

تعیین جهش در اگزون ۸ ژن *p53* در بیماران مبتلا به تومور مغزی از نوع آستروسایتوما

الهه عبداللهی: کارشناس ارشد، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. elah.e.abdollahy@gmail.com

* پروین مهدی پور: استاد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول). mehdipor@tums.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: اکثر پژوهش‌ها نشان داده‌اند که بین ایجاد تومورهای مغزی و میزان بدخیمی تومورها و ژن‌های سرکوب گر تومور و انکوژن‌ها ارتباط وجود دارد. هدف از انجام این پروژه بررسی جهش‌های اگزون ۸ ژن *P53* در بیماران مبتلا به تومور مغزی از نوع آستروسیتوما می‌باشد. **روش کار:** این تحقیق از نوع تجربی آزمایشگاهی بوده و طی آن ابتدا استخراج DNA از ۳۰ نمونه بافت تازه مغز به روش فنول کلروفرم انجام شد و بعد از انجام PCR اگزون ۸ ژن *p53* غربالگری اولیه از طریق SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) برای تشخیص شیفت در نمونه‌ها انجام شد. سپس مواردی که دارای شیفت بودند تعیین توالی شدند. **یافته‌ها:** در این تحقیق یک جهش بدمعنی (*g.13851A>G (Missense)* (تبدیل اسید آمینه‌ای K291E) در بیمار مبتلا به آستروسایتوما درجه چهار شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این مطالعه می‌توان تغییر بد معنی فوق که در ناحیه متصل شونده به DNA فاکتور رونویسی *p53* رخ داده را تحت عنوان یک جهش پاتوژن در نظر گرفت. احتمالاً این جهش از عملکرد سرکوب گر توموری این فاکتور جلوگیری می‌کند و منجر به سرطان می‌شود. این مسئله در ژن درمانی و تشخیص زودهنگام تومورهای مغزی می‌تواند حائز اهمیت باشد.

کلیدواژه‌ها: آستروسایتوما، *p53*، جهش، اگزون ۸

مقدمه

در سیستم عصبی (CNS) آستروسیت‌ها هومئوستازی را حفظ می‌کنند. هم‌چنین این سلول‌ها به سرعت به عفونت سیستم عصبی مرکزی پاسخ می‌دهند و به تنظیم التهاب سلول‌های عصبی کمک می‌کنند. از طرفی برای حفظ بقا و عملکرد پردازش اطلاعات در نورون‌ها ضروری هستند. آستروسیت‌ها در مغز بیشتر از نورون‌ها بوده و در انتقال پیام عصبی نقش اساسی دارند. این سلول‌ها انرژی را به صورت گلیکوژن ذخیره می‌کنند. همه این خصوصیات آستروسیت‌ها موجب می‌شود این سلول‌ها در فرایندهای فیزیولوژیکی مهم شرکت کنند (۱). آستروسیتوما شایع‌ترین تومور سیستم عصبی مرکزی است و طبق آخرین آمارها پیش‌آگهی این سرطان و میزان بقاء افراد مبتلا بسیار پایین است (۳ و ۲). ژن *TP53* پروتئین سرکوب گر تومور *p53* را کد

می‌کند که این پروتئین چرخه سلول را کنترل می‌کند. عملکرد این ژن باعث جلوگیری از ایجاد سرطان می‌شود. به پروتئین *p53* پروتئین "محافظ ژنوم" هم می‌گویند. ژن *TP53* روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ ناحیه 17P13.1 قرار دارد. زمانی که ژن *TP53* آسیب دیده باشد سرکوب شدن تومورها به شدت کاهش می‌یابد. در بیش از ۵۰ درصد تومورهای انسانی ژن *TP53* جهش یافته است (۴-۶). فاکتور رونویسی *P53* در پی آسیب دیدن DNA چرخه سلول را متوقف می‌کند و در صورتی که آسیب DNA ترمیم نشود در پاسخ به استرس پیری سلول و آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلول) را افزایش می‌دهد (۷). جهش در ژن *P53* نقش عمده‌ای در سرطان‌زایی انسان دارد، به طوری که در اکثر سرطان‌های انسانی عملکرد پروتئین *P53* تغییر پیدا کرده و از حالت طبیعی خارج می‌شود (۸-۱۰). در چندین مطالعه ناحیه،

مورد بررسی قرار گرفتند و پرایمرهای زیر مورد استفاده قرار گرفتند.

F: 5'-ACAGGGCTGGTTGCCAAGGGG-3'

R: 5'-CCCTTGGAACCCAGCCCTGT-3'

جهت انجام واکنش PCR از ترکیب مواد با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت ۲۰۰ نانوگرم، ۰/۸ میکرولیتر پرایمر F و ۰/۸ میکرولیتر پرایمر R، هر کدام با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ۱۰ میکرولیتر Master Mix (مربوط به شرکت Ampliqon) و ۱۲ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد. برنامه حرارتی دستگاه ترموسایکلر به صورت واسرشته شدن اولیه و فعال سازی آنزیم DNA پلی مرز در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۳ دقیقه و ۳۰ چرخه شامل سه مرحله واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه تنظیم شد. در نهایت مرحله تکثیر نهایی برای مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد صورت گرفت. جهت اطمینان از تکثیر قطعه موردنظر داخل هر نمونه مقدار ۵ میکرولیتر بافر بارگذاری (loading dye) اضافه نموده و به مقدار ۱۵ میکرولیتر بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند.

چندشکلی فرم فضایی رشته‌های منفرد (SSCP): مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۵ میکرولیتر از بافر بارگذاری فرمامید (فرمامید ۹۵٪، هیدروکسید سدیم ۱۰۰ میلی مولار، برموفنل بلو ۰/۲۵٪ و گزین سیانول ۰/۳۵٪) را مخلوط نموده و جهت تک‌رشته‌ای نمودن محصول PCR، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد حرارت داده شد و بلافاصله تا زمان استفاده از آن داخل فریزر قرار داده شد. برای تهیه ژل از محلول پایه ۳۰٪ با نسبت ۱۹:۱ اکریل آمید به بیس اکریل آمید استفاده شد و نمونه‌ها در ژل پلی اکریل آمید ۶٪ به مدت ۱۷ ساعت با ولتاژ ۷۰ ولت الکتروفورز عمودی شدند. از رنگ آمیزی نقره نیز برای مشاهده باندها استفاده شد.

فلوسایتومتري: برای بررسی و تأیید جهش

نوع و فراوانی جهش‌های سوماتیک P53 بررسی شده است که به طوری که در سرطان‌های مختلف انسانی بیش از ۸۶ درصد جهش‌ها بین کدون‌های ۱۲۵ و ۳۰۰ که ناحیه متصل شونده به DNA است رخ می‌دهد (۱۱).

از طرفی در بررسی‌های انجام شده نشان داده‌اند که در نمونه‌های بافتی آناپلاستیک آستروسیتوما، جهش p53 وجود دارد (۱۲). از سوئی در یک مطالعه که روی ۸۵ نمونه گلیومای انسانی انجام شد، نشان داده شد که P53 در ۱۵ نمونه از ۸۵ نمونه جهش یافته بود. این جهش‌ها توسط روش SSCP و Sequencing شناسایی شدند (۱۳). در بررسی‌های انجام شده مشاهده شد که در نمونه‌های بافتی آناپلاستیک آستروسیتوما، جهش p53 وجود دارد. با این وجود بین جهش P53 و بقاء بیماران ارتباطی وجود ندارد. این مطالعات نشان می‌دهند که جهش ژن P53 برای نئوپلاسم سلول‌های گلایال در گروه‌های سنی ۱۸ تا ۴۵ سال یک مکانیسم شایع است، اما با پیشرفت درجه تومور در ارتباط نیست (۱۲).

از آنجایی که ژن P53 نقش اساسی در محافظت از ژنوم و سرکوب کردن تومور دارد و اگزون ۸ این ژن hot spot برای جهش است و اگزون‌های ۵، ۶، ۷ و ۸ دومین‌های متصل شونده به DNA را کد کرده و بسیار حفظ شده هستند پس بنابراین نقش اساسی در عملکرد پروتئین p53 دارند (۱۴). از طرفی بررسی زیادی تاکنون در مورد جهش‌های اگزون ۸ این ژن در بیماران تومور مغزی انجام نگرفته است، بنابراین تحقیق حاضر به بررسی جهش‌های اگزون ۸ ژن p53 در افراد مبتلا به تومور مغزی از نوع آستروسیتوما پرداخته است.

روش کار

مطالعه حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی بود. **استخراج DNA:** در این تحقیق استخراج DNA تمامی نمونه‌های توموری از بافت فریز شده مغز به روش فنول کلروفرم انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): برای تکثیر قطعه ۲۲۱ جفت اگزون ۸ ژن p53 ابتدا صحت توالی پرایمرها از طریق سایت Primer3

شده تعیین توالی شدند. در اگزون ۸ ژن $p53$ در نمونه آستروسایتوما درجه ۴ تغییر نوکلئوتیدی A به G ($g.13851A>G$) در وضعیت هتروزیگوت مشاهده گردید (شکل ۱).

تجزیه و تحلیل تغییر نوکلئوتیدی $g.13851A>G$ از طریق سایت ensemble نشان داد که این تغییر از نوع بدمعنی می‌باشد که منجر به تبدیل اسیدآمینه لیزین به گلوتامیک اسید ($K291E$) در ناحیه متصل شونده به DNA پروتئین $p53$ شده است.

با توجه به اینکه آزمون بررسی بیان پروتئین در نمونه جهش یافته سه مرتبه انجام شد، بررسی‌های آماری نشان داد که میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان پروتئین $p53$ در نمونه جهش یافته $1.513 \pm$ $2966/6$ می‌باشد و میانگین $\pm$ انحراف در نمونه‌های فاقد جهش $p53$ $8/865 \pm 8066/6$ می‌باشد.

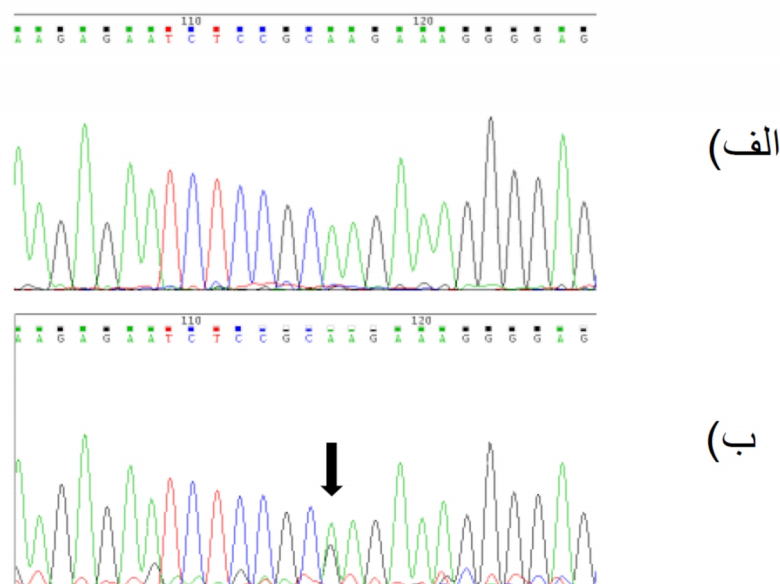
آنالیزهای آماری توسط آزمون t -test نشان داد که بیان پروتئین $p53$ در نمونه جهش یافته به‌طور معناداری $0.004/p < 0.05$ از نمونه نرمال کمتر می‌باشد.

یافت شده توسط فلوسایتومتری از سلول‌های استخراج شده از بافت تومور مغزی استفاده گردید. سوسپانسیون سلولی حاصل از بافت تومور مغزی بر اساس پروتکل استاندارد رنگ‌آمیزی شد. به‌طور خلاصه سلول‌ها تریپسینه شده و در بافر فسفات نمکی (PBS) به‌صورت سوسپانسیون درآورده شدند. بعد از ۱۰ دقیقه به سلول‌های غوطه‌ور در PBS آنتی‌بادی $p53$ اضافه شد بعد از ۴۵ دقیقه کونژوگه آنتی‌بادی $p53$ متصل به رنگ فلورسینس FITC به محلول اضافه شد. آنالیز فلوسایتومتری با استفاده از دستگاه FACS canto II انجام شد.

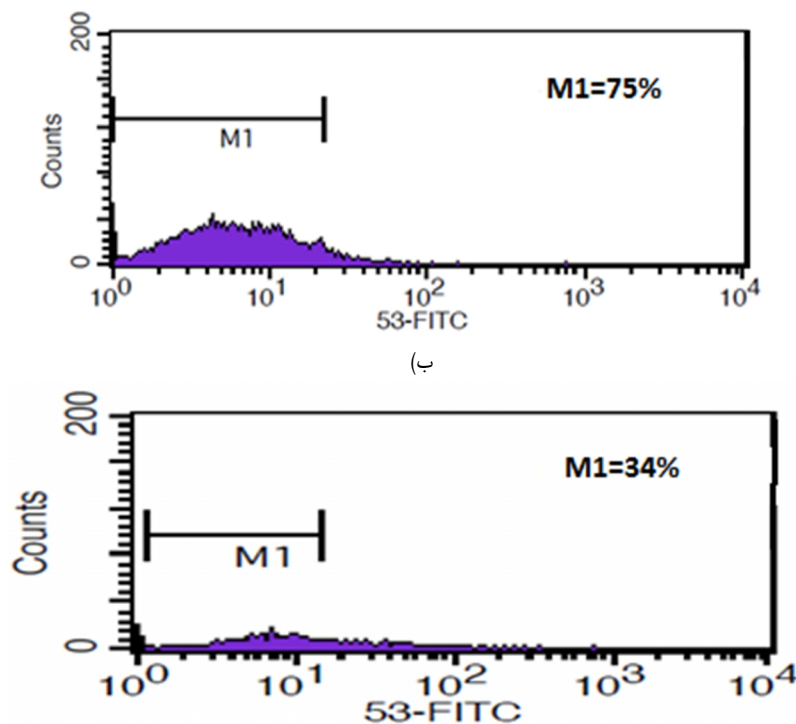
در نهایت جهت بررسی‌های آماری، پس از حصول اطمینان از توزیع طبیعی داده‌ها، روش آماری t -test مورد استفاده قرار گرفت و با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS اعمال گردید، در آنالیز واریانس معنی‌داری اختلاف گروه‌ها با استفاده از آزمون فیشر (Fisher's LSD) تعیین گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه تعداد ۳۰ نمونه تومور مغزی از نوع آستروسایتوما بررسی شد. بعد از غربالگری جهش از طریق تکنیک SSCP نمونه‌های غربال



شکل ۱- نتیجه تعیین توالی جهش $g.13851A>G$ مشاهده شده در فرد بیمار در مقایسه با توالی طبیعی محل وقوع جهش با پیکان مشخص شده است. الف) توالی نمونه نرمال، ب) توالی نمونه جهش یافته.



شکل ۲- هیستوگرام فلوسایتومتری، رنگ آمیزی با استفاده از رنگ فلورسنت FITC، M1 نشان دهنده بیان پروتئین p53، (الف) نمونه ی فاقد جهش (ژن p53 نرمال)، (ب) نمونه جهش یافته.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه به منظور تأیید نتایج تعیین توالی DNA و همچنین بررسی اثرات این جهش نتایج فلوسایتومتری پروتئین p53 در نمونه جهش یافته و نمونه نرمال مقایسه شدند.

در یک مطالعه که روی ۸۵ نمونه گلیومای انسانی انجام شد، P53 در ۱۵ نمونه از ۸۵ نمونه جهش یافته بود. این جهش ها توسط روش SSCP و Sequencing شناسایی شدند و همچنین مشخص شد که هایپرمتیلاسیون ژن P53 باعث توقف آپوپتوز می شود (۱۳). همچنین در مطالعه دیگری آنالیز فلوسایتومتری S-MYC, P53 نشان داد که این دو پروتئین متوقف کننده چرخه سلولی در مرز بین دو فاز S, G1 هستند. این اطلاعات پیشنهاد می کنند که این دو ژن اثرات منفی روی تکثیر سلول های توموری دارند و احتمالاً می توانند برای ژن درمانی گلیوما که در اثر تغییر ژن P53 و یا بعضی ژن های دیگر ایجاد می شود مورد بررسی قرار گیرند (۱۵). در مطالعات مختلف ناحیه، نوع و فراوانی

جهش های سوماتیک P53 بررسی شده است که به طوری که در سرطان های مختلف انسانی بیش از ۸۶٪ جهش ها بین کدون های ۱۲۵ و ۳۰۰ که ناحیه متصل شونده به DNA است رخ می دهد (۱۱).

از سوئی بررسی های انجام شده نشان داده اند که در نمونه های بافتی آناپلاستیک آستروسیتوما، جهش p53 وجود دارد. با این وجود بین جهش P53 و بقاء بیماران ارتباطی وجود ندارد. این مطالعات نشان می دهند که جهش ژن P53 برای نوپلاسم سلول های گلیال در گروه های سنی ۱۸ تا ۴۵ سال یک مکانیسم شایع است، اما با پیشرفت درجه تومور در ارتباط نیست (۱۲).

بر اساس یافته ها و نتایج این پروژه می توان استنتاج کرد که تغییر نوکلئوتیدی g.13851A>G در آگزون ۸ ژن p53 که باعث تبدیل اسید آمینه لایزین به گلوتامیک اسید می شود و تأثیر خود را در ناحیه متصل شونده به پروتئین می گذارند و باعث از دست رفتن عملکرد پروتئین p53 می شود. از آنجایی که تومور مغزی آستروسیتوما درجه چهار

Methods Mol Biol; 2015.1219:75-86.

8. Ha SA, Kim HK, Yoo JA, Kim S, Shin SM, Gong GH, et al. HCCRB-3 induces tumorigenesis through direct interaction with HCCR-1 in human cancers. *Mol Carcinog*; 2012 Jul 31.

9. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*; 2009. 9: 749-758.

10. Zhang X, Miao X, Guo Y, Tan W, Zhou Y, Sun T, et al. Genetic polymorphisms in cell cycleregulatory genes MDM2 and TP53 are associated with susceptibility to lung cancer. *Hum Mutat*; 2006 Jan. 27(1):110-7.

11. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 2010. 2:a001008.

12. Rasheed BK, McLendon RE, Herndon JE, Friedman HS, Friedman AH, Bigner DD, et al. Alterations of the TP53 gene in human gliomas. *Cancer Res*; 1994 Mar 1. 54(5):1324-30.

13. Yin D, Xie D, Hofmann WK, Miller CW, Black KL, Koeffler HP. Methylation, expression, and mutation analysis of the cell cycle control genes in human brain tumors. *Oncogene*; 2002 Nov 28. 21(54):8372-8.

14. Keshava R, Jothi M, Gope M, Gope R. Functional modulation of the p53 gene and its protein in human brain tumors. *Ann. Neurosci*; 2008. 15(3).

15. Asai A, Miyagi Y, Sugiyama A, Gamanuma M, Hong SH, Takamoto S, Nomura K, Matsutani M, Takakura K, Kuchino Y. Negative effects of wild-type p53 and s-MYC on cellular growth and tumorigenicity of glioma cells. Implication of the tumor suppressor genes for gene therapy. *J Neurooncol*; 1994. 19(3):259-68.

16. Wang YY, Zhang T, Li SW, Qian TY, Fan X, Peng XX, et al. Mapping p53 mutations in low-grade glioma: a voxel-based neuroimaging analysis. *AJNR Am J Neuroradiol*; 2015 Jan. 36(1):70-6.

بیشتر نیمکره‌های مغز را درگیر می‌کند و همچنین بیان پروتئین p53 در نیمکره‌های مغز بالا است (۱۶)، می‌توان استنتاج کرد که احتمالاً به همین دلیل ژن p53 نقش مهمی در ایجاد انواع بدخیم تومور مغزی از نوع آستروسایتوما دارد، بنابراین تشخیص زودهنگام تومور مغزی، می‌تواند درمان سریع‌تر و مؤثرتری را به دنبال داشته باشد.

به دلیل نبود زمان و امکانات موردنیاز در این پروژه فاکتورهای دیگر مؤثر در چرخه سلولی که می‌توانند نقش مهمی در ایجاد تومور مغزی ایفا کنند مورد بررسی قرار نگرفتند که پیشنهاد می‌شود در پروژه‌های مشابه بعدی مورد بررسی قرار گیرند.

تقدیر و تشکر

این پژوهش با حمایت‌های معنوی و مالی حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از کمک و مساعدت این عزیزان تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1. Mishra MK, Kumawat KL, Basu A. Japanese encephalitis virus differentially modulates the induction of multiple pro-inflammatory mediators in human astrocytoma and astrogloma cell-lines. *Cell Biol Int*; 2008 Dec. 32(12):1506-13.

2. Yang Z, Wang Y, Fang J, Chen F, Liu J, Wu J, et al. Downregulation of WIF-1 by hypermethylation in astrocytomas. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*; 2010 Jun 15. 42(6):418-25.

3. Bouchard J. Central nervous system. In *Textbook of Radiotherapy*, 2nd ed. J. Fletcher, Ed. Philadelphia, Lea and Febiger; 1973:pp. 336-418.

4. Read A P, Strachan T. Human molecular genetics 2. New York: Wiley; Chapter Cancer Genetics; 1999.

5. Pise-Masison CA, Brady JN. Setting the stage for transformation: HTLV-1 Tax inhibition of p53 function. *Front Biosci*; 2005 Jan 1. 10: 919-30.

6. Zhang X, Miao X, Guo Y, Tan W, Zhou Y, Sun T, et al. Genetic polymorphisms in cell cycleregulatory genes MDM2 and TP53 are associated with susceptibility to lung cancer. *Hum Mutat*; 2006 Jan. 27(1):110-7.

7. Yang-Hartwich Y, Bingham J, Garofalo F, Alvero AB, Mor G. Detection of p53 protein aggregation in cancer cell lines and tumor samples.

Evaluation of exon 8 *p53* gene mutation in patient affected by astrocytoma brain tumor

Elahe Abdollahy, MSc, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. elahe.abdollahy@gmail.com

*Parvin Mehdipour, PhD, Professor, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author). mehdipor@tums.ac.ir

Abstract

Background: Most studies have shown that there are association between the development and malignancy of brain tumors and tumor suppressor genes and oncogenes. The aim of this project was to investigate the *P53* gene mutations in exon 8 in patients with astrocytoma type's brain tumor.

Methods: In this present survey, The DNA isolation from 30 samples of brain tissue was done by phenol-chloroform protocols. After PCR amplification for *p53* at exon 8, screening by SSCP (Single -Strand Conformation Polymorphism) was performed to determine the mobility shifts. Samples that have shift were sequenced.

Results: A malignant missense nucleotide changes (g.13851A>G) was found at exon 8 in a sample with grade 4 of astrocytoma. The sequence changes at protein level of this mutations is K291E.

Conclusion: Based of the study finding, the above nucleotide change which was found within the protein's DNA binding domain could be a pathogenic mutation. This mutation can prevent tumor suppressing function of *p53* and possibly causes cancer. This may be important in early diagnosis and gene therapy of brain tumors.

Keywords: Astrocytoma, *p53*, Mutation, Exon 8