

بررسی جهش‌های شایع ژن *KRAS* در بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال تک گیر در استان خوزستان

سید رضا کاظمی نژاد*، آسیه کازرونیان، حمید گله داری و تینا شفاف

اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه ژنتیک

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۲۷

چکیده

سرطان کلورکتال (CRC) یکی از بدخیمی‌های شایع در جهان است. جهش‌های *KRAS* یکی از وقایع اولیه در تکوین و پیشرفت CRC می‌باشند. کدونهای ۱۲ و ۱۳ از اگزون شماره ۱، نقاط داغ جهش در این ژن هستند. در این بررسی فراوانی وقوع جهش‌های کدون ۱۲ و ۱۳ در بیماران خوزستانی مبتلا به سرطان کلورکتال تک گیر (SCRC) تعیین گردید و با میزان آن در سایر نواحی ایران و نیز در دیگر کشورها مقایسه شد. DNA ژنومی از بافت‌های توموری ۴۵ بیمار خوزستانی مبتلا به SCRC استخراج شد. جهش‌های نقطه‌ای در این دو کدون با روش PCR/RFLP و سپس غنی‌سازی جهش، شناسایی گردید. جهش‌ها با توالی‌یابی به روش Sanger تأیید شدند. ۱۳/۳۳ درصد تومورها در کدونهای ۱۲ و ۱۳ ژن *KRAS* جهش داشتند. این فراوانی با اغلب فراوانی‌های به دست آمده در دیگر کشورها (۳۳-۵۳ درصد) و نیز فراوانی‌های به دست آمده در سایر نقاط ایران (۲۰،۳ و ۲۸ درصد) تفاوت دارد که می‌تواند براساس دلایل متعددی از جمله بالا بودن احتمالی وضعیت ناپایداری میکروستلاستی در آنها، حساسیت ناکافی روش غربالگری، فاکتورهای ژنتیکی و محیطی متفاوت از جمله رژیم غذایی سرشاز از امگا-۳ در این جمعیت باشد. همچنین با استفاده از روش غنی‌سازی فرکانس آللهای شناسایی شده در گروه مورد بررسی دو برابر گشت.

واژه‌های کلیدی: سرطان کلورکتال تک گیر، ژن *KRAS*، آنالیز جهش، Enrichment-RFLP

* نویسنده مسئول، تلفن ۰۹۱۶۳۱۸۸۴۹۹، پست الکترونیکی kazemi_reza@scu.ac.ir

مقدمه

کلورکتال رخ می‌دهند (۵، ۶ و ۸). خانواده ژنی *ras* در انسان یکی از هدف‌های بالقوه برای تغییرات جهش‌زایی است که نقش مهمی در تومورزایی در انسان دارند. این خانواده دارای ژنهای *K-ras*، *H-ras*، *N-ras* می‌باشد (۲۵). ژن *KRAS* که با نامهای *V-KI-RAS2* و *c-Ki-ras2* نیز شناخته می‌شود، پروتئوکوژنی است که بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۲ و در ناحیه 12p12.1 و در رشته منفی DNA قرار گرفته است (۱۲). ژن *KRAS2* پروتئین *KRAS* یا همان p21 را کد می‌کند. پروتئین *KRAS* یک GTPase کوچک متشکل از ۱۸۸ یا ۱۸۹ آمینواسید (بسته به ایزوفرم آن) بوده و دارای وزن مولکولی 21KDa می‌باشد.

سرطان کولون و سرطان رکتوم خصوصیات مشترک زیادی با یکدیگر دارند؛ به همین دلیل اغلب آن دو را با هم به عنوان سرطان کلورکتال (CRC) می‌نامند. این سرطان یکی از بدخیمی‌های شایع در جهان است (۱۱). شیوع CRC در نقاط مختلف جهان تا ۱۰ برابر می‌تواند متفاوت باشد. به نظر می‌رسد این تفاوت‌های جغرافیایی مربوط به تفاوت‌های رژیم غذایی و فاکتورهای محیطی در زمینه‌ای از استعداد ژنتیکی ابتلا به CRC فرصت بروز پیدا می‌کنند. در ایران CRC چهارمین سرطان شایع در مردان و سومین در زنان می‌باشد. ۶۷ جهش *KRAS* با فراوانی نسبتاً بالایی در انواعی از سرطانها و در ۳۰ تا ۵۰ درصد از سرطانهای

برای تکثیر قطعه مورد نظر ژن *KRAS* در نظر گرفته شد به صورت

ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-
3' و با Tm برابر ۶۲/۷ درجه سانتیگراد، و پرایمر Reverse
'-TCAAAGAATGGTCCTGCACC-3' با Tm برابر
۵۷/۳ درجه طبق آزمایش Bartsch و همکاران (1998)
استفاده شد (۷). حجم کلی مخلوط PCR، ۲۵ μl در نظر
گرفته شد. مخلوط PCR شامل ۳ μl DNA ژنومی،
۱۵/۷۵ μl آب مقطر استریل، بافر مناسب آنزیم Taq پلیمرز
به میزان ۲/۵ μl، ۰/۷۵ μl محلول کلرید منیزیم ۵۰ mM،
۰/۵ μl از مخلوط dNTP ها، ۱ μl از هر یک از پرایمرهای
forward و reverse با رقت ۰/۲۵، و نهایتاً ۰/۵ μl آنزیم
Taq پلیمرز می باشد. در برنامه بهینه شده PCR،
واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه
و ۱ سیکل، سپس ۳۵ سیکل واسرشتگی در ۹۴ درجه به
مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۵۵ درجه به مدت ۳۰
ثانیه، گسترش پرایمرها در دمای ۷۲ درجه به مدت ۲۰
ثانیه انجام گرفت (۷) و در مرحله آخر گسترش نهایی در
دمای ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه و یک سیکل با استفاده از
دستگاه ترموسایکلر گرادینت مدل applied biosystems
(AB) انجام شد. پس از عمل تکثیر، ۵ میکرولیتر از
محصولات PCR در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید
تا از انجام آن اطمینان حاصل شود (۲).

پس از تکثیر قطعه مورد نظر ژن *KRAS* در بافتهای
توموری و سالم بیماران مورد مطالعه، برای بررسی حضور
یا عدم حضور جهش در کدون ۱۲ و ۱۳ این ژن،
محصولات PCR با استفاده از تکنیک RFLP با آنزیم
محدود کننده BstN1 (Mva1) (شرکت Thermofisher)
برش داده و بررسی شدند. برای تهیه مخلوط RFLP از
۱۰ μl محصول PCR، ۷ μl آب مقطر استریل، ۲ μl بافر R و
۱ μl آنزیم محدود کننده BstN1 در حجم نهایی ۲۰ μl
استفاده شد. عملیات RFLP و الکتروفورز محصولات
حاصل از آن برای محصولات PCR برای نمونه های

باشد (۲۴). این GTPase کوچک که در بسیاری از
سلولهای انسانی به میزان زیاد بیان می شود، در غشای
سلولی لنگر می اندازد و در انتقال پیام درون سلولی شرکت
می کند که عمدتاً از طریق فعال سازی مسیر پیام رسانی
گیرنده اپیدرمی هورمون رشد (EGFR) می باشد. فراوان
ترین انواع جهشهای مشاهده شده در *KRAS* در تمام
سرطانهای انسانی، G > A ترنژیشن و G > T ترنسورژن
می باشد (۱۳، ۱۶، ۱۹ و ۲۷). جهشهای بدمعنی در *RAS*
اساساً منجر به جایگزینی در کدونهای ۱۲ و ۱۳ از آگزون ۱
و ۶۱ از آگزون ۲ می شود. جهش در کدونهای ۵۹ و ۶۳
در آگزون ۳ نیز گزارش شده است (۱۵). این جهشها
فعالیت GTPase ذاتی و با واسطه گری GAP را در این
پروتئین تخریب کرده و باعث می شوند همواره در حالت
فعال باقی بماند (۲۳، ۲۶، ۲۸، ۲۹ و ۳۰).

در مطالعه حاضر، فراوانی جهش در کدونهای ۱۲ و ۱۳ ژن
KRAS در نمونه ای از جمعیت بیماران خوزستانی مبتلا به
سرطان کولورکتال تک گیر مورد بررسی قرار گرفته است.

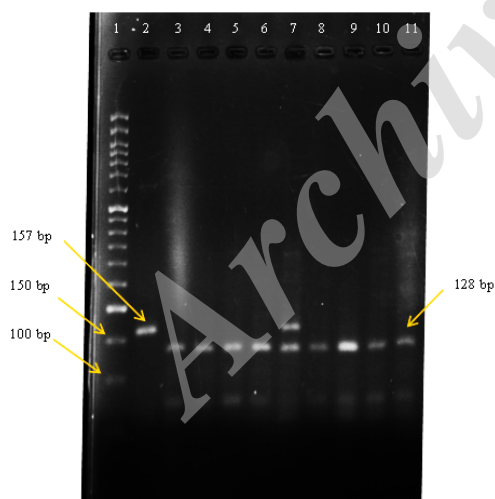
مواد و روشها

برای جمع آوری نمونه های مورد نیاز این مطالعه تعداد ۴۵
بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال تک گیر و با سن حداقل
۵۰ سال که به بیمارستانهای مهر، امام خمینی و گلستان
اهواز از تاریخ ۱۳۸۹/۱۲/۱ تا ۱۳۹۰/۱۲/۱ مراجعه کرده
بودند، انتخاب شدند. رضایت آنان جلب شده و موافقت
کتبی شان کسب گردید. سپس، نمونه هایی از بافت
توموری و بافت سالم با فاصله حداقل ۶ سانتیمتر از بافت
تومور برداشت گردید. نمونه ها در داخل لوله های فالتکون
محتوی الکل ۹۶ درصد قرار داده شد. استخراج DNA از
بافتهای با استفاده از کیت *AccuPrep Genomic DNA*
Extraction شرکت کره ای Bioneer انجام شد. پس از
اطمینان از کیفیت مناسب ژنومهای استخراج شده، قطعه
مورد نظر از ژن *KRAS* توسط PCR با پرایمرهای ویژه
تکثیر گردید. پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی Forward که

در نهایت محصولات PCR به منظور شناسایی جهش‌های موجود در کدون ۱۲ و ۱۳ مورد تعیین توالی قرار گرفتند (Seqlab Germany). توالی یابی در یک جهت و با پرایمر Forward انجام شد. تعیین توالی توسط دستگاه ABI 3130 و بر اساس روش Sanger صورت پذیرفت. با استفاده از نرم افزار Chromas2 کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی خوانده شد. سپس با توالی مرجع ژن *KRAS* مربوط به لوکوس NG_007524.1 مقایسه گردید. توالی کدونهای ۱۲ و ۱۳ در هر نمونه با توالی مرجع تطبیق داده شد و تغییرات نوکلئوتیدی آنها آشکار گشت.

نتایج و بحث

باند‌های حاصل شده از واکنش PCR طبق انتظار دارای طول ۱۵۷bp بودند. کنترل منفی نیز عدم وجود آلودگی در واکنش PCR نشان داد. پس از تکثیر قطعات مورد نظر و هضم آنزیمی آنها با آنزیم محدود کننده *BstNI*، نتیجه RFLP بر روی ژل آگارز طبق شکل ۱ مشاهده شد.

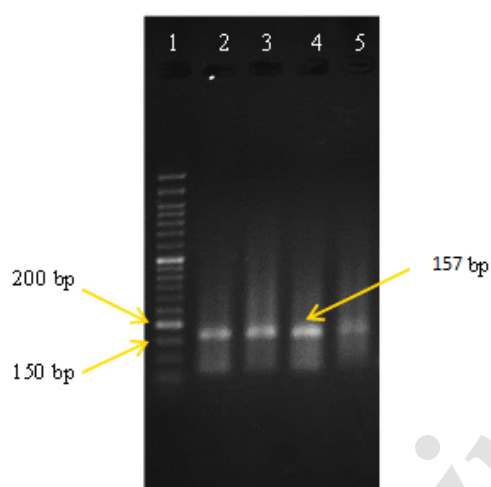


شکل ۱- تصویر محصولات RFLP قطعات تکثیر شده پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز. چاهک شماره ۱، مارکر ۵۰bp. چاهک شماره ۲ محصول PCR قبل از برش آنزیمی (طول ۱۵۷bp). چاهک‌های شماره ۳ تا ۱۱، محصولات RFLP انجام شده بر روی قطعات حاصل از PCR. نمونه‌های دارای آلل وحشی از لحاظ این دو کدون، طی RFLP با آنزیم برش خورده و قطعه‌ای کوچک تر از

توموری و سالم تمامی بیماران انجام گردید. برای افزایش دقت در ردیابی جهش‌ها حتی در درصد کمی از سلول‌ها، پس از انجام RFLP بر روی قطعات تکثیر شده ژن *KRAS*، Enrichment PCR مجدداً مطابق با برنامه بهینه مذکور با پرایمرهای نامبرده تکرار شد. در این واکنش حجم کلی مخلوط PCR، ۲۶µl در نظر گرفته شد شامل ۱µl DNA ژنومی با رقت ۰/۳، ۱۸/۷۵µl آب مقطر استریل، بافر مناسب آنزیم Taq پلیمرز به میزان ۲/۵µl، ۰/۷۵µl محلول کلرید منیزیم ۵۰mM، ۰/۵µl از مخلوط dNTP ها، ۱µl از هریک از پرایمرهای forward و reverse با رقت ۰/۲۵ و نهایتاً ۰/۵ µl آنزیم Taq پلیمرز می باشد. محصولات نهایی به وسیله الکتروفورز درصد جداسازی شدند (۱)

پس از انجام Enrichment PCR و تکثیر قطعات جهش یافته که در RFLP اول برش نخورده بودند، نیاز به بررسی و تأیید مجدد جهش یافته بودن محصولات این تکثیر وجود داشت. بدین منظور محصولات Enrichment PCR با تکنیک RFLP و مطابق پارامترهای RFLP اول در معرض برش آنزیمی قرار گرفتند. با این تفاوت که به جای محصول PCR، از محصول Enrichment PCR استفاده گردید. سپس برای تأیید درستی عملکرد تکنیک RFLP و نیز تشخیص نوع تغییر نوکلئوتیدی در نمونه‌های توموری جهش یافته، تمامی نمونه‌هایی که به عنوان جهش یافته شناسایی گردیدند و همچنین دو نمونه تصادفی از تومورهایی که فاقد جهش تشخیص داده شدند، برای انجام PCR توالی یابی انتخاب شدند. در این مرحله برای انجام PCR بر روی نمونه‌های انتخابی از پرایمر forward با توالی 5'-TTTTCATGATTGAATTTTGTAAGG-3' و Tm برابر با ۵۳/۹ درجه و پرایمر reverse با توالی 5'-TTGAAACCCAAGGTACATTTCA-3' با دمای Tm برابر ۵۷/۷ درجه طراحی (Oligo, version 3.4; National Biosciences Inc.) و استفاده گردید و PCR انجام شد.

در ادامه جهش یافته بودن محصولاتتی که در مرحله قبل تکثیر شدند، RFLP بر روی محصولات Enrichment PCR انجام گرفت. قطعات دارای جهش مجدداً برش نخورده و در الکتروفورز بانندی با طول ۱۵۷bp به دست دادند. این باندها در الکتروفورز، تأیید کننده جهش یافته بودن محصول Enrichment PCR و در نتیجه وجود آلل جهش یافته در نمونه اولیه است.



شکل ۲- تصویر محصولات Enrichment PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز. در چاهک شماره ۱، مارکر ۵۰bp مشاهده می‌شود. چاهکهای شماره ۲ تا ۵، محصولات Enrichment PCR. چاهکهای ۲ تا ۴، نمونه‌هایی که تا مرحله قبل به عنوان جهش یافته شناسایی شده بودند. همان‌گونه که مشاهده می‌شود در آنها، باندها ۱۵۷bp دیده می‌شود؛ لذا این نمونه‌ها آللهای جهش یافته‌ای دارند که در مرحله قبل (RFLP) برش نخورده و در این مرحله تکثیر شده‌اند. اما در چاهک شماره ۵، باندها ۱۵۷bp وجود ندارد.

پس از انجام Enrichment PCR و RFLP محصولات آن، مشخص شد که در میان ۴۵ بیمار خوزستانی بررسی شده که همگی مبتلا به سرطان کلورکتال تک‌گیر بودند، ۶ بیمار در تومورهای خود، جهش کدون ۱۲ یا ۱۳ یا هر دو کدون ژن KRAS را داشتند که این تعداد ۱۳/۳۳ درصد کل بیماران را شامل می‌شد. پس از انجام واکنش PCR به

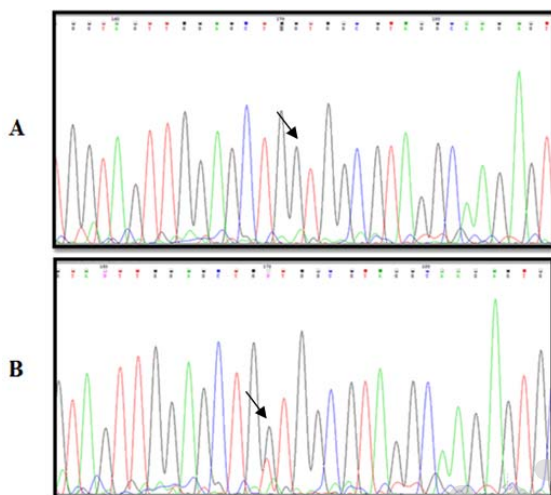
قطعه اصلی با طول ۱۲۸bp تولید کرده‌اند. چاهک شماره ۷، نمونه دارای جهش می‌باشد.

بر اثر RFLP، دو قطعه با طولهای ۱۲۸bp و ۲۹bp ایجاد شدند. باندها مربوط به قطعه ۲۹bp به علت اندازه بسیار کم، بر روی ژل آگارز قابل مشاهده نیست. چنانچه محصول PCR در کدون ۱۲ یا ۱۳ و یا هر دو کدون جهشی داشته باشد، باعث تغییر نوکلئوتیدی در این دو کدون و در نتیجه از دست رفتن جایگاه شناسایی آنزیم محدود کننده BstN1 می‌گردد؛ بنابراین طی RFLP این قطعات برش نمی‌خورند. از این رو پس از الکتروفورز نمونه‌های دارای آلل جهش یافته در کدون/کدونهای ۱۲ و ۱۳، یک باندها با طول ۱۵۷bp بر روی ژل آگارز مشاهده می‌شود.

تا مرحله PCR/RFLP اول مشخص شد که ۳ نمونه دارای جهش در کدون ۱۲ یا ۱۳ یا هر دو کدون از ژن KRAS هستند. بنابراین تا این مرحله و قبل از انجام مراحل غنی‌سازی جهش، فراوانی جهش در کدون ۱۲ و ۱۳ ژن KRAS در جمعیت بیماران مورد مطالعه که همگی دارای سرطان کلورکتال تک‌گیر بودند، ۶/۶۷ درصد به دست آمد.

سپس بر روی محصولات RFLP واکنش Enrichment PCR انجام گرفت. برای تکثیر آللهای دارای جهش که ممکن است با نسبت‌های بسیار کم در نمونه‌ها موجود بوده و طی RFLP به دلیل دارا بودن جهش، برش نخورده و دست نخورده باقی مانده باشند، یک مرحله PCR با همان پرایمرهای قبلی تکرار شد. در این PCR، آللهای نوع وحشی که در RFLP برش خورده بودند قابل تکثیر نیستند و تنها آللهای جهش یافته تکثیر شده و تعداد آنها افزایش می‌یابد؛ از این رو مقدار اولیه اندک آنها در این مرحله افزایش یافته و قابل شناسایی می‌گردد. در شکل ۲ تصویر نتایج Enrichment PCR بر روی ژل آگارز مشاهده می‌شود.

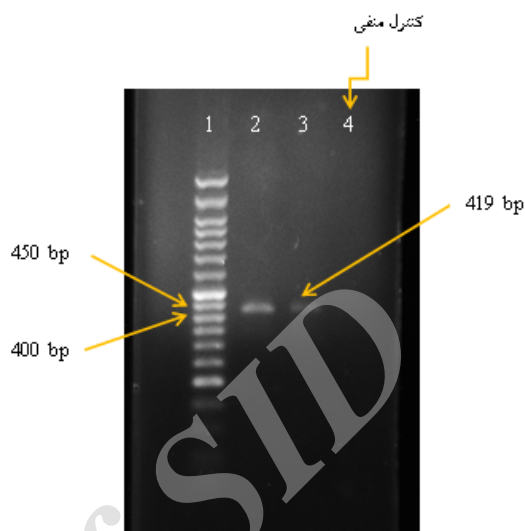
سنی بالاتر یا مساوی ۶۰ سال یافت شد و بیماران زیر ۶۰ سال جهشی در این دو کدون *KRAS* نداشتند. اگر نتایج به دست آمده در مراحل اول، دوم و سوم مقایسه شود، می‌توان گفت پس از اولین PCR/RFLP فراوانی جهش برابر ۶/۶۷ درصد به دست آمد. پس از انجام مراحل غنی‌سازی وجود جهش در ۳ نمونه دیگر نیز آشکار گشت و فراوانی برابر ۱۳/۳۳ درصد به دست آمد و این نتایج پس از توالی‌یابی تأیید گشتند.



شکل ۴- کروماتوگرام‌های حاصل از توالی‌یابی محصول PCR آللهای نوع وحشی (A) و جهش یافته (B) ژن *KRAS*.

در نخستین بررسی جامع RASCAL که بر روی ۲۷۲۱ بیمار از CRC از ۱۳ کشور انجام شد، جهش‌های کدون ۱۲ یا ۱۳ ژن *KRAS* در ۳۷/۷ درصد تومورها گزارش شد. ۸۱ درصد این جهش‌ها در کدون ۱۲ و مابقی در کدون ۱۳ رخ داده بود. ۷۸ درصد جهش‌ها نیز در باز سوم این دو کدون اتفاق افتاده بود (۴). در دومین بررسی RASCAL بر روی ۳۴۳۹ بیمار از CRC از ۳۵ مرکز در ۱۹ کشور، فراوانی جهش *KRAS* برابر ۳۴/۸ درصد برآورد شد (۵). در سال ۲۰۱۲ در کشور چین با استفاده از PCR/Sequencing مطالعاتی بر روی کدون‌های ۱۲، ۱۳ و ۱۴ از ۵۷ نمونه انجام شد و میزان فراوانی جهش ۴۳/۹ تخمین زده شد (۲۱). در سال ۱۹۹۴ در پروژ مطالعات PCR/SSO برای ۱۲ جهش خاص

منظور توالی‌یابی، قطعه تکثیر شونده توسط این پرایمرها با ۴۱۹bp طول مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳- تصویر محصولات PCR برای توالی‌یابی. در چاهک شماره ۱، مارکر ۵۰bp مشاهده می‌گردد. در چاهک‌های شماره ۲ و ۳ محصولات PCR ژنومها مشاهده می‌شود. در چاهک شماره ۴ کنترل منفی واکنش بارگذاری شده است.

با استفاده از نرم افزار Chromas2 کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی خوانده شد، سپس با توالی مرجع *KRAS* مربوط به لوکوس NG_007524.1 مقایسه گردید. توالی کدون‌های ۱۲ و ۱۳ در هر نمونه با توالی مرجع تطبیق داده شدند و تغییرات نوکلئوتیدی آنها آشکار گشت. کروماتوگرام‌های مربوط به توالی‌یابی محصولات PCR نمونه‌های دارای جهش و فاقد آن، با استفاده از پرایمر Forward در شکل ۴ مشاهده می‌شوند. کروماتوگرام‌ها از نظر وجود جهش در کدون‌های ۱۲ و ۱۳ و علاوه بر اینها، در کدون‌های ۵۹، ۶۱، ۶۳ و ۱۴۶ این ژن که همگی نقاط داغ جهشی *KRAS* می‌باشند، بررسی گردید.

جهش‌های کدون ۱۲ و ۱۳ به ترتیب (۶/۵) ۸۳/۳۴ درصد و (۶/۱) ۱۶/۶۶ درصد از کل جهش‌های *KRAS* را در گروه نمونه مورد بررسی شامل شدند. در ۸ نمونه توالی‌یابی شده، هیچ جهشی در کدون‌های ۵۹، ۶۱، ۶۳ و ۱۴۶ وجود نداشت. از نظر رده بندی سنی، تمام جهش‌ها در بیماران رده

روش PCR/RFLP برابر ۶/۶۷ درصد و با روش تکمیلی Enrichment PCR/RFLP برابر ۱۳/۳۳ درصد به دست آمد. آشکار است که با روش کامل PCR/RFLP/Enrichment حساسیت شناسایی جهش تا دو برابر افزایش داده شده است و این روش دو برابر دقیق‌تر در شناسایی جهش عمل می‌کند. طبق مطالعات جامعی که فراوانی جهش *KRAS* را در جمعیت‌های مختلف جمع‌بندی و تحلیل نموده‌اند، میانگین جهش این ژن در جمعیت‌های مختلف بیماران CRC برابر ۳۷/۷ درصد و ۳۴/۸ درصد گزارش شده است که بیشتر از فراوانی به دست آمده در این بررسی می‌باشد. فرضیات متعددی در رابطه با دلایل احتمالی پایین بودن فراوانی جهش *KRAS* در جمعیت مورد بررسی نسبت به بسیاری از جمعیت‌های دیگر می‌توان ارائه داد. به عنوان مثال، با توجه به بررسی‌های دیگر انجام شده بر روی این نمونه و پایین بودن فراوانی جهش *APC* و بالا بودن فراوانی‌های پیرمتیلاسیون این ژن در این گروه نمونه، امکان بالا بودن فراوانی فنوتیپ متیلاتور جزایر CpG یا ناپایداری میکروستلایتی در این گروه تومورها وجود دارد. این دو گروه، هر دو با نرخ پایین جهش *KRAS* همراهی نشان می‌دهند. در ضمن با توجه به یافته‌های دو بررسی پیشین و بررسی حاضر انجام شده بر روی این نمونه پیشنهاد می‌گردد در تکوین این تومورها، مسیر سرطان زایی *Serrated* سهم بیشتری نسبت به مسیر آدنوما-کارسینوما داشته است؛ زیرا جهش *APC* و *KRAS* که جزء رویدادهای مسیر آدنوما-کارسینوما می‌باشند، در این نمونه دارای شیوع پایینی بوده و در مقابل هایپرمتیلاسیون *APC* که از رویدادهای مسیر سرطان زایی *Serrated* می‌باشد، فراوانی بالایی داشته است. از دیگر دلایل احتمالی فراوانی پایین جهش *KRAS* در نمونه مورد بررسی می‌توان به خیلی بزرگ نبودن این نمونه و به دنبال آن خطای نمونه‌گیری و سوگیری اشاره کرد. به عنوان مثال ممکن است بخش زیادی از تومورهای گروه نمونه را تومورهای دارای سطوح

در کدونهای ۱۲ و ۱۳ از ۲۵۱ بیمار انجام گرفت و فراوانی جهش ۳۹/۴ محاسبه گشت (۹). در فرانسه در سال ۲۰۱۰، PCR/Sequencing برای ۷ جهش خاص در کدونهای ۱۲ و ۱۳ از ۶۱ بیمار میزان ۳۷ درصد برای فراوانی جهش نشان داد (۱۷). مطالعات PCR/RFLP/Enrichment در ژاپن در سال ۲۰۰۴ بر روی کدون ۱۲ و ۱۳ از ۲۳۴ بیمار، فراوانی جهش را ۳۱ درصد نشان داد (۲۲ و ۳۱). مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۸ در ترکیه با استفاده از روش PCR/SSCP/Sequencing کدونهای ۱۲ و ۱۳ از ۵۳ بیمار، میزان جهش را ۱۱ درصد گزارش داد (۳). در کشور پرو در سال ۲۰۱۱ با استفاده از روش PCR/Sequencing در آگزون ۱ از ۹۰ بیمار میزان فراوانی جهش ۱۶/۷ درصد گزارش داده شد (۱۴) و در کشور ایران در سال ۲۰۱۰ فراوانی جهش در کدونهای ۱۲ و ۱۳ از ۵۹ بیمار در شهر تهران با استفاده از روش PCR/Sequencing میزان ۲۰/۳ درصد گزارش شده است (۳۱). سهم هریک از مسیرهای مختلف سرطان زایی *CRC* در بروز انواع توارثی و تک‌گیر این بیماری متفاوت است؛ بنابراین فراوانی جهش *KRAS* نیز در این دو نوع بیماری می‌تواند متفاوت باشد. هرچند که در نخستین مطالعه جامع RASCAL مشخص شده که فراوانی این جهش‌ها در میان تومورهای تک‌گیر، *FAP* و *HNPCC* تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد (۴)؛ اما در برخی مطالعات دیگر گفته شده است که دو گروه آخر در مقایسه با تومورهای تک‌گیر تفاوت نرخ جهش *KRAS* دارند (۱۰، ۱۸ و ۲۰).

در مطالعه حاضر، در مجموع تعداد ۴۵ تومور از ۴۵ بیمار خوزستانی مبتلا به سرطان کلورکتال تک‌گیر از نظر جهش در کدونهای ۱۲ و ۱۳ ژن *KRAS* با روش PCR/RFLP و Enrichment PCR/RFLP ارزیابی گشته و در ۶ عدد از تومورها جهش در کدونهای ذکر شده یافت شد. با روش توالی‌یابی، وجود جهش در این نمونه‌ها و نیز فقدان جهش در دو نمونه تصادفی از نمونه‌های فاقد جهش تأیید شد. فراوانی جهش این دو کدون در نمونه مورد بررسی با

امگا-۳، فاکتورهای محیطی و زمینه ژنتیکی متفاوت از دیگر فاکتورهای مؤثر بر فراوانی جهش *KRAS* در بیماران CRC این استان می‌باشد. با توجه به تأثیر قابل توجه جهش *KRAS* در میزان پاسخ دهی به شیمی درمانی در بیماران مبتلا به CRC تحت درمان با شیمی درمانی، انجام مطالعات مشابه بر روی سایر جمعیت‌های ایرانی لازم است تا بتوان به درستی درباره نیاز یا عدم نیاز به انجام آزمون مولکولی جهش *KRAS* قبل از ارجاع بیماران ایرانی مبتلا به CRC برای شیمی درمانی، تصمیم‌گیری قطعی نمود.

تشکر و قدردانی

مؤلفین این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل حمایت مالی و تمامی عزیزان یاری دهنده در انجام این پروژه، نهایت سپاس و امتنان را دارند.

تمایزی پایین تشکیل داده باشند. طبق گزارشات شیوع جهش *KRAS* در این گونه تومورها کمتر از تومورهای سایر سطوح تمایزی است. علاوه بر این، از آن جایی که سلولهای توموری از نظر جهش این ژن موزاییک هستند و نیز این جهش تقریباً همیشه به صورت هتروزیگوت روی می‌دهد، این احتمال وجود دارد که برخی تومورهایی که نسبتهای پایین آلل جهش یافته/سالم دارند، توسط روش غربالگری به کار رفته به عنوان تومور دارای جهش شناسایی نشوند و در آمار تومورهای جهش یافته محسوب نگردند. این پدیده نیز به نوبه خود، فراوانی محاسبه شده کمتری برای فراوانی این جهش در پی خواهد داشت. با توجه به پایین بودن نرخ جهش در کدون ۱۲ و ۱۳ ژن *KRAS* در بررسیهای دیگر انجام شده بر روی جمعیت ایرانی، این احتمال وجود دارد که در این جمعیت نقاط داغ جهش *KRAS* در کدونهای دیگر اگزون اول یا اگزونهای دیگر باشد. شیوه زندگی، رژیم غذایی سرشار از ماهی و

منابع

- حسین زاده کلاگر ا، فلاح ف، یوسف زاده ح، ۱۳۹۴. تنوع و تمایز ژنتیکی جمعیت‌های توس (*Betula pendula*) ایران، با استفاده از چندشکلی DNA سه ناحیه (KIK2, DT, CD) ژنوم کلروپلاستی. مجله زیست‌شناسی ایران ۱۹۴:۲۸.
- محمدآبادی م، ۱۳۹۴. تنوع آللی ژن کالپاستین در گوسفند سنجابی. مجله زیست‌شناسی ایران ۳۹۷:۲۸.
- Akkiprik, M., Celikel, C.A., Düşünceli, F., Sönmez, O., Güllüoğlu, B.M., Sav, A. and Ozer, A., 2008. Relationship between overexpression of ras p21 oncoprotein and K-ras codon 12 and 13 mutations in Turkish colorectal cancer patients. The Turkish journal of gastroenterology: the official journal of Turkish Society of Gastroenterology, 19(1), pp.22-27.
- Andreyev, H.J.N., Norman, A.R., Clarke, P.A., Cunningham, D. and Oates, J.R., 1998. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. Journal of the National Cancer Institute, 90(9), pp.675-684.
- Andreyev, H.J.N., Norman, A.R., Cunningham, D., Oates, J., Dix, B.R., Iacopetta, B.J., Young, J., Walsh, T., Ward, R., Hawkins, N. and Beranek, M., 2001. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. British journal of cancer, 85(5), p.692.
- Banck, M.S. and Grothey, A., 2009. Biomarkers of resistance to epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in patients with metastatic colorectal cancer. Clinical Cancer Research, 15(24), pp.7492-7501.
- Bartsch, D., Bastian, D., Barth, P., Schudy, A., Nies, C., Kisker, O., Wagner, H.J. and Rothmund, M., 1998. K-ras oncogene mutations indicate malignancy in cystic tumors of the pancreas. Annals of surgery, 228(1), p.79.
- Bazan, V., Migliavacca, M., Zanna, I., Tubiolo, C., Grassi, N., Latteri, M.A., La Farina, M., Albanese, I., Dardanoni, G., Salerno, S. and Tomasino, R.M., 2002. Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype. Annals of Oncology, 13(9), pp.1438-1446.

9. Breivik, J., Meling, G.I., Spurkland, A., Rognum, T.O. and Gaudernack, G., 1994. K-ras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. *British journal of cancer*, 69(2), p.367.
10. Burner GC, Levine DS, Kulander BG, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. C-Ki-ras mutations in chronic ulcerative colitis and sporadic colon carcinoma. *Gastroenterology*. 1990 Jan 8;99(2):416-20.
11. Calistri, D., Rengucci, C., Seymour, I., Leonardi, E., Truini, M., Malacarne, D., Castagnola, P. and Giaretti, W., 2006. KRAS, p53 and BRAF gene mutations and aneuploidy in sporadic colorectal cancer progression. *Analytical Cellular Pathology*, 28(4), pp.161-166.
12. Chen, F., JUNB jun B proto-oncogene, 2011 (accessed June 8, 2011). <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/JUNBID178.Html>.
13. Downward, J., 2003. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3(1), pp.11-22.
14. Egoavil, C.M., Montenegro, P., Soto, J.L., Casanova, L., Sánchez-Lihon, J., Castillejo, M.I., Martínez-Canto, A., Pérez-Carbonell, L., Castillejo, A., Guarinos, C. and Barbera, V.M., 2011. Clinically important molecular features of Peruvian colorectal tumours: high prevalence of DNA mismatch repair deficiency and low incidence of KRAS mutations. *Pathology-Journal of the RCPA*, 43(3), pp.228-233.
15. Grimmond, S.M., Raghavan, D. and Russell, P.J., 1992. Detection of a rare point mutation in Ki-ras of a human bladder cancer xenograft by polymerase chain reaction and direct sequencing. *Urological research*, 20(2), pp.121-126.
16. Haigis, K.M., Kendall, K.R., Wang, Y., Cheung, A., Haigis, M.C., Glickman, J.N., Niwa-Kawakita, M., Sweet-Cordero, A., Sebolt-Leopold, J., Shannon, K.M. and Settleman, J., 2008. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nature genetics*, 40(5), pp.600-608.
17. Italiano, A., Hostein, I., Soubeyran, I., Fabas, T., Benchimol, D., Evrard, S., Gugenheim, J., Becouarn, Y., Brunet, R., Fonck, M. and François, E., 2010. KRAS and BRAF mutational status in primary colorectal tumors and related metastatic sites: biological and clinical implications. *Annals of surgical oncology*, 17(5), pp.1429-1434.
18. Konishi, M.O.T.O.K.O., Kikuchi-Yanoshita, R., Tanaka, K.I.Y.O.K.O., Muraoka, M.A.S.A.T.O.S.H.I., Onda, A.S.A.K.A., Okumura, Y.U.K.A.K.O., Kishi, N.A.O.K.O., Iwama, T.A.K.E.O., Mori, T.A.K.E.O., Koike, M. and Ushio, K., 1996. Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology*, 111(2), pp.307-317.
19. Malumbres, M. and Barbacid, M., 2003. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), pp.459-465.
20. Mancini, I., Santucci, C., Sestini, R., Simi, L., Pratesi, N., Cianchi, F., Valanzano, R., Pinzani, P. and Orlando, C., 2010. The use of COLD-PCR and high-resolution melting analysis improves the limit of detection of KRAS and BRAF mutations in colorectal cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12(5), pp.705-711.
21. Mao, C., Zhou, J., Yang, Z., Huang, Y., Wu, X., Shen, H., Tang, J. and Chen, Q., 2012. KRAS, BRAF and PIK3CA mutations and the loss of PTEN expression in Chinese patients with colorectal cancer. *PLoS One*, 7(5), p.e36653.
22. Nagasaka, T., Sasamoto, H., Notohara, K., Cullings, H.M., Takeda, M., Kimura, K., Kambara, T., MacPhee, D.G., Young, J., Leggett, B.A. and Jass, J.R., 2004. Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation. *Journal of Clinical Oncology*, 22(22), pp.4584-4594.
23. Oliveira, C., Velho, S., Moutinho, C., Ferreira, A., Preto, A., Domingo, E., Capelinha, A.F., Duval, A., Hamelin, R., Machado, J.C. and Schwartz, S., 2007. KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression. *Oncogene*, 26(1), pp.158-163.
24. Palaghia, M., Prelipcean, C.C., Cotea, E., Vlad, N. and Lenesci, L., 2015. Metastatic Colorectal Cancer: Review of Diagnosis and Treatment Options. *Journal of Surgery [Jurnalul de chirurgie]*, 10(4), pp.249-256.
25. Palmirotta, R., Savonarola, A., Ludovici, G., De Marchis, M.L., Covello, R., Ettore, G.M., Ialongo, C. and Guadagni, F., 2011. Concurrent mutation in exons 1 and 2 of the K-ras oncogene in colorectal cancer. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 49(4), pp.729-733.

26. Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Velculescu, V.E., 2002. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*, 418(6901), pp.934-934.
27. Roberts, M.L., Drosopoulos, K.G., Vasileiou, I., Stricker, M., Taoufik, E., Maercker, C., Guialis, A., Alexis, M.N. and Pintzas, A., 2006. Microarray analysis of the differential transformation mediated by Kirsten and Harvey Ras oncogenes in a human colorectal adenocarcinoma cell line. *International journal of cancer*, 118(3), pp.616-627.
28. Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F. and Wittinghofer, A., 1997. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*, 277(5324), pp.333-339.
29. Schubbert, S., Shannon, K. and Bollag, G., 2007. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(4), pp.295-308.
30. Shen, L., Toyota, M., Kondo, Y., Lin, E., Zhang, L., Guo, Y., Hernandez, N.S., Chen, X., Ahmed, S., Konishi, K. and Hamilton, S.R., 2007. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47), pp.18654-18659.
31. Sobhani, S., Ghaffarpour, M., Mostakhdemin Hosseini, Z., Kamali, F., Nour Mohammadi, Z. and Houshmand, M., 2010. The prevalence of common mutation frequency in K-ras codons 12, 13 in Iranian Colorectal Cancer patients. *Genetics in the 3rd millennium*, 8(2), pp.2011-2018.

Analysis of common mutations of *KRAS* gene in patients suffering from sporadic colorectal cancer in Khuzestan

Kazemi Nezhad S.R., Kazerounian A., Galehdari H. and Shaffaf T.

Genetics Dept., Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignancies in the world (rate of death: 33%). Codons 12 and 13 of exon 1 are the hot spots for occurrence of mutations in *KRAS*. This study aims to define the occurrence of *KRAS* mutations at codon 12 and 13 in patients from Khuzestan suffering from sporadic colorectal cancer (SCRC) and compare them with patients from other regions of Iran and other countries. Genomic DNA was first extracted from 45 SCRC specimens. *KRAS* point mutations were genotyped by PCR-RFLP analysis followed by enrichment PCR. Enrichment PCR is an appropriate method which we use for detecting even lower percentage of heterozygous mutations in one specimen. Finally Sanger sequencing was used to confirm mutations identified. 13.33% of tumor samples showed mutations at codon 12 or 13 of the *KRAS* gene. It's totally different with the frequency of those from many of other countries (33-53%) and alternative studies in Iran (20.3% and 28%); that could be because of various reasons such as less role of serrated pathway in development of CRC among Khuzestani population, probable microsatellite instability-high status of these tumors, insufficient sensitivity of RFLP method, different genetic and environmental factors like high intake of omega-3 fat in the Khuzestani usual diet. Also, use of enrichment method, doubled the frequency of mutations identified in this cohort.

Key words: sporadic colorectal cancer, *KRAS*, mutation analysis, Enrichment-RFLP