غربالگری پلی مورفیسم جایگاه Phe80Val ژن *MLH1* در زنان مبتلا به سرطان تخمدان 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*] استادیارگروه ژنتیک، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

Email: ab.rezaei@tonekaboniau.ac.ir

چکیده

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 می شود،به همین دلیل در بین همه ی بدخیمی های دستگاه تناسلی زنان از بالاترین موارد مرگ ومیر برخوردار است. تغییرات ریزRNA که بیان ژن را کنترل میکند در این سرطان به چشم می خورد. تغییر در الگوی متیله شدن در ناحیه پروموتر ژن ها نیز از دیگر پیشامد های سرطان تخمدان است. مواد و روش ها: در مطالعه حاضر نمونه های مورد آزمایش افراد بیمار و افراد سالم از آزمایشگاه جمع آوری گردید.جمعیت مورد مطالعه شامل ۲۵فرد مبتلا به سرطان تخمدان و ۲۵فرد 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 Tetra ARMS-PCR 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 مورفیسمPhe80Val ژن *MLH1* و سرطان تخمدان در نمونه های حاضر وجود نداشت. هرچند نیاز به بررسی روی نمونه های بیشتراز سایر مناطق ایران می باشد.

واژگان کلیدی: سرطان تخمدان- پروموتر-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 معمولا در تعمیر پلی مورفیسم هایی که منجر به سرطان میشوند، دخالت دارند. خصوصا 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 پروموتر ژن ها نیز از دیگر پیشامد های سرطان تخمدان است به ویژه بیش متیله شدن در پروموتر 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-PCRمورد 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 کندکه 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 تواانند بیماری زا باشد، اما برای اثبات قطعی آن به داده های بیشتری نیاز است. بنابراین، احتمالا 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 ریزماهواره‌ای بالا (MSI-H) اما رنگ‌آمیزی طبیعی IHC *MLH1* 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 گروه‌های 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(۳و۲).

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(٤).همچنین *MLH1* یکی از ۵ پروتیین 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. اخیرا 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 نیز به سرطان تخمدان مرتبط بوده یا خیرمی باشد(٤-٦). در یک تحقیقی ژنوتایپ ۸۹۹ فرد مبتلا به سرطان تخمدان مورد بررسی قرار گرفت ، نتایج نشان داد که موتاسیون درژن *MLH1* با افزایش خطر ابتلا به سرطان تخمدان مهاجم همراه است. در مطالعه ای مشاهده شد به طور سیستمیک بررسی

نقش پیش آگهی هفت ژنMMR ، MSH2، MSH3، MSH6، *MLH1*، MLH3، PMS1و PMS2در 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 mRNAرا در این ژن ها MSH6، *MLH1*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 هایMSH6 وPMS2 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 آزمایشگاهای استان های گلستان و مازندران انتخاب شده اند . افراد مورد تحقیق شامل۵۰نمونه 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 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 -20ºC 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 نهایتا 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 نهایتا 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 سانتریفوژ شد تا به طور کامل اتانول آن ازبین برود.سپس ۷۰۰ میکرولیتر Elution buffer به ستون استخراج اضافه و به مدت یک دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول باقی مانده در میکروتیوپ 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 موتانت (G allele) **مطابق با گزارش سایت** NCBI **(جدول شماره ۱)** ، به کمک نرم افزار oligo 7 طراحی پرایمر انجام شد پرایمر های مورد بررسی در جدول شماره ۲ آورده شده بود.

جدول شماره ۱. جایگاه Phe80Val ژن *MLH1* در آن 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	*MLH1*
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 شماره 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

باند آلل موتانت(FI-OR)=314, **باند کنترل**(FO-OR)=1064,**باند آالل نرمال**(FO-IR)=803 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-Sequencing طراحی و بصورت جدول شماره ۳ نشان داده شده بود.

جدول شماره ۳. **پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام PCR sequencing**

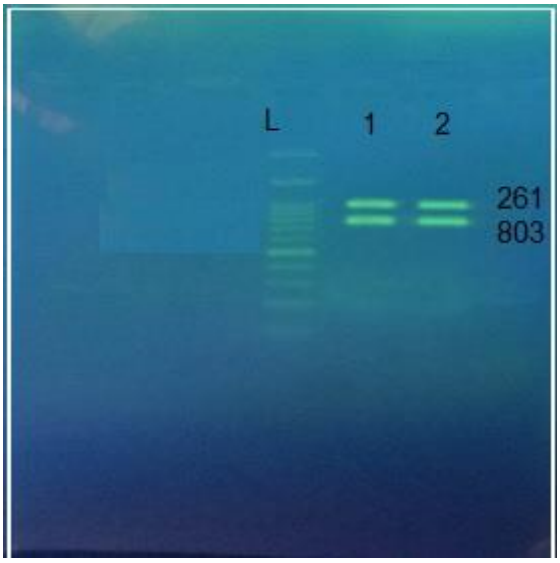
Primer	Sequence	TM(°C)	size	PCR size
Forward	GAT TAA ATC AAG AAA ATG GGA ATT CAA AG	60	29 mer	261
Reverse	GAG AAA TAC ATA CTA ACA AAT GAC AGA C	58.6	28 mer	261

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 هـای اختصاصـی [illegible] پس از انجام PCR نتایج حاصل با استفاده ازدستگاه 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.



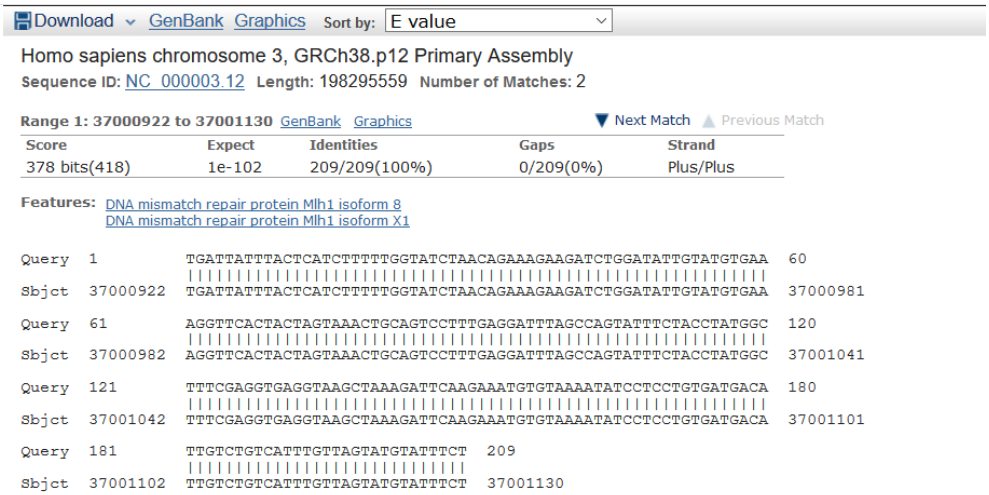
شکل شماره ۱. محصولات PCR مربوط به جایگاه Phe80Val ژن *MLH1* که با تکنیک Tetra ARMS-PCR.

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

٤-٧-آنالیز پلی مورفیسم جایگاه Phe80Val ژن *MLH1* با استفاده از نرم افزار BLAST در سایت NCBI

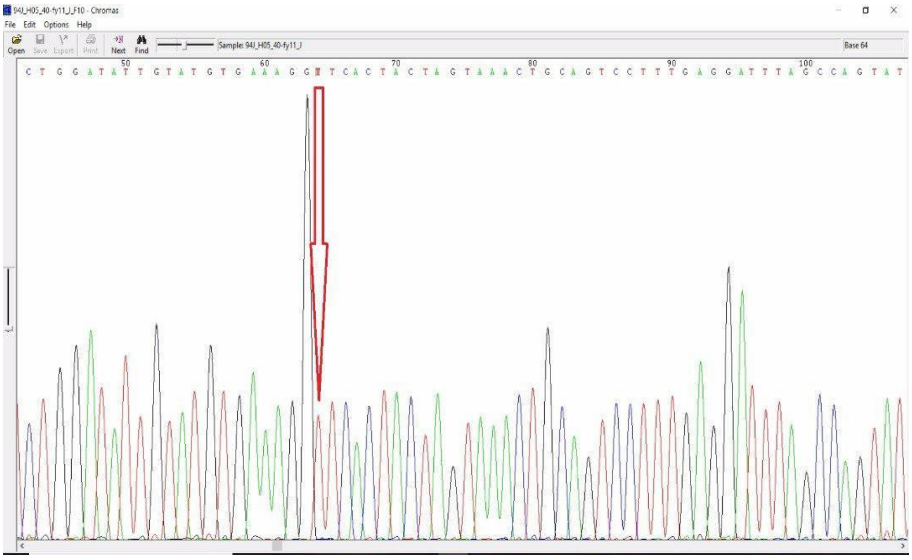
نمونه های تعیین توالی شده به منظور اطلاع از وضعیت همولوژی آن ها و نحوه قرار گیری موتاسیون های تک نوکلئوتیدی با برنامه BLAST آنالیز شدند و همولوژی ۱۰۰ درصد با توالی ثبت شده در بانک ژن و بدون هیچ گونه SNP مشاهده گردید (شکل‌شماره ۳).



شکل‌شماره 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.

٤-١٠ آنالیز پلی مورفیسم Phe80Val ژن *MLH1* با استفاده از برنامه Chromas

نتایج تعیین توالی به کمک برنامه Chromas آنالیز و نتایج آن در شکل شماره۵ نشان داده شده است . همانطور که در شکل نشان داده شده است هیچگونه موتاسیونی در جایگاه مورد نظر مشاهده نمی شود.



شکل شماره ٤. نتایج انالیز 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 و بررسی

سرطان تخمدان کشنده‌ترین سرطان ژنیکولوژیک زنان است و ۲٪ زنانی‌که 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٪ بدخیمی های تخمدان و ۲۵٪ بدخیمی های تناسلی را تشکیل می دهد.از آنجا که دیر تشخیص داده می شود مرگبار است. خطر ابتلای به سرطان تخمدان در طول عمر زنان فاقد سابقه مثبت خانوادگی در آمریکا ۲٪ می‌باشد (۱۲-۹).

ژن *MLH1* دستورالعمل هایی برای ساخت پروتئینی است که نقش قابل توجهی در ترمیم DNA دارد و به رفع اشتباهاتی که هنگام کپی DNA انجام می شود کمک می کند.این Complex فعالیت پروتئین های دیگر را که خطاهای ایجاد شده در طی تکرار DNA را برطرف می کند، هماهنگ می کند(۱۳).

ژن *MLH1* ژن سرکوب کننده تومور است .ژن های سرکوب کننده تومور باعث کاهش بخشی از سلول می شوند (١٤). تعمیر اشتباه DNA و یا مرگ سلولی ،هنگامی که آنها به درستی کار نمی کنند، سلول ها می توانند رشد کنند که می تواند منجر به سرطان شود.همانند اکثر ژن ها، هر فرد دارای دو نسخه از آن است اگر ژن *MLH1* یکی از هرکدام به ارث رسیده باشد(۱۵). یعنی ژن به ارث رسیده از یک والدین باشد، سبب سندرم لینچ می شود، خطر ابتلا به سرطان کولورکتال، رحم، تخمدان و دیگر سرطان ها را افزایش می دهد(١٦-١٩). اگر یک زن دارای جهش درژن *MLH1* باشد، شانس او برای رشد تخمدان، کولورکتال،رحم، سیستم عصبی مرکزی، پانکراس، نئوپلاسم های 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 قطعا در معرض سرطان قرار خواهد گرفت.(۲۰) جهش های 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 مورفیسم های مختلفی در ارتباط با موتاسیون ژن MLH1 مورد بررسی قرار گرفته است. همانطور که نشان داده شده این جایگاه ها با بسیاری از بیماری های مختلف نظیر سرطان کولون، سرطان معده ، سرطان پستان، سرطان دهانه رحم و سرطان تخمدان مرتبط می باشد و نشان دهنده ریسک بالای جایگاه های فوق در ایجاد بیماری بودند.

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

SNPs	Gene	CEU haplotypes							
		1	2	3	4	5	6	7	8
rs1800743	*MLH1*	G	G	A	G	G	A	A	G
rs3774341	*MLH1*	C	A	A	C	A	A	A	C
rs1799977	*MLH1*	G	A	A	A	A	A	G	A
rs1558528	*MLH1*	A	C	C	A	C	C	C	C
rs9876116	*MLH1*	G	A	A	G	A	A	A	G
rs749072	*LRRFIP2*	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 MLH1تعیین شد. اولین موتاسیون یک جهش متقاطع (Transversion)(C>A.364c)بود که سبب تغییر اسید آمینه ترئونین به پرولین در کدون ۱۱٦ شده بود. این کدون در منطقه بشدت حفظ شده بخش HATPase پروتئین *MLH1*قرار دارد. دومین موتاسیون نیز یک موتاسیون transversion بود که در موقعیت ۷۳٦ باعث تغییر نوکلئوتید آدنین به تیمین و در نتیجه سبب تغییر اسیدآمینه 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 زوهنگام شده بود. یکی از بیماران از نظر مارکرهای توالیهای تکراری دارای پایداری بود، در حالیکه بیمار دیگر ناپایداری در مارکرهای توالیهای تکرای 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، اولا 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. ثانیا 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. ثالثا تکنیک ARMS-PCR می تواند نتایج متفاوتی نسبت به سایر تکنیک ها نظیر PCR Sequencing که یک متد با sensivity بالاست. بطور کلی دلایل متفاوتی می تواند در اینکه پلی مورفیسم مورد مطالعه تاثیرگار 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 وحود 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 محدودشده (RFLP) میباشد. این روش بر پایه تفاوت نوکلئوتیدهای 3´ پرایمرهابرای آلل های مختلف ساخته شده است .اساس این تکنیک تکثیر اختصاصی آلل ها توسط PCR (PCR Amplification Specific Alleles) نیزخوانده می شوند، می باشد. دو واکنش PCR بوسیله ی یک مولکول DNA یا الگوصورت می گیرد، که در هر واکنش صورت گرفته یک پرایمر مشترک به همراه یک یا دوپرایمراختصاصی الل مورد بررسی قرار می گیرد .حالت اختصاصی این پرایمرها برای هریک ازاین الل‌ها حاکی از تفاوت درنوکلئوتیدهای آنها می باشدو مربوط به نقطه متفاوت بین دو الل است، استفاده از Tag DNA پلی‌مراز ویا یک DNA پلی‌مراز یکسان که فاقدخاصیت اگزونوکلئازی بوده دراین واکنش ضروری است (۱۹). تکنیک ARMS برای بررسی تعداد زیادی از چندشکلی‌های ژنتیکی ،تشخیص پیش از تولد بیماری‌های ژنتیکی ،تعیین ناقلین ژن‌های بیماری ، جهش‌های ارثی واکتسابی، ،تعیین میزان سلول های باقیمانده در درمان سرطان مورد استفاده قرارگرفته 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 فریزرمنفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری می شوند. استخراج DNA ژنومی

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 وDNA های زنان مبتلا به سرطان تخمدان با استفاده از واکنش Tetra ARMS PCR برای بررسی حضور آلل مورد نظرتکثیر 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 کروماس تجزیه و تحلیل شد. هدف از این مطالعه غربالگری جهش جایگاه Phe80Val **ژن** *MLH1* درخون زنان مبتلا به سرطان تخمدان با روش Tetra ARMS PCR می باشد.

۵-۲ 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 مطالعه به بررسی مطالعاتی مرتبط با بررسی وجود پلی مورفیسم 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 ۲۵فرد 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 استفده قرار گیرد و احتمالا می تواند در نتایچ 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.

References

1. Flam, F., Einhorn, N., Sjovall 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. Genevie`veDufresne-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), BRCAI 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 ofneurofibromatosis 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.

Abstract

Abstract Background and aim: The ovary is in the form of two small tubers on the two sides of the uterus that are covered by the end of the ovarian tube. Since more than two-thirds of the cases of ovarian cancer have spread to the abdominal cavity at the time of diagnosis, they are almost untreated. Also, the survival of these patients has not been significantly improved in the last three decades; however, screening methods for ovarian cancer are not economical, so it seems that studies for early diagnosis of the disease are beneficial. epithelial cancer accounts for 90% of the ovarian malignancies and 1/4 of the female genital malignancies, and because of its late diagnosis, it has the highest rate of mortality among all malignancies in the genital tract. The cancer is the sixth female cancer in Western countries and the fifth cause of cancer deaths in women in the United States of America. Multiple genes are involved in the onset and onset of this cancer. There are also changes in the micro-RNA that controls the expression of the gene in the cancer. Changes in the pattern of motility in the promoter region of genes are also other causes of ovarian cancer.

Materials and Methods: In this study, the samples were collected from patients and healthy people from the pathological laboratory of Jam in the province of Guilan, which was originally received for collecting samples from patients. The study population included 25 individuals with ovarian cancer and 25 healthy people at different ages. Blood samples were collected in EDTA containing 3 cc vials and stored at -20 ° C. The kit was used to extract (DNA) genomic blood from blood. Then, gene (Phe80Val) was used to investigate its polymorphism using Tetra ARMS-PCR method. Results: Among the samples, none of the samples showed mutation, and two samples were sent out for sequencing, and the nucleotide position was observed without any changes. Conclusion: In general, the results of this study showed that there is no relationship between mutation of MLH1 gene (rs63749990) and ovarian cancer in these samples, although it is necessary to study more samples in other regions of Iran.

Key Words: Ovarian Cancer-Promoter-Gene Expression-MLH1

FAthemeh Yousefnejad[1], Abolhasan Rezaei[2]*

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