

Tần suất đột biến Cys242Ser của gen p53 trên bệnh nhân phơi nhiễm với chất độc hóa học/Dioxin

Frequency of Cys242Ser mutations of gene p53 in patients exposures to chemical toxic agents/Dioxin

Nguyễn Linh Toàn¹
Nguyễn Liễu²

¹Học viện Quân y
²Bệnh viện 103

Tóm tắt

Gene p53 mã hoá protein p53, trọng lượng phân tử 53kilo dalton (kD), có vai trò quan trọng trong điều hoà kiểm soát sự phát triển tế bào và chết theo chương trình. Đột biến p53 có thể làm rối loạn chu trình tế bào và hậu quả có thể phát sinh ung thư. 50 mẫu DNA vùng "nóng" trên gen p53 của bệnh nhân phơi nhiễm với chất độc hóa học/Dioxin được giải trình tự và phân tích đột biến. Kết quả, ở vị trí 1450 trên gen p53 thymin thay đổi thành alanin (1450^{T/A}) kết quả làm thay đổi acid amin Cys242Ser trên protein p53. Đột biến điểm Cys242Ser trên protein p53 có tần suất cao với 0.30 ở bệnh nhân có phơi nhiễm với chất độc hóa học/Dioxin. Nghiên cứu tới cần xác định vai trò của đột biến trong bệnh sinh liên quan với bệnh nhân nhiễm chất độc hóa học/Dioxin.

Từ khóa: p53, dioxin, Cys242Ser.

Summary

Gene P53 encodes p53 protein, molecular weight 53 Daltons, plays an important role in cell cycle control and apoptosis. Defective p53 could allow abnormal cell proliferations, and may result in cancer developments. The 50 DNA samples isolated from patients who have exposure to chemical toxic agents/Dioxin were analyzed by direct sequencing on hotspot region which may occur mutation on p53 gene. Results indicated that point mutations at position 1450^{T/A} of p53 gene leading to vary in amino acid Cys242Ser. The point mutations of Cys242Ser on p53 protein was high frequency with 0.3 in patients who had exposures to chemical toxic agents/Dioxin. Future study needs to clarify this mutated roles in pathogenesis relating to patients who had exposures to this chemical toxicity.

Keywords: p53, dioxin, Cys242Ser.

1. Đặt vấn đề

Protein p53 có chức năng điều hoà kiểm soát sự phát triển tế bào và ức chế sự hình thành khối u bằng con đường thúc đẩy tế bào chết theo chương trình và khả năng làm dừng sự phân chia của tế bào ở bất kỳ điểm nào trong nhiều điểm kiểm soát của tế bào. Khi có tổn thương ở DNA, p53 làm ngừng chu

trình tế bào cho đến khi DNA bị tổn thương được sửa chữa hoặc làm chết tế bào theo chương trình nếu không còn khả năng sửa chữa DNA [2, 11]. Gene p53 khu trú trên nhiễm sắc thể số 17, mã hoá protein p53 có kích thước 393 acid amin (aa) và trọng lượng phân tử là 53kilo dalton (kD) [2, 11]. Đột biến gene p53 có thể làm thay đổi cấu trúc protein

p53 hậu quả sẽ gây thay đổi chức năng kiểm soát điều hòa của nó. Những đột biến mất chức năng p53 làm tăng tính bất ổn định di truyền và làm giảm chết tế bào theo chương trình [3, 4]. Trên 50% những người mắc các bệnh về ung thư như ung thư vú, ung thư đại tràng, ung thư phổi, ung thư gan, thực quản, não và nhiều cơ quan khác đều có những điểm khác biệt hoặc đột biến trên gene mã hoá p53 [7]. Những nghiên cứu gần đây chứng minh mối liên quan giữa đột biến gen p53 và sự phát triển hoặc tiến triển ung thư. Người ta thấy rằng, đột biến p53 có liên quan trong kháng thuốc điều trị ung thư. Trên 90% đột biến gen p53 xảy ra trên exone 5 tới 8, vì thế nhiều nghiên cứu tập trung chủ yếu trên vùng này. Chúng ta không thể loại trừ hoàn toàn khả năng có thể xảy ra đột biến gen ngoài những vùng bảo thủ gene. Một đột biến điểm quan trọng liên quan trong cơ chế phát sinh ung thư thường xảy ra tại vị trí 249 (AGG to AGT, = hotspot), đột biến này gây ra biến đổi acid amin arginine thay thế bằng serine Agr249Ser). Người ta thấy rằng vùng nóng Agr249 có chuỗi trình tự nucleotid AGGCC là vị trí bám dính của độc tố Aflatoxin β 1 nên từ trước tới nay các nghiên cứu chủ yếu tập trung trên các đối tượng bệnh nhân ung thư gan có liên quan chất độc này [3, 6]. Tuy nhiên, đối với nạn nhân tiếp xúc lâu dài với chất độc hóa học/Dioxin hiện có rất ít thông tin đề cập tới đột biến vùng nóng này của p53 (2,4-5,7-10). Trong công bố mới đây, chúng tôi thấy rằng đột biến ở vị trí Agr249Ser ở bệnh nhân phơi nhiễm với chất độc hóa học/Dioxin có tần suất thấp là 0,04 [1]. Vì vậy, nghiên cứu xác định các đột biến khác xảy ra trên gene mã hoá p53 ở nạn nhân tiếp xúc lâu dài với chất độc hóa học/Dioxin có thể liên quan tổn thương ở mức phân tử, cũng như là một yếu tố dự báo và tiên lượng bệnh có ý nghĩa quan trọng trong áp dụng các biện pháp chẩn đoán và hỗ trợ nạn nhân.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Tổng số bệnh nhân tham gia nghiên cứu gồm 50 người được thu dung điều trị tại Bệnh viện

103, Hà Đông, Hà Nội. Những bệnh nhân đã được công nhận là nạn nhân chất độc hóa học (CĐHH)/Dioxin bị phơi nhiễm trực tiếp hoặc gián tiếp và hưởng chế độ trợ cấp của nhà nước. Bao gồm 48 nam và 2 nữ, phần lớn số bệnh nhân này là các cựu chiến binh đã tham gia chiến đấu tại chiến trường miền Nam trước năm 1975. Tất cả các bệnh nhân được thăm khám lâm sàng, xét nghiệm thu thập hồ sơ theo mẫu thống nhất, được theo dõi đăng kí đầy đủ trong quá trình điều trị tại Bệnh viện 103.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu thập mẫu bệnh phẩm

Mẫu máu tĩnh mạch được lấy 1 lần tại thời điểm khi đưa vào nghiên cứu, tách khối tế bào máu giàu bạch cầu và huyết tương riêng bảo quản ở -80°C cho đến khi sử dụng.

2.2.2. Phương pháp tách DNA

DNA tổng số được tách từ khối tế bào máu ngoại vi sử dụng bộ kit của hãng QIAgen. Qui trình tách tinh sạch theo hướng dẫn của nhà sản xuất (www1.qiagen.com). Nồng độ DNA tổng số và độ tinh sạch được kiểm tra trên hệ thống Nano Drop đảm bảo độ tinh sạch và nồng độ DNA được sử dụng cho phản ứng PCR.

2.2.3. Trình tự primer

Các primer P53-F1 và P53-R1 được dùng làm bộ mô hình chính nhân đoạn gene P53 từ vị trí 13970 đến vị trí 14176 (206bp) để giải trình tự vùng nóng có đột biến có thể có liên quan trong ung thư. Trình tự mỗi: P53 F1: 5'-CTTGCCACAGGTCTCCCCAA-3' và P53 R1: 5'-AGGGGTCAGCGGCAA-GCAGA-3'

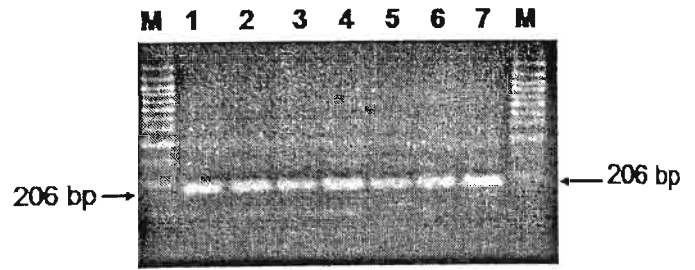
2.2.4. Thành phần phản ứng PCR

Đệm 10X 2,5 μ l, mỗi P53-F1 (15pM) 0,5 μ l, mỗi P53-R1 (15pM) 0,5 μ l, dNTPs (2mM) 2,5 μ l, Mg^{2+} (25mM) 3 μ l, Taq DNA polymerase 0,2 μ l, dH₂O 10,8 μ l, DNA khuôn 5 μ l. Chu trình nhiệt: 1 vòng 95°C x 5 phút; 40 vòng (94°C x 30 giây, 55°C x 30 giây, 72°C x 45 giây), kết thúc 72°C x 7 phút.

2.2.5. Giải trình tự gen (direct DNA-sequencing)

Sản phẩm PCR sau khi được nhân thành công bằng cặp mồi P53-F1 và P53-R1 sẽ được giải trình tự trực tiếp bằng các bước như sau: Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit PCR purification của Bioneer (các bước tiến hành theo chỉ dẫn của nhà sản xuất). Để kiểm tra độ tinh sạch cũng như định lượng một cách tương đối hàm lượng DNA của sản phẩm PCR đã qua tinh sạch, chúng tôi tiến hành điện di lại trên agarose và đo trên máy quang phổ ở hai bước sóng 260nm và 280nm. Sản phẩm PCR sau khi đã qua tinh sạch sẽ làm khuôn cho phản ứng PCR cho giải trình tự. Các trình tự sau đó sẽ được xuất ra và phân tích bằng phần mềm BioEdit. Sau khi giải trình tự gene kết quả được so sánh với trình tự chuẩn trên ngân hàng dữ liệu theo địa chỉ trang Web: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome. Sau đó trình tự gen được phân tích trên phần mềm Bioedite 7.05.

và P53 R1, cho kết quả 50/50 (100%) mẫu có sản phẩm PCR điển hình với kích thước đặc hiệu 206 bp (hình 1).



Hình 1. Sản phẩm PCR nhân đoạn gen p53. 1-7 sản phẩm PCR đoạn gen P53 của các bệnh nhân tương ứng. M, thang chuẩn DNA.

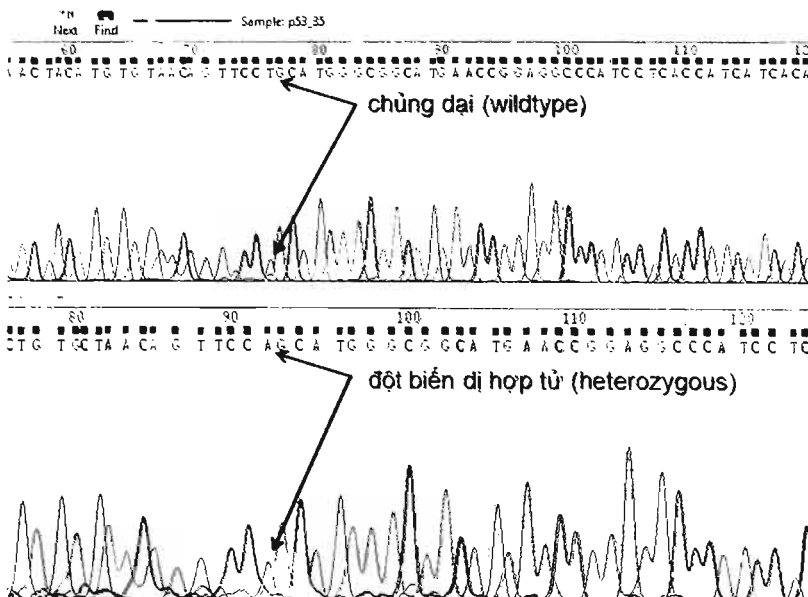
3. Kết quả

3.1. Phản ứng PCR nhân đoạn gen p53 tế bào

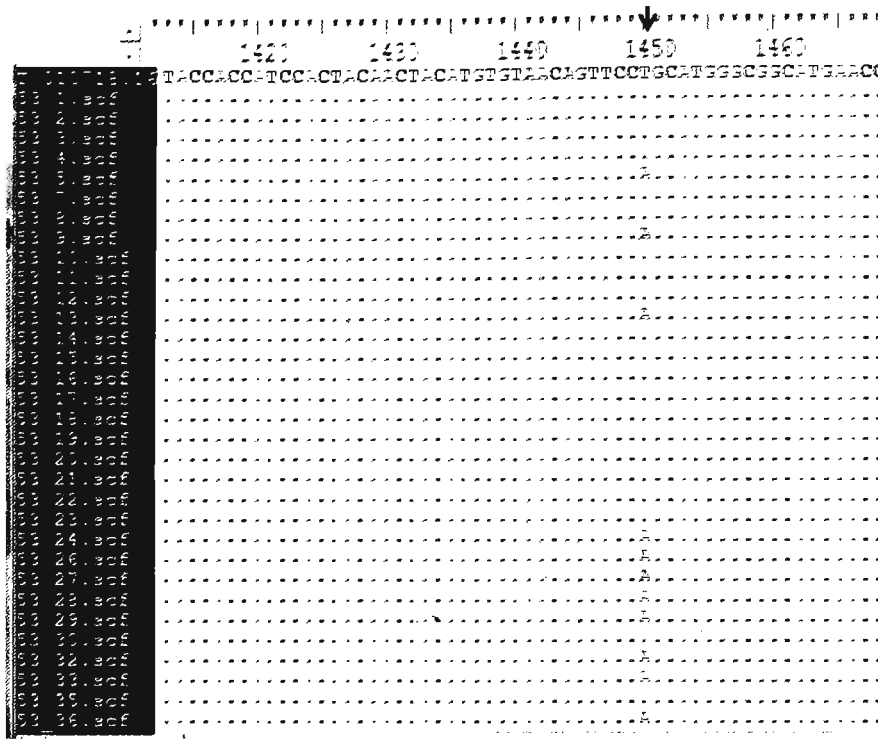
Để khảo sát đoạn gene p53 có thể có những đột biến liên quan phơi nhiễm chất độc hóa học, chúng tôi khảo sát đoạn gene có vị trí từ 13970 đến vị trí 14176. Phản ứng PCR với cặp mồi P53 F1

3.2. Hình ảnh các đột biến điểm gene P53 điển hình

Giải trình tự gen sản phẩm PCR này cho thấy 35/50 (70%) mẫu có trình tự gen điển hình mang kiểu gen hoang dại (wildtype) không có khác biệt hay thay đổi nào về trình tự các nucleotide. Bằng chương trình Bioedid, phân tích so sánh với trình tự gen chuẩn NT_010718.16, NW_001838403, NW_926584.1 cho thấy 100% tương đồng về trình tự nucleotide của đoạn gen p53 người. Phân tích trình tự DNA trên đoạn gene p53 tại vị trí 14050 thấy có 15/50 (30%) mẫu xuất hiện sự thay đổi nucleotid là Thymine (T) chuyển thành Alanine (T→T/A). Chính sự thay của nucleotid này làm thay đổi acid amin tại vị trí 242 (Cysteine → Serine, Cys242Ser) (Hình 2, Bảng 1-2).



Hình 2: Biểu đồ (trên) trình tự đoạn gen p53 chủng hoang dại; biểu đồ (dưới) là trình tự đoạn gen có đột biến dị hợp tử ở vị trí 14050 T/A (mũi tên chỉ)



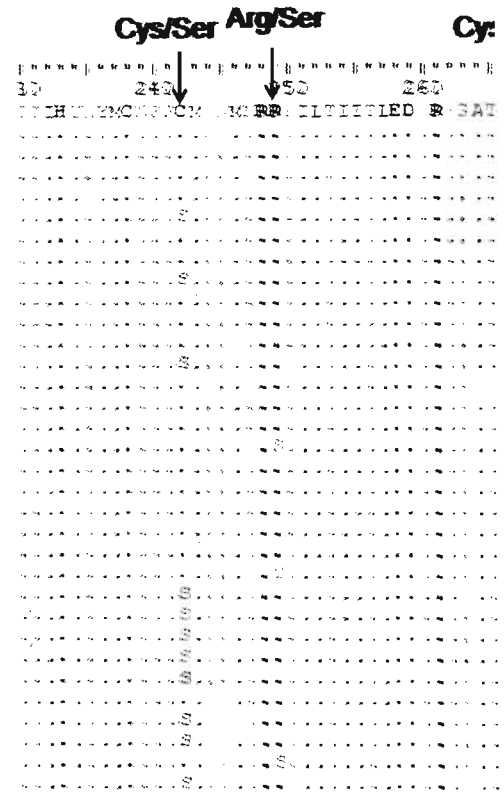
Hình 3: Hình tổng hợp trình tự 34 mẫu trình tự gen P53. 11 mẫu đột biến điểm tại vị trí 14050 Thymine chuyển thành Alanine

3.3. Đặc điểm và tần suất các đột biến điểm trên đoạn gene p53 từ vị trí 13970 đến 14176

Trong nghiên cứu công bố gần đây, chúng tôi đã mô tả chi tiết hai đột biến điểm hiếm gặp tại vị trí 14073^{G/T} và 14122^{T/A} theo thứ tự có tần suất 0,04 và 0,01 xuất hiện ở bệnh nhân phơi nhiễm với chất độc hóa học/Dioxin [11]. Điều thú vị là, ở vị trí 14050 có tới 30% trường hợp xuất hiện đột biến (T→T/A), hậu quả của thay đổi này là acid amin Cystein được thay thế bằng Serine ở vị trí 242 (Cys242Ser) trong cấu trúc phân tử p53 (Hình 4, Bảng 1, 2).

Bảng 1: Đặc điểm và vị trí đột biến điểm trên đoạn gene p53 ở các bệnh nhân

Vị trí trên gen P53	Thay đổi về nucleotide	Thay đổi về acid amin
14050	T/A	Cys242Ser
14073 (1)	G/T	Arg249Ser
14122 (1)	T/A	Cys266Ser
Số loại đột biến	3	3



Hình 4. Trình tự axit amin và đột biến điểm vị trí và Cys242Ser và Arg249Ser của protein p53. Vị trí đột biến điểm Cys242Ser và Arg249Ser xuất hiện trong quần thể nghiên cứu (Mũi tên chỉ).

Bảng 2. Tần suất xuất hiện đột biến điểm Cys242Ser trên gene P53 ở các bệnh nhân

Thay đổi về nucleotid	Thay đổi về acid amin	Số mẫu (đột biến/n; f)	Đột biến nhiễm sắc thể (đột biến/n; n,%)
14050 ^{T/A}	Cys242Ser	15/50 (0,30)	30 (30%)

Trên bệnh nhân phơi nhiễm với chất độc hóa học/Dioxin quan sát thấy 3 đột biến điểm khác nhau dẫn đến thay đổi acid amin trong cấu trúc phân tử p53 [11].

Tần suất cao đột biến điểm Cys242Ser trên gen P53 xuất hiện ở các bệnh nhân phơi nhiễm chất độc hóa học là 0,3 trong khi các đột biến khác có tần suất thấp như Arg249Ser là 0,04 và Cys266Ser là 0,01 [11].

4. Bàn luận

Gen p53 là gen ức chế u, sự thay đổi chức năng của nó có liên quan đến bệnh sinh ung thư. Protein P53 có vai trò điều hòa kiểm soát sự phát triển tế bào. Nó có khả năng ức chế sự hình thành u bằng thúc đẩy con đường tế bào chết theo chương trình và làm dừng sự phân chia của tế bào ở bất kỳ điểm nào trong nhiều điểm kiểm soát của tế bào [1, 2]. Trên bệnh nhân ung thư gan đột biến gen p53 lên tới hơn 50%, trong đó chủ yếu là đột biến điểm tại vị trí 249 (AGG → AGT, = hotspot), đột biến này gây ra biến đổi acid amin serine thay thế arginine (249^{ser}). Đột biến gen p53 làm thay đổi cấu trúc phân tử và chức năng gây giải phóng sự điều hòa tế bào chết theo chương trình, làm tăng quá trình nhân lên và sống sót của tế bào, trong một số trường hợp thúc đẩy làm mất ổn định và kháng lại trị liệu hóa học [3]. Phơi nhiễm với chất độc hóa học/Dioxin có thể gây ra bệnh tật qua cơ chế tác động trực tiếp của Dioxin lên tế bào chủ yếu thông qua protein thụ cảm thể aryl hydrocarbon receptor (AhR) [4, 7, 8]. Khi tiếp xúc với Dioxin, tế bào tăng cường biểu lộ gen mã hóa AhR kèm theo rối loạn quá trình phiên mã (transcription) của nhiều gen tham gia vào quá trình điều hòa tăng sinh và chu kỳ phân bào, trong đó có TGF (transforming growth factor), cyclin A, các oncogen c-myc, c-Fos... Thông qua AhR, dioxin hoạt hóa sự biểu hiện các gen như: cytochrome P4501A1 (Cyp1A1), plasminogen

activator inhibitor-2 (PAI-2)... [4, 7, 10]. Trong khi đó nó lại làm suy giảm biểu hiện gen mã hóa TGF-beta2. Kết quả là quá trình phân bào bị rối loạn gây nên những hậu quả tiếp theo rất đa dạng. Dioxin làm ức chế làm giảm biểu lộ gen mã hóa glucose transporter-4 (GLUT-4) một protein vận chuyển glucose [4, 9]. Đặc biệt nguy hiểm, Dioxin tác động lên các gen của các tế bào sinh sản, thông qua cơ chế Dioxin bám vào thụ cảm thể hormon tế bào, làm thay đổi chức năng và cơ chế di truyền của tế bào. Hậu quả sẽ gây ra hàng loạt biến đổi như: dioxin làm thay đổi biểu lộ gen mã hóa 17-20 lyase (CYP17A1). Kết quả là lượng hormon của tế bào trứng như progesteron và estradiol bị giảm sút dẫn đến các hậu quả nghiêm trọng về sinh sản. Dioxin tác động lên sự phát triển của tinh hoàn gây teo. Đặc biệt, Dioxin có thể liên quan đến sự phát triển của nhiều bệnh ung thư thông qua các thay đổi ở các gen như p53, p27Kip1, p21/waf1, cdc2p34 kinase và cdk4 [4-11]. Trong nghiên cứu này chúng tôi phát hiện thấy tần suất cao đột biến điểm ở vị trí 14050^{T/A} làm thay thế acid amin Cystein bằng Serine ở vị trí 242. Đây là một đột biến điểm chưa được mô tả có tỷ lệ lên đến 30% các trường hợp nghiên cứu. Trong nhiều nghiên cứu gần đây ở trong cũng như ngoài nước về đột biến gen p53 chúng tôi chưa thấy các tác giả có mô tả đột biến điểm vị trí Cys242Ser và liên quan của nó trong sự phát sinh bệnh lý nói chung, ung thư nói riêng và ở nạn nhân phơi nhiễm với chất độc hóa học/DIOXIN [2-11]. Trong khi một vị trí đột biến được quan tâm nhiều trên gen p53 là Arg249Ser lại chỉ gặp với tần suất thấp 0,04 ở bệnh nhân phơi nhiễm với chất độc hóa học/Dioxin [1]. Vì vậy, chức năng của đột biến Cys242Ser của p53 cần được nghiên cứu sâu hơn, đặc biệt vai trò của nó trong bệnh lý nói chung, ung thư nói riêng cũng như ở nạn nhân phơi nhiễm chất độc hóa học/DIOXIN.

5. Kết luận

Từ kết quả giải trình tự gen trực tiếp 50 mẫu DNA trên vùng nóng của gen p53 chúng tôi rút ra kết luận: Đột biến điểm ở vị trí 14050^{T/A} làm thay đổi trên trình tự acid amin Cys242Ser với tần suất cao là 0,30 trên những nạn nhân phơi nhiễm với chất độc hóa học/Dioxin.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Linh Toàn, Nguyễn Hoàng Thanh, Nguyễn Bá Vương (2011), Tần suất thấp đột biến Arg249Ser và Cys266Ser của gen p53 trên bệnh nhân phơi nhiễm với chất độc hóa học/Dioxin. Tạp chí y dược học Quân sự, Số 5.
2. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, et al. p53 Gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990; 50:7717-7722.
3. Lim SO, Kim H, Jung G. p53 inhibits tumor cell invasion via the degradation of snail protein in hepatocellular carcinoma. *FEBS Lett.* 2010 Jun 3; 584(11):2231-6.
4. Lindén J, Lensu S, Tuomisto J, Pohjanvirta R. Dioxins, the aryl hydrocarbon receptor and the central regulation of energy balance. *Front Neuroendocrinol.* 2010 Oct; 31(4): 452-78.
5. Geusau A, Abraham K, Geissler K, Sator MO, Stingl G, Tschachler E. Severe 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) intoxication: clinical and laboratory effects. *Environ Health Perspect.* 2001; 109(8):865-9.
6. Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature.* 2007 Feb 8; 445(7128):656-60.
7. Nicol CJ, Harrison ML, Laposa RR, Gimelshtein IL, Wells PG. A teratologic suppressor role for p53 in benzo[a]pyrene-treated transgenic p53-deficient mice. *Nat Genet.* 1995 Jun; 10(2):181-7.
8. Chen SC, Liao TL, Wei YH, Tzeng CR, Kao SH. Endocrine disruptor, dioxin (TCDD)-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in human trophoblast-like JAR cells. *Mol Hum Reprod.* 2010 May; 16(5):361-72.
9. Wirgin I, Roy NK, Loftus M, Chambers RC, Franks DG, Hahn ME. Mechanistic basis of resistance to PCBs in Atlantic tomcod from the Hudson River. *Science.* 2011 Mar 11; 331(6022):1322-5.
10. Yang AL, Smith AG, Akhtar R, Clothier B, Robinson S, MacFarlane M, Festing MF. Low levels of p53 are associated with resistance to tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in DBA/2 mice. *Pharmacogenetics.* 1999 Apr; 9(2):183-8.
11. Soussi T, Caron de Fromentel C, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 1990; 5:945-952.