

شناسایی جهش در اگزون‌های پنج و شش ژن P53 در زنان مبتلا به سرطان پستان آذربایجان شرقی

حوریه خانی^۱، دکتر محمد علی حسینپور فیضی^۲، ناصر پولادی^۳، دکتر نادر چاпарزاده^۴، دکتر وحید منتظری^۵، پروین آذرنام^۶

نویسنده مسئول: تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، بخش بیولوژی pourfeizi@eastp.ir

دریافت: ۸۹/۶/۴ پذیرش: ۹۰/۶/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی در زنان جهان است. ژن سرکوبگر توموری P53 یکی از فراوان‌ترین ژن‌های تغییر یافته در سرطان‌های انسانی می‌باشد. ارزیابی دقیق جهش‌های ژن P53 در مبتلایان سرطان پستان می‌تواند در تشخیص، پیش‌آگهی یا درمان اهمیت داشته باشد.

روش بررسی: تعداد ۱۰۲ نمونه‌ی توموری از بیماران سرطان پستان نژاد ترک منطقه‌ی آذربایجان شرقی، که طی سال‌های ۸۶ تا ۸۸ به بیمارستان‌های شهر تبریز مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری و DNA آن‌ها استخراج شد. سپس ژن P53 از ابتدای اگزون ۵ تا انتهای اگزون ۶ تکثیر و توالی‌یابی گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه ۱۸ تغییر مشاهده شد (۱۷/۶۴ درصد) که ۷ مورد آن مربوط به پلی‌مورفیسم (۷/۸۶ درصد) و ۱۱ مورد آن مربوط به جهش (۱۰/۷۸ درصد) می‌باشد. جهش‌های (ATG>AAG) codon ۱۶۰ و (ATC>AAG) codon ۱۶۳ که در اگزون ۵ قرار گرفته‌اند، ۱/۷۲ درصد جهش‌ها را شامل شدند. همچنین ۸۱/۸ درصد جهش‌ها در اگزون ۶ مشاهده شدند که شامل (CAT>AAT) codon ۱۹۳، (ATC>TTC) codon ۱۹۵، (ATC>ACC) codon ۱۹۵، (GAA>TAA) codon ۱۹۸، (TAT>TGT) codon ۲۲۰، (CGA>CTA) codon ۲۱۳ و (CAT>CGT) codon ۲۱۴ بود. در اینترون ۵ تغییری مشاهده نشد و همه‌ی پلی‌مورفیسم‌ها در اگزون ۶ و در نوکلئوتید ۱۳۳۹۹ شناسایی شدند. اکثر جهش‌های شناسایی شده در این مطالعه از نوع جهش بدمعنی (Missense) بودند که در دومین اتصال به DNA ژن P53 قرار گرفته بودند. این جهش‌ها منجر به تولید پروتئین جهش یافته‌ای می‌شود که دارای ساختار ناپایدار بوده، قابلیت اتصال به DNA آن تغییر یافته است.

نتیجه‌گیری: این مطالعه اولین گزارش تغییرات ژن P53 در منطقه‌ی آذربایجان شرقی بود. نتایج ما جهش‌پذیری بالای اگزون ۶ ژن P53 را در بیماران مورد مطالعه نشان داد و اینکه الگوی جهش‌ها متفاوت از سایر مناطق بود. ادامه‌ی بررسی‌ها می‌تواند تغییرات این ژن و نقش آن را در مبتلایان سرطان پستان بیشتر آشکار سازد.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، ژن P53، آذربایجان شرقی

-
- ۱- کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، مرکز ژنتیک جهاد دانشگاهی تبریز
 - ۲- دکترای رادیوبیولوژی، استاد دانشگاه تبریز
 - ۳- دانشجوی دکترای بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه تهران، مربی دانشگاه تربیت معلم آذربایجان
 - ۴- دکترای تخصصی فیزیولوژی گیاهی، استادیار دانشگاه تربیت معلم آذربایجان
 - ۵- متخصص جراحی عمومی، استاد دانشگاه علوم پزشکی تبریز
 - ۶- کارشناسی ارشد فیزیک پزشکی، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست جانوری، دانشگاه تبریز

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در میان زنان جهان است و نرخ بروز این بیماری بین نژادها و نواحی مختلف جغرافیایی متفاوت است (۱). در جهان هر ساله بیش از یک میلیون مورد بیمار سرطان پستان تشخیص داده می‌شود. بیشترین نرخ شیوع در آمریکای شمالی و کمترین در آفریقا و آسیا است (۲و۳). از طرف دیگر نرخ‌های کمتر در شرق و مرکز اروپا و شرق دور با سرعت روبه افزایش است؛ برای مثال شیوع سرطان پستان در ژاپنی‌ها در طی ۴۰ سال اخیر دوبرابر شده است (۳). در کشور ما نیز سرطان سومین عامل مرگ و میر بوده، ۳۰۰۰۰ ایرانی هر ساله به علت سرطان می‌میرند. سرطان پستان یکی از فراوان‌ترین بدخیمی‌ها در میان زنان ایرانی می‌باشد و میزان شیوع آن در کشورمان رو به افزایش است (۴). تشخیص به موقع سرطان قبل از عود بیماری برای درمان سرطان اهمیت دارد؛ زیرا بیمارانی که در مرحله‌ی عود بیماری تشخیص داده می‌شوند، شانس بقای کمتری دارند. اولین پارامتری که برای درمان سرطان پستان در نظر گرفته می‌شود، درگیری گره‌های لنفاوی محوری است اما بررسی‌ها نشان داده است که ۲۰ تا ۳۰ درصد از بیماران مبتلا به سرطان پستان با عدم درگیری گره‌های لنفاوی، دارای عود شدگی موضعی یا متاستاز دور می‌باشند. بنابراین مارکرهای پیش‌آگهی معتبر مورد نیاز هستند تا به پزشکان در جهت اتخاذ تصمیمات درمانی مناسب کمک کنند. تغییرات ژنتیکی مولکولی متنوعی مانند تغییر در اونکوژن‌ها و ژن‌های سرکوبگر توموری در سرطان پستان مطالعه شده تا ارتباط مولکولی میان پیش‌آگهی و صفات بالینی و فنوتیپ‌های سرطان پستان شناخته شود. ژن P53 به‌عنوان ژن سرکوبگر توموری بوده و در ۱۵ تا ۷۱ درصد بیماران سرطان پستان به‌صورت جهش یافته دیده شده است (۵). ژن P53 به‌عنوان یک ژن تک نسخه‌ای روی کروموزوم ۱۷ انسان و کروموزوم ۱۱ موش قرار دارد. اندازه‌ی آن در انسان حدود ۲۰Kb بوده،

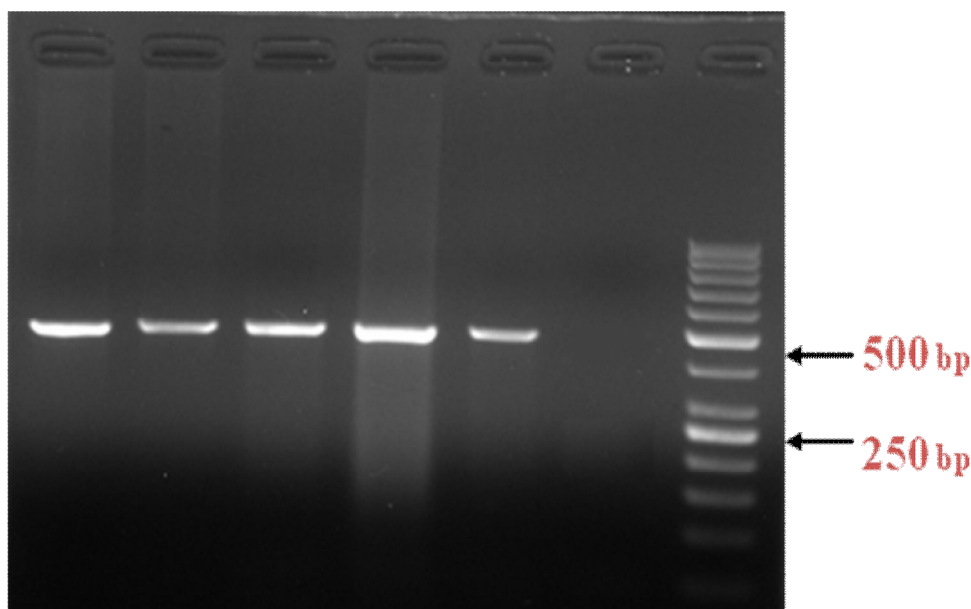
دارای ۱۱ اگزون می‌باشد. این ژن متعلق به خانواده به شدت حفظ شده می‌باشد که از این خانواده می‌توان به ژن‌های p63 و p73 اشاره کرد (۶). پروتیین P53 انسان از ۳۹۳ اسید آمینه تشکیل شده، وزن مولکولی ظاهری آن حدود ۵۳ کیلو دالتون است. این پروتیین را می‌توان از نظر عملکرد به چند بخش (دومین) تقسیم کرد (۹): از جمله ناحیه‌ی اسیدی انتهای آمینی (اسید آمینه‌های ۱ الی ۱۰۱)، ناحیه‌ی مرکزی اتصال اختصاصی به DNA (اسید آمینه‌های ۱۰۲ الی ۲۹۲)، و ناحیه‌ی بازی انتهای کربوکسیلی (اسید آمینه‌های ۲۹۳ الی ۳۹۳) (۶). ژن سرکوبگر توموری P53 یکی از فراوان‌ترین ژن‌های تغییر یافته در سرطان‌های انسانی می‌باشد. ارزیابی دقیق جهش‌های این ژن در مبتلایان سرطان پستان می‌تواند در تشخیص، پیش‌آگهی یا درمان اهمیت داشته باشد. این مطالعه به‌منظور شناسایی نوع و فراوانی جهش‌های این ژن در مبتلایان سرطان پستان در منطقه‌ی آذربایجان شرقی طراحی گردید و روش PCR و توالی‌یابی مستقیم مورد استفاده قرار گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی توصیفی بیماران به‌صورت تصادفی انتخاب شدند تا نمونه‌ی واقعی از جمعیت بیمار در منطقه‌ی آذربایجان شرقی باشند. این مطالعه بر روی ۱۰۲ بیمار سرطان پستان در جمعیت ترک منطقه‌ی آذربایجان شرقی، که طی سال‌های ۸۶ تا ۸۸ به بیمارستان‌های امام‌خمینی، امام رضا و نورنجات شهر تبریز برای جراحی مراجعه کرده بودند، پس از تکمیل رضایت نامه توسط بیماران انجام گرفت. از بین این بیماران ۶۲/۱۶ درصد در زمان جراحی در مرحله‌ی stage III، ۲۸ درصد در مرحله‌ی Stage II و ۹/۷۵ درصد در مرحله‌ی Stage I بیماری قرار داشتند. بافت توموری در محل جراحی برداشته شده، به‌صورت تازه (Fresh) و در داخل ازت مایع به آزمایشگاه منتقل و در فریزر -۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده

و 3'- TTAACCCCTCCTCCCAGAGA -5' R: استفاده شد. طول قطعه‌ی انتخابی جهت تکثیر 472 جفت باز بوده، شامل اگزون پنج (249 bp)، ایترون پنج و اگزون شش (113 bp) بود. جهت تکثیر این قطعه 2/5 µl بافر PCR 10x، 1/5 میلی‌مولار MgCl2، 0/2 میلی‌مولار dNTP، 1u آنزیم Taq پلیمرراز و یک µl از DNA نمونه سرطانی و 0/4 میکرومولار از هر کدام از پرایمرها را در حجم 25 میکرولیتری PCR گردید. در این مطالعه دمای واسرشتی 96 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه، دمای اتصال پرایمرها 59 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه و دمای گسترش 72 درجه‌ی سانتی‌گراد و به مدت 1 دقیقه در 30 تا 35 دور چرخه‌ی دمایی اعمال شد. محصول PCR به مدت 30 دقیقه با ولتاژ 100 الکتروفورز گردید (شکل ۱).

شد. پس از تایید پاتولوژی تومورها جهت استخراج DNA، SE بافر، SDS و پروتئیناز K را به بافت توموری خرد شده اضافه کرده، به مدت 24 ساعت در دمای 40 درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس یک ساعت در دمای 60 تا 55 درجه‌ی سانتی‌گراد قرار دادیم. در این مرحله آب نمک اشباع و کلروفرم به بافت اضافه کرده، با دور 3500 دور در دقیقه سانتریفوژ کردیم. مایع شفاف‌رویی حاوی کلاف DNA بود که با اضافه کردن اتانل سرد مطلق ظاهر شد و کلاف DNA را با سمپلر به آرامی جدا کرده، پس از شستشو با اتانل 70 درصد در بافر TAE حل کردیم. برای بررسی جهش‌های ژن P53، از روش تعیین توالی استفاده شد. برای تکثیر توالی مورد نظر از یک جفت پرایمر رفت و برگشت 5'-TTATCTGTTCACTTGTGCCC-3' F:



شکل ۱: محصولات PCR قطعه‌ی 472 جفت بازی می‌باشد که حاوی اگزون‌های پنج و شش و ایترون پنج ژن P53 می‌باشد.

ابتدا پیک‌های (توالی‌های) به‌دست آمده بررسی شده و سپس این توالی‌ها با کمک نرم‌افزار Chromas، با توالی‌های ثبت شده در NCBI بلیست (Blast) گردیدند. همچنین توالی‌های حاصل به کمک نرم‌افزار ClustalW2

در نهایت 200 میکرولیتر محصول PCR تایید شده از نظر کیفیت به‌همراه پرایمرها، جهت تعیین توالی به شرکت فزابیوتک (www.fazabiotech.cim) فرستاده شد. برای شناسایی تغییرات احتمالی در نمونه‌های مورد بررسی،

توالی ژن طبیعی P53، مقایسه شدند. در نهایت هر نوع تفاوت در نمونه‌ها، پس از مقایسه مجدد با پیک مربوطه، به‌عنوان تغییر در نمونه مورد بررسی تایید شد.

یافته‌ها

بیماران مورد بررسی در این مطالعه در محدوده‌ی سنی ۲۳ تا ۸۰ سال قرار داشتند. متوسط سنی بیماران ۴۶ سال بود که در مقایسه با سن بیماران سرطان پستان کشورهای توسعه یافته پایین است. ۸۱/۴۱ درصد بیماران تحت بررسی مبتلا به کارسینومای تهاجمی مجرای (Invasive Ductal Carcinoma) بودند. طبق اطلاعات موجود در پرونده‌ی بیماران ۴۴ درصد بیماران تحت جراحی پستان چپ و ۵۴ درصد بیماران تحت جراحی پستان راست و ۲ درصد تحت جراحی هر دو پستان قرار گرفته بودند. اندازه‌ی تومور در ۲۴/۶ درصد از بیماران کوچکتر از ۲ سانتی‌متر، در ۳۶/۹۲ درصد بین ۲ تا ۵ سانتی‌متر و در ۳۰/۷۶ درصد بزرگتر از ۵ سانتی‌متر می‌باشد. در ۷/۶۹ درصد از افراد،

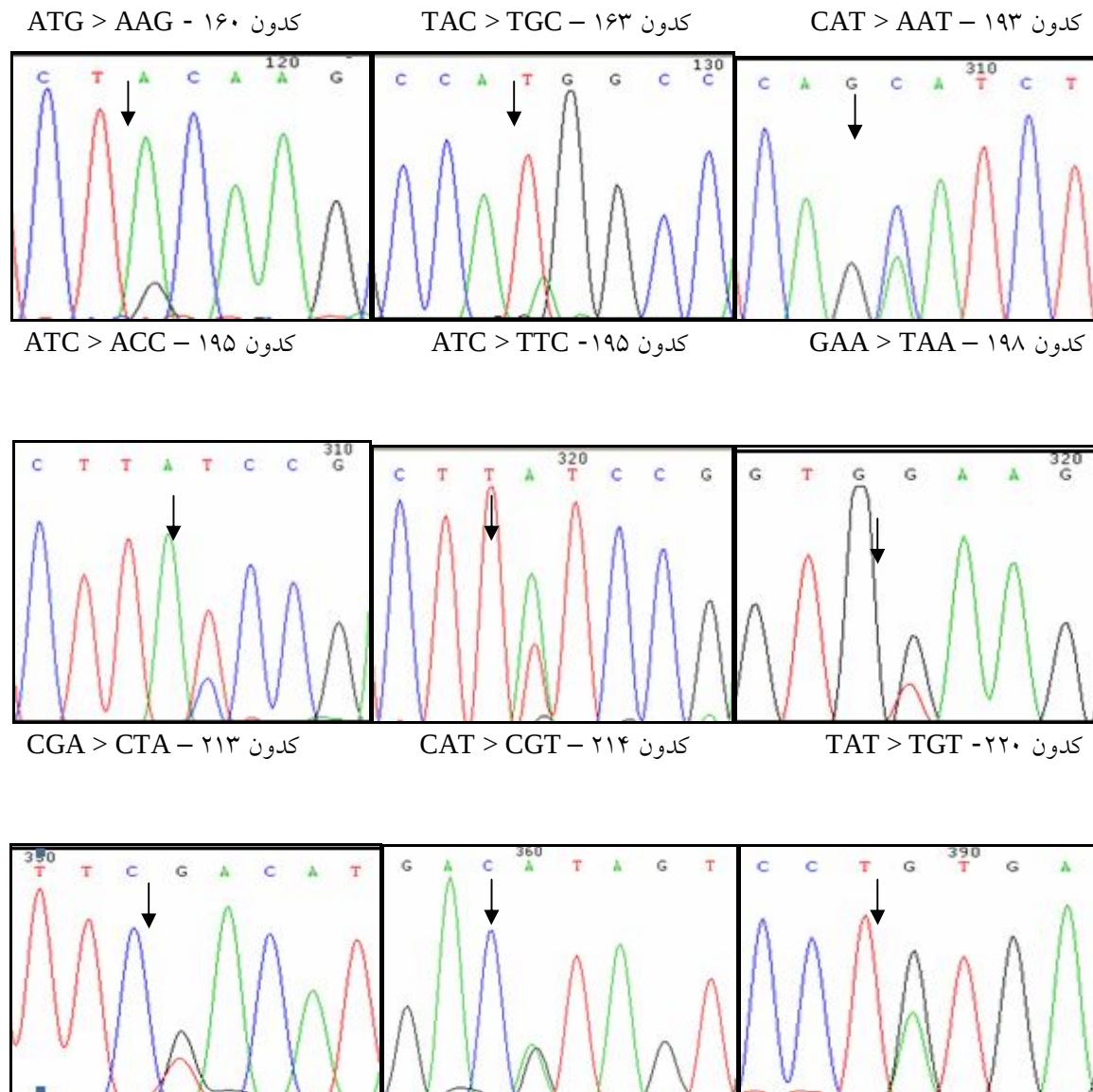
بیماری گسترش پیدا کرده، پوست بیمار را درگیر نموده بود. با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت قطعه‌ی ۴۷۲ جفت بازی شامل اگزون‌های پنج و شش و ایترون پنج به‌دست آمد که شکل یک الکترو فورز محصولات PCR را در آگارز نشان داد. در این مطالعه ۱۸ تغییر مشاهده شد (۱۷/۶۴ درصد) که ۷ مورد آن مربوط به پلی‌مورفیسم (۶/۸۶ درصد) و ۱۱ مورد آن مربوط به جهش (۱۰/۷۸ درصد) بود. جهش‌های codon ۱۶۰ (ATG>AAG) و codon ۱۶۳ (ATC>AAG) که در اگزون ۵ قرار گرفته بود ۱۸/۲ درصد جهش‌ها را شامل شد. همچنین ۸۱/۸ درصد جهش‌ها در اگزون ۶ مشاهده شدند که شامل codon ۱۹۳ (CAT>AAT)، codon ۱۹۵ (ATC>TTC)، codon ۱۹۸ (GAA>TAA)، codon ۲۱۳ (CGA>CTA)، codon ۲۲۰ (TAT>TGT) و codon ۲۱۴ (CAT>CGT) بود. در ایترون ۵ تغییری مشاهده نشد و همه پلی‌مورفیسم‌ها در اگزون ۶ و در نوکلئوتید ۱۳۳۹۹ شناسایی شدند.

جدول ۱: مشخصات جهش‌های شناسایی شده در اگزون‌های ۵ و ۶ و ایترون ۵؛ در این جدول شماره‌ی نمونه، کدون طبیعی و جهش یافته و نیز اسید آمینه طبیعی و تغییر یافته در مورد هر نمونه آورده شده است

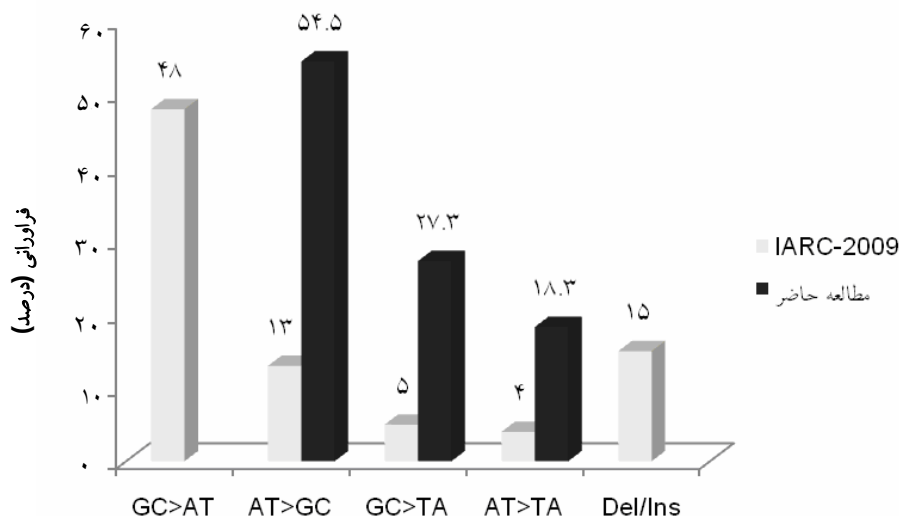
نمونه	کدون	کدون طبیعی	کدون جهش یافته	اسید آمینه طبیعی	اسید آمینه جهشی
۵۱	۱۶۰	ATG	AAG	Met	Lys
۵۲	۱۶۳	TAC	TGC	Tyr	Cys
۱۷	۱۹۳	CAT	AAT	His	Asn
۶۶	۱۹۵	ATC	ACC	Ile	Thr
۳۶	۱۹۵	ATC	TTC	Ile	Phe
۱۹	۱۹۸	GAA	TAA	Glu	Stop
۶۳	۲۱۳	CGA	CTA	Arg	Leu
۱۶	۲۱۴	CAT	CGT	His	Arg
۵۶	۲۱۴	CAT	CGT	His	Arg
۳۳	۲۲۰	TAT	TGT	Tyr	Cys
۵۵	۲۲۰	TAT	TGT	Tyr	Cys

اتصال به DNA آن تغییر یافته است. مشخصات و نوع جهش‌های شناسایی شده با ذکر شماره‌ی نمونه و شماره‌ی کدون جهش یافته در جدول (۱) ذکر شده است. همچنین توالی‌های جهش‌های شناسایی شده در شکل (۲) آمده است.

اکثر جهش‌های شناسایی شده در این مطالعه از نوع جهش بدمعنی (Missense) بودند که در دومین اتصال به DNA ژن P53 قرار گرفته‌اند. این جهش‌ها منجر به تولید پروتئین جهش یافته‌ای می‌شوند که دارای ساختار ناپایدار بوده، قابلیت



شکل ۲: در این شکل توالی نمونه‌های دارای جهش در اگزون ۵ الی اگزون ۶ با ذکر شماره‌ی کدون در بالای هر شکل آورده شده است



نمودار مقایسه‌ای فراوانی جهش‌ها

نمودار ۳، مقایسه‌ی فراوانی انواع جهش‌های شناسایی شده در بیماران مورد مطالعه در این نمودار ستون‌های سفید مربوط به فراوانی ثبت شده هر کدام از جهش‌ها در IARC در سال ۲۰۰۹ بوده، ستون‌های سیاه فراوانی هر کدام از جهش‌ها را در این مطالعه نشان می‌دهد.

بحث

در کل شیوع سرطان پستان در ایران رو به افزایش است. بیماران در مرحله‌ی توسعه‌ی یافته‌ی بیماری هستند و نسبتاً جوان‌تر (حدود ده سال) از هم‌تا‌های غربی‌شان می‌باشند (۷). تشخیص زود هنگام بیماری نقش مهمی در کاهش نرخ مرگ و میر و بهبود پیش‌آگهی بیماری دارد. در این مطالعه اندازه‌ی تومور، درگیری غدد لنفاوی و مرحله‌ی پیشرفته‌ی بیماری در بین بیماران مورد مطالعه، حاکی از غربالگری ضعیف و عدم تشخیص به موقع بیماری بوده، ضرورت تغییر در برنامه‌های غربالگری و افزایش آگاهی زنان منطقه نسبت به بیماری را نشان می‌دهد. فراوانی جهش‌های ژن P53 در تومورهای پستان ۱۵ تا ۱۷ درصد می‌باشد (۴). میزان جهش ژن P53 در تومورهای پستان جمعیت‌های مختلف قومی نژادی و جغرافیایی متفاوت است. نتایج حاصل از بررسی دو آگزون ژن P53 در این مطالعه، فراوانی ۱۰/۷ درصدی جهش‌ها را نشان می‌دهد. فراوانی جهش‌های ژن P53 در این مطالعه قابل

مقایسه با کشورهای مثل فرانسه (۱۹ درصد) و نیواورلند (Neworland) (۱۵ درصد) بوده، بیشتر از فراوانی گزارش شده از دهلی در هند (۳ درصد) و کمتر از گزارش‌های کشورهای ایالات متحده‌ی آمریکا (۴۵ درصد)، بریتانیا (۳۴/۵ درصد) و کشمیر (۴۴ درصد) و گزارش IARC (۲۳/۵۶ درصد) می‌باشد (۸). همچنین در مطالعه‌ای که در همدان - ایران انجام گرفته فراوانی جهش در ژن P53 ۲۵ درصد گزارش شده است (۹). تفاوت فراوانی و الگوی جهش‌های سوماتیکی احتمالاً بیانگر عرضه‌ی موتاژن‌های محیطی مختلف می‌باشد. همچنین فراوانی پایین جهش ژن P53 می‌تواند نشان دهنده‌ی درگیری ژن‌های مختلف دیگر در مسیر سرطان‌زایی باشد (۱۰). احتمالاً این تفاوت‌ها در فراوانی جهش‌های P53 در سرطان پستان به علت فاکتورهای مثل مطالعه‌ی جمعیت‌های مختلف قومی و جغرافیایی، اندازه‌ی کوچک نمونه‌های مورد بررسی، تفاوت در انتخاب نمونه‌ها، روش‌های مختلف نمونه‌گیری، تکنیک‌های مختلف آنالیزی،

تفاوت در عرضه‌ی کارسینوژن‌های اندوژن و اگزوژن، تفاوت در سبک زندگی، الگوهای تولید مثلی و عادات غذایی، تفاوت‌های فرهنگی و اجتماعی می‌باشد که نقش هر کدام از این‌ها نیاز به مطالعه و اثبات دارد (۸). در این مطالعه درصد بالایی از جهش‌ها در اگزون شش (۸۱/۲ درصد، ۹/۱۱) شناسایی شدند و تنها ۱۱/۱۱ درصد (۲/۱۸) جهش‌ها در اگزون پنج شناسایی شد. فراوانی بالای جهش‌های شناسایی شده در اگزون شش و فراوانی پایین آن‌ها در اگزون پنج مشابه با فراوانی گزارش شده از بیماران سرطان پستان کشمیری در سال ۲۰۰۷ (به ترتیب ۵۲/۹ درصد و صفر درصد) می‌باشد (۸). فراوانی بالای جهش در اگزون شش نشان‌دهنده‌ی فعال بودن این دومین در منطقه می‌باشد. همه‌ی جهش‌های شناسایی شده در این مطالعه از نوع جانشینی‌های تک نوکلئوتیدی می‌باشند. که ۹ درصد آن‌ها جهش‌های نقطه‌ای بی‌معنی (Nonsense) و ۹۱ درصد جهش‌های شناسایی شده از نوع جهش‌های نقطه‌ای ناجور معنی (Missense) می‌باشند. این مقادیر در مرکز اطلاعاتی (International Agency for Research on Cancer) IARC به ترتیب ۷ درصد و ۸۱ درصد گزارش شده است. این جانشینی‌های تک نوکلئوتیدی منجر به تولید پروتئین تغییر یافته می‌شود که با یک آمینواسید با پروتئین نوع طبیعی تفاوت دارد. این جانشینی‌ها معمولاً باعث تغییرات ساختاری می‌شود که ساختار P53 را ناپایدار کرده و قابلیت اتصال به DNA آنرا تغییر می‌دهد. در نتیجه فعالیت رونویسی را از دست داده، و قادر به مهار چرخه‌ی سلولی یا آپوپتوز نخواهد بود. جهش‌های ناجور معنی ممکن است فنوتیپ‌های منفی غالب (Dominant - Negative) یا حصول عملکردی (Gain of Function) را نشان دهند (۱۱ و ۱۲). جهش‌های نقطه‌ای، حذف و بازآرایی ژن P53 می‌تواند ویژگی‌های بیولوژیکی پروتئین از جمله افزایش ثبات و انباشتگی پروتئین جهش یافته را تغییر دهد. پروتئین جهش یافته با از دست

دادن فعالیت ضد تکثیر مشخص می‌شود و ممکن است به وسیله‌ی تشکیل کمپلکس اثر منفی غالب روی P53 طبیعی باقی مانده داشته باشد (۱۳). تنها دو جهش شناسایی شده در این مطالعه (کدون ۲۲۰) در منطقه‌ی Hot Spot می‌باشند. جهش‌های شناسایی شده دیگر از جهش‌های نادر می‌باشند. جهش در مناطق Hot Spot، جهش‌های واقعی P53 هستند و مطالعات بیوشیمیایی و بیولوژیکی نشان می‌دهند که این پروتئین‌های P53 دارای فعالیت ناقص در اتصال به DNA هستند که باعث غیرفعال شدن فعالیت ترانس اکتیواسیون پروتئین می‌شود. این پروتئین همچنین خصوصیات مهار رشد و پروآپوپتوتیک را از دست می‌دهند. از طرف دیگر تعیین اهمیت بیولوژیکی واریانت‌های نادر بسار سخت است و نیاز به بررسی دارد. از بین جهش‌های شناسایی شده در این مطالعه، ۴۵/۵ درصد جهش‌ها (۵/۱۱) از نوع جهش‌های معکوس شدگی (Transversion) و ۵۴/۵ درصد جهش‌ها (۶/۱۱) از نوع جهش‌های جابجایی (Transition) می‌باشند. فراوانی جهش‌های جابجایی A:T>G:C شناسایی شده در این مطالعه ۵۴/۵ درصد (۶/۱۱) محاسبه گردید (نمودار ۱) که این مقدار بیشتر از فراوانی گزارش شده از کشمیر (۱۷/۶ درصد)، بریتانیا (۱۸/۹ درصد)، ژاپن (۱۳ درصد)، ایالات متحده‌ی آمریکا (۱۱/۹ درصد) بوده، همچنین بیشتر از گزارشات طیف جهشی مرکز اطلاعاتی IARC در همه‌ی سرطان‌های پستان (۱۳ درصد) می‌باشد. آسیب DNA در A:T با عرضه‌ی عوامل استالدهیدی که متابولیت الکل می‌باشد، افزایش می‌یابد. اگرچه ارتباط مثبت بین مصرف الکل (بیش از سه بار در روز) و ریسک بالای سرطان پستان گزارش شده است، اما دلیل واقعی فراوانی بالای جابجایی A:T>G:C در بیماران سرطان پستان در استان آذربایجان شرقی مبهم است چرا که مصرف الکل در این جمعیت بسیار پایین بوده و بیماران مورد مطالعه سابقه‌ی مصرف الکل ندارند (۵). در این مطالعه هیچ تغییری از نوع جهش‌های جابجایی

(کدون ۲۱۳) در آگزون شش می‌باشد. کدون ۲۱۳ در جایگاه اتصال پروتئین‌های شوک گرمایی گزارش شده است و تغییر CGA>CGG (توالی بازی پیدا شده در پلی مورفیسم کدون ۲۱۳) احتمالاً الگوی متیلاسیون را تغییر می‌دهد (۱۵). بررسی‌ها نشان می‌دهد که میزان بقا در بیماران دارای پلی مورفیسم کدون ۲۱۳ نسبت به بیماران دارای جهش‌های دیگر و نیز بیماران دارای P53 طبیعی کمتر است (۱۶). سرطان‌های پستان که شکل طبیعی ژن P53 را دارند، احتمالاً فعالیت سرکوبگری آن‌را با حبس پروتئین در سیتوپلاسم غیر فعال می‌کنند. شناسایی پروتئین P53 در سیتوپلاسم بافت‌های نرمال شیرساز پستان نشان می‌دهد که این مکانیسم در شرایط فیزیولوژیکی ویژه‌ای انجام می‌شود و مجوز تکثیر موقتی سلول‌ها را فراهم می‌کند. این مشاهدات می‌تواند توضیح دهد که چگونه بعضی بافت‌های سرطان پستان عملکرد پروتئین P53 را بدون ایجاد جهش غیرفعال می‌کنند (۱۷ و ۱۸).

نتیجه‌گیری

از ویژگی‌های نتایج حاصل از بررسی ژن p53 در منطقه‌ای آذربایجان شرقی بالا بودن فراوانی جهش‌ها در آگزون شش و شناسایی نشدن جهش از نوع دخول (Insertion) در آگزون‌های مورد بررسی می‌باشد. این ویژگی‌ها که تفاوت قابل توجهی را با یافته‌های کشورهای دیگر و نیز با گزارشات مرکز اطلاعاتی IARC نشان می‌دهد؛ بیانگر الگوی جهشی متفاوت در منطقه می‌باشد و برای اولین بار در منطقه گزارش می‌شود. مطالعات بعدی جهت بررسی علت جهش‌پذیری بالای این منطقه و ارتباط آن با زمینه‌ی ژنتیکی - قومی، سبک زندگی، رژیم غذایی سازش یافته با زندگی منطقه‌ای و کارسینوژن‌های محیطی ضروری است.

G:C>A:T پیدا نشد؛ در حالی‌که این میزان در مرکز اطلاعاتی IARC، ۴۸ درصد گزارش شده است. فراوانی جهش‌های معکوس شدگی در این مطالعه ۴۵/۵ درصد (۵/۱۱) بود. ۲۷/۳ درصد آن‌ها (۳/۱۱) از نوع G:C>T:A و ۱۸/۲ درصد آن‌ها (۲/۱۱) از نوع A:T>T:A می‌باشد. این فراوانی‌ها در مرکز اطلاعاتی IARC به ترتیب ۹ درصد و ۴ درصد گزارش شده است (شکل ۳). معکوس شدگی G>T به‌طور مشخص در بین سرطان‌های مختلف متفاوت است و در سرطان‌های مرتبط با سیگار مثل ریه برجسته شده است (۵). ۱۸/۲ درصد جهش‌های شناسایی شده در این مطالعه در کدون ۱۹۵ (یک مورد جهش Thr195 و یک مورد جهش Phe195) می‌باشد. این کدون آمینواسید ایزولوسین را کد می‌کند و در دومین L2 واقع شده است. دومین L2 برای فولدینگ و ثبات بخش مرکزی پروتئین لازم است و به نظر می‌رسد جهش در این کدون باعث اختلال در تاخوردگی پروتئین (Folding) و تغییر پایداری پروتئین می‌شود. دیده شده است که پروتئین P53 در سلول‌های توموری دارای جهش Thr195 انباشته می‌شود. همچنین بررسی‌های عملکردی نشان می‌دهند که فعالیت‌های ترانس اکتیواسیون و عملکرد مهار رشد P53 نوع Thr195 تخریب می‌شود. بیان MDM2، BAX و P21 در حضور P53 نوع Thr195 پایین گزارش شده است. بنابراین جهش Thr195 عملکرد ترانس اکتیواسیون را در پروموتورهای حساس به P53 کاهش می‌دهد. همچنین دیده شده که بیان P53 نوع Thr195 توانایی مهار رشد سلول را ندارد و یا این توانایی بسیار کم است چرا که تمایل وکتور را در تشکیل کلون مهار نمی‌کند. بنابراین P53 نوع Thr195 از لحاظ عملکردی غیر فعال است (۱۴). خصوصیت دیگر تغییرات ژن P53 در بیماران منطقه‌ی آذربایجان شرقی، شناسایی پلی مورفیسم A>G ۱۳۳۹۹

References

- 1- Kalemi TG, Lambropoulos AF, Gueorguiev M, Chrisafi S, Papazisis KT, Kotsis A. The association of p53 mutations and p53 codon 72, Her2 codon655 and THFR C677T polymorphisms with breast cancer in Northern Greece. *Cancer Let.* 2005; 222; 57-65.
- 2- Borresen-Dale AL; TP53 and breast cancer. *Hum Mutat.* 2003; 21: 292-300.
- 3- Breast cancer – UK incidence statistics; 2009; Cancer research UK.
- 4- Marjain A, Kabir MJ. Breast cancer incidence among female in the Golestan province, Iran. *Indian J Cancer.* 2009; 46; 351-2.
- 5- Soussi T, Beroud C. Significance of Tp53 mutation in human cancer: a critical analysis of mutations at CPG dinucleotide. *Hum Mutat.* 2003; 21: 192-200.
- 6- Lacroix M, Toillon R A, Leclercq G. P53 and breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2006; 13: 293-325.
- 7- Sadjadi A, Nouraie M, Ghorbani A, Ali mohammadian M, Malekzadeh R. Epidemiology of breast cancer in the Islamic of Iran: first results from a population based cancer registry. *East Mediterr Health J.* 2009; 15: 1426-31.
- 8- Eachkoti R, Hussain I, Afrozea D, et al. BRCA1 and Tp53 mutation spectrum of breast carcinoma in an ethnic of Kashmir, an emerging high risk area. *Cancer Let.* 2007; 248: 308-20.
- 9- Etemadi K, Mehdi‌pour P. Molecular study of the P53 gene mutations in breast cancer patients by non-radioactive PCR-SSCP. *Scientific J Hamedan Univ Med Sci.* 2002; 4: 65-70.
- 10- Bozhanov SS, Angelova SG, Krasteva ME, et al. Alterations in p53, BRCA1, ATM, PIK3CA, and HER2 genes and their effect in modifying clinicopathological characteristics and overall survival of Bulgarian patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010; 136: 1657-69.
- 11- Parant JM, Lozano G. Disrupting TP53 in mouse models of human cancers. *Hum Mutat.* 2003; 21: 321-6.
- 12- Olivier M, Petitjean A, Marcel V, et al. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther.* 2009; 16: 1-12.
- 13- Poremba C, Yandell DW, Huang Q, et al. Frequency and spectrum of p53 mutations in gastric cancer: a molecular genetic and immunohistochemical study. *Virchows Arch.* 1995; 426: 447-55.
- 14- Yamada H, Shinmura K, Yamamura Y, et al. Identification and characterization of a novel germline p53 mutation in a patient with glioblastoma and colon cancer. *Int J Cancer.* 2006; 125: 973-6.
- 15- Krasteva ME, Georgieva EI. Germline p53 single-base changes associated with Balkan endemic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 342, 562-7.
- 16- Berns EM, van Staveren IL, Look MP, Smid M, Klijn JG, Foekens JA. Mutations in residues of TP53 that directly contact DNA predict poor

outcome in human primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1998; 77: 1130-6.

17- Russo A, Migliavacca M, Zanna I, et al. P53 mutations in L3-Loop zinc-binding domain, DNA-ploidy, and S phase fraction are independent prognostic indicators in colorectal

cancer: a prospective study with a five-year follow-up. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003; 11: 1322-31.

18- Moll UM, Riou G, Levine AJ. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: Mutation and nuclear exclusion. *Med Sci*. 1992; 89: 7262-6.

Detection of P53 Gene Exons 5 and 6 Mutations Among East Azerbaijani Women with Breast Cancer

Khani H¹, Hosseinpourefeizi M², Pouladi N³, Chaparzadeh N³, Montazeri V⁴, Azarfam P⁵

¹ACECR, Tabriz University, Tabriz, Iran

²Dept. of Biology, Faculty of Natural Science, Tabriz University, Tabriz, Iran

³Dept. of Biology, Faculty of Science, Azarbaijan University of Tarbiat Moallem, Tabriz, Iran

⁴Imam -Reza Hospital, Tabriz University of Medical Sciences and Health Services, Tabriz, Iran

⁵Dept. of Biology, Faculty of Natural Science, Tabriz University, Tabriz, Iran

Corresponding Author: Hosseinpourefeizi M, Dept. of Biology, Faculty of Natural Science, Tabriz University, Tabriz, Iran

E-mail: pourfeizi@eastp.ir

Received: 26 Aug 2010 **Accepted:** 12 Sep 2011

Background and Objectives: Breast cancer (BC) is the most common invasive malignancy affecting women worldwide. The tumor-suppressor P53 gene (*P53*) is frequently mutated in breast tumors. To use *P53* as a target for therapy, it is important to accurately assess *p53* mutation status in tumor samples.

Materials and Methods: A total of 102 tumor samples were collected from breast cancer patients referred to Tabriz hospitals between the 2007-2009 period. DNA was extracted by Proteinase K– Isopropanol method and then performed amplification and sequencing of *P53* from exons 5 and 6.

Results: Mutations in the P53 gene were detected in 17.6% of the patients. Including 7 polymorphisms (6.68%) and 11 mutations (10.78%). Overall, 18.2% of the mutations were found in codons 160 (ATG>AAG) and 163 (ATC>AAG) in exon 5. Also 81.8% of the mutations observed in exon 6: codon 193(CAT>AAT), codon195 (ATC>TTC), codon 195 (ATC>AAC), codon 198(GAA>TAA), codon 220 (TAT>TGT), codon 213 (CGA>CTA), and codon 214 (CAT>CG). No alteration observed in intron5 and all of polymorphism detected in 13399A>G nucleotide of exon 6. The majority of detected mutations are missense that located on DNA-binding domain of *P53*. This type of mutation usually leads to the production of a mutant protein with a compromised structure and altered DNA-binding capacity.

Conclusion: This is the first report of its kind from the East Azarbaijan region. Our results indicate a rather high frequency of exon 6 mutations in *P53* among patients with breast cancer. Furthermore, the mutation pattern appears differs from other regions. However, further studies are needed to determine the role of *P53* mutations in breast cancer development.

Keywords: Breast cancer, *P53* gene, East Azarbaijan