

تشخیص جهش‌های ژن *MSH2* در نمونه‌های سرطان کولورکتال با به کارگیری تکنیک HRMA

Diagnosis of *MSH2* gene mutations in human colorectal cancer using high resolution melting analysis

سمیه نادرخانی^۱، عباس بهاری^{۲*}، سعید آیریان^۱

۱- کارشناسی ارشد، استادیار، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران

۲- استادیار، پژوهشکده فناوری های نوین زیستی دانشگاه زنجان

Naderkhani S¹, Bahari A^{*2}, Irian S¹

1. MSc Student, Assistant Professor, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University of Tehran
2. Assistant Professor, Research Institute of modern biological techniques, University of Zanjan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: bahari@znu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۲/۰۳)

چکیده

فرآیند توموری شدن سلول‌ها در بیشتر موارد توسط عوامل محیطی و گاهی تصادفی رخ می‌دهد اما در برخی موارد عوامل وراثت‌پذیر نقش مهمی دارند. سرطان کولورکتال (CRC) دومین سرطان رایج در کشورهای توسعه یافته است که بیشتر از ۱۰ درصد آن ارثی است و شامل HNPCC و FAP هستند. HNPCC رایج‌ترین نوع سرطان کولورکتال ارثی است و حدود ۱۰-۱ درصد سرطان‌های کولورکتال را شامل می‌شود. جهش‌های رده زاینده در ژن‌های *MMR* به‌ویژه *MSH2*، *MLH1* و *MSH6* سبب ایجاد کولورکتال می‌شوند. ژن *MSH2* بر روی کروموزوم ۲ (2p21) قرار دارد. جهش‌های *MSH2* در ۲۵٪ از HNPCC ها درگیر هستند که جهش حذفی ۵۰-۱۷ درصد از آن‌ها را دربر می‌گیرد. در این تحقیق ۵۰ نمونه سرطانی کولورکتال مورد مطالعه قرار گرفت. ابتدا DNA ژنومی از نمونه سرطانی استخراج شد و سپس جهش حذفی AAT با روش HRMA و تعیین توالی مستقیم DNA مورد ارزیابی قرار گرفت در این بررسی نمونه‌های سرطانی با روش HRMA به‌عنوان ژنوتیپ wild و بدون جهش حذفی AAT شناسایی و گزارش شدند. نتایج نشان داد که HRMA می‌تواند به‌عنوان ابزار جدید و بسیار کارآمدی در جهت تشخیص مولکولی و پیشگیری از بیماری‌ها به کار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی

تجزیه و تحلیل منحنی ذوب با وضوح بالا

جهش حذفی

سرطان کولورکتال

HNPCC

MSH2

سرطان یکی از معضلات اصلی سلامتی انسان در جهان است، مطالعات نشان می‌دهد که نقص ژن‌ها دلیل این بیماری است. بیشتر جهش‌های درگیر در سرطان‌ها، جهش‌های سوماتیک هستند که فقط در سلول‌های بافت سرطانی یافت می‌شوند. اما حدود یک درصد از کل سرطان‌ها، به‌صورت وراثتی ایجاد می‌شوند و جهش رده زاینده در آن‌ها درگیر است و همه سلول‌ها حاوی آن جهش هستند (Lynch et al. 2000). جهش‌ها از دلایل اصلی گسترش سرطان‌ها هستند (Shilpa et al. 2014).

جهش‌هایی که در تومورزایی نقش دارند به‌طور عموم در سه نوع ژن رخ می‌دهند: ژن‌های سرکوبگر تومور، پروتوانکوژن‌ها، ژن‌های درگیر در ترمیم و همانندسازی DNA (Teklemariam et al. 2015). جهش در ژن‌های درگیر در ترمیم DNA، مسئول گسترش تومورها و بیماری‌های ارثی مختلف است (Hsieh 2001). ژن‌های اصلی ترمیم DNA شامل *MSH2*، *MSH3*، *MSH6*، *MLH1*، *BLM* و *PMS2* است (Josep et al. 2012).

سرطان کولورکتال (CRC) بیماری هتروژنتیکی است (Worthley et al. 2010) که در اثر تجمع جهش‌های ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی ایجاد می‌شود (Ewing et al 2014; Kheirelseid et al 2013). عوامل ژنتیکی در ایجاد حدود ۳۵ درصد موارد CRC شرکت دارند (Mitchell et al. 2002) و دومین عامل مرگ‌های ناشی از سرطان است و تقریباً ۱۰ درصد از آن را به خود اختصاص می‌دهد (Mitchell et al. 2002; Tarraga et al. 2014; Vasen et al. 2007) و به‌طور معمول به یکی از ۳ الگوی تک‌گیر، خانوادگی یا ارثی رخ می‌دهد (Kashfi et al. 2014; Amersi et al 2005). جهش‌های ارثی رده زاینده به‌وجود می‌آید (Stintzing 2014; Kheirelseid et al 2013) که حدود ۱۰ درصد موارد CRC را تشکیل می‌دهد و دو سندرم معروف آن شامل HNPCC و FAP هستند (Kheirelseid et al. 2013). سرطان کولورکتال غیر پولیپی ارثی (HNPCC) رایج‌ترین فرم سرطان کولورکتال ارثی است و از جهش رده زاینده در ژن *MMR* ایجاد می‌شود (Labianca et al. 2010).

جهش‌ها در چهار ژن *MMR* شامل *MLH1*، *MSH2*، *MSH6* و *PMS2* به‌طور قابل توجه‌ای با ابتلا به HNPCC مرتبط هستند.

HNPCC به‌طور رسمی به‌عنوان سندرم نقص *MMR* شناخته می‌شود ژن *MSH2* بر روی کروموزوم 2p22-p21 قرار دارد و از ۱۶ اگزون تشکیل شده‌است که RNA آن به اندازه 3145bp و تعداد آمینواسید آن ۹۳۴ تا و وزن مولکولی آن 104/7 kDa است. جهش‌های رده‌زاینده در طول اگزون *MSH2* پراکنده هستند و در ژن *MSH2* نقاط جهش داغ، اگزون ۳ و ۱۲ هستند. به غیر از اگزون‌ها و مناطق اگزون-اینترون، تعداد کمی جهش نقطه‌ای در بخش پیشبر *MSH2* شناسایی شده است (Peltomaki et al. 2004).

در غربالگری بیماران برای بیشتر بیماری‌ها مثل HNPCC یا لینچ سندرم شناسایی حذف‌های درون ژنی نسبتاً بزرگ بسیار مهم است. در HNPCC ۲۷ درصد جهش‌های پاتوژنیک به جهش‌های حذفی بزرگ در *MSH2* و *MLH1* نسبت داده می‌شوند بیشتر جهش‌های گزارش شده در پایگاه‌های اطلاعاتی، منحصربه‌فرد هستند به‌طور مثال ویژه هر خانواده هستند با این وجود تعداد کمی جهش‌های تکراری شناسایی شده‌اند که در خانواده‌های HNPCC در سراسر جهان رخ می‌دهند (Vaughn et al. 2008) که از این جهش‌های رایج، حذف توالی نوکلئوتیدی AAT در نوکلئوتید ۱۷۸۸-۱۷۸۶ اگزون ۱۲ ژن *MSH2* می‌باشد که منجر به حذف (جهش چارچوب) آمینواسید اسپارژین (کدون ۵۹۶) می‌شود (Vaughn et al. 2008; Mitchell et al. 2002). این جهش بارها در مقالات مختلف گزارش شده است (Buerstedde et al. 1995; Desai et al. 2000; Domingo et al. 2004; Mueller et al. 2009; Moslein et al. 1996; Stormorken et al. 2003; Wijnen et al. 1997).

N596del که باعث حذف آمینواسید اسپارژین در کدون ۵۹۶ می‌شود (Ripa et al. 2005) آمینواسید حذف شده در بالادست منطقه حفظ شده انتهای C قرار دارد که به الیگونوکلئوتیدهای ناجور جفت‌باز متصل می‌شود و همچنین فعالیت ATPase را حفظ می‌کند این منطقه اثر بسیار زیادی بر عملکرد پروتئین *MSH2* در موجود زنده دارد (Whitehouse et al. 1997). حذف یک آمینواسید که احتمال دارد از طریق تغییر ساختار پروتئین که سرانجام عملکرد پروتئین را تغییر می‌دهد می‌تواند منجر به بیماری می‌شود (Kunzelmann et al. 2000). N596del به‌عنوان جهش ایجاد کننده بیماری مطرح است که بروز بالینی دارد و بر

طرح شامل استخراج DNA، بررسی جهش به وسیله روش HRMA و تایید نتایج HRMA با توالی‌یابی (Sequencing) است. DNA ژنومی از نمونه‌های بافت پارانینه سرطان کلورکتال با روش سنتی استخراج شد و سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت. کمیت DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ و کیفیت DNA به وسیله الکتروفورز ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. بعد از استخراج DNA، طراحی آغازگر انجام شد. برای طراحی پرایمر، ابتدا توالی آگرون ۱۲ ژن *MSH2* از پایگاه علمی NCBI و Ensemble به دست آمد و سپس با استفاده از نرم‌افزار CLC main workbench مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آغازگرها هم با استفاده از نرم‌افزار Beacon designer ver 8 و گزینه HRMA آن طراحی شدند. و سرانجام اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده، در سایت آنالین NCBI BLAST بررسی شد. در جدول ۱ به ویژگی‌های آغازگر طراحی شده اشاره شده است.

جهت اطمینان از وجود DNA استخراج شده و اطمینان از صحت آغازگر طراحی شده، ابتدا واکنش PCR انجام شد تا شرایط آزمایش HRMA بهینه‌سازی شود. واکنش‌های PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر طبق جدول ۲ و ۳ انجام شد. در این مطالعه ژن نمونه‌های شاهد (به علت کوتاه بودن توالی) که شامل ۹۶ نوکلئوتید است سنتز شدند. نمونه wild فاقد جهش AAT (توالی آن شامل ۹۶ نوکلئوتید) و نمونه mutant دارای جهش حذفی AAT (توالی آن شامل ۹۳ نوکلئوتید) و نمونه شاهد هتروزیگوت ترکیبی از هر دو توالی wild و mutant است.

توالی نمونه wild:

5'ACAGGCTATGTAGAACCAATGCAGACACTCAATGATG
TGTTAGCTCAGCTAGATGCTGTTGTCAGCTTTGCTCACG
TGTCAAATGGA3'

توالی نمونه mutant:

5'ACAGGCTATGTAGAACCAATGCAGACACTCGATGTGT
TAGCTCAGCTAGATGCTGTTGTCAGCTTTGCTCACGTGT
CAAATGGA3'

جدول ۱- ویژگی‌های آغازگرهای استفاده شده در واکنش‌های PCR

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای ذوب (C)	طول آغازگر
<i>MSH2</i> رفت	5'-ACAGGCTATGTAGAACCAAT-3'	60.2	(20 mer)
<i>MSH2</i> برگشت	5'-AACAGGTGCTCCATTTGA-3'	60.6	(18 mer)

این اساس، به‌کارگیری جهش N596del ژن *MSH2* در غربالگری قبل از بروز علائم بیماری خانواده‌های HNPCC توصیه شده است (Whitehouse et al. 1997).

HRMA برای اولین بار در سال ۱۹۹۷ معرفی شده است (Teixeira Pinto. 2009) این روش برای ژنوتایپینگ تنوع شناخته شده و غربالگری تنوع ناشناخته کاربرد دارد و روشی ساده براساس PCR می‌باشد که با اندازه‌گیری تغییرات دمای ذوب DNA دورشته‌ای تنوع توالی DNA را شناسایی می‌کند. T_m DNA دورشته‌ای در میان توالی هموزیگوت، توالی هموزیگوت جهش‌دار و توالی هتروزیگوت متفاوت است و فلورسانس هر کدام از آن‌ها وقتی که در معرض افزایش دما هستند متفاوت بوده و در نتیجه منحنی‌های ذوب متفاوتی خواهند داشت. جهش‌ها توسط تغییر در شکل منحنی دمایی در مقایسه با نمایه (پروفایل) مرجع شناسایی می‌شود. HRMA روشی ساده، ارزان، و با اختصاصیت، حساسیت و دقت بالا است. فاکتورهایی از قبیل منبع نمونه، طول قطعه (آمپلیکون)، میزان GC، رنگ و غیره دقت HRMA را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Chen et al. 2014) روش تجزیه و تحلیل ذوب با وضوح بالا (HRMA) روش مؤثری برای شناسایی ناپایداری ریزماهورای نمونه‌های بالینی است (Janavicius et al. 2010) و حساسیت این روش برای شناسایی جهش‌های رده زاینده تقریباً ۱۰۰ درصد است (Teixeira Pinto. 2009).

در این مطالعه سعی بر آن است که غربالگری بین ۵۰ نمونه بافت سرطانی از نظر جهش حذفی در آگرون ۱۲ ژن *MSH2* با استفاده از روش HRMA صورت پذیرد.

مواد و روش‌ها

اجرای این پژوهش در آزمایشگاه ژنومیکس پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی دانشگاه زنجان صورت پذیرفت. این

جدول ۲- واکنشگرهای مورد استفاده در PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر

واکنشگرها	حجم مواد در ۲۵ میکرولیتر
Red Master Mix 2x	۱۲/۵
آغازگر رفت*	۱
آغازگر برگشت*	۱
DNA	۱
آب مقطر	۹/۵

* غلظت آغازگرهای مورد استفاده در واکنش معادل ۱۰ پیکومول در میکرولیتر بود.

جدول ۳- برنامه‌های مورد استفاده در PCR

تعداد چرخه	مدت زمان	دما (°C)	مراحل
۱	۵'	۹۵	واسرشته‌سازی اولیه
	۲۰"	۹۵	واسرشته‌سازی
۴۰	۲۰"	۵۰	اتصال آغازگرها
	۲۰"	۷۲	بسط آغازگرها
۱	۵'	۷۲	بسط نهایی آغازگرها

جدول ۴- واکنشگرهای مورد استفاده در HRMA با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر

واکنشگرها	حجم مواد در ۲۰ میکرولیتر
Evagreen Master	۴
آغازگر رفت*	۰/۷
آغازگر برگشت*	۰/۷
DNA	۱
آب مقطر	۱۳/۶

* غلظت آغازگرهای مورد استفاده در واکنش معادل ۱۰ پیکومول در میکرولیتر بود.

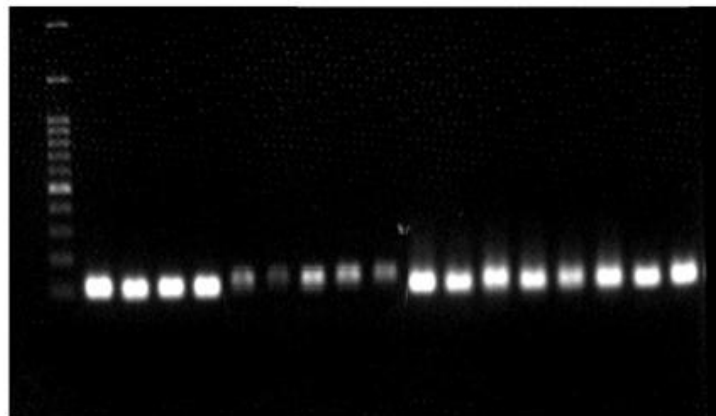
و سپس مخلوط اصلی را که شامل کیت اواگرین، پرایمرها و آب است. بین لوله‌های کوچک دارای الگوها، تقسیم شدند. همه مراحل در اتاق تاریک و بر روی کیسه یخ و سریع انجام شد. حجم و نوع واکنشگرهای مورد استفاده در HRMA در جدول ۴ آورده شده است. برنامه‌های بهینه سازی شده برای آغازگرهای مورد استفاده در واکنش HRMA در جدول ۵ آورده شده است. برای تایید نتایج HRMA، از روش توالی‌یابی (Sequencing) استفاده شد. چندین نمونه شاهد و سرطانی mutant و wild شناسایی شده با روش HRMA، آماده‌سازی و برای تعیین توالی فرستاده شد.

DNA ۵۰ نمونه سرطانی با HRMA مورد مطالعه قرار گرفت، به علت حساس بودن روش HRMA، همه نمونه‌ها باید به‌طور کامل همسان باشند در ابتدا همه نمونه‌ها نانودراپ شدند تا غلظت اصلی آن‌ها به دست آید سپس برحسب غلظت اصلی رقیق‌سازی انجام گرفت و غلظت همه نمونه‌ها بر روی ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر تنظیم شد، نمونه‌های شاهد چون سنتز شده بودند خلوص‌شان بالاتر از نمونه‌های DNA استخراجی بود و در نتیجه با غلظت نمونه‌های سرطانی قابل مقایسه نبود در نتیجه همسان‌سازی نمونه‌های شاهد و سرطانی از روی Ct انجام گرفت. ابتدا الگوها (DNA) را در لوله‌های کوچک (میکروتیوب) ریخته

جدول ۵- برنامه‌های مورد استفاده در HRMA

تعداد چرخه	مدت زمان	دما ($^{\circ}\text{C}$)	مراحل	
۱	۱۵'	۹۵	واسرشته سازی اولیه	Cycling
۴۵	۲۰"	۹۵	واسرشته سازی	
		۵۰	اتصال آغازگرها	
	۲۰"	۷۲	بسط آغازگرها	
۱	۰/۱"	۸۰-۹۹		HRMA
۱	۰/۸"	۷۰-۹۹		Melt

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰ ۱۱ ۱۲ ۱۳ ۱۴ ۱۵ ۱۶ ۱۷ ۱۸



شکل ۱- نتایج مربوط به تکثیر نمونه‌های کنترلی و سرطانی در دستگاه Rotor gene 6000. از چپ به راست چاهک اول لدر و چاهک‌های بعدی محصولات PCR نمونه‌های سرطانی (از شماره ۶ تا ۱۰) و کنترلی (۲-۴ و ۱۱-۱۸) می‌باشد.

نتایج

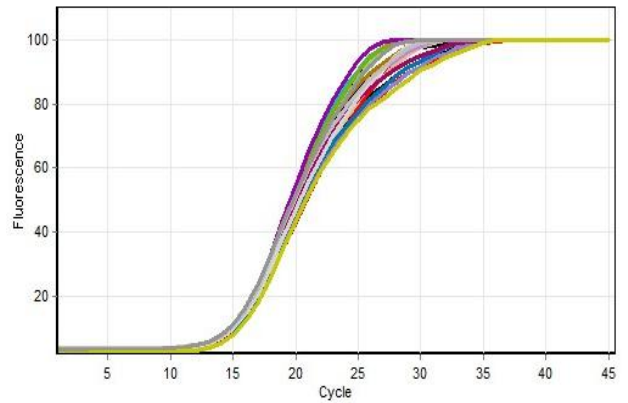
قبل از انجام واکنش‌های اصلی مربوط به HRMA، جهت بهینه‌سازی و اطمینان از سالم بودن دستگاه Rotor gene 6000، کیت مورد استفاده و وجود الگوها، چندین نمونه کنترل و سرطانی با دستگاه Rotor gene 6000 مورد PCR قرار گرفتند که نتایج تکثیر بر روی ژل آگارز ۲ درصد در شکل ۱ قابل مشاهده می‌باشد. طول توالی ژن مورد نظر ۹۶ نوکلئوتید می‌باشد و همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود نمونه‌های تکثیری نیز در محدوده ۱۰۰ bp قرار داشتند که تایید کننده تکثیر صحیح نمونه‌ها می‌باشد.

در نرم‌افزار HRMA، Rotor gene 6000 چند نوع گراف (پلات) ترسیم می‌شود در مرحله اول، تکثیر الگو اتفاق می‌افتد و گراف Amplification (تکثیر) ترسیم می‌شود. در این گراف در محور xها تعداد سیکل‌های انجام واکنش قرار دارد و محور yها میزان

فلورسنت ساطع شده ویژه هر واکنش (هر تیوب) را نشان می‌دهد. بر مبنای همین گراف است که Ct را به دست آورده و الگو اولیه بر مبنای آن همسان‌سازی می‌شود. شکل ۲ نمودار تکثیر نمونه‌های شاهد و سرطانی برای جهش حذفی AAT ژن *MSH2* را نشان می‌دهد. بعد از اتمام مرحله Amplification، مرحله HRMA آغاز می‌شود که بر مبنای ذوب است و آنالیز اصلی بر مبنای گراف‌های این مرحله انجام می‌گیرد. در آنالیز HRMA سه گراف ترسیم می‌شود گراف اول نمودار معمولی (Normalised Graph) می‌باشد، در این گراف به صورت دستی محدوده T_m قطعه مورد نظر را که برای آنالیز نهایی HRMA مهم است مشخص می‌شود. شکل (۳-الف)، نمودار معمولی ۶ نمونه کنترلی wild، mutant و heterozygote را نشان می‌دهد.

نمونه‌های کنترلی به صورت کاملاً مشخص از هم تفکیک و شناسایی شده‌اند. گراف سوم: اگر از منحنی سیگموئیدی ذوب در واحد زمان مشتق گرفته شود (Df/dt) منحنی درجه دومی به دست می‌آید که هر پیک در آن نشان دهنده تکثیر یک قطعه ویژه و T_m آن قطعه می‌باشد. از این گراف برای تفکیک دمایی ژنوتیپ‌های گروه‌های کنترل استفاده می‌شود هر کدام از این نمونه‌ها پیک دمایی ویژه خود را دارند. شکل (۴-الف)، گراف مربوط به منحنی ذوب HRMA ۶ نمونه کنترلی wild، mutant و hetrozygote می‌باشد. به دلیل اینکه T_m نمونه‌ها بیشتر از ۸۰ درجه سانتی‌گراد بود گستره دمایی برای منحنی ذوب HRMA، از ۸۰ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد با دمای raising ۰/۱ در نظر گرفته شد، طبق شکل زیر انجام صحیح واکنش HRM، تایید می‌شود چون هر نمونه (دوپلیکیت) پیک و T_m ویژه خود را دارد.

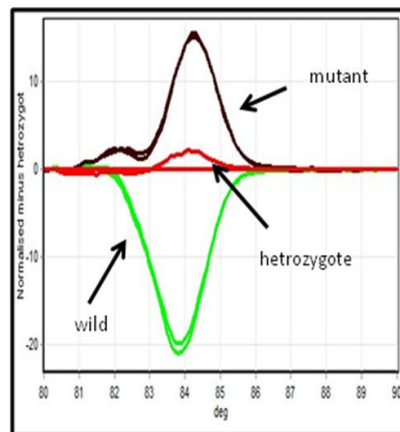
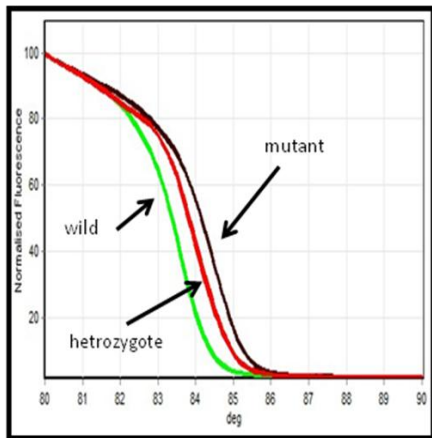
شکل (۴-ب)، گراف منحنی ذوب Melt، ۶ نمونه کنترلی wild، mutant و hetrozygote را نشان می‌دهد. طبق این گراف هر پیک نشان‌دهنده تکثیر یک قطعه ویژه می‌باشد و پیک اضافی تری هم وجود ندارد، که این تکثیر اختصاصی و بدون آلودگی و پرایمر دایمر را نشان می‌دهد.



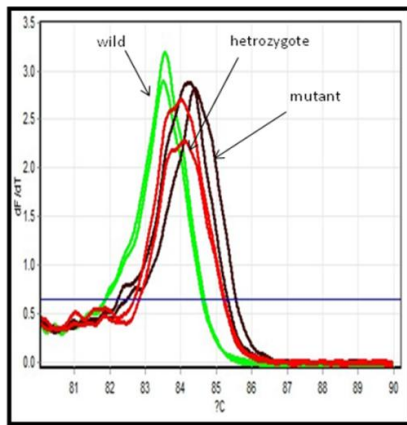
شکل ۲- نمودار تکثیر نمونه‌های شاهد و سرطانی.

در این نمودار، نمونه‌های کنترلی هموزیگوت با shift نمودار یا گراف کاملاً از هم شناسایی شدند و گراف نمونه کنترلی hetrozygote در وسط دو گراف هموزیگوت wild و mutant قرار دارد و تغییر شکل در گراف hetrozygote نسبت به نمونه‌های کنترلی هموزیگوت کاملاً مشهود می‌باشد.

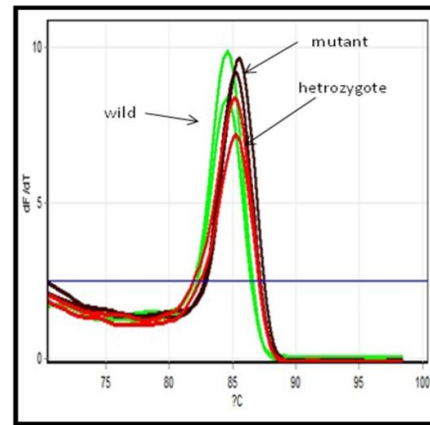
گراف دوم نمودار تفریق (Difference Graph) می‌باشد که مهمترین گراف برای تفکیک نمونه‌ها می‌باشد و به صورت گرافیکی نمونه‌ها را از یکدیگر جدا می‌سازد. شکل (۳-ب) نمودار تفریق ۶ نمونه کنترلی wild، mutant و hetrozygote را با مبنای قرار دادن نمونه hetrozygote نشان می‌دهد. طبق این شکل،



شکل ۳- نمودارهای نمونه‌های شاهد. الف. نمودار معمولی ۶ نمونه کنترلی wild، mutant و hetrozygote. ب. نمودار تفریق نمونه‌های کنترل بر مبنای hetrozygote.



الف

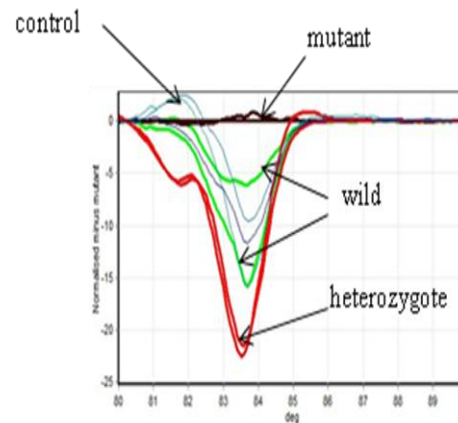


ب

شکل ۴- نمودارهای منحنی ذوب نمونه‌های شاهد. الف. نمودار منحنی ذوب HRMA ۶ نمونه شاهد. ب. نمودار منحنی ذوب Melt ۶ نمونه شاهد



الف



ب

شکل ۵- نمودارهای نمونه‌های شاهد و ۳ نمونه سرطانی. الف. نمودار معمولی نمونه‌های سرطانی و شاهد. ب. نمودار تفریق نمونه‌های سرطانی و شاهد.

شکل نمودار نمونه‌های سرطانی بر نمودار نمونه شاهد wild منطبق می‌باشند.

شکل (۵-ب)، نمودار تفریق (Difference Graph) نمونه‌های شاهد wild، mutant و heterozygote و سه نمونه سرطانی را نشان می‌دهد. از نمودار تفریق برای تفکیک بهتر نمونه‌ها استفاده می‌شود. که در این شکل نمودار تفریق بر پایه ژنوتیپ mutant است. در نمودار تفریق هم منحنی نمونه‌های سرطانی در محدوده منحنی نمونه‌های کنترل wild است و همچنین کاملاً هم‌شکل هستند در نتیجه طبق هر دو نمودار (معمولی و تفریق)، هر سه نمونه سرطانی بعنوان ژنوتیپ wild شناسایی می‌شوند.

شکل ۶ نمودار تفریق سه نمونه شاهد wild، mutant و heterozygote با ۲۵ نمونه سرطانی را نشان می‌دهد. در این نمودار تفریق، نمونه mutant به‌عنوان ژنوتیپ پایه قرار داده شده

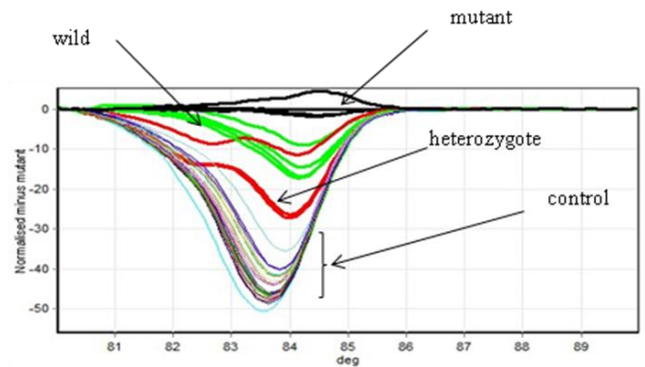
گستره دمایی برای منحنی ذوب Melt، از ۷۰ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد با دمایی raising ۰/۸ در نظر گرفته شده است. گراف منحنی ذوب HRMA در مقایسه با منحنی ذوب Melt، به‌علت دمایی raising پایین تفکیک بهتری را نشان می‌دهد.

برای بررسی و شناسایی نمونه‌های سرطانی، از سه نمونه wild، mutant و heterozygote (به‌صورت دوتایی یا سه‌تایی و یا بیشتر) به‌عنوان شاهد استفاده شد و سپس منحنی نمونه‌های سرطانی با نمونه‌های شاهد مقایسه و شناسایی شد. ابتدا شناسایی سه نمونه سرطانی با سه نمونه شاهد (به‌صورت دوتایی) مورد بررسی قرار گرفت تا شرایط شناسایی نمونه‌های سرطانی بر پایه نمونه‌های شاهد بهینه‌سازی شود. شکل (۵-الف)، نمودار معمولی (Normalised Graph) نمونه‌های شاهد wild، mutant و heterozygote و سه نمونه سرطانی را نشان می‌دهد. طبق این

شکلی در منحنی آن‌ها نسبت به نمونه‌های شاهد *wild* و *mutant* مشاهده می‌شود. و منحنی هر سه نمونه شاهد *wild* روی هم افتاده و شکل یکسانی دارند که این نتایج تایید کننده شناسایی صحیح نمونه‌ها است. در این نمودار منحنی نمونه‌های سرطانی (۲۴ نمونه) بر منحنی نمونه کنترلی *wild* منطبق هستند و در نتیجه همه نمونه‌های سرطانی (۲۴ نمونه) به‌عنوان ژنوتیپ *wild* شناسایی و دسته‌بندی می‌شوند.

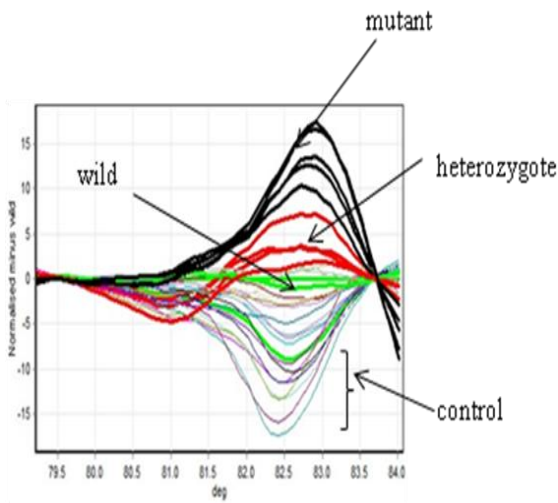
شکل‌های (۷-الف-ب-ج-د) نمودار تفریق نمونه‌های شاهد *wild*، *mutant*، *heterozygote* و نمونه‌های سرطانی را نشان می‌دهد. در سه شکل زیر که در هر شکل یک نوع نمونه شاهد به‌عنوان ژنوتیپ پایه قرار گرفته است، گراف‌های هر سه نوع شاهد کاملاً از هم تفکیک شده و قابل شناسایی هستند و شکل خاص خودشان را دارند. طبق هر سه شکل کاملاً مشهود است که منحنی نمونه‌های سرطانی (۲۴ نمونه) به منحنی نمونه‌های شاهد *wild*، شبیه و نزدیک است. از این ۲۴ نمونه سرطانی، چند نمونه در آزمایش قبلی در نمودار تفریق شکل ۳ بررسی شده بودند و در هر دو آزمایش هم *wild* شناسایی شدند.

است و سپس دو نمونه شاهد دیگر و نمونه‌های سرطانی بر پایه آن شناسایی شده‌اند. طبق شکل، منحنی همه نمونه‌های سرطانی شبیه منحنی نمونه شاهد *wild* می‌باشد پس همه این نمونه‌های سرطانی، *wild* شناسایی می‌شوند.

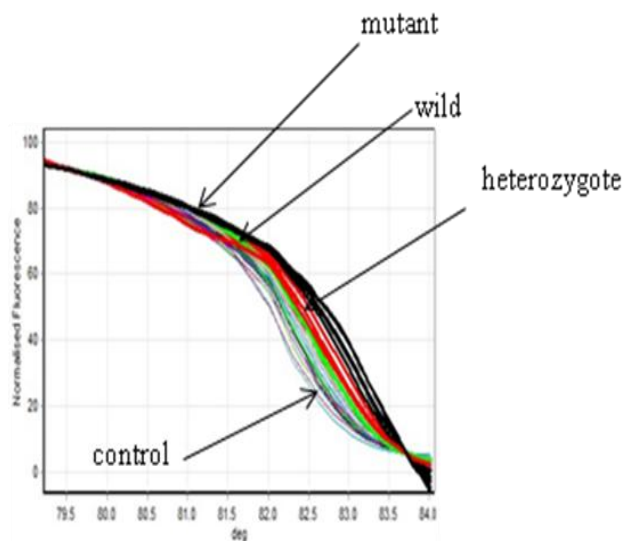


شکل ۶- نمودار تفریق نمونه‌های شاهد و ۲۵ نمونه سرطانی بر پایه ژنوتیپ *mutant*

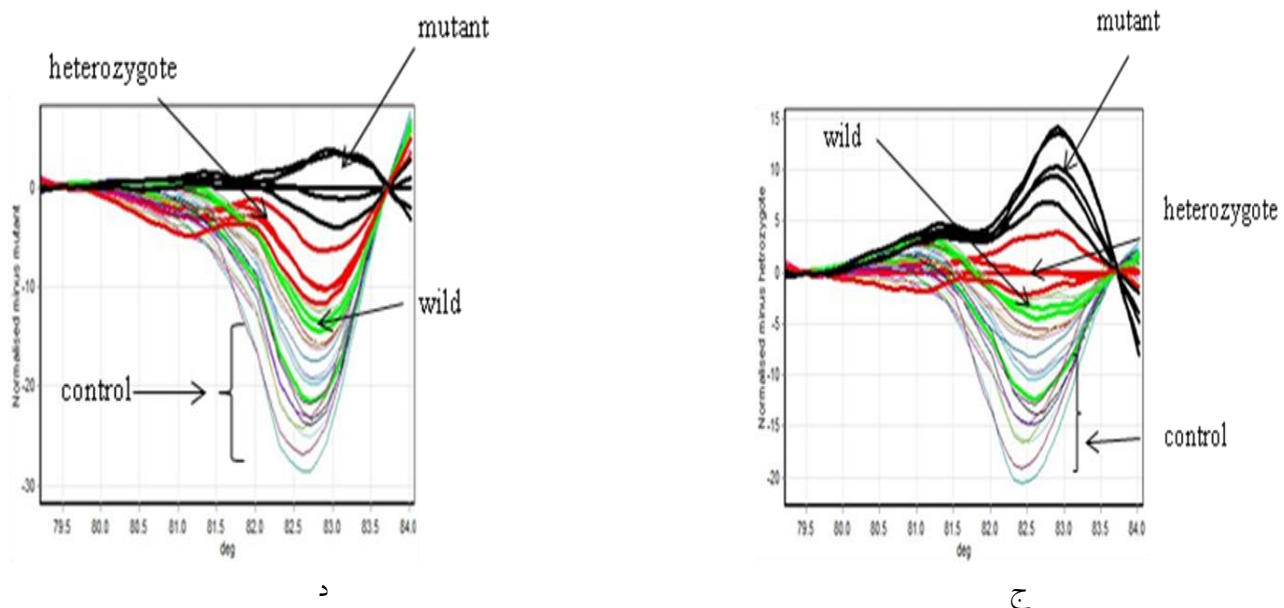
شکل (۷-الف) نمودار معمولی نمونه‌های شاهد *wild*، *mutant*، *heterozygote* و ۲۴ نمونه سرطانی را نشان می‌دهد. در این نمودار منحنی‌های هر پنج نمونه شاهد کاملاً هم‌شکل و بر هم منطبق هستند. و در مورد نمونه‌های شاهد *heterozygote*، هم منحنی چهار نمونه *heterozygote* یکسان هستند و یک تغییر



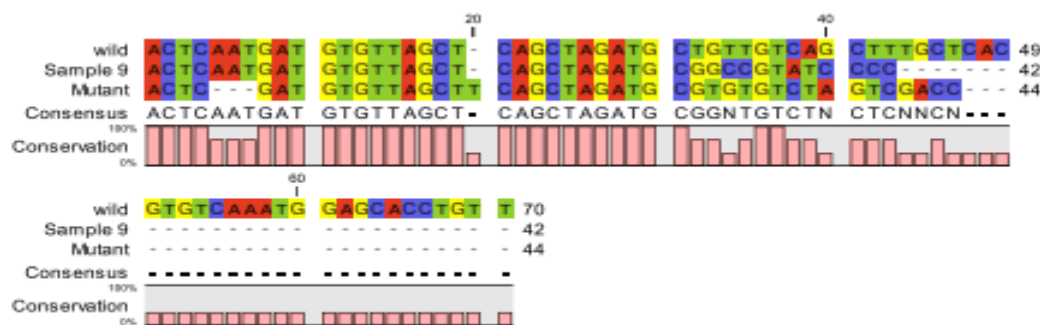
ب



الف



شکل ۷- نمودارهای نمونه‌های شاهد و ۲۴ نمونه سرطانی. الف. نمودار معمولی نمونه‌های شاهد و ۲۴ نمونه سرطانی ب. نمودار تفریق نمونه‌های شاهد و ۲۴ نمونه سرطانی بر پایه wild. ج. نمودار تفریق نمونه‌های شاهد و ۲۴ نمونه سرطانی بر پایه mutant. د. نمودار تفریق نمونه‌های شاهد و ۲۴ نمونه سرطانی بر پایه heterozygote.



شکل ۸- هم‌ترازسازی دو نمونه شاهد wild, mutant و نمونه سرطانی

روش‌های دیگر پویش جهش (Scanning)، برای غربال تفاوت‌ها بین دو کپی DNA در یک فرد توسعه یافته است. این روش‌ها شامل^۱ DGGE, SSCP،^۲ DHPLC،^۳ TGCE^۴ و اسپکتروسکوپی جرمی هستند. همه این روش‌ها نیاز به جداسازی نمونه بر روی ژل یا ماتریکس‌های دیگر دارند. نمایش فلورسانس نمایه دمایی محصول PCR، جایگزین دیگری برای توالی‌یابی DNA است که امکان شناسایی جهش‌های DNA در محلول را می‌دهد که نیازی به جداسازی بر روی ژل را ندارد. روش‌های فلورسانتی و

شکل ۸ نتایج هم‌ترازسازی (Alignment) سه نمونه wild, mutant و یک نمونه سرطانی را نشان می‌دهد، همان‌طور که در شکل مشخص است نمونه wild دارای توالی AAT می‌باشد و نمونه mutant فاقد این توالی است و طبق این هم‌ترازسازی همچنین نمونه سرطانی ژنوتیپ wild شناخته شد.

بحث

توالی‌یابی DNA، به‌عنوان روش «استاندارد طلایی» برای پویش توالی (Scanning) جهش شناخته شده و ناشناخته در نظر گرفته می‌شود، ولی روشی نسبتاً گران، دشوار و زمان‌بر می‌باشد. بیشتر

¹ Single-Strand Conformational Polymorphism Analysis

² Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

³ Denaturing High Performance Liquid Chromatography

⁴ Temperature Gradient Capillary Electrophoresis

اختصاصیت بالا و بسیار مناسب برای غربالگری جهش می‌باشد (Henry et al. 2015).

ناپایداری ریزماهواره‌ای (MSI) نشانگر مهمی برای غربالگری HNPCC (لینچ‌سندرم) و همچنین نشانگر تشخیصی برای سرطان کولورکتال تک‌گیر می‌باشد. رایج‌ترین روش‌های شناسایی MSI، الکتروفورزموتین فلورسنسی و DHPLC می‌باشد که هر دو روش مزیت‌ها و عیب‌هایی دارند. HRMA، روش جدیدی است که عیب‌های اصلی دو روش الکتروفورزموتین فلورسنسی و DHPLC را ندارد. در مطالعه‌ای کاربرد HRMA برای شناسایی MSI در ۷۰ نمونه پارافینه CRC انجام گرفت و توانایی HRMA دو دستگاه LightCycler-480 و Light Scanner مقایسه شد. و همچنین اختصاصیت و حساسیت این روش در دو دستگاه ذکر شده با نمونه‌های شناخته شده با MSI مثبت و نمونه‌های CRC پایدار ماهواره‌ای (Microsatellite-Stable CRC) بررسی شد. همه نمونه‌های MSI مثبت در هر دو دستگاه با حساسیت ۱۰۰ درصد شناسایی شده و اختصاصیت آن‌ها در دو دستگاه LightCycler-480 و Light Scanner به ترتیب ۹۹/۱٪ و ۹۲/۳٪ بود. بنابراین روش تجزیه و تحلیل HRM به‌عنوان روش مؤثر شناسایی MSI در نمونه‌های کلینیکی (بالینی) کاربرد دارد (Janavicius et al. 2010). در مطالعه‌ای دیگر شناسایی تغییرات ژنتیکی جدید در ژن‌های *MSH2*، *MLH1* و *MSH6* در بیماران مشکوک به لینچ سندرم (HNPCC) با روش HRMA و IHC^۱ مورد بررسی قرار گرفته و برای تایید نتایج HRMA از روش تعیین توالی مسقیم استفاده شده است. ۶۶ بیمار مورد مطالعه بوده است که در بررسی با روش HRMA، در سه بیمار جهش حذفی جدید در *MSH2* و در یک بیمار جهش بی‌معنی در *MLH1* گزارش شده است و گزارش این جهش‌ها در روش IHC به ترتیب به صورت بیان نشدن پروتئین *MSH2* و بیان ضعیف پروتئین *MLH1* و *PMS2* بوده است. در این مطالعه گزارش می‌شود که HRMA روشی سریع، ارزان و توانمند برای شناسایی جهش‌های نقطه‌ای و حذفی کوچک در ژن‌های MMR هست اما تاکید می‌کند که برای شناسایی جهش‌های حذفی بزرگتر و بی‌نظمی‌های کروموزومی روش HRMA به تنهایی کافی نیست و بلکه باید از روش‌های

براساس پروب مثل هیبریداسیون دوگانه، کاوشگرهای اگزونوکلئازی (TaqMan) یا کاوشگرهای سنساق‌سری (بیکون مولکولی) برای شناسایی جهش کاربرد دارند اما فقط بازه‌هایی که با کاوشگر پوشش داده شده‌اند را شناسایی می‌کنند و بنابراین این روش‌ها برای پوشش (Scanning) جهش کارایی ندارند، چرا که پوشش جهش مستلزم روش‌هایی است که بتواند جهش‌ها را در سرتاسر نواحی بزرگتر شناسایی کند. بنابراین بعضی از روش‌های فوق به صورت اتوماتیک عمل نمی‌کنند و زحمت بالایی را می‌طلبند در حالی که سایر روش‌ها پیچیده، گران و مستلزم تجهیزات اختصاصی هستند (Li et al. 2015).

برخلاف روش‌های ذکر شده در بالا، HRMA روش مفیدی برای ارزیابی تنوع توالی است. ساده و ارزان بودن، حساسیت، اختصاصیت و دقت بالا ویژگی‌های بسیار خوبی هستند که HRMA را به‌عنوان ابزار جدید و جالبی برای کاربرد در آزمایشگاه‌های تشخیصی و تعیین ژنوتیپ تبدیل کرده است. این روش قدرت ژنوتایپینگ جهش شناخته شده و پوشش جهش ناشناخته را دارد. و روش مبتنی بر PCR می‌باشد که در غربالگری جهش سرطانی کاربرد دارد (Henry et al. 2015; Vossen et al. 2009) حساسیت و اختصاصیت HRMA به رنگ، دستگاه و نرم‌افزار مورد استفاده بستگی دارد (Erali et al. 2010). در مطالعه‌ای غربالگری جهش در سرطان معده و کولورکتال با روش HRMA بر روی DNA استخراجی از بافت پارافینه سرطانی و رده‌های سلولی سرطان کولورکتال و بافت سالم با استفاده از دو دستگاه ABI 7500 real-time PCR و LightScanner انجام گرفت و تجزیه و تحلیل داده‌های HRMA هم با نرم‌افزارهای ABI HRM software v2.0.1 و Call-IT 2.5 LightScanner انجام شد. در این مطالعه دقت و صحت، حساسیت و اختصاصیت ABI 7500 HRM نسبت به LightScanner در غربالگری جهش مورد بررسی قرار گرفت. دقت، حساسیت و اختصاصیت ABI 7500 HRM در مقایسه با LightScanner بسیار مناسب بود و همچنین برای LightScanner هم ایده‌آل بود؛ برعکس قدرت تفکیک در نرم‌افزار Call-IT 2.5 LightScanner بالاتر از ABI HRM Software v2.0.1 بود در این مطالعه نشان داده شد که HRMA، روشی با دقت، حساسیت و

¹ Immunohistochemistry

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، روش HRMA را می‌توان به‌عنوان یک روش غربال‌گری مناسب برای جهش‌های شناخته شده در بیماری‌ها معرفی کرد بنابراین، با به‌کارگیری این روش می‌توان از ابتلای افراد مستعد به سرطان کلورکتال ارثی HNPCC پیشگیری کرد. روش HRMA مزیت‌های زیادی دارد از قبیل:

- نسبت به روش‌های تشخیصی دیگر با هزینه کمتری قدرت تکرار پذیری بالایی دارد.
- در صورت بهینه‌سازی صحیح شرایط آماده‌سازی نمونه‌های شاهد و سرطانی (مجهول) و تکرار آزمایش برای هر نمونه، روش HRMA از دقت بالایی برخوردار بوده و قابل اعتماد است.
- روش بسیار سریعی است (برای نمونه‌گیری، استخراج DNA و انجام HRMA زمان بسیار کمی نیاز است).
- آلودگی در این روش بسیار کم است چون همه مراحل در داخل یک لوله کوچک انجام می‌گیرد.
- روش بسیار حساسی است در این روش همه نمونه‌ها (شاهد و سرطانی) باید در شرایط یکسان آماده شوند چون این مورد در شناسایی نمونه‌های شاهد و سرطانی مؤثر است و احتمال دارد نمونه‌ها اشتباه شناسایی شوند.
- در روش HRMA، تجزیه و تحلیل نتایج بسیار مهم و تاثیرگذار است.

منابع

Amersi F, Agustin M and Y Ko (2005) Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Health Service. Clinics in Colon and Rectal Surgery 18:3

Buerstedde J-M, Alday P, Torhorst J, Weber W, Muller H, Scott R (1995) Detection of new mutations in six out of 10 Swiss HNPCC families by genomic sequencing of the hMSH2 and hMLH1 genes. Journal of Medical Genetics 32: 909-912.

Chen D, Wang YY, Chuai ZR, Huang JF, Wang YX, Liu K, Zhang LQ, Yang Z, Shi D.Ch, Liu Q, Hung Q, Fu WL (2014) High-Resolution Melting Analysis for accurate detection of BRAF mutations :a systematic review and metaanalysis. Scientificreports 4: 4168.

Desai DC, Lockman JC, et al (2000) Recurrent germline mutation in MSH2 arise frequently de novo. Journal of Medical Genetics 37: 646-652.

Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, French AJ, Westra J, Frebourg T, Espi'n E, Armengol M, Hamelin R, Yamamoto H, Hofstra RM W, Seruca R, Lindblom A, Peltoma kiP, Thibodeau SN, Aaltonen LA,

MLPA و array-CGH استفاده شود (Mazurek et al. 2012). طبق مقاله‌های یاد شده در بالا، HRMA روش حساسی است و عوامل مختلفی مثل نوع دستگاه، نحوه‌ی تجزیه و تحلیل نتایج، نوع رنگ، نرم‌افزار مورد استفاده و غیره می‌تواند بر نتیجه تاثیر بگذارد بنابراین در بیشتر موارد در کنار روش HRMA از روش‌های دیگری برای تایید نتایج HRMA استفاده می‌شود یا اینکه با روش‌های دیگر آزمایش‌هایی انجام شده و نتایج مشخص شده است و فقط برای بررسی حساسیت و اختصاصیت HRMA، از این روش برای بررسی دوباره آزمایش استفاده شده‌است.

در این تحقیق بررسی میزان جهش حذفی AAT در آگزون ۱۲ ژن *MSH2* (یکی از ژن‌های درگیر در ایجاد سرطان) که بر روی کروموزم ۲ انسانی قرار دارد، در بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال بررسی شد. سرانجام با مقایسه منحنی هر نمونه در آزمایش‌های مختلف همه ۵۰ نمونه سرطانی با ژنوتیپ wild (فاقد جهش حذفی AAT) شناسایی و گزارش شدند. در برخی موارد برای تایید نتایج از روش توالی‌یابی مستقیم DNA، استفاده شد. در این تحقیق از روش HRMA به‌عنوان روش اصلی استفاده شده و از تکرار آزمایش و تکرار نمونه‌ها برای تایید آزمایش استفاده شده است.

Schwartz SJr (2004) BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic. Journal of Medical Genetics 41:664-668.

Erali M, Wittwer CT (2010) High resolution melting analysis for gene scanning. Methods 50:250-61.

Ewing I, Hurley JJ, Josephides E, Millar A (2014) The molecular genetics of colorectal cancer. Frontline Gastroenterology 5: 26-30.

Janavicius R, Dovile Matiukaite Arturas Jakubauskas, Laimonas Griskevicius (2010) Microsatellite Instability Detection by High-Resolution Melting Analysis. Clinical Chemistry 56(11).

Janavicius R, Matiukaite D, Jakubauskas A and Griskevicius L (2010) Microsatellite Instability Detection by High-Resolution Melting Analysis. Clinical Chemistry 56:1750-1757.

Josep J. Centelles (2012) General Aspects of Colorectal Cancer. International Scholarly Research Network ISRN Oncology Henry OE and M Ilyas (2015) Cancer mutation screening: Comparison of high-resolution melt analysis between two platforms. Ecancer 9:522.

- Hsieh P (2001) Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutation Research* 486: 71-87.
- Kashfi SMH, Golmohammadi M, Behboudi F, Nazemalhosseini-Mojarad E, Zali M R (2014) MUTYH the base excision repair gene family member associated with colorectal cancer polyposis. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 6:1-10
- Kheirelseid EAH, Miller N, Kerin MJ (2013) Molecular biology of colorectal cancer: Review of the literature. *American Journal of Molecular Biology* 3: 72-80.
- Kunzelmann K, Nitschke R (2000) Defects in processing and trafficking of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Exp. Nephrol* 8: 332-342.
- Labianca R, Nordlinger B, G D Beretta, Brouquet A and Cervantes A (2010) Primary colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 21:70-77.
- Li BS, Wang XY, Ma FL, Jiang B, Song XX, et al (2011) Is High Resolution Melting Analysis (HRMA) Accurate for Detection of Human Disease Associated Mutations? A Meta Analysis. *PLoS ONE* 6: e28078.
- Lynch H T, Lynch J (2000) Lynch syndrome: genetics, natural history, genetic counseling, and prevention. *Journal of Clinical Oncology*:18(21 Suppl): 19-31.
- Mazurek A, Fiszer-Kierzkowska A, Budryk M (2012) Identification of new genetic alterations in MLH1, MSH2 and MSH6 using IHC and HRM analysis in Lynch syndrome-suspected patients. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* 10 (Suppl 3):A11
- Mitchell RJ, Farrington SM, Dunlop MG, Campbell H (2002) Mismatch Repair Genes hMLH1 and hMSH2 and Colorectal Cancer: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology* 156: 885-902.
- Moslein G, Tester DJ, Lindor NM, Honchel R, Cunningham J M, French A J, Halling K C, Schwab M, Goretzki P and Thibodeau SN (1996) Microsatellite instability and mutation analysis of hMSH2 and hMLH1 in patients with sporadic, familial and hereditary colorectal cancer. *Human Molecular Genetics* 5:1245-1252.
- Mueller J, Gazzoli I, Bandipalliam P, Garber JE, Syngal S, and Kolodner RD (2009) Comprehensive Molecular Analysis of Mismatch Repair Gene Defects in Suspected Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) Cases. *Cancer Research* 69: 17
- Peltomaki P and Vasen H (2004) Mutations associated with HNPCC predisposition – Update of ICG-HNPCC/INSIGHT mutation database. *Disease Markers* 20: 269-276.
- Ripa RS, Katballe N, Wikman FP, Jager AC, Bernstein I, Qrntoft T, Schwartz M, Nielsen FC, Bisgaard ML (2005) Presymptomatic diagnosis using a deletion of a single codon in families with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Mutation Research* 570:89-96.
- Roper J and Hung KE (2013) Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer. Chapter 2 :Molecular Mechanisms of Colorectal C arcinogenesis. Springer Science.
- Shilpa V, Lakshmi K (2014) Molecular Mechanisms of Mismatch Repair Genes in Cancer – A Brief Review. *Journal Proteomics Genomics* 1:101
- Stintzing S (2014) Management of colorectal cancer. *F1000Prime Reports* 6(108).
- Stormorken AT, Müller W, Lindblom A, Heimdal K, Aase S, Lothe, IM Norèn T, Wijnen JT, Moslein G and Moller P (2003) The inframe MSH2 codon 596 deletion is linked with HNPCC and associated with lack of MSH2 protein in tumours. *Familial Cancer* 2: 9-13.
- Tarraga LPJ, Albero JS, Rodroguex-Montes JA (2014) Primary and secondary Prevention of Colorectal Cancer. *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology* 7:33-46.
- Teixeira Pinto PM (2009) Comparison of methodologies for KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer. Porto. Dissertação de Mestrado em Oncologia
- Teklemariam AD, Geleta G and Tassew A (2015) A Review on Gene Involved in Cancer Development and Oncogenic Viruses. *African Journal of Basic & Applied Sciences* 7: 223-232
- Vasen HFA, Moslein G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, Burn J, Capella G, Engel C, Frayling I, Friedl W, Hes FJ, Hodgson S, Mecklin JP, Moller P, Nagengast F, Parc Y, Sinisalo R, J Sampson R, Stormorken A, Wijnen J (2007) Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *Journal of Medical Genetics* 44:353-362.
- Vaughn CP, Lyon E, and Samowitz WS (2008) Confirmation of Single Exon Deletions in MLH1 and MSH2 Using Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Journal of Molecular Diagnostics* 10 (4).
- Vossen RH, Aten E, Roos A, den Dunnen JT (2009) High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Human Mutation* 30:860 –6.
- Whitehouse A, Deeble J, Taylor GR, Guillou PJ, Phillips SE, Meredith DM, Markham AF (1997) Mapping the minimal domain of hMSH-2 sufficient for binding mismatched oligonucleotides. *Biochemical Biophysical Research Communication* 232:10-13.
- Wijnen J, Khan PM, Vasen H, van der Klift H, Mulder A, van Leeuwen-Cornelisse I, Bakker B, Losekoot M, Moeller P, and Fodde R (1997) Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Families Not Complying with the Amsterdam Criteria Show Extremely Low Frequency of Mismatch-Repair-Gene Mutations. *American Journal Human Genetics* 61:329-335
- Worthley DL, Leggett BA (2010) Colorectal Cancer: Molecular Features and Clinical Opportunities. *The Clinical Biochemist Reviews* 31.