دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و ششم، شماره ۳، صفحه ۱۶۶-۱۵۵ (مرداد و شهریور ۱۴۰۲)

Iran South Med J 2023; 26(3): 155-166

بررسی ارتباط چندشکلی ژن MLH1 (rs63749795 C>T) با استعداد ابتلا به سرطان پستان در منطقه شمال غرب ایران

سعید ملک‌زاده (MSc) [1*]، سارا غفاریان (PhD) [1**]

[1] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۹/۸- پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۰/۲۴)

چکیده

زمینه سیستم ترمیم بعد از همانند سازی (MMR) سیستمی حفاظت شده با نقش کلیدی در پایداری ژنتیکی و صحت همانندسازی است. ژن MLH1 یکی از ۴ جز اصلی کمپلکس MMR است. این مطالعه با هدف بررسی همراهی چندشکلی MLH1(rs63749795 C>T) با استعداد ابتلا به سرطان پستان در جمعیت زنان شمال غرب ایران انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مورد- شاهدی، بر روی ۱۰۰ زن مبتلا به سرطان و ۱۰۰ کنترل سالم بدون سابقه خانوادگی ابتلا به سرطان انجام شد. همراهی چندشکلی تک نوکلئوتیدی MLH1 (rs63749795 C>T) با تکنیک Tetra ARMS-PCR بررسی و نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۴ تجزیه شد. همراه چندشکلی تک نوکلئوتیدی با علائم بالینی بیماران بررسی شد.

یافته‌ها: ژنوتیپ CC در جمعیت بیمار و کنترل مشاهده نشد. فراوانی ژنوتیپ‌های TC و TT در بیماران به ترتیب ۴۰ و ۶۰ درصد و فراوانی آن‌ها در افراد سالم مورد مطالعه به ترتیب ۴۱/۸۴ و ۵۸/۱۶ درصد بود. فراوانی آلل‌های C و T در بیماران به ترتیب ۲۰ و ۸۰ درصد و در جمعیت کنترل به ترتیب ۲۰/۹۱ و ۷۹/۰۹ درصد بود. تجزیه‌های آماری نشان دهنده عدم همراهی توزیع ژنوتیپی و آللی با سرطان پستان بود. نتایج حاصل نشان دهندهٔ عدم همراهی ویژگی‌های بالینی مورد مطالعه با سرطان پستان بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش نشان داد ارتباط معنی‌داری بین توزیع ژنوتیپی و آللی چندشکلی rs63749795 C>T ژن MLH1 با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان و همچنین ویژگی‌های بالینی مورد مطالعه بیماران در شمال غرب ایران وجود ندارد.

واژگان کلیدی: چندشکلی تک نوکلوتیدی، سرطان پستان، ژن MLH1، Tetra ARMS-PCR

**تبریز، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

Email: s.ghaffarian@azruniv.ac.ir
*ORCID: 0009-0008-2002-7426
**ORCID: 0000-0003-0385-8638

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.26.3.155]

مقدمه

سرطان سینه شایع‌ترین بدخیمی و عامل اصلی مرگ ومیر ناشی از سرطان در بین زنان جهان است (۱). بر اساس پژوهش‌های انجام شده ۱۰-۵ درصد از سرطان‌های پستان وراثتی هستند (۲). ۳۰ درصد از سرطان‌های زنان جهان (۱) و حدوداً ۲۲ درصد از موارد سرطان‌های زنان در ایران را، سرطان پستان تشکیل می‌دهد. شایع‌ترین سرطان در میان زنان ایرانی است و سن ابتلا به این بیماری در ایران ۱۰ سال کمتر از سن ابتلا به آن در کشورهای غربی است (۳).

سیستم ترمیم بعد از همانند سازی (MMR) در تمامی موجودات پروکاریوت و یوکاریوت از جمله انسان سیستمی حفاظت شده است و نقشی کلیدی در پایداری ژنتیکی و صحت همانندسازی دارد (۴). این سیستم بر پایهٔ تعویض جفت بازهای ناجور و حلقه‌های حذفی و الحاقی (IDLs) عمل می‌کند و مسئول ترمیم آن دسته از خطاهای همانندسازی است که طی فرآیند غلط‌گیری DNA پلیمراز ترمیم نشده باشند (۵). کمپلکس MMR از چهار جزء mutL homolog 1(MLH1)، mutS homolog 2(MSH2)، mutS homolog 6(MSH6) و Postmeiotic segregation increased 2(PMS2) تشکیل شده است. ژن MLH1 (mutL homologe 1) از ژن‌های خانواده MMR در موقعیت ۳p۲۲/۲ بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۳، از جفت باز ۳۷۰۰۹۹۸۲ شروع و تا جفت باز ۳۷۰۶۷۳۴۰ ادامه دارد. نام رسمی این ژن هومولوگ mutl1 است و دارای ۱۹ اگزون می‌باشد. این ژن پروتئین mlh1 با ۷۵۶ آمینواسید را کد می‌کند و نقش اساسی در ترمیم DNA بازی می‌کند. تاکنون بیش از ۲۰۰ جهش در این ژن گزارش‌شده است (۶).

MLH1 برای اولین بار به‌عنوان ژن جهش‌یافته مرتبط با سرطان کولون غیرپولیپوزی وراثتی مورد مطالعه قرار گرفت (۷).

مسیر اصلی MMR با شناسایی جفت بازهای ناجور و حلقه‌های حذف و الحاقی (IDLs) در تکرارهای تک و چهار نوکلئوتیدی توسط هترودیمر تشکیل شده از پروتئین‌های MSH2 و MSH6(MutSα)، آغاز می‌گردد (۸). در مسیر دیگر MMR، هترودایمرهای متشکل از MSH2 و MSH3 (MutSβ) مسئول اتصال به جهش‌های حذفی و درجی، ترجیحاً جهش‌های دی نوکلئوتیدی و IDLهای بزرگ‌تر و اصلاح آن‌ها هستند. به محض شناسایی جفت باز ناجور در DNA، فرآیند اصلاح با مشارکت هترودایمرهای تشکیل شده از زیرواحدهای MLH1 و PMS2 (MutLα) که به عنوان یک اندونوکلئاز عمل می‌کنند آغاز می‌شود. متعاقب آن هضم DNA در رشته دارای برش جفت باز ناجور تحریک شده و هضم توسط اگزونوکلئاز EXO1 صورت می‌گیرد (۸ و ۹). همچنین سیستم MMR در ارتباط با یک عملکرد ضد نوترکیبی می‌باشد که مانع از نوترکیبی هومولوگ شده و در پیام رسانی آسیب‌های DNA نقش دارد (۱۰).

جهش در هر یک از این اجزا و یا خاموشی اپی ژنتیکی این ژن‌ها، می‌تواند منجر به عدم تولید پروتئین MLH1 و یا فرم غیرفعال این پروتئین، عملکرد نامطلوب کمپلکس MMR، تجمع خطاهای به‌جامانده از ترمیم DNA حین همانندسازی و در نهایت ناپایداری ژنتیکی و افزایش احتمال ابتلا به سرطان شود. بر اساس گزارشات موجود حدود ۳۰ درصد از جهش‌های MLH1 از نوع missense هستند. علاوه بر جهش، عوامل دیگری از جمله متیله شدن پروموتور سبب مختل شدن عملکرد این ژن می‌شود. هنگامی که پروموتور MLH1 به‌طور کامل متیله شود، پروتئین آن بیانی نخواهد داشت (۱۱). همچنین این ژن در

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.26.3.155]

پیام‌رسانی مربوط به آسیب DNA نیز نقش دارد (۱۲). چندشکلی تک نوکلئوتیدی (Single-Nucleotide Polymorphism: SNP)، چند شکلی در توالی DNA است که در اثر جهش تک نوکلئوتیدی در سطح ژنوم ایجاد می‌شود و بر اساس مطالعات انجام شده انواع چند شکلی تک نوکلئوتیدی، مثل چند شکلی‌های ناحیه تنظیمی و ناحیه کدکننده، احتمالاً منجر به جهش ژنی یا تغییر در ساختمان پروتئین می‌شود و ارتباط نزدیکی با سرطان دارد (۱۳). چندشکلی SNP به معنی تفاوت تک نوکلئوتیدی در جمعیت است، یک SNP الل که در یک منطقه جغرافیایی یا گروه نژادی مشترک است، ممکن است بین دیگر گونه‌ها وجود نداشته باشد. در طیف وسیعی از بدخیمی‌های خونی و توموری ارتباط قابل توجهی بین چندشکلی تک نوکلئوتیدی با سرطان‌های انسانی نشان داده است. شناسایی SNPهای مرتبط با مستعد بودن به سرطان باعث افزایش درک بیولوژیکی از تأثیر واریانت‌ها بر سرطان و کاربرد بالینی بیومارکرهای SNP می‌شود (۱۴). مطالعه این ژن‌ها می‌تواند به عنوان نشانگر احتمالی در تشخیص زودهنگام سرطان به کار رود. درک ویژگی‌های مولکولی سرطان اطلاعات تشخیصی و پیش آگهی را فراهم می‌کند که در غربالگری، تشخیص زود هنگام و پیش آگهی ازاستعداد ابتلا به سرطان، انتخاب روش درمان و پاسخ‌دهی به درمان اهمیت بالایی دارد.

SNPهای مختلفی از ژن MLH1 در تحقیقات مختلف شناسایی و ارتباط یا عدم ارتباط آن‌ها با سرطان پستان تعیین شده است. با توجه به اینکه جستجوی داده پایگاه‌های مختلف به زبان فارسی و انگلیسی برای بررسی پلی‌مورفیسم این SNP و حتی این ژن، بر روی جمعیت آذری و حتی ایرانی نشان دهندهٔ عدم وجود چنین مطالعه‌ای بود، در این پژوهش چندشکلی جایگاه rs63749795C>T ژن MLH1 در جمعیت زنان شمال غرب ایران بررسی و ارتباط آن با احتمال ابتلا به سرطان پستان و همچنین با ویژگی‌های پاتولوژیکی سرطان پستان در این جمعیت مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA

این پژوهش یک مطالعهٔ موردی- شاهدی مبتنی بر مقایسه دو گروه بیمار و کنترل در جمعیت زنان رده سنی ۸۱-۲۵ سال شمال‌غرب ایران، بود. نمونه‌های مورد مطالعه شامل ۸۹ فرد مبتلا به سرطان پستان از بین مراجعه کنندگان به بیمارستان نور نجات تبریز و ۹۸ فرد سالم بدون سابقهٔ فامیلی سرطان در اقوام درجه یک و دو آن‌ها به عنوان گروه کنترل بود. ابتدا از هر فرد ۴ سی‌سی خون وریدی گرفته شده و تا زمان استخراج DNA در لوله‌های خون‌گیری حاوی EDTA و در یخچال نگه‌داری شدند. همچنین مشخصات بالینی بیماران از قبیل سن، اندازه تومور، درجه تومور، درگیری غدد لنفاوی، سمت درگیری (راست یا چپ) و نوع تومور و سن گروه شاهد با کسب اجازه از آن‌ها در قالب پرسش‌نامه جمع‌آوری شد.

در این پژوهش استخراج DNA از خون وریدی به روش نمک اشباع (Salting out) و با استفاده از پروتئیناز K انجام شد (۱۵). سپس کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده به دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت DNAها با آب مقطر استریل رقیق شده و تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

تکنیک Tetra-ARMS-PCR

در این پژوهش از تکنیک Tetra-ARMS-PCR برای بررسی چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs63749795C>T ژن MLH1 استفاده شد (۱۶). تکنیک

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]
[DOI: 10.61186/ismj.26.3.155]

Tetra-ARMS PCR یک روش مبتنی بر PCR برای شناسایی چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) در ژنوم و ابزاری قوی در تفکیک الل‌های دارای جهش و فاقد جهش، بر مبنای تکثیر یا عدم تکثیر یک توالی در واکنش PCR می‌باشد (۱۷). توالی آغازگرها بر مبنای مطالعهٔ ملیک (Malik) و همکاران (۱۸)، طراحی و سنتز آن‌ها توسط شرکت Metabion (Gernany) انجام شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱) توالی آغازگرها و اندازه قطعات تکثیری طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

پرایمر	توالی	چندشکلی	طول محصول
Outer Forward	AGAACAGACTGATCTTGTTGGCCTTCTG		۳۹۲
Outer Reverse	ATGACTGCTTTCTCCATTTCCAAAACCT		
Inner Forward	GATGTGGAAATGGTGGAAGATGATTACC	C	۲۳۹
Inner Reverse	ATGACTGCTTTCTCCATTTCCAAAACCT	T	۲۰۴

واکنش Tetra-ARMS-PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر با ترکیبات پرایمرهای رفت و برگشت بیرونی هر کدام به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، پرایمرهای رفت و برگشت درونی هر کدام به مقدار ۰/۹ میکرولیتر، DNA الگو به مقدار ۱ میکرولیتر، Master mix (AMPLIQON) به مقدار ۵ میکرولیتر و آب به مقدار ۱/۲ میکرولیتر انجام شد. چرخه‌های حرارتی واکنش زنجیره‌ای شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، ۴۰ چرخه واسرشت سازی در ۹۵ °C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۸ °C به مدت ۶۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ °C به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه بود. در نهایت محصولات حاصل از واکنش PCR جهت شناسایی چندشکلی تک نوکلئوتیدی بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش یک مطالعه مورد – شاهدی بوده و تجزیه و تحلیل آماری نتایج بین افراد بیمار و سالم به صورت مقایسه‌ای انجام شد. برای این منظور ارتباط بین فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها بین دو گروه شاهد و بیمار از آزمون مربع کای پیرسون، و در مواردی که تعداد داده‌های مشاهده شده کم‌تر از پنج بود. از آزمون دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد و p<۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. شدت ارتباط بین چند شکلی‌ها و خطر ابتلا به سرطان با استفاده از نسبت شانس با فاصلهٔ اطمینان ۹۵ درصد محاسبه شد. محاسبهٔ آزمون‌های آماری اشاره شده برای ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها با استفاده از از برنامهٔ javastat online statistics package(http://statpages.org/ctab2x2.html) انجام شد. برای بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌ها و مشخصات بالینی بیماران و همین‌طور شاخص میانگین از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۴ استفاده شد. در تمامی آزمون‌ها، p<۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. همچنین تغییرات ساختار فضایی ناشی از چندشکلی rs1972820 ژن ERBB4 توسط نرم‌افزار آنلاین RNAsnp مورد بررسی قرار گرفت.

ملاحظات اخلاقی

تمامی اطلاعات لازم از پرونده‌های بالینی بیماران استخراج و فرم رضایت انجام طرح تحقیقاتی توسط بیماران تکمیل گردیده بود. هیچ نوع مداخله اضافی از طرف محققین بر

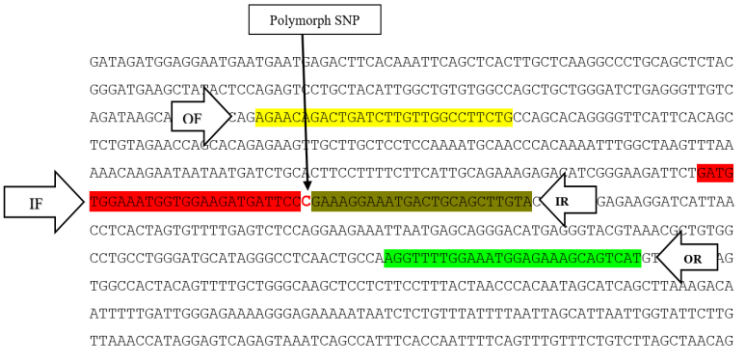
[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.26.3.155]

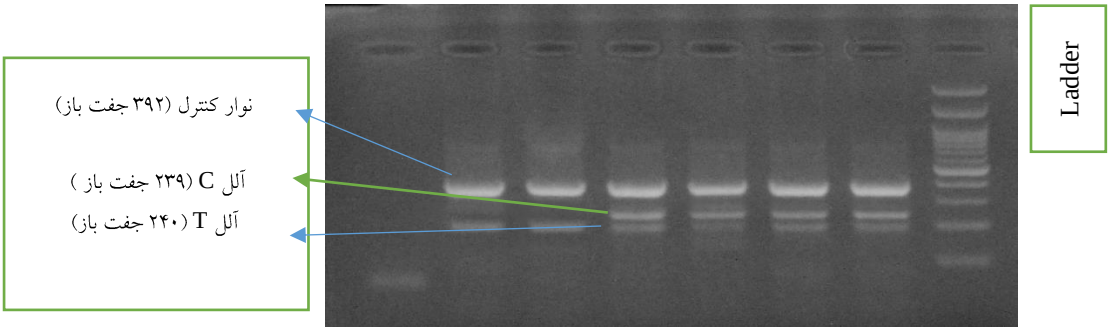
روی بیماران صورت نگرفت. تمامی اطلاعات بیماران کاملاً محرمانه بوده و در جایی نام و نشانی از آن‌ها ذکر نخواهد شد. این پژوهش با کد اخلاق به شماره IR.AZARUNIV.REC .۱۴۰۲ .۰۰۳ در کمیته اخلاق دانشگاه شهید مدنی آذربایجان تصویب و در سامانه ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی ثبت شده است.

یافته‌ها

در این مطالعه نمونه خون محیطی ۱۰۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۹۸ فرد سالم بدون سابقه ابتلا به سرطان در اقوام درجه یک و دو آن‌ها، جمع‌آوری و تکثیر الل‌های C و T در جایگاه rs63749795 به روش Tetra-ARMS PCR انجام شد (شکل ۱). هیچ کدام از افراد مورد مطالعه سیگار و الکل مصرف نمی‌کردند. اندازه محصولات PCR بر روی ژل آگارز شامل نوار کنترل به طول ۳۹۲ جفت باز، نوار مربوط به آلل C به طول ۲۳۹ جفت باز و نوار مربوط به آلل T به طول ۲۰۴ جفت باز بود. الگوی نواربندی این آلل‌ها بر روی ژل آگاروز در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱) محل اتصال آغازگرها و جایگاه چندشکل مورد مطالعه بر روی توالی ژن
Fig 1) Primers annealing location on target DNA sequence



شکل۲) نتایج حاصل از واکنش Tetra ARMS-PCR بر روی ژل آگاروز
Fig 2) Tetra-ARMS PCR products on agarose gel

توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها بین دو گروه بیمار و سالم

از ۱۰۰ بیمار مورد مطالعه ۴۰ نفر دارای ژنوتیپ CT (۴۰ درصد) و ۶۰ نفر دارای ژنوتیپ TT (۶۰ درصد) بودند. از ۹۸ فرد مورد مطالعه در گروه شاهد ۴۱ نفر دارای ژنوتیپ CT (۴۱/۸۴ درصد) و ۵۷ نفر دارای ژنوتیپ TT (۵۸/۱۶ درصد) بودند. در هیچ یک از افراد بیمار و کنترل مورد مطالعه ژنوتیپ CC مشاهده نشد. اختلاف فراوانی دو ژنوتیپ TT (p-value=۰/۷۹۳، ۹۵ درصد=CI و

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]
[DOI: 10.61186/ismj.26.3.155]

(OR=۰/۹۲۷) و CT (p-value=۰/۷۹۳، ۹۵ درصد=CI و OR=۱/۰۷۹) بین دو گروه بیمار و کنترل معنی‌دار نبود.

توزیع فراوانی آلل‌ها بین دو گروه بیمار و سالم

بر اساس نتایج حاصل از مطالعهٔ آلل‌های C و T، تعداد آلل C در گروه بیمار ۴۰ (با فراوانی ۲۰ درصد) و در گروه کنترل ۴۱ (با فراوانی ۲۰/۹۱ درصد) بود که اختلاف آن بین دو گروه بیمار و کنترل معنی‌دار نبود (p-value=۰/۸۲۱، ۹۵ درصد=CI و OR=۰/۹۴۵). همچنین تعداد آلل T در گروه بیمار ۱۶۰ (با فراوانی ۸۰ درصد) و در گروه کنترل ۱۵۵ (با فراوانی ۷۹/۰۹ درصد) بود که بر این اساس اختلاف فراوانی آللی بین این دو گروه معنی‌دار نبود (p-value=۰/۸۲۱، ۹۵ درصد=CI و OR=۱/۰۵۸). ارتباط معنی‌داری بین توزیع فراوانی آللی در گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۲) توزیع فراوانی ژنوتیپی و آللی در افراد بیمار و کنترل

ژنوتیپ/ آلل	بیمار	درصد فراوانی	کنترل	درصد فراوانی	p-value	OR(CI=۹۵٪)
CT	۴۰	۴۰	۴۱	۴۱/۸۴	۰/۷۹۳	۰/۹۲۷ (۰/۱-۵۲۶/۶۳۳)
TT	۶۰	۶۰	۵۷	۵۸/۱۶	۰/۷۹۳	۱/۰۷۹ (۱/۰-۹۰۲/۶۱۲)
C	۴۰	۲۰	۴۱	۲۰/۹۱	۰/۸۲۱	۰/۹۴۵ (۱/۰-۵۴۰/۵۸۰)
T	۱۶۰	۸۰	۱۵۵	۷۹/۰۹	۰/۸۲۱	۱/۰۵۸ (۱/۰-۷۲۴/۶۴۹)

توزیع فراوانی ژنوتیپ ها و علائم بالینی

بر اساس تجزیه‌های انجام شده بر روی ارتباط چندشکلی rs63749795 ژن MLH1 با علائم بالینی بیماران، ارتباط معنی‌داری بین توزیع فراوانی ژنوتیپی این SNP و علائم بالینی مورد مطالعه شامل نوع تومور (p-value=۰/۳۹۵)، درجه تومور (p-value=۰/۶۸۶)، سن (p-value=۰/۱۲۵)، سمت درگیر (p-value=۰/۳۷۱)، اندازه تومور (p-value=۰/۰۶۵) و درگیری غدد لنفی (p-value=۰/۷۴۶) مشاهده نشد (جدول ۳).

جدول ۳) توزیع ژنوتیپی بیماران مورد مطالعه در جایگاه rs63749795C>T ژن *MLH1* در ارتباط با مشخصات بالینی بیماران

ویژگی	انواع	تعداد (درصد)	ژنوتیپ TT	ژنوتیپ CT	p-value
سن	۴۵≥	۳۹	۱۹	۲۰	۰/۱۲۵
	۴۵<	۴۶	۳۰	۱۶	
	نامعلوم	۱۵			
سمت درگیر	راست	۴۵	۲۸	۱۷	۰/۳۷۱
	چپ	۳۶	۲۰	۱۶	
	هر دو سمت	۴	۱	۳	
	نامعلوم	۱۵			
نوع تومور	Comodo	۱	۰	۱	۰/۳۹۵
	Fibroadenoma	۹	۴	۵	
	Fibrocystic	۶	۲	۴	
	IDC	۵۴	۳۲	۲۲	
	ILC	۵	۴	۱	
	Phyllodes	۱	۱	۰	
	نامعلوم	۲۲			
درجه تومور	I	۴۳	۱۹	۱۴	۰/۶۸۶
	II	۲۴	۱۴	۱۰	
	III	۲	۲	۰	
	نامعلوم	۳۱			
اندازه تومور	T_1*	۳۵	۲۴	۱۱	۰/۰۶۵
	T_2	۴۱	۱۹	۲۲	
	نامعلوم	۲۴			
درگیری لنف	N_0*	۴۰	۲۷	۱۳	۰/۷۴۶
	N_1	۱۷	۹	۸	
	N_2	۱۱	۷	۴	
	N_3	۱	۱	۰	
	نامعلوم	۳۱			

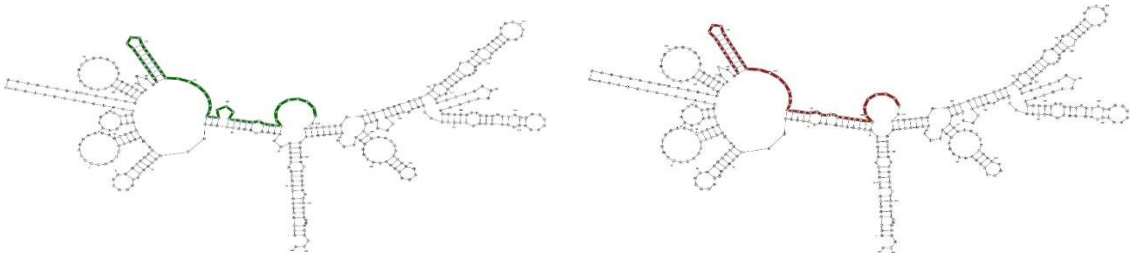
* T1≤ 2.5cm, T2> 2.5cm, ** N0: 0, N1: 1-3cm, N2: 4-9cm, N3≥ 10cm

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.26.3.155]

تغییرات ساختار فضایی

تغییرات ساختار فضایی ناشی از چندشکلی rs63749795C>T ژن MLH1 توسط نرم‌افزار آنالیز RNAsnp در شکل ۳ نشان داده شده است. بر این اساس تغییر ساختار فضایی ناشی از چندشکلی rs63749795C>T ژن MLH1 منجر به کاهش ΔG آلل جهش یافته (ΔG = ۷۵/۱- کیلوکالری بر مول) نسبت به آلل طبیعی (ΔG = ۷۶/۹- کیلوکالری بر مول) با p=۰/۶۵۷۵ شد که غیر معنی‌دار بود (p-value>۰/۲).



(الف) (ب)

شکل ۳) تغییرات ساختار فضایی ناشی از چندشکلی rs63749795C>T ژن *MLH1* (الف) آلل طبیعی، ب) آلل جهش یافته.

Fig 3) RNA secondary structure changes caused by *MLH1* gene (SNP: rs63749795C>T) polymorphism (A. Wild allele, B. Mutant allele)

بحث

در تمامی موجودات زنده از جمله انسان، سیستم ترمیم بعد از همانند سازی (MMR) سیستمی حفاظت شده با نقش کلیدی در پایداری ژنتیکی و صحت همانندسازی است (۴). کمپلکس MMR از چهار جزء اصلی تشکیل شده است و MLH1 (mutL homolog 1) یکی از این ۴ جز است. وقوع جهشی در موقعیت ۱۴۶ ژن MLH1، که باعث جایگزینی سیتوزین با یوراسیل در این موقعیت می‌شود، منجر به تبدیل کدون CAA به کدون UAA و در نهایت ایجاد یک کدون پایان نابجا می‌شود. در نتیجه پروتئین از این موقعیت کوتاه شده و ساختار جهش یافته تنها یک دومین ATPase خواهد داشت. پروتئین‌های در حال تعامل با پروتئین MLH1 یعنی، PMS1/MLH3/PMS2، برای فعالیت به پایانه C نیاز دارند و در نتیجهٔ این جهش، این پروتئین‌ها قابلیت برهمکنش با پایانه C را از دست می‌دهند. این امر باعث کاهش فعالیت مؤثر مسیر تعمیر عدم تطابق (MMR) می‌شود. این جهش موجب کاهش یا حذف کامل پروتئین MLH1 و در نتیجه از بین رفتن فعالیت پروتئین MMR می‌شود. پروتئین MMR از فاکتورهای حیاتی در جلوگیری از سرطان پستان است (۱۹).

ارتباط چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی با ریسک ابتلا به سرطان‌های مختلف به دفعات مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۰). ملیک و همکاران با مطالعه روی ۳۸۷ زن کنترل سالم و ۴۹۳ زن مبتلا به سرطان پستان از کشور پاکستان، وجود ارتباط معنی‌دار بین ژنوتیپ T/C جایگاه rs63749795، ژن MLH1 و افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان گزارش کردند. در این پژوهش فراوانی افراد واجد ژنوتیپ CC ۷۳/۷۷ درصد و مجموع

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.26.3.155]

فراوانی افراد دارای الل جهش یافته شامل ژنوتیپ‌های CT و TT ۲۶/۲۲ درصد بود. در این مطالعه همچنین رابطه بین جایگاه چندشکل تک نوکلئوتیدی rs63749820C/T ژن MLH1 با خطر ابتلا به سرطان پستان معنی‌دار گزارش شد (۱۸).

بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر ژنوتیپ هموزیگوت CC در جمعیت زنان شمال غرب ایران مشاهده نشد. همچنین فراوانی افراد واجد الل جهش یافته شامل ژنوتیپ‌های TT و CT بسیار نزدیک و اختلاف فراوانی آن‌ها غیرمعنی‌دار بود. بر این اساس، ارتباط معنی‌داری بین توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها در جایگاه چند شکل rs63749795 ژن MLH1 و احتمال ابتلا به سرطان پستان در زنان شمال غرب ایران مشاهده نشد. همچنین بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش ارتباط معنی‌داری بین چند شکلی جایگاه تک نوکلئوتیدی rs63749795 ژن MLH1 و هیچ یک از علائم بالینی مورد مطالعه شامل نوع تومور، درجه تومور، سن ابتلا، سمت درگیر، اندازه تومور و درگیری غدد لنفی مشاهده نشد.

مک‌کالو (McCullough) و همکاران، چندشکلی پنج SNP از سه ژن مسیر ترمیم عدم تطابق شامل MSH3 (rs1650663)، MLH1 (rs2286940)، MSH2 (rs2303428، rs3732182، rs4583514) و یک SNP عملکردی MLH1(rs1799977) را بر روی ۱۰۵۳ زن مبتلا به سرطان پستان و ۱۱۰۲ زن کنترل از نیویورک مطالعه کردند. در این پژوهش نیز هیچ ارتباطی بین SNPهای مورد مطالعه و خطر ابتلا به سرطان پستان مشاهده نشد. در این مطالعه هیچ مدرکی مبنی بر اثر اصلی هیچ یک از SNPها روی خطر ابتلا به سرطان پستان یافت نشد. همچنین نتایج این مطالعه، با وضعیت یائستگی ارتباطی نشان نداد (۲۱). نتایج این پژوهش هم راستا با پژوهش حاضر بود.

مطالعه ملیک و همکاران بر روی این SNP در جمعیت کشور پاکستان ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی جایگاه تک نوکلئوتیدی rs63749795 ژن MLH1 با سابقه خانوادگی و شروع زودرس یائسگی نشان داد. کلیک و همکاران نیز عدم وجود رابطه معنی‌دار بین سن و چندشکلی جایگاه تک نوکلئوتیدی rs63749795 ژن MLH1 را گزارش نمودند (۱۸). عدم همراهی نتایج این دو پژوهش می‌تواند در ارتباط با تفاوت اندازه و زمینه ژنتیکی دو جمعیت باشد که می‌تواند حاصل عواملی مثل اختلاف در منطقه جغرافیایی و نوع تغذیه باشد (۲۰). مطالعه‌ای بر روی ۸۰ نفر بیمار مبتلا به سرطان پستان از پاکستان به عنوان بیمار و بافت سالم مجاور تومور آن‌ها به عنوان شاهد، نشان دهندهٔ عدم همراهی سه SNPی rs1799977، rs2286940، و rs1800734 ژن MLH1 با ریسک ابتلا به سرطان پستان بود (۲۲).

در پژوهشی دیگر ملیک و همکاران، با مطالعه همراهی بیان ژن MLH1 با استفاده روش‌های ایمنوهیستوشیمیایی ارتباط معنی‌داری بین کاهش بیان این ژن با سرطان پستان گزار ش کردند. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه کمبود MLH1 می‌تواند به پیشرفت سرطان پستان منجر شود که با شیمی درمانی در ارتباط است. بین ترمیم MMR با سن، درجه تومور، تشکیل گره لنفی و یائسگی ارتباط معنی‌دار گزارش شد (۷).

بر اساس مطالعات انجام شده به دلیل هایپرمتیلاسیون MLH1 و خاموشی آن، در سرطان‌های CRC (۱۵ درصد) و EC (۳۰ درصد) عدم پایداری میکروستلایت‌ها مشاهده می‌شود. چندشکلی rs1800734 پروموتر ژن MLH1 با ریسک CRC همراهی داشته، متیلاسیون آن را افزایش داد. در

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]
[DOI: 10.61186/ismj.26.3.155]

نمونه‌های EC هیچ مدرکی مبنی بر ارتباط SNPهای MLH1 با ریسک EC مشاهده نشد و این SNP متیلاسیون و بیان این ژن را تغییر نداد (۲۳).

در یک مطالعه متاآنالیز بر روی ارتباط دو چندشکلی عملکردی ژن MLH1 شامل 93G>A- و I219V با انواع سرطان‌ها، در مجموع داده‌های ۳۳ مقاله مورد- شاهدی منتشر شده جمع‌آوری و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بر این اساس در تمام مدل‌های ژنتیکی الل A از چندشکلی 93G>A- با افزایش ریسک ابتلا به سرطان خصوصاً در جمعیت‌های غیرآسیایی همراهی معنی‌داری نشان داد. در مورد چندشکلی I219V در هیچ مدل ژنتیکی اثر مهمی بر روی سرطان مشاهده نشد. در این پژوهش SNPی 93G>A- به عنوان یک بیومارکر برای سرطان معرفی شد (۲۴). وانگ (Wang) و همکاران، در مطالعه‌ای دیگر همراهی چندشکلی‌های ژن MLH1 را با خطر CRC، رایج‌ترین سرطان کولورکتال مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه که بر روی داده‌های حاصل از ۸ مقاله انجام شد. خطر تجمعی سرطان CRC بر اساس سن و جنس در حاملان جهش هتروزیگوت تخمین و نشان داده شد ریسک ابتلا به این سرطان در ۷۰ سالگی برای حاملان الل جهش یافته مرد و زن به ترتیب ۴۳/۹ و ۳۷/۳ درصد بود (۲۵).

با توجه به اینکه این اولین گزارش از ارتباط چندشکلی rs63749820 ژن MLH1 با احتمال ابتلا به سرطان پستان در شمال غرب ایران است و پژوهش‌های دیگر در آسیا نیز عدم همراهی این ژن را با سرطان پستان گزارش نموده‌اند، این نتایج می‌تواند نشان‌دهنده عدم همراهی چندشکلی مورد مطالعه با سرطان پستان در زنان این منطقه باشد.

نرم‌افزار RNAsnp تغییرات ساختاری RNA القا شده توسط یک SNP را بطور مؤثر شناسایی و بر نواحی حاوی حداکثر تغییرات ساختاری بین نوع طبیعی و جهش یافته RNA تمرکز دارد (۲۶). این نرم‌افزار آنلاین ضمن تعیین معنی‌داری، تغییر ساختار دوم RNA در نتیجهٔ چندشکلی را به صورت شماتیک نشان می‌دهد. بر اساس این نتایج نیز چندشکلی مورد مطالعه تأثیر معنی‌داری بر ساختار RNA نداشت.

نتیجه‌گیری

ژنوتیپ هموزیگوت CC در هیچ کدام از دو گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد. هیچ کدام از دو ژنوتیپ دیگر TT و CT جایگاه چند شکل rs63749820 ژن MLH1 ارتباط معنی‌داری با سرطان پستان در جمعیت مورد بررسی نداشتند. همچنین توزیع آلل‌ها هم همراهی معنی‌داری با سرطان پستان نشان نداد. توزیع ژنوتیپی rs63749820 ژن MLH1 با علائم بالینی افراد بیمار از قبیل سن، اندازه تومور، درجه تومور، درگیری غدد لنفاوی، سمت درگیری (راست یا چپ) و نوع تومور همراهی مؤثری نداشتند. با توجه به اینکه این اولین گزارش از ارتباط چندشکلی rs63749820 ژن MLH1 با احتمال ابتلا به سرطان پستان در شمال غرب ایران است می‌تواند نشان دهنده عدم همراهی این چندشکلی با سرطان پستان در زنان این منطقه باشد. هرچند به منظور اطمینان بیشتر بررسی ارتباط این چندشکلی با احتمال ابتلا به سرطان پستان در جامعه آماری بزرگ‌تری از افراد بیمار و سالم و مطالعه بیان افتراقی آن در افراد بیمار و کنترل، قابل توصیه است.

سپاس و قدردانی

پژوهش فوق حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی با گرایش سلولی- مولکولی مصوب شورای تحصیلات تکمیلی دانشگاه شهید مدنی

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.26.3.155]

آذربایجان است. این مطالعه در آزمایشگاه زیست شناسی سلولی – مولکولی گروه زیست دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و با بودجه اختصاص یافته معاونت پژوهش به پایان‌نامه دانشجو انجام یافته است.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Wang J, Zhang S, Zhang Z, et al. A single-nucleotide polymorphism involved in alternative splicing of PTEN is associated with chemotherapy resistance in breast cancer in Chinese population. Res square 2021; 1-22.
doi:10.21203/rs.3.rs-360619/v1.

2.Lee A, Mavaddat N, Wilcox AN, et al. BOADICEA: a comprehensive breast cancer risk prediction model incorporating genetic and nongenetic risk factors. Genet Med 2019; 21(8): 1708-1718.
doi: 10.1038/s41436-018-0406-9.

3.Afrasiabifar A, Hamzhiekia SH, Hosseini NA. The effect of self-care program using orem's self- care model on the life quality of women with breast cancer undergoing chemotherapy: a randomized controlled trial. J Armgh Dane 2018; 23(1): 1-13. (Persian)
URL: http://armaghanj.yums.ac.ir/article-1-2090-en.html.

4.Couch FJ, Rasmussen LJ, Hofstra R, et al. Assessment of functional effects of unclassified genetic variants. Hum Mutat 2008; 29(11): 1314-1326.
doi: 10.1002/humu.20899.

5.Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. Cell Res 2008; 18(1): 85-98.
doi: 10.1038/cr.2007.115.

6.Tarancón-Diez M, Büttner R, Friedrichs N. Enhanced Tumoral *MLH1*-Expression in *MLH1*-/*PMS2*-Deficient Colon Cancer Is Indicative of Sporadic Colon Cancer and Not HNPCC. Pathol Oncol Res 2020; 26(3): 1435-1439.
doi:10.1007/s12253-018-00571-3.

7.Malik SS, Masood N, Asif M, et al. Expressional analysis of MLH1 and MSH2 in breast cancer. Curr prob cancer 2019; 43(2): 97-105.
doi: 10.1016/j.currproblcancer.2018.08.001.

8.Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. Mech Ageing Dev 2008; 129(7-8): 391-407.
doi: 10.1016/j.mad.2008.02.012.

9.Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. Nat Rev Mol Cell Biol 2006; 7(5): 335-346.
doi: 10.1038/nrm1907.

10.Smith TR, Levine EA, Freimanis RI, et al. Polygenic model of DNA repair genetic polymorphisms in human breast cancer risk. Carcinogenesis 2008; 29(11): 2132-2138.
doi: 10.1093/carcin/bgn193.

11.Busbait S, Al-Babtain A, Tawfeeq Y, et al. Turcot's syndrome presenting as an acute abdomen. J Pediatr Surg Case Rep 2019; 40: 17-9.
https://doi.org/10.1016/j.epsc.2018.10.003.

12.Claeys Bouuaert C, Keeney S. Distinct DNA-binding surfaces in the ATPase and linker domains of MutLγ determine its substrate specificities and exert separable functions in meiotic recombination and mismatch repair. PLoS genet 2017; 13(5): e1006722.
doi: 10.1371/journal.pgen.1006722.

13.Yuan P, Liu D, Deng M, et al. Identification of differently expressed genes with specific SNP loci for breast cancer by the integration of SNP and gene expression profiling analyses. Pathol Oncol Res 2015; 21(2): 469-75.
doi: 10.1007/s12253-014-9851-1.

14.Stracquadanio G, Wang X, Wallace MD, et al. The importance of p53 pathway genetics in inherited and somatic cancer genomes. Nat rev Cancer 2016; 16(4): 251-265.
doi: 10.1038/nrc.2016.15.

15.Suguna S, Nandal DH, Kamble S, et al. Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non enzymatic salting out method. Int J Pharm Sci 2014; 6(6): 198-199.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.26.3.155]

https://www.researchgate.net/publication/289617992_Genomic_DNA_isolation_from_human_whole_blood_samples_by_non_enzymatic_salting_out_method.
16.Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Res 1989; 17(7): 2503-2516.
doi: 10.1093/nar/17.7.2503.
17.Little S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. Curr Protoc Hum Genet 1995; 9: 1-12.
https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0908s07.
18.Malik SS, Zia A, Mubarik S, et al. Correlation of MLH1 polymorphisms, survival statistics, in silico assessment and gene downregulation with clinical outcomes among breast cancer cases. Mol Biol Rep 2020; 47(1): 683-692.
doi: 10.1007/s11033-019-05175-x.
19.Sun L, Cheng B, Zhou Y, et al. ErbB4 Mutation that Decreased NRG1-ErbB4 Signaling Involved in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis/Frontotemporal Dementia. J Alzheimer's Dis 2020; 74(2): 535-544.
doi: 10.3233/JAD-191230.
20.Ebadi Z, Ghaffarian S. Association of WDR79 (rs2287497C>T) Poly-morphism with Breast Cancer Susceptibility in Northwest of Iran. Iran South Med J 2023; 26(1): 1-13. (Persian)
URL: http://ismj.bpums.ac.ir/article-1-1771-en.html.
21.McCullough LE, Santella RM, Cleveland RJ, et al. Polymorphisms in DNA repair genes, recreational physical activity and breast cancer risk. Int J Cancer 2014; 134(3): 654-663.
doi: 10.1002/ijc.28383.
22.Kappil M, Terry MB, Delgado-Cruzata L, et al. Mismatch Repair Polymorphisms as Markers of Breast Cancer Prevalence in the Breast Cancer Family Registry. Anticancer Res 2017; 36(9): 4437-4441.
doi: 10.21873/anticanres.10987.
23.Russell H, Kedzierska K, Buchanan DD, et al. The MLH1 polymorphism rs1800734 and risk of endometrial cancer with microsatellite instability. Clin Epigenetics 2020: 12(1): 102.
doi: 10.1186/s13148-020-00889-3.
24.Xu JL, Yin ZQ, Huang MD, et al. MLH1 Polymorphisms and Cancer risk: a Meta-analysis Based on 33 Case-control Studies. Asian Pac J Cancer Prev 2012; 13(3): 901-907.
doi: 10.7314/apjcp.2012.13.3.901.
25.Wang C, Wang Y, Hughes KS, et al. Penetrance of Colorectal Cancer Among Mismatch Repair Gene Mutation Carriers: A Meta-Analysis. JNCI Cancer Spectr 2020; 4(5): pkaa027.
doi: 10.1093/jncics/pkaa027.
26.Sabarinathan R, Tafer H, Seemann SE, et al. RNAsnp: efficient detection of local RNA secondary structure changes induced by SNPs. Hum Mutat 2013; 34(4): 546-56.
doi: 10.1002/humu.22273.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.26.3.155]

Iran South Med J 2023; 26(3): 155-166

Original Article

The Association of *MLH1* Gene (rs63749795 C>T) Polymorphism with Breast Cancer Susceptibility in the Northwest of Iran

***S. Malekzadeh** (MSC)[1*], **S. Ghaffarian** (PhD)[1**]*

[1] *Department of Cellular and Molecular Biology, Scholl of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran*

(Received 29 Nov, 2023 Accepted 14 Jan, 2024)

Abstract

Background: The MisMatch Repair (MMR) system is a conserved system with a key role in genetic stability and replication integrity. The MLH1 gene is one of the four main components of the MMR complex. This study was conducted to assess the association of MLH1 (rs63749795 C>T) gene polymorphism with the risk of breast cancer among women in the northwest of Iran.

Materials and Methods: A case-control study was conducted on 100 women with breast cancer and 100 healthy controls with no family history of cancer. The association of single-nucleotide polymorphism of MLH1 (rs63749795 C>T) was examined by Tetra-ARMS-PCR assay and the resultant data were analyzed in SPSS software, version 24. Single-nucleotide polymorphism association with clinical symptoms was examined in the patients.

Results: CC genotype was not observed in the patient and control groups. The frequency of TC and TT genotypes was 40% and 60% in the case group, and 41.84% and 58.16% in the control group. The frequency of C and T alleles was 20% and 80% in the case group, and 20.91% and 79.09% in the control group. The statistical analysis of the data showed no association between genotypic and allelic distribution and breast cancer in northwestern Iran. The results also showed no significant association between clinical characteristics and breast cancer.

Conclusion: The findings of this research showed that there is no significant relationship between the genotypic and allelic distribution of the rs63749795 C>T polymorphism of MLH1 gene and the increased risk of breast cancer or clinical characteristics of the studied patients in northwest Iran.

Keywords: Single-Nucleotide Polymorphism, Breast Cancer, MLH1 Gene, Tetra ARMS-PCR

©Iran South Med J. All rights reserved

Cite this article as: Malekzadeh S, Ghaffarian S. The Association of MLH1 Gene (rs63749795 C>T) Polymorphism with Breast Cancer Susceptibility in the Northwest of Iran. Iran South Med J 2023; 26(3): 155-166

[**]*Address for correspondence*: Department of Cellular and Molecular Biology, Scholl of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.
Email: s.ghaffarian@azruniv.ac.ir
*ORCID: 0009-0008-2002-7426
**ORCID: 0000-0003-0385-8638

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-01-02]

[DOI: 10.61186/ismj.26.3.155]