



دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکتری تخصصی

رشته پزشکی مولکولی

شماره طرح تحقیقاتی: 394531

عنوان:

مطالعه و تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی جهت شناسایی
لوکوس های $(GJB2, GJB6)DFNB1$ ، $(MYO7A)DFNB2$ ،
 $(MYO15A)DFNB3$ ، $(SLC26A4)DFNB4$ ، $(TMC1)DFNB7/11$ ،
 $(TECTA)DFNB21$ و $(GRXCR2)DFNB101$ عامل ناشنوایی غیر
نشانگانی با وراثت مغلوب اتوزومی در 20 خانواده منفی
برای جهش های $GJB2$ در استان اصفهان

اساتید راهنما

دکتر محمد امین طباطبایی فر

دکتر مرتضی هاشم زاده چالشتی

اساتید مشاور

دکتر منصور صالحی

دکتر حمیدرضا ابطحي

دکتر محمد رضا نوری دلویی

نگارش

محبوبه کوهیان

اسفندماه 1396

مطالعه و تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی جهت شناسایی لوکوس های
(*MYO15A*)DFNB3 ، (*MYO7A*)DFNB2 ، (*GJB2, GJB6*)DFNB1
(*TECTA*)DFNB21 ، (*TMC1*)DFNB7/11 ، (*SLC26A4*)DFNB4
(*GRXCR2*)DFNB101 عامل ناشنوایی غیر نشانگانی با وراثت مغلوب
اتوزومی در 20 خانواده منفی برای جهش‌های *GJB2* در استان اصفهان

چکیده

مقدمه: ناشنوایی شایع‌ترین نقص حسی عصبی در هنگام تولد است که تقریباً 1/1000 نوزاد را درگیر می‌کند. بیشتر از 50% موارد ناشنوایی ارثی هستند و تقریباً 70% موارد ناشنوایی ارثی، غیر نشانگانی است که حدود 80% این نوع ناشنوایی به صورت مغلوب اتوزومی به ارث می‌رسد. ناشنوایی یک اختلال بسیار هتروژن است به طوری که تاکنون بیش از صد لوکوس مؤثر در ناشنوایی غیر نشانگانی مغلوب اتوزومی نقشه‌یابی شده است. با توجه به ویژگی‌های جمعیتی ایران که شامل قومیت‌های مختلف است و همچنین فراوانی ازدواج‌های خویشاوندی، تعیین سبب‌شناسی ناشنوایی بر اساس قومیت در این کشور ضروری است. هدف از مطالعه حاضر، تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی 7 لوکوس شایع عامل ناشنوایی غیر نشانگانی مغلوب اتوزومی در 20 خانواده منفی برای جهش‌های ژن *GJB2* در استان اصفهان است.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی، 30 خانواده دارای حداقل 3 فرد ناشنوا از استان اصفهان با ناشنوایی غیر نشانگانی مغلوب اتوزومی انتخاب شدند. پس از استخراج DNA ژنومیک از نمونه خون بیماران، ژن *GJB2* به طور مستقیم تعیین توالی شد. سپس ژن *GJB6* برای وجود حذف‌های بزرگ در این ژن مورد بررسی قرار گرفت. افراد فاقد جهش در این دو ژن، به منظور تعیین ارتباط ناشنوایی با 6 ژن دیگر عامل ناشنوایی واقع در لوکوس های *DFNB2*، *DFNB3*، *DFNB4*، *DFNB7/11*، *DFNB21* و *DFNB101* از طریق آنالیز پیوستگی بررسی شدند. در ادامه، دو خانواده (*ISF-13 & ISF-19*) دارای ارزش *SLINK* 2/54 و 2/2 که به هیچ‌کدام از لوکوس های مورد مطالعه پیوستگی نشان نداده بودند تحت بررسی توالی‌یابی کل اگزوم قرار گرفتند.

یافته‌ها: مجموعاً 7 خانواده دارای جهش هموزیگوس بیماری‌زا در ژن *GJB2* بودند. جهش‌های ژن *GJB6* در هیچ خانواده‌ای یافت نشد و 5 خانواده هم به 3 لوکوس زیر پیوستگی نشان دادند: 1 خانواده به لوکوس *DFNB2*، 1 خانواده به لوکوس *DFNB3* و 3 خانواده هم به لوکوس *DFNB4*، توالی ژن‌های مربوطه سه جهش در ژن *SLC26A4* را مشخص کرد. در خانواده‌های مورد مطالعه از طریق توالی‌یابی کل اگزوم، پس از تجزیه و تحلیل اطلاعات حاصل از توالی‌یابی، دو واریانت جدید شناسایی شد. در شجره *ISF-13* واریانت *c.311G>A* در ژن *CABP2* لوکوس *DFNB93* و در شجره *ISF-19* واریانت *c.2977G>A* در ژن *CDH23* لوکوس *DFNB12* شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه جهش‌های ژن *GJB2* و *SLC26A4* دلایل اصلی ناشنوایی بودند. هیچ موردی از جهش‌های ژن *GJB6* مشاهده نشد. لوکوس های *DFNB21*، *DFNB7/11* و *DFNB101* اهمیت چندانی در بروز ناشنوایی در جمعیت مورد مطالعه نداشتند. به این ترتیب ژن های

GJB2، *SLC26A4*، *MYO7A* و *MYO15A* جزء ژن هايي هستند كه مي توانند در پانل ناشنوايي مربوط به استان اصفهان قرار گيرند. **كليدواژه:** ناشنوايي غير نشانگاني اتوزومي مغلوب (ARNSHL)، تجزيه و تحليل پيوستگي ژنتيكي، *GJB2*، ايران

فهرست مطالب

عنوان

صفحه

فصل اول: معرفی پژوهش.....	1
1-1- مقدمه.....	1
1-2- بیان مسئله و ضرورت اجرای پژوهش.....	2
1-3- اهداف پژوهشی.....	5
1-3-1- هدف کلی.....	5
1-3-2- اهداف اختصاصی.....	6
1-3-3- اهداف کاربردی.....	6
1-4- سئوالات پژوهشی.....	8
1-5- تعریف واژه ها.....	8
فصل دوم: مبانی نظری و پیشینه پژوهش.....	8
2-1- مقدمه.....	9
2-2- ساختمان گوش.....	10
2-2-1- گوش خارجی.....	10
2-2-2- گوش میانی.....	11
2-2-3- گوش داخلی.....	11
2-2-3-1- حلزون.....	12
2-2-3-2- غشای پایه‌ای و تشدید در حلزون.....	13
2-2-3-4- سلول‌های مویی.....	14
2-3- فیزیولوژی شنوایی.....	15
2-3-1- امواج صوتی و فرکانس‌های قابل شنیدن.....	15
2-3-2- انتقال صوت و شنوایی.....	16
2-3-3- مسیر عصبی شنوایی.....	16
2-3-4- سنجش شنوایی.....	17
2-4- دسته بندی انواع ناشنوایی.....	19
2-4-1- ناشنوایی انتقالی.....	20
2-4-2- ناشنوایی حسی-عصبی.....	21
2-4-3- ناشنوایی مختلط.....	21
2-5- اپیدمیولوژی ناشنوایی.....	22
2-6- ناشنوایی غیر ژنتیکی.....	22
2-7- ناشنوایی ژنتیکی.....	23
2-7-1- ناشنوایی نشانگانی.....	23
2-7-1-1- نشانگان آشر.....	24
2-7-1-2- نشانگان پندرد.....	24
2-7-2- ناشنوایی غیرنشانگانی.....	24
2-7-2-1- ناشنوایی غیرنشانگانی مغلوب اتوزومی.....	25
2-7-2-2- ناشنوایی وابسته به کروموزوم‌های جنسی.....	25
2-7-2-3- ناشنوایی میتوکندریایی.....	26

- 8-2- برخی از ژن‌های درگیر در مراحل شنوایی انسان و عملکرد آنها 26
- 27..... 2-8-1- انواع ژن‌ها براساس محل فیزیولوژیکی اثر..... 27
- 27..... 2-8-1-1- ژن‌هایی که در غشای تکتول (TM) بیان می‌گردند..... 27
- 27..... 2-8-1-2- ژن‌هایی که در سلول‌های مژکدار حلزون بیان می‌گردند..... 27
- 27..... 2-8-1-3- ژن‌هایی که در سلول‌های ای‌تلیال و بافت همبند حلزون بیان می‌شوند..... 27
- 27..... 2-8-2- انواع ژن‌ها براساس عملکرد..... 27
- 28..... 2-8-2-1- ژن‌های دخیل در همئوستازی حلزون..... 28
- 28..... 2-8-2-1-1- ژن‌های دخیل در همئوستازی حلزون..... 28
- 28..... 2-8-2-1-2- ژن KCNQ4..... 28
- 29..... 2-8-2-2- ژن TMC1..... 29
- 29..... 2-8-2-3- ژن‌های تنظیمی مسئول فاکتورهای رونویسی..... 29
- 29..... 9-2- بیماری‌های گوش..... 29
- 30..... 2-9-1- اختلالات مادرزادی..... 30

10-2- تجزیه و تحلیل

..... پیوستگی.....

.....

30.....

- 30..... 2-10-1- ویژگی‌های یک شجره‌ی مناسب برای تجزیه و تحلیل پیوستگی..... 30
- 31..... 2-11- امتیاز LOD..... 31
- 31..... 2-12- نقشه برداری ژنوم..... 31

.....

.....

31.....

- 32..... 2-13- تعیین ژنوتیپ..... 32
- 33..... 2-14- انواع نشانگرها..... 33
- 34..... 2-14-1- RFLP..... 34
- 34..... 2-14-2- VNTR..... 34
- 34..... 2-14-3- STR..... 34
- 35..... 2-14-4- SNP..... 35
- 35..... 2-15- تعیین توالی..... 35
- 36..... 2-15-1- تعیین توالی نسل جدید..... 36
- 36..... 2-15-2- مفهوم پوشش در تعیین توالی..... 36
- 36..... 2-15-3- توالی یابی کل اگزوم..... 36

.....

.....

37.....

- 37..... 2-3- مروری بر پیشینه پژوهش..... 37
- 37..... 2-3-1- لوکوس DFNB1..... 37
- 38..... 2-3-1-1- GJB2..... 38
- 38..... 2-3-1-2- GJB6..... 38

39DFNB2 لوکوس	2-3-2
40DFNB3 لوکوس	3-3-2
41DFNB4 لوکوس	4-3-2
41DFNB7/11 لوکوس	5-3-2
42DFNB21 لوکوس	6-3-2
43DFNB101 لوکوس	7-3-2
43DFNB93 لوکوس	8-3-2
44DFNB12 لوکوس	9-3-2
46 فصل سوم: مواد و روش‌ها	
47 1-3- نوع مطالعه	

2-3- جمعیت مورد مطالعه

.....
.....

47

47 1-2-3- نمونه برداری و شرایط نمونه ها	
47 2-2-3- نمونه گیری.....	
48 3-2-3- استخراج DNA ژنومی.....	
50 1-3-2-3- استخراج DNA ژنومی به روش فنل-کلروفرم.....	
50 2-3-2-3- طرز تهیهی بافر لیز گلبول‌های قرمز خون.....	
51 3-3-2-3- طرز تهیه محلول SDS 10 درصد.....	
51 4-3-2-3- محلول پروتئیناز K.....	
52 5-3-2-3- فنل اشباع.....	
52 6-3-2-3- ایزوآمیل الکل-کلروفرم 1:24.....	
53 7-3-2-3- نحوهی استخراج DNA از نمونه خون به روش فنل کلروفرم..	
53 8-3-2-3- بررسی کیفیت و کمیت DNA.....	
53 3-2-3- بررسی وجود جهش های GJB2.....	
54 4-2-3- تکثیر ژن GJB2.....	
54 1-4-2-3- نحوه انجام واکنش.....	
54 5-2-3- بررسی شجره ها از نظر جهش های حذفی GJB6.....	
55 6-2-3- انتخاب نشانگرها و لوکوس ها.....	
56 7-2-3- تعیین ژنوتیپ نشانگرهای STR.....	
59 1-7-2-3- روش تاج داون.....	
59 2-7-2-3- ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید.....	
60 1-2-7-2-3- نحوه بستن ژل و انجام الکتروفورز.....	
61 2-2-7-2-3- بارگذاری محصولات PCR در ژل.....	
62 3-7-2-3- رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید به روش نیترات نقره.....	
63 1-3-7-2-3- مواد و محلول های لازم برای رنگ آمیزی.....	
64 2-3-7-2-3- نحوه رنگ آمیزی رنگ آمیزی.....	
65 4-7-2-3- بررسی نتایج ژل پلی اکریل آمید جهت تجزیه و تحلیل پیوستگی.....	
65 8-2-3- بتجزیه و تحلیل پیوستگی، محاسبه ارزش SLINK و امتیاز LOD.....	

66	MYO7A	ژن هاي جهش	غربالگري	9-2-3
67	SLC26A4	ژن هاي جهش	غربالگري	10-2-3
68	MYO15A	ژن هاي جهش	غربالگري	11-2-3
69	SLC26A4	ژن هاي جهش	غربالگري	12-2-3
70		توالي يابي	كل اگزوم	3-3
71		آماده سازي نمونه	برای ارسال به شرکت اتوژنتیک	1-3-3
71		تعيين توالي به وسيله	شرکت اتوژنتیک	2-3-3
		تفسير نتايج با استفاده	از سرورهای تعيين کننده ی آسيپرسان	3-4
72		بودن تغيير اسيد آمينه ای		72
72	SIFT			1-4-3
73	POLYPHEN2			2-4-3
74	PANTHER			3-4-3
75	PROVEAN			4-4-3
75	IMUTANT			5-4-3
76	MUTATION TASTER			6-4-3
76		بررسی توالی يابی	اگزوم	5-3
77	CDH23 و CABP2	در ژن	واریانت جديد	6-3
77	CDH23 و CABP2	در ژن	واریانت جديد	1-6-3
78		بررسی وجود يا عدم وجود	واریانت در گروه کنترل	2-6-3
79	Tetra-ARMS-PCR			1-2-6-3
79		بررسی ماهیت واریانت و اسيد آمينه	تغيير یافته	3-6-3
81		کليه دستگاه های استفاده شده	در مراحل مختلف اين پژوهش	4-6-3
82		زمان و مکان پژوهش		7-3
83		متغيرهاي پژوهشي		8-3
83		روش تجزيه و تحليل داده ها		9-3
84		ملاحظات اخلاقی		10-3
85		محدوديتها و مشکلات اجرای طرح		11-3
86		فصل چهارم: نتايج		
87		نمونه های مورد مطالعه		1-4
90		استخراج DNA و بررسی کیفی و کمی آن		2-4
91	GJB2	نتايج بررسی ژن		3-4
92	GJB6	نتايج بررسی حذف هاي موجود در ژن		4-4
92	SLINK	نتايج محاسبه		5-4
93		تعيين ژنوتیپ و تجزيه و تحليل پیوستگی		6-4
93	DFNB4	خانواده ای پیوسته به لوکوس		7-4
96	ISF-5	خانواده		1-7-4
100	ISF-2	خانواده		2-7-4
103	ISF-17	خانواده		3-7-4
106	DFNB3	خانواده ای پیوسته به لوکوس		8-4
106	ISF-14	خانواده		1-8-4

107	9-4-خانواده اي پيوسته به لوکوس DFNB2
108	1-9-4-خانواده ISF-12
109	10-4- خلاصه اي از خانواده هاي پيوسته به لوکوس هاي مورد مطالعه
110	11-4- نتايج بررسي توالي يابي اگزوم
111	1-11-4- شجره ISF-13
115	2-11-4- شجره ISF-19
119	12-4- نتايج PCR و PAGE اگزون 4 ژن CABP2
121	13-4- نتايج بررسي شواهد بيماري زايي و اريانت جديد c.311G>A
123	14-4- نتايج PCR و PAGE اگزون 26 ژن CDh23
125	15-4- نتايج بررسي شواهد بيماري زايي و اريانت جديد c.2977G>A
129	پنجم: بحث و نتيجه گيري
130	1-5- مقدمه
131	2-5- نقش جهش هاي GJB2 در بروز ناشنوايي
133	3-5- بررس دو حذف شايع در ژن GJB6
134	4-5- مطالعه پيوستگي خانواده ها
135	5-5- بررسي نتايج تجزيه و تحليل پيوستگي
136	1-5-5- بررسي پيوستگي به لوکوس DFNB4
137	2-5-5- بررسي پيوستگي به لوکوس DFNB3
138	3-5-5- بررسي پيوستگي به لوکوس DFNB2
139	4-5-5- عدم پيوستگي به لوکوس هاي DFNB7/11 ، DFNB101 ، DFNB21
142	6-5- بررسي نتايج توالي يابي شجره هاي ISF-13 و ISF-19
146	7-5- رتبه بندي ژن هاي ناشنوايي در استان اصفهان
148	8-5- نتيجه گيري و پيشنهاها
150	فهرست منابع
162	پيوست 1

فهرست جدولها

عنوان

صفحه

68	جدول 1-3- متغير هاي پژوهش
75	جدول 2-3- انواع نشانگرهاي لوکوس DFNB39 و توالي پرايمرهاي مربوط به آنها
75	جدول 3-3- انواع نشانگرهاي لوکوس DFNB53 و توالي پرايمرهاي مربوط به آنها
78	جدول 4-3- مقادير لازم براي PCR نشانگرهاي لوکوس DFNB39
79	جدول 5-3- مقادير لازم براي PCR نشانگرهاي لوکوس DFNB53
80	جدول 6-3- برنامه ي دمائي PCR نشانگر D7S2212
80	جدول 7-3- برنامه ي دمائي PCR نشانگر D7S2443
81	جدول 8-3- برنامه ي دمائي PCR نشانگر D7S820

81	جدول 3-9- برنامه‌ی دمایی PCR نشانگر D7S804
82	جدول 3-10- برنامه‌ی دمایی PCR نشانگر D7S802
82	جدول 3-11- برنامه‌ی دمایی PCR نشانگر D7S634
83	جدول 3-12- برنامه‌ی دمایی PCR نشانگر D6S2414
83	جدول 3-13- برنامه‌ی دمایی PCR نشانگر D6S1560
84	جدول 3-14- برنامه‌ی دمایی PCR نشانگر D6S1629
84	جدول 3-15- برنامه‌ی دمایی PCR نشانگر D6S963
85	جدول 3-16- برنامه‌ی دمایی PCR نشانگر D6S439
85	جدول 3-17- برنامه‌ی دمایی PCR نشانگر D6S1666
86	جدول 3-18- برنامه‌ی دمایی PCR نشانگر D6S1014
89	جدول 3-19- مقادیر لازم جهت تهیه‌ی ژل 8 درصد (29:1)
90	جدول 3-20- مقادیر لازم جهت تهیه‌ی ژل 12 درصد (29:1)
90	جدول 3-21- مقادیر لازم جهت تهیه‌ی ژل 10 درصد (19:1)
98	جدول 3-22- ژن‌های موجود در پنل ناشنوایی شرکت اتوژنتیک
	جدول 3-23- سرورهای بررسی درجه‌ی آسیب رسان بودن تغییرات نوکلئوتیدی غیر هم‌معنی و بی‌معنی
109	جدول 3-24- الگوریتم‌های تطبیق توالی‌های کوتاه (216)
110	جدول 3-25- معیارهای دسته‌بندی واریانت‌های بیماریزا (217)
111	جدول 3-26- قوانین ترکیب معیارهای دسته‌بندی واریانت‌ها (217)
113	جدول 3-27- مشخصات یرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر اگزون 40 ژن MYO15A
114	جدول 3-28- مقدار مواد مصرفی مورد استفاده در PCR اگزون 40 ژن MYO15A
115	جدول 3-29- برنامه‌ی دمایی PCR اگزون 40 ژن MYO15A
115	جدول 3-30- اسامی، برند، شرکت و کشور سازنده‌ی دستگاه‌های استفاده شده در مراحل مختلف این پژوهش
116	جدول 4-1- مشخصات 22 خانواده‌ی مورد بررسی
119	جدول 4-2- واریانت‌هایی که قبلاً گزارش شده‌اند و اطلاعات مربوط به این واریانت‌ها
129	جدول 4-3- واریانت‌هایی که قبلاً گزارش نشده‌اند
130	جدول 4-4- واریانت‌های VOUS
131	جدول 4-5- نتایج بررسی واریانت‌هایی که گزارش شده با استفاده از سرورهای تعیین آسیب رسان بودن تغییرهای نوکلئوتیدی
132	

فهرست شکل‌ها

عنوان

صفحه

4	شکل ۱-۱- قسمت‌های مختلف گوش خارجی، میانی، داخلی (12)
5	شکل 1-2- نمایی از گوش خارجی (14)

شکل 1-3- پرده‌ی صماخ و استخوانچه‌های شنوایی: چکشی، سندانی و رکابی (15) .

شکل 1-4- مجرای دهلیزی، حلزون و مجاری نیم‌دایره‌ای (18) .

شکل 1-5- مقطع عرضی حلزون (21) .

شکل 1-6- سلول‌های مویی خارجی و داخلی (24) .

شکل 1-7- اودیوگرام مربوط به فرد طبیعی (27) .

شکل 1-8- اودیوگرام مربوط به ناشنوایی انتقالی (28) .

شکل 1-9- اودیوگرام به ناشنوایی حسی-عصبی (29) .

شکل 1-10- اودیوگرام مربوط به ناشنوایی مختلط (30) .

شکل 1-11- روش تعیین توالی Illumina

..... (143)

48

شکل 1-12- روش تعیین توالی SOLID (144) .

شکل 1-13- تعیین توالی با فناوری 454 (144) .

شکل 1-14- روش تعیین توالی SMRT (148) .

شکل 1-15- روش Nanopore (142) .

شکل 3-1- مراحل PCR (192) .

شکل 4-1- محاسبه‌ی ارزش SLINK در 22 خانواده از استان خوزستان..

شکل 4-2- محاسبه‌ی ارزش SLINK در خانواده‌ی Abd-4 با استفاده از نرم

افزار Fast SLINK version 2.51.....

شکل 4-3- محاسبه‌ی امتیاز LOD پارامتری دونقطه‌ای برای خانواده‌ی

Abd-4 مربوط به لوکوس DFNB53 با استفاده از نرم افزار Gene Hunter

version 2.1.....

شکل 4-4- نتیجه‌ی بررسی تکثیر نشانگر D6S1014 بر روی ژل پلی آکریل

آمید.....

شکل 4-5- نتیجه‌ی بررسی تکثیر نشانگر D6S963.....

شکل 4-6- نتیجه‌ی بررسی تکثیر نشانگر D6S2414

.....

124

شکل 4-7- شجره و هاپلوتایپ خانواده‌ی Abd-4.....

شکل 4-8- نتیجه‌ی بررسی تکثیر نشانگر D7S2443.....

شکل 4-9- هاپلوتایپ مربوط به عدم پیوستگی به لوکوس DFNB39.....

شکل 4-10- شجره نامه‌ی خانواده‌ی Ahv-19.....

شکل 4-11- اودیوگرام مربوط به گوش چپ و راست یکی از ناشنوایان مبتلا

به ناشنوایی عمیق خانواده‌ی Ahv-19.....

شکل 4-12- محاسبه‌ی SLINK در خانواده‌ی Ahv-19 با نرم افزار Fast SLINK

version 2.51.....

شکل 4-13- نتیجه‌ی PAGE محصولات PCR اگزون 40 ژن MYO15A. روی ژل

پلی آکریل آمید (29:1) 8 درصد.....

شکل 4-14- نتایج بررسی هم تفکیکی بر روی شجره‌ی خانواده‌ی Mas-1

شکل 4-15- الکتروفروگرام مربوط به اگزون 40 ژن MYO15A.....

- .1 Morton, N., *Genetic epidemiology of hearing impairment*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1991. **630**(1): p. 16-31.
- .2 Brink, P. and M. Stones, *Examination of the relationship among hearing impairment, linguistic communication, mood, and social engagement of residents in complex continuing-care facilities*. The Gerontologist, 2007. **47**(5): p. 633-641.
- .3 Petersen, M. and P. Willems, *Non-syndromic, autosomal-recessive deafness*. Clinical genetics, 2006. **69**(5): p. 371-392.
- .4 Atcherson, S.R., *Hearing: Anatomy, Physiology, and Disorders of the Auditory System*, 2015, Taylor & Francis.
- .5 Van Camp, G., P.J. Willems, and R. Smith, *Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity*. American journal of human genetics, 1997. **60**(4): p. 758.
- .6 Saadat, M., *Epidemiology and mortality of hospitalized burn patients in Kohkiluyeh va Boyer-Ahmad province (Iran): 2002–2004*. Burns, 2005. **31**(3): p. 306-309.
- .7 Chaleshtori, M.H., D. Farhud, and M. Patton, *Congratulation to margaret chan familial and sporadic GJB2-Related Deafness in Iran: Review of Gene Mutations*. Iranian Journal of Public Health, 2007. **36**(1): p. 1-14.
- .8 Organization, W.H., *Obesity and Overweight factsheet from the WHO*. Health, 2017.
- .9 Sliwinska-Kowalska, M. and M. Pawelczyk, *Contribution of genetic factors to noise-induced hearing loss: a human studies review*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2013. **752**(1): p. 61-65.
- .10 Alford, R.L., et al., *American College of Medical Genetics and Genomics guideline for the clinical evaluation and etiologic diagnosis of hearing loss*. Genetics in Medicine, 2014. **16**(4): p. 347.
- .11 Friedman, T.B. and A.J. Griffith, *Human nonsyndromic sensorineural deafness*. Annual review of genomics and human genetics, 2003. **4**(1): p. 341-402.
- .12 Atik, T., et al., *Comprehensive Analysis of Deafness Genes in Families with Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Loss*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0142154.
- .13 Diaz-Horta O, D.D., Foster J 2nd, Sirmaci 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): p. e50628.
- .14 Chaleshtori MH, F.D., Patton M, *Congratulation to margaret chan familial and sporadic GJB2-Related Deafness in Iran: Review of Gene Mutations*. Iranian Journal of Public Health, 2007. **36**(1): p. 1-14.
- .15 Najmabadi, H., et al., *GJB2 mutations: passage through Iran*. Am J Med Genet A, 2005. **133A**(2): p. 132-7.
- .16 Mahdih, N., 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): p. 489-93.
- .17 Amini, S.R. and M. Kamali, *Consanguineous marriage among the parents of hearing impaired students in Mashhad*. Iranian Rehabilitation Journal, 2010. **8**(2): p. 36-39.
- .18 Haghghat-Nia, A., et al., *Mutation spectrum of autosomal recessive non-syndromic hearing loss in central Iran*. International journal of pediatric otorhinolaryngology, 2015. **79**(11): p. 1892-1895.
- .19 Cryns, K. and G. Van Camp, *Deafness genes and their diagnostic applications*. Audiology and Neurotology, 2004. **9**(1): p. 2-22.

- .20 Cranefield, P.F. and W. Federn, *Paulus Zacchias on mental deficiency and on deafness*. Bulletin of the New York Academy of Medicine, 1970. **46**(1): p. 3.
- .21 Fransen, E., et al., *Age-related hearing impairment (ARHI): environmental risk factors and genetic prospects*. Experimental gerontology, 2003. **38**(4): p. 353-359.
- .22 Martini, A., A.P. Read, and D. Stephens, *Genetics and hearing impairment*. 1996: Whurr Publishers.
- .23 Panel, G.E.o.C.H.L.E., *Genetics evaluation guidelines for the etiologic diagnosis of congenital hearing loss*. Genetics in Medicine, 2002. **4**(3): p. 162.
- .24 Guyton AC, a.H.J., *Medical Physiology*. 11 ed. 2005: W. B. Saunders Co.
- .25 Ganong ,W.F. and W. Ganong, *Review of medical physiology*. 1995: Appleton & Lange Norwalk, CT.
- .26 Britannica, E., 2015.
- .27 Ganong, W.F., *Review of medical physiology*. 1975.
- .28 scape, m., 2013.
- .29 Møller, A.R., *Hearing: anatomy, physiology, and disorders of the auditory system*. 2012: Plural Publishing.
- .30 Ganong, W., *Review of Medical Physiology Ganong*. California: Lange medical publication, 2001: p. Chapter 9: 133-142.
- .31 Guyton, A.C., Hall M.D., John, E. , *Medical Physiology: 10th ed.2000*. . University of Mississippi Medical Center;, 2000: p. Chapter 52: 1263-86.
- .32 Willems, P.J., *Genetic causes of hearing loss*. New England Journal of Medicine, 2000. **342**(15): p. 1101-1109.
- .33 Hall, J.E., *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology E-Book*. 2015: Elsevier Health Sciences.
- .34 JE., H., *Pocket companion to Guyton & Hall textbook of medical physiology. 12th ed*. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2011: p. 255-62.
- .35 S, A., *Manual of Practical Audiometry*. Ear Hear, 1990. **11**(3): p. 244.
- .36 Fei, J., et al., *An investigation into hearing loss among patients of 50 years or older*. Journal of Otology, 2011. **6**(1): p. 44-49.
- .37 Smith, R.J., J.F. Bale, and K.R. White, *Sensorineural hearing loss in children*. The Lancet, 2005. **365**(9462): p. 879-890.
- .38 Roberts ,A., *Sensorineural Hearing Loss*. Synopsis of Causation, Ministry of Defence, 2008: p. 1-30.
- .39 Hilgert, N., R.J. Smith, and G. Van Camp, *Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics?* Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2009. **681**(2): p. 189-196.
- .40 Petit, C., J. Levilliers, and J.-P. Hardelin, *Molecular genetics of hearing loss*. Annual review of genetics, 2001. **35**(1): p. 589-645.
- .41 Olusanya, B.O., R.J. Ruben, and A. Parving, *Reducing the burden of communication disorders in the developing world: an opportunity for the millennium development project*. Jama, 2006. **296**(4): p. 441-444.
- .42 Lanzieri, T.M., et al., *Systematic review of the birth prevalence of congenital cytomegalovirus infection in developing countries*. International Journal of Infectious Diseases, 2014. **22**: p. 44-48.
- .43 Karanja, B.W., et al., *Risk factors for hearing loss in children following bacterial meningitis in a tertiary referral hospital*. International journal of otolaryngology, 2013. **2013**.
- .44 Karanja, B.W., et al., *Prevalence of hearing loss in children following bacterial meningitis in a tertiary referral hospital*. BMC research notes, 2014. **7**(1): p. 138.

- .45 Mathers, C., A. Smith, and M. Concha, *Global burden of hearing loss in the year 2000*. Global burden of Disease, 2000. **18**(4): p. 1-30.
- .46 Vele, O. and I. Schrijver, *Inherited hearing loss: molecular genetics and diagnostic testing*. Expert opinion on medical diagnostics, 2008. **2**(3): p. 231-248.
- .47 Van Camp, G. and R.J. Smith, *Hereditary hearing loss homepage*, 2006.
- .48 Gorlin, R.J., H.V. Toriello, and M.M. Cohen, *Hereditary hearing loss and its syndromes*. 1995: Oxford University Press, USA.
- .49 Liu, X., et al., *Myosin VIIa, the product of the Usher 1B syndrome gene, is concentrated in the connecting cilia of photoreceptor cells*. Cell motility and the cytoskeleton, 1997. **37**(3): p. 240-252.
- .50 Riahi, Z., et al., *Whole exome sequencing identifies mutations in Usher syndrome genes in profoundly deaf Tunisian patients*. PLoS one, 2015. **10**(3): p. e0120584.
- .51 Petit, C., *Usher syndrome: from genetics to pathogenesis*. Annual review of genomics and human genetics, 2001. **2**(1): p. 271-297.
- .52 Everett, L.A., et al., *Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS)*. Nature genetics, 1997. **17**(4): p. 411.
- .53 Bizhanova, A. and P. Kopp, *Genetics and phenomics of Pendred syndrome*. Molecular and cellular endocrinology, 2010. **322**(1): p. 83-90.
- .54 Berrettini, S., et al., *Mitochondrial non-syndromic sensorineural hearing loss: a clinical, audiological and pathological study from Italy, and revision of the literature*. Bioscience reports, 2008. **28**(1): p. 49-59.
- .55 Ensink, R., et al., *A Dutch family with progressive autosomal dominant non-syndromic sensorineural hearing impairment linked to DFNA13*. Clinical Otolaryngology, 2001. **26**(4): p. 310-316.
- .56 Piatto, V.B., et al., *Molecular genetics of non-syndromic deafness*. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia, 2005. **71**(2): p. 216-223.
- .57 Kokotas, H., M.B. Petersen, and P.J. Willems, *Mitochondrial deafness*. Clinical genetics, 2007. **71**(5): p. 379-391.
- .58 Brandon, M.C., et al., *MITOMAP: a human mitochondrial genome database—2004 update*. Nucleic acids research, 2005. **33**(suppl_1): p. D611-D613.
- .59 Chang, E.H., G. Van Camp, and R.J. Smith, *The role of connexins in human disease*. Ear and hearing, 2003. **24**(4): p. 314-323.
- .60 Zhao, H.-B., et al., *Gap junctions and cochlear homeostasis*. The Journal of membrane biology, 2006. **209**(2-3): p. 177.
- .61 Kooshavar, D., et al., *Digenic inheritance in autosomal recessive non-syndromic hearing loss cases carrying GJB2 heterozygote mutations: assessment of GJB4, GJA1, and GJC3*. International journal of pediatric otorhinolaryngology, 2013. **77**(2): p. 189-193.
- .62 Zelante, L., et al., *Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans*. Human molecular genetics, 1997. **6**(9): p. 1605-1609.
- .63 Kelsell, D.P., et al., *Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness*. nature, 1997. **387**(6628): p. 80.
- .64 Kurima, K., et al., *Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMCI, required for cochlear hair-cell function*. Nature genetics, 2002. **30**(3): p. 277-284.
- .65 Vahava, O., et al., *Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans*. Science, 1998. **279**(5358): p. 1950-1954.

- .66 Peters, L.M., et al., *Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28*. Human Molecular Genetics, 2002. **11**(23): p. 2877-2885.
- .67 Powell, S. and R. Bull, *Diseases of the ear, nose and throat*. The Journal of Laryngology and Otology, 2008. **122**(10): p. 1135.
- .68 Dracopoli, N.C., *Short protocols in human genetics: a compendium of methods from current protocols in human genetics*. 2004: J. Wiley.
- .69 Botstein, D., et al., *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms*. American journal of human genetics, 1980. **32**(3): p. 314.
- .70 States, J.C., *Short Protocols in Human Genetics*, 2005, Henry Stewart Publications.
- .71 Ott, J., *Analysis of human genetic linkage*. 1999: JHU Press.
- .72 Kong, A., et al., *A high-resolution recombination map of the human genome*. Nature genetics, 2002. **31**(3): p. 241-247.
- .73 Broman, K.W., et al., *Comprehensive human genetic maps: individual and sex-specific variation in recombination*. The American Journal of Human Genetics, 1998. **63**(3): p. 861-869-
- .74 Agarwal, M., N. Shrivastava, and H. Padh, *Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences*. Plant cell reports, 2008. **27**(4): p. 617-631.
- .75 Harper, P.S., *Landmarks in medical genetics: Classic papers with commentaries*. 2004: Oxford University Press.
- .76 Jeffreys, A., V. Wilson, and S. Thein, *Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA*. 1985. Biotechnology (Reading, Mass.), 1992. **24**: p. 467.
- .77 Queller, D.C., J.E. Strassmann, and C.R. Hughes, *Microsatellites and kinship*. Trends in Ecology & Evolution, 1993. **8**(8): p. 285-288.
- .78 Kruglyak, S., et al., *Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(18): p. 10774-10778.
- .79 Wenz, H.-M., et al., *High-precision genotyping by denaturing capillary electrophoresis*. Genome research, 1998. **8**(1): p. 69-80.
- .80 Jarne, P. and P.J. Lagoda, *Microsatellites, from molecules to populations and back*. Trends in ecology & evolution, 1996. **11**(10): p. 424-429.
- .81 Broeckel, U. and N.J. Schork, *Identifying genes and genetic variation underlying human diseases and complex phenotypes via recombination mapping*. The Journal of physiology, 2004. **554** : (1)p. 40-45.
- .82 Olsvik, Ø., et al., *Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in Vibrio cholerae O1 strains*. Journal of clinical microbiology, 1993. **31**(1): p. 22-25.
- .83 Maxam, A.M. and W. Gilbert, *A new method for sequencing DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(2): p. 560-564.
- .84 Gilbert, W. and A. Maxam, *The nucleotide sequence of the lac operator*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1973. **70**(12): p. 3581-3584.
- .85 Reis-Filho, J.S., *Next-generation sequencing*. Breast Cancer Research, 2009. **11**(3): p. S12.
- .86 Reis-Filho, J.S., *Next-generation sequencing*. Breast Cancer Res, 2009. **11**(Suppl 3): p. S12.
- .87 De Magalhães, J.P., C.E .Finch, and G. Janssens, *Next-generation sequencing in aging research: emerging applications, problems, pitfalls and possible solutions*. Ageing research reviews, 2010. **9**(3): p. 315-323.

- .88 Ajay, S.S., et al., *Accurate and comprehensive sequencing of personal genomes*. Genome research, 2011. **21**(9): p. 1498-1505.
- .89 Smedley, D. and P.N. Robinson, *Phenotype-driven strategies for exome prioritization of human Mendelian disease genes*. Genome medicine, 2015. **7**(1): p. 81.
- .90 Sabag, A.D., O. Dagan, and K.B. Avraham, *Connexins in hearing loss: a comprehensive overview*. Journal of basic and clinical physiology and pharmacology, 2005. **16**(2-3): p. 101-116.
- .91 Rădulescu, L., et al., *Prevalence of mutations located at the *dfnb1* locus in a population of cochlear implanted children in eastern Romania*. International journal of pediatric otorhinolaryngology, 2012. **76**(1): p. 90-94.
- .92 Santos, R., et al., *Low prevalence of Connexin 26 (*GJB2*) variants in Pakistani families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment*. Clinical genetics, 2005. **67**(1): p. 61-68.
- .93 Shi, G.-z., et al., **GJB2* gene mutations in newborns with non-syndromic hearing impairment in Northern China*. Hearing research, 2004. **197**(1): p. 19-23.
- .94 Kalay, E., et al., **GJB2* mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations*. Hearing research, 2005. **203**(1): p. 88-93.
- .95 Yoong, S.Y., et al., *Low prevalence of *DFNB1* (connexin 26) mutations in British Pakistani children with non-syndromic sensorineural hearing loss*. Archives of disease in childhood, 2011. **96**(9): p. 798-803.
- .96 Shahin, H., et al., *Genetics of congenital deafness in the Palestinian population: multiple connexin 26 alleles with shared origins in the Middle East*. Human genetics, 2002. **110**(3): p. 284-289.
- .97 Gasmelseed, N., et al., *Low frequency of deafness-associated *GJB2* variants in Kenya and Sudan and novel *GJB2* variants*. Human mutation, 2004. **23**(2): p. 206-207.
- .98 Lerer, I., et al., *Contribution of connexin 26 mutations to nonsyndromic deafness in Ashkenazi patients and the variable phenotypic effect of the mutation 167delT*. American Journal of Medical Genetics Part A, 2000. **95**(1): p. 53-56.
- .99 Abe, S., et al., *Prevalent connexin 26 gene (*GJB2*) mutations in Japanese*. Journal of medical genetics, 2000 :**(1)**37 .p. 41-43.
- .100 Najmabadi, H., et al., **GJB2* mutations: passage through Iran*. American Journal of Medical Genetics Part A, 2005. **133**(2): p. 132-137.
- .101 Rodriguez-Paris, J. and I. Schrijver, *The digenic hypothesis unraveled: the *GJB6 del (GJB6-D13S1* (830mutation causes allele-specific loss of *GJB2* expression in cis*. Biochemical and biophysical research communications, 2009. **389**(2): p. 354-359.
- .102 Del Castillo, I., et al., *Prevalence and evolutionary origins of the *del (GJB6-D13S1830)* mutation in the *DFNB1* locus in hearing-impaired subjects: a multicenter study*. The American Journal of Human Genetics, 2003. **73**(6): p. 1452-1458.
- .103 Álvarez, A., et al., *High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (*GJB2*) in Spanish Romani (gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss*. American Journal of Medical Genetics Part A, 2005. **137**(3): p. 255-258.
- .104 Seeman, P., et al., *Double heterozygosity with mutations involving both the *GJB2* and *GJB6* genes is a possible, but very rare, cause of congenital deafness in the Czech population*. Annals of human genetics, 2005. **69**(1): p. 9-14.
- .105 Belintani, P.V., et al., *Prevalence of the *GJB2* mutations and the *del (GJB6-D13S1830)* mutation in Brazilian patients with deafness*. Hearing research, 2004. **196**(1-2): p. 87-93.
- .106 Del Castillo, F., et al., *A novel deletion involving the connexin-30 gene, *del (GJB6-d13s1854)*, found in trans with mutations in the *GJB2* gene (connexin-26) in subjects*

- with *DFNBI* non-syndromic hearing impairment. *Journal of medical genetics*, 2005. **42**(7): p. 588-594.
- .107 Walid, A.-A., et al., *First report of prevalence c. IVS1+1G> A and del (GJB6-13S1854) mutations in Syrian families with non-syndromic sensorineural hearing loss*. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 2017. **92**: p. 82-87.
- .108 Ghasemnejad, T., et al., *An update of common autosomal recessive non-syndromic hearing loss genes in Iranian population*. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2017.
- .109 Liu, X.-Z., et al. *„Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness*. *Nature genetics*, 1997. **16**(2): p. 188-190.
- .110 Riazuddin, S., et al., *Mutation spectrum of MYO7A and evaluation of a novel nonsyndromic deafness DFNB2 allele with residual function*. *Human mutation*, 2008. **29**(4): p. 502-511.
- .111 Thompson, R.F. and G.M. Langford, *Myosin superfamily evolutionary history*. *The Anatomical Record*, 2002. **268**(3): p. 276-289.
- .112 Millán, J.M., et al., *An update on the genetics of usher syndrome*. *Journal of ophthalmology*, 2010. **2011**.
- .113 Well, D., et al., *Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type IB*. *Nature*, 1995. **374**(6517): p. 60-61.
- .114 Tabatabaiefar, M., 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): p. 34.
- .115 Babanejad, M., et al., *A comprehensive study to determine heterogeneity of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss in Iran*. *American journal of medical genetics Part A*, 2012. **158**(10): p. 2485-2492.
- .116 Asgharzade, S., et al., *Screening of Myo7A Mutations in Iranian Patients with Autosomal Recessive Hearing Loss from West of Iran*. *Iranian journal of public health*, 2017. **46**(1): p. 76.
- .117 Wang, R., et al., *Molecular Analysis of Twelve Pakistani Families with Nonsyndromic or Syndromic Hearing Loss*. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 2017. **21**(5): p. 316-321.
- .118 Friedman, T.B., et al., *A gene for congenital, recessive deafness DFNB3 maps to the pericentromeric region of chromosome 17*. *Nature genetics*, 1995. **9**(1): p. 86-91.
- .119 Wang, A., et al., *Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3*. *Science*, 1998. **280**(5368): p. 1447-1451.
- .120 Nal, N., et al. *„Mutational spectrum of MYO15A: the large N-terminal extension of myosin XVA is required for hearing*. *Human mutation*, 2007. **28**(10): p. 1014-1019.
- .121 Lezirovitz, K., et al., *Unexpected genetic heterogeneity in a large consanguineous Brazilian pedigree presenting deafness*. *European Journal of Human Genetics*, 2008. **16**(1): p. 89-96.
- .122 Friedman, T., et al., *DFNB3, spectrum of MYO15A recessive mutant alleles and an emerging genotype-phenotype correlation*, in *Genetic Hearing Impairment*. 2002, Karger Publishers. p. 124-130.
- .123 Fattahi, Z., et al., *Screening for MYO15A gene mutations in autosomal recessive nonsyndromic, GJB2 negative Iranian deaf population*. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2012. **158**(8): p. 1857-1864.
- .124 Sadeghi, A., et al. *„Contribution of GJB2 mutations and Four common DFNB loci in autosomal recessive non-syndromic hearing impairment in Markazi and Qom provinces of Iran*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2009. **7**(2): p. 108-111.

- .125 Asgharzade, S., et al., *MUTATION IN SECOND EXON OF MYO15A GENE CAUSE OF NONSYNDROMIC HEARING LOSS AND ITS ASSOCIATION IN THE ARAB POPULATION IN IRAN*. *Genetika*, 2016. **48**(2): p. 587-596.
- .126 Reisi, S., et al., *Screening of DFNB3 in Iranian families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss reveals a novel pathogenic mutation in the MyTh4 domain of the MYO15A gene in a linked family*. *Iranian journal of basic medical sciences*, 2016. **19**(7): p. 772.
- .127 Li, X.C., et al., *A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness*. *Nature genetics*, 1998. **18**(3): p. 215-217.
- .128 Iwasaki, S., et al., *Association of SLC26A4 mutations with clinical features and thyroid function in deaf infants with enlarged vestibular aqueduct*. *Journal of human genetics*, 2006. **51**(9): p. 805-810.
- .129 Park, H., et al., *Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness*. *Journal of medical genetics*, 2003. **40**(4): p. 242-248.
- .130 Kahrizi, K., et al., *Identification of SLC26A4 gene mutations in Iranian families with hereditary hearing impairment*. *European journal of pediatrics*, 2009. **168**(6): p. 651.
- .131 Yazdanpanahi, N., et al., *Compound heterozygosity for two novel SLC26A4 mutations in a large Iranian pedigree with Pendred syndrome*. *Clinical and experimental otorhinolaryngology*, 2013. **6**(4): p. 201.
- .132 Jain, P.K., et al., *A human recessive neurosensory nonsyndromic hearing impairment locus is a potential homologue of the murine deafness (dn) locus*. *Human molecular genetics*, 1995. **4**(12): p. 2391-2394.
- .133 Kurima, K., et al., *Characterization of the transmembrane channel-like (TMC) gene family: functional clues from hearing loss and epidermodysplasia verruciformis* ☆. *Genomics*, 2003. **82**(3): p. 300-308.
- .134 Saïd, M.B., et al., *High frequency of the p. R34X mutation in the TMC1 gene associated with nonsyndromic hearing loss is due to founder effects*. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 2010. **14**(3): p. 307-311.
- .135 Sirmacı, A., et al., *Mutations in TMC1 contribute significantly to nonsyndromic autosomal recessive sensorineural hearing loss: a report of five novel mutations*. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 2009. **73**(5): p. 699-705.
- .136 Santos, R.L.P., et al., *Novel sequence variants in the TMC1 gene in Pakistani families with autosomal recessive hearing impairment*. *Human mutation*, 2005. **26**(4): p. 396-396.
- .137 Davoudi-Dehaghani, E., et al., *Allelic heterogeneity among Iranian DFNB7/11 families: report of a new Iranian deaf family with TMC1 mutation identified by next-generation sequencing*. *Acta oto-laryngologica*, 2015. **135**(2): p. 125-129.
- .138 Najmabadi, H. and K. Kahrizi, *Genetics of non-syndromic hearing loss in the Middle East*. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 2014. **78**(12): p. 2026-2036.
- .139 Mustapha, M., et al., *An α -tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21*. *Human molecular genetics*, 1999. **8**(3): p. 409-412.
- .140 Verhoeven, K., et al., *Mutations in the human α -tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment*. *Nature genetics*, 1998. **19**(1): p. 60-62.
- .141 Iwasaki, S., et al., *Association of clinical features with mutation of TECTA in a family with autosomal dominant hearing loss*. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 2002. **128**(8): p. 913-917.

- .142 Naz, S., et al., *Distinctive audiometric profile associated with DFNB21 alleles ofTECTA*. Journal of medical genetics, 2003. **40**(5): p. 360-363.
- .143 Meyer, N.C., et al., *Identification of three novelTECTA mutations in Iranian families with autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment at the DFNB21 locus*. American Journal of Medical Genetics Part A, 2007. **143**(14): p. 1623-1629.
- .144 Asgharzade, S., et al., *A novelTECTA mutation causes ARNSHL*. International journal of pediatric otorhinolaryngology, 2017. **92**: p. 88-93.
- .145 Imtiaz, A., D.C. Kohrman, and S. Naz, *A frameshift mutation in GRXCR2 causes recessively inherited hearing loss*. Human mutation, 2014. **35**(5): p.624-618 .
- .146 Odeh, H., et al., *Mutations in Grxcr1 are the basis for inner ear dysfunction in the pirouette mouse*. The American Journal of Human Genetics, 2010. **86**(2): p. 148-160.
- .147 Atik, T., et al., *Whole-exome sequencing and its impact in hereditary hearing loss*. Genetics research, 2015. **97**.
- .148 Tabatabaiefar, M., et al., *DFNB93, a novel locus for autosomal recessive moderate-to-severe hearing impairment*. Clinical genetics, 2011. **79**(6): p. 594-598.
- .149 Schrauwen, I., et al., *A mutation in CABP2, expressed in cochlear hair cells, causes autosomal-recessive hearing impairment*. The American Journal of Human Genetics, 2012. **91**(4): p. 636-645.
- .150 Jenkins, M.A., et al., *Ca²⁺-dependent facilitation of Cav1. 3 Ca²⁺ channels by densin and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*. Journal of Neuroscience, 2010. **30**(15): p. 5125-5135.
- .151 Hardie, J. and A. Lee, *Decalmodulation of Cav1 channels by CaBPs*. Channels, 2016. **10**(1): p. 33-37.
- .152 Inagaki, A. and A. Lee, *Developmental alterations in the biophysical properties of Cav1. 3 Ca²⁺ channels in mouse inner hair cells*. Channels, 2013. **7**(3): p. 171-181.
- .153 Littink, K.W., et al., *A Novel Homozygous Nonsense Mutation in CABP4 Causes Congenital Cone–Rod Synaptic Disorder*. Investigative ophthalmology & visual science, 2009. **50**(5): p. 2344-2350.
- .154 Bork, J.M., et al., *Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23*. The American Journal of Human Genetics, 2001. **6**:(1)8p. 26-37.
- .155 Astuto, L., et al., *CDH23 mutation and phenotype heterogeneity: a profile of 107 diverse families with Usher syndrome and nonsyndromic deafness*. The American Journal of Human Genetics, 2002. **71**(2): p. 262-275.
- .156 Vanniya, S., et al ,*Recurrence of reported CDH23 mutations causing DFNB12 in a special cohort of South Indian hearing impaired assortative mating families—an evaluation*. Annals of human genetics, 2017.
- .157 Ullah, S., et al., *Causes of deafness in the Punjab region of Pakistan and the role of consanguinity*. Public Health, 2017. **145**: p. 93-95.
- .158 Wagatsuma, M., et al., *Distribution and frequencies of CDH23 mutations in Japanese patients with non-syndromic hearing loss*. Clinical genetics, 2007. **72**(4): p. 339-344.
- .159 Woo ,H.-M., et al., *Identification of CDH23 mutations in Korean families with hearing loss by whole-exome sequencing*. BMC medical genetics, 2014. **15**(1): p. 46.
- .160 Davoudi-Dehaghani, E., et al., *Homozygosity mapping and CDH23 mutation analysis in Iranian deaf families*. Hearing, Balance and Communication, 2016. **14**(4): p. 189-193.
- .161 Grimberg, J., et al., *A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood*. Nucleic acids research, 1989. **17**(20): p. 8390-8390.
- .162 Mullis ,K.B. and F.A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods in enzymology, 1987. **155**: p. 335.

- .163 Lindner, T.H. and K. Hoffmann, *easyLINKAGE: a PERL script for easy and automated two-/multi-point linkage analyses*. *Bioinformatics*, 2005. **21**(3): p. 405-407.
- .164 Dracopoli NC, H.J., Korf BR, et al. and *Short Protocols in Human Genetics*. 1 ed. 2004: Wiley.
- .165 Fishelson, M. and D. Geiger, *Exact genetic linkage computations for general pedigrees*. *Bioinformatics*, 2002. **18**(suppl 1): p. S189-S198.
- .166 Sobel, E., H. Sengul, and D.E. Weeks, *Multipoint estimation of identity-by-descent probabilities at arbitrary positions among marker loci on general pedigrees*. *Human heredity*, 2001. **52**(3): p. 121-131.
- .167 com/, O.I.N.G.N.c.A.A.f.w.o.
- .168 Ng, P.C. and S. Henikoff, *SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function*. *Nucleic acids research*, 2003. **31**(13): p. 3812-3814.
- .169 Dash, R. and K. Ramanathan, *Computational Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms in Regulator of G Protein Signaling 4 (RGS4) Gene*. *World Journal of Medical Sciences*, 2013. **8**(3): p. 217-225.
- .170 Doss, C.G.P., et al., *Identification and structural comparison of deleterious mutations in nsSNPs of ABL1 gene in chronic myeloid leukemia: a bio-informatics study*. *Journal of biomedical informatics*, 2008. **41**(4): p. 607-612.
- .171 Ng, P.C. and S. Henikoff, *Predicting deleterious amino acid substitutions*. *Genome research*, 2001. **11**(5): p. 863-874.
- .172 Salih, M.A., et al., *Mutation in (GJB3 and GJB4) Genes involved in Deafness in two Sudanese Families Using Next Generation Sequencing*.
- .173 Shihab, H.A., et al., *Ranking non-synonymous single nucleotide polymorphisms based on disease concepts*. *Human genomics*, 2014. **8**(1): p. 11.
- .174 Reva, B .,Y. Antipin, and C. Sander, *Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics*. *Nucleic acids research*, 2011: p. gkr407.
- .175 Schwarz, J.M., et al., *MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations*. *Nature methods*, 2010. **7**(8): p. 575-576.
- .176 Santos-Cortez, R.L.P., et al., *Autosomal-recessive hearing impairment due to rare missense variants within SIPR2*. *The American Journal of Human Genetics*, 2016. **98**(2): p. 331-338.
- .177 Delmaghani, S., et al., *Mutations in CDC14A, encoding a protein phosphatase involved in hair cell ciliogenesis, cause autosomal-recessive severe to profound deafness*. *The American Journal of Human Genetics*, 2016. **98**(6): p. 1266-1270.
- .178 Said, M.B., et al., *A mutation in SLC22A4 encoding an organic cation transporter expressed in the cochlea stria vascularis causes human recessive non-syndromic hearing loss DFNB60*. *Human genetics*, 2016. **135**(5): p. 513-524.
- .179 Davarnia, B., et al., *Spectrum of GJB2 (Cx26) gene mutations in Iranian Azeri patients with nonsyndromic autosomal recessive hearing loss*. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 2012. **76**(2): p. 268-271.
- .180 Naghavi, A., et al., *GJB2 mutations in Baluchi population*. *Journal of genetics*, 2008. **87**(2) :p. 195-197.
- .181 Simsek, M., et al., *Absence of deafness-associated connexin-26 (GJB2) gene mutations in the Omani population*. *Human mutation*, 2001. **18**(6): p. 545-546.
- .182 Bonyadi, M., et al., *Mutation analysis of familial GJB2-related deafness in Iranian Azeri Turkish patients*. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 2009. **13**(5): p. 689-692.

- .183 Bazazzadegan, N., et al., *The spectrum of GJB2 mutations in the Iranian population with non-syndromic hearing loss—a twelve year study*. International journal of pediatric otorhinolaryngology, 2012. **76**(8): p. 1164-1174.
- .184 Zeinali, S., et al., *GJB2 c.-23+1G>A mutation is second most common mutation among Iranian individuals with autosomal recessive hearing loss*. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, 2015. **272**(9): p. 2255-2259.
- .185 Norouzi, V., et al., *Did the GJB2 35delG mutation originate in Iran?* American Journal of Medical Genetics Part A, 2011. **155**(10): p. 2453-2458.
- .186 Maeda, S., et al., *Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution*. Nature, 2009. **458**(7238): p. 597-602.
- .187 Bilal, S., et al., *Structure modeling and mutational analysis of gap junction beta 2 (GJB2)*. African Journal of Biotechnology, 2012. **11**(27): p. 6965-6973.
- .188 Esmaili, M., M. Bonyadi, and M. Nejadkazem, *Common mutation analysis of GJB2 and GJB6 genes in affected families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss from Iran: simultaneous detection of two common mutations (35delG/del (GJB6-D13S1830)) in the DFNB1-related deafness*. International journal of pediatric otorhinolaryngology, 2007. **71**(6): p. 869-873.
- .189 Hildebrandt, F., et al., *A systematic approach to mapping recessive disease genes in individuals from outbred populations*. PLoS genetics, 2009. **5**(1): p. e1000353.
- .190 Vozzi, D., 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): p. 209-216.
- .191 Khan, M.R., R. Bashir, and S. Naz, *SLC26A4 mutations in patients with moderate to severe hearing loss*. Biochemical genetics, 2013. **51**(7-8): p. 514-523.
- .192 Fang, Y., et al., *GJB2 as well as SLC26A4 gene mutations are prominent causes for congenital deafness*. Cell biochemistry and biophysics, 2015. **73**(1): p. 41-44.
- .193 Hutchin, T., et al., *Assessment of the genetic causes of recessive childhood non-syndromic deafness in the UK—implications for genetic testing*. Clinical genetics, 2005. **68**(6): p. 506-512.
- .194 Shahin, H., et al., *Five novel loci for inherited hearing loss mapped by SNP-based homozygosity profiles in Palestinian families*. European Journal of Human Genetics, 2010. **18**(4): p. 407-413.
- .195 Tekin, M., et al., *Screening the SLC26A4 gene in probands with deafness and goiter (Pendred syndrome) ascertained from a large group of students of the schools for the deaf in Turkey*. Clinical genetics, 2003. **64**(4): p. 371-374.
- .196 Reisi, S., et al., *The study of SLC26A4 gene causing autosomal recessive hearing loss by linkage analysis in a Cohort of Iranian Populations*. International journal of molecular and cellular medicine, 2014. **3**(3): p. 176.
- .197 Kalay, E., et al., *MYO15A (DFNB3) mutations in Turkish hearing loss families and functional modeling of a novel motor domain mutation*. American Journal of Medical Genetics Part A : (20)143 .2007 ,p. 2382-2389.
- .198 Bashir, R., A. Fatima, and S. Naz, *Prioritized sequencing of the second exon of MYO15A reveals a new mutation segregating in a Pakistani family with moderate to severe hearing loss*. European journal of medical genetics : (2)55 .2012 ,p. 99-102.
- .199 Nishio, S.-y. and S.-i. Usami, *Deafness gene variations in a 1120 nonsyndromic hearing loss cohort: molecular epidemiology and deafness mutation spectrum of patients in Japan*. Annals of Otology, Rhinology & Laryngology, 2015 . _1)124suppl): p. 49S-60S.
- .200 Belguith, H., et al., *Screening of the DFNB3 locus: identification of three novel mutations of MYO15A associated with hearing loss and further suggestion for two*

- distinctive genes on this locus. Genetic testing and molecular biomarkers*, 2009. **13**(1): p. 147-151.
- .201 Salime, S., et al., *Homozygous mutations in PJK and MYO15A genes associated with non-syndromic hearing loss in Moroccan families*. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 2017. **101**: p. 25-29.
- .202 Duman, D., et al., *Screening of 38 genes identifies mutations in 62% of families with nonsyndromic deafness in Turkey*. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 2011. **15**(1-2): p. 29-33.
- .203 Sloan-Heggen, C.M., et al., *Characterising the spectrum of autosomal recessive hereditary hearing loss in Iran*. *Journal of medical genetics*, 2015. **52**(12): p. 823-829.
- .204 Rzdzińska, A.K., et al., *An actin molecular treadmill and myosins maintain stereocilia functional architecture and self-renewal*. *J Cell Biol*, 200 : (6)164 .4p. 887-897.
- .205 Pourahmadiyam, A., et al., *Genetic linkage analysis of DFNB7/11 locus in patients with autosomal recessive non syndromic hearing loss from Hamedan province*. *journal of shahrekord university of medical sciences*, 2016. **18**(3).
- .206 Khosrofar, M., et al., *Genetic Linkage Analysis of the DFNB21 Locus in Autosomal Recessive Hearing Loss in Large Families from Khuzestan Province*. *Arak Medical University Journal*, 2017. **20**(3).
- .207 Bademci, G., et al., *Comprehensive analysis via exome sequencing uncovers genetic etiology in autosomal recessive nonsyndromic deafness in a large multiethnic cohort*. *Genetics in Medicine*, 2016. **18**(4): p. 364.
- .208 Mahdieh, N., et al., *Genetic causes of nonsyndromic hearing loss in Iran in comparison with other populations*. *Journal of human genetics*, 2010. **55**(10).
- .209 Huang, S., et al., *Extremely discrepant mutation spectrum of SLC26A4 between Chinese patients with isolated Mondini deformity and enlarged vestibular aqueduct*. *Journal of translational medicine* : (1)9 .2011 ,p. 167.
- .210 Du, W., et al., *A rapid method for simultaneous multi-gene mutation screening in children with nonsyndromic hearing loss*. *Genomics*, 2014. **104**(4): p. 264-270.
- .211 Pera, A., et al., *A mutational analysis of the SLC26A4 gene in Spanish hearing-impaired families provides new insights into the genetic causes of Pendred syndrome and DFNB4 hearing loss*. *European Journal of Human Genetics*, 2008. **16**(8): p. 888-896.
- .212 Gorbunov, D., et al., *Molecular architecture and the structural basis for anion interaction in prestin and SLC26 transporters*. *Nature communications*, 2014. **5**.
- .213 Bassot, C., et al., *Mapping pathogenic mutations suggests an innovative structural model for the pendrin (SLC26A4) transmembrane domain*. *Biochimie*, 2017. **132** :p. 109-120.
- .214 Screpanti, E. and C. Hunte, *Discontinuous membrane helices in transport proteins and their correlation with function*. *Journal of structural biology*, 2007. **159**(2): p. 261-267.
- .215 Dossena, S., et al., *Functional characterization of wild-type and mutated pendrin (SLC26A4), the anion transporter involved in Pendred syndrome*. *Journal of molecular endocrinology*, 2009. **43**(3): p. 93-103.
- .216 Haeseleer, F., et al., *Five members of a novel Ca²⁺-binding protein (CABP) subfamily with similarity to calmodulin*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(2): p. 1247-1260.
- .217 Haeseleer, F., et al., *Calcium-binding proteins: intracellular sensors from the calmodulin superfamily*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2002. **290**(2): p. 6.623-15

- .218 Cui, G., et al., *Ca²⁺-binding proteins tune Ca²⁺-feedback to Cav1. 3 channels in mouse auditory hair cells*. The Journal of physiology, 2007. **585**(3): p. 791-803.
- .219 Bademci, G., et al., *Comprehensive Analysis via Exome Sequencing Uncovers Genetic Etiology in Autosomal Recessive Non-Syndromic Deafness in a Large Multiethnic Cohort*. Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics, 2016. **18**(4): p. 364.
- .220 Garnier, J., J.-F. Gibrat, and B. Robson, [32] *GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence*. Methods in enzymology, 1996. **266**: p. 540-553.
- .221 Bolz, H., et al., *Usher Syndrome Type 1 Due to Missense Mutations on Both CDH23 Alleles: Investigation of mRNA Splicing*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2008. **49**(13): p. 459-459.
- .222 Frei, K., et al., *GJB2 mutations in hearing impairment: identification of a broad clinical spectrum for improved genetic counseling*. The Laryngoscope, 2005. **115**(3): p. 461-465.
- .223 Ku, C.S., et al., *Exome sequencing: dual role as a discovery and diagnostic tool*. Annals of neurology, 2012. **71**(1): p. 5-14.



Faculty of Medicine

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of
Ph.D in Molecular Medicine

Project Number: **394531**

Title:

Genetic linkage study and analysis of DFNB1 (*GJB2, GJB6*) ,DFNB2 (*MYO7A*) ,DFNB3 (*MYO15*) ,DFNB4 (*SLC26A4*) , DFNB7/11 (*TMC1*) , DFNB21(*TECTA*) و DFNB101 (*GRXCR2*) involved in autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL) in 20 families negative for *GJB2* mutations in Isfahan province

Supervisors:

Dr. Mohammad Amin Tabatabaiefar

Dr. Morteza Hashemzadeh Chaleshtori

Advisors:

Dr. Mansoor Salehi

Dr. Hamid reza Abtahi

Dr. Mohammad Reza noori Dalooi

By:

Mahbobeh Koochian

March 2018