Archive of SID

(مقالات پژوهشی)

بررسی نقاط داغ جهش پذیری در اگزون ۱۵ در ژن APC مبتلایان به پولیپوز آدنوماتوز فامیلی و خویشاوندان آن در خوزستان

عبدالرحیم مسجدی زاده*[1]، علی محمد فروغ مند**، حمید گله داری***
نجمه رنجی****

چکیده

مقدمه: مشخصه بیماری پولیپوز آدنوماتوز فامیلی (FAP) حضور صدها تا هزاران پولیپ ادنوماتوز در کولون و رکتوم می باشد و چنانچه درمان نشود منجر به سرطان کولون می گردد. این بیماری توارثی دارای الگوی آتوزومی غالب می باشد و به علت جهش در ژن APC در سلول های germ line رخ می دهد. ژن APC در روی کروموزم (22-21) 5(q) واقع و شامل ۲۱ اگزون می باشد. اگزون ۱۵ این ژن به عنوان نقطه داغ برای جهش های ژنی تشخیص داده شده است.این بیماری ۰/۵ تا ۲ درصد همه موارد سرطان کولورکتال را شامل می شود در این مطالعه سعی بر این بود تا فراوانی جهش در اگزون ۱۵ ژن APC در بیماران FAP بررسی شود.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی توصیفی ۱۲ بیمار مبتلا به FAP و ۱۱ نفر از بستگان درجه اول آن ها مورد بررسی ژنتیکی قرار گرفتند. استخراج DNA از نمونه های خونی بیماران و بستگان به کمک روش های روتین و استاندارد رسوب دهی انجام گرفت. سه ناحیه جهش پذیر از اگزون ۱۵ از ژن APC با سه جفت پرایمر با استفاده از روش های PCR و SSCP (single strand conformation polymorphism) بررسی و آنالیز گردید.

یافته ها: در ۷ بیمار و ۲ نفر از بستگان با متد SSCP باندهای نابجا مشاهده گردید که بعد از تعیین توالی، ۵ بیمار (۲۴ تا ۳۵ سال) جهش frame shift (inst ۳۱۹۶-۳۱۹۵)داشتند. و در دو بیمار و دو نفر از خویشاوندان آن ها نیز علیرغم مثبت بودن SCCP هیچگونه جهشی مشاهده نگردید.

نتیجه گیری: تقریباً در ۵۰درصد از بیماران FAP مورد مطالعه دارای جهش در اگزون ۱۵ در ژن APC بودند؛ البته در این مطالعه ناحیه کوچکی از ژن APC مورد تحقیق قرار گرفت و همه بیماران نیز دارای جهش یکسان بودند.

م ع پ ۱۳۸۸ ؛ ۸ (۱) : ۷۸-۷۰

کلید واژه گان: ژن APC، پولیپوز آدنوماتوز فامیلی، رویکرد SSCP

---

*دانشیار گروه گوارش دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
**استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز
***دانشیار گروه زیست دانشگاه شهید چمران اهواز
****دانشجوی ارشد گروه زیست دانشگاه شهید چمران اهواز
۱-نویسنده مسوول: Email: rmasjedi@hotmail.com

دریافت مقاله:۱۳۸۶/۱/۲۹ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۷/۱۰/۱۶ اعلام قبولی: ۱۳۸۷/۱۱/۸

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری پولیپوز آدنوماتوز فامیلی FAP سندرم توارثی با الگوی آتوزومی غالب می باشد که در نتیجه جهش در سلول های دودمانی جنسی(Germ-Line Cells) در ژن APC رخ می دهد(۱). مشخصه این بیماری حضور صدها تا هزاران پولیپ آدنوماتوز در طول کولون و رکتوم در اوایل زندگی می باشد(۲و۳). تخمین زده می شود که از هر ۱۰۰۰۰ نفر یک نفر مبتلا به این بیماری باشد(۴و۵) و زیاد بودن تعداد پولیپ ها احتمال کارسینوم کولورکتال را تا ۱۰۰درصد افزایش می دهد(۶و۷). این بیماری درنتیجه جهش در ژن APC که یک ژن بزرگ متشکل از ۱۵ اگزون با ناحیه کد کننده(Open Reading Frame) برابر با ۸۵۳۸ جفت باز می باشد(۸).

ژن APC یک ژن سرکوبگر تومور می باشد و پروتئینی با ۲۸۴۳ اسید آمینه تولید می کند. این پروتئین نقش مهمی در چسبندگی سلول ها، انتقال سیگنال ها و فعالیت نسخه برداری دارد. جهش در ژن APC در ۸۰ تا ۹۰ درصد خانواده های دارای FAP گزارش شده است. متجاوز از ۳۰۰ جهش مختلف منجر به بیماری در ژن APC شناسایی شده است. اغلب جهش ها از نوع تغییر در چهار چوب(frame shifts mutation) بوده که ناشی از وارد شدن(Insertion) یا حذف(Deletion) در یک تا ۸ جفت باز می باشد. این ژن دارای ۲۱ اگزون است اما اکثر جهش ها در اگزون ۱۵ مشاهده گردیده است.

فراوانی بالائی از جهش ها در ناحیه ′5 از اگزون ۱۵ بین کدون های ۱۰۰۰ تا ۱۶۰۰ که یک ناحیه تجمعی(Cluster) از جهش های تعیین شده است و ۲۰درصد کل ژن را در بر می گیرد رخ می دهد. در حدود ۳۰درصد از جهش های APC در کدون های ۱۰۶۱، ۱۳۰۹ یا ۱۴۶۵ مشاهده می شوند.(۹) در این مطالعه تلاش شد تا با بررسی نمونه خونی بیماران مبتلا به FAP و بستگان درجه اول آن ها نقاط داغ جهش پذیر در اگزون ۱۵ ژن APC به روش SSCP جهت غربالگری جهش ها در جفت کدون های ۱۰۳۴ تا ۱۰۹۵، ۱۲۹۱ تا ۱۳۳۴ و ۱۴۰۷ تا ۱۴۸۵ مورد بررسی و سپس به روش تعیین ترادف(Sequencing) مورد تأیید قرار گیرد.

روش بررسی

در این مطالعه مقطعی توصیفی ۱۲ بیمار مبتلا به FAP که بین سال های ۸۰ تا ۸۴ تشخیص بیماری شان بوسیله کولونوسکوپی و آسیب شناسی تأیید وتحت عمل جراحی پروکتوکولکتومی کامل با ایلئوآنال آناستوموز همراه با پاچ بودند بررسی گردیدند. جهت تمام بیماران آندوسکوپی جهت بررسی پولیپ های معده و دئودنم و اطراف آمپول واتر بعمل آمد. معاینه چشمی از نظر ضایعات پیگمانته فوندوس(Congenital hypertrophy of retinal pigment epithelium) CHRPE و رادیوگرافی جمجمه و استخوان های بلند جهت ارزیابی استئوما و سی تی اسکن شکمی جهت بررسی تومورهای خوش خیم مثل اسیموئید بعمل آمد. تمام بیماران مزبور توسط متخصصین غدد معاینه تیروئید شدند. سن بیماران ۲۴ تا ۴۵ سال بود. تعداد ۵ مورد مرد و ۷ مورد زن بودند. از ۱۱ نفر از بستگان درجه اول بیمارانی که عمدتاً خواهر یا برادر بیماران بودند بعد از مصاحبه شفاهی و آگاهی دادن به آن ها در مورد نقش توارث و نیاز به غربالگری ژنتیکی و در صورت مثبت بودن جهش ژن انجام سرویلانس کولونوسکوپی و کسب موافقت کتبی وارد مطالعه شدند.

جمع آوری نمونه

نمونه خون ۲۳ نفر (شامل ۱۲ بیمار و ۱۱ مورد از بستگان بیماران) برای نقاط داغ جهش پذیر در اگزون ۱۵ ژن APC به کمک SSCP (یکی از روش های مناسب در غربالگری جهش ها) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه خون بیماران در کلینیک گوارش و در لوله های آزمایش EDTA دار 5M/ نگهداری شده و سپس به بخش ژنتیک ارسال می شد.

www.SID.ir

Archive of SID

استخراج DNA

استخراج ژنوم بـه کمـک روش هـای روتـین و استاندارد رسوب دهی انجام گرفتند. جهت بررسی کمی و کیفی ژنوم استخراج شده از ژل آگارز و اسـپکتروفتومتری با نور ماوراء بنفش استفاده گردید.

جهت بررسی اگزون ۱۵ از ژن APC و به دلیل طول نسبتاً زیاد ایـن اگـزون، سـه جفـت پرایمـر طراحـی گردید. جفت اول کدون ۱۰۳۴ تا ۱۰۹۵، جفت دوم کدون ۱۲۹۱ تـا ۱۳۳۴ و جفـت سـوم کـدون ۱۴۰۷ تـا ۱۴۸۵ را پوشش می دادند. ترادف پرایمرهای استفاده شـده و طـول محصول آن ها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: ترادف پرایمرها برای تکثیر سه منطقه داغ در اگزون ۱۵ ژنAPC

محصول PCR	منطقه کدونی پوشش دهنده توسط پرایمر	پرایمر رفت	پرایمر برگشت	طول محصول
A1	۱۰۳٤ تا ۱۰۹۵	5′- GCAGTTGAACTCTGGAAGG-3′	5′-TGTCCAAAATGTGGTTGGAA-3′	184bp
A2	۱۲۹۱ تا ۱۳۳٤	5′-CAGACGACACAGGAACCAGA-3′	5′-TGGATTTGGTTCTAGGGTGC -3′	132bp
A3	۱٤۰۷ تا ۱٤۸۵	5′-GTGAACCATGCAGTGGAATG-3′	5′-AGCATCTGGAAGAACCTGGA-3′	236bp

مقـدار ۵۰ نـانوگرم از هـر نمونـه DNA در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش PCR در ۳۵ سـیکل و در حجـم ۲۵ میکرولیتـر و بـا حـضور ۲۰۰ میکرومول dNTPs، ۱/۵ میکرومـول کلرایـد منیـزیم، ۲۵ میکرومول از هـر پرایمـر و نهایتـاً ۲/۵ واحـد آنـزیم تـک پلیمراز انجام پذیرفت. هر سیکل در سـه مرحلـه حرارتـی شامل مرحله واسرشت در دمـای ۹۴ درجـه سـانتی گـراد، مرحله اتصال پرایمر به الگو در درمـای اختـصاصی ۵۵ تـا ۵۷ درجه برای هـر سـه جفـت پرایمـر و مرحلـه واکـنش پلیمرازی در دمای ۷۲ درجه صورت گرفت.

روش SSCP جهت غربالگری جهش ها

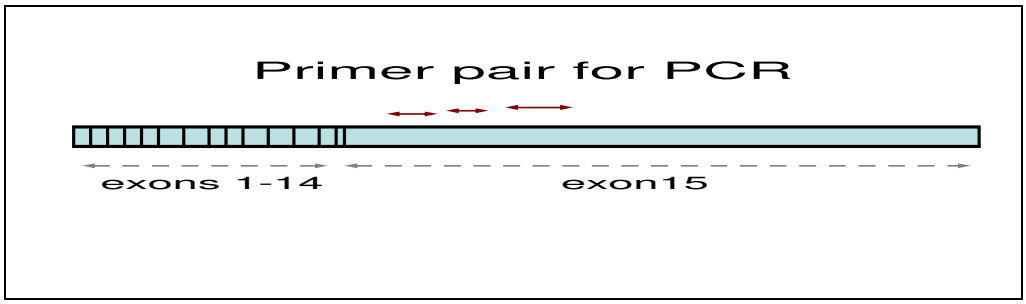
برای این منظور ابتدا ژل پلیمـر اکریـل آمیـد ۱۲ درصد با ۵ درصد گلیسرول و ۳۰۰ میکرولیتر محلـول ۱۰ در صـدی آمونیـوم پرسـولفات بـه همـراه ۳۰ میکرولیتـر Temed آماده گردید. سپس ۴ میکرولیتر محصول PCR با ۴ میکرولیتر بافر حـاوی ۹۵ درصـد فرمامیـد، ۱۰ میلـی مولار سـود و ۱۰ میلـی مـولار بـرم فنـول آبـی و گـزیلن سیانول مخلوط گردید. و به مـدت ۵ دقیقـه در دمـای ۹۵ درجه سانتی گراد حرارت داده، سپس بر روی یخ گذاشـته و سریعاً به ژل انتقال داده شد. نمونه ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ ساعت در دمای محیط و با ولتـاژ ۳۰۰ ولـت الکتروفـورز شدند. در خاتمه ژل بـا کمـک روش نیتـرات نقـره رنـگ آمیزی و سپس در دستگاه ژل خشک کن خشک گردید.

یافته ها

بررسی جهـش در افـراد فـوق نـشان داد کـه در مجموع ۹ نفر از بیماران و بـستگان آن هـا در سـه منطقـه مـورد بررسـی، از ژن APC (شـکل ۱)بـه کمـک روش SSCP دارا بودن جهش را نشان می دهند(جدول ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: موقعیت پرایمرها برای تکثیر نقاط داغ جهش پذیر

جدول ۲: مقایسه نتایج SSCP و تعیین توالی، Sequencing

ردیف	کد فرد	سن	ناحیه واجد جهش مشاهده شده	هتروزیگوت در SSCP	جهش در Sequencing
۱	209	۳۱	3195-3196 insertion	+	+
۲	211	۳۵	۱۲۹۱ تا۱۳۳٤	+	-
۳	212	۲۶	3195-3196 insertion	+	+
۴	215	۴۶	3195-3196 insertion	-	+
۵	217	۳۸	۱۲۹۱ تا ۱۳۳٤	+	-
۶	222	۲۴	3195-3196 insertion	+	+
۷	227	۴۵	۱۲۹۱ تا ۱۳۳٤	+	-
۸	227A	-	۱۲۹۱ تا ۱۳۳٤	+	-
۹	231	۴۲	۱۲۹۱ تا ۱۳۳٤	+	-
۱۰	231A	۱۳	۱۲۹۱ تا ۱۳۳٤	+	-
۱۱	234	-	3195-3196 insertion	-	+

تعداد ۸ مورد از این جهش ها (شامل ۶ بیمار و ۲ نفر از بستگان) در منطقه A۱ در کدون های ۱۰۶۵ و ۱۰۶۶ دیده شد(شکل ۲). فقط در یک بیمار جهش در محدوده A2 (شکل ۳) و کدون های ۱۲۹۱ تا ۱۳۳۴ با استفاده از روش SSCP و مشاهده شیفت بندها مشاهده گردید جداول۳ و ۴ و شکل ۴).

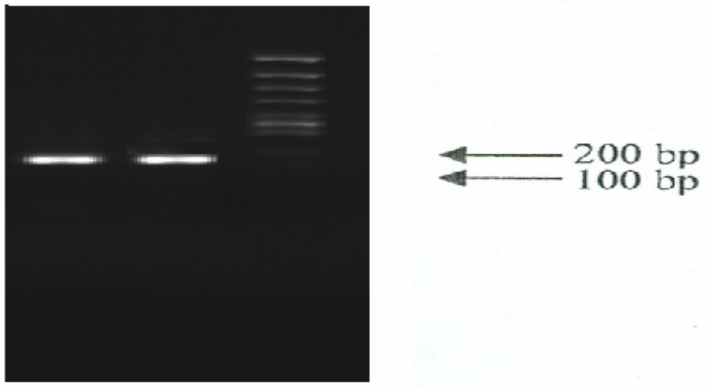
سپس نمونه های مثبت از نظر SSCP مورد مطالعه تعیین ترادف قرار گرفتند. فقط ۵ بیمار که سنین ۲۴ تا ۳۵ سال داشتند واجد جهش تغییر در چهار چوب (inst ۳۱۹۶-۳۱۹۵) بودند(شکل ۵) که سبب تولید پروتئین غیر طبیعی در این ها می گردد. در دو بیمار و دو نفر از خویشاوندان آنها هیچگونه جهشی مشاهده نگردید در حالیکه SSCP مثبت بود جدول (۳ و ۲).

www.SID.ir

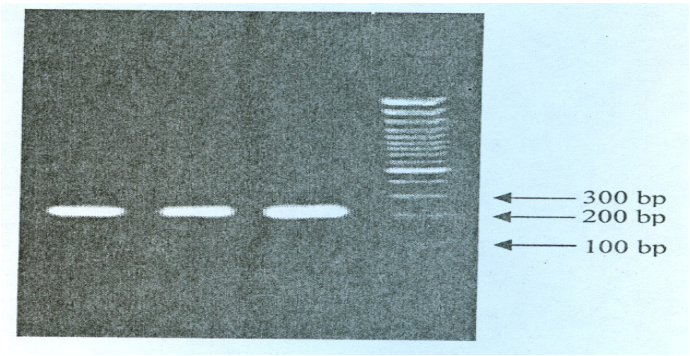
Archive of SID

جدول ۳: نتیجه تعیین توالی و مشاهده جهش در محصول A_1 در ۵ بیمار حاصل از insertion T بین کدونهای ۱۰۶۵ و ۱۰۶۶

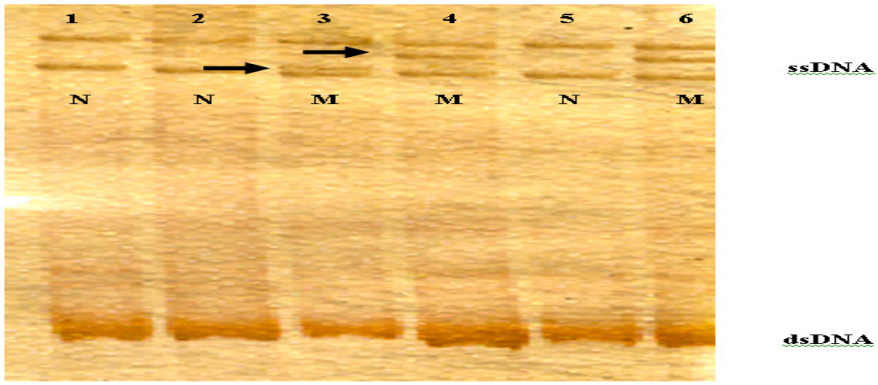
ناحیه واجد جهش	جهش	تعداد بیمار	تعداد خویشاوند
۳۱۹۵-۳۱۹۶ inst	+	۵	-
-	-	۷	۱۱



شکل ۲: محصولات PCR با جفت آغازگر EX2 (A2) با طول ۱۳۲bp کمی بالاتر از قطعه ۱۰۰bp مارکر ژنی قرار گرفته اند.



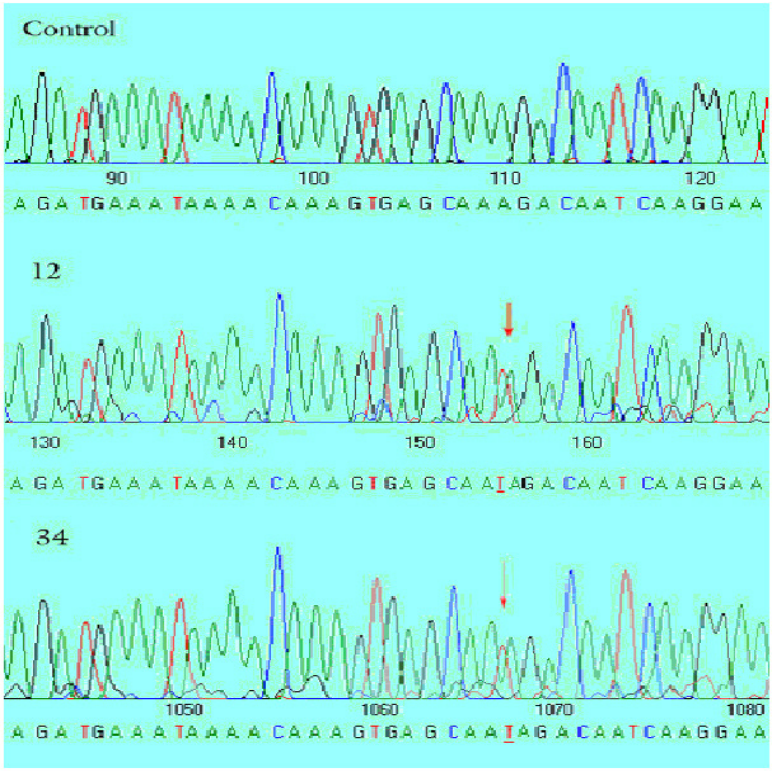
شکل۳: محصولات PCR با جفت آغازگرEX3 (A3) با طولbp ۲۳۶ کمی بالاتر از قطعهbp ۲۰۰ مارکر ژنی قرار گرفته اند



شکل ۴:نمونه ای از ژل پلی اکریل آمید حاصل رنگ آمیزی با نیترات نقره با هدف غربالگری جهش ها به کمک روش SSCP. در این روش بطور معمول بخشی از DNA بصورت دو رشته ای (ds DNA) و بخشی بطور تک رشته ای (ss DNA) ظاهر می شود. در این ژل نمونه های ۳و۴و۶ یک باند اضافه را نشان می دهند که نمایان گر جهش در محصول PCR می باشد

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵: توالی بازی حاوی جهش (3195-3196insT) در دو فرد مبتلا به FAP و یک فرد شاهد(control) بدون جهش (در مبتلایان محل جهش با فلش نشان داده شده است).

بحث

شانس انتقال FAP به نسل های بعد با الگوی توارث غالب، ریسک بالای ابتلا به سرطان کولورکتال و نیاز به برنامه غربالگری بر اساس نتایج بررسی جهش های شایع از دیگر دلایل اهمیت این مطالعه می باشد. با توجه به کوتاه بودن دوره بررسی و شیوع کم بیماری ۱۲ بیمار و ۱۱ نفر از بستگان درجه اول آن ها مورد مطالعه قرار گرفتند. به علت شیوع بالای جهش ها در اگزون ۱۵ در این مطالعه فقط نقاط داغ (Hot spot) این ژن در ناحیه ´۵ اگزون ۱۵ مورد بررسی قرار گرفت. بیش از ۱۴۰۰ جهش در ژن APC در سرطان کولون تا سال ۱۹۹۹ گزارش شده است(۱۰ و ۱۱). ۶۸درصد آن ها تغییر در چهار چوب و ۳۰درصد جهش ها nonsense بودند که منجر به تولید پروتئین های کوتاه(Truncated Proteins) می شوند.

بیشتر گزارشات نقاط داغ جهش ها ی سلول های دود مانی جنسی را در دو کدون ۱۰۶۱ و ۱۳۰۹ معرفی نموده اند و در همین رابطه هینمان Heinimann به کمک سه روش Direct sequencing, PTT و SSCPدر ۷۲درصد از جمعیت ۵۰ فامیلی سویسی مبتلا به FAP جهش های سلول های دودمانی جنسی در APC را در کدون های ۱۰۶۱ (سه فامیل)، ۱۶۰۲، ۱۳۰۹(دو فامیل)، ۱۳۳۴ و ۱۴۱۴ و ۱۴۵۰ و ۱۴۶۵ را گزارش نمودند(۱۲).

همچنین جهش هایی که والیس(Wallis) و همکاران در ژن APC در مبتلایان به FAP گزارش دادند

www.SID.ir

Archive of SID

اغلب در اگزون ۱۵ رخ داده بود. شایعترین آن ها در del 5bp با شروع در کدون های ۱۰۶۱ و ۱۳۰۹ بود که به ترتیب در ۱۰ و ۱۱ مورد از مبتلایان دیده شد.(۱۳).

گروه تحقیقاتی اسکات(Scott) با بررسی ۵۳ فرد مبتلا به FAP, AFAP اگر چه جهشی در کدون ۱۳۰۹ پیدا نکردند اما توانستند در دیگر نواحی ژن یا به کار بردن متد های DGGE و PTT و تعیین ترادف در کدون ۱۰۶۱ (سه فامیل)، ۱۴۴۳ (دو فامیل) و جهش هایی را بیابند (۱۴).

پلاوسکی(Plawsky) و همکارانش (۱۵) با بررسی ۱۲۰ فرد مبتلا به FAP توانستند ۲۲ جهش را در جمعیت لهستان بیابند که ۱۴ مورد از آن ها در دیگر جمعیت ها گزارش نشده بود. نکته قابل توجه در این تحقیق این بود که اغلب جهش های تعیین شده در انتهای ´۵ اگزون ۱۵ رخ داده بودند. ۵۰درصد آن ها در ناحیه بین کدون های ۱۰۴۰ و ۱۳۰۹ بود. بیشترین فراوانی جهش ها در کدون های ۱۰۶۱ و ۱۰۳۹ به ترتیب با ۵درصد و ۱۲/۵درصد بود که با فراوانی آن ها در جمعیت های دیگر متفاوت بود(۱۵) به طوریکه در جمعیت شمال غربی اسپانیا هیچ جهشی در این دو نقطه داغ دیده نشده بود. فراوانی این جهش ها در مبتلایان استرالیائی ۸/۴ درصد و ۲/۴ درصد، در اسرائیلی ها ۱/۵درصد و ۷ درصد و در آلمانی های مبتلا ۴/۹درصد و ۷درصد بود(۱۸-۱۶).

چنانچه مشاهده می شود در تحقیقات مختلف از چندین روش در غربالگری جهش ها در نواحی مختلف ژن APC استفاده می شود، اما از روش تعیین ترادف به عنوان روشی تکمیل کننده در تعیین جهش ها استفاده می شود. در این پژوهش از روش SSCP به عنوان روشی برای غربالگری جهش ها استفاده گردید و سپس نمونه ها برای تعیین نوع جهش تحت روش تعیین ترادف قرار گرفتند. استفاده از دیگر روش ها نظیر PTT به خاطر وقت گیر بودن و هزینه بالا در این مطالعه پیشنهاد نشد. مزیت SSCP بر دیگر روش ها، صرف هزینه کمتر و زمان کمتر با حساسیت قابل توجه در شناسایی جهش ها می باشد. همچنین تکرار پذیر بودن سریع آن برای تأیید باند های مشاهده شده در ژل از دیگر مزایای این روش آزمایشگاهی است (۱۹). از سوی دیگر برای بالا بردن حساسیت این روش، قطعات PCR در نواحی داغ اگزون ۱۵ طوری طراحی شد که طولی کمتر از ۳۰۰ باز داشته باشد.

نتیجه این تحقیق مشاهده جهش از نوع تغییر در چهار چوب حاصل از اضافه شدن یک تیمیدین بین دو کدون ۱۰۶۵ و ۱۰۶۶ بود که منجر به ایجاد کدون پایان در کدون ۱۰۶۶ (TAG) گردید. این جهش در ۵ بیمار با محدوده سنی ۴۶-۲۴ سال مشاهده گردید. در هر ۵ مورد در اگزون ۱۵ این ژن یک باز T بین دو باز ۳۱۹۵ و ۳۱۹۶ اضافه شده بود(inst۳۱۹۶-۳۱۹۵ CAATAGACAA → CAAAGACAA). اضافه شدن جفت باز T-A به ژن APC در این جایگاه باعث تولید پروتئین ناقص می گردد. پروتئین حاصل به خاطر پایان زودرس در کدون ۱۰۶۶ فاقد بخشی از توالی های ۱۵ اسیدآمینه و ناحیه ´۳ آن است. این پروتئین قادر به اتصال مؤثر با β کاتنین وتنظیم آن نخواهد بود و در نتیجه تسریع تکثیر سلولی در اثر افزایش سطح سیتوپلاسمی β کاتنین و تحریک فعالیت های رونویسی وابسته به آن را باعث می شود(۷ و ۴). همچنین فاقد نواحی عملکردی در سمت ´۳ بوده و با جهش دوم APC سبب شروع تومور زائی سلول و پیشرفت مسیر ژنتیکی آدنوم به کارسینوم می گردد.

در این مطالعه هر چند جهش دیگری در ژن APC در مبتلایان به FAP مشاهده نگردید اما جهش inst ۳۱۹۶-۳۱۹۵ قبلاً در هیچ یک از جمعیت های جهان گزارش نشده بود. همچنین یکسان بودن جهش در هر ۵ مورد ممکن است بیانگر فراوانی بالای این جهش در جمعیت خوزستان باشد. نکته دیگر فرکانس نابرابر آن بین دو جنس بود؛ به نحوی که از ۵ مورد دارای جهش تنها یک مورد مرد (۲۰درصد) و بقیه زن (۸۰درصد) بودند. این امر ممکن است به دلیل تعداد محدود افراد مورد مطالعه و یا عدم بررسی دیگر نواحی ژن سبب شده باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

فقط در ۳ بیمار مورد مطالعه پولیپ های دئودنال دیده شد. در هیچ کدام از بیماران یافته ای کلینیکی شامل تومورهای دسموئید، استئوم و ضایعات رتینین چشمی پیدا نشد. در این مطالعه به علت حجم کم نمونه مورد بررسی ارتباط بین فنوتیپ و جهش در APC امکان پذیر نبود.

نتیجه گیری

مشاهدات ما از احتمال بالای جهش های ژنی در بیماران با FAP حمایت می کند. این نتایج تأکید بیشتری را جهت ارزیابی کامل همه اگزون ها برای رسیدن به ماکزیمم میزان ارزیابی تشخیصی در بیماران FAP به همراه دارد. گزارش جهش جدید در ژن مورد مطالعه در این بررسی می تواند در مطالعات جمعیت شناسی با اهداف متفاوت دارای اهمیت قابل توجهی باشد.

منابع

1- Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. Science 1991; 253:661-5.

2- Bussey HJR. Familial polyposis coli, Family studies, histopathology, differential diagnosis, and results of treatment. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1975.

3- Bülow S. Familial polyposis coli. Dan Med Bull 1987; 34:1-15.

4- Narayan S, Roy D. Role of APC and mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. Mol cancer 2003;2:41.

5- Vasen HF. Clinical diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes. J Clin Onco 2002;18:81s-92s.

6- Wennstrom J, Pierce ER, McKusick VA. Hereditary benign and malignant lesions of the large bowel. Cancer 1974;34:850.

7- Sieber OM, Tomlinson LP, et al. The adenomatous polyposis coli (APC) tumour suppressor genetics, function and diseae. Mol Med today 2000;6:464-8.

8-Laurent-Puig P, Beroud C, Soussi T. APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. Nucleic Acids Res 1998;26:269-70.

9-Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, Oddoux C, Oster H, Giardiello FM, et al. Familial colorectal cancer in Askenazim due to a hypermutable tract in APC. Nat Genet 1997;17:79-83.

10- Goss Kh, Gordon J. Biology of the adenomatous polyposis coli tumour suppressor. J C Onco 2000;18:1967-79.

11- Laurent-Puig P, Beroud C, Soussi T. APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumours and cell lines. Nucleic acids Res 1998; 26(1):269-70.

12- Heinimann K, Müllhaupt B, Weber W, Attenhofer M, Scott RJ, Fried M, et al. Phenotypic differences in familial adenomatous polyposis based on *APC* gene mutation status. Gut 1998;43:675-9.

13- Wallis Yl, Morton DG, Mckewon, 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 Jan 1999;36(1):14-20.

14- Scott RJ, meldrum C, Crooks R. Familial adenomatous polyposis: more evidence for disease diversity and genetic heterogeneity. Gut 2001; 48(4):508-14.

15- Plawski A, Lubinski J, Banasiewicz T, Paszkowski J, Lipinski D, Strembalska A, et al. Novel germline mutations in the adenomatous polyposis coli gene in polish families with familial adenomatous polyposis. J Med Genet 2004; 41:e11.

16- Kohoutova M, Stekrova J, Jirasek V, and Kapras J. APC germline mutations identified in Czech patients with familial adenomatous polyopsis. Hum Mutat 2002;19(4):460-1.

17- Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, Oddoux C, Oster H, Giardiello FM, et al. Familial colorectal cancer in Askenazim due to a hypermutable tract inAPC. Nat Genet 1997;17:79-83.

18-Gavert N, Yaron y. Molecular analysis of the APC gene in 71 Israeli families: 17 novel mutations. Hum Mutat 2002; 19(6):664.

19-Hayashi K. PCR-SSCP: A Simple and Sensitive Method for Detection of Mutations in the Genomic DNA. PCR Methods Appl 1991;1:34-8.

www.SID.ir

Archive of SID

A study on mutations in hotspot sites of exon 15 of apc gene in familial adenomatous polyposis patients and their relatives in Iran Khuzestan province

Masjedi Zadeh[1*] AR, Foroughmand[2] AM, Galehdari[3] H, Ranji[2] N

[1] *Medical College, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences Iran,*[2] *Department of Biology, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.*

Abstract

Objective*:*. The aim of this study was to estimate mutation frequency in exon 15 of APC gene in Khuzestan FAP patients and their relatives

Subjects and Methods: We have analyzed 12 patients and 11 individual among their relatives. DNA extraction from EDTA treated whole blood was performed by routine salting out method. Three hotspot regions of axon 15 from APC gene were amplified separately with three primer pairs by PCR and the fragments have been analyzed for putative mutations by single stranded conformation polymorphism (SSCP) according to standard protocols and subsequent sequencing.

Results*:* we found aberrant bands by SSCP method in seven patients and two related members, that compared with data from sequence analysis yield following results: five patients (24 to 35 years old) carried novel frame shift mutation (3195-3196insT) leading to premature protein. In two patients whose SSCP were positive, no mutations in their two relatives were identified.

Conclusion*:* In this report we have used SSCP as pre-screening method for mutation analysis of our samples and found putative mutations in nine of them. After sequencing, only in five samples "true mutation" could be confirmed It is intersting that approximately 50% of Khuzestan FAP patients carry mutation in axon 15 of APC gene. Noteworthly, in this work only a small region of the APC gene was subject of the investigation and interestingly, all patients showed the same new mutation. Studies with large number of samples can help us to know, whether this new mutation is predominant or even exclusive within Khuzestan FAP patients.

Keywords: APC gene**,** SSCP

*Corresponding author:Email: rmasjedi@hotmail.com

www.SID.ir