جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل / كلية العلوم

قسم علوم الحياة

دراسة تعبير الجين *TP73* و دوره بسرطان الثدي في مدينة الموصل

نور مازن عبدالرحمن محمدعلي عطارباشي

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة / علم الحيوان

بإشراف

الأستاذ الدكتور أويس موفق حامد الحسنيّ

١٤٤٥هـ ٢٠٢٣ م

بسم الله الرحمن الرحيم

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة و السلام على سيد المرسلين سيدنا ومولانا محمد صلى الله تعالى عليه وعلى اله وصحبه وسلم تسليما، بدايةً أشكر الله سبحانه و تعالى وأخضع له سجوداً وابتهالا لتوفيقه اياي لإتمام هذا البحث العلمي المتوسم في أطروحتي بعد جهدٍ وعناءٍ طويل والذي لولاه لما اهتديت إلى طريقي هذا. كما تفيض أروع كلمات الثناء والشكر إلى صاحب المقام العلي المعلم والأستاذ الأول والذي غرس فينا حب العلم والتعلم، حضرة الرسول الكريم سيدنا محمد الصادق الأمين صلى الله تعالى عليه وعلى آله الطيبين الطاهرين وصحبه الغر الميامين.

كما أتقدم بوافر الشكر والعرفان لمشرفي الكريم المتواضع **(أ.د. أويس موفق الحسني)** لتوجيهاته السديدة والقيمة ولعطائه الكريم الذي لاينفذ بكل ما لديه من روح التعاون كي تظهر الأطروحة على أحسن ما يرام ولأثره الطيب في إثراء موضوع دراستي في جوانبه المختلفة، فجزاه الله عني خيراً.

كما أَتقدمُ بجزيل الشكر والعرفان إلى وزارة التعليم العالي والبحث العلمي متمثلة بالسيد وزير التعليم العالي والبحث العلمي المحترم **(الدكتور نعيم العبودي)** والى رئاسة جامعة الموصل ومنتسبيها متمثلة بالسيد رئيس الجامعة المحترم **(أ.د. قصي الأحمدي)** و إلى عمادة كلية العلوم ومنتسبيها متمثلة بالسيدة عميد كلية العلوم **(أ.د. هيام عادل الطائي)** والسيدة مسؤولة الشؤون العلمية **(م.د. ابتسام عبد يحيى)** ، وإلى قسم علوم الحياة المتمثل بالسيد رئيس القسم **(أ.د. رائد سالم الصفار)** وإلى قسم الفيزياء الطبية المتمثل بالسيد رئيس القسم **(أ.م.د مروان زهير إلياس)** وجميع أساتذة ومنتسبي قسمي علوم الحياة والفيزياء الطبية والزملاء من طلبة الدراسات العليا، لما أَبدوه من تشجيع و تعاون طيلة مدة الدراسة.

كما يسعدني بأن أتوجه بجميل الشكر والعرفان إلى كادر مستشفى الزهراوي العام والزهراوي الأهلي والسلام المتواضعين الذين بذلوا جهودا طيبة في مساعدتي في عملية جمع العينات و تقديم كل التسهيلات بكل محبة واحترام واخص بالذكر العميد السابق لكلية طب نينوى **(أ.د. طه حسن الصائغ)** و المشرف الميداني **(أ.م.د. الدكتور خلف رشيد اللويزي)**.

واتوجه بأسمى وارفع مقامات الشكر والعرفان إلى كنزي الثمين ومن أرجو رضاهما عني دائماً واللذان غمراني بصلواتهم ودعواتهم الطيبة لتنير دربي بأمان **والدي العزيزين** ، والى الجواهر الثمينة و المتلئلئة والقلوب النقية التي لازالت تهديني الأمان **إخوتي و أخواتي** الأعزاء، و بكل عبارات الحب والود أود أن أشكر زوجي الحبيب ودرتي المكنونة ولدي الحبيب واللذان يساندني دائماً في حياتي العلمية والعملية والفنية لتحقيق طموحي وأمالي شكراً لعطائكم الذي لا ينتهي...

و أعتذر لكل من لم يرد أسمه فمعروفهم باق وفضلهم لن ينسى والله ولي التوفيق.

الباحثة

نور مازن عطارباشي

الخلاصة:

هدفت الدراسة إلى تحديد دور مثيلة الـDNA وتأثيرها على مستوى التعبير الجيني للجين *TP73* لدى النساء المصابات بسرطان الثدي في مدينة الموصل. شملت الدراسةالحالية 80 امرأة تراوحت أعمارهن بين(٣٧-٥٥) سنة من النساء السليمات من الأمراض والمصابات بسرطان الثدي، وللمدة من شهر كانون الثاني لغاية شهر أيلول لسنة ٢٠٢٢ ، وقُسمت العينات إلى مجموعتين، المجموعة الأولى وتضمنت ٤٠ امرأة وجمعت بشكل عينة الدم من الاصحاء، أما المجموعة الثانية تضمنت ٤٠ امرأة وجمعت بشكل عينة الدم والقطعة النسجية من المصابات بسرطان الثدي، وقسمت العينة إلى ثلاثة أجزاء، الجزء الأول لإستخلاص الـDNA والجزء الثاني لإستخلاص الـRNA والجزء الثالث لإجراء الأختبارات الكيموحيوية.

ثم كُشف عن التباينات الوراثية للجين *TP73* في الموقعين (G4C14-A4T14) و (rs1801173) للجين *TP73* بإستخدام تقنية الـTetra-ARMS-PCR ، و حُددت تتابعات النيوكليوتيدات للقطع المضخمة بوساطة تقنية الـDNA-Sequencing كما تم تحليل مستويات التعبير الجيني للجين *TP73* بوساطة تقنية الـ RT-PCR وقيست مثيلة الـDNA في بادئ Primer الجين *TP73* ، وكذلك قيست بعض المؤشرات الكيموحيوية المرتبطة بالجين *TP73* ولها تأثير على سرطان الثدي مثل بروتينات ("TP73" Tumor Protein p73 و "PKC" Protein kinase C و "PUMA" p53 Upregulated Modulator Of Apoptosis) بوساطة تقنية الاليزا.

أظهرت نتائج نسب المشاهدة الأليلية و تكرار الأنماط الوراثية المختلفة للجين *TP73* في الموقع (G4C14-A4T14) لدى مرضى أورام الثدي بأن قيمة التكرار للطراز الوراثي الطبيعي Wild genotype "GC/ GC" كانت بنسبة 75% و هي النسبة الأعلى مقارنة بما ظهر في الطراز الوراثي المتغاير Hetero genotype "GC/AT" الذي كانت نسبته 15%، اما الطراز الوراثي الطافر Mutant genotype "AT/AT" فكانت نسبته تعادل 10% وهو نادر، و إن نسبة التكرار الاليلي للاليل الطبيعي GC كانت مرتفعة 82.5 % مقارنة بالاليل الطافر AT بنسبة ١٧.٥ % . كما تبين بأن نسبة المشاهدة الحاصل عليها مع نسبة المشاهدة المتوقعة الناتجة من توازن هاردي وينبيرغ Hardy-Weinberg Equilibrium "HWE" تكون فيها قيمة P-value = 0.0023 وهي اقل من P= 0.05، وهذا يدل على أنها تخضع لقانون التوازن وان المؤثر هو بيئي، و له تأثير متنحي على الدراسة.

كما أظهرت النتائج بأن نسبة الملاحظة الأليلية و تكرار الأنماط الوراثية المختلفة للجين *TP73* في الموقع (rs1801173) لدى مرضى أورام الثدي بأن قيمة التكرار للطراز الوراثي الطبيعي والسليم "CC" Wild genotype كانت بنسبة 35% بينما ظهرت قيمة التكرار للطراز الوراثي الطافر "TT" Mutant genotype الذي تكون نسبته 15%. أما الطراز الوراثي المتغاير "CT" Hetero genotype فكانت نسبته تعادل 50% و هي النسبة الأعلى مقارنة بالطرز الأخرى. كما أظهرت نتائج الدراسة الحالية بأن نسبة تكرار الاليل الطافر كانت 40 % وهي أقل مقارنة بنسبة 60 %

للاليل الطبيعي . كما تبين بأن نسبة المشاهدة الحاصل عليها مع نسبة المشاهدة المتوقعة الناتجة من توازن HWE تكون فيها قيمة الـ P-value = 0.79 ، وهذا يدل على أنها لا تخضع لقانون التوازن وأن المؤثر هو وراثي وله تأثير متنحي، ولايوجد تأثير سيادي لهذا التباين.

أظهرت نتائج السكونس لدى المرضى لتضخيم جين الـ*TP73* وجود إختلافات غير مسجلة مسبقاً في تسلسلات عدد من النيوكليوتيدات وسُجل نمط وراثي جديد للجين *TP73* في مدينة الموصل في بنك الجينات العالمي ضمن المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحياتية National Center Biotechnology Information "NCBI" ، و اعطي الرقم التعريفي له LC742131 GenBank: فضلاً عن تسجيل نمط مظهري جديد للبروتين الكابح للورم TP73 واعطي الرقم التعريفي له GenBank: LC742132.

أظهرت نتائج الاختبارات التابعة لعملية المثيلة في الـDNA في محفز Promoter الجين *TP73* بوجود ارتفاع في عملية المثيلة DNA Methylated في محفز الجين لدى المرضى مقارنة بالأصحاء في حين انخفضت قيمة الـ DNA Un-Methylated لدى المرضى مقارنة بالأصحاء.

نتائج اختبارات التعبير الجيني أظهرت بأن هناك ارتفاع معنوي في مستويات التعبير الجيني لمرضى سرطان الثدي للنمطان الوراثيان (4.31) *TP73* Variant 1 و (2.21) *TP73* Variant 2 بينما يوجد انخفاض في مستوى التعبير الجيني للنمط الوراثي(0.71)3 *TP73* Variant مقارنة مع مجموعة الاصحاء التي بلغت قيمتها ١.

كما تبين من خلال نتائج الدراسة الحالية بأن النساء المصابات بسرطان الثدي ولديهم حالةالمثيلة Methylation بنسبة ٢٥ % في بروموتر الجين *TP73* كان لديهم انخفاضاً كبيراً جداً في مستوى التعبير الجيني للجين *TP73* بأنماطه الثلاثة المختلفة (V3= 0.25 , V2= ٠.٤٤ , V1=0.70). في حين إن النساء اللواتي لديهن حالةSemi Methylated بنسبة ٤٠ % كان نسبة التعبير الجيني للجين *TP73* لديهن مرتفعة للأنماط الثلاث المختلفة مقارنة بحالات المثيلة المختلفة (V3= 0.55 , V2= 1.44 , V1=1.90).

كما أظهرت نتائج الدراسة وجود انخفاض معنوي عند مستوى احتمالية 0.05 ≥P لكل من المتغيرات الكيموحيوية المرتبطة بفعالية الجين *TP73* فقد انخفض مستوى بروتين TP73 المشفر من قبل الجين لدى المرضى (106.9 ± 3.5 pg/ml) مقارنة بمجموعة الاصحاء (176.4 ± 12.4 pg/ml)، وانخفض مستوى بروتين PKC لدى المرضى (10.3 ± 0.92 ng/ml) مقارنة مع مجموعة الاصحاء (15.3 ± 1.46 ng/ml) كذلك انخفض مستوى بروتين PUMA لدى المرضى (131.2 ± 13.3 pg/ml) مقارنة مع مجموعة الاصحاء (176.2 ± 17.4 pg/ml) .

Summary

The current study aimed to determine the role of DNA methylation and it's effects on the level of gene expression of the *TP73* gene in women with breast cancer in Mosul city. The current study included 80 women, old age (37-55) years, 40 from healthy women and 40 affected with breast cancer: for the study conducted during January to September of 2022, the first group included 40 women and blood sample collected, the second group included 40 women and blood sample and tissue biopsy were collected from patients with breast cancer, and the sample was divided into three parts, the first part to extract DNA, the second part to extract RNA, and the third part to conduct biochemical tests.

Then, genetic variations of the *TP73* gene were detected in the two sites G4C14-A4T14 and rs1801173 using the Tetra-ARMS-PCR technique, and the nucleotide sequences of the amplified pieces were determined by DNA-sequencing, and the expression levels of the *TP73* gene were analyzed by RT-PCR, the methylation of the DNA in the primer of the *TP73* gene was measured, as well as some biochemical indicators associated with the *TP73* gene and having an effect on breast cancer, such as Tumor Protein p73 "TP73" , Protein kinase C "PKC" and p53 Upregulated Modulator Of Apoptosis "PUMA" proteins, by ELISA technique.

The results showed that the allelic incidence and recurrence of different genotypes of the *TP73* gene at the site G4C14-A4T14 in patients with breast tumors showed that the recurrence value for the normal and healthy wild genotype "GC/GC" was 75%, which is the highest percentage. In the "GC/AT" hetero-genotype, which was 15%. As for the genotype mutant "AT/AT", its rate was equivalent to 10% and it is rare. The allelic frequency of the natural allele GC was high 82.5% compared to the mutant allele AT by 17.5%. It was also found that the obtained result ratio with the expected result from the Hardy-Weinberg Equilibrium "HWE" has a P-value = 0.0023, and this indicates that it

is subject to the law of balance H.W.E and that the influence is environmental, and this indicates that it has a recessive effect on the study.

The results also showed that the percentage of allelic observation and recurrence of different genotypes of the *TP73* gene at locus (rs1801173) in patients with breast cancer showed that the recurrence value of the normal and healthy wild genotype "CC" was 35%, while the recurrence value of the mutant genotype "TT" appeared. Which is 15%. As for the hetero genotype "CT", the percentage was equivalent to 50%, which is the highest percentage compared to the other types. The results of the current study also showed that the frequency of the mutant allele was 40%, which is lower compared to 60% for the normal allele. It was also found that the obtained result ratio with the expected result from the HWE equilibrium has a P-value = 0.79, which is higher than P = 0.05, and this indicates that it is not subject to the law of balance H.W.E. and the effect is hereditary and has a recessive effect, and there is no dominant effect for this variance.

The sequence results for the amplification of the *TP73* gene in patients also showed the presence of previously unrecorded differences in the sequences of a number of nucleotides. A new genotype for the *TP73* gene was recorded in the city of Mosul in the National Center for Biotechnology Information "NCBI", and the identification number was given to it GeneBank: LC742131 In addition to recording a new phenotype of the p73 tumor suppressor protein, which was assigned the ID number GeneBank: LC742132.

The results of tests related to the DNA methylation process in the primer of the *TP73* gene showed that there was an increase in the methylated DNA in the gene promoter in patients compared to the control, while the value of un-methylated DNA decreased in patients compared to healthy.

The results of gene expression tests also showed that there is a significant increase in the gene expression levels of patients with breast cancer of the genotype *TP73* Variant 1 (4.31) and *TP73* Variant 2 (2.21), while there was a

slight decrease in *TP73* Variant 3 (0.71) compared with the control group that was (1).

It was also shown through the results of the current study that women with breast cancer and having 25% methylation in the *TP73* gene promoter had a very significant decrease in the level of gene expression for the TP73 gene in its three different types (V1=0.70, V2=0.44, V3= 0.25). Whereas, women with semi-methylated status of 40% had a high percentage of *TP73* gene expression for the three different types compared to the different methylation states (V3 = 0.55, V1 = 1.90, V2 = 1.44).

The results of the study also showed that there was a significant decrease at the level of probability $P \leq 0.05$ for each of the biochemical variables associated with the activity of the *TP73* gene. The level of the TP73 protein encoded by the gene decreased in patients (106.9 ± 3.5 pg / ml) compared to the control group (176.4 ± 12.4 pg /ml), and the level of protein kinase C "PKC" that activating TP73 protein decreased in patients (10.3 ± 0.92 ng/ml) compared to the healthy group (15.3 ± 1.46 ng/ml). Also, the level of p53 upregulated modulator of apoptosis "PUMA", decreased in patients (131.2 ± 13.3). pg/ml) compared with the healthy group (176.2 ± 17.4 pg/ml).

University of Mosul
College of Science

Study of *TP73* Gene Expression and it's Role in Breast Cancer in Mosul City

Noor Mazin Abdulrahman Mohamed Ali Atarbashi

Ph. D. Thesis

Biology / Zoology

Supervised By
Professor Doctor
Owayes Mouaffaq Hamed Al-Hassani

1445 A.H. **2023 A.D.**