

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۸، شماره ۶/ بهمن و اسفند ۱۳۹۵/ ۶-۱۷

**مقاله پژوهشی****بررسی پیوستگی ژنتیکی لوکوس‌های DFNB98 و DFNB48 در خانواده‌هایی با ناشنوایی غیرسندرومی مغلوب اتوزومی از استان خوزستان**افسانه تقی‌پور ششده<sup>۱</sup>، محمد امین طباطبایی فر<sup>۲</sup>، فاطمه نعمتی‌زرگران<sup>۱</sup>، فهیمه مرادی<sup>۳</sup>، نرگس زارع‌پور<sup>۱</sup>، مرتضی هاشم زاده چالشتری<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>مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ <sup>۴</sup>گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۵

**چکیده:**

**زمینه و هدف:** ناشنوایی اختلالی حسی-عصبی و از شایع‌ترین نقایص مادرزادی است که بروز آن برابر یک در ۵۰۰ نوزاد می‌باشد. ناشنوایی یک اختلال بسیار ناهمگن است و نیمی از موارد ناشنوایی با علل ژنتیکی مرتبط است؛ علل محیطی و ناشناخته مسئول باقیمانده می‌باشند. نوع غیرسندرومی حدود ۷۰٪ موارد ناشنوایی را شکل می‌دهد. الگوی وراثت نزدیک به ۸۰٪ این نوع ناشنوایی به صورت مغلوب اتوزومی است. جمعیت ایرانی به دلیل نرخ بالای ازدواج خویشاوندی منبع ژنتیکی باارزشی را جهت مطالعه این نوع ناشنوایی فراهم می‌آورد. در این مطالعه پیوستگی ژنتیکی لوکوس‌های DFNB48 (CIB2) و DFNB98 (TSPEAR) در ناشنوایی خانواده‌های ناشنوای غیرسندرومی مغلوب اتوزومی در استان خوزستان بررسی شده است.

**روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی ۳۰۰ فرد از ۲۵ خانواده جهت تعیین نوع و شیوع جهش‌های دو لوکوس DFNB98 و DFNB48 در استان خوزستان بررسی شد. انتخاب خانواده‌ها دارای معیارهایی بود. خانواده‌های دارای والدین سالم، ازدواج خویشاوندی، وجود حداقل ۲ فرد ناشنوا در خانواده و همچنین منفی بودن جهش GJB2 انتخاب شدند. ۳ خانواده که برای جهش در GJB2 مثبت تشخیص داده شدند از مطالعه خارج شدند. آنالیز پیوستگی برای ۲۲ خانواده با استفاده از ۶ نشانگر STR داخلی یا نزدیک به این دو لوکوس انجام شد.

**یافته‌ها:** هیچ یک از خانواده‌های بررسی شده با آنالیز پیوستگی به لوکوس‌های DFNB48 و DFNB98 پیوستگی نشان نداد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتیجه این مطالعه به نظر می‌رسد جهش‌های ژن CIB2 و ژن TSPEAR اهمیت چندانی در بروز ناشنوایی در استان خوزستان ندارد.

**واژه‌های کلیدی:** DFNB98، DFNB48، ناشنوایی غیرسندرومی مغلوب اتوزومی، بررسی پیوستگی ژنتیکی

**مقدمه:**

ناشنوایی حسی-عصبی اختلالی پیچیده و شایع‌ترین نقص مادرزادی است که با میانگین ۱ در ۵۰۰ نوزاد رخ می‌دهد (۲،۱). مطابق با بررسی‌ها بیش از ۳۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان از این اختلال رنج می‌برند (۳). با پیشرفت بهداشت عمومی، سهم نسبی ژنتیک در ناشنوایی افزایش یافته است. ژنتیک به تنهایی مسئول ۵۰٪ همه ناشنوایی‌ها می‌باشد (۴).

ناشنوایی دوسویه در کودکان سبب نقایص ادراکی در نواحی مرکزی وابسته به شنوایی شده که سبب تأخیر در تکوین و توسعه تکلم، ضعف مهارت‌های زبانی و

ناشنوایی حسی-عصبی اختلالی پیچیده و شایع‌ترین نقص مادرزادی است که با میانگین ۱ در ۵۰۰ نوزاد رخ می‌دهد (۲،۱). مطابق با بررسی‌ها بیش از ۳۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان از این اختلال رنج می‌برند (۳). با پیشرفت بهداشت عمومی، سهم نسبی ژنتیک در ناشنوایی افزایش یافته است. ژنتیک به تنهایی مسئول ۵۰٪ همه ناشنوایی‌ها می‌باشد (۴).

\*نویسنده مسئول: شهرکرد- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد- گروه ژنتیک پزشکی- تلفن: ۰۳۸-۳۳۳۴۶۶۹۲، E-mail: mchalesh@yahoo.com

ژنتیک مناسب و اصولی و به دنبال آن کاهش نسبی سهم ژنتیک در این اختلال را خواهد داشت (۱۶).

ژن *TSPEAR* واقع در لوکوس DFNB98 توسط Scheel و همکاران بر روی کروموزوم ۲۱ نقشه‌یابی شد (۱۷). دلمقانی در مطالعه خود بر روی خانواده‌های ناشنوای ایرانی یک خانواده ایرانی با ۶ نسل ازدواج خویشاوندی را بررسی کرد که در آن ۳ برادر حاصل ازدواج عموزاده‌های درجه یک، ناشنوایی حسی-عصبی غیرسندرومی پیش از تکلم داشتند. دلمقانی برای این خانواده آنالیز پیوستگی سراسر ژنومی که با نقشه‌کشی هموزیگوسیتی و آنالیز SNP و ترسیم هاپلوتیپ دنبال شد، تهیه کرد. وی یک ناحیه ۸-۴ مگا بازی را روی کروموزوم ۲۱ (21q22.3-qter) تشخیص داد.

توالی‌یابی کل آگروم بین نوکلئوتیدهای موقعیت ۴۳،۳۶۲،۳۲۴ و ۴۸۸۴،۷۴۷ دو واریانت همسایه را در ژن *TSPEAR* آشکار کرد. این دو واریانت به این قرار بودند؛  $1726G>T$  و  $1728delC$ . در این خانواده ۳ برادر بیمار برای این دو واریانت هموزیگوس و والدین و خواهران سالم آن‌ها هتروزیگوس بودند. آنالیز ژن *TSPEAR* در ۵۵ خانواده بزرگ ایرانی دیگر با افراد ناشنوا هیچ جهش دیگری را آشکار نکرد. دلمقانی و همکاران با استفاده از نشاندار کردن ایمونوفلورسنس در حلزونی موش مشاهده کردند که نشاندار کردن *TSPEAR* فقط به سلول‌های مویی حسی در اندام کورتی محدود می‌شود، به ویژه در قاعده دستجات سلول‌های مویی خارجی و داخلی. این نشاندار کردن در غیاب نفوذپذیر کردن سلول صورت گرفت که بیانگر ترشحی بودن پروتئین *TSPEAR* است (۱۸). *TSPEAR* دارای ۴ رونوشت است که حاصل پیرایش متناوب است.

واریانت ۱ آن دارای ۱۲ آگرون است و یک پروتئین ۶۹۹ اسید آمینه‌ای کد می‌کند (۱۷). آنالیز ایمونوسیتوفلورسنس سلول‌های ترانسفکت شده COS-7 نشان داد که *TSPEAR* جهش یافته تنها به شبکه اندوپلاسمی نزدیک هسته محدود می‌شود که نمایانگر انتقال درون سلولی غیرطبیعی شکل دم بریده پروتئین است (۱۸).

نقص در رفتارهای فیزیکی و ذهنی می‌شود (۵). ناشنوایی از نظر شدت به انواع عمیق، شدید تا خفیف و بر اساس حضور یا عدم حضور تظاهرات بالینی مرتبط، ناشنوایی به دو دسته سندرومی و غیر سندرومی تقسیم می‌شود (۷،۶).

نزدیک به ۷۰٪ موارد ناشنوایی غیرسندرومی است و از این میزان ۸۰٪ به شکل مغلوب اتوزومی می‌باشد (۸-۱۱). بیش از ۱٪ کل ژن‌های انسان در ناشنوایی نقش دارند. نقص ناشنوایی به شدت ناهمگن است؛ تاکنون بیش از ۱۲۰ لوکوس برای این نقص شناخته شده است. بیش از ۴۰ ژن برای فرم مغلوب ناشنوایی غیرسندرومی (DFNB) و نزدیک به ۲۷ ژن برای نقص ناشنوایی به فرم غالب (DFNA) تشخیص داده شده است (۷).

ناشنوایی غیرسندرومی مغلوب اتوزوم شدیدترین فوتیپ را نشان می‌دهد و شایع‌ترین نوع ناشنوایی می‌باشد (۱۲). به طور واضح ناشنوایی نیز همانند سایر صفات مندلی مغلوب در جوامعی با ازدواج خویشاوندی بالاتر، فراوان‌تر خواهد بود. در جمعیت‌های مختلف سراسر دنیا *GJB2* با فراوانی متفاوت مهم‌ترین عامل شناخته شده برای ARNSHL می‌باشد (۱۴،۱۳،۸).

با توجه به این موضوع که بیشتر مطالعات ناشنوایی در ایران روی ژن‌های شناخته شده مانند *GJB2* تمرکز داشته و مطالعات کمتری روی سایر ژن‌های مستعد صورت گرفته و در نظر داشتن این موضوع که ژن *GJB2* مسئول تنها ۱۸/۳٪ از ناشنوایی‌های خانواده‌های ایرانی می‌باشد بررسی سایر ژن‌های کمتر مطالعه شده ضرورت خواهد داشت. جمعیت ایرانی به دلیل میزان ازدواج خویشاوندی نسبتاً بالا زمینه مناسبی را جهت مطالعه این نوع ناشنوایی فراهم می‌آورد (۱۵،۱۲).

از آن‌جا که ناشنوایی غیرسندرومی مغلوب اتوزوم یک نقص به شدت هتروژن است، یافتن جهش ژن مسئول این نقص در هر خانواده خود چالش بسیار بزرگی است که نیاز به کار آزمایشگاهی بسیاری دارد. از سوی دیگر این نقص شایع‌ترین نقص مادرزادی بوده لذا مطالعه این اختلال و تلاش در جهت تشخیص دلیل ناشنوایی جمعیت‌های مختلف نقش به‌سزایی در ارتقای کیفیت یک مشاوره

پراکندگی در جمعیت‌های ناشنای ایرانی گزینه‌های مناسبی جهت مطالعه‌اند.

بهره‌گیری از تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی (GLA) و نقشه‌کشی هموزیگوسیتی که در آن از نشانگرهای چند شکل (Polymorphic) استفاده می‌شود، اساس این مطالعه بود. در این روش از تکرارهای پشت سرهم کوتاه (STR) برای بررسی پیوستگی استفاده شد. STRها، واحدهای تکراری ۲ تا ۷ نوکلئوتیدی هستند که در سراسر ژنوم پراکنده شده‌اند. نشانگرهای مذکور بسیار چندشکل بوده و غالباً تعداد آلل‌های هر جایگاه به ۵ تا ۱۰ عدد می‌رسد. بین آلل‌های مختلف رابطه هم بارز می‌باشد. STRها، در طول ژنوم دارای توزیع یکنواختی بوده و به راحتی توسط PCR و الکتروفورز قابل بررسی‌اند (۲۲). در مطالعه حاضر بررسی پیوستگی و بررسی هاپلوتیپ نشانگرهای STR که در ناحیه لوکوس‌های (CIB2) (DFNB48) و (TSPEAR) (DFNB98) قرار دارند در خانواده‌های خوزستانی با نقص ARNSHL، انجام گرفت.

### روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی تعداد ۲۵ خانواده با حداقل دو فرد ناشنوا، والدین سالم و دارای ازدواج خویشاوندی در خانواده، از میان مراجعه‌کنندگان به مراکز بهزیستی شهرستان‌های استان خوزستان انتخاب شدند. افراد انتخاب شده برای نمونه‌گیری، مبتلا به ناشنوایی غیرسندرومی با علت ژنتیکی بودند و افراد دارای علل غیر ژنتیکی و یا نشانه‌های سندرومی از مطالعه حذف شدند. ناشنوایی در این افراد به صورت پیش از تکلم و غیرپیشرونده بود. در این راستا، تمامی افراد ناشنوا برای ریخت شناسی ظاهری گوش، خصوصیات بد ریختی (Dysmorphic) چهره، ناهنجاری اندام‌های حرکتی و عقب‌افتادگی ذهنی بررسی و موارد مثبت از مطالعه خارج شدند. از کلیه افراد ناشنوا ادیوگرام تهیه گردید و ناشنوایی توسط متخصص تأیید شد. پس از اخذ رضایت‌نامه

احمد با آنالیز پیوستگی در ۵ خانواده بزرگ پاکستانی با ناشنوایی غیرسندرومی مغلوب اتوزومی دوسویه عمیق، لوکوس DFNB48 را به عنوان لوکوس دخیل در ناشنوایی غیرسندرومی کشف کرد. وی لوکوس این صفت را روی کروموزوم ۱۵ (15q23-q25.1) نقشه‌یابی نمود (۱۹). احمد و همکاران ژن TLE3 را درون لوکوس DFNB48 توالی‌یابی کردند؛ اما هیچ آلل بیماری‌زایی را در آن تشخیص ندادند (۲۰). ریاض‌الدین و همکاران یک جهش هموزیگوس در ژن CIB2 را به شکل F91S در افراد بیمار ۵۴ خانواده پاکستانی با ناشنوایی مغلوب اتوزوم ۴۸ تشخیص دادند. آنالیز هاپلوتیپ وجود یک اثر بنیان‌گذار را نشان داد. دو جهش هموزیگوس دیگر I123T و C99W هم در خانواده‌های دیگر مشخص شد.

ژن CIB2 پروتئینی کد می‌کند که به خانواده پروتئین‌های متصل به کلسیم و اینترگرین شامل ۳ یا ۴ دومین EF-hand تعلق دارد. CIB2 نقش‌های حفاظت شده‌ای در پایداری کلسیم دارد (۲۱).

CIB2 دارای ۱۶ اگزون است که ۳ ایزوفرم مختلف را کد می‌کند و دارای اثر مهارکننده بر پاسخ‌های کلسیم است. CIB2 با مولتی‌مر ویرلین و میوزین VIIa میان‌کنش دارد. این دو پروتئین در سندروم Usher درگیرند.

این جهش‌ها دارای اثر بر فعالیت بافری یا اتصال به کلسیم CIB2 هستند و فقدان این ژن سبب نقایصی در تنظیم کلسیم می‌گردد.

ریاض‌الدین و همکاران تخمین زدند که جهش‌های CIB2 دلیل ۷/۲۵٪ ناشنوایی مغلوب اتوزومی خانواده‌های پاکستانی است.

۴ نوع جهش در این ژن شناسایی شده که ۳ جهش ذکر شده سبب بروز ناشنوایی غیرسندرومی مغلوب اتوزوم ۴۸ شده و جهش E64D سندروم Usher را سبب می‌شود (۲۱).

این دو لوکوس به دلیل ویژگی‌های خاص و نقش شان در روند شنوایی و همچنین عدم مطالعه

پایگاه داده‌ی NCBI genome browser Map viewer جهت انتخاب STRهای مناسب برای لوکوس‌های مورد نظر در اولویت بود. همچنین پایگاه داده‌ی UCSC در روند انتخاب نشانگر مناسب سودمند واقع شد. انتخاب پرایمرهای لازم جهت تکثیر STRهای انتخاب شده، از طریق پایگاه داده NCBI UniSTS انجام شد. در این روند نشانگرهایی انتخاب شدند که درون ژنی بوده و یا نسبت به سایرین فاصله کمتری از ژن داشتند. درجه‌ی چندشکلی بالا، دامنه و طول محصول PCR برای یک نشانگر معین و همچنین هتروزیگوت بودن پدر و مادر برای آن نشانگر از جمله معیارهای انتخاب این نشانگرهای دارای واحدهای تکراری دو نوکلئوتیدی بود. مشخصات مربوط به هر نشانگر و اطلاعات هر کدام جهت تکثیر در جداول شماره ۱ و ۲ آورده شده است.

آگاهانه از تمامی افراد در دسترس شجره‌نامه، به میزان ۵ میلی‌لیتر خون در لوله‌های حاوی ۰/۵ مولار EDTA نمونه‌برداری شد (در صورت نوزاد بودن فرد ناشنوا تنها ۱ میلی‌لیتر نمونه خون گرفته شد). نمونه‌ها پیش از استخراج در دمای ۲۰- نگه‌داری شدند. استخراج DNA از این نمونه‌ها با استفاده از روش استاندارد فنل - کلروفرم که برای هر نمونه روندی ۳ روزه دارد، انجام گرفت. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از نانودراپ بررسی و توسط ژل آگارز تأیید شد (۲۳). نمونه‌ها برای جهش در ژن *GJB2* بررسی شدند و پس از این که ۳ خانواده از نظر جهش در *GJB2* مثبت شدند، این ۳ خانواده از مطالعه خارج و ۲۲ خانوادگی که از نظر جهش در این ژن منفی بودند در مطالعه باقی ماندند.

**جدول شماره ۱: نشانگرهای مورد استفاده برای لوکوس‌های DFNB48 و DFNB98**

توالی پرایمر	طول محصول PCR	دمای اتصال	نشانگر	لوکوس
F:GCAGCAGCATCAACATTC R:GAAGAGATGTTGAACCTTCACTG	۱۹۴-۲۰۴	۵۷	D21S1261	DFNB98 ( <i>TSPEAR</i> )
F: GATCAAGTTAAGAGGAGGCT R: GTGGGCTGCTGCTATCTTTG	۲۰۰-۲۰۴	۶۰	D21S171	DFNB98 ( <i>TSPEAR</i> ) DFNB48 ( <i>CIB2</i> )
F:TGACCACAGATTTCCCAATC R:AAAAACACTCTGAACGATTAAGG	۱۴۳-۱۷۳	۵۲	D21S1890	
F: TCCAAGGGGTTTCATCC R: CCCAAGGCACTGTTCC	۲۰۰-۲۱۴	۵۲	D21S1260	
F:ATGTACGATACGTAATACTTGACAA R: GTCCCAAAGGACCTGCTC	۲۰۹-۲۲۳	۶۱	D21S1446	
F: GAGCCACCCCTGGTAAC R: CCCTCATAACAGATTTAAAACACAC	۱۷۳-۲۰۵	۵۷	D21S1912	
F: CTGAAAACCAGCCCACTC R: GAGTCCCTGGAGAGCCC	۱۹۶-۲۱۰	۵۸	D15S1027	
F: GAGGCTCCGAGGGCAG R: GCAGACACGCTCGCAT	۲۰۰	۵۷	D15S984	DFNB48 ( <i>CIB2</i> )
F: TGGGCCTTGTGATTTTAG R: CATCTGTGTCTGTGACTG	۲۵۹	۵۴	D15S1001	
F:AGAATGAGCAGCACTGTTTG R:TTGTCACTGCTTTTCTCTGC	۱۷۷	۵۹	D15S114	
F:ATCCACCTGACTCAAGGA R:TTCTCCATCAGTAAATTGCG	۲۵۰	۵۷	D15S973	
F: AGCTTGGTGACTCTATCAGGGTG R: AACTGGCTGGTCTCTATTATCTGCG	۱۹۸	۶۴	D15S991	
F: GGTATTGTTTTGGACCACATCTTAG R: GGGAGGCTGAGACAGTTTC	۲۷۲	۵۹	D15S1023	

**جدول شماره ۲: برنامه دمایی PCR نشانگرها**

مراحل PCR	دما (سانتی گراد)	زمان	تعداد سیکل
۱	۹۵	۴ دقیقه	۱
۲	۹۵	۳۰ ثانیه	۸
	۵۲-۶۴*	۳۰ ثانیه	
۳	۷۲	۳۰ ثانیه	۲۷
	۹۵	۳۰ ثانیه	
	۵۲	۳۰ ثانیه	
۴	۷۲	۳۰ ثانیه	۱
	۷۲	۵ دقیقه	

\*: دمای اتصال پرایمر برای هر نشانگر متفاوت بوده و در محدود ۵۲-۶۴ درجه است.

به منظور تکثیر STR های انتخابی، واکنش PCR درون میکروتیوب های ۰/۲ میکرولیتری با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در نمونه های افراد مورد بررسی انجام گرفت.

برای انجام هر واکنش PCR، به میزان ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰x)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر منیزیم کلرید (۵۰ میلی مولار)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمر از (۵ واحد/ میکرولیتر) (ساخت شرکت ایرانی (KBC)، ۰/۳ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ پیکومولار) (شرکت وارد کننده ژن فن آوران) و ۱/۵ میکرولیتر DNA (۴۰-۵۰ نانوگرم/ میکرولیتر) در یک میکروتیوب ریخته شد و با آب به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. از روش Touchdown PCR برای تکثیر نشانگرها استفاده شد. در این روند در چند چرخه آغازین PCR، دمای Annealing از چند درجه بالاتر آغاز می شود و به آرامی به دمای اتصال اختصاصی می رسد تا اتصال پرایمرها حتی الامکان اختصاصی باشد. معمولا ۸ چرخه ابتدایی به این شکل بوده و ۲۷ چرخه بعدی با دمای Annealing اصلی ادامه می یابد. محصول PCR

به کمک ژل پلی اکریل آمید ۱۲-۸٪، با جریان Ma60 به مدت ۲-۴ ساعت الکتروفورز شد و رنگ آمیزی ژل با استفاده از محلول نیترات نقره ۰/۱٪ و محلول ظهور سدیم هیدروکسید ۱۵٪ و فرمالدئید ۳۷٪ صورت گرفت. باندهای ظاهر شده روی ژل، در صورت اطلاع دهنده بودن هر نشانگر برای هر خانواده، ژنوتیپ افراد را مشخص نمود. برای اطمینان از نتیجه مشاهده شده، بارگذاری نمونه ها روی ژل و الکتروفورز برای هر نمونه حداقل دو بار تکرار شد. چنانچه تفکیک آلی تمامی افراد خانواده مشابه یکدیگر بود؛ خواه به شکل هتروزیگوت و خواه به شکل هموزیگوت آن نشانگر برای آن خانواده غیراطلاع دهنده قلمداد شد و نشانگرهای اطلاع دهنده جایگزین شدند.

پیش از آغاز روند آزمایشگاهی ارزش SLINK با نرم افزار FastSLINK version 2.51 محاسبه گشت. محاسبه امتیاز LOD پارامتری دونقطه با نرم افزار SuperLink version 1.6 انجام شد (۲۴-۲۶). از نرم افزار GeneHunter برای محاسبه امتیاز LOD پارامتری چند نقطه ای استفاده شد (۲۷). لازم بود برای خانواده هایی که احتمال پیوستگی وجود داشت، به منظور تأیید یا رد پیوستگی، رسم هاپلوتایپ (مجموعه ی ژنوتیپ نشانگرهای مجاور) با کمک نرم افزار HaploPainter version 029.5 صورت گیرد (۲۸).

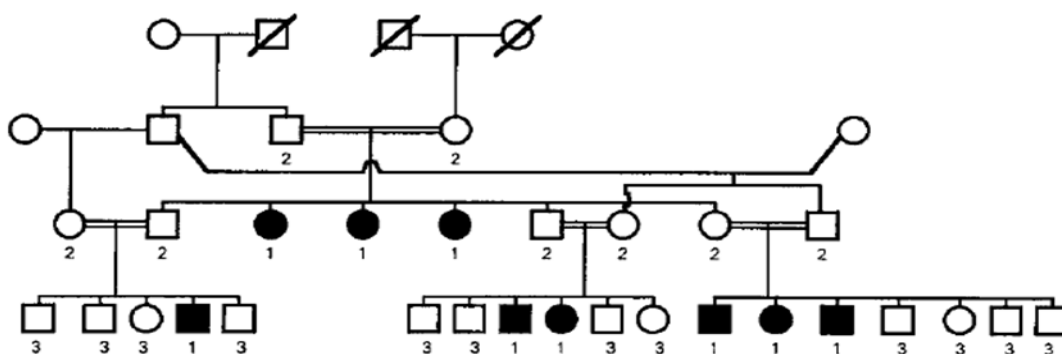
### یافته ها:

در مطالعه حاضر ۱۱۰ فرد ناشنای غیرسندرومی مغلوب اتوزوم از ۲۵ خانواده خوزستانی شرکت داشتند که پس از بررسی *GJB2*، ۳ خانواده از مطالعه حذف شدند. افراد مبتلا در جمعیت مورد بررسی، به ناشنوایی دوطرفه ی حسی-عصبی شدید تا عمیق دچار بودند و همگی جهت عدم ابتلا به سایر بیماری ها توسط متخصص بررسی شده بودند. نوع ناشنوایی در این خانواده ها بر اساس تفسیر و

چنانچه نشانگری برای خانواده‌ای اطلاع‌دهنده نبود از سایر نشانگرهای مناسب در آن محدوده ژنی بهره گرفته شد. برای رد پیوستگی در هر خانواده حداقل دو نشانگر اطلاع‌دهنده مناسب به کار برده شد و در صورتی که سایر نشانگرها نیز برای خانواده‌ها اطلاع‌دهنده بودند، برای اطمینان بیشتر استفاده شدند. قابل ذکر است که هیچ مورد مشکوکی به پیوستگی دیده نشد. نمونه شجره‌نامه ناشنوایی مغلوب اتوزوم در تصویر شماره ۱، ژل عدم پیوستگی در تصویر شماره ۲ و ۳، نمونه هاپلوتایپ در تصویر شماره ۴ و اطلاعات خانواده‌ها و بیماران در جدول شماره ۳ آورده شده است.

مطالعه شجره‌نامه‌ها غیرسندرومی و الگوی وراثت مغلوب اتوزومی بود. بالغ بر ۸۰٪ این خانواده‌ها دارای حداقل ۳ نسل ازدواج خویشاوندی بودند. ارزش SLINK برای این خانواده‌ها، بین ۲ تا ۶ محاسبه شده است. (عدد SLINK به معنای این است که نسبت پیوستگی تنها ۱۰ برابر عدم پیوستگی است).

محاسبه SLINK قبل از خون‌گیری جهت یافتن خانواده‌هایی است که احتمال پیوستگی بالاتری دارند. در این خانواده مورد مطالعه با استفاده از نشانگرها و الگوی تفکیک ایجاد شده بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید هیچ گونه پیوستگی در هیچ یک از نشانگرهای این دو لوکوس مشاهده نشد.

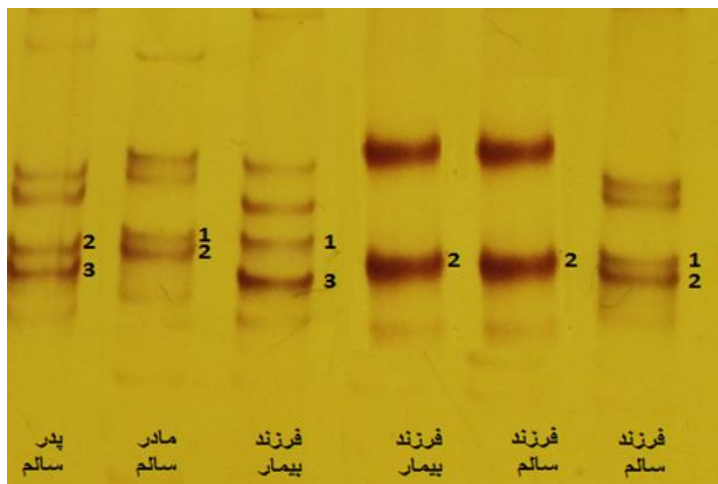


تصویر شماره ۱: شجره‌نامه ناشنوایی مغلوب اتوزومی



تصویر شماره ۲: تعیین ژنوتیپ نشانگر D15S1027 مربوط به لوکوس DFNB48 بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۰٪ مربوط به خانواده F6

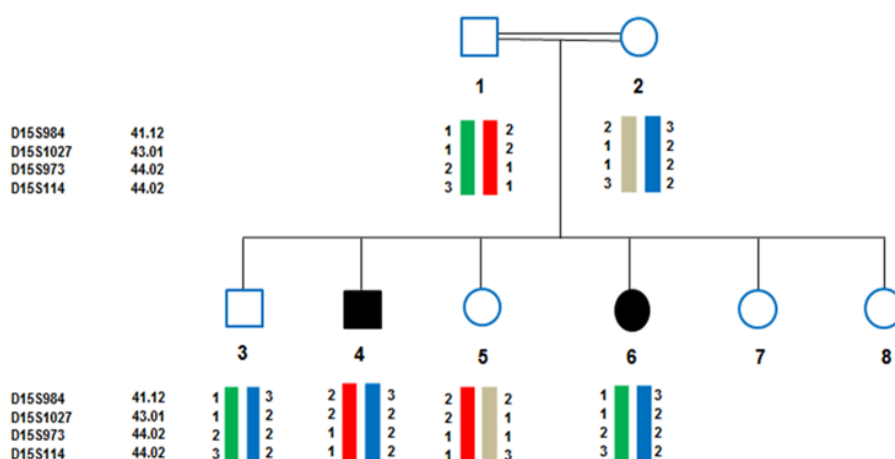
الگوی تفکیک آلی پدر و مادر مشابه بوده و یکی از فرزندان ناشوا الگوی هتروزیگوت و دیگری الگوی هموزیگوت نشان داده است که این خود پیوستگی را رد می کند.



تصویر شماره ۳: تعیین ژنوتیپ نشانگر D2S1446 مربوط به لوکوس DFNB98 بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪ مربوط به خانواده F6

الگوی تفکیک پدر و مادر هر دو هتروزیگوت است و در آلل ۲ مشترک هستند. الگوی تفکیک فرزندان ناشوا از هم متفاوت است و پیوستگی دیده نمی شود.

### Family f6



تصویر شماره ۴: نمونه هاپلوتایپ مربوط به خانواده F6 برای لوکوس DFNB48

افراد بیمار هاپلوتایپ مشترکی به ارث نبرده اند که نشان دهنده پیوسته نبودن ناشنوبی این خانواده به این لوکوس می باشد. نقشه ژنتیکی نشانگرها بر اساس مارشیلداست.

جدول شماره ۳: اطلاعات خانواده‌ها و بیماران

خانواده	تعداد کل افراد نمونه‌گیری شده	تعداد افراد ناشنوی نمونه‌گیری شده	تعداد لوپ خویشاوندی	افراد ناشنوی حاصل از لوپ خویشاوندی	SLINK
F1	۹	۴	۲	۴	۲/۸
F2	۱۳	۶	۲	۴	۳/۳
F3	۱۷	۷	۴	۷	۵/۴
F4	۱۱	۷	۱	۷	۴/۱
F5	۱۵	۵	۴	۵	۱/۹
F6	۱۳	۶	۳	۴	۳/۷
F7	۷	۳	۲	۳	۲
F8	۱۴	۶	۴	۶	۴/۱
F9	۱۱	۳	۵	۳	۳/۲۷
F10	۱۱	۵	۴	۵	۲/۹۵
F11	۹	۴	۵	۴	۲
F12	۷	۴	۱	۴	۲/۲
F13	۱۳	۴	۱	۴	۲/۷۷
F14	۱۰	۴	۲	۴	۳/۳۸
F15	۱۰	۳	۱	۳	۳/۰۸
F16	۱۱	۳	۲	۳	۲/۲۴
F17	۱۷	۷	۳	۵	۲/۶۸
F18	۱۱	۵	۱	۵	۱/۸
F19	۱۳	۴	۲	۴	۲/۵
F20	۶	۳	۲	۳	۳/۱۲
F21	۱۴	۶	۲	۳	۳/۰۲
F22	۱۰	۵	۲	۵	۳/۸
F23	۱۸	۶	۳	۶	۳/۹
F24	۸	۳	۱	۳	۲/۸
F25	۱۳	۳	۲	۳	۲

خانواده‌های F4، F15 و F18 به دلیل مثبت بودن جهش GJB2 از مطالعه خارج شدند.

### بحث:

خویشاوندی را داراست و گزینه مناسبی جهت مطالعه بیماری‌های مغلوب اتوزوم می‌باشد، پرداخته شد. در این مطالعه، ۲۲ خانواده با ۱۰۰ فرد ناشنوی غیرسندرومی مغلوب اتوزوم برای لوکوس DFNB48 و DFNB98

در مطالعه حاضر به دلیل نامشخص بودن فراوانی و پراکندگی جهش‌های لوکوس‌های DFNB48 و DFNB98 در جمعیت ناشنوی ایران به بررسی این ژن‌ها در استان خوزستان که درجه بالایی از ازدواج



مورد بررسی قرار گرفتند و هیچ گونه پیوستگی مشاهده نشد.

هر چند جهش در لوکوس DFNB48 مسئول بیش از ۷٪ ناشنوایی جمعیت ناشنوای پاکستان است؛ پیوستگی به ژن *CIB2* بسیار نادر می‌باشد، تاکنون هیچ گزارشی پیوستگی این لوکوس را به ناشنوایی خانواده‌های ایرانی تأیید نکرده است. پروتئین حاصله از این ژن نقش بسیار مهمی در تعادل و تنظیم کلسیمی دارد که در روند شنوایی اصل اساسی می‌باشد؛ لذا جهش در این ژن تأثیر تخریبی عمیقی در روند شنوایی دارد. با وجود اهمیت قابل توجه این ژن در شنوایی، به غیر از ۳ جهش هموزیگوت *I123T*، *C99W* و *F91S* ایجادکننده ناشنوایی غیرسندرومی مغلوب اتوزوم و جهش *E64D* مسبب سندروم آشر، همچنان سایر جهش‌های این ژن شناسایی نشده است.

در سایر مطالعات صورت گرفته در ایران نیز به غیر از مطالعه دلمقانی، پیوستگی لوکوس DFNB98 به ناشنوایی جمعیت ایرانی گزارش نشده است و هم‌اکنون جهش‌های هموزیگوت *1726G>T* و *1728delC* ایجاد کننده شکل دم‌بریده پروتئین *TSPEAR* که توسط دلمقانی برای یک خانواده ایرانی ثبت شد. تنها جهش‌های گزارش شده در این لوکوس هستند که سبب ناشنوایی غیرسندرومی مغلوب اتوزوم می‌شوند.

با توجه به نتیجه مطالعه حاضر و در نظر داشتن مطالعات پیش‌تر صورت گرفته می‌توان چنین گفت که این دو ژن سهم بسیار اندکی در ایجاد ناشنوایی جمعیت ایرانی دارند. البته به دلیل تنوع بالای قومیتی در ایران و همچنین عدم مطالعه جامع این دو لوکوس در جمعیت‌های مختلف می‌توان انتظار داشت پیوستگی به این دو لوکوس در سایر مناطق کشور دیده شود.

هر روش پژوهشی دارای نقاط قوت و ضعفی است که روش حاضر نیز از این قاعده مستثنی نبوده است. از آن‌جا که پیش از شروع کار برای خانواده‌ها

ارزش *SLINK* محاسبه می‌شود، در هزینه و زمان صرفه جویی می‌شود و معمولاً ارزش *SLINK* محاسبه شده با امتیاز *LOD* که پس از بررسی خانواده محاسبه می‌گردد، هم‌خوانی دارد؛ از این‌رو می‌توان خانواده‌ها را جهت بررسی اولویت‌بندی نمود. اما ارزش *SLINK* به شدت تحت تأثیر تعداد افراد و ساختار شجره است. ممکن است خانواده‌ای با وجود پیوستگی به لوکوس مورد نظر به دلیل اندازه کوچک خانواده و تعداد کم افراد ناشنوا، ارزش *SLINK* پایینی داشته باشد و وارد مطالعه نشود. هر چند احتمال وقوع چنین خطایی بسیار اندک است اما چنین خطاهایی ممکن است. در نتیجه پژوهش تأثیرگذار باشد. قابل ذکر است حتی در صورت بروز چنین اشتباهاتی نیز نتیجه بررسی‌های پیوستگی یک دید جامع و کلی را نسبت به پراکندگی و شیوع لوکوس‌های مورد مطالعه ارائه می‌دهد.

از آن‌جا که مطالعات اندکی روی این دو لوکوس انجام گرفته است جهت اطلاع از چگونگی و میزان دخالت این دو ژن در ناشنوایی جمعیت ایرانی و همچنین یافتن سایر جهش‌های این لوکوس‌ها که می‌تواند منجر به این نوع ناشنوایی شود و البته دستیابی به یک طرح نسبی از فراوانی و پراکندگی جهش‌های این دو ژن و حتی سایر ژن‌های کمتر مطالعه شده، نیاز به بسط مطالعات به سایر نقاط کشور می‌باشد. چرا که به دلیل تنوع قومیتی در ایران می‌توان انتظار تنوع پراکندگی جهش‌های این دو ژن را داشت. با در نظر گرفتن نقش لوکوس DFNB48 در ARNSHL و سندروم آشر این لوکوس می‌تواند گزینه مناسبی جهت مطالعه هر دو بیماری باشد.

شیوع متفاوت ژن *GJB2* در نقاط مختلف کشور نمونه بارز این تنوع پراکندگی است و کاهش فراوانی آن در حرکت از شمال به سمت جنوب کشور دیده می‌شود (۱۲). با توجه به این تفاوت پراکندگی در سراسر کشور انتظار می‌رود که جهش در لوکوس‌های DFNB48 و DFNB98 نیز در جمعیت‌های مختلف کشور شیوع متفاوتی داشته باشد.

**نتیجه گیری:**

بنا بر بررسی صورت گرفته بر روی این خانواده‌های خوزستانی مذکور با ناشنوایی غیرسندرومی مغلوب اتوزوم و عدم مشاهده هیچ گونه جهش، این دو لوکوس احتمالاً دارای نقش کمتری در ایجاد ناشنوایی در این استان می‌باشند و می‌توان گفت دلیل ایجاد ناشنوایی در این افراد دیگر لوکوس‌های درگیر در ناشنوایی است که شایع‌ترند. لذا جهت تعیین پراکندگی و نقش دقیق‌تر این لوکوس‌ها و همچنین ارتقای سطح مشاوره ژنتیک اصولی در این زمینه نیاز به گسترده کردن دامنه مطالعات به مناطق دیگر و خانواده‌های بیشتر است.

**تشکر و قدردانی:**

با سپاس فراوان از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد با شماره گرانته ۱۷۶۷ جهت تأمین بودجه و همچنین کارکنان گرامی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی که در این مطالعه ما را یاری کردند؛ همچنین از صبر و همکاری بیماران ناشنوا و خانواده‌های ایشان در انجام این پروژه سپاسگزاری می‌گردد. این مقاله مربوط به نتایج پایان نامه افسانه تقی‌پور می‌باشد که پس از بررسی در شورای پژوهشی و تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد در تاریخ ۹۳/۱۲/۶ به تصویب رسید.

**منابع:**

1. Chang KW. Genetics of Hearing Loss-Nonsyndromic. *Otolaryngol Clin North Am.* 2015; 48(6): 1063-72.
2. Qing J, Zhou Y, Lai R, Hu P, Ding Y, Wu W, et al. Prevalence of mutations in *GJB2*, *SLC26A4*, and mtDNA in children with severe or profound sensorineural hearing loss in southwestern China. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2015; 19(1): 52-8.
3. Tekin M, Arnos KS, Pandya A. Advances in hereditary deafness. *Lancet.* 2001; 358(9287): 1082-90.
4. Brown KK, Rehm HL. Molecular diagnosis of hearing loss. *Curr Protoc Hum Genet.* 2012; 9(16): 1-9.
5. Lasak JM, Allen P, McVay T, Lewis D. Hearing loss: diagnosis and management. *Prim Care.* 2014; 41(1): 19-31.
6. Atik T, Onay H, Aykut A, Bademci G, Kirazli T, Tekin M, et al. Comprehensive analysis of deafness genes in families with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *PLoS One.* 2015; 10(11): e0142154.
7. Najmabadi H, Kahrizi K. Genetics of non-syndromic hearing loss in the Middle East. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2014; 78(12): 2026-36.
8. 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.
9. 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.
10. Li W, Guo L, Li Y, Wu Q, Li Q, Li H, et al. A novel recessive truncating mutation in *MYO15A* causing prelingual sensorineural hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2016; 81: 92-5.
11. Rimoin DL, Pyeritz RE, Korf B. *Emery and Rimoin's Essential Medical Genetics*: Elsevier; 2013.
12. 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.
13. Kahrizi K, Mohseni M, Nishimura C, Bazazzadegan N, Fischer SM, Dehghani A, et al. Identification of *SLC26A4* gene mutations in Iranian families with hereditary hearing impairment. *Eur J Pediatr.* 2009; 168(6): 651-3.

14. Bakhchane A, Bousfiha A, Charoute H, Salime S, Detsouli M, Snoussi K, et al. Update of the spectrum of *GJB2* gene mutations in 152 Moroccan families with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Eur J Med Genet.* 2016; 59(6-7): 325-9.
15. 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; 133(2): 132-7.
16. Sommen M, Schrauwen I, Vandeweyer G, Boeckx N, Corneveaux JJ, Van den Ende J, et al. DNA Diagnostics of Hereditary Hearing Loss: A targeted resequencing approach combined with a mutation classification system. *Hum Mutat.* 2016; 37(8): 812-9.
17. Scheel H, Tomiuk S, Hofmann K. A common protein interaction domain links two recently identified epilepsy genes. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(15): 1757-62.
18. Delmaghani S, Aghaie A, Michalski N, Bonnet C, Weil D, Petit C. Defect in the gene encoding the EAR/EPTP domain-containing protein *TSPEAR* causes DFNB98 profound deafness. *Hum Mol Genet.* 2012; 21(17): 3835-44.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23(21): 4407-14.
23. 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.
24. Fishelson M, Geiger D. Exact genetic linkage computations for general pedigrees. *Bioinformatics.* 2002; 18(Suppl 1): S189-98.
25. Ott J. Computer-simulation methods in human linkage analysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86(11): 4175-8.
26. 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.
27. Silberstein M, Weissbrod O, Otten L, Tzemach A, Anisania A, Shtark O, et al. A system for exact and approximate genetic linkage analysis of SNP data in large pedigrees. *Bioinformatics.* 2013; 29(2): 197-205.
28. Tabatabaiefar MA, Shariati L, Montazer-Zohour M, Ashrafi K, Saffari-Chaleshtori J, Ghasemikhah R, et al. Mutation screening of *GJB2* and *GJB6* and genetic linkage study of three prevalent DFNB loci in Iranian families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *J Shahrekord Univ Med Sci.* 2010; 12(2): 65-75.

## Genetic linkage analysis of the DFNB48 and DFNB98 loci in families with Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss (ARNSHL) from Khuzestan province

Taghipour Sheshdeh A<sup>1</sup>, Tabatabaiefar MA<sup>2</sup>, Nemati Zargaran F<sup>1</sup>, Moradi F<sup>3</sup>, Zarepour N<sup>1</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 Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; <sup>3</sup>Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; <sup>4</sup>Human Genetics Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 5/Jan/2016 Accepted: 25/Jun/2016

**Background and aims:** Hearing loss, a sensorineural disorder, is one of the most common congenital impairments, occurring in approximately 1 in 500 newborns. Hearing loss is a highly heterogenic disease and half of the cases of deafness are attributed to genetic causes; environmental and unknown factors account for the remainder. Non-syndromic type forms 70% of hearing loss cases. Pattern of inheritance of nearly 80% of this type of HL is recessive autosomal. Iranian population provides a valuable genetic resource to study this kind of HL because of high ratio of consanguinity. In this study, genetic linkage of DFNB48 (*CIB2*) and DFNB98 (*TSPEAR*) is investigated in families with ARNSHL impairment from Khuzestan province.

**Methods:** In this descriptive study 300 individuals of 25 families with hearing loss were examined in order to determine type and frequency of mutation of DFNB48 and DFNB98 loci in Khuzestan province. Families' selection had some criteria. Families with healthy parents, consanguineous marriage and negative result for mutations of *GJB2* gene with at least two affected individuals were selected. 3 families which were detected positive for mutations of *GJB2* gene were excluded from study. Linkage analysis was done for 22 families by using six STR markers which were located in or were tightly linked to each locus.

**Results:** None of these families inspected by linkage analysis was linked to the DFNB48 or DFNB98 loci.

**Conclusion:** Considering these results it seems that *CIB2* and *TSPEAR* genes mutations have not important roles in hearing loss in Khuzestan province.

**Keywords:** DFNB48 locus, DFNB98 locus, ARNSHL, Linkage analysis.

**Cite this article as:** Taghipour Sheshdeh A, Tabatabaiefar MA, Nemati Zargaran F, Moradi F, Zarepour N, Hashemzadeh Chaleshtori M. Genetic linkage analysis of the DFNB48 and DFNB98 loci in families with Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss (ARNSHL) from Khuzestan province. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017; 18(6): 6-17.

**\*Corresponding author:**

Human Genetics Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.  
Tel: 00983833346692, E-mail: mchalesh@yahoo.com