Archive of SID

مقاله پژوهشی
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
سال اول، جلد ۱، شماره دوم، ۱۳۸۱

تعیین جهش در اگزون‌های شماره ۵ و ۸ ژن P_{53} در مبتلایان به سرطان پستان فامیلی با روش غیر رادیواکتیو PCR-SSCP

محمدرضا میرزایی[۱]، پروین مهدی‌پور[۲]، مرتضی عطری[۳]، حسین تیموری[۴]، غلامرضا اسدی کرم[۵]

خلاصه

سابقه و هدف: سرطان پستان شایع‌ترین سرطان زنان در دنیا می‌باشد و تغییرات ژنتیکی متنوعی را می‌توان در آن مشاهده کرد یکی از شایع‌ترین این تغییرات، جهش در ژن P_{53} است. این ژن یکی از مهمترین مهارکننده‌های تومور می‌باشد و پروتئین مزبور (P_{53}) در بسیاری از اعمال یاخته نقش دارد. این ژن شامل ۱۱ اگزون است که اگزون‌های چهارگانه ۵ تا ۸ نواحی مرکزی پروتئین که عملکرد P_{53} را به عهده دارد کد می‌کنند. بنابراین جهش‌های این اگزون‌ها از اهمیت بیشتری برخوردار بوده و باعث غیرفعال شدن یا سوء عملکرد این پروتئین می‌شود. تعیین جهش‌های این ژن کمک بزرگی در شناخت سازوکار ژنتیکی شروع و پیشرفت سرطان پستان و در نتیجه تشخیص و درمان به موقع این سرطان می‌نماید. هدف این مطالعه تعیین جهش‌های P_{53} در دو اگزون شماره ۵ و ۸ این ژن بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۳۲ بیمار مبتلا به سرطان پستان فامیلی که تحت عمل بیوپسی پستان قرار گرفته بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج DNA با روش فنل - کلروفرم. انجام و پس از تعیین درجه خلوص با روش اسپکتروفتومتری، جهت تکثیر اگزون‌های شماره ۵ و ۸ از روش polymerase chain reaction (PCR) استفاده گردید. با روش SSCP (single strand conformation polymorphism) که روش معمول تعیین جهش برای ژن P_{53} می‌باشد، محصولات تک رشته‌ای (Single strand) اگزون‌های مزبور در ژل پلی‌اکریل آمید الکتروفورز و توسط روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردید نهایتاً تغییرات حرکتی باندهای حاصله با نمونه کنترل (طبیعی) مقایسه و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: پس از آنالیز ژل‌های SSCP و مقایسه حرکت باندهای حاصله در ژل با نمونه کنترل، در اگزون شماره ۵ دو مورد و در اگزون شماره ۸ چهار مورد جهش تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه به علت محدود بودن تعداد بیماران و محدودیت زمان انجام تحقیق تنها جهش‌های ژن P_{53} در دو اگزون شماره ۵ و ۸ بیماران مبتلا به سرطان پستان فامیلی بررسی شد. لذا پیشنهاد می‌گردد این جهش‌ها در دیگر اگزون‌ها و در مقیاس بزرگتر بررسی گردد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان فامیلی، جهش، ژن P_{53}، PCR-SSCP

۱- مربی و عضو هیئت علمی گروه بیوشیمی - ژنتیک دانشکده پزشکی رفسنجان (نویسندهٔ مسئول)
۲- دانشیار و عضو هیئت علمی گروه ژنتیک دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- استادیار انکولوژی مؤسسه سرطان بیمارستان امام خمینی تهران
۴- مربی و عضو هیئت علمی گروه بیوشیمی - ژنتیک دانشکده پزشکی گرگان
۵- استادیار و عضو هیئت علمی گروه بیوشیمی - ژنتیک دانشکده پزشکی رفسنجان

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان زنان است که شیوعی بین ۱۲-۸ درصد در مناطق مختلف جغرافیایی دارد [۱]. در این سرطان تغییرات مختلف سیتوژنتیکی و جهش‌های ژنی را می‌توان مشاهده کرد که بارزترین اختلال مشاهده شده در سطح سیتوژنتیکی حذف منطقه کروموزومی P_{13} کروموزوم شماره ۱۷ است که این جایگاه، محل فیزیکی ژن مهارکننده تومور یعنی P_{53} است [۱۷، ۱۴، ۸]. مولکول P_{53} در بسیاری از اعمال حیاتی سلول از جمله تنظیم کپی‌برداری، تنظیم همانند سازی، تنظیم سیکل سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول نقش اساسی دارد [۱۶، ۷، ۵].

ژن P_{53} با طول kbp ۲۰ در جایگاه p ۱۳/۱ ۱۷ (بازوی کوتاه کروموزم شماره ۱۷) قرار داشته که شامل ۱۱ اگزون بوده‌و mRNA آن پس از ترجمه پروتئینی با وزن مولکولی ۵۳ کیلو دالتون شامل ۳۹۳ اسیدآمینه را کد می‌نماید [۶].

اگزون شماره ۱ و قسمت اعظم اگزون شماره ۱۱ کدکننده نمی‌باشند. ۵ منطقه حفاظت شده در این ژن قرار دارد که مناطق II-V اگزون‌های شماره ۵ تا ۸ را شامل شده و بیش از ۹۰ درصد جهش‌های این ژن در این مناطق رخ می‌دهند [۱۳، ۱۲، ۱۱]. تعدادی از کدها به طور شاخص در سرطان‌های مختلف بیشتر متحمل جهش می‌شوند که این کدها را مناطق داغ جهش‌زا (hot spots) می‌گویند. علاوه بر جهش نقطه‌ای، حذف آللی P_{53} نیز در برخی موارد سرطان پستان گزارش شده است به طوری که افراد مبتلا به سندروم لی ـ فرامنی(Li-Fraumeni) که یکی از آلل‌های P_{53} در این افراد به طور زایشی جهش یافته یا حذف شده است چندین برابر افراد طبیعی مستعد ابتلاء به سرطان‌های مختلف خصوصاً سرطان پستان می‌باشند [۱۵، ۹].

جهش در ژن P_{53} به عنوان کلید شروع سرطان پستان (بویژه نوع فامیلی آن) قلمداد می‌گردد [۲]. این جهش‌ها توزیع جغرافیایی خاصی داشته به طوری که در بعضی مناطق تا ۸۰ درصد موارد سرطان پستان با جهش در این ژن همراه است [۴]. با توجه به اهمیت موضوع و اینکه شناخت سازوکار ژنتیکی سرطان پستان می‌تواند در طراحی تست‌های غربالگری، تشخیص‌های کلینیکی و ارائه الگوی توارثی این سرطان راهگشا باشد. در این مطالعه جهش‌های ژن P_{53} در دو اگزون با اهمیت این ژن (اگزون‌های شماره ۵ و ۸) در ۳۲ بیمار مبتلا به سرطان پستان فامیلی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی تعداد ۳۲ بیمار مبتلا به سرطان پستان با سابقه فامیلی ابتلاء به سرطان در شجره‌نامه که به مؤسسه سرطان (انستیتو کانسر) بیمارستان امام خمینی تهران مراجعه و تحت عمل بیوپسی قرار گرفته بودند، مطالعه شدند.

نمونه‌های لازم که بافت بیوپسی پستان بودند به صورت بلوک‌های پارافینه پاتولوژیکی و یا قسمت کوچکی از بافت تازه بیوپسی شده بیماران به آزمایشگاه ژنتیک دانشکده بهداشت دانشگاه تهران ارسال شد.

با روش معمول فنل، کلروفرم، استخراج DNA انجام گرفت بدین ترتیب که پس از پارافینه‌زدایی برش‌های بلوک پاتولوژیکی و یا خرد کردن بافت‌های تازه، آنها را در لوله آزمایش ریخته و به هر لوله آزمایش ۱/۵ میلی‌لیتر با فرلیز کننده (EDTA ۱۰ mM، Nacl ۱۰۰ mM، Tris-Hcl ۱۰۰ mM، SDS ۰/۱ml ۱۰ درصد و ۲۰µl پروتئیناز K (۲۵ mg/ml) اضافه به مدت ۲۴-۱۶ ساعت در ۴۸°C انکوبه می‌گردید. پس از این مدت به هر لوله ۱/۵ میلی‌لیتر فنل به تعادل رسیده با Tris-Hcl افزوده و پس از مخلوط کردن و سانتریفوژ (دور ۴۰۰۰ به مدت ۱۲ دقیقه) محلول بالایی (supernatant) جدا و مجدداً توسط فنل (یکبار) و مخلوط کلروفرم ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) دوبار شستشو می‌گردید. مجدداً پس از سانتریفوژ محلول بالایی جدا و به نسبت دو برابر حجم آن اتانل ۹۶ درصد و به نسبت ۰/۱ حجم آن استات سدیم(۳M) اضافه و سپس به مدت ۲۴-۱۶ ساعت در ۲۰°C- نگهداری و پس از آن سانتریفوژ می‌گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

رسوب DNA جدا و سه بار توسط اتانل ۷۵ درصد شستشو و نهایتاً رسوب DNA در بافر (Tris- Hcl 10mM, EDTA-100mM TE) حل می‌شد.

پس از تعیین درجه خلوص DNA با روش اسپکتروفتومتری (نسبت جذب نوری در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر) جهت تکثیر اگزون‌های مورد نظر از روش PCR استفاده گردید. پرایمرهای استفاده شده برای اگزون شماره ۵ رشته‌های رهبر و پیرو به ترتیب 5´GACTTTCAACCTCTGTCTCCT3´ و 5´CTGGGGACCCTGGGGAACCA3´ و پرایمرهای استفاده شده اگزون شماره ۸ برای رشته‌های رهبر و پیرو به ترتیب 5´CCTTACTGCCTCTTGCTTC3´ و 5´TGAATCTGAGGCATAATCTGC´ بودند که بر اساس توالی ۲۰ نوکلئوتید سمت ´۳ و ´۵ اگزون‌های مورد نظر طراحی و ساخته شده بودند. ۵۰ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR شامل ۳۰ Pmol از هر پرایمر، ۲۵۰ µM از هر نوکلئوتید (dNTP)، ۱۰۰ ng DNA ژنومیک و یک واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq در بافر PCR تهیه و به هر میکروتیوب PCR اضافه گردید. PCR در دو مرحله انجام شد بدین ترتیب که برای اگزون شماره ۵ مرحله اول با شرایط ۹۴°C (۳ دقیقه) و ۵۴°C (۱ دقیقه) و ۷۲°C (۱ دقیقه) برای سه سیکل و مرحلهٔ دوم برای ۳۲ سیکل با شرایط ۹۴°C، ۵۴°C و ۷۲°C هر کدام یک دقیقه انجام گردید. برای اگزون شماره ۸ مرحله اول در سه سیکل با شرایط ۹۴°C به مدت ۲ دقیقه و ۵۵°C و ۷۲°C هر کدام یک دقیقه و برای ۳۲ سیکل مرحله دوم شرایط ۹۴°C، ۵۵°C و ۷۲°C هر کدام به مدت یک دقیقه انجام شد. به منظور اطمینان از انجام موفق PCR محصولات در ژل آگاروز ۲ درصد و در بافر M TBE ۰/۵ M,EDTA ۰/۴۴۵ M,Buric Acid ۰/۴۴۵ (Tris-base) الکتروفورز گردید.

جهت انجام SSCP، محصولات PCR نمونه‌های مختلف مطابق روش زیر در ژل پلی‌آکریل آمید الکتروفوز و تعیین جهش گردیدند. بدین ترتیب که ابتدا محصولات PCR به منظور تک رشته‌ای شدن به مدت ۵ دقیقه در ۹۵°C قرار گرفتند و سپس بلافاصله به ظرف یخ منتقل گردیدند. از ژل پلی‌آکریل آمید ۱۰ درصد در سیستم الکتروفورز عمودی برای انجام SSCP استفاده گردید. بدین منظور ۵ میکرولیتر محصول PCR و ۵ میکرولیتر با فر SSCP (فرمامید ۹۵ درصد، هیدروکسیدسدیم ۱۰mM، برموفنل‌بلو ۰/۰۵ درصد و گزیلین سیانول ۰/۰۵ درصد) با هم مخلوط و به چاهک‌های ژل اضافه و الکتروفورز انجام شد (۱۵ ساعت با ولتاژ ۷۰ و در بافر ۰/۶× TBE).

رنگ آمیزی ژل با روش نیترات نقره انجام گرفت بدین صورت که ژل در محلول A (اتانل ۱۰ درصد و اسید استیک ۰/۵ درصد) به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد سپس به مدت ۱۰ دقیقه به محلول B (نیترات نقره ۰/۱ درصد) انتقال یافت سپس تا ظاهر شدن باندهای ژل در محلول C ((۹/۴ میلی‌لیتر NaOH (۱۰N)، ۲۵ میلی‌لیتر (۱ درصد) NaBH4 و یک میلی لیتر فرمالدئید در حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر) نگهداری و نهایتاً ژل به مدت ۵ دقیقه در محلول D (بی‌کربنات سدیم ۰/۷۵ درصد) قرار داده شد و پس از شستشو با آب مقطر باندها مورد بررسی و آنالیز قرار گرفتند.

نتایج

مشخصات هیستوپاتولوژیکی تومور، سن و جنس بیماران در جدول ۱ نشان داده شده است. تمامی بیماران دارای سابقه ابتلاء به سرطان در خانواده بودند. از ۳۲ بیمار دارای سرطان پستان مورد مطالعه ۶/۲۵ درصد بیماران مرد و ۹۳/۷۵ درصد زن، ۱۶/۱ درصد سن زیر ۳۲ سال و ۸۳/۹ درصد سن بالای ۳۲ سال و ۴۵/۱ درصد دچار درگیری غدد لنفاوی نیز بودند.

تشخیص پاتولوژیک بیماری در ۸۷/۵ درصد، invasive ductal carcinoma (Inv.D.C) ۹/۳۷ درصد، invasive Lobular carcinoma (Inv.L.C) و ۳/۱ درصد infiltrating ductal carcinoma (Inf.D.C) بود. درجه تفکیک و تمایز تومور در ۵۸/۶ درصد درجه III و بقیه

www.SID.ir

Archive of SID

درجه I-II ، ۴۴ درصد درگیری پستان سمت راست و ۵۶ درصد درگیری پستان سمت چپ داشتند. قطر تومور در ۳۷/۵ درصد بیماران مساوی یا بیشتر از ۳ و در بقیه موارد کمتر از ۳ می‌باشد.

جدول ۱: مشخصات هیستوپاتولوژی، سن، جنس و سابقه فامیلی ابتلاء به سرطان ۳۲ بیمار مبتلا به سرطان پستان

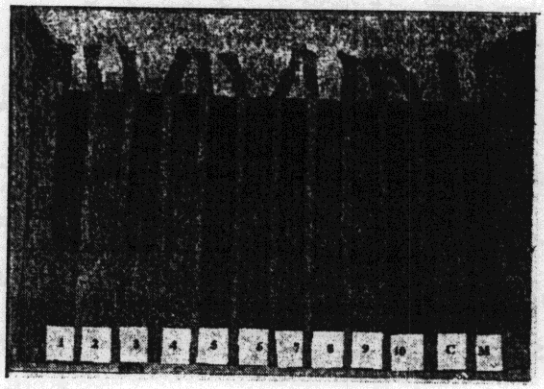
سابقه خانوادگی	پستان درگیر	درگیری غدد لنفاوی	درجه تمایز	قطر تومور Cm	نوع تومور	سن	جنس	شماره بیمار
+	L	+	III	۲	inv.D.C	۲۳	F	۱
+	R	+	II	۱/۳	inv.D.C	۴۳	F	۲
+	L	-	III	۴/۵	inv.D.C	۳۸	F	۳
+	L	-	?	۲	inv.D.C	؟	M	۴
+	R	+	?	۱/۳	inv.D.C	۴۰	F	۵
+	L	+	III	۲/۵	inv.D.C	۳۴	F	۶
+	R	-	III	۲/۵	inv.D.C	۴۵	F	۷
+	R	+	III	?	inv.D.C	۵۶	F	۸
+	R	؟	?	?	inv.D.C	۷۵	M	۹
+	R	-	III	۱/۵	inv.D.C	۵۰	F	۱۰
+	R	-	I-II	?	inv.D.C	۴۴	F	۱۱
+	L	-	II-III	۲/۵	inv.D.C	۵۰	F	۱۲
+	L	-	II-III	۱	inv.D.C	۵۳	F	۱۳
+	L	-	III	۲/۵	inv.D.C	۴۲	F	۱۴
+	L	-	II-III	۳	inv.D.C	۴۸	F	۱۵
+	L	-	II-III	?	inv.D.C	۳۰	F	۱۶
+	R	-	II-III	۴	F	۴۰	F	۱۷
+	R	-	II-III	۲/۵	inv.D.C	۶۷	F	۱۸
+	R	-	III	۲	inv.D.C	۶۵	F	۱۹
+	L	-	II	۴	inv.D.C	۴۲	F	۲۰
+	R	-	II	?	inv.D.C	۴۸	F	۲۱
+	R	-	III	?	inv.D.C	۴۵	F	۲۲
+	L	-	II	?	inv.D.C	۳۴	F	۲۳
+	L	-	III	۲	inv.D.C	۳۸	F	۲۴
+	R	-	III	۲/۲	inv.D.C	۳۶	F	۲۵
+	L	-	III	۱/۹	inv.D.C	۴۱	F	۲۶
+	L	-	III	۷/۵	inv.D.C	۳۴	F	۲۷
+	L	+	III	۷	inv.D.C	۷۵	F	۲۸
+	L	-	II	۳	inv.D.C	۷۲	F	۲۹
+	R	-	II	۳/۵	inv.D.C	۴۹	F	۳۰
+	R	-	?	?	inv.D.C	۵۲	F	۳۱
+	R	+	III	۳/۵	inv.D.C	۳۶	F	۳۲

F : Female, M: Male, inv. D.C: Invasive Ductal Carcinoma, inv. L.C: invasive Lobular Carcinoma, inf.D.C: infiltrating Ductal Carcinoma, L: Left, R: Right.

www.SID.ir

Archive of SID

استخراج DNA بطور موفقیت‌آمیزی انجام گرفت و نتیجه تعیین درجه خلوص DNA (نسبت جذب نوری در ۲۶۰nm/۲۸۰nm) در تمامی موارد در حد قابل قبول (۱/۷-۱/۳)بود. برای اطمینان از انجام PCR، محصولات PCR در آگاروز ۱درصد الکتروفورز شده و نهایتاً الکتروفورز SSCP روی محصولات PCR انجام گردید (شکل ۱).



شکل ۱:نمونه ژل SSCP اگزون شماره ۵ ژن P_{53}. نمونه‌های ۲ و ۹ حرکتی متمایز از دیگر نمونه‌ها و نمونه کنترل داشته جهش تلقی می‌شود C: Control و M: Marker

شکل ۱، نمونه‌ای از الکتروفورز SSCP اگزون شماره ۵ پس از رنگ‌آمیزی با نیترات نقره می‌باشد. باندهای شماره ۲ و ۹ که متعلق به دو بیمار مبتلا به سرطان پستان فامیلی می‌باشند، بطور مشخصی حرکت متفاوتی از نمونه کنترل و نیز نمونه‌های دیگر بیماران دارند که نشان دهنده تغییر نوکلئوتیدی (موتاسیون نقطه‌ای) در این دو بیمار می‌باشد. بالاخره نتیجه SSCP، ۳۲ بیمار مورد مطالعه نشان داد که در اگزون شماره ۵ دو مورد و در اگزون شماره ۸ چهار مورد جهش اتفاق افتاده است.

نتایج با آزمون آماری Fisher Exact جهت تعیین میزان ارتباط جهش‌های شناخته شده و فاکتورهای متعدد دخیل در سرطان پستان بررسی و مقایسه گردید. بین جهش در اگزون‌های شماره ۵ و ۸ ژن P_{53} و سن بیماران ارتباط معنی‌داری یافت نشد (P=۰/۵۲) هم‌چنین ارتباط جهش‌های ذکر شده و درگیری غدد لنفاوی (P=۰/۷۵)، تشخیص پاتولوژیک (P=۰/۲۷)، درجه تمایز تومور (P=۰/۳) و درگیری پستان سمت راست یا چپ (P=۰/۳۷) در حد معنی‌داری نبود.

بحث

این پژوهش بخشی از یک طرح تحقیقاتی کلی می‌باشد که به منظور تعیین جهش‌های ژن P_{53} در مبتلایان به سرطان پستان فامیلی در جامعه ایرانی توسط وزارت بهداشت و درمان تصویب شده بود. نتیجه این پژوهش نشان داد که در ۳۲ بیمار مبتلا به سرطان پستان فامیلی مطالعه شده در اگزون شماره ۵ دو جهش (۶/۲۵ درصد)و در اگزون شماره ۸ چهار جهش (۱۲/۵ درصد) اتفاق افتاده است. در مطالعات قبلی میزان جهش تعیین شده برای اگزون شماره ۵ در مبتلایان به سرطان پستان فامیلی در جوامع مختلف، متفاوت بوده است، بطوری که بر اساس مطالعات گزارش شده در بخشی از جامعه ژاپن آن را ۷ درصد [۱۰،۱۲]، در جامعه هلند ۱۷ درصد[۴] و در استرالیا ۱۲ درصد[۱۰] اعلام نموده‌اند. در مورد اگزون شماره ۸ در بخشی از جامعه ژاپن میزان جهش آن را در مبتلایان به سرطان پستان فامیلی ۲۸ درصد [۱۰،۱۲] و در بخش دیگری از جامعهٔ ژاپن ۵/۲ درصد [۱۰، ۱۲] و در بخشی از جامعهٔ استرالیا ۲۴ درصد[۱۰] و در هلند ۱۷ درصد [۴] گزارش کرده‌اند.

بنابراین فراوانی جهش‌های P_{53} در سرطان پستان توزیع جغرافیایی دارد و می توان نتیجه‌گیری نمود عوامل محیطی که در اتیولوژی سرطان پستان نقش دارند بر نحوه جهش‌زایی ژن‌ها نیز مؤثرند. برای مثال در شمال ژاپن میزان کل جهش P_{53} در مبتلایان به سرطان پستان ۸۱ درصد در حالی که در جنوب این کشور این میزان، ۲۱ درصد گزارش شده است [۱۰،۱۲]. بنابراین با توجه به وجود قومیت‌های مختلف در ایران اولاً لازم است میزان جهش‌ها در جامعهٔ ایرانی و ثانیاً در اقوام مختلف (همانند بسیاری از کشورها) به طور دقیق تعیین گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعه جهش‌های P_{53} توسط تکنیک‌های مختلف انجام می‌گیرد که متداولترین آنها عبارتند از شکست RNA's، الکتروفورز ژل با شیب واسرشتی (Denaturant gradient get electrophoresis)، برش شیمیایی جفت شدگی ناجور (chemical cleavage of mismatch)، تجزیه و تحلیل هترو و دوبلکس، آزمایش پروتئین ناقص شده و چند شکلی فضایی تک رشته‌ای (SSCP). از این میان روش PCR-SSCP متداولترین روشی است که جهت تعیین جهش‌های ژن P_{53} توسط محققین استفاده می‌شود [۳]. اساس این روش آن است که در قطعات با طول کمتر از ۳۰۰ جفت باز چنانچه، حتی یک نوکلوتید نسبت به حالت طبیعی تغییر کرده باشد در شکل سه بعدی تک رشته‌ای DNA (Single strand) حرکتی متفاوت از حالت طبیعی در ژل خواهد داشت، با توجه به اینکه طول قطعات اگزون‌های مورد مطالعه کمتر از ۳۰۰ جفت باز بوده و نیز سادگی، سریع و ارزان بودن این روش و دقت بالای آن (میزان دقت روش مذکور جهت تعیین جهش ۹۰ درصد می‌باشد) [۳]. از این روش جهت تعیین جهش‌های ژن P_{53} استفاده گردید. برای حصول اطمینان قطعی از جهش باید محصولات PCR اگزون‌های جهش یافته در روش SSCP، تعیین توالی شده و نوع تغییر نوکلوتیدی به طور دقیق مشخص گردد، اما در زمان انجام این طرح امکان این مرحله میسر نبود. به هر حال نتیجه این تحقیق میزان جهش‌های موجود در اگزون شماره ۵ و ۸ ژن P_{53} در ۳۲ بیمار مبتلا به سرطان پستان فامیلی مورد مطالعه را مشخص نمود اما با توجه به محدود بودن تعداد بیماران و رسالت این بخش از تحقیق که وظیفه تعیین جهش در همین تعداد بیماران را به عهده داشت جهت نتیجه‌گیری کلی، باید منتظر ارائه نتایج پایان طرح شد و با استفاده از نتایج مطالعات انجام شده در نقاط مختلف جغرافیایی جهان کدهای حساس به جهش (hot spots) شناسایی شده و در طراحی تست‌های غربالگری و تشخیص‌های کلینیکی استفاده گردد.

منابع

[۱] مهدی پور پ. جنبه‌های ژنتیک سرطان پستان چاپ اول، موسسه نشر کلمه، تهران، ۱۳۷۶؛ صفحات ۱۴۲-۱۳۹.

[2] Bieche I, Lidereau R. Genetic alterations in breast cancer, *Gene chromosome cancer*, 1995; 14(2):227-251.

[3] Behn M, Schuermann M. Sensitive detection of P_{53} gene mutant enriched PCR- SSCP technique. *Nucleic Acid Reserch*, 1998; 26(5): 1356-1358.

[4] Beroud C, Verdier F, Soussi T. P_{53} gene mutation. *Nucleic Acid Research*, 1996; 24(3):147-250.

[5] Chen A, Neubauer A, Kurisu W. Loos of heterozygosity on the short arm of chromosom 17 is associated with high proliterative capacity and DNA aneuploidy in primary human breayt cancer. *Ploc Natl Acad Sci USA*, 1996; 88(9):572-585.

[6] Davidoff AM and Humphrey PA, Genetic basis for P53 overexpression in human breast cancer *Proc Natl Acad Sci USA*.1991; 88(11):724-732

[7] Ford D and Easton DF. The genetics of breast and ovarian cancer. *Br J Cancer*, 1995; 72 (4): 805-812.

[8] Frebourg T, kassel J, lam KT. Germ- line mutation of the P53 Tumor supressor gene in patients with high risk for cancer inactived to the P_{53} protein. *Proc Natl Acad sci USA* 1992; 89(14):1240-52.

[9] Frebourg T and Barbier N. Germ-line P53 mutation in families with li-fraumeni syndrome. *Am J Hum Genet.* 1995; 56(3): 608-615.

www.SID.ir

Archive of SID

[10] Greenblatt MS, Bennett WP , Hollstein M, Harris M. Mutations in the P53 tumor suppressor gene. *Cancer Reserch,* 1994; 54(18):4855-78.

[11] Hartmann A and Blaszyk A. P53 gene mutation inside and outisiđe of exsons 5-8: The patterns differ in breast cancer. *Oncogene,* 1995; 10 (4):681-88.

[12] Kleihues P and Schavble B. Tumors assocaited with P53 germ line mutations A synopsis of 91 families. *Am J Pathology,* 1997; 150:1-9.

[13] Levine AJ, Momand J, Finalay CA. The P53 Tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351 (6326): 453-55.

[14] Molina R, Segui MA, Climent MA. P53 on coprotein as a prognostic Indicator in patients with breast cancer. *Anti-Cacer Research,* 1998; 18(1B):507-512.

[15] Moll UM, Riou G, levine AJ. Tow distinct Mechanisms alter P53 in breast cancer: mutation and nuclrar exclusion. *Proc Natl Acad USA,* 1992; 89(15):1320-28.

[16] Pdyak K, YongXia J, Kenneth W, etal. A model for P53- induced apoptosis. *Nature* 1997; 389: 300-305

[17]Tornaleti S, Bates S, Gerd P. A high-resolution analysis of chromatin stucture along P53 sequences. *Molecular Carcinogenesis,* 1996; 17: 192-201.

www.SID.ir