مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۶، شماره۴/ مهر و آبان ۱۳۹۳/ ۷۰-۶۲

مقاله پژوهشی

بررسی ارتباط میان پیوستگی ژنتیکی لوکوس DFNB93 و نا شنوایی غیر سندرومی مغلوب اتوزومی در نمونه هایی از دو استان چهارمحال و بختیاری و کهگیلویه و بویراحمد

فاطمه رضاییان[۱]، محمد امین طباطبایی فر[۲]، فاطمه هیبتی[۳]، سمیه رئیسی[۴]، شهربانو پرچمی[۵]، مرضیه ابوالحسنی[۵]، بهشته امیری[۵]، احمد رضا صالحی[۵]، مرتضی هاشم زاده چالشتری[۵*]

[۱]کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [۲]دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ [۳]دانشجو، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [۴]دانشجو، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران، تهران، ایران؛ [۵]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۹ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/٤

چکیده:

زمینه و هدف: **ناشنوایی یک اختلال حسی، عصبی است و بیشترین اختلال موجود در هنگام تولد است. بیش از ٦۰٪ موارد ناشنوایی ارثی است. انواع ژنتیکی آن به دو نوع سندرومی و غیر سندرومی تقسیم می شود که نا شنوایی غیر سندرومی مغلوب اتوزومی (*ARNSHL*) با بیشترین درصد (۷۰٪) رخ می دهد. این مطالعه با هدف تعیین پیوستگی ژنتیکی به لوکوس *DFNB93* در خانواده های مبتلا به *ARNSHL* انجام شد.**

روش بررسی: **این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی بر روی ٤۰ شجره بزرگ مبتلا به *ARNSHL* دارای حداقل دو بیمار، والدین سالم و عمدتاً دارای ازدواج خویشاوندی و منفی از نظر جهش های ژن *GJB2*، از استان های چهارمحال و بختیاری و کهگیلویه و بویراحمد انجام گردید. سپس خانواده ها برای پیوستگی ژنتیکی به لوکوس *DFNB93* با استفاده از نشانگرهای *STR* و روش *PCR* و سپس ژل پلی اکریل آمید بررسی شدند.**

یافته ها: **از تعداد ٤۰ خانواده، ۱ خانواده (۲/۵٪) به لوکوس *DFNB93* پیوستگی نشان داد. ارزش *SLINK* این خانواده ۲/٦۷ و *LOD* بیشینه دو نقطه ای ۲/۰۵ و *LOD* بیشینه چند نقطه ای ۲/۰۵ محاسبه شد.**

نتیجه گیری: **بر اساس نتیجه پژوهش حاضر، این لوکوس احتمالاً نقش کمی در ایجاد ناشنوایی در جمعیت مورد مطالعه (دو استان) دارد ولی برای تعیین نقش دقیق تر این لوکوس در ایجاد ناشنوایی در جمعیت ایرانی، مطالعات بیشتری ضروری می باشد.**

واژه های کلیدی: **لوکوس DFNB93، ژن CABP2، نا شنوایی غیر سندرومیک مغلوب اتوزومی، پیوستگی ژنتیکی.**

مقدمه:

ناشنوایی (HL) یک اختلال حسی، عصبی است که طبق ارزیابی های انجام شده ۷۰ میلیون نفر در سر تا سر جهان از آن رنج می برند. این مشکل بیشترین اختلال موجود در هنگام تولد است که با میانگین ۱ در هر۱۰۰۰ نوزاد رخ می‌دهد (۱). تشخیص دیر هنگام ناشنوایی و یا ناشنوایی که تشخیص داده نمی‌شود می‌تواند اثر عمیقی بر روی قابلیت های ارتباطی و زبانی و همچنین تکوین ارتباط روانی- اجتماعی یک کودک داشته باشد (۲). ناشنوایی یک اختلال بسیار هتروژن می‌باشد و می‌تواند به دلیل فاکتورهای ژنتیکی، محیطی یا هر دو رخ دهد (۴،۳). بیشتر از ۵۰٪ موارد ناشنوایی ناشی از عوامل ژنتیکی است که از این مقدار، ۷۰٪ آن ها از نوع غیر سندرومی و ۳۰٪ باقیمانده ناشنوایی های سندرومی می‌باشد (۵). حدود ۷۰٪ موارد ناشنوایی، ناشی از فاکتورهای ژنتیکی از نوع ناشنوایی غیر سندرومی مغلوب اتوزومی (ARNSHL) است (۷،۶)

نویسنده مسئول: *شهرکرد- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی- تلفن:۰۳۸۱-۳۳٤٦٦۹۲، E-mail: mchalesh@yahoo.com*

www.SID.ir

که البته اکثر این ژن ها برای عملکرد صحیح گوش درونی ضروری هستند. در مواردی، ناشنوایی می‌تواند به دلیل آسیب در قسمت های دیگر گوش به غیر از حلزون هم ایجاد شود.

ناشنوایی حسی- عصبی به دلیل نقص عملکردی گوش داخلی ایجاد می‌شود و نوع دیگر آن نوع مختلط می‌باشد که ترکیبی از نوع انتقالی و حسی- عصبی می‌باشد (۲). طبیعت فوق العاده هتروژن این بیماری به همراه تنوع جمعیتی و نرخ بالای ازدواج خویشاوندی در کشورمان لزوم مطالعه سیستماتیک بر روی این بیماری را پیش روی پژوهشگران قرار می دهد.

در این مطالعه ژن CABP2 واقع در لوکوس DFNB93 بررسی شد. این ژن در لوکوس DFNB93 و در موقیت سیتوژنتیکی 11q12.3-13.2 قرار دارد. این ژن ۷ اگزون و طولی حدود ۵Kb دارد و پروتئین CABP2 را کد می کند که جز خانواده پروتئین های متصل شونده به کلسیم است و شباهت زیادی به کالمودولین دارد. این پروتئین در مغز و ارگان های حسی مانند حلزون گوش و شبکیه چشم بیان می شود (۹،۸) و یک حد واسط مهم کلسیمی انتقال دهنده علائم درون سلولی است (۱۱،۱۰). بنابراین هرگونه اختلال و جهش در این ژن، پیام رسانی درون سلولی در سلول های گوش داخلی را با مشکل مواجه ساخته و می تواند منجر به بروز ناشنوایی گردد (۱۲).

تجزیه و تحلیل پیوستگی در حقیقت بررسی همراهی توارث جایگاه نشانگر با فنوتیپ بیماری است که تحت تأثیر فاصله بین جایگاه ژن بیماری و نشانگر مربوطه قرار می گیرد. این روش نه تنها به عنوان اولین قدم برای شناسایی ژن ناشناخته بیماری به روش کلونینگ موقعیتی استفاده می شود، بلکه برای ردیابی ژن های شناخته شده مسئول بیماری در شجره نیز به کار می رود. در بیماری های هتروژن نظیر HL که غالباً دارای تعداد زیادی ژن های بزرگ مسئول بیماری می باشند، تجزیه و تحلیل پیوستگی جهت ردیابی ژن بیماری در هر شجره کمک شایان توجهی به کاهش هزینه ها و زمان خواهد نمود (۱۳،۱۴). هدف پژوهش حاضرتجزیه و تحلیل پیوستگی به لوکوس DFNB93 بر روی خانواده هایی که برای جهش های ژن GJB2 منفی بودند صورت گرفت.

روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی- آزمایشگاهی پس از تصویب طرح در کمیته اخلاق و شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد با کد اخلاق (۱-۸-۱۳۹۰) و تکمیل پرسشنامه و ارزیابی های بالینی، ۴۰ خانواده مبتلا به ARNSHL دارای حداقل دو بیمار، والدین سالم و عمدتاً دارای ازدواج خویشاوندی و منفی از نظر جهش های ژن GJB2 از استان های چهارمحال و بختیاری و کهگیلویه و بویراحمد (۳۰ خانواده از استان چهارمحال و بختیاری و ۱۰ خانواده از استان و کهگیلویه و بویراحمد) انتخاب شد. پس از اخذ رضایت نامه آگاهانه (از حداقل ۳ نسل از افراد در دسترس در هر شجره نامه) از هر فرد به میزان ۵ میلی لیتر خون در لوله های حاوی نیم مولار EDTA نمونه برداری شد. سپس DNA به روش استاندارد فنل- کلروفرم استخراج گردید (۱۵، ۱۶) و کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ (Thermo scientific-USA) اندازه گیری شد. میانگین غلظت DNA استخراج شده نمونه های مورد بررسی بین ۵۰۰ تا ۷۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر و ضریب جذب آن ها در طول موج های ۲۶۰ به ۲۸۰ به طور میانگین ۱/۸ بود.

جهت مطالعات پیوستگی از مارکرهای ژنتیکی (STR) مناسب استفاده شد که معیار انتخاب مارکرها فاصله از ژن، درجه چند شکلی (polymorphism) آن ها و دامنه و طول محصول PCR بود. انتخاب STR های مناسب توسط پایگاه های اطلاعاتی NCBI genome browser Map viewer و انتخاب پرایمرهای لازم جهت تکثیر STR ها از طریق پایگاه داده NCBI UniSTS انجام شد.

Archive of SID
www.SID.ir

برنامه دمایی تکثیر نشانگرها در واکنش PCR به صورت زیر بود: حرارت ۹۵ºC به مدت ۳ دقیقه جهت واسرشته شدن اولیه، ۱۰ سیکل تاچ داون (Touch-down)، شامل واسرشته شدن در ۹۵ºC به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۷ºC-۵۸ (متغیر برای مارکرهای مختلف) به مدت ۴۵ ثانیه جهت اتصال پرایمرها به DNA (با کاهش یک درجه دما به ازای هر سیکل) و ۷۲ºC به مدت ۳۰ ثانیه برای گسترش رشته های مکمل و بعد از آن، ۲۷ سیکل شامل ۹۵ºC به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ºC-۵۱ (متغیر برای مارکرهای مختلف) به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ºC به مدت ۳۰ ثانیه ودر نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ºC به مدت ۷ دقیقه.

هر میکروتیوب PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰mM)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰mM)، ۰/۱۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰pM)، ۱ میکرولیتر DNA (۴۰-۵۰ng)، ۰/۱ میکرولیتر Taq پلیمراز (۵unit/µl) که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۵µl رسید.

سپس محصولات PCR نشانگرهای مختلف جهت بررسی و تجزیه و تحلیل پیوستگی بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد و ۱۰ درصد بارگذاری و الکتروفورز شد. مدت زمان الکتروفورز به مدت ۲ ساعت و نیم تا ۳ ساعت در ۴۰ میلی آمپر برای ژل ۸ درصد و مدت زمان ۴ ساعت و نیم تا ۵ ساعت در ۴۰ میلی آمپر برای ژل ۱۰ درصد همراه با اوره بود و سپس ژل ها به روش نیترات نقره رنگ آمیزی و باندها رویت گردید.

در این پژوهش برای تجزیه و تحلیل پیوستگی از نرم افزار Easylinkage plus version 5.05 استفاده شد (۱۷). برای تعیین میزان قدرت خانواده ها و در نتیجه مناسب بودن آن ها برای بررسی پیوستگی ژنتیکی از ارزش SLINK (Simulation of linkage) یا LOD (Logarithm of odds) اولیه استفاده شد. برای محاسبه ارزش SLINK نرم افزار FastSLINK version 2.51 مورد استفاده قرار گرفت (۱۴). از نرم افزار SuperLink version 1.6 برای محاسبه امتیاز LOD پارامتری دو نقطه (۱۸) و از نرم افزار GeneHunter برای محاسبه امتیاز LOD پارامتری چند نقطه ای (۱۹) استفاده شد. در محاسبه امتیازهای LOD دو نقطه و چند نقطه، الگوی مغلوب اتوزومی، نفوذ کامل، فنوکپی صفر و فراوانی آلل بیماری ۰/۰۰۱ و فراوانی یکسان نوترکیبی در زن و مرد در نظر گرفته شد و از نقشه مارش فیلد استفاده شد (۲۰). پس از انجام تجزیه و تحلیل پیوستگی و محاسبه LOD برای رسم هاپلوتایپ (مجموعه ژنوتیپ های نشانگرهای مجاور) از نرم افزارهای SimWalk version 2.91 و Haplopainter version 029.5 استفاده شد.

پس از پیدا کردن پیوستگی ژنتیکی به لوکوس DFNB93، برای بررسی تغییرات احتمالی در ژن CABP2 در خانواده ای که پیوستگی ژنتیکی دیده شد (خانواده F1)، ابتدا جهش (c.637+1G>T) در اگزون ۶ را با استفاده از روش PCR-RFLP بررسی کردیم.

هر میکروتیوب PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۰/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱۰۰mM)، ۰/۲ میکرولیتر dNTP (۴۰mM)، ۰/۱۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰pM)، ۱/۵ میکرولیتر DNA (۵۰ng-۴۰)، ۰/۱ میکرولیتر Taq پلیمراز (۵unit/µl) که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۵µl رسید.

سپس محصولات PCR اگزون ۶ با استفاده از آنزیم محدود کننده KpnI، مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. به این ترتیب که ۵ میکرولیتر از محصول PCR را در میکروتیوب ریخته و سپس ۲ میکرولیتر بافر KpnI، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم محدودالاثر و ۱۲/۸ میکرولیتر آب مقطربه میکروتیوب اضافه کرده تا به حجم ۲۰ میکرولیتر برسد؛ سپس کاملاً مخلوط کردیم. میکروتیوب ها را به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه گذاشتیم و پس از آن محصولات حاصل از برش آنزیم را با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز

Archive of SID

www.SID.ir

کردیم. در ادامه برای بررسی وجود سایر تغییرات ژنی در این خانواده، کلیه اگزون ها (۷ اگزون) و پروموتور این ژن را PCR و سپس تعیین توالی کردیم (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر اگزون ها و پروموتور ژن CABP2 در مرحله تعیین توالی

اگزون	توالی پرایمرهای ('3→'5)	طول محصول (bp)	دما
۱	F: GCAGTCTGGGGAGGCTGT	٤٩٩	٦١
	R: CAAGATCAGGATGGCCAGAG		٦١
۲	F: TCCTCAGTTTGCCCAAC	٥٤٨	٥٧
	R: TGTGTACCTTTGCTCTGATG		٥٨
۳	F: TGTGCGTGTTGGATTGTG	٥٠٩	٥٩
	R: ACTAATTGACGTTGGTCTC		٥٤
٤	F: GGCAGCAAAGAGAATCTGATG	٣٧٩	٦٠
	R: GACCAAGGTCATGGGCTCT		٦٠
٥	F: ATTGGGAAATACAGATGAC	٣٧٧	٥٠
	R: ATTGGTGTCGAACTGTGG		٥٥
٦	F: GATGCCCTGGGTCTGTAATG	٦٩٨	٥٨
	R: ATGGGAATGCAGCATAGAGG		٥٨
۷	F:CCCATAAGACAAAGACTCCTC	٥١٨	٦٠
	R:CTTGTGATCCAAGGGGACAG		٦٠
P	F: CTGACCCCTCCTACCTTAGG	٦٦٨	٥٨
	R: TGCAAGCAATTGGGGCTACC		٦١

F (پرایمر Forward)، R (پرایمر Reverse)، P (Promoter).

برنامه دمایی مورد استفاده جهت تکثیر اگزون ها و پروموتور به صورت زیر بود: حرارت ºC ۹۵ به مدت ۴ دقیقه سپس ۳۵ سیکل شامل ۹۵ºC به مدت ۴۵ ثانیه تا ۱ دقیقه (متغیر در اگزون های مختلف)، ۶۸ºC-۵۶ به مدت ۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه (متغیر در اگزون های مختلف) و ۷۲ºC به مدت ۴۵ ثانیه تا ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ºC به مدت ۵ دقیقه.

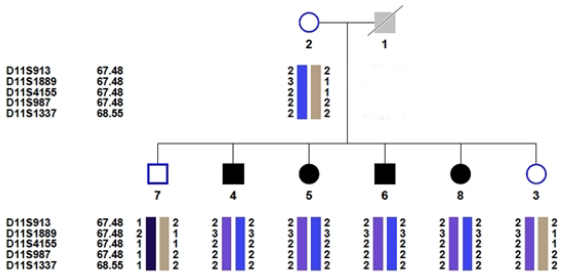
هر میکروتیوب PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۰/۵ میکرولیتر $MgCL_2$ (۱۰۰mM)، ۰/۲ میکرولیتر dNTP (۴۰mM)، ۰/۱۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰pM)، ۱/۵ میکرولیتر DNA (۵۰-۴۰ng)، ۰/۱ میکرولیتر Taq پلیمراز (۵unit/µl) که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۵µl رسید. سپس نمونه ها تعیین توالی شدند.

یافته ها:

از ۴۰ خانواده مورد بررسی، ۱ خانواده (خانواده F1) به لوکوس DFNB93 پیوستگی ژنتیکی نشان داد (تصویر شماره ۲،۱) که این خانواده اهل استان چهارمحال و بختیاری است و ناشنوایی فرزندان بیمار خانواده عمیق می باشد. ارزش SLINK این خانواده ۲/۶۷ و LOD بیشینه دو نقطه ای ۲/۰۵ و LOD بیشینه چند نقطه ای ۲/۰۵ محاسبه شد.

در بررسی اگزون ۶ جهش (c.637+1G>T) در خانواده F1 وجود نداشت. هر چند پس از بررسی نتایج تعیین توالی با نرم افزار Chromas تغییر جدیدی در هیچ یک از اگزون ها و پروموتور دیده نشد؛ اما یک مورد پلی مورفیسم c.281 G>A در اگزون ۴ در فرد بیمار مشاهده گردید.

Archive of SID
www.SID.ir

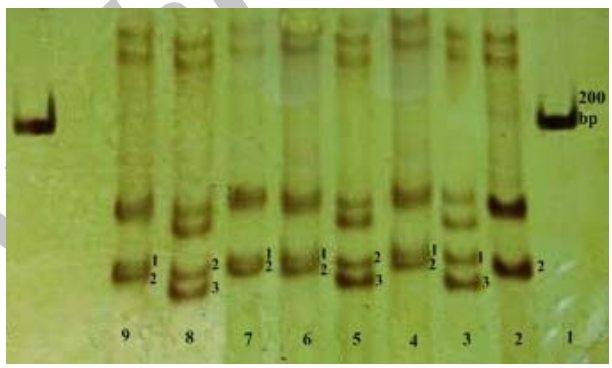


تصویر شماره ۱: شجره و هاپلوتیپ خانواده F1

شجره و هاپلوتیپ خانواده F1 که به لوکوس DFNB93 پیوستگی نشان داده است؛ افراد بیمار هاپلوتیپ مشترکی را به ارث برده اند؛ هاپلوتیپ بر اساس نقشه مارش فیلد رسم شده است.

تصویر شماره ۲: نمونه ای از روش تعیین ژنوتیپ نشانگرهای STR با کمک ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد

این روش الگوی پیوستگی را نشان می دهد؛ ردیف ۱: نشانگر اندازه، ۲: مادر (سالم) باند ۳ و ۷ فرزندان سالم، ٤ تا ٦ و ۸ فرزندان ناشنوا. در ضمن نمونه پدر خانواده به دلیل فوت پدر در دسترس نبود.



تصویر شماره ۳: نمونه ای از روش تعیین ژنوتیپ نشانگرهای STR با کمک ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد

در این روش الگوی پیوستگی نشان داده نمی شود؛ ردیف ۱: نشانگر اندازه، ۲: پدر(سالم)، ۳: مادر(سالم)، ٤ و ۷ و ۸: فرزندان سالم، ٥ و ٦ و ۹ فرزندان ناشنوا. فرزندان ناشنوا به صورت هتروزیگوت هستند و به آن ها یک هاپلوتیپ مشترک به ارث نرسیده است.

بحث:

ناشنوایی یک اختلال بسیار هتروژن می‌باشد و می‌تواند به دلیل فاکتورهای ژنتیکی، محیطی یا هر دو رخ دهد (۴،۳). تخمین ها حاکی از آن است که ممکن است تا ۱ درصد ژن های انسان به نحوی در فرآیند شنوایی دخیل باشند (۲۱). با توجه به هتروژن بودن این بیماری تعداد زیادی از افراد به HL مبتلا می باشند و این

www.SID.ir

تعداد در سال های اخیر نیز رو به افزایش می باشد و با توجه به مطالعاتی که در این زمینه صورت گرفته است، فقط نقش بعضی از ژن های دخیل در ناشنوایی مشخص می باشد. ژن GJB2 واقع در لوکوس DFNB1 به عنوان اولین دلیل ناشنوایی در جهان و کشورمان شناخته شده است. این ژن عامل حدود ۱۶ تا ۱۸ درصد ARNSHL در کشورمان می باشد (۲۲). بعد از آن ژن SLC26A4 (لوکوس DFNB4) به عنوان دومین عامل ناشنوایی، دلیل حدود ۱۰ درصد و همچنین لوکوس DFNB21 (ژن TECTA)، دلیل حدود ۴ درصد، ARNSHL در کشورمان می باشد (۳). بنابراین طبق این اطلاعات هنوز دلیل درصد زیادی از مبتلایان به ناشنوایی مشخص نشده است و این لزوم مطالعات بیشتر را در این زمینه ایجاب می کند تا نقش دیگر ژن ها در ایجاد ناشنوایی بررسی شود. یکی از این لوکوس های عامل ناشنوایی، لوکوس DFNB93 (ژن CABP2) می باشد که در سال ۲۰۱۲ توسط طباطبایی فر و همکارانش کشف شده است (۲۴،۲۳). بنابراین مشهود است که این ژن، ژن جدیدی می باشد و تاکنون غیر از مطالعه طباطبایی فر مطالعه دیگری در ایران و جهان بر روی آن صورت نگرفته است؛ بنابراین بررسی نقش آن ضروری به نظر می رسد تا بتوان با توجه به نقش ژن های درگیر در ناشنوایی جمعیت ایران، راه را برای تشخیص، مشاوره ژنتیک و پیشگیری باز کرد.

در مطالعه حاضر ۴۰ خانواده ARNSHL از استان های چهارمحال و بختیاری و کهگیلویه و بویراحمد بررسی شد. از این ۴۰ خانواده، ۱ خانواده (خانواده F1) با ناشنوایی عمیق (profound) به لوکوس DFNB93 پیوستگی ژنتیکی نشان داد که این خانواده اهل استان چهارمحال و بختیاری است؛ ولی هیچ تغییر پاتوژنی در ژن CABP2 یافت نشد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر نقش این ژن در ایجاد ناشنوایی جمعیت مورد مطالعه حدود ۲/۵ درصد تخمین زده می شود. این لوکوس در بررسی ۳۷ خانواده ARNSHL توسط طباطبایی فر و همکارانش برای اولین بار در سال۲۰۱۲ شناسایی شد (۲۴،۲۳) که در آن، ۳ خانواده از ۳۷ خانواده (۲ خانواده از استان فارس و ۱ خانواده از استان چهارمحال و بختیاری) با ناشنوایی متوسط تا شدید (Moderate to severe) به لوکوس DFNB93 پیوستگی نشان دادند. بنابراین در مطالعه طباطبایی فر علت ناشنوایی حدود ۸ درصد جمیت مورد مطالعه لوکوس DFNB93 اعلام شد که درصد قابل توجهی است. علت متفاوت بودن درصد پیوستگی ژنتیکی به لوکوس DFNB93 در دو مطالعه با توجه به هتروژن بودن جمیت ایران قابل توجیه است. همانگونه که ژن GJB2 در نقاط مختلف کشور شیوع متنوع و متفاوتی دارد به طوری که فراوانی آن در استان های شمالی کشور حدود ۳۸ درصد، در جمعیت های آذری کشور ۲۸ درصد و در جنوب غرب کشور ۹ درصد می باشد و در کل در حرکت از شمال به سمت جنوب کشور فراوانی آن کاهش می یابد (۲۵). این آمار هتروژن بودن جمیت های مختلف کشور را به خوبی نشان می دهد. در نتیجه احتمالاً لوکوس DFNB93 در جمعیت های متفاوت کشور شیوع مختلفی دارد. از طرفی علت اینکه با وجود پیوستگی، تغییر پاتوژنی یافت نشد احتمالاً جهش در قسمت های دیگر ژن مانند نواحی حفاظت شده (Conserve) در اینترون و یا جهش در ژن دیگری از این لوکوس که در ناشنوایی نقش داشته و هنوز شناسایی نشده است، باشد. همچنین با توجه به اینکه ۳ خانواده ای که در مطالعه قبل پیوستگی ژنتیکی نشان دادند، ناشنوایی آن ها متوسط تا شدید بوده است؛ ولی در این مطالعه ادیوگرام ناشنوایی خانواده F1، عمیق است می توان گفت که احتمالاً علت ناشنوایی این خانواده (F1) ژنی غیر از ژن CABP2 می باشد. از علل دیگر می توان به همپوشانی لوکوس DFNB93 (11q12.3-13.2) با لوکوس DFNB63 (11q13.2-13.3 اشاره کرد (۲۶). لوکوس DFNB63 با ناشنوایی عمیق (profound) مرتبط می باشد، بنابراین احتمال اینکه خانواده F1 با لوکوس DFNB63 نیز پیوسته باشد و جهش عامل ناشنوایی این خانواده (F1) در ژن

Archive of SID
www.SID.ir

LRTOMT وجود داشته باشد، دور از انتظار نیست. به هر حال با توجه به جدید بودن لوکوس و اینکه تا به حال مطالعات زیادی بر روی آن انجام نشده است؛ برای بحث در مورد نقش دقیق آن، مطالعات بیشتر و گسترده تری در دیگر جمعیت های کشور ضروری می باشد.

نتیجه گیری:

با توجه به نتایج این پژوهش این لوکوس احتمالاً نقش اندکی در ناشنوایی جمعیت مورد مطالعه دارد و دلیل عمده ناشنوایی جمعیت مورد مطالعه مشخص نشد. در عین حال برای تعیین دقیق تر نقش لوکوس DFNB93 در جمعیت ایرانی، مطالعات بیشتر ضروری می باشد تا بتوان با توجه به نقش لوکوس DFNB93 و نقش دیگر لوکوس ها در ناشنوایی، راه را برای تشخیص، مشاوره ژنتیک و پیشگیری باز کرد.

تشکر و قدردانی:

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد جهت تأمین بودجه این مطالعه با شماره گرانت ۱۰۱۴ و از خانواده های بیماران به دلیل مشارکت در این پژوهش و همچنین پرسنل مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به دلیل کمک های بی دریغشان کمال تقدیر و تشکر را داریم.

منابع:

1. Genc GA, Konukseven O, Muluk NB, Kirkim G, Basar FS, Tuncer U, 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. Schrijver I. Hereditary non-syndromic sensorineural hearing loss: transforming silence to sound. J Mol Diagn. 2004; 6(4): 275-84.
3. Tabatabaiefar M, Alasti F, Zohour MM, Shariati L, Farrokhi E, Farhud D, et al. Genetic Linkage Analysis of 15 DFNB Loci in a Group of Iranian Families with Autosomal Recessive Hearing Loss. Iran J Public Health. 2011; 40(2): 34-48.
4. Bonneux S, Fransen E, Van Eyken E, Van Laer L, Huyghe J, Van de Heyning P, 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.
5. 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.
6. 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.
7. Varga R, Kelley PM, Keats BJ, Starr A, Leal SM, Cohn E, et al. Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (OTOF) gene. J Med Genet. 2003; 40(1): 45-50.
8. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet. 1980; 32(3): 314-31.
9. Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, Morton CC, Seidman CE, Rosenzweig A, et al. Short protocols in human genetics. 1st ed: New Jersey: John Wiley and Sons, Wiley; 2004.
10. [database on the Internet]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM.
11. [database on the Internet]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene.
12. Jenkins MA, Christel CJ, Jiao Y, Abiria S, Kim KY, Usachev YM, et al. Ca2+-dependent facilitation of Cav1.3 Ca2+ channels by densin and Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. J Neurosci. 2010; 30(15): 5125-35.
13. Haynes LP, McCue HV, Burgoyne RD. Evolution and functional diversity of the Calcium Binding Proteins (CaBPs). Front Mol Neurosci. 2012; 5:9.
14. Moser T, Predoehl F, Starr A. Review of hair cell synapse defects in sensorineural hearing impairment. Otol Neurotol. 2013; 34(6): 995-1004.

Archive of SID

www.SID.ir

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 Hausen A, 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. Ott J. Computer-simulation methods in human linkage analysis. Proc Natl Acad Sci USA. 1989; 86(11): 4175-8.
19. Fishelson M, Geiger D. Exact genetic linkage computations for general pedigrees. Bioinformatics. 2002; 18 Suppl 1: S189-98.
20. Sobel E, Sengul H, Weeks DE. Multipoint estimation of identity-by-descent probabilities at arbitrary positions among marker loci on general pedigrees. Hum Hered. 2001; 52(3): 121-31.
21. Van Camp G, Willems PJ, Smith RJ. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. Am J Hum Genet. 1997; 60(4): 758-64.
22. Hashemzadeh Chaleshtori M, Farhud DD, Patton MA. 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.
23. Schrauwen I, Helfmann S, Inagaki A, Predoehl F, Tabatabaiefar MA, Picher MM, 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.
24. Tabatabaiefar MA, Alasti F, Shariati L, Farrokhi E, Fransen E, Nooridaloii MR, et al. DFNB93, a novel locus for autosomal recessive moderate-to-severe hearing impairment. Clin Genet. 2011; 79(6): 594-8.
25. 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.
26. Tabatabaiefar MA. Genetic linkage analysis to identify the loci involved in the autosomal recessive non-syndromic hearing loss in the iranian population [Dissertation]. Tehran University of Medical Sciences School of Medicine. Tehran: 2010.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2014 Oct, Nov; 16(4):62-70. ***Original article***

Genetic linkage analysis of DFNB93 locus in a group of families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss in Chahar Mahal & Bakhtiari and Kohkiluyeh & Boyer Ahmad provinces of Iran

Rezaeian F[1], Tabatabaiefar MA[2], Heybati F[3], Reiisi S[4], Parchami Sh[5], Abolhasani M[5], Amiri B[5], Salehi AR[5], Hashemzadeh-Chaleshtori M[5*]

[1] Student Research Committee, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; [2]Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; [3]Student, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, I.R. Iran; [4]Student, Tehran National Institue of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. Iran; [5]Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 30/Dec/2013 Accepted: 23/Feb/2014

Background and aims: Hearing loss (HL) is one of the sensory, neurological disorders and is the highest rate of existing disorder at birth. More than 60% of deafness is hereditary. Genetic type of HL is divided into two groups, syndromic HL (SHL) and Non-syndromic HL (NSHL). Autosomal recessive non syndromic deafness (ARNSHL) occurs with the highest percentage (70%). This study aimed to determine genetic linkage of DFNB93 Locus in families with ARNSHL.

Methods: The descriptive study was performed on 40 large pedigrees with at least two ARNSHL patients. They had healthy parents and most of consanguineous marriage. These cases were negative for GJB2 gene mutation in Chahar Mahal & Bakhtiari and Kohkiluyeh & Boyer Ahmad provinces of Iran. Then families were investigated for genetic linkage to the DFNB93 locus using STR markers, PCR and polyacrylamide gels.

Results: Results showed that one of the 40 families (2.5%) was linked to the DFNB93 locus. The value of SLINK (2.67), preliminary two-point LOD (2.05), and multipoint LOD (2.05) for this family was calculated.

Conclusion: Based on the results of this study, DFNB93 locus has probably little role in deafness of studied population. Further investigations are necessary to determine the role of this locus in deafness in Iranian population more precisely.

Keywords: **DFNB93 locus, CABP2 gene, Autosomal recessive non-syndromic hearing loss, Genetic linkage, PCR-RFLP.**

Arc

Cite this article as: Rezaeian F, Tabatabaiefar MA, Heybati F, Reiisi S, Parchami Sh, Abolhasani M, et al. Genetic linkage analysis of dfnb93 locus in a group of families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL) in Chahar Mahal & Bakhtiari and Kohkiluyeh & Boyer Ahmad provinces of Iran. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 16(4): 62-70.

[*]**Corresponding author:**
Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran. Tel:00983813336692, E-mail:mchalesh@yahoo.com

www.SID.ir