بسم ا . . .
الرحمن الرحيم

دانشکده علوم زیستی

پایان نامه کارشناسي ارشد رشته زیست شناسي گرایش ژنتیک

بررسي بیان ژنهاي باز برنامه نویسي OCT4، Sox2، Klf4 و NANOG در سرطان مثانه

نگارنده:

جمشید اسدزاده تبریزي

استاد راهنما:

دکتر سید جواد مولي

استاد مشاور:

دکتر احمد رضا بهرامي

تیرماه ۸۸

تقدیم به:

پدر و مادر فداکار و عزیزم

و همسرم افسانه که همیشه یار و یاور من در طی این مسیر بوده و هست

تشکر و قدردانی

با سپاس از کلیه عزیزانی که بنده را در طول دوران تحصیل یاری نموده و لطف و مرحمتشان را همیشه نسبت به بنده ارزانی داشته اند. عزیزانی که بدون شک راهنمایي هایشان عامل اصلي رسیدن من به این نقطه از زندگی بوده است.

و با تشکر از اساتید دلسوز و مهربان، آقایان دکتر مولي و دکتر بهرامی که بدون راهنمایي های ایشان انجام این پایان نامه امری غیر ممکن بود.

در نهایت از مسئولین بیمارستان لبافی نژاد که در جمع آوری نمونه ها کمک های فراوانی به اینجانب نمودند کمال تشکر را دارم.

چکیده :

تکثیر بي رويه و خارج از کنترل سلولها در يک موجود پر سلولي، اصلي ترين ويژگي سرطان مي باشد. سلولهايي که به اين مرحله مي رسند خصوصيات جالبي از خود نشان مي دهند ازجمله مشابهت بسيار بالاي آنها به سلولهاي بنيادي مثلاً از لحاظ بيان پروفايل ژني و نيز ناميرايي و قابليت انجام تقسيمات نامحدود. در يک تومور شکل گرفته، تعداد محدودي از سلولهاي توموري اين خصوصيات را نشان مي دهند. اين سلولها بنا بر مشابهت ذکر شده، بن ياخته هاي سرطاني ناميده مي شوند. طبق فرضيه بن ياخته هاي سرطاني، همين تعداد سلولهاي اندک مسئول گسترش و ايجاد بدخيمي بوده، و بنابر اين اهداف ايده آلي در تشخيص و درمان سرطانها مي باشند. بنا بر اين مشابهت، يکي از سوالهاي مطرح اينست که آيا ژنهاي مهم موثر در حفظ ناميرايي و قدرت تقسيم پذيري نامحدود در سلولهاي بنيادي، در بن ياخته هاي سرطاني نيز بيان مي شوند؟ و اگر چنين است رفتار آنها در درجات و مراحل مختلف ايجاد تومور به چه شکلي است؟ آيا مي توان از آنها به عنوان ماركرهايي جهت تشخيص زود هنگام و نيز درمان استفاده نمود؟ در تائيد اينکه اين ژنها مي توانند به عنوان مهمترين ژنهاي آغازگر در نظر گرفته شوند، گروهي از محققين توانستند نشان دهند که بيان نابجاي تعدادي از اين ژنها در سلولهاي کاملاً تمايز يافته، مي تواند به اين سلولها خصوصياتي شبيه خصوصيات سلولهاي بنيادي بدهد و آنها را قادر به انجام تقسيمات نامحدود سازد. در اين تحقيق، طبق اين نتايج و نيز نظريه بن ياخته هاي سرطاني، بيان اين ژنهاي مهم توسط تکنيک قدرتمند Real-time PCR در تومورهاي سرطاني در مقايسه با بافت سالم بررسي شد. ژنهاي مورد بررسي عبارتند از: OCT4 (A, B, B1 variants)، Sox2، Klf4، NANOG، Lin28 و Nucleostemin. به علاوه در اين تحقيق ميزان بيان اين ژنها بين درجات مختلف توموري مقايسه گرديد. نتايج اين تحقيق حاکي از آنند که ژنهاي OCT4-A، OCT4-B، OCT4-B1 و Nucleostemin در تومورها نسبت به بافتهاي سرطاني افزايش بيان نشان مي دهند. به علاوه، مقايسه بيان در درجات مختلف توموري نشان داد که ژن OCT4-B1 در درجات بالاي توموري افزايش بيان بيشتری نسبت به درجات

پائین توموری از خود نشان مي دهد. همچنین ژن Sox2 که در حالت کلي افزایش بیاني ازخود نشان نمي دهد، در درجات بالا بشدت بیانش افزایش مي یابد. ژن Nucleostemin نیز در تومورها افزایش بیان معني داري از خود نشان مي دهد که این افزایش بیان در درجات مختلف توموري تغییر خاصي نمي کند.

واژه های کلیدی: OCT4-A، OCT4-B، OCT4-B1، Sox2، Klf4، NANOG، Lin28، Nucleostemin، سرطان مثانه، بازبرنامه نویسی، Real-time PCR

فهرست مطالب:

۱- مقدمه

۱-۱- سرطان مثانه
..... ۲

۱-۱-۱- علائم و نشانه های بیماری
..... ۳

۱-۱-۲- انواع سرطان مثانه
..... ۴

۱-۱-۲-۱- تومورهای اپیتلیال
..... ۴

۱-۱-۲-۱-۱- کارسینوما در محل
..... ۵

۱-۱-۲-۱-۲- کارسینومای سلولی ترانزیشنال
..... ۵

۱-۱-۲-۱-۳- کارسینومای سلولهای سنگفرشی
..... ۵

۱-۱-۲-۱-۴- آدنوکارسینوما
..... ۶

۱-۱-۲-۲- تومورهای غیر اپیتلیالی
.....
.....
۶ ..

۱-۱-۳- روشهای تشخیص بیماری
.....
.....
۶ ...

۱-۱-۳-۱- سیستوسکپی و سیتولوژی ادرار
.....
۶ .....

۱-۱-۳-۲- فلوسیتومتری
.....
.....
۷ .....

۱-۱-۳-۳- آنالیز تصویری
.....
.....
۸ .....

۱-۱-۳-۴- تکنیکهای تصویر برداری
.....
.....
۸

۱-۱-۳-۵- مارکرهای مولکولی در سرطان مثانه
.....
۹ .....

۱-۱-۴- درجه بندی و مرحله بندی تومورهای مثانه
.....
۹ .....

۱-۱-۵- نظریه منشاء کلونال
.....
.....
۱۲ .....

۱-۲- سلولهای بنیادي
.....

۱۴

۱-۲-۱- انواع سلولهای بنیادی از لحاظ ایجاد سلولهای تمایز یافته
۱۵

۱-۲-۲- مکانیسمهاي کنترل خود بازسازي و تمایز سلولهاي بنیادي
۱۶

۱-۲-۲-۱- مسیرهای هدایت سیگنال
۱۷

۱-۲-۲-۲- فاکتورهاي تنظیمي درونی
۱۸

۱-۳- بن یاخته های سرطانی
۲۱

۱-۳-۱- پیشینه پیدایش فرضیه بن یاخته هاي سرطاني
۲۱

۱-۳-۲- کشف بن یاخته هاي سرطاني
۲۲

۱-۳-۳- منشاء بن یاخته هاي سرطاني
۲۵

۱-۳-۴- استراتژي هاي درماني با توجه به منشاء تومورهاي سرطاني
۲۶

۱-۴- مکانیسم بازبرنامه نویسي (Reprogramming)
..... ۲۶

۱-۴-۱- پیشینه تحقیق در زمینه بازبرنامه نویسي
..... ۲۶

۱-۴-۲- تولید سلولهاي بازبرنامه نویسي شده با استفاده از انتقال ژنهاي معین ۳۰

۱-۵- ژنهاي مورد مطالعه
.....
..... ۳۳

۱-۵-۱- ژن OCT4
.....
..... ۳۳

۱-۵-۱-۱- مشخصات کلي و ساختار ژن OCT4
..... ۳۳

۱-۵-۱-۲- بیان ژن OCT4
.....
..... ۳۵

۱-۵-۱-۳- ساختار و عملکرد پروتئین OCT4
..... ۳۶

۱-۵-۱-۳-۱- ساختار پروتئین OCT4 به عنوان یک فاکتور رونویسي ۳۶

۱-۵-۱-۳-۲- عملکرد پروتئین OCT4
..... ۳۸

۱-۵-۱-۴- واریانت هاي OCT4
.....

۳۹ .....

۱-۵-۲- ژن Sox2 (SRY-related HMG box2)
۴۲ .....

۱-۵-۳- ژن Klf4 (Krupple-like factor 4)
۴۲ .....

۱-۵-۴- ژن NANOG
۴۳ .....

۱-۵-۵- ژن Lin28
۴۵ .....

۱-۵-۶- ژن Nucleostemin
۴۷ .....

۱-۶- Real-time PCR
۵۰ .....

۱-۶-۱- ویژگیهای تکنیک Real-time PCR
۵۰ .....

۱-۶-۲- روشهای مرسوم انجام Real-time PCR
۵۱ .....

۱-۶-۳- روشهاي آنالیز داده ها
۵۲ .....

۱-۶-۳-۱- روش ΔΔCT
.....
۵۳ .....
۱-۶-۳-۱-۱- مفهوم Efficiency
.....
۵۵ ..
۱-۶-۳-۲- روش Pfaffl
.....
۵۶ .....
۱-۷- شکل گیری ایده
.....
۵۷ .....
۲- مواد و روشها
۲-۱- جمع آوری نمونه ها
.....
۶۰ .....
۲-۲- بررسي بيان ژنهاي مورد نظر در بافتهاي جمع آوري شده
.....
۶۱ ....
۲-۲-۱- استخراج RNAی تام سلولی
.....
۶۱ .....
۲-۲-۱-۱- روش تهیه آب تیمار شده با DEPC
.....
۶۲ .....
۲-۲-۲- بررسي كمي و كيفي RNAي استخراج شده
.....
۶۴ .....

۲-۲-۲-۱- اسپکتروفوتومتري UV
.....
.....
۶۴ ..

۲-۲-۲-۲- الکتروفورز ژل آگارز
.....
.....
۶۴ .....

۲-۲-۲-۲-۱- روش تهیه محلول ها و بافرهاي مورد نیاز در الکتروفورز
۶۵ .....

۲-۲-۲-۲-۲- عکس برداري از ژل آگارز
.....
۶۷ .....

۲-۳- تیمار با آنزیم DNase I
.....
.....
۶۷ .....

۲-۴- واکنش رونویسي معکوس
.....
.....
۶۸ .....

۲-۵- واکنش Real-time PCR
.....
.....
۷۰ ...

۲-۵-۱- طراحي پرایمرها و پروب ها
.....
.....
۷۰

۲-۵-۲- آماده سازي پرایمرها و پروب ها
.....
۷۳ .....

۲-۵-۳- انجام واکنش Real-time PCR
..... ۷۴

۲-۵-۴- تعیین Efficiency براي هرجفت پرایمر و پروب
..... ۷۶

۲-۵-۵- تائید محصولات PCR
..... ۷۸

۳- نتایج

۳-۱- توصیف نمونه هاي انساني جمع آوري شده
..... ۸۰

۳-۲- بررسي کیفیت و کمیت RNA ي استخراج شده
..... ۸۲

۳-۳- تعیین Efficiency پرایمرها وپروب ها با استفاده از سلولهای NT2 ..... ۸۴

۳-۴- بیان ژنهاي مورد مطالعه در نمونه هاي توموري و به ظاهر نرمال مثانه ۸۵

۳-۵- ضرایب همبستگی
..... ۹۶

۳-۶- نتایج تعیین توالي
..... ۹۸

۴- بحث و نتیجه گیری

۴-۱- ضرورت تحقیق و اهداف آن
.....

۱۰۳ ....

۴-۲- تفسیر نتایج

۱۰۶ ....

۴-۳- پیشنهادات

۱۱۱ ....

منابع و مآخذ

۱۱۳ ....

فهرست اشکال

شکل ۱-۱ : مرحله بندي تومور در سرطان مثانه

۱۲ ....

شکل۱-۲: خصوصیات سلولهاي بنیادي

۱۵ ....

شکل ۱-۳: شبکه ارتباطي فاکتورهاي مهم رونویسي

۱۹ ....

شکل ۱-۴: اهداف فعالسازی و مهار فاکتورهای مهم سلولهای بنیادی

۲۰ ....

شکل ۱-۵: روش انتقال هسته سلول سوماتیک به سلول تخم

۲۹ ....

شکل ۱-۶: نمونه اي از کلني هاي نهایي iPS ایجاد شده از فیبروبلاستهاي ترانسفکت شده

. . . . . ۳۱

شکل ۱-۷: تولید سلولهاي iPS با استفاده از ۴ فاکتور ۳۲

شکل ۱-۸: فرآیند پیرایش افتراقي در ژن OCT4 . . . . . ۳۴

شکل ۱-۹: بیان OCT4 از مرحله زیگوت تا بلاستوسیست ۳۶

شکل ۱-۱۰: ساختار پروتئین OCT4 . . . . . ۳۷

شکل ۱-۱۱: mRNAي واریانت هاي A و B، شباهتها و تفاوتها ۴۰

شکل ۱-۱۲: ساختار واریانت B1 و مقایسه آن با واریانت B ۴۱

شکل ۱-۱۳: جاي گیري درون سلولیLin28 . . . . . ۴۶

شکل ۱-۱۴: فعالیت پیشنهادي نوکلئوستمین براي مهار عملکرد پروتئین p53 . . . . . ۴۹

شکل ۱-۱۵: نمودارهاي سیگموئیدي و لگاریتمي ترسیم شده توسط دستگاه Real-time

. . . . . ۵۱

شکل ۱-۱۶: روشهاي Taqman و SYBR Green بصورت شماتيک ۵۲

شکل ۱-۱۷: نحوه مشخص نمودن Ct
.....
..... ۵۳

شکل ۱-۱۸: دليل استفاده از ژن کنترل داخلي
.....
..... ۵۴

شکل ۲-۱: نمونه اي از منحني استاندارد مورد استفاده در تعيين Efficiency واکنش..... ۷۷

شکل ۳-۱: RNA ي تام استخراج شده از دو نمونه به ظاهر نرمال و توموري ۸۳

شکل ۳-۲: نمودارهاي سيگموئيدي، لگاريتمي و منحني استاندارد تعيين Efficiency براي

ژن NANOG
.....
.....
..... ۸۵

فـصل اول

مـقـدمـه

کلیات و مروري بر مطالعات گذشته

۱-۱- سرطان مثانه

در ايران ساليانه ۲۱۰۰ مورد جديد سرطان مثانه و ۱۰۶۰ مورد مرگ و مير ناشي از آن گزارش مي شود. اين سرطان در ايران چهارمين سرطان شايع درمردان (پس از سرطان هاي معده، مري و كولون) و سيزدهمين سرطان معمول در زنان مي باشد. (۱ و ۲) ميزان شيوع سرطان مثانه در مردان ۳ برابر زنان و در سفيدپوستان بيش از سياه پوستان مي باشد . اين سرطان در هر سني رخ ميدهد اما معمولا در دوران ميانسالي (در مردان از سن ۶۹ سالگي و در زنان از سن ۷۱ سالگي به بعد) بروز مي كند، و با افزايش سن احتمال وقوع آن و نيز مرگ و مير ناشي از آن بالا مي رود. (۳) اين سرطان داراي درجه عود بالائي است و مبتلايان بايد تحت نظارت دقيق باشند. (۴)

ريسك فاكتورهاي شناخته شده براي اين سرطان عبارتند از: استعمال دخانيات، مشاغل نيازمند قرار گيري در معرض رنگها، وجود نيترات در رژيم غذايي، التهاب مزمن مثانه، در معرض تشعشع قرار گرفتن لگن و مصرف داروهاي حاوي سيكلوفسفاميد. (۵) تاكنون شواهدي دال بر اهميت زمينه ژنتيكي در بروز اين بيماري به عنوان يك ريسك فاكتور مشاهده نشده است.

سرطان مثانه همانند بسياري ديگر از بدخيمي هايي كه در سنين بالا بروز مي كنند، نتيجه تغييرات اكتسابي در DNA بوده كه اين تغييرات مي تواند شامل القاء انكوژنها، از