

Evaluating the Most Common Mutation in BRCA1 and BRCA2 Genes in Women Who had Mothers with Breast Cancer and Controls

Faezeh Sarvar¹,
Reza Nekoeian²,
Samira Saei rad³,
Mohammad Javad Gharavi⁴,
Mohsen Tehrani⁵,
Maryam Sarvar Taherabadi⁶,
Masoud Sharif³,
Saeid Abediankenari⁷

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).

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 می شود. هدف از این مطالعه تعیین شیوع ژن های شایع BRCA1 و BRCA2 در دختران مادران مبتلا به سرطان سینه بوده است.
مواد و روش ها: در یک مطالعه مورد-شاهدی، تعداد ۱۰۹ نفر از خانم هایی با سن زیر ۴۰ سال که مادر مبتلا به سرطان سینه داشتند، انتخاب شدند. جهت تعیین جهش در ژن های BRCA1 و BRCA2، آگزون های ۲ و ۲۰ برای BRCA1 و آگزون 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.
یافته ها: هیچ یک از جهش های مورد بررسی در جمعیت مورد مطالعه یافت نشد.
استنتاج: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که هیچ یک از ژن های مورد مطالعه در نمونه های تست و کنترل دیده نشده است. لذا شاید جهش های دیگر در پاتوژنز سرطان پستان در جمعیت مورد مطالعه دخالت دارند.

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

مقدمه

سرطان و نیز ۱۴ درصد از موارد منجر به مرگ ناشی از سرطان در سال ۲۰۰۸ را شامل می شود (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)

سرطان ها یکی از مشکلات بهداشتی - درمانی در جوامع محسوب می شوند که به دلیل جهش در سلول های ترانسفرم شده ایجاد می گردند. سرطان سینه، شایع ترین سرطان منجر شونده به مرگ در زنان در کل دنیا می باشد. این بیماری ۲۳ درصد از کل موارد ابتلا به

E-mail: abwsianlab@yahoo.co.ck

مؤلف مسئول: سعید عابدیان کناری - ساری: مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

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

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 فوتوتیپ 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.

سانتی‌گراد نگهداری گردید و سه جهش شایع شامل 5382insC(rs80357906)، 185delAG(rs80357713) 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 شماره ۲).

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

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		

یافته‌ها و بحث

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

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 هیچ‌گونه سرطان سینه و تخمدان در خانواده نداشته‌اند، به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. گروه مورد شاهد از مراجعه‌کنندگان به مرکز بیماری‌های پستان در کرج و نیز آزمایشگاه مرکزی فردیس پس از تکمیل رضایت‌نامه 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

مواد و روش‌ها

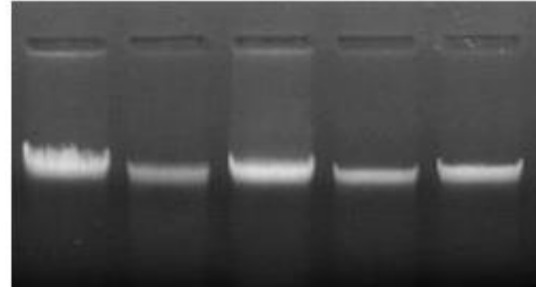
جدول شماره ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده در شناسایی ژن‌های مرتبط با سرطان پستان

اندازه محصول	توالی	پرایمر
---	5' ggftggcagcaaatgtgaa	Common forward (P1)
۳۳۵ bp	5' gctgactaccagatggactctc	Wild-type reverse (P2)
۳۵۴ bp	5' cccaaattaatacactctgtcgtgactaccagatggacagta	Mutant reverse (P3)
---	5' gacgggaatccaaattacacag	Common reverse (P4)
۲۷۱ bp	5' aaagcgagcaagagaatcgca	Wild-type forward (P5)
۲۹۵ bp	5' aatcgaagaaccaccaagtcccttagcgagcaagagaatcacc	Mutant forward (P6)
---	5' agctgtctgaatgtcttact	Common reverse (P7)
۱۵۱ bp	5' gtggatttttagcacagctagt	Wild-type forward (P8)
۱۷۱ bp	5' cagtctctctgcaaaactctcaggatttttagcacagcatgg	Mutant forward (P9)

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).

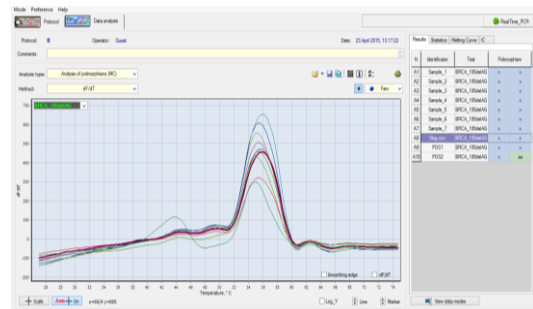
تحقیقی دیگر در ۶۶ خانواده که حداقل سه مورد ابتلا به سرطان سینه و تخمدان داشتند، نشان داد که ۲۶ خانواده دارای سرطان سینه و تخمدان، ۴ خانواده دارای سرطان تخمدان و ۳۶ خانواده فقط دارای سرطان سینه بودند که در ۳۵ درصد این خانواده‌ها موتاسیون‌های BRCA1 مشاهده شد (۱۱). جهش‌های بررسی شده در این پژوهش بر اساس شایع ترین جهش های یافت شده در دنیا بوده است که هیچ یک در جمعیت مورد مطالعه ما یافت نشد. منفی بودن آن‌ها 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 BRCA1 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 پژوهش های انجام شده در کشور طراحی شده باشند. هم‌چنین مطالعه حاضر به علت محدودیت زمان و تعداد نمونه، فقط بر روی افراد پرخطر 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 مطمئن ترین روش پیدا کردن ژن معیوب و موتاسیون‌های موجود در ذخیره ژنتیکی



تصویر شماره ۱: ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده

در بررسی پلی مورفیسم ژن BRCA1 در جایگاه های 5382insC(rs80357906) و 185delAG(rs80357713) 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

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

ژن های 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 D17S1322، D17S855 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 پیش‌آگهی دهنده در ابتلا به سرطان سینه و تخمدان اهمیت داشته باشد (۹).

می تواند کمک بزرگی به پیش آگهی و پیشگیری از سرطان سینه نماید (۱۳).

در مطالعه حاضر هیچ ارتباط معنی داری بین وجود هر یک از این جهش ها و سرطان سینه در جمعیت مورد بررسی یافت نشد. لذا با توجه به مهم بودن نقش این جهش ها در نواحی جغرافیایی دیگر، لزوم انجام چنین پژوهش هایی در کشور و در جمعیت های مختلف ضروری است.

یک خانواده با سابقه سرطان سینه ارثی، انجام آزمایش NGS (Next Generation Sequencing) می باشد که در آن کل اگزون های ژن های دخیل در سرطان سینه بررسی می گردد. ولی به دلیل هزینه بالای این آزمایش و نیز فوت شدن فرد مبتلا در اکثر موارد، امکان انجام این آزمایش برای همه مقدور نیست. لذا ادامه چنین پژوهش هایی که نتیجه آن یافت شدن جهش های شایع در جمعیت کشور و نیز جهش های غیر شایع می باشد،

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.