Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 4:11 +0330 on Wednesday October 28th 2020

BRIEF REPORT

Evaluating the Most Common Mutation in BRCAI and BRCA2 Genes in Women Who had Mothers with Brest Cancer and Controls

Faezeh Sarvar[1],
Reza Nekoeian[2],
Samira Saei rad[3],
Mohammad Javad Gharavi[4],
Mohsen Tehrani[5]
Maryam Sarvar Taherabadi[6],
Masoud Sharif[3],
Saeid Abediankenari[7]

[1] MSc in Immunology, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Assistant of Professor, Department of Genetics, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] BSc in Laboratory Sciences, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran
[4] Professor, Department of Parasitology, School of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5] Assistant of Professor, Department of Immunology, Immunogenetic Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[6] BSc in BioChemistry, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran
[7] Professor, Immunogenetic Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received May 7, 2016 ; Accepted September 13, 2016)

Abstract

Background and purpose: Breast Cancer is one of the health problems in every population. The aim of this study was to determine the frequency of BRCA1 and BRCA2 common mutations in women whose mothers were diagnosed with breast cancer.

Materials and methods: A case–control study was performed in 109 females (less than 40 years of age) who had mothers with breast cancer. For scanning of genomic mutations in BRCA1 and BRCA2, genes mutation analysis was done in BRCA1 (exon2, 20) and BRCA2 (exon11) using Real Time PCR test. We also studied 109 healthy controls without family history of breast cancer.

Results: No any mutation was found in this population.

Conclusion: This study showed no mutation in affected and control group. Therefore, other mutations and genes may have a role in breast cancer pathogenesis in our population.

Keywords: breast neoplasms, BRCA1, mutation

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26 (141): 137-142 (Persian).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 4:11 +0330 on Wednesday October 28th 2020

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۱ مهر سال ۱۳۹۵ (۱۴۲-۱۳۷)

بررسی موتاسیون های شایع ژن BRCA1 و BRCA2 در دختران مادران مبتلا به سرطان سینه و مقایسه آن با گروه کنترل

فائزه سرور[۱]
رضا نکوییان[۲]
سمیرا ساعی راد[۳]
محمد جواد غروی[۴]
محسن تهرانی[۵]
مریم سرور طاهر آبادی[۶]
مسعود شریف[۳]
سعید عابدیان کناری[۷]

چکیده

سابقه و هدف: سرطان سینه یکی از مشکلات بهداشتی در جامعه محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه تعیین شیوع ژن‌های شایع BRCA1 و BRCA2 در دختران مادران مبتلا به سرطان سینه بوده است.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه مورد-شاهدی، تعداد ۱۰۹ نفر از خانم‌هایی با سن زیر ۴۰ سال که مادر مبتلا به سرطان سینه داشتند، انتخاب شدند. جهت تعیین جهش در ژن های BRCA1 و BRCA2، اگزون های ۲ و ۲۰ برای BRCA1 و اگزون ۱۱ در BRCA2 با استفاده از روش Real Time PCR استفاده شد. علاوه بر این، ۱۰۹ فرد سالم، بدون تاریخچه خانوادگی ابتلا به سرطان پستان به عنوان کنترل مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: هیچ یک از جهش‌های مورد بررسی در جمعیت مورد مطالعه یافت نشد.

استنتاج: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که هیچ یک از ژن‌های مورد مطالعه در نمونه‌های تست و کنترل دیده نشده است. لذا شاید جهش‌های دیگر در پاتوژنز سرطان پستان در جمعیت مورد مطالعه دخالت دارند.

واژه های کلیدی: سرطان پستان، موتاسیون، آنتی ژن سرطان پستان ۱

مقدمه

سرطان‌ها یکی از مشکلات بهداشتی- درمانی در جوامع محسوب می‌شوند که به دلیل جهش در سلول‌های ترانسفرم شده ایجاد می گردند. سرطان سینه، شایع‌ترین سرطان منجر شونده به مرگ در زنان در کل دنیا می‌باشد. این بیماری ۲۳ درصد از کل موارد ابتلا به سرطان و نیز ۱۴ درصد از موارد منجر به مرگ ناشی از سرطان در سال ۲۰۰۸ را شامل می‌شود-۱). احتمال بروز سرطان سینه در افرادی که سابقه ابتلا به سرطان سینه در خانواده دارند، بالا است(۵). ژن BRCA2 در جایگاه 13q12,13 (ناحیه ۱۲ و ۱۳ کروموزوم شماره ۱۳)

مولف مسئول: سعید عابدیان کناری- ساری: مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران E-mail: abwsianlab@yahoo.co.ck
۱. کارشناسی ارشد ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۳. کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
۴. استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۵. استادیار، گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۶. کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
۷. استاد، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۲/۱۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۲/۲۰ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۶/۲۳

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 4:11 +0330 on Wednesday October 28th 2020

شناسایی شد(۶). ژن‌های BRCA1,2 مسئول ۲۵-۲۰ درصد خطرات ابتلا به سرطان سینه ارثی می‌باشند. موتاسیون در این دو ژن احتمال بروز سرطان سینه و تخمدان را در طول زندگی افزایش می‌دهد. زنانی که حامل موتاسیون در این دو ژن می‌باشند، شانس بیش‌تری برای ابتلا به سرطان سینه تا قبل از ۵۰ سالگی دارند(۸،۷). نقش اصلی BRCA1 ترمیم DNA می‌باشد. شیوع و فنوتیپ موتاسیون BRCA بر اساس کشور و نژاد، متفاوت است(۹). اطلاعات راجع به این موتاسیون‌ها در ایران بسیار کم است. لذا هدف از انجام این مطالعه بررسی شیوع این موتاسیون‌ها در جمعیت مورد مطالعه است.

مواد و روش ها

در یک مطالعه مورد- شاهدی، ۱۰۹ نفر خانم سالم که مادرشان و یک نفر دیگر از اقوام درجه یک و یا خانم‌های سالمی که مادرشان و حداقل ۲ نفر از اقوام درجه دو در خانواده آن‌ها در سن بین ۴۰ تا ۴۵ سال مبتلا به سرطان سینه شده‌اند، به عنوان گروه مورد انتخاب شدند. ۱۰۹ نفر از خانم‌های سالمی که هیچ گونه سرطان سینه و تخمدان در خانواده نداشته‌اند، به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. گروه مورد و شاهد از مراجعه‌کنندگان به مرکز بیماری‌های پستان در کرج و نیز آزمایشگاه مرکزی فردیس پس از تکمیل رضایت نامه انتخاب شدند. از هر فرد ۵ سی‌سی خون کامل در ضد انعقاد EDTA گرفته شد و DNA نمونه‌ها به روش Salting Out استخراج و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید و سه جهش شایع شامل 185delAG(rs80357713)، 5382insC(rs80357906) در BRCA1 و 6174delT(rs80359550) در BRCA2 با استفاده از روش Real-Time PCR بررسی شدند. جهت انجام واکنش PCR از دستگاه Applied Biosystem Real-Time PCR و کیت Master Mix شرکت Fermentas (Cat No. K0221) استفاده شد. در این واکنش، ۳ میکروتیوب برای هر نمونه انتخاب نموده، به هر میکروتیوب Master Mix، آب مقطر استریل و سپس پرایمرهای مربوط به جهش‌های مورد مطالعه اضافه گردید (جدول شماره ۱). پس از آن مقدار ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده به هر کدام از میکروتیوب‌ها اضافه شده و طبق برنامه تعریف شده در دستگاه، جهش‌های موردنظر بررسی شدند (جدول شماره۲).

جدول شماره ۱: برنامه دمایی- زمانی، واکنش زنجیره ای پلیمراز

مرحله	درجه حرارت	زمان	تعداد
Pre-Denaturation	۹۴ °C	۵ min	۱
Denaturation	۹۴ °C	۳۰ S	
Annealing	۶۴ °C	۱۵ S	۵
Extention	۶۷ °C	۵ S	
Holding	۱۰ °C		

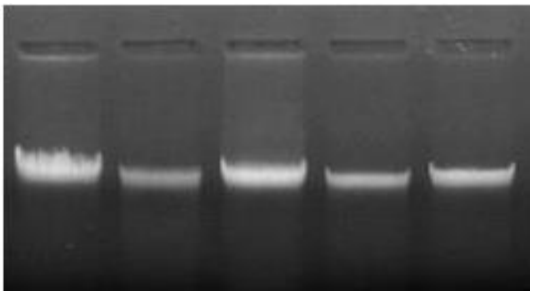
یافته ها و بحث

جهت بررسی کیفیت نمونه‌های استخراج شده، ۳µl از DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد (تصویر شماره ۱).

جدول شماره ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده در شناسایی ژن های مرتبط با سرطان پستان

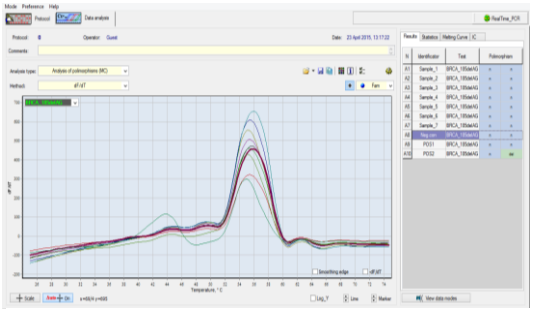
پرایمر		توالی	اندازه محصول
BRCA1 185delAG	Common forward (P1)	5' ggttggcagcaatatgtgaa	---
	Wild-type reverse (P2)	5' gctgacttaccagatgggactctc	۳۳۵ bp
	Mutant reverse (P3)	5'cccaaattaatacactcttgtcgtgacttaccagatgggacagta	۳۵۴ bp
BRCA1 5382insC	Common reverse (P4)	5' gacgggaatccaaattacacag	---
	Wild-type forward (P5)	5' aaagcgagcaagagaatcgca	۲۷۱ bp
	Mutant forward (P6)	5'aatcgaagaaaccaccaaagtccttagcgagcaagagaatcacc	۲۹۵ bp
BRCA2 6174delT	Common reverse (P7)	5' agctggtctgaatgttcgttact	---
	Wild-type forward (P8)	5' gtgggatttttagcacagctagt	۱۵۱ bp
	Mutant forward (P9)	5'cagtctcatctgcaaatacttcagggatttttagcacagcatgg	۱۷۱ bp

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 4:11 +0330 on Wednesday October 28th 2020



تصویر شماره ۱: ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده

در بررسی پلی‌مورفیسم ژن BRCA1 در جایگاه های 185delAG(rs80357713) و 5382insC(rs80357906) از مجموع ۱۰۹ نفر از افراد با خطر بالا و نیز ژن BRCA2، هیچ یک از این جهش‌ها یافت نشد (نمودار شماره ۱) (جدول شماره ۳).



نمودار شماره ۱: نمونه ای از منحنی تکثیری موتاسیون 185delAG (کنترل +)

جدول شماره ۳: نتایج حاصل از بررسی پلی مورفیسم های ژن BRCA1&2

چند شکلی	گروه با خطر بالا	گروه کنترل
185delAG (rs80357713)	Negative	Negative
5382insC (rs80357906)	Negative	Negative
6174delT (rs80359550)	Negative	Negative

ژن‌های BRCA1 و BRCA2 از خانواده سرکوب کننده تومور بوده و عمده عملکرد آن‌ها ترمیم DNA در سلول‌ها می باشد(۱۰). مطالعه اخیر در زاهدان با روش Fragment Analysis با سه آلل D17S855، D17S1322 و D17S1323 نشان می‌دهد که دو نفر در ژن D17S855 و دو مورد در ژن D17S1323 جهش داشتند که وجود این جهش‌ها در فرد می‌تواند یک مارکر پیش‌آگهی‌دهنده در ابتلا به سرطان سینه و تخمدان اهمیت داشته باشد(۹).

نتیجه مطالعه ای که در آن حداقل یک نفر در خانواده درجه اول آن‌ها به سرطان سینه مبتلا شده‌اند، نشان داد که موتاسیون مرتبط با بیماری در ۱۴ خانواده (۱۶/۵ درصد) یافت شد(۱۰).

تحقیقی دیگر در ۶۶ خانواده که حداقل سه مورد ابتلا به سرطان سینه و تخمدان داشتند، نشان داد که ۲۶ خانواده دارای سرطان سینه و تخمدان، ۴ خانواده دارای سرطان تخمدان و ۳۶ خانواده فقط دارای سرطان سینه بودند که در ۳۵ درصد این خانواده‌ها موتاسیون‌های BRCA1 مشاهده شد(۱۱). جهش‌های بررسی شده در این پژوهش بر اساس شایع ترین جهش های یافت شده در دنیا بوده است که هیچ یک در جمعیت مورد مطالعه ما یافت نشد. منفی بودن آن ها به این معناست که احتمالاً جهش های شایعی که در جمعیت های دیگر در ژن BRCA1 عامل سرطان سینه است، در جمعیت مورد آزمایش ما متفاوت هستند. علت این که در این پژوهش خویشاوندان سالم را بررسی کرده‌ایم، بررسی Penetrance ژن BRCA است. مبحث Penetrance در علم ژنتیک به معنی نفوذ ژن بیماری‌زا در فنوتیپ فرد می باشد. اگر Penetrance ناقص باشد، فرد حامل جهش است، ولی جهش را بروز نمی دهد و فنوتیپ کاملاً سالم دارد، ولی چنانچه Penetrance کامل باشد، فرد حامل جهش، حتماً بیماری را نشان می‌دهد(۱۲). به علاوه کیت‌های تجاری موجود در بازار بر اساس ذخیره ژنتیکی (Gene pool) جمعیت های دیگر طراحی شده‌اند که ضروری است از کیت‌هایی استفاده شود که پرایمرهای موجود در آن‌ها بر اساس نتیجه پژوهش‌های انجام شده در کشور طراحی شده باشند. هم‌چنین مطالعه حاضر به علت محدویت زمان و تعداد نمونه، فقط بر روی افراد پر خطر انجام شد که اکثر مادران این افراد فوت شده بودند، در نتیجه دسترسی به نمونه آن‌ها و بررسی جهش‌های مادران مقدور نبوده است.

هم‌اکنون، بهترین و مطمئن‌ترین روش پیدا کردن ژن معیوب و موتاسیون‌های موجود در ذخیره ژنتیکی

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 4:11 +0330 on Wednesday October 28th 2020

یک خانواده با سابقه سرطان سینه ارثی، انجام آزمایش NGS(Next Generation Sequncing) می‌باشد که در آن کل اگزون‌های ژن‌های دخیل در سرطان سینه بررسی می‌گردد. ولی به دلیل هزینه بالای این آزمایش و نیز فوت‌شدن فرد مبتلا در اکثر موارد، امکان انجام این آزمایش برای همه مقدور نیست. لذا ادامه چنین پژوهش‌هایی که نتیجه آن یافت شدن جهش‌های شایع در جمعیت کشور و نیز جهش‌های غیر شایع می‌باشد، می‌تواند کمک بزرگی به پیش‌آگهی و پیشگیری از سرطان سینه نماید(۱۳).

در مطالعه حاضر هیچ ارتباط معنی‌داری بین وجود هر یک از این جهش‌ها و سرطان سینه در جمعیت مورد بررسی یافت نشد. لذا با توجه به مهم بودن نقش این جهش‌ها در نواحی جغرافیایی دیگر، لزوم انجام چنین پژوهش‌هایی در کشور و در جمعیت‌های مختلف ضروری است.

References

1. Abediankenari S, Janbabaei Mollae G, Ghasemi M, Yousefzadeh Y, Bahrami M, Alimoghaddam K.Vaccination of diffuse large B-cell lymphoma patients with antigen-primed dendritic cells. Acta Med Iran 2013; 51(5): 284-288.
2. Abediankenari S, Jeivad F. Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms and gastric cancer in Iran.Asian Pac J Cancer Prev 2013; 14(5): 3187-3190.
3. Abediankenari S, Ghasemi M, Kim YJ. Human leukocyte antigen-G expression on dendritic cells induced by transforming growth factor-beta1 and CD4+T cells proliferation. Iran Biomed J 2011; 15(1-2): 1-5.
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. CA: a Cancer Journal for Clinicians 2008; 58(2): 71-96.
5. Loman N, Johannsson O, Kristoffersson U, Olsson H, Borg Å. Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of early-onset breast cancer. J Natl Cancer Inst 2001; 93(16): 1215-1223.
6. Ford D, Easton D, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. Am J Hum Genet 1998; 62(3): 676-689.
7. Haraldsson K, Loman N, Zhang Q-X, Johannsson O, Olsson H, Borg Å. BRCA2 germ-line mutations are frequent in male breast cancer patients without a family history of the disease. Cancer Res 1998; 58(7): 1367-1371.
8. King M-C, Marks JH, Mandell JB, Group NYBCS. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. Science 2003; 302(5645): 643-646.
9. Miresmaeili SM, Kordi Tamandani DM, Kalantar SM, Moshtaghioun SM. Haplotype analysis of BRCA1 intragenic markers in Iranian patients with familial breast and ovarian cancer. Int J Reprod Biomed (Yazd) 2016; 14(4): 271-274.
10. Adami H-O, Graffman S, Lindgren A, Sällström J. Prognostic implication of estrogen receptor content in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 1985; 5(3): 293-300.
11. Miller JW, King JB, Joseph DA, Richardson LC, CDC. Breast cancer screening among adult women—behavioral risk factor surveillance system, United States, 2010. MMWR Suppl 2012; 61(2): 46-50.

12. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. J Clin Oncol 2007; 25(11): 1329-1333.
13. Feliubadaló L, Lopez-Doriga A, Castellsagué E, del Valle J, Menéndez M, Tornero E, et al. Next-generation sequencing meets genetic diagnostics: development of a comprehensive workflow for the analysis of BRCA1 and BRCA2 genes. Eur J Hum Genet 2013; 21(8): 864-870.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 4:11 +0330 on Wednesday October 28th 2020