

## بررسی پلی مورفیسم تکرار TAAAA در ژن p53 و ارتباط آن با سرطان پستان

سمیه نجفی درجه<sup>۱</sup>، دکتر منوچهر توسلی<sup>۲</sup>، دکتر سیمین همتی<sup>۳</sup>، فروزان صفری<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** تغییرات ژنتیک در ژن p53 با تومورزایی، به خصوص تومورهای جامد مانند پستان، کلون و ریه، در ارتباط می‌باشد. جهش‌های ژن p53 بیشترین فراوانی را در سرطان‌های انسان دارد. بر اساس اطلاعات ما، تا زمان انجام این تحقیق، مطالعه‌ای در مورد ارتباط تعداد تکرارهای TAAAA واقع در اینترون ۱ ژن p53 و سرطان صورت نگرفته بود. هدف این پژوهش، بررسی پلی مورفیسم TAAAA واقع در اینترون ۱ ژن p53 در بین مبتلایان به سرطان پستان و افراد شاهد و ارتباط آن با سرطان پستان بود.

**روش‌ها:** در این پژوهش، نمونه‌ی خون ۲۰۰ زن مبتلا به سرطان پستان و ۲۰۰ زن شاهد جمع‌آوری و بررسی شد. پس از استخراج DNA ژنومی از خون محیطی و تکثیر توالی مورد نظر، تعداد تکرار و توالی TAAAA با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید و تعیین توالی به دست آمد.

**یافته‌ها:** در این مطالعه، پنج آلل متفاوت از تکرار TAAAA بین ۶ تا ۱۰ تکرار و ۱۱ ترکیب آللی (ژنوتیپ) مختلف در بین افراد شاهد و مورد مشاهده شد. بیشترین فراوانی آللی در میان افراد مورد و شاهد مربوط به آلل ۸ تکرار بود. خانم‌هایی با ژنوتیپ هتروزایگوت ۶ و یا هموزایگوت ۷ دارای خطر افزایش یافته‌ای برای ابتلا به سرطان پستان بودند. در این مطالعه، ارتباط معنی‌داری بین این ژنوتیپ‌ها با درجه‌ی پیشرفت بیماری، وضعیت بیان گیرنده‌های استروژن، پروژسترون و Her2 و سن مشاهده نشد.

**نتیجه‌گیری:** مطالعه‌ی ما ارتباط معنی‌داری را بین پلی مورفیسم تکرار TAAAA در ژن p53 و خطر ابتلا به سرطان پستان نشان داد. افراد هتروزایگوت ۶/۷ و ۶/۸ و نیز هموزایگوت ۷/۷ خطر افزایش یافته‌ای برای ابتلا به سرطان پستان دارند.

**واژگان کلیدی:** p53، سرطان پستان، تکرار TAAAA، پلی مورفیسم

**ارجاع:** نجفی درجه سیمیه، توسلی منوچهر، همتی سیمین، صفری فروزان. بررسی پلی مورفیسم تکرار TAAAA در ژن p53 و ارتباط آن

با سرطان پستان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۲۳): ۱۴۳-۱۳۴

به صورتی که از هر ۱۰۰ هزار زن ایرانی، ۱۲۰ نفر به این سرطان مبتلا می‌شوند (۲-۳).

در سال ۱۹۷۹ شش گروه از دانشمندان که به طور مستقل کار می‌کردند، یک پروتئین ۵۳ کیلودالتونی را که در سلول‌های انسان و موش بود، شناسایی کردند. در پنج مطالعه، این پروتئین به علت اتصال به

### مقدمه

سرطان پستان یکی از فراوان‌ترین سرطان‌ها و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان در زنان است (۱). تحقیقات نشان می‌دهد سرطان پستان یکی از فراوان‌ترین بدخیمی‌ها در میان زنان ایرانی می‌باشد؛

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه پر تودرمانی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

حدود ۷۴ درصد می‌باشد (۲۱). بررسی بیوانفورماتیکی ژن p53 یک ناحیه از توالی تکراری TAAAA را در اینترون ۱ این ژن نشان می‌دهد. از آنجایی که توالی‌های تکراری واقع در اینترون ۱ ژن‌ها می‌توانند بر روی بیان ژن و یا پیرایش متفاوت اینترون‌ها تاثیر بگذارند، در مطالعه‌ی حاضر پلی مورفیسم تکرار TAAAA در اینترون ۱ ژن p53 و ارتباط آن با خطر ابتلا به سرطان پستان در جمعیت اصفهان مورد بررسی قرار گرفت.

### روش‌ها

نمونه‌ی خون تام ۲۰۰ زن بیمار مبتلا به سرطان پستان در محدوده‌ی سنی ۸۰-۲۵ سال که تحت شیمی درمانی و رادیو درمانی قرار داشتند، با رضایت بیماران از بیمارستان سیدالشهدای (ع) اصفهان (گروه مورد) و همچنین نمونه‌ی خون تام ۲۰۰ زن سالم که هیچ سابقه‌ی فامیلی سرطان در خانواده نداشتند و از نظر سنی در محدوده‌ی افراد بیمار قرار داشتند و جهت بررسی وضعیت سلامتی خود به بیمارستان مراجعه کرده بودند (گروه شاهد)، جمع‌آوری شد. اطلاعات مربوط به درجه‌ی پیشرفت بیماری، وضعیت گیرنده‌ها و سن به وسیله‌ی مطالعه‌ی پرونده‌ی افراد مورد بررسی به دست آمد. از نمونه‌ی خون افراد مورد مطالعه، DNA ژنومی به روش رسوب‌دهی نمکی استخراج (۲۲) و ناحیه‌ی ژنی مورد نظر توسط پرایمرهای پیش‌رو و پیرو 5'-AATCCGGGAGGAGGTTGCAGTAAG-3' و 5'-ACAGCTCCTTTAATGGCAGGCTCTTT-3' تکثیر گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراس (Polymerase chain reaction یا PCR) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۰۰-۲۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs (Deoxyribonucleotide)، ۲۰۰ نانومولار از هر یک از

Large T antigen، در سلول‌های آلوده به ویروس SV40 شناسایی شد (۹-۴). ژن p53 بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ (17p13.1) قرار دارد و یک فسفو پروتئین هسته‌ای را کد می‌کند. در ابتدا تصور می‌شد که این ژن یک آنکوژن است؛ چرا که همراه با آنکوژن Ras، سلول‌های فیرو بلاست چونندگان را سرطانی می‌کرد (۱۰). تحقیقات بعدی نشان داد که این ژن در حقیقت یک سرکوبگر تومور می‌باشد (۱۱-۱۲). اگر پروتئین p53 دارای جهش غیر فعال کننده باشد و یا پروتئین طبیعی p53 به وسیله‌ی اتصال به MDM2 و یا آنکو پروتئین‌های ویروسی غیر فعال شود، سلول به تکثیر ادامه می‌دهد (۱۳).

p53 در چهار نوع مرگ سلولی شامل اتوفاژی (Autophagy)، آپوپتوز (Apoptosis)، پیری سلولی (Senescence) و نکروز (Necrosis) دخالت دارد (۱۴). به عبارت دیگر، در ادامه‌ی آسیب DNA (Deoxyribonucleic acid)، p53 فرایندهای اساسی مانند ترمیم DNA، توقف چرخه‌ی سلولی، پیری سلولی و آپوپتوز را به منظور سرکوب تومور کنترل می‌کند (۱۵). عملکرد p53 به عنوان سرکوب کننده‌ی تومور نشان می‌دهد که ما بدون آن قادر به ادامه زندگی نیستیم، اما یک دید جامع‌تر پیشنهاد می‌کند که تمام عملکردهای آن، منجر به زندگی سالم و طولانی نمی‌شود (۱۶-۱۷).

به نظر می‌رسد که بیشتر جهش‌های ژن p53 در مناطق بسیار حفاظت شده ژن رخ می‌دهد (۱۸). اغلب این جهش‌ها به صورت Missense (قرار گرفتن یک نوکلئوتید به جای نوکلئوتید دیگر) می‌باشند (۱۹). جهش‌های ژن p53 در تمامی آگزون‌های کد کننده‌ی آن به خصوص در آگزون‌های ۴ تا ۹ که کد کننده‌ی دامین متصل شونده به DNA می‌باشند، وجود دارند (۲۰). جهش در این آگزون‌ها

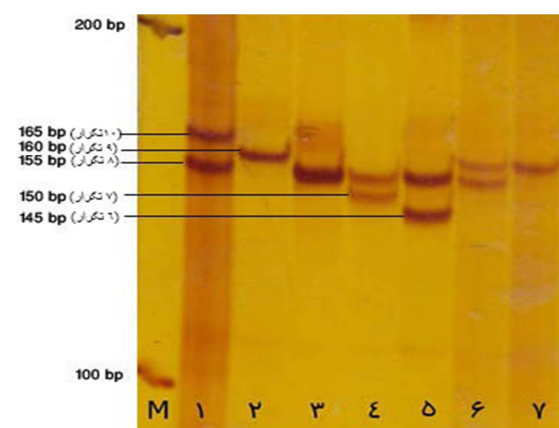
ردیف‌های ۱ تا ۷ تنوعات آللی تکرارهای TAAAA در ژن p53 را در افراد مورد بررسی و اندازه‌های مختلف آلل‌ها، اختلاف در تعداد تکرارهای TAAAA را نمایش می‌دهد. نمونه‌ی شماره‌ی ۱ هتروزیگوت ۸/۱۰، شماره‌ی ۲ هموزیگوت ۹/۹، شماره‌ی ۳ هموزیگوت ۸/۸، شماره‌ی ۴ هتروزیگوت ۷/۸، شماره‌ی ۵ هتروزیگوت ۶/۸، شماره‌ی ۶ هتروزیگوت ۸/۹ و شماره‌ی ۷ هموزیگوت ۹/۹ می‌باشد.

پس از مشاهده‌ی پلی مورفیسم، دو نمونه با اندازه‌های مختلف توسط کیت استخراج DNA (شرکت فرمنتاز) از ژل آگارز خالص‌سازی شد. سپس جهت تعیین توالی به شرکت سیناکلون ارسال گردید تا به عنوان نشانگر آللی مورد استفاده قرار گیرد. به کمک این نشانگرها، طول تکرار آلل‌های مورد و شاهد، تعیین و فراوانی آللی ژن p53 محاسبه شد. در نهایت اطلاعات آماری توسط نرم‌افزار SISA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در ابتدا فراوانی ترکیبات آللی و فراوانی آلل‌های ژن مورد نظر مشخص شد و سپس ارتباط این تکرارها با بروز سرطان به کمک آزمون  $\chi^2$  و OR (Odds ratio) توسط آزمون رگرسیون محاسبه گردید.  $P < 0/050$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

با توجه به توانایی کم ژل آگارز در جداسازی قطعات DNA با اختلاف کم، برای اندازه‌گیری دقیق تعداد تکرارهای توالی TAAAA واقع در اینترون ۱ ژن p53، بررسی‌های بعدی محصول PCR بر روی ژل پلی‌آکریل آمید ۱۰ درصد انجام شد (شکل ۱).

پرایمرهای پیش‌رو و پیرو، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR 10X، ۲ میلی‌مولار  $MgCl_2$  و دو واحد آنزیم SmarTaq DNA polymerase (شرکت سیناژن تهران) در دستگاه ترموسایکلر شرکت اپندورف انجام شد. پس از واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۳ سیکل PCR در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه به منظور واسرشت شدن رشته‌ها، ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه جهت اتصال پرایمرها و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه جهت گسترش پرایمرها انجام شد. یک سیکل انتهایی نیز جهت تکثیر توالی‌های ناقص به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط ژل آگارز ۱ درصد تأیید و جهت بررسی پلی مورفیسم ژن p53 از الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید ۱۰ درصد غیر واسرشت (Non-Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis یا Non-Denaturing PAGE) استفاده شد. ژل با روش نترات نقره رنگ‌آمیزی و نتایج توسط اسکنر ثبت شد (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر ژل پلی‌آکریل آمید ۱۰ درصد جهت بررسی

پلی مورفیسم TAAAA در اینترون ۱ ژن p53



| P       | OR (95% CI درصد)  | گروه مورد    |             | آلل |
|---------|-------------------|--------------|-------------|-----|
|         |                   | تعداد (درصد) | تعداد شاهد  |     |
| ۰/۱۷۸   | ۴/۰۳ (۰/۴۵-۳۶/۲۲) | ۴ (۱/۰۰)     | ۱ (۰/۲۵)    | ۶   |
| ۰/۱۸۴   | ۱/۲۷ (۰/۸۹-۱/۷۹)  | ۸۷ (۲۱/۷۵)   | ۷۲ (۱۸/۰۰)  | ۷   |
| ۰/۴۲۸   | ۰/۸۹ (۰/۶۷-۱/۱۸)  | ۲۳۲ (۵۸/۰۰)  | ۲۴۳ (۶۰/۷۵) | ۸   |
| ۰/۵۳۱   | ۰/۸۹ (۰/۶۳-۱/۲۷)  | ۷۴ (۱۸/۵۰)   | ۸۱ (۲۰/۲۵)  | ۹   |
| > ۰/۹۹۹ | ۱ (۰/۲۰-۴/۹۸)     | ۳ (۰/۷۵)     | ۳ (۰/۷۵)    | ۱۰  |

OR: Odds ratio; CI: Confidence interval

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف در بین افراد گروه‌های مورد و شاهد و ارتباط این ژنوتیپ‌ها با خطر ابتلا به سرطان پستان

| P       | OR (95% CI درصد)  | گروه مورد    |            | ژنوتیپ |
|---------|-------------------|--------------|------------|--------|
|         |                   | تعداد (درصد) | تعداد شاهد |        |
| -       | -                 | ۱ (۰/۵)      | ۰ (۰/۰)    | ۶/۷    |
| ۰/۳۱۵   | ۳/۰۳ (۰/۳۱-۲۹/۳۸) | ۳ (۱/۵)      | ۱ (۰/۵)    | ۶/۸    |
| ۰/۰۱۱   | ۴/۵۶ (۱/۲۸-۱۶/۲۸) | ۱۳ (۶/۵)     | ۳ (۱/۵)    | ۷/۷    |
| ۰/۲۰۲   | ۰/۷۴ (۰/۴۷-۱/۱۷)  | ۴۴ (۲۲/۰)    | ۵۵ (۲۷/۵)  | ۷/۸    |
| ۰/۴۱۷   | ۱/۳۹ (۰/۶۲-۳/۱۱)  | ۱۵ (۷/۵)     | ۱۱ (۵/۵)   | ۷/۹    |
| -       | -                 | ۱ (۰/۵)      | ۰ (۰/۰)    | ۷/۱۰   |
| ۰/۵۹۷   | ۱/۱۲ (۰/۷۴-۱/۶۹)  | ۷۰ (۳۵/۰)    | ۶۵ (۳۲/۵)  | ۸/۸    |
| ۰/۱۶۳   | ۰/۷۲ (۰/۴۶-۱/۱۴)  | ۴۳ (۲۱/۵)    | ۵۵ (۲۷/۵)  | ۸/۹    |
| > ۰/۹۹۹ | ۱ (۰/۱۴-۷/۱۷)     | ۲ (۱/۰)      | ۲ (۱/۰)    | ۸/۱۰   |
| ۰/۷۹۲   | ۱/۱۵ (۰/۴۱-۳/۲۳)  | ۸ (۴/۰)      | ۷ (۳/۵)    | ۹/۹    |
| -       | -                 | ۰ (۰/۰)      | ۱ (۰/۵)    | ۹/۱۰   |

OR: Odds ratio; CI: Confidence interval

با خطر ابتلا به سرطان پستان بررسی شد. فراوانی ژنوتیپ‌های هتروزیگوت ۶/۷، ۶/۸ و هموزیگوت ۷/۷ در افراد گروه مورد (۱۷ نفر و ۸/۵ درصد) به طور قابل توجهی بیشتر از افراد گروه شاهد (۴ نفر و ۲/۰ درصد) می‌باشد. به نظر می‌رسد این افراد دارای خطر افزایش یافته‌ای برای ابتلا به سرطان پستان باشند. سطح معنی‌داری  $P = ۰/۰۰۳$  و وجود ارتباط ژنوتیپ‌های هتروزیگوت ۶/۷، ۶/۸ و هموزیگوت ۷/۷ با خطر ابتلا به سرطان پستان را اثبات می‌کند.

در کل افراد مورد مطالعه، ۱۱ ترکیب آلی (ژنوتیپ) مختلف برای ژن p53 مشاهده شد. نتایج بررسی ژنوتیپ‌های مختلف ژن p53 نشان داد که فراوان‌ترین ژنوتیپ موجود در هر دو گروه مورد (۳۵ درصد) و شاهد (۳۲/۵ درصد) متعلق به ژنوتیپ ۸/۸ است، علاوه بر این، ترکیبات آلی ۶/۷ و ۷/۱۰ فقط در بین افراد گروه‌های مورد و ترکیب آلی ۹/۱۰ فقط در افراد گروه شاهد مشاهده شد. در جدول ۲ توزیع میزان فراوانی هر ترکیب آلی در بین بیماران و افراد شاهد برای ژن p53 و نیز ارتباط این ژنوتیپ‌ها

در مرحله بعد ارتباط ژنوتیپ‌های هتروزیگوت ۶/۸، ۶/۷ و هموزیگوت ۷/۷ با درجه‌ی پیشرفت بیماری، وضعیت گیرنده‌ها و سن بررسی و پس از آن توسط آزمون رگرسیون تجزیه و تحلیل گردید. ارتباط معنی‌داری بین این ژنوتیپ‌ها و عوامل ذکر شده مشاهده نشد (جدول ۳).

اساس مطالعات انجام شده، گیرنده‌ی استروژن از آپوتوز وابسته به p53 در سرطان پستان جلوگیری می‌کند (۲۷). جهش در یک کپی از ژن p53 و از دست دادن کپی دیگر (Loss of heterozygosity یا LOH) در بسیاری از سرطان‌ها مشاهده شده است و این مسأله پیشنهاد می‌کند که از دست دادن هر دو کپی از ژن p53 جهت تومورزایی ضروری می‌باشد. Thompson و همکاران ارتباطی بین LOH در اطراف ناحیه ی ژنی p53 و جهش در این ژن مشاهده نکردند. آنان پیشنهاد کردند که تنها یک کپی غیر فعال از ژن p53 جهت تومورزایی کافی می‌باشد (۲۸).

Deng و همکاران نشان دادند که ارتباطی بین جهش‌های p53 و LOH در خود ژن p53 در سرطان پستان وجود ندارد، اما جهش‌های p53 با LOH در دو محل کروموزومی خاص (3p24-26, و 7q31) مرتبط بود (۲۹) که با مطالعه‌ی Thompson و همکاران (۲۸) مطابقت داشت. آن‌ها پیشنهاد کردند که سرطان پستان تنها یک آلل ناقص p53 دارد (۲۹).

### بحث

ژن P53 به عنوان سرکوب کننده‌ی تومور عمل می‌نماید (۲۳) و بر روی بازده‌ی شیمی درمانی و رادیوتراپی تأثیر می‌گذارد. تحقیقات نشان می‌دهد که مسیر فعالی از p53 برای شیمی درمانی و رادیوتراپی لازم است (۲۴). جهش‌های غیر فعال کننده در ژن p53 در ۵۰ درصد از سرطان‌های انسان شناسایی شده است (۲۵). سه نوع سرطان پستان شامل لومینال، بازال و مولکولار آپوکرین وجود دارد بیشترین نرخ جهش‌ها در تومورهای بازال (۸۸ درصد) و کمترین نرخ آن در تومورهای لومینال (۲۶ درصد) می‌باشد (۲۶). بر

جدول ۳. ارتباط ژنوتیپ‌های هتروزیگوت ۶/۸، ۶/۷ و هموزیگوت ۷/۷ با درجه‌ی پیشرفت بیماری، وضعیت گیرنده‌ها و سن

| P     | OR (CI ۹۵ درصد)   | تعداد ژنوتیپ‌ها |           | ژنوتیپ |
|-------|-------------------|-----------------|-----------|--------|
|       |                   | سایر ژنوتیپ‌ها  | ۶/۷ و ۶/۸ |        |
| ۰/۴۸۲ | ۰/۴۶ (۰/۰۵-۴/۲۳)  | ۱۷              | ۱         | M+     |
|       |                   | ۳۹              | ۵         | M-     |
| ۰/۶۰۵ | ۱/۵۶ (۰/۲۹-۸/۴۳)  | ۶۱              | ۵         | ER+    |
|       |                   | ۳۸              | ۲         | ER-    |
| ۰/۵۳۶ | ۱/۶۹ (۰/۳۱-۹/۱۷)  | ۵۹              | ۵         | PR+    |
|       |                   | ۴۰              | ۲         | PR-    |
| ۰/۳۵۰ | ۰/۳۵ (۰/۰۳-۳/۴۸)  | ۴۳              | ۱         | HER2+  |
|       |                   | ۴۵              | ۳         | HER2-  |
| ۰/۳۰۰ | ۲/۳۰ (۰/۴۶-۱۱/۵۶) | ۷۰              | ۷         | < ۵۰   |
|       |                   | ۴۶              | ۲         | ≥ ۵۰   |

M: Metastasis; ER: Estrogen receptor; PR: Progesterone receptor; HER2: Human epidermal growth factor receptor 2; OR: Odds ratio; CI: Confidence interval

احتمال این که DNAهای ماهواره‌ای ریز یا STRها با قرار گرفتن در توالی افزایش دهنده‌ها بتوانند با تغییر ساختمان ایجاد شده بر روی بیان ژن‌ها تأثیرگذار باشند و یا با قرار گرفتن در اینترون‌ها بتوانند در سرعت جدا شدن اینترون‌ها در نتیجه بر بیان ژن‌ها اثر بگذارند، وجود دارد (۳۷-۳۴). این امکان وجود دارد که در ژنوتیپ‌های هتروزیگوت ۶/۷، ۶/۸ و هموزیگوت ۷/۷ میزان بیان p53 کاهش پیدا کند. همچنین STRهای واقع شده در اینترون‌ها می‌توانند بر روی محصولات پیرایش متفاوت اینترون‌ها و ایجاد ایزوفرم‌های مختلف تأثیرگذار باشند (۳۹-۳۸). برخی از ایزوفرم‌های p53 فاقد N انتهایی فعال کننده‌ی رونویسی می‌باشند، بنابراین این امکان وجود دارد که ژنوتیپ‌های هتروزیگوت ۶/۷، ۶/۸ و هموزیگوت ۷/۷ ژن p53 در تولید بیشتر این ایزوفرم‌ها نقش داشته باشند.

### نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر پلی مورفیسم تکرار TAAAA در ژن p53 و ارتباط آن با خطر ابتلا به سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت. با بررسی پلی مورفیسم تکرار TAAAA در اینترون شماره یک ژن p53 مشخص شد که افراد با ژنوتیپ‌های ۶/۷، ۶/۸ و ۷/۷ خطر افزایش یافته‌ای برای ابتلا به سرطان پستان دارند. بنابراین ممکن است این تکرار آلی بتواند به عنوان یک مارکر پیش‌آگاهی سرطان پستان مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر این، در مطالعه‌ی حاضر هیچ ارتباطی بین این ژنوتیپ‌ها با درجه‌ی پیشرفت بیماری و وضعیت بیان گیرنده‌های استروژن، پروژسترون و Her2 و سن مشاهده نشد.

Kamat و همکاران نشان دادند که شیمی درمانی بر p53 تأثیر گذاشته، سبب تغییر این ژن در سرطان پستان می‌شود (۳۰).

پلی مورفیسم توالی تکراری TAAAA در منطقه پروموتوری ژن لیوپروتئین a [LP(a)] نیز مشاهده شده است (۳۳-۳۱). این پلی مورفیسم با افزایش فعالیت رونویسی و افزایش سطح پلاسمایی لیوپروتئین a مرتبط می‌باشد. بین تکرارهای پنج‌تایی لیوپروتئین a و سطح این پروتئین ارتباط معکوسی وجود دارد. اندازه‌ی آلل‌ها و فراوانی تکرارهای TAAAA در مطالعه حاضر با مطالعه‌ی انجام شده برای ژن لیوپروتئین a مشابه می‌باشد، اما در مطالعه ما آلل ۱۱ تکرار مشاهده نشد.

در تحقیق حاضر پنج آلل مختلف برای تکرار TAAAA واقع در اینترون شماره ۱ ژن p53 در محدوده‌ی ۶ تا ۱۰ تکرار در افراد شاهد و مبتلایان به سرطان پستان مشاهده شد. از بین این آلل‌ها، آلل ۸ تکرار TAAAA شایع‌ترین آلل ژن p53 در بین بیماران (۵۸/۰۰ درصد) و افراد شاهد (۶۰/۷۵ درصد) بود. در کل افراد مورد مطالعه، ۱۱ ترکیب آلی (ژنوتیپ) مختلف برای ژن p53 مشاهده شد. نتایج بررسی ژنوتیپ‌های مختلف ژن p53 نشان داد که فراوان‌ترین ژنوتیپ موجود در هر دو گروه بیمار (۳۵/۰ درصد) و شاهد (۳۲/۵ درصد) متعلق به ژنوتیپ ۸/۸ می‌باشد.

ژنوتیپ‌های هتروزیگوت ۶/۷، ۶/۸ و هموزیگوت ۷/۷ دارای فراوانی بسیار متفاوتی در بین دو گروه بیمار (۸/۵ درصد) و شاهد (۲ درصد) بودند. بر اساس آزمون‌های آماری، سطح معنی‌داری  $P = ۰/۰۰۳$  و  $OR = ۴/۵۵$  وجود ارتباط ژنوتیپ‌های هتروزیگوت ۶/۷، ۶/۸ و هموزیگوت ۷/۷ با خطر ابتلا به سرطان پستان را اثبات می‌کند.

## تشکر و قدردانی

از حمایت‌های مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری

دانشگاه اصفهان جهت انجام پژوهش حاضر، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

## References

- Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med* 2005; 9(1): 208-21.
- Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J* 2007; 13(4): 383-91.
- Yavari P, Mosavizadeh M, Sadrol-Hefazi B, Mehrabi Y. Reproductive characteristics and the risk of breast cancer--a case-control study in Iran. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2004;6(3):370-5.
- Kress M, May E, Cassingena R, May P. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* 1979; 31(2): 472-83.
- DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(5): 2420-4.
- Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; 278(5701): 261-3.
- Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979; 17(1): 43-52.
- Melero JA, Stitt DT, Mangel WF, Carroll RB. Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells. *Virology* 1979; 93(2): 466-80.
- Smith AE, Smith R, Paucha E. Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by simian virus 40. *Cell* 1979; 18(2): 335-46.
- Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 1984; 312(5995): 646-9.
- Knudson AG, Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 1985; 45(4): 1437-43.
- Lane DP, Benchimol S. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev* 1990; 4(1): 1-8.
- Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358(6381): 80-3.
- Baumann K. Cell death: multitasking p53 promotes necrosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13(8): 480-1.
- Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(5): 402-12.
- Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(4): 275-83.
- Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 2003; 10(4): 431-42.
- Soussi T, Caron de FC, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 1990; 5(7): 945-52.
- Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 2000; 77: 81-137.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994; 265(5170): 346-55.
- Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 2007; 28(6): 622-9.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215.
- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989; 342(6250): 705-8.
- Chen F, Wang W, El-Deiry WS. Current strategies to target p53 in cancer. *Biochem Pharmacol*. 2010;80(5):724-30.
- Ziyaie D, Hupp TR, Thompson AM. P53 and breast cancer. *Breast* 2000; 9(5): 239-46.
- Dumay A, Feugeas JP, Wittmer E, Lehmann-Che J, Bertheau P, Espie M, et al. Distinct tumor protein p53 mutants in breast cancer subgroups. *Int J Cancer* 2013; 132(5): 1227-31.
- Bailey ST, Shin H, Westerling T, Liu XS, Brown M. Estrogen receptor prevents p53-



- dependent apoptosis in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(44): 18060-5.
28. Thompson AM, Anderson TJ, Condie A, Prosser J, Chetty U, Carter DC, et al. p53 allele losses, mutations and expression in breast cancer and their relationship to clinico-pathological parameters. *Int J Cancer* 1992; 50(4): 528-32.
29. Deng G, Chen LC, Schott DR, Thor A, Bhargava V, Ljung BM, et al. Loss of heterozygosity and p53 gene mutations in breast cancer. *Cancer Res* 1994; 54(2): 499-505.
30. Kamat N, Khidhir MA, Jaloudi M, Hussain S, Alashari MM, Al Qawasmeh KH, et al. High incidence of microsatellite instability and loss of heterozygosity in three loci in breast cancer patients receiving chemotherapy: a prospective study. *BMC Cancer* 2012; 12: 373.
31. Nascimento H, Silva L, Lourenco P, Vieira E, Dos SR, Rego C, et al. Lipoprotein(a) levels in obese Portuguese children and adolescents: contribution of the pentanucleotide repeat (TTTTA)<sub>n</sub> polymorphism in the apolipoprotein(a) gene. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2009; 163(4): 393-4.
32. Trommsdorff M, Kochl S, Lingenhel A, Kronenberg F, Delpont R, Vermaak H, et al. A pentanucleotide repeat polymorphism in the 5' control region of the apolipoprotein(a) gene is associated with lipoprotein(a) plasma concentrations in Caucasians. *J Clin Invest* 1995; 96(1): 150-7.
33. Berglund L, Ramakrishnan R. Lipoprotein(a): an elusive cardiovascular risk factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(12): 2219-26.
34. Gebhardt F, Zanker KS, Brandt B. Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biol Chem* 1999; 274(19): 13176-80.
35. Agarwal AK, Giacchetti G, Lavery G, Nikkila H, Palermo M, Ricketts M, et al. CA-Repeat polymorphism in intron 1 of HSD11B2: effects on gene expression and salt sensitivity. *Hypertension* 2000; 36(2): 187-94.
36. Suzuki M, Kageyama S, Shinmura K, Okudela K, Bunai T, Nagura K, et al. Inverse relationship between the length of the EGFR CA repeat polymorphism in lung carcinoma and protein expression of EGFR in the carcinoma. *J Surg Oncol* 2008; 98(6): 457-61.
37. Sharma VK, Kumar N, Brahmachari SK, Ramachandran S. Abundance of dinucleotide repeats and gene expression are inversely correlated: a role for gene function in addition to intron length. *Physiol Genomics* 2007; 31(1): 96-103.
38. Hui J, Reither G, Bindereif A. Novel functional role of CA repeats and hnRNP L in RNA stability. *RNA* 2003; 9(8): 931-6.
39. Hui J, Stangl K, Lane WS, Bindereif A. HnRNP L stimulates splicing of the eNOS gene by binding to variable-length CA repeats. *Nat Struct Biol* 2003; 10(1): 33-7.

## The Study of TAAAA Polymorphism in p53 Gene and Its Association with Breast Cancer

Somaye Najafi-Dorche<sup>1</sup>, Manoochehr Tavassoli PhD<sup>2</sup>, Simin Hemati MD<sup>3</sup>,  
Forouzan Safari MSc<sup>4</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Genetic alternation in p53 gene is associated with tumorigenesis, especially in breast, colon and lung tumors. Somatic mutation of the p53 gene is the most common genetic alteration seen in human cancers. To our knowledge, before this research, there was no study on the relationship of TAAAA repeat in the first intron of p53 gene and cancer risk. The purpose of this study was to investigate the polymorphism of TAAAA in the first intron of p53 gene among patients with breast cancer and healthy individuals and its relation to risk of breast cancer.

**Methods:** Peripheral blood samples were collected from 200 women with breast cancer and 200 healthy women. After DNA extraction from peripheral blood samples via salting out method and amplification of desired sequence via polymerase chain reaction (PCR), the number of TAAAA repeats was determined using polyacrylamide gel electrophoresis and direct sequencing.

**Findings:** Five different length of TAAAA repeat in the range of 6-10 and 11 allele combinations (genotypes) were observed among patients and controls. The most frequent allele in both patients and controls was the 8-TAAAA repeat. Women who were homozygous for (TAAAA)7 or heterozygous for (TAAAA)6 were at higher risk of developing breast cancer. The allelic length of p53 polymorphisms had no significant effect on the metastasis, the expression of estrogen receptors, progesterone receptors and ErbB2 (HER2) and age of the onset.

**Conclusion:** Our study shows strong association between the TAAAA repeat polymorphism in p53 gene and risk of breast cancer. On the other hand, women who are homozygous for (TAAAA)7 or heterozygous for (TAAAA)6 are at higher risk of developing breast cancer.

**Keywords:** p53, Breast cancer, TAAAA repeat, Polymorphism

**Citation:** Najafi-Dorche S, Tavassoli M, Hemati S, Safari F. **The Study of TAAAA Polymorphism in p53 Gene and Its Association with Breast Cancer.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(323): 134-43

1- MSc Student, Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Radiotherapy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Manoochehr Tavassoli PhD, Email: manoochehr@biol.ui.ac.ir