

١٤١٧٤

ب

در
رشد

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

گرایش بیوشیمی

بررسی پلی مورفیسم P53 در بیماران مبتلا به کولیت اولسرو

از:

سید صلاح الدین واژی

استاد راهنما:

دکتر زیور صالحی

اساتید مشاور:

دکتر امینیان

دکتر مشایخی

شهریور ۱۳۸۸



۱۴۱۷۲۶

تقدیم به پدر و مادرم

صفحه	فهرست مطالب
.....	چکیده فارسی
.....	چکیده انگلیسی
فصل اول: مقدمه	
.....	۱ مقدمه
.....	۱-۱ اپیدمیولوژی
.....	۱-۳-۱ سبب شناسی
.....	۱-۳-۱ عوامل ژنتیک
.....	۱-۳-۲ عوامل ایمونولوژیک
.....	۱-۳-۳ عوامل محیطی
.....	۱-۴-۱ آسیب شناسی
.....	۱-۴-۱ تظاهرات ماکروسکوپی
.....	۱-۴-۲ تظاهرات میکروسکوپی
.....	۱-۵-۱ علائم بالینی
.....	۱-۶-۱ پروتئین P53
.....	۱-۶-۱: ساختار پروتئین P53
.....	۱-۶-۲ عملکرد و تنظیم پروتئین P53
.....	۱-۶-۳ توقف در G1
.....	۱-۶-۴ توقف در G2
.....	۱-۶-۵ القاء مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپوپتوزیس)
.....	۱-۶-۶ مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی
.....	۱-۶-۷ مسیر خارجی یا مسیر وابسته به رسپتور
.....	۱-۷-۱ اهمیت بالینی پروتئین P53
.....	۱-۷-۱ پلی مورفیسم در کدون ۷۲ پروتئین P53 و اهمیت آن
فصل دوم: مواد و روش‌ها	
.....	۱-۲-۱ دستگاه‌ها و مواد مورد استفاده
.....	۱-۲-۲ مواد شیمیایی مورد نیاز
.....	۱-۲-۳ بافرها و محلول‌های مورد استفاده
.....	۱-۳-۲ بافر TAE (Tris-acetate) (10x)

۲۴.....	TBE (Tris - borate) (10x) بافر	۲-۳-۲
۲۴.....	پراکسی آمونیوم سولفات ۱۰ درصد (APS)	۳-۳-۲
۲۵.....	محلول B (برای رنگ آمیزی)	۶-۳-۲
۲۵.....	محلول C (برای ظاهر سازی)	۷-۳-۲
۲۵.....	Loading Buffer	۸-۳-۲
۲۶.....	شرایط استریل نمودن محلولها	۴-۲
۲۶.....	تهیه و انتقال نمونه	۵-۲
۲۶.....	بررسی پلی مورفیسم های کدون ۷۲ P53	۶-۲
۲۶.....	استخراج DNA	۱-۶-۲
۲۷.....	استخراج DNA به روش Marais	۲-۶-۲
۲۸.....	استخراج DNA به روش فنل کلروفرم	۳-۶-۲
۳۰.....	استخراج DNA با استفاده از کیت Fermentas	۴-۶-۲
۳۱.....	بررسی کیفیت DNA استخراج شده	۷-۲
۳۱.....	ژل آگارز	۱-۷-۲
۳۲.....	روش اسپکتروفتومتری	۲-۷-۲
۳۳.....	جهت بررسی کدون ۷۲ AS-PCR	۸-۲
۳۳.....	مواد	۱-۸-۲
۳۳.....	جفت پرایمر مربوط به لوکوس Arginine	۲-۸-۲
۳۴.....	جفت پرایمر مربوط به لوکوس Proline	۳-۸-۲
۳۶.....	نحوه انجام PCR	۴-۸-۲
۳۶.....	چرخه حرارتی PCR	۵-۸-۲
۳۷.....	ارزیابی محصولات PCR	۹-۲
۳۷.....	ژل آگارز ۲ درصد	۱-۹-۲
۳۷.....	ژل عمودی یا پلی آکریل آمید ۶ درصد	۲-۹-۲
۳۸.....	روش رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید با نیترات نقره	۳-۸-۲
۳۸.....	ابرسی تجمع هسته ای P53 به وسیله IHC	۱۰-۲
۳۸.....	فالب گیری و برش گیری نمونه ها	۱-۱۰-۲
۳۹.....	رنگ آمیزی نمونه ها با آنتی بادی ضد P53	۲-۱۰-۲
فصل سوم: نتایج		
۴۳.....	نمونه گیری	۱-۳
۴۳.....	بررسی های ژنتیک	۲-۳

.....	٤٣	١-٢-٣ DNA تخلص
.....	٤٣	٢-٢-٣ بررسى كدون ٧٢
.....	٤٧	٣-٣ بررسى ايمونو هيستو شيمي
فصل چهارم: بحث و نتيجہ گيرى		
.....	٥٠	بحث و نتيجہ گيرى
.....	٥٦	پيشنهادات
فصل پنجم : منابع		
.....	٥٨	منابع

- شکل ۱-۱: نمای آندوسکوپی کولیت اولسرو..... ۵
- شکل ۲-۱: ساختار پروتئین P53..... ۸
- شکل ۳-۱: رابطه پروتئین P53 با پروتئین MDM2..... ۱۰
- شکل ۴-۱: توقف G1 به S..... ۱۲
- شکل ۵-۱: توقف G2..... ۱۳
- شکل ۶-۱: انواع راههای مرگ برنامه ریزی شده سلولی..... ۱۶
- شکل ۱-۳: DNA تخلیص شده در ژل آگارز..... ۴۳
- شکل ۲-۳: محصول PCR کدون ۷۲ در ژل آگارز..... ۴۴
- شکل ۳-۳: مقایسه فراوانی مشاهده شده فراوانی ژنوتیپ..... ۴۵
- شکل ۴-۳: مقایسه فراوانی آلی در دو گروه کنترل و بیمار..... ۴۶
- شکل ۵-۳: اسلاید رنگ آمیزی شده با آنتی بادی ضد P53..... ۴۸
- شکل ۶-۳: اسلاید رنگ آمیزی شده با آنتی بادی ضد P53..... ۴۸

- جدول ۱-۱: یکسری از علایم کلی کولیت اولسرو..... ۶
- جدول ۱-۲: فراوانی آلی ژن پروتئین P53 در کدون ۷۲ در جمعیت های مختلف..... ۱۹
- جدول ۱-۲-۱: مشخصات پرایمرهای مربوط به ژن Arginine..... ۳۳
- جدول ۲-۲: مشخصات پرایمرهای مربوط به ژن Proline..... ۳۴
- جدول ۲-۳: مشخصات و حجم مواد مورد استفاده در PCR..... ۳۶
- جدول ۲-۴: برنامه زمانی حرارتی PCR برای قطعه های Arg و Pro..... ۳۷
- جدول ۳-۱: بررسی آماری تفاوت ژنوتیپ و آلی بین دو گروه کنترل و بیمار..... ۴۶

بررسی پلی مورفیسم P53 در بیماران مبتلا به کولیت اولسرو

سید صلاح الدین واژی

چکیده:

بیماری کولیت اولسرو شامل التهاب و زخم ممتد در نواحی کولون و رکتوم می باشد. اگر چه علت دقیق این بیماری هنوز نامشخص است اما فاکتور های ژنتیکی و محیطی می توانند در ایجاد این بیماری مؤثر باشند.

P53 به دلیل نقشی که به عنوان سرکویگر تومور ایفا می کند، یکی از ژن های مورد توجه است. فعالیت های P53 گسترده بوده و شامل رونویسی از ژن های مختلف، القاء مرگ سلولی، ترمیم DNA، تمایز، کنترل چرخه سلولی می باشد. یکی از پلی مورفیسم های شایع که در افزایش خطر ابتلا به بسیاری از سرطان ها و بیماری ها نقش دارد، در کدون ۷۲ ژن P53 رخ می دهد. این پلی مورفیسم باعث ایجاد دو فرم از P53 می شود که شامل Arg/Pro می باشد. در این تحقیق کدون ۷۲ ژن P53 در ۵۲ بیمار مبتلا به کولیت اولسرو و ۴۵ فرد سالم مورد بررسی قرار گرفت. روش AS-PCR جهت تعیین ژنوتیپ مورد استفاده قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان دهنده تفاوت در فراوانی ژنوتیپ های کدون ۷۲ در دو گروه کنترل و بیمار بود ($P=0/001$). در گروه بیمار فراوانی آلل Pro کاملاً مشهود بود که نشان دهنده نقش این الل در القای بیماری کولیت اولسرو در جمعیت مورد مطالعه می باشد (Odds Ratio ۰٫۷۰۶، ۹۵٪ CI ۰٫۳۰۸-۱۱/۹۲).

جهت مطالعه میزان تاثیر کدون ۷۲ بر پیشرفت بیماری، رابطه کدون ۷۲ و تجمع هسته ای P53 در بیماران توسط روش ایمونوهیستوشیمی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج بدست آمده، هیچ رابطه مشخصی را بین این دو پارامتر نشان نداد، که بیان کننده استقلال این دو عامل از یکدیگر است. مشاهده فراوانی متفاوت کدون ۷۲ در بین بیماران و جمعیت سالم ریشه در وجود تفاوت بیوشیمیایی بین این دو فرم از P53 دارد. P53 دارای Arg بسیار نسبت به تجزیه وابسته به پروتئازوم حساس است اما توانایی بالایی در القاء مرگ سلولی دارد. از سوی دیگر P53 دارای فرم Pro فاکتور رونویسی موثری است اما مرگ سلولی را به صورت ضعیف تری القاء می کند.

Investigation of P53 polymorphism in patients with ulcerative colitis

Said Salaheddin Vaji

Abstract;

Ulcerative colitis affects the colon and rectum and typically involves only the innermost lining or mucosa, manifesting as continuous areas of inflammation and ulceration, with no segments of normal tissue. Although the exact cause of ulcerative colitis remains undetermined, the condition appears to be related to a combination of genetic and environmental factors.

The p53 gene is one of the most extensively studied human genes because of its role as a tumor suppressor gene. Its diverse functions include DNA binding, cell cycle control, DNA repair, differentiation, genomic plasticity, and apoptosis. A common polymorphism of the p53 gene at codon 72 has been associated with human cancer susceptibility. In this study, we investigated codon 72 polymorphism in 52 ulcerative colitis cases and 45 healthy individual in Rasht. AS-PCR method was applied for determination of codon 72 polymorphism. The distribution of genotypes in ulcerative colitis cases and controls were different ($P= 0.001$). According to the results the Pro allele has an elevated frequency among patients (Odds Ratio 6.06 , 95% CI 3.08-11.92).

In order to assess the effect of codon 72 on ulcerative colitis progression, the relation of codon 72 genotypes and P53 localization was investigated by IHC and no significant correlation was detected. These results imply that these two factors (codon 72 and P53 localization) are independent and play their role in ulcerative colitis development. The different distribution of codon 72 genotypes in patients is a result of biochemical difference of two form of P53 (one with Arg at codon 72 and the other with Pro). Arg form of P53 is a stronger apoptosis inducer; however this form is more vulnerable to proteasomic degradation. On the other hand, despite the fact that Pro form of P53 is a strong transcriptional factor, it is a weaker apoptosis inducer.

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه :

کولیت اولسرو^۱ از بیماریهای التهابی روده^۲ (IBD) می باشد و با تغییرات التهابی ممتد در مخاط وزیر مخاط روده بزرگ مشخص می گردد. بیماری از رکتوم آغاز و به طرف پروکسیمال ادامه می یابد [۱]. از مشخصات بالینی آن اسهال^۳، درد شکم، احساس دفع سریع، واسهال خونی است و عوارض عمده آن، مگاکولون سمی، کم خونی و آدنوکارسینوم^۴ کولون می باشد [۲]. این بیماری در کشورهای پیشرفته نظیر اروپای شمالی، امریکای شمالی و استرالیا و کشورهای دیگر نظیر افریقای جنوبی شایع تر است [۳]. افراد دارای این بیماری استعداد بیشتری برای ابتلا به سرطان کولون^۵ دارند ولذا مرگ و میر در افراد مبتلا دیده می شود [۴].

۱-۱- اپیدمیولوژی^۶ :

کولیت اولسرو (UC) در سفیدپوستان شایع تر از سیاه پوستان است و به میزان سه تا شش برابر در یهودیان دیده می شود [۵]. هر دو جنس به میزان مساوی مبتلا می شوند و در امریکا و اروپای شمالی بیشتر از سایر نقاط جهان دیده می شود، به طوریکه فراوانی آن در مناطق امریکا و اروپای شمالی تقریباً شش تا هشت مورد در هر صد هزار نفر می باشد [۳]. سن ابتلا به کولیت اولسرو معمولاً پانزده تا سی سالگی است البته احتمال ابتلا به این بیماری در سنین دیگر نیز وجود دارد [۶].

۱-۳- سبب شناسی^۷ :

اتیولوژی و بیماری زایی کولیت اولسرو هنوز به طور کامل روشن نیست. مطالعات، عواملی نظیر ژنتیک، ایمنولوژیک و محیطی را در ایجاد بیماری معرفی نموده اند. [۷].

¹ ulcerative colitis
² Inflammatory bowel disease
³ diarrhea
⁴ carcinoma
⁵ colon cancer
⁶ Epidemiology
⁷ etiology

۱-۳-۱ عوامل ژنتیک^۱:

باتوجه به پیشرفت های ژنومیک، برخی مناطق مستعد کننده کولیت اولسرو بر روی کروموزوم^۲ های ۳، ۷، ۶ و ۱۲ مشخص شده اند[۳]. درگروهی از بیماران، آلل های DR_2 با بیماری رابطه مثبت و آلل های DR_4 و DR_{w6} رابطه منفی با کولیت اولسرو نشان می دهند[۸]. ژن کدکننده آنتی ژن^۳ لکوسیت انسانی HLA (روی کروموزوم ۶) از دیر زمان از نظر ایفای نقش در کولیت اولسرو مدنظر بوده است[۵]. پلی مورفیسم^۴ در آنتاگونیست گیرنده IL1 در شدت و گسترش بیماری نقش دارد[۹]. در ۱۰٪ از مبتلایان به کولیت اولسرو، یکی از بستگان درجه یک بیمار نیز مبتلا هستند و در نهایت رابطه کولیت اولسرو با بیماریهای ژنتیکی مانند سندرم ترنر^۵، سندرم هرمانسکی-پودلاک^۶، سندرم داون^۷ و بیماری ذخیره گلیکوژن تیپ 1b تا حدودی مشخص شده است[۱۰]. تحقیقات جدید ژنهای دیگری مانند CARD15, TNF-308A, STAT6, NKG2D (natural killer cell 2D), N-acetyltransferase 2 (NAT2), MIF-173, (NOD2), Fas, TLR4, CD14, MICA-A5, IL-4, IL-18, HLA class-II, HLA-DRB1, MICA-MICB, CTLA-4 NF- κ B, p53, 670 [۸۹] و پلی مورفیسم ژن MBL [۹۰] را در ابتلا به کولیت اولسرو موثر میدانند.

۱-۳-۲ عوامل ایمنولوژیک^۸:

درحالت طبیعی، روده حاوی مقادیر زیادی بافت لنفویید تازه فعال شده دربخش مخاطی می باشد. این حالت به عنوان التهاب فیزیولوژیک توصیف شده است و به نظر می رسد در پاسخ به آنتی ژن های عبور کرده از لومن که از سد اپیتلیالی^۱ گذشته اند به وجود آمده باشد[۱۱].

¹ genetic factor
² chromosome
³ antigen
⁴ polymorphism
⁵ Turner Syndrome
⁶ hermansky-pudlak Syndrome
⁷ Down Syndrome
⁸ immunologic factor

درکولیت اولسرو فعالیت سلولهای مختلف مخاطی افزایش می یابد. سلولهای $CD4T^+$ احتمالا نقش مهمی را در این رابطه عهده دار می باشند. سلولهای $CD4T^+$ را بر اساس تولید مواد بیش انتهایی به $Th1$ (نظیر فاکتور نکروز تومور آلفا، گاما اینترفرون) و $Th2$ (نظیر اینترلوکین 4,5,13) تقسیم می کنند. واکنش های $Th2, Th1$ احتمالا در ایجاد کولیت اولسرو موثر می باشند [۳].

۱-۳-۳ عوامل محیطی:

بسیاری از عوامل عفونی مانند مایکوباکتريا پاراتوبرکولوزیس^۲، ویروس سرخک (پارامیکسوویروس^۳) و گونه هایی از هلیکوباکتر^۴ احتمالا در ایجاد این بیماری نقش دارند [۱۲]. اما تنها عامل محیطی اثبات شده درکولیت اولسرو، سیگار می باشد. مطالعات نشان می دهد که مصرف سیگار حالت حفاظت کننده در مقابل بیماری دارد [۱۳].

استرسهای روحی روانی طولانی مدت در ۴۰٪ از بیماران مبتلا به کولیت اولسرو گزارش شده است. حوادث مهم زندگی مانند مرگ یکی از اعضای خانواده، طلاق و غیره می تواند در تشدید این بیماری باافزایش نشانه هایی مانند درد و خون ریزی همراه باشد [۱۴].

۱-۴-۱ آسب شناسی^۵:

۱-۴-۱-۱ تظاهرات ماکروسکوپی:

کولیت اولسرو یک بیماری مخاطی است که معمولا رکتوم را درگیر می کند و به سمت پروگزیمال پیشرفت می نماید. ممکن است بخشی از کولون یا تمام آن را درگیر نماید. تقریبا در ۴۰ تا ۵۰٪ از بیماران کولیت اولسرو محدود به رکتوم و رکتوسیگمونید است در ۳۰ تا ۴۰٪ موارد، فراتر از سیگمونید بوده اما تمام کولون را در بر نمی گیرد و ۲۰٪ از بیماران دچار کولیت سرتاسری هستند (شکل ۱-۱) [۱۵].

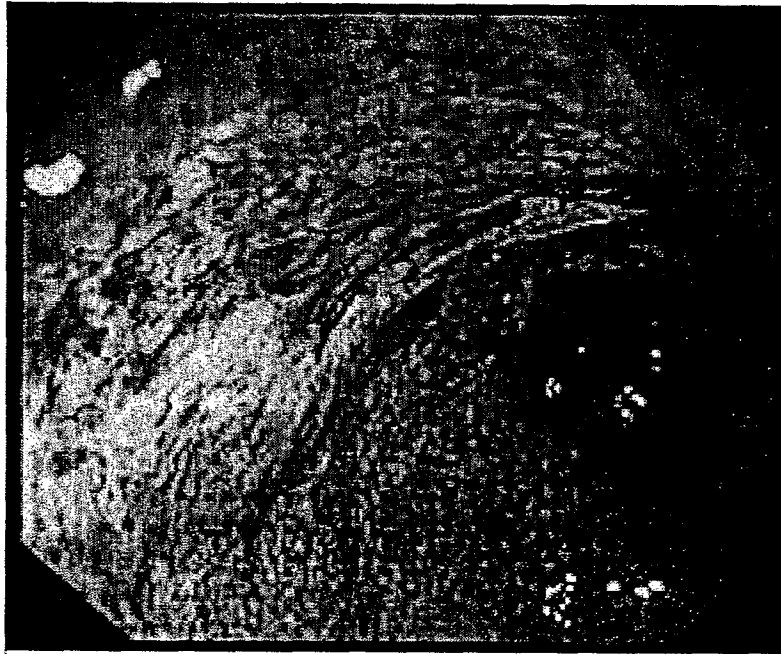
¹ epithelial

² Mycobacterium tuberculosis

³ Paramyxovirus

⁴ Helicobacter

⁵ pathology



شکل ۱-۱: نمای آندوسکوپی کولیت اولسرو. خونریزی، التهاب و آبه از علائم کولیت اولسرو هستند
(برگرفته از <http://itsthekitch.files.wordpress.com>)

۱-۴-۲ تظاهرات میکروسکوپی:

یافته های بافت شناسی کاملاً با تظاهرات آندوسکوپی^۱ و سیر بالینی کولیت اولسرو همخوانی دارند. فرایند بیماری به مخاط و زیر مخاط سطحی محدود بوده و لایه های عمیق تر (به جز در بیماری برق آسا) مبتلا می شوند. در کولیت اولسرو، تغییرات بافت شناسی مشخصی وجود دارند. اولاً نمای کریپت اپی تلیال کولون بر هم می خورد. کریپت ممکن است دوشاخه شوند و تعداد آنها کاهش یابد. برخی از بیماران در قاعده کریپت دارای پلاسماسل و تجمعات لنفوئید^۲ منفرد هستند. در کل برهم خوردن نظم کریپت اپی تلیال، التهاب و تشکیل آبه^۳ از یافته های مشخص کولیت اولسرو می باشند [۱۶].

^۱ endoscopy

^۲ lymphoid

^۳ abscesses

۵-۱ علائم بالینی^۱:

نشانه های اصلی کولیت اولسرو عبارتند از اسهال، خونریزی از رکتوم، زورپیچ، دفع موکوس، و دردهای کرامپی شکم. شدت نشانه ها با وسعت بیماری متناسب است. این نشانه ها معمولا هفته ها تاماها ادامه می یابند [۱۷]. کولیت اولسرو علاوه بر علائم روده ای دارای علائم خارج روده ای نیز می باشد. برخی از علائم کولیت اولسرو در جدول (۱-۱) به آنها اشاره شده است.

اسهال	۹۶/۴%
خون در مدفوع	۸۹/۳%
درد	۸۱/۳%
احساس خوب نبودن	۴۰/۲%
کاهش وزن	۳۸/۴%
درد مفاصل	۲۷/۴%
تب	۲۰/۵%
تغیر در پوست	۲۰/۵%
کاهش اشتها	۱۵/۲%
اشکالات چشمی	۷/۱%
تهوع	۶/۳%
استفراق	۴/۵%
آبسه	۳/۱%
فیستول	۳/۱%
تورم غدد لنفاوی	۱/۸%

جدول ۱-۱: برخی علائم کولیت اولسرو. همانطور که در این جدول مشاهده می شود اسهال با ۹۶/۴٪ و تورم غدد لنفاوی با ۱/۸٪ به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را در بین سایر علائم به خود اختصاص داده اند. (برگرفته از Ardizzone, 2003)

^۱ medical symptoms

مگاکولون سمی^۱ از عوارض اصلی کولیت اولسرو است که با اتساع روده بزرگ همراه با تب^۲، درد شکم، کم آبی، تاکی کاردی^۳ و اسهال خونی همراه می باشد و نیازمند جراحی فوری است [۱۸]. عارضه کم خونی، ناشی از خون ریزی زیاد از بخش های آسیب دیده روده و نیز مهار مغز استخوان ناشی از بیماری التهابی است [۷]. شانس آدنوکارسینوم کولون (سرطان کولون) پس از ۱۰ سال از شروع بیماری، در مقایسه با افراد غیر مبتلا ۱۰ تا ۲۰ برابر می شود و یکی از عوامل عمده مرگ در بیماران است [۴].

۶-۱ پروتئین P53:

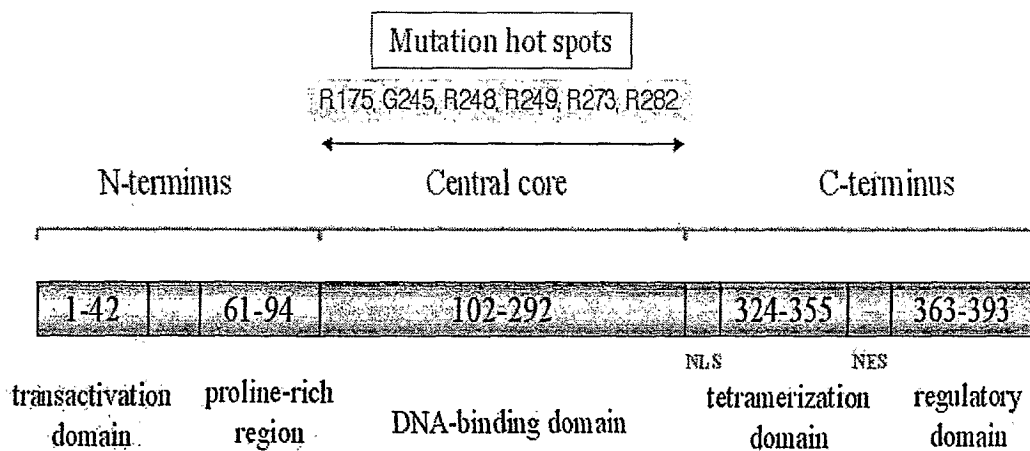
پروتئین P53 برای اولین بار در سال ۱۹۷۹ کشف شد [۱۹]. جالب است که در آن زمان به عنوان یک پروتئین تغییر یافته و انکوژن که در هسته ی سلول به طور قوی به آنتی ژن simian virus40(SV40)large T antigen متصل بود، شناسایی گردید [۲۰]. مطالعات بیشتر نشان داد که در سرطانهای مختلف نقص عملکردی پروتئین P53 وجود دارد و از آن زمان به بعد، این پروتئین به عنوان محافظ ژنوم^۴ مورد توجه واقع گردید [۲۱].

دخالت P53 در پروسه های سلولی نظیر تنظیم چرخه سلولی^۶، القاء مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپوپتوزیس)^۷، نمو^۸، تمایز^۹ و نو ترکیبی DNA^{۱۰}، تفکیک کروموزومی^{۱۱} و پیری سلول مشخص شده است [۲۲]. از آنجا که در ۵۰٪ از سرطانهای انسانی جهش ژن پروتئین P53 دیده می شود پروتئین P53 به عنوان یک کلید ویژه در سرطانها مورد بحث می باشد [۲۳].

۶-۱-۱: ساختار پروتئین P53:

¹ toxic megacolon
² fever
³ Tachycardia
⁴ p53 protein
⁵ guardian of the genome
⁶ cell-cycle regulation
⁷ apoptosis
⁸ development
⁹ differentiation
¹⁰ DNA recombination
¹¹ chromosomal segregation

هرچند پروتئین P53 در سلول به فرم تترامری فعالیت می نماید اما هنوز ساختار چهارم تترامری پروتئین P53 ناشناخته است. پروتئین P53 یک فسفو پروتئین هسته^۱ ای است که وزن مولکولی آن پنجاه و سه کیلو دالتون می باشد. این پروتئین توسط ژنی بیست کیلو بازی (20Kb)، که شامل یازده آگزون وده اینترون می باشد و در بازوی کوچک کروموزوم ۱۷ قرار دارد کد گذاری شده است [۲۴]. پروتئین P53 شامل سیصد و نود و سه آمینو اسید می باشد و دارای دمیتهای^۲ ساختاری^۳ و عملکردی^۴ است (شکل ۱-۲). بخش N ترمینال P53 از اسید آمینه یک تا نود و چهار است. این دمین از دو قسمت تشکیل شده است: از اسید آمینه یک تا چهل و دو مربوط به ناحیه فعال سازی^۵ و از اسید آمینه های شصت و دو تا نود و چهار مربوط به ناحیه غنی از پرولین^۶. ناحیه اخیر شامل چندین کپی از PxxP است که X می تواند هر اسید آمینه ای باشد [۲۵].



شکل ۱-۲: ساختار پروتئین P53 و دمین های آن. P53 شامل سه ناحیه اصلی N ترمینال، منطقه مرکزی و C ترمینال است. جهش های مهم در منطقه مرکزی P53 متمرکز هستند (بر گرفته از <http://www.mupnet.com>).

¹ nuclear phosphoprotein

² domain

³ structural

⁴ functional domains

⁵ transactivation subdomain

⁶ proline-rich region

دمین دیگر، دمین اتصالی به DNA^۱ یا منطقه مرکزی است که اسید آمینه های صدودو تا دویست نودودو را شامل می شود. این دمین قسمت اصلی پروتئین P53 است که با اتصال به نواحی خاصی از DNA باعث رونویسی و متعاقبا ایجاد یکسری از پروسه های سلولی می شود. در ضمن جهش در این دمین، خطرناکترین اثرات را خواهد داشت [۲۶]. بخش سوم پروتئین C ترمینال است که خود از نواحی تترامریزاسیون^۲ (اسید آمینه سیصد و بیست و چهار تا سیصد و پنجاه و پنج) و ناحیه تنظیمی^۳ (اسید آمینه های سیصد و شصت و سه تا سیصد و نود و سه) و نواحی NES^۴ و NLS^۵ تشکیل شده است [۲۷].

۱-۶-۲ عملکرد و تنظیم^۶ پروتئین P53:

پروتئین P53 در حالت عادی در سلول به شکل غیر فعال و در غلظت پایین وجود دارد. هنگامی که به DNA سلول آسیب وارد شود پروتئین P53 به شکل فعال درآمده و میزان غلظت آن بالا می رود [۲۸]. پروتئین MDM2 مهمترین نقش را در پایداری و میزان پروتئین P53 دارد [۲۹]. MDM2^۷ با اتصال به ناحیه غنی از پرولین در N ترمینال P53، پروتئین P53 را به سمت یوبیکوئیتینه شدن^۸ و تشکیل پروتئازوم^۹ و تجزیه پروتئین P53 می کشاند [۳۰]. جالب است که پروتئین MDM2 توسط P53 رونویسی می شود. به عبارت دیگر یک چرخه کنترلی بین این دو مولکول وجود دارد، که نتیجه آن در حالت طبیعی، حفظ میزان پروتئین P53 در حالت پایه و کنترل فعالیت این پروتئین است [۳۱] (شکل ۱-۳).

^۱ DNA binding domain

^۲ tetramerization domain

^۳ regulatory domain

^۴ nuclear export signal sequence

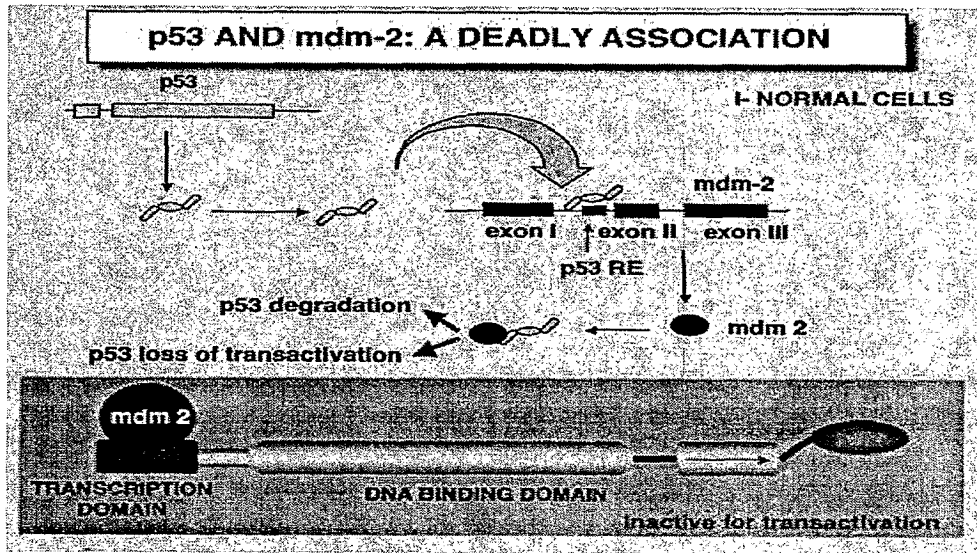
^۵ nuclear localization signal sequence

^۶ regulation

^۷ murine double minute 2

^۸ ubiquitylation

^۹ proteasome



شکل ۱-۳: رابطه ی پروتئین P53 با پروتئین MDM2. یک حالت فیدبک منفی بین P53 و MDM2 وجود دارد. MDM2 باعث کاهش سطح و فعالیت P53 می شود (برگرفته از <http://www.mupnet.com>).

فعالیت پروتئین P53 توسط تغییرات بعد از ترجمه^۱ مانند فسفریلاسیون^۲ و استیلاسیون^۳ تنظیم می گردد [۳۲]. فسفریلاسیون در اسید آمینه سرین و ترئونین در جایگاه های مختلف، و استیلاسیون در جایگاه های لیزین صورت می گیرد. جایگاه های تغییرات بعد از ترجمه در پروتئین P53 زیادی باشد و یک شبکه پیچیده مولکولی را نشان می دهند [۳۳].

آسیب های DNA (که توسط عوامل مختلف رخ می دهد) باعث فعال شدن پروتئین P53 می شود. یکی از راههای فعال شدن پروتئین P53، فسفریلاسیون آن توسط کینازهای^۴ مختلف است [۳۴]. فسفریلاسیون در N ترمینال پروتئین P53 باعث کاهش اتصال به پروتئین MDM2 و در نتیجه کاهش تجزیه پروتئین P53 و در نهایت افزایش میزان آن می گردد. برخی از فسفریلاسیون های P53 منجر به افزایش فعالیت رونویسی پروتئین P53 می شوند [۳۵]. آسیب به ژنوم سلول باعث فسفریله شدن پروتئین های مثل ATR^۵ و ATM^۱ می گردد [۳۶]. ATM کینازی به نام CHK2 را

¹ Posttranslational modifications

² phosphorylation

³ acetylation

⁴ kinase

⁵ ATM and Rad3-related protein