مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۳۷٤/هفته‌ی دوم اردیبهشت ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱/۱۵

تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی لوکوس‌های DFNB40 و DFNB48 در خانواده‌هایی با ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی از استان‌های غربی کشور

اعظم پوراحمدیان[۱]، محمدامین طباطبایی‌فر[۲]، سمیه رئیسی[۳]، پریا علی‌پور[۱]، نجمه فتاحی[۱]، مرتضی هاشم‌زاده چالشتری[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ناشنوایی حسی- عصبی، رایج‌ترین ناهنجاری عصبی است که با میانگین ۱ در ۱۰۰۰-۵۰۰ نوزاد رخ می‌دهد. موارد غیر سندرمی، ۷۰ درصد ناشنوایی‌ها را شامل می‌شود که ۸۰ درصد موارد، الگوی توارث مغلوب اتوزومی دارند. هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی لوکوس‌های DFNB40 و DFNB48 به منظور بررسی شیوع آن‌ها در میان خانواده‌های مورد بررسی با ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی از استان‌های غربی کشور بود.

روش‌ها: در این مطالعه، ۶۰ خانواده با [illegible]ایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی از سه استان ایران شامل همدان، کهگیلویه و بویراحمد و چهار محال و بختیاری بررسی شدند. خانواده‌های انتخاب شده در [illegible] حاصل ازدواج خویشاوندی و دارای حداقل ۲ فرد ناشنوا و از نظر جهش GJB2 منفی بودند.

یافته‌ها: پس از بررسی خانواده‌های مختلف هیچ یک از خانواده‌های مورد بررسی به لوکوس‌های DFNB40 و DFNB48 پیوستگی نشان ندادند.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این مطالعه، احتمال می‌رود لوکوس‌های DFNB48 و DFNB40 در ایجاد ناشنوایی در استان‌های مورد مطالعه، نقش مهمی ندارند؛ اما برای تعیین نقش دقیق‌تر این لوکوس‌ها در جمعیت [illegible] مطالعات بیشتر ضروری است.

واژگان کلیدی: لوکوس DFNB48، لوکوس DFNB40، ناشنوایی غیر سندرومی مغلوب اتوزومی

ارجاع: پوراحمدیان اعظم، طباطبایی‌فر محمدامین، رئیسی سمیه، علی‌پور پریا، فتاحی نجمه، هاشم‌زاده چالشتری مرتضی. **تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی لوکوس‌های DFNB40 و DFNB48 در خانواده‌هایی با ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی از استان‌های غربی کشور.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۷۴): ۲۲۰-۲۱۴

مقدمه

ناشنوایی، یک ناهنجاری حسی- عصبی است که طبق ارزیابی‌های انجام شده، ۷۰ میلیون نفر در سرتاسر جهان از آن رنج می‌برند. این مشکل جزء بیشترین ناهنجاری‌های موجود در هنگام تولد است که با میانگین ۱ در ۱۰۰۰ نوزاد رخ می‌دهد (۱). تشخیص دیر هنگام و یا عدم تشخیص ناشنوایی، می‌تواند اثرات عمیقی بر روی قابلیت‌های ارتباطی و زبانی و همچنین تکوین ارتباط روانی-اجتماعی یک کودک داشته باشد. تأخیر در تشخیص، ممکن است سبب انزوا و کناره‌گیری کودک در آینده شود (۲).

ناشنوایی دامنه طیف وسیعی از تظاهرات بالینی شامل مادرزادی، دیررس، هدایتی، حسی، عصبی، سندرمی یا غیر سندرمی می‌باشد. سبب‌شناسی ناشنوایی بسیار عاملی است و شامل دلایل ژنتیک، محیطی و گاهی هر دو می‌باشد که بیش از ۶۰ درصد موارد ژنتیک است (۳). تخمین‌ها حاکی از آن است که ممکن است تا ۱ درصد ژن‌های انسان به نحوی در فرایند شنوایی دخیل باشند (۴). ناشنوایی ژنتیک، به دو صورت سندرمی و یا غیر سندرمی دیده می‌شود (۵). تحقیقات در مورد الگوی توارثی ناشنوایی‌های ارثی غیر سندرمی نشان داده است که حدود ۸۵-۷۵ درصد از آن‌ها الگوی مغلوب

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲- استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴- استاد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: مرتضی هاشم‌زاده چالشتری
Email: mchalesh@yahoo.com

Proof Version

اتوزومی، ۲۴-۱۵ درصد آن‌ها الگوی غالب اتوزومی و ۲-۱ درصد پیوسته به X و حدود ۲ درصد نیز میتوکندریایی می‌باشند (۶).

در مجموع، ناشنوایی مغلوب به طور معمول شدیدتر از ناشنوایی غالب بروز می‌کند؛ چرا که اغلب عمیق، پیش از تکلم و با نفوذ کامل است؛ در حالی که ناشنوایی غالب، اغلب پیش رونده، پس از تکلم و از نظر بالینی به شکل ناشنوایی یک طرفه یا دو طرفه‌ی خفیف است. علاوه بر این، بیماری‌هایی با وراثت مغلوب در جمعیت‌هایی شایع‌ترند که ازدواج‌های خویشاوندی معمول‌تر است. چنین اثری در موارد مغلوب ناشنوایی نیز مشاهده شده است. ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی (Autosomal recessive non-syndromic hearing loss یا ARNSHL) شایع‌ترین دلیل ناشنوایی ارثی است و اغلب شدیدترین فنوتیپ ناشنوایی را نشان می‌دهد (۷). ناشنوایی غیر سندرمی با وراثت مغلوب، حدود ۷۰ لوکوس شناخته شده دارد. بنا بر این، ناشنوایی طیف گسترده‌ای از علل ژنتیک، محیطی و ناشناخته دارد که نوع و سهم هر یک از علل در اقوام و جمعیت‌های مختلف متفاوت است. در کشور ما، مطالعات به نسبت کمی بر روی ARNSHL انجام گرفته و بیشتر پژوهش‌ها به یک لوکوس خاص و به طور مشخص DFNB1 که ژن GJB2 (CX26) را در بردارد، معطوف بوده است (۸).

به طور میانگین، در ایران تنها حدود ۱۸/۲۹ درصد موارد ARNSHL به وسیله‌ی ژن GJB2 ایجاد می‌شود (۹). بر اساس نسبت بالای ازدواج خویشاوندی در ایران (۳۸/۶ درصد)، می‌توان پیش‌بینی نمود که در ایران نسبت به جمعیت‌های اروپا و آمریکای شمالی، ARNSHL نسبت بالاتری در میان ناشنوایی‌های ژنتیکی غیر سندرمی دارد (۸). بنا بر این، مطالعه‌ی ژنتیک لوکوس‌های اصلی درگیر در ARNSHL به منظور روشن‌سازی نقش هر یک از این لوکوس‌ها در جمعیت کشورمان ضروری به نظر می‌رسد.

در پژوهش حاضر، تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی لوکوس DFNB40 و DFNB48 در خانواده‌هایی که برای جهش‌های موجود در GJB2 منفی بودند، انجام شد.

تجزیه و تحلیل پیوستگی در واقع بررسی همراهی توارث جایگاه نشانگر با فنوتیپ بیماری است که تحت تأثیر فاصله‌ی بین جایگاه ژن بیماری و نشانگر مربوط قرار می‌گیرد. این روش، نه تنها به عنوان اولین گام برای شناسایی ژن ناشناخته‌ی بیماری به روش کلونینگ موقعیتی استفاده می‌شود، بلکه برای ردیابی ژن‌های شناخته شده‌ی مسؤول بیماری در شجره نیز به کار می‌رود. در بیماری‌های هتروژن مثل ناشنوایی که اغلب دارای تعداد زیادی ژن‌های بزرگ مسؤول بیماری می‌باشند، تجزیه و تحلیل پیوستگی جهت ردیابی ژن بیماری در هر شجره کمک بسیاری به کاهش هزینه‌ها و زمان خواهد نمود (۱۰).

لوکوس DFNB40 در سال ۲۰۰۳ در یک خانواده‌ی ایرانی با ARSNHL از طریق تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیک کشف شد. این لوکوس، بر روی 22q11.2 واقع می‌باشد. محدوده‌ی این لوکوس بیش از ۸۰ ژن دارد و با محدوده‌ی درگیر در سندرم‌هایی که ناشنوایی یکی از ویژگی آن‌ها می‌باشد، هم‌پوشانی دارد. این سندرم‌ها، شامل سندرم چشم گربه (CES یا Cat eye syndrome) و سندرم دی جرج (DiGeorge syndrome) می‌باشند (۱۱). ژن مسؤول این بیماری، هنوز ناشناخته است.

لوکوس DFNB48 در سال ۲۰۰۵ با تجزیه و تحلیل پیوستگی ۵ خانواده‌ی پاکستانی خویشاوند دارای ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی روی کروموزوم 15q23-q25.1 نقشه‌کشی شد (۱۲).

ژن CIB2 در لوکوس DFNB48 قرار دارد و جهش‌های آن مسؤول ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی ۴۸ (DFNB48) و سندرم Ascher می‌باشد. ژن CIB2 شش اگزون دارد که به دلیل پیرایش متناوب، کد کننده‌ی سه ایزوفرم مختلف است. ژن CIB2 یک پروتئین از خانواده‌ی پروتئین‌های متصل شونده به اینتگرین و کلسیم را کد می‌کند. در اثر اتصال به کلسیم، کونفورماسیون CIB2 تغییر می‌یابد و پیام‌رسانی کلسیم درون سلولی را میانجی‌گری می‌کند. CIB2 در هموستاز کلسیم نقش حفاظت شده و در پیام‌رسانی کلسیم دخالت دارد.

همچنین، پیشنهاد شده است که CIB2 برای هدایت و انتقال مناسب نوری و جلوگیری از تخریب وابسته به نور شبکیه ضروری است. ژن CIB2 باعث نقص در تنظیم کلسیم می‌شود که خود می‌تواند منجر به نقص در هدایت و انتقال مکانیکی- الکتریکی در گوش و نقص در گیرنده‌های نوری در چشم شود (۱۳).

پژوهش حاضر با هدف بررسی شیوع دو لوکوس DFNB40 و DFNB48 با استفاده از راهبرد تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی در خانواده‌هایی که برای جهش در ژن GJB2 منفی بودند، صورت گرفت.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی Case series، ۶۰ خانواده‌ی مبتلا به ARNSHL که دارای حداقل دو بیمار، والدین سالم و ازدواج خویشاوندی بودند، از استان‌های چهار محال و بختیاری، کهگیلویه و بویراحمد و 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 رضایت‌نامه‌ی کتبی از کلیه‌ی افراد شجره‌نامه انجام شد؛ به گونه‌ای که از هر فرد، به میزان ۵ میلی‌لیتر خون گرفته شد و با روش فنل کلروفرم DNA ژنومی به صورت استاندارد استخراج و از نظر کمی با دستگاه نانودراپ بررسی شده بود (۱۴). تنها خانواده‌های فاقد جهش در ژن GJB2 در این مطالعه وارد شدند.

Proof Version

جدول ۱. نشانگرهای لوکوس DFNB40

نام نشانگر	پرایمر F (Forward)	پرایمر R (Reverse)	اندازه‌ی محصول (bp)	هتروزیگوسیتی
D22S427	TGCTGTTTTGTAGAGTGTTTAGAC	GTGCCCAGCCGTATTT	۱۰۲	۶۲ درصد
D22S1144	GCTGAAATTGCCAAAGTTTA	GAGCCTCTGGTCCTCTGT	۱۹۱	۷۶ درصد
D22S1174	GAATCACTAGGGGCCTTCA	TGAGGCTATGTGCCCAG	۲۱۶	۷۲ درصد
D22S1154	GCCTAACCTGTGATTGTTTCATCTA	TGGCGAATTGATTCTCACCTA	۲۵۹	۷۲ درصد
D22S1140	AGTGTCCCCATCTGAATATG	TCTGGTGTACGCGCAC	۲۲۹	۷۰ درصد
D22S1142	TGAAGATAATAGCAGCGAATACACC	CCTGGCTTGAGACCCTGTA	۱۹۰	۷۷ درصد

انتخاب نشانگرها، تعیین ژنوتیپ و بررسی پیوستگی ژنتیکی از طریق تجزیه و تحلیل پیوستگی وجود ارتباط بین ناشنوایی و لوکوس DFNB40 و DFNB48 بررسی شد. انتخاب نشانگرهای Short tandem repeat (STR) از طریق پایگاه‌های اطلاعاتی National center for biotechnology information map viewer (NCBI map viewer) و انتخاب پرایمرهای لازم جهت تکثیر این نشانگرها توسط NCBI UniSTS صورت گرفت. وجود محدوده‌ی تغییرات در طول محصول و ستر بالا و وجود هتروزیگوت بودن پدر و مادر برای یک نشانگر معین، از جمله معیارهای مهم انتخاب نشانگرها در مطالعات پیوستگی ژنتیکی می‌باشد. ویژگی‌های مربوط به نشانگرهای لوکوس DFNB40 و لوکوس DFNB48 به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ ذکر شده است. در صورت معنی‌دار نبودن (Uninformative) نشانگرها در هر یک از خانواده‌های مورد مطالعه از نشانگرهای دیگری در محل لوکوس مورد نظر استفاده شد.

برای تکثیر نشانگرها، از روش PCR Touchdown (Touchdown polymerase chain reaction) استفاده شد. به این صورت که در چند چرخه‌ی شروع PCR، دمای Annealing از چند درجه بالاتر شروع می‌شود تا پرایمرها به طور اختصاصی‌تری به محل مورد نظر در ژن اتصال پیدا کنند و سپس، PCR در دمای واقعی Annealing ادامه می‌یابد. برنامه‌ی حرارتی برای تکثیر نشانگرها به صورت زیر بود: ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای واسرشت شدن اولیه، ۸ چرخه‌ی Touchdown شامل ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشت کردن رشته‌های DNA، دمای اتصال پرایمرها از ۶۳-۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۲۵ چرخه‌ی بعدی شامل ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه که با ۵ دقیقه سنتز نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد پایان یافت.

در هر واکنش PCR، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومولار) (شرکت سازنده TAGC دانمارک، شرکت وارد کننده فن‌آوران ایران)، ۰/۵ میکرولیتر (۱۰ میلی‌مولار) Deoxy nucleotide triphosphate mix (dNTP) (شرکت سازنده KBC ایران)، ۱ میکرولیتر از $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار) (شرکت سازنده KBC ایران)، ۰/۱ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمراز (۵ واحد/میکرولیتر) (شرکت سازنده KBC ایران) و ۲ میکرولیتر از DNA ژنومیک استخراج شده که آب مقطر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد.

جدول ۲. نشانگرهای لوکوس DFNB48

نام نشانگر	پرایمر F (Forward)	پرایمر R (Reverse)	اندازه‌ی محصول (bp)	هتروزیگوسیتی
D15S1027	CTGAAAACCAGCCCACTC	GAGTCCCTGGAGAGCCC	۱۹۶	۶۶ درصد
D15S984	GCAGACACGCTCGCAT	GAGGCTCCGAGGGCAG	۲۲۰	۹۲ درصد
D15S1023	GGTATTGTTTTGGACCACATCTTAG	GGGAGGCTGAGACAGTTTC	۲۷۲	۸۶ درصد
D15S973	ATCCACCTGACTCAAGGA	TTCTCCATCAGTAAATTGCG	۲۵۰	۶۷ درصد
D15S114	AGAATGAGCAGCACTGTTTG	TTGTCACTGCTTTTCTCT	۱۷۷	۷۰ درصد
D15S991	AGCTTGGTGACTCTATCAGGGTG	AACTGGCTGGTCTCTATTATCTGCG	۱۹۸	۶۲ درصد
D15S1001	TGGGCCTTGTGATTTTAG	CATCTGTGTGTCTGTGACTG	۲۵۹	۵۳ درصد

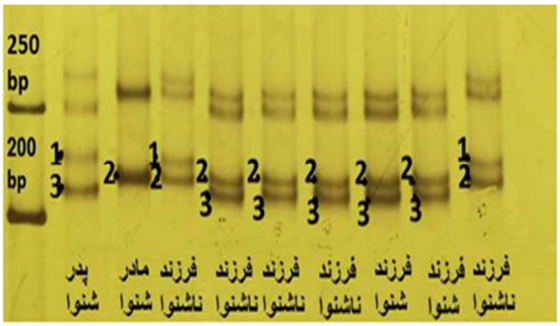
Proof Version

بعد از تکثیر قطعات مورد نظر به روش PCR، نمونه‌ها بر روی ژل پلی‌آکریل آمید (شرکت سازنده Merck آلمان، شرکت وارد کننده یاهو طب ایران) ۱۲-۸ درصد، با جریان ۴۰ میلی‌آمپر به مدت ۵-۴ ساعت الکتروفورز شد و سپس با نیترات نقره رنگ‌آمیزی و باندها مشاهده گردید. هموزیگوت بودن نشانگرها در افراد بیمار، نشانه‌ی وجود پیوستگی می‌باشد و در افراد سالم و آن‌هایی که پیوستگی نشان نمی‌دهند به صورت هتروزیگوت می‌باشد.

برای محاسبه‌ی SLink از FastSlink version 2.51 و برای محاسبه‌ی نمره‌ی LOD (LOD score) پارامتری دو نقطه‌ای و چند نقطه‌ای، به ترتیب از Superlink version 1.6 و Simwalk version 2.91 استفاده شد (۱۵). رسم هاپلوتایپ (مجموعه‌ی ژنوتیپ نشانگرهای مجاور) در مورد خانواده‌های مشکوک به پیوستگی با استفاده از نرم‌افزار Haplopainter version 2.95 صورت گرفت. این مرحله به منظور تأیید یا رد پیوستگی استفاده می‌شود (۱۶).

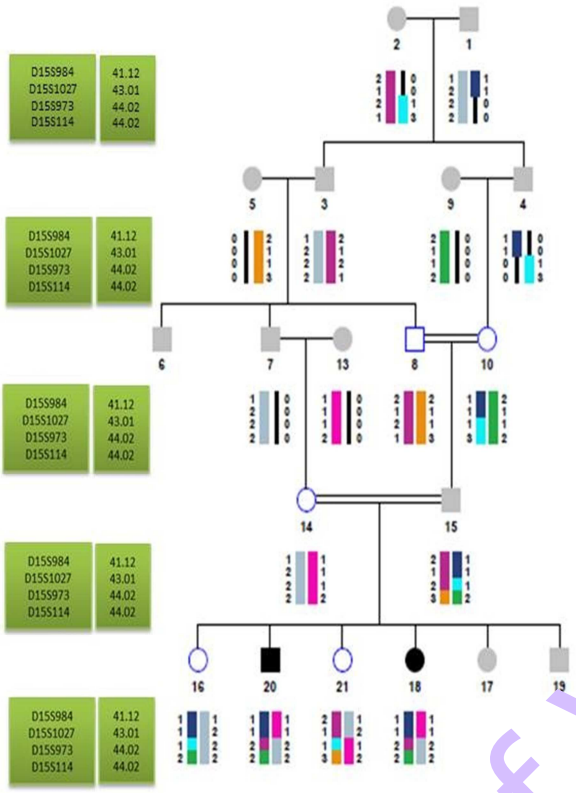
یافته‌ها

۹۰ درصد افراد مورد مطالعه در جمعیت مورد بررسی، ناشنوایی دو طرفه‌ی حسی- عصبی شدید تا عمیق داشتند. در ۸۰ درصد خانواده‌های مورد بررسی، سه نسل ازدواج خویشاوندی دیده شد. با توجه به داده‌های مرتبط با شجره‌نامه، غیر سندرمی بودن ناشنوایی و الگوی توارث مغلوب اتوزومی مورد تأیید بود. ارزش SLINK این خانواده‌ها بین ۷-۲ برآورد شده است. در ۶۰ خانواده‌ی مورد مطالعه، پس از بررسی الگوی نشانگرهای هر لوکوس و با تکرار دو بار یا بیشتر الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریل آمید برای خانواده‌های دارای ارزش SLINK بالاتر، پیوستگی رد شد (شکل ۱).



شکل ۱. نتیجه‌ی بررسی تکثیر نشانگر D15S984 بر روی ژل پلی‌آکریل آمید. شماره‌های ۱، ۲ و ۳ هر کدام بیانگر یک آلل است. افراد بیمار، الگوی هتروزیگوت (۱ و ۲ یا ۲ و ۳) را نشان دادند. در صورت پیوستگی، افراد سالم حامل ژن به صورت هتروزیگوت و تمام افراد بیمار به صورت هموزیگوت می‌باشند.

البته برخی نشانگرها الگوی پیوستگی نشان دادند، اما در نهایت، با رسم هاپلوتایپ همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود، الگوی پیوستگی به لوکوس‌های DFNB40 و DFNB48 تأیید نشد.



شکل ۲. هاپلوتایپ مربوط به عدم پیوستگی در یکی از خانواده‌های مورد بررسی. در صورت پیوستگی الگوی هاپلوتایپ بیماران باید به صورت دو آلل یکسان باشد. در این شجره‌نامه بیماران ۱۵، ۱۸ و ۲۰، هاپلوتایپ یکسان ندارند و پیوستگی به لوکوس DFNB48 رد می‌شود. نقشه‌ی ژنتیکی نشانگرها بر اساس مارشفیلد می‌باشد.

بحث

در این مطالعه، ۶۰ خانواده با حداقل دو فرد ناشنوا از استان‌های همدان، کهگیلویه و بویر احمد و چهار محال و بختیاری، از نظر پیوستگی به لوکوس‌های DFNB40 و DFNB48 بررسی شدند. هدف از انجام این مطالعه، تعیین شیوع این دو لوکوس در خانواده‌های مورد بررسی بود. در این مطالعه، هیچ یک از خانواده‌ها به لوکوس‌های مورد بررسی پیوستگی نشان ندادند.

لوکوس DFNB40، توسط دلمقانی و همکاران با بررسی ۴۰۰ نشانگر با نقشه‌کشی پیوستگی ABI Prism در یک خانواده‌ی ایرانی مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی کشف شد. سپس، چندین ژن موجود در ناحیه‌ی مورد نظر تعیین توالی شدند.

Proof Version

ژن عامل رونویسی TBX1 (ژنی که در سندرم دی‌جرج درگیر است و عامل نقص شنوایی در برخی از مبتلایان به این سندرم می‌باشد) در این خانواده بررسی شد؛ در اگزون‌های کد کننده‌ی این ژن، جهشی یافت نشد. همچنین، جهش‌های ژن DGCR6 (ژن ۶ منطقه‌ی اصلی سندرم دی‌جرج) که در گوش داخلی بیان می‌شود و ژن CRYBB1 (ژن B کریستالین B1) جستجو شدند و در نواحی کد کننده‌ی این ژن‌ها نیز جهشی یافت نشد. همچنین، ۷۴ خانواده‌ی مبتلا به ARSNHL توسط دلمقانی و همکاران تحت تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی لوکوس DFNB40 قرار گرفتند که موردی از پیوستگی در آنان یافت نشد (۱۱).

Riazuddin و همکاران طی مطالعه‌ای، ۴ جهش مختلف در ژن CIB2 یافتند. در ۵۴ خانواده‌ی پاکستانی با ARNSHL، یک جایگزینی c.272T>C هموزیگوت در ژن CIB2 شناسایی کردند که باعث جایگزینی ۹۱ آمین اسید [illegible] فنیل آلانین به سرین (F91S) در دنباله‌ی آمینواسیدی به [illegible] حفاظت شده در اولین دامین اتصالی EF-hand می‌شود. در ۲ خانواده‌ی ترکیه‌ای با ARNSHL، یک جایگزینی c.297C>G هموزیگوت در ژن CIB2 شناسایی شد که باعث جایگزینی ۹۹ آمین اسید آمینی سیستئین به تریپتوفان (C99W) در دنباله‌ی آمینواسیدی به شدت حفاظت شده می‌شود. ترانسفکشن ژن حامل جهش‌های F91S و C99W در سلول‌های COS-7 توانایی CIB2 را در کاهش رهاسازی کلسیم القا شده توسط Adenosine triphosphate (ATP) از سلول در مقایسه با نوع وحشی کاهش می‌دهد یا از بین می‌برد. در یک خانواده‌ی ترکیه‌ای با ARNSHL، یک جایگزینی c.368T>C هموزیگوت در ژن CIB2 شناسایی شد که باعث جایگزینی دنباله‌ی آمینواسیدی شماره‌ی ۱۲۳ یعنی ایزولوسین به ترئونین (I123T) در جایگاهی به شدت حفاظت شده در دامین اتصالی EF-hand دوم می‌شود. ترانسفکشن ژن حاوی جهش 1123T، توانایی CIB2 را در کاهش رهاسازی کلسیم القا شده توسط ATP از سلول، در مقایسه با نوع وحشی، افزایش می‌دهد. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که جهش‌ها روی اتصال به کلسیم CIB2 یا فعالیت بافری آن تأثیر می‌گذارد و نشان می‌دهد که فقدان این ژن، موجب نقص در تنظیم کلسیم می‌شود (۱۳).

در یک خانواده‌ی خویشاوند بزرگ با سندرم آشر نوع IJ از ترکیه که توسط Ahmed و همکاران به عنوان خانواده‌ی PKDF117 گزارش شده بود (۱۷)، یک جایگزینی c.192G>C هموزیگوت در ژن CIB2 مشاهده شد که باعث جایگزینی ۶۴ آمین اسید آمینه یعنی گلوتامات به آسپارتات (E64D) در باقی‌مانده‌ی به شدت حفاظت شده می‌شد. ترانسفکشن جهش در سلول‌های COS-7 توانایی CIB2 را در کاهش رهاسازی کلسیم القا شده توسط ATP از سلول در مقایسه با نوع وحشی به شدت کاهش داد (۱۳).

به طور خلاصه، در مطالعه‌ی حاضر، هیچ یک از دو لوکوس DFNB40 و DFNB48 در خانواده‌های مورد بررسی پیوستگی نشان ندادند. با توجه به این که تا کنون در ایران و سایر نقاط جهان درباره‌ی این دو لوکوس مطالعات اندکی صورت گرفته است، بررسی بیشتر این لوکوس‌ها در جمعیت‌هایی با منشأ نژادی و جغرافیایی متفاوت ضروری به نظر می‌رسد تا بتوان نقش این لوکوس‌ها را در ایجاد ناشنوایی تعیین کرد. از آن جایی که ژن مربوط در لوکوس DFNB40 تا به امروز شناسایی نشده است، مطالعات بیشتر جهت کشف این ژن نیاز است. از طرف دیگر، با توجه به نقش لوکوس DFNB48 در ARNSHL و همچنین در سندرم آشر، این لوکوس می‌تواند گزینه‌ی مناسبی برای پژوهش در هر دو بیماری باشد. چنین مطالعاتی می‌توانند به طور چشمگیری در پیشرفت غربالگری ناشنوایی در جمعیت‌های ایرانی و در ادامه‌ی مشاوره‌ی ژنتیک اصولی سهیم باشند.

نتیجه‌گیری نهایی این که احتمال می‌رود لوکوس‌های DFNB40 و DFNB48 نقش کمی در ایجاد ناشنوایی در جمعیت‌های نواحی بر[illegible] داشته باشند و دلیل اصلی ناشنوایی در جمعیت مورد مطالعه [illegible] می‌توانند مربوط به سایر لوکوس‌های درگیر در ناشنوایی باشد. با این حال، برای تعیین نقش دقیق‌تر این لوکوس‌ها در کشورمان به مطالعات و تعداد [illegible] بیشتری نیاز است.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از نتایج پایان‌نامه‌ی اعظم پوراحمدیان با شماره گرنت ۱۴۹۷ می‌باشد. از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، 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 به عمل می‌آید. همچنین، از بیماران ناشنوا و خانواده‌های ایشان که در انجام این پژوهش همکاری نمودند قدردانی می‌گردد.

Proof Version

References

1. Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening--a silent revolution. N Engl J Med 2006; 354(20): 2151-64.
2. Schrijver I. Hereditary non-syndromic sensorineural hearing loss: transforming silence to sound. J Mol Diagn 2004; 6(4): 275-84.
3. Van Laer L, Cryns K, Smith RJ, Van Camp G. Nonsyndromic hearing loss. Ear Hear 2003; 24(4): 275-88.
4. Brownstein Z, Avraham KB. Deafness genes in Israel: Implications for diagnostics in the clinic. Pediatr Res 2009; 66(2): 128-34.
5. Kochhar A, Hildebrand MS, Smith RJ. Clinical aspects of hereditary hearing loss. Genet Med 2007; 9(7): 393-408.
6. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. Ann N Y Acad Sci 1991; 630: 16-31.
7. Imtiaz F, Taibah K, Ramzan K, Bin-Khamis G, Kennedy S, Al-Mubarak B, et al. A comprehensive introduction to the genetic basis of non-syndromic hearing loss in the Saudi Arabian population. BMC Med Genet 2011; 12: 91.
8. Saadat M, Ansari-Lari M, Farhud DD. Consanguineous marriage in Iran. Ann Hum Biol 2004; 31(2): 263-9.
9. 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.
10. 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.
11. Delmaghani S, Aghaie A, Compain-Nouaille S, Ataie A, Lemainque A, Zeinali S, et al. DFNB40, a recessive form of sensorineural hearing loss, maps to chromosome 22q11.21-12.1. Eur J Hum Genet 2003; 11(10): 816-8.
12. Ahmad J, Khan SN, Khan SY, Ramzan K, Riazuddin S, Ahmed ZM, et al. DFNB48, a new nonsyndromic recessive deafness locus, maps to chromosome 15q23-q25.1. Hum Genet 2005; 116(5): 407-12.
13. Riazuddin S, Belyantseva IA, Giese AP, Lee K, Indzhykulian AA, Nandamuri SP, et al. Alterations of the CIB2 calcium- and integrin-binding protein cause Usher syndrome type 1J and nonsyndromic deafness DFNB48. Nat Genet 2012; 44(11): 1265-71.
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-
16. 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.
17. Ahmed ZM, Riazuddin S, Khan SN, Friedman PL, Riazuddin S, Friedman TB. USH1H, a novel locus for type I Usher syndrome, maps to chromosome 15q22-23. Clin Genet 2009; 75(1): 86-91.

Proof Version

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 34, No. 374, 2nd Week, May 2016

Received: 29.12.2015

Accepted: 03.04.2016

Genetic Linkage Analysis of DFNB40 and DFNB48 loci in Families with Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss (ARNSHL) from Western Provinces of Iran

Azam Pourahmadiyan[1], Mohammad Amin Tabatabaiefar[2], Somayeh Reiisi[3], Paria Alipour[1], Najmeh Fattahi[1], Morteza Hashemzadeh-Chaleshtori[4]

Original Article

Abstract

Background: Sensorineural hearing loss (SNHL) is the most common sensory disorder and 1 in every 500-1000 newborns is affected. Non-syndromic SNHL accounts for 70% of hereditary hearing loss and 80% of SNHL cases have an autosomal recessive mode of inheritance (ARNSHL). The Purpose of the recent study is genetic linkage analysis to determine the prevalence of DFNB40 and DFNB48 loci in studying families with ARNSHL from the western provinces of Iran.

Methods: In this study, 60 families from 3 provinces of Iran involving Hamedan, Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad and Chaharmahal and Bakhtiari with autosomal recessive non syndromic hearing loss were examined. The selected families in this study were consanguineous and had at least two patients. They also were negative for GJB2 mutations. Linkage analysis was performed by using 6 markers short tandem repeat (STR) for the DFNB40 locus and 7 markers STR for the DFNB48 locus.

Findings: After examining different families, it was revealed that none of them showed linkage to the DFNB40 and DFNB48 loci.

Conclusion: The recent study suggests that DFNB40 and DFNB48 loci might not play an important role in causing hearing loss in the mentioned provinces. However, further studies are necessary to determine more precisely the role of these loci in the Iranian population.

Keywords: DFNB40 locus, DFNB48 locus, Autosomal recessive non-syndromic hearing loss

Citation: Pourahmadiyan A, Tabatabaiefar MA, Reiisi S, Alipour P, Fattahi N, Hashemzadeh-Chaleshtori M. **Genetic Linkage Analysis of DFNB40 and DFNB48 loci in Families with Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss (ARNSHL) from Western Provinces of Iran.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(374): 214-20

Proof Version

1- MS Student, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
2- Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Assistant Professor, Department of Genetics, School of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
4- Professor, Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
Corresponding Author: Morteza Hashemzadeh-Chaleshtori, Email: mchalesh@yahoo.com