

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، محمدتقی اکبری^۵، سیروس زینلی^{۲*}،
ناهید صفری^۶

^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 قزوین
^۴ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی تبریز
^۵ گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
^۶ مرکز تحقیقات پروتئومیکس، 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 جهش‌های 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 رسوب دهی، نمک اشباع استخراج و با کیت مخصوص واکنش MLPA استفاده شد و اگر واکنش موفقیت آمیز بود اندازه قطعات Q اندازه گیری شد.

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

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

واژگان کلیدی: ناشنوایی، GJB2، MLPA

مقدمه

که ازدواج خویشاوندی در آنها بیشتر است. میزان ازدواج فامیلی 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.

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 کشورهای بالا است

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

در این پژوهش، 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. ۷ قطعه کنترل که محصول تکثیر آن کوچکتر از ۱۲۰ نوکلئوتید است افزون بر این، ۴ قطعه DNA کمی (قطعات DQ یا DNA (Quantity fragment (Q-fragment) (۶۴-۷۰-۷۶-۸۲ نوکلئوتیدی) و سه قطعه کنترل واسرشتگی DNA (قطعات D) در نواحی ۸۸-۹۲-۹۶ نوکلئوتیدی در مخلوط پروب کیت وجود دارد. قطعات Q وابسته به لیگاسیون نبوده و در مقادیر اندک وجود دارند؛ اگر واکنش MLPA موفقیت آمیز باشد اندازه قطعات Q کاهش می‌یابد. با افزایش مقدار DNA الگو، منحنی قطعات Q کوتاه می‌شود. از سوی دیگر، قطعات D درست مانند پروب‌های 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، GJB6، ZNF198، PSC1، 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 ژنوتیپ‌های مربوط به خانواده‌های مورد مطالعه در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- ژنوتیپ‌های خانواده‌های بررسی شده در این پژوهش

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

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 کدکننده پروتئین کانکسین ۳۰، del(GJB6-D13S1830)، del(GJB6-D13S1854)، del(chr13:19,837,344-19,968,698) و ۹۲۰ کیلوبازی، مسبب ناشنوایی در برخی جوامع هستند (۱۲-۱۰). 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، در واقع 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 بالینی و رسم شجره نامه توسط نرم‌افزار 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 پروژه 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 منتقل شد.



شکل ۱- محل حذف‌های ژنی بر روی کروموزوم ۱۳

هتروزیگوت مرکب بیماری ایجاد کند، وجود دارد. همچنین، در دو مطالعه‌ای که در جمعیت‌های ترک و کرد در کشور صورت گرفته، جهش $\Delta(GJB6-D13S1830)$ 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 برزیل با فراوانی زیاد و در جمعیت آمریکا، بلژیک و استرالیا با فراوانی کمتری مشاهده شده است. این جهش در کشورهای مثل چین (۱۹) و ترکیه (۲۰) مشاهده نشده است. جهش $\Delta(GJB6-D13S1830)$ به عنوان دومین عامل ناشنوایی ارثی غیرسندرومی اتوزومی 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 $GJB6$ و $GJB2$ در ایجاد ناشنوایی به این دلیل است که این دو ژن با یکدیگر در ساختمان گوش داخلی بیان می‌شوند و از نظر توالی آمینواسیدی ۷۷٪ با یکدیگر شباهت دارند (۲۱، ۴).

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 حالی که جهش‌های این ژن تنها در ۱۴ تا ۲۰٪ از ناشنوایان کشور یافت شده است (۸-۶). تاکنون، حدود ۵۵ ژن و بیش از یکصد لکوس مختلف به عنوان عامل ناشنوایی غیرسندرومی شناسایی شده است؛ فراوانی جهش در این ژن‌ها در قومیت‌های مختلف، متفاوت است.

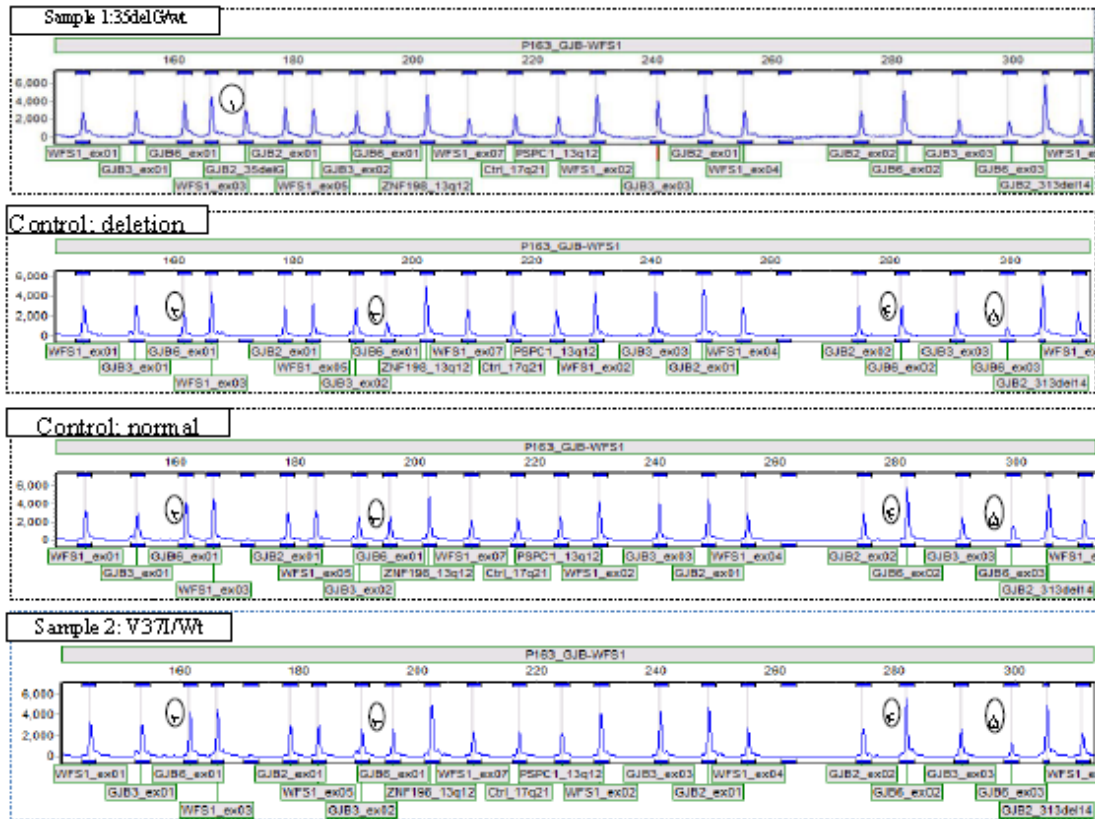
از روش MLPA برای شناسایی حذف‌ها و مضاعف شدگی‌های ژنی استفاده شده است؛ اگرچه در بیشتر بیماری‌های ژنتیکی، حذف‌ها و یا دو برابر شدن یک ناحیه و بطور کل تغییرات وسیع در سطح ژنومی تنها ۱۰٪ انواع جهش‌ها را تشکیل می‌دهند اما در برخی این مقدار به ۳۰٪ یا بالاتر هم می‌رسد. لذا

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 هموزیگوتی، <0.7 نشانه‌دهنده یک نسخه یا حذف هتروزیگوتی، بین $1/3 < N < 0.7$ نشانه وجود دو نسخه و مقادیر بیشتر از $1/3$ 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 del Castillo از دانشگاه مادرید (که برای نخستین بار جهش‌های حذفی را گزارش کرده بود) و دکتر Feldmann (مرکز رفانس بیماری‌های ژنتیکی در پاریس فرانسه) انجام شد. این اساتید نمونه‌های کنترل حذف‌های $\Delta(GJB6-D13S1830)$ و $\Delta(GJB6-D13S1854)$ 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 دوبرابری‌ها 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 جهش $35delG$ 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 موئینه تعدادی از نمونه‌هایی که در این پژوهش بررسی شدند. نمونه ۱ که هتروزایگوت جهش 35delG بود منحنی این جهش در محل شماره ۱ دیده می‌شود. شماره‌های ۲ تا ۵ جایگاه‌های تکثیر پروب‌های GJB6 را نشان می‌دهند این منحنی‌ها در نمونه کنترل حذف کوچکتر هستند.

نخست، DNA در شرایط گرمایی DNA واسرشته می‌شود. پس از یک شوک حرارتی اولیه جهت باز شدن رشته‌ها از هم، مخلوط DNA و پروب‌ها به مدت یک شب در شرایط دمایی مناسب برای هیبرید پروب‌ها با توالی مکمل خود در روی رشته DNA قرار می‌گیرند. در انتهای ۵' هر یک از پروب‌ها توالی مکمل پرایمرهای مشترک لازم برای انجام PCR اضافه گردیده است. این پروب‌ها 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 می‌شوند. تنها آن گروه از رشته‌های پروب که در کنار هم جفت شده و بهم متصل شده باشند در طی واکنش PCR، آمادگی تکثیر شدن دارند. قطعات تکثیرشده با استفاده از تکنیک الکتروفورز بر روی ژل و یا روش اتوماتیک بر اساس تکنولوژی لوله‌های موئین قابل بررسی است. نتیجه حاصل در روش اتوماتیک مجموعه‌ای از منحنی‌هاست که هر منحنی بیانگر وجود یا عدم وجود و نیز تعداد نسخه هر قطعه خواهد بود که در قیاس با نمونه طبیعی کنترل آنالیز می‌گردد. اگر

همراه کردن این روش در تشخیص بالینی می‌تواند قدرت تشخیصی را تا حد زیادی افزایش دهد (۱۴). در واکنش MLPA برخلاف PCR قطعه ژنی هدف تکثیر نمی‌گردد بلکه پروب‌های مکمل طراحی شده پس از هیبرید شدن به قطعه هدف و چسبیدن آنزیمی به هم تکثیر می‌گردند. به کمک یک جفت پرایمر نشاندار مشترک برای تکثیر همه قطعات استفاده می‌گردد. قطعات ناشی از تکثیر پروب‌های جفت متصل شده به هم بین ۱۳۰ تا ۴۸۰ نوکلئوتید طول دارند که توسط تکنیک الکتروفورز در لوله‌های موئینه بررسی می‌شوند. نتیجه، منحنی‌هایی خواهد بود که نسبت ارتفاع و سطح زیرین منحنی‌ها در قیاس با منحنی‌های کنترل بیانگر تعداد نسخه‌های غیر طبیعی الگوهای تکثیر شده است. واکنش MLPA قابل تقسیم به پنج مرحله است که شامل: ۱- واسرشته کردن DNA و واکنش هیبریداسیون بین رشته‌های DNA و مخلوط پروب‌ها ۲- واکنش چسبیدن به وسیله آنزیم لیگاز ۳- انجام واکنش PCR با پرایمرهای نشاندار ۴- جداسازی قطعات با روش الکتروفورز و ۵- آنالیز یافته‌ها می‌باشد.

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

قدردانی 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.

پروپ‌ها به توالی هدف نچسبند و اکنش چسباندن آنزیمی صورت نپذیرفته و در واکنش PCR، پروپ مربوط به ناحیه مذکور تکثیر نخواهد شد.

در حدود بیست پروپ در کیت MLPA ناحیه ژن GJB6 و پیرامون آن را پوشش می‌دهد. یافته‌های MLPA هیچ جهش حذفی را نشان نداد. افزون بر این، نواحی مختلفی از اگزون‌های ژن‌های GJB3 و WFS1 نیز بوسیله این کیت بررسی شد. نبود هرگونه حذف و دو برابردگی در این ژن‌ها بازمه دامنه پاسخ به این پرسش را محدودتر می‌سازد که چه تعداد ژن در ناشنوایی ایران درگیر هستند.

از آنجایی که جهش‌های 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, Loundon 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. Mahdih N, Rabbani B, Wiley S, Akabari 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. Mahdih N, Nishimura C, Ali-Madadi K, Riazalhosseini Y, Yazdan H, Arzhanghi 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.