

مطالعه‌ی بیان دو واریانت $p63$ ($d4TAp63$ و $\Delta Np73L$) به عنوان مارکر ملکولی در تشخیص و

پیش آگهی سرطان پستان

مریم مرادی نسب¹، محمدعلی حسینپور فیضی²، ریحانه روانبخش کاوکانی¹، ناصر پولادی³، آئیدا صدایی بناب¹، پروین آذرغام⁴، وحید منتظری⁵، اشرف فخرجو⁶

1. کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

2. استاد رادیوبیولوژی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران (نویسنده‌ی مسوول)، تلفن ثابت: 041-3336 22 80، pourfeizi@eastp.ir

3. استادیار زیست شناسی سلولی و ملکولی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

4. کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

5. استاد جراحی توراکیس، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

6. استاد پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: ژن $TP63$ ، بعنوان قدیمی‌ترین همولوگ $TP53$ ، دو واریانت N-ترمینالی اصلی را بوسیله‌ی پروموتورهای مختلف کد می‌کند. واریانت $TAp63$ با فعالیت سرکوبگری تومور و $\Delta Np63$ با فعالیت انکوژنی. در اثر حذف آگزون شماره‌ی 4 هر یک از واریانت‌های مذکور، دو واریانت N-ترمینالی دیگر نیز در دهه‌ی گذشته برای $p63$ گزارش شد: $d4TAp63$ و $\Delta Np73L$ ، اما همچنان عملکرد دقیق این واریانت‌ها در سلول‌های سالم و توموری مشخص نشده‌است. در این مطالعه الگوی بیانی واریانت‌های $p63$ و صلاحیت بیان واریانت‌های $d4TAp63$ و $\Delta Np73L$ به عنوان مارکر مولکولی بالقوه در تشخیص تومورهای پستان مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در مجموع در 30 نمونه‌ی توموری و 20 نمونه‌ی مربوط به حاشیه‌ی تومور ارزیابی بیان ژن با استفاده از تکنیک RT-nested PCR نیمه کمی انجام شد. نتایج بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه 16 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

یافته‌ها: واریانت‌های $d4TAp63$ و $\Delta Np73L$ همواره در تمامی نمونه‌هایی که واریانت‌های $TAp63$ و $\Delta Np63$ بیان دارند، بطور همزمان با واریانت‌های طویل مربوطه بیان می‌شوند. در نمونه‌های توموری و حاشیه‌ی تومور میانگین شدت بیان واریانت $\Delta Np73L$ بطور معنی داری بالاتر از میانگین شدت بیان برای واریانت $d4TAP63$ می‌باشد (به ترتیب $P=0/008$ و $P=0/009$). سطح بیان واریانت $\Delta Np63$ نیز در نمونه‌های توموری و حاشیه‌ی تومور نسبت به $TAp63$ بالاتر می‌باشد که در نمونه‌های توموری این اختلاف معنی دار بوده ($P=0/03$). اما در حاشیه‌ی تومور اختلاف بین این دو گروه معنی دار نمی‌باشد ($P=0/11$).

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده فعالیت مهار کنندگی غالب منفی $\Delta Np63$ و نقش احتمالی آن به عنوان انکوژن را در سرطان پستان مطرح می‌کند. واریانت $\Delta Np73L$ نیز در مقایسه با $d4TAp63$ ، در بافت‌های توموری و سالم پستان احتمالا می‌تواند بعنوان واریانت غالب منفی عمل می‌کند و هر دو واریانت $\Delta Np73L$ و $d4TAp63$ با داشتن الگوی بیانی مشابه واریانت‌های طویل مربوط به خود ($\Delta Np63$ و $TAp63$) و ضمن بیان همزمان با این واریانت‌ها احتمالا در تقویت عملکرد انکوژنیک و سرکوبگر توموری آنها در سلول‌های سالم و توموری پستان نقش دارند. از سوی دیگر با توجه به الگوی بیانی واریانت‌های $\Delta Np73L$ و $d4TAp63$ آنها را نمی‌توان به عنوان مارکر ملکولی در تشخیص تومورهای پستان در نظر گرفت.

واژه‌های کلیدی: بیان، ژن $TP63$ ، سرطان پستان، مارکر مولکولی، واریانت $d4TAp63$ ، واریانت $\Delta Np73L$.

وصول مقاله: 92/3/18 اصلاحیه نهایی: 92/2/26 پذیرش: 93/2/16

القاء کند و باعث القای آپوپتوز و توقف چرخه‌ی سلولی شده و همچنین نقش مهمی در تمایز سلولی ایفا می‌کند. در مقابل واریانت $\Delta Np63$ مهار کننده‌ی غالب منفی برای اعضای خانواده‌ی $p53$ ($p53$ ، $TAp63$ و $TAp73$) می‌باشد و عملکرد انکوژنیک دارد (4 و 3). مطالعات بالینی بیش بیان $\Delta Np63\alpha$ را در 85% تا 100% از تمام موارد کارسینومای سلول‌های سنگفرشی (SCC) (از جمله SCC سر و گردن (7 و 6)، مری (8)، ریه (9)، و دهانه رحم (10)) نشان داده‌اند. در نتیجه، $p63$ توانایی تنظیم تعدادی از ژن‌ها با نقش‌های متنوع را دارد و دارای اثر تنظیمی متضاد با بیان مقادیر مختلف از واریانت‌های $TAp63$ و $\Delta Np63$ می‌باشد. از اینرو در اپیتلیوم نرمال تعادل میان این ایزوفرم‌های پروتئینی نقش مهمی در تکثیر و تمایز صحیح ایفا می‌کند و تغییر غیر طبیعی در بیان این ایزوفرم‌ها به احتمال زیاد تاثیر بسزایی در تومورزایی دارد (11).

$\Delta Np63\gamma$ اگرورژن بیان شده در سلول‌های اریترولوکمی در پاسخ به استرس‌های ژنوتوکسیک تجمع می‌یابد و می‌تواند بیان P21 را افزایش دهد، در نتیجه باعث توقف پیشرفت چرخه سلولی شود، در حالی که $\Delta Np63\alpha$ اگرورژن به طور مستقیم به پروموتور P21 متصل می‌شود و بیان را مهار می‌کند (12). $\Delta Np63\alpha$ ممکن است از طریق مکانیسم‌های دیگر نیز باعث تومورزایی شود. به عنوان مثال، $\Delta Np63\alpha$ باعث افزایش بیان پروتئین شوک حرارتی 70 (HSP70) می‌شود، و بیان هر دو پروتئین در نمونه‌های بیوپسی HNSCC اولیه ارتباط معنی داری دارد (13)، همچنین ممکن است با تقویت انکوژن Ras به عنوان یک انکوژن عمل کند (14).

بطور کلی $p63$ در سلول‌های اپیتلیال مطبق⁸ مانند پوست، مری، دهانه‌ی خارجی رحم و مثانه و در سلول‌های بازال از ساختارهای غده‌ای پروستات، غدد بزاقی و ریه بیان می‌شود.

سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی در میان زنان و دومین عامل عمده‌ی مرگ‌های ناشی از سرطان می‌باشد. در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای معرفی مارکرهای مولکولی که بتواند ماهیت تومورها را پیش بینی کرده و به عنوان فاکتور کمکی تشخیصی و پیش آگهی در کنار روش‌های دقیق پاتولوژیکی به کار برده شوند در حال انجام است. در این راستا مارکرهایی مطالعه و معرفی شده‌اند اما مارکری که دارای حساسیت بالا بوده و بتواند اکثر انواع بیماری را پوشش دهد در دسترس نمی‌باشد (2 و 1).

$p63$ به عنوان قدیمی‌ترین عضو خانواده‌ی پروتئین سرکوبگر تومور $p53$ ، نقش مهمی در تمایز اپیدرمال و تومورزایی دارد و دارای ساختمان پروتئینی مشابه $p53$ می‌باشد: شامل یک دمین مرکزی اتصال به DNA^1 (DBD)، یک دمین فعال کننده‌ی رونویسی TA^2 و یک دمین الیگومریزاسیون³ (OD). پروتئین $p63$ انسانی، توسط ژن $TP63$ کد گذاری می‌شود که روی کروموزوم 28-27q3 واقع شده است و شامل 15 اگزون و 2 پروموتور می‌باشد (3). رونویسی از پروموتور اول که در بالادست اگزون 1 واقع شده، پروتئین $TAp63$ با طول کامل⁴ را نتیجه می‌دهد و در اثر رونویسی از پروموتور دوم که در داخل اینترون 3 قرار گرفته نیز یک واریانت ناقص (بریده شده) N-ترمینالی⁵ بنام $\Delta Np63$ ایجاد می‌شود. در اثر آلترنیتیو اسپلایسینگ در انتهای 3' از $mRNA$ TP63 نیز چندین واریانت پروتئینی C-ترمینالی مانند α ، β ، γ ، δ و ϵ توصیف شده‌اند که در مجموع ده واریانت مختلف را داریم (5 و 4) (شکل 1).

واریانت $TAp63$ قادر است از طریق اتصال به پروموتور ژن‌های هدف $p53$ ، عملکردهای مشابه $p53$ را در سلول

¹ DNA binding domain

² Transactivation domain

³ Oligomerization domain

⁴ Full-length

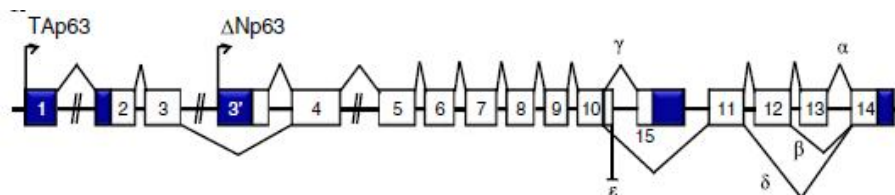
⁵ Aminoterminal truncated variants

⁶ Overexpression

⁷ Squamous cell carcinoma

⁸ Stratified epithelia

مطالعات مختلف به عنوان یک مارکر مولکولی برای سلول‌های میوایتلیال پستان معرفی شده است (15 و 3).



شکل 1: ساختار ژن *p63* (*TP63*) (4)

سرطان پستان و ارتباط بیان این واریانت‌ها با یکدیگر بررسی شد.

روش بررسی

نمونه‌گیری: این مطالعه بر روی 50 نمونه‌ی مربوط به بافت پستان از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان نور نجات تبریز انجام گرفت. نمونه‌های مورد نظر بصورت تازه⁹، تحت نظارت جراح متخصص توراکیس و با رضایت بیماران از کسانی که تحت عمل جراحی بیوپسی یا انواع ماستکتومی بودند، جمع آوری شده و در تیوب‌های عاری از RNase قرار داده شدند. نمونه‌ها بلافاصله به نیتروژن مایع منتقل شدند و تا مرحله‌ی استخراج در فریزر 80- نگه‌داری شدند. در مجموع 30 نمونه‌ی توموری و 20 نمونه از بافت‌های حاشیه‌ی تومور جمع‌آوری شد و در یک مطالعه‌ی مورد-شاهدی مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های مربوط به حاشیه‌ی تومور از محل دور از تومور که فاقد درگیری توموری بودند جمع‌آوری شدند.

استخراج RNA و RT-PCR: به منظور استخراج RNA کل¹⁰ از بافت، 100-50 میلی‌گرم از بافت مورد نظر به فویل منتقل شده، در هاون محتوی نیتروژن مایع خرد شد و با استفاده از محلول RNX plus TM و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (سیناژن-ایران) RNA کل استخراج شد. به دلیل حساسیت کار با RNA از نظر آلودگی با RNase

همچنین دیده شده که در ساختار پستان، *p63* تنها در هسته‌ی سلول‌های لایه‌ی میوایتلیال بیان می‌شود و طی

در دهه‌ی گذشته علاوه بر ایزوفرم‌های ذکر شده برای *p63*، دو ایزوفرم N ترمینالی دیگر نیز گزارش شده است که فاقد اگزون شماره‌ی چهار میباشند و عبارتند از: *d4TAp63* و *ΔNp73L*. در مطالعات انجام گرفته *ΔNp73L* در کارسینومای سلول‌های سنگفرشی حفره‌ی دهانی و تومورهای غدد بزاقی دیده شده اما در بافت نرمال غده‌ی بزاقی و موکوس غیر نئوپلاستیک سنگفرشی دهان دیده نشده است. همچنین در کارسینومای سلول‌های فلسی حفره‌ی دهانی واریانت‌های *d4TAp63* و *ΔNp73L* غالباً توسط تومورهای با متاستاز گره لنفاوی بیان می‌شوند و نتیجه‌گیری شده که این دو واریانت برای ترانسفورماسیون سلول نئوپلاستیک مهم هستند (16-18). از سوی دیگر طی بررسی 40 نمونه‌ی سالم و توموری پستان دیده شد که دو واریانت کوتاه فاقد اگزون 4 در نمونه‌های سالم و خوش خیم پستان بیان نمی‌شوند و تنها در نمونه‌های بدخیم قابل شناسایی اند (19).

هر چند مطالعات انجام گرفته حاکی از ارتباط واریانت‌های *d4TAp63* و *ΔNp73L* با ماهیت توموری در تعدادی از سرطان‌های انسانی می‌باشد اما همچنان نقش دقیق این واریانت‌ها در تومور زایی و خصوصاً پیشرفت تومورهای پستان مشخص نشده‌است. هدف این تحقیق، ارزیابی توانایی واریانت‌های *d4TAp63* و *ΔNp73L* به عنوان مارکر مولکولی در تشخیص و پیش‌آگهی سرطان پستان به منظور اتخاذ روش درمانی مناسب می‌باشد. در عین حال در این مطالعه پروفایل بیانی واریانت‌های مختلف ژن *p63* در

⁹ -Fresh

یافت. مرحله‌ی گسترش نهایی نیز به مدت 10 دقیقه و در 72 درجه انجام گرفت. واکنش PCR دوم با تغییر پرایمرهای برگشت (*ΔNp63ex6nst* برای *ΔNp73L* و *TAp63ex5out* برای *d4TAP63*) و در شرایطی مشابه PCR اول، با استفاده از 1 μl از محصول PCR اول و طی 33 سیکل انجام گرفت. یک واکنش PCR نیز برای ژن β2m به عنوان کنترل داخلی، با استفاده از پرایمرهای گزارش شده در جدول 1 و در شرایطی مشابه واریانت‌های p63 انجام شد.

جهت اطمینان از عدم آلودگی در واکنش‌های PCR، یک تیوب نیز به عنوان کنترل منفی به کار رفت که در آن به جای cDNA از آب دوبار تقطیر استفاده شد. در نهایت محصولات PCR حاصله در ژل آگارز 2 درصد بارگذاری شد.

جهت غیرفعال سازی این آنزیم کلیه‌ی لوازم مورد استفاده با محلول 0/1 DEPC¹¹ درصد تیمار گردید. پس از استخراج RNA، کمیت و کیفیت آن با کمک دستگاه Picodrop و الکتروفورز ژل آگارز بررسی گردید.

به منظور تبدیل RNAی کل استخراجی به cDNA و برای جلوگیری از آلودگی RNA حاصله با DNA، ابتدا مقادیر یکسان از RNA اولیه (1/5 میکروگرم از هر نمونه) با آنزیم DNaseI تیمار شد. سپس با استفاده از پرایمر oligo (dT)₁₈ و طی واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (RevertAidTM M-) (MuLV, Fermentase) به cDNA تبدیل شدند.

PCR & Nested PCR: پس از انجام واکنش رونویسی معکوس و بدست آوردن cDNA، به منظور تکثیر قطعه‌ی مورد نظر از پرایمرهای طراحی شده توسط Dario de Biase و همکاران، استفاده شد (19). واکنش PCR اول با استفاده از پرایمرهای گزارش شده در جدول 1 انجام شد. پرایمرهای *ΔNp63ex3'* و *ΔNp63ex7out* برای شناسایی واریانت‌های *ΔNp73L* و *ΔNp63*، و پرایمرهای *TAp63ex2* و *ΔNp63ex6nst* برای واریانت‌های *TAp63* و *d4TAP63* استفاده شدند. واکنش PCR اول با استفاده از 3.5 μL از cDNA تهیه شده به همراه 0.25 μL آنزیم Taq DNA polymerase (5 unit/μL)، 1.2 μL MgCl₂ (50mM)، 0.5 μL مخلوط dNTP (10mM)، 2.5 بافر تکثیر 10X، 0.6 μL از هر پرایمر بالا و پایین دست (10 μM) و آب تزریقی استریل (اتوکلاو شده) در حجم نهایی 25 μL با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر انجام گرفت. بعد از دناتوراسیون اولیه در 95 درجه سانتیگراد و به مدت 5 دقیقه، واکنش طی 38 سیکل و بصورت 30: ثانیه در 95 درجه، 30 ثانیه در 56 درجه برای *ΔNp73L* و 58 درجه برای *d4TAP63* و 40 ثانیه در 72 درجه ادامه

جدول شماره 1: پرایمرهای استفاده شده برای PCR و nested PCR

نام پرایمر و شماره آگزون	توالی پرایمر (5' -3')
$\Delta Np63ex3'$ (sense)	ACCTggAAAACAATgCCCAgAC
$\Delta Np63ex7out$ (antisense)	TTCATCCCTCCAACACAACACTgC
TAp63ex2 (sense)	ACCCCAgCTCATTTTCTTgga
TAp63ex5out (antisense)	GgTggggTCATCACCTTgATCT
$\Delta Np63ex6nst$ (antisense)	GCATggCTgTTCCCTCTACTC
Human $\beta 2mfw$ (sense)	CTACTCTCTTTTCTggCCTg
Human $\beta 2m rv$ (antisense)	GACAAgTCTgAATgCTCCAC

یافته ها

در این مطالعه 30 نمونه ی توموری پستان و 20 نمونه ی مربوط به بافت های حاشیه ی تومور مورد مطالعه قرار گرفتند. از 30 نمونه ی توموری، 25 نمونه در گروه بدخیم و 5 نمونه در گروه خوش خیم دسته بندی شدند (البته به دلیل تعداد کم نمونه های توموری خوش خیم در مقایسه با نمونه های توموری بدخیم، نمونه های خوش خیم را در آنالیزهای آماری وارد نکردیم و تنها به منظور بررسی الگوی بیان واریانت های $\Delta Np73L$ و $d4TAp63$ مورد توجه قرار گرفتند). از 25 نمونه ی بدخیم نیز، 7 نمونه در stage 1، 9 نمونه در stage 2 و 9 نمونه در stage 3 قرار داشتند. همچنین تومورهای بدخیم بدلیل شیوع بالای کارسینومای مهاجم مجرای از این نوع انتخاب شدند. غدد لنفاوی 11 بیمار عاری از تومور و 14 بیمار دارای درگیری توموری بودند. میانگین سنی بیماران در گروه توموری بدخیم $55 \pm 10/4$ و در گروه توموری خوش خیم $50 \pm 6/1$ سال بود و توزیع بیماری در طرف چپ در هر دو گروه بالاتر بود.

مقایسه ی درصد بیان دو گروه واریانتی مورد مطالعه در نمونه های توموری و حاشیه ی تومور و مراحل مختلف توموری اختلاف معنی داری را نشان نمی دهد. بررسی بیان واریانت های $d4TAp63$ و $TAp63$ در گروه های مختلف افزایش بیان را به ترتیب از گروه های حاشیه ی تومور تا

تعیین توالی DNA: به منظور تایید هویت قطعات حاصل از PCR، منطقه حاوی هر 4 باندا از ژل بریده شده و هر 4 باندا 580 نوکلئوتیدی $TAp63$ ، 305 نوکلئوتیدی $d4TAp63$ ، 528 نوکلئوتیدی $\Delta Np63$ و 274 نوکلئوتیدی $\Delta Np73L$ از طریق شرکت پیشگام تهران، توسط شرکت MACROGEN تعیین توالی شد و با توالی موجود در Gene Bank مقایسه شدند.

نیمه کمی کردن بیان ژن: برای بررسی بیان هر 4 واریانت به صورت نیمه کمی، شدت باندهای مورد نظر $\beta 2m$ برای هر نمونه با استفاده از نرم افزار Uvitech تعیین و نسبت شدت بیان واریانت مورد نظر به $\beta 2m$ در هر نمونه به عنوان شاخص شدت بیان هر یک از واریانت ها برای آن نمونه در نظر گرفته شد.

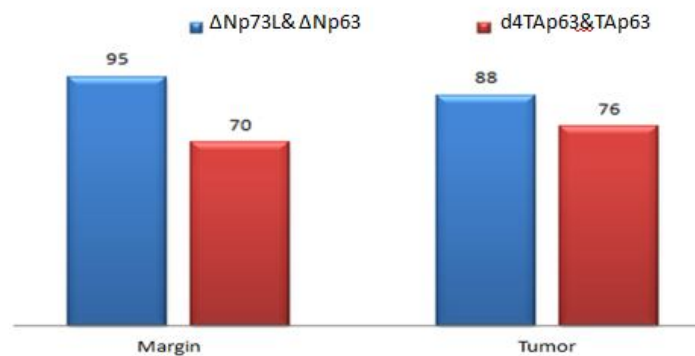
آنالیز آماری: به منظور آنالیز آماری، میزان بیان هر 4 واریانت با استفاده از نرم افزار SPSS و تست های One way-Anova، T-test و χ^2 در گروه های مختلف مورد مقایسه قرار گرفت و معنی دار بودن در سطح 5 درصد در نظر گرفته شده است. قابل ذکر است که داده های کمی با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شده و از نرمال بودن داده ها اطمینان حاصل گردید.

با افزایش درجه‌ی تومور از 1 به 3، میانگین شدت بیان کاهش می‌یابد که هیچ یک از این اختلافات از لحاظ آماری معنی دار نمی‌باشند. مقایسه‌ی میانگین شدت بیان بین دو واریانت $d4TAp63$ و $\Delta Np73L$ نشان داد که در هر دو نمونه‌ی توموری و حاشیه‌ی تومور میانگین شدت بیان واریانت $\Delta Np73L$ بطور معنی داری بالاتر از میانگین شدت بیان برای واریانت $d4TAp63$ می‌باشد (به ترتیب $P=0/009$ و $P=0/008$) (نمودار 3). از سوی دیگر سطح بیان واریانت $\Delta Np63$ نیز در نمونه‌های توموری نسبت به $TAp63$ به طور معنی داری بالاتر می‌باشد ($P=0/03$) اما در نمونه‌های حاشیه‌ی تومور هر چند واریانت $\Delta Np63$ سطح بیانی بالاتری در مقایسه با $TAp63$ نشان می‌دهد، اختلاف بین دو گروه معنی دار نمی‌باشد ($P=0/11$). مقایسه‌ی میانگین شدت بیان هر 4 واریانت $d4TAp63$ ، $TAp63$ ، $\Delta Np73L$ و $\Delta Np63$ میان تومورهای بدون درگیری غدد لنفاوی و تومورهای با درگیری غدد لنفاوی اختلاف معنی داری نشان نداد ($P>0/05$).

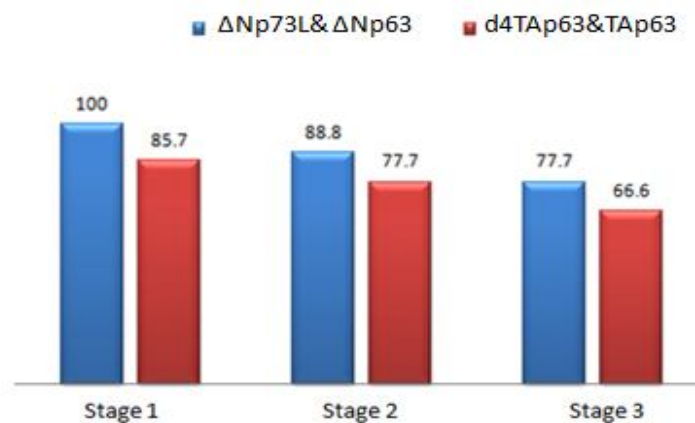
توموری نشان داد (70 درصد برای نمونه‌های حاشیه‌ی تومور و 76 درصد برای نمونه‌های توموری) (نمودار 1) و در میان نمونه‌های توموری بدخیم نیز میزان بیان با افزایش مرحله‌ی¹² توموری کاهش می‌یابد ($P=0/4$) (برای مراحل 1، 2 و 3 به ترتیب 85/7 درصد، 77/7 درصد و 66/6 درصد) (نمودار 2). در تطبیق با داده‌های پاتولوژیکی، ارتباط بیان واریانت‌های $d4TAp63$ و $TAp63$ با درگیری غدد لنفاوی و متاستاز نیز بررسی شد، که درصد بیان این واریانت‌ها در گروه‌های با درگیری غدد لنفاوی 71% و در گروه بدون درگیری غدد لنفاوی 68% بدست آمد. (آمار ذکر شده بر مبنای مشاهده یا عدم مشاهده‌ی باندهای مربوط به هر یک از واریانت‌ها، در نمونه‌های مورد مطالعه می‌باشد). برای واریانت‌های $\Delta Np73L$ و $\Delta Np63$ کاهش بیان از گروه‌های حاشیه‌ی تومور تا توموری دیده شد (95 درصد برای نمونه‌های حاشیه‌ی تومور و 88 درصد برای نمونه‌های توموری) (نمودار 1) و در میان نمونه‌های توموری بدخیم نیز میزان بیان با افزایش مرحله‌ی توموری، کاهش نشان می‌دهد ($P=0/65$) (نمودار 2). همچنین درصد بیان واریانت‌های $\Delta Np73L$ و $\Delta Np63$ در گروه‌های با درگیری غدد لنفاوی 85% و در گروه بدون درگیری غدد لنفاوی 80% بدست آمد.

بررسی شدت بیان هر یک از واریانت‌های مورد مطالعه در گروه‌های توموری و حاشیه‌ی تومور و همچنین ارتباط میزان بیان آن‌ها با درجه‌ی تومور و درگیری غدد لنفاوی توسط تومور نشان می‌دهد که: در مورد هر 4 واریانت $p63$ ($\Delta Np73L$ ، $TAp63$ ، $d4TAp63$ و $\Delta Np63$) میانگین شدت بیان در گروه حاشیه‌ی تومور بالاتر از گروه توموری می‌باشد که البته این اختلافات معنی دار نیستند (برای واریانت‌های $d4TAp63$ ، $TAp63$ ، $\Delta Np73L$ و $\Delta Np63$ بترتیب $P=0/64$ ، $P=0/47$ ، $P=0/67$ و $P=0/96$). در گروه توموری بدخیم نیز برای هر 4 واریانت

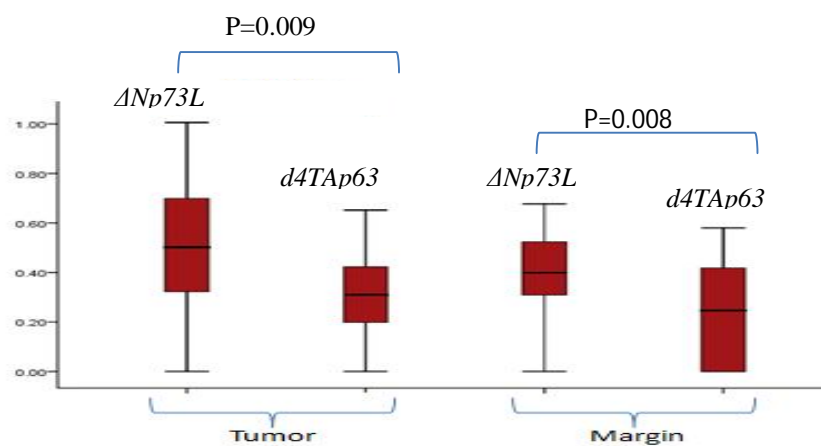
¹² Stage



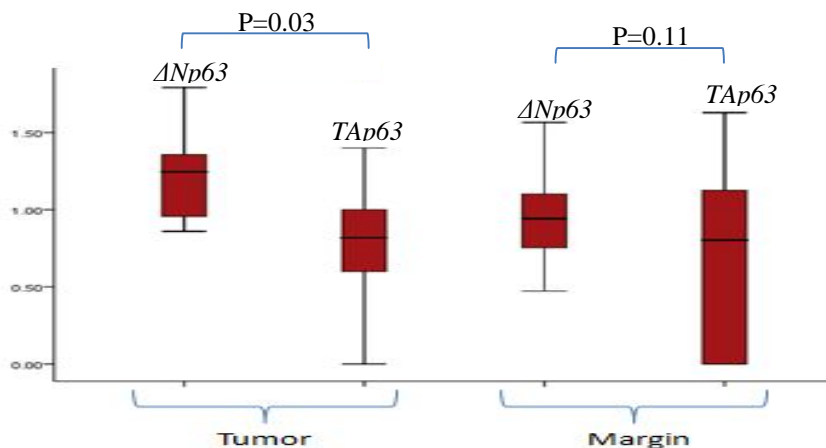
نمودار 1: مقایسه‌ی درصد بیان واریانت‌های $\Delta Np73L$ ، $\Delta Np63$ ، $d4TAp63$ و $TAp63$ در گروه‌های توموری و حاشیه‌ی تومور



نمودار 2: مقایسه‌ی درصد بیان واریانت‌های $\Delta Np73L$ ، $\Delta Np63$ ، $d4TAp63$ و $TAp63$ در مراحل مختلف توموری

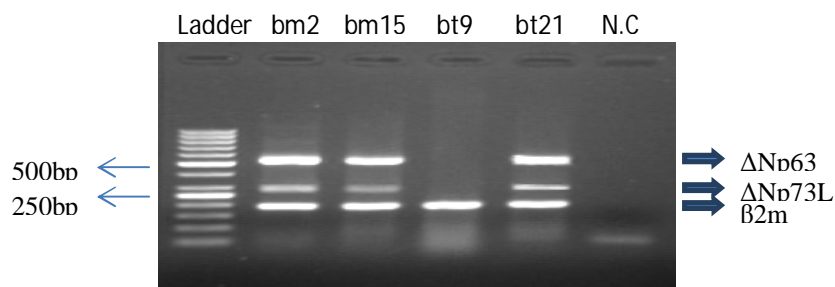


نمودار 3: مقایسه‌ی بیان دو واریانت $\Delta Np73L$ و $d4TAp63$ در گروه توموری و حاشیه‌ی تومور در نمودار Box plot. میانگین شدت بیان $\Delta Np73L$ در هر دو گروه توموری و حاشیه تومور بطور معنی داری بالاتر از میانگین شدت بیان برای واریانت $d4TAP63$ می‌باشد. در هر نمودار محدوده‌ی بیان هر واریانت نشان داده شده است.

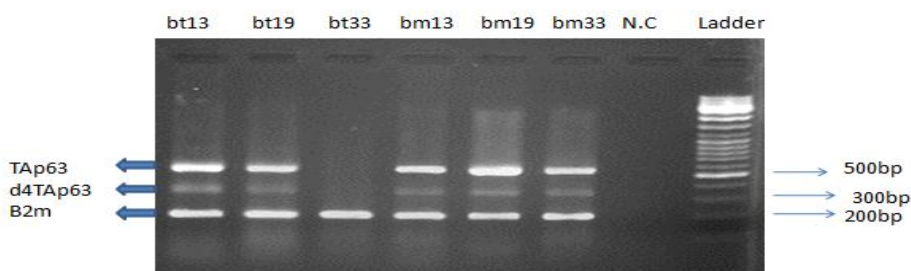


نمودار 4: مقایسه‌ی بیان دو واریانت $\Delta Np63$ و $TAp63$ در گروه توموری و حاشیه‌ی تومور در نمودار Box plot. میانگین شدت بیان واریانت $\Delta Np63$ در نمونه‌های توموری و حاشیه‌ی تومور نسبت به $TAp63$ بالاتر می‌باشد که در نمونه‌های توموری این اختلاف معنی دار بوده اما در حاشیه‌ی تومور اختلاف این دو گروه معنی دار نمی‌باشد. در هر نمودار محدوده‌ی بیان هر واریانت نشان داده شده است.

A



B



شکل 2: الگوی الکتروفورز محصولات PCR واریانت‌های $\Delta Np63$, $\Delta Np73L$, $TAp63$, $d4TAp63$ و $\beta 2m$ در نمونه‌های توموری. (A) نمونه‌های بدخیم و حاشیه تومور مربوط به $\Delta Np63$ (528 bp), $\Delta Np73L$ (274bp), $d4TAp63$ (305bp) و $\beta 2m$ (580bp) (B) نمونه‌های بدخیم و حاشیه تومور مربوط به $TAp63$, $d4TAp63$ و $B2m$.

بحث

در سال 2001 ضمن بررسی پروفایل بیانی ایزوفرم‌های $TAp63$ و $\Delta Np63$ در رده‌های سلولی سرطان پوست انسانی، Senoo و همکاران برای نخستین بار بیان $\Delta Np73L$ فرکانس بالایی دارد (75%) در

ایزوفرم $\Delta Np73L$ را شناسایی کردند. این گروه نشان دادند که در نمونه‌های سرطان پوستی که $TAp63$ را بیان می‌کنند، بیان $\Delta Np73L$ فرکانس بالایی دارد (75%) در

سالم) واریانت‌های کوتاه مربوطه نیز، *d4TAp63* و *ANp73L*، به طور همزمان با آنها بیان می‌شوند. به عبارتی بیان یا عدم بیان این دو گروه واریانتی هم در نمونه‌های سالم و هم توموری به طور هم‌زمان رخ می‌دهد. بررسی بیان *p63* به کمک تکنیک ایمونوهیستوشیمی در بافت‌های نرمال، هایپرپلاستیک و بدخیم پستان نشان داده که *p63* منحصراً در سلول‌های میوپیتلیال پستان سالم و به عنوان مارکر ملکولی در این سلول‌ها بیان می‌شود، بطور جزئی در هایپرپلازی داکتال و بطور نادر در کارسینومای درجا و کارسینومای تهاجمی بیان می‌شود (20-22). اما نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان واریانت‌های *p63* در سلول‌های سالم و توموری پستان وجود ندارد که می‌تواند به دلایل مختلفی باشد: ممکن است تنظیمات بیان پروتئین *p63* در طول ترجمه یا بعد از آن رخ دهد تا اینکه در سطح mRNA یا DNA ژنومی یا اینکه این واریانت‌ها در توسعه‌ی سلول‌های سرطانی نیز مانند سلول‌های سالم نقش مهمی داشته باشند. از سوی دیگر نتایج ما همراستای با برخی نتایج در مورد واریانت‌های *ANp63* و *TAp63* در کارسینومای سلول‌های فلسی مری (23)، سلول‌های فلسی سر و گردن (24)، پروستات (25)، یوروتلیال (26) و غدد بزاقی (27) نشان می‌دهد که در بافت‌های سالم و توموری پستان واریانت *ANp63* به طور غالب نسبت به واریانت *TAp63* بیان می‌شود. البته در نمونه‌های توموری این افزایش بیان معنی دار می‌باشد (P=0/03)، اما در نمونه‌های سالم پستان هر چند *ANp63* در سطح بالاتری نسبت به *TAp63* بیان می‌شود اما این افزایش بیان از لحاظ آماری معنی دار نمی‌باشد (P=0/11) این نتایج می‌تواند تایید کننده نقش غالب منفی برای *ANp63* در نمونه‌های توموری پستان باشد و نقش انکوژنیک این واریانت را در سرطان پستان تایید کند. جالب توجه است که الگوی بیانی واریانت‌های N-ترمینالی جدید *p63* یعنی *ANp73L* و *d4TAp63* نیز مشابه واریانت‌های طولی مربوطه می‌باشد. در واقع دیده شد که در نمونه‌های توموری

حالی که در نمونه‌های سالم پوست بیان نمی‌شود. بر این اساس پیشنهاد کردند که احتمالاً *ANp73L* می‌تواند رونویسی وابسته به *p53* و *TAp63* را مهار کند و با پاتوژنز در کارسینومای سلول‌های فلسی انسان مشارکت داشته باشد (16). Foschini و همکاران نیز در سال 2004 طی آنالیز بیان *TAp63* در کارسینومای سلول‌های فلسی حفره‌ی دهانی (OSCC)¹³، واریانت *d4TAp63* را شناسایی کردند. دیده شد که واریانت‌های کوتاه نسبت به واریانت‌های طولی در تعداد کمتری از نمونه‌ها بیان می‌شوند و این واریانت‌های کوتاه غالباً توسط تومورهای با متاستاز گره لنفوای بیان می‌شوند که این اختلاف بیان برای $\Delta Np73L$ بین دو گروه (با متاستاز و بدون متاستاز) معنی دار بود (17). در مطالعه دیگری که توسط Foschini و همکاران بر روی غدد بزاقی انجام گرفت، دیده شد که *d4TAp63* در یک نمونه سالم و تعدادی از نمونه‌های توموری بیان می‌شود در حالیکه واریانت *ANp73L* فقط در تومورهای بدخیم بیان می‌شود و در نمونه‌های خوش خیم و سالم بیان نمی‌شود. به این ترتیب این گروه اینگونه نتیجه‌گیری کردند که *ANp73L* برای ترانسفورماسیون سلول نئوپلاستیک مهم است (18). و در نهایت در سال 2010 Dario de Biase و همکاران طی بررسی 40 نمونه سالم و توموری پستان مطرح کردند که دو واریانت کوتاه فاقد اگزون 4 در نمونه‌های سالم و خوش خیم پستان بیان نمی‌شوند و تنها در نمونه‌های بدخیم قابل شناسایی اند (*ANp73L* و *d4TAP63* به ترتیب در 4 مورد و 11 مورد) که همراه با ایزوفرم‌های طولی در تعدادی از نمونه‌های نئوپلاستیک کارسینومای تهاجمی بیان می‌شوند (19). بر خلاف نتایج پیشین، نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که در تمامی نمونه‌هایی که واریانت‌های طولی‌تر *p63* *TAp63* و *ANp63* بیان می‌شوند (اعم از نمونه‌های توموری بدخیم، خوش خیم و

¹³ Oral cavity squamous cell carcinoma

$\Delta Np73L$ ضمن بیان همزمان با واریانت‌های طولیل مربوط به خود، $\Delta Np63$ و $TAp63$ و داشتن الگوی بیانی مشابه با این واریانت‌ها احتمالاً همراستای این واریانت‌ها و در تقویت فعالیت سرکوبگر توموری و انکوژنیک آنها در سلول‌های سالم و توموری پستان نقش دارند. از سوی دیگر با توجه به الگوی بیانی واریانت‌های $\Delta Np73L$ و $d4TAp63$ نمی‌توان آنها را به عنوان تومور مارکر در سرطان پستان در نظر گرفت.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری کارکنان اتاق عمل بیمارستان نورنجات تبریز و همکاران ارجمند پارک علم و فناوری استان آذربایجان شرقی ابراز می‌دارند.

و سالم پستان، $\Delta Np73L$ نیز بصورت غالب نسبت به واریانت $d4TAp63$ بیان می‌شود که این افزایش بیان در مورد هر دو نمونه‌ی سالم و توموری معنی دار می‌باشد (به ترتیب $P=0/008$ و $P=0/009$). بنابراین واریانت $\Delta Np73L$ نیز در مقایسه با $d4TAp63$ الگوی غالب منفی را در نمونه‌های سالم و توموری پستان دنبال می‌کند.

نتیجه‌گیری

بطور کلی نتایج بدست آمده فعالیت مهارکنندگی غالب منفی احتمالی $\Delta Np63$ را مطرح می‌کند و می‌تواند نقش آن به عنوان انکوژن را در سرطان پستان تایید کند. نتایج مشابهی نیز برای واریانت $\Delta Np73L$ نسبت به $d4TAp63$ بدست آمد که حاکی از فعالیت مهارکنندگی غالب منفی احتمالی آن در بافت‌های سالم و توموری پستان است. همچنین قابل ذکر است که واریانت‌های $d4TAp63$ و

Reference

1. Takemi T and Paolo D. Nanotechnology for breast cancer therapy. Biomed Microdevices 2009; 11:49–63.
2. Tumor markers: AFP, HCG, CA-125. Available at: WWW.TC-Cancer.com Access time: August 22, 2008.
3. Marta N, Jitka H. The role of p63 in cancer, stem cells and cancer stem cells. Cellular and Molecular Biology Letter 2011; 16:296-327.
4. Johann B and Zhi-Xiong Xiao. Role of p63 in development, tumorigenesis and cancer progression. Cancer Microenvironment 2012; 5:311–322.
5. F Murray-Zmijewski, DP Lane and J-C Bourdon. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. Cell Death and Differentiation 2006; 13: 962–972.
6. Weber A, Bellmann U, Bootz F, Wittekind C and Tannapfel A. Expression of p53 and its homologues in primary and recurrent squamous cell carcinomas of the head and neck. Int J Cancer 2002; 99:22–28.
7. Sniezek JC, Matheny KE, Westfall MD and Pietenpol JA. Dominant negative p63 isoform expression in head and neck squamous cell carcinoma. Laryngoscope 2004; 114:2063–2072.
8. Hu H, Xia SH, Li AD, Xu X, Cai Y, Han YL, et al. Elevated expression of p63 protein in human esophageal squamous cell carcinomas. Int J Cancer 2002; 102:580–583.
9. Massion PP, Taflan PM, Jamshedur Rahman SM, Yildiz P, Shyr Y, Edgerton ME, et al. Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis. Cancer Res 2003; 63:7113–7121.

10. Wang TY , Chen BF, Yang YC, Chen H, Wang Y, Cviko A, et al. Histologic and immunophenotypic classification of cervical carcinomas by expression of the p53 homologue p63: a study of 250 cases. *Hum Pathol* 2001; 32:479–486.
11. Jean Bernard, NSetha Douc-Rasy, and Jean-Charles Ahomadegbe. TP53 family members and human cancers *Human Mutation* 2003; 21:182-191 .
12. Chatterjee A , Chang X, Sen T, Ravi R, Bedi A, Sidransky D. Regulation of p53 family member isoform delta p63alpha by the nuclear factor-kappa b targeting kinase I kappa b kinase beta. *Cancer Res* 2010; 70:1419–1429.
13. Wu G , Osada M, Guo Z, Fomenkov A, Begum S, Zhao M, et al. Delta Np63alpha up-regulates the Hsp70 gene in human cancer. *Cancer Res* 2005;65:758–766.
14. Keyes WM, Pecoraro M, Aranda V, Vernersson-Lindahl E, Li W, Vogel H, et al. Np63 α is an oncogene that targets chromatin remodeler Lsh to drive skin stem cell proliferation and tumorigenesis. *Cell Stem Cell* 2011; 8:164–176.
15. Barbieri CE, Pietenpol JA. p63 and epithelial biology. *Exp Cell Res* 2006; 312:695–706.
16. Senoo M, Tsuchiya I, Matsumura Y, T Mori, Y Saito, H Kato, et al. Transcriptional dysregulation of the p73L/p63/p51/p40/KET gene in human squamous cell carcinomas: expression of Delta Np73L, a novel dominant-negative isoform, and loss of expression of the potential tumour suppressor p51. *Br J Cancer* 2001; 84:1235–1241.
17. Foschini MP, Gaiba A, Cocchi R, Pennesi MG, Gatto MR, Frezza GP et al. Pattern of p63 expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Virchows Arch* 2004;444:332–339.
18. Foschini MP, Gaiba A, Cocchi R, Pennesi MG and Pession A. p63 expression in salivary gland tumours: role of Delta Np73L in neoplastic transformation. *Int J Surg Pathol* 2005; 13:329–335.
19. Dario de Biase and Luca Morandi. p63 short isoforms are found in invasive carcinomas only and not in benign breast conditions. *Virchows Arch* 2010; 456:395–401.
20. Wang X, Mori I, Tang W, Nakamura M, Nakamura Y, Sato M, Sakurai T, et al. p63 expression in normal, hyperplastic and malignant breast tissues. *Breast Cancer* 2002; 9:216–219.
21. Stefanou D, Batistatou A, Nonni A, Arkoumani E, Agnantis NJ. p63 expression in benign and malignant breast lesions. *Histol Histopathol* 2004; 19:465–471.
22. Koker MM, Kleer CG. p63 expression in breast cancer: a highly sensitive and specific marker of metaplastic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2004; 28:1506-1512.
23. Hai Hu, Shu-Hua Xia, Ai-Dong Li, and Xin Xu. Elevated expression of p63 protein in human esophageal squamous cell carcinomas. *International Journal of Cancer* 2002; 102:580-583.
24. Snizek JC, Matheny KE, Westfall MD, and Pietenpol JA. Dominant negative p63 isoform expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2004;114:2063-72.
25. Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, Isaac B, Lin D, and Garraway L. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am J Pathol* 2000;157:1769-75.
26. Koga F, Kawakami S, Kumagai J, Takizawa T, Ando N, and Arai G. Impaired Delta Np63 expression associates with reduced beta-catenin and aggressive phenotypes of urothelial neoplasms. *Br J Cancer* 2003;88:740-7.
27. Yoshitsugu Mitani, Jie Li, Randal S Weber, Scott L Lippman, and Elsa R Flores. Expression and regulation of the delta N and TAp63 isoforms in salivary gland tumorigenesis. *Am J Pathol*. Jul 2011; 179: 391–399.