

Identification of mutation in 3'-end of exon 15 of APC gene in familial adenomatous polyposis patients

Habibollahi H^{1*}, Ranji N¹, Khazaei-Koohpar Z², Kamalifar HS³

- 1- Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, I.R. Iran.
2- Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, I.R. Iran.
3- Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, I.R. Iran.

Received: 2019/01/4 | Accepted: 2019/10/28

Abstract:

Background: Familial adenomatous polyposis (FAP) is a hereditary precancerous syndrome and is characterized by the manifestation of adenomatous polyps in the colon and rectum at an early age. Germline mutations of APC gene cause FAP. This study aimed to investigate about the part of 3'-end of exon 15 of APC gene in FAP patients in Guilan, Ilam and Lorestan province in 2018.

Materials and Methods: In this descriptive cross-sectional study, 18 FAP patients were recognized and Blood sampling was done. After DNA extraction, a part 3'-end of exon 15 of APC gene was amplified by PCR method and underwent direct sequencing.

Results: In this study one nonsense mutation (c.4606G>T, p.E1536X) in a classic FAP patient and one missense mutation (c.5465T>A, p.V1822D) in an AFAP as homozygote and four classic FAP patients as heterozygote was observed. Also, four silent mutations p.T1493T, p.G1678G, p.S1756S and p.P1960P were identified in these FAP patients.

Conclusion: It seems that mutation E1536X is the main reason of disease in a patient with severe polyposis. Also, mutation V1822D as homozygous can cause AFAP; but for classic FAP development a more destructive mutation is needed along with this mutation.

Keywords: APC gene, Colorectal cancer, Familial adenomatous polyposis, Germinal mutation, Missense mutation

*Corresponding Author:

Email: habibollahi@iaurasht.ac.ir

Tel: 0098 921 739 0353

Fax: 0098 133 344 7060

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2020; Vol. 23, No 6, Pages 672-678

Please cite this article as: Habibollahi H¹, Ranji N, Khazaei-Koohpar Z, Kamalifar HS. Identification of mutation in 3'-end of exon 15 of APC gene in familial adenomatous polyposis patients. *Feyz* 2020; 23(6): 672-8.

شناسایی جهش در انتهای ۳' اگزون ۱۵ ژن APC در افراد مبتلا به پولیپوز آدنوماتوز فامیلی

هادی حبیب‌الهی^{۱*}، نجمه رنجی^۱، زینب خزائی کوهپر^۲، هانیه السادات کمالی^۳

خلاصه:

سابقه و هدف: پولیپوز آدنوماتوز فامیلی (FAP) یک سندرم ارثی مستعدکننده به سرطان است که با ظهور پولیپ‌های آدنوماتوزی در کولون و رکتوم در سن پایین شناسایی می‌شود. جهش‌های ژرمینال در ژن APC ایجادکننده FAP هستند. هدف از این مطالعه، بررسی جهش‌های بخش انتهای ۳' اگزون ۱۵ ژن APC در مبتلایان به FAP در استان‌های گیلان، ایلام و لرستان در سال ۱۳۹۷ بود. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۱۸ فرد مبتلا به FAP شناسایی و از آن‌ها خون‌گیری انجام شد. بعد از استخراج DNA، یک بخش از انتهای ۳' اگزون ۱۵ ژن APC به روش PCR تکثیر شد و تحت تعیین توالی مستقیم قرار گرفت. **نتایج:** در این مطالعه یک جهش بی‌معنی (c.4606G>T, p.E1536X) در یک فرد مبتلا به FAP کلاسیک و یک جهش بدمعنی (c.5465T>A, p.V1822D) در یک فرد مبتلا به AFAP به‌صورت هموزیگوت و چهار فرد مبتلا به FAP کلاسیک به‌صورت هتروزیگوت مشاهده شد. همچنین چهار جهش خاموش (p.T1493T, p.G1678G, p.S1756S, p.P1960P) در این بیماران شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد جهش E1536X در یک بیمار با پولیپوز شدید علت اصلی بیماری باشد. همچنین جهش V1822D به‌صورت هموزیگوت می‌تواند باعث AFAP شود؛ اما برای بروز FAP کلاسیک به جهش دوم مخرب‌تری به همراه این جهش نیاز می‌باشد.

واژگان کلیدی: ژن APC، سرطان کلورکتال، پولیپوز آدنوماتوز فامیلی، جهش ژرمینال، جهش بدمعنی

دو ماه‌نامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۹۸، صفحات ۶۷۸-۶۷۲

مقدمه

حدود نیمی از افراد مبتلا به FAP کلاسیک در ۱۵ سالگی دارای آدنوم هستند و سرطان کلورکتال (CRC) به‌طور حتم در سن پایین‌تر از سن سرطان‌های اسپورادیک رخ می‌دهد. در FAP نوع متوسط صدها پولیپ در دهه دوم تا سوم زندگی ظاهر می‌شود و CRC تقریباً در ۴۰ سالگی رخ می‌دهد [۵]. اما در FAP خفیف (Attenuated FAP) یا AFAP تعداد پولیپ‌ها به ده تا صد پولیپ (اغلب در سمت راست کولون) کاهش یافته و برخلاف دو نوع قبلی، خطر سرطانی‌شدن آن بسیار کم است [۶]. بیماری FAP در اثر جهش ژرمینال در ژن تومور ساپرسور APC ایجاد می‌شود [۷] که حاوی ۱۵ اگزون بوده، با موقعیت ژنومی 5q21-22 یک پروتئین ۲۸۴۳ آمینو اسیدی را رمزدهی می‌کند [۸]. پروتئین APC در یک کمپلکس تخریبی همراه با GSK β3 و آکسین (Axin) باعث تجزیه β کاتنین و در نتیجه مهار انتقال آن به هسته می‌شوند. در حالی‌که از دست دادن عملکرد APC (در اثر جهش)، باعث انتقال β کاتنین به هسته و فعال‌شدن فاکتورهای رونویسی خاصی و در نهایت افزایش بیان انکوژن‌هایی چون c-myc و تنظیم تکثیر و بقای سلولی می‌شود. ژن APC مهم‌ترین و شایع‌ترین ژن جهش‌یافته در سرطان‌های کلورکتال محسوب می‌شود و در حدود ۶۰ درصد آدنوم و کارسینوم‌ها دارای جهش در این ژن هستند [۹]. در ۷۰-۹۰ درصد افراد مبتلا به FAP جهش ژرمینال APC رخ داده و در ۳۰-۱۰ درصد باقیمانده، جهش در ژن MUTYH

پولیپوز آدنوماتوز فامیلی (FAP) یک بیماری ژنتیکی با شیوع کم در جمعیت‌ها می‌باشد. شیوع بیماری بین یک در ۶۸۵۰ تا یک در ۳۱۲۵۰ در متولدین زنده (۲/۲۹ تا ۳/۲ درصد موارد در ۱۰۰۰۰ نفر) با فرکانس ثابت در سرتاسر دنیا و با فرکانس یکسان بین زنان و مردان می‌باشد [۱]؛ اما به‌دلیل داشتن الگوی وراثت اتوزومی غالب [۳،۲]، می‌تواند منجر به بروز بیماری در چندین عضو یک خانواده شود. علامت مشخصه بیماری، بروز صدها تا هزاران پولیپ مستعد به سرطانی‌شدن در کولون و رکتوم در کودکی و بزرگسالی است [۴]. به این فرم بیماری FAP کلاسیک یا تهاجمی (aggressive or classic FAP) گفته می‌شود.

۱. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران
۳. کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۹۲۱۷۳۹۰۳۵۳

پست الکترونیک: habibollahi@iaurasht.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۸/۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱۴

ژن APC در محدوده اطراف کدون ۱۳۰۹ در افراد مبتلا به FAP بود؛ با توجه به این که انجام تعیین توالی برای کلّ اگزون‌های این ژن در هر فرد مورد مطالعه، نیاز به هزینه بیشتری داشت؛ به همین منظور منطقه‌ای از ژن که جهش‌پذیری بیشتری از آن در دنیا گزارش شده بود، در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی، طی یک دوره یک‌ساله تعداد ۵ بیمار مبتلا به FAP از استان گیلان و ۱۳ بیمار از استان‌های ایلام و لرستان با مراجعه به مطب متخصصان دستگاه گوارش، کبد و انکولوژی با کد اخلاق به شماره IR.IAU.RASHT.REC.1397.027 از دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت با داشتن ۵ تا ۱۰۰ پولیپ (AFAP) و بیش از ۱۰۰ پولیپ در کلورکتال (FAP کلاسیک) [۱۶] شناسایی شدند. بعد از تکمیل فرم رضایت‌نامه، از بیماران خون‌گیری انجام شد. نمونه‌های خونی به مقدار ۵ سی‌سی در لوله‌های حاوی EDTA 0.5M (به عنوان ماده ضد انعقاد خون) به آزمایشگاه منتقل شد.

استخراج DNA ژنومی

جهت تخلیص DNA از نمونه‌های خونی، از کیت Dynabio™ Blood/Tissue DNA Extraction mini kit (تکاپوزیست، تهران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. پس از تخلیص نمونه‌ها، صحت DNAهای تخلیص‌شده با الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد.

واکنش PCR و تعیین توالی

جهت تکثیر DNA به روش PCR از کیت Master Mix (شرکت Golden double helix، کره جنوبی) استفاده شد. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ µl با افزودن DNA ژنومی، جفت پرایمرهای مربوطه (۲۰ µM) و آب استریل به محلول PreMix (حاوی آنزیم، کوفاکتور و بافر مخصوص) آماده شد. دو جفت پرایمر در محدوده کدون ۱۳۰۹ با استفاده از نرم‌افزار CLC main workbench v3.5 طراحی شدند و از نظر منحصربه‌فرد بودن با نرم‌افزار آنلاین BLAST مورد بررسی قرار گرفتند. سنتز پرایمرها توسط شرکت MacroGen (کره جنوبی) صورت گرفت (جدول شماره ۱). واکنش PCR با استفاده از ترموسایکلر Analaytik Jena طبق برنامه ذیل انجام شد: یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در C ۹۵ به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل به ترتیب در دمای C ۹۵ به مدت ۱ دقیقه، C ۶۵ به مدت ۱ دقیقه و C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه، و یک مرحله گسترش نهایی در دمای C ۷۲ به مدت ۵ دقیقه. بعد از تأیید تک‌باند بودن

گزارش شده است [۵]. در مطالعات مختلف نشان داده شده که اغلب جهش‌های APC از نوع تغییر قالب خواندن هستند. همچنین حذف پنج نوکلئوتیدی در کدون‌های ۱۳۰۹ و ۱۰۶۱، شایع‌ترین جهش‌های ژرمینال در این ژن بوده [۱۰]. به عنوان نواحی داغ جهش‌پذیری در ژن APC در سرطان‌های کلورکتال شناخته می‌شوند [۵] که در پروتئین APC جایگاه اتصال β کاتنین هستند. فرکانس حذف در کدون ۱۳۰۹ در شمال اسپانیا ۰ درصد، جمعیت اسرائیلی ۱/۵ درصد و استرالیا ۸/۴ درصد در مبتلایان به FAP می‌باشد. فرکانس حذف در کدون ۱۰۶۱ در ایتالیا ۱۶ درصد، جمعیت اسرائیلی ۷ درصد، هلندی ۵ درصد، جنوب غرب اسپانیا ۰ درصد و استرالیا ۲/۴ درصد گزارش شده است. همچنین بیش از ۶۰ درصد جهش‌های APC در ناحیه MCR (mutation cluster region) بین کدون‌های ۱۲۸۴-۱۵۸۰ یا ۱۴۶۴-۱۲۸۴ مشاهده شده است. در یک مطالعه کوهورت در مصر با ۱۸ جهش مختلف مشخص شد که ۸۰ درصد جهش‌ها بین اگزون ۳ و کدون ۱۵۰۳ رخ داده بودند [۱۰]. شایع‌ترین واریانت بیماری‌زای APC در کدون ۱۳۰۹ (حذف پنج نوکلئوتیدی) است [۱۱] که با حضور تعداد زیاد آدنوم در سنین پایین‌تر همراه است. واریانت‌های بیماری‌زا در بخش ۵' ژن (کدون‌های ۱-۱۷۷)، اگزون ۹ و انتهای دیستال ۳' ژن وجود دارند [۲]. از سوی دیگر در مطالعات مختلف مشخص شده که ارتباط بین فنوتیپ و ژنوتیپ بیماری در اغلب بیماران وجود دارد. از جمله این که جهش در ناحیه کدونی ۱۶۸ تا ۱۵۸۰ باعث FAP کلاسیک، از یک تا ۱۶۸ و از ۱۵۸۰ تا انتهای ژن: AFAP، از ۴۵۷ تا ۱۴۴۴ به غیر از پولیپوز داشتن علائم خارج کولونی نظیر CHRPE (هیپرتروفی مادرزادی اپیتلیوم رنگدانه شبکیه)، از ۱۲۵۰ تا ۱۴۶۴: پولیپوز شدید و از ۱۳۹۵ تا ۲۰۰۰: به غیر از FAP تومورهای دسموئیدی هم در افراد مبتلا دیده می‌شود [۱۲]. همچنین بر اساس مطالعات مختلف، بین سن بروز بیماری و موقعیت جهش‌ها نیز ارتباط وجود دارد. به‌طوری‌که جهش در کدون ۱۳۰۹ در سن ۲۰ سالگی، جهش در کدون‌های ۱۶۸ تا ۱۵۸۰ در سن ۳۰ سالگی و جهش در سمت ۵' کدون ۱۶۸ و سمت ۳' کدون ۱۵۸۰ در سن ۵۲ سالگی باعث بروز بیماری می‌شود [۱۳]. با توجه به چنین ارتباطی بین ژنوتیپ و فنوتیپ [۱۴] و همچنین ژنوتیپ و سن بروز بیماری [۱۵]، آگاهی از ژنوتیپ بیماران ایرانی می‌تواند به شناسایی افراد در ریسک بیماری و شروع به موقع مداخلات درمانی در این افراد و کاهش میزان مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در آن‌ها کمک شایانی نماید. بنابراین به‌خاطر طول زیاد ژن و هزینه بالای تعیین توالی، هدف از این مطالعه، بررسی جهش‌ها تنها در بخشی از انتهای ۳' اگزون ۱۵

آنالین BLAST از نظر وجود جهش در نمونه‌های بیمار در مقایسه با نمونه رفرنس موجود در سایت NCBI (NG_008481.4) مورد بررسی قرار گرفت.

محصولات PCR با طول مشخص در ژل آگارز ۲ درصد، نمونه‌ها با حفظ زنجیره سرمایی به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال و تعیین توالی شد. سپس نتایج حاصل از تعیین توالی به کمک نرم‌افزار CLC main workbench ویرایش ۳/۵ و نرم‌افزار

جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول
APC-F1	5'-CACAGAATGAAAGATGGGCAAGACC-3'	842 bp
APC-R1	5'-TGGAACCTCGCTCACAGGATC-3'	
APC-F2	5'-GTAATCAGACGACACAGGAAGCAG-3'	579 bp
APC-R2	5'-GAACCTGGACCCTCTGAACTGCA-3'	

نتایج

نظر متخصص گوارش و کبد) در جدول شماره ۲ ذکر شده است. در بین آن‌ها یک فرد مبتلا به FAP خفیف (۴۸ ساله) و ۱۷ فرد مبتلا به FAP کلاسیک (۱۷ تا ۴۱ ساله) بودند.

در این مطالعه ۱۸ فرد مبتلا به FAP (۴۴ درصد زن و ۵۶ درصد مرد) در بخشی از اگزون ۱۵ ژن APC مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند. اطلاعات فردی و پاتولوژیکی بیماران (با

جدول شماره ۲- اطلاعات فردی و پاتولوژیکی بیماران مورد مطالعه

ردیف	محل سکونت	مرد	زن	محدوده سنی	شدت پولیپوز	تعداد افراد دارای جهش
۱	گیلان	۳	۲	۳۰-۴۸	S	۲
		-	۱		A	
۲	لرستان	۶	۵	۳۰-۴۱	S	۲
۳	ایلام	۱	۱	۱۷-۴۰	S	۱

S: severe, A: Attenuated

بدمعنی c.5465T>A) p.V1822D (در پنج بیمار (۱۷ درصد) شامل چهار فرد مبتلا به FAP کلاسیک (cFAP) به صورت هتروزیگوت و در یک فرد مبتلا به AFAP به صورت هموزیگوت مشاهده شد. چهار جهش خاموش p.T1493T ، p.G1678G ، p.S1756S و p.P1960P در ژن APC در شش بیمار به صورت هتروزیگوت یا هموزیگوت گزارش شد.

تعیین توالی بخشی از اگزون ۱۵ ژن APC

نتایج تعیین توالی، شش نوع جهش بی‌معنی، بدمعنی و خاموش را در شش بیمار نشان داد. در این مطالعه در بیمار شماره ۱ با داشتن پولیپوز شدید و سابقه فامیلی FAP، یک جهش بی‌معنی p.E1536X (c.4606G>T) (۳ درصد) در کدون ۱۵۳۶ منجر به تبدیل گلوتامیک اسید به کدون خاتمه شد. جهش

جدول شماره ۳- جهش‌های موجود در بخشی از انتهای ۳' اگزون ۱۵ ژن APC در مبتلایان به FAP

بیمار	نوع بیماری	جهش بی‌معنی	جهش خاموش	جهش بدمعنی
۱	cFAP	GAA(Glu)>TA A(stop) c.4606G>T p.E1536X	GGG(Gly)>GGA (Gly) c.5034G>A p.G1678G	GTC(Val)>GAC(Asp) c.5465T>A p.V1822D
۲	AFAP			
۵	cFAP			
۸	cFAP			
۱۳	cFAP			
۱۷	cFAP			

بحث

با توجه به این‌که ابتلا به بیماری FAP، فرد را مستعد به سرطان کلورکتال در سنین قبل از ۴۰ سالگی می‌نماید، لازم است جهت شناسایی افراد در خطر و انجام غربالگری‌های ضروری برای این افراد در هر استان مداخلات پزشکی کارآمدی صورت گیرد. به همین خاطر، شناسایی جهش‌های شایع در هر استان و در کشور ضروری می‌باشد. غربالگری جهش‌ها در ژن APC در مبتلایان به FAP به‌خاطر طول زیاد ژن نیاز به صرف زمان و هزینه زیادی دارد. بیشترین توالی مربوط به ژن APC در اگزون ۱۵ این ژن قرار گرفته، با توجه به این‌که شایع‌ترین جهش‌ها در این ژن در مبتلایان به FAP در این اگزون رخ می‌دهد، در این مطالعه تنها بخشی از انتهای ۳' اگزون ۱۵ مورد بررسی قرار گرفت و از بین ۱۸ فرد مبتلا به FAP در شش بیمار جهش‌های بی‌معنی، بدمعنی و خاموش شناسایی شد. در این مطالعه، در یک بیمار از استان گیلان با پولیپوز شدید در کلورکتال، جهش بی‌معنی p.E1536X به نظر می‌رسد که برای دومین بار در دنیا گزارش می‌شود. قبلاً تنها در یک مطالعه، Thomas و همکاران در یک فرد مبتلا به FAP با ده آدنوم در انگلستان جهش p.E1536X را شناسایی کردند. البته در این فرد جهش ژرمینال p.R213X بود و جهش p.E1536X به عنوان جهش دوم (سوماتیک) گزارش شد [۱۷]. کدون ۱۵۳۶ در ناحیه تکرارهای ۲۰ آمینواسیدی (بین کدون‌های ۱۳۲۴ تا ۲۰۷۵) [۳] در پروتئین APC قرار دارد که محل اتصال بتاکاتین است. برای کاهش فعالیت بتاکاتین و تجزیه آن، حداقل به سه تکرار از هفت تکرار ۲۰ آمینواسیدی APC نیاز است. انتهای سومین تکرار، کدون ۱۵۱۳ است. اغلب پروتئین‌های APC که در اثر جهش کوتاه شده‌اند (Truncated protein)، همه یا اکثر توالی‌های تکراری ۲۰ آمینواسیدی را ندارند [۱۸]. بنابراین در بیمار مورد بررسی در مطالعه حاضر به نظر می‌رسد عملکرد بتاکاتین چندان دچار مشکل نشده باشد، اما عملکرد دیگر پروتئین‌های قابل اتصال به پروتئین APC که در انتهای C ترمینال قرار دارند، از دست رفته باشد و در بروز بیماری تنظیم ناصحیح آن‌ها نقش داشته باشد. به‌طوری‌که دومین سمت C ترمینال این پروتئین در انتقال به هسته، اتصال به DNA، اتصال به میکروتوبول‌ها و انجام تقسیم صحیح کروموزوم‌ها (segregation) نقش دارد [۱۹]. اما در بیمار مذکور حذف این دومین می‌تواند فقدان چنین عملکردهایی را در سلول‌های کلورکتال فرد به‌خاطر حذف نواحی کدینگ مربوط به این عملکردها در یک آلل به همراه داشته باشد. از سوی دیگر در پنج بیمار جهش بدمعنی V1822D مشاهده شد. در مطالعه Russo و همکاران در اوکراین این جهش به‌همراه جهش

Q1260X در فرد دچار سرطان کلورکتال مشاهده شد [۲۰]. در مطالعه Ikenoue و همکاران بر روی یک خانواده مبتلا به AFAP جهش V1822D شناسایی شد [۲۱]. در مطالعه Iwaizumi و همکاران در یک فرد مبتلا به FAP با پولیپوز پراکنده این جهش به همراه جهش‌های دیگر مشاهده شد [۲۲]. در مطالعه Yang و همکاران، جهش بدمعنی V1822D با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیک به‌عنوان یک جهش مضر تعیین شد که در تأیید این آنالیزها، قبلاً به عنوان یک پلی‌مورفیسم مرتبط با سرطان کلورکتال با خطر بالا شناسایی شده بود. در مطالعه Yang و همکاران، این جهش ژرمینال در پنج بیمار مشاهده شد که در بعضی از بیماران همراه با دیگر جهش‌های بدمعنی یا بی‌معنی همراه بود و در بعضی از بیماران، جهش ژرمینال دیگری همراه با این جهش در اگزون ۱۵ شناسایی نشد [۲۳]. در مطالعه حاضر این جهش در یک بیمار با پولیپوز شدید همراه با جهش بی‌معنی E1536X مشاهده شد. در این بیمار جهش V1822D ممکن است تا حدودی باعث کاهش عملکرد پروتئین حاصل شود و جهش E1536X نقش مؤثرتری (با تولید پروتئین‌های با عملکرد ناکامل) در شدت بیماری داشته باشد. در حالی‌که در سه بیمار دیگر مبتلا به FAP کلاسیک با پولیپوز شدید با جهش V1822D، جهش بدمعنی یا جهش بی‌معنی دیگری شناسایی نشد. بنابراین در این افراد باید جهش دوم با اثرات مخرب‌تر رخ داده باشد که در ایجاد پولیپوز شدید نقش داشته باشد. با توجه به این‌که بین موقعیت جهش اول و جهش دوم و بروز پولیپوز ارتباط وجود دارد، در صورتی‌که جهش اول در محدوده ۱۱۹۴ تا ۱۳۹۲ رخ داده باشد، جهش دوم با LOH همراه است. در حالی‌که جهش اول در خارج از این ناحیه رخ داده باشد، جهش دوم در ناحیه MCR و از نوع جهش کوتاه‌کننده (Truncating mutation) مشاهده می‌شود [۱۸]. بنابراین جهش اصلی ایجادکننده پولیپوز شدید در این سه بیمار در آلل دیگر ژن ممکن است در ناحیه MCR و از نوع جهش کوتاه‌کننده رخ داده باشد که به مطالعات بیشتر در این زمینه نیاز است. همچنین در یک بیمار مبتلا به AFAP در این مطالعه، جهش V1822D به صورت هموزیگوت مشاهده شد که به‌نظر می‌رسد علت بروز بیماری به‌صورت خفیف در این فرد شناسایی شود که همان جهش در کدون ۱۸۲۲ می‌باشد. در مطالعات قبلی تأیید شده که جهش بعد از کدون ۱۵۸۰ تا انتهای ۳' ژن منجر به AFAP می‌شود [۱۲]. در مطالعه بهبودی فرح‌بخش و همکاران در بیمارستان طالقانی تهران از بین ۳۳ فرد مبتلا به FAP در ۵ بیمار حذف پنج نوکلئوتیدی ۱۳۰۹ مشاهده شد [۱۱]. در مطالعه کشفی و همکاران در یک بیمار مبتلا به cFAP و یک فرد مبتلا به AFAP حذف پنج نوکلئوتیدی

است که جهش ژرمینال دیگر یا جهش در آلل دوم در بخش ۵' اگزون ۱۵ رخ داده باشد. اما در فرد مبتلا به AFAP ممکن است شدت کمتر بیماری به دلیل انتهایی بودن جهش ژرمینال باشد که می‌تواند تأییدکننده نقش جهش V1822D به‌عنوان یک جهش مضر در ایجاد تعداد کم پولیپ در افراد مبتلا باشد. همچنین وقوع جهش E1536X در یک فرد مبتلا به FAP کلاسیک در مطالعه حاضر نشان‌دهنده اهمیت این جهش در بروز پولیپوز شدید بوده؛ چرا که جهش دوم در این فرد (V1822D) ظاهراً در ایجاد پولیپوز خفیف مؤثر است.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت جهت تأمین هزینه‌های طرح، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References:

- [1] Sokic-Milutinovic A. Appropriate Management of Attenuated Familial Adenomatous Polyposis: Report of a Case and Review of the Literature. *Dig Dis* 2019; 37(5): 400-5.
- [2] Shahnazi Gerdehsang P, Ranji N, Gorji M, Pakizehkar S, Kiani AA, Veysi S. New Mutations in APC Gene Among Familial Adenomatous Polyposis (FAP) Patients in Iran. *Int J Hum Genet* 2017; 17(4): 145-50.
- [3] Plawski A, Banasiewicz T, Borun P, Kubaszewski L, Krowicz P, Skrzypczak-Zielinska M, et al. Familial adenomatous polyposis of the colon. *Hered Cancer Clin Pr* 2013; 11(1): 15.
- [4] Dalavi SB, Vedpalsingh TH, Bankar SS, Ahmed MH, Bhosale DN. Familial Adenomatous Polyposis (FAP)-A Case Study and Review of Literature. *J Clin Diagn Res* 2015; 9(3): PD05-6.
- [5] D'Elia G, Caliendo G, Casamassimi A, Cioffi M, Molinari AM, Vietri MT. APC and MUTYH Analysis in FAP Patients: A Novel Mutation in APC Gene and Genotype-Phenotype Correlation. *Genes* 2018;9(7).
- [6] Ibrahim A, Barnes DR, Dunlop J, Barrowdale D, Antoniou AC, Berg JN. Attenuated familial adenomatous polyposis manifests as autosomal dominant late-onset colorectal cancer. *Eur J Hum Genet* 2014; 22(11): 1330-3.
- [7] De Queiroz Rossanese LB, De Lima Marson FA, Ribeiro JD, Coy CS, Bertuzzo CS. APC germline mutations in families with familial adenomatous polyposis. *Oncol Rep* 2013; 30(5): 2081-8.
- [8] Liu Q, Li X, Li S, Qu S, Wang Y, Tang Q, et al. Three novel mutations of APC gene in Chinese

۱۳۰۹ مشاهده شد [۲۴]. در مطالعه Chen و همکاران در ۱۴ فرد مبتلا به FAP شش جهش هتروزیگوت شناسایی شد که شایع‌ترین آن‌ها حذف پنج نوکلئوتیدی ۱۳۰۹ بود [۲۵]. با توجه به این‌که در این مطالعه این جهش شایع، شناسایی نشد؛ برای بررسی دقیق‌تر به جمعیت بزرگ‌تری از بیماران در استان‌های مورد مطالعه نیاز است تا حضور یا عدم حضور چنین جهش مهمی مورد ارزیابی قرار گیرد. بنابراین در افراد شرکت‌کننده در این مطالعه چنین جهشی شناسایی نشد و ممکن است در استان‌های گیلان، ایلام و لرستان جهش‌های دیگری دارای اهمیت باشند که نیاز به مطالعات گسترده‌تری دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به این‌که جهش‌های ژرمینال شناسایی شده در سه بیمار با پولیپوز شدید در بخش ۳' ژن APC قرار داشت، ممکن

- patients with familial adenomatous polyposis. *Tumour Biol* 2016; 37(8): 11421-7.
- [9] Majumder S, Shah R, Elias J, Mistry Y, Coral K, Shah P, et al. A neopeptide derived from a novel human germline APC gene mutation in familial adenomatous polyposis shows selective immunogenicity. *PloS One* 2018; 13(9): e0203845.
 - [10] Eshghifar N, Farrokhi N, Naji T, Zali M. Tumor suppressor genes in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2017; 10(1): 3-13.
 - [11] Behboudi Farahbakhsh F, Maghsoudi H, Asadzadeh Aghdai H, Nazemalhosseini-Mojarad E. Germline mutation at codon 1309 of the adenomatous polyposis coli gene and extracolonic manifestations in familial adenomatous polyposis. *Tehran Univ Med J* 2017; 75(4): 259-66.
 - [12] Hyer W, Cohen S, Attard T, Vila-Miravet V, Pienar C, Auth M, et al. Management of Familial Adenomatous Polyposis in Children and Adolescents: Position Paper From the ESPGHAN Polyposis Working Group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2019; 68(3): 428-41.
 - [13] Giang H, Nguyen VT, Nguyen SD, Nguyen HP, Vo BT, Nguyen TM, et al. Detection of a heterozygous germline APC mutation in a three-generation family with familial adenomatous polyposis using targeted massive parallel sequencing in Vietnam. *BMC Med Genet* 2018; 19(1): 188.
 - [14] Torrezan GT, da Silva FC, Santos EM, Krepisch AC, Achatz MI, Aguiar SJr, et al. Mutational spectrum of the APC and MUTYH genes and genotype-phenotype correlations in

Brazilian FAP, AFAP, and MAP patients. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8: 54.

[15] Newton KF, Mallinson EK, Bowen J, Laloo F, Clancy T, Hill J, et al. Genotype-phenotype correlation in colorectal polyposis. *Clin Genet* 2012; 81(6): 521-31.S

[16] Marabelli M, Molinaro V, Abou Khouzam R, Berrino E, Panero M, Balsamo A, et al. Colorectal Adenomatous Polyposis: Heterogeneity of Susceptibility Gene Mutations and Phenotypes in a Cohort of Italian Patients. *Genet Test Mol Biomarkers* 2016; 20(12): 777-85.

[17] Thomas LE, Hurley JJ, Meuser E, Jose S, Ashelford KE, Mort M, et al. Burden and Profile of Somatic Mutation in Duodenal Adenomas from Patients with Familial Adenomatous- and MUTYH-associated Polyposis. *Clin Cancer Res* 2017; 23(21): 6721-32.

[18] Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 2001; 10(7): 721-33.

[19] Hankey W, Frankel WL, Groden J. Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting. *Cancer Metastasis Rev* 2018; 37(1): 159-72.

[20] Russo L, Cifarelli RA, Di Venere B, Sgambato A, Susi M, Fragasso A, et al. Novel Germline Mutation (Q1260X) in APC Gene Causes

Familial Adenomatous Polyposis in a Ukrainian Family. *J Genet Syndr Gene Ther* 2013; 4(10): 1-4.

[21] Ikenoue T, Yamaguchi K, Komura M, Imoto S, Yamaguchi R, Shimizu E, et al. Attenuated familial adenomatous polyposis with desmoids caused by an APC mutation. *Hum Genome Var* 2015; 2: 15011.

[22] Iwaizumi M, Tao H, Yamaguchi K, Yamada H, Shinmura K, Kahyo T, et al. A novel APC mosaicism in a patient with familial adenomatous polyposis. *Hum Genome Var* 2015; 2: 15057.

[23] Yang J, Liu WQ, Li WL, Chen C, Zhu Z, Hong M, et al. Investigating polymorphisms by bioinformatics is a potential cost-effective method to screen for germline mutations in Chinese familial adenomatous polyposis patients. *Oncol Lett* 2016; 12(1): 421-8.

[24] Kashfi SM, Behboudi Farahbakhsh F, Golmohammadi M, Nazemalhosseini Mojarad E, Azimzadeh P, Asadzadeh Aghdaie H. Frameshift Mutations (Deletion at Codon 1309 and Codon 849) in the APC Gene in Iranian FAP Patients: a Case Series and Review of the Literature. *Int J Mol Cell Med* 2014; 3(3): 196-202.

[25] Chen QW, Zhang XM, Zhou JN, Zhou X, Ma GJ, Zhu M, et al. Analysis of Small Fragment Deletions of the APC gene in Chinese Patients with Familial Adenomatous Polyposis, a Precancerous Condition. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(12): 4915-20.