دانشگاه علوم پزشکی تهران

دانشکده داروسازی

پایان نامه

جهت دریافت درجه دکترای داروسازی

موضوع:

بررسی بیان ژنهای $p16^{INK4a}$ و $p18^{INK4c}$

به روش RT-PCR

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر محمد حسین قهرمانی

اساتید مشاور:

جناب آقای دکتر سید ناصر استاد

جناب آقای دکتر ابراهیم عزیزی

نگارش:

اردشیر گلیائی

۱۳۸۶/۶/۳۰

سال تحصیلی ۸۵-۸۴

شماره پایان نامه ۴۶۲۹

۸۰۵۹۳

تقدیم به خواهرم فروغ

که فروغ زندگی من است

۳۳۸۶ /۱۶/ ۳

تشکر می کنم از استاد بزرگوارم

جناب آقای دکتر قهرمانی

که بیش از همه چیز،

درس چگونه زندگی کردن را از وی آموخته ام

فهرست مطالب

عنوان.....صفحه

چکیده ۱

فصل اول : مقدمه ۴

۱-۱-سرطان ۵

۱-۱-۱-انواع سرطان ۶

۱-۱-۲-ویژگی‌های سلولهای سرطانی ۷

۱-۲-انکوژنها (Oncogenes) و ژنهای سرکوبگر تومور (Tumor Suppressor Genes) ۹

۱-۳-چرخه سلولی ۱۱

۱-۳-۱-مسیر pRb(pRb/p16INK4a/Cyclin D1) ۱۴

۱-۳-۱-۱- کینازهای وابسته به سیکلین ۱۴

۱-۳-۱-۲- سیکلینها ۱۵

۱-۳-۱-۳- مهارکننده های چرخه سلولی ۱۶

۱-۳-۲-مسیر p53(p14ARF/MDM2/p53) ۱۷

۱-۴- خانواده INK4 ..... ۱۹

۱-۴-۱-پروتئین p16INK4a ۲۱

۱-۴-۲- پروتئین p18INK4c ۲۴

۱-۵-هدف از مطالعه ۲۷

فصل دوم : مواد و روشها ۲۸

۲-۱-کشت سلول ۲۹

۲-۱-۱-مواد، وسایل و دستگاهها ۲۹

۲-۱-۲-رده سلولی مورداستفاده ۳۰

۲-۱-۲-۱-رده سلولی Saos-2 ..... ۳۰

۲-۱-۲-۲-رده سلولی HEK ۳۰
۲-۱-۲-۳-رده سلولی A549 ..... ۳۱
۲-۱-۳- آماده‌سازی محلولها ۳۱
۲-۱-٤- تکنیکهای کشت سلولی ۳٤
۲-۱-٤-۱- ذوب کردن (Thawing) ۳۵
۲-۱-٤-۲- پاساژ سلولی (Subculture،Passage) ۳٦
۲-۱-٤-۳- تعویض محیط کشت ۳۷
۲-۱-٤-٤- منجمد کردن (Freezing) ۳۸
۲-۱-٤-۵- شمارش سلولی مستقیم به روش Trypan blue dye exclusion ٤۱
۲-۲- جداسازی RNA از عصاره سلولی ٤۳
۲-۲-۱- مواد و دستگاه‌ها ٤۳
۲-۲-۲- آماده‌سازی محلول DEPC treated H2O ٤۳
۲-۲-۳- کلیات ٤٤
۲-۲-٤- روش جداسازی RNA بوسیله Trizol ٤٦
۲-۳- RT-PCR ٤۷
۲-۳-۱- مواد، وسایل و دستگاه‌ها ٤۷
۲-۳-۱-۱-واکنش RT ٤۷
۲-۳-۱-۲-واکنش زنجیره ای پلیمراز ٤۸
۲-۳-۲- واکنش Reverse Transcriptase ٤۹
۲-۳-۲-۱- کلیات ٤۹
۲-۳-۲-۲- روش کار ۵۰
۲-۳-۳-Polymerase Chain Reaction ۵۲
۲-۳-۳-۱- کلیات ۵۲
۲-۳-۳-۲- روش کار ٦۱
۲-۳-٤- واکنش زنجیره ای پلیمراز نیمه‌کمی ٦٤
۲-٤-روشهای اندازه‌گیری غلظت اسیدنوکلئیک ٦٤
۲-۵- الکتروفورز ٦۷
۲-۵-۱- مواد، وسایل و دستگاه‌ها ٦۷
۲-۵-۲- آماده‌سازی محلولها ٦۸
۲-۵-۳- کلیات ٦۹
۲-۵-٤- روش کار: ۷۲
۲-۵-٤-۱- الکتروفورز نمونه‌هایRNA ۷۲
۲-۵-٤-۲- الکتروفورز نمونه‌های DNA ۷۳

۲-۵-۵- آشکارسازی ژل الکتروفورز ۷٤
۲-۵-٦- عکس‌برداری از DNA در ژل الکتروفورز ۷۵
۲-۵-۷- اندازه‌گیری intensity باندهای آشکارشده پس از الکتروفورز ۷٦
۲-٦- طراحی پرایمر ۷٦
۲-٦-۱- کلیات ۷٦
۲-٦-۲- محاسبه Tm (Melting Tempreture) ۷۸
۲-٦-۳- طراحی کامپیوتری پرایمرها ۸۰
۲-٦-٤- معرفی برنامه PrimerSelect ۸۱
۲-٦-۵- تعیین توالی coding sequence ۸۲
۲-٦-۵-۱- معرفی GenBank ۸۲
فصل سوم: نتایج ۸۴
۳-۱- کشت رده‌سلولی Saos-2و تهیه منحنی رشد ۸۵
۳-۲- استخراج RNA و بررسی کمیت و کیفیت آن ۸٦
۳-۲-۱- روش اسپکتروفتومتری ۸٦
۳-۲-۲- روش الکتروفورز ۸۷
۳-۳- تهیه cDNA سلولی و بررسی کمیت و کیفیت آن ۸۹
۳-۳-۱- روش اسپکتروفتومتری ۸۹
۳-۳-۲- روش الکتروفورز ۹۰
۳-٤- طراحی پرایمر ۹۱
۳-٤-۱- توالی پرایمرهای طراحی شده جهت تشخیص ژن p16INK4a انسانی: ۹۲
۳-٤-۲- توالی پرایمرهای طراحی شده جهت تشخیص ژن p18INK4c انسانی: ۹٤
۳-٤-۳- توالی پرایمرهای مورداستفاده جهت تشخیص ژن :β-actin ۹٦
۳-۵-بیان ژنی با استفاده از RT-PCR نیمه کمی ۹٦
۳-۵-۱-بیان ژنی p16INK4a، p18INK4c و β-actin در رده سلولی Saos-2 ..... ۹٦
۳-۵-۲-بیان ژنی p16INK4a، p18INK4c و β-actin در رده سلولی HEK ۹۷
۳-۵-۲-۱- بیان ژنی p16INK4a در رده سلولی HEK ۹۷
۳-۵-۲-۲- نمودار غلظت cDNA در برابر Intensity باندهای آشکار شده پس از الکتروفورز در رده‌سلولی HEK با استفاده از پرایمرهای p16INK4a ۹۸
۳-۵-۲-۳- بیان ژنی p18INK4c در رده سلولی HEK ۹۹
۳-۵-۲-٤- نمودار غلظت cDNA در برابر Intensity باندهای آشکار شده پس از الکتروفورز در رده‌سلولی HEK با استفاده از پرایمرهای p18INK4c ۹۹
۳-۵-۲-۵- بیان ژنی β-actin در رده سلولی HEK ۱۰۰

۳-۵-۲-٦-نمودار غلظت cDNA در برابر Intensity باندهای آشکارشده پس از الکتروفورز در ردهسلولی HEK با استفاده از پرایمرهای β-actin ۱۰۱
۳-۵-۳-بیان ژنی p16INK4a، p18INK4c و β-actin در رده سلولی A549 ..... ۱۰۲
۳-۵-۳-۱- بیان ژنی p16INK4a در رده سلولی A549 ..... ۱۰۳
۳-۵-۳-۲- نمودار غلظت cDNA در برابر Intensity باندهای آشکار شده پس از الکتروفورز در ردهسلولی A549 با استفاده از پرایمرهای p16INK4a ۱۰۳
۳-۵-۳-۳- بیان ژنی p18INK4c در رده سلولی A549 ..... ۱۰٤
۳-۵-۳-٤- نمودار غلظت cDNA در برابر Intensity باندهای آشکار شده پس از الکتروفورز در ردهسلولی A549 با استفاده از پرایمرهای p18INK4c ۱۰۵
۳-۵-۳-۵- بیان ژنی β-actin در رده سلولی A549 ..... ۱۰٦
۳-۵-۳-٦- نمودار غلظت cDNA در برابر Intensity باندهای آشکار شده پس از الکتروفورز در ردهسلولی A549 با استفاده از پرایمرهای β-actin ۱۰٦
۳-٦-بررسی بیان ژنهای p16INK4a و p18INK4c در رده های سلولی سرطانی ۱۰۸
فصل چهارم: بحث ۱۱۰
منابع ۱۱۷

فهرست اشکال

عنوان.....صفحه

شکل ۱-۱-مراحل مختلف چرخه سلولی و مکانیسمهای کنترلی در آن.....۱۲

شکل ۱-۲- پروتئین p16 که از چهار ردیف Ankyrin repeat تشکیل شده است.....۲۰

شکل۳-۱- آگاروز ژل الکتروفورز RNA تام بدست آمده از سلولهای Saos-2.....۸۸

شکل ۳-۲- آگاروز ژل الکتروفورز cDNAحاصل از واکنش Reverse transcriptase.....۹۰

شکل۳-۳- آگاروز ژل الکتروفورز نمونه های حاصل PCR در رده سلولی HEK با استفاده از پرایمر اختصاصی p16INK4a.....۹۷

شکل۳-٤- آگاروز ژل الکتروفورز نمونه های حاصل PCR در رده سلولی HEK با استفاده از پرایمر اختصاصی p18INK4c.....۹۹

شکل۳-٥- آگاروز ژل الکتروفورز نمونه های حاصل PCR در رده سلولیHEK با استفاده از پرایمر اختصاصی β-actin.....۱۰۱

شکل۳-٦- آگاروز ژل الکتروفورز نمونه های حاصل PCR در رده سلولی A549 با استفاده از پرایمر اختصاصی p16INK4a.....۱۰۳

شکل۳-۷- آگاروز ژل الکتروفورز نمونه های حاصل PCR در رده سلولی A549 با استفاده از پرایمر اختصاصی p18INK4c.....۱۰۵

شکل۳-۸- آگاروز ژل الکتروفورز نمونه های حاصل PCR در رده های سلولی مختلف.....۱۰۹

فهرست جداول

عنوان.....صفحه

جدول ۲-۱-اجزا واکنش Reverse Transcriptase.....۵۰

جدول۲-۲- مقادیر بهینه تعیین شده برای واکنش زنجیره ای پلیمراز در مورد ژنهای p16، p18 و β-actin۶۱

جدول۳-۱- حداقل مقدار قابل تشخیص ژنهای p16INK4a و p18INK4c توسط RT-PCR در رده‌های HEK و A549.....۱۰۷

جدول۳-۲- نسبت بیان ژنهای p16INK4a و p18INK4c به کنترل داخلی (β-actin) در سلولهای موردمطالعه ۱۰۸

فهرست نمودارها

عنوان.....صفحه

نمودار۳-۱- منحنی رشد سلولهای Saos-2 کشت داده‌شده در RPMI 1640 ..... ۸۵

نمودار۳-۲- منحنی مربوط به غلظتهای مختلف cDNAدر رده‌سلولی HEK با پرایمرهای .p16..... ۹۸

نمودار۳-۳- منحنی مربوط به غلظتهای مختلف cDNAدر رده‌سلولی HEK با پرایمرهای .p18..... ۱۰۰

نمودار۳-٤- منحنی مربوط به غلظتهای مختلف cDNAدر رده‌سلولی HEK با پرایمرهای .β-actin..... ۱۰۲

نمودار۳-٥- منحنی مربوط به غلظتهای مختلف cDNAدر رده‌سلولی A549 با پرایمرهای .p16..... ۱۰٤

نمودار۳-٦- منحنی مربوط به غلظتهای مختلف cDNAدر رده‌سلولی A549 با پرایمرهای .p18..... ۱۰٥

نمودار۳-۷- منحنی مربوط به غلظتهای مختلف cDNAدر رده‌سلولی A549 با پرایمرهای .β-actin..... ۱۰٦

چکیده

حضور و فعالیت عادی پروتئینهای دخیل در چرخه سلولی عملکرد مناسب در پیشرفت و کنترل فرآیند تکثیر سلول را موجب میشود. از طرف دیگر اخلال در بیان و یا عملکرد این ژنها میتواند موجب تکثیرغیر عادی و تومور زایی گردد. به طوری که اختلالات جهشی در این ژنها و یا نقایص بیان پروتئینهای مربوطه موجب عملکرد معیوب و بدون کنترل این ژنها میگردد. مطالعه عوامل مرتبط با چرخه سلولی از جمله پروتئینهای مربوطه میتواند اخلال در این ژنها را آشکار ساخته و آنها را به عنوان اهداف درمانی پیشنهاد کند. از طرف دیگر این ژنهای معیوب را میتوان به عنوان شناساگر تومور معرفی کرده و سلولهای سرطانی را بر این اساس دسته بندی کرد. از این جمله ژنهای مهار کننده کینازهای وابسته به سایکلین (Cyclin dependent kinase inhibitors,CKIs) میباشند که چرخه سلولی را در مراحل مختلف آن کنترل میکنند. این ژنها با اتصال به کمپلکس CDK-cyclin عملکرد آن را متوقف میکند. مطالعات نشان میدهد که بسیاری از انواع تومورهای سرطانی اختلالات جهشی و یا حذف ژنی که موجب نقص در عملکرد این ژنها و یا اخلال در تنظیم این پروتئینها میگردد از عوامل اصلی تکثیر بدون کنترل سلول میباشد. خانواده ژنهای مهارکننده کینازهای وابسته به سایکلین شامل $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$, $p19^{INK4d}$ میباشند که در این میان اخلال در ژنهای $p16^{INK4a}$ و $p18^{INK4c}$ بیشتر گزارش شده است. بنابراین

بررسی بیان این ژنها و ارائه مناسب یک مدل سلولی در مطالعه این ژنها حایز اهمیت است. در این مطالعه میزان بیان دو ژن $p16^{INK4a}$ و $p18^{INK4c}$ با روش RT-PCR در رده سلولی HEK ،که یک رده سلولی اپیتلیال کلیه طبیعی است، و A549 که رده سلولی سرطان ریه است، بررسی شد به این ترتیب که mRNA این سلولها در زمان مناسب استخراج شد و توسط واکنش RT به cDNA Library تبدیل شد. سپس توسط پرایمر های اختصاصی طراحی شده برای هر ژن، واکنش زنجیره ای پلیمراز Setup و انجام شد. بر اساس PCR نیمه کمی میزان بیان ژنهای $p16^{INK4a}$ و $p18^{INK4c}$ نسبت به کنترل داخلی (β-actin) در رده سلولی HEK به ترتیب 0.876±0.117 و 1.319±0.147 و در رده سلولی A549 به ترتیب 0.296±0.017 و 1.537±0.665 می باشد. سپس بیان این دو ژن در رده های سلولی HT1080،HT29 ، MCF7 ، HepG2 و کبد طبیعی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این آزمایش نشان می دهد که رده های سلولی HepG2و MCF7 هر دو این ژنها را بیان می کنند، در حالیکه رده سلولی HT1080 هیچ کدام از ژنهای مذکور را بیان نمی کند. رده سلولی HT29 فقط ژن p18 و کبد طبیعی فقط ژن p16 را بیان می کنند. بدین ترتیب مشخص گردید که رده های سلولی مختلف از نظر بیان ژنهای p16 و p18 و مقدار بیان آنها با هم متفاوت هستند. ضمنا میزان بیان این ژنها با توجه به خصوصیات تهاجمی و سرعت

رشد آنها می تواند ارتباط داشته باشد. این مطالعه مدل مناسبی را جهت مطالعه و دستکاری ژنتیکی بر روی این ژنها ارائه می نماید. علاوه بر این setup روش مذکور میتواند به عنوان یک ابزار تحقیقی و تشخیصی در بررسی مارکرهای سرطانی در بافت مورد استفاده قرار گیرد.

فصل اول : مقدمه

۱-۱-سرطان

روند تکثیر سلولها یک روند منظم و حساب شده است که در پاسخ به نیاز بدن و به دنبال مرگ سلول اتفاق می‌افتد. در یک موجود پر سلولی در ابتدا تکثیر سلولها بر مرگ آنها غلبه دارد تا پدیده رشد اتفاق بیفتد، اما پس از رشد و بزرگ شدن جاندار تعادل بین مرگ و تکثیر سلولها بر قرار می‌شود تا وضعیت موجود حفظ شود. رشد و تکثیر سلولی در بین سلولهای مختلف بسیار متنوع است. در بعضی از انواع سلولها روند نو شدن و تکثیر و متعاقبا ترمیم بافت سریعتر صورت می‌گیرد، مثلا سلولهای دستگاه گوارش یا سلولهای گلبولهای سفید نیمه عمری چند روزه دارند اما گلبولهای قرمز نیمه عمری در حدود صد روز دارند و یا سلولهای مغزی به ندرت از بین می‌روند و روند جایگزینی یا اصلا صورت نمی‌گیرد و یا بسیار کند می‌باشد. بعضی اوقات بنا به دلایلی مکانیسمهای کنترلی روی تکثیر سلولی از بین می‌روند. سلولی که این اتفاق در آن رخ می‌دهد دیگر قابلیت پاسخ دهی به نیازهای بدن را از دست می‌دهد و بدون کنترل شروع به تقسیم شدن و رشد می‌کند. در اثر ادامه این روند یک توده سلولی ناخواسته ایجاد می‌شود که تومور نامیده می‌شود. در یک تقسیم‌بندی تومورها به دو دسته خوش خیم و بد خیم تقسیم می‌شوند که در نوع بد خیم احتمال توسعه و پیشرفت تومور در سرتاسر بدن وجود دارد(۲،۱).