Downloaded from zums.ac.ir at 21:05 IRDT on Sunday June 24th 2018

مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۳، شماره‌ی ۹۷، خرداد و تیر ۱۳۹٤، صفحات ٦۱ تا ۷۱

بررسی اطلاع‌دهندگی مارکر D9S1876 واقع در ناحیه ژن TMC1 در جمعیت ایرانی

سمیرا معتمدی[۱]، دکتر مرتضی هاشم‌زاده چالشتری[۲]، مرجان مجتبوی‌نائینی[۳]، دکتر حسین تیموری[۴]

نویسنده‌ی مسوول: شهرکرد، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی hteimori@skums.ac.ir

دریافت: ۹۲/۱۲/۲۷ پذیرش: ۹۳/۷/۳

چکیده

زمینه و هدف: *جهش‌های ژن TMC1 یکی از فراوان‌ترین دلایل ناشنوایی غیرسندرومی اتوزومی مغلوب در جمعیت‌های مختلف می‌باشند. با توجه به اندازه بزرگ ژن TMC1 و تعداد زیاد جهش‌های شناخته شده در این ژن، استفاده از مارکرهای چند شکل جهت تشخیص ناقلین و تشخیص پیش از تولد در خانواده‌ها پیشنهاد می‌شود. در این مطالعه، اطلاع‌دهندگی مارکر D9S1876 با توالی‌های تکراری CA، در پنج قوم مختلف جمعیت ایرانی شامل قوم فارس، آذری، ترکمن، گیلک و عرب مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: *جایگاه ژنی D9S1876 واقع در ناحیه ژن TMC1 توسط واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز (PCR) و سپس ژل الکتروفورز پلی‌اکریل‌آمید (PAGE) و در نهایت الکتروفورز فلورسنت موئینه تعیین ژنوتیپ گردید. نتایج حاصل از ژنوتیپ‌های ۱۶۵ فرد سالم غیرخویشاوند توسط نرم‌افزارهای GeneMarker HID Human STR Identity, GenePop و Microsatellite Tools مورد آنالیز قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *نتایج به دست آمده از برنامه GenePop حاکی از حضور ۹ آلل در جمعیت ایرانی می‌باشد که بیشترین فراوانی مربوط به آلل ۱۴۸ جفت باز با فراوانی ۳۴/۸۵ درصد در جمعیت ایرانی می‌باشد. بالاترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در میان اقوام مختلف و کل جمعیت ایرانی متعلق به قوم عرب به میزان ۹۰/۹ درصد می‌باشد. در نهایت مقدار PIC محاسبه شده گویای اطلاع‌دهندگی شدید مارکر D9S1876 در اقوام مورد بررسی جمعیت ایرانی (مقدار PIC بالاتر از ۰/۷) می‌باشد.*

نتیجه‌گیری: *مارکر D9S1876 را می‌توان به عنوان مارکر با اطلاع‌دهندگی شدید جهت شناسایی ناقلین وتشخیص پیش از تولد مرتبط با ناشنوایی غیرسندرومی اتوزومی مغلوب وابسته به ژن TMC1 به روش آنالیز پیوستگی در جمعیت ایرانی معرفی نمود.*

واژگان کلیدی: ***ناشنوایی غیرسندرومیک اتوزومی مغلوب، هتروزیگوسیتی، ژن TMC1، توالی تکراری ریزماهواره***

مقدمه

ناشنوایی یکی از شایع‌ترین اختلالات حسی در انسان است (۱). این اختلال شایع با فراوانی ۱ در ۱۰۰۰ تولد زنده رخ می‌دهد که نیمی از این موارد اساس و آسیب شناسی ژنتیکی دارند (۲). سبب شناسی ناشنوایی چند عاملی است و شامل دلایل ژنتیکی، محیطی و گاه هر دو می‌باشد. گفتنی است علی‌رغم بهبود سطح بهداشتی جوامع، سهم ژنتیک همچنان در حال افزایش است (۳). تقریبا ۷۰ درصد موارد ناشنوایی ارثی، غیرسندرومی و ۳۰ درصد بقیه‌ی موارد

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۲- دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی، استاد مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۳- دانشجوی دکترای ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان
۴- دکترای تخصصی ژنتیک پزشکی، استادیار مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

Downloaded from zums.ac.ir at 21:05 IRDT on Sunday June 24th 2018

ناشنوایی، سندرومی است (۴). ناشنوایی غیرسندرومیک بر اساس سن بروز، پیش‌گفتاری (Prelingual) و پس گفتاری (Postlingual) خوانده می‌شوند و با توجه به الگوی وراثتی به چهار دسته‌ی اتوزومی غالب Nonsyndromic Deafness, Autosomal Dominant (DFNA)، اتوزومی مغلوب Nonsyndromic Deafness, Autosomal Recessive (DFNB)، وابسته به X Nonsyndromic Deafness, X-linked (DFNX) و میتوکندریایی Mitochondrial Nonsyndromic Deafness(DFN) تقسیم‌بندی می‌شوند. ناشنوایی با وراثت اتوزومی مغلوب با فراوانی ۸۰-۷۵ درصد در میان چهار گروه دارای بیشترین فراوانی می‌باشد (۴). جهش‌های ژن TMC1 یکی از شایع‌ترین جهش‌های مسوول ناشنوایی غیرسندرومیک با وراثت اتوزومی مغلوب Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss (NSHL) در بسیاری از جمعیت‌های جهان از جمله جمعیت ایرانی می‌باشد (۵). تشخیص مولکولی ناشنوایی بر اساس دو روش بررسی مستقیم جهش و بررسی غیرمستقیم توسط آنالیز پیوستگی انجام می‌شود. انتخاب روش، در تشخیص‌های مولکولی به ویژگی‌های ژن مورد نظر بستگی دارد و اولویت آن‌ها در ژن‌های مختلف، متفاوت است (٦). در بررسی مستقیم می‌توان به تعیین توالی ژنوم بیماران برای تشخیص جهش‌های ایجاد کننده بیماری، اشاره کرد که برای جهش‌های ژن GJB2 به علت وسعت کم ژن و شیوع بالای جهش 35delG در میان جهش‌ها، مناسب به نظر می‌آید (۷). ژن TMC1 کدکننده‌ی شبه پروتئین کانال غشایی است که در گوش داخلی یافت می‌شود. این ژن که بر روی کروموزوم ۹ (9q21.13) قرار دارد، شامل ٢٤ اگزون می‌باشد و پروتئینی به وزن ۸۷ کیلو دالتون تولید می‌کند (۸). جهش‌های TMC1 می‌تواند ناشنوایی مغلوب در لوکوس DFNB7/11 یا ناشنوایی غالب در لوکوس DFNB36 ایجاد نماید (۸). جهش‌های ژن TMC1 یکی از فراوان‌ترین دلایل ناشنوایی غیرسندرومیک در نواحی شمال آفریقا، خاورمیانه و بخش‌هایی از جنوب آسیا محسوب می‌شود (۱۲-۹). به دلیل وسعت بالای ژن TMC1 و پراکندگی جهش‌های مشاهده شده در نواحی مختلف این ژن و نیز شیوع تقریبا یکسان این جهش‌ها، روش مستقیم برای بررسی این جهش‌ها مناسب نمی‌باشد و بهتر است به‌منظور جلوگیری از اتلاف وقت و هزینه از روش غیرمستقیم استفاده گردد (۱۳).

بررسی غیرمستقیم جهش‌ها یا آنالیز پیوستگی، توسط مارکرهای چند شکلی پیوسته به ژن انجام می‌شود. یکی از مارکرهای مورد استفاده در بررسی غیرمستقیم توالی تکراری پشت سر هم Short Tandem Repeat (STR)، از دسته‌ی ریزماهواره‌های موجود در ژنوم هستند که به تعداد بسیار فراوان و به شکل تصادفی در طول ژنوم پراکنده می‌باشند (۱۴). چندشکلی‌های (پلی‌مورفیسم‌های) STR از تغییر در تعداد واحدهای توالی کوتاه ۲ تا ۴ نوکلئوتیدی که پشت سر هم تکرار شده است ایجاد می‌شوند. در آنالیزهای پیوستگی جهت افزایش کیفیت لازم است که از مارکرهای اطلاع‌دهنده استفاده شود. اطلاع‌دهندگی یک مارکر توسط فاکتور ظرفیت اطلاعاتی چند شکلی یا Polymorphism Information Content (PIC) محاسبه می‌گردد. مقدار PIC برای جایگاه‌های ژنی در جمعیت، در تعادل هاردی وینبرگ تعریف می‌شود که به تعداد آلل‌ها و هتروزیگوسیتی مارکر بستگی دارد و بنابراین در جمعیت‌های گوناگون به دلیل ساختار ژنتیکی متفاوت متغیر می‌باشد (۱۶و ۱۵). بنابراین جهت غربالگری بهینه‌ی جهش‌ها به روش غیرمستقیم، لازم است که مارکرهای مورد استفاده در جمعیت‌های مختلف ارزیابی شوند و مارکرهای اطلاع‌دهنده‌ی هر جمعیت به‌طور مجزا مشخص گردند. تاکنون هیچ مطالعه‌ای مبنی بر بررسی مارکرهای اطلاع‌دهنده‌ی مرتبط با ژن TMC1 در جمعیت ایرانی صورت نگرفته است. در این مطالعه به بررسی خصوصیات و اطلاع‌دهندگی مارکر درون ژنی D9S1876

Downloaded from zums.ac.ir at 21:05 IRDT on Sunday June 24th 2018

در پنج قوم جمعیت ایرانی پرداخته و فراوانی آن در قومیت‌ها مورد مقایسه قرار گرفته است که نتایج آن می‌تواند موجب بهینه‌سازی تشخیص‌های مولکولی ناشنوایی مرتبط با ژن TMC1 و همچنین تقویت اطلاعات ساختاری ژنتیکی جمعیت ایرانی گردد.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی توصیفی تحلیلی، از ۱۶۵ فرد شنوای غیرخویشاوند مربوط به پنج قوم مختلف کشور (فارس، آذری، ترکمن، گیلک و عرب) به‌میزان تقریبا برابر، از خانم‌ها و آقایان نمونه جمع‌آوری و در قالب یک جمعیت ایرانی مورد مطالعه قرار گرفت. به‌دلیل پهناور بودن کشور ایران و پراکندگی قوم فارس در نقاط مختلف کشور، شهر اصفهان به دلیل مرکزیت آن در کشور و حضور فارس‌ها از نقاط مختلف کشور، انتخاب شد (قابل ذکر است که تنها از فارس‌ها نمونه‌گیری به عمل آمده است). حجم نمونه‌ی لازم برای برآورد P یا فراوانی آللی از فرمول زیر به دست می‌آید:

$$n = pq\left[\frac{z_{\frac{\alpha}{2}}}{d}\right]^2$$

با استفاده از این فرمول و مطالعه‌ی ۱۶۴ نفر ۸۰ درصد اطمینان خواهیم داشت که خطای برآورد بین ۰/۰۵+ و ۰/۰۵- خواهد بود. در پایگاه داده‌ها مارکرهای مختلفی در ناحیه‌ی ژن TMC1 معرفی شده است. یکی از مارکرهای درون ژنی D9S1876 می‌باشد که به علت پیوستگی آن به ژن TMC1 و هتروزیگوسیتی بالای این مارکر طبق گزارشات پایگاه‌ها جهت بررسی بیشتر در جمعیت ایرانی انتخاب گردید (۱۸و ۱۷). پس از کسب رضایت‌نامه‌ی کتبی از افراد، با روش نمونه‌گیری آسان به‌طور تصادفی ۱۰ میلی‌لیتر از خون تام فرد در لوله‌ی حاوی یک میلی‌لیتر EDTA با غلظت ۰/۵ مولار ریخته و پس از ثبت اطلاعات بر روی آن تا زمان شروع استخراج در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. در این مطالعه از روش فنل- کلروفرم جهت استخراج DNA نمونه‌های خون استفاده شد (۱۹) و مقدار DNA به کمک دستگاه نانو دراپ 1000 (Isogen, Rockland/Montchanin, USA) مورد بررسی قرار گرفت. مارکرهای STR ناحیه‌ی ژن TMC1 موجود در پایگاه داده UniSTS بررسی شدند و مارکر D9S1876 را که نوعی مارکر درون ژنی با هتروزیگوسیتی بالا طبق گزارشات پایگاه‌ها می‌باشد، جهت مطالعات بیشتر انتخاب گردید (۱۷). پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق، از پایگاه داده UniSTS در سایت NCBI استخراج گردید. توالی پرایمر مستقیم Forward(F) و پرایمر معکوس Reverse(R) به‌صورت زیر می‌باشد که با انجام واکنش زنجیره‌ی پلیمراز PCR قطعاتی به‌طول متغیر ۱۳۲-۱۵۲ جفت باز تولید می‌کند (۱۷).

F: 5′- GATGTACCCAGAGAAGTCTCG –3′

R: 5′- AGTGGTTACCATTTACCCAAG -3′

واکنش PCR بر روی نمونه‌های DNA با برنامه‌ی تاچ‌دان Touch Down توسط دستگاه ترموسایکلر ASTEC PC-818 انجام شد.

ترکیبات مورد نیاز واکنش PCR شامل: ۱ میکرولیتر از دو پرایمر (۱۰ پیکومول)، ۰/۱ میکرولیتر از DNA Polymerase Taq (۵ واحد در هر میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر از dNTP Mix (۱۰ میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر از Taq DNA Buffer (۱۰X)، ۱ میکرولیتر از $Mgcl_2$ (۵۰ میلی‌مولار) و ۲ میکرولیتر از DNA (۸۰ نانوگرم) که با ddH_2O به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانیده شد. حدود ۲/۵-۱ میکرولیتر از هر یک از محصولات PCR بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۸ درصد (نسبت ۱ بیس اکریل آمید به ۱۹ اکریل آمید) به مدت سه ساعت با ولتاژ ۲۰۰ ولت رانده شد و سرانجام ژل حاصله به روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردید.پس از تایید کیفیت باندها، محصولات با

Downloaded from zums.ac.ir at 21:05 IRDT on Sunday June 24th 2018

استفاده از دستگاه الکتروفورز مویینه‌ی فلورسنت مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین طول محصولات PCR توسط دستگاه الکتروفورز مویینه، انتهای پرایمر معکوس با رنگ فلورسنت HEX (رنگ سبز) نشان‌دار شد که توسط دستگاه ABI Prism 3130 خوانده شده و در نهایت نتایج به‌صورت نمودار، در نرم‌افزار Peak Scaner نمایش داده شد. نتایج حاصل از نمودارها توسط نرم‌افزار GeneMarker HID STR تعیین ژنوتیپ وآلل‌بندی شدند. آنالیز آماری نتایج به‌دست آمده از تعیین ژنوتیپ افراد، جهت محاسبه‌ی فراوانی آللی، درجه‌ی هتروزیگوسیتی و فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار فنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت و همچنین بررسی تعادل هاردی وینبرگ با استفاده از پایگاه Gene Pop انجام شد (۲۰). آزمون فیشر یکی از روش‌های تعادل هاردی وینبرگ می‌باشد. آزمون فیشر وقتی که آلل‌های نادر وجود دارد مناسب است و بنابراین بایستی برای مارکرهایی که تعداد زیادی آلل دارند، (مانند لوکوس‌های ریزماهواره) استفاده شود (۲۲و ۲۱). این نرم‌افزار با استفاده از آزمون دقیق فیشر به بررسی تعادل می‌پردازد. در این آزمون فرض صفر بر مبنای وجود تعادل هاردی وینبرگ در جمعیت ایرانی و اقوام مورد بررسی قرار دارد. در صورتی که مقدار P حاصله کوچکتر از ۰/۰۵ شود فرضیه‌ی صفر مبنی بر وجود تعادل هاردی وینبرگ رد می‌شود (۲۳). در پایان به کمک نرم‌افزار Microsatellite Tools میزان PIC محاسبه شد و میزان اطلاع‌دهندگی مارکر مورد نظر در اقوام مختلف بررسی گردید (۲۴). اطلاع‌دهندگی یک مارکر جهت استفاده در آنالیز پیوستگی توسط فاکتور ظرفیت اطلاعاتی چند شکلی یا PIC اندازه‌گیری می‌شود. مقدار PIC بزرگتر از ۰/۷ نشان‌دهنده‌ی اطلاع‌دهندگی شدید مارکر در آنالیز پیوستگی برای ژن پیوسته به آن است. اگر مقدار PIC مابین ۰/۴۴ و ۰/۷ باشد نشان‌دهنده‌ی اطلاع‌دهندگی متوسط مارکر است و در صورتی که این مقدار به کوچکتر از ۰/۴۴ برسد، اطلاع‌دهندگی مارکر ضعیف به شمار می‌آید.

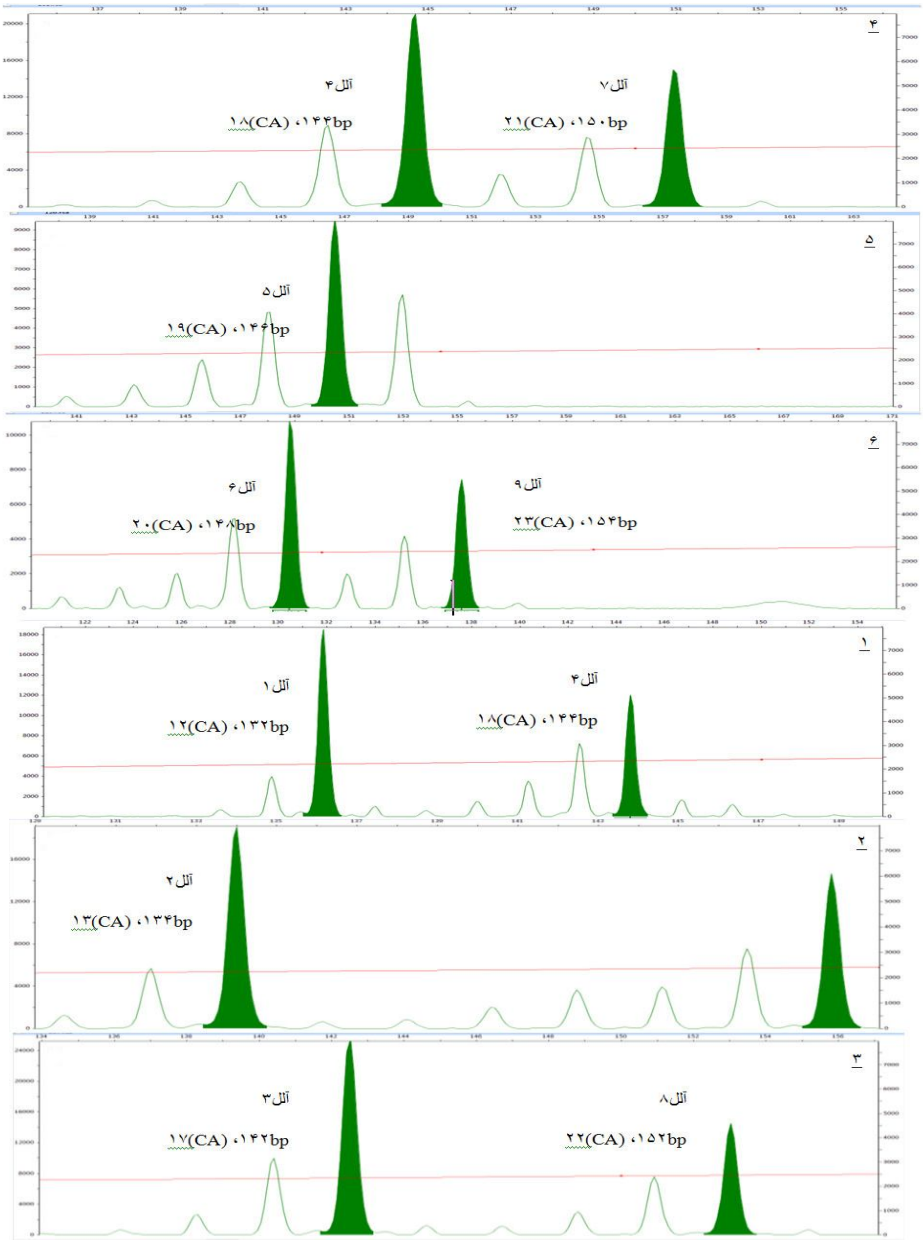
یافته‌ها

محصول PCR نمونه های افراد شنوای غیرخویشاوند مارکر D9S1876 ابتدا با روش الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد مشاهده و ارزیابی شدند و با اطمینان از وجود محصولات PCR مناسب با استفاده از الکتروفورز فلورسنت موئینه تعیین ژنوتیپ و آلل‌بندی شدند.

جدول ۱: آلل‌ها و درصد فراوانی آللی مارکر D9S1876 در پنج قوم از جمعیت ایرانی، آلل‌ها به دو صورت طول قطعات PCR و تعداد تکرارهای توالی CA انجام شده است.

شماره	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
آلل (bp) / قوم	۱۳۲ $_{12}$CA	۱۳۴ $_{13}$CA	۱۴۲ $_{17}$CA	۱۴۴ $_{18}$CA	۱۴۶ $_{19}$CA	۱۴۸ $_{20}$CA	۱۵۰ $_{21}$CA	۱۵۲ $_{22}$CA	۱۵۴ $_{23}$CA
فارس	۹/۰۹	۹/۰۹	۱۲/۱۲	۱۵/۱۵	۱۲/۱۲	۲۸/۷۹	۹/۰۹	۳/۰۳	۱/۵۲
آذری	۶/۰۶	۴/۵۵	۲۴/۲۴	۱۰/۶۱	۱۶/۶۷	۳۱/۸۲	۶/۰۶		
ترکمن	۱/۵۲	۷/۵۸	۲۲/۷۳	۶/۰۶	۱۰/۶۱	۴۶/۹۷	۴/۵۵		
گیلک	۱۰/۶۱	۶/۰۶	۲۱/۲۱	۷/۵۸	۷/۵۸	۳۱/۸۲	۱۲/۱۲	۱/۵۲	۱/۵۲
عرب	۴/۵۵	۷/۵۸	۱۶/۶۷	۱۸/۱۸	۱۲/۱۲	۳۶/۳۶	۴/۵۵		
کلیه اقوام جمعت ایرانی	۶/۳۶	۶/۹۷	۱۹/۳۹	۱۱/۸۲	۱۱/۸۲	۳۴/۸۵	۷/۲۷	۰/۹۱	۰/۶۱

مطـابق بـا شـکل ۱ آلـل‌بنـدی‌هـا بـه دو صـورت تعـداد جفت بـاز طـول محـصولات PCR و تعـداد تکرارهـای CA بیان شده است. نتـایج حاصـل نـشان‌دهنـده‌ی وجـود ۹ آلـل در جمعیت ایرانی می باشد. از میان تمامی آلل هـا قـوم فـارس ۹آلـل، آذری ۷ آلل، ترکمن ۷ آلل، گیلک ۹ آلل و عرب ۷ آلل را دارا بودند. نتایج حاصل از فراوانی آلل‌ها بـه‌طـور جداگانـه در هـر قـوم و بـه طـور کلـی در جمعیـت ایرانـی در جـدول ۱ بیـان شده است.



شکل ۱ : تعیین نوع و تعداد آلل‌های مارکر D9S1876. شماره‌بندی نمونه‌ها در سمت راست تصویر و با یک خط در زیر آن‌ها نشان داده شده است. نمونه‌های ۱، ۲، ۳، ٤ و ٦ با دو قله سیاه، هتروزیگوت و نمونه ٥ با یک قله سیاه، هموزیگوت می باشند (سایر قله‌ها تصاویر آینه‌ای می‌باشند که در نظر گرفته نمی‌شوند). در این ٦ نمونه ۹ آلل مشاهده شده در کلیه‌ی نمونه‌ها نشان داده شده است.

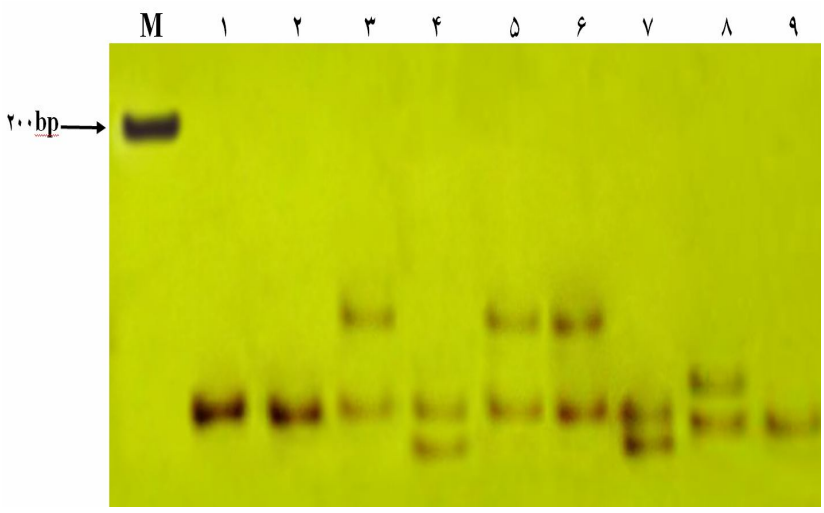
Downloaded from zums.ac.ir at 21:05 IRDT on Sunday June 24th 2018

Downloaded from zums.ac.ir at 21:05 IRDT on Sunday June 24th 2018

در نهایت با تعیین ژنوتیپ افراد، درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده برای هر قوم به‌طور جداگانه و همچنین به‌طور کلی برای جمعیت ایرانی توسط نرم‌افزار Gene Pop محاسبه شد (جدول ۲) (شکل ۲).

جدول ۲: درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده‌ی مارکر D9S1876 با استفاده از پایگاه Gene Pop

قوم	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (درصد)	هتروزیگوسیتی مشاهده شده (درصد)	هموزیگوسیتی مورد انتظار	هموزیگوسیتی مشاهده شده (درصد)
فارس	۸۵/۲	۷۲/۷	۱۴/۸	۲۷/۳
آذری	۸۰/۴	۷۲/۷	۱۹/۶	۲۷/۳
ترکمن	۷۱/۶	۶۹/۷	۲۸/۴	۳۰/۳
گیلک	۸۲/۵	۸۱/۸	۱۷/۵	۱۸/۲
عرب	۷۹/۴	۹۰/۹	۲۰/۶	۹/۱
کلیه اقوام ایرانی	۸۰/۱	۷۷	۲۹/۹	۲۳



شکل ۲: نتیجه PCR مارکر D9S1876 بر روی ژل پلی اکریل‌آمید ۸ درصد اندازه‌ی متفاوت آلل‌ها نشان دهنده‌ی اختلاف در تعداد توالی‌های تکراری دو نوکلئوتیدی CA در نمونه‌های مختلف است. نمونه‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ هتروزیگوت و نمونه‌های ۱، ۲ و ۹ هموزیگوت هستند. باندهای مورد انتظار در محدوده‌ی ۱۵۲-۱۳۲، جفت باز می‌باشند. M در ستون اول مارکر ۱۰۰ جفت بازی را نشان می‌دهد.

طبق قانون هاردی وینبرگ در صورتی که همه‌ی فرضیه‌ها شامل جفت‌گیری تصادفی، عدم مهاجرت، جهش و انتخاب در مورد یک جمعیت صدق کند، فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها از نسلی به نسل دیگر تغییر نمی‌کند. در این مطالعه تعادل هاردی وینبرگ برای جایگاه مارکر D9S1876 در اقوام مختلف کشور و همچنین برای جمعیت ایرانی با استفاده از

Downloaded from zums.ac.ir at 21:05 IRDT on Sunday June 24th 2018

نرم‌افزار GenePop مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصله در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج، نمایانگر مقدار P بزرگ‌تر از ۰/۰۵ در تمامی اقوام به غیر از قوم آذری می‌باشد. در پایان به این علت که چهار قوم فارس، ترکمن، گیلک و عرب در جایگاه ژنی مارکر در تعادل هاردی وینبرگ قرار داشتند و با توجه به داده‌های حاصل از فراوانی آلل‌ها وهتروزیگوسیتی مشاهده شده، مقدار PIC با استفاده از نرم‌افزار Microsatellite Tools، در این چهار قوم طبق جدول ۳ محاسبه شد. به علت عدم حضور مارکر در تعادل هاردی وینبرگ برای قوم آذری، مقدار PIC محاسبه شده برای آن گروه فاقد اعتبار است بنابراین جهت بررسی اطلاع‌دهندگی مارکر در این قوم از مقدار PIC محاسبه شده در جمعیت ایرانی که اطلاعات ژنوتیپی این قوم نیز در آن دخیل است، استفاده می‌گردد.

جدول ۳: تعادل هاردی وینبرگ و مقدار PIC برای مارکر D9S1876 در جمعیت ایرانی و اقوام آن

قوم	P-value	PIC value
فارس	۰/۰۵۳۱	۰/۸۲۱
آذری	۰/۰۲۴۸	–
ترکمن	۰/۷۳۷۵	۰/۷۰۰
گیلک	۰/۶۵۹۶	۰/۷۹
عرب	۰/۹۴۱۵	۰/۷۵۵
کلیه اقوام ایرانی	۰/۵۱۹۱	۰/۷۷۵

بحث

این تحقیق جهت تعیین ویژگی‌های مارکر D9S1876 در جمعیت ایرانی و اقوام مختلف آن صورت گرفته است که این بررسی ما را قادر به انتخاب مارکرهای مناسب به منظور تشخیص مولکولی جهش‌های ژن TMC1 مسوول ناشنوایی به روش غیرمستقیم می‌نماید و در پیشرفت روش‌های تشخیصی در جمعیت ایرانی موثر می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر بر روی مارکر D9S1876 از بین ۹ آلل شناسایی شده، آلل ۶ که دارای طول محصول PCR ۱۴۶ جفت باز با فراوانی ۳۴/۸۵ درصد و آلل ۹ که دارای طول محصول PCR ۱۵۴ جفت باز با فراوانی ۰/۶۱ درصد می‌باشند، به‌ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را در جمعیت ایرانی نشان دادند (جدول ۱). براساس اطلاعات پایگاه داده‌ی UniSTS، آلل‌های این مارکر دارای محدوده‌ی محصول PCR ۱۳۲ تا ۱۵۲ جفت باز می‌باشند (۱۷). نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که علاوه بر آلل‌های گزارش شده در پایگاه داده‌ی UniSTS، آلل‌هایی با طول محصول PCR ۱۵۴ جفت باز نیز، در جمعیت ایرانی وجود دارند که به دلیل فراوانی کم‌تر از ۱ درصدشان، به عنوان انواع نادر جدید معرفی می‌شوند. بنابراین آلل‌های ۱۵۲ و۱۵٤ جفت باز به عنوان انواع نادر در جمعیت ایرانی شناخته شدند. این مارکر در قوم فارس نشان‌دهنده‌ی وجود هر ۹ آللی بود که در جمعیت ایرانی دیده شد و در این میان آلل ۱۴۸ با فراوانی ۲۸/۷۹ درصد دارای بیشترین فراوانی و آلل ۱۵۴ با فراوانی ۱/۵۲ درصد دارای کمترین فراوانی هستند. قوم آذری تنها ۷ آلل را نشان دادند که آلل ۱۴۸ با ۳۱/۸۶ درصد شایع‌ترین و

Downloaded from zums.ac.ir at 21:05 IRDT on Sunday June 24th 2018

آلـل ۱۳۴ بـا ۴/۵۵ درصـد کمیـاب‌تـرین فراوانـی را دارنـد. بررسـی‌هـا بـر روی افـراد قـوم تـرکمن نیـز حـاکی از وجود ۷ آلل هستند که آلل ۱۳۲ و ۱۴۸ به‌ترتیب بـا ۴۶/۹۷ و ۱/۵۲ درصد شایع‌ترین و کمیاب‌ترین آلل‌ها به‌شمار می‌آینـد. قوم گیلک دارای همه‌ی ۹ آلل مشاهده شده در جمعیت ایرانی بـود و در میـان آلـل‌هـا، دو آلـل ۱۵۲ و۱۵۴ بـا فراوانـی ۱/۵۲ درصـد شـایع تـرین و آلـل ۱۴۸ بـا فراوانـی ۳۱/۸۲ کمیاب‌ترین آلل محسوب می‌شوند. در نهایت، در قـوم عـرب آلل ۱۴۸ با فراوانی ۳۶/۳۶ درصد بیشترین و آلل‌هـای ۱۵۰ و ۱۳۲ با فراوانی ۴/۵۵ درصد کمترین فراوانی را دارا می‌باشـند و بررسی ژنوتیپ‌های این قوم حاکی از فقدان دو آلـل ۱۵۲ و ۱۵۴ مشاهده شده در جمعیت ایرانی هستند. بررسی‌ها گویای این هستند که آلل‌هـای ۱۵۲ و ۱۵۴ فقـط در اقـوام فـارس و گیلک حضور دارند و سایر قوم های بررسی شده دارای ۷ آلل دیگر می‌باشند.

طبق جـدول ۲ هتروزیگوسـیتی مـشاهده شـده بـرای مـارکر D9S1876 به‌طور کلی در جمعیت ایرانی برابر با ۷۷ درصـد می‌باشد که این مقدار، کمی از هتروزیگوسـیتی مـورد انتظـار ۸۰/۱ کمتر است و میـزان هتروزیگوسـیتی محاسـبه شـده در پایگـاه اینترنتـی Mammalian Genotyping Service، ۸۱ درصـد مـی‌باشـد و نـشان‌گـر کمتـر بـودن درصـد هتروزیگوسیتی جمعیت ایرانی نسبت به این گزارش می‌باشد. بالاترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده با ۹۰/۷ درصـد متعلـق به قوم عرب و پایین‌ترین درصد هتروزیگوسیتی مشاهده شده با ۶۹/۷ درصد متعلق به قوم ترکمن می‌باشد. یکـی از دلایـل پایین بودن درصد هتروزیگوسیتی، مربـوط بـه درون زادآوری قومی می‌باشد که موجب افـزایش هموزیگوسـیتی و کـاهش هتروزیگوسیتی می‌گردد.

پس از تخمین فراوانی‌های ژنوتیپی و آللـی داده‌هـا، برقـراری تعادل هاردی وینبرگ نیز توسط نرم‌افزار GenePop بررسـی شد. مطابق با جدول ۳ مقدار P بزرگتـر از ۰/۰۵ در جمعیـت ایرانی برای مارکر D9S1876 حاکی از وجود تعادل هاردی-وینبرگ در این جمعیت می‌باشد. مقـدار P بـرای چهـار قـوم فـارس، تـرکمن، گیلـک و عـرب مـورد بررسـی بزرگتـر از ۰/۰۵ تخمین زده شد. بنابراین، این اقوام بـرای جایگـاه ژنـی مارکر D9S1876 در تعادل هـاردی وینبـرگ قـرار دارنـد در حالی که این مقدار P برای آذری‌ها کوچکتر از ۰/۰۵ محاسبه شد و در نتیجه این قوم بـرای جایگـاه مـارکر D9S1876 در تعادل هاردی وینبرگ نمی‌باشد.

در این تحقیق مقدار PIC محاسبه شده برای چهار قوم، معتبر می‌باشد و مقـدار PIC قـوم آذری قابـل تحلیـل نمـی‌باشـد. بنـابراین مقـدار PIC محاسـبه شـده در جمعیـت ایرانـی کـه اطلاعات ژنوتیپی این قوم در آن دخیل است را به قـوم آذری نیز تعمیم می‌دهـیم. مقـدار PIC در هـر چهـار قـوم فـارس، ترکمن، گیلک و عرب بـالاتر از ۰/۷ اسـت در نتیجـه مـارکر D9S1876 برای این چهار قوم دارای اطـلاع‌دهنـدگی قـوی است. مقدار PIC برای کلیه اقوام بررسـی شـده در جمعیـت ایرانـی بـالاتر از ۰/۷ مـی‌باشـد در نتیجـه مـی‌تـوان مـارکر D9S1876 را به‌عنوان مارکر با اطلاع‌دهندگی شـدید جهـت بررسـی جهـش‌هـای ژن TMC1 بـه روش آنـالیز پیوسـتگی معرفی نمود. به علت عدم وجود تعـادل هـاردی وینبـرگ در قوم آذری با توجه به مقدار PIC جمعیت ایرانی کـه میـزانش بالاتر از ۰/۷ بود واز طرفی اطلاعات ژنوتیپی افراد قـوم آذری در محاسبات آن دخالت داشت بنابراین مارکر D9S1876 در قوم فارس نیز به‌عنوان مارکر با اطلاع‌دهنـدگی شـدید جهـت آنالیز پیوستگی معرفی می‌شود.

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که مـارکر D9S1876 بـه‌عنـوان ابـزاری بـسیار اطـلاع‌دهنـده‌ی جهـت تشخیص‌های مولکولی ناشنوایی غیرسندرومیک مرتبط بـا ژن TMC1 با توارث اتوزومی مغلوب به روش آنـالیز پیوسـتگی

در جمعیت ایرانی می‌باشد. همچنین به علت وجود تعداد بیشتری از آلل‌های این مارکر در جمعیت ایرانی نسبت به سایر جمعیت‌ها، دارای ارزشمندی بیشتری می‌باشد.

تقدیر و تشکر

در پایان از معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد که با تصویب این طرح، هزینه‌های انجام مطالعه را پرداخت نمودند و نیز از کلیه کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی مولکولی شهرکرد تشکرو قدردانی می‌گردد. لازم به ذکر است که این مقاله‌ی حاصل از پایان‌نامه دانشجویی می‌باشد.

References

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

2- Kenneson A, Braun KVN, Boyle C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. *Genet Med.* 2002; 4: 258-74.

3- Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM. Hereditary hearing loss and its syndromes: Oxford University Press; 1995.

4- Hilgert N, Smith RJH, Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics. *Mutat Res*. 2009; 681: 189-96.

5- Tabatabaiefar MA, Hashemzadeh Chaleshtori M. Genetic linkage analysis of 15 DFNB Loci in a group of Iranian families with autosomal recessive hearing loss. *Iran J Public Health*. 2011; 34-48.

6- Zhao H, Pfeiffer R, Gail MH. Haplotype analysis in population genetics and association studies. *Pharmacogenomics*. 2003; 4: 171-8.

7- Rabionet R, Zelante L, Lopez-Bigas N, et al. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum Gene*. 2000; 106: 40-4

8- Kurima K, Peters LM, Yang Y, et al. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function. *Nat Genet*. 2002; 30: 277-84.

9- De Heer A-M, Collin RW, Huygen PL, et al. Progressive sensorineural hearing loss and normal vestibular function in a Dutch DFNB7/11 family with a novel mutation in TMC1. *Audiol Neurotol*. 2010; 16: 93-105.

10- Kitajiri S, McNamara R, Makishima T, et al. Identities, frequencies and origins of TMC1 mutations causing DFNB7/B11 deafness in Pakistan. *Clin Genet*. 2007; 72: 546-50.

11- Meyer CG, Gasmelseed NM, Mergani A, et al. Novel TMC1 structural and splice variants associated with congenital nonsyndromic deafness in a Sudanese pedigree. *Hum Mutat.* 2005; 25: 100.

12- Sirmaci A, Duman D, Öztürkmen-Akay H, et al. Mutations in TMC1 contribute significantly to nonsyndromic autosomal recessive sensorineural

Downloaded from zums.ac.ir at 21:05 IRDT on Sunday June 24th 2018

hearing loss: a report of five novel mutations. Int *J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2009; 73: 699-705.

13- Yazdanpanahi N, Chaleshtori MH, Tabatabaiefar MA, et al. The novel TMC1 mutations in Iranian families with autosomal recessive hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2012; 76: 845-50.

14- Gibbs RA, Belmont JW, Hardenbol P, et al. The international hapmap project. *Nature*. 2003; 426: 789-96.

15- Elahi E, Kumm J, Ronaghi M. Global genetic analysis. *J Biochem Mol Biol*. 2004; 37: 11-27.

16- Hildebrand CE, David C, Torney WRP, Wagner P. Informativeness of polymorphic DNA markers. *Los Alamos Science*. 1992; 20:100-2.

17- UniSTS database. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe?

18- Mammalian Genotyping Service. Available from: http://research.marshfieldclinic.org

19- Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16: 1215.

20- Raymond M, Rousset F. Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Evolution*. 1995; 49:1280-3.

21- Weir BS. Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data. Sinauer associates, Inc; 1996.

22- Engels WR. Exact tests for hardy-weinberg proportions. *Genetics*. 2009; 183: 1431-41.

23- Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of hardy-weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 1992; 48: 361-72.

24- Park SDE. Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. Ph D thesis, Dublin University. 2001.

Downloaded from zums.ac.ir at 21:05 IRDT on Sunday June 24th 2018

Informativeness of D9S1876 Marker Located within the TMC1 Gene in Iranian Population

Motamedi S[1], Hashemzadeh chaleshtori M[1], Mojtabavi Naeini M[2], Teimori H[1]

[1]Cellular & Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

[2]Dept. of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Teimori H, Cellular & Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

E_mail: hteimori@skums.ac.ir

Received: 18 Mar 2014 **Accepted:** 25 Sep 2014

Downloaded from zums.ac.ir at 21:05 IRDT on Sunday June 24th 2018

Background and Objective*: TMC1* gene mutations are known as the most common causes of autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL) in different populations. According to large size of the *TMC1* gene and the large number of identified mutations in this gene, application of polymorphic markers is suggested for carrier detection and prenatal diagnosis in families. In this study, informativeness of D9S1876 STR marker with CA repeat was evaluated in five various ethnic groups of the Iranian population including Fars, Azeri, Turkmen, Gilak and Arab.

Materials and Methods: The D9S1876 locus located within the TMC1 gene region was genotyped by polymerase chain reaction (PCR) followed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and fluorescent capillary electrophoresis. The genotyping data from 165 unrelated healthy individuals were analyzed by GeneMarker HID Human STR Identity software, GenePop program and Microsatellite Tools software.

Results: The obtained results via GenePop indicated the presence of 9 alleles of D9S1876 marker in Iranian population. The most frequent allele computed for 148bp with 34.85% frequency. The maximum heterozygosity observed in Arab people with 90.9%. The data of PIC value demonstrated that the D9S1876 marker was found highly informative in the population examined (PIC value above 0.7).

Conclusion: D9S1876 can be suggested as a highly informative marker for possible carrier detection and prenatal diagnosis of TMC1 gene based ARNSHL by linkage analysis in Iranian population.

Keywords: ARNSHL, Heterozygosity, TMC1 gene, Microsatellite Repeats