مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۲۱۸/هفته چهارم بهمن ماه ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۹/۲۸

بررسی فراوانی جهش‌های ژن‌های BRCA1 و BRCA2 در بیماران مبتلا به سرطان پستان

محمد حسن تاج‌الدینی[۱]، حورا خادم[۲]، دکتر معراج پورحسین[۳]، دکتر میر علیمحمد سبزقبائی[۴]، دکتر سیمین همتی[۵]، دکتر حمید میرمحمد صادقی[۶]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ژنتیک و سابقه‌ی فامیلی یک عامل خطر ثابت شده در بروز سرطان پستان محسوب می‌شود. BRCA1 و BRCA2 از ژن‌های مؤثر در سرطان پستان می‌باشند. بنابراین شناسایی زنان ناقل جهش‌های BRCA1 و BRCA2 در کاهش خطر کلی از اهمیت خاصی برخوردار است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی فراوانی جهش‌های ژن‌های BRCA1 و BRCA2 در بیماران مبتلا به سرطان پستان با استفاده از روش HRM (High resolution melting) بود.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی توصیفی، نمونه‌ی خون محیطی ۴۱ زن مبتلا به سرطان پستان و ۲۰ زن سالم به صورت تصادفی جمع‌آوری شد. حداقل سن افراد مورد مورد مطالعه ۴۰ سال بود و به سایر بیماری‌ها از جمله سایر سرطان‌ها مبتلا نبودند. جهش‌های BRCA1 185 del AG، BRCA1 5382 ins C، BRCA2 6174 del T، BRCA2 6033-34 ins GT، BRCA1 3889 del AG و BRCA1 1476 del G برای این مطالعه در نظر گرفته شدند. DNA ژنومی از نمونه‌های خون استخراج گردید. برای هر جهش یک جفت پرایمر Forward و Reverse طراحی شد. سپس واکنش RT-PCR (Real time polymerase chain reaction) و آنالیز HRM انجام شد. برای هر جهش چند نمونه به صورت تصادفی توالی‌یابی گردید.

یافته‌ها: نمودارهای HRM و ذوب مربوط به هر جهش، در گروه‌های مورد و شاهد مقایسه گردید. جهش‌های مورد نظر در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نشد. نمونه‌های توالی‌یابی شده نیز نتایج HRM را تأیید کردند.

نتیجه‌گیری: با توجه به تعداد کم نمونه‌ها، محدودیت امکانات و بودجه‌ی ناکافی و عدم تعیین و ثبت جهش‌های بومی، احتمال مشاهده‌ی جهش در مطالعاتی نظیر مطالعه‌ی فوق بسیار اندک است. با این وجود، این مطالعه می‌تواند به عنوان پایه‌ای برای انجام مطالعات وسیع و کاربردی در بررسی جهش‌های بومی و غیر بومی در جمعیت ایرانی به کار رود.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، BRCA1، BRCA2، High resolution melting

ارجاع: تاج‌الدینی محمد حسن، خادم حورا، پورحسین معراج، سبزقبائی میر علیمحمد، همتی سیمین، میرمحمد صادقی حمید. **بررسی فراوانی جهش‌های ژن‌های BRCA1 و BRCA2 در بیماران مبتلا به سرطان پستان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۱؛ ۳۰ (۲۱۸): ۲۲۱۷-۲۲۲۴

---

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای به شماره‌ی ۳۸۹۳۸۴ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات فیزیولوژی و گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی داروسازی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشیار، گروه بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- دانشیار، مرکز پژوهش‌های توکسیکولوژی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۵- استادیار، گروه رادیوتراپی و انکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۶- استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حمید میر محمدصادقی
Email: h_sadeghi@pharm.mui.ac.ir

مقدمه

سرطان یکی از بیماری‌های ژنتیکی است که در نتیجه‌ی تجمع تغییرات و ناهنجاری‌های ژنی در قسمت‌های مختلف بدن ایجاد می‌شود (۱). از میان انواع سرطان‌ها، سرطان پستان به عنوان شایع‌ترین سرطان در میان زنان، ۲۲ درصد همه‌ی سرطان‌های زنان در جهان را به خود اختصاص داده است (۳-۲). در جمعیت زنان ایرانی سرطان پستان با بیشترین شیوع نسبت به سایر سرطان‌ها، ۲٤/٤ درصد بدخیمی‌ها را شامل می‌شود (٤).

جنس، سن، نژاد، عوامل هورمونی (سیکل قاعدگی، سابقه‌ی زایمان، سابقه‌ی هورمون‌درمانی در دوران یائسگی)، چگالی پستان، بیماری‌های خوش‌خیم پستان، تشعشع، مصرف الکل، فعالیت فیزیکی و شاخص توده‌ی بدنی از عوامل تأثیرگذار بر ابتلا به سرطان پستان می‌باشند (٦-٥، ۱). از بین عوامل مؤثر در بروز این بیماری، ژنتیک و سابقه‌ی فامیلی یک عامل خطر ثابت شده محسوب می‌شود (۷، ۱). بنابراین بررسی ژنتیکی افرادی که سابقه‌ی فامیلی ابتلا به سرطان دارند، به منظور غربالگری افراد مستعد ابتلا به این بیماری حایز اهمیت می‌باشد.

نزدیک به ۱۰-۵ درصد کل سرطان‌های شناخته‌شده‌ی پستان در اثر جهش در ژن‌های مستعدکننده‌ی سرطان پستان (۵) و به صورت موروثی در زنان با سابقه‌ی فامیلی مشاهده می‌شود (۱۰-۸). این ژن‌ها با توجه به تأثیری که در بروز سرطان دارند به ۳ دسته‌ی ژن‌های پر خطر، ژن‌های با خطر متوسط و ژن‌های کم خطر تقسیم می‌شوند (٦-٥). ژن‌های پر خطر شامل BRCA1 (۱۱)، BRCA2 (۱۱)، PTEN (۱۲)، TP53 (۱۳)، CDH1 (۱٤) و LKB1/STK11 (۱۵) می‌باشند (۵). از بین ژن‌های یادشده، جهش در ژن‌های BRCA1 و BRCA2 یکی از دلایل مهم ابتلا به سرطان‌های پستان و تخمدان و نیز سندروم سرطان پستان و تخمدان موروثی می‌باشد (۲۱-۱٦). بنابراین شناسایی زنان ناقل جهش‌های BRCA1 و BRCA2 به منظور شروع اقدامات پیشگیرانه و کاهش خطر کلی از اهمیت خاصی برخوردار است (۲۲-۱٦). از سوی دیگر، به تازگی مشخص شده است که تومورهای ناشی از جهش‌های BRCA1 و BRCA2 به بازدارنده‌های PARP (Poly ADP-ribose polymerase) حساس هستند و آزمایش سریع و حساس این جهش‌ها می‌تواند به طور مستقیم در کلینیک مورد استفاده قرار گیرد (۲۳).

شناسایی گوناگونی‌های توالی ژنی با استفاده از روش‌های غربالگری انجام می‌شود. روش‌های غربالگری به منظور کاهش هزینه‌ها و زمان صرف‌شده، به عنوان جایگزین توالی‌یابی که استاندارد طلایی برای بررسی گوناگونی‌های ژنتیکی می‌باشد، به کار گرفته می‌شوند. از میان روش‌های گوناگون، با توجه به دقت، هزینه و زمان صرف شده، روش HRM (High resolution melting) ابزار مناسب و قدرتمندی برای غربالگری به نظر می‌رسد. HRM یک روش از PCR (Polymerase chain reaction) است که برای شناسایی انواع جهش‌ها در بیماری‌های ژنتیکی (۳۵-۲٤) و پلی‌مورفیسم‌ها (۳۷-۳٦، ۲٤) به کار می‌رود.

از مزایای این روش می‌توان به بررسی تعداد فراوان نمونه‌ها به طور همزمان و انجام تمام فرایند (PCR و آنالیز نمودار ذوب) در یک لوله‌ی واحد

دربسته اشاره کرد که علاوه بر کاهش زمان، خطر آلودگی محصول را نیز کم می‌کند (۲۶-۲۵). اولین گزارش استفاده از HRM برای ژنوتایپینگ نواحی مختلف BRCA1 و BRCA2 در سال ۲۰۰۶ منتشر شد (۳۸) و پس از آن به طور گسترده در غربالگری جهش‌ها و پلی‌مورفیسم‌های BRCA1 و BRCA2 مورد استفاده قرار گرفت (۴۱-۱۷).

با توجه به مطالب بیان شده، بررسی ژن‌های BRCA1 و BRCA2 با یک روش مناسب به منظور غربالگری ناقلین جهش در این ژن‌ها ضروری به نظر می‌رسد. هدف این مطالعه، بررسی فراوانی جهش‌های 185 del AG، 5382 ins C، 3889 del AG و 1476 del G در ژن BRCA1 و 6174 del T و جهش 6033-34 ins GT در ژن BRCA2 با استفاده از روش HRM در جمعیت بیماران مبتلا به سرطان پستان بود.

روش‌ها

نمونه‌گیری از ۲ گروه بیمار و شاهد به ترتیب در بیمارستان سیدالشهدا (ع) و آزمایشگاه خواجه نصیرالدین طوسی در شهر اصفهان انجام شد. ۳ میلی‌لیتر از خون محیطی ۴۱ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۲۰ فرد سالم با سن حداقل ۴۰ سال جمع‌آوری شد. همه‌ی افراد مورد مطالعه زن بودند. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده تا زمان استفاده در فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای جداسازی DNA ژنومی از نمونه‌های خون از کیت QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen®, Germany) استفاده شد. به منظور تکثیر اختصاصی نواحی مورد نظر، برای هر موتاسیون یک جفت پرایمر Forward و Reverse با استفاده از نرم‌افزار Beacon designer نسخه‌ی ۷/۹۱ طراحی گردید. با توجه به این که غلظت مورد نیاز پرایمر در واکنش PCR، ۱۰ میکرومول در لیتر بود، پرایمرها به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر استریل رقیق شدند و Primer master mix از اختلاط پرایمرهای Forward و Reverse هر جهش با نسبت برابر تهیه شد. پرایمرها قبل از شروع آزمایش HRM توسط Traditional PCR مورد بررسی کیفی قرار گرفتند.

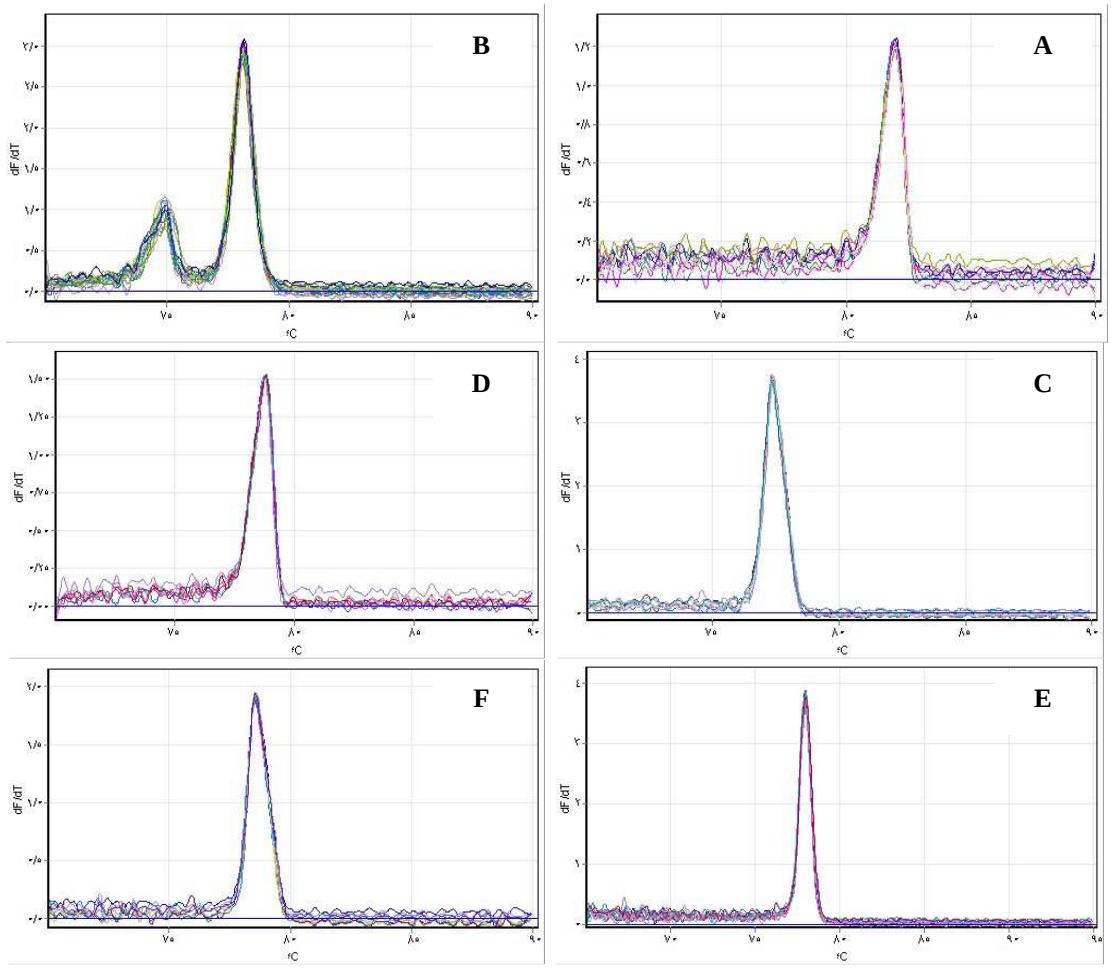
برای انجام واکنش Real-Time PCR و آنالیز HRM از دستگاه Corbette rotor gene ۶۰۰۰ و کیت Type-it® HRM™PCR kit (QIAGEN®-GERMANY) استفاده شد. ۱۲/۵ میکرولیتر 2 x HRM PCR Master Mix، ۲ میکرولیتر Primer mix ۱۰ M مولار، ۸/۵ میکرولیتر RNase-free water و در نهایت ۲ میکرولیتر نمونه‌ی DNA به میکروتیوب‌های ۰/۱ میلی‌لیتری منتقل شد و داخل دستگاه قرار گرفت. به دنبال یک مرحله‌ی فعال‌سازی آنزیم HotStarTaq Plus DNA Polimerase (موجود در Master Mix) در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، واکنش PCR در ۵۰ سیکل سه مرحله‌ای انجام شد. در هر سیکل مراحل: Denaturation به مدت ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، Anealing به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و Extention به مدت ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد تکرار شد. پس از اتمام مراحل PCR، دما به ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد کاهش یافت و هر ۲ ثانیه، ۰/۱ درجه‌ی سانتی‌گراد افزایش یافت و تغییرات مقدار فلوئورسنس توسط دستگاه

ثبت شد. این روند تا رسیدن به دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ادامه یافت و منحنی ذوب در این بازه‌ی دمایی توسط نرم‌افزار مربوط رسم گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه‌ی توصیفی، ٤١ زن مبتلا به سرطان پستان به عنوان گروه مورد و ۲۰ زن سالم به عنوان گروه شاهد مورد مطالعه قرار گرفتند. حداقل سن افراد مورد مطالعه ٤٠ سال بود. میانگین سنی در گروه مورد ۵۲/۷۸ و در گروه شاهد ۵۳/۰۵ سال محاسبه شد. بر اساس آزمون Student-t توزیع فراوانی سنی در دو گروه تفاوت معنی‌داری نداشت (P = ۰/۹۱). هر دو گروه از نظر ابتلا به سایر بیماری‌ها مانند سایر سرطان‌ها بررسی شدند و مورد مثبتی در این زمینه مشاهده نشد.

تمام نمونه‌های هر دو گروه مورد و شاهد با هر ٦ جفت پرایمر و با روش HRM بررسی شدند و نمودارهای HRM و ذوب آن‌ها توسط نرم‌افزار مربوط رسم گردید (شکل ۱). در هر مورد در صورت وجود، نمودارهای نمونه‌ی مشکوک و در غیر این صورت تعدادی نمونه به صورت تصادفی توالی‌یابی گردید. در هیچ یک از موارد برای هیچ یک از جهش‌ها مورد مثبتی گزارش نشد.



شکل ۱. نمودارهای HRM (High resolution melting) و ذوب مربوط به جهش‌های مورد نظر A: BRCA1 185del AG، B: BRCA1 5382 ins C، C: BRCA2 6174 del T، D: BRCA2 6033-34 ins GT، E: BRCA1 3889 del AG و F: BRCA1 1476 del G

بحث

از میان ٦ جهش بررسی شده، ٣ جهش اول، BRCA1 185 del AG، BRCA1 5382 ins C و BRCA2 6174 del T جهش‌های Founder یهودیان اشکنازی محسوب می‌شوند. با توجه به نمودارهای HRM و ذوب مربوط، این جهش‌ها در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نشدند.

بر اساس مطالعات مختلف انجام شده توسط Jimenez و همکاران، جهش BRCA1 185 del AG علاوه بر یهودیان اشکنازی، در جمعیت اسپانیایی نیز مشاهده شده است (٤٣-٤٢، ٣٩). این جهش در بیماران مبتلا به سرطان پستان بررسی‌شده در پاکستان در پژوهش Liede و همکاران نیز وجود داشته است (٤٤). جهش BRCA1 5382 ins C طبق اطلاعات مرکز اطلاعات پستان دومین جهش شایع BRCA1 می‌باشد (٤٥). این جهش در بیماران جمعیت‌های مختلف مانند یونان، اسپانیا، اسلوونی، آلمان، چک، اسلوواکی، هلند و استرالیا دیده شده است (٤٨-٤٦). به نظر می‌رسد این جهش به دلیل حضور گسترده‌ی یهودیان در این نواحی، بومی مناطق مرکزی و شرقی اروپا باشد.

چهارمین جهش بررسی شده، BRCA2 6033-34 ins GT بود. این جهش برای اولین بار در مطالعه‌ی Pietschmann و همکاران روی جهش‌های BRCA1 و BRCA2 در خانواده‌های ایرانی با خطر بالای سرطان پستان در جمعیت ایرانی مشاهده شد و تاکنون در هیچ جمعیت دیگری دیده نشده است (٨). با وجود این که این جهش بومی جمعیت ایران می‌باشد، در نمونه‌های بررسی‌شده در این مطالعه مشاهده نشد. دلیل این مسأله را می‌توان تعداد محدود نمونه‌ها و یا فراوانی اندک جهش در کل جمعیت ایرانی دانست.

دو جهش BRCA1 3889 del AG و BRCA1 1476 del G در مطالعه‌ی انجام شده در پاکستان توسط Liede و همکاران در بیماران مبتلا به سرطان پستان مشاهده شد (٤٤). انتظار می‌رفت که به دلیل نزدیکی جغرافیایی و ژنتیکی، این جهش‌ها در جمعیت ایرانی نیز وجود داشته باشند. در حالی که در بیماران بررسی‌شده در این مطالعه دیده نشدند.

با توجه به این که مطالعات پایه‌ای در راستای ترسیم نقشه‌ی ژنتیکی جمعیت ایرانی و تعیین و ثبت جهش‌های بومی به طور جدی صورت نگرفته است، احتمال مشاهده و شناسایی جهش در مطالعاتی نظیر مطالعه‌ی فوق به دلیل تعداد کم نمونه‌ها، محدودیت امکانات و بودجه‌ی ناکافی بسیار بعید به نظر می‌رسد. با این وجود، مطالعاتی از این قبیل می‌تواند دورنمای روشنی از چگونگی انجام مطالعات وسیع و کاربردی در زمینه‌ی ترسیم نقشه‌ی ژنی و بررسی جهش‌های بومی و غیر بومی در جمعیت ایرانی به دست دهد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات و راهنمایی‌های سرکار خانم دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد و مرکز تحقیقات فیزیولوژی به خاطر در اختیار گذاشتن امکانات آن مرکز برای انجام آزمایش‌ها و همچنین از زحمات سرکار خانم فاطمه مؤذن کارشناس ارشد آزمایشگاه بیوتکنولوژی دارویی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان سپاسگزاری می‌نماییم.

References

1. American Cancer Society. Breast cancer facts and figures 2009-2010. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2010.
2. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 1999; 49(1): 33-64.
3. Parkin DM. International variation. Oncogene 2004; 23(38): 6329-40.
4. Kolahdoozan S, Sadjadi A, Radmard AR, Khademi H. Five common cancers in Iran. Arch Iran Med 2010; 13(2): 143-6.
5. Oldenburg RA, Meijers-Heijboer H, Cornelisse CJ, Devilee P. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? Crit Rev Oncol Hematol 2007; 63(2): 125-49.
6. Mavaddat N, Antoniou AC, Easton DF, Garcia-Closas M. Genetic susceptibility to breast cancer. Mol Oncol 2010; 4(3): 174-91.
7. Mehdipour P, Atri M, Jafarimojarrad E, Hosseini-Asl SS, Javidroozi M. Laddering through pedigrees: family history of malignancies in primary breast cancer patients. Asian Pac J Cancer Prev 2003; 4(3): 185-92.
8. Pietschmann A, Mehdipour P, Mehdipour P, Atri M, Hofmann W, Hosseini-Asl SS, et al. Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Iranian high risk breast cancer families. J Cancer Res Clin Oncol 2005; 131(8): 552-8.
9. Claus EB, Risch N, Thompson WD. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. Am J Hum Genet 1991; 48(2): 232-42.
10. Newman B, Austin MA, Lee M, King MC. Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85(9): 3044-8.
11. Antoniou AC, Cunningham AP, Peto J, Evans DG, Lalloo F, Narod SA, et al. The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancers: updates and extensions. Br J Cancer 2008; 98(8): 1457-66.
12. Nelen MR, Padberg GW, Peeters EA, Lin AY, van den Helm B, Frants RR, et al. Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. Nat Genet 1996; 13(1): 114-6.
13. Birch JM, Alston RD, McNally RJ, Evans DG, Kelsey AM, Harris M, et al. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. Oncogene 2001; 20(34): 4621-8.
14. Masciari S, Larsson N, Senz J, Boyd N, Kaurah P, Kandel MJ, et al. Germline E-cadherin mutations in familial lobular breast cancer. J Med Genet 2007; 44(11): 726-31.
15. Jenne DE, Reimann H, Nezu J, Friedel W, Loff S, Jeschke R, et al. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. Nat Genet 1998; 18(1): 38-43.
16. Tucker III JM, Rizk B. Hereditary female cancers: breast, ovarian, and endometrial. Middle East Fertil Soc J 2011; 16(4): 241-7.
17. Takano EA, Mitchell G, Fox SB, Dobrovic A. Rapid detection of carriers with BRCA1 and BRCA2 mutations using high resolution melting analysis. BMC Cancer 2008; 8: 59.
18. De LK, Coene I, Poppe B, De PA, Claes K. Rapid and sensitive detection of BRCA1/2 mutations in a diagnostic setting: comparison of two high-resolution melting platforms. Clin Chem 2008; 54(6): 982-9.
19. Balmain A, Gray J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer. Nat Genet 2003; 33(Suppl): 238-44.
20. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. Science 2003; 302(5645): 643-6.
21. Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. N Engl J Med 2003; 348(23): 2339-47.
22. Kauff ND, Satagopan JM, Robson ME, Scheuer L, Hensley M, Hudis CA, et al. Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. N Engl J Med 2002; 346(21): 1609-15.
23. Rubinstein WS. Hereditary breast cancer: pathobiology, clinical translation, and potential for targeted cancer therapeutics. Fam Cancer 2008; 7(1): 83-9.
24. Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. Clin Chem 2004; 50(10): 1748-54.
25. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. Pharmacogenomics 2007; 8(6): 597-608.
26. Erali M, Voelkerding KV, Wittwer CT. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. Exp Mol Pathol 2008; 85(1): 50-8.
27. Kennerson ML, Warburton T, Nelis E, Brewer M, Polly P, De JP, et al. Mutation scanning the GJB1 gene with high-resolution melting analysis: implications for mutation scanning of genes for Charcot-Marie-Tooth disease. Clin Chem 2007; 53(2): 349-52.
28. Laurie AD, Smith MP, George PM. Detection of factor VIII gene mutations by high-resolution melting analysis. Clin Chem 2007; 53(12): 2211-4.

29. Margraf RL, Mao R, Highsmith WE, Holtegaard LM, Wittwer CT. Mutation scanning of the RET protooncogene using high-resolution melting analysis. Clin Chem 2006; 52(1): 138-41.
30. Margraf RL, Mao R, Highsmith WE, Holtegaard LM, Wittwer CT. RET proto-oncogene genotyping using unlabeled probes, the masking technique, and amplicon high-resolution melting analysis. J Mol Diagn 2007; 9(2): 184-96.
31. Willmore-Payne C, Holden JA, Chadwick BE, Layfield LJ. Detection of c-kit exons 11- and 17-activating mutations in testicular seminomas by high-resolution melting amplicon analysis. Mod Pathol 2006; 19(9): 1164-9.
32. Nomoto K, Tsuta K, Takano T, Fukui T, Fukui T, Yokozawa K, et al. Detection of EGFR mutations in archived cytologic specimens of non-small cell lung cancer using high-resolution melting analysis. Am J Clin Pathol 2006; 126(4): 608-15.
33. Hung CC, Lee CN, Chang CH, Jong YJ, Chen CP, Hsieh WS, et al. Genotyping of the G1138A mutation of the FGFR3 gene in patients with achondroplasia using high-resolution melting analysis. Clin Biochem 2008; 41(3): 162-6.
34. Bastien R, Lewis TB, Hawkes JE, Quackenbush JF, Robbins TC, Palazzo J, et al. High-throughput amplicon scanning of the TP53 gene in breast cancer using high-resolution fluorescent melting curve analyses and automatic mutation calling. Hum Mutat 2008; 29(5): 757-64.
35. Audrezet MP, Dabricot A, Le MC, Ferec C. Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. J Mol Diagn 2008; 10(5): 424-34.
36. Hill CE, Duncan A, Wirth D, Nolte FS. Detection and identification of cytochrome P-450 2C9 alleles *1, *2, and *3 by high-resolution melting curve analysis of PCR amplicons. Am J Clin Pathol 2006; 125(4): 584-91.
37. Liew M, Nelson L, Margraf R, Mitchell S, Erali M, Mao R, et al. Genotyping of human platelet antigens 1 to 6 and 15 by high-resolution amplicon melting and conventional hybridization probes. J Mol Diagn 2006; 8(1): 97-104.
38. Dufresne SD, Belloni DR, Wells WA, Tsongalis GJ. BRCA1 and BRCA2 mutation screening using SmartCycler II high-resolution melt curve analysis. Arch Pathol Lab Med 2006; 130(2): 185-7.
39. de Juan I, Esteban E, Palanca S, Barragan E, Bolufer P. High-resolution melting analysis for rapid screening of BRCA1 and BRCA2 Spanish mutations. Breast Cancer Res Treat 2009; 115(2): 405-14.
40. Cvok ML, Cretnik M, Musani V, Ozretic P, Levanat S. New sequence variants in BRCA1 and BRCA2 genes detected by high-resolution melting analysis in an elderly healthy female population in Croatia. Clin Chem Lab Med 2008; 46(10): 1376-83.
41. Coulet F, Pires F, Rouleau E, Lefol C, Martin S, Colas C, et al. A one-step prescreening for point mutations and large rearrangement in BRCA1 and BRCA2 genes using quantitative polymerase chain reaction and high-resolution melting curve analysis. Genet Test Mol Biomarkers 2010; 14(5): 677-90.
42. Jimenez IJ, Esteban CE, Palanca SS, Gonzalez EB, Bolufer GP. Advantages of the high resolution melting in the detection of BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. Clin Biochem 2009; 42(15): 1572-6.
43. de Juan Jimenez I, Cardenosa EE, Suela SP, Gonzalez EB, Trejo DS, Lluch OF, et al. Advantage of high-resolution melting curve analysis over conformation-sensitive gel electrophoresis for mutational screening of BRCA1 and BRCA2 genes. Clin Chim Acta 2011; 412(7-8): 578-82.
44. Liede A, Malik IA, Aziz Z, Rios Pd PL, 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.
45. Breast Cancer Information Core. An Open Access On-Line Breast Cancer Mutation Data Base. [cited 2009 Feb]. Available from: URL: http://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/.
46. Kroupis C, Christopoulos K, Devetzoglou M, Tsiagas I, Lianidou ES. Asymmetric real-time PCR detection of BRCA1 5382insC mutation by melting curve analysis in the LightCycler. Clin Chim Acta 2008; 390(1-2): 141-4.
47. Vorkas PA, Christopoulos K, Kroupis C, Lianidou ES. Mutation scanning of exon 20 of the BRCA1 gene by high-resolution melting curve analysis. Clin Biochem 2010; 43(1-2): 178-85.
48. Stegel V, Krajc M, Zgajnar J, Teugels E, De GJ, Hocevar M, et al. The occurrence of germline BRCA1 and BRCA2 sequence alterations in Slovenian population. BMC Med Genet 2011; 12: 9.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 23.10.2012
Vol. 30, No. 218, 4th Week, February 2013
Accepted: 18.12.2012

Investigating the Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Gene Mutations in Patients with Breast Cancer

Mohammad Hassan Tajadini[1], Houra Khadem[2], Meraj Pourhosein PhD[3], Ali Mohammad Sabzghabaee Pharm D[4], Simin Hemati MD[5], Hamid Mirmohammad Sadeghi PhD[6]

Original Article

Abstract

Background: Breast cancer is the most common cancer among women. Genetic is a proven risk factor in this disease. As breast cancer genes (BRCA1 and BRCA2) affect the incidence of this type of cancer, identification of mutation carriers is important in reduction of the overall risk. The purpose of this study was to determine the prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in patients with breast cancer using high resolution melting (HRM) analysis.

Methods: Blood samples of 41 female patients with breast cancer and 20 healthy women were collected randomly. The studied mutations were 185delAG, 5382insC, 3889delAG and 1476delG in BRCA1 and 6174delT and 6033-34insGT in BRCA2. Genomic DNA was extracted from blood samples. Forward and reverse primers were designed for each mutation. DNA samples of healthy individuals were sequenced to make sure about the absence of the studied mutations. Real-time polymerase chain reaction (PCR) and HRM analysis were performed and HRM and melting curves were plotted for all samples. For each mutation, some random samples were sequenced. The curves in the case and control groups were compared for each mutation.

Findings: The desired mutations were not observed in any samples of the case group. Sequenced samples confirmed the HRM results.

Conclusion: Due to the low number of samples and lack of known native mutations, observation and identification of mutations seem to be impossible in studies such as the present one. However, this study can serve as a base for extensive and applied studies of native and non-native mutations in Iranian population.

Keywords: Breast cancer, BRCA1 gene, BRCA2 gene, High resolution melting

Citation: Tajadini MH, Khadem H, Pourhosein M, Sabzghabaee AM, Hemati S, Mirmohammad Sadeghi H. **Investigating the Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Gene Mutations in Patients with Breast Cancer.** J Isfahan Med Sch 2013; 30(218): 2217-24

* This paper is derived from a Pharm D thesis No. 389384 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- MSc Student, Physiology Research Center AND Department of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Student of Pharmacy, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Department of Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Associate Professor, Isfahan Clinical Toxicology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- Assistant Professor, Department of Radiotherapy and Oncology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
6- Professor, Department of Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences AND Physiology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Hamid Mirmohammad Sadeghi PhD, Email: h_sadeghi@pharm.mui.ac.ir