

## بررسی نوع و میزان جهش‌های موجود در اگزون‌های ۵ و ۸ ژن سرکوبگر تومور TP53 در بیماران مبتلا به سرطان سلول سنگفرشی ریه بستری در بیمارستان افضل‌پور کرمان

دکتر غلامعباس محمدی<sup>۱</sup>، علی وزیری گهر<sup>۲\*</sup>، دکتر محمدرضا شکیبائی<sup>۳</sup> و دکتر مسعود بقائی<sup>۴</sup>

### خلاصه

مقدمه: سرطان ریه دومین سرطان شایع در زنان پس از سرطان پستان و همین‌طور در مردان پس از سرطان پروستات است. از بین تمامی ژن‌هایی که در سرطان ریه دچار جهش می‌شوند، ژن TP53 که در موقعیت ۱۷p۱۳/۱ قرار دارد از اهمیت تشخیصی و پیش‌آگهی قابل توجهی برخوردار است و جهش‌های این ژن از جمله وقایع کلیدی در سرطان زایی ریه به حساب می‌آیند. در این مطالعه، نوع و میزان جهش‌های احتمالی موجود در اگزون‌های ۵ و ۸ ژن TP53 در بیماران مبتلا به سرطان سلول سنگفرشی ریه بستری در بیمارستان افضل‌پور کرمان بین سال‌های ۱۳۷۶ تا ۱۳۸۴ مورد بررسی قرار گرفت. روش: پس از دریافت بلوک‌های پارافینی حاوی تومور بافت ریه تثبیت شده با فرمالین، DNA آنها استخراج گردید و پس از تکثیر اگزون‌های ۵ و ۸ توسط روش PCR، توالی بازهای آنها تعیین گردید. یافته‌ها: آنالیز نتایج تعیین توالی نشان داد که در ۱۸ نمونه از ۲۲ نمونه (۸۱/۸ درصد) در اگزون ۵ و در ۱۵ نمونه از ۱۸ نمونه (۸۳/۳ درصد) در اگزون ۸ ژن TP53 جهش وجود دارد. از مجموع ۶۴ کدون جهش یافته در اگزون ۵ نمونه‌های فوق، جهش در کدون‌های ۶ (۱۷ درصد)، ۱۴ (۷/۸ درصد) و ۲۵ (۴/۶ درصد) بیشترین شیوع را داشتند و همچنین از مجموع ۴۶ کدون جهش یافته در اگزون ۸ نمونه‌های فوق، کدون‌های ۲ (۱۳ درصد)، ۲۷ و ۳۵ (هر کدام ۱۰/۸۶ درصد) بیشترین شیوع را داشتند. نتیجه‌گیری: جهش‌های ژن TP53 در بیماران مورد مطالعه، شیوع نسبتاً بالایی در مقایسه با سایر مطالعات داشتند. این امر ممکن است به دلیل تفاوت‌های ژنتیکی و اختلافات موجود در عوامل محیطی و پارامترهای اپیدمیولوژیکی مانند نحوه رژیم غذایی و شیوه زندگی باشد.

واژه‌های کلیدی: ژن TP53، سرطان سلول سنگفرشی ریه، جهش

۱- دانشیار یوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۲- مربی بخش یوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان، ۳- دانشیار ژنتیک مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۴- استادیار جراحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان

\* نویسنده مسؤول: بخش یوشیمی، دانشکده پزشکی افضل‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان • آدرس پست الکترونیک: a\_vaziri@kmu.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۸/۲۲ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۶/۲/۴ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۲/۶

## مقدمه

سرطان یک بیماری ژنتیکی است. چهار دسته از ژن‌های تنظیم کننده، هدف عمده آسیب‌های ژنتیکی قرار می‌گیرند که عبارتند از پروتوآنکوژن‌ها، ژن‌های سرکوبگر سرطان یا آنتی انکوژن‌ها، ژن‌هایی که مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها را تنظیم می‌کنند و ژن‌هایی که ترمیم DNA آسیب دیده را بر عهده دارند. امروزه به خوبی مشخص شده است که شرایط محیطی و تغییرات ژنتیکی با ایجاد فنوتیپ بدخیمی ارتباط دارند (۸).

سرطان ریه دومین سرطان شایع در زنان (پس از سرطان پستان) و همین‌طور در مردان (پس از سرطان پروستات) است. سرطان ریه دو نوع مختلف دارد که از لحاظ بالینی، بافت‌شناسی، ژنتیکی و بیوشیمیایی کاملاً از هم متمایز می‌باشند. سرطان ریه سلول غیر کوچک [Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)] که حدود ۷۵ درصد بیماران مبتلا به سرطان ریه را در بر می‌گیرد و شامل سرطان‌های سلول سنگفرشی (Squamous cell carcinoma) و غده‌ای (Adenocarcinoma) و سلول بزرگ (Large cell carcinoma) می‌باشد. نوع دیگر سرطان ریه، سرطان ریه سلول کوچک [Small Cell Lung cancer (SCLC)] است که ۲۵ درصد مابقی بیماران مبتلا به سرطان ریه را شامل می‌شود. بیماران مبتلا به این نوع، سریعاً دوره رشد را پشت سر گذاشته و میانگین طول عمر بیماران درمان نشده، کمتر از ۴ ماه می‌باشد (۳).

ژن TP53 شناخته شده ترین ژن سرکوبگر تومور است که در موقعیت ۱۷p۱۳/۱ یعنی در بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ و در باند ۱۳ و زیر باند اول قرار دارد و شایع‌ترین هدف تغییرات ژنتیکی در تومورهای انسانی است. این ژن دارای ۱۱ اگزون می‌باشد و فسفو پروتئین هسته‌ای موسوم به پروتئین P53 با وزن ملکولی ۵۳ کیلو دالتون را تولید می‌نماید. این ژن در تمام بافت‌ها اما به میزان متفاوت رونویسی می‌گردد. محصول این ژن دارای ۳۹۳ اسید آمینه و چندین ناحیه ساختمانی و عملکردی است. پروتئین P53 در هسته قرار دارد و هنگامی که وارد عمل می‌شود باعث کنترل رونویسی چندین ژن می‌گردد. از این دسته ژن‌ها

می‌توان به ژن‌های BAX, WAF-1/CIP-1, FAS/APO-1, MDM2, PIG3 و خود TP53 اشاره کرد (۳،۴،۷).

آسیب DNA سلول باعث تجمع و فعال شدن پروتئین p53 شده و به DNA آسیب یافته متصل می‌گردد و سپس رونویسی چندین ژن مانند ژن WAF1 را فعال می‌کند. این ژن پروتئین p21 را که یک مهارکننده کیناز وابسته به سایکلین می‌باشد تولید می‌کند. پروتئین p21 فعالیت پروتئین کینازی سایکلین - کیناز وابسته به سایکلین را مهار می‌نماید. در نتیجه در حضور پروتئین p21، پروتئین رتینوبلاستوما غیر فسفریله باقی می‌ماند و به فاکتور نسخه‌برداری E2F-1 متصل می‌شود و از ورود سلول به مرحله همانندسازی جلوگیری نموده و سلول را در مرحله G1 چرخه سلولی نگه می‌دارد (۸).

اگر در طی وقفه در تقسیم سلولی، آسیب DNA با موفقیت ترمیم نگردد، پروتئین p53 به عنوان آخرین تلاش با القای فعالیت ژن‌های ایجاد کننده مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، سلول را نابود می‌کند. ژن‌های BAX و IGF-BP3 دو ژن پاسخ‌دهنده به پروتئین p53 هستند که دستور مرگ سلولی توسط p53 را اجرا می‌کنند (۵،۱۳،۱۸).

با مطالعات سائتوژنتیک بر روی موقعیت ۱۷p۱۳/۱ کروموزوم‌های سلول‌های تومور مشخص گردید که در اکثر انواع سرطان‌ها مخصوصاً سرطان‌های ریه، روده بزرگ و پستان (سه علت اول مرگ در اثر سرطان) این ناحیه از کروموزوم دچار اختلال گردیده است. این واقعیت که جهش‌های ژن TP53 در بسیاری از تومورهای انسانی وجود دارد مؤید این است که پروتئین p53 یک محافظ حیاتی در برابر تشکیل تومور است. با بررسی بر روی بسیاری از نمونه‌های تومور ریه مشخص شده است که در ۱۰۰ درصد سرطان‌های ریه سلول کوچک و در ۵۰ تا ۷۰ درصد سرطان‌های ریه سلول غیر کوچک ژن TP53 دچار جهش شده است (۸-۳).

سلول‌هایی که در آنها ژن TP53 در اثر ایجاد جهش و یا از دست رفتن هموزیگوتی غیر فعال شده است در صورت آسیب DNA، توانایی ترمیم آسیب و حذف سلول

پس از تخلیه اتانول، لوله حاوی بافت با درب باز در فور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا بافت‌ها کاملاً خشک گردند و به این طریق بافت‌ها کاملاً عاری از پارافین شدند.

### ۳. هضم بافت‌ها

محلول هضم‌کننده‌ای حاوی ۴۰ میلی‌مولار تریس (مرک، آلمان)، یک میلی‌مولار EDTA (سیناژن، ایران) و نیم درصد توئین-۲۰ (سیگما، امریکا) ساخته شد. پس از تهیه محلول فوق، pH آن روی ۸ تنظیم گردید و سپس به ۵۰۰ میکرولیتر از آن، ۲۰ میکرولیتر محلول پروتئیناز K (۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، بایونیر، کره جنوبی) اضافه شد و پس از بهم زدن مختصری در بن‌ماری ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. لوله هر نیم ساعت یکبار، با سروته کردن مخلوط شد تا اینکه در نهایت بافت‌ها به صورت محلولی شفاف و یکنواخت درآمدند. سپس برای غیر فعال کردن آنزیم پروتئیناز k، لوله به مدت ۵ دقیقه در بنماری ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

### ۴. استخراج DNA

برای استخراج DNA، چندین روش مورد ارزیابی قرار گرفتند که در نهایت استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم به شرح زیر مورد استفاده قرار گرفت.

ابتدا محلول فنل با محلول تریس مخلوط گردید تا pH فنل به حدود ۸ رسید و به این ترتیب فنل اشباع آماده گشت (۸،۹). سپس هم حجم بافت هضم شده موجود در لوله، فنل اشباع افزوده و لوله به مدت ۱۰ دقیقه روی روتاتور قرار داده شد و سپس به مدت ۲ دقیقه در ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. پس از بیرون آوردن لوله از سانتریفیوژ، حدود ۲۵۰ میکرولیتر از محلول رویی به لوله دیگری منتقل و روی آن ۲۵۰ میکرولیتر فنل-کلروفرم (۱:۱) افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه روی روتاتور قرار داده و به مدت ۲ دقیقه در ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی به لوله دیگری منتقل شد و معادل ۲/۵ برابر آن، اتانول سرد خالص (۴ درجه سانتی‌گراد) افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس لوله از فریزر خارج کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰g و در ۴ درجه

با فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را ندارند و در نتیجه آسیب DNA می‌تواند به سوی تشکیل و تکامل تومور پیش رود (۱).

با توجه به تأثیر عوامل محیطی و جغرافیایی در وقوع و میزان شیوع سرطان‌ها، در این تحقیق نوع و میزان جهش‌های موجود در اگزون‌های ۵ و ۸ ژن سرکویگر تومور TP53 در بیماران مبتلا به سرطان سلول سنگفرشی ریه که بین سال‌های ۱۳۷۶ تا ۱۳۸۴ در بیمارستان افضل‌پور کرمان بستری شده و مورد جراحی قرار گرفته بودند مورد بررسی قرار گرفت.

### روش بررسی

در این مطالعه ۳۰ بلوک پارافینی تثبیت شده با فرمالین که حاوی مقدار کافی تومور سلول سنگفرشی ریه بوده و از بیماران مبتلا به سرطان سلول سنگفرشی ریه بستری شده در بیمارستان افضل‌پور کرمان طی سال‌های ۸۴-۱۳۷۶ مورد استفاده قرار گرفتند.

پارافین‌زدائی از نمونه‌ها و استخراج DNA با استفاده از تلفیق چند روش صورت گرفت (۲،۴،۹،۱۲). در زیر مراحل مختلف انجام این مطالعه ارائه می‌گردد.

#### ۱. پارافین زدایی از بافت‌ها

حدود ۲۵ تا ۵۰ میلی‌گرم از بافت موجود در نمونه‌های تثبیت شده پارافینی با میکروتوم و یا تیغ جراحی به صورت نازک با ضخامتی در حدود یک میلی‌لیتر برش داده شده و به یک لوله ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند. بافت‌ها سه بار با زایلن (شرکت مرک، آلمان) و در بن‌ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شدند تا پارافین موجود در بافت‌ها در زایلن حل شود و سپس تخلیه شدند.

#### ۲. حذف زایلن از بافت‌ها

برای حذف زایلن، بافت‌ها با اتانول خالص (شرکت مرک، آلمان)، اتانول ۹۰ درصد، ۷۰ درصد و ۵۰ درصد به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند و در پایان لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰۰۰g سانتریفیوژ گردیدند و اتانول داخل لوله‌ها تخلیه گردید.

پرایمرهای رشته پایه و پیرو (ایزوژن، هلند) هر کدام با غلظت یک میکرومولار و حدود ۱۰۰ نانوگرم DNA استخراج شده از تومورها ساخته شد.

برای تکثیر آگزون ۵ (به طول ۱۸۴ جفت باز) و آگزون ۸ (به طول ۱۳۸ جفت باز) ژن TP53 از دستگاه ترمال سایکلر (کوریت، استرالیا) و از روش Touch down PCR استفاده گردید برای این منظور ابتدا مخلوط واکنش به مدت ۳ دقیقه در حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت و سپس سیکل‌های PCR آغاز گشتند که در هر کدام ابتدا ۱ دقیقه حرارت ۹۴ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه حرارت ۶۸ درجه سانتیگراد (این دما در سیکل‌های دیگر کاهش یافته و تا ۶۱ درجه سانتیگراد کاهش می‌یابد)، ۲ دقیقه حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد و در پایان سیکل‌ها نیز به منظور استفاده بیشتر از مواد اولیه مخلوط ۵ دقیقه حرارت ۷۲ درجه اعمال گردید.

#### ۷. الکتروفورز و تعیین توالی محصولات PCR

محصولات حاصل از تکثیر ۳۰ بلوک پارافینی تثبیت شده با فرمالین، روی ژل آگاروز ۲/۵ درصد، الکتروفورز شدند.

پس از مشاهده باندهای حاصل از تکثیر آگزون‌های ۵ و ۸ ژن TP53، مشخص گردید که عمده توالی‌های تکثیر یافته، حاوی باندهای اختصاصی آگزون‌های مورد نظر بودند و تنها تعداد اندکی از نمونه‌ها باند غیر اختصاصی داشتند که یا مجدداً تحت واکنش PCR قرار گرفتند و یا آن قسمتی از ژل الکتروفورز که حاوی باند اختصاصی مورد نظر بود از طریق شرکت تکاپو زیست به شرکت تک دراگون (Techdragon Co.) در هنگ کنگ فرستاده شد و توسط دستگاه ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer و کیت ABI PRISM® Big Dye™ Terminators V3.1 تعیین توالی شدند.

#### نتایج

در شکل ۱، DNA استخراج شده و باندهای DNA تکثیر یافته آگزون‌های ۵ و ۸ ژن TP53 یکی از بافت‌های تثبیت شده در فرمالین سرطان سلول سنگفرشی ریه به عنوان نمونه

سانتیگراد سانتریفیوژ گردید. پس از تخلیه اتانول، رسوب سفید رنگ (DNA) ته لوله دوبار به آرامی با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. سپس لوله به صورت دریاژ در حرارت آزمایشگاه قرار داده شد تا کاملاً خشک گردد. بسته به میزان رسوب DNA مقدار ۳۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه در لوله ریخته و در یخچال (۴ درجه سانتیگراد) نگهداری شد تا DNA حل گردد.

#### ۵. الکتروفورز DNA

بعد از انجام مراحل فوق برای حصول اطمینان از موفقیت آمیز بودن عمل استخراج DNA، الکتروفورز افقی در ژل آگاروز ۰/۶ درصد حاوی نیم میکروگرم/میلی‌لیتر برومور اتیدیوم و بافر TBE (با غلظت ۱x) صورت گرفت (۸،۹). برای انتقال DNA استخراج شده به ژل، محلول حاوی DNA به نسبت مساوی با بافر نمونه‌گذاری مخلوط و به چاهک‌هایی درون ژل انتقال داده شد. نمونه‌گذاری با استفاده از بافر SBX شامل ۵۰ درصد سوکروز (مرک، آلمان)، ۰/۲۵ درصد برموفنل بلو (مرک، آلمان) و ۰/۲۵ درصد زایلین سیانول (مرک، آلمان) صورت گرفت. پس از انتقال نمونه‌ها به ژل، الکتروفورز در ولتاژ ۱۰۰ ولت و به مدت ۱ ساعت انجام و سپس وجود DNA با استفاده از آشکارساز نور UV مشخص شد.

#### ۶. واکنش PCR

در ابتدا، پرایمرهای زیر برای تکثیر آگزون‌های ۵ و ۸ ژن TP53 طراحی گردیدند.

Exon 5- Forward: 5'-TCT-GTT-CAC-TTG-TGC-CCT-GAC-TTT-CAA-C-3'

Exon 5- Reverse: 5'-GCA-ACC-AGC-CCT-GTC-TCT-CCA-3'

Exon 8- Forward: 5'-GTA-GGA-CCT-GAT-TTC-CTT-ACT-GCC-3'

Exon 8- Reverse: 5'-TGA-GGC-ATA-ACT-GCA-CCC-TTG-GTC-T-3'

واکنش PCR در شرایط زیر صورت گرفت:

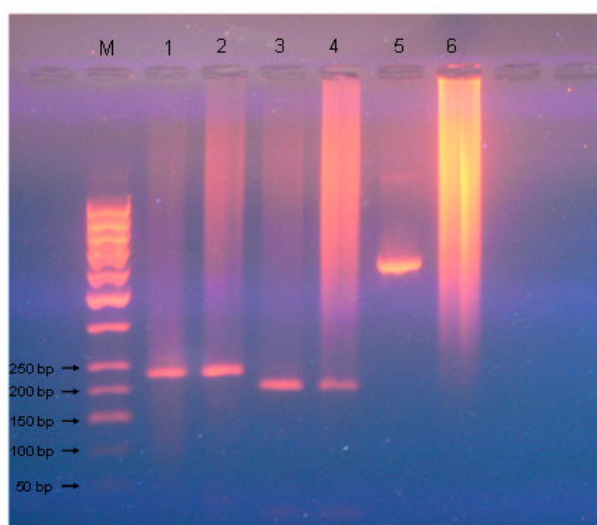
مخلوط PCR در حجم ۲۵ مایکرولیتر که شامل بافر PCR (سینازن، ایران) با غلظت یک x، مخلوط انواع بازهای DNA (سینازن، ایران) با غلظت ۰/۲ مولار، کلرید منیزیم (سینازن، ایران) با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار، ۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (فرمنتاس، لیتوانی) و

استفاده تولید نمودند. از ۲۲ نمونه مربوط به آگزون ۵، ۶۴ کدون جهش یافته شناسایی گردید که مجموعاً در آنها ۷۳ جهش اتفاق افتاده بود، که از این بین تعداد ۴ نمونه هر کدام با یک جهش، ۷ نمونه هر کدام با دو جهش، ۲ نمونه هر کدام با ۳ جهش، ۲ نمونه با ۴ جهش، یک نمونه با ۸ جهش، یک نمونه با ۱۱ جهش و یک نمونه با ۲۲ جهش شناسایی گردید. نوع و میزان جهش‌های موجود در آگزون ۵ در جدول ۱، نشان داده شده است.

نشان داده شده است. پرایمرها در حدود ۵۰ جفت باز پیش از محل شروع آگزون‌ها طراحی گردیدند و به این ترتیب اندازه باندهای حاصله نیز حدود ۵۰ جفت باز افزایش یافتند.

۱. نتایج حاصل از بررسی نوع و میزان جهش‌های موجود در آگزون ۵ ژن  $TP_{53}$

در مجموع از ۲۵ نمونه مورد استفاده در تعیین توالی، ۲۲ نمونه برای آگزون ۵ و ۱۸ نمونه برای آگزون ۸ نتایج قابل



شکل ۱: DNA استخراج شده و باندهای DNA تکثیر یافته یکی از بافت‌های تشبیه شده با فرمالین در ژل آگارز ۲/۵ درصد. (M) مارکر DNA (۱ و ۲) آگزون ۵ تکثیر یافته ژن  $TP_{53}$ ، (۳ و ۴) آگزون ۸ تکثیر یافته ژن  $TP_{53}$ ، (۵) کنترل مثبت تکثیر یافته و (۶) DNA ژنومی استخراج شده از بافت.

جدول ۱: نوع و میزان جهش‌های موجود در آگزون ۵ ژن  $TP_{53}$

C→A	T→A	C→T	اضافه شدن نوکلئوتید	A→C	A→T	G→C	G→A	G→T	حذف نوکلئوتید	نوع جهش
										فراوانی
۱	۲	۲	۳	۴	۷	۱۲	۱۲	۱۳	۱۷	تعداد
٪۱/۴	٪۲/۸	٪۲/۸	٪۴/۱	٪۵/۴	٪۹/۵	٪۱۶/۴	٪۱۶/۴	٪۱۷/۸	٪۲۳/۲	درصد

جدول ۲- نوع و میزان جهش‌های موجود در آگزون ۸ ژن TP<sub>53</sub>

نوع جهش فراوانی	G→T	A→T	حذف نوکلئوتید	اضافه شدن نوکلئوتید	C→T
تعداد	۱۶	۱۶	۱۰	۴	۱
درصد	٪۳۴	٪۳۴	٪۲۱/۳	٪۸/۵	٪۲/۱

همانطور که از جدول مشخص است از ۴۷ جهش مشاهده شده در آگزون ۸ به ترتیب اکثریت، تعداد ۱۶ جهش (۳۴ درصد) در هر یک از جهش‌های جابجایی گوانین با تیمین و جابجایی آدنین با تیمین، ۱۰ جهش (۲۱/۳ درصد) از نوع حذف نوکلئوتید، ۴ جهش (۸/۵ درصد) اضافه شدن تعداد نوکلئوتیدهای کدون و ۱ جهش (۲/۱ درصد) جانشینی سیتوزین با تیمین مورد شناسایی قرار گرفتند.

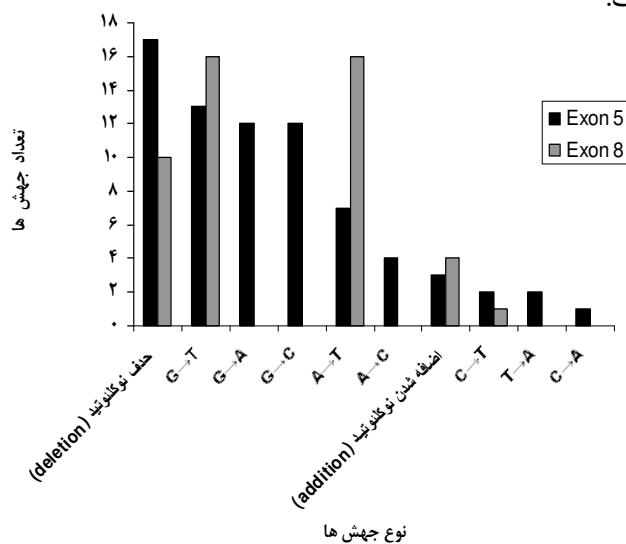
از مجموع ۴۶ کدون جهش یافته آگزون ۸ در ۱۸ نمونه، کدون‌های ۲ (۱۳ درصد)، ۲۷ (۱۰/۸۶ درصد) و ۳۵ (۱۰/۸۶ درصد) بیشترین شیوع را داشتند به عنوان کدون‌های مهم مطالعه حاضر معرفی گردیدند.

نتایج حاصل از بررسی نوع و میزان جهش‌های احتمالی موجود در آگزون‌های ۵ و ۸ ژن TP<sub>53</sub> به طور مقایسه‌ای در نمودار ۱ نشان داده شده است.

از مجموع ۶۴ کدون جهش یافته در آگزون ۵ در ۲۲ نمونه، ۱۱ جهش در کدون ۶ (۱۷ درصد)، ۵ جهش در کدون ۱۴ (۷/۸ درصد) و ۳ جهش در کدون ۲۵ (۴/۶ درصد) مشاهده گردید. کدون‌های ۶، ۱۴ و ۲۵ که بیشترین شیوع جهش را داشتند به عنوان کدون‌های مهم [Hot Spot Codons] مطالعه حاضر تعیین شدند.

۲. نتایج حاصل از بررسی نوع و میزان جهش‌های موجود در آگزون ۸ ژن TP<sub>53</sub>

از مجموع ۱۸ نمونه مورد استفاده در آگزون ۸، ۴۶ کدون جهش یافته شناسایی گردید که مجموعاً در آنها ۴۷ جهش اتفاق افتاده بود، که از این بین، ۵ نمونه هر کدام با یک جهش، چهار نمونه هر کدام با ۲ جهش، یک نمونه با ۳ جهش، دو نمونه هر کدام با ۴ جهش، یک نمونه با ۵ جهش، یک نمونه با ۶ جهش و یک نمونه با ۱۱ جهش شناسایی گردید. نوع و میزان جهش‌های موجود در آگزون ۸ در جدول ۲، نشان داده شده است.

نمودار ۱: تعداد و نوع جهش‌های موجود در آگزون‌های ۵ و ۸ ژن TP<sub>53</sub>

## بحث

ژن TP53 مهم‌ترین ژن سرکوبگر تومور می‌باشد که در بسیاری از سرطان‌ها دچار جهش می‌شود. بیشتر جهش‌ها در ناحیه محافظت شده شدید [High Conserved Region] که شامل اگزون‌های ۵ تا ۸ می‌باشد رخ می‌دهند. این اگزون‌ها ایجاد کننده ناحیه مرکزی پروتئین p53 می‌باشند و نقش اصلی را در شناسایی DNA معیوب به عهده دارند. بنابراین هرگونه جهش در این اگزون‌ها، از اهمیت بالایی برخوردار است و باعث غیر فعال شدن یا نقص در عملکرد این پروتئین می‌شود و فرد بیمار را مستعد ایجاد طیف وسیعی (حدوداً ۶۵ درصد انواع سرطان‌ها) خواهد کرد (۴،۶).

پروتئین p53 یک فاکتور رونویسی چند کاره می‌باشد که در پیشرفت چرخه سلولی و فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نقش دارد و در ارتباط با چندین پروتئین کلیدی که در همانندسازی DNA، رونویسی و ترمیم DNA نقش دارند می‌باشد (۵).

افرادی که مبتلا به سندرم لی-فرا منی (Li-Fraumeni) هستند، در مقایسه با جمعیت طبیعی تا سن ۵ سالگی، ۲۵ برابر بیشتر احتمال ابتلا به یک تومور بدخیم را دارند و طیف ایجاد تومورها در بیماران مبتلا به سندرم لی-فرا منی بسیار متغیر است. شایع‌ترین انواع تومورها عبارتند از سارکوما، سرطان پستان، لوسمی، تومورهای مغز و کارسینوم‌های قشر فوق کلیه.

جهش ژن TP53 در ۵۰ تا ۷۰ درصد بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول غیر کوچک شناسایی شده است. دیگر ژن‌های سرکوبگر سرطان که اختلال آنها در سرطان ریه سلول غیر کوچک شناسایی شده شامل ژن‌های RB1، PTEN و INK4 می‌باشد که به ترتیب در ۱۵-۱۰ درصد، ۵-۰ درصد و ۷۵ درصد بیماران دیده شده است (۳).

این نکته قابل توجه می‌باشد که بیش از ۷۵ درصد جهش‌های این ژن تغییرات تک اسید آمینه‌ای می‌باشد. این مطلب یک وجه تمایز این ژن با دیگر ژن‌های سرکوبگر تومور مانند رتینوبلاستوما و APC می‌باشد که معمولاً دچار تغییرات در چارچوب (Frameshift) و جهش‌های خاموش (Silent

mutations) می‌شوند و توالی پروتئین را از بین می‌برند (۵).

در مطالعات مشابه که در کشورهای مختلف صورت گرفته است، تاگاو و همکاران جهش‌های موجود در اگزون‌های ۵ تا ۹ ژن TP53 را در ۳۴ درصد بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول کوچک (۱۷)، گائو و همکاران، جهش‌های موجود در اگزون‌های ۵ تا ۸ ژن TP53 را در ۳۵ درصد بیماران مبتلا به سرطان سلول سنگفرشی ریه (۴)، ماتسوزو و همکاران، جهش‌های موجود در اگزون‌های ۵ و ۸ ژن TP53 را در ۳۸ درصد بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول کوچک (۱۰) و نیکلینسکا و همکاران، جهش‌های موجود در اگزون‌های ۵ تا ۸ ژن TP53 را در ۴۵ درصد بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول کوچک شناسایی کردند (۱۱،۱۲).

در این مطالعه جهش‌های موجود در اگزون‌های ۵ و ۸ ژن TP53 با استفاده از روش‌های PCR و تعیین توالی DNA مشخص گردیدند و نتایج نشان دادند که فقط قسمت کوتاهی از ژن دچار تغییر شده است و بقیه توالی با ژن طبیعی مطابقت دارد و همچنین در تعدادی از نمونه‌ها ساختمان ژن هیچ نوع تغییری نداشته است، بنابراین می‌توان با اطمینان گفت که توالی‌های تکثیر شده همان اگزون‌های ۵ و ۸ ژن TP53 می‌باشند.

در ۱۸ نمونه از ۲۲ نمونه (۸۱/۸ درصد) در اگزون ۵ و در ۱۵ نمونه از ۱۸ نمونه (۸۳/۳ درصد) در اگزون ۸ ژن TP53، جهش وجود دارد و در مجموع تعداد ۱۲۰ جهش (۷۳) جهش در اگزون ۵ و ۴۷ جهش در اگزون ۸ ژن TP53 در بیماران مبتلا به سرطان سلول سنگفرشی ریه شناسایی گردید.

در مجموع حدود یک چهارم جهش‌ها (بیشترین نوع جهش) جابجایی گوانین با تیمین می‌باشد. پس از این نوع جهش، جهش حذف نوکلئوتید (۲۲ درصد) و جابجایی آدنین با تیمین (۱۹ درصد) بیشترین فراوانی را در جهش‌های شناسایی شده اگزون‌های ۵ و ۸ به خود اختصاص داده‌اند. بنابراین نوع جهش اصلی در این مطالعه، مطابق با گزارش‌های پیشین در مورد بیماران مبتلا به

سرطان ریه می‌باشد.

نتایج نشان دادند که جهش‌های این ژن در بیماران بستری شده در بیمارستان افضل‌پور کرمان در مقایسه با سایر مطالعات شیوع بالایی داشتند. این امر ممکن است به دلیل تفاوت‌های ژنتیکی و اختلافات موجود در عوامل محیطی مانند رژیم غذایی، میزان استرس، شرایط جغرافیایی و شیوه زندگی مردم باشد.

وجود درصد بالای جهش جایجایی گوانین با تیمین (G→T) در ژن TP53 به مصرف بالای دخانیات و خاصیت جهش‌زایی ترکیب PAH در دود سیگار بر می‌گردد. رودین و همکاران و همچنین دیگر پژوهشگران نشان داده‌اند که ژن سرکوبگر تومور TP53 در بیماران مبتلا به سرطان ریه افزایش قابل توجهی در جهش جایجایی گوانین با تیمین دارد که این نوع جهش به سبب فعالیت ترکیب جهش‌زای PAH می‌باشد. شیوع بالای این جهش خاص در ارتباط با مصرف سیگار می‌باشد و مخصوصاً مشخص شده است که مصرف سیگار ممکن است مهار کننده ترمیم جهش جایجایی گوانین با تیمین در رشته غیر رونویسی شونده باشد. همچنین وجود درصد بالای جهش‌های جانیشینی گوانین با آدنین (G→A) در آگزون ۵ ژن TP53، در ارتباط با وجود نیتروزو آمین خاصی در دود سیگار به نام NNK می‌باشد که اهمیت این ماده در سرطان‌زایی ریه مشخص شده است (۱۶-۱۴).

جهش‌های جایجایی گوانین با تیمین و سیتوزین با آدنین در اثر جهش‌زایی مانند PAH و انواع گونه‌های اکسیژن فعال [Reactive Oxygen Species (ROS)] می‌باشد. PAH از عوامل جهش‌زای اصلی در سرطان‌زایی ریه می‌باشد. اثر متابولیت‌های PAH مانند benzo(a)pyrene-diol-epoxide روی رشته غیر رونویسی شونده [Non-transcribed strand (NTS)] باعث می‌شوند تا ترمیم آسیب‌های این رشته، ۲ تا ۴ مرتبه آهسته‌تر از رشته دیگر صورت گیرد و با جهش‌های هات‌اسپات (جهش‌های شایع) مشاهده شده در سرطان ریه

انسانی مرتبط باشد (۱۸، ۱۶).

نقص هموزیگوت و هتروزیگوت در ژن TP53 حیوانات، در ابتلاء به تومورهای خود به خودی با شیوع بالا همراه می‌باشد. تمامی حیواناتی که خاموش شدن ژن TP53 آنها به صورت هموزیگوت و در حین شش ماه اول زندگی‌شان صورت می‌گیرد، به طور غالب در اثر ابتلا به لنفوما خواهند مرد و در آنهایی که خاموش شدن ژن TP53 آنها به صورت هتروزیگوت می‌باشد، به تومورهای مختلفی دچار می‌گردند که در بین این تومورها، سارکوما و لنفوما بیش از بقیه مشاهده می‌شود. دلیل بالا بودن شیوع سرطان در حیوانات دارای نقص در ژن TP53، با نقش این ژن به عنوان محافظ ژنوم سازگار است که از طریق مهار رشد و فرایند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی فعالیت می‌نماید.

رنگ‌آمیزی پروتئین p53 به روش ایمونوهیستوشیمی، به عنوان یک آزمایش غیر مستقیم نشان داده است که بیان پروتئین جهش یافته در مخاط طبیعی، صفر درصد، در متاپلازی اسکوآموس ۸/۳ درصد، در دیسپلازی ملایم ۵ تا ۷ درصد، در دیسپلازی متوسط ۱۲/۵ درصد و در دیسپلازی شدید ۹۳/۸ درصد است (۳).

این مطالب نشان می‌دهند که غیر فعال شدن این ژن رخداد اولیه‌ای در سرطان ریه می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک مارکر ملکولی مفید در تشخیص زود هنگام بکار رود. شناسایی دیگر جهش‌های این ژن و مکانیسم‌های دخیل در ایجاد جهش‌ها، راه‌های جلوگیری از تشکیل جهش‌ها و همچنین فعال‌سازی این ژن می‌توانند راه را برای تشخیص و درمان سرطان هموار نمایند.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از آقایان دکتر حمید تبریزی و دکتر شهریار دبیری و همچنین پرسنل محترم بخش پاتولوژی بیمارستان افضل‌پور کرمان به دلیل همکاری در تحویل نمونه‌های تثبیت شده فرمالینی و از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان نیز به سبب فراهم نمودن بودجه این مطالعه سپاسگزاری می‌شود.



## Summary

### Detection of Mutations in Exons 5 and 8 of Tumor Suppressor Tp<sub>53</sub> Gene in Patients with Squamous Cell Carcinoma of Lung Hospitalized in Afzalipour Hospital, Kerman, Iran

Mohammadi GH., PhD.<sup>1</sup>, Vaziri Gohar A., M.Sc.<sup>2</sup>, Shakibaie M.R., PhD.<sup>3</sup>, Baghaie M., MD.<sup>4</sup>

1. Associate Professor of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Kerman Physiology Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran 2. Instructor of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran 3. Associate Professor of Molecular Genetics, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran 4. Assistant Professor of Surgery, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences Kerman, Iran

**Introduction:** Despite improvements in the diagnosis and treatment of lung cancer in the past two decades, it has remained the most common cause of death from cancer worldwide. Among all genes that are mutated in lung cancer, TP<sub>53</sub> located on chromosome 17p13/1 has a significant diagnostic and prognostic value. TP<sub>53</sub> mutations have been extensively studied in lung cancer and TP<sub>53</sub> mutational spectra have been used for finding the origin(s) and mechanisms of these mutations in lung cancer development. The present study was conducted to investigate the TP<sub>53</sub> mutations in patients with Non- small cell lung cancer hospitalized during 1997-2005 in Afzalipour Hospital, Kerman, Iran.

**Method:** Formalin- fixed, Paraffin- embedded tissues from lung cancer patients undergone surgery between 1997 to 2005 were evaluated. The mutational status of the TP<sub>53</sub> gene (exons 5 & 8) was screened by polymerase chain reaction (PCR) analysis followed by sequencing.

**Results:** Of all cases of squamous cell carcinoma, 73 mutations were found in Exon 5 (in 18 cases) and 47 mutations in Exon 8 of TP<sub>53</sub> gene (in 15 cases). we identified mutation hot spot at codons 6, 14, 25 of exon 5 and codons 2, 27, 35 of exon 8 of TP<sub>53</sub> gene. Tansversions (G to T, A to T and G to C) and deletion mutations were the most in both exons 5 and 8. The incidence of G to T transversion mutations did not significantly differ between Exons 5 and 8.

**Conclusion:** Higher prevalence of mutations in TP<sub>53</sub> gene in the present study comparing to previous studies may be due to genetic, environmental and some epidemiological factors such as diet and life style of studied subjects.

**Key words:** TP53 Gene, Squamous cell carcinoma, Mutation

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2007; 14(2): 90-99

## References

1. Brakensiek K, Langer F, Kreipe H, Lehmann U. Absence of p21(CIP1), p27(KIP1) and p57(KIP2) methylation in MDS and AML. *Leuk Res* 2005; 29(11): 1357-60.
2. Cawkwell L, Quirke P. Direct multiplex amplification of DNA from formalin fixed, paraffin wax embedded tissue section. *Mol Pathol* 2000; 53(1): 51-2.
3. Cowell J.K: Molecular Genetics of Cancer. 2<sup>nd</sup> ed. BIOS Scientific Publishers Limited; 2001; PP195-212: 391-3.
4. Gao WM, Mady HH, Yu GY, Siegfried JM, Luketich JD, Melhem MF, et al. Comparison of p53 mutations between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: unique spectra involving G to A transitions and G to T transversions in both histologic types. *Lung Cancer* 2003; 40(2): 141-50.
5. Glazko GV, Koonin EV, Rogozin IB. Mutation hotspots in the p53 gene in tumors of different origin: correlation with evolutionary conservation and signs of positive selection. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1679(2): 95-106.
6. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Tumor

- suppressor genes: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and human risk assessment. *Lung Cancer* 2001; 34 suppl 2: S7-S15.
7. Ko JL, Chiao MC, Chang SL, Lin P, Lin JC, Sheu GT, et al. A novel p53 mutant retained functional activity in lung carcinomas. *DNA Repair* 2002; 1(9): 755-62.
  8. Macdonald F, Ford C.H.J. Molecular Biology of Cancer. BIOS Scientific Publishers Limited; 1997; PP35-40.
  9. Mahony JB: Detection of viral nucleic acids in clinical materials. In: Mahy BWJ, Kangro HO (editors). Virology methods manual. New York, Academic Press, 1996; PP327-28.
  10. Matsuzoe D, Hideshima T, Kimura A, Inada K, Watanabe K, Akita Y, et al. p53 mutations predict non-small cell lung carcinoma response to radiotherapy. *Cancer Lett* 1999; 135(2): 189-94.
  11. Niklinska W, Burzykowski T, Chyczewski L, Niklinski J. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in non-small cell lung cancer: association with p53 gene mutation and prognosis. *Lung Cancer* 2001; 34(suppl 2): S59-S64.
  12. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: *Globocan* 2000. *Int J Cancer* 2001; 94(2): 153-6.
  13. Piaskowski S, Rieske P, Szybka M, Wozniak K, Bednarek A, Pluciennik E, et al. GADD45A and EPB41 as tumor suppressor genes in meningioma pathogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 162(1): 63-7.
  14. Rodin SN, Rodin AS. On the excess of G→T transversions in the p53 gene in lung cancer cell lines, Reply to Pfeifer and Hainaut. *Mutat Res* 2004; 545(1-2): 141-4.
  15. Rodin S.N, Rodin A.S. On the origin of p53 G:C→T:A transversions in lung cancers. *Mutat Res* 2002; 508(1-2): 1-19.
  16. Rodin SN, Rodin AS. Origins and selection of p53 mutations in lung carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2005; 15(2): 103-12.
  17. Tagawa M, Murata M, Kimura H. Prognostic value of mutations and a germ line polymorphism of the p53 gene in non-small cell lung carcinoma: association with clinicopathological features. *Cancer Lett* 1998; 128(1): 93-9.
  18. Wiseman A. p53 Protein or BID protein select the route to either apoptosis (programmed cell death) or to cell cycle arrest opposing carcinogenesis after DNA damage by ROS. *Med Hypotheses* 2006; 67(2): 296-9.