مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۱، دوره ۶۷، شماره ۱، ۳۴-۲۷

مطالعه تغییرات ژن P53 (اگزون‌های ۵و۶) در تومورهای مثانه گاو

فرهنگ ساسانی[1*] فرشاد باغبان[1] غلامرضا نیکبخت بروجنی[2] محمد کاظمی[3]

۱) گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) گروه میکرو بیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۴) گروه ژنتیک و بیولوژی ملکولی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان - ایران.

(دریافت مقاله: ۲ شهریور ماه ۱۳۹۰ ، پذیرش نهایی: ۴ دی ماه ۱۳۹۰)

چکیده

زمینه مطالعه: P۵۳ یک ژن سرکوب کننده تومور است. موتاسیون این ژن بطور معمول در تومورهای مثانه در گاو بروز می یابند. **هدف:** مطالعه تعیین موتاسیون‌های احتمالی در اگزون‌های ۵و۶ ژن P۵۳ به روش SSCP می‌باشد. **روش کار:** برای این منظور تعداد ۱۵ بلوک پارافینی از نمونه‌های مختلف تومورهای مثانه گاو شامل کارسینومای سلول ترانزیشنال (۳ مورد)، کارسینومای سلول سنگفرشی (۲ مورد)، همانژیوما (۳ مورد)، پاپیلوما (۲ مورد)، کارسینومای در جا (۳ مورد) فیبروما (۱ مورد)، لیومیوما (۱ مورد) از موارد گاوهای کشتارگاهی استان گیلان انتخاب گردیدند. پس از استخراج DNA، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی اگزون‌های ۵ و ۶، انجام و محصولات با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شدند. محصولات با روش مورد ارزیابی قرارگرفتند تا نمونه‌هایی که دارای تغییر الکتروفورتیک بودند، مشخص گردیده و برای تعیین توالی ارسال شوند. **نتایج:** در این مطالعه در محدوده اگزون‌های ۵و۶ هیچ تغییر الگوی الکتروفورتیک مشاهده نشد. در ۳ نمونه شامل همانژیوما، پاپیلوما و کارسینومای در جا، تغییر الگوی الکتروفورزی مشاهده گردید که پس از تعیین توالی مشخص گردید که در سه نمونه همانژیوما، پاپیلوما و کارسینومای در جا، حذف نوکلئوتید (T) به شماره ۹۳۳۲ در اینترون ۶ روی داده است. لذا موتاسیون‌های اینترونیک می‌توانند زمینه‌ساز بروز سرطان شوند. **نتیجه‌گیری نهایی:** بنابراین در این مطالعه اگرچه در اگزون‌های ۵و۶ هیچ موتاسیونی مشاهده نگردید ولی با توجه به تغییرات اینترونیک مشاهده‌شده، بررسی موتاسیون‌های اینترونیک ژن p۵۳ در تومورهای مثانه در گاو میتواند در آینده در شناخت انکوژنز این تومورها مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: P53، اگزون، اینترون، موتاسیون، تومور مثانه، گاو.

مقدمه

پروتئین P53 با ۳۸۷ اسید آمینه، یک فسفوپروتئین هسته‌ای با وزن ملکولی ۵۳ کیلودالتون (KDa) است که بوسیله یک ژن ۲۰ کیلوبازی حاوی ۱۱ اگزون و ۱۰ اینترون کد می‌شود و در انسان برروی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ (17p13.1) قرار دارد (۲۲،۲۴). در گاو با تکنیک هیبریدیزاسیون فلورسنس در جا (FISH)(Fluorescence In Situ Hybridization) محل ژن P53 بر روی کروموزوم ۱۹ (19q15) با همان ویژگی‌های P53 انسانی شناسایی گردیده است (۱۳). P53 بعنوان یک ژن سرکوب کننده تومور (Tumor suppressive gene) توصیف شده است (۲۵،۲۷،۲۸).

P53، سیکل سلول، رونوشت برداری از ژن، ترمیم DNA و آپوپتوز را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۵). در طی روند ایجاد تومور فرایندی بطور انتخابی فعالیت رونوشت برداری ژن P53 را بی اثر می‌نماید. در واقع غیر فعال شدن P53 باعث می‌شود که سلول‌های سرطانی از آپوپتوز بگریزند. از اینرو غیر فعال شدن P53 یک واقعه کلیدی در کارسینوژنز است (۱۰،۱۹،۴۵). فعالیت سرکوب کنندگی تومور P53 در سرطان‌ها می‌تواند با مکانیسم‌های مختلفی از جمله ضایعاتی که از فعال شدن P53 جلوگیری می‌کنند، موتاسیون‌های داخل خود ژن P53 یا موتاسیون در پروتئین‌هایی که میانجی فعالیت P53 هستند، کاهش می‌یابد، از اینرو تغییر ژنتیکی فراوان ترین علت تغییر فعالیت ژن P53 می‌باشد (۴۲). موتاسیون‌های اکتسابی در ژن P53 در تمام انواع اصلی سرطان‌های انسان یافت شده است و تقریباً نیمی از تومورهای انسان دارای یک موتاسیون یا کاهش در ژن P53 هستند که منجر به غیر فعال شدن آن می‌شود (۴).

تکنیک SSCP به عنوان وروشی برای غربالگری جهش‌های احتمالی در قطعات ژنی، در ۱۹۸۹ بوسیله Orita و همکاران معرفی شد. این روش بر پایه تغییرات نوکلئوتیدی در ساختمان دوم یک قطعه DNA تک رشته‌ای است که در اثر جهش در توالی قطعه ایجاد شده است (۳۴). تغییرات ساختمانی ایجاد شده باعث تغییر در الگوی حرکتی قطعات جهش یافته نسبت به توالی‌های طبیعی بر روی ژل پلی آکریلامید می‌شوند که پس از رنگ آمیزی قابل تشخیص هستند. این روش نسبتاً ساده، به صرفه و نیازمند حداقل تجهیزات می‌باشد. SSCP روش دقیقی است که می‌تواند موتاسیون‌ها را به خوبی شناسایی نماید و دقت آن در رابطه با برخی ژن‌ها به بیش از ۹۵ درصد می‌رسد (۱۸،۳۴).

در گاو، مصرف طولانی مدت گونه‌های سرخس عقابی پتریدیوم آکولینوم تحت گونه آکولینوم (Pteridium aquilinum subsp. aquilinum) با هشت واریته و تحت گونه کائوداتوم (Caudatum) با چهار گونه و سایر سرخس‌ها (Cheilandesseiberi) منجر به ایجاد یک سندرم

*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۹۲۳۵۱۰-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: f sasani@ut.ac.ir

نئوپلاستیک می‌گردد که تحت عنوان هماتوری آنزئوتیک گاوی (Bovine Enzootic Hematuria)(BEH) شناخته می‌شود. این سندرم بوسیله وقوع هماتوری و تومورهای مثانه توصیف شده است (۵،۹،۱۲،۳۲). طیف وسیعی از مواد سمی مانند تیامیناز مواد سرطان زا، جهش زا و سرکوب کننده ایمنی مانند کرستین (Quercetin)، شیکمیک اسید (Shikimic acid)، پرونازین (Prunasin)، تاکیلوزاید (Ptaquilosaide) یا براکسین (Braxin C) C و تاکیلوزاید (Z Ptaquilosaide) Z و آکیلید (Aquilide A) A و یک عامل خونریزی دهنده با ساختمان ناشناخته در سرخس عقابی شناسایی شده است(۳۲،۳۳). گاوهای مبتلا به CEH به فراوانی سرطان مثانه را با هر دو منشاء بافت پوششی و مزانشیمی را بروز می‌دهند(۳۵). Campo و همکاران در سال ۱۹۹۲، ارتباطی قوی میان ویروس پاپیلومای گاوی تیپ ۲ (Bovine papillomavirus type-2) (BPV-2)و سرخس عقابی در کارسینوژنز مثانه گاوها نشان دادند. در این مطالعه تجربی طولانی، در گاوان تغذیه شده با سرخس عقابی، سرطان‌های مثانه با هر دو منشاء اپی تلیال و عروقی (همانژیوماها و همانژیوسارکوماها) مشاهده گردیدکه عمدتاً با هم در یک مثانه بروز نموده بودند. در این مطالعه DNA BPV-2 در ۶۹ درصد تومورهای ایجاد شده بطور تجربی و در ۴۶ درصد موارد طبیعی یافت گردید (۱۱). با توجه به اهمیت موتاسیون‌های ژن P53 در بروز انواع مختلف تومورهای انسان و درمیان دام‌ها (۱۵،۱۶،۳۲) و همچنین با در نظر گرفتن جایگاه موتاسیون‌های ژن P53 در بروز تومورهای مثانه در انسان (۴۱)، در مطالعه حاضر، موتاسیون‌های دو اگزون ۵ و ۶ ژن P53 در تومورهای مختلف مثانه در گاو با استفاده از روش PCR-SSCP و تعیین توالی الگوهای تغییریافته در SSCP مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

نمونه‌های بافتی: تعداد ۱۵ بلوک پارافینی از نمونه‌های مختلف تومورهای مثانه از موارد گاوهای کشتارگاهی استان گیلان که در فرمالین ۱۰ درصد بافری ثابت شده بودند، برای این مطالعه در نظر گرفته شد. این نمونه تومورها شامل کارسینومای سلول ترانزیشنال (۳ مورد)، کارسینومای سلول سنگفرشی (۲ مورد)، همانژیوما (۳ مورد)، پاپیلوما (۲ مورد)، کارسینومای درجا (۳ مورد)، فیبروما (۱ مورد) و لیومیوما (۱ مورد) بودند. نمونه‌ها مربوط به گاوان مناطق شمالی ایران بودند، بویژه مناطقی که در طول سال برای مدتی آن هم به اجبار از سرخس عقابی برای تغذیه گاوان استفاده می‌شود.

استخراج DNA: برای استخراج DNA از نمونه‌های بافتی آغشته به پارافین ابتدا از هر قالب بطور جداگانه ۱۰ برش پارافینی به ضخامت ۵ میکرومتر بوسیله میکروتوم استاندارد تهیه گردید و برش‌ها به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری منتقل شدند. دستگاه میکروتوم پیش از انجام برش‌ها ابتدا با گزیلن و اتانول شستشو داده شد و به منظور جلوگیری از آلودگی با سایر نمونه‌ها، از تیغه‌های یکبار مصرف استفاده گردید. به هر میکروتیوب ۶۰۰ میکرولیتر از محلول SDS ۱ درصد و NaOH ۰/۱ مولار (pH=۱۲/۷) و (۱۰ دانه چلکس ۲۰) (Chelex 20) شرکت سیگما، کشور سازنده آلمان) اضافه شد. میکروتیوب‌ها در یک حمام آب در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۴۵ دقیقه حرارت داده شدند. بدنبال آن برای مدت ۵ دقیقه میکروتیوب‌ها را سرد نموده سپس لایه پارافینی رویی هر میکروتیوب بوسیله یک سرسمپلر استریل از میکروتیوب‌ها خارج گردید و مایع زیرین لایه پارافینی به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد. مراحل بعدی استخراج و خالص سازی بر اساس روش پیشنهادی Shi و همکاران در سال ۲۰۰۲ دنبال گردید(۴۰).

پرایمرها: در این بررسی پرایمرها بر اساس پرایمرهای پیشنهاد شده توسط Dequiedt در سال ۱۹۹۵ (۱۴) برای اگزون‌های ۵ و ۶ ژن P53 مورد استفاده قرار گرفت. این پرایمرها در جدول زیر ارائه شده اند (جدول ۱).

روش انجام PCR (Polymerase Chain Reaction): PCR در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. در هر واکنش ۳ میکرولیتر از سوسپانسیون DNA بعنوان الگو در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. برای هر دو اگزون ۵ و ۶، بافر KCl۱۰X) ۵۰ میلی مولار، Tris-HCl ۱۰ میلی مولار (PH=۸/۴)، بافر AMS محتوی ۲۰ میلی مولار سولفات آمونیوم، Tris -HCl ۷۵ میلی مولار (PH=۸/۸) ۲/۵ میکرولیتر، Mgcl2 ۱/۵ میلی مولار، dNTP ۰/۲ میلی مولار و از هر پرایمر به میزان ۰/۵ پیکومولار بوده است. آنزیم Taq پلی مراز (شرکت سیناژن) به میزان ۱ واحد در هر واکنش استفاده گردید.

واکنش PCR توسط دستگاه ترموسیکلر اپندورف (ep gradiant Eppendorf)(کشور سازنده آلمان) انجام شد. شرایط PCR به ترتیب زیر بود. یک مرحله واسرشت آغازین (Initial Denaturation) در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، بدنبال آن تعداد ۳۵ چرخه متشکل از مرحله واسرشت، ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، مرحله هم سرشت (Annealing) برای اگزون ۵، ۵۷/۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و برای اگزون ۶، ۶۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش (Extension) برای هر دو اگزون ۷۲ درجه سانتی گراد برای مدت ۵۰ ثانیه و در انتها یک مرحله گسترش نهایی (Final Extension)، ۷۲ درجه سانتی گراد برای مدت ۱۰ دقیقه بود. برای کنترل مثبت از نمونه‌های DNA استخراج شده از خون گاو سالم استفاده شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، نوار DNA با استفاده از اشعه ماوراء بنفش (UV) مشاهده گردید.

روش انجام SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism): جهت انجام SSCP، ۵ میکرولیتر محصول PCR را با ۵ میکرولیتر رنگ بارگذاری فرمامید (Formamide loading dye)(۹۵ درصد فرمامید، ۱۰ میلی مولار NaOH، ۰/۵ درصد گزیلن سیانول و ۰/۵ درصد برموفنول بلو) مخلوط گردید و ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵

دقیقه حرارت داده شدتا DNA دو رشته‌ای دناتوره شده و بصورت تک رشته‌ای دربیاید. سپس فوراً آن را روی یخ سرد نموده و پس از گذشت زمان ۵ دقیقه، نمونه‌ها آماده بودند تا به روی ژل انتقال یابند. برای تهیه ژل آکریلامید ۱۰درصد از استوک آکریلامید - بیس آکریلامید ۴۰درصد که به نسبت ۳۸:۲تهیه شده بود استفاده گردید. از استوک، ۱۲/۵ میلی لیتر برداشت نموده با ۵ میلی لیتر بافر TBEX۱۰و ۲/۵ میلی لیتر گلیسرول مخلوط کرده، سپس حجم، با آب دیونیزه به ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. برای پلی مریزه شدن ژل از آمونیوم پرسولفات(APS) ۱۰درصد به میزان ۵۰۰ میکرولیتر و از تترامتیل اتیلن دیامین (TEMED) به میزان ۵۰ میکرولیتر استفاده گردید. از هر نمونه ۸ میکرولیتردر داخل گوده‌های تعبیه شده در ژل قرار داده شد. الکتروفورز برای مدت ۲۰ ساعت با اختلاف پتانسیل ۱۰۰ ولت همراه با بافر TBEX۱ در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام گردید و در پایان ژل با نیترات نقره رنگ آمیزی شد. نمونه‌هایی که در SSCP دارای تغییرات الکتروفورتیک بودند برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردیدند. تعیین توالی به روش سانجر (Sanger) با دستگاه MILLEGEN ساخت کشور فرانسه مدل biosystem 3730XL Applied، انجام گردید. تعداد ۴ نمونه برای تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست ارسال گردید که یک نمونه سالم و سه نمونه مشکوک بودند. درخواست گردید تا نمونه‌ها ی مشکوک هر کدام سه مرتبه بصورت دو طرفه تعیین توالی گردند.

نتایج

پیش از انجام SSCP ابتدا محصول PCR مربوط به هر دو اگزون ۵ و ۶ ژن P53 بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید (تصویر ۱،۲). در SSCP محصولات PCR مربوط به اگزون ۵ هیچ تغییری در الگوی حرکتی قطعات نمونه‌های توموری مشاهده نگردید (تصویر ۳). در رابطه با اگزون ۶، SSCP محصول PCR در سه نمونه توموری، همانژیوما، پاپیلوما و کارسینومای در جا، تغییری در الگوی الکتروفورزی خود نشان دادند (تصویر ۴). پس از تعیین توالی، از آنجائیکه پرایمرهای مورد استفاده برای اگزون ۶ از دو طرف مقداری از اینترون ۵ و ۶ را نیز شامل می‌شد، مشخص گردید که در نمونه‌های مربوط به همانژیوما، پاپیلوما و کارسینوما ی در جا، در اینترون ۶ حذف نوکلئوتید تیمین (T) به شماره ۹۳۳۲ (GGTCCGGTT/-GGCAACTGG) اتفاق افتاده است (تصویر ۵).

بحث

در رابطه با اتیوپاتوژنز سندرم هماتوری آنزئوتیک گاوی (BEH) مشخص شده است که کارسینوژن‌های سرخس عقابی و حضور ویروس پاپیلومای گاوی تیپ ۲ (BPV-2)، شرایط را برای ترانسفورماسیون سلولی و بروز تومورهای مثانه در گاو فراهم می‌آورند(۱۱). تاکنون افزایش فعالیت تلومراز (Telomerase)(۶) افزایش بیان انکوژن H-ras (۳۸)، افزایش بیان سیکلواکسیژناز ۲ (COX-2)(۷)، کاهش بیان ژن سرکوب کننده تومور تترادهای شکننده هیستیدین (Fragile Histidin Tetrads) (۵)، فعال شدن گیرنده‌های بتای فاکتور رشد مشتق از پلاکت (Factor receptor of Platelet Derived Growth -(²-(PDGF²)(۸) و افزایش بیان زنجیره سنگین فرتین (Ferritin Heavy Chain)(FHC)(۳۶) در سلول‌های سرطانی اوروتلیال گاوانی که از سرخس عقابی چرا می‌نمایند، گزارش شده است.

در دام‌ها، تغییرات ژن P53 در سرطان‌های مختلف ثبت شده است. بعلاوه تغییرات ژن P53 در تومورهای مثانه سگ نیز نشان داده شده است(۳۲).

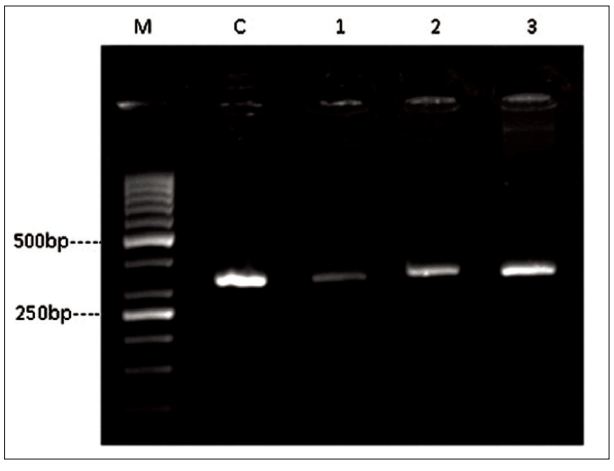
در یک مطالعه، لاین سلول‌های آزمایشگاهی PaLF را تحت تأثیر ماده کارسینوژن کرستین سرخس عقابی قرار دادند. در این سلول‌ها یک موتاسیون در کدون ۲۴۳ در ناحیه حفاظت شده IV ژن P53 به صورت ACC‘CCC اتفاق افتاد که منجر به جایگزینی ترئونین به جای پرولین گردید. این موتاسیون ممکن است از اثر مستقیم کرستین حاصل شده باشد (۲).

Carvalho و همکاران در ۲۰۰۹ بیان غیر طبیعی ژن P53 را در سرطان مثانه گاو به صورت ایمونوهیستوشیمی، منحصراً در همانژیوسارکوماهای مهاجم به عضله نشان دادند. به نظر می‌رسد P53 در تومورهای آندوتلیال مثانه دچار نقصان گردیده و واکنش پذیری ایمنی آن بطور مثبت با افزایش تهاجم در ارتباط باشد. تجمع هسته‌ای P53 و شناسایی آن با تکنیک‌هایی چون ایمونوهیستوشیمی ناشی از موتاسیون‌های ژن P53 یا غیرفعال شدن مکانیسم‌هایی است که پایداری آن را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۲).

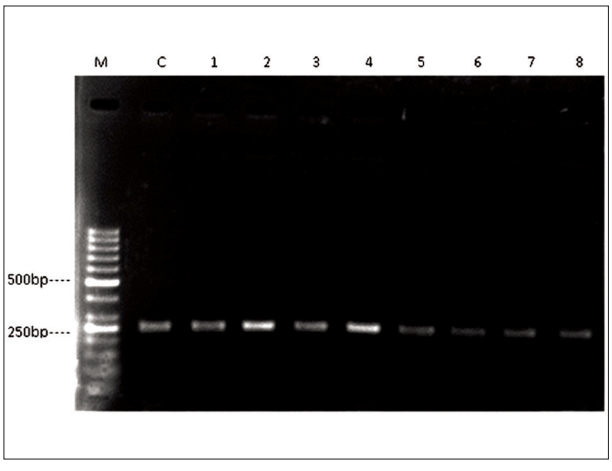
موتاسیون و حذف ژن سرکوب کننده تومور P53 فراوانترین تغییرات ژنتیکی سرطان مثانه با منشاء سلول‌های پوششی در انسان به شمار می‌روند و با موارد پیشرفته بیماری در ارتباط می‌باشند(۱۵،۱۶،۴۱).

Berggren و همکاران در ۲۰۰۱ سال اگزون‌های ۸-۵ ژن p53 را در ۱۸۹ بیمار مبتلا به نئوپلاسم‌های مثانه مورد ارزیابی قرار دادند. در ۲۶ بیمار (۱۴ درصد) موتاسیون‌های ژن p53 یافت گردید. در این ۲۶ بیمار ۳۱ موتاسیون مشخص گردید. در این مطالعه ۷ موتاسیون در اگزون ۵، ۵ موتاسیون در اگزون ۶، ۷ موتاسیون در اگزون ۷ و ۱۲ موتاسیون در اگزون ۸ یافت شد. ۳ موتاسیون از نوع خاموش، ۲۲ تا از نوع اشتباهی، ۵ تا از نوع بی معنی و یکی از نوع حذفی بوده است (۳).

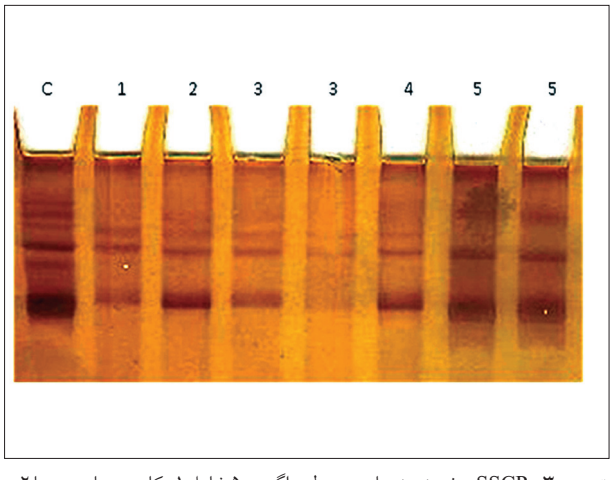
Lorenzo-Romero و همکاران در ۲۰۰۴ موتاسیون‌های ژن p53 را در اگزون‌های ۹-۵ را در ۶۰ بیمار مبتلا به TCC سطحی را به روش SSCP-PCR مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه ۳۸/۳درصد بیماران یک یا چند موتاسیون را در اگزون‌ها نشان دادند. ۹۳/۳ درصد این موتاسیون‌ها در ناحیه بسیار حفاظت شده ژن p53 و در ۷۳/۳درصد آنها در نقاط داغ بودند. تمام موتاسیون‌های یافت شده از نوع موتاسیون نقطه‌ای بودند که



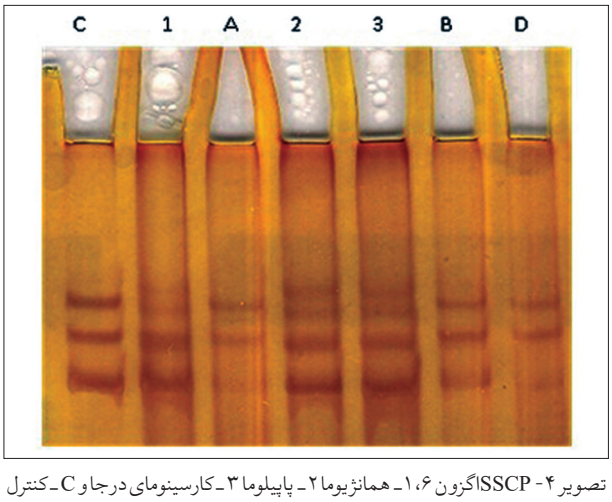
تصویر ۱ـ باندهای مربوط به الکتروفورز محصولات PCR اگزون ۵ ژن P53 مربوط به چند نمونه توموری برروی ژل آگارز ۱/۵درصد مشاهده می‌شود. باندها به طول bp ۳۳۲ در مقایسه با مارکر ۵۰bp قابل مشاهده هستند. M نشانگر مارکر و C نشانگر کنترل مثبت مربوط به DNA استخراج شده از خون گاو سالم می‌باشد.



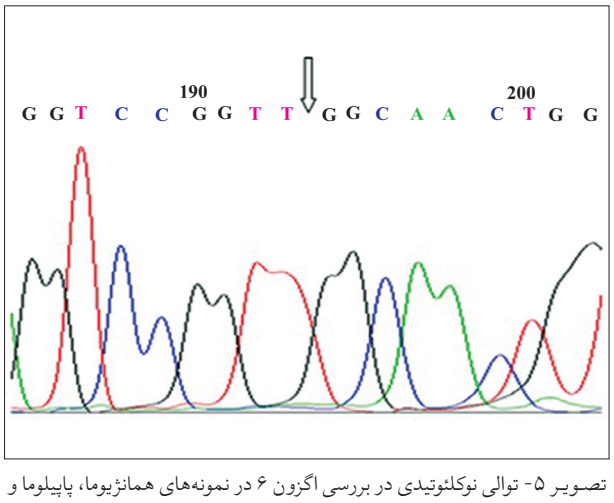
تصویر ۲ـ باندهای مربوط به الکتروفورز محصولات PCR اگزون ۶ ژن P53 مربوط به چند نمونه توموری برروی ژل آگارز ۱/۵درصد مشاهده می‌شود باندها به طول bp ۲۴۸ در مقایسه با مارکر ۵۰bp قابل مشاهده هستند. M نشانگر مارکر و C نشانگر کنترل مثبت مربوط به DNA استخراج شده از خون گاو سالم می‌باشد.



تصویر ۳- SSCP برخی نمونه‌های مربوط به اگزون ۵ شامل ۱ـ کارسینومای در جا ۲ـ پاپیلوما ۳ـ همانژیوما ۴ـ کارسینومای سلول سنگفرشی ۵ـ کارسینومای سلول ترانزیشنال و Cـ کنترل(نمونه سالم).در مقایسه با کنترل سالم هیچ تغییری در الگوی الکتروفورزی محصول PCR نمونه مشاهده نگردید.



تصویر ۴- SSCP اگزون ۶، ۱ـ همانژیوما ۲ـ پاپیلوما ۳ـ کارسینومای درجا و Cـ کنترل (نمونه سالم). ۳ نمونه که شماره گذاری شده اند دارای تغییر الگوی الکتروفورزی هستند که توالی آنها تعیین گردیده است. در نمونه‌های Aـ کارسینومای سلول سنگفرشی، Bـ کارسینومای سلول ترانزیشنال و Dـ کارسینومای درجا، تغییر الگوی الکتروفورزی مشاهده نشد.



تصویر ۵- توالی نوکلئوتیدی در بررسی اگزون ۶ در نمونه‌های همانژیوما، پاپیلوما و کارسینومای در جا. حذف نوکلئوتید T به شماره ۹۳۳۲ (GGCAACTGG-/GGTCCGGTT) در ناحیه اینترون ۶ مشاهده می‌شود.

منجر به غیر طبیعی‌های ساختمانی ژن p53 می‌گردند (۲۹).

در مطالعه دیگری موتاسیون‌های ژن p53 در ۱۴۰ بیمار مبتلا به سرطان مثانه به روش SSCP و بدنبال آن تعیین توالی مستقیم مورد ارزیابی قرار گرفتند. از این تعداد در ۷۹ مورد (۵۶/۴درصد) موتاسیون‌های ژن p53 شناسایی گردید. تعیین توالی مستقیم، ۶۶ مورد موتاسیون نقطه‌ای و ۵ مورد موتاسیون‌های Frame Shift را مشخص نمود (۳۰).

موتاسیون‌های ژن p53 در اگزون‌های ۸-۵ در مطالعه دیگری به روش PCR-SSCP در ۳۲۷ بیمار مبتلا به سرطان مثانه با منشاء قفقازی در حومه استکهلم مورد مطالعه قرار گرفتند. موتاسیون‌های متقاطع در ۲۶درصد(۱۳/۵۰) موتاسیون‌ها و موتاسیون‌های انتقالی در ۷۴ درصد (۳۷/۵۰) از موتاسیون‌ها مشاهده گردید (۳۷).

جدول ۱ـ پرایمرهای مورد استفاده برای اگزون‌های ۵ و ۶ ژن P53 در این مطالعه.

پرایمر	سایز باند
332bp	R: 5′- CAATCAGGGAGGAATTAGGG-3′ 5F: 5′- TCGGTGCTTGTACATTCGAC-3′
248bp	6R: 5′- CCTCCACCTAGGGTGGTCAC-3′ 6F: 5′- GGGACTGTGGATGGGACCGG-3′

در مطالعه حاضر اگرچه در محدوده اگزون‌های ۵ و ۶ هیچ تغییر الگوی الکتروفورتیک با روش SSCP مشاهده نگردید ولی حذف نوکلئوتید T در سه نمونه توموری در جای خود از اهمیت به سزایی برخوردار است.

اینترون‌ها اجزاء مهم ژنوم‌های ائوکاریوتیک هستند که اعمال بسیار با اهمیتی را انجام می‌دهند و بطور فعال در تکامل ژن شرکت می‌نمایند. یک تعداد اجزاء تنظیم کننده بیان ژن در توالی‌های اینترونیک یافت شده است. اینترون‌ها در انتقال پیام برای خروج mRNA از هسته نیز ایفای نقش می‌نمایند(۱۷). اینترون‌ها توالی‌های غیر کد شونده بین اگزون‌ها هستند که طی پردازش (Splicing) بوسیله اگزونوکلئازها از mRNA پیش از ترجمه حذف می‌شوند. اینترون‌ها معمولاً با GT آغاز و با AG ختم می‌شوند(۴۶).

پردازش باید خیلی دقیق انجام شود، زیرا هرگونه اشتباه حتی در یک نوکلئوتید (حذف یا اضافه شدن یک نوکلئوتید) می‌تواند باعث تغییر کامل در چهارچوب خواندن باز (Open reading frame) کدون شود. این تغییر منجر به یک توالی جدیدی از کدون‌ها می‌شود که منجر به ایجاد اسیدهای آمینه کاملاً متفاوتی می‌گردد یا اینکه باعث ورود یک کدون توقف برای خاتمه سنتز پپتید می‌شود(۲۰).

پردازش از سمت ژ۵ بطرف ژ۳ mRNA انجام می‌شود. تغییر در بازهای اینترونیک سمت ژ۵ می‌تواند منجر به نقص در پردازش mRNA شده، در نهایت یک ملکول mRNA ناقص ایجاد نماید. موتاسیون‌هایی که پردازش mRNA را متأثر می‌سازند، محل‌های پردازش ژ۵ و ژ۳ را معمولاً در بر می‌گیرند(۴۶). در مطالعه حاضر، حذف نوکلئوتید (تیمین V) به شماره ۹۳۳۲ در تومورهای همانژیوما، پاپیلوما و کارسینومای درجا روی داده است. این باز در سمت ژ۵ اینترون ۶ ژن P53 گاوی واقع شده است. این موتاسیون توالی پردازش را از ′3-5′-GTCCGGTTT به ′3-5′-GTCCGGTTG تبدیل می‌نماید.

گزارش شده است که تغییرات نوکلئوتیدی اینترون ۶ ژن P53 با سندرم‌های زمینه ساز سرطان، تجمع پروتئین P53 و کاهش In Vitro آپوپتوز القاء شده با شیمی درمانی ارتباط دارد(۲۶). ارتباط میان فنوتیپ‌های سرطان و پلی مورفیسم اینترونیک ژن P53 ارثی در مطالعات بر روی سرطان‌های اپی تلیال از جمله تخمدان، پستان، کولون، معده، نازوفارنکس، تیروئید، مثانه و ریه در انسان مشاهده شده است(۴۳). بعلاوه تغییرات اینترونیک ژن P53 در شوانوما (۳۹)، هپاتوسلولار کارسینوما (۲۳)، فائوکروموسیتوما (۴۴)، لمفومای سلول B بزرگ منتشر (۲۶) و لوسمی لمفوبلاستیک حاد سلول T (T-ALL) (۲۱) در انسان یافت شده است.

در گربه حذف ۲۳ جفت باز که در بر گیرنده اتصال میان اینترون ۵ و اگزون ۶ بوده است در یک پلئومورفیک سارکوما (Sarcoma Pleomorphic) مشاهده گردیده و در یک فیبروسارکومای گربه نیز حذف ۴ جفت باز در اینترون ۷ ژن P53 یافت شده است(۳۱).

موتاسیون‌های اینترونیک در پایدار شدن پروتئین تیپ وحشی P53 نقش مهمی ایفا می‌نمایند که منجر به تجمع غیر طبیعی آن و زمینه ساز ابتلاء به سرطان می‌گردند(۱). بنابراین بررسی موتاسیون‌های اینترونیک ژن P53 در تومورهای مثانه گاو نیز می‌تواند در کنار مطالعه تغییرات در اگزون‌ها تا حدود زیادی در تعیین نقش موتاسیون‌های ژن P53 در بروز این گونه تومورها در گاو مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران برای انجام این تحقیق و همچنین از همکاری کارشناسان بخش آسیب‌شناسی مهندس سامانی و مهندس بنی نجّار و کارشناسان بخش میکروبیولوژی و ایمنی شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جناب آقای مهندس خرمالی و مهندس اشرافی و مدیریت و پرسنل آزمایشگاه پاتوبیولوژی سینای رشت صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Avigard, S., Barel, D., Blau, O., Malka, A., Zoldan, M., Mor, C., Fogel, M., Cohen, I.J., Stark, B., Goshen, Y., Stein, J., Zaizov, R. (1997) A novel germ line P53 mutation in intron 6 in diverse childhood malignancies.Oncogene. 14:1541-1545.
2. Beniston, R.G., Morgan, I.M, O´Brien, V., Campo, M.S. (2001) Quercetin, E7 and P53 in papillomavirus oncogenic cell transformation. Carcinogenesis. 22: 1069-1076.
3. Berggren, P., Steineck, G., Adolfsson, J., Hansson, J., Jansson, O. et. al. (2001) P53 mutations in urinary bladder cancers.Br.J.Cancer.84: 1505-1511.
4. Bode, A.M., Dong, Z. (2004) Post translational modification of P53 in tumorigenesis. Nat. Rev. Cancer. 4: 793- 805.

5. Borzacchiello, G., Ambrosio, V.,Galati, P., Poggiali, F., Venuti, A., Roperto, F. (2001) The pagetoid variant of urothelial carcinoma in situ of urinary bladder in a cow. Vet. Pathol. 38: 113-116.
6. Borzacchiello, G., Iovane, G., Marcante, M. L., Pogialli, F., Roperto, F., Roperto, S. et. al. (2003a) Presence of bovine papillomavirus Type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring urinary bladder tumors in cows. J. Gen. Virol. 84: 2921-2926.
7. Borzacchiello, G., Ambrosio, V., Galati, P., Perillo, A., Roperto, F. (2003b) Cyclooxygenase 1 and -2 expression in urothelial carcinomas of the urinary bladder in cows.Vet. Pathol. 40: 455-459.
8. Borzacchiello, G., Russo, V., Gentile, F., Roperto, F., Venuti,A.,Nitsch,L.et.al.(2006)Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the activated form of the platelet-derived growth factor beta receptor in naturally occurring bovine urinary bladder tumors. Oncogene. 25:1251-1260.
9. Borzacchiello, G., Resendes, A. R., Roperto, S., Roperto, F. (2009) Co-expression of bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in naturally occurring carcinomas of the urinary bladder in cattle.J.Com.Pathol. 141: 84-88.
10. Bullok, A. N., Fersht, A. R. (2001) Rescuing the function of mutant P53 . Nat. Rev. cancer. 1: 68-76.
11. Campo, M.S., Jarrett, W.F.H., Barron, R.J., o´Neil, B.W., Smith, K.T. (1992) Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. Cancer. Res . 52: 6898-6904.
12. Carvalho, T., Naydan, D., Nunes, T., Pinto, C., Peleteiro, M. C. (2009) Immunohistochemical evaluation of vascular urinary bladder tumors from cows with enzootic hematuria.Vet. Pathol. 46: 211-221.
13. Coggins, L.W., Scobie, L., Jackson , M.E., Campo, M.S. (1995) Assignment of the bovine P53 gene (TP53) to chromosome 19q15 by fluorescence insitu hybridization. Mamm. Genome. 6: 687-688.
14. Dequiedt, F., Kettmann, R., Burny, A., Willems, L. (1995) Mutations in the P53 tumor-suppressor gene are frequently associated with bovine leukemia virus -induced leukemogenesis in cattle but not in sheep. Virology. 209:676-683.
15. Ecke, T.H., Schlechte, H.H., Gunia, S., Lenk, S.V., Loening, S.A. (2008) Body mass index (BMI) and mutations of tumor suppressor gene P53 (TP53) in patients with urinary bladder cancer. Urol. Oncol: seminars and original investigations. 26: 470-473.
16. Erill, N., Colomer, A.,Verdo, M., Cordon-cardo, C., Puig, X. (2004) Genetic and immunophenotype analyses of TP53 in bladder cancer: TP53 alterations are associated with tumor progression. Diag. Mol. Pathol. 13: 217-223.
17. Fedorova, L., Fedorov,A. (2003) Introns in gene evolution. Genetica.118:123-131.
18. Fidalgo, P., Almeida, M.R., West, S., Gasper, C., Maia, L., Wijnen, J. et. al. (2000) Detection of mutations in mismatch repair genes in Portuguese families with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) by a multi-method approach. Eur. J. Hum. Genet. 8:49-53
19. Halazontis, T.D. (2004) Constitutively active DNA damage checkpoint pathways as the driving force for the high frequency of P53 mutations in human cancer. DNA. Repair. 3: 1057- 1062.
20. Heroux, J.,Gharib, A. M. (2008) Introduction to molecular biology. In: Molecular Imaging in Oncology. Pomper, M., Gelovani, J. G. (eds.). Informa Healthcare. NewYork. USA. p. 29-42.
21. Hsiao, M.H., Yu, A.L.,Yeargin, J., Ku, D., Hass, M. (1994) Nonhereditary P53 mutations in T-cell acute Lymphoblastic leukemia are associated with the relapse phase. Blood. 83: 2922-2930.
22. Isobe, M., Emanuel, B.S., Givol, D., Oren, M. (1986) Localization of gene for human P53 tumor antigen to band 17P13. Nature. 320: 84-85.
23. Lai, M.Y., Chang, H.C., Li, H.P., Ku, C.K., Chen, P.J, Sheu, J.C. et. al. (1993) Splicing mutations of the P53 gene in human hepatocellular carcinoma. Cancer. Res. 53: 1653-1656.
24. Lamb, P., Crawford, L. (1986) Characterization of the human P53 gene. Mol. Cell. Biol. 6: 1379-1385.
25. Lane, D.P. (1992) P53, guardian of the genome.

Nature. 358: 15-16.

26. Leroy, K., Haioun, C., Lepage, E., LeMetayer, N., Berger, F., Labouyrie, E. et. al. (2002) P53 gene mutation are associated with poor survival in low and low-intermediate risk diffuse large B-cell lymphomas. Annul. Oncol.13:1108-1115.
27. Levine, A.J., Momand, J., Finlay, C.A. (1991) The P53 tumor suppressor gene. Nature. 351: 435-456
28. Levine, A.J. (1997) P53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell. 88: 323-331.
29. Lorenzo-Romero, J.G., Salins Sanchez, A.S., Gimenez Bachs, J.M., Sanchez Sanches, F. et. al. (2004) p53 gene mutations in superficial bladder cancer. Urol. Int. 73: 212-218.
30. Lu, M.L., Wikman, F., Orntoft, T.F., Charytonowicz, E., Rabbani, F. et. al. (2002) Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer on clinical outcome,assessed by onventional and array-based method. Clin. Cancer. Res. 8: 171-179.
31. May, B., Reifinger, M., Alton, K.,Schaffner, G. (1998) Novel P53 tumor suppressor mutations in cases of spindle cell sarcoma,pleomorphic sarcoma and fibrosarcoma in cats. Vet. Res. Commun. 22: 249-253.
32. Meuten, D.J. (2002) Tumors of the urinary system. In: Tumors in Domestic Animals. Meuten, D.J.(ed.). (4th ed.). Blackwell. Iowa, USA. p. 509-546.
33. Newman, S.J., Confer, A.W., Panciera, R.J. (2007) Urinary system. In: Pathologic Basis of Veterinary Disease. McGavin, M.D.,Zachary, J.F.(eds.). (4thed.). Mosby Elsevier. Iowa, USA. p. 613-691.
34. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc.Natl. Acad.Sci. 86: 2766-2770.
35. Roperto, S., Borzacchiello, G., Brun, R., Leonardi, L., Maiolino, P., Martano, M. et. al. (2010a) A review of bovine urothelial tumors and tumor like lesions of the urinary bladder. J.Com.Pathol. 142: 95-108.
36. Roperto, S., Borzacchiello, G., Brun, R., Costanzo, F., Faniello, M.C., Raso, C. et. al. (2010b) Ferritin heavy chain (FHC) is up-regulated in papillomavirus -associatedurothelial tumors of the urinary bladder in cattle. J. Com. Pathol. 142: 9-18.
37. Ryk, C., Kumar, R., Sanyal, S., Berggren, P.J., Hemminki, K. et. al. (2006) Influence of polymorphism in DNA repair and defense genes on p53 mutations in bladder tumors. Cancer. Lett. 241: 142-149.
38. Sardon, D., de la Fuente, I., Calong, E., Perez Alenza, M. D., Castano, M., Dunner, S. et. al. (2005) H-rasimmunohistochemical expression and molecular analysis of urinary bladder lesions in grazing adult cattle exposed to bracken fern. J. Comp. Pathol. 132:195-201.
39. Schneiderstock, R., Oda, Y.,Rossner, A. (1997) New splicing mutation in exon 5-6 of the P53 -tumor suppressor gene in a malignant schwannoma. Hum. Mutat. 9: 91-94.
40. Shi, S.R., Cote, R.J., Wu, L., Liu, C., Dater, R., Shi, Y. et. al. (2002) DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. J. Histochem. Cytochem. 50: 1005-1011.
41. Sidransky, D., Eschenbach, A.V., Tsai, Y.C., Jones, P., Summerhayes,I.,Marshall,F.et.al.(1991)Identification of P53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. Science. 252:706-709.
42. Vousden, K.H., Lu, X. (2002) Live or let die: the cell´s response to P53. Nat. Rev. Cancer. 2: 594-604.
43. Wang-Gohrke, S., Weikel, W., Risch, H., Vesprini, D., Abrahamson, J., Lerman, C. et. al. (1999) Intron variants of the P53 gene are associated with increased risk for ovarian cancer but not in carriers ofBRCA1 or BRCA2 germ line mutations. Br. J. Cancer. 81: 179-183.
44. Yoshimoto, T., Naruse, M., Zeng, Z., Nishikawa, T., Kasajima, T., Tomas, H. et. al. (1998) The relatively high frequency of P53 gene mutation in multiple and malignant phaeochromocytomas. J. Endoc. 159: 245-255.
45. Zalcenstein, A., Stambolsky, P., Weisz, L.,Muller, M., Wallach, D., Goncharov, T.M. et. al. (2003) Mutant

P53 gain of function: repression of CD95 (Fas/Apo-1) gene expression by tumor-associated P53 mutants. Oncogene. 22: 5667-5676.

46. Zhang, S., Davidson, D.D., Zhang, D.Y., Parks, J.A., Cheng, L. (2008) Principles of clinical molecular biology. In: Molecular Genetic Pathology. Cheng, L., Zhang, D.Y. (eds.). Humana Press. New Jersey. USA. p. 3-32.

J. Vet. Res. 67, 1:27-34, 2012

Study on P53 gene alterations (5 and 6 exons) in bovine urinary bladder tumors

Sasani, F.[1*], Baghban, F.[1], Nikbakht Broujeni, Gh.R.[2], Kazemi, M.[3]

[1]*Department of Pathology, Faculty o Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.*

[2]*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine , University of Tehran, Tehran-Iran.*

[3]*Department of Genetic and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan Medical Sciences University, Isfahan-Iran.*

(Received 24 August 2011 , Accepted 25 December 2011)

Abstract:

BACKGROUNDS: P53 is a tumor suppressive gene which frequently mutates in tumors of animals and human. This gene commonly mutates in urinary bladder tumors of human beings. Urinary bladder tumors have occurred in cattle with bovine enzootic hematuria (BEH). **OBJECTIVES:** The aim of present study was to evaluate P53 mutations in 15 samples of different bovine urinary bladder tumors by the PCR-SSCP technique. **METHODS:** Fifteen paraffin embedded blocks were selected from different kinds of bovine urinary bladder tumors. DNA was extracted from the samples and PCR was done by using specified primers for 5 and 6 exons. After electrophoresis, the PCR products were assessed by the SSCP method, and samples with changes in electrophoresis patterns were selected and sequenced. **RESULTS:** Results showed that there are intronic alterations of the P53 gene in cattle with urinary bladder tumors. There were no changes in the electrophoretic pattern of exons 5 and 6, but on each side of the designed primers for exon 6, there was a part of introns 5 and 6. The samples, including hemangioma, papilloma and carcinoma in situ with electrophoretic changes, showed nucleotide T deletion with number 9332 in intron 6 after direct sequencing. Intronic mutations can be a predisposition for developing cancers. **CONCLUSIONS:** It is possible that some of urinary tumors are inducted by P53 mutations in intronic zone.

Key words: P53, exon, intron, mutation, urinary bladder tumor, bovine.

***Corresponding author's email: fsasani@ut.ac.ir, Tel: 021-66923510, Fax: 021-66933222**