مقاله پژوهشی

فصلنامهٔ بیماری‌های پستان ایران، سال هفتم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۳

مطالعه جهش G908A (K303R) در ژن گیرنده استروژن α– در سرطان پستان

سکینه عباسی*: استادیارگروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

حسین یاری‌پور: کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

مینا رسولی: دانشکده پزشکی، دانشگاه نیو ساوث ولز، سیدنی، استرالیا

چکیده

مقدمه: جهش‌های ژنتیکی با توجه به نقش غیرقابل انکاری که در پیدایش بیماری‌ها داشته و با تاثیر بر روی کنش‌های بعدی بیماری، موجب آسیب‌های بدخیم در پستان می‌شوند. از آن جمله، جهش نقطه‌ای در ژن گیرنده استروژن α (*ESR1*)، مانند G908A (لیزین ۳۰۳ آرژینین) سبب تکثیر بی‌رویه سلول‌های حساس به استروژن و رشد تومور در پستان می‌شود. در این تحقیق ما به شناسایی و غربالگری این جهش در میان زنان ایرانی مبتلا به سرطان پستان تهاجمی پرداخته‌ایم.

روش بررسی: جمعیت مورد مطالعه (مطالعه مورد- شاهد) شامل ۱۴۷ نفر سالم (کنترل) و ۱۵۰ نفر بیمار (مورد) با سرطان پستان تهاجمی است. جهش *ESR1* G908A از طریق آنالیز تغییرات ساختاری تک رشته DNA(SSCP) و تعیین توالی DNA P-cycle$_{33}$ مورد شناسایی قرار گرفت.

یافته‌ها: جهش *ESR1* G908A با فراوانی ۱۰/۷٪ به شکل ژنوتیپ هتروزیگوت تنها در بیماران سرطانی شناسایی شد. همچنین فراوانی آلل جهش‌یافته AGG در کدان ۳۰۳ در بین بیمارانی که دارای سابقه خانوادگی سرطان پستان بودند ۲۸/۹٪، بیش از بیمارانی بود که سابقه خانوادگی سرطان پستان را نداشتند ۱/۹٪ و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود (P=۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: بنابر نتایج این تحقیق جهش در کدون ۳۰۳ در ژن *ESR1*، با جنبه‌های گوناگون سرطان پستان در ایران ارتباط داشته و ژنوتیپ *ESR1* می‌تواند یک نشانگر جایگزین در پیش بینی ابتلا به سرطان پستان در طول زندگی یک فرد باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، جهش، گیرنده استروژن، PCR-SSCP، متاستاز گره لنفاوی.

* نشانی نویسنده پاسخگو: دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پیراپزشکی، سکینه عباسی.
نشانی الکترونیک: sakineh4612004@yahoo.com

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در میان زنان سراسر دنیاست (۱). متاسفانه افزایش سرعت شیوع آن در ۴ دهه گذشته، سرطان پستان را به یکی از سرطان‌های بدخیم در میان زنان ایرانی تبدیل کرده است (۲) و نکته مهم‌تر اینکه زنان ایرانی یک دهه جوان‌تر از زنان کشورهای پیشرفته به این بیماری مبتلا می‌شوند (۳،۴). اغلب فاکتورهای خطر ابتلا در سرطان پستان باعث افزایش ترشح استروژن می‌شوند (۵) و بخشی از این افزایش می‌تواند به تغییرات الگوهای تولیدمثلی مانند تاخیر در بچه‌دار شدن یا داشتن بچه‌های کمتر مربوط شود. به هرحال، اهمیت نقش استروژن در پیدایش سرطان پستان، به دلیل تغییرات پیام‌رسانی در بیان دو ژن گیرنده استروژن(ERs) به نام‌های *ESR2* و *ESR1* در روند پیدایش تومور و پیشرفت آن است (۶،۱۰،۱۲،۱۳).

تشخیص زود هنگام سرطان پستان یکی از چالش‌های مهم برای سلامتی زنان است. جهش‌ها و پلی‌مورفیسم ژن‌های درگیر در سرطان برای پیش بینی تشکیل تومور و چگونگی پاسخ به درمان مورد استفاده قرار می‌گیرد. گرچه فراوانی جهش ژن گیرنده استروژن- α (*ESR1*) در بافت سرطان پستان کم است (۶،۱۱،۱۲)، اما تحقیقات نشان می‌دهد که گوناگونی آللی در ژن‌های گیرنده استروژن با خطر ابتلا به سرطان پستان و ویژگی‌های بالینی از جمله سابقه فامیلی سرطان پستان (۱۱) و متاستاز گره لنفاوی (LN) (۲۰) در جمعیت سفیدپوستان رابطه مستقیم دارد (۱۹-۱۲). از طرف دیگر، مطالعات اندکی نیز ارتباط بین گوناگونی ژنی در ژن *ESR1* با سرطان پستان را رد می‌کنند (۲۳-۲۱). نظریه نقش جهش در ژن *ESR1* در بروز سرطان پستان و متعاقب آن در پاسخ به درمان پس از کشف جهش سوماتیکی G908A یا K303R در اگزون شماره ۴ ژن *ESR1* و به نوبه خود تغییر اسید آمینه لیزین به آرژنین مطرح شد (۲۴،۲۵). به‌طوری‌که این جهش در اکثر هایپرپلازی‌های پستان و سرطان‌های تهاجمی و متاستازی گزارش شده است (۲۶،۲۷). ظاهرا جهش *ESR1* K303R حساسیت به استرادیول را افزایش می‌دهد (۲۴)، ویژگی که خود باعث می‌شود سرطان پستان به سطوح پایین‌تری از تحریک استروژنی پاسخ داده و تاثیرپذیری ضداستروژن‌ها را در درمان افزایش دهد.

در حال حاضر اطلاعات کمی پیرامون نحوه بیان ژن *ESR1*، فراوانی جهشی و گوناگونی آللی در سرطان پستان در بین سفیدپوستان آسیایی (ایرانیان) وجود دارد. بنابراین در مطالعه حاضر ما به بررسی و غربالگری جهش نقطه‌ای *ESR1* G908A از طریق واکنش زنجیره پلیمرازی روی تغییرات ساختاری تک رشته DNA (PCR-SSCP) و تعیین توالی DNA P-cycle$_{33}$ در بیماران مراجعه‌کننده به مجتمع بیمارستانی امام خمینی(ره) پرداخته‌ایم.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه:

پس از اخذ اجازه از کمیته اخلاقی مجتمع بیمارستانی امام خمینی(ره)، جمعیت مورد مطالعه خود را از میان بیمارانی که از نظر آسیب‌شناختی به تازگی سرطان در آنها تشخیص داده شده بود انتخاب کردیم. بیماران مبتلا به سرطان پستان در این مطالعه ۱۵۰ نفر بودند که اغلب آنان در تهران زندگی می‌کردند. گروه شاهد (۱۴۷نفر)، شامل زنان سالم که ساکن تهران بوده و هیچ سابقه خانوادگی سرطان پستان و سایر بیماری‌های نئوپلاستیکی را نداشتند. زنانی که رحم خود را برداشته بودند (عمل هیسترکتومی)، یا یائسگی مصنوعی داشته و یا در طول زندگی خود در معرض نوعی از پرتودهی و شیمی‌درمانی قرار گرفته بودند از شرکت در این مطالعه مورد- شاهد، منع شدند. لازم به ذکر است که براساس مجوز کمیته اخلاقی بیمارستان تمام بیماران پیش از شرکت در این تحقیق فرم رضایت نامه را تکمیل کردند.

اطلاعات آماری و اپیدمیولوژیکی افراد از طریق چک‌لیست جمع‌آوری شد که شامل اطلاعاتی دموگرافیکی در مورد سابقه خانوادگی سرطان پستان (خویشاوندان درجه یک)، سن شروع قاعدگی، سن یائسگی، گروه‌های خونی و نوع RH، نژاد و قومیت، سن شروع بیماری، متاستازهای گره لنفی و بیان ژن ER در بافت سرطانی بود که توسط پرستاران پرسشگر آموزش دیده از طریق مصاحبه با بیماران و اعضای خانواده آنها انجام شد. به‌طوری‌که افرادی که حداقل یک عضو از خویشاوندان درجه یک یا دو عضو

از خویشاوندان درجه دو به سرطان پستان مبتلا بودند در گروه بیماران با سابقه خانوادگی سرطان پستان قرار گرفتند. نمونه‌های بافت توموری که در فرمالین تثبیت شده و در پارافین جاسازی شده بودند برای انجام تست‌های ژنومی جمع‌آوری و ذخیره شدند. تومورها برش-برداری شده و براساس روش‌های استاندارد هیستوپاتولوژی قبل از انجام آزمایشات مورد بررسی قرار گرفتند (۲۸).

با استفاده از اسلایدهای رنگی هماتوکسیلین و ائوزین، ناحیه توموری به دقت از نواحی پیرامون غیرتوموری جدا شد و DNA حاصل از تجزیه سلولی با استفاده از کیت (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (۵۰) #۵۶۴۰۴) استخراج شد. همچنین ۳ ml خون محیطی جمع‌آوری و تا پایان آنالیزهای ژنوتیپی نگه‌داری شد. مشخصات بالینی ۱۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

PCR اگزون شماره ۴ ژن *ESR1* استخراج شده از DNA:

به منظور شناسایی عوامل ایجاد بیماری تمامی ۱۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان با ۱۴۷ نفر گروه های شاهد مورد مقایسه قرار گرفتند. DNA ژنومی مطابق دستورالعمل شرکت تولیدکننده، از نمونه‌های تومور استخراج شد. ۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی در هرچرخه از PCR استفاده شد. ۳۲۹ جفت باز از ۳۳۶ جفت باز از اگزون ۴ بوسیله پرایمرهای جلوبرنده (5'-ACC TGT GTT TTC AGG GAT ACG A-3') و معکوس (5'-GCT GCG CTT CGC ATT CTT AC-3') تکثیر شد. واکنش‌های PCR در محلول بافر PCR (۸/۳ - gelatin mM Tris - HCL ۵۰mM KCL - ۰/۰۰۱pH ۱۰- ۱/۵mM $Mgcl_2$) با ۱۰۰ µM از هریک از چهار دزوکسی ریبونوکلئوتیدهای تری‌فسفات، ۱/۲۵واحد از پلی مرازهای AmpliTag Gold DNA(ABI)، ۰/۶ Mm از هریک از پرایمرها، ۱ µl تجزیه‌کننده DNA تحت شرایط دمایی و زمانی زیر انجام شد: یک بار در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، و سی دور در دمای۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۵°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه.

جداسازی جهش ESR1 A۹۰۸ G از راه PCR-SSCP:

به منظور شناسایی جهش در محل کدان شماره ۳۰۳ در ژن *ESR1*، نمونه‌ها با روش PCR-SSCP غربالگری شدند. محصول دور اول PCR در آب مقطر رقیق شد (۱:۲۵) و ۱ µl از آن برای ۲۰ µl واکنش SSCP-PCR ، شامل پرایمرها ۶۰۰nM، بافر PCR، هر dNTP به مقدار ۱۵۰ µM بجز مارکر ۳۲P-dCTP (۰/۲ µl از dCTP ۲۲/۵ µM) و ۰/۵واحد از AmpliTaq Gold DNA Polymerase (ABI). دما و زمانی که برای هر دور استفاده می‌شود به شرح زیر بوده است:

دور اول: ۴ دقیقه در ۹۵°C درجه، ۳۰ ثانیه در ۶۰°C و ۴۰ ثانیه ۷۲°C.

در ۲۹ دور بعد: ۳۰ ثانیه در ۹۴°C ، ۳۰ ثانیه در ۶۰°C و ۱ دقیقه در ۷۲°C ، و در دور نهایی ۱ دقیقه در ۹۴°Cو ۸ دقیقه در ۶۰°C.

محصولSSCP- PCR تکثیرشده به نسبت ۱:۵۰ در ۰/۱٪ SDS و ۱۰ mM از EDTA رقیق شد، سپس به نسبت ۱:۱ با فرمامید ۹۲٪ و ۴۰ mM از EDTA مخلوط گردید، و تک رشته شده و بوسیله جداسازی الکتروفورزی در ژل پلی اکریلامید ۸٪ (به نسبت ۱۹:۱ پلی اکریلامید: بیس اکریلامید) و در بافر (mmol/lTris-borate ۹۰ و mmol ۲ از EDTA) به همراه نمونه‌های کنترل مثبت، منفی و اشباع نشده، به مدت ۲ ساعت در ولتاژ ۲۲۰ ولت و سپس ۲۴ ساعت در ولتاژ ۲۵۰ ولت در دمای ۱۶°C انجام شد. بعد از الکتروفورز برای نمایان ساختن باندهای روی ژل از رنگ نیترات نقره ۰/۱٪ استفاده شد.

توالی‌یابی P- cycle$_{33}$:

نمونه‌های SSCP–PCR که باندی متفاوت را نشان می‌دادند، با استفاده از کیت استخراج DNA، Fermentas # K0153، Germany از روی ژل آگاروز خالص شدند. سپس با به کارگیری روش‌های توالی‌یابی P- cycle$_{33}$، هر دو زنجیره Forward و Reverse توالی‌یابی شدند. محصولات خالص شده PCR، با ExoSAP-IT (۲ µl برای هر۵ µl از محصول PCR) مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. توالی‌یابی چرخه‌ای به‌وسیله کیت Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing (USB) برای هر پرایمر برای ۳۰ دور از ۳۰ ثانیه در ۹۵°C، ۳۰ ثانیه در ۶۲°C و ۱ دقیقه در ۷۲°C انجام شد.

جدول ۱: توزیع فراوانی ژنوتیپی کدان ۳۰۳، اگزون ۴ جهش اگزون ژنگیرنده استروژن -α و ویژگی‌های دموگرافیکی منتخب و عوامل خطر عمده در جمعیت مورد مطالعه: گروه مورد در مقابل گروه شاهد

مشخصه گروه		نرمال		هتروزیگوت		P Value
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	
سن شروع قاعدگی (سال)						
=/>۱۲	**مورد**	۵۱	۸۵/۰	۹	۱۵/۰	**p=۰/۰۰۳**
	کنترل	۳۶	۱۰۰	-	-	
>۱۲	**مورد**	۸۳	۹۲/۲	۷	۷/۸	**p=۰/۰۰۱**
	کنترل	۱۱۱	۱۰۰	-	-	
گروه خون ABO						
A	**مورد**	۲۴	۸۸/۹	۳	۱۱/۱	**p=۰/۰۱۵**
	کنترل	۴۳	۱۰۰	-	-	
B	**مورد**	۱۰	۷۱/۴	4	28.6	**p=۰/۰۰۱**
	کنترل	۳۵	۱۰۰	-	-	
AB	**مورد**	۶	۱۰۰	-	-	-
	کنترل	۱۶	۱۰۰	-	-	
O	**مورد**	۹۴	۹۱/۳	۹	۸/۷	**p=۰/۰۰۵**
	کنترل	۵۳	۱۰۰	-	-	
نژاد						
عرب و ارمنی	**مورد**	۳	۱۰۰	-	-	-
	کنترل	-	-	-	-	
فارس	**مورد**	۵۰	۸۳/۳	۱۰	۱۶/۷	**p=۰/۰۰۱**
	کنترل	۸۸	۱۰۰	-	-	
	مجموع	۱۳۸	۹۳/۲	۱۰	۶/۸	
لر و کرد	**مورد**	۱۶	۸۸/۹	۲	۱۱/۱	**p=۰/۱۹۲**
	کنترل	۹	۱۰۰	-	-	
ترک	**مورد**	۴۴	۹۵/۷	۲	۴/۳	**p=۰/۱۱۴**
	کنترل	۳۹	۱۰۰	-	-	
گیلکی و مازندرانی	**مورد**	۲۱	۹۱/۳	۲	۸/۷	**p=۰/۲۰۳**
	کنترل	۱۱	۱۰۰	-	-	

سپس محلول بازدارنده (فرمامید ۹۵٪، ۲۰ mM از EDTA، ۰/۰۵٪ بروموفنول آبی و ۰/۰۵٪ گزیلون سیالون FF) را با نمونه‌ها مخلوط کرده و قبل از قرار دادن در ژل پلی اکریل امید استاندارد ۸٪، به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C گرم شدند. همه جهش‌ها با دو بار توالی یابی محصول PCR جدید به طور جداگانه تایید شدند(احتمال وجود جهش های مصنوعی نیز رد شد). بعلاوه حداقل ۵٪ از نمونه‌های منفی SSCP (n=۴۶) توالی‌یابی شد، اما هیچ جهشی یافت نشد. همچنین ازکنترل مثبت (Fermentas, USA) نیز جهت تایید نتایج حاصل از غربالگری جهش G908A بوسیله توالی-یابی S35 و P33 استفاده شد.

توالی‌یابی خودکار فلوئورسنت:

محصول PCR با ۲۱۹جفت باز در اگزون شماره ۴ ژن *ESR1* توالی‌یابی شد. بدین ترتیب که ابتدا محصول PCR با کیت QIAquick (USA ۲۸۱۰۴ QIAGEN cat.#)، خالص شده و سپس توالی‌یابی چرخه‌ای با نشانگر Big Dye v1.1 terminators (ABI) بر روی DNA انجام شد.

آنالیزهای آماری:

داده‌ها با استفاده از نرم افزار ۱۶ -SPSS و آزمون کای اسکوئر (χ^2) تجزیه و تحلیل شدند و برای ارزیابی و سنجش موقعیت جهش بر روی خصوصیات سرطان پستان، نسبت شانس (Odds Ratio) با ۹۵٪ IC نیز محاسبه گردید. سطح معنی‌داری در این مطالعه برابر ۵ درصد در نظر گرفته شد (P value).

یافته‌ها

ویژ گی‌های نمونه‌های سالم و بیمار:

در این تحقیق ۱۵۰ نفر بیمار (میانگین سنی۱۱/۴۳± ۴۷/۴۹ سال) مبتلا به سرطان پستان تهاجمی و ۱۴۷ نفر (میانگین سنی۱۰/۵۴± ۴۰/۷۵سال) افراد سالم شرکت داشتند که برای مقایسه و بررسی جهش دراگزون شماره ۴، کدان شماره ۳۰۳ از ژن ESR1، به همراه بعضی از خصوصیات کلینیکی بیماران در رابطه با جهش ژن *ESR1* (۳۰) مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفتند. ۷۶٪ ازبیماران قبل از یائسگی به سرطان پستان مبتلا شده بودند و در ۹۴/۷٪ بیماران نوع سرطان پستان در آنها یک طرفه بود. همچنین ۸۴٪ بیماران از نظر متاستاز گره لنفاوی منفی بودند و ۸۸/۷٪ از بیماران در مرحله II از پیشرفت بیماری قرار داشتند. از میان ۱۵۰ بیمار سرطان پستان ۱۶ نفر (۱۰/۷٪) جهش ژن A۹۰۸G *ESR1* را نشان دادند و ژنوتیپ‌شان هتروزیگوت بود (AAG/AGG)، و همه افراد کنترل برای جهش ژن *ESR1* منفی بودند.

فاکتورهای خطرابتلا به سرطان پستان بر اساس جهش ESR1 G908A:

این جهش فقط در بین بیماران سرطان پستان که دارای ژنوتیپ هتروزیگوتی بودند مشاهده شد، و در افراد سالم وجود نداشت. توزیع فراوانی ژنوتیپی جهش کدان شماره ۳۰۳ ژن *ESR1* و فاکتورهای خطر در سرطان پستان در مقابل گروه‌های کنترل در جدول ۱ نشان داده شده است. مقایسه توزیع فراوانی برای بعضی از فاکتورهای خطر در بیماران با افراد سالم از لحاظ آماری معنی‌دار بود از جمله: سن شروع قاعدگی ۱۲سال و زیر ۱۲سال (P=۰/۰۰۳)، در میان نژادهای متفاوت نژادفارس(P=۰/۰۰۱) ، و در میان گروه‌های خونی گروهای O وA،B (به ترتیب P= ۰/۰۰۵; P= ۰/۰۰۱; P= ۰/۰۱۵).

جدول ۲ توزیع فراوانی ژنوتیپی جهش کدان ۳۰۳ و فاکتورهای خطر اصلی در سرطان پستان را نشان می‌دهد. در میان تمام فاکتورهای خطر، سابقه خانوادگی سرطان پستان و متاستاز گره لنفاوی از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را در میان ژنوتیپ‌های متفاوت (نرمال و ژنوتیپ هتروزیگوتی) نشان داد (P=۰/۰۱۷; P= ۰/۰۰۱). فراوانی ژنوتیپی و آللی گروه‌های مورد مطالعه در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. ژنوتیپ هتروزیگوت (AAG/AGG)(۱۰/۷٪)، و مسلما آلل جهش‌یافته فقط در میان بیماران سرطانی یافت شد (۵/۳٪) (P=۰/۰۰۱). مضافاً، فراوانی آللی آلل جهش یافته (AGG) در کدان ۳۰۳ به طور قابل توجهی (P=۰/۰۰۱) در میان بیماران سرطانی با سابقه خانوادگی سرطان پستان (۲۸/۹٪)، در مقایسه با بیماران بدون سابقه خانوادگی سرطان پستان (۱/۹٪) بیشتر است.

جدول ۲: فراوانی ژنوتیپی کدان ۳۰۳ ،اگزون ۴ ژن استروژن گیرنده-α و ویژگی‌های دموگرافیکی منتخب و عوامل خطر عمده در گروه مورد

مشخصه	نرمال		هتروزیگوت		نتیجه آزمون
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	x^2
سن شروع سرطان پستان (به سال)					
<۴۰	۴۳	۸۹/۶	۵	۱۰/۴	x^2=۰/۰۰۵
=/۴۰<	۹۱	۸۹/۲	۱۱	۱۰/۸	p=۰/۹۴۶
سابقه خانوادگی سرطان پستان					
درفامیل درجه یک	۸	۴۲/۱	۱۱	۵۷/۹	x^2=۳۳/۵۱۸
بدون سابقه فامیلی	۱۲۶	۹۶/۲	۵	۳/۸	p=۰/۰۰۱
متاستاز غدد لنفاوی					
دارد	۲۳	۱۰۰	-	-	x^2=۵/۶۶۲
ندارد	۱۱۱	۸۷/۴	۱۶	۱۲/۶	p=۰/۰۱۷
در بافت سرطان پستان ER بیان ژن					
مثبت	۳۴	۸۵/۰	۶	۱۵/۰	x^2=۴/۶
منفی	۸۶	۹۳/۵	۶	۶/۵	p=۰/۱
بررسی نشده	۱۴	۷۷/۸	۴	۲۲/۲	

Genotype heterozygote , AAG/AGG

جدول ۳: فراونی آللیکدان ۳۰۳ (AAG→AGG)، اگزون ۴ ژن گیرنده استروژن-α در جمعیت مورد مطالعه: گروه مورد در مقابل گروه شاهد وگروه مورد در حضور در مقابل عدم حضور عوامل خطر عمده

مشخصه		ER-α Alleles	
		0[b] تعداد(درصد)	1[a] تعداد(درصد)
سرطان پستان			
مورد	(n=150)	(۲۸۴%)۹۴/۳	۱۶ (۵/۳٪)
کنترل	(n=۱۴۷)	(۱۰۰%)۲۹۴	-
		x^2 =۱۶/۱۱۴ P,=۰/۰۰۱	
سن شروع قاعدگی (سال)			
۱۲</=	(n=۶۰)	۱۱۱ (۹۲/۵٪)	۹ (۷/۵٪)
۱۲>	(n=۹۰)	۱۷۳ (۹۶/۱٪)	۷ (۳/۹٪)
		x^2 =۱/۸۶ P,=۰/۱۷۳	
سن شروع سرطان پستان			
</=۴۰	(n=۴۸)	۹۱ (۹۴/۸٪)	۵ (۵/۲٪)
>۴۰	(n=۶۶)	۱۲۶ (۹۵/۵٪)	۶ (۴/۵٪)
پس از یائسگی	(n=۳۶)	۶۷ (۹۳/۱٪)	۵ (۶/۹٪)
		x^2 =۰/۵۳۵ P,=۰/۷۶۵	
گروه خون ABO			
A	(n=۲۷)	۵۱ (۹۴/۴٪)	۳ (۵/۶٪)
B	(n=۱۴)	۵۴ (۸۵/۷٪)	۴ (۱۴/۳٪)
AB	(n=۶)	۱۲ (۱۰۰٪)	-
O	(n=۱۰۳)	۱۹۷ (۹۵/۶٪)	۹ (۴/۴٪)
		x^2 =۴/۸۳۸ P,=۱/۱۸۴	
نژاد			
عرب و ارمنی	(n=۳)	۶ (۱۰۰٪)	-
فارس	(n=۶۰)	۱۱۰ (۹۱/۷٪)	۱۰ (۸/۳٪)
لر و کرد	(n=۱۸)	۳۴ (۹۴/۴٪)	۲ (۵/۶٪)
ترک	(n=۴۶)	۹۰ (۹۷/۸٪)	۲ (۲/۲٪)
گیلکی و مازندرانی	(n=۲۳)	۴۴ (۹۵/۷٪)	۲ (۴/۳٪)
		x^2 =۴/۹۱۶ P,=۰/۲۹۶	
سابقه خانوادگی سرطان پستان			
در فامیل درجه یک	(n=۱۹)	۲۷ (۷۱/۱٪)	۱۱ (۲۸/۹٪)
بدون سابقه فامیلی	(n=۱۳۱)	۲۵۷ (۹۸/۱٪)	۵ (۱/۹٪)
		x^2 =۲۹/۷۰۹ P,=۰/۰۰۱	
متاستاز غدد لنفاوی			
دارد	(n=۲۳)	۴۶ (۱۰۰٪)	-
ندارد	(n=۱۲۷)	۲۳۸ (۹۳/۷٪)	۱۶ (۶/۶۳٪)
		x^2 =۵/۴۸۷ P,=۰/۰۹۱	
بیان ER در بافت سرطانی			
مثبت	(n=۴۰)	۷۴ (۹۲/۵٪)	۶ (۷/۵٪)
منفی	(n=۹۲)	۱۷ (۹۶/۷٪)	۶ (۳/۳٪)
بررسی نشده	(n=۱۸)	۳۲ (۸۸/۹٪)	۴ (۱۱/۱٪)
		x^2 =۴/۳۱۲ P,=۰/۱۱۶	

1[a] =Allele 0 ,AAG, **0[b]** =Allele 1, AGG

محاسبه OR نشان می‌دهد که خطر پیش‌بینی شده برای ابتلا به سرطان فامیلی در بیمارانی که ژنوتیپ نرمال دارند ۶٪ می‌باشد، درحالی‌که خطر پیش‌بینی شده برای ابتلا به سرطان فامیلی در بیمارانی که ژنوتیپ هتروزیگوت برای جهش کدان ۳۰۳ دارند بسیار افزایش یافته است که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد (P=۰/۰۰۱) (۳۱/۲٪) (۰/۰۰۸-۰/۱۰۳ CI ۹۵٪، OR۰/۰۲۹). بعلاوه اختلاف بین حضور و عدم حضور متاستاز گره لنفاوی برای کدان ۳۰۳ نیز از نظر آماری معنی‌دار بود (P=۰/۰۱۷) (جدول شماره ۴).

پیش از این حساسیت تومورهای پستانی در رابطه با جهش ژن *ESR1* نسبت به استروژن و تاثیر آن در بروز روند پیشرفت سرطان پستان توسط Fuqua و Conway (۲۶ و ۳۵) مطالعه شده است. همچنین، اطلاعات به دست آمده از برخی مطالعات اپیدمیولوژیک سرطان پستان نشان می‌دهد که زیر مجموعه‌های توموری بر اساس تغییر بیان پروتیین خاصی که ممکن است با عوامل خطر خاص در ارتباط باشد طبقه‌بندی می‌شوند (۳۷، ۳۶). ما نیز در مطالعات خود به این نتیجه رسیدیم که سابقه خانوادگی سرطان پستان در فامیل درجه یک ممکن است

جدول ۴: خطرتخمینی برای ویژگی‌های دموگرافیکی منتخب و عوامل خطر عمده در رابطه با ژنوتیپ‌های مختلف کدون۳۰۳، اگزون ۴، ژن گیرنده استروژن-α

سرطان پستان ژنوتیپ	بلی n=۱۵۰	خیر n=۱۴۷	P value	OR (۹۵% CI)
[a] نرمال	(٪۴۷/۷) ۱۳۴	(٪۵۲/۳) ۱۴۷	۰/۰۰۱	(مبنا)۱/۰
[b] هتروزیگوت	۱۶ (٪۱۰۰)	-		-
سابقه خانوادگی افراد درجه اول ابتلا به سرطان پستان **ژنوتیپ**	**دارد** **n=۱۹**	**ندارد** **n=۱۳۱**	**P value**	**OR (۹۵% CI)**
نرمال	۸ (٪۰/۶)	۱۲۶ (٪۹۴)	۰/۰۰۱	(مبنا)۱/۰
هتروزیگوت	۱۱ (٪۶۸/۸)	۵ (٪۳۱/۳)		(۰/۰۰۸-۰/۱۰۳) ۰/۰۲۹
متاستاز غدد لنفاوی **ژنوتیپ**	**دارد** **n=۲۳**	**ندارد** **n=۱۲۷**	**P value**	**OR (۹۵% CI)**
نرمال	۲۳ (٪۱۷/۲)	(٪۸۲/۸) ۱۱۱	۰/۰۱۷	(مبنا)۱/۰
هتروزیگوت	-	۱۶ (٪۱۰۰)		-

[a] Genotype normal, AAG/AAG, [b] Genotype heterozygote, AAG/AGG

بحث

شواهد زیادی مبنی بر اینکه سرطان پستان مجموعه‌ای از انواع بیماری‌های بیولوژیکی کاملا مجزا، با ویژگی‌هایی چون پروفایل‌های منحصر به فرد بیان ژن، مارکرهای مولکولی و پروتئینی، با رفتار بالینی، پیش‌آگهی و پاسخ به درمان متفاوت موجود است (۳۴-۲۹،۲۵،۲۴).

که یک فاکتور خطر برای تومورهای پستان باشد که جهش‌های ژن *ESR1* را به نسل‌های بعدی منتقل می‌کند. در نتیجه فراوانی آللی آلل جهش یافته (AGG) در کدان ۳۰۳ بطور قابل توجهی (P=۰/۰۰۱) در بیماران سرطانی که سابقه خانوادگی سرطان پستان دارند (٪۲۸/۹) از آنهایی که سابقه خانوادگی سرطان پستان ندارند (٪۱/۹) بالاتر است. به علاوه، فراوانی جهش

G908A یا K303R در تومور پستانی در مطالعه حاضر (۱۰/۷٪) در مقایسه با مطالعات انجام شده (حدوداً ۶٪) بسیار بالاتر است (۶).

در همین ارتباط مطالعات Conway (۳۸) و همکاران در سال ۲۰۰۷ و همچنین تحقیق حاضر نشان می‌دهد که سابقه خانوادگی سرطان پستان ممکن است یک عامل خطر ابتلا به تومورهای سینه حامل جهش G908A *ESR1* باشد. در مقایسه با گروه کنترل، گروه مورد با ابتلا به سرطان پستان که از نظر جهش G908A *ESR1* مثبت هستند بیشتر احتمال اینکه دارای سابقه خانوادگی درجه اول به سرطان پستان باشند بیشتر است از زمانی است که از نظر جهش G908A *ESR1* منفی می‌باشند و این یافته‌ها را مقایسه مورد به مورد حمایت می‌کند.

با این حال، نمی‌توان این احتمال را رد کرد که، افراد مبتلا به سرطان پستان ممکن است در سلول‌های جنسی خود ژن‌های تغییریافته دیگری را حمل کنند که این ژن‌ها نیز به نوبه خود در استعداد ابتلا به سرطان پستان تاثیر گذارد (۳۹).

نتایج ما حضور جهش G908A در ژن *ESR1* در سرطان تهاجمی پستان را تایید کرده و با یافته‌های دیگر نیز مطابقت دارد (۴۰ و ۴۱).

Fuqua و همکاران در آمریکا در سال ۲۰۰۰ ارتباط مستقیم جهش G908A را در ژن استروژن آلفا با بدخیمی‌های پستان مطرح می‌سازد. گرچه فراوانی آنرا حدود ۱٪ گزارش می‌کند (۲۴). درحالی‌که Conway در آمریکا در سال ۲۰۰۵ فراوانی موتاسیون G908A ۵/۷ ٪ گزارش می‌کند (۴۲).

علی‌رغم مشاهدات Fuqua و همکاران در سال ۲۰۰۰، Zhang و همکاران (۴۳)، همچنین Tokunaga و همکاران در سال ۲۰۰۳ (۴۴) در ژاپن، Tebbit و همکاران در آمریکا در سال ۲۰۰۴ (۴۵) و Davis و همکاران در انگلستان در سال ۲۰۰۵ (۴۶) در جمعیت مورد مطالعه‌شان از زنان مبتلا به سرطان پستان موفق به یافتن جهش G908A نشدند.

به نظر می‌رسد که عوامل متعددی به نتایج متغیر در مطالعات کمک کرده است. این عوامل عبارتند از روش‌های غربالگری آزمایشگاهی، تومورهای مختلف و یا خصوصیات بیماران در جمعیت مورد بررسی، اندازه تومورهای پستان مورد بررسی، شیوع کم این جهش و حضور جهش در تعداد معدودی از سلول بافت تومور،که از طرف دیگر،باعث کاهش حساسیت تشخیص جهش باز G در کدان ۳۰۳ (AAG→AGG) می شود.

در سه مطالعه مختلف که منجر به شناسایی موتاسیون (AAG→AGG) نشده‌اند همه از روش توالی‌یابی خودکار فلور سنتی استفاده کرده‌اند (۴۷-۴۵)، که حساسیت این روش در مقایسه با روش توالی‌یابی رادیو ایزوتوپ بسیار کمتر است، بطوری‌که باعث عدم تشخیص یک سوم موتاسیون‌ها در ژن P53 می‌شود (۴۴).

از زمان Fuqua و Conway این اولین باری است که (۲۶ و ۳۵) از روش رادیو ایزوتوپ در توالی‌یابی برای شناسایی جهش G908A *ESR1* در بافت پستان استفاده می‌شود. ترکیب دو روش SSCP و چرخه توالی‌یابی ^{33}P روشی حساس و قابل اعتمادی را فراهم می‌سازد، زیرا در روش SSCP الگوی تغییر باند را در زمانی که جهشی رخ داده است نشان دهد حتی باند خیلی ضعیف در موقعیت صحیح بر روی ژل SSCP نمایانگر حضور جهش است. روش چرخه توالی‌یابی ^{33}P نشان‌دار شدن یکنواخت همه بازها را در توالی DNA امکان‌پذیر کرده و باعث می‌شود که جهش به وضوح تشخیص داده شود درحالی‌که در روش توالی‌یابی فلورسنت این امکان میسر نیست.

بر اساس این یافته‌ها، حضور جهش G908A در میان سلول‌های بافت تومور با تاثیر در تنظیم مثبت و تغییر در مسیر سیگنالینگ استروژن منجر به رشد تهاجمی بیشتر تومور می‌شود. و نکته جالب اینکه مشخص شود که آیا قرص‌های ضدبارداری و درمان‌های جایگزین هورمونی و دیگر فاکتورهای هورمونی آندرو ژنیک در تعامل با جهش A۹۰۸G *ESR1* به تقویت رشد سلول‌های سرطانی و تشکیل تومور می‌انجامد (۱۰،۴۷،۴۸-۶).

از نقطه نظر درمانی، این نکته نیز مهم است که مشخص شود که پاسخ یا ایجاد مقاومت به تاموکسیفن یا سایر درمان‌های ضداستروژن تحت تاثیر جهش قرار دارد یا خیر. در گزارش اخیر Michalides و همکارانش (۴۹) نشان داد که فسفوریلاسیون سرین ۳۰۵ توسط PKA مقاومت به تاموکسیفن شده و حتی ممکن است تبدیل تاموکسیفن از آنتاگونیست به آگونیست شود، اگر چه Fuqua و همکاران (۲۴) در مطالعات آزمایشگاهی خود در شرایط in vivo به چنین نتایجی دست نیافتند.

در اولین ارزیابی در ایران، ارتباط معنی‌داری میان جهش ژن *ESR1* با بعضی فاکتورهای دموگرافیک و خصوصیات بالینی سرطان پستان بدست آمد، به عنوان مثال: سن شروع قاعدگی زیر ۱۲ سال در مقایسه با بالای ۱۲ سال، از میان گروه‌های خونی، گروه‌های خونی B و O و از میان ۸ نوع مختلف نژاد، نژاد فارس، در بیماران سرطانی هتروزیگوت AAG/AGG مشاهده شد. خطر پیش‌بینی شده برای ابتلا به سرطان فامیلی در بیمارانی که ژنوتیپ هتروزیگوت برای جهش کدان ۳۰۳ دارند بسیار افزایش یافته است که این افزایش از نظر آماری نیز معنی‌دار می‌باشد. در مقایسه با گروه کنترل، بیماران ایرانی مبتلا به سرطان پستان که جهش ژن G908A را دربافت تومور پستان دارند در مقایسه با آنان که این جهش را ندارند احتمال سابقه فامیلی سرطان پستان در فامیل درجه یک بیشتر است، این نتیجه را مقایسه‌های بین گروه‌های کنترل و بیماران نیز تایید می‌نماید (۳۸ و ۴۲).

سرانجام با قرار دادن این داده‌ها در کنار هم به این نتایج رسیدیم:

۱- حضور جهش نقطه‌ای ژن *ESR1* در تومورهای پستان تهاجمی ممکن است در پیدایش سرطان و پیشرفت آن نقش داشته باشد و همچنین در بین ژنوتیپ‌های هتروزیگوت موجب افزایش خطر سرطان پستان تهاجمی در افراد می‌شود.

۲- احتمال وجود جهش G←A در بین بیمارانی که سابقه خانوادگی سرطان پستان را دارند از افرادی که این تاریخچه خانوادگی سرطان را ندارند بیشتر است.

۳- هر چه فراوانی آلل جهش یافته بیشتر باشد، احتمال متاستاز گره لنفاوی در زنان ایرانی کمتر است.

اختلاف کم ولی از نظر آماری معنی‌دار بین نحوه توزیع آللی و ابتلا به سرطان پستان فامیلی وجود دارد. به‌دلیل محدود بودن تعداد نمونه‌ها در مطالعه حاضر، یافته‌های ما در مورد ارتباط بین متاستاز گره لنفاوی و آلل جهش یافته کدان ۳۰۳ نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

اگرچه ارتباط این جهش با ویژگی‌های رشد تومور بسیار حائز اهمیت است اما نتایج ما بر اساس تعداد کمی از تومورهای جهش مثبت صورت گرفته است مسلما مطالعات دیگری بر روی نمونه‌های بیشتر لازم است تا نقش این جهش درخطر ابتلا به سرطان پستان مشخص شود.

نتیجه‌گیری

نتایج ما وجود جهش *ESR1* A908G را با فراوانی ۱۰/۷ در سرطان پستان تهاجمی تایید می‌کند و نشان می‌دهد که سرطان پستان با جهش درژن *ESR1*، با سابقه خانوادگی سرطان پستان در فامیل درجه یک بیمار ارتباط مستقیم داشته و می‌تواند دراتیولوژی، پیش‌آگهی و درمان سرطان پستان نقش مهمی داشته باشد. بعلاوه مطالعات بیشتری لازم است تا یافته‌های ما را به طور کامل تایید نماید.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از خانم‌ها الهام فرازنده و معصومه جعفری افتخار برای جمع‌آوری نمونه‌ها در آزمایشگاه مرکزی مجتمع بیمارستانی امام خمینی(ره) صمیمانه قدردانی می‌نمایند. همچنین از خانم مهندس رویا شریفیان برای تجزیه و تحلیل آماری یافته متواضعانه سپاسگزاریم.

References

1. Screening for Breast Cancer. 2007. Available at: http://www.who. Int/cancer/detection/ Breastcancer/en/
2. Behjati F, Atri M, Najmabadi H, Nouri K, Zamani M, Mehdipour P. Prognostic value of chromosome 1 and 8 copy number in invasive ductal breast carcinoma among Iranian women: an interphase FISH analysis. Pathol Oncol Res 2005; 11: 157-63.
3. Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A, Momtahen AJ. Breast cancer in Iran: results of a multicenter study. Asian Pac J Cancer Prev 2004; 5: 24-7.
4. Lin Y, Kikuchi S, Tamakoshi K, Wakai K, Kondo T, Niwa Y, et al. Japan Collaborative Cohort Study Group for Evaluation of Cancer Risk. Active smoking, passive smoking, and breast cancer risk: findings from the Japan

Collaborative Cohort Study Group for Evaluation of Cancer Risk. J Epidemiol 2008; 18: 77-83.

5. Pike MC, Spicer DV, Dahmoush L, Press MF. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. Epidemiol Rev 1993; 15: 17-35.

6. Herynk MH, Parra I, Cui Y, Beyer A, Wu MF, Hilsenbeck SG, at al. Association between the estrogen receptor alpha A908G mutation and outcomes in invasive breast cancer. Clin Cancer Res 2007; 13: 3235-43.

7. Herynk MH, Hopp T, Cui Y, Beyer A, Wu MF, Hilsenbeck SG, et al. A hypersensitive estrogen receptor alpha mutation that alters dynamic protein interactions. Breast Cancer Res Treat 2010; 122: 381-93.

8. Barone I, Brusco L, Fuqua SA. Estrogen receptor mutations and changes in downstream gene Expression and signaling. Clin Cancer Res 2010; 16: 2702-8.

9. Iwao K, Miyoshi Y, Egawa C, Ikeda N, Noguchi S. Quantitative analysis of estrogen receptor-beta mRNA and its variants in human breast cancer. Int J Cancer 2000; 88: 733-6.

10. Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. Carcinogenesis 2000; 21: 427-33.

11. Roodi N, Bailey LR, Kao WY, Verrier CS, Yee CJ, Dupont WD, Parl FF. Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor- negative primary breast cancer. J Natl Cancer Inst 1995; 87: 446-51.

12. Ramalhinho AC, Marques J, Fonseca-Moutinho J, Breitenfeld L. Genetic polymorphims of estrogen receptor alpha -397 PvuII (T>C) and -351 XbaI (A>G) in a portuguese population: prevalence and relation with breast cancer susceptibility. Mol Biol Rep; 2013. 40(8):5093-103.

13. Azimi C, Abbasi S. Genetic polymorphisms in the estrogen receptor-α gene codon 325(CCCTCCG) and risk of breast cancer among Iranian women: a case control study. Med J Islamic Republic of Iran 2009; 23: 75-82.

14. Madeira KP, Daltoé RD, Sirtoli GM, Carvalho AA, Rangel LB, Silva IV. Estrogen receptor alpha (ERS1) SNPs c454-397T>C (PvuII) and c454-351A>G (XbaI) are risk biomarkers for breast cancer development. Mol Biol Rep. 2014 Jun 14.

15. Borgquist S, Hjertberg M, Henningson M, Ingvar C, Rose C, Jernström H. Given breast cancer, is fat better than thin? Impact of the estrogen receptor beta gene polymorphisms. Breast Cancer Res Treat 2013; 137(3):849-62.

16. 16. Segal CV, Dowsett M. Estrogen receptor mutations in breast cancer--new focus on an old target. Clin Cancer Res. 2014 1; 20 (7):1724-6.

17. Abbasi S. Polymorphisms in estrogen receptor - alpha and beta genes in breast cancer patients from Imam Khomeini Hospital. In (Ph.D thesis) Malaysia: 2008; Universiti Putra Malaysia.

18. Abbasi S, Azimi C, Otman F, Noori Daloii MR, Ashtiani ZO, et al. (ESR1) gene codon 10 (T392C) polymorphism in Iranian women with breast cancer: a case control study. Trends Mol Scie 2009; 1: 1 - 10.

19. Abbasi S, Ismail P, Othman F, Rosli R, Azimi C. Estrogen receptor-α (ESR1) gene, codon 594 (G3242A) polymorphism among Iranian women with breast cancer: a case control study. Asian J Scie Res 2009; 2: 51-60.

20. Vasconcelos A, Medeiros R, Veiga I, Pereira D, Carrilho S, Palmeira C, et al. Analysis of estrogen receptor polymorphism in codon 325 by PCRSSCP in breast cancer: association with lymph node metastasis. Breast J 2002; 8: 226-9.

21. Slattery ML, Sweeney C, Herrick J, Wolff R, Baumgartner K, Giuliano A, et al. ESR1, AR, body size, and breast cancer risk in Hispanic and non-Hispanic white women living in the Southwestern United States. Breast Cancer Res Treat 2007; 105: 327-35.

22. Einarsdóttir K, Darabi H, Li Y, Low YL, Li YQ, Bonnard C, et al. ESR1 and EGF genetic variation in relation to breast

cancer risk and survival. Breast Cancer Res 2008; 10: R15.

23. González-Zuloeta Ladd AM, Vásquez A, Siemes C, Hofman A, Stricker BH, Pols HA, et al. Estrogen receptor α polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. Breast Cancer Research and Treatment 2008; 107: 415-9.

24. Fuqua SA, Wiltschke C, Zhang QX, Borg A, Castles CG, Friedrichs WE, et al. A hypersensitive estrogen receptor-alpha mutation in premalignant breast lesions. Cancer Res 2000; 60: 4026-9.

25. Zubairy S, Cui Y, Fuqua SA. The K303R estrogen receptor alpha breast cancer mutant generates a new Akt kinase site. Proc Am Assoc Cancer Res 2004; 45: 659.

26. Fuqua SA. The role of estrogen receptors in breast cancer metastasis. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2001; 6: 407-17.

27. Won Jeong K, Chodankar R, Purcell DJ, Bittencourt D, Stallcup MR. Gene-Specific Patterns of Coregulator Requirements by Estrogen Receptor- α in Breast Cancer Cells. Mol Endocrinol 2012; 26: 955-66.

28. Dressler LG, Geradts J, Burroughs M, Cowan D, Millikan RC, Newman B. Policy guidelines for the utilization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections: the UNC SPORE experience. Breast Cancer Res Treat. 1999; 58:31–9.

29. Filippini1 SE, Vega A. Breast cancer genes. Beyond BRCA1 and BRCA2. Front Biosci 2013; 18:1358-72.

30. Holst F, Stahl PR, Ruiz C, Hellwinkel O, Jehan Z, Wendland M, et al. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. Nat Genet 2007; 39: 655-60.

31. Santarpia L, Qi Y, Stemke-Hale K, Wang B, Young EJ, Booser DJ, et al. Mutation profiling identifies numerous rare drug targets and distinct mutation patterns in different clinical subtypes of breast cancers. Breast Cancer Res Treat 2012; 134(1):333-43.

32. Barone I, Cui Y, Herynk MH, Rodriguez AC, Giordano C, Selever J. Expression of the K303R Estrogen Receptor α Breast Cancer Mutation Induces Resistance to an Aromatase Inhibitor via Addiction to the PI3K/Akt Kinase Pathway. Cancer Res 2009; 69: 4724-32.

33. Cizkova M, Susini A, Vacher S, Clairac GC, Andrieu C, Driouch K, et al. PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ERalpha, PR and ERBB2- based subgroups. Breast Cancer Res 2012; 14: R28.

34. Huang E, Cheng SH, Dressman H, Pittman J, Tsou MH, Horng CF, et al. Gene expression predictors of breast cancer outcomes. Lancet 2003; 361:1590-6.

35. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. Physiol Rev 2007; 87: 905-31.

36. Conway K, Edmiston SN, Cui L, Drouin SS, Pang J, He M, et al. Prevalence and spectrum of p53 mutations associated with smoking in breast cancer. Cancer Res 2002; 62:1987–95.

37. Tsakountakis N, Sanidas E, Stathopoulos E, Kafousi M, Anogiannaki N, Georgoulias V, et al. Correlation of breast cancer risk factors with HER-2/neu protein overexpression according to menopausal and estrogen receptor status. BMC Womens Health 2005; 5:1–9.

38. Conway K, Parrish E, Edmiston SN, Tolbert D, Tse CK, Moorman P, et al. Risk factors for breast cancer characterized by the estrogen receptor alpha A908G (K303R) mutation. Breast Cancer Res 2007; 9(3):R36.

39. Newman B, Mu H, Butler LM, Millikan RC, Moorman PG, King MC. Frequency of breast cancer attributable to BRCA1 in a population-based series of American women. JAMA 1998; 279:915–21.

40. Murphy LC, Dotzlaw H, Leygue E, Douglas D, Coutts A, Watson PH. Estrogen receptor variants and mutations. J Steroid Biochem Molec Biol 1997; 62:363–72.

41. Herynk MH, Fuqua SAW. Estrogen receptor mutations in human disease. Endocr Rev 2004; 25:869–98.

42. Conway K, Parrish E, Edmiston SN, Tolbert D, Tse CK, Geradts J, et al. the estrogen receptor-alpha A908G (K303R) mutation occurs at a low frequency in invasive breast tumors: results from a population-based study. Breast Cancer Res 2005; 7(6):R871-80.

43. Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Omoto Y, Sugiura H, Hara Y, et al. Estrogen receptor alpha mutation (A-to-G transition at nucleotide 908) is not found in different types of breast lesions from Japanese women. Breast Cancer 2003; 10:70–3.

44. Tokunaga E, Kimura Y, Maehara Y. No hypersensitive estrogen receptor-alpha mutation (K303R) in Japanese breast carcinomas. Breast Cancer Res Treat 2004; 84:289–92.

45. Tebbit CL, Bentley RC, Olson JA, Jr, Marks JR. Estrogen receptor alpha (ESR1) mutant A908G is not a common feature in benign and malignant proliferations of the breast. Genes Chromosomes Cancer 2004; 40:51–4.

46. Davies MPA, O'Neill PA, Innes H, Sibson DR. Hypersensitive K303R oestrogen receptor-α variant not found in invasive carcinomas. Breast Cancer Res 2004; 7:R113–8.

47. Ahrendt SA, Halachmi S, Chow JT, Wu L, Halachmi N, Yang SC, et al. Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:7382–7.

48. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. Physiol Rev 2007; 87: 905-31.

49. Michalides R, Griekspoor A, Balkenende A, Verwoerd D, Janssen L, Jalink K, et al. Tamoxifen resistance by a conformational arrest of the estrogen receptor α after PKA activation in breast cancer. Cancer Cell 2004; 5:597–605.