



دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

دانشکده پزشکی - بخش ژنتیک

عنوان طرح: بررسی نوع موتاسیون اکسون های ۵ و ۶ ژن P53 در نمونه

های سرطانی کولورکتال غربال شده در شهر اصفهان

گزارش نهایی طرح تحقیقاتی: تیرماه ۱۳۸۷

( مصوب به شماره: ۱۸۴۱۲۷ )

مجری طرح: دکتر رحیم گل محمدی

همکاران طرح: دکتر مهدی نیکبخت، دکتر منصور صالحی و دکتر محمد رضا مهاجری

خلاصه

بررسی نوع جهش اکسون های ۵ و ۶ ژن P53 در نمونه های سرطانی کولورکتال غربال شده در

شهر اصفهان

مقدمه وهدف:

بررسی تغییرات ژنتیکی در سرطان ها از دید مولکولی جهت تشخیص، پی گیری و درمان، لازم و ضروری است. ژن P53 مهمترین ژن مهارکننده تومور می باشد. سرطان کولورکتال یکی از علت های اصلی مرگ و میر در دنیا است میزان جهش missense and nonsense ژن P53 در نمونه های سرطانی کولورکتال در نواحی مختلف متفاوت گزارش شده است. هدف ما از این مطالعه مشخص کردن نوع جهش در اکسون های ۵ و ۶ ژن P53 در نمونه های سرطانی کولورکتال غربال شده در شهر اصفهان می باشد.

مواد وروش:

این مطالعه از نوع توصیفی و تحلیلی است که بر روی ۶۱ نمونه سرطانی کولورکتال انجام شد. DNA نمونه ها با کیت وروش فنل کلروفرم، ایزوآمیل الکل در بخش ژنتیک دانشکده پزشکی اصفهان استخراج گردید و آگزون های ۵ و ۶ ژن P53 با PCR تکثیر گردید، و متعاقب الکتروفورز افقی با روش SSCP و DNA sequencing جهش اکسون های ۵ و ۶ تعیین شد.

یافته ها:

از ۶۱ نمونه سرطان کولورکتال ۱۵ نمونه (۲۵٪) زن و ۴۶ مورد (۷۵٪) مرد بود، ۱۱ نمونه (۱۸٪) در ناحیه رکتوم و ۵۰ نمونه (۸۲٪) در بخش های مختلف روده بزرگ قرار داشتند. سن نمونه های مورد مطالعه بین ۴۴ تا ۹۱ سال و میانگین سن آنها  $62/44 \pm$  سال بود. در ۱۴ نمونه (۲۳٪) همراه با موتاسیون در سرطان کولورکتال ۱۸ جهش نقطه ای در اکسون های ۵ و ۶ ژن P53 مشاهده شده که ۱۶ مورد (۸۹٪) از صحن ها از نوع missense و ۲ مورد (۱۱٪) از نوع nonsense بود. بحث و نتیجه گیری:

در مطالعه حاضر missense mutations ژن P53 در سرطان کولورکتال در اکسون های ۵ و ۶ از

نوع غالب بود

کلیدواژه: سرطان کولورکتال، جهش missense and nonsense، ژن P53، اکسون

## فهرست مطالب

فصل اول کلیات	۱
فصل دوم اهداف و فرضیات	۶
۲-۱ هدف کلی	۷
۲-۲ اهداف جزئی	۷
۲-۳ اهداف کاربردی	۷
۲-۴ سؤالات پژوهشی و فرضیات	۷
	.....
فصل سوم مواد و روش ها	۸
۳-۱ روش اجرای طرح	۹
۳-۲ نحوی جمع آوری نمونه‌ها	۹
۳-۳ وسایل مورد نیاز برای استخراج <i>PCR</i> و <i>SSCP</i>	۱۲
استخراج <i>DNA</i>	۱۴
<i>PCR</i> اکسون های ۵ و ۶ ژن <i>P53</i>	۱۶
الکتروفورز محصولات <i>PCR</i> اکسون‌های ۵ تا ۶ ژن <i>P53</i>	۲۰

۲۳	فصل چهارم نتایج
۲۵	شکل (۱-۴): مقطع عرضی بافت رکتوم
۲۶	شکل (۲-۴): مقطع عرضی بافت کولون
۲۶	شکل (۳-۴): مقطع عرضی آدنو کارسینومای موسینی بافت کولون
۲۷	شکل (۴-۴): محصول PCR اکسون ۶ و ۵ ژن P53
۲۷	شکل (۴-۵): محصول PCR اکسون ۶ و ۵ ژن P5
۲۸	شکل (۴-۶): محصول PCR اکسون ۶ و ۵ ژن P53
۲۹	شکل (۴-۷): محصول PCR اکسون ۶ و ۵ ژن P53
۳۰	شکل (۴-۸): SSCP اکسون ۶ و ۵ ژن P53
۳۱	شکل (۴-۹): محصول PCR اکسون ۶ و ۵ ژن P53
۳۲	شکل (۴-۱۰): محصول PCR اکسون ۶ و ۵ ژن P53
۳۳	شکل (۴-۱۱): توالی اکسون های ۵ و ۶ ژن p53
۳۴	شکل (۴-۱۲): توالی اکسون های ۵ و ۶ ژن p53
۳۴	شکل (۴-۱۳): تغییر کدون از TTT به TAT در توالی
۳۵	شکل (۴-۱۴): تغییر کدون از GAT به AAT
۳۶	شکل (۴-۱۵): تغییر کدون از GCA به GGA
۳۶	شکل (۴-۱۶): تغییر کدون از ATA به TAA
۳۷	جدول ۱: تغییر در توالی نوکلئوتیدها
۳۷	موتاسیون missense و nonsense در آدنو کارسینومای کولورکتال

۳۸ ..... فصل پنجم بحث و نتیجه گیری

۴۲ ..... منابع

۴۶ ..... خلاصه انگلیسی

## فهرست منابع:

- 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: quantitative study. *World J Gastroenterol*. 2004 Feb 1;10(3):439-42.
۳. محمد رضا انصاری امجدی هیوا، نوروییگی نسیم، زمانی فرشته، میر ناصری محمد مهدی، خالق نژاد احمد و ملک زاده رضا. بررسی گذشته نگر میزان بقا و تعدادی از عوامل موثر بر آن در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال جراحی شده در دو بیمارستان شریعتی و مهر تهران. فصلنامه گوارش دوره ۱۲ شماره ۱ بهار ۱۳۸۶ صفحات ۷-۱۵
- 4-Lipkin M, Reddy B, Newmark H, Lamprecht SA. Dietary factors in human colorectal cancer. *Annu Rev Nutr*. 1999;19:545-86.
- 5-Sandler RS. Epidemiology and risk factors for colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 1996 Dec;25(4):717-35.
- 6-Soussi T. The p53 tumour suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. *Mol Med Today*. 1996 Jan;2(1):32-7.
- 7- Steinmetz KA, Kushi LH, Bostick RM, Folsom AR, Potter JD. Vegetables, fruit, and colon cancer in the Iowa Women's Health Study. *Am J Epidemiol*. 1994 Jan 1;139(1):1-15.
- 8-Wargovich MJ, Baer AR, Hu PJ, Sumiyoshi H. Dietary factors and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 1988 Dec;17(4):727-45.
- 9-Turesky RJ, Lang NP, Butler MA, Teitel CH, Kadlubar FF. Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. *Carcinogenesis*. 1991 Oct;12(10):1839-45.
- 10-Sandler RS. Epidemiology and risk factors for Colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 1996 Dec;25(4):717-35.
- 11-Anti M, Armelao F, Marra G, Percesepe A, Bartoli GM, Palozza P, Parrella P, Canetta C, Gentiloni N, De Vitis I, et al. Effects of different doses of fish oil on rectal cell proliferation in patients with sporadic colonic adenomas. *Gastroenterology*. 1994 Dec;107(6):1709-18.
- 12-Bostick RM, Potter JD, Kushi LH, Sellers TA, Steinmetz KA, McKenzie DR, Gapstur SM, Folsom AR. Sugar, meat, and fat intake, and non-dietary risk factors for colon cancer incidence in Iowa women (United States). *Cancer Causes Control*. 1994 Jan;5(1):38-52.
- 13-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.
- 14 - 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.
- 15-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.
- 16-Renehan AG, O'Dwyer ST, Haboubi NJ, Potten CS. Early cellular events in colorectal carcinogenesis. *Colorectal Dis*. 2002 Mar;4(2):76-89.

- 17-Perrone G, Vincenzi B, Santini D, Verzi A, Tonini G, Vetrani A, Rabitti C. Correlation of p53 and bcl-2 expression with vascular endothelial growth factor(VEGF), microvessel density (MVD) and clinico-pathological features in coloncancer. *Cancer Lett.* 2004 May 28;208(2):227-34.
- 18-Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2004 Apr;25(4):177-81. Review.
- 19- Ruley HE. p53 and response to chemotherapy and radiotherapy. *Important Adv Oncol.* 1996;:37-56.
- 20-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.
- 21-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.
- 22- Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N; TP53-CRCCollaborative Study Group. The TP53 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
- 23-Tullo A, D'Erchia AM, Honda K, Mitry RR, Kelly MD, Habib NA, Saccone C, Sbisa E. Characterization of p53 mutations in colorectal liver metastases and correlation with clinical parameters. *Clin Cancer Res.* 1999 Nov;5(11):3523-8.
- 24-Shunsuke Kato, Shuang- Yin Han, Wen Liu, Kazunori Otsuka. Understanding the function- Structure and function mutation relationship of p53 tumor suppressor protein by high resolution missense mutation analysis. *PNAS:* 2003; vol 100, no 17: 8424-8429.
- 25-Pluquet O, Hainaut P. Genotoxic and non genotoxic pathways of p53 induction. *Cancer Letters.* 2001;174:1-15.
- 26- de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 1999 Apr 1;13(7):768-85.
- 27-Katsumata K, Sumi T, Tomioka H, Aoki T, Koyanagi Y. Induction of apoptosis by p53, bax, bcl-2, and p21 expressed in colorectal cancer. *Int J Clin Oncol.* 2003 Dec;8(6):352-6.
- 28-Viale G, Pellegrini C, Mazzarol G, Maisonneuve P, Silverman ML, Bosari S. p21WAF1/CIP1 expression in colorectal carcinoma correlates with advanced disease stage and p53 mutations. *J Pathol.* 1999 Feb;187(3):302-7.
- 29-Smith ML, Seo YR. p53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis.* 2002 Mar;17(2):149-56.
- 30-Adimoolam S, Ford JM. P53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. 2003;2:947-954.
- 31- Offer H, Erez N, Zurer I, Tang X, Milyavsky M, Goldfinger N, Rotter V. The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA. *Carcinogenesis.* 2002 Jun;23(6):1025-32.
- 32-Mummenbrauer T, Janus F, Muller B, Wiesmuller L, Deppert W, Grosse F. p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell.* 1996 Jun 28;85(7):1089-99.
- 33-Ballal K, Zhang W, Mukhopadhyay T, Huang P. Suppression of mismatched mutation by p53: a mechanism for guarding genomic integrity. *J Mol Med.* 2002 Jan;80(1):25-32. Epub 2001 Oct 18.
- 34- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Nature. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. 1990 May 31;345(6274):458-60.
- 35-Cristofalo VJ, Pignolo RJ. Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiol Rev.*

1993 Jul;73(3):617-38.

36-Altshuler ML, Servein SE, Glukhov AI. The tumor and telomerase. *Biochemistry (Mosc)*. 2003; Dec; 68(12)pp; 127-83.

37-Vinay Kumar, Abbaas Fausto. *Pathology Basis of Disease 7th edition*, Saunders; 2005, pp; 862-867.

38- Ruley HE. p53 and response to chemotherapy and radiotherapy. *Important Adv Oncol*. 1996;:37-56.

39- Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat*. 1974 Dec; 141(4):537-61.

40- Zhang JS, Caplin S, Bosman FT, Benhattar J. Genetic diversity at the p53 locus between primary human colorectal adenocarcinomas and their lymph-node metastases. *Int J Cancer*. 1997 Mar 17; 70(6):674-8.

41-Meplan C, Mann K, Hainaut P. Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J Biol Chem*. 1999 Oct 29; 274(44):31663-70.

42- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*. 2003 Oct 15; 116(Pt 20):4077-85.

43-Yamashita K, Yoshida T, Shinoda H, Okayasu I. Novel method for multaneous 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.

44-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.

45-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.

46-Yang Y, Xia Q, Lian F. [p53 mutations and protein overexpression in primary colorectal cancer and its liver metastasis] *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 1999 Mar; 21(2):114-8. Chinese

47-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):130-7.

48- from: <http://www.colorado.edu/MCDB2150Fall/notes/L25.html>.

49- Logullo AF, de Moura RP, Nonogaki S, Kowalski LP, Nagai MA, Simpson AJ. LL A proposal for the integration of immunohistochemical staining and DNA-based techniques for the determination of TP53 mutations in human carcinomas. *Diagn Mol Pathol*. 2000 Mar; 9(1):35-40.

50-Becker WM, Kleinsmith LJ, Hardin J. *The word of the cell*. Forth edition. Addison Wesley Longman. 2000. Page; 571-577.

۵۱- گل محمدی رحیم، نیکبخت مهدی، صالحی منصور. بررسی موتاسیون اکسون ۵ ژن P53 در سرطان کولورکتال. *مجله دانشکده علوم پزشکی اصفهان* ۱۳۸۴ سال ۲۳ شماره ۷۸۲ صفحات ۸۱ تا ۸۷.

۵۲- گل محمدی رحیم، نیکبخت مهدی، صالحی منصور. بررسی فراوان جهش اکسون ۶ ژن P53 با روش PCR-SSCP در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال فیض کاشان، ۱۳۸۵ دوره دهم شماره ۲ صفحات ۱ تا ۶.

53-Leahy DT, Salman R, Mulcahy H, Sheahan K, O'Donoghue DP, Parfrey NA. *J Pathol*. Prognostic significance of p53 abnormalities in colorectal carcinoma detected by PCR-SSCP and immunohistochemical



analysis.1996 Dec;180(4):364-70.

54- Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue.Nucleic Acids Res. 1999 Aug 15;27(16):e12.

55-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

56-Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction.Ann Biol Clin (paris).1990;48(8):579-82.

57-Rolfs A,Schulder I,Finck U.PCR;Clinical diagnostics research.Berlin,spring Verlag.1992;1-66.

58-Dieffen Bach CW,Dveksler GS.PCR primer.New york,Cold spring Harbor Laboratory press.1995;83-99.

59- Pan ZZ, Wan DS, Chen G, Li LR, Lu ZH, Huang BJ. Co-mutation of p53, K-ras genes and accumulation of p53 protein and its correlation to clinicopathological features in rectal cancer.World J Gastroenterol. 2004 Dec 15;10(24):3688-90.

60- Farcy E, Fleury C, Lelong C, Dubos MP, Voiseux C, Fiévet B, Lebel JM Mar Environ Res. Molecular cloning of a new member of the p53 family from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and seasonal pattern of its transcriptional expression level 2008 Aug;66(2):300-308. Epub 2008 May 10.

61-Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Apr;86(8):2766-70.

62-Hayashi K. PCR Methods Appl. 1991 Aug;1(1):34-8.

63-Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? Hum Mutat. 1993;2(5):338-46.

64- Orti G, Hare MP, Avise JC.Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. Mol Ecol. 1997 Jun;6(6):575-80.

65-Burden DW,Whitheny DB.Biotechnenology proteins to PCR.USA,Birkhauser.1995;173-189.

66-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.

67-Kovach JS, Hartmann A, Blaszyk H, Cunningham J, Schaid D, Sommer SS. Mutation detection by highly sensitive methods indicates that p53 gene mutations in breast cancer can have important prognostic value. Proc Natl Acad Sci U S A.1996 Feb 6;93(3):1093.

68- Tyl RW, Friedman MA. Effects of acrylamide on rodent reproductive performance.Reprod Toxicol. 2003 Jan-Feb;17(1):1-13.

69- Spiker S. A modification of the acetic acid-urea system for use in microslab polyacrylamide gel electrophoresis.Anal Biochem. 1980 Nov 1;108(2):263-5.

70-Chiu SJ, Hsu TS, Chao JI. Expression of securin promotes colorectal cancer cell death via a p53-independent.pathway after radiation. Chem Biol Interact. 2007 Dec 15;170(3):153-61. Epub 2007 Aug 8.

71-Munro AJ, Lain S, Lane DP. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer.Br J Cancer. 2005 Feb 14;92(3):434-44.

72-Ford JM. Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53.Mutat Res. 2005 Sep 4;577(1-2):195-202.

73-Ishioka C, Sato T, Gamoh M, Suzuki T, Shibata H, Kanamaru R, Wakui A, Yamazaki T.P53 mutations in colorectal cancer assessed in both genomic DNA and cDNA as compared to the presence of p53 LOH.Int J Oncol. 2002 Aug;21(2):409-15.

## Characterization of p53 Missense and Nonsense mutations in exons 5 and 6 in the colorectal cancer samples

### **Abstract**

**Introduction:** Assessment of genetic changes from a molecular viewpoint is essential for diagnosis, follow-up and treatment. P53 gene is the most important tumor suppressor which involved in colorectal cancer (CRC). CRC is one of the major causes morbidity and mortality, Incident rate of CRC mutation missense and non sense mutation of p53 gene were reported from many different geographic area. Purpose of this study was detect missense and non sense mutation of p53 gene in CRC admitted to Isfahan hospital .

**Materials and Methods:** This descriptive-analytical study was conducted on 61 colorectal cancer specimens. DNA was extracted by phenol chloroform isoamil alcohol and standard kit after doing tissue processing and pathological diagnostic in genetic department of Isfahan medical school. Exon 5 and 6 of the p53 Gene were amplified by using specific primers in a PCR assay, and consequently mutations was detected by SSCP and DNA sequencing.

**Results:** Out of 61 subject, 15(25%) were female and 46(75%) male. Their age ranged from 44 to 91 with the mean being  $62/44 \pm 9$  years. In this study there was 18 point mutation in 14 samples(23%) in exon 5 and 6 P53 gene adenocarcinoma colon and rectum.

**Conclusions:** Our study demonstrates that missene mutation exon 5 and 6 of P53 gene are dominant in Isfahan area.

**Key words:** Colorectal Cancer, missense and nonsensense mutations, P53 gene