

بررسی تنوع ژنتیکی نشانگر rs4148326 واقع در ناحیهی ژنی UGT1A1: یک نشانگر آگاهی دهنده برای تشخیص مولکولی سندرم کریگلر - نجار

زکيه نادعلی^۱، امين کریمی^۱، دکتر صادق وليان بروجنی^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سندرم کریگلر - نجار یک بیماری نادر با وراثت اتوزومی مغلوب می باشد که با افزایش بیلی روبین غیر کونژوگه و غیر همولیتیک شناخته می شود. بیماری در اثر جهش در ژن UGT1A1 که باعث فقدان یا کاهش فعالیت آنزیم UGT1A1 و در نتیجه عدم ترکیب بیلی روبین با گلوکورونیک اسید می گردد، ایجاد می شود. تشخیص مولکولی این سندرم مبتنی بر روش بررسی مستقیم جهش ها می باشد، ولی با توجه به تنوع بالای جهش ها و پر هزینه و وقت گیر بودن روش مزبور، بررسی غیر مستقیم جهش ها و آنالیز پیوستگی با استفاده از نشانگرهای چند شکلی به عنوان روش جایگزین پیشنهاد می گردد. نشانگرهای چند شکلی متعددی در ناحیهی ژنی UGT1A1 گزارش شده اند.

روش ها: با بررسی بیوانفورماتیک مارکرهای ناحیهی ژنی UGT1A1، مارکر rs4148326 با توالی C/T، واقع در ناحیهی 5' این ژن جهت مطالعه در جمعیت ایرانی انتخاب شد. به این منظور نمونه های از افراد سالم جمعیت اصفهان شامل ۱۸۶ فرد غیر خویشاوند با استفاده از تکنیک Tetra-primer ARMS PCR (Tetra-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction) تعیین ژنوتیپ شدند. نتایج حاصله با نرم افزار GENEPOP از نظر آماری بررسی شدند.

یافته ها: بر اساس نتایج به دست آمده، فراوانی هتروزیگوسیتی نشانگر rs4148326 ۶۲/۹ درصد و فراوانی آللی آن برای آلل T و C به ترتیب ۶۶/۹۴ درصد و ۳۳/۰۶ درصد بود. بررسی تعادل هاردی - وینبرگ (Hardy weinberg equilibrium یا HWE) نیز نشان داد که جمعیت اصفهان برای نشانگر rs4148326 در تعادل بود.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده در این مطالعه نشانگر rs4148326 را در نمونه های از جمعیت ایرانی به عنوان یک نشانگر آگاهی دهنده در تشخیص های مولکولی سندرم کریگلر - نجار به روش آنالیز پیوستگی معرفی می نماید.

واژگان کلیدی: چندشکلی تک نوکلئوتیدی، UGT1A1، سندرم کریگلر - نجار، Tetra-primer ARMS PCR

ارجاع: نادعلی زکيه، کریمی امین، وليان بروجنی صادق. بررسی تنوع ژنتیکی نشانگر rs4148326 واقع در ناحیهی ژنی UGT1A1: یک نشانگر آگاهی دهنده برای تشخیص مولکولی سندرم کریگلر - نجار. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۶۰): ۱۸۲۱-۱۸۲۸

میلیون نوزاد می باشد (۱-۲). بیماری طی دوره ی نوزادی با زردی زودرس و شدید به علت وجود بیلی روبین غیر کونژوگه، آشکار می گردد (۳). همچنین در نوع ۱ بیماری به دلیل ایجاد سندرم نورولوژیک

مقدمه

سندرم کریگلر - نجار با افزایش بیلی روبین غیر کونژوگه و غیر همولیتیک شناخته می شود و یک بیماری نادر اتوزومی مغلوب با شیوع ۱ در یک

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده ی مسؤو: دکتر صادق وليان بروجنی

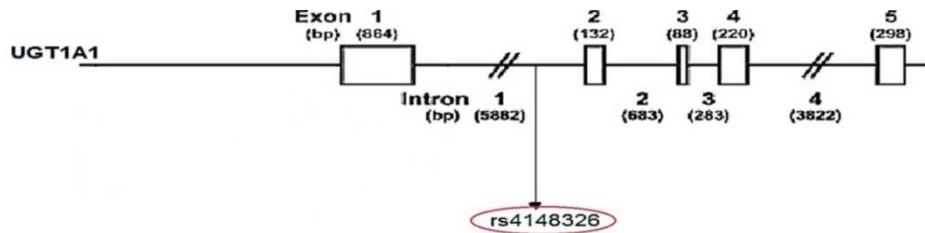
Email: svallian@biol.ui.ac.ir

می‌شود. محدودیت‌های استفاده از روش غیر مستقیم شامل غیر قابل استفاده بودن در خانواده‌هایی است که بیماری فرد ناشی از جهش جدید است و یا هیچ سابقه‌ی فامیلی برای بیماری در خانواده وجود ندارد (۹-۱۰، ۴). در روش غیر مستقیم مجموعه‌ای از چندشکلی‌های ژنومی به عنوان نشانگرهای ژنتیکی برای تعیین ارتباط بین یک ناحیه‌ی ژنومی خاص و بیماری به کار می‌روند (۱۱). از جمله نشانگرهای مورد استفاده در روش غیر مستقیم، مارکرهای چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) یا Single nucleotide polymorphism هستند. این مارکرها به دلایلی چون فراوانی بیشتر به عنوان نشانگرهای ژنتیکی برگزیده در آنالیز پیوستگی، جایگزین سایر مارکرها از جمله STR (Short tandem repeats) و VNTR (Variable numbers of tandem repeats) شده‌اند (۱۲). برای غربالگری بهینه‌ی جهش‌ها با روش غیر مستقیم، نشانگرهای مورد استفاده باید در هر جمعیت به طور خاص مورد بررسی قرار گیرند و نشانگرهای آگاهی‌دهنده در آن جمعیت به صورت جداگانه معرفی شوند.

تا کنون در جمعیت ایران مطالعه‌ای در رابطه با بررسی نشانگرهای آگاهی‌دهنده‌ی مرتبط با ژن UGT1A1 انجام نگرفته است. بنابراین مطالعه‌ی حاضر به بررسی ویژگی‌های نشانگر rs4148326 در جمعیت اصفهان پرداخت. این مارکر یک SNP با توالی C/T است که در ناحیه‌ی 5' ژن UGT1A1 در ایترون شماره‌ی ۱ قرار دارد (شکل ۱).

پیش‌رونده و شدید در صورت عدم درمان، اغلب موجب مرگ در دو سال اول زندگی می‌شود (۴). نقایص ژنتیکی در جایگاه ژنی UGT1A1 (UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1) منجر به غیر فعال شدن یا کاهش شدید فعالیت آنزیم UGT1A1 و ایجاد سندرم کریگلر-نچار نوع ۱ و ۲ می‌گردد. در واقع نوع ۱ بیماری فرم شدید محسوب می‌گردد و با فقدان کمابیش کامل فعالیت آنزیم و در نتیجه عدم ترکیب بیلی‌روبین با گلوکورونیک اسید همراه است. در پی آن موجب عدم دفع بیلی‌روبین از صفرا، رسوب در بافت‌ها و آسیب‌رسانی به مغز می‌گردد. سندرم کریگلر-نچار نوع ۲ نیز شکل خفیف بیماری محسوب می‌گردد و با کاهش فعالیت آنزیم UGT1A1، عدم ایجاد آسیب مغزی و پاسخ به درمان با فنوباریتال شناسایی می‌گردد (۵-۶).

تشخیص مولکولی سندرم کریگلر-نچار با استفاده از روش مستقیم و بررسی موتاسیون‌های مسبب بیماری انجام می‌شود (۷). در تشخیص‌های مولکولی انتخاب روش به ویژگی‌های ژن مورد بررسی بستگی دارد و اولویت استفاده از هر یک از روش‌های مستقیم و غیر مستقیم در ژن‌های مختلف متفاوت است (۸). به دلیل هتروژنی ژنتیکی این سندرم و وجود هتروزیگوت‌های مرکب، تشخیص مستقیم با هزینه و صرف زمان زیاد همراه است. به همین دلیل تشخیص مولکولی بیماری با بررسی غیر مستقیم جهش‌ها با استفاده از آنالیز پیوستگی توسط نشانگرهای چند شکلی متصل به ژن به عنوان روش جایگزین در خانواده‌های دارای یک فرد مبتلا معرفی



شکل ۱. ژن UGT1A1 و موقعیت نشانگر rs4148326. در شکل مستطیل‌ها نمایانگر آگزون‌ها می‌باشند و ناحیه‌ی بین دو مستطیل نیز مربوط به اینترون‌ها است. موقعیت نشانگر در اینترون ۱ با پیکان مشخص شده است

اطلاعات افراد بر روی آن تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج DNA از خون محیطی با استفاده از روش رسوب نمک صورت گرفت. ارزیابی کمی میزان DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد.

بررسی بیوانفورماتیک ناحیه‌ی ژنی UGT1A1 با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی از جمله NCBI، ALFRED و SNPper انجام شد (۱۶-۱۴). پس از بررسی نشانگرهای ناحیه‌ی ژنی UGT1A1، در نهایت نشانگر rs4148326 بر اساس ملاک‌هایی از جمله بالا بودن فراوانی آللی و درجه‌ی هتروزیگوسیتی، نزدیکی به ژن UGT1A1 و قرار گرفتن در بلوک‌های هاپلوטיפی که در پایگاه‌های اطلاعاتی ذکر شده ثبت شده بود، انتخاب گردید. در پایگاه‌های مزبور، مطالعات انجام‌شده با استفاده از مارکر فوق برای بررسی ارتباط نشانگر با سطوح بیلی‌روبین سرم گزارش شده‌اند (۱۷).

تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها با استفاده از تکنیک Tetra-primer ARMS PCR (Tetra-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction) انجام شد. این تکنیک امکان آنالیز SNP را به طور سریع، ساده، کم هزینه و با کارایی بالا فراهم می‌کند به صورتی که دو جفت پرایمر شامل یک جفت پرایمر داخلی و یک جفت

تا کنون در دنیا هیچ مطالعه‌ای در رابطه با آگاهی‌دهندگی نشانگر rs4148326 در تشخیص مولکولی غیر مستقیم سندرم کریگلر-نجار صورت نگرفته است. نتایج حاصل از این مطالعه ضمن معرفی مارکر مزبور به عنوان یک مارکر آگاهی‌دهنده در مطالعات پیوستگی ژن UGT1A1 و تشخیص مولکولی بیماری کریگلر-نجار، می‌تواند موجب تقویت اطلاعات ساختار ژنتیکی جمعیت ایرانی گردد. نمونه‌های استفاده‌شده در این مطالعه مربوط به جمعیت اصفهان بود.

روش‌ها

حجم نمونه‌ی لازم برای برآورد فراوانی آللی با استفاده از فرمول ارائه‌شده توسط Johnso و Bhattacharyya محاسبه گردید. طبق این فرمول با بررسی نمونه‌ای به اندازه‌ی ۱۶۴ نفر، ۸۰ درصد اطمینان خواهیم داشت که خطای برآورد بین ۰/۰۵- و ۰/۰۵+ خواهد بود. در مطالعه‌ی حاضر بر روی ۱۸۶ نمونه کار شد که اطمینان بیشتری داشت (۱۳). نمونه‌گیری از ۱۸۶ فرد سالم غیر خویشاوند انجام شد.

۱۰ میلی‌لیتر از خون تام هر یک از افراد مورد مطالعه در لوله‌ی حاوی ۱ میلی‌لیتر از EDTA با غلظت ۰/۵ مول جمع‌آوری شد و پس از ثبت

نسخه‌ی ۷ مورد بررسی قرار گرفتند و تغییرات لازم بر روی آن‌ها اعمال گردید. بهینه‌سازی شرایط انجام واکنش PCR از لحاظ دمای اتصال پرایمرها، تعیین غلظت $MgCl_2$ و همچنین غلظتی از دو جفت پرایمر به صورتی که امکان استفاده‌ی هم‌زمان از هر دو جفت پرایمر در یک واکنش PCR منفرد فراهم شود، انجام شد و در نهایت واکنش Tetra-primer ARMS PCR بهینه‌شده در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰۰ نانوگرم DNA، ۳ پیکومول از پرایمرهای خارجی و ۱ پیکومول از پرایمرهای داخلی، ۱/۵ میکرولیتر از dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۷۵ میکرولیتر از $MgCl_2$ ۱۰۰ میلی‌مولار، ۲/۵ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq، در ۳/۵ میکرولیتر بافر 10 X PCR انجام گرفت. تکثیر DNA در دستگاه ترموسایکلر (مدل Eppendorf آلمان) طبق جدول ۲ انجام گرفت. آنالیز محصولات PCR نیز بر روی ژل آگارز ۲ درصد و ولتاژ ۸۲ ولت انجام گردید.

خارجی، برای تکثیر اختصاصی آلل طبیعی و جهش‌یافته‌ی مربوط به SNP در یک واکنش PCR منفرد به کار گرفته می‌شوند (۱۸-۱۹).

پرایمرهای مزبور با استفاده از نرم‌افزار Primer 1 طراحی گردیدند (۲۰-۲۱). با اعمال تنظیمات نرم‌افزار از نظر پارامترهایی چون دمای بهینه، طول محصولات PCR، پرایمرهای مناسب توسط نرم‌افزار ارائه شد. طراحی این پرایمرها به گونه‌ای بود که علاوه بر محصولاتی با طول متمایز بسته به نوع آلل پلی‌مورفیسم، پرایمرهای خارج محصولی جهت موارد شاهد مثبت ایجاد کردند. تکثیر آلل‌ها به این صورت بود که پرایمرهای رفت داخلی Inner forward و برگشت خارجی Outer reverse باعث تکثیر آلل C و پرایمرهای برگشت داخلی Inner reverse و رفت خارجی Outer forward آلل T را تکثیر کردند.

سپس این پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Oligo

جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده جهت Tetra-primer ARMS PCR

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی (5' > 3')	طول محصول (جفت باز)
IF (آغازگر رفت آلل C)	CAGGGTGTCTTCTGCTACAAACCAAAACAC	۳۱۳
OR (آغازگر برگشت آلل C)	AGGATGCTGGTCACCCTAGATG	۳۱۳
OF (آغازگر رفت آلل T)	AAGTAAGCCATTTACCAACGCTCAG	۱۹۴
IR (آغازگر برگشت آلل T)	ATCCTCCCCACCACCATGCTTCA	۱۹۴

کنترل مثبت محصول تکثیر توسط دو پرایمر OR و OF شامل ۴۵۶ جفت باز می‌باشد.

Tetra-primer ARMS PCR: Tetra-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction; IF: Inner forward; OR: Outer reverse; OF: Outer forward; IR: Inner reverse

جدول ۲. برنامه‌ی بهینه‌شده جهت تکثیر نشانگر rs4148326 با استفاده از پرایمرهای طراحی شده در روش

مرحله	دما (درجه‌ی سانتی‌گراد)	مدت	تعداد سیکل
۱	۹۴	۵°	۱
۲	۹۴	۳۰**	۳۰
	۶۴	۵۰**	
	۷۲	۵۰**	
۳	۷۲	۱۰*	۱

*: دقیقه؛ **: ثانیه

Tetra-primer ARMS PCR: Tetra-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction

نتایج به دست آمده نشان داد که از ۱۸۶ فرد مورد مطالعه ۱۱۷ نفر ژنوتیپ هتروزیگوت (CT)، ۶۶ ژنوتیپ هموزیگوت (TT) و ۳ نفر ژنوتیپ (CC) داشتند. فراوانی آلل‌های C و T به ترتیب ۳۴/۰۶ درصد و ۶۶/۹۴ درصد بود.

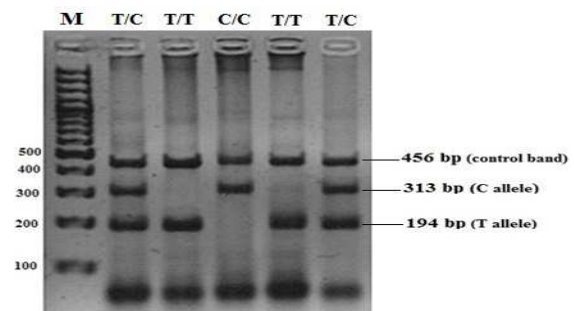
پس از تعیین ژنوتیپ افراد، درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای افراد مورد مطالعه محاسبه شد. هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای این نشانگر در جمعیت اصفهان ۶۲/۹ درصد بود. در حالی که هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۴۴/۳۸ درصد محاسبه شد. هموزیگوسیتی مشاهده شده نیز ۳۶ درصد بود، در صورتی که هموزیگوسیتی مورد انتظار ۵۴/۸ درصد تعیین شد.

در این مطالعه بررسی تعادل هاردی-وینبرگ با استفاده از آزمون χ^2 برای جایگاه نشانگر در نمونه‌ای از جمعیت ایرانی بررسی شد. مقدار χ^2 محاسبه شده نیز با مقدار χ^2 حاصل از جدول احتمال با $P < 0/05$ مقایسه گردید. مقدار χ^2 محاسبه شده برای نشانگر rs4148326 کوچک‌تر از مقدار χ^2 با درجه‌ی آزادی ۱ و $P < 0/05$ بود. بنابراین این نشانگر در جمعیت اصفهان در تعادل هاردی-وینبرگ قرار داشت. مقدار χ^2 محاسبه شده ۰/۱۸۲ و $P < 0/001$ بود.

در نهایت آنالیز آماری نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتیپ افراد شامل تخمین فراوانی آللی، درجه‌ی هتروزیگوسیتی و فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار فنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت با استفاده از نرم‌افزار پایگاه GENEPOP انجام شد (۲۲). پس از تخمین فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی داده‌ها، وجود تعادل هاردی-وینبرگ (HWE) یا Hardy Weinberg equilibrium با استفاده از آزمون χ^2 مورد بررسی قرار گرفت (۲۳). مقدار معنی‌داری P نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه مارکر rs4148326 با استفاده از روش Tetra-Primer ARMS-PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده‌ی جدید در نمونه‌ای از جمعیت ایرانی تعیین ژنوتیپ شد (شکل ۲).



شکل ۲. یک نمونه از نتایج مربوط به تعیین ژنوتیپ مارکر rs4148326 با روش Tetra-primer ARMS PCR. Tetra-Primer ARMS PCR: Tetra-primer amplification refractory mutation system (polymerase chain reaction)

نمونه‌ی PCR مربوط به پنج فرد و نمایش ۳ نوع ژنوتیپ روی ژل آگارز است. ژنوتیپ‌های هتروزیگوت (TC) و هموزیگوت (TT) و (CC) در بالای شکل نشان داده شده است. طول مربوط به هر باند نیز در سمت راست شکل قابل مشاهده است. M نشان‌دهنده‌ی نشانگر می‌باشد.

بحث

تنوع بالای جهش‌های ژنی مرتبط با سندرم کریگلر-نچار و همچنین وجود هتروزیگوت‌های مرکب، تشخیص جهش‌های بیماری‌زا در ژن UGT1A1 مرتبط با بیماری را توسط روش مستقیم مشکل نموده است. بنابراین استفاده از روش غیر مستقیم با استفاده از نشانگرهای چندشکلی پیشنهاد شده است (۲۴). در

این مطالعه با سایر مطالعات مربوط به جمعیت‌های غیر ایرانی نشان داد که فراوانی آلل C مربوط به این نشانگر در جمعیت آفریقایی-آمریکایی ۵۷ درصد و در جمعیت قفقازی ۴۳ درصد و در واقع بیشتر از جمعیت ایرانی بود. هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده نیز برای نشانگر rs4148326 در جمعیت اصفهان بالاتر از سایر جمعیت‌ها به دست آمد (۲۵، ۱۷).

در مجموع، با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، برای اولین بار می‌توان نشانگر rs4148326 را واقع در ناحیه‌ی ژنی UGT1A1، به عنوان یک نشانگر مناسب در تشخیص‌های مولکولی سندرم کریگلر-نجار به روش آنالیز پیوستگی جمعیت اصفهان، معرفی کرد. همچنین به دلیل هتروزیگوسیتی بالاتر آن در جمعیت مورد مطالعه نسبت به سایر جمعیت‌ها این نشانگر در جمعیت اصفهان به عنوان نمونه‌ای از جمعیت ایرانی از ارزشمندی بیشتری برخوردار است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان جهت تأمین بودجه‌ی این مطالعه در قالب پژوهانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

این مطالعه پس از بررسی نشانگرهای ناحیه‌ی ژنی UGT1A1، نشانگر rs4148326 به منظور مطالعه در جمعیت ایرانی انتخاب گردید.

پس از مطالعه‌ی این نشانگر در نمونه‌ای از جمعیت ایرانی فراوانی آللی آن برای آلل T و C به ترتیب ۶۶/۹۴ و ۳۳/۰۶ درصد مشاهده شد. فراوانی آلل C در پایگاه dbSNP ۴۵٪ درصد گزارش شده است. همین‌طور هتروزیگوسیتی نشانگر مزبور در جمعیت ایرانی ۶۲/۹ درصد محاسبه شد در صورتی که در پایگاه داده‌ی ALFRED میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده در جمعیت‌های غیر ایرانی ۴۳/۹ درصد گزارش شده است. این نتایج نشان‌دهنده‌ی ارزش بالای هتروزیگوتی مارکر مزبور در جمعیت ایرانی در مقایسه با سایر جمعیت‌ها برای مارکر rs4148326 بود.

پس از تخمین فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی داده‌ها، وجود تعادل هاردی-وینبرگ مورد بررسی قرار گرفت. استفاده از آزمون χ^2 نشان داد که این نشانگر در جمعیت اصفهان در تعادل هاردی-وینبرگ قرار دارد. این یافته‌ها نشان‌دهنده‌ی این واقعیت می‌باشند که نشانگر rs4148326 در جمعیت مورد مطالعه از فراوانی آللی و هتروزیگوسیتی به نسبت بالایی برخوردار می‌باشد. مقایسه‌ی نتایج به دست‌آمده از

References

1. Bellodi-Privato M, Aubert D, Pichard V, Myara A, Trivin F, Ferry N. Successful gene therapy of the Gunn rat by in vivo neonatal hepatic gene transfer using murine oncoretroviral vectors. *Hepatology* 2005; 42(2): 431-8.
2. Liu WL, Li F, He ZX, Jiang HY, Ai R, Chen XX, et al. Analysis of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene mutations in an unusual Crigler-Najjar syndrome patient. *Mol Med Rep* 2012; 6(3): 667-9.
3. Crigler JF, Najjar VA. Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus. *Pediatrics* 1952; 10(2): 169-80.
4. Sampietro M, Iolascon A. Molecular pathology of Crigler-Najjar type I and II and Gilbert's syndromes. *Haematologica* 1999; 84(2): 150-7.
5. Costa E. Hematologically important mutations: bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene mutations in Gilbert and Crigler-Najjar syndromes. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36(1): 77-80.
6. Canu G, Minucci A, Zuppi C, Capoluongo E.

- Gilbert and Crigler Najjar syndromes: an update of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene mutation database. *Blood Cells Mol Dis* 2013; 50(4): 273-80.
7. Francoual J, Trioche P, Mokrani C, Seboui H, Khrouf N, Chalas J, et al. Prenatal diagnosis of Crigler-Najjar syndrome type I by single-strand conformation polymorphism (SSCP). *Prenat Diagn* 2002; 22(10): 914-6.
 8. Zhao H, Pfeiffer R, Gail MH. Haplotype analysis in population genetics and association studies. *Pharmacogenomics* 2003; 4(2): 171-8.
 9. Ciotti M, Chen F, Rubaltelli FF, Owens IS. Coding defect and a TATA box mutation at the bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene cause Crigler-Najjar type I disease. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1407(1): 40-50.
 10. Pomares E, Marfany G, Brion MJ, Carracedo A, Gonzalez-Duarte R. Novel high-throughput SNP genotyping cosegregation analysis for genetic diagnosis of autosomal recessive retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. *Hum Mutat* 2007; 28(5): 511-6.
 11. The International HapMap Project. *Nature* 2003; 426(6968): 789-96.
 12. Selmer KK, Brandal K, Olstad OK, Birkenes B, Undlien DE, Egeland T. Genome-wide linkage analysis with clustered SNP markers. *J Biomol Screen* 2009; 14(1): 92-6.
 13. Johnso RA, Bhattacharyya GK. *Statistics: principles and methods*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 1992.
 14. 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(1): 308-11.
 15. 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(1): 361-3.
 16. Riva A, Kohane IS. SNPper: retrieval and analysis of human SNPs. *Bioinformatics* 2002; 18(12): 1681-5.
 17. Hong AL, Huo D, Kim HJ, Niu Q, Fackenthal DL, Cummings SA, et al. UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 gene polymorphisms and total bilirubin levels in an ethnically diverse cohort of women. *Drug Metab Dispos* 2007; 35(8): 1254-61.
 18. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(17): E88.
 19. Okayama N, Fujimura K, Nakamura J, Suehiro Y, Hamanaka Y, Hinoda Y. Evaluation of a new efficient procedure for single-nucleotide polymorphism genotyping: tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42(1): 13-6.
 20. Collins A, Ke X. Primer1: Primer design Web service for Tetra-Primer ARMS-PCR. *The Open Bioinformatics Journal* 2012; 6: 55-8.
 21. PRIMER1: primer design for tetra-primer ARMS-PCR [Online]. [cited 2013]; Available from: URL: <http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>
 22. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 1995; 86(3): 248-9.
 23. Engels WR. Exact tests for Hardy-Weinberg proportions. *Genetics* 2009; 183(4): 1431-41.
 24. Maruo Y, Sato H. UDP-glucuronosyltransferase. *Nihon Eiseigaku Zasshi* 2002; 56(4): 629-33. [In Japanese].
 25. Milton JN, Sebastiani P, Solovieff N, Hartley SW, Bhatnagar P, Arking DE, et al. A genome-wide association study of total bilirubin and cholelithiasis risk in sickle cell anemia. *PLoS One* 2012; 7(4): e34741.

Analysis of Genetic Variation of rs4148326 Marker Located in *UGT1A1* Gene Region: An Informative Marker for Molecular Diagnosis of Crigler-Najjar Syndrome

Zakiyeh Nadeali MSc¹, Amin Karimi MSc¹, Sadeq Vallian-Borujeni PhD²

Original Article

Abstract

Background: Crigler-Najjar syndrome is a rare, autosomal recessive disorder characterized by unconjugated, non-hemolytic hyperbilirubinemia. The disease is caused by mutations in the *UGT1A1* gene, which result in the decrease or lack of the UGT1A1 enzyme activity and thus, lack of bilirubin conjugation with glucuronic acid. Molecular diagnosis of the syndrome has been essentially based on direct mutation analysis. However, due to a large number of mutations associated with the disease, direct mutation analysis is expensive and time consuming. Alternatively, indirect analysis of mutations using linkage analysis by means of polymorphic markers is proposed. Several polymorphic markers associated with the *UGT1A1* gene have been studied.

Methods: Using bioinformatic analysis of these markers, the single nucleotide polymorphism (SNP) rs4148326 with the C/T sequence, located at 5' region of the gene was selected. Analysis of the marker was performed by genotyping of 186 unrelated healthy individuals in the Isfahanian population, Iran, using tetra-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction (Tetra-Primer ARMS PCR) technique. Statistical analysis of the results was performed using the GENEPOP software.

Findings: The heterozygosity of rs4148326 the marker was 62.9% and the allele frequency for T and C allele was 66.94% and 33.06%, respectively. Analysis of deviations from Hardy-Weinberg equilibrium demonstrated that the Isfahanian population was in equilibrium ($P < 0.001$) for rs4148326 locus.

Conclusion: The data suggested that rs4148326 could be introduced as an informative marker for molecular diagnosis of Crigler-Najjar syndrome in a representative sample of the Iranian population.

Keywords: Single nucleotide polymorphism, UGT1A1 gene, Crigler-Najjar syndrome, Tetra-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction

Citation: Nadeali Z, Karimi A, Vallian-Borujeni 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): 1821-8

1- Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2- Professor, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Sadeq Vallian Borujeni PhD, Email: svallian@biol.ui.ac.ir