مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۰ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۷ صفحات ۱۲-۷

جهش‌های ژن کانکسین ۲۶ در مبتلایان به ناشنوایی در منطقه آذربایجان شرقی با استفاده از تکنیک SSCP/HA

معصومه ابهری: گروه زیست شناسی جانوری،، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
دکتر مرتضی جبارپور بنیادی: گروه زیست شناسی جانوری، قطب علمی سیتوملکولی تنوع زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، مرکز تحقیقات بیماریهای کبد وگوارش، دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
E-mail: Jabbarpour@tabrizu.ac.ir
محسن اسماعیلی: گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
دکتر علیرضا لطفی: گروه گوش و حلق و بینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۶/۷/۲۴، پذیرش: ۸۷/۱/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: ناشنوایی یکی از شایعترین اختلالات حسی ـ عصبی است. ۸۰ درصد از ناشنوایی‌های ارثی، غیرسندرومی است. تاکنون ۸۵ لوکوس ژنی برای ناشنوایی غیرسندرمی با انواع الگوهای وراثتی شناسایی شده است. یکی از این لوکوس‌ها، DFNB1 است که دربرگیرنده ژن کانکسین ۲۶ می باشد. جهش‌های این ژن، به تنهایی مسئول ۵۰ درصد ناشنوایی‌های غیرسندرمی با الگوی وراثتی اتوزوم مغلوب درجمعیت سفیدپوستان گزارش شده است. تاکنون، بیش از ۹۰ جهش متفاوت در جمعیت‌های مختلف در ژن کانکسین ۲۶ گزارش شده است. با توجه به اینکه در مبتلایان به ناشنوایی از منطقه آذربایجان‌شرقی بررسی کامل ژن کانکسین ۲۶ با استفاده از تکنیک بسیار حساس و در عین حال اقتصادی(Single Strand Conformation Polymorphism/Heteroduplex Analysis, SSCP/HA) صورت نپذیرفته، این بررسی ضرورت پیدا کرد.

روش بررسی: از ۱۰۰ فرد مبتلا به ناشنوایی با الگوی وراثتی اتوزوم مغلوب از منطقه آذربایجان‌شرقی افرادیکه در بررسی قبلی بصورت هموزیگوت دارای جهش delG ۳۵ بودند، کنار گذاشته شد. در بقیه مبتلایان (۸۵ مبتلای غیرخویشاوند) ژن کانکسین ۲۶ با استفاده از تکنیک SSCP/HA مورد بررسی قرار گرفت. لازم بذکر است استخراجDNA از بافت خونی و پس از اخذ رضایتنامه کتبی از افراد بیمار یا خانواده آنها صورت گرفت.

یافته‌ها: از تعداد ۱۷۰ کروموزوم بررسی شده برای اگزون ۲ ژن کانکسین ۲۶ در مجموع ۱۴ الگوی متفاوت SSCP در ۶۲ کروموزم (۳۶٪ درصد) مشاهده گردید. در یک فرد ناشنوا (۲ کروموزوم) این تفاوت در الگو بصورت هموزیگوت و در ۳۰ فرد ناشنوای دیگر (۶۰ کروموزوم) این تفاوت بصورت هتروزیگوت بود. ۶۷ درصد بیماران بررسی شده حاصل ازدواج فامیلی بوده و بقیه ناشنوایان دارای والدین با ازدواج غیرخویشاوند بودند.

نتیجه گیری: الگوی متفاوت باندی SSCP برای اگزون ۲ ژن کانکسین ۲۶ در مقایسه با افراد نرمال در ٪۳۶ از کروموزوم‌های مورد بررسی از خانواده‌های مبتلا از آذربایجانشرقی مشاهده شد که ضرورت بررسی این ژن را در قدم اول برای الگوهای مشخص شده نشان میدهد.

کلید واژها: ژن کانکسین ۲۶، تکنیک SSCP/HA، ناشنوائی غیرسندرمی اتوزومی مغلوب

مقدمه

ناشنوایی یکی ازشایعترین اختلالات حسی ـ عصبی ارثی در انسان است. بر اساس آمارهای جهانی از هر ۱۰۰۰ نوزاد زنده یک نوزاد در هنگام تولد دارای نقص شنوایی عمیق تا شدید می‌باشد(۱) این آمار در مطالعات اخیر به یک در ۶۵۰ نوزاد تغییر یافته است (۲). ۵۰ درصد از این موارد ناشنوایی ناشی از اختلال ژنتیکی است. ۸۰ درصد از ناشنوایی‌های ارثی، غیرسندرومی است. در ناشنوائی غیرسندرمیک، تنها گوش داخلی متحمل آسیب گردیده و دیگر عوارض کلینیکی در این مبتلایان مشاهده نمی‌شود.

در نوع سندرمی، ناشنوائی بهمراه دیگر علائم بالینی در بیش از ۴۰۰ سندرم مختلف گزارش شده است. ناشنوایی غیرسندرمی با الگوی وراثتی اتوزوم مغلوب (Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss ARNSHL) (۸۰ درصد)، اتوزومی غالب (۲۰ درصد)، وابسته به جنس (۱درصد) و میتوکندریایی (کمتر از یک درصد) درخانواده‌های مبتلا گزارش شده است(۳،۱). براین اساس ناشنوایی غیرسندرمی با الگوی وراثتی اتوزوم مغلوب شایع‌ترین نوع ناشنوایی است. تاکنون بیش از ۸۵ لوکوس ژنی که می‌تواند باعث اختلال شنوائی غیرسندرومی با الگوهای وراثتی مختلف شوند شناسایی گردیده است(۳). یکی از این لوکوس‌ها، DFNB1 (Deafness B1) است که دربرگیرنده ژن کانکسین ۲۶ است. جهش در این ژن که الگوی وراثتی اتوزوم مغلوب نشان می‌دهد، به تنهایی مسئول ۵۰ درصد ناشنوایی‌های غیرسندرمی مغلوب درجمعیت اروپایی و سفیدپوستان آمریکایی است. تاکنون بیش از ۹۰ جهش متفاوت در ژن کانکسین ۲۶ گزارش شده است(۳). پروتئین کانکسین۲۶ که محصول این ژن می‌باشد، باعث ایجاد اتصالات باز بین سلولی (Gap Junction B [GJB]) بوده و در انتقال یون‌های پتاسیم و برقراری هموستازی یونی در گوش داخلی، جهت تبدیل پالس‌های مکانیکی صوت به پیام های عصبی عملکرد مهمی را بعهده دارد. جایگاه کروموزومی ژن کانکسین ۲۶ برروی بازوی بلند کروموزم ۱۳ است. طول این ژن ۵/۵ کیلو جفت باز بوده و دارای دو اگزون و یک اینترون است که اگزون دوم آن که ۶۸۱ جفت‌باز طول دارد به تنهایی کد کننده پروتئین کانکسین ۲۶ می‌باشد و اگزون اول آن غیرکدکننده است (٤). جهش delG ۳۵ که منجر به ایجاد کدون خاتمه زودرس در موقعیت اسید آمینه شماره ۱۳ می‌شود، جهش delT ۱۶۷ و جهش delC ۲۳۵ جزو جهش‌های بسیار شایع گزارش شده در داخل اقوام و جمعیت‌های مختلف است (۷،۶،۵،۳). با توجه به جهش-های متعدد گزارش شده در این ژن و نیز وفور نسبی جایگاه DFNB1 به‌عنوان مسئول ناشنوایی درمجموع گزارشات، اهمیت زیاد بررسی تغییرات این ژن در بروز ناشنوایی مشخص می‌گردد. با توجه به اینکه در منطقه آذربایجان‌شرقی بررسی کامل ژن کانکسین ۲۶ با استفاده از تکنیک قابل اعتماد و اقتصادی SSCP/HA گزارش نشده است، هدف این مطالعه بررسی کلیه تغییرات و جهش‌های ژن مذکور در مبتلایان به ناشنوایی در منطقه مورد مطالعه با استفاده از تکنیک SSCP/HA می‌باشد.

مواد و روش ها

از میان افراد مبتلا به ناشنوایی ارجاع داده شده به کلینیک ژنتیک پزشکی تبریز، پس از انجام معاینه بالینی توسط پزشک متخصص، انجام آزمایشات شنوائی سنجی، تکمیل پرسشنامه و رسم شجره نامه، از بین ۱۰۰ فرد مبتلا به ناشنوایی با الگوی وراثتی اتوزوم مغلوب از ۱۰۰ خانواده غیرخویشاوند از منطقه آذربایجان شرقی، انتخاب و از بین این افراد، افرادیکه در بررسی قبلی(۸) بصورت هموزیگوت دارای جهش delG ۳۵ بودند، کنار گذاشته شدند. در بقیه مبتلایان (۸۵ بیمار) و نیز تعدادی از اعضاء خانواده آنها، ژن کانکسین ۲۶ با استفاده از تکنیک SSCP/HA مورد بررسی قرار گرفت. خونگیری از بیماران بعد از اخذ رضایت کتبی از مبتلایان و یا والدین آنها به عمل آمد. خون با مقداری ماده ضد انعقاد (EDTA) مخلوط شده ونمونه‌ها در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگه‌داری شد. برای استخراج DNA ژنومی از بافت خون از روش اصلاح شده فنل ـ کلروفرم مطابق متدی که قبلاً توضیح داده شده است (۹) استفاده گردید. اگزون دوم ژن کانکسین ۲۶ با استفاده از سه جفت پرایمر همپوشان (F,3R۱؛ F,15R۱۰ و F,5R۶)(۲) با روش PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) تکثیر یافت. بهینه‌سازی شرایط PCR مطابق روش استفاده شده در بررسی قبلی صورت گرفت (۸). محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. ژل آگارز با محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده و باندهای حاصل از محصولات PCR زیر اشعه ماوراءبنفش مشاهده گردید.

تکنیک SSCP/HA: پس از عملکرد بهینه PCR و عدم وجود باند غیراختصاصی، محصول PCR با استفاده از تکنیک SSCP/HD مورد بررسی قرار گرفت. محصول PCR نمونه مورد نظر با بافر SSCP (فرمآمید ۹۵٪، ۱۰۰ میلی مولار NaOH ، برموفنل بلو ۰.۲۵٪ و زایلن سیانول ۰.۳۵٪) با نسبت ۲:۱ مخلوط شده بمدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس بمدت ۱۰ دقیقه در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و بلافاصله روی ژل SSCP با غلظت آکریلامید ۱۰ درصد، با ولتاژ ۸۵ به مدت ١٤ ساعت الکتروفورز گردید. ژل SSCP با روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شده و الگوی باندهای SSCP بدست آمده برای هر بیمار با الگوی باندهای SSCP فرد سالم (که از همین جامعه انتخاب شده بودند) مقایسه و تفسیر شد. در مواردی که بیمار حالت هموزیگوت را برای یک تغییر در الگوی SSCP نشان می‌داد جهت اینکه تغییر موجود خود را به صورت هتروزیگوت نشان دهد، آنالیز هترودوپلکس مورد استفاده قرار می‌گرفت.

یافته‌ها

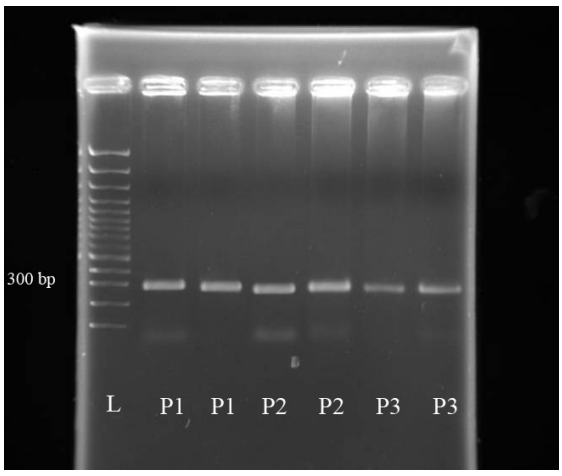
در این مطالعه، ژن کانکسین ۲۶ در ۱۷۰ کروموزوم (۸۵ فرد ناشنوا) و تعدادی از اعضاء خانواده آنها جهت بررسی‌های تکمیلی، با تکنیک SSCP مورد بررسی قرار گرفت. ۵۷ فرد (٦٧ درصد) حاصل ازدواج فامیلی بوده و بقیه ناشنوایان دارای والدین با ازدواج غیرخویشاوند بودند. در صورت مشاهده تفاوت در هر یک از نمونه‌ها، نمونه موردنظر دوباره با محصول PCR جدید بر روی ژل SSCP بررسی گردید تا وجود تفاوت به طور قطعی اثبات شود. شکل ۱ حاوی نتایج الکتروفورز محصولات PCR مربوط به تکثیر اگزون دوم ژن کانکسین ۲۶ با استفاده از سه جفت پرایمر که با یکدیگر همپوشانی داشتند می‌باشد. نتایج الکتروفورز این

محصولات PCR برروی ژل SSCP و تعدادی از انواع الگوهای SSCP متفاوت مشاهده شده، در شکل ۲ نشان داده شده است که مربوط به الگوهای متفاوت SSCP از محصول‌های جفت پرایمر اول و دوم و سوم می‌باشد. در مجموع در ۶۲ کروموزم (۳۶٪ درصد) بیماران با ناشنوایی غیرسندرومی با الگوی توارثی اتوزوم مغلوب، در الگوی باندهای SSCP/HA ژن کانکسین۲۶ در مقایسه با افراد سالم تغییر مشاهده شد. بیشترین تنوع الگوی SSCP در قطعه اول ژن که با جفت پرایمر F,3R۱ تکثیر شد، مشاهده گردید (۵۰ درصد). این تغییرات در ۱۴ الگوی متفاوت دسته‌بندی شدند (شکل ۲). الگوی باندی مشاهده شده در یک فرد ناشنوا، متفاوت از الگوی فرد نرمال و همچنین الگوی مخلوط محصول PCR فرد نرمال و ناشنوا بود (شکل۳) و در مجموع تغییر در الگو در یک فرد ناشنوا، بصورت هموزیگوت (شکل۳) بوده و در ۳۰ فرد ناشنوای دیگر (۶۰ کروموزوم) این تفاوت بصورت هتروزیگوت تشخیص داده شد.

بحث

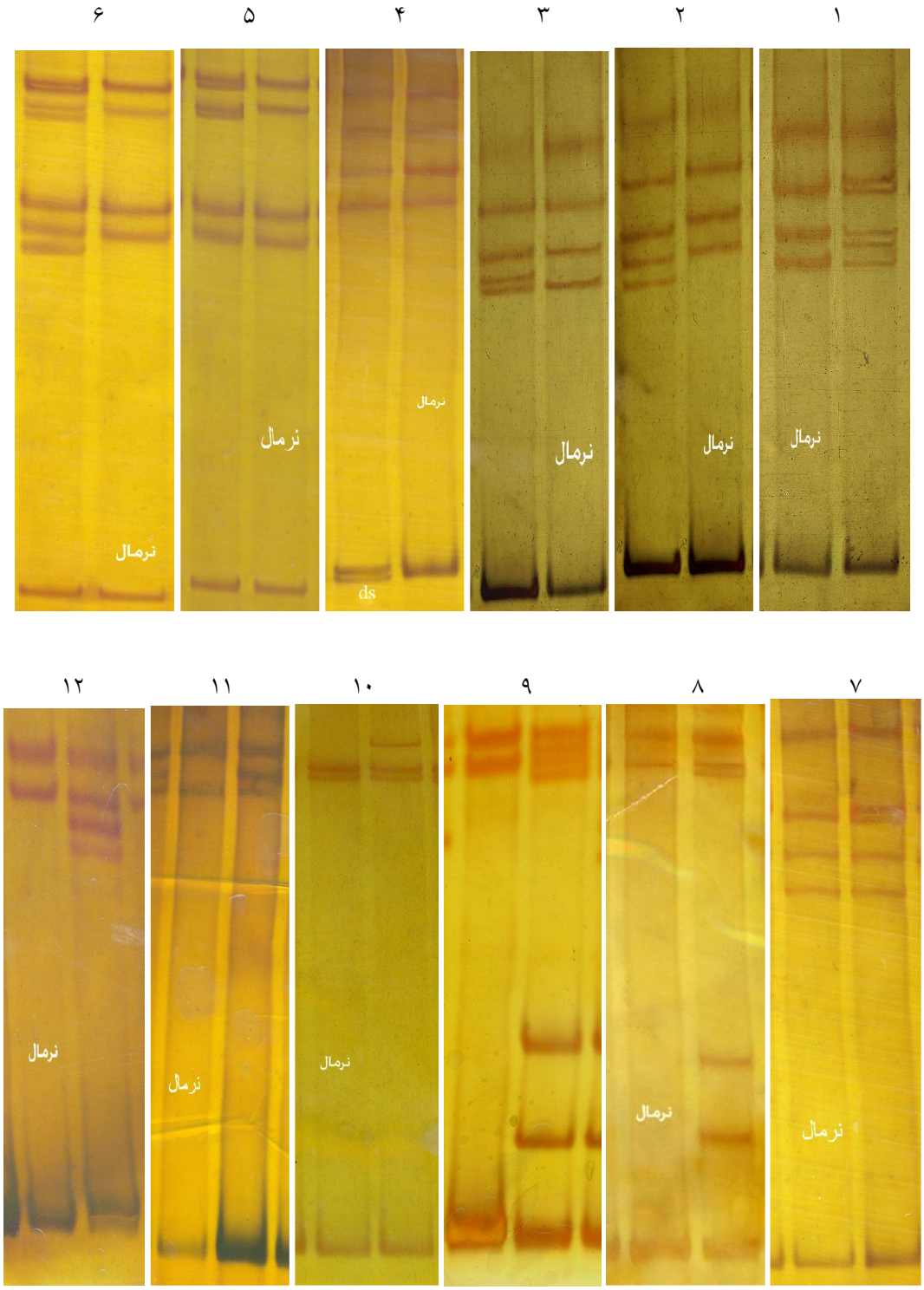
فراوانی ناشنوایی و پراکنش جهش‌های مختلف آن در قسمت-های مختلف جهان متفاوت می‌باشد. جهش در ژن‌های متعددی عامل ایجاد ناشنوایی می‌باشد و تاکنون تعداد ۳۹ کروموزم و بیش از ۲۳ ژن در این ارتباط شناخته شده است که دربین آنها ژن کانکسین۲۶ به تنهایی مسئول درصد بالایی از موارد ناشنوایی بوده است(۳). در این تحقیق جهت بررسی این ژن از تکنیک SSCP استفاده گردید. مزیت استفاده از تکنیک SSCP این است که یک روش حساس، دقیق، اقتصادی و با تخصص‌یافتگی بالا بوده و قادر به شناسایی بیش از ۹۰ درصد از جهش‌ها می‌باشد. همچنین در این تکنیک نیازی به استفاده از مواد رادیواکتیو وجود نداشته و از بهترین روش‌ها برای مطالعه اولیه و تشخیص جهش‌های ناشناخته درون یک جمعیت است. همچنین تکنیک SSCP در مقایسه با تکنیک‌هایی نظیرARMS[1]، ASO، RFLP[2] دارای این برتری می‌باشد که تکنیک‌های ذکر شده تنها قادر به شناسایی جهش‌های شناخته شده بوده و شناسایی جهش‌های جدید و ناشناخته با آنها مقدور نمی‌باشد. در دهه‌های اخیر شیوع نقص شنوایی اکتسابی در مقایسه با نقص شنوایی ژنتیکی کمتر شده و یک رشد نسبی در جمعیت کودکانی که دارای اختلالات شنوایی ژنتیکی هستند، مشاهده می‌شود(۱۰). لازم به ذکر است که فراوانی ناشنوایی‌های ژنتیکی در کشورهای آسیایی از جمله ایران به علت بالا بودن میزان ازدواج‌های فامیلی، بیشتر از کشورهای اروپایی و آمریکایی بوده و از طرف دیگر در کشورهای اروپایی و امریکایی به دلیل کاهش عوامل محیطی ناشنوایی، ناشنوایی اکتسابی کاهش یافته است. اطلاعات بدست‌آمده از آزمایشات ژنتیکی می‌تواند نقش مهمی در تصمیم‌گیری‌های اساسی از جمله تصمیم‌گیری در روش درمان نظیر استفاده از سمعک یا کاشت حلزون و مشاوره ژنتیکی قبل از ازدواج و قبل از بارداری (و همچنین در دوران بارداری) داشته - باشد. بررسی نتایج مطالعات در جمعیت‌های متعدد درصدهای مختلفی از ارتباط ژن کانکسین ۲۶ با ایجاد ناشنوایی را نشان داده است. در یک مطالعه در کشور ترکیه ارتباط بین ژن کانکسین۲۶ و ناشنوایی غیرسندرومی با الگوی توارثی اتوزوم مغلوب در ۲۱/۴ درصد موارد (در ۱۴ خانواده) گزارش شده است(۴).

در مطالعه دیگری از همین کشور که بر روی ۶۰ خانواده مبتلا صورت گرفته، در ۳۱/۷ درصد موارد جهش در ژن کانکسین۲۶ گزارش شده است(۱۱). در مطالعات گزارش شده از کشور ما ارتباط ناشنوایی با ژن کانکسین۲۶ در یک بررسی ۱۱ درصد(۱۲)، و در بررسی دیگر ۱۶/۷ درصد(۱۳) گزارش شده است. بر اساس گزارشات در اقوام گوناگون جهش‌های مختلفی از این ژن شیوع دارد که دلالت بروجود اثر بنیان‌گذار (Founder Effect) در مورد این ژن دارد(۳). فرکانس آلل delG ۳۵ در جمعیت ترکیه بین ۵۳- ۵ درصد گزارش شده است(۱۴،۱۵). در بررسی های اخیر که ما انجام دادیم، فرکانس این جهش در جمعیت آذربایجان ۱۸ درصد برآورد شده است(۸).

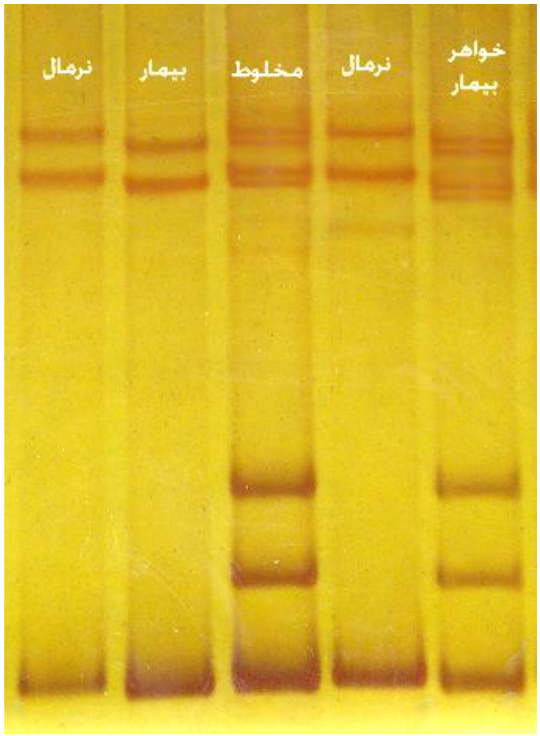


شکل۱: الکتروفورز محصولات PCR از اگزون دوم ژن کانکسین ۲۶ بر روی ژل آگارز. **L**: مارکر ۱۰۰ جفت باز می‌باشد.P1، P2 و P3 به‌ترتیب نشان‌دهنده محصولات PCR جفت پرایمر اول (F,3R۱)، جفت پرایمر دوم (F,15R۱۰) و جفت پرایمر سوم (F,5R۶) می‌باشد.

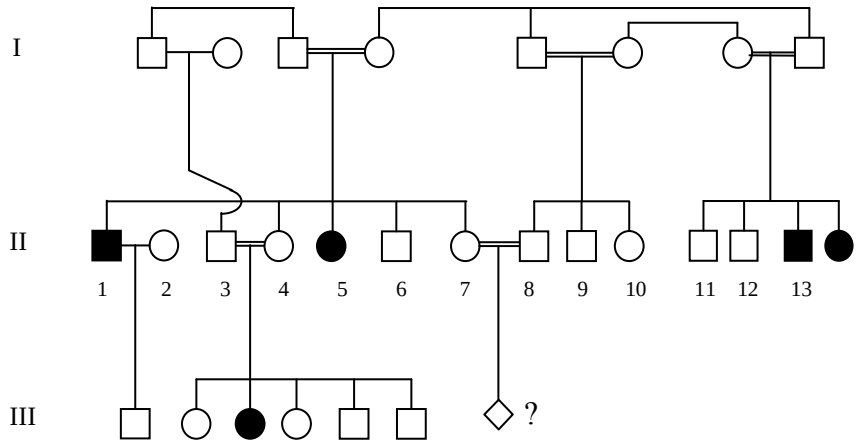
1. Amplification Refractory Mutation System, ARMS
2. Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP



شکل ۲: الگوهای متفاوت بدست آمده از تکنیک SSCP/HA از محصولات PCR ژن کانکسین ۲۶ در افراد نرمال و مبتلا. شماره ۱–۷ روی ژل SSCP مربوط به الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از جفت پرایمر اول F,3R۱. الگوی SSCP ۸ و ۹ مربوط به الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از جفت پرایمر دوم F,15R۱۰. و الگوی ۱۰ تا ۱۲ مربوط به الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از جفت پرایمر سوم F,6R۵ می‌باشد.



شکل ۳: الگوی SSCP بدست آمده از فرد هموزیگوت به جهش در ژن کانکسین ۲۶.
الگوی شماره ۱۳ و ۱٤ روی ژل SSCP مربوط به الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از جفت پرایمر F,15R۱۰. یک الگوی هموزیگوت مشاهده شده در یک بیمار و الگوی یکی از اعضا خانواده او بر روی ژل نشان داده شده است، ستون ۱ و ٤ الگوی SSCP افراد سالم برروی این ژل است. ستون دوم الگوی SSCP فرد بیمار ، ستون سوم الگوی SSCP مربوط به مخلوط محصول PCR فرد بیمار با سالم (به‌منظور تشخیص الگوی هموزیگوت در بیمار)، ستون پنجم الگوی SSCP خواهر سالم فرد ناشنوا، الگوی ۹ می‌باشد. الگوی SSCP بیمار با افراد نرمال، و همچنین با الگوی مخلوط متفاوت است که نشاندهنده هموزیگوت بودن جهش است.



شکل ٤: شجره‌نامه مربوط به خانواده‌ای با ازدواج‌های فامیلی متعدد
ا فراد II1,5,13,14 و III3 ناشنوا هستند. افراد II7 و II8 (افراد II7 باردار بوده)جهت مشاوره ژنتیکی مراجعه نمودند الگوی شماره ۵ در شکل ۲، الگوی SSCP مشاهده شده در افراد II5, II8, III6 می‌باشد.

جدول ۱: نتایج کلی بدست آمده از بررسی ناشنوایان با استفاده از تکنیک SSCP.

تعداد بیماران	درصد ازدواج فامیلی	درصد کل بیمارانی که در آنها شیفت دیده شده است	درصد بیماران حاصل ازدواج فامیلی که در آنها شیفت دیده شده است	تعداد الگوهای مشاهده شده	تعداد الگوهای هتروزیگوت
۸۵	٪۶۷ (۵۷ بیمار)	٪۳۶ (۳۱بیمار)	٪۵۴	۱۴	۱۳

جمعیت ایران از اقوام مختلفی تشکیل شده است، در گزارش نجم آبادی و همکاران (۲۰۰۵) به یک گرادیانت از شمال‌غرب به جنوب‌شرق ایران، در میزان ارتباط بین جهش در ژن GJB2 و ناشنوایی اشاره شده است بطوریکه کمترین فراوانی مشاهده در جنوب و جنوب‌شرقی، و بیشترین میزان در منطقه شمال و شمال-غرب کشور بوده است که نشان‌دهنده لزوم انجام بررسی‌های بیشتر برروی این ژن در منطقه شمال‌غرب و بویژه آذربایجان می-باشد. در این پژوهش با کنار گذاشتن بیمارانی که در فاز اول بررسی نسبت به جهش delG ۳۵ هموزیگوت تشخیص داده‌شده بودند، در بقیه بیماران ناشنوایی غیرسندرمی با الگوی توارثی مغلوب در منطقه آذربایجان در ۳۶ درصد موارد در الگوی باندهای ژل SSCP در مقایسه با الگوی باندی افراد سالم در اگزون دوم ژن کانکسین۲۶ تغییر مشاهده شد که قابل طبقه‌بندی در ۱۴ الگوی مختلف بود. نیمی از این الگوهای مشاهده شده در یک سوم ابتدایی اگزون که با جفت پرایمر F,3R1 تکثیر شد، مشاهده گردید. قطعه دوم و سوم به ترتیب کمترین تفاوت الگویی را نشان داده اند. تعدد الگوهای مشاهده شده می‌تواند نشان‌دهنده وجود انواع جهش‌های ایجادکننده ناشنوایی باشد و مستلزم تعیین توالی جهت شناسایی این جهش‌ها است. از ناشنوایان بررسی شده، ۵۷ فرد (٦٧ درصد) محصول ازدواج فامیلی بودند با این وجود برخلاف انتظار، فرکانس جهش‌های هموزیگوت بسیار پائین (۰/۰۳ درصد) بود که این خود می‌تواند دلیل دیگری بر تعدد و تنوع جهش‌های ژن کانکسین ٢٦ در این منطقه باشد. بررسی‌های بیشتر از تغییرات احتمالی سایر ژن‌های درگیر در ایجاد ناشنوایی در بیماران منطقه آذربایجان‌شرقی حائز اهمیت می‌باشد.

نتیجه گیری

الگوی متفاوت باندی SSCP برای اگزون ۲ ژن کانکسین ٢٦ در مقایسه با افراد نرمال در ٣٦٪ از کروموزوم‌های مورد بررسی از خانواده‌های مبتلا از آذربایجانشرقی مشاهده شد که ضرورت بررسی این ژن را در قدم اول برای الگوهای مشخص شده نشان می‌دهد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از خانواده های مبتلا که کمال همکاری را در این مطالعه داشتند، همچنین از سرکار خانم ابراهیمی برای خونگیری از مبتلایان سپاسگزار می‌باشند. این پروژه توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز حمایت مالی شده است.

References

1. Prasad S, Cucci RA, Green GE, Smith RJH. Genetic testing for hereditary hearing loss: Connexin 26 (GJB2) allele variants and two novel deafness-causing mutations (R32C and 645-648delTAGA). *Human Mutation* 2000; **16**: 502-508.
2. Snoeckx RL, Huygen PLM, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J, et al. GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *Am J Hum Genet* 2005; **77**: 945–957.
3. Petersen MB, Willems PJ. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet* 2006; **69**: 371-392.
4. Bayazit YA, Cable BB, Cataloluk O, Kara C, Chamberlin P, Smith RJ, et al. GJB2 gene mutations causing familial hereditary deafness in Turkey. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003; **67**: 1331–1335.
5. Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ. Goforth L, Friderici K, Fisher R, et al. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med* 1998; **339**: 1500–1505.
6. Fuse Y, Doi K, Hasegawa T, Suggii A, Hibino H, Kubo T. Three novel connexin26 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic deafness. *NeuroReport* 1999; **10**: 1853–1857.
7. Brobby GW, Muller-Myhsok B, Horstmann RD. Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. *N Engl J Med* 1998: **338**: 548–550.
8. Esmaeili M, Bonyadi M, Nejadkazem M. 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. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007; **71**: 869-73.
9. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1998; **16**: 1215.
10. Kenneth M, Grundfast Spirasky NB, Chuong MS. Genetic and molecular biology of deafness, *Syndromic and other congenital anomalies of the head and neck*, 2000; 336
11. Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, Hafiz G, Ghanbari A, Baserer N, et al. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clin Genet*. 2003; **64**: 65–69.
12. Najmabadi H, Cucci RA, Sahebjam S, Kouchakian N, Farhadi M, Kahrizi K, et al. GJB2 mutations in Iranians with autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss. *Hum Mutat* 2002: **19**: 572.
13. Najmabadi H, Nishimura C, Kahrizi K, Riazalhosseini Y, Malekpour M, Daneshi A, et al .GJB2 mutations-passage through Iran. A J Med Genet 2005; **133**: 132-137.
14. Baris I, Kilinc MO, Tolun A. Frequency of the 35delG mutation in the connexin 26 gene in Turkish hearing-impaired patients. *Clin Genet* 2001; **60**: 452–455.
15. Tekin M, Duman T, Bogoclu G, Incesulu A, Comak E, Ilhan I, et al. Spectrum of GJB2 mutations in Turkey comprises both Caucasian and Oriental variants: Roles of parental consanguinity and assortative mating. *Hum Mutat* 2003; **21**: 552–553.