مجلة غدد درون‌ريز و متابوليسم ايران
دانشگاه علوم پزشكي و خدمات بهداشتي ـ درماني شهيد بهشتي
دورة هفتم، ضميمة شمارة ۴، صفحه‌هاي ۴۰۳ ـ ۳۹۹ (زمستان ۱۳۸۴)

مقالة پژوهشي

بررسي برقراري تعادل هاردي واينبرگ و پيوستگي غيرتعادلي در ارتباط با دو پلي‌مورفيسم 629A/C- و TaqI در ژن CETP در تهران

مريم‌السادات دانشپور، دكتر مهدي هدايتي، دكتر فريدون عزيزي

چكيده

مقدمه: در اين مطالعه، تعادل هاردي واينبرگ براي اللهاي بررسي شده در پلي‌مورفيسم‌هاي TaqI و 629A/C- در ژن CETP و ميزان پيوستگي غير تعادلي بين اللهاي B2 و A محاسبه شده است. مواد و روش‌ها: از ميان جمعيت مورد بررسي در مطالعة قند و ليپيد تهران ۳۳۵ نفر در سه گروه با HDL كم، متوسط و بالا انتخاب شدند. DNA ژنومي در اين سه گروه استخراج و قطعه‌اي از پروموتر ژن CETP و قطعه‌اي از اينترون ۱ اين ژن با روش PCR تكثير شدند و سپس با روش RFLP اثر آنزيم Van19 I و TaqI بر اين قطعات بررسي شد. يافته‌ها: فراواني الل B2 در پلي‌مورفيسم TaqI برابر با ۰/۳۸۲ و فراواني الل A در پلي‌مورفيسم 629A/C- برابر با ۰/۴۶۲ به دست آمد و در بررسي، پيوستگي غير تعادلي مقادير D=۰/۰۹۶۵ و D'=۰/۴۶۹۵ است. نتيجه‌گيري: نتايج حاصل نشان داد كه اللهاي B1 و B2 در اينترون ۱ و اللهاي A و C در پروموتر اين ژن در جامعة مورد بررسي متعادل است و بين دو الل B2 و A پيوستگي غير تعادلي وجود دارد.

واژگان كليدي: پروتئين انتقال دهندة كلسترول استريفيه، پلي‌مورفيسم، الل، تعادل هاردي واينبرگ، پيوستگي غيرتعادلي

دريافت مقاله: ۸۴/۱۱/۱۵ ـ دريافت اصلاحيه: ۸۴/۱۱/۲۱ ـ پذيرش مقاله: ۸۴/۱۱/۲۲

مقدمه

در علم ژنتيک جمعيت، توزيع ژن‌ها و چگونگي حفظ يا تغيير فراواني ژن‌ها و ژنوتيپ‌ها در جمعيت مورد بررسي قرار مي‌گيرد. در اين زمينه، عوامل مربوط به ژنتيک مانند جهش و توليدمثل و عوامل محيطي و اجتماعي مانند انتخاب و مهاجرت، مي‌توانند فراواني و توزيع بيماري‌هاي ژنتيک را در خانواده و جوامع تعيين نمايند.[۱] جهت تعيين فراواني نسبي دو الل در يک جمعيت مي‌توان از طريق شمارش اللهاي افراد هر ژنوتيپ عمل نمود اما به دست آوردن اين فراواني ژنوتيپي تنها از طريق شمارش ميسر نيست زيرا ما از قبل نمي‌دانيم که چگونه اللها در افراد هتروزيگوت و هموزيگوت توزيع شده‌اند اما اگر جمعيتي التزام‌هاي خاصي داشته باشد، يک ارتباط سادة رياضي به نام قانون هاردي واينبرگ[i] براي محاسبة فراواني ژنوتيپ از فراواني اللي وجود دارد.[۲] از طرفي براي بررسي پيوستگي دو الل نزديک به هم بر روي يک کروموزوم از آزمون پيوستگي[ii] استفاده مي‌شود. اين آزمون نشان مي‌دهد که آيا اللهاي نزديک به هم بر روي يک کروموزوم، براي انتقال با هم به عنوان يک

i- Hardy Weinberg law
ii- Linkage analysis

مرکز تحقيقات غدد درون‌ريز و متابوليسم شهيد بهشتي؛ دانشگاه علوم پزشکي و خدمات بهداشتي ـ درماني شهيد بهشتي، **نشاني مکاتبة نويسندة مسؤول:** تهران، صندوق پستي ۴۷۶۳-۱۹۳۹۵؛ دکتر فريدون عزيزي E-mail: azizi@erc.ac.ir

واحد طي ميوز، تمايل دارند يا خير. هنگامي كه فراواني ژنوتيپ‌ها در يک جايگاه ژني، غير وابسته به فراواني ژنوتيپ‌ها در جايگاه ژني ديگر باشد، اين دو ژن پيوستگي غير تعادلي[i] نشان مي‌دهند. عوامل مختلفي چون تاريخچهٔ جهش‌ها، دريفت ژنتيكي و انتخاب بر پيوستگي اثرگذار مي‌باشند و اين پيوستگي تنها در جايگاه‌هاي ژني نزديک به هم ديده مي‌شود.[۲] در مطالعات قبلي در جمعيت تهران كه از مطالعهٔ قند و ليپيد تهران انتخاب شده بودند، ارتباط دو پلي‌مورفيسم TaqI در اينترون ۱ ژن CETP و پلي‌مورفيسم 629A/C- در پروموتر اين ژن با ميزان HDL-C خون محيطي نشان داده شد[۳] و فراواني الل‌هاي B1 و B2 در پلي‌مورفيسم TaqI[۴] و همچنين الل‌هاي A و C در پلي‌مورفيسم629A/C-[۵] گزارش گرديد. هدف از نگارش اين مقاله، بررسي تعادل هاردي واينبرگ براي الل‌هاي بررسي شده در پلي‌مورفيسم‌هاي مذكور و محاسبه ميزان پيوستگي غير تعادلي بين الل‌هاي B2 و C است.

مواد و روش‌ها

جامعهٔ مورد بررسي از مطالعهٔ قند و ليپيد تهران انتخاب شده است. مطالعهٔ قند وليپيد تهران بررسي آينده‌نگري است كه به منظور بررسي عوامل خطرساز بيماري‌هاي غيرواگير و مداخله براي كاهش بروز آنها طي دو مرحله بر روي ۱۵۰۰۵ نفر از جمعيت تهران انجام مي‌شود.[۶]

انتخاب گروه‌هاي مورد بررسي:

در اين مطالعهٔ مقطعي ۳۳۵ نفر با روشي كه در مقالات پيشين ذكر گرديد انتخاب[۴] و DNA ژنومي از خون آنها استخراج شد.[۷] سپس به روش PCR بخشي از پروموتر ژن CETP شامل ۲۳۲ bp و ناحيهٔ ديگري در اينترون ۱ شامل ۵۳۵bp تكثير شد. محصولات حاصل از تكثير اين قطعات تحت تأثير آنزيم‌هاي محدودالاثر TaqI براي قطعهٔ تكثير شده در اينترون ۱ و آنزيم محدودالاثر Van19 I براي قطعهٔ تكثير شده در پروموتر اين ژن قرار گرفت و محصولات حاصل از هضم آنزيمي بر روي ژل آگارز با غلظت مناسب الكتروفورز شد. نتيجهٔ الكتروفورز محصولات RFLP، (ژل آگارز۱/۵% و ۳/۵ % و بافر TBE، رنگ‌آميزي با اتيديوم بروماید) پس از تصويربرداري از الگوي باندها توسط دستگاه ترانس لومیناتور بر روي ديسكت ذخيره شد. الگوي باندهاي حاصل براي الل، A قطعات ۱۷۵bp و ۴۷ bp, و براي الل Cيک قطعهٔ ۲۳۲ bp است.[۱۰] همچنين دو قطعهٔ bp ۱۷۴ و ۳۶۱bp نمايانگر الل B1 و قطعهٔ ۵۳۵bp نمايانگر الل B2 است.[۳-۵]

نحوهٔ تجزيه و تحليل داده‌ها:

داده‌ها به وسيلهٔ نرم‌افزار SPSS تجزيه و تحليل شد. متغيرهاي كمي با ميانگين ± انحراف معيار و متغيرهاي كيفي به صورت درصد بيان شد. در اين مطالعه فراواني هر الل با توجه به نتايج آزمون‌هاي مولكولي و درستي تعادل با استفاده از فرمول هاردي ـ واينبرگ محاسبه گرديد. مطابق اين قانون، اگر الل‌هاي A و a دو الل يک ژن باشند و فراواني الل A معادل p و فراواني الل a معادل q باشد، هنگامي اين جامعه متعادل است كه علاوه بر اينكه $p+q$ معادل ۱ است، $(p+q)^2$ نيز برابر با ۱ باشد. همچنين جهت بررسي وجود يا عدم وجود پيوستگي غير تعادلي، لازم است ابتدا وجه اشتراک الل‌ها در افراد طبق جدول ۳ بررسي شده و سپس طبق اين فرمول محاسبه گردد:$D=(d/N)^{1/2}-[((b+d)/N)((c+d)/N)]^{1/2}$

يافته‌ها

در اين مطالعه ۳۳۵ نفر با ميانگين سني ۱۸±۳۵ سال از ميان ۱۰۲۱ نفر انتخاب و در سه گروه HDL: صدک ۱۰: HDL ≤ ۲۸ mg/dL (۱۰۴ نفر)، صدک ۴۵-۵۵ : mg/dL HDL = ۳۷-۳۹ (۱۲۷ نفر) و صدک ۹۰ : HDL ≥ ۵۰mg/dL (۱۰۴ نفر) مورد بررسي قرار گرفتند كه از اين تعداد ۱۶۰ نفر مرد و ۱۷۵ نفر زن بودند.

بررسي تعادل هاردي واينبرگ در پلي‌مورفيسم TaqI

الل‌هاي B1 و B2 نتيجهٔ برش يا عدم برش آنزيم TaqI در ناحيهٔ تكثير شده در اينترون ۱ ژن CETP مي‌باشند.

همان‌طور كه طبق جدول ۱ مشاهده مي‌شود، فراواني الل B2 معادل ۰/۳۸۲ است؛ در نتيجه فراواني الل B1 طبق قانون هاردي واينبرگ طبق اين فرمول محاسبه مي‌گردد:

$p=۰/۳۸۲ \rightarrow q=۱-p \rightarrow q=۰/۶۱۸$

[i] Linkage disequilibrium

جدول ۱- پلي‌مورفيسم الل‌هاي A،B2،B1 و C مربوط به ژن CETP

کل جمعيت n=۳۳۵			
فراواني الل B2	۰/۳۸۲	فراواني الل A	۰/۴۶۲
فراواني الل B1	۰/۶۱۸	فراواني الل C	۰/۵۳۸
(%) B1B1	۳۰/۸	(%) AA	۲۳
(%) B1B2	۶۲	(%) AC	۴۶/۵
(%) B2B2	۷/۲	(%) CC	۳۰/۵

بررسي اين رابطه در اين مطالعه طبق اين فرمول انجام گرفت: ۱ = (۰/۶۱۸)^۲ + ۲ (۰/۳۸۲) (۰/۳۸۲)^۲

بررسي تعادل هاردي واينبرگ در پلي‌مورفيسم 629A/C-

اثر آنزيم Van19 I بر قطعة تكثير شده در قسمت پروموتور ژن CETP قطعاتي به وجود مي‌آورد كه نشانگر دو الل A و C مي‌باشند. مطابق اطلاعات جدول ۱ فراواني الل A در اين جمعيت برابر با ۰/۴۶۲ است، بنابراين فراواني الل C از طريق زير محاسبه مي‌شود:

q=۰/۵۳۸← q=۱- p← p=۰/۴۶۲

و بررسي متعادل بودن فراواني اين الل‌ها در جامعه به اين صورت بررسي مي‌شود:

(۰/۴۶۲)^۲+(۵۳۸)^۲+۲(۰/۴۶۲)(۰/۵۳۸)= ۱

جدول۲- اشتراک ژنوتيپ‌هاي TaqI و 629A/C- در جمعيت مورد بررسي

TaqI	C-629C	A-629C	A-629A
B1B1 (%)	(۵۱/۴)* ۵۷	(۳۶/۹)۴۱	(۱۱/۷)۱۳
B1B2 (%)	(۱۹/۲)۳۷	(۵۵/۴)۱۰۷	(۲۵/۴)۴۹
B2B2 (%)	(۲۵/۸) ۸	(۲۵/۸)۸	(۴۸/۴)۱۵

* اعداد داخل پرانتز درصد را نشان مي‌دهند.

محاسبة پيوستگي غير تعادلي بين الل B2 و A

اشتراک ژنوتيپ‌هاي TaqI و 629A/C- در جمعيت مورد بررسي در جدول ۲ مشاهده مي‌شود. از آنجا كه الل‌هاي B2 و A در اين ژن با ميزان HDL-C ارتباط معني‌داري نشان داده‌اند، اين دو الل جهت محاسبة پيوستگي انتخاب شدند. براي اين منظور به تهية جدول ديگري نياز است كه فراواني افرادي كه اين دو الل را به طور مشترک دارند نشان دهد. با توجه به نتايج حاصل در جدول ۳ مي‌توان ميزان D را از اين رابطه محاسبه كرد:

$$\mathbf{D}= (d/N)^{1/2} - [((b+d)/N)((c+d)/N)]^{1/2}$$

با جايگذاري اعداد جدول ۳ در جايگاه مناسب، ميزان D ۰/۰۹۶۵ محاسبه شد كه عددي مثبت است. براي بررسي پيوستگي بايد عدد D′ را نيز محاسبه نمود كه روش محاسبة آن به شرح زير است:

$$D' = \frac{D}{\min (P_{B2}P_C, P_{B1}P_A)} = ۰/۴۶۹۵$$

جدول ۳- اشتراک حضور و عدم حضور الل‌هاي B2 و C

	حضور يا عدم حضور الل‌ها	الل A: حضور(+)	الل A: عدم حضور(-)	جمع رديف‌ها
الل B2	حضور(+)	a (+/+) ۱۷۹	b (+/-) ۴۵	a+b ۲۲۴
	عدم حضور(-)	c (-/+) ۵۴	d (-/-) ۵۷	c+d ۱۱۱
	جمع ستون‌ها	a+c ۲۳۳	b+d ۱۰۲	N=a+b+c+d ۳۳۵

بحث

نتايج حاصل از اين تحقيق نشان مي‌دهد كه جامعة مورد بررسي از نظر فراواني اللهاي C,A,B1,B2 در حال تعادل است و همچنين بين اللهاي B2 و A پيوستگي غيرتعادلي وجود دارد. هاردي رياضيدان انگليسي و واينبرگ پزشک آلماني به طور جداگانه در سال ۱۹۰۸ بر روي اساس رياضي ژنتيک جمعيت كار كردند. فرمول پيشنهادي آنها در يک جمعيت مندلي، با استفاده از فراواني اللها، فراواني ژنوتيپها را پيش‌بيني مي‌كند. مطابق اين قانون، در يک جامعة درحال تعادل، نسبت ژنوتيپها از نسلي به نسل ديگر تغيير نخواهد كرد؛ يعني فراواني‌هاي ژنوتيپ جمعيتي اگر فراواني‌هاي اللي p و q ثابت بماند، ثابت خواهد ماند. به طور اختصاصي‌تر، وقتي كه آميزش تصادفي در جمعيتي با ژنوتيپ‌هاي aa,Aa,AA به ترتيب با نسبت‌هاي $p^2:2pq:q^2$ موجود است، فراواني ژنوتيپي در نسل بعدي با همان نسبت‌ها باقي خواهد ماند. عواملي چون اندازة جمعيت، تصادفي بودن آميزش‌ها، جهش و مهاجرت مي‌توانند در برقراري اين تعادل اثرگذار باشند. در مطالعات پيشين بر روي اين دو پلي‌مورفيسم اللهاي مذكور از اين قانون پيروي كرده‌اند و در اين مطالعه نيز جامعه انتخاب شده متعادل بوده است.[۸]

براي بررسي پيوستگي دو الل، كافي است كه بر مبناي فراواني اللهاي مورد نظر در جامعه عمل كنيم.[۱] به دليل پديدة نوتركيبي، هر كروموزومي كه از والد به فرزند مي‌رسد، ضرورتاً به طور كامل مشابه يكي از دو كپي كروموزوم‌هاي والديني نيست، بلكه احتمالاً حاوي بعضي از قطعات مشتق شده از پدر و مادر والدين است. اگر دو لكوس كه بر روي يک كروموزوم قرار دارند خيلي جدا از هم باشند به طوري‌كه احتمال وقوع حداقل يک كراسينگ اور بين آنها در هر ميوز وجود داشته باشد، ژنوتيپ‌هاي نوتركيب و غيرنوتركيب در فرزندان با نسبت‌هاي برابر رخ خواهد داد و به نظر مي‌رسد كه دو لكوس غير پيوسته باشند، درست مثل اينكه بر روي كروموزوم‌هاي مجزا قرار گرفته باشند اما اگر دو لكوس بر روي يک كروموزوم تا حدي نزديک يكديگر باشند كه احتمال وقوع كراسينگ اور به حداقل برسد، پيوستگي كامل است. هنگامي كه فراواني ژنوتيپي در يک لكوس، غير وابسته به فراواني ژنوتيپي در لكوس ديگر باشد اين پيوستگي تعادلي و در عدم وجود اين حالت پيوستگي به صورت غير تعادلي است كه عواملي چون دريفت ژنتيكي و انتخاب در تشكيل اين حالت مؤثرند. در اين مطالعه عدد D و D′ محاسبه شده است. عدد D بيانگر شدت تفاوت فراواني‌ها پلوتيپ‌هاي مشاهده شده با فراواني قابل انتظار است كه مقادير مثبت، نشانگر وجود پيوستگي غير تعادلي بين دو الل مورد بررسي و مقادير منفي نشانگر عدم وقوع همزمان اين دو الل است. بر همين مبنا مقدار صفر به مفهوم وجود پيوستگي تعادلي بين دو الل مورد بررسي است. به دليل وابستگي ميزان D به فراواني اللها نياز به نرمال‌سازي آن از طريق محاسبة D′ است كه از اين طريق اثر فراواني اللها حذف مي‌شود. عدد ۱ براي D′ نشانگر پيوستگي كامل و عدد صفر نشانگر عدم پيوستگي است. در اين مطالعه، D′=۰/۴۶۹۵ كه نشانگر وجود پيوستگي غير تعادلي بين دو الل B2 و A است كه البته اين ارتباط كامل نيست. در مطالعة مشابهي توسط فرانسين و همكاران[۹] پيوستگي غير تعادلي بين اللهاي B1 و C محاسبه شده است كه در اين مطالعه D=۰/۲۱۲۸ و D′=۰/۹۶۶۱ و اين مقادير نشانگر حضور پيوستگي غير تعادلي بين دو الل مورد بررسي است. نتايج اين مطالعه نشانگر پيروي جامعة مورد بررسي از قانون تعادل هاردي ـ واينبرگ در مورد اللهاي بررسي شده و همچنين حضور پيوستگي غير تعادلي بين دو الل B2 و A است.

۳. دانشپور مريم‌السادات، هدايتي مهدي، عزيزي فريدون. ارتباط فراواني پلي‌مورفيسم 629A/C- و Taq I در ژن CETP، با ميزان DL-C در تهران. مجلة پژوهش در پزشكي، ۱۳۸۴؛ سال ۲۹، شمارة ۱، صفحات ۱۳ تا ۱۷.

References

1. Cavalli-Sforza LL. The DNA revolution in population genetics. Trends Genet.1998; 14: 60-5.
2. Hartel DL, Clark AG. Principle of population genetics, 3rd ed. Sunderland: Sinauer associates; 1997.

٤. دانشپور مریم‌السادات، هدایتي مهدي، آذري فرشته، قاسمي فرشته، عزیزي فریدون. ارتباط پلي‌مورفیسم ژن CETP(TaqI)با میزان کم HDL-C در جمعیت ایراني. مجلة غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران ۱۳۸۲؛ سال پنجم، ضمیمة شمارة ۴، صفحات ۳۵۵ تا ۳۶۲.

٥. دانشپور مریم‌السادات، هدایتي مهدي، آذري فرشته، قاسمي فرشته، عزیزي فریدون. ارتباط فراواني الل B2 در ژن CETP، با میزانHDL-C در جمعیت تهران. مجلة دانشگاه علوم پزشکي ایران، ۱۳۸۳؛ سال ۱۱، شمارة ۴۳، صفحات ۷۵۷ تا ۷۶۴.

6. Azizi F, Rahmani M, Emami H, Mirmiran P, Hajipour R, Madjid M, et al. Cardiovascular risk factors in an Iranian urban population: Tehran lipid and glucose study (phase 1). Soz Praventivmed 2002; 47: 408-26.

7. Ferrie RM, Schwarz MJ, Robertson NH, Vaudin S, Super M, Malone G, et al. Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. Am J Hum Genet. 1992; 51: 251-62.

8. Lu H, Inazu A, Moriyama Y, Higashikata T, Kawashiri MA, Yu W, et al. Haplotype analyses of cholesteryl ester transfer protein gene promoter: a clue to an unsolved mystery of TaqIB polymorphism. J Mol Med 2003; 81: 246-55.

9. van Venrooij FV, Stolk RP, Banga JD, Sijmonsma TP, van Tol A, Erkelens DW, et al. DALI Study Group. Common cholesteryl ester transfer protein gene polymorphisms and the effect of atorvastatin therapy in type 2 diabetes. Diabetes Care 2003; 26: 1216-23.