Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2016; 19(111): 1-10

# Analysis of Genetic Variation of rs1542705 Marker in *SMPD1* Gene Region as an Informative Marker for Molecular Diagnosis of Niemann-Pick Disease in Isfahan Population

Nasim Ebrahimi[1], Sadegh Vallian Borujeni[2]*

1- MSc Student in Genetics, Department of Biology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
2- Professor, PhD in Midical Genetics, Department of Biology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

Received: 19 April 2016, Accepted: 29 Jun 2016

**Abstract**

***Background:*** Niemann-Pick disease (NPD) refers to a group of lysosomal storage diseases that causes abnormal metabolism of lipids. One of the genes that play a role in the pathogenesis of this disease is SMPD1. To date, more than hundred disease- causing mutations have been identified in SMPD1 gene. Due to the large number of mutations in this gene, direct analysis of the mutations is costly and time-consuming. Therefore, indirect linkage analysis using polymorphic markers as an alternative method for molecular diagnosis of the mutations has been recommended. In the present study, allele frequency of rs1542705 genetic marker was analyzed in the Iranian population. The aim was to determine the polymorphic information content (PIC) and the possibility of its application in indirect diagnosing of NPD.

***Materials and Methods:*** After bioinformatics analysis of the *SMPD1* gene region, rs1542705 marker was selected for genotyping in Isfahan population. In order to calculate the allele and genotype frequency of the marker, molecular tests were done on 113 DNA samples of unrelated healthy individuals by using ARMS-PCR technique. Finally, the information related to the genotype of the individuals was statistically analyzed using Powermarker and Genepop software.

***Results:*** The analyses showed that the studied population was in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium. Allele frequency of rs1542705 marker for T and C alleles was 71.24% and 28.76%, respectively, and the heterozygosity of the marker was 43.36%. Also, polymorphic information content (PIC) was 0.325.

***Conclusion:*** The results of this study showed that rs1542705 marker could be considered as an informative marker for molecular diagnosis of Niemann- Pick disease using linkage analysis in the studied population.

***Keywords:*** Single nucleotide polymorphism, Niemann- Pick disease, Iranian population, ARMS PCR, *SMPD1*

*Corresponding Author:
Address: Department of Genetics, Faculty of Biology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
Email: svallian@sei.ui.ad.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۹، شماره ۶ (شماره پیاپی ۱۱۱)، شهریور ۱۳۹۵، ۱۰-۱

# بررسی تنوع ژنتیکی نشان‌گر rs1542705 در ناحیه ژنی *SMPD1* به عنوان یک نشان‌گر آگاهی دهنده جهت تشخیص مولکولی بیماری نیمن پیک در جمعیت اصفهان

**نسیم ابراهیمی[۱]، صادق ولیان بروجنی[۲]***

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

۲- استاد، دکترای ژنتیک پزشکی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۹

**چکیده**

**زمینه و هدف:** بیماری نیمن پیک (NPD)، به گروهی از بیماری‌های ذخیره لیزوزومی اطلاق می‌شود که سبب متابولیسم غیرطبیعی لیپیدها می‌گردد. یکی از ژن‌هایی که در بروز این بیماری نقش دارد *SMPD1* است که تا کنون بیش از صد جهش بیماری‌زا در این ژن شناسایی شده است. به علت تنوع زیاد وقوع جهش‌ها در این ژن و وقت‌گیر بودن و پرهزینه بودن بررسی مستقیم آن‌ها، بررسی غیر مستقیم با آنالیز پیوستگی نشان‌گرهای چند شکلی به عنوان روشی جایگزین جهت تشخیص مولکولی جهش‌ها پیشنهاد می‌شود. در مطالعه‌ی حاضر فراوانی آللی نشان‌گر rs1542705 در جمعیت ایران مورد بررسی قرار گرفت. هدف از تعیین فراوانی آللی این نشان‌گر، تعیین محتوای اطلاعاتی چند شکل (PIC) و امکان استفاده از آن در تشخیص غیرمستقیم بیماری نیمن پیک بود.

**مواد و روش‌ها:** پس از انجام مطالعات بیوانفورماتیک بر روی ژن *SMPD1* ، نشان‌گر rs1542705 جهت تعیین ژنوتیپ در جمعیت اصفهان انتخاب گردید. به منظور تعیین فراوانی آللی و ژنوتیپی این نشان‌گر، آزمایشات مولکولی با استفاده از تکنیک ARMS PCR بر روی ۱۱۳ نمونه DNA فرد سالم غیر خویشاوند انجام گرفت. در نهایت اطلاعات مربوط به ژنوتیپ افراد وارد نرم‌افزارهای Genepop و Powermarker شد و تحلیل‌های آماری لازم بر روی آن‌ها انجام گرفت.

**یافته‌ها:** تحلیل‌های انجام گرفته نشان داد که جمعیت مورد مطالعه برای این نشان‌گر در تعادل هاردی- واینبرگ قرار دارد. فراوانی آللی نشان‌گر rs1542705 برای آلل‌های T و C به ترتیب ۷۱/۲۴ و ۲۸/۷۶درصد و فراوانی هتروزیگوسیتی آن ۴۳/۳۶ درصد محاسبه گردید. هم‌چنین مقدار محتوای اطلاعاتی چندشکلی (PIC) برابر با ۰/۳۲۵ به دست آمد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که می‌توان از نشان‌گر rs1542705 به عنوان یک نشان‌گر آگاهی دهنده در تشخیص مولکولی بیماری نیمن پیک با استفاده از روش تحلیل پیوستگی در جمعیت مورد مطالعه استفاده نمود.

**واژگان کلیدی:** چند شکلی تک نوکلئوتیدی، بیماری نیمن پیک، جمعیت ایرانی، *SMPD1*، ARMS PCR

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

Email: svallin@sci.ui.ac.ir

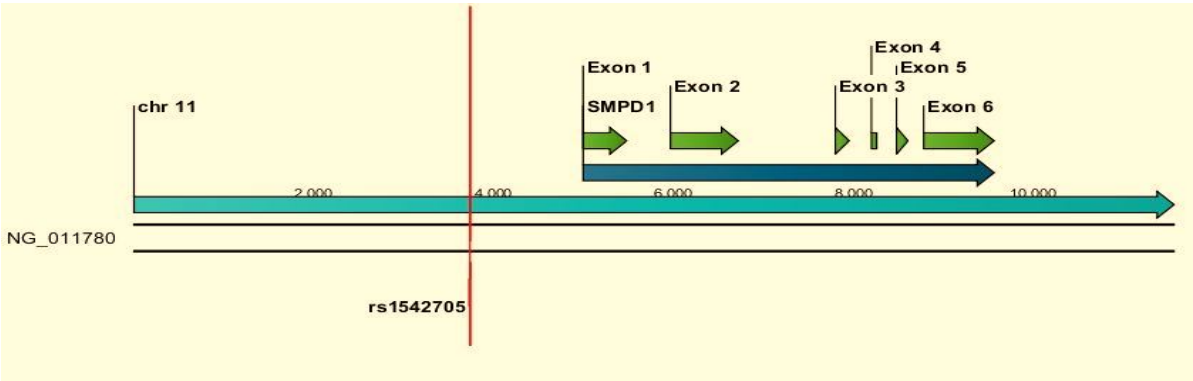
**مقدمه**

بیماری نیمن پیک (NPD) به گروهی از بیماری‌های ذخیره‌ای لیزوزومی با وراثت اتوزومی مغلوب اطلاق می‌شود که به علت اختلال در متابولیسم و انتقال لیپیدها به وجود می‌آید(۱، ۲). این بیماری به صورت هتروژن بوده و شیوع آن تقریبا ۱:۱۵۰۰۰۰ در هر تولد زنده می‌باشد. در مورد شیوع این بیماری در جمعیت ایرانی اطلاعات دقیقی در دست نیست، اما براساس گزارشات موجود به نظر می‌رسد بیماری از شیوع قابل توجهی برخوردار باشد(۶-۲). به علت تنوعی که در ویژگی‌های بالینی و پاتولوژیکی این بیماری وجود دارد، افرادی که به این بیماری مبتلا هستند در دو گروه قرار می‌گیرند(۳). دسته‌ی اول بیمارانی هستند که به دلیل نقص در آنزیم اسید اسفنگومیلیناز (ASM) به این بیماری مبتلا شده‌اند و بسته به نوع و موقعیت جهش‌هایی که در ژن رمز کننده‌ی این آنزیم اتفاق می‌افتد، ممکن است به تیپ A یا B آن مبتلا باشند(۲). تیپ A، فرم شدید بیماری می‌باشد و باعث تخریب سیستم عصبی می‌گردد. این تیپ در دوران کودکی بروز می‌کند و باعث مرگ در ۳ سال اول زندگی می‌گردد(۶). از علائم تیپ A می‌توان به هپاتواسپلنومگالی (بزرگ شدن کبد و طحال)، هایپوتونیای شدید (اختلال در عملکرد ماهیچه‌های بدن که منجر به ضعف و آتروفی عضلانی می‌شود) و عقب ماندگی ذهنی-حرکتی اشاره کرد(۷). تیپ B این بیماری معمولا سیستم عصبی را درگیر نمی‌کند و فرد بیمار تا دوران بزرگ‌سالی زنده می‌ماند. در دوران بزرگ‌سالی، افراد مبتلا ممکن است علائم خفیف عصبی را نشان دهند، اما از ویژگی‌های بارز این تیپ که احتمال دارد در افراد بیمار دیده شود می‌توان به ناهنجاری‌های پیش‌رونده و شدید اندام‌های احشایی شامل هپاتواسپلنومگالی، نارسایی ریوی و ناراحتی‌های قلبی-عروقی اشاره کرد(۷). تیپ A و B بیماری NPD ناشی از جهش‌های بیماری‌زا در ژن رمزکننده‌ی آنزیم ASM به نام اسفنگومیلین فسفودی‌استراز ۱ (*SMPD1*) می‌باشد. ژن *SMPD1* دارای ۶ اگزون بوده و در ناحیه کروموزومی 11p15.1-11p15.4 قرار گرفته است. این ژن دارای قاب باز خواندن (ORF) به طول ۱۸۹۰ جفت باز بوده که یک پروتئین ۶۲۹ اسیدآمینه‌ای را رمز می‌نماید(۸). ASM گلیکوپرتئینی است که اسفنگومیلین را به فسفوکولین و سرآمید تبدیل می‌کند. این آنزیم نقش مهمی در تنظیم متابولیکی فعالیت زیستی اسفنگولیپیدها، تمایز سلولی، پاسخ‌های ایمنی و التهابی، نقل و انتقال بین سلولی کلسترول و متابولیسم ایفا می‌کند(۱۱-۹). تا به امروز جهش‌های زیادی در ژن *SMPD1* شناسایی شده‌اند که باعث بروز بیماری NPD می‌شوند(۷). نتیجه‌ی این جهش‌ها نقص در فعالیت ASM می‌باشد(۱۲).

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 تحلیل پیوستگی از طریق پلی‌مورفیسم‌های متصل به ژن می‌تواند راه مناسبی جهت بررسی مولکولی بیماری در جمعیت ارائه نماید. با این وجود، روش غیر مستقیم نیز دارای محدودیت‌هایی می‌باشد که از جمله‌ی این محدودیت‌ها می‌توان به غیرقابل 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(۱۳). در روش غیرمستقیم از پلی‌مورفیسم‌ها یا همان چند شکلی‌های ژنومی به عنوان نشان‌گرهای ژنتیکی به منظور تعیین ارتباط بین یک ناحیه‌ی ژنومی خاص و بیماری مورد نظر استفاده می‌شود. از جمله نشان‌گرهایی که در روش غیرمستقیم مورد استفاده می‌گردد، می‌توان چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی(SNP) را نام برد. این نشان‌گرها به سبب داشتن ویژگی‌هایی مانند فراوانی بیشتر و پایداری، جایگزین سایر نشان‌گرها از جمله STR (تکرار پشت سرهم کوتاه) و VNTR (تکرار تعداد متغیر پشت سرهم) شده و به عنوان نشان‌گرهای ژنتیکی برگزیده در تحلیل پیوستگی استفاده می‌شوند(۱۳). بر اساس ارزیابی‌های انجام گرفته، فراوانی تغییرات SNP در ژنوم انسان، ۱ عدد در هر ۲۵۰ تا ۳۰۰ نوکلئوتید بوده و مسئول ۹۰

درصد تنوعات ژنوم انسان می‌باشند(۱۴). هر SNP نشان‌دهنده‌ی یک تغییر تک نوکلئوتیدی در ژنوم است و زمانی این تغییر به عنوان SNP پذیرفته می‌شود که فراوانی آلل مغلوب در جمعیت مورد مطالعه بیشتر از ۱ درصد باشد(۱۵). به دلیل این که فراوانی آلل‌های مربوط به تغییرات SNP و به طور کلی نشان‌گرهای چندشکلی بین جمعیت‌های مختلف متفاوت است، از این رو برای غربال‌گری بهینه‌ی جهش‌ها با روش غیرمسقیم، نشان‌گرهای مورد استفاده باید در هر جمعیت به طور خاص مورد بررسی قرار گرفته و نشان‌گرهای آگاهی دهنده آن جمعیت به صورت جداگانه معرفی شوند(۱۳).

در جمعیت ایران تا کنون پژوهشی در رابطه با شناسایی نشان‌گرهای گویا مرتبط با ژن *SMPD1* انجام نگرفته است و بر این اساس، نشان‌گر rs1542705 جهت مشخص نمودن ویژگی‌هایی مانند فراوانی آلل‌های آن و نیز گویا بودن این نشان‌گر در جمعیت اصفهان انتخاب گردید. این نشان‌گر که از نوع SNP می‌باشد در ناحیه‌ی پروموتری ژن *SMPD1* قرار گرفته است(شکل ۱) و دارای دو آلل T/C می‌باشد. نتایج حاصل از این مطالعه ضمن معرفی نشان‌گر مورد بررسی به عنوان یک نشان‌گر گویا در مطالعات تحلیل پیوستگی، می‌تواند به افزایش آگاهی در مورد ساختار ژنتیکی جمعیت ایران و هم‌چنین شباهت‌ها و تفاوت‌های آن با جمعیت سایر کشورها کمک شایانی نماید.




**شکل ۱. شمایی از ژن *SMPD1* به همراه موقعیت نسبی اگزون‌های این ژن و جایگاه نشان‌گر rs1542705 در ناحیه‌ی پروموتری آن.**

## مواد و روش‌ها

این پژوهش در دسته‌ی مطالعات توصیفی-تجربی قرار دارد. بر همین اساس، هدف از این مطالعه تنها تعیین فراوانی آلل‌های نشان‌گر rs1542705 و تعیین میزان آگاهی دهندگی آن در جمعیت نرمال (سالم) ایرانی و امکان استفاده از آن در تشخیص پیش از تولد بیماری نیمن پیک تیپ A و B بود. با توجه به این که در مطالعات مربوط به عدم تعادل پیوستگی نمونه با حجم حداقل ۱۰۰ فرد غیر خویشاوند ضروری است(۱۴)، در این مطالعه، برای افزایش صحت تحلیل آماری تعداد ۱۱۳ فرد سالم و غیر خویشاوند انتخاب گردید. پس از کسب رضایت‌نامه از افراد شرکت کننده در این پژوهش و نیز مجوز اخلاق پژوهش دانشگاه به شماره ۷۹۰۲۰۵، DNA نمونه‌ی خون آن‌ها با استفاده از روش رسوب نمکی میلر استخراج و برای مراحل بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(۱۶). به منظور بررسی خلوص DNA ژنومی به روش کیفی از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد و مقدار نمونه مورد استفاده بر اساس شدت باندها جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد تخمین قرار گرفت. هم‌چنین ارزیابی کمی DNA ژنومی با استفاده از میزان جذب نور محلول حاوی DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Eppendroff AG) صورت گرفت. با استفاده از پایگاه‌های داده‌ای نظیر

NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)، HapMap(https://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/)، SNPper(http://snpper.chip.org/) و ALFRED (https://alfred.med.yale.edu/)، ناحیه‌ی ژنی *SMPD1* بررسی شد. پس از بررسی توالی ژن *SMPD1* و هم‌چنین تغییرات SNP که در این ژن اتفاق می‌افتند، در نهایت نشان‌گر rs1542705 بر اساس معیارهایی نظیر بالا بودن درجه‌ی هتروزیگوسیتی و فراوانی آللی، نزدیک بودن به ژن *SMPD1* و قرار گرفتن در بلوک‌های هاپلوتایپی که از طریق پایگاه‌های داده ذکر شده در بالا استخراج شد، برای این مطالعه انتخاب گردید.

جهت تعیین ژنوتیپ نمونه‌های DNA، از تکنیک ARMS PCR استفاده گردید. این تکنیک روشی ساده، مقرون به صرفه و درعین حال بسیار دقیق بوده که جهت تعیین فراوانی آللی و ژنوتیپی نشان‌گرهای SNP کاربرد دارد(۱۷، ۱۸). طراحی پرایمرهای مورد نیاز برای این تکنیک با استفاده از نرم‌افزار تحت شبکه پرایمر ۱ انجام گرفت(۱۹). در این نرم‌افزار با مشخص نمودن محدوده‌ی پارامترهایی مانند حداقل و حداکثر طول پرایمرها، حداقل و حداکثر درصد GC پرایمرها، دمای بهینه اتصال پرایمرها و چندین متغیر دیگر، پرایمرهای مناسب پیشنهاد گردیدند. سپس پرایمرهای پیشنهادی جهت بررسی‌های بیشتر از نظر اتصال پرایمرها به جایگاه‌های غیراختصاصی، تشکیل مضاعف شدگی پرایمری بین پرایمرها و هم‌چنین تشکیل ساختار سنجاق سری در خود پرایمر، در نرم‌افزار الیگو ۷ وارد گردیدند و تغییرات مورد نیاز جهت بهینه شدن پرایمرها در آن‌ها اعمال شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

**جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی شده برای تکنیک ARMS PCR**

| نام پرایمر | توالی نوکلئوتیدی | طول محصول (جفت باز) |
|---|---|---|
| (FO) پیش رو خارجی | 5'-TGGGCCTGATAATTTAAAGGGG-3' | 346 (FO-RO) |
| (RO) پس رو خارجی | 5'-CAGAGGGCGAAGGGAAAGTTT-3' | 346 (FO-RO) |
| (RN.T) پیش رو داخلی آلل T | 5'-TGTTTGACGAGTGCTTCTGATGA-3' | 230 (FO-RN.T) |
| (RN.C) پس رو داخلی | 5'-TGTTTGACGAGTGCTTCTGATGG-3' | 230 (FO-RN.C) |

محصول پرایمرهای FO-RO به عنوان کنترل بوده و نشان‌دهنده‌ی انجام واکنش PCR می‌باشد.

مواد مورد نیاز شامل آنزیم پلی‌مراز Taq و dNTP جهت تکثیر ناحیه مورد نظر DNA از شرکت سینا ژن(Cina Clone, Co LTD، تهران، ایران) خریداری شد. تکثیر محصولات PCR به این صورت است که پرایمرهای پیش رو خارجی و پس رو خارجی (FO-RO) محصولی به طول 346 bp را تکثیر می‌نمایند که به عنوان باند کنترل داخلی بوده و نشان دهنده‌ی انجام واکنش PCR می‌باشد. عدم مشاهده‌ی این باند بیان‌گر عدم انجام واکنش PCR و لزوم تکرار واکنش برای آن نمونه می‌باشد. پرایمرهای پیش رو خارجی و پس رو داخلی آلل T (FO-RN.T) باعث تکثیر آلل T و پرایمرهای پیش رو خارجی و پس رو داخلی آلل C (FO-RN.C) باعث تکثیر آلل C شده و محصولی به طول 230 bp تولید می‌کنند. بهینه‌سازی شرایط انجام ARMS PCR از لحاظ غلظت پرایمرها، غلظت MgCl2 و dNTP و هم‌چنین دمای بهینه اتصال پرایمرها انجام شد و در نهایت واکنش ARMS PCR بهینه شده در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA (۱۰۰ نانوگرم)، ۰/۷۵ میکرولیتر پرایمر پیش رو خارجی، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر پس رو خارجی، ۱ میکرولیتر پرایمر پس رو داخلی آلل T (ویال ۱)، ۱ میکرولیتر پرایمر پس رو داخلی آلل C (ویال ۲) (غلظت تمام پرایمرها ۱۰ پیکول بر میکرولیتر)، ۰/۷۵ میکرولیتر MgCl2 (۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP

mix (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۲ میکرولیتر پلی‌مراز Taq (۵ واحد بر میکرولیتر)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (10X) و در نهایت ۱۷/۸ میکرولیتر $ddH_2O$ انجام گرفت. جهت انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر (مدل اپندورف، آلمان) طبق شرایط جدول ۲ استفاده شد.

**جدول ۲ . شرایط دمایی انجام واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان)**

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

پس از انجام واکنش ARMS PCR، محصولات مربوط به تکثیر DNA افراد بر روی ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری شدند و به مدت ۳۰ دقیقه تحت جریان دستگاه الکتروفورز با ولتاژ ۹۶ ولت قرار گرفتند. پس از الکتروفورز، ژل توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید و با استفاده از دستگاه Gel documentation TM300 (Biometra) مورد بررسی قرار گرفت و ژنوتیپ افراد آشکارسازی شد.

## یافته ها

پس از مشخص شدن ژنوتیپ افراد (شکل ۲)، اطلاعات ژنوتیپی آن‌ها با استفاده از پایگاه اطلاعاتی Genepop و نرم افزار تحت ویندوز Powermarker مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت(۲۲-۲۰).

پس از آشکارسازی ژنوتیپ افراد بر روی ژل آگارز ۲ درصد با استفاده از دستگاه آشکارساز ژل (شکل ۳)، اطلاعات حاصل از تعیین ژنوتیپ افراد طبق فرمت خواسته شده به نرم‌افزارهای مورد نظر داده شد.

با استفاده از پایگاه Genepop، فراوانی مشاهده شده و مورد انتظار ژنوتیپ‌های نشان‌گر rs1542705 به دست آمد که در جدول ۳ با جزئیات ذکر شده‌اند (ژنوتیپ ۱۱۳ فرد).

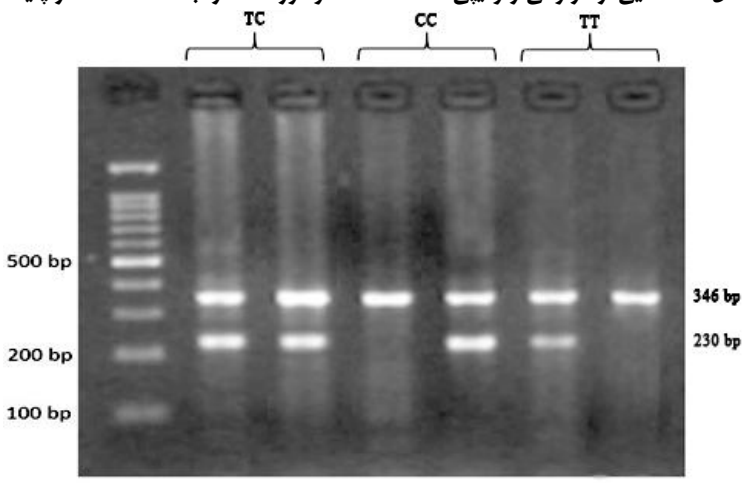
**جدول ۳. فراوانی ژنوتیپ‌های مشاهده شده و مورد انتظار در جمعیت. فراوانی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Genepop محاسبه گردید.**

| | ژنوتیپ‌ها | | |
|---|---|---|---|
| | TT | TC | CC |
| فراوانی مشاهده شده | ۵۶ (٪۴۹/۵۶) | ۴۹(٪۴۳/۳۶) | ۸ (٪۷/۰۸) |
| فراوانی مورد انتظار | ۵۷/۲۴(٪۵۰/۶۵) | ۴۶/۵۱(٪۴۱/۱۶) | ۹/۲۵ (٪۸/۱۹) |

در شکل ۲ شمایی از نتایج به دست آمده توسط پایگاه اطلاعاتی Genepop آورده شده است.

```
-----------------------------------------------
 Pop: 113    Locus: rs1542705
-----------------------------------------------

      Genotypic matrix:
          1    2
        ________
      1   56
      2   49    8

     Genotypes   Obs.        Expected
      1 , 1       56        57.2444
      2 , 1       49        46.5111
      2 , 2        8         9.2444

     Expected number of homozygotes   : 66.4889
     Observed number of homozygotes   : 64
     Expected number of heterozygotes: 46.5111
     Observed number of heterozygotes: 49


     Allele frequencies and Fis:
     -------------------------------------------------------
                                              Fis
                                             ----------------
     Allele      Sample count      Frequency   W&C       R&H
      1               161            0.7124   -0.0538
      2                65            0.2876   -0.0538
     Tot              226                     -0.0538   -0.0540
```

**شکل ۲. شمایی از فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار به دست آمده در پایگاه اطلاعاتی Genepop**




**شکل ۳. نمونه‌ای از تعیین ژنوتیپ DNA چند فرد برای نشان‌گر rs1542705 با استفاده از تکنیک ARMS PCR. باند 345 bp نشان دهنده‌ی محصول کنترل داخلی بوده و باند 230 bp نشان‌دهنده‌ی محصول اختصاصی آلل‌ها می‌باشد. با توجه به ژنوتیپ افـراد ۳ الگـوی ژنوتیپی TC/CC/TT بر روی ژل مشاهده می‌شود.**

هم‌چنین با استفاده از این نرم‌افزار وجود تعادل هاردی- واینبرگ برای این نشان‌گر در جمعیت بررسی شد. مقدار p محاسبه شده برای تعادل هاردی-واینبرگ ۰/۶۴۹۴ به دست آمد و از آن جایی که این مقدار بزرگ‌تر از ۰/۰۵ بود، می‌توان نتیجه گرفت که جمعیت مورد نظر برای این نشان‌گر در تعادل قرار دارد. معیاری که بر اساس آن گویا بودن یا نبودن یک نشان‌گر جهت مطالعات تحلیل پیوستگی و تشخیص مولکولی بیماری‌ها استفاده می‌گردد، شاخص آگاهی دهندگی چندشکلی (PIC) نام دارد. مقدار PIC بزرگ‌تر از ۰/۲۵ نشان دهنده‌ی آگاهی دهنده بودن نشان‌گر بوده و بدین معنی است که می‌توان از آن نشان‌گر جهت انجام تحلیل‌های پیوستگی در آن جمعیت استفاده نمود. به منظور محاسبه PIC از نرم‌افزار Powermarker استفاده شد. مقدار PIC برای این نشان‌گر ۰/۳۲۵ محاسبه شد و با توجه به بزرگ‌تر بودن آن از ۰/۲۵ می‌توان نتیجه گرفت که این نشان‌گر در جمعیت مورد مطالعه دارای آگاهی دهندگی مناسب جهت انجام مطالعات پیوستگی مرتبط با ژن *SMPD1* و بیماری NPD می‌باشد.

علاوه بر این، نتایج این مطالعه با گزارش‌های دیگری که در رابطه با فراوانی آلل‌های این نشان‌گر در نقاط مختلف دنیا انجام گرفته است با استفاده از پایگاه داده HapMap مقایسه گردید. در جدول ۴ مقایسه فراوانی آلل C این نشان‌گر با تعدادی از این جمعیت‌ها آورده شده است.

**جدول ۴. مقایسه فراوانی آلل C نشان‌گر rs1542705 در جمعیت‌های مختلف در مقایسه با مطالعه حاضر بر اساس پایگاه داده HapMap**

| جمعیت | فراوانی آلل C |
|---|---|
| سیاه‌پوستان آمریکایی افریقایی تبار | ۰/۵۴۵ |
| چینی | ۰/۲۴۱ |
| چینی‌های مقیم دنور ایالت کلورادو | ۰/۲۰۲ |
| ژاپنی | ۰/۲۱۷ |
| ایران(مطالعه حاضر) | ۰/۲۸۷ |
| ایتالیایی | ۰/۳۸۷ |
| نیجریه‌ای | ۰/۶۷۸ |

با توجه به اطلاعات این جدول بیش‌ترین فراوانی آلل C در جمعیت نیجریه و کم‌ترین فراوانی آن در جمعیت چینی‌های مقیم دنور ایالت کلورادو گزارش شده است.

## بحث

این مطالعه با هدف شناسایی یک نشان‌گر گویا در ناحیه‌ی ژنی *SMPD1* جهت مطالعه‌ی غیر مستقیم بیماری NPD انجام شد. پس از مطالعه ناحیه ژنی *SMPD1*، در نهایت نشان‌گر rs1542705 برای مطالعه در جمعیت اصفهان انتخاب گردید. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش فراوانی آلل‌های T و C به ترتیب ۷۱/۲۴ و ۲۸/۷ درصد به دست آمد. هم‌چنین نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که مارکر مزبور با هتروزیگوسیتی ۴۳/۳۶ درصد و PIC= ۰/۳۲۵، دارای پیوستگی با ژن SMPD1 بوده و از گویایی بالایی برخوردار است و بنابراین می‌تواند به عنوان یک مارکر گویا با دقت بالا در تشخیص مولکولی بیماری NPD استفاده گردد. بر اساس مطالعات انجام گرفته، در صورتی که مقدار PIC محاسبه شده برای یک نشان‌گر بیش‌تر از ۰/۲۵ باشد، می‌توان از آن نشان‌گر در انجام مطالعات پیوستگی و تشخیص غیرمستقیم آلل‌های جهش یافته آن ژن در بیماری مربوطه استفاده نمود(۱۵).

یکی از مواردی که در ژنتیک بالینی از اهمیت بالایی برخوردار است، تشخیص دقیق جهش‌های پنی بیماری‌زا است که باعث بروز بیماری می‌گردد. با توجه به تعداد بالای جهش‌هایی که در ژن *SMPD1* شناسایی شده‌اند و هم‌چنین احتمال وجود جهش‌های ناشناخته در این ژن، شناسایی جهش‌ها به روش مستقیم از نظر اقتصادی و هم‌چنین زمان صرف شده، در بیش‌تر موارد غیر قابل توجیه و مشکل می‌باشد. به همین دلیل استفاده از روش‌های غیرمستقیم و استفاده از نشان‌گرهای چندشکلی به عنوان یک روش مناسب جهت جایگزینی برای روش‌های مستقیم توصیه می‌گردد(۱۳، ۱۵). بررسی‌های غیر مستقیم یک ژن با استفاده از نشان‌گرهای چند شکلی می‌تواند به شناسایی آلل‌های جهش یافته آن ژن در افراد بیمار و هم‌چنین شناسایی فرد ناقل و تشخیص پیش از تولد در خانواده‌های دارای فرزند مبتلا به بیماری مرتبط به ژن مورد نظر کمک شایانی نماید(۲۳).

مقایسه فراوانی آللی این نشان‌گر در جمعیت ایران با دیگر جمعیت‌های دنیا نشان داد که کم‌ترین فراوانی آلل مغلوب این نشان‌گر در جمعیت چینی‌های مقیم ایالت دنور کلورادو(۰/۲۰۲) و بیش‌ترین فراوانی آن در جمعیت نیجریه (۰/۶۷۸) مشاهده گردیده و به عبارتی این آلل در این جمعیت بر خلاف سایر جمعیت‌ها آلل غالب می‌باشد.

نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند به کامل‌تر شدن اطلاعات در مورد ویژگی‌های ساختاری جمعیت ایران و هم‌چنین شباهت‌ها و تفاوت‌های این جمعیت با سایر جمعیت‌های جهان کمک شایانی نماید. از جمله مزیت‌های استفاده از نشان‌گرهای چند شکلی به روش غیر مستقیم این است که با توجه به تعداد بالای جهش‌های مرتبط با ژن *SMPD1* و هم‌چنین نامشخص بودن طیف جهش‌های شایع این ژن در جمعیت ایرانی، به راحتی می‌توان انتقال آلل‌های بیماری‌زا در خانواده‌های دارای یک فرزند بیمار را بررسی

نمود. محدودیت روش مزبور، نیاز به حداقل یک فرد بیمار در خانواده می‌باشد(۱۳).

## نتیجه‌گیری

به طور خلاصه نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که می‌توان از نشانگر rs1542705 به عنوان یک نشان‌گر آگاهی دهنده در تشخیص مولکولی بیماری نیمن پیک با استفاده از روش تحلیل پیوستگی در جمعیت ایرانی مورد مطالعه استفاده نمود. با توجه به نتایج امیدوار کننده این پژوهش می‌توان از این مارکر برای کامل کردن نقشه‌ی هاپلوتایپی و مطالعات پیوستگی جمعیت ایران استفاده نمود. با انجام مطالعات مشابه در دیگر قومیت‌های جمعیت ایران می‌توان به شناخت دقیق‌تری از این جمعیت دست یافت و از این اطلاعات جهت افزایش دقت و درستی نقشه‌ی ژنتیکی جمعیت ایران استفاده نمود(۲۴).

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از کلیه‌ی کسانی که در انجام این پژوهش همکاری صمیمانه نموده‌اند سپاس‌گزاری می‌نمایند.

## منابع

1. M. T. Vanier, Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C. Journal of inherited metabolic disease 38, 187-199 (2015).
2. E. H. Schuchman, M. P. Wasserstein, Types A and B Niemann-Pick disease. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 29, 237-247 (2015).
3. H. Galehdari, R. Tangestani, S. Ghasemian, New single nucleotide deletion in the SMPD1 gene causes niemann pick disease type A in a child from Southwest Iran: a case report. Iranian journal of pediatrics 23, 233 (2013).
4. H. Hamamy, Consanguineous marriages. Journal of community genetics 3, 185-192 (2012).
5. M. Farzaneh, M. Maryam, S. Soroush, A. Mandana, M. Fatemeh, Liver Storage Disease in Iran: A Ten Year Study of Liver Biopsies in Children Medical Center Hospital in Tehran-Iran. Hepatitis monthly 2011, 652-655 (2011).
6. M. P. Wasserstein, R. J. Desnick, E. H. Schuchman, Types A and B Niemann–Pick Disease. Lysosomal Storage Disorders: A Practical Guide, 80-86 (2012).
7. A. Aykut, E. Karaca, H. Onay, S. K. Ucar, M. Coker, O. Cogulu, F. Ozkinay, Analysis of the sphingomyelin phosphodiesterase 1 gene (SMPD1) in Turkish Niemann–Pick disease patients: Mutation profile and description of a novel mutation. Gene 526, 484-486 (2013).
8. E. Schuchman, The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann–Pick disease. Journal of inherited metabolic disease 30, 654-663 (2007).
9. G. Ion, R. Fajka-Boja, F. Kovács, G. Szebeni, I. Gombos, Á. Czibula, J. Matkó, É. Monostori, Acid sphingomyelinase mediated release of ceramide is essential to trigger the mitochondrial pathway of apoptosis by galectin-1. Cellular signalling 18, 1887-1896 (2006).
10. C. Y. Lee, T. Tamura, N. Rabah, D.-Y. D. Lee, I. Ruel, A. Hafiane, I. Iatan, D. Nyholt, F. Laporte, C. Lazure, Carboxyl-terminal disulfide bond of acid sphingomyelinase is critical for its secretion and enzymatic function. Biochemistry 46, 14969-14978 (2007).
11. M.-L. Wong, B. Xie, N. Beatini, P. Phu, S. Marathe, A. Johns, P. W. Gold, E. Hirsch, K. J. Williams, J. Licinio, Acute systemic inflammation up-regulates secretory sphingomyelinase in vivo: a possible link between inflammatory cytokines and atherogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences 97, 8681-8686 (2000).
12. M. Acuña, P. Martínez, C. Moraga, X. He, M. Moraga, B. Hunter, P. Nuernberg, R. A. Gutiérrez, M. González, E. H. Schuchman, Epidemiological, clinical and biochemical characterization of the p.(Ala359Asp) SMPD1 variant causing Niemann–Pick disease type B. European Journal of Human Genetics 24, 208-213 (2016).
13. Z. Nadeali, A. Karimi, S. Vallian-Borujeni, Analysis of Genetic Variation of rs4148326 Marker Located in UGT1A1 Gene Region: An Informative Marker for Molecular Diagnosis of Crigler-Najjar Syndrome. Journal of Isfahan Medical School 31, (2014).

14. A. Jazaeri, A. Karimi Moghadam, S. Vallian Borujeni, Evaluating the Association between Rs1800624 in RAGE Gene and Multiple Sclerosis in Isfahan Population. SSU_Journals 23, 923-931 (2016).
15. A. Karimi, S. Vallian, Analysis of Genetic Variation of rs11658369 Marker in AIPL1 Gene as an Informative Marker for Molecular Diagnosis of Leber Congenital Amaurosis (LCA) in Isfahan Population. (2014).
16. S. Miller, D. Dykes, H. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic acids research 16, 1215 (1988).
17. M. Gaudet, A.-G. Fara, I. Beritognolo, M. Sabatti, Allele-specific PCR in SNP genotyping. Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols, 415-424 (2009).
18. S. Little, Amplification-Refractory Mutation System (ARMS) Analysis of Point Mutations. Current protocols in human genetics, 9.8. 1-9.8. 12 (2001).
19. S. Ye, S. Dhillon, X. Ke, A. R. Collins, I. N. Day, An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. Nucleic acids research 29, e88-e88 (2001).
20. M. Raymond, F. Rousset, GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of heredity 86, 248-249 (1995).
21. F. Rousset, genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. Molecular ecology resources 8, 103-106 (2008).
22. K. Lui, S. Muse, PowerMarker: integrated analysis environment for genetic marker data. Bioinformatics 21, 2128-2129 (2005).
23. L. Esmaili Chamgordani, A. Jazayeri, S. Vallian Borujeni, Genotyping Rs2274625 Marker in NPHS2 Gene Associated with Nephrotic Syndrome in Isfahan Population. SSU_Journals 23, 870-878 (2015).
24. R. A. Gibbs, J. W. Belmont, P. Hardenbol, T. D. Willis, F. Yu, H. Yang, L.-Y. Ch'ang, W. Huang, B. Liu, Y. Shen, The international HapMap project. Nature 426, 789-796 (2003).