

مطالعه تغییرات ژن P53 (اگزون‌های ۵ و ۶) در تومورهای مثانه گاو

فرهنگ ساسانی^{۱*}، فرشاد باغبان^۱، غلامرضا نیکبخت بروجنی^۲، محمد کاظمی^۳

۱) گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۲) گروه میکرو بیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۳) 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: P53 یک ژن سرکوب کننده تومور است. موتاسیون این ژن بطور معمول در تومورهای مثانه در گاو بروز می یابند. **هدف:** مطالعه تعیین موتاسیون های احتمالی در اگزون های ۵ و ۶ ژن P53 به روش SSCP می باشد. **روش کار:** برای این منظور تعداد ۱۵ بلوک پارافینی از نمونه های مختلف تومورهای مثانه گاو شامل کارسینوما سلول ترانزیشنال (۳ مورد)، کارسینوما سلول سنگفرشی (۲ مورد)، همانژیوما (۳ مورد)، پاپیلوما (۲ مورد)، کارسینوما 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 اگزون های ۵ و ۶، انجام و محصولات با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شدند. محصولات با روش مورد ارزیابی قرار گرفتند تا نمونه هایی که دارای تغییر الکتروفوریک بودند، مشخص گردیده و برای تعیین توالی ارسال شوند. **نتایج:** در این مطالعه در محدوده اگزون های ۵ و ۶ هیچ تغییر الگوی الکتروفوریک مشاهده نشد. در ۳ نمونه شامل همانژیوما، پاپیلوما و کارسینوما در جا، تغییر الگوی الکتروفورزی مشاهده گردید که پس از تعیین توالی مشخص گردید که در سه نمونه همانژیوما، پاپیلوما و کارسینوما در جا، حذف نوکلئوتید (T) به شماره ۹۳۳۲ در اینترون ۶ روی داده است. لذا موتاسیون های اینترونیک می توانند زمینه ساز بروز سرطان شوند. **نتیجه گیری نهایی:** بنابراین در این مطالعه اگرچه در اگزون های ۵ و ۶ هیچ موتاسیونی مشاهده نگردید ولی با توجه به تغییرات اینترونیک مشاهده شده، بررسی موتاسیون های اینترونیک ژن P53 در تومورهای مثانه در گاو میتواند در آینده در شناخت انکوژن های این تومورها مؤثر باشد.

واژه های کلیدی: P53، اگزون، اینترون، موتاسیون، تومور مثانه، گاو.

اینرو تغییر ژنتیکی فراوان ترین علت تغییر فعالیت ژن P53 می باشد (۴۲). موتاسیون های اکتسابی در ژن P53 در تمام انواع اصلی سرطان های 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 می شود (۴).

تکنیک SSCP به عنوان روشی برای غربالگری جهش های 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 رشته ای 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 توالی های طبیعی بر روی ژل پلی آکرلامید می شوند که پس از رنگ آمیزی قابل تشخیص هستند. این روش نسبتاً ساده، به صرفه و نیازمند حداقل تجهیزات می باشد. SSCP روش دقیقی است که می تواند موتاسیون ها را به خوبی شناسایی نماید و دقت آن در رابطه با برخی ژن ها به بیش از ۹۵ درصد می رسد (۱۸، ۳۴).

در گاو، مصرف طولانی مدت گونه های سرخس عقابی پتریدیوم آکولینوم تحت گونه آکولینوم (*aquilinum subsp. aquilinum*) با چهار گونه و سایر سرخس ها (*Caudatum*) با چهار گونه و سایر سرخس ها (*Cheilandesseiberi*) منجر به ایجاد یک سندرم

مقدمه

پروتئین P53 با ۳۸۷ اسید آمینه، یک فسفو پروتئین هسته ای با وزن ملکولی ۵۳ کیلودالتون (KDa) است که بوسیله یک ژن ۲۰ کیلوبازی حاوی ۱۱ اگزون و ۱۰ اینترون کد می شود و در انسان بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ (17p13.1) قرار دارد (۲۲، ۲۴). در گاو با تکنیک هیبریدیزاسیون فلورسنس در جا (Fluorescence In Situ Hybridization) (FISH) محل ژن P53 بر روی کروموزوم ۱۹ (19q15) با همان ویژگی های 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 می دهد (۱۵). در طی روند ایجاد تومور فرایندی بطور انتخابی فعالیت رونوشت برداری ژن P53 را بی اثر می نماید. در واقع غیر فعال شدن P53 باعث می شود که سلول های 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 سرطان ها می تواند با مکانیسم های مختلفی از جمله ضایعاتی که از فعال شدن P53 جلوگیری می کنند، موتاسیون های داخل خود ژن P53 یا موتاسیون در پروتئین هایی که میانجی فعالیت P53 هستند، کاهش می یابد، از



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 آگزون‌های 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 الگودر واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. برای هر دو آگزون ۵ و ۶، بافر KCl ۱۰X (۵۰ میلی مولار، ۱۰ Tris-HCl میلی مولار (pH=۸/۴)، بافر AMS محتوی ۲۰ میلی مولار سولفات آمونیوم، ۷۵ Tris-HCl میلی مولار (pH=۸/۸) ۲/۵ میکرولیتر، ۲/۵ MgCl₂ میلی مولار، ۰/۲ dNTP میلی مولار و از هر پرایمر به میزان ۰/۵ میکرومولار بوده است. آنزیم Taq پلی مراز (شرکت سینازن) به میزان ۱ واحد در هر واکنش استفاده گردید.

واکنش PCR توسط دستگاه ترموسیکلر اپندورف (ep gradient Eppendorf) (کشور سازنده آلمان) انجام شد. شرایط PCR به ترتیب زیر بود. یک مرحله واسرشت آغازین (Initial Denaturation) در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، بدنبال آن تعداد ۳۵ چرخه متشکل از مرحله واسرشت، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، مرحله هم سرشت (Annealing) برای آگزون ۵، ۵۷/۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و برای آگزون ۶، ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش (Extension) برای هر دو آگزون ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵۰ ثانیه و در انتها یک مرحله گسترش نهایی (Final Extension)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد 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 (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 گزین سیانول و ۰/۵ درصد برموفنول (بلو) مخلوط گردید و ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵

نئوپلاستیک می‌گردد که تحت عنوان هماتوری آنزوتیک گاو (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 تیمیناز مواد سرطان زا، جهش زا و سرکوب کننده ایمنی مانند کرسیتین (Quercetin)، شیکمیک اسید (Shikimic acid)، پرونازین (Prunasin)، تاکیلوزاید (Ptaquiloside) یا براکسین (Braxin C) و تاکیلوزاید (Z) (Ptaquiloside) و آکیلید (A) (Aquilide A) و یک عامل خونریزی دهنده با ساختمان ناشناخته در سرخس عقابی شناسایی شده است (۳۳، ۳۲). 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 پاپیلوما گاو تیپ ۲ (BPV-2) (Bovine papillomavirus type-2) و سرخس عقابی در کارسینوز 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 (همانژ یوماها و همانژ یوسارکوماها) مشاهده گردید که 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 در میان 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 آگزون ۵ و ۶ ژن P53 در تومورهای مختلف مثانه در گاو با استفاده از روش PCR-SSCP و تعیین توالی الگوهای تغییر یافته 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 کارسینوما سلول ترانزیشنال (۳ مورد)، کارسینوما سلول سنگفرشی (۲ مورد)، همانژ یوما (۲ مورد)، پاپیلوما (۲ مورد)، کارسینوما 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 گزین و اتانول شستشوداده شد و به منظور جلوگیری



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 of Platelet Derived Growth²-receptor) (۸) و افزایش بیان زنجیره سنگین فرتین (Ferritin Heavy Chain) (FHC) (۳۶) در سلول‌های سرطانی اوروتلیال گاوانی که از سرخس عقابی چرامی نمایند، گزارش شده است.

در دام‌ها، تغییرات ژن P53 در سرطان‌های مختلف ثبت شده است. علاوه بر 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 کرسستین 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 کرسستین حاصل شده باشد (۲).

Carvalho و همکاران در ۲۰۰۹ بیان غیرطبیعی 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 (۴۱، ۱۶، ۱۵).

Berggren و همکاران در ۲۰۰۱ سال‌هاگزون‌های 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 آگزون ۵، ۵ موتاسیون در آگزون ۶، ۷ موتاسیون در آگزون ۷ و ۱۲ موتاسیون در آگزون ۸ یافت شد. ۳ موتاسیون از نوع خاموش، ۲۲ تا از نوع اشتباهی، ۵ تا از نوع بی‌معنی و یکی از نوع حذفی بوده است (۳).

Lorenzo-Romero و همکاران در ۲۰۰۴ موتاسیون‌های ژن P53 را در آگزون‌های ۹-۵ را در ۶۰ بیمار مبتلا به TCC سطحی را به روش SSCP-PCR مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه ۳/۲۸ درصد بیماران یک یا چند موتاسیون را در آگزون‌ها نشان دادند. ۳/۹۳ درصد این موتاسیون‌ها در ناحیه بسیار حفاظت شده ژن P53 و در ۳/۷۳ درصد آنها در نقاط داغ بودند. تمام موتاسیون‌های یافت شده از نوع موتاسیون نقطه‌ای بودند که

دقیقه حرارت داده شد تا DNA دو رشته‌ای دناتوره شده و بصورت تک رشته‌ای در بیاید. 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 آکرلامید ۱۰ درصد از استوک آکرلامید - بیس آکرلامید ۴۰ درصد که به نسبت ۲:۳۸ تهیه شده بود استفاده گردید. از استوک، ۵/۱۲ میلی لیتر برداشت نموده با ۵ میلی لیتر بافر TBEX ۱۰ و ۵/۲ میلی لیتر گلیسرول مخلوط کرده، سپس حجم، با آب دیونیزه به ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. برای پلی‌مریزه شدن ژل از آمونیوم پرسولفات (APS) ۱۰ درصد به میزان ۵۰۰ میکرولیتر و از تترامیل اتیلن دیامین (TEMED) به میزان ۵۰ میکرولیتر استفاده گردید. از هر نمونه ۸ میکرولیتر در داخل گوده‌های تعبیه شده در ژل قرار داده شد. الکتروفورز برای مدت ۲۰ ساعت با اختلاف پتانسیل ۱۰۰ ولت همراه با بافر TBEX ۱۰ در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام گردید و در پایان ژل با نیترا نقره رنگ آمیزی شد. نمونه‌هایی که در SSCP دارای تغییرات الکتروفوریک 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 تکاپوزیست ارسال گردید که یک نمونه سالم و سه نمونه مشکوک بودند. درخواست گردید تا نمونه‌های مشکوک هر کدام سه مرتبه بصورت دو طرفه تعیین توالی گردند.

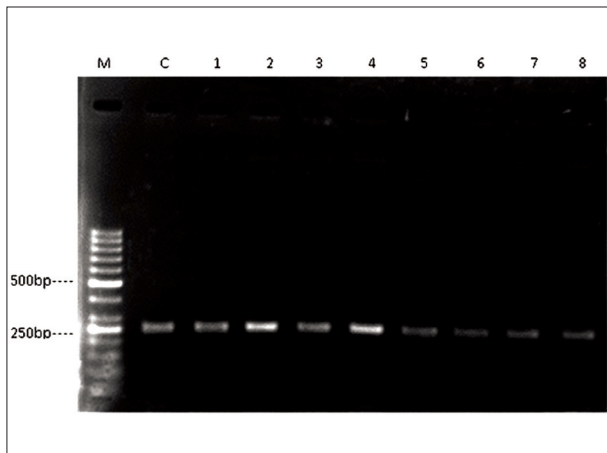
نتایج

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

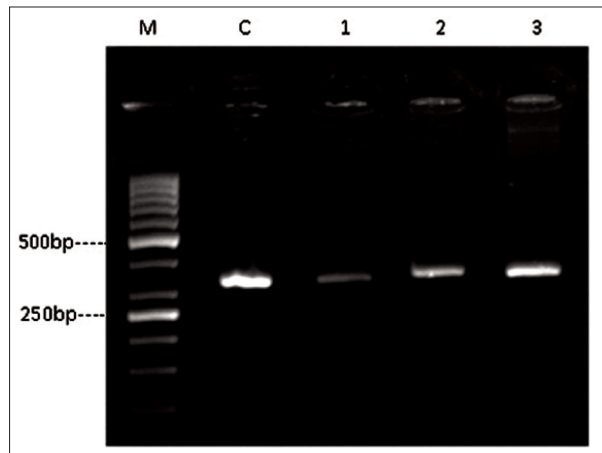
بحث

در رابطه با اتیوپاتوژنز سندرم هماتوری آنژیوتیک گاوی (BEH) مشخص شده است که کارسینوژن‌های سرخس عقابی و حضور ویروس پاپیلوما گاوی تیپ ۲ (BPV-2)، شرایط را برای ترانسفورماسیون سلولی و بروز تومورهای مثانه در گاو فراهم می‌آوردند (۱۱). تاکنون افزایش فعالیت تلومراز (Telomerase) (۶) افزایش بیان انکوژن H-ras (۳۸)،

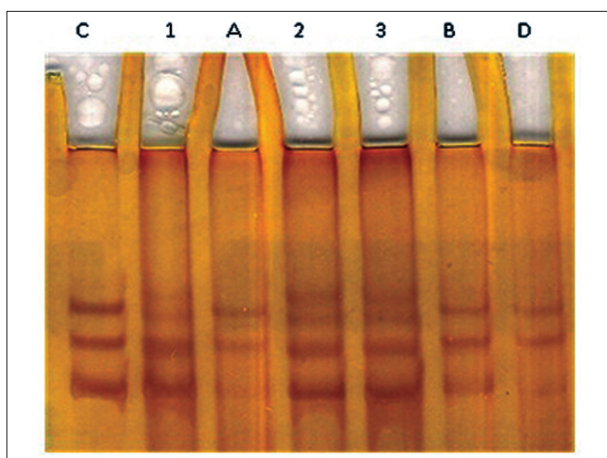




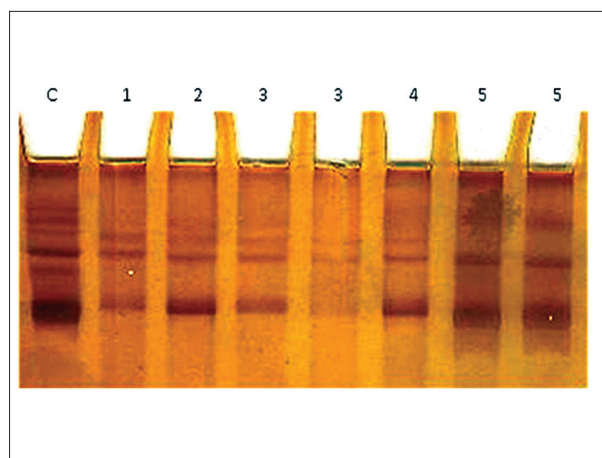
تصویر ۲- باندهای مربوط به الکتروفورز محصولات PCR اگزون ۶ ژن P53 مربوط به چند نمونه توموری بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد مشاهده می شود باندها به طول ۲۴۸bp در مقایسه با مارکر ۵۰bp قابل مشاهده هستند. M نشانگر مارکر و C نشانگر کنترل مثبت مربوط به DNA استخراج شده از خون گاو سالم می باشد.



تصویر ۱- باندهای مربوط به الکتروفورز محصولات PCR اگزون ۵ ژن P53 مربوط به چند نمونه توموری بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد مشاهده می شود. باندها به طول ۳۳۲bp 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 می باشد.



تصویر ۴- SSCP اگزون ۶، ۱- همانژیوما ۲- پاپیلوما ۳- کارسینوما در جا و C- کنترل (نمونه سالم). ۳۰ نمونه که شماره گذاری شده اند دارای تغییر الگوی الکتروفورزی هستند که توالی آنها تعیین گردیده است. در نمونه های A- کارسینوما سلول سنگفرشی، B- کارسینوما سلول ترانزیشنال و D- کارسینوما در جا، تغییر الگوی الکتروفورزی مشاهده نشد.

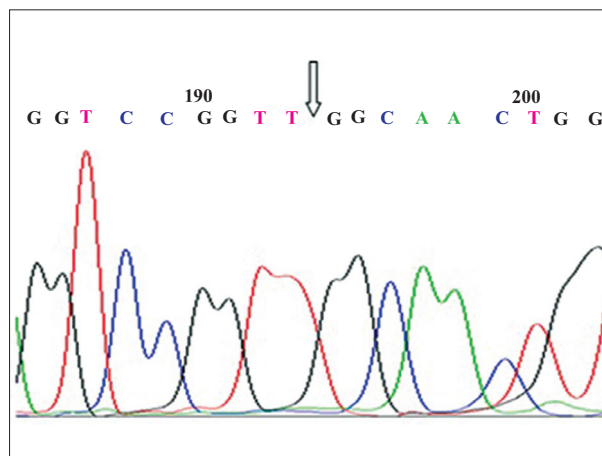


تصویر ۳- SSCP برخی نمونه های مربوط به اگزون ۵ شامل ۱- کارسینوما در جا ۲- پاپیلوما ۳- همانژیوما ۴- کارسینوما سلول سنگفرشی ۵- کارسینوما سلول ترانزیشنال و C- کنترل (نمونه سالم). در مقایسه با کنترل سالم هیچ تغییری در الگوی الکتروفورزی محصول PCR نمونه مشاهده نگردید.

منجر به غیر طبیعی های ساختمانی ژن p53 می گردند (۲۹).

در مطالعه دیگری موتاسیون های 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 (۵۶/۴ درصد) موتاسیون های ژن p53 شناسایی گردید. تعیین توالی مستقیم، ۶۶ مورد موتاسیون نقطه ای و ۵ مورد موتاسیون های Frame Shift را مشخص نمود (۳۰).

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



تصویر ۵- توالی نوکلئوتیدی در بررسی اگزون ۶ در نمونه های همانژیوما، پاپیلوما و کارسینوما در جا. حذف نوکلئوتید T به شماره ۹۳۳۲ (GGCAACTGG-GGTCCGGTT) در ناحیه اینترون ۶ مشاهده می شود.

(۲۶) ولوسمی لمفوبلاستیک حاد سلول (T-ALL) (۲۱) در انسان یافت شده است.

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

موتاسیون های اینترونیک در پایدار شدن پروتئین تیپ وحشی P53 نقش مهمی ایفا می نمایند که منجر به تجمع غیر طبیعی آن و زمینه ساز ابتلاء به سرطان می گردند (۱). بنابراین بررسی موتاسیون های اینترونیک ژن P53 در تومورهای مثانه گاو نیز می تواند در کنار مطالعه تغییرات در اگزون ها تا حدود زیادی در تعیین نقش موتاسیون های 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 آسیب شناسی مهندس سامانی و مهندس بنی نجار 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 می گردد.

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.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای اگزون های ۵ و ۶ ژن P53 در این مطالعه.

پرایمر	سایز باند
R: 5'- CAATCAGGGAGGAATTAGGG-3' 5F: 5'- TCGGTGCTGTACATTCGAC-3'	332bp
6R: 5'- CCTCCACCTAGGGTGGTAC-3' 6F: 5'- GGGACTGTGGATGGGACCGG-3'	248bp

در مطالعه حاضر اگرچه در محدوده اگزون های ۵ و ۶ هیچ تغییر الگوی الکتروفوریتیک با روش SSCP مشاهده نگردید ولی حذف نوکلئوتید T در سه نمونه توموری در جای خود از اهمیت به سزایی برخوردار است. اینترون ها اجزاء مهم ژنوم های ائوکاریوتیک هستند که اعمال بسیار با اهمیتی را انجام می دهند و بطور فعال در تکامل ژن شرکت می نمایند. یک تعداد اجزاء تنظیم کننده بیان ژن در توالی های اینترونیک یافت شده است. اینترون ها در انتقال پیام برای خروج mRNA از هسته نیز ایفای نقش می نمایند (۱۷). اینترون ها توالی های غیر کد شونده بین اگزون ها هستند که طی پردازش (Splicing) بوسیله اگزونوکلئازها از mRNA پیش از ترجمه حذف می شوند. اینترون ها معمولاً با GT آغاز و با AG ختم می شوند (۴۶).

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

پردازش از سمت ۵' بطرف ۳' mRNA انجام می شود. تغییر در بازهای اینترونیک سمت ۵' می تواند منجر به نقص در پردازش mRNA شده، در نهایت یک ملکول mRNA ناقص ایجاد نماید. موتاسیون هایی که پردازش mRNA را متأثر می سازند، محل های پردازش ۵' و ۳' را معمولاً در بر می گیرند (۴۶). در مطالعه حاضر، حذف نوکلئوتید (تیمین ۷) به شماره ۹۳۳۲ در تومورهای همانژیوما، پاپیلوما و کارسینوما در جراحی داده است. این باز در سمت ۵' اینترون ۶ ژن P53 گاو واقع شده است. این موتاسیون توالی پردازش را از ۳'-GTCCGGTTT-5' به ۳'-GTCCGGTTG-5' تبدیل می نماید.

گزارش شده است که تغییرات نوکلئوتیدی اینترون ۶ ژن P53 با سندرم های زمینه ساز سرطان، تجمع پروتئین P53 و کاهش In Vitro آپوپتوز القاء شده با شیمی درمانی ارتباط دارد (۲۶). ارتباط میان فنوتیپ های سرطان و پلی مورفیسم اینترونیک ژن P53 در مطالعات بر روی سرطان های 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)، لمفوما سلول B بزرگ منتشر



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., Poggiali, 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. Comp. 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. New York. 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.). (4th ed.). 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-associated urothelial 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-ras immunohistochemical 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 of BRCA1 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 pheochromocytomas. *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.

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

¹Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.

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

³Department 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 induced 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

