

## بررسی فراوانی آللی و ژنوتیپی نشانگر rs67992843 واقع در ناحیه ژنی *SMPDI* مرتبط با بیماری نیمن پیک در جمعیت اصفهان

نسیم ابراهیمی<sup>۱</sup>، صادق ولیان بروجنی<sup>۱\*</sup>

(۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۲۳

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۵

### چکیده

**مقدمه:** بیماری نیمن پیک (NPD) Niemann-Pick Disease یک بیماری ذخیره ی لیپیدی با وراثت اتوزومی مغلوب است. این بیماری اساساً به دلیل نقص در ژن *SMPDI* (11p15.4) که رمزکننده ی آنزیم اسید اسفنگو میلیناز Acid sphingomyelinase (ASM) می باشد، بروز می یابد. نقص در این آنزیم منجر به تجمع اسفنگو میلین در مغز و کبد می شود، که نتیجه ی آن اختلال در عملکرد یا آسیب این دو بافت است. نشانگر های چندشکلی مانند چند شکلی های تک نوکلئوتیدی (SNP) Single Nucleotide Polymorphism در تشخیص مولکولی بیماری های ژنتیکی از طریق بررسی پیوستگی یا نقشه یابی همو زیگوسیتی استفاده می شوند. فراوانی آللی و درجه ی هترو زیگوسیتی یک نشانگر معمولاً وابسته به جمعیت است. هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی آللی و درجه ی هترو زیگوسیتی نشانگر rs67992843 واقع در ناحیه ژن *SMPDI* در جمعیت ایرانی بود. این نشانگر از نوع SNP بوده و دارای دو آلل C/G می باشد.

**مواد و روش ها:** تعداد ۱۱۳ فرد سالم غیر خویشاوند برای انجام این مطالعه انتخاب گردیدند. نشانگر rs67992843 با استفاده از تکنیک ARMS PCR و طراحی پرایمر های جدید بر اساس این تکنیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار تحت وب Genepop و نرم افزار Powermarker جهت تعیین فراوانی آللی و هترو زیگوسیتی، وجود تعادل هاردی-واینبرگ و محتوای اطلاعاتی چند شکلی (PIC) Polymorphic Information Content، تحت آنالیز های آماری قرار گرفتند.

**یافته های پژوهش:** آنالیز اطلاعات به دست آمده نشان داد که در جمعیت ایرانی فراوانی آلل مغلوب این نشانگر (آلل C) برابر ۳۱/۴۲٪ می باشد. هم چنین درجه ی هترو زیگوسیتی و PIC این نشانگر به ترتیب ۳۹/۸۲٪ و ۰/۳۳۸ محاسبه گردید. **بحث و نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که می توان از نشانگر rs67992843 برای آنالیز پیوستگی و تشخیص مولکولی ژن *SMPDI* در ارتباط با بیماری NPD استفاده نمود.

**واژه های کلیدی:** چند شکلی تک نوکلئوتیدی، بیماری نیمن پیک، *ASM*، *SMPDI*، جمعیت ایرانی

\* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

Email: svallian@sci.ui.ac.ir

Copyright © 2017 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

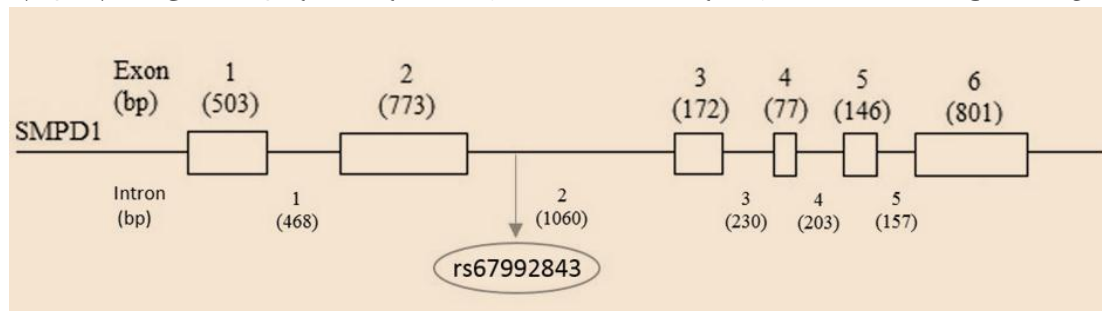
## مقدمه

بیماری نیمین پیک (NPD) به گروهی هتروژن از بیماری های ذخیره ای لیزوزومی اطلاق می شود که دارای وراثت اتوزومی مغلوب بوده و سبب متابولیسم غیر طبیعی لیپیدها می گردد (۱-۳). این بیماری دارای چندین تیپ مختلف بوده که در دو گروه تقسیم بندی می شوند (۴). گروه اول دارای کمبود کامل یا جزئی آنزیم اسید اسفنگو میلیناز ( Acid sphingomyelinase (ASM) می باشند و افرادی که در این گروه قرار می گیرند به تیپ A یا B این بیماری مبتلا هستند. کمبود آنزیم ASM در تیپ A بیماری شدید تر است (۵٪ افراد سالم)، این در حالی است که بیماران تیپ B، دارای سطح بالا تری از این آنزیم می باشند (۶۰-۱۰٪ افراد سالم) (۵). تیپ A بیماری NPD، فرم حاد و عصبی بیماری است. علائم این تیپ اندکی بعد از تولد ظاهر می شود که می توان به هپاتو اسپلنو مگالی، زوال عصبی و هایپو تونیای شدید اشاره کرد. احتمال تشخیص لکه ی قرمز آلبالویی در بررسی های فیزیولوژیکی نیز وجود دارد. در ادامه با اضافه شدن آسیب های نورو لوژیکی، در نهایت مرگ نوزاد در سه سال اول زندگی اتفاق می افتد. این در حالی است که تیپ B این بیماری، فرم خفیف تر و غیرعصبی بیماری NPD می باشد. علائم این تیپ ممکن است در نوزادی، کودکی و یا بزرگ سالی بروز یابد. هر چند علامت مشخص این تیپ اسپلنو مگالی و هپاتو اسپلنو مگالی می باشد، اما علائم دیگری از جمله ناراحتی های ریوی، تغییرات چشمی و سر درد نیز در افراد مبتلا گزارش شده است (۶، ۴، ۲). گروه دوم دارای جهش در یکی از دو ژن رمز کننده پروتئین های درگیر در انتقال کلسترول به نام های NPC1 و NPC2 هستند که این امر سبب تجمع درون سلولی کلسترول می گردد (۳). افراد مبتلا به تیپ C و D بیماری NPD، در این گروه قرار می گیرند (۷). اطلاعات محدودی در مورد میزان بروز و فراوانی بیماری NPD در جمعیت های مختلف وجود دارد. تیپ A بیماری در میان یهودیان اشکنازی رایج تر است و در این جمعیت نرخ بروز NPD، ۲ تا ۳ مبتلا در هر ۱۰۰۰۰ نفر است. تیپ B بیماری اغلب در آمریکای شمالی و اروپای غربی رایج است (۷، ۳).

در کل گزارش شده که شیوع این بیماری ۱ نفر در هر ۱۵۰۰۰۰ تولد زنده است (۲).

جهش در ژن اسفنگو میلین فسفو دی استراز ( Sphingomyelin Phospho Diesterase 1 ) (*SMPDI*) که رمزکننده ی آنزیم ASM است، سبب NPD تیپ A و B می گردد. این ژن در ناحیه کروموزومی 11p15.4 واقع شده است (۷) و اندازه آن ۴۵۸۵ جفت باز بوده و دارای ۶ اگزون و ۹۴۱ پلی - مورفیسیم تک نوکلئوتید (Single nucleotide polymorphism, SNP) می باشد (۱). آنزیم ASM که محصول این ژن است دارای ۶۲۹ اسید آمینه بوده و نقش آن برش هیدرو لیتیک اسفنگو میلین و تبدیل آن به فسفو کولین و سرآمید می باشد (۷، ۳). تاکنون بیش از ۱۲۰ موتاسیون مختلف در ژن *SMPDI* گزارش شده است که سبب NPD تیپ A و B می گردند. این موتاسیون ها شامل هر گونه تغییر و تبدیل از جمله جهش های نقطه ای (بد معنی و بی معنی)، حذف های کوچک و اختلالات پیرایش هستند (۷). با توجه به تعداد بالای جهش های مرتبط با ژن *SMPDI* و بروز بیماری نیمین پیک، بر هزینه و وقت گیر بودن بررسی مستقیم جهش ها و نا مشخص بودن طیف جهش های شایع ایرانی، بررسی نشانگر های چند شکلی در آنالیز پیوستگی می تواند راه مناسبی جهت بررسی مولکولی بیماری در جمعیت ارائه نماید. این نشانگر ها بر حسب این که در داخل و یا خارج ژن واقع شده باشند و با توجه به درجه هترو زیگوسیتی آن ها، دارای ارزش تشخیصی متفاوتی هستند (۸). نشانگر های چند شکلی از لحاظ فراوانی آللی و درجه هترو زیگوسیتی، وابسته به جمعیت می باشند (۹). بنا بر این قبل از استفاده از نشانگر ها در تشخیص مولکولی بیماری های ژنتیکی، لازم است فراوانی آللی و درجه هترو زیگوسیتی آن ها در جمعیت مورد مطالعه بررسی شود (۸). معرفی نشانگر های گویا می تواند در مطالعه مولکولی بیماری نیمین پیک با روش غیر مستقیم در جمعیت ایرانی کمک موثری نماید. در روش غیر مستقیم مجموعه ای از چند شکلی های ژنومی به عنوان نشانگرهای ژنتیکی، برای تعیین ارتباط یک ناحیه ی ژنومی خاص با بیماری مورد نظر به کار می روند (۹). چند شکلی های تک

همین دلیل به منظور غربالگری بهینه ی جهش ها با روش غیرمستقیم، نشانگر های مورد استفاده در هر جمعیت باید به طور اختصاصی مورد بررسی قرار گیرند و نشانگر های آگاهی دهنده در آن جمعیت به طور جداگانه معرفی گردند (۹). تا کنون در جمعیت ایران مطالعه ای جهت بررسی نشانگرهای آگاهی دهنده ی مرتبط با ژن *SMPD1* انجام نگرفته است. بنا بر این در این مطالعه ویژگی های نشانگر rs67992843 در جمعیت اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. این نشانگر از نوع SNP بوده که در ناحیه ی اینترون ۲ این ژن قرار گرفته است و دارای دو آلل G/C می باشد (شکل ۱).



شکل ۱- شمایی از ژن *SMPD1* به همراه موقعیت نسبی اگزون ها و اینترون های این ژن و جایگاه نشانگر rs67992843 که در ناحیه ی اینترون ۲ این ژن قرار گرفته است.

روی لوله ها، جهت انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شدند. با استفاده از روش رسوب نمکی میلر، استخراج DNA از نمونه های خون افراد انجام گرفت (۱۲). ارزیابی کمی میزان DNA با استفاده از دستگاه اسپکترو فتومتر انجام شد.

**بررسی های بیوانفورماتیک:** با استفاده از پایگاه-های داده ای نظیر: HapMap, Ensembl, NCBI و SNPper ناحیه ی ژنی *SMPD1* از نظر بیوانفورماتیک مورد بررسی قرار گرفت (۱۳, ۱۴). پس از بررسی نشانگر های تک نوکلئوتیدی ناحیه ی ژنی *SMPD1*، در نهایت نشانگر rs67992843 بر اساس معیار هایی نظیر: بالا بودن فراوانی آللی و درجه ی هترو زیگوسیتی و قرار گرفتن در بلوک های هاپلو تایپی که در پایگا های داده ذکر شده در بالا به آن اشاره شده بود، انتخاب گردید.

**طراحی پرایمر و تعیین ژنوتیپ:** تعیین ژنوتیپ نمونه ها با استفاده از تکنیک ARMS PCR

نوکلئوتیدی (single nucleotide polymorphism, SNP) از جمله نشانگرهای مورد استفاده در روش غیر مستقیم می باشد. این نشانگر ها به دلیل داشتن ویژگی هایی مانند فراوانی بالا و پایداری بیشتر در جمعیت، به عنوان نشانگر های برگزیده در مطالعات آنالیز پیوستگی، جایگزین سایر نشانگر ها از جمله (STR) Variable Number Short Tandem Repeat و Tandem Repeat (VNTR) شده اند (۱۰). همان طوری که گفته شد از آن جایی که در بیش تر مواقع جمعیت های مختلف از نظر نوع و هم چنین فراوانی جهش های شایع بیماری زا با یکدیگر متفاوت اند، به

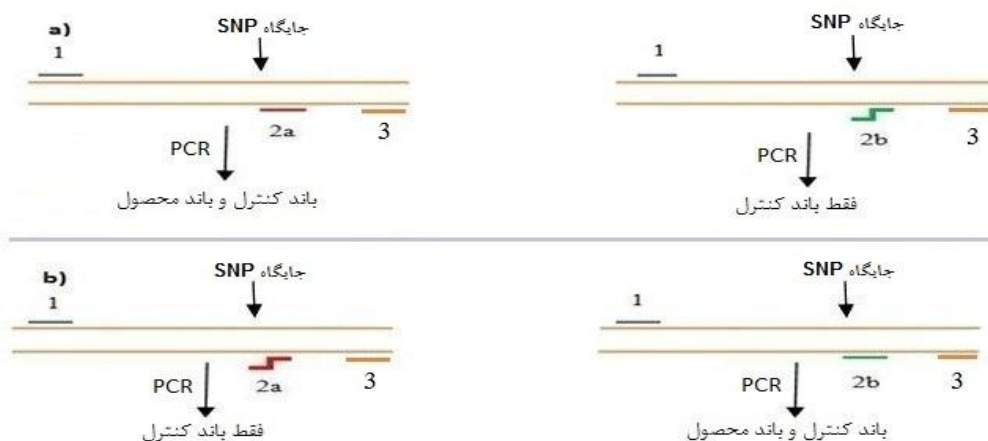
نتایج حاصل از این مطالعه از یک سو می تواند با مشخص نموده این نشانگر به عنوان یک نشانگر آگاهی دهنده، جهت تشخیص مولکولی بیماری نیم پیک در جمعیت ایران کمک نماید و از سوی دیگر در ایجاد بانک اطلاعاتی نشانگر های ژنی جمعیت ایرانی مورد استفاده قرار گیرد.

### مواد و روش ها:

**نمونه گیری و استخراج DNA:** با توجه به این که در مطالعات مربوط به عدم تعادل پیوستگی نمونه ای به اندازه حداقل ۱۰۰ فرد غیر خویشاوند ضروری است (۱۱) لذا در این مطالعه تجربی، برای افزایش صحت آنالیز های آماری تعداد ۱۱۳ فرد سالم و غیر خویشاوند انتخاب گردید. پس از کسب رضایت نامه از افراد شرکت کننده و تایید کمیته ی اخلاقی دانشگاه اصفهان، ۱۰ میلی لیتر از خون هر فرد در لوله ی آزمایش حاوی ۱ میلی لیتر EDTA با غلظت ۰/۵ مولار جمع آوری شد و پس از ثبت مشخصات افراد بر

دو واکنش PCR مجزا انجام می گیرد که تفاوت آن ها در وجود پرایمر آلل ۱ در یک ویال و وجود پرایمر آلل ۲ در ویال دیگر است (شکل ۲) (۱۶، ۱۵).

(amplification refractory mutation system PCR) انجام شد. این تکنیک امکان آنالیز تنوعات SNP را به روشی سریع، ساده، کم هزینه و با کارایی بالا فراهم می کند. در این تکنیک به طور معمول سه پرایمر استفاده می شود. برای نمونه ی DNA هر فرد



شکل ۲- شمایی ساده از نحوه انجام تکنیک ARMS PCR. در این تکنیک برای هر نمونه DNA دو واکنش PCR انجام می گیرد. در صورتی که فرد هترو زیگوت باشد هر دو واکنش منجر به تولید محصول خواهد شده و در صورتی که فرد همو زیگوت باشد فقط یکی از محصولات آللی قابل رویت خواهد بود. پرایمر ۳ به منظور تولید باند کنترل با پرایمر ۱ مورد استفاده قرار می گیرد.

های پیشنهادی در نرم افزار Oligo v7 وارد و از نظر ویژگی هایی نظیر: اتصال پرایمر ها به جایگاه غیر اختصاصی، تشکیل داپلکس بین پرایمر ها و تشکیل ساختار سنجاق سری درون پرایمری، مورد بررسی قرار گرفتند و در صورت نیاز تغییرات لازم در آن ها اعمال شد (جدول ۱).

طراحی پرایمر های مورد نظر در این مطالعه با استفاده از نرم افزار Primer1 انجام شد (۱۷، ۱۸). با اعمال تنظیمات مورد نظر در این نرم افزار و مشخص کردن پارامتر هایی مانند دمای بهینه اتصال پرایمر ها، حداقل و حداکثر طول پرایمر ها، درصد GC موجود در پرایمرها و چندین متغیر دیگر، پرایمرهای مناسب توسط این نرم افزار پیشنهاد گردیدند. سپس پرایمر

جدول ۱- توالی پرایمر های طراحی شده برای تکنیک ARMS PCR. محصول پرایمر های FO-RO به عنوان کنترل بوده و نشان دهنده ی انجام واکنش PCR می باشد. پرایمر های RN.G و RN.C جهت تکثیر اختصاصی آل های این نشانگر طراحی شده اند.

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	طول محصول (جفت باز)
Forward outer (FO)	5'- CTTCATTGAGGGCAACCACTCCT-3'	427 (FO-RO)
Reverse outer (RO)	5'- AGGGAGGGCCAGGAGCAGTA-3'	427 (FO-RO)
Reverse inner G (RN.G)	5'- AAAAGCCTGGTGCGGCAATAC-3'	273 (FO-RN.G)
Reverse inner C (RN.C)	5'- AAAAAGCCTGGTGCGGCAATAG-3'	273 (FO-RN.C)

از بهینه کردن واکنش ARMS PCR از نظر دمای مناسب اتصال پرایمر ها، غلظت مناسب  $MgCl_2$  و dNTP و هم چنین غلظت مناسب پرایمر ها، واکنش PCR بهینه شده در حجم ۲۵ میکرو لیتر که شامل ۱ میکرو لیتر DNA (۱۰۰ ng/μl)، ۰/۷۵ میکرو لیتر پرایمر FO، ۰/۵ میکرو لیتر پرایمر RO، ۱ میکرو لیتر

تکثیر پرایمر ها به این صورت بود که پرایمر های خارجی (forward outer) و برگشت خارجی (reverse outer) باعث تکثیر باند کنترل، پرایمر های خارجی و برگشت داخلی G (reverse inner G) باعث تکثیر آلل C، و رفت خارجی و برگشت داخلی C (reverse inner C) باعث تکثیر آلل G می شدند. پس

10X PCR buffer ۲/۵ میکرو لیتر taq (5unit/μl)، در نهایت ۱۷/۸ میکرو لیتر ddH<sub>2</sub>O بود، انجام گرفت. جهت انجام PCR از دستگاه ترمو سایکلر (مدل Eppendorf آلمان) طبق شرایط جدول ۲ استفاده شد.

پرایمر RN.C (ویال ۱)، ۱ میکرو لیتر پرایمر RN.G (ویال ۲) (غلظت تمام پرایمر ها ۱۰ پیکو مول بر میکرو لیتر)، ۰/۷۵ میکرو لیتر MgCl<sub>2</sub> ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرو لیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۰/۲ میکرو لیتر

جدول ۲- شرایط دمایی انجام واکنش ARMS PCR در دستگاه ترمو سایکلر (Eppendorf آلمان)

مرحله	دما (°C)	زمان (دقیقه)	تکرار
۱	۹۴	۳	۱
۲	۹۴	۱	۱
۳	۵۷	۱	۳۵
۴	۷۲	۱	۱
۵	۷۲	۵	۱

### یافته های پژوهش:

در این مطالعه نشانگر rs67992843 با استفاده از تکنیک ARMS PCR و پرایمر های طراحی شده جدید در نمونه ای از جمعیت ایرانی ژنوتیپ شد. با توجه به ژنوتیپ افراد، سه الگوی متفاوت مشاهده می شود که در شکل ۳ نمونه ای از آن نشان داده شده است.

پس از تعیین فراوانی آلی و ژنوتیپی داده ها، برقراری تعادل هاردی-واینبرگ (Hardy-Weinberg equilibrium) برای این نشانگر با استفاده از نرم افزار Genepop محاسبه شد (۲۲). مقدار p توسط این نرم افزار ۰/۳۹۳۴ محاسبه گردید که بزرگ تر بودن این عدد از ۰/۰۵، نشان دهنده ی برقراری تعادل برای این نشانگر در جمعیت مورد مطالعه است. فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار نیز با استفاده از این نرم افزار محاسبه گردید که در جدول ۳ با جزئیات نشان داده شده اند.

الکتروفورز محصولات PCR نیز بر روی ژل آگارز ۲ درصد و ولتاژ ۱۰۰ ولت، به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. پس از الکتروفورز، ژل توسط اتیدیوم بروماید رنگ-آمیزی گردید و با استفاده از دستگاه Gel documentation (Biometra) ژنوتیپ افراد آشکار سازی شد (شکل ۲). با توجه به ژنوتیپ افراد سه الگوی مختلف در ژل قابل مشاهده است که در شکل ۳ این سه الگو نشان داده شده اند.

### تحلیل آماری:

در نهایت آنالیز های آماری بر روی نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ افراد مورد آزمایش که شامل تخمین فراوانی آلی و درجه ی هترو زیگوسیتی، فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار، تعادل هاردی-واینبرگ و هم چنین محاسبه ی شاخص آگاهی دهندگی چند شکلی (Polymorphic Information Content) بود، با استفاده از نرم افزار های Powermarker و Genepop انجام شد (۲۱-۱۹).

جدول ۳- فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار برای نشانگر rs67992843.

	ژنوتیپ ها		
	GG	GC	CC
فراوانی مشاهده شده	۵۵ (%۵۵/۷)	۴۵ (%۳۹/۸)	۱۳ (%۱۱/۵)
فراوانی مورد انتظار	۵۲/۰۴ (%۴۶/۹۴)	۴۸/۹۱ (%۴۳/۲۸)	۱۱/۰۵ (%۹/۷۸)

فراوانی آلی مشاهده شده برای آلل های G و C نیز به ترتیب ۶۸/۵۸ % و ۳۱/۴۲ % محاسبه شد.

بر اساس اطلاعات این جدول، درصد فراوانی همو زیگوسیتی و هترو زیگوسیتی مشاهده شده به ترتیب ۶۰/۱۸ % و ۳۹/۸۲ % به دست آمد. هم چنین درصد

مورد مقایسه قرار گرفت که در جدول ۴ آورده شده اند (۲۳). در این جدول درصد فراوانی آلل C و هم چنین فراوانی هترو زیگوسیتی این نشانگر در تعدادی از جمعیت ها آورده شده‌اند.

پس از تعیین فراوانی آللی و درجه ی هترو زیگوسیتی نشانگر مزبور، اطلاعات به دست آمده در این مطالعه با نتایج گزارش شده از این نشانگر در تعدادی از جمعیت های دیگر جهان با استفاده از پایگاه داده Ensembl

جدول ۴- مقایسه ی درصد فراوانی آلل C و هترو زیگوسیتی مارکر rs67992843 در تعدادی از جمعیت های جهان

جمعیت	درصد فراوانی آلل C	فراوانی هترو زیگوسیتی
امریکا	۹/۷	۱۵/۹
قبیله لویا کنیا	۳۳/۳	۳۸/۴
کلمبیا	۱۳/۸	۲۳/۴
ایران(مطالعه حاضر)	۳۱/۴۲	۳۹/۸
فنلاند	۹/۶	۱۷/۲
بریتانیا	۱۱/۵	۲۰/۹
بنگلادش	۱۲/۸	۲۵/۳
هندی های ساکن انگلیس	۲۱/۶	۳۵/۳

rs67992843 به عنوان یک نشانگر تک نوکلئوتیدی در جمعیت اصفهان می باشد.

#### بحث و نتیجه گیری:

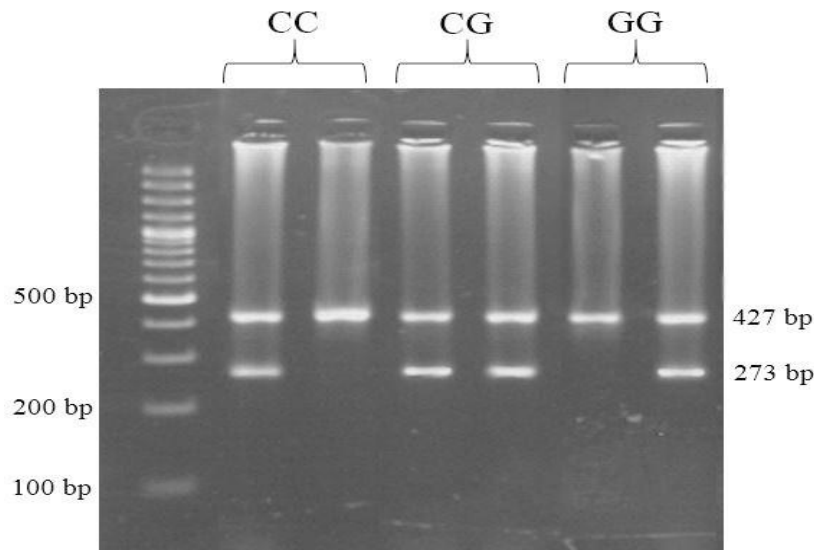
چالش مهمی که در تشخیص مولکولی بیماری های ژنتیکی وجود دارد در درجه ی اول شناسایی ژن عامل بیماری (در مورد بیماری های هتروژن) و در درجه ی دوم شناسایی جهش مسئول بیماری می باشد (۲۴). با توجه به تعداد زیاد جهش های مرتبط با ژن *SMPDI* و بیماری نیمن پیک، شناسایی جهشی که باعث این بیماری می شود با روش مستقیم بسیار پر هزینه و زمان بر خواهد بود. با توجه به دلایل ذکر شده استفاده از روش غیر مستقیم و استفاده از نشانگر های چند شکلی به عنوان راه حل جایگزین پیشنهاد می گردد. تا به امروز در رابطه با بیماری نیمن پیک و نیز جهش های بیماری زای ژن *SMPDI* در ایران مطالعات محدودی انجام گرفته است. از جمله ی این مطالعات می توان به مطالعه ی معتمدی و همکاران در سال ۲۰۰۵ اشاره کرد که یک مورد NPD تیپ B گزارش کرده و دوره بالینی بیمار را توصیف نمودند (۲۵). معتمد و همکاران در سال ۲۰۱۱ یک مطالعه ۱۰ ساله بر روی بیوپسی کبد در مرکز پزشکی کودکان تهران انجام دادند. آن ها تعداد زیادی بیمار با نا هنجاری های ذخیره ای شناسایی کردند که بیش تر این بیماران به

با توجه به اطلاعات ارائه شده در این جدول، جمعیت مطالعه شده در کنیا دارای بیش ترین فراوانی آلل C و جمعیت فنلاند دارای کم ترین فراوانی آلل C می باشند.

معیاری که بر اساس آن گویا بودن یا نبودن یک نشانگر جهت مطالعات آنالیز پیوستگی و تشخیص مولکولی بیماری ها استفاده می گردد، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) نام دارد. مقدار PIC بزرگ تر از ۰/۲۵ نشان دهنده ی آگاهی دهنده بودن نشانگر بوده و بدین معنی است که می توان از آن نشانگر جهت انجام آنالیز های پیوستگی در آن جمعیت استفاده نمود (۲۴). جهت تخمین مقدار PIC در جمعیت مورد مطالعه از نرم افزار Powermarker استفاده شد. همان طور که اشاره شد، PIC جهت تعیین آگاهی دهنده گی یک نشانگر در مطالعات آنالیز پیوستگی مورد استفاده قرار می گیرد. این فاکتور برای نشانگر هایی که در جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی- واینبرگ قرار دارند، تعریف می شود. این فاکتور به درجه ی هترو زیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت و هم چنین فراوانی آلل ها وابسته است (۲۴). پس از وارد نمودن اطلاعات ژنوتیپ افراد به نرم افزار فوق الذکر بر اساس فرمت خواسته شده و انجام آنالیز های مورد نیاز در نهایت مقدار  $PIC = 0/338$  محاسبه گردید. این مقدار PIC، نشان دهنده ی اطلاع دهنده گی بالای نشانگر

سری نشانگر ژنتیکی از جمله rs72896270، rs1542705، rs7128818، rs11040859، rs11601088، rs74053351، rs72896270، rs1050239 در جمعیت مردم شیلی بررسی کردند و متوجه شدند که این جهش فعالیت آنزیم ASM را حدود ۹۵٪ کاهش می دهد و سبب NPD تیپ B می گردد (۲). در این پژوهش پس از مطالعه نشانگر های تک نوکلئوتیدی ناحیه ی ژنی *SMPDI*، در نهایت نشانگر rs67992834 که در ناحیه ی ایترونی این ژن قرار گرفته و دارای دو آلل G/C می باشد به منظور مطالعه در جمعیت ایران انتخاب شد (شکل ۳).

NPD مبتلا بودند (۲۶). گله داری و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲، حذف یک گوانین در اگزون ۲ ژن *SMPDI* را گزارش کردند که سبب NPD تیپ A می شود (۲). هم چنین از جمله مطالعاتی که در دنیا جهت شناسایی تنوعات SNP بیماری زای ژن *SMPDI* صورت گرفته می توان به مطالعه ی رین اشاره کرد. رین و همکارانش در سال ۲۰۱۵، چهار SNP را بررسی کردند و متوجه شدند که از بین این چهار SNP، فقط یکی از آن ها (c.973C>G)، سبب فقدان عملکرد آنزیم ASM می گردد و سه SNP دیگر فعالیت ASM را حدود ۵ برابر افزایش می دهند (۲۷). آکونا و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵، فراوانی و خصوصیات ژنتیکی جهش p.Ala359Asp را با یک



شکل ۳- نمونه ای از نتیجه ی تعیین ژنوتیپ سه فرد بر روی ژل الکتروفورز ۲ درصد بر اساس روش ARMS PCR.

دهنده ی آگاهی دهنده بودن نشانگر بوده و بدین معنی است که می توان از آن نشانگر جهت انجام آنالیز های پیوستگی در آن جمعیت استفاده نمود. جهت تخمین مقدار PIC در جمعیت مورد مطالعه از نرم افزار Powermarker استفاده شد. همان طوری که اشاره شد، جهت تعیین آگاهی دهنده گی یک نشانگر در مطالعات آنالیز پیوستگی مورد استفاده قرار می گیرد. این فاکتور برای نشانگر هایی که در جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی- واینبرگ قرار دارند، تعریف می شود. این فاکتور به درجه ی هترو زیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت و همچنین فراوانی آلل ها وابسته است (۲۳) و از آن جا که میزان PIC این نشانگر بیشتر

پس از مطالعه ی این نشانگر در جمعیت اصفهان، فراوانی آلل های G و C به ترتیب ۶۸/۵۸٪ و ۳۱/۴۲٪ محاسبه شد. نتایج حاصل از این مطالعه از یک سو می تواند با مشخص نمودن این نشانگر به عنوان یک نشانگر آگاهی دهنده، جهت تشخیص مولکولی بیماری نیمن پیک در جمعیت ایران کمک نماید و از سوی دیگر در ایجاد بانک اطلاعاتی نشانگر های ژنی جمعیت ایرانی مورد استفاده قرار گیرد. معیاری که بر اساس آن گویا بودن یا نبودن یک نشانگر جهت مطالعات آنالیز پیوستگی و تشخیص مولکولی بیماری ها استفاده می گردد، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) نام دارد. مقدار PIC بزرگ تر از ۰/۲۵ نشان -

جمله‌ی این محدودیت‌ها می‌توان به غیر قابل استفاده بودن آن در خانواده‌هایی اشاره کرد که در آن‌ها بیماری فرد به دلیل جهش جدید است و یا هیچ سابقه‌ی خانوادگی برای بیماری در خانواده وجود نداشته باشد (۲۳). با توجه به تجربیات به دست آمده از مطالعه حاضر، موارد زیر برای تحقیقات آینده پیشنهاد می‌شود: (۱) بررسی هاپلو تایپ‌های به دست آمده از مطالعه حاضر در دو گروه افراد سالم و افراد بیمار و مقایسه نتایج حاصل با یکدیگر (۲) تخمین فراوانی آللی، درجه هترو زیگوسیتی و عدم تعادل پیوستگی بین مارکرهای بررسی شده در مطالعه حاضر در نواحی مختلف ایران به تفکیک موقعیت جغرافیایی و قومی - نژادی (۳) تخمین فراوانی آللی و درجه هترو زیگوسیتی سایر چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی ناحیه ژنی *SMPD1* در جمعیت ایران (۴) بررسی عدم تعادل پیوستگی بین سایر چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی ناحیه ژنی *SMPD1* با استفاده از تعداد نمونه بیشتر در جمعیت ایران (۵) تعیین هاپلو تایپ‌های گویای سایر چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی ناحیه ژنی *SMPD1* در جمعیت ایران. در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، می‌توان نشانگر rs67992843 که در ناحیه‌ی اینترونی ژن *SMPD1* قرار گرفته است را به عنوان نشانگری گویا در تشخیص‌های مولکولی بیماری نیمین پیک به روش غیر مستقیم و از طریق مطالعات پیوستگی در جمعیت اصفهان معرفی نمود. هم‌چنین می‌توان از اطلاعات حاصل از این مطالعه در کامل نمودن نقشه‌ی ژنتیکی جمعیت ایران و شناخت بهتر ویژگی‌های جمعیتی آن و هم‌چنین شباهت‌ها و تفاوت‌های آن با سایر جمعیت‌های جهان استفاده نمود.

از ۰/۲۵ است بنا بر این به عنوان یک نشانگر آکاهی دهنده در جمعیت اصفهان معرفی می‌شود. هم‌چنین، نتایج به دست آمده در این مطالعه با نتایج گزارش شده در دیگر جمعیت‌های جهان مورد مقایسه قرار گرفت. نکته‌ی قابل توجه در این مقایسه این بود که در تعدادی از جمعیت‌های جنوب شرق آسیا از جمله ژاپن و ویتنام فراوانی این آلل صفر درصد گزارش شده است و فقط آلل غالب وجود دارد. بعد از جمعیت شرق آسیا کمترین فراوانی آلل مغلوب مربوط به جمعیت فنلاند (۹/۶٪) و بعد از آن آمریکا (۹/۷٪) و سپس بریتانیا (۱۱/۵٪) است. بیشترین فراوانی آلل مغلوب در جمعیت قبیله لویا کنیا (۳۳/۳٪) مشاهده گردیده است. در مطالعه حاضر آلل مغلوب جایگاه دوم را از جهت فراوانی در بین جمعیت‌های بررسی شده جهان دارد و بعد از جمعیت کنیا دارای بیشترین فراوانی می‌باشد (۱۸). از جمله مزیت‌های بررسی نشانگرهای چند شکلی به روش غیر مستقیم این است که، با توجه به تعداد بالای جهش‌های مرتبط با ژن *SMPD1*، پرهزینه و وقت‌گیر بودن بررسی مستقیم جهش‌ها و هم‌چنین نامشخص بودن طیف جهش‌های شایع این ژن در جمعیت ایرانی، بررسی نشانگرهای چند شکلی به روش غیر مستقیم و با استفاده از آنالیز پیوستگی توسط پلی مورفیسم‌های متصل به ژن می‌تواند روش مناسبی جهت بررسی مولکولی بیماری در جمعیت ارائه نماید. علاوه بر این، با کامل شدن نقشه‌ی ژنتیکی و بلوک‌های هاپلو تایپی رایج در جمعیت ایران، می‌توان از آن‌ها برای شناسایی جهش‌های رایج و اختصاصی مرتبط با بروز بیماری‌ها یا مستعد کننده ابتلا به بیماری در این جمعیت، استفاده نمود. با این وجود روش غیر مستقیم نیز دارای محدودیت‌هایی می‌باشد که از

## References

- Schuchman EH, Wasserstein MP. Types A and B Niemann pick disease. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab2015;29:237-47.
- Acuña M, Martínez P, Moraga C, He X, Moraga M, Hunter B, et al. Epidemiological, clinical and biochemical characterization of the p. Ala359Asp SMPD1 variant causing Niemann pick

- disease type B. European J Hum Genet 2016;24:208-13.
- Wasserstein MP, Desnick RJ, Schuchman EH. Types A and B Niemann pick disease lysosomal storage 4. schuchman EH, Wasserstein MP. Types A and B Niemann pick disease. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab2015;29:237-47.



4. Rezaei H, Vallian S. BanI/D13S141/D13S175 represents a novel informative haplotype at the GJB2 gene region in the Iranian population. *Cell Mole Neurobiol*2011;31:749-54.
5. Nadeali Z, Karimi A, Vallianborujeni S. Analysis of genetic variation of rs4148326 marker located in UGT1A1 gene region an informative marker for molecular diagnosis of crigler-najjar syndrome. *J Isfahan Med Sch* 2014;31:260.
6. Selmer KK, Brandal K, Olstad OK, Birkenes B, Undlien DE, Egeland T. Genome-wide linkage analysis with clustered SNP markers. *J Biomole Screen* 2009;14:92-6.
7. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988;16:1215.
8. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. DbSNP the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*2001;29:308-11.
9. Cheung KH, Osier MV, Kidd JR, Pakstis AJ, Miller PL, Kidd KK. Alfred an allele frequency database for diverse populations and DNA polymorphisms. *Nucleic Acids Res*2000;28:361-3.
10. Little S. Amplification refractory mutation system analysis of point mutations. *Current Prot Hum Genet*2001;9.8. 1-9.8. 12.
11. Gaudet M, Fara AG, Beritognolo I, Sabatti M. Allele specific PCR in SNP genotyping. *Sin Nucle Pol Meth Prot*2009;2:415-24.
12. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*2001;29:88.
13. Collins A, Ke X. Primer design web service for tetra primer ARMS-PCR. *Open Bioinform J* 2012;6:55-8.
14. Rousset F. Genepop 007 a complete re implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mole Ecolo Res* 2008;8:103-6.
15. Lui K, Muse S. Powermarker integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics*2005;21:2128-9.
16. Raymond M, Rousset F. Genepop version 1.2 population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredit*1995;86:248-9.
17. Engels WR. Exact tests for hardy weinberg proportions. *Genetics* 2009;183:1431-41.
18. Cunningham F, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, et al. *Nucle Acids Res*2015;43: 662-9.
19. Galehdari H, Tangestani R, Ghasemian S. New single nucleotide deletion in the SMPD1 gene causes niemann pick disease type A in a child from Southwest Iran a case report. *Iranian J Pediatr*2013;23:233.
20. Vanier M. Niemann-pick diseases. *Clin Neurol*2012;113:1717-21.
21. Aykut A, Karaca E, Onay H, Ucar SK, Coker M, Cogulu O, et al. Analysis of the sphingomyelin phosphodiesterase 1 gene in Turkish Niemann pick disease patients mutation profile and description of a novel mutation. *Genetics*2013;526:484-6.
22. Elder DE, Ferrell LD, Kakar S. *Liver pathology*. 3<sup>th</sup> ed. Demos Medical Publication.2011;P.133-6.
23. Karimi A, Vallian S. [Analysis of genetic variation of rs11658369 marker in AIPL1 gene as an informative marker for molecular diagnosis of leber congenital Amaurosis in Isfahan population]. *Genet Third Mille*2014; 11:3260-9. (Persian)
24. Kalantarmotamedi M, Khoddami M, Naseri M. Type B Niemann pick disease report of a case with miliary pattern on chest x-ray. *Arch Iranian Med*2005;8:223-5.
25. Farzaneh M, Maryam M, Soroush S, Mandana A, Fatemeh M. Liver storage disease in Iran a ten year study of liver biopsies in children medical center hospital in Tehran Iran. *Hepat Month*2011;2011:652-5.
26. Rhein C, Muhle C, Kornhuber J, Reichel M. Alleged detrimental mutations in the SMPD1 gene in patients with Niemann-pick disease. *Int J Mole Sci*2015;16:13649-52.

## Analysis of Allele Frequency and Genotyping of rs67992843 Marker in SMPD1 Gene Region Associated with Niemann Pick Disease in Isfahan Population

Ebrahimi N<sup>1</sup>, Vallianborujeni S<sup>2\*</sup>

Accepted: August 13, 2016

(Received: May 4, 2016)

### Abstract

**Introduction:** Niemann Pick Disease (NPD) is a lipid storage disorder with an autosomal recessive inheritance. The disease occurs mainly due to defects in *SMPD1* gene (11p15.4), encoding sphingomyelinase. Disruption of this enzyme leads to the accumulation of sphingomyelin in brain and liver resulting in dysfunction or damage of the brain tissues.

Polymorphic markers such as Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) are used in molecular diagnosis of genetic disease through linkage analysis or homozygosity mapping. The allele frequency and degree of heterozygosity of the markers are usually population dependent. The aim of this study was to investigate the allele frequency and degree heterozygosity of rs67992843 marker located in the *SMPD1* gene region in the Iranian population.

**Materials & methods:** 113 unrelated individuals were selected for this study. The

marker was genotyped using ARMS PCR with newly designed primers. The results were analyzed by Genepop database and Power Marker software to estimate allelic frequency, heterozygosity rate, presence of Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) and polymorphism information content (PIC).

**Findings:** The data showed 31.42% Minor Allele Frequency (MAF), 39.82% heterozygosity rate and PIC 0.338 for rs67992843 marker in the Iranian population.

**Discussion & conclusions:** The results of this study showed that rs67992843 marker could be suggested for linkage analysis and molecular diagnosis of *SMPD1* gene in the Iranian population.

**Keywords:** Single nucleotide polymorphism, Niemann pick disease, *SMPD1*, ASM, Iranian population

1. Dept. of Biology, Faculty of Science, Isfahan University, Isfahan, Iran  
\*Corresponding author Email: svallian@biol.ui.ac.ir