

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

دنیا سعیدی<sup>۱</sup>، حبیب عنصری<sup>۲\*</sup>

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

(۲) گروه زیست‌شناسی سلولی و ملکولی، واحد مرند، دانشگاه آزاد اسلامی، مرند، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۲۷

### چکیده

**مقدمه:** ناشنوایی یکی از شایع‌ترین اختلالات حسی-عصبی با فراوانی ۱ در ۱۰۰۰ نوزاد می‌باشد و در دو حالت سندرمی و غیر سندرمی دیده می‌شود. با توجه به این که جهش‌های جایگاه ژنی DFNB1، در برگیرنده دو ژن کانکسین ۲۶ و ۳۰، به تنهایی مسئول ۵۰ درصد ناشنوایی‌های غیر سندرمی با الگوی وراثتی اتوزومی مغلوب در جمعیت‌های مختلف می‌باشند، هدف مطالعه حاضر بررسی جهش‌های حذفی (GJB6-D13S1830) del و (GJB6-D13S1854) del ژن کانکسین ۳۰ در افراد ناشنوای فاقد جهش در ژن کانکسین ۲۶ در استان خراسان رضوی می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش توصیفی، تعداد ۸۵ فرد غیر خویشاوند (۴۴ مرد و ۴۱ زن) مبتلا به ناشنوایی 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 میلی‌لیتر خون وریدی به روش RGDE صورت گرفت. بررسی جهش‌های مورد مطالعه با استفاده از روش‌های مالتی پلکس PCR و تعیین توالی مستقیم انجام یافت.

**یافته‌های پژوهش:** از تعداد ۱۷۰ کروموزوم بررسی شده، هیچ یک از جهش‌های حذفی (GJB6-D13 S1830) del و (GJB6-D13S1854) del در افراد ناشنوای مورد مطالعه یافت نشد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** عدم وجود جهش‌های حذفی در ژن کانکسین ۳۰، در افراد ناشنوای منطقه مورد مطالعه، نشان دهنده دخالت ژن‌های دیگر در بروز بیماری می‌باشد. لذا لازم است در این افراد ناشنوای ژن‌های دیگر عامل ناشنوایی مورد مطالعه قرار گیرند.

**واژه‌های کلیدی:** ناشنوایی، کانکسین ۳۰، GJB6، (GJB6-D13 S1830) del، (GJB6-D13S1854) del

\* نویسنده مسئول: گروه زیست‌شناسی سلولی و ملکولی، واحد مرند، دانشگاه آزاد اسلامی، مرند، ایران

Email: [onsoribiomol@marandiau.ac.ir](mailto: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 می باشد. 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 می شود 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 می شود 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. جهش های جایگاه ژنی DFNB1 به تنهایی مسئول ۵۰ درصد نا شنوایی های غیر سندرمی با الگوی وراثتی اتوزومی مغلوب در جمعیت های مختلف می باشند 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 می باشد 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 می باشند (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 می باشد که به طول ۲۶۱ اسید آمینه بوده و ۷۶٪ شباهت با پروتئین کانکسین ۲۶ را نشان می دهد. تعداد اندکی جهش های نقطه ای 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) (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 می باشد و پروتئین حاصل از این ژن از خانواده بزرگ کانال های ایجاد کننده ی اتصالات شکاف دار (Gap Junctions) است که مسئول ایجاد اتصالات باز بین سلولی بوده و اجازه انتقال یون پتاسیم و مولکول 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 نا شنوایی ژنتیکی در این کشور ها بیشتر از کشور های 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

از هر بیمار مقدار ۵-۳ میلی لیتر خون وریدی گرفته شد و به فالكون 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 °C ۲۰- نگهداری شد.

استخراج DNA ژنومی به روش (rapid RGDE 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 جهش های 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 MgCl<sub>2</sub>، ۱۰ پیکو مول از هر یک از پرایمرها، ۵/۰ واحد آنزیم Taq پلیمرز، 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 Labcycler/Germany شرکت SENSOQUEST تنظیم گردید (جدول شماره ۲).

مطالعه ژنتیکی لوکوس های اصلی درگیر در ARNSHL در جمعیت ایران ضروری می باشد. 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 (۱۴-۱۸).

هدف پژوهش حاضر بررسی جهش های حذفی del (GJB6-D13 S1830) و del (GJB6-D13 S1854) در ژن Cx30 در افراد نا شنوای غیر سندرمی اتوزومال مغلوب در استان خراسان رضوی می باشد که فاقد جهش در ژن CX26 می باشند.

### مواد و روش ها:

نمونه گیری خونی و استخراج DNA ژنومی: این مطالعه توصیفی، طی سال های 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 می باشد. 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 خانواده های مبتلا صورت گرفت. افراد مبتلا از هر دو جنس زن و مرد بوده و گروه سنی آن ها 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

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

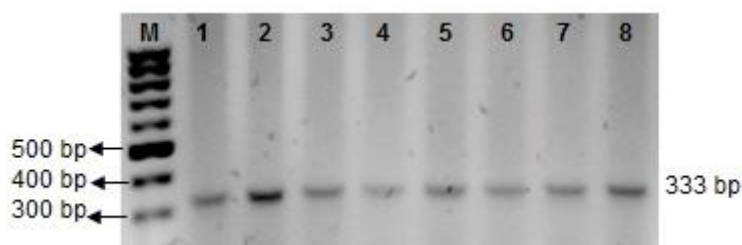
نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه قطعه تکثیر شده	نوع جهش حذفی
GJB6-1R	5'- TTTAGGGCATGATTGGGGTGATTT-3'	460 bp	del (GJB6-D13S1830)
BKR-1	5'-CACCATGCGTAGCCTTAACCATTTT-3'		
DelBK1	5'-TCATAGTGAAGAACTCGATGCTGTTT-3'	564 bp	del(GJB6-D13S1854)
DelBK2	5'-CAGCGGCTACCCTAGTTGTGGT-3'		
Cx30Ex1A	5'-CGTCTTTGGGGGTGTTGCTT-3'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

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

مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	تعداد چرخه
دنا تورا سیون اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
دنا تورا سیون	۹۴	۴۰ ثانیه	۵ چرخه
اتصال پرایمرها	۶۵ (یک درجه کاهش در هر سیکل)	۴۰ ثانیه	touchdown
پلیمریزاسیون	۷۲	۱ دقیقه	
دنا تورا سیون	۹۴	۴۰ ثانیه	۳۰ چرخه
اتصال پرایمرها	۶۰	۴۰ ثانیه	
پلیمریزاسیون	۷۲	۱ دقیقه	
پلیمریزاسیون	۷۲	۷ دقیقه	۱
تکمیلی			

### 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 (GJB6-D13S1830) و (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 (Basic local alignment) Blast و Lite 2.0 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 ۱/۵ درصد. M: مارکر، ردیف‌های ۱-۷: افراد نا شنوا و ردیف ۸: فرد سالم. قطعه ۳۳۳ جفت بازی نشان دهنده عدم وجود جهش حذفی در ژن *Cx30* می‌باشد.

می‌تواند نقش مهمی در تصمیم‌گیری اساسی از جمله تصمیم‌گیری در روش درمان نظیر استفاده از سمک 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.

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 (Basic Local Alignment) BLAST و Lite 2.0 Search Tool انجام یافت.

### 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

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 گزارش‌های 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 (۲۳ و ۲۴). 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، جهش‌های مختلفی از این ژن شایع است. در جمعیت اروپایی و سفیدپوستان آمریکایی جهش 35delG بیشترین فراوانی را دارد در صورتی که در جمعیت زردپوست کشور آسیای شرقی جهش 235delC (۲۴)، در جمعیت یهودیان اشکنازی جهش R143W 167delT (۲۵) و در جمعیت آفریقا جهش به عنوان جهش شایع گزارش شده اند (۱۳).

در چندین مطالعه از نقاط مختلف دنیا نشان داده شده است که جهش حذفی (GJB6-D13S1830) del با بیشترین شیوع در اسپانیا، فرانسه، انگلیس، اسرائیل و برزیل (۵/۹-۹/۷٪)؛ و با شیوع کم تر در آمریکا، بلژیک و استرالیا (۴/۵- ۱/۳٪) و با کمترین 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 (GJB6-D13S1854) del بوده و از کشور‌های مختلفی گزارش شده است در حالی که جهش del(GJB6-D13S1854) از کشور‌های 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) del 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 جهش‌های حذفی del(GJB6-D13S1830) و del(GJB6-D13S1854) به وسیله تعدادی از محققین صورت گرفته است. برای آشکار سازی جهش‌های 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 می‌رسد 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 درصد‌های 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 در استان 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 مرنده در شمال غرب کشور هیچ یک از جهش‌های 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 جهش‌های حذفی مذکور تقویت می‌کنند. هم چنین این نتایج نشان می‌دهند که در جمعیت ما احتمالاً ژن‌های دیگری علت ایجاد نا شنوایی غیر سندرمی اتوزومی مغلوب (ARNSD) می‌باشند. بنا بر این با توجه به این که جمعیت ایرانی ترکیبی از قبایل مختلف است، با بررسی آن‌ها می‌توان به نتایج جدید تری دست یافت که در نهایت کمک شایانی در مشاوره ژنتیک، کنترل و درمان این گروه از بیماران خواهد کرد.

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 گزارش‌های 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 (۲۳ و ۲۴). 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، جهش‌های مختلفی از این ژن شایع است. در جمعیت اروپایی و سفیدپوستان آمریکایی جهش 35delG بیشترین فراوانی را دارد در صورتی که در جمعیت زردپوست کشور آسیای شرقی جهش 235delC (۲۴)، در جمعیت یهودیان اشکنازی جهش R143W 167delT (۲۵) و در جمعیت آفریقا جهش به عنوان جهش شایع گزارش شده اند (۱۳).

در چندین مطالعه از نقاط مختلف دنیا نشان داده شده است که جهش حذفی (GJB6-D13S1830) del با بیشترین شیوع در اسپانیا، فرانسه، انگلیس، اسرائیل و برزیل (۵/۹-۹/۷٪)؛ و با شیوع کم تر در آمریکا، بلژیک و استرالیا (۴/۵- ۱/۳٪) و با کمترین 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 (GJB6-D13S1854) del بوده و از کشور‌های مختلفی گزارش شده است در حالی که جهش del(GJB6-D13S1854) از کشور‌های 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) del نشده است. در بلژیک del(GJB6-D13S1830) یک

## سپاسگزاری:

بیمارستان قائم مشهد و جناب آقای دکتر مجرد که در تهیه نمونه های بیماران ما را یاری فرمودند، قدردانی می شود.

بدینوسیله از خانواده های محترم بیماران به دلیل مشارکت در این پژوهش و هم چنین از پرسنل محترم

## 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 basis of inherited disease. 5<sup>th</sup> ed. Mc Graw Hill Medical 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 and 645-648 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 L, 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. Nonsyndromic, 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 Biomark* 2009; 13: 689-92.
17. Mahdieh N, Nishimura C, Alimadadi K, Riazalhosseini Y, Yazdan H, Arzhanghi 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. Matsushiro, 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 familial hereditary deafness in Turkey. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 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 Mutat* 2002; 19: 572.
24. Fuse Y, Doi K, Hasegawa T, Sugii A, Hibino H, Kubo T., Three novel connexin 26 gene mutations in autosomal recessive 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<sup>1</sup>, Onsori H<sup>2\*</sup>

(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