Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2013; 16(76): 55-65

Study of Alleles Characteristics and Informativeness of D7S2459 Marker in Five Ethnic Groups of the Iranian Population

Mojtabavi Naeini M[1], Vallian S[2], Hashemzadeh Chaleshtori M[1*]

1- Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.
2- Department of Biology, Genetics Division, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

Received:7 Apr 2013, Accepted: 21 Aug 2013

Abstract

Background*: SLC26A4* gene mutations are the second identifiable genetic cause of autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL) after *GJB2* mutations. In this study, the identity and informativeness of D7S2459 marker in SLC26A4 gene region was examined in five ethnic groups of the Iranian population.

Materials and Methods*:* The study was accomplished by genotyping the locus in 165 individuals of five different ethnic groups including Fars, Azari, Torkaman, Gilak and Arab using polymerase chain reaction (PCR) followed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and fluorescent capillary electrophoresis. In this study, results were analyzed by GeneMarker HID Human STR Identity software, GenePop program and Microsatellite Tools software.

Results: Analysis of the allelic frequency revealed the presence of 8 alleles of D7S2459 marker in the Iranian population. Among all, allele 148bp at the D7S2459 locus was the most frequent with 31% frequency. The most heterozygosity observed in Azari ethnic by 84.8%. Finally, analysis of PIC value revealed that D7S2459 marker could be considered as a highly informative marker in each ethnic of the Iranian population (PIC value above 0.7).

Conclusion: Our data suggested that D7S2459 could be introduced as a highly informative marker in molecular diagnosis of *SLC26A4* based ARNSHL by Linkage analysis.

Keywords*:* Genetic Markers, Microsatellite Repeats, SLC26A4

*Corresponding author:
Adress: Cellular and Molecoular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Rahmatieh, Shahrekord, Iran.
Email: mchalesh@skums.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 16، شماره 7 (شماره پیاپی 76)، مهر 1392، 65-55

مطالعه خصوصیات آلل‌ها و اطلاع‌دهندگی مارکر D7S2459 در پنج قوم از جمعیت ایرانی

مرجان مجتبوی نائینی[1]، صادق ولیان بروجنی[2]، مرتضی هاشم‌زاده چالشتری[3*]

1. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم‌پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
2. استاد، بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
3. استاد، بخش ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم‌پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت:92/1/18 تاریخ پذیرش: 92/5/30

چکیده

زمینه و هدف: جهش‌های ژن *SLC26A4* پس از جهش ژن *GJB2* دومین عامل ژنتیکی ایجادکننده ناشنوایی غیر سندرمیک با وراثت اتوزومی مغلوب هستند که امروزه در تشخیص‌های مولکولی مورد بررسی قرار می‌گیرند. در این مطالعه، خصوصیات مارکر D7S2459 با توالی‌های تکراری CA، که در اینترون 10 ژن *SLC26A4* می‌باشند، در پنج قوم مختلف جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: به منظور انجام این مطالعه پژوهشی، تعیین ژنوتیپ جایگاه ژنی مارکر D7S2459 در 165 فرد شنوای غیر خویشاوند 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 برای تحلیل نتایج از نرم‌افزارهایGeneMarker HID Human STR Identity، GenePop و Microsatellite Tools استفاده شد.

یافته‌ها: بررسی آلل‌های مارکر D7S2459 بیان‌گر حضور 8 آلل در جمعیت ایرانی است که آلل 148 جفت باز با فراوانی 31 درصد در جمعیت ایرانی فراوان‌ترین آلل به شمار می‌آید. از میان هتروزیگوسیتی مشاهده شده، بالاترین متعلق به قوم آذری به میزان 84/8 درصد می‌باشد. در انتها، بررسی مقدار PIC مارکر حاکی از اطلاع دهندگی شدید (Highly Informative) آن در اقوام مورد بررسی جمعیت ایرانی می‌باشد (مقدار PIC بالاتر از 0/7).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می دهند که مارکر D7S2459 در تشخیص‌های مولکولی ناشنوایی غیر سندرمیک وابسته به *SLC26A4* با توارث اتوزومی مغلوب به روش آنالیز پیوستگی در جمعیت ایرانی بسیار اطلاع دهنده می باشد.

واژگان کلیدی: مارکرهای ژنتیکی، توالی‌های تکراری ریز ماهواره، *SLC26A4*

* **نویسنده مسئول:** شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

Email:mchalesh@skums.ac.ir.

مقدمه

متداول‌ترین نقص حسی در انسان ناشنوایی مادر زادی است که شیوع آن 1 در 1000 نوزاد می‌باشد (1). عوامل متعددی موجب ناشنوایی می‌گردند که بیش از 50 درصد موارد مادر زادی، وراثتی هستند (2). ناشنوایی وراثتی به دو دسته سندرمیک و غیرسندرمیک دسته‌بندی می‌شود. نوع غیرسندرمیک (NSHL) 70 درصد و نوع سندرمیک (SHL) 30 درصد کل ناشنوایی‌های وراثتی را تشکیل می‌دهند. ناشنوایی غیرسندرمیک براساس سن بروز، پیش‌گفتاری(Prelingual) و پس‌گفتاری (Poslingual) خوانده می‌شوند و با توجه به الگوی وراثتی به چهار دسته اتوزومی غالب(DFNA)، اتوزومی مغلوب (DFNB)، وابسته به X (DFN) و میتوکندریایی (DFNM) تقسیم‌بندی می شوند (3). ناشنوایی با وراثت اتوزومی مغلوب با فراوانی 80-75 درصد، در میان چهار گروه دارای بیش‌ترین فراوانی می‌باشد (4). شایع‌ترین جهش‌های مسئول ناشنوایی غیرسندرمیک با وراثت اتوزومی مغلوب در بسیاری از جمعیت‌های جهان از جمله جمعیت ایرانی جهش‌های ژن *GJB2* و پس از آن ژن *SLC26A4* می باشند (5، 6).

هتروژنی بالا و نقش کم بسیاری از ژن‌های ایجاد کننده ناشنوایی موجب آن شده که غربالگری کامل جهش‌ها در تشخیص‌های مولکولی امکان پذیر نباشد و در بسیاری از نقاط جهان غربالگری تنها برای جهش‌های دو ژن *GJB2* و *SLC26A4* صورت می‌گیرد (5). 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 (7). در بررسی مستقیم می‌توان به تعیین توالی ژنوم بیماران برای تشخیص جهش‌های ایجادکننده 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 (8). ژن *SLC26A4* که در لکوس DFNB4 و موقعیت سیتوژنتیکی 7q31 واقع شده است، دارای 21 اگزون بوده و پروتئینی به نام پندرین تولید می‌نماید (9). به دلیل بزرگی 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 نمی‌باشد و بهتر است به منظور صرفه‌جویی در وقت و هزینه از روش غیرمستقیم استفاده گردد (10).

بررسی غیر مستقیم جهش‌ها یا آنالیز پیوستگی توسط مارکرهای چند شکلی متصل به ژن انجام می‌شود. یکی از مارکرهای مورد استفاده در بررسی غیر مستقیم توالی‌های تکراری پشت سر هم (STR)، دسته ریز ماهواره‌های موجود در ژنوم هستند که به مقدار بسیار زیاد و به شکل تصادفی در طول ژنوم پراکنده می‌باشند (11). تغییر در تعداد واحدهای توالی کوتاه 2 تا 4 نوکلئوتیدی که پشت سرهم تکرار شده است چند شکلی‌ها (پلی مورفیسم های) STR را ایجاد می‌نماید. در آنالیز پیوستگی برای افزایش کیفیت بررسی بایستی از مارکرهای اطلاع‌دهنده استفاده شود. اطلاع‌دهندگی یک مارکر توسط فاکتور ظرفیت اطلاعاتی چند شکلی(Polymorphism Information Content یا PIC) اندازه‌گیری می‌شود. مقدار PIC برای جایگاه‌های ژنی در تعادل هاردی-وینبرگ در جمعیت تعریف می‌شود که به تعداد آلل‌ها و هتروزیگوسیتی مارکر بستگی دارد و بنابراین در جمعیت‌های مختلف به دلیل ساختارهای ژنتیکی متفاوت متغیر می‌باشد (12، 13). در نتیجه به منظور غربالگری بهینه جهش‌ها به روش غیر مستقیم، 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. تنها مارکر STR درون ژنی معرفی شده، D7S2459 می‌باشد که در اینترون شماره 10 این ژن قرار دارد و بنابر این به علت پیوستگی آن به ژن *SLC26A4* برای بررسی بیش‌تر در جمعیت ایرانی انتخاب گردید. در این مطالعه خصوصیات و اطلاع‌دهندگی این مارکر در پنج قوم جمعیت ایرانی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته است که نتایج آن می‌تواند موجب بهینه سازی تشخیص‌های مولکولی ناشنوایی‌های وابسته به ژن *SLC26A4* و هم‌چنین تقویت اطلاعات ساختاری ژنتیکی جمعیت ایرانی گردد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه بنیادی-کاربردی به مجوز اخلاق در پژوهش 20-10-90 دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، 165 فرد شنوای غیرخویشاوند از پنج قوم مختلف ایرانی شامل فارس، آذری، ترکمن، گیلک و عرب با میزان تقریباً برابر از خانم‌ها و آقایان انتخاب شدند(33 فرد از هر قوم). به دلیل پراکندگی قوم فارس در نقاط مختلف کشور، شهر اصفهان به دلیل مرکزیت آن در کشور و حضور فارس‌ها از نقاط مختلف کشور در آن انتخاب شد (قابل ذکر است که تنها از فارس‌ها نمونه‌گیری به عمل آمده است). شهرهای تبریز، گرگان، رشت و اهواز به ترتیب به عنوان نماینده اقوام آذری، ترکمن، گیلک و عرب انتخاب شدند (تنها از اعراب شهر اهواز نمونه‌گیری صورت گرفت). نمونه‌گیری خون از افراد به طور تصادفی و پس از کسب رضایت نامه کتبی به عمل آمد. به این ترتیب 10 میلی‌لیتر خون تام فرد در لوله حاوی یک میلی‌لیتر از EDTA با غلظت 0/5 M ریخته و پس از ثبت اطلاعات افراد بر روی آن تا زمان آزمایش در 20°c- نگه داری شد.

DNA نمونه‌های خون به روش استاندارد فنل-کلروفرم استخراج گردید و کمیت حاصله با استفاده از دستگاه نانو دراپ 1000 (ایزوژن، آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت. کلیه مارکرهای STR ناحیه ژن *SLC26A4* موجود در پایگاه داده UniSTS بررسی شدند و در نهایت مارکر D7S2459 (UniSTS:3694) که تنها مارکر STR درون ژنی معرفی شده می‌باشد به منظور مطالعه بیش‌تر انتخاب گردید (14).

پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق، از تحقیقات پیشین و پایگاه داده UniSTS در سایت NCBI استخراج گردید. توالی پرایمر پیشرو(F) و پرایمر پیرو(R) به صورت زیر می‌باشد که با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) قطعاتی با طول متغیر 152-140 جفت باز تولید می‌نماید (14).

F: 5′-AAGAAGTGCATTGAGACTCC-3′
R: 5′-AAATAATGACTGAGGCTCAAAACA-3′

انجام PCR بر روی نمونه‌های DNA با برنامه تاچ داون (Touch Down) طبق جدول شماره 1 و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (آستک پی.سی.818، آمریکا) انجام شد. شرایط واکنش PCR شامل: 1 میکرولیتر از دو پرایمر (10 پیکو مول)، 1 میکرولیتر از Taq DNA Polymerase (5 واحد در هر میکرولیتر)، 0/5 میکرولیتر از dNTP mix (10 میلی‌مولار)، 2/5 میکرولیتر از TaqDNAbuffer (10X)، 1 میکرولیتر از $MgCl_2$ (50 میلی مولار) و 2 میکرولیتر از DNA (80 نانوگرم) که با ddH_2O به حجم 25 میکرولیتر رسانیده شد.

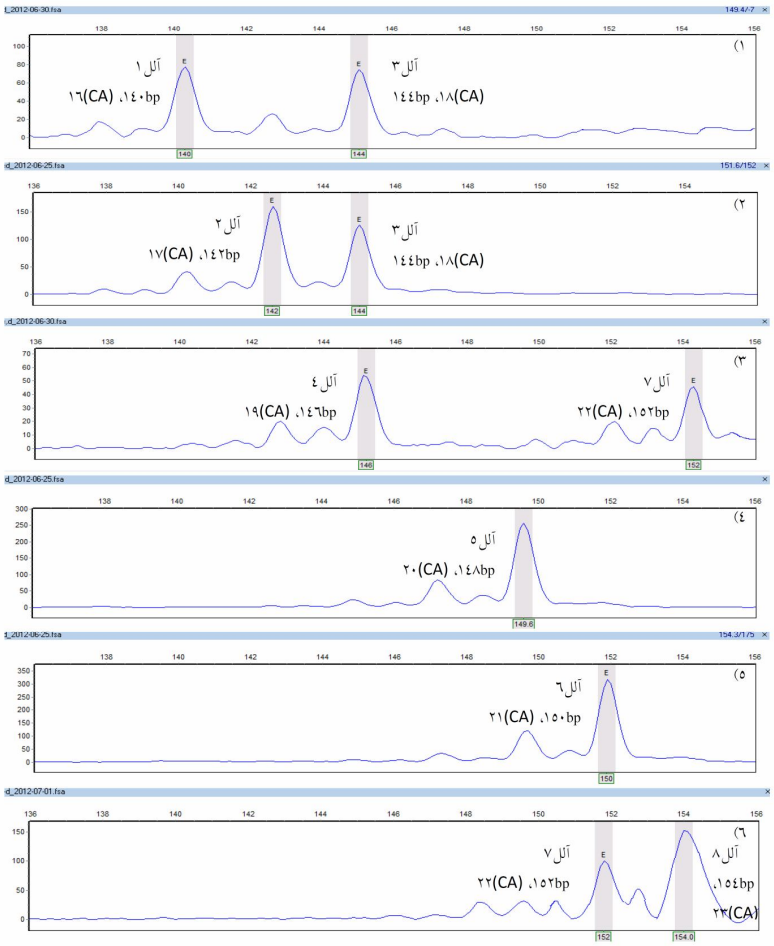
جدول 1: برنامه بهینه شده نهایی دستگاه ترموسایکلر برای مارکر D7S2459

مرحله	دما(°C)	مدت	تعداد سیکل
1	94	3 دقیقه	1
2	94	30 ثانیه	10 سیکل تاچ داون
	60 الی 51	30 ثانیه (کم شدن یک درجه در هر سیکل)	
	72	30 ثانیه	
3	94	30 ثانیه	25 سیکل معمولی
	50	30 ثانیه	
	72	30 ثانیه	
4	72	7 دقیقه	1

کلیه محصولات بر روی ژل پلی اکریل آمید 8 درصد (نسبت 1 بیس اکریل آمید: 19 اکریل آمید) به مدت سه ساعت با ولتاژ 200 ولت رانده شد و ژل به دست آمده با نیترات نقره رنگ آمیزی گردید. پس از تأیید کیفیت باندها، محصولات توسط الکتروفورز موئینه فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند. در سر ۵َ پرایمر پیرو، به منظور تعیین طول محصولات PCR توسط تکنیک الکتروفورز موئینه، رنگ فلورسنت 6-Fam (رنگ آبی) افزوده شد که توسط دستگاه ABI Prism 3130 خوانده شده و در نهایت نتایج به صورت نمودار نمایش داده شد. نمودارهای به دست آمده توسط نرم‌افزار GeneMarker HID Human STR تعیین ژنوتیپ و آلل بندی شدند.

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 و هم‌چنین بررسی تعادل هاردی-وینبرگ (HWE) با استفاده از نرم‌افزار پایگاه GenePop انجام شد(15). یکی از روش‌ها برای بررسی تعادل هاردی-وینبرگ آزمون دقیق فیشر است. آزمون فیشر وقتی که آلل‌های نادر وجود دارند مناسب می باشد و بنابر این بایستی برای مارکرهایی که تعداد زیادی آلل دارند (همانند لوکوس‌های ریزماهواره) استفاده شود (16، 17). این نرم‌افزار با استفاده از آزمون دقیق فیشر به بررسی تعادل می‌پردازد.

در نهایت با استفاده از نرم‌افزار Microsatellite Tools میزان PIC را تخمین زده و میزان اطلاع‌دهندگی مارکر در اقوام مختلف بررسی گردید (18).



شکل 1. تعیین تعداد آلل‌های مارکر D7S2459. نمونه‌های 1، 2، 3 و 6 هتروزیگوت و نمونه های 4 و 5 هموزیگوت می‌باشند. در این 6 نمونه، 8 آلل مشاهده شده در کلیه نمونه‌ها نشان داده شده است.

یافته‌ها

محصول PCR نمونه‌های افراد شنوای غیرخویشاوند برای مارکر D7S2459 ابتدا با روش الکتروفورز بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید 8 درصد مورد مشاهده و ارزیابی قرار گرفت و پس از اطمینان از وجود محصولات PCR مناسب با استفاده از فلورسنت الکتروفورز موئینه تعیین ژنوتیپ و آلل‌بندی شد. در این آلل بندی‌ها به دو صورت تعداد جفت باز طول محصولات و تعداد تکرارهای CA بیان شده است. نتایج حاصل نشان‌دهنده حضور مجموع 8 آلل به طور کلی در جمعیت ایرانی است (شکل شماره 1). از میان تمامی آلل‌ها قوم فارس 6 آلل، آذری 8 آلل، ترکمن 6 آلل، گیلک 6 آلل و عرب 6 آلل را دارا بودند که در جدول شماره 2 فراوانی آلل‌ها به طور جداگانه در هر قوم و به طور کلی در جمعیت ایرانی بیان شده است.

جدول 2: آلل‌ها و درصد فراوانی‌های آللی مارکر D7S2459 در اقوام مختلف و جمعیت ایرانی

قوم	شماره آلل	1	2	3	4	5	6	7	8
		140	142	144	146	148	150	152	154
		$_{16}$CA	$_{17}$CA	$_{18}$CA	$_{19}$CA	$_{20}$CA	$_{21}$CA	$_{22}$CA	$_{23}$CA
فارس			1/52	43/94	1/52	25/76	21/21	6/06	
آذری		1/52	1/52	19/70	4/55	27/27	30/30	13/64	1/52
ترکمن			6/06	27/27	6/06	34/85	24/24	1/52	
گیلک			3/03	27/27	4/55	30/30	16/67	18/18	
عرب			3/03	21/21	1/52	34/85	27/27	12/12	
کلیه اقوام (جمعیت ایرانی)		0/3	3/03	27/88	3/64	30/61	23/94	10/3	0/3

پس از تعیین ژنوتیپ افراد، درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای هر یک از اقوام به صورت جداگانه و در نهایت برای جمعیت ایرانی توسط نرم‌افزار GenePop محاسبه شد که به تفصیل در جدول شماره 3 نشان داده شده است.

جدول 3. درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار مارکر D7S2420 با استفاده از پایگاه اینترنتی GenePop

قوم	هتروزیگوسیتی مشاهده شده (درصد)	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (درصد)	هموزیگوسیتی مشاهده شده (درصد)	هموزیگوسیتی مورد انتظار (درصد)
فارس	51/5	70/2	48/5	29/8
آذری	84/8	78/6	15/2	21/4
ترکمن	63/6	74/9	36/4	25/1
گیلک	78/8	78/2	21/2	21/8
عرب	72/7	75/7	27/3	24/3
کلیه اقوام (جمعیت ایرانی)	70/3	76/1	29/7	23/9

تعادل هاردی- وینبرگ 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. در این مطالعه تعادل هاردی- وینبرگ برای جایگاه مارکر در قوم‌های مختلف و هم‌چنین به طور کلی جمعیت ایرانی توسط نرم‌افزار GenePop بررسی شد که نتایج به دست آمده در جدول شماره 4 نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهند که تمامی اقوام به غیر از قوم فارس دارای مقدار P بزرگ‌تر از 0/05 می‌باشند.

جدول 4. تعادل هاردی- وینبرگ و مقدار PIC مارکر D7S2459 در جمعیت ایرانی و اقوام مختلف آن

قوم	مقدار p	مقدار PIC
فارس	0/0003	-
آذری	0/6099	0/738
ترکمن	0/0831	0/700
گیلک	0/4187	0/733
عرب	0/7041	0/700
کلیه اقوام (جمعیت ایرانی)	0/0836	0/718

در انتها، به دلیل حضور جایگاه ژنی مارکر در چهار قوم آذری، ترکمن، گیلک و عرب در تعادل هاردی- وینبرگ، مقدار PIC توسط نرم‌افزار Microsatellite Tools، با توجه به اطلاعات به دست آمده از فراوانی آلل‌ها و هتروزیگوسیتی مشاهده شده، در این چهار قوم به طور جداگانه محاسبه شد (جدول شماره 4). قوم فارس برای این مارکر در تعادل هاردی-وینبرگ نمی‌باشد، در نتیجه مقدار PIC محاسبه شده برای آن معتبر نخواهد بود و برای بررسی اطلاع‌دهندگی مارکر در این قوم از مقدار PIC به دست آمده برای جمعیت ایرانی که اطلاعات ژنوتیپی این قوم نیز در آن دخیل است استفاده می‌گردد.

بحث

این مطالعه به منظور تعیین آلل‌ها و خصوصیات مارکر D7S2459 در جمعیت ایرانی و در اقوام مختلف آن صورت گرفته است که خود به انتخاب بهینه مارکرهای مورد استفاده در تشخیص مولکولی جهش‌های *SLC26A4* مسئول ناشنوایی به روش غیر مستقیم کمک می‌نماید و در پیشرفت روش‌های تشخیصی در جمعیت ایرانی موثر می‌باشد. هم‌چنین نتایج این مطالعه موجب تقویت اطلاعات ساختاری ژنتیکی جمعیت ایرانی و اقوام مختلف آن می‌گردد.

در مطالعهٔ حاضر از بین 8 آلل شناسایی شده مارکر D7S2459 ، آلل 5 (148 جفت باز) با فراوانی 30/61 درصد و آلل 1و 8 (140 و 154 جفت باز) با فراوانی 0/3 درصد به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین فراوانی را در جمعیت ایرانی نشان دادند (جدول شماره 2). براساس اطلاعات پایگاه داده UniSTS (UniSTS:3694) آلل‌های این مارکر دارای محدوده محصول PCR 152-140 جفت باز می‌باشند (13). مرکز Genethon فرانسه نیز برای مارکر D7S2459، مشابه با پایگاه داده UniSTS 7 آلل با طول محصول PCR در محدودهٔ 152-140 جفت باز معرفی کرده است (19). برخلاف دو گزارش قبلی، Mammalian Genotyping Service برای این مارکر 6 آلل و طول محصول PCR در محدوده 150-140 جفت باز گزارش نموده است (20). نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که علاوه بر آلل‌های گزارش شده توسط پایگاه داده UniSTS و مرکز Genethon، جمعیت ایرانی دارای آلل 154 جفت باز نیز می‌باشد که در گزارشات قبلی عنوان نشده است و به دلیل فراوانی کم‌تر از 1 درصد آن در جمعیت ایرانی، به عنوان یک واریانت نادر جدید معرفی می‌شود. به عنوان یک نتیجه‌گیری کلی آلل‌های 140 و 154 جفت باز، واریانت‌های نادر جمعیت ایرانی به حساب می‌آیند.

ژنوتیپ‌های بررسی شده از قوم فارس حاکی از حضور 6 آلل از این مارکر بود که در میان آن‌ها آلل‌های 140 و 154 حضور نداشتند. در این قوم آلل 144 با فراوانی 43/94 درصد شایع‌ترین و آلل‌های 142 و 146 با فراوانی 1/52 درصد کمیاب‌ترین آلل‌ها بودند (جدول شماره 2). قوم آذری از 8 آلل جمعیت ایرانی، هر 8 آلل را دارا بود که در میان آن‌ها آلل 150 با فراوانی 30/30 درصد شایع‌ترین و آلل‌های 140، 142 و 154 با فراوانی 1/52 درصد

کمیاب‌ترین آلل‌ها به شمار می‌آیند (جدول شماره 2). بررسی‌های انجام شده بر روی افراد قوم ترکمن نشان‌دهنده حضور 6 آلل از مارکر D7S2459 در این قوم می‌باشد. در قوم ترکمن نیز آلل 148 با فراوانی 34/85 درصد شایع‌ترین و آلل 152 با فراوانی 1/52 درصد کمیاب‌ترین آلل این قوم می‌باشند. بررسی ژنوتیپ‌های افراد این قوم حاکی از عدم حضور آلل‌های 140 و 154 بود. گیلکی‌ها نیز 6 آلل از مارکر مورد بررسی را دارا بودند که در این میان، آلل 148 با فراوانی 30/30 درصد بیشترین فراوانی را دارا بود. هم‌چنین آلل142 با فراوانی 3/03 درصد کم‌ترین درصد فراوانی را در این قوم داشت. آلل‌های 140 و 154 نیز در این قوم مشاهده نشدند. در انتها، در قوم عرب از میان 8 آلل مشاهده شده در جمعیت ایرانی آلل 148 با فراوانی 34/85 درصد شایع‌ترین و آلل 146 با فراوانی 1/52 درصد کمیاب‌ترین به شمار می‌آیند. آلل‌های 140 و 154 جمعیت ایرانی در قوم عرب دیده نشد. همان‌طور که بررسی‌ها نشان می‌دهد آلل‌های 140 و 154 تنها در قوم آذری حضور دارد و سایر اقوام مورد بررسی تنها 6 آلل دیگر را دارا می‌باشند.

درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار اقوام مورد بررسی و به طور کلی جمعیت ایرانی در جدول شماره 3 گزارش شده است. هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای مارکر D7S2459 در جمعیت ایران 70/3 درصد است که کمی کمتر از هتروزیگوسیتی مورد انتظار(76/1 درصد) می‌باشد. هتروزیگوسیتی گزارش شده توسط Genethon center و Mammalian Genotyping Service به ترتیب 76 و 77 درصد می‌باشند. در نتیجه هتروزیگوسیتی مارکر D7S2459 در جمعیت ایرانی کم‌تر از میزان دو گزارش قبلی است (18، 19). بالاترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده متعلق به قوم آذری (84/8 درصد) و پایین‌ترین متعلق به قوم فارس (51/5 درصد) بودند. یکی از مهم‌ترین دلایل پایین بودن هتروزیگوسیتی، درون زادآوری قومی است که خود منجر به افزایش هموزیگوسیتی و کاهش هتروزیگوسیتی می‌گردد.

پس از تخمین فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی داده‌ها، وجود تعادل هاردی- وینبرگ با استفاده از نرم‌افزار GenePop مورد بررسی قرار گرفت (20). فرض صفر در این آزمون مبنی بر حضور تعادل هاردی- وینبرگ در اقوام و جمعیت مورد بررسی است. در صورتی که مقدار P کوچک‌تر از 0/05 به دست آید فرضیه صفر مبنی بر وجود تعادل هاردی- وینبرگ رد می‌شود. نتایج به دست آمده از بررسی تعادل هاردی- وینبرگ در جدول شماره 4 گزارش شده است. مقدار P بزرگ‌تر از 0/05 برای مارکر D7S2459 در جمعیت ایرانی نشان دهنده حضور تعادل هاردی- وینبرگ در این جمعیت می‌باشد. مقدار p محاسبه شده برای چهار قوم عرب، آذری، ترکمن و گیلک مورد بررسی بزرگ‌تر از 0/05 هستند و در نتیجه این اقوام برای جایگاه مارکر مورد بررسی، در تعادل هاردی- وینبرگ می‌باشند. این در حالی است که مقدار p برای قوم فارس کم‌تر از 0/05 می‌باشد و در نتیجه این قوم برای جایگاه مارکر D7S2459 در تعادل هاردی- وینبرگ نمی‌باشد.

فاکتور ظرفیت اطلاعاتی چند شکلی(PIC) یک فاکتور محاسباتی برای تعیین اطلاع‌دهندگی مارکرها به منظور استفاده در آنالیز پیوستگی می‌باشد. این فاکتور برای جایگاه مارکرهای دارای تعادل هاردی- وینبرگ در جمعیت تعریف می‌شود و به تعداد و فراوانی آلل‌ها و هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت وابسته است. مقدار PIC بالاتر از 0/7 نشان‌دهنده اطلاع‌دهندگی شدید (Highly Informative) مارکر در آنالیز پیوستگی برای ژن متصل به آن است. هنگامی که مقدار آن مابین 0/44 و 0/7 باشد، مارکر از اطلاع دهندگی متوسط (Moderately Informative) برخوردار است و اگر کمتر از 0/44 باشد، مارکر اطلاع دهنده‌ای ضعیف به شمار می‌آید (12). در این مطالعه مقدار PIC تنها برای چهار قوم در تعادل دارای اعتبار می‌باشد و نمی‌توان مقدار PIC قوم فارس را تحلیل نمود. در نتیجه مقدار PIC محاسبه شده برای جمعیت ایرانی را به قوم فارس نیز تعمیم می‌دهیم. مقدار PIC چهار قوم آذری، ترکمن، گیلک و عرب بالاتر

از 0/7 است و بنابر این مارکر D7S2459 برای این چهار قوم دارای اطلاع‌دهندگی شدید (Highly Informative) می‌باشد. مقدار PIC کلیه اقوام جمعیت ایرانی (مقدار PIC = 0/718) بالاتر از 0/7 است و در نتیجه می‌توان در مجموع این مارکر را برای جمعیت ایرانی یک مارکر با اطلاع‌دهندگی شدید برای بررسی جهش‌های ژن *SLC26A4* به روش آنالیز پیوستگی دانست. به دلیل این که قوم فارس به‌تنهایی در تعادل هاردی- وینبرگ نبود، با توجه به مقدار PIC جمعیت ایرانی که اطلاعات ژنوتیپی افراد قوم فارس نیز در محاسبات دخالت داده شده است، نتیجه می‌گیریم که مارکر D7S2459 در قوم فارس نیز برای آنالیز پیوستگی به شدت اطلاع‌دهنده می‌باشد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان می‌دهد که مارکر D7S2459 دارای اطلاع دهندگی شدید در تشخیص‌های مولکولی ناشنوایی غیرسندرمیک وابسته به *SLC26A4* با توارث اتوزومی مغلوب به روش آنالیز پیوستگی در جمعیت ایرانی می‌باشد و نسبت به سایر جمعیت‌ها دارای ارزشمندی بیشتری نیز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد جهت تأمین بودجه (شماره گرانت 1045) و از کلیه کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی شهرکرد تشکر و قدردانی می‌گردد. متذکر شده که این مقاله منتج از پایان نامه کد 151 می‌باشد.

منابع

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. American Journal of Medical Genetics. 2005;46(5):486-491.
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. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. 2008;72(9):1301-1309.
3. Hilgert N, Smith RJH, Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 2009;681(2):189-196.
4. Hone SW, Smith RJH. Genetic screening for hearing loss. Clinical Otolaryngology & Allied Sciences. 2003;28(4):285-290.
5. Smith RJH, Robin NH. Genetic testing for deafness GJB2 and SLC26A4 as causes of deafness. Journal of Communication Disorders. 2002;35(4):367-377.
6. Tabatabaiefar MA, Alasti F, Zohour MM, Shariati L, Farrokhi E, Farhud DD, et al. Genetic linkage analysis of 15 DFNB loci in a group of Iranian families with autosomal recessive hearing loss. Iranian Journal of Public Health. 2011;40(2):34-48.
7. Zhao H, Pfeiffer R, Gail MH. Haplotype analysis in population genetics and association studies. Pharmacogenomics. 2003;4(2):171-178.
8. Rabionet R, Zelante L, Lopez-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. Human Genetics. 2000;106(1):40-44.
9. Everett LA, Morsli H, Wu DK, Green ED. Expression pattern of the mouse ortholog of the Pendred's syndrome gene (Pds) suggests a key role for pendrin in the inner ear. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1999;96(17):9727-32.
10. 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.

International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2012;76(6):845-850.
11. Gibbs RA, Belmont JW, Hardenbol P, Willis TD, Yu F, Yang H, et al. The international HapMap project. Nature. 2003;426(6968):789-96.
12. Elahi E, Kumm J, Ronaghi M. Global genetic analysis. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 2004;37(1):11-27.
13. Hildebrand CE, David C ,Torney WRP, Wagner P. Informativeness of polymorphic DNA markers. Los Alamos Science. 1992;20(20):100-102.
14. UniSTS Database [database on the Internet]. [cited. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists/.]
15. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2) :population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of heredity. 1995;86(3):248-9.
16. Weir BS. Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data. Sinauer associates, Inc; 1996.
17. Engels WR. Exact tests for Hardy-Weinberg proportions. Genetics. 2009;183(76):1431-1441.
18. Park SDE. Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. Ph D thesis, University of Dublin. 2001.
19. Genethon Center [database on the Internet]. [cited .Available from: http://www.genethon.fr/.]
20. Mammalian Genotyping Service [database on the Internet]. [cited. Available from: http://research.marshfieldclinic.org/genetics/home/index.asp.]
21. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics. 1992;48(2):361-372.