

## مطالعه‌ی لوکوس DFNB۳ وابسته به ناشنوایی غیر سندرمیک اتوزومال مغلوب در جمعیتی از ناشنوایان ایرانی با روش آنالیز پیوستگی ژنتیکی

سمیه رئیسی<sup>۱</sup>، دکتر محمد حسین صنعتی<sup>۲</sup>، دکتر محمد امین طباطبائی فر<sup>۳</sup>، دکتر حمیدرضا پورجعفری<sup>۴</sup>، دکتر زرین مینوچهر<sup>۵</sup>، افسانه شاورزی<sup>۶</sup>، میترا عطایی<sup>۷</sup>، محبوبه کثیری<sup>۸</sup>، دکتر مرتضی هاشم‌زاده چالشتی<sup>۹</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** ناشنوایی یک اختلال شایع می‌باشد که به طور معمول، هتروژنی ژنتیکی را در جمعیت‌های انسانی نشان می‌دهد. بروز ناشنوایی مادرزادی به میزان ۱ در هر ۵۰۰ تولد محاسبه شده است که حدود ۷۰ درصد این موارد به عوامل ژنتیکی نسبت داده می‌شوند. نقص ژنتیکی ناشنوایی به دو نوع سندرمیک و غیر سندرمیک دسته‌بندی می‌شود و در میان ناشنوایی‌های غیر سندرمیک نوع اتوزومال مغلوب (ARNSHL) یا (Autosomal, recessive, non-syndromic hearing loss) برای حدود ۸۰-۷۵ درصد موارد محاسبه می‌شود. این نوع از ناشنوایی بسیار هتروژن می‌باشد و بیش از ۱۰۰ لوکوس را شامل می‌شود. برای ناشنوایی مغلوب، شایع‌ترین ژن‌های مورد بررسی در سراسر جهان شامل GJB۲، SLC۲۶A۴، MYO۱۵A، OTOF و CDH۲۳ می‌باشند. بنابراین هدف این مطالعه، تعیین نقش موتاسیون‌های ژن MYO۱۵A (DFNB۳) در خانواده‌های ایرانی به وسیله‌ی آنالیز پیوستگی می‌باشد.

**روش‌ها:** در این مطالعه، برای بررسی فراوانی لوکوس DFNB۳ در ناشنوایی، آنالیز پیوستگی در ۳۰ خانواده‌ی ایرانی با بیش از سه فرد ناشنوا و منفی برای ژن GJB۲ انجام شد. شجره‌های با موتاسیون منفی برای ژن GJB۲ برای پیوستگی به لوکوس DFNB۳ با استفاده از نشانگرهای STR (Short tandem repeat) مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** موتاسیون ۳۵delG در ۵ خانواده از ۳۰ خانواده‌ی مورد بررسی به وسیله‌ی تعیین توالی ناحیه‌ی کد کننده‌ی ژن GJB۲ شناسایی شد. در میان بقیه‌ی خانواده‌ها، یک خانواده به لوکوس DFNB۳ پیوستگی نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج این مطالعه و سایر مطالعات، لوکوس DFNB۳ در جمعیت ایرانی سومین عامل ناشنوایی بعد از DFNB۱ (GJB۲) و DFNB۴ (SLC۲۶A۴) می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** DFNB۳، آنالیز پیوستگی، ناشنوایی غیر سندرمیک اتوزومال مغلوب، ایرانی

**ارجاع:** رئیسی سمیه، صنعتی محمد حسین، طباطبائی فر محمد امین، پورجعفری حمیدرضا، مینوچهر زرین، شاورزی افسانه، عطایی میترا، کثیری محبوبه، مرتضی هاشم‌زاده چالشتی. **مطالعه‌ی لوکوس DFNB۳ وابسته به ناشنوایی غیر سندرمیک اتوزومال مغلوب در جمعیتی از**

**ناشنوایان ایرانی با روش آنالیز پیوستگی ژنتیکی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۵): ۶۷۷-۶۶۹

۱- دانشجوی دکتری، بخش بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران ایران

۲- دانشیار، بخش بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۴- استاد، گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۵- استادیار، بخش ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۶- کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۷- کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، بخش بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۸- پرستار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۹- استاد، گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

## مقدمه

ناشنوایی یک اختلال حسی-عصبی است که طبق ارزیابی‌های انجام شده، ۷۰ میلیون نفر در سرتاسر جهان از آن رنج می‌برند. این مشکل بیشترین اختلال موجود در هنگام تولد است که با میانگین ۱ در ۵۰۰ نوزاد رخ می‌دهد (۱). ناشنوایی یک اختلال بسیار هتروژن می‌باشد و می‌تواند به دلیل عوامل ژنتیکی، محیطی یا هر دو رخ دهد (۲). بیشتر از ۵۰ درصد از موارد ناشنوایی ناشی از عوامل ژنتیکی است که از این مقدار، ۷۰ درصد آن‌ها از نوع غیر سندرمیک و ۳۰ درصد باقی‌مانده ناشنوایی‌های سندرمیک می‌باشد (۳). طبق ارزیابی‌های انجام شده تا کنون ۴۶ ژن برای ناشنوایی غیر سندرمیک شناسایی شده است (۴).

مطالعات نشان داده‌اند که به غیر از GJB۲ که جهش در آن در برخی جمعیت‌ها سهم قابل توجهی در بروز ناشنوایی غیر سندرمی اتوزومی مغلوب دارد، جهش در هر کدام از دیگر ژن‌های مرتبط با ناشنوایی، اغلب سهم کمتری در بروز این بیماری دارد. در واقع، هتروژنیتی بالا در مورد ناشنوایی، معضل بزرگی در جهت شناسایی علت ژنتیکی این بیماری در خانواده‌ها و بنابراین مشاوره‌ی ژنتیک مربوط به این بیماری ایجاد کرده است؛ به طوری که با وجود شناسایی این بیماری از سال‌ها قبل، هنوز ابهامات زیادی در مورد ژن‌های دخیل در این بیماری وجود دارد (۵). با توجه به هتروژنیتی بالا در مورد این بیماری، محققان مطالعه‌ی خانواده‌های بزرگ را در جمعیت‌هایی مثل جمعیت‌های خاورمیانه که فراوانی ازدواج خویشاوندی در آن‌ها بالا می‌باشد، پیشنهاد کرده‌اند (۶).

کشور ایران با توجه به ویژگی‌های جمعیتی آن، یکی از کشورهای است که می‌تواند برای این مطالعات مناسب باشد. مطالعات در ایران نشان داده‌اند که سهم جهش‌های ژن GJB۲ در بروز ناشنوایی در جمعیت‌های مختلف ایرانی متفاوت و از حدود ۲۷-۳۸ درصد در جمعیت ساکن در شمال ایران تا ۴-۰ درصد در جمعیت‌های جنوب شرقی ایران متفاوت می‌باشد. تاکنون جهش در سایر ژن‌های مرتبط با ناشنوایی نیز تنها در خانواده‌های محدودی از جمعیت ایرانی شناسایی شده است و به نظر می‌آید که جهت تعیین سهم دقیق هر کدام از این ژن‌ها در بروز ناشنوایی در جمعیت ایرانی، مطالعات بسیار گسترده‌تری مورد نیاز باشد (۷-۹).

در این میان، ژن SLC۲۶A۴ واقع در لوکوس DFNB۴ در جایگاه دوم در میان ژن‌های یافت شده در ناشنوایی قرار می‌گیرد. بعد از ژن‌های GJB۲ و SLC۲۶A۴ موتاسیون در ژن MYO۱۵A فراوان‌ترین دلیل ناشنوایی غیر سندرمی اتوزومال مغلوب در سرتاسر جهان می‌باشد (۴). ۲۴ موتاسیون در ژن MYO۱۵A شناسایی شده است و این موتاسیون‌ها توسط آنالیز پیوستگی در خانواده‌های خویشاوند یافت شده‌اند (۱۱-۱۰، ۴). MYO۱۵A یک میوزین غیر معمول (Unconventional) می‌باشد و نقشی در تشکیل Stereocilia دارد (۱۲). میوزین‌ها پروتئین‌های موتور مولکولی هستند که حرکت فیلامنت‌های اکتین را توسط هیدرولیز ATP (Adenosine triphosphate) انجام می‌دهند و انقباض عضلانی، عبور و مرور سلولی، حرکت سلولی، سیتوکینز و انتقال سیگنال را تسهیل می‌کنند. میوزین XVa در میان میوزین‌های غیر معمول منحصر به فرد

می‌باشد. شرایط واکنش برای تکثیر ژن شامل  $2/5 \mu\text{l}$  بافر PCR (Polymerase chain reaction) (X 10)،  $2 \mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (50 mM)،  $0/5 \mu\text{l}$  از مخلوط (10 mM) dNTP (Deoxynucleotide triphosphates)،  $0/2 \mu\text{l}$  از هر کدام پرایمرهای فوروارد (F) و ریورس (R) ( $50 \text{ pmol}$ )،  $1 \mu\text{l}$  از DNA ژنومیک ( $\sim 100 \text{ ng}$ ) و در نهایت،  $0/5 \text{ U}$  آنزیم Taq پلیمرز ( $5 \text{ U}/\mu\text{l}$ ) بود که با  $\text{ddH}_2\text{O}$  (Double-distilled water) به حجم  $25 \mu\text{l}$  رسانده شد. تکثیر DNA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (ASTEC, PC118-Japan) انجام شد. برنامه‌ی حرارتی برای واکنش شامل واسرشت‌سازی اولیه‌ی  $95^\circ\text{C}$  به مدت 5 دقیقه، 31 سیکل شامل  $94^\circ\text{C}$  واسرشت کردن به مدت 40 ثانیه،  $59^\circ\text{C}$  دمای اتصال پرایمرها به مدت 40 ثانیه و  $72^\circ\text{C}$  برای تکثیر رشته‌ها به مدت 40 ثانیه بود و با یک سیکل  $72^\circ\text{C}$  به مدت 7 دقیقه برای تکثیر نهایی خاتمه یافت. سپس محصولات PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید 8 درصد با جریان  $45 \text{ mA}$  به مدت  $1/5$  ساعت الکتروفورز شدند و باندهای DNA توسط رنگ‌آمیزی نیترات نقره مشاهده گردیدند و در این جا وجود باندهای با اندازه‌ی 809 جفت باز تأیید شد. سپس توالی‌یابی محصولات PCR انجام شد تا وجود هر نوع تغییر در این ژن مشخص شود.

#### محاسبه‌ی S-Link، آنالیز پیوستگی و بررسی

##### ژنوتایپ‌ها

برای محاسبه‌ی S-link و امتیاز LOD (Logarithm of the odds) از نرم‌افزار ژنتیکی Easy linkage plus نسخه‌ی 5/05 استفاده گردید (17). برای محاسبه‌ی S-Link از FastSlink نسخه‌ی 2/51 و برای محاسبه‌ی نمره‌ی LOD (LOD score)

می‌باشد؛ چون دارای یک دمین N ترمینال بلند (کد شده توسط اگزون 2) می‌باشد و اسپلیسینگ متفاوت آن دو ایزوفرم 1 و 2 را ایجاد می‌کند و موتاسیون در این دمین پروتئینی سبب اختلال ناشنوایی وابسته به DFNB۳ می‌شود (13-14).

## روش‌ها

### نمونه‌برداری و استخراج DNA ژنومیک

در این مطالعه‌ی توصیفی-آزمایشگاهی، پس از تکمیل پرسش‌نامه و ارزیابی‌های بالینی، تعداد 30 خانواده که دارای حداقل 2 فرد ناشنوا از نوع غیر سندرمی اتوزمال مغلوب می‌باشند، از دو استان همدان و کهگیلویه و بویراحمد جمع‌آوری گردیدند. تمامی موارد ناشنوایی سندرمیک و با عوامل محیطی مانند ضربه به سر، مننژیت، هپاتیت و داروهای اتوتوکسیک از مطالعه حذف شدند. پس از اخذ رضایت‌نامه از افراد بیمار و خانواده‌های آنان، به میزان 5 cc خون محیطی در لوله‌های حاوی EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 0/5 مولار از کلیه‌ی افراد در دسترس خانواده گرفته شد. سپس DNA ژنومیک به روش معمول فنل-کلروفرم از نمونه‌های خون استخراج گردید و میزان کیفیت DNA با روش اسپکتوفتومتری (USA, 2100 UNICO) مورد بررسی قرار گرفت (15-16).

### بررسی ژن کانکسین 26

از هر شجره، حداقل یک بیمار برای توالی‌یابی ژن GJB2 انتخاب شد. پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن کانکسین 26 (GJB2) شامل  $3'$  CTC CCT GTT CTG TCC TAG CT و  $5'$  F و  $3'$  CTC ATC CCT CTC ATG CTG TC و  $5'$  R

برنامه‌ی حرارتی برای تکثیر نشانگرها به صورت زیر بود: ۹۵ °C برای واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه، ۸ سیکل Touch down شامل ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه جهت واسرشت کردن رشته‌های DNA، دمای اتصال پرایمرها از ۶۲ تا ۵۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۴ °C شامل ۳۰ ثانیه جهت واسرشت کردن رشته‌های DNA، اتصال پرایمرها ۵۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه که با ۵ دقیقه سنتز نهایی در ۷۲ °C پایان پذیرفت. در هر واکنش PCR، ۰/۵ μl از هر یک از پرایمرها (۱۰ PM)، ۰/۵ μl dNTP mix (۱۰ mM)، ۱ μl از MgCl<sub>2</sub> (۵۰ mM)، ۰/۱ μl از آنزیم Taq پلیمرراز (۵ unit/μl) و ۲ μl از DNA ژنومیک استفاده شد که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۵ μl رسانده می‌شد. بعد از تکثیر قطعات مورد نظر با واکنش PCR، نمونه‌های مورد نظر برای هر خانواده به صورت جداگانه بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۲-۸ درصد با جریان ۳۵-۴۰ mA به مدت ۳ ساعت الکتروفورز شد و سپس ژل مورد نظر با نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد و باندهای مربوط به نشانگرها مشاهده گردید.

پارامتری دو نقطه‌ای و چند نقطه‌ای به ترتیب از ۱/۶ Superlink نسخه‌ی ۱/۶ و Genehunter نسخه‌ی ۲/۹۱ استفاده شد. برای نرم‌افزار الگوی وراثتی مغلوب اتوزومی، نفوذ کامل و فراوانی آللی یک هزارم فرض شد. برای رسم هاپلوتا‌یپ از نرم‌افزار HaploPainter نسخه‌ی ۰/۲۹/۵ استفاده شد (۱۸). نمونه‌های منفی برای جهش‌های ژن کانکسین ۲۶ برای تجزیه و تحلیل پیوستگی انتخاب شدند. جهت بررسی لوکوس مورد نظر، از شش نشانگر مولکولی مختلف استفاده شد و در صورتی که برای هر یک از خانواده‌های مورد مطالعه نشانگری اطلاع دهنده نبود (Uninformative)، از نشانگر دیگری در منطقه‌ی لوکوس مورد نظر استفاده می‌شد. در جدول ۱، نشانگرهای مورد استفاده و ویژگی آن‌ها به صورت خلاصه آمده است. معیارهای انتخاب این نشانگرها شامل هتروزیگوسیتی بالا برای نشانگر، نزدیک‌ترین جایگاه نوکلئوتیدی به ژن مورد بررسی و اندازه‌ی طول محصول کمتر می‌باشد. انتخاب نشانگرهای مولکولی با کمک پایگاه NCBI map viewer انجام شد. پرایمرهای نشانگرها از پایگاه NCBI UniSTS گرفته شدند و برای تکثیر آن‌ها از برنامه‌ی Touch down استفاده شد.

جدول ۱، نشانگرهای مورد استفاده و ویژگی آن‌ها

نام نشانگر	پرایمر (Forward) F	پرایمر (Reverse) R	اندازه‌ی محصول (bp)	هتروزیگوسیتی
D1۷S۹۲۱	GGCCACCATAATCATGTCA GACAAT	GGCCACCATAATCATGTCA GACAAT	۱۶۹-۱۸۵	۰/۷۲
D1۷S۱۸۴۳	AATTCAAAGGCTAAAAGCA AAC	GAGAATCACCTGAACCCG	۱۵۹-۲۰۳	۰/۷۰
D1۷S۹۵۳	ACTATCCGCCAATACA	AAGGGCTTGCTTTGAC	۱۱۹-۱۳۱	۰/۷۶
D1۷S۱۸۵۷	TGCCTAAACTGCTTTCAGGT	TGCACAGGCCAATTCCTTAC	۱۷۷-۱۸۷	۰/۶۲
D1۷S۷۴۰	TACATTTAATGCAGGATGCC	CTCTTTGTGCTTGGCAGGT	۱۰۳-۱۵۱	۰/۷۱
D1۷S۲۱۹۶	CCAACATCTAGAATTAATCA GAATC	ATATTTCAATATTGTAACCA	۱۳۹-۱۶۳	۰/۸۱

## یافته‌ها

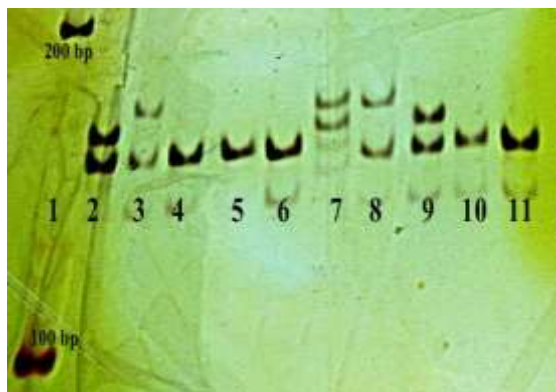
اکثر افراد مورد مطالعه، ناشنوایی دو طرفه‌ی حسی-عصبی شدید تا عمیق را نشان دادند. در ۷۰ درصد خانواده‌های مورد بررسی، ازدواج‌های خویشاوندی دیده می‌شد و با توجه به اطلاعات مربوط به شجره‌نامه، نوع ناشنوایی غیر سندرمیک و اتوزومال مغلوب قابل تأیید بود.

تعیین توالی DNA از ناحیه‌ی کد کننده‌ی ژن GJB۲ سبب شناسایی موتاسیون ۳۵delG در ۵ خانواده از ۳۰ خانواده‌ی مورد بررسی شد. موتاسیون شناسایی شده برای افراد به صورت هموزیگوت بود و این خانواده‌ها از آنالیز پیوستگی کنار گذاشته شدند. البته برای اطمینان از نقش لوکوس DFNB۱ به عنوان عامل ناشنوایی در خانواده‌ها، بقیه‌ی خانواده‌ها برای پیوستگی به این لوکوس، توسط سه نشانگر Informative مورد بررسی قرار گرفتند. با این وجود آنالیز پیوستگی، خانواده‌ای را که پیوسته به لوکوس DFNB۱ باشد، آشکار نکرد.

برای بررسی پیوستگی به سایر لوکوس‌ها، ابتدا ارزش SLINK برای خانواده‌های باقی مانده محاسبه شد. ۱۴ خانواده دارای ارزش SLINK برابر و بزرگ‌تر از ۳ بودند و ۵ خانواده SLINK کمتر از ۲ داشتند و باقی مانده‌ی خانواده‌ها، دارای SLINK ۲ تا ۳ بودند.

بررسی خانواده‌های منفی به GJB۲ برای پیوستگی ژنتیکی به لوکوس DFNB۳ توسط ۶ نشانگر STR انجام شد (شکل ۱) و از میان ۲۵ خانواده‌ی باقی مانده، با بررسی هاپلوتایپ، یک خانواده به این لوکوس پیوستگی نشان داد و خانواده‌ی پیوسته به لوکوس مورد نظر، الگوی کامل لینک را نشان داد (شکل ۲).

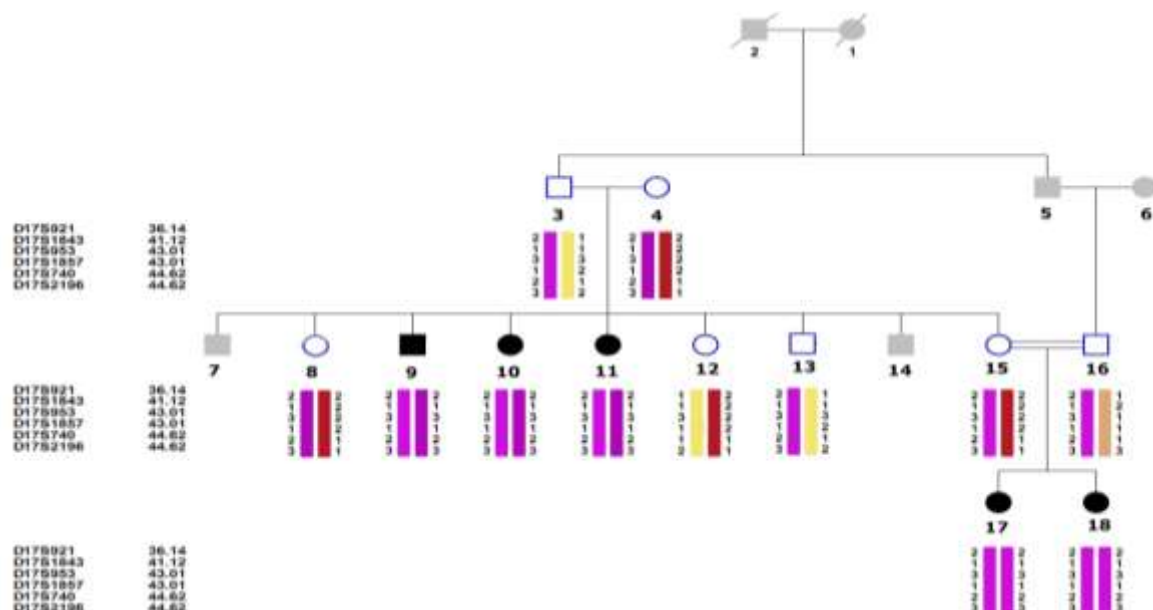
بررسی اودیوگرام مربوط به خانواده، نوع ناشنوایی عمیق را در تمامی افراد ناشنوا نشان می‌داد. SLINK محاسبه شده برای این خانواده برابر با ۳/۱۵ بود که پیوستگی به لوکوس را تأیید کرد.



شکل ۱. ژل پلی اکریل آمید مربوط به یکی از نشانگرهای مولکولی DFNB۳- شماره‌های ۲، ۳، ۸ و ۹ والدین هتروزیگوت، شماره‌های ۴، ۵، ۶، ۱۰ و ۱۱ افراد ناشنوا به صورت هموزیگوت و فرد شماره‌ی ۷ فرزند سالم

## بحث

در این مطالعه، به بررسی ۳۰ خانواده با حداقل ۲ ناشنوا از استان‌های همدان و کهگیلویه و بویراحمد پرداخته شد. مطالعه‌ی پیوستگی و بررسی هاپلوتایپ نشانگرهای مولکولی STR در منطقه‌ی لوکوس DFNB۳ برای خانواده‌های منفی برای موتاسیون‌های ژن کانکسین ۲۶ انجام شد. با توجه به این که ناشنوایی ناشی از جهش‌های ژن کانکسین ۲۶، علت ۱۸/۲۹ درصد ناشنوایی فامیلی شناخته شده است و با توجه به به شدت هتروژن بودن عارضه‌ی ناشنوایی و تنوع جمعیتی در ایران و همچنین میزان بالای ازدواج‌های درون قومی در کشور، بررسی سایر لوکوس‌های درگیر در ناشنوایی برای جمعیت‌های مختلف ایران ضروری می‌باشد (۷).



شکل ۲. شجره‌نامه و هاپلوتايب خانوادہ‌ی پیوسته به لوکوس DFNB3  
ترتیب نشانگرها بر اساس نقشه‌ی مارشفیلد (Marshfield genetic maps) می‌باشد.

Stereocilia سلول مویی گوش داخلی ایفا می‌کند و همچنین برای سازمان‌دهی اکتین در سلول‌های مویی ضروری می‌باشد (۲۰).

در مطالعات مختلف مشخص شد که موتاسیون در قسمت‌های مختلف این ژن می‌تواند سبب ایجاد ناشنوایی غیر سندرمی اتوزومی مغلوب شود. موتاسیون‌های ایجاد کننده‌ی ناشنوایی در لوکوس DFNB3 برای اولین بار در ساکنینی از روستایی در اندونزی شناسایی شدند. میزان فراوانی موتاسیون با مطالعات بیشتر حدود ۹ درصد تخمین زده شد. بعد از آن، موتاسیون‌های زیادی در مناطق مختلفی در هند، پاکستان، ایران، ترکیه، اندونزی و برزیل گزارش شده است (۲۱-۲۲).

اکثر موتاسیون‌های یافت شده در این ژن، توسط روش آنالیز پیوستگی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در مطالعات انجام شده توسط صادقی و همکاران بر روی ۴۰ خانوادہ‌ی خویشاوند دارای فرزند ناشنوا از

بنابراین، با بررسی خانوادہ‌هایی که نسبت به این ژن منفی می‌باشند و بررسی سایر ژن‌های درگیر در ناشنوایی، می‌توان دیدگاه دقیق‌تری نسبت به شیوع سایر ژن‌ها به دست بیاوریم. در این بررسی، از ۳۰ خانوادہ در آنالیز پیوستگی ۱ خانوادہ (~ ۴ درصد) به لوکوس DFNB3 پیوستگی نشان دادند. DFNB3 به عنوان سومین لوکوس برای ناشنوایی وراثتی مغلوب در جمعیت‌های مختلف شناسایی شده است و بیشتر موتاسیون‌های ایجاد شده در ژن ناشنوایی شدید تا عمیق را ایجاد می‌کنند (۱۹).

با توجه به بررسی‌های انجام شده در این مطالعه، یک خانوادہ با پیوستگی ژنتیکی به لوکوس DFNB3 شناسایی شد. ژن موجود در لوکوس DFNB3 به نام MYO15A خوانده می‌شود (۱۴)، که با ۶۶ اگزون کد کننده، یک میوزین غیر رسمی را کد می‌کند (Myosin XVa) که در Cochlea بیان می‌شود. این پروتئین نقش‌های مهمی در تمایز و طویل‌سازی



می‌باشد. هر چند، علت ناشنوایی برای حدود ۸۰ درصد خانواده‌های باقی‌مانده نامشخص می‌باشد و نیازمند مطالعات بعدی است. اما مطالعاتی از این دست می‌تواند مقدمه‌ای بر مطالعات بر روی جمعیت‌های دیگر و همچنین سایر لوکوس‌ها بر روی همین جمعیت و سایر جمعیت‌ها باشد تا بتواند در امر تشخیص بیماری و مشاوره‌ی دقیق‌تر خانواده‌ی بیماران کمک کننده باشد.

### تشریح و قدردانی

از ناشنوایان و خانواده‌های محترمشان به دلیل همکاری صمیمانه‌ای که در این مطالعه داشتند و همچنین از کلیه‌ی کارکنان مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری به خاطر محبت‌هایشان در انجام مطالعه قدردانی می‌شود. این مطالعه برگرفته از پایان‌نامه‌ی دانشجویی نویسنده‌ی اول می‌باشد.

استان‌های قم و مرکزی، دو خانواده به لوکوس DFNB۳ پیوستگی نشان دادند (۲۳). در مطالعه‌ی دیگری که توسط فتاحی و همکاران بر روی این لوکوس انجام شد، تعداد ۸ خانواده‌ی پیوسته به لوکوس مورد شناسایی قرار گرفتند (۲۲). در بررسی‌های مختلف بر روی جمعیت‌های ایرانی نشان داده شده است که موتاسیون در ژن‌های GJB۲ و SLC۲۶A۴ به ترتیب در اولویت‌های اول و دوم ایجاد کننده‌ی ناشنوایی می‌باشند. با توجه به مطالعات قبل، تاکنون حدود ۱۰ موتاسیون مختلف در ژن MYO۱۵A مشخص شده است. بنابراین، با توجه به مطالعات اخیر می‌توان نقش لوکوس DFNB۳ را بعد از دو ژن ذکر شده به عنوان عامل ناشنوایی در نظر گرفت و چنین مطالعاتی می‌تواند در فهم شیوع ژن‌هایی مانند MYO۱۵A نقش به‌سزایی داشته باشد و در تصمیم‌گیری برای مراکز مشاوره‌ای و بالینی مؤثر باشد. در مطالعه‌ی حاضر، در مجموع علت ناشنوایی برای ۲۰ درصد از خانواده‌های مورد بررسی مشخص شد که مربوط به ژن‌های GJB۲ و MYO۱۵A

### References

1. Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med* 2006; 354(20): 2151-64.
2. Collin RW, Kalay E, Oostrik J, Caylan R, Wollnik B, Arslan S, et al. Involvement of DFNB59 mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment. *Hum Mutat* 2007; 28(7): 718-23.
3. Van CG, Willems PJ, Smith RJ. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1997; 60(4): 758-64.
4. Hilgert N, Smith RJ, Van CG. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat Res* 2009; 681(2-3): 189-96.
5. 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.
6. Strachan T, Read A. *human molecular genetics*. New York, NY: Garland Science; 2011.
7. Hashemzadeh Chaleshtori M, Farhud D, Patton M. Congratulation to Margaret Chan familial and sporadic Gjb2-related deafness in Iran: review of gene mutations. *Iran J Public Health* 2007; 36(1): 1-14.
8. Mahdieh N, Rabbani B, Shirkavand A, Bagherian H, Movahed ZS, Fouladi P, et al. Impact of consanguineous marriages in GJB2-related hearing loss in the Iranian population: a report of a novel variant. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011; 15(7-8): 489-93.
9. Najmabadi H, Nishimura C, Kahrizi K, Riazalhosseini Y, Malekpour M, Daneshi A, et

- al. GJB2 mutations: passage through Iran. *Am J Med Genet A* 2005; 133A(2): 132-7.
10. Sininger Y, Starr A. Auditory neuropathy: a new perspective on hearing disorders. Stamford, CT: Cengage Learning; 2001.
  11. Smith RJH, Shearer AE, Hildebrand MS, van Camp G. Deafness and hereditary hearing loss overview. Gene review sat Gene Tests: Medical genetics information resource. Seattle, WA: University of Washington; 1999. 2008.
  12. Anderson DW, Probst FJ, Belyantseva IA, Fridell RA, Beyer L, Martin DM, et al. The motor and tail regions of myosin XV are critical for normal structure and function of auditory and vestibular hair cells. *Hum Mol Genet* 2000; 9(12): 1729-38.
  13. Belyantseva IA, Boger ET, Friedman TB. Myosin XVa localizes to the tips of inner ear sensory cell stereocilia and is essential for staircase formation of the hair bundle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(24): 13958-63.
  14. Liang Y, Wang A, Belyantseva IA, Anderson DW, Probst FJ, Barber TD, et al. Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker 2. *Genomics* 1999; 61(3): 243-58.
  15. 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.
  16. Kleihues P, Schauble B, Zur HA, Esteve J, Ohgaki H. Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol* 1997; 150(1): 1-13.
  17. Lindner TH, Hoffmann K. easyLINKAGE: a PERL script for easy and automated two-/multi-point linkage analyses. *Bioinformatics* 2005; 21(3): 405-7.
  18. Thiele H, Nurnberg P. HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes. *Bioinformatics* 2005; 21(8): 1730-2.
  19. Liburd N, Ghosh M, Riazuddin S, Naz S, Khan S, Ahmed Z, et al. Novel mutations of MYO15A associated with profound deafness in consanguineous families and moderately severe hearing loss in a patient with Smith-Magenis syndrome. *Hum Genet* 2001; 109(5): 535-41.
  20. Berg JS, Powell BC, Cheney RE. A millennial myosin census. *Mol Biol Cell* 2001; 12(4): 780-94.
  21. Cengiz FB, Duman D, Sirmaci A, Tokgoz-Yilmaz S, Erbek S, Ozturkmen-Akay H, et al. Recurrent and private MYO15A mutations are associated with deafness in the Turkish population. *Genet Test Mol Biomarkers* 2010; 14(4): 543-50.
  22. Fattahi Z, Shearer AE, Babanejad M, Bazazzadegan N, Almadani SN, Nikzat N, et al. Screening for MYO15A gene mutations in autosomal recessive nonsyndromic, GJB2 negative Iranian deaf population. *Am J Med Genet A* 2012; 158A(8): 1857-64.
  23. Sadeghi A, Sanati MH, Alasti F, Hashemzadeh Chaleshtori M, 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 Biotech* 2009; 7(2): 108-11.



## Study of the Association of DFNB3 Locus with Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss in Iranian Deaf Population Using Genetic Linkage Analysis

Somayeh Reiisi<sup>1</sup>, Mohammad Hossein Sanati PhD<sup>2</sup>, Mohammad Amin Tabatabaiefar PhD<sup>3</sup>, Hamid Reza Pourjafari PhD<sup>4</sup>, Zarrin Minuchehr PhD<sup>5</sup>, Afsaneh Shavarzi<sup>6</sup>, Mitra Ataie MSc<sup>7</sup>, Mahbobeh Kasiri<sup>6</sup>, Morteza Hashemzadeh-Chaleshtori PhD<sup>8</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Hearing loss is a common sensory disorder that typically illustrates genetic heterogeneity in human populations. The incidence of congenital hearing loss is estimated at 1 in 500 births of which approximately 70% of cases are attributed to genetic factors. Genetic hearing impairment can be classified as either syndromic or non-syndromic and among non-syndromic hearing loss autosomal recessive (ALNSHL) accounts for approximately 75-80% of cases. This type of hearing loss is extremely heterogeneous and includes over 100 loci. For recessive deafness, most frequent genes are GJB2, SLC26A4, MYO15A, OTOF, and CDH23 in worldwide. This study aimed to determine the role of MYO15A (DFNB3) gene mutations in Iranian deaf population using linkage analysis.

**Methods:** To investigate the frequency of DFNB3 gene mutation, linkage analysis was performed in 30 Iranian families with over three deaf child and negative GJB2. The negative mutations pedigrees for these gene mutations were then tested for the linkage to DFNB3 (*MYO15A*) locus, using short tandem repeat (STR) markers.

**Findings:** Mutation 35delG was identified in 5 families out of 30 by sequencing the coding region of GJB2 gene. One family showed linkage to DFNB3 locus.

**Conclusion:** Based on the results of this study, DFNB3 locus is the third cause of deafness after DFNB1 (GJB2) and DFNB4 (SLC26A4).

**Keywords:** DFNB3, Linkeage Analysis, Autosomal recessive non-syndromic hearing loss, Iran

**Citation:** Reiisi S, Sanati MH, Tabatabaiefar MA, Pourjafari HR, Minuchehr Z, Shavarzi A, et al. **Study of the Association of DFNB3 Locus with Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss in Iranian Deaf Population Using Genetic Linkage Analysis.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(285): 669-77

- 1- PhD Student, Department of Medical Genetics, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
- 2- Associate Professor, Department of Medical Genetics, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
- 4- Professor, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
- 5- Assistant Professor, Department of Molecular Genetics, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
- 6- Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
- 7- Department of Medical Genetics, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
- 8- Professor, Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

**Corresponding Author:** Morteza Hashemzadeh-Chaleshtori PhD, Email: mchalesh@yahoo.com