تحقیقی

تعیین اطلاع‌دهندگی مارکر D7S2456 در تشخیص مولکولی ناشنوایی غیرسندرمی اتوزومی مغلوب در پنج قومیت ایرانی

مرجان مجتبوی نائینی[۱]، دکتر صادق ولیان بروجنی[۲]، دکتر مرتضی هاشم زاده چالشتری*[۳]

۱- کارشناس ارشد ژنتیک انسانی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد. ۲- استاد، بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان.
۳- استاد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد.

چکیده

زمینه و هدف : *جهش‌های ژن SLC26A4 پس از ژن GJB2 مهم‌ترین عامل ژنتیکی ایجاد کننده ناشنوایی غیرسندرمی با وراثت اتوزومی مغلوب هستند که امروزه در تشخیص‌های مولکولی مورد بررسی قرار می‌گیرند. در پایگاه داده‌ها تعداد زیادی از مارکرهای STR مرتبط با این ناحیه معرفی شده است. این مطالعه به منظور تعیین خصوصیات و اطلاع‌دهندگی مارکر D7S2456 با توالی‌های تکراری CA که در ناحیه ۳ ژن SLC26A4 است؛ در پنج قومیت از جمعیت ایرانی انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی تعیین ژنوتیپ جایگاه ژنی مارکر D7S2456 در ۱۶۵ فرد شنوای غیرخویشاوند از پنج قوم فارس، آذری، ترکمن، گیلک و عرب توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR) و سپس ژل الکتروفورز پلی‌اکریل‌آمید (PAGE) و در نهایت الکتروفورز فلورسنت موئینه صورت گرفت. در این مطالعه از نرم‌افزارهایGeneMarker HID Human STR Identity، GenePop و Microsatellite Tools استفاده شد.*

یافته‌ها : *بررسی آلل‌های مارکر D7S2456 بیانگر حضور ۹ آلل در جمعیت ایرانی بود و آلل ۵ با فراوانی ۵۵درصد در جمعیت ایرانی فراوان‌ترین آلل تعیین شد. بالاترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده متعلق به قوم آذری به میزان ۸۱/۸درصد بود. بررسی تعادل هاردی-واینبرگ (HWE) نشان داد که کلیه اقوام جمعیت ایرانی به غیر از قوم فارس برای مارکر D7S2456 در تعادل هستند. بررسی مقدار PIC (Polymorphism Information Content) مارکر مابین ۰/٤٤ و ۰/۷ حاکی از اطلاع‌دهندگی متوسط (Moderately Informative) آن در اقوام مورد بررسی جمعیت ایرانی بود.*

نتیجه‌گیری : *مارکر D7S2456 اطلاع دهنده متوسط در تشخیص‌های مولکولی ناشنوایی غیرسندرمی وابسته به SLC26A4 با توارث اتوزومی مغلوب به روش آنالیز پیوستگی در جمعیت ایرانی است.*

کلید واژه‌ها : *توالی تکراری پشت سر هم ، ژن SLC26A4 ، مارکر D7S2456 ، ناشنوایی غیرسندرمی اتوزومی مغلوب ، قومیت ، ایران*

* نویسنده مسؤول : دکتر مرتضی هاشم زاده چالشتری ، پست الکترونیکی mchalesh@skums.ac.ir و mchalesh@yahoo.com
نشانی : شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد ، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی ، تلفن ۳۳٤٦٦۹۲-۰۳۸۱ ، نمابر ۳۳۳۰۳۸۲
وصول مقاله : ۹۲/۱/۲۰ ، اصلاح نهایی : ۹۲/٤/۲۲ ، پذیرش مقاله : ۹۲/٤/۲٦

مقدمه

ناشنوایی مادرزادی متداول‌ترین نقص حسی در انسان است و شیوع آن یک در هزار نوزاد است (۱). عوامل مختلفی موجب ناشنوایی می‌گردند که بیش از ۵۰ درصد موارد مادرزادی و وراثتی هستند (۲). ناشنوایی وراثتی به دو دسته سندرمی و غیرسندرمی دسته‌بندی می‌شود. نوع غیرسندرمی (NSHL) (non-syndromic hearing loss) ۷۰ درصد و نوع سندرمی (syndromic hearing loss: SHL) ۳۰ درصد کل ناشنوایی‌های وراثتی را تشکیل می‌دهند. ناشنوایی غیرسندرمی براساس سن آغاز پیش‌گفتاری (Prelingual) و پس‌گفتاری (Postlingual) خوانده می‌شوند و با توجه به الگوی وراثتی به چهار دسته اتوزومی غالب (non-syndromic deafness, autosomal dominant: DFNA)، اتوزومی مغلوب(non-syndromic deafness, autosomal recessive: DFNB)، وابسته به X (DFN) و میتوکندریایی (DFNM) (non-syndromic deafness, mitochondrial) تقسیم‌بندی می‌گردند (۳). ناشنوایی با وراثت اتوزومی مغلوب با فراوانی ۸۰-۷۵ درصد از میان چهار گروه دارای بیشترین فراوانی است (۴). در بسیاری از جمعیت‌های جهان از جمله جمعیت ایرانی شایع‌ترین

جهش‌های مسؤول ناشنوایی غیرسندرمی با وراثت اتوزومی مغلوب جهش‌های ژن *GJB2* و پس از آن ژن *SLC26A4* است (۵و۶).

به علت هتروژنی بالا و نقش کم بسیاری از ژن‌های ایجاد کننده ناشنوایی، غربالگری کامل جهش‌ها در تشخیص‌های مولکولی امکان‌پذیر نیست و در بسیاری از نقاط جهان در تشخیص‌های مولکولی، غربالگری جهش‌ها تنها برای دو ژن *GJB2* و *SLC26A4* صورت می‌گیرد (۵). تشخیص مولکولی ناشنوایی بر پایه دو روش بررسی مستقیم جهش و بررسی غیرمستقیم توسط آنالیز پیوستگی انجام می‌شود. انتخاب روش در تشخیص‌های مولکولی به ویژگی‌های ژن مورد بررسی بستگی دارد و اولویت آنها در ژن‌های مختلف متفاوت است (۷). روش بررسی مستقیم، شامل تعیین توالی ژنوم بیماران برای تشخیص جهش‌های ایجادکننده بیماری است که برای جهش‌های ژن *GJB2* به علت وسعت کم ژن و شیوع بالای جهش 35delG از میان جهش‌ها مناسب به‌نظر می‌آید (۸). در حالی که به دلیل وسعت زیاد ژن *SLC26A4* و پراکندگی جهش‌های مشاهده شده در جمعیت ایرانی در نواحی مختلف ژن و نیز شیوع تقریباً یکسان این جهش‌ها، روش مستقیم یک روش ایده‌آل برای بررسی جهش‌های این ژن نیست و بهتر است به منظور صرفه‌جویی در وقت و هزینه از روش غیرمستقیم استفاده گردد (۹).

بررسی غیرمستقیم جهش‌ها یا آنالیز پیوستگی توسط مارکرهای چندشکلی متصل به ژن انجام می‌شود. یکی از مارکرهای مورد استفاده در بررسی غیرمستقیم توالی‌های تکراری از دسته ریزماهواره‌های موجود در ژنوم هستند که به مقدار بسیار زیاد و به شکل تصادفی در طول ژنوم پراکنده هستند و به آنها توالی‌های تکراری پشت سر هم (short tandem repeat: STR) گویند (۱۰). چندشکلی‌های STR از تغییر در تعداد تکرارهای پشت سر هم مربوط به واحدهای توالی کوتاه ۲ تا ۴ نوکلئوتیدی ایجاد می‌شوند. در آنالیز پیوستگی برای افزایش کیفیت بررسی بایستی از مارکرهای اطلاع‌دهنده استفاده شود. اطلاع‌دهندگی یک مارکر توسط عامل ظرفیت اطلاعاتی چندشکلی (Polymorphism Information Content: PIC) اندازه‌گیری می‌شود. مقدار PIC برای جایگاه‌های ژنی در تعادل هاردی-واینبرگ در جمعیت تعریف می‌شود که به تعداد آلل‌ها و هتروزیگوسیتی مارکر بستگی دارد و بنابراین در جمعیت‌های مختلف به دلیل ساختارهای ژنتیکی متفاوت متغیر است (۱۱و۱۲). در نتیجه به منظور غربالگری بهینه جهش‌ها به روش غیرمستقیم، مارکرهای مورد استفاده بایستی در جمعیت‌های مختلف ارزیابی شوند و مارکرهای اطلاع‌دهنده هر جمعیت به طور جداگانه معرفی گردند.

تاکنون هیچ مطالعه‌ای مبنی بر بررسی مارکرهای اطلاع‌دهنده مرتبط با ژن *SLC26A4* در جمعیت ایرانی صورت نگرفته است. در پایگاه داده‌ها مارکرهای مختلفی در ناحیه ژن *SLC26A4* معرفی شده است. یکی از مارکرهای پیوسته به ژن *SLC26A4*، D7S2456 است که در ناحیه ۳′ این ژن قرار دارد و دارای هتروزیگوسیتی بالا است (۱۳و۱۴) که برای بررسی در جمعیت ایرانی انتخاب شد. در این مطالعه خصوصیات و اطلاع‌دهندگی این مارکر در پنج قومیت از جمعیت ایرانی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

روش بررسی

این مطالعه آزمایشگاهی روی ۱۶۵ فرد شنوای غیرخویشاوند از پنج قومیت مختلف شامل فارس، آذری، ترکمن، گیلک و عرب در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد طی سال‌های ۹۱-۱۳۹۰ انجام شد. نمونه‌گیری قومیت‌های فارس، آذری، ترکمن، گیلک و عرب به ترتیب از شهرستان‌های اصفهان، تبریز، گرگان، رشت و اهواز به‌عمل آمد.

افراد پس از کسب رضایت‌نامه کتبی، با روش نمونه گیری آسان وارد مطالعه شدند. ۱۰ میلی‌لیتر از خون تام افراد (۳۳ نفر از هر قومیت) در لوله حاوی یک میلی‌لیتر از EDTA با غلظت ۰/۵ M جمع‌آوری و تا زمان آزمایش در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. DNA نمونه‌های خون به روش استاندارد فنل-کلروفرم استخراج گردید و کمیت حاصله با استفاده از دستگاه نانودراپ ۱۰۰۰(Isogen, Rockland/Montchanin, USA) مورد بررسی قرار گرفت. کلیه مارکرهای STR ناحیه ژن *SLC26A4* موجود در پایگاه داده UniSTS بررسی شدند و در نهایت مارکر D7S2456 (UniSTS:38668) به منظور مطالعه بیشتر به علت گزارش هتروزیگوسیتی بالا در پایگاه داده‌هایی از جمله center Genethon انتخاب گردید (۱۴).

پرایمرهای مورد استفاده از تحقیقات پیشین و پایگاه داده UniSTS در سایت NCBI استخراج شد. توالی پرایمر پیشرو (F) و پرایمر پیرو (R) به صورت زیر بود که با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) قطعاتی با طول متغیر ۲۵۲-۲۳۸ جفت باز تولید نمود (۱۵):

F: 5′-CTGGAAATTGACCTGAAACCTT-3′
R: 5′-ACAGGGGTCTCTCACACATATTA-3′

انجام PCR بر روی نمونه‌های DNA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (ASTEC PC818-Japan) با برنامه تاچ داون (Touch Down) طبق جدول یک انجام شد. شرایط واکنش PCR شامل 1µl از دو پرایمر (10Pm)، 1µl از Taq DNA Polymerase (5U/µl)، 0.5µl از mix dNTP (10mM)، 2.5µl از TaqDNAbuffer (10X)، 2µl از MgCl2 (50mM) و 1µl از DNA (80ng) که با ddH2O به حجم 25µl رسانده شد.

کلیه محصولات بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد (نسبت ۱ بیس اکریل‌آمید: ۱۹ اکریل‌آمید) به مدت سه ساعت با ولتاژ ۲۰۰

ولت رانده شد و ژل حاصله با نیترات‌نقره رنگ‌آمیزی گردید. پس از تایید کیفیت باندها محصولات توسط الکتروفورز موئینه فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند. در سر ۵ پرایمر پیرو، به منظور تعیین طول محصولات PCR توسط تکنیک الکتروفورز موئینه رنگ فلورسنت سبز (HEX) افزوده شد که توسط دستگاه ای-بی-آی پریسم ۳۱۳۰ خوانده شد و در نهایت نتایج به صورت نمودار نمایش داده شد. نمودارهای حاصله توسط نرم‌افزار GeneMarker HID Human STR تعیین ژنوتیپ و آلل‌بندی شدند.

محصول PCR نمونه‌های افراد شنوای غیرخویشاوند برای مارکر D7S2456 ابتدا با روش الکتروفورز بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸درصد مورد مشاهده و ارزیابی قرار گرفت. پس از اطمینان از وجود محصولات PCR مناسب با استفاده از فلورسنت الکتروفورز موئینه تعیین ژنوتیپ و آلل‌بندی انجام گردید. این آلل‌بندی‌ها به دو صورت تعداد جفت باز طول محصولات و تعداد تکرارهای CA بیان شد.

آنالیز آماری نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتیپ افراد شامل تخمین فراوانی آللی، درجه هتروزیگوسیتی و فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار فنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت بود. بررسی تعادل هاردی-واینبرگ (HWE) با استفاده از نرم‌افزار پایگاه GenePop انجام شد (۱۶). تعادل هاردی-واینبرگ بیان می‌کند که در جمعیتی با جفت‌گیری تصادفی بدون انتخاب، جهش، یا مهاجرت فراوانی‌های آللی و فراوانی‌های ژنوتیپی از نسلی به نسل دیگر ثابت هستند (۱۷). با توجه به این که هنگام وجود آلل‌های نادر، آزمون فیشر مناسب است و برای مارکرهایی با تعداد زیاد آلل همانند لوکوس‌های ریزماهواره کاربرد دارد (۱۸و۱۹)؛ این نرم‌افزار با استفاده از آزمون دقیق فیشر به بررسی تعادل پرداخت. برای بررسی تعادل هاردی-واینبرگ از فرض صفر مبنی بر حضور تعادل هاردی-واینبرگ در اقوام و جمعیت مورد بررسی استفاده شد. در صورتی که p-value کمتر از ۰/۰۵ حاصل شد؛ فرضیه صفر مبنی بر وجود تعادل هاردی-واینبرگ رد گردید. علت انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ می‌تواند به دلیل عوامل ژنتیک جمعیت مانند درون‌زایی و یا مهاجرت رخ دهد (۲۰).

بااستفاده از نرم‌افزار Microsatellite Tools میزان عامل ظرفیت اطلاعاتی چند شکلی (PIC) تخمین زده شد و اطلاع‌دهندگی مارکر در اقوام مختلف تعیین گردید (۲۱). PIC یک عامل محاسباتی برای تعیین اطلاع‌دهندگی مارکرها به منظور استفاده در آنالیز پیوستگی است. این عامل برای جایگاه مارکرهای دارای تعادل هاردی-واینبرگ در جمعیت تعریف می‌شود که به تعداد و فراوانی آلل‌ها و هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت وابسته است. مقدار PIC بالاتر از ۰/۷ نشان‌دهنده اطلاع‌دهندگی شدید (Highly Informative) مارکر در آنالیز پیوستگی برای ژن متصل به آن است. هنگامی که مقدار آن مابین ۰/۴۴ و ۰/۷ باشد؛ مارکر از اطلاع‌دهندگی متوسط (Moderately Informative) برخوردار است و اگر کمتر از ۰/۴۴ باشد؛ مارکر اطلاع دهندگی ضعیفی دارد (۱۲).

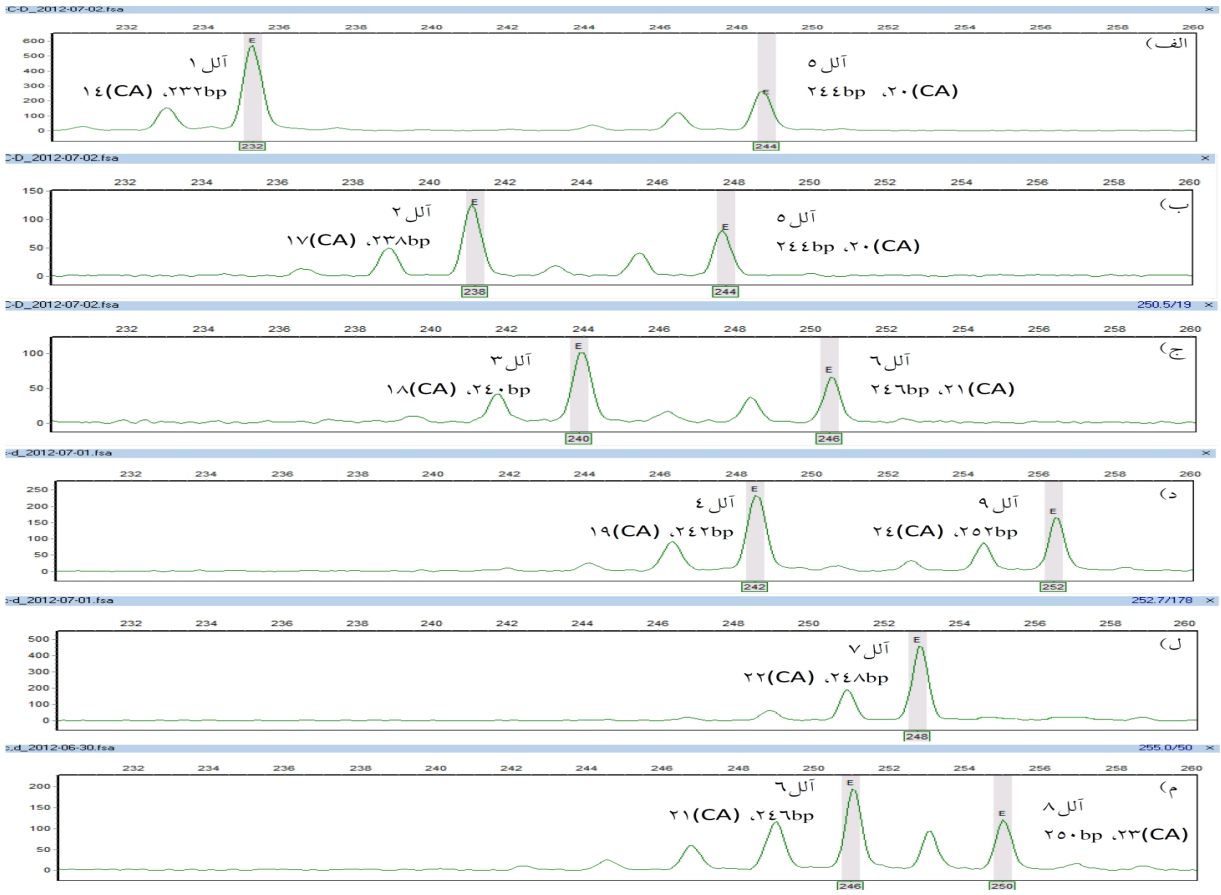
یافته‌ها

به طور کلی ۹ آلل در جمعیت ایرانی حضور داشت (شکل یک). از میان تمامی آلل‌ها قوم فارس ۸ آلل، آذری ۷ آلل، ترکمن ۷ آلل، گیلک ۷ آلل و عرب ۶ آلل را دارا بودند. از میان ۹ آلل شناسایی شده، آلل ۵ (۵۵/۱۵درصد) و آلل ۸ (۰/۰۳درصد) به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را در جمعیت ایرانی نشان دادند (جدول ۲).

پس از تعیین ژنوتیپ افراد، درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای هر یک از قوم‌ها به صورت جداگانه و در نهایت برای جمعیت ایرانی محاسبه شد. هتروزیگوسیتی در ۶۴/۲درصد جمعیت ایرانی و در قومیت‌های فارس، آذری، ترکمن، گیلک و عرب به ترتیب به میزان ۵۱/۵درصد، ۸۱/۸درصد، ۶۶/۷درصد، ۶۳/۶درصد و ۵۷/۶درصد مشاهده شد (جدول ۳). در حالی که هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای جمعیت ایرانی ۶۳/۴درصد، قوم فارس ۶۱/۸درصد، آذری ۶۷/۷درصد، ترکمن ۶۵/۱درصد، گیلک ۶۴/۴درصد و عرب ۵۸/۳درصد محاسبه شد. به تبع آن هموزیگوسیتی مشاهده شده برای جمعیت ایرانی ۳۵/۸درصد، قوم فارس ۴۸/۵درصد، آذری ۱۸/۲درصد، ترکمن ۳۳/۳درصد، گیلک ۳۶/۴درصد و عرب ۴۲/۴درصد بود. در صورتی که هموزیگوسیتی مورد انتظار جمعیت ایرانی ۳۶/۶درصد، قوم فارس ۳۸/۲درصد، آذری ۳۲/۳درصد، ترکمن ۳۴/۹درصد، گیلک ۳۵/۶درصد و عرب ۴۱/۷درصد بود.

با توجه به بررسی تعادل هاردی-واینبرگ برای جایگاه مارکر در قوم‌های مختلف و جمعیت ایرانی، p-value محاسبه شده از آزمون دقیق فیشر برای جمعیت ایرانی ۰/۳۳۱۸، قوم فارس ۰/۱۶۸۹، آذری ۰/۱۳۷۱، ترکمن ۰/۱۶۵۴، گیلک ۰/۷۸۵۸ و عرب ۰/۸۶۱۰ تعیین شد (جدول ۴). p-value بیش از ۰/۰۵ در تمامی اقوام و جمعیت ایرانی نمایانگر وجود تعادل هاردی-واینبرگ بود.

به دلیل حضور جایگاه ژنی مارکر مورد بررسی در تعادل هاردی-واینبرگ در اقوام مورد بررسی با توجه به اطلاعات به دست آمده از فراوانی آلل‌ها و هتروزیگوسیتی مشاهده شده؛ مقدار PIC در هر قوم به طور جداگانه محاسبه شد (جدول ۵). این نتایج نشان داد که مقدار PIC برای جمعیت ایرانی ۰/۵۹۳، قوم فارس ۰/۵۷۹، آذری ۰/۶۱۵، ترکمن ۰/۶۰۳، گیلک ۰/۵۹۲ و عرب ۰/۵۳۰ است که تمامی مقادیر PIC ما بین ۰/۴۴ و ۰/۷ بودند.



شکل ۱ : تعیین تعداد آلل‌های مارکر D7S2456
نمونه‌های الف، ب، ج، د و م هتروزیگوت و نمونه ل هموزیگوت است.
در این ٦ نمونه ۹ آلل مشاهده شده در کلیه نمونه‌ها نشان داده شده است.

جدول ۲ : آلل‌ها و درصد فراوانی‌های آللی مارکر D7S2456 در اقوام مختلف و جمعیت ایرانی

	شماره	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹
	آلل (bp)	۲۳۲	۲۳۸	۲٤۰	۲٤۲	۲٤٤	۲٤٦	۲٤۸	۲۵۰	۲۵۲
	تعداد تکرار	۱٤CA	۱۷CA	۱۸CA	۱۹CA	۲۰CA	۲۱CA	۲۲CA	۲۳CA	۲٤CA
	جمعیت ایرانی	۰/۳	۰/٦۱	۳/۳۳	۳/۰۳	۵۵/۱۵	۲۳/۰۳	۷/۵۸	۰/۰۳	۳/۹٤
	فارس	۱/۵۲		۳/۰۳	۱/۵۲	۵۹/۰۹	۱٦/٦۷	۹/۰۹	۳/۰۳	٦/۰٦
قومیت	آذری			۳/۰۳	۱/۵۲	٤٦/۹۷	۳۱/۸۲	۷/۵۸	٦/۰٦	۳/۰۳
	ترکمن			۳/۰۳	۳/۰۳	۵٤/۵۵	۲۱/۲۱	۷/۵۸	۱/۵۲	۹/۰۹
	گیلک		۳/۰۳	٤/۵۵	٦/۰٦	۵٤/۵۵	۲٤/۲٤	۳/۰۳	٤/۵۵	
	عرب			۳/۰۳	۳/۰۳	٦۰/٦۱	۲۱/۲۱	۱۰/٦۱		۱/۵۲

جدول ۳ : درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار مارکر D7S2456 با استفاده از پایگاه اینترنتی GenePop

قومیت	درصد هتروزیگوسیتی		درصد هموزیگوسیتی	
	مشاهده شده	مورد انتظار	مشاهده شده	مورد انتظار
جمعیت ایرانی	٦٤/۲	٦۳/٤	۳۵/۸	۳٦/٦
فارس	۵۱/۵	٦۱/۸	٤۸/۵	۳۸/۲
آذری	۸۱/۸	٦۷/۷	۱۸/۲	۳۲/۳
ترکمن	٦٦/۷	٦۵/۱	۳۳/۳	۳٤/۹
گیلک	٦۳/٦	٦٤/٤	۳٦/٤	۳۵/٦
عرب	۵۷/٦	۵۸/۳	٤۲/٤	٤۱/۷

جدول ٤ : مقادیر P-value آزمون دقیق فیشر برای بررسی تعادل هاردی - واینبرگ مارکر D7S2456 در جمعیت ایرانی و اقوام مختلف آن

قومیت	p-value
جمعیت ایرانی	۰/۳۳۸۵
فارس	۰/۱٦۸۹
آذری	۰/۱۳۷۱
ترکمن	۰/۱٦٥٤
گیلک	۰/۷۸۵۸
عرب	۰/۸٦۱۰

جدول ٥ : مقدار عامل ظرفیت اطلاعاتی چندشکلی (PIC) برای مارکر D7S2456 در جمعیت ایرانی و اقوام مختلف آن

قومیت	PIC
جمعیت ایرانی	۰/۵۹۳
فارس	۰/۵۷۹
آذری	۰/٦۱٥
ترکمن	۰/٦۰۳
گیلک	۰/۵۹۲
عرب	۰/۵۳۰

بحث

در مطالعه حاضر از میان ۹ آلل شناسایی شده بر روی مارکر D7S2456 ، آلل ۵ و آلل ۸ به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را در جمعیت ایرانی نشان دادند. مطالعات صورت گرفته بر روی این مارکر در سایر جمعیت‌ها بسیار ناچیز و تنها به گزارش‌های پایگاه داده‌های UniSTS، Mammalian Genotyping Service و Genethon center که منتج از نتایج توالی‌یابی است؛ محدود شده است. براساس اطلاعات پایگاه داده UniSTS (UniSTS:38668) آلل‌های این مارکر دارای محدوده محصول PCR ۲۵۲-۲۳۸ جفت باز است. Genethon center فرانسه و Mammalian Genotyping Service نیز گزارشی مشابه با پایگاه داده UniSTS ارایه داده‌اند (۱۳و۱۴). نتایج به دست آمده از مطالعه کنونی نشان داد که ۸ آلل مطابق با گزارش ها است؛ ولی واریانت ۲۳۲ جفت باز (آلل ۱) مازاد بر گزارش های معرفی شده در سطح جهان در جمعیت ایرانی است. این واریانت به عنوان یک واریانت نادر جمعیتی جدید (کمتر از ۱۰ درصد) معرفی می‌شود. به خصوص به نظر می‌رسد که به دلیل تفاوت ۶ نوکلئوتید در طول آن با کوچک‌ترین آلل گزارش شده، در سایر جمعیت‌ها نیز به عنوان آلل دیده نشود. به عنوان یک نتیجه‌گیری کلی آلل‌های ۱، ۲ و ۸ واریانت‌های نادر جمعیت ایرانی هستند.

ژنوتیپ‌های بررسی شده از قوم فارس حاکی از حضور ۸ آلل از این مارکر بود که در میان آنها آلل ۲ حضور نداشت. در این قوم آلل۵ شایع‌ترین و آلل‌های ۱ و ۴ کمیاب‌ترین آلل‌ها بودند. قوم آذری از ۹ آلل جمعیت ایرانی تنها ۷ آلل را دارا بود که از میان آنها آلل ۵ بیشترین و آلل‌های ۳ و ۹ کمترین فراوانی را داشتند. در قوم آذری نیز دو آلل ۱ و ۲ مشاهده نشد. ۷ آلل از مارکر D7S2456 در این قومیت ترکمن مشاهده شد. همچنین آلل ۵ شایع‌ترین و آلل ۸ کمیاب‌ترین آلل‌های این قومیت بود. ژنوتیپ افراد این قوم نیز همانند قوم آذری فاقد آلل‌های ۱ و ۲ بود. گیلکی‌ها نیز ۷ آلل از مارکر مورد بررسی را دارا بودند که مشابه با قوم ترکمن فراوان‌ترین آلل، آلل ۵ بود. همچنین دو آلل ۲ و ۷ کمترین درصد فراوانی را در این قوم داشتند. آلل‌های ۱ و ۹ در این قوم مشاهده نشد. در قوم عرب از میان ۶ آلل مشاهده شده، آلل ۵ شایع‌ترین آلل بود. در حالی که آلل ۹ کمیاب‌ترین به‌شمار می‌آید. آلل‌های ۱، ۲ و ۸ جمعیت ایرانی در قوم عرب دیده نشد. مارکر D7S2456 در اقوام مختلف دارای بیش از ۶ آلل بود.

در این مطالعه درصد هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای مارکر D7S2456 در جمعیت ایرانی ۶۴/۲درصد بود که کمی بیشتر از درصد هتروزیگوسیتی مورد انتظار بود. درصد هتروزیگوسیتی گزارش شده توسط Genethon center فرانسه و Mammalian Genotyping Service ۶۳درصد بود (۱۳و۱۴) که تقریباً ۱درصد کمتر از نتیجه حاصله در جمعیت ایرانی است. در نتیجه درصد هتروزیگوسیتی مارکر D7S2456 در جمعیت ایرانی کمی بیشتر از این دو درصد گزارش شده است (۱۳و۱۴). در مطالعه حاضر بالاترین درصد هتروزیگوسیتی مشاهده شده متعلق به قوم آذری و پایین‌ترین متعلق به قوم فارس بود. یکی از مهم‌ترین دلایل پایین بودن درصد هتروزیگوسیتی تمایل افراد به درون‌زادآوری قومی است که خود منجر به افزایش هموزیگوسیتی و کاهش هتروزیگوسیتی می‌گردد. با کمال تعجب، برای مارکر D7S2456 پایین‌ترین درصد هتروزیگوسیتی متعلق به قوم فارس بود که در آن نسبت به سایر اقوام درون‌زادآوری قومی به میزان کمتری دیده می‌شود؛ لذا احتمالاً عوامل دیگری در کاهش درصد هتروزیگوسیتی نقش دارند.

در مطالعه حاضر پس از تخمین فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی داده‌ها، وجود تعادل هاردی-واینبرگ بررسی شد. مقدار P بزرگ‌تر از ۰/۰۵ (P=۰/۳۳۸۵) برای مارکر D7S2456 در جمعیت ایرانی نشان‌دهنده حضور تعادل هاردی-واینبرگ در این جمعیت بود. همچنین p-value محاسبه شده برای پنج قوم مورد بررسی بزرگ‌تر از ۰/۰۵ بود؛ در نتیجه همه اقوام برای جایگاه مارکر مورد بررسی در تعادل هاردی-واینبرگ بودند که نشان‌دهنده قابل توجه نبودن عوامل برهم زننده تعادل هاردی- واینبرگ در جمعیت ایرانی برای جایگاه مارکر D7S2456 است.

در این مطالعه مقدار PIC محاسبه شده برای پنج قوم مختلف و

جمعیت ایرانی، مابین ۰/۴۴ و ۰/۷ بود. لذا این مارکر D7S2456 در پنج قوم مورد بررسی و به طور کلی جمعیت ایرانی برای بررسی جهش‌های ژن *SLC26A4* به روش آنالیز پیوستگی دارای اطلاع‌دهندگی متوسط ارزیابی شد. مارکر D7S2456، از میان اقوام مختلف از شدیدترین اطلاع‌دهندگی برای قوم آذری برخوردار بود که احتمالاً به علت بالاتر بودن هتروزیگوسیتی مشاهده شده در این قوم نسبت به سایرین بود. با توجه به اطلاع‌دهندگی متوسط مارکر D7S2456، شاید به عنوان بهترین مارکر تشخیصی در ناشنوایی‌های وابسته به ژن *SLC26A4* معرفی نشود؛ ولی همچنان به عنوان یک مارکر مناسب پس از مارکرهای دارای اطلاع‌دهندگی شدید معرفی می‌گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که مارکر D7S2456 واقع در سمت ۳ ژن *SLC26A4* و متصل به آن؛ دارای اطلاع‌دهندگی متوسط در تشخیص‌های مولکولی ناشنوایی غیرسندرمی وابسته به *SLC26A4* با توارث اتوزومی مغلوب به روش آنالیز پیوستگی در جمعیت ایرانی است و می‌توان آن را پس از مارکرهای دارای اطلاع‌دهندگی شدید مورد استفاده قرار داد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (کد ۱۵۱) مرجان مجتبوی نائینی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته ژنتیک انسانی از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد بود. بدین‌وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به خاطر تامین بودجه (شماره گرانت ۱۰۴۵) و نیز همه کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

1. Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. Am J Med Genet. 1993 Jun;46(5):486-91.

2. Lee KY, Choi SY, Bae JW, Kim S, Chung KW, Drayna D, et al. Molecular analysis of the GJB2, GJB6 and SLC26A4 genes in Korean deafness patients. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2008 Sep;72(9):1301-9.

3. 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 Mar-Jun;681(2-3):189-96.

4. Hone SW, Smith RJ. Genetic screening for hearing loss. Clin Otolaryngol Allied Sci. 2003 Aug;28(4):285-90.

5. Smith RJ, Robin NH. Genetic testing for deafness--GJB2 and SLC26A4 as causes of deafness. J Commun Disord. 2002 Jul-Aug;35(4):367-77.

6. Tabatabaiefar M, Alasti F, Zohour MM, Shariati L, Farrokhi E, Farhud D, et al. Genetic Linkage Analysis of 15 DFNB Loci in a Group of Iranian Families with Autosomal Recessive Hearing Loss. Iran J Public Health. 2011;40(2):34-48.

7. Zhao H, Pfeiffer R, Gail MH. Haplotype analysis in population genetics and association studies. Pharmacogenomics. 2003 Mar;4(2):171-8.

8. Rabionet R, Zelante L, López-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, et al. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. Hum Genet. 2000 Jan;106(1):40-4.

9. Yazdanpanahi N, Chaleshtori MH, Tabatabaiefar MA, Noormohammadi Z, Farrokhi E, Najmabadi H, et al. Two novel SLC26A4 mutations in Iranian families with autosomal recessive hearing loss. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2012 Jun;76(6):845-50.

10. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. Nature. 2003 Dec;426(6968):789-96.

11. Elahi E, Kumm J, Ronaghi M. Global genetic analysis. J Biochem Mol Biol. 2004 Jan;37(1):11-27.

12. Hildebrand CE, Torney DC, Wagner RP. Informativeness of polymorphic DNA markers. Los Alamos Science. 1992; 20:100-2.

13. Mammalian Genotyping Service [database on the Internet]. Available at: http://research.marshfieldclinic.org/genetics/home/index.asp

14. Genethon Center. [database on the Internet]. Available at: http://www.genethon.fr/

15. UniSTS Database [database on the Internet]. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists/

16. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. J Hered. 1995;86(3):248-9.

17. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics. 1992 Jun;48(2):361-72.

18. Weir BS. Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data. 2nd. Sunderland: Sinauer Associates.1996.

19. Engels WR. Exact tests for Hardy-Weinberg proportions. Genetics. 2009 Dec;183(4):1431-41.

20. Balding DJ, Bishop M, Cannings C. Handbook of statistical genetics. 3rd. New York: Wiley-Interscience. 2007; pp: 878-43.

21. Park SDE. Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. Ph.D Dissertaion. University of Dublin. 2001.

Original Paper

Informativeness of D7S2456 marker for molecular diagnosis of autosomal recessive non syndromic hearing loss in five Iranian ethnic groups

Mojtabavi Naeini M (M.Sc)[1], Vallian Broujeni S (Ph.D)[2]
Hashemzadeh Chaleshtori M (Ph.D)*[3]

[1]M.Sc in Human Genetics, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran. [2]Professor, Genetics Division, Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran. [3]Professor, Cellular and Molecoular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

Abstract

Background and Objective: *SLC26A4* gene mutations after *GJB2* mutations are the second currently identifiable genetic cause of autosomal recessive non syndromic hearing loss (ARNSHL) which currently is used in molecular diagnosis of ARNSHL. Several potential STR markers related to this region have been reported .This study was carried out to identity the informativeness of D7S2456 CA repeat STR marker in *SLC26A4* gene region in five ethnic groups of the Iranian population.

Methods: In this descriptive study, The locus was genotyped in 165 unrelated healthy individuals of five different ethnics including Fars, Azari, Turkmen, Gilaki and Arabs ethnic groups using polymerase chain reaction (PCR) followed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and fluorescent capillary electrophoresis. Data was analyzed by Gene Marker HID Human STR Identity software, Gene Pop program and Microsatellite Tools software.

Results: Analysis of the allelic frequency revealed the presence of 9 alleles for D7S2456 marker in the Iranian population, which allele 5 at the D7S2456 locus with 55% frequency was the most frequent. The most frequent heterozygosity with rate of 81.8% belongs to Azari ethnic group. Analysis of deviations from Hardy-Weinberg equilibrium demonstrated that all the ethnics except Fars were in equilibrium for D7S2456 locus. D7S2456 marker is a moderately informative marker in Iranian ethnic population (PIC value within 0.44 and 0.7).

Conclusion: D7S2456 is a moderately informative marker in diagnosis of *SLC26A4* based autosomal recessive non syndromic hearing loss in Iranian population by linkage analysis.

Keywords: Short Tandem Repeat, *SLC26A4* gene, D7S2456 marker, Autosomal recessive non syndromic hearing loss, Ethnicity, Iran

*** Corresponding Author: Hashemzadeh Chaleshtori M (Ph.D), E-mail: mchalesh@skums.ac.ir**

Received 9 Apr 2013 **Revised** 13 Jul 2013 **Accepted** 17 Jul 2013

This paper should be cited as: Mojtabavi Naeini M, Vallian Broujeni S, Hashemzadeh Chaleshtori M. [Informativeness of D7S2456 marker for molecular diagnosis of autosomal recessive non syndromic hearing loss in five Iranian ethnic groups]. J Gorgan Uni Med Sci. 2014; 16(2): 82-88. [Article in Persian]