آنالیز پیوستگی ۵۰ خانواده ایرانی مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی با وراثت اتوزومی‌مغلوب برای جایگاه ژنی DFNB21

پریسا ایمانی راد[۱] دکتر کیمیا کهریزی[۲] نیلوفر بزاززادگان[۱] مرضیه محسنی[۱] گلناز اسعدی[۳] نوشین نیک ذات[۳] فاطمه سادات استقامت[۱]
* دکتر حسین نجم آبادی[۴]

چکیده

هدف: از هر ۱۰۰۰ نوزاد متولد شده در سراسر جهان یک نفر مبتلا به ناشنوایی بوده که ۵۰٪ از علل آن ژنتیکی می‌باشد. ارتباط جایگاه ژنی DFNB21 با ناشنوایی غیر سندرمی جسمی مغلوب در کشورهای همسایه ایران در چندین مطالعه نشان داده شده است. بدین منظور ۵۰ خانواده ایرانی مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی‌جسمی مغلوب برای آنالیز پیوستگی با این جایگاه ژنی در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند.

روش بررسی: در این مطالعه که به روش توصیفی مقطعی انجام گرفت ۵۰ خانواده مبتلا به ناشنوایی با الگوی وراثتی اتوزومی‌مغلوب از سراسر ایران به صورت نمونه‌های در دسترس و شناخته شده بر اساس منفی بودن موتاسیونهای وابسته به GJB2 و GJB6، وجود حداقل سه فرزند ناشنوا و علاوه بر آن ازدواج خویشاوندی برای بررسی جایگاه ژنی DFNB21 انتخاب شدند.

یافته‌ها: از بین این خانواده‌ها ۲ خانواده (۴٪) الگوی پیوستگی به لوکوس DFNB21 را نشان دادند. بررسی ژن Tecta با روش تعیین توالی جهشهای delT۲۶۶ و ۹۶۱۱ جفت باز را به صورت هموزیگوت در افراد مبتلای خانواده‌ها، مسؤل اختلال در ناشنوایی نشان داد.

نتیجه‌گیری: بنظر می‌رسد که جایگاه ژنی DFNB21 نقش قابل توجهی را در ایجاد ناشنوایی در جمعیت ایرانی ایفا کند. این موضوع می‌تواند با غربالگری خانواده‌های بیشتر برای این لوکوس بررسی شود.

کلید واژه‌ها: ناشنوایی غیر سندرمی / وراثت اتوزومی / اتوزومال مغلوب / جایگاه *DFNB21* / آنالیز پیوستگی / خانواده‌های ایرانی

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و ملکولی
۲- متخصص اطفال، دانشیار
۳- کارشناس ارشد ژنتیک
۴- استاد و فوق تخصص ژنتیک

کلیه نویسندگان از مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

تاریخ دریافت مقاله: ۸۴/۱۱/۳۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۸۵/۳/۳۰

* آدرس نویسنده مسئول:
تهران، اوین، بلوار دانشجو، بن بست کودکیار، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، مرکز تحقیقات ژنتیک
تلفکس: ۲۲۴۰۷۸۱۴
* E-mail: hnajm@uswr.ac.ir

مقدمه

نقص در شنوایی[1] شایعترین اختلال حسی عصبی در سراسر دنیا می‌باشد(۱). تقریباً ۷۰ میلیون بیمار در جهان از نقص شنوایی رنج می‌برند که در ۶۰-۵۰ ٪ موارد علت ژنتیکی دارد(۲). ناشنوایی به دو فرم سندرمی و غیرسندرمی دیده می‌شود که فرم غیر سندرمی می‌تواند وراثت جسمی غالب و یا مغلوب داشته باشد. تا به امروز ۹۰ جایگاه ژنی مسئول اختلال در ناشنوایی در کروموزومهای مختلف پیدا شده است و تعداد ۳۹ ژن هسته‌ای و ۳ ژن میتوکندریایی برای آن شناسایی شده‌اند که مسئول ایجاد این بیماری می‌باشند(۳). تشخیص نوع سندرمی و غیر سندرمی و یا توارث غالب و مغلوب در این گونه موارد از طریق شرح حال، معاینه بالینی و نیز تعیین نحوه توارث متداول می‌باشد(۴).

نقص در شنوایی ایجاد شده توسط موتاسیون در ژن GJB2 (DFNB1) شایع‌ترین علت ناشنوایی غیرسندرمی با وراثت جسمی مغلوب (بیشتر از ۵۰٪) در جمعیت‌های اروپایی و سفید پوست می‌باشد(۶، ۵). در جمعیت اروپایی، آمریکای شمالی و مدیترانه‌ای شایع‌ترین جهش یک حذف گوانین تحت عنوان ۳۵delG می‌باشد(۸، ۷). درلوکوس DFNB1 علاوه بر ژن GJB2، ژن GJB6 نیز وجود دارد که جهش در این ژن نیز (که یک حذف بسیار بزرگ می‌باشد) در جمعیت اروپای غربی دومین علت شایع شنوایی غیرسندرمی جسمی مغلوب می‌باشد(۹). با توجه به شیوع بالای ناشنوایی در ایران، پیدا کردن اساس ژنتیکی ناشنوایی و کشف ژن‌ها و جهش‌های درگیر در جهت ممانعت از پیشرفت شیوع این بیماری و تشخیص و درمان به موقع آن، کمک مهمی به خانواده‌های مبتلا در جامعه ایران می‌نماید. اخیرا جهشهایی در جایگاه ژنی DFNB21 در کشورهای همسایه ایران گزارش شده است(۶) که مسئول ناشنوایی افراد بیمار می‌باشند. جایگاه ژنی DFNB21 (OMIM # ۶۰۳۶۲۹) در منطقه کروموزومی ۲۵-۲۳ 11q قرار دارد که درآن ژن Tecta واقع شده است. ژن Tecta (OMIM# ۶۰۲۵۷۴) ۲۳ اگزون دارد و پروتئین ۲۳۹ کیلو دالتونی راکد می‌کند. بر اساس نرمال بودن هتروزیگوتهای DFNB21 پیشنهاد می‌شود که نصف مقدار آلفا تکتورین برای حفظ خصوصیات مکانیکی و الکتریکی غشاء تکتوریال کافی می‌باشد(۱۰).

با توجه به شیوع بالای ناشنوایی که یکی از حوزه‌های توانبخشی به جهت ارتقاء سطح کیفی زندگی بیماران می‌باشد و از آنجا که بخش مهمی از توانبخشی، گستره شناخت و پیشگیری از اختلالات ناتوان‌کننده می‌باشد بر این اساس مطالعه آنالیز پیوستگی[2] بر روی ۵۰ خانواده ایرانی انتخاب شده از سراسر کشور مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی جسمی مغلوب بر اساس شرح حال، معاینه بالینی، نوار گوش و شجره خانوادگی با شرایط ویژه برای مطالعه جایگاه DFNB21 صورت گرفت.

روش بررسی

در یک مطالعه توصیفی و مقطعی با انتخاب از نمونه‌های در دسترس از بین خانواده‌های مراجعه کننده به مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی برای انجام مشاوره ژنتیک در امر ناشنوایی، ۵۰ خانواده ناشنوای ایرانی با داشتن حداقل ۴ شرط انتخاب شدند: ۱) منفی بودن برای جهش‌های GJB2 ۲) وجود حداقل سه فرزند ناشنوا در خانواده ۳) پدر و مادر سالم ۴) حتی‌الامکان ازدواج خویشاوندی والدین. سپس با انجام مشاوره ژنتیکی و رسم شجره نامه، معاینات بالینی مبنی بر عدم وجود نشانه‌های دیگر از قبیل اختلالات اسکلتی، اختلال در بینایی، تیروئید و کلیه و اطمینان از غیر سندرمی‌بودن ناشنوایی و توارث جسمی مغلوب انجام شد و تست شنوایی سنجی برای تمام افراد خانواده‌ها اعم از سالم و ناشنوا انجام شد. با اخذ رضایت‌نامه کتبی از خانواده‌ها جهت استخراج DNA، از تمامی افراد خانواده‌ها حدود ۱۰-۵ میلی لیتر خون گرفته شد. استخراج DNA ژنومی به روش نمک اشباع[3] صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی برای تکرارهای پشت سرهم کوتاه[4] بعنوان مارکر اطراف ژن Tecta که با آن پیوستگی دارند، انجام شد. خصوصیات مارکرها(۱۲، ۱۱) شامل نام، موقعیت، اندازه محصول PCR و دمای اتصال آنها در جدول ۱ نشان داده شده است. همچنین شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی آنها نیز در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱ـ خصوصیات مارکرهای استفاده شده

مارکر	n نوکلئوتیدی	موقعیت	سایز محصول PCR	دمای اتصال
D11S۱۹۹۸	تترا	۱۱۷۲۰۲۹۴۱–۱۱۷۲۰۳۲۴۰ bp	۱۴۹ bp	۵۵°c
D11S۴۴۶۴	تترا	۱۲۳۱۳۱۵۹۴–۱۱۲۳۱۳۲۲۳۰ bp	۲۲۵–۲۴۹ bp	۵۵°c
D11S۱۲۹۹	دی	۱۱۹۱۳۹۵۰۰–۱۱۹۱۴۰۰۴۷ bp	۳۶۰ bp	۵۵°c

1- Hereditary Impaired Hearing: HIH
2- Linkage Analysis
3- salting out
4- Short Tandem Repeats

جدول۲ـ شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی مارکرهای مورد استفاده در این پژوهش

مرحله	دما(°c)	زمان	تعدادسیکل
دمای واسرشت ابتدایی	۹٤°c	۵'	۱ سیکل
دمای واسرشت	۹٤°c	٤۰"	۳۰ سیکل
دمای اتصال	۵۵°c	۳۰"	
دمای امتداد	۷۲°c	٤۰"	
دمای امتداد انتهایی	۷۲°c	۲'	۱ سیکل

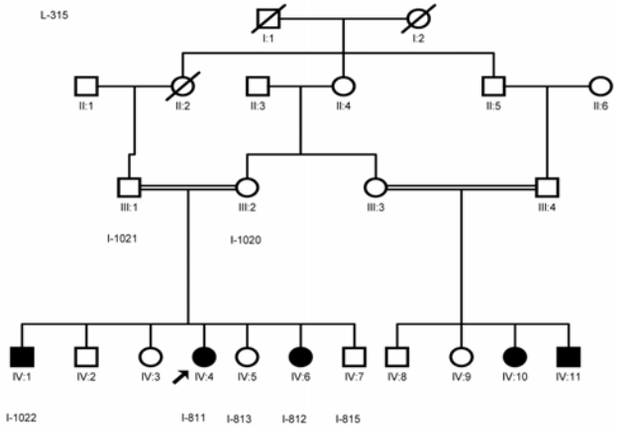
پس از آن الکتروفورز با ژل پلی اکریل امید ۸٪ در V ۲۰۰ برای محصولات PCR انجام شد و زمان انجام آن با توجه به طول محصول PCR برای هر مارکر متفاوت بود. پس از بررسی نتایج، ژل الکتروفورز هر کدام از خانواده‌هایی که الگوی پیوستگی را برای مارکرها نشان دادند، برای توالی یابی آن، Tecta نمونه DNA نمونه‌ها به مرکز تحقیقات شنوایی سنجی دانشگاه آیوا[1] فرستاده شد. توالی یابی با استفاده از ABI ۳۷۳۰ capillary machine (Applied Bios stems) انجام گردید.

یافته‌ها

از بین خانواده‌های بررسی شده، ۲ خانواده (از استانهای مشهد و تهران) الگوی پیوستگی به این جایگاه را نشان دادند.

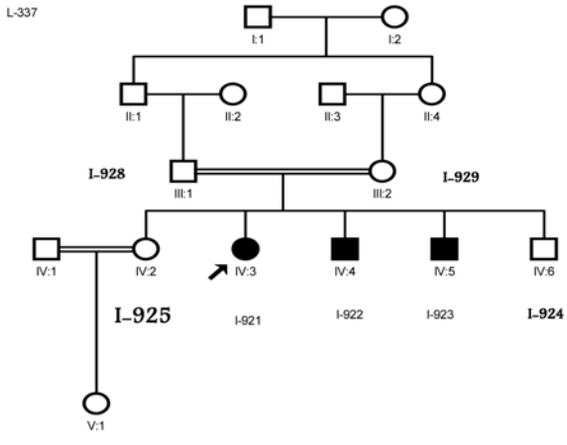
نتایج توالی یابی خانواده A: توالی ژن Tecta جهش ۲۶۶delT را در افراد مبتلا به صورت هموزیگوت و در والدین و همچنین در فرزندان سالم به صورت هتروزیگوت نشان داد . این جهش برای اولین بار به عنوان علت ناشنوایی در خانواده مذکور گزارش شد. شروع ناشنوایی در این خانواده به صورت پیش کلامی‌بود. از نظر پیشرفت نوع ناشنوایی ثابت بوده و با شدت متوسط تا شدید مشاهده گردید.بر اساس شرح حال و معاینات بالینی نکته قابل توجهی دال بر سندرمی‌بودن بیماری مشاهده نگردید.

شکل ۱ـ شجره نامه خانواده A

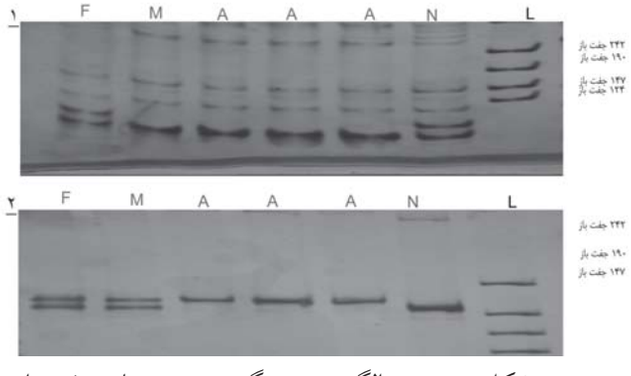


نتایج توالی‌یابی خانواده B: نتایج توالی یابی خانواده B یک جهش جدید شامل حذف ۹۶۱۱ جفت باز را در اینترون ۹ نشان داد که ابتدای اگزون ۱۰را نیز دربر می‌گیرد. هر سه فرزند مبتلا دو کپی از این جهش و پدر و مادر و فرزند سالم یک کپی از این حذف را حمل می‌کردند. همانند خانواده اول شروع ناشنوایی در این خانواده به صورت پیش کلامی‌بود. شدت ناشنوایی در این خانواده غیر پیشرونده بوده و با شدت متوسط تا شدید گزارش شد. لازم به ذکر است در یکی از اعضای این خانواده ناشنوایی عمیق مشهود بود. در این خانواده نیز علائمی دال بر سندرمی‌بودن نوع ناشنوایی مشاهده نشد.

شکل ۲ـ شجره نامه خانواده B



شکل ۳ـ بررسی الگوی پیوستگی با استفاده از مارکرهای مورد مطالعه



در هر دو شکل به ترتیب الگوی پیوستگی در پدر، مادر، فرزندان مبتلای اول، دوم و سوم و فرزند سالم در روی ژل دیده می‌شود. در آخرین خانه مارکر شماره ۸ (Roche) بار شده است. ۱ـ بررسی الگوی پیوستگی با استفاده از مارکرهای D11S1998 بر روی پلی آکریل آمید ۸٪ ۲ـ بررسی الگوی پیوستگی با استفاده از مارکر D11S4464 بر روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪ (پدر =F، مادر =M، فرزند مبتلا =A، فرزند نرمال =N، L: سایز مارکر شماره ۸ (Roche) می‌باشد).

1- Molecular Otolaryngology Research Laboratories, Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, University of Iowa, IA, United States

بحث

جهش در ژن GJB2 علت حدود ۵۰٪ از موارد ناشنوایی اتوزومی مغلوب در جوامع اروپایی می‌باشد(۶). با توجه به تحقیقات گسترده در مورد ناشنوایی در مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی در طی چندین سال، مشخص شده است که جهش‌های ژن GJB2 تنها مسئول ۱۶/۷٪ ناشنوایی غیر سندرمی‌جسمی مغلوب در ایران بوده و جهش ژن GJB6 در جمعیت مورد مطالعه یافت نشده است(۱۳). بر این اساس انتظار می‌رود جهش در ژنهای دیگری در ایجاد ناشنوایی غیر سندرمی‌جسمی مغلوب در جمعیت ایرانی حائز اهمیت باشند. به منظور پیدا کردن اساس ژنتیکی ناشنوایی در ایران مطالعات پیوستگی روی ۵۰ خانواده ایرانی مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی‌جسمی مغلوب صورت گرفت و مشخص شد که جهش در جایگاه DFNB21 مسئول ایجاد ناشنوایی در ۲ (۴٪) خانواده می‌باشد. تاکنون جهشهای DFNB21 فقط در سه خانواده لبنانی و پاکستانی و ایرانی گزارش شده است(۱۴، ۶) و مطالعات کمی در این زمینه وجود دارد که بتوان نتایج آنها را با بررسی کشورمان مقایسه نمود. نتیجه این تحقیق پیشنهاد می‌کند که جهشهای جایگاهDFNB21 می‌تواند نقش مهمی را در ایجاد ناشنوایی در جمعیت ایرانی ایفا کند. این موضوع با غربالگری خانواده‌های بیشتر برای این جایگاه می‌تواند بررسی شود.

نقص در شنوایی اختلال شایعی در انسانها می‌باشد که افراد را در تمام سنین درگیر می‌سازد. تکنولوژی‌هایی مثل کاشت حلزون و کمک‌های شنوایی در حال پیشرفت می‌باشند و این متدها ارتباط را برای این افراد و به جهت ورود آنها به یک جامعه شنوا تسهیل می‌کند. با این پیشرفتها و متعاقباً مشاوره ژنتیکی و تست‌های ژنتیکی حاصل از این پیشرفت‌ها، و روشهای درمانی جدید در جهت ممانعت یا بهبود ناشنوایی، کیفیت زندگی این افراد افزایش می‌یابد. در حال حاضر تست ژنتیکی با ارزشترین قدم در تشخیص علت دقیق ناشنوایی در افراد ناشنو می‌باشد که در صورت انجام مشاوره ژنتیک در خانواده‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند(۱۵).

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه جهش‌های ژن GJB2 و جایگاه DFNB21 به ترتیب بیشترین نقش را در ایجاد ARNSHL در خانواده‌های ایرانی ایفا می‌کنند، بنابراین توصیه می‌شود، در موارد برخورد با افراد ناشنوا در ابتدا انجام تست ژنتیکی برای جهش ۳۵delG مربوط به ژن GJB2 انجام گیرد. در صورت منفی و یا هتروزیگوت بودن جواب، توالی یابی برای دیگر جهش‌های وابسته بهGJB2 انجام شده و در صورت منفی بودن جواب مطالعات پیوستگی برای DFNB21 انجام گیرد.

در نهایت، با توجه به نتیجه مطالعه اخیر و فراوانی شیوع جهشهای ژن Tecta واقع در جایگاه ژنیDFNB21 به عنوان عامل ناشنوایی در جمعیت ایرانی، غربالگری ژنتیکی این ژن و جهشهای آن می‌تواند در تشخیص پیش از تولد این بیماری کمک شایانی نماید. همچنین برای کسب آمار دقیق فراوانی جایگاه ژنی DFNB21 در ناشنوایی در جمعیت کشورمان، انجام این مطالعه در جمعیت بیشتری از ناشنوایان ضروری به نظر می‌رسد.

جدول ۳- جهشهای ژن Tecta که منجر به ناشنوایی غیرسندرمی‌با وراثت مغلوب می‌شود

جمعیت	جهش	زمان شروع	پیشرفت	شدت
لبنانی (۱۱)	G>A intron 9 donor splice site	پیش کلامی	ثابت	متوسط- شدید
ایرانی (۱۵)	649 insC	پیش کلامی	ثابت	متوسط- شدید
پاکستانی (۱۵)	6037delG	پیش کلامی	ثابت	متوسط- شدید
ایرانی(مطالعه اخیر)	9611 bp deletion in intron 9 and exon 10	پیش کلامی	ثابت	متوسط- شدید
ایرانی(مطالعه اخیر)	266 delT	پیش کلامی	ثابت	متوسط- شدید

منابع:

1- Bitner M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. Br. Med. Bull 2002; 63: 73-94
2- Tekin M, Arnos KS, Pandya S. Advance in hereditary deafness. Lancet 2001; 358: 1082-1090
3- Petersen MB. Non- syndromic autosomal-dominant deafness. Clin. Genet 2002; 62:1-13
4- Van Laer L, van Camp G, Huizing Egbert H DFNA5.- In: Genetic hearing Toss / Willems Patrick J. [edit.], New York, Dekker 2004; 321-328
5-Denoyelle F, Well D, Maw MA. Prelingual deafness : high prevalence of a 30 delG mutation in the connexin 26 gene. Hum Mol Genet 1997; 6:2173-71
6- Zelante L, Gasparini P, Estivill X. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. Hum Mol Genet 1997; 6:1605-9
7- Gasparini P, Estivill X, Volpini V. Linkage of DFNB1 to non –syndromic neurosensory autosomal recessive deafness in Mediterranean families. Eur J Hum Genet 1997; 5:83-8.
8- Green G E, Scott D A, McDonald J M. Carrier rates in the Miswestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. JAMA 1999; 281: 2211-16
9- del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo M A., del Castillo F J, Alvarez A., Telleria D, et al. Deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. New Eng. J. Med 2002; 346: 243-249
010- Mustapha M, Weil D, Chardenoux E, Beckmann JS, Loiselet, J, Petit c. An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. Hum. Molec. Genet 1999; 8: 409-412
11- http://www.ncbi.nlm.nih.gov
12-http://www.genome.ucsc.edu
13- Najmabadi H, Nishimura C, Kahrizi K, Riazalhosseini Y, Malekpour M, Daneshi A, et al. GJB2 mutations: passage through Iran. Is J Med Genet A 2005 Mar 1; 133(2):132-7
14- Naz S, Alasti F, Mowjoodi A, Riazuddin S, Sanati MH, Friedman TB, et al. Distinctive audiometric profile associated with DFNB21 alleles of TECTA. J Med Genet 2003; May, 40(5):360-63. No abstract available. PubMed citation
15- Frei K, Ramsebner R, Lucas T, Hamader G, Szuhai K, Weipoltshammer K, et al. GJB2 mutations in hearing impairment: identification of a broad clinical spectrum for improved genetic counseling. Laryngoscope 2005; Mar, 115(3): 461-65