Journal of
Arak University of Medical Sciences

April & May 2021. Vol 24. Issue 1

Research Paper

Investigating *GJB2* Mutation in 31 Individuals With Non-syndromic Hearing Loss

Pedram Pouryari Biyachal[1], *Najmeh Ranji[2], Ali Nazemi[1]

1. Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
2. Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation: Pouryari Biyachal P, Ranji N, Nazemi A. [Investigation of *GJB2* Mutation in 31 Individuals With Non-syndromic Hearing Loss in Guilan Province (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2021; 24(1):50-61. https://doi.org/10.32598/JAMS.24.1.4277.6

https://doi.org/10.32598/JAMS.24.1.4277.6

CC BY NC

Article Info:
Received: 13 Jul 2020
Accepted: 26 Oct 2020
Available Online: 01 April 2021

Keywords:
GJB2 gene, *Gene deletion*, Hearing loss, Sequencing

ABSTRACT

Background and Aim Non-syndromic hearing loss is a genetically heterogeneous disorder. Mutation in the *GJB2* gene is a major cause of non-syndromic hearing loss in numerous countries. This study aimed to evaluate *GJB2* mutations in 31 individuals with non-syndromic hearing loss

Methods & Materials In this descriptive cross-sectional study, the required blood samples were collected from 31 individuals with non-syndromic hearing loss in Rasht and Bandar Anzali Cities, Gilan Province, Iran. After DNA isolation, the *GJB2* gene was amplified by the PCR method and underwent sequencing.

Ethical Considerations This study was approved by the Ethics Committee of the Islamic Azad University, Mashhad Branch (Code: IR.IAU.MSHD.REC.1398.027).

Results In this study, 3 mutations were determined in 18 individuals with hearing loss. Accordingly, 35delG mutation had the highest frequency (48.38%) in individuals with hearing loss as homozygote (n=14) and heterozygote (n=2). A patient with heterozygosity in V153I mutation and a patient with compound heterozygosity in 35delG/G200R mutation was determined.

Conclusion It appears that 35delG mutation is a common mutation in the *GJB2* gene in individuals with non-syndromic hearing loss in Guilan Province.

Extended Abstract

1. Introduction

Deafness is among the major sensory-neurological deficits; the World Health Organization (WHO) estimates that approximately 360 million individuals with mild to severe deafness live in the world. Deafness is a heterogeneous disorder, i.e., caused by environmental and genetic factors [1]. Despite the genetic diversity of deafness in different populations, the DFNB1 locus is the cause of approximately 50% of non-syndromic deafness [2]. The *GJB2* gene is located at the DFNB1 locus and has two exons [1]; it produces a protein product called connexin 26 [2]. Connexin 26 acts as an essential regulator of potassium ion (K+) homeostasis in the inner ear. Without K+ exchanges, auditory cells fail to respond to sound responses [2]. This study aimed to evaluate *GJB2* gene mutations by PCR-sequencing in 31 non-syndromic deaf individuals.

2. Materials and Methods

In this descriptive cross-sectional study, a total of 85 unrelated deaf individuals from 85 families who were referred

* *Corresponding Author:*
Najmeh Ranji, PhD.
Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
Tel: +98 (13) 33424080
E-mail: n_ranji@iaurasht.ac.ir

Table 1. Mutations observed in GJB2 gene in the explored deaf subjects

The Number of Patients	The Name of the Mutation	Type of Mutation	Number of Alleles	Relative Frequency (%)	Game Changes
16	c.35delG p.G12VfsX2	Removal of a single nucleotide by changing the reading format	30	48.38	GGT> GTG CCA> CAC
1	c.457G> A p.V153I	Meaningful displacement	1	1.61	GTC> ATC
1	c.598G> A p.G200R	Meaningful displacement (pathogenic variant)	1	1.16	GGA> AGA
Total	-	-	32	51.6	

Journal of Arak University of Medical Sciences

to Guilan General Welfare Office and Rasht Welfare Office, Rasht Deafness Center, and White Silence Deafness Center (in Anzali port) in Gilan Province, Iran, were identified. Among them, 31 patients with non-syndromic deafness and bilateral deafness, deafness from birth, and having one or more deaf relatives, ranging in age from 17 to 50 years were selected. Accordingly, the necessary blood samples were collected from them. After DNA purification, the entire length of the *GJB2* gene was amplified by PCR. Besides, sequencing was performed with the reverse primer. The results of sequencing using CLC main workbench v3.5 software and online blast software (BLAST) were examined for mutations in deaf subjects, compared to the reference gene available at the NCBI site.

Ethical considerations: With the permission of the Ethics Committee of the Islamic Azad University, Tonekabon Branch (Code: IR.IAU.TON.REC.1398.015) and with the consent of the deaf subjects or their parents, the sampling of deaf individuals was performed.

3. Results

In this study, 31 non-syndromic deaf individuals (out of 85 deaf subjects) from Gilan Province were included; of them, 22(71%) and 9(29%) subjects were females and males, in sequence. The mean age of the examined deaf subjects was 33.33 years. In this study, 35 delG mutations in the *GJB2* gene were detected in 16 patients (Table 1). Of them, 14 patients were homozygous (Figure 1) and two patients were heterozygous (Figure 2). In one patient, the V153I mutation was observed as heterozygous. In one of two patients with a 35delG heterozygous mutation, the pathogenic variant of G200R was also observed as heterozygous (35delG/G200R).

4. Discussion and Conclusion

Approximately 52% of the explored deaf individuals from Rasht and Bandar Anzali deaf centers presented mutations in the *GJB2* gene; the most common mutation among these individuals was 35delG mutation with a frequency of 48.38%. Moreover, 35delG mutation in some studies in Isfahan with a frequency of 6.12% [1], in the Kurdish population with an allelic frequency of 13.33% [14], in Qom with a prevalence of 61.9% [15], in Tabriz with a frequency of 39% [11], and Lorestan with a frequency of 9.4% [16] was reported. The present study was more similar to Tabriz and Qom data concerning the frequency of 35delG mutation. However, in some parts of Iran, including Kurdistan, Azerbaijan, Isfahan, and neighboring countries (Turkey & Pakistan), the prevalence of this mutation is lower.

The allelic frequency of V153I mutation in several studies was measured as follows: Fars Province: about 6% [4], Isfahan: about 2.04% [1], and Lorestan: about 2.8% [16]. The V153I mutation was reported as a common mutation in some studies; however, in the present study, it was reported in only one allele and may not be highly prevalent in deaf individuals in Gilan Province.

In two studies in Shanghai, China [19] and Iran, the G200R variant was introduced as a pathogenic variant [20]. The frequency of this pathogenic variant in Morocco was reported to be almost 0.66% [21]. In a study in Iran, this pathogenic variant was reported in two alleles with a frequency of 0.05%. This pathogenic variant is in the second quarter (TM4) [22]; its importance in pathogenicity remains unknown. Mahdieh et al. found a small frequency of this variant in more than 10 studies in Iran; however, only in Gilan Province, this pathogenic variant was observed in abundance in an allele.

Due to the high rate of mutation in the *GJB2* gene in Rasht and Anzali Cities in Gilan Province, it can be expected that

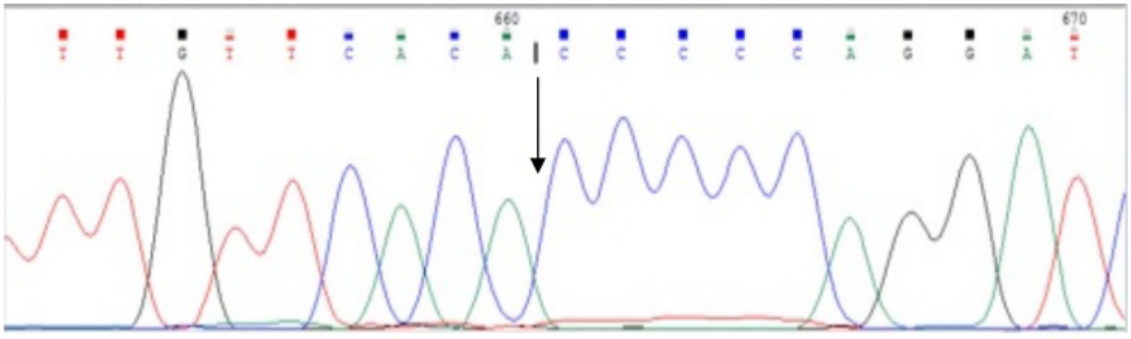


Figure 1. Electrograph of the c.35delG mutation (p.G12VfsX2) as homozygous in a deaf subject

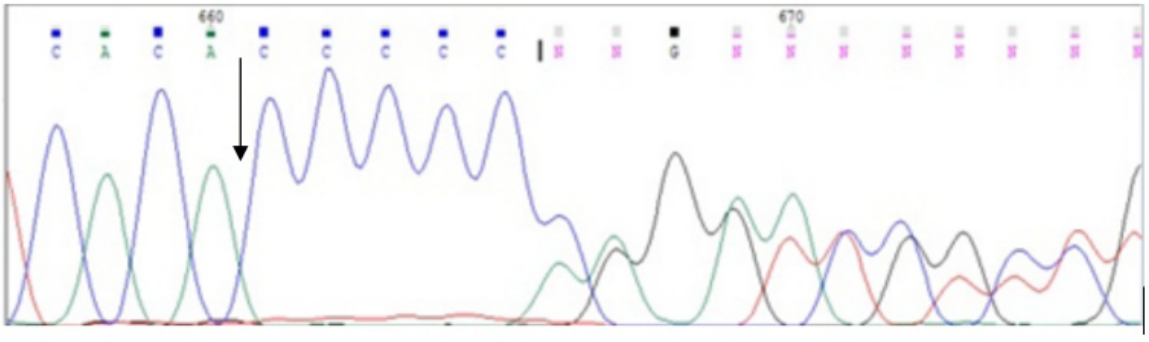


Figure 2. Electrograph of the c.35delG mutation (p.G12VfsX2) as heterozygous in a deaf individual

mutation in this gene is critical in the occurrence of deafness in these cities. Due to the high prevalence of 35delG mutation concerning the genetic screening of deafness in Guilan Province, it is necessary to study the *GJB2* gene as the main gene affecting non-syndromic deafness.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Ethics Committee of the Islamic Azad University, Tonekabon Branch (Code: IR.IAU.TON.REC.1398.015).

Funding

This study was extracted from MSc. thesis of the first author at the Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon.

Authors' contributions

Conceptualization: Najmeh Ranji and Ali Nazemi; Research and sampling method: Pedram Pouryari Biyachal; Data Analysis, Text Writing, and Review: All Authors.

Conflicts of interest

The authors declared no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank the General Department of Welfare of Guilan Province, Welfare of Rasht City, Deaf Centers of Guilan Province located in Rasht and Bandar Anzali, and Mr. Sobhan Darvishi.

مقاله پژوهشی

بررسی جهش‌های ژن *GJB2* در ۳۱ فرد ناشنوای غیرسندرمی در استان گیلان

پدرام پوریاری بیاچال[۱]، *نجمه رنجی[۲]، علی ناظمی[۱]

۱. گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی ، رشت، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۲۳ تیر ۱۳۹۹
تاریخ پذیرش: ۵ آبان ۱۳۹۹
تاریخ انتشار: ۱۲ فروردین ۱۴۰۰

چکیده

زمینه و هدف ناشنوایی غیرسندرمی یک ناهنجاری ناهمگن ژنتیکی است. جهش در ژن *GJB2* یکی از مهم‌ترین علل ناشنوایی غیرسندرمی در بسیاری از کشورها است. هدف از این مطالعه ارزیابی جهش‌های ژن *GJB2* در ۳۱ فرد ناشنوا در استان گیلان بود.

مواد و روش‌ها در این مطالعه توصیفی مقطعی، نمونه‌های خونی از ۳۱ فرد ناشنوای غیرسندرمی از شهرهای رشت و بندرانزلی جمع‌آوری شد. بعد از جداسازی DNA، ژن *GJB2* به روش PCR تکثیر و سپس تعیین توالی شد.

ملاحظات اخلاقی این مقاله مورد تایید دانشگاه دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد قرار گرفته است (کد: IR.IAU.MSHD.REC.1398.027).

یافته‌ها در این مطالعه، سه جهش در هجده فرد ناشنوا شناسایی شد. جهش 35delG بالاترین فراوانی (۴۸/۳۸ درصد) را در افراد ناشنوا به صورت هموزیگوت (در چهارده فرد) و به صورت هتروزیگوت (در دو فرد) داشت. یک بیمار با جهش V153I به صورت هتروزیگوت و یک بیمار با 35delG/G200R جهش به صورت هتروزیگوت مرکب شناسایی شد.

نتیجه‌گیری به نظر می‌رسد که جهش 35delG یک جهش شایع در ژن *GJB2* در افراد ناشنوای غیرسندرمی در استان گیلان باشد.

کلیدواژه‌ها:

ژن *GJB2*، حذف ژنی، ناشنوایی، توالی‌یابی

مقدمه

ناشنوایی یکی از مهم‌ترین نواقص شناختی و حسی عصبی است که سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که حدود ۳۶۰ میلیون فرد با ناشنوایی خفیف تا شدید در جهان زندگی می‌کنند. ناشنوایی یک اختلال هتروژن بوده که به واسطه عوامل محیطی یا علل ژنتیکی ایجاد می‌شود [۱].

امروزه بیش از ۱۵۰ لوکوس ژنی در ایجاد ناشنوایی غیرسندرمی[1] نقش دارند که الگوی وراثت آنها اتوزومی غالب (۱۰ درصد)، اتوزومی مغلوب (۸۰ درصد)، وابسته به X (۱ درصد>)، وابسته به Y (۱ درصد>) و میتوکندریایی (۱ درصد>) است [۱]. بیش از ۱۲۰۰ جهش مختلف در ژنوم انسان در بروز ناشنوایی تعیین شده است.

فراوانی این جهش‌ها در جمعیت‌های مختلف یکسان نیست. با وجود تنوع ژنتیکی ناشنوایی در جمعیت‌های مختلف، لوکوس DFNB1 (در موقعیت کروموزومی 13q11-12) باعث حدود ۵۰ درصد از موارد ایجاد ناشنوایی غیرسندرمی می‌شود [۲].

دو ژن *GJB2* و *GJB6* در این لوکوس وجود دارند که به طور هم‌زمان بیان می‌شوند. ژن *GJB2* دارای دو اگزون بوده که فقط یکی از دو اگزون قابل ترجمه است [۱]. محصول ژن *GJB2* یک پروتئین اتصالی به نام کانکسین ۲۶ است [۲] که ۲۶ کیلو دالتون (26kDa) وزن داشته و از ۲۲۶ آمینو اسید تشکیل شده است [۱].

کانکسین ۲۶ در گوش داخلی به عنوان یک تنظیم‌کننده مهم هموستازی یون پتاسیم (K+) عمل می‌کند. در صورت عدم تبادلات K+، سلول‌های شنوایی قادر به واکنش در پاسخ به صدا نخواهند بود [۲]. قابل توجه است که همراهی یک جهش در *GJB2* و جهش دوم در *GJB6*، در بعضی موارد ناشنوایی گزارش شده است. محصول ژن *GJB6*، کانکسین سی (30kDa) با ۲۶۱ آمینو اسید است که در انتقال یون‌ها و بعضی متابولیت‌ها در محل اتصالات سلول‌های شنوایی نقش دارد [۱].

جهش در ژن *GJB2*، به عنوان مهم‌ترین علت ناشنوایی ارثی

1. Non-syndromic Hearing Loss (NSHL)

* نویسنده مسئول:
دکتر نجمه رنجی
نشانی: رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی.
تلفن: ۳۳۴۲۴۰۸۰ (۱۳) ۹۸+
پست الکترونیکی: n_ranji@iaurasht.ac.ir

در دنیا شناخته شده است؛ بنابراین بررسی جهش‌های این ژن یکی از مهم‌ترین روش‌های غربالگری جهت تشخیص ناشنوایی در دنیا محسوب می‌شود [۳]. جهش‌های از نوع حذف که منجر به تولید پروتئین کوتاه‌شده[2] و به عبارتی سنتز ناقص پروتئین *GJB2* می‌شوند [۴]، بسته به تعداد دومین حذف‌شده پروتئین، باعث فقدان همه یا بخشی از عملکردهای پروتئین می‌شوند.

شایع‌ترین جهش در ژن *GJB2*، جهش 35delG است؛ در اثر این جهش، یک نوع تغییر قالب خواندن در اثر حذف یک گوانوزین (G) در نوکلئوتید ۳۵ ژن رخ داده و به ختم زودرس (TGA) منجر شده و درنتیجه یک پروتئین کوتاه‌شده از کانکسین ۲۶ تولید می‌شود [۵]، درحالی‌که جهش‌های دیگری که منجر به ختم زودرس رونویسی و تغییر قالب خواندن نمی‌شوند (ازجمله جابه‌جایی‌ها)، بسته به موقعیت جهش ممکن است فقط تا حدی روی عملکرد پروتئین تأثیرگذار باشند [۴].

بر اساس مطالعات قبلی به نظر می‌رسد جهش c.35delG (p.G12VfsX2) از یک جد باستانی در اروپا (شرق مرکزی یا مدیترانه) به واسطه مهاجرت در دیگر نقاط دنیا منتشر شده باشد [۶]. جهش 35delG شایع‌ترین جهش *GJB2* در جمعیت‌های قفقازی با شیوع ۸۵ درصدی بوده که باعث تولید پروتئین کوتاه‌شده غیرعملکردی می‌شود.

میانگین فراوانی ناقلین این جهش در اروپا یک در ۵۱ تولد زنده بود که با فراوانی آن در آمریکای شمالی و استرالیا تفاوت قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد، درحالی‌که فراوانی آللی جهش 35delG در ژن *GJB2* به عنوان شایع‌ترین جهش در مناطق جغرافیایی مختلف ایران، بین ۵ درصد تا ۲۲ درصد گزارش شده است [۴]. هدف از این مطالعه، بررسی جهش‌های موجود در ژن *GJB2* در ۳۱ فرد ناشنوای غیرسندرمی در استان گیلان بود که به روش PCR تعیین توالی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

بیماران

در این مطالعه توصیفی مقطعی، در مجموع ۸۵ فرد ناشنوا غیرخویشاوند از ۸۵ خانواده مراجعه‌کننده به اداره کل بهزیستی استان گیلان و اداره بهزیستی شهرستان رشت، کانون ناشنوایی رشت و کانون ناشنوایی سکوت سفید (در بندرانزلی) شناسایی شدند.

اطلاعات بیماران با همکاری این مراکز و با توجه به اطلاعات مندرج توسط پزشک متخصص در پرونده هر فرد جمع‌آوری شد. در این بین، ۳۱ فرد مبتلا به ناشنوایی غیرسندرمی با ناشنوایی دوطرفه، ناشنوایی از بدو تولد و با داشتن یک یا چند خویشاوند ناشنوا (با تأیید پزشک معالج موجود در پرونده بیمار)، با محدوده سنی هفده تا پنجاه سال انتخاب و خون‌گیری از آن‌ها انجام شد.

سپس نمونه‌های خونی از ۳۱ فرد ناشنوای غیرسندرومی غیرخویشاوند در لوله‌های حاوی EDTA نیم مولار قرار گرفته و به آزمایشگاه انتقال داده شدند و تا زمان استفاده در فریزر منفی ۲۰ در حالت انجماد نگهداری شدند.

تخلیص DNA ژنومی

از نمونه‌های خونی ۳۱ فرد ناشنوای غیرخویشاوند و یک فرد سالم با استفاده از کیت WizPrepTM gDNA Mini Kit (شرکت Wizbiosolutions، کره جنوبی) تخلیص DNA صورت گرفت. جهت اطمینان از تخلیص صحیح و سالم بودن DNA هر فرد، نمونه‌ها در ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ نود ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد.

تکثیر ژن GJB2 به روش PCR و تعیین توالی آن

جهت تکثیر ژن *GJB2* از کیت Pfu master mix (شرکت PhiloKorea، کره جنوبی) در حجم نهایی ۲۵µl استفاده شد. به این منظور با افزودن DNA ژنومی، جفت پرایمر (۲۰ pM) و آب استریل به مسترمیکس (حاوی آنزیم، کوفاکتور و بافر مخصوص) اجزای واکنش PCR مخلوط شد.

بعد از طراحی جفت پرایمر، سنتز پرایمرها (جدول شماره ۱) توسط شرکت Bioneer صورت گرفت. واکنش PCR با استفاده از ترموسایکلر Analaytik jena (آلمان) طبق برنامه زیر انجام شد:

یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در ۹۵° C به مدت سه دقیقه، ۳۰ سیکل در دمای ۹۵° C به مدت سی ثانیه، ۶۷ ° C به مدت سی ثانیه، ۷۲° C به مدت یک دقیقه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲° C به مدت پنج دقیقه. توالی پرایمرها در جدول شماره ۱ ذکر شده است.

بعد از اطمینان از تک باند بودن محصولات PCR با طول ۸۸۵ جفت باز، نمونه‌ها با حفظ زنجیره سرمایی به شرکت BGI group (چین) ارسال و تعیین توالی با پرایمر برگشتی صورت گرفت. به دلیل اینکه در انتهای'۵ ژن، جهش حذفی رخ داده بود و توالی خوانده شده با پرایمر مستقیم با طول کمی خوانده می‌شد، درنتیجه همه توالی‌ها با پرایمر برگشتی (از انتهای"۳) خوانده شد و جهت تأیید توالی برای بار دوم با پرایمر برگشتی تعیین توالی شد.

نتایج حاصل از تعیین توالی به کمک نرم‌افزار CLC main workbench v3.5 و نرم‌افزار برخط «بلاست» از نظر وجود جهش در افراد ناشنوا در مقایسه با ژن رفرنس موجود در سایت NCBI مطالعه و بررسی شد.

2. Truncated Protein

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول
GJB2-F	5'-ATGCTTGCTTACCCAGACTCAG-3'	885 bp
GJB2-R	5'-TGTTGGGAAATGCTAGCGACTG-3'	

یافته‌ها

در این مطالعه، ۳۱ فرد ناشنوای غیرسندرمی از بین ۸۵ فرد ناشنوا از استان گیلان شرکت داده شدند که ۲۲ نفر زن (۷۱ درصد~) و نُه نفر مرد (۲۹ درصد~) بودند. میانگین سنی ناشنوایان در این مطالعه ۳۳/۳۳ سال بود. مطابق تصویر شماره ۱ بعد از اطمینان از تک باند بودن محصولات PCR، نمونه‌ها تعیین توالی شد.

در این مطالعه (جدول شماره ۲)، در شانزده بیمار جهش 35delG شناسایی شد که در این بین، چهارده بیمار به صورت هموزیگوت (تصویر شماره ۲) و دو بیمار به صورت هتروزیگوت (تصویر شماره ۳) این جهش را داشتند. در یک بیمار نیز جهش V153I به صورت هتروزیگوت مشاهده شد (تصویر شماره ۴).

در یکی از دو بیمار با جهش هتروزیگوت 35delG، واریانت بیماری‌زای G200R نیز به صورت هتروزیگوت مشاهده شد (35delG/G200R) (تصویر شماره ۵). توالی ژن *GJB2* در فرد سالم در سه ناحیه جهش‌یافته در این مطالعه به ترتیب در سه تصاویر۶، ۷ و ۸ نشان داده شده است.

ناشنوایی غیرسندرمی در اثر اختلال در ژن‌های مختلفی ایجاد می‌شود. فراوانی جهش‌های بیماری‌زای مؤثر در ناشنوایی در ژن‌های مختلف در هر جمعیت بسته به مواردی نظیر الگوی وراثت، میزان جهش‌پذیری هر ژن و جریان ژنی متغیر است.

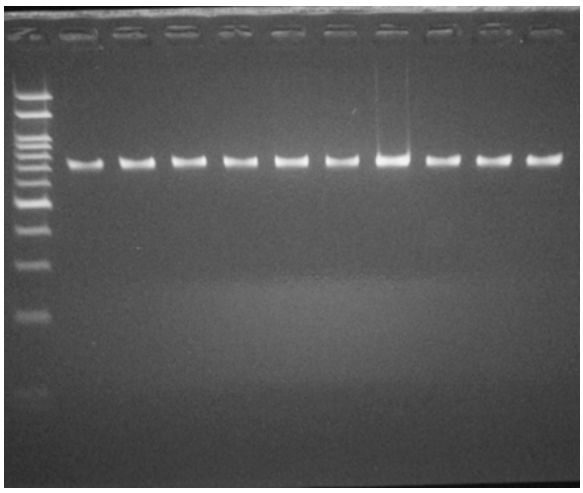
در مطالعه حاضر در استان گیلان با بررسی ۳۱ فرد ناشنوای غیرسندرمی غیرخویشاوند، نزدیک به ۵۲ درصد افراد دارای جهش در ژن *GJB2* بودند. در این افراد سه جهش و یک واریانت بیماری‌زای ژنی شناسایی شد و جهش 35delG با بیشترین فراوانی در این مطالعه گزارش شد.

در مطالعه هاشمی و همکاران، جهش در ژن *GJB2* در افراد ناشنوا در شهر شیراز با فراوانی ۳۰ درصدی گزارش شد [۴]. شیوع جهش در این ژن در مطالعه بهرامی و همکاران در استان کردستان ۲۰ درصد [۷]، در مطالعه بنیادی و همکاران در جمعیت آذری‌های ترک ایران ۲۸٪ [۸] و در مطالعه ابطحی و همکاران در اصفهان حدود ۲۴ درصد [۱] و در مطالعه محمودی و همکاران در ایلام ۴ درصد [۹] و در مطالعه آهنگری و همکاران در هرمزگان حدود ۶ درصد گزارش شد [۱۰]. در مطالعه جهانگیری و همکاران در تبریز از بین پنجاه فرد ناشنوای مادرزادی ۳۹ درصد موارد دارای جهش در این ژن بودند [۱۱].

در مطالعه کالای و همکاران در ترکیه شیوع جهش در این ژن ۲۵ درصد [۱۲] و در مطالعه مینارلیک و همکاران در پاکستان شیوع آن ۶/۱ درصد بود [۱۳]. در مقایسه با مطالعات یادشده در چندین استان و دو کشور همسایه به نظر می‌رسد شیوع جهش در *GJB2* در استان گیلان نرخ بالایی داشته باشد و توصیه می‌شود در غربالگری‌های ژنتیکی در خط اول آزمایشات در افراد در خطر در این استان قرار گیرد.

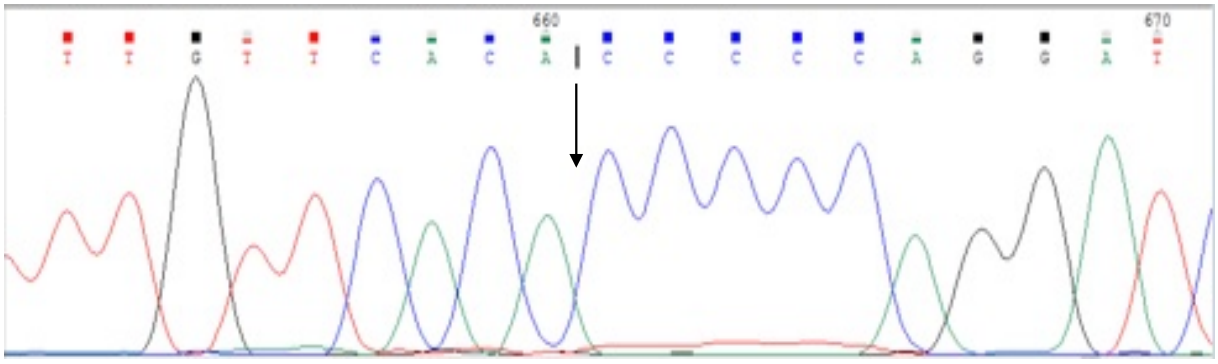
در مطالعه هاشمی و همکاران، فراوانی آللی جهش 35delG حدود ۷ درصد و جهش V153I حدود ۶ درصد به عنوان شایع‌ترین جهش‌ها گزارش شدند. در این مطالعه، هر دو جهش هم به صورت هتروزیگوت و هم هموزیگوت در ناشنوایان شناسایی شد [۴]. در مطالعه ابطحی و همکاران در اصفهان جهش 35delG با فراوانی ۶/۱۲ درصد (به عنوان شایع‌ترین جهش) و جهش V153I با فراوانی آللی ۲/۰۴ درصد بین ۴۶ ناشنوا گزارش شد [۱].

در مطالعه آزادگان و دهکردی، جهش 35delG با فراوانی



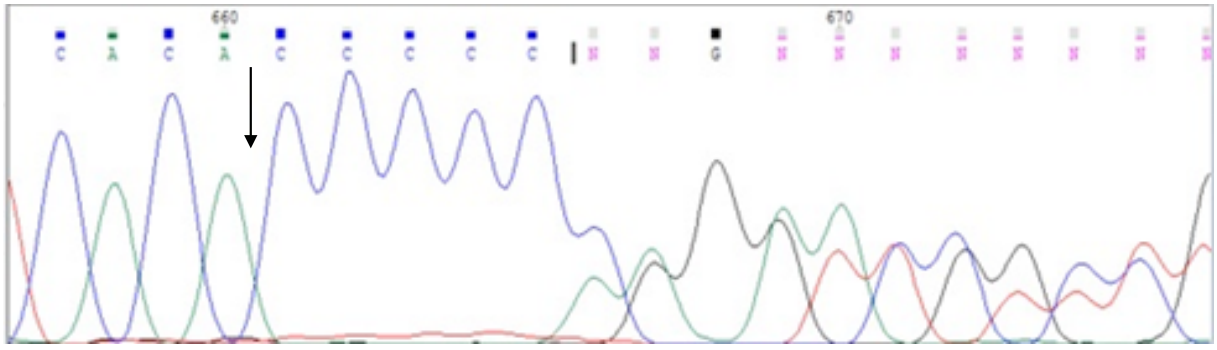
تصویر ۱. محصولات PCR مربوط به ژن *GJB2* در ژل آگارز ۱/۵ درصد با طول ۵۸۸ جفت باز

لدر ۱۰۰ جفت بازی در چاهک اول از سمت چپ لود شده است.



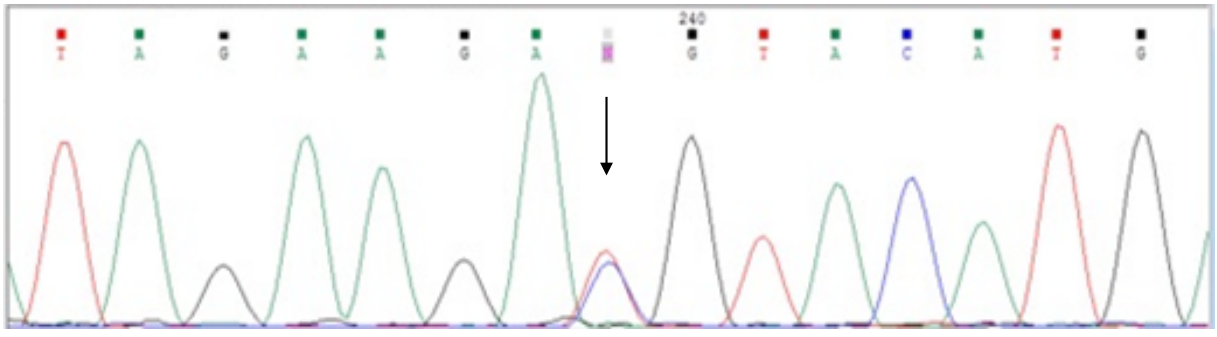
تصویر ۲. الکتروفروگرام مربوط به جهش 35delG.c (G12VfsX2.p) به صورت هموزیگوت در یک فرد ناشنوا

حذف در توالی reverse نشان داده شده که به جای GGT>GTGدر رشته مکمل به صورت CAC>ACC (خوانش توالی از سمت راست به چپ) گزارش می‌شود. محل فلش، محل حذف است که با حذف C (یاG) به صورت CAC خوانده می‌شود. قابل ذکر است از آنجا که حذف در نوکلئوتید ۵۳ ژن رخ داده بود، خواندن بقیه توالی از روی پرایمر فوروارد با frameshift همراه بود. درنتیجه توالی در زمان تعیین توالی با استفاده از پرایمر reverse خوانده شد تا تغییر قالب خواندن ابتدای ژن مشکل‌ساز نباشد.



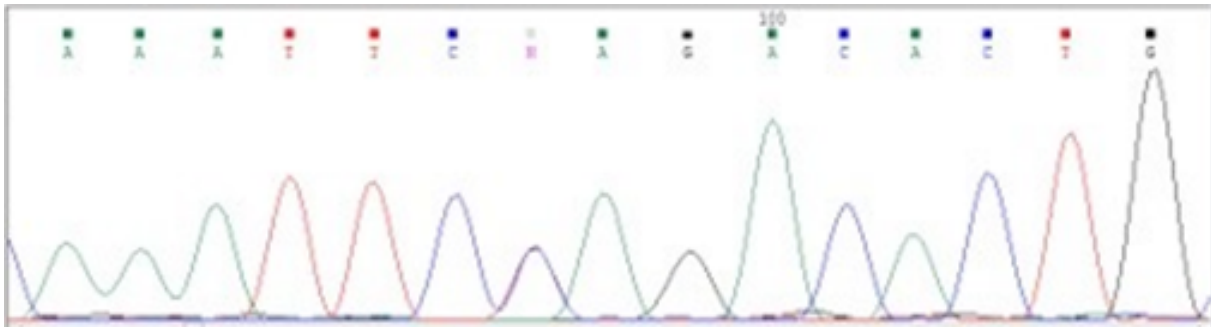
تصویر ۳. الکتروفروگرام مربوط به جهش 35delG.c (G12VfsX2.p) به صورت هتروزیگوت در یک فرد ناشنوا

حذف در توالی reverse نشان داده شده که به جای GGT>GTGدر رشته مکمل به صورت CCA>CAC (خوانش توالی از سمت راست به چپ) گزارش می‌شود. محل فلش، محل حذف است. به دلیل هتروزیگوت بودن اختلال در توالی‌یابی بعد از حذف و بعد از پنجمین C، به صورت frameshift قابل مشاهده است.



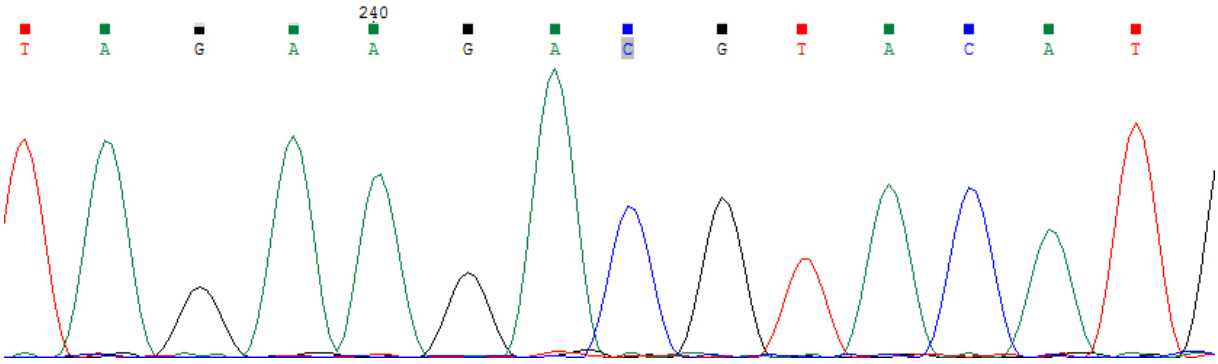
تصویر ۴. الکتروفروگرام مربوط به جهش A>457G.c (V153I.p) به صورت هتروزیگوت در یک فرد ناشنوا

جهش در توالی reverse نشان داده شده که CAG>TAG در این رشته (خوانش توالی از سمت راست به چپ)، معادل GTC>ATCدر رشته فوروارد با شروع از نقطه شروع ترجمه است.

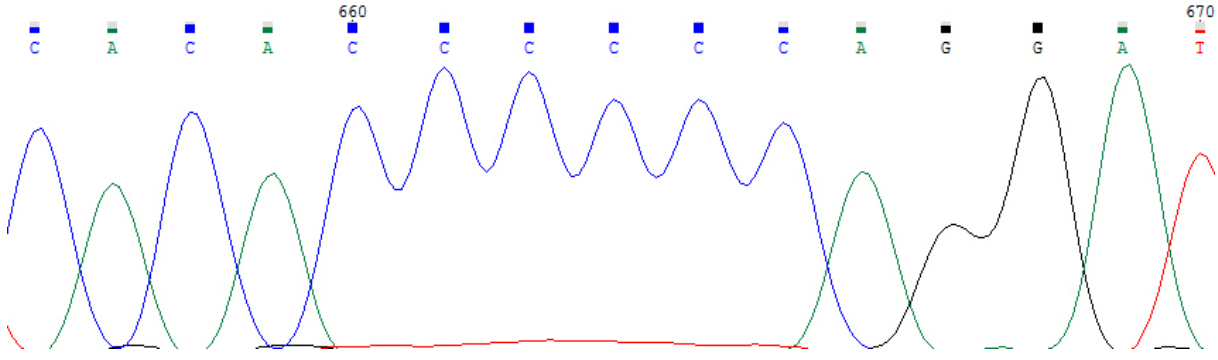


تصویر ۵. الکتروفروگرام مربوط به واریانت بیماری‌زای 598G>A.c (G200R.p) به صورت هتروزیگوت در یک فرد ناشنوا

جهش در توالی reverse نشان داده شده که CCT>TCT در این رشته (خوانش توالی از سمت راست به چپ)، معادل GGA>AGAدر رشته فوروارد با شروع از نقطه شروع ترجمه است.



تصویر ۶. الکتروفروگرام مربوط به فرد سالم در محدوده کدونی ۳۵۱ در ژن *GJB2*

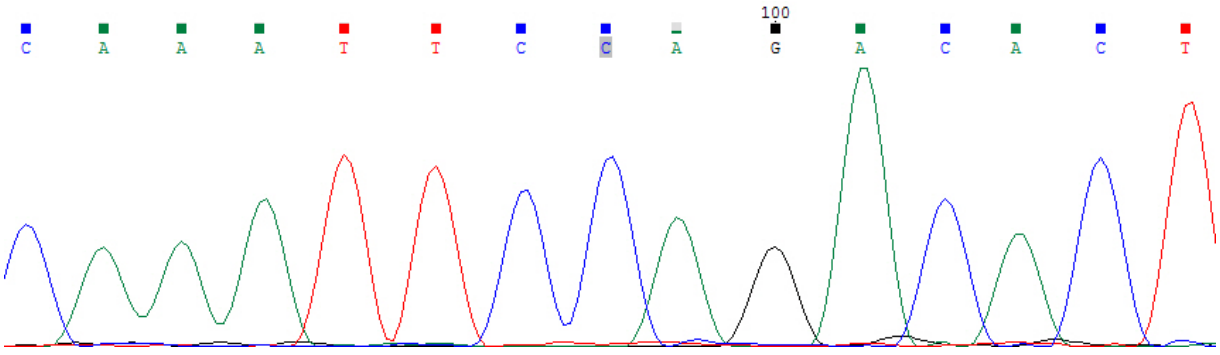


تصویر۷. الکتروفروگرام مربوط به فرد سالم در محدوده کدونی ۵۳ در ژن *GJB2*

آللی ۱۳/۳۳ درصد بین ۴۵ ناشنوای کُرد مشاهده شد [۱۴]. در مطالعه ندافنیا و همکاران روی ۱۳۱ فرد ناشنوا در قم، شیوع بالای این جهش (۶۱/۹ درصد) گزارش شد [۱۵]. در مطالعه جهانگیری و همکاران در تبریز از بین ۵۰ فرد ناشنوای مادرزادی همه ۳۹ درصد مورد دارای جهش در ژن *GJB2* از نوع 35delG بودند و جهش دیگری در این افراد مشاهده نشد [۱۱].

در مطالعه سپهوند و همکاران روی ۵۳ فرد ناشنوا در لرستان حدود ۹/۴ درصد موارد دارای جهش 35delG و حدود ۲/۸ درصد افراد دارای جهش V153I بودند [۱۶].

مطالعه حاضر از نظر جهش 35delG بین ۳۱ فرد ناشنوای غیرخویشاوند (۴۸/۳۸ درصد) ظاهراً با مطالعات جهانگیری و همکاران در تبریز و ندافنیا و همکاران در قم از نظر فراوانی بالا شباهت بیشتری دارد، درحالی‌که در بعضی از مناطق ایران، ازجمله کردستان، آذربایجان، اصفهان و کشورهای همسایه



تصویر ۸. الکتروفروگرام مربوط به فرد سالم در محدوده کدونی ۰۰۲ در ژن *GJB2*

(ترکیه و پاکستان) با وجود شایع بودن این جهش در این مناطق، ظاهراً شیوع پایین‌تری مشاهده شده است.

به خاطر نرخ بالای جهش در این ژن در شهرهای مورد مطالعه (رشت و انزلی) در استان گیلان می‌توان انتظار داشت که جهش در این ژن در بروز ناشنوایی در این شهرها دارای اهمیت بسزایی باشد. همچنین جهش V153I در بعضی مطالعات یادشده به عنوان جهش شایع گزارش شده، درحالی‌که در مطالعه حاضر تنها در یک آلل گزارش شد و احتمالاً در استان گیلان فراوانی بالایی در بین ناشنوایان نداشته باشد.

از سوی دیگر، در یک مطالعه دوازده ساله توسط بزاز زادگان و همکاران روی ۲۳۲۲ ناشنوا از سراسر ایران، شیوع بالای جهش 35delG در اردبیل (۷۵ درصد)، آذربایجان (۷۸ درصد)، اصفهان (۷۶ درصد)، شیراز (۸۱ درصد) و گیلان (۸۴ درصد) در سال ۲۰۱۲ گزارش شد. در بعضی از استان‌ها احتمال می‌رود به دلیل تعداد بسیار کم نمونه این جهش یافت نشد. با این حال در سیستان و بلوچستان با وجود مطالعه روی ۲۱ ناشنوا، این جهش در هیچ‌یک از بیماران وجود نداشت. در کل، شیوع این جهش در ایران قابل ملاحظه (۶۴/۷ درصد) است [۱۷].

در مطالعه ایرچی[3] و همکاران فراوانی آللی این جهش ۱۳/۴ درصد در بین ۵۶ ناشنوا در ترکیه گزارش شد [۱۸]. قابل ذکر است فراوانی جهش 35delG در مطالعه بزاز زادگان، با فراوانی آن در مطالعات انجام‌شده در هر استان به تنهایی و با مطالعه حاضر دارای تفاوت مشهودی است. به عنوان نمونه مطالعه ابطحی و همکاران در اصفهان جهش 35delG با فراوانی ۶/۱۲ درصد گزارش شد، درحالی‌که در مطالعه بزاز زادگان در اصفهان با نرخ ۷۶ درصد مشاهده شد.

در مطالعه حاضر در استان گیلان جهش 35delG با نرخ ۴۸/۳۸ درصد گزارش شد و در مطالعه بزاز زادگان در گیلان با نرخ ۸۴ درصد گزارش شد. عوامل مختلفی می‌تواند باعث تفاوت این گزارشات شود.

مطالعه حاضر نمونه‌گیری از ناشنوایان طی یک دوره شش ماهه صورت گرفته، درحالی‌که در مطالعه بزاز زادگان طی دوازده سال شناسایی افراد ناشنوا در کل کشور صورت گرفت.

در مطالعه حاضر، نمونه‌گیری از ناشنوایان از دو شهر رشت و انزلی صورت گرفت، درحالی‌که در مطالعه بزاز زادگان محل نمونه‌گیری در استان گیلان ذکر نشده است. همچنین علاوه بر تفاوت در فراوانی آللی جهش 35delG، جهش‌های دیگر گزارش‌شده در دو مطالعه کاملاً متفاوت است. در مطالعه بزاز زادگان و همکاران جهش‌های E110DfsX4، R184P و D46N و

3. Eyerci

جدول ۲. جهش‌های مشاهده در ژن *GJB2* در افراد ناشنوا در استان گیلان

تعداد بیماران	نام جهش	نوع جهش	تعداد آلل‌ها	فراوانی نسبی (%)	تغییرات بازی
۱۶	c.35delG p.G12VfsX2	حذف تک نوکلئوتیدی با تغییر قالب خواندن	۳۰	۴۸/۳۸	GGT>GTG CCA>CAC
۱	c.457G>A p.V153I	جابه‌جایی بدمعنی	۱	۱/۶۱	GTC>ATC
۱	c.598G>A p.G200R	جابه‌جایی بدمعنی (واریانت بیماری‌زا)	۱	۱/۶۱	GGA>AGA
جمع کل	-	-	۳۲	۵۱/۶	-

R32C گزارش شد [۱۷]، درحالی‌که هیچ‌کدام از این جهش‌ها در افراد ناشنوا در مطالعه حاضر شناسایی نشدند.

همچنین نتایج مطالعه بزاز زادگان و همکاران از نظر زمانی نسبت به مطالعه حاضر قدیمی‌تر است، به‌طوری‌که تفاوت دو مطالعه در زمان نمونه‌گیری طی دو دهه اخیر (۲۰۰۰ تا ۲۰۱۹) در نوع و نرخ جهش‌های آن تأثیرگذار بوده و با مقایسه نتایج این دو مطالعه پیشنهاد می‌شود که برای آگاهی از آمار صحیح جهش‌ها، جهت استفاده در غربالگری‌های ژنتیکی ناشنوایی در هر استان این سری از مطالعات هرچند سال یکبار در بین ناشنوایان هر استان تکرار و آمار دقیق جهش‌ها گزارش شود تا شیوع این ناهنجاری بین خانواده‌های ایرانی کاهش یابد (۱۷).

مطالعه هاشمی و همکاران در شیراز [۴] و ابطحی و همکاران در اصفهان [۱] نیز نتایج بسیار متفاوتی با مطالعه بزاز زادگان در فراوانی آللی 35delG نشان می‌دهد که به نظر می‌رسد به خاطر تفاوت در زمان یا بازه زمانی مورد مطالعه باشد و از این لحاظ مطالعه حاضر نرخ بالای این جهش را همچنان بعد از دو دهه در گیلان نشان می‌دهد که به پیگیری‌های بیشتر جهت کاهش نرخ بیماری در استان نیاز است. در مطالعه یو و همکاران روی ۱۸۵۲ فرد ناشنوا در شانگهای چین واریانت G200R به عنوان یک واریانت بیماری‌زا معرفی شد [۱۹]. در مطالعه هاشم‌زاده چالشتری و همکاران در تهران و تبریز روی افراد ناشنوا، واریانت بیماری‌زای G200R در مبتلایان تهرانی گزارش شد [۲۰].

فراوانی این واریانت بیماری‌زا بین ۱۵۲ خانواده ناشنوای مراکشی حدود ۰/۶۶ درصد گزارش شد [۲۱]. در مطالعه مروری مهدیه و همکاران مشخص شد که در مطالعات قبلی در ایران این واریانت بیماری‌زا تنها در دو آللی با فراوانی ۰/۰۵ درصد گزارش شده بود. این واریانت بیماری‌زا در دومین چهارم (TM۴) قرار داشته [۲۲] و اهمیت آن در بیماری‌زایی هنوز ناشناخته است.

با اینکه مهدیه و همکاران، فراوانی کمی از این واریانت را در بیش از ده مطالعه در ایران یافته‌اند؛ قابل توجه است که فقط در استان گیلان این واریانت بیماری‌زا با فراوانی در یک آلل مشاهده شد. هرچند برای بررسی اهمیت آن لازم است جمعیت بیشتری از ناشنوایان و هم افراد شنوا مورد بررسی قرار گیرند که در مطالعه حاضر امکان انجام آزمایشات به این گسترگی وجود نداشت.

با توجه به اینکه ژن‌های مختلفی در بروز ناشنوایی دخیل است از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به پیچیدگی شجره‌های ناشنوایی و دخیل بودن ژن‌های مختلف در تفسیر این شجره‌ها اشاره کرد که به صرف هزینه و زمان زیادی جهت شناسایی عوامل ژنتیکی بروز این ناهنجاری نیاز دارد.

همچنین از دیگر محدودیت‌های تحقیق نحوه برقراری ارتباط با ناشنوایان است؛ بنابراین با توجه به حمایت‌های بی‌شائبه کانون‌های ناشنوایی رشت و بندرانزلی در این تحقیق توانستیم ۳۱ فرد ناشنوا با سابقه فامیلی را از بین ۸۵ فرد ناشنوا شناسایی و از نظر جهش‌های ژن GJB2 بررسی کنیم.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، حدود ۵۲ درصد از افراد ناشنوا از کانون‌های ناشنوایی رشت و بندرانزلی در ژن GJB2 دارای جهش بودند که شایع‌ترین جهش در بین این ناشنوایان جهش 35delG بود. با توجه به شیوع بالای جهش 35delG در استان گیلان، در غربالگری‌های ژنتیکی ناشنوایی در گیلان لازم است ژن GJB2 به عنوان مهم‌ترین ژن مؤثر در ناشنوایی غیرسندرمی بررسی شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مقاله مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن با کد اخلاق پزشکی به شماره IR.IAU.TON.REC.۱۳۹۸/۰۱۵ قرار گرفته است.

حامی مالی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول در گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی: نجمه رنجی و علی ناظمی؛ روش پژوهش و نمونه‌گیری: پدرام پوریاری بیاچال؛ تحلیل داده‌ها، نگارش متن و بازبینی: تمامی نویسندگان.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تعارضی در منافع اعلام نکردند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از اداره کل بهزیستی استان گیلان، بهزیستی شهرستان رشت، کانون‌های ناشنوایی استان گیلان مستقر در شهرهای رشت و بندرانزلی به دلیل همکاری بی‌شائبه در شناسایی ناشنوایان و تهیه نمونه خونی از ایشان کمال تشکر و قدردانی را دارند. همچنین از آقای سبحان درویشی به جهت طراحی پرایمر و کمک در آنالیز نتایج کمال تشکر را داریم.

Reference

[1] Abtahi SHR, Malekzadeh A, Soheilipour S, Salehi M, Taleban R, Rabieian R, et al. Evaluation of GJB2 and GJB6 mutations in patients afflicted with non-syndromic hearing loss. Int J Pediatr 2019; 7(2):9053-60. [DOI:10.22038/IJP.2018.34154.3017]

[2] Amritkumar P, Jeffrey JM, Chandru J, Kalaimathi M, Ramakrishnan R, Karthikeyen NP, et al. Role of DFNB1 mutations in hereditary hearing loss among assortative mating hearing impaired families from South India. BMC Med Genet. 2018; 19:105. [DOI:10.1186/s12881-018-0609-6] [PMID] [PMCID]

[3] Abe S, Nishio SY, Yokota Y, Moteki H, Kumakawa K, Usami SI. Diagnostic pitfalls for GJB2-related hearing loss: A novel deletion detected by Array-CGH analysis in a Japanese patient with congenital profound hearing loss. Clin Case Rep. 2018; 6(11):2111-6. [DOI:10.1002/ccr3.1800] [PMID] [PMCID]

[4] Hashemi SB, Ashraf MJ, Saboori M, Azarpira N, Darai M. Prevalence of GJB2 (CX26) gene mutations in South Iranian patients with autosomal recessive nonsyndromic sensorineural hearing loss. Mol Biol Rep. 2012; 39(12):10481-7. [DOI:10.1007/s11033-012-1929-9] [PMID]

[5] Missoum A. The role of gene GJB2 and connexin 26 in hearing impairment. Ukr Biochem J. 2018; 90(6):5-11. [DOI:10.15407/ubj90.06.005]

[6] Zytsar MV, Barashkov NA, Bady-Khoo MS, Shubina-Olejnik OA, Danilenko NG, Bondar AA, et al. Updated carrier rates for c.35delG (GJB2) associated with hearing loss in Russia and common c.35delG haplotypes in Siberia. BMC Med Genet. 2018; 19:138. [DOI:10.1186/s12881-018-0650-5] [PMID] [PMCID]

[7] Bahrami T, Jalilian N, Karbasi G, Noori-Daloii MR. Specific distribution of GJB2 mutations in Kurdistan province of Iran; Report of a relatively isolated population. J Sci Islam Repub Iran. 2017; 28(1):5-11. https://jsciences.ut.ac.ir/article_59397.html

[8] Bonyadi M, Esmaeili M, Abhari M, Lotfi A. Mutation analysis of familial GJB2-related deafness in Iranian Azeri Turkish patients. Genet Test Mol Biomarkers. 2009; 13(5):689-92. [DOI:10.1089/gtmb.2009.0026] [PMID]

[9] Mahmoodi H, Mohamadiari S, Sohrab jaidari M, Kordi S, Bakhtiari S, Mahdieh N. [The frequency of mutations in GJB2 gene in deaf subjects referring to the welfare center of Ilam: Lack of 35delG mutation (Persian)]. J Ilam Univ Med Sci. 2014; 22(3):41-5. https://www.magiran.com/paper/1299261

[10] Ahangari N, Masoudi M, Poursadegh A, Nejatizadeh A. [Investigating the relationship of genetic mutations in GJB2 and linkage analysis of DFNB4 Locus in a group of non-syndromic hearing impaired people with autosomal recessive inheritance in Hormozgan (Persian)]. Jorjani Biomed J. 2014; 2(2):11-8. http://goums.ac.ir/jorjanijournal/article-1-311-en.html

[11] Jahangiri S, Onsori H. [Investigation of the GJB2 gene mutations among subjects with non-syndromic sensorineural hearing loss (Persian)]. Razi J Med Sci. 2017; 24(155):33-9. http://rjms.iums.ac.ir/browse.php?a_id=4475&sid=1.&slc_lang=en

[12] Kalay E, Caylan R, Kremer H, de Brouwer AP, Karaguzel A. GJB2 mutations in Turkish patients with ARNSHL: Prevalence and two novel mutations. Hear Res. 2005; 203(1-2):88-93. [DOI:10.1016/j.heares.2004.11.022] [PMID]

[13] Minarik G, Ferakova E, Ficek A, Polakova H, Kadasi L. GJB2 gene mutations in Slovak hearing-impaired patients of Caucasian origin: Spectrum, frequencies and SNP analysis. Clin Genet. 2005; 68(6):554-7. [DOI:10.1111/j.1399-0004.2005.00529.x] [PMID]

[14] Azadegan-Dehkordi F, Bahrami T, Shirzad M, Karbasi G, Yazdanpanahi N, Farrokhi E, et al. Mutations in GJB2 as major causes of autosomal recessive non-syndromic hearing loss: First report of c.299-300delAT mutation in Kurdish population of Iran. J Audiol Otol. 2019; 23(1):20-6. [DOI:10.7874/jao.2018.00185] [PMID] [PMCID]

[15] Naddafnia H, Noormohammadi Z, Irani S, Salahshoorifar I. Frequency of GJB2 mutations, GJB6-D13S1830 and GJB6-D13S1854 deletions among patients with non-syndromic hearing loss from the central region of Iran. Mol Genet Genomic Med. 2019; 7(7):e00780. [DOI:10.1002/mgg3.780] [PMID] [PMCID]

[16] Sepahvand M, Kahrizi K, Daneshi A, Riaz Alhosseini Y, Mohseni Marzieh BN. [Relative frequency of GJB2 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL) patients in Lorestan population (Persian)]. Yafte. 2007; 8(2):89-95. http://yafte.lums.ac.ir/article-1-1018-en.html

[17] Bazazzadegan N, Nikzat N, Fattahi Z, Nishimura C, Meyer N, Sahraian S, et al. The spectrum of GJB2 mutations in the Iranian population with non-syndromic hearing loss--a twelve year study. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2012; 76(8):1164-74. [DOI:10.1016/j.ijporl.2012.04.026] [PMID]

[18] Eyerci N, Altaş E, Pirim I. GJB2 mutations in Turkish patients with non-syndromic hearing loss. Meta Gene. 2016; 10:56-60. [DOI:10.1016/j.mgene.2016.10.006]

[19] Yu X, Lin Y, Xu J, Che T, Li L, Yang T, et al. Molecular epidemiology of Chinese Han deaf patients with bi-allelic and mono-allelic GJB2 mutations. Orphanet J Rare Dis. 2020; 15:29. [DOI:10.1186/s13023-020-1311-2] [PMID] [PMCID]

[20] Hashemzadeh Chaleshtori M, Hoghooghi Rad H, Dolati M, Sasanfar R, Hoseinipour A, Montazer Zohour M, et al. Frequencies of mutations in the connexin 26 Gene (GJB2) in two populations of Iran (Tehran and Tabriz). Iran J Publ Health. 2005; 34(1):1-7. https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/emr-71101

[21] Bakhchane A, Bousfiha A, Charoute H, Salime S, Detsouli M, Snoussi K, et al. Update of the spectrum of GJB2 gene mutations in 152 Moroccan families with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. Eur J Med Genet. 2016; 59(6-7):325-9. [DOI:10.1016/j.ejmg.2016.05.002] [P;D]

[22] Mahdieh N, Rabbani B, Wiley S, Akbari MT, Zeinali S. Genetic causes of nonsyndromic hearing loss in Iran in comparison with other populations. J Hum Genet. 2010; 55(10):639-48. [DOI:10.1038/jhg.2010.96] [PMID]

This Page Intentionally Left Blank