

مطالعه ناشنوایی وابسته به موتاسیون‌های ژن DFNB59 (پژواکین) در جمعیت‌های

ناشنوای استان فارس

سمیه رئیسی^۱، عفت فرخی^۲، مریم طاهرزاده^۳، فاطمه آزادگان^۴، مرضیه ابوالحسنی^۵، مرضیه رئیسی^۶، گل اندام بنی‌طالبی^۷، ابوالقاسم اسماعیلی^۸، سید رسول ذاکر^۹، مرتضی هاشم‌زاده^{۱۰}

^۱ دانشجوی کارشناس ارشد علوم سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران.
^۲ کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران.
^۳ کارشناس ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران.
^۴ کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران.
^۵ استادیار علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.
^۶ مربی علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.
^۷ استاد ژنتیک انسانی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: ناشنوایی فراوان‌ترین اختلال حسی است که یکی از هر ۵۰۰ نوزاد را با بیشتر از ۵۰٪ موارد ارثی، درگیر می‌کند. این عارضه یک اختلال بسیار هتروژن بوده که به دلیل فاکتورهای ژنتیکی یا محیطی یا هر دو مورد رخ می‌دهد. بیشتر از ۴۶ ژن ممکن است در ناشنوایی غیر سندرومیک دخیل باشند. اخیراً، ژن DFNB59 (پژواکین) به عنوان علت ناشنوایی در برخی جمعیت‌های ایرانی نشان داده شده است. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی جهش‌های ژن پژواکین در یک گروه ۱۳۰ نفری از دانش‌آموزان ناشنوا در استان فارس صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - آزمایشگاهی، میزان فراوانی جهش‌های ژن پژواکین با استفاده از استراتژی PCR-SSCP و هترو دوپلکس بررسی گردید.

یافته‌ها: ۲ نوع پلی مورفیسم متفاوت ژن پژواکین شامل 874G>A و 793C>G به ترتیب در ۱ و ۹ تا از ۱۳۰ بیمار مطالعه شده، یافت شد. با این وجود، هیچ جهشی از پژواکین شناسایی نگردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد همراهی جهش‌های DFNB59 (پژواکین) با ناشنوایی در استان فارس بسیار پایین می‌باشد.

کلید واژه‌ها: DFNB59؛ واکنش PCR-SSCP؛ واکنش هترو دوپلکس؛ ناشنوایی.

نویسنده مسئول مکاتبات: مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: mchalesh@yahoo.com

تلفن: ۰۳۸۱-۳۳۴۶۶۹۲

تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۱۳

تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۲۸

مقدمه

طریق رشته‌های عصب شنوایی یا پردازش غیرطبیعی در مسیر شنوایی مرکزی ایجاد شود. با استفاده از تست‌های فیزیولوژیک می‌توان ۳ نوع ناشنوایی را، که به آنها ناشنوایی حسی - عصبی گفته می‌شود، از یکدیگر تمیز داد. پتانسیل‌های برانگیخته شنوایی مثل پاسخ شنوایی ساقه مغز یا (Auditory Brainstem Response) ABR،

بیشترین اختلال موجود در هنگام تولد ناشنوایی است که یکی از هر ۵۰۰ نوزاد را درگیر می‌کند (۱). ناشنوایی می‌تواند به دلایل مختلف مانند: کاهش انتقال صوت به حلزون، کاهش انتقال صوت از طریق سلول‌های مویی داخلی در حلزون، انتقال غیرطبیعی ایمپالس‌ها از

روش بررسی

در این پژوهش توصیفی - آزمایشگاهی که در طی سال ۱۳۸۸ انجام شد، با کمک سازمان بهزیستی استان فارس ۱۳۰ نفر از دانش‌آموزان ناشنوا از مدارس استثنایی شامل ۵۰ پسر و ۸۰ دختر با میانگین سنی ۲۰ سال و دامنه سنی ۲۳-۱۵ سال با روش نمونه‌گیری آسان، وارد مطالعه شدند. پس از کسب رضایت‌نامه کتبی از والدین یا خود افراد، اطلاعات دموگرافیک و بالینی آنها از طریق پرسشنامه جمع‌آوری شد. افراد مورد نظر دارای ناشنوایی غیرسندرومیک با عامل ژنتیکی بودند و تمامی افراد دارای ناشنوایی سندرومیک یا علل غیرژنتیکی، از مطالعه حذف شدند. از هر فرد ۵ ml خون برای آزمایشات مولکولی گرفته شد، سپس نمونه‌های خونی به ظرف حاوی ماده ضد انعقاد EDTA (۱۰/۵ m) منتقل شدند. DNA ژنومیک با استفاده از روش فنل - کلروفرم استخراج شد، سپس کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با اسپکتروفتومتر (Unico 2100 USA) بررسی گردید. توالی ژن DFNB59 (Accession Number#DQ365827.1) از پایگاه اطلاعاتی UCSC دریافت شد. پرایمرها (جدول شماره ۱) برای آگزون‌های ۷-۲ ژن کدکننده پژواکین با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی شدند. برای آگزون‌هایی که کنترل مثبت نداشتند، با استفاده از روش موتان‌زایی و ایجاد یک پرایمر موتانت، نمونه‌های کنترل مثبت ایجاد گردید. توالی پرایمرهای موتانت در جدول شماره ۱ آورده شده است. برای تکثیر نواحی مورد نظر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction) با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (ASTEC, PC818 Japan) در حجم ۲۵ µL انجام شد. مخلوط واکنش شامل: ۲/۵ µL بافر (10X) PCR، ۳ µL MgCl₂ (۵۰ mM)، ۰/۵ µL از مخلوط (۱۰ mM) dNTP، ۰/۲ µL از پرایمرهای فوروارد (F) و ریورس R (۵۰ pmol)، ۱ µL از DNA ژنومیک (۱۰۰ ng) و در نهایت ۰/۵ U آنزیم Taq پلیمرز (۵ U/µL) بود که با ddH₂O به حجم ۲۵ µL رسانده شد. دمای اتصال پرایمر (Annealing Temperature) مربوط به هر آگزون در جدول شماره ۱ آورده شده است. فاز واسرشت شدن ابتدایی ۹۶°C به مدت ۳ دقیقه بود و واکنش برای ۳۵ سیکل انجام گردید. (فاز واسرشت شدن و ساخت قطعات برای هر سیکل به ترتیب ۹۵°C و ۷۲°C می‌باشد). سپس محصولات PCR بر روی ژل پلی‌اکریل آمید

برای بررسی عملکرد عصب شنوایی و دستگاه عصبی مرکزی به کار می‌روند (۲). گسیل‌های صوتی گوش گذرا یا OAE (Otoacoustic Emission) و کوکلتار میکروفونیک (CM) نیز در بررسی عملکرد سلول‌های مویی شنوایی نقش دارند (۳). با این وجود، ناشنوایی یک اختلال بسیار هتروژن بوده و فاکتورهای ژنتیکی، محیطی یا هر دو در بروز آن دخیل می‌باشند (۴). بیشتر از ۵۰٪ موارد ناشنوایی ناشی از فاکتورهای ژنتیکی است که از این تعداد، ۷۰٪ آنها از نوع غیرسندرومیک هستند (۵). طبق ارزیابی‌های انجام شده تاکنون ۴۶ ژن برای ناشنوایی غیرسندرومیک شناسایی شده است (۶)، که اکثر این ژن‌ها برای عملکرد صحیح گوش درونی و حلزون ضروری می‌باشند. همچنین در مواردی مانند "نقص در انتقال سیگنال عصبی به کورتکس مغزی" که ناشی از جهش در ژن اتوفرلین و پژواکین می‌باشد، ناشنوایی می‌تواند به دلیل آسیب ماورای حلزون ایجاد شود (۷،۴). اخیراً دلمقانی و همکارانش (سال ۲۰۰۶) ژن پژواکین را در لوکوس DFNB59 شناسایی کرده‌اند. آنها توالی کامل ژن را از کتابخانه cDNA مربوط به بافت بیضه انسانی جدا کرده و محصول ژنی را به نام پژواکین، که از کلمه فارسی بازتاب (echo) منشأ گرفته است، نامگذاری نمودند. دلمقانی و همکارانش، جهش‌های این ژن را به عنوان عامل ناشنوایی عصبی در ۴ خانواده ایرانی گزارش کردند. ژن DFNB59 شامل ۱۷ آگزون است که ۹/۸ kb از ژنوم را به خود اختصاص داده است (۸). این ژن بر روی کروموزوم 2 (2q31.2) قرار دارد و اولین آگزون آن غیرکدکننده است. پروتئینی که این ژن کد می‌کند شامل ۳۵۲ اسید آمینه می‌باشد که البته شواهد نشان داده است این پروتئین یک پروتئین ترانس‌ممبران نیست، ولی دارای سیگنال ورود به هسته بوده و در اجسام سلولی نورون‌های مسیر شنوایی متمرکز شده است (۸،۴). در بررسی‌های انجام شده در سرتاسر جهان تاکنون ۹ جهش از این ژن شناسایی شده است (۴) (۸-۱۱). با این وجود، اطلاعات محدودی در رابطه با نوع و فراوانی جهش‌ها در ژن کدکننده پژواکین در جمعیت‌های مختلف وجود دارد. در این مطالعه فراوانی جهش ژن DFNB59 در استان فارس بررسی شده است؛ تا بتوان از این طریق اطلاعاتی راجع به نقش جهش‌های این ژن در ایجاد ناشنوایی در استان مزبور به دست آورد.

۸/ در ۴۵ mA به مدت ۱/۵ ساعت الکتروفورز شدند و باندهای DNA توسط رنگ آمیزی نیترات نقره مشاهده گردید.

جدول شماره ۱: اندازه قطعات PCR و پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

شماره اگزون	اندازه قطعه	نام پرایمر	توالی پرایمر (۳→۵)	دمای اتصال پرایمر
اگزون ۲	۲۹۶	F2 R2	ATG GAT TTA TCT GGG GGT TGC ACA GAT GAA TGA GTT GGC ACT CC	۵۲°C
اگزون ۳	۲۳۶	F3 R3 *F3M	ACT GAG TTT CTT CTT ATA AAG G TTA GGA TTA TTA TAC TGA CCG ACT GAG TTT CTT CTT AGA AAG G	۵۵°C
اگزون ۴	۲۸۲	F4 R4 F4M*	TAC TAT TAG GTG AAC TAT GAA TG AGT TAG TAA GAG AAC CCA AC TAC TAT TAG GTG AAC TAC GAA TG	۵۵°C
اگزون ۵	۱۹۳	F5 R5 F5M*	AGC TAT CCT TAC ATG TTA TGA TCC TCA TGC AGA CCC TTA ACT CAC AGC TAT CCT TAC ATG TTA GGA TCC	۵۷°C
اگزون ۶	۲۳۱	F6 R6	TTC ATC ACC CCA TCA AAC AA TCA TGT GTT AAG CCA GGA	۵۳°C
اگزون ۷A	۲۱۵	F7A R7A	CAC ATT TCT TTT CTG TTT TT GAA GTT CCC CAT TCC ACA GA	۵۳°C
اگزون ۷B	۲۳۸	F7B R7B	GAA GGG ACC CAT ATC CGA GT GTG GCA CAA CTG ACA CTA AA	۵۶°C

*توالی پرایمرهای دارای تغییر برای واکنش موتان زایی

۳۷°C رسانده؛ تا در طی این واکنش فرصت برای تشکیل هترو دوپلکس ها فراهم شود. بعد از انجام واکنش، نمونه ها بر روی ژل پلی اکریل آمید همراه با محصولات PCR آماده شده جهت SSCP بارگذاری شدند و باندهای مربوطه توسط رنگ آمیزی نیترات نقره مشاهده گردید.

جدول شماره ۲: شرایط تنظیم شده برای SSCP اگزون های ژن

نوع اگزون	غلظت ژل	زمان	ولتاژ	دما
اگزون ۲	٪۸	۶ ساعت	۲۸۰	۵°C
اگزون ۳	٪۶	۷ ساعت	۲۰۰	۱۰°C
اگزون ۴	٪۱۰	۷ ساعت	۳۰۰	۱۰°C
اگزون ۵	٪۶	۵ ساعت	۲۰۰	۲۰°C
اگزون ۶	٪۶	۵/۵ ساعت	۲۰۰	۲۰°C
اگزون ۷A	٪۶	۶ ساعت	۲۰۰	۲۰°C
اگزون ۷B	٪۸	۶/۵ ساعت	۲۸۰	۵°C

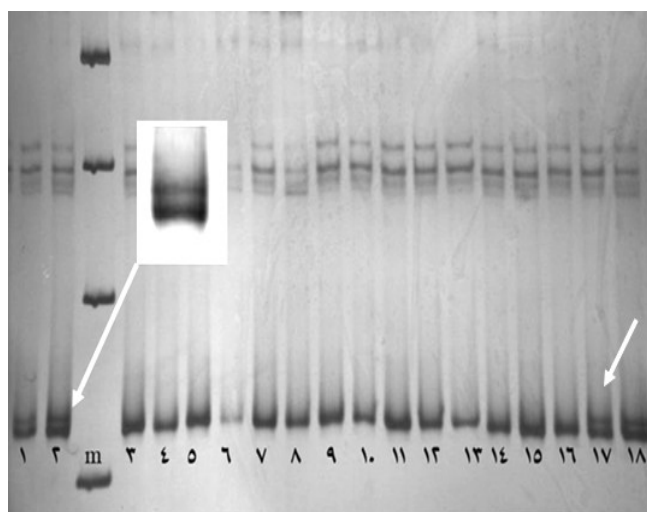
یافته ها

در این پژوهش، ۱۳۰ دانش آموز ناشنوا با میانگین سنی ۲۰ سال بررسی شدند. افراد مورد مطالعه از ناشنوایی حسی - عصبی شدید تا عمیق رنج می بردند. بیماران فاقد نقص های مورفولوژیکی بوده

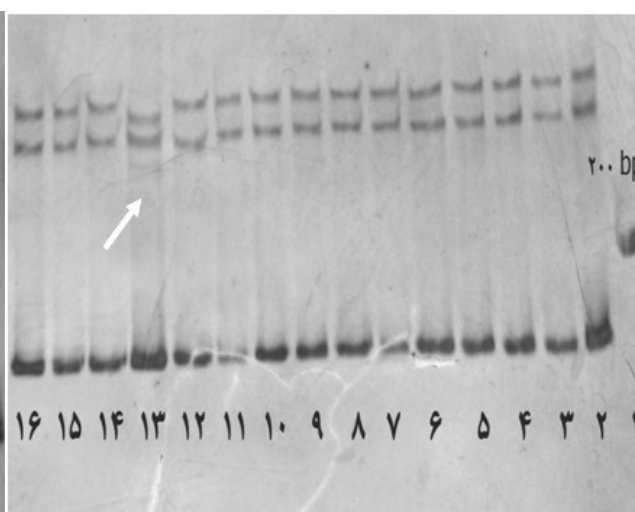
بعد از تکثیر قطعات برای تعیین جهش در اگزون های ژن DFNB59 از روش SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) و هترو دوپلکس به طور همزمان به شرح زیر استفاده شد. در واکنش SSCP برای هر نمونه، به میزان ۸ μL محصول PCR با ۶ μL از بافر دناتور کننده (۹۵٪ فرمامید، ۰/۵ ml EDTA، ۱۰ mM)، ۰/۰۵٪ گزین سیانول، ۰/۰۵٪ برموفنل بلو) مخلوط شد. مخلوط حاصل، به مدت ۱۵ دقیقه تا ۹۶°C حرارت داده شد. سپس نمونه ها بلافاصله بر روی یخ قرار گرفتند و به مدت ۵ دقیقه قبل از بارگذاری در ژل، در یخ نگه داشته شدند. ژل پلی اکریل آمید با نسبت ۳۹ به ۱ از مخلوط اکریل آمید - بیس اکریل آمید با ۵٪ گلیسرول ساخته شد. الکتروفورز با استفاده از سیستم الکتروفورز ATTO AE-6141E (Japan) انجام گردید. شرایط آن برای هر اگزون در جدول شماره ۲ آورده شده است. در ژل از بافر 1X و در تانک از بافر X ۰/۶ استفاده شد. دمای بافر توسط دستگاه سیر کولاتور در ۲۰-۵°C بسته به هر اگزون حفظ گردید (جدول شماره ۲). برای انجام واکنش هترو دوپلکس، ۳ μL از ۰/۵ M EDTA با ۲ μL از محصولات PCR مربوط به هر نمونه مخلوط شده و به میزان ۹۶°C حرارت داده شد، سپس طی واکنشی با ۶۰ سیکل، حرارت را از ۹۶°C به

(شکل شماره ۱). در باندهای SSCP یک تغییر مشاهده گردید، که بعد از تأیید توسط روش تعیین توالی، وجود پلی‌مورفیسم $874G>A$ به اثبات رسید (شکل شماره ۲: الف). همچنین در باندهای هترودوپلکس مربوط به ۹ نمونه بیمار در همین آگزون، الگوی متفاوتی دیده شد که بعد از واکنش تعیین توالی پلی‌مورفیسم $793C>G$ را آشکار کرد (شکل شماره ۲: ب). در واکنش SSCP و هترودوپلکس مربوط به دیگر آگزون‌ها هیچ‌گونه تغییری مشاهده نگردید.

و ظاهری نرمال داشتند که وجود ناشنوایی سندرومیک را در آنها رد می‌کرد. بعد از تکثیر آگزون‌های موجود در ژن پژواکین برای تأیید انجام درست واکنش PCR محصولات بر روی ژل برده شدند و باندهای قوی و فاقد باند اضافی با اندازه‌ای در محدوده ۲۰۰-۳۰۰ جفت باز، بسته به هر آگزون بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۸٪ مشاهده شد. برای واکنش PCR-SSCP و هترودوپلکس از محصولات PCR استفاده گردید. در واکنش‌های انجام شده تنها تغییراتی در قسمت ابتدایی آگزون ۷ (VA) این ژن دیده شد

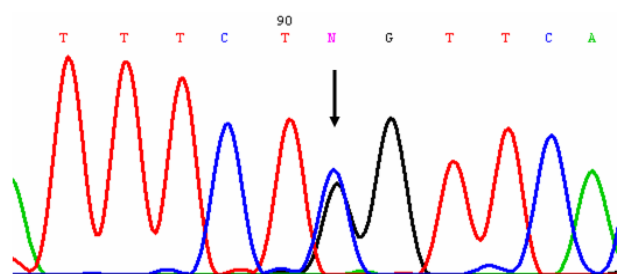


(ب)



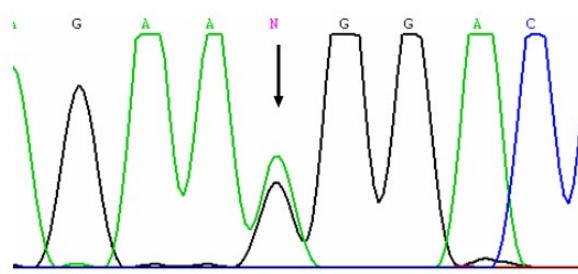
(الف)

شکل شماره ۱: تغییرات مشاهده شده در ژل SSCP مربوط به محصولات PCR آگزون ۷A ژن پژواکین الف) تغییر مشاهده شده برای پلی‌مورفیسم $874G>A$ در نمونه ۱۳، سایر نمونه‌ها فاقد تغییر می‌باشند. ب) هترودوپلکس‌های مشاهده شده برای پلی‌مورفیسم $793C>G$ در نمونه‌های ۱، ۱۷، ۱۸، در سایر نمونه‌ها تغییر مشاهده نشد. m: مارکر استفاده شده در ژل



(ب)

ب) توالی مربوط به پلی‌مورفیسم $793C>G$



(الف)

شکل شماره ۲: الف) توالی مربوط به پلی‌مورفیسم $874G>A$

بحث

با فراوانی ۰/۷۷٪ شناسایی شد. اولین مطالعات بر روی این ژن در خانواده‌های ایرانی توسط دلمقانی انجام شد که منجر به شناسایی ۲ جهش $161C>T$ و $547C>T$ گردید (۸). در این تحقیق ژن مزبور، عامل ناشنوایی عصبی (نوروپاتی شنوایی) معرفی شد که در آن عملکرد عصب شنوایی و ساقه مغز دچار اختلال می‌شود

این تحقیق با هدف تعیین فراوانی جهش‌های ژن پژواکین در ناشنوایان استان فارس انجام شد. نتایج مطالعه حاضر، فقدان جهش را در ۱۳۰ نمونه مورد بررسی نشان داد. در این میان ۲ نوع پلی‌مورفیسم $793C>G$ با فراوانی ۶/۲۹٪ و پلی‌مورفیسم $874G>A$

طریق موتان‌زایی (Site Directed Mutagenesis) در این مطالعه ایجاد شد، همزمان با نمونه‌های دیگر بر روی ژل برده شدند که الگوی متفاوتی را در ژل نشان داد و بدین صورت صحت واکنش انجام شده، تأیید گردید. همچنین در تحقیقاتی که همزمان با این پژوهش انجام شد، یافته‌ها توسط روش PCR-SSCP/ هترو دوپلکس برای آگزون ۷ در ۱۰۰ بیمار با روش تعیین توالی تکرار گردید. نتایج به دست آمده از تعیین توالی دقیقاً مشابه روش PCR-SSCP/ هترو دوپلکس بود. بنابراین تاکنون تعداد محدودی جهش در این ژن گزارش شده است که نشان‌دهنده نقش پایین این ژن در ایجاد ناشنوایی است، اما با این وجود نمی‌توان نقش آن را در ایجاد ناشنوایی نادیده گرفت. لذا با توجه به میزان بالای ازدواج‌های خویشاوندی و درون قومی در کشور ایران، بررسی چنین ژن‌هایی می‌تواند کمک شایانی در پیشگیری و مدیریت این اختلال باشد. از این رو بررسی قسمت‌های دیگر ژن مانند پروموتور، همچنین تعداد نمونه‌های بیشتر از نواحی مختلف کشور پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعات حاضر و تحقیقات قبلی حاکی از فراوانی اندک جهش‌های ژن DFNB59 در ناشنویان است. اما با توجه به تحقیقات انجام شده در کشور ایران که اهمیت این ژن را در توسعه ناشنوایی بعد از ژن GJB2 ارزیابی کرده است، نمی‌توان نقش آن را نادیده گرفت. لذا بررسی این ژن در اقوام و مناطق مختلف کشور برای ارزیابی دقیق نقش آن توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

لازم است مراتب قدردانی و تشکر فراوان را از اداره آموزش و پرورش استثنایی، سازمان بهزیستی استان فارس و کلیه دانش‌آموزان و والدین آنها به خاطر همکاری صمیمانه با این تحقیق داشته باشیم.

(۱۲، ۱۳). میزان فراوانی این جهش‌ها توسط دلمقانی گزارش نشده بود، در مطالعه‌ای که توسط هاشم‌زاده بر روی ۳۰ خانواده خویشاوند ایرانی انجام گردید، ۲ جهش 726delT و 988delG گزارش شد. تحقیقات هاشم‌زاده نشان داد جهش‌های ژن DFNB59 سهمی حدود ۶/۷٪، در ایجاد ناشنوایی در خانواده‌های ناشنوای مورد بررسی دارند و از نظر اهمیت، احتمالاً بعد از جهش‌های ژن GJB2 (کانکسین ۲۶) در کشور قرار می‌گیرند (۱۰). در یک مطالعه دیگر که در ایران بر روی ۵۰ خانواده ایرانی با ناشنوایی اتوزومال مغلوب صورت گرفت، میزان فراوانی جهش‌ها در ژن DFNB59 به میزان ۴٪ گزارش گردید (۱۴). با این وجود، تحقیقات دیگری هم که در نقاط مختلف جهان بر روی این ژن انجام شده است، حاکی از نقش ناچیز جهش‌های موجود در این ژن در ایجاد ناشنوایی می‌باشد. در بررسی‌هایی که توسط Collin بر روی ۶۸ خانواده ترک و ۸۳ فرد هلندی انجام گردید، تنها جهش $499C>T$ در افراد ترک (۱/۴٪) و $509-512delCACT$ و $731T>G$ (هر کدام ۱/۲٪) در افراد هلندی شناسایی شد (۴). همچنین در مطالعه Ebermann بر روی خانواده‌ای بزرگ با اختلال شنوایی در مراکش تنها یک جهش $113-114insT$ گزارش گردید (۹). اخیراً مطالعه دیگری نیز بر روی خانواده‌های چینی انجام شده است که در این مطالعه هیچ‌گونه تغییری در این ژن یافت نشد (۱۵). روش به کار رفته در این مطالعه PCR-SSCP بود که به صورت همزمان با روش هترو دوپلکس انجام شد. روش فوق ساده، ارزان و حساس با دقت ۸۵-۸۰٪ می‌باشد (۱۶). اگرچه این روش دارای دقت ۱۰۰٪ نیست، ولی با کاربرد توأم روش‌هایی مانند هترو دوپلکس و استفاده از نمونه‌های کنترل می‌توان دقت را به حدود ۱۰۰٪ رساند. به‌عنوان مثال کلیه نمونه‌هایی که در واکنش هترو دوپلکس آنها الگوی متفاوت وجود دارد، توسط واکنش تعیین توالی تأیید می‌شوند که نشان‌دهنده صحت تقریباً ۱۰۰٪ این روش برای تعیین جهش می‌باشد. از طرفی، نمونه‌هایی که به‌عنوان کنترل مثبت از

References:

1. Morton CC, Nance WE. Newborn Hearing Screening-a Silent Revolution. *N Engl J Med* 2006;354:2151-64.
2. Picton TW. Auditory Evoked Potentials. In: DD Daly, TA Pedley, editors. *Current Practice of Clinical Electroencephalography*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1990. p. 6455-78.
3. Starr A, Picton TW, Kim R. Pathophysiology of Auditory Neuropathy. In: Sininger Y, Starr A, editors. *Auditory Neuropathy: A New Perspective on Hearing Disorders*. San Diego: Singular Thomson Learning; 2001. p. 67-82.

4. Collin RW, Kalay E, Oostrik J, Caylan, R, Wollnik B, Arslan S, et al. Involvement of DFNB59 Mutations in Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Impairment. *Hum Mutat* 2007;28(7):718-23.
5. Van Camp G, Willems PJ, Smith RJ. Nonsyndromic Hearing Impairment: Unparalleled Heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1997;60:758-64.
6. Hilgert N, Smith RJ, Van Camp G. Forty-Six Genes Causing Nonsyndromic Hearing Impairment: Which Ones Should be Analyzed in DNA Diagnostics? *Mutat Res* 2009;681:189-96.
7. Varga R, Keats BJ, Starr A, Leal SM, Cohn E, Kimberling WJ. Non-Syndromic Recessive Auditory Neuropathy Is the Result of Mutations in the Otoferlin (OTOF) Gene. *J Med Genet* 2003;40:45-50.
8. Delmaghani S, Del Castillo FJ, Michel V, Leibovici M, Aghaie A, Ron U, et al. Mutations in the Gene Encoding Pejvakin, a Newly Identified Protein of the Afferent Auditory Pathway, Cause DFNB59 Auditory Neuropathy. *Nat Genet* 2006;38(7):770-8.
9. Ebermann I, Walger M, Scholl HP, Charbel Issa P, Luke C, Nurnberg G, et al. Truncating Mutation of the DFNB59 Gene Causes Cochlear Hearing Impairment and Central Vestibular Dysfunction. *Hum Mutat* 2007;28(6):571-7.
10. Hashemzadeh Chaleshtori M, Simpson MA, Farrokhi E, Dolati M, Hoghooghi Rad L, Amani Geshnigani S, et al. Novel Mutations in the Pejvakin Gene are Associated with Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss in Iranian Families. *Clin Genet* 2007;72(3):261-263.
11. Schwander M, Sczaniecka A, Grillet N, Bailey JS, Avenarius M, Najmabadi H, et al. A Forward Genetics Screen in Mice Identifies Recessive Deafness Traits and Reveals that Pejvakin is Essential for Outer Hair Cell Function. *J Neurosci* 2007;27(9):2163-75.
12. Davis H. An Active Process in Cochlear Mechanics. *Hear Res* 1984;9:79-90.
13. Hall JW. *New Handbook of Auditory Evoked Responses*. Pearson Education Inc; 2007. p. 138-50.
14. Bazazzadegan N, Meyer N, Kahrizi K, Khosh Aien A, Mohseni M, Nikzad N, et al. Linkage Analysis of DFNB59 Locus in 50 Iranian Families with Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss. *Iran Genetic Congress*. 10th ed. Center of Razi Congress 2008 May 21-23. Tehran; 2008. p. 38-9.
15. Xu S, Chen Z, Lu Y, Wei Q, Cao X, Xing G, Bu X. Sequence Analysis of DFNB59 Gene in a Chinese Family with Dominantly Inherited Auditory Neuropathy. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2008;22(19):880-2.
16. Sunnucks P, Wilson AC, Beheregaray L, Zenger K, French J, Taylor AC. SSCP is Not So Difficult: The Application and Utility of Single-Stranded Conformation Polymorphism in Evolutionary Biology and Molecular Ecology. *Mol Ecol* 2000;9:1699-710.

