● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ یازدهم، شمارهٔ ۳، ص ۱۴۰-۱۳۶، ۱۳۸۳

مقالهٔ پژوهشی

وفور نسبی جهش (35delG) در ژن GJB2 در جمعیت ناشنوایان غیرسندرومی جسمی مغلوب استان کرمان

نیلوفر بزاززادگان[۱]، دکتر نوشین میرحسینی[۲]، دکتر حسن ضیاالدینی[۳]، دکتر علیرضا اسدی[۴]، دکتر کیمیا کهریزی[۵]، ساناز ارژنگی[۶]، اکرم آستانی[۷]، مرضیه محسنی[۱]، یاسر ریاض‌الحسینی[۱]، مهدیه نجات[۸]، خدیجه جلالوند[۶]، دکتر ریچارد اسمیت[۹]، کارلا نیشیمورا[۱۰] و دکتر حسین نجم‌آبادی[۱۱]

خلاصه

ناشنوایی مادرزادی که علل ژنتیکی و محیطی بسیاری دارد، یک از هر هزار نوزاد تازه متولد شده را تحت تأثیر قرار می‌دهد. جهش در ژن GJB2 (Gap Junction Beta-2) که رمز کننده کانکسین ۲۶ پروتئین تشکیل‌دهنده اتصال باز است به عنوان اساس ناشنوایی غیرسندرومی جسمی مغلوب شناخته شده است. هدف ما در این مطالعه تعیین وفور نسبی شایع‌ترین جهش(35delG) ژن GJB2 در جمعیت ناشنوای غیرسندرومی جسمی مغلوب استان کرمان بود. در این مطالعه ۱۳۰ کروموزوم (از ۶۵ فرد بیمار) مورد بررسی قرار گرفت که جهش 35delG در ۳ (۲/۳٪)کروموزوم (یک بیمار هموزیگوت و دیگری هتروزیگوت بود) تشخیص داده شد. این درصد تفاوت زیادی را در مقایسه با فراوانی آن در کل ایران نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی : ناشنوایی غیرسندرومی جسمی مغلوب، GJB2، 35delG، کرمان

۱ـ کارشناس ارشد سلولی- مولکولی، ۵- متخصص کودکان، ۶- کارشناس پرستاری، ۸- کارشناس ارشد ژنتیک، ۱۱- دانشیار ژنتیک، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی تهران ۲- متخصص کودکان، ۳- پزشک عمومی، ۴- دکترای طب فیزیکی و توانبخشی ، ۷- کارشناس ارشد ویروس‌شناسی، بخش ژنتیک، سازمان بهزیستی استان کرمان ۹- استاد ادیولوژی، رئیس بخش تحقیقات گوش و حلق، ۱۰- کارشناس آزمایشگاه، سرپرست بخش ژنتیک، دانشگاه آیوا

دریافت مقاله: ۱۳۸۲/۸/۶ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۸۳/۳/۲۰ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۳/۴/۳

مقدمه

ناشنوایی اختلالی هتروژن است که علت‌های محیطی و ژنتیکی فراوانی دارد (۱۲). ناشنوایی مادرزادی یک اختلال بسیار شایع است که تقریبا ۱ از ۱۰۰۰ کودک متولد شده را تحت تأثیر قرار می‌دهد که حدود ۵۰٪ آنها منشأ ژنتیکی دارند (۶). حدود ۷۰٪ از ناشنوایی‌های ژنتیکی غیرسندرومی است (۱۱).این نوع بدون هیچ نشانگان یا نقص دیگری تظاهر می‌کند (۱۶). ۸۵٪ از این نوع ناشنوایی الگوی وراثتی جسمی مغلوب DFNB (Deafness, Neurosensory, Autosomal Recessive) دارند. ۱۵-۱۲٪ موارد غیرسندرومی الگوی جسمی غالب DFNA (Deafness, Neurosensory, Autosomal Dominant) را نشان می‌دهند و ۳-۱٪ آنها شکل وابسته به DFN X (Deafness, Neurosensory X-Linked) را بروز می‌دهند (۶). کانکسین ۲۶ عضوی از خانواده کانال اتصالات باز است که پروتئین‌های متشکل آن عموماً هر کدام بر اساس وزن مولکولی نام‌گذاری می‌شوند. مثل کانکسین ۲۶ و کانکسین ۳۰ و غیره. ژن کد کننده ۲۰ پروتئین کانکسین مختلف در ژنوم انسان وجود دارد (۹). اتصالات باز ساختارهایی در غشاهای سلولی سلول‌های مجاور یکدیگر در ارگانیسم‌های چند سلولی هستند (۱). این اتصالات اجازه عبور مولکول‌های کمتر از ۱۰۰۰ دالتون مثل متابولیت‌ها و یون‌ها را بین سلول‌ها می‌دهند (۵). ژن GJB2 (Gap Junction Beta 2) پروتئین کانکسین ۲۶ را رمز می‌کند. کانکسین ۲۶ در حلزون گوش داخلی وجود دارد. نقش اتصالات باز بعد از تحریک سلول‌های موئی بازگرداندن یون‌های پتاسیم از طریق سیناپس‌ها در قاعده این سلول‌ها و توسط سلول‌های محافظ و فیبروبلاست ها به سمت اندولنف حاوی پتاسیم بالا در دستگاه حلزونی است (۶). جهش در ژن GJB2 که بر روی بازوی بزرگ کروموزوم ۱۳ قرار دارد به‌عنوان اساس ناشنوایی غیرسندرومی جسمی مغلوب (DFNB1) شناخته شده است(۴،۱۵). با وجود درگیری تعداد بسیاری ژن دراختلال شنوایی عمومی‌ترین علت ناشنوایی ارثی در جمعیت‌های مختلف دنیا جهش‌های ژن GJB2 است (۲،۸،۱۱) یک جهش به نام 35delG شناخته شده که اکثریت الل‌های جهش یافته کانکسین ۲۶ را تشکیل می‌دهد و عمومی‌ترین علت ناشنوایی‌های مادرزادی اسپورادیک و ارثی است. این جهش شایع‌ترین نوع جهش در جمعیت سفیدپوست است (۱۴). در ایران این جهش در جمعیت Autosomal Recessive Non Syndromic Hearing Loss (ARNSHL) مطالعه شده است ومشخص گردید که فراوانی جهش(۶/۶٪) می‌باشد (۱۱). در این مطالعه شیوع نسبی جهش 35delG در جمعیت ARNSHL کرمان بررسی شده است.

روش کار

ابتدا با کامل کردن پرسش نامه‌هایی که جهت این کار تهیه شده بود، اطلاعات جمع‌آوری شد و شجره خانوادگی رسم والگوی وراثتی بیماری مشخص گردید. ادیوگرام بیمار ضمیمه پرونده شد، سپس با اخذ رضایت از ۶۵ بیمار مبتلا به ناشنوایی غیرسندرومی با الگوی وراثتی جسمی مغلوب ۱۰-۵ سی‌سی خون جهت استخراج DNA ژنومی گرفته شد و برای جلوگیری از لخته شدن در لوله‌های حاوی EDTA (Ethylene- Diamine-Tetra-Acetic acid) نگهداری شد. DNA ژنومی توسط روش نمک اشباع (Salting out) استخراج گردید و سپس کیفیت و کمیت آن توسط اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. جهت تشخیص جهش 35delG از روش ARMS/PCR (Allele Refraction Mutation System Polymerase Chain Reaction) و الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید استفاده شد. در این PCR از ۵ پرایمر استفاده شد که عبارتند از ۲ پرایمر کنترل داخلی (Control A, Control B)، پرایمرهای نرمال (N)، موتانت (M) و مشترک (COM) که توالی آنها به شرح زیراست:

35 NOR 5' TTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGAG 3'

35 MUT 5' TTGGGGCACGCTGCAGACGATCCTGGGGAT 3'

35 COM 5' GAAGTAGT GATCGTAGCACACGTTCTTGCA3'

ControlA5' CCCACCTTCCCCTCTCTCCAGGCAAATGGG3'

ControlB5' PCRGGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGTG3'

PCR طبق شرایط زیر صورت گرفت:

۹۵ درجه ۵ دقیقه

۳۴ سیکل با:

۹۵ درجه ۴۰ ثانیه

۶۰ درجه ۳۰ ثانیه

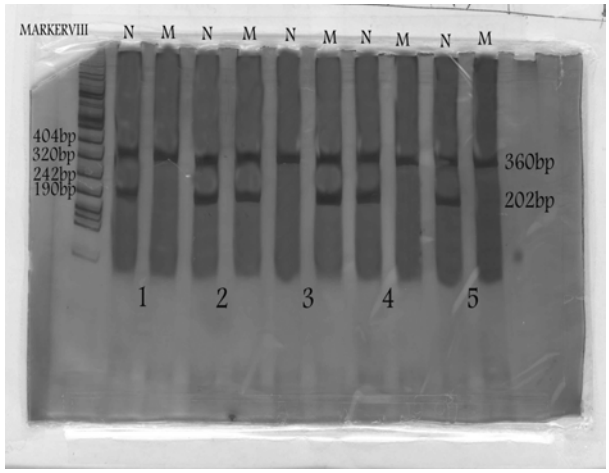
۷۲ درجه ۱ دقیقه (۳).

و محصولات آن بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸٪ به مدت یک ساعت با ولتاژ ۲۰۰ ولت الکتروفورز شدند.

نتایج

پس از بررسی ۱۳۰ کروموزوم از ۶۵ بیمار غیر خویشاوند مشخص شد که تنها ۳ کروموزوم (۲/۳٪) حامل

جهش 35delG می‌باشند که این کروموزوم‌ها متعلق به ۲ فرد بیمار بودند. که یکی از آنها هتروزیگوت و دیگری هموزیگوت بود. همانطور که در شکل ژل آکریل‌آمید (تصویر ۱) مشاهده می‌شود برای هر فرد دو ستون در نظر گرفته شده است که یکی مربوط به عملکرد پرایمر نرمال (N= Normal)و دیگری مربوط به عملکرد پرایمر موتانت (M= Mutant) است. در هر ستون یک باند به طول ۳۶۰ جفت باز (bp) دیده می‌شود که برای کنترل عملکرد PCR (کنترل داخلی) است وحاصل عمل پرایمرهای کنترل A وB است. باند دیگر باند ۲۰۲ جفت بازی است که باندهای حاصل از عمل پرایمرهای نرمال و موتانت و مشترک هستند.اگر بیماری حامل جهش 35delG در یکی از کروموزوم‌های خود باشد هم پرایمر نرمال و هم پرایمر موتانت با پرایمر مشترک عمل PCR را انجام می‌دهند وهم در ستون N و هم در ستون M باند دیده می‌شود ، این فرد از نظر جهش 35delG هتروزیگوت است.



تصویر ۱ : *تصویر فوق مربوط به ژل آکریل آمید الکتروفورز محصولات PCR ۵ فرد می‌باشد. برای هر فرد دو ستون در نظرگرفته شده است. در همه ستون‌ها باند ۳٦۰bp وجود دارد که مربوط به کنترل داخلی PCR است. باند ۲۰۲bp بسته به اینکه در ستون N=Normal یا M=Mutant و یا هر دو وجود داشته باشد، به ترتیب نشان‌دهندهٔ ژنوتیپ نرمال، هموزیگوت و یا هتروزیگوت برای جهش 35delG در بیمار می‌باشد. شماره‌های ۱، ۲، ۳ مربوط به کنترل‌های نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت بوده و شماره‌های ٤ و ۵ مربوط به دو بیمار نرمال از نظر جهش 35delG می‌باشد.*

اگر بیمار جهش35delG را نداشته باشد و یا هر دو کروموزوم حامل این جهش در فرد باشند به ترتیب فقط در ستون N یا M باند دیده می‌شود که در حالت اول فقط پرایمر نرمال و مشترک و در حالت دوم فقط پرایمر موتانت و مشترک عمل PCR را انجام داده‌اند این‌ها به ترتیب حالات نرمال و هموزیگوت هستند.

بحث و نتیجه‌گیری

جهش 35delG شایع‌ترین نوع جهش در جمعیت سفید پوستان است و با شیوع ناقلی ۲/۵٪ گزارش شده است (۱۴،۱۷). این جهش به عنوان جهش شایع ناشنوایی جسمی مغلوب غیرسندرومی در جمعیت اروپای شمالی و جنوبی است. این الل همچنین به عنوان علت اصلی ناشنوایی ژنتیکی در خانواده‌های مدیترانه‌ای یافت شده است و همچنین به صورت هتروزیگوت در یک خانواده مسلمان عرب- اسرائیلی گزارش شده است (۴). در کره با مطالعه بر روی ۱۴۷ فرد با ناشنوایی غیرسندرومی جهش 35delG نسبتا نادر بود و فقط ۲ هتروزیگوت 35delG پیدا شد (۱۴). این جهش در جمعیت ژاپن و چین نیز نادر بود (۷،۱۳). از ۶۸ خانواده اردنی ناشنوایان غیر سندرومی با الگوی وراثتی جسمی مغلوب که برای جهش‌های ژن GJB2 بررسی شدند، در ۱۶٪ این خانواده‌ها جهش در ارتباط با لوکوس DFNB1 بوده و 35delG تنها جهش یافت شده در این خانواده‌ها بود (۱۰). در ایران نیز ۱۶۶ کروموزوم از ۸۳ فرد ناشنوا از نظر جهش 35delG مورد مطالعه قرار گرفتند. این جهش ۶/۶٪ کل کروموزوم‌ها (۱۱/۱۶۶) را شامل می‌شد (۱۱). در این مطالعه در استان کرمان۱۳۰ کروموزوم از ۶۵ فرد ناشنوای غیر سندرومی با الگوی وراثتی جسمی مغلوب مورد بررسی قرار گرفتند که تنها ۳ کروموزوم (۲/۳٪) جهش 35delG را نشان دادند. یک فرد هتروزیگوت و دیگری هموزیگوت بود. همانطور که ذکر شد، در بخش‌های مختلف جهان این جهش که شایع‌ترین جهش ژن GJB2 است، مورد بررسی قرار گرفته است. درصد این جهش در کشورهای مختلف متفاوت است. در ایران این جهش شایع‌ترین جهش این ژن است و بالاترین درصد را به خود اختصاص داده است. میزان این جهش در کرمان در مقایسه با کل ایران کم است بنابر این جهش‌های دیگر ژن GJB2 ویا ژن‌های دیگر دخیل در ناشنوایی با این الگوی وراثتی می‌توانند در ناشنوایی افراد نقش داشته باشند.

سپاسگزاری

با تشکر و سپاس فراوان از کلیه همکاران و عزیزانی که در بهزیستی استان و شهرستان وآموزش و پرورش استثنایی کرمان و همچنین کلیه عزیزانی که در مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه بهزیستی و توانبخشی تهران نویسندگان را یاری رساندند.

Summary

Relative Frequency of 35delG Mutation in GJB2 Gene in Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss (ARNSHL) Patients in Kerman Population

Bazazzadegan N, MSc.[1], Mirhoseini N, MD.[2], . Ziaaddini H, MD.[3], Asadi AR, PhD.[4], Kahrizi K, MD.[5], Arzhangi S, BSc.[6], Astani A, MSc.[7], Mohseni M, MSc.[1], Riazalhosseini Y, MSc.[1], Nejat M, MSc.[8], Jalalvand Kh, BSc.[6], Smith RJH, PhD.[9], Nishimura C, BSc.[10], and Najmabadi H, PhD.[11]

1. Master of Science in Cell and Molecular Biology , 5. Pediatrician, 6. Bachelor of Science in Nursing, 8. Master of Science in Genetics, 11. Associate Professor of Genetics, Genetics Research Center, The University of Social Welfare and Rehabilitation, Tehran, Iran. 2. Pediatrician, 3.General Practicioner, 4. PhD in Medical Physics and Rehabilitation, 7. Master of Science in Virology, Genetics Department, Kerman Social Welfare and Rehabilitation Organization, Kerman Iran. 9. Audiologist, Head of Otolaryngology Research Center, 10. Head of Gentics Department, Otolaryngology Research Center, University of Iowa City, IA, USA.

Congenital hearing loss with many genetic and environmental causes affects 1 in 1000 newborns. Mutations in the GJB2(Gap Junction Beta-2) gene encoding the gap junction protein connexin 26 have been established as the main cause of autosomal recessive non-syndromic hearing loss. The aim of this study was to study the frequency of one mutation (35delG) of GJB2 gene in Kerman non-syndromic deaf population. For this purpose, 130 chromosomes from 65 patients were studied and 35delG mutation was diagnosed in 3(2.3%) chromosomes (one patient was homozygote and the other one was heterozygote). This rate of frequency is significantly higher comparing to that in the whole population of Iran.

Key Words: *Autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL), GJB2, 35delG*
Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2004; 11(3): 136-140

References

1. Falk MM. Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. *Eur J Cell Biol* 2000; 79(8): 564-574.
2. Frei K, Szuhai K, Lucas T *et al.* Connexin 26 mutations in cases of sensorineural deafness in eastern Austria . *European Journal of Human Genetics* 2002; 10: 427-432.
3. Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Sheffield VC and Smith RJ. Carrier rates in the Midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *JAMA* 1999; 281(23): 2211-2216.
4. Kelley PM, Harris DJ, Comer BC *et al.* Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 1998; 62(4): 792-799.
5. Kelsell DP, Dunlop J and Hodgins MB. Human diseases: clues to cracking the connexin code? *Trends cell biol* 2001; 11(1): 2-6.
6. Lefebvre PP and Van De Water TR. Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. *Brain res rev* 2000; 32(1): 159-162.
7. Liu Y, Ke X, Qi Y, Li W and Zhu P. Connexin 26 gene (GJB2) :Prevalence of mutations in the Chinese population. *J Hum Genet* 2002; 47(12): 688-690.
8. Maheshwari M , Vijaya R, Ghosh M, Shastri S, Kabra M and Menon PS. Screening of families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment (ARNSHI) for mutations in (GJB2) gene: Indian scenario. *Am J Med Genet* 2003; 120A

(2): 180-184.

9. Marziano NK, Casalotti SO, Portelli AE, Becker DL and Forge A. Mutations in the gene for connexin 26 (GJB2) that cause hearing loss have a dominant negative effect on connexin 30. *Hum Mol Genet* 2003; 12(8): 805-812.
10. Medlej-Hashim M, Mustapha M, Chouery E *et al.* Non-syndromic recessive deafness in Jordan: Mapping of a new locus to chromosome 9q34.3 and prevalence of DFNB1 mutations . *Eur J Hum Genet* 2002; 10(6): 391-394.
11. 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.
12. Nance WE. The genetics of deafness. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2003; 9(2): 109-119.
13. Ohtsuka A, Yuge I, Kimura S *et al.* GJB2 deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation. *Hum Genet* 2003; 112(4): 329-333.
14. Park H.J, Hahn S.H, Chun Y.M, Park K and Kim H.N. Connexin 26 mutations associated with non-syndromic hearing loss. *Laryngoscope* 2000; 110: 1535-1538.
15. Richard G, White T.W, Smith L.E *et al.* Functional defects of Cx 26 resulting from a heterozygous missence mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma. *Hum Genet* 1998; 103(4): 393-399.
16. Rothrock CR, Murgia A, Sartorato EL *et al.* Connexin 26 35delG deos not represent a mutational hotspot. *Hum Genet* 2003; 113(1): 18-23.
17. Schade G, Kothe C, Ruge G, Hess M and Meyer CG. Non-invasive screening for GJB2 mutations in buccal smears for the diagnosis of inherited hearing impairment. *Laryngorhinootologie* 2003; 82(6): 397-401.