

بیان ژن BRCA1 در سرطان القایی پستان به وسیله DMBA در موش‌های صحرائی

دکتر احمد همتا*^۱، پیوند پروینی^۲

۱- دکتری ژنتیک مولکولی و سیتوژنتیک، استادیار گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک.

۲- کارشناس ارشد زیست‌شناسی گرایش سلولی - تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک.

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌های زنان در جهان است. این مطالعه به منظور تعیین میزان بیان ژن BRCA1 در سرطان القایی پستان به وسیله کارسینوژن ۷-۱۲ دی متیل بنزانتراسن (DMBA) در موش‌های صحرائی انجام شد. **روش بررسی:** در این مطالعه تجربی برای ایجاد مدل سرطان پستان از DMBA به موش‌های صحرائی نژاد Sprague dawley خوراندند. برای تهیه سلول‌های سرطانی، تومورهای ایجاد شده در شرایط استریل خرد و کشت داده شدند و از سلول‌های سرطانی استخراج شده برای تهیه کروموزوم‌های متافازی استفاده گردید. سپس نواربندی‌های کروموزومی توسط رنگ‌آمیزی گیمسا انجام گرفت. فراوان‌ترین مشترک‌ترین تغییرات کروموزومی ثبت شد و بر اساس چگونگی تغییرات و محل آنها و با کمک پایگاه‌های اطلاعاتی و تعیین توالی‌های نوکلئوتیدی و مقایسه ژنومیک بین موش صحرائی و انسان، فهرستی از ژن‌های موجود در نواحی که به احتمال زیاد با تغییرات خود سبب بروز تومور شدند؛ تهیه گردید. برای تأیید نتایج حاصله از روش نواربندی کروموزومی، آنالیز ژن BRCA1 توسط روش FISH انجام شد. **یافته‌ها:** ناحیه (q24-q32.1) کروموزوم ۱۰ موش صحرائی که ژن BRCA1 نیز روی همین بخش قرار دارد؛ دچار حذف‌شدگی گشت. نتایج روش FISH نیز حاکی از حذف دو نسخه ژن BRCA1 در ۷/۲۴ درصد سلول‌ها و یک نسخه ژن در ۸/۲۳ درصد سلول‌های مورد مطالعه بود.

نتیجه‌گیری: در سلول‌های سرطانی القا شده با DMBA حذف در نسخه‌های ژن BRCA1 مشاهده شد که این امر ممکن است در روند ایجاد تومور پستان نقش داشته باشد.

کلید واژه‌ها: سرطان پستان القایی، ژن BRCA1، نواربندی گیمسا، فلورسانس هیبریداسیون درجا، موش صحرائی

* نویسنده مسؤول: دکتر احمد همتا، پست الکترونیکی a-hamta@araku.ac.ir

نشانی: اراک، سردشت، دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، کدپستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

تلفن ۳۴۱۷۳۴۱۴-۰۸۶۱، نمابر ۰۶۳۴۱۷۰۴۰۶

وصول مقاله: ۳۱/۴/۹۱، اصلاح نهایی: ۲۹/۸/۹۱، پذیرش مقاله: ۲۴/۱۰/۹۱

مقدمه

و انسان حفاظت شده است. به گونه‌ای که پروتئین حاصل از ترجمه BRCA1 موشی دارای ۵۸ درصد شباهت آمینواسیدی و ۷۲ درصد همولوژی با پروتئین انسانی است و این امر استفاده از مدل‌های حیوانی برای مطالعه این ژن را به خوبی توجیه می‌کند (۴).

القا تومور در مدل‌های حیوانی یکی از روش‌های رایج برای مطالعه سرطان است. هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) یک کلاس مهم از کارسینوژن‌های محیطی است که در توموریزن پستان نقش مهمی ایفا می‌کنند. ۷-۱۲ دی متیل بنزانتراسن (DMBA: 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene) یک PAH پروتوتیپیک است که برای ایجاد تومور در حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵). اولین بار Huggins و

اگرچه سرطان نتیجه مجموعه‌ای از عوامل مختلف شامل جهش‌های ارثی و عوامل محیطی است؛ اما ۱۰-۵ درصد از موارد ابتلا به سرطان پستان را می‌توان به جهش‌های ارثی نسبت داد که اغلب در ژن‌های BRCA1 و BRCA2 رخ می‌دهند (۱). ۱۳ درصد زنان مبتلا به سرطان پستان زودرس که در آنها سن ابتلا پیش از ۳۰ سالگی است و ۷ درصد زنان مبتلا به این سرطان که در آنها سن ابتلا قبل از ۳۵ سالگی است؛ دارای حداقل یک جهش ژنتیکی در ژن BRCA1 بوده‌اند (۲). بخش عمده این جهش‌ها در اگزون‌های ۲ و ۲۰ ژن BRCA1 رخ می‌دهند (۳).

ساختار ژنومیک، آرایش و سازمان‌دهی ژن BRCA1 بین موش

همکارانش در سال ۱۹۶۴ اعلام نمودند که استفاده داخل معدی (گاوژ) نوعی هیدروکربن آروماتیک چندحلقه‌ای موجب افزایش رخداد سرطان پستان در موش‌های صحرایی ماده نژاد SD می‌شود. پس از آن زمان استفاده از این مدل به صورت گسترده‌ای برای مطالعه انواع سرطان‌ها رواج یافت (۶).

آنالیز کروموزومی، به عنوان یک روش تشخیصی رایج برای تعدادی از فنوتیپ‌های خاص مورد مواجهه در طب بالینی کاربرد دارد. یکی از این فنوتیپ‌ها سرطان است و عملاً تمام سرطان‌ها با یک یا بیش از یک اختلال کروموزومی همراه هستند. ارزیابی کروموزوم‌ها در یک نمونه بافتی مناسب می‌تواند اطلاعات مفیدی برای تشخیص بیماری با تعیین پیش‌آگهی آن فراهم کند (۷).

پیدایش فنون هیبریدسازی فلورسانس درجا (FISH) برای بررسی وجود یا فقدان یک توالی خاص DNA یا برای ارزیابی تعداد یا سازمان‌یابی یک کروموزوم یا ناحیه کروموزومی، انقلابی عظیم در سیتوژنتیک تحقیقاتی و بالینی ایجاد کرد. تلاقی رویکردهای ژنتیک مولکولی و سلولی که سیتوژنتیک مولکولی نام دارد؛ دامنه و نیز دقت تجزیه و تحلیل معمول کروموزومی را به میزان قابل توجهی گسترش داده است (۸). روش FISH به منظور بهبود نتایج آنالیز کروموزومی در سال ۱۹۸۰ به عنوان مرحله مهمی گسترش یافت. FISH بر پایه استفاده از پروب‌های نشاندار شده با رنگ آمیزی فلورسنت است که می‌توان با توالی‌های مکملشان روی کروموزوم‌ها در محلی که تولید علامت فلورسنت می‌کنند؛ هیبرید شوند (۹). این روش کاربرد گسترده‌ای در ژنتیک سلولی بالینی تشخیصی و مطالعه رفتار ژن‌ها در بیماری‌های پیچیده مانند سرطان دارد. کاوشگر FISH می‌تواند مخلوط پیچیده‌ای از DNA یک بخش بازوی کروموزومی، یک بازوی کروموزومی کامل یا حتی کل یک کروموزوم باشد. با پروب‌های طراحی شده برای مناطق خاص روی ژنوم، ناهنجاری‌ها حتی می‌توانند در سطح ژن‌های منفرد آشکار شوند (۱۰). این مطالعه به منظور تعیین میزان بیان ژن BRCA1 در سرطان القایی پستان به وسیله DMBA در موش‌های صحرایی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۳۰ سر موش صحرایی ماده بالغ از نژاد Sprague dawley خریداری شده از مؤسسه سرم‌سازی رازی در آزمایشگاه دانشکده علوم پایه دانشگاه اراک انجام شد.

در این مطالعه اصول اخلاقی کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی مصوب کمیته حقوق حیوانات دانشگاه اراک رعایت گردید.

میانگین وزنی موش‌ها 150 ± 10 گرم بود. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی، درجه حرارت 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد و دسترسی آزادانه به آب و غذا، در قفس‌های

مخصوص در اتاق حیوانات نگهداری شدند.

دوز دارو و روش تیمار

حیوانات به سه گروه ده تایی تقسیم شدند. به گروه اول به عنوان گروه کنترل یک میلی‌لیتر روغن کنجد؛ به گروه دوم به عنوان گروه تیمار اول، یک میلی‌لیتر محلول حاوی ۱۰ میلی‌گرم DMBA که در یک میلی‌لیتر روغن کنجد حل شده بود و به گروه سوم به عنوان گروه تیمار دوم، محلول حاوی ۲۰ میلی‌گرم DMBA که در یک میلی‌لیتر روغن کنجد حل شده بود؛ گاوژا شد. این دارو ۲ بار در طول دو هفته متوالی و در روز و ساعت معین به گروه تیمار خوراندند شد. پس از پایان دوره تیمار و رسیدن تومور به اندازه لازم حیوانات توسط دی‌اتیل اتر بیهوش و در محل استریل تشریح شدند و تومور به‌طور کامل خارج گردید و در ظرف حاوی HBSS به زیر هود لامینار منتقل شد.

برای تهیه سلول از بافت توموری، از قسمت‌های داخلی‌تر قطعاتی بریده شد و به فالكون‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر HBSS استریل انتقال داده شد. پس از جدا کردن خون و بافت اضافه، باقیمانده تومور با اسکالپل به ذرات بسیار ریز (chopping) خرد شد. سپس سوسپانسیون حاصله به فالكون منتقل گردید و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (۱۵۰۰rpm) شد. پس از آن محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب ته فالكون ۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS اضافه گردید. پس از پیشتاژ کردن، ۱/۵ تا ۲ میلی‌لیتر از مخلوط همگن شده به فلاسک‌های T25 منتقل و حجم محیط داخل فلاسک به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس فلاسک داخل انکوباتور CO2 دار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داد شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط رویی فلاسک تخلیه و ۵ میلی‌لیتر محیط کشت تازه به فلاسک افزوده گردید. تعویض محیط و پاساژ سلول‌ها برحسب نیاز انجام گرفت.

آماده‌سازی کروموزوم‌ها برای تهیه لام گسترش

برای تهیه کروموزوم‌ها کشت سلولی با ۴۰ میکرولیتر Colcemid ($0.5 \mu\text{g/ml}$) به مدت ۲۰ دقیقه تیمار شد. سپس سلول‌ها از کف فلاسک جدا شد و با سانتریفیوژ رسوب داده شد. رسوب سلولی در 0.075 mol/L KCl (سوسپانسیون شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس فالكون حاوی KCl سانتریفیوژ شد و پس از تخلیه مایع رویی، روی رسوب سلولی فیکساتیو کارنوی (یک قسمت اسیداستیک و سه قسمت متانول) تازه تهیه شده، به صورت قطره قطره اضافه گردید و مجدداً سانتریفیوژ انجام شد. این عمل سه بار تکرار شد تا سلول‌ها کاملاً فیکس شدند. سپس مقداری از فیکساتیو روی رسوب ریخته شد و رسوب سلولی در آن حل گردید. با استفاده از پیپت پاستور مقداری از محلول حاوی فیکساتیو و سلول‌ها برداشته شد و از فاصله ۳۰ سانتی‌متری حدود ۳-۴ قطره از

میکروسکوپ فلوروسنس (Olympus X51) مجهز به فیلترهای مخصوص FITC، رودامین و DAPI (در ترکیب با برنامه Q-FISH برای میکروفوتوگرافی) و با استفاده از نرم افزار Leica CW 4000 انجام شد. در نهایت تصاویر دیجیتال متافازهای هیبرید شده رنگ شده با DAPI، FITC، و رودامین توسط دوربین Coho charge-coupled ثبت گردید.

یافته‌ها

نتایج حاصل از رنگ آمیزی کروموزوم‌ها

داده‌های به دست آمده از مطالعه کروموزوم‌های رنگ آمیزی شده توسط نرم افزار Leica CW 4000 نشان داد که حذف در ناحیه (q24-q32.1) کروموزوم ۱۰ موش صحرایی که همولوژی با بخش (q11-q21.2) کروموزوم ۱۷ انسانی دارد؛ صورت گرفته است. این نواحی به ترتیب حدود ۲۰۱ و ۱۴۰ ژن داشت و ژن BRCA1 نیز روی همین قسمت از کروموزوم انسانی قرار گرفته بود (17q21) (شکل یک).

نتایج حاصل از روش دورگ گیری فلوروسنس درجا (FISH)

بر اساس نتایج به دست آمده از بررسی ژن BRCA1 در کروموزوم‌های سلول‌های سرطانی، مشاهده شد که در ۲۴/۷ درصد سلول‌ها دو نسخه ژن (شکل‌های ۴ و ۵) در ۲۳/۸ درصد سلول‌ها یک نسخه ژن BRCA1 (شکل ۳) فاقد سیگنال است؛ اما در ۴۷ درصد باقیمانده سلول‌ها تغییری در تعداد نسخه‌های ژنی مشاهده نگردید (شکل ۲) (جدول یک).

جدول ۱: مقایسه تعداد نسخه‌های ژن BRCA1 در ۱۱۳ سلول مطالعه شده به روش FISH

تعداد (درصد)	تعداد سیگنال	توضیحات
۲۸ (۲۴/۷)	صفر	حذف کامل
۳۲ (۲۸/۳)	۲	حذف در یک نسخه ژن
۵۳ (۴۷)	۴	طبیعی

بحث

نتایج به دست آمده از بررسی کروموزوم‌ها به روش رنگ آمیزی G.Banding نشان داد که یک حذف شدگی در ناحیه (q24-q32.1) کروموزوم ۱۰ موش صحرایی که همولوژی با بخش (q11-q21.2) کروموزوم ۱۷ انسانی دارد؛ رخ داده است (۱۱). در حدود ۱۹۶ ژن در این بخش از ژنوم واقع شده است. از جمله مهم‌ترین ژن‌هایی که در این بخش از ژنوم انسان یافت می‌شوند؛ به ژن NLK (nemo-like kinase) که در موقعیت q11.1 کروموزوم ۱۷ انسان و در قطعه q25 کروموزوم ۱۰ موش صحرایی جای داشته و در سرطان Colon نقش دارد (۱۲)؛ می‌توان اشاره نمود. ژن neurofibromin 1 (NF1) که در مکان 17q11.2 انسان قرار دارد؛ نقش تنظیمی منفی در تکثیر سلول‌های اندوتلیالی بازی می‌کند و در سرطان‌هایی نظیر روده بزرگ (۱۳) و تومورهای غده فوق کلیه

آن روی لام‌های سرد و تمیزی که به مدت ۲۴ ساعت در الکل ۷۰ درصد در فریزر قرار گرفته بودند؛ چکانده شد. گستره‌های کروموزومی تهیه شده در هوای اتاق خشک شد و تا زمان استفاده در اتانول ۷۰ درصد و دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

رنگ آمیزی G.Banding

با استفاده از روش رنگ آمیزی G.Banding همه کروموزوم‌ها با نواریندی مشخص رنگ می‌گیرند. برای رنگ آمیزی گیمسا ابتدا لام‌ها به مدت ۱۰-۳۰ ثانیه درون تریپسین ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و پس از آن به مدت چند ثانیه داخل بافر PBS سرد شسته شدند. سپس لام‌ها به مدت ۵ دقیقه در محلول رنگ گیمسای آماده قرار داده شدند و پس از شستشو با بافر PBS و خشک شدن در هوای اتاق برای مشاهده باندها به وسیله میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

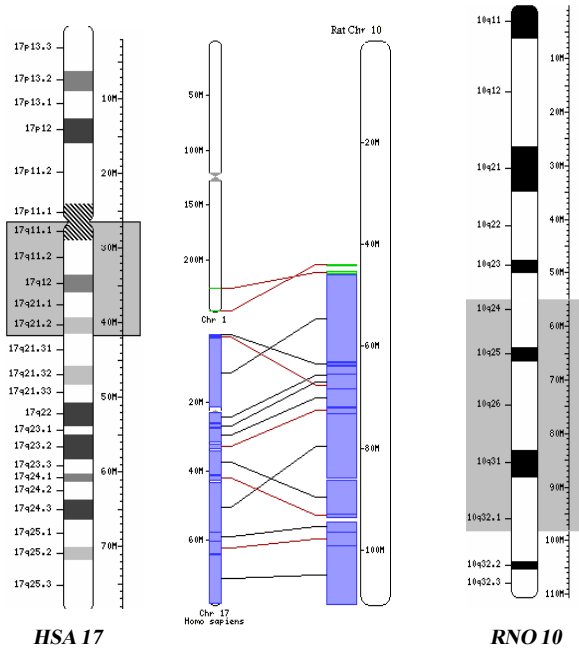
پس از انجام مراحل فوق، با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus از کروموزوم‌های فیکس شده روی لام عکس برداری صورت گرفت.

آنالیز کروموزومی

برای آنالیز کروموزوم‌های رنگ آمیزی شده به روش نواریندی G.Banding از نرم افزار Leica CW 4000 استفاده شد.

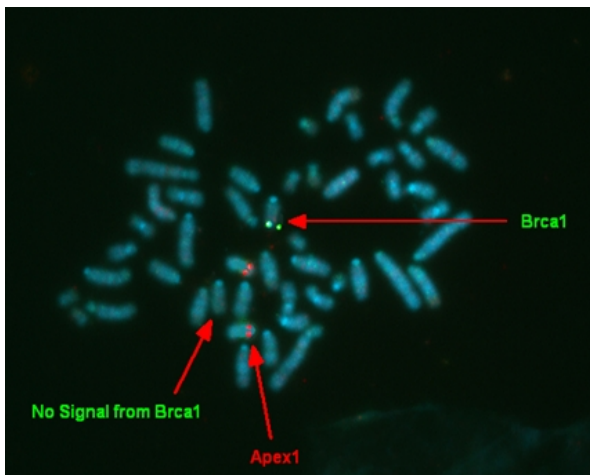
روش FISH (Fluorescence in situ hybridization)

روش FISH بر اساس روش به کار رفته توسط Pinkel و همکاران انجام شد (۸). کلون‌های PAC پس از استخراج از باکتری E. coli به عنوان میزبان به وسیله Biotin و Digoxigenin با استفاده از روش nick translation به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۱۶ درجه سانتی گراد نشاندار شدند. سپس پروب‌های نشاندار توسط مقادیر اضافی از DNA سونیکه شده موش صحرایی رسوب داده شد و پس از آن در ۲۰ میکرولیتر بافر هیبریدیزاسیون حاوی ۵۰ درصد Formamide، ۱۰ درصد Dextran sulfate و SSC (2x) ۱ حل شد. بعد از دناتوراسیون به مدت ۵ دقیقه در ۷۵ درجه سانتی گراد، پروب‌ها به صورت جفت - جفت (یک پروب نشاندار شده با Digoxigenin و یک پروب نشاندار شده با Biotin) به کروموزوم‌هایی که از قبل در ۷۰ درصد Formamide به مدت ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد آماده شده بودند؛ اضافه گردید. هیبریدیزاسیون در یک اتاق مرطوب به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد. سپس شستشو در Formamide ۵۰ درصد و SSC (2x) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و پس از آن در SSC (2x) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد. ردیابی پروب با افزودن آویدین متصل به FITC و Anti-Digoxigenin نشان‌دار شده با رودامین انجام شد. سپس کروموزوم‌ها با DAPI رنگ آمیزی شده و آنالیز توسط

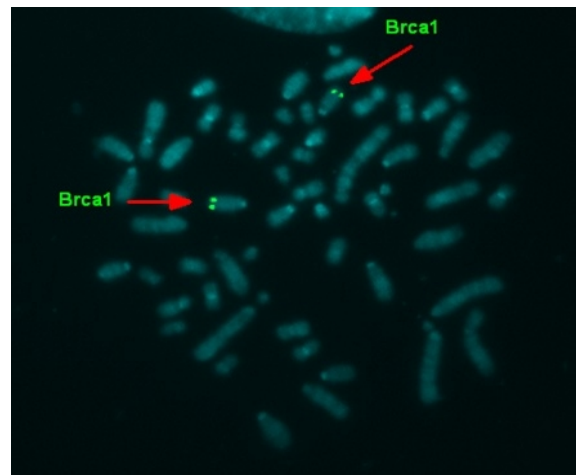


شکل ۱: در تصویر سمت راست، ناحیه خاکستری حذف در (q24-q32.1) کروموزوم شماره ۱۰ موش صحرایی قابل مشاهده است. در شکل میانی همولوگ این نواحی در کروموزوم‌های انسانی و در شکل سمت چپ متناظر این نواحی در کروموزوم ۱۷ انسانی نشان داده شده است (ناحیه تیره رنگ بر روی کروموزوم شماره ۱۷ انسانی، همولوگ ناحیه حذف شده در کروموزوم ۱۰ موش صحرایی است).

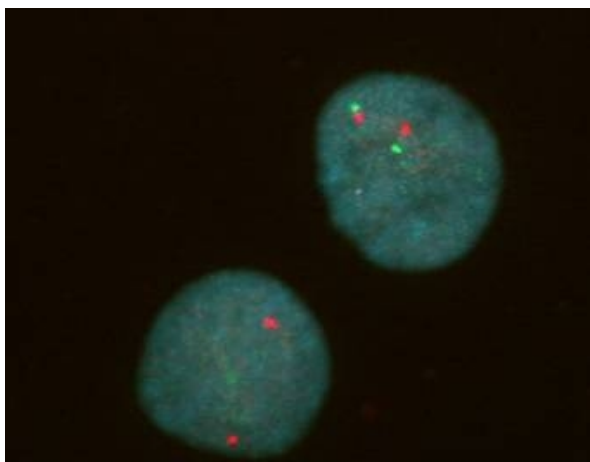
بخشی از شکل ۱ از سایت www.ensemble.com اقتباس شده است.



شکل ۳: حذف یک نسخه ژن BRCA1 کروموزوم شماره ۱۰ موش صحرایی (از ژن Apex1 به عنوان کنترل داخلی برای اطمینان از صحت نتیجه تست و انجام هیبریداسیون استفاده شد).



شکل ۲: سلول طبیعی از نظر تعداد نسخه‌های ژن BRCA1



شکل ۵: در سمت راست یک سلول طبیعی با حضور هر دو نسخه ژن BRCA1 و در سمت چپ سلول فاقد نسخه‌های ژن BRCA1 مشاهده می‌شود.



شکل ۴: حذف دو نسخه ژن BRCA1 یکی از کروموزوم‌های یک سلول تریپلوئید

اعلام نمودند که بین متیلاسیون BRCA1 در سرطان‌های تک گیر و کاهش تعداد نسخه‌های ژنی آن رابطه مستقیم وجود دارد (۲۱). با توجه به مطالعات انسانی متعددی که در این مورد صورت گرفته و با توجه به نتایج به دست آمده از روش FISH در مطالعه حاضر، حذف ژن BRCA1 در مدل سرطان القایی مورد استفاده در این تحقیق نشان می‌دهد که مسیرهای ژنتیکی که توسط ژن BRCA1 در موارد تک گیر و ارثی سرطان پستان انسانی کنترل می‌شود؛ ممکن است در بروز سرطان پستان القایی در موش صحرایی نیز نقش داشته باشد. گرچه مکانیسم مولکولی این امر هنوز ناشناخته است.

همچنین با توجه به این نکته که وجود یک سیگنال از کروموزوم همولوگ نشان از وجود و حضور یک الل سالم دارد؛ با این وجود مشاهده نتایج FISH در سلول‌های اینترفازی و کروموزوم‌های متافازی که هیچگونه سیگنالی از این ژن در آنها مشاهده نمی‌شد؛ می‌تواند دلیلی بر امکان حذف کامل این ژن در زیر مجموعه‌های سلولی تومور باشد و همان‌طور که پیش‌تر گفته شد؛ حذف در ژن BRCA1 می‌تواند مکانیسم‌های حفظ پایداری ژنومی را مختل نموده و از این راه به پیشبرد تومور کمک کند.

نتیجه‌گیری

در سلول‌های سرطانی القا شده با DMBA حذف در نسخه‌های ژن BRCA1 مشاهده شد که این امر ممکن است در روند توموریزشن نقش داشته باشد. هدف یا یکی از اهداف حذف قطعه 10q21-23 مشاهده شده در نواریندی گیمسای کروموزوم‌های سلول‌های سرطانی القا شده توسط DMBA می‌تواند نشان دهنده از کار افتادن این ژن مهم در روند بروز سرطان پستان القا شده در موش‌های صحرایی مورد مطالعه باشد. از سوی دیگر می‌تواند به وجود ژن یا ژن‌های تومور سوپرسور مهم دیگری در این ناحیه اشاره داشته باشد که برای خاموش شدن آنها این قطعه کروموزومی در روند تشکیل و پیشرفت سرطان در موش‌های صحرایی دچار حذف شدگی گشته است. صحت این مطلب با مطالعات بیشتر بررسی خواهد شد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۹۰/۳۶۰۸) معاونت پژوهشی دانشگاه اراک بود. بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه که هزینه‌های انجام این مطالعه را تأمین نمودند؛ صمیمانه تشکر می‌نمایم. همچنین از آقای دکتر محمود محمدی محقق ارشد مرکز تحقیقات کارولینسکای استکهلم به خاطر تأمین برخی از پراب‌های مورد استفاده در مطالعه سپاسگزاری می‌کنیم.

(۱۴) موثر است. همچنین به ژن BRCA1 که در موقعیت 17q21.31 کروموزوم انسان و 10q32 کروموزوم موش صحرایی واقع شده و نقش آن در ایجاد سرطان پستان و تخمدان ارثی به خوبی به اثبات رسیده است (۳)؛ می‌توان اشاره نمود.

نتایج به دست آمده از روش الگوبندی گیمسا نیز مؤید وجود حذف شدگی قطعات کروموزومی در تعدادی از کروموزوم‌ها بود. دخالت BRCA1 در ایجاد و گسترش تومورهای پستانی تک گیر هنوز کاملاً مشخص نیست. زیرا هنوز موتاسیون‌های سوماتیک در آن یافت نشده است (۱۶ و ۱۵). اما متیلاسیون پروموتور ژن BRCA1 و فقدان بیان ژن BRCA1 به طور قابل توجهی در ارتباط با سرطان پستان تک گیر بوده و به وفور رخ می‌دهند. قبلاً گزارش شده بود که شاید خاموش کردن اپی‌ژنتیک BRCA1 یک جایگزین برای موتاسیون سوماتیک به عنوان یک مکانیسم برای غیرفعال کردن BRCA1 در موارد تک گیر سرطان پستان باشد (۱۷).

Hartman و همکاران با بررسی ۷۵ بیمار مبتلا به سرطان پستان ارثی گزارش کردند که ۶ درصد از موارد مورد مطالعه دارای حذف در آگرون‌های ۱ و ۲ هستند. احتمالاً حذف آگرون‌های ۱ و ۲ می‌تواند ناحیه پروموتور BRCA1 را مختل نماید که منجر به از دست رفتن کامل نسخه‌های mRNA این آلل می‌شود. حذف و درج‌های ژنومی بزرگ در ژن BRCA1 در ۱۰ درصد موارد خانواده‌های با خطر بالا مشاهده شده است که حدوداً یک سوم همه موتاسیون‌های BRCA1 را شامل می‌شود (۱۸).

در مطالعه Brown و همکاران دو حذف شدگی در ناحیه 5' ژن BRCA1 کشف گردید. به طوری که حداقل یکی از آنها تمام ناحیه پروموتور و بخشی از آگرون شماره ۲ را در بر گرفته بود و موجب از دست رفتن نسخه برداری از آلل از دست رفته شده بود. برداشت آنها از این تغییر اینگونه بود که تغییر در تعداد نسخه‌ها و یا خاموشی اپی‌ژنتیک BRCA1 در سرطان‌های تک گیر می‌تواند به عنوان یک ضربه ناسون عمل کرده و موجب از کار افتادن آلل دیگر شود (۱۹). Wei و همکاران نیز با مطالعه ۱۲۰ ژن مبتلا به سرطان پستان تک گیر به این نتیجه رسیدند که در این مبتلایان، متیلاسیون BRCA1 موجب حذف یکی از آلل‌های ژن و کاهش تعداد نسخه‌های ژنی آن شده است. زیرا تقریباً در تمام تومور‌هایی که BRCA1 متیله شده بود؛ کاهش و یا عدم بیان آن مشاهده شد (۲۰).

Birgisdottir و همکاران نیز پس از بررسی وضعیت ژن BRCA1 در ۱۴۳ مورد سرطان پستان تک گیر پس از این که در ۹ درصد کل موارد مطالعه شده حذف BRCA1 را مشاهده کردند؛

References

- Ripperger T, Gadzicki D, Meindl A, Schlegelberger B. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *Eur J Hum Genet*. 2009 Jun;17(6):722-31.
- Falagas ME, Zarkadoulia EA, Ioannidou EN, Peppas G, Christodoulou Ch, Rafailidis P. The effect of psychosocial factors on breast cancer outcome: a systematic review. *Breast Cancer Res*. 2007; 9(4): R44.
- Rebbeck TR, Couch FJ, Kant J, Calzone K, DeShano M, Peng Y, et al. Genetic heterogeneity in hereditary breast cancer: role of BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet*. 1996 Sep;59(3):547-53.
- Chodosh LA. Expression of BRCA1 and BRCA2 in normal and neoplastic cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1998 Oct;3(4):389-402.
- Mastrangelo G, Fadda E, Marzia V. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environ Health Perspect*. 1996 Nov; 104(11):1166-70.
- Shull JD. The rat oncogenome: comparative genetics and genomics of rat models of mammary carcinogenesis. *Breast Dis*. 2007;28:69-86.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson and Thompson Genetics in Medicine. 6th. Philadelphia: Saunders Company. 2001; p: 22.
- Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Seagraves R, Lucas J, et al. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Dec;85(23): 9138-42.
- Liehr T. Fluorescence in situ hybridization (FISH) - application guide. Berlin, Heidelberg: Springer. 2008; pp: 301-11.
- Morozova O, Marra MA. From cytogenetics to next-generation sequencing technologies: advances in the detection of genome rearrangements in tumors. *Biochem Cell Biol*. 2008 Apr;86(2):81-91.
- Hamta A, Shariatzadeh SMA, Solimani M, Saifi F. [Chromosomal Rearrangement and Bioinformatic Studies of the Involved Genes in DMBA-Induced Breast Cancer in SD Rat Strains and Verification of their Syntenic Segments in Human Chromosomes]. *J Kerman Univ Med Sci*. 2010;17(3):191-207. [Article in Persian]
- Yasuda J, Tsuchiya A, Yamada T, Sakamoto M, Sekiya T, Hirohashi S. Nemo-like kinase induces apoptosis in DLD-1 human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Aug; 308(2):227-33.
- Čačev T, Radošević S, Spaventi R, Pavelić K, Kapitanović S. NF1 gene loss of heterozygosity and expression analysis in sporadic colon cancer. *Gut*. 2005 Aug;54(8): 1129-35.
- Gutmann DH, Cole JL, Stone WJ, Ponder BA, Collins FS. Loss of neurofibromin in adrenal gland tumors from patients with neurofibromatosis type I. *Gene Chromosome Canc*. 1994 May; 10(1):55-8.
- Stefánsson OA, Jonasson JG, Johannsson OT, Olafsdóttir K, Steinarsdóttir M, Valgeirsdóttir S, et al. Genomic profiling of breast tumours in relation to BRCA abnormalities and phenotypes. *Breast Cancer Res*. 2009;11(4):R47.
- Lancaster JM, Wooster R, Mangion J, Phelan CM, Cochran C, Gumbs C, et al. BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. *Nat Genet*. 1996 Jun;13(2):238-40.
- Bava SV, Puliappadamba VT, Deepti A, Nair A, Karunagarani D, Anto RJ. Sensitization of taxol-induced apoptosis by curcumin involves down-regulation of nuclear factor-kappaB and the serine/threonine kinase Akt and is independent of tubulin polymerization. *J Biol Chem*. 2005 Feb;280(8):6301-8.
- Hartmann C, John AL, Klaes R, Hofmann W, Bielen R, Koehler R, et al. Large BRCA1 gene deletions are found in 3% of German high-risk breast cancer families. *Hum Mutat*. 2004 Dec;24(6):534.
- Brown MA, Lo LJ, Catteau A, Xu CF, Lindeman GJ, Hodgson S, Solomon E. Germline BRCA1 promoter deletions in UK and Australian familial breast cancer patients: Identification of a novel deletion consistent with BRCA1:psiBRCA1 recombination. *Hum Mutat*. 2002 Apr;19(4):435-42.
- Wei M, Grushko TA, Dignam J, Hagos F, Nanda R, Sveen L, et al. BRCA1 promoter methylation in sporadic breast cancer is associated with reduced BRCA1 copy number and chromosome 17 aneusomy. *Cancer Res*. 2005 Dec;65(23):10692-9.
- Birgisdóttir V, Stefánsson OA, Bodvarsdóttir SK, Hilmarsdóttir H, Jonasson JG, Eyfjörd JE. Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *east Cancer Res*. 2006;8(4):R38.

Original Paper

BRCA1 gene expression in DMBA induced breast cancer in rats

Hamta A (PhD)*¹, Parvini P (MSc)²

¹Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran.

²Biologist, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran.

Abstract

Background and Objective: Breast cancer is one of the most frequent malignancies among women. This study was done to determine the BRCA1 gene expression in 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced breast cancer in rats.

Materials and Methods: In this experimental study, the breast cancer was induced by DMBA in Sprague dawley rats. After tumors arise, cell cultures were prepared and G-banding staining was performed on metaphase chromosomal smear. According to databases, genes in the affected area were collected and after comparing genome of the rats and human in changed chromosomal segments, a gene list was prepared. FISH technique was performed on BRCA1 gene to prove accuracy of chromosomal banding results.

Results: Structural changes such as deletion occurred in chromosomes 10, which BRCA1 is located on. 24.7% of cells showed evidence of physical deletion in both copy of BRCA1 gene and 23.8% of cells showed deletion in one copy.

Conclusion: Induced DMBA Breast cancer cells showed deletion in BRCA1 copy numbers. This gene may be involved in animal breast tumor model.

Keywords: Breast cancer, BRCA1 gene, G-banding, FISH, Rat

* Corresponding Author: Hamta A (PhD), E-mail: a-hamta@araku.ac.ir

Received 21 July 2012

Revised 19 November 2012

Accepted 13 January 2013