

Genetic Linkage Analysis of the DFNB21 Locus in Autosomal Recessive Hearing Loss in Large Families from Khuzestan Province

Mahtab Khosrofar¹, Mohammad Reza Pourreza², Samira Asgharzadeh³, Parisa Tahmasebi⁴, Elahe Ali Asgari⁵, Reza Ghasemikhah⁶, Nader Saki⁷, Javad Mohammadi-asl⁸, Morteza Hashemzadeh Chaleshtori⁹, Mohammad Amin Tabatabaiefar^{10*}

- 1.MSc, Department of Cellular & Molecular Biology, School of Basic Sciences, East Tehran Branch (Ghiamdast), Islamic Azad University, Tehran, Iran
- 2.MSc Student, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
- 3.PhD in Molecular Medicine, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
- 4.PhD in Molecular Genetics, Department of Biology, School of Sciences, Ilam University, Ilam, Iran
- 5.Instructor, Department of Cellular & Molecular Biology, School of Basic Sciences, East Tehran Branch (Ghiamdast), Islamic Azad University, Tehran, Iran
- 6.Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
- 7.Associate Professor, Hearing Research Center, Department of Otorinolaryngology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
- 8.Assistant Professor, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
- 9.Professor, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
- 10.Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Received:19 Dec 2016, Accepted:30 Apr 2017

Abstract

Background: Hearing loss (HL) is the most common congenital defect in humans. One or two in thousand newborn babies have prelingual hearing loss. Autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL) is the most common form of hereditary deafness. Hearing loss is more common in the developing countries which is due to genetic and environmental (cultural -health factors) reasons. HL has a wide range of clinical demonstrations including: congenital or late onset, conductive or sensory-neural, syndromic or non-syndromic hearing loss. The goal of this project is to determine the portion of the DFNB21 (*TECTA*) in ARNSHL in families with negative *GJB2* gene in Khuzestan province.

Materials and Methods: We studied 21 families with ARNSHL with at least 4 patients and negative for *GJB2* mutations from Khuzestan province. Genetic linkage analysis was performed using STR markers linked to DFNB21 locus.

Results: Following genetic linkage analysis and haplotyping, out of 21 families with ARNSHL, one family showed linkage to the DFNB21 (*TECTA*) locus.

Conclusion: The results of this project confirm other studies in Iran and give insight into the most common loci causing ARNSHL in Iran which could be helpful in research and clinic.

Keywords: Autosomal recessive non-syndromic hearing loss, DFNB21 locus, Genetic linkage.

*Corresponding Author:

Address: Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Email: tabatabaiefar@med.mui.ac.ir

مطالعه و تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی لوکوس DFNB21 در بیماری ناشنوایی مغلوب اتوزومی در خانواده‌های بزرگ استان خوزستان

مهتاب خسروفر^۱، محمد رضا پوررضا^۲، سمیرا اصغرزاده^۳، پریسا طهماسبی^۴، الهه علی عسگری^۵، رضا قاسمی خواه^۶، نادر صاکی^۷، جواد محمدی اصل^۸، مرتضی هاشم زاده چالستری^۹، محمد امین طباطبایی فر^{۱۰*}

۱. کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی سلولی و ملکولی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شرق (قیامدشت)، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک و زیست شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳. متخصص پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴. متخصص ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
۵. مربی، گروه زیست شناسی سلولی و ملکولی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شرق (قیامدشت)، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۶. استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۷. دانشیار، مرکز تحقیقات شنوایی، گروه گوش، حلق و بینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۸. استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۹. استاد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۱۰. دانشیار، گروه ژنتیک و زیست شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: ناشنوایی یکی از متداول ترین ناهنجاری‌های مادرزادی است. یک تا دو مورد از هر ۱۰۰۰ تولد دارای ناشنوایی پیش از تکلم می‌باشند. ناشنوایی غیر نشانگانی مغلوب اتوزومی متداول ترین نوع ناشنوایی ارثی است. رواج ناشنوایی در کشورهای در حال توسعه بیش تر می‌باشد که عواملی چون ژنتیک و محیط (عوامل فرهنگی- بهداشتی) در بروز آن نقش دارند. ناشنوایی طیف گسترده‌ای از تظاهرات بالینی مادرزادی یا دیررس، هدایتی یا حسی-عصبی، نشانگانی یا غیرنشانگانی را شامل می‌شود. هدف از این پژوهش، تعیین سهم لوکوس DFNB21 (*TECTA*) در ایجاد ناشنوایی غیر نشانگانی مغلوب اتوزومی در گروهی از خانواده‌های اهل استان خوزستان بود که برای ژن *GJB2* منفی بودند.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی ۲۱ خانواده مبتلا به ناشنوایی غیر نشانگانی مغلوب اتوزومی با حداقل ۴ فرد بیمار و منفی برای جهش‌های *GJB2* در استان خوزستان انجام شد. تجزیه و تحلیل پیوستگی با استفاده از نشان‌گرهای STR پیوسته به لوکوس DFNB21 انجام گردید.

یافته‌ها: پس از رسم هاپلوتیپ و بررسی پیوستگی، از مجموع ۲۱ خانواده، یک خانواده به DFNB21 (*TECTA*) پیوستگی نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش موید سایر مطالعات انجام شده در ایران است و ارائه گر یک دیدگاه کلی در زمینه‌ی فراوان ترین لوکوس‌های دخیل در بیماران مبتلا به ناشنوایی غیر نشانگانی مغلوب اتوزومی در ایران است که می‌تواند برای پژوهش و بالین مفید باشد.

واژگان کلیدی: ناشنوایی غیر نشانگانی مغلوب اتوزومی، لوکوس DFNB21، پیوستگی ژنتیکی

*نویسنده مسئول: ایران، اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک و زیست شناسی مولکولی

Email: tabatabaiefar@med.mui.ac.ir

مقدمه

بیماری ناشنوایی یکی از ناهمگن‌ترین اختلالات بوده و شایع‌ترین اختلالات حسی-عصبی می‌باشد عوامل محیطی و ژنتیکی در آن نقش دارند (۱). حدوداً ۷۰ درصد ناشنوایی‌های ژنتیکی غیر سندرمی است. بدین معنی که فرد به جز ناشنوایی با اختلال دیگری درگیر نمی‌باشد. ناشنوایی غیر نشانگانی مغلوب اتوزومی متداول‌ترین فرم ناشنوایی ارثی می‌باشد (۲). ژن‌های متعددی در بروز ناشنوایی غیر نشانگانی دخیل هستند که در حدود ۱۰۰ جایگاه ژنی برای آن تخمین زده شده است (۳). تشخیص دیر هنگام ناشنوایی تاثیر عمیقی بر روی قابلیت‌های زبانی و ارتباطی یک کودک خواهد داشت (۴).

طی مطالعه‌ای بر روی یک خانواده لبنانی با نه فرد مبتلا به ناشنوایی غیر نشانگانی مغلوب اتوزومی پیش زبانی شدید تا عمیق، جهش در ژن *TECTA* روی کروموزوم ۲۵-۱۱q۲۳ به عنوان ژن جدید شناسایی شد (۵). در برخی از خانواده‌ها آدیوگرام با الگوی مشخص U شکل دیده می‌شود (۶). هم‌چنین جهش‌های این ژن باعث ناشنوایی غیر نشانگانی غالب اتوزومی می‌شود (۷). این ژن با بیست و سه اگزون، کدکننده پروتئین آلفا-تکتورین می‌باشد. آلفا-تکتورین به صورت پروتئولیتیک به سه پلی پپتید شکسته می‌شود. این سه رشته پلی پپتیدی از طریق پیوند دی سولفیدی به هم متصل شده و با بتا-تکتورین تعامل می‌کنند و جز غیر کلاژنی غشا تکتورین در گوش داخلی را تشکیل می‌دهند. غشا تکتوریال یک غشا ماتریکس خارج سلولی در گوش داخلی است که دستجات استرئوسیلیای مربوط به سلول‌های مویی حسی را به هم وصل می‌کند. نیروهای مکانیکی امواج صوتی، بین سلول‌های مویی لرزش ایجاد کرده و غشا تکتورین در دستجات مویی خمش ایجاد می‌کند و باز کردن کانال‌های پتاسیم را به دنبال دارد که خود ورود پتاسیم از آندولنف و آزاد شدن نوروترانسمیترها

را موجب می‌شود و سرانجام، عصب شنوایی فعال می‌شود (۷، ۸).

هدف از این پژوهش تعیین سهم لوکوس DFNB21 در ایجاد ناشنوایی اتوزومال مغلوب در گروهی از خانواده‌های ناشنوای اهل استان خوزستان بود. در این مطالعه تعداد ۲۱ خانواده با حداقل ۴ فرد ناشنوا در شجره حاصل ازدواج خویشاوندی مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از بررسی و جمع‌آوری اطلاعات شجره‌نامه و تست نوار گوش نمونه خون افراد گرفته شد و نیز DNA افراد استخراج گردید و پس از انجام PCR برای مارکرهای STR و الکتروفورز موینه محصولات، پیوستگی به لوکوس مد نظر مورد ارزیابی قرار گرفتند که از این میان یک خانواده به لوکوس DFNB21 پیوستگی نشان داد.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

بررسی شجره نامه‌ها و پرسش‌نامه‌های تکمیل شده از خانواده‌های ناشنوای سراسر استان با همکاری سازمان بهزیستی، اداره آموزش و پرورش استثنایی و کلینیک گوش، حلق و بینی دانشگاه (این طرح مصوب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز و علوم پزشکی اصفهان می‌باشد) و انتخاب ۲۱ خانواده بزرگ‌تر دارای حداقل ۴ مورد ناشنوا با الگوی ناشنوایی غیر نشانگانی مغلوب اتوزومی (ARNSHL) و بدون درگیری عوامل محیطی مانند عفونت‌ها از جمله سرخچه، مننژیت و داروهای سمی برای گوش توضیح آن که، ناشنوایی باید به صورت پیش از تکلم و غیر پیش رونده باشد. رضایت نامه کتبی از افراد شرکت کننده در پژوهش یا سرپرست آن‌ها گرفته شد و سپس ۵ الی ۱۰ میلی‌لیتر خون وریدی در لوله آزمایش حاوی ضد انعقاد EDTA 0.5mM جمع آوری شد.

آزمایشات مولکولی

استخراج DNA: به روش نمک اشباع با استفاده از پروتیناز K و فنل کلروفرم صورت گرفت. بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از ژل آگارز ۱.۲٪ و دستگاه Nano Drop (ساخت کمپانی Maestrogene، کشور تایوان) سنجیده شد.

انجام PCR: آزمایشات با طراحی جفت پرایمر مربوط به نشانگرهای STR پیوسته به لوکوس DFNB21 انجام شد. پرایمرهای لازم جهت تکثیر STRها از طریق پایگاه NCBI Uni STS انتخاب شدند. واکنش PCR در حجم 25µl حاوی بافر 1X، 0.2mM dNTP، 1.5mM mgcl₂ از پرایمرهای forward و reverse و 50ng از DNA ژنومی انجام شد.

تعیین ژنوتیپ: تعیین ژنوتیپ با استفاده از الکتروفورز موینه (Q Sep100 DNA Fragment Analyser آمریکا) صورت گرفت. ابتدا کاتریج قلم مانند

را داخل دستگاه قرار داده و پس از آن نمونه‌ها را داخل دستگاه قرار داده و دستگاه را روشن می‌کنیم. نتایج آنالیز را می‌توان ۶۰۰-۱۲۰ ثانیه بعد مشاهده کرد. در این تکنیک، زمانی که ژل‌ها تحت ولتاژ قرار می‌گیرند قطعات DNA به دلیل داشتن بار منفی ناشی از فسفات موجود در ساختار خود به سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند که توسط نور لیزر که طول موج آن به ملکول فلورسنت بستگی دارد. نتایج به صورت باندهایی مشاهده می‌شوند که در آن هموزیگوت‌ها به صورت تک قله و هتروزیگوت‌ها دو قله نمایش داده می‌شوند. دستگاه دارای یک DNA سایز مارکر استاندارد نیز می‌باشد. شایان ذکر است که برای اولین بار در ایران از این دستگاه استفاده شده و از مزایای آن می‌توان به مقرون به صرفه بودن آن و دقت بالای (قدرت تفکیک ۴-۱ bp) آن اشاره کرد. در شکل‌های ۱ و ۲ اطلاعات به همراه جزئیات مربوطه ترسیم شده است.

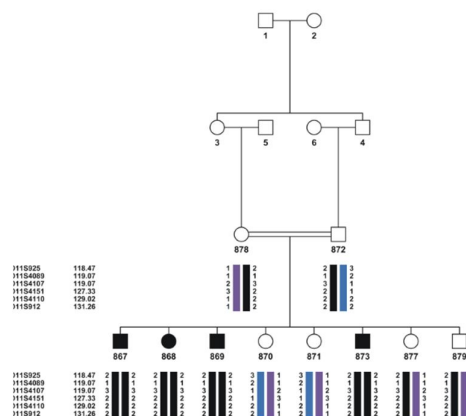


شکل ۱. دستگاه کیلاری الکتروفورز تمام اتومات (USA)Bioptic Q Sep100 DNA Fragment Analyser

یافته‌ها

افراد مورد مطالعه دارای ناشنوایی غیر نشانگانی غیر پیش رونده دو طرفه حسی-عصبی با شدت متوسط تا عمیق بودند. در تمامی خانواده‌ها افراد مبتلا حاصل ازدواج خویشاوندی بودند که پیشنهاد دهنده الگوی وراثتی مغلوب آتوزومی بود. بررسی اطلاعات پرسشنامه‌ای و پرونده بیماران و تکرر رخداد بیماری در شجره‌ها نشان دهنده ژنتیکی بودن بیماری است. در ۲۱ خانواده مورد مطالعه Slink بالاتر از ۲/۵ معنی دار در نظر گرفته شد و وارد مطالعه آنالیز پیوستگی ژنتیکی شدند. خانواده‌ها برای جهش های ژن *GJB2* منفی بودند.

در این مطالعه یک خانواده (۴/۷ درصد از خانواده‌ها) با چهار فرزند مبتلا به ناشنوایی حاصل ازدواج خویشاوندی با قدرت آماری ۲/۹ به لوکوس DFNB21 پیوستگی نشان داد. آدیوگرام بیماران شدت متوسط تا شدید کاسه‌ای شکل با الگوی غیر پیش‌رونده بود. الگوی باندها در والدین به صورت هموزیگوت و در افراد مبتلا به صورت هموزیگوت بود (شکل ۲). خواهران و برادر سالم هتروزیگوت بودند. امتیاز LOD دو نقطه‌ای و چند نقطه‌ای به ترتیب ۲/۶ و ۳/۱ به دست آمد. هاپلوتایپ ترسیم شده پیوستگی به این لوکوس را تایید کرد (شکل ۳).



شکل ۳. هاپلوتایپ و شجره خانواده. ازدواج خویشاوندی و رخداد ناشنوایی در چهار فرد در یک نسل بیان گر الگوی وراثتی مغلوب آتوزومی است. هاپلوتایپ بیماران هموزیگوت بودن برای مارکرها را نشان می دهد در حالی که افراد سالم فاقد آن هاپلوتایپ هستند و یا هتروزیگوت اند.

بحث

ناشنوایی یکی از هتروژن‌ترین اختلالات بوده و رایج‌ترین بیماری حسی-عصبی می‌باشد. جهت تعیین نقش لوکوس DFNB21 در استان خوزستان ۲۱ خانواده با بیماران مبتلا به ناشنوایی غیر نشانگانی مغلوب آتوزومی و منفی برای جهش‌های ژن *GJB2* با استفاده از روش آنالیز پیوستگی بررسی شدند.

مطالعه جداگانه ۳۱ و ۴۵ خانواده ایرانی و منفی برای *GJB2* مورد تجزیه و تحلیل پیوستگی قرار گرفتند که به ترتیب ۱ و ۳ خانواده به این لوکوس پیوستگی نشان دادند (۹، ۱۰). در مطالعه تجزیه و تحلیل پیوستگی ۴۰ خانواده ایرانی از استان‌های قم و مرکزی هیچ خانواده‌ای به این لوکوس پیوستگی نشان نداد (۱۱). در یک مطالعه کوهورت با حجم ۱۴۴ خانواده ایرانی، پنج خانواده به این جایگاه پیوستگی نشان دادند و جهش‌های ژن *TECTA* در آنها یافت شد، از این میان یک مورد جهش جدید نیز گزارش شد (۱۲). در یک مطالعه چند ملیتی بر روی ۱۶۰ خانواده که ۵۴ مورد ۳۶

پس از اولین گزارش ژن *TECTA* در بروز ناشنوایی، ناز و همکاران جهش در این ژن را در دو خانواده خویشاوند ایرانی و پاکستانی گزارش کردند (۶). در دو

منابع

1. Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med*. 2006;354(20):2151-64.
2. Gurtler N, Lalwani AK. Etiology of syndromic and nonsyndromic sensorineural hearing loss. *Otolaryngologic clinics of North America*. 2002;35(4):891-908.
3. Chang KW. Genetics of Hearing Loss--Nonsyndromic. *Otolaryngologic clinics of North America*. 2015;48(6):1063-72.
4. Yoshinaga-Itano C, Sedey AL, Coulter DK, Mehl AL. Language of early- and later-identified children with hearing loss. *Pediatrics*. 1998;102(5):1161-71.
5. Mustapha M, Weil D, Chardenoux S, Elias S, El-Zir E, Beckmann JS, et al. An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Human molecular genetics*. 1999;8(3):409-12.
6. Naz S, Alasti F, Mowjoodi A, Riazuddin S, Sanati MH, Friedman TB, et al. Distinctive audiometric profile associated with DFNB21 alleles of TECTA. *Journal of medical genetics*. 2003;40(5):360-3.
7. Verhoeven K, Van Laer L, Kirschhofer K, Legan PK, Hughes DC, Schatteman I, et al. Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nature genetics*. 1998;19(1):60-2.
8. Legan PK, Rau A, Keen JN, Richardson GP. The mouse tectorins. Modular matrix proteins of the inner ear homologous to components of the sperm-egg adhesion system. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(13):8791-801.
9. Meyer NC, Alasti F, Nishimura CJ, Imanirad P, Kahrizi K, Riazalhosseini Y, et al. Identification of three novel TECTA mutations in Iranian families with autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment at the DFNB21 locus. *American journal of medical genetics Part A*. 2007;143A(14):1623-9.

ایرانی بودند با استفاده از تکنیک توالی یابی کل اگزوم سبب شناسی یکی از خانواده‌ها به علت ژن *TECTA* بود (۱۳). در مطالعه‌ای بر روی ۳۰۲ خانواده ایرانی و منفی برای جهش‌های *GJB2* با استفاده از توالی یابی هدفمند نسل جدید جهش‌های هموزیگوت در ۴ خانواده مشاهده شد (۱۴).

با توجه به این که در مطالعات پیشین و این مطالعه اثبات می‌شود پروفایل ناشنوایی معتدل تا شدید است، از این رو بررسی این ژن در کنار ژن *CABP2* می‌تواند در بررسی‌های ژنتیکی کارآمد باشد (۱۵). با توجه به دخالت کم ژن *GJB2* در جمعیت مزبور و هتروژنی فوق العاده این بیماری (با دخالت بیش از ۱۰۰ لوکوس) که ناشی از پیچیدگی دستگاه شنوایی است، و نیز این که تعداد زیادی از خانواده‌ها به دلیل دارا بودن امتیاز *SLINK* پایین یا ساختار شجره‌ای نه چندان مناسب برای مطالعه ژنومی، رسیدن به این نتیجه می‌تواند جالب باشد. شناسایی عوامل ژنتیکی برای خانواده‌های باقیمانده می‌تواند در بررسی‌های بعدی انجام شود به ویژه در زمانی که فن‌آوری‌های جدید توالی‌یابی برای این نوع از بررسی‌ها بهینه سازی شده باشد. نتایج این پژوهش تا حدودی نتایج دیگر مطالعات انجام شده در ایران را تأیید می‌کند و یک دید کلی نسبت به فراوان‌ترین لوکوس‌های دخیل در بیماران *ARNSHL* ایرانی ارائه می‌دهد که می‌تواند برای پژوهش و بالین مفید باشد.

تشکر و قدردانی

از تمام بیماران و خانواده‌های محترم آن‌ها جهت همکاری و شرکت در این تحقیق صمیمانه سپاس‌گزاری می‌نماید. این کار با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان (۱۹۴۰۶۸) و معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز (U-91074) انجام شده است.

13. Bademci G, Foster J, 2nd, Mahdiah N, Bonyadi M, Duman D, Cengiz FB, et al. Comprehensive analysis via exome sequencing uncovers genetic etiology in autosomal recessive nonsyndromic deafness in a large multiethnic cohort. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2016;18(4):364-71.
14. Sloan-Heggen CM, Babanejad M, Beheshtian M, Simpson AC, Booth KT, Ardalani F, et al. Characterising the spectrum of autosomal recessive hereditary hearing loss in Iran. *Journal of medical genetics*. 2015;52(12):823-9.
15. Schrauwen I, Helfmann S, Inagaki A, Predoehl F, Tabatabaiefar MA, Picher MM, et al. A mutation in CABP2, expressed in cochlear hair cells, causes autosomal-recessive hearing impairment. *American journal of human genetics*. 2012;91(4):636-45.
10. Tabatabaiefar M, Alasti F, Zohour MM, Shariati L, Farrokhi E, Farhud D, et al. Genetic Linkage Analysis of 15 DFNB Loci in a Group of Iranian Families with Autosomal Recessive Hearing Loss. *Iranian journal of public health*. 2011;40(2):34-48.
11. Sadeghi A SM AF, Hashemzadeh Chaleshtori M, Mahmoudian S, Ataei M. Contribution of GJB2 mutations and Four common DFNB loci in autosomal recessive non-syndromic hearing impairment in Markazi and Qom provinces of Iran. *Iran j Biotechnol*. 2009;7(2):108-11.
12. 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. *American journal of medical genetics Part A*. 2012;158A(10):2485-92.