بررسی جهش‌های حذفی Del (*GJB6*-D13S1854) و Del (*GJB6* –D13S1830) ژن کانکسین ۳۰ در افراد مبتلا به نا شنوایی حسی- عصبی غیر سندرمی در استان خراسان رضوی

دنیا سعیدی[1] ، حبیب عنصری[2]*

۱) گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، تبریز، ایران

۲) گروه زیست شناسی سلولی و ملکولی، واحد مرند، دانشگاه آزاد اسلامی، مرند، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۲۷

چکیده

مقدمه: نا شنوایی یکی از شایع ترین اختلالات حسی- عصبی با فراوانی ۱ در ۱۰۰۰ نوزاد می باشد و در دو حالت سندرمی و غیر سندرمی دیده می شود. با توجه به این که جهش‌های جایگاه ژنی DFNB1، در بر گیرنده دو ژن کانکسین ۲۶ و ۳۰، به تنهایی مسئول ۵۰ درصد نا شنوایی های غیر سندرمی با الگوی وراثتی اتوزومی مغلوب در جمعیت های مختلف می باشند، هدف مطالعه حاضر بررسی جهش‌های حذفی del (GJB6-D13S1830) و del (GJB6-D13S1854) ژن کانکسین ۳۰ در افراد نا شنوای فاقد جهش در ژن کانکسین ۲۶ در استان خراسان رضوی می باشد.

مواد و روش ها: در این پژوهش توصیفی، تعداد ۸۵ فرد غیر خویشاوند (۴۴ مرد و ۴۱ زن) مبتلا به نا شنوایی با الگوی وراثتی اتوزومی مغلوب از استان خراسان رضوی که نسبت به جهش در ژن CX26 منفی بودند مورد مطالعه قرار گرفتند. استخراج DNA ژنومی از یک میلی لیتر خون وریدی به روش RGDE صورت گرفت. بررسی جهش های مورد مطالعه با استفاده از روش‌های مالتی پلکس PCR و تعیین توالی مستقیم انجام یافت.

یافته های پژوهش: از تعداد ۱۷۰ کروموزوم بررسی شده، هیچ یک از جهش های حذفی del (GJB6-D13 S1830) و del (GJB6-D13S1854) در افراد نا شنوای مورد مطالعه یافت نشد.

بحث و نتیجه گیری: عدم وجود جهش های حذفی در ژن کانکسین ۳۰، در افراد نا شنوای منطقه مورد مطالعه، نشان دهنده دخالت ژن های دیگر در بروز بیماری می باشد. لذا لازم است در این افراد نا شنوا ژن های دیگر عامل نا شنوایی مورد مطالعه قرار گیرند.

واژه های کلیدی: نا شنوایی، کانکسین ۳۰، GJB6، del (GJB6 –D13 S1830)، del (GJB6-D13S1854)

* **نویسنده مسئول** : گروه زیست شناسی سلولی و ملکولی، واحد مرند، دانشگاه آزاد اسلامی، مرند، ایران

Email: onsoribiomol@marandiau.ac.ir

Copyright © 2017 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه:

نا شنوایی به عنوان شایع ترین اختلال حسی- عصبی و یک بیماری هتروژن (Heterogeneous) در انسان است و می تواند ناشی از علل محیطی و یا ژنتیکی باشد. از هر ۱۰۰۰ نوزاد زنده یک نوزاد در هنگام تولد دارای نقص شنوایی عمیق تا شدید می باشد (۱). پیامد های شخصی و اجتماعی اختلالات شنوایی به طور عمده تحت تاثیر شدت نا شنوایی و سن شروع آن می باشد. از نظر فیزیولوژی گوش، نقص شنوایی به دو نوع نقص شنوایی هدایتی و نقص شنوایی حسی- عصبی می‌باشد. در نقص شنوایی از نوع هدایتی گوش داخلی سالم بوده ولی انتقال صوت به علت وجود یک نا هنجاری در گوش خارجی یا میانی با مانع مواجه است. در نا شنوایی نوع حسی – عصبی نقص در حلزون شنوایی، عصب هشتم و یا اختلال در مدار های شنوایی سیستم عصبی مرکزی اتفاق می افتد (۲). عوامل مسبب این اختلال به صورت نا همگن هستند که بیش از ۶۰ درصد موارد ناشی از عوامل ژنتیکی می باشد و در دو حالت سندرمی و غیر سندرمی به ترتیب ۴۰ و ۶۰ درصد دیده می‌شود که نا شنوایی از نوع غیرسندرمی با الگوی توارثی اتوزومی مغلوب (ARNSHL: autosomal recessive non-syndromic hearing loss) حدود ۸۰ درصد از نا شنوایی های مادر زادی را شامل می‌شود و به طور تقریبی الگوی توارث به صورت اتوزوم غالب (DFNA: nonsyndromic deafness, autosomal dominant) ۲۰ درصد، اتوزوم مغلوب (DFNB: nonsyndromic deafness, autosomal recessive) ۸۰ درصد, وابسته به جنس (DFNX: nonsyndromic deafness, X-linked) ۱ درصد و میتوکندریایی کم تر از یک درصد در خانواده های مبتلا گزارش شده است (۱،۳). تا به حال بیش از ۱۰۰ جایگاه ژنی برای نا شنوایی غیر سندرمی با انواع الگو های وراثتی شناسایی شده است. جهش‌های جایگاه ژنی DFNB1 به تنهایی مسئول ۵۰ درصد نا شنوایی های غیر سندرمی با الگوی وراثتی اتوزومی مغلوب در جمعیت های مختلف می‌باشند که در بر گیرنده ی ژن های GJB6 و GJB2 است(۴).

بر اساس مطالعات گزارش شده، انواع جهش در ژن GJB2(CX26) در بین جمعیت های مختلف متفاوت می‌باشد به طوری که در جمعیت های سفید پوست جهش 35delG (۵،۶) و در یهودیان اشکنازی جهش 167del T (۷) و در آفریقا جهش R143W شایع می‌باشند (۸). بعد از ژن GJB2، ژن GJB6 (CX30) در برخی از جمعیت ها درصد بالایی از جهش های عامل نا شنوایی را نشان می دهد (۹). ژن GJB6 (MIM 604418, GeneID 10804)، در مجاورت ژن GJB2 در موقعیت 13q12، کد کننده یک پروتئین کانکسین به وزن ۳۰ کیلو دالتون می‌باشد که به طول ۲۶۱ اسید آمینه بوده و۷۶٪ شباهت با پروتئین کانکسین ۲۶ را نشان می‌دهد. تعداد اندکی جهش‌های نقطه‌ای *در ژن GJB6 یافت* شده اند که در ارتباط با نا شنوایی از نوع اتوزومی غالب و نا هنجاری های دیگر می باشد. جهش در ژن GJB6 معمولا از نوع جهش های حذفی می باشد. چهار جهش بزرگ در ژن GJB6 شامل del (GJB6-D13S1830)، del (GJB6-D13S1854)، del (chr13:19,837,344-19,968,698) و یک جهش ۹۲۰ کیلو بازی در ارتباط با نا شنوایی به همراه یک جهش منفرد در ژن GJB2 یافت شده اند (۱۰). ژن GJB6 دارای ۳ اگزون می‌باشد و پروتئین حاصل از این ژن از خانواده بزرگ کانال‌های ایجاد کننده ی اتصالات شکاف دار (Gap Junctions) است که مسئول ایجاد اتصالات باز بین سلولی بوده و اجازه انتقال یون پتاسیم و مولکلول های کوچک را می دهد (۱۱).

در دهه های اخیر شیوع نقص شنوایی اکتسابی در مقایسه با نقص شنوایی ژنتیکی کم تر شده است در صورتی که اختلالات شنوایی ژنتیکی در مقایسه، یک رشد نسبی را در جمعیت کودکان نشان می دهد (۱۲). با توجه به علت بالا بودن میزان ازدواج های فامیلی در کشور های آسیایی از جمله ایران (۳۸/۶ درصد)، فراوانی ناشنوایی ژنتیکی در این کشور ها بیشتر از کشور های مطالعه شده اروپایی و آمریکایی است اما در کشور های اروپایی و آمریکایی به علت کم شدن عوامل محیطی نا شنوایی، نا شنوایی اکتسابی به نسبت عوامل ژنتیکی فرکانس پایین تری دارد (۱۳). بنا بر این

مطالعه ژنتیکی لوکوس های اصلی درگیر در ARNSHL در جمعیت ایران ضرروی می‌باشد. بر این اساس چندین مطالعه توسط محققین در مناطق مختلف کشور انجام یافته است که از جمله آن ها می توان به مطالعه نجم آبادی و همکاران، هاشم زاده و همکاران، بنیادی و همکاران، مهدیه و همکاران و عنصری بر روی دو ژن GJB2 و GJB6 اشاره کرد (۱۸-۱۴).

هدف پژوهش حاضر بررسی جهش‌های حذفی del(GJB6–D13 S1830) و del (GJB6– D13S1854) در ژن Cx30 در افراد نا شنوای غیر سندرمی اتوزومال مغلوب در استان خراسان رضوی می‌باشد که فاقد جهش در ژن CX26 می‌باشند.

مواد و روش ها:

نمونه گیری خونی و استخراج DNA ژنومی: این مطالعه توصیفی، طی سال‌های ۱۳۹۳-۹۴ در آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند انجام یافت. انتخاب افراد مورد مطالعه با معرفی و معاینه پزشکان متخصص صورت گرفته که فاقد هرگونه نا هنجاری دیگر به غیر از نا شنوایی بودند که دال بر غیر سندرمی بودن نا شنوایی می‌باشد. نمونه گیری خونی از مبتلایان با همکاری متخصصین مربوطه بیمارستان قائم استان خراسان رضوی و با مجوز کمیته اخلاق پزشکی و هم چنین با رضایت کامل و آگاهانه از خانواده‌های مبتلا صورت گرفت. افراد مبتلا از هر دو جنس زن و مرد بوده و گروه سنی آن‌ها بین ۲-۵۰ سال، میانگین سنی ۲۰ و تعداد افراد مورد مطالعه در این تحقیق ۸۵ نفر فرد مبتلا (نا شنوای مادر زادی) و دو نفر فرد سالم (کنترل) بود. بسته به شرایط بیماران از هر بیمار مقدار ۵-۳ میلی لیتر خون وریدی گرفته شد و به فالکون های ۵ میلی لیتر حاوی مقدار لازم از ماده ضد انعقاد EDTA (اتیل دی آمین تترا استیک اسید) منتقل شد و تا زمان استخراج DNA در دمای ^{oC} ۲۰- نگهداری شد.

استخراج DNA ژنومی به روش RGDE (rapid genomic DNA extraction) صورت گرفت (۱۹). میزان خلوص و کمیت DNA استخراج شده بر اساس الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و اسپکترو فتومتری نانو دراپ با نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰ سنجیده شد و نسبت های بین ۸/۱ -۲ به عنوان وضعیت مطلوب در نظر گرفته شد.

راه اندازی واکنش گرهای PCR :

به منظور بررسی جهش‌های حذفی ژن Cx30 شامل del (GJB6 –D13 S1830) و del (GJB6 – D13 S1854) ، از روش multiplex PCR استفاده شد. در این روش از سه جفت پرایمر که برگرفته از مطالعات قبلی بودند (۲۰)، به صورت هم زمان در واکنش PCR استفاده شد (جدول شماره ۱). مخلوط واکنش PCR برای حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر تنظیم گردید که حاوی ۲/۰ میلی مولار dNTP ، ۵/۱ میلی مولار MgCl2، ۱۰ پیکو مول از هر یک از پرایمرها، ۵/۰ واحد آنزیم Taq پلیمراز، بافر 1X-PCR و حدود ۱ میکرو گرم از DNA ژنومی بود. پس از تهیه مخلوط واکنش، برای تکثیر قطعات مورد نظر، برنامه واکنش PCR بر روی دستگاه ترمو سایکلر مدل SENSOQUEST شرکت Labcycler/Germany تنظیم گردید (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱. مشخصات پرایمرهای استفاده شده در تکنیک Multiplex PCR

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه قطعه تکثیر شده	نوع جهش حذفی
GJB6-1R	5′- TTTAGGGCATGATTGGGGTGATTT-3′	460 bp	del (GJB6-D13S1830)
BKR-1	5′-CACCATGCGTAGCCTTAACCATTTT-3′		
DelBK1	5′-TCATAGTGAAGAACTCGATGCTGTTT-3′	564 bp	del(GJB6-D13S1854)
DelBK2	5′-CAGCGGCTACCCTAGTTGTGGT-3′		
Cx30Ex1A	5′-CGTCTTTGGGGGTGTTGCTT-3′	333 bp	Normal (GJB6 exon 1)
Cx30Ex1B	5′- CATGAAGAGGGCGTACAAGTTAGAA-3′		

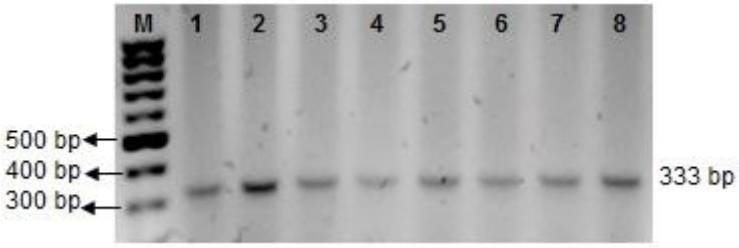
جدول شماره ۲. برنامه دمایی و زمانی PCR بر روی ترمو سایکلر SENSOQUEST

تعداد چرخه	زمان	دما (درجه سانتی گراد)	مرحله
۱	۵ دقیقه	۹۵	**دناتوراسیون اولیه**
۵ چرخه	۴۰ ثانیه	۹۴	**دناتوراسیون**
touchdown	۴۰ ثانیه	۶۵ (یک درجه کاهش در هر سیکل)	**اتصال پرایمرها**
	۱ دقیقه	۷۲	**پلیمریزاسیون**
۳۰ چرخه	۴۰ ثانیه	۹۴	**دناتوراسیون**
	۴۰ ثانیه	۶۰	**اتصال پرایمرها**
	۱ دقیقه	۷۲	**پلیمریزاسیون**
۱	۷ دقیقه	۷۲	**پلیمریزاسیون تکمیلی**

بعد از انجام واکنش Multiplex PCR، محصولات واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. پس از تایید قطعه تکثیری، محصولات PCR تعدادی از نمونه‌های مورد مطالعه به صورت تصادفی به همراه پرایمرهای رفت و برگشت برای تعیین توالی به شرکت فزا پژوه تهران ارسال شدند. آنالیز توالی های به دست آمده و مقایسه آن با توالی نرمال با استفاده از نرم افزارهای Chromas Lite 2.0 و BLAST(Basic Local Alignment) Search Tool انجام یافت.

یافته های پژوهش:

از کل ۸۵ فرد مورد مطالعه که شامل ۴۴ مرد و ۳۱ زن بودند و نسبت به جهش در ژن *Cx26* منفی بودند، هیچ یک از جهش های حذفی del (GJB6-D13S1830) وdel(GJB6-D13S1854) مشاهده نشدند و همه افراد باند طبیعی ۳۳۳ bp را نشان دادند (شکل شماره ۱). مقایسه توالی های به دست آمده با توالی نرمال با استفاده از نرم افزار های chromas Lite 2.0 و Blast (Basic local alignment search Tool) هیچ نوع جهش حذفی یا نقطه‌ای را نشان ندادند (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۱. الکتروفورز قطعات DNA تکثیر یافته حاصل از تکنیک Multiplex PCR بر روی ژل آگارز ۵/۱ درصد.
M: مارکر، ردیف‌های ۷-۱: افراد نا شنوا و ردیف ۸: فرد سالم. قطعه ۳۳۳ جفت بازی نشان دهنده عدم وجود جهش حذفی در ژن Cx30 می‌باشد.

بحث و نتیجه گیری:

آزمایشات ژنتیک مولکولی امیدهای تازه‌ای در بهبود روش های درمان نا شنوایی حسی– عصبی در کودکان ایجاد کرده و وضعیت پیچیده تشخیصی که در نتیجه فنوتیپ بسیار متغیر نا شنوایی وجود دارد را تسهیل کرده است. Matsushiro و همکاران کاشت موفق حلزون گوش را در بیماران نا شنوایی پیش گفتاری ناشی از جهش 235 delc را گزارش کردند (۲۱). بنا بر این اطلاعات به دست آمده از آزمایشات ژنتیکی می‌تواند نقش مهمی در تصمیم گیری اساسی از جمله تصمیم گیری در روش درمان نظیر استفاده از سمعک یا کاشت حلزون و مشاوره ژنتیکی قبل از ازدواج و قبل و حین بارداری داشته باشد. با در نظر گرفتن این نکته که جهش های متفاوت در اقوام و جمعیت های مختلف گزارش شده است، توجه به پیش زمینه ژنتیکی قومی در بررسی ژنتیکی نا شنوایی بسیار اهمیت می‌یابد.

بررسی نتایج مطالعات در جمعیت های متعدد درصد های مختلفی در ارتباط با ژن GJB2 نشان داده است.

در یک مطالعه در کشور ترکیه ارتباط بین ژن کانکسین ۲۶ و نا شنوایی غیر سندرمی با الگوی توارثی اتوزوم مغلوب در ۲۱/۴ درصد موارد در ۱۴ خانواده گزارش شده است(۲۲). بر اساس مطالعات انجام یافته بر روی قومیت‌های مختلف در ایران گزارش های مختلفی از ارتباط نا شنوایی با ژن GJB2 ارایه شده است. در دو مطالعه‌ای که توسط نجم آبادی و همکاران صورت گرفته است این ارتباط به ترتیب ۱۱ و ۱۶/۷ درصد نشان داده شده است (۱۴و۲۳). هم چنین مهدیه و همکاران به ترتیب ۲۲ و ۲۰ درصد (۱۰،۱۷) و عنصری ۲۰ درصد گزارش کرده اند (۱۸). براساس گزارشات در اقوام گوناگون، جهش های مختلفی از این ژن شایع است. در جمعیت اروپایی و سفیدپوستان آمریکایی جهش 35delG بیش ترین فراوانی را دارد در صورتی که در جمعیت زردپوست کشور آسیای شرقی جهش 235delC (۲۴)، در جمعیت یهودیان اشکنازی جهش 167delT (۲۵) و در جمعیت آفریقا جهش R143W به عنوان جهش شایع گزارش شده اند (۱۳).

در چندین مطالعه از نقاط مختلف دنیا نشان داده شده است که جهش حذفی del(GJB6-D13S1830) با بیش ترین شیوع در اسپانیا، فرانسه، انگلیس، اسرائیل و برزیل (۹/۷–۵/۹ ٪)؛ و با شیوع کم تر در آمریکا، بلژیک و استرالیا (۴/۵ –۱/۳ ٪) و با کم ترین میزان در جنوب ایتالیا می باشد. مطالعات اخیر نشان داده اند که جهش مذکور در شمال ایتالیا با فراوانی مشابه کشورهای اروپایی یافت می‌شود(۲۶). این جهش همچنین در دیگر مطالعات در آمریکا و آلمان یافت شده است اما در استرالیا، ترکیه و چین یافت نشده است(۱۴). جهش del(*GJB6*-D13S1830) بسیار شایع تر از جهش del (GJB6-D13S1854) بوده و از کشور های مختلفی گزارش شده است در حالی که جهش del(GJB6-D13S1854) از کشور های محدودی گزارش شده است (۲۷). هر دو جهش از اسپانیا و انگلستان به میزان ۱۰/۶ درصد و ۹/۸ درصد از آلل موتانت DFNB1 گزارش شده اند. در فرانسه علی رغم شیوع بالا del (GJB6-D13S1830) هیچ گونه گزارشی از جهش del (GJB6-D13S1854) نشده است. در بلژیک del (GJB6-D13S1830) یک آلل شایع نیست و del (GJB6-D13S1854) هم تا کنون گزارش نشده است (۲۸).

در ایران نیز چندین مطالعه در ارتباط با جهش های حذفی del (GJB6-D13S1830) و-del (GJB6 D13S1854) به وسیله تعدادی از محققین صورت گرفته است. برای آشکار سازی جهش های حذفی در ژن GJB6، محققین از تکنیک‌های مختلفی استفاده می‌کنند. برای مثال، مهدیه و همکاران از روش Real time PCR و بسیاری از محققین مثل بنیادی و همکاران، ریاض الحسینی و همکاران و Castillo و همکاران از روش Multiplex PCR استفاده کرده اند. در این تحقیق نیز از روش Multiplex PCR استفاده شد که به نظر می رسد نسبت به روش Real time PCR کم هزینه و تفسیر نتایج آن ساده می‌باشد. همان طور که در بالا اشاره شد جهش‌های حذفی GJB6 در جوامع مختلف با درصد های گوناگون گزارش شده است اما در ایران با مطالعاتی که به وسیله محققین بر روی اقوام مختلف صورت گرفته است، این جهش‌ها مشاهده نشده اند. جبار پور بنیادی و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی مبتلایان به نا شنوایی غیر سندرمی دراستان آذربایجان شرقی انجام دادند جهش مذکور را مشاهده نکردند (۲۹). مطالعه دیگری در سال ۱۳۸۴ توسط نجم آبادی و همکاران بر روی ۸۳ خانواده انجام گرفت که تنها در ۹٪ نا شنوایی وابسته به ژن GJB2 تشخیص داده شد و جهش del (GJB6-D13S1830) در هیچ یک از افراد هترو زیگوت مورد بررسی پیدا نشد (۱۴) و عنصری با مطالعه بر روی جمعیت نا شنوای مرند در شمال غرب کشور هیچ یک از جهش های حذفی مذکور را مشاهده نشد (۳۰). بنا بر این نتایج ما با نتایج مطالعات پیشین در مناطق مختلف کشور مطابقت دارد و این مطالعات در کنار هم اثر بنیان گذاری بیماری را در ارتباط با جهش های حذفی مذکور تقویت می‌کنند. هم چنین این نتایج نشان می دهند که در جمعیت ما احتمالاً ژن‌های دیگری علت ایجاد نا شنوایی غیر سندرمی اتوزومی مغلوب (ARNSD) می باشند. بنا بر این با توجه به این که جمعیت ایرانی ترکیبی از قبایل مختلف است، با بررسی آن ها می توان به نتایج جدید تری دست یافت که در نهایت کمک شایانی در مشاوره ژنتیک، کنترل و درمان این گروه از بیماران خواهد کرد.

سپاسگزاری:

بدینوسیله از خانواده های محترم بیماران به دلیل مشارکت در این پژوهش و هم چنین از پرسنل محترم بیمارستان قائم مشهد و جناب آقای دکتر مجرد که در تهیه نمونه های بیماران ما را یاری فرمودند، قدردانی می شود.

References

1. Kenneson A, Vannaardenbraun K, Boyle C. GJB2 connexin 26 variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss a huge review. Genet Med 2002; 4: 258-74.
2. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, kinzler KW, et al. The metabolic and molecular basic of inherited disease.5th ed. Mc Graw Hill Med Publication. 2001; P. 6281-9.
3. Prasad S, Cucci RA, Green GE, Smith RJH. Genetic testing for hereditary hearing loss Connexin 26 (GJB2) allele variants and two novel deafness causing mutations (E32C and645- 648 Del TGA). Hum Mutat 2000; 16:502-8.
4. Petit C. Genes responsible for human hereditary deafness symphony of a thousand. Nat Genet 1996; 14: 385-91.
5. Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, Dagruma L, Govea N, et al. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. Hum Mol Genet 1997; 6: 1605-9.
6. Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, Dagruma, et al. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. Lancet 1998; 351: 394-8.
7. Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Friderici K, Fisher R, et al. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. N Engl J Med 1998; 339: 1500-5.
8. Brobby GW, Mullermyhsok B, Horstmann RD. connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. N Engl J Med 1998; 338: 548-50.
9. Petersen MR, Willems PJ. Non-syndromic, autosomal recessive deafness. Clin Genet 2006; 69: 371-92.
10. Mahdieh, N., Rabbani, B., Wiley, S., Akbari, M. T. & Zeinali, S. Genetic causes of nonsyndromic hearing loss in Iran in comparison with other populations. J Hum Genet 2010; 55: 639-48.
11. Harris AL. Emerging issues of connexin channels biophysics fills the gap. Q Rev Biophys 2001; 34: 325-472.
12. Grundfast KM, Spirasky NB, Chuong MS. Genetic and molecular biology of deafness, syndromic and other congenital anomalies of the head and neck. Otolaryngol Clin North Am 2000; 33:1367-94.
13. Saadat M, Ansarilari M, Farhud DD. Consanguineous marriage in Iran. Ann Hum Biol 2004; 31: 263-69.
14. Najmabadi H, Nishimura C, Kahrizi K, RiazalhosseinilY, Malekpour M, Daneshi A, et al .GJB2 mutations passage through Iran. A J Med Genet 2005; 133: 132-7.
15. Hashemzadehchaleshtori M, Farhud DD, Patton MA. Familial and sporadic GJB2-related deafness in Iran: review of gene mutations. Iran J Publ Health 2007; 36: 1-14.
16. Bonyadi, M, Esmaeili M, Abhari M, Lotfi A. Mutation analysis of familial GJB2 related deafness in Iranian Azeri Turkish patients. Genet Test Mol Biomark2009; 13: 689-92.
17. Mahdieh N, Nishimura C, Alimadadi K, Riazalhosseini Y, Yazdan H, Arzhangi S, et al. The frequency of GJB2 mutations and the (GJB6-D13S1830) deletion as a cause of autosomal recessive non-syndromic deafness in the Kurdish population. Clin Genet 2004; 65: 506-8.
18. Onsori H. [Study of Cx26 gene mutations in patients with non-syndromic sensorineural hearing loss]. Feyz 2015; 19: 242-8. (Persian)
19. Saremi MA, Saremi M, Tavallaei M. Rapid Genomic DNA Extraction (RGDE). Forensic Sci Int 2008; 1: 63–5.
20. 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; 121: 102- 8.
21. Matsoshiro, N, Doi, K, Fuse Y, Nagai K, Yamamoto K, Iwaki T, et al. Successful cochlear implantation in prelingual profound deafness resulting from the common 233del C mutation of the GJB2 gene in the Japanese. Laryngoscope 2011; 112: 255-61.
22. Bayazit YA, Cable BB, Cataloluk O, Kara C, Chamberlin P, Smith RJ, et al. GJB2 gene mutations causing famililial hereditary deafiness in Turkey. Int J Pediatr Otorhinolatyngol 2003; 67: 1331-5.
23. Najmabadi H, Cucci RA, Sahebjam S, Kouchakian N, Farhadi M, Kahrizi K, et al. GJB2 mutations in Iranians with autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss. Hum Mutat2002; 19: 572.
24. Fuse Y, Doi K, Hasegawa T, Sugii A, Hibino H, Kubo T., Three novel connexin 26 gene mutations in autosomal ressive non-syndromic deafness. Neuro Report 1999; 10: 1853-7.
25. Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Friderici K, Fisher R, et al. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with non-syndromic recessive deafness. N Engl J Med 1998; 339:1500-5.
26. Gualandi F, Ravani A, Berto A, Burdo S, Trevisi P, Ferlini A, et al. Occurrence of del (GJB6-D13S1830) mutation in Italian non syndromic hearing loss patients carrying a single GJB2 mutated allele. Acta Otolaryngol Suppl 2004; 552: 29-34.
27. Castillo FJ, Rodriguezballesteros 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 DFNBI non syndromic hearing impairment. J Med Genet 2005; 42: 588-94.
28. Delcastillo I, Villamar M, Morenopelayo MA, 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: 243-9.
29. Jabbarpourbonyadi M, Esmaeili M, Younespour R, Lotfalizadeh N, Absavaran A. Analysis of common mutations in GJB2 and GJB6 genes in patients with autosomal recessive non syndromic hearing loss in Eastern Azarbaijan. ZUMS J 2006; 14: 30-8.
30. Onsori H. Investigation of the GJB6 deletion mutations Del (GJB6- D13s1830) and Del (GJB6-D13s1854) in Iranian patients with autosomal-recessive non syndromic hearing loss. Braz Arch Biol Technol 2016; 59: 1-6.

Investigation of the *Connexin-30* gene Deletion Mutations Del (GJB6-D13s1830) and Del (GJB6-D13s1854) among Subjects with Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss in Khorasan Razavi Province

*SaeediD[1], Onsori H[2]**

(Received: June 1, 2016 Accepted: July 17, 2016)

Abstract:

Introduction: Hearing loss (HL) is the most common sensorineural disorder with the frequency of 1 to 1000 neonates and it's seen in two syndromic and non-syndromic states. Given that the mutations of DFNB1 locus, containing *Connexin 26 (Cx26)* and *30* (*Cx30*) genes are the only responsible for 50% non-syndromic HL with autosomal recessive hereditary in different populations, the aim of this study is the screening of the connexin30 gene deletion mutations including Del (GJB6-D13S1830) and Del (GJB6-D13S1854) in HL subjects were negative to mutation in *Cx26* gene.

Materials & methods: In this descriptive study, 85 unrelated patients (44 males and 41 females) with autosomal recessive hearing loss of Khorasan Razavi province that were negative towards the *Cx26* gene mutations, were studied. Genomic DNA was extracted from 1 ml of EDTA anticoagulated peripheral blood by rapid genomic DNA extraction (RGDE) method. For molecular analysis, multiplex PCR and direct sequencing methods were used.

Findings: Out of 170 studied chromosomes, none of the Del (GJB6-D13S1830) and Del (GJB6-D13S1854) mutations found in the studied subjects.

Discussion & conclusions: Lack of the deletion mutations in the *Cx30* gene, indicates the involvement of other genes in causing disease. Thus, it is necessary to study other HL genes in these subjects.

Keywords: Hearing loss, Connexin30, GJB6, Del (GJB6-D13S1830), Del (GJB6-D13S1854)

1. Dept of Genetics, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. Dept of Cell and Molecular Biology, Marand Branch, Islamic Azad University, Marand, Iran
**Corresponding author Email: onsoribiomol@marandiau.ac.ir*

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences