تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال پنجم، شماره چهاردهم، بهار ۱۳۹۲، صفحه ۳۵-۴۰
دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۲/۱۶ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۰۵/۰۸

حفظ چندشکلی نشانگرهای ژن *GJB2* در جمعیت ایرانی به واسطه انتخاب متعادل

حلیمه رضایی [۱]، زهرا فاضلی عطار [۱و۲]، مرجان مجتبوی نائینی [۱] و صادق ولیان بروجنی [۱]*
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده
ژن *GJB2* کانکسین۲۶ را که یک پروتئین رابط بین سلولی مهم در پوست است، کد می‌کند. کانکسین ۲۶ یک پروتئین سرتاسری غشاء است که در مسیر بازسازی یون پتاسیم در گوش داخلی نقش دارد. در این مطالعه، آزمون‌های خنثی (neutrality) بر روی اطلاعات ژنوتیپی به دست آمده از سه نشانگر چندشکلی SNP1245، D13S141 و D13S175 واقع در ناحیه ژن *GJB2* اجرا شد. مجموعه برنامه‌های کامپیوتری آنالیز ژنتیک جمعیت، PyPop و Popgene32، برای آنالیز اطلاعات به دست آمده از جمعیت ایرانی استفاده شد. ارزش Fnd سه نشانگر SNP1245، D13S141 و D13S175 در جمعیت ایرانی به ترتیب ۰/۵۹۸۰-، ۱/۰۱۵۵- و ۰/۶۴۵۷- ولی بدون ارزش معنی‌دار P تخمین زده شد که بیانگر تأثیر انتخاب متعادل بر روی نشانگرهای چندشکلی در ژن *GJB2* است. در جمعیت مطالعه شده، ارزش F هر سه نشانگر چندشکلی در داخل ناحیه L95 و U95 ارزش F مورد انتظار واقع شده است که نشان‌دهنده عدم تأثیر ناکارآمدی (hitchhiking) ژنتیکی بر روی نشانگرهای ناحیه ژنی *GJB2* است. نتایج به دست آمده از این مطالعه بیانگر آن است که چندشکلی این سه نشانگر در ژن *GJB2* به واسطه ارزش سازگاری بالاتر هتروزیگوت‌ها در جمعیت ایرانی حفظ شده است.

واژه‌های کلیدی: آزمون neutrality، انتخاب متعادل، جمعیت ایرانی، ژن *GJB2*

مقدمه
در مطالعه‌ای که به تازگی بر روی جمعیت ناشنوایان ایرانی صورت گرفته است، شیوع آلل‌های جهش یافته ژن *GJB2* در بیماران مبتلا به ناشنوایی در ایران ۱۹/۹ درصد گزارش شده است. به نظر می‌رسد که جهش‌های ژن *GJB2* در جمعیت ناشنوای ایرانی همانند بسیاری از جمعیت‌های دنیا شیوع بالایی دارد (Daneshi *et al.*, 2011). ژن پروتئین اتصالات شکاف بتا-۲ (*GJB2*) شایع‌ترین ژن عامل بروز فقدان شنوایی توارثی غیرسندرومی در گروه‌های قومی مختلف است (Zelante *et al.*, 1997؛ Estivill *et al.*, 1998؛ Kelley *et al.*, 1998). کانال‌های اتصال شکاف،

* svallian@biol.ui.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

سیتوپلاسم سلول‌های مجاور را به هم متصل می‌کند و امکان انتشار یون‌ها و متابولیت‌های کوچک را فراهم می‌سازد (Bruzzone *et al.*, 1996؛ Martinez *et al.*, 2009). مشخص شده است که پروتئین GJB2 اتصالات شکاف بین سلول‌های بافت اپی‌تلیال و پیوندی در حلزون گوش را تشکیل می‌دهد و در بازسازی یون‌های پتاسیم درون لنف، مؤثر در فرآیند انتقال صدا، نقش دارد (Kikuchi *et al.*, 1995).

مشخص شده است که افراد هموزیگوت و هتروزیگوت برای جهش شایع ژن *GJB2* در آفریقا، R143W، پوست برونی ضخیم‌تر و ترشح بیشتری از کلرید و سدیم در عرق نسبت به سایر افراد سالم خانواده دارند. این مشاهدات پیشنهاد کننده آن است که فنوتیپ‌های پوست بیرونی که همراه با جهش‌های ژن *GJB2* است، ممکن است مکانیسم حفاظتی در برابر تهاجم پاتوژن‌ها را فراهم سازد (Meyer *et al.*, 2002). بررسی جهش‌های M34T، W44C و R143W در ژن *GJB2* آشکار ساخته است که جهش‌های ژن *GJB2* می‌تواند بقا سلول را در برابر عوامل عفونی افزایش دهد (Common *et al.*, 2004). مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که سلول‌های بیان‌کننده جهش R143W در مقایسه با سلول‌های وحشی، حساسیت کمتری نسبت به تهاجم سلولی پاتوژن *Shigella flexneri* دارند (Man *et al.*, 2007). نتایج بررسی‌های متعدد باز شدن کانکسین ۲۶ توسط باکتری شیگلا (*Shigella*) را تأیید می‌کند که ممکن است در پیشرفت تهاجم باکتریایی نقش داشته باشد (Tran *et al.*, 2003). به نظر می‌رسد که حاملین جهش‌های ژن *GJB2* مزیت هتروزیگوتی مشابه با مزیت هتروزیگوسیتی حاملین جهش‌های ژن *CFTR* دارند. جهش‌های ژن *CFTR* می‌تواند تهاجم سالمونلا تیفی (*Salmonella*) را به سلول‌های اپی‌تلیال محدود کند و باعث حفاظت در برابر تب تیفوئید گردد (Pier *et al.*, 1998؛ Adamo *et al.*, 2009).

در این بررسی، آزمون‌های neutrality بر روی اطلاعات ژنوتیپی به دست آمده از مطالعه جمعیت ایرانی برای سه نشانگر چندشکلی SNP1245، D13S175 و D13S141 که در ناحیه ژنی *GJB2* قرار دارند، اجرا شد. نتایج این مطالعه می‌تواند درک ما را از نقش انتخاب بر روی ژن *GJB2* در جمعیت ایرانی افزایش دهد.

مواد و روش‌ها

نمونه خون: این مطالعه بر روی ۱۰۰ فرد غیرخویشاوند سالم از افراد مراجعه کننده به مرکز ژنتیک پزشکی اصفهان انجام شد. این افراد به صورت تصادفی ساده از استان‌های اصفهان، چهارمحال و بختیاری، اهواز، تهران، تبریز و یزد انتخاب شدند که به عنوان نمونه‌ای از جمعیت ایرانی مورد مطالعه قرار گرفتند. از هر فرد، ۱۰ میلی‌لیتر خون بر روی محلول EDTA جمع‌آوری شد.

تعیین ژنوتیپ: ژنوتیپ نشانگرهای SNP1245، D13S175 و D13S141 بر روی نمونه DNA ژنومی افراد مطالعه شده با استفاده از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۲ درصد تفکیک شدند سپس اندازه قطعات با مقایسه با نشانگرهای اندازه تعیین شدند. توالی پرایمرها و شرایط واکنش PCR در منبع Rezaei و Vallian (۲۰۱۱) توضیح داده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

تحلیل آماری نتایج: اطلاعات ژنوتیپی افراد سالم برای تهیه فایل ورودی در دو نرم‌افزار Popgene32 و PyPop برای مطالعه جمعیتی استفاده شد. ارزش هموزیگوسیتی مشاهده شده (F)، حد پایین اطمینان ۹۵ درصد (L95) و حد بالای اطمینان ۹۵ درصد (U95)، ارزش هموزیگوسیتی مورد انتظار (F^) و انحراف نرمال هموزیگوسیتی (Fnd) برای هر کدام از نشانگرها به طور جداگانه با استفاده از برنامه‌های Popgene32 نسخه ۱/۳۱ (www.ualberta.ca) و PyPop (Lancaster *et al.*, 2003) تخمین زده شدند.

مشاهدات

تکثیر ناحیه مربوط به نشانگر SNP1245 قطعه‌ای با طول ۲۸۹ جفت باز تولید کرد. در صورتی که نوکلئوتید T در موقعیت ۱۲۴۵ وجود داشته باشد، هضم آنزیمی با آنزیم *Ban*I تولید باندهای ۲۴۵ و ۴۴ جفت باز را می‌کند. نوکلئوتید C در موقعیت ۱۲۴۵ یک جایگاه اضافی برای هضم آنزیمی با آنزیم *Ban*I را ایجاد کرد و در نتیجه سه باند ۱۴۸، ۹۷ و ۴۴ جفت باز را تولید می‌کند. برای نشانگرهای D13S141 و D13S175 به ترتیب ۴ و ۷ آلل مختلف در جمعیت موردمطالعه مشاهده شد. آزمون neutrality با استفاده از اطلاعات ژنوتیپی برای نشانگرهای SNP1245، D13S175 و D13S141 واقع در ناحیه ژنی *GJB2* اجرا شد. نتایج به دست آمده با برنامه Popgene32 و PyPop به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. ارزش F برای هر سه نشانگر مورد مطالعه شده در حدواسط L95 و U95 قرار داشت (جدول ۱). ارزش F برای هر سه نشانگر مورد مطالعه کوچکتر از ارزش F^ محاسبه گردید و ارزش Fnd هم برای نشانگرهای SNP1245، D13S141 و D13S175 در جمعیت ایرانی به ترتیب ۰/۵۹۸۰-، ۱/۰۱۵۵- و ۰/۶۴۵۷- ولی بدون ارزش معنی‌دار P تخمین زده شد (جدول ۲). نتایج حاصل از اجرا آزمون‌های neutrality بر روی سه نشانگر مطالعه شده در این تحقیق بیانگر آن است که احتمالاً این سه نشانگر در جمعیت ایرانی تحت تأثیر انتخاب متعادل قرار دارند.

جدول ۱- تخمین مقدار هموزیگوسیتی مشاهده شده، حد پایین اطمینان ۹۵ درصد و حد بالای اطمینان۹۵ درصد برای نشانگرهای SNP1245، D13S141 و D13S175 در جمعیت ایرانی با استفاده از برنامه Popgene32. K=تعداد آلل‌ها،F= هموزیگوسیتی مشاهده شده، L95= حد پایین اطمینان ۹۵ درصد، U95= حد بالای اطمینان ۹۵ درصد.

جایگاه ژنی	k	F	L95	U95
SNP1245	۲	۰/۷۳۱۲	۰/۵۰۲۴	۰/۹۹۰۱
D13S141	۴	۰/۴۲۲۰	۰/۳۲۰۴	۰/۹۴۱۳
D13S175	۷	۰/۳۲۵۵	۰/۲۲۰۴	۰/۷۷۰۸

جدول ۲- تخمین مقدار هموزیگوسیتی مشاهده شده، هموزیگوسیتی مورد انتظار و انحراف نرمال هموزیگوسیتی نشانگرهای SNP1245، D13S141 و D13S175 در جمعیت ایرانی با استفاده از برنامه PyPop. Fnd=انحراف نرمال هموزیگوسیتی، F= هموزیگوسیتی مشاهده شده، F^= هموزیگوسیتی موردانتظار.

جایگاه ژنی	F	F^	Fnd	ارزش P
SNP1245	۰/۷۳۱۲	۰/۸۳۱۴	-۰/۵۹۸۰	۰/۲۸۴۲
D13S141	۰/۴۲۲۰	۰/۶۱۰۲	-۱/۰۱۵۵	۰/۱۷۰۵
D13S175	۰/۳۲۵۵	۰/۴۲۲۹	-۰/۶۴۵۷	۰/۳۰۹۶

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ای که بر روی جمعیت اصفهان صورت گرفته است، مشخص شده است که هاپلوتیپ‌های نشانگرهای *Bgl*II-*Eco*RI در ژن فنیل آلانین

Archive of SID

www.SID.ir

هیدروکسیلاز (*PAH*) در جمعیت اصفهان تحت تأثیر انتخاب متعادل قرار دارند (Fazeli and Vallian, 2010). پس از آن، به منظور افزایش آگاهی در مورد ساختار ژنتیکی جمعیت‌های ایرانی، اثر انتخاب بر روی سه نشانگر واقع در ناحیه ژنی *GJB2* بررسی شد. نشانگرهای SNP1245، D13S141 و D13S175 به ترتیب در ناحیه پروموتوری، انتهای سانترومری و تلومری ژن *GJB2* قرار دارند.

با استفاده از اطلاعات ژنوتیپی ۱۰۰ فرد غیرخویشاوند، ارزش F (هموزیگوسیتی مشاهده شده) هر سه نشانگر SNP1245، D13S175 و D13S141 محاسبه گردید. همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، ارزش F محاسبه شده در حد پایین اطمینان ۹۵ درصد (L95) و حد بالای اطمینان ۹۵ درصد (U95) ارزش F مورد انتظار قرار داشت. در صورتی که ارزش F خارج از مقدار حدواسط L95 و U95 قرار داشته باشد، نشانگر مورد بررسی تحت hitchhiking ژنتیکی قرار خواهد داشت و نیروی انتخاب مؤثر بر روی نشانگر یا جایگاه ژنی دیگر بر روی فراوانی آللی و هتروزیگوسیتی نشانگر مورد مطالعه تأثیر خواهد گذاشت. بر اساس نتایج به دست آمده از برآورد ارزش F نشانگرهای مطالعه شده با نرم‌افزار Popgene32، به نظر نمی‌رسد که این سه نشانگر چندشکلی در جمعیت ایرانی تحت تأثیر hitchhiking ژنتیکی قرار داشته باشند.

مقدار هموزیگوسیتی مشاهده شده (F)، هموزیگوسیتی موردانتظار (F^) و انحراف نرمال هموزیگوسیتی (Fnd) سه نشانگر SNP1245، D13S141 و D13S175 در جمعیت ایرانی با نرم‌افزار Pypop تخمین زده شد. همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، ارزش F محاسبه شده برای نشانگرهای مطالعه شده در این تحقیق کوچکتر از ارزش F^ است و ارزش Fnd نیز منفی است. در صورتی که F>F^ باشد و ارزش Fnd نیز عددی مثبت باشد، می‌توان نتیجه گرفت که نشانگر یا جایگاه ژنی موردمطالعه تحت تأثیر انتخاب جهت‌دار قرار دارد. ارزش Fnd منفی و F<F^ بیانگر آن است که نشانگر یا جایگاه ژنی مطالعه شده در جمعیت تحت تأثیر انتخاب متعادل قرار دارد. نتایج آزمون neutrality سه نشانگر چندشکلی ژن *GJB2* که با نرم‌افزار Pypop به دست آمده است، اشاره بر آن دارد که نشانگرهای موردمطالعه در این تحقیق در جمعیت ایرانی تحت تأثیر انتخاب متعادل قرار دارند.

موانع جمعیتی، فرآیندهای تکاملی هستند که مانع تولید مثل درصد بالایی از جمعیت می‌گردند. موانع جمعیتی می‌توانند باعث افزایش درون زادآوری یا اثر بنیان‌گذار گردد که معمولاً باعث کاهش هتروزیگوسیتی می‌گردد. هتروزیگوسیتی مشاهده شده نشانگر D13S175 در جمعیت موردمطالعه ۵۳ درصد برآورد شده است. از میان ۷ آلل مشاهده شده برای نشانگر D13S175 در جمعیت ایرانی آلل ۳ بالاترین فراوانی را نشان می‌دهد و فراوانی تقریباً برابر با ۰/۵ دارد. از میان ۵۳ درصد افراد هتروزیگوت مشاهده شده، ۴۲ درصد افراد مورد مطالعه برای آلل ۳ هتروزیگوت بودند. به نظر می‌رسد، ژنوتیپ هتروزیگوت برای آلل ۳ نشانگر D13S175 در جمعیت ایرانی، سازگاری زیستی و تولید مثلی بالاتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها به افراد می‌دهد. نتایج حاصل از اجرای آزمون neutrality بر روی نشانگر D13S175 (جدول ۲) نیز تأییدکننده اثر انتخاب متعادل بر روی این نشانگر است. در مورد نشانگر D13S141، هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت

Archive of SID

www.SID.ir

ایرانی به میزان ۶۰ درصد برآورد شده است. آلل ۲ در مقایسه با سایر آلل‌های مشاهده شده برای نشانگر D13S141 فراوانی بالای ۰/۵ نشان می‌دهد که ۵۶ درصد افراد مطالعه شده برای آلل ۲ هتروزیگوت هستند. به نظر می‌رسد که هتروزیگوت بودن برای آلل ۲ نشانگر D13S141 نیز همانند ژنوتیپ هتروزیگوت برای آلل ۳ نشانگر D13S175 مزیت زیستی بالاتری را به افراد اعطا می‌کند. این نتایج با نتایج آزمون neutrality نشانگر D13S141 همخوانی دارد (جدول ۲).

اگر چه هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای نشانگر SNP1245 در جمعیت ایرانی موردمطالعه بسیار پایین و تقریبا ۲۴ درصد برآورد می‌شود، نتایج آزمون neutrality نشانگر SNP1245 بیانگر آن است که افراد هتروزیگوت با ژنوتیپ C/T در جمعیت ایرانی سازگاری زیستی بالاتری نسبت به افراد هموزیگوت دارند.

نتایج به دست آمده در این پژوهش، حاکی از تأثیر انتخاب متعادل بر روی نشانگرهای SNP1245، D13S141 و D13S175 ژن *GJB2* در جمعیت ایرانی است. به نظر می‌رسد که چندشکلی نشانگرهای ژن *GJB2* در جمعیت ایرانی توسط انتخاب متعادل حفظ می‌شود.

منابع

Adamo, P. D., Guerci, V. I., Fabretto, A., Faletra, F., Grasso, D. L., Ronfani, L., Montico, M. and Morgutti, M. (2009) Does epidermal thickening explain *GJB2* high carrier frequency and heterozygote advantage?. European Journal of Human Genetics 17: 284-286.

Bruzzone, R., White, T. and Paul, D. (1996) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. European Journal Biochemistry 238: 1-27.

Common, J. E., Davies, D. and Kelsell, D. P. (2004) Further evidence for heterozygote advantage of *GJB2* deafness mutations: a link with cell survival. Journal of Medical Genetics 41: 573-575.

Daneshi, A., Hassanzadeh, S., Emamdjomeh, H., Mohammadi, SH., Arzhangi, S., Farhadi, M. and Najmabadi, H. (2011) Prevalence of *GJB2*-associated deafness and outcomes of cochlear implantation in Iran. Journal of Laryngology and Otology 31: 1-5.

Estivill, X., Fortina, P. and Surrey, S. (1998) Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. Lancet 351: 394-398.

Fazeli, Z. and Vallian, S. (2010) Evidences for balancing selection from PAH-*Bgl*II and PAH-*Eco*RI polymorphisms in Isfahan population. Journal of Taxonomy and Biosystematics 1(1): 73-80.

Kelley, P., Harris, D. and Comer, B. (1998) Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. American Journal of Human Genetics 62: 792-799.

Kikuchi, T., Kimura, R. and Paul, D. (1995) Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. Anatomy and embryology 191: 101-118.

Lancaster, A., Nelson, M. P., Single, R. M., Meyer, D. and Thomson, G. (2003) PyPop: a software framework for population genomics: analyzing large-scale multi-locus genotype data. Pacific Symposium on Biocomputing 8: 514-525.

Man, Y. K., Trolove, C. and Tattersall, D. (2007) A deafness-associated mutant human connexin 26 improves the epithelial barrier in vitro. Journal of Membrane Biology 218: 29-37.

Martinez, A., Acuna, R. and Figueroa, V. (2009) Gap-junction channels dysfunction in deafness and

Archive of SID

www.SID.ir

hearing loss. Antioxidant and Redox Signaling 11: 309-322.

Meyer, C. G., Amedofu, G. K., Brandner, J. M., Pohland, D., Timmann, C. and Horstmann, R. D. (2002) Selection for deafness?. Nature Medicine 8: 1332-1333.

Pier, G. B., Grout, M. and Zaidi, T. (1998) Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. Nature 393: 79-82.

Tran, V. N., Hieu, G., Clair, C., Bruzzone, R. (2003) Connexin-dependent inter-cellular communication increases invasion and dissemination of Shigella in epithelial cells. Nature Cell Biology 5: 720-726.

Rezaei, H. and Vallian, S. (2011) BanI/D13S141/D13S175 Represents a novel informative haplotype at the *GJB2* gene region in the Iranian population. Cellular and Molecular Neurobiology 5: 749-754.

Zelante, L., Gasparini, P. and Estivill, X. (1997) Connexin26 mutations associated with the most common form of nonsyndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. Human Molecular Genetics 6: 1605-1609.

Archive of SID

www.SID.ir