

کاربرد ژنتیک در سرطان

دکتر رضا شیرکوهی^۱، دکتر حسین مبارکی^۲، دکتر علی یزدی‌نژاد^۳

مقاله بازآموزی

چکیده

بیماری سرطان بر پایه و اساس اختلالات ژنتیکی بنا نهاده شده است. به همین دلیل امروزه نقشی بسیار مهم در این دسته از بیماریها را برای آن در نظر می‌گیرند. این اختلالات می‌تواند بزرگ (در مقیاس مولکولی) در حد کروموزوم و یا بسیار کوچک در حد نوکلئوتید باشد که نهایتاً منجر به تغییرات غیر قابل بازگشت در سلول می‌گردد. روش‌های تکنیکی مرسوم در ژنتیک سرطانی عمدتاً بر پایه بررسی‌های مولکولی و یا سیتوژنتیکی می‌باشد. بر این اساس قادر خواهیم بود سرطان‌های فامیلیال را در خانواده قربال کرده و در برخی موارد خواهیم توانست به تشخیص بیماری و یا بررسی احتمال عود، میزان پاسخگویی به درمان و پیش‌بینی پیش‌آگهی سرطان کمک کنیم. در بعد درمانی روش‌های ژن درمانی عمدتاً به عنوان درمان مکمل و نه قطعی به کار می‌روند. در این مقاله سعی بر این خواهد بود تا کلیاتی از کاربرد این علم در سرطان مورد بحث قرار گیرد.

واژه‌گان کلیدی: سرطان، ژنتیک مولکولی، سیتوژنتیک، ژن درمانی

مقدمه:

اتیولوژی بیماری سرطان معمولاً بر پایه اختلالات ژنتیکی می‌باشد. برای رسیدن یک سلول به نقطه بدون بازگشت و ایجاد یک نوپلازی نواقص متعددی در نقشه ژنتیکی سلول ایجاد می‌گردد و نهایتاً منجر به ایجاد سلول‌هایی نامیرا با رفتارهای پاتوفیزیولوژیک جدید می‌گردد. در این بیماری علم ژنتیک از مناظر متعددی می‌تواند کمک‌کننده باشد. تغییرات ژنتیکی در این بیماری که در سلول‌های زاینده اتفاق می‌افتد معمولاً منجر به مستعد ساختن فرد به سرطان می‌گردد. چنین تغییراتی معمولاً به صورت صفات اتوزومال غالب به نسل‌های بعد منتقل می‌گردد. تغییراتی که در سلول‌های سوماتیک اتفاق می‌افتد

مختص به خود‌تومور بوده و در نتیجه با بررسی ناحیه درگیر قابل تشخیص می‌باشد. در این زمینه بر اساس نوع سرطان و همچنین نوع نواقص ژنتیکی، کاربرد متفاوتی از این علم را شاهد هستیم که در این مقاله سعی بر این است که به صورت جمع‌بندی شده این کاربرد را بیان کنیم.

انواع تغییرات ژنتیکی در ارتباط با سرطان

در ارتباط با پیدایش سرطان تغییرات متفاوتی در سلول‌ها رخ می‌دهد که منجر به ایجاد سرطان در آنها می‌گردد. امروزه حتی این تغییرات را در محیط میکروسکوپی اطراف سلول‌ها بررسی می‌کنند. بسیاری از این تغییرات در تنظیم بیان ژن‌های کلیدی در سلول‌ها رخ می‌دهد و

۱- متخصص ژنتیک، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران

مجتمع بیمارستانی امام خمینی، انستیتو کانسر، مرکز تحقیقات سرطان، بهار تمان ژنتیک، بخش ژنتیک مولکولی

۲- عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- پزشک عمومی، سازمان بهداشت و درمان صنعت نفت

مولکول DNA و رونوشت آنزیمی DNA می باشد. بطور کلی ترکیبات این فرآیند متشکل است از جفت پرایمرهای مکمل رشته های DNA (پیشرو یا Forward و معکوس یا Reverse)، بافر مخصوص، کاتیون های دو ظرفیتی مانند منیزیم و منگنز، مولکول های اسید نوکلئیک ۲ فسفات (dNTP) و آنزیم Taq polymerase جهت رونویسی بکار می رود. این آنزیم از باکتری به نام Thermus Aquaticus مشتق گردیده است که می تواند از آجرهای نوکلئوتیدی ساختمانی از DNA بسازد (۱-۳). این فرآیند خود روش های متنوعی را دارد که عمده ترین آنها عبارتند از:

۱) PCR اختصاصی برای آلل (Allele-specific PCR) که در مواردی که بین دو آلل از نقطه نظر توالی تفاوت وجود داشته باشد به کار می رود.

۲) PCR اختصاصی برای متیلاسیون (Methylation-specific PCR)، در بسیاری از موارد جهت بررسی متیلاسیون برخی از قسمت های DNA مخصوصاً در ناحیه پرموتور که نقش مهمی را در بیان ژن دارد بکار می رود (۵).

۳) PCR آشیانه ای (Nested PCR) که جهت بالا بردن حساسیت در کپی کردن قطعه مورد نظر بکار می رود. در این روش ابتدا قطعه ای بزرگتر از آنچه مورد نظر است کپی می گردد و سپس قطعه کوچکتر از میان همان محصول PCR کپی می گردد (۶).

۴) PCR مرکب (Multiplex-PCR) جهت کپی کردن همزمان چند قسمت متفاوت از DNA از آن استفاده می گردد. نکته مهم این است که پرایمرها باید به صورتی طراحی گردند که اندازه محصولات متفاوت باشند و در بررسی و آنالیز قابل افتراق باشند (۷).

۵) PCR کمی (Real Time PCR)، بیشتر در زمانی بکار می رود که بخواهیم تعداد کپی های محصولات PCR را بررسی کنیم (۸).

۶) PCR همراه با رونویسی معکوس (Reverse Transcription PCR) که جهت کپی برداری مولکول DNA از RNA می باشد. در واقع با رونویسی معکوس از مولکول RNA مولکول

بسیاری از آنها منجر به تغییرات رفتاری سلول و در نتیجه بروز رفتارهای تهاجمی از آن می گردد. عمده ترین آسیب هایی که در تومور ها از نقطه نظر ژنتیکی اتفاق می افتد دو دسته می باشد. شامل تغییرات کروموزومی (مانند تغییر در تعداد و یا ساختار کروموزومی مثل ترانسلوکاسیون ها و یا حذف قطعه ای) و همچنین تغییر در توالی DNA می باشد که منجر به ناپایداری ژنتیکی در سلول ها می گردد. فعال شدن یک یا چند انکوژن یا غیر فعال شدن ژن های سرکوبگر تومور این روند نئوپلاستیک را در سلول های آسیب دیده تسریع خواهد کرد. از آنجا که در این مقاله بیشتر به نقش کاربردی ژنتیک در سرطان و به صورت بالینی خواهیم پرداخت، سعی بر این خواهد بود که این تغییرات در غالب مثالهایی در انواع سرطان ها مطرح گردد. همانگونه که ذکر گردید مجموعه ای از تغییرات جهت ایجاد نئوپلاسم اتفاق می افتد.

روش های متداول در ژنتیک سرطان

می توان این روش ها را به دو دسته مولکولی و سیتوژنتیک تقسیم بندی نمود:

الف) روش مولکولی:

بر اساس نوع بیماری و بررسی مورد نیاز از انواع روش های مولکولی برای بررسی بیان ژن و یا تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در بیماری استفاده می شود:

- واکنش زنجیره ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction) PCR

شاید بتوان گفت این روش متداول ترین روش موجود می باشد و پایه و اساس بسیاری از تست های ژنتیکی را در بر می گیرد. تکنیک فوق بر اساس آنچه در سلول برای کپی سازی DNA اتفاق می افتد بازسازی گردیده است (۱-۳) و در سال ۱۹۹۳ منجر به دریافت جایزه نوبل شیمی برای ابداع کننده آن یعنی کری مولیس (Kary Mullis) گردید (۴). در این فرآیند از یک یا چند کپی DNA هزاران تا میلیون ها کپی می گردد که توالی مشابهی دارند. روش این فرآیند بر اساس چرخه حرارتی بوده که شامل چرخه های متوالی از حرارت و خنک کردن جهت باز شدن

عکس روش G Banding می باشد. (۳) روش C Banding که گیمسا به قسمت تشکیل دهنده هتروکروماتین اتصال یافته و سیب رنگ آمیزی سانترومرها می گردد.

(۴) روش Q Banding با استفاده از فلئورسانس استفاده می گردد و بسیار شبیه G Banding ظاهر می شود.

(۵) روش T Banding جهت مشاهده تلومرها بکار می رود.

(۶) رنگ آمیزی نقره که با استفاده از نیترات نقره و جهت رنگ آمیزی پروتئین های همراه با اجزاء تشکیل دهنده هستک مورد استفاده قرار می گیرد.

به طور معمول چه چیزهایی در یک کاریوتایپ مورد بررسی قرار می گیرد:

(۱) تفاوت در اندازه کروموزوم ها

(۲) تفاوت در محل سانترومر ها

(۳) تفاوت در تعداد پایه کروموزوم ها

(۴) تفاوت در تعداد و وضعیت ریزماهواره ها

(۵) تفاوت در درجه و توزیع ناحیه هتروکروماتیک

کاربرد ژنتیک در غربالگری

بیماری سرطان در بیشتر موارد یک بیماری اسپورادیک می باشد. یعنی اینکه در بیشتر موارد در سلول های سوماتیک، تغییرات ژنتیکی اتفاق افتاده و ناپایداری ژنتیکی در این سلول ها منجر به ایجاد سلول های نئوپلاستیک می گردد. در حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد موارد بیماری سرطان در اعضای یک خانواده ممکن است دیده شود که به آن سرطان خانوادگی یا فامیلیال می گویند. از طرفی دیگر سرطان ارثی در صد کمتری از این گروه را به خود اختصاص می دهد (۲۲-۲۱).

زمانی که شرح حال بیمار تکمیل می گردد، مشاور ژنتیک می تواند اطلاعات بیمار را مورد تجزیه و تحلیل قرار دهد که بر این اساس بتواند تعیین کند که بیمار مبتلا به سرطان ارثی است و یا اینکه سرطان خانوادگی و یا اصطلاحاً فامیلیال مطرح می گردد. بروز سرطان های

با قسمتهای مشابه در کروموزوم هیبرید شده و با میکروسکپ فلئورسنت شناسایی می گردد (۱۴). این روش Gold Standard برای بررسی HER2 و یا Human Epidermal growth factor Receptor 2 می باشد. یافتن بیان بالای این رسیپتور بر روی بافت تومور پستان نشاندهنده موثر بودن آنتی بادی مونوکلونال trastuzumab با نام تجاری Herceptin بر روی این سلول ها می باشد.

- روش هیبریداسیون درجای کروموزونیک chromogenic in situ hybridization (CISH) با استفاده از رنگ آمیزی های قراردادی، کمک به تعیین میزان ازدیاد فعالیت ژن، ترانسلوکاسیون های کروموزومی و تعداد کروموزوم ها می کند (۱۵). در مقایسه با FISH سه برتری مهم دارد:

(۱) جزئیات بافتی برش پارافینی معمولاً با زمینه درخشانتری ظاهر می گردد.

(۲) جزئیات مورفولوژیک به آسانی با استفاده از بزرگنمایی های پائین تر قابل مشاهده است.

(۳) سیگنال پروب به سرعت کم رنگ نمی گردد.

- روش کاریوتایپ

روش بسیار متداول و همچنین قدیمی در بررسی کروموزوم ها می باشد. برای این امر ابتدا سلول ها کشت داده شده و سپس بوسیله ترکیباتی مانند کلشی سین در مرحله میتوز متوقف می گردند. پس از آن، کروموزوم ها بر روی لام پهن شده، رنگ آمیزی گردیده و در زیر میکروسکپ شکل و تعداد کروموزوم ها بررسی و از آنها عکس گرفته می شود. عکس کروموزوم ها چیده شده و به ترتیب در کنار هم قرار می گیرد (کاریوگرام). بر اساس نوع رنگ آمیزی شکل ظاهری تفاوت دارد (۲۰-۱۶).

(۱) نوع متداول G Banding نام دارد که از گیمسا استفاده می شود. خطوط تیره یا هتروکروماتیک نشانگر نواحی پر از نوکلئوتیدهای AT و نواحی روشن یا یوکروماتیک نشانگر نواحی پر از نوکلئوتیدهای GC می باشد.

(۲) نوع R Banding که در واقع از نظر رنگ آمیزی

سرطان پستان و یا تخمدان که در سن کمتر از ۵۰ سال اتفاق بیافتد مخصوصا در مورد نژاد های خاص مانند یهودیان اشکنازی (که بیشتر در شرق یا مرکز اروپا زندگی می کنند).

سرطان در فردی که نقص مادرزادی دارد. شواهدی از بروز بیماری به صورت اتوزوم غالب دو یا چند تن از بستگان نزدیک با ابتلاء به سرطان مشابه (در سمت مشابه شایع در خانواده) دستجاتی از سرطان هایی که با یک سندرم فامیلیال شناخته شده همراه می باشند (مانند پستان و تخمدان) وجود مواردی از سرطان در یک خانواده به طوری که بیش از شانسی بودن آن باشد.

شایع ترین انواع سرطان های ارثی عبارتند از: سرطان های پستان و تخمدان، در اثر تغییرات در ژن های BRCA1 و BRCA2.

سرطان کولون، در اثر تغییرات در ژن هایی مانند hMSH1 و hMLH2 (که به عنوان سندرم لینچ Lynch Syndrome نامیده می شود) (جدول شماره ۱ برخی از ژن های شایع در سرطان کولون را نشان می دهد).

مشاورین ژنتیک در واقع به صورت روتین و گسترده و با استفاده از برنامه های محاسباتی رایانه ای و به کمک شرح حال و رسم شجره نامه از بیماران خطر بیماران را به طور فردی تعیین می کنند. موارد متعددی مشاهده شده است که در آن تاریخچه قوی از احتمال وجود یک پایه ارثی بیماری موجود باشد ولی در بررسی های ژنتیکی تغییراتی مشاهده نگردد. نتایج فوق نمی تواند احتمال وجود سرطان ارثی را رد کند. این نکته لازم به ذکر است که در مورد تعیین مستعد بودن یک فرد از اعضاء خانواده به سرطان ارثی، بهتر است که ابتدا فردی که مبتلا به بیماری است مورد بررسی قرار گیرد. در صورتی که این تغییرات ژنتیکی در فرد مبتلا یافت گردید می توان در دیگر اعضاء خانواده این نکته را جستجو نمود. این در حالی است که بررسی تغییرات در دیگر اعضاء خانواده در صورتی که موردی در فرد بیمار یافت نشود معنایی ندارد (۲۵-۲۶).

فامیلیال معمولا در خانواده ها به صورتی اتفاق می افتد که بیش از اینکه تصادفی بودن آن را از نظر شیوع بیان کند، ارتباط یک فاکتور مشترک را درون آنها مطرح می کند. این سرطانها معمولا در سنین پائین تر از انتظار اتفاق می افتند و یا ممکن است دلالت بر وجود یک جهش ژنی داشته باشند که در این صورت خطر ابتلا را بالا خواهند برد (۲۳-۲۱). سرطان فامیلیال بیانگر بروز دستجاتی از سرطان ها می باشد که ممکن است به صورت اتفاقی رخ دهند. به عبارتی دیگر ممکن است مجموعه ای از فاکتورهای ژنتیکی و غیر ژنتیکی (مانند محیطی) وجود داشته باشد که منجر به ایجاد سرطان در یک خانواده گردد (۲۳).

سرطان ارثی به معنای تغییر در یک ژن منفرد اصلی می باشد که قویا در بوجود آمدن و یا وضعیت های در ارتباط با سرطان خانواده دخالت داشته باشد.

نشانه هایی که دلالت بر کانسر ارثی دارند عبارتند از: بروز سرطان های متعدد در بستگان نزدیک، مخصوصا بیش از دو نسل. این امر شامل افرادی می گردد که در آنها تشخیص همان نوع سرطان و یا سرطان های با ارتباط ژنتیکی مشابه داده می شود. مثال های سرطان های مرتبط ژنتیکی شامل موارد زیر می باشد:

- پستان و تخمدان
- کولن و آندومتر (رحم)
- ملانوم و پانکراس
- پستان و سارکوم
- پستان و تیروئید

سن زودرس بیماری: جوانتر از ۵۰-۴۰ سال برای سرطان های بزرگسالان
سرطان های اولیه متعدد در یک فرد (مانند پستان و تخمدان)

سرطان در اندام های جفت (پستان و کلیه)
تظاهرات نادر سرطان (سرطان پستان در مردان)
وجود موارد غیر طبیعی که همراهی آنها به عنوان افزایش خطر سرطان مطرح می گردد (مانند خال های آتیپیک و خطر ابتلا به ملانوم پوستی)

جدول ۱- برخی ژن های لخیل در سرطان روده بزرگ (۲۴)

Gene	Syndrome	Hereditary Pattern	Predominant Cancer
Tumor suppressor genes			
APC	FAP	Dominant	Colon, intestine, etc.
AXIN2	Attenuated polyposis	Dominant	Colon
TP53 (p53)	Li-Fraumeni	Dominant	Multiple (including colon)
STK11	Peutz-Jeghers	Dominant	Multiple (including intestine)
PTEN	Cowden	Dominant	Multiple (including intestine)
BMPR1A	Juvenile polyposis	Dominant	Gastrointestinal
SMAD4 (DPC4)	Juvenile polyposis	Dominant	Gastrointestinal
Repair/Stability genes			
hMLH1, hMSH2, hMSH6, PMS2	Lynch	Dominant	Multiple (including colon, uterus, and others)
MYH (MutYH)	Attenuated polyposis	Recessive	Colon
BLM	Bloom	Recessive	Multiple (including colon)
Oncogenes			
KIT	Familial GI stromal tumor		GI stromal tumors
PDGFRA	Familial GI stromal tumor		GI stromal tumors

موارد این امر به دلیل عوامل محیطی و یا دیگر مسائل می باشد. در سندرم های فامیلیال توارث جهش ژنتیکی در یک فرد خطر ابتلا به سرطان و یا دیگر علائم فیزیکی را افزایش می دهد. سندرم های سرطان فامیلیال مختلفی وجود دارد و هرکدام از آنها مجموعه ای از علائم و

بنابراین سندرم سرطان فامیلیال وضعیتی ژنتیکی است. که با افزایش خطر برای انواع خاصی از سرطان ها همراه می باشد. سرطان های فامیلیال تنها حدود ۱۰-۵ درصد کل سرطان ها را شامل می گردد. بسیاری از مردم بستگانی دارند که به سرطان مبتلا شده اند ولی در بیشتر

نیستند ولی ناقل جهش بیماری می باشند. ۲۵ درصد فرزندان اینگونه والدین احتمال ابتلا به بیماری را خواهند داشت. وقتی در یک فرد تشخیص سرطان فامیلیال داده می شود، بستگان بیمار می بایست جهت علایم و نشانه ها بررسی گردند. البته موارد نادرتر مانند انتقال توارث از نقطه نظر وابسته به جنس و یا کروموزومال نیز وجود دارد. گاهی اوقات بیمار مبتلا به سندرم سرطان فامیلیال، اولین فرد مبتلا در خانواده می باشد. فرد مبتلا توانایی این را دارد که بیماری را به فرزندان خود انتقال دهد. اما والدین و خواهر و برادر درگیر نمی باشند. بر اساس این سندرم، متخصصین ژنتیک می توانند تعیین نمایند که کدامیک از اعضای خانواده در خطر هستند (۲۵).

ریسک بیماری

سندرم های سرطان فامیلیال مختلف دارای ریسک های متفاوت در زمینه سرطان و علائم همراه می باشند. به طور کلی، فردی که سندرم فوق را به ارث می برد ریسک ایجاد سرطان همراه با سندرم در وی بیش از جمعیت عادی می باشد، اما نمی تواند تضمینی برای این باشد که سرطان ایجاد خواهد شد و راهنمای غربالگری در جمعیت عمومی باید ادامه یابد (۲۵).

تست های ژنتیکی

اگرچه تست های ژنتیکی برای بسیاری از سندرم های فامیلیال در دسترس می باشد، هنوز ژن های زیادی هستند که باید کشف گردند. هر سندرم در رابطه با تست های ژنتیکی مربوطه تبصره های خاص خود را دارد. برای مثال، تست در چه سنی می بایست انجام گردد؟ چگونه نتایج می تواند بر روی مدیریت بیماری تاثیر بگذارد؟ آیا بیمه می تواند تست را پوشش دهد؟ آیا اطلاعات می تواند روی خانواده تاثیر بگذارد؟ متخصصین معمولاً با سرطان های فامیلیال آشنا هستند و مرتباً با پیشرفت های ژنتیک سرطان به روز می گردند و به طور دائم در رابطه با ریسک بیماران و سود و زیان تست ها با اعضای خانواده مبتلا بحث و گفتگو می کنند (۲۲).

خصوصیات ویژه ای را با خود همراه دارند. برای مثال، جهش در ژن های BRCA1 و BRCA2 همراه با افزایش خطر در سرطان پستان و تخمدان می باشد. مثالی از دیگر سندرم های فامیلیال را می توان از Von Hippel-Lindau و Putz-Jeghers، و Li-Fraumani نام برد (۲۵).

تشخیص

مهم ترین مرحله در تعیین اینکه در یک خانواده سندرم فامیلیال وجود دارد یا خیر جمع آوری یک تاریخچه خانوادگی صحیح می باشد. تاریخچه خانوادگی باید شامل تاریخچه فرزندان، برادر و خواهر، والدین، عمه و خاله، عمو و دایی، پدر و مادر بزرگ، خواهرزاده ها و برادر زاده ها، فرزندان عموها و عمه ها و خاله ها و دایی ها می باشد. برای افراد مبتلا به سرطان نوع سرطان و سن تشخیص باید به دقت ثبت گردد. به دلیل اینکه در بسیاری از موارد، بستگان بیمار ممکن است آگاهی و اطلاعات لازم در مورد بیماری فرد مبتلا را نداشته باشند، شاید بهتر است برای اثبات نوع سرطان از مدارک پزشکی مانند گزارشات بیمار استفاده گردد. نواقص مادرزادی، یافته های غیر طبیعی پوستی، تومورهای خوش خیم و تست های غربالگری اختصاصی (مانند کولونوسکوپی برای بررسی پولیپ های کولون) باید در نظر گرفته شود. در صورتیکه اطلاعات خانوادگی در دسترس نباشد، تا جایی که امکان دارد می بایست به دنبال سرخ در یک تن یا تعداد معدودی از اعضای خانواده بود. متخصص ژنتیک، مشاور ژنتیک، انکولوژیست و یک مددکار جهت تعیین ریسک، حمایت، غربالگری و توصیه های پیشگیرانه به بیماران و خانواده آنها کمک می کنند و در صورت نیاز و در دسترس بودن، تست های ژنتیکی نیز انجام می دهند (۲۶-۲۵).

توارث

برخی از سندرم های فامیلیال توارث اتوزم غالب از خود نشان می دهند، که در واقع فرد مبتلا ۵۰ درصد شانس انتقال جهش ژنتیکی را به فرزندان خود خواهد داشت. دیگر سندرم سرطان فامیلیال، توارث اتوزومال مغلوب می باشد که در واقع هر دو والدین بیمار معمولاً مبتلا

جدول ۲- ارتباط برخی از ژن ها با سندرم های خاص

ژن	مشکل ایجاد شده به دنبال از دست دادن ژن مربوطه
Rb	رتینوبلاستوم، استئوسارکوم
TP۵۳	سندرم Li-Fraumeni
Wt1	تومور Wilms
VHL	سندرم Von Hippel-Lindau ، کارسینوم Renal Cell
NF1	بیماری Von Recklinghausen ، نورو فیبروماتوز، تیپ ۱، شوآنوم و گلیوم
NF2	نورو فیبروماتوز تیپ ۲، نوروم آکوستیک و مننژیوم
APC	پولیپوز فامیلیال آدنوماتوز، تومورهای کولورکتال

کاربرد ژنتیک در تشخیص زودرس

در حال حاضر تلاش های فراوانی برای یافتن راهی در زمینه تشخیص زودرس این بیماری در حال انجام است. بررسی مارکرهای مشخصه در سرطان های خاص در راس این تلاش ها قرار دارد. روش واکنش زنجیره ای پلیمرز به صورت کمی و با روش های مدرن یکی از این راهها می باشد. در این روش با استفاده از آنتی بادی های خاص سلول های مورد نظر که حاوی آنتی ژن اختصاصی می باشند از طریق قرار دادن در میدان مغناطیسی و یا فلوسیتومتری از دیگر سلول ها مجزا می گردند. سپس با انجام واکنش معکوس زنجیره ای پلیمرز کمی mRNA کد کننده ژن مورد نظر تکثیر می گردد و سپس از نقطه نظر وجود سلول های سرطانی بررسی می گردد. این روش قادر به تشخیص سلول های سرطانی در گردش حتی در مقیاس بسیار اندک که با روش های ایمونولوژی مانند الایزا قابل تشخیص نیست می باشد. هرچند این روش کاربرد بیشتری در زمینه عود بیماری دارد، به نظر می رسد در رابطه با تشخیص زودرس در افرادی که در خطر بالایی از ابتلا به سرطان قرار دارند جایگزین روش های تهاجمی گردد. روش فوق در حال حاضر بغیر از ایالات متحده که در آن جنبه تحقیقاتی دارد، در بسیاری از کشورهای دنیا اهمیت بالینی پیدا نموده است (۲۷-۲۹).
کاربرد ژنتیک در کمک به تشخیص در موارد

مشکوک

یکی از معضلات همیشگی در طب، تشخیص افتراقی در بیماری ها می باشد. در مورد بیماری های سرطانی نیز گاهی این مشکلات منجر به ایجاد دشواریهایی در تشخیص و اقدامات درمانی می گردد. امروزه با پیشرفت در تکنیک های تشخیص بافتی مانند روش های ایمونوهیستوشیمی و استفاد از میکروسکپ الکترونی این مشکلات کاهش یافته است ولی در برخی موارد با استفاده از روش های ژنتیکی چه از منظر سیتوژنتیک و چه از نقطه نظر مولکولی، این مشکلات به حداقل رسیده است. برای مثال در بیماری مایکوزیس فونگوئیدوس که در واقع لنفوم سلول های T می باشد، با بررسی یاز تریبی رسپتورهای گامای سلول های T و بررسی وجود آن در بافت مبتلا می توان این بیماری را در مواردی که با بررسی پاتولوژی قابل افتراق نباشد با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز از موارد التهابی افتراق داد. لو کمی و لنفوم رده لنفوئید T ایجاد کلونی از سلولهای تومورال اصلی باز ترکیب یافته می نماید. این سلولها در مقایسه با سلول های طبیعی رده T cell که در واقع عملکرد مشخصی دارند، طرح های گوناگونی از آنتی ژنهای اختصاصی و باز ترکیبی DNA را از خود نشان می دهند. این مسئله برای لو سمی و لنفوم هایی که از سلولهای پیشاهنگ هماتولوژیک لنفوئید T مشتق شده اند

است. تعیین نوترپیتی PML/RARA اهمیت فراوانی در PML دارد به دلیل اینکه مطابقت با میزان پاسخگویی به درمان با all-trans retinoic acid (ATRA) و یا آرسنیک خواهد داشت (۳۲).

مثال دیگر در مورد سرطان کولون می باشد. داروی 5-Fu در واقع داروی خط اول برای سرطان کلورکتال می باشد. در موارد متاستاتیک و همچنین در موارد درمان طبی سرطان Thymidylate Synthase (TS) آنزیم هدف داروی شیمی درمانی 5-Fu به پروتئین (5-Fu) می باشد. متابولیت فعال 5-Fu به پروتئین TYMS متصل گردیده و ایجاد یک کمپلکس پایدار و غیر فعال می کند. وقتی VNR (variable number of tandem repeats) در قسمت ۵ ناحیه ترجمه نشده ژن TYMS انسانی مورد بررسی قرار می گیرد، ژنو تپ های متعددی متحمل است. شایع ترین آن تکرار دوتایی یا سه تایی پشت سرهم می باشد. موارد هموزیگوت با دو تکرار و هتروزیگوت واریانس ۲/۳ همراه با افزایش سه برابر احتمال برای Down Staging تومور کلورکتال متعاقب درمان با 5-Fu در مقایسه با موارد هموزیگوت با سه تکرار می باشد (۳۳-۳۴).

در واقع آلل با سه تکرار منجر به بیان بیشتر ژن TYMS و فعالیت بیشتر TYMS می گردد. بنابراین منجر به پاسخ ضعیف تر به 5-Fu می گردد. مطالعات بالینی این گمان را تقویت می کند که بیماران با Stage ۲ سرطان کلورکتال که دارای آلل هموزیگوت ۳ تکرار می باشند درمان طبی 5-Fu چندان برایشان سودمند نیست. دانستن ژنو تپ TS می تواند به پیش گویی در مورد پاسخ به درمان 5-Fu و بقاء در سرطان کلورکتال کمک کند (۳۴).

تا کنون بیش از ۳۰ جهش در مورد DPD Dihydro-Pyrimidine Dehydrogenase یافت شده است که شایع ترین آنها که منجر به نقص شدید DPD می گردد ترانزسیون G به A در سایت شناسایی splicing اینترون ۱۴ می باشد (IVS14+1G>A). آنزیم DPD آنزیم شروع کننده در کاتابولیسم 5-Fu می باشد. در بسیاری از گزارشات مشخص گردیده است که بیش از ۸۰

ارزش تشخیص دارد. حتی باز ترتیبی اختصاصی DNA می تواند به عنوان یک مارکر اختصاصی جهت شناسایی تومور مورد استفاده قرار گیرد (۳۰).

مثال دیگر در مورد لنفوم می باشد. شکست در نواحی کروموزومی (14q21) و (18q21) فیوژنی دو طرفه بوجود می آورد. فیوژنی که باعث باز ترکیبی منحصر به فرد قطعات یا پهلوی هم قرار گرفتن سکانسهای IGH و BCL₂ می گردد. در واقع مشخص کردن قطعه هیبرید (q32;q21) (14;18) افزاینده (enhancer) مشخصه ۹۰٪ موارد لنفوم فولیکولر است. ترانسلوکاسیون پهلویی ژن BCL₂ روی 18q21 با ناحیه افزاینده ژن IGH از کروموزوم 14q32 منجر به تولید بیان غیر طبیعی پروتئین BCL₂ در سلولهای B Lymphoid بالغ می گردد. ترانسلوکاسیون همچنین برای موارد لنفوم سلول بزرگ منتشر (diffuse large cell lymphoma) ارزش تشخیصی دارد (۳۱).

در بسیاری از موارد نیز روش هایی مانند هیبریداسیون فلئورسانس درجا به تشخیص پاتولوژی بیماری کمک می کند.

کاربرد ژنتیک در کمک به انتخاب درمان

استفاده از علم ژنتیک برای یافتن موارد حساس و یا مقاوم به درمان در بیماران سرطانی بسیار حائز اهمیت است. در مواردی که فرد بیماری پیشرونده ای دارد (مانند موارد متاستاتیک)، جایگزین نمودن روش های قابل اطمینان برای یافتن موارد مقاوم به درمان به جای مشاهده عدم پاسخگویی به درمان به صورت بالینی، می تواند زمان طلایی را برای درمان بیماری حفظ نماید.

لوکمی حاد (M3) پرومیلوسیتیک (APL) نوع مشخصی از لوکمی حاد میلوژنی AML می باشد که ۱۰ درصد از موارد AML را در بر می گیرد. این بیماران معمولاً فرم رونویسی شده ترانسلوکاسیون کروموزومی PML/RARA که در واقع (15;17)t می باشد را بیان می کنند که در واقع اتصال ژن PML به ژن گیرنده آلفای رتینوئیک اسید می باشد، سه فرم برای اتصال آنها شناسایی شده

از ABL1 تیروزین کیناز تشکیل شده است. از این فیوژن می توان در بررسی حداقل بیماری باقیمانده نیز استفاده نمود (جهت بررسی عود بیماری) (۲۸).

کاربرد ژنتیک در پیش آگهی و پیش بینی بیماری

دو نوع اختصاصی جهش در رابطه با ژن FLT3 وجود دارد که دلالت مهمی با پیش آگهی AML دارد. این تغییرات از دوپلیکاسیون بخش مجاور غشایی ژن (اگزون های ۱۱ و ۱۲) برای فعال شدن FLT3 بوجود می آید. این تغییرات در ۲۰ تا ۳۰ درصد بیماران مبتلا به AML مشاهده گردیده است. نوع دوم جهش FLT3 یک جهش missense در محل ۸۳۵ و در اسید آسپارتیک بوجود می آید که منجر به فعال شدن پروتئین FLT3 خواهد گردید. این تغییر در ۷ درصد بیماران AML مشاهده می گردد. هر دو جهش در نهایت منجر به فعال شدن پروتئین FLT3 گردیده و همراه با پروگنوز بد در بیماران مبتلا به AML می باشد که این امر شامل بقاء بیماران کاهش بقاء بدون بیماری و افزایش خطر عود می باشد (۴۰-۳۹).

ژن Janus Kinase 2 (JAK2) در واقع عضوی از خانواده Janus Tyrosine Kinase می باشد که در پروسه Signaling گیرنده فاکتور رشد و سیتوکین در سلولهای هماتوپیتیک نقش دارد. مطالعات متعددی یک جهش سو ماتیکی (V617F) را در سلولهای هماتوپیتیک بیماران مبتلا به بدخیمی هماتولوژیک کلونال که به عنوان اختلالات میلو پرولیفراتیو مزمن (CMPDs) شناخته می شوند و مشخص گردیده است. جهش Missense در نوکلئوتید ۱۸۴۹ باعث تغییر G به T می گردد و تولید یک جانشینی اسید آمینه فنیل آلانین بجای والین ترمال در کدون ۶۱۷ پروتئین می کند. این جهش منجر به فعال شدن سرشتی JAK2 شده و به نظر میرسد نقش کلیدی در فنوتیپ نئوپلاستیک را دارا می باشد. V617F بیشتر در بیماران با پلی سیتمی حقیقی (۵۶-۹۷٪) و ترومبوسیتمی اولیه (۲۳-۵۷٪) و میلو فیبروز مزمن با منشأ ناشناخته (۳۵-۵۷٪) شناسایی شده است. جهش

درصد داروی 5-Fu توسط این آنزیم کاتابولیز می شود. بنابراین فعالیت این آنزیم به طور برجسته ای سمیت و اثربخشی دارو را تحت الشعاع قرار خواهد داد. مشخص گردیده است در بیمارانی که دچار نقص در DPD می باشند، پس از دریافت 5-Fu دچار عوارض سمیت دارویی از جمله اسهال، نوتروپنی و نوروکسیسیتی می گردند. نقص کامل DPD بسیار پائین بوده و حدود ۳ تا ۵ درصد جمعیت را شامل می گردد و بیشتر به صورت هتروزیگوت می باشد. در صورت درمان با 5-Fu در بیماران واجد نقص کامل با این مسمومیت بسیار شدید خواهد بود (۳۷-۳۵).

کاربرد ژنتیک در تشخیص عود (حداقل بیماری باقیمانده)

یکی از مشکلات کاربردی در سرطان بررسی عود بیماری می باشد. این امر بخصوص در مورد بیماریهای که بسیار تهاجمی هستند مانند لومفی حاد اهمیت حیاتی دارد. در این بیماران، عود بالینی بیمار گاهی اوقات بسیار سریع و با علائمی مانند DIC همراه است که زندگی بیمار را به مخاطره می اندازد. در چنین مواردی با استفاده از روشهایی که بررسی سلولها حتی در زمانی که با روشهای متداول قابل تشخیص نیستند حائز اهمیت است. یکی از این روش های بررسی مولکولی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز می باشد. در این روش، در بیمارانی که قبلاً یک مارکر مثبت داشته اند، به طور متناوب مورد بررسی قرار می گیرند و در صورت مثبت ماندن و یا مثبت شدن مارکر خاص می توان به پاسخگویی به درمان و یا عود بیماری در مراحل ابتدایی (حداقل بیماری باقیمانده) پی برد. بیشتر مارکری که جنبه تشخیصی دارند و از برخی از آنها پیشتر نام برده شد مانند؛ PML/RARA, JAK2, FLT3ITD, ABL/BCR نیز از این جنبه حائز اهمیت هستند.

ترانسلوکاسیون اگزون های BCR و ABL1 سبب بوجود آمدن محصول فیوژن پروتئینی (p210 در CML و p190 در AML) میگردد که اکثریت توالی پروتئینی آن

درمان مکمل در برخی موارد می توان استفاده نمود. در این روش در واقع بیان ژن معیوب جایگزین و یا به عبارتی تنظیم می گردد. در ژن درمانی القا ژن به صورت استفاده از ویروس و یا غیر ویرال می باشد. ویروس های استفاده شده می بایست باز ترکیب یافته باشد تا از تکثیر آن در داخل سلول و ایجاد عفونت ویروسی جلوگیری گردد. از جمله ویروس هایی که کاربرد وسیعی در این امر دارند می توان رتروویروس ها، آدنوویروس ها، لنتی ویروس ها و ویروس های وابسته به آدنو را نام برد. در روش های غیر ویروسی می توان از انتقال DNA برهنه و لیپوزوم نام برد. در روش های جدیدتر از DNA و RNA یا مداخله گر استفاده می شود که به ترتیب سبب اختلال در بیان ژن هدف از طریق متیلاسیون ناحیه پرموتوری ژن و اختلال در ترجمه RNA پیغامبر می گردد (۵۵-۵۱).

آینده ژنتیک در سرطان

همانگونه که پیشرفت های روزمره در علم ژنتیک رخ می دهد، نقش این علم در آینده سرطان روشن تر می گردد. پروژه ژنوم انسانی یکی از این پیشرفت های شگرف در این علم می باشد. از اواسط سال ۲۰۰۲، زمانی که اولین پیش نویس پروژه ژنوم انسانی کامل شد، پیشرفت های سریع و چشمگیری در کشف نقاط اختصاصی ژن های سرطانی به عمل آمد (۵۶). با نقشه برداری هر ژن نرمال در بدن انسان، محققین می توانند توالی غیر طبیعی DNA را که منجر به سرطان می شود مقایسه نمایند. یافته های ناشی از پروژه ژنوم انسانی می تواند کمک شایانی در تعیین ژن های سرطانی کند. باعث توسعه تست های ژنتیکی بهتر گردد و منجر به پیشرفت در مداخلات پیشگیرنده و درمانی شود. مطمئنا در آینده، برای هر فرد این قابلیت میسر خواهد بود که با اسکن کامل ژنوم خود احتمال ابتلا به انواع بیماری ها از جمله سرطان را بیابد.

فوق با شیوع کمتری در موارد دیگر CMPDs، لو سمی میلوئوسیتیک مزمن، لو کمی و سندروم های میلو دیس پلاستیک گزارش شده است (۴۲-۴۱).

امروزه در مورد پیش آگهی بیماری های سرطان مخصوصا سرطان پستان، رویکرد به بررسی های پیش بینی کننده اهمیت بسیاری پیدا نموده است. برای مثال در روش با نام های تجاری Oncotype و mamaprint که بر پایه microarray قرار گرفته است، در بسیاری از کشورهای پیشرفته به عنوان یک تست روتین مورد استفاده قرار می گیرد.

تست oncotype بر اساس بررسی ۲۱ ژن (با استفاده از بررسی بیان) و در نتیجه تعیین پیش آگهی بیمار مبتلا به سرطان پستان و بر اساس منفی بودن غدد لنفاوی و مثبت بودن رسپتور استروژنی پایه گذاری گردید و با استفاده از بررسی این ۲۱ ژن می توان پیش آگهی بیمار را تعیین نمود (۴۶-۴۳).

در روش Mammaprint این تست بر اساس بررسی ۷۰ ژن پایه گذاری گردیده است که می بایست در بیمار جوانتر از ۶۱ سال و بدون درگیری غدد لنفاوی و همچنین اندازه تومور کمتر از ۵ سانتیمتر بررسی گردد. بر اساس بیان این ۷۰ ژن می توان پیش آگهی بیمار را تعیین نمود (۵۰-۴۷).

ژن درمانی و آینده آن در سرطان

ژن درمانی یکی از روش های جدید در مبارزه با بیماری های با منشأ ژنتیکی می باشد و امروزه در برخی از بیماری های که بدنبال اختلالات تک ژنی ایجاد می گردد جایگاه ویژه ای را به خود اختصاص داده است. به عنوان مثال در زمینه بیماری دوشن و فیبروکیستیک، ژن درمانی اهمیت بسزایی دارد. متاسفانه به دلیل مولتی فاکتوریال بودن اتیولوژی سرطان و درگیر بودن بیش از یک ژن، این روش کاربرد درمانی چشمگیری تاکنون نداشته است. بیشتر موارد برای افزایش حساسیت سلول های تومورال به روش های درمانی از این روش استفاده می گردد. در واقع می توان گفت از این روش به عنوان

REFERENCE:

1. Bartlett JMS, Stirling D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *Methods Mol Biol.* 2003. 226:3-6.
2. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985. 230 (4732): 1350-4.
3. Saiki, RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988. 239 (4839): 487-91.
4. Kary Mullis Nobel Lecture, December 8, 1993
5. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996. 93 (13): 9821-9826.
6. Grasso YZ, Gupta MK, Levin HS, Zippe CD, Klein EA. Expand+Combined Nested RT-PCR Assay for Prostate-specific Antigen and Prostate-specific Membrane Antigen in Prostate Cancer Patients: Correlation with Pathological Stage1 Cancer Res. 1998. 58(7):1456-9.
7. Hayden MJ, Nguyen TM, Waterman A, Chalmers KJ. Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics.* 2008. 9: 80.
8. Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *Plant Cell.* 2008. 20 (7): 1736-1737.
9. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. Academic Press London. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* 1990.
10. Olsvik O, Wahlberg J, Petterson B, Uhlen M, Popovic T, Wachsmuth IK, Fields PI. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 1993. 31 (1): 22-5.
11. Pettersson E, Lundeberg J, Ahmadian A. Generations of sequencing technologies. *Genomics.* 2009. 93 (2): 105-11.
12. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002. 30 (12): e57.
13. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995. 270 (5235): 467-470.
14. Sieben VJ, Debes Marun CS, Pilarski PM, Kaigala GV, Pilarski LM, Backhouse CJ. FISH and chips: chromosomal analysis on microfluidic platforms. *IET Nanobiotechnology.* 2007. 1 (3): 27-35.
15. Conlon S, Colgan A, Allen D, O'Grady A, Kay EW. Comparison of dual-colour chromogenic in-situ hybridization and fluorescence in-situ hybridization in the assessment of HER2 gene amplification in breast carcinoma. *Histopathology.* 2011. 58 (2):319-21
16. White MJD. *The chromosomes.* 6th ed, Chapman & Hall, London. 1973
17. Stebbins GL. *Variation and evolution in plants.* Chapter XII: The Karyotype. Columbia University Press NY. 1950
18. King RC, Stansfield WD, Mulligan PK. *A dictionary of genetics.* 7th ed, Oxford U.P Oxford & NY. 2006. p242
19. Hsu TC. *Human and mammalian cytogenetics: a historical perspective.* Springer-Verlag, NY. 1979
20. Gustashaw KM. Chromosome stains. In *The ACT Cytogenetics Laboratory Manual* 2nd ed, ed. M.J. Barch. The Association of Cytogenetic Tech-

nologists, Raven Press, New York. 1991.

21. Cummings S. The Genetic Testing Process: How Much Counseling Is Needed? *Journal of Clinical Oncology* 18, Supplement. 2000. 60-4.

22. Elsas LJ, Trepanier A. Cancer genetics in primary care: When is genetic screening an option and when is it the standard of care? *Postgraduate Medicine*. 2000.107: 191-208.

23. Identifying Cancer Genes—Will it Really Lead to Better Treatment? *Biotech Week*. 2003: 645.

24. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004.10 (8): 789-99.

25. Lynch H, Watson P, Shaw TG, Lynch JF, Harty AE, Franklin BA, Kapler CR, Tinley ST, Liu B. Clinical Impact of Molecular Genetic Diagnosis, Genetic Counseling, and Management of Hereditary Cancer: Part I: Studies of Cancer in Families. *Cancer*. 86 (1999): 2449-56.

26. Wiesner GL, Daley D, Lewis S, Ticknor C, Platzer P, Lutterbaugh J, MacMillen M, Baliner B, Willis J, Elston RC, Markowitz SD. A Subset of Familial Colorectal Neoplasia Kindreds Linked to Chromosome 9q22.2.-31.2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 2003. 100(22):12961-5.

27. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LW, Pienta KJ, Raghavan D. Circulating Tumor Cells (CTC) predict survival benefit from treatment in metastatic castration resistant prostate cancer (CRPC). *Clin Can Res*. 2008.14: 6302-9.

28. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with non-malignant diseases. *Clin Can Res*. 2004. 10: 6897-6904.

29. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T,

Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Jänicke F, Jackson S, Gornet T, Cristofanilli M, Pantel K. Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Metastatic Breast Cancer: A Validation Study of the CellSearch System. *Clin Cancer Res*. 2007.13 (3): 920-8.

30. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, Garcia-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003.17(12):2257-317

31. Poteat HT, Sklar J. A simplified polymerase chain reaction assay for detection of chromosomal translocations in hematologic malignancies. *Diag. Mol. Path.* 1997. 6(1):3-9.

32. Miller WH Jr, Kakizuka A, Frankel SR, Warrell RP Jr, DeBlasio A, Levine K, Evans RM, Dmitrovsky E. RT-PCR for the rearranged RAR clarifies diagnosis and detects minimal residual disease in APL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. 89(7): 2694-8.

33. Peters GJ, Backus HH, Freemantle S, van Triest B, Codacci-Pisanelli G, van der Wilt CL, Smid K, Lunec J, Calvert AH, Marsh S, McLeod HL, Bloemena E, Meijer S, Jansen G, van Groeningen CJ, Pinedo HM. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002. 1587:194-205.

34. Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, Warren R, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and

toxicity of 5-FU chemotherapy. *The Pharmacogenomics Journal*. 2001. 1(1): 65-70.

35. Wei X, McLeod HL, McMurrough J, Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P. Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. *J Clin Invest*. 1996. 98: 610-615.

36. Vreken P, van Kuilenburg ABP, Meinsma R, Smit GP, Bakker HD, De Abreu RA, van Gennip AH. A point mutation in an invariant splice donor site leads to exon skipping in two unrelated Dutch patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis*. 1996. 19: 645-654.

37. van Kuilenburg ABP, De Abreu RA, van Gennip AH. Pharmacogenetic and clinical aspects of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Ann Clin Biochem*. 2003. 40: 41-45.

38. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Díaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999. 13(12):1901-28.

39. Murphy KM, Levis M, Hafez MJ, Geiger T, Cooper LC, Smith BD, Small D, Berg KD. Detection of FLT3 Internal Tandem duplication and D835 Mutations by a Multiplex Polymerase Chain Reaction and Capillary Electrophoresis Assay. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2003. 5(2):96-102.

40. Rombouts WJ, Blokland I, Löwenberg B, Ploemacher RE. Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the FLT3 gene. *Leukemia* 2000. 14(4):675-683.

41. Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, Zahrieh D,

Lee S, Chagnon P, Gilliland DG, Busque L. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617 assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood*. 2006. 107 (10), 4139-4141.

42. McClure r, Mai M, Lasho T. Validation of two clinically useful assays for evaluation of JAK2 V617 F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia*. 2006. 20:168-171.

43. Hornberger J, Cosler LE, Lyman GH. Economic analysis of targeting chemotherapy using a 21-gene RT-PCR assay in lymph-node-negative, estrogen-receptor-positive, early-stage breast cancer. *Am J Manag Care*. 2005. 11(5):313-24.

44. Tsoi DT, Inoue M, Kelly CM, Verma S, Pritchard KI. Cost-Effectiveness Analysis of Recurrence Score-Guided Treatment Using a 21-Gene Assay in Early Breast Cancer. *Oncologist*. 2010. 15(5):457-65.

45. Kondo M, Hoshi SL, Ishiguro H, Yoshibayashi H, Toi M. Economic evaluation of 21-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay in lymph-node-negative, estrogen-receptor-positive, early-stage breast cancer in Japan. *Breast Cancer Res Treat*. 2008. 112(1):175-87.

46. Lyman GH, Cosler LE, Kuderer NM, Hornberger J. Impact of a 21-gene RT-PCR assay on treatment decisions in early-stage breast cancer: an economic analysis based on prognostic and predictive validation studies. *Cancer*. 2007. 109(6):1011-8.

47. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002. 415

(6871): 530-6.

48. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2002. 347(25): 1999-2009

49. Glas AM, Floore A, Delahaye LJ, Witteveen AT, Pover RC, Bakx N, Lahti-Domenici JS, Bruinsma TJ, Warmoes MO, Bernards R, Wessels LF, Van't Veer LJ. Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. *BMC Genomics.* 2006.7: 278.

50. Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, d'Assignies MS, Bergh J, Lidereau R, Ellis P, Harris A, Bogaerts J, Therasse P, Floore A, Amakrane M, Piette F, Rutgers E, Sotiriou C, Cardoso F, Piccart MJ; TRANSBIG Consortium. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006. 98 (17): 1183-92.

51. Friedmann T, Roblin R. Gene Therapy for Human Genetic Disease? *Science.* 1972. 175 (25): 949.

52. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topa-

lian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science.* 2006. 314 (5796): 126-9.

53. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, Glimm H, Kühlcke K, Schilz A, Kunkel H, Naundorf S, Brinkmann A, Deichmann A, Fischer M, Ball C, Pilz I, Dunbar C, Du Y, Jenkins NA, Copeland NG, Lüthi U, Hassan M, Thrasher AJ, Hoelzer D, von Kalle C, Seger R, Grez M. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med.* 2006. 12 (4): 401-9.

54. Brown BD, Venneri MA, Zingale A, Sergi Sergi L, Naldini L. Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat Med.* 2006. 12 (5): 585-91.

55. Levine BL, Humeau LM, Boyer J, MacGregor RR, Rebello T, Lu X, Binder GK, Slepishkin V, Lemiale F, Mascola JR, Bushman FD, Dropulic B, June CH. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006. 103 (46): 17372-7.

56. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001. 409 (6822): 860-921.