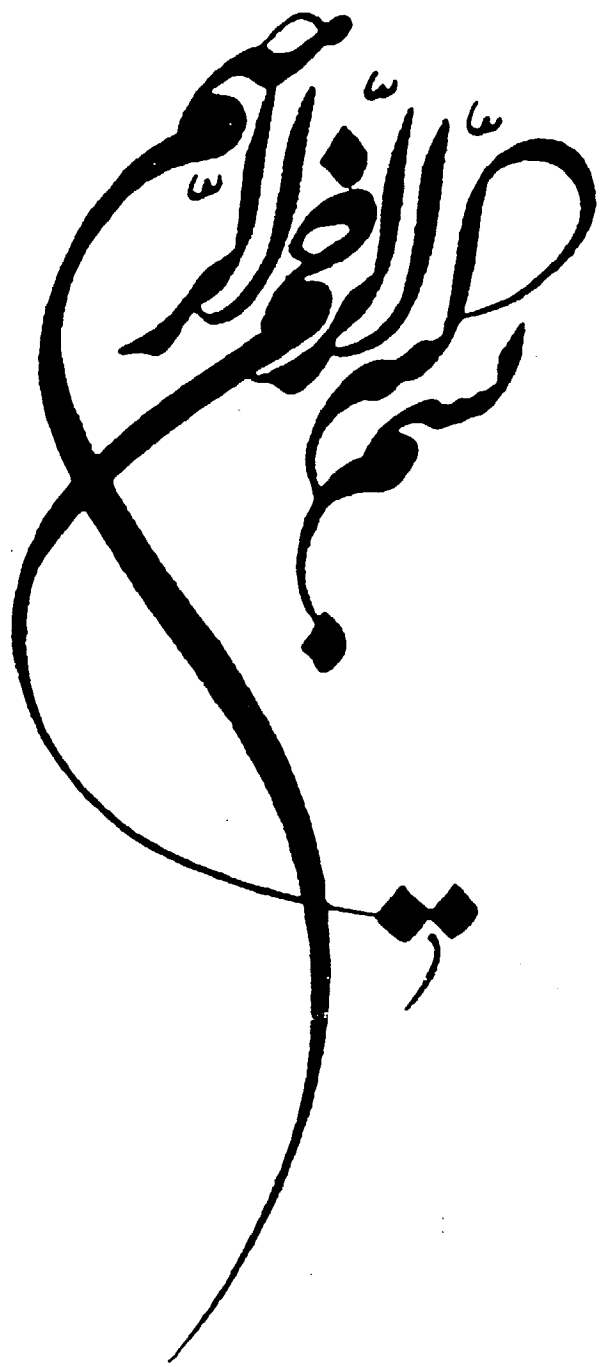

۵۸۶۱۲

دانشگاه تهران

مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد بیوشیمی

موضوع :

بررسی اثر بیان ژن *TP53* بر روی سلولهای لمفومیک و لوکمیک انسانی

۱۳۸۲/۱۲/۱۵

نگارش :

محمد معصومی

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر عبدعلی ضیائی

۵۸۶۱۲

زمستان ۱۳۸۱

بسمه تعالی

گواهی می‌شود آقای / خانم محمد معصومی دانشجوی مقطع کارشناسی‌ارشد رشته بیوشیمی در تاریخ ۸۱/۱۲/۲۶

از پایان نامه خود دفاع نموده و نمره ۱۹/۸ را احراز نمودند.

نام و نام خانوادگی استاد راهنما : جناب آقای دکتر ضیایی امضاء

نام و نام خانوادگی استاد مشاور : امضاء

نام و نام خانوادگی استاد داور : سرکار خانم دکتر احمدیان امضاء

۱۳۸۲ /۱۱/ ۱۵

نام و نام خانوادگی استاد داور : جناب آقای دکتر سربلوکی امضاء

نام و نام خانوادگی استاد داور و مدیر گروه : سرکار خانم دکتر اردستانی امضاء

۸۱/۱۲/۲۶

منت خدای را ست عزّ و جل.

یک روز شیخ ما بوسعید(قه) ،در نیشابور مجلس می گفت. خواجه بو علی سینا از در خانقاه شیخ درآمد و ایشان هر دو، پیش از آن، یکدیگر را ندیده بودند، اگر چه میان ایشان مکاتبت بوده-چون او از در در آمد شیخ ما روی به وی کرد و گفت:((حکمت دان آمد.)) خواجه بو علی در آمد و بنشست شیخ با سر سخن شد.تمام کرد و از تخت فرود آمد و در خانه شد. خواجه بو علی با شیخ در آنجا شد. و در خانه فراز کردند و سه روز با یکدیگر بودند به خلوت و سخن می‌گفتند که کس ندانست و هیچ کس در بر ایشان نشد، مگر کسی را که اجازت دادند، و جز به نماز جماعت بیرون نیامدند. بعد از سه شباروز خواجه بوعلی برفت.شاگردان از خواجه بوعلی پرسیدند که ((شیخ را چگونه یافتی؟)) گفت: ((هر چه من می دانم او می بیند.)) و متصوفه و مریدان شیخ چون به نزدیک شیخ در آمدند از شیخ سؤال کردند که ((ای شیخ، بو علی را چون یافتی؟)) شیخ گفت: ((هر چه ما می‌بینیم او می داند.))

اسرارالتوحید

تقدیـم به

همسر مهربانم

که در تمام لحظات در کنار من بوده و هست.

با تشکر از:

استاد ارجمند جناب آقای دکتر عبد علی ضیائی که راهنمائی این پایان نامه را بر عهده داشتند.

و با تشکر از:

جناب آقای دکتر محمد نبی سربلوکی استاد محترم مرکزتحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک.

سرکار خانم دکتر سوسن اردستانی مدیر محترم گروه بیوشیمی مرکزتحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک.

سرکار خانم دکترشهین احمدیان عضو هیئت علمی مرکزتحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک.

که بر ما منت گذاشته و داوری این پایان نامه را قبول فرموده اند.

همچنین در اینجا جا دارد دوباره از جناب آقای دکتر محمد نبی سربلوکی به خاطر همکاریهای استادانهٔ ایشان در مورد استفاده از دندروزوم تشکر نمایم.

و با تشکر و سپاس فراوان از:

سـرکار خانم دکتر آقائی پور مسئول محترم بخش فلوسایتومتری سـازمان انـتقال خـون ایـران و همچنیـن سـرکار خانم دکترخیر اندیـش کـه در انجـام مـراحل فلوسـایتومتری اینجانب را یاری فـرموده انـد و بـدون شک بدون همکاری ایشان و آن سازمان به انجام رساندن این پایان نامه مقدور نبود.

همچنین با تشکر فراوان از:

همکاران محترمم در آزمایشگاه بیولوژی مولکولی:خانم ها کریمیانپور،کاظمی،

موسوی،ملک ثابت وشاه حسینی.

کلیهٔ دوستانم در مرکز:آقایان اسماعیلی،رضائی،شفیعی،زینلی،صادقی،اسدی،حسنی،

شبانی،نعمتیان،بنائی،دارش،عمادی،کربلائی،یوسفی،لشکربلوکی و خانم‌ها میان آبادی،

حاجی حسن،دیوسالار،فلاح،فراورده،خداقلی به خاطر همکاریهای دوستانه اشان در

طی انجام این پایان نامه.

از کلیهٔ کارکنان محترم مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک در بخش های آموزش،

کتابخانه،سانتریفوژ،عکاسی،تکثیر،دبیرخانه،سلف سرویس،نگهبانی و انبار.

چکیده:

پروتئین سرکوبگر تومور p53، پروتینی با چندین عملکرد است که می‌تواند باعث القاء مرگ سلولی در بعضی از سلولهای سرطانی شود. هم اکنون تحقیقات گسترده ای در زمینهٔ استفاده از ژن TP53 برای ژن درمانی سرطانها در حال انجام است که در کشور ما نیز انجام این گونه تحقیقات ضروری به نظر می‌رسد. در این تحقیق، اثر بیان ژن *TP53* بر روی دو دودمان سلولی MOLT-4 و CCRF-CEM ، مشتق شده از سلولهای لمفومای T انسان و دودمان سلولی K562 که یک اریترولوکمیک انسانی است مورد مطالعه قرار گرفت. در اولین گام برای بررسی توالی p53 cDNA و اطمینان از سالم بودن توالی اسیدهای آمینه پروتئین کد شده به وسیلهٔ این cDNA، قطعه p53 cDNA که در درون پلاسمید pC53-SN3 بود درآورده شد و در داخل پلاسمید pPMgtB53 کلون شد. نتایج حاصل از تعیین توالی p53 cDNA نشان داد که هیچگونه جهشی در p53 cDNA وجود ندارد و این cDNA یک p53 نرمال را کد می‌کند. پس از اطمینان از صحت توالی p53 cDNA، این cDNA توسط دو وکتور غیر ویروسی دندروزوم و لیپوفکتین وارد سلولهای مورد مطالعه شد. دندروزوم یک وکتور سنتتیک اسفروئیدی دندانه‌دار است. رنگ‌آمیزی سلولها به وسیلهٔ تریپان بلو برای ارزیابی میزان قدرت بقاء سلولهای مورد مطالعه نشان داد که سلولهای K562 و CCRF-CEM آلوده شده با پلی‌پلکس دندروزوم - p53 cDNA و لیپوپلکس لیپوفکتین - p53 cDNA یک کاهش قدرت بقاء قابل توجهی را نسبت به نمونه‌های کنترل از خود نشان می‌دهند. بررسی‌ها در مورد سلولهای MOLT-4 هیچ تفاوت معنی‌داری را بین سلولهای آلوده شده با p53 cDNA و نمونه کنترل نشان نداد. در اینجا برای بررسی میزان افزایش مرگ سلولی و انهدام سلولی از تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد. مطالعات فلوسایتومتری نشان داد که آلوده شدن سلولهای K562 و CCRF-CEM بوسیلهٔ p53 cDNA با استفاده از دو وکتور دندروزوم و لیپوفکتین می‌تواند باعث افزایش مرگ سلولی و انهدام سلولی در این دودمانهای سلولی شود. بررسی میزان مرگ سلولی به وسیله فلوسایتومتری در دودمان سلولی MOLT-4 نشان داد که آلوده شدن این سلولها با p53 cDNA هیچ تأثیری بر روی این دودمان سلولی ندارد. بنابراین با انجام این تحقیق می‌توان چنین نتیجه گرفت که وارد شدن p53 cDNA به وسیله لیپوفکتین و دندروزوم به درون سلولهای K562 و CCRF-CEM می‌تواند باعث افزایش میزان مرگ سلولی و انهدام سلولی در این دودمان سلولی شود و این موضوع می‌تواند کمک موثری در تحقیقات مربوط به ژن درمانی لمفوما و لوکمیا باشد.

فهرست مطالب

عنـــوان	صفحـه
چکیده	
۱- مقدمـه	
۱-۱- سرطان	۱
۱-۱-۱-تقسیم بندی سرطان	۱
۱-۱-۲- مراحل ایجاد سرطان	۲
۱-۱-۳- عوامل ایجاد کنندهٔ سرطان	۲
۱-۱-۳-۱: عوامل محیطی	۲
۱-۱-۳-۲- عوامل ژنتیکی	۳
۱-۱-۳-۲-۱- پروتوانکوژن‌ها	۳
۱-۱-۳-۲-۲- ژنهای مهار کنندهٔ تومور	۳
۱-۲- p53	۴
۱-۲-۱- ژن *TP53*	۴
۱-۲-۲- ساختمان پروتئین p53	۷
۱-۲-۳- تاریخچه مطالعات انجام شده بر روی ژن *TP53*	۱۱
۱-۳- ژن درمانی به عنوان یک روش درمانی نوین	۱۱
۱-۳-۱- وکتورهای ژن درمانی	۱۴
۱-۳-۱-۱- وکتورهای ویروسی	۱۵
۱-۳-۱-۱-۱- رتروویروسها	۱۵
۱-۳-۱-۱-۲- آدنوویروس‌ها	۱۷
۱-۳-۱-۱-۳- ویروس‌های وابسته به آدنوویروس‌ها	۱۹
۱-۳-۱-۱-۴- هرپس سیمپلکس ویروس	۲۲
۱-۳-۱-۱-۵- واکسینیاویروس	۲۲
۱-۳-۱-۲- وکتورهای غیر ویروسی	۲۲

۱-۳-۱-۲-۱- انتقال ژن با واسطهٔ گیرنده ۲۲
۱-۳-۱-۲-۲- استفاده از لیپوزوم‌ها و وکتورهای سنتتیک ۲۳
۱-۳-۱-۲-۲-۱- ساختمان و خواص فیزیکی لیپیدهای کاتیونی ۲۳
۱-۳-۱-۲-۲-۲- ساختمان کمپلکس لیپید-DNA ۲۵
۱-۳-۱-۲-۲-۳- عملکرد کمپلکس لیپید-DNA ۲۶
۱-۳-۱-۲-۲-۴- میانکنش کمپلکس با اجزاء موجود در سرم ۲۷
۱-۳-۱-۲-۲-۵- دورنمای استفاده از لیپوزوم‌ها ۲۷
۱-۳-۱-۲-۲-۶- وکتورهای سنتتیک ۲۷
۱-۳-۱-۲-۳- تفنگ ژنی ۲۷
۱-۳-۱-۳- بررسی تنوع وکتورهای به کار گرفته شده و آزمایشات کلینیکی ۲۸
۱-۴- کاربردهای ژن درمانی ۲۹
۱-۴-۱- بیماریهای ژنتیکی ۲۹
۱-۴-۲- بیماریهای اکتسابی ژنتیکی ۲۹
۱-۴-۳- سرطان ۳۰
۱-۴-۳-۱- استفاده از ژنهایی که باعث خودکشی سلول ها می‌شوند ۳۱
۱-۴-۳-۲- ژن درمانی به وسیله سیتوکین‌ها ۳۱
۱-۴-۳-۳- ژن درمانی بوسیله ژنهای مهار کنندهٔ تومور ۳۲
۱-۵- مرگ سلولی، یک هدف مهم در ژن درمانی ۳۲
۱-۵-۱- اختلال در مرگ سلولی سلولهای سرطانی ۳۳
۱-۵-۲- عوامل درگیر در مرگ سلولی ۳۴
۱-۵-۲-۱- پروتئین‌های خانواده Bcl-2 ۳۴
۱-۵-۲-۲- کاسپیس‌ها ۳۶
۱-۵-۲-۳- پروتئین‌های مهار کننده مرگ سلولی ۳۸
۱-۵-۲-۴- گیرنده‌های فاکتور منهدم کنندهٔ توموری ۳۸
۱-۵-۲-۵- نقش p53 در مرگ سلولی ۳۹
۱-۵-۳- کاربرد القاء کننده‌های مرگ سلولی در ژن درمانی ۴۲

۱-۵-۳-۱- *TP53* ۴۳

۱-۵-۳-۲- آنتاگونیست‌های IGF-I ۴۴

۱-۵-۳-۳- فاکتورهای ضد رگ زایی ۴۵

۱-۵-۳-۴- لیگاند Fas ۴۵

۱-۵-۳-۵- $Bcl\text{-}X_s$ و Bax ۴۶

۱-۵-۳-۶- کاسپیس ها ۴۶

۱-۵-۴- خلاصه بحث ژن درمانی سرطان ۴۷

۱-۶- هدف از این مطالعه ۴۷

۲- مـــواد و روشهـــا

۲-۱- مـــواد مورد استفاده در مرحلهٔ اول ۴۹

۲-۱-۱- میزبان پروکاریوتی ۴۹

۲-۱-۲- پلاسمیدها ۴۹

۲-۱-۳- آنزیمها و بافرهای خاص ۴۹

۲-۱-۴- مارکر ۵۰

۲-۱-۵- آنتی‌بیوتیک‌ها ۵۰

۲-۱-۶- مواد لازم برای استخراج فنل ۵۰

۲-۱-۷- محیط ها و محلولهای مربوط به استخراج پلاسمید ۵۰

۲-۱-۸- محلولهای لازم جهت الکتروفورز با ژل آگارز ۵۲

۲-۱-۹- محیط و محلولهای لازم جهت انتقال پلاسمید به باکتری ۵۲

۲-۱-۱۰- محلولهای لازم جهت انتخاب کلنی‌های سفید و آبی ۵۳

۲-۱-۱۱- محیط های کشت باکتریایی ۵۳

۲-۱-۱۲- نرم‌افزارهای کامپیوتری مورد استفاده ۵۴

۲-۱-۱۳- دستگاههای مورد استفاده ۵۴

۲-۲- مواد استفاده شده در مرحله دوم ۵۴

۲-۲-۱- دودمانهای سلولی ۵۴

۲-۲-۱-۱- دودمان سلولی K562 ۵۵

۲-۲-۱-۲- دودمان سلولی MOLT-4 ۵۶

۲-۲-۱-۳- دودمان سلولی CCRF-CEM ۵۷

۲-۲-۲- محیط کشت سلولی ۵۸

۲-۲-۳- مواد و وسائل لازم جهت شمارش سلولها ۵۸

۲-۲-۴- مواد لازم جهت آلوده کردن سلولها ۵۹

۲-۲-۴-۱- دندروزوم ۵۹

۲-۲-۴-۲- لیپوفکتین ۵۹

۲-۲-۵- مواد لازم جهت بررسی میزان مرگ سلولی به روش فلوسایترمتری ۵۹

۲-۲-۵-۱- Annexin V-FITC ۵۹

۲-۲-۵-۲- پروپیدیوم آیوداید ۶۰

۲-۲-۵-۳- بافر کلسیم ۶۱

۲-۳- روشهای مورد استفاده در مرحلهٔ اول ۶۱

۲-۳-۱- روشهای میکروبی ۶۱

۲-۳-۱-۱- کشت باکتری جهت ذخیره‌سازی ۶۱

۲-۳-۱-۲- کشت باکتری روی پلیت ۶۲

۲-۳-۱-۳- تهیهٔ سلول مستعد ۶۲

۲-۳-۱-۴- انتقال پلاسمید به باکتری ۶۲

۲-۳-۱-۵- انتخاب کلنی‌های حامل DNA نوترکیب با تست تکمیل α (کلنی سفید و آبی) ۶۳

۲-۳-۲ روشهای شیمیایی ۶۳

۲-۳-۲-۱- تقطیر فنل ۶۳

۲-۳-۲-۲- اشباع و تنظیم pH فنل ۶۳

۲-۳-۲-۳- استخراج پلاسمید در حجم کم (Miniprep) ۶۳

۲-۳-۲-۴- استخراج پلاسمید در حجم متوسط (Medium Scale Preparation) ۶۴

۲-۳-۲-۴- تعیین غلظت DNA و خلوص آن ۶۵

۲-۳-۲-۵- الکتروفورز با ژل آگارز ۶۶

۲-۳-۲-۶- هضم DNA با آنزیم برشگر محدودکننده BamHI ۶۶

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

۲-۳-۲-۷- اتصال DNA با آنزیم T4 DNA ligase ۶۷
۲-۳-۲-- تعیین توالی (Chain Termination Sequencing) ۶۷
۲-۴- روشهای مورد استفاده در مرحله دوم ۶۸
۲-۴-۱- کشت سلولی ۶۸
۲-۴-۲- نگهداری و ذخیره سازی سلول ۶۸
۲-۴-۳- ذوب کردن سلول منجمد شده ۶۹
۲-۴-۴- بدست آوردن قدرت بقاء با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو ۶۹
۲-۴-۵- بدست آوردن غلظت مناسبی برای نئومایسین ۷۱
۲-۴-۶- آلوده کردن سلولها بوسیله وکتورهای غیر ویروسی ۷۲
۲-۴-۷- آماده کردن سلولها برای فلوسایتومتری ۷۲
۲-۴-۸- عکس برداری توسط میکروسکوپ فلورسنت ۷۳
۲-۴-۹- بررسی میزان آپوپتوز و نکروز بوسیله تکنیک فلوسایتومتری ۷۳
۲-۴-۹-۱- فلوسایتومتری ۷۳
۲-۴-۹-۲- آنالیز فلوسایتومتری سلولهای رنگ‌آمیزی شده ۷۵
۲-۴-۹-۳- مراحل آماده کردن دستگاه ۷۶
۲-۴-۹-۴- روش آماده سازی نمونه‌ها و انجام فلوسایتومتری ۷۷
۲-۴-۹-۴- نرم افزارهای استفاده شده در این مرحله ۷۷

۳- نتایج

۳-۱- نتایج بدست آمده از مرحلهٔ اول مطالعه و بحث مربوط به آن ۷۸
۳-۱-۱- اطمینان از صحت توالی p53 cDNA ۷۸
۳-۱-۱-۱- بدست آوردن یک توالی پیشنهادی مرجع برای p53 cDNA ۷۹
۳-۱-۱-۲- تعیین توالی بازی p53 cDNA ۷۹
۳-۱-۱-۲-۱- کلون کردن p53 cDNA در پلاسمید pBluescript II KS(+) و ساخت پلاسمید pPMgtB53 ۸۱
مرحلهٔ۱) ترانسفورماسیون باکتریهای Top10F' بوسیلهٔ پلاسمید pC53-SN3 ۸۱