

بررسی جهش در اگزون های هفت و هشت ژن TP53 در بیماران آذری مبتلا به سرطان پستان

ناصر پولادی (PhD)^۱، محمد علی حسین پور فیضی (PhD)^{۲*}، حوریه خانی (MSc)^۳

۱- گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

۲- گروه زیست جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

۳- جهاد دانشگاهی شاخه دانشگاه تبریز

دریافت: ۹۴/۶/۱۹، اصلاح: ۹۴/۷/۶، پذیرش: ۹۴/۱۰/۱۶

خلاصه

سابقه و هدف: سرطان پستان، شایع ترین سرطان در زنان است که ژن سرکوبگر توموری TP53 نیز از فراوانترین ژن های تغییر یافته در سرطان های انسانی می باشد. ارزیابی دقیق جهش های ژن TP53 در مبتلایان سرطان می تواند در تشخیص، پیش آگهی یا درمان اهمیت داشته باشد. این مطالعه به منظور شناسایی جهش های این ژن در مبتلایان سرطان پستان انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی، تعداد ۱۰۲ نمونه توموری از زنان آذری مبتلا به سرطان پستان که طی سالهای ۸۶ تا ۸۸ به بیمارستانهای شهر تبریز مراجعه کردند، جمع آوری شد و DNA آنها به روش پروتئیناز K استخراج گردید. جهش های ژن TP53 در اگزون های هفت و هشت همراه اینترون هفت با روش های واکنش های زنجیره ای پلیمرز (PCR) و توالی یابی مستقیم مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در این مطالعه هفت مورد جهش (۶/۸۶٪) و ۱۴ مورد پلی مورفیسم (۱۳/۷۲٪) شناسایی شدند. جهش های (CGG → CAG) ۲۴۸ codon (در دو مورد) و (CTG → CCG) ۲۵۷ codon در اگزون هفت و جهش G > T در اولین نوکلئوتید اینترون هفت مشاهده گردید. در اگزون هشت، جهش GTG > ATG در کدون ۲۷۲، جهش CCT > TCT در کدون ۲۷۸ و حذف سه نوکلئوتید در کدون ۲۶۲ شناسایی شدند.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه، الگوی متفاوت جهش های ژن TP53 را در بیماران آذری مبتلا به سرطان پستان نشان می دهد. بررسی های بیشتر می تواند نقش جهش های ژن TP53 را در پیشرفت سرطان پستان مشخص سازد.

واژه های کلیدی: سرطان پستان، ژن TP53، جهش.

مقدمه

بیماری برای درمان سرطان اهمیت دارد زیرا بیمارانی که در مرحله عود بیماری تشخیص داده می شوند شانس بقاء کمتری دارند (۸-۶). بنابراین مارکرهای پیش آگهی معتبر مورد نیاز هستند تا به پزشکان در جهت اتخاذ تصمیمات درمانی مناسب کمک کنند. تغییرات ژنتیکی مولکولی متنوعی مانند تغییر در اونکوژنها و ژنهای سرکوبگر توموری در سرطان پستان مطالعه شده است تا ارتباط مولکولی میان پیش آگهی و صفات بالینی و فنتیپ های سرطان پستان شناخته شود. ژن TP53 به عنوان ژن سرکوبگر توموری بوده و در ۷۱-۱۵ درصد بیماران سرطان پستان بصورت جهش یافته دیده شده است (۹). p۵۳، یک فاکتور رونویسی فسفوپروتئینی است که بیان بیش از ۲۵۰۰ ژن هدف را تنظیم می کند و در فرآیندهای مختلف سلولی از جمله حفظ ثبات و پایداری ژنوم، طول عمر، متابولیسم و مهمتر از همه سرکوب تومور درگیر است (۹). ژن آن بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ قرار دارد (p۱۳،۱) و دارای ۱۱ اگزون و طول ۲۰ کیلو باز می باشد. پروتئین p53 طبیعی شامل ۳۹۳ آمینو اسید و چندین دمین ساختاری- عملکردی است که عبارت از: دو دمین فعال کننده رونویسی در انتهای آمین، یک

سرطان پستان، شایع ترین سرطان در زنان در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است (۱). هر ساله بیش از ۱/۱ میلیون زن در گستره جهانی با سرطان پستان شناسایی می شوند و بیش از ۴۱۰ هزار نفر از آنها بر اثر این بیماری فوت می کنند. بیشترین نرخ شیوع در آمریکای شمالی و کمترین در آفریقا و آسیا است (۲و۳). از طرف دیگر نرخ های کمتر در شرق و مرکز اروپا و شرق دور با سرعت رو به افزایش است. برای مثال شیوع سرطان پستان در ژاپنی ها در طی ۴۰ سال اخیر دو برابر شده است (۳). در حالیکه کشور های توسعه یافته در آستانه حذف سرطان پستان بعنوان تهدید کننده سلامت عمومی می باشند، در کشورهای آسیایی می توان انتظار ادامه افزایش در رخداد سرطان پستان را داشت و به نظر می رسد که در آینده نزدیک، سرطان پستان یک بیماری مرتبط با کشورهای در حال توسعه به شمار آید (۱). در کشور ما نیز سرطان سومین عامل مرگ و میر بوده و ۳۰۰۰۰ ایرانی هر ساله به علت سرطان می میرند. سرطان پستان یکی از فراوانترین بدخیمی ها در میان زنان ایرانی می باشد و میزان شیوع آن در کشورمان رو به افزایش است (۴-۶). تشخیص به موقع سرطان قبل از عود

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ب ۳۱/۴/ دانشگاه تبریز می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر محمد علی حسین پور فیضی

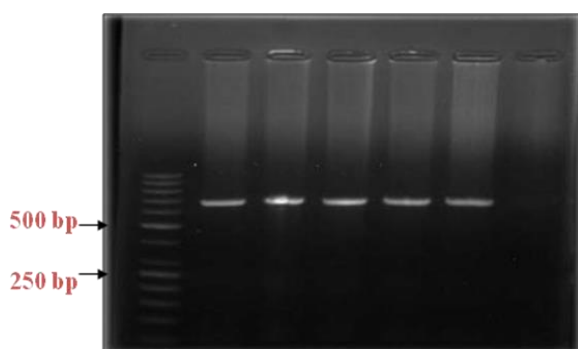
آدرس: تبریز، بلوار آزادی، پارک علم و فناوری. تلفن: ۳۳۳۶۲۲۸۰-۰۴۱

۱ دقیقه در ۳۵-۳۰ دور چرخه دمایی اعمال شد. محصول PCR به مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز گردید (شکل ۱).

تعیین توالی: ۲۰۰ میکرولیتر محصول PCR تایید شده از نظر کیفیت به همراه پرایمرها، جهت تعیین توالی به شرکت فزایبوتک فرستاده شد. برای شناسایی تغییرات احتمالی در نمونه های مورد بررسی، ابتدا پیک های (توالی های) بدست آمده بررسی شده و سپس این توالی ها با کمک نرم افزار Chromas، با توالی های ثبت شده در NCBI بلیست (Blast) گردیدند. همچنین توالی های حاصل به کمک نرم افزار ClustalW2 با توالی ژن طبیعی p53، مقایسه شدند. در نهایت هر نوع تفاوت در نمونه ها، پس از مقایسه مجدد با پیک مربوطه، به عنوان تغییر ژنتیکی، در نمونه مورد بررسی تایید شد.

یافته ها

بیماران مورد بررسی در این مطالعه در محدوده سنی ۸۰-۲۳ سال قرار دارند. متوسط سنی بیماران ۴۶ سال می باشد که در مقایسه با سن بیماران سرطان پستان کشورهای توسعه یافته پایین است. نوع بیماری در ۸۱/۴۱٪ بیماران تحت بررسی، کارسینومای تهاجمی مجرای (Invasive ductal carcinoma) بود. بر اساس طبقه بندی TNM، از بین این بیماران ۶۲/۱۶٪ در زمان جراحی در مرحله Stage III، ۲۸٪ در مرحله Stage II و ۹/۷۵٪ در مرحله Stage I بیماری قرار داشتند. طبق اطلاعات موجود در پرونده بیماران ۴۴٪ بیماران تحت جراحی پستان چپ و ۵۴٪ بیماران تحت جراحی پستان راست و ۲٪ تحت جراحی هر دو پستان قرار گرفتند. اندازه تومور در ۲۴/۶٪ از بیماران کوچکتر از ۲ سانتی متر، در ۳۶/۹۲٪ بین ۲-۵ سانتی متر و در ۳۰/۷۶٪ بزرگتر از ۵ سانتی متر بود. در ۷/۶۹٪ از افراد، بیماری گسترش پیدا کرده و پوست بیمار را درگیر کرده بود. با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت قطعه ی ۶۸۲ جفت بازی شامل اگزون های هفت و هشت و اینترون هفت بدست آمد که (شکل ۱).



شکل ۱. محصولات PCR قطعه ۶۸۲ جفت بازی حاوی اگزون های هفت، هشت و اینترون هفت ژن TP53

در این مطالعه ۲۱ مورد (۲۰/۵۸٪) تغییر ژنتیکی مشاهده شد که ۱۴ مورد آن مربوط به پلی مورفیسم (۱۳/۷۲٪) و هفت مورد آن مربوط به جهش (۶/۸۶٪) می باشد. جهش های (CGG→CAG) codon ۲۴۸ (در دو مورد) و (CTG→CCG) codon ۲۵۷ که در اگزون هفت قرار گرفتند. در اولین

دمین غنی از پرولین، دمین مرکزی متصل شونده به DNA و دمین های تترامریزاسیون و پایه در انتهای کربوکسیل (۹۰/۱۰). این ژن یکی از فراوانترین ژن های تغییر یافته در سرطان های انسانی می باشد (۱۰ و ۱۱). ارزیابی دقیق جهش های این ژن در مبتلایان سرطان پستان در منطقه آذربایجان شرقی می تواند در تشخیص، پیش آگهی یا درمان اهمیت داشته باشد. همچنین با مشخص شدن الگوی پراکندگی جهش های سوماتیکی و یا ژرم لاین (germ line) این ژن در منطقه می توان اطلاعاتی را در مورد حضور موتاژن های محیطی مختلف و یا سندرم نادر لی فراومنی (Li-Fraumeni) در خانواده های آذری، بدست آورد. مطالعه قبلی ما، فراوانی و نوع جهش ها در اگزون های پنج و شش ژن TP53 بدست آمد (۱۱).

این مطالعه به منظور شناسایی جهش در اگزون های هفت و هشت به همراه اینترون هفت ژن TP53 به روش واکنش های زنجیره ای پلیمرز (PCR) و توالی یابی مستقیم برای شناسایی نوع جهش ها استفاده گردید. در مبتلایان سرطان پستان در منطقه آذربایجان شرقی طراحی گردید.

مواد و روش ها

نمونه برداری: این مطالعه توصیفی پس از اخذ رضایت نامه کتبی، بر روی ۱۰۲ بیمار سرطان پستان در جمعیت ترک منطقه آذربایجان شرقی که طی سالهای ۸۶ تا ۸۸ به بیمارستانهای امام خمینی، امام رضا و نورنجات شهر تبریز برای جراحی مراجعه کرده بودند، انجام شد. بیماران بصورت تصادفی انتخاب شدند تا نمونه واقعی از جمعیت بیمار در منطقه آذربایجان شرقی باشند. بافت های توموری بر اساس سیستم استاندارد طبقه بندی تومورهای پستانی (TNM staging system) توسط متخصص پاتولوژیست طبقه بندی گردید. بافت توموری در محل جراحی برداشته شده و بصورت تازه (fresh) و در داخل ازلت مایع به آزمایشگاه منتقل و در فریزر ۸۰- قرار داده شد.

استخراج DNA: پس از تایید پاتولوژی تومورها، جهت استخراج DNA، SE بافر، SDS و پروتئیناز K را به بافت توموری خرد شده اضافه کرده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه و سپس یک ساعت در دمای ۵۵-۶۰ درجه قرار داده شد. در این مرحله آب نمک اشباع و کلروفرم به بافت اضافه کرده و با دور ۳۵۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع شفاف رویی حاوی کلاف DNA می باشد که با اضافه کردن اتانل سرد مطلق ظاهر می شود. این کلاف را می توان با سمپلر به آرامی جدا کرده و پس از شستشو با اتانل ۷۰٪ در آب حل کرد.

انجام PCR: برای بررسی جهش های ژن p53، از روش تعیین توالی استفاده شد. برای تکثیر ژن از یک جفت پرایمر 'I6F5/GCCCTCCCCTGCTTGCC3' و 'E8R5/TCCACCGCTTCTGTCTGCTGC3' استفاده شد. طول قطعه انتخابی جهت تکثیر ۶۸۲ جفت باز بوده و شامل اگزون هفت (۱۱۰ bp)، اینترون هفت و اگزون هشت (۱۳۷ bp) می باشد. جهت تکثیر این قطعه، ۲/۵ μl بافر PCR10x، ۱/۵ میلی مولار MgCl2، ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۱۰ μl آنزیم Taq پلیمرز، یک μl از DNA نمونه سرطانی و ۰/۴ میکرو مولار از هر کدام از پرایمرها را در حجم ۲۵ میکرو لیتری در میکروتیوب ریخته و PCR انجام شد. در این مطالعه دمای واسرشتی ۹۶ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۹ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و دمای گسترش ۷۲ درجه و به مدت

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این بررسی حضور هفت جهش را در اگزون های هفت و هشت و اینترون هفت ژن *TP53* در بیماران مشخص کرد. چهار جهش در اگزون هفت مشاهده شد که جهش در کدون ۲۴۸ در دو نمونه رخ داده بود و منجر به تغییر آمینواسید آرژنین به گلوتامین می شود. کدون ۲۴۸ یک نقطه داغ (Hot spot) از نظر جهش پذیری در بیماران مبتلا به سرطان پستان شناخته شده است (۹). مطالعه حاضر اهمیت این نقطه جهش پذیر را در زنان آذری مبتلا به سرطان نشان می دهد. تبدیل C>T در کدون ۲۵۷ (در بیمار کد ۱۰۱) آمینواسید لوسین را به پرولین تبدیل کرده است. در اولین نوکلئوتید اینترون هفت جهش G>T در یک نمونه توموری منجر به جهش پیرایشی گردیده است. تغییر GTG>ATG در کدون ۲۷۲ اگزون هشت والین را به متیونین تبدیل می کند و جهش CCT>TCT در کدون ۲۷۸ در این اگزون اسید آمینه ی پرولین را با سرین جایگزین می کند (۹). حذف سه نوکلئوتیدی در کدون ۲۶۲ اسید آمینه گلیسین را از پروتئین حاصل حذف می کند. این یافته ها حضور جهش های حذفی و پیرایشی را به همراه جهش های بد معنی (Missense) در این مطالعه نشان می دهد که در اگزون های پنج و شش در مطالعه قبلی مشاهده نشده بود (۱۱). فراوانی جهش های ژن *p53* در تومورهای پستان ۷۱-۱۵ درصد می باشد (۹). میزان جهش ژن *TP53* در تومورهای پستان جمعیت های مختلف قومی نژادی و جغرافیایی متفاوت است. نتایج حاصل از بررسی دو اگزون ژن *TP53* در این مطالعه، فراوانی ۶/۸۶ درصدی جهش ها را نشان می دهد. در مطالعه قبلی ما، فراوانی جهش ها را در اگزون های پنج و شش ژن *p53* ۱۰/۷۸ بدست آمد (۱۱). در این مطالعه فراوانی جهش های ژن *TP53* در اگزون های ۵-۸ در بیماران آذری مبتلا به سرطان پستان ۱۷/۶۴ درصد گزارش شد که این فراوانی قابل مقایسه با کشورهایی مثل فرانسه (۱۹٪)، نیوارلند (Neworland) (۱۵٪) بوده و بیشتر از فراوانی گزارش شده از دهلی هند (۳٪) و کمتر از گزارش های کشورهای ایالات متحده آمریکا (۴۵٪)، بریتانیا (۳۴/۵٪) و کشمیر (۴۴٪) و گزارش IARC (۲۳/۵۶٪) می باشد (۱۲-۱۴). همچنین در مطالعه ای که در همدان انجام شد فراوانی جهش در ژن *p53* ۲۵٪ گزارش گردید (۱۵). مطابق با بانک اطلاعاتی IARC، جهش های R۱۷۵H و R۲۷۳H دو جهش بسیار شایع در سرطان های پستان هستند. در حالیکه در پژوهش حاضر، نمونه های توموری مورد بررسی، هیچ کدام از این دو جهش را نشان ندادند. الگوی ویژه از طیف جهش های *TP53* در زنان آذری قابل انتظار بود و نتایج مشابه در مطالعات انجام یافته در جمعیت هایی متفاوت از نظر جغرافیایی و قومیتی نیز گزارش شده است (۱۶-۱۹).

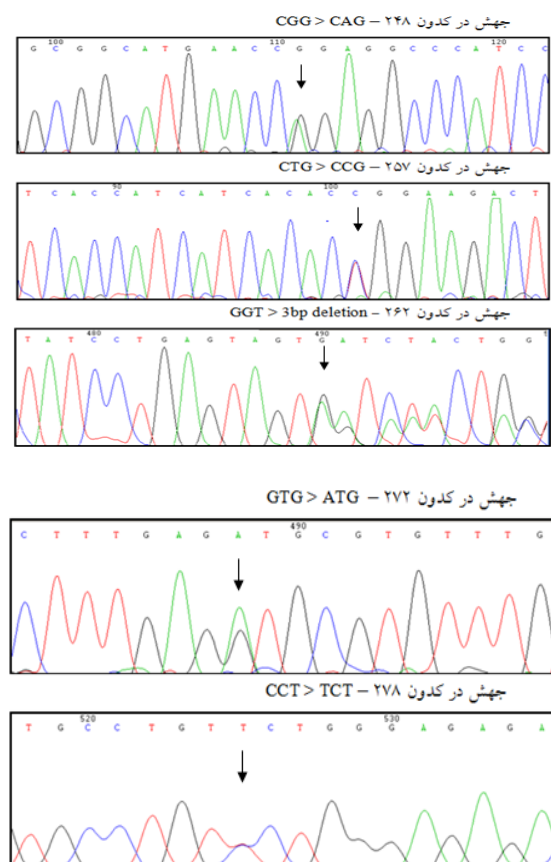
تفاوت فراوانی و الگوی جهش های سوماتیکی احتمالاً بیانگر عرضه موتاژن های محیطی مختلف می باشد. همچنین فراوانی پایین جهش ژن *TP53* می تواند نشان دهنده درگیری ژنهای مختلف دیگر در مسیر سرطان زایی باشد (۱۶ و ۱۷). احتمالاً این تفاوت ها در فراوانی جهش های *p53* در سرطان پستان به علت فاکتورهایی مثل مطالعه جمعیت های مختلف قومی و جغرافیایی، اندازه کوچک نمونه های مورد بررسی، تفاوت در انتخاب نمونه ها، روش های مختلف نمونه گیری، تکنیک های مختلف آنالیزی، تفاوت در عرضه کارسینوژنهای اندوزن و اگزوزن، تفاوت در سبک زندگی، الگوهای تولید مثلی و عادات غذایی، تفاوت های فرهنگی و اجتماعی می باشد که نقش هر کدام از اینها نیاز به مطالعه و اثبات دارد

نوکلئوتید اینترون هفت، جهش G>T، در یک نمونه توموری، منجر به جهش پیرایشی (splicing mutation) در اینترون می گردد. در اگزون هشت جهش GTG>ATG در کدون ۲۷۲، والین را به متیونین تبدیل می نماید و جهش CCT>TCT در کدون ۲۷۸ آمینواسید پرولین را با سرین جایگزین می کند. حذف سه نوکلئوتیدی در کدون ۲۶۲، آمینواسید گلیسین را از پروتئین حاصل حذف می نماید. (جدول ۱). توالی های جهش های شناسایی شده در شکل ۲ آمده است.

جدول ۱. مشخصات جهش های شناسایی شده در اگزون های

هفت، هشت و اینترون هفت ژن TP53

نمونه	کدون	کدون طبیعی	کدون جهش یافته	اسید آمینه طبیعی	اسید آمینه جهش یافته
۳۱	۲۴۸	CGG	CAG	Arg	Gln
۷۷	۲۴۸	CGG	CAG	Arg	Gln
۱۰۱	۲۵۷	CTG	CCG	Leu	Pro
۶۹	۲۶۲	GGT	Deletion	Gly	-
۹۵	۲۷۲	GTG	ATG	Val	Met
۵۸	۲۷۸	CCT	TCT	Pro	Ser
۹۹	Intv	(۱۴۴۵۱)	G>T	-	-



شکل ۲. توالی نمونه های دارای جهش در اگزون هفت الی اگزون هشت ژن *TP53*. شماره کدون در بالای هر شکل آورده شده است

(۱۷ و ۱۸). در این مطالعه اندازه تومور، درگیری غدد لنفاوی و مرحله پیشرفته بیماری در بین بیماران مورد مطالعه، حاکی از غربالگری ضعیف و عدم تشخیص به موقع بیماری بوده و ضرورت تغییر در برنامه های غربالگری و افزایش آگاهی زنان منطقه نسبت به بیماری را نشان می دهد. در دوره "درمان هدفمند" (Targeted Therapy)، محققان توانستند ملکولهای هدف ویژه و یا تغییرات ژنتیکی را که برای تومورزایی و رشد سلول های سرطانی لازم هستند، توسط داروها یا ملکول های کوچک شناسایی و مورد هدف قرار دهند (۱۸ و ۱۹). از آنجا که جهش های ژن *TP53* یکی از فراوانترین تغییرات ژنتیکی مشاهده شده در تمام سرطان های انسانی می باشند، روش های جدید درمانی که تغییرات *p53* را شناسایی و مورد هدف قرار می دهند، معرفی شده اند. دوباره فعال سازی (Reactivation) پروتیین *p53* جهش یافته با استفاده از ملکول های کوچک، امیدهایی را برای درمان سرطان با کاهش اثرات جانبی ایجاد کرده است (۲۴-۲۰). نتایج حاصل از بررسی ژن *TP53* در منطقه آذربایجان شرقی، الگوی ویژه از

طیف جهش های *p53* در زنان آذری نشان می دهد. این ویژگی ها که تفاوت قابل توجهی را با یافته های کشورهای دیگر و نیز با گزارشات مرکز اطلاعاتی IARC نشان می دهد، بیانگر الگوی جهشی متفاوت در منطقه می باشد که برای اولین بار گزارش می شود. این نتایج می تواند در درمان موثر بیماران مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات بعدی جهت بررسی علت این تفاوتها و ارتباط آن با زمینه ژنتیکی- قومی، سبک زندگی، رژیم غذایی سازش یافته با زندگی منطقه ای و کارسینو ژنهای محیطی ضروری است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از تمامی کارکنان و تیم جراحی بیمارستان نورنجات، آزمایشگاه پاتولوژی آذربایجان و آزمایشگاه رادیوبیولوژی دانشگاه تبریز جهت همکاری در نمونه گیری و جمع آوری داده های بالینی تشکر و قدردانی می گردد.

Evaluation of Mutations in Exons 7 and 8 of TP53 Gene in Breast Cancer Patients from Azarbaijan

N. Pouladi (PhD)¹, M.A. Hossein Pour Feizi (PhD)^{*2}, H. Khani (MSc)³

1.Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R.Iran

2.Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, I.R.Iran

3.ACECR, Tabriz University Branch, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(2); Feb 2016; PP:19-25

Received: Sep 10th 2015, Revised: Sep 28th 2015, Accepted: Jan 6th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Breast cancer is the most common type of malignancy in women, and TP53 tumor-suppressor gene is one of the most commonly transformed genes in human cancers. Accurate assessment of TP53 gene mutations in cancer patients can play an important role in diagnosis, prognosis, or treatment. This study aimed to identify mutations of this gene in breast cancer patients.

METHODS: In this descriptive study, 102 tumor samples were obtained from female breast cancer patients from Azarbaijan, Iran. All the participants were referred to hospitals of Tabriz during 2007-2009, and their DNA was extracted by Proteinase K. TP53 gene mutations in exons 7 and 8 and intron 7 were investigated using polymerase chain reaction technique and direct sequencing.

FINDINGS: Seven (6.86%) cases of mutation and 14 (13.72%) cases of polymorphisms were identified. Mutations (CGG → CAG) at codon 248 (in two cases) and (CTG → CCG) at codon 257 in exon 7 and G>T mutation in the first nucleotide of intron 7 were observed. In exon 8, GTG>ATG mutation at codon 272, CCT>TCT mutation at codon 278, and three nucleotide deletion at codon 262 were identified.

CONCLUSION: The results of this study showed a different pattern of TP53 gene mutation in female breast cancer patients. Further studies could specify the role of TP53 mutations in the progression of breast cancer.

KEY WORDS: Breast cancer, Mutation, TP53 gene.

Please cite this article as follows:

Pouladi N, Hossein Pour Feizi 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.

***Corresponding Author: M.A. Hossein Pour Feizi (PhD)**

Address: Department of Sciences & Technology, Azadi blv., Tabriz, I.R.Iran

Tel: +98 41 33362280

E-mail: pourfeizi@eastp.ir

References

1. American cancer society. Breast cancer facts & figures 2013-2014. Atlanta: Am Cancer Soc, Inc. 2013. Available from: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-042725.pdf>
2. Borresen-Dale AL. TP53 and breast cancer. *Hum Mutat*. 2003;21(3):292-300.
3. Stewart B, Wild CP. International agency for research on cancer, WHO. World Cancer Report. 2014 [Online]. Available from: <http://www.thehealthwell.info/node/725845>
4. Marjain A, Kabir M. Breast cancer incidence among female in the Golestan province, Iran; *Ind J Cancer*. 2009;46(4):351-2
5. 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]
6. Hossein Pour Feizi M, Ravanbakhsh Gavgani 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]
7. Sadjadi A, Nouraei M, Ghorbani A, Alimohammadian M, Malekzadeh R. Epidemiology of breast cancer in the Islamic of Iran: first results from a population based cancer registry. *La Revue de Santé de la Méditerranée orientale*. 2009;6(15):1428-31.
8. Martin AM, Weber B L. Genetic and Hormonal Risk Factors in Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(14):1126-35.
9. Thierry Soussi and Christophe Be'roud. significance of Tp53 mutation in human cancer: a critical analysis of mutations at CPG dinucleotide *Hum Mut*. 2003;21(3):192-200.
10. Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. p53 and breast cancer, an update. *Endocrine- Relat Cancer*. 2006;13(1):293-325.
11. Khani H, Hosseinpourefeizi M, Pouladi N, Chaparzadeh N, Montazeri V, Azarfam P. Detection of P53 gene exons 5 and 6 mutations among East Azerbaijani women with breast cancer. *Zanjan Univ Med Sci J*. 2012;20(78):36-46. [In Persian]
12. Eachkoti R, Hussain I, Afroze D, Aejazaziz S, Jan M, Shah ZA, et al. BRCA1 and TP53 mutation spectrum of breast carcinoma in an ethnic population of Kashmir, an emerging high-risk area. *Cancer Lett*. 2007;248(2):308-20.
13. Lou MA, Tseng SL, Chang SF, Yue CT, Chang BL, Chou CH, et al. Novel patterns of p53 abnormality in breast cancer from Taiwan: experience from a low-incidence area. *Br J Cancer*. 1997;75(5):746-51.
14. Etemadi K and Mehdipour P. Molecular study of the p53 gene mutations in breast cancer patients by non-radioactive PCR-SSCP. *Sci J Hamedan Univ Med Sci*. 2003;9(4):65-70. [In Persian]
15. Soussi T. Advances in carcinogenesis: A historical perspective from observational studies to tumor genome sequencing and TP53 mutation spectrum analysis. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1816(2):199-208.
16. Hartmann A, Blaszyk H, Kovach JS, Sommer SS. The molecular epidemiology of p53 gene mutations in human breast cancer. *Trends Genet*. 1997;13(1):27-33.
17. Dehghan R, Hosseinpour Feizi MA, Pouladi N, et al. Association of p53 (-16ins-Pro) haplotype with the decreased risk of differentiated thyroid carcinoma in iranian-azeri patients. *Pathol Oncol Res*. 2015;21(2):449-54.
18. Bozhanov SS, Angelova SG, Krasteva ME, Markov TL, Christova SL, Gavrilov IG, et al. Alterations in p53, BRCA1, ATM, PIK3CA, and HER2 genes and their effect in modifying clinicopathological characteristics and overall survival of Bulgarian patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(11):1657-69.
19. Freed-Pastor WA, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev*. 2012;26(12):1268-86.
20. Suter R, Marcum JA. The molecular genetics of breast cancer and targeted therapy. *Biologics*. 2007;1(3):241-58.

21. Farnebo M1, Bykov VJ, Wiman KG. The p53 tumor suppressor: A master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;396(1):85-9.
22. Chen F, Wanga W, El-Deiry WS. Current strategies to target p53 in cancer. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(5):724-30.
23. Pouladi N, Kouhsari SM, Feizi MH, Gavvani RR, Azarfam P. Overlapping region of p53/wrap53 transcripts: mutational analysis and sequence similarity with microRNA-4732- 5p. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(6):3503-7.
24. Sedaie Bonab A, Pouladi N, Hosseinpourfeizi MA, Ravanbakhsh Gavvani R, Dehghan R, Azarfam P, et al. 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.