Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:33 +0430 on Thursday September 21st 2017

مقاله پژوهشی

طیف جهش های ژن کانکسین ۲۶ در جمعیت ناشنوایان غیر سندرمیک استان همدان

دکتر یوسف شفقتی* ، احمد ابراهیمی ** ، مرضیه محسنی **، دکتر فرزانه استادی*** ، دکتر هاله حبیبی****
دکتر حمید پورجعفری***** ، دکتر آرـ جی ـ اچ اسمیت ****** ، دکتر حسین نجم آبادی*******

دریافت : ۸۴/۲/۱۸ ، پذیرش : ۸۴/۹/۱۶

چکیده:

مقدمه و هدف : ناشنوائی یکی از شایعترین نقص های حسی عصبی در انسان می باشد که ازهر ۱۰۰۰ کودک یک نفر به آن مبتلا می‌شود. بر اساس منابع موجود بیش از نیمی از موارد اختلال ناشنوائی جنبه ارثی دارند. بیش از ۸۰٪ ناشنوائی های ارثی با وراثت مغلوب اتوزومی منتقل می شوند. جهش در ژن کانکسین ۲۶ عمده ترین عامل ناشنوایی در مناطق مطالعه شده و جمعیتهای مختلف دنیا می باشد. این ژن بر روی بازوی بلند کروموزوم۱۳ و در جایگاه ژنی 13q11-12 قراردارد. ما در این مطالعه ۷۶ نفر (۱۵۲ کروموزوم) از ۷۶ خانواده ناشنوای مقیم استان همدان را که دچار نا شنوائی شدید تا عمیق غیر سندرمیک بودند را مطالعه و به بررسی جهش های ژن GJB2 آنان پرداختیم.

روش کار : تمام نمونه ها برای تعیین جهش در ژن کانکسین ۲۶ (CX26) با استفاده از تکنیک (Allele-Specific PCR) غربالگری شدند، نمونه های دارای جهش هموزیگوت 35delG جدا شدند. در نمونه های منفی بررسی باروش DHPLC انجام وآنهائی که پروفایل های غیرطبیعی نشان می دادند، مستقیماً تعیین توالی (Direct Sequencing) شدند.

نتایج : در این مطالعه چهارجهش در اگزون ۲ (35delG, R32H, delE120, R184P) و یک جهش در اگزون ۱ (-3170G>A) کشف گردید. ۱۱ فرد آلل جهش یافته (35delG) را داشتند (۸ نفر به صورت هموزیگوت و ۳ نفر هتروزیگوت). در بین سایر آللهای موتانت یک جهش جدید از نوع تغییر قالب نیز در این مطالعه با مشخصات 507InsAACG شناسائی گردید. که برای اولین بار در دنیا در این جمعیت کشف شده که گزارش می گردد. همچنین ما در یک بیمار کمپلکس اللی V27I;E114G/wt را که قبلاً بوسیله سایر محققین گزارش شده بود کشف نمودیم.

نتیجه نهائی : بر اساس این داده ها، جهش در ژن GJB2 در ۱۸/۱٪ موارد ناشنوایی شدید تا عمیق در جمعیت استان همدان وجود دارد. که جهش (35delG) حدود ۱۲/۵٪ موارد را تشکیل می دهد.

کلید واژه ها : جهش / ژن کانکسین ۲۶ / ناشنوایی ارثی / ناشنوایی غیر سندرمیک

* استادیار مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی ، تهران (y_shafeghaty@uswr.ac.ir)
** کارشناس ارشد مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی ، تهران
*** متخصص کودکان مرکز مشاوره ژنتیک پزشکی سازمان بهزیستی استان همدان
**** دکتری حرفه ای پزشکی مرکز مشاوره ژنتیک پزشکی سازمان بهزیستی استان همدان
***** دانشیار گروه بیولوژی مولکولی و ژنتیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
****** استاد مرکز تحقیقات ناشنوایی دانشگاه آیوا آمریکا
******* دانشیار مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی ، تهران

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:33 +0430 on Thursday September 21st 2017

مقدمه :

ناشنوایی یک اختلال هتروژن است که علل محیطی و ژنتیکی فراوانی دارد (۱). ناشنوایی مادرزادی یک اختلال بسیار شایع است که وفورآن ۱ نفر در هر ۱۰۰۰ کودک می باشد(۲). حدود ۶۰٪ ناشنواییها منشا ژنتیکی دارند(۳). اختلال در شنوایی می‌تواند همراه با علائم دیگر و بعنوان بخشی از یک بیماری بروز کند که به آنها ناشنوایی های سندرمیک (Syndromic hearing impairment) گفته می شود. برای مثال یکی ازعلائم افراد مبتلا به سندرم Usher، ناشنوایی می باشد. همچنین ناشنوایی می‌تواند به صورت تنها علامت و بصورت منفرد بروز نماید که به ناشنوایی غیرسندرمیک (Non-syndromic hearing loss) معروف است. شیوع اختلال شنوایی ارثی در کشورهای در حال توسعه در مقایسه با کشورهای توسعه یافته خیلی بالاتر است (۴). حدود ۷۰٪ از ناشنوایی های ژنتیکی غیرسندرمیک هستند (۵). این نوع ناشنوایی ها بدون هیچ نشانگان یا نقص ساختاری یا فونکسیونی دیگرمشاهده می شوند (۶). ۸۰ تا ۸۵٪ از این نوع ناشنوایی ها با الگوی وراثتی مغلوب اتوزومی منتقل، وآنها را با مخفف (DFNB) نشان می دهند (۲). بطور کلی در ازدواج های خویشاوندی بیماری های مغلوب اتوزومی از جمله اختلالات شنوایی شیوع بالایی دارند (۴). ۱۵-۱۲٪ موارد ناشنوائی های غیرسندرمیک الگوی وراثت غالب اتوزومی (DFNA) را نشان می دهند و ۳-۱٪ آن ها هم به شکل وابسته به X (DFNX) منتقل می شوند(۲).

اتصالات باز(Gap Junction) ساختارهایی هستند در غشاء های سلولی در تماس با یکدیگر و اغلب به صورت پراکنده در ارگانیسم های چند سلولی وجود دارند (۷). این اتصالات باز به مولکول های کمتر از ۱۰۰۰ دالتون مثل متابولیت ها و یون ها در بین سلول ها اجازه عبور می‌دهند (۸). کانکسین ۲۶ عضوی از خانواده کانال اتصالات باز است که پروتئین‌های متشکل آن عموماً بر اساس‌وزن مولکولی‌نامگذاری می شوند مانند کانکسین ۲۶ و کانکسین ۳۰ و غیره. ژنهای کد کننده ۲۰ نوع کانکسین مختلف در ژنوم انسان شناسائی شده است(۹). ژن GJB2 زیر واحد بتا-دو پروتئین کانکسین ۲۶ را کد می کند. در حلزون گوش داخلی بیان این ژن اثبات شده است. این کانال ها بعد از تحریک سلولهای موئی، یونهای پتاسیم را از سیناپس های قاعده سلول های موئی و از خلال سلول های پشتیبان و فیبروبلاست ها، به سمت اندولنف حاوی پتاسیم بالای دستگاه حلزونی باز می گردانند(۲).

موتاسیون در ژن کانکسین ۲۶ که بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۳ قرار دارد بعنوان علت اصلی ناشنوایی غیرسندرمیک اتوزومال مغلوب (DFNB1) شناخته شده است (۱۰،۱۱). در ژنGJB2 شش تکرار از نوکلئوتید گوانین در موقعیت۳۵-۳۰ وجود دارد که شایعترین جهش، حذف یک نوکلئوتید در این منطقه (30delG - 35delG) می باشد(۱۱) ، که علت عمده ناشنوایی های مادرزادی اسپورادیک و ارثی می باشد. در جمعیت سفیدپوست موتاسیون35delG شایع ترین نوع موتاسیون در ژن GJB2 است(۱۲). از آنجا که این جهش در جمعیتها و کشورهای مختلف (آمریکا،اسپانیا، انگلستان، ژاپن، فلسطین و...) (۲۰۰۲-۱۹۹۷) گزارش شده است(۱۳، ۱۱ ،۴). پذیرفته شده که این قطعه شش نوکلئوتیدی که از موقعیت ۳۰ شروع می شود یک منطقه با جهش پذیری بالاست. تحقیقات جدیدتر نشان می دهند که قدمت این جهش ها به ۱۰۰۰۰ سال قبل بر می گردد (Founder Effect) .

تمام یافته ها و اطلاعات به روز در سایت اینترنتی (http:/www.uia.ac.be/dnalab/hhh) موجود است. درایران هم تقریباً ۸۶٪از موارد ناشنوایی به صورت اتوزومی مغلوب به ارث میرسند که در بین الگوهای توارثی بیشترین درصد را شامل می شود(۱۴).

این مطالعه با هدف تعیین طیف جهشهای ژن کانکسین ۲۶ در جمعیت ناشنوایان غیر سندرمیک در استان همدان انجام گرفت.

روش کار:

معیارهای گزینش بیماران دراین مطالعه عبارت بودند از:

۱) نشانه های ناشنوایی غیر سندرمیک با توارث مغلوب اتوزومی در مبتلایان.

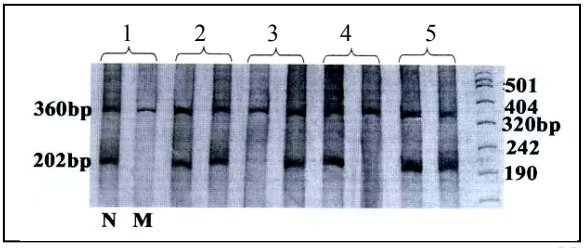
۲) مجزا کردن موارد ناشنوایی بدلیل علل محیطی، با بررسی پرونده پزشکی بیماران وپرسش دقیق درباره عوامل ممکن، از قبیل ناشنوایی های ناشی از عفونتهای داخل رحمی، مننژیت، یرقان نوزادی، صدمات فیزیکی و . . .

۳) تائید نوع ناشنوایی بااستفاده ا ز آزمایشات ادیولوژیک.

ابتدا با پر کردن پرسش نامه هایی که جهت این کار تهیه شده بود اطلاعات مورد نیاز جمع آوری شد . سپس شجره خانوادگی ترسیم والگوی وراثتی ناشنوایی تعیین ومدارک شنوائی سنجی وادیوگرام بیمار ضمیمه گردید. پس از

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:33 +0430 on Thursday September 21st 2017

مشخص شدن الگوی وراثتی بیماری برای اثبات ژنتیکی بودن اختلال و تعیین نوع جهش با کسب رضایت از بیماران ۱۰-۵ سی سی خون جهت استخراج DNA ژنومی (gDNA) گرفته شد، و بر اساس روشهای استاندارد DNA آن استخراج گردید. به منظور غربالگری نمونه ها از نظر تعیین جهش 35delG از روش Allele-Specific PCR (ARMS) و الکتروفورزبرروی ژل پلی آکریل آمید ۸٪ با ولتاژ ۲۰۰ ولت مطابق پروتکل های موجود استفاده شد (۵،۱۵). نمونه های حاوی جهش هموزیگوت 35delG کنار گذاشته شد (شکل۱). در بقیه موارد پس از انجام DHPLC نمونه‌هایی که پروفایل غیر طبیعی داشتند جهت تعیین توالی بروش مستقیم (Direct Sequencing) به دانشگاه آیوا در ایالات متحده آمریکا ارسال گردید.



N: باند نرمال
M: باند موتان
(۱): کنترل نرمال برای جهش 35delG
(۲): کنترل هتروزیگوت برای جهش 35delG
(۳): کنترل هموزیگوت برای جهش 35delG
(۴) بیمار نرمال برای جهش 35delG
(۵) بیمارهتروزیگوت برای جهش 35delG

نتایج :

بر اساس معیار های تعریف شده ۷۶ خانواده برای مطالعه انتخاب شدند. در تمام افراد ناشنوا معاینات فیزیکی و ادیوگرام ها، ناشنوائی شدید تا عمیق غیر سندرمیکی را تائید می کرد. غربالگری جهش بر روی ۱۵۲ کروموزوم انجام شد.جهش در ژن کانکسین ۲۶ (CX26) در ۲۸ کروموزوم (۱۸/۱٪) کشف گردید. در ۸ خانواده افراد ناشنوا جهش 35delG را به صورت هوموزیگوت داشتند، در ۳ خانواده دیگر این جهش به حالت هتروزیگوت مشاهده شد. قابل ذکر این که یک جهش جدید با تغییر غالب (507InsAACG) برای اولین بار در یک بیمار در این جمعیت مشاهده شد که باعث تغییر در ساختار و قالب ژن گردیده (Frame-shift mutation) و توالی نوکلئوتیدی را به هم زده بود. جهش هائی که در نتیجه انجام توالی یابی مستقیم DNA بدست آمده اند عبارتند از: - 35delG, 507insAACG*, R127H, 3170G>A, delE120, V27I ; E114G وهمچنین در ۱۱ خانواده (۷/۹٪) پلی مورفیسم های E114G, V27I, V153I مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱: ژنوتیپ های مشاهده شده در جمعیت مورد مطالعه

Family	Chromosome	Region Exon2	Region Exon1
8	16	35delG/35delG	Wt
1	1	507insAACG/wt	Wt
2	4	35delG/wt	-3170G>A/wt
1	1	35delG/wt	Wt
1	2	DelE120/delE120	Wt
1	1	R127H/wt	Wt
1	1	delE120/wt	Wt
1	2	V27I ;E114G	Wt
16	28	Total	

ترکیب دوپلی مورفیسم (E114G;V27I) درگزارش هائی ازترکیه وازجمله ایران به عنوان جهش گزارش گردیده است (۱۸-۱۶) ، که در یکی از بیماران ما هم شناسائی گردید (جدول۲).

جدول ۲: پلی مورفیسمهای مشاهده شده در جمعیت مورد مطالعه

Family	Chromosome	Region Exon2	Region Exon 1
4	4	V27I /wt	Wt
5	5	V153I /wt	Wt
2	2	E114G/wt	Wt
11	11	Total	

شایان ذکر است که ترکیب(507insAACG/wt) فقط دریک خانواده از بیماران ما کشف گردید. این جهش در سایر مطالعات انجام شده درایران و سایر نقاط جهان گزارش نشده است بنابراین اولین موردی است که گزارش می گردد.

بحث:

با وجود هتروژنیسیته بالای اختلال شنوایی شایعترین علت ناشنوایی ارثی در جمعیت های مختلف دنیا جهش در ژن GJB2 است(۳،۵،۱۹). جهش 35delG شایع ترین نوع جهش در جمعیت سفید پوستان است (۱۲). این جهش به عنوان جهش شایع ناشنوایی اتوزومال مغلوب غیرسندرمیک در جمعیت اروپای شمالی و جنوبی است(۱۱). این الل همچنین به عنوان علت اصلی ناشنوایی ژنتیکی در خانواده های ناشنوای منطقه مدیترانه ای گزارش شده است. تصور می کنند که دلیل آن پدیده تاثیر بنیان گذار

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:33 +0430 on Thursday September 21st 2017

یا (Founder Effect) برای این جهش است، که قدمت آن را حدود ۱۰۰۰۰ سال محاسبه کرده اند. درکره با مطالعه بـر روی ۱۴۷ فـرد بـا ناشـنوایی غیرسـندرمیک جهـش 35delG نسـبتا نـادر بـود و فقـط ۲ فـرد هتروزیگـوت برای35delG پیدا شد (۱۲). این جهش در جمعیت ژاپن و چین نیـز نـادر اسـت (۵). از ۶۸ خـانواده اردنـی بیمـاران مبتلابه ناشنوائی غیـر سـندرمیک بـرای جهـش هـای ژن GJB2 ; توالی یابی (sequence) شده اند،۱۶٪ این خـانواده ها جهـش در لوکـوس DFNB1 داشـتند و 35delG تنهـا جهش یافت شده در این خانواده ها بـود(۲۰). شـیوع ایـن جهش در بخشهای مختلف ایران متفاوت است. در اسـتان کرمان تنها ۲ فرد از ۴۵ خانواده(۴/۴۴٪) جهـش 35delG را نشـان دادنـد(۱۵).در اسـتان کرمانشـاه سـه جهـش 35delG, delE120, IVS+1G>A نسبت به بقیـه جهشـها بالاترین شیوع را داشتند (۲۱). شیوع جهش در ژن GJB2 دراین جمعیت برابر۲۵٪ می باشد. جهشهایGJB2 مسبب ۱۸/۱٪ از ناشـنوایی غیرسـندرومیک در جمعیـت اسـتان همدان است. ترکیب پولی مورفیسـم V27I/E114G قـبلاً در ترکیه به عنوان یک جهش جدید گـزارش شـده اسـت، این ناهنجاری ژنتیکی درمطالعات متفاوتی دراسـتان هـای تهران، تبریز، سیستان و بلوچستان، هرمزگان، خوزسـتان، گلستان، وکردستان هم به عنـوان جهـش ژنـی شناسـائی وگزارش شده است(۱۸-۱۶). جهش جدید 507InsAACG در اگزون۲ تاکنون درهـیچ منبـع معتبـر پزشـکی گـزارش نشده است، که علت ناشنوائی دریکـی از بیمـاران مـا بـوده است. شیوع جهش 35delG در این جمعیـت برابـر ۱۲/۵٪ بدست آمد که در مجموع ۷۰٪ کل جهـش هـا را تشـکیل می دهد.در این مطالعه، بیشـترین فراوانـی جهـش در ژن GJB2 در ناشنوایان با روند مغلوب دیده شد. جهش هائی که در این جمعیت باعث ناشنوایی شده اند عبارت بودنـد از : delE120, R127H, 35delG, -3170G>A .

در۶/۲٪ از موارد بررسی شده علی رغم وجود الگـوی غیر طبیعـی در DHPLC هـیچ جهشـی یافـت نشـد و در ۵/۲٪ از مـوارد هـم تنهـا نـوعی تنـوع آللـی نظیـر V153I ،E114G,V27I مشاهده شد.

نتیجه نهائی :

این داده ها نشـان مـی دهنـد کـه در اقـوام مختلـف ایرانی شـیوع جهـش هـای GJB2 متفـاوت بـوده والگـوی جهش های شایع نیز کاملا با سایر مناطق دنیا فـــــرق می کند. لذا می توان دخالت سایر لوکوس های ژنـی را در ایجاد ناشنوایی غیر سندرمیک در ایران محتمل دانست. از این موضوع می توان برای انجام مشاوره ژنتیک دقیق تـر و ارائه اطلاعات صحیح تر به خانواده ها استفاده نمود.

سپاسگزاری :

نویسندگان بر خود واجب میدانند از کلیه خانواده های مبـتلا بـه خـاطر حوصـله شـان، و از همکـاران محتـرم و عزیزانی کـه در بهزیسـتی اسـتان و شهرسـتان همـدان و آموزش و پرورش استثنایی همدان و همچنین کلیه همکاران مرکز تحقیقـات ژنتیـک دانشـگاه بهزیسـتی و توانبخشـی تهران به خاطر همکاری های ارزنده شان تشکر نمایند. بـه ویژه انجام این تحقیق بدون کمک همکاران ارجمند دکتـر کلانتـر، دکتـر محمـد مهـدی شـاهقدمی، نجـات مهدیـه، ابراهیم کامرانی صالح، امیر کوکائیان و ایمان سلحشوری فر میسر نمی شد که از همه آنان ممنون و سپاسگزاریم.

منابع :

1. Nance WE. The genetics of deafness. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2003 ; 9.(2): 109-119
2. Philippe P. Connexins, hearing and deafness, clinicalaspects of mutations in the connexin 26 gene. Brain research reviews 2002; 32:159-162.
3. Klemens F. Connexin 26 mutations in cases of sensorineural deafness in eastern Austria. Eur J Hum Gene 2002; 10:427-432
4. Shahin H, Walsh T, Sobe T, Lynch E, King MC, Avraham KB, et al. Genetics of Congenital deafness in the Palestinian population: Multiple connexin 26 alleles with shared origins in the middle east. Hum Gene 2002; 110:284-289.
5. Najmabadi H, Cucci RA, Sahebjam S, Kouchakian N, Farhadi M, Kahrizi K, et al. GJB2 mutations in Iranian with autosomal recessive non-syndromic-sensorineural hearing loss. Hum Mutation 2002: 504.
6. Liu Y , Ke X, Qi Y, Li W, Zhu P. Connexin 26 gene (GJB2) :Prevalence of mutations in the Chinese population. J Hum Genet 2002; 47(12): 688-690
7. Falk MM. Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. Eur J Cell Biol 2000; 79:564-574.
8. Kelsell DP , Dunlop J , Hodgins MB. Hu-

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:33 +0430 on Thursday September 21st 2017

مغلوب استان کرمان. مجلـه دانشـگاه علـوم پزشـکی کرمان. دوره ١١ ، شماره٣ ، ١٣٨٣: ١٤٠-١٣٦.

16. Hashemzadeh Chaleshtori M, Dowlati M , Farhud DD, Hoghooghi Rad I , Sasanfar R, Hosseinipour A, et al. Two novel mutations and predominant 35-delG mutation in the connecxin 26 gene (GJB2) in Iranian Population. Iranian J Pub Health 2004;33(2):14-19.
17. Sasanfar R, Hashemzadeh Chaleshtori M , Hosseinipour A, Farhud DD, Tolooi A , Dowlati M, et al. Frequency of A very rare 35delG mutation in two ethnic groups of Iranian populations. Iranian J Pub Health 2004;33(4): 26-3.
18. Hashemzadeh Chaleshtori M, Hoghooghi Rad I, Dowlati M, Sasanfar R, Hosseinipour A, Montazer Zohour M , et al. Frequency of mutations in the connexin 26 gene (GJB2) in two Iranian populations of Iran. Iranian J Pub Health 2005; 34(1):1-7.
19. Denoyelle F, Weil D. Pre-lingual deafness: High prevalence of a 30 delG mutation in the connexin 26 gene. Hum Mol Genet 1997;6:2173-7.
20. Medleg-Hashim M. Non-syndromic recessive deafness in Jordan: Mapping of a new locus to chromosome 9p34.3 and prevalence of DFNB1 mutations. Eur J Hum Genet 2002;10(6):391-394
21. Nejat M, Nishimura C, Ali-Madadi K, Riazalhosseini Y, Yazdan H, Arzhangi S, et al. The frequency of GJB2 mutations and the Δ (GJB6-D13S1830) deletion as a cause of autosomal recessive non-syndr-omic deafness in the Kurdish population. Clin Genet 2004; 65(6): 506-508.

man diseases:clues to cracking the connexin code? Trends in cell biology. 2001; 11(1):
9. Nerissa KM. Mutations in the gene for connexin 26 (GJB2) that cause hearing loss have a dominant negative effect on connexin 30. Hum Mol Gene 2003; 12 (8): 805-812
10. Gabriela R. 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): 93-399
11. Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. Am J Hum Genet 1998;62:792-799
12. Hong-Joon P, Hahn SH, Chun YM, Park K, Kim HN. Connexin 26 mutations associated with non-syndromic hearing loss, Laryngoscope 2000; 110:1535-1538
13. Ohtsuka A, Yuge I, Kimura S, Namba A, Abe S, Van Laer L, 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.

١۴. کوچکیـان نفیسـه. تعیـین نحـوهء تـوارث اخـتلالات شنوایی ژنتیکی غیرسندرمی. پایان نامه کارشناسـی ارشد ژنتیک. دانشگاه خاتم الانبیاء. ١٣٧٨-١٣٧٧.

١۵. بزاززادگـان نیلـوفر، میرحسـینی نوشـین، ضـیاالدینی حسن، اسدی علیرضا، کهریزی کیمیا، ارژنگی سـاناز و همکاران. وفـور نسـبی جهـش (35delG) در ژن GJB2 در جمعیت ناشنوایان غیرسندرومی جسمی