

مقاله اصلی

بررسی تغییرات نوکلئوتیدی ژن *LMO1* به عنوان یک تنظیم کننده مثبت نسخه برداری در بیماران مبتلا به تومورهای مغزی از نوع گلیوبلاستوما

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۷

خلاصه

مقدمه: گلیوبلاستوما یکی از بدخیم ترین تومورهای مغزی است که به عنوان تومورهای اولیه اپیتلیال عصبی نیز شناخته می شود. تومورهای بدخیم گلیوبلاستوما در حدود ۴۰٪-۲۰ موارد از تومورهای مغزی را شامل می شوند. ژن *LMO1* در موقعیت 11p15.4 قرار دارد و به عنوان انکوژن در برخی سرطان ها معرفی می شود. این مطالعه، برای اولین بار در ایران، جهت شناسایی و بررسی ارتباط جهش های ژن *LMO1* با گلیوبلاستوما، انجام شده است.

روش کار: در این تحقیق، از تکنیک Touchdown PCR و روش تعیین توالی DNA، در ۳۵ نمونه ی خون افراد مبتلا به گلیوبلاستوما ی مولتی فرم و ۴۰ نمونه شاهد استفاده شد. همچنین آنالیزهای بیوانفورماتیکی، برای بررسی اثر پاتوژنستی تغییرات نوکلئوتیدی در این ژن انجام شد.

نتایج: طی این مطالعه، چهار جهش نقطه ای شناسایی شد که دو تا از جهش های جدید، بدمعنی بوده و منجر به تغییر اسید آمینه در یکی از دامین های مهم پروتئین می شدند (p.N148H و p.M135K) که نشان دهنده اهمیت بالقوه بیماریزایی آنها است. نتایج مطالعه ما در چندین پایگاه داده بیوانفورماتیکی، پیش بینی کرد که هر دو این جهش ها بر عملکرد پروتئین اثر گذار هستند، بگونه ای که می توانند این دامین را مختل کرده و عملکرد آن را دچار نقص کنند. همچنین، یک تغییر نوکلئوتیدی هم در ناحیه 3'UTR این ژن مشاهده شد (c.*74A>G) که در جایگاه اتصال دو miRNA تنظیمی قرار دارد و پیش بینی می شود بتواند اتصال این miRNA ها به توالی هدف را مختل کند.

نتیجه گیری: یافته های مطالعه حاضر پیش بینی می کنند که هرگونه جهش در دامین های حساس LIM در ژن *LMO1* به طور قابل توجهی با بیماریزایی گلیوبلاستوما ی مولتی فرم مرتبط هستند و به احتمال زیاد بر عملکرد این کوفاکتور نسخه برداری تاثیر بسزایی دارند.

کلمات کلیدی: تومورهای مغزی، تعیین توالی، گلیوبلاستوما ی مولتی فرم، ژن *LMO1*، Touchdown PCR

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می باشد.

حدیث محمدی^۱

محمد مهدی حیدری^{۲*}

مهری خاتمی^۳

احسان ضیایی^۴

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

^۲ دانشیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران، (نویسنده مسئول)

^۳ دانشیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

^۴ متخصص بیماری های مغز و اعصاب (نورولوژی)، گروه جراحی مغز و اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

Email: heidarimm@yazd.ac.ir

مقدمه

تومورهای مغزی، تومورهایی هستند که از سیستم اعصاب مرکزی منشاء می‌گیرند. این تومورها می‌توانند بدخیم (Malignant) یا متاستاتیک و یا خوش‌بدخیم (Benign)، اولیه و غیرمتاستاتیک باشند. تومورهای مغزی اولیه، از درون بافت مغز منشاء گرفته و این توانایی را دارند که تنها در داخل مغز گسترش یابند، درحالی که تومورهای مغزی متاستاتیک، از اندام‌ها و بافت‌های خارج از مغز منشاء می‌گیرند و با رشد سریع خود، قادر به تهاجم به بافت‌ها و ساختارهای دیگر، مانند مغز هستند. اگرچه این نوع تومورهای متاستاتیک، در میان کودکان و نوجوانان کمتر دیده می‌شوند، اما بطور کلی رایج‌ترین تومورهای مغزی محسوب می‌شوند (۴۰-٪۲۰ کل موارد) (۱، ۲). علائم بالینی تومورهای مغزی متنوع است. سردردهای صبحگاهی مکرر، یک نشانه معمول آنها است، اما برای تشخیص تومورهای مغزی، حساسیت و اختصاصی کافی را ندارد، چون تنها در یک چهارم تا یک سوم از بیماران، وجود دارند (۳، ۴). آشفته‌گی و پریشان‌حالی، از دیگر علائم رایج در بیماران با تومورهای مغزی است که می‌تواند در هر زمانی از دوره بیماری رخ دهد. برخی بیماران ممکن است با علائم کانونی نورولوژیک مشخص شوند که از جمله آنها می‌توان به ناتوانی در تکلم، ضعف بدنی، کاهش حس شنوایی، اختلال در بینایی و عدم تعادل و هماهنگی عصبی، اشاره نمود. آسیب‌های رفتاری یا شناختی نیز در بیماران، رایج بوده که ممکن است در نتیجه آسیب به سیستم اعصاب مرکزی و یا به دلیل افزایش فشار داخل جمجمه‌ای باشد (۵).

گلیوبلاستوما یکی از بدخیم‌ترین گروه‌های هتروژنوس تومورهای مغزی است که به عنوان تومورهای اولیه اپیتلیال عصبی سیستم اعصاب مرکزی (CNS) شناخته شده و از سلول‌های گلیال (Glial cells) منشاء می‌گیرند. گلیوماها براساس طبقه‌بندی WHO 2016 از درجه یک تا چهار، براساس بدخیمی تومور درجه‌بندی می‌شوند که درجه یک، با عنوان خوش‌خیم و درجه چهار با نام گلیوبلاستوما، تهاجمی‌ترین بدخیمی اولیه مغز، با میانگین بقای تقریباً ۱۵ ماه است (۶). درمان بیماران بصورت تهاجمی و جراحی با برداشتن تومور، همراه با روشهای تکمیلی

رادیوتراپی و شیمی‌درمانی است که تأثیر بسیار منفی بر کیفیت زندگی بیماران دارد. تاکنون تغییرات مولکولی و ژنتیکی متعددی در ژنهای *ERBB2*، *TP53*، *IDH1/2*، *ATRX*، *EGFR*، *TERT*، *PI3KR1* و *MGMT* در بیماران مورد بررسی قرار گرفته‌اند که راه را برای عصر مولکولی جدیدی در نوروانکولوژی هموار می‌کنند (۷، ۸).

از زمان انجام این تحقیقات اولیه، انواع تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی دیگر در گلیوبلاستوما مشخص شده است که نتیجه همه این تلاش‌ها، بالابردن درک مولکولی پاتوژنز گلیوبلاستوما و در نتیجه شخصی‌سازی درمان‌ها برای بهبود سریعتر بیماران بوده است. ما در این مطالعه، برای اولین بار، ژن *LMO1* را در بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما بررسی کردیم تا ارتباط بین تغییرات نوکلئوتیدی این ژن را با این نوع تومور مغزی مشخص نماییم. در دهه‌های اخیر، مطالعات گسترده ژنومی (GWAS)، منجر به شناسایی چندین جایگاه ژنی جدید در ارتباط با این ژن، *LMO1* (*LIM domain only1*) به عنوان یک انکوژن کاندید و تنظیم‌کننده مثبت نسخه‌برداری، شده است. اثر تغییرات این ژن، همچنین در سرطان کلورکتال (CRC) و سرطان ریه نیز، به عنوان یک انکوژن جدید تایید شده است (۹). بررسی افزایش بیان *LMO1* به عنوان، یک مارکر پیش‌آگهی جدید، در درمان علیه گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال (*EGFR*) نیز کمک شایانی نموده است. با اینحال، تفاوت آشکاری در سطح بیان ژن *LMO1* بین بافت‌های توموری و سلولهای نرمال اطراف آن، در سرطان سینه، بافت سرطانی پروستات، کارسینومای سلول کبدی (HCC) و تاحدودی سرطان معده (GC) مشاهده شده است که پیشنهاد می‌شود که ژن *LMO1* ممکن است شبکه عملکردی پیچیده‌ای را در انواع متفاوت سرطان‌ها داشته باشد (۱۰، ۱۱). بنابراین، افزایش بیان *LMO1* می‌تواند به عنوان مارکر پیش‌آگهی مهمی، در برخی از انواع سرطانهای خاص، مانند تومورهای مغزی، نوروبلاستوما و انواع سرطان‌های خون، مانند T-ALL (لوکمی لنفوبلاستیک حاد سلول T) مطرح باشد (۱۲).

ژن *LMO1* کدکننده یک فاکتور تنظیم‌کننده نسخه‌برداری است که حاوی دو دامین انگشت‌روی (zinc finger) LIM غنی از

سیستین است، اما فاقد دامین متصل شونده به DNA است. دامین های LIM ممکن است در میانکشی های پروتئینی و تنظیم کمپلکس های فاکتورهای نسخه برداری دیگر نقش داشته باشند. بنابراین، انتظار می رود پروتئین بیان شده توسط این ژن، نسخه برداری را از طریق اتصال رقابتی با دیگر فاکتورهای متصل شونده به DNA کنترل کند (رقابت بین فاکتورهای نسخه برداری جهت اتصال به پروتئین *LMO1*) (13). این ژن دارای تغییرات نوکلئوتیدی یا پلی مورفیسم های چالش برانگیزی است که از آن جمله، می توان به rs2168101 G>T اشاره کرد که رابطه نزدیکی با نوروبلاستوما داشته و در super-enhancer اولین اینترون ژن *LMO1* قرار دارد که یک موتیف اتصال به فاکتور نسخه برداری حفاظت شده GATA می باشد. آلل G باعث تشدید تومورزایی در افراد شرق آسیا و اروپا می گردد، در صورتی که آلل T منجر به کاهش استعداد ابتلا به سرطان، در جمعیت آفریقایی خواهد شد (۱۴). *LMO1* متعلق به یک ابرخانواده پروتئینی است که توسط چهار ژن شامل *LMO1*، *LMO2*، *LMO3* و *LMO4* کد می شود. شواهد متعددی، از جمله رویدادهای جابجایی کروموزومی و مدل های موشی، به شدت این خانواده ژنی را در اتیولوژی سرطان انسان، از جمله لوسمی سلول T و نوروبلاستوما دخیل می دانند (۱۵). هدف از پژوهش حاضر نیز بررسی پلی مورفیسم (های) تک نوکلئوتیدی ژن *LMO1* در بیماران ایرانی مبتلا به تومور مغزی، از نوع گلیوبلاستوما و همچنین ارزیابی بیوانفورماتیکی اثرات جهش های این ناحیه از ژن بر بیان پروتئین است.

روش کار

در این مطالعه که به روش مورد-شاهدی انجام گرفته است، تعداد ۳۵ نمونه خون از افراد مبتلا به تومور مغزی (گلیوبلاستوما مولتی فرم) از بیمارستان های شهید رهنمون یزد، بیمارستان دکتر مرتاض یزد و مرکز پرتودرمانی شهید رمضان زاده یزد جمع آوری شد. پس از تکمیل پرسش نامه و اخذ رضایت نامه از همه شرکت کنندگان در تحقیق، ۵ میلی لیتر خون، از افراد مبتلا به تومور مغزی گرفته شد و به لوله های استریل ۱۵۰ میلی لیتری، حاوی ۲۰۰ میکرولیتر EDTA، منتقل شد و تا زمان آزمایشات

بعدی، در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد 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 جهش های ژن *LMO1* انتخاب شدند و مورد بررسی قرار گرفتند.

همچنین، یک گروه ۴۰ نفره به عنوان نمونه های کنترل و سالم انتخاب شدند که سابقه خانوادگی شناخته شده ای 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 گروه های بیمار و کنترل، به خوبی توزیع شده بودند، بنابراین از نظر یک تحلیل آماری، معتبر و قابل قبول در نظر گرفته شدند. پروپوزال این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه یزد مورد تایید قرار گرفت (IR.YAZD.REC.1402.049) و تمامی رویه ها مطابق با اعلامیه هلسینکی (Declaration of Helsinki 1975)، اصلاح شده در سال ۲۰۰۸ و استانداردهای اخلاقی انجام شد.

استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA pure، طی روش استاندارد انجام شد. پس از استخراج DNA جهت تکثیر ۴ اگزون ژن *LMO1*، از تکنیک Touchdown PCR استفاده شد. در PCR معمولی و استاندارد، از یک دمای اتصال ثابت، برای تکثیر توالی استفاده می شود، اما در تکنیک Touchdown PCR، برای انتخاب بهترین درجه حرارت اتصال پرایمرها به توالی هدف و جهت جلوگیری از اتصال غیراختصاصی پرایمرها، ابتدا در سیکل های اولیه، درجه حرارت اتصال، بالا انتخاب می شود و در سیکل های بعدی، درجه حرارت اتصال، بتدریج کاهش می یابد. برای انجام واکنش های تکثیر DNA، ابتدا با استفاده از نرم افزار Gene Runner (<http://www.generunner.com>)، چهار جفت پرایمر طراحی شد و سپس با استفاده از نرم افزار 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 هم ردیف شدند.

جستجو در پایگاه داده‌های بیوانفورماتیکی

پایگاه داده SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>)

با استفاده از پایگاه داده SIFT، می‌توان اثرات جایگزینی اسیدهای آمینه را بر عملکرد پروتئین، با در نظر گرفتن همولوژی توالی و خواص فیزیکی اسیدهای آمینه، پیش‌بینی کرد. در این نرم‌افزار، اگر امتیاز ارزیابی شده توسط SIFT کمتر از ۰/۰۵ باشد، جهش به‌عنوان یک تغییر اسیدآمینه مؤثر بر عملکرد پروتئین معرفی می‌شود. اما اگر امتیاز ارزیابی شده توسط SIFT بیشتر از ۰/۰۵ باشد، جهش به‌عنوان یک تغییر اسیدآمینه قابل تحمل در عملکرد پروتئین و یا بدون اثر، پیش‌بینی می‌گردد.

PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)

PolyPhen-2، به‌عنوان یک ابزار مبتنی بر وب، اثر جایگزینی اسیدهای آمینه را بر ساختار و عملکرد پروتئین، براساس همترازی چندین توالی همولوگ و ساختارهای سه‌بعدی پروتئین، پیش‌بینی می‌کند. امتیاز ارزیابی براساس موقعیت خاص (PSIC) را می‌توان از ۰ تا ۱ با استفاده از این ابزار محاسبه کرد. PolyPhen-2 نتیجه را به‌صورت جهش خوش‌خیم (با امتیاز ۰-۰/۱۵)، احتمالاً آسیب‌زا (با امتیاز ۰/۱۵-۰/۸۵) و آسیب‌زا (با امتیاز ۰/۸۵-۱) گزارش می‌کند. این ابزار دو مقدار «حساسیت» و «ویژگی» را نیز برای پیش‌بینی‌های خود ارائه می‌کند.

PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>)

از وب سرور PROVEAN برای تجزیه و تحلیل انواع واریانت‌های پروتئین، از طریق یک رویکرد امتیازدهی مبتنی بر هم‌ترازی استفاده می‌شود. این نرم‌افزار پیش‌بینی می‌کند که آیا یک جایگزینی آمینواسیدی، تأثیری بر عملکرد زیستی پروتئین دارد یا خیر. اگر امتیاز محاسبه‌شده برای جایگزینی اسیدآمینه، کمتر از ۲/۵- باشد، آن جهش مضر و آسیب‌رسان پیش‌بینی می‌شود.

SNPs&GO (<http://snps.biofold.org/snps-and-go>)

SNPs&GO یک ابزار مبتنی بر وب است که اثر جایگزینی اسیدهای آمینه را به‌عنوان یک تغییر مرتبط با بیماری یا اثرگذار و یا یک تغییر خنثی، براساس ساختار سه‌بعدی پروتئین و توالی آن،

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، 200 میکرولیتر از هر یک از dNTPها، ۱-۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، 4-1 میلی‌مولار $MgCl_2$ ، به همراه 2 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 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 موردنظر، 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. 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 13.0 برای Windows استفاده شد. محاسبات با استفاده از نرم افزار GraphPad انجام شد و سطح معنی‌داری کم‌تر از ۰/۰۵ ($P < 0.05$) از نظر آماری مهم در نظر گرفته شد.

(حفاظت‌شدگی پایین) و ۹ مربوط به یک اسید آمینه ثابت (حفاظت‌شدگی بالا) است.

نرم افزار PyMOL

PyMOL که نوشته شده در پایتون است، یکی از مشهورترین زبان‌های برنامه‌نویسی است که در آن، یک سیستم تجسم مولکولی برای ارزیابی مطالعات ساختاری و سه‌بعدی پروتئین‌ها، فاصله بین اتم‌ها و تعداد پیوندهای شیمیایی در مولکول‌ها استفاده می‌شود. از قابلیت‌های دیگر آن، می‌توان به مدل‌سازی لیگاند-پروتئین، شبیه‌سازی مولکولی و همچنین طراحی دارو اشاره کرد. در این نرم‌افزار با استفاده از فایل PDB، آنالیز سه‌بعدی پروتئین موردنظر از لحاظ انواع برهمکنش‌ها، بررسی نوع اسید آمینه‌های موجود در توالی پروتئین و کیفیت پیوندهای پپتیدی تشکیل شده در بین آنها، انجام می‌شود.

HOPE project (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope>)

HOPE یک سرویس وب است که اثرات ساختاری جهش‌های نقطه‌ای را در یک توالی پروتئینی با ترکیب اطلاعات موجود به دست آمده، از یک سری خدمات وب و پایگاه‌های داده، تجزیه و تحلیل می‌کند. بطور خلاصه، HOPE اطلاعات ساختاری پروتئین‌ها را از منابع دیگر جمع‌آوری می‌کند، از جمله پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین، تفسیر توالی‌ها در Uniprot و پیش‌بینی در نرم‌افزار Reprof. سپس HOPE این اطلاعات را ترکیب کرده تا اثر یک جهش مشخص بر روی ساختار پروتئین را بررسی کند.

تجزیه و تحلیل تغییرات آب‌گریزی (هیدروفوبیسیته)

تغییرات آب‌گریزی پروتئین با استفاده از دو نرم‌افزار PEPTIDE 2.0

https://www.peptide2.com/N_peptide_hydrophobicity

ExPASy/ProtScale و [_hydrophilicity.php](https://web.expasy.org/protscale)

(<https://web.expasy.org/protscale>) با مقیاس اسید آمینه

Kyte و Doolittle بررسی می‌شود. ExPASy/ProtScale برای

پیش‌بینی مقیاس آب‌گریزی یا آبدوستی و پارامترهای ساختاری

پروتئین، بر اساس خواص شیمیایی و فیزیکی اسیدهای آمینه

تعریف شده است. امتیاز یک اسید آمینه از طریق یک ارزش

(معیار) عددی اختصاص یافته به هر نوع اسید آمینه و پارامترهای

کنفورماسیون در ساختارهای ثانویه محاسبه می‌شود.

پیش‌بینی می‌کند. امتیاز ارزیابی شده از ۰ تا ۱ است که امتیاز کمتر از ۰/۵، به عنوان یک جهش مرتبط و اثرگذار در بیماری شناسایی می‌شود.

PANTHER (<http://www.pantherdb.org>)

سیستم طبقه‌بندی PANTHER یک سیستم تجزیه و تحلیل ژنومی، مبتنی بر عملکرد ژن، مسیرهای عملکردی و ابزارهای تجزیه و تحلیل آماری است. این سرور، مدت زمان حفاظت‌شدگی یک آمینواسید را در واحد میلیون سال تکاملی، محاسبه می‌کند. هر چه زمان حفاظت‌شدگی اسید آمینه در توالی پروتئین طولانی‌تر باشد، احتمال اثر عملکردی آن در پروتئین بیشتر است.

I-Mutant3.0 (<http://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant3.0>)

I-Mutant2.0 یک نرم‌افزار تفسیری است که تغییرات پایداری پروتئین را به دلیل جهش‌های نقطه‌ای، براساس ساختار یا توالی پروتئین پیش‌بینی می‌کند. نرم‌افزار I-Mutant3.0، با استفاده از داده‌های ترمودینامیکی تجربی، تغییرات انرژی آزاد پروتئین (DDG) را محاسبه می‌کند. براین اساس، اگر DDG به ترتیب کمتر یا بالاتر از صفر باشد، پایداری پروتئین موتانت، کاهش یا افزایش می‌یابد.

NetSurfP-2.0

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetSurfP>)

NetSurfP-2.0، به عنوان یک ابزار مبتنی بر توالی، ساختار ثانویه، دسترسی به سطح، اختلالات ساختاری و زوایای دو وجهی ستون فقرات (زوایای Psi و Phi) را برای هر اسید آمینه در توالی پروتئین پیش‌بینی می‌کند. این ابزار میزان دسترسی نسبی به حلال (RSA) را نیز برای یک اسید آمینه (درون ساختار پروتئین یا در معرض حلال) با یک حد آستانه ۲۵٪ پیش‌بینی می‌کند.

ConSurf (<https://consurf.tau.ac.il>)

وب سرور ConSurf سطح حفاظت‌شدگی اسیدهای آمینه را بر اساس روابط تکاملی بین پروتئین و همولوگ‌های آن ارزیابی می‌کند. ConSurf ساختار سه‌بعدی پروتئین را با مقیاس رنگی از ۱ تا ۹ ترسیم می‌کند که ۱ مربوط به یک اسید آمینه فوق متغیر

نرم افزارهای پیش بینی جهت بررسی جهش های

ناحیه 3'UTR

TargetScan

miRNAها اغلب از طریق جفت شدن با جایگاه های مکمل خود بر روی mRNA هدف، نقش تنظیمی خود را ایفا می کنند، اما تمام نوکلئوتیدهای جایگاه های موردنظر بر روی mRNA هدف، تاثیر مشابهی با هم ندارند. این پایگاه داده، می تواند نوکلئوتیدهای هدف موثر روی mRNA را از طریق جستجوی جایگاه های اتصال ۶ تایی، ۷ تایی و یا ۸ تایی با هر miRNA مکمل پیش بینی کند. در چنین پایگاهی حتی تخمین میزان حفاظت شدگی جایگاه های اتصال miRNA-mRNA نیز امکان پذیر است. TargetScan جفت شدن miRNA-mRNA در ناحیه 3'UTR ژن های انسان و ارتولوگ های آن را نیز بررسی می کند.

miRDB

miRDB پایگاه آنالینی برای پیش بینی miRNAهای موردنظر و تفسیر اثر عملکردی آنها است. جایگاه هدف برای تمامی miRNAها از طریق یک ابزار بیوانفورماتیکی پیش بینی می شود. miRDB جایگاه های اتصال miRNAها را در پنج گونه انسان، موش خانگی، rat، سگ و جوجه پیش بینی می کند. علاوه بر این، کاربر از طریق آنالیزهای محاسباتی ترکیبی، می تواند پیش بینی خود را از miRNAهای فعال و عملکردی انجام دهد.

DIANA-microT

ابزار آنالین DIANA یک پایگاه اطلاعاتی و نرم افزاری، جهت تفسیر و دسته بندی اطلاعات، در یک چهارچوب سیستماتیک، با ردیفی از آنالیزهای تنظیم بیان ژنی، عناصر تنظیمی miRNA و تفسیر نقش RNAهای غیر کدکننده در بیماری ها و مسیرهای مختلف است.

miRMAP

در این پایگاه اطلاعاتی، نقشه های ژنومی و توالی miRNAها به همراه جایگاه اتصال هدف آنها پیش بینی می شود. علاوه بر این miRMAP با مشارکت پایگاه های اطلاعاتی دیگر از جمله، Ensemble، Gene Ontology، UCSC و Genom Browser، داده های متنوعی را پیرامون miRNAها و جایگاه هدف آنها فراهم می آورد.

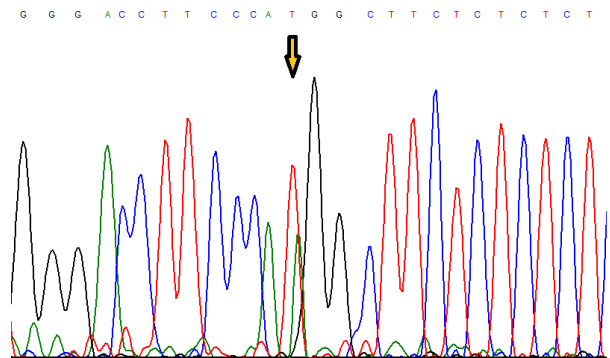
نتایج

براساس اطلاعات پایگاه داده NCBI، ژن LMO1 (NG_032827) بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۱ (11P15.4) قرار دارد و دارای ۴ ناحیه کدینگ (517...541، 36779...36904، 39158...39263، 33375...33588) می باشد. پروتئین کدشده توسط این ژن، رومبتین-۱ (rhombotin-1)، دارای دو دامین LIM انگشت روی می باشد که در تشکیل و تنظیم کمپلکس فاکتورهای نسخه برداری نقش دارد. این پروتئین دو ایزوفرم با ساختار متفاوت، ولی عملکرد یکسان دارد، همچنین فاقد دامین متصل شونده به DNA است و بنابراین جهت اتصال به DNA، به پروتئین های دیگر وابسته است. با بررسی صفحه GenBank این ژن، مشخص شد که ژن دارای ۳۹۵۷۰ جفت باز است و درواقع، این ژن به عنوان یکی از انکوژن های کاندید در تومورهای انسانی معرفی می شود. در این مطالعه، با بررسی نتایج تعیین توالی و کروماتوگرام ۳۵ نمونه بیمار و ۴۰ مورد شاهد، با استفاده از نرم افزار MEGAX و برنامه کروماس (chromas)، ۴ تغییر نوکلئوتیدی (۳ جهش ژنی جدید و ۱ جهش همانم که قبلا گزارش شده بود) مشاهده گردید. نتایج حاصل از این بررسی ها به شرح زیر است:

جدول ۱. جهش های مشاهده شده در بیماران گلیوبلاستومای مورد مطالعه

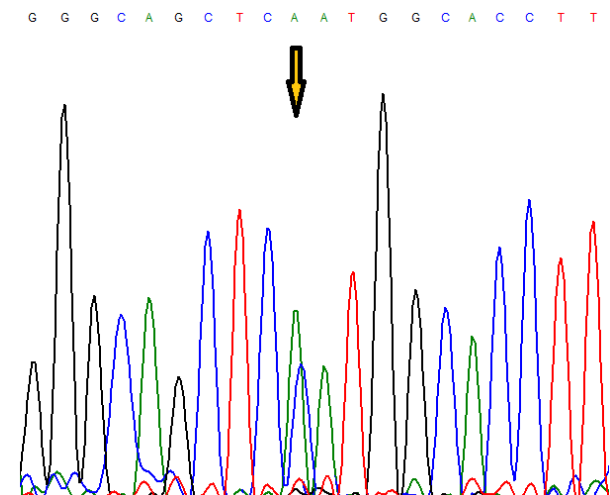
Mutation type	Genomic Position	Coding region	Amino acid change	Novel/ Reported	Number Of patients
Missense	g.48953T>A	c.38A>T	p.Met134Lys	N	1
Missense	g.48991A>C	c.76A>C	p.Asn147His	N	1
Synonymous	g.49002T>C	c.87 T>C	p.phe=150	R	1
3'UTR	g.49094A>G	c.*74A>G	-	N	1

جهش تغییر اسید آمینه c.38A>T, p.Met134Lys :
 A>Tg.48953: این جهش در یک مرد بیمار ۵۵ ساله مشاهده شد
 که نشان دهنده‌ی یک جایگزینی تک نوکلئوتیدی، بصورت
 هتروزیگوت، و تغییر کدون ATG>AAG (M134K) می‌باشد.
 این تغییر نوکلئوتیدی جدید است و تاکنون در هیچ مطالعه‌ای،
 گزارش نشده است (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر کروماتوگرام حاصل از تعیین توالی نمونه بیمار که جهش تغییر اسید آمینه p.Met134Lys، c.38A>T، g.48953T>A را نشان می‌دهد.

جهش تغییر اسید آمینه c.76A>C, p.Asn147His :
C>g.48991A: این جهش در نمونه مرد بیماری ۴۳ ساله مشاهده شد که نشان دهنده‌ی یک جایگزینی هتروزیگوت و تغییر کدون AAT>CAT (N147H) می‌باشد. این تغییر نوکلئوتیدی نیز جدید است و تاکنون گزارش نشده است (شکل ۲).



شکل ۲. تصویر کروماتوگرام حاصل از تعیین توالی نمونه بیمار که جهش تغییر اسید آمینه $C>A$ 48991g : $C>A$ 147His, p. c.76A را نشان می دهد.

پاتوژن‌سیتی **جهش‌های** *Missense*

SIFT

سرور SIFT جهت بررسی جهش‌های موجود در توالی پروتئین،
آنها را امتیازدهی می‌کند، اگر این امتیاز نزدیک به صفر باشد،

جهش M134K، بیماری‌زا با امتیاز ۰/۵۸۲ و برای جهش N147H، بیماری‌زا با امتیاز ۰/۵۴۵ محاسبه شد.

PANTHER

چنین سروری بر میزان حفاظت‌شدگی اسیدهای آمینه در توالی پروتئین (در هر میلیون سال) تمرکز دارد و پیش‌بینی می‌کند که هر چه این حفاظت‌شدگی بیشتر باشد، جهش در آن موقعیت، بر عملکرد زیستی پروتئین اثر بیشتری خواهد داشت. این محدوده بصورت آستانه‌ای از ۲۰۰ تا ۴۵۰ میلیون سال در نظر گرفته می‌شود. مطابق با این آستانه، اسیدهای آمینه در موقعیت‌های با حفاظت‌شدگی بیشتر از ۴۵۰ میلیون سال، بصورت “probably damaging”، اسیدهای آمینه با حفاظت‌شدگی بین ۲۰۰-۴۵۰ میلیون سال، “possibly damaging” و اسیدهای آمینه با حفاظت‌شدگی کمتر از ۲۰۰ میلیون سال، با عنوان “probably benign” مشخص می‌شوند. در اینجا برای دو جهش تغییر اسیدآمینه مشاهده شده در بیماران، نتایج زیر به دست آمد: پیش‌بینی برای جهش M134K، احتمالاً بیماری‌زا با حفاظت‌شدگی بیشتر از ۷۵۰ میلیون سال و برای جهش N147H، احتمالاً بیماری‌زا با حفاظت‌شدگی بیشتر از ۴۵۶ میلیون سال محاسبه شد.

I-Mutant

این سرور اثر یک جهش در میزان پایداری پروتئین، بر اساس اختلاف انرژی آزاد گیبس (ΔG یا DDG) را مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌دهد. در اینجا برای دو جهش تغییر اسیدآمینه مشاهده شده در بیماران، نتایج زیر به دست آمد: پیش‌بینی برای جهش M134K، کاهش پایداری با $DDG = -2.20$ و برای جهش N147H نیز کاهش پایداری با $DDG = -1.46$ محاسبه شد.

NetSurfP-2.0

این نرم‌افزار، ساختار ثانویه، میزان دسترسی به سطح (RSA)، درصد بروز اختلالات ساختاری (Pdisorder) و زوایای Psi و Phi را برای هر اسیدآمینه نرمال و موتانت، در توالی پروتئین پیش‌بینی می‌کند. در اینجا برای دو جهش تغییر اسیدآمینه مشاهده شده در بیماران، نتایج پیش‌بینی بصورت شکلهای ۵ و ۶ محاسبه شد.

جهش موردنظر بیماری‌زا بوده و هر چه به عدد یک، نزدیک‌تر شود، احتمال بیماری‌زایی آن جهش، کاهش می‌یابد و بصورت جهشی قابل تحمل (Tolerated) گزارش می‌شود. در اینجا برای دو جهش تغییر اسیدآمینه مشاهده شده در بیماران، نتایج زیر به دست آمد: پیش‌بینی برای جهش M134K، قابل تحمل با امتیاز ۰/۹۴ و برای جهش N147H، بیماری‌زا و موثر در عملکرد پروتئین، با امتیاز ۰/۰۴ محاسبه شد.

Polyphen-2

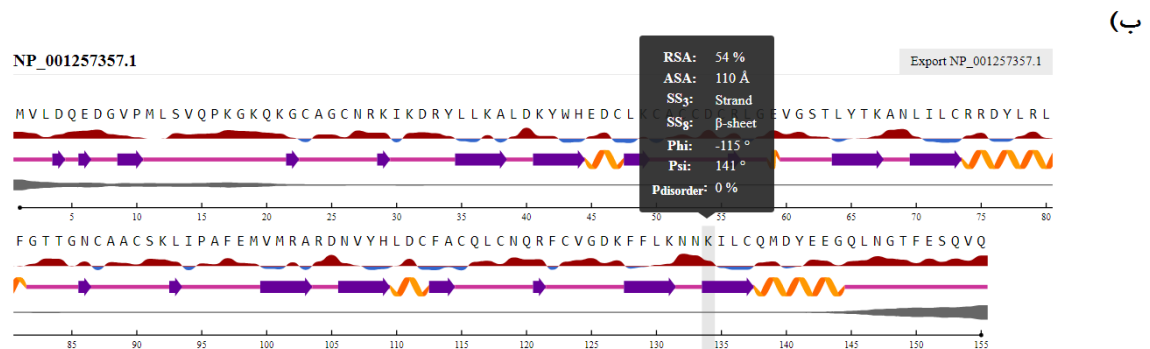
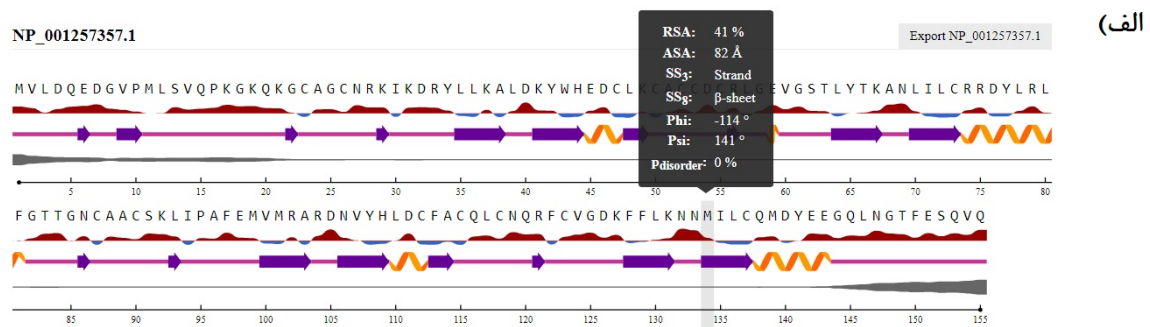
این سرور بر اساس امتیازی که به هر جهش اختصاص می‌دهد، بیماری‌زایی آن را پیش‌بینی خواهد کرد، در اینجا برای دو جهش تغییر اسیدآمینه مشاهده شده در بیماران، نتایج زیر به دست آمد: پیش‌بینی برای جهش M134K، خوش‌خیم (Benign) با امتیاز ۰/۰۰ (حساسیت: ۱/۰۰ و اختصاصیت: ۰/۰۰) و برای جهش N147H، خوش‌خیم با امتیاز ۰/۳۸۷ (حساسیت: ۰/۹۰ و اختصاصیت: ۰/۸۹) محاسبه شد.

PROVEAN

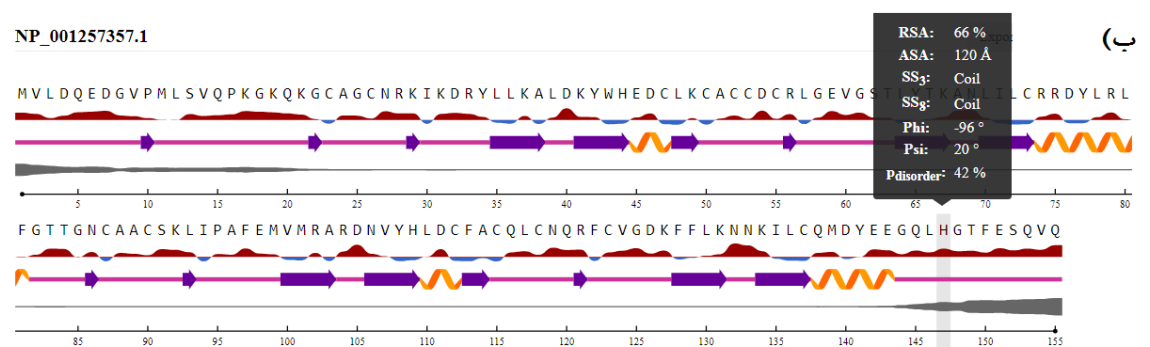
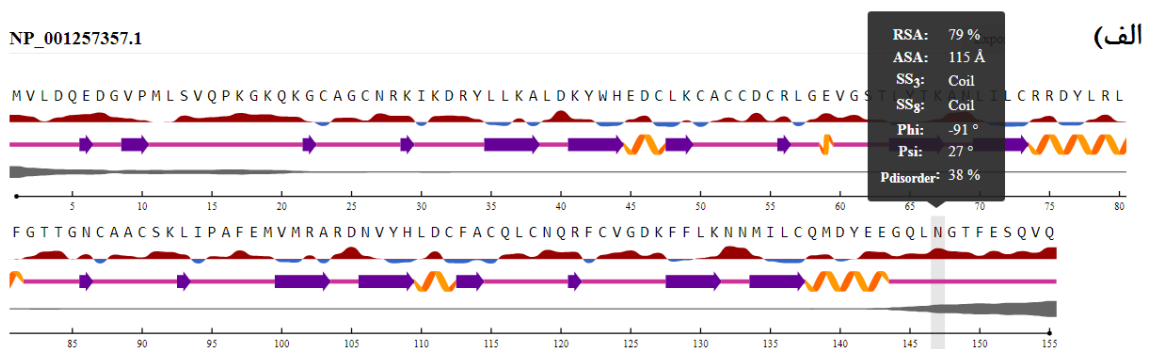
با این سرور می‌توان واریانت‌های زیان‌آور و خنثی را براساس امتیازی که در این برنامه به آنها داده می‌شود تشخیص داد. این امتیاز به این گونه است که اگر امتیاز تعلق گرفته به واریانتی، برابر با ۲/۵ یا پایین‌تر از آن باشد، آن واریانت زیان‌آور تلقی می‌شود و مقادیر بالاتر از این حد، به منزله خنثی و یا غیربیماری‌زا در نظر گرفته خواهد شد. در اینجا برای دو جهش تغییر اسیدآمینه مشاهده شده در بیماران، نتایج زیر به دست آمد: پیش‌بینی برای جهش M134K، بیماری‌زا با امتیاز ۲/۴۱۹ و برای جهش N147H، بیماری‌زا با امتیاز ۰/۳۱۲ محاسبه شد.

SNP & GO

در این سرور نیز با تمرکز بر میزان بیماری‌زایی واریانت‌ها، در توالی پروتئینی امتیازدهی به عمل می‌آید. این امتیاز به این صورت است که اگر امتیاز تعلق گرفته به واریانتی، بیشتر از ۰/۵ باشد، آن واریانت زیان‌آور (deleterious) پیش‌بینی می‌شود و مقادیر کمتر از این حد، به منزله خنثی (Neutral) و یا غیربیماری‌زا در نظر گرفته خواهد شد. در اینجا برای دو جهش تغییر اسیدآمینه مشاهده شده در بیماران، نتایج زیر به دست آمد: پیش‌بینی برای



شکل ۵. نتایج NetSurfP و پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئین (الف) نرمال و (ب) موتانت M134K



شکل ۶. نتایج NetSurfP و پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئین (الف) نرمال و (ب) موتانت N147H

(حفاظت‌شدگی پایین) و ۹ مربوط به یک اسید آمینه ثابت
(حفاظت‌شدگی بالا) است. در اینجا برای دو جهش تغییر

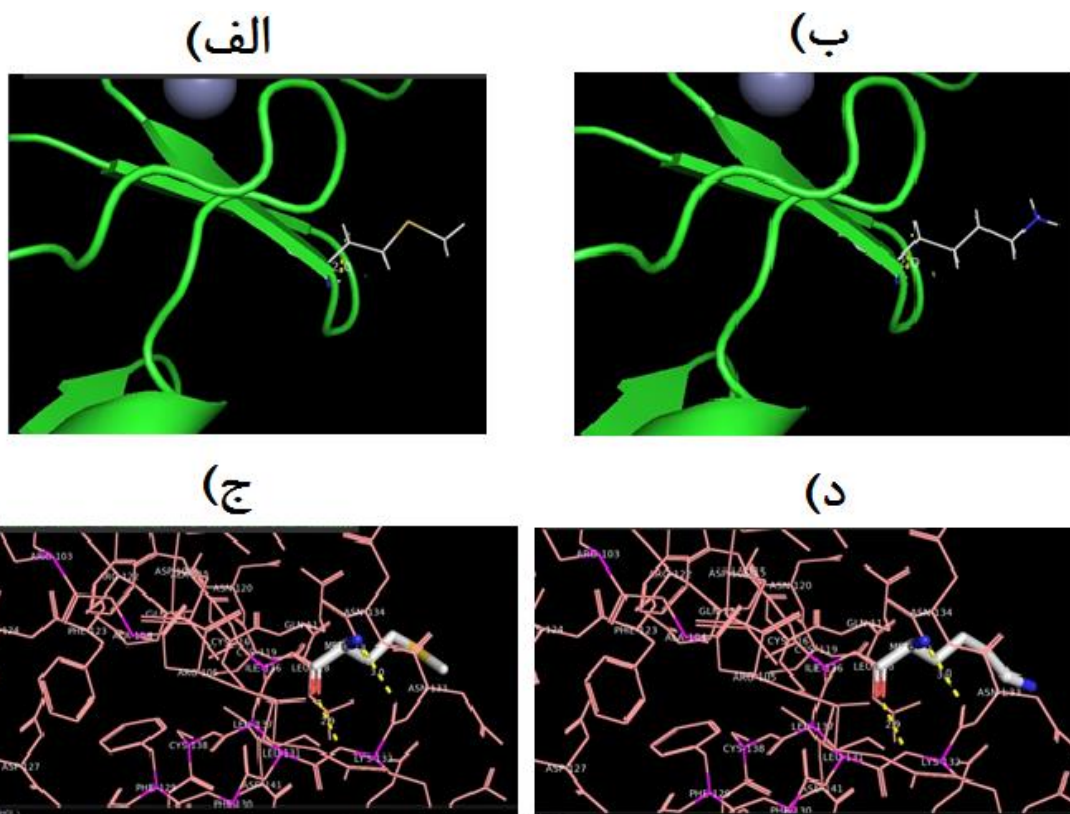
ConSurf
این سرور سطح حفاظت‌شدگی اسیدهای آمینه را با مقیاس رنگی
از ۱ تا ۹ ترسیم می‌کند که ۱ مربوط به یک اسید آمینه فوق متغیر

در نرم افزار PyMOL، از نظر شکل فضایی هر اسید آمینه و میانکشی آن با اسیدهای آمینه دیگر، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هر دو جهش M134K و N147H تاثیری چندانی بر ساختار پروتئین ندارند و تعداد و فاصله پیوندهای هیدروژنی آن ناحیه را نیز تغییر نمی دهند (شکل ۷)، اگرچه درصد قطبیت اسید آمینه لیزین نسبت به متیونین بیشتر است.

اسید آمینه مشاهده شده در بیماران، برای هر دو جهش M134K و N147H، حفاظت شدگی بالا با امتیاز ۸ و ۹ محاسبه شد.

PyMOL

به دلیل در دسترس نبودن اطلاعات ساختاری در مورد پروتئین ژن LMO1 در پایگاه اطلاعاتی PDB Bank، ابتدا مدل سازی پروتئین در نرم افزار Swiss Model انجام شد و پس از همتراز کردن با توالی های پروتئینی همولوگ، دو مدل مشابه با توالی مورد نظر به دست آمد که در نهایت فایل PDB توالی مشابه تر انتخاب شد و



شکل ۷. نتایج نرم افزار PyMOL برای جهش M134K، (الف) ساختار نرمال، (ب) ساختار پروتئین موتانت، (ج) میانکشی اسید آمینه نرمال Met134 با سایر اسیدهای آمینه و (د) میانکشی اسید آمینه موتانت Lys134 با سایر اسیدهای آمینه

اسید آمینه موتانت از نوع نرمال آن بزرگتر است. بار اسید آمینه موتانت مثبت است، درحالی که بار اسید آمینه نرمال خنثی است، که این تفاوت می تواند باعث دافعه بین اسید آمینه جهش یافته و اسیدهای آمینه مجاور شود. همچنین، اسید آمینه نرمال نسبت به اسید آمینه جهش یافته، آبگریز تر است. بنابراین، این جهش ممکن است باعث از بین رفتن برهمکنش های آبگریز با سایر مولکول های روی سطح پروتئین شود. این جهش در دامین حفاظت شده ای در پروتئین قرار دارد که در سایت UniProt به عنوان LIM zinc-

HOPE project

با بررسی نتایج حاصل از جهش های مشاهده شده در این نرم افزار که اثرات ساختاری تغییرات نوکلئوتیدی را بر توالی پروتئین نشان می دهد، جهش ها به قرار زیر توصیف می شوند:

در جهش M134K، زنجیره جانبی اسید آمینه نرمال (متیونین) که بصورت خطی است، به زنجیره جانبی پیچیده تر اسید آمینه جهش یافته (لیزین) تغییر کرده است و همین تغییر می تواند بر میزان هیدروفوبیسیت پروتئین موتانت تاثیر بگذارد. همچنین

زیاد، به پروتئین آسیب می‌رساند. همچنین، چون اسید آمینه موتانت، روی سطح دامینی با عملکرد ناشناخته قرار دارد، بنابراین، جهش در این اسید آمینه، می‌تواند برهمکنش با مولکول‌های دیگر یا سایر بخش‌های پروتئین را مختل کند.

binding 2 مشخص شده است. این جهش (M134K) یک اسید آمینه با خواص متفاوتی را وارد پروتئین می‌کند که می‌تواند این دامین را مختل کرده و عملکرد آن را دچار نقص کند. اسید آمینه نرمال در این موقعیت و در توالی‌های همولوگ، حفاظت شده است، بنابراین، این جهش به احتمال



شکل ۸. موقعیت اسید آمینه نرمال (الف) و اسید آمینه موتانت (ب) در ساختار پروتئین تحت تاثیر جهش M134K

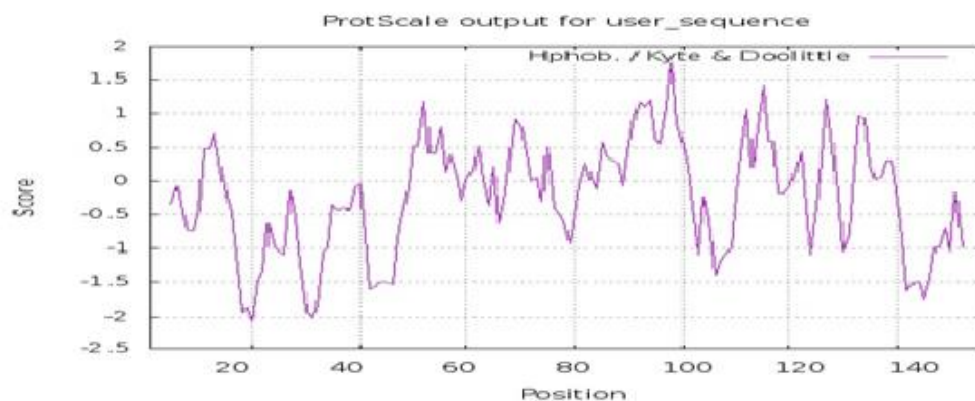
بنابراین، این جهش (N147H) ممکن است به پروتئین آسیب برساند. همچنین، چون اسید آمینه موتانت، روی سطح دامینی با عملکرد ناشناخته قرار دارد، بنابراین، جهش در این اسید آمینه، می‌تواند برهمکنش با سایر بخش‌های پروتئین را مختل کند.

Expasy protscale

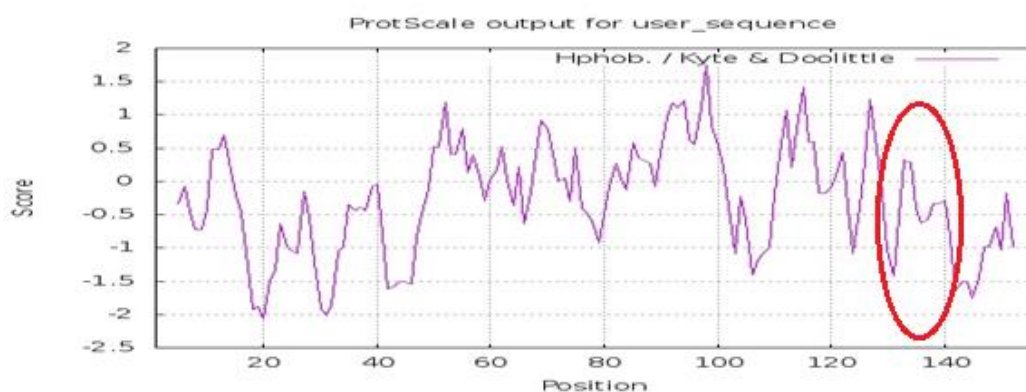
این سرور به پیش‌بینی تغییرات هیدروفوبیسیته در توالی پروتئین نرمال و موتانت، در قالب یک منحنی می‌پردازد. در اینجا برای دو جهش تغییر اسید آمینه مشاهده شده در بیماران، نتایج زیر به دست آمد: پیش‌بینی برای جهش M135K، تغییر هیدروفوبیسیته از شاخص ۱/۹۰۰ (برای اسید آمینه آلیفاتیک و شدیداً هیدروفوبیک متیونین) به ۳/۹۰۰- (برای اسید آمینه بازی و هیدروفیلیک لیزین) و برای جهش N148H، تغییر هیدروفوبیسیته از شاخص ۳/۹۰۰- (برای اسید آمینه قطبی و هیدروفیلیک آسپارژین) به ۳/۲۰۰- (برای اسید آمینه بازی هیستیدین) محاسبه شد (شکل ۹).

در جهش N147H، اسید آمینه نرمال (آسپارژین) یک پیوند هیدروژنی با اسید گلوتامیک در موقعیت ۱۴۳ تشکیل می‌دهد. تفاوت اندازه بین اسید آمینه نرمال و جهش یافته باعث می‌شود اسید آمینه جدید در موقعیت درستی قرار نگیرد تا پیوند هیدروژنی مشابهی را ایجاد کند، همانگونه که اسید آمینه نوع نرمال انجام داده بود. آمینواسید نوع نرمال و موتانت، از نظر اندازه متفاوت هستند. اسید آمینه موتانت بزرگتر از اسید آمینه نوع نرمال است. این اسید آمینه در سطح پروتئین قرار دارد، بنابراین، جهش در این اسید آمینه، می‌تواند برهمکنش با مولکول‌های دیگر یا سایر بخش‌های پروتئین را مختل کند. ما از dbNSFP برای یافتن ارتباط این جهش با واریانت‌های ژنومی استفاده کردیم. امتیاز MetaRNN این جهش، ۰/۳۷۹۱۳۲۹ است. این امتیاز می‌تواند بین ۰/۰ تا ۱/۰ باشد، هر چه این عدد بیشتر باشد، احتمال بیماری‌زا بودن جهش بیشتر است. همچنین اسید آمینه جهش یافته، در نزدیکی یک موقعیت بسیار حفاظت شده قرار دارد، بصورتی که در توالی‌های همولوگ دیگر نیز، نه این اسید آمینه موتانت و نه هیچ نوع اسید آمینه دیگری با خواص مشابه، در این موقعیت مشاهده نشد،

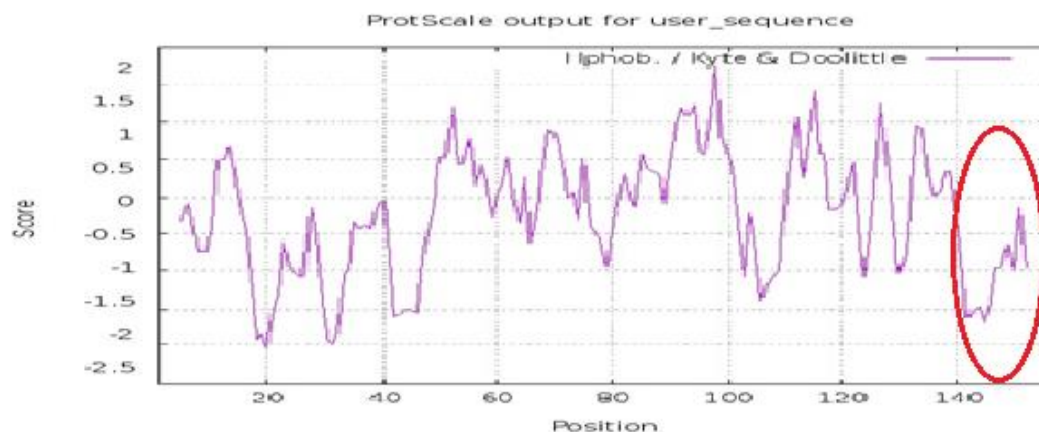
الف



ب



ج



شکل ۹: منحنی تغییرات هیدروفوبیسیته برای الف) توالی نرمال پروتئین، ب) جهش M135K و ج) جهش N148H

نتایج آنالیزهای بیوانفورماتیکی برای بررسی اثر جهش

ناحیه 3'-UTR

TargetScan

این پایگاه اطلاعاتی، بطور گسترده نشان دهنده جایگاه اتصال طیف وسیعی از miRNAها می باشد. در اینجا با وارد کردن نام ژن *LMO1* موردنظر و انتخاب موجود زنده که در این پژوهش انسان است، می توان جایگاه هدف miRNAها را در ناحیه 3' UTR ژن بررسی

کرد. در این پایگاه داده، چندین miRNA مربوط به توالی هدف ژن *LMO1* پیش بینی شد که در اثر جهش نوکلئوتیدی *74A>G، اتصالشان به ناحیه 3' UTR در mRNA ژن موردنظر مختل شود. نتایج حاصل در شکل ۱۰ آمده است:

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type
Position 64-70 of LMO1 3' UTR	5' ... CACCUGCCUGGCCGGCCAGCCAG ... hsa-miR-6842-3p 3' GACGCCUCGUCUCUGGUCGGUU	7mer-m8
Position 68-74 of LMO1 3' UTR	5' ... UGCCUGGCCGGCCAGCCAGCC ... hsa-miR-6842-3p 3' GACGCCUCGUCUCUGGUCGGUU	7mer-m8
Position 73-79 of LMO1 3' UTR	5' ... GGCCGGCCAGCCAGCCACUCUAC ... hsa-miR-5586-3p 3' GAAAUUGGUCGAACAGUGAGAC	7mer-A1

شکل ۱۰. موقعیت جهش c.*74A>G در ناحیه 3' UTR mRNA ژن *LMO1* و تاثیر آن بر مختل کردن پیوندهای هیدروژنی واتسون-کریکی در جایگاه اتصال با سه miRNA تنظیمی

مطالعه گذشته، مشخص شده است که ژن *LMO1* در بیماران گلیوبلاستوما، به ویژه در گلیوبلاستوماهای بدخیم، به شدت دستخوش تغییر می‌شود، و ثابت شده است که افزایش بیان *LMO1* با کاهش بقای بیماران همراه است، که نشان می‌دهد *LMO1* نقش مهمی در بدخیمی گلیوبلاستوما دارد (۱۷، ۱۸). ژن *LMO1* (gene ID: 4004) روی کروموزوم ۱۱ در ناحیه p15.4 قرار دارد و عضوی از خانواده ژن‌های کدکننده کوفاکتورهای رونویسی غنی از سیستمین است که دو دامین LIM انگشت‌روی را بیان می‌کند و دامین‌های تعاملی پروتئین-پروتئین را تشکیل می‌دهد (۱۹، ۱۰). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که پروتئین‌های *LMO* نقش اساسی در سیستم عصبی مرکزی دارند (۹). با این حال، علیرغم افزایش شواهد، مبنی بر اینکه این کوفاکتور در تومورزایی و پیشرفت انواع مختلف سرطان‌ها، مانند لوسمی لنفوبلاستیک حاد سلول T (۲۰)، سرطان معده (۲۱)، سرطان ریه (۲۲) و سرطان پروستات (۲۳) نقش دارد، نقش پروتئین‌های *LMO* در گلیوبلاستوما انسانی هنوز بطور کامل، مشخص نیست. بر اساس داده‌های تجربی، پیشنهاد می‌شود که *LMO1* یک بیومارکر جدید در سلول‌های گلیوبلاستوما انسانی است که با فعال کردن مسیر سیگنالینگ NF-kB باعث رشد و تکثیر سلول‌ها و مهاجرت آنها می‌شود (۹). توالی ژن *LMO1* در شامپانزه (chimpanzee)، میمون رزوس (Rhesus monkey)، سگ (dog)، گاو (cow)، موش (mouse)، موش صحرائی (rat)، مرغ (chicken)، گورخرماهی (zebrafish) و پشه (mosquito) بسیار حفاظت شده است،

miRDB

این پایگاه اطلاعاتی قادر به جستجوی انواع miRNAها با بررسی توالی هدف موردنظر و یا از طریق وارد کردن نام آنها در این سرور می‌باشد. نتیجه بررسی توالی ناحیه 3' UTR در mRNA ژن *LMO1* با این پایگاه داده، بصورت زیر است: در اثر جهش c.*74A>G، جایگاه اتصال has-miR6842-3p دچار اختلال می‌شود، این miRNA، طولی برابر با ۲۲ نوکلئوتید دارد و جایگاه اتصال مرکزی آن (موقعیت Seed)، در نوکلئوتیدهای ۶۴ تا ۷۰ (توالی CCAGCCA) ناحیه 3' UTR است.

miRMap

این پایگاه اطلاعاتی به مطالعه و بررسی جایگاه اتصال miRNAها بر روی توالی هدف می‌پردازد. در اینجا با وارد کردن نام ژن و انتخاب نام انسان، لیستی از miRNAهای مربوط به توالی mRNA هدف، به نمایش گذاشته می‌شود. در اینجا نتایج پایگاه اطلاعاتی TargetsScan مورد تایید قرار گرفت و جایگاه اتصال has-miR5586-3p در موقعیت نوکلئوتیدهای ۷۳ تا ۷۹ (توالی CACUCUA) ناحیه 3' UTR مشخص شد. در اثر جهش c.*74A>G، جایگاه اتصال این miRNA دچار اختلال می‌شود.

بحث

در حال حاضر، پیش‌آگهی بیماران گلیوبلاستوما بسیار ضعیف است، حتی زمانی که از استراتژی‌های درمانی چندجانبه هم استفاده می‌شود، این ضعف همچنان باقی است. علیرغم پیشرفت‌هایی که در تشخیص و درمان گلیوبلاستوما، صورت گرفته است، روش‌های کنونی بسیار محدود هستند (۱۶). در

بنابراین، هرگونه تغییر نوکلئوتیدی و جهش‌های نقطه‌ای در توالی‌های کدکننده و حتی غیر کدکننده این ژن، احتمالاً منجر به اختلال در عملکرد این تنظیم‌کننده نسخه‌برداری خواهد شد که منجر به تسریع روند تومورزایی می‌شود (۲۴، ۲۵). ژن *LMO1* حاوی حداقل ۱۰۷۴۰ پلی‌مورفیسم است که ۱۵۳ تغییر نوکلئوتیدی از آنها، از نوع بدمعنی می‌باشند و با تغییر اسید آمینه همراه هستند (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). مطالعه‌ای، Li و همکارانش، یک جهش سوماتیک (C>T) را در توالی غیرکدکننده، ۴ کیلوباز بالادست جایگاه شروع نسخه‌برداری انکوژن *LMO1*، در نمونه بیماران T-ALL گزارش کردند که منجر به تشکیل یک کمپلکس افزاینده (enhancer) غیرمعمول نسخه‌برداری می‌گردد که نتیجه آن، افزایش سطح بیان ژن مذکور خواهد بود (۲۶). در مطالعه دیگری، Zhang و همکارانش، با بررسی تغییرات بیان ژن *LMO1* از طریق آنالیز کمی با استفاده از Real-time PCR و ایمنوهیستوشیمی، سطح بالای بیان این ژن را در بافت‌های توموری، نسبت به بافت‌های غیرسرطانی سنجیده و ارتباط بیان آن را با فسفریلاسیون ژن *AKT* در مسیر پیام‌رسان سلول که منجر به سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه (NSCLC) می‌شود تایید کردند (۲۷). Beuten و همکارانش نیز با بررسی ۲۹ ژن کاندید سرطان در کودکان قفقازی، ۶۷۲ پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) را یافتند که بطور اختصاصی با خطر ابتلا به B-ALL در کودکان ارتباط داشتند. یکی از این تغییرات نوکلئوتیدی، rs442264 در ناحیه بالادست ژن *LMO1* (g.31034C>A) بود (۲۸). همچنین Lin و همکارانش، برای شناسایی عوامل خطر ژنتیکی، مطالعه ژنومی گسترده‌ای را در کودکان آمریکایی مبتلا به نوروبلاستوما انجام دادند. آنها در جایگاه ژنی 11p15.4 (*LMO1*) موفق به یافتن ۴ تغییر نوکلئوتیدی (rs10840002، rs4758051، rs110419 و rs204938) شدند که با تسریع روند تومورزایی و کاهش میزان بقا در این کودکان مبتلا ارتباط داشتند ($P=0.046$) (۱۰). در ادامه، Oldridge و همکارانش، با بررسی بیماران مبتلا به نوروبلاستوما در جمعیت اروپایی-آمریکایی، موفق به نقشه‌برداری دقیقی از SNP‌ها و تغییرات ژنومی در جایگاه ژن *LMO1* شدند. آنها ۲۷ SNP با فرکانس آللی پایین ($MAF >$

0.01) را شناسایی کردند. همچنین داده‌های آنها نشان داد که مهم‌ترین SNP مرتبط با این جایگاه ژنی (*LMO1*) در بیماران، rs2168101 است، که در یک ناحیه افزاینده (enhancer) بسیار حفاظت‌شده و فعال ژن قرار دارد. از آنجایی که SNP‌های ژنی ممکن است اتصال فاکتورهای رونویسی را در نواحی افزاینده، مختل کنند، نتایج آنها تایید کرد که G>T rs2168101 کاندید اصلی برهم‌زننده یک موتیف اتصال فاکتور GATA است که موتیفی بسیار حفاظت‌شده می‌باشد (۲۹). در مجموع، این داده‌ها مکانیسم مولکولی زیربنایی را برای یافتن یک ارتباط ژنتیکی بسیار قوی جایگاه ژنی *LMO1*، با انواع تومورها نشان می‌دهند و نشان می‌دهند که تغییرات ژنی و جهش‌های نوکلئوتیدی می‌توانند جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی دیگر را در توالی‌های خاص این ژن مختل کنند.

اما برای تعیین اینکه آیا ژنوم سلول‌های توموری گلیوبلاستوما در بیماران ایرانی نیز دارای جهش‌های نوکلئوتیدی در جایگاه ژنی *LMO1* هستند، ما در این مطالعه، جهش‌های سوماتیک کدکننده و غیرکدکننده را در این ژن را با استفاده از نتایج توالی‌یابی ژن بررسی کردیم. این مطالعه مورد-شاهدی، 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، چهار جهش (۲ جهش بدمعنی، ۱ جهش همنام و مترادف، و یک جهش در ناحیه غیرکدینگ 3' UTR این ژن) در ۴ مورد از ۳۵ مورد (۱۱/۴۲٪) بیماران تحت مطالعه نشان داد. سه تا از این جهش‌ها جدید هستند (p.N148H، p.M135K و c.*74A>G) و تاکنون در هیچ تحقیقی گزارش نشده‌اند، ولی جهش همنام و مترادف (p.phe=150) قبلاً توسط Li و همکارانش، به عنوان یک جهش بیمارزا در تومور ویلمز نیز گزارش شده است (rs1042359) (۳۰). هیچکدام از این جهش‌های هتروزیگوت، در نتیجه توالی‌یابی سانگر، در افراد کنترل و سالم مورد مطالعه مشاهده نشدند. در مطالعه حاضر، با استفاده از نتایج چندین پایگاه داده بیوانفورماتیکی، ما تأیید

تومورهای بدخیم حمایت می‌کنند (۳۱، ۳۲). نتایج ما پیش‌بینی می‌کنند که احتمالاً هر سه تغییر نوکلئوتیدی مشاهده شده در ژن *LMO1* (p.N148H، p.M135K و c.*74A>G) به طور قابل توجهی با بیماری‌زایی و خطر افزایش گلیوبلاستومای مولتی‌فرم مرتبط هستند، یافته‌ای که منطبق بر مطالعات مولکولی مشابه روی ژن *LMO1* است و بیان می‌کند که هرگونه جهش و تغییر نوکلئوتیدی در دامین های حساس LIM Zinc-binding-1 & 2 به احتمال زیاد بر عملکرد این کوفاکتور نسخه‌برداری تاثیر بسزایی دارد (۱۵، ۳۳).

اگرچه گزارش حاضر، اولین مطالعه مورد-شاهدی و بررسی مولکولی روی ژن *LMO1* در بیماران گلیوبلاستومای ایرانی است، با اینحال، محدودیت مهمی در این مطالعه باید ذکر شود. اگرچه ما بیماران گلیوبلاستوما را با وجود نادر بودن موارد بیمار، با همکاری چندین مرکز پزشکی جمع‌آوری کردیم، ولی حجم نمونه مورد مطالعه، هنوز کوچک است. این حجم نمونه عمدتاً به دلیل در دسترس نبودن نمونه‌ها و شیوع کم بروز گلیوبلاستوما در جمعیت است. از این رو، مطالعات چندقومیتی بزرگتری برای تایید یافته‌ها پیشنهاد می‌شود. به دلیل این محدودیت، چندین ریسک فاکتور مهم، مانند بررسی میزان قرار گرفتن بیماران در معرض چندین عامل محیطی (مانند گرد و غبار، منابع تشعشع، هیدروکربن‌های آروماتیک و استایل زندگی) و همچنین رژیم غذایی در دسترس نبود و از این رو، یافتن ارتباط و همبستگی بین عوامل محیطی و تغییرات ژنتیکی ژن *LMO1* در بیماران مقدور نبود.

نتیجه‌گیری

ما در مطالعه حاضر، برای اولین بار، جایگاه ژنی *LMO1* را در بیماران گلیوبلاستومای ایرانی بررسی کردیم و چهار تغییر نوکلئوتیدی (سه تا در ناحیه کدینگ و یکی در ناحیه 3' UTR) را شناسایی کردیم که نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی مورد استفاده در این مطالعه، آنها را به احتمال زیاد با افزایش خطر گلیوبلاستوما مرتبط، پیش‌بینی کردند. ما یک رویکرد ژنومیک و بیوانفورماتیک منسجم و یکپارچه‌ای را برای نشان دادن اینکه آیا تغییرات ژنتیکی جایگاه ژنی *LMO1* که کدکننده یک فاکتور

کردیم که تغییرات نوکلئوتیدی ژن *LMO1*، با افزایش خطر گلیوبلاستوما در بیماران ایرانی مرتبط است. طبق دانش ما، این گزارش، اولین مطالعه مولکولی روی این ژن است که در بیماران ایرانی گلیوبلاستوما انجام شده است.

هر دو جهش بدمعنی (تغییر اسیدآمینه) مشاهده شده، p.N148H و p.M135K، دقیقاً در نقاط داغ ژن، منجر به جابجایی اسیدآمینه در دومین دامین LIM Zinc-binding-2 (در موقعیت اسیدهای آمینه ۱۴۷-۸۸) شدند که نشان‌دهنده اهمیت بالقوه بیماری‌زایی آنها است. بطور اجماع، نتایج مطالعات بیوانفورماتیکی ما نیز پیش‌بینی می‌کنند که هر دو جهش بدمعنی و جدید مشاهده شده در بیماران، p.M135K و p.N148H، بیماری‌زا هستند و بر عملکرد پروتئین اثرگذار هستند. هر دو این جهش‌ها، اسیدهای آمینه با خواص متفاوتی را وارد پروتئین می‌کنند که می‌توانند این دامین حساس را مختل کرده و عملکرد آن را دچار نقص کنند. هر دو اسیدآمینه نرمال در این موقعیت‌ها، حفاظت شده هستند، بنابراین، این جهش‌های بدمعنی به احتمال زیاد، به پروتئین آسیب می‌رسانند. همچنین، چون اسیدهای آمینه موتانت، روی سطح دامینی با عملکرد ناشناخته اما مهم قرار دارند، بنابراین، جهش در این اسیدهای آمینه، می‌تواند برهمکنش با فاکتورهای نسخه‌برداری دیگر (مانند: TAL2، LDB1، LDB2، TAL1 و GATA3) یا سایر بخش‌های پروتئین را مختل کند.

در مورد جهش ناحیه غیرکدکننده ناحیه 3' UTR (g.49094A>G، c.*74A>G)، طبق نتایج نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی، این جهش در جایگاه اتصال دو miRNA تنظیمی (CCAGCCACTCTA) قرار دارد که پیش‌بینی می‌شود بتواند در اتصال این miRNAها (has-miR-6842-3 و has-miR-5586-3) به توالی هدف در ناحیه 3' UTR ژن تاثیر گذاشته و بیان ژن *LMO1* را تحت تاثیر قرار دهد. این جهش تاکنون در هیچ مطالعه‌ای گزارش نشده است و برای اولین بار در بیماران گلیوبلاستومای ایرانی مشاهده شده است. نتایج تجربی متعددی، از نقش حیاتی microRNAها در پاتوژنز انواع تومورها، مانند لنفوماهای سلول T غیر هوچکین (NHL) که از بافت‌های خون ساز لنفاوی منشاء می‌گیرند، و همچنین سایر

قبلاً در فنوتیپ بدخیم گلیوبلاستوما شناسایی نشده بودند، معرفی کند. این چنین تلاش‌هایی ممکن است در کشف اهداف درمانی جدید و نشانگرهای زیستی مهم که پیش‌بینی کننده روند تهاجمی تومور باشند، ارزشمند باشد.

تنظیمی مهم در روند نسخه‌برداری سلولی است، مرتبط با افزایش خطر سرطان گلیوبلاستوما است و تغییرات ژنومی آن بر پیشرفت چندین تومور تاکنون ثابت شده بود، انجام دادیم. نتایج ما نشان می‌دهد که مطالعات ژنومی می‌تواند نقش انکوژنهای جدیدی که

References

1. Wang Y, Wang Z, Hua C, Xu Y, Li Y, Zhao G. Primary Malignant Brain Tumors following Systemic Malignancies: A Population-Based Analysis. *Neuroepidemiology*. 2022; 56 (6): 452-459.
2. Lu QR, Qian L. Developmental origins and oncogenic pathways in malignant brain tumors. 2019; 8 (4): e342.
3. Miller KD, Ostrom QT, Kruchko C, Patil N, Tihan T, Cioffi G, Fuchs HE, Waite KA, Jemal A, Siegel RL, Barnholtz-Sloan JS. Brain and other central nervous system tumor statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021; 71 (5): 381-406.
4. Banan R, Hartmann C. The new WHO classification of brain tumors-what neurosurgeons need to know. *Acta neurochirurgica*. 2017; 159 (3): 403-418.
5. McKinney PA. Brain tumours: incidence, survival, and aetiology. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2004; 75 (suppl 2): ii12-ii17.
6. Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee Sh U. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2017; 18 (1): 3-9.
7. Kanzawa T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Current and Future Gene Therapy for Malignant Gliomas. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2003; 2003 (1): 25-34.
8. Owlia F, Heidari MM, Khatami M, Ziaei E, Broomand MA. Studying the Pathogenic Effect of New Nucleotide Changes in the Promoter Region of the TERT Gene in Patients with Glioblastoma Brain Tumor. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*. 2024.
9. Gao L, Wu J, Wang H, Yang Y, Zheng Z, Ni B, Wang X, Peng Y, Li Y. LMO1 Plays an Oncogenic Role in Human Glioma Associated With NF- κ B Pathway. *Frontiers in oncology*. 2022; 12: 770299.
10. Lin H, Chen H, Lin A, Liu X, Huang X, Zhou J, Yuan L, Zhuo Z. Associations between LMO1 gene polymorphisms and central nervous system tumor susceptibility. *Pediatric investigation*. 2021; 5 (4): 281-287.
11. Lu J, Chu P, Wang H, Jin Y, Han S, Han W, Tai J, Guo Y, Ni X. Candidate Gene Association Analysis of Neuroblastoma in Chinese Children Strengthens the Role of LMO1. *PloS one*. 2015; 10 (6): e0127856.
12. Zhuang H-H, Qu Q, Teng X-Q, Dai Y-H, Qu J. Superenhancers as master gene regulators and novel therapeutic targets in brain tumors. *Experimental & Molecular Medicine*. 2023; 55 (2): 290-303.
13. He L, Zhu J, Han F, Tang Y, Zhou C, Dai J, Wang Y, Zhou H, He J, Wu H. LMO1 Gene Polymorphisms Reduce Neuroblastoma Risk in Eastern Chinese Children: A Three-Center Case-Control Study. *Frontiers in oncology*. 2018; 8: 468.
14. He J, Zhang X, Zhang J, Zhang R, Yang T, Zhu J, Xia H, Zou Y. LMO1 super-enhancer polymorphism rs2168101 G>T correlates with decreased neuroblastoma risk in Chinese children. *Journal of Cancer*. 2018; 9 (9): 1592-1597.
15. Zhao GF, Du LQ, Zhang L, Jia YC. LIM domain only 1: an oncogenic transcription cofactor contributing to the tumorigenesis of multiple cancer types. *Chinese medical journal*. 2021; 134 (9): 1017-1030.
16. Tan AC, Ashley DM, López GY, Malinzak M, Friedman HS, Khasraw M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2020; 70 (4): 299-312.
17. Wang L, Tan TK, Durbin AD, Zimmerman MW, Abraham BJ, Tan SH, Ngoc PCT, Weichert-Leahey N, Akahane K, Lawton LN, Rokita JL, Maris JM, Young RA, Look AT, Sanda T. ASCL1 is a MYCN- and LMO1-dependent member of the adrenergic neuroblastoma core regulatory circuitry. *Nature Communications*. 2019; 10 (1): 5622.
18. Weichert-Leahey N, Shi H, Tao T, Oldridge DA, Durbin AD, Abraham BJ, Zimmerman MW, Zhu S, Wood AC, Reyon D, Joung JK, Young RA, Diskin SJ, Maris JM, Look AT. Genetic predisposition to neuroblastoma results from a regulatory polymorphism that promotes the adrenergic cell state. *The Journal of Clinical Investigation*. 2023; 133 (10):
19. Matthews J, Lester K, Joseph S, Curtis D. LIM-domain-only proteins in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2013; 13:
20. Tremblay M, Tremblay CS, Herblot S, Aplan PD, Hébert J, Perreault C, Hoang T. Modeling T-cell acute lymphoblastic leukemia induced by the SCL and LMO1 oncogenes. *Genes & development*. 2010; 24 (11): 1093-1105.
21. Sun Y, Ma GJ, Hu XJ, Yin XY, Peng YH. Clinical significance of LMO1 in gastric cancer tissue and its association with apoptosis of cancer cells. *Oncol Lett*. 2017; 14 (6): 6511-6518.

22. Du L, Zhao Z, Suraokar M, Shelton SS, Ma X, Hsiao TH, Minna JD, Wistuba I, Pertsemlidis A. LMO1 functions as an oncogene by regulating TTK expression and correlates with neuroendocrine differentiation of lung cancer. *Oncotarget*. 2018; 9 (51): 29601-29618.
23. Gu H, Liu T, Cai X, Tong Y, Li Y, Wang C, Li F. Upregulated LMO1 in prostate cancer acts as a novel coactivator of the androgen receptor Corrigendum in /10.3892/ijo.2016.3344. *Int J Oncol*. 2015; 47 (6): 2181-2187.
24. Oram SH, Thoms J, Sive JJ, Calero-Nieto FJ, Kinston SJ, Schütte J, Knezevic K, Lock RB, Pimanda JE, Göttgens B. Bivalent promoter marks and a latent enhancer may prime the leukaemia oncogene LMO1 for ectopic expression in T-cell leukaemia. *Leukemia*. 2013; 27 (6): 1348-1357.
25. Sang M, Ma L, Sang M, Zhou X, Gao W, Geng C. LIM-domain-only proteins: multifunctional nuclear transcription coregulators that interacts with diverse proteins. *Molecular biology reports*. 2014; 41 (2): 1067-1073.
26. Li Z, Abraham BJ, Berezovskaya A, Farah N, Liu Y, Leon T, Fielding A, Tan SH, Sanda T, Weintraub AS, Li B, Shen S, Zhang J, Mansour MR, Young RA, Look AT. APOBEC signature mutation generates an oncogenic enhancer that drives LMO1 expression in T-ALL. *Leukemia*. 2017; 31 (10): 2057-2064.
27. Zhang Y, Yang J, Wang J, Guo H, Jing N. LMO1 is a novel oncogene in lung cancer, and its overexpression is a new predictive marker for anti-EGFR therapy. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 2014; 31 (8): 99.
28. Beuten J, Gelfond JA, Piwkham D, Pollock BH, Winick NJ, Collier AB, 3rd, Tomlinson GE. Candidate gene association analysis of acute lymphoblastic leukemia identifies new susceptibility locus at 11p15 (LMO1). *Carcinogenesis*. 2011; 32 (9): 1349-1353.
29. Oldridge DA, Wood AC, Weichert-Leahey N, Crimmins I, Sussman R, Winter C, McDaniel LD, Diamond M, Hart LS, Zhu S, Durbin AD, Abraham BJ, Anders L, Tian L, Zhang S, Wei JS, Khan J, Bramlett K, Rahman N, Capasso M, Iolascon A, Gerhard DS, Guidry Auvil JM, Young RA, Hakonarson H, Diskin SJ, Thomas Look A, Maris JM. Genetic predisposition to neuroblastoma mediated by a LMO1 super-enhancer polymorphism. *Nature*. 2015; 528 (7582): 418-421.
30. Li G, Jia W, Yin Z, Zhu J, Liu G, Xia H, He J, Fu W. LMO1 Super-Enhancer rs2168101 G>T Polymorphism Reduces Wilms Tumor Risk. *Journal of Cancer*. 2019; 10 (8): 1808-1813.
31. Naji P, Heidari MM, Khatami M, Zare-Zardini H, Chamani R. MicroRNAs as a New Molecular Biomarker for Diagnosis and Prognosis of T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL): A Systematic Review. *Iranian journal of Pediatric Hematology and Oncology*. 2020; 10 (3): 184-199.
32. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2016; 1 (1): 15004.
33. Bach I. The LIM domain: regulation by association. *Mechanisms of Development*. 2000; 91 (1): 5-17.

Original Article

Investigating nucleotide changes of *LMO1* gene as a positive regulator of transcription in patients with glioblastoma brain tumors

Received: 05/09/2023 - Accepted: 17/06/2025

Hadis Mohammadi ¹
 Mohammad Mehdi Heidari ^{2*}
 Mehri Khatami ³
 Ehsan Ziaei ⁴

¹ Master's student in Genetics, Department of Biology, Yazd University, Yazd, Iran

² Associate Professor of Molecular Genetics, Department of Biology, Yazd University, Yazd, Iran, (corresponding author)

³ Associate Professor of Molecular Genetics, Department of Biology, Yazd University, Yazd, Iran

⁴ Neurology specialist, Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Shahid Sadougi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Email: heidarimm@yazd.ac.ir

Abstract

Background: Glioblastoma is one of the most malignant brain tumors, which is also known as primary neuroepithelial tumors. Glioblastoma malignant tumors include 20-40% of brain tumors. The *LMO1* gene is located at position 11P15.4 and is introduced as an oncogene in some cancers. This study was conducted for the first time in Iran to identify and investigate the relationship between *LMO1* gene mutations and glioblastoma.

Materials and Methods: In this research, the Touchdown PCR technique and DNA sequencing method were used in 35 blood samples of people with glioblastoma multiforme and 40 control samples. Bioinformatics analyses were also performed to investigate the pathogenic effect of nucleotide changes in this gene.

Results: In this study, four point mutations were identified, of which two of the new mutations were missense and led to amino acid changes in one of the important domains of the protein (p.M135K and p.N148H), which indicates their potential pathogenicity. Our results of bioinformatics databases predicted that both of these mutations affect protein function, such that they can disrupt this domain and impair its function. Also, a nucleotide change was observed in the 3'UTR region of this gene (c.*74A>G), which is located at the binding site of two regulatory miRNAs and is expected to disrupt the binding of these miRNAs to the target sequence.

Conclusion: These findings predict that any mutations in the LIM-sensitive domains in the *LMO1* gene are significantly related to the pathogenesis of glioblastoma and most likely have a significant impact on the function of this transcriptional cofactor.

Keywords: Brain tumors, sequencing, Glioblastoma multiform, *LMO1* gene, Touchdown PCR

Acknowledgement: There is no conflict of interest