

بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم تکرارهای دوتایی CA در اینترون شماره ۲ ژن src و خطر ابتلا به سرطان پستان

غزاله حافظی^۱، منوچهر توسلی^۲، سیمین همتی^۳، فروزان صفری^۱

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان پستان، شایع‌ترین عامل بدخیمی‌های مربوط به زنان و نخستین عامل مرگ زنان در دنیا می‌باشد. تنظیم بیان پروتئین‌های خانواده‌ی src در بسیاری از سرطان‌ها با اختلال مواجه می‌شود. توالی‌های تکراری در اینترون‌ها می‌توانند بر روی بیان ژن، پیرایش متفاوت اینترون‌ها و یا ساختار محصول نهایی اثر بگذارند. این پژوهش، با هدف بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم تکرارهای CA در اینترون ۲ ژن src با خطر ابتلا به سرطان پستان انجام شد.

روش‌ها: از ۱۱۹ خانم مبتلا به سرطان پستان و ۱۴۵ خانم سالم در اصفهان، خون محیطی گرفته و استخراج DNA به روش غیر آنزیمی (Salting out) انجام شد. توالی مورد نظر از طریق Polymerase chain reaction (PCR) تکثیر و تعداد تکرارهای CA در هر نمونه، توسط الکتروفورز ژل پلی‌آکریلامید و تعیین توالی مشخص گردید.

یافته‌ها: میانگین تکرار الی CA در ژن src در جمعیت مورد مطالعه ۲۷-۱۴ بود. ال شایع در هر دو گروه، ۲۱ تکرار داشت. فراوانی ال ۲۲ در میان افراد بیمار بسیار بیشتر بود. ۲۶ ژنوتیپ مشاهده شد و شایع‌ترین ژنوتیپ در میان افراد هر دو گروه، ۲۱/۲۱ بود. فراوانی ژنوتیپ ۲۲/۲۲ در بیماران به طور معنی‌داری از افراد سالم بیشتر بود. محاسبات آماری با استفاده از χ^2 و نسبت افزایشده (OR یا Odd ratio) نشان داد که افراد دارای ال ۲۲ بیشتر در معرض خطر سرطان پستان قرار دارند و زنان دارای ژنوتیپ ۲۲/۲۲ دارای بیشترین احتمال ابتلا می‌باشند.

نتیجه‌گیری: بین ال ۲۲ و بروز سرطان پستان رابطه‌ی مستقیمی وجود داشت. نتایج این پژوهش می‌تواند در تشخیص افراد مستعد ابتلا به این سرطان سودمند باشد.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، پلی‌مورفیسم ژنتیک، ژن src، توالی تکراری آمینواسید

ارجاع: حافظی غزاله، توسلی منوچهر، همتی سیمین، صفری فروزان. بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم تکرارهای دوتایی CA در اینترون شماره ۲ ژن

src و خطر ابتلا به سرطان پستان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۱۹): ۸۷-۹۲

به عنوان یک پروتئو انکوژن عمل می‌نماید و محصول آن در بسیاری از فرایندهای سلولی نقش دارد؛ از این رو، تعجبی ندارد که نقص در مسیرهای انتقال پیام آن در ظهور تومورهای متعدد دخیل باشد (۳).

ساختار پروتئین src، یک توالی ۱۴ کربنه‌ی مرستیل در انتهای آمین پروتئین وجود دارد و پس از آن، دمین‌های SH (src Homology) قرار دارند که شامل یک دمین SH4، یک دمین SH3 و یک دمین SH2 می‌شوند. به علاوه، یک دمین تیروزین کیناز و یک دمین تنظیمی در انتهای کربوکسیل پروتئین وجود دارد. مرستیل‌سیون انتهای آمینی، برای اتصال به غشا اهمیت دارد و در

مقدمه

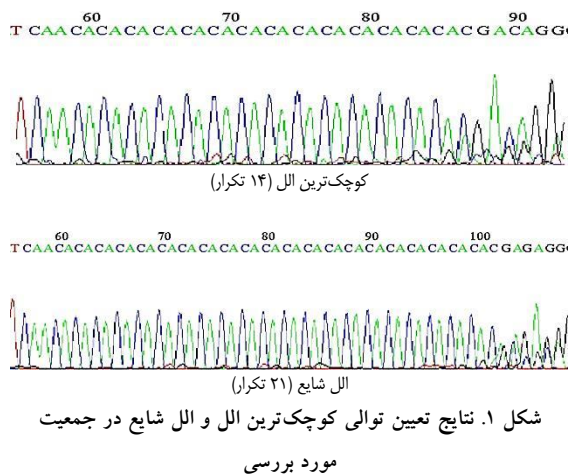
امروزه، سرطان پستان شایع‌ترین عامل بدخیمی‌های زنان و نخستین عامل مرگ زنان در دنیا می‌باشد. گیرنده‌های استروژن فرایندهای بسیاری از جمله رشد سلولی را در سلول‌های پستان کنترل می‌کنند. در این رشد سلولی، تیروزین کیناز غیر گیرنده‌ای src نقش به‌سزایی دارد (۱). نرخ ابتلا به سرطان پستان در حال افزایش است (۲). پروتئین‌های خانواده‌ی src (Sarcom) تیروزین کینازهای غیر گیرنده‌ای هستند که تحت عنوان src family kinases (SFKs) شناخته می‌شوند و تنظیم بیان آن‌ها در بسیاری از سرطان‌ها، با اختلال مواجه می‌شود. ژن C-src در سلول‌های بافت طبیعی پستان

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه پرستودرمانی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

حجم نهایی ۲۵ ماکرو، حاوی ۱۰۰-۵۰ ماکروگرم DNA ژنومی، ۲۰۰ ماکرومولار Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)، ۱۰۰ نانومولار از ترکیب پرایمرهای پیشرو و پیرو، ۱ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۲/۵ ماکرولیتر از بافر PCR 10X و ۲ واحد از آنزیم Taq پلیمرز، در دستگاه ترموسایکلر خریداری شده از شرکت TAKARA انجام پذیرفت. تمام مواد به کار رفته برای PCR از شرکت سیناژن تهیه گردید. برنامه‌ی PCR شامل یک واسرشتی اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس، ۲۰ ثانیه در همان دما برای واسرشت شدن دو رشته‌ی DNA، ۲۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد برای اتصال پرایمرها و ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای گسترش پرایمرها در ۲۲ چرخه اجرا شد. به منظور بررسی تنوع تکرارها، فرآورده‌های PCR روی ژل پلی‌آکرلامید ۱۰ درصد برده شد و کوچک‌ترین الی همراه الی شایع جهت تعیین توالی به شرکت سیناژن ارسال گردید تا به عنوان نشانگر جهت تعیین توالی دقیق سایر نمونه‌ها مورد استفاده قرار گیرد (شکل ۱).



یافته‌ها

پراکندگی تکرار الی CA در ژن Src در جمعیت مورد مطالعه بین ۱۴-۲۷ بود. الی شایع که بیشترین فراوانی را در میان افراد بیمار (۵۶/۲ درصد) و سالم (۵۹/۶ درصد) داشت، الی ۲۱ بود. در مقایسه با افراد شاهد، فرکانس الی‌های ۲۲ تکرار در افراد بیمار بیشتر بود. محاسبات آماری با کمک آزمون χ^2 و Odd ratio (OR) نشان داد که این افراد به طور معنی‌داری در معرض خطر افزایش یافته‌ی سرطان پستان قرار دارند ($OR = 1/8$ و $P = 0/03$) (جدول ۱). در جدول ۲، توزیع فراوانی ترکیبات مختلف الی در بین افراد بیمار و سالم آمده است.

انکوژنیک شدن موتانت‌های src نقش مهمی دارد. دمین‌های SH1-4 در خود تنظیمی کیناز src و برهم‌کنش با اجزای مختلف سلول به منظور ایجاد مجموعه‌های انتقال پیام شرکت دارند. بیماران مبتلا به سرطان پستان که دارای بیان بالای src می‌باشند، به طور میانگین طول عمری حدود ۴/۵ سال دارند. در حالی که متوسط طول عمر بیماران دیگر که بیان src در آن‌ها پایین‌تر است، ۱۱/۵ سال می‌باشد (۴).

مسیر انتقال پیام وابسته به src از طریق فسفریلاسیون پروتئین src در ser17 و tyr416 به دنبال فعالیت پروتئین کیناز A (PKA) یا Protein kinase A (Protein kinase A)، در تغییر شکل سلول‌های غدد پستانی نقش دارد (۵). سرکوب src قابلیت رشد مستقل از بستر سلول‌ها را کاهش می‌دهد (۶). ریزماهورها (Microsatellites)، نشانگرهای مهمی برای تشخیص بیماری‌ها هستند (۷).

با توجه به این که پژوهشی در رابطه با بررسی نقش توالی‌های تکراری در ژن src و بروز سرطان پستان صورت نگرفته بود، این پژوهش با هدف بررسی این ارتباط انجام شد. پژوهش حاضر با استفاده از پایگاه اینترنتی Dfam، در توالی ژن src، در اینترون شماره‌ی ۲، توالی تکراری از دی‌نوکلئوتیدی CA مشاهده گردید. از این رو، با بررسی تعداد تکرارهای دی‌نوکلئوتید CA در اینترون ۲ ژن src، در افراد سالم و بیمار مبتلا به سرطان پستان، احتمال ارتباط این تکرار با سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در شناسایی سریع‌تر و آسان‌تر افراد مستعد ابتلا به سرطان پستان یاری نماید.

روش‌ها

این پژوهش به صورت مورد-شاهدی و تحت تأیید رسمی کمیته‌ی اخلاق دانشگاه اصفهان صورت پذیرفت. نمونه‌گیری خون از ۱۱۹ زن مبتلا به سرطان پستان و ۱۴۵ زن سالم بین سنین ۲۹-۷۴ سال در واحد نمونه‌گیری بیمارستان سیدالشهدای (ع) اصفهان انجام شد. نمونه‌گیری از افراد شرکت کننده در این پژوهش با رضایت کامل و به صورت کتبی از افراد صورت گرفت.

DNA ژنومی از نمونه‌ی خون افراد به روش رسوب نمکی (Salting out) استخراج شد و ناحیه‌ی در برگیرنده‌ی توالی تکراری CA در اینترون ۲ ژن src با استفاده از پرایمر پیشروی 5'-CAGAGAACAGAAGCTCAGAGAAG-3' و پرایمر پیروی 5'-GAGACCTGGGTGTGAGAGA-3' در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR یا Polymerase chain reaction) تکثیر گردید.

طراحی پرایمرها با استفاده از سایت اینترنتی Integrated DNA technologies (IDT) صورت گرفت. PCR در

جدول ۱. فراوانی‌های ال‌های مختلف تکرار CA در جمعیت مورد بررسی و بررسی ارتباط ال ۲۲ تکرار ژن src با خطر ابتلا به سرطان پستان

تعداد تکرار	فراوانی ال‌های در افراد شاهد (درصد)	فراوانی ال‌های در بیماران (درصد)	فراوانی ال‌های در کل افراد مورد بررسی (درصد)
۱۴	۱ (۰/۳)	۰ (۰)	۱ (۰/۱)
۱۵	۲ (۰/۶)	۳ (۱/۳)	۵ (۰/۹)
۱۶	۴ (۱/۳)	۳ (۱/۳)	۷ (۱/۳)
۱۷	۳ (۱/۰)	۲ (۰/۸)	۵ (۰/۹)
۱۸	۶ (۲/۰)	۵ (۲/۱)	۱۱ (۲/۱)
۱۹	۲ (۰/۶)	۲ (۰/۸)	۴ (۰/۷)
۲۰	۳۷ (۱۲/۷)	۳۱ (۱۳/۵)	۶۸ (۱۳/۱)
۲۱	۱۷۳ (۵۹/۶)	۱۲۰ (۵۲/۶)	۲۹۳ (۵۶/۵)
۲۲	۲۲ (۷/۵)	۳۰ (۱۳/۱)	۵۲ (۱۰/۰)
۲۳	۱۰ (۳/۴)	۶ (۲/۶)	۱۶ (۳/۰)
۲۴	۱۰ (۳/۴)	۶ (۲/۶)	۱۶ (۳/۰)
۲۵	۸ (۲/۷)	۵ (۲/۱)	۳ (۲/۵)
۲۶	۶ (۲/۰)	۳ (۱۳/۱)	۹ (۱/۷)
۲۷	۴ (۱/۳)	۵ (۲/۱)	۹ (۱/۷)
مجموع	۲۹۰	۲۲۸	۵۱۸

آزمون OR برای ال ۲۲ تکرار			آزمون χ^2 برای ال ۲۲ تکرار		
فاصله‌ی اطمینان	OR برای ال ۲۲	نتیجه‌ی آزمون $P < \alpha$	سطح خطا (α)	مقدار P	درجه‌ی آزادی
۱/۳-۳/۲	۱/۸	تأیید ارتباط	۰/۰۵	۰/۰۳	۱
					آماره‌ی آزمون ۴/۳

OR: Odd ratio

طبق نتایج حاصل از جدول بالا، ال ۲۲ می‌تواند با بروز سرطان پستان ارتباطی منطقی داشته باشد.

کننده به مرکز درمانی سیدالشهدای (ع) اصفهان محاسبه شد و نتایج حاکی از آن بود که ال‌های ۲۲ تکرار و ژنوتیپ‌های هموزیگوت ۲۲/۲۲ می‌توانند یک عامل خطر برای ابتلا به سرطان پستان باشند. DNAهای ماهواره‌ای ریز یا STRها با قرار گرفتن در توالی افزایش دهنده‌ها و یا حتی خارج از توالی آن‌ها و به احتمال زیاد با تغییر ساختمان ایجاد شده، می‌توانند بر روی بیان ژن‌ها تأثیر بگذارند. STRها همچنین با قرار گرفتن در اینترون‌ها و تغییر ساختمان ایجاد شده، می‌توانند در سرعت جدا شدن اینترون‌ها و در نتیجه بر بیان ژن‌ها تأثیر بگذارند. از این رو، می‌توان پیش‌بینی کرد که ال‌های ۲۲ تکرار در ژن src منجر به افزایش بیان این ژن و افزایش خطر ابتلا به سرطان می‌شوند، اما با این وجود، به منظور تأیید این امر پژوهش‌های بیشتری نیاز است. یافته‌های پژوهش حاضر، رابطه‌ی مستقیمی را بین تعداد تکرارهای CA در ژن src و خطر ابتلا به سرطان پستان نشان دادند. بنابراین، امکان آن وجود دارد که از این توالی تکراری بتوان به عنوان نشانگر به منظور پیش‌آگهی سرطان پستان بهره برد.

۲۶ ترکیب ال‌ی (ژنوتیپ) مختلف برای ژن src مشاهده شد. نتایج بررسی ژنوتیپ‌های مختلف ژن src نشان داد که ترکیب ال‌ی ۲۱/۲۱ بیشترین فراوانی را در بین بیماران (۲۵/۲ درصد) و افراد شاهد (۲۸/۹ درصد) به خود اختصاص داده است. زنان دارای ژنوتیپ ۲۲/۲۲ دارای بیشترین احتمال ابتلا به سرطان پستان (حدود ۹ مرتبه بیشتر)، در مقایسه با زنان دارای سایر ژنوتیپ‌ها در جمعیت مورد مطالعه هستند ($OR = 9$ و $P = 0/010$) (جدول ۲).

بحث

مسیرهای انتقال پیام سلولی که src در آن‌ها فعال است، می‌توانند در پیدایش بدخیمی‌ها نقش داشته باشند (۸). بنابراین، اجزای این مسیر می‌توانند هدف مناسبی برای مطالعات مربوط به درمان سرطان باشند. تکرارهای دی‌نوکلئوتیدی به طور گسترده به عنوان نشانگرهای ژنتیک استفاده می‌شوند و برخی از توالی‌های تکراری دی‌نوکلئوتیدی، در تنظیم رونویسی نقش دارند (۹-۱۱).

در این پژوهش، پراکندگی و فراوانی ال‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف توالی تکراری CA در ژن src در جمعیت بیماران مراجعه

جدول ۲. توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها در جمعیت مورد بررسی و بررسی ارتباط بین ژنوتیپ ۲۲/۲۲ و Src و ابتلا به سرطان پستان

ژنوتیپ	شاهد تعداد (درصد)	مورد تعداد (درصد)
۲۰/۱۴	۱ (۰/۶)	۰ (۰)
۲۱/۱۵	۲ (۱/۳)	۳ (۲/۵)
۲۱/۱۶	۲ (۱/۳)	۳ (۲/۵)
۲۲/۱۶	۱ (۰/۶)	۰ (۰)
۲۵/۱۶	۱ (۰/۶)	۰ (۰)
۲۲/۱۷	۱ (۰/۶)	۱ (۰/۸)
۲۴/۱۷	۱ (۰/۶)	۱ (۰/۸)
۲۶/۱۷	۱ (۰/۶)	۰
۲۱/۱۸	۶ (۴/۱)	۴ (۳/۳)
۲۳/۱۸	۰ (۰)	۱ (۰/۸)
۲۲/۱۹	۲ (۱/۳)	۲ (۱/۶)
۲۱/۲۰	۳۶ (۲۴/۸)	۳۱ (۲۶/۰)
۲۱/۲۱	۴۲ (۲۸/۹)	۳۰ (۲۵/۲)
۲۲/۲۱	۱۳ (۸/۹)	۱۵ (۱۲/۶)
۲۳/۲۱	۹ (۶/۲)	۴ (۳/۳)
۲۴/۲۱	۸ (۵/۵)	۵ (۴/۲)
۲۵/۲۱	۶ (۴/۱)	۳ (۲/۵)
۲۶/۲۱	۴ (۲/۷)	۱ (۰/۸)
۲۷/۲۱	۲ (۱/۳)	۱ (۰/۸)
۲۸/۲۱	۱ (۰/۶)	۰ (۰)
۲۲/۲۲	۱ (۰/۶)	۷ (۵/۸)
۲۵/۲۲	۱ (۰/۶)	۲ (۱/۶)
۲۶/۲۲	۱ (۰/۶)	۲ (۱/۶)
۲۷/۲۲	۱ (۰/۶)	۱ (۰/۸)
۲۷/۲۳	۱ (۰/۶)	۱ (۰/۸)
۲۷/۲۷	۰ (۰)	۱ (۰/۸)
مجموع	۱۴۵	۱۱۹
آزمون OR برای ژنوتیپ ۲۲/۲۲	آزمون χ^2 برای ژنوتیپ ۲۲/۲۲	
فاصله‌ی اطمینان (CI)	میزان OR برای ژنوتیپ ۲۲/۲۲	نتیجه‌ی آزمون
۱/۰۹-۷۴/۲	۹	$P < \alpha$
		تایید ارتباط
		سطح خطا (α)
		۰/۰۵
		سطح معنی‌داری (P)
		۰/۰۱
		درجه‌ی آزادی
		۱
		آماره‌ی آزمون
		۵/۹

OR: Odd ratio; CI: Confidence interval

طبق نتایج حاصل از جدول بالا، ژنوتیپ ۲۲/۲۲ می‌تواند با بروز سرطان پستان ارتباطی منطقی داشته باشد.

اندر کاران و کارمندان محترم مرکز پزشکی - درمانی سیدالشهدای (ع) اصفهان و سایر افرادی که به ما در اجرای این مطالعه یاری رساندند، سپاسگزاری می‌گردد.

تشریح و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد در دانشگاه اصفهان به شماره‌ی ۲۳۲۳۹۵۴ می‌باشد. از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه اصفهان جهت انجام این پژوهش و همچنین، دست

References

1. Planas-Silva MD, Bruggeman RD, Grenko RT, Stanley SJ. Role of c-Src and focal adhesion kinase in progression and metastasis of estrogen receptor-positive breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341(1): 73-81.
2. Benson JR, Jatoti I. The global breast cancer burden.

- Future Oncol 2012; 8(6): 697-702.
- Zhang S, Yu D. Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. Trends Pharmacol Sci 2012; 33(3): 122-8.
 - Elsberger B. Translational evidence on the role of Src kinase and activated Src kinase in invasive breast cancer. Crit Rev Oncol Hematol 2014; 89(3): 343-51.
 - Beristain AG, Molyneux SD, Joshi PA, Pomroy NC, Di Grappa MA, Chang MC, et al. PKA signaling drives mammary tumorigenesis through Src. Oncogene 2015; 34(9): 1160-73.
 - Sanchez-Bailon MP, Calcabrini A, Mayoral-Varo V, Molinari A, Wagner KU, Losada JP, et al. Cyr61 as mediator of Src signaling in triple negative breast cancer cells. Oncotarget 2015; 6(15): 13520-38.
 - Jarne P, Lagoda PJ. Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends Ecol Evol 1996; 11(10): 424-9.
 - Herold CI, Chadaram V, Peterson BL, Marcom PK, Hopkins J, Kimmick GG, et al. Phase II trial of dasatinib in patients with metastatic breast cancer using real-time pharmacodynamic tissue biomarkers of Src inhibition to escalate dosing. Clin Cancer Res 2011; 17(18): 6061-70.
 - Lian Y, Garner HR. Evidence for the regulation of alternative splicing via complementary DNA sequence repeats. Bioinformatics 2005; 21(8): 1358-64.
 - Hegyí H, Kalmar L, Horvath T, Tompa P. Verification of alternative splicing variants based on domain integrity, truncation length and intrinsic protein disorder. Nucleic Acids Res 2011; 39(4): 1208-19.
 - Lim HT, Zhong T, Cho IC, Seo BY, Kim JH, Lee SS, et al. Novel alternative splicing by exon skipping in KIT associated with whole-body roan in an intercrossed population of Landrace and Korean Native pigs. Anim Genet 2011; 42(4): 451-5.

The Association between CA Polymorphism in src Gene and Risk of Breast Cancer

Ghazaleh Hafezi¹, Manoochehr Tavssoli², Simin Hemmati³, Forouzan Safari¹

Original Article

Abstract

Background: Breast cancer is the most common malignancy in women and is the first cause of death among the women in the world. Disruption of gene expression of src family members has been observed in many cancers. Repeated sequences in introns influence gene expression, splicing or change the structure of product. In the present study, the association between CA polymorphism in intron 2 of the src gene and the risk of breast cancer was investigated.

Methods: This was a cohort study on 119 patients with breast cancer and 145 healthy people. Genomic DNAs were extracted from white blood cells. CA dinucleotide region of the src gene was amplified via polymerase chain reaction (PCR) technique and the number of CA repeats was determined using polyacrylamide gel electrophoresis.

Findings: Distribution of the CA repeats in src gene in the target population was between 14-27 repeats. The most common allele in two groups was 21. The frequency of the allele 22 in patients was significantly higher than healthy group. 26 genotypes were identified and the genotype 21/21 was the most common one among the two groups. The genotype 22/22 was more frequent in patients than in healthy group. Chi-square test and odds ratio (OR) showed that women with allele 22 were exposed more to breast cancer. Women with genotype 22/22 had a higher risk of developing breast cancer.

Conclusion: it can be concluded that the allele 22 can have a role in developing breast cancer.

Keywords: Breast cancer, Genetic polymorphism, src gene, Amino acid repeat sequence

Citation: Hafezi G, Tavssoli M, Hemmati S, Safari F. **The Association between CA Polymorphism in src Gene and Risk of Breast Cancer.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(419): 87-92.

1- Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2- Professor, Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Radiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Manoochehr Tavssoli, Email: manoochehrt@yahoo.com