

تکثیر چندگانه مبتنی بر لیگاسیون پروب MLPA برای شناسایی جهش‌های حذف ژنی در ناشنوایان هتروزیگوت ژن GJB2

نجات مهدیه^{۱*}، عاطفه شیرکوند^۲، بهاره ربانی^۳، بهمن اکبری^۴، محمد تقی اکبری^۵، سیروس زینلی^۶،
ناهید صفری^۷

^۱ گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

^۲ مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، آزمایشگاه دکتر زینلی

^۳ گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فزوین

^۴ گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

^۵ گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

^۶ مرکز تحقیقات پرتوئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: ناشنوایی شایع‌ترین نقص حسی در انسان است که در نیمی از موارد به علل ژنتیکی مربوط است. با توجه به اهمیت ژن‌های ژن GJB2 در مورد ناشنوایی، در این تحقیق از تکنیک چندگانه مبتنی بر لیگاسیون پروب MLPA برای شناسایی حذف‌های ژنی انجام گرفت.

روش بررسی: تحقیق به روش توصیفی روی ۸ خانواده هتروزیگوت GJB2 انجام گرفت. با اخذ ۵ تا ۱۰ سی سی خون، DNA به روش رسبو بدهی، نمک اشباع استخراج و با کیت مخصوص واکنش MLPA استفاده شد و اگر واکنش موقفيت آمیز بود اندازه قطعات Q اندازه گیری شد.

یافته‌ها: از تعداد ۸ خانوار واحد شرایط که مورد بررسی قرار گرفتند، هیچ‌یک در ژن GJB2 حذفی نداشتند. همچنین ژن‌های GJB3 و WFS1 نیز قادر حذف‌های ژنی بودند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که احتمالاً جهش در ژن دیگری به صورت توارث دوختی سبب ناشنوایی در این خانواده‌ها شده است. با توجه به اهمیت شناسایی ژهش‌های حذف ژنی، انجام این نوع مطالعات توصیه می‌گردد.

واژگان کلیدی: ناشنوایی، GJB2، MLPA

که ازدواج خویشاوندی در آنها بیشتر است. میزان ازدواج فamilی در ایران بالا و برابر ۳۸/۶٪ گزارش شده است.^(۳) در جمعیت قفقازی ۵۰٪ موارد ناشنوایی به علت جهش‌های ژن GJB2 و در کشورهای اسپانیا و ایتالیا این رقم ۷۹٪ گزارش شده است.^(۴,۵) در حالیکه جهش‌های این ژن تنها در ۱۴ تا ۲۰٪ از ناشنوایان کشور یافت شده است.^(۶-۸) دو ژن GJB2 و GJB6 حدود ۳۵ کیلوباز از یکدیگر فاصله دارند.

مقدمه

ناشنوایی، شایع‌ترین نقص حسی عصبی در انسان با فراوانی حدود ۱/۸۶ در ۱۰۰۰ نوزاد می‌باشد.^(۱) حدود ۸۰٪ ناشنوایی‌های غیرسندرومی از نوع اتوزومی مغلوب می‌باشند.^(۲) فراوانی این نوع ناشنوایی به ویژه در کشورهایی بالا است

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، نجات مهدیه

DNA به روش رسوبدهی نمک اشباع استخراج و تعیین غلظت شد (Thermo NanoDrop 2000 spectrophotometer).[Thermo Fisher Scientific, USA]

SALSA MLPA Kit P163-B1، از کیت SALSA MLPA Kit P163-B1 (MRC-Holland) GJB-WFS1 برای انجام واکنش MLPA استفاده شد. این کیت در کل محتوی ۴۱ پروب بوده و طول محصولات تکثیر بین ۱۲۴ و ۴۲۸ جفت باز است. قطعه کنترل که محصول تکثیر آن کوچکتر از ۱۲۰ نوکلئوتید است افزون بر این، ۴ قطعه DNA کمی (قطعات DQ یا DNA ۸۲-۷۶-۷۰-۶۴) (Quantity fragment (Q-fragment) نوکلئوتیدی) و سه قطعه کنترل واسرشتگی (قطعات D) (در نواحی ۹۶-۹۲-۸۸ نوکلئوتیدی در مخلوط پروب کیت وجود دارد. قطعات Q وابسته به لیگاسیون نبوده و در مقدار بر اندازه قطعات Q کاهش می‌باشد. با افزایش مقدار DNA الگو، منحنی قطعات Q کوتاه می‌شود. از سوی دیگر، قطعات D درست مانند پروب های دیگر وابسته به DNA و لیگاسیون هستند. این قطعات، تنها هنگامی ظاهر می‌شوند که لیگاسیون انجام بگیرد و مقدار DNA و واسرشتگی کافی باشد. بر پایه پروب‌های این کیت، ۲۲ ناحیه از کروموزوم ۱۳ (جایگاه ژن‌های GJB2، ZNF198، PSPC1، LATS2 و SGCG)، ۴ جایگاه مربوط به ژن GJB3 و ۸ مکان از ژن WFS1 در فرد بیمار بررسی می‌گردد. مراحل آزمایش بر اساس دستورالعمل کیت انجام گرفت. سپس، نمونه‌ها به کمک الکتروفورز موئینه دستگاه ABI3130XL بررسی شدند.

یافته‌ها

تحقیق روی تعداد ۸ خانواده واجد شرایط انجام گرفت و ژنتوپیپ‌های مربوط به خانواده‌های مورد مطالعه در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- ژنتوپیپ‌های خانواده‌های بررسی شده در این پژوهش

ژنتوپیپ	شماره
35delG/wt	1
V37I/wt	2
W24X/wt	3
M163V/wt	4
35delG/wt	5
G12D/wt	6
35delG/wt	7
R127H/wt	8

پروتئینی که توسط ژن GJB6 کد می‌شود، کانکسین ۳۰ نامیده می‌شود. اهمیت این ژن زمانی آشکار شد که مشاهده شد برخی خانواده‌ها که یک آلل جهش یافته GJB2 دارند، آلل دوم جهش یافته، در ژن GJB6 است (۹). جهش‌های نقطه‌ای بسیار کمی در ژن GJB6 به عنوان عامل ناشنوایی غیرسندرومی ناشنوایی اتوزوم مغلوب گزارش شده است. گزارش‌هایی نیز در مورد وراثت دو ژنی GJB2 و GJB6 وجود دارد (۱۰، ۱۱). اما بعدها مشخص شد که جهش‌های GJB6 در حالت سیس، و نه ترانس، بیان ژن GJB2 را از بین می‌برند. بنابراین نمی‌تواند رابطه دو ژنی وجود داشته باشد.

بر اساس مطالعات مختلف، چهار جهش حذف بزرگ در ژن GJB6-D13S1830، del(GJB6-D13S1830)، del(chr13:19,837,344–19,968,698) و ۹۲۰ کیلوبازی، مسبب ناشنوایی در برخی جوامع هستند (۱۰-۱۲). این حذف‌ها ممکن است بیش از ۱۰٪ آلل‌های DFNB1 را شامل شوند (۱۳). روش‌های مختلفی برای شناسایی این حذف‌ها به کار گرفته شده است. ما در این پژوهش، از روش تکنیک تکثیر چندگانه مبتنی بر لیگاسیون پروب یا MLPA برای شناسایی حذف‌های ژنی در ناشنوایان استفاده کردیم. این روش، درواقع نوعی واکنش چندگانه PCR می‌باشد که برای تشخیص تعداد غیرطبیعی نسخه‌های ژنی بطور همزمان و تا تعداد ۴۸ ناحیه در سطح DNA و یا RNA استفاده می‌گردد.

مواد و روشها

تحقیق به روش توصیفی انجام گرفت. از خانواده‌های مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی کوثر که تنها یکی از جهش‌های آنها در ژن GJB2 شناسایی شده بود، برای آزمایشات ژنتیک دعوت شد. پس از مشاوره ژنتیک، آزمایشات Genopro2007 (version2.0.1.6)، خانواده‌های مورد نظر گزینش شدند. در نهایت، ۸ خانواده که تنها یک آلل جهش یافته در ژن GJB2 پیدا داشتند، برای انجام آزمایش MLPA انتخاب شدند. اطلاعات مربوط به آزمایش و مزایا و خطرات آن به خانواده‌ها گوشزد شد. در مورد اختیاری بودن شرکت در این پژوهش پژوهشی نیز بحث گردید. خانواده‌هایی که می‌خواستند در این پژوهش شرکت کنند، رضایت‌نامه را پس از خواندن و کسب آگاهی لازم امضاء کردند. سپس از همه افراد خانواده‌ها ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر خون گرفته و به لوله‌های EDTA منقل شد.



شکل ۱- محل حذف‌های ژنی بر روی کروموزوم ۱۳

هتروزیگوت مرکب بیماری ایجاد کند، وجود دارد. همچنان، در دو مطالعه‌ای که در جمعیت‌های ترک و کرد در کشور صورت گرفته، جهش GJB6-D13S1830 در هیچ یک از افراد هتروزیگوت برای جهش GJB2 مشاهده نشده است (۱۸-۱۵) که با یافته‌های ما سازگاری دارد. جهش GJB6-D13S1830 که شامل حذف ۳۴۲ kb از ژن GJB6 است، به صورت هموزیگوت و مستقل یا به صورت هتروزیگوت با جهش‌های ژن GJB2 در کشورهای اسپانیا، فرانسه، انگلیس، اسرائیل و برباد با فراوانی زیاد و در جمعیت آمریکا، بلژیک و استرالیا با فراوانی کمتر مشاهده شده است. این جهش در کشورهایی مثل چین (۱۹) و ترکیه (۲۰) مشاهده نشده است. جهش GJB6-D13S1830 به عنوان دومین عامل ناشنوایی ارثی غیرسندرومی اتوزوومی مغلوب بعد از جهش 35delG در ژن GJB2 در جمعیت اسپانیا مطرح شده است. این جهش در ۶۷٪ مواردی که جهش در ژن GJB2 را به صورت هتروزیگوت دارند، مشاهده شده است (۹). به نظر می‌رسد توارث دوژنی GJB2 و GJB6 در ایجاد ناشنوایی به این دلیل است که این دو ژن با یکدیگر در ساختمان گوش داخلی بیان می‌شوند و از نظر توالی آمنیواسیدی ۷۷٪ با یکدیگر شباهت دارند (۴، ۲۱).

در جمعیت قفقازی ۵۰٪ موارد ناشنوایی به علت جهش‌های ژن GJB2 در کشورهای اسپانیا و ایتالیا این رقم ۷۹٪ گزارش شده است (۴، ۵) در حالی که جهش‌های این ژن تنها در ۱۴٪ تا ۲۰٪ از ناشنوایان کشور یافت شده است (۶-۸). تاکنون، حدود ۵۵٪ از یکصد لکوس مختلف به عنوان عامل ناشنوایی غیرسندرومی شناسایی شده است؛ فراوانی جهش در این ژن‌ها در قومیت‌های مختلف، متفاوت است.

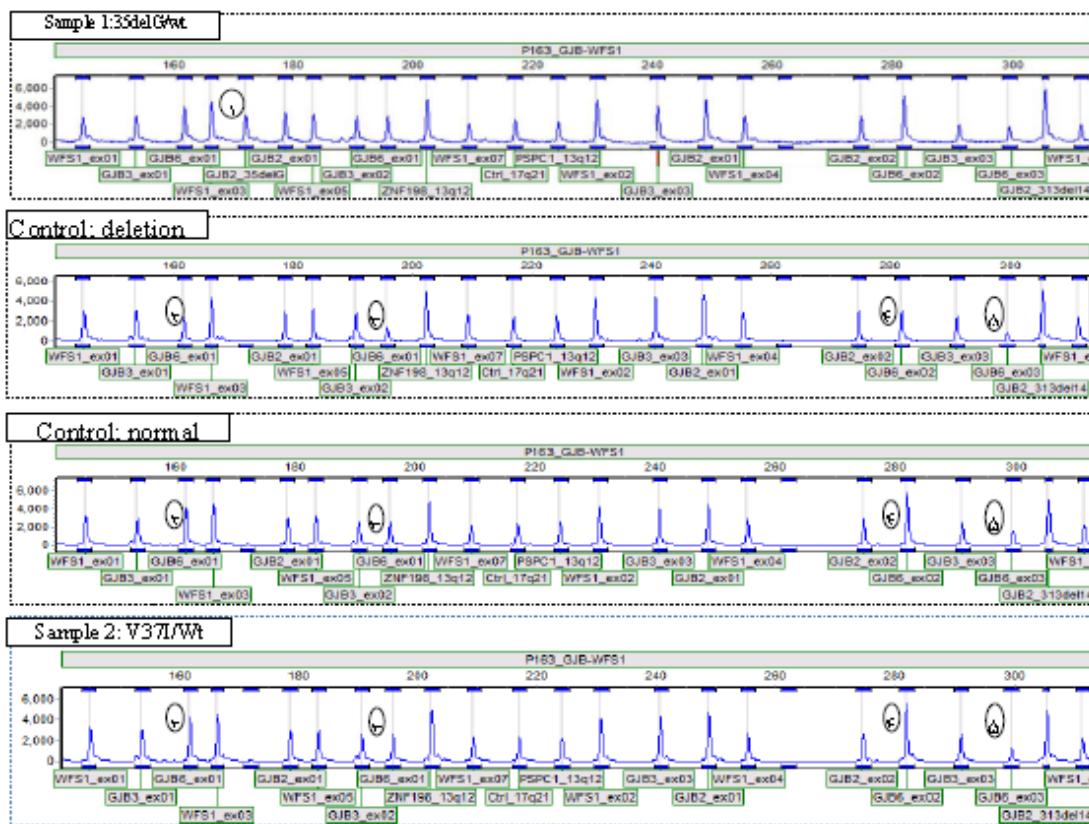
از روش MLPA برای شناسایی حذف‌ها و مضاعف شدگی‌های ژنی استفاده شده است؛ اگرچه در بیشتر بیماری‌های ژنتیکی، حذف‌ها و یا دو برابر شدن یک ناحیه و بطور کل تغییرات وسیع در سطح ژنومی تنها ۱۰٪ از جهش‌ها را تشکیل می‌دهند اما در برخی این مقدار به ۳۰٪ یا بالاتر هم می‌رسد. لذا

برای تعیین تعداد نسخه هر فرد، یافته‌ها با کنترل‌های نرمال، هموزیگوت و هتروزیگوت مقایسه شدند. تعداد نسخه‌ها بر اساس نسبت پیک‌ها (مساحت زیر منحنی نمونه/مساحت کل نمونه‌ها) می‌گردد. عدد صفر نشانه هیچ نسخه یا حذف هetrozیگوتی، <۰٪ نشانه‌دهنده یک نسخه یا حذف هetrozیگوتی، بین ۰٪ < N < ۱/۳ نشانه وجود دو نسخه و مقادیر بیشتر از ۱/۳ نشان‌دهنده افزایش نسخه ژنی می‌باشد. لازم به یادآوری است که جهش‌های ژن GJB6 تاکنون در ایران گزارش نشده است؛ بنابراین، ما نمونه کنترل‌های حذفی در داخل کشور پیدا نکردیم. برای این منظور، مکاتباتی با دکتر Castillo از دانشگاه مادرید (که برای نخستین بار Feldmann جهش‌های حذفی را گزارش کرده بود) و دکتر (مرکز رفرازنس بیماری‌های ژنتیکی در پاریس فرانسه) انجام del(GJB6-D13S1830) و del(GJB6-D13S1854) را برای ما ارسال کردند. محل این حذف‌ها بر روی کروموزوم ۱۳ در شکل ۱ نشان داده شده است.

با آنالیز چشمی می‌توان حذف‌ها و دوبرابرشده‌گی‌ها را پیدا کرد. شکل ۲ خروجی نرم افزار GeneMarkerV1.85 است که منحنی‌های مربوط به نمونه‌های کنترل و مورد آزمایش (هتروزیگوت‌ها) را نشان می‌دهد. نمونه ۱ که هتروزیگوت 35delG جهش ۳۵delG بود منحنی این جهش در محل شماره ۱ دیده می‌شود. شماره‌های ۲ تا ۵ جایگاه‌های تکثیر پروب‌های GJB6 را نشان می‌دهند این‌ها منحنی‌هایی در نمونه کنترل حذف کوچکتر هستند. در هیچ یک از بیماران هتروزیگوت، حذف‌های گزارش شده در ژن GJB6 وجود نداشت.

بحث

در هیچ یک از بیماران هتروزیگوت در این پژوهش، حذف‌های گزارش شده در ژن GJB6 وجود نداشت. لذا احتمال اینکه در کشور ما ژن GJB2 با ژن دیگری غیر از GJB6 به صورت



شکل ۲- الگوی الکتروفورز مؤینه تعدادی از نمونه هایی که در این پژوهش بررسی شدند. نمونه ۱ که هتروزیگوت جهش 35delG بود منحنی این جهش در محل شماره ۱ دیده می شود. شماره های ۲ تا ۵ جایگاه های تکثیر پروب های GJB6 را نشان می دهند این منحنی ها در نمونه کنترل حذف کوچکتر هستند.

نخست، DNA در شرایط گرمائی DNA و اسرشته می شود. پس از یک شوک حرارتی اولیه جهت باز شدن رشته ها از هم، مخلوط DNA و پروب ها به مدت یک شب در شرایط دمائی مناسب برای هیبرید پروب ها با توالی مکمل خود در روی رشته DNA قرار می گیرند. در انتهای ۵ هر یک از پروب ها توالی مکمل پرایمرهای مشترک لازم برای انجام PCR اضافه گردیده است. این پروب ها در مرحله هیبرید در کنار هم به توالی هدف در روی الگو جفت شده و در صورتی که الگو طبیعی و جفت شدن کامل باشد توسط آنزیم لیگاز به هم چسبانده می شوند. تنها آن گروه از رشته های پروب که در کنار هم جفت شده و بهم متصل شده باشند در طی واکنش PCR، آمادگی تکثیر شدن دارند. قطعات تکثیر شده با استفاده از تکنیک الکتروفورز بر روی ژل و یا روش اتوماتیک بر اساس تکنولوژی لوله های مؤین قابل بررسی است. نتیجه حاصل در روش اتوماتیک مجموعه ای از منحنی هاست که هر منحنی بیانگر وجود یا عدم وجود و نیز تعداد نسخه هر قطعه خواهد بود که در قیاس با نمونه طبیعی کنترل آنالیز می گردد. اگر

همراه کردن این روش در تشخیص بالینی می تواند قدرت تشخیصی را تا حد زیادی افزایش دهد (۱۴). در واکنش MLPA برخلاف PCR قطعه ژنی هدف تکثیر نمی گردد بلکه پروب های مکمل طراحی شده پس از هیبرید شدن به قطعه هدف و چسبیدن آنژیمی به هم تکثیر می گردد. به کمک یک جفت پرایمیر نشاندار مشترک برای تکثیر همه قطعات استفاده می گردد. قطعات ناشی از تکثیر پروب های جفت متصل شده به هم بین ۱۳۰ تا ۴۸۰ نوکلوتید طول دارند که توسط تکنیک الکتروفورز در لوله های موینه بررسی می شوند. نتیجه، منحنی هایی خواهد بود که نسبت ارتفاع و سطح زیرین منحنی ها در قیاس با منحنی های کنترل بیانگر تعداد نسخه های غیر طبیعی الگوهای تکثیر شده است. واکنش MLPA قابل تقسیم به پنج مرحله است که شامل: ۱- واسرشته کردن DNA و واکنش هیبریداسیون بین رشته های DNA و مخلوط پروب ها - ۲- واکنش چسبیدن به وسیله آنژیم لیگاز - ۳- انجام واکنش PCR با پرایمرهای نشاندار - ۴- جداسازی قطعات با روش الکتروفورز و - ۵- آنالیز یافته ها می باشد.

الگوی وراثتی ARNSHL داشتند احتمال وراثت دو ژنی افزایش می‌یابد. به این دلیل که هریک از این چهش‌ها نوع توارثی اتوزومی مغلوب دارند پس به تنها یک سبب ناشنوایی حسی-عصبی غیر سندرومی در فرد نمی‌شوند. البته، تا شناسایی چهش دوم در این افراد نمی‌توان آنها را در دسته DFNB1 قرار داد.

قدرتانی و تشکر

با تشکر از خانواده‌های محترمی که در این پژوهش شرکت کردند. همچنین از زحمات همکاران محترم در آزمایشگاه دکتر زینلی تشکر و قدردانی می‌نماییم.

پروب‌ها به توالی هدف نجسبند واکنش چسباندن آنزیمی صورت نپذیرفته و در واکنش PCR، پروب مربوط به ناحیه مذکور تکثیر نخواهد شد.

در حدود بیست پروب در کیت MLPA ناحیه ژن GJB6 و پیرامون آن را پوشش می‌دهد. یافته‌های MLPA هیچ چهش حذفی را نشان نداد. افرون بر این، نواحی مختلفی از اگزون ژن های GJB3 و WFS1 نیز بواسیله این کیت بررسی شد. نبود هرگونه حذف و دو برابر شدگی در این ژن‌ها بازهم دامنه پاسخ به این پوشش را محدودتر می‌سازد که چه تعداد ژن در ناشنوایی ایران درگیر هستند.

از آنجایی که چهش‌های ژن GJB6 در هیچ‌کدام از این خانواده‌ها یافت نگردید و با توجه به اینکه تمام این خانواده‌ها

REFERENCES

1. Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med* 2006; 354:2151-64.
2. Tekin M, Arnos KS, Pandya A. Advances in hereditary deafness. *Lancet* 2001;358:1082-90.
3. Saadat M, Ansari-Lari M, Farhud DD. Consanguineous marriage in Iran. *Ann Hum Biol* 2004;31: 263-69.
4. Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox SA, Lench NJ, Allen-Powell DR, et al. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* 1997;6:2173-77.
5. Marlin S, Feldmann D, Blons H, Louondon N. GJB2 and GJB6 mutations. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;131: 481-86.
6. Hashemzadeh Chaleshtori M, Farhud DD, Patton MA. Familial and sporadic GJB2-related deafness in Iran: review of gene mutations. *Iranian J Publ Health* 2007;36:1-14.
7. Najmabadi H, Nishimura C, Kahrizi K, Riazalhosseini Y, Malekpour M, Daneshi A, et al. GJB2 mutations: passage through Iran. *Am J Med Genet A* 2005;133A:132-37.
8. Mahdieu N, Rabbani B, Wiley S, Akbari MT, Zeinali S. Genetic causes of nonsyndromic hearing loss in Iran in comparison with other populations. *J Hum Genet* 2010;55:639-48.
9. del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Tellería D, et al. *N Engl J Med* 2002;346:243-49.
10. del Castillo FJ, Rodríguez-Ballesteros M, Alvarez A, Hutchin T, Leonardi E, de Oliveira CA, et al. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13S1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *J Med Genet* 2005;42:588-94.
11. Pallares-Ruiz N, Blanchet P, Mondain M, Claustres M, Roux AF. A large deletion including most of GJB6 in recessive non syndromic deafness: a digenic effect? *Eur J Hum Genet* 2002;10:72-76.
12. Wilch E, Azaiez H, Fisher RA, Elfenbein J, Murgia A, Birkenhäger R, et al. A novel DFNB1 deletion allele supports the existence of a distant cis-regulatory region that controls GJB2 and GJB6 expression. *Clin Genet* 2010; 78: 267-74.
13. Stevenson VA, Ito M, Milunsky JM. Connexin-30 deletion analysis in connexin-26 heterozygotes. *Genet Test* 2003;7:151-54.
14. den Dunnen JT, White SJ. MLPA and MAPH: sensitive detection of deletions and duplications. *Curr Protoc Hum Genet* 2006;7:7-14.
15. Mahdieu N, Nishimura C, Ali-Madadi K, Riazalhosseini Y, Yazdan H, Arzhangi S, et al. The frequency of GJB2 mutations and the Delta (GJB6-D13S1830) deletion as a cause of autosomal recessive non-syndromic deafness in the Kurdish population. *Clin Genet* 2004;65:506-508.
16. Bonyadi M, Esmaeili M, Abhari M, Lotfi A. Mutation Analysis of Familial GJB2-Related Deafness in Iranian Azeri Turkish Patients. *Genet Test Mol Biomarkers* 2009;13:689-92.

17. Tabatabaiefar MA, Montazer Zohour M, Shariati L, Saffari Chaleshtori J, Ashrafi K, Gholami A, et al. Mutation Analysis of GJB2 and GJB6 Genes and the Genetic Linkage Analysis of Five Common DFNB Loci in the Iranian Families with Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss. Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran 2010;21:105-12.
18. Riazalhosseini Y, Nishimura C, Kahrizi K, Shafeghati Y, Daneshi A, Jogataie MT, et al. Del(GJB6-D13S1830) is not a common cause of non-syndromic hearing loss in the Iranian population. Arch Iranian Med 2005;8:104-108.
19. Liu Y, Ke X, Qi Y, Li W, Zhu P. Connexin26 gene (GJB2): prevalence of mutations in the Chinese population. J Hum Genet 2002;47:688-90.
20. Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, Hafiz G, Ghanbari A, Baserer N, et al. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. Clin Genet 2003;64:65-69.
21. Cryns K, Van Camp G. Deafness genes and their diagnostic applications. Audiol Neurootol 2004;9:2-22.