

مطالعه ی پلی مورفیسم‌های اگزون ۲ ژن *BMP15* و اگزون ۹ ژن *BMPR1B* در زنان نابارور ایرانی مبتلا به نارسایی زودرس تخمدان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۰

خلاصه

مقدمه: نارسایی زودرس تخمدان (POF)، به توقف فعالیت تخمدان‌ها قبل از سن ۴۰ سالگی گفته می‌شود که با سطح پایین هورمون‌های جنسی و سطح بالای گنادوتروپین‌ها همراه است. عوامل ژنتیکی بیشترین نقش را در POF ایفا می‌کنند. *BMP15* و گیرنده ی آن *BMPR1B* از اعضای ابرخانواده ی $TGF\beta$ هستند که در بافت تخمدان بیان می‌شوند و در مسیر فولیکولوژن دخالت دارند. هرگونه تغییر در این ژن‌ها ممکن است مسیر فولیکولوژن را مختل کند. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی ۴ واریانت در اگزون ۲ ژن *BMP15* و دو واریانت در اگزون ۹ ژن *BMPR1B* به عنوان واریانتی کاندید در زنان نابارور ایرانی مبتلا به POF می‌باشد.

روش کار: با استفاده از دیتابیس Uniprot و تکنیک PCR-SSCP ارتباط بین واریانت‌های $443T>C$ ، $468G>A$ ، $538G>A$ ، $598C>T$ ژن *BMP15* و $945G>A$ ، $1020A>G$ ژن *BMPR1B* در ۴۵ زن مبتلا به POF و ۴۵ زن سالم صاحب فرزند، بدون هیچگونه سابقه بیماری‌های مرتبط با فولیکولوژن و تخمک‌گذاری به عنوان کنترل بررسی شد. سپس تعدادی از محصولات PCR با تغییر الگوی حرکتی باندها، تعیین توالی شدند و نتایج حاصل از آن با نرم‌افزار CLC تحلیل شد.

نتایج: نتایج ژل الکتروفورز، SSCP و گراف‌های تعیین توالی هیچ کدام از واریانت‌ها، تغییری را در توالی ژنوم افراد بیمار نسبت به افراد کنترل نشان ندادند.

نتیجه گیری: با توجه به نقش کلیدی *BMP15* در مسیر فولیکولوژن و گزارش مطالعات قبلی، احتمالاً *BMP15* در پیدایش POF مؤثر باشد. عدم مشاهده SNP در بیماران این مطالعه می‌تواند به علت کم بودن حجم نمونه‌های مورد مطالعه و تفاوت‌های ژنتیکی افراد باشد.

کلمات کلیدی: نارسایی زودرس تخمدان، پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی، ناباروری زنان، *BMP15*، *BMPR1B*

پروانه زرین^۱

سیده نفیسه طباطبایی^۲

سید محمد مشتاقیون^{۳*}

علی فلاحتی^۴

نسرین قاسمی^۵

^۱ کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه یزد، پردیس علوم، گروه

زیست‌شناسی

^۲ دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، پژوهشکده زیست

فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک

و زیست‌فناوری، تهران، ایران

^۳ استادیار ژنتیک مولکولی، دانشگاه یزد، پردیس علوم، گروه

زیست‌شناسی

^۴ استادیار فیزیولوژی جانوری، دانشگاه یزد، پردیس علوم،

گروه زیست‌شناسی

^۵ استاد ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی،

پژوهشکده علوم تولید مثل یزد، مرکز تحقیقات سقط

Email:

moshtaghiun@yazd.ac.ir

مقدمه

یائسگی؛ کاهش تدریجی عملکرد تخمدان است که منجر به کمبود استروژن و کاهش در قدرت باروری می‌شود. این فرآیند با افزایش سطح گنادوتروپین همراه است (۱). سن معمول این فرآیند طبیعی ۴۹-۵۲ سال در کشورهای پردرآمد است که بروز آن قبل از ۴۰ سالگی به عنوان نارسایی زودرس تخمدان^۲ (POF) شناخته می‌شود. این اصطلاح به شرایطی اطلاق می‌شود که تخمدان‌ها به دلیل فقدان فولیکول‌های تخمدان قبل از سن معمول یائسگی، عملکردهای زایشی^۳ و هورمونی خود را از دست بدهند (۲). این وضعیت از یائسگی متمایز است، زیرا در ۵۰٪ موارد عملکرد تخمدان متناوب و غیرقابل پیش بینی است، در ۲۰٪ موارد تخمک گذاری خود به خود انجام می‌شود و ۱۰-۵ درصد از بیماران مبتلا به POF، می‌توانند پس از تشخیص، باردار شوند و زایمان کنند (۳). POF تقریباً ۱/۲-۰/۹ درصد از زنان را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۴). شیوع آن یک در ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ زن به ترتیب در سن ۴۰، ۳۰ و ۲۰ سالگی است (۵). علائم رایج این بیماری، قاعدگی نامنظم یا عدم وجود قاعدگی، گرگرفتگی و عرق شبانه، عصبانیت، افسردگی، اضطراب، ناراحتی، اختلال خواب، زبری مو، خستگی، کاهش میل جنسی و نشانه‌های کاهش اشباع استروژن به عنوان مثال خشکی واژن است (۶). نارسایی زودرس تخمدان (POF) با سه ویژگی: افزایش سطح FSH به بیش از ۴۰ IU/L در Postmenopausal^۴، آمنوره^۵ (توقف چرخه قاعدگی) ثانویه به مدت چهار ماه یا بیشتر و سن زیر ۴۰ سال، تشخیص داده می‌شود (۷).

علت ایجاد نارسایی زودرس تخمدان تقریباً تا ۶۸ درصد آیدیوپاتی^۶ (بدون علت مشخص و دلیل واضح) است (۸)، در حالی که در باقی موارد، دلایلی از جمله عوامل آنزیمی و

محیطی، پیامدهای خود ایمنی، واکسیناسیون، شیمی درمانی، پرتودرمانی و عوامل ژنتیکی دخالت دارند (جدول ۱) (۹، ۱۰). از بین عوامل ژنتیکی نیز ناهنجاری‌های کروموزومی در ۱۰ تا ۱۵ درصد از بیماران مبتلا به POF و سایر عوامل ژنتیکی مرتبط در ۲۰ تا ۲۵ درصد تشخیص داده می‌شوند (۸). مطالعات مربوط به موارد POF خود به خودی خانوادگی، نشان داد که پیشینه ژنتیکی به شدت در بروز POF تأثیرگذار است و موارد خانوادگی از ۴ تا بیشتر از ۳۰ درصد موارد را شامل می‌شود. نقص ژنی مانند اختلالات کروموزوم X و اتوزومی نقش مهمی در ایجاد POF دارند، به ویژه اختلالات ساختاری و جابه‌جایی کروموزوم X با کروموزوم‌های اتوزومی، سندرم ترنر، تریزومی X، جهش ژن‌های وابسته به X از جمله برخی که در عملکرد تخمدان نقش دارند شامل ژن‌های *ZFX*^۷، *USP9X*^۸ و *BMP15*^۹ است و جهش ژن‌های اتوزومی مرتبط از جمله *GDF9* در POF مشاهده شده است (۱۱).

عملکرد تخمدان توسط ترکیبی از محرک‌ها از جمله گنادوتروپین‌ها، هورمون تحریک کننده فولیکولار (FSH)، هورمون لوتئینه‌ز کننده (LH) و فاکتورهای درگیر در تخمدان مانند مهارکننده‌ها، فعال کننده‌ها، پروتئین مورفوژنیک استخوان ۱۵ (BMP15) و فاکتور تمایز رشد ۹ (GDF9) تنظیم شوند (۱۲).

جدول ۱. خلاصه ای از عوامل ایجاد کننده نارسایی زودرس تخمدان (۹)

مثال	علل ایجاد POF
(۱) سندروم ترنر ^۱	
(۲) پیش جهش‌های X شکسته ^{۱۱}	اختلالات کروموزوم
(۳) <i>BMP15</i>	X ژنتیکی
(۱) جهش در گیرنده‌های LH و FSH	
(۲) گالاکتوزمی و جهش مهارکننده	اختلالات کروموزوم
(۳) جهش در ژن‌های <i>FOXL2</i> ، <i>PMM2</i>	های اتوزومی

⁷ Zinc finger X chromosomal protein

⁸ Ubiquitin specific peptidase 9 X-linked

⁹ Bone Morphogenetic Protein 15

¹ Turner Syndrome 0

¹ Fragile X pre-mutations 1

¹ پیش جهش وضعیتی است که افزایش تعداد تکرارها در ژن وجود دارد و باعث می‌شود در

معرض خطر افزایش طول در طی همانند سازی قرار گیرد.

¹ Menopause

² Premature Ovarian Failure

³ Germinative

^۴ اصطلاح "postmenopausal" زنانی را توصیف می‌کند که حداقل ۱۲ ماه هیچ

دوره قاعدگی را تجربه نکرده اند، با این فرض که رحم دارند و باردار یا شیرده نیستند.

⁵ Amenorrhea

⁶ Idiopathic

بیان ژن‌های هدف تعامل داشته باشد (۱۴, ۱۵). به طور خاص، همودایمرهای BMP15 به گیرنده ALK6 متصل می‌شوند تا مسیر پیام رسانی Smad1/5/8 را در برخی گونه‌ها از جمله انسان و گوسفند فعال کنند. فعال سازی مسیر پیام رسانی SMAD، متعاقباً بر تکثیر، گسترش و آپوپتوز سلول‌های کومولوس^۳ تأثیر می‌گذارد (۱۶).

تاکنون مطالعات زیادی در ارتباط با جهش‌ها و پلی مورفیسم‌های درگیر در ژن BMP15 با بیماری‌های مختلف زنان از جمله سندروم تخمدان پلی کیستیک (PCOS)، نارسایی اولیه تخمدان (POI)، سندروم تحریک بیش از حد تخمدان^{۱۵} (OHSS) و POF انجام گرفته است. در سال ۲۰۱۹، Santos و همکاران به بررسی تأثیر سه پلی مورفیسم مربوط به ژن BMP15 در زنان مبتلا به POI پرداختند. آنالیز ژنوتیپ‌های BMP15 آلل‌های آن نشان داد که ژنوتیپ‌های CT و TT برای واریانت c.852 C>T در افراد مبتلا به POI مورد مطالعه، شایع‌تر از افراد کنترل بود ولی هیچ تفاوت معناداری در تغییرات BMP15 در بیماران با FSH بالا و گروه شاهد و هیچ هاپلوتیپی در ارتباط با افراد مبتلا به POI یا افرادی با سطح FSH بالا، در دو پلی مورفیسم دیگر مشاهده نشد (۱۷). Kumar و همکاران در سال ۲۰۱۷ SNP‌های درگیر در دو ژن BMP15 و GDF9 را در زنان مبتلا به POF مطالعه کردند. پس از آنالیز داده‌ها، چهار واریانت مختلف در ۶ بیمار مبتلا به POF در حالت هتروزیگوس، در ژن BMP15 مشاهده کردند. اگرچه دو تا از این واریانت‌ها جایگزینی بد معنی هستند ولی اثری خنثی بر عملکرد پروتین دارند (۱۸). علاوه بر این در تحقیقی که در سال ۲۰۱۵ بر روی زنان سوری مبتلا به POF توسط Rana Al-ajoury و همکاران انجام گرفت، به طور خلاصه دو واریانت جایگزینی بد معنی، یک واریانت درج^{۱۶}، یک واریانت خاموش و یک واریانت جدید در ناحیه اینترونی ژن BMP15 مشاهده کردند که

، *FRAX, GDF9*

۱۷-آلفا هیدروکسیلاز، آروماتاز

عفونت‌های ویروسی، سیگار کشیدن

واکسیناسیون HPV

بیماری‌های مرتبط:

بیماری آدیسون^۱، ویلتیلیگو^۲، میاستنی گراویس^۳

سندرم شوگر^۴، لوپوس اریترماتوز سیستمیک^۵

بیماری سلیاک^۶، سندروم اتوآنتی بادی چندگانه ای^۷

اتوآنتی بادی تخمدان^۸، اتوآنتی بادی زنولا پلوسیدا^۹

عدم تعادل سلول‌های ایمنی:

افزایش سلول‌های T CD4+ سلول B سلول

سیکلو فسفامید، بوسولفان، خردل نیتروژن

شیمی درمانی و پرتودرمانی

BMP15 و GDF9 که جزئی از خانواده فاکتور رشد تراریختی بتا^{۱۱} (TGF-β) می‌باشند هر دو به گیرنده‌های غشایی سرین/ترئونین کیناز^{۱۱} که فعال کننده گیرنده شبه کیناز^{۱۲} (ALK) نیز خوانده می‌شوند، متصل می‌شوند (۱۳). این گیرنده‌ها به دو زیر گروه تقسیم می‌شوند: گیرنده نوع I که شامل هفت گیرنده (ALK 1-7) است و گیرنده‌های نوع II که شامل پنج گیرنده (ActRII، ActRIIB، AMHRII، TGF-βRII و BMPRII) می‌باشد. GDF9 به گیرنده‌های (ALK5 و BMPRII) و BMP15 به گیرنده (ALK6 و BMPRII) متصل می‌شود. هنگامی که گیرنده‌های نوع I و II به لیگاندهای خود متصل می‌شوند، یک مجموعه هتروداپمیریک ایجاد می‌کنند که در آن گیرنده نوع II (BMPRII)، گیرنده نوع I (ALK5,6) را فعال می‌کند. پس از فعال شدن، گیرنده نوع I، پروتئین‌های SMAD تنظیم کننده گیرنده خاص (R-SMAD) را فسفریله می‌کند که از طریق تعامل با SMAD مشترک (SMAD4 یا Co-SMAD) سیگنال را به هسته منتقل می‌کند. این کمپلکس SMAD سپس به هسته منتقل می‌شود تا با عوامل رونویسی خاص برای تنظیم

¹ Addison's diseases

² Vitiligo

³ Myasthenia gravis

⁴ Sjögren's syndrome

⁵ Systemic lupus erythematosus

⁶ Celiac disease

⁷ Autoimmune polyglandular syndrome

⁸ Ovarian autoantibody

⁹ Zona pellucida autoantibody

¹ Transforming growth factor-β

¹ Transmembrane Serine/Threonine Kinase Receptors

¹ Activin receptor-like kinase²

سلول‌های کومولوس، خوشه‌ای از سلول‌هاست که تخمک را در فولیکول تخمدان و پس از تخمک گذاری احاطه کرده است. در فولیکول آنترال، ممکن است به عنوان امتداد غشای میمران گرانولوزا در نظر گرفته شود.

¹ Primary Ovarian Insufficiency

¹ Ovarian hyperstimulation syndrome

¹ Insertion

روش کار

مطالعات بیوانفورماتیکی

با استفاده از دیتابیس یونی پرات (Uniprot) واریانت های ژن *BMP15* انسانی با کد دسترسی O599720 بررسی شد. واریانت های طبیعی متعددی برای این دو ژن در این دیتابیس عنوان شده است که تعدادی از آن ها در ارتباط با بیماری ها هستند. مشخصات واریانت های بررسی شده در این مطالعه به طور کامل در جدول ۲ گردآوری شده است.

جمع آوری نمونه و استخراج DNA ژنومی

در این مطالعه از ۴۵ نفر از زنان مراجعه کننده به پژوهشگاه علوم تولید مثل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد که توسط پزشک متخصص به عنوان بیمار مبتلا به POF تشخیص داده شده بودند و علائم مرتبط با POF از جمله بالا بودن سطح LH و FSH و پایین بودن سطح هورمون های جنسی و از دست دادن دوره های قاعدگی منظم قبل از ۴۰ سالگی را داشتند و همچنین ۴۵ زن سالم و صاحب فرزند بدون هیچگونه سابقه بیماری های مرتبط با فولیکولوژن و تخمک گذاری نمونه ی خون وریدی گرفته شد. خون گرفته شده در تیوب های حاوی EDTA ریخته و در دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند. سپس DNA ژنومی از لنفوسیت های خون به روش Salting out استخراج گردید.

مواد و روش برای طراحی پرایمر، PCR و SSCP

ناحیه ی اگزون شماره ی ۲ ژن *BMP15* که پلی مورفیسم های 598 C>T، 538 G>A، 468 G>A، 443 T>C - شود و همچنین ناحیه ی اگزون شماره ی ۹ ژن *ALK6* که در برگرفته ی پلی مورفیسم های 671 G>A و 1020 A>G است، جهت طراحی پرایمر مورد استفاده قرار گرفتند. طراحی پرایمر با استفاده از نرم افزار پرایمر ۳ انجام گرفت (جدول ۳). با استفاده از این پرایمرها، قطعات مورد نظر برای هر کدام از این ژن ها از طریق روش واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) تکثیر شدند. واکنش PCR برای ژن *BMP15* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۱ میکرولیتر از نمونه

واریانت اینترونی جدید تاکنون توصیف نشده بود و در افراد کنترل نیز مشاهده نشد (۱۹).

ژن *ALK6 (BMPR1B)* در انسان روی بازوی بلند کروموزوم ۴ در موقعیت 4q22.3 واقع شده است و دارای ۱۸ اگزون می باشد. در سال ۲۰۱۹، Jia و همکاران پلی مورفیسم های اگزون ۹ ژن *BMPR1B* را در میش های سه نژاد بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که SNP های اگزون ۹ ژن *BMPR1B* که با استفاده از روش های PCR-SSCP و تعیین توالی DNA مشخص شده بود، با اندازه توله های میش و صفات چندقلوزایی آن ها در ارتباط است (۲۰). علاوه بر این Renault et al. در سال ۲۰۲۰ به بررسی سه واریانت بدمعنی ژن *BMPR1A* و *BMPR1B* در سه زن مبتلا به POI پرداختند. آن ها نشان دادند که واریانت های *BMPR1A-p.Arg442His* و *BMPR1B-p.Phe272Leu* به درستی بیان شده اند و در جایگاه درست قرار گرفته اند، اما منجر به اختلال در سیگنالینگ های پایین دست BMP می شوند. اگرچه واریانت *BMPR1B-p.Arg254His* بر فعالیت رونویسی اثری ندارد و تأثیر عملکردی در شرایط آزمایشگاهی را نشان نمی دهد، اما با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک، یک اثر مخرب بالقوه نشان دادند (۲۱).

داده های مطالعات اخیر از ژن *BMP15* و گیرنده آن *BMPR1B*، شواهدی بر روند طبیعی وقوع پلی مورفیسم در ارتباط با نارسایی زودرس تخمدان را ارائه می دهد و به اهمیت بسیار زیاد *BMP15* به عنوان یک ژن کاندید حیاتی اشاره می کند، که باید در سایر جمعیت ها نیز مورد مطالعه قرار گیرد. جالب است که همه یافته های توصیف شده برای واریانت های شناسایی شده انسانی، ممکن است نشان دهد که *BMP15* ممکن است نقش تعیین کننده ای در نارسایی زودرس تخمدان داشته باشد. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی ۴ واریانت از اگزون ۲ ژن *BMP15* و دو واریانت از اگزون شماره ۹ ژن *BMPR1B* در جمعیت زنان ایرانی مبتلا به نارسایی زودرس تخمدان است.

در SSCP قطعات روی ژل های پلی آکریل آمید با استفاده از الکتروفورز در شرایط دناتوره کردن جدا می شوند. برای انجام SSCP، ۵ μl از محصول PCR با ۵ μl از لودینگ بافر SSCP را در یک میکروتیوپ ریخته و میکروتیوپ ها داخل هیتر در دمای ۹۴ درجه به مدت ۸ تا ۱۰ دقیقه قرار گرفت و بلافاصله به مدت ۱۰ دقیقه در داخل پودر یخ فرو برده شد تا شکل فضایی مناسب را به خود بگیرند. محصولات PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪، به مدت ۲۲ ساعت با ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز شدند و پس از آن با رنگ نترات نقره رنگ آمیزی شدند. از آنجایی که SSCP دقت بالایی دارد و بر اساس تغییر کنفورماسیون حاصل از تغییر در نوع یا توالی نوکلئوتیدها است، تفاوت های تک نوکلئوتیدی را نشان می دهد. تعدادی از نمونه ها که مشکوک به شیفت باندی بودند، جهت تعیین توالی به شرکت پیشگام ارسال شدند و نتایج حاصل از آن با نرم افزار CLC Genomics Workbench بررسی شد.

DNA، ۷. میکرولیتر از هر دو نوع پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومول و ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mix (Ampliqon، محصول کشور دانمارک) صورت گرفت. واکنش PCR برای ژن *BMP1B* از هر دو نوع پرایمر ۱ μl با غلظت ۱۰ pmol، ۱۰ μl MasterMix ۱۲/۵، ۱ μl نمونه DNA با غلظت ۱۰۰ ng ترکیب و با آب استریل به حجم نهایی ۲۵ μl رسانده شد. برنامه زمانی و دمایی واکنش PCR برای هر دو ژن بدین صورت انجام شد: مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و تعداد ۳۰ دور، مرحله واسرشت (دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه)، مرحله اتصال (دمای ۶۳ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه)، مرحله تکثیر یا طویل شدن (دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه) انجام شد و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه تنظیم شد. در نهایت برای اطمینان از تکثیر قطعات، محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد.

جدول ۲. مشخصات واریانت های بررسی شده ژن *BMP15* و *BMP1B* شامل جایگزینی در سطح ژنومی (شماره گذاری به منطقه

کد گذاری اشاره می کند) (AA) نمادی برای اسید آمینه، (Chr.) نمادی برای کروموزوم می باشد.

Gene	Location/ Exon count	Position	Sequence variation	Protein change	Position Change	dbSNP	Disease association	Description/ References
<i>BMP15</i>	Xp11.22/ 2	Exon 2	c.598 C>T	p.His200Tyr (H>Y)	200	rs202165852	Yes	Ovarian dysgenesis 2
			c.538 G>A	p.Ala180Thr (A>T)	180	rs104894767	Yes	1- POF4 (unknown pathological significance; no or minor deleterious effect detected)
			c.443 T>C	p.Leu148Pro (L>P)	148	rs114823607	Yes	2-Ovarian dysgenesis 2 Ovarian dysgenesis 2
<i>BMP1B</i> (<i>ALK6</i>)	4q22.3/ 18	Exon9	c.468 G>A c.671G>T	p.V156 p.Arg224Leu (R>L)	224	rs35973133	NO	
*c.1020A>G								

* پلی مورفیسم A>G 1020 در ژنوم انسان است که معادل آن پلی مورفیسم FecB (A>G) 830 موجود در ژن *ALK6* گوسفند است.

جدول ۳. مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای دو ژن *BMP15* و *BMP1B*

Gene	Primers (5'-3')	Position	Accession number	TM (°C)	Amplicon size (bp)
<i>BMP15</i>	BMP15-FW: ACCTGGCATATACAGATCCTGGG	Int-Exon 2	NM_005448	63	250
	BMP15-RV: ACCTTTGCTGAACAAGTTGTGTG	Exon 2			
<i>BMP1B</i> (<i>ALK6</i>)	ALK6-FW: TGGGATTTCACAGGTCCAAAGG	Int-Exon 9	NM_001203	63	248
	ALK6-RV: AGCTAGGAAACCCTGAACATAGC	Int-9-10			

نتایج

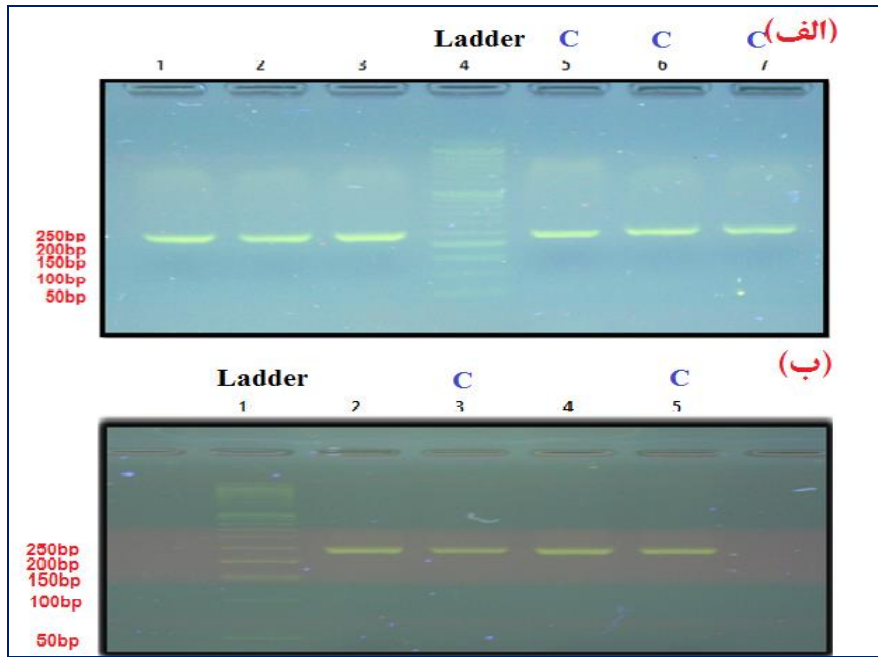
پس از حصول اطمینان از کیفیت و کمیت DNA استخراج شده، تمامی نمونه‌های استخراج شده با شرایط ذکر شده PCR شدند و محصولات PCR ژن *BMP15* و *BMP1B* روی ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد برده شد. همانطور که در شکل ۱ قسمت الف و ب دیده می‌شود هیچ شیفت بانندی در نمونه‌های بیمار مشاهده نشد.

پس از استخراج DNA ژنومی و استفاده آن در تکنیک SSCP-PCR، نمونه‌های SSCP مربوط به ژن *BMP15*، در ۹ بیمار از ۴۵ نفر، باند اضافه نشان دادند (شکل ۲-الف) که برای اطمینان از وجود شیفت بانندی به همراه تعدادی از نمونه‌ی کنترل و بیمار که تغییری نداشتند برای تعیین توالی به شرکت پیشگام فرستاده شدند. در سایر نمونه‌ها تغییری در الگوی باندها مشاهده نشد.

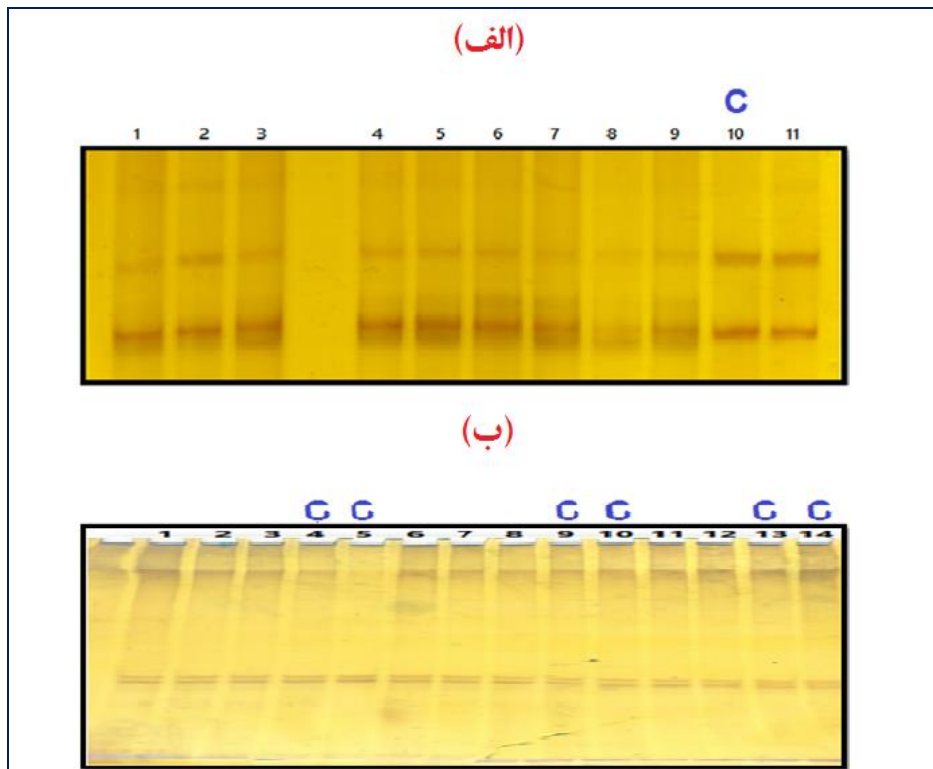
برای آزمون ۹ ژن *BMP1B* هیچ تفاوتی در الگوی باندها دیده نشد (شکل ۲-ب).

تعدادی از نمونه‌های کنترل و بیمار که نتایج SSCP آنها مشکوک بود انتخاب شده و تعیین توالی شدند. نتایج تعیین توالی برای هر دو ژن هیچ جهش یا حالت هتروزیگوتی را نشان ندادند (شکل ۳ و ۴).

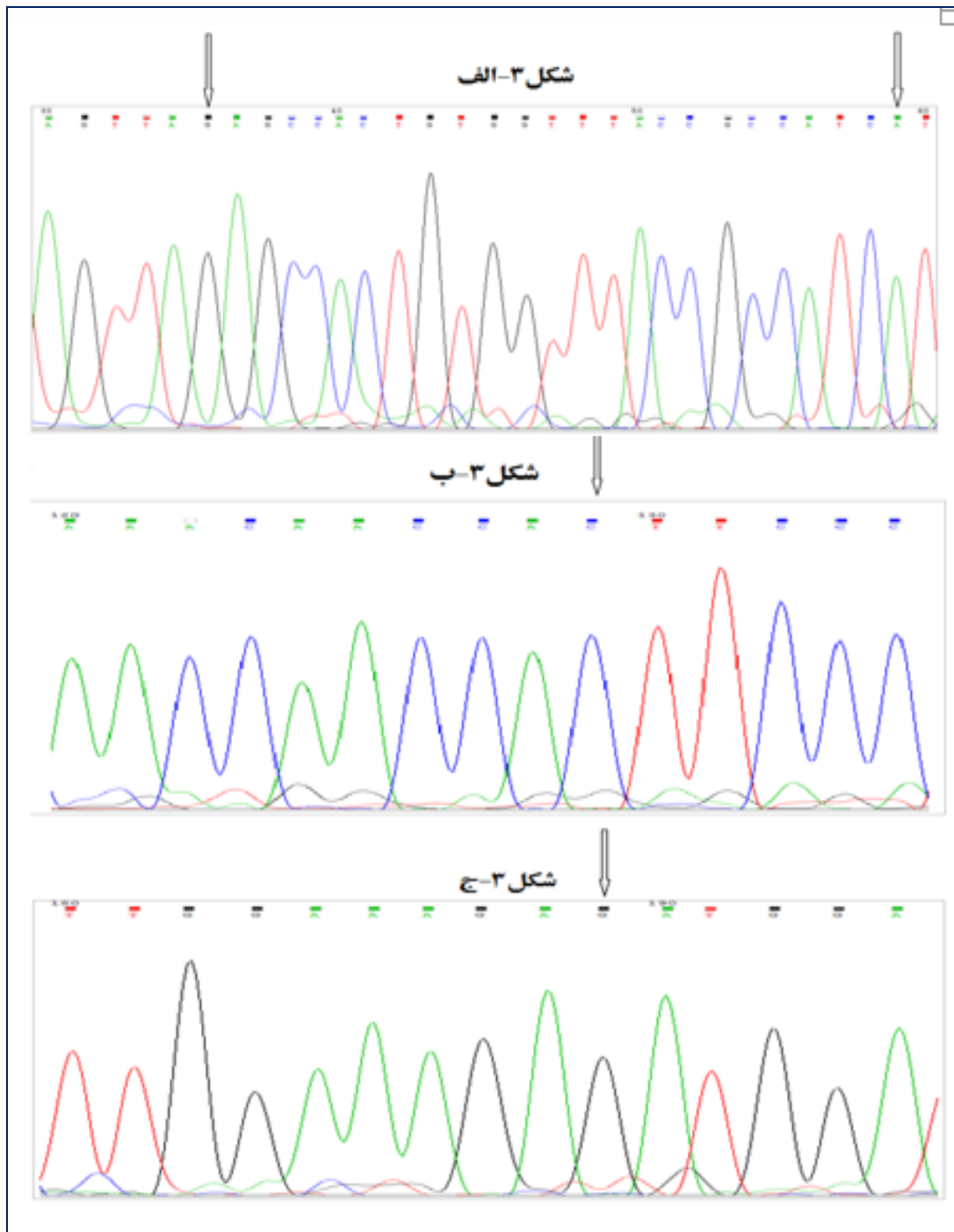
با وجود اینکه در نتایج ژل SSCP ژن *BMP15* در تعدادی از نمونه‌ها شیفت بانندی دیده شد اما نتایج BLAST یا همردیفی توالی افراد کنترل، افراد بیمار و ژنوم مرجع انسانی هیچ تغییری را نشان ندادند (ژن *BMP1B* شکل ۵-، ژن *BMP15* شکل ۶) نتایج حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم افزار CLC Genomics Workbench بررسی شد و اطلاعات دریافتی از این طریق نیز نشان داد هیچ یک از SNP‌های مورد نظر و یا SNP جدیدی در توالی افراد بیمار اتفاق نیفتاده است.



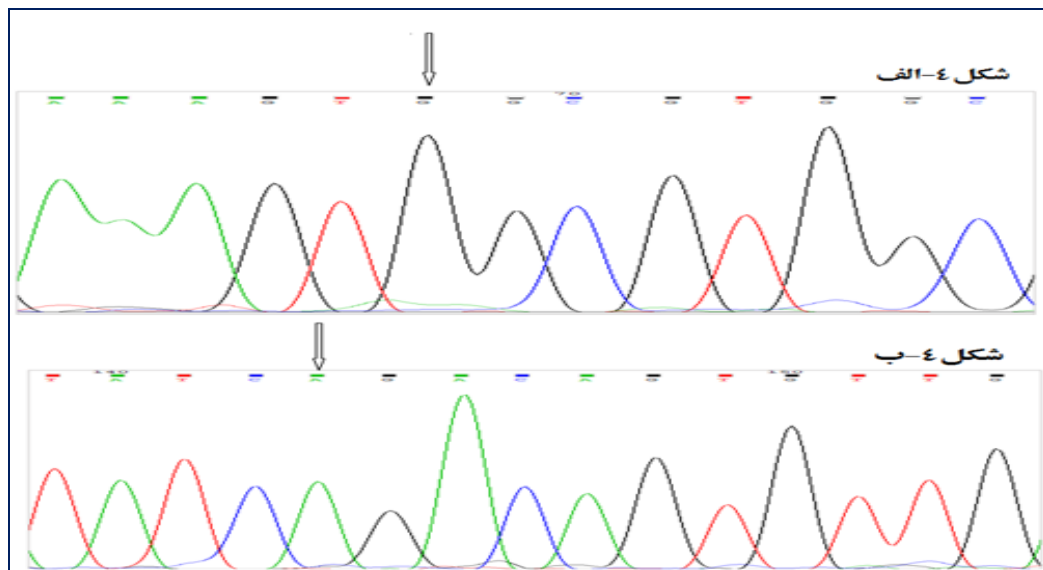
شکل ۱. (الف) نتیجه ی PCR آگزون دوم ژن *BMP15*. چاهک های ۱، ۲ و ۳ مربوط به نمونه بیمار و چاهک ۵، ۶ و ۷ مربوط به نمونه های کنترل است. چاهک ۴ Ladder را نشان می دهد (ب) نتیجه ی PCR مربوط به ژن *ALK6* است. چاهک ۲ و ۴ مربوط به نمونه بیمار و چاهک ۳ و ۵ نمونه های کنترل را نشان می دهد.



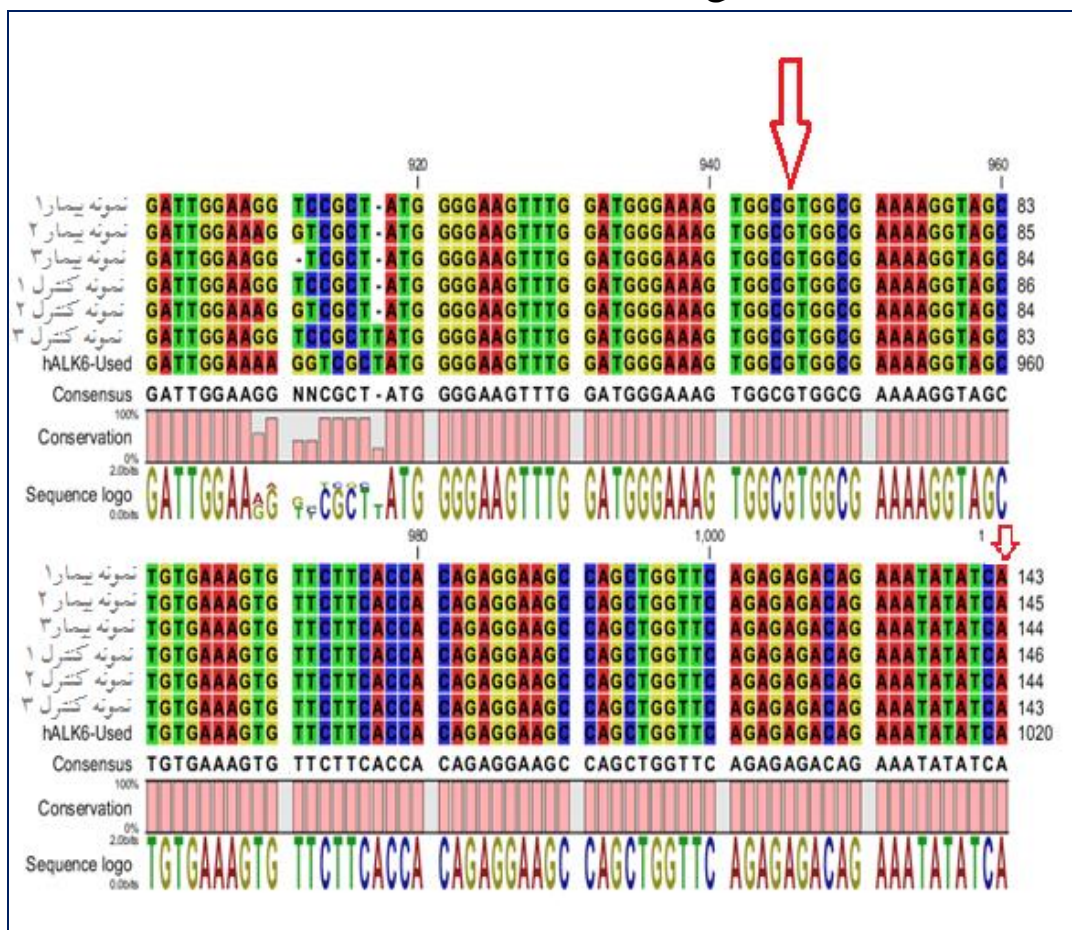
شکل ۲: (الف) نتایج حاصل از SSCP مربوط به آگزون ۲ ژن *BMP15*. چاهک ۱۰ مربوط به نمونه کنترل و سایر موارد مربوط به نمونه های بیمار است. (ب) نتایج حاصل از SSCP مربوط به آگزون ۹ ژن *BMPR1B* چاهک های (۱-۳، ۶-۸، ۱۱ و ۱۲) مربوط به نمونه های بیمار، و افرادی که با c مشخص شده اند، نمونه کنترل است.



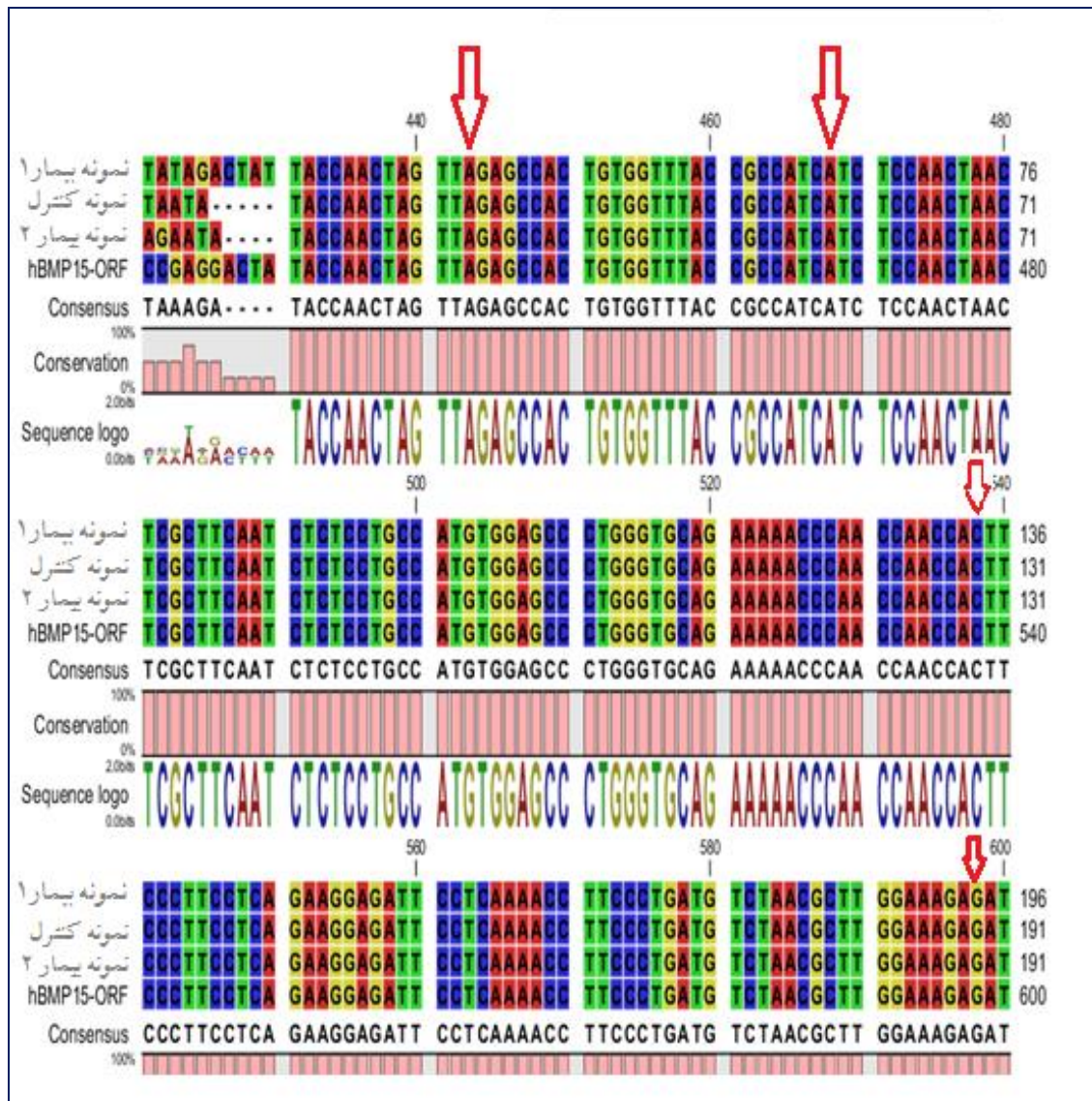
شکل ۳. نتیجه تعیین توالی یک نمونه از افراد مبتلا به POF برای ژن *BMP15* (الف) همانطور که مشاهده می شود هیچ تغییری در موقعیت ۴۴۳ و ۴۶۸ مشاهده نمی شود (ب) هیچ تغییری در موقعیت ۵۳۸ دیده نمی شود (ج) نتیجه تعیین توالی مربوط به فرد مبتلا به POF برای ژن *BMP15* در موقعیت ۵۹۸ هیچ تغییری مشاهده نمی شود.



شکل ۴: نتیجه تعیین توالی مربوط به بیمار POF برای ژن *ALK6* (الف) تغییری در موقعیت ۹۴۵ دیده نمی- شود (ب) هیچ تغییری در موقعیت ۱۰۲۰ مشاهده نمی شود.



شکل ۵. نتایج مربوط به همردیفی داده های حاصل از تعیین توالی ژن *BMPRI1* (*ALK6*) با نرم افزار CLC. سه ردیف اول مربوط به افراد بیمار و سه ردیف دوم مربوط به افراد کنترل و ردیف ششم ژنوم مرجع انسانی است. طبق شکل در موقعیت ۹۴۵ و ۱۰۲۰ تغییری اتفاق نیفتاده است.



شکل ۶. نتایج مربوط به همردیفی داده‌های حاصل از تعیین توالی ژن *BMP15* با نرم‌افزار CLC. ردیف اول و سوم مربوط به نمونه‌های بیمار، ردیف دوم نمونه کنترل و ردیف چهارم ORF مرجع انسانی است. طبق شکل در موقعیت ۴۴۳، ۴۶۸، ۵۳۸ و ۵۹۸ تغییری مشاهده نمی‌شود.

بحث

مکانیسم‌هایی که تفاوت‌های خاص گونه را در تعداد فولیکول‌هایی که در طول هر چرخه تولیدمثلی به تخمک‌گذاری می‌روند، تنظیم می‌کنند، به خوبی شناخته نشده‌اند. سطوح بیان mRNA مربوط *GDF9* و *BMP15* به شدت در هر گونه تنظیم می‌شود و بر میزان تخمک‌گذاری خاص گونه تأثیر می‌گذارند (۲۲). *GDF9*، *BMP15* و *BMP1B* جزء پروتئین‌های ابرخانواده *TGFβ* می‌

فیزیولوژی و باروری تخمدان توسط سیگنال‌های غدد درون ریز و پاراکرین کنترل می‌شود. این سیگنال‌ها وابسته به گونه عمل می‌کنند و تعداد تخمک‌گذاری را در گونه‌های مختلف پستانداران تعیین می‌کنند. در حالی که انسان و پستاندارانی مانند گاو یا گوزن قرمز معمولاً فقط یک تخمک در هر چرخه تخمک‌گذاری آزاد می‌کنند، پستانداران دیگر مانند موش و خوک می‌توانند بیش از ۱۰ تخمک در هر چرخه تخمک‌گذاری آزاد کنند.

باشند که در بافت های تخمدان بیان می شوند و تنظیم کننده ی فولیکولوژن در تخمدان هستند (۲۳).

BMP15 انسانی از جمله پروتئین های ترشحی تخمدان است که ژن کد کننده ی آن روی بازوی کوتاه کروموزوم X قرار گرفته است و شامل ۳۹۲ اسید آمینه می باشد. به احتمال زیاد این پروتئین در رشد فولیکول ها نقش دارد. فاکتور رشد یا تمایز مختص تخمک است که فولیکولوژن و رشد سلول های گرانولوزا (GC) را تحریک می کند (۲۴). مطالعات مختلفی ارتباط آن را با بیماری های مرتبط با ناباروری از جمله POF و PCOS نشان می دهند (۲۵).

نارسایی زودرس تخمدان (POF)، توقف فعالیت تخمدان ها قبل از سن ۴۰ سالگی است. در این عارضه فرد دوره های قاعدگی منظم خود را از دست می دهد و سطح پایین هورمون های جنسی و افزایش سطح گنادوتروپین ها در این بیماران قابل مشاهده است. در بیشتر موارد این بیماری علت مشخصی ندارد اما عوامل متعددی از جمله فاکتورهای ژنتیکی، عوامل متابولیکی، بیماری های خود ایمنی، جراحی، شیمی درمانی و پرتودرمانی و عفونت در شکل گیری این بیماری دخالت دارند. افسردگی، عصبانیت، کاهش میل جنسی از جمله علائم این بیماری است و شیوه های درمانی که برای این بیماری اتخاذ می شود هورمون درمانی و بارداری از طریق تخمک اهدا شده است (۲۶،۲۷).

در مطالعه ای که Laissue و همکارانش در سال ۲۰۰۶ روی ۲۰۳ بیمار مبتلا به POF و ۵۴ زن با قاعدگی منظم که حداقل یک فرزند داشتند انجام دادند، واریانت هایی برای ژن BMP15 مشاهده کردند که در افراد کنترل وجود نداشت از جمله این واریانت ها 443 T>C، 468 G>A و 538 G>T بودند. واریانت های 468 G>A و 538 G>T جایگزینی های خاموش هستند. در نهایت این بررسی نشان داد که شاید BMP15 علت اصلی نارسایی زودرس تخمدان نباشد اما این احتمال وجود دارد که در این بیماری دخالت داشته باشد (۲۸).

Tiotiu و همکارانش در سال ۲۰۱۰ با مطالعه روی ۵۰ زن مبتلا به POF و ۲۱۴ کنترل، ۹ واریانت برای ژن BMP15 تشخیص دادند. برای بیشتر واریانت ها، پیش بینی شد که جایگزینی آمینواسیدی تاثیر به سزایی روی ساختار و عملکرد پروتئین نداشته باشد. واریانت

A180T در دو بیمار مبتلا به POF و در دو فرد کنترل مشاهده شد و واریانت L148P که به طور بالقوه مخرب است و سابقاً در بیماران POF گزارش شده بود برای اولین بار در میان کنترل ها هم مشاهده شد (۲۹).

سپس در مطالعه ای که Al-ajoury و همکارانش در سوریه در سال ۲۰۱۴ بر روی ۶۵ بیمار مبتلا به POF و ۱۰۰ کنترل داشتند، ۵ واریانت در ۶ بیمار مشاهده شد از جمله جایگزینی بدمعنی 538 G>T که در حالت هتروزیگوس در یک بیمار مشاهده شد. یافته های این مطالعه نقش کلیدی BMP15 را در فولیکولوژن انسان نشان داد (۱۹).

به علاوه در مطالعه ی Liu و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در چین بر روی ۲۱۶ بیمار مبتلا به PCOS، ۵ جهش بدمعنی جدید در BMP15 کشف شد، که جهش C>T 598 در اگرون دوم این ژن مشاهده شد (۳۰).

بیشتر واریانت های گزارش شده در BMP15 در ناحیه ی Pro-region این ژن واقع شده اند. این ناحیه در پردازش پس از ترجمه ی پرو-پروتئین BMP15 دخالت دارد و نقش اساسی پردازش پس از ترجمه ی مناسب پرو-پروتئین BMP15 در بارداری زنان را بر عهده دارد. وجود پلی مورفیسم در ژن BMP15 منجر به کاهش ترشح پروتئین های فعال می شود و ممکن است در روند طبیعی فعالیت های این ژن اختلال ایجاد کند. برای مثال جهش 443 T>C منجر به تغییر L148P در سطح پروتئین می شود. تبدیل لوسین به پرولین منجر به تغییر در خاصیت آب گریزی این پروتئین می شود. وجود پرولین ممکن است استحکام زنجیره پپتیدی را تغییر دهد و می تواند چین خوردگی پروتئین یا سینتیک آن را تغییر دهد. این واریانت در چندین بیمار مبتلا به POF با فنوتیپ های مختلف دیده شده است. به عنوان مثال در بیماری با نژاد آفریقایی-آمریکایی مبتلا به POF در سن ۲۰ سالگی مشاهده شده است (۲۹). همچنین در زنی آفریقایی با آمنوره ثانویه پیشرفته طی دوره جلوگیری از بارداری در سن ۲۹ سالگی دیده شده است (۳۱). علاوه بر این، جهش 538 G>A در تخریب دایمریزاسیون و ترشح پروتئین های فعال دخالت دارد.

POF را نشان می دهد، اینگونه استنباط می شود که جهش در این ژن با بیماری زایی POF در ارتباط است و عدم مشاهده هرگونه SNP در بیماران مورد مطالعه می تواند به علت کم بودن حجم نمونه های مورد مطالعه باشد. همچنین در جمعیت های مختلف ممکن است تفاوت های ژنتیکی وجود داشته باشد و بعضی از واریانت ها به جمعیت خاصی محدود شوند یا در بعضی جمعیت ها بیشتر مشاهده شوند. در مورد ژن *BMP1B* نیز به دلیل عدم وجود پیشینه ی تحقیق در خصوص وجود ارتباط با بیماری POF و دیده نشدن هیچ گونه SNP در این مطالعه و با توجه به نقش مهم این ژن در مسیر فولیکولوژن و میزان تخمک گذاری، برای اظهار نظر نیاز به مطالعه ی بیشتری در این زمینه است.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک مولکولی بوده و توسط دانشگاه یزد حمایت مالی شده است. از جناب آقای حمیدرضا اشرف زاده و پرسنل محترم مرکز تحقیقات سقط در پژوهشکده علوم تولید مثل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند، کمال تقدیر و تشکر را داریم.

تضاد منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را گزارش نکرده اند.

References

1. Santoro N, Roeca C, Peters BA, Neal-Perry G. The Menopause Transition: Signs, Symptoms, and Management Options. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2021;106(1):1-15.
2. Ghahremani-Nasab M, Ghanbari E, Jahanbani Y, Mehdizadeh A, Yousefi M. Premature ovarian failure and tissue engineering. *Journal of cellular physiology*. 2020;235(5):4217-26.
3. Komorowska B. Autoimmune premature ovarian failure. *Menopause Review/Przegląd Menopauzalny*. 2016 Dec 1;15(4):210-4.
4. He Y, Chen D, Yang L, Hou Q, Ma H, Xu X. The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in premature ovarian failure. *Stem cell research & therapy*. 2018;9(1):1-7.
5. Ayesha VJ, Goswami D. Premature ovarian failure: an association with autoimmune diseases. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2016;10(10):QC10.
6. Jankowska K. Premature ovarian failure. *Przegląd menopauzalny= Menopause review*. 2017;16(2):51.
7. Pastore LM, Christianson MS, Stelling J, Kearns WG, Segars JH. Reproductive ovarian testing and the alphabet soup of diagnoses: DOR, POI, POF, POR, and FOR. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2018;35(1):17-23.
8. Jin H, Ahn J, Park Y, Sim J, Park HS, Ryu CS, et al. Identification of potential causal variants for premature ovarian failure by whole exome sequencing. *BMC medical genomics*. 2020;13(1):1-8.

در بررسی ما وجود واریانت های $468 G>A$ ، $443 T>C$ ، $538 G>A$ که سابقاً در بیماران مبتلا به POF گزارش شده بود و همچنین واریانت $598 C>T$ که در بیماران مبتلا به سندروم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) گزارش شده بود، به دلیل نزدیکی این جهش به سایر جهش های انتخابی و همچنین احتمال ارتباط POF و PCOS در بیماران مبتلا به POF در جمعیت زنان ایرانی بررسی شد اما در هیچ یک از ۴۵ بیمار مورد مطالعه و افراد کنترل این واریانت ها دیده نشد.

ژن *ALK6* *BMP1B*، فاکتور ترشحي دیگر تخمدان است که در روند فولیکولوژن دخالت دارد. این ژن گیرنده ی BMP15 است و تاکنون شواهدی که نشان دهنده ی نقش این ژن در گسترش POF باشد گزارش نشده است. اما در مطالعات زیادی نقش واریانت های آن در افزایش نرخ تخمک گذاری و چندقلو زایی در گوسفندان اثبات شده است (۳۲،۳۳). جهش بدمعنی $671 G>A$ در سرطان تخمدان گزارش شده است (۳۴) که این جهش در Transcript variant 2 در موقعیت ۹۴۵ قرار می گیرد. علاوه بر این در مطالعه ی حاضر، وجود و ارتباط جهش $1020 A>G$ که در گوسفندان گزارش شده بود (۳۲)، با پیدایش POF بررسی شد که در نمونه های مبتلا به POF مورد مطالعه ی ما این واریانت نیز رؤیت نشد.

نتیجه گیری

با توجه به نقش *BMP15* در مسیر فولیکولوژن و مطالعات قبلی، که شواهدی دال بر وجود جهش در این ژن در بیماران مبتلا به

9. Sheikhsari G, Aghebati-Maleki L, Nouri M, Jadidi-Niaragh F, Yousefi M. Current approaches for the treatment of premature ovarian failure with stem cell therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;102:254-62.
10. Cordts EB, Christofolini DM, Dos Santos AA, Bianco B, Barbosa CP. Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2011;283(3):635-43.
11. Tšuiiko O, Noukas M, Žilina O, Hensen K, Tapanainen JS, Mägi R, et al. Copy number variation analysis detects novel candidate genes involved in follicular growth and oocyte maturation in a cohort of premature ovarian failure cases. *Human reproduction*. 2016;31(8):1913-25.
12. Persani L, Rossetti R, Cacciatori C, Fabre S. Genetic defects of ovarian TGF- β -like factors and premature ovarian failure. *Journal of endocrinological investigation*. 2011 Mar;34(3):244-51.
13. Miyazawa K, Miyazono K. Regulation of TGF- β family signaling by inhibitory Smads. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2017;9(3):a022095.
14. Qin Y, Tang T, Li W, Liu Z, Yang X, Shi X, et al. Bone morphogenetic protein 15 knockdown inhibits porcine ovarian follicular development and ovulation. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2019;7:286.
15. Nickel J, Mueller TD. Specification of BMP signaling. *Cells*. 2019;8(12):1579.
16. Belli M, Shimasaki S. Molecular aspects and clinical relevance of GDF9 and BMP15 in ovarian function. *Vitamins and hormones*. 2018;107:317-48.
17. Santos M, Cordts EB, Peluso C, Dornas M, Neto FHV, Bianco B, et al. Association of BMP15 and GDF9 variants to premature ovarian insufficiency. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2019;36(10):2163-9.
18. Kumar R, Alwani M, Kosta S, Kaur R, Agarwal S. BMP15 and GDF9 gene mutations in premature ovarian failure. *Journal of reproduction & infertility*. 2017;18(1):185.
19. Al-ajoury R, Kassem E, Al-halabi B, Moassess F, Al-achkar W. Investigation of some genetic variations in BMP15 accompanied with premature ovarian failure (POF) in Syrian women. *Middle East Fertility Society Journal*. 2015 Jun 1;20(2):91-6.
20. Jia J, Chen Q, Gui L, Jin J, Li Y, Ru Q, et al. Association of polymorphisms in bone morphogenetic protein receptor-1B gene exon-9 with litter size in Dorset, Mongolian, and Small Tail Han ewes. *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 2019;32(7):949.
21. Renault L, Patiño LC, Magnin F, Delemer B, Young J, Laissue P, et al. BMPR1A and BMPR1B missense mutations cause primary ovarian insufficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2020;105(4):e1449-57.
22. Crawford JL, McNatty KP. The ratio of growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 mRNA expression is tightly co-regulated and differs between species over a wide range of ovulation rates. *Molecular and cellular endocrinology*. 2012 Jan 2;348(1):339-43.
23. Yatsenko SA, Rajkovic A. Genetics of human female infertility. *Biology of reproduction*. 2019 Sep 1;101(3):549-66.
24. Saito S, Yano K, Sharma S, McMahon HE, Shimasaki S. Characterization of the post-translational modification of recombinant human BMP-15 mature protein. *Protein Science*. 2008 Feb; 17(2):362-70.
25. Clarke H. Control of mammalian oocyte development by interactions with the maternal follicular environment. *Oocytes*. 2017:17-41.
26. Sanfins A, Rodrigues P, Albertini DF. GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2018;35(10):1741-50.
27. Pouresmaeili F, Fazeli Z. Premature ovarian failure: a critical condition in the reproductive potential with various genetic causes. *International journal of fertility & sterility*. 2014;8(1):1.
28. Laissue P, Maitre S, Touraine P, Kuttann F, Ritvos O, Aittomaki K, et al. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *European Journal of Endocrinology*. 2006; 154: 739-744
29. Tiotiu D, Mercadal BA, Imbert R, Verbist J, Demeestere I, De Leener A, et al. Variants of the BMP15 gene in a cohort of patients with premature ovarian failure. *Human Reproduction*. 2010; 25: 1581-1587.
30. Liu J, Wang B, Wei Z, Zhou P, Zu Y, Zhou S, et al. Mutational analysis of human bone morphogenetic protein 15 in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism Clinical and Experimental* 60. 2011; 1511-1514.
31. Di Pasquale E, Rossetti R, Marozzi A, Bodega B, Borgato S, Cavallo L, et al. Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006; 91(5):1976-9.
32. Wen Y-L, Guo X-F, Ma L, Zhang X-S, Zhang J-L, Zhao S-G, et al. The expression and mutation of BMPR1B and its association with litter size in small-tail Han sheep (*Ovis aries*). *Archives Animal Breeding*. 2021; 64(1):211-21.
33. Zhang X, Zhang L, Sun W, Lang X, Wu J, Zhu C, et al. Study on the correlation between BMPR1B protein in

- sheep blood and reproductive performance. *Journal of animal science*. 2020; 98(5):skaa100.
34. Neumann JC, Chandler GL, Damoulis VA, Fustino NJ, Lillard K, Looijenga L, et al. Mutation in the type IB bone morphogenetic protein receptor *alk6b* impairs germ-cell differentiation and causes germ-cell tumors in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108: 13153-13158.

Original Article

The Study of Exon 2 of *BMP15* and Exon 9 of *BMPR1B* Gene Polymorphisms in Iranian Infertile Women with Premature Ovarian Failure

Received: 19/09/2021 - Accepted: 11/09/2022

Parvane Zarrin¹
Seyede Nafise Tabatabaei²
Seyed Mohammad Moshtaghiun^{3*}
Ali Falahati⁴
Nasrin Ghasemi⁵

¹ MSc. of Genetics, Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Yazd, Iran.

² PhD student, Bioprocess Engineering Research Group; Institute of Industrial and Environmental Biotechnology (IIEB), National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

³ Assistant Professor of Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Yazd, Iran.

⁴ Professor of Medical Genetics, Abortion Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

⁵ Professor of Medical Genetics, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd Reproductive Sciences Research Institute, Abortion Research Center

Email: moshtaghiun@yazd.ac.ir

Abstract

Introduction: Premature ovarian failure (POF) is the end of ovarian activity before the age of 40, which is associated with low levels of sex hormones and high levels of gonadotropins. Genetic factors play an essential role in POF. *BMP15* and its receptor *BMPR1B* are members of the TGF β superfamily that are expressed in the ovaries and are involved in folliculogenesis. Any changes in these genes may disrupt them. So, this study aimed to assess 4 SNPs in exon 2 of *BMP15* and 2 SNPs in exon 9 of *BMPR1B* genes as candidate SNPs in infertile Iranian women with POF.

Materials and Methods: Using the Uniprot database and PCR-SSCP methods, the link between SNPs 443T>C, 468G>A, 538G>A, 598C>T of *BMP15*, and 945G>A, 1020A>G of *BMPR1B* gene in 45 women with POF and 45 healthy women with children, without any history of diseases related to folliculogenesis and ovulation were examined as controls. Then, PCR products with mobility shift were sent for sequencing and the results were analyzed with CLC software

Results: The results of gel electrophoresis, SSCP, and sequencing graphs of none of the SNPs, did not show a change in the sequence of the patients compared to the control samples.

Conclusion: According to the key role of *BMP15* in folliculogenesis and previous reports; *BMP15* may be effective in the occurrence of POF. The absence of SNPs in these POF patients can be due to the small size of the studied samples and their genetic differences.

Keywords: Premature Ovarian Failure, Single Nucleotide Polymorphism, Female Infertility, *BMP15*, *BMPR1B*.