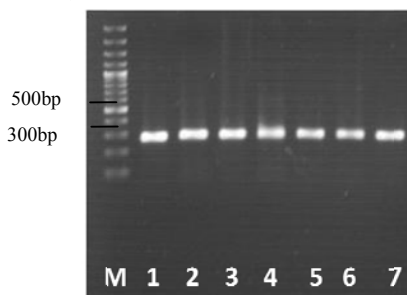


الکتروفورز ژل آگارز اگزون شماره ۹ در شکل ۱ نشان داده شده است.

محصولات PCR به نسبت ۱:۱ با بافر بارگیری SSCP حاوی EDTA ۱۲ میلی‌مولار، برومو فنل بلو ۰/۰۵ درصد، زایلن سیانول FF ۰/۰۵ درصد، گلیسرول ۰/۰۶ درصد، فرمامید ۳۰ درصد و NaOH ۲۰ میلی‌مولار مخلوط شد. سپس در دمای ۹۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه دناتوراسیون انجام شد و به سرعت روی یخ قرار داده شد. ۱۵-۵ میکرولیتر از این مخلوط روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۰ درصد معمولی حاوی گلیسرول بارگیری شد و الکتروفورز در ولتاژ ۲۰۰ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ثابت ۴ درجه سانتی‌گراد در حضور بافر 1X TBE انجام شد. سپس این ژل با روش رنگ‌آمیزی نیترا نقره رنگ‌آمیزی شد. در شکل ۲ نمونه‌ای از ژل رنگ‌آمیزی شده‌ی پلی‌اکریل نشان داده شده است. در این شکل نمونه‌های

سانتی‌گراد به مدت ۳ تا ۵ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل PCR به ترتیب با دمای واسرشت شدن ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای اتصال متفاوت برای هر کدام از پرایمرها بین ۴۸ تا ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد و در انتها تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر توالی‌های ناقص در نظر گرفته شد. محصولات PCR توسط الکتروفورز با ژل ۱ درصد آگارز بررسی شدند. PCR حاوی ۲۰۰-۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی ۲۰۰ نانومولار از پرایمرهای پیشرو و پیرو ۰/۲ ماکرومولار dNTP، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR 1X، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ و دو واحد آنزیم DNA Smar Taq Polymerase (شرکت سیناژن) در دستگاه ترموسایکلر شرکت Takara انجام شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در این PCR در جدول ۱ آورده شده است.



شکل ۱. الکتروفورز ژل آگارز اگزون شماره ۹ را نشان می‌دهد. (M: DNA مارکر ۱۰۰ bp)

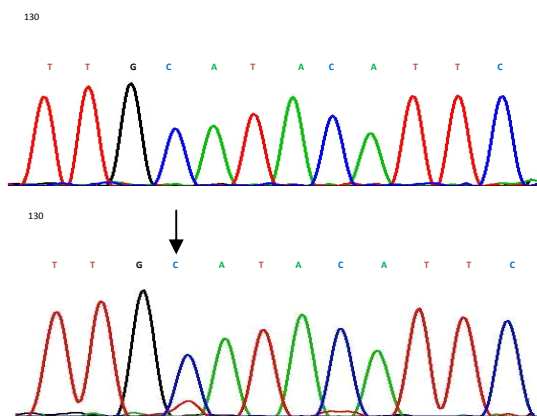
پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر اگزون ۹، یک ژن کاذب روی کروموزوم 11.2q۲۲ را نیز تکثیر می‌کردند (۱۶). برای از بین بردن امکان تکثیر این سودوژن یک جفت پرایمر دیگر (9Psu) طراحی شد و دمای اتصال تا حد ممکن بالا برده شد و شرایط تکثیر برای این پرایمرها بهینه شد. سپس با استفاده از یک جفت پرایمر درونی این اگزون تکثیر شد. نمونه‌ای از

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر اگزون ۲۰ و ۹ ژن PIK3CA

توالی پرایمر	نام پرایمر
5' CTG AAA ATA AAG TCT TGC AAT GAA 3'	F
5' TGT AAA TTC TGC TTT ATT TAT TCC 3'	R
5' TCC AGA GGG GAA AAA TAT GAC 3'	F
5' TAT GGT AAA AAC ATG CTG AG 3'	R
5' AGA CCT GAA GGT ATT AAC ATC 3'	F
5' TCG AAT GTA TGC AAT GTC ATC 3'	R
5' TGA TGC TTG GCT CTG GAA TG 3'	F
5' ATG CTG TTT AAT TGT GTG GAA G 3'	R
	Exon 9 psu
	Exon 9
	Exon 20A
	Exon 20B

یافته‌ها

در ۵۰ نمونه تومور جسم رحم بررسی شده در اصفهان و تهران حدود ۴۷ درصد جهش مشاهده شد که ۶۰ درصد در آگزون ۲۰ (دمین کاتالیتیک) و ۴۰ درصد در آگزون ۹ (دمین هلیکالی) رخ دادند. تعیین توالی آگزون ۲۰ جهش (C3059T) (A1020V) را نشان داد. در شکل ۳ نتیجه‌ی تعیین توالی آگزون ۲۰ را مشاهده می‌کنید. در بخش اول تعیین توالی یک نمونه‌ی شاهد منفی و شکل دوم تعیین توالی نمونه‌ی جهش‌دار آگزون ۲۰ را نشان می‌دهد. تعیین توالی آگزون ۹، جهش G1624A (E542K) که یک جهش متداول در این آگزون است و جهش دیگر، G1610A (R537Q) که تا به حال گزارش نشده بود را تأیید کرد. این جهش‌ها در نمونه‌های خون مشاهده نشدند در نتیجه این تغییرات چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) نیستند.

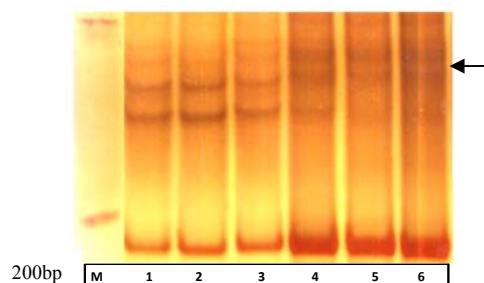


شکل ۳ توالی طبیعی و جهش یافته‌ی آگزون ۲۰، جهش باعث تبدیل C به T شده است

در این مطالعه همچنین ارتباط بین جهش‌های PIK3CA با درگیری غدد لنفاوی، سن بیمار، مرحله‌ی پیشرفت بیماری و درجه‌ی تومور بررسی شد. در جمعیت مورد مطالعه ارتباط معنی‌داری بین جهش و درجه‌ی تومور مشاهده شد ($P = 0/03$, $OR = 5/5$).

شماره‌ی ۴ شاهد مثبت و ۲ شاهد منفی نمونه‌های ۶ و ۵ نمونه‌های بیمار دارای جهش هستند. نمونه‌ی ۳ و ۱ نمونه‌های بیمار فاقد جهش می‌باشند.

مراحل PCR و SSCP (Single-strand Conformation Polymorphism) برای افزایش دقت و صحت نتایج سه بار تکرار شد. حساسیت SSCP تحت تأثیر طول محصول PCR می‌باشد به طوری که قطعات کوچک‌تر از 300bp برای SSCP مناسب‌تر هستند. به همین دلیل برای آگزون ۲۰ دو جفت پرایمر طراحی شد. به منظور تأیید نتایج تکنیک SSCP و تعیین نوع جهش‌ها تعدادی از نمونه‌ها تعیین توالی شدند. به این منظور نمونه‌های هر آگزون پس از انجام PCR از ژل آگارز خالص‌سازی شدند. برای استخراج و خالص‌سازی DNA، از کیت mi-Gel Extraction Kit شرکت Metabion استفاده شد. ارتباط بین جهش‌های PIK3CA با درگیری غدد لنفاوی، سن بیمار، مرحله‌ی پیشرفت بیماری و درجه‌ی تومور به وسیله‌ی آزمون χ^2 بررسی شد. بررسی‌های آماری به وسیله‌ی SPSS نسخه‌ی ۱۶ (SPSS version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد.



شکل ۲. بررسی جهش‌های آگزون ۲۰B به وسیله‌ی SSCP. در این شکل نمونه‌های شماره‌ی ۴ شاهد مثبت و ۲ شاهد منفی و نمونه‌های ۶ و ۵ نمونه‌های بیمار دارای جهش هستند. نمونه‌ی ۳ و ۱ نمونه‌های بیمار فاقد جهش می‌باشند. (M: DNA مارکر 100 bp)

انجام شد، این جهش در سرطان پستان نیز برای اولین بار گزارش شد (۱۷). این مشاهده می‌تواند نشان دهنده‌ی این مطلب باشد که عامل جهش‌زا در جمعیت مورد مطالعه‌ی ما با سایر جمعیت‌ها متفاوت است. تا به حال در مطالعات قبلی بیش از ۳۶ جهش در ۲۰ اگزون این ژن معرفی شده است. که جهش‌های H1047R یا A3140G جهش متداول اگزون ۲۰ و E545K یا G1633A و G1624A یا E542K جهش‌های متداول اگزون ۹ می‌باشند. تعیین توالی اگزون ۹، جهش G1624A (E542K) را نشان داد که باعث تغییر رمز اسید آمینه‌ی گلوتامیک اسید به لیزین می‌شود. اسید آمینه‌ی گلوتامیک اسید دارای بار منفی و قطبی است، در حالی که لیزین یک اسید آمینه‌ی بازی است. بنابراین می‌تواند بر ساختار پروتئین اثر بگذارد. جهش دیگر در اگزون ۹، G1610A (R537Q) است که تا به حال گزارش نشده است. این جهش باعث تبدیل اسید آمینه‌ی آرژنین به گلوتامین می‌شود. آرژنین یک اسید آمینه‌ی به شدت بازی است در صورتی که گلوتامین خنثی است، بنابراین به نظر می‌رسد این جهش تأثیر زیادی بر روی ساختار پروتئین بگذارد. همچنین در این مطالعه ارتباط معنی داری بین جهش و درجه‌بندی تومور مشاهده شد. نتایج به دست آمده حاکی از این است که طیف سرطان رحم و نوع جهش در جمعیت مورد مطالعه‌ی ما با سایر جمعیت‌ها متفاوت است و جهش‌هایی مشاهده شد که تاکنون گزارش نشده است و می‌تواند نشان‌دهنده‌ی این مطلب باشد که عامل جهش‌زا در جمعیت مورد مطالعه‌ی ما با سایر جمعیت‌ها متفاوت است پس نیاز به بررسی نمونه‌های بیشتر و انواع دیگر سرطان وجود دارد.

فراوانی درجه‌ی ۳ (Grade III) و درجه‌ی ۱ و ۲ (Grade I,II) در افراد دارای جهش و فاقد جهش در جدول ۲ آورده شده است، اما ارتباط معنی‌داری بین جهش با درگیری غدد لنفاوی ($P = 0/107$)، مرحله‌ی پیشرفت بیماری ($P = 74/0$) و سن بروز بیماری ($P = 0/12$) مشاهده نشد.

جدول ۲. فراوانی درجه‌ی ۳ و درجه‌ی ۱ و ۲ در افراد دارای جهش

و فاقد جهش			
	درجه‌ی ۳	درجه‌ی ۱ و ۲	کل
M+	۷	۱۴	۲۱
M-	۲	۲۲	۲۴
کل	۹	۳۶	۴۵

M+: بیماران دارای جهش در ژن مورد بررسی و M-: بیماران فاقد جهش در ژن

بحث

در این مطالعه جهش‌های PIK3CA در اگزون‌های ۹ و ۲۰ این ژن در سرطان جسم رحم در اصفهان و نمونه‌های دریافتی از انستیتو کانسر ایران در تهران بررسی شد. روش SSCP یک روش غربال‌گری اولیه برای تشخیص جهش است و در مرحله‌ی بعد برای تأیید جهش‌ها برخی از نمونه‌های مشکوک برای تعیین توالی فرستاده شدند. فراوانی جهش‌های مشاهده شده در سرطان جسم رحم در مطالعات پیشین ۲۴ تا ۳۹ درصد گزارش شده بود. در این مطالعه حدود ۴۷ درصد جهش در این ژن مشاهده شد. تعیین توالی اگزون ۲۰ یک جهش (C3059T) را که پیش از این در مورد سرطان آندومتر گزارش نشده بود و فقط در مورد سرطان روده‌ی بزرگ دیده شده بود را تأیید کرد (www.sanger.ac.uk). این جهش سبب تغییر اسید آمینه آلانین به والین می‌گردد (A1020V). در مطالعه‌ی ای که توسط غربی و همکاران در جمعیت اصفهان

References

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60(5): 277-300.
2. National register of cancer cases reported. [Online]. 2004. Available from: URL: http://www.ssu.ac.ir/fileadmin/templates/fa/Moa-venatha/Moavenat_behdasht/MB_mobarezebima-riha/Upload_MB_Mobareze/cancer/1383/National%20Cancer%20Registry_1383.pdf.
3. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983; 15(1): 10-7.
4. Hecht JL, Mutter GL. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *J Clin Oncol* 2006; 24(29): 4783-91.
5. Oda K, Stokoe D, Taketani Y, McCormick F. High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65(23): 10669-73.
6. Hirsch E, Braccini L, Ciralo E, Morello F, Perino A. Twice upon a time: PI3K's secret double life exposed. *Trends Biochem Sci* 2009; 34(5): 244-8.
7. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(7): 489-501.
8. Fry MJ. Structure, regulation and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1226(3): 237-68.
9. Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 1999; 253(1): 239-54.
10. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004; 304(5670): 554.
11. Campbell IG, Russell SE, Choong DY, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CS, et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 2004; 64(21): 7678-81.
12. Lee S, Choi EJ, Jin C, Kim DH. Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line. *Gynecol Oncol* 2005; 97(1): 26-34.
13. Catusus L, Gallardo A, Cuatrecasas M, Prat J. PIK3CA mutations in the kinase domain (exon 20) of uterine endometrial adenocarcinomas are associated with adverse prognostic parameters. *Mod Pathol* 2008; 21(2): 131-9.
14. Hayes MP, Wang H, Espinal-Witter R, Douglas W, Solomon GJ, Baker SJ, et al. PIK3CA and PTEN mutations in uterine endometrioid carcinoma and complex atypical hyperplasia. *Clin Cancer Res* 2006; 12(20 Pt 1): 5932-5.
15. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2004; 3(8): 772-5.
16. Qiu W, Schonleben F, Li X, Ho DJ, Close LG, Manolidis S, et al. PIK3CA mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12(5): 1441-6.
17. Gharbi S, Faghihi M, Tavassoli M. A novel PIK3CA hotspot mutation in Isfahanian breast cancer patients. *Cancer Invest* 2011; 29(4): 313-7.

Detection of PI3K Gene Mutations in Endometrial Cancer in Iran

Masoumeh Elyasi¹, Manoochehr Tavasoli PhD², Mehri Faghihi MD³, Simin Hemati MD⁴

Abstract

Background: The phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) signaling pathway regulates a variety of biological processes including proliferation, motility, insulin metabolism, and apoptosis. Activated PI3K phosphorylates phosphatidylinositol 4, 5 bisphosphate [PtdIns(4,5)P₂] and thus produces phosphatidylinositol 3, 4, 5 triphosphate [PtdIns(3,4,5)P₃]. This lipid activates Akt (protein kinase B). The frequency of PIK3 catalytic alpha (PIK3CA) gene mutations in endometrial cancer ranges from 24% to 39%. More than 90% of the mutations in PIK3CA have been localized in the helical (exon 9) and kinase (exon 20) domains.

Methods: In this study, we analyzed the presence of PIK3CA mutations by means of single-strand conformational polymorphism (SSCP) and direct DNA sequencing in a population of Iranian endometrial cancer patients in the city of Isfahan and Tehran Cancer Institute. We also investigated the correlation between PIK3CA mutations and lymph node involvement, age, and disease stage and grade by Pearson's chi-square test.

Findings: Among the 47% PIK3CA mutations in this study, 60% were identified in the kinase domain (exon 20). A novel mutation was found in codon 3059 of exon 20 [C3059T (A1020V)] which has not been reported previously in endometrial cancer. In addition to hotspot mutation of exon 9 [G1624A (E542K)], we also detected a novel mutation [G1610A (R537Q)] in exon 9. We found that PIK3CA mutations are mainly associated with histological grade of tumors (P = 0.03; OR = 5.5). However, we did not observe any significant correlations between PIK3CA mutations and lymph node involvement, stage, or age of patients.

Conclusion: Our results showed that the spectrum of PIK3CA mutations in our population was different. Therefore, further research on a larger number of samples and other types of cancers would be necessary.

Keywords: Endometrial cancer, Mutation, Apoptosis, Phosphatidylinositol-3-kinase.

¹ Student, Department of Biology, School of Sciences, Isfahan University, Isfahan, Iran

² Associate Professor, Department of Biology, School of Sciences, Isfahan University, Isfahan, Iran

³ Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Radiotherapy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Manoochehr Tavasoli PhD, Email: manoochehrt@yahoo.com