

## بررسی وراثت دوزنی ژن *GJB4* در ناشنوایان غیر سندرومی مغلوب اتوزومی دارای یک آلل جهش یافته *GJB2*

دنیز کوشاور<sup>۱\*</sup>، عفت فرخی<sup>۲</sup>، مرضیه ابوالحسنی<sup>۲</sup>، دکتر محمد امین طباطبایی فر<sup>۳</sup>، دکتر محمدرضا نوری

دلویی<sup>۱</sup>، دکتر مرتضی هاشم زاده چالشتی<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup>گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران؛ <sup>۲</sup>مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛

<sup>۳</sup>گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۱۰ اصلاح نهایی: ۹۱/۵/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۶/۱۱

### چکیده:

زمینه و هدف: ناشنوایی غیر سندرومی مغلوب اتوزومی (ARNSHL) تا حدود ۵۰٪ موارد در اثر جهش‌های ژن *GJB2* (Gap junction protein, beta 2, 26kDa) کدکننده کانکسین ۲۶ ایجاد می‌شود. با این حال ۱۰ تا ۴۲٪ از ناشنوایان دارای جهش‌های مغلوب، حامل تنها یک آلل جهش یافته *GJB2* هستند. جهش در ژن *GJB4* کدکننده کانکسین ۳۰/۳ نیز می‌تواند باعث ناشنوایی شود. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات در ژن *GJB4* به عنوان آلل دوم جهش یافته مسبب بیماری با الگوی وراثت دوزنی در بیماران مطالعه شده هتروزیگوت *GJB2* می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی برای ۴۲ نمونه با یک آلل جهش یافته *GJB2* از هفت استان کشور، حاصل از ۸۹۰ خانواده مبتلا به ARNSHL، DNA به روش فنل کلروفورم استخراج شد. ژن *GJB4* در این نمونه‌ها به روش PCR و تعیین توالی بررسی و حفاظت‌شدگی اسید آمینه‌های درگیر تعیین شد. جهت تعیین بیماری‌زایی تغییرات یافت شده، ۲۰۰ فرد کنترل شنوا به روش PCR-RFLP آزمایش شد.

یافته‌ها: در ژن *GJB4* پنج جایگزینی هتروزیگوس (c.451C>A, c.219C>T, c.507C>G, c.155\_158delTCTG, c.542C>T) در ۵ نفر از بیماران و ۱۳ نفر از افراد کنترل یافت شد. تغییر c.542C>T در نمونه‌های کنترل مشاهده نشد و درجه حفاظت‌شدگی اسید آمینه‌ی مربوطه بسیار بالا بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به شواهد موجود پیشنهاد می‌شود که تغییر c.542C>T در ژن *GJB4* و تغییرات دیگر در این ژن با احتمال کمتری، می‌تواند در ابتلا به ARNSHL با الگوی دوزنی در حاملین جهش‌های هتروزیگوت *GJB2* نقش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: کانکسین، وراثت دوزنی، ناشنوایی، *GJB4*، *GJB2*.

### مقدمه:

جمعیت‌ها تا حدود ۵۰ درصد موارد، دلیل ناشنوایی غیر سندرومی مغلوب اتوزومی (ARNSHL) به شمار می‌رود (۳). ۱۰ تا ۴۲ درصد از بیماران دارای جهش‌های *GJB2*، حاملین هتروزیگوت آلل جهش یافته‌ی *GJB2* هستند (۱۴-۴). خانواده ژنی کانکسین‌ها در انسان شامل ۲۱ عضو است. کانکسین‌ها به عنوان

ناشنوایی با بروز حدوداً ۱ در ۱۰۰۰ نوزاد، فراوان‌ترین ناهنجاری حسی-عصبی محسوب می‌شود. این بیماری بسیار هتروژن بوده و می‌تواند به دلایل ژنتیکی، محیطی و یا هر دو ایجاد شود (۲۱). با وجود هتروژنی ژنتیکی، جهش در ژن *GJB2* (MIM ID: 121011) که کانکسین ۲۶ (Connexin 26) را کد می‌کند، در برخی

\*نویسنده مسئول: شهرکرد-رحمتیه-دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد-دانشکده پزشکی-مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی-تلفن: ۰۳۸۱-۳۳۴۶۶۶۲.

همچنین تشخیص ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی و Preimplantation genetic diagnosis (PGD) و مداخلات درمانی احتمالی کمک‌کننده باشد.

### روش بررسی:

در مجموع ۴۲ بیمار ناشنوا از هفت استان کشور (آذربایجان شرقی، خراسان رضوی، خوزستان، گلستان، گیلان، سیستان و بلوچستان، هرمزگان) و ۲۰۰ نفر به عنوان کنترل سالم از لحاظ شنوایی در این مطالعه توصیفی - آزمایشگاهی وارد شدند. تمام بیماران مبتلا به ARNSHL و دارای یک آلل جهش‌یافته *GJB2* بودند (جدول شماره ۱) که قبلاً برای جهش‌های *GJB2* در ۸۹۰ خانواده دارای افراد مبتلا به ناشنوایی خفیف تا عمیق مورد غربالگری قرار گرفته بودند (۱۹). نمونه‌های کنترل از دو استان گلستان و آذربایجان شرقی (۱۰۰ نمونه از هر استان، مطابق با محلی که بیمار دارای تغییر آللی جدید شناسایی شده بود) جمع‌آوری شدند. از هر فرد به میزان ۵ میلی لیتر خون در لوله‌ی حاوی EDTA نیم مولار نمونه برداری شد. از تمام افراد ناشنوا (یا والدینشان) و افراد کنترل رضایت‌نامه کتبی اخذ شد و پروتکل مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به تصویب رسید. DNA ژنومی به

### جدول شماره ۱: فراوانی ژنوتیپ نمونه‌های مورد مطالعه

درصد	فراوانی	واریانت‌های هتروزیگوس <i>GJB2</i>
۷۱/۴۲	۳۰	35delG/WT
۹/۵۲	۴	R127H/WT
۷/۱۴	۳	V27I;E114G/WT
۲/۳۸	۱	E47X/WT
۲/۳۸	۱	235delC/WT
۲/۳۸	۱	W24X/WT
۲/۳۸	۱	M163V/WT
۲/۳۸	۱	R184P/WT
۱۰۰	۴۲	مجموع

واحد‌های سازنده‌ی اتصالات شکافدار، کانال‌های بین سلولی را تشکیل می‌دهند که موجب انتشار یون‌ها و مولکول‌های کوچک و در نتیجه ایجاد ارتباط بین سلول‌های همجوار می‌شوند. اولیگومریزاسیون شش زیر واحد کانکسین یک نیم کانال به نام کانکسون (Connexon) تشکیل می‌دهد و مجتمع شدن دو کانکسون یک اتصال شکافدار کامل را ایجاد می‌کند (۱۵). جهش در برخی از اعضای خانواده ژنی کانکسین مانند Cx26، Cx29، Cx30، Cx31، Cx32، Cx30.3 و Cx43 به عنوان جهش‌های مسبب ناشنوایی گزارش شده‌اند و می‌توانند به دو شکل تک‌ژنی یا دوزنی به ارث برسند (۱۶، ۱۷، ۱۸).

در ایران ۱۸/۲۹ درصد از موارد ARNSHL اثر جهش‌های *GJB2* ایجاد می‌شوند، که از این میان ۲۲/۸ درصد از موارد، معادل ۴/۱۷ درصد کل ARNSHL ها، حامل تنها یک آلل جهش‌یافته *GJB2* می‌باشند (۱۹). فرضیه‌ی وراثت دوزنی در هتروزیگوت‌های *GJB2* در گذشته در بررسی تغییرات دو ژن *GJB3* و *GJB6* به عنوان آلل دوم جهش یافته ثابت شده است (۲۰-۲۲).

ژن *GJB4* (Gap junction protein, beta 4, 30.3kDa) کدکننده کانکسین ۳۰/۳ دارای دو اگزون به طول‌های ۴۸ و ۲۷۹۶ bp می‌باشد. این ژن در حلزون گوش موش صحرائی بیان می‌شود و جهش در آن با بیماری‌های پوستی و ناشنوایی در ارتباط می‌باشد (۲۳-۲۵). تعدادی از مطالعات ژن *GJB4* را در بیماران مبتلا به ARNSHL ارزیابی کرده‌اند ولی هدف اصلی آن‌ها بررسی وراثت دوزنی نبوده است (۲۳، ۲۴، ۲۶). بنابراین بررسی وراثت دوزنی به عنوان الگوی احتمالی مسبب بیماری در هتروزیگوت‌های جهش‌های مغلوب *GJB2* ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه حاضر نقش *GJB4* در توارث دوزنی در بیماران مبتلا به ARNSHL دارای یک آلل جهش‌یافته *GJB2* بررسی می‌شود. نتایج این گونه پژوهش‌ها بی‌شک می‌تواند در روشن شدن هر چه بیشتر علت شناسی ناشنوایی و به طبع آن در آینده مشاوره ژنتیک اصولی‌تر، پیشگیری و

چرخه تا ۵۷°C در چرخه پنجم و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه برای گسترش رشته، سپس ۳۰ چرخه شامل ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه برای واسرشت، ۵۶°C برای اتصال پرایمر به مدت ۱ دقیقه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه برای گسترش و در آخر گسترش نهایی در ۷۲°C به مدت ۶ دقیقه.

محصولات PCR برای بررسی کیفیت، تحت الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید (PAGE) ۸ درصد با ولتاژ ۲۰۰ و شدت جریان ۵۰ میلی آمپر به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند و با نترات نقره رنگ آمیزی و نوارها رؤیت شدند تا وجود نوار با اندازه 964bp تایید گردد. تسوالی یابی محصولات PCR توسط دستگاه تسوالی یابی ABI (capillary system) 3730X2 انجام گرفت. تسوالی ژن *GJB4* افراد بیمار با تسوالی منتشر شده استاندارد UCSC (Genome Browser © The Regents of the University of California) با استفاده از نرم افزار Chromas (Version 2.33) مقایسه گردید و هرگونه تغییر نوکلئوتیدی ثبت شد. درجه حفاظت شدگی اسید آمینه‌ای از طریق ابزار اینترنتی ConSurf Server بدست آمد.

محصول PCR ژن *GJB4* حاصل از نمونه های کنترل استان آذربایجان شرقی برای بررسی وجود یا عدم وجود تغییر نوکلئوتیدی c.507C>G تحت PCR-RFLP با استفاده از آنزیم محدود کننده StyI در دمای ۳۷°C قرار گرفت. تغییر نوکلئوتیدی مورد اشاره موجب ایجاد یک مکان شناسایی جدید می شود و هر محصول PCR به طول ۹۶۴bp مربوط به آلل تغییر یافته به سه قطعه ۵۷۱ و ۳۳۵ و ۵۸ نوکلئوتیدی هضم می شود در حالی که آلل نرمال با یک برش به دو قطعه ۹۰۶ و ۵۸ نوکلئوتیدی تبدیل می شود.

نمونه‌های کنترل استان آذربایجان شرقی برای بررسی وجود یا عدم وجود تغییر نوکلئوتیدی *GJB4* c.155\_158delTCTG محصولات PCR ژن *GJB4* تحت PCR-RFLP در دمای ۳۷°C با استفاده از آنزیم محدود کننده Tth111I قرار گرفت. یک مکان

روش استاندارد فنل-کلروفورم از خون محیطی افراد بیمار و کنترل استخراج گردید (۲۷). کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد بررسی شد.

برای تمام افراد بیمار، کل طول تسوالی کد کننده به اضافه‌ی حدود ۵۰ جفت باز فرادست و فرودست آن، در ژن *GJB4* (RefSeq ID: NM\_153212) توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر شد. پرایمرهای مورد استفاده برای ژن *GJB4* با استفاده از نرم افزار اینترنتی Primer3 (v. 0.4.0) (۲۸) طراحی شدند که تسوالی آن‌ها به شرح زیر می باشد:

F1B4: 5'-TCAATCGCACCAGCATTAAG-3'  
R1B4: 5'-GGGGGACCTGTTGATCTTATC-3'

سپس جهت تعیین ویژگی (Specificity) پرایمرها و تایید اینکه پرایمرها اختصاصاً قطعه مورد نظر ما را از میان کل ژنوم انسان شناسایی خواهند کرد، تسوالی طراحی شده Blast شد (NCBI/ Primer-BLAST).

هر میکروتیوب PCR شامل ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای F1B4 و R1B4 (10 PM)، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم پلیمرز Taq (5 unit/μl)، ۰/۶ میکرولیتر dNTP (10mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۲/۵ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub> (50mM) و ۱ میکرولیتر DNA (50ng/μl) بود که با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر ASTEC PC-818 (Fukuoka، ژاپن) انجام شد. برنامه‌ی دمایی PCR به صورت تاج داون (Touch Down) بود که در چند چرخه اول، دمای اتصال پرایمر از درجات بالاتر از دمای اتصال بهینه‌ی پرایمر شروع می شود تا پرایمر به صورت اختصاصی تری به محل مورد نظر متصل شود. چرخه‌های دمایی و مدت زمان هر چرخه به شرح زیر می باشد: واسرشت ابتدیی در دمای ۹۶°C به مدت ۳ دقیقه، ۵ چرخه تاج داون شامل ۹۵°C برای واسرشت به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه، ۶۱°C به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه برای اتصال پرایمرها در چرخه اول و کاهش به میزان یک درجه به ازای هر

میکرولیتر آنزیم پلیمراز Taq (5 unit/ $\mu$ l)، ۰/۳ میکرولیتر dNTP (10mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۱ میکرولیتر  $MgCl_2$  (50mM) و ۱ میکرولیتر محصول PCR رقیق شده به میزان 100X بود که با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. برنامه‌ی دمایی Semi-nested PCR به صورت تاج داون به شرح زیر استفاده شد: واسرشت ابتدایی در دمای ۹۶°C به مدت ۴ دقیقه، ۷ چرخه تاج داون شامل ۹۵°C برای واسرشت به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه، ۶۳°C به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه برای اتصال در چرخه اول و کاهش یک درجه به ازای هر چرخه تا ۵۷°C در چرخه هفتم و ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه برای گسترش رشته، سپس ۲۵ چرخه شامل ۹۵°C به مدت ۱ دقیقه برای واسرشت، ۵۶°C برای اتصال پرایمر به مدت ۱ دقیقه و ۷۲°C به مدت ۳۵ ثانیه برای گسترش و در آخر گسترش نهایی در ۷۲°C به مدت ۴ دقیقه. محصولات PCR توسط PAGE از لحاظ کیفی بررسی و سپس با نیترات نقره رنگ آمیزی و نوارها با اندازه 407bp رؤیت شد. واکنش PCR-RFLP با آنزیم BsiEI در دمای ۳۷°C روی محصولات ۴۰۷ نوکلئوتیدی نمونه های کنترل استان گرگان انجام شده و آلل تیپ وحشی تحت اثر آنزیم به دو قطعه ۳۸۷ و ۲۰ نوکلئوتیدی برش یافت در حالی که آلل حاوی تغییر نوکلئوتیدی دست نخورده باقی ماند.

قابل ذکر است که کلیه محصولات واکنش PCR-RFLP روی PAGE (به روش فوق) شناسایی شدند. جهت تأیید تغییر نوکلئوتیدی، برای تمام محصولات با نتایج مثبت PCR-RFLP، توالی‌یابی نیز انجام شد.

برای بررسی وراثت دوزنی، در افراد کنترلی که با PCR-RFLP دارای تغییر در GJB4 تشخیص داده شدند، ژن GJB2 (RefSeq ID: NM\_004004) تحت تکثیر با PCR و سپس توالی‌یابی قرار گرفت. پرایمرهای مورد استفاده (۲۹) به شرح زیر بود:

شناسایی برای آنزیم محدود کننده Tth111I در مکان تغییر نوکلئوتیدی در آلل نرمال وجود دارد. محصول PCR مربوط به فرد دارای آلل نرمال به دو قطعه ۶۸۶ و ۲۷۸ نوکلئوتیدی هضم می شود در حالی که آلل دارای تغییر نوکلئوتیدی برش نخورده باقی می ماند.

همچنین برای بررسی وجود تغییر نوکلئوتیدی c.542C>T، در محصولات PCR ژن GJB4 حاصل از ۱۰۰ نمونه کنترل استان آذربایجان شرقی PCR-RFLP با استفاده از آنزیم محدود کننده NcoI (Bsp19I) در دمای ۳۷°C انجام گرفت. تغییر نوکلئوتیدی فوق موجب ایجاد یک مکان شناسایی برای آنزیم محدود کننده NcoI می شود و محصول PCR ژن GJB4 به طول ۹۶۴ نوکلئوتید مربوط به فرد حامل آلل تغییر یافته به دو قطعه ۶۶۶ و ۲۹۸ نوکلئوتیدی هضم می شود، در حالی که آلل نرمال بدون برش باقی می ماند.

برای بررسی وجود یا عدم وجود تغییر نوکلئوتیدی c.451C>A در محصولات PCR ژن GJB4 حاصل از نمونه های کنترل استان گرگان، هیچ یک از آنزیم های تجاری موجود توانایی شناسایی و برش منطقه تغییر یافته و در نتیجه تشخیص آلل تیپ وحشی (Wild Type) از آلل تغییر یافته را نداشتند. در نتیجه مکان شناسایی برای یک آنزیم محدود کننده به صورت مصنوعی ایجاد شد (روش Site directed mutagenesis). این کار با استفاده از پرایمر های ناجور (Mismatch) و یک واکنش نیمه آشیانه ای PCR (Semi-nested) انجام گرفت. پرایمر جدید با یک نوکلئوتید ناجور C>G طراحی شد که موجب ایجاد مکان شناسایی جدید و مکان برش برای آنزیم محدودگر BsiEI می شود. توالی پرایمر پیشرو طراحی شده به صورت:

5'-GCTTCCTCTATATCTTCGAC-3' F2B4 بود که به همراه پرایمر معکوس اولیه طراحی شده برای ژن GJB4، جهت PCR نمونه های کنترل استان گرگان استفاده شد. هر میکروتیوب PCR شامل ۰/۳ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای F2B4 و R1B4 (10 PM)، ۰/۱

C>G در باز شماره ۵۰۷ یافت شد (جدول شماره ۲) که در توالی پروتئینی کانکسین ۳۰/۳ موجب تبدیل سیستمین شماره ۱۶۹، با درجه حفاظت شدگی (Conservation score) برابر ۹، به تریپتوفان خواهد شد (جدول شماره ۳). در بررسی این تغییر به روش PCR-RFLP در ۱۰۰ فرد کنترل از استان آذربایجان شرقی ۷ نفر (۷٪) حامل هتروزیگوت تغییر فوق بودند. نتایج PCR-RFLP با توالی یابی تأیید شد و در ضمن همگی ۷ نفر کنترل مذکور، توالی *GJB2* نرمال داشتند. در بیمار دیگری از آذربایجان شرقی، که دارای جهش اولیه 35delG در *GJB2* بود، یک تغییر به صورت حذف چهار نوکلئوتید TCTG که در باز شماره ۱۵۵ شروع و تا باز شماره ۱۵۸ ادامه داشت، در ژن *GJB4* دیده شد که در توالی پروتئینی کانکسین ۳۰/۳ موجب تبدیل آلانین شماره ۵۲ به والین شده و تغییر چارچوب ایجاد شده موجب ظهور کدون پایان زودرس با فاصله ۵۵ اسید آمینه از نقطه‌ی تغییر خواهد شد. (جدول شماره ۲) در بررسی این تغییر به روش PCR-RFLP در ۱۰۰ نفر کنترل از استان آذربایجان شرقی ۵ نفر (۵٪) حامل هتروزیگوت این تغییر بودند. نتایج PCR-RFLP با روش توالی یابی نیز تأیید شد. در بررسی ژن *GJB2* در کنترل های مثبت، هر ۵ نفر کنترل، توالی *GJB2* نرمال داشتند.

یک بیمار از استان آذربایجان شرقی، که در ژن *GJB2* دارای جهش اولیه R184P بود، تغییری به صورت C>T در باز شماره ۵۴۲ نشان داد که در توالی پروتئینی موجب تبدیل ترئونین شماره ۱۸۱ به متیونین خواهد شد. (جدول شماره ۲) ترئونین تغییر یافته دارای درجه حفاظت شدگی برابر ۹ بود. در هیچ یک از ۱۰۰ نفر کنترل از این استان که به روش PCR-RFLP بررسی شدند، تغییر فوق یافت نشد.

بیماری از استان گلستان، با جهش اولیه 35delG در *GJB2*، یک جایگزینی به صورت C>A در باز شماره ۴۵۱ نشان داد که در توالی پروتئینی موجب تبدیل آرژنین شماره ۱۵۱، با درجه حفاظت شدگی برابر ۲، به سرین خواهد شد (جدول شماره ۲).

F1B2: 5'-CTCCCTGTTCTGTCTAGCT-3'  
R1B2: 5'-CTCATCCCTCTCATGCTGTC-3'

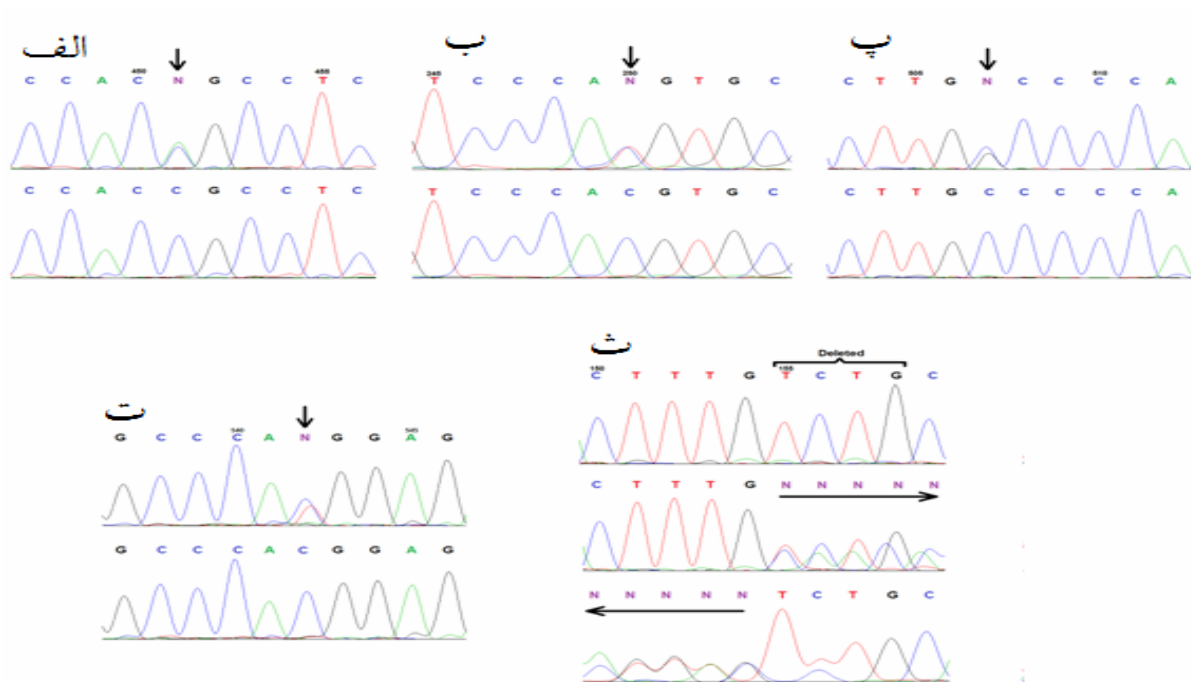
میکروتیوب PCR شامل ۰/۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای F1B2 و R1B2 (10 PM)، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم پلیمرز Taq (5 unit/μl)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (10mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۱ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub> (50mM) و ۲ میکرولیتر DNA (50ng/μl) بود که با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. برنامه‌ی دمایی PCR به صورت تاج داون به شرح زیر استفاده شد: واسرشت ابتدیی در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، ۵ چرخه تاج داون شامل ۹۵°C برای واسرشت به مدت ۱ دقیقه، ۶۲°C به مدت ۱ دقیقه برای اتصال در چرخه اول و کاهش یک درجه به ازای هر چرخه تا ۵۸°C در چرخه پنجم و ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه برای گسترش رشته، سپس ۲۹ چرخه شامل ۹۴°C به مدت ۵۰ ثانیه برای واسرشت، ۵۷°C برای اتصال پرایمر به مدت ۵۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه برای گسترش و در آخر گسترش نهایی در ۷۲°C به مدت ۶ دقیقه. محصولات PCR توسط PAGE بررسی و سپس با نترات نقره رنگ آمیزی و نوارها با اندازه 806bp رؤیت شدند. سپس توالی یابی محصولات PCR (به روش فوق) انجام شد.

## یافته ها:

پس از انجام PCR برای ژن *GJB4* و توالی یابی محصول واکنش و مقایسه توالی ژنی بیماران با توالی ژن مرجع، روی هم رفته ۵ تغییر آلیلی هتروزیگوس در ژن *GJB4* در ۵ نفر از ۴۲ نفر بیمار (۱۱/۹۰٪) شناسایی شد (جدول شماره ۲) (تصویر شماره ۱).

در یک نمونه بیمار از استان گیلان، با جهش اولیه 35delG در *GJB2*، یک تغییر به صورت C>T در باز شماره ۲۱۹ مشاهده شد که در محصول پروتئینی هیچ تغییری در توالی اسید آمینه‌ای وجود نخواهد داشت (جدول شماره ۲).

در یک بیمار از استان آذربایجان شرقی، دارای جهش 35delG در ژن *GJB2*، یک تغییر به صورت



تصویر شماره ۱: الکترو فروگرام تغییرات ژن *GJB4*.

در هر مورد ردیف بالا آلل هتروزیگوت تغییر یافته، ردیف پایین آلل نرمال. الف)  $451C>A$  (ب)  $219C>T$  (پ)  $507C>G$ ،  
ت)  $542C>T$  (ث) ردیف بالا آلل نرمال، ردیف وسط و پایین آلل هتروزیگوت  $155\_158delTCTG$  توالی یابی شده در دو جهت.

جدول شماره ۲: گزارش تغییرات یافت شده در ژن *GJB4*

منابع	آنزیم RFLP	***SNP	فراوانی فراوانی کنترل	فراوانی بیمار (%)	اثر پیش بینی شده	دمین پروتئین**	ژنوتیپ <i>GJB2</i> اولیه	تغییر اسید آمینه*	ژنوتیپ تغییر <i>GJB4</i> *
مطالعه حاضر	BsiEI	rs78499418	1/100	1 (۲/۳۸)	Missense	E2	35delG/Wt	(Arg151Ser)	c.451C>A/Wt
مطالعه حاضر	-	rs143547547	-	1 (۲/۳۸)	Silent	M2	35delG/Wt	(p.=)	c.219C>T/Wt
(۲۴)	StyI	rs79193415	7/100	1 (۲/۳۸)	Missense	E2	35delG/Wt	(p.Cys169Trp)	c.507C>G/Wt
(۲۴)	Tth111I	NR	5/100	1 (۲/۳۸)	Frameshift	E2	35delG/Wt	(p.Ala52ValfsX55)	c.155_158delTCTG/Wt
مطالعه حاضر	NcoI	rs142410428	0/100	1 (۲/۳۸)	Missense	E2	R184P/Wt	(p.Thr181Met)	c.542C>T/Wt

\*نامگذاری (Human Genome Variation Society) HGVS \*\* E2 دمین حلقه خارج سلولی دوم، M2 دمین ترانس ممبران دوم، \*\*\* پایگاه داده چندشکلی نوکلئوتید واحد (dbSNP) NR: گزارش نشده

روش توالی‌یابی نیز تأیید شد و در بررسی ژن *GJB2* در این فرد، توالی *GJB2* نرمال مشاهده شد.

در جستجوی این تغییر به روش PCR-RFLP در ۱۰۰ نفر کنترل از استان گلستان ۱ نفر (۱٪) حامل یک آلل هتروزیگوت این تغییر بود. نتیجه‌ی PCR-RFLP با

### جدول شماره ۳: حفاظت شدگی اسید آمینه تغییر یافته کانکسین ۳/۳۰

موقعیت	اسید آمینه	درجه حفاظت شدگی* (مقیاس)**	داده MSA***	نوع اسید آمینه ای
۱۵۱	R	۷۱۸/۰ (۲)	150/150	F,A,S,T,N,K,Y,V,H,Q,M,C,I,R,L
۱۶۹	C	۹۴۳/۰ (۹)	150/150	A,C
۱۸۱	T	۸۴۷/۰ (۹)	150/150	A,S,M,T,E

\* درجه حفاظت شدگی نرمال شده،  
\*\*\* تعداد توالی های ارگانسیم هم تراز شده  
\*\* مقیاس نشانگر درجه حفاظت شدگی ۹: حفاظت شده ۱: متغیر

### بحث:

به غشای پلاسمایی ضروری است (۳۰)، ایفای نقش در بیماریزایی برای یک تغییر خاموش نسبتاً نامحتمل به نظر می‌رسد. برای مشخص شدن هر گونه نقش ممکن این تغییر بر سطح تولید یا ساختار پروتئین مطالعات بیشتری مورد نیاز است (۳۱).

c.507C>G (p.Cys169Trp) از دیگر تغییراتی بود که در این مطالعه و برخی مطالعات دیگر مشاهده شده است و در ناشنوایی ایفای نقش می‌کند.

در این مطالعات فراوانی این تغییر نوکلئوتیدی در بیماران به صورت معنی داری بالاتر از نمونه های کنترل می باشد (۲۴،۲۳). اسید آمینه تغییر یافته یک سیستم بسیار حفاظت شده در دمن خارج سلولی دوم کانکسین ۳۰/۳ است و در نتیجه هر گونه تغییر در آن می‌تواند موجب ناسازگاری در تشکیل کانال های هتروتیپیک عملکردی شود (۳۰). این موضوع می‌تواند به عنوان شاهدهی مبنی بر اثر دوژنی احتمالی بین *GJB4* و کانکسین های دیگر از جمله *GJB2* جهش یافته در نظر گرفته شود. بر خلاف این مطالعات، این تغییر در ۷ نمونه کنترل از مطالعه حاضر به صورت هتروزیگوس یافت شد. فراوانی بالای هتروزیگوت های حامل این تغییر در نمونه های کنترل نوعی تناقض در نقش این تغییر در بیماریزایی ناشنوایی در ذهن ایجاد می‌کند. در هر حال فرض در این مطالعه، احتمال بیماریزایی در حالت هتروزیگوت مرکب و توارث دوژنی است. حصول اطمینان از نقش این تغییر به صورت دوژنی به همراه

با توجه به اینکه ۳/۲۵ درصد از کل ARNSHL ها، حامل تنها یک آلل جهش یافته *GJB2* می‌باشند، برای بررسی الگوی احتمالی مسبب بیماری، لزوم مطالعه سایر ژن های خانواده کانکسین برای وراثت دوژنی در این هتروزیگوت های جهش های مغلوب *GJB2* ضروری به نظر می‌رسد. بر همین اساس مطالعه حاضر با ۴۲ نمونه بیمار ARNSHL از مناطق مختلف جغرافیایی ایران که دارای یک آلل جهش یافته *GJB2* بودند انجام شد و ژن *GJB4* به عنوان یکی از ژن های خانواده کانکسین که نقش آن در ناشنوایی شناخته شده است، جهت بررسی وجود یا عدم وجود هر گونه تغییر نوکلئوتیدی به عنوان آلل دوم جهش یافته با الگوی وراثت دوژنی، با روش PCR و به دنبال آن توالی یابی مستقیم مورد بررسی قرار گرفت. سپس تغییرات نوکلئوتیدی خاص یافت شده، توسط روش PCR-RFLP در نمونه های افراد کنترل جستجو و بررسی شد.

در این مطالعه پنج تغییر نوکلئوتیدی مختلف در ۵ نمونه از ۴۲ نمونه بیمار (۱۱/۹۰٪) و ۱۳ نمونه از ۲۰۰ نمونه کنترل (۶/۵٪) رد یابی شد. تغییر نوکلئوتیدی c.219C>T در هیچ یک از مطالعات گذشته در ناشنوایی گزارش نشده است و تغییری در کدون اسید آمینه هیستیدین بسیار حفاظت شده در دمن غشایی دوم ایجاد نمی‌کند و به عنوان یک تغییر هم معنی (Synonymous) یا خاموش در نظر گرفته می‌شود. گرچه یکپارچگی این دمن برای انتقال دقیق کانکسین

جایابی نیم کانال‌های اتصالات شکافدار حیاتی است و مسئول سازگاری بین پروتئین‌های کانکسین مختلف جهت ساخت کانال‌های اتصال شکافدار هتروتیپیک عملکردی است (۳۰). با این حال، با توجه به اینکه آرژنینین تغییر یافته یک اسید آمینه غیر حفاظت شده در کانکسین ۳۰/۳ از گونه‌های مختلف می‌باشد و احتمالاً ویژگی‌های عملکردی اندکی در ساختار پروتئین دارد و اینکه تغییر فوق در ۱ نمونه کنترل نیز یافت شد، امکان اثرگذاری این تغییر در ایجاد بیماری به حداقل می‌رسد. مطالعه حاضر می‌تواند به عنوان بخشی از یک پژوهش پایه‌ای برای روشن شدن نسبی نقش وراثت دوزنی در ARNSHL در ایران، همچنین برای معرفی ژن‌های مناسب جهت بررسی در این مورد محسوب شود. در این مطالعه ۱۱/۹۰ درصد از حاملین هتروزیگوت جهش‌های *GJB2* تغییر ثانویه‌ای در ژن *GJB4* به صورت هتروزیگوت مرکب نشان دادند. نکته‌ی جالب توجه اینکه هیچ‌یک از نمونه‌های کنترل هتروزیگوسیستی مضاعف برای *GJB2* نمایش ندادند. این مسئله بیانگر این است که بدون شک بایستی در هتروزیگوت‌های *GJB2*، برهم‌کنش با ژن‌های کانکسین دیگر به عنوان عامل مکمل در بیماریزایی ARNSHL به صورت دوزنی مد نظر قرار گیرد. لذا پیشنهاد می‌شود تغییر T181M در *GJB4* یک جهش احتمالاً بیماریزایا بوده و می‌تواند در حاملین هتروزیگوت *GJB2* در بروز ARNSHL به صورت دوزنی نقش داشته باشد. بی‌تردید مطالعات کارکردی و خانوادگی برای تأیید قطعی تغییرات یافت شده مورد نیاز می‌باشد. همچنین مطالعات دیگری جهت بررسی نقش سایر ژن‌های عضو خانواده ژنی کانکسین در فرضیه وراثت دوزنی ناشنوایی پیشنهاد می‌شود.

### نتیجه‌گیری:

با توجه به شواهد موجود پیشنهاد می‌شود که تغییر *c.542C>T* در ژن *GJB4* و احتمالاً تغییرات دیگر در این ژن، می‌تواند در ابتلا به ARNSHL با الگوی

جهش‌های *GJB2* در ایران نیاز به تحقیقات بیشتر دارد. تغییر *c.155\_158delTCTG (p.Ala52ValfsX55)* یک تغییر چارچوب را در یکی از نمونه‌های بیمار و ۵ نمونه کنترل به وجود آورد که موجب ایجاد یک کدون ایست جدید در توالی نوکلئوتیدی خواهد شد. با این حال López-Bigas و همکاران (۲۴) ثابت کردند که این تغییر نوکلئوتیدی نمی‌تواند عامل ناشنوایی باشد. اطلاعات ما در این تحقیق، یافته‌های آنان را تأیید می‌کند چرا که تغییر معنی‌داری بین بیماران و کنترل‌ها مشاهده نمی‌شود و در هر دو مطالعه میزان فراوانی آللی در جمعیت کنترل بیشتر از میزان مورد انتظار برای یک آلل بیماریزایا است. به علاوه، همانند بسیاری از پروتئین‌های بن‌بریده این پروتئین حاوی کدون ایست زود هنگام نیز در سلول ممکن است در معرض تجزیه با واسطه تغییر بی‌معنی (Non-sense mediated decay) قرار گیرد (۳۲).

تغییر نوکلئوتیدی *c.542C>T (p.Thr181Met)* در گزارشات پیشین در ناشنوایی مطرح نشده است. در این تغییر یک ترنونین کاملاً حفاظت شده در دمین حلقه خارج سلولی دوم تغییر پیدا کرده است که نشانگر نقش مهم این اسید آمینه در ساختار و کارکرد کانکسین ۳۰/۳ است. با توجه به دمین مربوطه، بسیار محتمل است که تغییر فوق جایابی نیم کانال و کنار هم جمع شدن Cx30.3 با کانکسین‌های دیگر در کانال‌های هتروتیپیک را تحت تأثیر قرار دهد (۳۰). علاوه بر این تغییر نوکلئوتیدی فوق در نمونه‌های کنترل سالم استان آذربایجان شرقی دیده نشد. بنابر این در بین تغییرات یافت شده در ژن *GJB4*، با توجه به شواهد موجود تغییر T181M به همراهی جهش R184P در *GJB2*، محتمل ترین جهشی است که می‌تواند به عنوان جهش بیماریزایا در الگوی دوزنی ناشنوایی نقش داشته باشد.

تغییر *c.451C>A (Arg151Ser)* یک جایگزینی است که در هیچ یک از مطالعات پیشین در ناشنوایی گزارش نشده است. در این مورد دمین خارج سلولی دوم در *GJB4* تحت تأثیر قرار می‌گیرد که برای



این مطالعه سپاسگذاری می‌شود. همچنین از تمامی کارکنان مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و کلیه افرادی که در اجرای این پروژه ما را یاری رساندند قدردانی می‌کنیم. این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته‌ی ژنتیک پزشکی می‌باشد که توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تحت گرنت شماره ۶۶۴۸۰۰۰۰ تأمین مالی شده است.

دوژنی در حاملین جهش‌های هتروزیگوت *GJB2* نقش داشته باشد. همچنین *GJB4* ژن مناسب و با پتانسیل بالایی جهت بررسی وراثت دوژنی به همراهی جهش‌های هتروزیگوت *GJB2* گزارش می‌شود.

### تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از بیماران و افراد کنترل به دلیل مشارکت در

---

### منابع:

1. Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE. Genetic epidemiological studies of early onset deafness in the US school age population. *Am J Med Genet.* 1993 Jun; 46(5): 486-91.
2. Van Laer L, Cryns K, Smith RJH, Van Camp G. Nonsyndromic hearing loss. *Ear Hear.* 2003 Aug; 24(4): 275-88.
3. Petersen M, Willems P. Non syndromic, autosomal recessive deafness. *Clin Genet.* 2006 May; 69(5): 371-92.
4. Kelley P, Harris D, Comer B, Askew J, Fowler T, Smith S, et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet.* 1998 Apr; 62(4): 792-9.
5. Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ. Prevalent connexin 26 gene (*GJB2*) mutations in Japanese. *J Med Genet.* 2000 Jan; 37(1): 41-3.
6. Denoyelle F, Marlin S, Weil D, Moatti L, Chauvin P, Garabédian ÉN, et al. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet.* 1999 Apr; 353(9161): 1298-303.
7. Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L, et al. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet.* 1998 Feb; 351(9100): 394-8.
8. Gabriel H, Kupsch P, Sudendey J, Winterhager E, Jahnke K, Lautermann J. Mutations in the connexin26/*GJB2* gene are the most common event in non syndromic hearing loss among the German population. *Hum Mutat.* 2001 Jun; 17(6): 521-2.
9. Lench N, Houseman M, Newton V, Van Camp G, Mueller R. Connexin-26 mutations in sporadic non-syndromal sensorineural deafness. *Lancet.* 1998; 351(9100): 415.
10. Murgia A, Orzan E, Polli R, Martella M, Vinanzi C, Leonardi E, et al. Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *J Med Genet.* 1999 Nov; 36(11): 829-32.
11. Scott D, Kraft M, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, Yairi Y, et al. Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum mutat.* 1998; 11(5): 387-94.
12. Sobe T, Vreugde S, Shahin H, Berlin M, Davis N, Kanaan M, et al. The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. *Hum Genet.* 2000; 106(1): 50-7.
13. Wilcox SA, Saunders K, Osborn AH, Arnold A, Wunderlich J, Kelly T, et al. High frequency hearing loss correlated with mutations in the *GJB2* gene. *Hum Genet.* 2000; 106(4): 399-405.

14. Rabionet R, Zelante L, Lopez-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, et al. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum Genet.* 2000; 106(1): 40-4.
15. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem.* 1996; 65: 475-502.
16. Belguith H, Tlili A, Dhoubi H, Rebeh IB, Lahmar I, Charfeddine I, et al. Mutation in gap and tight junctions in patients with non-syndromic hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jul; 385(1): 1-5.
17. Yang JJ, Wang WH, Lin YC, Weng HH, Yang JT, Hwang CF, et al. Prospective variants screening of connexin genes in children with hearing impairment: genotype/phenotype Correlation. *Hum Genet.* 2010; 128(3): 303-13.
18. Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Hum Mutat.* 2000; 16(3): 190-202.
19. Chaleshtori MH, Farhud D, Patton M. Congratulation to margaret chan familial and sporadic *GJB2*-Related Deafness in Iran: Review of Gene Mutations. *Iran J Pub Health.* 2007; 36(1): 1-14.
20. Liu XZ, Yuan Y, Yan D, Ding EH, Ouyang XM, Fei Y, et al. Digenic inheritance of non-syndromic deafness caused by mutations at the gap junction proteins Cx26 and Cx31. *Hum Genet.* 2009; 125(1): 53-62.
21. 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? *European journal of human genetics.* *Eur J Hum Genet.* 2002 Jan; 10(1): 72-6.
22. Rodriguez-Paris J, Schrijver I. The digenic hypothesis unraveled: the *GJB6*-D13S1830) mutation causes allele-specific loss of GJB2 expression in cis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Nov; 389(2): 354-9.
23. Yang JJ, Huang SH, Chou KH, Liao PJ, Su CC, Li SY. Identification of mutations in members of the connexin gene family as a cause of nonsyndromic deafness in Taiwan. *Audiol Neurootol.* 2007; 12(3): 198-208.
24. Lopez Bigas N, Melchionda S, Gasparini P, Borragán A, Arbonés ML, Estivill X. A common frameshift mutation and other variants in GJB4 (connexin 30.3): Analysis of hearing impairment families. *Hum Mutat.* 2002; 19(4): 458.
25. Wang WH, Yang JJ, Lin YC, Yang JT, Li SY. Novel expression patterns of connexin 30.3 in adult rat cochlea. *Hear Res.* 2010 Jun; 265(1-2): 77-82.
26. Alexandrino F, de Oliveira CA, Magalhaes RF, Florence MEB, de Souza EM, Sartorato EL. Connexin mutations in Brazilian patients with skin disorders with or without hearing loss. *Am J Med Genet A.* 2009 Feb; 149A(4): 681-4
27. 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 Oct; 17(20): 8390.
28. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000; 132(3): 365-86.
29. 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. *J Sci Islam Rep Iran.* 2010; 21(2): 105-12.

30. Krutovskikh V, Yamasaki H. Connexin gene mutations in human genetic diseases. *Mutat Res.* 2000 Apr; 462(2-3): 197-207.
31. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet.* 2011 Aug; 12(10): 683-91.
32. Frischmeyer PA, Dietz HC. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet.* 1999; 8(10): 1893-900.

Archive of SID

## Digenic inheritance of *GJB4* gene in autosomal recessive Non-syndromic hearing loss patients with one mutant *GJB2* allele.

Kooshavar D (MSc)<sup>1,2</sup>, Farrokhi E (MSc)<sup>2</sup>, Abolhasani M (MSc)<sup>2</sup>, Tabatabaiefar MA (PhD)<sup>1,3</sup>, Noori Dalooi MR (PhD)<sup>1</sup>, Hashemzadeh-Chaleshtori M (PhD)<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Medical Genetics Dept., Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran; <sup>2</sup>Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; <sup>3</sup>Medical Genetics Dept., Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, I.R.

Received: 31/Jul/2012      Revised: 11/Aug/2012      Accepted: 1/Sep/2012

**Background and aims:** Autosomal Recessive Non-syndromic Hearing Loss (ARNSHL), in up to 50 percent of the cases, is caused by mutations in *GJB2* (GJ: Gap Junction) gene, encoding connexin 26. However 10 to 42 percent of patients with recessive mutations are carriers of only one mutant *GJB2* allele. Mutations in *GJB4* gene encoding Cx30.3 can also lead to hearing loss. Mixing of different connexins in heteromeric and heterotypic GJ assemblies is possible. The aim of this study is to answer whether variations *GJB4* gene can be the second mutant allele causing the disease in Digenic mode of inheritance in the *GJB2* heterozygous cases studied.

**Methods:** In this descriptive study 42 subjects with ARNSHL from seven provinces of Iran were examined and using polymerase chain reaction (PCR) then conservation of involved amino acids was obtained. According to the variations found in patients, 200 hearing control samples were tested sequenced using Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method.

**Results:** In *GJB4* gene five heterozygous variations (c.451C>A, c.219C>T, c.507C>G, c.155\_158delTCTG, c.542C>T) were found in five patients and 13 control individuals. c.542C>T variation was not detected in control samples and conservation score of corresponding amino acid was very high.

**Conclusion:** Regarding the obtained evidences, it is suggested that c.542C>T variation in *GJB4* and other variations in this gene with lower possibility might contribute to ARNSHL in digenic pattern in heterozygote carriers of *GJB2*.

**Keywords:** Connexin, Digenic inheritance, Hearing loss, *GJB2*, *GJB4*.

**Cite this article as:** Kooshavar D, Farrokhi E, Abolhasani M, Tabatabaiefar MA, Noori-Dalooi MR, Hashemzadeh-Chaleshtori M. Digenic inheritance of *GJB4* gene in Autosomal Recessive Non-syndromic Hearing loss patients with one mutant *GJB2* allele. J Sharekord Univ Med Sci. 2013 Feb, March; 14(6): 89-100.

**\*Corresponding author:**

Cellolar and Molecoular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Rahmatieh, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 00983813346692, E-mail: mchalesh@yahoo.com