

بررسی جهش‌های احتمالی ژن APC در بیماران مبتلا به پولیپوز آدنوماتوز

خانوادگی با استفاده از روش

Conformation Sensitive Gel Electrophoresis

نسیم وصلی^۱، مهرداد نوروزی نیا^{۲*}، ابوطالب صارمی^۳، مهرداد عزمی^۴، فروزنده محجوبی^۵

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- پزشک، بیمارستان فوق تخصصی زنان و زایمان و نازایی صارم، تهران، ایران

۴- استادیار، انستیتو کنسر، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۵- استادیار، پژوهشگاه علمی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۶/۹/۱۲

دریافت مقاله: ۸۶/۵/۷

چکیده

هدف: پولیپوز آدنوماتوز خانوادگی (FAP)، نوعی استعداد ارثی به سرطان روده بزرگ با توارث اتوزوم غالب و با نفوذ بالا می‌باشد. این نشانگان ژنتیکی با حضور بیش از یکصد پولیپ آدنوماتوزی در روده بزرگ و رکتوم شناخته می‌شود. سایر تظاهرات فنوتیپی شامل تومورهای دسموئیدی، استئوما، تومور در قسمتهای فوقانی دستگاه گوارش و هیپرتروفی مادرزادی پوشش رنگی شبکیه می‌باشند. ژن APC در اکثر قریب به اتفاق بیماران جهش یافته است. افراد مبتلا به نشانگان FAP در صورت عدم درمان در سن متوسط ۴۰ سالگی دچار سرطان روده بزرگ خواهند شد. ژن APC بر روی بازوی بلند کروموزوم ۵ واقع شده و با ۱۵ اگزون و ۸۵۳۸ نوکلئوتید، پروتئینی با ۲۸۴۳ اسید آمینه کد می‌کند. مواد و روش‌ها: ۵ خانواده از میان ۱۵۰ خانواده مبتلا به سرطان روده بزرگ براساس معیارهای استاندارد تشخیص FAP، انتخاب شدند. در این مطالعه بر پایه روش CSGE و با تغییراتی، غربالگری جهش‌های مناطق کد دهنده و بعضی از مناطق غیر کد دهنده ژن APC راه‌اندازی شد.

نتایج: هر ۵ خانواده دارای تغییر غیر طبیعی الگوی الکتروفورز در طی CSGE در اگزون ۱۵ ژن می‌باشند. با شناسایی قطعه دارای تغییر الکتروفورز و با استفاده از تعیین توالی مستقیم تغییر کد این مناطق شناسایی شد. جهش‌های پیدا شده در خانواده‌های مبتلا به APC، جهش‌های شناخته شده‌ای بوده‌اند. این جهش‌ها از نوع بی‌معنی یا تغییر قاب خواندن و حذف می‌باشند. نتیجه‌گیری: CSGE برای اولین بار برای تشخیص جهش‌های ژن APC راه‌اندازی شد. این روش به علت مزایایی که نسبت به روش‌های دیگر غربالگری دارد، می‌تواند در گستره وسیع و در آزمایشگاه‌های معمولی ژنتیک در کشور راه‌اندازی شود. به علت اینکه بیماران مبتلا به FAP امروزه در کشور نمی‌توانند از تشخیص ژنتیکی بیماری خود بهره ببرند، راه‌اندازی این روش می‌تواند در حل مشکل تشخیصی این خانواده‌ها کمک‌کننده باشد.

کلید واژگان: ژن APC، پولیپوز آدنوماتوز خانوادگی، CSGE.

۱- مقدمه

روده بزرگ بوده [۱] و با حضور صدها تا هزاران پولیپ آدنوماتوزی (Adenomatous polyp) در روده بزرگ که بیشتر در دوران بلوغ ظاهر می‌شوند؛ شناخته می‌شود [۲]. این

پولیپوز آدنوماتوز خانوادگی (Familial Adenomatous polyposis: FAP) بیماری ژنتیکی اتوزومی (Autosomal) غالبی است که نفوذ تقریباً صد در صد دارد و مسئول ۱٪ از تمام موارد سرطان

الکتروفورز با ژل گرادیان دنـاتوره کـنـده DGGE (Protein Truncation Test) PTT (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) و CSGE (Conformation Sensitive Gel Electrophoresis) می‌باشند [۱۳،۱۲] که حساسیت این روش‌ها از ۳۵٪ تا ۱۰۰٪ با توجه به اندازه و توالی DNA مورد نظر متغیر می‌باشند [۱۴]. چون ژن APC تا کنون با روش CSGE مورد بررسی قرار نگرفته بود و روش‌هایی مانند SSCP یا DGGE یا PTT بسیار زمان‌بر و پرهزینه می‌باشند و بعضاً حساسیت کمتری نسبت به CSGE دارند، لذا در این مطالعه از شیوه CSGE عنوان شیوه شناسایی کننده جهش در ژن استفاده شد. CSGE برای بررسی تغییرات سه بعدی و ثابت قطعه DNA در سیستم ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید بهینه شده، طراحی شده است. در این روش هتروduplexها (Heteroduplexes) و همودوپلکس‌های (Homoduplexes) حاصل از محصولات PCR به علت تغییرات ثابت در شکل DNA و در نتیجه تغییر سرعت حرکت این قطعات در زمان الکتروفورز، الگوی حرکتی متفاوتی را بر روی ژل پلی اکریل آمید ایجاد می‌کنند [۱۵]. این شیوه قابل استفاده برای هر محصول PCR که اندازه‌ای بین ۲۰۰-۸۰۰ جفت باز دارد، می‌باشد و احتیاج به ابزاری خاص و یا آماده‌سازی نمونه‌ها ندارد [۱۶]. CSGE روشی قوی، ارزان قیمت و با حساسیت بالا بوده؛ بنابراین برای غربالگری ژن‌ها روش ایده‌آل می‌باشد. امتیاز دیگر آن این است که در این روش نیازی به استفاده از موارد رادیواکتیو نمی‌باشد [۱۷]. هدف این مطالعه راه‌اندازی غربالگری جهش‌های ژن APC در بیماران مبتلا به FAP با کمک CSGE و تأیید موارد مثبت با روش تعیین توالی مستقیم می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌ها و استخراج DNA

ابتدا پرونده پزشکی ۱۵۰ بیمار در بیمارستان‌های ایرانمهر، امام خمینی و حضرت رسول در سالهای ۱۳۶۸-۱۳۸۵، که در آنها تشخیص بالینی ابتلا به FAP داده شده بود، بررسی شد.

این بیماری دارای تظاهرات خارج روده بزرگی مانند هیپرتروفی مادرزادی پوشش رنگی شبکیه (Congenital Hypertrophy of Retinal Pigment Epithelium: CHRPE)، تومورهای دسموئیدی (Desmoid tumors)، آدنوماها (Adenoma) و کارسینوماها (Carcinoma) در معده و بالای روده، هپاتوبلاستوما (Hepatoblastoma)، تومورهای استخوانی، تومورهای بافت نرم و تومورهای سایر اندام‌ها می‌باشد [۴،۳]. در نوع کلاسیک بیماری پولیپوز آدنوماتوز، صدها تا هزاران پولیپ آدنوماتوزی در روده بزرگ ایجاد می‌شوند. علائم کولورکتال (Colorectal) مانند خونریزی، اسهال و درد شکم معمولاً در بیماران درمان نشده تا سن متوسط ۳۰ سال ایجاد می‌شود [۶،۵].

ژن مسئول، APC (Adenomatous Polyposis Coli)، یک ژن سرکوبگر تومور است که بر روی بازوی بلند کروموزوم ۵ (5q21-q22) قرار گرفته است؛ این ژن با ۱۵ اگزون (Exon) و ۸۵۳۸ نوکلئوتید، پروتئینی با ۲۸۴۳ اسید آمینه کد می‌کند [۷]. تعدادی از جهش‌ها در این ژن در بیماران مبتلا به FAP شناسایی شده‌اند. اکثر این جهش‌ها، جهش‌های بی معنی یا تغییر قاب خواندن در انتهای ۵' ژن هستند که منجر به تولید کدون‌های پایانی زودرس می‌شوند [۸]. لذا پروتئین تولیدی کوتاه شده، ناقص و فاقد عملکرد می‌باشد. از دست دادن هر دو کپی عملکردی ژن APC منجر به رشد سلولی خارج از کنترل می‌شود. جهش در ژن APC در بیش از ۸۰-۹۰٪ خانواده‌های مبتلا به این بیماری قابل شناسایی است [۹]. و نیز در تومورزایی سرطان‌های کولورکتال تک‌گیر (Sporadic) نقش دارد. جهش‌های سوماتیکی ژن APC در بیش از ۸۰٪ تومورهای تک‌گیر یافت شده‌اند که به نظر می‌رسد در شروع تومورزایی دخالت دارند [۱۰]. امروزه کاملاً مشخص شده است که جهش‌های سوماتیکی APC در پولیپ‌های روده بزرگ، در بیماری FAP، به طور غیر تصادفی ایجاد می‌شوند و معمولاً در ناحیه خوشه جهش (Somatic Mutation Cluster Region: MCR) یعنی بین کدونهای ۱۲۸۶ و ۱۵۱۳، اتفاق می‌افتند [۱۱]. روش‌هایی که می‌توان از آنها برای شناسایی جهش‌ها در ژن APC استفاده کرد شامل SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)،

۲-۲- واکنش زنجیره‌ای پلیمرزی (PCR)

توالی آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن APC در جدول ۱ داده شده است. از آنجایی که آگزون ۱۵ ژن APC بسیار بزرگ است، ۱۱ واکنش PCR برای کل آگزون ۱۵ و برای کل ژن APC ۲۶ واکنش طراحی شد. در طراحی آغازگرها این نکته در نظر گرفته شده که انتهای ۳' و ۵' هر آغازگر ۵۰ نوکلئوتید با ناحیه مورد نظر جهت بررسی، فاصله داشته باشد. آغازگرهای ۷-۱۵، ۸-۱۵ و ۹-۱۵ از منبع [۱۱] و سایر آغازگرها به وسیله برنامه 3 Primer و با توجه به اصول مهم در ساخت آغازگرهای CSGE طراحی شدند. واکنش PCR در محلول ۲۵ میکرولیتر، حاوی ۱ میکرولیتر DNA ژنومی، بافر ۱۰X PCR، ۲ mM dNTP، ۱/۵ MgCl₂ میکرولیتر از محلول ۲۵ mM آغازگر رفت و برگشت و آنزیم Taq پلیمرز (Taq Polymerase) و با برنامه ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ دور به ترتیب ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۱ درجه به مدت ۲ دقیقه و ۷۰ درجه به مدت ۲ دقیقه و گسترش نهایی (Final extension) در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید ۷/۵٪ الکتروفورز شدند.

۲-۳- CSGE

شناسایی جهش‌ها در ژن APC با روش CSGE، همان‌طور که قبلاً توضیح داده شده بود [۱۵]، با تغییرات کمی صورت گرفت. به طور خلاصه، یک ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪ با ضخامت ۱ میلی‌متر که شامل مواد زیر بود، آماده شد: ۹۹:۱ اکریل آمید (Sigma-Aldrich) به ۴۰-۱ بیس اکریلوئیل پیرازین (BAP) (Fluka)، ۱۵٪ فرماید (Merck)، ۱۰٪ اتیلن گلیکول (Merck)، ۱۰٪ آمونیوم پر سولفات (Cinnagen)، ۰/۰۷٪ TTE، N',N',N,N-تترامیلین دیامین (Merck) و ۰/۵ X بافر TTE (Tris-Taurine-EDTA) حاوی ۱/۴ mM تورین، ۴۴ mM تریس و ۰/۱ mM EDTA (pH=۹). سپس ژل به مدت یک ساعت با ولتاژ ۳۰۰ ولت پیش الکتروفورز شد. تشکیل هترو دوپلکس‌ها با استفاده از گرم کردن محصولات PCR در دستگاه PCR صورت گرفت به این ترتیب که نمونه‌ها در ۹۸ درجه به مدت ۵ دقیقه و ۶۵

بیماری [۶،۵] مانند حضور بیش از ۱۰۰ پولیپ کولورکتال (Colorectal Polyp) دارای معیارهای FAP کلاسیک و شجره‌نامه فAMILI قابل دسترسی بوده‌اند انتخاب شدند. از بین این خانواده‌ها ۵ خانواده که حاضر به همکاری بودند، در طرح شرکت کردند. DNA خون محیطی فرد بیمار در هر یک از این خانواده‌ها با روش رسوب‌دهی با نمک (Salting Out) استخراج شد. این روش به طور خلاصه به صورت زیر انجام شد: به ۲ سی‌سی خون هر بیمار، ۱۰ سی‌سی آب اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰ rpm در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد سرد شد. سپس محلول رویی با پیپت کشیده شده و دوباره ۱۰ سی‌سی آب اضافه گردید و مانند مرحله قبل شستشو و سانتی‌گراد گردید. این مرحله ۳ بار تکرار شد. در مرحله بعد، ۱۰ سی‌سی بافر لیز کننده (M۰/۳۲ سوکروز، ۱۰ mM Tris HCl، pH=۷/۶، ۵ mM MgCl₂، ۱٪ تریتون X۱۰۰) اضافه کرده و با دور ۶۰۰۰ rpm در ۴ درجه، به مدت ۱۵ دقیقه سانتی‌گراد سرد شد. سپس ۱/۵ سی‌سی بافر TE (Tris-EDTA) (۲ mM EDTA، pH=۸، ۵۰۰ ul NaCl) و ۵۰۰ ul SDS (Sodium Dodecyl sulfate) (۱۰٪ و ۵۵ ul پروتئیناز K) اضافه گردید و در ۶۵ درجه به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. پس از انکوباسیون (Incubation)، به هر لوله ۵۰۰ ul محلول NaCl (M۵) اضافه کرده و به مدت ۱۵ ثانیه، لوله‌ها به شدت تکان داده شدند و سپس با دور ۴۰۰۰ rpm در ۲۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه سانتی‌گراد شدند. پس از سانتی‌گراد، مایع رویی به لوله دیگری که حاوی ۱۲ سی‌سی اتانول ۱۰۰٪ می‌باشد، منتقل شدند و لوله‌ها چند بار معکوس شد تا DNA به صورت کلاف سفیدی درآمد. DNAها با یک سر سمپلر به لوله اپندورف (Eppendorf) حاوی ۱ سی‌سی اتانول ۷۰٪ انتقال یافته و به مدت ۳ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm سانتی‌گراد شدند. پس از سانتی‌گراد، مایع رویی را با سمپلر کشیده و در لوله‌ها باز گذاشته شدند تا رسوب‌ها خشک شوند. پس از اینکه رسوب‌ها خشک شدند، ۱۰۰ ul آب مقطر دیونیزه به DNAها اضافه شد [۱۸]. در پایان، نمونه‌های DNA استخراج شده در ۲۰- درجه قرار داده شد.

لامپ ماورای بنفش (Ultraviolet: UV) باندها مشاهده شدند. قطعاتی که در ژل CSGE هترودوپلکس نشان می‌دادند به روش تعیین توالی مستقیم و با استفاده از آغازگرهای جدول ۱ مورد تعیین توالی قرار گرفتند. برای تعیین توالی، ۲۵ میکرولیتر از DNA را به همراه ۵ میکرولیتر از آغازگر رفت، در دستگاه ABI 3700 Capillary System قرار داده و تعیین توالی انجام شد.

درجه به مدت یک ساعت حرارت داده شدند. سپس ۵ میکرولیتر از نمونه‌ها همراه با ۱ میکرولیتر بافر بارگذاری (Loading buffer) داخل چاهک‌ها ریخته شده و در دمای اتاق به مدت ۴ ساعت با ولتاژ ۳۰۰ ولت الکتروفورز شدند. در ادامه ژل در محلول رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد تا باندها رنگ شدند و سپس ۱۰ دقیقه در آب مقطر قرار داده شد تا رنگ‌زدایی شدند. پس از آن در دستگاه ژل داگ (Gel Doc) زیر

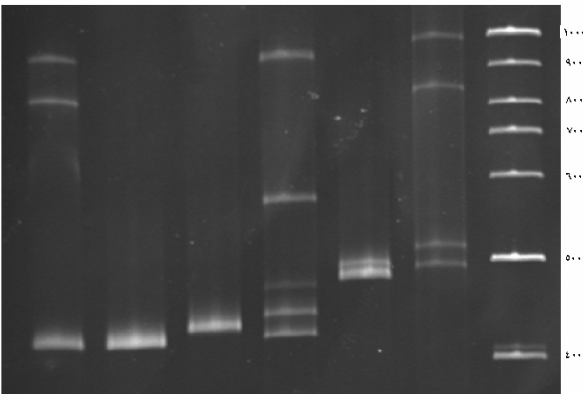
جدول ۱ توالی آغازگرهای رفت و برگشت جهت تکثیر اگزون‌های ژن APC نوکلئوتیدهای مربوط به توالی اینترون‌ها بصورت حروف کوچک و نوکلئوتیدهای مربوط به توالی اگزون‌ها با حروف بزرگ نشان داده شده‌اند.

اگزون	اندازه	آغازگر رفت	آغازگر برگشت
۱	۴۷۵	۵'-tttcctctcttcgcagatgctgct-۳'	۵'-aaatgctaacttttcgagcaagaaga-۳'
۲	۳۰۵	۵'-gtgctgctttgagacagtgtat-۳'	۵'-accaacacccgggcaaatcgagag-۳'
۳	۵۱۱	۵'-ttaccctgaccaagtggac-۳'	۵'-tgagtttaaaatgcaaatgctc-۳'
۴	۳۰۴	۵'-agcactttagcacagtagagaagttgc-۳'	۵'-ttatcctgaattccataatggattacct-۳'
۵	۳۵۱	۵'-gcaccatgactgaccacgtatttg-۳'	۵'-gccaaaatacacaacacagcctatg-۳'
۶	۳۰۰	۵'-aatgattgacataaccctgggcagc-۳'	۵'-tgaaagaacatctcgcatattcaatgggtg-۳'
۷	۳۳۱	۵'-tctgtataattgatgattccacagagc-۳'	۵'-tgcattcaggactaagaaatagg-۳'
۸	۳۰۳	۵'-ttatcatcacagacacttctatattgga-۳'	۵'-ctcccataaataatgctgggatta-۳'
a9	۵۳۰	۵'-ctggaaggttttcctttggtt-۳'	۵'-ATTGCCCTCCTGGTCCATGC-۳'
b9	۴۱۵	۵'-TATCCATACATACTGGA-۳'	۵'-tgagtagcccgacaatggctga-۳'
۱۰	۳۰۲	۵'-tgatccctgcatatttcgcataaagtaca-۳'	۵'-tggcccagtatatcctaattcatca-۳'
۱۱	۴۱۶	۵'-aattctaaggcaacccttaaacca-۳'	۵'-agcgaatgcagtgagcagcaggt-۳'
۱۲	۳۰۱	۵'-ccaaaaataaagctcccggttc-۳'	۵'-cctcggccagaggctgaagtgg-۳'
۱۳	۳۹۹	۵'-accacggctagccaaaagaattt-۳'	۵'-atggccccataaagaaggcagca-۳'
۱۴	۴۰۵	۵'-agggacgggcaactcctagatag-۳'	۵'-cattgctccctacaattagctttttga-۳'
۱۵-۱	۴۲۵	۵'-aggagatgtggaatccctccactgga-۳'	۵'-AAGCCGCTTGAGTAGCCAT-۳'
۱۵-۲	۴۹۶	۵'-GGAAGCATGGACATGG-۳'	۵'-TAGCCACCACGCGTTCTC-۳'
۱۵-۳	۵۲۲	۵'-TTACCCAGTCTTCATCA-۳'	۵'-TAGGTCGGCGGGTATTGAC-۳'
۱۵-۴	۴۳۳	۵'-AGGTATGAAGCTCGAT-۳'	۵'-TCCATGTGAACCCACTCG-۳'
۱۵-۵	۴۲۹	۵'-TTCCAACCAGGGTGACA-۳'	۵'-GAGCTGTTGCCTCTTGG-۳'
۱۵-۶	۵۰۳	۵'-TGCCACATGTCCTTCATCA-۳'	۵'-CTTTGTTTTGGCTGATTCT-۳'
۱۵-۷	۴۵۰	۵'-AGACTTATTGAAGATAC-۳'	۵'-ATGGTCTTTGAACGGA-۳'
۱۵-۸	۴۲۱	۵'-ATCTTGGAAGTGGTGC-۳'	۵'-TCCATCTGGTTAGTATTG-۳'
۱۵-۹	۴۷۵	۵'-TCTGTCAAGGGCTTGATAG-۳'	۵'-CATTTGATTTTCGGCTGC-۳'
۱۵-۱۰	۳۸۶	۵'-GAGCCTCTGGGAGCCATTA-۳'	۵'-TATCATCCTTCGTGTAATAA-۳'
۱۵-۱۱	۴۸۱	۵'-CTGTGAGGTTAAACCAAGT-۳'	۵'-TGATTTTAAGGGTGCAGA-۳'

۳- نتایج

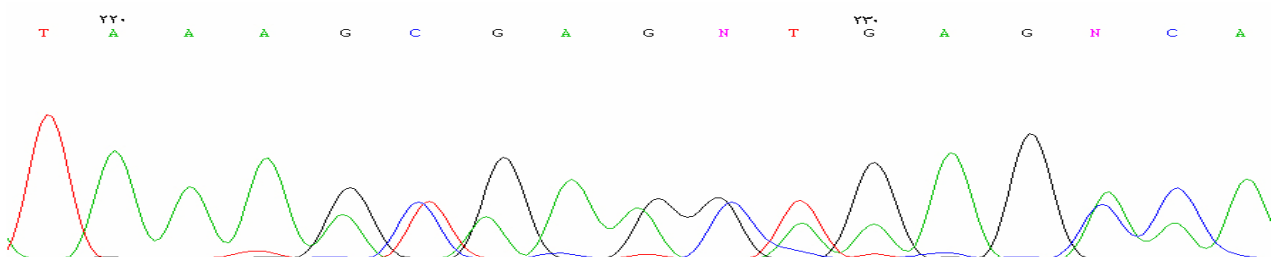
در آگزون ۱۵، هر ۵ بیمار با روش CSGE هترو دوپلکس‌ها مشاهده شدند که در شکل ۱ نشان داده شده‌اند. برای شناسایی جهش‌های شناخته شده به وسیله شیوه غربالگری، تعیین توالی مستقیم انجام شد. نمونه‌ای از توالی‌ها در شکل ۲ نشان داده شده‌اند. نتیجه آنالیز تعیین توالی مستقیم بیماران نشان دهنده وجود جهش در هر ۵ بیمار می‌باشد (جدول ۲). همان‌گونه که مشخص است، در هر ۵ بیمار، کدون پایانی زودرس تشکیل شده است. این کدون پایانی در بیمار ۱ و ۲ در آگزون ۱۵-۴، در بیمار ۳ در آگزون ۱۵-۱، در بیمار ۴ در آگزون ۱۵-۵ و در بیمار ۵ در آگزون ۱۵-۲ تشکیل شده‌اند و لذا در هر ۵ بیمار پروتئینی ناقص و کوتاه شده تولید می‌شود. نتایج تعیین توالی تأیید کننده نتایج به دست آمده از روش CSGE می‌باشند.

(الف)



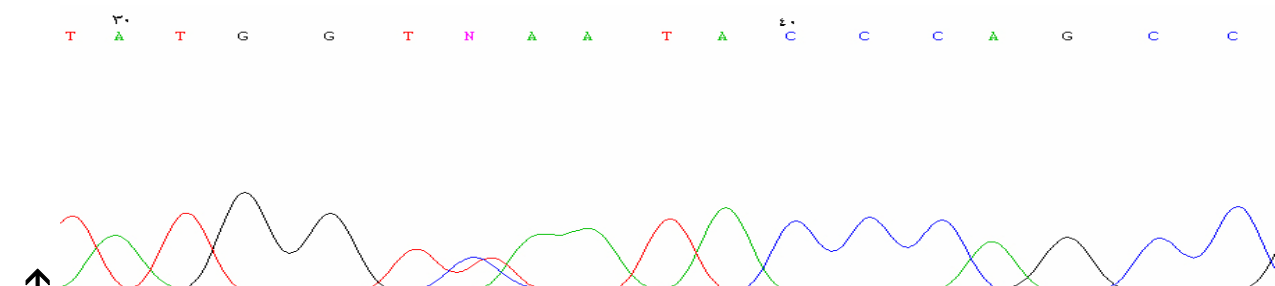
نردبان کنترل مثبت بیمار ۵ بیمار ۴ بیمار ۳ بیمار ۲ بیمار ۱ بیمار
شماره قطعه ۱۵-۲ ۱۵-۵ ۱۵-۱ ۱۵-۴ ۱۵-۴

شکل ۱ هترو دوپلکس‌ها در ژل CSGE قابل مشاهده هستند. همان‌گونه که در شکل مشخص است تمامی ۵ بیمار هترو دوپلکس نشان داده‌اند. هترو دوپلکس در بیمار ۱ و ۲ در آگزون ۱۵-۴، در بیمار ۳ در آگزون ۱۵-۱، در بیمار ۴ در آگزون ۱۵-۵ و در بیمار ۵ در آگزون ۱۵-۲ تشکیل شده است



↑
AAATAAAACAAAGTGAGCAAAGACAA

(ب)



↑
TTATGGTCAATACCCA

شکل ۲ الف) نتیجه تعیین توالی در بیمار ۱ که دارای جهش 3183-3187 del ACAA, Gln 1062 ter در آگزون ۱۵-۴ می‌باشد. فلش نشان دهنده مکان جهش است ب) نتیجه تعیین توالی در بیمار ۲ که دارای جهش 2995 C>T, Gln 999 ter در آگزون ۱۵-۴ می‌باشد. فلش مکان جهش را نشان می‌دهد.

جدول ۲ نتیجه آنالیز تعیین توالی بیماران بر روی دستگاه ABI نشان دهنده وجود جهش در ناحیه قبل از MCR در هر ۵ بیمار بوده است.

بیمار	اگزون	قطعه	جهش
بیمار ۱	۱۵	قبل از MCR	3183-3187 del ACAA, Gln 1062 ter
بیمار ۲	۱۵	قبل از MCR	2995 C>T, Gln 999 ter
بیمار ۳	۱۵	قبل از MCR	1999 C>T, Gln 667 ter
بیمار ۴	۱۵	قبل از MCR	3444 del TGAA, Ser 1148 fs 1163 ter
بیمار ۵	۱۵	قبل از MCR	2334-2335 ins T, Lys 779 fs 787 ter

۴- بحث

قبل از نوآوری آزمایش‌های علمی پیش علامتی، غربالگری برای شناسایی پولیپ‌های آدنوماتوز، مؤثرترین راه در شناسایی افراد دارای خطر بالای این نشانگان در خانواده‌های شناخته شده بوده است. چنین برنامه‌های تشخیص زودهنگام، شامل بررسی روده بزرگ به روش سیگموئیدوسکوپی نرم یا کولونوسکوپی بوده است که در دوره‌های متوالی بوده و از سن ۱۰-۱۴ سالگی شروع شده و تا ۴۰ سالگی ادامه یافته است. پس از سن ۴۰ سالگی نیز چنین بررسی‌هایی هر ۳-۴ سال یکبار تا سن ۶۰ سال ادامه داشته است [۱۹].

شناخت ژن APC، انقلابی در شناسایی حاملین جهش و غربالگری بالینی خانواده‌های مبتلا به FAP بوجود آورد. امروزه بررسی ژنتیکی، پیش علامتی در افراد دارای خطر این بیماری، از استانداردهای جهانی می‌باشد [۲۰، ۲۱]. اهمیت بالینی آزمایش‌های پیش از علامت در خانواده‌های FAP از دو جهت می‌باشد: اولاً با شناخت افرادی که دارای جهش خانوادگی و استعداد ژنتیکی ابتلا به FAP می‌باشند به علت نفوذ نزدیک به ۱۰۰٪ جهش، برنامه تشخیص زودرس استاندارد پیگیری شده و در افرادی که فاقد جهش می‌باشند به علت اینکه دارای خطری بالاتر از افراد دیگر جامعه نمی‌باشند برنامه پیگیری و تشخیص زودرس ضرورتی نداشته و انجام نمی‌شود [۲۲]. ثانیاً با تشخیص دقیق گروه دارای خطر به علت کاهش مثبت کاذب (کاهش افراد بدون خطری که مورد کولونوسکوپی قرار می‌گیرند) روش‌های

تشخیص زودرس (مانند کولونوسکوپی) در خانواده‌های FAP مؤثرتر خواهند بود [۲۳]. یکی از علل این امر بروز ۱۰۰٪ بیماری و سرطان در حاملین جهش در ژن APC می‌باشد.

تشخیص پیش علامتی این بیماری به کمک ژنتیک می‌تواند منجر به کلکتومی (Colectomy) پیشگیرانه در این افراد شده و از مرگ زود هنگام آنها جلوگیری کند [۲۴]. از طرف دیگر، شناخت کافی از سازوکار مولکولی این بیماری، در دسته بندی بیماران و طراحی بهترین درمان‌ها کمک خواهد کرد [۲۵]. ایجاد راهبرد تعیین جهش در خانواده‌های دارای عضو مبتلا به بیماری FAP، از توصیه‌های اکید انجمن‌های تخصصی بوده و از مرگ و میر بالای افراد حامل جهش خواهد کاست [۲۶]. به همین علت، بیماران مبتلا به FAP می‌باشند و افراد بالقوه حامل جهش خانوادگی، باید مورد مشاوره و بررسی ژنتیک و در صورت لزوم بررسی‌های اندوسکوپی (Endoscopic) قرار بگیرند [۲۷].

اکثر جهش‌های رده زاینده در ژن APC از نوع تغییر قاب خواندن (Frameshift)، بی معنی (Nonsense) یا جهش‌های ناحیه برش (Splice site) در انتهای ۵' ژن هستند که منجر به تولید پروتئین کوتاه شده و ناقص می‌شوند [۲۸]. در هر ۵ بیمار انتخاب شده نیز کدون پایانی زودرس تشکیل شده است؛ بنابراین پروتئین تولیدی ناقص و فاقد عملکرد می‌باشد. برای شناسایی جهش‌ها در ژن APC، روش‌های مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرند. گزارش‌هایی مبنی بر مقایسه

در غربالگری جهش‌های ژن APC می‌باشد و در عین حال راه‌اندازی آن برای تمام منطقه کد دهنده و مناطق ایترونی (Intron) مهم زمینه را برای تحقیقات بیشتر در این سرطان در بیماران ایرانی ایجاد کرده است. باید توجه داشت که شناسایی جهش در ژن APC از الزامات کنترل بیماری می‌باشد که در تمام استانداردهای ارائه شده به وسیله کمیته‌های تخصصی کشورهای مختلف جهان به آن توصیه اکید شده است. با استفاده از این شیوه حساس به جای تعیین توالی مستقیم، می‌توان انتظار داشت که بیماران بیشتری از خدمات ژنتیکی استفاده کرده و در عین حال بتوان با شناسایی جهش‌های بومی در بررسی‌های گسترده، استانداردهای آزمایشگاهی مناسبی برای بررسی جهش در ایران ارائه داد.

حساسیت روش CSGE با سایر روش‌ها مانند DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) و SSCP ... منتشر شده است. این گزارش‌ها بیانگر حساسیت بالای CSGE نسبت به شیوه ما می‌باشد. از طرف دیگر CSGE روشی بسیار کارا برای قطعات دارای اندازه بزرگ بوده و به علت عدم استفاده از مواد رادیواکتیو، قابل استفاده در آزمایشگاه‌های کوچک می‌باشد. طول قطعات می‌تواند عامل محدود کننده در بسیاری از شیوه‌ها همانند SSCP باشد. در این روش هترو دوپلکس‌های ناشی از هیبریداسیون آلل جهش‌دار با آلل وحشی، به علت داشتن الگوی مهاجرت الکتروفورزی متفاوت نسبت به توالی وحشی قابل شناسایی بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید نیمه دناتوره کننده می‌باشند [۱۵]. تحقیق انجام شده نشان دهنده امکان استفاده از روش CSGE

۵- منابع

- [1] Sterkrova J, Sulova M, Kebrdlova V, Zidkova K, Kotlas J, Ilencikova D. Novel APC mutations in Czech and Slovak FAP families: clinical and genetic aspects. *BMC Med Genet* 2007; 8: 16.
- [2] Strate L, Syngal S. Hereditary colorectal cancer syndromes. *Cancer Causes Control* 2005; 16:201-13.
- [3] Uchino S, Noguchi S, Yamashita H, Watanabe S, Ogawa T, Tsuno A. Mutational analysis of the APC gene in Cribriform-Morula variant of papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* 2006; 30: 775-9.
- [4] Bonk T, Humenya A, Sutter C, Gebert J, Knebel Doeberitz M, Becker C. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis (FAP): Genotyping of adenomatous polyposis coli (APC) alleles by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Biochem* 2002; 35: 87-92.
- [5] Petersen G, Boyd P. Gene tests and counseling for colorectal cancer risk: lessons from familial polyposis. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1995; 17: 67-71.
- [6] Petersen G, Slack J, Nakamura Y. Screening guidelines and premorbid diagnosis of familial adenomatous polyposis using linkage. *Gastroenterology* 1991; 100(6): 1658-64.
- [7] Ionescu D, Papachristou G, Schoen R, Hedge M, Richards S, Monzon F. Attenuated familial adenomatous polyposis :A case report with mixed features and review of genotype-phenotype correlation. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129(11):1401-4.
- [8] Eccles D, Vander Lui R, Breukel C. Hereditary desmoid disease due to a frameshift mutation at codon 1924 of the APC gene. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 1193-1201.
- [9] Powell S, Petersen G, Krush A, Booker S, Jen J, Giardiello F. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 329(27): 1982-7.
- [10] Powell S, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan T, Hamilton S, Thibodeau S. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359(6392): 235-7.
- [11] Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura

- Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 229-33.
- [12] Sieber O, Lamlum H, Crabtree M, Rowan A, Barclay E, Lipton L, Hodgson S, Thomas H, Neale K, Phillips R, Farrington S, Dunlop M, Mueller H, Bisgaard M, Bulow S. Whole-gene APC deletions cause classical familial adenomatous polyposis, but not attenuated polyposis or "multiple" colorectal adenomas. *PNAS* 2002; 99(5): 2954-8.
- [13] van der Luijt RB, Khan PM, Vasen HF, Tops CM, van Leeuwen-Cornelisse IS, Wijnen JT, van der Klift HM, Plug RJ, Griffioen G, Fodde R. Molecular analysis of the APC gene in 105 Dutch kindreds with familial adenomatous polyposis: 67 germline mutations identified by DGGE, PTT, and southern analysis. *Hum Mutat* 1997; 9(1): 7-16.
- [14] Soteh M, Peake I, Marsden L, Anson J, Batlle J, Meyer D, Fressinaud E, Mazurier C, Goudemand J, Eikenboom J, Goodeve A. Mutational analysis of the von Willebrand factor gene in type 1 von Willebrand disease using conformation sensitive gel electrophoresis: a comparison of fluorescent and manual techniques. *Haematologica* 2007; 92(4): 550-3.
- [15] Ganguly A. An update on conformation sensitive gel electrophoresis. *Hum Mutat* 2002; 19: 334-42.
- [16] Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(21): 10325-9.
- [17] Lakhotia S, Somasundaram K. Conformation-sensitive gel electrophoresis for detecting BRCA1 mutations. *Methods Mol Biol* 2003; 223: 403-12.
- [18] Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215.
- [19] Bulow S. The establishment of a polyposis registers. *Int J Colorectal Dis* 1993; 8(1): 34-8.
- [20] Gebert J, Dupon C, Kadmon M, Hahn M, Herfarth C. Combined molecular and clinical approaches for the identification of families with familial adenomatous polyposis coli. *Ann Surg* 1999; 229(3): 350-61.
- [21] Wallis Y, Morton D, McKeown C, Macdonald F. Molecular analysis of the APC gene in 205 families: extended genotype-phenotype correlations in FAP and evidence for the role of APC amino acid changes in colorectal cancer predisposition. *J Med Genet* 1999; 36(1): 14-20.
- [22] Bapat B, Noorani H, Cohen Z, Berk T, Mitri A, Gallie B. Cost comparison of predictive genetic testing versus conventional clinical screening for familial adenomatous polyposis. *Gut* 1999; 44(5): 698-703.
- [23] Belchetz L, Berk T, Bapat B, Cohen Z, Gallinger S. Changing causes of mortality in patients with familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 1996; 39(4): 384-7.
- [24] Resta N. Two novel mutations and a new STK11/LKB1 gene isoform in Peutz-Jeghers patients. *Hum Mutat* 2002; 20(1): 78-9.
- [25] Friedl W, Caspari R, Sengteller M, Uhlhaas S, Lamberti C. Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Gut* 2001; 48(4): 515-21.
- [26] Trimbath J, Giardiello F. Review article: genetic testing and counselling for hereditary colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16(11): 1843-57.
- [27] Gryfe R. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 1997; 21(5): 233-300.
- [28] Fearnhead N, Britton M, Bodmer W. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 721-33.