

## تعیین وفور نسبی جهش های ژن GJB2 در جمعیت ناشنوایان غیر سندرومی جسمی مغلوب استان لرستان

- میترا سپهوند<sup>1</sup>، کیمیا کهریزی<sup>2</sup>، احمد دانشی<sup>3</sup>، مرضیه محسنی<sup>4</sup>، یاسر ریاض الحسینی<sup>4</sup>، نیلوفر بزازادگان<sup>4</sup>، حسین نجم آبادی<sup>5</sup>
- 1- پزشکی عمومی، مرکز مشاوره ژنتیک سازمان بهزیستی استان لرستان
  - 2- متخصص، مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی تهران
  - 3- استاد، مرکز تحقیقات گوش و حلق و بینی و جراحی سر و گردن بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص)، دانشگاه علوم پزشکی ایران
  - 4- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی تهران
  - 5- دانشیار، مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی تهران

یافته / دوره هشتادم / شماره 2 / تابستان 85 / مسلسل 28

### چکیده

دریافت مقاله: 84/11/19، پذیرش مقاله: 85/2/6

Ø مقدمه: ناشنوایی مادرزادی که علل ژنتیکی و محیطی بسیاری دارد، یک از هر هزار نوزاد تازه متولد شده را تحت تأثیر قرار می‌دهد. جهش های ژن GJB2 که رمز کننده کانکسین 26 پروتئین تشکیل دهنده اتصال باز است به عنوان اساس ناشنوایی غیر سندرومی جسمی مغلوب شناخته شده است.

Ø مواد و روش ها: هدف ما در این مطالعه تعیین وفور نسبی جهش های ژن GJB2 در جمعیت ناشنوای غیر سندرومی جسمی مغلوب استان لرستان با استفاده از تکنیک DHPLC، ARMS، PCR و تعیین توالی مستقیم بود.

Ø یافته ها: در این مطالعه 106 کروموزوم (از 53 فرد بیمار) مورد بررسی قرار گرفت، 18 کروموزوم (17%) در ژن GJB2 جهش داشتند. جهش 35delG در ده کروموزوم (9/4%) (چهار بیمار هموزیگوت و دو بیمار هتروزیگوت بود) تشخیص داده شد. سایر جهش هایی که در این منطقه دیده شد، شامل: 3170G>A، W24X، V95M، 35delG 512insAACG، 314del14 و 510insCGAA بودند. همچنین پلی مورفیسیم V153I در سه فرد بصورت هتروزیگوت دیده شد و آخرین جهش (510insCGAA) یک جهش جدید می باشد که وجود آن تاکنون در جمعیت های دیگر جهان گزارش نشده است.

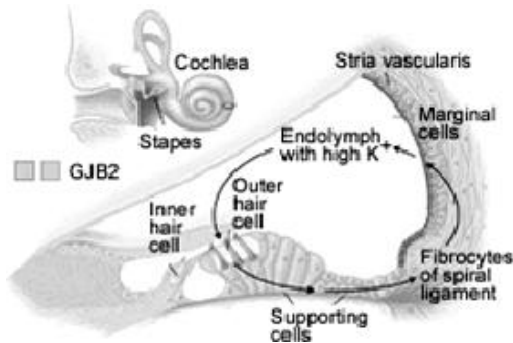
Ø نتیجه گیری: نتایج این مطالعه در مقایسه با فراوانی جهش ژن کانکسین 26 که عامل بیش از 50% ناشنوایی های غیر سندرومی در جمعیت های مختلف جهان می باشد، بسیار اندک بوده و فقط 17% موارد را شامل می شود، از طرفی در این مطالعه جهش (510insCGAA) یک جهش جدید می باشد که وجود آن تاکنون در جمعیت های دیگر جهان گزارش نشده است. این نتایج نشان می دهد که در جمعیت ما احتمالاً ژن های دیگری عامل ایجاد ARNSHL می باشد.

واژه های کلیدی: ناشنوایی غیر سندرومی جسمی مغلوب، جهش، کانکسین 26، GJB2

آدرس مکاتبه: خرم آباد، چهارراه بانک، کوچه پشت بانک ملی مرکزی، مرکز مشاوره خانواده و ژنتیک

## مقدمه

کانکسین 30 (CX30) اتفاق می افتد. کانکسین 26 ژن کوچکی است که بر روی کروموزوم شماره 13 قرار گرفته است. طول این ژن 5/5 کیلو باز بوده و از دواگزون تشکیل شده است که بوسیله یک اینترون از هم جدا میشوند. اما تنها توالی از GJB2<sup>3</sup> که دارای کد برای سنتز پروتئین کانکسین 26 می باشد از ژن 2 است (6 و 7). پروتئین کانکسین 26 عضوی از خانواده کانال اتصال باز بتا 2 می باشد (که بعد از این با نام کانکسین 26 خوانده می شود) کانکسین 26 یکی از مهمترین پروتئینهای دخیل در هموستاز یون پتاسیم در بخش حلزون گوش داخلی است که در سلولهای حفاظتی، فیبروبلاستهای لیگامنت ماریپیچ و درون سلولهای ماریپیچی لیمبوس وجود دارد. این پروتئین مسئول ایجاد اتصالات باز بین سلولی است که اجازه انتقال به مولکولهای کوچک را می دهد (شکل 2).

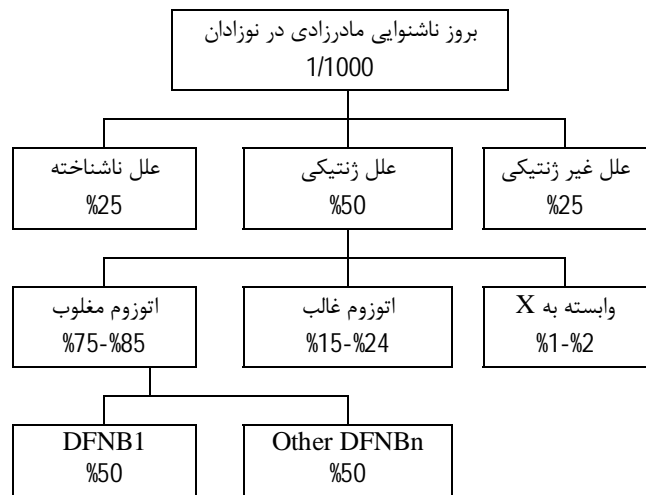


شکل شماره 2- کانکسین 26 یکی از مهمترین پروتئینهای دخیل در هموستاز یون پتاسیم در بخش حلزون گوش داخلی است. که در سلولهای حفاظتی، فیبروبلاستهای لیگامنت ماریپیچ و درون سلولهای ماریپیچی لیمبوس وجود دارد.

تا کنون بیش از 90 جهش در ژن کانکسین 26 کشف شده است (8). 35delG شایعترین جهش در این ژن (در حدود 70 درصد) می باشد که منجر به ایجاد کدون خاتمه زودرس در موقعیت اسید آمینه شماره 13 می شود (9). در ژن کانکسین 26 شش تکرار از باز گوانین در موقعیت 30-35

ناشنوایی اختلالی هتروژن است که علت های محیطی و ژنتیکی فراوانی دارد (1). نقص شنوایی ژنتیکی شایعترین اختلال حسی عصبی ارثی است که تقریباً 1/1000-2000 کودک تازه متولد را تحت تاثیر قرار می دهد (2، 3). حدود 70% از ناشنوایی های ژنتیکی غیرسندرومی است که در آن فرد ناشنوا هیچ اختلال دیگری ندارد (2). کاهش شنوایی حسی عصبی جسمی مغلوب غیر سندرومی (ARNSHL)<sup>1</sup> شایعترین فرم کاهش شنوایی ارثی از نوع شدید است که 85% موارد ناشنوایی را به خود اختصاص می دهد (4 و 5).

در سالهای اخیر پیشرفت های قابل ملاحظه ای در شناسایی ژن های دخیل در ناشنوایی غیرسندرومی به وقوع پیوسته است. ژنهای مختلفی باعث این اختلال می شوند که در نهایت 100 لوکوس برای آن تخمین زده شده است (شکل 1).



شکل شماره 1- فراوانی انواع شنوایی

لوکوسهای مغلوب غیرسندرومی به صورت DFNBn نمایش داده میشوند که در آن DFNBn ناشنوایی، B مغلوب و n ترتیب شناسایی لوکوس مورد نظر است (مثلاً DFNB1 ژن رمز کننده GJB2 می باشد). از میان آنها DFNB1<sup>2</sup> به تنهایی مسئول 50% از ناشنوایی های جسمی مغلوب می باشد که توسط جهش های ژن کانکسین 26 (CX26) و ژن

1. Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss  
2. Deafness Neurosensory Autosomal Recessive  
3. Gap Junction Beta

لزوم بیمار باید سایر تست های خونی، تصویربرداری و... را انجام دهد.

3- اساس شجره نامه بر اساس اتوزومی مغلوب بود. یعنی بیماری به صورت افقی دیده شده و معمولاً در نسلهای قبلی به وفور زیاد دیده نمی شود.

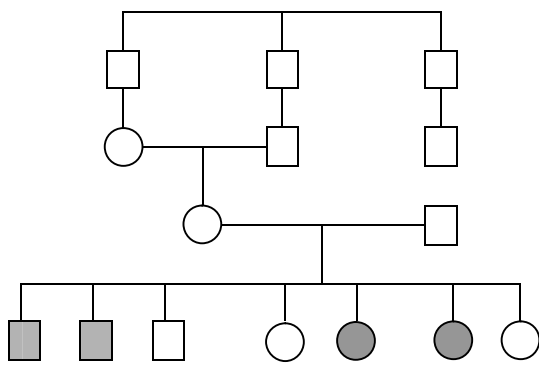
شنوایی پدر و مادر نرمال بود و والدین عموماً با همدیگر نسبت خانوادگی داشتند. در این طرح، بیشتر افراد دارای ازدواج های فامیلی مد نظر بودند.

دو یا سه مورد نا شنوایی در هر خانواده دیده شد (شکل 3).

ابتدا از افراد کم شنوا و یا ناشنوایی که برای مشاوره ژنتیک به مرکز بهزیستی شهرستانهای استان مراجعه کردند استفاده نموده و با تکمیل پرسشنامه و ترسیم شجره برای آنها پرونده تشکیل گردید. ادیوگرام های مربوطه نیز ضمیمه پرونده شدند.

سپس با اخذ رضایت از 53 بیمار مبتلا به ناشنوایی

غیر سندرومی با الگوی وراثتی جسمی مغلوب 5-10 سی سی خون جهت استخراج DNA ژنومی گرفته شد و برای جلوگیری از لخته شدن در لوله های حاوی EDTA<sup>2</sup> نگهداری شد. DNA ژنومی توسط روش نمک اشباع<sup>3</sup> استخراج گردید و سپس کیفیت و کمیت آن توسط روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت.



شکل شماره 3- الگوی وراثت اتوزومی مغلوب در ناشنوایان مورد مطالعه که در آن بیماری بصورت افقی دیده می شود

منطقه کد کننده وجود دارد که حذف یکی از این نوکلئوتیدها باعث ایجاد جهش 35delG یا 30delG می شود (10). این جهش اولین بار توسط زلانت<sup>1</sup> و همکارانش در سال 1997 گزارش شد. بعد ها 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 (11).

مقالات و گزارشات مختلف از سراسر جهان نشان داده اند که جهش های ژن کانکسین 26 در مناطق جغرافیایی و اقوام مختلف با هم متفاوت هستند. در جمعیت های اروپایی و سفید پوستان امریکایی جهشی به نام 35delG بیشترین شیوع را داراست در صورتی که در یهودیان اشکنازی جهش دیگری به نام 167delT شایع است. نکته قابل ملاحظه این است که جهش 35delG در بیشتر نقاط جهان گسترده شده است (12و13).

## مواد و روش ها

این مطالعه با استفاده از روش مطالعه توصیفی پس رویدادی انجام گرفته است. هدف از این پژوهش بررسی شایعترین جهش در ژن کانکسین 26 در ناشنوایان ژنتیکی جسمی مغلوب غیر سندرومی از نوع حسی - عصبی بود. بدین منظور از خانواده هایی که برای دریافت سمعک مراجعه می نمودند، متقاضیان کاشت حلزون، مراجعین متقاضی مشاوره ژنتیک، موارد تک موردی و... استفاده گردیده است. بیماران مورد بررسی دارای مشخصات زیر بودند:

- 1- تست شنوایی را برای بررسی نوع کاهش شنوایی انجام داده بودند که معمولاً دارای انواع متوسط (41 db)، عمیق (70db)، شدید (70-56db) هستند که می توانند به صورت پیشرونده نیز باشند.
- 2- کاهش شنوایی در افراد مورد بررسی با سایر مشکلات کلینیکی همراه نبود. این بررسی که به صورت معاینه بالینی و توسط پزشک صورت می گیرد، برای تشخیص غیر سندرومی بودن ناشنوایی به کار می رود. در صورت

1. Zelante  
2. Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic acid  
3. Salting out

تاکنون در جمعیت‌های دیگر جهان گزارش نشده است و همچنین در 3 خانواده (2/8%) پلی مورفیسم V153I مشاهده شد. ژنوتیپ‌های یافت شده در این بیماران در جدول شماره 1 آمده است.

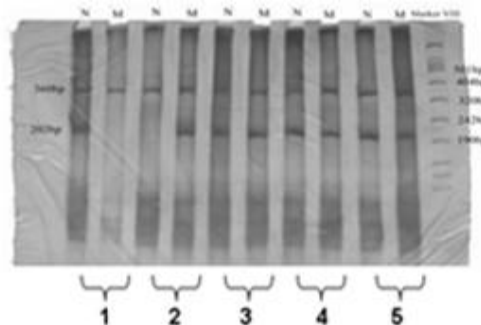
جدول شماره 1- ژنوتیپ‌های یافت شده در بیماران

ژنوتیپ	فراوانی
35delG/35delG	4
314del14/314del14	1
512insAACG/512insAACG	1
35delG/W24X	1
510insCGAA/-3170G>A	1
35delG/V95M	1

### بحث

کاهش شنوایی ارثی<sup>3</sup> از جمله بیماری‌های هتروژن است، با وجود این جهش در ژن کانکسین 26 عامل عمده (ARNSHL) کاهش شنوایی حسی عصبی جسمی مغلوب غیر سندرمی می باشد. جهش در این ژن عامل نیمی از ناشنوایی‌ها از نوع خفیف تا شدید در جمعیت‌های مختلف است (14 و 15). در جمعیت‌های مختلف جهش‌های خاصی شایع است مثلاً" در کشورهای شرق آسیا جهش 235delC و در یهودیان اشکنازی جهش 167delT و در کشورهای اروپایی 35delG از بیشترین شیوع برخوردار است. جهش 35delG در بیشتر جمعیت‌های جهان با فراوانی‌های متفاوتی دیده می شود. در مطالعه اولیه ای که توسط دکتر نجم آبادی و همکاران انجام گرفت 83 خانواده مطالعه شد که تنها در 9 خانواده (11%) ناشنوایی وابسته به GJB2 تشخیص داده شد که بیشترین ژنوتیپ مربوط به 35delG بود به طوری که 4 تا از 9 خانواده ژنوتیپ هموزیگوت 35delG داشتند (16).

جهت تشخیص جهش 35delG از روش ARMS/PCR<sup>1</sup> و الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید 8% با ولتاژ 200 ولت استفاده شد (شکل 3). نمونه‌های هموزیگوت 35delG مشخص و کنار گذاشته شدند (شکل 4). در بقیه موارد پس از انجام DHPLC نمونه‌هایی که پروفایل غیر نرمال داشتند مستقیماً تعیین توالی<sup>2</sup> شدند.



N: نوار طبیعی

M: نوار جهش یافته

ردیف (1): شاهد طبیعی برای جهش 35delG

ردیف (2): شاهد هموزیگوت برای جهش 35delG

ردیف (3): شاهد هتروزیگوت برای جهش 35delG

ردیف (4 و 5): نمونه‌های مورد مطالعه (هتروزیگوت برای جهش 35delG)

شکل شماره 4- نمونه جهش یافته ژن 35delG

### یافته‌ها

داده‌های حاصل از پژوهش با استفاده از روش‌های آماری مطالعه توصیفی مورد تحلیل قرار گرفت بر اساس معیارهای مورد نظر ما 53 بیمار از 53 خانواده مطالعه شدند (106 کروموزوم). 18 کروموزوم (17%) حاوی جهش در ژن کانکسین 26 بودند. فراوانی جهش 35delG برابر 9/4% بود. جهش 35delG در بین سایر جهش‌های GJB2 55/5% موارد را به خود اختصاص داده بود. جهش‌هایی که در نتیجه انجام توالی‌یابی مستقیم DNA بدست آمدند عبارتند از:

.V95M .314del14 .W24X .510insCGAA

.512insAACG .3170G>A که جهش‌های اتوزومی

مغلوب در ژن CX26 می باشند. شایان ذکر است که

510insCGAA یک جهش جدید می باشد که وجود آن

1. Allele Refraction Mutation System/Polymerase Chain Reaction
2. Direct sequencing
3. Hereditary Hearing Loss

(18). در این مطالعه نیز ما ناشنوایان غیر سندرومی استان لرستان را با 53 خانواده مورد بررسی قرار دادیم که جهش در ژن GJB2 در 9/4% مشاهده شد. این امر نشان دهنده میزان شیوع پائین این جهش نسبت به گزارش های انجام شده در کشورهای غربی است (19 و 20 و 21).

این نتایج نشان می دهد که در جمعیت ما احتمالاً ژن های دیگری عامل ایجاد ARNSHL می باشد. 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.

همچنین در مطالعه بعدی همین گروه در سال 2004 فراوانی این جهش در بین (ARNSL) ناشنوایان ژنتیکی غیر سندرومی جسمی مغلوب ایران 12/6% گزارش شده است. از 664 خانواده مورد مطالعه تنها 16/7% جهش در ژن GJB2 را نشان دادند (17). به هر حال در این بررسی نیز شیوع جهش های ژن کانکسین 26 در جمعیت ایران بسیار کمتر از جمعیت های غربی گزارش شد. از آنجا که ایران از قوم های مختلفی تشکیل شده و نیز با توجه به اینکه شیوع آلل های جهش دار در جمعیت های مختلف متفاوت است، ضروری به نظر می رسد که اقوام مختلف به صورت جدا بررسی شوند. در مطالعه ای که در کرمان بر روی 65 فرد ناشنوای غیر سندرومی جسمی مغلوب توسط دکتر نجم آبادی و همکاران انجام شده است تنها 3 کروموزوم (2/3%) جهش 35delG را نشان دادند

## References

1. Nance WE. The genetics of deafness. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2003; 9(2): 109-119
  2. Zelante L, Gasparini P, Estivill X: 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 MM. Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. *Eur J Cell Biol* 2000; 79(8): 564-574
  4. Reardon W, Middleton HR, Sand kuijl L, et al: Genetic Deafness. *J Med Genet* 1992;29:521-526
  5. 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
  6. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, connexon, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 1996;65:475-502
  7. Kiang DT, Jin N, Tu ZJ, Lin HH. 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 PM, Harris DJ. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 1998;62:792-799
  11. 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
  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:180-184
  14. Maw Ma: The contibution of the DFNB1 locus to neurosensory Deafness in Caucasian Population. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 629
  15. Rabionet R, Lopes-Bigas N, Dagrimal. Molecular Basis of Childhood Deafness Resulting from Mutations in the GIB2 (connexin 26) Gene. *Hum Genet* 2000;106:40-44
  16. Najmabadi H, Cucci RA, Sahebjam. 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, Riazalhosseini Y, Malekpour M, Daneshi A, GJB2 Mutations-Passage Through Iran. *AJMed Genet* 2004; 133A: 132-7
- 18- بزاززادگان ن، میرحسینی ن، ضیالدینی ح، اسدی ع، کهریزی ک، ارژنگی س، آستانی ا، محسنی م، ریاضالحسینی ی، نجات م، جلالوند خ، اسمیت ر، نیشیمیورا ک و نجمآبادی ح. وفور نسبی جهش (35delG) در ژن GJB2 در جمعیت ناشنویان

غیرسندرومی جسمی مغلوب استان کرمان: مجله دانشگاه  
علوم پزشکی کرمان. دوره 11، شماره 3

19. Fuse Y, Doi K, Hasegawa T. Three Novel Connxin 26 Gene Mutations in Autosomal Recessive Non-Syndromic Deafness. NeuroReport 1999;10:1853-1857
20. Abe S, Usami S, Shinkawa H: Prevalent Connexin 26 Gene (GJB2) Mutations in

Japanese Population. J Med Genet 2000; 37: 41-43

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