

# Validation of methylation-specific polymerase chain reaction method and evaluation of FMR1 gene pre-mutations in premature ovarian insufficiency

Fatemeh Afkhami<sup>1</sup> , Shirin Shahbazi<sup>1\*</sup> , Laya Farzadi<sup>2</sup> , Masoumeh Azizi<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Women's Reproductive Health Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>3</sup>Molecular Medicine Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

## ARTICLE INFO

### Article History:

Received: 5 Mar 2022

Accepted: 12 July 2022

ePublished: 29 Aug 2022

### Keywords:

- *FMR1* premutation
- Dynamic mutation
- Trinucleotide repeat expansion
- Fragile X-associated primary ovarian insufficiency
- Methylation-specific polymerase chain reaction

## Abstract

**Background.** Fragile X-associated premature ovarian insufficiency is clinically defined as a type of early ovarian failure with irregular menstrual cycles, increased follicle-stimulating hormone, premature menopause, and infertility. Genetically, the CGG trinucleotide repeat expansion in the 5'-untranslated region of the *FMR1* gene is recognized as a causative factor. The aim of this study was to standardize molecular detection methods and estimate the number of repeats among patients with premature ovarian insufficiency.

**Methods.** After obtaining a consent form and blood sampling, genomic DNA was extracted and treated with sodium bisulfite. The *FMR1* gene is located on X chromosome and one allele is methylated by X-inactivation. As a result, the methylation-specific polymerase chain reaction (MS-PCR) was performed using two pairs of specific primers for methylated and non-methylated DNA yielding the products of 108+3n and 168+3n bp, respectively. Following clinical evaluations, 20 sporadic patients and two families with at least two patients were studied.

**Results.** The mean level of follicle-stimulating hormone was 85.45±44.73UI/L in sporadic and 75.72±33.61UI/L in familial cases. Ultrasound examinations reported atrophic ovaries in sporadic and familial cases by 80% and 75%, respectively. The evaluation of the trinucleotide repeat expansions on agarose gels showed that two sporadic patients were carriers of *FMR1* intermediate alleles (10%). No cases of pre-mutation or full mutation were observed in other sporadic or familial cases and the trinucleotide repeat expansions were estimated between 15 and 35.

**Conclusion.** Due to the role of the *FMR1* gene trinucleotide repeat expansion in women with premature ovarian insufficiency, a fast and cost-effective molecular detection method is of particular importance. This test will be beneficial not only in ovarian dysfunction, but also to identify pre-mutations that may expand in next generations leading to fragile X syndrome.

**Practical Implications.** In young women, the detection of expanded CGG trinucleotide repeats in the 5'-untranslated region of the *FMR1* gene along with genetic counseling will provide them to plan reproductive life.

**How to cite this article:** Afkhami F, Shahbazi Sh, Farzadi L, Azizi M. Validation of methylation-specific polymerase chain reaction method and evaluation of FMR1 gene pre-mutations in premature ovarian insufficiency. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2022;44(4):317-330. doi: 10.34172/mj.2022.032. Persian.

\*Corresponding author; Email: sh.shahbazi@modares.ac.ir

© 2022 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## Extended Abstract

### Background

Fragile X-associated premature ovarian insufficiency (POI) is clinically defined as a early ovarian failure with irregular menstrual cycles, increased follicle-stimulating hormone (FSH), premature menopause, and infertility. Genetically, the CGG trinucleotide repeat expansion in the 5'-untranslated region of the *FMR1* gene is recognized as a causative factor. The numbers of CGG repeats less than 54 are considered normal with an average of 29 in healthy individuals. Expansion of the repeats between 55 and 199 is known as pre-mutation, which leads to POI in women. In more detailed classifications, 41-54 repeats are considered as gray or intermediate zone. Studies on the carriers of the intermediate alleles showed an increased risk of POI. It has been reported that one third of these patients experience premature menstruation at the age of 30. The aim of this study was to standardize molecular detection methods and estimation of the repeats among patients with POI.

### Methods

A total of 20 women with POI (sporadic cases) and two families with at least two affected individuals were selected. The inclusion criteria were primary or secondary amenorrhea before the age of 40 with normal karyotype and two FSH test results above 25 IU/L. Five ml peripheral blood was collected in ethylenediaminetetraacetic acid solution from patients and their family members. Genomic DNA was extracted by salting out method and treated with sodium bisulfite. In this study, we used two different methods of bisulfite treatment in the standardization stages of the methylation-specific polymerase chain reaction (MS-PCR). The *FMR1* gene is located on X chromosome and one allele is methylated by X-inactivation. As a result, the MS-PCR reactions were performed using two pairs of specific primers for methylated and non-methylated DNA yielding the products of  $108+3n$  and  $168+3n$  bp, respectively. Initial study of assay optimization was provided by control samples as follows: 1) treated DNA of a normal woman previously confirmed by clinical molecular tests, 2) sample of a pre-mutation carrier

woman previously confirmed by clinical molecular tests, and 3) untreated DNA sample of a normal female. Amplification of PCR fragments and their sizes were checked on 1% agarose gel in comparison with 50 bp DNA marker and pre-mutation carrier control sample. Demographic and clinical data of patients were collected using questionnaires and medical records, and descriptive statistics including mean, standard deviation, and frequency were calculated using SPSS version 16.

### Results

The mean level of FSH was  $85.45 \pm 44.73$  UI/L in sporadic and  $75.72 \pm 33.61$  UI/L in familial cases. Ultrasound examinations reported atrophic ovaries in sporadic and familial cases by 80% and 75%, respectively. The accuracy of two bisulfite treatment methods was confirmed and no difference was observed between the two procedures. In normal women, the evaluation of the *FMR1* gene trinucleotide repeat expansions on agarose gels showed methylated-PCR and non-methylated-PCR products in the range of 126-273bp and 186-333bp, respectively. We estimated these normal trinucleotide repeat expansions between 15 and 35 repeats. Our results indicated two carriers of *FMR1* intermediate alleles (10%) in sporadic patients. The MS-PCR of the first patient revealed 45-47 repeats in both alleles. Clinical investigations showed that a 23-year-old woman suffered from secondary amenorrhea since the age of 17. The FSH and anti-mullerian hormone (AMH) levels were reported as 46.6 UI/L and 0.8 UI/L, respectively. In ultrasound, the patient's ovaries were found to be smaller than normal. The second patient was a 24-year-old woman who had normal menstruation at the age of 13. After a few years, she experienced menstrual irregularities and finally secondary amenorrhea at the age of 20, and was diagnosed with POI. The test results showed that the patient's FSH increased above 50 UI/L and the AMH level was reported at 0.01 UI/L. Sonographic examinations showed that both ovaries had degrees of atrophy and were smaller than normal size. The results of MS-PCR gel electrophoresis of this patient showed alleles of the

20 and 54 repeats. Further analysis confirmed skewed X-inactivation of the intermediate allele, since methylated-PCR led to a unique band of 54 repeats and non-methylated-PCR led to a unique band of 20. In other sporadic or familial samples, no cases of pre-mutation or full mutation were observed.

### Conclusion

Pre-mutation of CGG repeats in the promoter regions of *FMRI* gene, with an incidence of 1: 200 women, is known as the most significant genetic factor associated with POI, which is seen in about 8%

of sporadic and up to 13% of familial cases. Due to these evidences, a fast and cost-effective molecular detection method is of particular importance. The test will be beneficial not only in ovarian dysfunction, but also to identify pre-mutations that may expand in next generations leading to fragile X syndrome. In young women, the detection of expanded CGG trinucleotide repeats in the 5'-untranslated region of the *FMRI* gene along with genetic counseling will provide them to plan reproductive life.

## اعتبارسنجی MS-PCR و تعیین پیش جهش ژن FMR1 در نارسایی زودرس تخمدان

فاطمه افخمی<sup>۱</sup>، شیرین شهبازی<sup>۱\*</sup>، لعلیا فرزندی<sup>۲</sup>، معصومه عزیزی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات سلامت باروری زنان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران  
<sup>۳</sup> بخش پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

### اطلاعات مقاله

#### سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۴  
پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۲۱  
انتشار برخط: ۱۴۰۱/۶/۷

#### کلیدواژه‌ها:

- پیش جهش FMR1
- جهش دینامیک
- بسط تکرار سه تایی
- نارسایی زودرس تخمدان
- وابسته به ایکس شکننده
- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز اختصاصی متیلاسیون

### چکیده

**زمینه.** نارسایی زودرس تخمدان وابسته به ایکس شکننده از نظر بالینی به عنوان نوعی از نارسایی اولیه تخمدان با چرخه‌های قاعدگی نامنظم، افزایش سطح هورمون محرک فولیکول، یائسگی زودرس و ناباروری تعریف شده است. از نظر ژنتیکی عامل آن پیش جهش تکرار CGG ناحیه ۵'-ترجمه نشده ژن FMR1 می‌باشد. هدف این مطالعه استاندارد سازی روش‌های مولکولی و مقایسه تعداد تکرار CGG ژن FMR1 در بیماران نارسایی زودرس تخمدان بود.

**روش کار.** پس از اخذ رضایت و خونگیری، DNA ژنومی استخراج و به دو روش دستی و کیت با سدیم بی‌سولفیت تیمار شد. با استفاده از دو جفت پرایمر اختصاصی، DNA متیله شده و DNA غیرمتیله با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز اختصاصی متیلاسیون تکثیر و محصولات به ترتیب به ترتیب ۳n + ۱۰۸ و ۳n + ۱۶۸ جفت باز بر روی ژل آگارز آشکار شد. پس از ارزیابی‌های بالینی ۲۰ بیمار مبتلا به فرم تک‌گیر و ۲ خانواده با حداقل دو فرد مبتلا مورد مطالعه قرار گرفتند.

**یافته‌ها.** متوسط سطح سرمی هورمون محرک فولیکول در موارد تک‌گیر  $45/80 \pm 44/73$  UI/L و در موارد خانوادگی  $61/33 \pm 72/70$  UI/L بود. بررسی‌های سونوگرافیک در موارد تک‌گیر و موارد خانوادگی به ترتیب ۸۰ درصد و ۷۵ درصد تخمدان‌های آتروفیک را گزارش کرد. صحت تیمار بی‌سولفیت DNA در هر دو روش دستی و کیت تأیید شد، و تفاوتی بین دو روش مشاهده نشد. نتایج بررسی تعداد تکرارها بر روی ژل آگارز نشان داد دو بیمار در بین موارد تک‌گیر (۱۰ درصد) ناقل الل اینترمدیته FMR1 بودند. هیچ موردی از پیش جهش و یا جهش کامل در موارد تک‌گیر یا خانوادگی مشاهده نشد، و تعداد تکرارها در آن‌ها بین ۱۵ تا ۳۵ تخمین زده شد.

**نتیجه‌گیری.** به دلیل نقش ژن FMR1 در عملکرد تخمدان، بررسی آن از اهمیت برخوردار است استانداردسازی یک روش تشخیص مولکولی سریع و مقرون به صرفه از اولویت‌ها در این زمینه می‌باشد.

**پیامدهای عملی.** تعیین تکرار CGG ناحیه ۵'-ترجمه نشده ژن FMR1 و شناسایی پیش جهش‌هایی که ممکن است گسترش یافته و منجر به سندرم ایکس شکننده شوند در میان زنان جوان امکان مشاوره ژنتیکی لازم برای برنامه‌ریزی زندگی باروری را فراهم می‌کند.

### مقدمه

عوامل مختلف محیطی و ژنتیکی می‌توانند در بروز این بیماری دخالت داشته باشند. شایع‌ترین علت تک ژنی ابتلا به POI تغییر پیش‌جهش ژن Fragile X mental retardation 1 (FMR1) می‌باشد که به عنوان نارسایی زودرس تخمدان وابسته به سندرم ایکس شکننده یا FXPOI (Fragile X-associated premature ovarian insufficiency) دسته‌بندی می‌شود.<sup>۲</sup> ژن FMR1 بر روی کروموزوم ایکس واقع شده است، و دارای یک ناحیه تکرار سه نوکلئوتیدی در ۵' غیر ترجمه شونده پروموتور می‌باشد. جهش دینامیک و بسط

نارسایی زودرس تخمدان یا Premature ovarian insufficiency (POI) به حداقل ۴ ماه فقدان قاعدگی در خانم‌های زیر ۴۰ سال اطلاق می‌شود. این بیماری با دو سطح سرمی هورمون محرک فولیکول یا Follicle-stimulating hormone (FSH) در محدوده سطوح یائسگی که حداقل در فاصله ۱ ماه اندازه‌گیری شده باشند، تأیید می‌گردد. علائم شایع POI شامل سیکل‌های نامنظم یا فقدان قاعدگی، کاهش باروری، ناباروری، گرگرفتگی و دیگر علائم و عوارض یائسگی است که به طور زودرس رخ می‌دهند.<sup>۱</sup>

\*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: sh.shahbazi@modares.ac.ir

حق تالیف برای مولفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

Lyonization یا غیر فعال شدن کروموزوم ایکس (X-Inactivation) متیله و خاموش می‌شود. به طور طبیعی خاموش شدن ایکس‌ها به صورت تصادفی و با درصد برابر اتفاق می‌افتد. در صورتی که خاموش شدن کروموزوم ایکس به صورت غیر تصادفی یا Skewed رخ دهد، می‌تواند سن شروع و شدت FXPOI را مانند سایر اختلالات کروموزوم ایکس در زنان، تحت تأثیر قرار دهد. هر دوی این وضعیت‌ها می‌توانند دستخوش حالت موزائیسیم باشند که بر پیچیدگی تشخیص‌های مولکولی FXPOI افزوده است.<sup>۹</sup>

آنالیز متیلاسیون DNA به روش بی‌سولفیت فناوری استاندارد با کارآمدی و دقت بالا حتی برای شناسایی یک جفت باز ۵-میتیل سیتوزین می‌باشد. با این حال تخریب وسیع DNA در طول تیمار با بی‌سولفیت، تبدیل ناکامل سیتوزین به یوراسیل و وجود ۵-میتیل سیتوزینهای غیرواکنشی ممکن است منجر به نتایج ناموفق و مثبت کاذب شوند. بنابراین حصول نتایج موفقیت‌آمیز نیاز به پروتکل با حساسیت و دقت بالا و استانداردسازی دقیق دارد.<sup>۱۰</sup> واکنش زنجیره‌ای پلیمرز اختصاصی متیلاسیون Methylation Specific Polymerase Chain Reaction (MS-PCR) و آنالیز ساترن بلات برای تشخیص اندازه تکرار و شناسایی حذف‌های احتمالی *FMRI* به طور متداول استفاده می‌شوند. مطالعات نشان داده که روش MS-PCR دارای مزیت هزینه کمتر بوده و می‌تواند اندازه تکرار را در محدوده طبیعی، اینترمدیت و پیش‌جهش ارائه دهد، البته فاقد قدرت کافی در تشخیص اندازه تکرارهای طولانی‌تر است. تخمین زده شده است که تقریباً ۸۰٪ از زنان تنها با یک آزمایش استاندارد MS-PCR با موفقیت غربالگری می‌شوند، در حالی که ۲۰٪ نیاز به آنالیز ساترن بلات برای شناسایی الگوی موزائیکی پیش‌جهش و یا جهش کامل دارند.<sup>۱۱</sup>

با توجه به اهمیت بیماری POI در تشخیص‌های ناباروری و سلامت زنان و پیچیدگی‌های تشخیص مولکولی این بیماری، در این مطالعه ما بر آن شدیم که با مقایسه روش‌های مختلف تیمار بی‌سولفیت، مراحل استانداردسازی روش MS-PCR را جهت حصول بهترین نتایج انجام دهیم و روش استانداردشده را در نمونه‌های بالینی، ارزیابی کنیم.

### روش کار نمونه‌گیری:

در این مطالعه پس از تأیید کمیته اخلاق با کد اخلاق IR.MODARES.REC.1399.006 و کسب رضایت آگاهانه (مطابق با مصوبات کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس) ۲۰ خانم مبتلا به POI (موارد تک‌گیر) و ۲ خانواده با حداقل دو فرد مبتلا (موارد

تکرار سه نوکلئوتیدی CGG می‌تواند فنوتیپ‌های متفاوتی را ایجاد کند که در سه گستره پلی‌مورفیک طولی دسته‌بندی می‌شوند: تعداد تکرار CGG کمتر از ۵۴ طبیعی بوده به صورتی که افراد سالم به طور متوسط واجد ۲۹ تکرار می‌باشند. بسط تعداد تکرارها بین ۵۵ تا ۱۹۹ به عنوان پیش‌جهش شناخته می‌شود که منجر به بیماریهای FXPOI در زنان و سندرم آتاکسی/ترمور مرتبط با ایکس شکننده (Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS در مردان می‌شود. دسته‌بندی سوم شامل تکرارهای بالای ۲۰۰ می‌باشد که به آن جهش کامل *FMRI* اطلاق می‌شود. در این حالت عدم رونویسی از روی ژن *FMRI* و در نتیجه عدم تولید Fragile X mental retardation protein (FMRP) منجر به بیماری سندرم ایکس شکننده یا Fragile X syndrome (FXS) با شیوع ۱ در ۴۰۰۰ مرد و ۱ در ۸۰۰۰ زن می‌گردد. از مشخصات این بیماری کم‌توانی ذهنی خفیف تا متوسط و اختلالات شناختی می‌باشد.<sup>۳</sup> مشخص شده افراد واجد تکرارهای پیش‌جهش، به دلیل ناپایداری تعداد تکرارهای CGG مستعد انتقال بیماری FXS به نسل بعد هستند. نکته حائز اهمیت این است که زنان با آلل‌های جهش کامل که در آنها ژن *FMRI* بیان نمی‌شود و نتیجتاً FMRP تولید نمی‌گردد، در معرض خطر POI نیستند که دال بر نقش *FMRI*-mRNA در پاتوژنز بیماری است.<sup>۴</sup>

در تقسیم‌بندی‌های دقیق‌تری که برای FXPOI انجام شده، تکرارهای بین ۴۱-۵۸، ۴۵-۵۴ و یا ۴۱-۶۰ به عنوان منطقه خاکستری یا اینترمدیت در نظر گرفته شده‌اند.<sup>۵، ۶</sup> برخی تحقیقات در مورد سن یائسگی در ناقلین آلل‌های اینترمدیت *FMRI* نشان داد که این افراد نیز مانند ناقلین آلل پیش‌جهش در معرض افزایش خطر POI هستند به صورتی که تقریباً ۲۰ درصد از کل این خانم‌ها، دچار POI می‌شوند و یک سوم این افراد قبل از ۳۰ سالگی قطع‌نهایی قاعدگی را تجربه می‌کنند.<sup>۷</sup> البته مطالعه جدیدی با حجم نمونه ۱۶۶۸، ریسک خطر POI را مشخصاً برای تعداد تکرارهای ۶۵ به بالا با بیشترین احتمال ابتلا برای تکرارهای ۸۵-۸۹ شناسایی کرده است.<sup>۸</sup> باید توجه داشت که FXPOI با یک الگوی غالب وابسته به ایکس به ارث می‌رسد. این بدان معناست که زنانی که حتی در یک نسخه از ژن‌های *FMRI* خود دارای تکرارهای در محدوده ریسک هستند، در معرض خطر ابتلا به FXPOI قرار می‌گیرند.<sup>۱</sup>

تشخیص مولکولی اختلالات مرتبط با ژن *FMRI* مبتنی بر ارزیابی دو عامل تعداد تکرارها و وضعیت متیلاسیون طراحی می‌گردد. بررسی متیلاسیون به علت قرارگیری ژن *FMRI* بر روی کروموزوم ایکس است که یکی از آلل‌ها از طریق پدیده



کاهش تبخیر، روغن معدنی بر روی محلول DNA حاصل از دو مرحله قبل اضافه و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ تا ۱۶ ساعت در محیط تاریک انکوباسیون قرار داده شد. DNA بی‌سولفیت شده، در آب دیونیزه حل شد و برای دسولفینه شدن DNA، NaOH ۳ مولار به محلول اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. برای رسوب DNA، آمونیوم استات ۵ مولار، اتانول مطلق و ایزوپروپانول اضافه و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ تا ۴ ساعت قرار داده شد. در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه با بالاترین سرعت سانتریفیوژ انجام و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب DNA با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد، و در نهایت اتانول رویی با دقت خارج و DNA حاصل در دمای محیط به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و با بافر TE یا آب دیونیزه حل شد.

#### تیمار DNA ژنومی با سدیم بی‌سولفیت با استفاده از کیت تجاری:

در این روش از کیت EpiTect Bisulfite Kits (QIAGEN) استفاده شد. برای تیمار DNA به روش کیت حدود ۱/۵ میلی‌گرم از DNA استخراج شده تا حجم ۲۰ میکرولیتر به تیوب‌های PCR منتقل شد. سپس میکس بی‌سولفیت و بافر DNA protect به آن اضافه و برای چند ثانیه مخلوط شد. بعد از آماده‌سازی، تیوب‌های PCR در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی که در کیت ذکر شده بود قرار داده شدند. در مرحله بعد، به طور جداگانه به هر یک از میکروتیوب‌ها بافر BL اضافه و سانتریفیوژ شد. در ادامه، ستون‌های EpiTect spin column درون میکروتیوب‌های ۱/۵ جدید قرار داده شده، و محتوای مرحله ی قبل وارد این ستون‌ها شد، و مجدداً سانتریفیوژ انجام و مایع عبور کرده از ستون دور ریخته شد. در مراحل بعد به ترتیب بافر BW و بافر BD اضافه شده، و بعد از اینکه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سانتریفیوژ شدند، دوباره به هر ستون بافر BW اضافه شد و سانتریفیوژ گردید. پس از یک مرحله انکوباسیون در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد، بافر EB به مرکز ستون اضافه شد، و DNA بی‌سولفیت‌شده حل‌شده پس از سانتریفیوژ به دست آمد. نمونه‌های DNA بی‌سولفیت شده در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

#### بهینه سازی روش MS-PCR:

ابتدا کیفیت روشهای تیمار بی‌سولفیت با تکنیک Methylation-Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM) و با بررسی متیلاسیون نواحی CG rich ژن ۳۳۵-miR به طول ۲۲۰ جفت باز که قبلاً برای پروژه دیگری استانداردسازی شده، مورد بررسی قرار

خانوادگی) پس از مشاوره ژنتیکی و رسم شجره انتخاب شدند. تشخیص بیماری با کمک متخصص زنان و بر طبق دستورالعمل European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) صورت پذیرفت. بیماران با کاریوتیپ طبیعی، بر اساس وجود سابقه آمنوره اولیه یا ثانویه قبل از ۴۰ سالگی به همراه دو بار آزمایش FSH بالای ۲۵ IU/L انتخاب شدند. شرح حال افراد مبتلا از لحاظ سن آمنوره، اختلالات قاعدگی، ازدواج فامیلی والدین، پیامدهای بالینی مانند بیماری‌های قلبی عروقی، استئوپوروز، بیماری‌های نورولوژیک، اختلالات رفتاری - خلقی و غیره گرفته شد و در یک پرسش‌نامه ارزیابی شده، ثبت گردید. همچنین حجم ذخایر تخمدانی خانم‌های شرکت‌کننده در مطالعه به وسیله سونوگرافی ترنس واژینال و ارزیابی تست هورمونی Anti-Mullerian Hormone (AMH) بررسی و برای ارزیابی فنوتیپی بیشتر، ثبت شد.

#### استخراج DNA:

پس از انتخاب افراد، ۵ میلی‌لیتر خون محیطی از بیماران و در موارد خانوادگی از اعضا خانواده آنها در محلول Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) جمع‌آوری شد. استخراج DNA نمونه‌های جمع‌آوری شده به روش Salting out مختصراً به شرح زیر انجام شد: ۵۰۰ میکرولیتر خون از هر نمونه به طور جداگانه داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده سلولی سرد به آن اضافه و سانتریفیوژ شد. پس از جدا کردن محلول رویی به رسوب حاصله، مجدداً بافر لیز کننده سرد اضافه شد. سپس با چند بار پیپت کردن، رسوب درون بافر حل و در نهایت حجم محلول با بافر لیز کننده به ۱۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد، و مجدداً سانتریفیوژ انجام گرفت. پس از دور ریختن مایع رویی، به رسوب حاصل، ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده هسته اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. با اضافه کردن NaCl و کلروفرم سرد به نمونه مجدداً سانتریفیوژ انجام شد. محلول رویی جدا و داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری جدید ریخته شده و اتانول مطلق سرد به آن اضافه گردید تا کلاف DNA در محلول ظاهر شود. نهایتاً کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از نانو دراپ مورد بررسی قرار گرفت.

#### تیمار DNA ژنومی با سدیم بی‌سولفیت به روش دستی:

ابتدا نمونه‌های DNA ژنومیک در بن ماری با دمای جوش به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد سپس NaOH ۳ مولار تازه تهیه شده و محلول سدیم بی‌سولفیت ۵ مولار به آن اضافه شد. برای

حجم نمونه مطالعه حاضر بر اساس نتایج تحقیقات منتشر شده در این زمینه و با استفاده از نرم‌افزار Medcalc، در سطح معنی‌داری ۵ درصد و توان آماری ۸۵ درصد تعیین شد. داده‌های دموگرافیک و بالینی بیماران با استفاده از پرسش‌نامه و پرونده‌های پزشکی گردآوری و آمار توصیفی شامل شاخص میانگین، انحراف معیار و فراوانی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ محاسبه گردید.

### یافته‌ها یافته‌های بالینی:

متوسط سن بیماران مبتلا به POI شرکت کننده در این مطالعه به ترتیب در موارد تک‌گیر و خانوادگی  $25/0 \pm 8/83$  و  $34/70 \pm 7/80$  سال بود. همه بیماران شرکت کننده در این مطالعه آمنوره ثانویه داشته، و موردی از آمنوره اولیه در بین موارد مورد مطالعه لحاظ نشد. متوسط سن منارک به ترتیب در موارد تک‌گیر و خانوادگی  $13/20 \pm 1/70$  و  $12/50 \pm 0/57$  محاسبه گردید. متوسط سطح سرمی FSH در موارد تک‌گیر  $44/73 \pm 8/40$  UI/L و در موارد خانوادگی  $33/61 \pm 7/72$  UI/L به دست آمد. بررسی‌های سونوگرافیک تخمدان‌ها در موارد تک‌گیر به ترتیب ۸۰ درصد و ۲۰ درصد آتروفیک و طبیعی را گزارش کرد، درحالی‌که در موارد خانوادگی، ۷۵ درصد تخمدانهای آتروفیک در مقابل ۲۵ درصد وضعیت طبیعی مشاهده شد.

### تأیید تیمار با بی‌سولفیت:

تیمار بی‌سولفیت انجام گرفته با دو روش دستی و کیت، با تکنیک MS-HRM و بررسی متیلاسیون نواحی CG rich ژن miR-۳۳۵ تأیید شد. همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، با تکثیر قطعات ۲۲۰ جفت باز حاصل از پرایمرهای اختصاصی استانداردسازی شده، صحت تیمار بی‌سولفیت DNA در هر دو روش دستی و کیت تأیید شد و تفاوتی بین دو روش مشاهده نگردید. در مراحل بعدی ارزیابی ژن *FMRI* از این قطعه ۲۲۰ جفت بازی به عنوان تأیید مارکر ۵۰ جفت باز نیز استفاده شد.

### اعتبار سنجی نتایج پیش جهش ژن *FMRI*:

تست تشخیصی مولکولی حاضر به شکلی طراحی شده که براساس MS-PCR بسط سه‌تایی طبیعی و پیش‌جهش *FMRI* را هم بر روی ایکس خاموش و هم ایکس فعال شناسایی کند، بدین‌صورت که یک واکنش nonMet-PCR تمام آلل‌های طبیعی و پیش‌جهش غیر متیله و واکنش Met-PCR مجزای دیگر آلل‌های طبیعی و پیش‌جهش متیله را شناسایی می‌کند.

گرفت، و سپس با تکنیک MS-PCR تعداد بسط سه‌تایی ژن *FMRI* ارزیابی گردید. در روش MS-PCR به دو جفت پرایمر اختصاصی نیاز می‌باشد به صورتی که یک جفت پرایمر اختصاصی DNA متیله شده را شناسایی کند و یک جفت پرایمر که اختصاصاً DNA غیرمتیله را شناسایی می‌کند. بنابراین، هر نمونه با دو واکنش nonMet-PCR و Met-PCR با جفت پرایمرهای اختصاصی بررسی می‌شود. تکثیر با جفت پرایمر متیله ال‌های خاموش شده و تکثیر با جفت پرایمر غیرمتیله نشان دهنده ال‌های فعال می‌باشد.<sup>۱۲</sup> تهیه محلول واکنش با استفاده از Master Mix ۲x، پرایمرها، DNA و تسهیل کننده‌های PCR مانند DMSO و Betaine enhancer buffer و با طی مراحل دمایی زیر انجام شد: مرحله ابتدایی ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله میانی متشکل از ۴۰ سیکل شامل ۳۰ ثانیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه ۶۰-۶۵ درجه سانتی‌گراد و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله نهایی ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد. مطالعات اولیه بهینه‌سازی سنجش با استفاده از DNA به دست آمده از نمونه‌های کنترل شامل: (۱) DNA تیمار شده یک خانم طبیعی تأیید شده با تست‌های مولکولار بالینی (۲) نمونه خانم حامل پیش جهش تأیید شده با تست‌های مولکولار بالینی (۳) نمونه DNA غیر تیمار شده یک خانم طبیعی انجام گرفت.

### آنالیز قطعات به دست آمده بر روی ژل آگارز:

تکثیر و یا عدم تکثیر قطعات حاصل از PCR و اندازه آنها روی ژل آگارز ۱ درصد در مقایسه با مارکر DNA ۵۰ جفت باز و نمونه کنترل فرد حامل پیش جهش انجام شد. برای تعیین دقیق اندازه باندهای حاوی CG rich از دو روش تأیید کننده می‌توان استفاده کرد. (۱) مارکرهای استاندارد CGG موجود در بازار (۲) قطعه یا قطعات ژنی CG rich که اندازه آنها قبلاً با روش‌های دیگر مولکولی مشخص شده باشد. در مطالعه حاضر، بر اساس روش دوم از محصول PCR تأیید شده نواحی CG rich ژن miR-۳۳۵ به طول ۲۲۰ جفت باز که با پرایمرهای اختصاصی و تکنیک MS-HRM تکثیر شده بود، استفاده شد تا دقت مارکر ۵۰ جفت باز را تأیید کند. قطعات مورد نظر دو واکنش nonMet-PCR و Met-PCR به ترتیب  $168 + 3n$  جفت باز و  $108 + 3n$  جفت باز می‌باشند. در صورت خاموش شدن غیر تصادفی کروموزوم ایکس، باندهای تکثیر در هر دو ژل nonMet-PCR و Met-PCR تکرارهای مشابه را نشان می‌دهد. این درحالی است که خاموش شدن تصادفی ایکس می‌تواند الگوی متفاوتی از باندهای تکثیر را در دو ژل نشان دهد.

### روش تجزیه تحلیل آماری:

ما بر روی ۲۰ فرد مبتلا به POI تک‌گیر و دو مورد POI خانوادگی، هیچ موردی از پیش جهش و یا جهش کامل مشاهده نشد. این در حالی است که دو بیمار (۱۰ درصد) به صورت ناقل الی اینترمدییت *FMRI* در بین موارد تک‌گیر شناسایی گردیدند.

بیمار اول در هر دو الی واجد تکرارهای ۴۵-۴۷ تایی بود. بررسی‌های بالینی نشان داد که این خانم ۲۳ ساله از ۱۷ سالگی دچار آمنوره ثانویه شده‌اند و سطح *FSH* و *AMH* به ترتیب ۴۶/۶ UI/L و ۰/۸ گزارش شده است. در سونوگرافی، تخمدان‌های بیمار کوچک‌تر از اندازه طبیعی مشاهده شد.

بیمار دوم خانمی ۲۴ ساله بودند که در سن ۱۳ سالگی قاعدگی طبیعی داشتند. بعد از چند سال دچار اختلال قاعدگی و نهایتاً آمنوره ثانویه در ۲۰ سالگی شدند و با تشخیص POI تحت بررسی قرار گرفتند. آزمایشات انجام شده نشان داد که *FSH* بیمار به بالای ۵۰ افزایش یافته است. سطح *AMH* بیمار نیز ۰/۱٪ گزارش شد. بررسی‌های سونوگرافیک مشخص کرد که هر دو تخمدان این بیمار واجد درجاتی از آتروفی و کوچک‌تر از اندازه طبیعی هستند. همانگونه که در شکل ۳ نشان داده شده است، نتایج ژل الکتروفورز DNA این بیمار خاموش شدن غیر تصادفی الی واجد جهش اینترمدییت را نشان داد. این فرد حامل الی‌ها با تکرارهای ۲۰ و ۵۴ بود که با خاموش شدن غیر تصادفی ایکسی که ۵۴ تکرار داشت، بر روی *Met-PCR* فقط باند ۵۴ و بر روی *nonMet-PCR* فقط باند ۲۰ قابل مشاهده بود. پدیده خاموش شدن غیر تصادفی کروموزوم ایکس در یک نمونه با تکرارها در محدوده طبیعی هم مشاهده شد. نمونه‌ای با ژنوتیپ تکرارهای ۱۷ و ۳۴، که متعاقب خاموش شدن غیر تصادفی ایکس واجد ۳۴ تکرار، در *Met-PCR* فقط باند ۳۴ تکراری و بر روی *nonMet-PCR* فقط باند ۱۷ تکراری وجود داشت (شکل ۳).

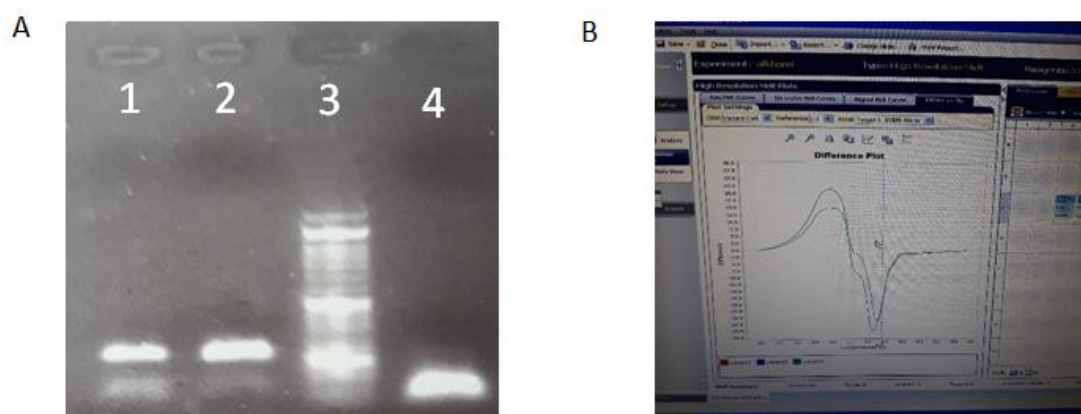
برای هر DNA، محصولات مورد انتظار *nonMet-PCR* و *Met-PCR* بر روی ژل آگارز مشاهده شدند. نتایج بدست آمده از بهینه‌سازی مطالعه ما با نتایج حاصل از تست‌های مولکولار بالینی مطابقت داشت، به صورتی که وضعیت پیش‌جهش، محصولات *Met-PCR* و *nonMet-PCR* مورد انتظار را تولید کرد.

همانطور که به‌طور شماتیک در شکل ۲ نشان داده شده است، برای *nonMet-PCR* سایز قطعات بین ۱۸۶ تا ۳۳۳ طبیعی و قطعات بین ۳۳۳ تا ۷۶۸ پیش‌جهش را مشخص می‌کند. در *Met-PCR* قطعات بین ۱۲۶ تا ۲۷۳ طبیعی، و قطعات بین ۲۷۳ تا ۷۰۸ نشان دهنده وضعیت پیش‌جهش می‌باشد. تکثیر احتمالی قطعات بزرگتر از ۷۰۸ جفت باز در *Met-PCR* هم مؤید جهش کامل در ژن *FMRI* است. هر خانم طبیعی که واجد دو کروموزوم ایکس است می‌تواند تکرارهایی بین ۶ تا ۵۵ داشته باشد که به‌طور تصادفی در طی روند خاموش شدن کروموزوم ایکس نیمی از هر کدام متیله (خاموش) و نیمی غیرمتیله (فعال) می‌شود. پس انتظار می‌رود هم در *Met-PCR* و هم در *nonMet-PCR* دو باند مربوط به دو کروموزوم ایکس دیده شود. البته اغلب به دلیل اینکه فاصله این دو باند خیلی از هم کم است (۱۰-۲۰ جفت باز)، روی ژل‌های آگارز به صورت تک باند دیده می‌شوند. در خانم‌های حامل پیش‌جهش، به همان صورت و به‌طور تصادفی نیمی از هر کدام از کروموزوم‌های ایکس متیله (خاموش) و نیمی غیرمتیله (فعال) است. اگر فاصله دو باند زیاد باشد، بر روی ژل آگارز قابل تفکیک بوده و به صورت دو باند مجزا دیده می‌شوند. از آنجایی که خاموش شدن کروموزوم ایکس می‌تواند تحت تأثیر عواملی به صورت غیر تصادفی اتفاق بیافتد، ممکن است ۴ باند محصول *PCR*‌های متیله و غیر متیله دستخوش تغییر شوند. در صورتی که بیش‌تر ایکس واجد الی طبیعی خاموش شود، باند الی طبیعی بر روی ژل متیله و باند الی پیش‌جهش بر روی ژل غیرمتیله واضح‌تر هستند. در وضعیت مقابل که به‌طور غیر تصادفی بیش‌تر ایکس واجد الی پیش‌جهش خاموش شود، باند الی پیش‌جهش روی ژل متیله و باند الی طبیعی روی ژل غیرمتیله واضح‌تر است.

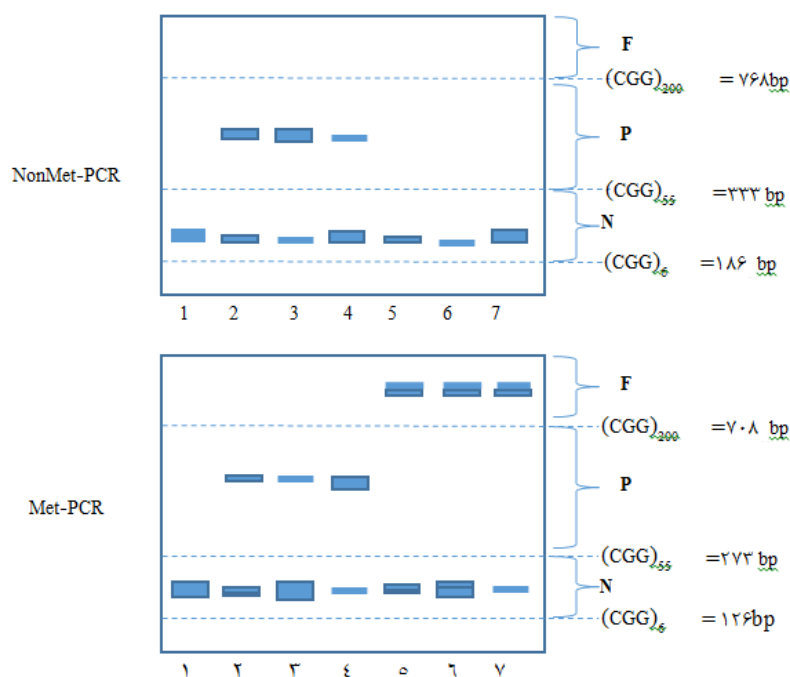
### نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتیپ ژن *FMRI*:

محصولات *Met-PCR* و *nonMet-PCR* خانم‌های دارای تکرار طبیعی ژن *FMRI*، به ترتیب در محدوده بین ۱۲۶ تا ۲۷۳ و بین ۱۸۶ تا ۳۳۳ مشاهده شد. در اکثریت بیماران تعداد تکرارها بین ۱۵ تا ۳۵ تکرار مشاهده گردید. با توجه به نتایج حاصل از مطالعه

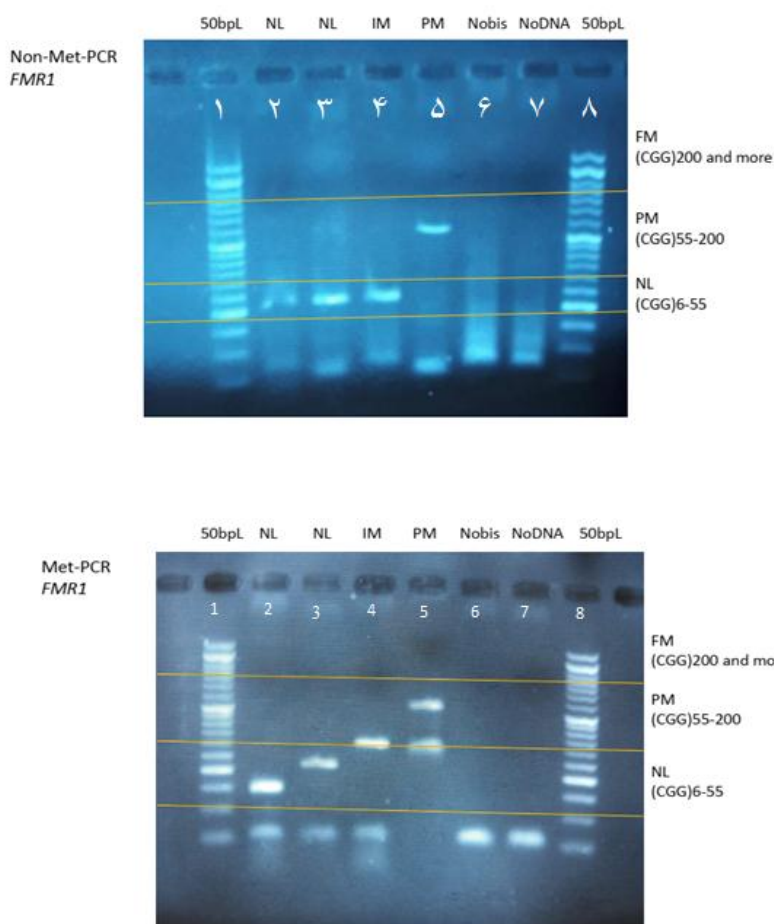




**شکل ۱.** تأیید روش‌های بی‌سولفیت و تیمارهای DNA با روش‌های MS-PCR و MS-HRM با پرایمرهای ژنی که قبلاً استانداردسازی شده بود. A: محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد: ستون ۱ محصول PCR بر روی DNA تیمار شده با بی‌سولفیت با استفاده از کیت تجاری، ستون ۳ مارکر ۵۰ جفت باز و ستون ۴ نمونه کنترل منفی B: نتایج حاصل از HRM که Difference plot دو نمونه را نشان می‌دهد.



**شکل ۲.** شکل بالا باندهای محصولات nonMet-PCR و شکل پایین باندهای محصولات Met-PCR را نشان می‌دهد. ستونهای ۱- باندهای مورد انتظار در یک نمونه خانم با الهای طبیعی. ستونهای ۲- باندهای مورد انتظار در یک نمونه خانم با الل واجد پیش جهش که خاموش شدن کروموزوم ایکس به صورت تصادفی رخ داده. ستونهای ۳- باندهای مورد انتظار در یک نمونه خانم با الل واجد پیش جهش که خاموش شدن کروموزوم ایکس به صورت غیر تصادفی رخ داده و بیشتر ایکس واجد الل طبیعی خاموش شده است. ستونهای ۴- باندهای مورد انتظار در یک نمونه خانم با الل واجد پیش جهش که خاموش شدن کروموزوم ایکس به صورت غیر تصادفی رخ داده و بیشتر ایکس واجد پیش جهش خاموش شده است. ستونهای ۵- باندهای مورد انتظار در یک نمونه خانم با جهش کامل که خاموش شدن کروموزوم ایکس به صورت تصادفی رخ داده که البته الل جهش کامل به علت متیلاسیون ثانویه به تکرارهای بیش از ۲۰۰، فقط باندهایی با اندازه بالا در PCR متیله خواهد داشت. ستونهای ۶- باندهای مورد انتظار در یک نمونه خانم با الل واجد جهش کامل که خاموش شدن کروموزوم ایکس به صورت غیر تصادفی رخ داده و بیشتر ایکس واجد تکرار طبیعی خاموش شده است. ستونهای ۷- باندهای مورد انتظار در یک نمونه خانم با الل واجد جهش کامل که خاموش شدن کروموزوم ایکس به صورت غیر تصادفی رخ داده و بیشتر ایکس واجد جهش کامل خاموش شده است.



**شکل ۳.** شکل بالا نتایج nonMet-PCR و شکل پایین نتایج Met-PCR را نشان می‌دهد. ستونها در دو ژل نشان دهنده نتایج نمونه یک فرد می‌باشد. ستونهای ۲ در هر دو ژل: نمونه کنترل فرد سالم با تکرارهای حدود ۱۴-۱۷. ستونهای ۳ در هر دو ژل: نمونه یک خانم با تکرارهای ۱۷ و ۳۴ است که با خاموش شدن غیر تصادفی ایکسی که ۳۴ تکرار دارد، بر روی Met-PCR فقط باند ۳۴ و بر روی nonMet-PCR فقط باند ۱۷ را می‌بینیم. ستونهای ۴ در هر دو ژل: نمونه یک خانم حامل الل ایبترمدیت با تکرارهای ۲۰ و ۵۴ است که با خاموش شدن غیر تصادفی ایکسی که ۵۴ تکرار دارد، بر روی Met-PCR فقط باند ۵۴ و بر روی nonMet-PCR فقط باند ۲۰ قابل مشاهده است. ستونهای ۵ در هر دو ژل: نمونه کنترل مثبت فرد حامل پیش جهش با تکرارهای ۱۳۰ و ۵۰. ستون ۶: نمونه کنترل منفی DNA بی‌سولفیت نشده، ستون ۷: نمونه کنترل منفی NTC، ستونهای ۱ و ۸: مارکر ۵۰ جفت بازی.

### بحث

متنوع باشد، و بنابراین تخمدانهای کوچک به همراه عدم وجود فولیکولها و یا تخمدانهای طبیعی با فولیکول از تظاهرات متنوع دیگر POI می‌باشد. این تنوع تظاهرات بالینی اهمیت تشخیص زودرس POI را به منظور کنترل و هدایت رشد فولیکولی و تخمدانی برای مواردی که هنوز فعالیت تخمدانی دارند، نشان می‌دهد.<sup>۱۳</sup>

پیش جهش تکرارهای CGG در نواحی پرموتوری ژن *FMR1* با بروز ۱:۲۰۰ زن، به عنوان مهم‌ترین عامل ژنتیکی مرتبط با POI شناخته می‌شود که در حدود ۸ درصد موارد تک‌گیر و تا ۱۳ درصد

در پاتوژنز POI سه مکانیسم احتمالی مطرح است: کمبود مادرزادی فولیکولهای پریموردیال، عملکرد معیوب آن‌ها و یا تخلیه زودرس تخمدان از فولیکول. بر اساس مکانیسم‌های متفاوت احتمالی، تظاهرات بالینی در POI نیز می‌تواند متنوع باشد. برای مثال، سن ابتلا در طیفی از سنین بلوغ تا ۴۰ سالگی مشاهده می‌شود. همچنین آمنوره به صورت اولیه یا ثانویه رخ می‌دهد به صورتی که آمنوره ثانویه در طیف سنی ۲۰ سالگی تا ۴۰ سالگی متغیر است، اما آمنوره اولیه در زنان جوانتر دیده می‌شود. همچنین، سطوح هورمونی افراد با توجه به عملکرد غدد می‌تواند

زنان می‌تواند منجر به آترزی فولیکول‌ها یا کاهش تعداد فولیکول‌های در حال رشد، مشابه موش‌های مدل شود.<sup>۲۳</sup> برخی از محققین FMRP را مسئول کنترل ذخایر تخمدانی به واسطه تأثیر بر سلول‌های گرانولوزا می‌دانند. سلول‌های گرانولوزا در طول بلوغ فولیکولی ژنهای مهم کنترلی غدد درون ریز و مسیرهای سیگنالینگ را برای بلوغ صحیح تخمک‌ها بیان می‌کنند. به نظر می‌رسد که FMRP و FMR1-mRNA با اتصال به رونوشت‌های متعدد، به عنوان سرکوبگرهای ترجمه‌ای در کنترل سطح ترجمه نقش بازی می‌کنند. بنابراین هنگامی که سطوح آنها در میان ناقلین پیش جهش تغییر می‌کند، سیگنال‌های کنترلی می‌توانند کاهش یابند یا از بین روند.<sup>۲۰</sup> در مطالعه‌ای جدید بیان FMR1 و ژن‌های کلیدی مسیرهای سیگنالینگ AKT/mTOR به طور مقایسه‌ای در سلول‌های گرانولوزا مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت، و نتایج بدست آمده بر یک ارتباط عملکردی بین بیان FMR1 و بیان ژن‌های مسیر سیگنالینگ AKT/mTOR که بلوغ فولیکولی انسان را کنترل می‌کنند، دلالت داشت.<sup>۲۴</sup>

در نتایج حاصل از مطالعه ما بر روی دو مورد خانوادگی و ۲۰ فرد مبتلا به POI تک‌گیر، دو بیمار (۱۰ درصد) ناقل الل اینترمدییت FMR1 مشاهده شدند. در مطالعه دیگری از ایران، اسدی و همکاران ناقلین الل اینترمدییت را ۳۰ درصد گزارش کرده‌اند.<sup>۲۵</sup> همچنین، نتایج ما موردی از پیش جهش در جمعیت بیماران مورد بررسی را نشان نداد که با مطالعه اخیر تانگ و همکاران مطابقت دارد.<sup>۲۶</sup>

همانگونه که قبلاً اشاره شد، پدیده خاموش شدن کروموزوم ایکس می‌تواند POI را تحت تأثیر قرار دهد. به همین دلیل در مطالعه حاضر، در کنار بررسی فراوانی ژنوتیپی، وضعیت متیلاسیون الیها نیز به روش MS-PCR بر اساس مطالعه ژو و همکاران،<sup>۱۳</sup> استاندارد سازی و اعتبار سنجی شد. نتایج داده‌های ما علاوه بر مشخص کردن الل‌های محدوده طبیعی و اینترمدییت که تحت تأثیر خاموش شدن کروموزوم ایکس متیله شده بودند، مواردی از خاموش شدن غیر تصادفی را نیز مشخص کرد. در این افراد یکی از الل‌ها کاملاً به صورت خاموش و متیله و الل دیگر کاملاً به صورت فعال و غیر متیله مشاهده شد. باید توجه داشت که اگر الل طبیعی FMR1، بیشتر متیله و غیرفعال شود، خطر بیش‌تری برای تظاهر فنوتیپ‌های مرتبط با POI وجود دارد. به عبارت دیگر، متیله و خاموش بودن الل طبیعی و غیرمتیله و فعال بودن الل پیش جهش، میزان تولید FMR1-mRNA را تغییر داده و فنوتیپ POI را تحت تأثیر قرار می‌دهد.<sup>۹</sup> در مطالعه جاستون-مک‌آنانی و همکاران، پیش جهش FMR1 و خاموش

موارد خانوادگی دیده می‌شود.<sup>۱۴</sup> در سال ۱۹۹۱ کروستر و همکاران ارتباط بین ژن FMR1 و POI را از نظر بالینی مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها دریافتند که ۱۳ درصد از زنان ناقل پیش جهش قبل از ۴۰ سالگی دچار یائسگی شدند.<sup>۱۵</sup> بعد از آن شوارتز و همکاران نشان دادند ناقلین پیش جهش در مقایسه با ناقلین جهش کامل خطر بیشتری برای POI دارند.<sup>۱۶</sup> در سال ۱۹۹۹ نیز آلینگهام هاوکینز و همکاران در یک مطالعه بین‌المللی تخمین زدند که ۱۶ درصد از زنان ناقل الل پیش جهش مبتلا به POI می‌شوند.<sup>۱۷</sup> این نتایج نشان داد که تنها درصدی از زنان دارای الل پیش جهش از اختلال عملکرد تخمدان رنج می‌برند که نشان دهنده اهمیت شناسایی عوامل مؤثر بر تنوع بالینی و کمک به آن دسته از خانم‌هایی است که در معرض خطر عوارض باروری هستند. از آنجا که بیماری‌های مرتبط با پیش جهش در افراد مبتلا به FXS دیده نمی‌شود، نظریاتی دال بر تفاوت مکانیسم POI با مکانیسم ایجاد FXS مطرح شد. در تحقیقات شوارتز و همکاران همچنین مشخص شده بود که خطر ابتلا به POI در زنان با الل‌های جهش کامل مشابه جمعیت عمومی (۱٪) است.<sup>۱۶</sup> مکانیسم‌های مختلفی در خصوص علت ایجاد POI بر اثر پیش جهش ژن FMR1 ارائه شده است. تغییر ساختار RNA کد شده که باعث از دست دادن عملکرد متقابل با بیش از ۳۰ پروتئین خاص می‌شود، یکی از دلایل مطرح‌شده می‌باشد. مکانیسم پیشنهادی دیگر بر اساس تأثیر توالی‌های تکراری بر تغییر نقطه آغاز ترجمه در کدون‌های شروع غیر AUG، ارائه شده است. در همین راستا در سال ۲۰۱۱، تاسونه و همکاران مشخص کردند که الل‌های پیش جهش دارای محل‌های شروع رونویسی و مکان‌های پلی‌آدنیل‌سیون متفاوتی هستند که منجر به تغییرات بیان در این الل‌ها نسبت به الل‌های طبیعی می‌شود.<sup>۱۸</sup> مطالعات قبلی همین گروه تحقیقاتی نشان داده بود که سطوح FMR1-mRNA تقریباً پنج برابر در ناقلین پیش جهش افزایش می‌یابد، اگرچه بیان پروتئین اندکی کاهش نشان می‌داد.<sup>۱۹</sup> تحقیقات دیگری نشان داد که این افزایش FMR1-mRNA در سلول‌های ژرمینال جنین بر تعداد تخمک‌ها و رشد آنها تأثیر منفی دارد.<sup>۲۰</sup> لو و همکاران یک موش ناقل پره موتاسیون را بررسی و مشاهده کردند که افزایش mRNA منجر به کاهش تعداد فولیکول و در نتیجه کاهش باروری می‌شود.<sup>۲۱</sup> از سوی دیگر، هافمن و همکاران گزارش کردند که ایجاد و تکامل ذخایر فولیکول اولیه طبیعی است، اما از دست دادن سریع فولیکول‌ها رخ می‌دهد که نشان دهنده یک مشکل ذاتی تخمدان است.<sup>۲۲</sup> مطالعات قبلی در زنان ناقل الل‌های پیش جهش نیز این موضوع را نشان داده بود که افزایش سطوح FMR1-mRNA در

### قدردانی ها

نویسندگان از همه بیماران و افراد خانواده آنان که در مطالعه شرکت کردند قدردانی می کنند.

### مشارکت پدیدآورندگان

شیرین شهبازی و فاطمه افخمی طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشتند. همچنین مقاله را تألیف و نسخه نهایی آن را خوانده و تأیید کرده اند. لعیا فرزندی و معصومه عزیزی در طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه مشارکت داشتند. همچنین نسخه نهایی آن را خوانده و تأیید کرده اند.

### منابع مالی

منابع مالی این طرح تحقیقاتی از طرف دانشگاه تربیت مدرس تأمین شده است.

### دسترس پذیری داده ها

داده های ایجاد شده در مطالعه فعلی در صورت درخواست معقول از پدیدآور رابط ارائه می گردد.

### ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در کمیته پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به شماره مرجع IR.MODARES.REC.1399.006 به تأیید رسیده است.

### تعارض منافع

مؤلفان اظهار می کنند که منافع متقابلی از تألیف و یا انتشار این مقاله ندارند.

شدن کروموزم ایکس، در خواهران دوقلوی تک تخمکی با فنوتیپ های ناسازگار بررسی شد. البته هیچ شواهدی از نقش خاموش شدن ایکس و آلل پیش جهش *FMR1* مرتبط با فنوتیپ متفاوت FXPOI به دست نیامد.<sup>۲۷</sup> در مقابل، بودگا و همکاران قبلاً شواهدی را از ارتباط مستقیم بین وضعیت فعال آلل پیش جهش *FMR1* و تظاهرات FXPOI با ارزیابی سه خواهر با گستره *FMR1* مشابه اما با فنوتیپ ناهماهنگ FXPOI ارائه داده بودند.<sup>۵</sup> مطالعات دیگر ارتباط خاموش شدن کروموزم ایکس را در خواهران با علائم عصبی در EXTAS نشان داده است.<sup>۲۸، ۲۹</sup> تفاوت در یافته های این مطالعات در نقش یا سهم خاموش شدن کروموزم ایکس در فنوتیپ های ناقلین پیش جهش را می توان با اندازه کوچک گروه ها، میزان موزائیسیم، تفاوتها و محدودیت های تکنیکی روش های مورد استفاده توضیح داد.

### نتیجه گیری

ژن *FMR1* یکی از مهم ترین ژن های مرتبط با POI است. به همین دلیل، بررسی و مطالعه آن در زنانی که علائم اختلال عملکرد تخمدان با علت ناشناخته را نشان می دهند، مهم است. این ارزیابی باید شامل مطالعه ساختار ژن *FMR1*، از جمله تعداد تکرار CGG و الگوی متیلاسیون آن باشد. این نه تنها برای دانستن علت اختلال عملکرد تخمدان، بلکه برای شناسایی پیش جهش که می توانند در برخی از نسل ها گسترش یافته و منجر به جهش و در نتیجه FXS در نسل بعد شوند، مفید خواهد بود. علاوه بر این، تشخیص این آلل ها در میان زنان جوان امکان مشاوره ژنتیکی لازم را برای برنامه ریزی زندگی باروری آنها با در نظر گرفتن اختلال عملکرد تخمدان فراهم می کند. البته به نظر می رسد در خصوص مکانیسم های مولکولی، تحقیقات بیشتری در انسان مورد نیاز است تا مشخص شود که چگونه *FMR1*-mRNA و *FMRP* در تخمدان ها عمل می کنند.<sup>۳۰</sup>

## References

1. Torrealday S, Kodaman P, Pal L. Premature Ovarian Insufficiency-an update on recent advances in understanding and management. *F1000Research*. 2017;6:2069. doi: 10.12688/f1000research.11948.1
2. Oostra BA, Willemsen R. FMR1: a gene with three faces. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790(6):467-77. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.02.007
3. Sears JC, Broadie K. Fragile X mental retardation protein regulates activity-dependent membrane trafficking and trans-synaptic signaling mediating synaptic remodeling. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018;10:440. doi: 10.3389/fnmol.2017.00440
4. Rosario R, Anderson R. The molecular mechanisms that underlie fragile X-associated premature ovarian insufficiency: is it RNA or protein based?. *Molecular human reproduction*. 2020 Oct;26(10):727-37. doi: 10.1093/molehr/gaaa057 %J Molecular Human Reproduction

5. Bodega B, Bione S, Dalprà L, Toniolo D, Ornaghi F, Vegetti W, et al. Influence of intermediate and uninterrupted FMR1 CGG expansions in premature ovarian failure manifestation. *Hum Reprod.* 2006;21(4):952-7. doi: 10.1093/humrep/dei432
6. Nolin SL, Glicksman A, Tortora N, Allen E, Macpherson J, Mila M, et al. Expansions and contractions of the FMR1 CGG repeat in 5,508 transmissions of normal, intermediate, and premutation alleles. *Am J Med Genet A.* 2019;179(7):1148-56. doi: 10.1002/ajmg.a.61165
7. Streuli I, Fraisse T, Ibecheole V, Moix I, Morris MA, de Ziegler D. Intermediate and premutation FMR1 alleles in women with occult primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril.* 2009;92(2):464-70.
8. Allen EG, Charen K, Hipp HS, Shubeck L, Amin A, He W, et al. Refining the risk for fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI) by FMR1 CGG repeat size. *Genet Med.* 2021;23(9):1648-55. doi: 10.1038/s41436-021-01177-y
9. Barad DH, Darmon S, Weghofer A, Latham GJ, Filipovic S, Wang Q, et al. Association of skewed X-chromosome inactivation with FMR1 CGG repeat length and anti-Mullerian hormone levels: a cohort study. *Reprod Biol Endocrinol.* 2017;15(1):34.
10. Li Y, Tollefsbol TO. DNA methylation detection: bisulfite genomic sequencing analysis. *Methods Mol Biol.* 2011;791:11-21. doi: 10.1007/978-1-61779-316-5\_2
11. Spector E, Behlmann A, Kronquist K, Rose NC, Lyon E, Reddi HV. Laboratory testing for fragile X, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2021;23(5):799-812. doi:10.1038/s41436-021-01115-y
12. Zhou Y, Law HY, Boehm CD, Yoon CS, Cutting GR, Ng IS, et al. Robust fragile X (CGG)n genotype classification using a methylation specific triple PCR assay. *J Med Genet.* 2004;41(4):e45. doi: 10.1136/jmg.2003.012716
13. Jiao X, Ke H, Qin Y, Chen ZJ. Molecular Genetics of Premature Ovarian Insufficiency. *Trends Endocrinol Metab.* 2018;29(11):795-807.
14. Murray A, Schoemaker MJ, Bennett CE, Ennis S, Macpherson JN, Jones M, et al. Population-based estimates of the prevalence of FMR1 expansion mutations in women with early menopause and primary ovarian insufficiency. *Genet Med.* 2014;16(1):19-24. doi: 10.1038/gim.2013.64
15. Cronister A, Schreiner R, Wittenberger M, Amiri K, Harris K, Hagerman RJ. Heterozygous fragile X female: historical, physical, cognitive, and cytogenetic features. *Am J Med Genet.* 1991;38(2-3):74-269. doi: 10.1002/ajmg.1320380221
16. Schwartz CE, Dean J, Howard-Peebles PN, Bugge M, Mikkelsen M, Tommerup N, et al. Obstetrical and gynecological complications in fragile X carriers: a multicenter study. *Am J Med Genet.* 1994;51(4):400-2. doi: 10.1002/ajmg.1320510419
17. Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, Holden JJ, Yang KT, Lee C, et al. Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study--preliminary data. *Am J Med Genet.* 1999;83(4):322-5.
18. Tassone F, De Rubeis S, Carosi C, La Fata G, Serpa G, Raske C, et al. Differential usage of transcriptional start sites and polyadenylation sites in FMR1 premutation alleles. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(14):6172-85. doi: 10.1093/nar/gkr100
19. Tassone F, Hagerman PJ. Expression of the FMR1 gene. *Cytogenet Genome Res.* 2003;100(1-4):124-8. doi: 10.1159/000072846
20. Schuettler J, Peng Z, Zimmer J, Sinn P, von Hagens C, Strowitzki T, et al. Variable expression of the Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1) gene in patients with premature ovarian failure syndrome is not dependent on number of (CGG)n triplets in exon 1. *Hum Reprod.* 2011;26(5):1241-51. doi: 10.1093/humrep/der018
21. Lu C, Lin L, Tan H, Wu H, Sherman SL, Gao F, et al. Fragile X premutation RNA is sufficient to cause primary ovarian insufficiency in mice. *Hum Mol Genet.* 2012;21(23):5039-47. doi: 10.1093/hmg/dd3348
22. Hoffman GE, Le WW, Entezam A, Otsuka N, Tong ZB, Nelson L, et al. Ovarian abnormalities in a mouse model of fragile X primary ovarian insufficiency. *J Histochem Cytochem.* 2012;60(6):439-56. doi: 10.1369/0022155412441002
23. Sullivan AK, Marcus M, Epstein MP, Allen EG, Anido AE, Paquin JJ, et al. Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Hum Reprod.* 2005;20(2):402-12. doi: 10.1093/humrep/deh635
24. Rehnitz J, Capp E, Messmer B, Nguyen XP, Germeyer A, Freis A, et al. Fmr1 and akt/mtor signaling in human granulosa cells: Functional interaction and impact on



- ovarian response. *Journal of clinical medicine*. 2021;10(17):3892. doi: 10.3390/jcm10173892
25. Asadi R, Omrani MD, Ghaedi H, Mirfakhraie R, Azargashb E, Habibi M, et al. Premutations of FMR1 CGG repeats are not related to idiopathic premature ovarian failure in Iranian patients :A case control study. *Gene*. 2018;676:189-94. doi: 10.1016/j.gene.2018.07.034
26. Tang R, Yu Q. The significance of FMR1 CGG repeats in Chinese women with premature ovarian insufficiency and diminished ovarian reserve. *Reprod Biol Endocrinol*. 2020;18(1):82. doi:10.1186/s12958-020-00645-5
27. Johnston-MacAnanny EB, Koty P, Pettenati M, Brady M, Yalcinkaya TM, Schmidt DW. The first case described: monozygotic twin sisters with the fragile X premutation but with a different phenotype for premature ovarian failure. *Fertility and sterility*. 2011;95(7):2431-e13. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.01.039
28. Berry-Kravis E, Potanos K, Weinberg D, Zhou L, Goetz CG. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in sisters related to X-inactivation. *Ann Neurol*. 2005;57(1):17-44. doi: 10.1002/ana.20360
29. Zühlke C, Budnik A, Gehlken U, Dalski A, Purmann S, Naumann M, et al. FMR1 premutation as a rare cause of late onset ataxia--evidence for FXTAS in female carriers. *J Neurol*. 2004;251(11):1418-9.
30. Barasoain M, Barrenetxea G, Huerta I, Téllez M, Criado B, Arrieta I. Study of the genetic etiology of primary ovarian insufficiency: FMR1 gene. *Genes*. 2016;7(12):123. doi:10.3390/genes7120123