Archive of SID

ردیابی جهش در اگزون‌های ۳، ۱۰ و ۱۲ ژن BRCA1 در ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان فامیلی

حسین تیموری* ، دکتر پروین مهدی‌پور** ، دکتر مرتضی عطری*** ، محمدرضا میرزایی****

چکیده

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین علل مرگ در میان زنان مبتلا به سرطان می‌باشد. بیش از نیمی از خانواده‌های دارای سرطان پستان فامیلی در ژن مستعدکننده به سرطان، معروف به BRCA1 جهش نشان می‌دهند. در این مطالعه نمونهٔ خون ۳۰ زن مبتلا به سرطان پستان که سابقه فامیلی در بروز بیماری داشتند، مورد بررسی قرار گرفت. روش غیررادیواکتیو PCR-SSCP به منظور تشخیص جهش‌زایی در اگزون‌های ۳، ۱۰ و ۱۲ ژن BRCA1 مورد استفاده واقع شد که منجر به شناسایی دو جهش در اگزون ۳ و دو جهش در اگزون ۱۲ گردید. در اگزون ۱۰ جهشی شناسایی نشد. تجزیه و تحلیل آماری به دلیل تعداد کم جهش شناسایی شده، بین وجود جهش و مشخصات آسیب‌شناختی رابطه معنی‌داری نشان نداد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد این سه اگزون کمتر دچار جهش زایشی می‌شوند. با بررسی مطالعات مشابه در دیگر کشورها و همخوانی نتایج این مطالعه با آنها، می‌توان نتیجه گرفت که جهش در اگزون‌های ۳، ۱۰ و ۱۲ کمتر اتفاق می‌افتد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، جهش، BRCA1، SSCP

*- عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان - نشانی: دانشکده پزشکی گرگان، تلفن: ۶-۲۲۳۱۶۵۵-۰۱۷۱

- عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه ژنتیک انسانی*- عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی - انستیتو کانسر

****- عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان در زنان می‌باشد. تقریباً ۱۰درصد زنان به درجات مختلفی از سرطان پستان ، دچار می‌شوند. سرطان پستان را از نظر استعداد ژنتیکی به سه دسته سرطان پستان تک‌گیر ، فامیلی و ارثی تقسیم می‌کنند. مواردی از سرطان راکه خویشاوندان درجه یک و دو فرد شاخص[1] مبتلا می‌شوند و از تعریف سرطان پستان ارثی تبعیت نمی‌کنند ، در دسته سرطان پستان فامیلی قرار می‌دهند. ۲۳ درصد مبتلایان در این دسته قرار می‌گیرند (۱).

دو ژن BRCA1[2] و BRCA2[3] مهم‌ترین ژن‌های دخیل در سرطان پستان می‌باشند (۲). جهش در ژن BRCA1 در ۵۰درصد موارد سرطان پستان فامیلی مشاهده می‌شود. این رقم در مبتلایان به سرطان پستان ارثی[4] به ۸۵ درصد می‌رسد. از این رو ژن BRCA1 به عنوان ژن مستعد کننده یا پیش‌آمادگی سرطان پستان ارثی به حساب می‌آید (۳).

BRCA1 یک ژن سرکوبگر توده[5] می‌باشد. این ژن در جایگاه ۱۷q۲۱ قرار گرفته ، طولی برابر ۱۰۰ کیلوباز داراست و شامل ۲۲ اگزون کدکننده و ۱۲ اگزون غیرکدکننده (اگزون‌های ۱ و ۲۴) می‌باشد (۴). عملکرد آن هنوز کاملاً مشخص نیست ولی در مقالات مختلف دخالت در ترمیم DNA (۵) ، تنظیم چرخهٔ سلولی (۶)، تمایز و تکامل جنین (۷) و عامل نسخه‌برداری (۸) به آن نسبت می‌دهند.

از میان اگزون‌های کدکننده ، اگزون ۱۱ با طولی برابر ۳/۴ کیلوباز بخش اعظم ژن را شامل می‌شود و بخش‌های راهبردی پروتئین مانند NLS[6] ، محل اتصال RAD۵۱ وگرانین را در خود جای داده است. اگزون ۳ حدود (bp) ۳۱۵ جفت باز طول دارد و در ساختمان RF[7] شرکت می‌کند. اگزون ۱۰ با طولی برابر (bp) ۲۲۰ جفت باز در ناحیه مجاور NLS قرار دارد. اگزون ۱۲ نیز بعد از ناحیه اتصال RAD۵۱ قرار گرفته و حدود (bp) ۲۲۰ جفت باز طول دارد (۹).

در این مطالعه ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان فامیلی[8] به منظور تشخیص جهش زایشی در اگزون‌های ۳ ، ۱۰ و ۱۲ به روش غیرراديواکتیو SSCP[9] - PCR[10] مورد بررسی قرار گرفتند.

وسایل و روش‌ها

افراد مورد بررسی زنان بستری در بخش سرطان بیمارستان امام خمینی و بیمارستان دی تهران بودند که برای معالجه سرطان پستان مورد جراحی قرار گرفتند. ابتدا بیماران به وسیلهٔ متخصص ژنتیک مشاوره ، و سپس از میان آنها ۳۰ بیمار که سابقه عود بیماری در خویشاوندان درجه یک و دو داشتند ، انتخاب شدند. مشخصات آسیب‌شناختی بیماران از پرونده‌های آنها استخراج گردید. نمونه‌های خون آنها در لوله‌های حاوی EDTA به آزمایشگاه انتقال یافت و به روش ایزوپروپانل استخراج DNA آنها صورت گرفت. DNA خالص در بافر TE در دمای ۴°C نگهداری گردید. اگزون‌های ۳ ، ۱۰ و ۱۲ افراد مورد مطالعه با روش PCR (۲۵ سیکل ، ۹۴°C یک دقیقه ، ۵۶°C چهل و پنج ثانیه و ۷۲°C سی ثانیه) تکثیر شدند. جدول ۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده راکه آژانس بین المللی سرطان (IARC)[11] در اختیار مجریان طرح قرار داده بود ، نشان می‌دهد.

محصولات PCR به منظور تایید واکنش ، روی ژل آگارز ۲درصد الکتروفورز و سپس نمونه‌ها برای تشخیص جهش با تکنیک SSCP تجزیه و تحلیل شدند. ماتریکس ژل SSCP پلی‌اکریل آمید ودریک مورد MDE بود و از رنگ‌آمیزی نقره[12] برای رنگ‌آمیزی ژل کمک گرفته شد. TBE به عنوان بافر الکتروفورز استفاده گردید و هر ژل با ولتاژ ۷۰ به مدت ۲۰ ساعت الکتروفورز شد. تست دقیق فیشر (Fisher exact test) برای تحلیل داده‌ها بکار گرفته شد.

---

1 - Proband
2 - Breast cancer 1
3 - Breast cancer 2
4 - Hereditary Breast Cancer
5 - Tumour Suppressor Gene
6 - Nuclear Localization Sequences (NLS)
7 - Ring Finger(RF)
8 - Familial Breast Cancer
9 - Single Stranded Conformation Polymorphism
10 - Polymerase Chain Reaction
11 - International Agency for Research on Cancer (IARC)
12 - Silver staining

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای اگزون ۳، ۱۰ و ۱۲

Gene	Exon	Primer	Sequence
BRCA1	3	Forward	5'TCCTGACACAGCAGACATTTA-3
		Reverse	5'TTGGACTTTTCGTTCTCACTTA3
	10	Forward	5'TGGTCAGCTTTCTGTAATCG-3
		Reverse	5'TATCTACCCACTCTCTTCTTCAG-3
	12	Forward	5'GTCCTGCCAATGAGAAGAAA-3
		Reverse	5'TGTCAGCAAACCTAAGAATGT-3

جدول ۲. توزیع فراوانی سن، محل توده، درگیری غددلنفاوی و وضعیت گیرنده استروژن در ۳۰ بیمار مورد بررسی

	وضعیت گیرنده استروژن			درگیری غددلنفاوی		محل توده		سن	
	نامعلوم	منفی	مثبت	منفی	مثبت	چپ	راست	>۳۵	≤۳۵
فراوانی	۸	۶	۱۶	۱۵	۱۵	۱۷	۱۳	۲۳	۷
فراوانی نسبی (درصد)	۲۶/۶	۲۰	۵۳/۳	۵۰	۵۰	۵۶/۷	۴۳/۳	۷۶/۶	۲۳/۳

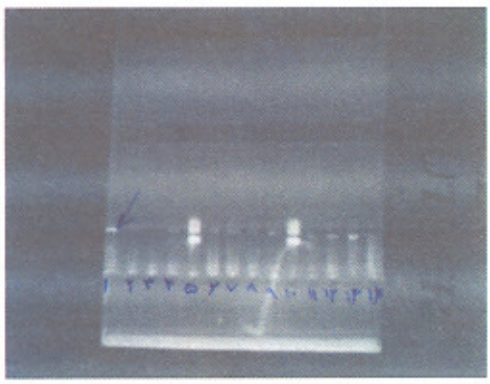
یافته‌ها

مشخصات آسیب‌شناختی ۳۰ زن مبتلا به سرطان پستان از پرونده‌های بیمارستانی استخراج شد. در همه بیماران یک پستان سرطانی شده بود. جداول ۲ و ۳ توزیع فراوانی سن، محل توده، درگیری غدد لنفاوی، وضعیت گیرنده استروژن، تشخیص آسیب‌شناسی و درجه تمایز توده را نشان می‌دهند.

از خون بیماران، DNA استخراج شد. آنگاه اگزون‌های ۳، ۱۰ و ۱۲ با روش PCR تکثیر شدند. محصولات PCR روی ژل آگارز الکتروفورز گردید. نمونه‌ای از ژل، آگارز در شکل ۱ نشان داده شده است.

برای تشخیص جهش، نمونه‌ها روی ژل SSCP الکتروفورز شدند. به منظور آشنایی با پروتکل SSCP به منبع ۱۱ مراجعه شود. شکل ۲ یک ژل SSCP رنگ‌آمیزی شده را نشان می‌دهد.

در پایان کار به کمک آزمایش SSCP، دو جهش در اگزون ۳ و دو جهش در اگزون ۱۲ شناسایی شد که جدول ۴ مشخصات آسیب‌شناختی بیماران دارای جهش را نشان می‌دهد.



شکل ۱. عکس از ژل آگارز که در آن نمونه‌ها از ۱ تا ۱۳ بارگزاری شده‌اند. ستون‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ محصولات PCR مربوط به اگزون ۳ می‌باشند. ستون ۵ و ۱۰ نشانگر ۱۰۰ bp است. ستون‌های ۶، ۷، ۸ و ۹ مربوط به اگزون ۱۰ و ستون‌های ۱۱، ۱۲ و ۱۳ مربوط به اگزون ۱۲ می‌باشند. ستون ۱۴ خالی است. در ستون ۳ باندی مشاهده نمی‌شود که به دلیل صورت نگرفتن واکنش PCR می‌باشد و آزمایش دوباره باید تکرار شود. فلش در سمت چپ تصویر باند شاخص هر اگزون را نشان می‌دهد.

جدول ۳. توزیع فراوانی انواع تشخیص آسیب‌شناسی و درجه تمایز توده در بیماران مورد مطالعه

	درجه تمایز توده				تشخیص آسیب‌شناسی					
	unkown	IV	III	II	unkown	[5]fibro	[4]Inv.PC	[3]Inf.LC	[2]Inf.DC	[1]Inv.DC
فراوانی	۹	۱	۱۶	۴	۳	۱	۱	۲	۹	۱۴
فراوانی نسبی (درصد)	۳۰	۳/۳۳	۵۳/۳	۱۳/۳	۱۰	۳/۳۳	۳/۳۳	۶/۶۷	۳۰	۴۶/۶

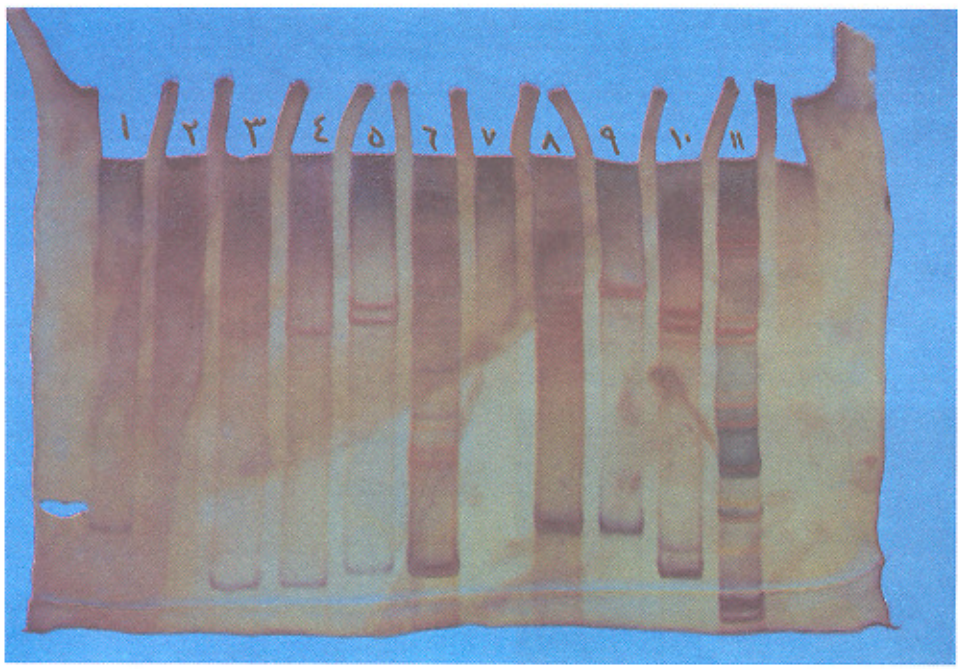
1- Invasive Ductal Carcinoma
2- Infiltrative Ductal Carcinoma
3-Infiltrative Lobular Carcinoma
4- Invasive Papillary Carcinoma
5- Fibroadenoma

www.SID.ir

Archive of SID

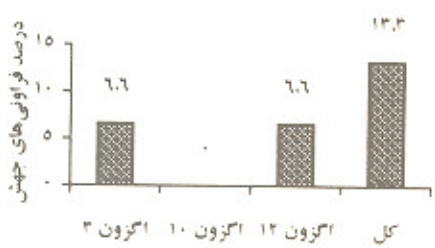
جدول ۴: مشخصات آسیب‌شناختی بیماران دارای جهش در افراد مورد مطالعه به روش PCR-SSCP

سن	محل توده	اندازه توده سانتی‌متر	تشخیص آسیب‌شناسی	درجه تمایز توده	درگیری غدد لنفاوی	وضعیت گیرنده استروژن	اگزون
۱۵	R	۹/۵	Inv.DC	?	+	+	۳
۷۵	L	۱	Inv.DC	?	-	-	۳
۱۵	R	۹/۵	Inv.DC	?	+	+	۱۲
۲۹	R	۲	Inf.LC	III	+	+	۱۲



شکل ۲: نتایج حاصل از SSCP محصولات PCR چندین اگزون به منظور نشان دادن توانایی تمیز اگزون‌ها. ستون ۱ و ۲ اگزون سه، ستون ۳ و ۴ اگزون ۱۰، ستون ۵ و ۱۰ اگزون ۱۲، ستون ۶ اگزون ۱۱ و ستون ۷، خطای PCR را نشان می‌دهند. ستون ۸ و ۹ اگزون ۱۴ و ستون آخر نشانگر VIII می‌باشد.

نمودار ۱ مربوط به توزیع فراوانی جهش در سه اگزون به قرار زیر است.



نمودار ۱: نمایش توزیع فراوانی جهش در اگزون ۳، ۱۰ و ۱۲ در بیماران مبتلا به سرطان پستان اولیه

تحلیل آماری فیشر هیچ رابطه معنی‌داری بین جهش‌ها و مشخصات آسیب‌شناختی در سطح ۰/۰۵ نشان نداد.

بحث

باید در نظر داشت که تعیین ارثی یا فامیلی بودن سرطان پستان از نظر بالینی بسیار مشکل است. به همین خاطر در بیشتر مطالعات پایه معمولاً تعدادی بیمار که در خانوادهٔ آنها سابقه ابتلا وجود دارد انتخاب کرده، آنها را از حیث جهش زایشی مورد بررسی قرار می‌دهند (۱). مطالعه حاضر نیز بر همین پایه نمونه‌های خود را انتخاب نمود. این تشابه ما را قادر می‌سازد که نتایج به دست آمده از این مطالعه را با دیگر مطالعات به راحتی مقایسه کنیم.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵: جهش در اگزون‌های ۳ و ۱۰ و ۱۲ ژن *BRCA1*

Reference	Population	Frequency	Effect	Mutation type	Codon	Nucleotide	Exon
۱۲	Ashkenazi	1/50	Stop at 39	Frameshift	33	23OdelAA	3
۱۳	Japan	1/30	Polymorphism	Silent	-	23	3
۱۴	U.S.A	1/33	Polymorphism	Silent	38	233	3
۱۵	Ashkenazi	1/45	Polymorphism	Silent	38	233	3
۱۲	Ashkenazi	1/50	Exon 3 deleted	Slice Site	?	?	3
۱۶	Canada	1/32	Tyr→cys	Missense	42	?	3
۱۷	France	?	Stop at 49	Frameshift	49	243del	3
۱۵	Ashkenazi	1/45	?	Unknown	?	731	10
۱۰	Italy	1/35	delAG-ter	Frameshift	1374	4239	12
۱۸	German	1/27	delAG-ter	Frameshift	1389	4283	12
۱۴	U.S.A	1/33	C→T	Nonsense	1395	4302	12
۱۵	Ashkenazi	1/45	C→T	Nonsense	1395	4302	12
۱۹	England	?	C→T	Unknown	1396	4302	12
۱۳	Japan	1/30	Polymorphism	Missense	1421	4410	12

هرچند روش SSCP روشی آسان و ارزان قیمت برای غربالگری جهش می‌باشد و قادر است با ۹۵درصد اطمینان جهش را تشخیص دهد، اما برای تعیین دقیق محل و نوع جهش با روش تعیین توالی[1] مورد بررسی قرار گیرند.

جهش‌های متعددی در ژن BRCA1 شناسایی شده است. بیشترین جهش در اگزون ۱۱گزارش شده است. اگزون‌های ۲، ۵، ۱۹، ۲۰ و ۲۱ به نسبت دیگر اگزون‌ها جهش‌های بیشتری نشان می‌دهند. ۸۱درصد جهش‌ها از نوع بی‌معنی[2] می‌باشند که خود نشان می‌دهد فقدان محصول ژن BRCA1 نقش بیشتری در سرطان زایی دارد (۱۳). جهش در اگزون‌های ۳، ۱۰ و ۱۲ به دلیل قرار نگرفتن این سه اگزون در مناطق نقاط داغ[3] ژن کمتر گزارش شده است (۹).

بی‌معنی بودن نتایج آزمون‌های آماری انجام شده به دلیل نادربودن جهش در سه اگزون مورد بررسی در این طرح می‌باشد. طبیعی است وقتی ۲ جهش در ۳۰ بیمار تشخیص داده شود هیچ رابطه‌ای با مشخصات آسیب‌شناختی نخواهد داشت.

جدول ۵ خلاصه‌ای از نتایج تحقیقاتی است که در دیگر کشورها انجام شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در کشورهای ژاپن، آمریکا، کانادا، فرانسه، ایتالیا و انگلیس فراوانی جهش در اگزون‌های ۳ و ۱۲ بسیار پایین است. در جدول فقط یک جهش در اگزون ۱۰گزارش شده است. از آن جاکه روی این سه اگزون در خانواده‌های ایرانی بررسی صورت نگرفته بود، نتایج این مطالعه نشان داد که در این گروه از آزمایش شوندگان، نیز مانند دیگر کشورها فراوانی جهش در اگزون‌های ۳، ۱۰ و ۱۲ پایین می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از آقایان دکتر مرتضی هاشم‌زاده، دکتر سیروس عظیمی، سیدسعید حسینی اصل، مجید خیرالهی و رضا میرفخرایی به خاطر مساعدت و همکاری شایسته‌شان صمیمانه تشکر می‌گردد. از مسؤولان آزمایشگاه ژنتیک دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران و آژانس بین المللی سرطان فرانسه IARC نیز به خاطر همکاری‌هایشان متشکریم.

1 - Sequencing analysis 2 - Nonsense
3 - Hotspot

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1- Kirby I.Bland, Edward M Copeland. Breast. Seymour I. Schwartz,G.Tom Shires. Frank C.Spencer. Principles of surgery. Chapter 14. vol 2. 7th Ed. New York. MC Graw Hill, 1999; p: 554-555.

2- Marco Van Der L. , Csilla Szabo. Istran Beznyak. Gyorgy Liszka. Prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutation among breast and ovarian cancer. Int J Cancer. 2000; 8: 337-740.

3- James WE. Paterson A. A review of structure and putative functions of BRCA1. Disease Markers. 1998; 13 (2): 261-274.

4- Miki Y. Swensen J. A strony candidate for the breast and ovarian cancer. Science. 1994; 266: 66-71.

5- Bork P. Hofman K. A superfamily of conserved domains in DNA damage. Hum Molec Genet. 1995; 4: 2265-2273.

6- Chapman MS. Vema IM. Transcriptional activation by BRCA1. Nature. 1996; 382 (6593): 678-679.

7- Zabludoff SD. Wright WW. BRC1 mRNA is expressed highly during meiosis. Oncoyene. 1996; 13 (3): 649-653.

8- Lewin B. Gene V. Fifith Ed. London. Oxford University Press. 1994; 887-891.

9- Startten MR. Wooster R. Hereditary predisposition to breast cancer. Am J Hum Genet. 1996; 13: 1031-1039.

10- Montagona M. Santactterina M. Identification of seven new BRCA1 germline mutation. Cancer Resarch. 1996; 56: 5466-5469.

11- Hayashi K. PCR SSCP. Landegren ULF. Hayashi K. Labratory protocols for mutation detection. First Ed. London. Oxford University Press. 1996; pp: 14-26.

12- Fredman LS. Szabo CI. Novel inherited mutations and variable expressivity of BRCA1 alleles. Am J Hum Genet. 1995; 57 (6): 1284-1297.

13- Fukutomi T. Ushijima T. Germline mutation of BRCA1 in Japanese. Cancer Res. 1995; 55 (16): 3521-3524.

14- Malone KE. Daling JR. Thompson JD. BRCA1 mutation and breast cancer in the general population. JAMA. 1998; 279 (12): 922-929.

15- Shattuck Eidens D. Dliphant A. MC Clure M. BRCA1 sequence analysis in women at high risk. JAMA. 1997; 278 (15): 1242-1250.

16- Serova DM. Mazoyer Sylvie. Pufet N. Mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast cancer families. Am J Hum Genet. 1997; 60 (3): 486-495.

17- Stoppa-Lyonnet D. Laurent-Puig P. Essoux L. BRCA1 sequence variations in 160 individuais. Am J Genet. 1997; 60 (5): 1021-1030.

18- Juan Dony. Jenny C. A high proportion of mutations in the BRCA1 gene. Hum Genet. 1998; 103 (2): 154-161.

19- Eccels DM. Englefield P. Soulby MA. BRCA1 mutations in Southern England. British J Cancer. 1998; 77: 2199-2203.

www.SID.ir