

اثر بیان اگزورنوس ژن TP53 حمل شده توسط دندروزوم در سلولهای لنفومای T و لوکمیی انسانی

محمد معصومی، M.Sc.*؛ عبدعلی ضیایی، Ph.D.*؛ محمدنبی سربلوکی، Ph.D.*

پژوهشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک (I.B.B)

* پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی

پست الکترونیک: Email:massumi@royaninstitute.org

مکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۹/۲۲، پذیرش مقاله: ۸۳/۱۲/۳

*** هدف:** ارزیابی تاثیر بیان cdNA ژن TP53 در آپوپتوز رده‌های سلولی T لنفومای MOLT-4، CCRF-CEM و اریترولوکمیک K562

*** مواد و روشها:** در ابتدا پلاسمید pc53-SN3 حاوی cdNA ژن TP53 نرمال انسان به طور جداگانه توسط دو وکتور غیرویروسی دندروزوم و لیپوفکتین وارد سلولهای CCRF-CEM، MOLT-4 (هر دو جز T لنفوماها هستند) و سلولهای اریترولوکمیک K562 شدند. سپس میزان قدرت بقاء توسط رنگ آمیزی تریپان بلو تعیین شد. به منظور بررسی آپوپتوز و نکروز در سلولهای ترانسفکت شده از تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد. همچنین سلولهای رنگ شده توسط مواد فلوروسنت در زیر میکروسکوپ فلوروسنت مورد بررسی قرار گرفتند.

*** یافته‌ها:** ارزیابی قدرت بقاء در سلولهای CCRF-CEM و K562 ترانسفکت شده با Dend+p53 به ترتیب ۵۵/۸ درصد و ۱۷/۹ درصد کاهش قدرت بقاء نسبت به نمونه‌های کنترل (Dend+pcDNA3) نشان داد در حالی که سلولهای MOLT-4 ترانسفکت شده هیچ گونه تغییر قابل توجهی در میزان قدرت بقاء از خود نشان ندادند. مطالعات فلوسایتومتری در مورد سلولهای CCRF-CEM و K562 ترانسفکت شده با p53 افزایش قابل توجهی در میزان آپوپتوز و نکروز این سلولها را نشان داد. بازده ترانسفکشن وکتور دندروزوم در مورد سلولهای K562 بسیار بیشتر از لیپوفکتین بود.

*** نتیجه گیری:** وارد شدن cdNA ژن TP53 و بیان پروتیین p53 در درون سلولهای CCRF-CEM و K562 باعث افزایش میزان آپوپتوز در این سلولها می‌شود در حالی که بیان این پروتیین در مورد MOLT-4 هیچ گونه تاثیری بر روی این رده سلولی ندارد. از طرف دیگر بازده ترانسفکشن وکتورهای مختلف بستگی به نوع آن سلول دارد.

کل واژگان: TP53، دندروزوم، T لنفوما، لوکمیا، آپوپتوز

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، زمستان ۸۳، شماره ۲۴، صفحات ۲۰۶ - ۲۱۱

مقدمه

مهارکننده تومور p53، پروتیینی با چندین عملکرد مختلف است که می‌تواند باعث القاء آپوپتوز در بعضی از سلولهای سرطانی گردد. غیر فعال شدن p53 در بیش از نیمی از انواع سرطانهای انسانی مشاهده می‌شود (۱، ۲). مطالعات زیادی نشان داده‌اند که p53 با عملکرد Trans-activation خود و اتصال به پروموتورهای ژنهای القاء کننده مرگ در سلول، باعث آپوپتوز می‌شود (۳، ۴، ۵، ۶).

در میان تمام ژنهای القاء کننده آپوپتوز که در ژن درمانی سرطان به کار می‌روند، ژن TP53 از اهمیت خاصی برخوردار است (۷، ۸) ژن درمانی سرطان به وسیله TP53 به چند دلیل حائز اهمیت است: ۱- ژن TP53 در بسیاری از سرطانها غیرفعال است؛ ۲- p53 باعث القاء بیان چندین ژن درگیر در آپوپتوز می‌شود، که این خاصیت علاوه بر اثر توقف سیکل سلولی این پروتیین است؛ ۳- p53 باعث القاء تولید یک سری پروتیینهای ترشعی می‌شود که این پروتیینهای ترشعی مرگ سلولی را به پیش می‌برند، بنابراین علاوه بر خود سلول، سلولهای همسایه

نیز تحت تاثیر مرگ سلولی قرار می‌گیرند که این یک مزیت مهم در ژن درمانی سرطان به شمار می‌رود. تحقیقات زیادی نشان داده‌اند که با بازسازی بیان ژن TP53 در سلولهای سرطانی، می‌توان از رشد سلولها جلوگیری کرده و باعث مرگ آنها شد (۹، ۱۰).

Buttgereit و همکارانش با ترانسفکت کردن سلولهای لنفومای B انسانی به وسیله ژن TP53 حمل شده توسط آدنو ویروس توانستند باعث افزایش میزان آپوپتوز و نکروز در این سلولها گردند (۱۱)، اما تاکنون گزارشات زیادی در رابطه با ترانسفکشن سلولهای لنفومای T انسانی به وسیله ژن TP53 منتشر نشده است. در این مطالعه، از دو رده سلولی لنفومای T یعنی CCRF-CEM و MOLT-4 استفاده شد که اولی ژن TP53 را به صورت موتانت و دومی ژن TP53 را به صورت نرمال بیان می‌کند (۱۲، ۱۳).

لیپوزومها و به ویژه لیپوزومهای کاتونیک از وکتورهای غیر ویروسی بسیار مهم در ژن درمانی سلولهای یوکاریوتی و بافتهای توموری به حساب می‌آیند (۱۴، ۱۵). علی‌رغم کاربردهای وسیع آنها، لیپوزومها

پس از ترانسفکشن، سلولهای ترانسفکت نشده (کنترل)، ترانسفکت شده با پلاسמיד pc53-SN3 توسط لیپوفکتین یا دندروزوم، ترانسفکت شده با پلاسמיד pcDNA3 توسط لیپوفکتین یا دندروزوم، سلولهای تیمار شده با لیپوفکتین، دندروزوم (بدون پلاسמיד pc53-SN3) یا پلاسמיד pc53-SN3 به تنهایی و بدون وکتور از لحاظ قدرت بقاء مورد ارزیابی قرار گرفتند.

فلوسایتومتری (Flow-cytometry)

برای اندازه گیری میزان آپوپتوز، ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن سلولها تحت رنگ آمیزی دوگانه Annexin V-FITC/PI قرار گرفتند. Annexin V به طور اختصاصی به مولکولهای فسفاتیدیل سرین موجود در غشاء سلولهای آپوپتوز شده متصل می شوند. کیت شناسایی آپوپتوز حاوی Annexin V-FITC از شرکت IQ product هلند خریداری شد. برای رنگ آمیزی ابتدا 5×10^5 سلول با PBS سرد شسته شدند. سپس $500 \mu\text{L}$ binding buffer حاوی $50 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC و $10 \mu\text{L}$ PI (۱۰ میکروگرم بر میلی گرم) به سلولها اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. سلولهای رنگ شده توسط Coulter Epics XL cytometer (Coulter Epics XL cytometer) مورد آنالیز قرار گرفتند. سلولهای که در مراحل اولیه آپوپتوز باشند تنها توسط Annexin V-FITC رنگ می شوند در حالی که سلولهای که در مرحله پایانی آپوپتوز یا مرحله نکروز قرار دارند با هر دو رنگ Annexin V-FITC و PI رنگ می شوند.

یافته‌ها

اثرات Dend+p53 و Lipo+p53 بر روی رشد سلول

سلولهای ترانسفکت نشده، Dend+pcDNA3 و Lipo+pcDNA3 به عنوان کنترل به کار رفتند. هر رده سلولی به طور جداگانه با Dend+p53 (پلی پلکسی از دندروزوم و cdNA نرمال ژن TP53) یا Lipo+p53 (لیپوپلکسی از لیپوفکتین و cdNA نرمال ژن TP53) ترانسفکت شدند و نتایج با یکدیگر و با کنترلها مورد مقایسه قرار گرفتند، تعیین قدرت بقاء هر ۲۴ ساعت تا ۵ روز انجام شد. همان طوری که در شکل ۱A مشاهده می شود ترانسفکشن سلولهای K562 به وسیله Dend+p53 و Lipo+p53 باعث کاهش قدرت بقاء به میزان $97 \pm 5/85$ درصد ($p < 0/05$) و $96 \pm 3/54$ درصد ($p < 0/05$) در مقایسه با کنترلهاشان یعنی Dend+pcDNA3 و Lipo+pcDNA3 می شوند. در رده سلولی CCRF-CEM سلولهای ترانسفکت شده با Dend+p53 و Lipo+p53 به ترتیب $10 \pm 3/97$ درصد ($p < 0/05$) و $98 \pm 2/96$ درصد ($p < 0/05$) کاهش قدرت بقاء نسبت به کنترلهاشان نشان دادند (شکل ۱B). ترانسفکشن MOLT-4 با Dend+p53 یا Lipo+p53 هیچ گونه تغییر قابل توجهی در میزان قدرت بقاء این سلولها در مقایسه با کنترلهاشان نشان نداد.

دارای چندین عیب هستند. برای مثال لیپوزومها از لحاظ انتقال ژن به سلولهای لنفوما و لوکمیا بازده خوبی ندارند و معمولا دارای عوارض جانبی چون سیتوتوکسیسیته هستند (۱۶). در این مطالعه علاوه بر وکتور تجاری لیپوفکتین از وکتور دندروزوم ساخت داخل برای ترانسفکشن سلولها استفاده شد و نتایج با یکدیگر مقایسه گردید. مطالعات قبلی نشان داد که دندروزوم دارای یک بازده بالا برای انتقال ژن به سلولهای کبدی و کلیوی انسانی است (۱۷).

مواد و روشها

رده‌های سلولی

رده‌های سلولی MOLT-4، CCRF-CEM (هر دو جزء رده‌های T لنفوما انسانی هستند) و اریترولوکمیک K562 در این تحقیق به کار رفتند. تمام این رده‌های سلولی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلولها در محیط کشت RPMI 1640 (Gibco) حاوی ده درصد FCS (Biochrom, Berlin, Germany) کشت داده شدند. برای جلوگیری از آلودگی محیط کشت از (Sigma) استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و (Sigma) پنی سیلین (۱۰۰ U/ml) استفاده شد. سلولها برای رشد در انکوباتور ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

پلاسمیدها

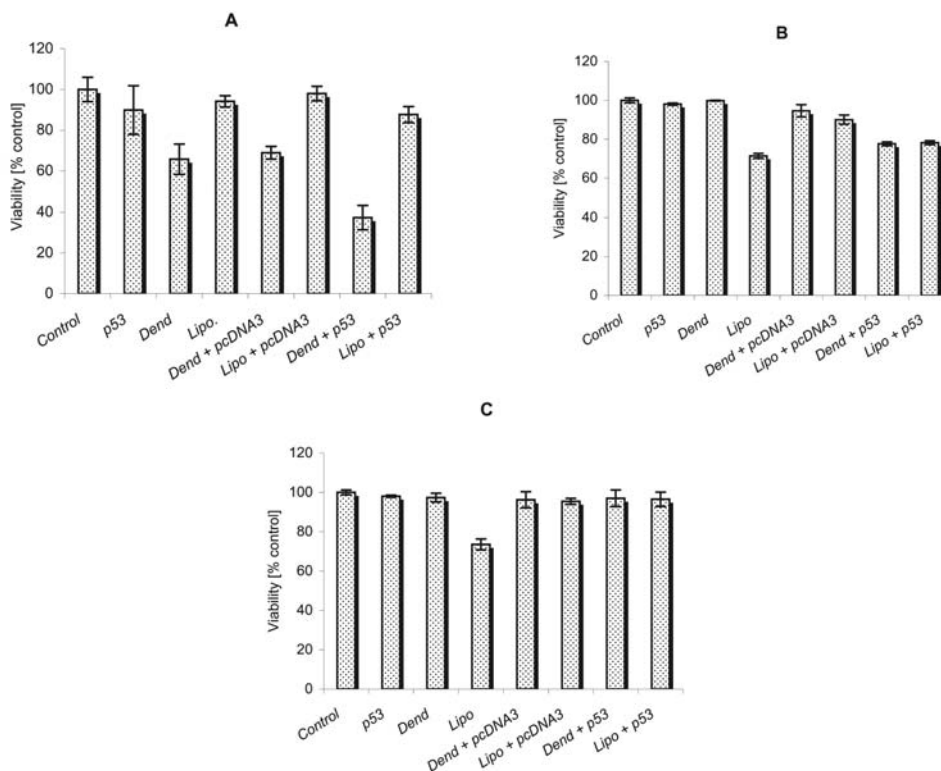
در این مطالعه از پلاسמיד pc53-SN3 که حاوی cdNA ژن TP53 است استفاده شد (۱۸، ۱۹)، برای ساخت این پلاسמיד cdNA ژن TP53 وارد جایگاه Bam HI پلاسמיד pCMV-Neo-Bam شد (۲۰). چندین مطالعه با استفاده از پلاسמיד pc53-SN3 بر روی چند رده از سلولهای انسانی نشان داد که این پلاسמיד می تواند به میزان زیادی پروتئین p53 را بیان می کند (۱۸، ۱۹). در این پلاسמיד علاوه بر پروموتور سیتومگالو ویروس، نواحی تشدید کننده (enhancer) و بیان اپی زومال p53 (episomal) در فرادست وجود دارد. در این مطالعه برای پلاسמיד کنترل از پلاسמיד pcDNA3 استفاده شد که از بسیاری جهات مشابه pc53-SN3 است با این تفاوت که در این پلاسמיד cdNA ژن TP53 وجود ندارد.

ترانسفکشن رده‌های سلولی

هر کدام از سه رده سلولی به طور جداگانه بوسیله لیپوفکتین (Lipofectin™ reagent, Life Technologies, USA) و دندروزوم (یک نانوپارسیکل اسفروبییدی دندریتیک که در I.B.B سنتز می شود) ترانسفکت شدند (۱۴).

مطالعات قدرت بقاء (Viability Studies)

قدرت بقاء سلولها توسط رنگ آمیزی تریپان بلو اندازه گیری شد.



شکل ۱. اثر بیان ژن TP53 بر روی قدرت بقاء سلولهای K526(A), CCRF-CEM(B) و MOLT-4(C) control: سلولهای ترانسفکت نشده؛ p53: سلولهای که تنها با pc53-SN3 تیمار شده‌اند؛ Dend: سلولهای که تنها با دندروزوم تیمار شده‌اند؛ Lipo: سلولهای که تنها با لیپوفکتین تیمار شده‌اند؛ Dend pcDNA3: سلولهای که با پلی‌پلکس دندروزوم و pcDNA3 ترانسفکت شده‌اند؛ Lipo+ pcDNA3: سلولهای که با پلی‌پلکس دندروزوم و pcDNA3 ترانسفکت شده‌اند؛ Dend+p53: سلولهای که با پلی‌پلکس دندروزوم و p53 ترانسفکت شده‌اند؛ Lipo+ p53: سلولهای که با پلی‌پلکس دندروزوم و p53 ترانسفکت شده‌اند؛ Dend+p53: سلولهای که با پلی‌پلکس دندروزوم و p53 ترانسفکت شده‌اند؛ Lipo+p53: سلولهای که با پلی‌پلکس دندروزوم و p53 ترانسفکت شده‌اند. پس از ۷۲ ساعت قدرت بقاء تعیین شد. داده‌ها مربوط به چهار آزمایش جداگانه هستند. داده‌ها به صورت

جدول ۱. القاء آپوپتوز و نکروز در سلولهای لنفوما و لوکیمای ترانسفکت شده با Dend+p53 و Lipo+p53

رده سلولی		کنترل	Dend+pcDNA53	Dend+p53	Lipo+pcDNA3	Lipo+p53	Pvalue
K562	آپوپتوز	۸/۸ ± ۱/۳	۲۲/۱ ± ۱/۴	۴۱/۰ ± ۱/۴	۱۲/۱ ± ۸/۲	۲۱/۳ ± ۴/۰	۰/۰۰۱۹
	نکروز	۱۰/۲ ± ۰/۳	۱۵/۲ ± ۱/۴	۱۷/۴ ± ۳/۱	۱۳/۰ ± ۱/۲	۱۴/۶ ± ۱/۰	۰/۰۴۳۰
	تعداد سلول	۱۰۰/۰ ± ۶/۰	۶۸/۹ ± ۱/۳	۳۷/۴ ± ۵/۹	۹۸/۰ ± ۳/۵	۸۷/۶ ± ۴/۰	۰/۰۰۱۴
CCRF-CEM	آپوپتوز	۸/۷ ± ۳/۱	۱۰/۱ ± ۴/۵	۲۱/۵ ± ۱/۳	۱۲/۴ ± ۵/۲	۲۰/۹ ± ۵/۱	۰/۰۰۵۰
	نکروز	۶/۹ ± ۰/۴	۱۴/۹ ± ۱/۲	۱۳/۹ ± ۰/۶	۱۶/۸ ± ۴/۵	۱۹/۳ ± ۱/۸	۰/۰۴۸۰
	تعداد سلول	۱۰۰/۰ ± ۱/۳	۹۴/۶ ± ۶۳/۱	۷۷/۶ ± ۱/۰	۹۰/۰ ± ۲/۴	۷۸/۲ ± ۰/۹	۰/۰۱۵۰
MOLT-4	آپوپتوز	۹/۳ ± ۰/۴	۱۰/۵ ± ۱/۲	۱۱/۳ ± ۴/۹	۱۳/۲ ± ۱/۲	۱۴/۹ ± ۳/۱	۰/۰۹۵
	نکروز	۸/۳ ± ۱/۱	۱۲/۲ ± ۰/۰	۹/۸ ± ۳/۲	۱۴/۵ ± ۰/۶	۱۵/۲ ± ۶/۳	۰/۰۴۲
	تعداد سلول	۱۰۰/۰ ± ۱/۰	۹۹/۱ ± ۱/۶	۹۸/۹ ± ۱/۳	۹۹/۸ ± ۰/۹	۱۰۰/۰ ± ۱/۰	۰/۰۳۱

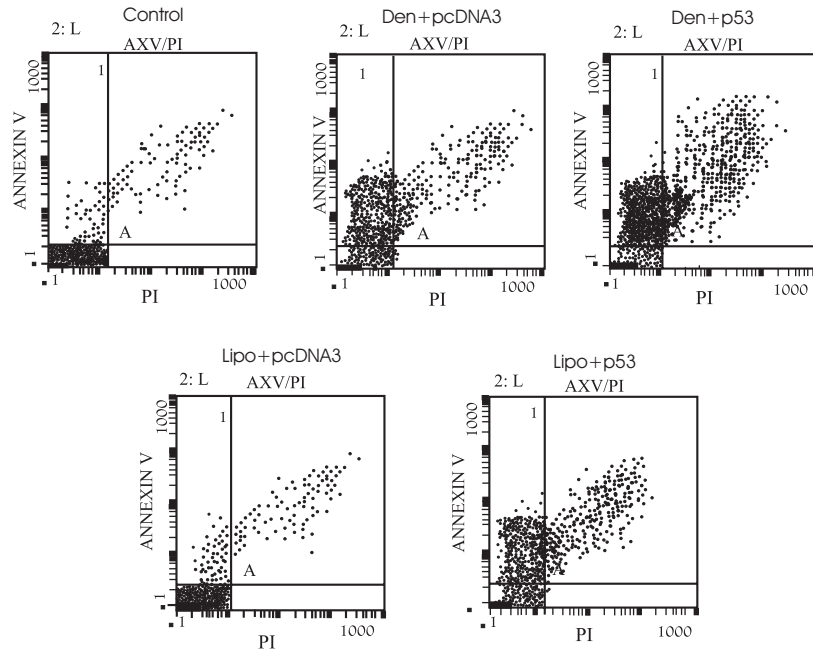
پس از ترانسفکشن؛ تعداد سلولها (درصد کنترل)، درصد آپوپتوز (تنها توسط annexin V-FITC رنگ آمیزی می‌شوند) و درصد نکروز (توسط هر دو رنگ FITC/PI رنگ می‌شوند) توسط آنالیز فلوسایتومتری پس از ۷۲ ساعت مشخص شد. میانگین و انحراف معیار چهار آزمایش جداگانه مشاهده می‌شود.

مطالعات فلوسایتومتری

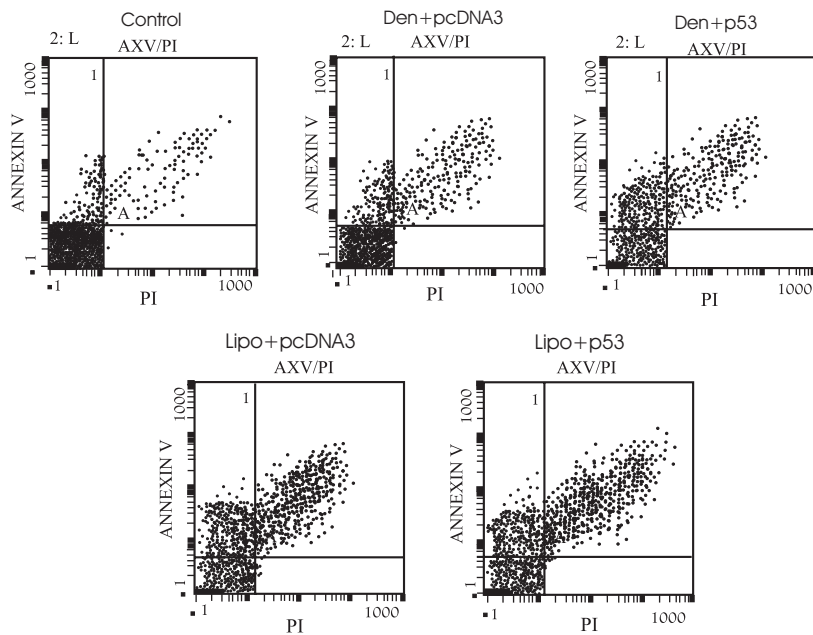
برای بررسی ارتباط بین توقف رشد سلولی در سلولهای ترانسفکت شده با p53، با مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوز) از آنالیز فلوسایتومتری annexin V-FITC/PI استفاده شد.

همچنان که در تصویر ۱ و جدول ۱ نشان داده شده است ترانسفکشن سلولهای K562 و CCRF-CEM با Dend+p53 یا Lipo+p53 دارای سطح اثر مهارتی متفاوتی بر روی این سلولها است. هیچ کدام از این رده‌های سلولی به طور کامل مهار رشد را نشان ندادند.

K562



CCRF-CEM



شکل ۲: تعیین آپوپتوز و نکروز در سلولهای K562 و CCRF-CEM به وسیله رنگ‌آمیزی دوگانه annexin V-FITC/PI. سلولها با Dend+p53 و Lipo+p53 ترانسفکت شدند. سلولهای ترانسفکت نشده به عنوان کنترل به کار رفتند. در روز سوم پس از ترانسفکشن رنگ‌آمیزی PI/annexin V انجام شد. سلولهای Annexin V مثبت و PI منفی نشان‌دهنده بخش آپوپتوزی هستند که در نمودارهای فلوسایتومتری در مستطیل بالا سمت چپ واقع می‌شوند؛ سلولهای مرحله انتهایی آپوپتوز و سلولهای مرحله نکروز در مستطیل بالا سمت راست واقع می‌شوند.

آپوپتوتیک شود. در این مرحله به دلیل اینکه کنترل نفوذپذیری غشاء هنوز از بین نرفته است PI نمی‌تواند وارد سلول شود. در مرحله انتهایی آپوپتوز و مرحله نکروز به دلیل از بین رفتن کنترل نفوذپذیری غشاء، سلولها توسط annexin V و PI رنگ می‌شوند. همچنان که در تصویر ۲ و جدول ۱ مشاهده می‌شود در سلولهای K562، آپوپتوز (مراحل اولیه

در مراحل اولیه آپوپتوز به دلیل از بین رفتن نامتقارنی (asymmetry) غشاء سلول، فسفاتیدیل سرین از لایه داخل غشاء سلولی به لایه خارجی غشاء منتقل می‌شود و بنابراین annexin V می‌تواند به این فسفولیپید متصل شود و باعث شناسایی سلولهای

CEM که پروتیین p53 را به صورت موتانت بیان می کند، ترانسفکشن سلولها TP53 باعث افزایش آپوپتوز به طور معنی دار در سلولها می شود اما این افزایش آپوپتوز در مقایسه با سلولهای K562 ترانسفکشن شده کمتر است. مشکل مهم در بیان اگزوژنوس پروتیین نرمال p53 در این رده سلولی، وجود پروتیین p53 موتانت در این رده سلولی است که به صورت اندوژنوس بیان می شود. تحقیقات زیادی نشان داده است که وجود پروتیین p53 موتانت در یک سلول باعث تغییر شکل فضایی پروتیین p53 نرمال در آن سلول می شود و p53 نرمال فعالیت خود را از دست خواهد داد (۲۹، ۲۸، ۲۷، ۱۹).

از طرف دیگر وجود موتاسیون در ژنهایی که در پایین دست مسیر آپوپتوزی p53 عمل می کنند می تواند عملاً اثر p53 را خنثی کند (۳۰). با توجه به این دو موضوع در مورد رده سلولی CCRF-CEM می توان این گونه استنباط کرد که ترانسفکشن این رده سلولی با TP53 نرمال نتواند میزان آپوپتوز را مثل سلولهای K562 ترانسفکشن شده بالا ببرد.

مطالعات قدرت بقاء و فلوسایتومتری در مورد MOLT-4 که پروتیین نرمال p53 را به صورت اندوژنوس بیان می کند هیچ تغییری در قدرت بقاء و میزان آپوپتوز در سلولهای MOLT-4 ترانسفکشن شده با TP53 نرمال نشان نداد. با توجه به بیان نرمال اندوژنوس p53 در این رده سلولی (۱۳) می توان دو دلیل برای این موضوع ارائه داد: اولاً تحقیقات نشان داده است که بعضی از سلولهای توموری مهارکننده های p53 را به صورت زیاد بیان (over express) می کنند

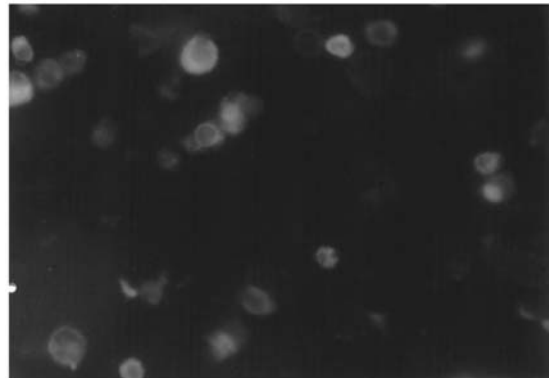
بنابراین از عملکرد پروتیین p53 جلوگیری می کنند از مهارکننده های p53 می توان به پروتیینهای سلولی Ham-2/mdm-2 و p53CP و پروتیین ویروسی E6 اشاره کرد. دوماً p53 برای فعالیت خود احتیاج به یک سری کوفاکتورهایی از قبیل P300/CBP، P85، HMG-1، ATM، ING-1 و P33 دارد و فقدان این کوفاکتورها حتی در حضور p53 نرمال نمی تواند به آپوپتوز ختم شود (۳۱). بنابراین ترانسفکشن سلولهای MOLT-4 با Dend+p53 یا Lipo+p53 بدون در نظر گرفتن شرایط داخلی سلول نمی تواند به آپوپتوز یا مهار رشد منجر شود.

مطالعات ما نشان داد که دندروزوم در مقایسه با لیسوفکتین یک وکتور مناسب برای ترانسفکشن سلولهای K562 است در حالی که در مورد سلولهای T لنفوما یعنی CCRF-CEM و MOLT-4 لیسوفکتین به طور جزئی دارای بازده ترانسفکشن بهتری نسبت به دندروزوم بود.

تقدیر و تشکر

از سرکار خانم فرزانه پورعسگری که در انجام این تحقیق ما را همراهی کرده اند بسیار سپاسگزاریم، همچنین از سرکار خانم دکتر آقائی پور و سرکار خانم دکتر خیراندیش مسئولین محترم بخش فلوسایتومتری سازمان انتقال خون ایران به خاطر مساعدتهای ایشان در مورد انجام تکنیک فلوسایتومتری قدردانی می نمایم.

و انتهائی) در ۵۸/۴ درصد از سلولهای ترانسفکشن شده با Dend+p53 و در ۳۵/۹ درصد از سلولهای ترانسفکشن شده با Lipo+p53 مشاهده می شود. میزان آپوپتوز در سلولهای CCRF-CEM که پروتیین موتانت p53 را بیان می کنند به ترتیب برای ترانسفکشن با Dend+p53 و Lipo+p53 برابر ۳۵/۱ درصد و ۴۰/۲ درصد بود. سلولهای MOLT-4 ترانسفکشن شده با Dend+p53 یا Lipo+p53 هیچ گونه افزایش آپوپتوزی را نسبت به کنترل نشان ندادند (جدول ۱). در اینجا نیز مانند نتایج قدرت بقاء مشاهده می شود که سطح آپوپتوز در سلولهای ترانسفکشن شده بستگی به نوع بیان اندوژنوس پروتیین p53 در این سلولها دارد.



شکل ۲. عکس میکروسکوپی فلوروسنت سلولهای K562 ترانسفکشن شده با Dend+p53 پس از رنگ آمیزی با annexin V-FITC/PI (بزرگنمایی ۴۰۰×) تصویر رنگی در انتهای مقالات

بحث

بسیاری از روشهای درمان سرطان که باعث مرگ سلولهای سرطانی می شوند از طریق القاء آپوپتوز به وسیله پروتیین p53 عمل می کنند (۷، ۸، ۲۱). ژن TP53 به عنوان مهم ترین ژن دارای موتاسیون در بین ژنهای مهار کننده تومور شناخته می شود (۱، ۲، ۲۲). این ژن در پاسخ به محرکهای چون آسیبهای ژنی، تخریبات DNA و استرسهای اکسیداتیو بیان می شود و باعث شروع آپوپتوز می گردد (۲۳، ۲۴، ۲۵). بنابراین ژن TP53 به عنوان یک کاندیدای مناسب برای ژن درمانی سلولهای بدخیم مورد توجه قرار گرفته است. سلولهای لنفوما و لوکیما هدفهای مناسبی برای ژن درمانی به حساب می آیند (۱۱، ۲۶). اغلب گزارشات ژن درمانی به واسطه TP53 مربوط به B لنفوماها است و گزارشات کمی در مورد ژن درمانی با استفاده از TP53 نرمال در سلولهای لنفوما T وجود دارد.

نتایج این تحقیق نشان داد که بیان ژن نرمال TP53 در رده سلولی K562 که پروتیین p53 را به صورت اندوژنوس بیان نمی کند باعث افزایش آپوپتوز و نکروز در این رده سلولی می شود. میزان آپوپتوز در سلولهای K562 ترانسفکشن شده با Dend+p53 تقریباً دو برابر سلولهای ترانسفکشن شده با Lipo+p53 بود که نشان دهنده بازده بالای ترانسفکشن دندروزوم در این رده سلولی است. در رده سلولی CCRF-

References

1. Vogelstein B, Kinzler KW. P53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70: 523-526
2. Levine AJ. P53 the cellular gate keeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323-331
3. Attardi LD, Lowe SW, Brugarolas J, Jacks T. Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. *EMBO J* 1996; 15: 3693-3701
4. Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptosis response of tumor cells. *Genes Dev* 1996; 10: 2348-2451
5. Roemer K, Mueller LN. P53 transactivation domain mutant q22, S23 is impaired for repression of promoters and mediation of apoptosis. *Oncogene* 1996; 12: 2069-2079
6. Yonish RE, Deguin V, Zaitchouk T, Breugnot C, Mishal Z. Transcriptional activation plays a role in the induction of apoptosis by transiently transfected wild-type p53. *Oncogene* 1996; 12: 2197-2205
7. Bookstain R, Demers W, Gregory R, Maneval D, Park J, Wills K. P53 gene therapy in vivo of hepatocellular and liver metastatic colorectal cancer. *Semin Oncol* 1996; 23: 66-77
8. Boulikas T. Gene therapy of prostate cancer: p53, suicidal genes, and other targets. *Anticancer Res* 1997; 17:1471-505
9. Zhang WW, Fang X, Mazur W. High efficiency gene transfer and high-level expression of wild-type p53 in human lung cancer cell mediated by recombinant adenovirus. *Cancer Gene Ther* 1994; 1: 5-13
10. Wills KN, Maneval DC, Menzel P. Development and characterization of recombinant adenoviruses encoding human p53 for gene therapy of cancer. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 1079-1088
11. Buttgerit P, Schakowski F, Marten A, Brand K, Renoth S. Effects of adenoviral wild-type p53 gene transfer in p53-mutated lymphoma cells. *Cancer Gene Ther* 2001; 8: 430-439
12. Rafki N, Roger FL, Devry L, Trentesaux C, Dufer J. p53 protein expression in human multidrug-resistant CEM lymphoblasts. *Leuk Res* 1997; 21: 147-152
13. Nakano H, Kohara M, Shinohara K. Evaluation of the relative contribution of p53-mediated pathway in X-ray-induced apoptosis in human leukemic MOLT-4 cells by Transfection with a mutant p53 gene at different expression levels. *Cell Tissue Res* 2001; 306: 101-106
14. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW. Lipofectin: a highly efficient, lipid-mediated DNA Transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7413-7417
15. Maruyama K, Ishida O, Takizawa T, Moribe K. Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes. *Adv Drug Del Rev* 1999; 40: 89-102
16. Buttgerit P, Weineck S, Ropke G, Marten A, Brand K. Efficient gene transfer into lymphoma cells using adenoviral vectors combined with lipofectin. *Cancer Gene Ther* 2000; 7: 1145-1155
17. Sabolouki MN, Sadeghizadeh M, Yaghoobi MM, Karami A, Lohrasbi T. Dendrosomes: a novel family of vehicles for transfection and therapy. *J Chem Tech Biotech* 2000; 75: 919-22
18. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 1990; 249: 912-915
19. Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW and Vogelstein B. Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* 1992; 256: 826-830
20. Karasuyama H, Tohyama N, Tada T. Autocrine growth and tumorigenicity of interleukin 2-dependent helper T cells Transfection with IL-2 gene. *J Exp Med* 1989; 169: 13-25
21. Shimada H, Matsubara H, Ochiai T. p53 gene therapy for esophageal cancer. *J Gastroenterol* 2002; 14: 87-91
22. Nielsen LL, Maneval DC. P53 tumor-suppressor gene therapy for cancer. *Cancer Gene Ther* 1998; 5: 52-63
23. Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC. Identification of a p53-dependent negative response element in the Bcl-2 gene. *Cancer Res* 1994; 54: 3131-3135
24. Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Vane Dyke T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 1997; 385: 637-640
25. Yin Y, Terauchi Y, Solomon GG, Aizawa S, Rangavajan PN, Yazaki Y, Kadowak T, Barrett JC. Involvement of p85 in p53-dependent apoptosis response to oxidative stress. *Nature* 1998; 391: 707-710
26. Ramqvist T, Magnusson KP, Wang Y. Wild-type p53 induces apoptosis in a Burkitt lymphoma (BL) line that carries mutant p53. *Oncogene* 1993; 8: 1495-1500
27. Milner J, Medcalf EA. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 1991; 65: 765-774
28. Roemer K. Mutant p53: Gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biol Chem* 1999; 380: 879-887
29. Zambetti GP, Levine AJ. A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *FASEB J* 1993; 7: 855-865
30. Wu GS, El-Deiry WS. Apoptotic death of tumor cells correlates with chemosensitivity, independent of p53 or bcl-2. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 623-633
31. Maki CG, Huibregtse JM, Howley PM. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Res* 1996; 56: 2649-2654

