

بررسی ارتباط جهش اکسون ۶ ژن P53 با بیان پروتئین و پیش آگهی بیماری در نمونه‌های سرطانی کولورکتال با روش SSCP و ایمونوهیستوشیمی

دکتر رحیم گل محمدی^۱، دکتر مهدی نیکبخت^۲

^۱ استادیار آناتومی، گروه علوم پایه، دانشکده علوم پزشکی سبزوار

^۲ استادیار گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

نویسنده مسؤول: دکتر رحیم گل محمدی. نشانی: سبزوار، جنب پلیس راه، دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار

E-mail: rahimgolmohammadi@yahoo.com

وصول: ۸۵/۱/۱۶، اصلاح: ۸۵/۲/۱۰، پذیرش: ۸۵/۳/۹

چکیده

زمینه و هدف: سرطان کولورکتال یکی از مهم‌ترین سرطان‌های شایع جهان می‌باشد. میزان شیوع سرطان کولورکتال بسته به ناحیه جغرافیایی متفاوت می‌باشد. در سرطان کولورکتال عوامل مختلف محیطی، ژنتیکی و عادت‌های غذایی نقش دارند. ژن P53 مهم‌ترین ژن مهارکننده تومور می‌باشد، میزان موتاسیون اکسون ۶ ژن P53 با بیان پروتئین فوق در نمونه‌های سرطانی کولورکتال در نواحی مختلف، متفاوت گزارش شده است. هدف از این مطالعه تعیین ارتباط جهش اکسون ۶ ژن P53 با بیان پروتئین و پیش آگهی بیماری در سرطان کولورکتال می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی ۸۰ نمونه سرطانی کولورکتال انجام شد که طی سال‌های ۱۳۸۲ تا ۱۳۸۵ به بیمارستان‌های شهر اصفهان مراجعه کرده بودند. DNA نمونه‌ها با روش فنل کلروفرم، ایزوآمیل الکل در بخش ژنتیک دانشکده پزشکی اصفهان استخراج گردید و اکسون ۶ ژن P53 با PCR تکثیر گردید و متعاقب الکتروفورز افقی با روش SSCP موتاسیون اکسون ۶ تعیین شد. بیان پروتئین P53 با روش ایمونوهیستوشیمی در نمونه‌های فوق مشخص شد. داده‌ها با آزمون مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: از ۸۰ نمونه مورد مطالعه در ۱۲ نمونه (۱۵ درصد) جهش وجود داشت که ۱۰ نمونه از جهش‌ها با بیان پروتئین همراه بود. بین جهش اکسون ۶ ژن P53 با بیان پروتئین P53 ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.001$). ولی بین جهش و Stage تومور ارتباط معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$).

نتیجه‌گیری: مطالعه نشان می‌دهد که تمام جهش‌های اکسون ۶ ژن P53 با بیان پروتئین P53 همراه نمی‌باشند. بنابراین، روش PCR-SSCP یا Sequencing در کنار ایمونوهیستوشیمی برای تشخیص جهش لازم و ضروری می‌باشد. (مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره ۱۳/ شماره ۱/ صص ۱۳-۷).

واژه‌های کلیدی: سرطان کولورکتال؛ جهش؛ P53؛ پیش آگهی.

مقدمه

سرطان کولورکتال یکی از مهم‌ترین تومورهای بدخیم در دنیا است و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان در غرب می‌باشد (۲،۱). در سرطان کولورکتال عوامل متعددی از جمله عادات غذایی، توارث، مواد شیمیایی، استرس‌های روحی و عصبی و محیط جغرافیایی دخیل می‌باشند (۷-۳). اکثر تومورهای کولورکتال را آدنوکارسینوما تشکیل می‌دهند که به اشکال مختلفی از جمله موسینی و اسکوآموسی دیده می‌شوند (۸). کروموزوم ۱۷ در اکثر موارد در سرطان کولورکتال درگیر می‌شود که بر روی بازوی کوتاه این کروموزوم ژن P53 قرار دارد (۹،۱۰،۳). محصول این ژن یک فسفوپروتئین هسته‌ای است که از ۳۹۳ اسید آمینه تشکیل شده است.

فسفوپروتئین هسته‌ای سه ناحیه (Domain) اصلی دارد. بخش N ترمینال پروتئین P53 نقش یک activator را دارد؛ بخش C ترمینال آن عمل regulator را دارد و بخش مرکزی (DNA binding domain) مهم‌ترین بخش پروتئین است که نقش سرکوب‌کنندگی تومور را به عهده دارد (۱۱،۱۲). در اکثر موارد، جهش ژن P53 در این قسمت اتفاق می‌افتد که توسط اکسون ۵ تا ۸ ژن P53 نسخه‌برداری می‌شود (۱۳). اکسون ۶ بخشی از این ناحیه است که در نمونه‌های سرطانی کولورکتال میزان جهش آن در نواحی مختلف جغرافیایی از جمله ژاپن، ایرلند و شیلی، متفاوت گزارش شده است (۱۴،۱۵،۱۶). اهمیت روزافزون این سرطان از دید مولکولی جهت تشخیص، پیگیری و درمان‌های نوین لازم و ضروری می‌باشد، خصوصاً این‌که با جهش ژن P53 که مهم‌ترین مهارکننده تومور است، همراه باشد. تمام جهش‌های این ژن خصوصاً اکسون ۶ آن به خاطر عدم پایداری پروتئین P53 با روش ایمونوهیستوشیمی مشخص نمی‌شود (۱۷،۱۸). هدف ما در این مطالعه تعیین ارتباط جهش اکسون ۶ ژن P53 با بیان پروتئین و پیش آگهی بیماری در سرطان کولورکتال می‌باشد.

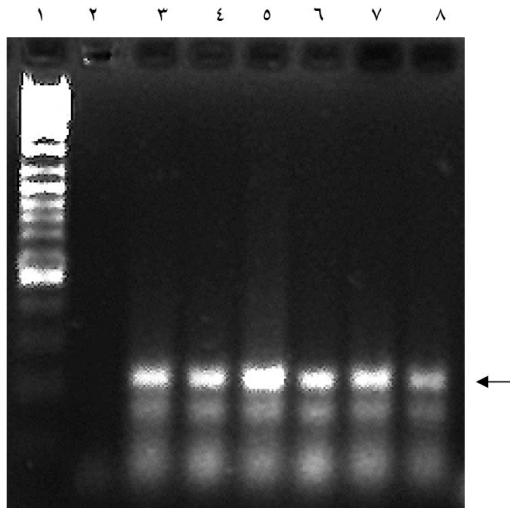
مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی و تحلیلی، بر روی ۸۰ نمونه سرطان کولورکتال انجام گرفته است که طی سال‌های ۱۳۸۲ تا ۱۳۸۵ به بیمارستان‌های شهر اصفهان جهت جراحی مراجعه کرده بودند. DNA نمونه‌ها به ترتیب ذیل استخراج گردید: حدود ۲۵ میلی‌گرم از ناحیه مبتلا به سرطان به طور دقیق با ترازوی الکتریکی وزن شد و در داخل اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری استریل قرار داده شد و همین مقدار نیز از ناحیه سالم بافت مجاور به طور جداگانه برداشت شد و در داخل اپندورف استریل دیگری قرار داده شد. با استفاده از بافرهای تجزیه TEN، آنزیم پروتئیناز K ۱۰ میلی‌مولار، تریس اسید کلریدریک، EDTA نیم مولار، NaCl، SDS ۲ درصد (Merk) و درجه حرارت ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت، بافت هضم شد. DNA با روش فنل، فنل کلروفرم، ایزوآمیل الکل (۱،۲۵،۲۴) و کلروفرم استخراج شد، سپس با اتانول DNA رسوب داده شده و در آب مقطر دو بار تقطیر شده نگهداری شد. در این مطالعه از دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار اپندورف با قدرت 12000g برای جدا کردن پروتئین‌ها و رسوب دادن DNA استفاده شد. با اسپکتروفتومتر غلظت DNA و میزان خلوص آن اندازه‌گیری شد و DNA در فریزر در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شد (۱۹،۱۵).

روش‌های PCR-SSCP

الف- PCR (Polymerase Chain Reaction- Single strand conformation polymorphism): یک و نیم میکرولیتر از DNA استخراج شده که حدود ۵۰ نانوگرم بود، همراه با ۲/۵ میکرولیتر از ۱۰x buffer با غلظت‌های متفاوت ۲ تا ۳ میکرولیتری از $MgCl_2$ ۲۵ میلی‌مولار با ۱/۵ میکرولیتر $dNTP$ ۵ میلی‌مولار و ۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse با غلظت‌های ۵ میلی-مولار و توالی زیر

F: 5'-GTCCCCAGGCTCTGATTC-3'
R: 5'-CAGAGACCCTCCTCCCAA-3'



تصویر ۱: الکتروفورز حاصل از تکثیر اکسون ۶ ژن p53 در نمونه‌های سرطانی کولورکتال در ژل آگاروز ۲ درصد (پیکان باند مورد نظر را نشان می‌دهد)

شماره ۱: استاندارد وزن مولکولی

شماره ۲: کنترل منفی

شماره ۳: نمونه سالم

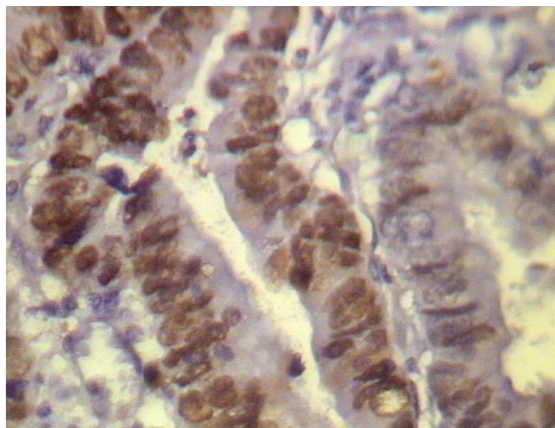
شماره ۴ تا ۸: نمونه‌های مربوط به سرطان کولورکتال

روش PCR-SSCP یک روش سریع و حساس برای تعیین موتاسیون می‌باشد (۲۱، ۲۰). طبق مطالعات انجام شده، این روش برای تعیین موتاسیون نسبت به روش تعیین توالی حساس‌تر می‌باشد (۲۳-۲۱). در این مطالعه ما از ژل آکرل امید ۱۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد بیس آکریل امید TBE buffer ۱۰x و آمونیوم پرسولفات (Merk) که رادیکال‌هایی آزاد را در ژل موجب می‌شود توأم با Temed استفاده شد که نقش کاتالیزور را در پلیمریزاسیون آکریل امید و بیس آکریل امید دارد. ژل را به مدت ۱/۵ ساعت برای پلیمریزه شدن در فضای اتاق قرار دادیم. سپس ۸ میکرولیتر از محصول PCR با ۴ میکرولیتر از Lodying dye مخلوط و با استفاده از درجه حرارت ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه DNA به صورت تک‌رشته‌ای درآورده شد. سپس بر روی ظرف یخ منتقل و پس از سه دقیقه در چاهک‌های ژل قرار داده شد. تانک به دستگاه الکتروفورز وصل گردید و در طول یک شب در اتاقک سرد با درجه ۴ درجه سلسیوس با ولتاژ ۶۰ و ۶ میلی‌آمپر

(از شرکت HPSF Biotech آلمان سفارش فرآیند دانش) (۱۹)، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase به میکروتیوب استریل افزوده شد و با آب مقطر دو بار تقطیر شده، حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس با استفاده از دستگاه ترموسیکلر Biored Mycycler^{USA} اکسون ۶ ژن P53 متعاقب بهینه‌سازی شرایط مطلوب برای PCR از نظر گرادیانت درجه حرارتی، غلظت DNA، پرایمر، کلرید منیزیم و زمان، اکسون ۶ ژن P53 تکثیر گردید. بهترین شرایط به شرح ذیل به دست آمد: سیکل اول با دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و ۴۰ سیکل بعدی با درجه حرارت ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه و درجه اتصالی پرایمر به DNA ۵۵ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و گسترش (extension) در درجه حرارت ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و یک سیکل نهایی با درجه حرارت ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ده دقیقه انجام شد. پس از تکثیر، محصول PCR در یخچال قرار داده شد. شش میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر از Loading dye مخلوط گردید و سپس در چاهک‌های ژل ۲ درصد آگارز قرار داده شد. از Ethidium bromide برای رنگ‌آمیزی DNA استفاده گردید، الکتروفورز به مدت ۹۰ دقیقه و با ولتاژ ۸۰ جهت قطعات تکثیر شده استفاده شد. پس از قرار دادن ژل در آب مقطر عمل عکسبرداری انجام شد. از نمونه کنترل منفی جهت تعیین آلودگی نیز استفاده شد. این نمونه حاوی تمام مواد لازم برای تکثیر ژن به جز DNA بود (شکل ۱) (۱۵).

ب- روش (SSCP Single strand conformation polymorphism): در این روش DNA با حرارت یا مواد شیمیایی به صورت تک رشته‌ای درمی‌آید، از آنجا که DNA در موتاسیون‌ها تغییر شکل فضایی می‌دهد، این تغییر در ژل آکرل امید با جابجایی باند (Abnormaly migrating bands) همراه می‌شود که می‌توان آن را با نمونه سالم از همان بافت مشخص نمود.

یا سلولی مشخص نمود. این تکنیک بر پایه شناسایی کمپلکس آنتی‌ژن و آنتی‌بادی صورت می‌گیرد. بلافاصله نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد جهت ثابت شدن قرار داده شدند. پاساژ باقی بوسیله دستگاه Tissue processing انجام شد. مقاطع ۵ میکرونی از تمام بلوک‌های پارافینی با میکروتوم چرخشی تهیه شد. عمل ماسک‌زدایی پس از پارافین‌زدایی با دستگاه ماکروویو انجام شد (۲۴،۲۵). از آنتی‌بادی مخصوص P53 که با پروتئین P53 باند می‌شود، استفاده شد. لام‌ها با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند (شکل ۳). با استفاده از نرم‌افزار SPSS، آزمون مجذور کای جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.



تصویر ۲: بیان پروتئین P53 در سلول‌های سرطانی بافت روده بزرگ با روش ایمونوهیستوشیمی (بزرگ‌نمایی ۴۰۰)

در ژل اکریل امید انجام شد. روز بعد ژل به آهستگی از تانک خارج و با اسید استیک ده درصد به مدت ۲۰ دقیقه مجاورت داده شد و پس از شستشو با آب مقطر با نیترات نقره ۰/۱ درصد (Merk) در تاریکی ژل رنگ‌آمیزی شد، در پایان با محلول ظهور ۳ درصد (بی‌کربنات سدیم، تیوسولفات سدیم و فرمالدئید ۳۷ درصد) (Merk) باندها ظاهر شد و متعاقب آن ژل در اسید استیک ۱۰ درصد ثابت و از آن عکس تهیه گردید (شکل ۲) (۱۷،۲۲).



تصویر ۲: SSCP اکسون ۶ ژن P53 در نمونه‌های مبتلابه سرطان کولورکتال پیکان باند جابجا شده را نشان می‌دهد
N: Normal Nc: Negative control C: cancer

ایمونوهیستوشیمی

ایمونوهیستوشیمی یک روش میکروسکوپی است که با کمک آن می‌توان محل آنتی‌ژن را در نمونه‌های بافتی

یافته‌ها

از ۸۰ نمونه سرطانی کولورکتال مورد مطالعه در

جدول شماره ۱: نتایج حاصل از جهش اکسون ۶ ژن P53 در سرطان‌های کولورکتال با بیان پروتئین

P	فراوانی		تعداد کل	متغیر
	عدم حضور جهش P53	حضور جهش P53		
p= ۰/۰۱	۴۸	۸	۵۶	جنس
	۲۰	۴	۲۴	مرد
p= ۰/۱۱	۳۰	۵	۳۵	سن
	۳۸	۷	۴۵	< ۶۰
p< ۰/۰۰۱	۵۸	۱۰	۶۸	محل تومور
	۱۰	۲	۱۲	کولون
p< ۰/۰۰۱	۷۰	۱۰	۸۰	بیان پروتئین
				رکتوم
				روده بزرگ

این پژوهش در ۱۲ نمونه (۱۵ درصد) در اکسون ۶، جهش مشاهده شد که ۸ نمونه آن مذکر و ۴ مورد مؤنث بودند. از ۱۲ مورد جهش در اکسون ۶، تعداد ۱۰ مورد در کولون و ۲ مورد در رکتوم قرار داشتند. توزیع جهش‌ها در روده بزرگ به ترتیب زیر بود: ۵ مورد در بخش سکوم و کولون صعودی، یک مورد در کولون نزولی، ۴ مورد در کولون سیگموئید. در ۱۰ مورد از نمونه‌های که جهش داشتند، بیان پروتئین مثبت بود. در حالی که در ۲ مورد از جهش‌ها بیان پروتئین منفی بود. بین جهش اکسون ۶ با بیان پروتئین P53 ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p < 0/001$). بین Stage، سن و جنس با جهش اکسون ۶ ژن P53 ارتباط معنی‌داری وجود نداشت. ($P > 0/05$) جدول (۱).

بحث

این مطالعه که بر روی نمونه‌های سرطان کولورکتال در ناحیه اصفهان انجام شده است در ۱۲ نمونه (۱۵ درصد) جهش اکسون ۶ ژن P53 مشاهده شد که ۱۰ مورد آن با بیان پروتئین P53 همراه بود، ولی در ۲ مورد که جهش وجود داشت، بیان پروتئین منفی بود. میزان جهش در این اکسون در مقایسه با مطالعات مشابه انجام شده توسط محققین چون لیهی، یاماشیتا و همکارانشان از ایرلند و ژاپن بیشتر می‌باشد (۱۵، ۱۴).

در ایرلند از ۶۶ نمونه مورد مطالعه، جهش اکسون ۶ در ۶ مورد گزارش شده است (۱۵). در حالی که در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۰ میلادی در ژاپن انجام شد، در یک مورد از ۲۰ مورد (۵ درصد) در اکسون ۶ جهش دیده شده (۱۴). در مطالعه‌ای که در کشور شیلی انجام شد، در ۱۲ مورد از ۴۲ نمونه (۲۹ درصد) موتاسیون اکسون ۶ در سرطان کولورکتال گزارش شد که در مقایسه با مطالعه حاضر ما میزان جهش بیشتر می‌باشد (۱۶). در مطالعه‌ای که توسط کولومر و همکارانش (۲۰۰۳) در اسپانیا انجام شد، در ۲۹ نمونه از ۱۰۰ مورد، بیان پروتئین نداشتند و در

۱۵ مورد از نمونه‌های فوق با روش PCR-SSCP باندهای جابجا شده (Mutation) مشخص شد (۱۷). در مطالعه دیگری که توسط Roa و همکارانش در کشور شیلی بر روی ۳۵ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال انجام شد، ۲۱ مورد جهش داشتند که ۱۸ نمونه آن با بیان پروتئین همراه بود، ولی ۳ مورد از نمونه‌های دارای که جهش، بیان پروتئین در آن‌ها منفی بود که تقریباً شبیه مطالعه حاضر می‌باشد (۱۶).

طول بقاء در بیماران با موتاسیون کمتر از بیمارانی است که جهش ندارند (۲۶، ۲۷)، طول بقاء در بیماران همراه با جهش در این اکسون کمتر از بیمارانی بود که جهش نداشتند. نتیجه می‌گیریم که میزان موتاسیون اکسون ۶ ژن P53 در نواحی مختلف جهان متفاوت است. اما تفسیر ما در مورد عدم بیان پروتئین P53 در نمونه مورد مطالعه این است که Stop codon به جای کدون‌های اصلی قرار گرفته و از تولید پروتئین جلوگیری نموده است. یا این که یک پروتئین ناقص تشکیل شده است که قادر به عبور از سیتوپلاسم به هسته نمی‌باشد زیرا پروتئین P53 یک فسفو پروتئین هسته‌ای است که اعمال مختلف خود را در هسته با اتصال به DNA انجام می‌دهد. در بعضی حالت‌ها موتاسیون وجود دارد ولی بیان پروتئین با روش ایمونوهیستوشیمی به خاطر عدم تشکیل پروتئین قابل شناسایی نمی‌باشد. بنابراین روش PCR-SSCP یا Sequencing در کنار ایمونوهیستوشیمی برای تشخیص جهش لازم و ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از پاتولوژیست محترم آقای دکتر محمدرضا مهاجری، آقای کرمی کارشناس اتاق عمل بیمارستان الزهرا (س) و کارشناس آزمایشگاه خانم محمودی تشکر می‌نمایم.

References

1. Johnston PG, Allegra CJ. Colorectal cancer biology: clinical implications. *Semin Oncol.* 1995 Oct; 22(5): 418-32.
2. Jin W, Gao MQ, Lin ZW, Yang DX. Multiple biomarkers of colorectal tumor in a differential diagnosis model: a quantitative study. *World J Gastroenterol.* 2004 Feb 1; 10(3): 439-42.
3. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, Garner RC, Steele RJ, Wolf CR. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative netic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002 Jul 9; 99(14): 9433-8.
4. Tang R, Wang PF, Wang HC, Wang JY, Hsieh LL. Mutations of p53 gene in human colorectal cancer: distinct frameshifts among populations. *Int J Cancer.* 2001 Mar 15; 91(6): 863-8.
5. Lipkin M, Reddy B, Newmark H, Lamprecht SA. Dietary factors in human colorectal cancer. *Annu Rev Nutr.* 1999; 19: 545-86.
6. Sandler RS. Epidemiology and risk factors for colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 1996 Dec; 25(4): 717-35.
7. Soussi T. The p53 tumour suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. *Mol Med Today.* 1996 Jan; 2(1): 32-7.
8. DeVita, JR, Samuel Hellman, Steven A. Rosenberg Cancer, principles and practice of oncology/edited by Vincent T.; 319 contributing authors 6th ed Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, c2001; 1216-1312.
9. Goi T, Takeuchi K, Katayama K, Hirose K, Yamaguchi A. Mutations of rabphilin-3A-like gene in colorectal cancers. *Oncol Rep.* 2002 Nov-Dec; 9(6): 1189-92.
10. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 1990 Dec 1; 50(23): 7717-22.
11. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2004 Apr; 25(4): 177-81.
12. Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene.* 2001 Oct 17; 277(1-2): 15-30.
13. Tullo A, D'Erchia AM, Honda K, Mitry RR, Kelly MD, Habib NA, Saccone C, Sbisà E. Characterization of p53 mutations in colorectal liver metastases and correlation with clinical parameters. *Clin Cancer Res.* 1999 Nov; 5(11): 3523-8.
14. Yamashita K, Yoshida T, Shinoda H, Okayasu I. Novel method for multianalytic analysis of p53 and K-ras mutations and p53 protein expression in single histologic sections. *Arch Pathol Lab Med.* 2001 Mar; 125(3): 347-52.
15. Leahy DT, Salman R, Mulcahy H, Sheahan K, O'Donoghue DP, Parfrey NA. Prognostic significance of p53 abnormalities in colorectal carcinoma detected by PCR-SSCP and immunohistochemical analysis. *J Pathol.* 1996 Dec; 180(4): 364-70.
16. Roa JC, Roa I, Melo A, Araya JC, Villaseca MA, Flores M, Schneider B. p53 gene mutation in cancer of the colon and rectum. *Rev Med Chil.* 2000 Sep; 128(9): 996-1004.
17. Colomer A, Erill N, Verdu M, Roman R, Vidal A, Cordon-Cardo C, Puig X. Lack of p53 nuclear immunostaining is not indicative of absence of TP53 gene mutations in colorectal adenocarcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2003 Jun; 11(2): 130-137.
18. Cripps KJ, Purdie CA, Carder PJ, White S, Komine K, Bird CC, Wyllie AH. A study of stabilisation of p53 protein versus point mutation in colorectal carcinoma. *Oncogene.* 1994 Sep; 9(9): 2739-43.
19. Jansson A, Gentile M, Sun XF. p53 Mutations are present in colorectal cancer with cytoplasmic p53 accumulation. *Int J Cancer.* 2001 May 1; 92(3): 338-41.

20. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*. 1993 May; 16(2): 325-32.
21. M. Schmitz I, Kayser M, Pauly P, Lagoda, Ö, Türeci, J, Weber, A, Kerschen, F, Ries and M. Dicato PCR-SSCP a sensitive and rapid method to detect mutations in the P53 tumor suppressor gene of patients with advanced colorectal cancer *European Journal of Cancer*, Volume 31, Supplement 6, November 1995, P.S96.
22. Chaubert P, Bautista D, Benhattar J. An improved method for rapid screening of DNA mutations by no radioactive single-strand conformation polymorphism procedure. *Biotechniques*. 1993 Oct; 15(4): 586.
23. Welsh JA, Castren K, Vahakangas KH. Single-strand conformation polymorphism analysis to detect p53 mutations: characterization and development of controls. *Clin Chem*. 1997 Dec; 43(12): 2251-5.
24. Shan-Rong Shi, Richard J, Cote and Clive R. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *The J of Histochem and Cytochem* 1997; 43(3); 327-343.
25. Billie JO, Kerns M, Patrick A, et al. P53 Over expression in formalin-fix, Paraffin-embedded Tissue Detected by Immunohistochemistry. *The J of Histochem and Cytochem*, 1992; 40(7): 1047-51.
26. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N; TP53-CRCCollaborative Study Group. The P53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol*. 2005 Oct 20; 23(30): 7518-28.
27. Bosari S, Viale G, Roncalli M, Graziani D, Borsani G, Lee AK, Coggi G. p53 gene mutations, p53 protein accumulation and compartmentalization in colorectal adenocarcinoma. *Am J Pathol*. 1995 Sep; 147(3): 790-8.