

غربالگری جهش‌های ژن GJB۲ در ناشنوایان غیر سندرمی جسمی مغلوب در استان خوزستان

دکتر کیمیا کهریزی^۱، دکتر علی سجادی^۲، مرضیه محسنی^۳، یاسر ریاض الحسینی^۴، نیلوفر بزازادگان^۵، * دکتر حسین نجم آبادی^۶

چکیده

هدف: کاهش شنوایی ۱ نفر از هر ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ کودک تازه متولد شده را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بیش از ۵۰٪ از این موارد را به عوامل ژنتیکی نسبت می‌دهند. کاهش شنوایی غیر سندرمی بیش از ۷۰ درصد از موارد ناشنوایی ارثی را شامل می‌شود که ۸۵ درصد از آن را وراثت جسمی مغلوب تشکیل می‌دهد و تاکنون بیش از یکصد جایگاه (locus) برای این نوع ناشنوایی برآورد شده است. ژن‌های مختلفی با این ناشنوایی در ارتباط هستند که عمده‌ترین آنها جهش در ژن کانکسین ۲۶ (CX26) می‌باشد که در جمعیت‌های مختلف وجود دارد. جهش در این ژن سبب کاهش شنوایی غیر سندرمی اتوزومی مغلوب می‌شود. هدف این مطالعه غربالگری بیماران برای جهش‌های ژن کانکسین ۲۶ در ناشنوایان استان خوزستان با استفاده از تکنیک ARMS/PCR می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تحلیلی از افراد ناشنوا یا کم شنوای مراجعه کننده به مراکز بهزیستی شهرستانهای استان خوزستان به منظور مشاوره ژنتیک، ۵۰ نفر بطور تصادفی انتخاب و ۵-۱۰ میلی لیتر خون از آنها گرفته شد و پس از استخراج DNA کیفیت و کمیت آن با استفاده از اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. جهش ۳۵ del G با روش ARMS/PCR مشخص و نمونه‌های هموزیگوت آن کنار گذاشته شد. نمونه‌هایی که هتروزیگوت یا منفی بودند با روش DHPLC و Direct Sequencing بررسی شدند.

یافته‌ها: در این تحقیق ۱۰۰ کروموزوم (۵۰ فرد بیمار) بررسی شد: ۱۳ کروموزوم (۱۳٪) در ژن GJB۲ جهش داشتند که بالاترین شیوع به جهش ۳۵ del G مربوط می‌شد. سایر جهش‌ها که در این منطقه دیده شد شامل: R1۲۷H، ۳۰۰del۲(AT)، R۳۲H و R۱۸۴P بودند. همچنین پلی مورفیسم ۷۱۵۳I در ۳ کروموزوم شناسایی گردید و پلی مورفیسم ۷۵۲۷ نیز در یک خانواده مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: این آمار با آمار سایر کشورهای جهان مشابهت چندانی ندارد و بیانگر وجود احتمالی ژن‌ها و لوکوس‌های دیگر دخیل در ایجاد ناشنوایی غیر سندرمی اتوزومی مغلوب در این منطقه می‌باشد.

کلید واژه‌ها: ناشنوایی غیر سندرمی / وراثت جسمی مغلوب / GJB ۲ / توالی یابی مستقیم / غربالگری / جهش ژنی / جایگاه ژن

- ۱- متخصص اطفال، دانشیار دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، مرکز تحقیقات ژنتیک
- ۲- پزشک عمومی، مرکز مشاوره ژنتیک سازمان بهزیستی استان خوزستان
- ۳- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات ژنتیک
- ۴- دکترای ژنتیک، استاد دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، مرکز تحقیقات ژنتیک

تاریخ دریافت مقاله: ۸۵/۴/۱۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۵/۶/۲۰

*آدرس نویسنده مسئول:

تهران، اوین، بلوار دانشجو، بن بست کودکان، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، مرکز تحقیقات ژنتیک

تلفن: ۲۲۴۲۳۲۵۰ داخلی ۳۱۰

* E-mail: hnajm@uswr.ac.ir

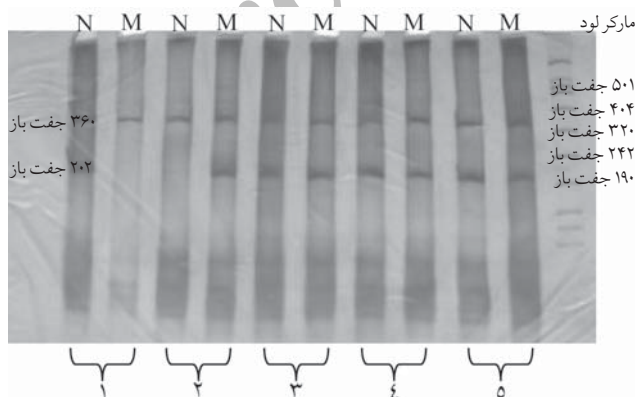


قابل ملاحظه این است که جهش $\Delta G 35$ در بیشتر نقاط جهان گسترده شده است (۱۳، ۱۲). هدف کلی این پروژه تعیین میزان جهش های $\Delta G 35$ در افراد مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی با توارث جسمی مغلوب در استان خوزستان بوده است.

روش بررسی

در این مطالعه تحلیلی ابتدا برای افراد کم شنوا و یا ناشنوایی که برای مشاوره ژنتیک به مراکز بهزیستی شهرستانهای استان خوزستان مراجعه کرده بودند با تکمیل پرسشنامه و ترسیم شجره پرونده تشکیل گردید. ادیوگرام های مربوطه نیز ضمیمه پرونده گردید. سپس با اخذ رضایت از ۵۰ بیمار مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی با الگوی وراثتی جسمی مغلوب که بصورت تصادفی انتخاب شده بودند، ۱۰-۵ سی سی خون جهت استخراج DNA ژنومی گرفته شد و برای جلوگیری از لخته شدن، در لوله های حاوی EDTA^۳ نگهداری شد. DNA ژنومی توسط روش نمک اشباع (Salting out) استخراج گردید و سپس کیفیت و کمیت آن توسط روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. جهت تشخیص جهش $\Delta G 35$ از روش ARMS/PCR^۴ و الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید ۸٪ با ولتاژ ۲۰۰ ولت استفاده شد (شکل ۱). نمونه های هموزیگوت $\Delta G 35$ مشخص و کنار گذاشته شدند. در بقیه موارد پس از انجام DHPLC^۵ نمونه هایی که پروفایل غیر نرمال داشتند مستقیماً تعیین توالی (Direct Sequencing) شدند.

شکل ۱



N: باند نرمال M: باند موتان

(۱): کنترل نرمال برای جهش $\Delta G 35$ (۲): کنترل هموزیگوت برای جهش $\Delta G 35$
(۳): کنترل هتروزیگوت برای جهش $\Delta G 35$ (۴، ۵): بیماران هتروزیگوت برای جهش $\Delta G 35$

- 1- Autosomal Recessive Non – Syndromic Hearing Loss
- 2- Gap Junction Beta 2
- 3- Ethylene- Diamine-Tetra-Acetic acid
- 4- Amplification Refractory Mutation System / Polymerase Chain Reaction
- 5- Denaturation High polymorphic Liquid Chromatography

ناشنوایی اختلالی هتروژن است که علت های محیطی و ژنتیکی فراوانی دارد (۱). نقص شنوایی ژنتیکی شایعترین اختلال حسی عصبی ارثی است که تقریباً یک نفر از هر ۲۰۰۰-۱۰۰۰ کودک تازه متولد شده را تحت تأثیر قرار می دهد (۲، ۳). حدود ۷۰٪ از ناشنوایی های ژنتیکی غیر سندرمی است که در آن فرد ناشنوا هیچ اختلال دیگری ندارد (۲). کاهش شنوایی حسی عصبی جسمی مغلوب غیر سندرمی (ARNSHL) شایعترین فرم کاهش شنوایی ارثی از نوع شدید است (۴) که ۸۵٪ موارد ناشنوایی را به خود اختصاص می دهد (۵). در سالهای اخیر پیشرفت های قابل ملاحظه ای در شناسایی ژن های دخیل در ناشنوایی غیر سندرمی به وقوع پیوسته است. ژن های مختلفی باعث این اختلال می شوند که در نهایت ۱۰۰ لوکوس برای آن تخمین زده شده است. از میان آنها DFNB^۱ به تنهایی مسئول ۵۰٪ از ناشنوایی های جسمی مغلوب می باشد که توسط جهش های ژن کانکسین ۲۶ (CX26) و ژن کانکسین ۳۲ (CX32) اتفاق می افتد. کانکسین ۲۶ ژن کوچکی است که بر روی کروموزوم شماره ۱۳ قرار گرفته است. طول این ژن ۵/۵ کیلو باز بوده و از دو آگزون تشکیل شده است که بوسیله یک اینترون از هم جدا می شوند. اما تنها توالی از GJB^۲ دارای کد برای سنتز پروتئین کانکسین ۲۶ می باشد آگرون ۲ است (۶، ۷). پروتئین کانکسین ۲۶ عضوی از خانواده کانال اتصال باز بتا^۲ (GJB²) می باشد (که بعد از این با نام کانکسین ۲۶ خوانده می شود). این پروتئین مسئول ایجاد اتصالات باز بین سلولی است که اجازه انتقال به مولکولهای کوچک می دهد.

تاکنون بیش از ۹۰ جهش در ژن کانکسین ۲۶ کشف شده است (۸). $\Delta G 35$ شایعترین جهش در این ژن (در حدود ۷۰٪) می باشد که منجر به ایجاد کدون خاتمه زودرس در موقعیت اسید آمینه شماره ۱۳ می شود (۹). در ژن کانکسین ۲۶ شش تکرار از باز گوانین در موقعیت ۳۵-۳۰ منطقه کدکننده وجود دارد که حذف یکی از این نوکلئوتیدها باعث ایجاد جهش $\Delta G 35$ یا $\Delta G 30$ می شود (۱۰). این جهش اولین بار توسط زلانت و همکارانش در سال ۱۹۹۷ گزارش شد. بعدها مشخص شد این جهش عمومی ترین علت ناشنوایی های مادرزادی اسپورادیک و ارثی است. این جهش شایع ترین نوع جهش در جمعیت سفید پوست است (۱۱). مقالات و گزارشات مختلف از سراسر جهان نشان داده اند که جهش های ژن کانکسین ۲۶ در مناطق جغرافیایی و اقوام مختلف باهم متفاوت هستند. در جمعیت های اروپایی و سفید پوستان آمریکایی جهشی به نام $\Delta G 35$ بیشترین شیوع را داراست در صورتی که در یهودیان اشکنازی جهش دیگری به نام $\Delta T 167$ شایع است. نکته



یافته‌ها

بر اساس معیارهای مورد نظر ما ۵۰ بیمار از ۵۰ خانواده مورد مطالعه قرار گرفتند (۱۰۰ کروموزوم). ۱۳ کروموزوم (۱۳٪) حاوی جهش در ژن کانکسین ۲۶ بودند. فراوانی جهش *GJB2* ۳۵del G برابر ۸٪ از کل کروموزومهای مطالعه شده بود. جهش *GJB2* ۳۵del G در بین سایر جهش‌های *GJB2*، ۶۱/۵٪ را به خود اختصاص داده بود. جهش‌هایی که در نتیجه انجام توالی‌یابی مستقیم DNA بدست آمده‌اند عبارتند از: R۱۲۷H، ۳۰۰del۲(AT)، R۳۲H و R۱۸۴P که جهش‌های اتوزومی مغلوب در ژن کانکسین ۲۶ می‌باشند. جهش ۳۰۰del۲(AT) یک جهش جدید است که فقط در جمعیت این استان دیده شده است. و همچنین در ۴ خانواده پلی مورفیسم‌های ۷۱۵۳I، ۷۵۲V مشاهده شد. ژنوتیپ‌های یافت شده در این بیماران در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول ۱- ژنوتیپ‌های یافت شده در بیماران

ژنوتیپ	فراوانی
۳۵del G / ۳۵del G	۳
۳۵del G/wt	۲
۳۰۰del۲(AT)/wt	۱
R۳۲H/wt	۱
R۱۲۷H/wt	۱
R۱۲۷H/wt	۱

بحث

کاهش شنوایی ارثی از جمله بیماری‌های هتروژن است. با وجود این، جهش در ژن کانکسین ۲۶ عامل عمده ARNSHL می‌باشد. جهش در این ژن عامل نیمی از ناشنوایی‌ها از نوع خفیف تا شدید در جمعیت‌های مختلف است (۱۴، ۱۵). در جمعیت‌های مختلف جهش‌های خاصی شایع است مثلاً در کشورهای شرق آسیا جهش *C235del* و در یهودیان اشکنازی جهش *T167del* و در کشورهای

منابع:

6-Goodenough D A, Goliger JA, Paul D L. Connexins, connexon, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 475-502
7-Kiang D T, Jin N, Tu Z J, Lin H H. Upstream genomic sequence of the human connexin 26 gene. *Gene* 1997;199: 165-171
8-<http://www.crg.es/deafness>
9-Zelante L, Gasparini P. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet* 1997;6: 1605-1609
10-Kelley P M, Harris D J. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 1998;62:792-799

اروپایی *GJB2* ۳۵del از بیشترین شیوع برخوردار است. جهش *GJB2* ۳۵del در بیشتر جمعیت‌های جهان با فراوانی‌های متفاوتی دیده می‌شود. در مطالعه اولیه‌ای که توسط دکتر نجم‌آبادی و همکارانشان انجام گرفت ۸۳ خانواده مطالعه شد که تنها در ۹ خانواده (۱۱٪) ناشنوایی وابسته به *GJB2* تشخیص داده شد که بیشترین ژنوتیپ مربوط به *GJB2* ۳۵del بود بطوریکه ۴ تا ۹ خانواده ژنوتیپ هموزیگوت *GJB2* ۳۵del داشتند (۱۶). همچنین در مطالعه بعدی همین گروه در سال ۲۰۰۴ فراوانی این جهش در بین ناشنوایان ژنتیکی غیر سندرومی جسمی مغلوب ایران ۱۲/۶٪ گزارش شده است. از ۶۶۴ خانواده مورد مطالعه تنها ۱۶/۷٪ جهش در ژن *GJB2* را نشان دادند (۱۷). به هر حال در این بررسی نیز شیوع جهش‌های ژن کانکسین ۲۶ در جمعیت ایران بسیار کمتر از جمعیت‌های غربی گزارش شد. از آنجا که ایران از قوم‌های مختلفی تشکیل شده و نیز با توجه به اینکه شیوع ال‌های جهش دار در جمعیت‌های مختلف متفاوت است، بنابراین ضروری به نظر می‌رسد که اقوام مختلف به صورت جدا بررسی شوند. در مطالعه‌ای که در کرمان بر روی ۶۵ فرد ناشنوای غیر سندرومی جسمی مغلوب توسط دکتر نجم‌آبادی و همکارانشان انجام شده است تنها ۳ کروموزوم (۳/۲٪) جهش *GJB2* ۳۵del را نشان دادند (۱۸). در این مطالعه نیز ما ناشنوایان غیر سندرومی خوزستان را با ۵۰ خانواده مورد بررسی قرار دادیم که جهش در ژن *GJB2* در ۱۳٪ مشاهده شد. این امر نشان دهنده میزان شیوع پائین این جهش نسبت به گزارش‌های انجام شده در کشورهای غربی است (۲۱-۱۹).

نتیجه‌گیری

این نتایج نشان می‌دهد که در جمعیت ما احتمالاً ژن‌های دیگری عامل ایجاد ARNSHL می‌باشند. بنابراین با توجه به اینکه جمعیت ایرانی ترکیبی از قبایل مختلف است، با بررسی آنها می‌توان به نتایج جدیدتری دست یافت. که نهایتاً کمک شایانی به امر مشاوره ژنتیک، کنترل و درمان این گروه از بیماران خواهد کرد.

1- Nance W E. The genetics of deafness. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2003; 9(2): 109-119.
2-Zelante L, Gasparini P, Estivill X, et al: Connexin 26 Mutations Associated with the Most Common Form of Non-Syndromic Neurosensory Sutosomal Recessive Deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet* 1997; 6:1605-1609.
3- Falk M M. Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. *Eur J Cell Biol* 2000; 79(8): 564-574.
4-Reardon W, Middleton H R, Sand kuijl L, et al: Genetic Deafness. *J Med Genet* 1992 ;29:521-526.
5-Lefebvre PP, Van De Water T R. Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. *Brain res rev* 2000; 32(1): 159-162.



11-Park H J, Hahn S H, Chun Y M, Park K, Kim H N. Connexin 26 mutations associated with non-syndromic hearing loss. *Laryngoscope* 2000; 110: 1535-1538.

12-Uyguner O, Emiroglu M. Frequencies of gap and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Clin Genet* 2003; 64:65-69

13-Maheshwari M,Vijaya R. Screening of families with autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment (ARNSHL) for mutations in GJB2 gene: Indian Scenario. *Am J Med Genet* 2003; 120A:180-4

14- Maw M. The Contribution of the DFNB1 locus to neurosensory Deafness in Caucasian Population. *Am J Hum Genet* 1995; 57:629

15- Rabionet R, Lopes-Bigas N, Dagrimal A, et al: Molecular Basis of Childhood Deafness Resulting from Mutations in the GJB2 (connexin 26) Gene. *Hum Genet* 2000; 106:40-44.

16-Najmabadi H, Cucci RA, Sahebjam S, et al. GJB2 mutations in Iranians with autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss. *Hum Mutat* 2002; 19(5): 572.

17-Najmabadi H, Nishimura C, Kahrizi K, et al. GJB2 Mutations-Passage through Iran. *AJMed Genet* 2004

۱۸- بزازادگان، ن. میرحسینی، ن. ضیالالدینی، ح. اسدی، ع. کهریزی، ک. ارژنگی، س. و سایر همکاران. وفور نسبی جهش (G del 35) در ژن GJB2 در جمعیت ناشنوایان غیرسندرمی جسمی مغلوب استان کرمان: مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان. دوره ۱۱ شماره ۳

19- Fuse Y, Doi K, Hasegawa T, et al: Three Novel Connxin 26 Gene Mutations in Autosomal Recessive Non-Syndromic Deafness. *NeuroReport* 1999; 10:1853-1857.

20-Abe S, Usami S, Shinkawa H, et al: Prevalent Connexin 26 Gene (GJB2) Mutations in Japanese. *J Med Genet* 2000; 37:41-43.

21-Kudo T, Ikeda K, Kure S, et al: Novel Mutations in the Connexin 26 Gene (GJB2) Responsible for Childhood Deafness in the Japanese Population. *Am J Med Genet* 2000; 90:141-145.