وقوع و سهم تغییرات توالی ژن‌های BRCA1/2 در سلول زایشی مبتلایان سرطان پستان

فاطمه کشاورزی[۱]، ناهید نفیسی[۲]
فریدون سیرتی[۳]، محمد صادق فلاح[۴]
رضا صالحی[۵]، زهرا حریری[۶]
زهرا شهاب موحد[۴]، مریم وحیدی[۴]
زهره شریفی[۴]، مریم شرفی فرزاد[۴]
سیروس زینلی[۷و۴*]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، سنندج، ایران.
۲- گروه جراحی عمومی، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳- گروه جراحی عمومی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۴- مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی، تهران، ایران.
۵- گروه ریاضی و آمار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، سنندج، ایران.
۶- گروه جراحی، بیمارستان مهراد، تهران، ایران.
۷- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، خیابان ۱۲ فروردین، نرسیده به خیابان پاستور، پلاک ۱۹، انستیتو پاستور، بخش پزشکی مولکولی تلفن: ۸۸۹۳۹۱۴۰-۰۲۱
E-mail: zeinali@kawsar.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۴/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان شایع‌ترین شکل سرطان وراثتی در جهان است. این سرطان یک علت مهم مرگ و میر میان زنان است. پنج تا ۱۰ درصد از همه موارد سرطان پستان و تخمدان به‌علت جهش‌های پرنفوذ ژن‌های مستعدکننده سرطان پستان در سلول‌های زایشی می‌باشد. ژن‌های BRCA1 و BRCA2 برای نصف این موارد در نظر گرفته می‌شوند، لذا درخواست غربالگری جهش‌های این دو ژن رو به افزایش است. نتایج این تست‌ها بر مدیریت کلینیکی افراد در معرض خطر اثر دارد. هدف از این تحقیق شناسایی جهش‌های این دو ژن در صد خانواده ایرانی با خطر بالای این بیماری است. ***روش بررسی:*** ما صد خانواده را که حداقل در یکی از گروه‌های در معرض خطر قرار داشتند، مورد ارزیابی قرار دادیم. کل توالی‌های کددهنده و مرزهای اگزون- اینترون ژن‌های BRCA1/2 در اعضای بیمار این خانواده‌ها و افراد گروه کنترل به‌وسیله توالی‌یابی مستقیم و MLPA بررسی شد. ***یافته‌ها:*** در مطالعه حاضر جهش‌های جدید زیر شناسایی شد: p.Gly1140Ser, p.Ile26Val, p.Leu1418X, p.Glu23Gln, p.Leu3X, p.Asn1403His, p.Asn1403Asp, p.Lys581X, p.Pro938Arg, p.Thr77Arg, p.Leu6Val, p.Arg7Cys, p.Leu15Ile, p.Ser177Thr, IVS7+83(-TT), IVS8 -70(-CATT), IVS2+9(G>C), IVS1-20(G>A), IVS1-8(A>G), p.Met1Ile, IVS2+24(A>G), IVS5-8 (A>G), IVS2 (35-39) TTcctatGAT, IVS13+9 G>C در ژن BRCA1 و جهش‌های p.Glu1391Gly, 1994-1995 (InsA), p.Val1852Ile, IVS6-70 (T>G) در ژن BRCA2. ***نتیجه‌گیری:*** ده عدد از کل جهش‌های شناسایی‌شده احتمالاً بیماری‌زا بوده و خانواده‌های با جهش‌های بیماری‌زا ۱۶ درصد کل خانواده‌های مورد بررسی را به‌خود اختصاص دادند. به‌علاوه از تعداد کل جایگزینی‌های و بازآرایی‌ها که ۴۲ عدد بود، ۸۰ درصد آن‌ها مربوط به ژن BRCA1 و ۲۰ درصد ناشی از ژن BRCA2 بود.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، BRCA1/2، سرطان خانوادگی، جهش ژنی.

مقدمه

سرطان پستان (Breast cancer) شایع‌ترین سرطان و دومین علت مرگ سرطانی در میان زنان جهان است.[۱] اکثر موارد سرطان پستان تک‌گیر است ولی بخشی از این بیماری ناشی از به‌ارث رسیدن ژن‌های جهش‌یافته خاصی می‌باشد.[۲] درصد بروز بیماری در زنانی که پیش‌زمینه این سرطان را در خانواده خود دارند تا اندازه‌ای کم و بیش بیش‌تر می‌باشد و زنانی که به‌میزان ۶۰ تا ۸۰ درصد ناهنجاری‌های ژنتیکی را به‌ارث می‌برند بسیار مستعد ابتلای به این سرطان هستند.[۳]

جهش در ژن‌های BRIPI, CHEK2, TGFB, PTEN, BRCA2, TP53, BRCA1 و تعدادی تک نوکلئوتیدهای پلی‌مورفیسم (SNPS) (CASP8D302H، 1GFB3-202C> A، PGRV660L، SOD2، V16A و TGFBRCA1 T29C) مرتبط با خطر سرطان پستان هستند.[۴] از میان این ژن‌ها BRCA1 و BRCA2 دارای بیش‌ترین اهمیت بوده و در مطالعات متعدد در سراسر جهان بالاترین درصد سرطان‌های پستان وراثتی را به‌خود اختصاص داده‌اند.[۴] ژن‌های BRCA2 و BRCA1 نقش مهمی در ترمیم DNA به‌روش نوترکیبی هومولوگوس، حفظ پایداری کروموزوم، فعال‌سازی نقاط کنترل DNA آسیب‌دیده و تنظیم چرخه

Archive of SID
www.SID.ir

سلولی دارند.[۵] اپی‌تلیوم پستان در زمان بلوغ تحت اثر هورمون‌های استروژنی تکثیر می‌یابد و برخلاف سلول‌های تکثیریافته اپی‌تلیال روده یا مجاری ادراری، پروژنی‌های حاصل از تکثیر اپی‌تلیوم پستان، در پستان حفظ می‌شوند، این مسئله بیان‌گر آن است که لوبول‌های پستان به‌صورت کلونال هستند.[۶] اگر قبل از توسعه لوبول‌ها یک سلول پیش‌ساز لوبولار جهش مستعدکننده سرطان را در مکان ژنی آشکاری کسب کند، لوبول کامل دارای سلول‌هایی است که همگی این جهش را دارند و این مسئله خطر نئوپلازی را افزایش می‌دهد.[۷] به‌طور مشابه دوز بالای اشعه یونیزه‌کننده در طی بلوغ یا حتی در اوایل بچگی و اشعه درمانی به‌طور ویژه، خانم‌ها را در میان‌سالی به سرطان پستان مستعد می‌کند. این وضعیت در حاملین جهش‌های BRCA مخصوصاً افرادی با ژنوتیپ هتروزیگوت -/+BRCA می‌تواند، آشکار شود. در واقع دوران بلوغ زمانی است که یک حامل جهش‌های BRCA در خطر ویژه رشد جهش‌های سرطان‌زا می‌باشد. این مسئله تفاوت زمانی آشکار سرطان‌های پستان تک‌گیر و ارثی را نشان می‌دهد. هم‌چنین تعدادی از متابولیت‌های استروژن به‌عنوان کارسینوژن بافت پستانی عمل می‌کنند که این اثر در حاملین جهش‌های BRCA افزایش می‌یابد.[۸] بر خلاف ترسی که حتی با شنیدن نام بیماری در زنان به‌وجود می‌آید در صورتی‌که این سرطان در مراحل اولیه تشخیص داده شود درمان موفقیت‌آمیز و بدون عارضه‌ای خواهد داشت. اگر فردی دارای سابقه خانوادگی سرطان پستان باشد تست‌های ژنتیکی برای سنجش او از لحاظ حامل بودن جهش ژن‌های مستعدکننده سرطان پستان لازم است. نتایج این تست‌ها راهنمای مفیدی برای تصمیم‌گیری چگونگی برخورد با این بیماری است. در مطالعه حاضر که تحقیقی در ارتباط با جمعیت ایران است ۱۰۰ خانواده با خطر بالا ابتلای به سرطان پستان و تخمدان مورد بررسی قرار گرفته‌اند. هدف اولاً، تاکید بر روی نتایج تحقیقات قبلی و هم‌چنین پیروی از این تفکر است که غربالگری جهش‌های BRCA1 و BRCA2 ممکن است یک اثر قوی بر روی مراقبت از سلامتی در یک جمعیت در معرض خطر داشته باشد ثانیاً، شناسایی جهش‌های شایع (اشکال پلی‌مورفیسم و بیماری‌زا) این ژن‌ها در جمعیت ایران جهت استفاده سریع‌تر و کم‌هزینه‌تر برای خانواده‌های سرطانی و افراد ناقل جهش‌ها می‌باشد. بر این اساس پس از مشاوره ژنتیکی براساس یک پروتکل استاندارد جهانی (Boadicea model)، از میان خانواده‌ها و بیماران مشاوره شده ۱۰۰ خانواده مجزا به‌همراه ۵۰ نفر کنترل (خانم‌های بالاتر از ۷۰ سال که تاکنون سابقه ابتلای به سرطان پستان و تخمدان در خود فرد و هم‌چنین خویشاوندان درجه ۱ و ۲ او مشاهده نشده است) انتخاب شدند و بعد از خون‌گیری و استخراج DNA کل توالی ژن‌های BRCA1 و BRCA2 این افراد توالی‌یابی مستقیم (Direct sequencing) گردید و در موارد عدم شناسایی جهش‌های پرخطر و بیماری‌زا با تکنیک Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) وجود یا عدم حذف‌های بزرگ و یا مضاعف شدن‌ها، در این دو ژن نیز در افراد بررسی شد.

روش بررسی

این بررسی در فاصله بین بهمن‌ماه ۱۳۸۷ تا آذرماه ۱۳۸۹ در آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی و مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر به‌صورت یک مطالعه توصیفی- تحلیلی انجام شد.

انتخاب خانواده‌ها: خانواده‌ها و بیماران از میان افراد ارجاع داده شده از مراکز درمانی و بیمارستان‌ها در سطح شهر تهران و شهرستان‌ها بر اساس ویژگی‌های فرد شاخص (تومور اولیه شخص، سن تشخیص سرطان پستان و یا تخمدان در این افراد و مذکر بودن فرد)، سابقه خانوادگی سرطان پستان یعنی سابقه ابتلای به سرطان پستان و یا تخمدان در خانواده فرد، تعداد افراد مبتلا و نسبت آن‌ها با فرد شاخص انتخاب شدند. مشاوره ژنتیکی براساس پروتکل استاندارد و جهانی (Boadicea model) انجام گرفت و افراد شاخصی که در یکی از گروه‌های در معرض خطر (Risk factor) زیر قرار می‌گرفتند، انتخاب شدند: F: سابقه خانوادگی، F1: دو فرد سرطان پستانی در خانواده، F2: یک فرد در خانواده با سرطان پستان و یک فرد با سرطان تخمدان، F3: سه یا تعداد بیشتری افراد مبتلا به سرطان پستان، F4: سه یا تعداد بیشتری افراد مبتلا به سرطان پستان و یا تخمدان شامل حداقل یک فرد با سرطان تخمدان، E: سرطان پستان زودهنگام که در سن زیر ۳۵ سال تشخیص داده شده باشد، B: سرطان پستان دو طرفه (Bilateral)، M: سرطان پستان مردان، D: سرطان پستان و سایر سرطان‌ها در خانواده.[۹] در هنگام مشاوره ژنتیکی، اهمیت تحقیق شرح داده شد و پس از جلب موافقت و گرفتن رضایت‌نامه از بیماران و اعضای خانواده آن‌ها، خانواده در

www.SID.ir
Archive of SID

تحقیق شرکت داده می‌شد. بیماران همگی عضو خانواده‌های مختلف بوده و به گروه و نژاد خاصی تعلق نداشتند بلکه از نقاط مختلف کشور بودند. علاوه بر این ۵۰ زن گروه کنترل ما را تشکیل دادند. گروه کنترل شامل خانم‌های با سن بالاتر از ۷۰ سال بود که سابقه ابتلای به سرطان پستان و تخمدان در خود فرد و هم‌چنین خویشاوندان درجه ۱ و ۲ آن‌ها مشاهده نشده بود.

طراحی پرایمر: از نرم‌افزار Gene runner (V.3.05) استفاده نمودیم. توالی پرایمرها در مقاله چاپ‌شده در ژورنال یاخته ذکر شده است.[۱۰]

استخراج DNA (DNA Extraction): DNA ژنومیک از نمونه‌های خون محیطی افراد با استفاده از کیت پرومگا (Promega, USA) با دستورالعمل کارخانه سازنده استخراج گردید.

تکثیر و خالص‌سازی DNA (PCR amplification and DNA purification): در انتخاب اگزون‌ها برای بررسی با توجه به جهش‌های شایع گزارش شده در دنیا و مطالعات انجام‌گرفته در کشورهای دیگر که گزارش آن در سایت‌های: HGMD (The Human Gene Mutation Database) و (Breast Cancer Information Core) BIC موجود می‌باشد، ابتدا جستجو برای شناسایی جهش در مورد هر فرد را با اگزون‌های که جهش‌های شایع داشتند یا اگزون بسیار بزرگ بود، شروع کردیم و در صورت عدم شناسایی جهش سایر اگزون‌ها بررسی می‌شدند. هر اگزون در ابتدا با روش PCR تکثیر شد. اگزون ۱ ژن BRCA1 و ژن BRCA2 در بالا دست مکان آغاز ترجمه قرار دارند و نیز نظر به این‌که اگزون ۴ ژن BRCA1 در رونوشت‌های سالم BRCA1 وجود ندارد، بنابراین تکثیر نشدند. هر واکنش PCR شامل ۳۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱۰ میکرومولار دزاکسی نوکلئوتید تری فسفات‌ها (dNTPs) (BioRon)، ۵۰ میکرومولار کلرید منیزیم، ۴۰ پیکومول از پرایمرهای Reverse و Forward (CinnaGen, Iran)، Tag ۲U پلیمراز (KBC, Iran)، دو میکرولیتر بافر 10X (KBC) و ۲۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر در یک حجم ۲۵ میکرولیتر بوده و برنامه PCR به قرار زیر: ۹۳ °C به‌مدت سه دقیقه، ۹۳ °C به‌مدت یک دقیقه، ۶۲–۵۷ °C به‌مدت یک دقیقه دمای چسبیدن پرایمرها بسته به نوع پرایمرها، دمای ۷۲ °C یک دقیقه و ۷۲ °C دو دقیقه برای ۳۵ چرخه.

محصول PCR با استفاده از Multi screen FB filterplates (Millipore corporation & Billerica MA) خالص‌شده و با ۷۰ تا ۱۴۰ میکرولیتر آب دو بار استریل رقیق شد و حضور محصول PCR در هر واکنش با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد همراه با اتیدیوم بروماید، و در نهایت دیدن تصاویر در ژل داک بررسی شد.

توالی‌یابی مستقیم (Direct sequencing): محصول PCR پس از خالص‌سازی با کیت آماده ABI PRISM Big Dye Terminator cycle توالی‌یابی مستقیم شد. واکنش با پنج تا ۱۰۰ نانوگرم از محصول خالص‌شده PCR، ۱۰/۴ پیکومول از پرایمرهای Reverse & Forward، بافر Ready Reaction premix 1x در یک حجم ۲۰ میکرولیتر انجام گردید. واکنش‌های تعیین توالی چرخه (Cycle sequencing) در دستگاه ترموسایکلر در برنامه: ۹۶ °C به‌مدت ۶۰ ثانیه، ۹۶ °C به‌مدت ۱۰ ثانیه، چسبیدن پرایمرها در ۵۰ °C به‌مدت پنج ثانیه و گسترش در ۶۰ °C به‌مدت چهار دقیقه در ۲۸ چرخه اجرا شد. سپس، بر اساس دستورالعمل ABI رسوب‌دهی با الکل انجام شد و اضافی پرایمرها، آنزیم، مواد معدنی، dNTPs و ddNTPs حذف شدند. سپس توسط افزودن فورامید و متعاقباً انجام یک دوره Hot-ice تک‌رشته‌های DNA به‌وسیله کاپیلاری الکتروفورز تعیین توالی شدند. داده‌های جمع‌آوری‌شده توسط دستگاه ژنتیک آنالیزور 3130X با استفاده از Sequencing analyzer 5.2 software آماده شده و سپس مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت. توالی‌های مرتب‌شده برای هر اگزون خوانده شده و در Consed viewer software قابل مشاهده گردید و تغییرات توالی ثبت شدند.

تغییرات توالی برای پرایمرهای Forward & reverse در مقایسه با پلات این دو ژن بررسی شد. پلات اصلی این دو ژن با استفاده از سایت (NCBI National Center for Biotechnology Information) به‌دست آمده بود، و به‌این وسیله جهش‌ها شناسایی شدند. جهش شناسایی‌شده برای هر اگزون هم با پرایمر Forward و هم پرایمر Reverse آن اگزون تائید می‌شد.

بررسی حذف‌های بزرگ و مضاعف شدن‌ها به‌روش MLPA: نمونه‌هایی که در توالی‌یابی مستقیم جهشی شناسایی نشد و یا جهش‌های شناسایی‌شده از گروه مترادف و پلی‌مورفیسم‌های شایع بدون اثر بیماری‌زایی بود، با تکنیک MLPA برای شناسایی حذف‌های بزرگ و یا مضاعف شدن‌ها بررسی مجدد با استفاده از سه کیت شد:

۱– SALSA MLPA KIT P239 BRCA1 region (Lot 0607)

۲– SALSA MLPA KIT P002-C1 BRCA1 (Lot 1209, 0409)

۳– SALSA MLPA KIT P090-A2 BRCA2 (Lot 0808)

www.SID.ir

کیت P239 BRCA1 region یک کیت غربالگری است که واجد پروب‌های برای بیش‌تر ژن‌های درگیر در سرطان پستان است در حالی‌که کیت P002-C1 BRCA1 پروب‌های مربوط به اگزون‌های ژن BRCA1 و کیت P090-A2 BRCA2 اگزون‌های مربوط به ژن BRCA2 را داراست. واکنش‌های MLPA براساس دستورالعمل در دو روز برای هر کیت به‌ترتیب زیر انجام شد:

1. DNA denaturation
   a. 95˚C 5 minute, b.25˚C pause
2. Hybridization reaction
   a. 95˚C 1 minute, b.60 ˚C pause
3. Ligation reaction
   a. 54˚C pause, b.54˚C 15 minute, c.98˚C 5 minute, d. 15˚C pause
4. PCR reaction
   a. 60˚C pause 35 cycles: ●95 30 seconds, ●60 30 seconds, ●72 60 seconds, b. 72˚C 20 minute, c. 15˚C pause
5. Fragment Separation

بعد واکنش PCR یک میکس با ترکیب زیر برای هر لوله ساخته شد:

0.7 µl of the PCR reaction + 0.3 µl ROX size standard + 9 µl HiDi formamide

میکس به‌داخل پلیت‌ها تزریق شد و برای دو دقیقه در ۸۰ °C انکوبه گردید. پلیت‌ها در دستگاه Capillary sequence system-ABI genetic analyzer 3130 (software 5.2) گذاشته و برنامه زیر داده شد:

Injection voltage: 1.6 kV; injection time: 15 sec.; run voltage: 15 kV; polymer: POP4

آنالیز MLPA و تفسیر نتایج: پس از استخراج داده‌های خام از الکتروفورز مویین، داده‌ها با نرم‌افزار GeneMarkerV1.6 آنالیز گردید.

فهرست اختصارات (Mutation nomenclature): کلیه جهش‌های شناسایی‌شده BRCA1 و BRCA2 براساس دو روش نام‌گذاری شد: ۱- HUGO-approved systematic nomenclature (for the description of sequence variations, Human Genome Variation Society. http://www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/mutnomen که طبق این نام‌گذاری در ژن‌های BRCA1 و BRCA2 با مختصات زیر:

BRCA1 (Gen Bank Accession no. NM_007294.1)

BRCA2 (Gen Bank Accession no. NM_000059.1)

نوکلئوتید A از کدون آغازین ترجمه (ATG) به‌عنوان نوکلئوتید ۱+ می‌باشد. ۲- موتاسیون‌های متداول BIC: براساس شماره فهرست‌های (Accession Number) زیر برای ژن‌های BRCA1 و BRCA2 می‌باشد:

BRCA1 (Gen Bank Accession no. U14680)

BRCA2 (Gen Bank Aaccession no. U43746)

نوکلئوتید A از کدون آغازین ترجمه برای ژن BRCA1 در مکان ۱۲۰ و برای ژن BRCA2 در مکان ۲۲۸ قرار دارد.

یافته‌ها

بعد از خون‌گیری و تکثیر DNA و انجام توالی‌یابی مستقیم داده‌های جمع‌آوری‌شده توسط دستگاه ژنتیک آنالیزور ABI3130X با استفاده از نرم‌افزار Sequencing analyzer 5.2 آماده شده و سپس مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت. نتایج آنالیز جهش‌های شناسایی‌شده در بیماران در جداول ۱ و ۲ خلاصه شده است. به‌علاوه از ۱۰۰ نمونه ۲۵ عدد از آن‌ها را که در توالی‌یابی مستقیم جهشی در آن‌ها شناسایی نشد یا جهش‌های شناسایی‌شده از گروه مترادف‌ها و پلی‌مورفیسم‌های شایع بدون اثر بیماری‌زایی بود با هر سه کیت MLPA بررسی شد ولی هیچ‌گونه حذف و مضاعف شدنی در ژن‌های مورد بررسی در این تعداد نمونه شناسایی نشد.

بحث

تاکنون بیش از ۸۰۰ جهش‌کشنده در BRCA1 شناسایی شده است که تعداد کمی از این جهش‌ها در خانواده‌های غیروابسته تکرار شده‌اند. درصد زیادی از این جهش‌ها در بیش از یک یا چند خانواده تکراری نیستند. با وجود آن‌که مطالعات دانشمندان نشان‌دهنده تفاوت‌هایی در خطر سرطان وابسته به جهش‌های متفاوت BRCA1 است، اما هیچ داده تعیین‌شده‌ای برای این نکته قابل دسترس نیست.[11] به‌علاوه، تقریباً ۵۰٪ جهش‌های شناسایی‌شده در توالی‌یابی مستقیم BRCA1 و BRCA2 اهمیت کلینیکال مشخصی ندارند یا واریانت‌های نرمال بدون اهمیت کلینیکی هستند،[12] و تعدادی از آن‌ها احتمالاً بیماری‌زا و همراه با افزایش خطر ابتلای به سرطان پستان می‌باشند. در این تحقیق تعداد محدودی جهش با اثر بیماری‌زایی تعیین گردید. شناسایی جهش‌های جدید با مراجعه به سایت‌های HGMD و BIC و مقایسه نتایج به‌دست آمد. ۲۳ جهش جدید هستند که ۱۹ جهش مربوط به ژن BRCA1 و چهار جهش مربوط به ژن BRCA2 می‌باشد. هشت جهش در ژن BRCA1 یعنی جهش‌های: L1418X, G1738E, L3X, K581X, M1I, IVS2-1 (GC), CD26SmallINS, Ile21Val و دو جهش در BRCA2 یعنی L1522F, 1994insA1995 احتمالاً دارای اثر بیماری‌زایی می‌باشند. بخش عمده جهش‌های شناسایی‌شده حالت پلی‌مورفیسم دارند. پلی‌مورفیسم‌ها جایگزینی‌های آمینواسیدی با اثر

www.SID.ir
Archive of SID

جدول-۱: واریانت و جهش شناسایی‌شده BRCA1 و BRCA2، تغییرات نوکلئوتیدی، تیپ جهش، عوارض کلینیکی و گزارش هر جهش در دنیا واریانت با اهمیت نامعلوم

نام ژن	شماره اگزون	تغییر نوکلئوتیدی	تغییر آمینواسیدی	تیپ جهش	اثر کلینیکی	وضعیت
BRCA1	۲	ATC> GTC	Ile۲۱Val	Missense	polymorphism	گزارش شده
BRCA1	۲	GAG>CAG	Glu۲۳Gln	Missense	polymorphism	جدید
BRCA1	۲	ATT>CTT	Ileu۱۵Leu	Missense	polymorphism	گزارش شده
BRCA1	۲	CCC>CCA	Pro۲۵	Synonymous	polymorphism	گزارش شده
BRCA1	۲	TTA>TGA	Leu۳X	Missense	pathogenic	جدید
BRCA1	۲	ATG>ATA	Met۱Ile	Missense	pathogenic	جدید
BRCA1	۲	CTT>GTT	Le۶Val	Missense	polymorphism	گزارش شده
BRCA1	۲	CGC>TGC	ArgVCys	Missense	Unknown	جدید
BRCA1	۲	ATC>GTC	Ile۲۶Val	Missense	polymorphism	گزارش شده
BRCA1	۲	IVS2+9G>C	بدون تغییر	Splicing	Unknown	جدید
BRCA1	۲	IVS1-20G>A	بدون تغییر	Splicing	Unknown	جدید
BRCA1	۲	IVS1-8A>G	بدون تغییر	Splicing	Unknown	جدید
BRCA1	۳	IVS2-1G>C	بدون تغییر	Splicing	pathogenic	گزارش شده
BRCA1	۲	IVS2+24A>G	بدون تغییر	Splicing	Unknown	جدید
BRCA1	۲	IVS2 (35-39) TTcctatGAT	بدون تغییر	Splicing	Unknown	جدید
BRCA1	۲	INSCD26Small ins GTCCC^ATCTGcatc tg-E2I2- GTAAGTCAG	بدون تغییر	Splicing	pathogenic	گزارش شده
BRCA1	۶	ACG>AGG	ThrVVArg	Missense	Unknown	جدید
BRCA1	۶	IVS5-8A>G	No change	Splicing	Unknown	جدید
BRCA1	۷	IVS7+83(-TT)	No change	Splicing	Unknown	جدید
BRCA1	۸	IVS8 -70(-CATT)	No change	Splicing	Unknown	جدید
BRCA1	۸	TCT>ACT	Ser۱VVThr	Missense	polymorphism	گزارش شده
BRCA1	۱۱	GAA> GAC	Glu۵۷۵Asp	Missense	polymorphism	گزارش شده
BRCA1	۱۱	AAA>TAA	Lys۵۸۱X	Missense	Pathogenic	جدید
BRCA1	۱۱	TTG>CTG	Leu۷۷۱	Synonymous	polymorphism	گزارش شده
BRCA1	۱۱	CTG>CCG	Leu۸۷۱Pro	Missense	polymorphism	گزارش شده
BRCA1	۱۱	CCA>CGA	Pro۹۳۸Arg	Missense	polymorphism	گزارش شده
BRCA1	۱۱	GAA>GGA	Glu۱۰۳۸Gly	Missense	polymorphism	گزارش شده
BRCA1	۱۱	AGC>AAC	Ser۱۰۴۰Asn	Missense	polymorphism	گزارش شده
BRCA1	۱۱	GGT>AGT	Gly۱۱۴۰Ser	Missense	polymorphism	گزارش شده
BRCA1	۱۲	CAG>CAA	Gln۱۳۸۸Gln	Synonymous	polymorphism	جدید
BRCA1	۱۳	IVS13+9 G>C	No change	Splicing	Unknown	جدید
BRCA1	۱۳	AAC>CAC	Asn۱۴۰۳His	Missense	polymorphism	جدید
BRCA1	۱۳	AAC>GAC	Asn۱۴۰۳Asp	Missense	polymorphism	جدید
BRCA1	۱۳	TTA>TGA	Leu۱۴۱۸X	Missense	Pathogenic	جدید
BRCA1	۱۳	TCT>TCC	Ser۱۴۳۶	Synonymous	polymorphism	گزارش شده
BRCA1	۱۶	AGT>GGT	Ser۱۶۱۳Gly	Missense	polymorphism	گزارش شده
BRCA1	۲۰	GAA>GAG	Glu۱۷۳۵	Synonymous	polymorphism	جدید
BRCA1	۲۰	GGA>GAA	Gly۱۷۳۸Glu	Missense	pathogenic	گزارش شده
BRCA2	۵–۷	IVS6-70 T>G	No change	Splicing	Unknown	جدید
BRCA2	۱۱	1994-1995 (InsA): TTACAAAAC → TTA^CAAaAAC	No change	Splicing	pathogenic	جدید
BRCA2	۱۱	GAA>GGA	Glu۱۳۹۱Gly	Missense	polymorphism	جدید
BRCA2	۱۱	CTA>CTG	Leu۱۵۲۱	Synonymous	polymorphism	گزارش شده
BRCA2	۱۱	CTT>ATT	Val۱۸۵۲Ile	Missense	polymorphism	جدید
BRCA2	۱۱	GTG>GTC	Val۲۱۷۱	Synonymous	polymorphism	گزارش شده
BRCA2	۱۱	CTT>TTT	Leu۱۵۲۲Phe	Missense	pathogenic	گزارش شده

Archive of SID

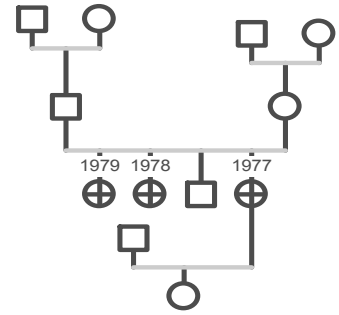
www.SID.ir

جدول-۲: نام‌گذاری جهش‌های شناسایی‌شده با دو روش HUGO-approved systematic nomenclature و BIC traditional

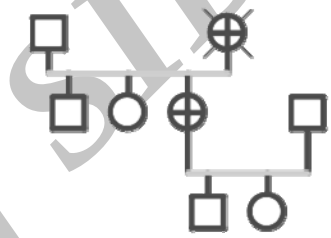
اگزون/ اینترون	Sequence variant	BIC traditional nomenclature	تغییر آمینو اسیدی	تعداد خانواده‌های حامل
BRCA1				
IVS1	c.2- 8G>A	IVS1-8 G>A	بدون تغییر	۱
IVS1	c.2- 20G>A	IVS1-20G>A	بدون تغییر	۱
۲	c.2G>A	122G>A	p.M1I	۲
۲	c.8T>G	127T>G	p.L3Stop	۱
۲	c.17C>G	136C>G	p.L6V	۳
۲	c.20C>T	139C>T	p.R7C	۱۶
۲	c.44A>C	163A>C	p.I15L	۱۹
۲	c.61A>G	161A>G	p.I21V	۱
۲	c.69G>C	188G>C	p.E 23Q	۱۸
۲	c.74>CA	193C>A	p.P25P	۱۷
۲	c.76A>G	195A>G	p.I26V	۲۰
۲	c.76-77ins	195inscatctg	بدون تغییر	۲
۲	c.80- 1G>C	IVS2-1G>C	بدون تغییر	۴
IVS2	c.80+ 9G>C	IVS2+9G>C	بدون تغییر	۴
IVS2	c.80+ 24A>G	IVS2+24A>G	بدون تغییر	۲
IVS2	c.80+ 35inscctat	IVS2(35-39)TTcctatGAT	بدون تغییر	۲
۶	c.349C>G	230C>G	p.Y77R	۱
IVS5	c.212- 8A>G	IVS5-8A>G	بدون تغییر	۱
IVS7	c.441+ 83delTT	IVS7+83(-TT)	بدون تغییر	۳
IVS8	c.488- 70delCATT	IVS8 -70(-CATT)	بدون تغییر	۳
۸	c.550T>A	649T>A	p.S177T	۱
۱۱	c.1725A>T	1844A>T	p.E575D	۲
۱۱	c.1141A>T	1260A>T	p.Lys581Stop	۱
۱۱	c.2311T>C	2430T>C	p.L771L	۹
۱۱	c.2212T>C	2331T>C	p.L871P	۱۱
۱۱	c.2814C>G	2933C>G	p.P938R	۴
۱۱	c.3111A>G	3232A>G	p.E1038S	۲۹
۱۱	c.3119G>A	3238G>A	p.S1040N	۱۰
۱۱	c.3419G>A	3538G>A	p.G1140S	۳۲
۱۲	c.4164G>A	4283G>A	p.E1388E	۲
IVS13	c.4355+ 9G>C	IVS13+9 G>C	بدون تغییر	۱
۱۳	c.4207A>C	4326A>C	p.N1403H	۲
۱۳	c.4207A>G	4326A>G	p.N1403D	۱۷
۱۳	c.4253T>G	4372T>G	p.L1418X	۱
۱۳	c.4301T>C	4421T>C	p.S1436S	۲۷
۱۶	c.4837A>G	4956A>G	p.S1613G	۹
۲۰	c.5205A>G	5324A>G	p.E1735E	۲
۲۰	c.5213G>A	5332G>A	p.G1738E	۵
BRCA2				
IVS6	c.2600- 70T>G	IVS6-70T>G	بدون تغییر	۱
۱۱	c.4182A>G	4410A>G	p.E1391G	۱
۱۱	c.4770A>G	4542A>G	p.L1521L	۱
۱۱	c.4771C>T	4543C>T	p.L1522F	۳
۱۱	c.5533C>T	5761C>T	p.V1852I	۶
۱۱	c.5963_5964insA	6191insA	p.1994	۴
۱۱	c.6494G>C	6722G>C	p.V2171V	۶

Archive of SID

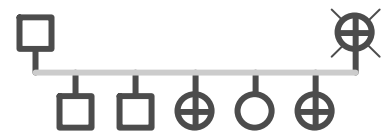
www.SID.ir



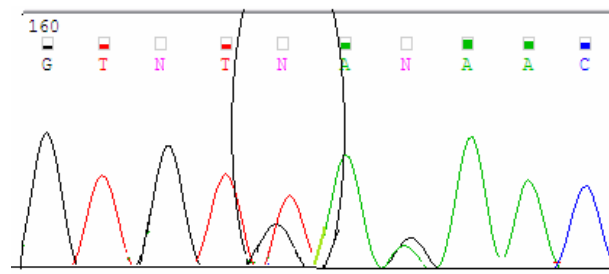
شجره-۱: سه دختر خانواده در سنین ۳۱، ۳۲ و ۳۳ سالگی به سرطان پستان مبتلا شده بودند، هر سه خواهر دارای جهش c.4253T>C(4373T>C) در ژن BRCA1 هستند.



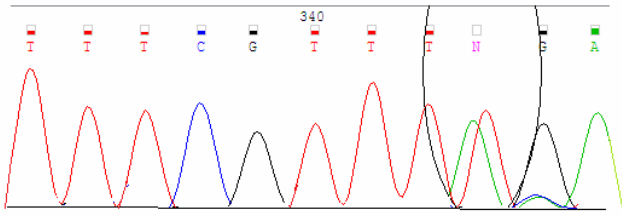
شجره-۲: شناسایی جهش بیماری‌زای c.1141A>T(1260A>T) در دو مبتلا در یک خانواده



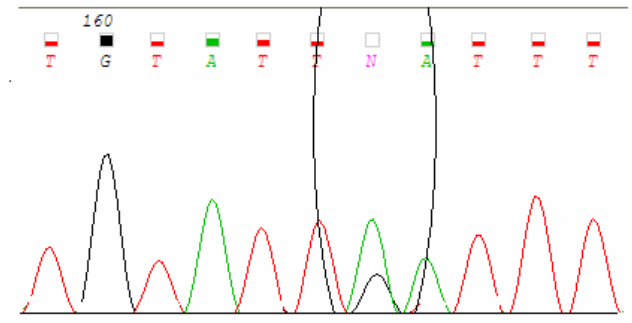
شجره-۳: جهش شناخته‌شده بیماری‌زای c.8T>G(127T>G) در دو دختر خانواده (خون مادر در دسترس نبود)



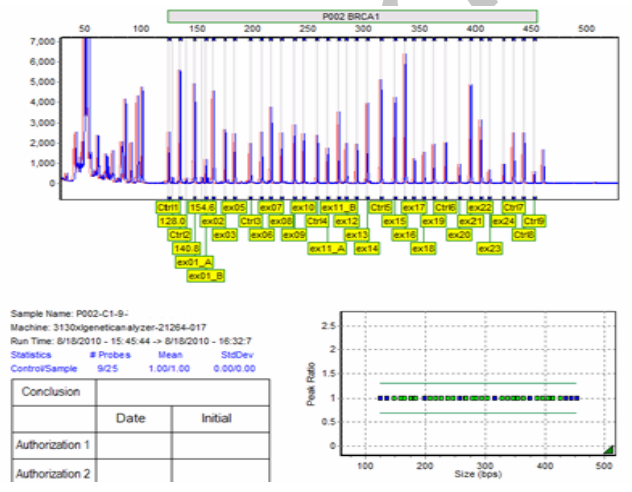
شکل-۱: تبدیل T→G (TTA>TGA) باعث خاتمه زودرس در کدون شماره ۱۴۱۸ ژن BRCA1 شده است.



شکل-۲: تبدیل A→T (AAA>TAA) باعث خاتمه زودرس در کدون شماره ۵۸۱ ژن BRCA1 شده است.



شکل-۳: تبدیل T→G (TTA>TGA) باعث خاتمه زودرس در کدون شماره ۳ ژن BRCA1 می‌شود.



شکل-۴: نتایج آنالیز MLPA هیچ‌گونه حذف یا مضاعف شدنی را برای ژن BRCA1 در این نمونه بیمار نشان نمی‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir

عملی غیرآشکار هستند و تقریباً با فراوانی مشابهی در افراد کنترل مشاهده می‌شوند. اثر بیماری‌زایی این تیپ از جهش‌ها در جمعیت کمتر از دو درصد است.[۱۳] این گروه از جهش‌ها را ما با مقایسه‌ای که در سایت Polyphen انجام دادیم شناسایی کردیم که در جداول ۱ و ۲ لیست شده‌اند. از جهش‌های شناسایی‌شده با اثر بیماری‌زایی، جهش‌های L3X, L1418X و K581X می‌باشد. در این تیپ از جهش‌ها یک جایگزینی تک نوکلئوتیدی در سطح DNA منجر به خاتمه زودرس در ترجمه پروتیین BRCA1 گشته و لذا یک پروتیین کوتاه و ناکارآمد را ایجاد می‌نماید.[۱۴] سه دختر یک خانواده (شجره ۱) در سنین ۳۱ و ۳۲ و ۳۳ سالگی به سرطان پستان مبتلا شده بودند. در خانواده پدری و مادری هیچ‌گونه سابقه‌ای از این بیماری نبود تنها سابقه پروستات مردان در خانواده پدری بالا بود. در بررسی مشخص شد هر سه خواهر جهش c.4253T>C(4373T>C) را در ژن BRCA1 دارند که منجر به پایان یافتن ترجمه پروتیین در لوسین ۱۴۱۸ (p. Leu1418X) (شکل ۱) شده است. مادر خانواده این جهش را نداشت و خون پدر و عمه‌ها در دسترس نبودند، لذا ما نمی‌توانیم با اطمینان بگوییم جهش ارثی است ولی ممکن است علت جهش در پدر باشد و از آنجا که مردان با احتمال کم‌تر اثر جهش را به‌صورت بیماری بروز می‌دهند پدر مبتلا گزارش نشد و یا علت جهش در سلول‌های زایشی (تخمدان‌ها) وی به‌صورت موزاییک باشد. در یک خانواده (شجره ۲) مادر به علت ابتلای به سرطان پستان و تخمدان فوت نموده بود. چند سال بعد دختر او که ازدواج نموده و صاحب دو فرزند است در سن ۳۷ سالگی به سرطان پستان مبتلا می‌شود. در بررسی در این خانم جهش بیماری‌زای c.1141A>T(1260A>T) در ژن BRCA1 که منجر به p.Lys581X می‌شود، شناسایی شد، این جهش را نتوانستیم در دختر این خانم به‌علت پایین بودن سن او ردیابی کنیم (شکل ۲). در یک خانواده (شجره ۳) با مادر و دو دختر مبتلا که یکی از دختران به سرطان پستان دوطرفه (Bilateral) مبتلا شده بود، جهش بیماری‌زای c.8T>G(127T>G) که منجر به p.Leu3 X (شکل ۳) می‌شود، شناسایی شد. سه جهش ذکر شده هر کدام در یک درصد خانواده‌ها وجود داشتند و در کل سه درصد خانواده‌ها را به خود اختصاص دادند. در کلیه اعضای بیمار پنج خانواده جهش بدمعنی G1738E (c.5213G>A, 5331G>A) شناسایی شد (پنج درصد موارد). در آزمایشات خارج بدن موجود زنده یعنی در لوله آزمایش مشخص شده که این جهش باعث از دست رفتن عملکرد پروتیین BRCA1 می‌شود.[۱۵] گلیسین تغییر یافته در سطح ساختار مارپیچی ناحیه Linker بخش BRCT وجود دارد و بنابراین جهش در آن ممکن است میان‌کنش یا اثر پروتیین را تخریب کند.[۱۶] این جهش در سال ۲۰۰۰،[۱۷] در چهار خانواده یونانی و در سال ۲۰۰۴ نیز توسط Abkevich به‌عنوان جهش بیماری‌زا در چند بیمار گزارش شده است.[۱۸] بر اساس اطلاعات حاصل از تاریخچه خانوادگی افراد و عدم حضور جهش در حاملین غیر بیماری‌زا و ۵۰ نفر از افراد کنترل ما نتیجه گرفتیم که این جهش نیز بیماری‌زا است. دخول (1994insA1995) در ژن BRCA2 در سه خانواده (دو درصد موارد) مشاهده شد، این نوع دخول قالب خواندن را عوض می‌کند و ایجاد پروتیین ناکارآمد می‌کند به‌نظر این جهش نیز بیماری‌زا باشد. جهش بدمعنی Ile21Val که در یک خانم جوان مبتلا به سرطان پستان (یک درصد موارد) شناسایی‌شده، اولین‌بار به‌وسیله Sakayori در سال ۲۰۰۳ به‌عنوان جهش مستعدکننده ابتلای به سرطان پستان، گزارش گردید.[۱۹] مکان این جهش بر روی اگزون دوم است و گزارشات از HGMD آن‌را به‌عنوان جهش بیماری‌زا تعیین کرده است. این جهش در هیچ‌کدام از افراد گروه کنترل شناسایی نشد. دخول CD26 Small INS GTCCC^ATCTG-E212catctgGTAAGTCAGC جهشی است که قبلاً به‌عنوان جهش مستعدکننده سرطان تخمدان به‌وسیله Tworek گزارش گردیده است.[۲۰] این جهش در سه خانواده مشاهده شد (سه درصد موارد) و در هیچ‌کدام از افراد گروه کنترل شناسایی نشد. جهش قالب خواندن پروتیین را به‌هم می‌ریزد، لذا ویژگی‌های پروتیین هم از لحاظ ساختاری و هم فیزیولوژیکی تغییر می‌کند.[۲۰] با توجه به این مسئله ما نتیجه گرفتیم که این جهش نیز احتمالاً بیماری‌زا است. نوترتیبی IVS2-1 (G>C) اولین‌بار در سال ۲۰۰۵ توسط Kroiss در بیماران مبتلای به سرطان پستان و تخمدان مشاهده شد و به‌عنوان یک مکان آلترناتیو اسپلایسینگ که پردازش ناصحیح ژن را باعث می‌شود معرفی شده است.[۲۱] این جهش در یک درصد خانواده‌های مورد بررسی شناسایی شد ولی در هیچ‌کدام از افراد گروه کنترل مشاهده نگردید. جهش بدمعنی Leu1522Phe در ژن BRCA2 که در یکی از بیماران با ۳۲ سال سن در زمان ابتلا شناسایی شد (یک درصد موارد)، اولین‌بار در سال ۱۹۹۷ توسط Castilla گزارش گردیده است.[۲۲] مکان 1524 محل اتصال ATM به BRCA1 است و جزو نقاط داغ در این ژن

www.SID.ir
Archive of SID

می‌باشد، و این جهش در نزدیکی این مکان است. جهش در هیچ‌کدام از افراد گروه کنترل شناسایی نشد. در مورد بیماری‌زا بودن این جهش نمی‌توان با اطمینان نظر داد، ولی با مقایسه‌ای که در سایت Polyphen انجام شد احتمالاً این جهش اثر بیماری‌زایی دارد. تعدادی نوترتیبی و حذف در ناحیه اینترون که قبلاً گزارش نشده‌اند در تعدادی از بیماران شناسایی شد (۲۲ بیمار)، این بازآرایی‌ها به‌قرار زیر هستند:

IVS7+83(-TT), IVS8-70(-CATT), IVS2+9(G>C), IVS1-20(G>A), IVS2+24(A>G), IVS13+9G>C, IVS5-8A>G IVS1-8(A>G) در ژن BRCA1 و IVS6-70T>G در ژن BRCA2. ما مکان‌های آلترناتیو اسپلایسینگ را بررسی نمودیم و هیچ نوع مکان غیرعادی را در این ناحیه مشاهده ننمودیم، ولی از آنجاکه تغییراتی مانند جایگزینی‌ها و حذف‌های ناحیه اینترون گاهی منجر به پردازش (Splicing) ناصحیح اگزون‌ها و حتی حذف اگزون ماقبل می‌گردند، ما این گروه از بازآرایی‌ها را جزو واریانت‌های با اثر و اهمیت نامشخص قرار دادیم. برای تائید بیماری‌زا بودن این جهش‌ها نیاز به بررسی‌های بیشتر و تحقیقات Silico analysis است.

مکان جانشینی بدمعنی Pro938Arg در جایگاه مهمی از ژن است. این جهش قبلاً گزارش نشده و ما آن را در هیچ‌کدام از افراد گروه کنترل شناسایی نکردیم ولی در چهار درصد خانواده‌ها شناسایی شد. مطالعات جمعیتی بیشتری برای شناسایی اثر این جهش‌ها مورد نیاز است لذا این جهش را جزو واریانت‌های با اثر و اهمیت نامشخص قرار دادیم. جهش بدمعنی 3538G>A در ۳۲ بیمار و هم‌زمان در هشت نفر از افراد گروه کنترل شناسایی شد. در ارتباط با مکان این جهش جدید Gly1140Ser(G3538A) بر روی پروتیین BRCA1، باید گفت نقاط داغ (Hot point) در حد فاصل ناحیه دومین حلقوی و BRCT، مکان‌های S988 محل اتصال CHK2 و S1387/1423/1524 محل اتصال ATM به BRCA1 است[۲۳] و لذا این جهش جدید شناسایی‌شده جزو نقاط داغ نیست و احتمالاً یک پلی‌مورفیسم می‌باشد. شیوع بالای این جهش و هم‌چنین جهش از قبل گزارش‌شده در دنیا یعنی Glu1038Gly در افراد بیمار مورد بررسی و ۲۰ درصد جمعیت کنترل در بررسی حاضر احتمالاً نشان‌دهنده این است که هاپلوتیپی از ژن BRCA1 که به‌وسیله این دو آلل تعیین می‌شود در حاملین خانم که تاکنون به سرطان مبتلا نشده‌اند، یک زنگ‌خطر است و این افراد بایستی احتیاط‌های لازم را به‌عمل آورند. جهش‌های بدمعنی Leu871Pro, Ser1613Gly به‌ترتیب در ۹ و ۱۱ بیمار و خانواده‌های آن‌ها شناسایی شد. جهش Ser1613Gly در سال ۲۰۰۵ به‌عنوان جهش مستعدکننده ابتلای به سرطان تخمدان معرفی شده است.[۲۴] در مطالعات گذشته در دنیا وابستگی (Linkage) این دو مکان با آلل‌های Glu1038Gly, Ser1040Asn بررسی شده است.[۲۵] Dunning فراوانی این چهار پلی‌مورفیسم در ژن BRCA1 را در تعداد زیادی از کیس‌های سرطان پستان و تخمدان و افراد کنترل مورد بررسی قرار داد و نتیجه گرفت که به‌علت عدم تعادل پیوستگی (Linkage disequilibrium)، چهار مکان ایجاد شده فقط سه هاپلوتیپ با فراوانی بیش‌تر از ۱/۳٪ دارد. مشترک‌ترین هاپلوتیپ‌ها فراوانی ۵۷٪ تا ۳۲٪ داشته و این فرکانس‌ها تفاوت برجسته میان گروه کنترل و بیمار ندارند.[۲۵] شیوع هم‌زمان جهش‌های بدمعنی Leu871Pro, Glu1038gly, Ser1613Gly, Gly1140Ser متعلق به ژن BRCA1 در تعدادی از بیماران ۳۰ تا ۳۵ سال در این مطالعه و مقایسه آن با نتایج حاصل از افراد گروه کنترل به‌ظاهر نشان می‌دهد شاید هاپلوتیپی از ژن BRCA1 که توسط این آلل‌ها تعیین شده دارای یک اثر بیماری‌زا باشد، اما وجود آلل‌های منفردی از Gly1140Ser, Glu1038Gly, Ser1613Gly یا هم‌زمان وجود آلل‌های Glu1038Gly, Gly1140Ser در حاملین باعث استعداد به سرطان پستان و تخمدان نمی‌گردد، اگرچه داده‌های بیش‌تری برای تعمیم این نظریه مورد نیاز است. 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 دوطرفه و خواهر دیگر علاوه بر سرطان یکی از پستان‌ها، فیبروم تخمدان نیز داشت هم‌زمان جهش‌های Glu1038gly، Gly1140Ser، Ser1613Gly در ژن BRCA1 و جهش Glu1391Gly در ژن BRCA2 یافت شد. لذا نمی‌توان با اطمینان گفت که جهش جدید Glu1391Gly به‌تنهایی استعداد ابتلای به سرطان پستان را در حاملین افزایش می‌دهد و مطالعات بیشتر مورد نیاز است. در حداقل ۱۶ خانواده از کل خانواده‌های مورد بررسی جایگزینی‌های Pro25Pro, Ile26val, Glu23Gln, Ile15Ieu, Arg7Cys در ژن BRCA1 به‌طور هم‌زمان مشاهده شد. احتمالاً همان پیوستگی که در مکان‌های ژنی Leu871Pro, Glu1038gly, Ser1613Gly, Gly1140Ser وجود دارد در این مکان ژنی هم مشاهده می‌شود، شاید این دو هاپلوتیپ

Archive of SID
www.SID.ir

مستعدکننده سرطان پستان در ایران باشند. در این ارتباط مطالعات مستقل مورد نیاز است. همه این‌ها جایگزینی‌های پلی‌مورفیک هستند و اثر بیماری‌زایی ندارند ولی شاید در کنار هم تغییر پر اهمیتی بر ساختار پروتیین داشته باشند. در میان واریانت‌های تعیین‌شده تعدادی از آن‌ها تحت عنوان مترادف‌ها (Synonymous) هستند. این‌ها عبارتند از: Glu1388Glu, Leu771Leu, Glu1735Glu, Ser1436Ser, Pro25Pro در ژن BRCA1 و Leu1521Leu, Val2171Val در ژن BRCA2. این حالت‌ها جایگزینی‌های تک نوکلئوتیدی هستند که تغییری در نوع اسید آمینه ایجاد نمی‌کنند، تاکنون هیچ اثر بیماری‌زایی در ارتباط با این‌گونه تغییرات گزارش نشده است.[۲۶] جهش c.349C>G (Thr77Arg) در یک خانواده مشاهده شد. با توجه به نوع جایگزینی آمینو اسیدی به‌نظر می‌رسد بایستی این جهش روی ساختار پروتیین اثر بگذارد، البته مکان جهش جزو نقاط داغ نیست، لذا ما این جهش را نیز جزو جهش‌های با اثر نامشخص طبقه‌بندی نمودیم. p.N1403H، p.S177T، p.E575D و p.N1403D در ژن BRCA1 که قبلاً در دنیا گزارش نشده‌اند به‌ظاهر جزو اشکال پلی‌مورفیسم هستند، چون نوع تغییر آمینو اسیدی تغییر آن‌چنانی بر ساختار پروتیینی ایجاد نمی‌کند. اسید آسپاراتیک، گلوتامین و آسپاراژین و هم‌چنین سرین و ترئونین در گروه‌های یکسانی از آمینو اسیدها با خواص یکسان قرار دارند و در ضمن این نقاط جزو مناطق حساس ژن نیستند. با این وجود این جایگزینی‌ها در سایت Polyphen نیز بررسی شد و بر اساس نتایج این جایگزینی‌ها نیز در گروه پلی‌مورفیسم‌ها قرار گرفت. به‌طور کلی در این مطالعه از ۱۰۰ خانواده مورد بررسی در حداقل ۷۰ مورد اشکال مختلف جهش اعم از بیمارزا، پلی‌مورفیسم، باز آرایی‌های نواحی اینترون و مترادف مشاهده شد، که بیش‌تر این جایگزینی‌ها پلی‌مورفیسم‌های بدون اثر بیماری‌زایی، بازآرایی‌های نواحی اینترون و مترادف بودند. از کل جهش‌ها ۱۰ عدد از آن‌ها احتمالاً اثر بیماری‌زایی دارند و خانواده‌های با جهش‌های بیماری‌زا ۱۶ درصد کل خانواده‌های مورد بررسی را به خود اختصاص دادند. به‌علاوه از تعداد کل جایگزینی‌ها و بازآرایی‌ها که ۴۲ عدد بود، ۸۰ درصد آن‌ها مربوط به ژن BRCA1 و ۲۰ درصد ناشی از ژن BRCA2 بود. به‌طور کلی جهش‌های پرنفوذ با وراثت مندلی برای شناسایی آسان هستند و بیش‌تر مکان ژن‌ها که وابسته به یک سطح بالایی از خطر هستند، هم‌اکنون شناسایی شده‌اند. در مقایسه شناسایی آلل‌های با نفوذ پایین‌تر یا ظهور دیرهنگام سخت است. در غیاب آگاهی از تعداد ژن‌هایی که فرد را مستعد به سرطان می‌کنند، مطالعات آماری قادر است اثرات شرایط محیطی و تغییرات ژنتیکی برای ایجاد تفاوت در خطر سرطان را آنالیز کند،[۲۶] زیرا تعدادی از جهش‌ها در نژادهای خاصی شیوع بالا دارند در ضمن اثرات محیطی، جغرافیایی و سایر عوامل بر شیوع و نوع واریانت جهش‌های BRCA1 و BRCA2 در میان جوامع متفاوت اثر دارند.[۲۷] از ۲۵ نمونه‌ای که با هر سه کیت MLPA بررسی شد هیچ‌گونه حذف بزرگ و یا مضاعف شدنی در هیچ نمونه‌ای شناسایی نشد. در مورد میزان حذف‌های بزرگ این ژن در جمعیت ایران با این تعداد نمونه فعلاً نمی‌توانیم نظری بدهیم و تحقیقات بیش‌تر مورد نیاز است. در شکل ۴ نتیجه یک آنالیز که عدم حذف را نشان می‌دهد مشاهده می‌شود.

سپاسگزاری: این تحقیق با حمایت مالی مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر و آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی صورت گرفت. از کلیه پزشکان و کادرهای درمانی مراکز همکار تشکر می‌شود. از همکاری‌های مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران تشکر می‌شود. از پرسنل آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی و مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر که در این تحقیق به ما کمک کردند تشکر می‌کنیم. هم‌چنین از کلیه بیماران و اعضای خانواده‌های آن‌ها برای در اختیار گذاشتن نمونه خون و اطلاعات پزشکی سپاسگزاریم.

References

1. Antoniou AC, Spurdle AB, Sinilnikova OM. Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet* 2008;82(4):937-48.
2. Dong Y, Hakimi MA, Chen X, Kumaraswamy E, Cooch NS, Godwin AK, et al. Regulation of BRCC, a holoenzyme complex containing BRCA1 and BRCA2, by a signalosome-like subunit and its role in DNA repair. *Mol Cell* 2003;12(5):1087-99.
3. De Silva W, Karunanayake EH, Tennekoon KH, Allen M, Amarasinghe I, Angunawala P, et al. 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.
4. Eccles DM, Pichert G. Familial non-BRCA1/BRCA2-associated breast cancer. *Lancet Oncol* 2005;6(9):705-11.
5. Teng LS, Zheng Y, Wang HH. BRCA1/2 associated hereditary breast cancer. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008;9(2):85-9.

Archive of SID
www.SID.ir

6. Scully R, Ganesan S, Brown M, De Caprio JA, Cannistra SA, Feunteun J, et al. Location of BRCA1 in human breast and ovarian cancer cells. *Science* 1996;272(5258):123-6.
7. Scully R, Ganesan S, Vlasakova K, Chen J, Socolovsky M, Livingston DM. Genetic analysis of BRCA1 function in a defined tumor cell line. *Mol Cell* 1999;4(6):1093-9.
8. Shakya R, Szabolcs M, McCarthy E, Ospina E, Basso K, Nandula S, et al. The basal-like mammary carcinomas induced by Brca1 or Bard1 inactivation implicate the BRCA1/BARD1 heterodimer in tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(19):7040-5.
9. Capalbo C, Ricevuto E, Vestri A, Ristori E, Sidoni T, Buffone O, et al. BRCA1 and BRCA2 genetic testing in Italian breast and/or ovarian cancer families: mutation spectrum and prevalence and analysis of mutation prediction models. *Ann Oncol* 2006;17 Suppl 7:34-40.
10. Keshavarzi F, Javadi GR, Nafissi N, Akbari ME, Yassaee VR, Sharafi Farzad M, Zeinali S. BRCA1 and BRCA2 Genetic Testing in Breast and/or Ovarian Cancer Families in Iran. *Yakhteh Med J* 2010;12(3):329-40.
11. Chen L, Nievera CJ, Lee AY, Wu X. Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *J Biol Chem* 2008;283(12):7713-20.
12. Teng LS, Zheng Y, Wang HH. BRCA1/2 associated hereditary breast cancer. J Zhejiang Univ Sci B 2008;9(2):85-9.
13. Lin C, Yang L, Tanasa B, Hutt K, Ju BG, Ohgi K, et al. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. Cell 2009;139(6):1069-83.
14. Lee SM, Park JH, Park HJ. Breast cancer risks in Korean women. A literature review. Int Nurs Rev 2008;55(3):355-9.
15. Vallon-Christersson J, Cayanan C, Haraldsson K, Loman N, Bergthorsson JT, Brøndum-Nielsen K, et al. Functional analysis of BRCA1 C-terminal missense mutations identified in breast and ovarian cancer families. *Hum Mol Genet* 2001;10(4):353-60.
16. Huyton T, Bates PA, Zhang X, Sternberg MJ, Freemont PS. The BRCA1 C-terminal Domain: structure and function. *Mutat Res* 2000;460(3-4):319-32.
17. Konstantopoulou I, Kroupis C, Ladopoulou A, Pantazidis A, BoumbaD, Lianidou ES, et al. BRCA1 mutation analysis in breast/ovarian cancer families from Greece. *Hum Mutat* 2000;16(3):272-3.
18. Abkevich V, Zharkikh A, Deffenbaugh AM, Frank D, Chen Y, Shattuck D, et al. Analysis of missense variation in human BRCA1 in the context of interspecific sequence variation. *J Med Genet* 2004;41(7):492-507.
19. Sakayori M, Kawahara M, Shiraishi K, Nomizu T, Shimada A, Kudo T, et al. 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.
20. Tworek H, Peng R, Fetzer S, Werness BA, Piver MS, Allen HJ, et al. Mutation analysis of BRCA1, TP53, and KRAS2 in ovarian and related pelvic tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;112(2):105-18.
21. Kroiss R, Winkler V, Bikas D, Fleischmann E, Mainau C, Frommlet F, et al; 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.
22. Castilla LH, Couch FJ, Erdos MR, Hoskins KF, Calzone K, Garber JE, et al. Mutations in the BRCA1 gene in families with early-onset breast and ovarian cancer. *Nat Genet* 1994;8(4):387-91.
23. Starita LM, Parvin JD. The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(3):345-50.
24. Majdak EJ, De Bock GH, Brozek I, Perkowska M, Ochman K, Debniak J, et al. 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.
25. Dunning AM, Chiano M, Smith NR, Dearden J, Gore M, Oakes S, et al. Common BRCA1 variants and susceptibility to breast and ovarian cancer in the general population. *Hum Mol Genet* 1997;6(2):285-9.
26. Hayes F, Cayanan C, Barillà D, Monteiro AN. Functional assay for BRCA1: mutagenesis of the COOH-terminal region reveals critical residues for transcription activation. *Cancer Res* 2000;60(9):2411-8.
27. Tommasi S, Crapolicchio A, Lacalamita R, Bruno M, Monaco A, Petroni S, et al. 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.

Archive of SID

www.SID.ir

Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 9, December 2011: 559-570

The occurrence and contribution of germline BRCA1/2 sequence alterations in Iranian patients with breast cancer

Fatemeh Keshavarzi Ph.D.[1]
Nahid Nafissi Ph.D.[2]
Fereydoun Sirati Ph.D.[3]
Mohammad Sadegh Fallah Ph.D.[4]
Reza Salehi M.Sc.[5]
Zahra Harriry B.Sc.[6]
Zahra Shahab Movahead B.Sc.[4]
Mariam Vahidi B.Sc.[4]
Zohre Sharifi B.Sc.[4]
Maryam Sharafi Farzad M.Sc.[4]
Sirous Zeinali Ph.D.[4,7*]

1- Department of Biology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.
2- Department of Surgery, Cancer Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Department of Surgery, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4- Genetics Laboratory of Dr. Zeinali, Kawsar Human Genetics Research Center, Tehran, Iran.
5- Department of Mathematics, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.
6- Department of Surgery, Mehrad Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
7- Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Dept. of Molecular Medicine, Pasteur Institute of Iran, No. 19, 12th Farvardin, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-88939140
E-mail: zeinali@kawsar.ir

Received: May 16, 2011 Accepted: July 13, 2011

Abstract

Background: Breast cancer is the most common form of hereditary cancer worldwide and is an important cause of morbidity and mortality. Approximately 5–10% of breast and ovarian cancers are due to the highly penetrating germline mutations in cancer predisposing genes. Two genes, BRCA1 and BRCA2, account for at least half of these cases. The demand for BRCA1 and BRCA2 mutation screening is rapidly increasing as their identification will affect the medical management of people at increased risk for the disease. Therefore, the aim of this study was to investigate *BRCA1/2* mutations in 100 high risk Iranian families.

Methods: One hundred families who met the minimal risk factors for breast/ovarian cancer were screened among the families referred to Kawsar Human Genetics Research Center for the diseases in 2009-2011. The entire coding sequences and each intron/exon boundaries of *BRCA1/2* genes were screened for by direct sequencing and MLPA in both patients and the controls.

Results: In the present study, we could detect the following novel mutations: p.Gly1140Ser, p.Ile26Val, p.Leu1418X, p.Glu23Gln, p.Leu3X, p.Asn1403His, p.Asn1403Asp, p.Lys581X, p.Pro938Arg, p.Thr77Arg, p.Leu6Val, p.Arg7Cys, p.Leu15Ile, p.Ser177Thr, IVS7+83(-TT), IVS8 -70(-CATT), IVS2+9(G>C), IVS1-20(G>A), IVS1-8(A>G), p.Met1Ile, IVS2+24(A>G), IVS5-8 (A>G), IVS2(35-39)TTcctatGAT, IVS13+9 G>C in BRCA1 and p.Glu1391Gly, p. Val1852Ile, IVS6-70(T>G), 1994-1995 (InsA) in *BRCA2*.

Conclusion: Ten mutations seemed to be pathogenic and the disease-causing mutations were seen in 16% of the families. In addition, from the total number of substitutions and reassortments (42), 80% related to BRCA1 and 20% to mutations in BRCA2 genes.

Keywords: BRCA1/ genes, breast cancer, familial cancer, Iran.

Archive of SID
www.SID.ir