٩٦٥٤٧

دانشگاه علوم بهزیستی و توان بخشی

گروه ژنتیک

پایا ن نامه کارشناسی ارشد ژنتیک

بررسی ژن *Caveolin-1(Cav-1)* در سطح DNA در نمونه های اسپورادیک سرطان پستان مراجعه شده به بیمارستان مهراد از تاریخ مهر ۸۵ لغایت مهر ۸۶

۱۳۸۶/۱۲/۱۱

نگارش : یاسر حشمتی

استاد راهنما : دکتر مینا اوحدی

استاد مشاور: دکتر حمید رضا خرم خورشید

استاد مشاور آمار: دکتر مسعود کریملو

زمستان ۱۳۸۶

شماره ثبت: ۱۳۰- ۱۰۰۰

۵۶۳۴۷

۱۳۰- ۱۰۰۰

بسمه تعالی

دانشگاه علوم بهزیستی وتوانبخشی

تعهد نامهٔ چاپ مطالب و مقالات مستخرج از پایان نامه یا رساله های دانشجویان دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

با عنایت به اینکه هر گونه مقاله استخراج شده از پایان نامه یا رساله و یا چاپ و انتشار بخشی یا تمام مطالب آن مبیّن قسمتی از فعالیتهای علمی – پژوهشی دانشگاه می باشد بنابراین اینجانب **یاسر حشمتی** دانش آموخته رشته**ژنتیک** متعهد می شوم که موارد ذیل را کاملاً رعایت نمایم.

۱. در صورت اقدام به چاپ هر مقاله ای از مطالب پایان نامه، خود را بعنوان دانش آموخته دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی معرفی نمایم و درج نام و آدرس محل دیگری خوداری کنم.

۲. در صورت اقدام به چاپ بخشی از یا تمام پایان نامه یا رساله خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به اطلاع "انتشارات" و "دفتر تحصیلات تکمیلی" دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی برسانم.

۳. در صورت اقدام به چاپ پایان نامه یا رساله در صفحه سوم کتاب(پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را درج نمایم:

" کتاب حاضر حاصل پایان نامهٔ کارشناسی ارشد نگارنده در رشته ژنتیک می باشد که در سال ۸۵/۱۲/۷ در دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی به راهنمائی سرکار خانم دکتر مینا اوحدی و مشاورهٔ جناب آقای دکترحمیدرضا خرم خورشید و مشاورهٔ آمار جناب آقای دکترمسعود کریملو انجام و در سال ۱۳۸۶ از آن دفاع شده است."

۴. به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک در صد شمارگان کتاب(در هر نوبت چاپ) را به انتشارات دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی اهداء نمایم. (دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.)

۵. در صورت عدم رعایت بند ۴، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تادیه می کنم.

۶. قبول می نمایم و تعهد می کنم که در صورت خوداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند. بعلاوه به دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی حق می دهم به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه معادل وجه مذکور در بند ۵ را از محل توقیف کتابهای عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

اینجانب **یاسر حشمتی** دانشجوی رشته **ژنتیک** مقطع **کارشناسی ارشد** ۱۳۸۶/۱۲/۱۱

تعهد فوق و ضمانت اجرایی آنرا بدون قید و شرط قبول می نمایم، و به انجام آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی

امضاء و تاریخ

۸۶/۱۱/۲۱

حمد سپاس خداوند بلند مرتبه ای را که پیوسته از لطف و کرمش بهره مند بوده ام امید آنکه به دیده منت از کوتاهیها و لغزشهایم بگذرد.

تقدیم به:

پدر، مادر و همسر عزیزم

که صبوریشان در وصف نگنجد و توان

بی پایان گامهایم از سحر نفسهایشان

است.

با تقدیر و تشکر از راهنمایی ها و زحمات دلسوزانه و بی دریغ اساتید گرامی:

دکتر اوحدی

دکتر خرم خورشید

دکتر کریملو

و

دکتر کمالی

و از اساتید محترمی که افتخار بهره گیری از محضر شان را داشتم، همچنین از سرکار خانم جلالوند مسئول آزمایشگاه و همه فعالان در مرکز تحقیقات ژنتیک که صمیمانه با من همکاری نمودند.

مقام فرزانگی زیبنده روزگارشان باد

چکیده:

سرطان پستان شایعترین نوع سرطان و علت اصلی مرگهای ناشی از سرطان در میان زنان کشورهای توسعه یافته است. میزان شیوع سرطان پستان در جهان در حال افزایش بوده، در بین زنان ایرانی هر ساله حدود ۷۰۰۰ مورد جدید مبتلا به سرطان یافت می شود.

سرطانهای انسانی توسط فعالیت غیر طبیعی پروتوانکوژنها و یا غیر فعال شدن ژنهای سرکوبگر تومور (TSG) که در نهایت باعث از بین رفتن پایداری ژنوم نیز می شود، ایجاد می شوند.

ژن سرکوبگر تومور *Cav-1* که در جایگاه 7q31 قرار دارد، یک پروتئین 22 kD را کد می کند که در فرایند های اندوسیتوز، هومئوستازی کلسترول و سیگنال ترانسداکسیون دارای نقش مهمی می باشد.

در این مطالعه ۵۲ نمونه سرطان غیر ارثی پستان زنان مراجعه کننده به بیمارستان مهراد تهران از مهر ۸۵ تا مهر ۸۶ مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از روش PCR-SSCP و سپس تعیین توالی، تمام اگزونهای سنتز کننده پروتئین *Cav-1* و پروموتر آن، جهش یابی و سپس با یک گروه ۱۰۰ نفری کنترل مقایسه گردید . همچنین ناحیه ای در بالادست این ژن که دارای توالی های تکراری بود مورد بررسی قرار گرفت.

در بررسی اگزون ها و پروموتر *Cav-1* (۵۰۰ نوکلئوتید قبل از ناحیه شروع نسخه برداری) هیچ جهشی در گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد. در بررسی ناحیه بالا دست ژن (۱۵۴۹- تا ۱۶۹۸-) که برای اولین بار در دنیا صورت می گرفت، یک ناحیه پلی مورف یافت شد که پس از تعیین الل های این ناحیه، فراوانی آلل ها در جمعیت کنترل و بیمار تفاوت بسیار معنی داری نسبت به یکدیگر داشت. همچنین آللی یافت شد (102 bp) که در جمعیت شاهد مشاهده نشد و بر عکس آللی در جمعیت کنترل دیده شد (122 bp) که در جمعیت بیمار وجود نداشت. همچنین دو ناحیه Hot spot mutation در این ناحیه یافت شد. با توجه به این نتایج و مطالعات صورت گرفته این احتمال وجود دارد که این توالی ها و تعداد تکرارهای این نواحی در بیان ژن *Cav-1* و اتیوپاتوفیزیولوژی سرطان پستان اسپورادیک نقش داشته باشد.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: کلیات تحقیق ۱

۱-۱ بیان مسئله ۲

۱-۲ اهمیت و ضرورت ۴

۱-۳ تعریف واژه ها ۵

۱-۳-۱ LOH ۵

۱-۴ هدف از اجرای تحقیق ۶

۱-۴-۱ اهداف کلی ۶

۱-۴-۲ اهداف فرعی ۶

۱-۴-۳ اهداف کاربردی ۶

۱-۵ فرضیه ۶

۱- ۶ سؤال ۷

فصل دوم: مروری بر مطالعات گذشته ۸

۲-۱ تعریف سرطان ۹

۲-۱-۱ درجه هیستولوژیک بدخیمی ۱۰

۲-۲ ساختمان پستان ۱۰

۲-۲-۱ غدد پستانی ۱۱

۲-۲-۲ نمو رویانی پستان ۱۱

۲-۲-۳ نمو پستان طی بلوغ ۱۱

۲-۲-۴ ساختمان پستان در زنان بالغ ۱۲

۲-۲-۵ عروق و لنفاتیک پستان ۱۴

۲-۳ پاتولوژی پستان ۱۴

۲-۳-۱ بیماریهای پستان ۱۴

۲-۳-۲ مرحله بندی سرطان پستان ۱۷

۲-۳-۳ اتیولوژی سرطان پستان ۱۸

۲-۳-۳-۱ جغرافیا ۱۸
۲-۳-۳-۲ عوامل ژنتیکی ۱۹
۲-۳-۳-۳ استروژن اضافی ۲۰
۲-۳-۳-۴ عوامل محیطی و رژیم غذایی ۲۰
۲-۳-۳-۵ تغییر فیبروکیستیک ۲۰
۲-۴ ژنتیک سرطان پستان ۲۱
۲-۴-۱ سرطان پستان فامیلی ۲۱

۲-۴-۲ سرطان پستان غیرفامیلی یا اسپورادیک ۲۲
۲-۴-۲-۱ گیرنده هورمون استروژن ۲۲
۲-۴-۲-۲ انکوژنها ۲۳
۲-۴-۲-۲-۱ *erbB-2* (*HER-2 , neu*) ۲۳
۲-۴-۲-۲-۲ *c-myc* ۲۳
۲-۴-۲-۲-۳ *c-met* ۲۳
۲-۴-۲-۲-۴ *EGFR* ۲۴
۲-۴-۲-۲-۵ *IGF-R* ۲۴
۲-۴-۲-۲-۶ *Waf1/Cip1* ۲۴
۲-۴-۲-۲-۷ *Kip1* ۲۴
۲-۴-۲-۲-۸ *VEGF* ۲۵
۲-۴-۲-۲-۹ سیکلین ها ۲۵
۲-۴-۲-۲-۱۰ گیرنده های لامینین ۲۵
۲-۴-۲-۲-۱۱ *Tenascin* ۲۵
۲-۴-۲-۲-۱۲ *CD44* ۲۵
۲-۴-۲-۲-۱۳ *V-int-2* ۲۶
۲-۴-۲-۲-۱۴ ژن‌های *BCAS3* و *BCAS4* ۲۶
۲-۴-۲-۲-۱۵ *C35* ۲۶

۲-۴-۲-۳ ژن های سرکوبگر تومور ۲۷
۲-۴-۲-۳-۱ *Car* ۲۷

۲-۳-۲-۴-۲ *Rb* ۲۷
۳-۳-۲-۴-۲ *P53* ۲۷
۴-۳-۲-۴-۲ *DCC* ۲۸
۵-۳-۲-۴-۲ *Prohibitin* ۲۸
۶-۳-۲-۴-۲ *APC* ۲۸
۷-۳-۲-۴-۲ *BRCA 1,2* ۲۸
۸-۳-۲-۴-۲ *RB1* ۲۹
۹-۳-۲-۴-۲ *PTEN* ۲۹
۱۰-۳-۲-۴-۲ *RhoBTB* ۲۹
۱۱-۳-۲-۴-۲ *P21* ۳۰
۱۲-۳-۲-۴-۲ *DOCK4* ۳۰
۱۳-۳-۲-۴-۲ *RAP1A* ۳۱
۱۴-۳-۲-۴-۲ *RAD51* ۳۲
۱۵-۳-۲-۴-۲ *Cav-1* ۳۲
۲-۴-۲-۴ ژنهای سرکوب کننده متاستاز ۳۷
۱-۴-۲-۴-۲ *E-cadherin* ۳۷
۲-۴-۲-۴-۲ *nm23* ۳۷
۲-۴-۲-۵ ژنهای مربوط به مسیرهای مرگ و بقای سلولی ۳۷
۲-۴-۲-۵-۱ تلومراز ۳۷
۲-۴-۲-۵-۲ ژنهای مرتبط با متاستاز ۳۷
۲-۵ ژن درمانی سرطان پستان ۳۷
فصل سوم:مواد و روش تحقیق ۳۹
۳-۱ روش شناسی تحقیق ۴۰
۳-۱-۱ نوع مطالعه ۴۰
۳-۱-۲ جامعه آماری ۴۰
۳-۱-۳ نمونه گیری ۴۰
۳-۱-۴ معیارهای انتخاب بیماران ۴۰
۳-۱-۵ روش جمع آوری داده ها ۴۱
۳-۱-۶ تعریف عملیاتی متغیر ها و مقیاس اندازه گیری ۴۱
۳-۱-۷ ملاحظات اخلاقی ۴۱

۳-۲-۶ روش اجرای پژوهش ۴۱
۳-۲ مواد و روشها ۴۲
۳-۲-۱ بررسی ژن *Cav-1* با کمک روشهای بیو انفورماتیک ۴۲
۳-۲-۱-۲ بررسی ناحیه پروموتر ۴۲
۳-۲-۲-۳ بررسی ناحیه بالا دست ژن ۴۳
۳-۲-۲ استخراج DNA از خون با روش نمک اشباع ۴۳
۳-۲-۲-۱ مواد مورد نیاز ۴۳
۳-۲-۲-۲ روش استخراج DNA از خون با نمک اشباع ۴۴
۳-۲-۳ استخراج DNA از نمونه های تومور ۴۵
۳-۲-۳-۱ روش فنل/کلروفرم ۴۵
۳-۲-۳-۲ استخراج DNA با استفاده از کیت ۴۶
۳-۲-۴ Polymerase Chain Reaction (PCR) ۴۶
۳-۲-۴-۱ مواد لازم جهت واکنش ۴۶
۳-۲-۴-۲ واکنش PCR ۴۸
۳-۲-۵ تهیه ژل پلی آکریلامید ۴۸
۳-۲-۵-۱ مواد لازم جهت تهیه ژل پلی آکریلامید ۴۸
۳-۲-۵-۲ وسایل مورد نیاز ۴۹
۳-۲-۵-۳ تهیه ژل پلی اکریلامید ۸٪ ۴۹
۳-۲-۶ ساخت بافر بار گذاری ۴۹
۳-۲-۷ روش بار گذاری ژل آکریلامید ۵۰
۳-۲-۸ الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ۵۰
۳-۲-۹ رنگ آمیزی ژل آکریل آمید به روش نیترات نقره ۵۰
۳-۲-۹-۱ مواد مورد نیاز برای رنگ آمیزی نیترات نقره ۵۰
۳-۲-۹-۲ وسایل مورد نیاز برای رنگ آمیزی ۵۰
۳-۲-۹-۳ روش رنگ آمیزی ۵۱
۳-۲-۱۱ Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) ۵۱
۳-۲-۱۱-۱ مواد مورد نیاز ۵۱
۳-۲-۱۱-۲ وسایل لازم برای الکتروفورز SSCP ۵۱
۳-۲-۱۱-۳ طرز تهیه ژل SSCP ۵۲
۳-۲-۱۱-۴ روش انجام SSCP ۵۲
۳-۲-۱۲ Sequencing ۵۳

فصل چهارم: نتایج تحقیق ۵۴
۴-۱ بررسی ژن *Cav-1* با کمک روشهای بیو انفورماتیک ۵۵
۴-۱-۱ جستجوی توالی کامل ژن همراه با SNPهای مربوط به آن و جستجوی توالی mRNA و پروتئین ۵۵
۴-۱-۲ جستجوی ناحیه بالا دست ژن ۵۵
۴-۱-۳ بررسی ناحیه پروموتر ۵۶
۴-۱-۴ بررسی پروتئین Caveolin-1 ..... ۵۶
۴-۲ نتیجه استخراج DNA از نمونه های بیمار ۵۸
۴-۳ PCR نمونه ها برای ژن *Cav-1* ۵۹
۴-۴ SSCP نمونه ها ۶۰
۴-۴-۱ SSCP ۶۰
۴-۴-۲ نتایج مربوط به SSCP و تعیین توالی قطعات مربوط به پروموتر ژن *cav-1* در نمونه های بیمار و کنترل ۶۱
۴-۴-۲-۱ SSCP در نمونه های بیمار ۶۱
۴-۴-۲-۲ SSCP در نمونه های کنترل ۶۱
۴-۴-۳ شناسایی یک ناحیه تکراری در بالا دست ژن Cav-1 در نمونه های بیمار و کنترل ۶۲
۴-۴-۳-۱ PCR در نمونه های کنترل ۶۲
۴-۴-۳-۲ PCR در نمونه های بیمار ۶۴
۴-۴-۳-۳ Sequencing نمونه های هموزیگوت برای ناحیه تکراری بالا دست ژن *Cav-1* ۶۵

۴-۵ تجزیه وتحلیل آماری ۶۸
۴-۵-۱ نتایج مربوط به بررسی پروموتر و اگزون های ژن *Cav-1* ۶۸
۴-۵-۲ بررسی ناحیه تکرار در بالا دست ژن *Cav-1* ۶۸
۴-۵-۲-۱ نتایج بررسی طول ناحیه تکراری در جمعیت کنترل و بیمار ۶۸
۴-۵-۲-۲ نتایج بررسی نواحی Hot Spot در جمعیت کنترل و بیمار ۷۲
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ۷۴
منابع ۷۸

فهرست جداول

جدول **صفحه**

جدول ۱-۱ : شیوع استاندارد شده با سن و سرطان پستان (۱۹۸۹) در ۱۰۰،۰۰۰ زن ۲
جدول ۱-۲: دسته بندی سرطان پستان از نظر ویژگیهای پاتولوژیک ۱۶
جدول ۲-۲: اساس مرحله بندی در سیستم TNM ۱۷
جدول ۳-۲: نحوه مرحله بندی در سیستم TNM ۱۸
جدول ۴-۲: تغییر بیان *caveolin-1* در انواع مختلف تومورهای انسان ۳۵
جدول ۵-۲: آنکوپروتئین های سلولی که سبب کاهش بیان Cav-1 می شوند ۳۶
جدول ۱-۳: تعریف عملیاتی متغییر ها و مقیاس اندازه گیری ۴۱
جدول ۲-۳: توالی پرایمر های مورد استفاده در این مطالعه ۴۷
جدول ۳-۳: شرایط مناسب برای تکثیر هر قطعه ۴۸
جدول ۴-۳: ولتاژ و مدت زمان الکتروفورز ژل SSCP برای هر یک از قطعات ۵۳
جدول ۱-۴: نتایج مربوط به OD (Optical Density) و غلظت نمونه های تومور پستان اسپورادیک ۵۸
جدول ۲-۴: خصوصیات و ویژگیهای هیستو پاتولوژیک نمو نه های تومور ۵۹
جدول ۳-۴: توزیع گروههای مورد مطالعه در ژن *Cav-1* ۶۸
جدول ۴-۴: فراوانی آلل 122 bp در میان ۲۰۰ آلل کنترل و ۱۰۴ آلل بیمار ۶۹
جدول ۵-۴: فراوانی آلل 118 bp در میان ۲۰۰ آلل کنترل و ۱۰۴ آلل بیمار ۶۹
جدول ۶-۴: فراوانی آلل 114 bp در میان ۲۰۰ آلل کنترل و ۱۰۴ آلل بیمار ۷۰
جدول ۷-۴: فراوانی آلل 110 bp در میان ۲۰۰ آلل کنترل و ۱۰۴ آلل بیمار ۷۰
جدول ۸-۴: فراوانی آلل 106 bp در میان ۲۰۰ آلل کنترل و ۱۰۴ آلل بیمار ۷۰
جدول ۹-۴: فراوانی آلل 102 bp در میان ۲۰۰ آلل کنترل و ۱۰۴ آلل بیمار ۷۰
جدول ۱۰-۴: تعداد تکرارهای مربوط به سه ناحیه پلی مورفیسم در بالا دست ژن ۷۱
جدول ۱۱-۴: انواع هاپلوتیپ ها ی یافت شده در جمعیت کنترل و بیمار ۷۲
جدول ۱۲-۴: تعداد و فراوانی جهش ها در ۵۶ آلل بررسی شده ۷۳
جدول ۱۳-۴: تعداد و فراوانی جهش ها در ۵۶ آلل بررسی شده ۷۳

فهرست نمودارها

نمودار **صفحه**

دیاگرام ۱-۲: نمایی از یافته های به دست آمده از ارزیابی توده های پستانی ۱۵
دیاگرام ۲-۲: مقایسه بین المللی بروز استاندارد شده با سن زنان مبتلا به سرطان پستان در سالهای ۱۹۹۳ تا ۱۹۹۷ ..... ۱۹
دیاگرام ۳-۲: انواع ژ نهای منتقل شده در مطالعات clinical trial ۳۸
دیاگرام ۱-۴: فراوانی آلل ها بر حسب طول الل در جمعیت کنترل و بیمار ۶۹

فهرست تصاویر

شکل **صفحه**

شکل ۱-۱: مکانیسم LOH و نقش آن در ایجاد تومور ۵
شکل ۱-۲: تصویر شماتیک پستان ۱۳
شکل۲-۲: ساختار Caveolae و محل قرار گیری Caveolin-1 در این ساختار ۳۳
شکل ۳-۲: ساختار پروتئین Caveolin-1 و دمین های آن ۳۳
شکل ۱-۳: سازماندهی ژن Cav-1 و نواحی تکراری ۴۷
شکل ۱-۴: محل نواحی تکراری در بالادست ژن *Cav-1* ۵۵
شکل ۲-۴: توالی تکراری بالا دست ژن *Cav-1* و محل پرایمرهای طراحی شده برای این ناحیه ۵۶
شکل ۳-۴: مقایسه پروتئین *Caveolin-1* در پنج گونه مختلف ۵۷
شکل ۴-۴: PCR نمونه ها ۶۰
شکل ۵-۴: SSCP کل قطعات مربوط به *Cav-1* ۶۰
شکل ۶-۴: نتایج مربوط به *Cav-1*.PRO2 در نمونه های سالم ۶۱
شکل ۷-۴: نتایج مربوط به ناحیه تکرار در نمونه های کنترل ۶۲
شکل ۸-۴: توالی ناحیه تکراری ۶۳
شکل ۹-۴: توالی ناحیه تکراری ۶۴
شکل ۱۰-۴: PCR ناحیه تکراری در نمونه های بیمار ۶۵
شکل ۱۱-۴: تولی تکراری بالادست ژن *Cav-1* ۶۵
شکل ۱۲-۴: یک نمونه Sequencing ناحیه تکراری ۶۶
شکل ۱۳-۴: توالی Sequence شده مربوط به توالی تکراری ۶۷
شکل ۱۴-۴: توالی Sequence شده مربوط به توالی تکراری ۶۷

فصل اول:

کلیات تحقیق

۱-۱ بیان مسئله

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان بوده، دومین علت شایع مرگ‌های ناشی از سرطان در کشورهای پیشرفته است. درآمریکای شمالی و اروپا کارسینومای پستان ۲۵٪ از کل سرطان‌های زنان را شامل می‌شود و تقریباً عامل ۲۰٪ از مرگهای ناشی از سرطان در بین زنان است. بروز این بیماری به طور پیوسته در حال افزایش بوده، به طوری که از هرهشت زن یک نفر ممکن است مبتلا گردد (۱). در ایران شیوع آن ۱ در ۱۰ تا ۱۲ زن و نیز اولین علت مرگ ناشی از سرطان در بین زنان است. میزان ابتلای مردان به سرطان سینه در مقیاس جهانی ۱٪ کل مبتلایان بوده که این نسبت در ایران ۴٪ است (۲و۳). سن ابتلا در ایران ۱۰ سال پائینتر بوده، در بین زنان ایرانی هر ساله حدود ۷۰۰۰ مورد جدید مبتلا به سرطان یافت می شود و مجموعا ۴۰ تا ۵۰ هزار بیمار مبتلا در سال وجود دارد (۲و۳).

جدول ۱-۱ : شیوع استاندارد شده با سن و سرطان پستان (۱۹۸۹) در ۱۰۰,۰۰۰ زن (۴).

کشور	شیوع	مرگ
ایالات امریکا	۷۰-۹۰	۳۳/۵
سوئد	۶۰/۷	۱۸/۱
بریتانیا	۵۵/۰	۵۳/۴
استرالیا	۵۰/۲	۲۸/۴
ژاپن	۲۲/۰	۹/۲

سرطان پستان از نظر توارث به دو دسته ارثی (خانوادگی) و غیر ارثی (اسپورادیک[1]) تقسیم می شود. پنج تا ده درصد کل سرطانهای پستان از نوع ارثی و سایر موارد غیر ارثی هستند.

جهش در ژن های *BRCA1* و *BRCA2*[2] باعث ۸۰٪ از انواع ارثی سرطان پستان می شود و نیز ژن *P53* که عامل ژنتیکی ۵۰٪ از کل سرطان‌ها می باشد یکی از ژنهای مهم در سرطان پستان ارثی است (۴).

یک دسته مهم از ژنهایی که با سرطان پستان غیر ارثی مرتبط هستند، ژنهای سرکوبگر تومور (TSG[3]) می باشند که در مراحل مختلف سیکل سلولی نقش داشته، از تکثیر بدون کنترل سلول

---

[1]. Sporadic
[2]. Breast cancer 1 and 2
[3]. Tumor Suppressor Genes

جلوگیری می کنند. هر گاه هر دو آلل این ژنها غیر فعال شوند، سلول به سمت اختلال در تکثیر و سرطانی شدن پیش می رود. LOH[4] یکی از مکانیسمهای غیر فعال شدن آللی در این ژنها است (۵).

محل ژن *Cav-1* در سرطان ها به کرات دچار *LOH* می گردد. حذف ناحیه q31.1 در کروموزوم شماره ۷ انسان (جایگاه *Cav1*) در بسیاری از انواع سرطان ها مشاهده شده است. همچنین کاهش و یا عدم بیان *Cav-1* نیز در بسیاری از سرطان ها دیده شده است. مطالعات LOH بر روی ژنوم و بررسی میزان LOD score در افراد مبتلا به سرطان پستان نشان می دهد که ناحیه 7q31.1 دارای بالاترین میزان LOH است (۶).

پروتئین های Caveolin خانواده ای از پروتئین هایی هستند که درون ساختارهای حفره مانندی به نام Caveolae در غشاء سیتوپلاسمی قرار دارند. ساختار Caveolae در سال ۱۹۵۳ شناسایی شد. این ساختار در بسیاری از انواع سلولها به ویژه در سلول های فیبروبلاست، چربی، اندوتلیال، اپی تلیال، و سلول های ماهیچه ای صاف و مخطط به فراوانی یافت می شود (۷). در این ساختار حفره مانند کلسترول، اسفنگولیپید و Caveolin ها به میزان زیادی وجود دارند. در ژنوم انسان سه ژن جزء خانواده Caveolin هستند که این سه ژن عبارتند از: *Cav-1*، *Cav-2* و *Cav-3*. ژن *Cav-1* دارای سه اگزون می باشد در حالی که *Cav-2* دارای دو اگزون است. این دو ژن با هم بیان می شوند و یک هترواليگومر را ایجاد می کنند. بیان بالای *Cav-1* و *Cav-2* در سلول های اندوتلیال، چربی و پنوموسیت های تیپ ۱ دیده می شود. در سلول های ماهیچه صاف به طور استثناء هر سه ژن Caveolin بیان می شود (۸).

از بین این سه ژن *Cav-1* از اهمیت ویژه ای برخوردار است. *Cav-1* در رشد و تمایز بافت پستان نقش مهمی دارد و به عنوان تنظیم کننده میزان کلسترول عمل می کند. *Cav-1* به عنوان یک تومور ساپرسور در غیر فعال کردن مسیرهای درون سلولی از قبیل Her/Neo، EGFR و PDGFR تیروزین کیناز، مسیرهای آبشاری Ras/P42/44 MAP Kinase، تعدادی از پروتئین های مسیر PI-3-Kinase، پروتئین های هتروتریمری متصل به گوانین (G protein; Src-like Kinases) ، پروتئین کیناز C آلفا و Ras وابسته به GTPase و NO نقش دارد. بیان این ژن در سلول های سرطانی *in-vitro* باعث ۵۰٪ کاهش تقسیم سلولی و محدود شدن استعداد متاستاز در آنها می شود (۹).

اکنون از Cav-1 به عنوان یک پروتئین مارکر برای فرایندهای مختلف سلولی از قبیل اندوسیتوز، هومئوستازی لیپید، سیگنال ترانسداکسیون و توموری شدن سلول ها استفاده می شود. حذف ناحیه q31.1 در کروموزوم شماره ۷ انسان(جایگاه *Cav-1*) در بسیاری از انواع سرطان ها دیده می شود.

---

[4] . loss of heterozygosity

همچنین کاهش و یا عدم بیان *Cav-1* نیز در بسیاری از سرطان ها دیده می شود مانند سرطان پستان، تخمدان،کولون ، کلیه و گردن و دهانه رحم. مطالعات LOH بر روی ژنوم و بررسی میزان LOD score در افراد مبتلا به سرطان پستان نشان می دهد که ناحیه 7q31 دارای بالاترین میزان LOH است (-Log=17.76) (۶). در واقع با کاهش بیان *Cav-1* در سلول های سرطانی، فعالیت پروتئین های EGF و H-Ras افزایش می یابد. آزمایشات صورت گرفته بر روی موش های فاقد ژن *Cav-1* باعث بروز علائم زیر می شود:

۱. عدم وجود ساختار Caveolae ۲. کاهش میزان پروتئین Cav-2 ۳. وجود ناهنجاری در ریه ۴. نقص در چرخه سلولی و توموری شدن سلول ها ۵. نقص در فرایند اندوسیتوز ۶. نقص در هومئوستازی لیپید ۷. نقص در vasoregulation (۹).

در مطالعات اخیر مشخص شده است که Cav-1 بر روی BRCA1 نیز تاثیر می گذارد. پروتئین BRCA1 یک تومور ساپرسور فرضی است که موتاسیون در آن می تواند در ایجاد سرطان پستان خانوادگی و سرطان تخمدان در سنین جوانی تاثیرگذار باشد (۱۰). این پروتئین در فعالیت های ترمیم DNA، کنترل رونویسی، رشد سلول، و آپوپتوزیس نقش دارد (۱۱). نتایج آزمایشات نشان می دهد که Cav-1 باعث تنظیم مقدار mRNA و پروتئین BRCA1 می شود. همچنین بر پروموتر این ژن و همچنین بر محل قرارگیری این پروتئین در داخل هسته نیز تاثیر می گذارد (۱۲).

لازم به ذکر است که ارتباط این ژن با سرطان پستان، سرطان پانکراس، سرطان رحم، آلزایمر، دیستروفی عضلانی و دیابت مشخص شده است (۷، ۱۳، ۱۴ و ۱۵).

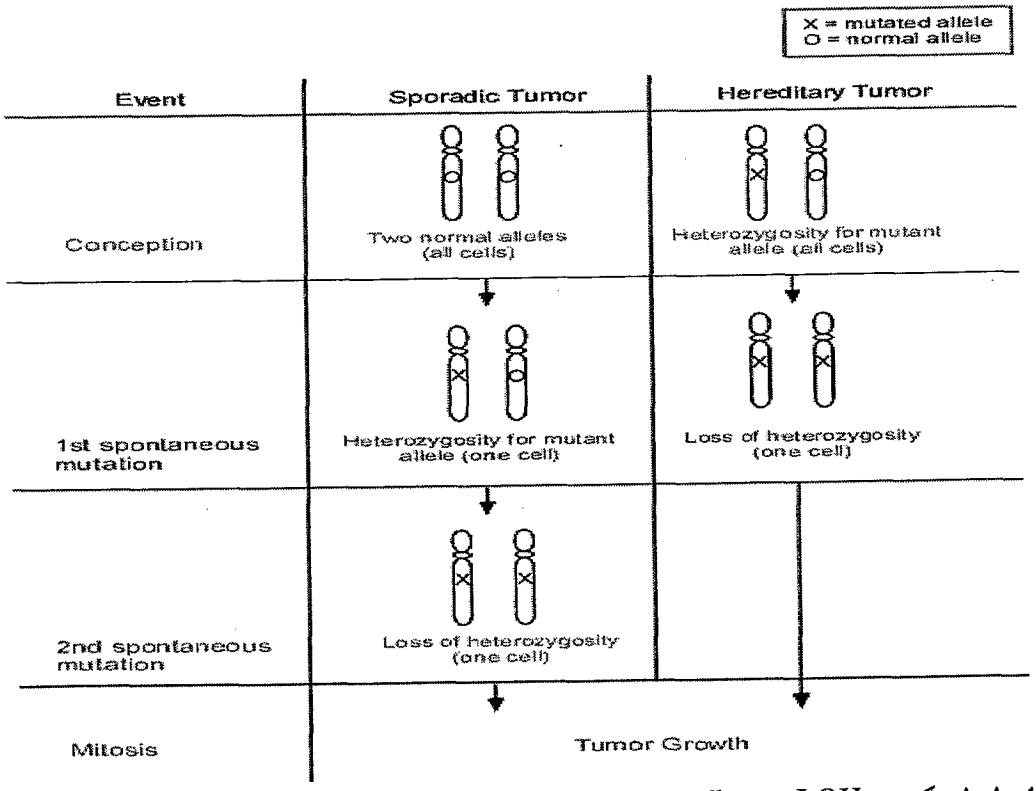
۱-۲ اهمیت و ضرورت

ژن *Cav-1* از نوع ژنهای سرکوب کننده تومور می باشد. لذا بررسی و شناخت این ژن احتمالاً می تواند در پیش آگهی، تشخیص و درمان سرطان پستان که در جامعه ایران شایع است، بکار آید. در ضمن، با توجه به اختلافات ژنتیکی جمعیت ایران با جمعیت هایی که قبلاً بررسی شده اند، امکان شناسایی موتاسیون های جدید در منطقه کد کننده وجود دارد. همچنین با بررسی ناحیه بالادست این ژن که برای اولین بار در دنیا صورت می گیرد، امید است رابطه ای بین پلی مورفیسم های این نواحی و تغییر بیان *Cav-1* در سلول های سرطانی یافت.

۱-۳ تعریف واژه ها

۱-۳-۱ LOH[5]

به از دست رفتن قسمتی از سهم یکی از والدین از ژنوم در یک سلول گفته می شود. معمولا به طور رایج در سرطان اتفاق می افتد و اغلب مبنی بر وجود یک ژن سرکوبگر تومور در یک ناحیه حذف شده می باشد. همان طور که گفته شد اولین کپی حذف شده و کپی باقی مانده بیشتر اوقات به وسیله جهش نقطه ای غیر فعال می شود. این پدیده به وسیله مکانیسم های متفاوتی شامل حذف[6]، نوترکیبی میتوزی[7]، *Gene conversion* و از دست رفتن کروموزومی[8] به وجود می آید (۱۶) (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱: مکانیسم LOH و نقش آن در ایجاد تومور(۱۶).

[5] . Loss of heterozygosity
[6] . Deletion
[7] . Mitotic recombination
[8] . Chromosome loss

۱-٤ هدف از اجرای تحقیق

۱-۴-۱ اهداف کلی

- تعیین جهش ها و SNP[9]های شناخته شده عملکردی[10] در ناحیه کد کننده ژن *Cav-1* و یافتن واریاسیون های[11] منطقه پروموتر[12] در جمعیت زنان ایرانی مبتلا به تومور پستان اسپورادیک در نمونه های ارجاع شده به بیمارستان مهراد تهران از مهر ۸۵ تا مهر ۸۶ و همچنین بررسی فراوانی آن در جمعیت کنترل (در صورت وجود واریاسیون در نمونه های بیمار).
- بررسی توالی های پلی مورفیک داخل و خارج از ژن و بررسی ارتباط احتمالی این پلی مورفیسم ها با سرطان پستان.

۱-۴-۲ اهداف فرعی

تعیین هاپلوتیپ ها و فراوانی هاپلوتیپ ها در نواحی پلی مورفیک احتمالی و تعیین انواع آلل ها برای این ناحیه.

۱-۴-۳ اهداف کاربردی

عوامل ژنتیکی شناسایی شده در این تحقیق می توانند جهت تعیین پیش آگهی، تشخیص زود هنگام و درمان بیماری به کار روند.

۱-۵ فرضیه

فرضیه تحقیق پیشنهادی فوق این است که با توجه به نقش عملکردی ژن *Cav-1* در هماهنگ سازی و انتقال سیگنال های مهم در رشد و تمایز سلولی به داخل سلول و نیز نرخ بالای LOH در لوکوس این ژن، تغییر توالی های این ژن منجر به بروز سرطان پستان اسپورادیک در بخشی از جمعیت زنان ایرانی می گردد.

---

[9]. single nucleotide polymorphism
[10]. fuctional
[11]. variation
[12]. promoter