Original Article

BRCA1 and *BRCA2* Genetic Testing in Breast and/or Ovarian Cancer Families in Iran

Fatemeh Keshavarzi, M.Sc.[1], Gholam Reza Javadi, Ph.D.[1], Nahid Nafissi, Ph.D.[2], Mohammad Esmail Akbari, Ph.D.[2], Vahid Reza Yassaee, Ph.D.[3], Maryam Sharafi Farzad, M.Sc.[4], Sirous Zeinali, Ph.D.[4, 5*]

1. Biology Department, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Cancer Research Center, Tehran, Iran
3. Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Genomic Research Center, Tehran, Iran
4. Kawsar Human Genetics Research Center, Medical Genetics Laboratory of Dr. Zeinali, Tehran, Iran
5. Pasteur Institute, Tehran, Iran

**** Corresponding Address: P.O.Box: 15956445513, Kawsar Human Genetics Research Center, Tehran, Iran***
Emails: zeinali@kawsar.ir

Received: 20/Jan/2010, Accepted: 6/Jul/2010

Abstract

Objective: Germline mutations in breast cancer susceptibility genes, breast cancer susceptibility gene 1 (*BRCA1*) and breast cancer susceptibility gene1 (*BRCA2*) are responsible for a substantial proportion of high-risk breast and breast/ovarian cancer in families. Therefore, the aim of this study was to investigate *BRCA1/2* mutations in five high risk Iranian families.

Materials and Methods: Of the 20 breast/ovarian cancer families counselled in our center, five were selected for *BRCA1/2* mutation screening according to our minimal criteria. The complete coding sequences in addition to each intron/exon boundary of the *BRCA1/2* genes were screened by direct sequencing.

Results: Fourteen missense substitutions were identified, which were: Gly1140Ser, Gly1738Glu, Glu1735Glu, leu871pro, Ser1613Gly, ser1040Asn, Glu1038Gly, Leu771Leu and Ser1436Ser in *BRCA1*; and Gln373His, Glu1391Gly, Leu1521Leu, Val2171Val and Glu1035Glu in *BRCA2*. In addition, the splice site mutations (IVS7+83(-TT) and so IVS8-70(-CATT) were observed in two families. Three mutations were novel (Gly1140Ser in *BRCA1* and Glu1391Gly, Gln373His in *BRCA2*).The missense substitutions Glu1038Pro and Gly1140Ser were found in a large series of patients and in five controls.

Conclusion: The missense substitution Gly1738Glu in *BRCA1* is pathogenic. In addition, these results showed that the probability genotype at the *BRCA1* locus defined by alleles Leu871Pro, GLu1038Gly, Ser1613Gly, Gly1140Ser has an effect pathogenic. In another family several missense substitutions in *BRCA1* gene such as Glu1038Gly, Gly 1140Ser were found as well as Glu1391Gly and Gln373His in *BRCA2*. The pathogenic effect yet has to be verified by more comprehensive populations studies.

These results support this thinking that screening for *BRCA1* and *BRCA2* mutations may have the strongest impact on health-care when targeted to high-risk populations.

Keywords: Breast Cancer, *BRCA1*, *BRCA2*, Familial Cancer, DNA Sequencing

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 3, Autumn 2010, Pages: 329-340

تست ژنتیکی ژن‌های *BRCA1* و *BRCA2* در خانواده‌های با سابقه ابتلا به سرطان پستان و یا سرطان پستان و تخمدان در ایران

فاطمه کشاورزی M.Sc.[1]، غلامرضا جوادی Ph.D.[1]، ناهید نفیسی Ph.D.[2]، محمد اسماعیل اکبری Ph.D.[2]، وحیدرضا یاسایی Ph.D.[3]، مریم شرفی فرزاد M.Sc.[4]، سیروس زینلی Ph.D.[4,5*]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران
۲. دانشگاه شهید بهشتی، مرکز تحقیقات سرطان، تهران، ایران
۳. دانشگاه شهید بهشتی، مرکز تحقیقات ژنومیک، تهران، ایران
۴. مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی، تهران، ایران
۵. انستیتو پاستور، تهران، ایران

* آدرس نویسندگان مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۱۵۹۵۶۴۵۵۱۳، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، آزمایشگاه ژنتیک دکتر زینلی
پست الکترونیک: **Emails: zeinali@kawsar.ir**

دریافت مقاله: ۸۸/۱۰/۳۰، پذیرش مقاله: ۸۹/۴/۱۵

چکیده

* **هدف:** شناسایی جهش‌های Breast Cancer Susceptibility Gene 1 (*BRCA1*) و Breast Cancer susceptibility Gene2 (*BRCA2*) در ۵ خانواده ایرانی با ظهور زود هنگام سرطان پستان

* **مواد و روش‌ها:** از ۲۰ خانواده مشاوره شده در مرکز کوثر، ۵ خانواده برای غربال‌گری جهش‌های *BRCA2* و *BRCA1*، براساس حداقل ضوابطی که در تحقیق به کار برده‌ایم، انتخاب شدند. بعد از خون‌گیری و استخراج DNA کل طول ناحیه کد دهنده (اگزون‌ها) و مرزهای اگزون- اینترون ژن‌های *BRCA2* و *BRCA1* توالی‌یابی مستقیم گردید.

* **یافته‌ها:** ۱۴جهش بد معنی (Missense Substitution) شناسایی شد که عبارتند از: Gly1140Ser, Glu1735Glu, Gly1738Glu, leu871pro, Ser1613Gly, ser1040Asn, Glu1038Gly, Leu771Leu, Ser1436Ser و Glu1035Glu ,Val2171Val, Leu1521Leu در ژن *BRCA1* و Gln373His, Glu1391Gly در ژن *BRCA2*.
دو حذف اینترون در ژن *BRCA1* نیز دیده شد [IVS8-70 (-CATT) and IVS7+83(-TT)]. جهش Gly1140Ser در ژن *BRCA1* و جهش‌های Glu1391Gly و Gln373His در ژن *BRCA2* جدید هستند. جهش‌های Glu1038Pro و Gly1140S در تعداد زیادی از بیماران و ۵ نفر از کنترل‌ها وجود داشت.

* **نتیجه‌گیری:** جهش Gly1738Glu بیماری‌زاست. این نتایج نشان می‌دهد که احتمالا ژنوتیپ ناشی از آلل‌های Leu871Pro, GLu1038Gly, Ser1613Gly, Gly1140Ser در فردی که حامل هر ۴ جهش است، بیماری‌زا می‌باشد. هم‌چنین جهش‌های Gly1140Ser و Glu1038Gly در ژن *BRCA1* در کنار جهش‌های Glu1391Gly و Gln373His در ژن *BRCA2* در یک خانواده مشاهده شد. اثر بیماری‌زایی این جهش‌ها در کنار هم بایستی با مطالعات بیشتر در جمعیت تایید شود. نتایج این تحقیق از این تفکر که غربال‌گری جهش‌های *BRCA1* و *BRCA2* ممکن است یک اثر قوی برروی مراقبت از سلامتی در یک جمعیت در معرض خطر داشته باشد، حمایت می‌کند.

* **کلیدواژگان:** سرطان پستان، ژن مستعدکننده سرطان پستان ۱، ژن مستعدکننده سرطان پستان ۲، سرطان خانوادگی، تعیین توالی DNA

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۸۹، صفحات: ۳۴۰-۳۲۹

مقدمه

سرطان پستان (Breast Cancer) شایع‌ترین سرطان با خطر ۸ تا ۱۰درصد در زنان است (۱). این سرطان دومین سرطان کشنده در میان خانم‌ها بعد از سرطان ریه است (۲). بیشتر از ۱۵ درصد زنان سالم دارای حداقل یک خویشاوند درجه یک با سرطان پستان هستند؛ تجربه نشان داده است که خطر سرطان پستان در این افراد دو برابردیگران است (۱). ۲۰ تا ۳۰ درصد افراد مبتلا به سرطان پستان دارای سابقه خانوادگی ابتلا به این سرطان هستند (۳، ۴). جهش (Mutation) در ژن‌های Breast Cancer Susceptibility Gene1 *(BRCA1)* و Breast Cancer Susceptibility Gene2 *(BRCA2)* در سلول‌های زایشی موجب استعداد وراثتی ابتلا به سرطان پستان و تخمدان می‌شود (۲). جهش در این ژن‌ها برای ۵ تا ۱۰ درصد کل موارد سرطان پستان و۲۰ تا ۴۰ درصد سرطان‌های خانوادگی پستان وجود دارد (۱) و این میزان معادل خطری درحد ۶۰ تا ۸۵ درصد در طول زندگی می‌باشد (۱). ژن‌های *BRCA2* و *BRCA1* نقش مهم و بزرگی در ترمیم DNA به روش نوترکیبی هومولوگوس، حفظ پایداری کروموزوم، فعال‌سازی نقاط کنترل DNA آسیب دیده و تنظیم چرخه سلولی دارند (۷-۵). ژن *BRCA1* دارای ۲۴ اگزون بوده و پروتیینی با همین نام به طول ۱۸۶۳ آمینواسید را کد می‌کند . این ژن بر روی بند ۲۱ بازوی بلند کروموزوم ۱۷ (17q21) قرار دارد. ژن *BRCA2* دارای ۲۷ اگزون بوده و پروتیینی ۳۴۱۸ آمینواسید را کد می‌کند. این ژن بر روی بند ۱۲ بازوی بلند کروموزوم ۱۳ (13q12) قرار دارد (۴). بیشترین جهش‌های کشنده (Lethal Mutation) در این ژن‌ها، جهش‌های تغییرقالب (Frameshift) و جهش‌های

بی‌معنی یا بدون معنی (Nonsense) هستند که باعث خاتمه زودرس (Premature Translation) در ساخت زنجیره پروتیینی می‌شوند. این نوع جهش‌ها در سراسر طول ژن قرار گرفته‌اند. در واقع جهش‌های جایگاه پیرایش (Splice-site)، جایگزینی‌های آمینواسیدی (Missense Substitution) و جهش‌های بدمعنی یا دگرمعنی (Missense Mutation) که در مناطق معینی از ژن رخ می‌دهند، بسیار مهم می‌باشند (۸). در حاملین جهش‌های کشنده *BRCA1* تا سن ۴۰ سالگی ۲۰ درصد خطر ابتلا به سرطان پستان و ۱۷ درصد خطر ابتلا به سرطان تخمدان وجود دارد که این میزان خطر با افزایش سن بالا می‌رود به طوری که تا سن ۸۰ سالگی برای سرطان پستان میزان خطر به ۸۲ درصد (۵) و برای سرطان تخمدان میزان خطر تا ۷۰ سالگی ۳۹ درصد و تا ۸۰ سالگی ۵۴ درصد می‌باشد (۱۰-۶). برای حاملین جهش‌های *BRCA2* تا سن ۷۰ سالگی خطر ابتلا به سرطان پستان ۴۵ درصد بوده و این خطر در مورد ابتلا به سرطان تخمدان ۱۱ درصد است (۹). جهش‌های کمیاب با قدرت نفوذ بالای ژن‌های *BRCA1*، BRCA2 و مستعدکننده سرطان پستان برای ۲۵-۱۶ درصد موارد وراثتی سرطان پستان در نظر گرفته می‌شود (۱۱، ۱۲).

این داده‌ها نشان می‌دهند که نوترکیبی‌های ژنومی (Genomic Recombinant) ژن‌های *BRCA1*، *BRCA2* باید در افراد شاخص جوان (Proband) با یک سابقه فامیلی ابتلا به سرطان پستان بررسی شود. امروزه در سراسر دنیا آزمایشات ژنتیکی به طور رایج برای تعیین حاملین جهش‌های ژنتیکی در خانواده‌هایی که سابقه قوی سرطان پستان دارند، انجام می‌گیرد. نتایج این آزمایشات 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. گزارش‌های منتشره از سراسر دنیا نشان می‌دهد که بروز جهش‌های *BRCA1* و *BRCA2* از ۱/۸ تا ۱۳/۱ درصد متغیر است (۱۳، ۱۴) و در کشورهای آسیایی این میزان از ۰/۸ تا ۸/۶ درصد است (۱۵). در مطالعه حاضر که بخشی از یک تحقیق بزرگ در ایران است افراد مبتلا به سرطان پستان و اعضای خانواده‌های آنها که در معرض خطر هستند و هم‌چنین ۳۰ نفر کنترل (خانم‌های با سن بالای هفتاد سال که تا کنون به سرطان مبتلا نگشته‌اند) برای وجود جهش‌های *BRCA1* و *BRCA2* مورد بررسی قرار گرفته‌اند و نوع تغییرات ژنتیکی این دو ژن درمیان این افراد توصیف شده است. هدف از این کار، تاکید برروی نتایج تحقیقات قبلی و هم‌چنین پیروی از این تفکر است که غربال‌گری جهش‌های *BRCA1* و *BRCA2* ممکن است یک اثر قوی برروی مراقبت از سلامتی در یک جمعیت در معرض خطر داشته باشد.

مواد و روش ها

این طرح مصوب کمیته مشترکی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران و مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر در تاریخ دی ماه ۱۳۸۷ می‌باشد.

انتخاب خانواده‌ها

خانواده‌های در معرض خطر از میان افراد مراجعه کننده به کلینیک مشاوره ژنتیک پزشکی مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر در تهران بر اساس ویژگی‌های فرد شاخص (مانند تومور اولیه شخص، سن تشخیص سرطان پستان و یا تخمدان در این فرد، نژاد و مذکر بودن فرد بیمار) و سابقه خانوادگی سرطان پستان یعنی سابقه ابتلا به سرطان پستان و یا تخمدان در خانواده فرد، تعداد افراد مبتلا و نسبت آنها، انتخاب شده‌اند. پس از مشاوره ژنتیک براساس یک پروتکل استاندارد و جهانی (Boadicea Model) و به دست آوردن اطلاعات لازم، خانواده‌هایی که حداقل یکی از ویژگی‌های زیر را داشتند از لیست افراد مراجعه کننده انتخاب شدند:

۱. داشتن حداقل ۳ خویشاوند مبتلا با هر سن، ۲. داشتن یک فرد در خانواده با سرطان پستان دو طرفه و یا سرطان پستان و تخمدان و یا تخمدان دو طرفه با این شرط که سن تشخیص یکی از سرطان‌ها پیش از ۵۰ سالگی باشد، ۳. داشتن یک فرد مذکر مبتلا در خانواده، ۴. داشتن یک فرد با نسبت خویشاوندی درجه یک با پروباند که سن تشخیص سرطان در او زیر ۳۵ سال بوده باشد.

بر این اساس از میان بیست خانواده مراجعه کننده، ۵ خانواده به علت قرار گرفتن در یکی از گروه‌بندی‌های ذکر شده برای این تحقیق انتخاب شدند. برای بیماران و افراد گروه کنترل پس از مشاوره ژنتیکی، اهمیت تحقیق شرح داده شد و پس از موافقت خانواده‌ها وگرفتن رضایت‌نامه از آنها در تحقیق شرکت داده شدند. هیچ کدام از خانواده‌ها وابسته به گروه و نژاد خاصی نبودند و هیچ نوع ارتباطی هم با یکدیگر نداشتند بلکه از نقاط مختلف کشور انتخاب شدند. افراد کنترل از میان خانم‌های با سن بالای ۷۰ سال که سابقه ابتلا به سرطان پستان و تخمدان در آنها و یا خویشاوندان درجه ۱ و ۲ آنها نبود، انتخاب شدند.

طراحی پرایمر

در طراحی پرایمر هم می‌توان به صورت چشمی و هم با استفاده از نرم‌افزار عمل نمود. در طراحی از نرم افزار Gene Runner استفاده نمودیم. برای این کار ابتدا پلات‌های مربوط به ژن‌های *BRCA1* و *BRCA2* از سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) گرفته شد. 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 این نرم‌افزار پرایمر طراحی شد. هر PCR دو پرایمر Forward & Reverse نیاز دارد. با توجه به اینکه هرچه طول پرایمر بزرگ‌تر باشد احتمال اینکه به جاهای مختلف بچسبد کمتر می‌شود، هم‌چنین درصد GC، دمای ذوب و چسبیدن پرایمرها به تک رشته‌های DNA و سایر مواردی که در برنامه Gene runner برای طراحی مناسب یک پرایمر در نظر گرفته شده است، پرایمرهای مناسب طراحی گردید و سپس از طریق NCBI→BLAST تاییدگردید. این پرایمرها طوری طراحی شدند که بیشتر از ۵۰ تا ۱۰۰ باز در بالا دست و پایین دست مرزهای اینترون - اگزون از هر اگزون را تکثیر دهند. جهت اگزون‌های بزرگ ۱۱ از ژن‌های *BRCA1* و *BRCA2*، اگزون‌ها به چند قطعه تقسیم شدند و برای هر یک از این قطعات متوالی پرایمرهای Forward & Reverse طراحی شد تا کل طول اگزون‌ها ی بزرگ ۱۱ از دو ژن توالی‌یابی گردد. برای چند اگزون به نسبت بزرگ دیگر از هر دو ژن این کار مجدد انجام شد. برای اگزون‌های کوتاه و نزدیک به هم مانند اگزون های ۵ و ۶ و۷ ژن *BRCA2* یک جفت پرایمر Forward & Reverse مشترک طراحی گردید. فهرست پرایمرها در جدول ۱ و ۲ آمده است.

جدول ۱: لیست پرایمرهای BRCA1

2F	5'TTTAAAATGATAAAATGAAGTTGTC3'
2R	5'GGCAATGTACGGCTAAATCGAATC CCAAATTAATACACTCTTGTG3'
6F	5'CGGTTTATACAGATGTCAATG3'
6R	5'CGTCATAGAAAGTAATTGTGC3'
7F	5'TTGGTTTCTTTGATTATAATTC3'
7R	5'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'

جدول ۲: 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' TTTAAACAGTGGAATTCTAGAG3'
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' CCCTAAATCACTGATACTGG 3'

استخراج DNA (DNA Extraction)

DNA ژنومیک از نمونه‌های خون محیطی افراد بیمار و اعضا خانواده‌های آنها بعد از خون‌گیری، با Promega DNA Purification Kit (Catalogue no. LA1620) براساس 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 انجام گرفته در کشورهای دیگر که گزارش آن در سایت‌های: The Human Gene Mutation Database (HGMD) و Breast Cancer Information Core (BIC) موجود می‌باشد، ابتدا به منظور شناسایی جهش در مورد هر فرد با اگزون‌هایی که جهش‌های شایع داشتند یا بسیار بزرگ بوده، جست‌وجو را شروع کردیم و در صورت عدم شناسایی جهش بیماری‌زا سایر اگزون‌ها بررسی شدند. 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، تکثیر نشدند.

جدول۳: نتایج واطلاعات بالینی ۵ خانواده بررسی شده

Family	Sample ID	Age at diagnostic	Disease
A	A1 I	38	Breast cancer
	A2 I	28	Breast cancer
	A3 I	38	Breast cancer
	A4 I	40	Breast cancer
B	A5 I	37	Carrier
	B1 I	53	Breast cancer
	B2 I	25	Breast cancer
	B3 I	30	Breast cancer
	B4 II	35	Breast cancer
	B5 II	57	Breast cancer
	B6 I	36	Carrier
C	B7 I	39	Carrier
	C1 I	77	Breast cancer
	C2 I	60	Breast cancer
	C3 II	35	Breast cancer
	C4 I	42	Carrier
D	C5 I	39	Carrier
	D1 I	75	Rectorajy
	D2 I	60	Brain tumor
	D3 II	45	Breast cancer
	D4 II	44	Breast cancer
	D5 II	43	Breast cancer
	D6 I	42	Nose tumor
	D7 I	44	Thyroidtumor
E	D8 I	46	femourtumor
	E1 I	42	Breast cancer
	E2 II	44	Breast cancer
	E2 I	42	Carrier

Family: A-D; Generation: I-II

جدول۴: نتایج جهش‌های شناسایی شده در ۵ خانواده ایرانی با خطر بالای سرطان پستان و تخمدان

Families	Gene	Exon	Sequence variant
A	BRCA1	11	leu771leu
A, B	BRCA1	11	leu871Pro
A, C, D	BRCA1	11	Glu1038Gly
A, B, C, D, E	BRCA1	11	Gly1140Ser
A, B, C, D	BRCA1	13	Ser1436Ser
A, C	BRCA1	16	Ser1613Gly
A, C	BRCA2	11	leu1521leu
A, D	BRCA2	11	Val2171Val
A, E	BRCA1	11	Ser1040Asn
B	BRCA1	20	Gly1738Glu
B	BRCA1	20	Glu1735Glu
D	BRCA2	11	Glu1391Gly
D	BRCA2	11	Leu1521Leu
C	BRCA1	9	IVS8-70(-CAAT)
A	BRCA1	7	IVS7+83(-TT)
D	BRCA2	10	Gln373His

جدول۵: انواع جهش‌های شناسایی شده ژن‌های BRCA1 و BRCA2 و تغییرات نوکلیوتیدی هر کدام

Gene	Exon	Nucleotide change	Amino acid change	Mutation effect
BRCA1	7	**IVS7+83(-TT)**	-	Non-coding IVS
BRCA1	9	**IVS8 -70(-CATT)**	-	Non-coding IVS
BRCA1	11	TTG>CTG	leu771	Synonymous
BRCA1	11	CTG>CCG	leu871Pro	Missense
BRCA1	11	GAA>GGA	Glu1038Gly	Missense
BRCA1	11	AGC>AAC	Ser1040Asn	Missense
BRCA1	11	GGT>AGT	Gly1140Ser	Missense
BRCA1	13	TCT>TCC	Ser1436	Synonymous
BRCA1	16	AGT>GGT	Ser1613Gly	Missense
BRCA1	20	GAA>GAG	Glu1735	Synonymous
BRCA1	20	GGA>GAA	Gly1738Glu	Missense
BRCA2	11	GAA>GGA	Glu1391Gly	Missense
BRCA2	11	CTA>CTG	Leu1521	Synonymous
BRCA2	11	GTG>GTC	VAL2171	Synonymous
BRCA2	10	**CAG>CAT**	**Gln373His**	Missense

هرواکنش PCR شامل ۳۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱۰میکرو مولار دزاکسی نوکلیوتید تری‌فسفات‌ها (dNTPs) (BioRon)، ۵۰ میکرو مولارکلرید منیزیم، ۴۰ پیکومول از پرایمرهای Reverse و Forward (CinnaGen, Iran)، ۲واحد taq پلیمراز (Kawsar, Iran)، ۲ میکرولیتر بافر 10X(KBC) و ۲۰ میکرولیترآب دوبار تقطیر در یک حجم ۲۵ میکرولیتر بوده و برنامه PCR به قرار زیر بوده است: ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۲–۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه دمای چسبیدن پرایمرها بسته به نوع پرایمرها، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت۲ دقیقه برای ۳۵ چرخه.

محصول PCR با استفاده از Multi Screen FB filterplates (Millipore Corporation & Billerica MA) خالص شده و با ۷۰ تا۱۴۰ میکرولیتر آب دو بار استریل رقیق شد و حضور محصول PCR در هر واکنش با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵درصد همراه با اتیدیوم بروماید و در نهایت دیدن تصاویر در ژل داک بررسی شد.

توالی‌یابی مستقیم (Direct Sequencing)

۱. محصول PCR پس از خالص‌سازی با کیت آماده ABI PRISM Big Dye Terminator cycle توالی‌یابی مستقیم شد. واکنش با ۵ تا ۱۰۰ نانوگرم از محصول خالص شده PCR، ۱۰/۴ پیکومول از پرایمرهای Reverse & Forward، بافر Ready Reaction 1x Premix در یک حجم ۲۰ میکرولیتر انجام گردید. واکنش‌های تعیین توالی چرخه (Cycle Sequencing) در دستگاه ترموسایکلر در برنامه به قرار زیر انجام شد: ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، چسبیدن پرایمرها در ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه و گسترش در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه در ۲۸ چرخه، سپس بر اساس دستورالعمل ABI رسوب‌دهی با الکل انجام و اضافی پرایمرها، آنزیم، موادمعدنی، dNTPs و ddNTPs حذف شد. سپس با افزودن فورمامید و متعاقب آن، انجام یک دوره Hot-Ice تک رشته‌های DNA به وسیله کاپیلاری الکتروفورز تعیین توالی شدند. داده‌های جمع‌آوری شده توسط دستگاه ژنتیک آنالیزور 3130X با استفاده از Sequencing Analyzer 5.2 Software آماده شده و مورد تجزیه وتحلیل قرارگرفت. توالی‌های مرتب شده برای هر اگزون خوانده و در Consed Viewer Software قابل مشاهده شد که 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 به دست آمده بود و به این وسیله جهش‌ها شناسایی شدند. جهش شناسایی شده برای هر اگزون می‌بایست هم با پرایمر Forward و هم پرایمر Reverse آن اگزون تایید می‌شد.

یافته ها

نتایج به دست آمده از توالی‌یابی مستقیم پنج خانواده سرطانی مورد بررسی در جدول‌های ۳، ۴ و ۵ آمده است.

در خانواده A، سه خواهر سرطان پستان داشتند که سن تشخیص آنها به ترتیب ۲۸، ۳۸ و ۴۰ سال بوده است. مادر این خانواده در ۳۸ سالگی به سرطان دچار و فوت شده بود، بنابراین اطلاعات ژنتیکی مادر در دسترس نبود.

طی توالی‌یابی DNA که بر روی ژن‌های BRCA1 & BRCA2 برای DNA ژنومی این سه خواهر انجام شد، مشخص گردید که سه نفر دارای جایگزینی‌های بدمعنی یا دگرمعنی ser1436ser ،Glu1038Gly(A3232G) ،leu871pro (C2731T) (T4427C)، leu771leu (T2430G) و ser1613Gly (A4956G) به صورت هتروزیگوت و Gly1140ser (G3538A) به صورت هموزیگوت و IVS7+83 (-TT) به صورت هتروزیگوت از ژن BRCA1 و هم‌چنین leu1521leu (A4770G) و val2171val (G6722C) به صورت هموزیگوت در ژن *BRCA2* بودند. برادر سالم این خانواده که ۴۰ سال داشت نیز حامل تمام این جهش‌ها بود.

در خانواده B یکی از دخترهای خانواده در سن ۲۵ سالگی مبتلا به سرطان پستان شده و فوت نموده بود. مادر خانواده و یکی دیگر از دخترهای او و هم‌چنین دو تا از دختر خاله‌های مادر نیز مبتلا به سرطان پستان شده بودند. سن تشخیص مادر ۵۳، دختر دوم ۳۰ و دختر خاله‌های مادر به ترتیب ۳۰ و ۵۷ سالگی بود. اطلاعات دختر فوت شده در دسترس نبود. مادر خانواده و دختر مبتلا دوم دارای یک جایگزینی بدمعنی leu871pro (C2731T) به صورت هموزیگوت و ser1040Asn (C2731T)، Gly1738Glu (G5331A) و Gly1140ser (G3538A) به صورت هتروزیگوت در ژن *BRCA1* بودند. در دختر

خاله‌های مادر جایگزینی‌های بدمعنی Gly1738Glu (G5331A)، leu871pro (C2731T) و Gly1140ser (G3538A) در ژن BRCA1 شناسایی شد. در بررسی دختر و پسر سالم این خانم که در سن زیر ۴۰ سال بودند، مشخص شد که دختر حامل جایگزینی‌های بدمعنی leu871pro (C2731T)، Gly1140ser (G3538A) و پسر حامل leu871pro (C2731T)، ser1040Asn (G3238A) Gly1140ser (G3538A) و Glu1035Glu (A3221G) در ژن *BRCA1* بود.

در خانواده C مادر خانواده و خواهر مادر هر دو مبتلا به سرطان پستان گشته و در سن ۷۳ و ۶۰ سالگی فوت نمودند. خواهرزاده مادر، دختر خانمی که در سن ۳۵ سالگی مبتلا به سرطان پستان شده و در سن ۶۰ سالگی فوت نموده بود. بنابراین هیچ داده‌ای از این سه فرد در دسترس نبود. دو تا دختر این مادر که جهت تست حامل بودن به مرکز مراجعه نمودند، مورد بررسی قرار گرفتند. آنها دارای سن زیر ۴۵ سال بودند و حامل جایگزینی‌های بدمعنی Glu1038Gly (A3232G) و Gly1140Ser (G3538A) به صورت هموزیگوت و Ser1436Ser (T4427C) و Ser1613Gly (A4956G) به صورت هتروزیگوت و هم‌چنین یک IVS 9-70 (- CATT) همگی مربوط به ژن *BRCA1* بودند.

در خانواده D سه خواهر در سنین ۴۲ و۴۴ و۴۶ سالگی به سرطان پستان مبتلا شده بودند. سرطان پستان در خواهر ۴۴ ساله به صورت دو طرفه و همه خواهرها کارسینومای تهاجمی مجاری پستان (Invasive Ductal Carcinoma) داشتند. مادر این خانواده سالم، پدر مبتلا به رکتوراژی و عمو دچار تومور مغزی شده و فوت نموده بود. سه تا از دخترعموها یکی مبتلا به تومور در ناحیه بینی، دیگری تومور ناحیه تیروئید و سومی تومور در ناحیه ران بوده که نفر سوم فوت نموده بود.

طی بررسی مشخص شده، دخترها و پدرشان دارای جایگزینی‌های بدمعنی Glu1038Gly (A3232G)، Gly1140Ser(G3538A) و Ser1436Ser (T4427C) به صورت هتروزیگوت مربوط به ژن *BRCA1* هم‌چنین Leu1521Leu(A4770G)، Val2171Val (G6722C) و Glu1391Gly (A4350G) به صورت هموزیگوت و Gln373His (CAG>CAT) به صورت هتروزیگوت در ژن *BRCA2* بودند.

در خانواده E مادر خانواده و خواهر مادر هر دو مبتلا به سرطان پستان گشته و در سن ۴۲ و ۴۴ سالگی فوت نموده بودند بنابراین هیچ داده‌ای از این افراد در دسترس نبود. دختر خانواده با سن۴۲ سال جهت بررسی حامل بودن خود به مرکز مراجعه نموده و درخواست انجام آزمایش ژنتیکی نمود. مشخص شد که اوحامل جایگزینی‌های بدمعنی Gly1140Ser (G3538A) به صورت هموزیگوت و ser1040Asn (G3238A) به صورت هتروزیگوت مربوط به ژن *BRCA1* بوده است.

بحث

دستورالعمل حک شده در DNA اهمیت اولیه برای بقا ارگانیسم دارد. اما با این حال DNA در معرض حملات ثابت عوامل خارجی مانند اشعه، مواد شیمیایی، آلودگی هوا، دود سیگار، مصرف داروها و هم‌چنین عوامل داخلی مانند آب، رادیکال‌های آزاد و خطاهای غیر قابل پرهیز در فرایندهای سلولی مانند همانندسازی DNA و نوترکیبی میوزی در هنگام گامتوژنز می‌باشد. انباشته شدن آسیب‌های DNA می‌تواند تغییرات پایدار را القا کند و منجر به سرطان یا حتی آسیب‌های سلولی شدید دیگری شود و در نهایت باعث مرگ سلولی به وسیله تحریک خودکشی سلول (Apoptosis) یا توقف غیر قابل برگشت رشد سلولی گردد. جهت برخورد با اثرات مرگ‌آور آسیب‌های DNA همه ارگانیسم‌ها یک شبکه پیچیده از مکانیسم‌های تعمیر DNA دارند (۱۶). ۵ مسیر عمده تعمیر DNA عبارتند از:
Homologous Recombination Repair (HRR), Non-Homologous End Joining (NHEJ), Nucleotide Excision Repair (NER), Base Excision Repair (BER) and Mismatch Repair (MMR).

BRCA1 و *BRCA2* در مسیرهای HRR, NHEJ و NER دارای نقش اصلی و کلیدی هستند و جهش‌های مرگ‌آور این دو ژن باعث می‌شود آنها در این فعالیت‌های اصلی نتوانند نقش خود را ایفا کنند (۱۶). در سلول‌های اپی‌تلیوم پستان افراد در معرض خطر، این جهش‌ها منجر به تحریک شدید چرخه سلولی، توقف خودکشی سلول در اثر عمل هورمون‌های استروژن، پروژسترون و فاکتورهای رشد و هم‌چنین نامیرا شدن (Immortalization) سلول‌ها در اثر بیان بالای تلومرازها می‌گردد که این رفتارها در نهایت بافت پستان را به طرف هیپر پلازی سوق می‌دهد. حال این هیپر پلازی سرآغاز یک کارسینوم است. جهش در فاکتور رشد و مسیرهای استرویید جنسی چرخه سلولی ویا ژن‌های C-ERBB2, C-MYC, CCDN1 CDKN2, RB-1, TP53 و هم‌چنین ناپایداری کروموزومی منجر به تبدیل هیپرپلازی به کارسینوم می‌شوند. تغییرات فنوتیپیکی بیشتر در چرخه سلولی، پاسخ به درمان و مرگ سلولی و هم‌چنین تغییرات فنوتیپیکی در فاکتور رشد مسبب رگ‌زایی(Angiogenesis)، جهش در CDH1، و نقص‌های در تعمیر Mismatch Repair منجر به فرایند متاستازی سرطان پستان می‌گردد (۱۷).

از لحاظ ساختاری پروتئین *BRCA1* در پایانه آمینی (N-terminal) دارای یک دومین حلقوی (Ring Domain) است که در فرایندهای اوبی کوییناسیون دخالت دارد. این ناحیه با BARD1 میان‌کنش می‌کند و این دو پروتئین یک هترودیمر پایدار را ایجاد می‌کنند. این پروتئین در پایانه C (C-terminal) دو توالی تکراری با ساختار دومین کروی دارد که BRCT نامیده می شود و ۱۱۰ آمینو اسید دارد. BRCT ویژگی مشترک همه پروتئین‌های شرکت کننده در فرایندهای تعمیر DNA می‌باشد. جهش‌های بدمعنی ناحیه دومین حلقوی و BRCT منجر به کاهش و تخریب فعالیت‌های سرکوب‌کنندگی تومور (Tumor Suppression)، *BRCA1* می‌گردد. در حدفاصل این دو ناحیه خوشه SQ می‌باشد که مکان فسفوریلاسیون *BRCA1* به وسیله CHK2، ATM و ATR است که خود این فسفوریلاسیون سرآغاز عملیات تنظیم‌کنندگی این پروتئین در چرخه سلولی است. بنابراین جهش در این مکان باعث از دست رفتن این ویژگی پروتئین می‌شود (۱۸). پروتئین *BRCA2* شامل هشت توالی تکراری (BRC) است که با Rad51 میان‌کنش می‌دهد که Rad51 در فرایند نوترکیبی هومولوگوس خود به DNA متصل می‌گردد (۱۸).

گزارشات بسیار محدود در ارتباط با فعالیت اتصال به DNA (DNA-Binding) این دو پروتئین وجود دارد. *BRCA1* در شرایط آزمایشگاهی *(in vitro)* به ساختارهای چهار رشته‌ای DNA متصل می‌شود و در نتیجه این اتصال، فعالیت‌های نوکلیولیتیک MRN

(Mre11/Rad50/Nbs1) (کمپلکسی که در آسیب‌های وارده به DNA در اثر اشعه یا عوامل دیگر، ایجاد می‌شود وآسیب را تعمیر می‌کند)، را کاهش می‌دهد (۱۹). این مشاهدات پیچیده است و به احتمال عمل اتصال به DNA پروتئین *BRCA1* را به مقدار زیادی تصدیق می‌کند. در هر حال با اینکه *BRCA1* به عنوان بخشی مهم از کمپلکس‌های پروتئینی بزرگ شناخته شده، ولی معلوم نیست که آیا این اتصال برای انجام کار اساسی است یا خیر (۱۹)؟ *BRCA2* نیز در انتهای C یک ناحیه ۸۰۰ آمینواسیدی دارد که مکان اتصال به تک رشته‌های DNA (Single Strand DNA) می‌باشد (۱۹).

با توجه به آنچه گفته شد، جهش‌های شناسایی شده در این مطالعه کوتاه را می‌توان گروه‌بندی، و اثر بیماری‌زایی آنها را با توجه به عملکردشان در ساختار پروتئین بررسی نمود.

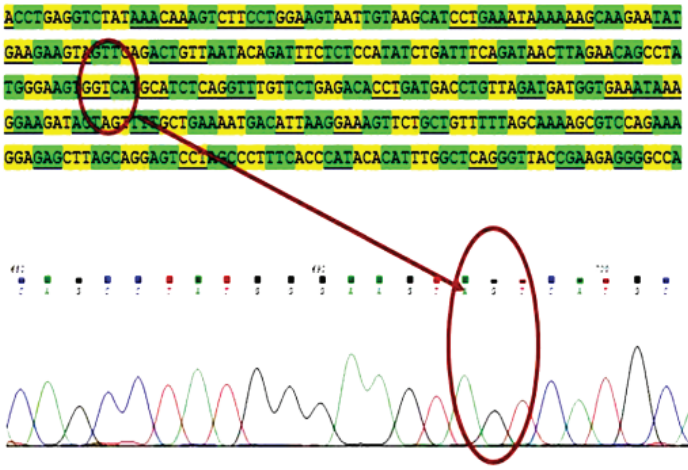
حذف‌های ناحیه اینترون یعنی IVS7+83(-TT) و IVS 9-70(-CATT) و پلی‌مورفیسم‌های Ser1436 و Leu771 مربوط به ژن *BRCA1* و Leu1521, Val2171, Glu1035 مربوط به ژن *BRCA2* در بیشتر از یک خانواده مشاهده شد.

در میان این واریانت‌ها تعدادی از آنها تحت عنوان Synonymousها هستند (جدول ۳). که عبارتند از:
(Leu771Leu, Val2171Val, Leu1521Leu, Glu1735Glu, Ser1436Ser).

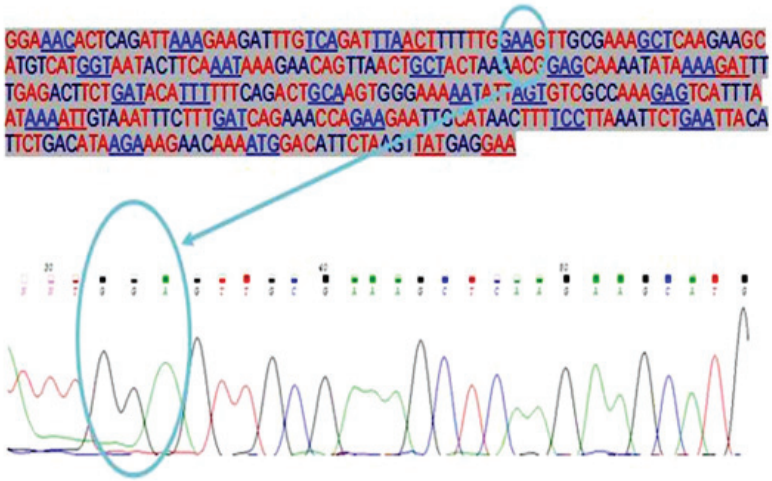
در این حالت یک تغییر تک نوکلیوتیدی، تغییری در نوع اسیدآمینه ایجاد نمی‌کند و در نتیجه تغییری نیز در ساختار پروتئین ایجاد نمی‌کند. تاکنون هیچ اثر پاتوژنیکی در ارتباط با این گونه تغییرات گزارش نشده است (۲۱-۲۰).

حذف‌های IVS7+83 (TT), IVS8 -70 (CATT) به احتمال بیماری‌زا نیست؛ چون همگی در ناحیه اینترون و دور از مکان برش اینترون‌ها (Splice Site) قرار دارند. البته مکان‌های آلترناتیو اسپلایسینگ را بررسی نموده‌ایم و هیچ نوع مکان غیرعادی در این ناحیه مشاهده ننموده‌ایم.

در این تحقیق جایگزینی‌های بدمعنی جدید (G3538A) Gly1140Ser (شکل ۱) مربوط به اگزون ۱۱ ژن BRCA1 در هر پنج خانواده و هم‌چنین Gln373His و Glu1391Gly (شکل ۲) به ترتیب مربوط به اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ در ژن *BRCA2* در خانواده D که تا کنون در دنیا گزارش نشده است، شناسایی گردید.



شکل ۱: Codon 1140...mut GGT>AGT GLy>Ser



شکل ۲: Codon1391....MUT GAA>GGA Glu>Gly

علاوه بر این پنج جایگزینی بدمعنی از قبل گزارش شده (HGMD) یعنی Gly1738Glu, leu871pro, Ser1613Gly, ser1040Asn و Glu1038Gly همگی مربوط به ژن *BRCA1* در بیش از یک خانواده تشخیص داده شد.

جایگزینی‌های بدمعنی Ser1613Gly, Glu1038Gly Gly1140Ser, Leu871Pro به عنوان اشکال پلی‌مورفیسم که گاه اثرات بیماری‌زایی داشته‌اند از قبل گزارش شده‌اند (۲۷-۲۲).

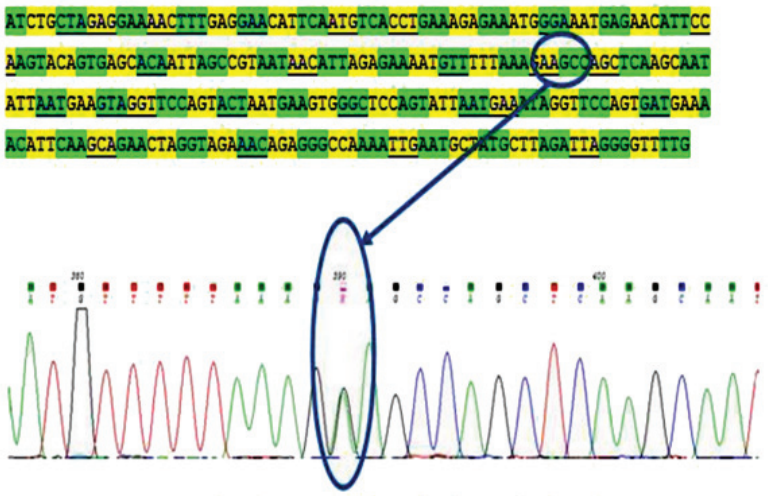
در ارتباط با مکان جهش Gly1140Ser (G3538A) بر روی پروتئین *BRCA1*، باید گفت نقاط داغ (Hot point) در حد فاصل ناحیه دومین حلقوی و BRCT مکان‌های S988 محل اتصال CHK2 و S1387/1423/1524 محل اتصال ATM به *BRCA1* است (۱۸) بنابراین این جهش جدید شناسایی شده جزو نقاط داغ نیست و یک پلی‌مورفیسم می‌باشد. البته شاید کار بر روی نمونه‌های بیشتر نتایج دیگری را در این ارتباط به دنبال داشته باشد. در ارتباط با جهش‌های Gln373His و Glu1391Gly در ژن *BRCA2*، می‌بایستی با بررسی خانواده‌های بیشتر و هم‌چنین آزمایشات *in vitro* اثر این جایگزینی‌ها را بر عملکرد پروتئین بررسی نمود.

در خانواده B جهش بدمعنی G>A5331 شناسایی شد. اثر واقعی این تغییر تک نوکلیوتیدی (G1738E) (شکل ۳) بر روی عمل پروتیین *BRCA1* به خوبی شناخته شده نیست. گلایسین تغییر یافته، بر سطح سوپرکویل ناحیه لینکردومین BRCT از ژن *BRCA1* قرار دارد. بنابراین جهش در این ناحیه می‌تواند بر عمل پروتیین اثر بگذارد (۲۸). این جهش از قبل در ۴ بیمار یونانی - که سابقه فامیلی با هم نداشته‌اند - (۲۹) و در سال ۲۰۰۴ نیز توسط ابکویچ در چند بیمار گزارش شده است (۲۷) که با آزمایشات مکمل انجام شده، پی برده‌اند که این نوع جایگزینی باعث از دست رفتن عمل پروتیین در شرایط آزمایشگاه (*in vitro*) می‌شود (۳۰). بر اساس این مطالعات و تاریخچه خانوادگی افراد توصیف شده در اینجا و عدم وجود جهش در دختر سالم و هم‌چنین در ۳۰ نفر کنترل، ما را بر این امر سوق می‌دهد که بگوییم این جهش پاتوژنیک است، اگرچه باز هم نیاز به داده‌های بیشتر می‌باشد. در خانواده A جایگزینی‌های Ser1613Gly, Gly1140Ser و IVS7+83(-TT) در ژن *BRCA1* و Val2171Val, Leu1521Leu در ژن *BRCA2* دیده می‌شود. تمام این موارد در سه دختر بیمار این خانواده که در سن زیر ۴۰ سال به سرطان مبتلا شده‌اند، دیده می‌شود. جایگزینی‌های Leu771, Ser1436 در ژن *BRCA1* و Leu1521, Val2171 و هم‌چنین حذف در ناحیه اینترون IVS7+83(-TT) همان طور که اشاره شد چون تغییری در نوع اسیدآمینه نداده‌اند پس بر ساختار پروتیین‌های *BRCA1*, *BRCA2* هیچ نوع اثری ندارند (۱۹، ۲۰) بنابراین اثر بیماری‌زایی هم نخواهند داشت.

طی بررسی‌های انجام شده بر افراد کنترل، Glu1038Gly (شکل ۴) را در پنج فرد ۷۰ سال به بالا از ۳۰ نفر کنترل که تاکنون به سرطان پستان مبتلا نشده‌اند، مشاهده کردیم که موارد Leu871Pro, Ser1613Gly در هیچ‌کدام از افراد کنترل مشاهده نشد.

جایگزینی Gly1140Ser که تاکنون گزارش نشده در هر ۴ خانواده بررسی و نیز در دو نفر از افرادی که به عنوان کنترل بودند، مشاهده کردیم. وجود جایگزینی‌های بدمعنی Ser1613Gly, Glu1038Gly, Gly1140Ser, Leu871Pro در سه خواهر خانواده A و هم‌چنین Glu1038Gly, Gly1140Ser, Ser1613Gly در دو خواهر حامل ۳۹ و ۴۰ ساله خانواده B و عدم بیمار شدن آنها و به علاوه Glu1038Gly, Gly1140Ser در ژن *BRCA1* در کنار Glu1391Gly و Gln373His در ژن *BRCA2* در سه خواهر بیمار خانواده D و ser1040Asn, Gly1140Ser در دختر سالم خانواده E و مقایسه آن با نتایج حاصل از کنترل‌ها می‌توان استنباط نمود که به احتمال ژنوتیپ ایجاد شده ناشی از آلل‌های Ser1613Gly, Gly1140Ser, Glu1038Gly Leu871Pro دارای اثر پاتوژنیک می‌باشد و ژنوتیپ‌های Glu1038Gly, Gly1140Ser Ser1613Gly و هم‌چنین Glu1038Gly, Gly1140Ser و یا هر کدام از این تغییرات تک نوکلیوتیدی به تنهایی یعنی Gly1140Ser, Glu1038Gly و Ser1613Gly دارای قدرت بسیار در مستعد کردن فرد برای ابتلا به سرطان پستان می‌باشند ولی به تنهایی عامل کافی جهت ابتلا به بیماری نیستند، اگر چه این داده‌ها کافی نیست و برای اطمینان داده‌های بیشتر مورد نیاز است. Dunning در مطالعاتی که انجام داده به نتایج مشابهی رسیده است (۳۱).

شکل ۳: **Mut GGA/GAA..Gly/Glu**



شکل ۴: CD1038 MUT....GAA/GGA Glu/Gly

در خاتمه باید گفت برای رسیدن به یک جدول کامل از جهش‌های شایع در ایران بایستی تعداد بیشتری از خانواده‌ها را بررسی نمود تا با اطمینان بیشتر بتوان در میان این تعداد از جهش‌ها، نوع بیماری‌زایی آنها را شناسایی نمود ودر آینده با تکنیک‌های ساده‌تر وکم‌هزینه‌تر برای بیماران وخانواده‌های در معرض خطر تست ژنتیکی را انجام داد.

نتیجه‌گیری

تعدادی واریانت با تعیین توالی DNA بیست وهشت نفر که متعلق به پنج خانواده در معرض سرطان بودند، شناسایی شد اما بخش عمده آنها حالت‌های پلی‌مورفیسم است. جهش Gly1140Ser در ژن *BRCA1* و جهش‌های Glu1391Gly و Gln373His در ژن *BRCA2* جدید هستند. دو نوع واریانت ناحیه اینترون در ژن *BRCA1* در دو خانواده مجزا دیده شد «IVS8-70(-CATT) و IVS7+83(-TT)». جهش Gly1738Glu بیماری‌زاست. این نتایج نشان می‌دهد که به احتمال ژنوتیپ ناشی از آلل‌های Leu871Pro, GLu1038Gly، Ser1613Gly, Gly1140Ser در فردی که حامل هر ۴ جهش است، بیماری‌زا می‌باشد. هم‌چنین جهش‌های Gly1140Ser و Glu1038Gly در ژن *BRCA1* در کنار جهش‌های Glu1391Gly و Gln373His در ژن *BRCA2* در یک خانواده باعث بیماری گردیده است. به طور قطع نتایج این تحقیق از این تفکر حمایت می‌کند که غربال‌گری جهش‌های *BRCA1* و *BRCA2* ممکن است یک اثر قوی برروی مراقبت از سلامتی در یک جمعیت در معرض خطر داشته باشد. این مطالعه می‌باید برای آنالیز تعداد زیادی از بیماران به منظور شناسایی جهش‌های بیماری‌زا در این دو ژن گسترش و ادامه یابد.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر و آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی که هزینه‌های مالی طرح را بر عهده داشته‌اند، تشکر و قدردانی می گردد.

References

1. Ripperger T, Gadzicki D, Meindi A, Schlegelberger D. Breast cancer susceptibility: Current knowledge and implications for genetic counseling. Eur J Hum Genet. 2009; 17: 722-731.
2. Falagas ME, Zarkadoulia EA, Ioannidou EN, Peppas G, Christodoulou C, Rafailidis PI. The effect of psychosocial factors on breast cancer outcome: a systematic review. Breast Cancer Res. 2007; 9: R44.
3. Nathanson KL, Wooster R, Weber BL. Breast cancer genetics: What we know and what we need. Nat Med.. 2001; 7: 552-556.
4- Fackenthal JD, Olopade OI. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. Nat Rev Cancer. 2007; 7: 937-948.
5. King MC, Marks JH, Mandell JB; New York Breast Cancer Study Group. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. Science. 2003; 302: 643-646.
6. Le Page F, Randrianarison V, Marot D, Cabannes J, Perricaudet M, Feunteun J, et al. BRCA1 and BRCA2 Are Necessary for the Transcription-Coupled Repair of the Oxidative 8-Oxoguanine Lesion in Human Cells. Cancer Res. 2000; 60: 5548-5552.
7. Starita LM, Parvin JD. The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. Curr Opin Cell Biol. 2003; 15: 345-350.
8. Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. Nat Rev Cancer. 2004; 4: 665-676.
9. Unger MA, Nathanson KL, Calzone K, Antin-Ozerkis D, Shih HA, Martin AM, et al. Screening for genomic rearrangements in families with breast and ovarian cancer identifies BRCA1 mutations previously missed by conformation-sensitive gel electrophoresis or sequencing. Am J Hum Genet. 2000; 67: 841-850.
10. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. Am J Hum Genet. 2003; 72: 1117-1130.

11. Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J, et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in families at high risk of breast cancer. JAMA. 2006; 295: 1379-1388.
12. Campos B, Díez O, Domènech M, Baena M, Balmaña J, Sanz J, et al. RNA analysis of eight BRCA1 and BRCA2 unclassified variants identified in breast/ovarian cancer families from Spain. Hum Mutat. 2003; 22: 337.
13. Beggs AD, Hodgson SV. Genomics and breast cancer: The different levels of inherited susceptibility Eur J Hum Genet. 2009; 17: 855-856.
14. Bonadona V, Sinilnikova OM, Chopin S, Antoniou AC, Mignotte H, Mathevet P, et al. 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: 404-413.
15. 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: 395-405.
16. Deng CX, Wang RH. Roles of BRCA1 in DNA damage repair: a link between development and cancer. Hum Mol Genet. 2003; 12 Spec No 1: R113-123.
17. Arun B, Vogel KJ, Lopez A, Hernandez M, Atchley D, Broglio KR,et al. igh prevalence of preinvasive lesions adjacent to BRCA1/2-associated breast cancers. Cancer Prev Res; 2009; 2(2): 122-127.
18. Scully R, Puget N. BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast cancer. Biochimie. 2002; 84: 95-102.
19. 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: 7713-7720.
20. Vallon-Christersson J, Cayanan C, Haraldsson K, Loman N, Bergthorsson JT, Brondum-Nielsen K, et al. Functional analysis of BRCA1 C-terminal missense mutations identified in breast and ovarian cancer families. Hum Mol Genet. 2001; 10: 353-360.
21. 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. 2000; 60: 2411-2418.
22. Couch FJ, DeShano ML, Blackwood MA Calzone K, Stopfer J, Campeau L. BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. N Engl J Med. 1997; 336: 1409-1415.
23. Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE, Hulick M, Ward BE, Lingenfelter B, et al. Clinical characteristics of individuals with germ line mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. J Clin Oncol. 2002; 20: 1480-1490.
24. Evans DG, Lalloo F, Wallace A, Rahman N. Update on the Manchester Scoring System for BRCA1 and BRCA2 testing. J Med Genet. 2005; 42(7): e39.
25. Antoniou AC, Pharoah PP, Smith P, Easton DF. The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancer. Br J Cancer. 2004; 91: 1580-1590.
26. Lin YP, Chen YL, Chang HT, Li S. Nature of genetic variants in the BRCA1 and BRCA2 genes from breast cancer families in Taiwan. Life Science Journal. 2009; 6: 99-103.
27. 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: 492-507.
28. 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.
29. Huyton T, Bates PA, Zhang X, Sternberg MJ, Freemont PS. The BRCA1 C-terminal domain: structure and function. Mutat Res. 2000; 460: 319-332.
30. Konstantopoulou I, Kroupis C, Ladopoulou A, Pantazidis A, Boumba D, Lianidou E, et al. BRCA1 mutation analysis in breast/ovarian cancer families from Greece. Hum Mutat. 2000; 16: 272-273.
31.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: 285-289.