

## ***Analysis of Genetic Variation of rs6442530 Marker in COLQ Gene as an Informative Marker for Molecular Diagnosis of Congenital Myasthenic Syndrome in Isfahan population***

Nafise Moeinifar<sup>1</sup>,  
Sadeq Vallian Borujeni<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MSc in Genetics, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

<sup>2</sup> Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

(Received July 19, 2016 ; Accepted December 19, 2016)

### ***Abstract***

**Background and purpose:** Congenital Myasthenic Syndrome (CMS) is a rare genetic disease with autosomal recessive inheritance pattern which is caused by mutations in the *COLQ* gene. Molecular diagnosis of the disease using direct mutation analysis is expensive and time consuming. Alternatively, linkage analysis using Single Nucleotide Polymorphic markers (SNP) provides a suitable method in carrier detection and prenatal diagnosis of the disease in families with an affected individual. The aim of this study was to investigate the informative situation of rs6442530 marker in *COLQ* gene.

**Materials and methods:** In this experimental study, using bioinformatics investigations, rs6442530 marker located in intron 1 of *COLQ* gene was selected for genotyping studies. For this purpose, 152 healthy individuals from Isfahan population were genotyped using ARMS PCR technique. Then the allelic frequencies, the Hardy-Weinberg equilibrium and heterozygosity of the marker were estimated using the Genepop software. Finally the amount of Polymorphism Information Content (PIC) was computed by PIC Calculator software for the marker.

**Results:** The results indicated 43.4% Minor Allele Frequency (MAF), 48.684211% heterozygosity rate and 0.3706 PIC for rs6442530 marker in Isfahan population. Hardy Weinberg Equilibrium showed the presence of equilibrium for rs6442530 in this population.

**Conclusion:** Together, according to the results (MAF>0.2 and PIC close to 0.375) rs6442530 marker could be suggested as an appropriate marker for molecular diagnosis of CMS in Isfahan population.

**Keywords:** rs6442530, Congenital Myasthenic Syndrome, Isfahan, population, Single Nucleotide Polymorphism

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26 (145): 1-8 (Persian).

# بررسی تنوع ژنتیکی مارکر rs6442530 در ناحیه ژنی COLQ به عنوان یک مارکر گویا در مطالعه مولکولی بیماری نشانگان میاستنی مادرزادی در جمعیت اصفهان

نفیسه معینی فر<sup>۱</sup>  
صادق ولیان بروجنی<sup>۲</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** نشانگان میاستنی مادرزادی (Congenital Myastenic Syndrome, CMS) یک بیماری ژنتیکی نادر با وراثت اتوزومی مغلوب می‌باشد که در اثر جهش در ژن COLQ ایجاد می‌شود. تشخیص مولکولی این بیماری با آنالیز مستقیم جهش‌های ژنی بسیار وقت‌گیر و پرهزینه می‌باشد. از این رو روش پیوستگی با استفاده از نشانگرهای چند شکلی تک نوکلئوتیدی (Single nucleotide polymorphism, SNP) برای تعیین افراد ناقل و هم‌چنین تشخیص پیش از تولد در خانواده‌های دارای فرزند مبتلا روش مناسبی می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی آگاهی‌دهندگی مارکر تک نوکلئوتیدی rs6442530 واقع در ژن COLQ می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی-تجربی، ابتدا با بررسی بیوانفورماتیکی، نشانگر rs6442530 واقع در اینترون شماره ۱ ژن COLQ برای مطالعه ژنوتایپینگ در جمعیت ایران انتخاب شد. سپس ۱۵۲ فرد سالم غیرخویشاوند از جمعیت اصفهان با استفاده از تکنیک ARMS-PCR تعیین ژنوتیپ شدند. فراوانی آللی، درجه هتروزیگوسیتی و وجود تعادل هاردی وینبرگ برای مارکر مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Genepop تخمین زده شد. در نهایت از نرم‌افزار PIC Calculator برای تخمین مقدار (Polymorphism Information Content) PIC استفاده شد.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل بیانگر فراوانی آلل مغلوب (Minor Allele Frequency, MAF) ۴۳/۴ درصد، درجه هتروزیگوسیتی ۴۸/۶۸۴۲۱۱ درصد و مقدار PIC ۰/۳۷۰۶ برای مارکر rs6442530 در جمعیت اصفهان بود. بررسی تعادل هاردی وینبرگ نیز نشان داد که جمعیت اصفهان برای نشانگر rs6442530 در تعادل می‌باشد.

**استنتاج:** در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر ( $MAF > 0/2$  و PIC نزدیک به ۰/۳۷۵) rs6442530 می‌تواند به عنوان نشانگر مناسب جهت تشخیص مولکولی بیماری CMS در جمعیت اصفهان پیشنهاد گردد.

**واژه‌های کلیدی:** نشانگر rs6442530، بیماری نشانگان میاستنی مادرزادی (CMS)، جمعیت، اصفهان، چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP)

## مقدمه

گروهی از اختلالات مادرزادی هتروژن اطلاق می‌گردد که در آن‌ها فرد علائمی مشابه بیماری خودایمنی میاستنی

نشانگان میاستنی مادرزادی یا (Congenital Myastenic Syndrome, CMS) به

E-mail: svallian@sci.ui.ac.ir

**مؤلف مسئول: صادق ولیان** - اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، بخش ژنتیک

۱. کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۵/۱۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۹/۲۹

گراویس بروز می‌دهد (۱). از هر ۵۰۰۰۰۰ نفر در اروپا یک نفر به CMS دچار می‌شود (۲،۳). نقص در آنزیم استیل کولین استراز (AChE) به عنوان اولین علت CMS شناخته شد (۴،۵). در ۲۰ سال گذشته جهش‌های ایجادکننده CMS در ۲۱ ژن مختلف شناسایی شدند. انواع CMS‌های شناخته شده به همراه ژن‌های اصلی دخیل در آن‌ها در جدول شماره ۱ به طور خلاصه آورده شده‌اند (۳،۶،۷).

جدول شماره ۱: انواع سندروم میاستنی مادرزادی و ژن‌های شناخته شده

نوع	درصد از کل CMS‌ها	ژن‌های اصلی
پیش سیناپسی	۵	CHAT
سیناپسی	۱۰	COLQ
پس سیناپسی	۸۵	AChR Rapsyn, Dok-7

بیماران میاستنی مادرزادی نوع سیناپسی، ۱۵-۱۰ درصد از کل CMS‌ها را شامل می‌شوند که در ژن COLQ که کدکننده دم کلاژنی AChE است دارای جهش می‌باشند (۹۸). مهم‌ترین اختلال در این بیماران کاهش مادرزادی آنزیم استیل کولین استراز است که برای اولین بار در سال ۱۹۷۷ شناخته شد (۱۰). توارث بیماری به صورت اتوزومی مغلوب است (۱۱، ۱۲). ژن COLQ رمزکننده پروتئینی به نام کلاژن Q (COLQ) می‌باشد که یکی از پروتئین‌های محل اتصال عصب و ماهیچه است که برای اتصال آنزیم استیل کولین استراز به غشای پایه نیاز است (۱۳). راهبرد اساسی برای مقابله با این بیماری در بسیاری از کشورها و مخصوصاً کشورهای در حال توسعه بر پایه تشخیص قبل از تولد می‌باشد. بنابراین بررسی مولکولی بیماران مبتلا به CMS و آنالیز مستقیم جهش‌ها قدم مهمی در تشخیص و پیشگیری بیماری در جامعه محسوب می‌شود (۱۶-۱۴). تاکنون بیش‌تر از ۴۰ جهش در ژن COLQ گزارش شده (۱۷) که این جهش‌ها در دومین‌های مختلف، ایجاد اختلالات گوناگونی در عملکرد پروتئین COLQ و در نتیجه آنزیم استیل کولین استراز می‌کنند (۱۸). با توجه به متنوع بودن جهش‌ها در ژن COLQ روش جایگزین

برای تشخیص ژنتیکی براساس آنالیز پیوستگی با استفاده از مارکرهای چندشکلی متصل به ژن می‌باشد. مارکرهای چند شکلی تک نوکلئوتیدی SNP، شایع‌ترین چندشکلی‌ها در ژنوم انسان هستند (۱۹). یک جایگاه تک نوکلئوتیدی معمولاً زمانی به عنوان یک SNP در نظر گرفته می‌شود که فراوانی آلل مغلوب آن در جمعیت ۱ درصد یا بیش‌تر باشد و زمانی به عنوان مارکر در تشخیص بیماری‌ها در نظر گرفته می‌شود که آگاهی‌دهنده باشد (۲۰). همین‌طور، یک مارکر آگاهی‌دهنده باید هتروزیگوسیتی بالایی داشته باشد. مارکرهای چند شکلی از لحاظ فراوانی آللی و درجه هتروزیگوسیتی و سایر معیارهای جمعیت شناختی وابسته به جمعیت می‌باشند (۲۱). بنابراین به منظور مشخص نمودن مناسب بودن یک مارکر پلی مورفیک برای غربالگری ژنوم در یک جمعیت، لازم است ابتدا وضعیت آن مارکر از لحاظ هتروزیگوسیتی و فراوانی آللی در آن جمعیت به‌طور ویژه بررسی شود (۲۲). هدف از مطالعه حاضر، بررسی آگاهی‌دهندگی مارکر rs6442530 واقع در ژن COLQ در جمعیت اصفهان به عنوان نمونه‌ای از جمعیت ایرانی است.

## مواد و روش‌ها

### نمونه

در این مطالعه توصیفی - تجربی، نمونه‌گیری از تعداد ۱۵۲ فرد سالم غیرخویشاوند از جمعیت اصفهان به عنوان نمونه‌ای از جمعیت ایرانی انجام شد. از هر فرد مقدار ۱۰ میلی‌لیتر خون در لوله‌ی حاوی ۱ میلی‌لیتر EDTA با غلظت ۰/۵ مولار جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. DNA ژنومی از سلول‌های لکوسیت خون به روش رسوب نمک استخراج گردید.

### بررسی بیوانفورماتیک

کلید مارکرهای چندشکلی موجود در ناحیه ژنی COLQ در پایگاه‌های dbSNP، Ensembl genome browser، F-SNP browser و UCSC Genome Browser از

لحاظ جایگاه، درجه هتروزیگوسیتی، عملکرد و فراوانی آللی آلل مغلوب مورد بررسی قرار گرفتند. مارکر rs6442530 واقع در اینترون ۱ از ژن COLQ با داشتن معیارهایی هم چون MAF (Minor Allele frequency) بالای ۰/۲ و درجه هتروزیگوسیتی بالا به عنوان مارکر پلی مورفیک مناسب جهت مطالعه بیشتر انتخاب گردید.

#### تعیین ژنوتیپ

تعیین ژنوتیپ مارکر با استفاده از تکنیک ARMS PCR انجام شد. در این تکنیک از سه آغازگر در هر ویال استفاده می شود به صورتی 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 می دهند. برای هر نمونه دو ویال جداگانه در نظر گرفته می شود و در هر کدام آغازگرهای رفت و برگشت خارجی و برگشت داخلی اضافه می گردد با این تفاوت که نوع آغازگر داخلی در هر ویال متفاوت بوده و هر کدام شامل یک آلل از دو آلل مارکر در سر ۳ آغازگر مزبور هستند و تشخیص نوع آلل را به عهده دارند. اطلاعات آغازگرها و طول باندهای تشخیصی و کنترل در جدول شماره ۲ آورده شده است. با استفاده از پایگاه های NCBI و Primer1 و اعمال تنظیمات مناسب از نظر طول محصولات PCR و دمای بهینه، آغازگرهای ایده آل طراحی گردیدند (۲۳).

جدول شماره ۲: آغازگرهای طراحی شده جهت ARMS PCR برای شناسایی مارکر rs6442530

آغازگر	توالی آغازگر 5'-3'	طول آغازگر	Tm
FO	AGTCTGAAATCAAGGTGTCGC	N۲۱	۵۸/۵۸
RO	ACTCGTGGGCTGTTTACCTA	N۲۱	۵۸/۱۲
(C) RI	AAATTAAGAAGTTTAAAAATGAGGGGTTT	N۲۸	۵۷/۳۴
(T) RI	AAATTAAGAAGTTTAAAAATGAGGGGTTT	N۲۸	۵۶/۹۹

ARMS PCR: Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction;

FI: Forward Inner;  
RO: Reverse Outer;  
FO: Forward Outer;  
RI: Reverse Inner

سپس به کمک نرم افزارهای Oligo7 و TM Calculator آغازگرهای طراحی شده ارزیابی شدند و تغییرات لازم بر روی آنها اعمال گردید. در نهایت این آغازگرها در پایگاه NCBI با ژنوم انسان Blast شده و امکان اتصال آغازگرها به ژن های دیگر و تشکیل باندهایی غیر از باند اصلی سنجیده شد و تایید نهایی برای آنها صورت پذیرفت.

واکنش PCR ARMS با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (آلمان-Eppendorf) طبق شرایط زیر انجام شد: ۱μL از آغازگر FO (10pM)، ۰/۵μL از آغازگر RO (10pM)، ۰/۷۵μL از آغازگر RI (10pM)، ۰/۲μL از آنزیم Taq DNA Polymerase (5u/μL)، ۰/۵μL از dNTP (20mM)، ۲/۵μL از PCR Buffer (10X)، ۰/۷۵μL از MgCl<sub>2</sub> (100mM) و ۱μL از DNA ژنومی. حجم محلول واکنش PCR با ddH<sub>2</sub>O به ۲۵μL رسانیده شد و واکنش PCR انجام گردید.

محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۴۵ دقیقه تحت ولتاژ ۹۰ ولت رانده شد. سپس با دستگاه Gel Documentation عکس برداری از ژل با کمک نور UV صورت پذیرفت.

#### بررسی آماری

در نهایت با استفاده از پایگاه Genepop نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتیپ افراد از لحاظ فراوانی آللی، درجه هتروزیگوسیتی و فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و فراوانی ژنوتیپی مورد انتظار در فنوتیپ های هموزیگوت و هتروزیگوت مورد بررسی قرار گرفتند (۲۴). هم چنین وجود تعادل هاردی وینبرگ بر اساس آزمون Chi Square ( $\chi^2$ ) بررسی شد.

#### یافته ها

با توجه به این که مارکر چندشکلی rs6442530 دارای دو آلل غالب C و آلل مغلوب T می باشد، بنابراین ژنوتیپ های CC، CT و TT در جمعیت مورد انتظار

جفت باز بر روی ژل مشاهده شد. قطعه بزرگ ۴۱۴ جفت بازی نشان دهنده نوار کنترل است و قطعه کوچک ۲۸۵ جفت بازی مشخص کننده نوارهای اختصاصی برای آلل غالب C و آلل مغلوب T می باشد. مشاهده شدن قطعه کوچک ۲۸۵ جفت بازی در هر دو ویال حاوی آغازگرهای داخلی، نشان دهنده هتروزیگوت بودن فرد است، در حالی که افراد هموزیگوت غالب و مغلوب فقط در یکی از ویالها باند ۲۸۵ جفت بازی را نشان می دهند.

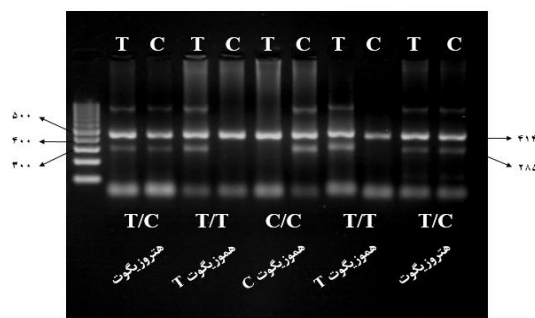
پس از تعیین آلل های افراد تحت مطالعه، فراوانی آللی، درجه هتروزیگوسیته و وجود تعادل هاردی وینبرگ برای مارکر مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار Genepop تخمین زده شد. فراوانی آللی مشاهده شده برای آلل های C و T به ترتیب ۵۶/۶ درصد و ۴۳/۴ درصد بود. هم چنین درصد هتروزیگوسیته و هموزیگوسیته مشاهده شده برای جمعیت اصفهان به ترتیب ۴۸/۶۸۴۲۱۱ درصد و ۵۱/۳۱۵۷۸۹ درصد بودند. این در حالی است که درصد هتروزیگوسیته و هموزیگوسیته مورد انتظار برای جمعیت اصفهان در پایگاه Genepop به کمک فرمول تعادل هاردی و اینبرگ ۴۹/۲۹۶۵۱۳ درصد و ۵۰/۷۰۳۴۸۷ درصد به دست آمدند.

بررسی تعادل هاردی وینبرگ نشان داد که جمعیت اصفهان برای نشانگر rs6442530 در تعادل می باشد زیرا، مقدار p محاسبه شده ۱/۰۰ به دست آمد که با توجه به این که مقدار p بزرگتر از ۰/۰۵ می باشد، بیانگر وجود تعادل هاردی و اینبرگ برای این مارکر در جمعیت اصفهان است. سپس مقدار PIC برای مارکر ژنتیکی rs6442530 محاسبه شد. بررسی ها نشان می دهد PIC می تواند مقداری بین ۰ تا ۱ داشته باشد. نشانگر دو آللی دارای حداکثر مقدار PIC=۰/۳۷۵ می باشد، بنابراین در نشانگرهای دو آللی هر چه PIC به دست آمده به عدد ۰/۳۷۵ نزدیک تر باشد می تواند به عنوان یک شاخص مناسب برای اطلاع دهندگی یک مارکر تک نوکلئوتیدی در نظر گرفته شود (۲۵).

است. تعیین ژنوتیپ افراد تحت مطالعه نشان داد که ۴۹ نفر دارای ژنوتیپ C/C، ۷۴ نفر دارای ژنوتیپ C/T و ۲۹ نفر نیز دارای ژنوتیپ T/T بودند. فراوانی مربوط به این ژنوتیپها در جدول شماره ۳ نشان داده شده است.

جدول شماره ۳: ژنوتیپ مارکر rs6442530 در جمعیت اصفهان به عنوان نمونه ای از جمعیت ایران

ژنوتیپ	ژنوتیپ های مشاهده شده	ژنوتیپ های مورد انتظار
C/C	۴۹	۴۸/۵۳۴۷
C/T	۷۴	۷۴/۹۳۰۷
T/T	۲۹	۲۸/۵۳۴۷



تصویر شماره ۱: تعیین ژنوتیپ نشانگر rs6442530.

نشانگر rs6442530 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و روش ARMS PCR تکثیر شد و سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد تفکیک شدند. باند ۴۱۴ جفت بازی نشان دهنده باند کنترل و باند ۲۸۵ جفت بازی نشان دهنده باند داخلی و تشخیصی است. برای هر فرد دو ستون در نظر گرفته شده است به صورتی که ستون اول از سمت راست مربوط به آلل C و ستون دوم مربوط به آلل T برای هر فرد است. بدین ترتیب ستون های ۱ و ۲ و هم چنین ستون های ۹ و ۱۰ از سمت راست مربوط به افراد هتروزیگوت T/C، ستون های ۳ و ۴ و ستون های ۷ و ۸ مربوط به افراد هموزیگوت T/T و ستون های ۵ و ۶ مربوط به فرد هموزیگوت C/C است. نمونه های DNA افراد سالم و غیر خویشاوند با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و روش ARMS PCR تکثیر شده و بر روی ژل آگارز برده شدند. دو باند مختلف با طول های ۴۱۴ و ۲۸۵

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که مقدار PIC برای مارکر rs6442530 در جمعیت اصفهان ۰/۳۷۰۶ می باشد که نشان دهنده اطلاع دهندگی بالای آن به عنوان یک مارکر تک نوکلئوتیدی در جمعیت اصفهان است.

## بحث

با توجه به ماهیت چندژنی بیماری سندروم میاستنی مادرزادی، شناسایی مستقیم جهش ها با استفاده از روش های تعیین توالی بسیار پرهزینه و زمان بر خواهد بود. بنابراین با توجه به تعداد زیاد ژن ها و جهش های متنوع در آن ها، تشخیص بیماری به صورت غیرمستقیم با استفاده از مارکرهای چندشکلی به خصوص مارکرهای SNP پیوسته با ژن می تواند مفیدتر باشد.

در این مطالعه مارکر rs6442530 در جمعیت اصفهان به عنوان نمونه ای از جمعیت ایرانی بررسی شد. نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ مارکر rs6442530 نشان می دهد که فراوانی آلل C (آلل غالب) ۰/۵۶۶ و فراوانی آلل T (آلل مغلوب) ۰/۴۳۴ می باشد. فراوانی آللی برای این مارکر در ناحیه ژنی COLQ برای جمعیت های مختلف در 1000 Genomes Project از طریق پایگاه Ensembl genome browser ارائه شده است. براساس این گزارش ها فراوانی آلل T (MAF) در جمعیت های چینی، نیجریایی، انگلیسی، اسپانیایی، ژاپنی، ایتالیایی، بنگلادشی و پاکستانی به ترتیب ۰/۶۴، ۰/۵۵، ۰/۳۲، ۰/۳۷، ۰/۶۵، ۰/۳۶، ۰/۴۳ و ۰/۳۶ می باشد (۲۶). این اطلاعات نشان می دهند که جمعیت ژاپنی در مقایسه با سایر جمعیت ها دارای بیشترین درصد فراوانی آلل T می باشد، در صورتی که کمترین درصد فراوانی آلل T مربوط به جمعیت انگلستان می باشد. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان می دهد که درصد فراوانی آلل T در جمعیت اصفهان به عنوان نمونه ای از جمعیت ایرانی نسبت به جمعیت های انگلستان، اسپانیا، ایتالیا بنگلادش و پاکستان بیش تر است، درحالی که نسبت به جمعیت های چینی، نیجریایی و ژاپنی کم تر می باشد. درضمن، جمعیت

بنگلادشی بیشترین شباهت را به جمعیت اصفهان از لحاظ فراوانی آلل مغلوب دارد. درصد هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای مارکر rs6442530 در جمعیت اصفهان ۴۸/۶۸۴۲۱۱ درصد محاسبه شد که کمی کم تر از درصد هتروزیگوسیتی مورد انتظار است. هم چنین با توجه به این که وجود تعادل هاردی واینبرگ می تواند صحت بررسی های آماری را تحت تاثیر قرار دهد، بنابراین مارکر rs6442530 از لحاظ وجود تعادل هاردی واینبرگ نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از پایگاه Genepop نشان داد که تعادل هاردی واینبرگ برای مارکر rs6442530 در جمعیت اصفهان وجود دارد، بنابراین عوامل برهم زننده تعادل هاردی واینبرگ در جمعیت اصفهان برای جایگاه مارکر rs6442530 اثر قابل توجهی نداشتند.

این یافته ها نشان می دهد که مارکر rs6442530 علاوه بر جمعیت های چینی، ژاپنی و نیجریایی، در جمعیت اصفهان نیز به عنوان نمونه ای از جمعیت ایرانی می تواند به عنوان یک مارکر گویا جهت بررسی های غیرمستقیم آلل های جهش یافته ژن COLQ مورد استفاده قرار گیرد. در مجموع با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، مارکر rs6442530 واقع در اینترون ۱ ژن COLQ به دلیل فراوانی آللی و درجه هتروزیگوسیتی بالا می تواند به عنوان مارکر تشخیصی مناسب در کنار مارکرهای آگاهی دهنده دیگر جهت استفاده در آنالیز پیوستگی و شناسایی جهش های بیماری زا در بیماری سندروم میاستنی مادرزادی معرفی شود. هم چنین دیگر اطلاعات به دست آمده از این مطالعه می تواند در تقویت اطلاعات ساختار ژنتیکی جمعیت ایران موثر باشد.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان جهت تامین بودجه مطالعه مزبور در قالب پژوهانه و هم چنین از کلیه افرادی که در تهیه نمونه ما را یاری نموده اند تشکر و قدردانی می کنیم.

## References

1. Engel AG, Ohno K, Sine SM. Congenital myasthenic syndromes: recent advances. *Arch Neurol* 1999; 56(2): 163-167.
2. Hantai D, Richard P, Koenig J, Eymard B. Congenital myasthenic syndromes. *Curr Opin Neurol* 2004; 17(5): 539-551.
3. Eymard B, Hantai D, Estournet B. Congenital myasthenic syndromes. *Handbook of Clinical Neurology* 2013; 113: 1469-1480.
4. Engel AG, Lambert EH, Gomez MR. A new myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency, small nerve terminals, and reduced acetylcholine release. *Ann Neurol* 1977; 1(4): 315-330.
5. Engel AG, Lambert EH, Mulder DM, Torres CF, Sahashi K, Bertorini TE, et al. A newly recognized congenital myasthenic syndrome attributed to a prolonged open time of the acetylcholine-induced ion channel. *Ann Neurol* 1982; 11(6): 553-569.
6. Finlayson S, Morrow JM, Rodriguez Cruz PM, Sinclair CD, Fischmann A, Thornton JS, et al. Muscle magnetic resonance imaging in congenital myasthenic syndromes. *Muscle Nerve* 2016; 54(2): 211-219.
7. Shillito P, Vincent A, Newsom-Davis J. Congenital myasthenic syndromes. *Neuromuscular Disorders* 1993; 3(3): 183-190.
8. Ohno K, Ohkawara B, Ito M. Recent advances in congenital myasthenic syndromes. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 2016; 7(3): 246-259.
9. Gandolfi B, Grahn RA, Creighton EK, Williams DC, Dickinson PJ, Sturges BK, et al. COLQ variant associated with Devon Rex and Sphynx feline hereditary myopathy. *Anim Genet* 2015; 46(6): 711-715.
10. Wargon I, Richard P, Kuntzer T, Sternberg D, Nafissi S, Gaudon K, et al. Long-term follow-up of patients with congenital myasthenic syndrome caused by COLQ mutations. *Neuromuscular Disord* 2012; 22(4): 318-324.
11. Walls TJ, Engel AG, Nagel AS, Harper CM, Trastek VF. Congenital Myasthenic Syndrome Associated with Paucity of Synaptic Vesicles and Reduced Quantal Release. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 681(1): 461-468.
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). *Am J Hum Genet* 1998; 63(4): 967-975.
13. Arredondo J, Lara M, Ng F, Gochez DA, Lee DC, Logia SP, et al. COOH-terminal collagen Q (COLQ) mutants causing human deficiency of endplate acetylcholinesterase impair the interaction of ColQ with proteins of the basal lamina. *Hum Genet* 2014; 133(5): 599-616.
14. Engel AG. The therapy of congenital myasthenic syndromes. *Neurotherapeutics* 2007; 4(2): 252-257.
15. Engel AG, Shen X-M, Selcen D, Sine SM. Congenital myasthenic syndromes: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Lancet Neurol* 2015; 14(4): 420-434.
16. Engel AG. Congenital myasthenic syndromes in 2012. *Curr Neurol Neurosci Reports* 2012; 12(1): 92-101.
17. Palace J, Beeson D. The congenital myasthenic syndromes. *J Neuroimmunol* 2008; 201: 2-5.
18. 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. *Pediatr Neurol* 2014; 51(1): 165-169.
19. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet* 2001; 27(3): 234-235.
  20. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* 2003; 33(suppl): 228-237.
  21. Fazeli Z, Vallian S. Molecular phylogenetic study of the Iranians based on polymorphic markers. *Gene* 2013; 512(1): 123-126.
  22. Fazeli Z, Vallian S. Phylogenetic relationship analysis of Iranians and other world populations using allele frequencies at 12 polymorphic markers. *Mol Biol Rep* 2012; 39(12): 11187-11199.
  23. Collins A, Ke X. Primer1: primer design web service for tetra-primer ARMS-PCR. *The Open Bioinformatics Journal* 2012; 6: 55-58.
  24. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 1995; 86(3): 248-249.
  25. Hildebrand CE, David C, Torney C, Wagner P. Informativeness of polymorphic DNA markers. *The Human Genome Project: deciphering the blueprint of heredity*. USA, CA: University Science Books, 1994: 100-102.
  26. Cunningham F, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, et al. Ensembl 2015. *Nucleic Acids Research* 2015; 43(D1): D662-D9.