

مطالعه اثر پاتوژنستی تغییرات نوکلئوتیدی جدید در ناحیه پروموتری ژن *TERT* در بیماران مبتلا به تومور مغزی از نوع گلیوبلاستوما

فرزانه اولیا^۱، محمد مهدی حیدری^{۱*}، مهری خاتمی^۱، احسان ضیایی^۲، محمدعلی برومند^۳

مقاله پژوهشی

مقدمه: علی‌رغم دهه‌ها تلاش در تشخیص و درمان تومورهای مغزی، همچنان این نوع تومورها، در بین کشنده‌ترین انواع سرطان‌ها دسته‌بندی می‌شوند. فعال شدن آنزیم تلومراز، به‌عنوان یک عامل اساسی در نامیرایی این سلول‌ها شناخته شده است. ژن *TERT* با بیان زیرواحد کاتالیتیک آنزیم، به‌عنوان مهم‌ترین تنظیم‌کننده فعالیت تلومراز معرفی شده است. جهش‌های نقطه‌ای در ناحیه پروموتری ژن *TERT*، به‌ویژه در نقاط داغ پروموتری، می‌توانند نقش مهمی در اتصال فاکتورهای رونویسی فعال‌کننده و مهار اتصال فاکتورهای تنظیم منفی ژن *TERT* و در نهایت، تنظیم بیان این ژن ایفا کنند. این پژوهش، با هدف شناسایی و بررسی بیوانفورماتیکی جهش‌های ناحیه پروموتری ژن *TERT* در تومور مغزی بدخیم گلیوبلاستوما انجام شده است.

روش بررسی: این مطالعه به روش مورد - شاهدهی انجام گرفته است و ۳۵ فرد مبتلا به تومور مغزی گلیوبلاستومای مولتی‌فرم و ۴۰ فرد به عنوان نمونه‌های کنترل بررسی شدند. در این پژوهش، از تکنیک Touchdown PCR و روش تعیین توالی مستقیم DNA، جهت تشخیص جهش‌های ناحیه پروموتری ژن *TERT* در افراد مبتلا به گلیوبلاستوما استفاده شد. هم‌چنین آنالیزهای بیوانفورماتیکی، برای بررسی اثر پاتوژنستی تغییرات نوکلئوتیدی این ناحیه ژنی انجام شد.

نتایج: طی این مطالعه، ۳ جهش نقطه‌ای در ناحیه هسته پروموتری ژن *TERT* شناسایی شد (c.*144C>G و c.*143G>C) که از بین آن‌ها، ۲ جهش برای اولین بار در بیماران گلیوبلاستومای مولتی‌فرم مشاهده شد و یک جهش دیگر نیز در نقطه‌ی داغ هسته پروموتری ژن (c.*146C>T) واقع شده بود.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، اثر پاتوژنستی جهش‌های ناحیه پروموتری *TERT* به‌عنوان بیومارکر گلیوبلاستوما بررسی شد. چنین یافته‌هایی، این احتمال را افزایش می‌دهند که جهش‌های سوماتیکی در مناطق تنظیم‌کننده، ممکن است رویدادهای القایی مهمی در روند سرطان‌زایی باشند.

واژه‌های کلیدی: تومور مغزی، تلومراز، گلیوبلاستومای مولتی‌فرم، ژن *TERT*، Touchdown PCR

ارجاع: اولیا فرزانه، حیدری محمد مهدی، خاتمی مهری، ضیایی احسان، برومند محمدعلی. مطالعه اثر پاتوژنستی تغییرات نوکلئوتیدی جدید در ناحیه پروموتری ژن *TERT* در بیماران مبتلا به تومور مغزی از نوع گلیوبلاستوما. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۳؛ ۳۲ (۳): ۵۹-۷۶.

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران.

۲- گروه جراحی مغز و اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.

۳- گروه انکولوژی بالینی، درمانگاه شهید رمضان‌زاده، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۳۵۳۱۲۳۳۳۸۱، پست الکترونیکی: heidarimm@yazd.ac.ir، صندوق پستی: ۸۹۱۵۸۱۸۴۱۱

مقدمه

تومور مغزی، توده‌ای از سلول‌ها (نئوپلاسم: Neoplasm) با رشد غیرطبیعی است (۱). تومورهای مغزی می‌توانند سرطانی (بدخیم: Malignant) یا غیرسرطانی (خوش‌خیم: Benign) باشند. تومورهای مغزی به دو گروه اولیه (از سلول‌های بافت مغز منشاء می‌گیرند) و ثانویه (منشاء گرفته از سایر ارگان‌ها مانند ریه و سینه) تقسیم‌بندی می‌شوند (۲،۳). علائم تومور مغزی، شامل علائم عصبی فوکال (مربوط به یک بخش خاص در مغز) یا ژنرالیزه (مربوط به کل بافت مغز) می‌باشد. علائم عصبی فوکال، مانند فلج عضلانی ضعیف در یک سمت بدن و یا از دست‌دادن قدرت تکلم است که بستگی زیادی به محل تومور درون جمجمه دارد. علائم ژنرالیزه، شامل تشنج (۸۰-۵۰ درصد) و سردرد (بیش از ۳۰ درصد) می‌باشند. در ۱۵٪ موارد، به‌علت افزایش فشار درون جمجمه، علائمی از جمله استفراغ و تهوع نیز مشاهده می‌شود (۲،۴). تومورهای مغزی اولیه، دو درصد از کل سرطان‌های جهان را با نرخ شیوع سالانه ۲۲ در هر ۱۰۰ هزار نفر تشکیل می‌دهند. نرخ شیوع با بالا رفتن سن، افزایش می‌یابد و در افراد بالای ۸۵ سال به بالاترین میزان خود می‌رسد. شیوع تومورهای مغزی اولیه، با فاکتورهایی چون سن، جنسیت و نژاد تغییر می‌کند. تومورهای مغزی بدخیم، مانند گلیوماها بیشتر در مردان رخ می‌دهد، اگرچه به‌طور کلی، تومورهای مغزی (به‌خصوص مننژیوماها و تومورهای غده هیپوفیز) بیشتر زنان را درگیر می‌کنند (۵، ۲). براساس یک تخمین آماری، بر اثر ابتلا به تومورهای مغزی بدخیم از نوع گلیوبلاستوما، در جهان بیش از ۱۰۰ هزار نفر در سال می‌میرند (۶، ۲-۴). از پرتوهای یونیزه‌کننده به عنوان تنها ریسک فاکتور محیطی این نوع تومور می‌توان نام برد. تحقیقات اپیدمیولوژیک گسترده نشان می‌دهند که ابتلا به بیماری‌های آلرژیک، مانند آسم، نیز خطر ابتلا به انواع مختلف سرطان دستگاه عصبی مرکزی، از جمله گلیوما را افزایش می‌دهد (۷). استفاده از تلفن‌های همراه، رنگ مو، ضربه به سر و رژیم‌های غذایی، حاوی N-nitro-soures به‌عنوان عواملی که موجب افزایش خطر ابتلا به تومورهای مغزی می‌شوند معرفی شدند، اما این داده‌ها هنوز

اثبات شده و قانع‌کننده نیستند (۱۰-۲،۴،۸). گلیوماها معمول‌ترین تومورهای مغزی اولیه هستند که در بیماران و در سنین مختلف، از لحاظ جایگاه تومور، ویژگی‌های بافت‌شناسی، تغییرات ژنتیکی، و پاسخ به درمان، بسیار متنوع می‌باشند (۱۱). تاکنون ۲۵ جایگاه ژنی پرخطر برای گلیوماها و چندین جهش ارثی نادر در برخی خانواده‌ها که ممکن است منجر به ایجاد تومور مغزی گلیوما شود، مشخص شده‌است (۹،۱۲). در سال‌های اخیر نیز مطالعات بر روی موارد گلیوماها، منجر به کشف تغییرات مولکولی متعددی در این تومورها شده‌است. از بین این تغییرات مولکولی، جهش‌های نوکلئوتیدی در ناحیه پروموتوری ژن *TERT* (Telomerase Reverse Transcriptase) که نتیجه آن‌ها، افزایش فعالیت تلومراز است، به عنوان عوامل خطر کاندید در بیش از ۸۰ درصد از گلیوبلاستوماها مطرح است. تلومرها کمپلکس‌های نوکلئوپروتئینی هستند که در انتهای کروموزوم‌ها قرار دارند و برای یکپارچگی کروموزوم‌ها مورد نیاز هستند. این جهش‌ها تاکنون، در بدخیم‌ترین گلیوماها (گلیوبلاستوما) و هم‌چنین گلیوماهای خوش‌خیم (الیگودندروگلیوما) گزارش شده‌اند. این مشاهدات موجب می‌شود تا بقاء تلومر به عنوان یک رخداد اساسی و اولیه در ایجاد تومورهای مغزی مورد توجه قرار گیرد (۱۳). تلومرها در هر چرخه سلولی کوتاه می‌شوند و در نهایت منجر به مرگ یا پیری سلول می‌گردند. سلول‌های سرطانی، مانند همه سلول‌هایی که فعالانه رشد می‌کنند و نامیرا هستند، باید توانایی حفظ تلومر خود را دارا باشند. تلومراز مسئول ترمیم تلومرها برای حفظ طول آن‌ها و جلوگیری از مرگ سلولی است. افزایش طول تلومر برای دستیابی به تکثیر بی‌نهایت سلول‌های سرطانی لازم است. بنابراین، فعالیت تلومراز به‌عنوان یک مکانیسم بالقوه برای رشد سرطان مورد بررسی قرار گرفته است. گلیوبلاستوما مولتی‌فرم (Glioblastoma multiforme: GBM)، شایع‌ترین و بدخیم‌ترین نوع تومور اولیه مغز است که حدود ۱۷ درصد از تومورهای درون‌جمجمه‌ای را شامل می‌شود. بیش از ۶۷٪ از بیماران بزرگسالی که به این نوع تومور مبتلا می‌شوند، حداکثر تا دو سال پس از تشخیص، زنده

روش بررسی

در این مطالعه که به روش مورد - شاهدهی انجام گرفته است، تعداد ۳۵ نمونه خون از افراد مبتلا به تومور مغزی (گلیوبلاستوما مولتی فرم) از بیمارستان‌های شهید رهنمون یزد، بیمارستان دکتر مرتاض یزد و مرکز پرتودرمانی شهید رمضان‌زاده یزد جمع‌آوری شد. پس از تکمیل پرسش‌نامه و اخذ رضایت‌نامه از همه شرکت‌کنندگان در تحقیق، ۵ میلی‌لیتر خون، از افراد مبتلا به تومور مغزی گرفته شد و به لوله‌های استریل ۱۵۰ میلی‌لیتری، حاوی ۲۰۰ میکرولیتر EDTA، منتقل شد و تا زمان آزمایشات بعدی، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. براساس تشخیص پزشکان متخصص و مشاوران ژنتیک، ۳۵ بیمار، شامل ۲۴ مرد (در محدوده سنی ۲۴ تا ۶۳ سال، میانگین سن در زمان تشخیص ۴۳/۶) و ۱۱ زن (در محدوده سنی ۳۵ تا ۵۰ سال، میانگین سن در زمان تشخیص ۴۰/۸) جهت مطالعه جهش‌های ناحیه هسته پروموتور ژن *TERT* انتخاب شدند و مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین، یک گروه ۴۰ نفره غیرخویشاوند با بیماران، به عنوان نمونه‌های کنترل و سالم استفاده شدند که سابقه خانوادگی شناخته‌شده‌ای از هیچ نوع سرطانی نداشتند و از همان منطقه جغرافیایی بیماران انتخاب شدند. افراد کنترل از نظر سن و جنسیت با گروه بیماران، اختلاف آماری مهم و معناداری نداشتند (۲۵ تا ۶۰ سال: $P=0/008$ و ۲۱ مرد و ۱۹ زن: $P=0/01$). در مطالعه حاضر، تمام متغیرهای انتخاب گروه‌های بیمار و کنترل، به‌خوبی توزیع شده بودند، بنابراین از نظر یک تحلیل آماری، معتبر و قابل قبول در نظر گرفته شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA pure، طی روش استاندارد انجام شد. پس از استخراج DNA جهت تکثیر ناحیه ژنی موردنظر، از تکنیک Touchdown PCR استفاده شد. در PCR معمولی و استاندارد، از یک دمای اتصال ثابت، برای تکثیر توالی استفاده می‌شود، اما در تکنیک Touchdown PCR، برای انتخاب بهترین درجه حرارت اتصال پرایمرها به توالی هدف و جهت جلوگیری از اتصال غیراختصاصی پرایمرها، ابتدا در سیکل‌های اولیه، درجه حرارت

می‌مانند که این میزان، پایین‌ترین نرخ رشد بقای بیماران، در بین تومورهای مغزی بدخیم، محسوب می‌شود (۱۵، ۱۴). با وجود اینکه هنوز مکانیسم دقیق فعال‌شدن ژن *TERT* در سلول‌های سرطانی و غیرفعال‌شدن آن در حین تمایز، کاملاً مشخص نیست، پژوهش‌های اخیر نشان دادند که جهش‌ها در پروموتور این ژن و همچنین بازآرایی‌های کروموزومی، در فعال‌شدن تلومراز سلول‌ها نقش دارند. این نتایج منجر به تحقیقات جدیدی بر روی روش‌های درمانی، مبتنی بر هدف قراردادن فعالیت تلومراز شده است (۱۶). ژن *TERT* از ۴۰ هزار جفت‌باز تشکیل شده و دارای ۱۶ اگزون و ۱۵ اینترون می‌باشد. این ژن بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۵ (5p15.33) واقع است و تقریباً ۱/۲ مگاباز دورتر از تلومر کروموزوم قرار دارد (۱۸، ۱۷). هسته پروموتور ژن *TERT* از ۳۷ جفت‌باز پایین‌دست نقطه شروع رونویسی ژن تا ۳۳۰ جفت‌باز بالادست آن گسترده است. ناحیه پروموتور این ژن، همانند ژن‌های خانه‌دار، غنی از GC و فاقد TATA box و CAAT box می‌باشد. این پروموتور دارای موتیف‌ها و جایگاه‌های متعددی جهت اتصال انواع فاکتورهای رونویسی، از جمله انکوژن c-Myc (E-box) و فاکتورهای فعال‌کننده رونویسی EST و MECP2 و همچنین فاکتور مهاری (GC box) SP1 می‌باشد. پروموتور ژن *TERT* در سلول‌های تمایز یافته، خاموش و غیرمتمیله است. طی تحقیقات اخیر، دو جهش نقطه‌ای پرتکرار در انواع سرطان‌ها، بر روی هسته پروموتور *TERT* یافت شده است. به‌طور دقیق‌تر، جهش‌ها در دو نقطه داغ (Hotspot)، واقع در ۱۲۴- جفت باز و ۱۴۶- جفت باز بالادست محل شروع ترجمه *TERT* رخ می‌دهند: (C228T) 5p15.33: 1,295,250 C > T (C250T) و 1,295,228 C > T. ثابت شده است که این جهش‌ها تغییراتی هستند که منجر به تنظیم مثبت بیان *TERT* مورد نیاز برای فعال‌سازی تلومراز می‌شوند. هدف از پژوهش حاضر نیز شناسایی و بررسی جهش‌های ناحیه هسته پروموتور ژن *TERT* در بیماران ایرانی مبتلا به تومور مغزی بدخیم، از نوع گلیوبلاستوما و همچنین ارزیابی بیوانفورماتیکی اثرات جهش‌های این ناحیه از ژن است.

دستگاه PCR (شرکت یکتا تجهیز آزما) واکنش تکثیر DNA انجام گرفت. برنامه زمانی و دمایی واکنش Touchdown PCR به این صورت انجام گرفت: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ سیکل دمایی، متشکل از دمای دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال از درجه حرارت ۵۳ تا ۶۸ درجه سانتی‌گراد (به صورت کاهشی ۰/۵ درجه سانتی‌گراد به ازای هر سیکل) به مدت ۱ دقیقه، مرحله گسترش به مدت ۳۰ ثانیه در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. در نهایت برای اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، ۵ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید، بارگذاری و الکتروفورز شد. ژل آگارز به مدت ۳۰ دقیقه و با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز گردید و پس از آن با استفاده از دستگاه Gel Doc نمونه‌ها مشاهده شد و تصویربرداری از آن‌ها صورت گرفت. پس از تایید صحت فرآیند PCR، نمونه‌ها جهت تعیین توالی مستقیم به شرکت‌های پیشگام و نورژن (تهران) ارسال شدند.

اتصال، بالا انتخاب می‌شود و در سیکل‌های بعدی، درجه حرارت اتصال، به تدریج کاهش می‌یابد. برای انجام واکنش، ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner یک جفت پرایمر طراحی شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار Oligo Analyzer خصوصیات هر پرایمر و اتصالات احتمالی پرایمرها با یکدیگر، بررسی و سپس توسط شرکت پیشگام ساخته شد. با استفاده از برنامه BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) توالی پرایمرها از نظر همولوژی با کل ژنوم انسان هم‌ردیف شدند. طول قطعه نهایی سنتز شده توسط این پرایمرها ۲۶۲ جفت باز محاسبه شد (جدول ۱).

برای انجام روش Touchdown PCR، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتری، شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط بهینه PCR (Master Mix-Amplicon-Pishgam) بود که شامل Buffer 1X، ۲۰۰ میکرولیتر از هر یک از dNTPها، ۱-۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، ۱ تا ۴ میلی‌مولار MgCl₂، به همراه ۲ میکرولیتر از هر پرایمر Forward و Reverse با غلظت ۰/۲۵ میکرومولار، ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو و ۵/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، آماده شد و با کمک

جدول ۱: پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ناحیه پروموتری ژن TERT

پرایمر	توالی پرایمر	موقعیت کروموزومی
Forward	5'-CCTTCCAGCTCCGCCTCCTC-3'	۱۲۹۵۱۶۳ تا ۱۲۹۵۱۸۴
Reverse	5'-GCAGCACCTCGCGGTAGTGG-3'	۱۲۹۴۸۳۳ تا ۱۲۹۴۹۲۸

(جهت بررسی توالی ناحیه پروموتری)، ePOSSUM2 (برای پیش‌بینی اثر جهش‌ها بر روی نقاط اتصال فاکتورهای رونویسی)، Regulationspotter (جهت بررسی و تفسیر جهش‌های خارج از ناحیه کدکننده ژن)، Softberry (جهت شناسایی موتیف‌ها و نقاط اتصال فاکتورهای رونویسی)، AliBaba2.1 (برای یافتن نقاط اتصال فاکتورهای رونویسی احتمالی)، miRDB (جهت پیش‌بینی نقاط احتمالی اتصال microRNAها) و EMBOSS (برای تشخیص تغییرات در نواحی غنی از GC پروموتری ژن TERT) استفاده شد.

آنالیزهای بیوانفورماتیک: در این پژوهش، جهت بررسی و تحلیل نتایج و پیش‌بینی اثر تغییرات نوکلئوتیدی، بر جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی به پروموتری و عملکرد آن‌ها، از برنامه‌ی MEGAX (جهت آنالیز فیلوژنتیکی توالی‌های DNA و پروتئینی) و پایگاه داده‌های NCBI (جهت یافتن توالی پروموتری ژن به فرمت FASTA و یافتن پلی‌مورفیسم‌های ناحیه موردنظر)، Swiss Regulon Portal (برای تفسیر و بررسی جایگاه‌های تنظیمی در ژنوم)، PROMO (جهت شناسایی فاکتورهای رونویسی متصل‌شونده به توالی پروموتری)، UCSC

که سیتوزین جایگزین گوانین شده است. این تغییر نوکلئوتیدی جدید است و تاکنون گزارش نشده است (شکل ۲ و ۱).
 جهش $c.*144C>G$: $g.1295248C>G$: مقایسه کروماتوگرام نمونه نرمال با نمونه مرد بیماری ۴۶ ساله، نشان‌دهنده یک جایگزینی هتروزیگوت در موقعیت ۱۴۴ جفت‌باز بالادست ژن می‌باشد که گوانین جایگزین سیتونین شده است. همچنین این جهش در سه بیمار دیگر (۲ مرد و ۱ زن) مشاهده شد. این تغییر نوکلئوتیدی نیز جدید است و تاکنون گزارش نشده است (شکل ۴ و ۳).

جهش $c.*146C>T$: $g.1295250C>T$: مقایسه کروماتوگرام نمونه نرمال با نمونه مرد بیماری ۴۴ ساله، نشان‌دهنده یک جایگزینی هتروزیگوت در موقعیت ۱۴۶ جفت‌باز بالادست ژن می‌باشد که تیمین جایگزین آدنین شده است. همچنین این جهش در ده بیمار مرد دیگر و یک بیمار زن (۵۱ ساله) نیز مشاهده شد. این تغییر نوکلئوتیدی به عنوان یک جهش نقطه‌ای داغ، در انواع سرطان‌ها گزارش شده است و ارتباط آن با افزایش بیان ژن *TERT* تایید شده است (شکل ۶ و ۵).

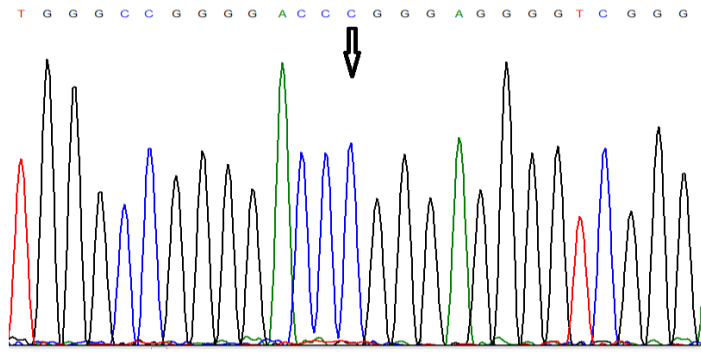
نتایج بررسی‌های بیوانفورماتیکی: از پایگاه داده UCSC به منظور به‌دست‌آوردن اطلاعات کلی، از نقاط اتصال فاکتورهای رونویسی، CpG Islands و نقاط برش توسط DNAase (که نشانگر میزان فشردگی کروماتین در ناحیه پروموتور ژن می‌باشد) استفاده گردید. پس از وارد کردن توالی پروموتور در قسمت BLAT، می‌توان توالی را به‌صورت گرافیکی و نموداری مشاهده کرد. سپس با انتخاب گزینه‌های مدنظر جهت بررسی پروموتور که در قسمت Regulatory قابل انتخاب هستند، ناحیه پروموتور ژن مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۷).

تجزیه و تحلیل آماری

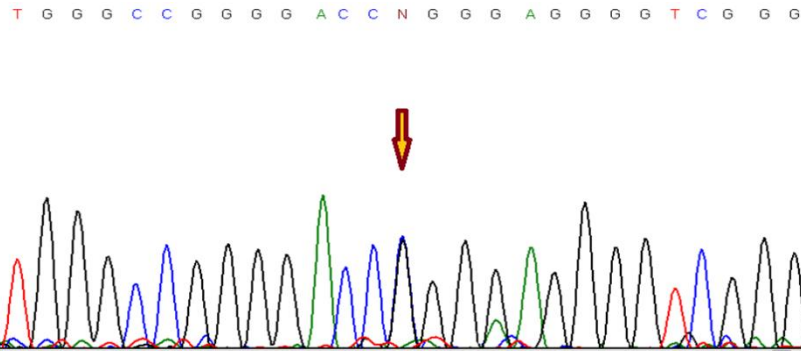
در این مطالعه برای آنالیزهای آماری و تعیین ارتباط یا تفاوت معنادار تغییرات نوکلئوتیدی با تومور گلیوبلاستوما، در دو گروه کنترل و بیمار، از آزمون آماری فیشر (Fisher's exact) و تست SPSS version 16 برای Windows استفاده شد. محاسبات با استفاده از نرم‌افزار GraphPad انجام شد و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ ($P<0.05$) از نظر آماری مهم در نظر گرفته شد.

نتایج

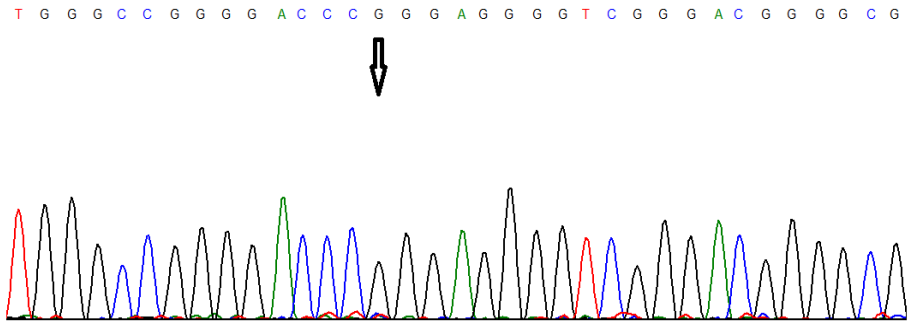
بر اساس پایگاه داده NCBI، ژن *TERT* در موقعیت کروموزومی 5p15.33 قرار دارد و دارای ۱۶ اگزون می‌باشد. پروتئین این ژن دارای دو ایزوفرم است. به‌علاوه، طبق جدیدترین رکورد توالی (NG_009265.1)، موقعیت کروموزومی ژن *TERT* از ۱۲۵۳۱۴۸ تا ۱۲۹۵۰۶۸ و بر روی رشته معکوس (Minus Strand) می‌باشد. با بررسی صفحه GenBank این ژن، مشخص شد که ژن دارای ۴۱۸۸۱ جفت‌باز است. در این مطالعه، با بررسی نتایج تعیین توالی و کروماتوگرام ۳۵ نمونه بیمار و ۴۰ مورد شاهد، با استفاده از نرم‌افزار MEGAX و برنامه کروماتس (chromas)، ۳ جهش و تغییر نوکلئوتیدی (۲ جهش جدید و ۱ جهش به‌عنوان Hotspot) مشاهده شد. نتایج حاصل از این بررسی‌ها به شرح زیر است: جهش $c.*143G>C$: $g.1295247G>C$: مقایسه کروماتوگرام نمونه نرمال با نمونه مرد بیماری ۵۱ ساله، نشان‌دهنده یک جایگزینی تک نوکلئوتیدی، به‌صورت هتروزیگوت، در موقعیت ۱۴۳ جفت‌باز بالادست ژن می‌باشد



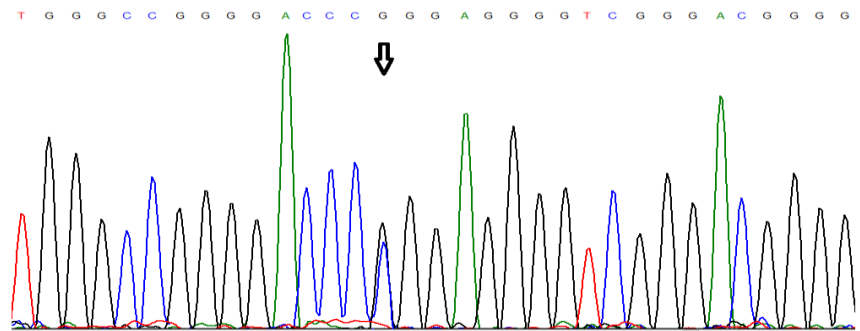
شکل ۱: تصویر کروماتوگرام حاصل از تعیین توالی نمونه فرد نرمال (از رشته ریورس) که نشان می‌دهد، در موقعیت ۱۴۳- نوکلئوتید **G** قرار دارد.



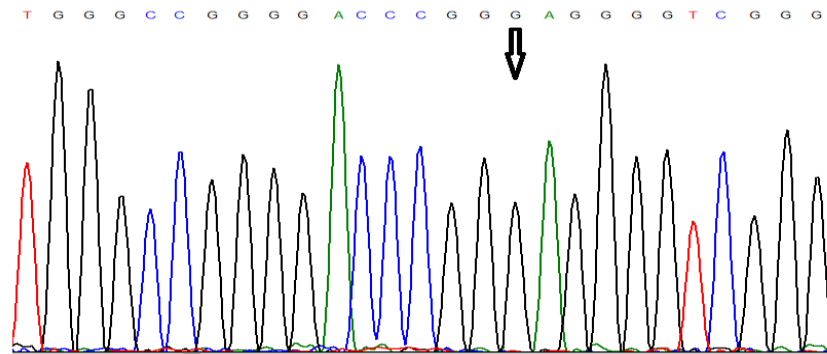
شکل ۲: تصویر کروماتوگرام حاصل از تعیین توالی نمونه بیمار که جایگزینی هتروزایگوت **G>C** را در موقعیت ۱۴۳- نشان می‌دهد.



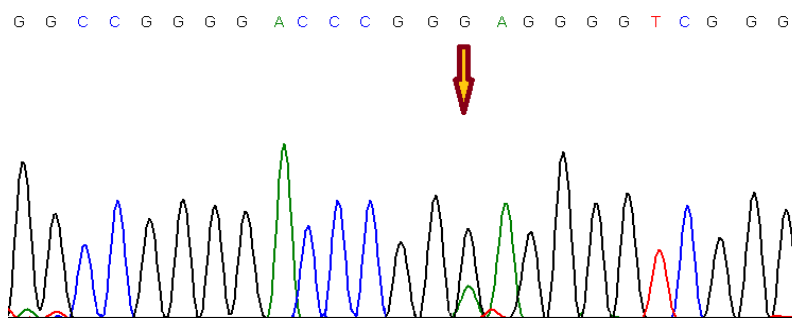
شکل ۳: تصویر کروماتوگرام حاصل از تعیین توالی نمونه فرد نرمال (از روی ریورس) که نشان می‌دهد، در موقعیت ۱۴۴- نوکلئوتید **C** قرار دارد.



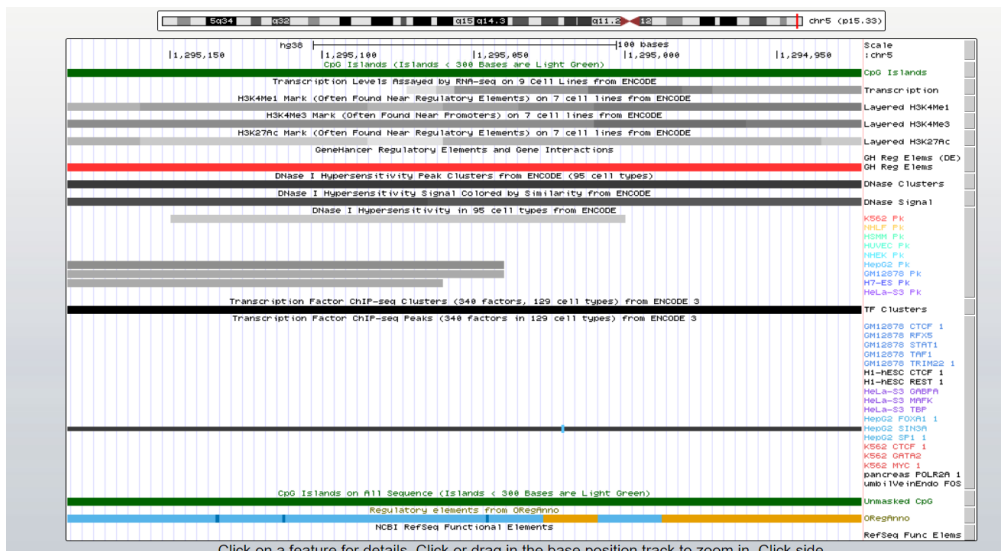
شکل ۴: تصویر کروماتوگرام حاصل از تعیین توالی نمونه بیمار که جایگزینی هتروزایگوت **C>G** را در موقعیت ۱۴۴- نشان می‌دهد.



شکل ۵: تصویر کروماتوگرام حاصل از تعیین توالی نمونه فرد نرمال (از رشته ریورس) که نشان می‌دهد، در موقعیت ۱۴۶- نوکلئوتید C قرار دارد.



شکل ۶: تصویر کروماتوگرام حاصل از تعیین توالی بیمار که جایگزینی تک نوکلئوتیدی C>T را در موقعیت ۱۴۶- نشان می‌دهد.



شکل ۷: نتایج به‌دست‌آمده از پایگاه‌داده UCSC در فرمت فشرده، اطلاعات کلی ناحیه پروموتور ژن *TERT* را نشان می‌دهد.

متصل می‌شود (1295240-1295155) که هر سه جهش یافت شده، در آن ناحیه واقع هستند، بنابراین، وقوع این تغییرات نوکلئوتیدی، احتمالاً باعث اختلال در اتصال این فاکتور رونویسی می‌گردد.

Swiss Regulon Portal: این پایگاه داده به منظور بررسی نقاط اتصال فاکتورهای رونویسی در توالی ۲۶۲ جفت‌بازی موردنظر استفاده شد. براساس نتایج این سایت، فاکتور رونویسی MECP2 (با Score= 0.778442) به ناحیه‌ای از پروموتور ژن

HIF-1, ETS2 و SP1/SP3 و برای توالی‌های موتانت، تنها فاکتور فعال‌کننده رونویسی ETS2 را پیش‌بینی کرده است. این بدان معنا است که جایگاه اتصال سایر فاکتورهای رونویسی، با وقوع جهش‌ها، تخریب شده است.

Alibaba2.1: با وارد کردن اطلاعات مربوط به توالی نرمال و جهش‌یافته موردنظر به صورت جداگانه، این سایت نواحی اتصال فاکتورهای رونویسی در توالی نرمال و توالی‌های موتانت را پیش‌بینی کرد. طبق نتایج این نرم‌افزار، با بررسی توالی ۱۳۱- تا ۱۵۸- ناحیه پروموتری ژن، در حالت نرمال، اتصال فاکتورهای رونویسی SP1, EGF, EGR-1, NF-1 و USF تایید شد، ولی در حالت موتانت و بروز جهش‌های مشاهده‌شده، تنها اتصال فاکتورهای رونویسی EGR-1 و NF-1 پیش‌بینی شد، بدین ترتیب، این نرم‌افزار، اتصال فاکتورهای رونویسی دیگر را در حالت‌های موتانت تایید نکرد.

mirdb: از این پایگاه داده، جهت بررسی جایگاه‌های اتصال microRNAهای احتمالی در ناحیه 5'-UTR ژن و ناحیه پروموتری موردنظر استفاده شد. در این سایت، ابتدا توالی نرمال و سپس توالی حاوی جهش‌های مشاهده‌شده در این پژوهش، وارد و مورد بررسی قرار گرفتند. طبق نتایج ما، احتمال اتصال یک miRNA (has-mir-6887-3p) به توالی موردنظر پروموتری وجود دارد که با وارد کردن سه توالی جهش یافته، به صورت جداگانه، پیش‌بینی شد که این miRNA با وقوع این جهش‌ها، دیگر به این ناحیه متصل نخواهد شد.

بحث

تکثیر بی‌حد و حصر سلول‌های سرطانی، یکی از ویژگی‌های اساسی رشد سرطان است. تلومرها که انتهای هر کروموزوم را تشکیل می‌دهند، توالی‌های DNA تکراری هستند که انتهای کروموزوم‌ها را از تشخیص شکستگی دورشته‌ای DNA محافظت می‌کنند و بنابراین توسط سیستم پاسخ آسیب DNA از بین می‌روند (۱۹). تلومرها در هر چرخه کوتاه می‌شوند و در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شوند. توصیف تغییرات ژنومی در سرطان‌های انسان، منجر به کشف طیف وسیعی از ژن‌های

PROMO: این پایگاه داده، به منظور بررسی و مقایسه نقاط اتصال احتمالی فاکتورهای رونویسی در نمونه نرمال و جهش‌یافته مورد استفاده قرار گرفت. طبق نتایج، پیش‌بینی شد که فاکتورهای رونویسی متصل‌شونده به پروموتر، در ناحیه ۱۴۰- تا ۱۵۰- (محدوده جهش‌های مشاهده‌شده در این مطالعه)، در حالت نرمال (غیرموتانت)، شامل فاکتورهای رونویسی GR-alpha, Pax-5, p53 و Sp1 و در حالت موتانت، تنها Pax-5 و GR-alpha هستند و بنابراین، وقوع جهش‌های گزارش‌شده، اتصال دو فاکتور دیگر را به ناحیه پروموتری ژن مختل می‌کنند.

POSSUM2: از این پایگاه داده، به منظور بررسی جداگانه هر ۳ جهش شناسایی‌شده از لحاظ اتصال فاکتورهای رونویسی استفاده شد. این سایت، امکان انتخاب بین فاکتورهای رونویسی که امکان اتصال به محل توالی را دارند را به کاربر می‌دهد. در این پژوهش، گزینه فاکتورهای شناخته‌شده برای این ناحیه پروموتری، انتخاب شد. نتایج پیش‌بینی‌های این سایت نشان داد که برای هر سه جهش مشاهده شده، کاهش میزان اتصال فاکتورهای رونویسی، مانند MECP2 (از ۷۲/۸٪ برای جهش C>143G* تا ۹۶/۴٪ برای دو جهش دیگر) تایید می‌شود.

RegulationSpotter: پس از وارد کردن هر جهش به صورت جداگانه، این پایگاه داده پیش‌بینی‌هایی در رابطه با تغییرات ایجادشده در پروموتر ژن ارائه می‌دهد. پیش‌بینی این سایت برای سه جهش یافت شده در پژوهش، با عبارت Functional Region (Much Evidenc) مشخص شده است. این عبارت به این معناست که جهش‌های موردنظر در جایگاه تنظیمی ژن واقع شده و طبق بررسی‌های آماری سایت، با احتمال بالایی موجب تغییر در بیان ژن می‌شوند، اما برای اثبات این مهم، به شواهد بیشتری نیاز است.

Softberry: در این پایگاه داده نیز با وارد کردن اطلاعات مرتبط با توالی نرمال و جهش‌یافته، به بررسی تغییرات در نواحی اتصال فاکتورهای رونویسی پرداخته شد. این سایت برای توالی نرمال، سه جایگاه اتصال برای فاکتورهای رونویسی

آن‌ها نشان دادند که جهش در مناطق غنی از GC ناحیه پروموتوری ژن *TERT*، منجر به ایجاد محل‌های اتصال فاکتورهای رونویسی می‌شود که موجب فعال‌شدن مجدد تلومراز در سلول‌های توموری می‌گردد (۲۴). همچنین، سطح بیان *TERT* در تومورهایی که حامل جهش ناحیه پروموتوری ژن بودند، به‌طور متوسط ۶ برابر بیشتر از تومورهایی بدون این جهش‌ها بود، که نشان می‌دهد پروموتور جهش‌یافته، منجر به تنظیم مثبت ژن *TERT* می‌شود. به‌طور کلی، به نظر می‌رسد حفظ طول تلومر از طریق فعالیت تلومراز، ناشی از جهش‌های ناحیه پروموتوری ژن *TERT*، یک رویداد مهم در گلیوماژنز باشد (۲۵). در مطالعه‌ای دیگری نیز بر روی بیماران گلیومای بالغ که اکثر آن‌ها گلیوبلاستوما بودند، Killela جهش‌های ناحیه پروموتوری ژن *TERT* را مورد مطالعه قرار داد و دریافت که این جهش‌ها، میزان بقای کمتری را برای بیماران گلیوبلاستوماها پیش‌بینی می‌کند (۲۶). اما برای تعیین اینکه آیا ژنوم سلول‌های توموری گلیوبلاستوما در بیماران ایرانی نیز دارای جهش‌های نوکلئوتیدی در خارج از مناطق کدکننده پروتئین هستند، ما در این مطالعه، جهش‌های سوماتیک غیرکدکننده در ناحیه پروموتوری ژن *TERT* را با استفاده از نتایج توالی‌یابی ناحیه پروموتوری ژن *TERT* بررسی کردیم. این پژوهش بر روی ۳۵ نمونه خون از بیماران مبتلا به تومور مغزی از نوع گلیوبلاستوما مولتی‌فرم و ۴۰ نمونه شاهد انجام شد. ۶۸/۵۷ درصد از بیماران را مردان و ۳۱/۴۲ درصد آنان را زنان تشکیل دادند. میانگین سنی بیماران در این تحقیق ۴۱ سال بود. تجزیه و تحلیل داده‌های توالی‌یابی این ژن، از بیماران با گلیوبلاستوما مولتی‌فرم، سه جهش در پروموتور این ژن را در ۲۸ مورد از ۳۵ مورد (۸۰٪) بیماران تحت‌مطالعه نشان داد. دو تا از این جهش‌ها جدید هستند (*c.*143G>C* و *c.*144C>G*) و تاکنون در هیچ تحقیقی گزارش نشده‌اند ولی یکی از آن‌ها (*c.*146C>T*) قبلاً به عنوان یک جهش شایع و بیماریزا در چندین سرطان گزارش شده است. هیچکدام از این جهش‌های هتروزیگوت، در نتیجه توالی‌یابی سانگر از افراد کنترل و سالم مورد مطالعه مشاهده نشدند. هر یک از این جهش‌های پروموتوری منجر به جابجایی نوکلئوتیدهای گوانین و سیتیدین در موتیف‌های دی‌نوکلئوتیدی CG و یا GG شدند

جهش یافته شده است که به پیشرفت تومور کمک می‌کنند (۲۰). Nonoguchi و همکاران، جهش‌های ناحیه پروموتوری ژن *TERT* را با توالی‌یابی مستقیم DNA در جمعیتی مشتمل بر ۳۵۸ نمونه گلیوبلاستوما بررسی کردند و جهش‌های پروموتوری ژن *TERT*(C228T, C250T) را در ۵۵ درصد گلیوبلاستوماهای آنالیز شده شناسایی کردند. از این نمونه بیمار، ۷۳ درصد دارای جهش C228T و ۲۷ درصد دارای جهش C250T بودند. تنها یک بیمار گلیوبلاستوما دارای هر دو جهش C228T و C250T بود. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که در ۵۵٪ از کل نمونه‌ها، جهش در مناطق غنی از GC پروموتور ژن *TERT* مشاهده می‌شود. همچنین آن‌ها به این نکته دست‌یافتند که جهش در پروموتور ژن *TERT* به‌وضوح در گلیوبلاستوماهای اولیه، فراوان‌تر از گلیوبلاستوماهای ثانویه است (۲۱). Simon و همکارانش نیز با آزمایش بر روی بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی‌فرم، جهش‌های ناحیه هسته پروموتور *TERT* را از طریق تعیین توالی بررسی کردند و جهش‌های پروموتوری *T>C242-1* و *T>C146-1* را در ۳/۸۰٪ گلیوبلاستوماهای اولیه و ۶/۲۸٪ موارد ثانویه شناسایی کردند ($P < 0.001$) آن‌ها دریافتند که حضور جهش‌های *TERT* با بقا و طول عمر کوتاهتری در بیماران همراه است. تاثیر پیش‌آگهی جهش‌های *TERT* در بیماران، منجر به انتخاب صحیح روش‌های درمانی توسط متخصصین بالینی می‌شود. به‌نظر می‌رسد وقوع جهش‌های *TERT*، تومورهایی را مشخص می‌کنند که نیاز به درمان تهاجمی‌تری در بیماران دارند (۲۲). Mosrati و همکاران، ۱۲۸ بیمار گلیوبلاستوما اولیه را از نظر پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در ناحیه کدینگ ژن *TERT* و ۹۲ مورد را برای جهش‌های ناحیه پروموتوری *TERT* مورد بررسی قرار دادند. جهش‌های ناحیه پروموتور *TERT* در ۸۶ درصد بیماران مشاهده شد و از این میان، C228T (۱۲۴- جفت باز بالادست کدون شروع) در ۷۵ درصد بیماران و C250T (۱۴۶- جفت باز) در ۲۵ درصد موارد مشاهده شد. جهش‌های پروموتور *TERT* با بقای کوتاه‌تر زندگی در بیماران همراه بود (۲۳). Arita و همکاران، منشأ سوماتیک جهش‌های *TERT* را با تعیین توالی نمونه‌های توموری گلیوبلاستوما و DNA نرمال از گلبول‌های سفیدخون محیطی تأیید کردند.

۱۴۰ تا ۱۵۰ جفت بازی (bp) بالادست جایگاه شروع رونویسی ژن *TERT* واقع شدند. (شکل ۸)

که نشان‌دهنده آسیب به توالی‌های ناحیه CpG پرموتر ژن *TERT* هستند. هر سه جهش، دقیقاً در نقاط داغ ژن، در ناحیه



شکل ۸: موقعیت جهش‌های مشاهده شده در ناحیه پرموتری ژن *TERT*. کدون شروع ترجمه (ATG) و جایگاه شروع رونویسی با فلش نشان داده شده است.

جهش‌های پرموتری در سلول‌های توموری مغز، منجر به عدم اتصال این فاکتور رونویسی و در نتیجه افزایش فعالیت رونویسی از پرموتر ژن *TERT* در مسیر تومورزایی شوند (۱۶). هم‌چنین، پیش‌بینی شد که فاکتورهای رونویسی متصل‌شونده به ناحیه پرموتر ژن، در ناحیه ۱۴۰- تا ۱۵۰- (محدوده جهش‌های مشاهده‌شده)، در حالت نرمال (غیرموتانت)، شامل فاکتورهای رونویسی Pax-5, GR-alpha, Sp1 و 5, p53 و در حالت موتانت، تنها Pax-5 و GR-alpha هستند، فاکتورهای رونویسی Pax-5 و GR-alpha، نقش فعال‌کننده رونویسی و سایر فاکتورها، نقش مهارکننده رونویسی این ژن را دارند و بنابراین، پیش‌بینی می‌شود، وقوع جهش‌های گزارش‌شده، اتصال فاکتورهای مهارری را به ناحیه پرموتری ژن مختل می‌کنند تا رونویسی از ژن *TERT* در سلول‌های توموری افزایش یابد. پایگاه داده Softberry نیز برای توالی نرمال، سه جایگاه اتصال برای فاکتورهای رونویسی HIF-1, ETS2 و SP1/SP3 و برای توالی‌های موتانت، تنها اتصال فاکتور رونویسی ETS2 (یک فعال‌کننده رونویسی) را پیش‌بینی کرد. این بدان معنا است که از اتصال فاکتورهای رونویسی مهارری، با وقوع جهش‌ها، جلوگیری می‌شود که در راستای اهداف تومورزایی سلول است. برای بررسی اینکه آیا

نتایج پایگاه داده UCSC و Regulation Spotter از ناحیه پرموتر ژن نیز نشان داد که در توالی موردنظر ما، یک ناحیه غنی از CG (جزیره CpG) قرار دارد که طول این ناحیه کمتر از ۳۰۰ جفت باز است و هر سه جهش این مطالعه، در این ناحیه رخ می‌دهند، هم‌چنین پیش‌بینی شد که ناحیه مورد بررسی، حاوی توالی‌های حساس به آنزیم است که این خاصیت معمولاً در پرموتر ژن‌ها وجود دارد. علاوه بر این، در این ناحیه، متیلاسیون و استیلاسیون هیستون‌ها نیز پیش‌بینی شد که می‌تواند به بازشدن ساختار کروماتین و در دسترس قرارگرفتن ناحیه پرموتری ژن، برای فاکتورهای رونویسی موثر باشد. بنابراین وقوع جهش‌ها در این ناحیه، می‌تواند بر میزان اتصال فاکتورهای رونویسی، بسیار مهم و اثرگذار باشند. نتایج پایگاه‌های اینترنتی نشان داد که هر سه جهش (c.*146C>T, c.*144C>G و c.*143G>C) در یک توالی نوکلئوتیدی ۱۲ جفت‌بازی قرار دارند که حاوی یک محل اتصال توافقی برای فاکتور رونویسی MECP2 در ناحیه پرموتر ژن *TERT* است (5'-CCCCTGGGCCCT-3'). از آنجا که این فاکتور رونویسی، نقش مهارکنندگی در مسیر سیگنالینگ پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوزن (MAP کیناز) در سلول نرمال را دارد، بنابراین فرض می‌شود که این

توسط آن، سلول‌های توموری همراه با جهش‌های انکوژنی دیگر، خاصیت نامیرایی پیدا کنند (۲۸). بنابراین چنین نتایجی پیشنهاد می‌کند که برای درمان موثرتر بیماران سرطانی، تلاش‌ها باید بیشتر معطوف به ایجاد مهارکننده‌های موثر بالینی آنزیم تلومراز باشد. Juratli و همکارانش با تحقیق بر روی تومورهای مغزی از نوع مننژیومای بدخیم و مقاوم به درمان‌های رایج، به این نتیجه رسیدند که جهش‌ها در ناحیه پروموتور ژن *TERT* در عود مجدد سرطان و مقاومت به شیمی‌درمانی این نوع تومورها دخیل است (۲۹). در عین حال، جهش‌های پروموتوری، احتمالاً یک مکانیسم بالقوه برای فعال‌سازی ژن *TERT* در طیف متنوعی از سرطان‌های انسانی است.

نتیجه‌گیری

مکانیسم‌های حفظ تلومر در طول تکثیر DNA در سلول‌های توموری گلیوبلاستوما بسیار مهم هستند. جهش‌های ناحیه پروموتور ژن *TERT* مهم‌ترین تغییرات نوکلئوتیدی در گلیوبلاستوما هستند که نقش محوری در تومورزایی آن دارند. بنابراین، شناسایی جهش‌های ناحیه پروموتور ژن *TERT* ضروری است که در حال حاضر در کنار روش‌های تشخیصی گلیوبلاستوما، جهت انتخاب بهترین روش درمان هدفمند کاربرد دارد. در این پژوهش با مطالعه بر روی ۳۵ نمونه خون از بیماران ایرانی مبتلا به تومور مغزی بدخیم، از نوع گلیوبلاستوما مولتی‌فرم، ۳ جهش هتروزیگوت در ناحیه حساس و داغ، در هسته پروموتور ژن *TERT* شناسایی شد. اگرچه فعال‌سازی تلومراز در سلول‌های توموری، نقش کلیدی در فرآیند نامیرایی آن‌ها دارد، اما هنوز مکانیسم زیربنایی روند فعال‌سازی آن، در سرطان‌ها مبهم باقی مانده است. با این حال، کشف جهش‌های تکرارپذیر، در پروموتور *TERT* یک مکانیسم احتمالی را برای افزایش بیان آنزیم تلومراز، در سلول‌های سرطانی آشکار می‌کند. مطالعات عملکردی متعددی نیز نشان داده‌اند که وجود جهش‌های ناحیه پروموتور *TERT*، منجر به جلوگیری از مهار رونویسی آن و آغاز روند تومورزایی می‌شود.

جهش‌های ناحیه پروموتور *TERT* در سایر انواع سرطان‌ها نیز رخ می‌دهد یا خیر، ما نتایج تحقیقات گذشته را در مورد چندین سرطان بررسی کردیم. مطالعات متعددی وقوع جهش‌های ناحیه پروموتور *TERT* را در طیف وسیعی از انواع سرطان نشان می‌دهند. همگی آن‌ها از این فرضیه حمایت می‌کنند که این جهش‌های پروموتوری، ممکن است به‌عنوان رویدادهای محرکی عمل کنند که از طریق اختلال در تنظیم *TERT*، به فعالیت انکوژنی آن در روند تومورزایی کمک می‌کنند و حداقل در گلیوبلاستوما مولتی‌فرم انسان، تحت انتخاب مثبت قرار می‌گیرند. Vallarelli و همکارانش تایید کردند که جهش‌های سوماتیک منحصربه‌فردی همچون C>T در پروموتور *TERT* در موقعیت‌های ۱۲۴- (۱۲۹۵۲۲۸) و ۱۴۶- (۱۲۹۵۲۵۰) جفت باز، منجر به ایجاد یک موتیف اتصال جدیدی برای فاکتور فعال‌کننده رونویسی ETS می‌گردند و با افزایش بیان *TERT* در سلول‌های توموری همراه هستند. با این حال، اگرچه نقش تلومراز در تومورزایی به‌خوبی مشخص شده است، اما جزئیات مربوط به اختلال در تنظیم آن در سلول‌های سرطانی، به‌ویژه در گلیوبلاستوما کاملاً شناخته شده نیست. جهش‌های پروموتوری *TERT* شناسایی شده در این مطالعه، ممکن است به تنظیم بیان ژن تلومراز و فعال‌سازی روند تومورزایی در این بدخیمی مرتبط باشند. به‌ویژه، شیوع بالای جهش $146C>T$ در بیماران گلیوبلاستوما، نشان می‌دهد که این جهش در ناحیه پروموتوری *TERT* ممکن است جزو رویدادهای ژنتیکی اولیه در پیدایش این تومور مغزی و یا سایر انواع سرطان‌ها باشد. Huang و همکارانش، با مطالعه بر روی پروموتور ژن *TERT* در بیماران چینی مبتلا به انواع سرطان‌ها، دریافتند که جهش‌ها در ناحیه پروموتور ژن *TERT* اغلب در گلیوبلاستوما (۸۳/۹٪)، الیگودندروگلیوما (۷۰٪)، سرطان مجاری ادراری (Urinary tract cancers) (۶۴/۴٪)، کارسینوما سلول‌های کبدی (۳۱/۴٪) و مدولوبلاستوما (۳۳/۳٪) رخ می‌دهد (۲۷). اگرچه افزایش بیان *TERT* به‌تنهایی، برای دوززدن روند پیری، ناشی از فعالیت انکوژنی تلومراز کافی نیست، ولی فعال‌شدن بیش از حد *TERT* ژنومی، ممکن است مکانیسم‌هایی را تقویت کند که

سپاس‌گزاری

نویسندگان مقاله از حمایت‌های دانشگاه یزد در انجام این پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد تشکر و قدرانی می‌کنند. از بیمارستان‌های شهید رهنمون یزد، بیمارستان دکتر مرتاض یزد و مرکز پرتودرمانی شهید رمضان‌زاده یزد که بیماران را جهت این مطالعه ارجاع داده‌اند تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از همکاری ارزشمند تمام بیماران سپاسگزاریم.

حامی مالی: ندارد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد مورد تایید قرار گرفت

(IR.SSU.REC.1398.011) و تمامی رویه‌ها مطابق با اعلامیه هلسینکی (Declaration of Helsinki 1975)، اصلاح شده در سال ۲۰۰۸ و استانداردهای اخلاقی انجام شد.

مشارکت نویسندگان

محمد مهدی حیدری در ارائه ایده، محمد مهدی حیدری و مهتری خاتمی در طراحی مطالعه، فرزانه اولیا در جمع‌آوری داده‌ها، احسان ضیائی و محمدعلی برومند در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

References:

- 1-Schaff LR, Mellinshoff IK. *Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review*. JAMA 2023; 329(7): 574-87.
- 2-Lapointe S, Perry A, Butowski NAJTL. *Primary brain tumours in adults*. Seminar 2018; 392 (10145): 432-46.
- 3-Manoj L, Kalyani M, Jyothi K, Bhavani GG, Govardhani V, Srinivasan RJIJoP, et al. *Review of Brain and Brain Cancer Treatment* 2011; 2: 468-77.
- 4-DeAngelis LM. *Brain Tumors*. New England J medicine 2001; 344 (2): 114-23.
- 5-Lim L, Rosenthal M, Maartens N, Ryan GJImj. *Management of Brain Metastases*. Journal of neurology 2004; 34 (5): 270-8.
- 6-Wen PY, Loeffler JSJO. *Management of Brain Metastases*. 1999; 13 (7): :941-54.
- 7-Barnholtz-Sloan JS, Ostrom QT, Cote DJNc. *Epidemiology of Brain Tumors*. Neurologic clinics 2018; 36 (3): 395-419.
- 8-Sauvageot CM, Kesari S, Stiles CDJNc. *Molecular Pathogenesis of Adult Brain Tumors and the Role of Stem Cells*. Neurologic Clinics 2007; 25 (4): 891-924.
- 9-Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary*. Acta Neuropathologica 2016; 131 (6): 803-20.
- 10-Huse JT, Holland ECJNrc. *Targeting Brain Cancer: Advances in the Molecular Pathology of Malignant Glioma and Medulloblastoma*. Nature reviews cancer 2010; 10(5): 319.

- 11-Vega JE, Brat DJ. *Incorporating Advances In Molecular Pathology Into Brain Tumor Diagnostics*. Advances in Anatomic Pathology 2018; 25(3): 143-71.
- 12-Molinaro AM, Taylor JW, Wiencke JK, Wrensch MR. *Genetic and Molecular Epidemiology of Adult Diffuse Glioma*. Nature Reviews Neurology 2019; 15(7): 405-17.
- 13-Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, et al. *Glioma groups based on 1p/19q, IDH, and TERT promoter mutations in tumors*. New England J Medicine 2015; 372 (26): 2499-508.
- 14-Shergalis A, Bankhead A, Luesakul U, Muangsin N, Neamati NJPr. *Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma*. Pharmacological Reviews 2018; 70(3): 412-45.
- 15-Szopa W, Burley TA, Kramer-Marek G, Kaspera WJBri. *Diagnostic and Therapeutic Biomarkers in Glioblastoma: Current Status and Future Perspectives*. BioMed research international 2017; 2017.
- 16-Ramlee MK, Wang J, Toh WX, Li SJG. *Transcription Regulation of the Human Telomerase Reverse Transcriptase(Htert)Gene*. Genes 2016; 7(8): 50.
- 17-Cong Y-S, Wen J, Bacchetti SJHmg. *The Human Telomerase Catalytic Subunit Htert: Organization of the Gene and Characterization of the Promoter*. Human Molecular Genetics 1999; 8(1): 137-42.
- 18-Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW. *Roles of Telomeres and Telomerase in Cancer, and Advances in Telomerase-Targeted Therapies*. Genome Medicine 2016; 8(1): 69.
- 19-Sethi G. *Telomerase and Hallmarks of Cancer: An Intricate Interplay Governing Cancer Cell Evolution*. Cancer Letters 2023; 578: 216459.
- 20-Saretzki G. *Role of Telomeres and Telomerase in Cancer and Aging*. International Journal of Molecular Sciences 2023; 24(12): 9932.
- 21-Nonoguchi N, Ohta T, Oh JE, Kim YH, Kleihues P, Ohgaki H. *TERT Promoter Mutations in Primary and Secondary Glioblastomas*. Acta Neuropathologica 2013; 126: 931-7.
- 22-Simon M, Hosen I, Gousias K, Rachakonda S, Heidenreich B, Gessi M, et al. *Tert Promoter Mutations: A Novel Independent Prognostic Factor in Primary Glioblastomas*. Neuro-oncology 2015; 17(1): 45-52.
- 23-Mosrati MA, Malmström A, Lysiak M, Krysztofiak A, Hallbeck M, Milos P, et al. *TERT Promoter Mutations and Polymorphisms as Prognostic Factors in Primary Glioblastoma*. Oncotarget 2015; 6(18): 16663.
- 24-Arita H, Yamasaki K, Matsushita Y, Nakamura T, Shimokawa A, Takami H, et al. *A Combination of Tert Promoter Mutation and Mgmt Methylation Status Predicts Clinically Relevant Subgroups of Newly Diagnosed Glioblastomas*. Acta Neuropathologica Communications 2016; 4: 1-14.
- 25-Yuan Y, Qi C, Maling G, Xiang W, Yanhui L, Ruofei L, et al. *TERT Mutation in Glioma: Frequency, Prognosis and Risk*. Journal of Clinical Neuroscience 2016; 26: 57-62.
- 26-Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz Jr LA, et al. *TERT Promoter Mutations Occur Frequently in Gliomas and a Subset of Tumors Derived from Cells with Low*

- Rates of Self-Renewal*. Proceedings of the National Academy of Sciences 2013; 110(15): 6021-6.
- 27-Huang D-S, Wang Z, He X-J, Diplas BH, Yang R, Killela PJ, et al. **Recurrent TERT Promoter Mutations Identified in a Large-Scale Study of Multiple Tumour Types are Associated with Increased TERT Expression and Telomerase Activation**. European J Cancer 2015; 51 (8): 969-76.
- 28-Arita H, Ichimura K. **Prognostic Significance of TERT Promoter Mutations in Adult-Type Diffuse Gliomas**. Brain Tumor Pathology 2022; 39(3): 121-9.
- 29-Juratli TA, Thiede C, Krex D, Brastianos PK, Wakimoto H, Schackert G, et al. **TERT Promoter Mutations in Progressive Treatment-Resistant Meningiomas**. American Society of Clinical Oncology 2017; 64(CN_suppl_1): 236-7.

Studying the Pathogenic Effect of New Nucleotide Changes in the Promoter Region of the TERT Gene in Patients with Glioblastoma Brain Tumor

Farzaneh Owlia¹, Mohammad Mehdi Heidari^{*1}, Mehri Khatami¹,
Ehsan Ziaei², Mohammad Ali Broomand³

Original Article

Introduction: Brain tumors are considered to be one of the most dangerous types of cancer, despite decades of research and treatment efforts. The activation of the telomerase enzyme is a critical factor in the immortality of these cells. Mutations in the promoter region of the *TERT* gene, particularly in the promoter hot spots, can influence the binding of activating transcription factors and inhibit the binding of negative regulatory factors of the *TERT* gene, ultimately regulating the gene's expression. This study aimed to identify and investigate the mutations of the *TERT* gene promoter region in glioblastoma, a malignant brain tumor, using bioinformatics.

Methods: A study was conducted using the case-control method where 35 patients with glioblastoma multiform brain tumor were examined along with 40 people who were examined as control samples. In this research, the Touchdown PCR technique and direct DNA sequencing were used to detect mutations in the promoter region of the *TERT* gene in patients with glioblastoma. Furthermore, bioinformatic analyses were conducted to investigate the pathogenic effect of nucleotide changes in this gene region.

Results: In the core region of the *TERT* gene promoter, three-point mutations were identified (c.*146C>T, c.*144C>G and c.*143G>C). Two of these mutations were novel and have been observed for the first time in glioblastoma multiform. The remaining mutation was located in the promoter core's hot spot of the gene. This mutation was known as c.*146C>T.

Conclusion: In this research, the harmful impact of *TERT* promoter region mutations as a biomarker for glioblastoma was examined. These findings suggest that mutations in regulatory regions, as well as coding sequences, could be significant contributory factors in the process of carcinogenesis.

Keywords: Brain tumor, Telomerase, Glioblastoma multiform, *TERT* gene, Touchdown PCR, Bioinformatics.

Citation: Owlia F, Heidari M.M, Khatami M, Ziaei E, Broomand M.A. **Studying the Pathogenic Effect of New Nucleotide Changes in the Promoter Region of the TERT Gene in Patients with Glioblastoma Brain Tumor.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2024; 32(3): 7645-59.

¹Department of Biology, Yazd University, Yazd, Iran.

²Department of Neurosurgery, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

³Clinical Oncology Department, Shahid Ramazan Zadeh Clinic, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

***Corresponding author: Tel:** 035-31233381, **email:** heidarimm@yazd.ac.ir