

بررسی جهش‌های ژن فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز در سرطان پستان و ارتباط آن با متاستاز در جمعیت اصفهان

صدیقه غربی*، منوچهر توسلی* و مهری فقیهی**

* گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان

** گروه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

چکیده

فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز (PI3K) عضوی از یک خانواده آنزیمی است که با فسفریله کردن فسفولیپیدها و ایجاد پیامبرهای ثانویه در مسیرهای مختلف انتقال پیام از جمله تکثیر، تمایز، کنترل سیکل سلولی و مرگ برنامه ریزی شده سلول شرکت می‌کند. کلاس I این خانواده آنزیمی هترودیمری متشکل از دو زیر واحد کاتالیتیکی و تنظیمی است. جهش‌های زیر واحد کاتالیتیکی سبب افزایش فعالیت آنزیمی و رشد کنترل نشده سلولها شده و در نهایت منجر به سرطانی شدن آنها می‌شود. مطالعات قبلی نشان دهنده درصد بالای جهش‌های این ژن در سرطان پستان می‌باشد. با توجه به شیوع بالای سرطان پستان در جمعیت اصفهان، در این مطالعه پس از جمع آوری ۶۰ نمونه بیمار و ۳۵ کنترل، استخراج DNA انجام و آزمون‌های این ژن تکثیر شدند. سپس وجود جهش در این ژن با استفاده از تکنیک SSCP مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج این مطالعه، ۲۸ درصد جهش در این ژن مشاهده شد. ارتباط مثبت جهش با درگیری غدد لنفاوی، با احتمال $P=0.01$ و $odd\ ratio = 7$ نشان دهنده دخیل بودن این مسیر در متاستاز است. درصد بالای جهش در این ژن و نقش آن در متاستاز نشان دهنده اهمیت این مسیر به منظور اهداف درمانی سرطان پستان است.

واژه‌های کلیدی: فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز - سرطان پستان - متاستاز

Association of Phosphatidylinositol 3-Kinases Mutations and Mtastasis in Isfahanian Breast Cancer Patients

S. Gharbi*, M. Tavassoli * and M. Faghihi **

* Biology Department, The University of Isfahan

** Pathology Department, University of Medical Sciences Isfahan

Abstract

The phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) are a family of serin/threonin kinase enzymes which are activated in response to external stimuli by tyrosine kinase receptors. Active PI3K participate in various signaling pathway including proliferation, differentiation, cell cycle control and apoptosis through producing PIP3 as second messenger and activating AKT. Class I of this family enzyme is heterodimer comprised of a catalytic and a regulatory subunit. Mutations of catalytic subunit can increase the enzyme activity and cause uncontrolled growth of the cells. This finally results in the cells, becoming cancerous. Previous studies indicate high percentage of mutation in this gene. Considering the high incidence of breast cancer in Isfahan, in this study mutations of this gene in breast cancer patients are investigated. DNA from 60 patient samples and 35 controls were extracted and the exons were amplified by PCR. Then mutations of this gene were analyzed by SSCP technique. Based on the results of this study, 28% mutations in this gene were reported, which approves the oncogenic feature of the PI3K. Positive association between mutations of the gene and lymph node involvement with $P=0.01$ and odd ratio = 7 indicates the role of this pathway in metastasis. The high percentage of mutation in this gene and its role in metastasis show the importance of this pathway for therapeutic purposes in order to prevent and stop the growth of breast cancer.

Keywords: phosphatidylinositol 3-kinases, breast cancer, breast cancer

مقدمه

سرطان در اثر تغییر در فعالیت و کنترل ژنهایی که رشد سلولی، تمایز و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول^۱ را کنترل می‌کند ایجاد می‌شود. این فرایند منجر به رشد غیر طبیعی و خارج از کنترل سلول‌ها می‌شود. سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان و دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان می‌باشد^(۷).

PI3K (آنزیم مورد بررسی در این مطالعه) با تولید PIP3 در سلول سبب فعال شدن مسیرهای مختلف سلولی می‌شود. این آنزیم بر اساس نوع سوبسترا به سه کلاس مختلف تقسیم می‌شود. کلاس I این خانواده آنزیمی، بیشتر از دو کلاس دیگر مورد مطالعه و بررسی

قرار گرفته است^(۸). این کلاس هترودیمری متشکل از دو زیر واحد کاتالیتیکی و تنظیمی است. با اتصال لیگاند به رسپتور در سطح سلول و فعال شدن رسپتورهای تیروزین کینازی، زیر واحد تنظیمی و در نهایت زیر واحد کاتالیتیکی PI3K فعال می‌شود. زیر واحد کاتالیتیکی که دارای فعالیت کینازی است با فسفریله کردن مشتقات فسفوانیزوتیدها در سلول، باعث افزایش سطح PIP3 می‌شود^(۲۶ و ۱۷).

PIP3 با اتصال به پروتئین‌های دارای ناحیه^۲ PH آنها را فعال می‌کند^(۵). AKT یا پروتئین کیناز B(PKB) یکی از این پروتئین‌هاست. AKT فعال شده با فسفریله کردن پروتئین‌های BAD و کاسپاز ۹ سبب مهار آپوپتوز

در این سرطان، در آگزون های ۱، ۹ و ۲۰ مورد بررسی قرار گرفت. سپس ارتباط جهش‌ها با چند فاکتور پاتولوژی شامل درجه بندی تومور، وضعیت هیستولوژیک و درگیری غدد لنفاوی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به ارتباط مثبت جهش‌های ژن PI3K و افزایش بیان erbB2، مشخص کردن جهش‌های این ژن می‌تواند به عنوان مارکری در تعیین نوع مسیر درمانی در بیماران سرطانی حایز اهمیت باشد. همچنین مشخص کردن درصد جهش در یک جمعیت می‌تواند در درمان سرطان پستان با استفاده از مهارکننده‌های فعالیت این آنزیم موثر و مفید باشد. دانشمندان در حال حاضر در حال بررسی اثر مهار کننده‌های فعالیت کینازی PIK3CA در این بیماران هستند.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، با توجه به سوماتیک بودن جهش‌های ژن PI3KCA (28)، نمونه‌های بافت توموری از ۶۰ بیمار سرطان سینه از آزمایشگاه‌های پاتولوژی و بیمارستان امید شهر اصفهان جمع‌آوری شد. سرطانی بودن این بافت‌ها توسط متخصص پاتولوژیست تأیید شد.

هم چنین نمونه‌های نرمال شامل ۳۰ نمونه خون و ۵ نمونه بافت سالم نیز تهیه گردید. اطلاعات پاتولوژی بیماران شامل درجه بندی تومور، وضعیت هیستولوژیک و متاستاز به غدد لنفاوی نیز جمع‌آوری گردید. سپس استخراج DNA از بافت و خون به ترتیب به روش‌های فنل-کلروفرم و روش نمکی میلر انجام شد (۱۸).

پرایمرهای آگزون های ۱، ۹ و ۲۰ این ژن، با استفاده از نرم افزار الیگو طراحی و با سفارش به شرکت فزایژوه

می‌شود. AKT با تاثیر بر فعالیت و بیان P27، P21 و سیکلین D، سبب پیشرفت سیکل سلولی می‌شود. هم چنین AKT، با فسفریله کردن نیتریک اکسید سنتتاز اندوتلیالی (eNOS) آن را فعال کرده و منجر به مهاجرت سلولی می‌شود (۱، ۶، ۲۲ و ۲۴).

تغییر در هر دو زیرواحد کاتالیتیکی و تنظیمی می‌تواند منجر به افزایش فعالیت آنزیم و سرطانی شدن سلول شود. اما با توجه به مطالعات قبلی، تغییرات زیر واحد کاتالیتیکی شایع تر می‌باشند (۲۳).

ژن کد کننده زیر واحد کاتالیتیکی کلاس I این خانواده آنزیمی، PIK3CA نامیده می‌شود که جهش‌های آن در سرطان‌های مختلف از جمله سرطان پستان شایع است (۹، ۱۳ و ۲۴). این ژن برای اولین بار در سال ۱۹۹۴ کلون شد و در سال ۲۰۰۴ شایسته و همکاران آن را به عنوان آنکوژن معرفی کردند (۲۳). ژن PIK3CA روی کروموزوم ۳ در موقعیت 3q26 قرار دارد و از ۲۰ آگزون تشکیل شده است (۱۴ و ۱۹). از بین این آگزون‌ها اکثریت جهش‌ها در آگزون های ۱، ۹ و ۲۰ این ژن گزارش شده‌اند (۳ و ۹). آگزون ۱ کدکننده دمین اتصالی به زیرواحد تنظیمی، آگزون ۹ کد کننده ناحیه ماریچ و آگزون ۲۰ کد کننده ناحیه کینازی آنزیم است. جهش در این آگزون‌ها منجر به افزایش فعالیت آنزیمی و در نهایت ایجاد سرطان می‌شود. خاصیت آنکوژنی PIK3CA در بسیاری از سرطان‌ها در مطالعات قبلی نشان داده شده است. درصد بالای جهش در این ژن نشان دهنده اهمیت بررسی آن به عنوان یک آنکوژن است (۲، ۳ و ۲۱).

به همین علت در این مطالعه با توجه به شیوع بالای سرطان پستان در جمعیت اصفهان، جهش‌های این ژن

در ولتاژ ۳۰۰ تا ۵۰۰ به مدت ۱۴ تا ۲۰ ساعت الکتروفورز گردید و در نهایت توسط روش نیترات نقره رنگ آمیزی شد.

تغییرات نمونه های بیمار در مقایسه با نمونه های نرمال بر روی ژل آکریل امید مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های دارای تغییر مجدداً تکثیر و بر روی ژل آکریل امید برده شدند و وجود تغییر و صحت انجام تکنیک SSCP، تائید شد. تعدادی از نمونه هایی که در SSCP نسبت به نمونه های نرمال تغییر نشان دادند پس از جدا سازی بر روی ژل آگارز جهت تعیین توالی توسط کیت فرمتازاستخراج و تخلیص گردیدند. نمونه ها توسط شرکت سیناژن تعیین توالی شدند. سپس ارتباط جهش با چندین فاکتور پاتولوژی شامل درجه بندی توموری، وضعیت هیستولوژیک و متاستاز به غدد لنفاوی با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۳ مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

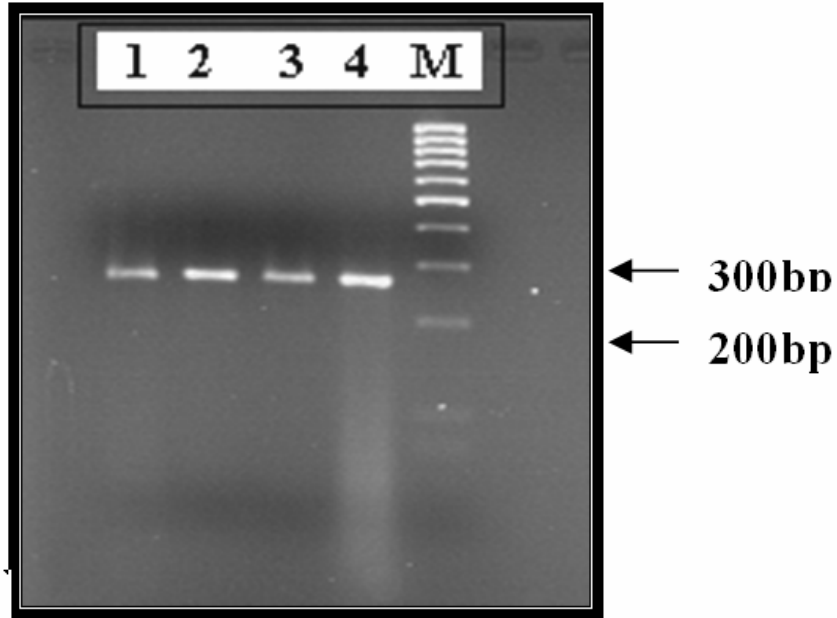
پس از استخراج DNA از نمونه ها آزمون های ۱، ۹ و ۲۰ این ژن با استفاده از پرایمرهای طراحی شده در جدول ۱ تکثیر شدند. شکل های ۱ و ۲ و ۳ نتایج PCR این آزمون ها را نشان می دهد. پس از بهینه سازی شرایط PCR و بدست آوردن شرایط مطلوب، تغییرات نمونه ها به وسیله تکنیک SSCP بر روی ژل پلی آکریل امید غیر دناتوره مورد بررسی قرار گرفت. جهت بهینه سازی شرایط تکنیک SSCP فاکتورهای متعددی تغییر داده شد که یکی از آنها بهینه سازی شرایط دناتوراسیون محصولات PCR می باشد که با استفاده از بافر SSCP که محتوی فرمامید و NaOH است انجام گرفت. این ترکیبات

تهیه گردید. توالی پرایمرها در جدول شماره ۱ آمده است. از تکنیک SSCP برای بررسی وجود جهش استفاده گردید. با توجه به این که افزایش طول محصولات بیشتر از ۳۰۰ نوکلئوتید باعث کاهش دقت و حساسیت این تکنیک می شود به همین دلیل در مورد آزمون ۱ و ۲۰ با طول بیش از ۳۰۰ نوکلئوتید دو جفت پرایمر طراحی گردید، که برای آزمون ۱ به صورت 1A و 1B و برای آزمون ۲۰ به صورت 20A و 20B نامگذاری شدند. این آزمون ها، طبق برنامه های جداگانه تکثیر گردیدند:

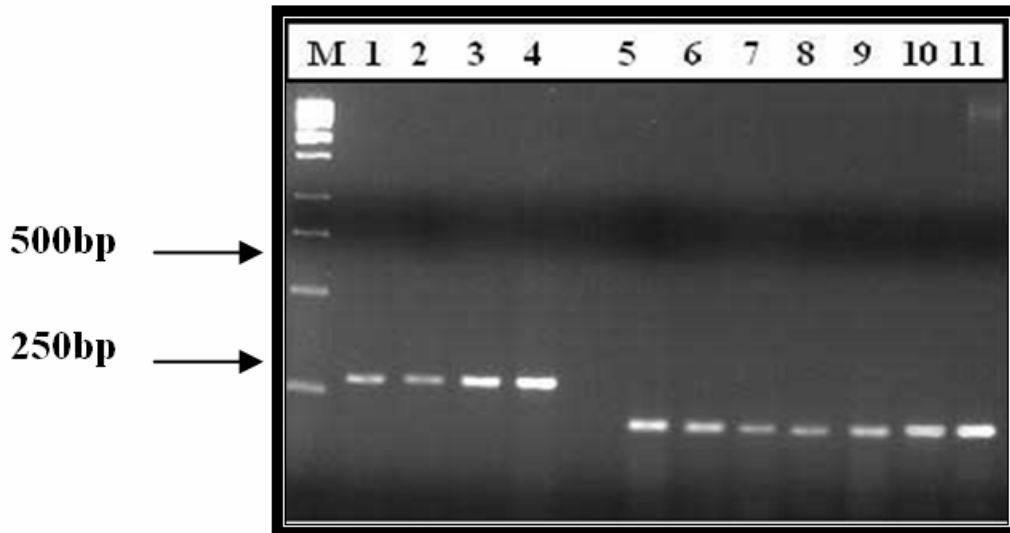
برنامه استفاده شده برای آزمون های 1A و 20A و ۹ شامل ۳۰ سیکل: ۹۴ درجه سانتی گراد یک دقیقه، ۵۰ درجه سانتی گراد یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد یک دقیقه و برای آزمون های 1B و 20B شامل ۳۰ سیکل: ۹۴ درجه سانتی گراد یک دقیقه، 48 و ۵۳ درجه سانتی گراد (به ترتیب برای 1B و 20B) یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و سرانجام در پایان، ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

سپس صحت تکثیر محصولات با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد تائید گردید. تکنیک SSCP پس از بهینه سازی های متعدد در ترکیب ژل آکریل امید غیر دناتوره ۱۰ درصد، حاوی گلیسرول ۵ درصد برای مشخص کردن جهش ها استفاده شد. هم چنین برای دناتوره کردن محصولات PCR، از بافر SSCP دارای ترکیب NaOH و فرمامید (0.05% Bromophenol blue، 10Mm NaOH، 12 mM EDTA، 05% Xylene Cyanol FF، 6% Glycerol، 30% Formamide) استفاده شد. به منظور جلوگیری از باز شدن ساختارهای ثانویه ژل الکتروفورز به دستگاه خنک کننده وصل شد و با توجه به طول محصولات PCR ژل

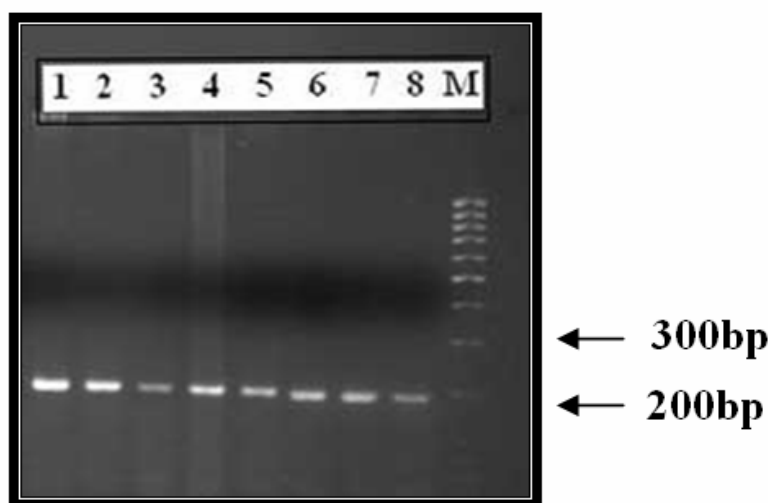
با کاهش نقطه ذوب به دو رشته‌ای شدن بهتر محصولات وضوح و شدت باندها شد. کمک می‌کند. همچنین ترکیب این بافر سبب افزایش



شکل ۱: محصولات PCR اگزون شماره ۹ را نشان می‌دهد. نمونه ۱، ۲ و ۳ نمونه‌های بیمار و نمونه ۴ نمونه نرمال می‌باشد (M: DNA مارکر ۱۰۰ bp).



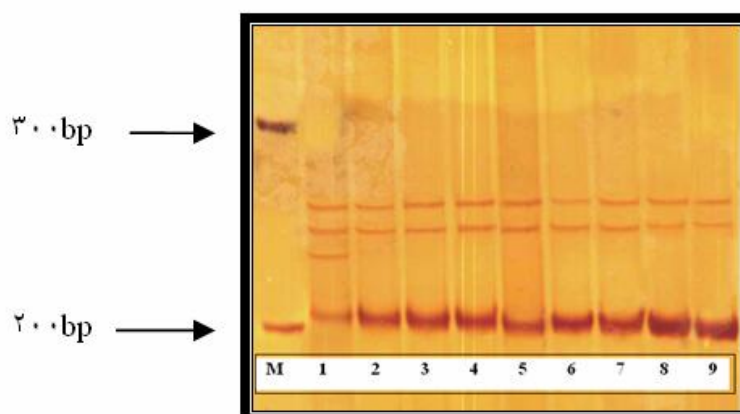
شکل ۲: PCR اگزون‌های ۱ و ۹ را در کنار هم نشان می‌دهد. نمونه‌های شماره ۱ تا ۴ محصولات PCR اگزون ۹ و نمونه‌های شماره ۵ تا ۱۱ PCR اگزون ۱ را نشان می‌دهد. نمونه‌های ۴ و ۵ نرمال و بقیه نمونه‌ها، بیمار می‌باشند (M: DNA مارکر ۱Kb).



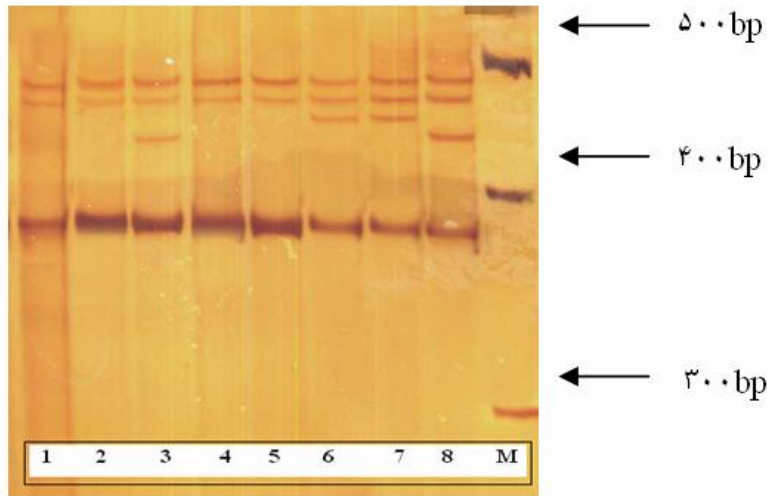
شکل ۳: PCR اگزون ۲۰ را نشان می دهد. مطابق شکل نمونه های شماره ۱ و ۲ محصولات PCR نمونه های نرمال و نمونه های شماره ۳ تا ۸ PCR نمونه های بیمار را نشان می دهد (M: DNA مارکر ۱۰۰ bp).

جهش دار احتمالاً هتروزیگوت بودن جهش های PIK3CA را نشان می دهند. به منظور اطمینان از صحت وجود جهش در نمونه ها، نمونه های مشکوک مجدداً PCR شده و بر روی ژل آکریل امید برده شدند. اکثر نمونه های مشکوک در آزمایش تکرار نیز تغییر را نشان دادند. همان طور که در شکل ۴ برای اگزون ۱ مشاهده می شود، نمونه ۱ دارای جهش می باشد.

تغییر شرایط الکتروفورز شامل تغییر درصد ژل از ۶ به ۱۰ درصد و اضافه کردن ترکیب خنثی گلیسرول تفکیک و وضوح باندها را به میزان قابل توجهی افزایش داد. شکل های شماره ۴، ۵ و ۶ به ترتیب ژل های آکریل امید اگزون های ۱، ۹ و ۲۰ را نشان می دهند. با توجه به اینکه نمونه های استفاده شده به تشخیص پاتولوژیست فاقد بافت طبیعی می باشند بندهای اضافی در نمونه های



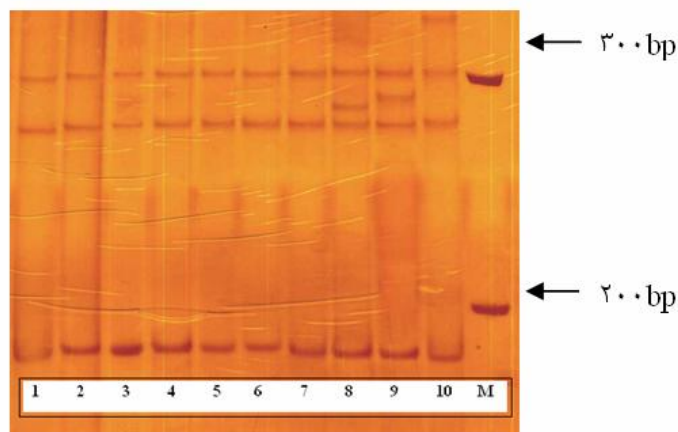
شکل ۴: SSCP اگزون ۱ با استفاده از پرایمرهای 1B را نشان می دهد. مطابق شکل بالا نمونه شماره ۱ نمونه دارای جهش است. نمونه ۵ نمونه نرمال و بقیه نمونه های بیمار فاقد جهش هستند (M: DNA مارکر ۱۰۰ bp).



شکل ۵: نمونه ای از ژل های SSCP اگزون شماره ۹ را نشان می دهد. ردیف های ۳، ۶، ۷ و ۸ نمونه های بیمار دارای جهش هستند که با توجه به باندهای متفاوت، احتمالاً دارای جهش های متفاوت می باشند. نمونه های ۴ و ۵ نمونه های بیمار فاقد تغییر می باشد (M: DNA مارکر ۱۰۰ bp).

این ژن مشاهده شد که ۶ درصد آن در اگزون ۱، ۷ درصد در اگزون ۲۰ و ۱۵ درصد در اگزون ۹ مشاهده گردید (جدول ۲).

در مورد اگزون ۹ در شکل شماره ۵، نمونه های ۴ و ۵ بدون جهش و بقیه نمونه‌ها دارای جهش می‌باشد. برای اگزون ۲۰ (شکل شماره ۶) نمونه‌های ۸ و ۹ دارای جهش می‌باشد. در مجموع حدود ۲۸ درصد جهش در



شکل ۶: بررسی جهش های اگزون ۲۰ به وسیله SSCP: در این شکل نمونه های شماره ۱ و ۲ نرمال و نمونه های ۳ تا ۷ نمونه های بیمار فاقد جهش هستند. نمونه های شماره ۸ و ۹ نمونه های دارای جهش می باشند (M: DNA مارکر ۱۰۰ bp).

جدول شماره ۱: توالی پرایمر های مورد استفاده در این تحقیق

Primer		sequence	Length of product
Exon 1A	F	5' CTC CAC GAC CAT CAT CAG G 3'	171bp
	R	5' GAA GAT TCA TCT TGA AGA AGT TG 3'	
Exon 1B	F	5' GAA GCA AGA AAA TAC CCC CTC 3'	200bp
	R	5' CCA ATT TCT CGA TTG AGG ATC 3'	
Exon 9	F	5' TCC AGA GGG GAA AAA TAT GAC 3'	272bp
	R	5' TAT GGT AAA AAC ATG CTG AG 3'	
Exon 20A	F	5' AGA CCT GAA GGT ATT AAC ATC 3'	194bp
	R	5' TCG AAT GTA TGC AAT GTC ATC 3'	
Exon 20B	F	5' TGA TGC TTG GCT CTG GAA TG 3'	184bp
	R	5' ATG CTG TTT AAT TGT GTG GAA G 3'	

جدول ۲: نشان دهنده درصد جهش در آگزون های ژن مورد بررسی

Exon	۱	۹	۲۰
Percentage of Mutation	۶	۱۵	۷
Total			۲۸

باعث تغییر رمز اسید آمینه گلوتامیک اسید به آلانین می‌شود. گلوتامیک اسید آمینه‌ای قطبی و اسیدی است، در حالی که آلانین غیر قطبی و خنثی می‌باشد. بنابراین این تغییر تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر ساختار پروتئین خواهد گذاشت.

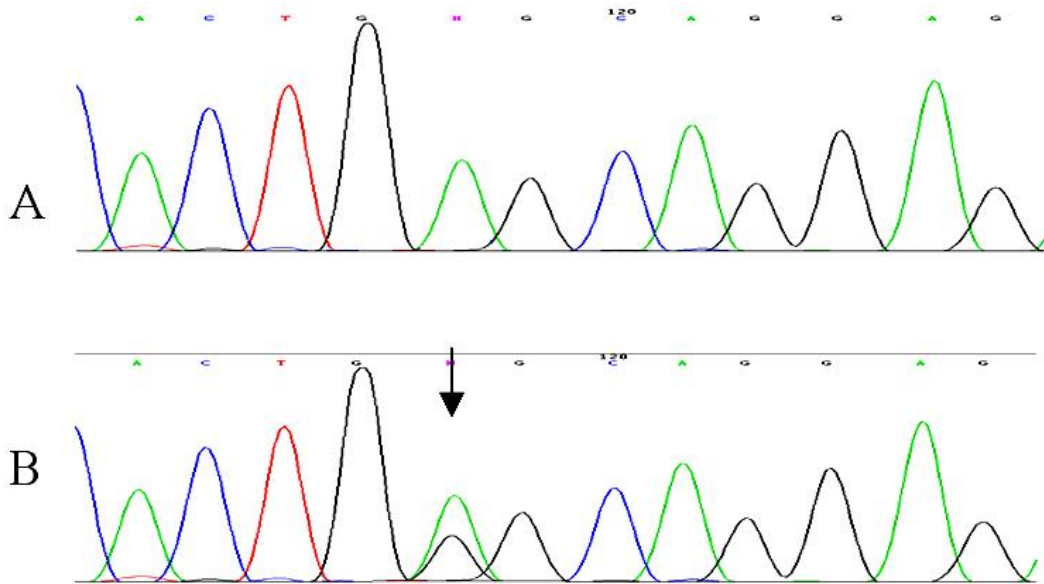
پس از مشخص کردن درصد جهش های این ژن، اثر جهش بر چند فاکتور مرتبط با سرطان شامل درجه بندی توموری، وضعیت هیستولوژیک و مناساز به غدد لنفاوی مورد بررسی قرار گرفت.

نمونه‌های آگزون ۹ نسبت به آگزون ۱ و ۲۰ تغییرات بیشتر و متنوع‌تری را نشان می‌دهند که احتمالاً به علت جهش های متفاوت این نمونه ها است.

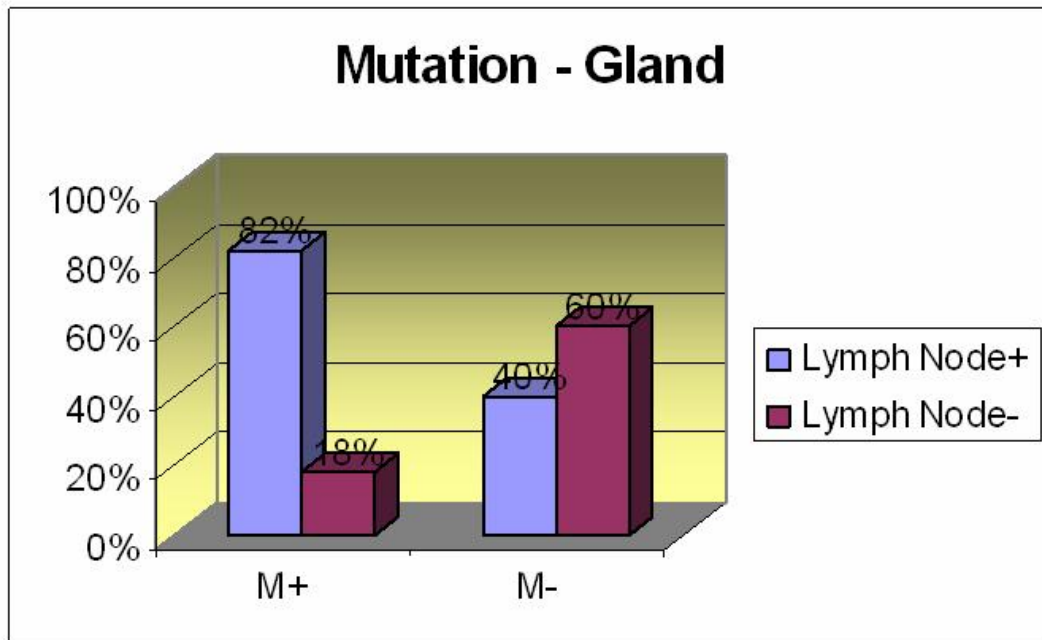
سپس یکی از نمونه‌های مشکوک به جهش جهت تعیین توالی از ژل استخراج شد، تا ارتباط بین تغییر الگوی بندها و وجود جهش تائید و در ضمن نوع جهش مشخص شود. نتایج تعیین توالی در شکل ۷ آمده است. تعیین توالی نمونه ۷ آگزون ۹، جهش متداول تبدیل نوکلئوتید A به G (A1634G، E545A) را نشان داد که

متاستاز به غدد لنفاوی در افراد دارای جهش نسبت به افراد فاقد جهش ۷ برابر بیشتر است. نمودار شماره ۸ نشان دهنده درصد درگیری غدد لنفاوی در بیماران دارای جهش و فاقد جهش است.

با احتمال $X^2=6.0$ و $P=0.01$ و $Odd\ Ratio=7$ در بررسی ارتباط جهش و متاستاز به غدد لنفاوی به دست آمد که نشان دهنده ارتباط معنی‌دار جهش و درگیری غدد لنفاوی است. $Odd\ Ratio=7$ نشان می‌دهد ریسک



شکل ۷: تعیین توالی اگزون ۹: A, توالی بافت نرمال. B, توالی نمونه ۷ اگزون ۹ (بیمار) که جهش **A1634G** (**E545G**) را نشان می‌دهد.



شکل شماره ۸: نشان دهنده درصد درگیر بودن غدد لنفاوی در بیماران دارای جهش و بدون جهش در ژن مورد بررسی

دهنده عدم ارتباط جهش و وضعیت هیستولوژیک تومور است.

بحث و نتیجه گیری

بررسی تغییرات مسیر PI3K/AKT در سرطان ها که در ارتباط با چند پروتئین مهم درون سلولی شامل تغییرات ErbB2، AKT و PTEN است از اهمیت بالایی برخوردار است (۲۰). در اکثریت سرطانها تغییرات یکی از این پروتئینها دیده می شود (۲۰). داروهای مهارکننده فعالیت کینازی پروتئین PI3K که در راس این مسیر قرار دارد می تواند اثرات آنکوژنیک این مسیر را کاهش دهد (۱۲).

درصد بالای جهش (۲۸%) این ژن، آنکوژنیک بودن آن را تأیید می کند. میزان جهش های PIK3CA در مناطق مختلف، متفاوت می باشد، میزان جهش های این ژن در استرالیا ۸ و ۴۰ درصد (۳ و ۲۱) در امریکا بین ۲۵ تا ۳۰ درصد (۱۹، ۱۲، ۲۹) در ژاپن ۲۹ درصد (۱۹) و در نروژ ۳۷ درصد (۲۱) گزارش شده است.

ارتباط مثبت جهش با درگیری غدد لنفاوی با $P=0.01$ به دست آمد. Campbell در سال ۲۰۰۴ و Bachman و همکاران در همین سال و Maruyama و همکاران در سال ۲۰۰۷ در مطالعه خود ارتباطی بین جهش و درگیری غدد لنفاوی پیدا نکرد. ولی Saal در سال ۲۰۰۵ این پیوستگی را با احتمال $P=0.03$ نشان داد (۲، ۳، ۱۹ و ۲۰). در این مطالعه و در مطالعه Saal و همکاران در سال ۲۰۰۵ ارتباط مثبت جهش های PIK3CA و متاستاز به غدد لنفاوی نشان داده شده است (۱۹) و همچنین

هم چنین ارتباط جهش با درجه بندی تومور نیز مورد بررسی قرار گرفت. بیماران مورد مطالعه در این تحقیق در سه Grade I، II، III تقسیم بندی می شوند. ۷% بیماران Grade I، ۵۲% بیماران Grade II و ۳۹% آنها Grade III می باشند (جدول ۳).

جدول ۳: بررسی ارتباط جهش با grade تومور

Grade	I	II	III
Percentage of Mutation	۷	۵۲	۳۹

$x^2=8/78$ با $P=0/01$ نشان دهنده ارتباط مثبت جهش و Grade تومور است. Grade III Odd Ratio نسبت به Grade II $8/3$ به دست آمد که نشان می دهد احتمال وجود جهش در Grade III برابر بیشتر از Grade II است. به علت کافی نبودن نمونه ها در Grade I از محاسبه Odd Ratio برای این Grade صرف نظر شد. احتمال وقوع جهش در Grade III نسبت به مجموع دو Grade دیگر در بیماران دارای جهش نسبت به بیماران فاقد جهش ۴ برابر شده است. $Odd\ Ratio=4/7$ برای این گروه محاسبه شد. ارتباط جهش با وضعیت هیستولوژیک مورد بررسی قرار گرفت. سه نوع وضعیت هیستولوژیک شامل IDC (Invasive، ILC (Invasive Lobular Carcinoma) و DCIS (Dctal Carcinoma In Situ) در بیماران مورد مطالعه دیده شد. ۷۰% بیماران در وضعیت IDC، ۲۵% به صورت ILC و ۵% بقیه به صورت DCIS هستند. $X^2=0/2$ با $P=0/8$ به دست آمد که نشان

بنابراین از این لحاظ می‌تواند به عنوان فاکتور تشخیصی و درمانی به کار رود.

منابع

- 1- M., Aoki, E., Blazek, & P. K., Vogt, A role of the Kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins PI3K and AKT. *Proceedings of the National Academy of Science*. 98. 136-141; (2001).
- 2- K. E., Bachman, p., Argani, Y., Samuel, N., Silliman, J., Ptak, S., Szobo, H., Konishi, B., Karakas, B., Blaire, C., Lin, B., Peters, V. E., Velculescu, B. H., Park, The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancer. *Cancer Biology and Therapy*. 3. 772- 775; (2004).
- 3- I. G., Campbell, S. E., Russel, D. Y., Choong, K. G., Montgomery, M. I., Civarella, C. S. F., Hooi, B. E., Cristiano, R. B., Person, & W. A., Philips Mutation of PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Research*. 64. 7678- 7681; (2004).
- 4- P. I., Depowski, & S. J., Rosenthal, Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol*. 14. 672- 6; (2001).

Depowski و همکاران در سال ۲۰۰۱ در مطالعه خود بر روی ژن PTEN که فسفاتاز PIP3 و تنظیم کننده منفی مسیر PI3K/AKT است پیوستگی بین عدم وجود پروتئین PTEN و متاستاز به غدد لنفاوی را نشان داد (۴)، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که افزایش تولید PIP3 در سلول و فعال شدن مسیر PI3K/AKT منجر به متاستاز سلول‌های سرطانی به غدد لنفاوی می‌شود. این واقعیت که PTEN ممانعت کننده مهاجرت سلولی و PI3K تنظیم کننده تحریک سلولی است تأیید کننده نتیجه فوق است. بنابراین مهار این مسیر می‌تواند از متاستاز سلول‌های سرطانی جلوگیری کند.

درصد نسبتاً بالای جهش‌های این ژن، در این جمعیت نیز خاصیت آنکوژنیک آن را تأیید می‌کند و اهمیت این مسیر را به عنوان مارکری تأثیر گذار در اهداف درمانی نشان می‌دهد. از آن جایی که تغییرات PTEN و جهش‌های PIK3CA به صورت آنتاگونیسم عمل می‌کنند و بیماران فاقد پروتئین PTEN به درمان به داروی Herceptin جواب نمی‌دهند بنابراین مشخص کردن پروتئین‌های تغییر یافته در این مسیر می‌تواند در تعیین مسیر درمانی بیمار را موثر باشد.

ارتباط مثبت جهش‌های ژن PIK3CA و افزایش بیان c-erbB2 نشان می‌دهد که این دو فاکتور تواما با غلبه بر تأثیر PTEN به عنوان تنظیم کننده منفی مسیر PI3K/AKT، منجر به سرطانی شدن سلول می‌شوند (۲۰). بنابراین با توجه به درصد بالای جهش‌های ژن PIK3CA در سرطان پستان می‌توان نتیجه گرفت که این پروتئین در گسترش سرطان در مراحل اولیه نقش دارد و

- huma Colorectal cancer. *Cancer Research*. 65. 4562- 4567; (2005).
- 12- S. J., Isakoff, J. A., Engelman, H. Y., Irie, J., Luo, S. M., Brachmann, R. V., Pearlin, L., Cantley, & J. S., Brugge, Breast cancer associated PIK3CA mutation are oncogenic in mammary epithelial cells. *Cancer Research*. 65. 10992-11000; (2005).
- 13- C., Jimenez, C., Calvo, E., Diez, J. P., Alber, S. G., Copin, C. V., Kobbe, J., Downward, & A. C., Carrera, Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3- kinase. *EMBO*. 17. 743-753; (1998).
- 14- S., Kang, A. G., Bader, & P. K., Vogt, Phosphatidylinositol 3- Kinase mutation identified in human cancer are oncogenic. *Proceedings of the National Academy of Science*. 102. 802- 807; (2005).
- 15- H., Lodish, A., Berk, S. L., Zipursky, P., Matsudaira, D., Baltimore, and J. E., Darnel, *Molecular Cell Biology*. Fourth Edition. Free man Co. 872-878; (2000).
- 16- D. A., Levin, F., Bogomolny, C. J., Yee, A., Lash, R. R., Barakat, P. I., Borgen, & J., Boyd, Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Human Cancer Biology*. 11. 2875-2878; (2005).
- 5- F. M., Foster, C. J., Traer, S. M., Abraham, & M. J., Fry, The phosphoinositide(PI)3- kinase family. *Cell Science*. 116- 3037 – 3040; (2003).
- 6- D. A., Fruman, L. E., Rameh, and L. C., Cantley. Phosphoinositide Binding Domains Embracing 3-Phosphate. *Cell*. 97. 817-820, (1999).
- 7- Futreal, P. A., Kaopryk, A., Birney, E. 2001. Phosphoinositide 3-kinase and the regulation of cell growth. *Cancer and Genetics*. *Nature*. 409. 850- 852.
- 8- M. J., Fry, Phosphoinositide 3- Kinase Signalling in Breast cancer: how big a role might it play. *Breast cancer research*. 3: 304- 312; (2001).
- 9- X., Guan, J. S.T., Sham, Y., Fang, K., Huo, & J. M., Yang, Isolation of a novel candidate oncogene within a frequently amplified region at 3q26 in ovarian cancer. *Cancer research*. 61. 3806- 3809; (2001).
- 10- W. C., Hahn, R. A., Winberg, Modeling the molecular. *Nature Review Cancer*. 2. 331- 340; (2002).
- 11- T., Ikenoue, F., Kanai, Y., Hikiba, T., Obata, Y., Tanaka, J., Imamura, M., Ohta, A., Jazag, B., Guleng, K., Tateshi, Y., Asaoka, M., MAsumura, T., Kawabe, & M., Omata, Functional analysis of PIK3CA gene mutation in

- 22- M. P., Scheid, and V., Duronio, Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt: involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Science*. 95. 7439-7444; (1998).
- 23- L., Shayesteh, Y., Lu, W., Kuo, R., Boldocchi, T., Godfrey, C., Collins, D., Pinkel, B., Powell, G. B., Mills, & J. W., Gray, PIK3CA is implicated as oncogene in ovarian cancer. *Nature genetics*. 21. 99- 102; (1999).
- 24- Y., Tanaka, F., Kanai, M., Tada, Y., Asaoka, B., Guleng, A., Jazag, M., Ohta, T., Ikenoue, K., Tateishi, S., Obi, T., Kawabe, O., yokosuka, & M., Omata, Absence of PIK3CA hot spot mutations in hepatocellular carcinoma in Japanese pations. *Oncogene*. 25. 2950- 2952; (2006).
- 25- J. E., Thompson, & C. B., Thompson, Putting The rap on AKT. *Clinical Oncology*. 22. 4217-4224; (2004).
- 26- J. E., Thompson, & C. B., Thompson, *Genetics in medicine*. Sixth edition. 344-367; (2001).
- 27- K., Vahaesebroeck, & M. D., Waterfield, Signaling by Distinc classes of Phosphoinositide 3- Kinase. *Experimental Cell Research*. 253: 239-254; (1999).
- 17- I., Lopez, M., Ilasaca, P. P., Crespo, G. J., Pellici, S., Gutkind, & R., Watzker, Linkage of G protein- coupled receptors to MAPK signaling pathway through PI3Kinase. *Science*. 275- 394; (1997).
- 18- S. A., Miller, D. D., Dykes, and H. F., Polesky, A simple salting out proceduce for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Reasearch*. 16. 1215; (1988).
- 19- N., Maruyama, Y., Miyoshi, T., Taguchi, Y., Tamaki, M., Monden, & S., Noguchi, Clinopathologic analysis of breast cancers with PIK3CA mutations in Japanese women. *Clinical Cancer Research*. 13. 372- 379; (2007).
- 20- L. H., Saal, K., holm, M., Maurer, J., Enoksson, H., Hibshosh, A., Borg, R., Parson, PIK3CA mutations correlate with hormone receptoes, node metastasis and ERBB2 and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer research*. 65. 2554-2559; (2005).
- 21- Y., Samuel, Z., Wang, A., BArdeli, N., Silliman, J., Ptac, S., Szabo, H., Yan, A., Gazdar, S. M., Powell, G. J., Riggins, J. K., Willson, S., Markowitz, K. W., Kinzler, B., Vogelstein, & C. E., Velculescu, High frequency of mutation of the PIK3CA gene in humen cancers. *Science*. 304-554; (2004).

Sidrnasky, Somatic mutation and gain copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Research*. 7. 609- 616; (2004).

31- Z., Xu, D., Stokoe, L. P., Kane, & A., Weiss, The inducible expression of the tumor suppressor gene PTEN promotes apoptosis and decrease cell size by inhibiting the PI3K/ Akt pathway in jurkat T cell. *Cell growth and differentiation*. 13. 285- 296; (2002).

28- Y., Wang, A., Helland, R., Holm, G. B., Kristensen, & A. L., Borresen-Dale, PIK3CA mutations in advanced ovarin carcinomas. *Human Mutation*. 787. 1-5; (2005).

29- B., Weir, X., Zhao, & M., Meyerson, Somatic Alteration in human cancer genom. *Cancer Research*. 6. 433- 440; (2004).

30- G., Wu, M., Xing, E., Mambo, X., Huang, J., Liu, Z., Guo, A., Chaherjee, D., Goldenberg, S. M., Golin, S., Sukumar, B., Trink, & D.,