

غربالگری پلی مورفیسم جایگاه Phe80Val ژن *MLH1* در زنان مبتلا به سرطان

تخمندان با تکنیک Tetra ARMS-PCR

فاطمه یوسف نژاد^۱، ابوالحسن رضایی^۲

۱- دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد رشته ژنتیک، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.

۲- استادیار گروه ژنتیک، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران. نویسنده مسئول: ab.rezaei@tonekaboniau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: سرطان اپی‌تلیال تخمدان ۹۰٪ بدخیمی های تخمدان و ۲۵٪ بدخیمی‌های تناسلی زنان را تشکیل می‌دهد و از آنجا که دیرتشخیص داده می‌شود، به همین دلیل در بین همه ی بدخیمی های دستگاه تناسلی زنان از بالاترین موارد مرگ و میر برخوردار است. تغییرات ریز RNA که بیان ژن را کنترل میکند در این سرطان به چشم می‌خورد. تغییر در الگوی متیله شدن در ناحیه پروموتور ژن ها نیز از دیگر پیشامد های سرطان تخمدان است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر نمونه های مورد آزمایش افراد بیمار و افراد سالم از آزمایشگاه جمع آوری گردید. جمعیت مورد مطالعه شامل ۲۵ فرد مبتلا به سرطان تخمدان و ۲۵ فرد سالم در سنین مختلف بوده است. از روش کیت، برای استخراج DNA ژنومی از خون، استفاده شد. سپس از جایگاه Phe80Val ژن *MLH1* جهت بررسی پلی مورفیسم آن با روش ARMS-PCR Tetra استفاده و همچنین یک جفت پرایمر جهت تایید نهایی تکنیک Tetra ARMS-PCR طراحی گردید.

نتایج: از بین نمونه های مورد بررسی هیچکدام موتاسیونی مشاهده نشد و دو عدد از نمونه ها جهت تعیین توالی به خارج از کشور فرستاده شدند و جایگاه نوکلئوتید بدون هیچ تغییری مشاهده شد.

نتیجه گیری: بطور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که هیچگونه ارتباطی بین پلی مورفیسم Phe80Val ژن *MLH1* و سرطان تخمدان در نمونه های حاضر وجود نداشت. هرچند نیاز به بررسی روی نمونه های بیشتر از سایر مناطق ایران می باشد.

کلمات کلیدی: سرطان تخمدان- پروموتور- بیان ژن - *MLH1*

مقدمه

موتاسیون ژن های زیادی در ایجاد سرطان تخمدان دخالت دارند که شامل *BRCA1*، *BRCA2*، *MLH2* و *PMS2* میباشد. این ژن ها معمولاً در تعمیر پلی مورفیسم هایی که منجر به سرطان میشوند، دخالت دارند. خصوصاً ژن *MLH1* در جلوگیری از mismatch نوکلئوتیدی دخالت دارد. همچنین تغییرات ریز RNA که بیان ژن را کنترل می کند. در این سرطان به چشم می خورد تغییر در الگوی متیله شدن در ناحیه پروموتور ژن ها نیز از دیگر پیشامد های سرطان تخمدان است به ویژه بیش متیله شدن در پروموتور ژن های سرکوبگر تومور رخ می دهد که موجب خاموشی ژن می شود (۱). از این رخداد می توان بعنوان نشانگر جهت تشخیص زود هنگام استفاده کرد. طور کلی در این تحقیق سعی بر این است با بررسی ژن *MLH1* که وجود پلی مورفیسم در آن به عنوان یک مارکر با سرطان تخمدان مرتبط میباشد، از طریق تکنیک Tetra ARMS-PCR مورد بررسی قرار گیرد. در این خصوص پروتئین *MLH1* با پروتئین دیگری به نام *PMS2* (تولید شده از ژن *PMS2*) ترکیب می شود. این پیچیدگی، فعالیت پروتئین های دیگر را که خطاهای ایجاد شده در طی همانندسازی DNA ایجاد می کند را برطرف می نماید. پلی مورفیسم های متعددی در ارتباط با ژن *MLH1* مرتبط می باشد که شامل پلی مورفیسم Phe80Val می باشد. این تغییر کدون، کدون فنیل آلانین و کدون والین که هر دو خنثی و غیرقطبی است، در کدون ۸۰ پروتئین *MLH1* (p.Phe80Val) جایگزین می کند که این تغییر نادرست در افراد با ویژگی های بالینی سندرم لینچ مشاهده شده است به طور خلاصه، شواهد موجود در حال حاضر نشان می دهد که این نوع پلی مورفیسم می تواند بیماری را باشد، اما برای اثبات قطعی آن به داده های بیشتری نیاز است. بنابراین، احتمالاً می تواند به عنوان یک پلی مورفیسم جهش زا طبقه بندی شود.

همچنین پلی مورفیسم p.F80V (به عنوان c.238T>G شناخته می شود)، واقع در ناحیه کد کننده اگزون شماره ۳ ژن *MLH1*، از جایگزینی T به G در موقعیت نوکلئوتیدی ۲۳۸ قرار دارد. فنیل آلانین در کدون ۸۰ با والین، یک اسید آمینه با خواص بسیار مشابه جایگزین می شود. این تغییر در فردی با سابقه شخصی و خانوادگی سرطان روده بزرگ تشخیص داده شد و تومور پروباند ناپایداری ریزماهورای بالا (MSI-H) اما رنگ آمیزی طبیعی *MLH1* IHC را نشان داد. در یک مطالعه عملکردی، این تغییر کاهش (۲۳.۷٪) فعالیت MMR آزمایشگاهی را نسبت به نوع وحشی، بیان نسبی $MLH1 > 75\%$ و یک اثر جهش دهنده منفی غالب در یکی از سه مطالعه مخمر نشان داد. این نوع بر اساس گروه های جمعیتی در پایگاه داده تجمع ژنوم (gnomAD) نادر است. این موقعیت اسید آمینه در گونه های مهره داران موجود به شدت حفظ شده است. علاوه بر این، این تغییر در تجزیه و تحلیل سیلیکو پیش بینی می شود که مضر باشد. بر اساس اکثر شواهد موجود تا به امروز، این پلی مورفیسم احتمالاً بیماری زا است (۲ و ۳).

اصلاح ژن *MLH1* با حذف یک بخش از DNA که شامل اشتباهات توالی مورد نظر که جایگزین بخشی از توالی اصلاح شده DNA می باشد، صورت می گیرد. تغییرات ارثی در ژن *MLH1* خطر ابتلا به سرطان تخمدان و سایر انواع سرطان را افزایش می دهد (۴). همچنین *MLH1* یکی از ۵ پروتئین مهم برای عملکرد MMR است. از دست دادن آن با بدست آوردن یک فنوتیپ جهش، بی ثباتی استعداد یک سرطان را نشان می دهد (۳). جهش های به ارث رسیده در ژن *MLH1* با یک نسبت خانوادگی همراه با سندرم سرطان کولون و غربالگری سرطان تخمدان همراه است. اخیراً نشان داده شده که یک نوع پلی مورفیک غیر کدینگ در *MLH1* به سرطان کولون و آندومتر منجر می شود، اما با کاهش شدت نفوذ به دنبال ایجاد این موضوع که آیا این نوع پلی مورفیک

نمونه خون از بیماران گرفته شد و در لوله های حاوی EDTA ریخته شد.

تحقیق حاضر در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن با کد اخلاق به شماره IR.IAU.TON.REC.1401.051 ثبت گردیده بود. همچنین نمونه خون سالم و بیمار در ویال های ۳ سی سی حاوی EDTA ریخته شد و در ظرفی دارای یخ به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن منتقل و در فریزر در دمای 20°C - نگهداری شد تا استخراج DNA انجام گیرد.

به منظور استخراج DNA از نمونه های خون، از کیت استخراج wizbiosolutions استفاده شد. طبق پروتکل کیت استخراج DNA، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه خونی داخل میکروتیوب جدید منتقل سپس ۲۰۰ میکرولیتر از بافر GB به همراه ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 56°C انکوبه و سپس ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درجه به آن اضافه و نهایتاً ورتکس گردید. در مرحله بعد به ستون استخراج منتقل و در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس به ستون استخراج ۵۰۰ میکرولیتر بافر WB1 اضافه و به مدت ۱ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. باقیمانده ویال سپس دور ریخته شده و به آن یافر WB2 به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر اضافه و نهایتاً به مدت ۱ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس باقی مانده در ویال جمع کننده را دور ریخته و ستون استخراج، در همان ویال جمع کننده قبلی قرار داده شد. و به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد تا به طور کامل اتانول آن از بین برود. سپس ۷۰۰ میکرولیتر Elution buffer به ستون استخراج اضافه و به مدت یک دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول باقی مانده در میکروتیوب همان DNA استخراج شده بود. همچنین در این تحقیق جهت تکثیر محصولات PCR، جایگاه Phe80Val ژن *MLH1* که در آن آلل نرمال (T allele) و پرایمرهای

نیز به سرطان تخمدان مرتبط بوده یا خیر می باشد (۴-۶). در یک تحقیقی ژنوتایپ ۸۹۹ فرد مبتلا به سرطان تخمدان مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که موتاسیون در ژن *MLH1* با افزایش خطر ابتلا به سرطان تخمدان مهاجم همراه است. در مطالعه ای مشاهده شد به طور سیستمیک بررسی نقش پیش آگهی هفت ژن MMR، *MSH2*، *MSH3*، *MSH6*، *MLH1*، *MLH3* و *PMS1* در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان تحت درمان با شیمی درمانی بودند که حاوی داده های بیان ژن و اطلاعات بقا از بیماران سرطان تخمدان بوده که مورد بررسی قرار گرفت. در میان هفت ژن، افزایش بیان mRNA را در این ژن ها *MLH1*، *MSH6* و *PMS2* مشاهده کردند. به طور قابل توجهی با بقای همه بیماران مبتلا به سرطان تخمدان درمان شده با شیمی درمانی مبتنی بر پلاتین، به خصوص در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان در مرحله نهایی مرتبط بود. افزایش بیان ژن های *MSH6* و *PMS2* با بیماران سرطان تخمدان ارتباط دارد. در تحقیق حاضر هدف بررسی غربالگری ژن *MLH1* در زنان مبتلا به سرطان تخمدان می باشد، با توجه به اهمیت شیوع سرطان تخمدان در ایران، ضروری است که تحقیقات در این زمینه صورت گیرد.

مواد و روش کار

افراد مورد بررسی از بین مراجعه کنندگان به آزمایشگاه های استان های گلستان و مازندران انتخاب شده اند. افراد مورد تحقیق شامل ۵۰ نمونه از دو گروه زنان مبتلا به سرطان تخمدان، و کنترل که افراد سالم بودند انتخاب شدند. اطلاعات اولیه از پرونده بیماران که در پرونده افراد مورد بررسی، ابتلا به سرطان با گرید های مختلف قید شده بود، انتخاب و پس از اخذ رضایت کتبی، نمونه گیری انجام شد. اطلاعات مورد نیاز شامل (سن ابتلا به بیماری های مورد بررسی، زمان قاعدگی، یائسگی و غیره) می گردد. پس از تکمیل پرسشنامه و گرفتن رضایتنامه از بیماران، مقدار ۲CC

موتانت (G allele) مطابق با گزارش سایت NCBI

(جدول ۱)، به کمک نرم افزار 7 oligo طراحی پرایمر انجام

شد پرایمر های مورد بررسی در جدول ۲ آورده شده بود.

جدول ۱- جایگاه Phe80Val ژن *MLH1* در آلل نرمال (T allele) و پرایمرهای موتانت G یا A تبدیل می گردد. مطابق با گزارش سایت NCBI.

Phe80Val (Homo Sapiens)	
Variant type	SNV
Alleles	T>A, G
Chromosome	3:37000985
Gene	<i>MLH1</i>
Functional Consequence	Intron _ Variant, missense_ Variant, 5_Prime_UTR
Clinical significance	Pathogenic, Likely -Pathogenic
HGVS	NC_000003.12:g.37000985T>A, NC_000003.12:g.37000985T>G, NC_000003.11:g.37042476T>A

جدول ۲- پرایمر های آلل نرمال (T allele) و پرایمرهای موتانت (G allele) ژن *MLH1* مورد استفاده برای تکنیک Tetra ARMS-PCR

Phe80Val	Primer (5'→3')
Forward Inner	AGATCTGGATATTGTATGTGAAAGGTG
Reverse Inner	CAAAGGACTGCAGTTTACTAGTAGTGA
Forward Outer	CTGAGAAGGAGCCACCTAGTAAG
Reverse Outer	GAAACATATATCAGAGGTCTCTGCAGG

جدول ۳- پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام PCR sequencing

Primer	Sequence	TM(°C)	size	PCR product size
Forward	GAT TAA ATC AAG AAA ATG GGA ATT CAA AG	60	29 mer	261
Reverse	GAG AAA TAC ATA CTA ACA AAT GAC AGA C	58.6	28 mer	261

(IR) جفت باز می باشد. علاوه بر آن به منظور صحت انجام

واکنش Tetra ARMS-PCR یک جفت پرایمر در

محدوده جهش ژن مورد بررسی جهت PCR-

باند آلل موتانت (FI-OR)=314, باند

کنترل (FO-OR)=1064, باند آلل نرمال (FO-OR)=803

Sequencing طراحی و بصورت جدول شماره ۳ نشان داده شده بود.

نتایج

نتایج آنالیز واکنش PCR برای بررسی پلی مورفیسم جایگاه Phe80Val ژن *MLH1*

در مطالعه حاضر جهت آزمایش مولکولی PCR برای بررسی پلی مورفیسم موردنظر از پرایمر های اختصاصی برای ناحیه مورد نظر استفاده شد پس

از انجام PCR نتایج حاصل با استفاده از دستگاه الکتروفورز، ترانسلومیناتور و Ladder مورد آنالیز قرار گرفت.

محصولات PCR مربوط به Phe80Val ژن *MLH1* با تکنیک Tetra ARMS – PCR تکثیر گردیده همانطور که در شکل شماره ۱ نشان داده شده یک باند ۸۰۳ جفت بازی که از پرایمر فوروارد و ریورس مربوط به فرد نرمال تکثیر شده است. در حالی که از پرایمر های موتانت هیچگونه تکثیری مشاهده نشد.



شکل ۱- محصولات PCR مربوط به جایگاه Phe80Val ژن *MLH1* که با تکنیک Tetra ARMS-PCR همانطور که در شکل فوق مشاهده میشود یک قطعه حدود ۸۰۳ جفت بازی است. که باند نرمال می باشد. چاهک ها به ترتیب از راست به چپ عبارتند از: DNA ladder و چاهک شماره ۱ کنترل منفی و چاهک شماره ۲ و ۳ نمونه های سالم جهت صحت تکنیک Tetra ARMS-PCR، یک نمونه جهت تعیین توالی فرستاده شد. همانطور که در شکل نشان داده شده یک باند ۲۶۱ جفت بازی مشاهده میشود.



شکل ۲- محصولات PCR مربوط به جایگاه Phe80Val ژن *MLH1*. همانطور که در شکل مشاهده میشود باند شارپ بوده کیفیت خوبی دارد.

آنالیز پلی مورفیسم Phe80Val ژن *MLH1* با استفاده از برنامه Chromas

نتایج تعیین توالی به کمک برنامه Chromas آنالیز و نتایج آن در شکل شماره ۵ نشان داده شده است. همانطور که در شکل نشان داده شده است هیچگونه موتاسیونی در جایگاه مورد نظر مشاهده نمی شود.

آنالیز پلی مورفیسم جایگاه Phe80Val ژن *MLH1* با استفاده از نرم افزار BLAST در سایت NCBI نمونه های تعیین توالی شده به منظور اطلاع از وضعیت همولوژی آن ها و نحوه قرار گیری موتاسیون های تک نوکلئوتیدی با برنامه BLAST آنالیز شدند و همولوژی ۱۰۰ درصد با توالی ثبت شده در بانک ژن و بدون هیچ گونه SNP مشاهده گردید (شکل ۳).

Download ▾ GenBank Graphics Sort by: E value ▾

Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p12 Primary Assembly

Sequence ID: [NC_000003.12](#) Length: 198295559 Number of Matches: 2

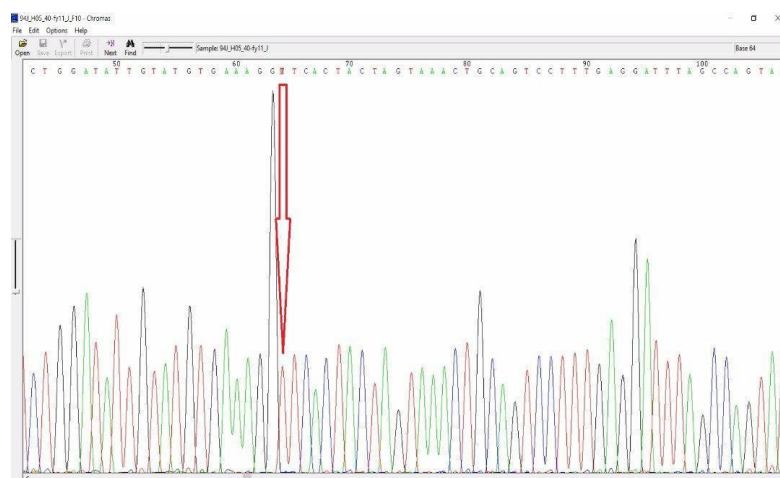
Range 1: 37000922 to 37001130 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
378 bits(418)	1e-102	209/209(100%)	0/209(0%)	Plus/Plus

Features: [DNA mismatch repair protein Mlh1 isoform 8](#)
[DNA mismatch repair protein Mlh1 isoform X1](#)

Query	1	TGATTATTTACTCATCTTTTGGTATCTAACAGAAAGAAGATCTGGATATTGTATGTGAA	60
Sbjct	37000922	TGATTATTTACTCATCTTTTGGTATCTAACAGAAAGAAGATCTGGATATTGTATGTGAA	37000981
Query	61	AGGTTCACTACTAGTAAACTGCAGTCCTTTGAGGATTTAGCCAGTATTCTACCTATGGC	120
Sbjct	37000982	AGGTTCACTACTAGTAAACTGCAGTCCTTTGAGGATTTAGCCAGTATTCTACCTATGGC	37001041
Query	121	TTTCGAGGTGAGGTAAGCTAAAGATTCAAGAAATGTGTAATAATATCCTCCTGTGATGACA	180
Sbjct	37001042	TTTCGAGGTGAGGTAAGCTAAAGATTCAAGAAATGTGTAATAATATCCTCCTGTGATGACA	37001101
Query	181	TTGCTGTGCATTTGTTAGTATGTATTCT	209
Sbjct	37001102	TTGCTGTGCATTTGTTAGTATGTATTCT	37001130

شکل ۳- آنالیز توالی تعیین شده پلی مورفیسم جایگاه Phe80Val ژن *MLH1* همولوژی ۱۰۰ درصد با توالی ثبت شده در بانک ژن و بدون هیچ گونه SNP مشاهده گردید.



شکل ۴- نتایج آنالیز جایگاه Phe80Val ژن *MLH1* با برنامه Chromas. همانطور که در شکل نشان داده شده است هیچگونه موتاسیونی در جایگاه مورد نظر مشاهده نمی شود.

بحث

سرطان تخمدان کشنده‌ترین سرطان ژنیکولوژیک زنان است و ۲٪ زنانی که سابقه فامیلی ابتلا به آن را ندارند، ممکن است در طول عمر خود به آن مبتلا شوند. متأسفانه تاکنون نه آزمون غربالگری و نه روش پیشگیری که باروری را نیز حفظ کند برای این بیماری وجود ندارد (۷). سرطان تخمدان چهارمین سرطان شایع و شایع‌ترین علت مرگ ناشی از سرطان‌های ژنیکولوژیک در زنان آمریکایی شمالی، اروپای شمالی و اروپای غربی و سرطان اپی‌تلیال تخمدان ششمین سرطان شایع در زنان است (۸). سرطان اپی‌تلیال تخمدان ۹۰٪ بدخیمی‌های تخمدان و ۲۵٪ بدخیمی‌های تناسلی را تشکیل می‌دهد. از آنجا که دیر تشخیص داده می‌شود مرگبار است. خطر ابتلای به سرطان تخمدان در طول عمر زنان فاقد سابقه مثبت خانوادگی در آمریکا ۲٪ می‌باشد (۹-۱۲).

ژن *MLH1* دستورالعمل‌هایی برای ساخت پروتئینی است که نقش قابل توجهی در ترمیم DNA دارد و به رفع اشتباهاتی که هنگام کپی DNA انجام می‌شود کمک می‌کند. این Complex فعالیت پروتئین‌های دیگر را که خطاهای ایجاد شده در طی تکرار DNA را برطرف می‌کند، هماهنگ می‌کند (۱۳).

ژن *MLH1* ژن سرکوب کننده تومور است. ژن‌های سرکوب کننده تومور باعث کاهش بخشی از سلول می‌شوند

(۱۴). تعمیر اشتباه DNA و یا مرگ سلولی، هنگامی که آنها به درستی کار نمی‌کنند، سلول‌ها می‌توانند رشد کنند که می‌تواند منجر به سرطان شود. همانند اکثر ژن‌ها، هر فرد دارای دو نسخه از آن است اگر ژن *MLH1* یکی از هر کدام به ارث رسیده باشد (۱۵). یعنی ژن به ارث رسیده از یک والدین باشد، سبب سندرم لینچ می‌شود، خطر ابتلا به سرطان کولورکتال، رحم، تخمدان و دیگر سرطان‌ها را افزایش می‌دهد (۱۶-۱۹). اگر یک زن دارای جهش در ژن *MLH1* باشد، شانس او برای رشد تخمدان، کولورکتال، رحم، سیستم عصبی مرکزی، پانکراس، نئوپلاسم‌های چربی، سرطان روده کوچک، معده و مجاری ادراری بیشتر از زنان متوسط ایالات متحده است این به این معنا نیست که او دارای تشخیص سرطان است و یا او قطعاً در معرض سرطان قرار خواهد گرفت (۲۰). جهش‌های مختلفی در خصوص ژن *MLH1* توسط محققین مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (جدول شماره ۳). همانطور که در جدول شماره ۳ نشان داده شده است پلی مورفیسم‌های مختلفی در ارتباط با موتاسیون ژن *MLH1* مورد بررسی قرار گرفته است. همانطور که نشان داده شده این جایگاه‌ها با بسیاری از بیماری‌های مختلف نظیر سرطان کولون، سرطان معده، سرطان پستان، سرطان دهانه رحم و سرطان تخمدان مرتبط می‌باشد و نشان دهنده ریسک بالای جایگاه‌های فوق در ایجاد بیماری بودند.

جدول شماره ۳. پلی مورفیسم ژن *MLH1* که در آن فراوانی هاپلوتیپ‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است.

SNPs	Gene	CEU haplotypes							
		1	2	3	4	5	6	7	8
rs1800743	<i>MLH1</i>	G	G	A	G	G	A	A	G
rs3774341	<i>MLH1</i>	C	A	A	C	A	A	A	C
rs1799977	<i>MLH1</i>	G	A	A	A	A	A	G	A
rs1558528	<i>MLH1</i>	A	C	C	A	C	C	C	C
rs9876116	<i>MLH1</i>	G	A	A	G	A	A	A	G
rs749072	<i>LRRFIP2</i>	T	T	C	T	C	T	C	T
Haplotype frequencies: %		33.3	26.6	17.5	15.0	4.1	1.6	1.6	0.8

همچنین محققین دیگری در خصوص سایر پلی مورفیسم های ژن فوق مور بررسی قرار دادند در این خصوص سه موتاسیون ژرم لاین جدید برای اولین بار در ژن *MLH1* تعیین شد. اولین موتاسیون یک جهش متقاطع *MLH1* (C>A.364c)(Transversion) بود که سبب تغییر اسید آمینه ترئونین به پرولین در کدون ۱۱۶ شده بود. این کدون در منطقه شدت حفظ شده بخش HATPase پروتئین *MLH1* قرار دارد. دومین موتاسیون نیز یک موتاسیون transversion بود که در موقعیت ۷۳۶ باعث تغییر نوکلئوتید آدنین به تیمین و در نتیجه سبب تغییر اسید آمینه ایزولوسین به لوسین شده بود. سومین جهش یک موتاسیون تغییر قاب (فریم شیفت) بود که با حذف ۲ نوکلئوتید تیمین و گوانین باعث ایجاد یک کدون خاتمه زودهنگام در ۵ کدون پایین دست ژن شده بود. با ایجاد این موتاسیون فریم شیفت، ۵ اسید آمینه پایین دست موتاسیون تغییر کرده بود که متعاقبا سبب ایجاد کدون خاتمه زودهنگام شده بود. یکی از بیماران از نظر مارکرهای توالیهای تکراری دارای پایداری بود، در حالیکه بیمار دیگر ناپایداری در مارکرهای توالیهای تکراری را نشان میداد (۲۰).

در خصوص جایگاه Phe80Val ژن *MLH1* تاکنون مطالعه ای صورت نگرفته است و در تحقیق حاضر هیچگونه موتاسیونی مشاهده نشده بود. دلایل مختلفی در این خصوص پیشنهاد می گردد، اولاً هرچند که در سایت NCBI در بخش SNP عملکرد پلی مورفیسم Phe80Val بصورت پاتوژنیک قید شده است ولی با توجه به تعداد کم جمعیت مورد مطالعه (۵۰ فرد که ۲۵ فرد بیمار و ۲۵ فرد سالم) می تواند بر نتایج تاثیرگذار باشد. ثانياً منطقه جغرافیایی و اینکه تمامی نمونه ها از دو منطقه (استان مازندران و گلستان) بودند و پراکندگی معنی داری وجود نداشته است می تواند تاثیرگذار باشد. ثالثاً تکنیک ARMS-PCR می تواند نتایج متفاوتی نسبت به سایر تکنیک ها نظیر PCR Sequencing که یک

متد با sensitivity بالاست. بطور کلی دلایل متفاوتی می تواند در اینکه پلی مورفیسم مورد مطالعه تاثیرگذار نبوده است وجود داشته است. نکته مهم دیگری که در تحقیق فوق مورد مطالعه قرار گرفته است تعیین توالی تعداد دو نمونه از نتایج تکنیک تکنیک ARMS-PCR بوده است. هدف از تعیین توالی تعیین صحت تکنیک ARMS-PCR می باشد و احتمال خطا در آن ممکن است وجود داشته باشد. روش ARMS روش آسان و سریع و قابل اعتماد برای تشخیص و مشاهده حذف یا اضافه شده کوچک در توالی مولکولی DNA، جهش های نقطه ای، چند شکلی های طولی قطعه محدود شده (RFLP) میباشد. این روش بر پایه تفاوت نوکلئوتیدهای 3' پرایمرها برای آلل های مختلف ساخته شده است. اساس این تکنیک تکثیر اختصاصی آلل ها توسط PCR (PCR Amplification Specific Alleles) نیز خوانده می شوند، می باشد. دو واکنش PCR بوسیله ی یک مولکول DNA یا الگو صورت می گیرد، که در هر واکنش صورت گرفته یک پرایمر مشترک به همراه یک یا دو پرایمر اختصاصی الل مورد بررسی قرار می گیرد. حالت اختصاصی این پرایمرها برای هریک از این الل ها حاکی از تفاوت در نوکلئوتیدهای آنها می باشد و مربوط به نقطه متفاوت بین دو الل است، استفاده از Tag DNA پلی مرز و یا یک DNA پلی مرز یکسان که فاقد خاصیت اگزونوکلئازی بوده در این واکنش ضروری است (۱۹). تکنیک ARMS برای بررسی تعداد زیادی از چند شکلی های ژنتیکی، تشخیص پیش از تولد بیماری های ژنتیکی، تعیین ناقلین ژن های بیماری، جهش های ارثی و اکتسابی، تعیین میزان سلول های باقیمانده در درمان سرطان مورد استفاده قرار گرفته است (۲۳-۲۰). در این مطالعه ی تجربی نمونه گیری از نمونه خون از زنان مبتلا به سرطان تخمدان (۲۵ نمونه) انجام گرفت. قبل از انجام عمل استخراج، تمامی نمونه ها پس از جمع آوری به آزمایشگاه ژنتیک منتقل شده و تا استخراج DNA در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری می شوند. استخراج DNA ژنومی

مطالعه به بررسی مطالعاتی مرتبط با بررسی وجود پلی مورفایسم های دیگر در ژن *MLH1* در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان با استفاده از روش های PCR پرداخته شد. نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که از ۲۵ فرد مبتلا به سرطان تخمدان هیچ یک از نمونه های مورد بررسی دارای جهش جایگاه Phe80Val در ژن *MLH1* نبودند و این نتایج با استفاده از روش PCR sequencing نیز تایید گردید. نتایج پژوهش حاضر و هم چنین نتایج مطالعات دیگر محققین نشان دهنده آن است که جهش جایگاه Phe80Val ژن *MLH1* به ندرت رخ داده و نیاز به مطالعات بیشتر در جمعیت های دیگر دارد. آنچه که قابل بررسی است محدودیت های جمع آوری نمونه بوده است این محدودیت ها شامل تعداد کم نمونه های بیمار، نحوه جمع آوری نمونه ها و عوامل دیگر دخیل بوده است. همانطور که در بخش بحث ذکر گردید از سایر تکنیک های مولکولی نظیر Real Time PCR و PCR Sequencing جهت بررسی نمونه ها مورد استفاده قرار گیرد و احتمالاً می تواند در نتایج تاثیرگذار باشد.

تشکر و قدردانی.

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد، مصوب معاونت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن می باشد. بدین وسیله، نویسندگان از این معاونت تشکر و قدردانی به عمل می آورند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را برای این مقاله گزارش نمی کنند.

از خون با استفاده از کیت طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. به منظور بررسی کیفی از استخراج مناسب DNA و اینکه روش استخراج به درستی انجام شده است، نمونه ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد، الکتروفورز گردید و به منظور بررسی کمی خلوص DNA استخراج شده از نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ استفاده شد. پس از استخراج DNA، پرایمر اختصاصی توسط نرم افزار oligo برای دو آلل نرمال و جهش یافته ی ژن *MLH1* طراحی شد و DNA های زنان مبتلا به سرطان تخمدان با استفاده از واکنش Tetra ARMS PCR برای بررسی حضور آلل مورد نظر تکثیر شدند که این امر بواسطه ی پروتکل حرارتی ذکر شده در بخش روش کار انجام پذیرفت. در نهایت جهت مشاهده محصول PCR، DNA های تکثیر یافته بر روی ژل آگارز ۱ درصد برده شده و طبق اندازه محصول PCR مورد نظر وجود جهش مشاهده شد. هم چنین جهت اطمینان از روش PCR sequencing استفاده شد و نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار کروماتس تجزیه و تحلیل شد. هدف از این مطالعه غربالگری جهش جایگاه Phe80Val ژن *MLH1* در خون زنان مبتلا به سرطان تخمدان با روش Tetra ARMS PCR می باشد.

نتیجه گیری

در ارتباط با این پژوهش، مطالعات اندکی در کشورهای مختلف انجام گرفته است و مطالعه ای مبنی بر غربالگری جهش جایگاه Phe80Val ژن *MLH1* در خون زنان مبتلا به سرطان تخمدان یافت نشد. از این رو این مطالعه با محدودیت هایی در این زمینه همراه بود و در راستای این

فهرست منابع

1. Flam, F., Einhorn, N., Sjøvall Km, (1988), Symptomatology of ovarian cancer. Eur J Gynecol Obstet Reprod Bio. 27:53-7.
2. Stratton, J.F., Thompson, D., Bobrow L., et al. (1999), The genetic epidemiology of

early-onset epithelial ovarian cancer: A population-based study Am. J. Hum. Genet. 65: 1725-1732.

3. Goodman, M.T., Howe, H.L., Tung, K.H. et al, (2003), incidence of ovarian cancer by race and ethnicity in the united states, 1992- 1997. Cancer. 97: 26-76.

4. Oscoe Klinck A.B. Lyna Inkel. Genevieve Dufresne-Martin, Julien Gervais-Bird, et al. (2008), Multiple Alternative Splicing Markers for Ovarian Cancer. 68(3): 7-11.
5. Pal, T., Permuth- wey, J., Betts, J.A., et al. (2005), BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. Cancer, 15(104), 12. 2807-2816.
6. de Almeida Paiva, V., de Souza Gomes, I., Monteiro, C. R., Mendonça, M. V., Martins, P. M., Santana, C. A., ... & de Azevedo Silveira, S. (2022). Protein structural bioinformatics: An overview. Computers in Biology and Medicine, 147, 105695.
7. Santos, C., Azuara, D., Rodríguez-Moranta, F., & Moreno, V. (2018). MLH1 mutations and chemotherapy resistance in colorectal cancer. Oncotarget, 9(15), 12179–12191.
8. Hamna, L., Adams, M, (2006), Prevention of ovarian cancer best practice and research clinical obstetrics and gynecology. 2: 339-362.
9. Dowty, J.G., Win, A.K., Buchanan, D.D., et al, (2013), Cancer risks for MLH1 and MSH2 mutation carriers. Hum Mutat. 34(3):490-7.
10. Holschneider, C.H., Berek, J.S, (2000), Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. Semin Surg Oncol. 19(1): 3-10.
11. Chuchu, Zhao., Saisai, Li., Menghuang, Zhao., Haiyan Zhu and Xueqiong Zhu, (2018), Prognostic values of DNA mismatch repair genes in ovarian cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. Arch Gynecol Obstet. 297(1): 153–159.
12. Lin, KM., et al, (1998), Colorectal and extracolonic cancer variations in MLH1/MSH2 hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds and the general population. Dis Colon Rectum. 41:428-33.
13. Wagner A, Tops C, Wijnen JT, Zwinderman K, van der Meer C, Kets M, et al.(2002). Genetic testing in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families with a MSH2, MLH1, or MSH6 mutation. J Med Genet . 39:833-37.
14. Valérie Bonadona, Bernard Bonaïti, Sylviane Olschwang, et al, (2011), Cancer Risks Associated With Germline Mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 Genes in Lynch Syndrome Article Information JAMA. 305(22):2304-2310.
15. Aquilina G, Ceccotti S, Martinelli S, Soddu S, Crescenzi M, Branch P, Karran P, Bignami M. (2000). Mismatch repair and p53 independently affect sensitivity to N-(2-chloroethyl)-N-cyclohexyl-N-nitrosourea. Clin Cancer Res. 6:671–680
16. Scartozzi M, De Nictolis M, Galizia E, Carassai P, Bianchi F, Berardi R, Gesuita R, Piga A, Cellerino R, Porfiri E. (2003). Loss of hMLH1 expression correlates with improved survival in stage III–IV ovarian cancer patients. Eur J Cancer. 39:1144–1149.
17. Hawn MT, Umar A, Carethers JM, Marra G, Kunkel TA, Boland CR, Koi M. (1995). Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. Cancer Res. 55:3721–3725.
18. Helleman J, van Staveren IL, Dinjens WN, van Kuijk PF, Ritstier K, Ewing PC, van der Burg ME, Stoter G, Berns EM. (2006).

Mismatch repair and treatment resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer*.6:201-208.

19. Ian H, Barry R, Harvey A. Risch, KS, Mario E. Beiner, JM, Ping S, Steven A. (2008). Narod Ovarian cancer risk is associated with a common variant in the promoter sequence of the mismatch repair gene MLH1. *109*(3): 384–387.

20. Bandipalliam P. Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with homozygous mismatch repair gene mutations. *FamCancer*. 2005;4(4):323-33.

21. Scartozzi M, De Nictolis M, Galizia E, Carassai P, Bianchi F, Berardi R, Gesuita R,

Piga A, Cellerino R, Porfiri E. (2003). Loss of hMLH1 expression correlates with improved survival in stage III–IV ovarian cancer patients. *Eur J Cancer*;39:1144–1149.

22. Wagner A, Tops C, Wijnen JT, Zwinderman K, Meer C, Kets M, et al. Genetic testing in hereditary non-polyposis colorectal cancer families with a MSH2, MLH1, or MSH5 mutation. *J Med Genet* 2002;39:833-37.

23. Stephenson BM, Finan PJ, Gascoyne J, Garbett F, Murday VA, Bishop DT, et al. (1995). Frequency of familial colorectal cancer. *Br J Surg*. 78:1162-66.



Screening of the Phe80Val polymorphism of the MLH1 gene in women with ovarian cancer by Tetra ARMS-PCR technique

FAthemeh Yousefnejad¹, Abolhasan Rezaei²

1- M.Sc. Graduated, Department of Genetics, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Genetics, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran. Corresponding Author: ab.rezaei@tonekaboniau.ac.ir

Received:2025.04.03

Accepted: 2025.07.06

Abstract

Background & Aim: Epithelial ovarian cancer accounts for 90% of ovarian malignancies and 25% of gynecologic cancers. Since it is diagnosed late, it has the highest mortality rate among all malignancies of the female reproductive system. Moreover microRNA genes, which regulate gene expression, are observed in ovarian cancer. So, changes in methylation patterns in gene promoter regions are also among the events associated with ovarian cancer.

Materials & Methods: In the present study, samples including normal and cases were collected from hospitals of north of Iran . The samples including twenty five individuals women with ovarian cancer and twenty five individuals women with normal situation in different ages. A commercial kit was used to extract genomic DNA from human blood. The Val80Phe locus of the MLH1 gene was then examined for polymorphism using the Tetra ARMS PCR technique, then for final confirmation of the Tetra ARMS PCR technique, were designed a pair of primers and done PCR sequencing technique.

Results:No mutations were observed between normal and cases. Then two samples were sequenced and no observed single nucleotide polymorphism between them.

Conclusion: Overall, the findings of the present study indicated that there was no association between the MLH1 Val80Phe polymorphism and ovarian cancer in the examined samples. However, further studies on larger sample sizes from other regions of Iran are needed.

Keywords: Ovarian Cancer, Promoter, Gene Expression, MLH1.