بررسی تنوع ژنتیکی مارکر rs2278961 در ناحیهٔ ژنی *COLQ*؛ نشانگری گویا در مطالعهٔ مولکولی بیماری نشانگان میاستنی مادرزادی در جمعیت اصفهان

نفیسه معینی‌فر[۱]، صادق ولیان بروجنی[۲]*

۱. کارشناسی‌ارشد ژنتیک مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
۲. استاد ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۲۱
تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۷/۲۱

چکیده

زمینه و هدف نشانگان میاستنی مادرزادی (CMS) بیماری‌ای هتروژنی است که به سه نوع پیش‌سیناپسی، سیناپسی و پس‌سیناپسی تقسیم می‌شود. نشانگان میاستنی مادرزادی نوع سیناپسی به‌دلیل جهش‌های مغلوب در ژن *COLQ* رخ می‌دهد. روش ایده‌ال برای تشخیص مولکولی این بیماری آنالیز مستقیم جهش‌های ژنی است که بسیار وقت‌گیر و پرهزینه است. بنابراین، از روش‌های جایگزین در بررسی پیوستگی با استفاده از نشانگرهای چند شکلی از جمله چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNP) می‌توان استفاده کرد.

مواد و روش‌ها در این مطالعه، نخست از طریق بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشانگر rs2278961 واقع در ناحیهٔ ۳'UTR، ژن *COLQ* انتخاب شد. بعد از انتخاب نشانگر، طراحی پرایمر انجام شد و در نهایت نشانگر rs2278961 در جمعیت اصفهان از طریق تکنیک ARMS PCR تعیین ژنوتیپ شد و با استفاده از اطلاعات حاصل از تعیین ژنوتیپ، درجهٔ هتروزیگوسیتی و فراوانی آللی آن به‌کمک پایگاه Genepop محاسبه گردید. در نهایت، از نرم‌افزار PIC Calculator برای تخمین مقدار PIC (Polymorphism Information Content) استفاده شد.

یافته‌ها با توجه به نتایج حاصل از پایگاه‌های Genepop و PIC Calculator، فراوانی آلل مغلوب A (MAF)، درجهٔ هتروزیگوسیتی و مقدار PIC به‌ترتیب ۰/۵۳۹، ۰/۶۱۸۴۲۱۰۵ و ۰/۳۷۳۵ تخمین زده شد.

نتیجه‌گیری از آنجا که MAF>۰/۲ و PIC نزدیک به ۰/۳۷۵ از معیارهای لازم برای نشانگری کارآمد است، rs2278961 با دارابودن شرایط ذکرشده نشانگر مناسبی در تشخیص مولکولی بیماری CMS در جمعیت ایرانی پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها:
بیماری نشانگان میاستنی مادرزادی (CMS)، جمعیت اصفهان، چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNP)، نشانگر rs2278961.

مقدمه

نشانگان میاستنی مادرزادی (CMS) بیماری‌ای هتروژن است که به سه نوع پیش‌سیناپسی، سیناپسی و پس‌سیناپسی تقسیم می‌شود. هر نوع از CMS دارای نقص خاصی در انتقال پیام از عصب به عضله است که از طریق یک یا چند سازوکار دنبال می‌شود [۱]. این بیماری در اوایل نوزادی یا کودکی بروز پیدا می‌کند. نخستین علایم عبارت است از افتادگی پلک‌ها (پتوز)، ضعف در مکیدن شیر، گریه، عفونت‌های تنفسی که در مرحلهٔ بحرانی تب و استفراغ نیز به‌دنبال دارد [۲]. در صورتی که این مرحله درمان نشود، ممکن است کشنده باشد و باعث آسیب به مغز به‌دلیل کمبود اکسیژن شود. با افزایش سن مراحل بحرانی کمتر اتفاق می‌افتد [۳].

نشانگان میاستنی مادرزادی نوع سیناپسی به‌دلیل نقص در فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (AChE) ایجاد می‌شود. این

* نویسندهٔ مسئول: صادق ولیان بروجنی
نشانی: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک
تلفن: ۰۳۱-۳۷۹۳۲۴۵۶ دورنگار: -
رایانه: svallian@sci.ui.ac.ir
شناسه ORCID: صادق ولیان بروجنی 0000-0002-5151-5923
نفیسه معینی فر 0000-0003-4576-1164

مجلهٔ علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۵، شمارهٔ ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۷، ص
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

امر به‌دلیل جهش‌های مغلوب در ژن *COLQ* است [۴]. ژن *COLQ* روی کروموزوم 3p25 قرارگرفته است و پروتئینی ۴۵۵ اسید آمینه‌ای را رمز می‌کند. این ژن مسئول سنتز پروتئین COLQ، دم کلاژنی سه رشته‌ای آنزیم استیل کولین استراز است [۵]. این پروتئین مسئول اتصال زیریونیت‌های کاتالیتیکی آنزیم استیل کولین استراز به غشای پایه از سلول‌های پس‌سیناپسی است [۶]. پروتئین COLQ سه دامنه دارد [۷]. جهش در هر یک از دامنه‌ها باعث نقص جزئی یا کامل در عملکرد آنزیم استیل کولین استراز خواهد شد [۸]. عدم‌حضور یا فعالیت آنزیم استیل کولین استراز باعث طولانی‌شدن حضور استیل کولین در کنار گیرنده‌اش می‌شود. این امر به طولانی‌شدن جریان پیام‌رسانی در انتهای نورون، حساسیت‌زدایی گیرنده و در نتیجه بلوکه‌شدن دپلاریزه‌شدن در غشای ماهیچه می‌انجامد [۹]. وجود موتاسیون هموزیگوت G240X در ۶ عرب فلسطینی و ۱ عراقی یهودی احتمال شایع‌بودن آن را در کشورهای شرقی قوت می‌بخشد [۱۰، ۱۱].

تشخیص CMS به‌کمک بیوپسی عضله از طریق نبود یا مشاهدهٔ ضعیف AChE در سیناپس عصب عضله (neuromuscular junction)، همچنین شناسایی مستقیم جهش‌ها انجام می‌شود [۱۲، ۱۳]. با توجه به تعداد بالای جهش‌ها در ژن *COLQ* (۴۰ جهش)، روش جایگزین در تشخیص ژنتیکی، بر اساس آنالیز پیوستگی با استفاده از نشانگرهای چندشکلی متصل به ژن است [۱۴].

چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNP) شایع‌ترین چندشکلی‌ها در ژنوم انسان است و به‌طور تقریبی به فاصلهٔ ۲۹۰ جفت بازی در ژنوم وجود دارد [۱۵]. جایگاه تک‌نوکلئوتیدی معمولاً زمانی SNP در نظر گرفته می‌شود که فراوانی آلل مغلوب آن در جمعیت حداقل ۱ درصد باشد و زمانی نشانگر در تشخیص بیماری‌ها در نظر گرفته می‌شود که آگاهی‌دهنده باشد [۱۶]. این نشانگرها بر حسب اینکه در داخل ژن یا خارج ژن واقع شده باشد و با توجه به درجهٔ هتروزیگوتی آن ارزش تشخیصی متفاوتی دارد. درجهٔ هتروزیگوتی و فراوانی آللی نشانگرهای چند شکل در جمعیت‌های مختلف متفاوت است و از الگوی وابسته به جمعیت تبعیت می‌کند [۱۷].

مواد و روش‌ها

تمامی نشانگرهای چندشکلی موجود در ناحیهٔ ژنی *COLQ* در پایگاه‌های dbSNP، SNPper، Ensembl genome browser، F-SNP و UCSC Genome Browser از لحاظ جایگاه، درجهٔ هتروزیگوسیتی، عملکرد و فراوانی آللی آلل مغلوب بررسی و نشانگر rs2278961 در ناحیهٔ ۳'UTR ژن *COLQ* برای مطالعه در جمعیت ایرانی انتخاب شد. این نشانگر شامل دو آلل G و A است. آلل G آلل غالب و متداول و آلل A در بیشتر جمعیت‌ها آلل مغلوب به‌شمار می‌رود. نشانگر مذکور از لحاظ عملکردی نیز در پایگاه‌های F-SNP و SNP Function Prediction بررسی و مشخص شد که در تنظیم بیان ژن *COLQ* نقش دارد.

به‌منظور تعیین ژنوتیپ نشانگر rs2278961، از ۱۵۲ نفر از افراد سالم غیرخویشاوند شهر اصفهان مقدار ۱۰ میلی‌لیتر خون در لولهٔ حاوی ۱ میلی‌لیتر EDTA با غلظت ۰/۵ مولار جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج DNA برای نمونه‌های خون به‌روش نمک اشباع (salting out) انجام شد. DNAهای استخراج‌شده هم از نظر کمّی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و هم از نظر کیفی با بردن روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. سپس، تعیین ژنوتیپ برای نشانگر مورد نظر به‌روش ARMS PCR انجام گرفت. در این روش، از سه آغازگر در هرویال استفاده می‌شود، به‌صورتی که آغازگر رفت خارجی (forward outer primer) و آغازگر برگشت خارجی (reverse outer primer) تشکیل باند کنترل مثبت و آغازگر رفت خارجی (forward outer primer) و آغازگر برگشت داخلی (reverse inner primer) تشکیل باند داخلی و تشخیصی برای تعیین ژنوتیپ نمونه می‌دهد. برای هر نمونه دو ویال جداگانه در نظر گرفته می‌شود و در هر کدام آغازگرهای رفت و برگشت خارجی و برگشت داخلی اضافه می‌شود، با این تفاوت که نوع آغازگر داخلی در هر ویال متفاوت و هر کدام شامل یک آلل از دو آلل مارکر در سر '۳ آغازگر مزبور است و تشخیص نوع آلل را به عهده دارد. بدین منظور، چهار آغازگر شامل دو آغازگر خارجی برای ایجاد باند کنترل و دو آغازگر داخلی برای تشخیص آلل از طریق پایگاه اینترنتی Primer1 طراحی شد. این پایگاه به‌طور اختصاصی برای طراحی آغازگرهای مربوط به tetra-primer ARMS-PCR به‌کار گرفته می‌شود [۱۸]. آغازگرهای طراحی‌شده با استفاده از نرم‌افزارهای Oligo7 و TM Caculator تجزیه‌وتحلیل و ویرایش‌هایی روی آن انجام شد. آغازگرهای نهایی از طریق پایگاه NCBI با ژنوم انسان BLAST و از نظر ایجاد باند فرعی بررسی و تأیید شد. اطلاعات آغازگرها و طول باندهای تشخیصی و کنترل در جدول ۱ آمده است.

شرایط واکنش PCR شامل ۱μL از آغازگر FO (10pM)،

۰/۵µL از آغـازگـر RO (10pM)، ۰/۷۵µL از آغـازگـر RI (10pM)، ۰/۲µL از آنـزیـم Taq DNA Polymerase (5u/µL)، ۰/۵µL از dNTP (20mM)، ۲/۵µL از PCR Buffer (10X)، ۰/۷۵µL از MgCl2 (100mM) و ۱µL از DNA ژنومی بود کـه در نهـایـت حجم محلول بـا ddH_2O به ۲۵µL رسـانیده شـد. برای انجام PCR از دسـتگاه ترموسـایکلر (Eppendorf Germany) اسـتفاده شـد. برنامهٔ انجام PCR به شرح زیر است:

۱. مرحلهٔ Primery Denaturation در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه
۲. مرحلهٔ Denaturation در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه
۳. مرحلهٔ Annealing در دمای ۵۵ درجهٔ سـانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه
۴. مرحلهٔ Extension در دمای ۷۲ درجهٔ سـانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه
۵. تکرار مرحلهٔ ۲ تا ۴ تا ۳۵ بار
۶. مـرحـلـهٔ Final Extension در دمـای ۷۲ درجـهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه.

محصـولات تکثیرشـده روی ژل آگارز ۲ درصد به‌مدت ۴۵ دقیقه تحت ولتاژ ۹۰ ولت رانده شـد. سـپس، با دسـتگاه Gel Documentation عکسـبرداری از ژل با کمک نور UV صـورت پذیرفت.

برای تخمین فراوانی آللی، درجهٔ هتروزیگوسیتی و فراوانی ژنوتیپی مشـاهده‌شده و مورد انتظار فنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت از پایگاه Genepop اسـتفاده شـد [۱۹]. همچنین، مقدار PIC (polymorphism information content) بر اساس معادلهٔ (۱) از طریق پایگاه PIC Caculator و نرم‌افزار Power Marker محاسـبه شد (Pi و Pj میزان فراوانی آللی آلل غالب و مغلوب است).

$$PIC=1-\sum_{i=1}^{n} p_i i^2 -2\sum_{i=1}^{n-1}\sum_{j=i+1}^{n} p_i^2 pj2 \quad (۱)$$

جدول ۱. آغازگرهای طراحی‌شده برای ARMS PCR در نشانگر rs2278961

آغازگر	توالی آغازگر 5'-3'	طول آغازگر	Tm	طول محصول
FO	GACAAATTCCTGCTACTAAGACATG	۲۵	۵۷/۹۹	-
RO	GAGAGAACGTGCCCACTTC	۱۹	۵۸/۱۷	۳۹۹
(G) RI	ATTCTAAAACAGCCTGCAGGTATG	۲۴	۵۹/۳۶	۲۵۱
(A) RI	ATTCTAAAACAGCCTGCAGGTATA	۲۴	۵۸	۲۵۱

ARMS PCR: Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction; FI: Forward Inner; RO: Reverse Outer; FO: Forward Outer; RI: Reverse Inner

نتایج

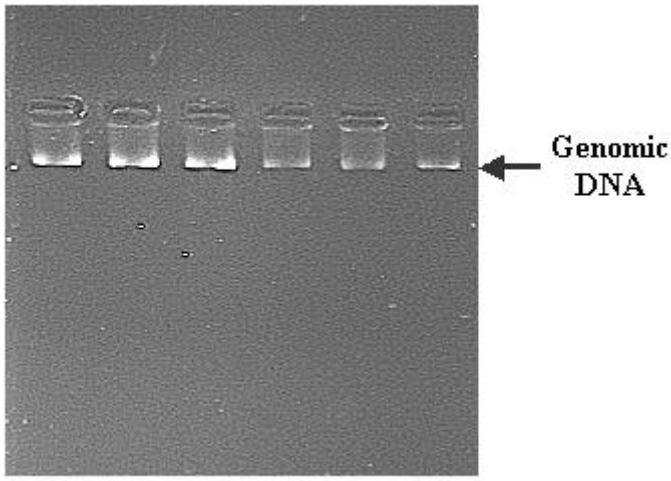
در مطالعهٔ حاضر پس از استخراج DNA ژنومی و ارزیابی آن از نظر کمّی و کیفی (شـکل ۱)، تنوع ژنتیکی مارکر چندشـکلی تک‌نوکئوتیدی rs2278961 با روش ARMS PCR بررسی شد. محصـولات حاصـل از PCR روی ژل آگارز ۲ درصـد برده و در هر ستون دو باند مشاهده شد (شکل ۲).

ژنوتیپ افراد تحت مطالعه به‌صـورت فایل ورودی به پایگاه اینترنتی Genepop داده شد. نتایج حاصل به شرح زیر است:

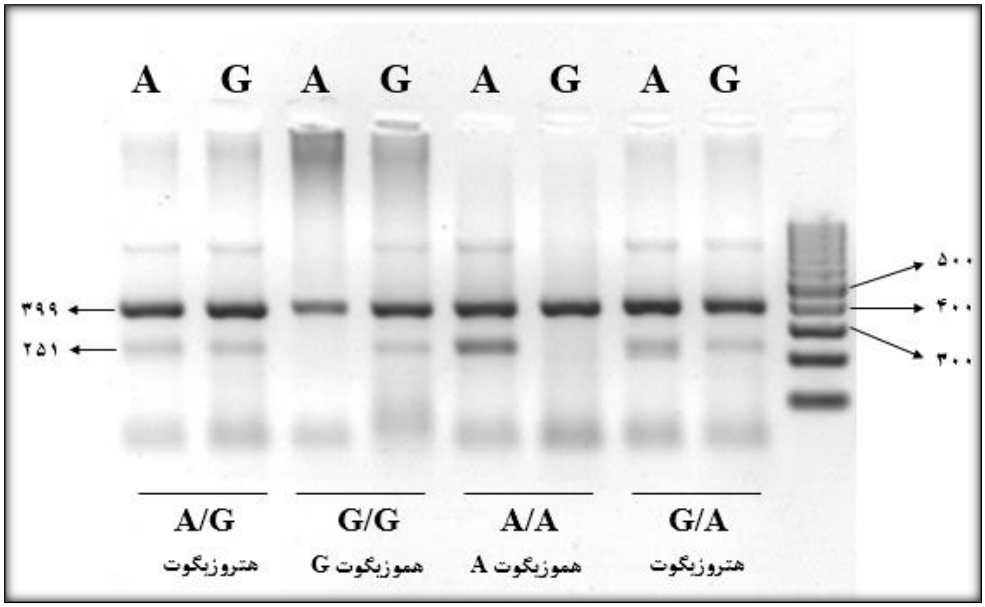
- از ۱۵۲ فرد مورد مطـالعـه ۲۳ نفر ژنوتیپ GG، ۳۵ نفر ژنوتیـپ AA و ۹۴ نفر ژنوتیـپ AG داشـتند. فراوانی مربوط به ژنوتیپ‌های مشـاهده شـده و مورد انتظار در جدول ۲ نشـان داده شـده اسـت.
- فراوانی آلل غالب G در جمعیت اصـفهان ۰/۴۶۱ و فراوانی آلل مغلوب A ۰/۵۳۹ به‌دست آمد.
- هموزیگوسـیتی مشـاهده‌شـده در جمعیت اصـفهان ۳۸/۱۵۷۸۹۵ درصـد اسـت، در حـالـی کـه هموزیگوسـیتی مورد انتظار برای جمعیت اصـفهان ۵۰/۱۴۷۶۳۲ محـاسـبـه شـد. هتروزیگوسـیتی مشـاهده‌شـده در جمعیت اصـفهان ۶۱/۸۴۲۱۰۵ درصد تخمین زده شد، در صورتی که هتروزیگوسیتی مورد انتظـار برای جمعیـت اصـفهان ۴۹/۸۵۲۳۶۸ درصد بود.

در نهـایـت، مقدار PIC به‌کمک پایگاه PIC Calculator و نرم‌افزار Power Marker محاسـبه شـد. PIC ممکن اسـت مقـداری بین ۰ تـا ۱ داشـته باشـد. PIC=۰ به معنای یک آللی‌بودن نشـانگر اسـت، درصـورتی که PIC=۱ نشـان‌دهندهٔ تعداد بی‌نهایتی از آلل‌ها برای یک نشانگر خواهد بود. مارکر دو آللی دارای حـداکثر مقـدار PIC=۰/۳۷۵ اسـت، بنـابراین در نشـانگرهای دو آللی هر چه PIC به‌دسـت‌آمده به عدد ۰/۳۷۵

نزدیک‌تر باشد، شاخص مناسبی برای اطلاع‌دهندگی نشانگر تک‌نوکلئوتیدی در نظر گرفته می‌شود [۲۱]. با توجه به اینکه مقدار PIC، به کمک هر دو نرم‌افزار نزدیک به ۰/۳۷۵ تخمین زده شد (جدول ۳)، بنابراین نشانگر rs2278961 از نظر اطلاع‌دهندگی نشانگر بسیار مناسبی خواهد بود.



شکل ۱. ارزیابی کیفی نمونه‌های DNA ژنومی استخراج‌شده به‌کمک ژل آگارز ۱ درصد



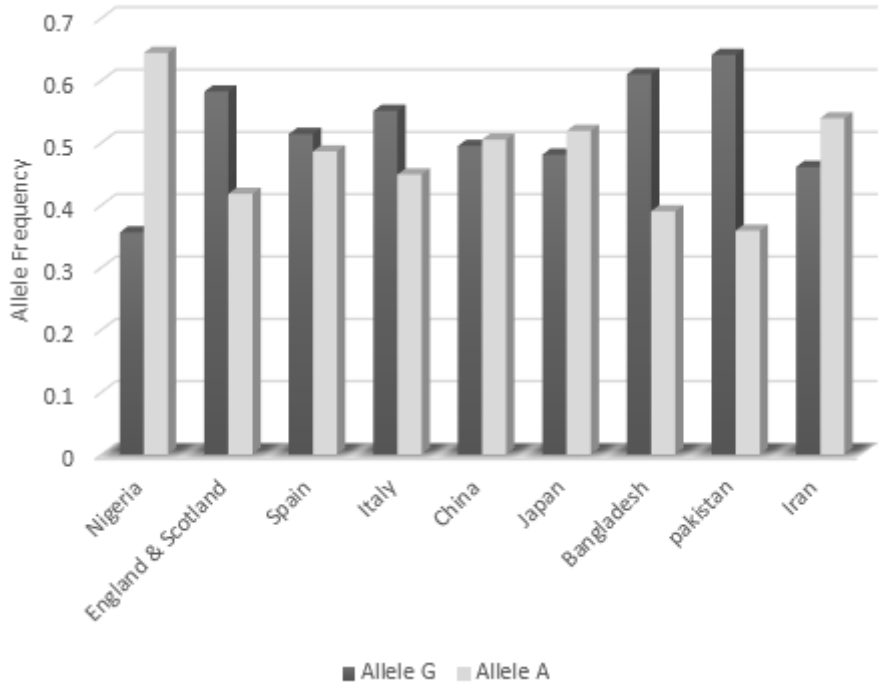
شکل ۲. تعیین ژنوتیپ نشانگر rs2278961 با استفاده از روش ARMS PCR روی ژل آگارز ۲ درصد. باند ۳۹۹ جفت بازی نشان‌دهندهٔ باند کنترل و باند ۲۵۱ جفت بازی نشان‌دهندهٔ باند داخلی و تشخیصی است. هر دو ستون مجاور متعلق به یک نفر است. در صورتی که در هر دو ستون دو باند کنترل و تشخیصی مشاهده شود، فرد مورد نظر هتروزیگوت است، ولی در صورتی که از دو ستون مربوط به یک فرد فقط یک ستون دو باند را نشان دهد و ستون دیگر فقط باند کنترل را داشته باشد، نشان‌دهندهٔ هموزیگوت‌بودن فرد مورد نظر خواهد بود. شکل سمت چپ ستون ۱ و ۲ مربوط به فرد هتروزیگوت AG، ستون ۳ و ۴ مربوط به فرد هموزیگوت G، ستون ۵ و ۶ مربوط به فرد هموزیگوت A و ستون ۷ و ۸ مربوط به فرد هتروزیگوت است. سایر باندها اضافی و غیراختصاصی است.

جدول ۲. ژنوتیپ‌های مشاهده‌شده و مورد انتظار از نشانگر rs2278961

ژنوتیپ	ژنوتیپ‌های مشاهده‌شده	ژنوتیپ‌های مورد انتظار
G/G	۲۳	۳۲/۱۱۲۲
G/A	۹۴	۷۵/۷۷۵۶
A/A	۳۵	۴۴/۱۱۲۲

جدول ۳. مقادیر PIC در نشانگر rs2278961 با استفاده از پایگاه PIC Calculator و نرم‌افزار Power Marker

نشانگر	مقدار PIC	
	Power Marker	PIC Calculator
rs2278961	۰/۳۷۳۴	۰/۳۷۳۵



شکل ۳. مقایسهٔ فراوانی آللی آلل‌های A و G در ایران و سایر کشورها

بحث

نشـانگان میاسـتنی مادرزادی نوع سـیناپسـی بیماری ژنتیکی نادری با وراثت اتوزومـــی مغلـــوب اسـت. بیماران میاستنی مادرزادی نوع سـیناپسـی ۱۰ درصـد کل CMSها را شـامل می‌شود که در ژن *COLQ* و کدکنندهٔ دم کلاژنی AChE دارای جهش است [۲۲]. تنوع بالای جهش‌های ژن *COLQ*، تشخیص مسـتقیم جهش‌های بیماری‌زا را مشـکل کرده اسـت. بنابراین، اسـتفاده از روش‌هـای غیرمسـتقیم به‌کمک نشـانگرهای چندشـکلی پیشـنهاد شده است [۲۳]. معرفی نشانگرهای گویا کمک مؤثری در مطالعهٔ مولکولی بیماری سـندروم میاستنی با روش غیرمستقیم در جمعیت ایرانی است. همین‌طور اطلاعات مولکولی حاصـل از تعیین ژنوتیپ نشـانگرها در ایجاد بانک اطلاعاتی نشـانگرهای ژنی ایرانی به‌کار گرفته می‌شـود. در این

مطالعه، پس از بررسی نشانگرهای ناحیهٔ ژنی *COLQ*، نشانگر rs2278961 برای مطالعه در جمعیت ایرانی انتخاب شد. پس از تعیین ژنوتیپ نشانگر rs2278961 روی ۱۵۲ نفر از جمعیت اصفهان، فراوانی آللی برای آلل‌های G و A محاسبه شد که مقادیر آن به‌ترتیب ۰/۴۶۱ و ۰/۵۳۹ تخمین زده شد. سپس، درصد هتروزیگوسیتی برای مارکر ذکرشده به‌کمک پایگاه اطلاعاتی Genepop محاسبه شد. هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار به‌ترتیب ۶۱/۸۴۲۱۰۵ و ۴۹/۸۵۲۳۶۸ ارزیابی شد.

فراوانی آلل A در پایگاه اطلاعاتی dbSNP به‌طور میانگین ۰/۴۸۰۲گزارش شده است. همچنین، در 1000 Genomes Project از طریق پایگاه Ensembl genome browser، فراوانی آلل A (MAF) در جمعیت نیجریایی ۰/۶۴۴ ارائه شده که از فراوانی این آلل در جمعیت ایرانی بیشتر بود، در صورتی که این مقدار برای جمعیت‌های انگلیسی، اسپانیایی، ایتالیایی، چینی، ژاپنی، بنگلادشی و پاکستانی به‌ترتیب ۰/۴۱۸، ۰/۴۸۶، ۰/۴۴۹، ۰/۵۰۵، ۰/۵۱۹، ۰/۳۹ و ۰/۳۵۹گزارش شده و از فراوانی آللی آن در جمعیت ایرانی کمتر است (شکل ۳).

بیشترین و کمترین MAF به‌ترتیب مربوط به جمعیت‌های نیجریایی و پاکستانی است [۲۴].

در نهایت، مقدار PIC برای نشانگر rs2278961 به‌کمک پایگاه PIC Calculator و نرم‌افزار Power Marker محاسبه شد. مقدار PIC ۰/۳۷۳۵ تخمین زده شد که با توجه به اینکه مقدار PIC بسیار به عدد ۰/۳۷۵ نزدیک است، آگاهی‌دهندگی این نشانگر بسیار بالا خواهد بود.

در مجموع، با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، می‌توان نشانگر rs2278961 واقع در ناحیهٔ 3'UTR ژن *COLQ* را نشانگر مناسبی در تشخیص‌های مولکولی سندروم میاستنی مادرزادی به‌روش آنالیز پیوستگی معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان برای تأمین بودجهٔ مطالعهٔ مزبور در غالب پژوهانه، همچنین از تمامی افرادی که در تهیهٔ نمونه ما را یاری کردند تشکر و قدردانی می‌کنیم.

References

[1]. Ohno K, Ohkawara B, Ito M, Engel AG. Molecular genetics of congenital myasthenic syndromes. eLS. 2014.
[2]. Engel AG. Congenital myasthenic syndromes. Journal of Child Neurology. 1988; 3(4): 233-46.
[3]. Engel A. The scientific basis of myology En: engel AG and banker BQ (eds). Myology Basic and Clinical. New York. McGraw-Hill. 1986.
[4]. Matlik HN, Milhem RM, Saadeldin IY, Al-Jaibeji HS, Al-Gazali L, Ali BR. Clinical and molecular analysis of a novel COLQ missense mutation causing congenital myasthenic syndrome in a Syrian family. Pediatric Neurology. 2014; 51(1): 165-9.
[5]. Bon S, Ayon A, Leroy J, Massoulié J. Trimerization domain of the collagen tail of acetylcholinesterase. Neurochemical Research. 2003; 28(3-4): 523-35.
[6]. Ohno K, Ohkawara B, Ito M. Recent advances in congenital myasthenic syndromes. Clinical and Experimental Neuroimmunology. 2016; 7(3): 246-59.
[7]. Harper CM. Congenital myasthenic syndromes. Seminars in Neurology. 2004; Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.
[8]. Engel AG, Shen XM, Selcen D, Sine SM. Congenital myasthenic syndromes: pathogenesis, diagnosis, and treatment. The Lancet Neurology. 2015; 14(4): 420-34.
[9]. Cruz PMR, Palace J, Beeson D. Congenital myasthenic syndromes and the neuromuscular junction. Current Opinion in Neurology. 2014; 27(5): 566-75.
[10]. Hantaï D, Richard P, Koenig J, Eymard B. Congenital myasthenic syndromes. Current Opinion in Neurology. 2004; 17(5): 539-51.
[11]. Shapira Y, Sadeh M, Bergtraum M, Tsujino A, Ohno K, Shen XM, et al. Three novel COLQ mutations and variation of phenotypic expressivity due to G240X. Neurology. 2002; 58(4): 603-9.
[12]. Donger C, Krejci E, Serradell AP, Eymard B, Bon S, Nicole S, et al. Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, COLQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic). The American Journal of Human Genetics. 1998; 63(4): 967-75.
[13]. Ohno K, Brengman J, Tsujino A, Engel AG. Human endplate acetylcholinesterase deficiency caused by mutations in the collagen-like tail subunit (ColQ) of the asymmetric enzyme. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998; 95(16): 9654-9.
[14]. Palace J, Beeson D. The congenital myasthenic syndromes. Journal of Neuroimmunology. 2008; 201: 2-5.
[15]. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. Nature Genetics. 2001; 27(3): 234-5.
[16]. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. Nature Genetics. 2003; 33: 228-37.
[17]. Fazeli Z, Vallian S. Molecular phylogenetic study of the Iranians based on polymorphic markers. Gene. 2013; 512(1): 123-6.
[18]. Collins A, Ke X. Primer1: primer design web service for tetra-primer ARMS-PCR. The Open Bioinformatics Journal. 2012; 6: 55-8.
[19]. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity. 1995; 86(3): 248-9.
[20]. Elston RC. Polymorphism information content. Encyclopedia of Biostatistics. 2005.
[21]. Hildebrand CE, David C, Torney C, Wagner P. Informativeness of polymorphic DNA markers. The Human Genome Project: deciphering the blueprint of heredity University Science Books, CA, USA. 1994: 100-2.
[22]. Eymard B, Hantai D, Estournet B. Congenital myasthenic syndromes. Handbook of Clinical Neurology. 2012; 113: 1469-80.
[23]. Engel AG. Congenital myasthenic syndromes in 2012. Current Neurology and Neuroscience Reports. 2012; 12(1): 92-101.
[24]. Siva N. 1000 Genomes project. Nature Biotechnology. 2008; 26(3): 256.

Analysis of genetic variation of rs2278961 Marker in *COLQ* gene as an informative marker for molecular diagnosis of congenital myasthenic syndrome in the Isfahan population

Nafiseh Moeinifar[1], Sadegh Vallian Brojeni[2*]

1. Department of Genetics,Isfahan university of Medical Sciences, Isfahan,Iran.
2. PhD of Genetics, Department of Genetics,Isfahan university of /medical Sciences, Isfahan,Iran.

Abstract

Background Congenital myasthenic syndromes (CMS) recognized as heterogeneous disorders arising from presynaptic, synaptic, or postsynaptic defects. Congenital myasthenic syndrome due to defects in synaptic activity of the acetylcholinesterase enzyme (AChE) is caused by recessive mutations in the COLQ gene. Ideal method for molecular diagnosis of this disease is direct analysis of the gene mutations, which is expensive and time consuming. Therefore, alternative methods such as linkage analysis using polymorphic markers including single nucleotide polymorphism (SNP) is suggested.

Materials and Methods In this study, using bioinformatic analysis, rs2278961 marker located on 3'UTR of COLQ gene was selected which contains two alleles G and A. rs2278961 marker was genotyped in the Isfahan population by ARMS PCR technique, using specific primers. Degree of heterozygosity and allelic frequencies were calculated by Genepop software. Finally, the amount of polymorphism information content (PIC) was computed by PIC Calculator software.

Results According to the results of Genepop and PIC Calculator, the frequency of recessive allele A (MAF), the degree of heterozygosity and the PIC were estimated 0.539, 0.61842105 and 0.3735, respectively.

Conclusion Since the MAF>0.2 and PIC close to 0.375 are the criteria for an efficient marker, rs2278961 having mentioned conditions, therefore it could be suggested as an appropriate markers for diagnosis of CMS disease in Iranian population..

Received: 2017/02/10
Accepted: 2017/10/13

Keywords: congenital myasthenic syndrome disease (CMS), Isfahan population, rs2278961, single nucleotide polymorphism (SNP).