

## ABSTRACT

## Analysis of CABP2 c.637+1G>T Mutation in Iranian Patients with Non-Syndromic Sporadic Hearing Loss

Ahmad Reza Salehi Chaleshtori, Mohammad Amin Tabatabaiefar, Hamid Reza Salehi, Morteza Hashemzadeh Chaleshtori\*

*The most common sensorineural defect in human is congenital hearing loss and genes have an incontestable role in the development of this defect. Many genetic mutations are known to be responsible in this heterogeneous disease. The most frequent mutations are GJB2 mutations followed by the SLC26A4 mutations. Recently, we published a report regarding the role of c.637+1G>T mutation in CABP2 gene, causing hearing loss in three Iranian families. The present study was launched to analyze the role of this recently reported mutation in patients with sporadic hearing loss.*

*One hundred and eighty three patients with moderate to profound sporadic hearing loss were included in this study. The mutation c.637+1 G>T was investigated in patients using the PCR-RFLP method.*

*PCR-RFLP findings revealed that the considered mutation was absent in subjects with sporadic hereditary hearing loss.*

*The mutation c.637+1 G>T in CABP2 gene did not play any roles in the investigated Iranian patients with sporadic hearing loss. Larger samples of different populations, and assessment of all exons and the promoter region of mentioned gene will help to determine the real role of this gene in producing hearing loss.*

**Key words:** Sporadic non-Syndromic Hearing Loss; Polymorphism, Restriction Fragment Length; CABP2 (Ca-Binding Protein 2); Iran.

\*Morteza Hashemzadeh Chaleshtori, PhD

Cell & Molecular Research Center, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

Email: [mchalesh@yahoo.com](mailto:mchalesh@yahoo.com)

Submission Date: 8. May. 2014 • Acceptance Date: 16. Jun. 2014

## بررسی جهش $c.637+1G>T$ در ژن CABP2 در بیماران ایرانی مبتلا به ناشنوایی غیرسندرومی اسپورادیک

احمدرضاصالحی چالشتری<sup>۱،۲</sup>، محمد امین طباطبائی فر<sup>۳</sup>، حمیدرضاصالحی<sup>۴</sup>، مرتضی هاشم زاده چالشتری<sup>۱\*</sup>

۱. مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ایران

۲. مرکز ژنتیک پزشکی ژنوم، بخش تحقیقات، اصفهان، ایران

۳. گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران

۴. گروه بهداشت، دانشکده بهداشت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

**چکیده/** شایعترین نقص حسی در انسان ناشنوایی مادرزادی است و نقش ژنها در شکل گیری این اختلال غیرقابل انکار است. جهشهای ژنی زیادی به عنوان عوامل دخیل در ایجاد این بیماری بسیار ناهمگن مطرح هستند که بالاترین فراوانی جهش در ژن GJB2 دیده شده است و بعد از آن، ژن SLC26A4 حائز رتبه دوم می باشد. به تازگی گزارشی برای اولین بار در جهان، مبنی بر نقش جهش  $c.637+1G>T$  در CABP2 در ایجاد ناشنوایی در سه خانواده ایرانی بررسی و منتشر نموده ایم. مطالعه حاضر با هدف بررسی این جهش جدیداً گزارش شده در موارد ناشنوایی اسپورادیک انجام شده است. تعداد ۱۸۳ بیمار مبتلا به سطوح متوسط تا عمیق ناشنوایی اسپورادیک برای این مطالعه در نظر گرفته شدند. جهش  $c.637+1G>T$  با استفاده از روش PCR-RFLP در بیماران مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از PCR-RFLP حاکی از عدم حضور جهش مورد مطالعه در نمونه های ناشنوای اسپورادیک مورد بررسی بود. جهش  $c.637+1G>T$  در ژن CABP2 در جمعیت ناشنوایان اسپورادیک ایرانی مورد بررسی در این مطالعه، نقشی در ایجاد ناشنوایی ندارد. حجم نمونه های بزرگتر از جمعیت های مختلف و بررسی کلیه آگزونها و قسمت پروموتور ژن مزبور در تعیین نقش واقعی این ژن در ایجاد ناشنوایی می تواند راهگشا باشد.

**واژگان کلیدی:** ناشنوایی غیر سندرومی اسپورادیک؛ PCR-RFLP؛ CABP2 (Ca-Binding Protein 2)؛ ایران

### مقدمه

در بین عوامل محیطی عواملی از جمله برخی داروها، عفونتهای باکتریایی، ویروسی و ضربه نقش چشمگیری دارند (۴،۵). سهم عوامل محیطی در بروز ناشنوایی کمتر از ۵۰ درصد است و بیش از نیمی از موارد ناشنوایی مادرزادی وراثتی هستند و در نتیجه تاثیر ژنها بوجود آمده اند (۶).

برای تقسیم بندی این بیماری از معیارهای متفاوتی استفاده می شود، در یک روش که مبتنی بر علائم بالینی است به انواع ناشنوایی هدایتی (اختلال مربوط به گوش بیرونی یا میانی است)،

از هر ۱۰۰۰ نوزاد تازه متولد شده بین ۱ تا ۶ نفر مبتلا به ناشنوایی مادرزادی هستند و این باعث شده که ناشنوایی رایجترین نقص حسی در انسان باشد (۱،۲). هم عوامل ژنتیکی و هم عوامل محیطی می توانند در سیستم شنوایی اختلال ایجاد کرده و باعث بروز ناشنوایی شوند (۳). این ناهنجاری به شکل چند عاملی بروز می کند و عوامل ژنتیکی و محیطی در بروز آن نقش دارند که

\* مرتضی هاشم زاده چالشتری

مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

پست الکترونیک: mchalesh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۱۸ • تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۲۶

ناشنوایی حسی-عصبی (به دلیل اختلال در گوش درونی ایجاد می شود) و ناشنوایی مخلوط (اختلال هدایتی و اختلال حسی-عصبی همزمان وجود دارند) تقسیم بندی می-شود. علاوه بر تقسیم بندی های مذکور تقسیم بندی دیگری نیز برای ناشنوایی وجود دارد که براساس شدت، این بیماری به انواع ناشنوایی عمیق تا خفیف تقسیم بندی شده است (۷). ناشنوایی بر اساس سن آغاز بروز علائم نیز به ناشنوایی پیش از تکلم (Pre lingual) و ناشنوایی پس از تکلم (Post lingual) دسته بندی می شود (۸،۹). همچنین در یک تقسیم بندی دیگر به انواع ناشنوایی سندرومی و ناشنوایی غیر سندرومی دسته بندی می شود (۷). تقریباً ۳۰٪ کل ناشنوایی های وراثتی از نوع ناشنوایی سندرومی هستند (در این موارد ناشنوایی همراه با مجموعه ای از علائم همراه بروز می-کند و به همین دلیل به آن ناشنوایی سندرومی اطلاق میگردد). ناشنوایی غیرسندرومی هم بیش از ۷۰٪ موارد ناشنوایی وراثتی را تشکیل می دهد (در چنین مواردی علائم همراه با بیماری وجود نداشته و بیماران مبتلا تنها با مشکلات شنوایی مواجه هستند). این دسته از موارد ناشنوایی بر اساس الگوی به ارث رسیدن نشان تقسیم بندی می شوند. ۷۵ تا ۸۰ درصد از چنین مواردی دارای توارث مغلوب اتوزومی (۱۰) هستند که به عنوان ناشنوایی غیر سندرومی مغلوب اتوزومی<sup>۱</sup> (ARNSHL) شناخته می شوند که عموماً از نوع پیش از تکلم می باشند (۶،۸،۹). ۲۰-۱۵ درصد نیز الگوی توارث غالب اتوزومی و بقیه نیز توارث وابسته به X یا میتوکندریایی دارند (۱۱).

بر اساس تخمین های موجود برآورد شده که ممکن است تا ۱ درصد ژنهای انسان به نحوی در فرآیند شنوایی دخیل باشند و طبیعتاً ایجاد جهش در این ژنها منجر به نقص در فرایند شنوایی و بروز ناشنوایی می شود. اهمیت این موضوع بواسطه تعدد ژنها و لوکوسهای شناخته شده برای این بیماری بروز می کند، به نحوی که تا کنون بیش از ۱۳۰ لوکوس و ۵۳ ژن مختلف برای NSHL شناخته شده است

(۱۲-۱۴) (<http://hereditaryhearingloss.org>)

تعدد لوکوس های شناسایی شده برای ناشنوایی و مخصوصاً ناشنوایی غیر سندرومی مغلوب اتوزومی نشاندهنده ناهمگنی ژنتیکی بسیار زیادی است که این بیماری نشان می دهد (۱۵) و در این نوع از ناشنوایی به تنهایی حدود ۷۰ لوکوس مسئول بیماری

شناسایی شده است (۱۲). (<http://hereditaryhearingloss.org>). ناشنوایی ناهمگن ترین بیماری جهان است (۱۶) و این امر برای انجام تحقیقات گسترده در این رابطه منطقی به نظر میرسد و از طرفی نیز باعث شده تا هنوز هم ژنهای مسبب این بیماری مورد بحث و بررسی زیادی باشند. این ناهمگنی ژنتیکی باعث شده تا درصد بسیاری از بیماران از لحاظ مولکولی غیرقابل تشخیص باشند و تعداد بسیار زیادی از لوکوسها، ژنها و جهش های مسئول این بیماری در جوامع مختلف و از جمله ایران ناشناخته باقی بماند (۵،۱۷).

شایعترین فاکتور مسبب ناشنوایی غیرسندرومی<sup>۲</sup> (NSHL)، جهش های ژن GJB2 واقع در لوکوس DFNB1 هستند (۲). بعد از ژن مذکور، ژن SLC26A4 واقع در لوکوس DFNB4 دومین دلیل شایع این بیماری است که به عنوان شایعترین دلیل در بروز موارد اسپورادیک در کودکان چینی ذکر شده است (۱۸) و بعد از اینها به ترتیب جهشهای موجود در DFNB2 و DFNB21 عمده ترین دلایل بروز اختلالات شنوایی مادرزادی می باشند (۵،۱۹).

در سال ۲۰۰۹ با استفاده از روش آنالیز پیوستگی گسترده ژنومی، لوکوس DFBN93 در محل 2-11q13. 3-11q12 و در یک خانواده ایرانی ناشنوا شناسایی شد. مطالعات بعدی نشان داد بیش از ۳۰ ژن در این ناحیه وجود دارد که تعدادی از این ژنها در گوش داخلی موش و انسان بیان می شوند (۲۰). در این منطقه ۳ ژن نزدیک این ناحیه بودند که شناسایی و تعیین توالی گردید ولی هیچ تغییری پاتوژنی در آنها یافت نشد (۲۰).

اخیراً جهش ژنی c.637+1G>T در ژن CABP2 که در لوکوس DFNB93 قرار دارد در سه خانواده ناشنوا ایرانی مشاهده و گزارش گردیده است (۲۱).

ژن CABP2 یک زیر خانواده (Subfamily) از پروتئین های متصل شونده به کلسیم است که شباهت زیادی به Calmodulin-Dependent Kinase II و Protein Phosphatase Calcineurin دارد و روی کروموزوم ۱۱ قرار گرفته است (11q13.1) (۲۲). ژن CABP2 دارای ۷ آگزون می باشد و پروتئین تولید شده توسط این ژن شامل ۲۲۰ اسید آمینه و یک حد واسط مهم کلسیمی برای انتقال علائم درون سلولی است (۲۳،۲۴). کانالهای هدایتی حساس

1. Autosomal Recessive Non Syndromic Hearing Loss  
2. Non Syndromic Hearing Loss

در مرحله بعد، توالی هدف را با استفاده از درگاه الکترونیکی NebCutter ۲ (۲۶) (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>) مورد بررسی قرار داده و با توجه به محل وقوع جهش مورد بررسی آنزیم محدودگر مناسب مشخص شد. در این مطالعه آنزیم KpnI با توجه به جایگاه برشی آن و قطعات حاصل از برش برای انجام روش PCR-RFLP و غربالگری جهش مورد نظر انتخاب گردید که نتایج احتمالی تاثیر این آنزیم به شکل *in silico* مورد بررسی قرار گرفت و از درستی آنزیم انتخاب شده اطمینان حاصل گردید. بر این اساس آنزیم مذکور قادر به برش DNA فاقد جهش مورد بررسی و تقسیم آن به قطعات ۲۹۶ جفت بازی و ۴۰۲ جفت بازی بود اما در مورد DNA جهش یافته به دلیل تغییر در جایگاه برشی آنزیم KpnI قادر به شناسایی جایگاه و برش آن نبوده و رویت قطعه برش نخورده روی ژل مورد انتظار است.

انجام واکنش PCR و برش با آنزیم محدودگر KpnI (PCR-RFLP) واکنش PCR تحت شرایط زیر انجام شد:

یک چرخه اولیه شامل  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه بعدی شامل واسرشته سازی (Denaturation) در  $94^{\circ}\text{C}$  برای مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمر (Annealing) در  $58^{\circ}\text{C}$  برای مدت ۳۰ ثانیه، و مرحله توسعه (Extension) در  $72^{\circ}\text{C}$  برای مدت ۲۵ ثانیه و یک مرحله توسعه آخر (Final Extension Step) در  $72^{\circ}\text{C}$  برای مدت ۵ دقیقه که در دستگاه ترموسیکلر (ASTEC PC818, Japan) انجام شد. مقادیر مورد استفاده در واکنش PCR به شرح ذیل هستند:

PCR Buffer (10X): 2.5 $\mu\text{l}$ , MgCl<sub>2</sub> (25mM): 1 $\mu\text{l}$ , dNTP(2mM): 1 $\mu\text{l}$ , Primer Forward(10mM): 1 $\mu\text{l}$ , Primer Reverse(10mM): 1 $\mu\text{l}$ , DNA template: 1.5 $\mu\text{l}$ , Taq Polymerase: 0.2 $\mu\text{l}$ , DDW: 16.8 $\mu\text{l}$

محصولات حاصل از تکثیر و نمونه کنترل منفی برای واکنش PCR، روی ژل پلی اکریلامید ۷ درصد با نسبت آکریلامید به بیس آکریلامید ۱:۲۹ و با ولتاژ ۲۷۰ ولت و جریان ۸۰ میلی آمپر الکتروفورز شدند (PAGE) و سپس با روش رنگ آمیزی نیترات نقره رنگ آمیزی گردیدند و سپس محصولات PCR بر روی Light Box مشاهده گردیدند. بدین ترتیب از صحت واکنش تکثیر و طول قطعات حاصله اطمینان حاصل گردید.

برای غربالگری بیماران دارای جهش هدف، محصولات همراه با

به کلسیم (BK Channels) نقش بسیار حیاتی در تنظیم تغییرات شیب پتانسیل الکتریکی در گوش داخلی دارند و این مهم در پیام رسانی سلولی گوش داخلی نقش مهمی را بازی می کند (۲۵). با توجه به نقش مهم این ژن در پیام رسانی داخل سلولی و اولین گزارش بیماریزایی جهش این ژن در خانواده های ناشنوی ایرانی، نیاز به مطالعات بیشتر در رابطه با تعیین میزان دقیق نقش جهش شناخته شده در این ژن در جمعیت های مختلف کشور و از جمله بیماران مبتلا به ناشنوایی با الگوی اسپورادیک محسوس می باشد. بر همین اساس در این مطالعه به بررسی جهش c.637+1G>T در ژن CABP2 در بیماران ناشنوی ایرانی با الگوی بروز اسپورادیک پرداخته ایم.

## روش بررسی

### جمع آوری نمونه خون بیماران و استخراج DNA

از بین نمونه های موجود تعداد ۱۸۳ نمونه مبتلا به ناشنوایی مغلوب اتوزومی اسپورادیک مورد استفاده قرار گرفت. این بیماران از ۸ استان آذربایجان شرقی، اصفهان، بوشهر، چهارمحال و بختیاری، سیستان و بلوچستان، فارس، کردستان و کهگیلویه و بویر احمد انتخاب شدند و مورد مطالعه قرار گرفتند.

استخراج DNA از نمونه های خون بیماران با استفاده از روش استاندارد فنل-کلروفرم (Phenol-Chloroform) انجام شد (۲۶). میزان DNA استخراج شده، با استفاده از روش Spectrophotometry و توسط دستگاه نانودراپ (Thermo NanoDrop ۲۰۰۰ Spectrophotometer, USA) اندازه گیری شد.

### طراحی جلودارها و آنزیم محدودگر مناسب

توالی ژن CABP2 از طریق پایگاه داده های دانشگاه کالیفرنیا UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu>) استخراج و جایگاه جهش هدف (c.637+1G>T) در ژن CABP2 رهگیری گردید. سپس با استفاده از درگاه الکترونیکی پرایمر ۳ (۲۶) جلودارهای (CAPF & CAPR) طراحی گردیدند که محدوده مورد نظر از ژن CABP2 را تکثیر می کنند.

CAPF: 5'-GATGCCCTGGGTCTGTAATG-3'

CAPR: 5'- ATGGGAATGCAGCATAGAGG-3'

هیچگونه موردی که حامل جهش c.637+1G>T باشد یافت نشد

### بحث

پروتئین های اتصال کلسیم<sup>۲</sup> (CaBPs)، بخشی از خانواده وسیع پروتئین های حاوی دومین EF-Hand هستند که سطوح کلسیم داخل سلولی را تنظیم می کنند. آنها در پهنه وسیعی از فعالیت های بیولوژیک شرکت می کنند که از جمله این فعالیتها می توان به مهاجرت، بیان ژن و فعالیت نورون ها اشاره کرد. یکی از پروتئین های اتصال کلسیم پروتئین CABP2 است (۲۸) که شباهت بسیار بالایی با کالمودولین (CALM1) دارد. این پروتئین ها درست مثل کالمودولین، اعضای خانواده CaBP با پروتئین هایی مثل کانالهای Cav وابسته به ولتاژ برهمکنش کرده و طی یک عملکرد وابسته به کلسیم آنها را تنظیم می کنند (۲۹،۳۰). تفاوت CABP2 با کالمودولین در این است که CABP2 تنها سه دومین بازوی EF اتصال با کلسیم دارد (بازوهای EF شماره ۱، ۳ و ۴) زیرا بازوی EF شماره ۲ شامل یک حذف ۳ اسید آمینه ای است که از اتصال به Ca<sup>۲+</sup> ممانعت می کند (۳۱). با وجود اینکه کالمودولین تقریباً در تمام سلولهای یوکاریوت وجود دارد، اما بیان CABP2 اختصاصی بافت است و این پروتئین تنها در شبکه چشم (۳۱) و گوش داخلی (۳۲) وجود دارد.

در گوش داخلی کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ Cav1.3 برای توسعه و عملکرد مناسب سلولهای موهای گوش داخلی (IHCs) به عنوان انتقال دهنده های حسگرهای مکانیکی ضروری هستند (۳۳). جریان Ca<sup>۲+</sup> در طول کانالهای Cav 1.3 کلسیم (نوع L) درون سلولهای موهای گوش داخلی آغازکننده انتقال سیناپسی به گانگلیونهای نرون هاست که با انتقال اطلاعات شنوایی به مغز همراهی می کند (۳۴،۳۵). قرار گیری پروتئین های اتصال با کلسیم (CABPs) در سلولهای موهای گوش داخلی می تواند یک جریان Ca<sup>۲+</sup> پیش سیناپسی را شکل دهد (۳۲،۳۶). تغییر در بیان CABP2 برای عملکرد سلولهای موهای گوش داخلی بسیار با اهمیت بوده (۲۵) و می توان متصور شد که هرگونه تغییر و جهش در این ژن توان بالقوه ای را برای ایجاد اختلال در شنوایی و بروز ناشنوایی دارند.

اخیراً جهش c.637+1G>T که در جایگاه پیرایشی و در ژن CABP2 (واقع در لوکوس DFNB93) قرار گرفته به عنوان یک

آنزیم محدودگر KpnI (Fermentas, Germany) طبق دستورالعمل شرکت سازنده به شکل شبانه گرماگذاری (Overnight Incubation) شدند. در نهایت محصولات حاصل از گرماگذاری شبانه برای تعیین اندازه قطعات و در نهایت شناسایی بیماران جهش یافته و تعیین ژنوتیپ (Genotyping) روی ژل پلی اکرلامید طبق شرایط فوق الذکر، الکتروفورز گردیدند.

### یافته ها

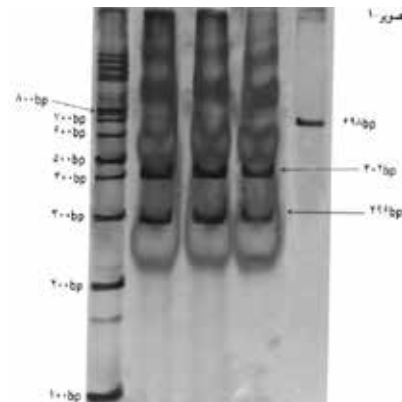
محدوده سنی بیماران مورد مطالعه از ۳۶-۸ سالگی متغیر بوده و جمعیت مورد مطالعه از نظر توزیع جنسیتی شامل ۴۶٪ زن و ۵۴٪ مرد بوده است.

### تخلیص DNA و واکنش PCR

متوسط غلظت اندازه گیری شده برای نمونه ها معادل با ۵۲۷ نانوگرم در هر میکرولیتر و متوسط نسبت جذب در ۲۶۰ نانومتر به جذب در ۲۸۰ نانومتر معادل با ۱/۸۴ بود. محصولات PCR نیز از طریق الکتروفورز روی ژل پلی اکرلامید ارزیابی شدند که درستی انجام واکنش PCR و محصولات مربوطه کاملاً تأیید گردیدند.

غربالگری جهش c.637+1G>T بوسیله RFLP

محصولات PCR که با استفاده از آنزیم KpnI گرماگذاری شدند روی ژل پلی اکرلامید الکتروفورز گردیدند که در نهایت کلیه نمونه ها دارای دو باند (296bp+402bp) روی ژل پلی اکرلامید بودند و



تصویر ۱: نمونه محصول PCR و برش آنها با آنزیم محدودگر Kpn I.

چاهک ۱. DNA Ladder

چاهک ۲ و ۳. نمونه های حاصل از گرماگذاری محصول PCR با KpnI مربوط به افراد ناشنوای مورد مطالعه که همگی هموزیگوت طبیعی برای جایگاه جهش مورد مطالعه هستند و جهش مورد مطالعه را ندارند.

چاهک ۴. نمونه حاصل از گرماگذاری محصول PCR با KpnI مربوط به فرد سالم که فاقد جهش مورد مطالعه می باشد.

چاهک ۵. نمونه محصول PCR از ژن CABP2 با استفاده از جلودارهای طراحی شده در مطالعه حاضر قبل از برش آنزیمی.

در ژن CABP2 در ایجاد ناشنوایی در جمعیت ناشنویان ایرانی است. البته با توجه به اینکه جهش مورد مطالعه در گزارشی که توسط شراون<sup>۴</sup> و همکاران صورت گرفته بود به عنوان یک جهش بنیانگذار (Founder Mutation) ذکر گردیده است. می توان این گونه تفسیر نمود که احتمالاً نمونه های مورد بررسی در مطالعه حاضر هاپلوتیپ اجدادی متفاوتی نسبت به نمونه های مورد مطالعه توسط شراون و همکاران داشته اند و این جهش بنیانگذار در اجداد جمعیت مورد بررسی ما وجود نداشته است (۲۱). در مطالعه دیگری که توسط نویسندگان انجام گردیده بود نیز نتایجی مشابه با نتایج همین مطالعه بدست آمده که بیانگر قوت گرفتن فرضیه تاثیر اثر بنیانگذار در توزیع این جهش ژنی می باشد (۳۹).

**نتیجه گیری:** با توجه به نتایج بدست آمده به نظر میرسد جهش  $c.637+1G>T$  در ژن CABP2 در جمعیت ناشنویان اسپورادیک ایرانی مورد بررسی در این مطالعه، نقشی در ایجاد ناشنوایی ندارد. بررسی مجدد جهش مذکور با افزایش حجم نمونه ها و گسترده تر کردن جمعیت های مورد تحقیق می تواند بسیار کمک کننده باشد. بعلاوه بررسی قسمت پروموتور ژن مزبور و بررسی کلیه اگزونهای ژن CABP2 نیز در تعیین نقش واقعی این ژن در ایجاد ناشنوایی می-تواند راهگشا باشد. این مطالعه سومین مطالعه ای است که تا کنون در دنیا بر روی ژن CABP2 در ارتباط با ناشنوایی ARNSHL انجام شده است و اولین مطالعه ای است که به طور گسترده احتمال دخالت جهش بنیانگذار  $c.637+1G>T$  را در موارد ناشنوایی غیرسندرومی اسپورادیک بررسی می نماید.

### تشکر و قدردانی

از همه بیماران و خانواده آنها که با مشارکت در این مطالعه نقش مهمی را در پیشرفت علم و خدمت به جامعه ایفا کردند کمال تشکر و قدردانی را داریم. این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی مصوب به شماره ۱۳۹۰-۰۷-۷۴-۸۸۱ انجام گرفته است و با حمایت کامل معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد صورت گرفته است.

"رضایت نامه کتبی از بیمار، مبنی بر انتشار این مقاله و کلیه تصاویر موجود در آن، گرفته شده است و نسخه آن در صورت نیاز در اختیار هیأت تحریریه فصلنامه قرار خواهد گرفت."

عامل مهم دیگر در بروز ناشنوایی غیر سندرومی مغلوب اتوزومی با شدت متوسط تا شدید معرفی شده است (۲۱). این ژن جدید، تولید کننده پروتئین CABP2 است و این پروتئین در پیام رسانی درون سلولی نقش بسیار مهمی را داراست (۳۷). در کل CABPs ها جزء خانواده بزرگ و وسیع EF-Hand-domain هستند و در تنظیم کلسیم درون سلولی نقش حیاتی را دارا هستند و به نحوی که پیام رسانی وابسته به کلسیم فرآیندی پایه ای در ارتباطات بین نورونی است (۲۸).

در واقع و به شکل پایه ای تمامی ارتباطات نورون های موجود در پستانداران وابسته به پیام رسانی درون سلولی کلسیم است (۳۷). از آنجایی که جهش مذکور در نقطه حساس برای پیرایش اینترون قرار گرفته است، در صورتی که RNA حاوی جهش مذکور بوسیله مکانیسم تخریب وابسته به کدون پایان (Non-Sense Mediated Decay) تخریب نشود، این جهش منجر به حذف اگزون ۶ از پروتئین CABP2 می شود و این تغییر موجب تغییر در چارچوب خواندن mRNA مربوطه و رسیدن به کدون پایانی به شکل زودرس و کوتاه شدن پروتئین تولید شده می شود (p.Phe164Serfs\*4). چنین تغییری باعث حذف بازوهای EF شماره ۳ و ۴ می شود (۳۸). چنین پروتئینی پیچیدگی متفاوتی در ساختار سوم خود داشته که این پیچش منجر به تغییر جدی در کارکرد آن شده و پیام رسانی داخل سلولی وابسته به این پروتئین را با مشکل مواجه می سازد که در نهایت می تواند منجر به ناشنوایی شود. طی مطالعه دیگری، به بیان نقش پروتئین های اتصالی به کلسیم در بازخورد (Feedback) کانالهای کلسیمی در سلولهای گوش داخلی موش پرداخته شده (۳۲) این کانالها مجموعه های چند زیرواحدی هستند که اهمیت این پروتئین ها در حفظ پتانسیل پایه و اهمیت آن در مکانیسم شنوایی در مطالعه دیگری به شکل کامل به تصویر کشیده شده است. (۲۵،۳۲).

با توجه به گزارش همزمان ۳ خانواده ایرانی برای جهش یکسان از ژن جدید CABP2 (۲۱) بر آن شدیم که در این مطالعه به بررسی دیگر بیماران ایرانی با الگوی بروز اسپورادیک بپردازیم. طراحی مطالعه حاضر بر اساس روش دقیق و نسبتاً ارزان PCR-RFLP انجام گردید. در این مطالعه، هیچ نمونه جهش یافته ای برای جهش  $c.637+1G>T$  در جمعیت بیماران مورد بررسی مشاهده نگردید. این امر نشان دهنده نقش کمزنگ جهش  $c.637+1G>T$

References / منابع

1. Genç GA, Konukseven Ö, Muluk NB, et al. Features of unilateral hearing loss detected by newborn hearing screening programme in different regions of Turkey. *Auris Nasus Larynx* 2013; 40(3): 251-9.
2. Choi S-Y, Lee KY, Kim H-J, et al. Functional evaluation of GJB2 variants in nonsyndromic hearing loss. *Molecular Medicine* 2011; 17(5-6): 550.
3. Bonneux S, Fransen E, Van Eyken E, et al. Inherited mitochondrial variants are not a major cause of age-related hearing impairment in the European population. *Mitochondrion* 2011; 11(5): 729-34.
4. Catlin FI. Prevention of hearing impairment from infection and ototoxic drugs. *Archives of Otolaryngology—Head & Neck Surgery* 1985; 111(6):377-84.
5. Tabatabaiefar MA, Alasti F, Montazer Zohour M, et al. Genetic Linkage Analysis of 15 DFNB Loci in a Group of Iranian Families with Autosomal Recessive Hearing Loss. *Iranian J Pub Health* 2011; 40(2): 34-48.
6. Park HJ, Houn Hahn S, Chun YM, Park K, Kim HN. Connexin26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss. *The Laryngoscope* 2000; 110(9): 1535-8.
7. Swanepoel DW, Hugo R, Roode R. Auditory steady-state responses for children with severe to profound hearing loss. *Archives of Otolaryngology—Head & Neck Surgery* 2004; 130(5): 531-5.8.
8. Ito T, Noguchi Y, Yashima T, Ohno K, Kitamura K. Hereditary hearing loss and deafness genes in Japan. *J Med Dent Sci* 2010; 57(1): 1-10.
9. Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *New England Journal of Medicine* 2005; 353(19): 2012-24.
10. McGuirt WT, Smith RJH. Connexin 26 as a cause of hereditary hearing loss. *American Journal of Audiology* 1999; 8(2): 93-100.
11. Mukherjee M, Phadke SR, Mittal B. Connexin 26 and autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Indian Journal of Human Genetics* 2003; 9(2): 40-50.
12. <http://hereditaryhearingloss.org/>.
13. Brownstein Z, Avraham KB. Deafness genes in Israel: implications for diagnostics in the clinic. *Pediatric Research* 2009; 66(2): 128-134.
14. Accetturo M, Creanza TM, Santoro C, et al. Finding new genes for non-syndromic hearing loss through an in silico prioritization study. *PLoS One* 2010; 5(9): e12742, 1-16.
15. de Kok YJM, Bom SJH, Brunt TM, et al. A Pro51Ser mutation in the COCH gene is associated with late onset autosomal dominant progressive sensorineural hearing loss with vestibular defects. *Human Molecular Genetics* 1999; 8(2): 361-366.
16. Petit C. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nature Genetics* 1996; 14(4): 385-91.
17. Hilgert N, Smith RJH, Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics?. *Mutation Research* 2009; 681(2-3): 189-96.
18. Qu C, Sun X, Shi Y, et al. Microarray-based mutation detection of pediatric sporadic nonsyndromic hearing loss in China. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2012; 76(2): 235-9.
19. 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.
20. Tabatabaiefar MA, Alasti F, Shariati L, et al. DFNB93, a novel locus for autosomal recessive moderate-to-severe hearing impairment. *Clin Genet* 2011; 79(6): 594-8.
21. Schrauwen I, Helfmann S, Inagaki A, et al. A mutation in CABP2, expressed in cochlear hair cells, causes autosomal-recessive hearing impairment. *Am J Hum Genet* 2012; 91(4): 636-45.
22. Christel C, Lee A. Ca<sup>2+</sup>-dependent modulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820(8): 1243-52.
23. Jenkins MA, Christel CJ, Jiao Y, et al. Ca<sup>2+</sup>-dependent facilitation of Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels by densin and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *The Journal of Neuroscience* 2010; 30(15): 5125-5135.
24. Haynes LP, McCue HV, Burgoyne RD. Evolution and functional diversity of the Calcium Binding Proteins (CaBPs).

- Frontiers in molecular neuroscience 2012; 5(9): 20-32.
25. Kowalik L, Hudspeth A. A search for factors specifying tonotopy implicates DNER in hair-cell development in the chick's cochlea. *Developmental Biology* 2011; 354(2): 221-31.
  26. <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>.
  27. <http://genome.ucsc.edu/>.
  28. Di Donato V, Auer TO, Duroure K, Del Bene F. Characterization of the Calcium Binding Protein Family in Zebrafish. *PloS one* 2013; 8(1): e53299, 1-13.
  29. Haeseleer F, Imanishi Y, Sokal I, Filipek S, Palczewski K. Calcium-binding proteins: intracellular sensors from the calmodulin superfamily. *Biochemical and biophysical research communications* 2002; 290(2): 615-23.
  30. Christel C, Lee A. Ca<sup>2+</sup>-dependent modulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 2012; 1820(8): 1243-52.
  31. Haeseleer F, Sokal I, Verlinde CL, et al. Five members of a novel Ca<sup>2+</sup>-binding protein (CABP) subfamily with similarity to calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(2): 1247-60.
  32. Cui G, Meyer AC, Calin - Jageman I, et al. Ca<sup>2+</sup> - binding proteins tune Ca<sup>2+</sup> - feedback to Cav1.3 channels in mouse auditory hair cells. *The Journal of Physiology* 2007; 585(3): 791-803.
  33. Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, et al. Congenital Deafness and Sinoatrial Node Dysfunction in Mice Lacking Class D L-Type Ca<sup>2+</sup> Channels. *Cell* 2000; 102(1): 89-97.
  34. Moser T, Neef A, Khimich D. Mechanisms underlying the temporal precision of sound coding at the inner hair cell ribbon synapse. *The Journal of Physiology* 2006; 576(1): 55-62.
  35. Matthews G, Fuchs P. The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission. *Nature Reviews Neuroscience* 2010; 11(12): 812-22.
  36. Yang PS, Alseikhan BA, Hiel H, et al. Switching of Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of Cav1.3 channels by calcium binding proteins of auditory hair cells. *The Journal of Neuroscience* 2006; 26(42): 10677-89.
  37. McCue HV, Haynes LP, Burgoyne RD. The diversity of calcium sensor proteins in the regulation of neuronal function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2010; 2(8): a004085:1-20.
  38. Schrauwen I, Helfmann S, Inagaki A, et al. A Mutation in *CABP2*, Expressed in Cochlear Hair Cells, Causes Autosomal-Recessive Hearing Impairment. *The American Journal of Human Genetics* 2012; 91(4): 636-645.
  39. Salehi Chaleshtori A, Fatahi F, Tabatabaiefar M, et al. Analysis of CABP2 c.637+1G>T Mutation in Iranian Families with Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss. *Journal of Babol University of Medical Sciences* 2014; 16(1): 70-76.