

جهش در اگزون‌های پنج تا هشت ژن *TP53* در بیماران آذری مبتلا به سرطان تیروئید تک‌گیرناصر پولادی<sup>۱\*</sup>، محمدعلی حسین‌پور فیضی<sup>۲</sup>

۱. استادیار، گروه زیست‌سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران  
 ۲. استاد، گروه زیست‌جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

## چکیده

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۱/۲۰  
 تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۹/۰۶

**سابقه و هدف** سرطان تیروئید شایع‌ترین بدخیمی سیستم اندوکرینی است. این سرطان در هر سن و جنس ممکن است رخ دهد. از مهم‌ترین ژن‌های سرکوبگر درگیر در سرطان، ژن *TP53* است. این ژن در تنظیم و توقف چرخه سلولی و آپوپتوز نقش مهمی دارد. جهش‌هایی که سبب غیرفعال شدن ژن *TP53* می‌شود در بیش از ۵۰ درصد بدخیمی‌های انسان دیده می‌شود. هدف از این تحقیق، تعیین جهش‌های ژن *TP53* در مبتلایان به سرطان تیروئید در جمعیت استان آذربایجان شرقی بود.

**مواد و روش‌ها** در این مطالعه توصیفی، تعداد ۴۰ نمونه توموری از بیماران آذری مبتلا به سرطان تیروئید طی سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۸ که به بیمارستان‌های شهر تبریز مراجعه کرده بودند جمع‌آوری و DNA آن‌ها به روش پروتئیناز K استخراج شد. جهش‌های ژن *TP53* در اگزون‌های پنج تا هشت با واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و توالی‌یابی مستقیم بررسی شد.

**یافته‌ها** نتایج حاصل وجود ۱۲/۵ درصد تغییرات ژنتیکی را در بیماران نشان می‌دهد که مربوط به جهش‌ها و پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی است. جهش در Codon216 (GTG>GTA)، Codon215 (AGT>ATT) و Codon273 (CGT>CAT) هر کدام در یکی از بیماران و دو پلی‌مورفیسم 14181C>T و 14201T>G در اینترون هفت به‌طور پیوسته در دو نمونه دیگر شناسایی شد.

**بحث** این نتایج تا حدی وضعیت جهش‌های ژن *TP53* را در بین مبتلایان تیروئید آذری روشن ساخت و مسیر را برای مطالعات بعدی فراهم می‌سازد.

## کلیدواژه‌ها:

تیروئید، جهش، سرطان، *TP53*.

## مقدمه

مطالعه بنیاد سرطان ایران نشان داده است که ۱/۸ درصد همه سرطان‌ها و ۷۶/۱ درصد سرطان‌های اندوکرین را نئوپلاسمی غده تیروئید تشکیل می‌دهد [۳]. مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان‌دهنده افزایش پایدار شیوع سرطان تیروئید، به‌ویژه متداول‌ترین نوع آن یعنی پاپیلاری کارسینوما، در بسیاری از کشورهای دنیاست [۴]. میزان رخداد سرطان تیروئید در کشورهای مختلف متفاوت است. تفاوت در شرایط محیطی و تنوع ژنتیکی از عوامل اصلی بروز متفاوت در مناطق

سرطان تیروئید شایع‌ترین بدخیمی سیستم اندوکرینی است که حدود ۱ درصد سرطان‌های بدخیم را تشکیل می‌دهد [۱]. میزان شیوع این سرطان بسته به شرایط جغرافیایی، محیطی و نژادی متغیر است. شیوع آن در ایسلند و هاوایی دو برابر کشورهای اروپای شمالی، کانادا و ایالات متحده است. این سرطان میان اقوام مختلف ساکن در هاوایی، مردان چینی و زنان فیلیپینی رایج‌تر است [۲].

\* نویسنده مسئول: ناصر پولادی

نشانی: گروه زیست‌سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

تلفن: ۰۴۱۱۳۳۳۶۲۲۸۰ - دورنگار: -

رایانه: srna52@gmail.com

شناسه ORCID: 0000-0001-8125-5352

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۵، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۷، ص  
 آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir  
 شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

عوامل جهش‌زای مؤثری را در جمعیت زنان آذری نشان می‌دهد. ناهمگنی محسوس بیماری سرطان پستان و ریسک‌فاکتورهای آن، جدایی جغرافیایی و قومیتی جمعیت مورد مطالعه از دلایل این تفاوت‌هاست [۱۳].

مطالعه دیگر ما نقش هاپلوتایپ‌های ژن p53 را در ریسک‌پذیری بیماران آذری مبتلا به سرطان تیروئید روشن کرد [۱۵، ۱۶]. با توجه به اینکه بیش از ۹۰ درصد جهش‌ها در ناحیه اتصال به DNA این پروتئین (کدشده با اگزون‌های پنج تا هشت) رخ می‌دهد [۱۳]، پژوهش حاضر، به منظور شناسایی نوع و فراوانی جهش‌های این ژن در اگزون‌های پنج تا هشت به همراه اینترون‌های پنج و هفت در مبتلایان به سرطان تیروئید در منطقه آذربایجان شرقی طراحی شد تا الگوی از پراکندگی جهش‌ها در این بیماران به دست آید. همچنین، به دلیل تعداد کم مطالعات روی جهش‌های ژن TP53 در سرطان تیروئید، این مطالعه داده‌های جدیدی را به اطلاعات قبلی اضافه می‌کند. در این مطالعه روش PCR و توالی‌یابی مستقیم استفاده شد. نتایج این بررسی نیز جهش‌پذیری اگزون شش ژن TP53 را در بیماران آذری مبتلا به سرطان تأیید می‌کند.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌گیری

در این مطالعه توصیفی از ۴۰ بیمار آذری مبتلا به سرطان تیروئید مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های امام خمینی، امام رضا و نورنجات شهر تبریز برای جراحی، پس از تکمیل رضایتنامه توسط بیماران، بافت توموری در محل جراحی برداشته و به صورت تازه (fresh) و در داخل ازت مایع به آزمایشگاه منتقل و تا مرحله استخراج در فریزر ۸۰- نگهداری شد. بافت‌های توموری بر اساس سیستم استاندارد طبقه‌بندی تومورهای تیروئیدی (TNM staging system) به دست متخصص پاتولوژیست طبقه‌بندی شد.

### استخراج DNA

استخراج DNA از بافت‌های توموری پس از تأیید پاتولوژی با روش نمک اشباع - پروتئیناز K انجام شد [۱۳]. به طور خلاصه، بافر SE، SDS و پروتئیناز K به بافت توموری خردشده اضافه

مختلف است [۵]. این سرطان از سلول‌های فولیکولی یا سلول‌های C غده تیروئید منشأ می‌گیرد و شامل انواع گوناگون پاپیلاری، فولیکولار، مدولاری و آناپلاستیک است. پاپیلاری کارسینوما شایع‌ترین نوع سرطان تیروئید است که از سلول‌های فولیکولی تیروئید منشأ می‌گیرد [۱، ۶].

از مهم‌ترین تغییرات ژن‌های درگیر در سرطان تیروئید می‌توان از جهش در ژن‌های سرطان‌زا و ژن‌های سرکوبگر تومور نام برد. ژن TP53 از مهم‌ترین ژن‌های سرکوبگر درگیر در سرطان است. این ژن روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ قرار دارد (17 P13.1) و دارای ۱۱ اگزون، به طول ۲۰ کیلوباز است [۷]. پروتئین p53 فاکتور رونویسی شناخته‌شده‌ای است که به توالی‌های اختصاصی روی DNA متصل می‌شود و بیان بیش از ۲۵۰۰ ژن هدف را تنظیم می‌کند [۸]. این پروتئین در پاسخ به استرس‌های متنوع سلولی نظیر هیپوکسی، فعال شدن نابه‌جای انکوژن‌ها و آسیب DNA فعال می‌شود و بسته به شدت و مدت زمان دوام استرس، سبب القای توقف چرخه سلولی یا آپوپتوز می‌شود [۹]. این ویژگی‌ها، TP53 را تبدیل به ژن سرکوبگر حیاتی می‌کند.

جهش‌های p53 تقریباً در نیمی از سرطان‌ها یافت می‌شود و به نظر می‌رسد که در نیم دیگر سرطان‌ها، تغییر در مسیرهای تنظیمی بالادست یا پایین‌دست p53 دخالت دارد [۱۰]. تحقیقات نشان داده است که جهش‌های p53 در کارسینوماهای به‌خوبی تمایز یافته و آدنوماهای فولیکولار تیروئید نادر و محدود به کارسینوماهای دارای تمایزافتگی ضعیف و کارسینوماهای آناپلاستیک است. به نظر می‌رسد که این جهش‌ها رخداد ثانویه و منجر به تمایززدایی بیشتر کارسینوماهای به‌خوبی تمایز یافته می‌شود و تومورها را به سمت سرطان‌های پیشرفته‌تر آناپلاستیک و دارای تمایزافتگی ضعیف سوق می‌دهد [۱۱، ۱۲].

ارزیابی جهش‌های ژن TP53 در بیماران سرطانی در تشخیص، پیش‌آگهی یا درمان اهمیت دارد [۱۰]. بررسی قبلی ما از جهش‌های ژن TP53 در مبتلایان به سرطان پستان، پراکندگی جهش‌ها را در زنان آذری مشخص کرد [۱۳، ۱۴].

در این مطالعه، الگوی متفاوت پراکندگی جهش‌ها و جهش‌پذیری بالای اگزون شش این ژن در بیماران آذری مبتلا به سرطان پستان به دست آمد که احتمال وجود فاکتور یا

به‌منظور تکثیر این قطعات ۲/۵ μl بافر PCR 10x، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl<sub>2</sub>، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۱u آنزیم Taq پلیمرز، ۱ μl DNA نمونه سرطانی و ۰/۴ میکرومولار از هر کدام از پرایمرها در حجم ۲۵ میکرولیتری PCR شد. در این مطالعه، دمای واسرشتی ۹۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و دمای گسترش ۷۲ درجه و به‌مدت ۱ دقیقه در ۳۰-۳۵ دور چرخه دمایی اعمال شد. محصول PCR به‌مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز شد (شکل ۱). در نهایت، ۲۰۰ میکرولیتر محصول PCR تأییدشده از نظر کیفیت به‌همراه پرایمرها، برای تعیین توالی به شرکت فزابیوتک (www.fazabiotech.cim) فرستاده شد.

برای شناسایی تغییرات احتمالی در نمونه‌های مورد بررسی، نخست پیک‌های (توالی‌های) به‌دست‌آمده بررسی و با کمک نرم‌افزار Chromas، با توالی‌های ثبت‌شده در NCBI بلست (blast) شد. همچنین، توالی‌های حاصل به‌کمک نرم‌افزار ClustalW2 با توالی ژن طبیعی TP53، مقایسه شد. در نهایت، هر نوع تفاوت در نمونه‌ها، پس از مقایسه مجدد با پیک مربوط، تغییر در نمونه مورد مطالعه تأیید شد. برای بررسی آثار جهش مشاهده‌شده و پروتئین جهش‌یافته از بانک اطلاعاتی (Database) تخصصی MUTP53LOAD و سایت‌های SIFT و POLYPHEN2 استفاده شده است [۲۰-۱۷].

و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه و سپس یک ساعت در دمای ۵۵-۶۰ درجه قرار داده شد. در مرحله دوم، نمک اشباع و کلروفرم به محلول اضافه و با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع شفاف رویی به لوله دیگر منتقل و به آرامی اتانل مطلق سرد اضافه شد. کلاف DNA حاصل با سمپلر به آرامی جدا و پس از شستشو با اتانل ۷۰ درصد در آب مقطر استریل حل شد. در این مطالعه، از بیماران آذری مبتلا به سرطان تیروئید در گروه‌های سنی مختلف و از انواع پاپیلاری (۱۸ مورد)، فولیکولار (۱۹ مورد) و مدولاری کارسینوما (۳ مورد)، ۴۰ مورد انتخاب و اگزون‌های پنج تا هشت ژن TP53 تکثیر و توالی‌یابی شد.

### بررسی جهش در اگزون‌های پنج، شش، هفت و هشت

توالی اگزون‌های پنج و شش به‌صورت قطعه واحد و اگزون‌های هفت و هشت با هم در قطعه دیگر تکثیر شد. برای تکثیر توالی اگزون‌های پنج و شش از یک جفت پرایمر رفت‌وبرگشتی E5F و E6R استفاده شد. طول قطعه انتخابی برای تکثیر ۴۷۲ جفت باز بود شامل اگزون پنج (۲۴۹ bp)، اینترون پنج و اگزون شش (۱۱۳ bp). اگزون‌های هفت و هشت با استفاده از جفت پرایمر Int6F و P8R در قطعه‌ای به طول ۶۸۲ جفت باز تکثیر شد. توالی پرایمرها و مشخصات آن در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

منبع	دمای اتصال (°C)	اندازه محصول (bp)	توالی پرایمر (۵' به ۳')	نام پرایمر
۱۳	۵۹	۴۷۲	TTATCTGTTCACTTGTGCC	E5F
			TTAACCCCTCCTCCCAGAGA	E6R
			GCCCTCCCCTGCTTGCC3	Int6F
۱۴	۵۹	۶۸۲	TCCACCGCTTCTTGTCCTGC	E8R

بالینی، ۲۷ نفر (۶۷/۵ درصد) به کارسینوما پاپیلاری تیروئید، ۱۰ نفر (۲۵ درصد) به کارسینوما فولیکولار تیروئید و ۳ نفر (۷/۵ درصد) به کارسینوما مدولاری مبتلا بودند. بر اساس مرحله‌بندی TNM، ۳۱ نفر (۷۷/۵ درصد) از بیماران در مرحله توموری یک، ۷ نفر (۱۷/۵ درصد) از بیماران در مرحله

### یافته‌ها

#### آسیب‌شناسی

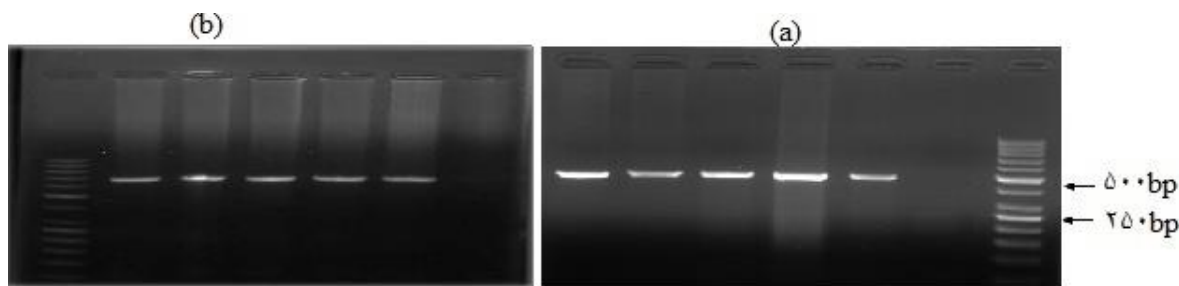
گروه مورد مطالعه شامل ۴۰ بیمار (۱۰ مرد و ۳۰ زن) با میانگین سنی ۳۷/۸۹ ± ۱۲/۲۱ سال بود. با توجه به اطلاعات

برای اگزون پنج، اینترون پنج و اگزون شش و قطعه ۶۸۲ جفت بازی برای اگزون‌های هفت و هشت و اینترون هفت به دست آمد که شکل الکتروفورز محصولات PCR را در آگارز نشان می‌دهد.

توموری دو و ۲ نفر (۵ درصد) از بیماران در مرحله توموری سه بودند.

### نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR

با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت قطعه ۴۷۲ جفت باز



شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR اگزون‌های پنج و شش (a: چاهک اول از راست: DNA مارکر، دوم: کنترل منفی، سوم تا هفتم نمونه سرطانی) و هفت و هشت (b: چاهک اول از راست: کنترل منفی، دوم تا ششم نمونه سرطانی هفتم: DNA مارکر) DNA مارکر به ترتیب از ۱۰۰۰ تا ۳۰۰، تفاوت صد جفت بازی و از ۳۰۰ به بعد تفاوت ۵۰ جفت بازی را نشان می‌دهد.

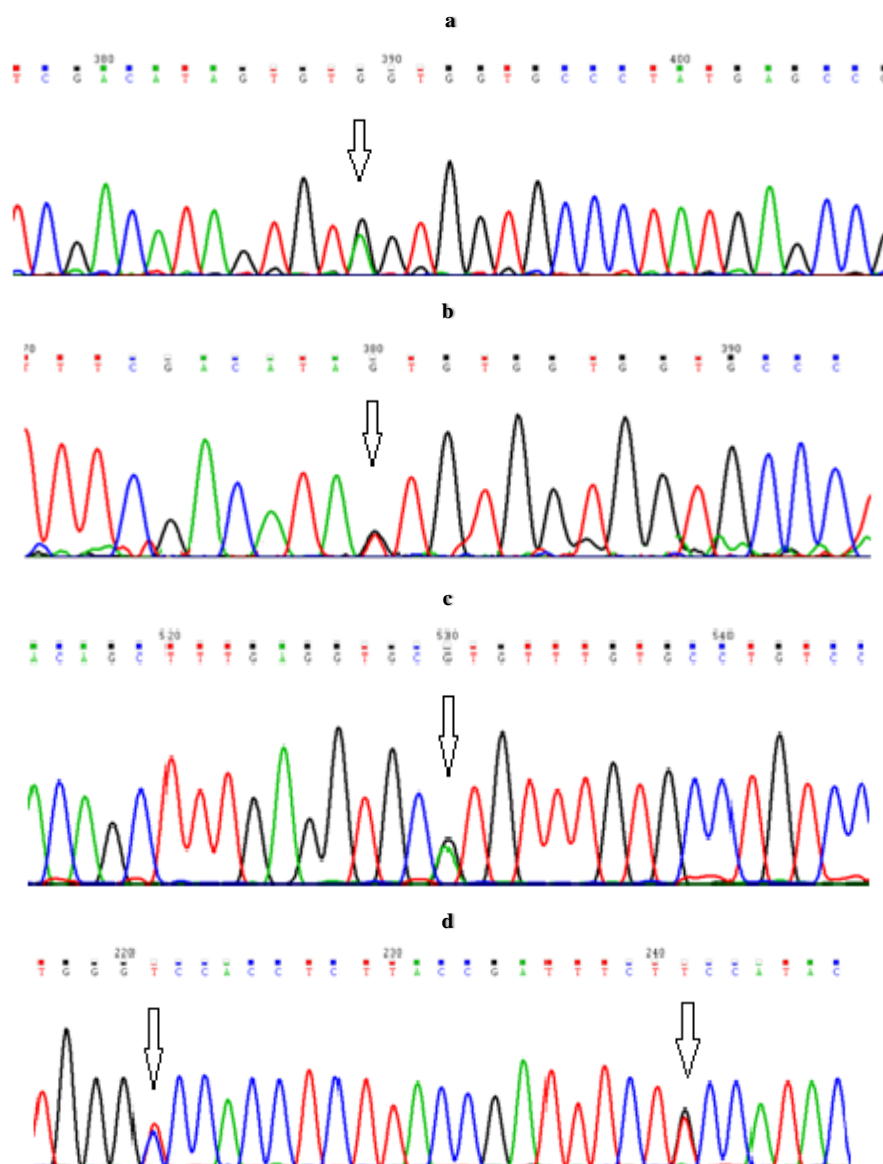
می‌کند. جهش دوم Codon215(AGT>ATT) منجر به جابه‌جایی آمینواسید سرین به ایزولوسین (S215I) می‌شود. جهش سوم در اگزون هشت و کدون ۲۷۳ رخ می‌دهد و آمینواسید هیستیدین جایگزین آرژینین می‌شود (R273H- شکل ۲). این جابه‌جایی‌های آمینواسیدی، باعث از دست رفتن فعالیت‌های ترانس‌اکسایشی (transactivation) پروتئین جهش‌یافته روی پروموتورهای مختلف ژن‌های درگیر در تنظیم چرخه سلولی و آپوپتوزیس می‌شود. جدول ۲ نتایج بررسی‌ها را روی این جهش‌یافته نشان می‌دهد. این نتایج از بانک اطلاعاتی MUTP53LOAD (Database) استخراج شده است [۱۷، ۲۲، ۲۳].

بررسی‌های بیشتر در مورد جهش‌های معرفی شده در این گزارش در سایت SIFT [۱۹] و POLYPHEN2 [۲۰] نشان می‌دهد که این جابه‌جایی نوکلئوتیدی در این کدون‌ها که منجر به تغییرات آمینواسیدی می‌شود و برای سلول غیر تحمل است یا ممکن است آثار تخریبی داشته باشد (شکل‌های ۳ و ۴). این داده‌ها نتایج جدول ۲ را تکمیل می‌کند.

نتایج حاصل از توالی‌یابی اگزون‌های پنج، شش، هفت و هشت

نتایج حاصل وجود ۱۲/۵ درصد تغییرات ژنتیکی را در بیماران نشان می‌دهد که مربوط به جهش‌ها و پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی است. جهش در Codon216(GTG>GTA) (شکل a۲)، Codon215(AGT>ATT) (شکل b۲) و Codon273 (CGT>CAT) (شکل c۲) هر کدام در یکی از بیماران و دو پلی‌مورفیسم 14201T>G و 14181C>T (شکل d۲) در اینترون هفت به‌طور پیوسته در دو مورد دیگر از مبتلایان شناسایی شد.

پلی‌مورفیسم C>T در موقعیت 14181، ۷۲ باز پایین‌تر از انتهای 3' اگزون هفت ژن TP53 قرارداد (مطابق با شماره ثبت X54156 بانک ژنی) [۲۱]. این پلی‌مورفیسم با پلی‌مورفیسم دوم T>G ۲۰ نوکلئوتید پایین‌تر در اینترون هفت در موقعیت ۱۴۲۰۱ به‌طور پیوسته مشاهده می‌شود و به‌صورت یک آللو تایپ به ارث می‌رسد [۲۱، ۲۲]. جهش Codon216(GTG>GTA) منجر به تغییر اسید آمینه نمی‌شود و هر دو تیپ وحشی و جهش‌یافته آمینو اسید والین را کد



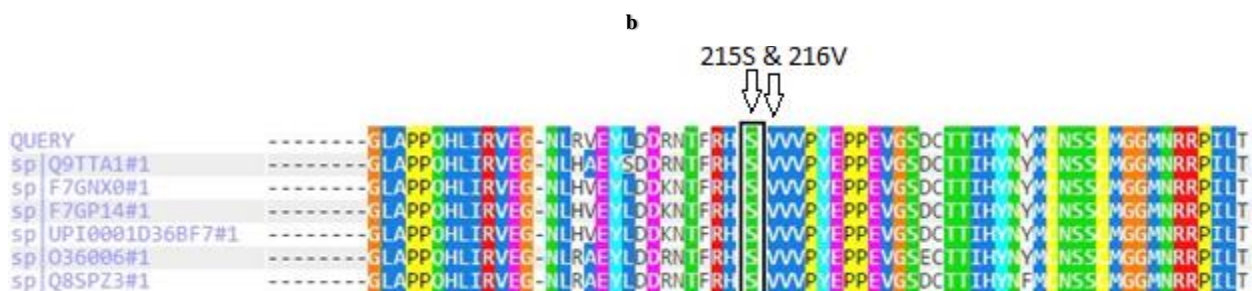
شکل ۲. جهش در (a) Codon216(GTG>GTA)، (b) Codon215(AGT>ATT) و (c) Codon273 (CGT>CAT) هر کدام در یکی از بیماران و دو پلی مورفیسم (d) 1420T>G و 1418C>T در اینترون هفت

جدول ۲. مشخصات جهش‌های شناسایی شده در اگزون‌های هفت، هشت و اینترون هفت ژن TP53 و فعالیت پروتئین جهش یافته (بر اساس [۱۷ و ۱۸])

نمونه	کدون	کدون طبیعی	کدون جهش یافته	اسید آمینه طبیعی	اسید آمینه جهش یافته	فعالیت پروتئین جهش یافته	عملکرد در دمای ۳۷°C
						ترانس آکسایشی (Transactivation)	توقف رشد (Growth arrest)
۶	۲۱۵	AGT	ATT	Ser	Ile	ندارد	ندارد
۱۳	۲۱۶	GTG	GTA	Val	Val	-	-
۳۲	۲۷۳	CTG	CCG	Arg	His	ندارد	ندارد
۱۹	Int7	(14451)	G>T	-	-	-	-
۳۴	Int7	(14451)	G>T	-	-	-	-

Predict Not Tolerated	Position	Seq	Rep	Predict Tolerated
y w v t r q p n m l k i h g f e d c a	215S	1.00	S	
y w t s r q p n m l k i h g f e d c a	216V	1.00	V	
y w v t s r q p n l k i h g f e d c a	237M	1.00	M	

شکل ۳. نتایج به دست آمده از سایت SIFT نشان می‌دهد که تنها آمینواسیدهای طبیعی (215S, 216V, 237M) قابل تحمل است و تغییر آن‌ها از نظر بیولوژیکی غیر قابل تحمل خواهد بود.



شکل ۴. نتایج به دست آمده از سایت POLYPHEN2 نشان می‌دهد که آمینواسیدهای طبیعی، (a) 273M، (b) 216V و 215S در طول تکامل به شدت محافظت شده است.

## بحث

کمتر مشخص شود. شناسایی دو جهش مجاور در کدون‌های ۲۱۶ و ۲۱۵ اگزون شش ژن *TP53* در این مطالعه، جهش‌پذیری اگزون شش را در بیماران آذری مبتلا به سرطان نشان می‌دهد.

جهش‌پذیری اگزون شش ژن *TP53* در مطالعه قبلی ما روی بیماران مبتلا به سرطان پستان منطقه مشاهده شده بود [۱۳]. جهش R273H یکی از شایع‌ترین جهش‌ها در ژن p53 در سرطان‌های انسانی است. این جهش در دمین اتصال پروتئین به DNA (DNA Binding Domain) ایجاد می‌شود. مطالعات نشان داده است که این پروتئین جهش‌یافته عملکردی جدید به دست می‌آورد (gain of function) و تومورهای حاوی این جهش به شدت متاستاتیکی است [۲۶].

در این بررسی، فراوانی جهش‌ها ۷/۵ درصد به دست آمد. فراوانی جهش‌های ژن *TP53* در سرطان‌های تیروئید پایین‌تر از فراوانی جهش‌ها در دیگر سرطان‌ها گزارش شده است. تعداد زیادی جهش سوماتیکی در ژن *TP53* در سرطان‌های مختلف شناخته شده است [۲۳]. در ۶۰۳ مورد سرطان تیروئید گزارش شده در بانک اطلاعاتی IARC (International Agency for Research on Cancer) ۵۸ جهش شناسایی شده است. بنابراین، فراوانی جهش در تومورهای تیروئیدی ۹/۶۲ درصد است ([http://p53.free.fr/Database/p53\\_database.html](http://p53.free.fr/Database/p53_database.html)) [۲۵]. تعداد کم مطالعات درباره سرطان تیروئید باعث شده است وضعیت جهش‌های ژن *TP53* نسبت به سرطان‌های دیگر

وضعیت *p53* حساسیت سلول‌های سرطانی بیمار سرطانی را به شیمی‌درمانی‌های مختلف تعیین می‌کند. هنگامی که سلول‌های حاوی *p53* جهش یابد، با طیف گسترده‌ای از داروهای شیمی‌درمانی تیمار می‌شود و نسبت به سلول‌هایی که *p53* طبیعی دارد مقاومت بیشتری نسبت به دارو نشان می‌دهد [۲۹-۳۱]، زیرا *p53* معمولاً در پاسخ به این داروها، با القای بیان ژن‌های پیش‌آپوپتوتیک، باعث پیشبرد آپوپتوزیس و حذف سلول‌های سرطانی می‌شود و طبیعی است که فقدان آن، به‌علت کاهش بیان این ژن‌ها، به مقاومت دارویی بینجامد. در بین جهش‌های *p53*، از نظر توانایی سرطان‌زایی و مقاومت به شیمی‌درمانی، تفاوت‌هایی وجود دارد [۳۲-۳۴]. گزارش ۷/۵ درصد جهش در این مطالعه، اهمیت آگاهی از وضعیت *p53* و نوع جهش‌های آن را در درمان مؤثر سرطان تیروئید نشان می‌دهد.

همچنین، از ویژگی‌های حاصل از این بررسی روی بیماران مبتلا به سرطان تیروئید، تأیید نتایج مطالعه قبلی ما روی بیماران مبتلا به سرطان پستان، یعنی بالابودن فراوانی جهش‌ها در اگزون شش، در منطقه آذربایجان شرقی است. بنابراین، مطالعات بعدی در بررسی علت جهش‌پذیری بالای اگزون شش ژن *TP53* در این منطقه و ارتباط آن با زمینه ژنتیکی - قومی، سبک زندگی، رژیم غذایی سازش‌یافته با زندگی منطقه‌ای و کارسینوزن‌های محیطی ضروری است. بررسی جهش در اگزون‌های دیگر ژن *TP53* در بیماران تیروئیدی نتایج این مطالعه را تکمیل می‌کند.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمامی مسئولان و پرسنل محترم اتاق‌های عمل بیمارستان‌های امام رضا (ع) و نور نجات تبریز که در تهیه نمونه‌های توموری همکاری داشتند و نیز کارکنان محترم آزمایشگاه رادیوبیولوژی دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز تشکر و قدردانی می‌کنیم. این مقاله مستخرج از نتایج طرح تحقیقاتی اجرا شده به شماره قرارداد ۴۰۱/۴۶۱ از محل اعتبار ویژه پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان است.

این فعالیت جدید باعث افزایش رونویسی ژن‌هایی مانند *MYC*، *BAG1*، *MDR1*، *NFκB2* و کاهش رونویسی ژن‌هایی مانند *hTERT*، *ATF3* و *CD-95* می‌شود [۲۷].

تحقیقات نشان می‌دهد، میزان شیوع سرطان تیروئید با شرایط جغرافیایی، محیطی و نژادی متغیر است. قرارگرفتن در معرض پرتوهای یونیزان فاکتور خطر ثابت‌شده برای ابتلا به سرطان تیروئید است. به‌همین دلیل، تیروئید اندام حساسی در برابر استرس‌های سلولی منجرشونده به نفوپلازی محسوب می‌شود و در نتیجه وضعیت ژن *TP53* نیز که در پاسخ به استرس سلولی و آسیب DNA نقش دارد در ابتلا به سرطان تیروئید مهم به‌نظر می‌رسد [۲۴]. بیان بالای پروتیین *p53* و جهش در این ژن در کارسینوماهای تمایزنیافته و آناپلاستیکی بیشتر از کارسینوماهای فولیکولار و پاپیلاری گزارش شده است. درمان رادیویدین ناکافی به جهش‌های ژنی در *p53* و تغییرات آناپلاستیکی در کارسینوماهای تیروئید تمایزنیافته می‌انجامد. جهش‌های ژن *TP53* در کارسینوماهای آناپلاستیکی فراوان‌تر از کارسینوماهای تمایز یافته است که نشان می‌دهد *p53* در پیشرفت از کارسینوما تمایز یافته به کارسینوم‌های تمایزنیافته نقشی اساسی دارد. بنابراین، با مشاهده جهش‌ها در این ژن باید درمان را هر چه سریع‌تر آغاز کرد. از طرفی دیگر، تومورها با جهش در ژن *TP53* به بسیاری از داروهای شیمی‌درمانی معمول مقاوم می‌شوند. بنابراین، راه‌های درمانی مناسبی را باید اتخاذ کرد [۲۴، ۲۵].

علاوه بر جهش در ژن‌های سرطان‌زا و ژن‌های سرکوبگر تومور، پلی‌مورفیسم‌ها (عامل تفاوت افراد در داشتن صفات منحصربه‌فرد) نیز عامل استعداد افراد به سرطان است [۴، ۱۷، ۲۹-۲۷]. در مطالعه قبلی، همراهی دو پلی‌مورفیسم ژن *TP53* را به‌صورت ترکیب هاپلوتایپی با کاهش سرطان تیروئید تمایز یافته در بیماران آذری نشان دادیم [۱۵]. در این مطالعه نیز دو پلی‌مورفیسم *T>G* 14181C و *T>G* 14201T را در اینترون هفت ژن *TP53* گزارش می‌کنیم. مطالعه بیشتر این دو پلی‌مورفیسم نقش آن‌ها را در سرطان تیروئید روشن‌تر می‌سازد.

شواهد حاصل از مطالعات مختلف نشان می‌دهد که

## References

- [1]. Raymon H, Grogan E, Mitmaker J, Orlo H, Clark. The evolution of biomarkers in thyroid cancer form mass screening to a personalized Biosig nature. *Cancers*. 2010; 2: 885-912. doi: 10, 3390/ cancers 2020885.
- [2]. Wartofsky L. Increasing world incidence of thyroid cancer: Increased detection or higher radiation exposure? *Hormones*. 2010; 9(2): 103-108.
- [3]. Larijani B, Aghakhani S, Haghpanah V. Review of thyroid cancer in Iran. *Austral - Asian Journal of Cancer*. 2005; 4(4): 199-203.
- [4]. Sipos JA, Mazzaferri EL. Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. *Clinical Oncology*. 2010; 22: 395-404.
- [5]. Kilfovy BA, Zheng T, Holford TR et al. International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973-2002. *Cancer Causes Control*. 2009; 20: 525-531.
- [6]. Mohammad Khanlou Z, Pouladi N, Hosseinpour Feizi M, Pedram N. Lack of associations of the MDM4 rs4245739 polymorphism with risk of thyroid cancer among Iranian-Azeri patients: a case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017; 18(4): 1133-1138.
- [7]. Varley IM. Germline TP53 mutations and li- fraumeni syndrom Human. *Mutation*. 2003; 21: 313-320.
- [8]. Stegh AH. Targeting the p53 signaling pathway in cancer therapy- The promises, challenges, and perils. *Expert Opin Ther Targets*. 2012; 16(1): 67-83.
- [9]. Lorne J, Hofseth S, Hussain P, Curtis C. Ha. p53: 25 years after its discovery. *TRENDS in Pharmacological. Sciences*. 2004; 25(4): 177-181.
- [10]. Ferraiuolo M, Verduci L, Blandino G, Strano S. Mutant p53 protein and the hippo transducers YAP and TAZ: a critical oncogenic node in human cancers. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(5): 1-29.
- [11]. Antico Arciuch VG, Russo MA, Dima M, Kang KS, Dasrath F, Liao XH, Refetoff S, Montagna C, Di Cristofano A. Thyrocyte-specific inactivation of P53 and Pten results in anaplastic thyroid carcinomas faithfully recapitulating human tumors. *Oncotarget*. 2011; 2(12): 1109-26.
- [12]. Donghi R, Longoni A, Pilotti S, Michieli P, Della Porta G, Pierotti MA. Gene P53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *The Journal of Clinical Investigation*. 1993; 91(4): 1753-60.
- [13]. Khani H, Hosseinpoureifezi M, Pouladi N, Chaparzadeh N, Montazeri V, Azarfam. Detection of P53 gene exons 5 and 6 mutations among East Azerbaijani women with breast cancer. *ZUMS Journal*. 2011; 20(78): 36-46.
- [14]. Pouladi N, Hosseinpourfeizi MA, Khani H. Evaluation of mutations in exons 7 and 8 of TP53 gene in breast cancer patients from Azarbaijan. *J Babol Univ Med Sci*. 2016; 18(2):19-25
- [15]. Dehghan R, Hosseinpour Feizi MA, Pouladi N, Babaei E, Montazeri V, Fakhrijoo A, Sedaei A, Azarfam P, Nemati M. Association of P53 (-16ins-Pro) haplotype with the decreased risk of differentiated thyroid carcinoma in Iranian-Azeri patients. *Pathol Oncol Res*. 2014 Nov 20.
- [16]. Hossein Pour Feizi M, Ravanbakhsh Gavvani R, Pourahmad R, Pouladi N, Azarfam P, Montazeri V. Association of p53 Arg/Pro polymorphism at codon 72 with risk of breast cancer in East Azerbaijani women. *J Babol Univ Med Sci*. 2012; 14(2): 31-8. [in Persian]
- [17]. <http://www.umd.be:2072/4DACTION/OPMA4R/1>. Available from Jun 2012.
- [18]. p53 knowledge base. Retrieved from <http://p53.bii.a-star.edu.sg/aboutp53/snps/index.php>.
- [19]. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009; 4(7): 1073-81 Available at: [http://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT\\_seq\\_submit2.html](http://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT_seq_submit2.html) [Accessed 14 Oct. 2016].
- [20]. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. *Nat methods*. 2010; 7(4): 248-249. Available at: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> [Accessed 14 Oct. 2016].
- [21]. Berggren P, Hemminki K, Steineck G. p53 intron 7 polymorphisms in urinary bladder cancer patients and controls. *Stockholm Bladder Cancer Group. Mutagenesis*. 2000; 15(1): 57-60.
- [22]. Shiraiishi K, Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Sakayori M, Ishida T, Takeda M, Kanamaru R, Ohuchi N, Ishioka C. Isolation of temperature-sensitive p53 mutations from a comprehensive missense mutation library. *J Biol Chem*. 2004; 279(1): 348-55. Epub 2003 Oct 13.
- [23]. Kato SL, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R, Ishioka C. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(14): 8424-9. Epub 2003 Jun 25.
- [24]. Duntas L, Grab-Duntas BM. Risk and prognostic factors for differentiated thyroid cancer. *Hell J Nucl Med*. 2006; 9(3): 156-62.
- [25]. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. 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): 622-629.
- [26]. Tan BS, Tiong KH, Choo HL, Chung FF, Hii LW, Tan SH. Mutant p53-R273H mediates cancer cell survival and anoikis resistance through AKT-dependent suppression of BCL2-modifying factor (BMF). *Cell Death Dis*. 2015; 6: e1826.
- [27]. Tan BS, Tiong KH, Choo HL et al. Mutant p53-R273H mediates cancer cell survival and anoikis resistance through AKT-dependent suppression of BCL2-modifying factor (BMF). *Cell Death Dis*. Jul. 2015; 16(6): e1826.
- [28]. Sadeghi M, Motovali Bashi M, Hojati Z. Association of a polymorphism in 1562 promoter nucleotide of collagenase IV with the age and type of metastasis in breast cancer. *J Babol Univ Med Sci*. 2009; 6(10): 7-13. [in Persian]
- [29]. Sedaie Bonab A, Pouladi N, Hosseinpourfeizi MA, Ravanbakhsh Gavvani R, Dehghan R, Azarfam P, Montazeri V, Fakhrijoo A. Single-strand conformational polymorphism analysis of a common single nucleotide variation in WRAP53 gene, rs2287499, and evaluating its association in relation to breast cancer risk and prognosis among Iranian-Azeri population. *Med Oncol*. 2014; 31(9): 168
- [30]. Pouladi N, Kouhsari SM, Feizi MH, Dehghan R, Azarfam P, Farajzadeh D. Lack of association of intron 3 16 bp polymorphism of TP53 with breast cancer among Iranian-Azeri patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(6) :2631-4.
- [31]. Dulcie LAL, Visser-Grieve S, Xiaolong YANG. Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. *Biosci. Rep*. 2012; 32: 361-374.
- [32]. Sax IK, El-Deiry WS. P53 downstream targets and chemosensitivity. *Cell Death Differ*. 2003; 10: 413-417.
- [33]. Morgan SE, Kim R, Wang PC et al. Differences in mutant p53 protein stability and functional activity in teniposide-sensitive and -resistant human leukemic CEM cells. *Oncogene*. 2000; 19(43): 5010-9.
- [34]. Bunz F, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y, Dillehav L, Williams J, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J. Clin. Invest*. 1999; 104: 263-269.....



## Detection of mutations within exons 5 to 8 of the *TP53* gene among Azeri patients with sporadic thyroid carcinoma

Nasser Pouladi<sup>1\*</sup>, Mohammadali Hosseinpour Feizi<sup>2</sup>

1. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
2. Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran

### Abstract

**Background** Thyroid cancer is the most common malignant endocrine tumor, and the incidence was rising worldwide over the last three decades. *TP53* is one of the most important tumor suppressor genes in the genome, and its mutations are found in approximately 50% of human cancers. It plays pivotal roles in the regulation of cell cycle arrest and apoptosis. The aim of this study was to analyze *TP53* gene mutations among thyroid cancer patients in East Azerbaijan..

**Material and Methods** 40 tumor samples have been collected from thyroid cancer patients from Tabriz hospitals between 2007-2009. DNA was extracted by Proteinase K– Iso propanol method and then the mutations in p53 gene from exon 5 to exon 8 were detected by Polymerase Chain Reactions (PCR) and direct sequencing techniques.

**Results** Alterations in the p53 gene were detected in 12.5% of the patients, including single nucleotide polymorphisms and mutations, including codon 216 (GTG>GTA), codon 215 (AGT>ATT) and codon 273 (CGT>CAT) mutations (each mutation in one of the cases) and two linked polymorphisms 14181C>T and 14201T>G (in two cases).

**Conclusion** This result helps us to clarify p53 mutation status among Azerbaijani thyroid cancer patients.

Received: 2017/04/09

Accepted: 2017/11/27

**Keywords:** mutation, p53 gene, thyroid cancer.