

## تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی لوکوس DFNB7/11 در بیماران ناشنوای غیر سندرومی مغلوب اتوزومی استان همدان

اعظم پوراحمدیان<sup>۱</sup>، محمد امین طباطبایی فر<sup>۲</sup>، سمیه رئیسی<sup>۳</sup>، پریا علی پور<sup>۴</sup>، نجمه فتاحی<sup>۴</sup>، مرتضی هاشمزاده چالشتی<sup>\*۴</sup>

<sup>۱</sup>دانشجو، کمیته تحقیقات دانشجویی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ <sup>۲</sup>گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ <sup>۳</sup>گروه ژنتیک، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ <sup>۴</sup>مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۱۴

### چکیده:

زمینه و هدف: ناشنوایی متداولترین نقص حسی در انسان است. ناشنوایی ممکن است هدایتی، حسی-عصبی یا ترکیبی از هر دو، سندرومی یا غیرسندرومی، پیش از تکلم یا پس از تکلم باشد. به دلیل پیچیدگی مکانیسم شنوایی جای تعجب نیست که چند صد ژن در ایجاد ناشنوایی توارثی نقش داشته باشند. تاکنون ۱۵۲ لوکوس شناسایی شده که با رایجترین نوع ناشنوایی یعنی ناشنوایی غیرسندرومی مرتبط هستند. هدف از این مطالعه تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی لوکوس DFNB7/11 در خانواده‌هایی با ناشنوایی غیرسندرومی مغلوب اتوزومی از استان همدان می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی، ۲۴ خانواده با ناشنوایی غیرسندرومی مغلوب اتوزومی از استان همدان بررسی شد. خانواده‌های انتخاب شده در این مطالعه، ازدواج خویشاوندی داشتند و از نظر جهش‌های ژن GJB2 منفی بودند. تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی توسط ۷ نشانگر برای لوکوس DFNB7/11 صورت گرفت.

یافته‌ها: پس از بررسی خانواده‌های مختلف، یک خانواده از ۲۴ خانواده (۱۶/۴٪) با لوکوس DFNB7/11 پیوستگی نشان داد، ولی در بررسی آگزون‌های مختلف و پروموتور ژن TMC1 جهشی یافت نشد. عدم مشاهده‌ی جهش در ژن TMC1 در خانواده‌ی مذکور، وجود جهش در نواحی غیر کدکننده‌ی ژن TMC1 و یا وجود ژن جدیدی در این لوکوس را پیشنهاد می‌کند. ارزش SLINK و امتیاز LOD این خانواده به ترتیب ۱/۴۵ و ۰/۵۴ بود.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه، لوکوس DFNB7/11 اهمیت چندانی در بروز ناشنوایی در جمعیت مورد ندارد، ولی برای تعیین نقش دقیق‌تر این لوکوس در جمعیت ایرانی مطالعات بیشتر ضروری است.

واژه‌های کلیدی: لوکوس DFNB7/11، ژن TMC1، ناشنوایی غیرسندرومی مغلوب اتوزومی.

### مقدمه:

غیرسندرومی (بین ۷۵ تا ۸۰٪) توارث مغلوب اتوزومی دارند که به ناشنوایی غیرسندرومی مغلوب اتوزومی (Autosomal, Recessive, Non-Syndromic Hearing Loss= ARNSHL) معروف بوده و معمولاً از نوع پیش از تکلم می‌باشند (۴). ARNSHL حدود ۸۲ لوکوس شناخته شده دارد؛ بنابراین ناشنوایی طیف گسترده‌ای از علل ژنتیکی، محیطی و ناشناخته دارد که نوع و سهم هر یک از علل

ناشنوایی مادرزادی رایج‌ترین نقص حسی در انسان بوده و شیوع آن در بین نوزادان تازه متولد شده از ۱/۱۰۰۰ تا ۶/۱۰۰۰ متغیر است (۱). ناشنوایی یک ناهنجاری بسیار هتروژن است و می‌تواند به دلیل عوامل ژنتیکی، محیطی و یا هر دو ایجاد شود (۲). بیش از ۵۰٪ موارد ناشنوایی، ژنتیکی می‌باشند که ۷۰٪ آن‌ها غیرسندرومی و ۳۰٪ باقی‌مانده سندرومی هستند (۳). گروه عمده‌ای از موارد

بیماری در هر شجره کمک شایان توجهی به کاهش هزینه‌ها و زمان خواهد نمود (۹). پژوهش حاضر با هدف تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی لوکوس DFNB7/11 در خانواده‌هایی که برای جهش‌های موجود در GJB2 منفی بودند، انجام شد.

لوکوس DFNB7/11 در سال ۱۹۹۵ کشف شد (۱۰). در سال ۲۰۰۳ ژن TMC1 در لوکوس DFNB7/11 شناخته شد (۱۱). پروتئین TMC1 عضوی از یک خانواده جدید از پروتئین‌هاست که دارای چندین ناحیه گذرنده از غشا می‌باشد. جهش‌های TMC1 در انسان می‌تواند ناشنوایی مغلوب در لوکوس DFNB7/11 یا ناشنوایی غالب در لوکوس DFNA36 ایجاد نماید. رونوشت‌های TMC1 در حلزون جنین انسان و سلول‌های مژکدار حلزونی داخلی و خارجی گوش و در اپیتلیوم حسی - عصبی اندام‌های انتهایی دهلیزی یافت شده است. TMC1 ممکن است در بلوغ سلول مژکدار نقش داشته باشد؛ همچنین این پروتئین احتمالاً کانال‌های یونی را تنظیم می‌کند و در حمل و نقل درون سلولی دخالت دارد (۱۲). جهش‌های ژن TMC1 یکی از فراوان‌ترین دلایل ARNSHL در جمعیت‌های خاورمیانه است. تاکنون بیش از ۲۰ جهش مختلف از آن گزارش شده که تنها یک مورد در جمعیت سفیدپوست بوده است. همه بیماران ناشنوایی شدید تا عمیق پیش زبانی با فنوتیپ مشابه را نشان می‌دهند (۱۳).

### روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی - آزمایشگاهی ۲۴ خانواده مبتلا به ARNSHL که دارای حداقل دو بیمار، والدین سالم و در صورت امکان دارای ازدواج خویشاوندی بودند، از استان همدان انتخاب شدند. نمونه‌گیری خون این افراد توسط مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد پس از تکمیل پرسشنامه و ارزیابی‌های بالینی و پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی از کلیه افراد شجره‌نامه

در اقوام و جمعیت‌های مختلف متفاوت است (۵). با توجه به هتروژنیستی بالا در این بیماری پژوهشگران مطالعه خانواده‌های بزرگ را در جمعیت‌هایی مثل جمعیت‌های خاورمیانه که فراوانی ازدواج خویشاوندی در آن‌ها بالا می‌باشد، پیشنهاد کرده‌اند (۶). شایع‌ترین علت ناشنوایی غیرسندرومی، جهش‌های ژن GJB2 واقع در لوکوس DFNB1 می‌باشد (۷). مطالعات در ایران سهم متفاوت جهش‌های ژن GJB2 را در بروز ناشنوایی در جمعیت‌های مختلف ایرانی نشان داده‌اند که حدود ۳۸-۲۷٪ در جمعیت‌های ساکن شمال ایران تا ۴-۰٪ در جمعیت‌های ساکن جنوب شرقی ایران متفاوت می‌باشد (۸). بعد از ژن GJB2 ژن SLC26A4 واقع در لوکوس DFNB4 دومین علت شایع این بیماری می‌باشد (۷). تاکنون جهش در سایر ژن‌های مرتبط با ناشنوایی نیز تنها در خانواده‌های محدودی از جمعیت ایرانی شناسایی شده است و به نظر می‌رسد جهت تعیین سهم دقیق هر کدام از این ژن‌ها در بروز ناشنوایی در جمعیت ایرانی، مطالعات بسیار گسترده‌تری مورد نیاز باشد (۸)؛ بنابراین کشورمان از نظر بیماری‌های مغلوب از جمله ARNSHL و شناسایی جهش‌ها و لوکوس‌های جدید مربوطه، جهت مدیریت بیماری، انجام مشاوره ژنتیک و اقدامات درمانی احتمالی حائز اهمیت است. در این مطالعه از روش تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی برای بررسی لوکوس DFNB7/11 بهره گرفته شد.

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 می‌گیرد. این روش نه تنها به‌عنوان اولین قدم برای شناسایی ژن ناشناخته بیماری به روش کلونینگ موقعیتی استفاده می‌شود بلکه برای ردیابی ژن‌های شناخته شده مسئول بیماری در شجره نیز به کار می‌رود. در بیماری‌های هتروژن نظیر ناشنوایی که غالباً دارای تعداد زیادی ژن‌های بزرگ مسئول بیماری می‌باشند، تجزیه و تحلیل پیوستگی جهت ردیابی ژن

تغییرات در طول محصول PCR و دارا بودن کمترین میزان باندهای ثانویه یا stutter band و هتروزیگوسیتی بالا و مهم تر از همه هتروزیگوت بودن پدر و مادر برای یک نشانگر ویژه از جمله معیارهای مهم انتخاب نشانگرها در مطالعات پیوستگی ژنتیکی است.

ویژگی های مربوط به هر نشانگر در (جدول شماره ۱) ذکر شده است. در صورت معنی دار نبودن نشانگرها در هر یک از خانواده های مورد مطالعه، از نشانگرهای دیگری که در محل لوکوس مورد نظر قرار دارد، استفاده شد.

صورت گرفت، به گونه ای که از هر فرد به میزان ۵ میلی لیتر خون اخذ و با روش استاندارد فنل کلروفرم DNA ژنومی استخراج و از نظر کمی با دستگاه نانودراپ بررسی شده بود (۱۴). تنها خانواده های فاقد جهش در ژن GJB2 در این مطالعه وارد شدند. از طریق تجزیه و تحلیل پیوستگی وجود ارتباط بین ناشنوایی و لوکوس DFNB7/11 بررسی شد. انتخاب نشانگرهای STR مناسب توسط پایگاه های اطلاعاتی NCBI map viewer و انتخاب پرایمرهای لازم جهت تکثیر این نشانگرها از طریق NCBI UniSTS انجام شد. داشتن محدوده

### جدول شماره ۱: نشانگرهای مورد استفاده و ویژگی های آنها

نام نشانگر	پرایمر F (5'→3')	پرایمر R (Reverse) (5'→3')	اندازه محصول (bp)	هتروزیگوسیتی
D9S186	GATGTACCCAGAGAAGTCTCG	AGTGGTTACCATTTACCCAAG	۱۳۲-۱۵۲	٪۸۱
D9S114	GGTGCCCACCATACTACT	TCTAATCCTTCCTTCCCTCG	۲۵۲-۲۷۶	٪۷۶
D9S187	CATGATGGTGGTCTCTGG	GGTGGGGCTCAAAGAGTAG	۲۰۵-۲۵۱	٪۷۴
D9S301	AGTTTTCATAACACAAAAGAGAACA	ACCTAAATGTTTCATCAAAAAGAGG	۲۰۹-۲۳۷	٪۷۸
D9S180	TTTTAGGTGTTCTCAGTACATGC	GGGAGCAACATTTTGACATT	۲۱۶-۲۶۶	٪۷۵
D9S182	AAGTTTGGCTTCTGCTGTAAGGGTC	AATCCCCCAGGCTGAGTG	۱۵۷-۱۶۳	٪۶۶
D9S179	TTGCCAACTATTTTAGCCC	TGCAGTTTCAATCCACATC	۱۳۹-۱۷۸	٪۹۱

پیدا کنند و سپس PCR در دمای واقعی اتصال ادامه می یابد.

مقادیر به کار برده شده برای PCR نشانگرها با پاره ای تغییرات در (جدول شماره ۲) بیان شده است.

تکثیر نشانگرها با روش PCR تاج داون انجام شد. به این صورت که در چند سیکل شروع PCR دمای اتصال از چند درجه بالاتر شروع می شود تا پرایمرها اختصاصی تر به محل مورد نظر در ژن اتصال

**جدول شماره ۲: مقادیر لازم برای PCR نشانگرهای مربوطه، پروموتور و اگزون‌های ژن TMC1**

مواد	غلظت	حجم میکرولیتر
dH <sub>2</sub> O		۱۷/۹
PCR buffer	۱۰X	۲/۵
dNTP	۱۰ میلی‌مولار	۰/۵
MgCl <sub>2</sub>	۵۰ میلی‌مولار	۱
Primer (F)	۱۰ پیکومولار	۰/۵
Primer (R)	۱۰ پیکومولار	۰/۵
Taq-DNA Polymerase	۵ واحد/میکرولیتر	۰/۱
DNA	۴۰-۵۰ نانوگرم/میکرولیتر	۲
حجم کل		۲۵

دو نقطه‌ای و چند نقطه‌ای به ترتیب از Simwalk version 2.91 و Superlink version 1.6 استفاده شد (۱۵). رسم هاپلوتایپ درمورد خانواده‌های مشکوک به پیوستگی با کمک نرم‌افزار HaploPainter version 2.95 صورت گرفت. این مرحله جهت تأیید یا رد پیوستگی استفاده می‌شود (۱۶).

پس از بررسی نتایج ژل الکتروفورز و رسم هاپلوتایپ یک خانواده به لوکوس مورد نظر پیوستگی نشان داد. در ادامه برای بررسی جهش‌های احتمالی در این خانواده برای پروموتور و اگزون‌های ژن TMC1 توسط نرم‌افزار Oligo7 و Primer3 پرایمر طراحی شد؛ سپس پروموتور و اگزون‌ها توسط روش PCR تکثیر و در نهایت تعیین توالی شدند.

ویژگی پرایمرهای هر یک از اگزون‌ها و پروموتور ژن TMC1 در (جدول شماره ۳) بیان شده است. مقادیر به کار برده شده برای PCR پروموتور و اگزون‌ها با پاره‌ای تغییرات مشابه با مقادیر به کار برده شده برای PCR نشانگرها در جدول شماره ۲ بیان شده است.

برنامه دمایی PCR نشانگرها به صورت زیر بود: دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه برای دناتوره شدن اولیه، ۸ سیکل تاج‌داون شامل دناتوره شدن اولیه: ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، جهت اتصال پرایمرها به DNA در سیکل اول ۶۰-۶۹°C (متغیر برای نشانگرهای مختلف) به مدت ۳۰ ثانیه با کاهش یک درجه دما به ازای هر سیکل و ۷۲°C برای گسترش رشته‌های مکمل به مدت ۳۰ ثانیه، ۲۷ سیکل شامل: ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه در مرحله دناتوره شدن، جهت اتصال پرایمرها به DNA ۵۲-۶۱°C (متغیر برای نشانگرهای مختلف) به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه برای گسترش رشته‌های مکمل و گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه.

بعد از تکثیر قطعات مورد نظر توسط روش PCR، نمونه‌ها بر روی ژل پلی آکریل آمید (Merk, Germany) ۸-۱۲٪، با جریان ۴۰ میلی آمپر به مدت ۴-۵ ساعت الکتروفورز شدند و سپس با نترات نقره رنگ آمیزی و باندها رؤیت گردید.

برای محاسبه‌ی S-Link از FastS link version 2.51

و برای محاسبه‌ی امتیاز LOD (LOD score) پارامتری

جدول شماره ۳: مشخصات پرایمرهای پروموتور و اگزون‌های ژن TMC1

توالی پرایمر R (5'→3')	توالی پرایمر F (5'→3')	طول محصول (bp)	اگزون پروموتور
CCTCTGAGTAGATGGGAAACAG	TAATTATGTTTCCCAAGGACTG	۷۶۴	پروموتور
ACTGGGACTATCCTAACT	CGACTGTTTCCCATCTAC	۴۸۰	۱
AGGAGGGTGGAAACAAGTTA	AAAACATGCCAACTGAGTTA	۴۷۴	۲
AGCCCTAAAGTTCAGTGT	CAGATCCAAGTCCCCTCC	۲۳۸	۳
CATTCATACAATCCTGCGT	ACCTTGTAATAACCATCATAGA	۳۶۵	۴
AACAAAGGGAAACTACCCACAG	TGGATGTGCTAGATCAAACCTGA	۲۶۹	۵
GACCATGAAAAGTTATCCACACA	TAACTGCACAAAAACATTATGAT	۲۸۰	۶
AAGGAGTGATCTTCTTCAGCA	TATCCATGATGCATCCCATC	۳۷۶	۷
TCAATATCAGGGAAAAGTGTCT	TCCAAAAGTCAAGCAAAGCTTAAC	۲۲۷	۸
AGAACCAGTGTCTTCTTAGAG	ATTCAAATGTCCACTACTTCTG	۲۳۲	۹
TTGTTTCTAGTCTTCCAAAA	TGCTGCCAGAGAGACATTTCC	۳۰۵	۱۰
ACTTACGCTCCTCTCTTAG	AGGTGAAGAGGAAGAGGAG	۱۸۷	۱۱
CTAAATAAAAAATCCATCCTCCCACC	GAGACCCAAAGAGTCCCCATAA	۲۷۲	۱۲
CAAAATTATATCCAATCCCCAAA	GGAGCAAAAACAATAGGGC	۳۷۱	۱۳
GATACTGCACTACTGGACCAGA	TATTGCTTCTCCACTTCAACAC	۳۲۸	۱۴
GAAACAAATGTCAGGTTCTAAGC	AGCTAAGATATTCTATTTTGGGT	۲۹۸	۱۵
AAATTCAGAGCCAGCACA	AAGCAATAATAACTTTAAACACCA	۶۷۲	۱۶/۱۷
CTCTGTGAGAAACACCCAAGAATTA	TGCCATTAATTGCAGTCTTCAAGC	۳۳۰	۱۸
GGAGGCTTTTCTGTAAGTGAT	TGTGAGACGCTAATCCAATGA	۱۵۱	۱۹
ACAATCAAAAAGATGGTGGGAG	GTTTGTCTGGTTGAAAGTGGC	۳۶۱	۲۰
AAGCTGAAATGTAAAAACAGCC	CTTGCTTTAACCATGGTTTTTC	۲۶۳	۲۱
AGGTAAGGATTGTGGAATGACT	CTGGACCTCAGCTTTTATCTAT	۵۳۲	۲۲/۲۳
TCTCTGGGCGTTCACATATTGC	TTTGCCTCCTGTTCACTTCTC	۱۷۱	۲۴

جهت اتصال پرایمرها به DNA  $60^{\circ}\text{C}$ – $54^{\circ}\text{C}$  (متغیر برای پروموتور و اگزون‌های مختلف) به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۵–۳۰ ثانیه (متغیر برای پروموتور و اگزون‌های مختلف) برای گسترش رشته‌های مکمل و گسترش نهایی در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۷ دقیقه.

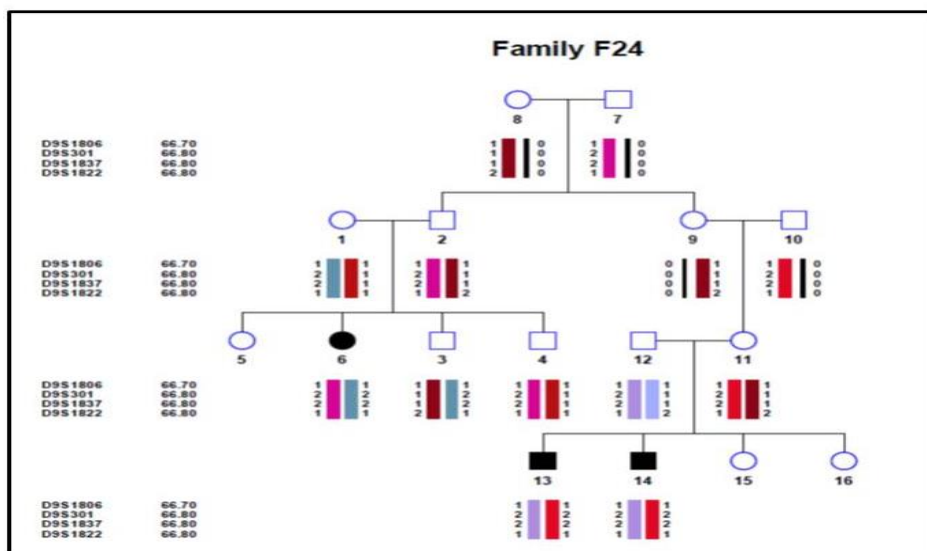
#### یافته‌ها:

در این مطالعه از ۲۴ خانواده‌ای که برای تجزیه و تحلیل پیوستگی انتخاب شدند، نمونه خون

برنامه دمایی پروموتور و اگزون‌ها به صورت زیر بود: دمای  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه برای دناتور شدن اولیه، ۸ سیکل تاج‌داون شامل دناتور شدن اولیه:  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه، جهت اتصال پرایمرها به DNA در سیکل اول  $68^{\circ}\text{C}$ – $62^{\circ}\text{C}$  (متغیر برای پروموتور و اگزون‌های مختلف) به مدت ۳۰ ثانیه با کاهش یک درجه دما به ازای هر سیکل و  $72^{\circ}\text{C}$  برای گسترش رشته‌های مکمل به مدت ۴۵–۳۰ ثانیه (متغیر برای پروموتور و اگزون‌های مختلف)، ۲۷ سیکل شامل:  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه در مرحله دناتور شدن،

تأیید بود. ارزش SLINK این خانواده‌ها که با نرم‌افزار FastSLINK version 2.51 محاسبه شدند، بین ۱/۱۲ تا ۷ برآورد شده است. در ۲۴ خانواده مورد مطالعه، یک خانواده به لوکوس مورد نظر پیوستگی نشان داد (تصویر شماره ۱). ارزش SLINK این خانواده برابر ۱/۴۵ و امتیاز LOD آن برابر ۰/۵۴ بود. پس از بررسی نتایج تعیین توالی با نرم افزار Chromas در هیچ یک از اگزون‌ها و پروموتور ژن TMC1 جهشی یافت نشد. البته یک پلی‌مورفیسم c.45C>T (rs2589615) در اگزون ۶ مشاهده شد (تصویر شماره ۲).

۲۳۰ نفر در دسترس بود که از این تعداد ۶۸ نفر ناشنوا بودند. میانگین سنی افراد ناشنوا ۱۰ سال و تعداد در هر دو جنس برابر بود. تمامی افراد ناشنوی جمعیت مورد بررسی، ناشنوایی دوطرفه‌ی حسی-عصبی شدید تا عمیق داشتند. در ۸۵٪ خانواده‌های مورد بررسی ۳ نسل ازدواج خویشاوندی مشاهده شد و با توجه به داده‌های در ارتباط با شجره‌نامه، غیرسندرومی بودن ناشنوایی (عدم وجود علائم بالینی دیگر به جز ناشنوایی) و الگوی توارث مغلوب اتوزومی (مشاهده بیماری به صورت یکسان در زنان و مردان و عدم وجود بیماری در تمام نسل‌ها) مورد

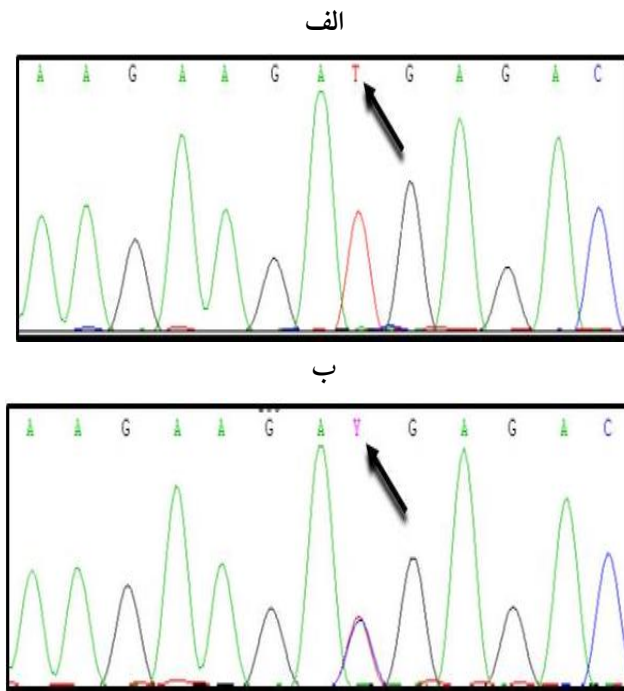


تصویر شماره ۱: الف- شجره و هاپلوتیپ خانواده F24 با نشان پیوستگی به لوکوس DFNB7/11



تصویر شماره ۲: ب- الگوی ژنوتیپ افراد خانواده F24 برای نشانگر D9S1837

افراد سالم هتروزیگوت و افراد بیمار هموزیگوت بودند.



**تصویر شماره ۲: الکتروفورگرام اگزون ۶ در خانواده F24**

الف- در موقعیت پلی مورفیسم c.45C هموزیگوت برای آلل T (فاقد پلی مورفیسم). ب- در موقعیت c.45C پلی مورفیسم c.45C>T به شکل هتروزیگوت مشاهده می شود.

## بحث:

پیوستگی هموزیگوتی، از ۶۵ خانواده غیر خویشاوند، ۴ خانواده به این لوکوس پیوستگی نشان دادند (۱۸). در مطالعه‌ای از ۱۶۸ خانواده پاکستانی با ARNSHL که از نظر جهش در ژن GJB2 منفی بودند، در ۷ خانواده ۵ جهش جدید در ژن TMC1 دیده شد که شامل: c.830A>G (p.Y277C) c.1114G>A, (p.V372M) c.1334G>A, (p.R445H) c.2004T>G, (p.S668R) c.2035G>A, (p.E679K) می باشد (۱۹). در مطالعه‌ای از کشورمان ۳۹ خانواده دارای ARNSHL که از مناطق مختلف ایران بودند و شامل ۲ یا بیشتر موارد ناشنوایی بودند برای لوکوس DFNB7/11 غربالگری شدند که در مجموع ۳ خانواده به این لوکوس پیوستگی نشان دادند که نتیجه گرفتند این لوکوس احتمالاً از رایج ترین دلایل ARNSHL در جمعیت ایران به شمار می آید (۲۰). در مطالعه‌ای در ۷ خانواده ترکیه‌ای که با لوکوس DFNB7/11 پیوستگی داشتند ۶ جهش مختلف در ژن TMC1 شناسایی شد که عبارتند از: (c.1330G>A)، (c.1333C>T)،

در این مطالعه ۲۴ خانواده ARNSHL از استان همدان بررسی شد. از این ۲۴ خانواده، یک خانواده به لوکوس DFNB7/11 پیوستگی ژنتیکی نشان داد. باتوجه به این نتایج نقش این ژن در ایجاد ناشنوایی در جمعیت مذکور حدود ۴/۱۶٪ تخمین زده شد. ارزش پایین SLINK و امتیاز LOD به دست آمده در خانواده مذکور بیانگر قدرت پایین آن برای مطالعه پیوستگی ژنتیکی بوده و نیز احتمال دارد جهش‌هایی در خارج از منطقه کد کننده ژن مربوطه موجود باشد. افزون بر این احتمال وجود یک ژن دیگر عامل ناشنوایی در ناحیه ژنومی پیوسته به این لوکوس وجود دارد و پیش از این نیز مطرح شده است (۱۷). پیوستگی به این لوکوس از میان ۲۳۰ خانواده خویشاوند هندی و پاکستانی در ۱۰ خانواده مشاهده شد و ژن جدیدی به نام TMC1 در آن یافت شد (۱۲). در یک بررسی در شمال شرق و شرق ترکیه، با بررسی سراسری ژنوم و تجزیه و تحلیل



شناسایی جهش‌های بیشتر و نیز جدیدتر ژن TMC1 منجر شود. مطالعاتی از این قبیل بر روی جمعیت‌های مختلف کشور و فراهم کردن امکانات تجزیه و تحلیل پیوستگی سراسری ژنوم، نوع و فراوانی لوکوس‌های درگیر را مشخص نموده و برای هر جمعیت اطلاعات لازم را فراهم می‌کند تا بتواند در تشخیص و مشاوره دقیق‌تر کارگشا باشد.

### نتیجه‌گیری:

باتوجه به نتایج این مطالعه، لوکوس DFNB7/11 احتمالاً نقش کمی در ایجاد ناشنوایی در جمعیت مورد بررسی دارد، دلیل اصلی ناشنوایی در جمعیت مورد مطالعه می‌تواند، مربوط به سایر لوکوس‌های درگیر در ناشنوایی باشد. با این حال برای تعیین نقش دقیق‌تر این لوکوس در کشورمان به مطالعات بیشتر و تعداد خانواده‌های بیشتر نیاز است.

### تشکر و قدردانی:

با تشکر فراوان از بیماران ناشنوا و خانواده‌های ایشان که در انجام این پروژه ما را یاری رساندند. این مقاله مربوط به نتایج پایان نامه نویسنده نفر اول می‌باشد. از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد با شماره گرنت ۱۴۹۷ جهت تأمین بودجه و همچنین کارکنان مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد که ما را در این پژوهش یاری نمودند، کمال تقدیر و تشکر دارم.

(c.2030T>A)، (c.64+2T>A)، (c.100C>T) و یک حذف بزرگ حدود ۳۱ کیلو باز در منطقه ۳ شامل اگزون‌های ۱۹-۲۴ (۲۱). در مطالعه‌ای در ۲ خانواده ایرانی با ARNSHL جهش (c.776+1G>A) و یک حذف جدید (c.1589-1590delCT, p.s530\*) در ژن TMC1 شناسایی شد (۲۲). در مطالعه‌ای روی ۱۱ نفر از ایران، پاکستان، لبنان، تونس، عراق، الجزیره، ترکیه که جهش p.R34X را در ژن TMC1 حمل می‌کردند منشاء این جهش بررسی شد که ۹ نفر بی‌تعدادی پیوستگی چشم‌گیری بین جهش مورد نظر و ۵ نشانگر پلی‌مورفیک در اینترون ۲۲۰ کیلو بازی نشان دادند که بیانگر منشاء گرفتن جهش مورد نظر از یک نیای مشترک بود (۲۳). در مطالعه‌ای در یک خانواده هلندی با ARNSHL که با لوکوس DFNB7/11 پیوستگی نشان داده بود یک جهش جدید (c.1763+3A>G) در جایگاه پیرایش اینترون ۱۹ ژن TMC1 شناسایی شد (۲۴). در بررسی دو خانواده ایرانی با ARNSHL که با لوکوس DFNB7/11 پیوستگی نشان داده بودند، یک جهش جدید (c.-258A>C) در ژن TMC1 یافت شد (۲۵). در بررسی یک خانواده چینی با ARNSHL که با لوکوس DFNB7/11 پیوستگی نشان داده بود، جهش‌های هتروزیگوت مرکب در ژن TMC1 شناسایی شد که شامل (c.589.G>A, p.G197R) و (c.1171C>T, p.Q391X) بود (۲۶). باتوجه به اینکه لوکوس مورد مطالعه از لوکوس‌های رایج مسبب ARNSHL در ایران و سایر نقاط جهان می‌باشد، مطالعات بیشتر در جمعیت‌های مختلف می‌تواند به

### 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. 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 Camp G, Willems PJ, Smith RJ. Nonsyndromic hearing impairment: Unparalleled heterogeneity. *Am J Hum Genet*. 1997; 60(4): 758-64.



4. Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med.* 2005; 353(19): 2012-24.
5. Saadat M, Ansari-Lari M, Farhud DD. Consanguineous marriage in Iran. *Ann Hum Biol.* 2004; 31(2): 263-9.
6. Strachan T, Read A. *Human molecular genetics.* New York: Garland Science Pub; 2011.
7. 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.
8. Chaleshtori MH, 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.
9. 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.
10. Jain PK, Fukushima K, Deshmukh D, Ramesh A, Thomas E, Lalwani AK, et al. A human recessive neurosensory nonsyndromic hearing impairment locus is a potential homologue of the murine deafness (dn) locus. *Hum Mol Genet.* 1995; 4(12): 2391-4.
11. Kurima K, Yang Y, Sorber K, Griffith AJ. Characterization of the transmembrane channel-like (TMC) gene family: Functional clues from hearing loss and epidermodysplasia verruciformis. *Genomics.* 2003; 82(3): 300-8.
12. Kurima K, Peters LM, Yang Y, Riazuddin S, Ahmed ZM, Naz S, et al. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function. *Nat Genet.* 2002; 30(3): 277-84.
13. 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.
14. 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.
15. Ott J. Computer-simulation methods in human linkage analysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86(11): 4175-8.
16. Broman KW, Murray JC, Sheffield VC, White RL, Weber JL. Comprehensive human genetic maps: Individual and sex-specific variation in recombination. *Am J Hum Genet.* 1998; 63(3): 861-9.
17. Hilgert N, Alasti F, Dieltjens N, Pawlik B, Wollnik B, Uyguner O, et al. Mutation analysis of TMC1 identifies four new mutations and suggests an additional deafness gene at loci DFNA36 and DFNB7/11. *Clin Genet.* 2008; 74(3): 223-32.
18. Sansovic I, Knezevic J, Musani V, Seeman P, Barisic I, Pavelic J. GJB2 mutations in patients with nonsyndromic hearing loss from Croatia. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2009; 13(5): 693-9.
19. Santos RL, Wajid M, Khan MN, McArthur N, Pham TL, Bhatti A, et al. Novel sequence variants in the TMC1 gene in Pakistani families with autosomal recessive hearing impairment. *Hum Mutat.* 2005; 26(4): 396.
20. Bazazzadegan N, Meyer N, Kahrizi K, Mohseni M, Imani P, Nikzat N. Screening of TMC1 gene mutations in DFNB7 (11) locus in autosomal recessive non-syndromic hearing loss Iranian population. *Eur J Human Genet.* 2007; 15(1): 131.
21. Sirmaci A, Duman D, Ozturkmen-Akay H, Erbek S, Incesulu A, Ozturk-Hismi B, et al. Mutations in TMC1 contribute significantly to nonsyndromic autosomal recessive sensorineural

- hearing loss: A report of five novel mutations. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009; 73(5): 699-705.
22. Hildebrand MS, Kahrizi K, Bromhead CJ, Shearer AE, Webster JA, Khodaei H, et al. Mutations in TMC1 are a common cause of DFNB7/11 hearing loss in the Iranian population. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2010; 119(12): 830-5.
23. Saïd MB, Hmani-Aifa M, Amar I, Baig SM, Mustapha M, Delmaghani S, et al. High frequency of the p. R34X mutation in the TMC1 gene associated with nonsyndromic hearing loss is due to founder effects. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2010; 14(3): 307-11.
24. de Heer AM, Collin RW, Huygen PL, Schraders M, Oostrik J, Rouwette M, et al. Progressive sensorineural hearing loss and normal vestibular function in a Dutch DFNB7/11 family with a novel mutation in TMC1. *Audiol Neurootol.* 2011; 16(2): 93-105.
25. Davoudi-Dehaghani E, Zeinali S, Mahdih N, Shirkavand A, Bagherian H, Tabatabaieifar MA. A transversion mutation in non-coding exon 3 of the TMC1 gene in two ethnically related Iranian deaf families from different geographical regions; evidence for founder effect. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2013; 77(5): 821-6.
26. Gao X, Su Y, Guan LP, Yuan YY, Huang SS, Lu Y, et al. Novel compound heterozygous TMC1 mutations associated with autosomal recessive hearing loss in a Chinese family. *PLoS One.* 2013; 8(5): e63026.

## Genetic linkage analysis of DFNB7/11 locus in patients with autosomal recessive non syndromic hearing loss from Hamedan province

Pourahmadiyan A<sup>1</sup>, Tabatabaiefar MA<sup>2</sup>, Reisi S<sup>3</sup>, Alipour P<sup>4</sup>, Fattahi N<sup>4</sup>, Hashemzadeh-Chaleshtori M<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Student, Student Research Committee, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; <sup>2</sup>Genetics and Molecular Biology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; <sup>3</sup>Genetics Dept., Shahrekord University, Shahrekord, Iran; <sup>4</sup>Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 25/Sep/2015 Accepted: 30/Dec/2015

**Background and aims:** Hearing loss is a most common sensory deficit in humans. The hearing loss may be conductive, sensorineural, or mixed (syndromic or nonsyndromic), prelingual or postlingual. Due to the complexity of the hearing mechanism, it is not surprising that several hundred genes might be involved in causing hereditary hearing loss. So far 152 loci have been identified which are associated with the most common type of hearing loss. This study aimed to analyze genetic linkage of DFNB7/11 locus in families with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss from Hamedan province.

**Methods:** In this descriptive laboratory study, 24 families from Hamedan province with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss were examined. Selected families in this study had consanguinity and they were negative for GJB2 gene mutations. Linkage analysis was performed by 7 markers (STR) for DFNB7/11 locus.

**Results:** After examining different families, one family of the 24 families (4.16%) showed linkage to the DFNB7/11 locus, but in examining different exons and promoter of TMC1 gene, no mutation was found. Lack of TMC1 gene mutations in mentioned family suggests mutations exist in noncoding regions of TMC1 genes or new gene exists in this locus. SLINK value and LOD score of this family was 1.45 and 0.54 respectively.

**Conclusion:** Based on the results of this study, DFNB7/11 locus may not have important role in causing hearing loss of population studied, but further studies are necessary to determine more precisely the role of this locus in hearing loss in Iranian population.

**Keywords:** DFNB7/11 locus, TMC1 gene, Autosomal recessive nonsyndromic hearing loss.

**Cite this article as:** Pourahmadiyan A, Tabatabaiefar MA, Reisi S, Alipour P, Fattahi F, Hashemzadeh-Chaleshtori M. Genetic linkage analysis of DFNB7/11 locus in patients with autosomal recessive non syndromic hearing loss from Hamedan province. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(3): 8-18.

**\*Corresponding author:**

Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 00983833331471, E-mail: mchalesh@yahoo.com