

A case report of non-syndromic sensorineural hearing loss with a compound heterozygous mutation (35delG/del120E) in the *GJB2* gene

H. Onori*

*Assistant Professor of Cellular and Molecular Biology, Marand Branch, Islamic Azad University, Marand, Iran

*Abstract

Hearing loss is one of the most common sensorineural disorders that occur in 1:1000. Mutation in the *GJB2* (*CX26*) gene at the DFNB1 locus on chromosome 13q12 is the most important cause of congenital hearing loss. The aim of this study was to determine the hearing loss causative mutations in the *GJB2* gene in a 37 year-old woman with non-syndromic congenital hearing loss. A compound heterozygous mutation (35delG/del120E) was found in the *GJB2* gene. With regards to the variety of mutations in the *GJB2* gene, screening the causative mutations of hearing loss is recommended for subjects referred to genetics counseling centers before marriage and pregnancy.

Keywords: Nonsyndromic Deafness, Connexin 26, Mutation

Citation: Onori H. A case report of non-syndromic sensorineural hearing loss with a compound heterozygous mutation (35delG/del120E) in the *GJB2* gene. J Qazvin Univ Med Sci. 2016; 20 (1): 70-74.

Corresponding Address: Habib Onori, Department of Cellular and Molecular Biology, Marand Branch, Islamic Azad University, Marand, Iran

Email: onoribiomol@marandiau.ac.ir

Tel: +98-914-4916337

Received: 18 Jun 2015

Accepted: 5 Sep 2015

گزارش یک مورد ناشنوایی حسی - عصبی غیرسندرمی با هتروزایگوسیتی ترکیبی *GJB2* ژن (35delG/del120E)

دکتر حبیب عنصری*

* استادیار زیست‌شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند، مرند، ایران

آدرس نویسنده مسؤول: گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، واحد مرند، دانشگاه آزاد اسلامی، مرند، ایران، تلفن ۰۹۱۴۴۹۱۶۳۳۷

Email: onsoribiomol@marandiau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۱۴

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲۸

* چکیده

ناشنوایی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های حسی - عصبی با فراوانی یک در هزار است. مهم‌ترین عامل ناشنوایی مادرزادی، جهش در ژن *GJB2* (*CX26*) در جایگاه ژنی DFNB1 در موقعیت 13q12 است. این مطالعه به منظور تعیین نوع جهش‌های عامل ناشنوایی در ژن *GJB2* در خانمی ۳۷ ساله با ناشنوایی کامل ارثی از نوع غیرسندرمی انجام شد. بررسی مولکولی وجود هتروزایگوسیتی ترکیبی (35delG/del120E) در ژن *GJB2* را در فرد مبتلا نشان داد. بنابراین، به دلیل تنوع جهش در ژن *GJB2*، بررسی جهش‌های عامل ناشنوایی برای مراجعه‌کنندگان به مراکز مشاوره ژنتیکی قبل از ازدواج و بارداری پیشنهاد می‌شود.

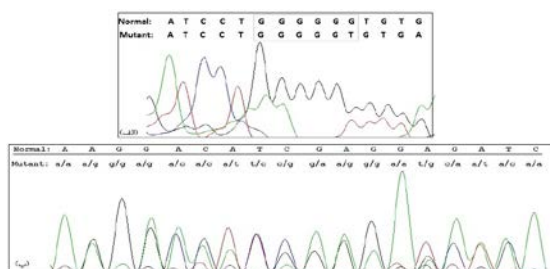
کلیدواژه‌ها: ناشنوایی غیرسندرمی، کانکسین ۲۶، جهش

* مقدمه

بالایی در جمعیت‌های مختلف با ناشنوایی مرتبط شناخته شده است. ژن درگیر در این نوع ناشنوایی *GJB2* نام دارد.^(۷) مهم‌ترین یافته‌ها در مورد ناشنوایی، کشف جهش‌ها در ژن *GJB2* (*CX26*) در جایگاه ژنی DFNB1 بر روی کروموزوم ۱۳ در موقعیت 13q12 است که عامل بیش از ۵۰ درصد ناشنوایی‌های مادرزادی از نوع اتوزومی مغلوب می‌باشد و این میزان در جمعیت‌های ایرانی ۱۴ تا ۱۷ درصد است.^(۸) ژن *GJB2* از دو اگزون و یک اینترون تشکیل شده است و اگزون شماره ۲ این ژن پروتئینی با نام کانکسین ۲۶ (connexin26) را کُدگذاری می‌کند که در اتصال‌های شکاف‌دار (Gap Junctions) بین سلولی مشاهده می‌شود.^(۳) با توجه به علل شناخته شده ناشنوایی، اولین اقدام پیشگیری این بیماری، شناخت جهش‌های ژنی و کنترل ژن‌های ناقل ناشنوایی است. براساس مطالعه‌های انجام شده و آمارهای موجود، بیش از ۷۰ درصد ناشنوایی‌های مادرزادی بر اثر ظهور علائم ژن‌های

ناشنوایی یکی از بیماری‌های شایع حسی - عصبی با فراوانی یک در هزار در کشورهای در حال توسعه است.^(۱-۳) از دست دادن حس شنوایی یک صفت پیچیده محسوب می‌شود که می‌تواند ناشی از عوامل ارثی یا محیطی یا ترکیبی از آن‌ها باشد.^(۵و۴) حداقل ۶۰ درصد ناشنوایی‌ها مربوط به عوامل ژنتیکی هستند و با الگوهای توارثی اتوزومی غالب، اتوزومی مغلوب، وابسته به X و میتوکندریایی مشاهده می‌شوند. حدود نیمی از ناشنوایی‌های شدید به عوامل ژنتیکی نسبت داده می‌شوند و تخمین زده می‌شود که بیش از ۴۰۰ جایگاه ژنی در ناشنوایی سندرمی و غیرسندرمی شرکت داشته باشند. حدود ۶۷ درصد ناشنوایی‌های ژنتیکی از نوع غیرسندرمی محسوب می‌شوند. در حالی که در ۳۳ درصد از موارد یک سندرم ویژه همراه با ناشنوایی شناخته می‌شود.^(۶) علی‌رغم این‌که بیش از ۲۰ جایگاه ژنی در مورد ناشنوایی اتوزومی مغلوب غیرسندرمی (DFNB) تعریف شده است، یک جایگاه ژنی با نام DFNB1 با نسبت

شامل ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی مولار داکیسی نوکلئوتید تری فسفات‌ها، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر (پرایمر) اختصاصی^(۱۰) [شامل آغازگر رفت -5': (CX26F) 3'-TCTTTTCCAGAGCAAACCGC- و آغازگر برگشت 3'-TGGGCAATGCGTAAACTGGC-5': (CX26R)] ۰/۵ واحد آنزیم Taq پلیمرز و یک میکروگرم از DNA ژنومی تنظیم گردید. پس از تهیه مخلوط واکنش، تکثیر ناحیه کدکننده ژن *GJB2* به شرح زیر بر روی دستگاه ترموسایکلر مدل SENSOQUEST (شرکت Labcyler آلمان) انجام شد: ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه با تک رشته‌ای شدن در ۹۵ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، چسبیدن آغازگر ۴۵ ثانیه در ۵۹ درجه، گسترش ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد. سپس محصولات PCR به همراه نشان‌گر استاندارد 100bp بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند. پس از الکتروفورز، قطعه مورد انتظار به طول ۷۳۴ جفت باز به دست آمد. قطعه تکثیر یافته به همراه آغازگرهای CX26R و CX26F برای تعیین توالی به شرکت فزایوتک ایران ارسال شدند. مقایسه توالی‌های به دست آمده با توالی وحشی با استفاده از نرم‌افزارهای Chromas Lite 2.0 و BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) انجام شد که وجود دو نوع جهش حذفی 35delG و del120E را به صورت هتروزیگوت در هر دو فرد نشان داد (شکل شماره ۲).



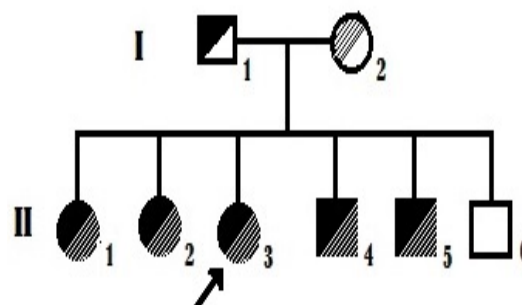
شکل ۲- توالی نوکلئوتیدی محل جهش و هم‌ردیفی آن با توالی وحشی

الف) قسمتی از ناحیه کدکننده ژن *GJB2* که محل جهش 35delG را به صورت هتروزیگوت نشان می‌دهد. ب) قسمتی از ناحیه کدکننده ژن *GJB2* که محل جهش del120E و هتروزیگوسیتی ترکیبی را در فرد مورد نظر نشان می‌دهد.

شناخته شده ناشنوایی هستند. لذا در این مقاله سعی شد نوع جهش‌های عامل ناشنوایی در ژن *GJB2* در خانمی ۳۷ ساله با ناشنوایی کامل ارثی از نوع غیرسندرمی گزارش شود.

*معرفی بیمار:

بیمار خانمی ۳۷ ساله با ناشنوایی کامل در هر دو گوش بود که والدین سالم، دو برادر ناشنوا، دو خواهر ناشنوا و یک برادر کاملاً سالم داشت (شکل شماره ۱). در سال ۱۳۹۲، نمونه خونی از بیمار و یکی از خواهران وی که در اداره بهزیستی شهرستان مرند پرونده داشتند، با همکاری اداره بهزیستی و دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند و با رعایت کلیه اصول و کدهای کمیته اخلاق پزشکی تهیه شد. آزمایش‌ها در آزمایشگاه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند انجام و DNA ژنومی طبق روش صارمی و همکاران (۲۰۰۸) از نیم میلی‌لیتر خون وریدی استخراج شد.^(۹) میزان خلوص و کمیت DNA استخراج شده براساس الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتروفتومتری نانودراپ با نسبت جذب 260/280 سنجیده شد.



شکل ۱- شجره نامه خانواده مبتلا

I₂ و I₁ = والدین سالم که هر یک از آن‌ها نسبت به یکی از جهش‌های 35delG و یا del120E هتروزیگوس (حامل) بودند. II₁₋₅ = فرزندان (خواهرها و برادرهای) مبتلا به ناشنوایی کامل حسی-عصبی غیرسندرمی با هتروزیگوسیتی ترکیبی (35delG/del120E) و II₆ = فرزند پسر سالم.

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، ابتدا غلظت واکنش‌گرهای PCR برای حجم ۲۵ میکرولیتر،

*** بحث و نتیجه گیری:**

در مطالعه حاضر، تعیین توالی ناحیه کدکننده ژن *GJB2*، دو نوع جهش حذفی را به صورت ترکیبی نشان داد. جهش اول، یک جهش نقطه‌ای با نام 35delG بود. در موقعیت ۳۰ تا ۳۵ ژن *GJB2* شش تکرار نوکلئوتیدی گوانین وجود دارد که حذف هر نوکلئوتید در این ناحیه باعث ایجاد شایع‌ترین جهش، به نام 35delG یا 30delG می‌شود.^(۱۱) این جهش که باعث تغییر قالب خواندن می‌شود، علت عمده ناشنوایی‌های مادرزادی تک‌گیر و وراثتی در سفیدپوستان است.^(۱۲) مطالعه‌های انجام شده در نقاط مختلف ایران بر روی ناشنوایان، جهش 35delG را یک جهش شایع نشان داده‌اند که فراوانی آن از صفر درصد در سیستان و بلوچستان تا ۱/۲۷ درصد در استان گیلان متفاوت بوده است.^(۱۳،۱۴) فراوانی این جهش در شهرستان مرند ۶ درصد ذکر شده است.^(۱۴)

جهش حذفی دوم در بیمار مورد مطالعه، delE120 بود. این جهش که به علت حذف کدون GAG در موقعیت ۱۱۹ یا ۱۲۰ رخ می‌دهد و باعث حذف باقی‌مانده گلوتامیک اسید در موقعیت ۱۲۰ در دومین IC2 می‌شود، به وسیله نجات و همکاران (۲۰۱۰) در دو عضو یک خانواده لرستانی به صورت هموزیگوت گزارش شده است.^(۱۵)

با توجه به این که بیش‌تر جهش‌های عامل ناشنوایی غیرسندرمی از نوع اتوزومی مغلوب هستند و این جهش‌ها در حالت هتروزیگوت نهفته می‌باشند؛ بنابراین بررسی جهش‌های عامل ناشنوایی از جمله ژن *GJB2* و کم کردن ازدواج‌های فامیلی و قبیله‌ای در خانواده‌های دارای سابقه ناشنوایی مادرزادی پیشنهاد می‌شود.

*** سپاس‌گزاری:**

از حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند و همکاری اعضای محترم خانواده بیمار و کارکنان محترم اداره بهزیستی شهرستان مرند تشکر می‌شود.

*** مراجع:**

1. Naghavi A, Nishimura C, Kahrizi K, Riazalhosseini Y, Bazazzadegan N, Mohseni M, et al. GJB2 mutations in Baluchi population. J Genet 2008 Aug; 87 (2): 195-97.
2. Salehi Chaleshtori AR, Fattahi F, Tabatabaiefar MA, Hoseinipour A, Salehi Chaleshtori HR, Rezaian F, et al. Analysis of CABP2 c.637+1G>T mutation in Iranian families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. J Babol Univ Med Sci 2014; 16 (1): 70-6. [In Persian]
3. Wingard JC and Zhao HB. Cellular and deafness mechanisms underlying connexin mutation-induced hearing loss – a common hereditary deafness. Front Cell Neurosci 2015 May 29; 9: 202.
4. Hashemzadeh Chaleshtori M, Farhud DD, Taylor R, Hadavi V, Patton MA, Afzal AR, et al. Deafness-associated connexin 26 gene (*GJB2*) mutations in Iranian population. Iranian J Publ Health 2002; 31 (3-4): 75-9.
5. Mukherjee M, Phadke SR, Mittal B. Connexin 26 and autosomal recessive non-syndromic hearing loss. Indian J Hum Genet 2003; 9: 40-50.
6. Primignani P, Trotta L, Castorina P, Lalatta F, Cuda D, Murri A, et al. A new de novo missense mutation in connexin 26 in a sporadic case of nonsyndromic deafness. Laryngoscope 2007 May; 117 (5): 821-4.
7. Ballana E, Ventayol M, Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. Connexins and deafness. CRG. Available at: <http://davinci.crg.es/deafness>. Accessed in: 2014.
8. Mahdieh N, Rabbani B. Molecular mechanism of hearing and different types of genetic hearing loss in Iran. J Babol Univ Med Sci 2014; 16 (S1): 27-38. [In Persian]

9. Saremi MA, Saremi M, Tavallaei M. Rapid genomic DNA extraction (RGDE). *Forensic Sci Int* 2008; 1: 63-5.
10. Snoeckx RL, Hassan DM, Kamal NM, Van Den Bogaert K, Van Camp G. Mutation analysis of the GJB2 (Connexin 26) gene in Egypt. *Hum Mutat* 2005 Jul; 26 (1): 60-1.
11. Moreira D, Silva Dd, Lopez P, Mantovani JC. Screening of connexin 26 in nonsyndromic hearing loss. *Int Arch Otorhinolaryngol* 2015 Jan; 19 (1): 30-3.
12. Rezaei H, Vallian Broojeni S, Movahedi R. High frequency of 35delG mutation in GJB2 associated with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss (ARNSHL) in the province of Isfahan-Iran. *Genetics in the 3rd Millennium* 2010; 8 (3): 2074-8. [In Persian]
13. Najmabadi H, Cucci RA, Sahebjam S, Kouchakian N, Farhadi M, Kahrizi K, et al. GJB2 mutations in Iranian with autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss. *Human Mutat* 2002 May; 19 (5): 572.
14. Onsoni H. Study of Cx26 gene mutations in patients with non-syndromic sensorineural hearing loss. *Feyz* 2015; 19 (3): 242-8.
15. Mahdiah N, Bagherian H, Shirkavand A, Sharafi M, Zwinali S. High level of intrafamilial phenotypic variability of non-syndromic hearing loss in a Lur family due to delE120 mutation in GJB2 gene. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010 Sep; 74 (9): 1089-91.