مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره چهاردهم/ زمستان ۱۳۸۸/ ۷۱-۶۰

بررسی نقش جهش‌های ژن BRCA1 در سرطان پستان تک‌گیر در شهر کرمانشاه

سمر قربانپور[۱]، علی بیدمشکی‌پور[۲]، محمدحسین میرمؤمنی[۳]، صدیقه خزاعی[۴]

۱-مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۲-استادیار ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران (مؤلف مسؤول) تلفن: ۰۸۳۱-۴۲۷۴۵۱۹ abidmeshki@razi.ac.ir

۳-استادیار بیولوژی مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۴-کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات مولکولی بیمارستان امام رضا(ع) کرمانشاه، دانشگاه علوم‌پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان مهم‌ترین نئوپلاسم در زنان است که سبب مرگ و میر در اغلب کشورهای پیشرفته و خیلی از کشورهای در حال توسعه است. با توجه به افزایش روزافزون وقوع سرطان پستان در ایران، تحقیقات مولکولی در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعات بسیاری موتاسیون‌های ژن BRCA1 در سرطان پستان وراثتی مورد بررسی قرار گرفته است ولی میزان بروز سرطان پستان غیروراثتی بر خلاف سرطان پستان فامیلی بسیار بالاست. هدف اصلی این مطالعه شناخت نقش جهش ژن BRCA1 در سرطان پستان تک‌گیر (Sporadic) می‌باشد.

روش بررسی: برای مشخص‌کردن موتاسیون ژن‌های BRCA1 از تکنیک PCR-SSCP استفاده شده است. ۳۰ عدد بلوک پارافینی بافت پستان از بیماران مبتلا به سرطان پستان که در بیمارستان امام رضا (ع) و بیمارستان طالقانی شهر کرمانشاه تحت جراحی قرار گرفتند جمع‌آوری شد. سپس بلوک‌ها جهت بررسی مشخصات تومور، با تهیه لام از نمونه‌های بافتی، توسط پاتولوژیست تحت مطالعه قرار گرفتند. بررسی موتاسیون در اگزون‌های ۵، ۱۱A و ۱۱B ژن BRCA1 با استفاده از تکنیک PCR-SSCP و رنگ‌آمیزی نیترات نقره آمونیاکی انجام شد. آزمون مورد استفاده در تحلیل داده‌ها، آزمون مربع کای پیرسون بود.

یافته‌ها: ۲۰٪ بیماران (۶ بیمار) دارای جهش بودند، به این صورت که از ۳۰ نمونه مورد مطالعه ۱۳/۳٪ (۴ بیمار) در اگزون ۵ و ۶/۷٪ (۲ بیمار) در اگزون ۱۱B دارای جهش بودند. جهشی در اگزون ۱۱A در نمونه‌های مورد بررسی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که جهش در اگزون‌های ۵ و ۱۱B ژن BRCA1 در پیشرفت سرطان پستان غیروراثتی در این بیماران نقش دارد.

کلید واژه‌ها: سرطان پستان، ژن BRCA1، جهش، ریسک فاکتور، تشخیص مولکولی

وصول مقاله: ۸۷/۷/۱۷ اصلاحیه نهایی: ۸۸/۹/۱ پذیرش مقاله: ۸۸/۱۰/۱۷

مقدمه

ریسک فاکتورهای اصلی در مورد سرطان پستان غیر وراثتی معمولاً ناشی از مسائل هورمونی هستند. به عنوان مثال می‌توان جنس، سن شروع قاعدگی و یائسگی، سابقه باروری، تغذیه نوزاد از پستان و استفاده از استروژن اگزوژن (با منشأ خارجی) را نام برد. در اغلب موارد، سرطان پستان غیر وراثتی، در زنان یائسه اتفاق می‌افتد و بیان بالای استروژن رسپتور (ER) در آنها دیده می‌شود. استروژن، حداقل ۲ نقش اصلی در ابتلای به سرطان پستان ایفا می‌کند: ۱- متابولیت‌های استروژن می‌توانند موتاسیون یابند و یا رادیکال‌های آزاد آسیب‌زننده به DNA تولید کنند (۱). ۲- استروژن از طریق فعالیت هورمونی خود که تکثیر سلولی است سبب ازدیاد سلول‌ها در ضایعات پیش‌سرطانی و

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

سرطان‌ها می‌شود. در عین حال، با توجه به اینکه گروه مهمی از کارسینوماهای پستان، ER- منفی هستند، قطعاً مکانیزم‌های دیگری هم در تکوین سرطان پستان نقش دارند (۲). جهش BRCA1، خطر احتمال ابتلا به سرطان پستان در طول زندگی را تا سن ۵۰ سالگی، به ۵۱٪ و تا سن ۷۰ سالگی به ۸۵٪ و نیز خطر احتمال ابتلا به سرطان تخمدان در طول زندگی را تا سن ۵۰ سالگی به ۲۳٪ و تا سن ۷۰ سالگی به ۶۳٪ می‌رساند (۳).

ژن BRCA1 طولی معادل ۱۰۰kb را روی کروموزوم 17q21 اشغال می‌کند و واجد ۲۴ اگزون است. mRNA آن ۷/۸ kb است و پروتئینی با ۱۸۶۳ اسیدآمینه را تولید می‌نماید (۴). ژن BRCA1 مجاور مارکر D17S855 است. اگزون ۱۱ آن بسیار طولانی بوده و ۶/۷ kb طول دارد. اگزون ۱ این ژن در سطح mRNA نسخه‌برداری نمی‌شود و اگزون ۴ نیز در واقع توالی Alu می‌باشد (۵). تجلی ژن BRCA1 تحت تنظیم پیچیده‌ای است، در تنظیم تجلی آن، دو مسأله حائز اهمیت و تأثیرگذار است؛ اول اینکه رونوشت آن تحت کنترل دو پروموتر است که دو رونوشت متمایز α و β را تولید می‌کنند و دوم اینکه پروموتر α با ژن NBR2 که مجاور آن است مشارکت کرده و این دو هم‌راستا عمل می‌کنند. نکته جالب توجه در تجلی BRCA1 آن است که هر دو پروموترهای α و β، پاسخگو به تحریک استروژن هستند و این، پیشنهاد می‌کند که BRCA1 ممکن است در مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی دخیل باشد (۶ و۳).

اگرچه هویت کامل و فعالیت پروتئین BRCA1 هنوز شناخته نشده است، شواهد زیادی دال بر فعالیت تنظیمی منفی تکثیر سلولی تومور وجود دارد. ممانعت تجلی و بیان BRCA1 با بهره‌گیری از الیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس باعث توقف تکثیر سلول‌های نرمال و نیز سلول‌های بدخیم اپی‌تلیال شد. BRCA1 در ترمیم DNA وکنترل چرخه سلول نقش دارد. از زمان ایزوله شدن ژن BRCA1 بیش از ۵۰۰ تغییر توالی در ناحیه کدکننده ژن مشخص شده است. بیشتر از ۱۰۰ جهش با نفوذ بالا نیز در سرطان‌های پستان گزارش شده است (۷). بیشتر این جهش‌ها از نوع تغییر قاب خواندن[1] است که با تکنیک‌های تشخیصی SSCP[2]، PTT[3] و توالی‌یابی مشخص شده‌اند. بیشتر این جهش‌ها منجربه ایجاد پروتئین BRCA1 کوتاه می‌شوند و بعضی از این جهش‌ها از نوع missense می‌باشند که این جهش‌ها منجر به نقص در عملکرد پروتئین می‌شوند (۸).

بعضی جهش‌ها مختص مناطق جغرافیایی خاصی‌اند و از آنها می‌توان به عنوان جهش‌های اثرگذار[4] در آن مناطق نام‌برد. در مورد ژن BRCA1 در سرطان پستان نیز جهش‌ها مختص مناطق جغرافیایی خاص مشاهده شده‌است. به عنوان مثال می‌توان از جهش اگزون ۲ ژن BRCA1 در یهودیان اشکنازی (۹)، جهش اگزونهای ۷ و ۱۱ در زنان هندی (۱۰)، جهش اگزون ۱۳ در نژاد آفریقایی- آمریکایی (۱۱) و جهش اگزون ۱۱ در ناحیه آمریکای شمالی (۱۲) نام برد.

روش بررسی

نمونه‌گیری

نوع مطالعه تحقیقی- تحلیلی و جامعه آماری شامل نمونه‌های بررسی شده از بین بیماران مبتلا به سرطان

1. Frame shift mutation
2. Single strand conformation polymorphism
3. Protein truncation test
4. Founder mutation

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

پستان بود که در بیمارستان‌های امام رضا و طالقانی کرمانشاه طی سالهای ۸۱ تا ۸۵ تحت جراحی قرار گرفته بودند. برای جمع‌آوری نمونه‌ها ابتدا پرونده پاتولوژی بیماران بررسی گردید و۳۰ نمونه براساس گزارش پاتولوژی که دارای داکتال کارسینوما و لوبولار کارسینوما بودند و همچنین واجد خویشاوند دارای سرطان پستان نبودند انتخاب شد. پس از انتخاب بیماران مورد نظر از بلوک‌های بافتی پارافینه بیماران اسمیر لام تهیه شد و پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، لامها توسط پاتولوژیست مورد مطالعه قرار گرفت و جهت بررسی‌های بعدی درجه تمایز تومور نمونه‌ها توسط پاتولوژیست گزارش شد.

استخراج DNA از بافت توموری با روش کلرید سدیم اشباع

به منظور بررسی جهش در اگزون‌های ۵، ۱۱A و ۱۱B ژن BRCA1، استخراج DNA از ۳۰ نمونه جمع‌آوری شده صورت گرفت. قطعات μm ۲۵-۲۰ از بلوک پارافینی تا ضخامت ۰/۵ میلیمتر با دستگاه میکروتوم جدا و با گزیلل و اتانول در دو مرحله عاری از پارافین شد، به اینصورت که در مرحله اول تنها از گزیلل و در مرحله دوم از گزیلل و مقدار کمی اتانول استفاده شد و بعد از هر مرحله فاز رویی دور ریخته شد. به این قطعات ۳ میلی‌لیتر از بافر لیزکننده و ۲۵ میکرولیتر SDS اضافه و سپس به مدت ۲۴ ساعت در محیط با دمای $50^{o}C$ قرار داده شد. در ادامه پس از اضافه شدن پروتئیناز K مدتی به وسیله تکان‌دهنده[1] مخلوط شد و برای ۲۴ ساعت در دمای $50^{o}C$ انکوبه گردید. سپس ۱/۳حجم لوله به آن NaCl ۶ مولار اضافه و مخلوط برای ۳۰ دقیقه در دور rpm ۳۵۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس هم‌حجم فاز مایع رویی جدا شده، محلول ایزوپروپانول سرد اضافه و خوب مخلوط شد. در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید تا DNA رسوب نماید، رسوب جدا شده پس از ۲ بار شستشو با اتانول ۷۰٪ در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حل شد. برای غیر فعال کردن پروتئیناز K محلول برای ۱۰ دقیقه در دمای $95^{o}C$ و سپس سریعاً روی یخ قرار داده شد. به منظور اطمینان از وجود DNA در نمونه‌های حاصل از استخراج، ۲-۱ میکرولیتر از آن در آگارز ۰/۸ درصد الکتروفوزر شد و با دستگاه UV illumination کمیت DNA استخراجی آن مورد بررسی قرار گرفت.

روش انجام PCR

ابتدا در هر میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتری، ۲۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR ریخته و به آن ۱ میکرولیتر از آغازگرهای[2] رقیق شده (به نسبت Pmol/μl ۱۰) مربوط به اگزون‌های مورد نظر اضافه شد. آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق مربوط به سه ناحیه مختلف از ژن BRCA1 و متعلق به اگزون‌های ۵ و A ۱۱ و B ۱۱ می‌باشد که توالی آنها در جدول ۱ آمده است. میزان آنزیم DNA پلیمراز اضافه شده ۰/۵ واحد برای هر واکنش است. در ادامه ۲ میکرولیتر از DNA ژنومی هر بیمار به مخلوط واکنش اضافه گشته کاملاً مخلوط گردید. پس از انجام یک سانتریفوژ کوتاه و سریع، برای جلوگیری از تبخیر نمونه‌ها در حرارت دستگاه، حدود ۲۰ میکرولیتر روغن معدنی به هر میکروتیوب اضافه گردید. این بار نیز یک سانتریفوژکوتاه دیگر انجام شد و نمونه‌ها در دستگاه مولد چرخه‌های حرارتی[3] قرار گرفتند تا با تنظیم دستگاه

1. Magnetic shaker

2. Primer
3. Termo-cycler

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

و روشن نمودن آن واکنش زنجیره‌های پلیمراز آغاز گردد. برای اطمینان از صحت عمل بخصوص در مورد مراحل بعدی، استفاده از کنترل مثبت که DNA یک فرد سالم می‌باشد ضروری است. دما و زمان مناسب برای واسرشتی DNA، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و برای تکثیر DNA ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه می باشد. دما و زمان مناسب برای اتصال هر یک از آغازگرها در جدول ۱ آمده است. پس از ۳۷ چرخه حرارتی تعداد زیادی از نسخه مورد نظر را خواهیم داشت که برای مشاهده نتیجه PCR، الکتروفورز محصولات ضروری است.

الکتروفورز SSCP

این روش می‌تواند در مورد جهش‌های شناخته و ناشناخته مورد استفاده قرار گیرد. در این مرحله ابتدا قطعات دورشته‌ای DNA واسرشته شده و بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید غیر واسرشته‌کننده الکتروفورز می‌گردند. حرکت تک‌رشته‌ها برحسب پیوند بین بازها و ایجاد اشکال فضایی صورت می‌گیرد. برای این منظور، ۵ میکرولیتر از محصولات PCR با ۵ میکرولیتر بافر SSCP مخلوط شد و بعد از یک سانتریفوژ سریع، ۲۰ میکرولیتر روغن معدنی بر روی هرکدام ریخته شد. سپس به مدت ۵ الی ۷ دقیقه در دمای $95^{o}C$ قرار گرفت تا رشته‌های DNA واسرشت شود. برای جلوگیری از اتصال مجدد رشته‌ها به یکدیگر بلافاصله به داخل یخ و سپس دمای $4^{o}C$ انتقال داده شد. سپس ۸ میکرولیتر از هر نمونه داخل چاهک‌های ژل اکریل‌آمید- بیس‌اکریل‌آمید۱۰٪، در کنار یک شناساگر وزن مولکولی DNA، یک کنترل منفی و یک نمونه غیر واسرشته، قرار گرفت. الکتروفورز در مدت ۳ ساعت با ولتاژ ۱۴۰ ولت انجام پذیرفت. ژل به روش نیترات نقره آمونیاکی رنگ آمیزی (۱۳) و سپس مورد بررسی قرارگرفت. با توجه به اینکه در SSCP احتمال خطا بالا است ممکن است با توجه به تغییر شرایط و حساس بودن فوق‌العاده این روش الگوهای حرکتی متفاوتی نشان دهد بنابراین بر روی محصولات PCR مربوط به اگزونهای هر یک از بیماران حداقل ۳ بار الکتروفورز SSCP در شرایط یکسان انجام شد. جابجایی یک قطعه در شرایط محیطی انتخاب شده یکسان ژل ممکن است در روزهای مختلف تغییر کند. بنابراین جابجایی ضرورتاً در بین ژل‌های مختلف قابل تکرار نمی‌باشد ولی در بین خطوط متفاوت یک ژل منفرد قابل تکرار است که در مورد اگزون ۱۱B در شکل ۵ نشان داده شده است. از این رو دسته‌ای از قطعات DNA با توالی مشابه که در یک ژل الکتروفورز می‌شوند اگر دارای الگوی حرکتی یکسانی باشند و دارای اختلاف در موقعیت نوارهای DNA نسبت به کنترل سالم باشند به عنوان یک نمونه مظنون به جهش تلقی می‌گردند.

در این روش هر نمونه که دارای اختلاف در موقعیت نوارهای DNA نسبت به کنترل سالم باشد به عنوان یک نمونه مظنون به جهش تلقی می‌گردد.

یافته‌ها

نمونه‌گیری و انتخاب بیمار

۳۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان مورد بررسی زن بودند و طبق اطلاعات بدست‌آمده هیچ یک از خویشاوندان آن‌ها مبتلا به سرطان پستان نبودند، بنابراین فرض می‌شود که سرطان پستان در آنها از نوع تک‌گیر بوده است. پس از انتخاب بیماران مورد نظر از بلوک‌های بافتی پارافینه بیماران اسمیر لام تهیه شد و پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، لامها توسط

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

پاتولوژیست مورد مطالعه قرار گرفت و جهت بررسی‌های بعدی درجه تمایز تومور نمونه‌ها توسط پاتولوژیست گزارش شد.

مشخصات پاتولوژیک جمع‌آوری شده از پرونده‌های بیماران شامل اندازه تومور، درگیری غدد لنفاوی و وضعیت گیرنده استروژن است که در مورد بیماران واجد جهش در اگزونهای مورد بررسی در جدول ۲ آمده است.

جدول۱: مشخصات پرایمرهای استفاده شده درPCR

نوع پرایمر	توالی	دما و زمان اتصال پرایمرها	طول محصول PCR
BRCA1E5F	5´-CTC TTA AGG GCA GTT GTG AG-3	۵۸ °C,۱ min	۲۳۵ bp
BRCA1E5R	5´-TTC CTA CTG TGG TTG CTT CC-3		
BRCA1E11AF	5´-AAC ACC ACT GAG AAG CGT GCA G-3	۵۲ °C,۱ sec	۳۰۹ bp
BRCA1E11AR	5´-CTC ACA CAG GGG ATC AGC ATT C-3		
BRCA1E11BF	5´-CAA CAT AAC AGA TGG GCT GGA AG-3	۵۲ °C,۱ sec	۲۹۶ bp
BRCA1E11BR	5´-ACG TCC AAT ACA TCA GCT ACT TTG G-3´		

جدول ۲: مشخصات پاتولوژی بیماران دارای جهش در افراد مورد مطالعه به روشPCR-SSCP
(Pos: Positive , N: Negative, Inv.DC: Invasive Ductal Carcinoma, Inf.DC: Infiltrative Ductal Carcinoma)

اندازه تومور	تشخیص پاتولوژی	درجه تمایز	درگیری غدد لنفاوی	وضعیت گیرنده استروژن	اگزون
۴ Cm	Inv.DC	I-II	-	Pos	۵
۱ cm	Inv.DC	II	+	Pos	۵
۳/۵ cm	Inf.DC	I-II	+	Pos	۵
۶ cm	Inv.DC	I-II	+	Neg	۵
۲/٤ cm	Inv.DC	II	+	Neg	۱۱B
۳/۵ cm	Inf.DC	I-II	+	Pos	۱۱B

استخراج DNA از بافت توموری و برتری روش کلرید سدیم اشباع

به منظور بررسی جهش در اگزون‌های ۵، ۱۱Aو۱۱B ژن BRCA1، استخراج DNA از ۳۰ نمونه جمع‌آوری شده صورت گرفت. برای آنکه بتوان از وجود DNA در نمونه های حاصل از استخراج، اطمینان حاصل نمود ۲-۱ میکرولیتر از آن ، در آگارز ۰/۸ درصد الکتروفوزر شد و با دستگاه UV illumination کمیت DNA استخراجی آن مورد بررسی قرار گرفت. استخراج DNA ژنومی از بلوک پارافینی با روش کلرید

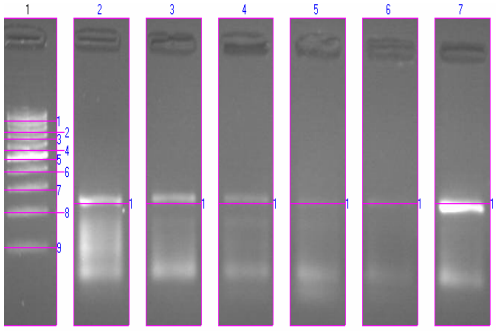
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

سدیم اشباع نسبت به روشهای استخراج DNA در مقالات دیگر نظیر روش فنل-کلروفرم (۱۴) و روش استات سدیم (۱۶و۱۵) دارای برتریهایی است. از جمله این که مقدار DNA بیشتری استخراج می شود و کیفیت DNA استخراج شده بالا می‌باشد و همچنین طول قطعات DNA ژنومی بدست آمده بلندتر است یعنی DNA ژنومی با این روش در مراحل استخراج DNA کمتر خرد می‌شود.

محصولات PCR و الکتروفورز آنها

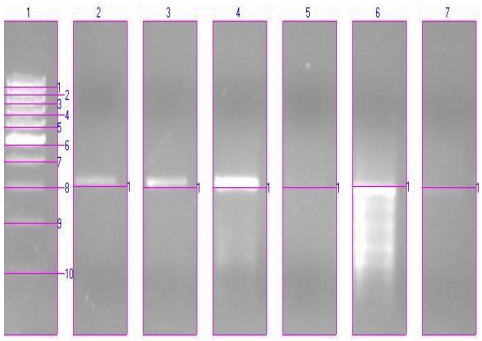
اندازه محصولات PCR با استفاده از نرم افزار .UVdoc مشخص شد. نتایج به دست آمده در شکل‌های ۱،۲ و ۳ نشان داده شده است.

پس از انجام PCR برای اطمینان از موفق بودن آن محصولات PCR را باید الکتروفورز کرد. به علت کوچکی اندازه قطعات مورد نظر در این مرحله از ژل آگارز ۲٪ استفاده شد. پس از انجام الکتروفورز و بررسی ژل با نورUV از آن عکسبرداری شد و سپس با استفاده از نرم افزار .UVdoc اندازه محصول PCR مشخص شد. بدین صورت بعد از حصول اطمینان از موفقیت آمیز بودن PCR محصولات آن جهت ردیابی جهش احتمالی بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید SSCP، الکتروفورز شد.



	MW-RF						
	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
1	900.000	235.946	235.946	235.946	235.946	235.946	235.946
2	800.000						
3	700.000						
4	600.000						
5	500.000						
6	400.000						
7	300.000						
8	200.000						
9	100.000						

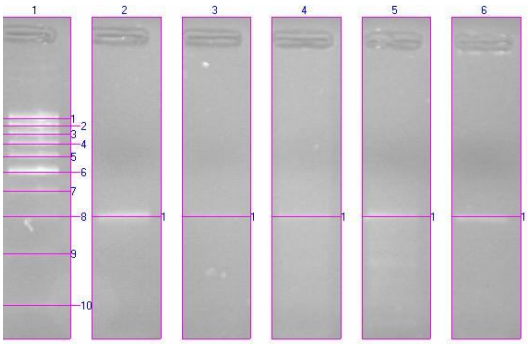
شکل۱: الکتروفورز محصولات PCR اگزون ۵ ژن BRCA1 و تخمین اندازه باندها با استفاده از نرم‌افزار UVdoc



	MW-RF						
	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
1	999.000	303.917	300.000	300.000	300.000	303.917	300.000
2	900.000						
3	800.000						
4	700.000						
5	600.000						
6	500.000						
7	400.000						
8	300.000						
9	200.000						
10	100.000						

شکل۲: الکتروفورز محصولات PCR اگزون ۱۱A ژن BRCA1 و تخمین اندازه باندها با استفاده از نرم‌افزار UVdoc

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]



	MW-RF					
	L1	L2	L3	L4	L5	L6
1	999.000	300.000	300.000	300.000	300.000	300.000
2	900.000					
3	800.000					
4	700.000					
5	600.000					
6	500.000					
7	400.000					
8	300.000					
9	200.000					
10	100.000					

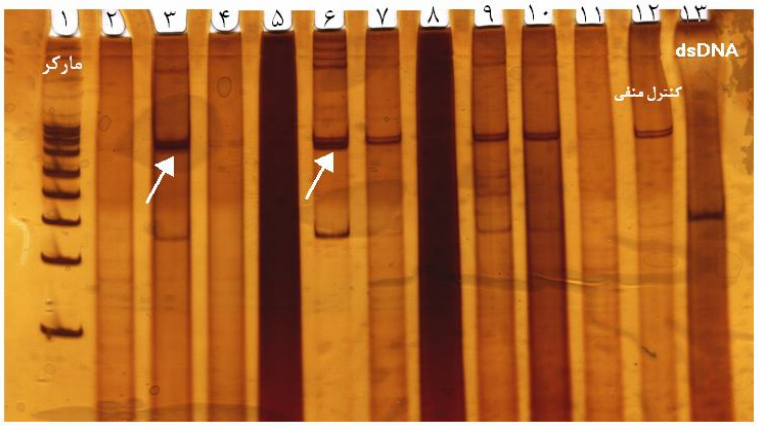
شکل۳: الکتروفورز محصولات PCR اگزون ۱۱B ژن BRCA1 و تخمین اندازه باندها با استفاده از نرم‌افزار UVdoc

الکتروفورز SSCP و تشخیص جهش

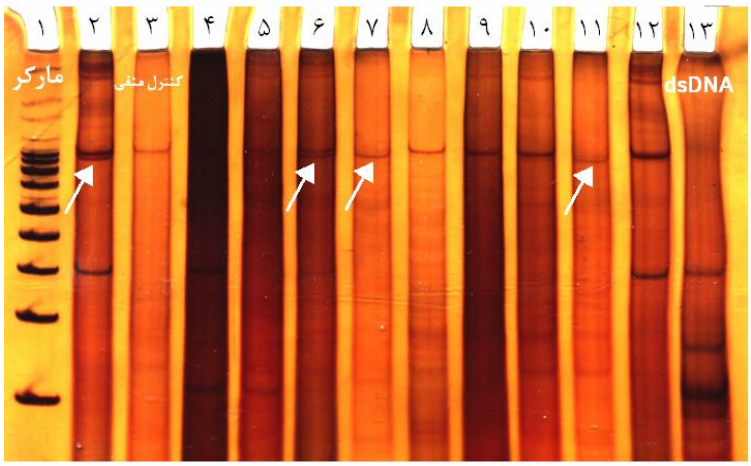
ژل SSCP یک ژل غیرمتداول است زیرا DNA تک‌رشته داخل ژل می‌شود و ژل فاقد مواد واسرشت-کننده است. الکتروفورز DNA تک‌رشته در این ژل باعث ایجاد میانکنش‌های داخل مولکولی می‌شود، به عبارت دیگر DNA تک‌رشته کم و بیش قادر به اتصال به خود می‌باشد. از آنجایی که DNA به صورت مولکول خطی در ژل SSCP حرکت می‌کند، جابجایی آن در ارتباط با اندازه و ساختمان فضایی می‌باشد. ساختمان سوم قطعات DNA تک‌رشته‌ای وابسته به توالی کل قطعه است. اگر جهشی در یک نقطه وجود داشته باشد، معمولاً ساختمان فضایی آن نقطه تغییر می‌کند. الکتروفورز SSCP محصولات PCR اگزون ۵ و ۱۱B در شکل‌های ۴ و ۵ آورده شده است.

با توجه به اینکه در SSCP احتمال خطا بالا است ممکن است با توجه به تغییر شرایط و حساس بودن فوق‌العاده این روش الگوهای حرکتی متفاوتی نشان دهد بنابراین بر روی محصولات PCR مربوط به اگزونهای هر یک از بیماران حداقل ۳ بار الکتروفورز SSCP در شرایط یکسان انجام شد. جابجایی یک قطعه در شرایط محیطی انتخاب شده یکسان ژل ممکن است در روزهای مختلف تغییر کند. بنابراین جابجایی ضرورتاً در بین ژل-های مختلف قابل تکرار نمی‌باشد ولی در بین خطوط متفاوت یک ژل منفرد قابل تکرار است که در مورد اگزون ۱۱B در شکل ۵ نشان داده شده است. از این رو دسته‌ای از قطعات DNA با توالی مشابه که در یک ژل الکتروفورز می‌شوند اگر دارای الگوی حرکتی یکسانی باشند و دارای اختلاف در موقعیت نوارهای DNA نسبت به کنترل سالم باشند به عنوان یک نمونه مظنون به جهش تلقی می‌گردند. نتایج حاصل از بررسی جهش‌ها در بیماران مورد مطالعه در جدول ۳ آمده است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]



شکل ٤: نتایج بررسی SSCP محصولات PCR اگزون ٥ روی ژل پلی‌آکریل‌آمید. ستون ۱۳: DNA دو رشته‌ای. ستون ۱: مارکر bp ۱۰۰. ستون ۱۲: نمونه فرد طبیعی. ستون‌های ۲ تا ۱۱: نمونه‌های افراد مورد بررسی. ستون ٥ و٨: خطای PCR. ستون‌های ٦ و ۳: وقوع جهش با توجه به تفاوت در تعداد باند.



شکل ٥: نتایج بررسی SSCP محصولات PCR اگزون ۱۱B روی ژل پلی‌آکریل‌آمید. ستون ۱۳: DNA دو رشته‌ای. ستون ۱: مارکر bp ۱۰۰. ستون ۳: نمونه فرد طبیعی. ستون‌های ۲ و ٤ تا ۱۲: نمونه‌های افراد مورد بررسی. ستون ٥ و٤: خطای PCR. وقوع جهش با توجه به تفاوت در تعداد باند در ستون‌های ٦ و ۲ (بیمار اول) و ستون ۷ و۱۱ (بیمار دوم).

جدول ۳: نتایج حاصل از بررسی جهش‌ها در سه اگزون ٥ و۱۱ A و۱۱ B ژن BRCA1 در بیماران مبتلا به سرطان پستان

ژن	اگزون	تعداد جهش	درصد ٪	تعداد بیمار
BRCA1	٥	۴	٪۱۳/۳۳	۳۰
	۱۱ A	۰	-	۳۰
	۱۱ B	۲	٪۶/۶۷	۳۰

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

بررسی آماری

به منظور بررسی وجود رابطه بین جهش و پارامترهای پاتولوژی، هر پارامتر در افراد دارای جهش و آنانکه با روش SSCP جهشی نشان ندادند از طریق آزمون نسبت دو جمله ای با توزیع دقیق با هم مقایسه شد. از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۵ برای تجزیه و تحلیل آماری رابطه بین جهش و پارامترهای پاتولوژی استفاده شد که با استفاده از این آزمون در سطح ۰/۰۵ خطا رابطه معنی‌داری بین پارامترهای پاتولوژی مورد بررسی بیمار و جهش وجود نداشت. این آزمون نشان می‌دهد که جهش تأثیر معنی‌داری در ایجاد سرطان سینه ندارد (جدول ۴).

به منظور بررسی وجود رابطه بین جهش و پارامترهای پاتولوژی، هر پارامتر در افراد دارای جهش و آنانکه با روش SSCP جهشی نشان ندادند از طریق آزمون مربع کای پیرسون با هم مقایسه شد. از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۵ برای تجزیه و تحلیل آماری رابطه بین جهش و پارامترهای پاتولوژی استفاده شد. این آزمون نشان می‌دهد که بین بیمارانی که جهش دارند با آنانی جهش ژنتیکی ندارند تفاوت معنی‌داری وجود دارد، بعبارت دیگر نسبت بیمارانی که جهش ژنتیکی ندارند به طور معنی‌داری از بیمارانی که این جهش را دارند بیشتر است (جدول ۴). این امر می‌تواند به دلیل کم بودن حجم نمونه باشد، برای نتیجه‌گیری دقیق‌تر نیز به نمونه‌های بیشتری می‌باشد.

جدول۴: نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل رابطه بین جهش و پارامترهای پاتولوژی در بیماران مبتلا به سرطان پستان

Binomial Test

		Category	N	Observed Prop.	Test Prop.	Asymp. Sig. (2-tailed)	Exact Sig. (2-tailed)
Exon5	Group 1	1.00	4	.13	.50	.000(a)	.000
	Group 2	.00	26	.87			
	Total		30	1.00			
AB11	Group 1	1.00	2	.07	.50	.000(a)	.000
	Group 2	.00	28	.93			
	Total		30	1.00			

a Based on Z Approximation.

بحث

یکی از ژن‌هایی که در مورد سرطان پستان به آن توجه زیادی شد، ژن BRCA1 است. جهش‌هایی که منجر به اتمام زودرس پروتئین می‌شوند، اکثریت جهش‌ها را در BRCA1 شامل می‌شوند که قسمت اعظم جهش‌های شناخته شده از نوع Nonsense هستند. فراوانی بالای این نوع جهش نشان می‌دهد که وقتی محصول ژن بصورت ناقص درآید عملکرد خود را از دست می‌دهد و باعث بروز سرطان می‌شود و تغییر یک اسیدآمینه کمتر در عملکرد پروتئین مؤثر است (۱۷). اگزون ۱۱ با طولی حدود Kb ۳/۴ قسمت اعظم بخش کدکننده ژن را تشکیل می‌دهد. قسمت‌های استراتژیک مانند محل اتصال RAD51 و گرانین در این اگزون قرار دارند بنابراین طبیعی است که بیشتر جهش‌های بیماریزا در این اگزون رخ دهد. جهش در مناطق دیگر خصوصاً در دو انتها نیز مشاهده شده است که شامل اگزون‌های ۲ تا ۵ در ناحیه آمین انتهایی است، که اگزون ۵ به علت وجود منطقه Zinc-Finger binding در قسمت پروتئینی کد شونده توسط آن، بیشتر مورد توجه است (۱۸). بنابراین

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

انتخاب ۳ اگزون مورد تحقیق با استراتژی وجود جهش‌های مؤثر و تأثیرگذار انجام شده‌است. تحقیق بر روی افرادی که برای این پژوهش انتخاب شده‌اند نشان می‌دهد که دارای سابقه خانوادگی سرطان پستان نبودند بنابراین فرض می‌شود که سرطان پستان در آنها از نوع تک‌گیر بوده است. در این بررسی علمی نمونه‌ها از حیث جهش در اگزون‌های ۵، ۱۱A و ۱۱B در ژن BRCA1 مورد بررسی قرار گرفتند. هدف اصلی این مطالعه تشخیص نقش جهش ژن BRCA1 در سرطان پستان تک‌گیر می‌باشد. از این رو هر بافت سرطانی از افراد مبتلا می‌تواند به عنوان منبع DNA برای آزمایش‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد. هرگونه تغییری که در توالی بازهای یک ژن اتفاق بیفتد جهش نقطه‌ای خوانده می‌شود. جهش نقطه‌ای می‌تواند به شکل واژگونی، کاهش، افزایش، جابجایی یک نوکلئوتید یا بخشی از ژن اتفاق بیفتد. جهش‌های BRCA1 در سایر نقاط جهان نیز بررسی شده است. نتایج هفت مقاله مربوط به نقاط مختلف اسپانیا جمع‌آوری و مقایسه شده است (۱۹). در اسپانیا نیز بیشتر جهش‌های ژن BRCA1 در اگزون ۱۱ بوده و سایر جهش‌ها در اگزونهای ۵، ۲، ۱۸ و ۱۹ بوده است. بررسی انجام شده روی بیماران دارای سرطان پستان در کشور کره (۱۷) نیز نشان می‌دهد که فراوانترین جهش در اگزون ۱۱ بوده است و سایر جهش‌ها در اگزونهای ۱۶ و ۲۴ مشاهده شده است. نتایج چندین تحقیق در نقاط مختلف ایالات متحده آمریکا نشان داد که در این جمعیت نیز جهش غالب متعلق به اگزون ۱۱ است. سایر جهش‌ها در اگزونهای ۲، ۵، ۱۶، ۱۷، ۱۹، ۲۰، ۲۲ و ۲۴ دیده شده است (۳). نتایج بررسی جهش ژن BRCA1 در هند نیز مؤید این مطلب است که بیشترین جهش در اگزون ۱۱ و همچنین ۷ رخ داده است (۲۰). همچنین در مطالعه‌ای بر روی ۸۳ بیمار از نقاط مختلف کشور که با همکاری دو مرکز اصلی رفرال سرطان در تهران صورت پذیرفت، اگزون ۱۱ در ژن BRCA1 به عنوان جهش اصلی گزارش شده است (۲۱).

در این تحقیق رابطه معنی‌داری بین پارامترهای بیولوژیک و جهش در اگزون‌های مورد بررسی مشاهده نشد. این موضوع از زوایای مختلف قابل بررسی می‌باشد. در صورتیکه کسی دنبال اثبات رابطه‌ای بین شاخص‌های پاتولوژیک و جهش برآید در واقع یک کار اپیدمیولوژیک می‌باشد که نیاز به محاسبات آماری دقیق و فراهم نمودن شرایط یک مطالعه اپیدمیولوژیک است و با اهداف درنظرگرفته‌شده در این مطالعه همخوانی ندارد. از سویی چه بسا اگر جهش‌ها در این سه اگزون با جهش‌های دیگر اگزون‌ها جمع شود رابطه معنی‌داری بین جهش در کل ژن و این شاخص‌ها به وجود آید. از بین مشخصات پاتولوژیک سن، درجه تمایز تومور و اندازه تومور صفاتی هستند که در شرایط یکسان برای همه بیماران اندازه‌گیری نمی‌شوند و می‌تواند با تغییر در زمان مراجعه بیمار به پزشک تغییر کند. به هر حال معنی‌دار نبودن رابطه جهش در این سه اگزون و مشخصات پاتولوژیک بیماران، از اهمیت BRCA1 به عنوان ژن مستعدکننده سرطان پستان نخواهد کاست.

نتیجه‌گیری

شش شیفت الگوی حرکتی DNA در ژل الکتروفورز محصولات PCR اگزونهای مورد بررسی در ۳۰ بیمار تحت بررسی مشاهده شد که عدد قابل توجهی است. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

که احتمالاً جهش در اگزون‌های ۵ و ۱۱B ژن BRCA1 در پیشرفت سرطان پستان غیروراثتی در بیماران مورد بررسی نقش دارد. همچنین می‌توان گفت احتمالاً اگزون ۵ که ۱۳/۳٪ جهش‌ها را شامل می‌شود، یک جهش تأثیرگذار در این بیماران می‌باشد.

با قرار دادن نتایج به دست آمده در این پژوهش در کنار مطالعات دیگر که به بعضی از آنها در بخش پیشین اشاره شد، می‌توان نتیجه گرفت که جهش اگزون ۱۱ در ژن BRCA1 اصلی‌ترین نقش را در بروز رفتارهای نابهنجار این ژن در پیدایش سرطان پستان ایفا می‌کند.

تشکر و قدردانی

با تشکر از همکاری بخش پاتولوژی بیمارستان امام رضا (ع) و بیمارستان طالقانی کرمانشاه، آقای دکتر کنعانی و آقای دکتر فرامرزی به خاطر کمک در مراحل اجرایی و سایر همکاران مرکز تحقیقات مولکولی و پاتولوژی بیمارستان امام رضا (ع) به خاطر همکاری بی‌دریغ آنها.

References

1. Yarden RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, Brody LC. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. Nature Genet 2002; 30: 265-269.
2. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cortran Pathologic Basis of Disease. 7th ed, Saunders, Philadelphia, 2004, p. 82-85.
3. Malone KE, Dalling JR, Thompson JD, Obrien CA, Francisco LV, Ostrander EA. BRCA1 mutation and breast cancer in the general population: analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history. JAMA 1998; 297: 922-929.
4. Deng CX, Brodie SG. Roles of BRCA1 and its interacting proteins. Bioessays 2000; 22: 728-737.
5. Stoppa-Lyonnet D. Familial invasive breast cancers: worse outcome related to BRCA1 mutations. J Clin Oncol 2000; 18: 4053-4059.
6. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science 1990; 250: 1684-1689.
7.Goldhirsch A, Kaye SB, Hansen HH, Cavalli F.Textbook of Medical Oncology. London: Martin Dunitz, 2000. p. 137-183.
8. MacLachlan TK. BRCA1 effects on the cell cycle and the DNA damage response are linked to altered gene expression. J Biol Chem 2000; 275: 2777-2785.
9. Krainer M, Silva-Arrieta S, FitzGerald MG, Shimada A, Ishioka C, Kanamaru R. Differential contributions of BRCA1 and BRCA2 to early-onset breast cancer. Engl J Med 1997; 336: 1416-1421.
10. Valarmathi M, Agarwal A, Suryanarayana S, Shukla NK, Satya N. BRCA1 germline mutations in Indian familial breast cancer. Human Mutation 2002; 1:98-99.
11. Pal T, Permuth-Wey J, Holtje T, Sutphen R. BRCA1 and BRCA2 mutations in a study of African American breast cancer patients. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 2004; 1: 1794-1799.
12. Liede A, Jack E, Hegele RA, Narod SA. A BRCA1 mutation in native North American families. Human mutation 2002; 1:122-125.
13. Benbouza H, Jacquemin JM, Baudoin JP, Mergeai G. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnol Agron Soc Environ 2006; 10: 77-81.
14. Cao W, Hashibe M, Rao JY, Morgenstern H, Zhang ZF. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. Cancer Detection and Prevention 2003; 27: 397-404.
15. Zilberman N, Reikhav S, Hulata G, Ron M. High-throughput genomic DNA extraction protocol from tilapia's fin tissue. Aquaculture 2006; 255: 597-599.
16. Riveroa ER, Nevesb AC, Silva-Valenzuelac MG, Sousac SO, Nunesc FE. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Pathology-Research and Practice 2006; 202: 523-529.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

17. Ahn SH, Son BH, Yoon KS, Noh DY, Han W, Kim SW, and et al. BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Korean breast cancer patients at high risk of carrying mutations. Cancer Letters 2007; 245: 90-95.
18. Ellingtona L, Maxwel A, Baty BJ, Roterd D, Dudley WN, Kinney AY. Genetic counseling communication with an African American BRCA1 kindred. Social Science & Medicine 2007; 64: 724-734.
19. Diez O, Gutierrez-Enrı quez S, Balmana J. Heterogeneous prevalence of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Spain according to the geographical area: implications for genetic testing familiar cancer. 2009; 7: 1-5.
20. Kumar BV, Lakhotia S, Ankathil R, Madhavan J, Jayaprakash PG, Nair MK, and et al. Germline BRCA1 mutation analysis in Indian breast/ovarian cancer families. Cancer Biol Ther 2002; 1: 22-3.
21. Yasai VR, Dalton A, Hornby DP. [The novel mutations in BRCA1/BRCA2 genes in Iranian breast cancer probands. Journal of Research in Medical Sciences 2004; 2: 101-109.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]