مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۸/هفته سوم مهر ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۵/۲۲

بررسی جهش‌های ژن LRTOMT (لوکوس DFNB۶۳) در بیماران مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمیک مغلوب استان هرمزگان با استفاده از روش‌های PCR-SSCP، PCR-HA و توالی‌یابی DNA

شهربانو پرچمی برجوئی[۱]، سمیه رئیسی[۲]، فاطمه رضائیان[۳]، فاطمه هیبتی[۳]، دکتر مرتضی هاشم‌زاده چالشتری[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ناشنوایی شایع‌ترین اختلال حسی مادرزادی در جوامع امروزی می‌باشد. ناشنوایی ژنتیکی به دو حالت نشانگانی و غیر نشانگانی دیده می‌شود. ناشنوایی غیر نشانگانی با توارث مغلوب اتوزومی (ARNSHL یا Autosomal recessive non-syndromic hearing loss) شایع‌ترین شکل ناشنوایی است و تا کنون ۹۵ لوکوس برای آن نقشه‌یابی شده است که از این مناطق، ۴۱ ژن ناشنوایی شناسایی گردیده است. با وجود مطالعات زیاد، برای لوکوس DFNB۶۳ ژن LRTOMT (Leucine rich transmembrane and O-methyltransferase) مطالعات اندکی انجام شده است. از این رو، بررسی جهش این لوکوس می‌تواند در شناخت بهتر ژن‌های مؤثر در ناشنوایی مؤثر باشد.

روش‌ها: در این مطالعه، ۹۰ نمونه ناشنوایی استان هرمزگان مورد بررسی قرار گرفت. DNA نمونه‌ها به روش فنل- کلروفرم استخراج شد و سپس مرحله‌ی PCR (Polymerase chain reaction) انجام گرفت. بعد با استفاده از محصول PCR، مراحل SSCP (Single-strand conformation polymorphism) و HA (Heteroduplex analysis) صورت گرفت و نمونه‌هایی که دارای باندهای متفاوت بودند، به منظور تعیین نوع تغییر نوکلئوتیدی توالی‌یابی شدند.

یافته‌ها: ۸ نمونه در اگزون‌های مختلف (هر کدام در یک اگزون خاص) در بررسی باندهای SSCP دارای شیفت بودند که به منظور تعیین نوع تغییر نوکلئوتیدی توالی‌یابی شدند. در نتیجه‌ی توالی‌یابی، هیچ تغییر نوکلئوتیدی در هیچ کدام از اگزون‌های مورد بررسی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج، بین جهش‌های ژن کد کننده‌ی LRTOMT و ناشنوایی غیر سندرومیک ارتباطی مشخص نشد. با توجه به این که زمان زیادی از کشف این ژن سپری نشده است، تحقیقات زیادی هم در رابطه با آن صورت نگرفته است. جهش‌های شناسایی شده در مطالعات انجام گرفته بر روی این ژن در سرتاسر جهان، تنها ۵ جهش می‌باشد که نقش کم‌رنگ آن را در ارتباط با ناشنوایی بیان می‌کند.

واژگان کلیدی: جهش، Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism، Polymerase chain reaction-heteroduplex، ژن Leucine rich transmembrane and O-methyltransferase

ارجاع: پرچمی برجوئی شهربانو، رئیسی سمیه، رضائیان فاطمه، فاطمه هیبتی، هاشم‌زاده چالشتری مرتضی. **بررسی جهش‌های ژن LRTOMT (لوکوس DFNB۶۳) در بیماران مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمیک مغلوب استان هرمزگان با استفاده از روش‌های PCR-SSCP، PCR-HA و توالی‌یابی DNA.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۸): ۱۳۳۷-۱۳۳۰

۱- کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری، تهران، ایران
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴- استاد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مرتضی هاشم‌زاده چالشتری
Email: mchalesh@yahoo.com

مقدمه

ناشنوایی (HL یا Hearing Loss) شایع‌ترین اختلال حسی مادرزادی در جوامع امروزی می‌باشد (۴-۱). به نظر می‌رسد که این اختلال، بیش از تمام ناتوانی‌های دوران کودکی، مورد بحث و بررسی قرار گرفته باشد و این امر، شاید بدان سبب است که قدرت تکلم ارتباط نزدیکی با قدرت شنوایی دارد (۵). ناشنوایی غیر نشانگانی با توارث مغلوب اتوزومی (ARNSHL یا Autosomal recessive non-syndromic hearing loss) شایع‌ترین شکل ناشنوایی است و تا کنون ۹۵ لوکوس برای آن نقشه‌یابی شده است که از این مناطق، ۴۱ ژن ناشنوایی شناسایی گردیده است (۶، ۲). این ارقام برای حالت غالب اتوزومی ۵۴ لوکوس با ۲۷ ژن و برای وابسته به X، ۵ لوکوس و ۳ ژن، ۲ لوکوس Modifier، ۱ لوکوس Y-linked و ۱ لوکوس AUNA می‌باشند.

بر طبق مطالعات انجام گرفته، حدود ۵۰ درصد از ناشنوایی‌های غیر سندرومیک به واسطه‌ی جهش در ژن‌های GJB۲ (CX-۲۶) و GJB۶ (CX-۳۰) واقع در لوکوس DFNB۱ ایجاد می‌شوند (۷).

در ایران حدود ۱۸/۲۹-۱۶/۷ درصد موارد ARNSHL به وسیله‌ی ژن GJB۲ ایجاد می‌شود. بنابراین علل ژنتیکی حدود ۸۳ درصد از ARNSHL در کشورمان، به عوامل ژنتیکی دیگری وابسته است (۸). بنابراین، با توجه به طبیعت فوق‌العاده ناهمگن این بیماری و تنوع جمعیتی کشور، بررسی لوکوس‌های دیگر ناشنوایی برای قومیت‌ها و مناطق مختلف ایران بسیار ضروری می‌باشد (۱۰-۹).

طی تجزیه و تحلیل پیوستگی سراسری ژنومی بر روی ۳۷ شجره از خانواده‌های غیر خویشاوند از نقاط مختلف ایران، که توسط طباطبایی‌فر و همکاران صورت گرفته است، ضمن تأیید نتایج دیگر مطالعات انجام شده، یک دید کلی نسبت به فراوان‌ترین لوکوس‌های دخیل در بیماران ARNSHL ایرانی ارایه گردیده است که می‌تواند برای پژوهش و بالین مفید باشد. اولویت‌های ارایه شده توسط این مطالعه به ترتیب (از راست به چپ) DFNB۱، DFNB۴، DFNB۲، DFNB۲۱، DFNB۷/۱۱ و DFNB۶۳ می‌باشند (۸).

با توجه به لوکوس‌های پیش‌گفته، تا کنون در زمینه‌ی لوکوس DFNB۶۳ ژن LRTOMT (Leucine rich transmembrane and O-methyltransferase) مطالعه‌ای صورت نگرفته است و نظر به پیشنهاد پژوهشگران مطالعه‌ی پیش‌گفته مبنی بر بررسی بیشتر این لوکوس در مطالعات بعدی بر روی بیماران ARNSHL، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی جهش‌های ژن LRTOMT انجام گرفت. البته لازم به ذکر است به دلیل این که حدود نیمی از ناشنوایی‌های غیر سندرومیک در ارتباط با جهش‌های ژن‌های GJB۲ و GJB۶ می‌باشند، در این پژوهش، حضور جهش در جایگاه ژنی DFNB۶۳ با استفاده از نمونه‌های ناشنوایی استان هرمزگان که برای جهش‌های CX-۲۶ و CX-۳۰ منفی بوده‌اند، بررسی شد (۹).

LRTOMT دارای ۱۰ اگزون و ۲ نوع قالب خواندن متناوب است و بنابراین دو پروتئین متفاوت LRTOMT۱ و LRTOMT۲ را کد می‌نماید که می‌توان این دو نوع را با روش لکه‌گذاری برای پروتئین شناسایی کرد. این دو نوع پروتئین در کدون‌های شروع ترجمه با هم تفاوت دارند.

اگزون‌های ۵، ۷ و ۸ چارچوب خواندن دوگانه دارند (۱۲). در مطالعه‌ی انجام گرفته بر مبنای بررسی جهش‌های این ژن، اگزون‌های ۸ و ۳ دارای بیشترین تغییر نوکلئوتیدی مرتبط با ناشنوایی بوده‌اند (۱۱). بنابراین این نقاط به عنوان نقاط داغ جهش در ارتباط با ناشنوایی مورد توجه هستند. هدف این بررسی، بر پایه‌ی شناسایی جهش در اگزون‌های ۱، ۳، ۵ و ۸ در ژن LRTOMT بود.

روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۹۰ نمونه‌ی مبتلا به بیماری ناشنوایی از استان هرمزگان مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های مورد استفاده از نظر جهش در ژن کانکسین ۲۶ مورد بررسی قرار گرفته و منفی بوده‌اند (۸). در انتخاب افراد ناشنوا، دقت شد که ناشنوایی آن‌ها ژنتیکی و دارای الگوی وراثتی غیر سندرمی آتوزومال مغلوب باشد. این مهم با بررسی اطلاعات موجود در پرسش‌نامه‌های تکمیل شده و شجره‌نامه‌ی به دست آمده از خانواده‌های ناشنوای مناسب، انجام شد. میانگین سنی افراد مورد مطالعه ۱۳/۵ سال بود و ۴۳/۵ درصد آنان مذکر و ۵۶/۵ درصد مؤنث بودند.

از هر فرد به میزان ۵ ml خون وریدی دریافت و داخل لوله‌ی آزمایش حاوی ۱۲ µl EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ۰/۵ M ریخته شد. نمونه‌های خون تا زمان شروع استخراج در دمای ۲۰- °C نگهداری شدند. DNA ژنومی با استفاده از پروتکل استاندارد فنل- کلروفرم استخراج گردید (۱۳، ۷). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری (اسپکتروفتومتر Unico ۲۱۰۰ USA) مورد بررسی قرار گرفت. در اجرای مراحل PCR (Polymerase chain reaction)، اولین مرحله طراحی پرایمر با کیفیت و دقت مطلوب با استفاده از نرم‌افزارهای موجود است. در مطالعه‌ی حاضر، پرایمرهای مورد استفاده بر اساس توالی مربوط به ژن LRTOMT از پایگاه اطلاعاتی UCSC برای اگزون‌های ۱، ۲، ۳، ۵ و ۸ ژن کد کننده‌ی LRTOM با استفاده از نرم‌افزار Primer۳ Online طراحی شدند (جدول ۱).

در مطالعه‌ی حاضر، برای تکثیر نواحی مورد نظر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (PC۸۱۸ Japan، Astec) در حجم ۲۵ µl انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ µl بافر (۱۰ X) PCR، ۱/۵ µl از $MgCl_2$ (۵۰ mM)، ۰/۵ µl از مخلوط DNTP (Deoxyribonucleotide) (۱۰ mM)، ۰/۲ µl از هر کدام از پرایمرها (۵۰ PM)، ۱۰۰ ng از DNA ژنومی (۱/۵ µl) و در نهایت ۰/۵ U از آنزیم Taq پلیمراز (۵ U/µl) تهیه گردید (تمامی مواد مصرف شده از شرکت سیناژن ایران تهیه شدند).

تکثیر توالی DNA اگزون‌های ژن مورد مطالعه با استفاده از شرایط دمایی پایه: ۱ سیکل ۹۵ °C و ۳ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل ۹۵ °C و ۴۵ ثانیه، ۵۸ °C و ۵۰ ثانیه، ۷۲ °C و ۵۰ ثانیه و در نهایت، ۷۲ °C و ۵ دقیقه برای یک سیکل به منظور تکثیر نهایی مورد استفاده قرار گرفت. البته سیکل‌ها برای هر کدام از اگزون‌های مورد مطالعه با توجه به شرایط دمایی، نوع پرایمر و موارد دیگر تنظیم گردید.

به منظور مشاهده‌ی کیفیت و کمیت توالی‌های تکثیر یافته، محصول PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آکریل آمید ۸ درصد مورد بررسی قرار گرفت (شرکت Merck آلمان). پس از الکتروفورز،

بـه منظـور مشـاهده‌ی بانـدهای DNA حاصـل، از روش رنـگ‌آمیـزی نیتـرات نقـره اسـتفاده شـد (۶). سـپس واکنش‌هـای PCR-HA (PCR-heteroduplex analysis) و PCR-SSCP (PCR-single strand conformation polymorphism) با استفاده از محصول PCR بـر اسـاس روش Nataraj و همکـاران صـورت گرفـت (۱۰-۹). نمونه‌هـای دارای بانـد متفـاوت بـر روی ژل الکتروفـورز SSCP و هترودوپلکس بـرای تأییـد نهـایی تعیـین تـوالی گردید. واکـنش تعیـین تـوالی بـا اسـتفاده از سیسـتم ABI (Capillary System) ۳۷۳۰ XL انجام شد (شکل ۱).

یافته‌ها

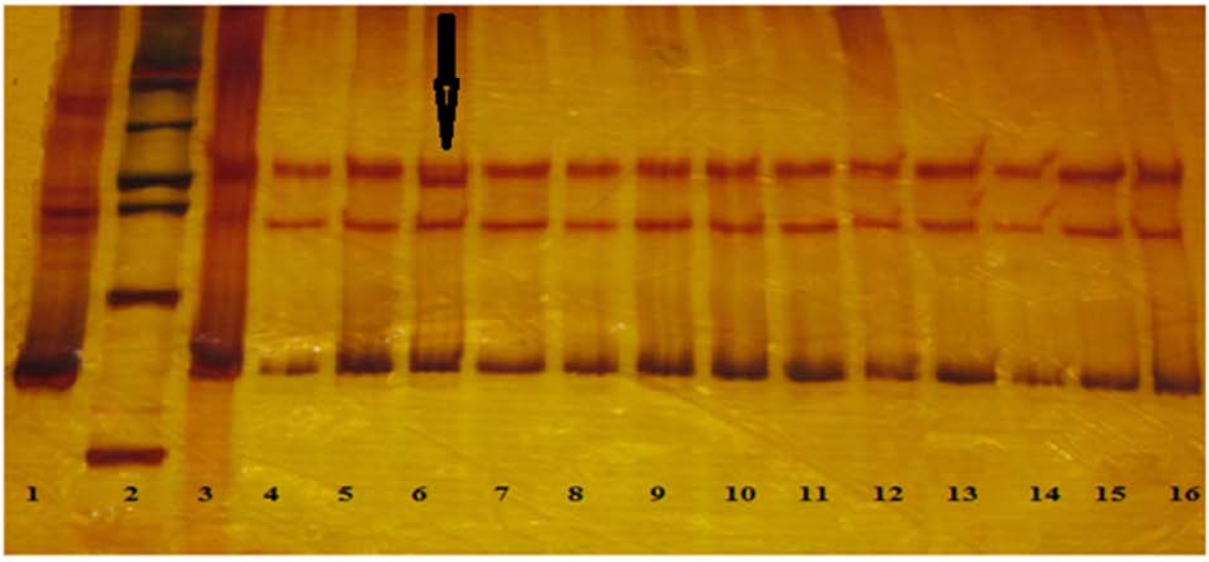
محصولات PCR تکثیر شده در مرحله‌ی قبـل، بـرای واکنش‌های SSCP و هترودوپلکس مورد استفاده قرار گرفتند. این روش برای غربالگری تغییرات موجود در توالی استفاده شد. این روش به صـورت همزمـان بـا روش هترودوپلکس به کـار رفـت. نتـایج ژل‌گـذاری هـیچ گونـه تفـاوت بانـدی را در نمونـه هـای مـورد مطالعه‌ی اگزون‌های ۱، ۳، ۵ و ۸ روی ژل نشان نداد. لازم به ذکر است که در اگـزون ۳ ایـن ژن (تغییـر در بانـدهای SSCP)، نمونـه‌ی مشـکوک (تغییـر در ۵ نمونـه) مشـاهده گردیـد. پـس از تعیـین تـوالی ایـن نمونـه‌هـا تغییـر در آن‌هـا تأییـد نشـد. بـر اسـاس بررسی‌های انجام شده در این مطالعه، در هیچ یـک از اگزون‌های مورد مطالعـه‌ی ژن LRTOMT، جهـش و یا تغییری مشاهده نشد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در PCR (Polymerase chain reaction)

توالی پرایمر(۳→ ۵)	نوع پرایمر	اندازه‌ی قطعه (bp)	نام اگزون
GAAAGCAGTTGCCATGGAGT	F	۱۹۶	E۱
GTGGGGGAAATCTCAGATCC	R		
GAAAGCAGTTGACATGGAGT	FM*		
GCAAGGATGCAAGGAAGAGT	F	۲۴۸	E۳a
GCTCCTGTACCGAAGTGTTC	R		
GCTCCTGTACCGAAGGGTTC	RM*		
GCACCTTTGAATGATGGCCT	F	۲۵۹	E۳b
ACTCTCCCCTACCCTCCAAA	R		
GCACCTTTGAATGATTGCCT	FM*		
AGTATGGCTGTGGAGGGTTG	F	۲۷۰	E۵a
TTCCTCCATGGGGTTCCCAT	R		
TTCCTCCATGGGGTTACCAT	RM*		
GTGAATAAGCTGGCTGTCCT	F	۲۷۷	E۵b
CAAGGAATGGAGGGACTTGA	R		
GTGAATAAGCTGGCGGTCCT	FM*		
AGGATAATAATTGCTACTGGCAAAA	F	۲۶۴	E۸a
GTGAGCACGTAGCTGAAG	R		
GTGAGCACGTAGCGGAAG	RM*		
GGCACTACTTCCGATTGCTG	F	۲۶۲	E۸b
ATCCCAAATATTCCTTCACTGTCTT	R		
GGCACTACTTCCGATGGCTG	FM*		

F: پرایمر فوروارد؛ R: پرایمر ریورس؛ *FM و *RM: پرایمرهای موتانت (فوروارد یا ریورس)

a و b: به دلیل این که محصول PCR (Polymerase chain reaction) مربوط به اگزون ۳، ۵ و ۸ بزرگ می‌باشد و حداکثر بازدهی در روش PCR-SSCP داشتن محصولاتی با اندازه‌ی ۳۰۰-۱۵۰ جفت باز می‌باشد؛ از این رو برای این اگزون‌ها، دو جفت پرایمر طراحی شد (دو آمپلیکون) که در جدول با علامت‌های a و b مشخص شده‌اند.



شکل ۱. تشکیل باند مربوط به تفکیک DNA حاصل از PCR (Polymerase chain reaction) بر روی ژل SSCP-HA (single strand conformation polymorphism- heteroduplex) (اگزون ۳)

۱: نمونه‌ی شاهد مثبت که دارای نوکلئوتید تغییر یافته می‌باشد، ۲: DNA نشانگر bp ۱۰۰، ۶: نمونه‌ی دارای باند متغیر، سایر باندها: نمونه‌های افراد ناشنوا می‌باشند که تغییر الگوی باندی در آن‌ها دیده نمی‌شود.

بحث

بر اساس نتایج مشاهده شده در این مطالعه، جهش‌های احتمالی اگزون‌های ۱، ۳، ۵ و ۸ ژن LRTOMT در ایجاد ناشنوایی در ناشنوایان غیر سندرومی تک‌گیر استان هرمزگان که مورد بررسی قرار گرفتند، تأثیر چندانی ندارند. Ahmed و همکاران طی مطالعه‌ای در اعضای تحت تأثیر واقع شده‌ی ۴ خانواده‌ی غیر مرتبط مبتلا به ناشنوایی مغلوب اتوزومی DFNB۶۳ چهار جهش هموزیگوت مختلف در اگزون‌های ۳ و ۸ را در ژن LRTOMT (۶۱۲۴۱۴.۰۰۰۴-۶۱۲۴۱۴.۰۰۰۱) شناسایی کردند. منشأ این خانواده‌ها ترکیه، تونس و پاکستان بود. در ادامه ایشان پیشنهاد بررسی این دو اگزون و ناحیه‌ی UTR ۳' در جمعیت‌های دیگر را عنوان کرده بودند. با توجه به عقیده‌ی Ahmed و همکاران، ناحیه‌ی UTR ۳' با در نظر گرفتن نوع قالب خوانده شدن برای چارچوب LRTOMT۱ و پروتئین(های) بیان شده، می‌توانست حایز اهمیت باشد (۱۱).

DU و همکاران ژن LRTOMT را در ۱۹۲ فرزند ناشنوای ارثی غیر مرتبط ایرانی آنالیز کردند و هموزیگوسیتی را برای یک جهش بی‌معنی در اگزون شماره‌ی ۳ در یک خانواده (۶۱۲۴۱۴.۰۰۰۵) و یک جهش هموزیگوت از نوع دگرمعنی (Missense) در اگزون شماره‌ی ۲ در خانواده‌ی دیگر، شناسایی کردند. البته دو تغییر هتروزیگوت در این ژن نیز توسط ایشان در این مطالعه گزارش شد (۱۲).

با توجه به مطالعات پیش‌گفته، میزان جهش‌های یافت شده در کشورهای مختلف بسیار پایین است و به صورت کلی حدود صفر است. نتایج حاصل از این مطالعه، حاکی از این است که میزان جهش در اگزون‌های ۱، ۳، ۵ و ۸ بیماران غیر سندرومی تک‌گیر مورد مطالعه در استان هرمزگان، صفر است. بنابراین

نتایج مطالعات قبلی و مطالعه‌ی حاضر شباهت بسیار بالایی دارند که تا حدود زیادی نتایج حاصل از این مطالعه را تأیید می‌کنند (۱۲).

در نگاه کلی، اطلاعات محدودی در رابطه با نوع و فراوانی جهش‌های ژن کد کننده‌ی LRTOMT در جمعیت‌های مختلف وجود دارد. اما با در نظر گرفتن مطالعه‌ی Du و همکاران (۱۲) که تنها مطالعه‌ی کامل در مورد این ژن در جمعیت ایرانی قبل از این مطالعه بوده است، شاید بتوان این گونه نتیجه‌گیری کرد که در مورد این ژن، نرخ جهش در جمعیت ایرانی، در اگزون شماره‌ی ۲ هم‌سطح با دیگر اگزون‌های گزارش شده باشد.

با توجه به این که زمان زیادی از کشف ژن کد کننده‌ی LRTOMT سپری نشده است، تحقیقات زیادی هم در رابطه با آن صورت نگرفته است. با این وجود، مطالعاتی در نقاط مختلف جهان، بیانگر آن است که جهش‌های ژن LRTOMT نقش پررنگی در ایجاد ناشنوایی ندارند. جهش‌های شناسایی شده در سرتاسر جهان، تنها ۵ جهش می‌باشد که نقش کم‌رنگ آن را در ایجاد ناشنوایی بیان می‌کند.

نتیجه‌ی نهایی این که در این تحقیق، از تکنیک PCR-SSCP با احتمال خطای پایین، بهره گرفته شد و نتایج این روش با آزمایش‌های دیگری تأیید گردید. بنابراین با توجه به یافته‌های این مطالعه، احتمال می‌رود که این جهش‌ها نقش بارزی در ایجاد ناشنوایی در ناشنوایان غیر سندرومی تک‌گیر استان هرمزگان نداشته باشند. با این حال، مطالعات بیشتری لازم است تا اقوام و جمعیت‌های مختلف ایرانی از نظر میزان پراکندگی جهش‌های این ژن و ارتباط آن با ناشنوایی و حتی نوع ناشنوایی بررسی دقیق‌تری شوند تا اطلاعات مورد نیاز جهت پیشگیری و مدیریت اختلال شنوایی وابسته به این ژن تأمین گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله با اقتباس از طرح تحقیقاتی با عنوان «بررسی جهش اگزون‌های ۱، ۳، ۵ و ۸ ژن LRTOMT (لوکوس DFNB۶۳) در بیماران ایرانی مبتلا به ناشنوایی ژنتیکی با استفاده از روش‌های PCR- SSCP، PCR-HA و توالی‌یابی DNA» با شماره‌ی ۵۷۷-۷۴-۰۷-۱۳۹۰ تدوین گردیده است.

References

1. Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, de Leon ACJ, Faxon DP, Freed MD, et al. ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (writing Committee to Revise the 1998 guidelines for the management of patients with valvular heart disease) developed in collaboration with the Society of Cardiovascular Anesthesiologists endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons. J Am Coll Cardiol 2006; 48(3): e1-148.
2. Hilgert N, Smith RJ, van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? Mutat Res 2009; 681(2-3): 189-96.
3. Kochhar A, Hildebrand MS, Smith RJ. Clinical aspects of hereditary hearing loss. Genet Med 2007; 9(7): 393-408.
4. Tucci M, Stucci S, Strippoli S, Silvestris F. Cytokine overproduction, T-cell activation, and defective T-regulatory functions promote nephritis in systemic lupus erythematosus. J Biomed Biotechnol 2010; 2010: 457146.
5. Sedighi Moghaddam B, Pazoki R. First internal evaluation of microbiology, parasitology and

immunology department in Semnan University of Medical Sciences. Koomesh 2002; 3(3): 137-44. [In Persian].
6. Rapley BI, Rowland RE, Page WH, Podd JV. Influence of extremely low frequency magnetic fields on chromosomes and the mitotic cycle in Vicia faba L., the broad bean. Bioelectromagnetics 1998; 19(3): 152-61.
7. Kenneson A, van Naarden BK, Boyle C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. Genet Med 2002; 4(4): 258-74.
8. Tabatabaiefar M, Montazer Zohour M, Shariati L, Jabbari Chaleshtori, Ashrafi K, Gholami A, et al. Mutation analysis of GJB2 and GJB6 genes and the genetic linkage analysis of five common DFNB loci in the Iranian families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. J Sci IR Iran. 2010; 21(2): 105-12.
9. Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusukawa N, Highsmith WE, Jr. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. Electrophoresis 1999; 20(6): 1177-85.
10. Rossetti S, Tomei MC, Nielsen PH, Tandoi V. "Microthrix parvicella", a filamentous bacterium causing bulking and foaming in activated sludge systems: a review of current knowledge. FEMS Microbiol Rev 2005; 29(1): 49-64.
11. Ahmed ZM, Masmoudi S, Kalay E, Belyantseva IA, Mosrati MA, Collin RW, et al. Mutations of LRTOMT, a fusion gene with alternative reading frames, cause nonsyndromic deafness in humans. Nat Genet 2008; 40(11): 1335-40.
12. Du X, Schwander M, Moresco EM, Viviani P, Haller C, Hildebrand MS, et al. A catechol-O-methyltransferase that is essential for auditory function in mice and humans. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105(38): 14609-14.
13. Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, McKee R, Turck A, Eisenberg A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. Nucleic Acids Res 1989; 17(20): 8390.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 09.05.2014
Vol. 32, No. 298, 3rd Week, October 2014
Accepted: 13.08.2014

Screening LRTOMT Gene (DFNB63 locus) in Patients with Recessive Nonsyndromic Hearing Loss in Hormozgan Province, Iran

Shahrbanoo Parchami-Barjui MSc[1], Somayeh Reiisi MSc[2], Fatemeh Rezaiean[3], Fatemeh Heybati[3], Morteza Hashemzadeh-Chaleshtori PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: Congenital hearing loss is the most common sensory disorder is modern societies. Two modes of syndromic and nonsyndromic genetic hearing loss can be seen. Autosomal recessive non-syndromic inheritance hearing loss (ARNSHL) is the most common form of inheritance hearing loss. So, far mapping it, 95 loci of the 41 regions of deafness genes have been identified. Despite numerous studies in this field, for DFNB63 (Leucine rich transmembrane and O-methyltransferase or LRTOMT gene), few studies have been conducted. Thus, the locus mutations can help us to better understand the genes involved in hearing loss.

Methods: 90 cases of hearing loss in Hormozgan province, Iran, were studied. DNA extracted via phenol-chloroform method. Polymerase chian reaction (PCR) was performed. Then, the product was used to perform polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and polymerase chain reaction-heteroduplex analysis (PCR-HA) methods. Samples with different bands were sequenced to determine the nucleotide changes.

Findings: In different exons, 8 samples (each in a specific exon) were sequenced to determine the type of changes that shift single-strand conformation polymorphism bands. No change was found in nucleotide sequencing of exons in any of the groups.

Conclusion: The results showed no relationship between non-syndromic deafness and LRTOMT gene mutations. As this gene is discovered in recent years, there are few studies on it. So far, only 5 mutation of this gene have been identified in the world that can determine pale relationship of the gene and hearing loss.

Keywords: Mutation, PCR-HA, PCR-SSCP, Leucine rich transmembrane and O-methyltransferase (LRTOMT) gene

Citation: Parchami-Barjui S, Reiisi S, Rezaiean F, Heybati F, Hashemzadeh-Chaleshtori M. **Screening LRTOMT Gene (DFNB63 locus) in Patients with Recessive Nonsyndromic Hearing Loss in Hormozgan Province, Iran.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(298): 1330-7

1- Department of Biotechnology, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
2- PhD Student, Department of Genetics, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
3- MSc Student, Department of Genetics, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
4- Professor, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
Corresponding Author: Morteza Hashemzadeh Chaleshtori PhD, Email: mchalesh@yahoo.com