Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۲، شماره ۲/ تابستان ۱۳۸۹/ ۷۵-۶۵

بررسی جهش های *کانکسین ۲۶* (*GJB2*) و *کانکسین ۳۰* (*GJB6*) و پیوستگی ژنتیکی سه لوکوس شایع DFNB در خانواده های ایرانی مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی

محمد امین طباطبایی فر*، لاله شریعتی**، مصطفی منتظر ظهور***، کوروش اشرفی†، جواد صفاری چالشتری††، دکتر رضا قاسمی خواه†††، عفت فرخی††، دکتر محمدرضا نوری دلویی●، دکتر مرتضی هاشم زاده چالشتری●●[1]

*دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک پزشکی – دانشگاه علوم پزشکی تهران، **کارشناس ارشد میکروب شناسی-مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ***دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک پزشکی- دانشگاه تربیت مدرس، †کارشناس ارشد میکروب شناسی- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ††کارشناس ارشد بیوشیمی- مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، †††دکتری تخصصی انگل شناسی پزشکی – دانشگاه علوم پزشکی اراک، ● استاد گروه ژنتیک پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی تهران، ●● استاد ژنتیک انسانی- مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد.

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۲/۱۶ تاریخ تایید: ۸۹/۳/۱۰

چکیده:

زمینه و هدف: **بروز ناشنوایی پیش از تکلم در نوزادان یک در هزار است که بیش از ۶۰٪ موارد ارثی است. تقریبا ۸۰٪ موارد ناشنوایی غیر سندرمی (NSHL) می باشد. ناشنوایی غیر سندرمی بسیار هتروژن بوده و بیش از ۱۰۰ لوکوس در آن شناخته شده که متداول ترین نوع آن مغلوب اتوزومی (ARNSHL) است. این مطالعه با هدف بررسی جهش های ژنی روی *کانکسین ۲۶* (*GJB2*) و *کانکسین ۳۰* (*GJB6*) و پیوستگی ژنتیکی سه لوکوس شایع ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی (DFNB) در خانواده های ایرانی انجام شد.**

روش بررسی: **این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی بر روی ۳۶ شجره بزرگ از ۷ استان انجام گردید. همه خانواده ها از نظر وجود جهش ها در ژن های *GJB2* و *GJB6* (del D13S1830 و del D13S1854) به ترتیب با تعیین توالی و Multiplex PCR بررسی گردیدند. سپس خانواده های منفی برای جهش های فوق الذکر، برای پیوستگی به ۳ لوکوس DFNB3 (*MYO7A*)، DFNB4 (*SLC26A4*) و DFNB7/11 (*TMC1*) با استفاده از مارکرهای STR (Short tandem repeats) با PCR و ژل پلی اکریل آمید بررسی شدند.**

یافته ها: **شش خانواده (۱۶/۶٪) دارای جهش های *GJB2* بودند. هیچ یک از حذف های *GJB6* یافت نشد. مجموعاً ۳ خانواده (۱۰٪) به DFNB4 و ۱ خانواده (۳/۲۲٪) به DFNB7/11 پیوستگی نشان دادند.**

نتیجه گیری: **بر اساس نتایج DFNB1 (*GJB2*) و DFNB4 علل اصلی ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب در بیماران مورد مطالعه بودند و ظاهراً، حذف های GJB6 در جمعیت ایران حضور ندارند.**

واژه های کلیدی: کانکسین ۲۶، کانکسین ۳۰، ناشنوایی، مطالعه پیوستگی.

مقدمه:

ناشنوایی رایج ترین نقص حسی در انسان است و ۰/۰۰۱ نوزادان دارای ناشنوایی پیش از تکلم (pre-lingual) هستند. همچنین درجاتی از ناشنوایی تعامل طبیعی را در ۴ درصد افراد زیر ۴۵ سال و ۱۰ درصد افراد ۶۵ سال و بالاتر دچار مشکل می کند (۳-۱). ناشنوایی دارای طیف وسیعی از تظاهرات بالینی شامل: مادرزادی یا دیررس، هدایتی یا حسی-عصبی، سندرمی یا غیرسندرومی می باشد. سبب شناسی ناشنوایی، چند عاملی است و شامل دلایل ژنتیکی، محیطی و گاه هر دو می باشد که بیش از ۶۰

[1] ***نویسنده مسئول:*** شهرکرد- رحمتیه –دانشکده پزشکی- مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی-تلفن: ۰۳۸۱-۳۳۴۶۶۹۲، E-mail:mchalesh@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

درصد موارد ژنتیکی است. شایان ذکر است که با بهبود سطح بهداشتی جوامع، سهم ژنتیک همچنان در حال افزایش است (۴). تقریباً ۸۰ درصد موارد ناشنوایی ارثی، غیر سندرمی (Non-syndromic hearing loss = NSHL) است که الگوی اصلی وراثت آن مغلوب اتوزومی است. فنوتیپ بیماری در موارد مغلوب به مراتب شدیدتر و معمولاً دارای بروز پیش از تکلم است (۴،۲،۱). تخمین ها حاکی از آن است که ممکن است تا ۱ درصد ژن های انسان به نحوی در فرآیند شنوایی دخیل باشند. به طور مشخص، تاکنون بیش از ۱۰۰ لوکوس در NSHL شناخته شده است. بنابراین می‌توان گفت ناشنوایی از جمله هتروژن‌ترین صفات ژنتیکی شناخته شده است (۵،۳). ناشنوایی غیرسندرمی با وراثت مغلوب (ARNSHL) حدود ۷۰ لوکوس شناخته شده دارد (۶).

بنابراین، ناشنوایی طیف گسترده ای از علل ژنتیکی و محیطی و ناشناخته دارد که نوع و سهم هر یک از علل در اقوام و جمعیت های مختلف متفاوت است. در کشور ما مطالعات مشابه نسبتاً کمی بر روی ARNSHL انجام گرفته و بیشتر پـــژوهش ها به یک لوکوس خاص و به طور مشخص DFNB1 که ژن *GJB2* (*CX26*) را در بـــر دارد، معطوف بوده است. طبیعت فوق العاده هتـــــروژن این بیماری به همراه تنوع جمعیتی کشورمان، لـــزوم مطالعه سیستماتیک تری را بر روی این بیمـــــاری پیش روی پژوهشگران قرار می دهد.

بر اساس نرخ بالای ازدواج خویشاوندی (۳۸/۶ درصد) در ایران، می توان پیش بینی نمود که در ایران نسبت به جمعیت های اروپا و آمریکای شمالی، ARNSHL نسبت بالاتری را در میان ناشنوایی های ژنتیکی غیر سندرومیک دارا باشد (۷). بنابراین، مطالعه ژنتیکی لوکوس‌هـــای اصلی درگیر در ARNSHL به منظور روشن سازی نقش هر یک از این لوکوس ها در جمعیت کشورمان ضـــروری به نظر می رسد. نتایج این گونه پژوهش ها بی تردید می تواند به نحو شایانی به غربال گری ناشنوایی در جمعیت ایرانی و به تبع آن مشاوره ژنتیک اصولی و همچنین تشخیص پیش از لانه گزینی (PGD) و تداخل درمانی آینده به منظور جلوگیری از آن کمک کند.

اساس مطالعه پیوستگی ژنتیکی، نقشه کشی اتوزیگوتی (Autozygous mapping) است که اولین بار توسط Lander و Botstein پیشنهاد گردید و فن انتخابی برای مطالعـــه ژنتیک بیماری های مغلوب اتوزومی است (۸). پژوهش حاضـــر، بـــا هدف غربال گری اولیه نمونه های ناشنوا با ژن های شایع تر شامل *GJB2* (*CX26*) (MIM# 121011) و *GJB6* (*CX30*) (MIM# 604418) (حذف‌های D13S1830 و D13S1854) انجام گردید. در مرحله بعد، تجزیه و تحلیل پیوستگی به ۳ لوکوس شناخته شده ناشنوایی بر روی خانواده هایی که برای جهش ها در دو ژن مورد بررسی منفی بودند صورت گرفت. در این پژوهش، غـــربالگـــری این چند لوکوس ناشنوایی مهم به منظور روشن سازی سهم هر یک از آنها در جمعیت مورد مطالعه انجام گردید.

روش بررسی:

DNA k Y €z ÁÆ¥Y{Æ¿ Â ¼ ¿.

در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی پس از تکمیل پرسشنامه و ارزیابی های بالینی تعداد ۳۶ خانواده ARNSHL از استان های چهارمحال و بختیاری، فارس، گیلان، تهران، خوزستان، آذربایجان شرقی و کردستان جمع آوری گردیدند. پس از اخذ رضایت نامه آگاهانه از کلیه افراد سالم و بیمار شجره نامه ها، از هر فرد به میزان ۵ میلی لیتر خون در لوله های حاوی نیم مولار EDTA نمونه برداری شد. سپس DNA به روش معمول فنل-کلروفرم استخراج گردیده و غلظت DNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتـــری (UNICO 2100, USA) اندازه گیری شد (۱۰،۹).

www.SID.ir

Archive of SID

GJB2 ÉZÆ§ÆtmÂ mÊÁt•€]

از هر شجره حداقل یک بیمار برای توالی یابی ژن GJB2 بر اساس پرایمرهای زیر انتخاب شد.

F: 5' CTC CCT GTT CTG TCC TAG CT 3'
R: 5' CTC ATC CCT CTC ATG CTG TC 3'

هر میکروتیوپ PCR شامل ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (10 PM)، ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمراز (5 unit/µl)، ۱ میکرولیتر dNTP (10mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰mM)، 1µl DNA (۱۰۰ng) که با آب مقطربه حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. تکثیر DNA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (ASTEC, PC818-Japan) انجام شد. برنامه حرارتی به قرار ذیل بود: واسرشت اولیه در دمای ۹۵° C به مدت ۳ دقیقه، ۳۱ سیکل شامل ۹۴ °C جهت واسرشت به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۹° C جهت اتصال پرایمرها به DNA هدف به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲° C جهت گسترش رشته های مکمل به مدت ۴۵ ثانیه و سرانجام گسترش نهایی در ۷۲° C به مدت ۱۰ دقیقه. پس از PCR، الکتروفورز بر روی ژل ۸-۶ درصد پلی اکریل آمید با ولتاژ۲۰۰ ولت و شدت جریان ۴۰ میلی آمپر به مدت ۲ ساعت انجام گردید و سپس با نیترات نقره رنگ آمیزی و باندها رؤیت شد (۱۱) تا وجود باند با اندازه 806bp تایید گردد. سپس توالی یابی محصولات PCR به روش سانجر انجام گردید (شرکت ژن فن آوران، ایران).

(CX30) GJB6 •{µÁYÆÊ¥ÆZ¥Å~uÊ‡•€]:

حذف های D13S1830 و D13S1854 بر روی حداقل یک بیمار از هر خانواده بررسی شدند. در PCR از کنترل مثبت و منفی استفاده گردید. در این روش از سه جفت پرایمر بصورت همزمان در واکنش(Multiplex PCR) PCR استفاده شد (۱۲). توالی پرایمرهای مورد استفاده به شرح ذیل می باشد (۱۴،۱۳):

del(*GJB6-D13S1830*):
F1: 5'CACCATGCGTAGCCTTAACCATTTT-3'
R1: 5'-TTTAGGGCATGATTGGGGTGATTT-3'
del(*GJB6-D13S1854*):
F2: 5'-CAGCGGCTACCCTAGTTGTGGT-3'
R2: 5'-TCATAGTGAAGAACTCGATGCTGTTT-3'
GJB6 (exon 1):
F3: 5'-CATGAAGAGGGCGTACAAGTTAGAA-3'
R3: 5'-CGTCTTTGGGGGTGTTGCTT-3'

هر میکروتیوپ PCR شامل ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (10 PM)، ۰/۱ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمراز (5 unit/µl)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (10mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۱ میکرولیتر MgCl2 (۵۰mM)، 1µl DNA (۱۰۰ng) که با آب مقطربه حجم نهایی ۲۵µl رسید. بعد از تکثیر قطعات مورد نظر توسط روش PCR، نمونه های مورد نظر بر روی ژل پلی اکریل آمید (Merk, Germany) ۸ درصد با جریان ۵۰mA به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شد و سپس با نیترات نقره رنگ آمیزی و باندها رؤیت گردید (۱۱).

STR ÉZÆ§Æ//Ç»€///¿ZŒÆ¿Â ¢/¾ÌÌ e

, DFNB3 Ä]•Â]/€¾(Short tandem repeats)

:DFNB7/11 ،DFNB4

نمونه های منفی برای جهش های ژن CX26 و حذف های CX30 از طریق تجزیه و تحلیل پیوستگی مورد تحلیل قرار گرفتند. جهت بررسی لوکوس ها، حداقل از چهار مارکر ژنتیکی مختلف برای هر لوکوس استفاده گردید. در صورتی که برای هر یک از خانواده های مورد مطالعه، نشانگرها بی معنی (Uninformative) بودند، از دیگر نشانگرهای موجود در منطقه ژنی مربوطه استفاده گردید. نزدیکی به ژن مورد نظر (حالت ایده آل نشانگر درون ژنی است)، وجود محدوده تغییرات در طول محصول PCR و دارا بودن کمترین حد باندهای ثانویه (سایه ای) یا stutter band و از همه مهمتر هتروزیگوت بودن پدر و مادر برای یک نشانگر معین از جمله معیارهای مهم انتخاب آن در مطالعات پیوستگی ژنتیکی است. برنامه های دمایی بصورت تاچ داون (Touch Down) بود به این صورت که در چند

www.SID.ir

Archive of SID

سیکل شروع PCR دمای Annealing از چند درجه بالاتر شروع می شود تا پرایمرها اختصاصی تر به محل مورد نظر در ژن اتصال پیدا کنند و سپس PCR در دمای واقعی Annealing ادامه می یابد. انتخاب نشانگرهای هر لوکوس بر اساس جستجو در NCBI MapViewer و انتخاب پرایمرها مطابق NCBI Uni STS بود. برنامه حرارتی در بیشتر موارد (با پاره‌ای تغییرات برای تعدادی از نشانگرها) به صورت ذیل بود: حرارت ۹۵ºC به مدت ۳ دقیقه جهت واسرشت اولیه، شش سیکل تاچ داون شامل ۹۴º C جهت واسرشت به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۸º C جهت اتصال پرایمرها به DNA در سیکل اول با کاهش یک درجه‌ای دما به ازاء هر سیکل و ۷۲º C جهت گسترش رشته های مکمل به مدت ۴۵ ثانیه، ۲۵–۲۶ سیکل شامل ۹۴º C جهت واسرشت به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۳º C جهت اتصال پرایمرها به DNA هدف به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲º C جهت گسترش رشته های مکمل به مدت ۴۵ ثانیه و سراتجام گسترش نهایی در ۷۲º C به مدت ۱۰ دقیقه.

هر میکروتیوپ PCR شامل ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (10 PM)، ۰/۱ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمراز (5 unit/µl)، ۱ میکرولیتر dNTP (10mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۳ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰mM)، ۱ میکرولیتر DNA (۱۰۰ng) که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۵µl رسید.

بعد از تکثیر قطعات مورد نظر توسط روش PCR، نمونه های مورد نظر بر روی ژل پلی اکریل آمید (Merk, Germany) ۸–۱۲ درصد با جریان ۵۰mA به مدت ۴–۲ ساعت الکتروفورز شد و سپس با نیترات نقره رنگ آمیزی و باندها رؤیت گردید (۱۱).

Á-Link ‰ ••Ä^ ‡ Z Ê ›f ‡ ÌÌ ¡ æ ÁÄ Ë , n e

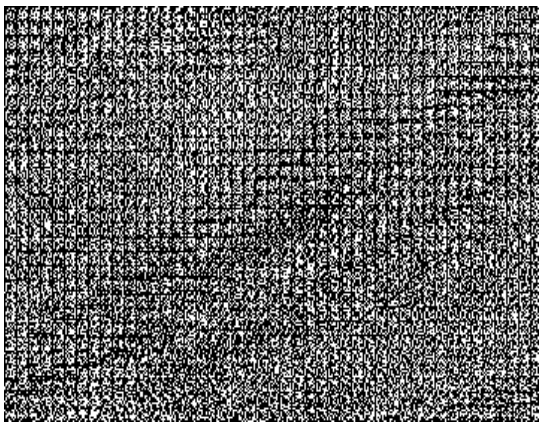
:(Log of the odds on linkage) LOD Ã € ¼ ¿

از نرم افزار ژنتیکی Easylinkage plus version 5.05 استفاده گردید (۱۵). برای محاسبه S-Link از FastSlink version 2.51 و برای محاسبه نمره LOD (LOD score) پارامتری دو نقطه ای و چند نقطه ای به ترتیب از Superlink version1.6 و Simwalk version 2.91 استفاده شد. فراوانی نوترکیبی در مرد و زن برابر در نظر گرفته شد، همچنین الگوی وراثتی مغلوب اتوزومی، نفوذ کامل، فنوکپی صفر و فراوانی آللی یک هزارم فرض گردیدند. ترسیم هاپلوتیپ (مجموعه ژنوتیپ نشانگرهای مجاور) با کمک نرم افزار Haplopainter version 029.5. (۱۶) صورت گرفت.

یافته ها:

GJB6 ÁGJB2 ÉZ Æ f { Š Æ f ‡ Â m Æ ‡ • €] Ë f ¿

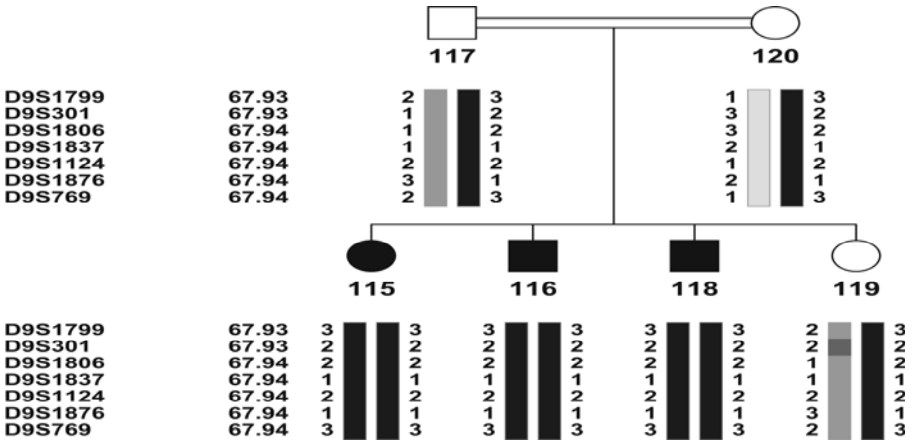
از مجموع ۳۶ شجره ARNSHL مورد مطالعه، ۶ شجره دارای جهش در ژن *CX26* بودند. در ۳۰ شجره باقیمانده، بررسی حذف در ژن *GJB6* انجام گردید. لازم به ذکر است برای افراد فاقد حذف های *GJB6* باند الکتروفورزی، در ناحیه ۳۳۳ جفت بازی مشاهده می‌شود ولی در افراد دارای جهش del(*GJB6-D13S1830*) در ناحیه ۴۶۰ و در افراد با جهش del(*GJB6-D13S1854*) در ناحیه ۵۶۴ جفت بازی مشاهده می گردد. یک نمونه کنترل هتروزیگوت با



تصویر شماره ۱: بررسی دو حذف شایع ژن کانکسین ۳۰ *GJB6* در خانواده های با ناشنوایی ارثی غیر سندرمی مغلوب (ARNSHL) **بر روی ژل** پلی **آکریل آمید** ۸٪.
۱ نشانگر، ۲–۴ نمونه های بیماران، ۵ کنترل منفی (شامل کلیه مواد واکنش PCR بدون DNA)، ۶ کنترل مثبت بصورت هتروزیگوت (del(GJB6-D13S1830)/wt)، وجود باند ۳۳۳ جفت بازی نشانه وضعیت طبیعی ژن *GJB6* است.

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر شماره ۲: هاپلوتایپ خانواده پیوسته به لوکوس و DFNB7/11

نشانگرهای D9S1837، D9S1124 و D9S1876 داخل ژنی می باشند. ترتیب نشانگرها بر اساس نقشه Marshfield است.

جهش (*GJB6-D13S1830*)del نیز در کنار نمونه ها تکثیر گردید. همه نمونه ها در ناحیه ۳۳۳ جفت بازی دارای باند الکتروفورزی بودند و بنابراین، هیـچ مـورد مثبتی مشاهده نگردید (تصویر شماره ۱).

:Ê´f‡ÂÌaŽÉjŽM%Â»ÄjMÂ]€ŒËZfj

از ۳۰ خانواده که برای لوکوس های DFNB3، DFNB4، DFNB7/11 مورد تجزیه و تحلیل پیوستگی قرار گرفتند، نتایج بررسی هاپلوتایپ ها در مجموع، ۳ خانواده به لوکوس DFNB4 و ۱ خانواده به لوکوس DFNB7/11 پیوستگی نشان دادند (تصویرهای شماره ۲ و ۳) که ارزش های S-Link و LOD دو نقطه‌ای و چند نقطه ای با این هاپلوتایپ ها مطابقت داشت (جدول شماره ۱). الگوی الکتروفورزی نشانگرهای مورد بررسی برای نمونه هایی که پیوستگی نشان دادند، به این صورت بود که در هر لوپ مورد بررسی از هر شجره، نمونه بیماران بصورت هموزیگوت و دارای یک باند بوده و با این الگو با نمونه افراد سالم متفاوت بود (تصویر شماره ۴).

جدول شماره ۱: ارزش های محاسبه شده Link- و نمره LOD بیشینه (دو نقطه ای و چند نقطه ای) برای هـر یـک از خانواده های پیوسته به دو لوکوس DFNB4 و DFNB7/11.

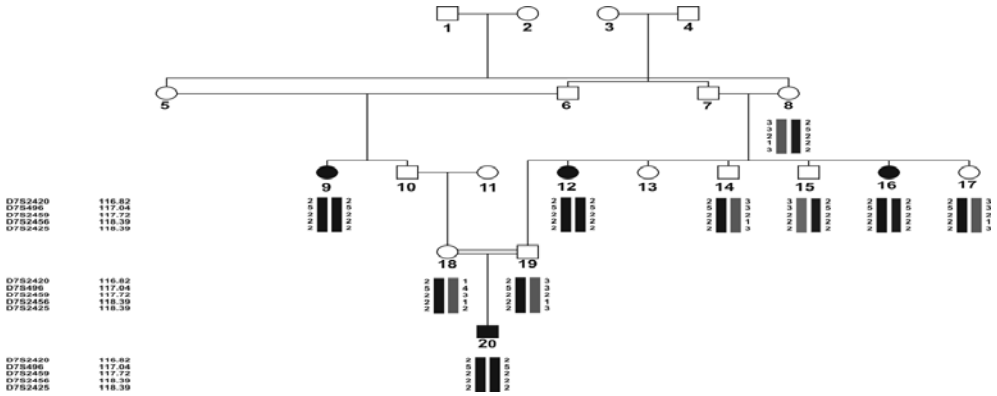
خانواده	لوکوس پیوسته	ارزش S-Link	نمره LOD بیشینه دو نقطه ای	نمره LOD بیشینه چند نقطه ای
IGHA	DFNB7/11	۱/۸	۱/٦۳	۲/۰
IJOL	DFNB4	۲/٤۲	۲/۱۱	۲/۳٦
ISH9	DFNB4	٦/۲	۳/۵	۵/۱۰
ISH17	DFNB4	۵/۲	۳/۳	٤/۰٦

LoD=Log of the odds on Linkage

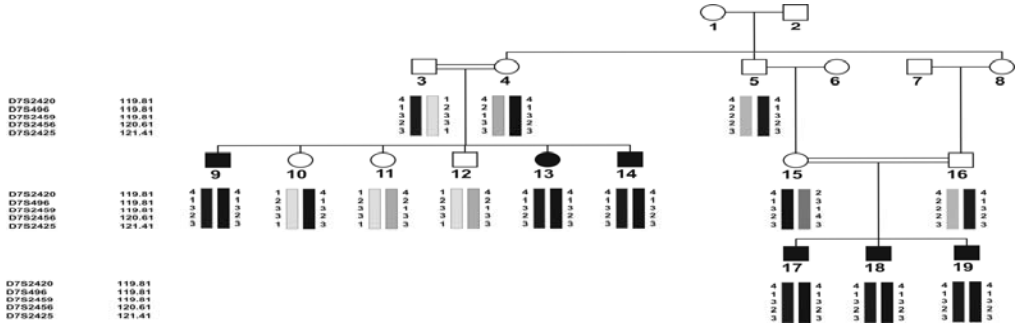
ارزش S-Link حدود نظری را که هر خانواده می تواند برای نمره LOD بیشینه نشان دهد پیش بینی می کند.

www.SID.ir

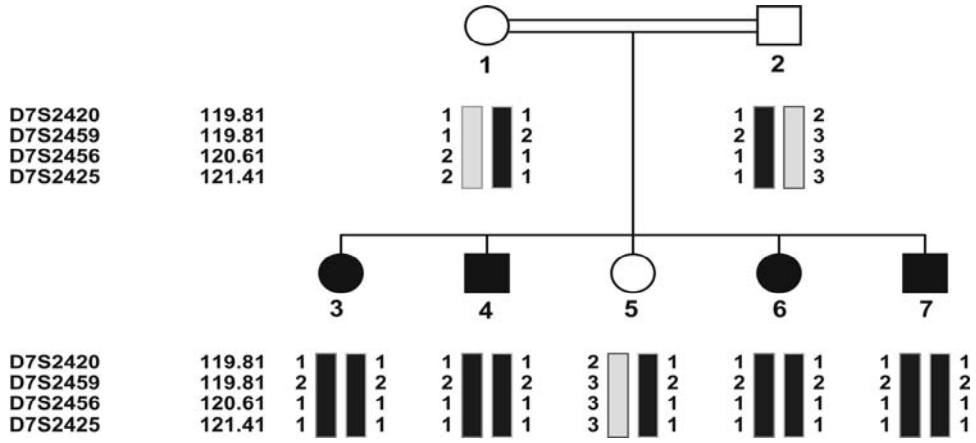
Archive of SID



الف: خانواده ISH17



ب: خانواده ISH9



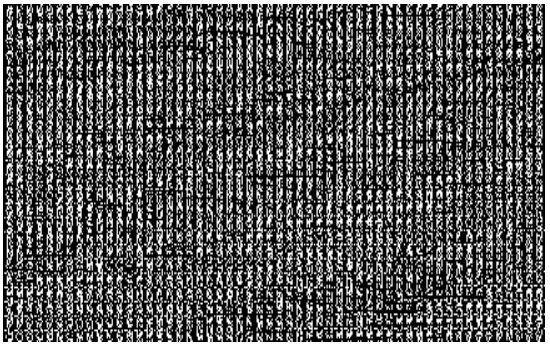
ج:خانواده IJOL

تصویر شماره ۳: هاپلوتایپ خانواده های دارای پیوستگی در لوکوس DFNB4

نشانگر D7S2459 داخل ژنی می باشند. ترتیب نشانگرها در تصویر الف بر اساس نقشه Decode و در تصاویر ب و ج بر اساس نقشه Marshfield است.

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر شماره۴: تعیین ژنوتیپ نشانگرهای STR با کمک ژل پلی آکریل آمید (۱۲٪)

باند ۱: نشانگر، باند ۲: پدر، باند ۳: مادر، باند ٦-٤: فرزندان بیمار، باند ۷: فرضسالم. همانگونه که مشاهده می گردد در سه نمونه بیمار تنها یک باند (هموزیگوس) مشاهده می گردد.

بحث:

در این مطالعه، به بررسی ۳۶ خانواده ARNSHL از استان های چهارمحال و بختیاری، فارس، گیلان، تهران، خوزستان، آذربایجان شرقی و کردستان پرداخته شد. پس از غربال گری جهش های ژن *GJB2* و دو حذف ژن *GJB6* (D13S1854 و D13S1830)، به مطالعه پیوستگی و بررسی هاپلوتیپ نشانگرهای STR در منطقه لوکوس‌های DFNB3، DFNB4، DFNB7/11 پرداخته شد. با توجه به اینکه ناشنوایی ناشی از جهش های ژن *GJB2*، علت ۱۸/۲۹ درصد ناشنوایی خانوادگی و ۱۲/۷ درصد ناشنوایی پراکنده شناخته شده است و با توجه به طبیعت فوق العاده هتروژن این بیماری و تنوع جمعیتی کشورمان، بررسی لوکوس های دیگر ناشنوایی برای جمعیت های مختلف ایران کاملاً ضروری می باشد (۱۷). با بررسی خانواده هایی که نسبت به این ژن منفی هستند، می توانیم به دیدگاه دقیق تری نسبت به دیگر ژن های درگیر در این نوع ناشنوایی در کشورمان دست یابیم.

در این مطالعه، تعداد ۶ خانواده نسبت به جهش های *GJB2* هموزیگوس بودند که بنابراین در ادامه مطالعه کنار گذارده شدند که مطابق با میزان دخالت ۱۶/۶ درصد (۱۸) و ۱۸/۲۹ درصد (۱۷) ژن *GJB2* در ایجاد ARNSHL است که این امر نشانگر هتروژنی بالای جمعیت ما است به نحوی که دیگر لوکوس ها و حتی لوکوس‌های جدید ممکن است دخیل باشند. این ژن در لوکوس DFNB1 قرار دارد و اولین لوکوس ناشنوایی است که نقشه برداری شده است و رایج ترین دلیل ARNSHL است که البته میزان دخالت آن (از ۰ تا حدود ۵۰٪)، تا حد زیادی به جمعیت وابسته است و در برخی جمعیت ها (آمریکای شمالی، مدیترانه و اغلب اروپا) تا حدود ۵۰ درصد موارد ARNSHL را شامل می شود.

CX30 (*GJB6*)، در مجاورت ژن *GJB2* بر روی لوکوس DFNB1 قرار گرفته و ایجاد ناشنوایی می کند و دو حذف شایع آن del(*GJB6-D13S1830*) و del(*GJB6-D13S1854*) می باشند: حذف ۳۴۲ کیلو بازی (*GJB6-D13S1830*) del به صورت هموزیگوت و یا به همراه جهش های ژن *GJB2* (هتروزیگوت مضاعف) بعنوان علت ناشنوایی در بسیاری از کشورها از جمله اسپانیا، فرانسه، انگلستان، برزیل، آمریکا، بلژیک و استرالیا گزارش شده است (۲۱-۱۹). در یک مطالعه مشخص شد که این حذف در جمعیت های اسپانیا، فرانسه، انگلیس و برزیل بین ۵/۹ تا ۹/۷ درصد از تمامی آلل‌های لوکوس DFNB1 را تشکیل می‌دهد (۱۹). بنابراین در مجموع، در تعدادی از جمعیت های مورد مطالعه به عنوان نامزد دوم، پس از جهش معروف 35delG در *Connexin-26* مطرح شد. با توجه به اینکه حدود ۱۰ تا ۵۰ درصد ناشنوایان دارای جهش های ژنی *GJB2* فقط یک آلل جهش یافته برای آن ژن دارند و اینکه حذف D13S1830 بعنوان آلل دوم موتانت فقط در ۳۰ تا ۷۰ درصد از این ناشنوایان گزارش شده است (۱۹)، یافتن علت ناشنوایی در سایر موارد تک آللی ژن *GJB2* همواره در دستور کار محققین در نقاط مختلف دنیا بوده است البته، این حذف ژنی در جمعیت های متنوع از کشورهای اروپایی و آسیایی نظیر اتریش، کرواسی، چین

www.SID.ir

Archive of SID

و هندوستان نقشی در ایجـاد ناشنوایی ندارد (۲۵-۲۲).

حذف ۲۳۲ کیلوبازی (*GJB6-D13S1854*)del حذف ژنی دیگری است که اخیراً در همان منطقه حذف قبلی مورد بررسی قرار گرفته است. این جهش منطقه کوتاه تری (۲۳۲ kb) از بالادست ژن *GJB2* را نسبت به جهش D13S1830 حذف می نماید (۲۱). در هر حال فراوانی و پراکنش این دو حذف در جمعیت های مختلف متفاوت است. در واقع جهش D13S1830 بسیار شایع‌تر از جهش D13S1854 است و از کشورهای مختلفی گزارش شده است. در حالی که جهش D13S1854 فقط از کشورهای محدودی گزارش شده است (۱۳). هر دو جهش از اسپانیا و انگلستان به میزان ۱۰/۶ درصد و ۹/۸ درصد از آلل های موتانت DFNB1 گزارش شده‌اند و جزو ۵ جهش شایع تر لوکوس DFNB1 مطرح‌اند. در فرانسه علیرغم شیوع بالای D13S1830، هیچگونه گزارشی از جهش D13S1854 نشده است در بلژیک D13S1830 یک آلل شایع نیست و D13S1854 هم تاکنون گزارش نشده است (۱۹).

مطالعاتی که در ارتباط با حذف D13S1830 ژنی در کشور انجام شده، عدم حضور این جهش را در جمعیت هایی از غرب، شمال غرب و مرکزی نشان داده است (۲۸-۲۶). نتایج این مطالعه نیز در همین راستا بوده و عدم ارتباط حذف D13S1830 را با ایجاد ناشنوایی در کشورمان نشان می دهد. از طرفی هیچ گونه ارتباطی بین حذف D13S1854 و ناشنوایی در خانواده های مورد مطالعه مشاهده نشد. این اولین گزارش از عدم دخالت این جهش در ایجاد ناشنوایی در کشور می باشد.

از ۳۰ خانواده باقیمانده در این مطالعه در تجزیه و تحلیل پیوستگی ۳ خانواده (۱۰٪) به DFNB4 پیوستگی نشان دادنـــد. این لوکـــوس، حاوی ژن *SLC26A4* است. Park و همکاران در یک مطالعه برای شناسایی دلیل ناشنوایی در آسیای جنوبی، ۲۱۲ پاکستانی و ۱۰۶ خانوادهٔ هندی را که دارای ۳ و یا بیشتر بیمار ناشنوا و خویشاوند بودند مورد جستجو قرار دادند. آن ها نتیجه گرفتند که تقریباً ۵ درصد موارد ARNSHL در آسیای جنوبی و دیگر جمعیت ها ناشی از جهش های *SLC26A4* است. در هر حال مطالعات دیگری در مناطق مختلف از جمله آسیای جنوب شرقی، پاکستان و هند حدود ۵ درصد از خانواده های ناشنوای مورد مطالعه را مرتبط با جهش های این لوکوس یافتند (۳۰،۲۹).

این لوکوس، مسؤول دو نوع سندرمی (سندرم پندرد) و غیر سندرمی (ناشنوایی مرتبط با DFNB4) است. در مطالعه ای که در ایران بر روی ناشنوایی انجام شد، از ۸۰ خانواده که دارای ۲ یا بیشتر موارد ناشنوا بودند، ۱۲ خانواده (۱۵٪) به لوکوس ۴ نقشه برداری گردیدند (۳۱) که شواهدی دال بر سندرمی بودن در ۵ مورد وجود داشت. بر طبق این مطالعه، سندرم پندرد شایع‌ترین دلیل ناشنوایی سندرمی در ایران محسوب می گردد در یک مطالعه دیگر که در کشور انجام شد، از ۳۴ خانواده منفی برای دخالت *GJB2*، ۳ خانواده (۸/۸٪) پیوستگی به لوکوس DFNB4 نشان دادند.

در مطالعه ما یک خانواده به DFNB7/11 پیوستگی نشان داد (۳/۳٪). پیوستگی به این لوکوس از میان ۲۳۰ خانواده خویشاوند هندی و پاکستانی در ۱۰ خانواده به دست آمد و ژن جدیدی به نام *TMC1* (Transmembrane channel-like1) در آن یافت شد (۳۲). جهش های TMC1 به نظر می رسد که یک دلیل نسبتاً شایع در هند و پاکستان برای ARNSHL است. اگر چه جهش های آن در خانواده هایی در ترکیه هم یافته شده است (۳۲). در یک بررسی در شمال شرق و شرق ترکیه، با بررسی سراسری ژنوم و تجزیه و تحلیل پیوستگی هموزیگوتی، از ۶۵ خانواده غیر خویشاوند، چهار خانواده به این لوکوس پیوستگی نشان دادند. بر اساس این مطالعه، جهش های *TMC1* مسئول حداقل ۶ درصد موارد ARNSHL در خانواده های ناشنوای ترکیه بودند که قبلاً برای جهش های *GJB2* غربال شده بودند. در مطالعـــه ای از کشورمان، ۳۹ خانـــواده دارای ARNSHL که از مناطق مختلف ایران بودند و شامل ۲ یا بیشتـــر مـــوارد ناشنـــوایی بودند، برای لـوکـــوس

www.SID.ir

Archive of SID

DFNB7/11 غربالگری شدند که مجموعاً ۳ خانواده به این لوکوس پیوستگی نشان دادند که نتیجه گرفتند که این لوکوس از رایج ترین دلایل ARNSHL در جمعیت ایران به شمار می آید (۳۳).

در مطالعه حاضر هیچ موردی از پیوستگی به DFNB3 یافت نشد. در مطالعه ای از میان ۶۰۰ خانواده خویشاوند مبتلا ARNSHL در پاکستان، هند و ترکیه به ترتیب ۳۰، ۶ و ۲ خانواده یافت شدند که به این لوکوس پیوستگی نشان دادند (۳۴). در مطالعه دیگری، بر روی خانواده های خویشاوند ناشنوا در پاکستان تقریباً ۱۰ درصد منطبق با پیوستگی به لوکوس ۳ بودند (۱۱ از ۱۱۲ خانواده). بنابراین پیشنهاد می شود که حداقل ۵ درصد جمعیت مربوطه در پاکستان دارای جهش در این ژن می باشند (۳۵).

در مطالعه ای که بر روی ۴۰ خانواده ایرانی از استان قم و مرکزی و دارای ۳ یا بیشتر ناشنوا شده است، پیوستگی ۳ خانواده را به DFNB4 و ۲ خانواده به DFNB3 (۵/۸٪) نشان داد (۳۶). احتمالاً فراوانی بیشتر دخالت DFNB3 در برخی از جمعیت های کشورمان نسبت به بقیه وجود دارد و بنابراین لزوم بررسی خانواده‌های بیشتر ARNSHL برای روشن شدن دخالت این لوکوس ضروری به نظر می رسد.

نتیجه گیری:

در مطالعه حاضر، در مجموع علت ناشنـــوایی ۲۷/۷ درصد از خانوادهای ناشنوا ی مورد مطالعه مشخص شد. هر چند علت بیش از ۷۰ درصد موارد، هنوز معلوم نیست و نیازمند مطالعات بعدی می باشد. با توجه به دخالت کم ژن *GJB2* در جمعیت مزبور و هتروژنی فوق العاده این بیماری، این میزان دخالت از ژن ها و لوکوس های مورد مطالعه قابل توجیه می باشد.

در هر حال توسعه مطالعاتی از این دست بر روی جمعیت های مختلف کشور و فراهم نمودن امکانات آنالیز پیوستگی سراسری ژنوم، نوع و فراوانی ژن ها و لـــوکوس های درگیر را مشخص نموده و برای هر جمعیت اطلاعات لازم را فراهم می آورد تا بتواند در امر تشخیص بیماری و مشاوره دقیق‌تر و موثرتر خانواده بیماران کارگشا باشد. فاز بعدی این مطالعه، شامل بررسی چند لوکوس شناخته شده دیگر و مطالعات تکمیلی ژنومی برای خانواده های باقی مانده ای که از لحاظ قدرت آماری (S-Link) مناسب باشند، خواهد بود.

تشکر و قدردانی:

از خانواده های بیماران به دلیل مشارکت در این پژوهش قدردانی می شود. بخشی از این پژوهش با گرنت پژوهشی شماره ۵۵۷ و ۶۸۳ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام گردیده است.

منابع:

1. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. Ann N Y Acad Sci. 1991; 630: 16-31.

2. Dror AA, Avraham KB. Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. Ann Rev Genet. 2009; 43: 411-37.

3. Petit C. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. Nat Genet. 1996; 14(4): 385-91.

4. Van Laer L, Cryns K, Smith RJ, Van Camp G. Nonsyndromic hearing loss. Ear Hear. 2003; 24(4): 275-88.

5. Van Camp G, Willems PJ, Smith RJ. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. Am J Hum Genet. 1997; 60(4): 758-64.

www.SID.ir

Archive of SID

6. Van Camp G, Smith R. Hereditary hearing loss homepage. [Internet] URL: http:// www. uia.ac.be/ dnalab/hhh. May 20, 2010.

7. Saadat M, Ansari-Lari M, Farhud DD. Consanguineous marriage in Iran. Ann Hum Biol. 2004; 31(2): 263-9.

8. Lander ES, Botstein D. Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. Science. 1987; 236(4808): 1567-70.

9. Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, McKee R, Turck A, Eisenberg A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. Nucleic Acids Res. 1989; 17(20): 8390.

10. Kleihues P, Schauble B, zur Hausen A, Esteve J, Ohgaki H. Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. Am J Pathol. 1997; 150(1): 1-13.

11. Berg LP, Grundy CB, Thomas F, Millar DS, Green PJ, Slomski R, et al. De novo splice site mutation in the antithrombin III (AT3) gene causing recurrent venous thrombosis: demonstration of exon skipping by ectopic transcript analysis. Genomics. 1992; 13(4): 1359-61.

12. Wu BL, Kenna M, Lip V, Irons M, Platt O. Use of a multiplex PCR/sequencing strategy to detect both connexin 30 (*GJB6*) 342 kb deletion and connexin 26 (*GJB2*) mutations in cases of childhood deafness. Am J Med Genet A. 2003; 121A(2): 102-8.

13. del Castillo FJ, Rodriguez-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(7): 588-94.

14. del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, et al. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. N Engl J Med. 2002; 346(4): 243-9.

15. Lindner TH, Hoffmann K. easyLINKAGE: a PERL script for easy and automated two /multi-point linkage analyses. Bioinformatics. 2005; 21(3): 405-7.

16. Thiele H, Nurnberg P. HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes. Bioinformatics. 2005; 21(8): 1730-2.

17. 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): 1-14.

18. 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(2): 132-7.

19. Del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, Del Castillo FJ, Brownstein Z, Marlin S, Adina Q, et al. Prevalence and evolutionary origins of the del(*GJB6-D13S1830*) mutation in the DFNB1 locus in hearing-impaired subjects: a multicenter study. Am J Hum Genet. 2003; 73(6): 1452-8.

20. Pandya A, Arnos KS, Xia XJ, Welch KO, Blanton SH, Friedman TB, et al. Frequency and distribution of *GJB2* (*connexin 26*) and GJB6 (*connexin 30*) mutations in a large North American repository of deaf probands. Genet Med. 2003; 5(4): 295-303.

21. Erbe CB, Harris KC, Runge-Samuelson CL, Flanary VA, Wackym PA. Connexin 26 and connexin 30 mutations in children with nonsyndromic hearing loss. Laryngoscope. 2004; 114(4): 607-11

22. .Gunther B, Steiner A, Nekahm-Heis D, Albegger K, Zorowka P, Utermann G, et al. The 342-kb deletion in *GJB6* is not present in patients with non-syndromic hearing loss from Austria. Hum Mutat. 2003; 22(2): 180-3.

23. Sansovic I, Knezevic J, Musani V, Seeman P, Barisic I, Pavelic J. *GJB2* mutations in patients with nonsyndromic hearing loss from Croatia. Genet Test Mol Biomarkers. 2009; 13(5): 693-9.

www.SID.ir

Archive of SID

24. Yuan Y, You Y, Huang D, Cui J, Wang Y, Wang Q, et al. Comprehensive molecular etiology analysis of nonsyndromic hearing impairment from typical areas in China. J Transl Med. 2009; 7: 79.

25. Bhalla S, Sharma R, Khandelwal G, Panda NK, Khullar M. Low incidence of *GJB2*, *GJB6* and mitochondrial DNA mutations in North Indian patients with non-syndromic hearing impairment. Biochem Biophys Res Commun. 2009; 385(3): 445-8.

26. Sadeghi A, Sanati M, Alasti F, Hashemzadeh Chaleshtori M, Ataei M. Mutation analysis of connexin 26 gene and del(*GJB6-D13S1830*) in patients with hereditary deafness from two provinces in Iran. Iran J Biotechnol. 2005; 3(4): 255-8.

27. Esmaeili M, Bonyadi M, Nejadkazem M. Common mutation analysis of GJB2 and GJB6 genes in affected families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss from Iran: simultaneous detection of two common mutations (35delG/del(*GJB6-D13S1830*)) in the DFNB1-related deafness. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2007; 71(6): 869-73.

28. Mahdieh 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(6): 506-8.

29. Park HJ, Shaukat S, Liu XZ, Hahn SH, Naz S, Ghosh M, et al. Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness. J Med Genet. 2003; 40(4): 242-8.

30. Park HJ, Lee SJ, Jin HS, Lee JO, Go SH, Jang HS, et al. Genetic basis of hearing loss associated with enlarged vestibular aqueducts in Koreans. Clin Genet. 2005; 67(2): 160-5.

31. Kahrizi K, Mohseni M, Nishimura C, Bazazzadegan N, Fischer SM, Dehghani A, et al. Identification of SLC26A4 gene mutations in Iranian families with hereditary hearing impairment. Eur J Pediatr. 2009; 168(6): 651-3.

32. Kurima K, Peters LM, Yang Y, Riazuddin S, Ahmed ZM, Naz S, et al. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, *TMC1*, required for cochlear hair-cell function. Nat Genet. 2002; 30(3): 277-84.

33. Bazazzadegan N, Meyer N, Kahrizi K, Mohseni M, Imani P, Nikzat N, et al. Screening of *TMC1* Gene Mutations in DFNB7(11) Locus in Autosomal Recessive Non- syndromic Hearing Loss Iranian Population. Eur J Human Genet. 2007; 15(Suppl 1): P0131.

34. Nal N, Ahmed ZM, Erkal E, Alper OM, Luleci G, Dinc O, et al. Mutational spectrum of MYO15A: the large N-terminal extension of myosin XVA is required for hearing. Hum Mutat. 2007; 28(10): 1014-9.

35. Friedman TB, Hinnant JT, Ghosh M, Boger ET, Riazuddin S, Lupski JR ,et al. DFNB3, spectrum of MYO15A recessive mutant alleles and an emerging genotype-phenotype correlation. Adv Otorhinolaryngol. 2002; 61: 124-30.

36. Sadeghi A, Sanati M, Alasti F, Hashemzadeh Chaleshtori M, Mahmoudian S, Ataei M. Contribution of *GJB2* mutations and four common DFNB loci in autosomal recessive non-syndromic hearing impairment in Markazi and Qom provinces of Iran. Iran J Biotechnol. 2009; 7(2): 108-211.

www.SID.ir

Journal of Shahrekord University
of
Medical Sciences

Accepted: 31/may/2010 *Received: 7/Mar/2010*

Mutation screening of GJB2 and GJB6 and genetic linkage study of three prevalent DFNB loci in Iranian families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss

Tabatabaiefar MA (PhD)*, Shariati L (MSc)**, Montazer-Zohour M (PhD)***, Ashrafi K (MSc)†, Saffari-Chaleshtori J (MSc)**, Ghasemikhah R (MSc)††, Farrokhi E (MSc)**, Noori-Daloii MR (PhD)†††, Hashemzadeh-Chaleshtori M (PhD)●[1]

**PhD Student, Medical Genetic Dept., Tehran Univ. of Med. Sci. Tehran, Iran, **Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran, ***PhD Student, Medical Genetics Dept., Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, †Medical Plants Research Center, Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran, ††Parasitology Dept., Arak Univ. of Med. Sci. Arak, Iran, †††Professor, Medical Genetics Dept., Tehran Univ. of Med. Sci. Tehran, Iran, ●Professor of Human Genetics, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran*

Background and aim: The incidence of prelingual hearing loss (HL) is about 1 in 1000 neonates of which, more than 60% of cases are inherited. Non-syndromic HL (NSHL) is extremely heterogeneous: more than 100 loci have been identified. The most common form of NSHL is the autosomal recessive form (ARNSHL). Here, we have investigated *CX26* (*GJB2*) and *CX30* (*GJB6*) gene mutation and linkage analysis of 3 known loci in Iranian families.

Methods: A cohort of 36 big ARNSHL pedigrees from 7 provinces of Iran was investigated. All of the families were examined for the presence of *GJB2* and *GJB6* (del D13S1830 and del D13S1854) mutations using direct sequencing and multiplex PCR, respectively. The negative mutations pedigrees for the above- mentioned mutations, were then tested for the linkage to the 3 known loci, including DFNB3(*MYO7A*), DFNB4(*SLC26A4*) and DFNB7/11(*TMC1*), using STR markers and conventional PCR and PAGE.

Results: Six families had *GJB2* mutations. No *GJB6* mutation was found. Totally, 3 families showed linkage to DFNB4 and 1 family was linked to DFNB7/11.

Conclusion: DFNB1 (*GJB2*) and DFNB4 are the main causes of ARNSHL in our study samples and *GJB6* mutations are apparently absent in the Iranian population.

Keywords:GJB2 **(CX26),** GJB6 **(CX30)**, **Hearing loss, Linkage Analysis.**

[1]Corresponding author
Cellular and Molecular Research Center Medical Faculty. Rahmatieh, Shahrekord, Iran.
Tel:
0381-3346692
E-mail:
mchalesh@yahoo.com