

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

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

دکتر وحید رضا یاسایی<sup>۱</sup>، دکتر Ann Dalton<sup>۲</sup>، دکتر David P. Hornby<sup>۲</sup>

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 و یا سرطان تخمدان در جمعیت ایرانی شناسایی نشده است.

**مواد و روش‌ها:** با همکاری دو مرکز اصلی رفراال سرطان در تهران اطلاعات بالینی، سابقه خانوادگی و خون محیطی از ۸۳ بیمار با سن کمتر از ۴۵ سال مبتلا به سرطان زودرس پستان برای بررسی مولکولی جهش ژنتیکی در ژن BRCA1/BRCA2 جمع‌آوری 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، ۴ 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 شده است) 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 ۴۵ 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

استثناء سرطان پوست، سه نوع از شایع‌ترین سرطان‌ها در زنان ایرانی به ترتیب شیوع عبارتند از سرطان مری، سرطان پستان و سرطان سرویکس (۴). 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، ۶). عبارت سرطان پستان ارثی زمانی اطلاق می‌شود که فرد سابقه خانوادگی از سرطان پستان و یا تخمدان

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). علی‌رغم 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

از جهش ژنتیکی در ژن BRCA1 در نوع اسپورادیک 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 ۱۳۷۶-۱۳۷۹ مورد مطالعه قرار گرفت و ۳۹ بیمار برای آنالیز مولکولی ژن‌های BRCA انتخاب شدند. همچنین از آذرماه ۱۳۷۸ بمدت یکسال تعداد ۴۴ بیمار ایرانی مبتلا به سرطان پستان مراجعه کننده به انستیتو سرطان نیز برای این مطالعه انتخاب شدند. سن کمتر از ۴۵ 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 فرم‌های رضایت نامه مربوطه را امضا نمودند.

نحوه تخلیص DNA و روش‌های تشخیصی جهش‌های ژنتیکی

با استفاده از کیت تخلیص DNA (PromegaCat. No.LAI620) و براساس پروتکل مربوطه آن، ژنومیک DNA از لئوسیت‌های 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 ۲، ۳، ۵، ۱۳، ۲۰ و ۲ ژن BRCA1 و اگزون‌های ۱۷، ۱۸، ۲۳ و ۹ با روش‌های SSCP/HA (۲۵، ۲۴) 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.

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).

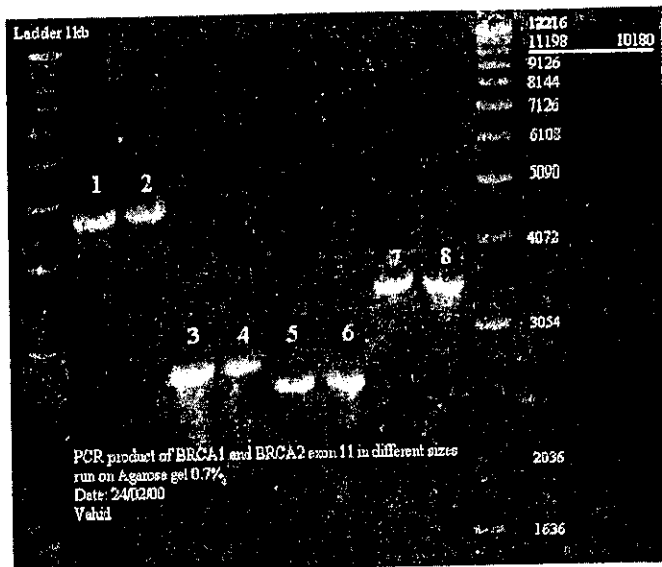
در سال ۱۹۹۰ محل اولین ژن مستعد کننده سرطان پستان BRCA1 با روش Linkage Analysis بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۷ شناسایی شد (۹). در سال ۱۹۹۴ ژن Miki BRCA1 را کشف کرد (۱۰). به دنبال آن در سال ۱۹۹۵ دومین ژن مستعد کننده سرطان پستان BRCA2 نیز کشف شد (۱۱). هر دو ژن BRCA1 و BRCA2 ژن‌های بزرگی هستند و به ترتیب از ۲۴ 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 (۱۴-۱۲). 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 می‌باشند (۱۲، ۱۵). تاکنون هیچ مطالعه مولکولی بر روی جهش‌های ژنتیکی سلول‌های 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 (۱۶). همچنین بیشتر از ۹۰۰ تغییر ژنتیکی مجزا در ژن BRCA1 شناسایی شده است (۱۶). جهش ژنتیکی به هیچ نقطه خاصی در ژن‌های فوق‌الذکر محدود نمی‌شود. بیشتر این جهش‌ها در هر دو ژن فقط یک بار گزارش شده است (۱۶).

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 می‌باشد (۹، ۱۷). تاکنون گزارشی

میلی مولار و  $10 \text{ MgSO}_4$  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 ۱۶ ساعت با قدرت ۴۵ وات حرکت داده شد. ستون شماره ۱ و ۲ نشاندهنده محصول PCR از تمام طول اگزون شماره ۱۱ ژن BRCA2 به سایز ۴۹۵۹ bp می باشد. ستون شماره ۳ و ۴ نشاندهنده محصول PCR از بخش اول اگزون شماره ۱۱ ژن BRCA2 به سایز ۲۸۳۴ bp می باشد. ستون شماره ۵ و ۶ نشاندهنده محصول PCR از بخش دوم اگزون شماره ۱۱ ژن BRCA2 به سایز ۲۶۵۷ bp می باشد. ستون شماره ۷ و ۸ نشاندهنده محصول PCR از تمام طول اگزون شماره ۱۱ ژن BRCA1 به سایز ۳۴۴۶ bp می باشد.

جدول ۱- برنامه PCR در روش PTT

مرحله	درجه حرارت (°C)	زمان	سیکل
دنانوره اولیه	۹۴	۱ دقیقه	۱
دنانوره	۹۴	۲۵ ثانیه	
Annealing	۵۶	۱ دقیقه	۳۱
Extension	۶۸	۴ دقیقه	
Extension نهایی	۶۸	۱۰ دقیقه	۱

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

۱- قبلاً نشان داده شده است که اگزونهای ۵، ۲۰، 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 می شوند.

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

۴- این نقاط در مطالعات متعدد قبلی مورد بررسی مولکولی قرار گرفته اند (۲۸-۳۲).

مقایسه مطالعات قبلی مشابه نشان داده است که انتخاب این استراتژی (آنالیز مولکولی قسمت های خاص از ژن های فوق الذکر) ممکن است منجر به عدم شناسایی جهش های ژنتیکی در سایر قسمت های بررسی نشده ژن های BRCA1/ BRCA2 به ترتیب به میزان ۱۴٪ و ۲۲٪ شود (۲۸-۳۲). از آنجاییکه تاکنون هیچ گونه جهش ژنتیکی اختصاصی در جمعیت ایرانی در ژن های BRCA1/ BRCA2 گزارش نشده است، لذا یافته های این مطالعه می بایست به عنوان اطلاعات پایه ای و اولیه مورد استفاده قرار گیرد.

#### روش Protein Truncation Test (PTT)

بیشتر جهش های ژنتیکی شناسایی شده در ژن های BRCA1/BRCA2 منجر به تولید پروتئین های ناقص می شوند که به آسانی می توانند توسط روش PTT تشخیص داده شوند. روشی حساس و دقیق در تشخیص جهش های ژنتیکی است.

در روش PTT نیاز به طراحی پرایمرهای اختصاصی است که قسمت های T7 promoter و Kozak consensus sequence می باشند. در این مطالعه با طراحی اختصاصی پرایمرها و استفاده از روش PCR طول کامل اگزون ۱۱ ژن BRCA1 شامل ۳۴۴۶ نوکلئوتید و اگزون ۱۱ ژن BRCA2 شامل ۴۹۵۹ نوکلئوتید در یک واکنش PCR تکثیر شد (شکل شماره ۱). همچنین برای جلوگیری از کاهش حساسیت این تست (PTT)، قسمت های انتهایی هر دو ژن به طور مجزا توسط روش SSCP مورد آنالیز قرار گرفت.

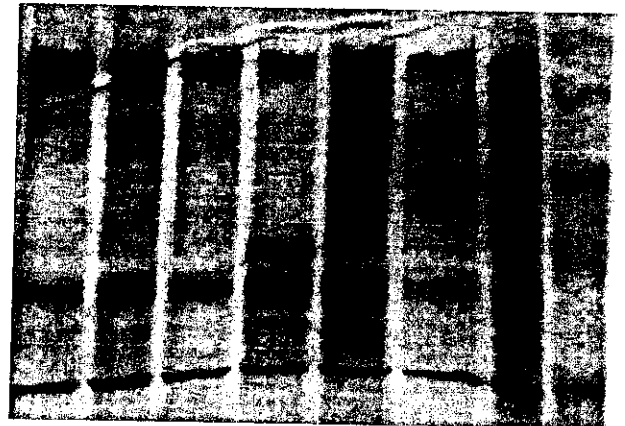
#### برنامه PCR در روش PTT

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  $300 \text{ Tris-SO}_4$  میلی مولار،  $\text{PH}=9.1$ ،  $90 \text{ SO}_4 (\text{NH}_4)_2$  میلی مولار و  $5 \text{ MgSO}_4$  میلی مولار] و ۲/۵ میکرولیتر از PCR بافر B [شامل  $300 \text{ Tris-SO}_4$  میلی مولار،  $\text{PH}=9.1$ ،  $90 \text{ SO}_4 (\text{NH}_4)_2$

جدول ۲- برنامه PCR در روش SSCP

مرحله	درجه حرارت (°C)	زمان	سیکل
دنا توره اولیه	۹۴	۲ دقیقه	۱
دنا توره	۹۴	۳۰ ثانیه	
Annealing	۵۵-۶۰	۶۰ ثانیه	۲۸
Extension	۷۴	۶۰ ثانیه	
Extension نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

BRCA1 و BRCA2 به ترتیب با اندازه‌های ۱۲۶ kDa و ۱۸۲ kDa توسط SDS-PAGE شناسایی شد (شکل شماره ۲).



شکل ۲- بررسی پروتئین اگزون ۱۱ ژن BRCA1 بر روی ژل SDS-PAGE با استفاده از روش PTT

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

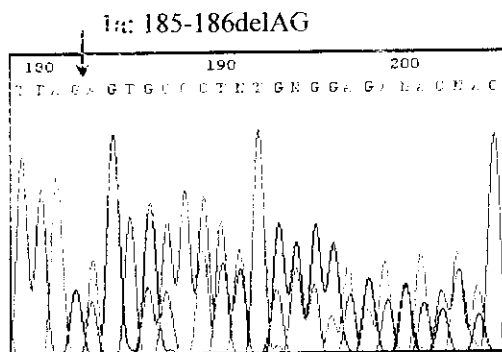
در این تصویر ستون اول از سمت راست مارکر پروتئینی می‌باشد. ستون پنجم از سمت راست پروتئین‌های منقطع شده (truncated proteins) قابل رویت می‌باشد. آلل طبیعی آن در قسمت بالای همه ستون‌های مشهود است. ستون‌های ۲، ۳، ۴، ۷، ۸ و ۹ همگی نشان‌دهنده پروتئین‌های طبیعی می‌باشند.

روش Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

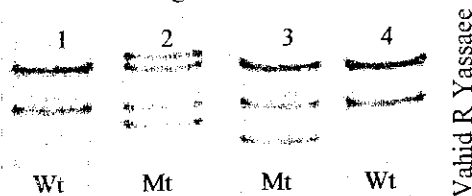
اگزون‌های ۲۰، ۱۳، ۵، ۳ و ۲ ژن BRCA1 و اگزون‌های ۲۳، ۱۸، ۱۷ و ۹ ژن BRCA2 و قسمت‌های انتهایی اگزون ۱۱ هر دو ژن BRCA با این روش مورد آنالیز قرار گرفت.

برنامه PCR در روش SSCP

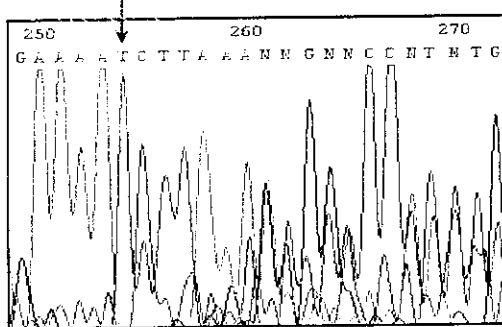
برنامه PCR برای تولید ماده مورد نیاز SSCP به شرح زیر انجام شد. مخلوطی از ۵۰ نانوگرم DNA ژنومیک، یک میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۵ پیکومول در میکرولیتر، ۱/۶ میکرولیتر از مخلوط dNTPs با غلظت ۲/۵ میلی مولار از هر dNTP، ۲ میکرولیتر از بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر، ۰/۷ واحد از آنزیم Red Hot Taq DNA polymerase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



1b: PAGE image



1c: 181-182ins T



شکل ۳- آنالیز Single Strand Conformational Polymorphism

در قسمت (1b) ستون‌های ۱ و ۴ نحوه حرکت طبیعی و ستون‌های ۲ و ۳ نحوه حرکت غیر طبیعی مولکول تک رشته‌ای DNA را بر روی ژل پلی آکریل آمید نشان می‌دهند. جهش نوع frameshift در ستون ۲ توسط روش توالی یابی DNA (1a) تایید شد و نشان داد که نوکلئیدهای AG در اگزون ۲ ژن BRCA1 در جایگاه ۱۸۶-۱۸۵ حذف (deletion) شده‌اند. این جهش منجر به تولید کدون متوقف کننده در سنتر پروتئین در کدون شماره ۳۹ می‌شود. جهش نوع frameshift در ستون ۳ نیز توسط روش توالی یابی DNA (1c) تایید شد و نشان داد که نوکلئید T در اگزون ۲ ژن BRCA1 بین نوکلئیدهای ۱۸۱-۱۸۲ اضافه (insertion) شده است. این جهش منجر به تولید کدون متوقف کننده در سنتر پروتئین در کدون شماره ۴۰ می‌شود.

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 هزینه‌های 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 می‌شود، سه جهش از نوع missense با اثرات ناشناخته و دو جهش polymorphism شناسایی شد (جدول ۳ و ۴).

یک نوع پلی مورفیسم (IVS16-14T>C) در ژن BRCA2 در جمعیت‌های 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.

جدول ۳ و ۴ به ترتیب مشخصات و نوع جهش‌های ژنتیکی شناسایی شده در ژن‌های BRCA1 و BRCA2 را نشان می‌دهد.

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 - پلی آکریل آمید (۵۷:۱) و با استفاده از غلظت‌های متفاوتی از گلیسرول (۱۰-۳ درصد) و در درجه حرارت‌های متفاوت (۱۲-۱۶ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲۰-۱۶ ساعت با ولتاژ ۲۴۵ در تانک الکتروفورزیز 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 توالی‌یابی مستقیم DNA

مشخصات همه جهش‌های ژنتیکی شناسایی شده توسط روش‌های PTT و SSCP با روش دقیق توالی‌یابی مستقیم DNA (Direct Sequencing) و بسا 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.

جدول ۳- مشخصات جهش‌های ژنتیکی سلول‌های زایا در ژن BRCA1

اگزون	۲	۲	۱۱	۲۰
موتاسیون و تغییر نوکلئوتیدی	185-186delAG	181-182insT	2335-2336delAA	12bpdup gtattccactec IVS20+48
Stop codon در این آمینواسید	39TGA	40TGA	741TAA	-
تأثیر Coding	Frameshift	frameshift	frameshift	پلی مورفیسم
روش غربالگری	SSCP/HA	SSCP/HA	PTT	SSCP/HA
سابقه خانوادگی	2BC-IPS	I-OV	2BC<40	2BC<42
سن در هنگام تشخیص (سال)	۳۷	۴۱	۴۲	*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 ۴- مشخصات جهش‌های ژنتیکی سلول‌های زایا در ژن BRCA2

اگزون	۱۱	۱۱	۱۱*	۱۸	۲۳
موتاسیون و تغییر نوکلئوتیدی	6261-6262insGT	3979-3980insA	5972C>T T1915M	8345A>G N2706S	9266C>T T3013I
Stop codon در این آمینواسید	2040TAA	1264TAA	-	-	-
تأثیر Coding	frameshift	frameshift	missense	missense	Missense
روش غربالگری	PTT	PTT	DS	SSCP/HA	SSCP/HA
سابقه خانوادگی	2BC<40	منفی	منفی	منفی	منفی
سن در هنگام تشخیص (سال)	۲۷*	۴۰	۴۱	۳۸	۳۱

\* این پلی مورفیسم شایع در هر دو جمعیت ایرانی و انگلیسی مشاهده شد. +این بیمار یک جهش پلی مورفیسم 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

## بحث

شناسایی این ژن‌ها نحوه واقعی خطر ابتلا به مکانیسم‌های مربوطه آنها را آشکار خواهد شد (۳۴).

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 در این مطالعه شرکت نموده‌اند صمیمانه تشکر می‌کنیم. همچنین از خانم دکتر زهرا صدیق، خانم‌ها مریم انصاری و زهرا مقدم به جهت همکاری و جمع‌آوری اطلاعات در این مطالعه نیز تشکر می‌کنیم. این مطالعه با کمک مالی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی ایران انجام شد.

این اولین گزارش از جهش‌های ژن‌های BRCA1/ BRCA2 در جمعیت ایرانی می‌باشد. همه بیماران شرکت کننده در این مطالعه، از گروه سنی کمتر از ۴۵ سال انتخاب شده‌اند. یکی از بیماران حامل جهش ژنتیکی، دارای سابقه خانوادگی محدودی در مقایسه با سایر مطالعات انجام شده مشابه بود. نتایج نشان داد که طیف جهش‌های شناسایی شده در این مطالعه کمی متفاوت از جهش‌های گزارش شده در سایر مطالعات مشابه می‌باشد. 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 ۷۰۲ درصد). چهار جهش بیماریزا در بین ۱۴ بیمار با سابقه خانوادگی از سرطان پستان با میزان شناسایی ۲۸/۶٪ (binomial CI/۹۵ = ۰/۰۹-۰/۵۸) در حالی که یک جهش بیماریزا در بین ۶۹ بیمار بدون سابقه خانوادگی با میزان شناسایی ۱/۵٪ (binomial CI/۹۵ = ۰-۰/۰۹) 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 (۳۳)، 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.

## REFERENCES

- 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.
- Easton D. Breast cancer genes; What are the real risks? *Nat Genet* 1997; 16: 210-11.
- Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. *Cancer J Clin* 1997; 47: 5-27.
- GLOBACAN 2000. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC cancer base. No. 5. Lyon: IARC Press: 2001.
- Mosavi-Jarrahi A, Mohagheghi MA, Zeraatti H, Mortazavi H. Cancer registration in Iran. *Asia Pacific Journal of Cancer Prevention* 2001; 2: 25-29.
- UK National Statistics web site at: <http://www.statistics.gov.uk/>
- 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.

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. Struwing 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](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, Coffey AI, Hainbuecher 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.