Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 36, No. 4, Oct. – Nov. 2014, Pages: 30-37

Association between the Expression of Tap73 and Δnp73 Variants and Breast Cancer in Patients of North-West of Iran

Mohammad Ali Hosseinpourfeizi[1]*, Aida Sedaie Bonab[1], Reyhaneh Ravanbakhsh[1], Nasser Pouladi[2], Maryam Moradi Nasab[1], Parvin Azarfam[1], Vahid Montazeri[3], Ashraf Fakhrjou[4]

[1]Department of Biology, School of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran
[2]Department of Cellular and Molecular Biology, School of Science, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
[3]Nour Nejat Hospital, Tabriz, Iran
[4]Department of Pathology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 7 Sep, 2013 Accepted: 4 Nov, 2013

Abstract

Background and Objectives: Breast cancer is the most common malignancy; meanwhile, finding molecular markers to identify it in the early stages, might be helpful in this regard. Overexpression of TP73 gene is frequent in cancers. TP73 is expressed in multiple variants with either tumor suppressor or oncogenic function. This study was performed to evaluate the association between the expression of tumor suppressor TAp73 and oncogenic ΔNp73 variants and breast tumorigenesis.

Materials and Methods: In this experimental study, 60 specimens (30 tumoral and 30 marginal tissues) were examined by RT-PCR technique and the semi-quantitative data were converted to quantitative data using UV-tech software.

Results: Overexpression of TAp73 and ΔNp73 was observed in 80% and 43.3% of tumors, respectively. A direct significant correlation was found between the expression level of both variants in tumors (P=0.01) that indicates co-upregulation of them in tumor tissues. A significant difference was found in the expression level of TAp73 between tumor and marginal tissues (P=0.001) but the difference in the expression level of ΔNp73, was not significant (P=0.92). There was not any significant difference in the expression level of studied variants between the early and the late stage tumors (P>0.05).

Conclusion: Overexpression of TAp73 is a marker for the detection of malignant breast tumors. Co-upregulation of TAp73 and ΔNp73 is also a hallmark of malignant epithelial cells of the breast. Overexpression of TAp73 is involved in tumorigenesis via the overexpression of ΔNp73. So, overexpression of tumor suppressor TAp73 can indirectly cause breast tumorigenesis.

Keywords: TP73 Gene, Tap73 Variant, Δnp73 Variant, Molecular Marker, Breast Cancer

*Corresponding author:
E-mail: pourfeizi@eastp.ir

مقاله پژوهشی

مطالعه‌ی ارتباط بیان واریانت‌های TAp73 و ΔNp73 با سرطان پستان در بیماران منطقه‌ی شمال غرب کشور

محمدعلی حسین پورفیضی[1*]، آئیدا صدائی بناب[1]، ریحانه روانبخش گاوگانی[1]، ناصر پولادی[2]، مریم مرادی نسب[1]، پروین آذرفام[1]، وحید منتظری[3]، اشرف فخرجو[4]

[1]گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[2]گروه زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
[3]بیمارستان نور نجات تبریز، تبریز، ایران
[4]گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت:۹۲/۶/۱۶ پذیرش:۹۲/۸/۱۳

چکیده

زمینه و اهداف: سرطان پستان شایع ترین بدخیمی در زنان بوده و یافتن مارکرهای مولکولی جهت تشخیص این سرطان در مراحل پیشرفت اولیه بسیار حیاتی است. افزایش بیان واریانت های TP73 یک رخداد شایع در سرطان ها می‌باشد. این ژن به صورت چند واریانت با عملکرد سرکوبگر تومری (واریانت TAp73) یا عملکرد انکوژنی (واریانت‌های ΔTAp73 (ΔEx2p73، ΔEx2/3p73، ΔN'p73 و ΔNp73)) بیان می‌شود. این مطالعه، به منظور بررسی سطح بیان واریانت سرکوبگر تومری TAp73 و واریانت انکوژنی ΔNp73 در تومورهای پستانی و همچنین بررسی ارتباط بیان واریانت های مذکور با تومورزایی در پستان صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در مطالعه ی مقطعی-تحقیقی حاضر، در مجموع ۶۰ نمونه‌ی بافتی (۳۰ بافت توموری و ۳۰ بافت حاشیه‌ی توموری) برای ارزیابی سطح بیان واریانت های TAp73 و ΔNp73 با تکنیک نیمه کمی RT-PCR بررسی شدند و داده های حاصل به منظور بررسی ارتباط بیان واریانت های مذکور با تومورزایی، توسط نرم افزار آماری SPSS با سطح معنی داری ۹۵٪ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: افزایش بیان واریانت های TAp73 و ΔNp73 به ترتیب در ۸۰ و ۴۳/۳ درصد از بافت های توموری مشاهده شد. ارتباط مستقیم معنی دار قابل توجهی در سطح بیان هر دو واریانت در بافت های توموری یافت شد (**P=۰/۰۱**) که نشان دهنده ی افزایش بیان همزمان هر دو واریانت در بافت های توموری می‌باشد. تفاوت معنی دار قابل توجهی در سطح بیان TAp73 بین بافت های توموری و حاشیه‌ی توموری یافت شد (**P=۰/۰۰۱**) اما تفاوت در سطح بیان واریانت ΔNp73 بین بافت های توموری و حاشیه ای معنی‌دار نبود (P=۰/۹۲). در سطح بیان واریانت های مذکور بین تومورهای مرحله‌ی اولیه و پیشرفته نیز تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: افزایش بیان واریانت TAp73 مارکری برای تشخیص بافت‌های توموری می‌باشد. افزایش بیان همزمان واریانت‌های TAp73 و ΔNp73 نیز یکی از شاخص‌های بدخیمی سلول‌های اپیتلیالی پستانی می‌باشد. افزایش بیان واریانت TAp73 از طریق افزایش بیان واریانت ΔNp73 در تومورزایی دخیل می‌باشد. در نتیجه، افزایش بیان واریانت سرکوبگر توموری TAp73 می‌تواند به طور غیر مستقیم منجر به تومورزایی در پستان شود.

کلید واژه ها: ژن TP73، سرطان پستان، مارکر مولکولی، واریانت TAp73، واریانت ΔNp73

***ایمیل نویسنده رابط:** pourfeizi@eastp.ir

مقدمه

سرطان پستان از شایع‌ترین بدخیمی‌های زنان و عمده ترین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان می‌باشد (۱). سرطان پستان در مردان نیز با فراوانی تقریبی یک درصد رخ می‌دهد (۲). منشأ اکثر سرطان‌های پستان، سلول‌های اپیتلیال سطح داخلی غدد شیرساز یا مجاری انتقال دهنده‌ی شیر است که در نهایت تشکیل تومور می-دهند (۳). اکثر سرطان‌های پستان از نوع تهاجمی بوده و درجه‌ی تهاجمی بودن آن‌ها نیز به وسعت انتشار به سایر نقاط بدن در زمان تشخیص بستگی دارد (۵و۴). از آنجایی که این سرطان می‌تواند اثرات روحی و جسمانی نامطلوبی بر فرد مبتلا داشته باشد، تحقیق و تلاش جهت کنترل و غربالگری آن بسیار حائز اهمیت می‌باشد

(۶). به عبارتی، شناسایی مارکرهای مولکولی اختصاصی جهت تشخیص افتراقی انواع تومورهای پستانی، پیش آگهی و انتخاب روش درمانی مناسب‌تر از اهمیت ویژه ای برخوردار می‌باشد (۷). از مهمترین مارکرهای مولکولی، تومورمارکرها هستند که مستقیما توسط تومور یا توسط سلول‌های طبیعی در اثر پاسخ به حضور تومور تولید می‌شوند. در شرایط حضور سرطان، این تومورمارکرها در سطوح بسیار بالاتری تولید می‌شوند. اکثر تومورمارکرها، پروتئینی هستند اما از تغییر در DNA و الگوهای بیان ژنی نیز می‌توان به عنوان تومورمارکر بهره برد (۸). ژن‌ها و انکوژن‌های متعددی در ارتباط با سرطان پستان شناخته شده اند که از مهمترین ژن ها می‌توان به ژن‌های خانواده‌ی سرکوبگر توموری TP53 اشاره کرد (۱۰و۹). (Tumor protein 73) TP73 به عنوان عضوی از این خانواده، دارای ۱۴ اگزون بوده و مکان کروموزومی آن بازوی کوتاه کروموزوم اول (۱p۳۶.۳) می‌باشد (۱۱). TP73 و TP53 هومولوژی ساختاری و عملکردی قابل توجهی دارند. به عبارتی هر دو ژن سه دومین اصلی به نام دومین القاء کننده‌ی رونویسی یا دومین (Transactivation domain) TA، دومین متصل شونده به DNA و دومین اولیگومریزه شونده دارند و هر دو قادر به القاء توقف چرخه‌ی سلولی و آپوپتوز در پاسخ به آسیب های DNA می باشند. با این وجود، TP73 عملکردهای منحصر به فرد نیز دارد که مهمترین آن تکامل و تمایز سلول های عصبی می‌باشد (۱۲). ژن TP73 علاوه بر عملکرد سرکوبگر توموری، عملکرد انکوژنی نیز دارد که این تفاوت در عملکرد ناشی از تولید چندین واریانت با عملکردهای متضاد می‌باشد (۱۳). واریانت TAp73 به دلیل داشتن دومین القاء کننده‌ی رونویسی، عملکرد سرکوبگر توموری دارد (۱۴) در حالی که واریانت‌های ΔTAp73 (ΔNp73، ΔN'p73، ΔEx2p73 و ΔEx2/3p73) به دلیل فقدان دومین القاء کننده‌ی رونویسی یا داشتن دومین القاء کننده‌ی رونویسی ناقص، عملکرد القاء کننده ی رونویسی ندارند (۱۵و۱۳) و از طریق رقابت در اتصال به مکان اتصالی TAp73 و p53 در DNA و یا از طریق تشکیل هترودوپلکس با TAp73، به عنوان مهار کننده‌های غالب منفی TAp73 و p53 عمل می‌کنند و بنابراین از بروز عملکرد های ضد توموری آن‌ها جلوگیری می‌کنند و به این ترتیب واریانت های ΔTAp73 عملکرد انکوژنیک از خود بروز می‌دهند (۱۷و۱۶). تعادل بیان بین واریانت‌های TAp73 و ΔTAp73 یک فاکتور حیاتی برای حفظ حیات سلول می‌باشد و عدم تعادل می‌تواند منجر به تومورزایی شود (۱۹و۱۸). در سرطان ها برخلاف TP53، موتاسیون‌های غیرفعال کننده‌ی TP73 به ندرت رخ می‌دهند اما تغییر در سطح بیان واریانت‌های آن بسیار متداول می‌باشد (۲۰). به عبارتی، TP73 در اکثر انواع تومورها دچار افزایش بیان شده که پیشنهاد می‌دهد این ژن در تومورزایی نقش دارد (۲۱). قابل ذکر است که واریانت TAp73 از پروموتر اول ژن TP73 رونویسی می‌شود و واریانت های ΔN′p73، ΔEx2p73 و ΔEx2/3p73 نیز حاصل فرایندهای پیرایشی از رونوشت‌های اولیه‌ی TAp73 هستند در حالی که واریانت ΔNp73 از پروموتر دوم ژن TP73 رونویسی می‌شود. هر یک از واریانت‌های مذکور می‌توانند در انتهای ۳' دستخوش فرایندهای پیرایشی دیگری نیز شوند (۲۳و۲۲). مطالعه‌ی حاضر به منظور تعیین الگوی بیان واریانت سرکوبگر توموری TAp73 و واریانت انکوژنی ΔNp73 در بافت‌های توموری پستان و همچنین بررسی ارتباط بیان واریانت‌های مذکور با تومورزایی در پستان صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در مطالعه‌ی مقطعی- تحقیقی حاضر که از مهرماه ۱۳۹۰ تا آذر ماه ۱۳۹۱ به طول انجامید، به منظور بررسی بیان واریانت های TAp73 و ΔNp73 از تکنیک Semi-quantitative RT-PCR استفاده شد.

نمونه گیری: بافت‌های توموری بدخیم و حاشیه‌ی توموری (در مجموع ۶۰ نمونه‌ی بافتی) ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان از مناطق آذربایجان شرقی و غربی که در بیمارستان نور نجات تبریز تحت انواع عمل جراحی ماستکتومی قرار گرفته بودند بلافاصله پس از هر عمل جمع آوری و داخل میکروتیوب های استریل و فاقدRNase گذاشته شدند و در داخل نیتروژن مایع به آزمایشگاه منتقل و در فریزر ۸۰- درجه‌ی سانتیگراد، نگهداری شدند. بافت های توموری بر اساس سیستم استاندارد طبقه‌بندی تومورهای پستانی (TNM staging system) و به کمک یافته های پاتولوژیکی در دو گروه تومورهای مرحله‌ی اولیه (stage I,II) و پیشرفته (stage III,IV) طبقه‌بندی شدند.

استخراج RNA: پس از تیمار لوازم مورد نیاز در محلول DEPC (Diethylpyrocarbonate) ۰/۱٪ (به منظور غیرفعال سازی RNase های محیطی)، استخراج RNA کل از بافت به کمک کیت استخراج RNXplus صورت گرفت و سپس برای بررسی کیفیت و کمیت RNAهای استخراج شده ابتدا از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ و سپس از اسپکتوفوتومتری UV توسط دستگاه Pico-Drop استفاده شد.

تیمار با آنزیم Dnase.I و واکنش رونویسی معکوس (RT): در مرحله‌ی بعد، حجم مشخصی از هر نمونه‌ی RNA بر حسب میکرولیتر (معادل ۱/۵ میکروگرم) ابتدا تحت تیمار با آنزیم Dnase.I قرار گرفت و سپس به منظور تبدیل RNA به cDNA واکنش رونویسی معکوس با به کار بردن پرایمر Oligo-dT و آنزیم ترنسکریپتاز معکوس (RevertAid^{TM} M-MuLV Fermentase) طی چند مرحله‌ی پی در پی راه اندازی شد.

طراحی پرایمر: برای تکثیر GAPDH به عنوان کنترل داخلی از پرایمرهایی که توسط شرکت Fermentase پیشنهاد شده‌اند، استفاده شد. جهت تکثیر واریانت TAp73، پرایمرهای استفاده شده در مطالعه‌ی انجام گرفته در سال ۲۰۰۶ انتخاب شدند (۲۳) و جهت تکثیر واریانت ΔNp73 نیز، یک جفت پرایمر توسط همکار محترم خانم روانبخش به کمک نرم افزار Gene runner طراحی شدند. تمام پرایمرها از طریق شرکت فرآیند دانش و توسط شرکت MWG آلمان سنتز و در این مطالعه مورد استفاده واقع شدند. توالی پرایمرهای مورد نظر به صورت زیر می‌باشند:

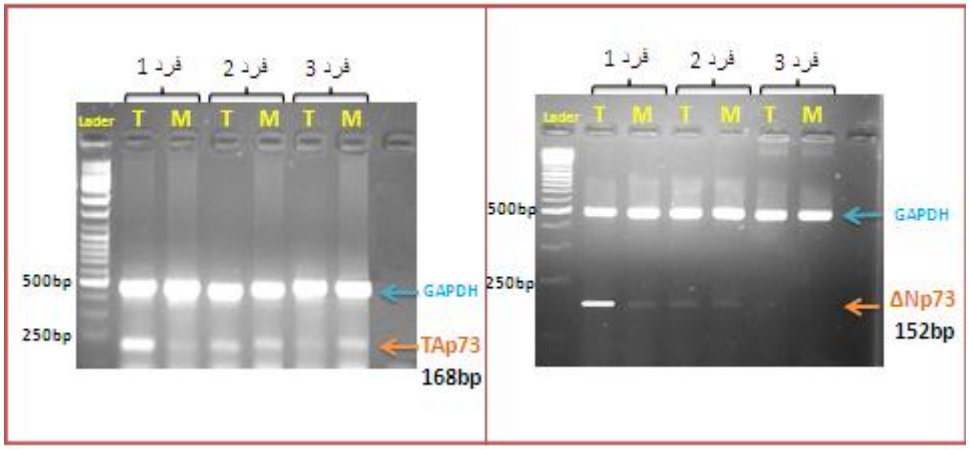
Human GAPDH:
Human GAPDH Forward Primer (HGF) / 23 bases: CAAGGTCATCCATGACAACTTTG
Human GAPDH Reverse Primer (HGR) / 22 bases: GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG
Human TAp73:
Human TAp73 Forward Primer (TAF) / 21 bases: GCACCACGTTTGAGCACCTCT
Human TAp73 Reverse Primer (TAR) / 21 bases: GCAGATTGAACTGGGCCATGA
Human ΔNp73:
Human ΔNp73 Forward Primer (ΔNF) / 21 bases: AGCGAAAATGCCAACAAACGG
Human ΔNp73 Revers Primer (ΔNR) / 20 bases: GTGGGACGAGGCATGGATCT

واکنش زنجیره ای پلیمراز: (PCR) به منظور اطمینان از وجود cDNA در محصول نهایی واکنش رونویسی معکوس، ابتدا cDNA مربوط به ژن (Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) GAPDH به عنوان کنترل داخلی طی واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) تکثیر شد و در نهایت واریانت‌های TAp73 و ΔNp73 به منظور تعیین میزان بیان هر یک در سطح رونویسی، مورد تکثیر قرار گرفتند. مقادیر لازم از هر یک از مواد مورد نیاز در این واکنش، به صورت تجربی بدست آمدند. برای تکثیر واریانت‌های مورد نظر و همچنین GAPDH، مقادیر یکسانی از بافر تکثیر ۱۰X، (۱۰mM) dNTP، پرایمرهای بالا دست و پایین دست (۲۰μM) و cDNA استفاده شدند که به ترتیب عبارتند از: ۲/۵، ۰/۵، ۱، ۱ و ۳/۵ میکرولیتر. مقدار لازم از (۵۰mM) Mgcl2 برای تکثیر TAp73، ΔNp73 و GAPDH به ترتیب عبارتند از: ۰/۷۵، ۱ و ۰/۷ میکرولیتر.

مقدار لازم از آنزیم (۵/unit μl) Taq DNA polymerase برای تکثیر TAp73، ΔNp73 و GAPDH به ترتیب عبارتند از: ۰/۲، ۰/۲۵ و ۰/۱۵ میکرولیتر. در نهایت حجم نهایی واکنش، توسط آب تزریقی استریل به ۲۵ μl رسانده شد. جهت اطمینان از عدم آلودگی در واکنش های PCR، یک تیوب نیز به عنوان کنترل منفی به کار رفت که در آن به جای cDNA از آب دوبار تقطیر استفاده شد. لازم به ذکر است که شرایط دمایی و زمانی مراحل مختلف واکنش PCR و همچنین تعداد سیکل مناسب جهت تکثیر هر واریانت، به صورت تجربی به دست آمدند. مرحله‌ی دناتوراسیون اولیه برای تمام موارد تکثیری، در دمای ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه تنظیم شد. مراحل دناتوراسیون، گسترش توالی و گسترش نهایی نیز برای تمام موارد به ترتیب در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه راه اندازی شد. مرحله‌ی اتصال پرایمرها برای TAp73، ΔNp73 و GAPDH به ترتیب در دماهای ۵۶،۵۹ و ۶۰ درجه و زمان ۳۰ ثانیه تنظیم شد. تعداد سیکل PCR نیز جهت تکثیر TAp73، ΔNp73 و GAPDH به ترتیب: ۴۰، ۳۵ و ۳۵ می باشد. پس از اتمام واکنش PCR، ۵ میکرولیتر از محصول واکنش بر ژل آگارز ۲٪ بارگذاری شدند.

تعیین توالی محصولات PCR: برای اطمینان از صحت تکثیر واریانت مورد نظر نیز حدود ۵۰ میکرولیتر از محصولات نهایی واکنش مربوط به هر واریانت برای تعیین توالی به شرکت پیشگام تهران ارسال شدند و توالی‌های به دست آمده با توالی موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) مقایسه شدند.

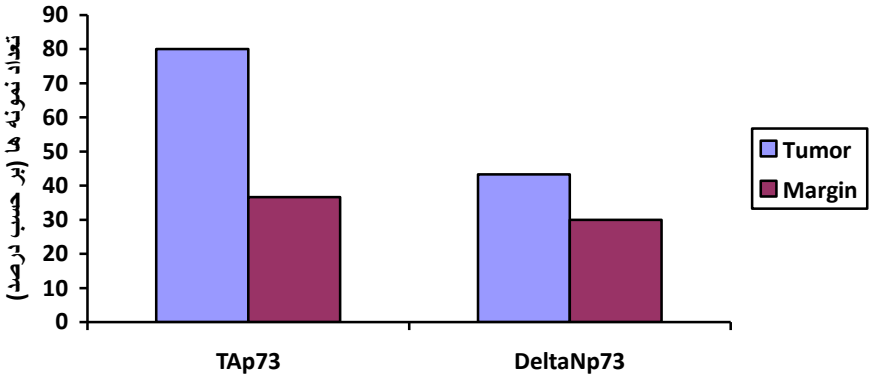
نیمه کمی کردن بیان ژن و آنالیز آماری: پس از تبدیل شدت باندهای بدست آمده به داده‌های کمی به کمک نرم افزار UV-Tech، از نرم افزار آماری SPSS (Statistical Package for the Social Sciences (Ver.16) و تست‌های آماری T.test و One-way Anowa به منظور بررسی و مقایسه‌ی سطح بیان واریانت‌های مورد نظر در بافت‌های توموری و حاشیه‌ی توموری استفاده شد. قابل ذکر است که در تمام موارد، سطح معنی داری ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.



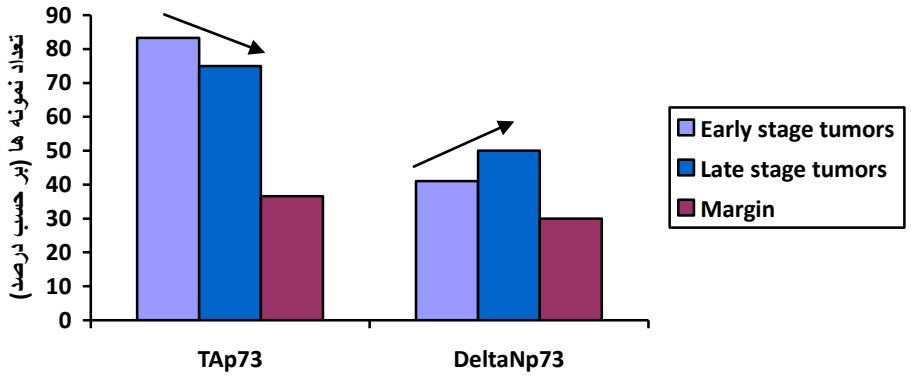
تصویر ۱- نمونه ای از الگوی بیان واریانت های TAp73 و ΔNp73 در بافت های توموری (T) و حاشیه‌ی توموری (M). چاهک انتهایی در هر دو ژل، مربوط به کنترل منفی (NG) می باشد.

یافته‌ها

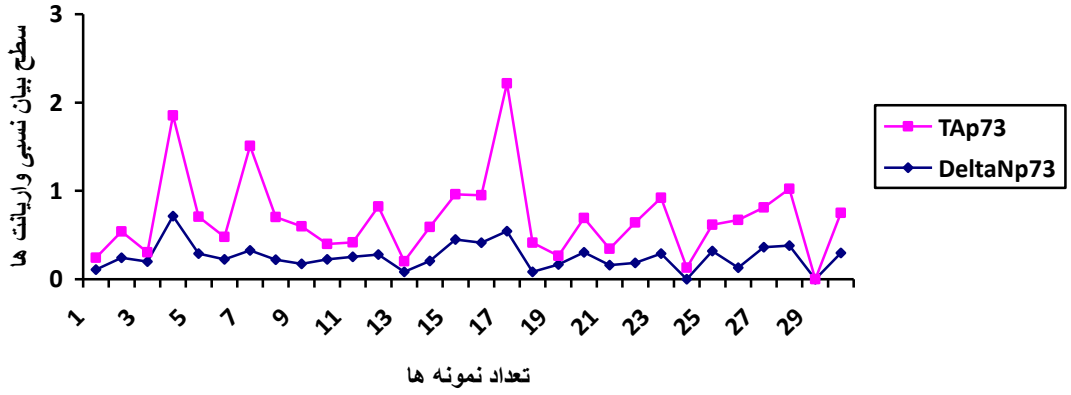
در این مطالعه پس از جمع‌آوری بافت‌های توموری و حاشیه‌ی توموری از بیماران مبتلا به سرطان پستان با بازه‌ی سنی ۸۰-۲۵ سال (میانگین سنی ۵۰ سال)، استخراج RNA کل و سپس تبدیل RNA به cDNA و در نهایت تکثیر واریانت‌های TAp73، ΔNp73 و کنترل داخلی GAPDH انجام شدند. پس از جمع‌آوری داده‌ها و تعیین آستانه‌ی بیان هر واریانت، مشخص شد که افزایش بیان واریانت سرکوبگر توموری TAp73 در ۸۰ ٪ از بافت‌های توموری و افزایش بیان واریانت انکوژنی ΔNp73 در ۴۳/۳ ٪ از بافت‌های توموری رخ داده است در حالی که افزایش بیان واریانت‌های TAp73 و ΔNp73 به ترتیب در ۳۶/۶٪ و ۳۰٪ از بافت‌های حاشیه‌ی توموری رخ داده بود (نمودار:۱). در یک بررسی افتراقی بین بافت‌های توموری مراحل اولیه و پیشرفته نیز دیده شد که افزایش بیان واریانت TAp73 در ۸۳/۳ ٪ از تومورهای مرحله‌ی اولیه و ۷۵٪ از تومورهای مرحله‌ی پیشرفته رخ داده است و این تفاوت می‌تواند ناشی از این امر باشد که با افزایش مرحله‌ی پیشرفت توموری یا با افزایش شدت بدخیمی تومورها، رونوشت های TAp73 در اثر فرایندهای پیرایشی ثانویه به واریانت‌های انکوژنی ΔEx2p73، ΔEx2/3p73 و ΔN'p73 تبدیل می‌شوند که بیان آن‌ها نیز با بروز بدخیمی ارتباط دارد. بنابراین فراوانی واریانت TAp73 در تومورهای مرحله‌ی پیشرفته نسبت به تومورهای مرحله‌ی اولیه کمتر می‌شود. بر خلاف TAp73، افزایش بیان واریانت ΔNp73 در ۳۸/۸٪ از تومورهای مرحله‌ی اولیه و ۵۰٪ از تومورهای مرحله‌ی پیشرفته دیده شد که نشان می‌دهد افزایش بیان واریانت انکوژنی ΔNp73 غالباً در تومورهای مرحله‌ی پیشرفته‌تر یا تومورهایی که شدت بدخیمی بیشتری دارند رخ می‌دهد به عبارتی فراوانی واریانت ΔNp73 در تومورهای پیشرفته‌تر بیشتر است و بیان بیش از حد آن نیز با بروز بدخیمی در ارتباط می‌باشد (نمودار: ۲). برای بررسی اینکه آیا تفاوت معنی‌داری در سطح بیان واریانت‌های مذکور بین بافت‌های توموری و حاشیه‌ی توموری وجود دارد یا خیر، پس از آنالیز داده‌ها در نرم افزار SPSS مشخص شد که ارتباط مستقیم معنی‌دار و قابل توجهی بین سطح بیان واریانت‌های TAp73 و ΔNp73 در بافت‌های توموری یافت شد (**P=۰/۰۱**) که نشان می‌دهد سطح بیان واریانت‌های TAp73 و ΔNp73 در بافت‌های توموری به موازات یکدیگر افزایش می‌یابند (نمودار: ۳). علاوه بر آن، تفاوت در سطح بیان واریانت TAp73 بین بافت‌های توموری و حاشیه‌ی توموری، به میزان قابل توجهی معنی‌دار بود (**P=۰/۰۰۱**) در حالی که تفاوت در سطح بیان واریانت ΔNp73 بین بافت‌های توموری و حاشیه‌ی توموری معنی‌دار نبود (**P=۰/۹۲**). تفاوت معنی‌دار در سطح بیان واریانت‌های مذکور بین تومورهای مراحل اولیه و پیشرفته یافت نشد.



نمودار ۱: مقایسه‌ی درصدی نمونه‌هایی که دچار افزایش بیان واریانت‌های TAp73 و ΔNp73 شده بودند



نمودار ۲: مقایسه‌ی افتراقی بین تومورهای مراحل اولیه و پیشرفته که دچار افزایش بیان واریانت‌های TAp73 و ΔNp73 بودند



نمودار ۳: افزایش بیان همزمان واریانت‌های TAp73 و ΔNp73 در بافت‌های توموری (**P**=۰/۰۱)

بحث

از مهمترین ژن‌های مهار کننده‌ی رشد تومور، ژن‌های خانواده‌ی p53 می‌باشند. ژن TP73 به صورت چند واریانت گوناگون با عملکرد مهار کننده‌ی رشد تومور (TAp73) و یا عملکرد انکوژنی (واریانت‌های ΔTAp73 (ΔNp73، ΔN'p73، ΔEx2p73 و ΔEx2/3p73)) بیان می‌شود (۱۲). شواهد نشان داده‌اند که واریانت های انکوژنی ΔTAp73 غالبا در تومورها و رده سلول‌های سرطانی یافت می‌شوند و در سرطان های انسانی به عنوان انکوژن عمل می‌کنند. به عبارتی واریانت‌های ΔTAp73 به دلیل اثر غالبیت منفی که بر واریانت TAp73 و همچنین p53 دارند قادرند با القاء افزایش تکثیر و مهاجرت سلولی و همچنین اعطای پتانسیل تهاجمی به سلول‌های سرطانی، عملکردهای انکوژنیک از خود بروز دهند و در نهایت منجر به مقاومت یا عدم پاسخ به شیمی درمانی و اشعه درمانی و بنابراین کاهش بازه ی زمان بقاء بیماران شوند (۲۲). با وجود اینکه موتاسیون‌های ژن TP53 شایع‌ترین تغییرات در بدخیمی‌های انسانی می‌باشند، موتاسیون های غیر فعال کننده‌ی ژن TP73 بسیار نادرند. با این وجود افزایش سطح بیان واریانت‌های TP73 یک رخداد شایع در بدخیمی‌های انسانی می‌باشد که نشان می‌دهد TP73 در فرآیندهای تومورزایی دخیل می باشد. قابل ذکر است که در بافت های طبیعی بدن، تغییر در سطح بیان واریانت های TP73 بسیار کم یا ناچیز است (۲۱). مطالعاتی که در سال‌های گذشته انجام گرفته‌اند نشان دهنده‌ی افزایش سطح بیان واریانت‌های ژن TP73 و ارتباط آن با تومورزایی در انواع مختلفی از تومورهای انسانی می‌باشند (۲۳-۱۸). نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر نیز، هم راستا با نتایج مطالعات پیشین می باشد. در مطالعه‌ی حاضر، بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که افزایش بیان TAp73 با تومورزایی در سلول‌های اپیتلیالی پستان در ارتباط می‌باشد. از آنجایی که واریانت TAp73 عملکرد سرکوبگر توموری دارد، افزایش بیان آن به دنبال تکثیر بی رویه‌ی سلول ها و افزایش آسیب های وارد شده به DNA یک پیامد طبیعی می‌باشد. افزایش بیان TAp73 در بافت‌های توموری ناشی از افزایش فعالیت پروموتر اول ژن TP73 می‌باشد که این امر نیز می‌تواند ناشی از افزایش سطح و فعالیت فعال کننده‌های پروموتر اول از جمله فاکتور رونویسی E2F1 باشد. در سرطان پستان، افزایش سطح بیان ژن E2F1 گزارش شده که می‌تواند منجر به القاء بیشتر افزایش بیان TAp73 شود. از آنجایی که TAp73 به عنوان یکی از اصلی ترین القاء کننده‌های بیان ΔNp73 در سطح رونویسی از دومین پروموتر ژن TP73 می‌باشد، افزایش بیان آن در تومورها می‌تواند منجر به افزایش بیان ΔNp73 نیز شود اما در این مطالعه تفاوت معنی‌داری در سطح بیان واریانت ΔNp73 بین بافت‌های توموری و حاشیه‌ی توموری یافت نشد. با این وجود، مشخص شد که بیان واریانت های TAp73 و ΔNp73 در بافت‌های توموری به موازات یکدیگر افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد بیان واریانت‌های مذکور توسط عامل مشترکی تنظیم می‌شود و به عبارتی افزایش بیان همزمان واریانت‌های TAp73 و ΔNp73 در تومورها، ناشی از افزایش سطح و یا فعالیت فاکتور رونویسی E2F1 در سلول‌های توموری به عنوان القاء کننده‌ی مشترک بیان هر دو واریانت می‌باشد (۲۵و۲۴و۲۳). افزایش فعالیت E2F1 در سلول‌های توموری نیز ناشی از القاء هیپرفسفریلاسیون پروتئین سرکوبگر توموری رتینوبلاستوما (Rb) توسط واریانت ΔNp73 بوده که منجر به حذف اثر مهاری رتینوبلاستوما بر E2F1 و بنابراین آزادسازی آن می شود. E2F1 نیز بر هر دو پروموتر ژن TP73 اثر تنظیمی مثبت دارد و منجر به القاء بیان TAp73 و واریانت‌های انکوژنی ΔTAp73 (به جز ΔNp73) از پروموتر اول و القاء بیان ΔNp73 از پروموتر دوم می شود. بنابراین افزایش سطح بیان TAp73 در سلول‌های سرطانی پستانی از طریق افزایش سطح ΔNp73 منجر به افزایش سطح E2F1 و بنابراین افزایش سطح کلیه‌ی واریانت‌های انکوژنی ΔTAp73 شده که در نهایت منجر به بروز پدیده‌های انکوژنیک و تومورزایی می‌شوند (۲۱). اما با وجود افزایش بیان همزمان واریانت‌های TAp73 و ΔNp73 در تومورها، واریانت‌های ضد توموری TAp73 قادر به غلبه بر واریانت های انکوژنی ΔNp73 و مهار رشد و پیشرفت تومور نمی‌باشند. زیرا افزایش بیان واریانت‌های ΔNp73 به عنوان مهار کننده‌های غالب منفی واریانت‌های TAp73 حتی در سطوح کم، می‌تواند منجر به افزایش تشکیل هترودوپلکس بین پروتئین‌های ΔNp73 و TAp73 و

همچنین افزایش رقابت در اتصال به DNA و بنابراین مهار القاء رونویسی از ژن‌های درگیر در پاسخ به آسیب DNA توسط TAp73 و درنهایت حذف عملکردهای ضد توموری TAp73 شود. علاوه بر آن واریانت‌های ΔNp73 در سطح پروتئینی نیز از واریانت‌های TAp73 پایدارترند که این پایداری می‌تواند منجر به تجمع بیشتر و طولانی مدت تر و در نتیجه غلبه ی بیشتر پروتئین-های ΔNp73 بر TAp73 و در نهایت ایجاد زمینه های انکوژنیک در سلول شود. از طرف دیگر، پروتئین‌های ΔNp73 قادرند با p53 نیز برای اتصال به مکان های اتصالی آن در DNA رقابت کنند و به این ترتیب عملکردهای ضد توموری آن را نیز مهار کنند (۲۲و۲۱). علاوه بر این، به دنبال آسیب DNA پروتئین های ΔNp73 قادرند به طور مستقیم در محل آسیب قرار گیرند و از طریق برهم کنش با پروتئین حسگر آسیب DNA (BP1۵۳) مانع از فعال شدن پروتئین ATM کیناز و در نتیجه مهار فسفریلاسیون و فعال شدن p53 شوند. به این ترتیب نیز از فعالیت های ضد توموری p53 در سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کنند. TAp73 و p53 با مهار بیان ژن آنزیم تلومراز نیز قادرند از سرطانی شدن سلول ها جلوگیری کنند. بیان ژن تلومراز در بافت‌های طبیعی دیده نشده اما در انواعی از تومورهای انسانی بیان آن به اثبات رسیده است. پروتئین‌های ΔNp73 از طریق تداخل با TAp73 و p53، از مهار بیان ژن تلومراز جلوگیری کرده و بنابراین زمینه را برای فعالیت تلومراز فراهم می‌کنند و به این ترتیب نیز مانع وقوع آپوپتوز و بنابراین حفظ حالت تکثیری سلول‌های سرطانی می‌شوند. علاوه بر تداخل با عملکردهای ضد توموری پروتئین های TAp73 و p53، پروتئین‌های ΔNp73 قادر به القاء هیپرفسفریلاسیون پروتئین ضد توموری رتینوبلاستوما و در نتیجه برداشت اثر مهاری آن از E2F1 می‌باشند. به این ترتیب سطح پروتئین‌های فعال E2F1 افزایش یافته و با القاء رونویسی از ژن های دخیل در گذر از فاز G1 به S، منجر به پیشرفت تکثیر سلول های سرطانی می شوند. در نتیجه، افزایش بیان واریانت ΔNp73 به دنبال افزایش بیان TAp73 در سلول‌های سرطانی، با مهار مسیر های اصلی مهار کننده‌ی رشد تومور (مسیرهای وابسته به TAp73، p53 و Rb) منجر به بروز اثرات انکوژنیک نظیر افزایش رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی، اعطای پتانسیل تهاجمی و همچنین مقاومت در برابر شیمی درمانی و اشعه درمانی و در نهایت حفظ بقاء سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۱و۱۷و۱۶). قابل ذکر است که در سلول‌های طبیعی نیز پس از بروز آسیب‌های DNA، افزایش سطح بیان واریانت TAp73 منجر به افزایش سطح بیان واریانت ΔNp73 می‌شود اما پروتئین‌های ΔNp73 به سرعت طی یک مسیر وابسته به c-jun تجزیه می‌شوند تا اثر مهاری آن‌ها از پروتئین های TAp73 برداشته و پاسخ‌های لازم به آسیب های ژنومی داده شوند (۲۴). اما ظاهرا در سلول های سرطانی این مکانیسم مختل شده یا اینکه قادر به تخریب کلیه‌ی پروتئین های افزایش یافته ی ΔNp73 نمی‌باشد و بنابراین بیان کنترل نشده‌ی واریانت ΔNp73 یا افزایش بیان ΔNp73 همزمان با افزایش بیان TAp73 پیامدهای نامطلوبی برای سلول‌های سرطانی به دنبال دارد. با این وجود، برای حصول اطمینان و تائید فرضیه‌ی اخیر نیاز به بررسی‌های بیشتر در ارتباط با پروتئین ها و مکانیسم‌های دخیل در تخریب و تجزیه ی ΔNp73 در سلول‌های سرطانی می‌باشد. علاوه بر آن، مطالعه‌ی الگوی بیان سایر واریانت‌های انکوژنی ژن TP73 و ارتباط بیان آن‌ها با تومورزایی در پستان و همچنین مطالعه و تحقیق در زمینه‌ی نحوه-ی کنترل بیان آن ها در سرطان‌ها پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

افزایش بیان معنی دار واریانت TAp73 در بافت‌های توموری نشان می‌دهد که می‌توان از آن به عنوان مارکری برای تشخیص تومورهای بدخیم پستانی سود جست. افزایش بیان همزمان و معنی‌دار واریانت‌های ΔNp73 و TAp73 در بافت‌های توموری را نیز می‌توان به عنوان شاخصی از بدخیمی سلول‌های اپیتلیالی پستان که در تشخیص آن ها کمک کند، در نظر گرفت. افزایش بیان TAp73، از طریق افزایش بیان واریانت انکوژنی ΔNp73 منجر به تومورزایی می‌شود. به عبارتی افزایش بیان ΔNp73 همزمان با افزایش بیان TAp73، از طریق تداخل با عملکردهای سرکوبگر توموری TAp73 منجر به بروز پدیده‌های انکوژنی و در نهایت تومورزایی می‌شود. در نتیجه، افزایش بیان واریانت سرکوبگر توموری TAp73 می‌تواند به طور غیرمستقیم منجر به بروز سرطان پستان شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از همکاری بیماران محترم و خانواده‌های ایشان، کارکنان گرامی پارک علمی فناوری استان آذربایجان شرقی، بیمارستان نور نجات تبریز و مرکز پاتولوژی آذربایجان و همچنین از همکاران محترم آزمایشگاه رادیوبیولوژی و گروه زیست شناسی دانشکده‌ی علوم طبیعی دانشگاه تبریز کمال تشکر و قدردانی را ابراز می‌نمایند.

References

1. Jemal A, Center MM, Desantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev* 2010; **19**(8): 1893-1907.
2. Korde LA, Zujewski JA, Kamin LS, Domchek S, Anderson WF, Bartlett JM, Gelmon K, et al. Multidisciplinary Meeting on Male Breast Cancer: Summary and Research Recommendations. *Journal of Clinical Oncology* 2010; **28**(12): 2114–2122.
3. Sariego J. Breast cancer in the young patient. *The American Surgeon* 2010; **76**(12): 1397–1401.
4. Woodward WA, Strom EA, Tucker SL, McNeese MD, Perkins GH, Schechter NR, et.al. Changes in the 2003 American Joint Committee on Cancer Staging for Breast Cancer Dramatically Affect Stage-Specific

Survival. *Journal of Clinical Oncology* 2003; **21**(17): 3244–3248.

5. Edge SB, Compton cc. American Joint Committee on Cancer. The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010; **17**(6): 1471-1474.
6. Kasper DL, Braunwald E, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Fauci AS. *Harrison's Principles of Internal Medicine*: Breast Cancer. 16th ed. ISBN 978-0-07-146633-2. New York, McGraw-Hill, 2004; 1245-1291.
7. Khatib OMN. Guidelines for the early detection and screening of breast cancer. 1st ed. World Health Organization, Regional Office for the Eastern Mediterranean, 2006; PP: 11-17.
8. Bigbee W, Herberman RB. Tumor markers and immunodiagnosis. In: Bast RC Jr, Kufe Kufe, Pollock RE, et al., editors. *Cancer Medicine.* 6th ed. Hamilton,Ontario Canada: BC Decker Inc; 2003.
9. Campeau Ph. M, Foulkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet* 2008; **124**(1): 31–42.
10. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and Tumor suppressor genes in breast cancer. *The Oncologist* 2004; **9**(4): 361-377.
11. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, et.al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997; **90**(4): 809-819.
12. Dötsch V, Bernassola F, Coutandin D, Candi E, Melino G. p63 and p73 the ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2**(9): 887.
13. Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC. P53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ* 2006; **13**(6): 962-972.
14. Jost CA, Marin MC, Kaelin WG. P73 is a simian (human) p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 1997; **389**(6647): 191-194.
15. Ishimoto O, Kawahara C, Enjo K, Obinata M, Nukiwa T, Ikawa S. Possible oncogenic potential of DeltaNp73: a newly identified isoform of human p73. *Cancer Res* 2002; **62**(3): 636-641.
16. Zaika AI, Slade N, Erster SH, Sansome C, Joseph TW, Peari M, et.al. DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med* 2002; **196**(6): 765-780.
17. Stiewe T, Theseling CC, Pützer BM. Transactivation-deficient Delta.TAp73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *J Biol Chem* 2002; **277**: 14177-14185.
18. Puig P, Capodieci P, Drobnjak M, Verbel D, Prives C, CordonCardo C, et.al. p73 Expression in human normal and tumor tissues: Loss of p73alpha expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Clinical Cancer Res* 2003; **9**(15): 5642–5651.
19. Concin N, Becker K, Slade N, Erster S, Mueller-Holzner E,Ulmer H, Daxenbichler G, et al. Transdominant DeltaTAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer, Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo. *Cancer Res* 2004; **64**(7): 2449–2460.
20. Douc-Rasy S, Barrois M, Echeynne M, Kaghad M, Blanc E, Raguenze G, et.al. DeltaNp73alpha accumulates in human neuroblastic tumors. *Am J Pathol* 2002; **160**(2): 631-639.
21. Buhlmann S, Pützer BM. ΔNp73, a matter of cancer: mechanisms and clinical implications. *Biochim Biophys Acta.* 2008; **1785**(2): 207-216.
22. Rufini A, Agostini M, Grespi F, Tomasini R, Sayan BS, Niklison-Chirou MV, et.al. p73 in Cancer. *Genes & Cancer* 2011; **2**(4): 491-502.
23. Domínguez G, García JM, Pen˜a C, Silva J, Garcia V, Martinez L, et.al. DeltaTAp73 Upregulation Correlates With Poor Prognosis in Human Tumors: Putative In Vivo Network Involving p73 Isoforms, p53, and E2F-1. *J Clin Oncol* 2006; **24**(5): 805-815.
24. Dulloo I, Gopalan G, Melino G, Sabappathy K. The ant apoptotic DeltaNp73 is degraded in a c-Jun–dependent manner upon genotoxic stress through the antizyme-mediated pathway. *PNAS* 2010; **107**(11): 4902–4907.
25. Coates PJ. Regulating p73 isoforms in human tumours. *J Pathology* 2006; **210**(4): 385–389.