

## تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی لوکوس DFNB39 در بیماران ناشنوای غیر سندرمی مغلوب اتوزومی استان خوزستان

نرگس زارع پور<sup>۱</sup>، محمدامین طباطبایی فر<sup>۲</sup>، افسانه تقی پور<sup>۱</sup>، فاطمه نعمتی<sup>۱</sup>، لادن صادقیان<sup>۱</sup>، مرتضی هاشم زاده چالستری<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup>دانشجو، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، 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، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۱۸

### چکیده:

زمینه و هدف: ناشنوایی رایج‌ترین نقص حسی در انسان است و در حدود یک مورد از هر ۱۰۰۰ کودک دارای ناشنوایی شدید یا عمیق می‌باشند. حدود ۵۰٪ موارد ناشنوایی، ارثی است و تقریباً ۷۰٪ موارد ناشنوایی، غیر سندرمی است که حدود ۸۰٪ این نوع ناشنوایی به صورت مغلوب اتوزومی به ارث می‌رسد. این بیماری هتروژن می‌باشد و شیوع آن در کشورهای در حال توسعه بیشتر است. در ایران نیز به دلیل بالا بودن نرخ ازدواج‌های خویشاوندی، فراوانی بالایی دارد. هدف از این مطالعه تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی لوکوس DFNB39 در خانواده‌هایی با ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی در استان خوزستان می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی، به منظور تعیین نوع و فراوانی جهش‌های ژن *HGF* ۳۰۰ فرد از ۲۵ خانواده با ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی از استان خوزستان بررسی شد. خانواده‌های انتخاب شده در این مطالعه، ازدواج خویشاوندی داشتند و دارای حداقل دو فرد ناشنوا بودند و همچنین از نظر جهش‌های ژن *GJB2* منفی بودند. تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی با انتخاب ۶ نشانگر STR (Short tandem repeats) داخلی یا نزدیک به لوکوس DFNB39 به وسیله PCR و ژل پلی آکرلید آمید صورت گرفت.

یافته‌ها: پس از بررسی خانواده‌های مختلف، هیچ یک از خانواده‌ها با لوکوس DFNB39 پیوستگی نشان نداد. این مطالعه حاکی از آن است که جهش‌های ژن *HGF* در ایجاد ناشنوایی در خانواده‌های مورد بررسی احتمالاً نقشی ندارند. نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه، لوکوس DFNB39 اهمیت چندانی در بروز ناشنوایی در جمعیت مورد مطالعه ندارد؛ ولی برای تعیین نقش دقیق‌تر این لوکوس در جمعیت ایرانی مطالعات بیشتر ضروری است.

واژه‌های کلیدی: لوکوس DFNB39، ژن *HGF*، ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی.

### مقدمه:

ناشنوایی رایج‌ترین نقص حسی در انسان است. ۱/۵۰۰ نوزادان دارای ناشنوایی حسی دائم دوطرفه می‌باشند که شیوع آن به ۲/۷ در ۱۰۰۰ در سن ۵ سالگی و ۳/۵ در ۱۰۰۰ در طول دوران بلوغ افزایش می‌یابد. این اختلال چندعاملی است که از طریق عوامل محیطی یا عوامل ژنتیکی و یا ترکیبی از این دو ایجاد می‌شود. بررسی‌های اپیدمیولوژیکی همواره نشان داده‌اند که حدود ۵۰٪ ناشنوایی‌های دوران کودکی به علل ژنتیکی مربوط می‌شوند (۱). ناشنوایی ارثی در ۲۵٪ موارد به صورت سندرمی (SHL) و در ۷۵٪ موارد به صورت غیر سندرمی یا NSHL (Non syndromic hearing loss) است. بر اساس سن شروع و شدت ناشنوایی، ناشنوایی

\*نویسنده مسئول: شهرکرد- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد- پژوهشکده علوم پایه سلامت- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی-

شمالی ARNSHL نسبت بالاتری در میان ناشنوایی‌های ژنتیکی غیر سندرمی دارد (۶). حدود ۴۵۰ هزار ناشنوا در ایران زندگی می‌کنند و سالانه حدود ۱۴۰۰ ناشنوای عمیق در کشور متولد می‌شوند که حداقل نیمی از این آمار را می‌توان با کمک مشاوره ژنتیک کنترل کرد (۱۰)؛ بنابراین مطالعه ژنتیکی لوکوس های اصلی درگیر در ARNSHL به منظور روشن‌سازی نقش هر یک از این لوکوس‌ها در جمعیت کشورمان ضروری به نظر می‌رسد. روشن‌سازی اساس ژنتیکی ناشنوایی می‌تواند در آینده، به تشخیص زود هنگام، پیش‌گیری و درمان این بیماری و همچنین ارائه مشاوره ژنتیک دقیق‌تر برای افراد بیمار کمک کند (۵).

اولین بار با تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنوم در یک خانواده ی پاکستانی مبتلا به ARNSHL، لوکوس DFNB39 که در q11,12-q11,22 قرار دارد، به عنوان لوکوس دخیل در ARNSHL شناسایی شد (۱۱).

در مطالعه‌ای دیگر ۴۱ خانواده ی پاکستانی و هندی خویشاوند مبتلا به ARNSHL با لوکوس DFNB39 پیوستگی نشان دادند. پس از توالی‌یابی آگرون های کد کننده و نواحی غیر کد کننده ی ۱۳ ژن موجود در این لوکوس در نهایت ۳ جهش تنظیمی در ژن *HGF* شناسایی شد. در این مطالعه همچنین از دو موش مدل با تنظیم بد یا dysregulation ژن *HGF* استفاده شد که در یکی از آنها، موش ترانس ژن این ژن را در همه ی بافت‌ها به مقدار زیاد بیان می‌کرد و در موش دیگر ژن *HGF* به وسیله ی conditional knockout در تعداد محدودی از بافت‌ها از جمله حلقون گوش حذف شده بود. بررسی گوش داخلی در موش‌های ترانس ژن نشان داد که بیان بیش از حد *HGF* با دژنراسیون پیش‌رونده ی سلول‌های مژک‌دار خارجی در حلقون گوش همراه است؛ در حالی که حذف *HGF* در حلقون گوش با دیسپلازی عمومی‌تری همراه است (۱۲). ژن *HGF* دارای ۱۷ اینترون و ۱۸ آگرون است. این ژن دارای ۵ ایزوفرم است که در مسیرهای سیگنالینگ بسیار متنوعی در بافت‌های مختلف نقش دارد. طول کامل

ارثی به انواع مادرزادی، پیش از تکلم، پس از تکلم و ملایم تا عمیق تقسیم‌بندی می‌شود. ۸۵٪-۷۵٪ موارد ناشنوایی غیر سندرمی به صورت مغلوب اتوزومی (ARNSHL) و ۲۵٪-۱۵٪ موارد به صورت غالب اتوزومی (ADNSHL) به ارث می‌رسند. حدود ۱٪ تا ۲٪ موارد نیز توارث میتوکندریایی و وابسته به X نشان می‌دهند (۳،۲). فنوتیپ بیماری در موارد مغلوب به مراتب شدیدتر و معمولاً دارای بروز پیش از تکلم است. با در نظر گرفتن پیچیدگی فرایند شنوایی می‌توان انتظار داشت که تعداد زیادی از ژن‌های انسان در این فرایند دخیل می‌باشند. تخمین‌ها حاکی از آن است که حدود ۱٪ ژن‌های انسان (۲۰۰ تا ۲۵۰ ژن) به نحوی در فرایند شنوایی دخیل می‌باشند. تا به امروز بیش از ۸۰ ژن، بیش از ۱۰۰ جهش و ۱۴۰ لوکوس برای همراهی با ناشنوایی غیر سندرمی شناسایی شده است (۴). به‌استثنای جهش‌های کمی که در ژن‌های نظیر *GJB2* و *SLC26A4* تاکنون شناخته شده است، اکثر جهش‌های ناشنوایی بی‌نهایت نادر هستند و در یک یا تعداد بسیار کمی از خانواده‌ها دیده شده‌اند (۵)؛ بنابراین ناشنوایی طیف گسترده‌ای از علل ژنتیکی، محیطی و ناشناخته دارد که نوع و سهم هر یک از علل در اقوام و جمعیت‌های مختلف متفاوت است. در کشور ما مطالعات نسبتاً کمی بر روی ARNSHL انجام گرفته و بیشتر پژوهش‌ها به یک لوکوس خاص و به‌طور مشخص DFNB1 که ژن *GJB2 (CX26)* را در بردارد، معطوف بوده است (۶). به‌طور میانگین در ایران تنها حدود ۱۸/۲۹٪ موارد ARNSHL به وسیله ژن *GJB2* ایجاد می‌شود (۷). جهش‌های *GJB2* در جمعیت شمال غربی ایران بیشترین شیوع (حدود ۴۰٪) را دارند و کمترین میزان شیوع آن‌ها (حدود ۲٪) به جمعیت خلیج فارس مربوط می‌شود. این یافته‌ها کاهش فراوانی ناشنوایی وابسته به جهش‌های *GJB2* از شمال غربی تا جنوب شرقی ایران را نشان می‌دهد (۹،۸). بر اساس نرخ بالای ازدواج خویشاوندی (۳۸/۶٪) در ایران می‌توان پیش‌بینی نمود که در ایران نسبت به جمعیت‌های اروپا و آمریکای

اگزون این ژن، در همه ۲۵ خانواده‌ی مورد مطالعه، توالی یابی انجام شد که در نهایت ۳ خانواده دارای جهش در ژن *GJB2* بودند و از مطالعه حذف شدند و تنها خانواده‌های فاقد جهش در ژن *GJB2* در این مطالعه وارد شدند.

انتخاب نشانگرها، تعیین ژنوتیپ و بررسی پیوستگی ژنتیکی از طریق تجزیه و تحلیل پیوستگی وجود ارتباط بین ناشنایی و لوکوس DFNB39 بررسی شد. انتخاب نشانگرهای (Short Tandem Repeat= STR) مناسب از طریق پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI map viewer و انتخاب پرایمرهای لازم جهت تکثیر این نشانگرها توسط NCBI UniSTS صورت گرفت. وجود محدوده تغییرات در طول محصول PCR و دارا بودن کمترین میزان باندهای ثانویه یا stutter band هتروزیگوسیتی 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 DFNB39 در جدول شماره ۱ 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.

ایزوفرم ۱ ژن *HGF* فاکتور رشد هپاتوسیتی را کد می‌کند که رشد، تحرک و ریخت‌زایی سلولی را پس از اتصال به گیرنده‌ی خود به وسیله‌ی فعال‌سازی یک مسیر تیروزین کینازی، تنظیم می‌کند (۱۴-۱۲).

در پژوهش حاضر، تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی لوکوس DFNB39 در خانواده‌های مبتلا به ناشنایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی در استان خوزستان که برای جهش‌های موجود در *GJB2* منفی بودند، انجام شد. این مطالعه با هدف بررسی شیوع لوکوس DFNB39 در جمعیت مورد نظر صورت گرفت.

### روش بررسی:

در این مطالعه‌ی مجموعه‌های بیماران، ۲۵ خانواده‌ی مبتلا به ARNSHL که دارای حداقل دو بیمار، والدین سالم و ازدواج خویشاوندی بودند از استان خوزستان انتخاب شدند. نمونه‌گیری خون این افراد پس از تکمیل پرسشنامه و ارزیابی‌های بالینی و پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی از کلیه افراد شجره‌نامه انجام شد؛ به گونه‌ای که از هر فرد به میزان ۵ میلی‌لیتر خون اخذ شده و با روش فنل کلروفورم DNA ژنومی به صورت استاندارد استخراج و از نظر کمی با دستگاه نانودراپ بررسی شده بود. در این مطالعه جهت بررسی جهش‌های ژن *GJB2* برای هر دو

جدول شماره ۱: نشانگرهای لوکوس DFNB39

نام نشانگر	آغازگر رفت (۵' - ۳')	آغازگر برگشت (۳' - ۵')	اندازه محصول (bp)	هتروزیگوسیتی
D7S2443	CTTATGTCATTTTATGTGTTAATCA	AATAGGGGTTTCATTTTATCC	۱۴۳	٪۷۹
D7S2212	AGATCCATATAGGTACATATCCAAA	GAACTCTCACCCCATCCTTT	۲۲۰	٪۷۳
D7S804	GAAATGGTAAAACTCCTCCTC	ACTATGTGTGTCTATGTGCG	۸۹	٪۶۶
D7S820	CTGAGGTATCAAAAACCTCAGAGG	TGTCATAGTTTAGAACGAACTAACG	۲۲۶	٪۸۳
D7S634	CTCAGTACACGTTGCTGGTA	AATCCTCCAAATGAAACAGA	۱۳۶	٪۷۸
D7S802	GGGTTTCCTTTTGTAGAGGACT	TGCAGAGAAACCTTGTGAGAT	۱۷۰	٪۸۱

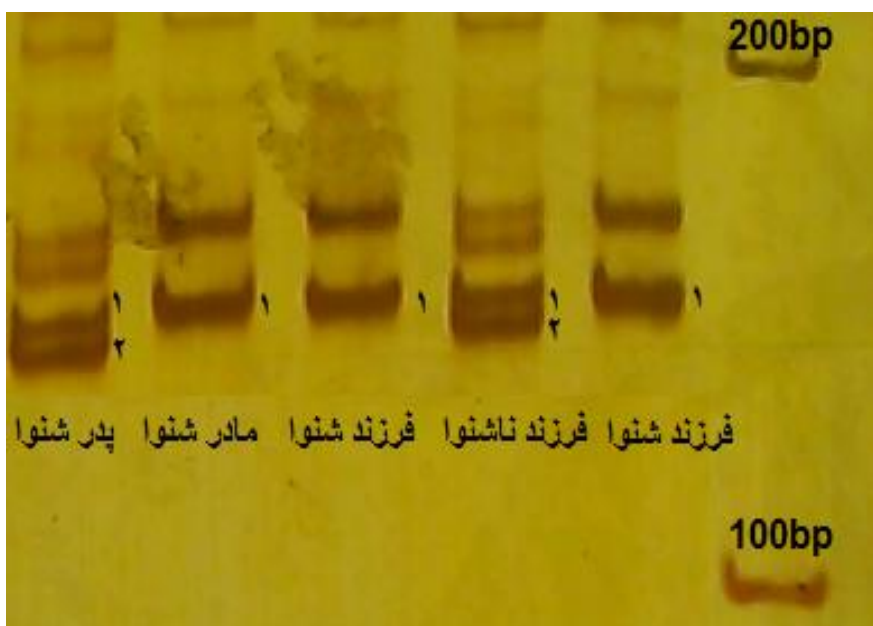
وسيله تترامیتیل اتیل دی آمین (TEMED) پایدار می شود. اندازه منافذ، به وسیله غلظت اکریل آمید در واکنش تعیین می شود. قدرت این نوع ژل فوق العاده زیاد است و قطعات DNA را که دارای اختلاف طول به کوچکی یک جفت باز هستند می تواند تفکیک نماید. ژل های پلی اکریل آمید در وضعیت عمودی و در یک جریان الکتریکی ثابت قرار می گیرند.

برای محاسبه ی SLink از FastSlink version 2.51 و برای محاسبه ی نمره ی LOD (LOD score) پارامتری دو نقطه ای و چند نقطه ای به ترتیب از Superlink version 1.6 و Simwalk version 2.91 استفاده شد (۱۷-۱۵). از نرم افزار GeneHunter برای محاسبه امتیاز LOD پارامتری چند نقطه ای استفاده شد (۱۸). رسم هاپلوتایپ (مجموعه ی ژنوتیپ نشانگرهای مجاور) در مورد خانواده های مشکوک به پیوستگی با کمک نرم افزار HaploPainter 2.95 version صورت گرفت. این مرحله به منظور تأیید یا رد پیوستگی استفاده می شود (۱۹).

### یافته ها:

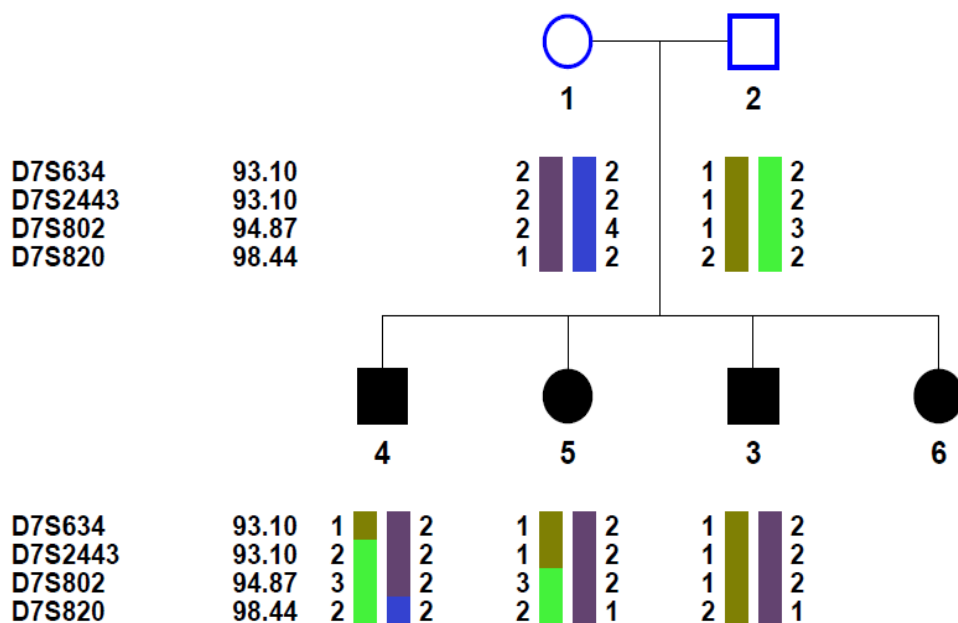
۸۴٪ افراد مورد مطالعه در جمعیت مورد بررسی، ناشنوایی دوطرفه ی حسی-عصبی شدید تا عمیق داشتند. در ۸۰٪ خانواده های مورد بررسی سه نسل ازدواج خویشاوندی دیده شد و با توجه به داده های در ارتباط با شجره نامه، غیر سندر می بودن ناشنوایی و الگوی توارث مغلوب اتوزومی مورد تأیید بود. ارزش SLINK این خانواده ها بین ۲ تا ۷ برآورد شده است. در ۲۵ خانواده مورد مطالعه پس از بررسی الگوی نشانگرهای لوکوس DFNB39 و با تکرار دوبار یا بیشتر الکتروفورز بر روی ژل (پلی آکریل آمید) برای تمامی خانواده ها پیوستگی رد شد. تصویر شماره ۱، جهت تأیید نتایج حاصل از ژل ها، همان طور که در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است، هاپلوتایپ خانواده ها نیز رسم شد که در نهایت در تمامی خانواده ها عدم پیوستگی به لوکوس DFNB39 تأیید شد.

برای تکثیر نشانگرها از روش PCR touchdown استفاده شد، به این صورت که در چند سیکل شروع PCR دمای Annealing از چند درجه بالاتر شروع می شود تا پرایمرها اختصاصی تر به محل مورد نظر در ژن اتصال پیدا کنند و سپس PCR در دمای واقعی Annealing ادامه می یابد. برنامه حرارتی برای تکثیر نشانگرها به این صورت بود. ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، ۸ سیکل touchdown شامل ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ تا ۴۸ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و ۲۷ سیکل بعدی شامل ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۷ °C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه که با ۵ دقیقه سنتز نهایی در ۷۲ °C پایان یافت. در هر واکنش PCR، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (10PM) (شرکت سازنده TAGC دانمارک، شرکت وارد کننده ژن فن آوران ایران)، ۲/۵ میکرولیتر از 10x PCRbuffer (شرکت سازنده KBC ایران)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP mix (10Mm) (شرکت سازنده KBC ایران)، یک میکرولیتر از 50mM MgCl<sub>2</sub> (شرکت سازنده KBC ایران)، ۰/۱ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمرز (5unit/μl) (شرکت سازنده KBC ایران) و ۱/۵ میکرولیتر از DNA ژنومیک استفاده شد که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. قطعات تکثیر شده به وسیله ی واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) بر روی ژل پلی اکریل آمید (شرکت سازنده Merck آلمان، شرکت وارد کننده یاهو طب ایران) ۸٪ تا ۱۲٪، با جریان ۴۰ میلی آمپر به مدت ۴-۵ ساعت الکتروفورز شد و سپس با نیترات نقره رنگ آمیزی و باندها رویت گردید. هموزیگوت بودن نشانگرها در افراد بیمار نشانه ی وجود پیوستگی می باشد و در افراد سالم و آنهایی که پیوستگی نشان نمی دهند، به صورت هتروزیگوت می باشد. ژل پلی اکریل آمید پلیمری از مونومرهای اکریل آمید است که توسط مواد پلیمریزه کننده (بیس اکریل آمید) حاصل می شود. معمولاً پلیمریزاسیون به وسیله آمونیوم پرسولفات (APS) انجام می شود. ژل به



تصویر شماره ۱: نتیجه بررسی تکثیر نشانگر D7S2443 بر روی ژل پلی آکریل آمید

شماره‌های ۱ و ۲ هرکدام بیانگر یک آلل است. فرد بیمار الگوی هتروزیگوت (۱ و ۲) را نشان داد. در صورت پیوستگی افراد سالم حامل ژن به صورت هتروزیگوت و تمام افراد بیمار به صورت هموزیگوت می‌باشند.



تصویر شماره ۲: یک هاپلوتاایپ 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 هاپلوتایپ یکسانی ندارند و پیوستگی به لوکوس DFNB39 رد می‌شود. نقشه ژنتیکی نشانگرها بر اساس مارشفلید می‌باشد.

## بحث:

این جهش نیز کد شدن ۲۴ آمینو اسید اضافی را قبل از کدون پایان پیش بینی می کند. در این مطالعه همچنین در سه عضو از یک خانواده ی پاکستانی مبتلا، برای یک جهش جانشینی هم معنی (c.495G>A [p.S165S]) در اگزون ۵ ژن *HGF* هموزیگوسیتی مشاهده کردند. این جهش سبب تبدیل کدون آمینو اسید سرین در کدون ۱۶۵ به کدون دیگر از همین آمینو اسید می شود. این جانشینی ۱۳ نوکلئونید درون اگزون ۵ نسبت به جایگاه پذیرنده ی پیرایش مربوط به ایزوفرم ۱ ژن *HGF* اتفاق می افتد؛ در حالی که همچنین در موقعیت ۳ نسبت به جایگاه پذیرنده ی پیرایش مربوط به ایزوفرم ۳ این ژن رخ می دهد که این مسئله تغییر طول نسبی دو جایگاه پیرایش را پیش بینی می کند (۱۲).

این محققان در حقیقت یک ناحیه ی موثر ۱,۲Mb هم پوشان معین کردند که درون لوکوس DFNB39، ۱۷,۶ Mb، اصلی قرار داشت (۱۲،۱۱). در مطالعه ای همچنین، دو ایزوفرم کوتاه ژن *HGF* را شناسایی کردند که شامل اگزون های ۱ تا ۴ و یک ناحیه ی ترجمه نشدنی<sup>۳</sup> در اینترون ۴ می باشند. طول کامل ایزوفرم ۱ ژن *HGF* یک پلی پپتید غیر فعال را کد می کند که به وسیله ی سرین پروتئازها به دو زنجیره ی آلفا ۶۹-kDa و بتا ۳۴\_kDa برش می خورد که یک باند دی سولفیدی بین دو زنجیره آلفا و بتا مولکول فعال هترومریک را تولید می کند. این مولکول فاکتور رشد هپاتوسیتی نام دارد. فاکتور رشد هپاتوسیتی یک سایتوکاین پلئوتروپیک است که فعالیت های میتوژنی، موتوژنی و مورفوژنیک را در سلول های متفاوتی از جمله سلول های عصبی انجام می دهد (۱۴-۱۲).

مطالعه ای در ۱۰۰ خانواده ی ایرانی مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی انجام شد که در طی این مطالعه با استفاده از STR های D7S804، D7S806 و D7S807 و یک خانواده به لوکوس DFNB39 پیوستگی نشان داد (۲۰).

در این مطالعه ۲۵ خانواده با حداقل دو فرد ناشنوا از استان خوزستان از نظر پیوستگی به لوکوس DFNB39 بررسی شدند. هدف مطالعه تعیین شیوع این لوکوس در خانواده های مورد بررسی بود. در این مطالعه هیچ یک از خانواده ها به لوکوس مورد بررسی پیوستگی نشان ندادند. لوکوس DFNB39 توسط Wajid و همکاران پس از انجام آنالیز پیوستگی برای ۵۰ نشانگر در یک خانواده پاکستانی خویشاوند و مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی کشف شد (۱۱). نیز در مطالعه ی Schultz و همکاران، ۴۱ خانواده ی پاکستانی و هندی خویشاوند مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی با لوکوس DFNB39 پیوستگی نشان دادند. آن ها سپس در ۱۱ خانواده از این ۴۱ خانواده اگزون های کد کننده ی ۱۳ ژن موجود در این لوکوس را توالی یابی کردند که هیچ گونه جهش بد معنی، بی معنی و تغییر چارچوبی را مشاهده نکردند. سرانجام پس از توالی یابی نواحی غیر کد کننده ی این ژن ها در نهایت ۳ جهش تنظیمی را در اینترون ۴ و اگزون ۵ ژن *HGF* شناسایی کردند. در افراد مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی ۳۶ خانواده ی پاکستانی و ۲ خانواده ی هندی برای یک حذف شدگی ۳bp (c.۴۸۲+۱۹۸۶-۱۹۸۸delITGA) درون اینترون ۴ ژن *HGF* هموزیگوسیتی مشخص شد. این جهش در یک ناحیه بسیار حفاظت شده که قسمتی از ناحیه ی ترجمه نشدنی<sup>۳</sup> است و به عنوان یک ایزوفرم کوتاه ژن *HGF* معین شده بود، رخ می دهد که این جهش به رمز درآوردن ۲۴ آمینو اسید اضافی قبل از مواجه با کدون پایان را پیش بینی می کند. آن ها همچنین در اعضای مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی ۲ خانواده ی پاکستانی برای یک حذف شدگی ۱۰bp (c.۴۸۲+۱۹۹۱-۲۰۰۰del GATGATGAAA) در اینترون ۴ ژن *HGF* هموزیگوسیتی مشاهده کردند. این جهش نیز در ناحیه ای که حذف ۳bp رخ می دهد، صورت می گیرد.

پیشرفت غربالگری ناشنوایی در جمعیت‌های ایرانی و در ادامه مشاوره ژنتیک اصولی سهیم باشند.

### نتیجه‌گیری:

با توجه به نتایج این مطالعه، لوکوس DFNB39 احتمالاً نقش کمی در ایجاد ناشنوایی در جمعیت بررسی شده دارد و دلیل اصلی ناشنوایی در جمعیت مورد مطالعه می‌تواند مربوط به سایر لوکوس‌های درگیر در ناشنوایی باشد. با این حال برای تعیین نقش دقیق‌تر این لوکوس‌ها 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 پایان‌نامه نویسنده نفر اول می‌باشد. از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد با شماره گرنت ۱۷۶۴ جهت تأمین بودجه و همچنین از کارکنان مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد که ما را در این پژوهش یاری نمودند، کمال تقدیر و تشکر دارم.

به‌طور خلاصه، در مطالعات پیشین تعداد اندکی از خانواده‌ها در جهان و تنها یک خانواده در ایران به لوکوس DFNB39 پیوستگی نشان داد. در مطالعه حاضر لوکوس DFNB39 در خانواده‌های مورد بررسی پیوستگی نشان نداد که این مسئله می‌تواند ناشی از هتروژنیتی بالای بیماری ناشنوایی باشد و احتمالاً لوکوس‌های دیگر دخیل در ناشنوایی در جمعیت مورد مطالعه‌ی این پژوهش، در ایجاد ناشنوایی مبتلابان نقش دارد. این مطالعه نشان می‌دهد که احتمالاً این لوکوس در جمعیت ایرانی نقش کمی در بروز ناشنوایی دارد. البته با توجه به این که تاکنون در ایران و سایر نقاط جهان درباره‌ی این لوکوس مطالعات اندکی صورت گرفته، بررسی بیشتر این لوکوس در جمعیت‌هایی با منشاء نژادی و جغرافیایی متفاوت، ضروری به نظر می‌رسد. چنین مطالعاتی سبب افزایش دانش ما در زمینه‌ی تعیین نقش این لوکوس در سیستم شنوایی و شناسایی فرایندهای مولکولی درگیر در آن می‌شود. به‌علاوه، این مطالعات دانش ما در زمینه‌ی چگونگی تغییر این فرایندها و ایجاد نقص در سیستم شنوایی به‌وسیله‌ی این تغییرات را بهبود می‌بخشد. چنین مطالعاتی می‌تواند به‌طور چشمگیری در

### منابع:

1. Practice P, Committee G. American College of Medical Genetics and Genomics guideline for the clinical evaluation and etiologic diagnosis of hearing loss. *Genet Med*. 2014; 16(4): 347-55.
2. Vozzi D, Morgan A, Vuckovic D, D'Eustacchio A, Abdulhadi K, Rubinato E, et al. Hereditary hearing loss: A 96 gene targeted sequencing protocol reveals novel alleles in a series of Italian and Qatari patients. *Gene*. 2014; 542(2): 209-16.
3. Atik T, Bademci G, Diaz-Horta O, Blanton SH, Tekin M. Whole-exome sequencing and its impact in hereditary hearing loss. *Genet Res*. 2015; 97: e4.
4. 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.
5. Diaz-Horta O, Duman D, Foster II J, Sirmacı A, Gonzalez M, Mahdih N, et al. Whole-exome sequencing efficiently detects rare mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *PloS one*. 2012; 7(11): e50628.
6. Saadat M, Ansari-Lari M, Farhud D. Short report consanguineous marriage in Iran. *Ann Hum Biol*. 2004; 31(2): 263-9.

7. 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.
8. 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.
9. Mahdieh N, Rabbani B, Shirkavand A, Bagherian H, Movahed ZS, Fouladi P, et al. Impact of consanguineous marriages in *GJB2*-related hearing loss in the Iranian population: A report of a novel variant. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011; 15(7-8): 489-93.
10. Mahdieh N, Rabbani B, Wiley S, Akbari MT, Zeinali S. Genetic causes of nonsyndromic hearing loss in Iran in comparison with other populations. *J Hum Genet*. 2010; 55(10): 639-48.
11. Wajid M, Abbasi AA, Ansar M, Pham TL, Yan K, Haque S, et al. *DFNB39*, a recessive form of sensorineural hearing impairment, maps to chromosome 7q11. 22-q21. *Eur J Hum Genet*. 2003; 11(10): 812.
12. Schultz JM, Khan SN, Ahmed ZM, Riazuddin S, Waryah AM, Chhatre D, et al. Noncoding mutations of *HGF* are associated with nonsyndromic hearing loss, *DFNB39*. *Am J Hum Genet*. 2009; 85(1): 25-39.
13. Mizuno K, Nakamura T. Molecular characteristics of *HGF* and the gene, and its biochemical aspects. *Exs*. 1993; 65: 1-29.
14. Nakamura T, Mizuno S. The discovery of hepatocyte growth factor (*HGF*) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2010; 86(6): 588-610.
15. Fishelson M, Geiger D. Exact genetic linkage computations for general pedigrees. *Bioinformatics*. 2002; 18(suppl\_1): S189-S98.
16. Ott J. Computer-simulation methods in human linkage analysis. *Proc Natl Acad Sci*. 1989; 86(11): 4175-8.
17. 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.
18. Silberstein M, Weissbrod O, Otten L, Tzemach A, Anisenia A, Shtark O, et al. A system for exact and approximate genetic linkage analysis of SNP data in large pedigrees. *Bioinformatics*. 2012; 29(2): 197-205.
19. Tabatabaiefar M, Alasti F, Shariati L, Farrokhi E, Franssen E, Nooridalooi M, et al. *DFNB93*, a novel locus for autosomal recessive moderate-to-severe hearing impairment. *Clin Genet*. 2011; 79(6): 594-8.
20. Babanejad M, Fattahi Z, Bazazzadegan N, Nishimura C, Meyer N, Nikzat N, et al. A comprehensive study to determine heterogeneity of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss in Iran. *Am J Med Genet A*. 2012; 158(10): 2485-92.



## Genetic linkage analysis of DFNB39 locus in families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL) from Khuzestan province

Zarepour N<sup>1</sup>, Tabatabaiefar MA<sup>2</sup>, Taghipour A<sup>1</sup>, Nemati F<sup>1</sup>, Sadeghian L<sup>1</sup>, Hashemzadeh Chaleshtori M<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Student, Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, 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, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 11/Jun/2016 Accepted: 8/Dec/2016

**Background and aims:** Hearing loss (HL) is a most common sensory deficit in humans and approximately one in 1,000 newborns has severe-to-profound HL. About 50% of HL cases are inherited and approximately 70 percent of HL cases are Non-syndromic that about 80 percent of this type of HL is inherited in recessive manner (ARNSHL). This is a heterogeneous disease and its prevalence is higher in developing countries. In Iran due to high rate of consanguinity has high frequency, too. The purpose of the present study was to investigate genetic linkage analysis of DFNB39 locus in families with autosomal recessive nonsyndromic HL from Khuzestan province.

**Methods:** In this descriptive laboratory study, to determine type and frequency of *HGF* mutations 300 individuals of 25 families from Khuzestan province with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss were examined. Selected families in this study had consanguinity and had at least 2 patients and also they were negative for *GJB2* gene mutations. Linkage analysis was performed by 6 markers STR (Short tandem repeats) which were located in or were tightly linked to DFNB39 locus conventional PCR and PAGE.

**Results:** After examining different families, it was revealed non of the families did not show linkage to the DFNB39 locus. Lack of *HGF* gene mutations in mentioned family suggests that the *HGF*'s mutations probably have no role in causing HL in the studied families.

**Conclusion:** Based on the results of this study, DFNB39 locus may not be important role in causing hearing loss of population studied. However, further studies are necessary to determine more precisely the role of this locus in hearing loss in Iranian population.

**Keywords:** DFNB39 locus, *HGF* gene, Autosomal recessive nonsyndromic hearing loss.

**Cite this article as:** Zarepour N, Tabatabaiefar MA, Taghipour A, Nemati F, Sadeghian L, Hashemzadeh Chaleshtori M. Genetic linkage analysis of DFNB39 locus in families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL) from Khuzestan province. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017; 19(3): 76-84.

**\*Corresponding author:**

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