

## Presejanje – iskanje mutacij v tumorskem supresorskem genu Tp53 z uporabo DGGE in sekveniranja

Alenka Ličar in Srdjan Novaković

### Povzetek

Mutacije v genu Tp53 so dokazane pri več kot 50 % malignih boleznih. Pri številnih malignih boleznih je vloga mutacij v tem genu neposredno povezana z nastankom raka. Namen našega prispevka je posredovati informacijo o metodoloških pristopih, s katerimi določamo mutacije v genu Tp53 na Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana.

### Uvod

Tumorski supresorski gen, ki kodira protein Tp53, je eden najbolj preiskovanih genov v genetiki rakastih boleznih. Protein Tp53 je transkripcijski faktor v celičnem jedru in posreduje pri številnih celičnih procesih, ki uravnavajo celično rast. Vpliva na celični cikl, sodeluje pri mehanizmih popravljanja DNK, uravnava diferenciacijo celic in celično staranje, zavira angiogenezo, poškodovane in nepravilno delujoče celice pa vodi v kontrolirano celično smrt, apoptozo. Osrednjo vlogo ima tudi pri celičnem odzivu na stres – na primer pri poškodbah DNK zaradi sevanja ali kemičnih agensov, pri oksidativnih poškodbah celice, osmotskem šoku, pri upadu koncentracije ribonukleotidov in ob napačnem uravnavanju izraženosti onkogenov.

Mutacije v genu za Tp53 povezujejo z nastankom vsaj polovice znanih malignih boleznih. Gre za razmeroma velik gen, ki se nahaja na kromosomu 17, sestavlja pa ga 10 kodirajočih eksonov, ki se prepišejo v 393 aminokislinskih ostankov velik protein. Protein Tp53 ima tri glavne domene, od katerih je najpomembnejša centralna domena za vezavo DNA (DNA-binding core domain, DBD). V tej domeni najdemo 90 % mutacij, zaradi katerih Tp53 izgubi sposobnost vezave na tarčna zaporedja DNA.

Mutacije v genu Tp53 navadno nastanejo na enem od alelov. Za popoln izostanek funkcije gena zadošča hipermetilacija drugega alela, ki nosi zdravo kopijo gena. Najpogostejše mutacije v Tp53 so t. i. drugačno pomenske (missense) (75 %) mutacije, druge pa vključujejo nesmiselne (non-sense) (7,5 %) mutacije, delecije, insercije in mutacije na spojitvenih mestih (splicing mutations) (17,5 %). Poznamo tudi t. i. vroče točke oz. »hot spots« v Tp53, kjer najdemo mutacije na oligodeoksinukleotidih CpC, in sicer na mestih kodonov 175, 248, 273 in 282. Značilne mutacije, ki so povezane z določeno izpostavljenostjo karcinogenom (cigaretni dim, aflatoksin, UV-žarki), so opazili pri pljučnem raku, raku jeter in kožnem raku. Mutacija v genu za Tp53 na splošno pomeni slabo prognozo za bolnike z različnimi vrstami raka.

Kadar oseba od staršev podeduje le eno funkcionalno kopijo gena Tp53, je zelo verjetno, da bo zgodaj v življenju zbolela za več različnimi tumorji. Ta redki, dominantno dedovani sindrom imenujemo Li-Fraumeni sindrom. V sklopu tega sindroma so različni avtorji opisali že več kot 55 mutacij v genu Tp53.

Zaradi velike vloge mutiranega Tp53 pri nastanku raka smo na Oddelku za molekularno diagnostiko začeli s presejanjem tega gena. Za grobo presejanje uporabljamo denaturacijsko gradientno gelsko elektroforezo (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE), dokončno pa mutacijo opredelimo s sekveniranjem. Denaturacijska gradientna gelska elektroforeza je tehnika, pri kateri ločujemo fragmente DNA na podlagi razlik v zaporedju DNA. Fragmenti iste dolžine, ki se razlikujejo v zaporedju DNA, bodo denaturirali v različnih koncentracijah denaturanta. Odkrijemo lahko tudi spremembe enega samega nukleotida. V literaturi tehniko DGGE navajajo kot izjemno zanesljivo, saj omogoča tudi odkrivanje večjih delecij in insercij, ki jih s sekveniranjem ne moremo določiti, vendar pa nam ne da kakovostnega podatka o tem, za kakšne nukleotidne spremembe gre v sekvenci. S sekveniranjem pa lahko natančno določimo vse nukleotidne zamenjave v nekem fragmentu DNA.

### Prikaz metod z rezultati in diskusija

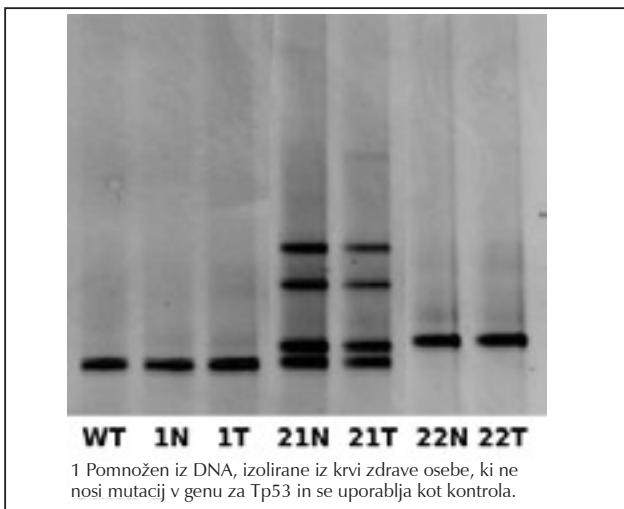
Preiskovani material je DNA, ki jo izoliramo iz krvi ali tkiva (svežega, zamrznjenega ali vklopljenega v parafin). Za izolacijo DNA iz krvi in tkiv uporabljamo komercialno dostopne komplete. Količino in kakovost izolirane DNA v vsakem vzorcu preverimo s spektrofotometrom. Preiskovane fragmente gena Tp53 pomnožimo v reakciji PCR (polymerase chain reaction, PCR), jih ločimo s tehniko DGGE in nato izbrane fragmente sekveniramo. Sekveniramo samo tiste, ki se razlikujejo od fragmentov normalnega (kontrolnega) vzorca.

Preiskovani ekson najprej s tehniko PCR pomnožimo z ustreznim parom posebno prirejenih oligonukleotidnih začetnikov, ki imajo pripeto sponko GC (Ingeny). Ta sponka omogoča, da pomnoženi fragmenti DNK po denaturaciji v ustrezni koncentraciji denaturanta v gelu DGGE ostanejo na mestu in ne potujejo več naprej. Tako pomnožene fragmente nanesejo na elektroforetski gel DGGE z naraščajočim gradientom denaturanta urea-formamida (35–75 %). Nato jih čez noč ločujemo pri napetosti 75 V in konstantni temperaturi 59 °C. Po končani elektroforezi DNA v gelu obarvamo z etidijevim bromidom in posnamemo sliko gela.

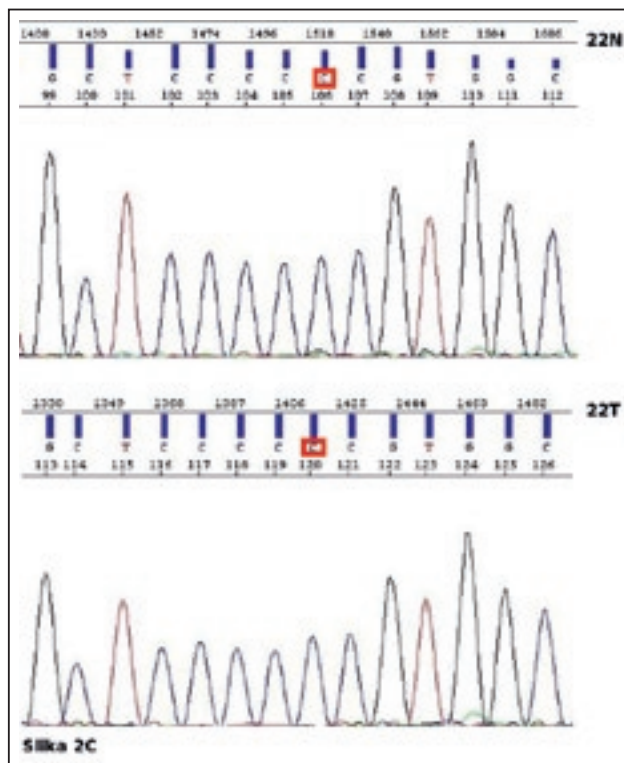
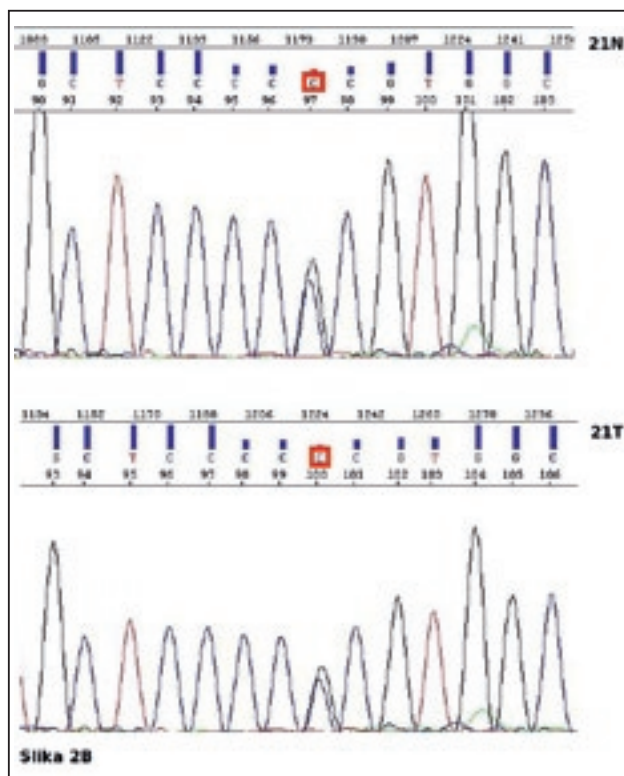
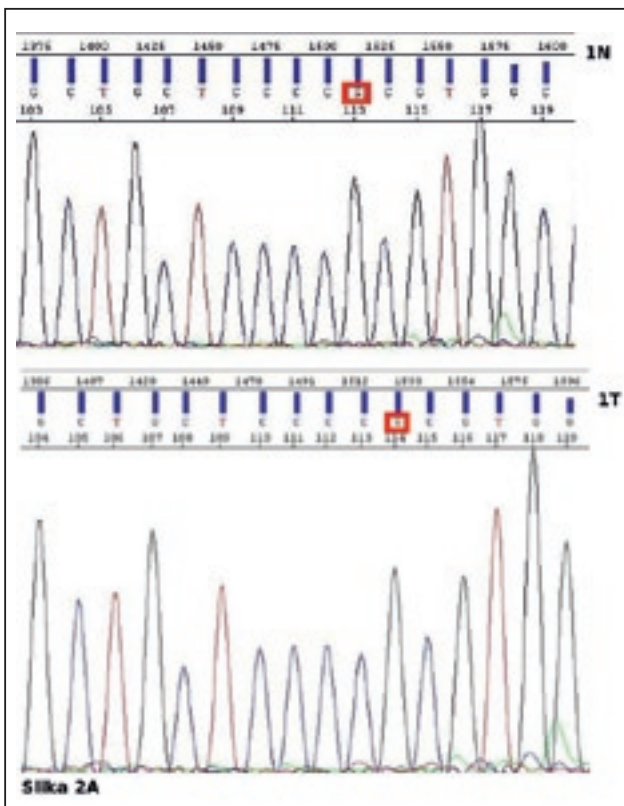
Pri sekveniranju istega eksona uporabimo isti par oligonukleotidnih začetnikov, vendar so ti brez sponke GC (pri sekveniranju ni potrebna). Preiskovane fragmente DNA najprej pomnožimo s tehniko PCR in preverimo količino in kakovost produktov PCR s čipom DNA (ChipDNA assay) na aparatu Agilent 2100 bioanalyzer. Fragmente nato z istim parom oligonukleotidnih začetnikov pomnožimo v sekvenčni reakciji, kjer uporabljamo posebne fluorescenčno označene nukleotide, ki omogočajo odkrivanje na sekvenatorju. Tako pomnožene fragmente sekveniramo na sekvenatorju ABI310. Sekvence fragmentov pregledamo z računalniškim

programom GeneRunner, kjer jih primerjamo z referenčno sekvenco iz podatkovne zbirke NCBI. Nazadnje ugotavljamo, kako se rezultati sekveniranja ujemajo s sliko gela DGGE preiskovanega eksona.

Primere rezultatov presejanja gena *Tp53* predstavljamo na sliki 1 ter slikah 2A, 2B in 2C. Gre za študijo v teku, kjer preiskujemo mutacije v genu *Tp53* pri primarnih in sekundarnih ščitničnih tumorjih. Slika 1 prikazuje fragmente DNA eksona 4.1, ki so med potovanjem po gelu DGGE zaradi razlik v zaporedju DNA denaturirali v različnih koncentracijah



**Slika 1.** Analiza DGGE eksona 4.1 gena *Tp53*.  
 N – normalno tkivo ščitnice, T – tumorsko tkivo, WT – divji (nativni) tip fragmenta 1.



**Slika 2.** Rezultati neposrednega sekveniranja eksona 4.1 gena *Tp53* treh različnih vzorcev.  
 Slika 2A – vzorec 1,  
 Slika 2B – vzorec 21,  
 Slika 2C – vzorec 22, N – normalno tkivo, T – tumorsko tkivo. Polimorfizmi so označeni z rdečim kvadratom.

denaturanta. Vzorca 1N in 1T vsebujeta homodupleks fragmentov (enaka alela), ki sta identična divjemu (nativnemu) tipu. Vzorca 22N in 22T pa vsebujeta homodupleks fragmentov in se razlikujeta od divjega (nativnega) tipa. Takšen rezultat kaže na homozigotno spremembo (oba alela sta različna od nativnega tipa) nukleotidnega zaporedja DNK v tem vzorcu. Vzorca 21N in 21T vsebujeta heterodupleks fragmentov (različna alela), kar kaže na prisotnost alela divjega (nativnega) tipa in mutiranega alela. Nukleotidne spremembe v teh fragmentih smo določili s sekveniranjem. Rezultati so prikazani na slikah 2A, 2B in 2C. Fragmenti DNA gena Tp53, eksona 4.1 v vzorcih 1N, 1T, 21N, 21T in 22N, 22T kažejo tri različne genetske profile: homozigot G (1N in 1T), homozigot CC (22N in 22T) in heterozigot GC (21N, 21T). V aminokislinskem zaporedju proteina Tp53 nukleotid G na kodonu 72 kodira aminokislino arginin, kodon C pa prolin. Polimorfizem Arg72Pro je v populaciji sicer razširjen, vendar različne študije kažejo, da je polimorfizem Arg72Pro povezan s povečanim tveganjem za nastanek pljučnega raka, ščitničnih tumorjev in ščitničnih tumorjev pri osebah, ki so bile izpostavljene radioaktivnemu sevanju.

### Sklep

Na Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta smo začeli s presejanjem gena Tp53. Trenutno izvajamo študijo na vzorcih primarnih in sekundarnih ščitničnih tumorjev. Postavljena in optimizirana metoda nam omogoča,

da raziskave širimo tudi na druge vrste raka, kadar obstaja sum, da gre za mutacije v Tp53. Presejanje je pomembno tudi pri genskem svetovanju, ko iščemo germinalne mutacije gena Tp53, ki so povezane s sindromom Li-Fraumeni.

### Viri

1. Spletna podatkovna baza OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
2. Read AP, Strachan T. Chapter 18: Cancer genetics. In: *Human molecular genetics* 2. New York: Wiley, 1999.
3. Novaković S. Karcinogeneza – nastanek rakastih celic. *Onkologija* 2006; 10(2): 99–102.
4. Oliver M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutations analysis and recommendations for users. *Human Mutation* 2002; 19: 607–14.
5. Roqounovitch TI, Saenko VA, Ashizawa K, et al. TP53 codon 72 polymorphism in radiation-associated human papillary thyroid cancer. *Oncol Rep* 2006; 15(4): 949–56.
6. Caglayan S, Aral C, Massaumilary S, Ozisik G, Baloglu H, Akkiprik M, Ozer A, Ozata M. Association of p53 codon 72 polymorphism with thyroid cancer. *Endocrine Abs* 2007; 14: 379.
7. Murata M, Tagawa M, Kimura H, Kakisawa K, Shirasawa H, Fujisawa T. Correlation of the mutation of p53 gene and the polymorphism at codon 72 in smoking-related non-small lung cancer patients. *Carcinogenesis* 1996; 17: 261–264.

