غربالگری جهش‌های میتوکندریایی A3243G، A1555G، A7445G در ژن‌های MTTL1،MTRNR1،MTTS1 در افراد ناشنوای حسی- عصبی غیرسندرمی

فاطمه تاجی(Stu)[1]- مصطفی منتظرظهوری(Stu)[1]- عفت فرخی(MSc)[1]- گل اندام بنی طالبی دهکردی(AD)[1]-
دکتر اعظم حسینی‌پور(MD)[1]- دکتر سوسن کشاورز(MD)[1]- اعظم عسگری(Stu)[1]- *دکتر مرتضی هاشم‌زاده چالشتری(Ph D)[1]
* نویسنده مسئول: شهرکرد، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی
پست الکترونیک:mchalesh@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله:۸۸/۱۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۳۱

چکیده

مقدمه: گزارش‌های متعددی از موتاسیون‌های DNA میتوکندریایی از جمعیت‌های مختلف در سراسر جهان گزارش شده است. سه جهش DNA میتوکندریایی شامل A1555G، A3243G، A7445G که در ژن‌های MTTL1، MTRNR1، MTTS1 اتفاق می افتد، به عنوان یکی از علل اصلی ناشنوایی در برخی جمعیت‌ها در نظر گرفته شده است.

هدف: تعیین فراوانی جهش‌های A1555G، A3243G، A7445G در افراد ناشنوای حسی- عصبی غیر سندرمی در استان گیلان در شمال ایران.

مواد و روش‌ها: ۴۶ فرد ناشنوای حسی- عصبی غیر سندرمی از سازمان بهزیستی استان گیلان با تهیه پرسشنامه و اودیوگرام برای بررسی جهش‌های A1555G، A3243G، A7445G به روش PCR-RFLP غربالگری شده که با تعیین توالی مستقیم، جهش‌های مورد نظر تأیید شدند.

نتایج: جهش‌های DNA میتوکندریایی شامل A1555G و A3243G، A7445G در مطالعه هم گروهی ۴۶ فرد ناشنوا یافت نشد ولی بررسی PCR-RFLP ژن MTTL1 برای بررسی جهش A3243G، به شناسایی واریانت G3316A- در نتیجه تخریب یک جایگاه محدودکننده- در جایگاه دیگر قطعه PCR منجر شد.

نتیجه‌گیری: احتمال ارتباط جهش‌های شایع میتوکندریایی با ناشنوایی در شمال ایران، خیلی کم است ولی در مطالعه ما جهش احتمالی G3316A شناخته شد که هنوز بیماریزایی آن در ارتباط با ناشنوایی در حال تحقیق است. بنابراین، در کل، فراوانی G3316A در بیماران ناشنوا در حدود ۱/۴۶ درصد است که در صورت اثبات بیماریزایی آن می تواند نقش جهش‌های میتوکندری را در ناشنوایی با اهمیت سازد.

کلید واژه‌ها: دی ان ا میتوکندریایی/ ناشنوایی حسی عصبی

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره نوزدهم شماره ۷۶، صفحات: ۲۱-۱۵

مقدمه

ناشنوایی بیماری هتروژن ژنتیکی است که ژن‌های هسته‌ای و میتوکندریایی در آن دخالت دارند و عوامل محیطی و ژنتیکی در ایجاد آن نقش دارند. ناشنوایی مادرزادی (حسی- عصبی) می‌توان در بدو تولد و به‌طور کلی قبل از یک سالگی تشخیص داد. شیوع ناشنوایی مادرزادی در حدود ۱ در ۱۰۰۰ تولد زنده است که بیش از نیمی از این موارد، ژنتیکی هستند. حدوداً ۳۰۰۰۰ ژن هسته‌ای و ۳۷ ژن میتوکندریایی در انسان شناسایی شده که حدود یک درصد از کل این ژن‌ها ممکن است مسئول ناشنوایی باشند(۱و۲). تاکنون بیش از ۳۰ لوکوس ژنتیکی مختلف که موجب ناشنوایی می‌شوند گزارش شده که ۷۰٪ آنها باعث ناشنوایی غیرسندرمی و ۳۰٪ باعث ناشنوایی سندرمی می‌شوند. انواع غیرسندرمی می‌تواند به چهار شکل اتوزومی غالب با لوکوس‌های DFNA، توارث اتوزوم مغلوب با لوکوس‌های DFNB، وا بسته به جنس با لوکوس‌های DFN و توارث میتوکندریایی باشند. در این میان ۸۰٪-۷۵٪ ناشنوایی‌ها به علل توارث اتوزوم مغلوب، ۲۰٪- اتوزوم غالب، ۵٪-۱ توارث وابسته به جنس و ۲۰٪-۰ میتوکندریایی هستند. به‌طور کلی هر میتوکندری در ماتریکس خود ۱۰-۳ DNA میتوکندریایی mt DNA دارد و هر یک از mt DNA ها در انسان ۱۶۵۶۹جفت باز دارد(۳و۴).

علل ناشنوایی به شیوه‌های متعددی تقسیم‌بندی می‌شوند: براساس سن بروز به پیش زبانی(prelingual) یا مادرزادی و پس‌زبانی (postlingual) یا دیررس، بر اساس محل وقوع نقص در گوش به ناشنوایی هدایتی (آسیب در گوش خارجی یا میانی)، ناشنوایی حسی- عصبی (آسیب گوش درونی یا عصب شنوایی) و ناشنوایی مختلط (آسیب همزمان

۱. شهرکرد، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

قسمت‌های مختلف گوش) و بر اساس علائم فیزیکی همراه ناشنوایی به سندرمی (همراه با دیگر علائم فیزیکی) یا غیرسندرومی (بدون علائم فیزیکی دیگر) (۵).

انواع مختلفی از ناشنوایی وجود دارد که به علت جهش در ژن میتوکندریایی هستند و از شایع‌ترین آنها عبارتند از ناشنوایی بعد از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها(آمینوگلیکوزیدی)، در اثر دیابت، حسی و عصبی (غیرسندرمی) و همراه با بیماری‌های عصبی- عضلانی (۸-۶).

دو ژن میتوکندریایی باعث ناشنوایی غیرسندرمی،12S rRNA و tRNASer(UCN) هستند. قابل توجه آن که همه ناشنوایی‌ها در اثر جهش ژن میتوکندریایی از مادر به ارث می‌رسد و هر دو جنس را به یک میزان مبتلا می‌کند(۹).

از زمان کشف اولین بیمار به علت جهش در ژن میتوکندریایی از سال ۱۹۸۸ بیش از ۷۰ جهش نقطه‌ای، انواع حذف و مضاعف‌شدن DNA میتوکندریایی که با انواع بیماری‌های ارثی در انسان همراه هستند، شناسایی شده‌است.

جهش‌های مختلفی در ژن MTRNR1 کد کننده12S rRNA می‌تواند باعث ناشنوایی غیرسندرومیک با توارث مادری شود که الگوی آن به دلایل مختلف می‌تواند شبیه اتوزوم مغلوب شود. جهش A1555G که در ژن MTRNR1 کدکننده 12S rRNAرخ می‌دهد، اولین جهش میتوکندریایی همراه با ناشنوایی غیر سندرومی بود که شناخته شد(۱۰).

بررسی‌های Dachun و همکاران بر ژن‌های میتوکندریایی 12S rRNA tRNA Ser (UCN) منجر به شناسایی جهش‌های A1555G و T1095C در ژن 12S rRNA شد که تقریباً به شکل هموپلاسمی دیده می‌شود(۱۱). برای اولین بار در سال ۲۰۰۸ Woong و همکاران جهش‌های میتوکندریایی را در جمعیتی از بیماران کره‌ای با ناشنوایی غیر سندرمی بررسی کردند(۱۲). جهش A1555G که در ژن MTRNR1 کدکننده 12S rRNAو جهش 35delG ژن GJB2، احتمالاً شایع‌ترین جهش‌های ایجادکننده ناشنوایی و همچنین شایع‌ترین جهش میتوکندریایی نسبت به سایر جهش‌ها هستند: در ۰/۵٪ -۱٪ ناشنوایان نژاد قفقازی (۱۳و۱٤)؛ گرچه در جمعیت‌های نمونه‌گیری آسان، جمع آوری و وارد مطالعه شد. شرط ورود به این مطالعه، ناشنوایی حسی- عصبی غیرسندرمی با الگوی اسپانیایی و آسیایی با فرکانس بالاتری گزارش شده‌است. در مطالعه‌ای دیگر، بیماران با جهش A1555G ژن 12S rRNA میتوکندری خطر افزایش یافته از تکامل ناشنوایی بعد از تیمار با آمینوگلیکوزید داشتند لیکن ناقلان جهش، همچنان ناشنوایی بدون قرار گرفتن در معرض دارو را نشان دادند (۱۵و۱۶). در مطالعه‌ای دیگرجهش A1555G در ۲٪ بیماران با ناشنوایی پیش‌زبانی گزارش شد(۱۷). جهش‌های متعددی در ژن MTTS1 کدکننده tRNASer(UCN) همراه با ناشنوایی حسی عصبی شناخته شد که شامل A7445G، T7510C، T7511C و 7472insC هستند(۱۸). سه جهش A3243G، T3271C و T4216C در ژن tRNALeu(UUR) (MTTL1) شناسایی شدند و جهش A3243G در ۰،۳۱۴٪ جمعیت ناشنوایان ژاپنی پیدا شد. همچنین، جهش A3243G در افراد دچار دیابت ملی‌توس نیز شناخته شد(۱۹). در ژن MTTS1 کدکننده tRNA Ser (UCN) جهش A7445G دیده می‌شود که برای نخستین بار در یک خانواده اسکاتلندی و سپس به ترتیب در یک خانواده نیوزلندی، ژاپنی، فرانسوی، اوکراینی، پرتغالی و مجارستانی پیدا شد(۲۰، ۳۲-۳۰). عدم رونویسی ژن در کدون پایان و اضافه شدن سه اسید آمینه (Ser-Gln-Lys) به انتهای C-terminal زنجیره H از mt-DNA در اثر تبدیل نوکلئوتید A به C در این کدون است. در واقع این تغییر در بخش '3 از پیش‌ساز L-strandRNA در نزدیکی محل اندونوکلئاز آن صورت می‌گیرد که منجر به ناشنوایی می‌شود(۳۳). واریانت G3316A همراه با تغییر آمینو اسید آلانین به ترئونین در بیماران دیابت ملی‌توس گزارش شد و احتمالاً این واریان در LHON و کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک نیز نقش دارد(۱۱و۳۴).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی- آزمایشگاهی، ۴۶ نمونه خون از ناشنوایان زن و مرد تحت نظر سازمان بهزیستی استان گیلان و دچار کاهش شنوایی غیرسندرمی با الگوی اتوزومی مغلوب، در محدوده سنی ۳۵-۲ ساله (میانگین۱۳/۸ ساله) به روش نمونه‌گیری آسان، جمع‌آوری و وارد مطلعه شد. شرط ورود به این مطالعه، ناشنوایی حسی- عصبی غیرسندرمی با الگوی

توارث اتوزومال مغلوب بود و افراد ناشنوای سندرمی از این مطالعه حذف شدند.

پس از اخذ رضایت نامه کتبی از کلیه بیماران، اطلاعات دموگرافی و بالینی آنها (ناشنوایی حسی- عصبی غیرسندرمی با الگوی توارث اتوزومال مغلوب) از طریق پرکردن پرسشنامه جمع آوری و سپس از هر بیمار 5ml خون برای آزمایش مولکولی در لوله‌های حاوی ضدانعقاد EDTA ۰/۵مولارگرفته شد. نمونه‌ها به مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد منتقل، سپس با روش استاندارد فنل-کلروفرم، DNA نمونه‌ها استخراج شد(۳۵). کیفیت DNA بدست آمده با اسپکتروفتومتر (Unico2100USA) اندازه‌گیری شد. سپس، با استفاده از توالی ژن میتوکندریایی به رمز دسترسی یافته (NC-012920) و نرم افزار Primer3 توالی‌های آغازگر F وR برای سه جهش این ژن طبق جدول ۱ طراحی و خریداری شد.

PCR برای بررسی جهش‌های میتوکندریایی A1555G، A3243G وA7445G بر نمونه‌های DNA با دستگاه ترموسایکلر (ASTEC PC 818 Japan) در شرایط دمایی زیر انجام شد:

هر واکنش شامل ۳۲ سیکل حرارتی بود که در هرسیکل، از حرارت ^{o}C۹۴ به مدت ۴۰s جهت واسرشته شدن رشته‌های DNA، دمای اتصال پرایمرها به DNA هدف در دمای^{o}C۵۸- ۶۰ به مدت ۴۰s و ^{o}C۷۲ به مدت ۴۵ s برای ساختن رشته‌های مکمل استفاده شد (جدول ۱).

شرایط واکنش PCR برای هر سه جهش، یکسان و شامل: lµl (یک میکرولیتر) از پرایمر F (10PM)، ۱µl از پرایمر , R (10PM) 0. 1µl آنزیم Taq DNA polymeras ((5U/µl)) ، 0.5 µl از mixed NTP (۱۰ mM)، ۲/۵µl از PCR buffer(۱۰ X)، ۱/۵ µl از MgCL2 (۵۰ mM) و DNA 1µl (100 ng) بودند که با dH2O به حجم ۲۵ µl رسانده شد.

کلیه محصول PCR برای تأیید نهایی روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪ (نسبت ۲۹:۱ بیس اکریل آمید: اکریل آمید) به مدت یک ساعت با ولتاژ ۲۰۰ V الکتروفورز شد و ژل بدست آمده توسط نیترات نقره رنگ‌آمیزی و برای بررسی جهش‌ها از روش PCR-RFLP استفاده شد(جدول ۱).

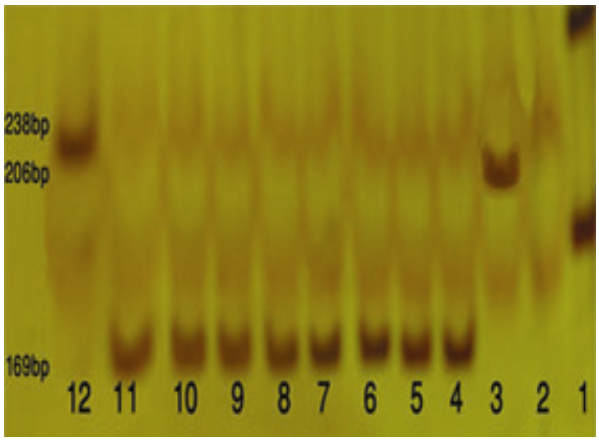
در هر میکروتیوب ۱۰µl از محصول PCR با ۱µl آنزیم محدودکننده مورد نظر (10U/ µl) و ۲ µl بافر و ۷ µl آب مقطر مخلوط و به مدت یک شبانه روز در ۳۷ °c قرار داده شد. سپس، فرآورده‌ها بر ژل ۱۲درصد پلی‌آکریل آمید به مدت ۳ ساعت با ولتاژ۲۰۰ ولت الکتروفورز شد (جدول یک).

جدول ۱: مشخصات توالی پرایمرها، دمای چسبیدن و اندازه محصولات PCR برای هر جفت پرایمر مورد استفاده در تشخیص جهش‌های میتوکندریایی

نام جهش میتوکندری	آغازگرها	دمای اتصال	اندازه محصول PCR	آنزیم‌های برشگر	اندازه قطعات برش خورده محصول طبیعیPCR	اندازه قطعات برش خورده محصول جهش یافتهPCR
A1555G	F- 5′ CAC AAA ATA GAC TAC GAA AGT GGC 3' R- 5′ ACT TAC CAT GTT ACG ACT GTG 3'	58 ºC	566 bp	HaeIII	111bp	91bp و 20bp
A3243G	F-5' CCT CCC TGT ACG AAA GGA C 3' R- 5' GCG ATT AGA ATG GGT ACA ATG 3'	60 ºC	238 bp	HaeIII	169bp	97bp و 72bp
A7445G	F- 5' GAG AAG CCT TCG CTT CGA AG 3' R- 5' GAG GGC GTG ATC ATG AAA GGT 3'	ºC 60	348 bp	XbaI	119bp و 229bp	348bp

نتایج

در این مطالعه توصیفی- آزمایشگاهی ۴۶ ناشنوای زن و مرد بررسی شد. در PCR-RFLP بر این نمونه‌ها هیچ‌یک از جهش‌های A1555G، A3243G و A7445G دیده نشد، اما بر روی یکی از نمونه‌هایی که بررسی جهش A3243G انجام شده‌بود، الگوی متفاوت باندها بدست آمد که به علت وجود واریان در محل ۳۳۱۶ یکی از سایت‌های آنزیم در محصول PCR تخریب شده بود و به جای ایجاد قطعه‌هایی با طول bp ۳۲، bp ۳۷ و bp ۱۶۹، قطعاتی به طول bp ۲۰۶ و bp ۳۲ ایجاد شد. این نتایج با روش توالی مستقیم، بررسی و تایید شد(شکل ۱).



شکل ۱: محصولاتPCR-RFLP بر روی ژل پلی‌اکریل آمید۸٪ جهت بررسی جهشA3243G. باند ۱- مارکر، باند ۲- کنترل منفی بدون DNA)، باند۳- واریانت G3316A. (باند bp ۳۷ از ژل خارج شده و مشاهده نمی‌شود)، باند ۴- ۱۱ نمونه‌های سالم، باند ۱۲- کنترل DNA بدون آنزیم)

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین ناشنوایی حسی- عصبی غیرسندرمی و جهش‌های شایع در ژن‌های میتوکندریایی انسان بر ۴۶ ناشنوای استان گیلان انجام شد. طبق نتایج بررسی‌های گذشته، کمتر از یک درصد ناشنوایی‌های حسی- عصبی، به علت جهش‌های میتوکندریایی ایجاد می شود. در نمونه‌های بررسی شده جهش‌های A1555G، A3243G و A7445G دیده نشد. احتمالاً حجم کم نمونه، دلیلی بر نیافتن جهش‌های مورد نظر، در این مطالعه باشد. البته، نتایج، الگویی متفاوت از جهش در ژن میتوکندریایی به صورت واریانت G3316A نشان داد که برای اولین بار در بیماری با فنوتیپ ناشنوایی یافت شده‌است. با توجه به یافت‌نشدن جهش A3243G، قطعاتی به طول bp ۲۰۶ و bp ۳۲ در اثر از بین رفتن یک جایگاه دیگر آنزیم HaeIII دیده شد که بعداً با تعیین توالی مستقیم، جهش G3316A شناسایی شد.

به طور کلی بر اساس تحقیق در مناطق مختلف دنیا ارتباط سه ژن میتو کندریایی با ناشنوایی بررسی و تأیید شده و شامل جهش A1555G در ژن MTRNAR1 کد کننده 12SrRNA، سه جهش A7445G, T7511C, 7472insC در ژنMTTS1 کدکننده tRNA (UCN Ser) و سه جهش A3243G، T3271C و T4216C در ژن tRNA (MTTL1) leu (UUR) است(۱۸).

تاکنون در ایران، مطالعه‌ای برای بررسی ارتباط بین جهش‌های میتوکندریایی و ناشنوایی صورت نگرفته اما بر اساس مطالعه در بیماران ژاپنی، جهش A3243G در ژن Leu(UUR) tRNA نشان داده شده‌است. همچنین، جهش A3243G در افراد دچار دیابت ملی‌توس نیز، بدست آمده‌است. این جهش باید به عنوان علت ناشنوایی، در بیمارانی که دیابت دارند، در نظر گرفته شود(۱۸). در مطالعه‌ی ما این جهش در هیچ‌یک از ٤٦ مورد یافت نشد.

اما به واریانت متفاوتی برخوردیم که به صورت G3316A تأیید شد. طبق مطالعات انجام شده تغییر G3316A همراه با تغییر آمینواسیدآلانین به ترئونین در بیماران دیابت ملی‌توس، گزارش شده اما هنوز ارتباط آن با ناشنوایی، مورد تأیید قرار نگرفته و نیاز به بررسی بیشتری دارد(۳۴).

برای اولین بار در سال ۲۰۰۸ Woong و همکاران جهش‌های میتوکندریایی را در ۲۲۷ بیمار غیرخویشاوند بیمار کره‌ای با ناشنوایی غیرسندرمی بررسی کردند. که دو نفر با جهش A1555G شناسایی شد. به علاوه دو نوع جدیدC895T و ژن 12S rRNA ممکن است یک محل داغ برای جهش‌های میتوکندریایی منجر به ناشنوایی در جمعیت کره‌ای باشد(۱۲).

بررسی‌های Dachun و همکاران بر ژن‌های میتوکندریایی 12S rRNA منجر به شناسایی جهش‌های A1555G و T1095C در ژن 12SrRNA شد که تقریباً به فرم هموپلاسمی بودند ولی

دیگر انواع تغییر نوکلئوتید میتوکندریایی مسئول دیده نشد. این یافته‌ها نشان از افزایش احتمالی نقص بیوشیمی در مسیر سنتز پروتئین میتوکندریایی در افراد، حاصل از جهش A1555G دارد. بنابراین، تغییر سن حمله و انواع آسیب‌های شنوایی را در پی خواهد داشت(۱۱).

در مطالعه‌ای دیگر بیماران با جهش A1555G ژن 12S rRNA میتوکندری خطر افزایش یافته تکامل ناشنوایی پس از تیمار با آمینوگلیکوزید داشتند. لیکن ناقلان ناشنوایی بدون قرارگرفتن در معرض دارو را نشان دادند(۱۵و۱۶). در مطالعه‌ای دیگر جهش A1555G در ۲٪ بیماران ژاپنی با ناشنوایی پیش‌زبانی گزارش شد (۱۷) ولی در مطالعه‌ی ما بدست نیامد.

به‌نظر می‌رسد در مطالعات آتی مکانیسم بیماریزایی این جهش باید بیشتر مورد بررسی قرار گیرد و مطالعه بر جهش و بیماریزایی آن هردو درکنار هم باشد. قابل‌توجه آن‌که مطالعات بر نقش جهش‌های میتوکندریایی در ناشنوایی قبل‌از زبان بازکردن اندک بوده‌است که مطالعه ما این نکته را تأییدمی‌کند. بر اساس یافته‌های این مطالعه و مطالعات قبلی، احتمال ارتباط جهش‌های میتوکندریایی با ناشنوایی در افراد ناشنوا در شمال ایران اندک است و لازم است مطالعات بیشتری بر سایر قوم‌ها و با نمونه‌های بیشتری انجام شود تا نقش جهش‌های میتوکندریایی در ایجاد ناشنوایی بهتر مشخص شود. تحقیق برای تعیین نوع جهش‌ها و تأثیر هر یک از آنها در ایجاد ناشنوایی در کشور می‌تواند راهکاری در جهت بالابردن کیفیت مشاوره‌های ژنتیکی یا مداخله‌های درمانی باشد.

تشکر و قدردانی: بدینوسیله از سازمان بهزیستی استان گیلان، سازمان بهزیستی استان چهارمحال و بختیاری، معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و تمامی افراد ناشنوا که بزرگوارانه در این مطالعه ما را یاری رساندند تشکر می‌کنیم. این مطالعه از نظر مالی از طریق گرانت ۵۳۵ دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تامین اعتبار شده‌است.

منابع

1. Martini A, Mazzoli M, Kimberling W. An Introduction To The Genetics of Normal and Defective Hearing .Ann N Y Acad Sci 1997; 830:361-74.

2. Tekin M, Arnos KS.Pandya A.Advances in Hereditarydeafness.Lancet 2001; 29; 358(9287):1082-90.

3. Hone SW, Smith RJ.Genetic Screening for Hearing Loss.Clin Otclinotolaryngol Allied Sci 2003; 28(4): 285-90.

4. Petersen MB.Non-Syndromic Autosomal-Dominant Deafness.Clin Genet 2002; 62(1):1-13.

5. Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Et al. Genetic Epidemiological Studies of Early-Onset Deafness in the U.S. School-Age Population. Am J Med Genet 1993: 46: 486–491.

6. Sue CM, et al. Cochlear Origin of Hearing Loss in MELAS Syndrome. Ann Neurol 1998:43:350-59.

7. Heidi L Rehm Robin E, Williamson, Margaret A Kenna, David P Corey, Bruce R Kor f. Understanding the Genetics of Deafness A Guide for Patients and Families. Harvard Medical School Center For Hereditary Deafness. 3 th Edition. Harvard Medical School Center for Hereditary Deafness; 2004: 1-16.

8. Nadol JB Jr, Merchant S N. Histopathology and Molecular Genetics of Hearing Loss in The Human. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 2001; 61: 1–15.

9. Hutchin T, Cortopassig. Mitochondrial Defects and Hearing Loss. CMLS Cell Mol Life 2000; 57: 1927-37.

10. Bravo O, Ballana E, Estivill X, et al. Cochlear Alterations In Deaf And Unaffected Subjects Carrying The Deafness Associated A1555G Mutation In The Mitochondrial 12S Rrna Gene. Biochem Biophys Res Commun 2006; 344: 511–516.

11. Dachun Dai, Yajie Lu, Zhibin Chen, Et al. Co-Segregation Of The T1095C With The A1555G Mutation Of The Mitochondrial 12S Rrna Gene In A Patient With Non-Syndromic Hearing Loss .Biochemical And Biophysical Research Communications 2008; 377: 1152–55.

12. Woong BJ, Yup LK, Youngcs, et al. Molecular Analysis of Mitochondrial Gene Mutations In Korean Patients With Nonsyndromic Hearing Loss. International Journal of Molecular Medicine 2008; 22: 175-80.

13. Pacifico C, Tessa A, Giannotti A, et al. Prevalance of Non-Mendelianmitochondrial Inheritance in Pediatric Sensorineural Hearingimpairment. Hereditary Deafness Epidemiology and Clinical Research. Third International Meeting, Bibioue, Italy, 4–7March, 1999.

14. Sue CM, Tanji K, Hadjigeorgiou G, et al. Maternally Inherited Hearing Loss In A Large Kindred With A Novel T7511C Mutation In The Mitochondrial DNA Trna(Ser (UCN) Gene. Neurology 1999; 52: 1905- 1908.

15. Schahawi M, Lopez De Munain A, Sarrazin A M, et al. Two Large Spanish Pedigrees With Nonsyndromic Sensorineural Deafness And The Mtdna

Mutation At Nt 1555 In The 12 S Rrna Gene: Evidence Of Heteroplasmy, Neurology 1997; 48: 453–6.

16. Prezant T.R, Agapian J.V, Bohlman M.C, et al. Mitochondrial Ribosomal RNAMutation Associated With Both Antibiotic-Induced And Non-Syndromic Deafness, Nat. Genet. 4 (1993) 289–294.

17. Jacobs H T. Disorders Of Mitochondrial Protein Synthesis. Hum Mol. Genet 2003; 12(2): R293- 301.

18. Shin-Ichi Usami, Satollo Abe, Jiro Akita, et al. Prevalence of Mitochondrial Gene Mutations Among Hearing Impaired Patients. J Med Genet 2000; 37 38-40.

19. Kelley PM Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, Kimberling WJ. Novel Mutations in the Connexin 26 Gene (GJB2) That Cause Autosomal Recessive (DFNB1) Hearing Loss. Am J Hum Genet 1998; 62:792-9.

20. Kupka S, Toth T, Wrobel M, Et al. Mutation A1555G In The 12S Rrna Gene And Its Epidemiological Importance In German, Hungarian, And Polish Patients. Hum Mutat 2002; 19: 308–309.

21. Martin L, Toutain A, Guillen C, Et al. Inherited Palmoplantar Keratoderma And Sensorineural Deafness Associated With A7445G Point Mutation In The Mitochondrial Genome. Br J Dermatol 2000; 143: 876–883.

22. Hutchin TP, Lench NJ, Arbuzova S, et al. Maternally Inherited Hearing Impairment in A Family With The Mitochondrial DNA A7445G Mutation. Eur J Hum Genet 2001; 9: 56 58

23. Caria H, Matos T, Oliveira Soares R, et al. A7445G Mtdna Mutation Present In A Portuguese Family Exhibiting Hereditary Deafness And Palmoplantar Keratoderma. J Eur Acad Dermatol Venereol 2005; 19 455–458.

24. Kokotas H, Petersen MB, Willems PJ. Mitochondrial Deafness. Cli Genet 2007; 71: 379-391.

25. Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brondum-Nielsen K, Metspalu A, Oitmaa E, Pisano M, Fortina P, Zelante L, Estivill X. The Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delg . High Carrier Frequency of the 35delg Deafness Mutation In European Populations. Eur J Hum Genet 2000; 8:19.

26. Storm K,Willocx S, Flothmann K, Van Camp G. Determination Of The Carrier Frequency of the Common GJB2 (Connexin-26) 35delg Mutation In The BelgianPopulation Using An Easy and Reliable Screening Method. Hum Mutat 1999; 14:263-6.

27. Denoyelle F, Weil D, Maw MA, et al. Prelingual Deafness: High Prevalence of A 30delg Mutation in The Connexin 26 Gene. Hum Mol Genet 1997; 6:2173-7.

28. Lucotte G, Bathelier C, Champenois T. PCR Test for Diagnosis of the Common GJB2 (Connexin 26) 35delg Mutation On Dried Blood Spots and Determination Of The Carrier Frequency In France. Mol Cell Probes 2001; 15:57-9.

29. Antoniadi T, Rabionet R, Kroupis C, Et al. High Prevalence In The Greek Population Of The 35delg Mutation In The Connexin 26 Gene Causing Prelingual Deafness. Clin Genet 1999; 55:381-2.

30. Estivill X, Fortina P, Surrey S, et al. Connexin-26 Mutations in Sporadic And Inherited Sensorineural Deafness. Lancet 1998; 351:394-8.

31. Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Fournier P et al. Mitochondrial Mutation Associated Whit Nonsyndromic Deafness.Am J Tolaryngol 1995:16:403-408.

32. Sevior KB, Hatamochi A,Stewartia Et al. Mitochondrial A7445G Mutation In Two Pedigrees Whit Palmoplantar Keratoderma And Deafness. Am J Med Genet 1998:75:179-185.

33. Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Et al. Mutations in the Connexin 26 Gene (GJB2) Among Ashkenazi Jews With Nonsyndromic Recessive Deafness. N Engl J Med 1998; 339:1500-5.

34. Odawara M, Maki H, Yamada N. Pathogenicity of Homoplasmic Mitochondrial DNA Mutation and Nuclear Gene Involvement. J Med Genet. 1999 December; 36(12): 934–935.

35. Dale JW, Schantz MV. Purification and Separation of Nucleic Acid in: Dale JW, Schantz MV. From Genes To Genomes. Chichester; John Wiley, 2002: 31 3.

Screening of Mitochondrial Mutations of A1555G, A 3243G, and A7445G in MTRNR1, MTTL1 and MTTS1 Genes in Subjects with Nonsyndromic Sensorineural Hearing Loss

Taji F.(Stu)[1]- Montazer Zohouri M.(Stu)[1]- Farokhi E.(MSc)[1]- Bani talebi Dehkordi G.A.(AD)[1]- Hosseini pour A.(MD)[1]- Keshavarz S.(MD)[1]- Asgari A.(MSc)[1]- *Hashemzadeh Chaleshtari M. (Ph D)[1]

***Corresponding Address:** Molecular and Cellular Research Center, Faculty of Medicine, Shahre Kord, IRAN

E-mail: mchalesh@yahoo.com

Received: 19 Mar/2010 Accepted: 22 Aug/2010

Abstract

Introduction: Various frequencies of the mtDNA mutations have been reported from different population world wild. Three mitochondrial DNA (mtDNA) mutations including A1555G, A 3243G, and A7445G which occurred in MTRNR1, MTTL1 and MTTS1 genes were considered as the main causes of mitochondrial hearing loss in some populations.

Objective: To determine the frequency of the A1555G, A3243G, and A7445G mutations in nonsyndromic sensorineural hearing loss subjects in Gilan.

Materials and Methods: Forty six subjects with nonsyndromic sensorineural hearing loss were screened by provided questionnaire and audiogram from Gillan Welfare Organization. PCR-RFLP procedure was used in order to presence the MtDNA of A1555GA 3243G and A7445G mutations and was confirmed by subsequent direct sequencing.

Result: There was no MtDNA of A1555G, A3243G and A7445G mutation in the cohort study of 46 deaf individuals. Investigation of PCR-RFLP of the MTTL1 gene for existence A3243G mutation lead to identification a G3316A variant that destroyed other restriction site, in the other site of PCR fragment.

Conclusion: Our finding indicated that possibility the association of mitochondrial mutations with deafness is very low in deaf subjects in north of Iran. According to existence the G3316A that its pathogenesis in relation to hearing loss phenotype has not stabilized, the frequency of G3316A is 1.46% that can be had highlights role of mitochondrial mutation in deafness.

Key words: DNA Mitochondrial/ Hearing Loss, Sensorineural

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 76, Pages: 15-21

1. Molecular and cellular Research Center, Faculty of Medicine shahre kord, IRAN