

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

شهربانو پرجمی برجوئی^۱، سمیه رئیسی^۲، فاطمه رضائیان^۳، فاطمه هیبیتی^۴، دکتر مرتضی هاشم‌زاده چالشتی^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

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

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

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

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

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

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

۱- کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری، تهران، ایران

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۴- استاد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

Email: mchalesh@yahoo.com

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مرتضی هاشم‌زاده چالشتی

مقدمه

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

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

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

طی تجزیه و تحلیل پیوستگی سراسری ژنومی بر روی ۳۷ شجره از خانواده‌های غیر خویشاوند از نقاط

مختلف ایران، که توسط طباطبایی فر و همکاران صورت گرفته است، ضمن تأیید نتایج دیگر مطالعات انجام شده، یک دید کلی نسبت به فراوان‌ترین لوکوس‌های دخیل در بیماران ARNSHL ایرانی ارائه گردیده است که می‌تواند برای پژوهش و بالین مفید باشد. اولویت‌های ارائه شده توسط این مطالعه به ترتیب (از راست به چپ) DFNB۱، DFNB۴، DFNB۲، DFNB۲۱، DFNB۷/۱۱، DFNB۶۳ و DFNB۲ می‌باشند (۸).

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

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

اجرای مراحل PCR (Polymerase chain reaction)، اولین مرحله طراحی پرایمر با کیفیت و دقت مطلوب با استفاده از نرم‌افزارهای موجود است. در مطالعه‌ی حاضر، پرایمرهای مورد استفاده بر اساس توالی مربوط به ژن LRTOMT از پایگاه اطلاعاتی UCSC برای اگزون‌های ۱، ۲، ۳، ۵ و ۸ ژن کد کننده‌ی LRTOM با استفاده از نرم‌افزار Primer³ Online طراحی شدند (جدول ۱).

در مطالعه‌ی حاضر، برای تکثیر نواحی مورد نظر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Astec, PC118 Japan) در حجم ۲۵ µl انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ µl بافر (10 X)، PCR، ۱/۵ µl از MgCl₂ (۵۰ mM)، ۰/۵ µl از مخلوط DNTP (Deoxyribonucleotide) (۱۰ mM)، ۰/۲ µl از هر کدام از پرایمرها (۵۰ PM)، ۱۰۰ ng از DNA ژنومی (۱/۵ µl) و در نهایت ۰/۵ U از آنزیم Taq پلیمرز (۵ U/µl) تهیه گردید (تمامی مواد مصرف شده از شرکت سیناژن ایران تهیه شدند).

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

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

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

روش‌ها

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

از هر فرد به میزان ۵ ml خون وریدی دریافت و داخل لوله‌ی آزمایش حاوی EDTA ۱۲ µl (Ethylenediaminetetraacetic acid) ۰/۵ M ریخته شد. نمونه‌های خون تا زمان شروع استخراج در دمای ۲۰ °C - نگهداری شدند. DNA ژنومی با استفاده از پروتکل استاندارد فنل - کلروفرم استخراج گردید (۷، ۱۳). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری (اسپکتروفتومتر Unico ۲۱۰۰ USA) مورد بررسی قرار گرفت. در

واکنش‌های SSCP و هترو دوپلکس مورد استفاده قرار گرفتند. این روش برای غربالگری تغییرات موجود در توالی استفاده شد. این روش به صورت همزمان با روش هترو دوپلکس به کار رفت. نتایج ژل‌گذاری هیچ گونه تفاوت باندی را در نمونه‌های مورد مطالعه‌ی اگزون‌های ۱، ۳، ۵ و ۸ روی ژل نشان نداد. لازم به ذکر است که در اگزون ۳ این ژن (تغییر در باندهای SSCP)، نمونه‌ی مشکوک (تغییر در ۵ نمونه) مشاهده گردید. پس از تعیین توالی این نمونه‌ها تغییر در آن‌ها تأیید نشد. بر اساس بررسی‌های انجام شده در این مطالعه، در هیچ یک از اگزون‌های مورد مطالعه‌ی ژن LRTOMT، جهش و یا تغییری مشاهده نشد.

به منظور مشاهده‌ی باندهای DNA حاصل، از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد (۶). سپس واکنش‌های PCR-HA (PCR- heteroduplex) و PCR-SSCP (PCR- single strand conformation polymorphism) با استفاده از محصول PCR بر اساس روش Nataraj و همکاران صورت گرفت (۹-۱۰). نمونه‌های دارای باند متفاوت بر روی ژل الکتروفورز SSCP و هترو دوپلکس برای تأیید نهایی تعیین توالی گردید. واکنش تعیین توالی با استفاده از سیستم XL ۳۷۳۰ (ABI (Capillary System) انجام شد.

یافته‌ها

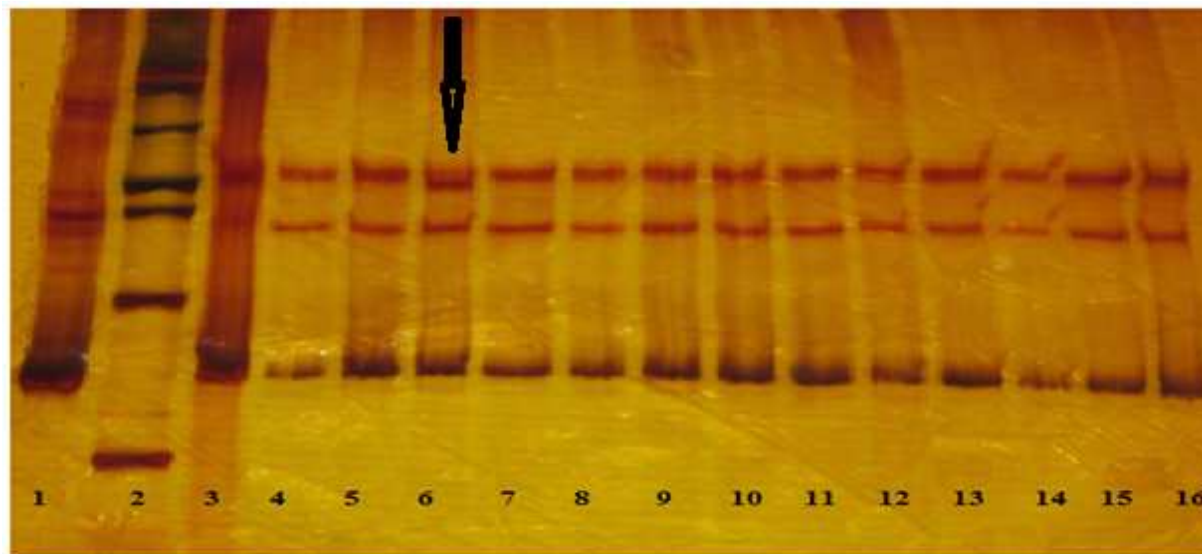
محصولات PCR تکثیر شده در مرحله‌ی قبل، برای

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

نام اگزون	اندازه‌ی قطعه (bp)	نوع پرایمر	توالی پرایمر (۳→۵)
E1	۱۹۶	F	GAAAGCAGTTGCCATGGAGT
		R	GTGGGGGAAATCTCAGATCC
		FM*	GAAAGCAGTTGACATGGAGT
E3a	۲۴۸	F	GCAAGGATGCAAGGAAGAGT
		R	GCTCCTGTACCGAAGTGTTT
		RM*	GCTCCTGTACCGAAGGGTTC
E3b	۲۵۹	F	GCACCTTTGAATGATGGCCT
		R	ACTCTCCCCTACCCTCCAAA
		FM*	GCACCTTTGAATGATTGCCT
E5a	۲۷۰	F	AGTATGGCTGTGGAGGGTTG
		R	TTCTCCATGGGGTTCAT
		RM*	TTCTCCATGGGGTACCAT
E5b	۲۷۷	F	GTGAATAAGCTGGCTGTCCT
		R	CAAGGAATGGAGGGACTTGA
		FM*	GTGAATAAGCTGGCGGTCT
E8a	۲۶۴	F	AGGATAATAATTGCTACTGGCAAAA
		R	GTGAGCACGTAGCTGAAG
		RM*	GTGAGCACGTAGCGGAAG
E8b	۲۶۲	F	GGCCTACTTCCGATTGCTG
		R	ATCCCAAATATTCCTTCACTGTCT
		FM*	GGCACTACTTCCGATGGCTG

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

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



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

۱: نمونه‌ی شاهد مثبت که دارای نوکلئوتید تغییر یافته می‌باشد، ۲: DNA نشانگر ۱۰۰ bp، ۳: نمونه‌ی دارای باند متغیر، سایر باندها: نمونه‌های افراد ناشنوا می‌باشند که تغییر الگوی باندی در آن‌ها دیده نمی‌شود.

برای چارچوب LRTOMT^۱ و پروتئین(های) بیان شده، می‌توانست حایز اهمیت باشد (۱۱).

DU و همکاران ژن LRTOMT را در ۱۹۲ فرزند ناشنوای ارثی غیر مرتبط ایرانی آنالیز کردند و هموزیگوسیتی را برای یک جهش بی‌معنی در اگزون شماره‌ی ۳ در یک خانواده (۶۱۲۴۱۴،۰۰۰۵) و یک جهش هموزیگوت از نوع دگرمعنی (Missense) در اگزون شماره‌ی ۲ در خانواده‌ی دیگر، شناسایی کردند. البته دو تغییر هتروزیگوت در این ژن نیز توسط ایشان در این مطالعه گزارش شد (۱۲).

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

بحث

بر اساس نتایج مشاهده شده در این مطالعه، جهش‌های احتمالی اگزون‌های ۱، ۳، ۵ و ۸ ژن LRTOMT در ایجاد ناشنوایی در ناشنوایان غیر سندرومی تک‌گیر استان هرمزگان که مورد بررسی قرار گرفتند، تأثیر چندانی ندارند. Ahmed و همکاران طی مطالعه‌ای در اعضای تحت تأثیر واقع شده‌ی ۴ خانواده‌ی غیر مرتبط مبتلا به ناشنوایی مغلوب اتوزومی DFNB۶۳ چهار جهش هموزیگوت مختلف در اگزون‌های ۳ و ۸ را در ژن LRTOMT (۶۱۲۴۱۴،۰۰۰۴-۶۱۲۴۱۴،۰۰۰۱) شناسایی کردند. منشأ این خانواده‌ها ترکیه، تونس و پاکستان بود. در ادامه ایشان پیشنهاد بررسی این دو اگزون و ناحیه‌ی UTR^{۳'} در جمعیت‌های دیگر را عنوان کرده بودند. با توجه به عقیده‌ی Ahmed و همکاران، ناحیه‌ی UTR^{۳'} با در نظر گرفتن نوع قالب خوانده شدن

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

تشکر و قدردانی

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

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

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

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

References

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

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

Screening LRTOMT Gene (DFNB63 locus) in Patients with Recessive Nonsyndromic Hearing Loss in Hormozgan Province by Using SSCP-PCR, HA-PCR and DNA Sequencing

Shahrbanoo Parchami-Barjui MSc¹, Somayeh Reisi MSc², Fatemeh Rezaiean³,
Fatemeh Heybati³, Morteza Hashemzadeh-Chaleshtori PhD⁴

Original Article

Abstract

Background: The most common sensory disorder congenital deafness is modern societies. Syndrome and non-syndromic genetic deafness in two modes can be seen. Non-deafness syndrome with autosomal recessive non-syndromic inheritance hearing loss (ARNSHL) is the most common form of inheritance hearing loss. So far mapping it 95 loci that of the 41 regions of deafness genes have been identified. Despite numerous studies in this field, since for DFNB63 (gene LRTOMT) few studies have been conducted. Thus, the locus mutations can help us to better understand the genes involved in deafn.

Methods: In this research were studied 90 cases of deafness of Hormozgan province. DNA extracted by phenol-chloroform method. PCR was performed, After using the PCR product was performed SSCP and HA methods. Samples that have had different bands were sequenced to determine the nucleotide changes.

Findings: In this study in different exons 8 samples (each in a specific exon) In order to determine the type of change that shift SSCP bands were sequenced, resulting in no change in nucleotide sequencing of exons in any of the groups.

Conclusion: In this research was used the PCR-SSCP and HA – PCR techniques that they are a low error probability. The results showed no relationship between non-syndromic deafness and LRTOMT gene mutations. Because that these gene have been discovered in recent years, so much research has been don' t in relation to it. So far, Only 5 mutation of this gene have been identified in the world that can determine pale relationship the gene and deafness disease.

Keywords: Mutation, PCR-HA, PCR-SSCP, LRTOMT

Citation: Parchami-Barjui S, Reisi S, Rezaiean F, Heybati F, Hashemzadeh-Chaleshtori M. **Screening LRTOMT Gene (DFNB63 locus) in Patients with Recessive Nonsyndromic Hearing Loss in Hormozgan Province by Using SSCP-PCR, HA-PCR and DNA Sequencing.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(298): ??.

1- Department of Biotechnology, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

2- PhD Student, Department of Genetics, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

3- MSc Student, Department of Genetics, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

4- Professor, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

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