

## شناسایی جهش در اگزون ده ژن *SLC26A4* در افراد ناشنوا در استان گیلان

امید رضایی<sup>۱</sup>، نجمه رنجی<sup>۲</sup>، زینب خزان‌کوهپیر<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناس ارشد، ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران  
<sup>۲</sup> استادیار، ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران  
<sup>۳</sup> استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

### چکیده

تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۷/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۲۰

**مقدمه:** نقص در ژن *SLC26A4* یکی از علل ناشنوایی سندرمی و غیر سندرمی است. جهش در این ژن به عنوان دومین علت شایع ناشنوایی در دنیا بعد از ژن *GJB2* گزارش شده است. هدف از این مطالعه ارزیابی جهش‌ها در اگزون ده ژن *SLC26A4* در افراد ناشنوا در استان گیلان بود.

**مواد و روشها:** در این مطالعه توصیفی مقطعی، نمونه‌های خونی از ۳۱ فرد ناشنوا در استان گیلان جمع‌آوری گردید. بعد از استخراج DNA، اگزون ده ژن *SLC26A4* به روش PCR تکثیر و تعیین توالی شد. یافته‌ها: در این مطالعه، ۲۲ زن (۷۱٪) و ۹ مرد (۲۹٪) دچار ناشنوایی شناسایی شدند و در پنج بیمار (۱۶٪)، جهش در اگزون ده ژن *SLC26A4* یافت شد. چهار بیمار، جابجایی بازی در کدون ۳۹۹ (p.S399P, c.1195T>C) بصورت هتروزیگوس داشتند. همچنین در یک بیمار، حذف تک نوکلئوتیدی در کدون ۳۹۹ (p.S399S, c.1197delT) بصورت هموزیگوس یافت شد.

**نتیجه:** به نظر می‌رسد جهش در ژن *SLC26A4* یکی از دلایل مهم ناشنوایی در افراد ناشنوا در استان گیلان باشد.

**کلمات کلیدی:** ناشنوایی، اگزون ده، جهش، ژن *SLC26A4*

### نویسنده مسئول:

استادیار، ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۰۱۳-۳۳۴۲۴۰۸۰

E-mail: n\_ranjji@iaurash.ac.ir

## مقدمه

ناشنوایی، شایعترین ناهنجاری حسی عصبی است که شیوع آن بین ۱ در ۳۰۰ تا ۱ در ۱۰۰۰ در کودکان متغیر می‌باشد.<sup>۱</sup> ناشنوایی به دو نوع سندرمی (۳۰٪) و غیر سندرمی (۷۰٪) قابل تقسیم است. بیش از ۳۰۰ سندرم شناسایی شده که ناشنوایی همراه با علائم دیگر، جزء عوارض آن سندرم می‌باشد از جمله سندرم پندرد (ناشنوایی همراه با ناهنجاری در غده تیروئید) و سندرم واردنبرگ (علائمی چون ناشنوایی یا کم شنوایی، سفید شدن بخشی از موی جلوی سر و یا عنبیه چشم با دو رنگ متفاوت). در حالی که در ناشنوایی غیر سندرمی، عارضه ای به غیر ناشنوایی در بیمار مشاهده نمی‌گردد.<sup>۲</sup> در این بین، حدود ۸۰٪ موارد غیر سندرمی الگوی وراثت اتوزومی مغلوب (deafness non-syndromic B: DFNB)، حدود ۲۰٪ موارد الگوی اتوزومی غالب (deafness non-syndromic A: DFNA) و ۱٪ وابسته به X (deafness non-syndromic: DFN) می‌باشند.<sup>۳</sup> فراوانی جهش‌های میتوکندریایی در ناشنوایی غیر سندرمی حدود ۱٪ است.<sup>۴</sup> شایع‌ترین علل ناشنوایی غیر سندرمی جهش در ژنهای *SLC26A4*، *GJB2* و *12S rRNA* میتوکندریایی می‌باشد.<sup>۱</sup>

جهش در ژن *SLC26A4* هم در ناشنوایی سندرمی پندرد (Pendred) و هم ناشنوایی غیر سندرمی DFNB4 با الگوی وراثت اتوزومی مغلوب مشاهده می‌شود. ژن *SLC26A4* دارای ۲۱ اگزون بوده و موقعیت کروموزومی آن 7q22-31 می‌باشد.<sup>۵</sup> این ژن کد کننده یک پروتئین غشایی به نام پندرین (pendrin) با وزن ۸۵ کیلو دالتون و ۷۸۰ اسید آمینه است. ژن *SLC26A4* در تیروئید، گوش داخلی و کلیه بیان می‌شود. بیش از ۳۰۰ نوع جهش در این ژن در موارد ناشنوایی گزارش شده است.<sup>۶</sup> عملکرد ناقص پندرین باعث اسیدیفیکاسیون مایع درون گوش (اندولنف) و در نتیجه نقص در انتقال حسی شنیداری می‌گردد. در حالی که عملکرد طبیعی آن با مهار بازجذب  $Ca^{2+}$  و تبادل کلرید/بی کربنات باعث حفظ هموستازی pH در گوش داخلی می‌شود. همچنین در تیروئید به عنوان یک مبادله کننده کلرید با ید، عمل می‌کند.<sup>۴</sup> پندرین دارای یک انتهای آمینی درون سلولی، ۱۱ دومین درون غشایی و یک انتهای کربوکسی خارج سلولی است.<sup>۷</sup>

جهش در ژن *SLC26A4* شایعترین جهش مربوط به ناشنوایی در شرق آسیا و دومین علت شایع بعد از جهش در کانکسین ۲۶ (GJB2) در دنیا<sup>۸</sup> و هم در ایران<sup>۹</sup> محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی جهش‌های اگزون ۱۰ ژن *SLC26A4* در افراد مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی در استان گیلان با استفاده از روش PCR-Sequencing بود.

## مواد و روش‌ها

## بیماران

در این مطالعه توصیفی، بعد از تصویب تحقیق در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن به شماره IR.IAU.TON.REC.1398.015 با همکاری اداره کل بهداشتی استان گیلان و اداره بهداشتی شهرستان رشت و با مراجعه به کانون ناشنوایی رشت و کانون ناشنوایی سکوت سفید (در بندر انزلی) از ۳۱ فرد غیر خویشاوند مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی، بعد از کسب رضایت نامه از فرد یا والدین شان، خونگیری از ناشنویان انجام شد. نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی EDTA نیم مولار تا زمان استفاده در فریزر منفی ۲۰ نگهداری شد.

## استخراج DNA ژنومی

نمونه‌های خونی در لوله‌های حاوی EDTA نیم مولار تا زمان استخراج، نگهداری شد. سپس با استفاده از کیت WizPrepTM gDNA Mini Kit (شرکت Wizbiosolutions، کره جنوبی) استخراج DNA انجام شد. به این منظور ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه خونی با بافر GB و پروتئیناز K مخلوط و بعد از ورتکس (Vortex) در ۵۶ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. بعد از افزودن اتانول به لیزات سلولی و ورتکس آن، نمونه‌ها به ستون (spin column) منتقل و به مدت ۱ دقیقه با دور 13000 rpm سانتریفیوژ گردید. برای شستشو از بافر W1 و سپس بافر W2 استفاده شد. در هر مرحله نمونه‌ها بعد از مخلوط شدن با بافر شستشو، سانتریفیوژ و سپس محلول زیرین دور ریخته شد. در نهایت به DNA موجود در فیلتر ستون ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل یا بافر رقیق سازی (Elution buffer) اضافه و برای خروج از ستون، سانتریفیوژ گردید. محلول

باز، نمونه‌ها با حفظ زنجیره سرمایی به شرکت BGI group ارسال و تعیین توالی گردید. سپس نتایج حاصل از سکونسیک به کمک نرم افزار CLC main workbench v3.5 و نرم افزار آنالیز بلاست (BLAST) از نظر وجود جهش در افراد ناشنوا در مقایسه با توالی رفرنس موجود در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفت.

### یافته‌ها

در این مطالعه ۳۱ فرد ناشنوا با قومیت گیلانی شناسایی شد (جدول ۱). بعد از اطمینان از تک باند بودن محصولات PCR (شکل ۱)، تعیین توالی صورت گرفت و در پنج بیمار جهش شناسایی شد. در چهار بیمار، جهش پاتوژن S399P (c.1195T>C) بصورت هتروزیگوت مشاهده شد که منجر به تغییر آمینو اسید سرین به پرولین در کدون ۳۹۹ گردید (شکل ۲) و در یک بیمار جهش از نوع حذف S399S (c.1197delT) بصورت هموزیگوت گزارش گردید (شکل ۳) که منجر به حذف تک نوکلئوتیدی T در باز ۱۱۹۷م در ناحیه کدینگ ژن شد. در این بیمار حذف تک نوکلئوتیدی باعث تغییر قالب خواندن (frame shift) ژن و پایان زودرس در ۳۴مین کدون بعد از کدون ۳۹۹ گردید.

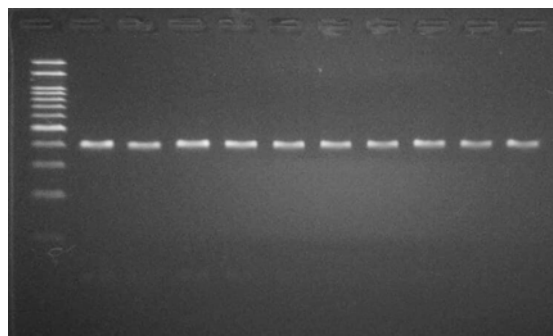
جمع آوری شده حاوی DNA در میکروتیوب زیر ستون، برای ادامه تحقیق جهت اطمینان از تخلیص مناسب، در ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید.

### واکنش PCR و تعیین توالی اگزون ۱۰ ژن SLC26A4

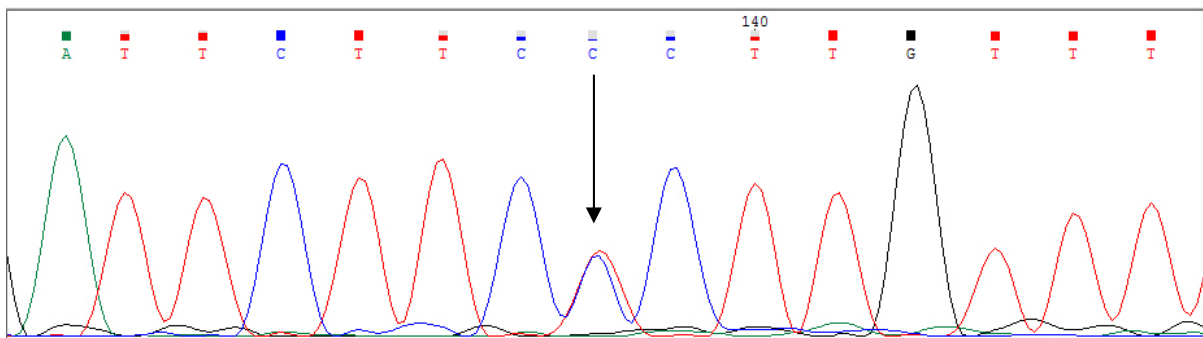
بعد از تخلیص DNA و اطمینان از تک باند بودن آن در ژل آگارز ۱/۵٪، اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ μl با استفاده از کیت Pfu master mix (شرکت PhiloKorea، کره جنوبی) با افزودن DNA ژنومی، جفت پرایمر (۱۰ μM) و آب استریل به مسترمیکس (حاوی آنزیم، کوفاکتور و بافر مخصوص) آماده شد. سنتز پرایمرها توسط شرکت Bioneer صورت گرفت. واکنش PCR با استفاده از ترموسایکلر Analytik jena طبق برنامه ذیل انجام شد: یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در ۹۴°C بمدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل در دمای ۹۴°C بمدت ۳۰ ثانیه، ۶۳°C بمدت ۳۰ ثانیه، ۷۲°C بمدت ۳۰ ثانیه، و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲°C بمدت ۵ دقیقه. توالی پرایمرها بصورت زیر می‌باشد: پرایمر مستقیم 5'-GGACCACCACGCAGAGTAGGC-3' و پرایمر برگشتی 5'-GATTCAGGTGAGGGAGTGGA-3'. بعد از اطمینان از تک باند بودن محصولات PCR با طول ۴۰۰ جفت

جدول ۱: اطلاعات دموگرافیک ناشنویان

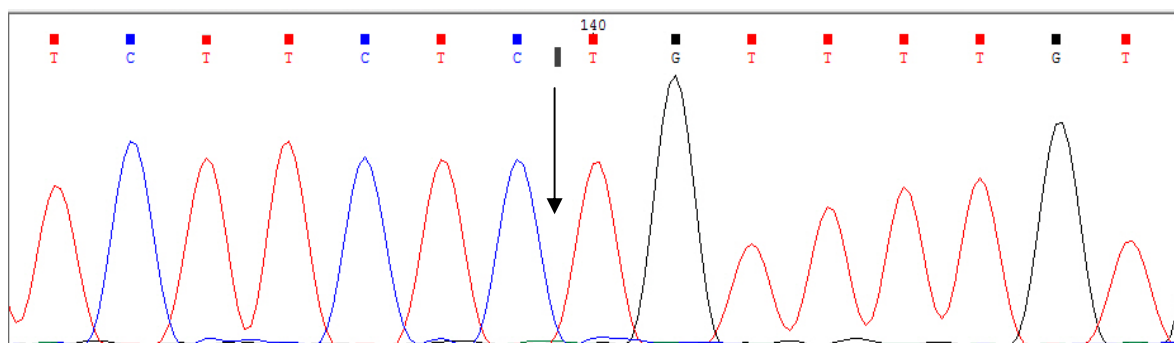
قومیت	میانگین سنی (سال)	تعداد (درصد)	جنسیت
گیلک	۳۳/۳۳	۹ (~۲۹٪)	مرد
		۲۲ (~۷۱٪)	زن



شکل ۱: محصولات PCR مربوط اگزون ۱۰ ژن SLC26A4 در ژل آگارز ۱/۵٪ با طول ۴۰۰ جفت باز. لدر ۱۰۰ جفت بازی در چاهک اول از سمت چپ لود شده است.



شکل ۲: الکتروفروگرام مربوط به جهش S399P (TCT>CCT) بصورت هتروزیگوت در یک فرد ناشنوا مشاهده شد.



شکل ۳: الکتروفروگرام مربوط به جهش هموزیگوت 1197delT که با تغییر TCT به TCT در کدون ۳۹۹ باعث تبدیل سرین به سرین گردید. این حذف با تغییر قالب خواندن منجر به پایان زودرس ترجمه ۳۱ کدون بعد از کدون ۳۹۹ شد.

جدول ۱: جهش‌های مشاهده شده در اگزون ۱۰ ژن *SLC26A4* در افراد ناشنوا در استان گیلان

تعداد بیماران	نام جهش	نوع جهش	تعداد آلل‌ها	فراوانی نسبی
۴	p.S399P c.1195T>C	جابجایی بازی (جهش بدمعنی)	۴	٪۶/۴۵
۱	p.Ser399SerfsX31 c.1197delT	حذف تک نوکلئوتیدی با تغییر قالب خواندن	۲	٪۳/۲۲
جمع کل			۶	٪۹/۶۷

### بحث

در مطالعه محسنی و همکاران در تهران از بین ۸۰ فرد مبتلا به ناشنوایی، ده جهش در ژن *SLC26A4* به روش توالی‌یابی در ۸ خانواده شناسایی شد.<sup>۸</sup> در مطالعه یزدان پناهی و همکاران در بین ۱۲۱ فرد ناشنوا، ۱۲ جهش در ۲۲ آلل در شهرکرد در این ژن شناسایی شد.<sup>۹</sup> فراوانی جهش در این ژن در جمعیت‌های مختلف ناشنوای غیر سندرومی در دنیا متفاوت است. در پاکستان ٪۷/۲، در شمال چین ٪۸/۹۵، در کره ٪۶/۵ و در مغولستان ٪۲/۱ فراوانی

ناشنوایی در صورت داشتن علل ژنتیکی، یک نوع ناهنجاری ناهمگن ژنتیکی محسوب می‌شود و در هر جمعیت لازم است فراوانی ژنهای مؤثر در بروز آن بررسی شود. در این مطالعه ۳۱ فرد ناشنوا از نظر وجود جهش در اگزون ۱۰ ژن *SLC26A4* بررسی و در پنج بیمار در این اگزون، جهش شناسایی شد.

نوکلئوتید ۱۱۹۷ در اگزون ۱۰ ژن SLC26A4 منجر به تغییر قالب خواندن از کدون ۴۰۰ و در نتیجه تولید یک پروتئین کوتاه شده با پایان زودرس در کدون ۴۳۰ می‌گردد. حذف تک نوکلئوتیدی در دومین هفتم درون غشایی رخ داده و باعث حذف دو دومین و نیم از قسمت کربوکسی ترمینال پروتئین پندرین می‌گردد. همچنین مشخص شده که جهش 1197delT به صورت هموزیگوت یا در ترکیب با جهشهای دیگر موجب سندرم پندرد می‌گردد.<sup>۷</sup> در مطالعه حاضر در یک بیمار این جهش بصورت هموزیگوت گزارش گردید. در نتیجه بر اساس نتایج حاصل و دیگر مطالعات می‌توان علت ژنتیکی ناشنوایی را در بیمار مذکور حذف تک نوکلئوتیدی در اگزون ۱۰ ژن SLC26A4 دانست.

### تشکر و سپاسگزاری

نتایج این مقاله مستخرج از پایان نامه دانشجویی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن بوده، لذا نویسندگان از اداره کل بهزیستی استان گیلان، بهزیستی شهرستان رشت، کانون‌های ناشنوایی استان گیلان مستقر در شهرهای رشت و بندر انزلی کمال تشکر و قدردانی را دارند. همچنین از آقای سبحان درویشی به جهت همکاری در آنالیز نتایج کمال تشکر را داریم.

جهش در این ژن گزارش شده است.<sup>۱۰</sup> چندین مطالعه در ایران، فرکانس جهش در این ژن را ۷/۵٪ و ۱۰/۸٪ گزارش کردند.<sup>۱۱</sup> با اینحال در مطالعه حاضر در پنج فرد ناشنوا (۱۶٪) جهش در این اگزون گزارش گردید که نسبت به گزارش‌های قبلی در کشور و هم در کشورهای آسیایی دیگر، فرکانس بالاتری نشان داد.

در مطالعه Hutchin و همکاران در یک جمعیت ناشنوای قفقازی در یک خواهر و برادر ناشنوا جهش S399P مشاهده شد. این جهش پاتوزنیک بوده و در افراد سالم گزارش نشده است.<sup>۱۲</sup> در مطالعه Adhikary و همکاران در هند جهش S399P در ۲ بیمار از بین ۲۱۵ فرد ناشنوا شناسایی شد.<sup>۱۳</sup> در مطالعه حاضر در چهار فرد مبتلا به ناشنوایی ارثی با سابقه فامیلی، جهش بدمعنی S399P بصورت هتروزیگوت در اگزون ۱۰ ژن SLC26A4 شناسایی گردید. با توجه به اینکه در مطالعات قبلی این جهش فقط در افراد ناشنوا گزارش شده، بنابراین این جهش پاتوزن در چهار فرد ناشنوا در استان گیلان باید با جهش دومی همراهی داشته باشد تا منجر به ناشنوایی گردیده و این جهش دوم ممکن است در دیگر اگزونهای ژن SLC26A4 و یا دیگر ژنهای دخیل در ناشنوایی رخ داده باشد. در مطالعه کهریزی و همکاران بر روی ۸۰ فامیل ناشنوا در تهران در یک فامیل با سه فرد مبتلا جهش 1197delT مشاهده گردید.<sup>۱۴</sup> در مطالعه Lofrano-Porto و همکاران در برزیل، جهش 1197delT در ۶ خواهر و برادر ناشنوا شناسایی گردید.<sup>۱۵</sup> حذف

### References

- Huang B, Han M, Wang G, et al. Genetic mutations in non-syndromic deafness patients in Hainan Province have a different mutational spectrum compared to patients from Mainland China. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2018;108: 49-54
- Najm-Abadi H, Kahrizi K. Review: Hearing Loss Genetics. *Archives of Rehabilitation* 2005;6(1): 48-56.
- Tabatabaiefar M, Alasti F, Zohour MM, et al. Genetic Linkage Analysis of 15 DFNB Loci in a Group of Iranian Families with Autosomal Recessive Hearing Loss. *Iran J Public Health* 2011;40(2): 34-48.
- Nonose RW, Lezirovitz K, de Mello Auricchio MTB, et al. Mutation analysis of SLC26A4 (Pendrin) gene in a Brazilian sample of hearing-impaired subjects. *BMC Med Genet*. 2018;19(1): 73.
- Reisi S, Sanati MH, Tabatabaiefar MA, et al. The Study of SLC26A4 Gene Causing Autosomal Recessive Hearing Loss by Linkage Analysis in a Cohort of Iranian Populations. *Int J Mol Cell Med*. 2014;3(3): 176-82.
- Khan MR, Bashir R, Naz S. SLC26A4 mutations in patients with moderate to severe hearing loss. *Biochem Genet*. 2013;51(7-8): 514-23.
- Fugazzola L, Mannavola D, Cerutti N, et al. Molecular analysis of the Pendred's syndrome gene and magnetic resonance imaging studies of the inner ear are essential for the diagnosis of true Pendred's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(7): 2469-75.
- Screening of DFNB4 locus in Iranian Families with Hereditary Hearing Impairment. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism* 2008;10(4): 395-400.
- Yazdanpanahi N, Tabatabaiefar MA, Bagheri N, et al. The role and spectrum of SLC26A4 mutations in Iranian patients with autosomal recessive hereditary deafness. *Int J Audiol*. 2015;54(2): 124-30.

10. Anwar S, Riazuddin S, Ahmed ZM, et al. SLC26A4 mutation spectrum associated with DFNB4 deafness and Pendred's syndrome in Pakistanis. *Journal of Human Genetics* 2009;54(5): 266-70.
11. Ghasemnejad T, Shekari Khaniani M, Zarei F, et al. An update of common autosomal recessive non-syndromic hearing loss genes in Iranian population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2017;97:113-26.
12. Hutchin T, Coy N, Conlon H, et al. Assessment of the genetic causes of recessive childhood non-syndromic deafness in the UK – implications for genetic testing. *Clinical Genetics* 2005;68(6): 506-12.
13. Adhikary B, Ghosh S, Paul S, et al. Spectrum and frequency of GJB2, GJB6 and SLC26A4 gene mutations among nonsyndromic hearing loss patients in eastern part of India. *Gene* 2015;573(2): 239-45.
14. Kahrizi K, Mohseni M, Nishimura C, et al. Identification of SLC26A4 gene mutations in Iranian families with hereditary hearing impairment. *Eur J Pediatr.* 2009;168(6): 651-3.
15. Lofrano-Porto A, Barra GB, Nascimento PP, et al. Pendred syndrome in a large consanguineous Brazilian family caused by a homozygous mutation in the SLC26A4 gene. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(8): 1296-303.

Omid Rezaei<sup>1</sup>, Najmeh Ranji<sup>2\*</sup>, Zeinab Khazaei Koohpar<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc Student, Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

## Mutation Identification in Exon 10 of *SLC26A4* Gene in Individuals with Hearing Loss in Guilan Province

Received: 3 Oct. 2019; Accepted: 9 Feb. 2020

### Abstract

**Introduction:** Mutation in *SLC26A4* gene is one of reason of syndromic and non-syndromic hearing loss. Mutation in this gene is reported to be the second most common cause of deafness in the worldwide, after *GJB2* gene. The aim of this study was to evaluate mutations in exon 10 of *SLC26A4* gene in individuals with hearing loss in Guilan province.

**Materials and Methods:** In this descriptive cross-sectional study, blood samples were collected from 31 individuals with hearing loss from Guilan province. After DNA extraction, exon 10 of *SLC26A4* gene was amplified by PCR method and underwent direct sequencing.

**Results:** In this study, 22 women (71%) and 9 men (29%) with hearing loss were found and in five patients (16%) was detected mutation in exon 10 of *SLC26A4* gene. Four patients had base substitution in codon 399 (c.1195T>C, p.S399P) as heterozygous. Also, in a patient was found a nucleotide deletion in codon 399 (c.1197delT, p.S399SfsX31) as homozygous.

**Discussion:** It seems that mutation in *SLC26A4* is one of the important reasons of deafness in hearing loss individual in Guilan province.

**Keywords:** Hearing loss, Exon 10, Mutation, *SLC26A4* Gene

**\*Corresponding Author:**  
Department of Biology,  
Faculty of Basic Sciences,  
Rasht Branch, Islamic Azad  
University, Rasht, Iran.  
P.O.Box: 41335-3516

Tel: 013-33424080  
E-mail: n\_ranji@iaurasht.ac.ir