

## Association Between MLH1 Gene rs63749820 Polymorphism and the Risk of Breast Cancer in Northwest of Iran

Fatemeh Azimi<sup>1</sup>, Sara Ghaffarian<sup>2</sup>, Mehdi Haghi<sup>3</sup>

1.MSc student, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. ORCID ID:0000-0001-8037-8491.

2.Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. (Corresponding Author), Tel:041-31452070, Email s.ghaffarian@azruniv.ac.ir, ORCID ID: 0000-0003-0385-8638.

3.Assistant Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran. ORCID ID: 0000-0001-8400-4209.

### ABSTRACT

**Background and Aim:** According to the available statistics in 2020, breast cancer was the most common cancer in women. The protein encoded by the MLH1 gene is part of the mismatch repair (MMR) system. In this study, the association of rs63749820 C>T polymorphism of MLH1 gene with susceptibility to breast cancer in northwest Iran was investigated.

**Materials and methods:** This case-control study was conducted on 100 women with breast cancer and 100 healthy women with no history of cancer in 1st and 2nd degree relatives. Single nucleotide polymorphism was investigated by Tetra-ARMS PCR technique. The analysis of the resulting data was done using the online statistical program java stat and SPSS version 26 software.

**Results:** The genotypic distribution of sick and healthy people was 23.91% and 28.57% respectively for CC genotype, 11.95% and 5.10% for TT genotype and 64.13% and 66.32% respectively for CT genotype. The frequency of C allele was 55.98% and 61.73% and the frequency of T allele was 44.04% and 38.27% in patients and control subjects, respectively.

**Conclusion:** The findings of this research showed that there is no significant relationship between the genotypic and allelic distribution of MLH1 gene rs63749820 polymorphism with increased risk of breast cancer risk. Also, the relationship between the clinical characteristics of people with breast cancer including age, tumor grade, lymph involvement, involved side, tumor size, tumor type with the genotypic distribution of this SNP was not significant.

**Keywords:** breast cancer, single nucleotide polymorphism, association study, MLH1 gene

**Received:** Feb 11, 2023

**Accepted:** Feb 6, 2024

**How to cite the article:** Fatemeh Azimi, Sara Ghaffarian, Mehdi Haghi. Association Between MLH1 Gene rs63749820 Polymorphism and the Risk of Breast Cancer in Northwest of Iran. SJKU 2024;29(4):14-24.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

## همراهی چندشکلی rs63749820 ژن MLH1 با استعداد ابتلا به سرطان پستان در شمال غرب ایران

فاطمه عظیمی<sup>۱</sup>، سارا غفاریان<sup>۲</sup>، مهدی حقی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران کد ارکید: ۸۴۹۱-۸۰۳۷-۰۰۰۱-۰۰۰۰
۲. استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. (نویسنده مسئول)، تلفن: ۰۴۱-۳۱۴۵۲۰۷۰، Email:s.gaffarian@azaruniv.ac.ir، کد ارکید: ۸۶۳۸-۰۳۸۵-۰۰۰۳-۰۰۰۰
۳. استادیار گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. کد ارکید: ۴۲۰۹-۸۴۰۰-۰۰۰۱-۰۰۰۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** بر اساس آمارهای موجود در سال ۲۰۲۰ سرطان پستان شایع ترین سرطان زنان بوده است. پروتئین کدگذاری شده توسط ژن MLH1 بخشی از سیستم تعمیر جفت باز ناجور (MMR) mismatch repair است. در این پژوهش همراهی چندشکلی rs63749820 C>T ژن MLH1 با استعداد ابتلا به سرطان پستان در شمال غرب ایران مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش ها:** این مطالعه به صورت مورد-شاهدی، بر روی ۱۰۰ زن مبتلا به سرطان پستان و ۱۰۰ زن سالم بدون سابقه ابتلا به سرطان در اقوام درجه ۱ و ۲ انجام شد. چندشکلی تک نوکلئوتیدی با تکنیک Tetra-ARMS PCR مورد بررسی قرار گرفت. تحلیل داده های حاصل با استفاده از برنامه های آماری آنلاین java stat و نرم افزار SPSS نسخه ی ۲۶ انجام شد.

**یافته ها:** توزیع ژنوتیپی افراد بیمار و سالم برای ژنوتیپ CC به ترتیب ۲۳/۹۱٪ و ۲۸/۵۷٪ برای ژنوتیپ TT به ترتیب ۱۱/۹۵٪ و ۵/۱۰٪ و برای ژنوتیپ CT به ترتیب ۶۴/۱۳٪ و ۶۶/۳۲٪ بود. به ترتیب در افراد بیمار و کنترل فراوانی آلل C، ۵۵/۹۸٪ و ۶۱/۷۳٪ و فراوانی آلل T، ۴۴/۰۴٪ و ۳۸/۲۷٪ بود.

**نتیجه گیری:** یافته های این پژوهش نشان داد ارتباط معنی داری بین توزیع ژنوتیپی و آللی چندشکلی rs63749820 ژن MLH1 با افزایش خطر ابتلا به سرطان وجود ندارد. ارتباط بین ویژگی های بالینی افراد مبتلا به سرطان پستان شامل سن، درجه تومور، درگیری لنف، سمت درگیر، اندازه تومور، نوع تومور با توزیع ژنوتیپی این SNP معنادار نبود.

**کلمات کلیدی:** سرطان پستان، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، مطالعه همراهی، ژن MLH1

وصول مقاله: ۱۴۰۱/۱۱/۲۲ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۲/۱۱/۸ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۷

## مقدمه

سرطان پستان یا سرطان سینه حاصل تکثیر غیر طبیعی سلول-ها در بافت پستان است (۱) و احتمال ابتلا به آن در زنان صد برابر بیشتر از مردان است (۲). بر اساس برآورد (GLOBOCAN (Global Cancer Observatory) در سال ۲۰۲۰ در سطح جهان، ۲/۲۶ میلیون زن به سرطان پستان مبتلا شده‌اند که ۲۴/۵ درصد از کل موارد ابتلای زنان به سرطان در این سال را شامل می‌شود. سرطان پستان شایع-ترین سرطان زنان در این سال بوده است (۳). در ایران حدوداً ۲۲ درصد از موارد سرطان‌های زنان را، سرطان پستان تشکیل می‌دهد. سرطان پستان 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 (۴). با پیشرفت مداوم تکنولوژی تشخیص SNP، مطالعه روی رابطه بین چندشکلی ژن و استعداد ژنتیکی با احتمال ابتلا به سرطان، مورد توجه قرار گرفته است. چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP)، چند شکلی در توالی DNA است که توسط جهش تک نوکلئوتیدی در سطح ژنوم ایجاد می‌شود. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که انواع چند شکلی تک نوکلئوتیدی، مانند چندشکلی‌های ناحیه تنظیمی و ناحیه کد کننده، احتمالاً منجر به جهش ژنی یا تغییر در ساختمان پروتئین می‌شود، که می‌تواند ارتباط نزدیکی با سرطان داشته باشد (۵). بر اساس این نتایج مطالعات SNP‌های ژن‌های ترمیم کننده DNA می‌توانند بر سطح بیان و فعالیت آنزیم‌ها و در نتیجه بازده ترمیم آسیب‌های DNA تاثیر بگذارند. نقص در ترمیم ژن ممکن است منجر به بی‌ثباتی ژنتیکی و بروز سرطان شود. که نشان دهنده‌ی اهمیت تفاوت‌های فردی در چندشکلی ژن‌های ترمیم کننده خاص در خطر ابتلا به سرطان است (۶).

ژن MLH1 روی بازوی کوتاه کروموزوم ۳ در موقعیت ۲.۲۲ قرار گرفته و دارای ۲۱ اگزون است. پروتئین

کدگذاری شده توسط این ژن می‌تواند با اندونوکلئاز دخیل در تعمیر جفت باز ناجور به نام PMS2 به منظور ایجاد MutLα که بخشی از سیستم تعمیر جفت باز ناجور mismatch repair (MMR) است، همکاری کند (۷). پروتئین MLH1 یک پروتئین ۸۴ کیلو دالتونی است که از ۷۵۶ اسید آمینه تشکیل شده‌است. یک جهش در موقعیت ۱۴۶ وجود دارد که در انتهای N پروتئین است و یک کدون توقف تولید می‌کند (۸). نقص در پروتئین‌های سیستم MMR می‌تواند در پی جهش‌های ژرم لاین در ژن‌های MLH1 (mutL homolog1)، MSH6، MSH2 و PMS2 حاصل شود که حدود ۹۰ درصد از این جهش‌ها در دو ژن MLH1 و MSH2 روی می‌دهد (۹).

بر اساس گزارشات موجود پلی‌مورفیسم‌های MLH1 با سرطان روده بزرگ، ریه، سینه، پروستات، سلول سنگفرشی سر و گردن و کارسینوم سنگفرشی دهان ارتباط نشان داده است (۶). سندرم لینچ همراه با جهش‌های ژرم لاین در ژن‌های MMR، به ویژه در MLH1 و MSH2، در ۹۰ درصد از بیماران سرطان کولورکتال غیرپولیپوز ارثی (سندرم لینچ یا HNPCC) مشاهده شده است (۱۰). افرادی که دارای جهش‌های ژنتیکی ژن‌های MMR هستند، در طول عمر با خطر بالایی برای ابتلا به سرطان روده بزرگ و همچنین افزایش تومورها در محل‌های خارج از روده، مانند اندومتر، لگن، کلیه، حالب، معده، روده کوچک، مجاری صفراوی، تخمدان و احتمالاً پستان مواجه هستند (۱۱).

جهش‌های مولفه MLH1 با افزایش خطر ابتلا به سرطان کولورکتال، ریه (۱۲)، آندومتر (۱۳) و سرطان پستان (۱۴) مرتبط هستند. گزارش شده است که ۷۰ تا ۸۵ درصد از سندرم لینچ ناشی از تغییرات ژنتیکی MLH1/MSH2 است (۱۵).

جایگاه چندشکل تک نوکلئوتیدی rs63749820C>T (p.Gln49Ter, c.146C>T) در ژن MLH1 قرار گرفته

و یا اقوام درجه یک و دو آنها) بود. جامعه مورد مطالعه جمعیت زنان شمال غرب ایران، در رده سنی مشابه بود. برای این منظور نمونه خون ۱۰۰ فرد مبتلا به سرطان پستان از بین مراجعه کنندگان به بیمارستان‌های تبریز جمع‌آوری شد. جامعه‌ی آماری شاهد پژوهش شامل ۱۰۰ فرد سالم، بدون سابقه‌ی فامیلی سرطان در اقوام درجه یک و دو آنها بود. مشخصات بالینی بیماران شامل سن، اندازه تومور، درجه تومور، درگیری غدد لنفاوی، سمت درگیری (راست یا چپ) و نوع تومور و سن در گروه شاهد با کسب اجازه از آنها در قالب پرسش‌نامه جمع‌آوری شد.

#### استخراج DNA

استخراج DNA از خون وریدی به روش پروتئیناز K یا نمک اشباع (Salting out) انجام شد. پس از بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراجی با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد و اسپکتروفوتومتر، DNA های استخراج شده با آب مقطر استریل رقیق شده و تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

#### تکنیک TETRA-ARMS-PCR

بررسی چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs63749820 ژن MLH1 در جمعیت مورد مطالعه با استفاده از تکنیک TETRA-ARMS-PCR انجام شد. توالی آغازگرها بر مبنای مطالعه‌ی Malik و همکاران (۲۰۲۰) (۸) طراحی و سنتز آنها توسط شرکت Metabion (Germany) انجام شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده شامل آغازگر رفت درونی (FI) (ال T) به توالی 5'CCCTCCTAAACCATGTGCTGGCACTT3'، آغازگر برگشت درونی (RI) (ال C) به توالی 5'ATTCTTACCGTGATCTGGGTCCCGTG3'، آغازگر رفت بیرونی (FO) به توالی

5'CTGGGAAACAAGAGCAAAACTCCGTC' و آغازگر برگشت بیرونی (RO) به توالی 5'CCATGCCACAAAAGCCAATAGTCATT

است. Malik و همکاران در سال ۲۰۲۰ ارتباط چندشکلی rs63749820 ژن MLH1 با احتمال ابتلا به سرطان پستان را در جمعیت زنان پاکستان مورد مطالعه قرار دادند. در این پژوهش چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs63749820 که منجر به چندشکلی‌های غیرمترادف آمینواسیدها در موقعیت Gln146Ter و کوتاه شدن طول پروتئین شده و نقش حیاتی در تومورزایی سرطان سینه نشان داده‌اند با تکنیک Tetra-ARMS مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه rs63749820C>T SNP ژن MLH1 همبستگی معناداری با ریسک توسعه سرطان سینه و سندرم Lynch نشان داد (P value ≤ ۰/۰۵). همچنین نتایج این مطالعه نشان دهنده‌ی کاهش بیان ژن MLH1 و کمبود پروتئین MLH1 در بیماران مبتلا به سرطان سینه بود که اثبات کننده‌ی پتانسیل نقش این ژن در توسعه بیماری بود. در این مطالعه از بین رفتن پروتئین MLH1 با سرطان پیشرفته و گره‌های لنفی نیز ارتباط نشان داد (۸).

ارتباط چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی rs2286940، rs1799977، rs63749795 و rs63750447 ژن MLH1 با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان به ترتیب توسط McCullough و همکاران در سال ۲۰۱۴ (۱۶)، Malik و همکاران در سال ۲۰۲۰ (۸)، Wei و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۱۷) گزارش شده است.

با توجه به بررسی منابع انجام شده و عدم وجود گزارش قبلی، در این مطالعه همراهی چندشکلی rs63749820C>T ژن MLH1 با استعداد ابتلا به سرطان پستان در زنان شمال غرب ایران مورد بررسی قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

##### جمعیت مورد مطالعه

این مطالعه یک بررسی موردی-شاهدی و مبتنی بر مقایسه دو گروه بیمار (مورد یا اقوام مبتلا به سرطان پستان) و کنترل (شاهد یا افراد فاقد سابقه ابتلا به سرطان در خود فرد

ارتباط بین چندشکلی ها و خطر ابتلا به سرطان با استفاده از نسبت شانس با فاصله اطمینان ۹۵٪ محاسبه شد. آزمون‌های آماری اشاره شده برای ژنوتیپ ها و آلل‌ها با استفاده از برنامه javastat online statistics package (https://statpages.info/ctab2x2.html) انجام شد. برای بررسی ارتباط بین ژنوتیپ ها و مشخصات بالینی بیماران از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ استفاده شد. همچنین تغییرات ساختار فضایی ناشی از چندشکلی rs63749820 ژن MLH1 توسط نرم افزار آنالیز RNAsnp مورد بررسی قرار گرفت.

### یافته‌ها

متوسط سن افراد بیمار و شاهد مورد مطالعه در این پژوهش ۴۸/۹ سال با انحراف معیار ۱۲/۵۶ بود. اطلاعات بالینی بیماران مورد مطالعه در جدول ۱ ذکر شده است. اندازه محصولات PCR بر روی ژل آگارز شامل نوار کنترل به طول ۴۶۷ جفت باز، نوار مربوط به آلل C به طول ۲۹۸ جفت باز و نوار مربوط به آلل T به طول ۲۲۰ جفت باز بود. الگوی نواریندی این آلل‌ها بر روی ژل آگارز در شکل ۲ نشان داده شده است.

T3' بود. محل اتصال آغازگرها به توالی ژن MLH1 در شکل ۱ نشان داده شده است.

واکنش ARMS-PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر با ترکیبات پرایمرهای رفت و برگشت بیرونی هرکدام به مقدار ۰/۲ میکرولیتر، پرایمرهای رفت و برگشت درونی هرکدام به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، DNA الگو به مقدار یک میکرولیتر، Master mix (AMPLIQON) به مقدار ۵ میکرولیتر و آب به مقدار ۲/۶ میکرولیتر انجام شد. چرخه‌های حرارتی واکنش PCR شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۳ دقیقه، چرخه واسرشت‌سازی در ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۳ °C به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ °C به مدت ۳ دقیقه بود. محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد الکتروفورز شدند. بررسی آماری:

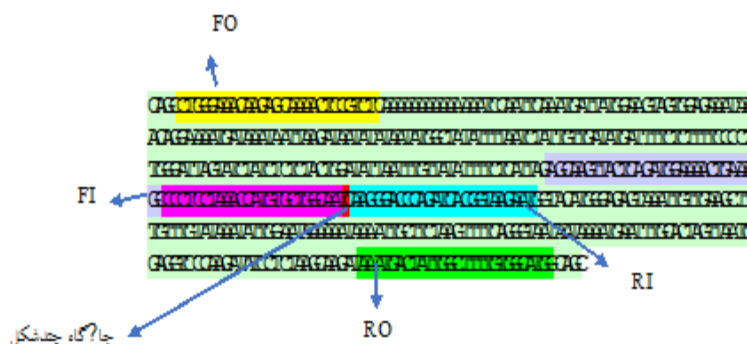
برای بررسی ارتباط بین فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها بین دو گروه شاهد و بیمار از آزمون مربع کای پیرسون و در مواردی که تعداد داده‌های مشاهده شده کمتر از پنج مورد بود از آزمون دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد.  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد. شدت

جدول ۱. مشخصات بالینی بیماران و توزیع چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs63749820 آلل C در ارتباط با مشخصات بالینی بیماران (n=92)

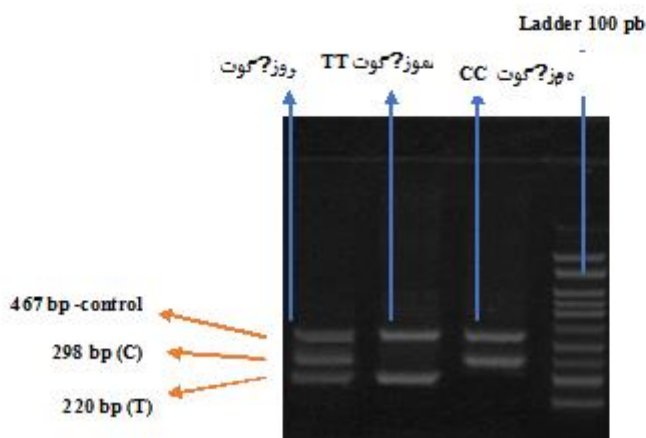
P value	حامل آلل C		درصد	تعداد کل	ویژگی	
	خیر	بله				
۰/۸۰۶	۴	۳۳	۴۰/۲۱	۳۷	۴۵<	سن
	۷	۳۶	۴۶/۷۳	۴۳	۴۵=>	
			۱۳/۰۴	۱۲	نامعلوم	
۰/۳۲۵	۸	۳۳	۴۴/۵۶	۴۱	راست	سمت درگیر
	۲	۳۳	۳۸/۰۴	۳۵	چپ	
	۱	۳	۴/۳۴	۴	هردوسمت	
			۱۳/۰۴	۱۲	نامعلوم	
	۱	۲	۳/۲۶	۳	ILC IDC	نوع تومور

۰/۳۳۸	۷	۴۶	۵۷/۶۱	۵۳	انواع دیگر
	۳	۱۲	۱۶/۳۰	۱۵	نامعلوم
			۲۲/۸۳	۲۱	
۰/۸۰۴	۵	۲۶	۳۳/۷۰	۳۱	I
	۴	۱۹	۲۵	۲۳	II
	۰	۲	۲/۱۷	۲	III
			۳۹/۱۳	۳۶	نامعلوم
۱/۰۰۰	۵	۳۰	۳۸/۰۴	۳۵	T <sub>1</sub>
	۶	۳۰	۳۹/۱۳	۳۶	T <sub>2</sub>
			۲۲/۸۳	۲۱	نامعلوم
۰/۱۰۶	۷	۳۲	۴۲/۳۹	۳۹	N <sub>0</sub>
	۱	۱۴	۱۶/۳۰	۱۵	N <sub>1</sub>
	۰	۱۱	۱۱/۹۶	۱۱	N <sub>2</sub>
	۱	۰	۱/۰۹	۱	N <sub>3</sub>
			۲۸/۲۶	۲۶	نامعلوم

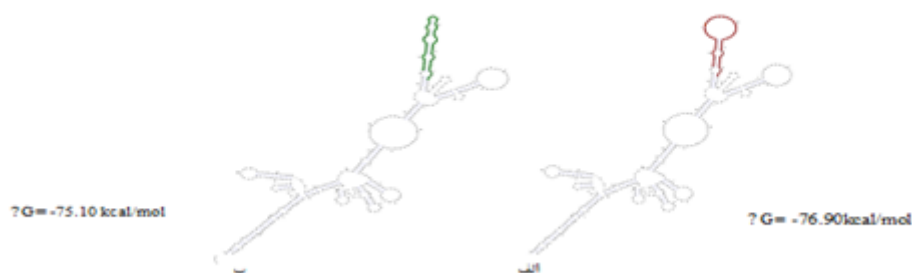
\* T<sub>1</sub> ≤ 2.5cm, T<sub>2</sub> > 2.5cm, \*\* N<sub>0</sub>: 0, N<sub>1</sub>: 1-3cm, N<sub>2</sub>: 4-9cm, N<sub>3</sub> ≥ 10cm



شکل ۱. محل اتصال آغازگرها به توالی هدف ژن MLH1



شکل ۲. الکتروفورز محصولات PCR مربوط به ژنوتیپ های CC, TT و CT افراد بیمار بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد



شکل ۴. موقعیت دومین‌های پروتئین MLH1 (علامت ستاره نشان دهنده محل وقوع جهش است).

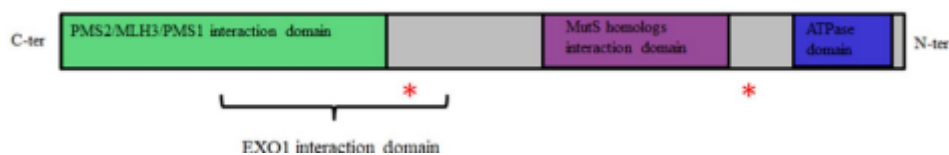
فراوانی آلل T در افراد بیمار و سالم به ترتیب ۴۴/۰۴٪ و ۳۸/۲۷٪ بود (P value=۰/۴۰۹). بین توزیع فراوانی آلل-های C و T با دو گروه بیمار و کنترل نیز ارتباط معنی داری مشاهده نشد (جدول ۲). پیروی جمعیت مورد مطالعه از تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از آزمون مربع کای مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر آماره برای دو گروه کنترل و بیمار میزان ۱۵/۹۸ و ۸/۳۴ بود که بر این اساس و در سطح احتمال ۵ درصد جمعیت‌ها در حالت تعادل نبودند.

جهش یافته توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها بین دو گروه بیمار و سالم: بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ CT بود که در ۶۴/۱۳٪ از بیماران و ۶۴/۳۲٪ از افراد سالم مشاهده شد (P value=۰/۷۴۵). ژنوتیپ CC در ۲۳/۹۱٪ از بیماران و ۲۸/۵۷٪ افراد سالم مشاهده شد (P value=۰/۴۵۴). همچنین ژنوتیپ TT در ۱۱/۹۵٪ از بیماران و ۵/۱۰٪ از افراد سالم (P value=۰/۰۸۳) مشاهده شد. تفاوت معنی‌داری در توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها بین دو گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد. فراوانی آلل C در افراد بیمار و سالم به ترتیب ۵۵/۹۸٪ و ۶۱/۷۳٪ (P value=۰/۴۰۹) و

جدول ۲. توزیع فراوانی ژنوتیپ و آلل در افراد سالم و بیمار

ژنوتیپ/آلل	بیمار/ تعداد=۹۲	درصدفراوانی	کنترل/ تعداد=۹۸	درصدفراوانی	P value	OR CI=95%
CC	۲۲	۲۳/۹۱	۲۸	۲۸/۵۷	۰/۴۶۶	۰/۷۸۶ (۰/۴۱۰ - ۱/۵۰۴)
CT	۵۹	۶۴/۱۳	۶۵	۶۶/۳۲	۰/۷۵۱	۰/۹۰۸ (۰/۴۹۹ - ۱/۶۵۰)
TT	۱۱	۱۱/۹۵	۵	۵/۱۰	۰/۰۸۹	۲/۵۲۶ (۰/۸۴۲ - ۷/۵۷۵)
C	۱۰۳	۵۵/۹۸	۱۲۱	۶۱/۷۳	۰/۲۵۴	۰/۷۸۸ (۰/۵۲۳ - ۱/۱۸۷)
T	۸۱	۴۴/۰۲	۷۵	۳۸/۲۷	۰/۲۵۴	۱/۲۶۹ (۰/۸۴۲ - ۱/۹۱۱)

تغییرات ساختار فضایی دوم RNA ناشی از چندشکلی rs63749820 ژن MLH1 توسط نرم افزار آنالیز RNAsnp بررسی و در شکل ۳ نشان داده شده است. بر این اساس تغییر ساختار فضایی ناشی از چندشکلی rs63749820 ژن MLH1 منجر به کاهش  $\Delta G$  آلل جهش یافته ( $\Delta G = -75.10 \text{ kcal/mol}$ ) در مقایسه با آلل طبیعی ( $\Delta G = -76.90 \text{ kcal/mol}$ ) با  $P \text{ value} = 0.05601$  شد که غیرمعنی‌دار بود ( $P \text{ value} > 0.05$ ).



شکل ۳. تغییرات ساختار فضایی ناشی از چندشکلی rs63749820 ژن MLH1، الف. آلل طبیعی، ب. آلل

آن شده که در سرطان‌زایی نقش دارند. Malik و همکاران همچنین ارتباط SNP rs63749795 ژن MLH1 با احتمال ابتلا به سرطان پستان را در همان جمعیت مورد مطالعه قرار دادند که ارتباط معنی‌داری با خطر ابتلا به سرطان پستان نشان داد (۸). یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر اندازه کوچک جمعیت مورد مطالعه می باشد که ممکن است یکی از دلایل عدم مطابقت نتایج این پژوهش با نتایج مطالعه ی مشابه باشد.

در موقعیت ۱۴۶ ژن MLH1 جهشی وجود دارد که با تبدیل سیتوزین به یوراسیل منجر به تبدیل کدون CAA به کدون UAA و در نتیجه ایجاد یک کدون پایان نابجا می-شود. در نتیجه پروتئین در این موقعیت کوتاه شده و در ساختار جهش یافته تنها یک دومین ATPase دارد. پروتئین‌های در حال تعامل با پروتئین MLH1 یعنی، PMS1/MLH3/PMS2، برای فعالیت به پایانه C نیاز دارند و در نتیجه‌ی این جهش، امکان برهمکنش این پروتئین‌ها با پایانه C از بین رفته است. این امر منجر به

توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها و علائم بالینی: بر اساس تجزیه‌های انجام شده بر روی ارتباط چندشکلی rs63749820 ژن MLH1 با علائم بالینی بیماران، ارتباط معنی داری بین توزیع فراوانی‌های ژنوتیپی این SNP و علائم بالینی مورد مطالعه شامل نوع تومور ( $P = 0.0338$ ) و علائم بالینی مورد مطالعه شامل نوع تومور ( $P \text{ value} = 0.0804$ )، سن ( $P = 0.0806$ )، سمت درگیر ( $P \text{ value} = 0.0325$ )، اندازه تومور ( $P \text{ value} = 0.0106$ ) و درگیری غدد لنفی ( $P \text{ value} = 0.0106$ ) مشاهده نشد (جدول ۱).

## بحث

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، ارتباط معنی داری بین توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها در جایگاه چندشکلی rs63749820 ژن MLH1 و احتمال ابتلا به سرطان پستان در زنان شمال غرب ایران مشاهده نشد. مطالعه Malik و همکاران با مطالعه روی ۳۸۷ شاهد و ۴۹۳ فرد مبتلا به سرطان پستان که از پنج بیمارستان شهر اسلام‌آباد کشور پاکستان جمع‌آوری شد، ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ CT جایگاه rs63749820 ژن MLH1 با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان گزارش کردند ( $P = 0.003$ ) و این SNP به عنوان یک نشانگر بالقوه برای پیش آگهی سرطان پستان در جمعیت مورد مطالعه معرفی شد. بر اساس مطالعه Malik و همکاران MLH1 یکی از فراوان‌ترین پروتئین‌های MMR است که بیان و فعالیت آن نقش مهمی در این مسیر سیستم تعمیر عدم تطابق دارد و در صورت اختلال منجر به پیامدهای بیماری‌زای می‌شود. چندین جهش ژنتیکی در ژن MLH1 منجر به کوتاه شدن پروتئین

کاهش فعالیت موثر مسیر تعمیر عدم تطابق (MMR) می‌شود (شکل ۴) (۸).

تجزیه و تحلیل ساختاری، نشان دهنده حذف در پایانه C پروتئین MLH1 بود که ممکن است یکی از دلایل اصلی کاهش فعالیت MMR باشد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه تغییر ژنتیکی هر دو SNP منجر به ساختار کوتاه MLH1 شد. بر اساس مشاهدات، پایانه C پروتئین MLH1 در اتصال PMS2 نقش دارد و به تشکیل هتروداپمر کمک می‌کند، با وقوع این جهش و حذف پایانه C، هتروداپمر MLH1 و PMS2 تشکیل نمی‌شود. ایجاد این جهش موجب کاهش یا از دست دادن کامل بیان پروتئین MLH1 می‌شود که باعث از بین رفتن فعالیت پروتئین MMR می‌شود. پروتئین MMR از فاکتورهای حیاتی در جلوگیری از سرطان پستان است (۸).

همچنین بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش ارتباط معنی داری بین چندشکلی جایگاه تک نوکلئوتیدی rs63749820 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. مطالعه Malik و همکاران بر روی این SNP در جمعیت کشور پاکستان ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی جایگاه تک نوکلئوتیدی rs63749820 ژن MLH1 با سابقه خانوادگی و شروع زودرس یائستگی نشان داد ( $P \text{ value} < 0.0001$ ) (۸). 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 (۱۸).

مطالعه پنج SNP از سه ژن مسیر ترمیم عدم تطابق (MMR) شامل MSH3 (rs1650663)، MLH1 (rs2286940)، MSH2 (rs4583514، rs3732182، rs2303428) و یک نوع SNP عملکردی MLH1 (rs1799977)؛ توسط McCullough و

همکاران بر روی ۱۰۵۳ زن مبتلا به سرطان پستان و ۱۱۰۲ زن شاهد از نیویورک هیچ ارتباطی بین این و خطر ابتلا به سرطان پستان نشان نداد. هیچ مدرکی نشان دهنده اثر اصلی هیچ یک از SNPها روی خطر ابتلا به سرطان پستان نبود و این یافته‌ها با وضعیت یائستگی تغییر نکرد (۱۶).

نرم‌افزار آنالیز RNAsnp تغییرات ساختاری RNA القا شده توسط SNP را بطور موثری شناسایی می‌کند. چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی ممکن است باعث تغییر ساختارهای طبیعی RNA شده و در عملکرد مولکولی آن‌ها دخالت کند. این نرم‌افزار بر نواحی حداکثر تغییرات ساختاری بین نوع طبیعی و جهش یافته RNA تمرکز دارد (۱۹).

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 چندشکلی مورد مطالعه با سرطان پستان در زنان این منطقه باشد.

### نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، ارتباط معنی‌داری بین توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها در جایگاه چندشکلی rs63749820 ژن MLH1 و احتمال ابتلا به سرطان پستان در زنان شمال غرب ایران مشاهده نشد. هیچ یک از ژنوتیپ‌های مورد نظر همراهی معناداری با ویژگی‌های پاتولوژیکی افراد بیمار شامل سن بیماران، درجه تومور، درگیری لنف، سمت درگیر، اندازه تومور، مرحله تومور و نوع تومور نداشتند. با توجه به مطالعات انجام شده و همراهی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی ژن MLH1 با سرطان‌های مختلف و تفاوت در همراهی یا عدم همراهی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی بین جمعیت‌های متفاوت، لازم است ارتباط چند شکلی rs63749820 با ابتلا به سرطان پستان در جامعه آماری بزرگتری از افراد بیمار و

اخلاق دانشگاه شهید مدنی آذربایجان مصوب گردید و از آدرس

<https://ethics.research.ac.ir/IR.AZARUNIV.R>

EC.1401.016 قابل رهگیری است. هیچ کدام از

نویسندگان این مطالعه، افراد یا دستگاه‌ها تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند.

سالم و نژادهای مختلف بصورت مستقل مورد مطالعه قرار گرفته و ریسک فاکتورهای نژادهای مختلف بصورت مستقل تعریف شوند.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش با گرنت استاد و گرنت اختصاص یافته به پایان نامه دانشجوی اجرا شد. همچنین این مطالعه با شناسه اخلاق به شماره IR.AZARUNIV.REC.1401.016 در کمیته

### منابع

1. Tvorogov D, Sundvall M, Kurppa K, Hollmén M, Repo S, Johnson MS, et al. Somatic mutations of ErbB4: selective loss-of-function phenotype affecting signal transduction pathways in cancer. *J Biol Chem*. 2009; 284(9): 5582-5591.
2. NCBI, Gene, Genes and mapped phenotypes, "ERBB4 erb-b2 receptor tyrosine kinase 4 [Homo sapiens (human)]," 2018.
3. <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-cancer-data>
4. Smit L, Berns K. An integrated genomic approach identifies that the PI3K/AKT/FOXO pathway is involved in breast cancer tumor initiation. *Oncotarget*. 2016; 7(3): 2596-610.
5. Yuan P, Liu D, Deng M. 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.
6. Ma G, Ge Y, Gu D, Du M, Chu H, Chen J, et al. Functional annotation of colorectal cancer susceptibility loci identifies MLH1 rs1800734 associated with MSI patients. *Gut*. 2016; 65(7): 1227-1228.
7. Takeda T, Banno K, Yanokura M, Adachi M, Iijima M, Kunitomi H, et al. Methylation Analysis of DNA mismatch repair genes using DNA derived from the peripheral blood of patients with endometrial cancer: epimutation in endometrial carcinogenesis. *Genes*. 2016; 7(10): 1-12.
8. Malik SS, Zia A, Mubarik S, Masood N, Rashid S, Sherrard A, 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.
9. Haghghi M, Radpour M, Aghajani R, Zali KN, Molaei M, Zali MR. Four novel germline mutations in the MLH1 and PMS2 mismatch repair genes in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J of Colorectal Dis*. 2009; 24(8): 885-893.
10. Lynch HT, Chapelle A. Hereditary Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348(10): 919-932.
11. Merg A, Lynch HT, Lynch JF, Howe JR. Hereditary colorectal cancer-part II. *Curr Probl Surg*. 2005; 42(1): 267-333.
12. Ma Y, Chen Y, Petersen I. Expression and promoter DNA methylation of MLH1 in colorectal cancer and lung cancer. *Pathol Res Pract*. 2017; 213(4):333-338.
13. Buchanan DD, Tan YY, Walsh MD, Clendenning M, Metcalf AM, Ferguson K, et al. Tumor mismatch repair immunohistochemistry and DNA MLH1 methylation testing of patients with endometrial cancer diagnosed at age younger than 60 years optimizes triage for population-level germline mismatch repair gene mutation testing. *J Clin Oncol*. 2014; 32(2):90.
14. Kappil M, Terry MB, Delgado-Cruzata L, Liao Y, Santella RM. Mismatch repair polymorphisms as markers of breast cancer prevalence in the Breast Cancer Family Registry. *Anticancer Res*. 2016; 36(9):4437-4441.
15. Dowty JG, Win AK, Buchanan DD, Lindor NM, Macrae FA, Clendenning M, et al. Cancer risks for MLH1 and MSH2 mutation carriers. *Hum Mutat*. 2013; 34(3):490-497.

16. Lauren E. McCullough, Regina M. Santella, Rebecca J. Cleveland, Robert C. Millikan, Andrew F. Olshan, Kari E. Polymorphisms in DNA repair genes, recreational physical activity and breast cancer risk. *Int J Cancer*. 2014; 134(3): 654-663.
17. Wei W, Jiang M, Luo L, Li Z, Wang P, Dong WQ. Colorectal cancer susceptibility variants alter risk of breast cancer in a Chinese Han population. *Genet Mol Res*. 2013; 12(4): 6268-6274.
18. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1972820#frequency\\_tab](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1972820#frequency_tab)
19. Sabarinathan R, Tafer H, Seemann S. RNAsnp: efficient detection of local RNA secondary structure changes induced by SNPs. *Hum Mutat*. 2013; 34(4): 546-56.