

## ارتباط جهش ژنتیکی در GJB۲ و آنالیز پیوستگی لوکوس DFNB۴ در گروهی از ناشنوایان غیر سندرمی با وراثت مغلوب اتوزومی در هرمزگان

نجمه آهنگری<sup>۱</sup>، مرجان مسعودی<sup>۲</sup>، علی اکبر پورصادق<sup>۳</sup>، دکتر عبدالعظیم نجاتی زاده<sup>۴\*</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران
۳. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران
۴. دانشیار، دکترای تخصصی ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

پذیرش: ۹۴/۴/۱۴

انجام اصلاحات: ۹۴/۳/۲

دریافت: ۹۴/۱/۹

چکیده

**زمینه و هدف:** ناشنوایی شایع ترین اختلال حسی در انسان است که از هتروژنی بالایی برخوردار می باشد. در میان انواع گوناگون ناشنوایی، ناشنوایی غیرسندرمی با وراثت مغلوب اتوزومی (ARNSHL) به عنوان ۸۰ درصد از موارد ناشنوایی پیش از تکلم مادرزادی به حساب می آید. هدف از این مطالعه بررسی پیوستگی ژنتیکی لوکوس DFNB۴ در خانواده های ناشنوای هرمزگانی می باشد.

**روش بررسی:** ۱۰ خانواده بزرگ ناشنوا در استان هرمزگان انتخاب شدند. از هر شجره یک فرد مبتلا انتخاب شده و توالی ژن GJB۲ از نظر جهش های ناحیه کدکننده به روش تعیین توالی بررسی شد. STR مارکرهای لوکوس DFNB۴ در خانواده هایی که فاقد جهش GJB۲ بودند با روش PCR تکثیر شدند و پس از تعیین نوع الی مورد تجزیه و تحلیل پیوستگی قرار گرفتند.

**یافته ها:** در ۱ خانواده از ۱۰ خانواده مورد مطالعه جهش GJB۲ مشاهده شد. ۹ خانواده دیگر وارد مطالعات پیوستگی شدند که هیچ موردی از پیوستگی به لوکوس فوق در این خانواده ها مشاهده نشد.

**نتیجه گیری:** به دلیل ناهمگنی زیاد لوکوس های مرتبط در ARNSHL، ممکنست عوامل دیگری در علت ناشنوایی خانواده های فاقد جهش های ژن GJB۲ و لوکوس مورد مطالعه دخیل باشند. از این رو مطالعه بر روی لوکوس های دیگر و خانواده های بیشتر پیشنهاد می شود.

**کلمات کلیدی:** پیوستگی ژنتیکی، لوکوس ژنتیکی، ناشنوایی، ژن GJB۲، لوکوس DFNB۴

نویسنده مسئول: دکتر عبدالعظیم نجاتی زاده

آدرس: ایران، بندر عباس، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی  
ایمیل: azimnejate@yahoo.com

### مقدمه

می شوند، به عنوان ۸۰ درصد از موارد ناشنوایی پیش از تکلم مادرزادی به حساب می آیند، درحالی که انواع Postlingual (پس از تکلم) مثلاً ناشنوایی دیررس به طور کلی با اشکال ناشنوایی اتوزومال غالب یا DFNA مطابقت دارد (۱). علل ژنتیکی ناشنوایی در سندرم هایی مثل آشر و سندرم پندرد از ناشنوایی غیر سندرمی متمایز می باشند. به تازگی رشد

ناشنوایی شایع ترین اختلال حسی در انسان است. تقریباً یک در هر هزار نوزاد در هنگام تولد یا در اوایل کودکی مبتلا به ناشنوایی عمیق می گردند. حدود نیمی از موارد اختلال شنوایی پیش از تکلم (Prelingual) علل ژنتیکی دارند و باقی مانده به عوامل محیطی نسبت داده شده اند. اشکال ناشنوایی اتوزومال مغلوب که DFNB نامیده

Universal Newborn Hearing Screening) در ایران با میانگین (statistics: UNSHS) می باشد (۱۶). ازدواج خویشاوندی به میزان ۳۸/۶ درصد و جمعیت ناهمگون در نتیجه قومیت های مختلف، می تواند فرصت مناسبی برای تحقیقات ژنتیکی روی ARNSHL فراهم آورد (۱۷). روش پیوستگی ژنتیکی (Linkage analysis) از مهم ترین روش های بررسی ژنتیکی بیماری ها در انسان محسوب می شود. آنالیز پیوستگی برای طرح ریزی نقشه های پیوستگی ژنتیکی مورد استفاده قرار می گیرد و توصیفی است از این که چگونه تعدادی جایگاه روی یک کروموزوم در فواصل ژنتیکی بهم مرتبط هستند (۱۸).

در این روش از مارکرهای (Short tandem Repeat) STR استفاده می شود (۱۹). STR ها، مارکرهای چند شکلی هستند که در سراسر ژنوم پراکنده اند و واحد تکرار آن ها بین ۲ تا ۵ نوکلئوتید می باشد (۲۰). اساس این روش نقشه کشی اتوزیگوسیتی (Autozygous mapping) است و فن انتخابی برای مطالعه ژنتیک بیماری های مغلوب اتوزومی می باشد (۲۱). یکی از لوکوس های دخیل در ناشنوایی لوکوس DFNB4 می باشد. این لوکوس، حاوی ژن Pendrin (SLC26A4) است و در مطالعه ای بر روی یک خانواده در خاور میانه، بر روی ۷q۳۱ نقشه برداری شده است (۲۲). این ژن که یک پروتئین گذر غشایی به نام Pendrin کد می کند که کلر و ید را عبور می دهد و در غده تیروئید، گوش درونی و کلیه بیان می شود و اصولاً در هوموستازی فلوئید نقش دارد بر اساس مطالعات قبلی، DFNB4 به طور قابل ملاحظه ای به ARNSHL در ایران کمک می کند و رتبه دوم بعد از DFNB1 محسوب می شود (۲۳). این مطالعه به منظور شناسایی خانواده های ناشنای با علت شایع جهش در ژن GJB2 و آنالیز پیوستگی لوکوس DFNB4 در جمعیت مورد مطالعه پرداخته شده است.

## روش بررسی:

### شناسایی و نمونه گیری خانواده های ناشنوا

در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی پس از هماهنگی با اداره بهداشتی شهرستان بندرعباس، واحد توانبخشی، خانواده های ناشنوی ARNSHL با حداقل ۲ مورد ناشنوا شناسایی شدند. پس از تکمیل فرم رضایت نامه کتبی، پرسشنامه شامل اطلاعات دموگرافیک و تاریخچه بیماری، برای هر خانواده شجره رسم

چشمگیری در شناسایی لوکوس ها و ژن های ناشنوی ارثی غیر سندرومی صورت گرفته است. حداقل ۳۶۰ میلیون نفر، بالغ بر ۵ درصد جمعیت جهانی مبتلا به ناشنوایی هستند (۴-۲). ناشنوایی بر اساس نوع وراثت، سن شروع، ویژگی های شنوایی سنجی، فنوتیپ دهلیزی گوش، و لوکوس ژنتیکی مسئول ناشنوایی طبقه بندی می گردد و می تواند حتی در درون یک خانواده از خفیف تا عمیق متفاوت باشد (۵، ۳). اکثریت موارد ناشنوایی غیر سندرومی است (Autosomal recessive non syndromic hearing loss: ARNSHL) و به صورت الگوی اتوزومال مغلوب خود را نشان می دهد (۷۰ درصد) و بقیه موارد شامل اتوزومال غالب (۲۰ درصد)، وابسته به X (۱ درصد) و میتوکندریایی (کمتر از ۱ درصد) می باشد (۶). در ناشنوایی غیر سندرومی تنها گوش داخلی متحمل آسیب گردیده و دیگر عوارض کلینیکی در این مبتلایان مشاهده نمی شود (۷). فرم اتوزومال مغلوب ناشنوایی معمولاً شدیدتر از اشکال دیگر ناشنوایی است و تقریباً به طور انحصاری به علت نقص حلزون شنوایی می باشد (۸). ناشنوایی ارثی از نظر ژنتیکی بسیار ناهمگن است. علیرغم پیشرفت های قابل توجهی که در درک صحیح اساس مولکولی ناشنوایی صورت گرفته، تشخیص دقیق علت ژنتیکی در یک فرد مبتلا همچنان دشوار است و بررسی های بالینی بایستی صورت پذیرد. از آنجایی که یکی از علل شایع ناشنوایی جهش ژن کانکسین ۲۶ (GJB2) است، غربالگری مولکولی برای آن باید در تمام موارد ناشنوایی غیر سندرومی که علت آن ناشناخته است انجام گردد (۹). ناشنوایی می تواند به طرق گوناگونی طبقه بندی گردد، از جمله به صورت prelingual (پیش از تکلم) در مقابل postlingual (پس از تکلم)، انتقالی در مقابل حسی، سندرومی در مقابل غیر سندرومی و ژنتیکی در مقابل محیطی (۱۰). در مجموع اشکال غیر سندرومی ناشنوایی تحت عنوان DFNA برای شکل اتوزوم غالب، DFNB برای اشکال اتوزومال مغلوب، و DFN برای اشکال وابسته به X نامگذاری می گردند (۱۱). ناشنوایی سندرومی حدود ۳۰ درصد موارد ناشنوایی کودکان را شامل می شود و چند صد سندرم مرتبط با ناشنوایی توصیف شده است (۱۳، ۱۲). بین سال های ۱۹۹۵ و ۲۰۱۲، بیش از ۱۰۰ لوکوس و حدود ۱۰۰ ژن عامل اشکال سندرومی و غیر سندرومی ناشنوایی ارثی شناخته شده است (۱۴، ۱۵). با توجه به پیامدهایی که ناشنوایی بر کیفیت زندگی افراد می گذارد، تشخیص زود هنگام ناشنوایی مادرزادی از اهداف مهم غربالگری جهانی ناشنوایی در نوزادان

باندهای ثانویه از جمله معیارهای مهم انتخاب آن در مطالعات پیوستگی ژنتیکی است. انتخاب مارکرهای هر لکوس بر اساس جستجو در NCBI Map Viewer و انتخاب پرایمرها مطابق NCBI Uni STS صورت گرفت.

#### تکثیر مارکرها

STR های انتخاب شده و پرایمرهای واکنش PCR به تفکیک هر جایگاه ژنتیکی در جدول شماره ۱ آمده است. هر میکروتیوب PCR شامل پرایمرهای پیش رو و پس رو هر کدام ۱۰ pm، مخلوط dNTP ۱۰ mM، MgCl<sub>2</sub> ۵۰ mM، آنزیم Taq پلیمرز شرکت ژن فن آوران ۵ u/μl، DNA ژنومیک ۵۰ ng که با ddH<sub>2</sub>O به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. جهت اتصال اختصاصی تر پرایمرها برنامه دمایی به صورت تاج داون (Touch down) تنظیم شده و سپس PCR در دمای واقعی اتصال، ادامه یافت (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: شرایط دمایی برنامه Touch down جهت STR های لوکوس DFNB۴

مرحله	دما	زمان	تعداد تکرار
۱	۹۵	۳ دقیقه	۱
۲	۹۵	۳۰ ثانیه	۷
	۵۶-۶۲	۳۰ ثانیه (۱ درجه کاهش دما در هر چرخه)	
	۷۲	۳۰ ثانیه	
۳	۹۵	۳۰ ثانیه	۲۵
	۵۹	۳۰ ثانیه	
	۷۲	۳۰ ثانیه	
۴	۷۲	۵ دقیقه	۱

#### آنالیز پیوستگی

بعد از تکثیر قطعات مورد نظر توسط روش PCR نمونه های مورد نظر بر روی ژل پلی اکریلامید ۱۰ درصد با جریان ۵۰ میلی آمپر و ولتاژ ۱۳۰ ولت به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شدند و سپس باندها از نظر هموزیگوت یا هتروزیگوت بودن بررسی گردید. در صورت مشاهده باند هموزیگوت در افراد ناشنوا و باند هتروزیگوت در والدین و خواهر/ برادر سالم، آنالیز پیوستگی ادامه می یابد.

شد. از هر یک از اعضای خانواده اعم از پروباند (فرد ناشنوا)، والدین و خواهر/ برادر فرد ناشنوا به میزان ۵ سی سی خون محیطی همراه EDTA نمونه گیری به عمل آمد. نمونه ها در اسرع وقت به فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد منتقل شدند.

#### استخراج DNA و غربالگری ژن GJB۲:

استخراج DNA به روش Salting out بعمل آمد. پس از استخراج DNA نمونه ها برای آگزون دوم ژن GJB۲ غربالگری شدند. به این منظور یک جفت پرایمر اختصاصی این ناحیه طراحی شد. پرایمرهای طراحی شده در NCBI ابتدا BLAST شدند و سپس در سایت Ensemble بررسی شدند. طول قطعه ای که تکثیر شد ۸۰۹ bp است. بر اساس شجره نامه از هر خانواده حداقل یک فرد مبتلا برای غربالگری جهش های ژن GJB۲ انتخاب شد. پس از تکثیر آگزون دوم ژن GJB۲ توسط پرایمرهای اختصاصی و PCR، ناحیه تکثیر شده به صورت یک طرفه تعیین توالی شد. پرایمرهای انتخابی شامل F: ۵' CTCCCTGTTCTGTCCTAGCT و R: ۳' CTCATCCCTCTCATGCTGTC بودند. هر میکروتیوب PCR شامل پرایمرهای پیش رو و پس رو هر کدام ۱۰ pm، مخلوط dNTP ۱۰ mM، MgCl<sub>2</sub> ۵۰ mM، آنزیم Taq پلیمرز شرکت ژن فن آوران ۵ u/μl، DNA ژنومیک ۵۰ ng که با ddH<sub>2</sub>O به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. تکثیر DNA با دستگاه ترموسایکلر (Labcyler (sensoquest انجام گردید. برنامه حرارتی به صورت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ سیکل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه در تمام سیکل طراحی شد. جهت کنترل محصول PCR ژن GJB۲ (تایید وجود باند ۸۰۹ bp) الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد به مدت ۵۰ دقیقه در ولتاژ ۱۰۰ میلی آمپر انجام گردید. سپس این محصولات به روش سانگر تعیین توالی شدند (شرکت MacroGene، کره).

#### تعیین ژنوتیپ مارکرهای STR مربوط به لوکوس DFNB۴

نمونه های منفی از نظر جهش های ژن GJB۲ از طریق تجزیه و تحلیل پیوستگی مورد تحلیل قرار گرفتند. جهت بررسی لوکوس مورد مطالعه حداقل از ۳ مارکر ژنتیکی مختلف استفاده گردید. نزدیکی به ژن مورد نظر، هتروزیگوت بودن پدر و مادر برای هر مارکر خاص، وجود محدوده تغییرات در طول محصول PCR و دارا بودن کمترین میزان

جدول شماره ۱: مارکرهای STR لوکوس DFNB4 به تفکیک جایگاه

لوکوس مورد مطالعه و جایگاه کروموزومی	مارکر STR	موقعیت فیزیکی بر حسب (bp)	محدوده محصول PCR	پرایمر Forward (۵'→۳')	پرایمر Reverse (۵'→۳')
DFNB4 (SLC26A4) ۷q۳۱	DvS۴۹۶	۱۰۷۱۵۴۴۸۹- ۱۰۷۱۵۴۷۱۳	۱۲۹-۱۴۱	AACAACAGTCAACCCACAAT	GCTATAACCTCATAANAAACCAAAA
	DvS۲۴۵۹	۱۰۷۳۳۱۶۴۲- ۱۰۷۳۳۱۵۰۱	۱۴۰-۱۵۲	AAGAAGTGCATTGAGACTCC	CCGCCTTAGTAAAACCC
	DvS۲۴۲۵	۱۰۸۳۴۷۳۲۲- ۱۰۸۳۴۷۰۷۹	۲۳۴-۲۴۶	CTAGTCCTGAGAAGACATTACCC	CCTGTTTCAGATGTTTATCCA

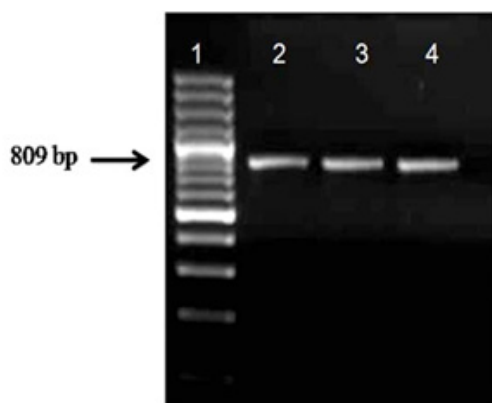
## یافته ها

## بررسی اطلاعات اپیدمیولوژی و شنوایی سنجی:

از ۱۰ خانواده مورد مطالعه (۶۵ نفر) در مجموع ۲۵ نفر مبتلا به ناشنوایی بودند (۳۸/۵ درصد). بر اساس اطلاعات پرسشنامه در ۵ خانواده ازدواج خویشاوندی والدین وجود داشت (۵۰ درصد). در برخی از خانواده ها شدت ناشنوایی افراد نیز باهم متفاوت بود. قومیت همه اعضاء فارس و متولد استان هرمزگان بودند. وضعیت بیماران از نظر شدت ناشنوایی در جدول شماره ۳ آمده است.

## بررسی وجود جهش های ژن GJB2:

از ۱۰ شجره خانوادگی مورد مطالعه ۱ خانواده دارای جهش ژن GJB2 بود (۶/۲۵ درصد) نتایج تعیین توالی اگزون دوم ژن GJB2 بیانگر وجود جهش شناخته شده  $G>A$  در ۲۸۳ در ۱ خانواده بود. این خانواده از مطالعات بعدی آنالیز پیوستگی خارج شد (شکل شماره ۱ و ۲).

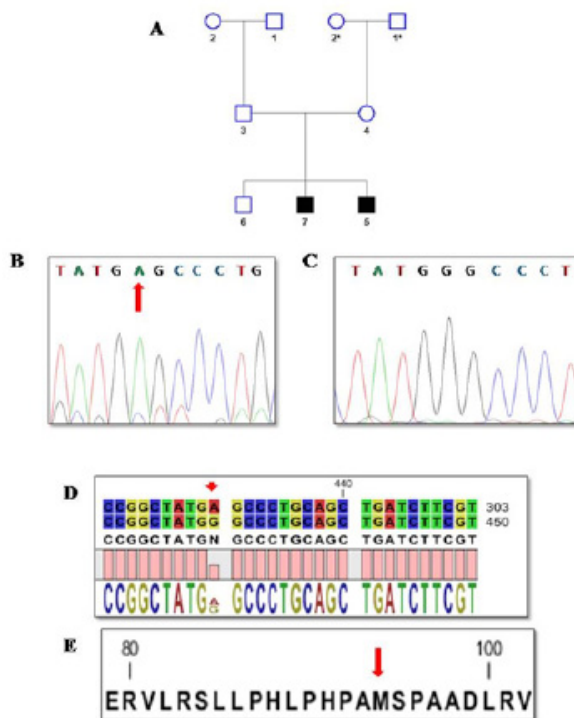
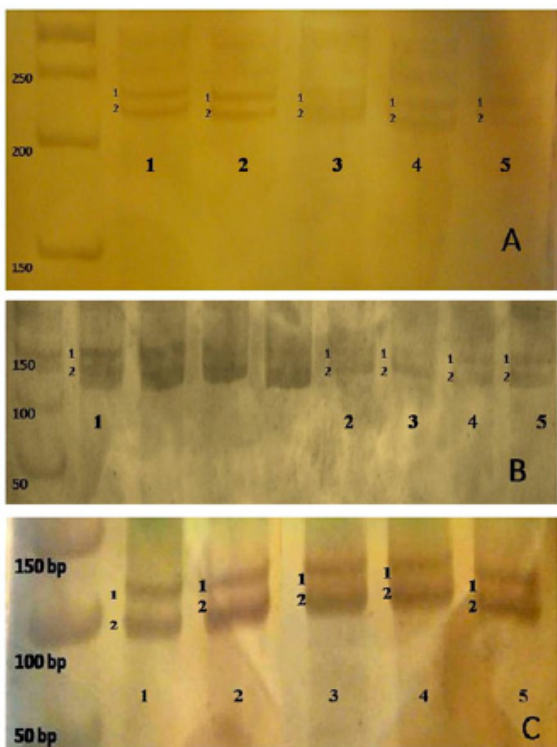


شکل ۱ شماره: نتایج الکتروفورزی محصولات PCR ژن GJB2 (۱: مارکر ۱۰۰bp، ۲، ۳ و ۴) نمونه ای از محصولات PCR ژن GJB2 از سه فرد ناشنواست. باندهای حاصله دارای طول ۸۰۹bp هستند.

## شدت ناشنوایی (db)

عمیق <sup>۱</sup>	شدید <sup>۲</sup>	متوسط تا شدید <sup>۳</sup>	متوسط <sup>۴</sup>	متوسط <sup>۵</sup>	خفیف <sup>۶</sup>
۶(۲۴)	۱۰(۴۰)	۶(۲۴)	۳(۱۲)	۰(۰)	
جمع کل					۲۵(۱۰۰)

۱. (بیش از ۹۰ دسی بل)  
 ۲. (۷۱-۹۰ دسی بل)  
 ۳. (۵۶-۷۰ دسی بل)  
 ۴. (۴۱-۵۵ دسی بل)  
 ۵. (۲۶-۴۰ دسی بل)



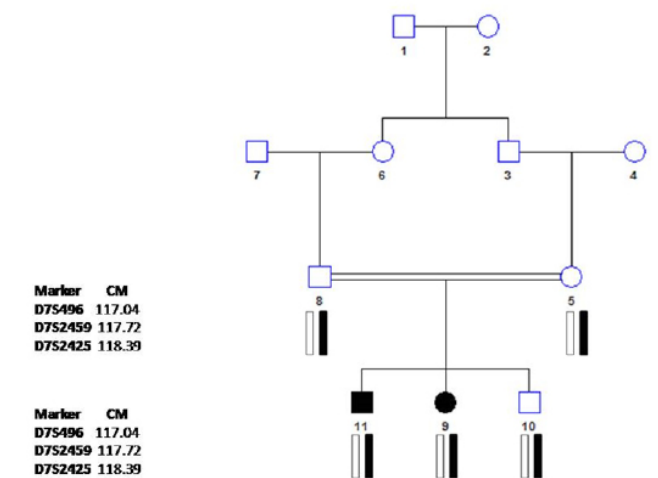
شکل شماره ۴: تعیین ژنوتیپ مارکرهای STR (لوکوس DFNB۴) روی ژل پلی اکریلامید ۱۰ درصد. A. مارکر DYS۲۴۲۵، B. مارکر DYS۲۴۴۹، C. مارکر DYS۴۹۶. در تمامی تصاویر به ترتیب از چپ به راست: مارکر ۵۰bp، باند ۱ پدر، باند ۲ مادر، باندها ۳ و ۴ فرزندان ناشنوا، باند ۵ فرزند سالم؛ همانطور که مشاهده می شود همه باندها هتروزیگوت هستند.

شکل شماره ۲: A. شجره خانواده SALA (کد خانوادگی)، B. کروماتوگراف ناحیه جهش C،  $G>A$  ۲۸۳. توالی نرمال، D. نتیجه آنالیز توالی با نرم افزار CLC بیانگر جایگزینی G به A می باشد، E. جایگزینی اسید آمینه متیونین به جای والین.

### نتایج مطالعات پیوستگی لوکوس های انتخابی:

### بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه که بر روی ۱۰ خانواده ARNSHL از استان هرمزگان صورت گرفت، ابتدا عوامل دخیل در ناشنوایی نظیر الگوهای توارث، شدت ناشنوایی، سندرمی یا غیر سندرمی بودن آن و خویشاوندی والدین بر اساس پرونده بیماران مورد بررسی قرار گرفت. نخست غربالگری جهش های ژن GJB۲ و سپس مطالعه پیوستگی برای لوکوس DFNB۴ به عمل آمد. در این مطالعه ۱ خانواده (۶/۲۵ درصد) که برای جهش GJB۲ مثبت بود و این جهش قبلاً به عنوان جهش بیماری زا گزارش شده (۲۴) و با نتایج گزارش شده از مطالعه صورت گرفته در ایران مشابهت دارد (۲۵)، در فاز اول مطالعه کنار گذاشته شد. از آنجا که اکنون ۲ تنها توالی ژن GJB۲ است که توالی لازم برای تولید پروتئین کانکسین ۲۶ را دارد (۲۶) و جهش های این ژن مسئول ۵۰ درصد موارد ناشنوایی مغلوب پیش از تکلم می باشد، ابتدا مورد بررسی قرار گرفت (۲۷). مطالعات صورت گرفته در کشورمان بیانگر تفاوت



شکل شماره ۳: شجره خانواده PA (کد خانوادگی). نام STR مارکرها به همراه فاصله فیزیکی آنها بر حسب سانتی موری مورگان (CM) در سمت چپ شکل نشان داده شده اند. فاصله ها بر حسب نقشه decode می باشند. مستطیل های سیاه و سفید بیانگر هتروزیگوت بودن هر کدام از مارکرها می باشد.



و پرسنل اداره بهزیستی بندرعباس، سازمان آموزش و پرورش استثنایی استان، مدرسه پیوند و به ویژه ریاست و پرسنل محترم کانون ناشنوایی استان هرمزگان که در تهیه لیست و هماهنگی بیماران و خانواده های آنها جهت نمونه گیری همکاری نموده اند صمیمانه قدردانی و سپاس به عمل می آید.

سبب ناهمگن بودن جمعیت ایران در نقاط مختلف کشور باشد و موید این است که ژن های دیگری نیز عامل ناشنوایی ارثی غیر سندرمی در ایران می باشند (۲۸). از ۹ خانواده باقیمانده که وارد مطالعات پیوستگی شدند هیچ خانواده ای به لکوس DFNB4 پیوستگی نشان نداد. این لوکوس، حاوی ژن Pendrin (SLC26A4) است و در مطالعه ای بر روی یک خانواده در خاور میانه، بر روی ۷q۳۱ نقشه برداری شده است (۲۲). یک خانواده بزرگ خویشاوند در هند به این لوکوس پیوستگی نشان داد (۲۹، ۲۲). جهش های این ژن مسئول سندرم Pendred است و در یک سری بزرگ از پروباندهای خویشاوند از آسیای شرقی و جنوبی در تقریباً ۵ درصد موارد، جهش های ژن SLC26A4 شناسایی شده است (۳۱-۲۹). تقریباً ۵ درصد موارد ARNSHL در آسیای جنوبی و دیگر جمعیت ها ناشی از جهش های SLC26A4 است (۳۱، ۳۰). در مطالعه ای در کشورمان، از ۸۰ خانواده که دارای ۲ یا بیشتر موارد ناشنوا بودند، ۱۲ خانواده (۱۵ درصد) به این لوکوس نقشه برداری گردیدند که البته شواهدی دال بر نشانگانی بودن در ۵ مورد وجود داشت (۳۲). در دو مطالعه اخیر در ایران، به ترتیب از ۳۱ مورد منفی از نظر GJB2، به ترتیب ۴ (۱۲/۹ درصد) و ۳ خانواده (۸/۸ درصد) پیوستگی به لوکوس DFNB4 نشان دادند. بنابراین، DFNB4 به طور قابل ملاحظه ای در ARNSHL در ایران نقش دارد و رتبه دوم بعد از DFNB1 محسوب می شود (۳۳، ۲۳).

در مطالعه حاضر در مجموع علت ژنتیکی ناشنوایی ۶/۲۵ درصد از خانواده های مبتلا به ARNSHL شناسایی شد. با توجه به این که هیچ موردی از پیوستگی به لوکوس مورد مطالعه در این استان یافت نشده است، بررسی خانواده های بیشتر، ارزیابی سایر ژن ها و لوکوس های درگیر در ناشنوایی سبب فراهم شدن اطلاعات لازم جهت تشخیص علت ناشنوایی جمعیت مورد مطالعه می گردد. مطالعات ژنتیک ناشنوایی می تواند در مشاوره صحیح و اصولی خانواده بیماران و کنترل و پیشگیری از بروز آن موثر واقع شود. از این رو مطالعات تکمیلی بر روی سایر خانواده های ناشنوای استان هرمزگان ادامه دارد.

### تشکر و قدردانی

این طرح با شماره ۲-ژ-۹۱ در دفتر تحصیلات تکمیلی دانشکده پزشکی بندرعباس به ثبت رسیده است. از تمامی بیماران و خانواده های آن ها که در این مطالعه شرکت نموده اند، ریاست

## References:

- Petit C. From deafness genes to hearing mechanisms: harmony and counterpoint. *Trends Mol Med.* 2006 Feb;12(2):57-64.
- Martins FTA, Ramos PZ, Svidnicki M, Castilho AM, Sartorato EL. Optimization of simultaneous screening of the main mutations involved in non-syndromic deafness using the TaqMan® OpenArray™ Genotyping Platform. *BMC Medical Genetics.* 2013;14(112).
- Duman D, Tekin M. Autosomal recessive nonsyndromic deafness genes: a review. *NIH Public Access.* 2013;17:2213-36.
- Birkenhager R, Aschendorff A, Schipper J, Laszig R. [Non-syndromic hereditary hearing impairment]. *Laryngorhinootologie.* 2007 Apr;86(4):299-309; quiz 10-3.
- Cryns K, Orzan E, Murgia A, Huygen PL, Moreno F, del Castillo I, et al. A genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin 26) deafness. *J Med Genet.* 2004;41(3):147-54.
- 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.
- Hilgert N, Smith RJH, Camp GV. Function and expression pattern of nonsyndromic deafness genes. *Curr Mol Med.* 2009;9(5):546-64.
- Petersen MB, Willems PJ. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet.* 2006;69(5):371-92.
- Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull.* 2002;63:73-94.
- Li XC, Friedman RA. Nonsyndromic hereditary hearing loss. *Otolaryngol Clin North Am.* 2002 ;35(2):275-85.
- Balciuniene J, Dahl N, Borg E, Samuelsson E, Koisti MJ, Pettersson U, et al. Evidence for digenic inheritance of nonsyndromic hereditary hearing loss in a Swedish family. *Am J Hum Genet.* 1998 ;63(3):786-93.
- Online Mendelian Inheritance in Man. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. 2001.
- RJ G, HV T, MM C. Hereditary hearing loss and its syndromes. Oxford,UK: Oxford University Press. 1995.
- Angeli S, Lin X, Liu XZ. Genetics of hearing and deafness. *Anat Rec (Hoboken).* 2012;295(11):1812-29.
- Jones SM, Jones TA. Genetics of Peripheral Vestibular Dysfunction: Lessons from Mutant Mouse Strains. *J Am Acad Audiol.* 2014 ;25(3):289-301.
- Arslan S, Isik AU, Imamoglu M, Topbas M, Aslan Y, Ural A. Universal newborn hearing screening: automated transient evoked otoacoustic emissions. *B-ENT.* 2013;9(2):122-31.
- Tabatabaiefar M, Alasti F, Zohour MM, E Shariati L F, GV Farhud DD C, Noori-Dalooi M, et al. Genetic Linkage Analysis of 15 DFNB Loci in a Group of Iranian Families with Autosomal Recessive Hearing Loss. *Iranian J Publ Health.* 2011;40:1-15.
- Ing'olfsd'ottir A, Christensen AL, Hansen JA, Johnsen J, Knudsen J, Rasmussen JI. A Formalization of Linkage Analysis. *BRICS Report Series.* 2002.
- Sheffield V, Weber J, Buetow K, Murray J, Even D, Wiles K, et al. A collection of tri- and tetranucleotide repeat markers used to generate high quality, high resolution human genome-wide linkage maps. *Hum Mol Genet.* 1995;4:1837-44.
- Guilford P, Arab SB, Blanchard S, Levilliers J, Weissenbach J, Belkahlia A, et al. A non-syndromic form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat Genet.* 1994;6(24-28).
- Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, et al. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet.* 1997;6:1605-9.
- Baldwin C, Weiss S, Farrer A, Stefano AD, Adair R, Franklyn B, et al. Linkage of congenital, recessive deafness (DFNB4) to chromosome 7q31 and evidence for genetic heterogeneity in the Middle Eastern Druze population. *Hum Mol Genet.* 1995;4:1637-42.
- Sadeghi A, Sanati M, Alasti F, Chaleshtori MH, Mahmoudian S, Ataei M. Contribution of GJB2 mutations and Four common DFNB loci in autosomal recessive non-syndromic hearing impairment in Markazi and Qom provinces of Iran. *Iran J Biotechnol.* 2009;7:108-211.
- Snoeckx RL, Huygen PL, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J, et al. GJB2 Mutations and Degree of Hearing Loss: A Multicenter Study. *The American Journal of Human Genetics.* 2005;77(6):945-57.
- Tabatabaiefar M, Shariati L, Montazer-Zohour M, Ashrafi K, Saf-fari-Chaleshtori J, Ghasemikah R. Mutation screening of GJB2 and GJB6 and genetic linkage study of three prevalent DFNB loci in Iranian families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *J Shahrekord Univ Med Sci.* 2010;12(2):65-75.
- Rezaei H, Boroujeni SV, Mohammadi R. High frequency of 35delG mutation associated to non syndromic hearing loss in Isfahan province. *Genetics in the 3rd millenium.* 1389;8(3):2074-8.
- Lee SW, Tomasetto C, Paul D, Keyomarsi K, Sager R. Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. *J Cell Biol.* 1992;118:1213-21.
- Bazazzadegan N, Mirhosseini N, aldin HZ, Kahrizi K, Arjangi S, Astani A, et al. The relative abundance mutation (35delG) on the GJB2 gene in autosomal recessive non-syndromic hearing of Kerman Journal of Kerman university of medical sciences. 1383;11(3):136-40.
- Everett L, Glaser B, Beck J, Idol J, Buchs A, Heyman M, et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* 1997;17:411-22.
- Park H, Lee S, Jin H, Lee J, Go S, Jang H, et al. Genetic basis of hearing loss associated with enlarged vestibular aqueducts in Koreans. *Clin Genet.* 2005;67:160-5.
- Park H, Shaukat S, Liu X, Hahn S, Naz S, Ghosh M, et al. Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness. *J Med Genet.* 2003;40:242-8.
- Kahrizi K, Mohseni M, Nishimura C, Bazazzadegan N, Fischer S, Dehghani A, et al. Identification of SLC26A4 gene mutations in Iranian families with hereditary hearing impairment. *Eur J Pediatr.* 2009;168:651-3.
- Tabatabaiefar MA, Alasti F, Zohour MM, Shariati L, Farrokhi E, Farhud DD, 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.



Original Article

Ahangari &amp; Colligues...

## 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

Najmeh Ahangari<sup>1</sup>, Marjan Masoudi<sup>2</sup>, Aliakbar Poursadegh<sup>3</sup>, Abdolazim Nejatizadeh<sup>4\*</sup>

1. MSc Student in Human Genetics, Center of Molecular Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran
2. MSc Student in Human Genetics, Center of Molecular Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran
3. MSc Student in Human Genetics, Center of Molecular Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran
4. Associate Professor, PhD of Medical Genetics, Center of Molecular Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

Received:2015.4.29

Revised:2015.5.23

Accepted:2015.7.5

Abstract

**Background & Objective:** Deafness is the most common sensory disorder in humans which is highly heterogeneous. Among its various types, autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL) is responsible for 80% of pre-speech congenital cases of hearing loss. The purpose of this study was to investigate the genetic linkage of DFNB4 locus in hearing impaired families in Hormozgan.

**Method:** Ten deaf large families in the Hormozgan province were selected. A hearing impaired person was selected from each family tree and sequence of the GJB2 gene in regards of coding regions' mutations was investigated using sequencing method. STR markers of DFNB4 locus in families with no mutation in GJB2 were amplified using PCR and after determining the type alleles, they were analyzed for linkage.

**Results:** In one among the ten studied families, GJB2 mutation was observed. The nine other families were entered for linkage studies and no linkage was found in the said families.

**Conclusion:** Due to the high heterogeneity of loci associated with ARNSHL, other factors may be involved in the cause of deafness in families, without mutations in the GJB2 gene and the investigated locus. Therefore it is recommended to study other loci and more families in this matter.

**Keywords:** Genetic Linkage, Genetic Locus, Hearing Loss, GJB2 Gene, DFNB Locus

Corresponding Author: Abdolazim Nejatizadeh

Address: Iran, Bandar Abbas, Hormozgan University of Medical Sciences, Research Center for Molecular Medicine

Email: azimnejate@yahoo.com

Please cite this paper as: Ahangari N, Masoudi M, Poursadegh A.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. Hakim Jorjani J. 2015; 2(2): 11-18.

