

ارتباط ناشنوایی غیرسندرمی اتوزومی مغلوب با جهش‌های ژن DFNB59 (پژواکین)

مرضیه ابوالحسنی^۱، عفت فرخی^۲، محسن نوربخش^۳، مریم طاهرزاده^۴
فاطمه آزادگان^۱، اعظم عسگری^۴، مرتضی هاشم‌زاده^۵

مقاله پژوهشی

۱. کارشناس ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهر کرد
۲. کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهر کرد
۳. دانشجوی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهر کرد
۴. کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهر کرد
۵. استاد ژنتیک انسانی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهر کرد

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۱۱/۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/۴/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: ناشنوایی شایع‌ترین اختلالی می‌باشد که میلیون‌ها نفر را در سراسر جهان با فراوانی حدود یک در هزار تولد جدید، تحت تاثیر قرار داده‌است. اخیراً مشخص شده است که یک ژن جدید به نام DFNB59 که پروتئین پژواکین را کد می‌کند، در ایجاد ناشنوایی عصبی نقش دارد. هدف این مطالعه تعیین فراوانی جهش‌ها در ژن DFNB59 در ۹۳ دانش‌آموز ناشنوا در استان سیستان و بلوچستان می‌باشد.

مواد و روش کار: در این مطالعه‌ی توصیفی آزمایشگاهی ۹۳ دانش‌آموز مبتلا به ناشنوایی غیرسندرمی از استان سیستان و بلوچستان، شامل ۵۳ پسر و ۴۰ دختر در محدوده‌ی سنی ۷-۲۵ سال به‌روش تصادفی آسان انتخاب و از هر یک پنج میلی‌لیتر خون گرفته شد؛ DNA خون به‌روش استاندارد فنل کلروفرم استخراج گردید. فراوانی جهش‌ها را در ژن DFNB59، در نواحی رمزگذار آن (اگزون ۷-۲)، به روش PCR-SSCP/HA مورد بررسی قرار دادیم. یافته‌ها: در نمونه‌های مورد مطالعه هیچ‌گونه جهش بیماری‌زا تشخیص داده نشد، اگرچه یک نوع چند شکلی C>G 793 در سه نمونه از ۹۳ دانش‌آموز مورد مطالعه (۳/۲٪) شناسایی گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه هیچ‌گونه ارتباطی بین جهش‌های ژن DFNB59 و ناشنوایی در استان سیستان و بلوچستان نشان نداد. [م ت ع پ ز، ۱۲(۳): ۲۳-۱۹]

کلیدواژه‌ها: واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، چند شکلی فضایی تک رشته، آنالیز هترو دوپلکس، پژواکین، ناشنوایی

مقدمه

ناشنوایی اختلالی بسیار هتروژن است، که در نتیجه‌ی عوامل ژنتیکی و محیطی یا هر دو ایجاد می‌شود. فراوانی آن حدود یک در هزار تولد جدید می‌باشد.^۱ تقریباً نیمی از موارد آن ارثی می‌باشد که به دو فرم سندرمیک (۳۰٪) و غیرسندرمیک (۷۰٪) در جمعیت‌ها مشاهده می‌گردند.^{۲،۳} حدود ۸۰ درصد از موارد غیرسندرمیک وراثت اتوزومال مغلوب دارند.^۴ ۶۷ جایگاه ژنی در ایجاد ناشنوایی غیرسندرمیک اتوزومال مغلوب نقش دارند که در ۲۶ جایگاه ژنی، ژن مربوط به ناشنوایی شناسایی شده است.^۵ در حالی که اغلب ژن‌های درگیر در ناشنوایی‌ها منجر به عملکرد نادرست حلزون گوش می‌شوند، تنها دو دسته ژن در نارسایی نوروپاتی نقش دارند.^{۶-۷} یکی از آن‌ها کانکسین 26 (GJB2) می‌باشد که جهش‌های این ژن در ایران، نسبت به ژن DFNB59 نقش بیشتری در ایجاد ناشنوایی دارد.^۸ ژن DFNB59 روی بازوی بلند کروموزوم شماره دو (2q31.2) قرار دارد و kb ۹/۸ از ژنوم را به خود اختصاص داده و شامل هفت اگزون می‌باشد، اگزون شماره یک غیررمزگذار (non-coding) است و پروتئینی به نام پژواکین (پلی‌پپتیدی شامل ۳۵۲ آمینو اسید) را کد می‌کند.^۹ دلمقانی و همکارانش برای اولین بار توالی کامل ژن پژواکین را در جایگاه ژنی DFNB59 شناسایی کردند. آن‌ها توالی کامل ژن را از کتابخانه cDNA مربوط به بافت بیضه

انسانی جدا کردند و جهش‌های این ژن را به‌عنوان عامل ناشنوایی عصبی در چهار خانواده ایرانی گزارش نمودند.^۵ سایر پژوهشگران نیز در مطالعات جداگانه‌ای جهش‌های توالی این ژن را مورد بررسی قرار دادند.^{۸-۱۱} به علت نحوه‌ی انتقال بیماری به‌صورت اتوزومال مغلوب، انتظار می‌رود که بروز این بیماری در جمعیت‌های با میزان بالاتر ازدواج فامیلی، بیشتر باشد. ۱۷۰۲۶ دانش‌آموز مبتلا به اختلالات شنوایی در مدارس استثنایی کشور مشغول به تحصیل هستند.^{۱۲} با توجه به درصد بالای ازدواج فامیلی در استان سیستان و بلوچستان و به منظور ارزیابی میزان تاثیر ژن پژواکین در ناشنوایی‌های پیش‌زبانی، وجود جهش در این ژن را در مبتلایان به ناشنوایی فامیلی در استان سیستان و بلوچستان مورد مطالعه قرار دادیم.

روش کار

این مطالعه‌ی توصیفی آزمایشگاهی در بهار و تابستان سال ۸۸ و در مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی شهرکرد انجام شد و پس از کسب رضایت‌نامه کتبی آگاهانه از والدین دانش‌آموزان ۹۳ دانش‌آموز مبتلا به ناشنوایی غیرسندرمی از سراسر استان سیستان و بلوچستان، شامل ۵۳ پسر و ۴۰ دختر در محدوده‌ی سنی ۷-۲۵ سال انتخاب شدند. این دانش‌آموزان دارای سابقه ازدواج فامیلی در خانواده بوده و از نظر جهش‌های ژن

GJB2 منفی گزارش شده بودند. بیماران ناشنوای اتوزومال مغلوب غیر سندرمی واجد شرایط ورود به مطالعه بودند. لازم به ذکر است که وجود جهش های ژن کانکسین 26 (GJB2) در نمونه ها معیار خروج از مطالعه تلقی شد.^{۱۳}

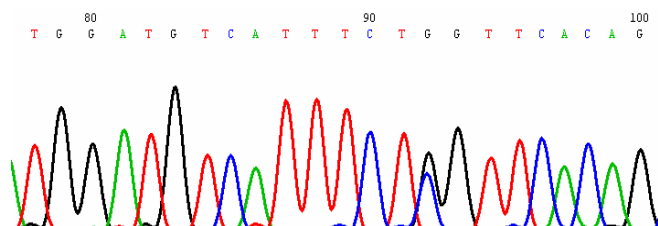
نمونه گیری به روش در دسترس و غیر تصادفی (از دانش آموزان ناشنوای استان سیستان و بلوچستان) انجام و اطلاعات بالینی و دموگرافیک به وسیله پرسشنامه گردآوری شد. جهت کلیه بیماران اودیومتری انجام و ۵ میلی لیتر خون محیطی در لوله های محتوی EDTA نیم مولار اخذ گردید و به مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انتقال داده شد. بررسی ژن DFNB59 از اوایل سال ۸۸ آغاز گردید. DNA خون بیماران به روش استاندارد فنل-کلروفرم^{۱۴} استخراج و جذب آن ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر 2100 Unico ساخت کشور آمریکا، اندازه گیری شد. حدود ۱۰۰ نانوگرم DNA برای هر واکنش PCR در نظر گرفته شد. توالی ژن DFNB59 از طریق سیت-سایت UCSC و آدرس <http://genom.ucsc.edu/> مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از نرم افزار Primer3، برای اگزون های دو تا هفت این ژن پرایمر طراحی گردید. با توجه به طول اگزون شماره هفت، این اگزون به دو قسمت تقسیم و دو جفت پرایمر 7A و 7B برای آن طراحی شد. قابل ذکر است که محصولات RCR با طول بیشتر از ۳۵۰ bp برای روش RCR-SSCP/HA کارایی ندارند.^{۱۵} در اگزون های سه تا پنج که نمونه ی کنترل مثبت جهت مقایسه در دسترس نبود، با استفاده از روش site directed mutagenesis، پرایمرهای موتانت طراحی شد و به عنوان کنترل مثبت در آزمایشات استفاده شد. دمای چسبیدن پرایمر در اگزون های ۴-۲ به صورت Touch down تنظیم گردید به طوری که در هر سیکل دما یک درجه کاهش یافت (جدول ۱).

واکنش PCR برای هر اگزون به طور اختصاصی و به منظور افزایش قطعه ی مورد نظر، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. به این منظور به یک میکرولیتر از DNA رقیق شده ی بیمار، ترکیبات مورد نیاز برای انجام واکنش شامل ۱۷/۷ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۲۳ میکرولیتر کلرید منیزیم (با غلظت ۵۰ میلی مول)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (با غلظت ۱۰ میلی مول)، ۰/۲ میکرولیتر پرایمر R، ۰/۲ میکرولیتر پرایمر F (غلظت پرایمرها ۱۰ ppm)، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز (غلظت ۵ u/μl) افزوده شد. این واکنش در دستگاه ترموسایکلر ASTEC PC818 ساخت کشور ژاپن صورت پذیرفت. در مرحله ی Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP)، ۸ میکرولیتر از محصولات PCR به میکروتیوب های حاوی ۶ میکرولیتر بافر دنا توره اضافه شد^{۱۶} و به مدت ده دقیقه در آب جوش قرار گرفتند و سپس بلافاصله، نمونه ها به ظرف حاوی یخ منتقل گردیدند و به مدت حداقل پنج دقیقه روی یخ نگهداری شدند. هم چنین به طور هم زمان دو میکرولیتر از هر محصول PCR با سه میکرولیتر از EDTA نیم مولار مخلوط و در دستگاه ترموسایکلر به حرارت ۹۶°C رسانده شد و سپس طی ۳۰ سیکل متوالی ۳۰ ثانیه ای حرارت کاهش یافته و به ۳۶°C رسانده شد تا در صورت وجود اختلال آلی، هترو دوپلکس ها تشکیل شوند. سپس محصول هترو دوپلکس هر میکروتیوب با محصول SSCP هم شماره ی آن مخلوط و روی ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز شدند. شرایط الکتروفورز SSCP/HA (شامل درصد ژل، ولتاژ، دما و زمان) که به طور تجربی به دست آمد (جدول ۲). در پایان جهت اطمینان از نتایج به دست آمده، نمونه هایی که الگوی متفاوتی از باند را نشان داده بودند، توسط سیستم ABI (capillary system) XL ۳۷۳۰ تعیین توالی گردیدند.

جدول ۱: توالی پرایمرها، طول قطعه و دمای چسبیدن پرایمر

اگزون	توالی پرایمر	دمای چسبیدن	طول قطعه
2	5' ATG GAT TTA TCT GGG GGT TGC 3'2F 5' ACA GAT GAA TGA GTT GGC ACT CC 3'2R	۵۳-۶۰°C	۲۹۶bp
3	5' ACT GAG TTT CTT CTT ATA AAG G 3'3F 5' TTA GGA TTA TTA TAC TGA CCG 3'3R F3M*:5' ACT GAG TTT CTT CTT AG*A AAG 3G 5' TAC TAT TAG GTG AAC TAT GAA TG 3'4F 5' AGT TAG TAA GAG AAC CCA AC 3'4R	۵۵-۶۰°C	۲۳۶bp
4	5' TAC TAT TAG GTG AAC TAC* GAA TG 3 F4M **:5' TAC TAT TAG GTG AAC TAC* GAA TG 3 5' AGC TAT CCT TAC ATG TTA TGA TCC 3'5F 5' TCA TGC AGA CCC TTA ACT CAC 3'5 R	۵۴-۶۲°C	۲۸۲bp
5	F5M*:5' AGC TAT CCT TAC ATG TTA G*GA TCC 3 F: 5'TTC ATC ACC CCA TCA AAC AA 3'6R R:5'TCA TGT GTT AAG CCA GGA AA3' 6R	۵۸°C	۱۹۲bp
6	AF:5'CAC ATT TCT TTT CTG TTT TT 3'7R AR:5'GAA GTT CCC CAT TCC ACA GA3'7R	۵۳°C	۲۳۱bp
7A	BF:5'GAA GGG ACC CAT ATC CGA GT37R	۵۳°C	۲۱۵bp
7B	BR:5'GTG GCA CAA CTG ACA CTA AA3'7R	۵۸°C	۲۳۸bp

F: پرایمر Forward، R: پرایمر Reverse، Fm: پرایمر جهش یافته ی Forward، * نوکلئوتید جهش یافته در پرایمر Forward.



تصویر ۲: نتایج تعیین توالی مربوط به اگزون 7A ژن پژواکین که پلی- مورفیزم 793C>G را نشان می‌دهد.

بحث

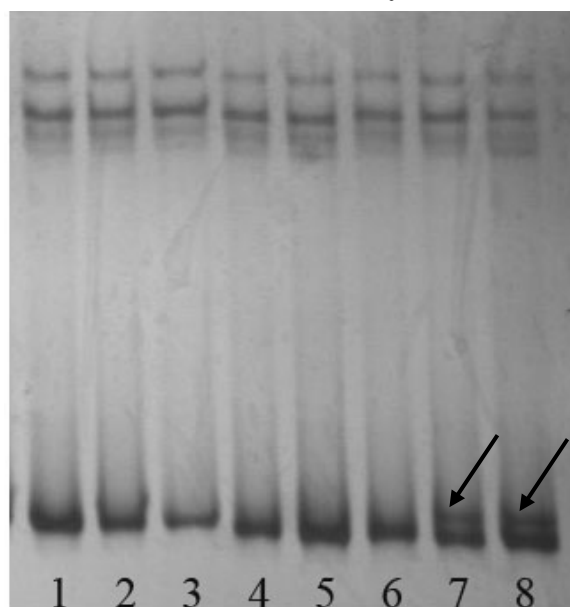
نتایج این مطالعه نشان دهنده‌ی سه مورد واریانت آللی $793C>G$ در اگزون شماره هفت این ژن پژواکین است. درواقع این واریانت آللی که بیانگر پلی مورفیزم می‌باشد، نوعی جهش missense محسوب می‌شود. مطالعات محدودی تاکنون در ایران و سایر نقاط دنیا بر روی این ژن انجام شده است بنابراین اطلاعات محدودی در رابطه با تاثیر ژن DFNB59 بر ناشنوایی غیرسندرومیک در دسترس می‌باشد. به‌طور کلی تاکنون در سراسر دنیا، نه موتاسیون بیماری‌زا و سه نوع واریانت آللی مرتبط با پلی مورفیزم در توالی ژن DFNB59 شناسایی شده است.^{۵،۹-۱۱} مطالعات بر روی ژن پژواکین برای اولین بار توسط دلمقانی و همکارانش در ایران انجام شد، که منجر به کشف دو جهش در چهار خانواده‌ی مبتلا به ناشنوایی اتوزومال مغلوب غیرسندرومیک گردید. جهش‌ها شامل یک مورد جهش T54I و سه مورد جهش R183W می‌باشند.^۵ Collin و همکارانش نیز در بررسی ۸۳ ناشنوا، تنها ۳ مورد موتاسیون $874G>A$ ، $731T>G$ ، CACT، 509-512 del را در این ژن گزارش نمودند.^۹ Yang و همکارانش در مطالعات خود، جهش ژن پژواکین را چهاردرصد گزارش نمودند.^{۱۱} در مطالعه‌ای دیگر Ebermann و همکارانش، در خانواده‌ای بزرگ با اختلال شنوایی، یک مورد جهش $113-114 \text{ ins T}$ در ژن DFNB59 یافتند.^{۱۱} هاشم‌زاده و همکارانش ۳۰ خانواده‌ی خویشاوند ایرانی را که در هر خانواده حداقل پنج مورد ناشنوایی وجود داشت، مورد مطالعه قرار دادند و دو جهش بیماری‌زا را شناسایی نمودند که هر دو جهش از نوع تغییر قالب بودند ($c.988 \text{ del G}$ و $c.726 \text{ del T}$). هم چنین سه نوع متفاوت جهش missense شامل $793C>T$ ، $793C>G$ ، $874G>A$ در خانواده‌های ایرانی شناسایی گردیده است^۹ که البته وجود واریانت آللی $874G>A$ در مطالعات Collin و همکارانش نیز به اثبات رسیده است.^۹ با توجه به نتیجه‌ی این مطالعه و ارتباط آن با نتایج حاصل از مطالعات هاشم‌زاده، می‌توان چنین نتیجه گرفت که پلی مورفیزم $793C>G$ در بین ایرانیان نسبتاً شایع بوده و اقوام مختلف این جامعه، منبع خوبی برای بررسی پلی- مورفیزم می‌باشند. لازم به ذکر است که برای شناسایی جهش‌های ژنتیکی ناشناخته، استفاده از روش آزمایشگاهی آسان، موثر، قابل اعتماد و ارزان با قدرت تشخیص بالای جهش‌ها ضروری به نظر می‌رسد. تکنیک SSCP این خصوصیات را در بردارد.^{۱۲} البته تاثیر پارامترهای محیطی مانند طول

جدول ۲: برنامه تنظیم شده الکتروفورز محصولات SSCP و HA اگزون‌های ژن

اگزون	ولتاژ	دما	زمان	پژواکین	
				درصد ژل	
۲	۲۸۰	۴	۵h	۶٪	
۳	۲۰۰	۱۰	۵h	۶٪	
۴	۲۰۰	۱۰	۷h	۶٪	
۵	۲۰۰	۲۰	۵h	۶٪	
۶	۱۰۰	۴	۱۵h	۸٪	
7A	۲۰۰	۴	۶h	۸٪	
7B	۲۸۰	۲۰	۵h	۸٪	

یافته‌ها

در این مطالعه ۵۳ دانش‌آموز پسر و ۴۰ دانش‌آموز دختر ناشنوا از استان سیستان و بلوچستان با میانگین سنی $13/28 \pm 0/48$ مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصل از PCR-SSCP/HA در اگزون ۷A نشان دهنده‌ی سه مورد الگوی باند متفاوت از ۹۳ مورد نمونه‌ی مورد مطالعه بود (تصویر ۱). این نتایج با روش Direct Sequencing مورد تایید قرار گرفت. همه دارای واریانت آللی missense $793C>G$ بودند که این واریانت ژنی بیماری‌زا نبوده و یک چند شکلی (پلی مورفیزم) محسوب می‌شود (تصویر ۲). لازم به ذکر است که در سایر اگزون‌ها تفاوتی در باند حاصل از PCR-SSCP/HA مشاهده نگردید.



تصویر ۱: ژل پلی اکریل آمید PCR-SSCP/HA اگزون 7A ژن پژواکین/ شماره‌های ۸-۱ نمونه‌های بیماران. نمونه‌های شماره ۷ و ۸ باند متفاوت نشان داده است.

نتایج به دست آمده از این تحقیق در استان سیستان و بلوچستان در تایید نتایج سایر مطالعات، در دیگر نقاط ایران و جهان بوده است.^{۵۸-۱۱} به نظر می‌رسد که این ژن نقش چندانی در ایجاد شنوایی بازی نمی‌کند، اما با این وجود لازم است مطالعات بیشتری از نظر میزان پراکندگی جهش‌های این ژن و پروموتور آن، هم‌چنین جایگاه‌های ژنی دیگر و ارتباطشان با ناشنوایی در سایر جوامع دنیا و به‌خصوص اقوام مختلف ایرانی انجام شود.

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه‌ی آموزش و پرورش و مدارس استثنایی استان سیستان و بلوچستان و مرکز تحقیقات سلولی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، تشکر و قدردانی می‌گردد. این مطالعه از نظر مالی توسط سازمان بهزیستی استان چهارمحال و بختیاری و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد (گزارش شماره ۵۳۴) حمایت شده است.

References

- Davidson J, Hyde ML, Alberti PW. Epidemiologic patterns in childhood hearing loss: a review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1989; 17(3): 239-66.
- Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, et al. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the US school-age population. *Am J Med Genet* 2005; 46(5): 486-91.
- Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann NY Acad Sci* 1991; 630: 16-31.
- Skvorak Giersch AB, Morton CC. Genetic causes of nonsyndromic hearing loss. *Curr Opin Pediatr* 1999; 11(6): 551.
- Delmaghani S, del Castillo FJ, Michel V, et al. Mutations in the gene encoding pejvakina, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy. *Nat Genet* 2006; 38(7): 770-8.
- Rodriguez-Ballesteros M, del Castillo FJ, Martin Y, et al. Auditory neuropathy in patients carrying mutations in the otoferlin gene (OTOF). *Hum Mutat* 2003; 22(6): 451-6.
- Varga R, Kelley PM, Keats BJ, et al. Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (OTOF) gene. *J Med Genet* 2003; 40(1): 45-50.
- Hashemzadeh-Chaleshtori M, Simpson MA, Farrokhi E, et al. Novel mutations in the pejvakina gene are associated with autosomal recessive non-syndromic hearing loss in Iranian families. *Clin Genet* 2007; 72(3): 261-3.
- Collin RW, Kalay E, Oostrik J, et al. Involvement of DFNB59 mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment. *Hum Mutat* 2007; 28(7): 718-23.
- Yang T, Kahrizi K, Bazazzadeghan N. A novel mutation adjacent to the Bth mouse mutation in the TMC1 gene makes this mouse an excellent model of human deafness at the DFNA36 locus. *Clin Genet* 2010; 77(4): 395-8.
- Ebermann I, Walger M, Scholl HPN, et al. Truncating mutation of the DFNB59 gene causes cochlear hearing impairment and central vestibular dysfunction. *Hum Mutat* 2007; 28(6): 571-7.
- قطعه (بهترین طول ۳۵۰-۱۵۰ bp)،^{۱۴} دنا تورا سیون کامل قطعات،^{۱۸} ترکیب ژل^{۱۹} سیستم بافری مناسب^{۲۰} و دما در میزان دقت SSCP را نباید نادیده گرفت. دقت روش SSCP در شناسایی جهش حدود ۸۵ درصد برآورد شده است،^{۲۱} به منظور افزایش هر چه بیشتر اطمینان در نتایج حاصله، از تکنیک‌های جانبی مانند هترو دوپلکس، طراحی پرایمرهای موتانت و تعیین توالی استفاده گردید. در یک بررسی میزان ازدواج فامیلی در کشورهای آسیایی ۶۸ درصد گزارش شده است،^{۲۲} از آنجا که به نظر می‌رسد میزان ازدواج‌های فامیلی در سیستان و بلوچستان مانند اکثر مناطق ایران بالا باشد، این جمعیت منبع بسیار با ارزشی جهت تحقیق بر روی بیماری‌های ژنتیکی با توارث اتوزومال مغلوب از جمله ناشنوایی می‌باشد. تحقیقات جهت تعیین نوع جهش‌ها و تاثیر هر یک از جهش‌ها در ایجاد ناشنوایی، مانند تعیین فراوانی جهش‌های ژن DFNB59 در کشور مقدمه‌ای راه گشا در جهت بالا بردن کیفیت مشاوره‌های ژنتیکی و یا مداخلات درمانی خواهد بود.
- Sadeghi A, Sanati NH, Alasti F and Hashemzadeh-Chaleshtori M. Accessing genetic and enviromental factors of hearing loss in 354 families in Qom and Markazi provinces. *J Rehabil* 2005; 21(7): 7-10.
- Hashemzadeh-Chaleshtori M, Farhud DD, Patton MA. Familial and sporadic GJB2-related deafness in Iran: Review of gene mutations. *Iran J Public Health* 2007; 36(1): 1-14.
- Dale J, Von Schantz M. How to clone a gene. In: Dale J, Von Schantz M. From genes to genomes: concepts and applications of DNA technology. 2nd ed. West Sussex, England: Wiley-Interscience; 2007.
- Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 2005; 2(5): 338-46.
- Fujita K, Silver J. Single-strand conformational polymorphism. *PCR Methods App* 1994; 4(3): S137-40.
- Sunnucks P, Wilson AC, Beheregaray LB, et al. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol* 2000; 9(11): 1699-710.
- Humphries SE, Gudnason V, Whittall R and Day INM. Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. *Clin Chem* 1997; 43(3): 427-35.
- Ravnlk-Glavac M, Glavac D, Dean M. Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. *Hum Mol Genet* 1994; 3(5): 801-7.
- Kukita Y, Tahira T, Sommer SS and Hayashi K. SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Hum Mutat* 1999; 10(5): 400-7.
- Glavaccaron D, Dean M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat* 2005; 2(5): 404-14.
- Parving A. Epidemiological of Genetic hearing impairment. In: Martini A, Read A, Stephens D, Editors. Genetics and hearing impartment. London: Whurr Publishers; 1996: 73-82.

The contribution of autosomal recessive non-syndromic deafness to DFNB59 mutations (Pejvakini)

Marzieh Abolhasani¹, Effat Farrokhi², Mohsen Noorbakhsh³, Maryam Taherzadeh²,
Fatemeh Azadegan¹, Azam Asgari⁴, Morteza Hashmzadeh⁵

Received: 27/Feb/2010

Accepted: 17/Jul/2010

Background: Hearing loss is a common disorder affecting millions of individuals worldwide with approximately 1 in 1000 newborns. A novel gene, DFNB59 encodes Pejvakini has been recently shown to cause neural deafness. The aim of this study was to determine the frequency of DFNB59 gene mutations in 93 deaf pupils in Sistan & Baluchestan province.

Materials and Method: We investigated the frequency of DFNB59 gene mutations in the coding regions (exons 2-7) of the gene. DNA was extracted following the standard phenol chloroform procedure, the frequency of DFNB59 gene mutations was investigated using PCR-SSCP /HA strategy.

Results: No pathogenic variant was detected in samples studied. However, one polymorphism including 793C>G was determined in 3 of 93 (3.2%) subject examined.

Conclusion: The results of this study showed no association between DFNB59 gene mutations and hearing loss in Sistan va Baluchestan province. [ZJRMS, 12(3):19-23]

Keywords: PCR-SSCP, heteroduplex analysis, pejvakini, deafness

1. BSc of Genetic, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences and Health Services, Shahrekord, Iran.
2. MSc of Biochemistry, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences and Health Services, Shahrekord, Iran.
3. Medical Student, Shahrekord University of Medical Sciences and Health Services, Shahrekord, Iran.
4. MSc of Animal Physiology, Plant Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences and Health Services, Shahrekord, Iran.
5. Professor of Human Genetics, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences and Health Services, Shahrekord, Iran.