Archive of SID

مقاله پژوهشی

فصلنامهٔ بیماری‌های پستان ایران، سال دوم، شماره دوم، تابستان ۱۳۸۸

شناسایی جهش‌های BRCA1 و BRCA2 در تعدادی از بیماران ایرانی با ظهور زودهنگام سرطان پستان و یا سابقهٔ خانوادگی ابتلا به این بیماری

فاطمهٔ کشاورزی: دانشجوی دکترای ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
غلامرضا جوادی: دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
ناهید نفیسی: استادیار جراحی عمومی، مرکز تحقیقات سرطان پستان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
کیوان مجیدزاده: عضو هیئت علمی، مرکز تحقیقات سرطان پستان جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران
وحید رضا یاسایی: استادیار ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات ژنومیک دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
حمیدهٔ باقریان: مشاور ژنتیک، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی
محمدرضا مشایخی: عضو هیئت علمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات آذربایجان شرقی
***سیروس زینلی:** دانشیار انستیتو پاستور ایران

چکیده

مقدمه : جهش‌های ژن BRCA1 (Breast Cancer susceptibility Gene1) تقریباً در ۵۰ درصد خانواده‌های با ظهور زودهنگام سرطان پستان و ۸۰ درصد خانواده‌های با ظهور زودهنگام سرطان پستان - تخمدان و جهش‌های ژن BRCA2 (Breast Cancer susceptibility Gene2) نیز در درصدی از موارد سرطان پستان ارثی وجود دارند. لذا از آنجا که جهش‌های این دو ژن بر مدیریت بالینی افراد درمعرض خطر اثر دارد، غربالگری آنها رو به افزایش است. بر این اساس هدف از این تحقیق شناسایی جهش‌های BRCA1 و BRCA2 در تعدادی از بیماران ایرانی با ظهور زودهنگام سرطان پستان و یا سابقهٔ خانوادگی ابتلا به این بیماری می‌باشد.

روش بررسی: شصت و سه بیمار با سن زیر ۴۰ سال یا سابقهٔ سرطان پستان در خانواده به همراه ۵۰ نفردیگر به‌عنوان گروه کنترل در مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر از بهمن ۱۳۸۷تا اسفند ۱۳۸۸ مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از خون‌گیری و استخراج DNA کل سکانس ژن‌های BRCA1 و BRCA2 این افراد توالی‌یابی مستقیم گردید.

یافته‌ها: تعدادی جهش بدمعنی شناسایی شد. در اینجا جهش‌های جدید گزارش می‌گردد:
Gly1140Ser, Ileu15Ieu, Ileu26Ieu, Glu23Gln, Leu3stop codon, Pro9Arg, Leu6Val, Arg7Cys, Ser177Val, IVS7+83(TT), IVS8 -70(CATT), IVS2+9(GC), IVS1-20(GA), IVS1-8(AG), IVS2+24(AG) in BRCA1 and Glu1391Gly in BRCA2).

جهش‌های Glu1038Pro و Gly1140Ser در تعداد زیادی از بیماران و کمتر از ۲۰ درصد افراد کنترل مشاهده شد. جهش‌های CD26SmallINSGTCCC^ATCTG Gly1738Glu, Leu3Stop codon, Ile21Val, IVS2-1 (GC) E212catctgGTAAGTCAGC, در ژن BRCA1 و Leu1522Phe در ژن BRCA2 بیماری‌زا می‌باشند. مقایسهٔ کنترل‌ها و بیماران نشان می‌دهد که احتمالاً تعدادی از هاپلوتیپ‌ها اثر بیماری‌زایی دارند. هاپلوتیپ ایجادشده از آلل‌های Leu871Pro, Gly1140Ser GLu1038Gly, Ser1613Gly, در ژن BRCA1 در حداقل ۱۰ خانوادهٔ بیمار مشاهده شد. مطالعات بیشتری جهت تعمیم این نظریه که پلی‌مورفیسم ژنتیکی همراه با بروز سرطان پستان است، مورد نیاز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: : سرطان پستان، ژن مستعدکنندهٔ ابتلا به سرطان پستان ۱، ژن مستعدکنندهٔ ابتلا به سرطان پستان ۲، چندریختی ژنتیکی، سرطان خانوادگی.

*نشانی نویسندهٔ پاسخگو: تهران، خیابان ولی‌عصر (عج)، کوچهٔ مجلسی، پلاک۴۱، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، سیروس زینلی
تلفن: ۰۹۱۲۱۳۷۲۰۴۰ نشانی الکترونیک: siruszeinali@yahoo.com /zeinali@kawsar.ir

Archive of SID

مقدمه

سرطان پستان اولین علت مرگ ناشی از سرطان در میان زنان سراسر جهان می‌باشد[۱]. مرگ‌ومیرهای ناشی از این سرطان ۲۳ درصد کل مرگ‌های ناشی از سرطان را باعث می‌شود. در ایران نیز طی مطالعات انجام شده، این سرطان به‌عنوان شایع‌ترین سرطان در میان زنان شناسایی شده است[۲]. فاکتورهای ژنتیکی دارای نقش مهمی در بروز این سرطان هستند و مطالعات نشان می‌دهد که خطر سرطان به‌میزان زیادی در خویشاوندان درجهٔ یک فرد شاخص (Proband) افزایش می‌یابد [۸- ۳]. پانزده درصد از کل موارد سرطان پستان وابسته به استعداد ژنتیکی قوی به این بیماری است که به‌صورت الگوی وراثتی بارز به ارث می‌رسد [۷و۸]. گزارش‌ها بیانگر آن است که جهش دردو ژن بسیار پرنفوذ BRCA1 (Breast Cancer susceptibility Gene1) و BRCA2 (Breast Cancer susceptibility Gene 2) علت ۲۰ تا ۳۰ درصد سرطان‌های پستان وراثتی است [۸]. این میزان معادل خطری در حدود ۶۰ تا ۸۵ درصد موارد ابتلا به سرطان پستان در افراد حامل جهش این دو ژن در طول زندگی می‌باشد[۸]. جهش‌های ژن BRCA1 تقریباً در ۵۰ درصد خانواده‌های با ظهور زودهنگام سرطان پستان و ۸۰ درصد خانواده‌های با ظهور زودهنگام سرطان پستان - تخمدان و جهش‌های ژن BRCA2 نیز در درصدی از موارد سرطان پستان ارثی وجود دارند [۹- ۷].

ژن BRCA1 برروی باند ۲۱ بازوی بلند کروموزوم ۱۷ (17q21) قرار دارد. این ژن ۲۴ اگزون دارد و پروتئینی با همین نام به‌طول ۱۸۶۳ آمینو اسید را کد می‌کند[۱۰]. ژن BRCA2 نیز ۲۷ اگزون دارد و پروتئینی ۳۴۱۸ آمینواسیدی را کد می‌کند. مکان ژن BRCA2 برروی باند ۱۲ بازوی بلند کروموزوم ۱۳(13q12) می‌باشد[۱۰].

ژن‌هایBRCA1 و BRCA2 نقش مهمی در ترمیم DNA به‌روش نوترکیبی هومولوگوس، حفظ پایداری کروموزوم، فعال‌سازی نقاط کنترل DNA آسیب‌دیده و تنظیم چرخهٔ سلولی دارند[۱۰-۸]. باوجود آنکه بیش از ۱۶۰۰ واریانت از ژن BRCA1 و ۱۸۰۰ عدد از ژن BRCA2 شناسایی شده است [۱۱و۱۲]، نقش بیماری‌زایی این واریانت‌ها در تعدادی از آن‌ها که حالت چندریختی(Polymorphism) دارند و جزء واریانت‌های طبقه‌بندی‌نشده می‌باشند، شرح داده نشده است [۱۳و۱۴]. تعدادی از این جهش‌ها در نژادهای خاصی ظاهر می‌گردند، لذا به‌عنوان جهش‌های اثر مؤسس (Founder effect) تلقی می‌گردند[۱۵]. آثار محیطی، جغرافیایی و سایر فاکتورها برروی شیوع و نوع واریانت جهش‌های BRCA1 و BRCA2 در میان جوامع متفاوت اثر دارند[۱۵و۱۶]. محیط مشترک و واریانت‌های ژنتیکی کم نفوذ، استعداد ابتلا به سرطان پستان را در میان جوامع انسانی تغییر می‌دهند[۱۷]. شیوع جهش‌های BRCA1 و BRCA2 در کشورهای توسعه‌یافته بین ۱/۸ تا ۱۳/۱ درصد متغیر است [۱۸]. این شیوع در میان کشورهای آسیایی در فاصلهٔ ۰/۸ تا ۸/۶ درصد است [۲۴-۱۹].

با توجه به آنچه بیان شد بایستی نوترتیبی ژن‌های BRCA1 و BRCA2 در افراد شاخص جوان (proband) و یا افرادی با سابقهٔ خانوادگی ابتلا به سرطان پستان بررسی شود. امروزه در سراسر دنیا آزمایش‌های ژنتیکی به‌طور رایج برای تعیین حاملان جهش‌های ژنتیکی در خانواده‌هایی که سابقهٔ قوی استعداد به سرطان پستان دارند، انجام می‌گیرد. نتایج این آزمایش‌ها راهنمای بسیار مفیدی برای افراد در معرض خطر است و به آن‌ها این امکان را می‌دهد که بتوانند از بروز سرطان جلوگیری کنند و یا اینکه آن را زودتر تشخیص دهند. در مطالعهٔ حاضر که بخشی از یک تحقیق در ارتباط با کل جمعیت ایران است، تعدادی بیمار مبتلا به سرطان پستان با سن زیر ۴۰ سال یا سابقهٔ خانوادگی ابتلا به بیماری برای وجود جهش‌های BRCA1 و BRCA2 در ساختار ژنوم آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند و نوع تغییرات ژنتیکی این دو ژن در میان این افراد توصیف شده است. هدف از این تحقیق اولاً تأکید بر روی نتایج تحقیقات قبلی در دنیا و پیروی از این تفکر است که غربالگری جهش‌های BRCA1 و BRCA2 ممکن است یک اثر قوی بر روی مراقبت سلامت در یک جمعیت در معرض خطر داشته باشد ثانیاً شناسایی جهش‌های شایع (اشکال پلی‌مورفیسم و بیماری زا) این ژن‌ها در جمعیت ایران جهت استفادهٔ سریع‌تر و کم‌هزینه‌تر برای خانواده‌های سرطانی و افراد ناقل جهش‌ها می‌باشد.

Archive of SID

روش بررسی

این بررسی به‌صورت یک مطالعهٔ توصیفی (Descriptive) در مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر از بهمن ۱۳۸۷تا اسفند ۱۳۸۸ انجام شد.

انتخاب خانواده ها:

خانواده‌ها و بیماران از میان افراد مراجعه‌کننده به کلینیک مشاورهٔ ژنتیک پزشکی مرکز تحقیقات ژنومیکس کوثر و مرکز تحقیقات سرطان پستان جهاد دانشگاهی (بانک نمونه‌های بیولوژیک) در تهران بر اساس ویژگی‌های فرد شاخص (تومور اولیهٔ شخص، سن تشخیص سرطان پستان و یا تخمدان در این افراد و مذکر بودن فرد) و سابقهٔ خانوادگی سرطان پستان یعنی سابقهٔ ابتلا به سرطان پستان و یا تخمدان درخانوادهٔ فرد، تعداد افراد مبتلا و نسبت آن‌ها انتخاب شدند. پس از مشاورهٔ ژنتیکی براساس یک پروتکل استاندارد و جهانی (Boadicea model) و به‌دست آوردن اطلاعات لازم، خانواده‌هایی که حداقل یکی از ویژگی‌های زیر را داشتند، مورد بررسی قرار گرفتند:

الف)داشتن حداقل ۳ خویشاوند درجهٔ ۱و۲ مبتلا با هر سن تشخیصی ب) داشتن یک فرد در خانواده با سرطان پستان دوطرفه و یا سرطان پستان و تخمدان و یا سرطان تخمدان دوطرفه با این شرط که سن تشخیص یکی از سرطان‌ها زودتر از ۵۰ سالگی باشد ج– داشتن یک فرد مذکر مبتلا در خانواده د- داشتن یک فرد با نسبت خویشاوندی درجهٔ یک با فرد شاخص که سن تشخیص سرطان در او زیر ۳۵ سال بوده باشد. افراد کنترل از میان خانم‌های با سن بالاتر از ۷۰ سال که تا این سن هیچ‌گونه سابقهٔ ابتلا به سرطان پستان و یا تخمدان در آن‌ها و یا خویشاوندان درجهٔ ۱و۲ آن‌ها نبود، انتخاب شدند [۲۵].

برای بیماران و افراد کنترل پس از مشاورهٔ ژنتیکی، اهمیت تحقیق شرح داده‌شد و پس از جلب موافقت وگرفتن رضایت‌نامه از آن‌ها در تحقیق شرکت داده شدند. ۶۳ بیمار با سن زیر ۴۰ سال یا سابقهٔ سرطان پستان در خانواده که همگی عضو خانواده‌های مختلف بودند و به گروه و نژاد خاصی تعلق نداشتند و از نقاط مختلف کشور بودند، به‌همراه ۵۰ زن به‌عنوان گروه کنترل، افراد مورد بررسی را تشکیل دادند. گروه کنترل شامل خانم‌های با سن بالاتر از ۷۰ سال بود که سابقهٔ ابتلا به سرطان پستان و تخمدان در خود فرد و همچنین خویشاوندان درجهٔ ۱ و ۲ آن‌ها مشاهده نشده بود. گزینش افراد کنترل به‌گونه‌ای بود که از نظر جنس، تغدیه و عوامل مؤثر با بیماران هماهنگ بودند. انتخاب گروه کنترل جهت تمایز اشکال بیماری‌زا و پلی‌مورفیسم جهش‌های شناسایی‌شده صورت گرفت. انتخاب این سن برای افراد کنترل بدین علت است که اگر یک جهش بیماری‌زا باشد تا این سن در تعدادی از افراد حامل، اثر خود را نشان می‌دهد. اگر جهشی در ۵۰ نفر بالای ۷۰ سال وجود نداشت یا در صورت وجود، اثر بیماری‌زایی نداشت پس مشخص می‌شود که یک پلی‌مورفیسم بدون اثر بیماری‌زایی در جمعیت است.

اطلاعات مربوط به هر بیمار و خانواده‌های آن‌ها وارد نرم‌افزار Excel (Microsoft, Redmond, USA) گردید و توسط همین نرم افزار تجزیه‌وتحلیل آماری صورت گرفت.

۲- طراحی پرایمر:

برای۲۴ اگزون BRCA1 و ۲۷ اگزون BRCA2 به جز اگزون ۱ و ۴ ژن BRCA1 و اگزون ۱ ژن BRCA2 و مرزهای اینترون- اگزون با استفاده از برنامهٔ Gene runner پرایمر طراحی شد. فهرست پرایمرها در جدول ۱و۲ آمده است. اگزون ۱ ژن BRCA1 و ژن BRCA2 در بالادست مکان آغاز ترجمه قرار دارند و نیز نظربه‌اینکه اگزون ۴ ژن BRCA1 در رونوشت‌های سالمBRCA1 وجود ندارد، بنابراین پرایمر آن‌ها طراحی نشد.

۳- استخراج DNA(DNA Extraction):

DNA ژنومیک از نمونه‌های خون محیطی افراد با استفاده از کیت پرومگا Promega , catalogue no. LA1620, (USA) براساس دستورالعمل کارخانهٔ سازنده استخراج گردید.

۴- تکثیر و خالص‌سازی DNA (PCR amplification and DNA purification):

با روش PCR و بااستفاده از پرایمرهای طراحی شده، اگزون‌های مورد نظر از این دو ژن تکثیر شدند. در انتخاب اگزون‌ها برای بررسی با توجه به جهش‌های شایع گزارش‌شده در دنیا و مطالعات انجام‌گرفته که گزارش آن در سایت‌های HGMD (The Human Gene Mutation Database) و BIC (Breast Cancer Information Core) می‌باشد، ابتدا جستجو برای

Archive of SID

شناسایی جهش در مورد هر فرد را با اگزون‌هایی که جهش‌های شایع داشت یا اگزون بسیار بزرگ بود شروع کردیم و در صورت عدم شناسایی جهش‌های بیماریزا و پاتوژنیک، سایر اگزون‌ها بررسی می‌شدند.

هرواکنشPCR شامل ۳۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱۰میکرومولار دزاکسی‌نوکلئوتید تری‌فسفات‌ها (BioRon) (dNTPs)، ۵۰ میکرومولارکلرید منیزیم، ۴۰ پیکو مول از پرایمرهای Reverse و Forward(CinnaGen, Iran)، ۲U Tag پلیمراز(Kawsar, Iran)، ۲میکرولیتر بافر10X(KBC,Iran) و ۲۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر در یک حجم ۲۵ میکرولیتر بود. و برنامهٔ PCR به قرار زیر: ۹۳ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه، ۹۳ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، ۶۲-۵۷ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱دقیقه دمای چسبیدن پرایمرها بسته به نوع پرایمرها، دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه، ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه برای ۳۵ چرخه. محصول PCR با استفاده از: Multi screen FB filter plates (Millipore Corporation Billerica MA) خالص‌شده و با ۷۰ تا ۱۴۰ میکرولیتر آب دوبار استریل رقیق‌شده و حضور محصول PCR در هر واکنش با الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۵ درصد اندازه‌گیری گردید.

جدول ۱: لیست پرایمرهای BRCA1

2F	5’TTTAAAATGATAAAATGAAGTTGTC3’
2R	5’GGCAATGTACGGCTAAATCGAATC CCAAATTAATACACTCTTGTG3’
6F	5’CGGTTTATACAGATGTCAATG3’
6R	5’CGTCATAGAAAGTAATTGTGC3’
7F	TTGGTTTCTTTGATTATAATTC3’
7R	AGATGTTGCCAGAATAAATG3’
8F	5’TTTATTTTGTCCATGGTGTC3’
8R	5’AGCTGCCTACCACAAATAC3’
9F	5’CCACAGTAGATGCTCAGTAAA3’
9R	5’CTATATAACAAACTGCACATACA3’
10F	5’GGTCAGCTTTCTGTAATCG3’
10R	5’GACCATACCACGACATTTG3’
20F	5’TTAAATATGACGTGTCTGCTC3’
20R	5’AAAGAACCTGTGTGAAAAGTATC3’
19F	5’GTTCTTCTGCTGTATGTAACC3’
19R	5’GATTATAGGTATGAGCCACAG3’
18F	5’GTTATAATTAGTGGTGTTTTCAG3’
18R	5’ACTCAGCATCAGCAAAAA3’
17F	5’CTAGTATTCTGAGCTGTGTGC3’
17R	5’ATGGTCTCGATCTCCTAATC3’
16F	5'TTAACAGAGACCAGAACTTTG3'
16R	5'TTGACAATACCTACATAAAACTC3'
15F	5'GTTTCATTATGCTTTGGC3'
15R	5'AACCTTGATTAACACTTGAGC3'
14F	5'TATCACTATCAGAACAAAGCAG3'
14R	5'GTTCAATATAAATAAAGATGTCA3'
12F	5'AAGTTGCAGCGTTTATAGTC3'
12R	5'TGTCAGCAAACCTAAGAATG3'
21F	5'TAGTGTTCTGGACATTGGAC3'
21R	5'GTGGGATCTTGCTTATAATAC3'
22F	5'ATACCCCTACTATTTTAAGACC3'
22R	5'GTCTTTTGGCACAGGTATG3'
23F	5'GTGACAGTTCCAGTAGTCCTAC3'
23R	5'GTGCCAAGAACTGTGCTAC3'
24F	5'CTAAGAACTCATACAACCAGG3'
24R	5'AATATTTAGTAGCCAGGACAG3'
13F	5'GATTAAAAGGTGTTCAGCTAG3'
13R	5'CATAAAATGTTGGAGCTAGG3'
3F	5'TCGATTTAGCCGCTACATTGCCACTCATTTATTTTCTTTTTCTCCC3'
3R	5'ACAGGAGTTTGGGTAGTCGCTACTAATAATGGAGCCACATAACAC3'
5F	5'AGCGACTACXXAAACTCCTGTAGGAAGTAAATTAAATTGTTCTTTC3'
5R	5'AGGTAGGCGGTTTCAGTGAGAGAATTCCAACCTAGCATCATTACC3'
11FA	5'ACCTCCAAGGTGTATGAAGTATG3'
11RA	5'TGGTAGAAGACTTCCTCCTCAG3'
11FB	5'ATGAGCTTTAATATGTAAAAGTG3'
11RB	5'TTTGTTAACTTCAGCTCTGGG3'
11FC	5'AGCCAAGAAGAGTAACAAGCC3'
11RC	5'ATTTGGCATTATCAACTGGC3'
11FD	5'GTCCAAAAGTCACTTTTGAATG3'
11RD	5'CTTCCTTTATTTCACCATCATC3'

Archive of SID

جدول۲- لیست پرایمرهای BRCA2

9F	5' TGTGCATTGAGAGTTTTTATAC 3'
9R	5' TAAACTGAGATCACGGGTG 3'
8F	5' TGTGTCATGTAATCAAATAGTA 3'
8R	5' ATATAGGACCAGGTTTAAGAC 3'
5-7F	5' AGATAAACTAGTTTTTGCCAG 3'
5-7R	5' CAATTATCAACCTCATCTGC 3'
4F	5' CCCTATACATTCTCATTCCC 3'
4R	5' TAGCATAAAATCAGATTCATC 3'
3F	5' GTTCTGGGTCACAAATTTG 3'
3R	5' AAAAAGAGGCCAGAGAGAC 3'
2F	5' TGTGTAAGTGCATTTTGGTC 3'
2R	5' TTTTAGCAAGCATTTTTTAG 3'
12F	5' CTCTTTCAAACATTAGGTCAC 3'
12R	5' TGCTCTTTTAGGTCCTCAG 3'
13F	5' TTGTAAAGCCTATAATTGTCTC 3'
13R	5' AACGTTAGTGTCATTATTTTTAG 3'
14F	5' TGTAGCAAATGAGGGTCTG 3'
14R	5' TAACAACGGAAATATCTAACTG 3'
15F	5' GGTTGTGCTTTTTAAATTTC 3'
15R	5' AGGCTAATTAGAAAATATGATG 3'
16F	5' CAGTTTTGGTTTGTTATAATTG 3'
16R	5' GATTTCTAGCCAACTTTTTAG 3'
17F	5' TTGTAGTTGTTGAATTCAGTATC 3'
17R	5' AGTCACAGACTACACAGAAA 3'
10AF	5' ATAACCCTTTAAATACTGATATG 3'
10AR	5' TCATCTCTGTTATTTACCACTG 3'
10BF	5' ATTCTTTGCCACGTATTTC 3'
10BR	5' GCCTAAGATTAAATATAAGATATG 3'
18F	5' TCTAGAATTTAACTGAATCAATG 3'
18R	5' TCTAGAATTTAACTGAATCAATG 3'
19F	5' ATGTTTGAGAAGTACTATATTGTG 3'
19R	5' AAGAGACCGAAACTCCATC 3'
20F	5' CTCAGGTGATCCACTAATCTC 3'
20R	5' TTGTTGCTATTCTTTGTCTAAC 3'
22F	5' TGTCCTGTTTAAAGCCATC 3'
22R	5' TTGCTTCTCTGAATATAAACTAAC 3'
23-24F	5' AAAGAGGATCTGTATTTATTTTG 3'
23-24R	5' GTAGCTCCAACTAATCATAAGAG 3'
21F	5' GTTTTATGCTTGGTTCTTTAG 3'
21R	5' TAAAACAGCTTCTCACCTTG 3'
25F	5' TCTTGCATCTTAAAATTCATC 3'
25R	5' TTACCTCACATACTACCTCAAC 3'
26F	5' CCCTAAATCACTGATACTGG 3'
26R	5' CAGAATATACGATGGCCTC 3'
27F	5' CTTTGATTTAGTTTTTTATGTTAC 3'
27R	5' CATAAGTACTAATGTGTGTGGTTTG 3'
11FA	5' TTAGTGAAAAATATTTAGTGAATGTG 3'
11RA	5' TTTTGCTCTTCTTAATGTTATGTTC 3'
11FB	5' ACAAATGGGCAGGACTCTTAG 3'
11RB	5' TTCTTTATTTGAAGTATTACCATGA 3'
11FC	5' TATGAAGGAGGGAAACACTCAG 3'
11RC	5' TGATCTTCAACATTCTTCAATACTG 3'
11FD	5' CTAACAGCTATTCCTACCATTCTG 3'
11RD	5' GTTGAAATTGAGAGAGATATGGAG 3'
11FF	5' AGAAATGGAAAAAACCTGCAG 3'
11FR	5' AGAAATGGAAAAAACCTGCAG 3'

Archive of SID

۵- توالی یابی مستقیم (Direct Sequencing):

محصول PCR پس از خالص‌سازی با کیت آمادهٔ ABI PRISM Dye Deoxy Terminator cycle Sequencing Kit (UK) و همچنین استفاده از سیستم (Applied Biosystems, Genetic Analyzer) ABI3130X Warrington, UK. توالی‌یابی مستقیم گردید. ترادف مرجع (Reference Sequence) برای BRCA1 توالی Genebank, U14680.1 و برای BRCA2 Genebank, NM_000059.1. بود.

واکنش با 5-100ng از محصول خالص‌شدهٔ PCR، ۱۰/۴ پیکومول از پرایمرهایReverse &Forward ، بافرReady 1x Reaction premix در یک حجم ۲۰ میکرولیتر انجام گردید. واکنش‌های تعیین توالی چرخه (Cycle Sequencing) در دستگاه ترموسایکلر در برنامه: ۹۶ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت۶۰ ثانیه ، ۹۶ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه، چسبیدن پرایمرها در ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵ ثانیه و گسترش در۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه در ۲۸ چرخه اجرا شد. سپس، بر اساس دستورالعمل ABI رسوب‌دهی با الکل انجام شد و اضافی پرایمرها، آنزیم، موادمعدنی، dNTPs و ddNTPs حذف شدند. سپس توسط افزودن فورمامید و متعاقبا" انجام یک‌دوره hot-ice تک‌رشته‌های DNA به‌وسیلهٔ کاپیلاری الکتروفورز تعیین توالی شدند. داده‌های جمع‌آوری شده توسط دستگاه ژنتیک آنالیزور ABI3130X با استفاده از Sequencing analyzer 5.2 software آماده شد و سپس مورد تجزیه‌وتحلیل قرارگرفت. توالی‌های مرتب شده برای هر اگزون خوانده‌شد و درconsed viewer software قابل مشاهده گردید و تغییرهای توالی ثبت شدند. تغییرهای توالی برای پرایمرهای forward & reverse در مقایسه با پلات این دو ژن که با استفاده از سایت NCBI از قبل به‌دست آمده‌بود بررسی شد و جهش‌ها به‌این‌وسیله شناسایی شدند. جهش شناسایی‌شده برای هر اگزون هم با پرایمر Forward و هم Reverse از آن اگزون تأیید می‌شد.

یافته‌ها

نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق در جداول ۳ و ۴ و۵ ثبت شده است. بخش عمدهٔ Missense substitutionها یا جهش‌های بدمعنی در ژن BRCA1 بود. تعدادی از جهش‌ها قبلاً گزارش نشده‌اند (جدول۴). جهش‌های جدید عبارت‌اند از: Gly1140Ser, Ileu15Ieu, Ileu26Ieu, Glu23Gln Leu3stop codon, Pro938Arg, Leu6Val, Arg7Cys, Ser177Val, IVS7+83(TT), IVS8 -70(CATT), IVS2+9(GC), IVS1-20(GA), IVS1-8(AG), IVS2+24(AG) در ژن BRCA1 و جهش Glu1391Gly در ژن BRCA2.

در یک خانواده با مادر و دو دختر مبتلا که یکی از دخترها دارای سرطان پستان دوطرفه (Bilateral) بود، جهش Leu3stop codon مشاهده‌شد ولی جهش در دختر سالم خانواده شناسایی نشد. این جهش جزء جهش‌های جدید است و تا به‌حال گزارشی از آن منتشر نشده است.

جهش‌های S1613G,G1140S,E1038G از ژن BRCA1 در بیش از ۴۳ تن از بیماران وکمتر از ۲۰ درصد گروه کنترل مشاهده‌شد(جدول۵). جهش‌های Gly1140Ser,Glu1038 درژن BRCA1 شیوع بالایی در میان بیماران نشان دادند. جهش Leu871Pro در کمتر از ۴۰درصد بیماران ردهٔ سنی ۴۵-۲۸ سال مشاهده گردید ولی در هیچ‌کدام از افراد گروه کنترل مشاهده نشد.

هاپلوتیپ ناشی از قرارگیری آلل‌های Leu871Pro,Glu1038Gly,Ser1613Gly,Gly1140Ser و هاپلوتیپ ناشی از آلل‌های Glu1038Gly, Ser1613Gly, G1140Ser در ژن BRCA1 به‌ترتیب درکمتر از ۴۰ درصد بیماران و ۴ نفر ازگروه کنترل مشاهده شد(جدول۵).

جهش Glu1391Gly در ژن BRCA2 در یک خانواده با ۴ خواهر مبتلا دیده شد. آن‌ها در کنار این جهش، جهش‌های بدمعنی S1613G,G1140S,E1038G در ژن BRCA1 را هم داشتند. جهش Glu1391Gly در هیچ‌کدام از افراد گروه کنترل دیده نشد (جدول۵) .

جهش بدمعنی Gly1738Glu در کمتر از ۸ درصد خانواده‌های تحت مطالعه با حداقل ۳ عضو مبتلا دیده شد اما، در هیچ یک از افراد گروه کنترل مشاهده نشد. در ۲ بیمار از بیمارانی که جهش G1738E را داشتند، جهش‌های بدمعنی G1140S و E1038G نیز وجود داشت.

چند جهش با اثر پاتوژنیک شناخته شده در دنیا در تعدادی از بیماران شناسایی شد. این‌ها عبارت‌اند از: جهش بدمعنی Ile21Val در خانمی که در سن ۲۸ سالگی به سرطان پستان مبتلا شده‌بود (جدول۳و۴). در ۲خانم از دو خانوادهٔ غیرمرتبط که در سن زیر ۳۵ سال به سرطان پستان مبتلا شده بودند، یک افزایش کوچک (Small insertion) در کدون۲۶- CD26 Small INS GTCCC^ATCTG (E212catctgGTAAGTCAGC) در ژن BRCA1 شناسایی شد .

نوترتیبی IVS2-1 (GC) در سه خانم (دو خواهر و دختر یکی از این خواهرها) که یکی از آن‌ها سابقهٔ فیبروم تخمدان داشت مشاهده گردید.

Archive of SID

جهش شناسایی‌شدهٔ دیگر Leu1522Phe در ژن شناسایی شد.
BRCA2 می‌باشد که در یک نفر از بیماران مورد بررسی

جدول ۳- انواع واریانت‌ها وجهش‌های BRCA1 و BRCA2 در ۶۳ بیمار ایرانی مطالعه‌شده

اثر کلینیکی جهش	آمینواسید تغییریافته	تغییرنوکلئوتیدی	ژن	اگزون
Vus	-	IVS7+83(TT)	BRCA1	7
Vus	-	IVS8 -70(CATT)	BRCA1	9
Synonymous	Leu771	TTG>CTG	BRCA1	11
Polymorphism	Leu871Pro	CTG>CCG	BRCA1	11
Polymorphism	Glu1038Gly	GAA>GGA	BRCA1	11
Polymorphism	Ser1040Asn	AGC>AAC	BRCA1	11
polymorphism	Gly1140Ser	GGT>AGT	BRCA1	11
Synonymous	Ser1436	TCT>TCC	BRCA1	13
polymorphism	Ser1613Gly	AGT>GGT	BRCA1	16
Synonymous	Glu1735	GAA>GAG	BRCA1	20
pathogenic	Gly1738Glu	GGA>GAA	BRCA1	20
Vus	Glu1391Gly	GAA>GGA	BRCA2	11
Synonymous	Leu1521	CTA>CTG	BRCA2	11
Synonymous	VAL2171	GTG>GTC	BRCA2	11
Synonymous	Gln373	CAG>CAA	BRCA2	10
polymorphism	Glu23Gln	GAG>CAG	BRCA1	2
polymorphism	Ileu15Leu	ATT>CTT	BRCA1	2
Synonymous	Pro25	CCC>CCA	BRCA1	2
polymorphism	Ileu26Leu	ATG>GTC	BRCA1	2
Vus	-	IVS2+9(GC)	BRCA1	2
Vus	Leu3Opal	TTA>TGA	BRCA1	2
Small insertion	Pro938Arg	CCA>CGA	BRCA1	11
	-	IVS1-20(GA)	BRCA1	2
polymorphism	-	IVS1-8(AG)	BRCA1	2
Vus	-	IVS2-1 (GC)	BRCA1	2
pathogenic	-	IVS2+24(AG)	BRCA1	2
polymorphism	-	IVS2(35-39)TTCctatGAT	BRCA1	2
pathogenic	-	INS CD26 Small ins GTCCC^ATCTG-E212catctgGTAAGTCAGC	BRCA1	2
	Leu6Val	CTT>GTT	BRCA1	2
	Arg7Cys	CGC>TGC	BRCA1	2
	Ile21Val	ATC>GTC	BRCA1	2
	Ser177Thr	TCT>ACT	BRCA1	8
	Leu1522Phe	CTT>TTT	BRCA2	11

VUS, variant of uncertain significance

Archive of SID

جدول٤ – سابقهٔ گزارش جهش‌های شناسایی‌شدهٔ ژن‌های BRCA1 و BRCA2 در دنیا

نوکلئوتید تغییر یافته	آمینواسید تغییر یافته	سابقهٔ گزارش در دنیا
IVS7+83(-TT)	–	NO
IVS8 -70(-CATT)	-	NO
TTG>CTG	Leu771	Yes
CTG>CCG	Leu771	
GAA>GGA	Leu871Pro	Yes
AGC>AAC	Glu1038Gly	Yes
GGT>AGT	Ser1040Asn	Yes
TCT>TCC	Gly1140Ser	NO
AGT>GGT	Ser1436	Yes
GAA>GAG	Ser1613Gly	Yes
GGA>GAA	Glu1735	NO
GAA>GGA	Gly1738Glu	Yes
CTA>CTG	Glu1391Gly	NO
GTG>GTC	Leu1521	Yes
CAG>CAA	VAL2171	Yes
GAG>CAG	Gln373	NO
ATT>CTT	Glu23Gln	NO
CCC>CCA	Ileu15Leu	NO
ATG>GTC	Pro25	Yes
IVS2+9(-GC)	Ileu26Leu	NO
TTA>TGA	-	NO
CCA>CGA	Leu3Ter	NO
IVS1-20(-GA)	Pro938Arg	NO
IVS1-8(-AG)	-	NO
IVS2-1 (-GC)	-	NO
IVS2+24(-AG)	-	Yes
IVS2(35-39)TTCctatGAT	-	NO
INS CD26 Small ins	-	NO
GTCCC^ATCTG-E212catctgGTAAGTCAGC	-	Yes
CTT>GTT	Leu6Val	NO
CGC>TGC	Arg7Cys	NO
ATC>GTC	Ile21Val	Yes
TCT>ACT	Ser177Thr	NO
CTT>TTT	Leu1522Phe	Yes

Archive of SID

جدول ۵: شیوع تعدادی از پلی مورفیسم‌های ژن‌های BRCA1 و BRCA2 در بیماران و افراد گروه کنترل

ژن	آلل	بیماران(۶۳) %		کنترل‌ها(۵۰)
BRCA1	L871P	25	39	-
BRCA1	E1038G	55	87	8
BRCA1	S1040N	22	34	9
BRCA1	G1140S	50	80	6
BRCA1	S1613G	23	35	
BRCA1	G1738E	6	8	-
BRCA2	E1391G	5	6.3	-
BRCA1	L871P,E1038G,S1613G,G1140S	4	30	-
BRCA1	E1038G, G1140S, S1613G	19	22	-
BRCA1	E1038G, G1140S	14	36	4
BRCA1	E1038G, G1140S, G1738E	23	3	-
BRCA1	E1038G, G1140S, S1613G and	2	6.3	-
BRCA2	E1391G	4		

بحث ونتیجه گیری

۲۰ تا ۳۰ درصد افراد مبتلا به سرطان پستان دارای سابقهٔ خانوادگی این سرطان هستند. جهش در ژن‌های BRCA1 و BRCA2 باعث استعداد وراثتی ابتلا به سرطان پستان و تخمدان می‌گردد[۸].جهش در این ژن‌ها برای ۵ تا ۱۰ درصد کل موارد سرطان پستان و ۲۰ تا۳۰ درصد سرطان‌های خانوادگی پستان وجود دارد و این میزان معادل خطری درحدود ۶۰ تا ۸۵ درصد درطول زندگی برای این خانواده‌ها است. لذا آنچه تحت عنوان تست ژنتیکی مطرح می‌باشد به‌طور عمده تا حدود ۹۰ درصد شامل بررسی وضعیت این دو ژن در فرد است [۹ – ۷]. از لحاظ ساختاری پروتئین BRCA1 در پایانهٔ آمینی (N-terminal) دارای یک دومین حلقوی (Ring Domain) است که در فرآیندهای اوبی کوئیناسیون دخالت دارد. این ناحیه با BARC1 میان‌کنش می‌کند واین دو پروتئین یک هترودیمر پایدار را ایجاد می‌کنند[۷]. این پروتئین در پایانهٔ C (C-terminal) دو توالی تکراری با ساختار دومین کروی دارد که BRCT نامیده می‌شود و ۱۱۰ آمینواسید دارد. BRCT ویژگی مشترک همهٔ پروتئین‌های شرکت‌کننده در فرآیندهای تعمیر DNA می‌باشد. جهش‌های بدمعنی ناحیهٔ دومین حلقوی و BRCT منجر به کاهش و تخریب فعالیت‌های سرکوب‌کنندگی تومور (tumor suppression)، BRCA1 می‌گردد[۷]. در حدفاصل این دو ناحیه، خوشهٔ SQ می‌باشد که مکان فسفوریلاسیون BRCA1 به‌وسیلهٔCHK2 , ATM و ATR است که خود این فسفوریلاسیون سرآغاز عملیات تنظیم‌کنندگی این پروتئین در چرخهٔ سلولی است و لذا جهش در این مکان باعث ازدست‌رفتن این ویژگی پروتئین می‌شود[۷]. پروتئین BRCA2 نیز شامل هشت توالی تکراری(BRC) است که باRad51 میان‌کنش می‌دهد. Rad51 در فرآیند نوترکیبی هومولوگوس خود به DNA متصل می‌گردد[۷]

با توجه به آنچه گفته‌شد جهش‌های شناسایی‌شده در این مطالعه را می‌توان گروه‌بندی کرد و اثر بیماری‌زایی آن‌ها را با توجه به عملکردشان در ساختار پروتئین بررسی نمود.

درابتدا باید گفت که اگرچه کار برروی افرادی با سابقهٔ خانوادگی ابتلا به سرطان پستان و یا سن پایین ابتلا به این سرطان صورت گرفت و همچنین کل طول ژن‌های BRCA1 و BRCA2 برای هر بیمار توالی‌یابی مستقیم گردید، تعداد محدودی جهش با اثرکشندگی یا بیماری‌زایی حاد تعیین گردید. نوزده جهش جدید هستند که از این میزان ۱۸ جهش مربوط به ژن BRCA1 و ۱ جهش مربوط به ژن BRCA2 می‌باشد. از این تعداد ۵ جهش در ژن BRCA1 Leu3 stop, G1738E,Ile21Val) D26SmallINSGTCCC^ATCTG (E212catctgGTAAGTCAGC, IVS2-1 (GC) و ۱ جهش در BRCA2 (Leu1522Phe) دارای اثر بیماری‌زایی می‌باشند. شناسایی جهش‌های جدید با مراجعه به سایت‌های HGMD و BIC و مقایسهٔ نتایج به‌دست آمد. علت تفاوت‌ها همانطور که اشاره شد این است که تعدادی از جهش‌ها در نژادهای خاصی ظاهر می‌گردند، لذا به‌عنوان (Founder effect) تلقی می‌شوند، در ضمن اثرات محیطی، جغرافیایی و سایر فاکتورها بر روی شیوع و نوع واریانت جهش‌های BRCA1 و BRCA2 در میان جوامع متفاوت اثر دارند [۱۵و۱۶].

بخش عمدهٔ جهش‌های شناسایی‌شده حالت چند ریختی یا پلی مورفیسم دارند (Gly1140Ser, Glu23Gln, GLu1038Gly Leu871Pro, Ser1613Gly, Ileu26Ieu, Leu6Val, Ser177Thr, Ileu15Ieu, Ileu21Val Ser1040Asn,). پلی مورفیسم‌ها جایگزینی‌های آمینواسیدی با

Archive of SID

اثر عملی غیرآشکار هستند و تقریباً با فرکانس مشابهی در افراد کنترل مشاهده می‌شوند . اثر بیماری‌زایی این‌ها در جمعیت، کمتر از دو درصد است [۲۶].

جهش جدید Leu3 stop codon در یک خانواده با مادر و دو دختر مبتلا که یکی از دودختر به سرطان پستان دوطرفه(Bilateral) مبتلا شده بود، مشاهده شد. این درحالی بود که جهش در دختر سالم خانواده دیده نشد. تغییر تک‌نوکلئوتیدی TTA>TGA باعث گردید کدون ۳ ژن BRCA1 که در حالت عادی برای آمینواسید لوسین کد می‌کند، به یک رمز پایانی ترجمهٔ پروتئین تغییر یابد و باعث خاتمهٔ زودرس ترجمهٔ mRNA این ژن در کدن ۳ شود. لذا یک پروتئین ناکارآمد BRCA1 را تولید می‌کند که قادر به ایفای نقش حیاتی خود به‌عنوان یک سرکوب‌کنندهٔ تومور نمی‌باشد[۸-۴]. بنابراین ما نتیجه گرفتیم که این جهش پاتوژنیک است .

جانشینی‌های بدمعنی Pro938Arg و Arg7 Cys دارای اهمیت ناشناخته هستند. این دو جهش قبلاً گزارش نشده‌اند و ما آن‌ها را در هیچ‌یک از افراد گروه کنترل شناسایی نکردیم. مطالعات جمعیتی بیشتری برای شناسایی اثر این جهش‌ها مورد نیاز است لذا این دو جهش را جزء واریانت‌های با اثر و اهمیت نامشخص قرار دادیم.

در ارتباط با مکان جهش جدید(Gly1140Ser(G3538A بر روی پروتئین BRCA1 ، باید گفت نقاط داغ (Hot point) در حدفاصل ناحیهٔ دومین حلقوی وBRCT مکان‌های S988 محل اتصال CHK2 و S1387/1423/1524 محل اتصال ATM به‌BRCA1 است[۷]، لذا این جهش جدید شناسایی‌شده جزء نقاط داغ نیست ویک پلی‌مورفیسم می‌باشد. شیوع بالای این جهش و همچنین جهش از قبل گزارش‌شده در دنیا یعنی Glu1038Gly در افراد بیمار مورد بررسی و کمتر از ۲۰ درصد جمعیت کنترل احتمالا" نشان دهندهٔ این است که هاپلوتیپی از ژن BRCA1 که به‌وسیلهٔ این دو آلل تعیین می‌شود در حاملین خانم که تاکنون به سرطان مبتلا نشده‌اند، یک زنگ خطر است و این افراد بایستی احتیاط‌های لازم را به‌عمل آورند. جهش‌های بدمعنی Leu871Pro ,Ser1613Gly در تعدادی از بیماران مشاهده‌شد (جدول۵). در مطالعات گذشته در دنیا وابستگی بین این دو آلل با Glu1038Gly اثبات شده‌است [۲۷]. جهش Ser1613Gly در سال ۲۰۰۵ توسط Majdak به عنوان جهش مستعدکنندهٔ ابتلا به سرطان تخمدان معرفی شده است [۲۸].

شیوع همزمان جهش‌های بدمعنی Leu871Pro,Glu1038gly,Ser1613Gly,Gly1140Ser متعلق به ژن BRCA1 در تعدادی از بیماران ۳۰ تا ۳۵ سال و مقایسهٔ آن با نتایج حاصل از افراد گروه کنترل نشان می‌دهد که احتمالاً هاپلوتیپی از ژنBRCA1 که توسط این آلل‌ها تعیین‌شده‌است دارای یک اثر پاتوژنیک است اما، هاپلوتیپ‌های از BRCA1 مانند وجود آلل‌های منفردی از Gly1140Ser Ser1613Gly, Glu1038Gly, یا Glu1038Gly Gly1140Ser, در حاملین استعداد پایین را در بروز سرطان پستان و تخمدان ایجاد می‌کند، اگرچه داده‌های بیشتری برای تعمیم این نظریه موردنیاز است. Dunning در مطالعاتی که انجام داد به نتایج مشابهی رسیده است [۲۷]. جهش‌های اخیر در بسیاری از مطالعات به‌تنهایی به‌عنوان اشکال پلی‌مورفیسم که شاید اثر بیماری‌زایی نداشته باشند، معرفی شده‌اند (HGMD).

در یک خانواده با سه خواهر مبتلا که یکی از خواهران سرطان پستان دو طرفه و خواهر دیگر علاوه بر سرطان یکی از پستان‌ها، فیبروم تخمدان نیز داشت همزمان جهش‌های Ser1613Gly Gly1140Ser, Glu1038gly, در ژن BRCA1 و جهش Glu1391Gly در ژن BRCA2 یافت شد. لذا ما نمی‌توانیم با اطمینان بگوییم که جهش جدید Glu1391Gly به تنهایی استعداد ابتلا به سرطان پستان را در حاملین افزایش می‌دهد و مطالعات بیشتر مورد نیاز است .

در دو خانواده جهش بدمعنی G1738E (5331G>A) شناسایی شد. در آزمایش‌های in vitro مشخص شده‌است که این جهش باعث ازدست‌رفتن عملکرد پروتئین BRCA1 می‌شود[۲۹و۳۰]. گلیسین تغییریافته در سطح ساختار مارپیچی ناحیهٔ Linker بخش BRCT وجود دارد و بنابراین جهش در آن ممکن است میان‌کنش یا اثر پروتئین را تخریب کند [۳۰]. این جهش در سال ۲۰۰۰ [۳۱] در ۴ خانوادهٔ یونانی و در سال ۲۰۰۴ نیز توسط Abkevick در چند بیمار گزارش شده است[۳۲]. بر اساس اطلاعات حاصل از تاریخچهٔ خانوادگی افراد و عدم حضور جهش در حاملین غیر بیماریزا و ۵۰ نفر از افراد کنترل نتیجه گرفتیم که این جهش نیز بیماریزا است .

جهش بدمعنی Ile21Val که دریک خانم جوان مبتلا به سرطان پستان شناسایی شده‌است، اولین‌بار به‌وسیلهٔ Sakayori در سال ۲۰۰۳ به‌عنوان جهش مستعدکنندهٔ ابتلا به سرطان پستان گزارش گردید [۳۳]. باتوجه به مکان جهش بر روی اگزون دوم و گزارش‌های قبلی (HGMD) و عدم تعیین آن در ۵۰ نفر گروه کنترل نتیجه گرفتیم این جهش در جمعیت ایران بیماری زا است.

CD26 Small INS GTCCC^ATCTG-E212catctgGTAAGTCAGC جهشی است که قبلاً به‌عنوان جهش مستعدکنندهٔ سرطان تخمدان به‌وسیلهٔ Tworek وهمکارانش گزارش گردیده است [۳۴]. با توجه به

Archive of SID

مشاهدهٔ این جهش در دو خانم زیر ۳۵ سال مبتلا به سرطان پستان و این مسئله که با دخول این بازها قالب خواندن پروتئین به‌هم می‌خورد و ویژگی‌های پروتئین هم از لحاظ ساختاری وهم فیزیولوژیکی تغییر می‌کند، پس این جهش نیز پاتوژنیک است [۳۴].

نوترتیبی IVS2-1 (GC) اولین بار در سال ۲۰۰۵ توسط Kroiss در بیماران مبتلا به سرطان پستان و تخمدان مشاهده شد. با توجه به مکان جهش که ابتدای اگزون ۲ است و عدم حضور آن در کنترل‌ها شاید یک جهش مضر و بیماری‌زا باشد[۳۵].

جهش بدمعنی Leu1522Phe در ژن BRCA2 که در یکی از بیماران با ۳۲ سال سن در زمان ابتلا شناسایی شد، در سال ۱۹۹۷ توسط Castilla گزارش گردیده است[۳۶]. شاید این جهش اثر بیماری‌زایی داشته‌باشد. ما این جهش را در هیچ‌یک از افراد کنترل شناسایی نکردیم.

تعدادی نوترتیبی وحذف در ناحیهٔ اینترون که قبلاً گزارش نشده‌اند در بعضی از بیماران شناسایی شد(IVS7+83(TT), IVS8 -70(CATT), IVS2+9(GC), IVS1-20(GA), IVS1-8(AG) IVS2+24(AG)). ما مکان‌های جایگزین اسپلایسینگ را بررسی نمودیم و هیچ نوع مکان غیرعادی را در این ناحیه مشاهده نکردیم ولی در هر حال این گروه را جزء واریانت‌های با اثر و اهمیت نامشخص قرار دادیم.

در میان واریانت‌های تعیین‌شده تعدادی از آن‌ها تحت عنوان Synonymous ها هستند(جدول ۳). این‌ها عبارت‌اند از: (Leu771Leu, Val2171Val, Leu1521Leu, Glu1735Glu, Ser1436Ser, Pro25Pro). در این حالت یک جایگزینی تک‌نوکلئوتیدی تغییری در نوع اسیدآمینه ایجاد نمی‌کند چون بیشتر آمینواسیدها دارای چندین توالی آنتی‌کدونی هستند و درنتیجه تغییری در ساختار پروتئین ایجاد نمی‌کنند. تاکنون هیچ اثر پاتوژنیکی در ارتباط با این‌گونه تغییرات گزارش نشده است [۳۷].

درخاتمه باید گفت برای رسیدن به یک جدول کامل از جهش‌های شایع در ایران بایستی تعداد بیشتری از خانواده‌ها را بررسی کرد تا با اطمینان بیشتر بتوان در میان این تعداد از جهش‌ها نوع بیماری‌زای آن‌ها را شناسایی نمود و در آینده با تکنیک‌های ساده‌تر وکم‌هزینه‌تر برای بیماران و خانواده‌های آن‌ها تست‌های ژنتیکی را انجام داد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر و آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی که هزینه‌های مالی طرح را بر عهده داشته‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از کلیهٔ بیماران و اعضای خانواده‌های آن‌ها برای دراختیار گذاشتن نمونهٔ خون واطلاعات پزشکی سپاسگزاریم.

منابع

5. Hulka BS, Stark AT. Breast Cancer: cause and prevention. Lancet 1995; 346: 883 –7.
6. Han W, Kang D, Park I, Won Kim S, Yeon Bae Ji, Chung K, Noh D. Associations between Breast Cancer Susceptibility Gene Polymorphisms and Clinic pathological Features. Clinical Cancer Research 2004; 10: 124–30.
7. Chen L, Nievera Ch, Yueh-Luen A. Cell Cycle-dependent Complex Formation of BRCA1·CtIP·MRN Is Important for DNA Double-strand Break Repair. Biological chemistry 2008; 283: 7713–20.
8. Beggs A, Hodgson Sh. The different levels of inherited susceptibility. European Journal of Human Genetics 2009; 17: 855–6.
9. Arun B, Vogel K, Lopez A. High Prevalence of Pre invasive Lesions Adjacent to BRCA1/2-Associated Breast Cancers. Cancer Prevention Research 2010; 2: 100-3.

References

1.Wasanthi S, Karunanayake E, Kamani H. Novel sequence variants and a high frequency of recurrent polymorphisms in BRCA1 gene in Sri Lankan breast cancer patients and at risk individuals. BMC Cancer 2008; 8: 214-20.
2. Mousavi SM, Mohagheghi MA, Mousavi-Jerrahi A, Nahvijou A, Seddighi Z. Outcome of breast cancer in Iran: a study of Tehran Cancer Registry data. Asian Pac J Cancer Prev 2008; 9(2) :275-8.
3. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52705 women with breast cancer and 108411women without breast cancer. Lancet 1997; 350: 1047–59.
4. Lee SM, Park JH, Park HJ. Breast cancer risks in Korean women. A literature review. Int Nurs Rev 2008; 55: 355–9.

Archive of SID

10. Teng L, Zheng Y, Wang H. BRCA1/2 associated hereditary breast cancer. J Zhejiang Univ Sci B 2008; 9(2): 85-9.
11. Falagas M, Zarkadoulia1 E, Ioannidou E, Peppas G, Christodoulou Ch, Rafailidis P. The effect of psychosocial factors on breast cancer outcome. Breast Cancer Research 2007; 9: 234-44.
12. Belogianni I, Apessos A, Mihalatos M, Labropoulos S, Petounis A, Gaki V, Keramopoulos A, Pandis N. Characterization of a novel large deletion and single point mutations in the BRCA1 gene in a Greek cohort of families with suspected hereditary breast cancer. BMC Cancer 2004; 4: 61-70.
13. Braillon A, Bewley S, Fry-Johnson Y. W, Rowley D. L, Takayama, J. I, Matsuo N, Antony A. C, Muglia L. J, Katz M. The Enigma of Spontaneous Preterm Birth. NEJM 2010; 362: 2032-4.
14. Wynia M. K, Ivey S. L, Hasnain-Wynia R. Collection of Data on Patients' Race and Ethnic Group by Physician Practices. NEJM 2010; 362: 846-50.
15. Landgren O, Katzmann J. A, Hsing A. W. Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance among Men in Ghana. Mayo Clin Proc 2007; *82*: 1468-73.
16. Claes K, Poppe B, Machackova E, Coene I, Foretova L, De Paepe A, Messiaen L. Differentiating pathogenic mutations from polymorphic alterations in the splice sites of BRCA1 and BRCA2. Genes Chromosomes Cancer 2003; 37: 314-20.
17. Bonadona V, Sinilnikova OM, Chopin S, Antoniou AC, Mignotte H, Mathevet P, Bremond A, Martin A, Bobin JY, Romestaing P, RaudrantD, Rudigoz RC, Leone M, Chauvin F, Easton DF, Lenoir GM, Lasset C. Contribution of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations to the incidence of breast cancer in young women: Results from a prospective population-based study in France. Genes, Chromosomes Cancer 2005; 43: 404-13.
18.Tommasi S, Crapolicchio A, Lacalamita R, Bruno M, Monaco A, PetroniS, Schittulli F, Longo S, Digennaro M, Calistri D, Mangia A, ParadisoA. *BRCA1* mutations and polymorphisms in a hospital based consecutive series of breast cancer patients from Apulia, Italy. Mutat Res 2005; 578(1–2): 395-405.
19. Liede A, Narod SA.Hereditary breast and ovarian cancer in Asia: Genetic Epidemiology of *BRCA1* and *BRCA2*. Hum Mutat 2002; 20: 413-24.
20. Zhi X, Szabo C, Chopin S, Suter N, Wang QS, Ostrander EA, Sinilnikova OM, Lenoir GM, Goldgar D, Shi YR. BRCA1 and BRCA2 sequence variants in Chinese breast cancer families. Hummutat in Brief 2002; 554: 1289-94.
21. Choi DH, Lee MH, Bale AE, Carter D, Haffty BG. Incidence of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in young Korean breast cancer patients. J Clin Oncol 2004; 22: 1638-45.
22. Valarmathi MT, awheney M, Deo SSV, Shukla NK, Das SN. Novel germline mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes in Indian breast-ovarian cancer families. Hum Mutat 2004; 23: 205-11.
23. Saxena S, Chakraborty A, Kaushal M, Kotwal S, Bhatanager D, Mohil RS, Chitamani C, Aggarwal AK, Sharma VK, Sharma PC, Lenoir G, Golgar DE, Szabo CI. Contribution of germline *BRCA1* and *BRCA2* sequence alterations to breast cancer in Nothern India. BMC Med Genet 2006; 7: 75-88.
24. Olden K, White SL. Health-related disparities: influence of environmental factors. Med Clin North Am 2005; 89: 721-38.
25. Capalbo C, Ricevuto E, Vestri A, Ristori E, Sidoni T, Buffone O, Adamo B, Cortesi E, Marchetti P, Scambia G, Tomao S, RinaldiC, Zani M, Ferraro S, Frati L, Screpanti I, Gulino A Giannini G. BRCA1 and BRCA2 genetic testing in Italian breast and/or ovarian cancer families: mutation spectrum and prevalence and analysis of mutation prediction models. Annals of Oncology 2006; 17: 34-40.
26. Bishop DT, Hopper JL. AT-tributable risks? Nature Genet 2007; 15: 226.
27. Dunning AM, Chiano M, Smith NR, Dearden J, Gore M, Oakes S, Wilson C, Stratton M, Peto J, Easton D, Clayton D, Ponder BA. Common BRCA1 variants and susceptibility to breast and ovarian cancer in the general population. Hum Mol Genet 1997; 6: 285-9.
28. Majdak EJ, De Bock GH, Brozek I, Perkowska M, Ochman K, Debniak J, Milczek T, Cornelisse CJ, Jassem J, Emerich J, Limon J, Devilee P. Prevalence and clinical correlations of BRCA1/BRCA2 unclassified variant carriers among unselected primary ovarian cancer cases - preliminary report. Eur J Cancer 2005; 41(1): 143-50.

Archive of SID

29. Christersson J, Cayanan C, Haraldsson K, Loman N, Bergthorsson JT, Brondum-Nielsen K, Gerdes AM, Moller P, Kristoffersson U, Olsson H, Borg A, Monteiro AN. Functional analysis of BRCA1 C-terminal missense mutations identified in breast and ovarian cancer families. Hum Mol Genet 2001; 10: 353-60.
30. Huyton T, Bates PA, Zhang X, Sternberg MJ, Freemont PS. The BRCA1 C-terminal Domain: structure and function. Mutat Res 2000; 460: 319-32.
31. Konstantopoulou I, Kroupis C, Ladopoulou A, Pantazidis A, BoumbaD, Lianidou ES, Petersen MB, Florentin L, Chiotellis E, Nounesis G, Efstathiou E, Skarlos D, Tsionou C, Fountzilas G, Yannoukakos D. BRCA1 mutation analysis in breast/ovarian Cancer families from Greece. Hum Mutat 2000; 16: 272-3.
32. Abkevich V, Zharkikh A, Deffenbaugh AM, Frank D, Chen Y, Shattuck D, Skolnick MH, Gutin A, Tavtigian SV. Analysis of missense variation in human BRCA1 in the context of interspecific sequence variation. J Med Genet 2004; 41(7): 492-507.
33. Sakayori M, Kawahara M, Shiraishi K, Nomizu T, Shimada A, Kudo T, Abe R, Ohuchi N, Takenoshita S, Kanamaru R, Ishioka C. Evaluation of the diagnostic accuracy of the stop codon (SC) assay for identifying protein-truncating mutations in the BRCA1and BRCA2genes in familial breast cancer. J Hum Genet 2003; 48(3): 130-7.
34. Tworek H, Peng R, Fetzer S, Werness BA, Piver MS, Allen HJ. Mutation analysis of BRCA1, TP53, and KRAS2 in ovarian and related pelvic tumors. Genet Cytogenet 1999; 112(2): 105-18.
35. Kroiss R, Winkler V, Bikas D, Fleischmann E, Mainau C, Frommlet F, Muhr D, Fuerhauser C, Tea M, Bittner B, Kubista E, Oefner PJ, Bauer P, Wagner TM. Austrian Hereditary Breast and Ovarian Cancer Group: Younger birth cohort correlates with higher breast and ovarian cancer risk in European BRCA1 mutation carriers. Hum Mutat 2005; 26(6): 583-9.
36. Castilla LH, Couch FJ, Erdos MR, Hoskins KF, Calzone K, Garber JE, Boyd J, Lubin MB, Deshano ML, Brody LC. Mutations in the BRCA1 gene in families with early-onset breast and ovarian cancer. Nat Genet 1994; 8(4): 387-91.
37. Hayes F, Cayanan C, Barilla D, Monteiro AN. Functional assay for BRCA1. Mutagenesis of the COOH-terminal region reveals critical residues for transcription activation. Cancer Res 2008; 60: 2411-8.