Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 12:08 IRDT on Monday May 20th 2019

Original Article

Identification of Nucleotide Changes of Two Known Causative Genes (BRCA2 and STK11) of Hereditary Breast Cancer in an Iranian Family using Exome Sequencing

Mojgan Ataei-Kachouei[1], Javad Nadaf[2], Mohammad Taghi Akbari[3*], Morteza Atri[4], Jacek Majewski[5], Yasser Riazalhosseini[5], Masoud Garshasbi[6]

1- PhD. Candidate, Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Ph.D., Department of Human Genetics, McGill University, Montreal, Canada
3- Associated Professor, Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4- M.D., Cancer Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5- Ph.D., McGill University and Genome Quebec Innovation Center, Montreal, Canada
6- Assistant Professor, Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: mtakbari@modares.ac.ir

Received: 04/May/2014, Accepted: 14/Jul/2014

Abstract

Objective: Since the identification of the two highly penetrant dominantly inherited genes, BRCA1/2, in the 1990s, a number of other genes have been identified which account for approximately 25% of the genetic basis for hereditary breast cancer. At least 75% are unidentified. The goal of this study is to investigate the presence or absence of a recessive pattern of inheritance in this heterogeneous disease whose possibility has been previously discussed by researchers.

Methods: In this study we used exome sequencing as the most recent approach for identification of the genetic basis of any disease. The results of exome sequencing were confirmed by Sanger sequencing.

Results: Although we did not find any homozygous mutation in this family, however a heterozygous 4bp deletion that led to a frame shift mutation was identified in exon 11 of the BRCA2 gene. Also identified was a heterozygous single nucleotide polymorphism in exon 9 of the STK11 gene.

Conclusion: The rs80359352 variation identified in this family is one of the frequent pathogenic mutations in the BRCA2 gene that has been reported in the BIC database. This variation has been previously observed in other ethnic populations such as Caucasians, Hispanics and the Chinese. In this study, for the first time, we report this mutation in Iranian population and its segregation in hereditary breast cancer.

Keywords: Hereditary breast cancer, Exome sequencing, BRCA2, rs80359352, STK11

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 17, No 3, Autumn 2014, Pages: 81-91

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 12:08 IRDT on Monday May 20th 2019

مقاله اصیل

شناسایی تغییرات نوکلئوتیدی دو ژن شناخته شده (BRCA2 و STK11) عامل سرطان پستان ارثی در یک خانواده ایرانی به روش تعیین توالی اگزوم

مژگان عطایی کچوئی[1]، جواد نداف[2]، محمدتقی اکبری[3*]، مرتضی عطری[4]، یاسک مجسکی[5]، یاسر ریاض الحسینی[5]، مسعود گرشاسبی[6]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دکتری تخصصی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه مک‌گیل، مونترال، کانادا
۳- دانشیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- متخصص جراحی عمومی، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۵- دکتری تخصصی، مرکز نوآوری ژنوم کبک، دانشگاه مک گیل، مونترال، کانادا
۶- استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی
Email: mtakbari@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۳/۰۲/۱۴ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۴/۲۳

چکیده

هدف: از زمان شناسایی دو ژن پرنفوذ BRCA1/2 با وراثت بارز در دهه ۱۹۹۰ تاکنون ژن‌های مختلفی شناسایی شده است که در مجموع حدود ۲۵ درصد اساس ژنتیکی سرطان پستان ارثی را توضیح می‌دهد و حداقل ۷۵ درصد آن همچنان ناشناخته باقی مانده است. هدف از انجام این مطالعه بررسی وجود یا عدم وجود الگوی وراثتی مغلوب در این بیماری هتروژن است که احتمال وجود آن توسط برخی از محققین مطرح شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از روش توالی‌یابی اگزوم که جدیدترین روش مورد استفاده در شناسایی اساس ژنتیکی بیماری‌ها است استفاده شد. همچنین نتایج توالی‌یابی اگزوم با روش توالی‌یابی سنگر تأیید شد.

نتایج: در بررسی حاضر هیچ‌گونه جهش هموزیگوتی در خانواده مورد بررسی شناسایی نشد اما یک حذف ٤ جفت بازی منجر به جهش تغییر چارچوب به‌صورت هتروزیگوت در اگزون ۱۱ ژن BRCA2 و همچنین یک چند شکلی تک نوکلئوتیدی هتروزیگوت در اگزون ۹ ژن STK11 در خانواده مورد نظر تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: واریاسیون rs80359352 که در این خانواده شناسایی شد یکی از جهش‌های بیماری‌زای شایع در ژن BRCA2 است که در پایگاه اطلاعاتی BIC گزارش شده است و قبلاً در گروه‌های نژادی مختلف از جمله قفقازی، هیسپانیک و چینی مشاهده شده است و از طریق این مطالعه برای اولین بار وجود آن در جمعیت ایرانی و تفکیک آن در سرطان پستان ارثی گزارش می‌شود.

کلیدواژگان: سرطان پستان ارثی، توالی‌یابی اگزوم، BRCA2، rs80359352، STK11

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳، صفحات: ۸۱-۹۱

مقدمه

سرطان پستان دومین سرطان شایع در دنیا و شایع‌ترین تومور بدخیم در زنان با حدود یک میلیون مورد جدید در هر سال در سراسر دنیا است [۱]. میزان خطر در طول زندگی در کشورهای توسعه یافته برای هر زن ۱ در ۱۰ است [۲]. در

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 12:08 IRDT on Monday May 20th 2019

ایران نیز سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان است و متأسفانه این سرطان زنان ایرانی را یک دهه زودتر از همتایانشان در کشورهای توسعه یافته درگیر می‌کند [۳]. بر طبق آمارهای گلوبوکن (GLOBOCAN) ۲۰۰۸ سرطان پستان در ایران دارای میزان بروز ۲۲ درصد است و میزان مرگ و میر ناشی از آن ۱٤/۸ درصد است. سرطان پستان یک بیماری چندعاملی با وراثت پیچیده است که تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد [٤]. این سرطان در ۵ درصد از موارد از نوع ارثی و در سایر موارد به شکل تک گیر بروز پیدا می‌کند [۵].

سرطان پستان ارثی به‌صورت تجمع خانوادگی قابل توجه سرطان پستان تعریف شده است و مسئول تقریباً ۵-۱۰ درصد از موارد تشخیص داده شده سرطان پستان است [٦]. از میان عوامل خطر متعددی که برای سرطان پستان شناسایی شده، مهم‌ترین آن‌ها سابقه خانوادگی مثبت است به‌گونه‌ای که خویشاوندان درجه اول فرد مبتلا نسبت به سایرین دارای دو برابر خطر بیشتر هستند [۷]. این میزان خطر با افزایش تعداد خویشاوندان مبتلا افزایش می‌یابد و در زنان با خویشاوند مبتلای جوان، ابتلای دو طرفه و سابقه شخصی از بیماری‌های خوش‌خیم پستان این میزان خطر بیشتر است [۸]. در سرطان پستان ارثی عوامل خطر محیطی شناخته شده که در بین خویشاوندان مرتبط هستند، غیرمحتمل است که بیش از ۱۰ درصد از میزان خطر را توجیه کنند [۹]. همچنین خطر بالاتر در دوقلوهای تک تخمی نسبت به دوقلوهای دوتخمی نشان دهنده اساس ژنتیکی تجمع خانوادگی سرطان پستان است [۱۰].

اگرچه ژن‌های مستعد کننده زیادی برای سرطان پستان ارثی شناخته شده‌است ولی قسمت اعظم اساس ژنتیکی این بیماری ناشناخته باقی مانده است. این اختلال در جزء ژنتیکی هتروژن است به شکلی که سه گروه از ژن‌ها شامل ژن‌های پرنفوذ، ژن‌های با نفوذ متوسط و ژن‌های کم نفوذ عامل ایجاد استعداد ابتلا به سرطان پستان هستند [۱۱].

در دهه ۱۹۹۰ دو ژن مهم استعداد به سرطان پستان BRCA1 (17q21, OMIM 113705) و BRCA2 (13q12.3, OMIM 600185) با انجام تجزیه و تحلیل پیوستگی در خانواده‌های با چندین فرد مبتلا شناسایی شد [۱۲، ۱۳]. جهش‌های لایه زایشی (Germ line) در این ژن‌ها همراه با خطر بالای سرطان پستان و تخمدان در طول عمر است [۸]. تخمین زده می‌شود که این دو ژن عامل ۲۰ درصد از موارد سرطان پستان ارثی باشد در حالی‌که دیگر ژن‌های همراه با خطر بالا مانند: TP53، STK11 و PTEN یا ژن‌های با خطر متوسط مثل: CHEK2، PALB2 و BRIP1 تنها ۵ درصد از موارد این سرطان را توضیح می‌دهند [۱۱]. بنابراین در اکثر خانواده‌ها جزء ژنتیکی بدون توضیح باقی می‌ماند که تحت عنوان خانواده‌های non-BRCA1/2 یا BRCAX نامیده می‌شوند [۱٤]. جهش‌های دو ژن BRCA1/2 دارای آثار بارز بوده و بنابراین شجره‌نامه‌های سرطان پستان ارثی ناشی از جهش این دو ژن، الگوی وراثتی اتوزومال بارز را نشان می‌دهد [۱۵] با این وجود مطالعات انجام شده در انگلستان، استرالیا و پاکستان از وجود الگوی وراثتی مغلوب در این بیماری حمایت می‌کند [۱۵-۱۷].

روش توالی‌یابی اگزوم (Exome Sequencing) یک روش مناسب برای شناسایی ژن‌های عامل بیماری‌های تک ژنی [۱۸-۲۰] و بیماری‌های با درجه بالای هتروژنی ژنتیکی است [۲۱]. این تکنولوژی تحولی نو در بررسی‌های ژنتیکی ایجاد کرده و امکان توالی‌یابی تمامی نوکلئوتیدهای ژنوم انسان را در زمان کوتاه با هزینه نسبتاً کم فراهم کرده است. این روش قادر به شناسایی جهش‌ها اعم از جهش‌های تک نوکلئوتیدی یا بازآرایی‌های ساختاری بوده و همچنین بررسی بیان ژن است [۲۲]. بر این اساس هدف از انجام این مطالعه بررسی وجود یا عدم وجود الگوی وراثتی مغلوب در سرطان پستان ارثی با استفاده از روش توالی‌یابی اگزوم است.

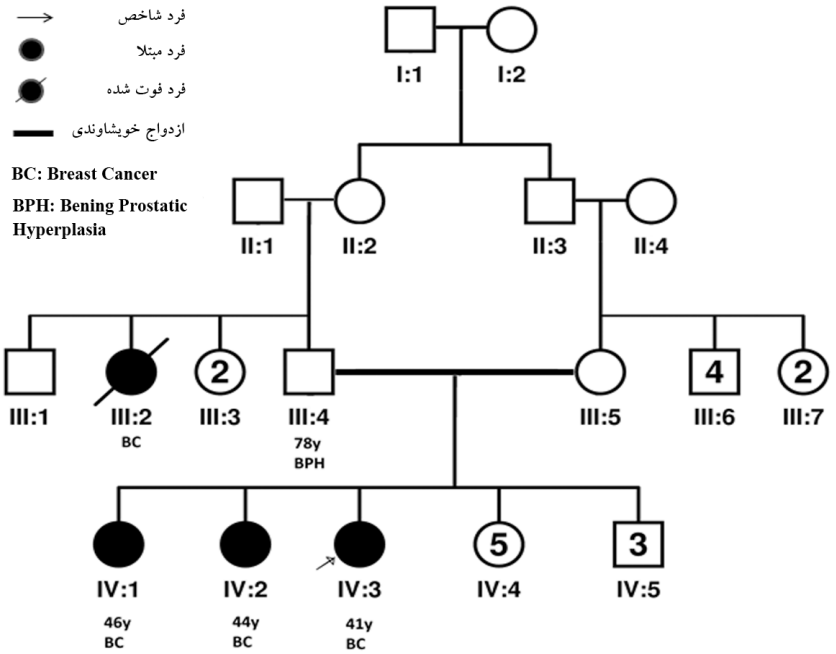
مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه یک خانواده از قومیت عرب با چهار فرد مبتلا به سرطان پستان بررسی شد. فرد شاخص این خانواده یک خانم

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 12:08 IRDT on Monday May 20th 2019

۴۱ ساله فرزند هفتم از یازده فرزند والدین با ازدواج خویشاوندی بود. علایم بالینی فرد شاخص در سن ۳۸ سالگی آغاز و بررسی‌های بالینی منجر به تشخیص سرطان پستان مدولاری (Medullary) و مجاری مهاجم شد و به دنبال آن ماستکتومی (Mastectomy) پستان چپ برای وی انجام شد. فرد شاخص دارای سابقه خانوادگی مثبت بود به این ترتیب که عمه فوت شده که اطلاعی از سن ابتلای او در دسترس نبود و دو خواهر بزرگ‌تر وی به‌ترتیب در سنین ۳۸ و ۳۶ سالگی به سرطان پستان مجاری مهاجم با نشانه‌هایی از درگیری بافت مدولاری مبتلا شده بودند. شجره‌نامه چهار نسلی این خانواده در شکل ۱ نشان داده شده است. هیچ‌گونه سابقه خانوادگی از سرطان تخمدان یا سرطان پستان مردانه که نشان دهنده نقش ژن‌های BRCA1/2 باشد یا سایر سرطان‌ها در این خانواده وجود نداشت. بر این اساس و همچنین با توجه به ساختار شجره‌نامه که الگوی وراثتی مغلوب را نشان می‌داد و نوع مشابه سرطان در افراد مبتلا، این خانواده به‌عنوان یک خانواده یکدست برای انجام بررسی‌های ژنتیکی و شناسایی ژن عامل سرطان پستان ارثی در این خانواده با روش توالی‌یابی اگزوم کاندید شد.



شکل ۱ شجره‌نامه خانواده مورد بررسی

نمونه خون محیطی با EDTA (Ethylenediamine-tetraacetic Acid) از ۷ عضو خانواده شامل والدین، سه دختر مبتلا و دو خواهر بزرگ‌تر سالم آن‌ها دریافت شد.

این مطالعه توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تأیید شد. فرم رضایت‌نامه آگاهانه توسط کلیه اعضای خانواده که وارد مطالعه شده بودند تکمیل و امضا شد.

استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه خون محیطی با روش نمک اشباع انجام شد. از آن‌جایی که DNA مورد نیاز برای توالی‌یابی اگزوم باید سالم و خرد نشده و دارای جذب نوری (Optical Density) ۲-۱/۸= ۲۶۰/۲۸۰ و ۱/۵< ۲۶۰/۲۳۰ باشد بنابراین پس از استخراج DNA و حل کردن آن در بافر TE برای

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 12:08 IRDT on Monday May 20th 2019

اطمینان از کیفیت DNA نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و جذب نوری نمونه‌ها با دستگاه نانودراپ (Nanodrop) تعیین شد.

توالی‌یابی اگزوم

توالی‌یابی اگزوم روی نمونه DNA جوان‌ترین فرد مبتلای خانواده در McGill University and Genome Quebec Innovation Center انجام شد.

در این مطالعه از پلتفورم Illumina HiSeq 2000 استفاده شد. از سه میکروگرم DNA برای غنی‌سازی توالی‌های کد کننده (اگزون‌ها) با کیت Agilent SureSelect V4 استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا از DNA ژنومیک دارای شرایط ذکر شده کتابخانه تهیه شد. بدین منظور DNA به‌صورت تصادفی با کمک امواج فراصوت با طول موج معین به قطعات ۱۰۰ جفت بازی خرد شد. آداپتورهایی به هر دو انتهای این قطعات متصل شده و سپس قطعات متصل به آداپتور خالص شدند. پس از تکثیر قطعات متصل به آداپتور با LM-PCR (Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction)، برای غنی‌سازی نواحی کد کننده، محصول PCR با کتابخانه RNA مخلوط شد و سپس قطعات متصل نشده با شستشو از محیط خارج شدند. پس از اطمینان از کیفیت غنی‌سازی توالی‌یابی با Illumina HiSeq 2000 از هر دو انتها (Pair-End) روی قطعات انجام شد. حدود ۹۰ میلیون توالی خوانده شده (Read) برای نمونه مورد بررسی تولید شد به این معنا که حداقل ۹۰ درصد از توالی‌های کد کننده در ژنوم این فرد هر یک حداقل ۱۰ بار خوانده شد. از نرم‌افزار GATK (Genome Analysis Toolkit) برای ارزیابی کفایت فرآیند غنی‌سازی توالی‌های کد کننده و تعداد متوسط قطعات خوانده شده (Coverage) که نوکلئوتیدهای مرجع (Tag SNPs) در ژنوم را شامل می‌شود، استفاده شد [۲۳]. توالی‌های خوانده شده پس از طی مراحل کنترل کیفی با استفاده از نرم‌افزار BWA (Burrows-Wheeler Alignment, v0.5.9) با توالی ژنومی مرجع UCSC hg19 هم‌تراز (Aligned) شدند [۲٤]. از نرم‌افزارهای SAMtools (Sequence Alignment/Map) و Annovar (Annotate Variation) برای شناسایی و تفسیر تغییرات استفاده شد [۲۵، ۲٦].

تأیید نتایج توالی‌یابی اگزوم با استفاده از توالی‌یابی سنگر

برای تأیید واریاسیون‌های مورد شناسایی توسط توالی‌یابی اگزوم باید از توالی‌یابی سنگر (Sanger Sequencing) استفاده شود. به این منظور برای تغییرات مورد شناسایی با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner v3.05 آغازگر (Primer) طراحی شد. PCR برای تکثیر قطعه مورد نظر در دستگاه ترمال سایکلر (Thermal Cycler) ساخت شرکت Applied Biosystems (آمریکا) بهینه‌سازی شد و پس از تأیید نتیجه PCR با الکتروفورز روی ژل آکریل آمید ۸ درصد محصول PCR برای توالی‌یابی سنگر فرستاده شد.

نتایج

در روش توالی‌یابی اگزوم کلیه مناطق کد کننده، محل اتصال اگزون- اینترون و قسمتی از نواحی اینترونی مورد توالی‌یابی قرار می‌گیرد. توالی‌یابی اگزوم در فرد مورد بررسی در مرحله اول حدود ۱۸٦۰۰۰ تغییر را مورد شناسایی قرار داد که از این میان ۳۱ تغییر در ژن BRCA1 و ۳٤ تغییر مربوط به ژن BRCA2 بود. تغییرات با فراوانی آللی بیشتر از ۵ درصد در پایگاه اطلاعاتی ۱۰۰۰ ژنوم (http://www.1000genomes.org)، یا فراوانی بیشتر از ۵ درصد در پایگاه اطلاعاتی Exome Variant Server (http://evs.gs.washington.edu/EVS/,v.0.0.14, June)، یا بیشتر از ۱ درصد در پایگاه اطلاعاتی اگزوم کنترل مستقر در McGill university and Genome Quebec Innovation Center (مشتمل بر نتایج حدود ۱۰۰۰ مورد فرد اگزوم شده غیر سرطانی) از نتایج به‌دست آمده حذف شد. در نهایت

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 12:08 IRDT on Monday May 20th 2019

۹۱۷ تغییر در این فرد از این مراحل فیلترینگ عبور کرد. سپس تغییرات عبور کرده از مرحله فیلترینگ با ژن‌هایی که از طریق بررسی متون به‌عنوان ژن‌های کاندید در سرطان پستان مشخص و الویت‌بندی شده بود، مقایسه شد. این بررسی یک حذف ٤ جفت بازی هتروزیگوت منجر به جهش تغییر چارچوب در اگزون ۱۱ ژن BRCA2 (BRCA2: NM_000059: exon11:c.2808_2811delACAA:p.Ala938ProfsX21) را به‌عنوان الویت و کاندید عامل سرطان پستان ارثی در این خانواده شناسایی کرد. این جهش در جایگاه کروموزومی chr13:32911297 قرار دارد و منجر به اضافه شدن ۲۰ اسید آمینه جدید قبل از کدون پایان زودرس می‌شود. برای تأیید این نتیجه برای جایگاه مورد نظر یک جفت آغازگر به‌ترتیب زیر در نرم‌افزار Gene runner v3.05 طراحی شد.

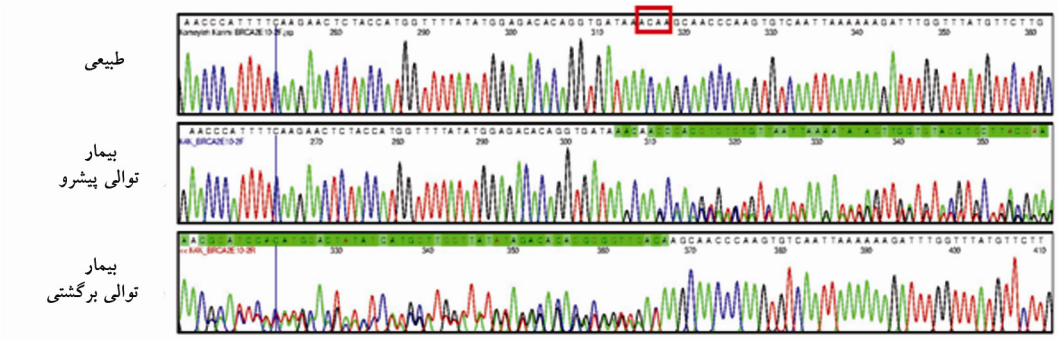
پیشرو: 5´-TGGCCTGTGAATGGTCTCAAC-3´

برگشتی: 5´-AGCATTTGCTTCAAACTGGG-3´

سپس محصول PCR برای انجام توالی‌یابی سنگر فرستاده شد. همچنین یک جانشینی تک بازی هتروزیگوت غیر هم‌معنی در اگزون ۹ ژن STK11 (STK11: NM_000455: exon9: c.A1264G:p.S422G) شناسایی شد.

تأیید نتایج با توالی‌یابی سنگر

توالی‌یابی سنگر وجود جهش مورد نظر را تأیید نمود. جهش مورد شناسایی در توالی‌یابی سنگر در شکل ۲ نشان داده شده است. سایر اعضای خانواده نیز از نظر وجود جهش بررسی شدند. جهش مذکور در سه خواهر مبتلا و پدر خانواده تأیید شد. مادر خانواده و دو دختر بزرگ‌تر و سالم او فاقد جهش بودند.



شکل ۲ تأیید نتیجه توالی‌یابی اگزوم با توالی‌یابی سنگر و مقایسه توالی طبیعی و توالی ناشی از حذف ٤ نوکلئوتید ACAA در اگزون ۱۱ ژن BRCA2 که منجر به جهش تغییر چارچوب شده است.

بحث

نتایج این بررسی هیچ‌گونه جهش هموزیگوتی را که نشان دهنده وراثت مغلوب سرطان پستان ارثی در خانواده مورد مطالعه باشد را، شناسایی نکرد اما یک حذف ٤ جفت بازی هتروزیگوت منجر به جهش تغییر چارچوب در اگزون ۱۱ ژن BRCA2 و یک جانشینی تک بازی هتروزیگوت غیر هم‌معنی در اگزون ۹ ژن STK11 شناسایی شد.

ژن‌های BRCA1/2 در ترمیم شکست‌های دو رشته‌ای DNA نقش دارد. در یوکاریوت‌ها دو مسیر اصلی برای ترمیم شکست‌های دو رشته‌ای وجود دارد که شامل نوترکیبی همولوگ و اتصال انتهاهای غیرهمولوگ است. پروتئین brca2 اساساً از طریق برهمکنش با پروتئین rad51 در فرآیند نوترکیبی همولوگ مشارکت می‌کند [۲۷].

در ژن BRCA2 بیشتر جهش‌ها به‌صورت حذف و اضافه شدن در اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ اتفاق می‌افتد و موجب تغییر چارچوب خواندن، کدون پایان زودرس و در نهایت پروتئین ناقص و غیرعملکردی می‌شود. نشان داده شده که دومین‌های

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 12:08 IRDT on Monday May 20th 2019

عملکردی حیاتی پروتئین brca2 شامل دومین ترمیم دورشته‌ای (Double-strand Break Domain: DBD)، سیگنال متمرکز کننده هسته‌ای (Nuclear Localizing Signal: NLS) و موتیف متصل شونده به پروتئین rad51 در ناحیه انتهای کربوکسیل پروتئین است که در اثر این جهش‌ها از ساختار پروتئین حذف می‌شود. از آن‌جایی که که سیگنال متمرکز کننده هسته‌ای در انتهای کربوکسیل پروتئین واقع شده است و اکثر جهش‌های این ژن منجر به حذف آن می‌شود بنابراین علت غیرعملکردی بودن پروتئین حاصل از این جهش‌ها عدم توانایی پروتئین برای انتقال از سیتوپلاسم به درون هسته است [۲۸].

ژن BRCA2 کد کننده یک سرکوبگر تومور است که ایجاد تومور ناشی از آن از فرضیه دوضربه‌ای نادسون (Knudson) تبعیت می‌کند به این معنا که هر دو آلل ژن باید عملکرد خود را از دست بدهند تا فرآیند کارسینوژنز (Carcinogenesis) ناشی از آن آغاز شود. از آن‌جایی که جهش شناسایی شده در این خانواده جهش رده زایشی و به‌صورت هتروزیگوت است، جهش دومی به‌صورت بدنی در بافت تومور افراد مبتلا در این خانواده باید وجود داشته باشد که منجر به غیر فعال‌سازی آلل طبیعی شده است. نکته جالب توجه این‌که در مورد ژن BRCA1 برخلاف ژن BRCA2 جهش‌هایی از این دست می‌تواند دارای آثار منفی بارز [۲۹] یا بی‌کفایتی هاپلو (Haploinsufficiency) [۳۰] باشد و بنابراین در تومورهای ناشی از جهش BRCA1 وجود ضربه دوم الزامی نیست.

rs80359352 که در این خانواده مورد شناسایی قرار گرفت یکی از جهش‌های شایع در ژن BRCA2 است که در پایگاه اطلاعاتی BIC (The Breast Cancer Information Core Database) ۱۲۸ بار ثبت شده است و قبلاً در جمعیت‌های مختلف از جمله قفقازی، هیسپانیک و چینی گزارش شده است [۳۱]؛ اما در هیچ‌یک از این مطالعات تفکیک آن در سرطان پستان ارثی بررسی نشده است.

مردان حامل جهش‌های BRCA2 در معرض خطر بالای ابتلا به سرطان پروستات هستند. احتمال ابتلا تا قبل از سن ٦٥ سالگی در افراد حامل ۷ برابر بیشتر از افراد غیرحامل است این افراد همچنین در معرض خطر ابتلا به سرطان‌های پانکراس، کولون، ملانوما و غیره هستند [۳۲] پس از شناسایی جهش در ژن BRCA2 در خانواده مورد نظر، بررسی‌های بیشتر نشان داد که پدر خانواده مبتلا به هایپرتروفی خوش‌خیم پروستات (Benign Prostatic Hyperplasia: BPH) است. توجیه احتمالی عدم ابتلای وی به سرطان پروستات می‌تواند در ارتباط با عدم وقوع ضربه دوم در این فرد باشد.

جهش‌های رده زایشی در ژن سرین- ترئونین کیناز STK11 روی کروموزوم 19p13.3 عامل ابتلا به نشانگان Peutz-Jeghers است. علامت اصلی این نشانگان پولیپ‌های هامارتومایی (Hamartoma Polyps) دستگاه گوارش بوده و افراد مبتلا در معرض خطر بالای ابتلا به سرطان به‌ویژه سرطان‌های دستگاه گوارش هستند [۳۳].

تغییرات مورد شناسایی در ژن STK11 در این خانواده تاکنون گزارش نشده است. این تغییر باعث جابه‌جایی آمینواسید سرین با گلیسین می‌شود اما از آن‌جایی که محل تغییر براساس بررسی‌های بیوانفورماتیکی در دومین‌های عملکردی پروتئین stk11 قرار ندارد و نمره سیفت (Sifting Intolerant From Tolerant: SIFT) آن ۰/٤۲ [قابل تحمل (Tolerated)] است؛ به‌نظر می‌رسد این تغییرات یک چند شکلی (Polymorfism) فاقد اهمیت باشد.

با توجه به این نتایج به‌نظر می‌رسد در مواردی از سرطان پستان ناشی از جهش رده زایشی ژن پرنفوذ BRCA2 به دلیل عدم بروز بیماری در یک نسل (Skip generation) برخلاف انتظار تفکیک بیماری در شجره‌نامه مانند شجره‌نامه مورد بررسی می‌تواند الگوی بارز را نشان ندهد. این امر می‌تواند به دلیل نیاز به وقوع ضربه دوم برای ایجاد سرطان که باید به‌صورت اکتسابی در رده سلول‌های بدنی رخ دهد باشد. بنابراین بررسی بافت تومور از نظر وقوع ضربه دوم در آلل طبیعی در افراد مبتلا می‌تواند جالب توجه باشد. از طرف دیگر؛ احتمال نفوذ متفاوت جهش‌های این ژن در دو جنس زن و مرد

می‌تواند علت دیگر وقوع این پدیده باشد. نفوذ متغییر جهش‌های BRCA2 در زن و مرد می‌تواند ناشی از اثر سایر جایگاه‌های ژنی یا عوامل محیطی باشد [۳٤]. بنابراین شاخص‌های فنوتیپی (عدم وجود سرطان‌های تخمدان و پستان مردانه) و شجره‌نامه‌ای (الگوی وراثتی مغلوب) نیز نمی‌تواند به‌طور قطع دلیل بر دخالت یا عدم دخالت ژن‌های BRCA1/2 در ایجاد سرطان پستان ارثی باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه مصوب رشته دکتری تخصصی ژنتیک پزشکی است که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، مرکز نوآوری ژنوم کبک، دانشگاه مک گیل، مونترال، کانادا و آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران به انجام رسیده است.

منابع

[1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005; 55(2): 74-108.

[2] Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 1999; 49(1): 33-64.

[3] Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, Ebrahimi M. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. Breast J 2007; 13(4): 383-91.

[4] Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. N Engl J Med 2000; 343(2): 78-85.

[5] Nathanson KL, Wooster R, Weber BL. Breast cancer genetics: what we know and what we need. Nat Med 2001; 7(5): 552-6.

[6] Arason A, Gunnarsson H, Johannesdottir G, Jonasson K, Bendahl PO, Gillanders EM, Agnarsson BA, Jönsson G, Pylkäs K, Mustonen A, Heikkinen T, Aittomäki K, Blomqvist C, Melin B, Johannsson OT, Møller P, Winqvist R, Nevanlinna H, Borg A, Barkardottir RB. Genome-wide search for breast cancer linkage in large Icelandic non-BRCA1/2 families. Breast Cancer Res 2010; 12(4): R50.

[7] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease Lancet 2001; 358(9291): 1389-99.

[8] Thompson D, Easton D. The genetic epidemiology of breast cancer genes. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2004; 9(3): 221-36.

[9] Hopper JL, Carlin JB. Familial aggregation of a disease consequent upon correlation between relatives in a risk factor measured on a continuous scale. Am J Epidemiol 1992; 136(9): 1138-47.

[10] Peto J, Mack TM. High constant incidence in twins and other relatives of women with breast cancer. Nat Genet 2000; 26(4): 411-4.

[11] Stratton MR, Rahman N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. Nat Genet 2008; 40(1): 17-22.

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 12:08 IRDT on Monday May 20th 2019

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 12:08 IRDT on Monday May 20th 2019

[12] Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, Hussey C, Tran T, McClure M, Frye C, Hattier T, Phelps R, Haugen-Strano A, Katcher H, Yakumo K, Gholami Z, Shaffer D, Stone S, Bayer S, Wray C, Bogden R, Dayananth P, Ward J, Tonin P, Narod S, Bristow P, Norris F, Helvering L, Morrison P, Rosteck P, Lai M, Barrett J, Lewis C, Neuhausen S, Cannon-Albright L, Goldgar D, Wiseman R, Kamb A, Skolnick M. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 1994; 266(5182): 66-71.

[13] Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature 1995; 378(6559): 789-92.

[14] Gonzalez-Neira A, Rosa-Rosa JM, Osorio A, Gonzalez E, Southey M, Sinilnikova O, Lynch H, Oldenburg RA, van Asperen CJ, Hoogerbrugge N, Pita G, Devilee P, Goldgar D, Benitez J. Genomewide high-density SNP linkage analysis of non-BRCA1/2 breast cancer families identifies various candidate regions and has greater power than microsatellite studies. BMC Genomics 2007; 8: 299.

[15] Cui J, Antoniou AC, Dite GS, Southey MC, Venter DJ, Easton DF, Giles GG, McCredie MR, Hopper JL. After BRCA1 and BRCA2-what next? Multifactorial segregation analyses of three-generation, population-based Australian families affected by female breast cancer. Am J Hum Genet 2001; 68(2): 420-31.

[16] Liede A, Malik IA, Aziz Z, Rios Pd Pde L, Kwan E, Narod SA. Contribution of BRCA1 and BRCA2 mutations to breast and ovarian cancer in Pakistan. Am J Hum Genet 2002; 71(3): 595-606.

[17] Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G, Day NE, Ponder BA, Easton D. Evidence for further breast cancer susceptibility genes in addition to BRCA1 and BRCA2 in a population-based study. Genet Epidemiol 2001; 21(1): 1-18.

[18] Heron SE, Smith KR, Bahlo M, Nobili L, Kahana E, Licchetta L, Oliver KL, Mazarib A, Afawi Z, Korczyn A, Plazzi G, Petrou S, Berkovic SF, Scheffer IE, Dibbens LM. Missense mutations in the sodium-gated potassium channel gene KCNT1 cause severe autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. Nat Genet 2012; 44(11): 1188-90.

[19] Horani A, Druley TE, Zariwala MA, Patel AC, Levinson BT, Van Arendonk LG, Thornton KC, Giacalone JC, Albee AJ, Wilson KS, Turner EH, Nickerson DA, Shendure J, Bayly PV, Leigh MW, Knowles MR, Brody SL, Dutcher SK, Ferkol TW. Whole-exome capture and sequencing identifies HEATR2 mutation as a cause of primary ciliary dyskinesia. Am J Hum Genet 2012; 91(4): 685-93.

[20] Campeau PM, Lu JT, Sule G, Jiang MM, Bae Y, Madan S, Högler W, Shaw NJ, Mumm S, Gibbs RA, Whyte MP, Lee BH. Whole-exome sequencing identifies mutations in the nucleoside transporter gene SLC29A3 in dysosteosclerosis, a form of osteopetrosis. Hum Mol Genet 2012; 21(22): 4904-9.

[21] Comino-Méndez I, Gracia-Aznárez FJ, Schiavi F, Landa I, Leandro-García LJ, Letón R,

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 12:08 IRDT on Monday May 20th 2019

Tinelli A. A new mutation of BRCA2 gene in an Italian healthy woman with familial breast cancer history. Fam Cancer 2011; 10(1): 65-71.

[28] Spain BH, Larson CJ, Shihabuddin LS, Gage FH, Verma IM. Truncated BRCA2 is cytoplasmic: implications for cancer-linked mutations. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(24): 13920-5.

[29] Karam R, Wengrod J, Gardner LB, Wilkinson MF. Regulation of nonsense-mediated mRNA decay: implications for physiology and disease. Biochim Biophys Acta 2013; 1829(6-7): 624-33.

[30] Konishi H, Mohseni M, Tamaki A, Garay JP, Croessmann S, Karnan S, Ota A, Wong HY, Konishi Y, Karakas B, Tahir K, Abukhdeir AM, Gustin JP, Cidado J, Wang GM, Cosgrove D, Cochran R, Jelovac D, Higgins MJ, Arena S, Hawkins L, Lauring J, Gross AL, Heaphy CM, Hosokawa Y, Gabrielson E, Meeker AK, Visvanathan K, Argani P, Bachman KE, Park BH. Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene BRCA1 leads to genomic instability in human breast epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108(43): 17773-8.

[31] Kwong A, Ng EK, Wong CL, Law FB, Au T, Wong HN, Kurian AW, West DW, Ford JM, Ma ES. Identification of BRCA1/2 founder mutations in Southern Chinese breast cancer patients using gene sequencing and high resolution DNA melting analysis. PLoS One 2012; 7(9): e43994.

[32] Liede A, Karlan BY, Narod SA. Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature. J Honrado E, Ramos-Medina R, Caronia D, Pita G, Gómez-Graña A, de Cubas AA, Inglada-Pérez L, Maliszewska A, Taschin E, Bobisse S, Pica G, Loli P, Hernández-Lavado R, Díaz JA, Gómez-Morales M, González-Neira A, Roncador G, Rodríguez-Antona C, Benítez J, Mannelli M, Opocher G, Robledo M, Cascón A. Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. Nat Genet 2011; 43(7): 663-7.

[22] Natrajan R, Reis-Filho JS. Next-generation sequencing applied to molecular diagnostics. Expert Rev Mol Diagn 2011; 11(4): 425-44.

[23] McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Res 2010; 20(9): 1297-303.

[24] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics 2009; 25(14): 1754-60.

[25] Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics 2009; 25(16): 2078-9.

[26] Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. Nucleic Acids Res 2010; 38(16): e164.

[27] Pisanò M, Mezzolla V, Galante MM, Alemanno G, Manca C, Lorusso V, Malvasi A,

Clin Oncol. 2004 Feb 15;22(4):735-42.

[33] Lim W, Olschwang S, Keller JJ, Westerman AM, Menko FH, Boardman LA, Scott RJ, Trimbath J, Giardiello FM, Gruber SB, Gille JJ, Offerhaus GJ, de Rooij FW, Wilson JH, Spigelman AD, Phillips RK, Houlston RS. Relative frequency and morphology of cancers in STK11 mutation carriers. Gastroenterology 2004; 126(7): 1788-94.

[34] Syrjäkoski K, Kuukasjärvi T, Waltering K, Haraldsson K, Auvinen A, Borg A, Kainu T, Kallioniemi OP, Koivisto PA. BRCA2 mutations in 154 finnish male breast cancer patients. Neoplasia 2004; 6(5): 541-5.

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 12:08 IRDT on Monday May 20th 2019