Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:34 +0330 on Saturday November 25th 2017

پژوهش در پزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
سال ۲۸، شماره ۲، صفحات ۱۰۱ تا ۱۰۸، تابستان ۸۳

Original Article

جهش‌های ژنتیکی جدید در ژن‌های اصلی سرطان پستان (BRCA1/BRCA2) در زنان ایرانی مبتلا به سرطان پستان زودرس

دکتر وحید رضا یاسایی[1]، دکتر Ann Dalton [2]، دکتر David P. Hornby [2]

۱- استادیار، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲- دانشگاه شفیلد، انگلستان

چکیده

سابقه و هدف: *سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی در زنان و عامل اصلی مرگ و میر در زنان میانسال می‌باشد. تاکنون جهش‌های ژنتیکی سلول‌های زایا در ژن‌های BRCA1/ BRCA2 در بیماران مبتلا به سرطان زودرس پستان ویا سرطان تخمدان در جمعیت ایرانی شناسایی نشده است.*

مواد و روش‌ها: *با همکاری دو مرکز اصلی رفرال سرطان در تهران اطلاعات بالینی، سابقه خانوادگی و خون محیطی از ۸۳ بیمار با سن کمتر از ٤٥ سال مبتلا به سرطان زودرس پستان برای بررسی مولکولی جهش ژنتیکی در ژن BRCA1/BRCA2 جمع آوری شد. قطعات مختلفی از DNA ژنومیک بیماران با استفاده از روش PCR تکثیر شد. اگزون ۱۱ ژن BRCA1 و اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ ژن BRCA2 با روش Protein Truncation Test (PTT) و اگزون‌های ۲۰، ۱۳، ۵، ۳، ۲ ژن BRCA1 و اگزون‌های ۲۳، ۱۸، ۱۷، ۹ با روش Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) مورد آنالیز مولکولی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *۱۰ جهش ژنتیکی برای اولین بار در جمعیت ایرانی شناسایی شد. این جهش‌ها شامل ۵ جهش از نوع frameshift (که باعث بروز سرطان پستان می‌شوند، ٤ جهش برای اولین بار در دنیا شناسایی شد)، ۳ جهش از نوع missense (با اثرات ناشناخته در بروز سرطان پستان) و ۲ جهش از نوع polymorphism (که یکی از آنها در جمعیت انگلیسی نیز به طور شایع شناسایی شده‌است) می‌باشند.*

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: *شناسایی این جهش‌های ژنتیکی جدید در جمعیت ایرانی نشان می‌دهد که هر جمعیتی می‌بایست یک بانک اطلاعاتی اختصاصی از جهش‌های ژنتیکی برای سرطان ارثی پستان تاسیس نماید و بر مبنای آن برنامه‌های غربالگری کشور را تدوین نماید. نحوه رخداد جهش‌های ژنتیکی شناسایی شده در این مطالعه به نظر مشابه سایر مطالعات در جوامع دیگر می‌باشد. از نظر اپیدمیولوژی، وجود سرطان پستان زودرس (بروز در سن کمتر از ٤٥ سال) و سابقه فامیلی برای تدوین برنامه‌های غربالگری (با احتمال یافتن جهش ژنتیکی به میزان ۲۵٪) در ایران کافی می‌باشد. این در حالی است که سرطان پستان اسپورادیک (با احتمال شناسایی جهش ژنتیکی به میزان ۵٪) به نظر مقرون به صرفه نمی‌باشد.*

واژگان کلیدی: ***BRCA1 , BRCA2*، سرطان پستان، جمعیت ایرانی، روشهای تشخیصی جهش‌های ژنتیکی**

مقدمه

پس از سرطان پوست، سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی در زنان است (۱). احتمال ابتلای به این سرطان در طول عمر برای زنان ۱۰ درصد می‌باشد. به عبارت دیگر از هر ۱۰ زن یک نفر به سرطان پستان مبتلا می‌شود (۲). علی رغم تلاش‌های به عمل آمده در تشخیص زودرس و درمان‌های بهتر، این سرطان بعد از سرطان ریه دومین عامل مرگ و میر در زنان به علت سرطان می‌باشد (۳). به استثناء سرطان پوست، سه نوع از شایع‌ترین سرطان‌ها در زنان ایرانی به ترتیب شیوع عبارتند از سرطان مری، سرطان پستان و سرطان سرویکس (٤). یک مطالعه اولیه نشان داده است که تفاوت معنی‌داری در سن بروز سرطان پستان در زنان ایرانی در مقایسه با دیگر جوامع وجود ندارد (۵، ٦). عبارت سرطان پستان ارثی زمانی اطلاق می‌شود که فرد سابقه خانوادگی از سرطان پستان و یا تخمدان

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:34 +0330 on Saturday November 25th 2017

داشته و نحوه وراثت آن را به صورت اتوزومال غالب نشان دهد (۷). امروزه تلاش بسیار زیادی صورت می‌گیرد تا میزان بروز و مرگ و میر سرطان پستان و یا تخمدان در زنان در معرض خطر بالا را از طریق تشخیص زودرس کاهش دهند. سرطان پستان یک بیماری سیستمیک نبوده ولی در صورت ابتلا پیشرونده است. در صورت تشخیص به موقع می‌توان با روش‌های پیشگیرانه شدید از ابتلای به آن تا حدود زیادی جلوگیری نمود. اگر چه غربالگری صحیح می‌تواند پیشرفت آن را متوقف کند لکن در انواع پیشرفته درمان عموماً بی‌نتیجه است (۸).

در سال ۱۹۹۰ محل اولین ژن مستعد کننده سرطان پستان BRCA1 با روش Linkage Analysis بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۷ شناسایی شد (۹). در سال ۱۹۹٤ Miki ژن BRCA1 را کشف کرد (۱۰). به دنبال آن در سال ۱۹۹۵ دومین ژن مستعد کننده سرطان پستان BRCA2 نیز کشف شد (۱۱). هر دو ژن BRCA1 و BRCA2 ژن‌های بزرگی هستند و به ترتیب از ۲٤ و ۲۷ اگزون تشکیل شده‌اند. زنانی که حامل جهش ژنتیکی در یکی از این دو ژن هستند شانس بسیار زیادی برای ابتلای به سرطان پستان را در سن کمتر از ۵۰ سال دارند (۱٤-۱۲). تعدادی از مطالعات نشان داده‌اند که ۱۳٪ زنان مبتلا به سرطان پستان با سن کمتر از ۳۰ سال و ۷٪ زنان مبتلا به سرطان پستان با سن کمتر از ۳۵ سال دارای جهش ژنتیکی در ژن BRCA1 می باشند (۱۲، ۱۵). تاکنون هیچ مطالعه مولکولی بر روی جهش‌های ژنتیکی سلول زایا ژن‌های در ژن‌های BRCA1/BRCA2 در جمعیت ایرانی گزارش نشده است. ویژگی‌های خاصی برای انتخاب شرکت کنندگان در این مطالعه در نظر گرفته شده تا شانس بیشتری برای داشتن جهش ژنتیکی سلول‌های زایا در ژن‌های فوق‌الذکر را داشته باشند.

طیف جهش‌های ژنتیکی

در حال حاضر بیش از ۸۷۸ نوع جهش ژنتیکی مجزا به صورت پلی‌مورفیسم و جهش‌های گوناگون در سرتاسر ژن BRCA1 کشف شده است (۱٦). همچنین بیشتر از ۹۰۰ تغییر ژنتیکی مجزا در ژن BRCA1 شناسایی شده است (۱٦). جهش ژنتیکی به هیچ نقطه خاصی در ژن‌های فوق الذکر محدود نمی شود. بیشتر این جهش‌ها در هر دو ژن فقط یک بار گزارش شده است (۱٦).

در حدود نیمی از همه موارد سرطان پستان زودرس و بیشتر موارد سرطان پستان فامیلیال و سرطان تخمدان به علت جهش ژنتیکی سلول‌های زایا در ژن BRCA1 می باشد (۹، ۱۷). تاکنون گزارشی از جهش ژنتیکی در ژن BRCA1 در نوع اسپورایک سرطان پستان گزارش نشده است (۱۸). اگرچه تعداد بسیار کمی از جهش‌های ژنتیکی این ژن در سرطان تخمدان اسپورادیک گزارش شده است (۱۹، ۲۰).

مواد و روش‌ها

این مطالعه به منظور دستیابی به تجربه اولیه در شناسایی جهش‌های ژنتیکی سلول‌های زایا در ژن‌های BRCA1/ BRCA2 در زنان ایرانی مبتلا به سرطان پستان زودرس انجام شده است. با همکاری دو مرکز بزرگ تحقیقات و درمان سرطان در تهران، مرکز سرطان پستان ایران (Iranian Center for Breast Cancer:ICBC) و انستیتو سرطان (وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران) ، ۸۳ نمونه خون محیطی از ۸۲ خانواده غیر وابسته برای شناسایی جهش‌های ژنتیکی در ژن‌های فوق‌الذکر جمع‌آوری شد.

اطلاعات پزشکی ۱۵۲ بیمار ایرانی مبتلا به سرطان پستان مراجعه کننده به ICBC در طی سالهای ۱۳۷۹-۱۳۷٦ مورد مطالعه قرار گرفت و ۳۹ بیمار برای آنالیز مولکولی ژن‌های BRCA انتخاب شدند. همچنین از آذرماه ۱۳۷۸ بمدت یکسال تعداد ٤٤ بیمار ایرانی مبتلا به سرطان پستان مراجعه کننده به انستیتو سرطان نیز برای این مطالعه انتخاب شدند. سن کمتر از ٤۵ سال ملاک سنی برای انتخاب افراد شرکت کننده در این مطالعه در نظر گرفته شد. آگاهی لازم از اهداف اجرای این پروژه و نحوه اعلام نتایج آن به شرکت کنندگان داده شد و آنان فرم های رضایت نامه مربوطه را امضا نمودند.

نحوه تخلیص DNA و روش های تشخیصی جهش‌های ژنتیکی

با استفاده از کیت تخلیص DNA(PromegaCat. No.LA1620) و براساس پروتکل مربوطه آن، ژنومیک DNA از لنفوسیت‌های خون محیطی در انستیتو پاستور تهران تخلیص شد.

اگزون ۱۱ ژن BRCA1 و اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ ژن BRCA2 با روش PTT (۲۳-۲۱) و اگزون‌های ۳،۵،۱۳،۲۰ و ۲ ژن BRCA1 و اگزون‌های ۱۷،۱۸،۲۳ و ۹ با روشهای SSCP/HA (۲۵،۲٤) و با استفاده از تکثیر ژنومیک DNA و انجام PCR مورد آنالیز قرار گرفتند. از آنجاییکه جهش‌های ژنتیکی در سرتاسر ژن‌های BRCA1/BRCA2 اتفاق می‌افتد و آنالیز مولکولی کامل ژنها به دلایل مالی و تکنیکی مقدور نبود، بعضی از نقاط شایع جهش یافته شناخته شده به دلایل زیر انتخاب شدند.

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:34 +0330 on Saturday November 25th 2017

۱- قبلاً نشان داده شده است که اگزون‌های ۲۰،۵، ۱۱،۳ و ۲ نقش مهمی در عملکرد پروتئین ژن BRCA1 دارند (۲۶،۲۷).

۲- اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ بخش بزرگی از هر دو ژن را شامل می‌شوند.

۳- جهش‌های ژنتیکی بیماریزا (سرطان پستان) بطور متعدد در این نقاط گزارش شده است.

٤- این نقاط در مطالعات متعدد قبلی مورد بررسی مولکولی قرار گرفته‌اند (۳۲ـ۲۸).

مقایسه مطالعات قبلی مشابه نشان داده است که انتخاب این استراتژی (آنالیز مولکولی قسمت‌های خاص از ژن‌های فوق الذکر) ممکن است منجر به عدم شناسایی جهش‌های ژنتیکی در سایر قسمتهای بررسی نشده ژن‌های BRCA1/ BRCA2 به ترتیب به میزان ۱٤٪ و ۲۲٪ شود (۳۲ـ۲۸). از آنجاییکه تاکنون هیچ گونه جهش ژنتیکی اختصاصی در جمعیت ایرانی در ژن‌های BRCA1/ BRCA2 گزارش نشده است، لذا یافته‌های این مطالعه می‌بایست به عنوان اطلاعات پایه‌ای و اولیه مورد استفاده قرار گیرد.

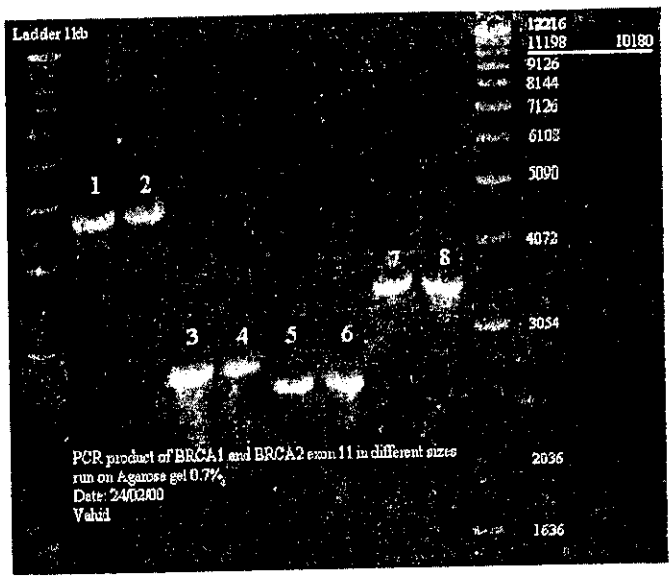
روش Protein Truncation Test (PTT)

بیشتر جهش‌های ژنتیکی شناسایی شده در ژن‌های BRCA1/BRCA2 منجر به تولید پروتئین‌های ناقص می‌شوند که به آسانی می‌توانند توسط روش PTT تشخیص داده شوند. PTT روشی حساس و دقیق در تشخیص جهش‌های ژنتیکی است.

در روش PTT نیاز به طراحی پرایمرهای اختصاصی است که شامل قسمت‌های T7 promoter و Kozak consensus sequence می‌باشند. در این مطالعه با طراحی اختصاصی پرایمرها و استفاده از روش PCR طول کامل اگزون ۱۱ ژن BRCA1 شامل ۳٤٤٦ نوکلئوتید و اگزون ۱۱ ژن BRCA2 شامل ٤۹۵۹ نوکلئوتید در یک واکنش PCR تکثیر شد (شکل شماره ۱). همچنین برای جلوگیری از کاهش حساسیت این تست (PTT)، قسمت‌های انتهایی هر دو ژن به طور مجزا توسط روش SSCP مورد آنالیز قرار گرفت.

برنامه PCR در روش PTT

مخلوطی از ۵۰ نانوگرم DNA ژنومیک، یک میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۵ پیکومول در میکرولیتر، ۲ میکرولیتر از مخلوط dNTPs با غلظت ۲/۵ میلی مولار از هر dNTP، ۲/۵ میکرولیتر از PCR بافر A [شامل ۳۰۰ Tris-SO_4 میلی مولار PH=9.1، $(NH4)_2$, SO_4 ۹۰ میلی مولار و $MgSO_4$ ۵ میلی مولار] و ۲/۵ میکرولیتر از PCR بافر B [شامل ۳۰۰ Tris-SO_4 میلی مولار، PH=9.1 $(NH4)_2$, SO_4 ۹۰ میلی مولار و $MgSO_4$ ۱۰ میلی مولار] با غلظتهای ۵ برابر، یک میکرولیتر آنزیم Elongase بر اساس پروتکل سازنده آن (Invitogen/Paisley, UK) و آب استریل تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر درون تیوب ۰/۵ سی سی میکروسانتریفوژ آماده شد و طبق برنامه مندرج در جدول شماره ۱ مورد PCR قرار گرفت.



شکل ۱- محصول PCR از ژن BRCA1/2 اگزون شماره ۱۱ بر روی ژل آگاروز

محصول PCR ژن BRCA1/2 اگزون شماره ۱۱ بر روی ژل آگاروز با غلظت ۰/۷ درصد بمدت ۱٦ ساعت با قدرت ٤۵ وات حرکت داده شد.

ستون شماره ۱ و ۲ نشاندهنده محصول PCR از تمام طول اگزون شماره ۱۱ ژن BRCA2 به سایز bp ٤۹۵۹ می باشد.

ستون شماره ۳ و ٤ نشاندهنده محصول PCR از بخش اول اگزون شماره ۱۱ ژن BRCA2 به سایز bp ۲۸۳٤ می باشد.

ستون شماره ۵ و ٦ نشاندهنده محصول PCR از بخش دوم اگزون شماره ۱۱ ژن BRCA2 به سایز bp ۲٦۵۷ می باشد.

ستون شماره ۷ و ۸ نشاندهنده محصول PCR از تمام طول اگزون شماره ۱۱ ژن BRCA1 به سایز bp ۳٤٤٦ می باشد.

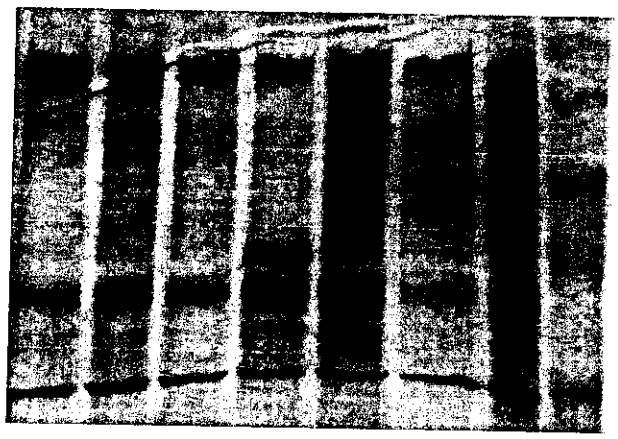
جدول ۱- برنامه PCR در روش PTT

مرحله	درجه حرارت (°C)	زمان	سیکل
دناتوره اولیه	۹٤	۱دقیقه	۱
دناتوره	۹٤	۲۵ثانیه	
Annealing	۵٦	۱دقیقه	۳۱
Extension	٦۸	٤دقیقه	
Extension نهایی	٦۸	۱۰دقیقه	۱

ابتدا محصول PCR بر روی ژل اگاروز ۰/۷ درصد بررسی شد و سپس یک میکرولیتر از محصول PCR برای انجام PTT با استفاده از ماده رادیواکتیو گوگرد ۳۵ (S^{35}) و براساس پروتکل شرکت سازنده آن مورد استفاده قرار گرفت. پروتئین تولید شده اگزون ۱۱ ژن‌های

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:34 +0330 on Saturday November 25th 2017

BRCA1 و BRCA2 بـه ترتیـب بـا اندازه‌هـای ۱۲۶ kDa و ۱۸۲ kDa توسط SDS-PAGE شناسایی شد (شکل شماره ۲).



شکل ۲- بررسی پروتئین اگزون ۱۱ ژن BRCA1 برروی ژل SDS-PAGE ٪۶ با استفاده از روش PTT

شکل فوق آنالیز پروتئین کامل و غیر کامل اگزون ۱۱ ژن BRCA1 را بر روی SDS-PAGE نشان می‌دهد.

در این تصویر ستون اول از سمت راست مارکر پروتئینی می‌باشد.

ستون پنجم از سمت راست پروتئین‌های منقطع شده (truncated proteins) قابل رویت می‌باشد. آلل طبیعی آن در قسمت بالای همه ستونهای مشهود است.

ستونهای ۲،۳،۴،۶،۷و۸ همگی نشاندهنده پروتئین‌های طبیعی میباشند.

روش Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

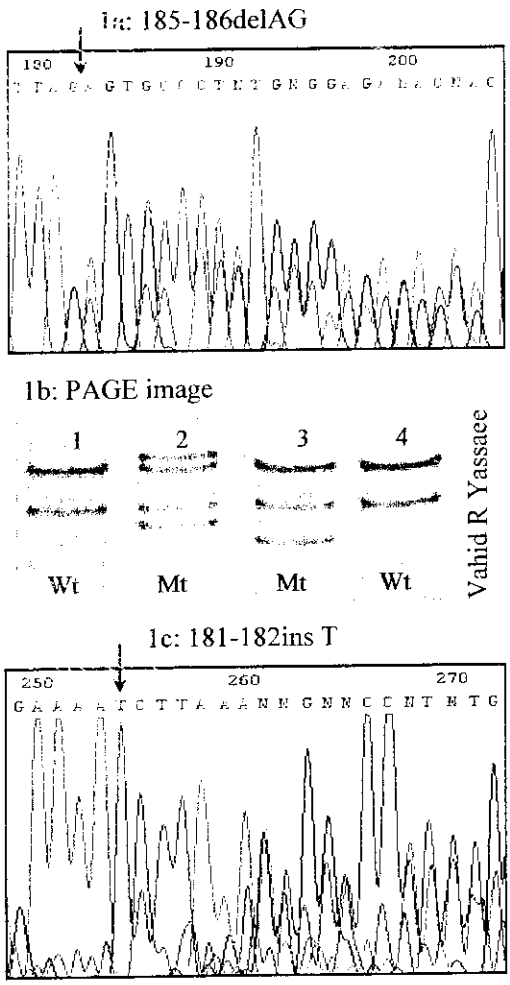
اگزون‌های ۲۰، ۱۳، ۵، ۳و۲ ژن BRCA1 و اگزون‌های ۲۳،۱۸،۱۷و۹ ژن BRCA2 و قسمت‌های انتهایی اگزون ۱۱ هر دو ژن BRCA بـا این روش مورد آنالیز قرار گرفت.

برنامه PCR در روش SSCP

برنامه PCR برای تولید ماده مورد نیاز SSCP بـه شـرح زیـر انجـام شد. مخلوطی از ۵۰ نانوگرم DNA ژنومیک، یک میکرولیـتر از هـر پرایمر با غلظت ۵ پیکومول در میکرولیتر، ۱/۶ میکرولیتر از مخلـوط dNTPs با غلظت ۲/۵ میلی مولار از هر dNTP، ۲ میکرولیتر از بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر، ۰/۷ واحد از آنزیم Red Hot Taq DNA polymerase و آب استریل تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر آماده شد و طبق برنامه مندرج در جدول شماره دو مورد PCR قرار گرفت.

جدول ۲- برنامه PCR در روش SSCP

مرحله	درجه حرارت (°C)	زمان	سیکل
دناتوره اولیه	۹٤	۲دقیقه	۱
دناتوره	۹٤	۳۰ثانیه	
Annealing	۵۵-٦۰	٦۰ثانیه	۲۸
Extension	۷٤	٦۰ثانیه	
Extension نهایی	۷۲	۵دقیقه	۱



شکل ۳- آنالیز Single Strand Conformational Polymorphism

در قسمت (1b) ستون‌های ۱و٤ نحوه حرکت طبیعی و ستونهای ۳و۲ نحوه حرکت غیر طبیعی مولکول تک رشته‌ای DNA را بر روی ژل‌پلی آکریل آمید نشان می‌دهند.

جهش نوع frameshift در ستون ۲ توسط روش توالی یابی DNA (1a) تایید شد و نشان داد که نوکلئوتیدهای AG در اگزون ۲ ژن BRCA1 در جایگاه ۱۸٦-۱۸۵ حذف (deletion) شده‌اند. این جهش منجر به تولید کدون متوقف کننده در سنتز پروتئین درکدون شماره ۳۹ می‌شود.

جهش نوع frameshift در ستون ۳ نیز توسط روش توالی یابی DNA(1c) تایید شد ونشان داد که نوکلئوتید T در اگزون ۲ ژن BRCA1 بین نوکلوتیدهای ۱۸۲-۱۸۱ اضافه (insertion) شده است. این جهش منجر به تولید کدون متوقف کننده در سنتز پروتئین درکدون شماره ٤۰ می‌شود.

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:34 +0330 on Saturday November 25th 2017

روش SSCP برای شناسایی جهش‌های ژنتیکی نقطه‌ای (point mutations) به شرح زیر انجام شد. مخلوطی از ۵ میکرولیتر از محصول PCR و ۵ میکرولیتر بافر لودینگ (loading buffer) توسط حرارت به مدت ۱۰ دقیقه دناتوره شد و سپس سریعاً درون یخ سرد شد. این مخلوط ۱۰ میکرولیتری بر روی ژل ۱۴٪ بیس ـ پلی آکریل آمید (۵۷:۱) و با استفاده از غلظت‌های متفاوتی از گلیسرول (۱۰ـ۳ درصد) و در درجه حرارت‌های متفاوت (۱۲-۱۶ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲۰-۱۶ ساعت با ولتاژ ۲۴۵ در تانک الکتروفورزیس اختصاصی مورد آنالیز قرار گرفت. مولکول‌های DNA تک‌رشته‌ای (single-stranded) و دو رشته‌ای (double-stranded) با استفاده از روش رنگ آمیزی نقره شناسایی شدند. نمونه‌های جهش یافته و نرمال به همراه مشخصات سکانس نمونه جهش یافته در شکل شماره ۳ نشان داده شده است.

روش توالی یابی مستقیم DNA

مشخصات همه جهش‌های ژنتیکی شناسایی شده توسط روش‌های PTT و SSCP با روش دقیق توالی یابی مستقیم DNA (Direct Sequencing) و با استفاده از دستگاه ABI 377 DNA Sequencer تایید شدند.

برای طراحی پرایمرها در روش SSCP، نقاط اتصال اینترون و اگزون (splice junction) در طراحی همه پرایمرها مورد نظر قرار گرفت. به علاوه، چهار جفت پرایمر برای آنالیز اختصاصی نقاط انتهایی اگزون ۱۱ هر دو ژن BRCA1/ BRCA2 طراحی شد.

در روش PTT دو جفت پرایمر اختصاصی برای آنالیز کامل اگزون ۱۱ هر دو ژن BRCA1/BRCA2 طراحی شد. این طراحی اختصاصی پرایمرها می‌تواند باعث افزایش دقت تست در آنالیز بخش‌های مختلف هر دو ژن و کاهش هزینه های غربالگری (screening cost) شود. این طراحی برای اولین بار در دنیا انجام شده و کاربرد آن در این مقاله بخوبی نشان داده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه آینده‌نگر ۱۰ جهش ژنتیکی مجزا شامل پنج جهش از نوع frameshift که چهار جهش از آنها برای اولین بار در دنیا گزارش می شود، سه جهش از نوع missense با اثرات ناشناخته و دو جهش polymorphism شناسایی شد (جداول ۳ و ٤).

یک نوع پلی‌مورفیسم (IVS16-14T>C) در ژن BRCA2 در جمعیت های ایرانی و انگلیسی شناسایی شد.

آنالیز اختصاصی نقاط انتهایی اگزون ۱۱ هر دو ژن BRCA با استفاده از روش SSCP هیچ‌گونه جهشی را شناسایی نکرد و این موضوع نشان دهنده حساسیت زیاد روش PTT در آنالیز قطعات بزرگ نظیر اگزون ۱۱ ژن‌های BRCA1/ BRCA2 می‌باشد.

جداول ۳ و ٤ به ترتیب مشخصات و نوع جهش‌های ژنتیکی شناسایی شده در ژن‌های BRCA1 و BRCA2 را نشان می دهد.

جدول ۳- مشخصات جهش‌های ژنتیکی سلولهای زایا در ژن BRCA1

اگزون	۲	۲	۱۱	۲۰
موتاسیون وتغییر نوکلئوتیدی	185-186de1AG	181-182insT	2335-2336de1AA	12bpdup gtattccactcc IVS20+48
Stop codon در این آمینواسید	39TGA	40TGA	741TAA	-
تاثیر Coding	Frameshift	frameshift	frameshift	پلی مورفیسم
روش غربالگری	SSCP/HA	SSCP/HA	PTT	SSCP/HA
سابقه خانوادگی	2BC-IPS	1-OV	2BC<40	2BC<42
سن در هنگام تشخیص(سال)	۳۷	٤۱	٤۲	*۲۷

* این بیمار یک جهش frameshift در اگزون ۱۱ ژن BRCA2 نیز داشت. BC، سرطان پستان، OV: سرطان تخمدان، PS: سرطان پروستات

HA: Heteroduplex Analysis ،SSCP: Single Strand Conformational Polymorphism Assay ، PTT:Protein Truncation Test

جدول ٤- مشخصات جهش‌های ژنتیکی سلولهای زایا در ژن BRCA2

اگزون	۱۱	۱۱	۱۱	۱۷*	۱۸	۲۳
موتاسیون وتغییر نوکلئوتیدی	6261-6262insGT	3979-3980insA	5972C>T Tl915M	IVS16-14T>C zvS16-6T>G	8345A>G N2706S	9266C>T T3013I
Stop codon دراین آمینواسید	2040TAA	1264TAA	-	-	-	-
تاثیر Coding	frameshift	frameshift	missense	Close to splice site	missinse	Missense
روش غربالگری	PTT	PTT	DS	SSCP/HA	SSCP/HA	SSCP/HA
سابقه خانوادگی	2BC<40	منفی	منفی	در دسترس نبود	منفی	منفی
سن در هنگام تشخیص(سال)	۲۷+	۴۰	۴۱	در دسترس نبود	۳۸	۳۱

* این پلی مورفیسم شایع در هر دو جمعیت ایرانی و انگلیسی مشاهده شد. +این بیمار یک جهش پلی موفیسم در اگزون ۲۰ ژن BRCA1 داشت

BC: سرطان پستان ، DC: سکانس مستقیم. PTT:Protein Truncation Test

HA: Heteroduplex Analysis SSCP: Single Strand Conformational Polymorphism Assay

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:34 +0330 on Saturday November 25th 2017

بحث

این اولین گزارش از جهش‌های ژن‌های BRCA1/ BRCA2 در جمعیت ایرانی می‌باشد. همه بیماران شرکت کننده در این مطالعه، از گروه سنی کمتر از ٤٥ سال انتخاب شده‌اند. یکی از بیماران حامل جهش ژنتیکی، دارای سابقه خانوادگی محدودی در مقایسه با سایر مطالعات انجام شده مشابه بود. نتایج نشان دادکه طیف جهش‌های شناسایی شده در این مطالعه کمی متفاوت از جهش‌های گزارش شده در سایر مطالعات مشابه می باشد. قابل توجه این که همه جهش‌ها فقط یک بار شناسایی شده، اصلاً تکراری نبوده و در سرتاسر ژن‌ها رخ داده‌اند.

در مجموع پنج جهش بیماریزا (frameshift mutations) شناسایی شد (میزان شناسایی ٦/٠٢ درصد). چهار جهش بیماری زا در بین ١٤ بیمار با سابقه خانوادگی از سرطان پستان با میزان شناسایی ٪٢٨/٦ (bionomial CI٪٩٥ =٠/٠٩-٠/٥٨) در حالی که یک جهش بیماریزا در بین ٦٩ بیمار بدون سابقه خانوادگی با میزان شناسایی ٪١/٥ (bionomial CI٪٩٥=٠-٠/٠٩).

در بسیاری از مطالعات آینده‌نگر بدون توجه به وجود یا عدم وجود سابقه خانوادگی از سرطان پستان، شناسایی جهش‌های ژنتیکی بیماریزا ممکن است با شکست مواجه شود (٣٣)، این امر می‌تواند ناشی از موارد اسپورادیک سرطان پستان باشد. به هر حال این موضوع واضح است که ژن‌های اصلی شناخته شده نمی‌توانند توضیحی برای تفاوت‌های موجود در میزان خطر ابتلا به سرطان پستان در جوامع مختلف ارائه نمایند.

مشکلات موجود در شناسایی ژن‌های جدید توسط linkage study نشان می‌دهد که ژن‌های باقیمانده ممکن است متعدد باشند.

شناسایی این ژن‌ها نحوه واقعی خطر ابتلا به مکانیسم‌های مربوطه آنها را آشکار خواهد شد (٣٤).

میزان شناسایی جهش‌ها: در این مطالعه (در خانواده‌های با سابقه سرطان پستان) بالا بود، خصوصاً موقعی که با سایر مطالعاتی که انجام غربالگری نیازمند سابقه خانوادگی از وجود سرطان پستان می‌باشد، مقایسه شود. این امر نشان می‌دهد که انتخاب افراد در این مطالعه، حتی در شرایط غیرکامل بودن آنالیز ژن‌ها، بدرستی انجام شده است. میزان کم شناسایی جهش‌ها در افرادی که ظاهراً مبتلا به سرطان پستان زودرس اسپورادیک شده‌اند نشان می‌دهد که سرطان پستان زودرس به تنهایی برای انجام برنامه‌های غربالگری در جمعیت ایرانی کافی نیست. اگر یافته‌های این مطالعه در ابعاد بزرگتر انجام و تایید شود، آنگاه روش‌های تشخیصی مولکولار جایگاه مهمی را در برنامه‌های غربالگری در ایران خواهند داشت. یافته‌های این مطالعه (جهش‌های ژنتیکی) تحت شماره‌های زیر در ژن بانک جهانی به نام ایران ثبت شد.

AF274503,AF284812,AF288936,
AF288937, AF288938,AF309413,
AF317283,AF348515,
AY008850,AY008851

تشکر و قدردانی

ما از بیماران و خانواده‌های محترم آنان که دراین مطالعه شرکت نموده‌اند صمیمانه تشکر می‌کنیم. همچنین از خانم دکتر زهرا صدیق، خانم ها مریم انصاری و زهرا مقدم به جهت همکاری و جمع آوری اطلاعات در این مطالعه نیز تشکر می کنیم. این مطالعه با کمک مالی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی ایران انجام شد.

REFERENCES

1. Marcus JN, Watson P, Page DL, Narod SA, Lenoir GM, Tonin P, et al. Hereditary breast cancer: pathobiology, prognosis, and BRCA1 and BRCA2 gene linkage. Cancer 1996; 77(4): 697-709.
2. Easton D. Breast cancer genes; What are the real risks? Nat Genet 1997; 16: 210-11.
3. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. Cancer J Clin 1997; 47: 5-27.
4. GLOBACAN 2000. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC cancer base. No. 5. Lyon: IARC Press: 2001.
5. Mosavi-Jarrahi A, Mohagheghi MA, Zeraatti H, Mortazavi H. Cancer registration in Iran. Asia Pacific Journal of Cancer Prevention 2001; 2: 25-29.
6. UK National Statistics web site at: http://www.statistics.gov.uk/
7. Newman B, Austin MA, Lee M, King MC. Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. Proc Natl Acad Sci 1988; 85(9): 3044-8.

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:34 +0330 on Saturday November 25th 2017

8. Tabar L, Duffy SW, Vitak B, Chen HH, Prevost TC. The natural history of breast carcinoma: what have we learned from screening? Cancer 1999; 86(3): 449-62.

9. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science 1990; 250(4988): 1684-9.

10. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 1994; 266(5182): 66-71.

11. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. Science. 1994; 265(5181): 2088-90.

12. Langston AA, Malone KE, Thompson JD, Daling JR, Ostrander EA. BRCA1 mutations in a population-based sample of young women with breast cancer. N Engl J Med 1996; 334(3): 137-42.

13. Struewing JP, Abeliovich D, Peretz T, Avishai N, Kaback MM, Collins FS, et al. The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. Nat Genet 1995; 11(2): 198-200.

14. Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, Neuhausen S, Jonasson JG, Tavtigian SV, et al. A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. Nat Genet 1996; 13(1): 117-9.

15. FitzGerald MG, MacDonald DJ, Krainer M, Hoover I, O'Neil E, Unsal H, et al. Germ-line BRCA1 mutations in Jewish and non-Jewish women with early-onset breast cancer. N Engl J Med 1996; 334(3): 143-9.

16. Breast Cancer Information Core (BIC). http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic

17. Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet 1993; 52(4): 678-701.

18. Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, et al. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. Science 1994; 266(5182): 120-2.

19. Merajver SD, Pham TM, Caduff RF, Chen M, Poy EL, Cooney KA, et al. Somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic ovarian tumours. Nat Genet 1995; 9(4): 439-43.

20. Weber BH, Brohm M, Stec I, Backe J, Caffier H. A somatic truncating mutation in BRCA2 in a sporadic breast tumor. Am J Hum Genet 1996; 59(4): 962-4.

21. Roest PA, Roberts RG, Sugino S, van Ommen GJ, den Dunnen JT. Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. Hum Mol Genet 1993; 2(10): 1719-21.

22. van der Luijt R, Khan PM, Vasen H, van Leeuwen C, Tops C, Roest P, et al. Rapid detection of translation-terminating mutations at the adenomatous polyposis coli (APC) gene by direct protein truncation test. Genomics 1994; 20(1): 1-4.

23. Hogervorst FB, Cornelis RS, Bout M, van Vliet M, Oosterwijk JC, Olmer R, et al. Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. Nat Genet 1995; 10(2): 208-12.

24. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 1989; 5(4): 874-9.

25. Gayther SA, Harrington P, Russell P, Kharkevich G, Garkavtseva RF, Ponder BA. Rapid detection of regionally clustered germ-line BRCA1 mutations by multiplex heteroduplex analysis. UKCCCR Familial Ovarian Cancer Study Group. Am J Hum Genet 1996; 58(3): 451-6.

26. Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, et al. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. Nat Genet 1996; 14(4): 430-40.

27. Zhang X, Morera S, Bates PA, Whitehead PC, Coffer AI, Hainbucher K, et al. Structure of an XRCC1 BRCT domain: a new protein-protein interaction module. EMBO J 1998; 17(21): 6404-11.

28. Shattuck-Eidens D, McClure M, Simard J, Labrie F, Narod S, Couch F, et al. A collaborative survey of 80 mutations in the BRCA1 breast and ovarian cancer susceptibility gene. Implications for presymptomatic testing and screening. JAMA 1995; 273(7): 535-41.

29. Gayther SA, Warren W, Mazoyer S, Russell PA, Harrington PA, Chiano M, et al. Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation. Nat Genet 1995; 11(4): 428-33.

30. Serova O, Montagna M, Torchard D, Narod SA, Tonin P, Sylla B, et al. A high incidence of BRCA1 mutations in 20 breast-ovarian cancer families. Am J Hum Genet 1996; 58(1): 42-51.

31. Peelen T, van Vliet M, Petrij-Bosch A, Mieremet R, Szabo C, van den Ouweland AM, et al. A high proportion of novel mutations in BRCA1 with strong founder effects among Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families. Am J Hum Genet 1997; 60(5): 1041-9.

32. Schubert EL, Lee MK, Mefford HC, Argonza RH, Morrow JE, Hull J, et al. BRCA2 in American families with four or more cases of breast or ovarian cancer: recurrent and novel mutations, variable expression, penetrance, and the possibility of families whose cancer is not attributable to BRCA1 or BRCA2. Am J Hum Genet 1997; 60(5): 1031-40.

33. Ghaderi A, Talei A, Farjadian S, Mosalaei A, Doroudchi M, Kimura H. Germline BRCA1 mutations in Iranian women with breast cancer. Cancer Lett 2001; 165(1): 87-94.

34. Easton D. Breast cancer--not just whether but when? Nat Genet 2000; 26(4): 390-1.

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:34 +0330 on Saturday November 25th 2017