View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk

brought to you by CORE

provided by kashan university of medical sciences

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 13:57 +0330 on Saturday November 11th 2017

Original Article

Study of genetic variations of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 4 in Iranian women with breast cancer

Arezi P, Rezvani Z*

Department of Biotechnology, Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, I. R. Iran.

Received December 8, 2016; Accepted June 1, 2017

Abstract:

Background: Breast cancer is the second reason of death in women population all around the world. One out of every eight women will be diagnosed with breast cancer in Iran. So, finding some clinical markers for prediction of cancer in the early stage is too important. There are many causes for cancer that mutation in the mitochondrial genome is one of the reasons, which had been observed in most breast cancer studies. The aim of this study was to evaluate the genetic region of ND4 in patients with breast cancer.

Materials and Methods: This cross-sectional study was conducted on 60 women with breast cancer and 28 healthy women. DNA was extracted from paraffin blocks, the area mtND4 (11646-11860) was amplified by polymerase chain reaction, then the SSCP analysis was used to investigate different conformations between normal and cancer samples. Finally, each sample with different conformation was sequenced.

Results: In this study, the sequence of mtND4 in 24 suspected patients was determined and 15 nucleotide changes were reported. the most variations was related to the G11719A polymorphism site. Other changes included 11803delT, G11717A, C11735T, C11716G, C11702T and A11812G.

Conclusion: The findings of this study show new genetic changes in the mtND4. So, further studies are required to examine the role of these mutations to detect early breast cancer.

Keyword: Breast cancer, Mitochondrial DNA, ND4, Mutation

* **Corresponding Author.**
Email: rezvani@kashanu.ac.ir
Tel: 0098 913 276 4145
Fax: 0098 31 559 12397

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, October, 2017; Vol. 21, No 4, Pages 367-375

Please cite this article as: Arezi P, Rezvani Z. Study of genetic variations of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 4 in Iranian women with breast cancer. ***Feyz*** 2017; 21(4): 367-75.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 13:57 +0330 on Saturday November 11th 2017

بررسی تغییرات ژنتیکی زیرواحد چهارم آنزیم NADH دهیدروژناز میتوکندری در زنان ایرانی مبتلا به سرطان پستان

پرستو عارضی [۱]، زهرا رضوانی [۲*]

خلاصه:

سابقه و هدف: سرطان پستان دومین عامل مرگ‌ومیر در جمعیت زنان در تمام دنیا است؛ به‌طوری‌که در ایران از هر هشت زن یک نفر به سرطان پستان مبتلا می‌شود. بنابراین پیدا کردن مارکرهای جدید برای تشخیص سرطان در مراحل اولیه اهمیت زیادی دارد. بروز سرطان علل مختلفی دارد که جهش در ژنوم میتوکندری یکی از دلایلی است که در بیشتر مطالعات مربوط به سرطان پستان مشاهده شده است. هدف از این مطالعه بررسی ژنتیکی ناحیه ND4 میتوکندری در بیماران مبتلا به سرطان پستان است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مقطعی روی ۶۰ زن مبتلا به سرطان پستان و ۲۸ زن سالم انجام شد. پس از استخراج DNA از بلوک‌های پارافینی، ابتدا ناحیه mtND4 (۱۱۸۶۰-۱۱۶۴۶) توسط تکنیک PCR تکثیر شد، سپس از تکنیک SSCP برای شناسایی تفاوت‌های ساختاری بین نمونه‌های سالم و سرطانی استفاده شد. در نهایت نمونه‌هایی که تفاوت ساختاری نشان دادند، برای توالی‌یابی ارسال شد.

نتایج: در این مطالعه با تعیین توالی ناحیه mtND4 در ۲۴ نمونه مشکوک ۱۵ تغییر نوکلئوتیدی گزارش شد. از این تغییرات، بیشترین تغییر مربوط به G11719A بود. سایر تغییرات عبارت بودند از 11803delT, G11717A, C11735T, C11716G, C11702T, A11812G.

نتیجه‌گیری: باتوجه به مشاهده تغییرات ژنتیکی جدید در ناحیه mtND4، نقش تشخیصی این موتاسیون‌ها برای تشخیص اولیه سرطان پستان در زنان ایرانی نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، ژنوم میتوکندری، ND4، جهش

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۴ مهر و آبان ۱۳۹۶، صفحات ۳۷۵-۳۶۷

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در دنیا است. کشورهای آسیایی از جمله ایران آمار روبه افزایش افراد مبتلا به سرطان پستان را اعلام می‌کنند. بر طبق مطالعات اخیر، ۶۱۶۰ مورد سرطان پستان هرساله گزارش می‌شود که حدود ۱۰۶۳ مورد آن منجر به مرگ می‌شود. نرخ جدید ابتلا به سرطان پستان حدود ۱۵۰۰۰ مورد تا سال ۲۰۳۰ پیش‌بینی شده است [۱]. براساس نُه سال مطالعه دکتر کاسئیان و همکارانش، نرخ مرگ‌ومیر در گروه سنی ۱۵ تا ۴۴ ساله بیشتر است و حدود ۱۰/۳ درصد پیش‌بینی‌شده است [۲]. میتوکندری انسان شامل ماده ژنتیک دو رشته‌ای مستقل است که ۱۳ پروتئین زنجیره تنفسی، ۲ rRNA و ۲۲ tRNA را کد می‌کند [۴،۳]. ND4 (۱۱۸۶۰-۱۱۶۴۶) یکی از زیرواحدهای زنجیره تنفسی است که نقص در آن در بسیاری از سرطان‌ها مانند سرطان تخمدان [۵]، کولون [۶] و لوسمی [۷] گزارش شده است.

ارتباط نقص در عملکرد میتوکندری و بروز سرطان برای اولین‌بار توسط Otto Warburg بیان شد. او مشاهده کرد سلول‌های سرطانی حتی در حضور اکسیژن، لاکتات زیادی تولید می‌کنند که آن را گلیکولیز هوازی نامید و امروزه به آن اثر واربرگ گویند [۹،۸]. بیان متفاوت میتوکندری در سرطان‌ها، شامل انواع جهش‌های نقطه‌ای، پلی‌مورفیسم‌ها، ریزماهواره‌ها و واردشدگی‌ها است [۴]. در میتوکندری طی واکنش زنجیره تنفسی در حین جابه‌جایی الکترون، ممکن است الکترون به یک مولکول O2 منتقل شود و رادیکال اکسیژن ($O_2^{\bullet}$) ایجاد شود. تعادل بین تولید و تجزیه گونه‌های فعال اکسیژن در سلول از اهمیت بالایی برخوردار است. هنگامی‌که این تعادل از بین برود رادیکال‌های آزاد در سلول تجمع یافته و باعث اختلال در زنجیره تنفسی می‌شوند [۱۳-۱۰]. ازآنجایی‌که ژنوم میتوکندری عاری از پروتئین‌های محافظ هیستونی است، تجمع رادیکال‌های آزاد به‌سادگی باعث ایجاد جهش در ژنوم میتوکندری می‌شود [۱۳]. یکی دیگر از عملکردهای مهم میتوکندری شرکت در فرآیند آپوپتوز است. در صورت اختلال در عملکرد میتوکندری این فرآیند نیز مختل می‌شود؛ بدین‌صورت سلول‌های سرطانی مقاوم به مرگ سلولی دچار آپوپتوز می‌شوند [۱۴،۱۱]. طی ۲۰ سال گذشته تلاش‌های زیادی برای درمان سرطان و پیدا کردن مارکری مناسب برای تشخیص

[۱] دانشجو کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده شیمی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه کاشان

[۲] دکتری ژنتیک مولکولی، دانشکده شیمی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه کاشان

* نشانی نویسنده مسئول:

دانشگاه کاشان، دانشکده شیمی، گروه بیوتکنولوژی

تلفن: ۰۹۱۳۲۷۶۴۱۴۵ دورنویس: ۰۳۱ ۵۵۹۱۲۳۹۷

پست الکترونیک: Rezvani@kashanu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۸ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۶/۳/۱۱

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 13:57 +0330 on Saturday November 11th 2017

این بیماری انجام شده است، اما هم‌چنان درمان سرطان پستان با نقص‌هایی روبه‌رو است. ازاین‌رو باتوجه به نرخ بالای سرطان پستان در ایران و کاهش سن ابتلا به آن، پیدا کردن مارکرهای مناسب برای تشخیص زودهنگام از اهمیت فراوانی برخوردار است. مطالعات اخیر در مورد سرطان پستان نشان داده‌اند در اغلب موارد میتوکندری سلول‌های سرطانی دچار جهش می‌شوند [۱۵]. بنابراین ما در این مطالعه تغییرات ناحیه mtND4 در بافت افراد سالم و سرطانی را مورد بررسی قرار دادیم. هم‌چنین، ارتباط برخی فاکتورهای بالینی با بروز سرطان پستان بررسی شد. این ناحیه از آنجایی برای ما اهمیت داشت که تاکنون مطالعه مشابهی در ایران انجام نشده و جهش‌های آن در جمعیت ایران به ثبت نرسیده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

این مطالعه مقطعی روی ۶۰ بلوک پارافینی اخذ شده از افراد مبتلا به سرطان پستان بدخیم ایرانی‌الاصل و ۲۸ بلوک پارافینی بافت سالم که در طی سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۵ به آزمایشگاه دکتر مهاجر، اصفهان مراجعه کرده بودند، با رضایت فردی جمع‌آوری شد. اطلاعات بالینی بیماران شامل سن، گیرنده استروژن (ER)، گیرنده پروژسترون (PR) و HER-2 از پرونده‌ی بیماران استخراج و ثبت گردید.

استخراج DNA ژنومی

ابتدا برش‌هایی به قطر ۱۰-۵ نانومتر از بلوک‌ها تهیه شد. بعد از پارافین‌زدایی و استفاده از محلول تجزیه‌کننده پروتئین به همراه پروتئیناز K، میکروتیوب‌ها حدود ۳ ساعت در حمام آب گرم انکوبه شدند. برای رسوب دادن پروتئین‌ها از روش فنل-کلروفرم-ایزوآمیل‌الکل استفاده شد [۱۶]. سپس، DNA که در فاز رویی قرار داشت، جدا شده و با اضافه کردن الکل ۱۰۰ درصد و استات سدیم، به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از سانتریفیوژ کردن و دور ریختن محلول رویی، میکروتیوب مجددا با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. در نهایت DNA در محلول Tris-EDTA حل شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد [۱۷]. غلظت و خلوص DNA استخراج شده با بررسی طیف جذبی در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مدل UV Spectrophtometer UV1800 شرکت Shimadzu/Japan مورد بررسی قرار گرفت.

انجام واکنش PCR

پرایمرهای مناسب برای تکثیر ناحیه مورد نظر ND4 میتوکندری (۱۱۸۶۰-۱۱۶۴۶) طبق مطالعات قبلی انتخاب شد [۱۹،۱۸]. در نهایت یک جفت پرایمر با توالی رفت و برگشت

5'-TCGTAGTAACAGCCATTCTC-3' (ONP12)
5'-GAGGTTAGCGAGGCTTGCTA-3' (ONP13)

به‌صورت لیوفیلیزه از شرکت فزابیوتک تهیه و طبق پروتکل شرکت به حجم رسانده شد. برای انجام واکنش PCR، ابتدا غلظت واکنش‌گرها در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر اختصاصی و ۲ میکروگرم از DNA ژنومی تنظیم گردید. پس از بهینه کردن شرایط مطلوب برای تکثیر ناحیه مورد نظر، برنامه واکنش PCR شامل ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه با دمای واسرشت ۹۵ درجه سانتی‌گراد، دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد و دمای گسترش ۷۲ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد روی دستگاه ترموسایکلر مدل my cycler شرکت Biorad/USA تنظیم گردید. درنهایت برای ارزیابی محصولات PCR، ۵ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۱ میکرولیتر رنگ فلورسانت روی ژل آگارز ۱/۵ درصد قرار داده شد و باندی به طول ۲۱۴ جفت باز مشاهده شد.

انجام تکنیک Single stranded conformation polymorphism (SSCP)

این تکنیک برای قطعاتی با طول ۱۵۰ تا ۲۵۰ جفت باز مناسب است که در آن تغییر پیکربندی نمونه‌های سالم نسبت به نمونه بیمار بررسی می‌شود [۲۱،۲۰]. پس از تهیه ژل پلی‌آکریل‌آمید ۶ درصد، ۵ میکرولیتر از محصولات PCR با ۲ میکرولیتر رنگ ترکیب شد. سپس، به‌منظور باز شدن دو رشته DNA، نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در نهایت با ولتاژ ۳۰۰ و دمای ۴ الی ۱۰ درجه سانتی‌گراد حدود یک ساعت الکتروفورز عمودی انجام شد [۲۲]. پس از رنگ‌آمیزی به روش نیترات نقره [۲۰]، در نهایت با مقایسه نمونه‌های بیمار و سالم، نمونه‌های مشکوک انتخاب شدند.

توالی‌یابی نمونه‌ها

تعداد ۲۴ نمونه مشکوک که از نظر موقعیت باندها با نمونه سالم تفاوت داشتند، برای توالی‌یابی به شرکت توپاز ژن کاوش ارسال گردید. آنالیز توالی‌های به‌دست‌آمده با توالی فرد نرمال با استفاده از نرم‌افزارهای ChromasPro 1.5.0.0 و BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) انجام یافت. در نهایت برای بررسی پلی‌مورفیسم از پایگاه

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 13:57 +0330 on Saturday November 11th 2017

www.mitomap.org و پایگاه داده SNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP) استفاده شد.

پیش‌بینی تغییرات در سطح پروتئین

خواص فیزیکی و بیوشیمیایی پروتئین ND4 به‌شرح زیر مورد بررسی قرار گرفت: این پروتئین دارای ۴۵۹ آمینو اسید است و به‌عنوان یکی از زیرواحدهای کمپلکس اول زنجیره فسفوریلاسیون اکسایشی در غشای داخلی میتوکندری قرار دارد. با استفاده از پایگاه داده TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0) این پروتئین به‌صورت مارپیچ‌های گذرنده از غشاء پیش‌بینی شد. برای بررسی پایداری پروتئین از پایگاه داده ProtParam (http://web.expasy.org/protparam) استفاده گردید. سپس با استفاده از پایگاه داده‌های PolyPhen-2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml) و PANTHER (www.pantherdb.org) تأثیر احتمالی تغییر یک آمینو اسید در ساختار و عملکرد پروتئین مورد نظر بررسی شده و به عنوان یک اثر خوش‌خیم یا بدخیم گزارش می‌شود [۲۳].

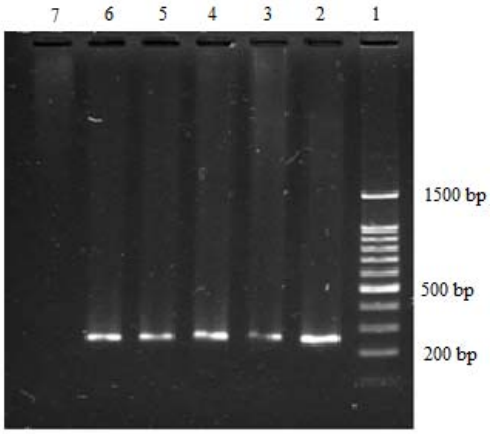
آنالیز آماری

مجموعه اطلاعات به‌دست‌آمده از هر بیمار به‌صورت جداگانه در چک لیست ثبت گردید و در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی نرخ بروز جهش و ارتباط آن با فاکتورهای پیش‌آگهی (سن، HER-2، PR، ER) از آزمون دقیق فیشر و لگاریتم خطی استفاده گردید و برای تمامی آزمون‌ها $P<۰/۰۵$ به‌معنی وجود تفاوت معنی‌دار درنظر گرفته شد.

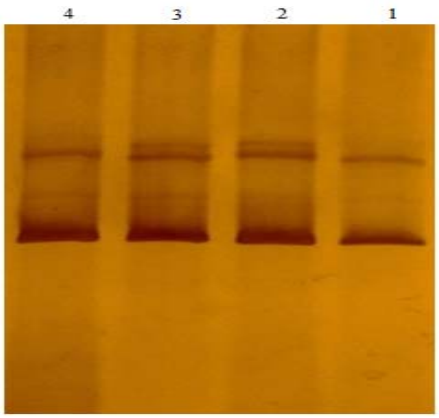
نتایج

در این تحقیق تعداد ۶۰ فرد بیمار و ۲۸ فرد سالم به عنوان شاهد مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج DNA ژنومی و انجام PCR، محصولات PCR به همراه مارکر استاندارد 100bp روی ژل آگارز الکتروفورز گردید و باند اختصاصی مورد نظر (۲۱۴ جفت باز) دیده شد (شکل شماره ۱). در مرحله بعد، برای بررسی تغییرات ژنتیکی از تکنیک SSCP استفاده شد. پس از اینکه قطعات دو رشته‌ای DNA به‌صورت تک‌رشته‌ای درآمد، روی ژل ۶ درصد آکریل‌آمید الکتروفورز گردید و با رنگ‌آمیزی نیترات نقره باندها مشاهده شدند. با مشاهده باند غیر نرمال روی ژل SSCP، این نمونه‌ها برای تعیین توالی ارسال شدند. باندهای غیر نرمال می‌توانند به‌صورت حضور یک باند جدید و یا حرکت یک باند باشند (شکل شماره ۲). نتایج حاصل از توالی‌یابی (شکل شماره ۳) با استفاده از نرم‌افزارهای ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه در ۲۴ نمونه مشکوک، ۱۵ تغییر نوکلئوتیدی شامل ۷ نوع تغییر مختلف (C11702T، C11716G، C11735T، 11803delT، G11717A، G11719A و A11812G) را نشان می‌دهد. تغییرات G11719A و A11812G قبلا گزارش‌شده، اما دیگر جهش‌ها تاکنون گزارش نشده‌اند. جدول شماره ۱ انواع جهش‌های مشاهده شده در بیماران را به‌طور خلاصه نشان می‌دهد. باتوجه به گزارش تغییرات نوکلئوتیدی جدید در این مطالعه، جهت بررسی تأثیر جهش‌ها بر ساختار پروتئین مربوطه ابتدا با استفاده از برنامه TMHMM 2.0 ساختار پروتئین به‌صورت مارپیچ گذرنده از غشاء پیش‌بینی شد. سپس، با استفاده از پایگاه داده ProtParam پایداری پروتئین در شرایط آزمایشگاهی حدود ۳۰ ساعت تخمین زده شد و لذا این پروتئین جزء پروتئین‌های پایدار طبقه‌بندی می‌شود. در نهایت با استفاده از وب‌سایت‌های PolyPhen-2 و PANTER بیماری‌زایی و تأثیرات این جهش‌ها در ایجاد بیماری پیش‌بینی شد که در جدول شماره ۲ بیان شده است. بر طبق اطلاعات بالینی ثبت شده از بیماران ۳۶/۷ درصد بیماران فاقد ER و ۶۱/۷ درصد ER مثبت بودند. هم‌چنین، ۴۱/۷ درصد بیماران فاقد PR و ۵۶/۷ درصد دارای PR بودند. در هر دو گروه ۳ فرد از نظر اطلاعات غایب بودند. از نظر HER-2، ۵۸/۳ درصد بیماران فاقد این گیرنده و ۳۳/۳ درصد دارای این گیرنده بودند و اطلاعات ۵ فرد در دسترس نبود (شکل شماره ۴). با استفاده از آزمون دقیق فیشر ارتباط بین جهش‌دار بودن یا نبودن با فاکتورهای ذکر شده بررسی شد. همان‌طور که در شکل شماره ۵ مشخص است، در هیچ‌کدام ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد ($P<۰/۰۵$). هم‌چنین، ارتباط بین سن بیماران با دیگر فاکتورها نیز سنجیده شد. مطابق شکل شماره ۶ ارتباطی بین سن و گیرنده استروژن و HER-2 دیده نشد، اما بین سن و مثبت بودن PR ارتباط معنی‌دار وجود داشت ($P=۰/۰۰۴$). برای بررسی هم‌زمان تمام عوامل بر بروز جهش از آزمون لگاریتم خطی استفاده شد که ارتباط معنی‌داری بین جهش‌زایی و دیگر فاکتورهای پیش‌آگهی مشاهده نشد ($P=۰/۳۴۸$).

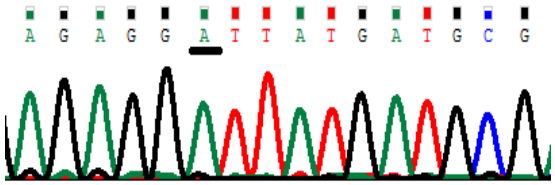
Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 13:57 +0330 on Saturday November 11th 2017



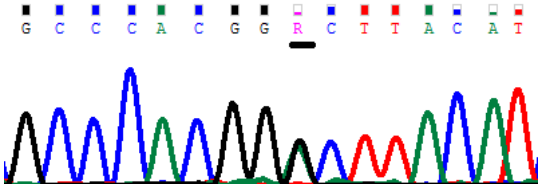
شکل شماره ۱- محصولات PCR تکثیر یافته با استفاده از پرایمرهای ONP12 و ONP13 به‌همراه مارکر 100 bp روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. ۱: مارکر؛ ۲، ۳ و ۵: ناحیه تکثیر شده ۲۱۴ جفت بازی در نمونه‌های بیمار؛ ۴ و ۶: ناحیه تکثیر شده ۲۱۴ جفت بازی در نمونه‌های سالم؛ ۷: کنترل منفی



شکل شماره ۲- آنالیز SSCP ناحیه mtND4 در نمونه‌های بیمار و سالم. ۱: نمونه بیمار بدون تغییر نوکلئوتیدی در ناحیهmtND4؛ ۲ و۳: نمونه‌های بیمار دارای تغییر نوکلئوتیدی در ناحیه mtND4؛ ۴: نمونه سالم



تغییر نوکلئوتید G11719A



تغییر نوکلئوتیدG11717A

شکل شماره ۳- برخی از نتایج حاصل از توالی‌یابی

جدول شماره ۱- تغییرات نوکلئوتیدی مشاهده شده در ناحیه mtND4 در زنان مبتلا به سرطان پستان به تفکیک بیماران و موقعیت تغییر به همراه تغییر نوکلئوتیدی

Patient no.	mtDNA position (CRS)	Nucleotide change	Amino acid change	Reference
C3	11719	G-A	G320G	5,6,15,28,30,32
C13	11719	G-A	G320G	5,6,15,28,30,32
	11716	C-G	H319Q	NR*
C14	11719	G-A	G320G	5,6,15,28,30,32
	11735	C-T	L326L	NR
C25	11812	A-G	L351L	5,30
C40	11803	CTT	delT	NR
C42	11719	G-A	G320G	5,6,15,28,30,32
C43	11719	G-A	G320G	5,6,15,28,30,32
C49	11719	G-A	G320G	5,6,15,28,30,32
C51	11702	C-T	L315F	NR
	11719	G-A	G320G	5,6,15,28,30,32
C52	11717	G-A	Stop	NR
C57	11717	G-A	Stop	NR
C58	11717	G-A	Stop	NR

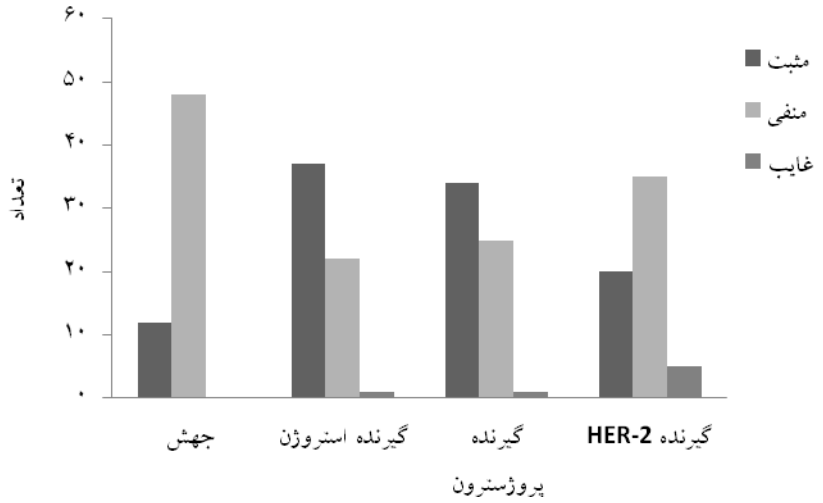
* گزارش نشده

جدول شماره ۲- بررسی تغییرات احتمالی واریانت‌های گزارش شده روی ساختار پروتئین مربوطه با استفاده از پایگاه داده‌های مختلف

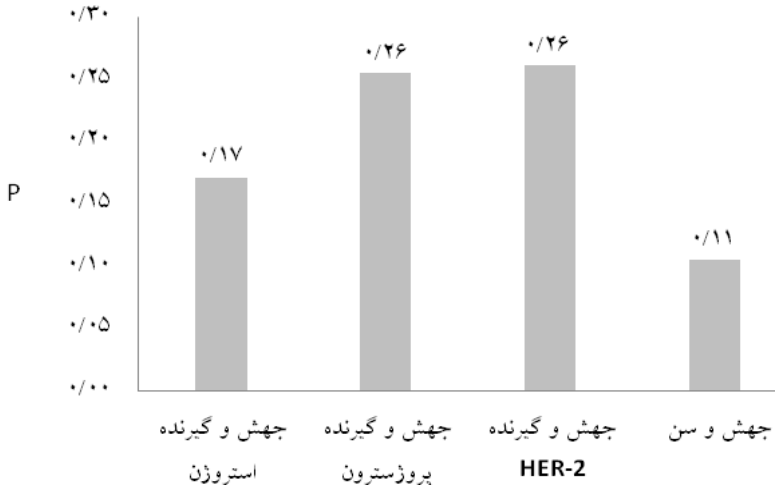
Locus	Amino acid change	Hom/ Het*	Polyphen		Panter	TMHMM
			Prediction	PSIC		
C11702T	F>L	Het	Probably Damaging	0.999	Possibly Damaging	Transmembrane
C11716G	Q>H	Het	Probably Damaging	0.999	Probably Damaging	Transmembrane
G11717A	Stop	Het	-	-	-	Transmembrane
G11719A	syn	Hom	-	-	Probably Damaging	Transmembrane
C11735T	syn	Het	-	-	probably Benign	Transmembrane
11803delT	del	-	-	-	-	Transmembrane
A11812G	syn	Het	-	-	Probably Benign	Transmembrane

* هموپلاستی/هتروپلاستی

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 13:57 +0330 on Saturday November 11th 2017



شکل شماره ۴- میزان درصد گیرنده استروژن، پروژسترون، HER-2، سن و جهش‌زایی در بیماران مورد مطالعه نمودار بیانگر تعدا افراد در هر گروه است. اطلاعات مرتبط با گیرنده استروژن و پروژسترون ۱ فرد در دسترس نبود. اطلاعات ۵ نفر از نظر گیرنده HER-2 در دسترس نبود.



شکل شماره ۵- ارتباط بین فاکتورهای پیش‌آگهی و جهش‌زایی در بیماران مورد مطالعه. ارتباط معنی‌داری بین بروز جهش در ناحیه ND4 با دیگر فاکتورها مشاهده نشد.

شکل شماره ۶- ارتباط بین فاکتورهای پیش‌آگهی و سن بیماران مورد مطالعه، ارتباط معنی‌داری بین سن افراد مبتلا با گیرنده‌های استروژن و HER-2 دیده نشد و تنها بین سن و گیرنده پروژسترون ارتباط معنی‌دار وجود داشت.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 13:57 +0330 on Saturday November 11th 2017

بحث

میتوکندری در چندین فعالیت فیزیولوژیک سلول مثل تولید ATP، تولید گونه‌های فعال اکسیژن، حفظ کلسیم داخل سلولی و تنظیم فرآیندهای مرگ سلولی نقش دارد. بنابراین، جای تعجب نیست که نقص در عملکرد میتوکندری در بیماری‌های مختلفی از جمله سندروم MELAS، LHON و بسیاری از بیماری‌های چندعاملی مثل دیابت و انواع سرطان‌ها گزارش شده است [۷،۲۴]. امروزه در حوزه سرطان‌شناسی مولکولی شناسایی جهش و پلی‌مورفیسم‌های میتوکندری به‌سرعت در حال پیشرفت است؛ به این علت که جهش‌های سوماتیک میتوکندری در بسیاری از سرطان‌ها شامل پستان، تخمدان، و پانکراس گزارش شده است. مطالعات زیادی بیان می‌کنند که شناسایی جهش‌های میتوکندری می‌تواند یکی از موفق‌ترین مارکرها جهت تشخیص سرطان پستان باشد. درنتیجه، شناسایی و آنالیز پلی‌مورفیسم‌های ژنوم میتوکندری در این زمینه اهمیت دارد [۲۵]. میتوکندری دارای ژن‌هایی است که در تنفس سلولی و تولید ATP نقش مهمی دارند. کمپلکس اول زنجیره تنفسی میتوکندری شامل ۴۴ زیرواحد مختلف است که ۷ زیرواحد ND1، ND2، ND3، ND4، ND4L، ND5 و ND6 توسط میتوکندری کد می‌شوند. کمپلکس اول نقطه ورود الکترون‌های NADH به زنجیره انتقال الکترون است؛ به‌عبارتی این کمپلکس نقطه آغاز زنجیره فسفوریلاسیون اکسیداتیو است. این کمپلکس در حفظ گرادیان پروتون نقش دارد که منجر به تولید ATP مورد نیاز برای دیگر واکنش‌ها می‌شود. جهش در ژن mtND4 به‌احتمال زیاد روی عملکرد زنجیره تنفسی تأثیر دارد و منجر به تغییر انرژی متابولیسم سلول می‌شود [۶]. جهش در ژنوم میتوکندری باعث نقص در عملکرد زنجیره انتقال الکترون و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن شده و درنتیجه باعث افزایش موتاسیون‌های انکوژنیک یا افزایش تکثیر سلولی می‌شود [۷]. در مطالعات مختلف بیان شده است که واریانت m.10398A>G و m.16519T>C با افزایش ریسک ابتلا به سرطان پستان مرتبط است. در جمعیت زنان آمریکایی-آفریقایی واریانت m.10398A>G افزایش ریسک سرطان پستان مهاجم را نشان می‌دهد. هم‌چنین، ارتباط واریانت‌های mtDNA با سرطان پانکراس نیز گزارش شده است [۲۶]. جهش در ND4 می‌تواند باعث مقاومت به سیس‌پلاتین شود و در روند شیمی‌درمانی اثر بگذارد؛ درنتیجه احتمالا شناسایی جهش در این ناحیه می‌تواند به شناسایی و درمان سریع‌تر سرطان پستان در آینده کمک کند [۲۷،۲۶]. در مطالعه حاضر نتایج حاصل از تعیین توالی ژنوم میتوکندری در ناحیه ND4 ۲۴ زن مبتلا به سرطان پستان، ۱۵ تغییر نوکلئوتیدی (۷ نوع) را در ۱۲ بیمار نشان داد. از نتایج به‌دست‌آمده ۳ موتاسیون همنام بودند که تغییری در کد آمینواسید ایجاد نمی‌کنند. در این مطالعه ۲ موتاسیون غیرهمنام یافت شد که احتمالا باعث نقص در عملکرد سیستم فسفو-ریلاسیون اکسایشی می‌شوند. سایر موتاسیون‌های ذکرشده نیز می‌توانند باعث تولید پروتئین غیر عملکردی یا کوتاه شده شوند. جایگزینی‌های غیرهمنام و تأثیر آن در پروتئین مربوطه با نرم‌افزارهای PolyPhen-2 و PANTHER سنجیده شد. پایگاه‌های داده ذکر شده تأثیر احتمالی تغییر یک آمینواسید را بر ساختار و عملکرد پروتئین موردنظر بررسی کرده و به‌صورت خوش‌خیم و یا بدخیم گزارش می‌کنند. از تغییرات گزارش شده، ۷ بیمار جهش G11719A را نشان دادند. این جهش در مطالعه‌ای که Czarnecka و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر کل ژنوم میتو-کندری در بیماران مبتلا به سرطان پستان انجام دادند، گزارش شده بود [۱۵]. این تغییر تأثیری در کد اسیدآمینه ایجاد نمی‌کند، اما به‌عنوان نقطه داغ در جهش‌های جایگزینی شناخته شده است [۲۸،۱۵]؛ زیرا بر اساس پیش‌بینی پایگاه داده PANTHER در منطقه حفاظت‌شده واقع شده است. هم‌چنین، در مطالعات گذشته بیان شده است که جهش در این ناحیه باعث کاهش تحرک اسپرم‌ها می‌شود [۲۹]. این جهش به‌عنوان شایع‌ترین جهش در بیماران مبتلا به کولیت اولسراتیو گزارش شده است [۶]. این تغییر در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان نیز مشاهده شده است [۵]. یک بیمار جهش A11812G را نشان داد که این تغییر نیز قبلا در افراد مبتلا به سرطان تخمدان و بیماری روانی گزارش شده بود [۳۰،۵]. این تغییر تأثیری در کد اسیدآمینه لوسین ایجاد نمی‌کند. تغییر C11702T در یک بیمار مشاهده شد که باعث تغییر آمینواسید L315F می‌شود و آمینواسید غیرقطبی لوسین با نقطه ایزوالکتریک ۶ به آمینواسید غیرقطبی فنیل‌آلانین با نقطه ایزوالکتریک ۵/۵ تبدیل می‌شود؛ این تغییر قبلا گزارش نشده بود. براساس نتایج پایگاه داده PolyPhen-2 این تغییر به‌صورت بدخیم گزارش شد. تغییر دیگری که در یک بیمار مشاهده شد، تغییر C11716G است که باعث تغییر آمینواسید H319Q می‌شود. آمینواسید هیستیدین دارای بار مثبت و نقطه ایزوالکتریک ۷/۶ است و آمینواسید قطبی گلوتامین دارای نقطه ایزوالکتریک ۵/۷ است؛ این تغییر نیز قبلا گزارش نشده بود. سه بیمار تغییر در G11717A را نشان دادند که کد اسیدآمینه غیرقطبی گلایسین را به کدون پایان تبدیل می-کند. یکی دیگر از تغییرات مشاهده شده، تغییر C11735T است که در یک بیمار مشاهده شد و تغییری در کد اسیدآمینه لوسین ایجاد نمی‌کند. این تغییر تأثیری در ساختار پروتئین ندارد و بر اساس پیش‌بینی پایگاه PANTHER به‌عنوان تغییری خوش‌خیم

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 13:57 +0330 on Saturday November 11th 2017

گزارش شد. و آخرین تغییر مشاهده شده حذف در ناحیه ۱۱۸۰۳ است که قبلا گزارش نشده است. از نظر آماری در این مطالعه هیچ ارتباط معنی‌داری بین نرخ جهش‌زایی و دیگر فاکتورهای ذکرشده، دیده نشد. بررسی‌های آماری در دیگر مطالعات نتایج زیر را بیان کرده‌اند: در سال ۲۰۱۴ غفارپور و همکاران مطالعه‌ای روی ناحیه ATPase6 و ATPase8 میتوکندری ۴۹ بیمار مبتلا به سرطان پستان انجام دادند و آن‌ها نیز ارتباط معنی‌داری بین خصوصیات بالینی و پاتولوژیکی بیماران و تغییرات ATPase مشاهده نکردند [۲۵]. هم‌چنین طبق مطالعه دیگری که در همان سال روی ۱۴ بیمار مبتلا به سرطان پستان در ناحیه D-Loop و زیرواحد اول سیتو-کروم‌اکسیداز C در جمعیت میزورام شمال هندوستان انجام شد، ارتباط معنی‌داری بین جهش‌های سوماتیک D-Loop و منفی بودن ER و PR مشاهده شد [۳۱]. مطالعه حاضر نشان می‌دهد ژن ND4 مستعد تغییرات ژنتیکی در سرطان پستان است و ممکن است نقش مهمی در ایجاد تومور داشته باشد. برخی از تغییرات در محلی است که از نظر ساختار و عملکرد پروتئین حائز اهمیت است؛ مانند تغییر C11702T که باعث تغییر اسیدآمینه لوسین به فنیل‌آلانین می‌شود و یا موقعیت C11716G که باعث تغییر اسید-آمینه هسیتیدین به گلوتامین شده و بر اساس پیش‌بینی پایگاه‌های ذکر شده به احتمال زیاد باعث بروز بدخیمی می‌شوند. هم‌چنین، پلی‌مورفیسم G11719A که در اکثر جمعیت‌ها گزارش شده است و حائز اهمیت است [۳۲،۱۵]. به‌دلیل حفاظت‌شدگی بسیار این ناحیه، می‌تواند باعث بروز بدخیمی شود. هرچند که مطالعات عملکردی گاهی اوقات ارتباط بین موتاسیون‌های mtDNA و تغییرات فنوتیپی را مشخص می‌کند، اما به‌طور کلی در موتاسیون‌های ژنوم میتوکندری بسیار مشکل است تا نقش یک جهش در ایجاد بیماری به‌خصوص در بیماری‌های چندعاملی مانند سرطان و دیابت مشخص شود، زیرا در این بیماری‌ها علاوه بر تغییرات mtDNA تغییر در ژنوم هسته و هم‌چنین عوامل محیطی نیز در ایجاد بیماری دخالت دارند و بسیاری از مواقع بیش از یک نوع تغییر نوکلئوتیدی در mtDNA گزارش می‌شود. مطالعه حاضر یافته‌های جدیدی در ارتباط با موتاسیون‌های ND4 ژنوم میتوکندری در سرطان پستان جمعیت ایران ارائه می‌دهد که نقش تشخیصی این موتاسیون‌ها برای تشخیص اولیه سرطان پستان نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعه حاضر، به‌نظر می‌رسد جهش در زیر-واحد چهارم آنزیم NADH دهیدروژناز میتوکندری می‌تواند باعث بروز سرطان شود که البته نیاز به تحقیقات بیشتر روی تمامی هاپلوگروه‌های ایران دارد. هم‌چنین، باید سابقه فامیلی، نوع رژیم غذایی و وزن افراد که در این مطالعه در دسترس نبود، در مطالعات آتی برای تأیید تأثیرات حاصل از جهش درنظر گرفته شود. به‌منظور معرفی جهش‌های میتوکندری به‌عنوان یک تست غربال‌گری در پیش‌آگهی سرطان، بهتر است مطالعه‌ای مشابه روی خون افراد مبتلا و سالم انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

از کارشناسان آزمایشگاه دکتر مهاجر و هم‌چنین سرکار خانم‌ها محمودی و دکتر وکیلی به‌خاطر همکاری در روند انجام این تحقیق صمیمانه تشکر می‌نماییم.

References:

[1] Kimiafar K, Sarbaz M, Sales SS, Esmaeili M, Ghazvini ZJ. Breast cancer patients' information needs and information-seeking behavior in a developing country. ***Breast*** 2016; 28: 156-60.

[2] Kasaeian A, Mosavi-Jarrahi A, Abadi A, Mahmoodi M, Mehrabi Y, Mohammad K, et al. Relative Survival of Breast Cancer Patients in Iran. ***Asian Pac J Cancer Prev*** 2014; 16(14): 5853-8.

[3] Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. ***Nature*** 2014; 505(7483): 335-43.

[4] Yadav N, Chandra D. Mitochondrial DNA mutations and breast tumorigenesis. ***Biochim Biophys Acta*** 2013; 1836(2): 336-44.

[5] Earp MA, Brooks-Wilson A, Cook L, Le N. Inherited common variants in mitochondrial DNA and invasive serous epithelial ovarian cancer risk. ***BMC Res Notes*** 2013; 6(1): 1.

[6] Dankowski T, Schröder T, Möller S, Yu X, Ellinghaus D, Bär F, et al. Male-specific association between MT-ND4 11719 A/G polymorphism and ulcerative colitis: a mitochondria-wide genetic association study. ***BMC Gastroenterol*** 2016; 16(1): 118.

[7] Damm F, Bunke T, Thol F, Markus B, Wagner K, Göhring G, et al. Prognostic implications and molecular associations of NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4) mutations in acute myeloid leukemia. ***Leukemia*** 2012; 26(2): 289-95.

[8] Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. ***Molecular Aspects Med*** 2010; 31(1): 60-74.

[9] Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 13:57 +0330 on Saturday November 11th 2017

metabolism as an anti-metastasis mechanism. ***Cancer Lett*** 2015; 356(2 Pt A): 156-64.
[10] Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? ***Nat Rev Cancer*** 2014; 14(11): 709-21.
[11] Scatena R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation. ***Adv Exp Med Biol*** 2012; 942: 287-308.
[12] Seyyed Rahmani R, Maali-Amiri R. ROS Signaling Pathway and Its Role in Environmental Stresses. ***Genetics Third Millennium*** 2014; 12(2): 3588-603.
[13] Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? ***Trends Cell Biol*** 2008; 18(4): 165-73.
[14] Lopez J, Tait SW. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. ***British J Cancer*** 2015; 112(6): 957-62.
[15] Czarnecka AM, Klemba A, Krawczyk T, Zdrozny M, Arnold RS, Bartnik E, et al. Mitochondrial NADH-dehydrogenase polymorphisms as sporadic breast cancer risk factor. ***Oncol Rep*** 2010; 23(2): 531-5.
[16] Pikor LA, Enfield KS, Cameron H, Lam WL. DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses. ***J Vis Exp*** 2011; (49). pii: 2763.
[17] Bouzari M, Ghaderian Z, Kardi MT, Talebi A. Development of DNA Extraction Method For Detection of DNA of viruses in formalin fixed paraffin embedded tissues. ***4th National Biotechnology Congress Islamic Republic of Iran*** 2005 Aug; Kerman.
[18] Saidijam M, Ghaffarpour M, Hasrak K, Houshmand M. Pitfall of Real-Time PCR Method to Find Delta mtDNA in Colon Cancer. ***Int Res J Biological Sci*** 2013; 2(11): 55-59.
[19] Rezvani Z, Didari E, Arastehkani A, Ghodsinejad V, Aryani O, Kamalidehghan B, et al. Fifteen novel mutations in the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 1, 2, 3, 4, 4L, 5 and 6 genes from Iranian patients with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON). ***Mol Biol Rep*** 2013; 40(12): 6837-41.
[20] Dong Y, Zhu H. Single-strand conformational polymorphism analysis. ***Methods Mol Med*** 2005; 108: 149-58.
[21] Gasser RB, Hu M, Chilton NB, Campbell BE, Jex AJ, Otranto D, et al. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. ***Nat Protoc*** 2006; 1(6): 3121-8.
[22] Maizel JV. Acrylamide gel electrophoresis of proteins and nucleic acids. Fundamental techniques in virology. Academic Press Inc., New York. 1969: 334-62.
[23] Grzybowska-Szatkowska L, Ślaska B, Rzymowska J, Brzozowska A, Floriańczyk B. Novel mitochondrial mutations in the ATP6 and ATP8 genes in patients with breast cancer. ***Mol Med Rep*** 2014; 10(4): 1772-8.
[24] Tzen CY, Mau BL, Hsu HJ. Analysis of disease-associated ND4 mutations: How do we know which mutation is pathogenic? ***Mitochondrion*** 2007; 7(1-2): 151-6.
[25] Ghaffarpour M, Mahdian R, Fereidooni F, Kamalidehghan B, Moazami N, Houshmand M. The mitochondrial ATPase6 gene is more susceptible to mutation than the ATPase8 gene in breast cancer patients. ***Cancer Cell Int*** 2014; 14(1): 1.
[26] Van Gisbergen MW, Voets AM, Starmans MH, de Coo I, Yadak R, Hoffmann R, et al. How do changes in the mtDNA and mitochondrial dysfunction influence cancer and cancer therapy? Challenges, opportunities and models. ***Mutat Res Rev Mutat Res*** 2015; 764: 16-30.
[27] Guerra F, Perrone AM, Kurelac I, Santini D, Ceccarelli C, Cricca M, et al. Mitochondrial DNA mutation in serous ovarian cancer: implications for mitochondria-coded genes in chemoresistance. ***J Clin Oncol*** 2012; 30(36): e373-e8.
[28] Lutz-Bonengel S, Schmidt U, Schmitt T, Pollak S. Sequence polymorphisms within the human mitochondrial genes MTATP6, MTATP8 and MTND4. ***Int J Legal Med*** 2003; 117(3): 133-42.
[29] Holyoake AJ, McHugh P, Wu M, O'Carroll S, Benny P, Sin IL, et al. High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in men. ***Int J Androl*** 2001; 24(3): 175-82.
[30] Sequeira A, Martin M, Rollins B, Moon EA, Bunney WE, Macciardi F, et al. Mitochondrial mutations and polymorphisms in psychiatric disorders. ***Front Genet*** 2012; 3: 103.
[31] Ghatak S, Lallawmzuali D, Lalmawia, Sapkota R, Zothanpuia, Pautu JL, et al. Mitochondrial D-loop and cytochrome oxidase C subunit I polymorphisms among the breast cancer patients of Mizoram, Northeast India. ***Curr Genet*** 2014; 60(3): 201-12.
[32] Tan DJ, Bai RK, Wong LJ. Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. ***Cancer Res*** 2002; 62(4): 972-6.