بسم الله الرحمن الرحيم

مدیریت تحصیلات تکمیلی
دانشکده علوم پایه
گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی- ژنتیک

بررسی بیان ژن گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در استان سیستان و بلوچستان با استفاده از روش reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction

اساتید راهنما:
دکتر غلامرضا مطلب
دکتر احمد راشکی

اساتید مشاور:
دکتر مهدی جهانتبغ
دکتر احمد یگانه مقدم

نگارش:
الهه پوررحمت

اردیبهشت ۹۲

تقدیم به:

تقدیم به: ای پدر از تو هر چه می گویم باز هم کم می آورم خورشیدی شدی و از روشنایی ات جان گرفتم و در ناامیدی ها، نازم را کشیدی و لبریزم کردی از شوق اکنون حاصل دستان خسته ات رمز موفقیتم شد به خودم تبریک می گویم که تو را دارم و دنیا با همه بزرگیش مثل تو را ندارد.

مادر صبور و فداکارم: دریای بی کران عشق و فداکاری که وجودم برایش همه رنج بود و وجودش برایم همه مهر. او که رنگ شادی هایم شد، غصه ها را با تمام وجود از من دور کرد و عمری خستگی ها را به جان خرید تا اکنون توانست طعم خوش پیروزی را به من بچشاند.

همسر عزیزم: که سایه مهربانیش سایه سار زندگیم می باشد، او که با صبرش در تمامی لحظات رفیق راه بود و مشکلات مسیر را برایم تسهیل نمود. همدلی که با واژه ی نجیب و مغرور تلاش؛ آشنایی دارد و تلاش را تین را می شناسد و عطر رویایی آن را استشمام می کند و مرا در راه رسیدن به اهداف عالی یاری می رساند.

خواهر عزیزم و همسرش که همیشه دلسوز و همراهم بودند

و خانواده همسرم که پشتیبان من در تمام مراحل بودند.

الهه پوررحمت- اردیبهشت ۹۲

سپاس خداوندی را که سخنوران از ستودن او عاجز، حسابگران از شمارش نعمت‌های او ناتوان و تلاشگران از ادای حق او درمانده‌اند. خدایی که افکار ژرف‌اندیش ذات او را درک نمی‌کنند و دست غواصان دریای علوم به او نخواهد رسید.

از فرمایشات مولای متقیان حضرت علی (ع)

از آنجایی که تجلیل از معلم، سپاس از انسانی است که هدف و غایت آفرینش را تامین می‌کند و سلامت امانت هایی را که به دستش سپرده‌اند، تضمین؛ بر حسب وظیفه:

از استاد ارجمندم:

جناب آقای دکتر غلامرضا مطلب که در کمال سعه صدر با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننموده و زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده گرفتند کمال تشکر را دارم.

وصمیمانه‌ترین سپاس‌های خود را به محضر استاد راهنمای دو مم جناب آقای دکتر احمد راشکی که مسئولیت راهنمایی اینجانب را بعهده داشته و در مراحل انجام کارهای پایان نامه از هیچ مساعدتی دریغ نفرموده‌اند، تقدیم می‌دارم.

از آقایان دکتر یگانه مقدم و دکتر جهانتیغ که مشاوره این پایان نامه را بعهده داشتند کمال تشکر را دارم.

در انتها از تمام دوستان و عزیزانی که مرا در انجام این مهم همراهی کردند، تشکر می‌کنم.

چکیده

سرطان کولورکتال سومین عامل شایع مرگ و میر ناشی از این بیماری در جهان بوده و همچنین این سرطان سومین سرطان شایع در بین مردان و چهارمین سرطان شایع در بین زنان در ایران می‌باشد. گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی یک رسپتور تیروزین کینازی است که در تومورهای اپیتلیال افزایش بیان نشان می‌دهد و فرایندهای مهم تومورزایی را تنظیم می‌کند. امروزه EGFR به دلیل اهمیت پیش‌آگاهی بیان آن در دامنه‌ی گسترده‌ای از تومورها و امکان دلالت آن بر انتخاب درمانی به عنوان هدف مهمی برای تحقیقات شناخته می‌شود. همبستگی مثبتی بین وضعیت EGFR و بسیاری از سرطان‌های انسانی نشان داده شده است تفاوت در استعداد ژنتیکی و میزان مواجه با عوامل تغذیه‌ای و محیطی منجر به تنوع در بروز و خصایص سرطانهای کولورکتال بر اساس منطقه جغرافیایی و نژاد می‌گردد. در این مطالعه، بیان ژن EGFR در نمونه‌های بافت پارافینه سرطان کولورکتال در استان سیستان و بلوچستان ایران مورد مطالعه قرار گرفت. پانزده نمونه بافت پارافینه سرطان کولورکتال جمع-آوری شده از مراکز درمانی استان سیستان و بلوچستان جهت اندازه گیری سطح بیان ژن EGFR توسط Reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction آنالیز گردید. تمام واکنش‌های PCR در سه تکرار برای ژن‌های EGFR و کنترل داخلی (18s rRNA) توسط متد (Livac) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد. تفاوت سطح بیان ژن هدف در بیماران و کنترل‌ها توسط روش t- test محاسبه و در سطح معنی داری $P \leq 0.05$ معنی دار بود. همه آنالیزها توسط نرم افزار (SPSS, Inc., Chicago, IL) SPSS 13 انجام شد. نتایج نشان دهنده افزایش بیان ژن EGFR در ۱۲ نفر (۸۰ درصد) از ۱۵ بیمار بود. از لحاظ آماری تفاوت معنی داری در شیوع بیان EGFR بین بیمار و کنترل برقرار بود ($p<0.05$). با توجه تعداد کم نمونه‌ها و کوچک بودن جامعه آماری مورد مطالعه، پیشنهاد می‌گردد که این مطالعه با تعداد بیشتر نمونه و در دیگر قومیت‌ها جهت دسترسی به آمار بهتر انجام گیرد.

کلمات کلیدی: سرطان کولورکتال، گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی، Reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه..... ۱
۱-۱-۱- ضرورت و اهداف تحقیق..... ۲
۱-۲- کلیات تحقیق..... ۳
۱-۳- سرطان..... ۳
۱-۴- نقش انکوژن‌ها در سرطان..... ۴
۱-۴-۱ محصولات انکوژن‌ها..... ۶
۱-۴-۲- فعال شدن انکوژن‌ها..... ۸
۱-۵- نقش ژن‌های سرکوبگر تومور..... ۱۰
۱-۶- سرطان کولورکتال..... ۱۲
۱-۷- آناتومی روده بزرگ..... ۱۲
۱-۸- جنین شناسی روده‌ی بزرگ..... ۱۳
۱-۹- بافت شناسی روده‌ی بزرگ..... ۱۴
۱-۱۰- اتیولوژی سرطان کولورکتال..... ۱۵
۱-۱۰-۱-عوامل محیطی..... ۱۵
۱-۱۰-۲- عوامل ژنتیکی..... ۱۷
۱-۱۰-۳- بیماری های التهابی روده..... ۱۷
۱-۱۱- علائم و نشانه ها..... ۱۸
۱-۱۲- انواع پولیپ..... ۱۸
۱-۱۲-۱- پولیپ‌های نئوپلاستیک..... ۱۹
۱-۱۲-۲- پولیپ‌های هامارتوماتوز..... ۲۰
۱-۱۲-۳- پولیپ‌های التهابی، لمفوئید و هیپرپلاستیک..... ۲۰
۱-۱۳- تغییرات ژنتیکی در سرطان کولورکتال..... ۲۱
۱-۱۴- انواع سرطان کولورکتال..... ۲۲
۱-۱۴-۱-پولیپوز آدنوماتوز خانوادگی FAP ۲۳
۱-۱۴-۲- سرطان کولورکتال غیر پولیپوز ارثی (HNPCC)..... ۲۴
۱-۱۵- سیستم های درجه بندی تومور..... ۲۵
۱-۱۶- انکوژن *EGFR*..... ۲۷
۱-۱۷- نقش انکوژن *EGFR* در سرطان کولورکتال..... ۲۹
۱-۱۸- استفاده از درمان های ضد *EGFR*..... ۳۱
۱-۱۹- مکانیسم عمل داروهای ضد *EGFR*..... ۳۲

فصل دوم: مروری بر منابع

۲-۱- گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی..... ۳۴
۲-۲- مطالعات صورت گرفته روی گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی در سرطان..... ۳۵
۲-۳- مطالعات انجام شده روی بافت پارافینه..... ۴۰

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱- تهیه نمونه‌ها..... ۴۴
۳-۲- مقطع گیری از نمونه‌ها..... ۴۴
۳-۳- استخراج RNA..... ۴۵
۳-۳-۱- تهیه DEPC water..... ۴۶
۳-۳-۲- طرز تهیه SDS ۰/۵ در صد..... ۴۶
۳-۳-۳- طرز تهیه اتانول ۷۰ درصد..... ۴۶
۳-۳-۴- پارفین‌زدایی..... ۴۶
۳-۳-۵- حذف گزایلن..... ۴۷
۳-۳-۶- استخراج RNA از بافت پارافینه توسط کیت RNeasy® FFPE شرکت کیاژن..... ۴۷
۳-۴- تعیین کمیت و کیفیت RNA..... ۵۰
۳-۴-۱- تعیین غلظت و کیفیت RNA توسط طیف سنجی نوری..... ۵۰
۳-۴-۲- طرز تهیه EDTA یک میلی مولار جهت شست و شوی کووت..... ۵۱
۳-۴-۳- طرز تهیه Tris.cl ۱۰ میلی مولار جهت رقیق سازی RNA..... ۵۲
۳-۴-۴- تعیین کیفیت RNA توسط ژل آگارز..... ۵۲
۳-۵- الکتروفورز با ژل آگارز..... ۵۳
۳-۵-۱- طرز تهیه ژل آگارز ۲ درصد..... ۵۳
۳-۵-۲- بافر الکتروفورز TAE 10 X (Tris-acetate-EDTA)..... ۵۴
۳-۵-۳- طرز تهیه اتیدیوم بروماید..... ۵۵
۳-۶- سنتز cDNA..... ۵۵
۳-۷- انجام RT-PCR..... ۵۷
۳-۷-۱- مشخصات توالی ژن *EGFR*..... ۵۷
۳-۷-۲- طراحی آغازگرها..... ۵۹
۳-۷-۳- مشخصات آغازگرهای ساخته شده..... ۶۰
۳-۷-۴- رقیق کردن آغازگرها..... ۶۰
۳-۸- انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز PCR..... ۶۱
۳-۸-۱- اجزاء واکنش..... ۶۱
۳-۸-۲- بهینه سازی شرایط PCR..... ۶۲
۳-۸-۳- PCR شیب دمایی..... ۶۲
۳-۹- انجام Real time PCR..... ۶۳
۳-۹-۱- رسم منحنی استاندارد..... ۶۳
۳-۹-۲- انجام واکنش Real time PCR..... ۶۴
۳-۹-۳- Threshold و مقدار Ct..... ۶۵
۳-۱۰- تعیین توالی محصولات PCR (Direct Sequencing)..... ۶۶
۳-۱۱- پردازش اطلاعات و آنالیزهای آماری..... ۶۶

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- نمونه گیری و اطلاعات بیماران ۶۹
۴-۲- نتایج استخراج RNA ۶۹
۴-۲-۱- نتایج تعیین غلظت و کیفیت RNA توسط اسپکتروفتومتری ۷۰
۴-۳- نتایج مربوط به PCR شیب دمایی ۷۰
۴-۴- نتایج تأیید سنتز cDNA ۷۱
۴-۵- نتایج منحنی استاندارد ۷۲
۴-۵-۱- منحنی استاندارد ژن *18s rRNA* ۷۲
۴-۵-۲- منحنی استاندارد ژن *EGFR* ۷۳
۴-۶- نتایج واکنش Real Time PCR ۷۴
۴-۶-۱- تکثیر ژن *18s rRNA* ۷۵
۴-۶-۲- تکثیر ژن *EGFR* ۷۵
۴-۷- نتایج آنالیز منحنی ذوب ۷۵
۴-۷-۱- منحنی تغییرات ذوب بر حسب دمای ژن *18s rRNA* ۷۶
۴-۷-۲- آنالیز منحنی ذوب ژن *18s rRNA* ۷۶
۴-۷-۳- منحنی تغییرات ذوب بر حسب دمای ژن *EGFR* ۷۷
۴-۸- بررسی اختصاصیت محصولات Real Time PCR ۷۹
۴-۹- نتایج آماری به دست آمد ۷۹
۴-۱۰- بحث ۸۲

منابع ۹۲
پیوست ۱۰۵

فهرست جداول

جدول ۱-۱- محصولات انکوژن‌ها..... ۸
جدول ۲-۱- ژنهای سرکوبگر تومور در سرطانهای ارثی و خود به‌خودی..... ۱۱
جدول۳-۱- الگوهای بیثباتی ژنومیکی در سرطان کولورکتال..... ۲۲
جدول۴-۱- سندرومهای ارثی مستعد برای سرطان کولورکتال ۲۳
جدول ۵-۱- مراحل سیستم درجه بندی دوک..... ۲۶
جدول ۶-۱- مرحله بندی TNM سرطان کولورکتال..... ۲۷
جدول۷-۱- گیرنده‌های ErbB و لیگاندهای اتصال یابنده به آنها..... ۲۹
جدول ۱-۳- لیست اجزای کیت استخراج RNA..... ۴۷
جدول ۲-۳- مواد مورد نیاز جهت الکتروفورز..... ۵۳
جدول ۳-۳- مواد و مقادیر مورد نیاز برای بافر الکتروفورز 10X..... ۵۴
جدول ۴-۳- مخلوط اول جهت ساخت cDNA..... ۵۶
جدول۵-۳- مخلوط دوم جهت ساخت cDNA..... ۵۶
جدول ۶-۳- مشخصات آغازگرهای ژن *EGFR*..... ۶۰
جدول ۷-۳- میزان بهینه اجزای واکنش PCR..... ۶۲
جدول ۸-۳- چرخه دمایی PCR..... ۶۳
جدول ۹-۳- مشخصات آغازگرهای ژن مرجع..... ۶۳
جدول۱۰-۳ مقدار مواد لازم جهت واکنش Real time PCR برای پرایمر *EGFR*..... ۶۴
جدول۱۱-۳- مقدار مواد لازم جهت واکنش Real time PCR برای پرایمر *18s rRNA*..... ۶۵
جدول۱۲-۳- شرایط دمایی و زمانی واکنش Real time PCR..... ۶۵

فهرست اشکال

شکل ۱-۱- خط زمانی کشف انکوژن‌های ویروسی..... ۶
شکل ۲-۱- فاکتورهای محافظت کننده و خطرناک در ایجاد سرطان کولورکتال..... ۱۶
شکل ۳-۱- مدل ساختاری *EGFR* قبل و بعد از اتصال لیگاند..... ۲۸
شکل ۴-۱- میانگین بیان گیرنده های *ErbB* و لیگاندهای مناسبشان..... ۳۰
شکل ۱-۳- دستگاه اسپکتوفتومتری..... ۵۱
شکل ۲-۳- توالی ژن *EGFR*..... ۵۹
شکل ۳-۳- توالی قطعه تکثیر یافته توسط آغازگرهای ژن *EGFR*..... ۶۰
شکل ۴-۳- ترموسایکر ساخت شرکت Eppendorf..... ۶۱
شکل ۱-۴- فراوانی (درصد) مردان و زنان شرکت کننده در مطالعه در دو گروه بیمار و کنترل..... ۶۹
شکل ۲-۴- نتایج استخراج RNA..... ۷۰
شکل ۳-۴- PCR شیب دمایی ژن *18srRNA*..... ۷۱
شکل ۴-۴- PCR شیب دمایی ژن *EGFR*..... ۷۱
شکل ۵-۴- تکثیر قطعه 93bp مربوط به ژن *EGFR*..... ۷۲
شکل ۶-۴- تکثیر قطعه 109bp مربوط به ژن *18srRNA*..... ۷۲
شکل ۷-۴- منحنی استاندارد ژن *18srRNA*..... ۷۳
شکل ۸-۴- منحنی استاندارد ژن EGFR..... ۷۴
شکل ۹-۴- منحنی تکثیر ژن *18s rRNA*..... ۷۵
شکل ۱۰-۴- منحنی تکثیر ژن *EGFR*..... ۷۵
شکل ۱۱-۴- تغییرات فلورسانس بر حسب دما برای ژن *18s rRNA*..... ۷۶
شکل ۱۲-۴- منحنی ذوب ژن *18s rRNA*..... ۷۷
شکل ۱۳-۴- تغییرات فلورسانس بر حسب دما برای ژن *EGFR*..... ۷۸
شکل ۱۴-۴- منحنی ذوب ژن *EGFR*..... ۷۸
شکل ۱۵-۴- نتایج تعیین توالی..... ۷۹
شکل ۱۶-۴- مقایسه میانگین ΔCT در دو جمعیت سالم و بیمار..... ۸۱
شکل ۱۷-۴- نمودار درصد نمونه های بیماران دارای Ct پایین‌تر از میانگین Ct کنترل..... ۸۱

فصل اول:

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه:

سرطان دومین علت شایع مرگ و میر در ایالات متحده می باشد، و نزدیک به ۱ مرگ از هر ۴ مرگ و میر محسوب می‌شود. موسسه ملی سرطان[1] تخمین زده است در سال ۲۰۱۲، حدود ۵۷۷۱۹۰ آمریکایی، بیش از ۱۵۰۰ نفر در روز از سرطان می‌میرند و در حدود ۱۶۳۸۹۱۰ موارد جدید سرطان، در سال ۲۰۱۲ تشخیص داده شده است (ACS[2]., 2012). در ایران سرطان سومین عامل شایع مرگ و میر محسوب می‌شود (Pourhoseingholi *et al*., 2010).

سرطان کولورکتال سومین عامل شایع مرگ و میر ناشی از این بیماری در جهان (Pourhoseingholi *et al*., 2010)، دومین و سومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان به ترتیب در زنان و مردان در جهان می‌باشد (Kang *et al*., 2011). این سرطان سومین سرطان شایع در بین مردان و چهارمین سرطان شایع در بین زنان در ایران می‌باشد (Kolahdoozan *et al*., 2009). تخمین زده می‌شود سالانه در ایران ۳۶۴۱ نفر به این بیماری مبتلا می‌شوند (Malekzadeh *et al*., 2009).

آسیب‌شناسی کارسینومای کولورکتال، پیچیده و چندعاملی می باشد بطوری که ژن‌های متعددی در مسیرهای ژنتیکی گوناگون در پیشرفت و توسعه آن دخالت دارند (منتظر حقیقی و همکاران، ۱۳۸۷).

گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی یک رسپتور تیروزین کینازی است که در تومورهای اپیتلیال افزایش بیان نشان می‌دهد (Scaltriti and Baselga., 2006). افزایش بیان ژن *EGFR* و در نتیجه سطح پروتیین *EGFR* که در بسیاری از تومورها مانند: ریه، سر و گردن، تخمدان، گردن رحم،

[1] National Cancer Institute
[2] American cancer Society

مثانه، مری، معده، مغز، پستان، آندومتر، روده بزرگ و پانکراس دیده می‌شود (Gotoh, 2011) فرایندهای مهم تومورزایی مانند تکثیر، آپوپتوز، رگ‌زایی و تهاجم را تنظیم می‌کند (Roy *et al*., 2008). اگرچه افزایش بیان ژن *EGFR* در ۸۲-۲۵ درصد از سرطان‌های کولورکتال گزارش شده است و برخی از مطالعات اخیر افزایش بیان پروتئین آن را در ۴۹-۳۵ درصد از موارد گزارش کرده‌اند، با این حال اهمیت بالینی بیان بالای *EGFR* در سرطان روده بزرگ نامشخص است (Krasinskas, 2011). به صورتی که در یک مطالعه روی ۲۴۹ سرطان کولورکتال با استفاده از روش ایمیونوهیستوشیمی ارتباط بین بیان بالای *EGFR* با درجه تومور نشان داده شد (Mckay *et al*., 2002)، در حالی که در مطالعه‌ای دیگر روی یک گروه از ۱۳۴نمونه‌ی تومور کولورکتال با همان تکنیک ارتباطی بین افزایش بیان *EGFR* و درجه تومور یافت نشد (Resnick *et al*., 2004). به طور مشابه بعضی از مطالعات ارتباط بین افزایش بیان *EGFR* و کاهش حیات را نشان داده‌اند (Resnick *et al*., 2004 and Goldstein and Armin., 2001) در حالی که بعضی مطالعات دیگر ارتباطی بین آنها نیافتند (Spano *et al*., 2005). کشف جهش‌های *EGFR* طی مطالعات بالینی منجر به انجام آزمایشات گسترده‌ای در زمینه نقش این جهش‌ها و تکثیر *EGFR* در پاتوژنز بیماری و پیش بینی و حساسیت آن به درمان شده است (Roy *et al*., 2008).

۱-۱-۱- ضرورت و اهداف تحقیق:

سرطان سومین عامل شایع مرگ و میر در ایران است. سالانه نزدیک به یک میلیون مورد جدید سرطان کولورکتال در سراسر جهان تشخیص داده می‌شود که نیم میلیون از این بیماران می‌میرند. اگرچه بروز سرطان کولورکتال در جمعیت ایران در حال حاضر کم است، اما بروز آن در طی سال-های اخیر به طور پیوسته افزایش یافته است. مسئله نگران کننده این است که سرطان کولورکتال، در مقایسه با کشورهای غربی، روی جمعیت جوان تأثیر می‌گذارد

(Pourhoseingholi *et al*., 2010). میزان بروز سرطان کولورکتال در چندین منطقه که از لحاظ تاریخچه، جزء مناطق با ریسک پایین بودند مانند اسپانیا و تعدادی از کشورهای شرق آسیا و اروپا به سرعت در حال افزایش است (Kang *et al*., 2011).

تفاوت در استعداد ژنتیکی و میزان مواجه با عوامل تغذیه‌ای و محیطی منجر به تنوع در بروز و خصایص سرطانهای کولورکتال بر اساس منطقه جغرافیایی و نژاد می‌گردد (فاخری و همکاران، ۱۳۸۷). گزارش شده که سرطان کولورکتال، تنوع جغرافیایی را در رخدادش حتی درون مناطقی از قوم و ملیتهای همگن نشان می‌دهد (سبحانی و همکاران، ۱۳۸۹).

آسیب‌شناسی مولکولی سرطان کولورکتال یکی از برجسته ترین موارد مورد مطالعه در سال‌های اخیر بوده است (Kang *et al*., 2011) و به دلیل اثرات جانبی شدید شیمی‌درمانی، استراتژی‌های جدید بر مبنای مکانیسم‌های مولکولی به شدت احساس می‌گردد (Hisayuki and Gazdar., 2005).

هدف از انجام این تحقیق ارزیابی بیان انکوژن *EGFR* در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال جهت پیش برد اهداف درمانی در استان سیستان و بلوچستان می‌باشد. به منظور بررسی میزان بیان ژن *EGFR* از روش reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction استفاده گردید.

آنچه که به عنوان فرضیه در این تحقیق مطرح گردید افزایش بیان انکوژن *EGFR* در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال می‌باشد. همچنین به سؤال ذیل پاسخ داده خواهد شد: آیا ارتباطی بین افزایش بیان ژن *EGFR* و بروز بیماری دربیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در استان سیستان و بلوچستان یافت می‌شود؟

۲-۱- کلیات تحقیق:

۳-۱- سرطان:

اصطلاح سرطان به تومور هایی اطلاق می شود که می توانند به بافت های مجاور خود که از سلول های سالم تشکیل شده اند حمله کنند. توانایی مهاجرت و هجوم سلول‌های توموری عامل طبقه بندی تومورها به دو دسته خوش خیم و بد خیم است. اگر یک تومور بدخیم به یک رگ خونی یا لنفی برسد می‌تواند متاستاز دهد و در بافت دورتری رشد کند. نئوپلاسم[1] (که معنی تحت اللفظی آن رشد جدید است)، شکل غیر طبیعی رشد سلول ها است و تومور، نئوپلاسمی است که با وضعیت بیمارگونه همراه است. تومورها، بیماری‌هایی هستند که در آنها جمعیتی از سلول های به لحاظ ژنتیکی هم خانواده توانایی رشد ناهنجار را کسب می کنند (نخعی سیستانی و همکاران، ۱۳۸۹).

دانش کنونی از مکانسیم های سرطان پیشنهاد کننده‌ی این مطلب است که علت ایجاد همه‌ی سرطان‌ها ناشی از هر دو عامل محیطی و ژنتیکی است (Clapp *et al*., 2005). عوامل ژنتیکی، هورمونی و ویروسی (به عنوان مثال پاپیلومای انسانی) روی سرطان تاثیر می‌گذارند. باقی ماندن تغییراتی مانند آسیب بافتی، تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی (مثل جهش، از دست دادن هتروزیگوسیتی و متیلاسیون پروموتور) و تغییرات ترانسکریپتوم (مثل التهاب و مسیرهای آپاپتوز) در دراز مدت منجر به فعال شدن مسیرها و عملکردهای سلولی نابجا (به عنوان مثال: عدم تنظیم تکثیر و آپاپتوز) گشته، در نهایت منجر به تغییرات پیش‌سرطانی می‌گردد. در نتیجه‌ی اضافه شدن تغییراتی مانند: رگزایی و تهاجم سرطان پیشرفته و متاستاز ایجاد شود. بسیاری از تغییرات مولکولی سرطان در مراحل پیشرفته بیماری نیز رخ می‌دهد (Roy *et al*., 2008). سرطان به وسیله تغییر در انکوژن‌ها، ژن‌های سرکوبگر تومور و ژن‌های micro RNA ایجاد می‌شود. یک تغییر ژنتیکی به ندرت برای توسعه یک تومور بدخیم کافی است. بیشتر شواهد به یک فرایند چند

[1] Neoplasm

مرحله‌ای از تغییرات پی در پی در انکوژن‌های مختلف، ژن‌های سرکوبگر تومور، یا ژن‌های microRNA در سلول های سرطانی اشاره دارند (Croce, 2008).

۴-۱- نقش انکوژن[1]ها در سرطان:

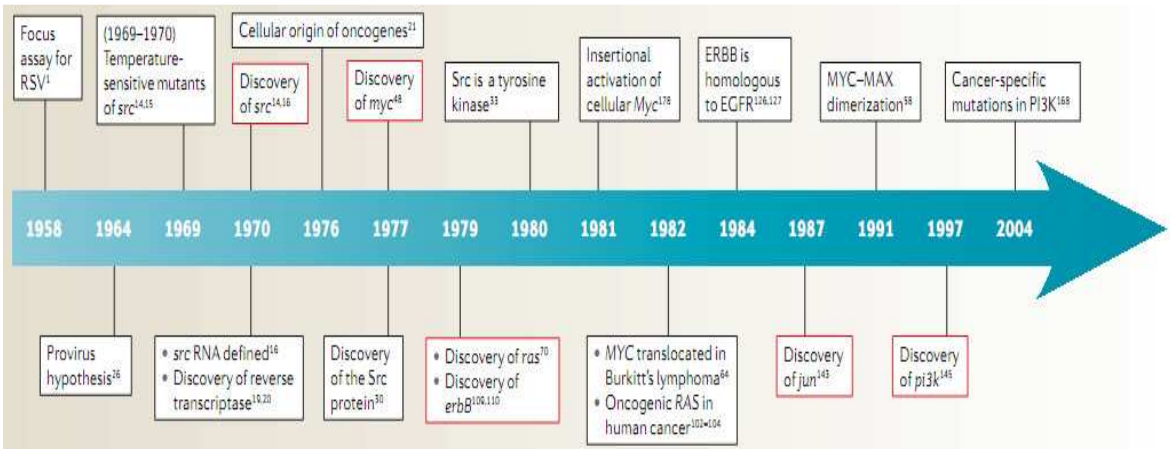
انکوژن‌ها شکل جهش یافته‌ی یک ژن طبیعی سلولی به نام پروتوانکوژن[2] است که در گسترش سرطان شرکت می‌کند (نخعی سیستانی و همکاران، ۱۳۸۹). پروتئین‌های حاصل از پروتوانکوژن‌ها در شرایط عادی عملکردهای حیاتی در پیام‌رسانی سلولی، رشد و تمایز بر عهده دارند، اما بیان غیر طبیعی آنها قادر به القای تومورزایی است (Pappou, 2010). انکوژن‌ها ژن‌های منحصر به فردی هستند که به وسیله‌ی جهش‌های تغییر دهنده و نه حذف کننده‌ی پروتئین‌های ساخته شده توسط آنها ایجاد می‌شوند (نخعی سیستانی و همکاران، ۱۳۸۹).

کشف انکوژن‌ها در سال ۱۹۱۰ زمانی که Peyton Rous نشان داد که یک عصاره‌ی عبور داده شده از فیلتر که فاقد سلول و باکتری است می تواند باعث ایجاد فیبروسارکوما[3] در جوجه ها شود آغاز شد (Pappou, 2010). بعد از آن او دریافت که سارکومای جوجه می‌تواند به دفعات به وسیله عصاره توموری فاقد سلول، از حیوانی به حیوان دیگر منتقل شود. عامل این بیماری در عصاره سلولی ویروس Rouse sarcoma virus(RSV) بود. کشف انکوژن‌های ویروسی برای اولین بار باعث شد که یک عامل ایجاد کننده سرطان از منظر ژنتیک مورد مطالعه قرار گیرد (نخعی سیستانی و همکاران، ۱۳۸۹). اغلب انکوژنها که نقش برجسته‌ای در سرطان‌های انسانی دارند در ابتدا در رتروویروس[4]ها شناخته شده‌اند. اینها شامل گیرنده تیروزین کینازی گیرنده فاکتور رشد *EGFR*، GTPase کوچک *RAS*، فسفواینوزیتول تری کیناز *PI3K* و تنظیم کننده رونویسی *MYC* می-باشند. کشف انکوژن‌های ویروسی در طول چهار دهه گذشته در حال حرکت بوده است، و به دوره

[1] oncogene
[2] Proto-oncogene
[3] fibrosarcomas
[4] retrovirus

ای از پیشرفت رسیده است که در عصر فعلی، ما از سرطان به عنوان یک بیماری ژنتیکی یاد کنیم. شکل ۱-۱کشف انکوژن‌های ویروسی را نشان می‌دهد (Vogt, 2012).

البته باید توجه داشت انکوژن‌هایی که اغلب در رشد و گسترش سرطان‌های انسانی شرکت دارند، به وسیله ویروس‌ها منتقل نمی‌شوند بلکه در نتیجه‌ی جهش‌های سوماتیک در پروتوانکوژن-ها ایجاد می‌گردند (نخعی سیستانی و همکاران، ۱۳۸۹). اولین شاهد در مورد این موضوع که سرطان از تغییرات ژنتیکی سوماتیک ایجاد می‌شود از مطالعه روی لنفوم بورکیت حاصل شد، که در آن یکی از سه جابه‌جایی مختلف یک انکوژن که روی کروموزوم ۸q۲۴، *MYC*، قرار دارد با لوکوس‌های ژن ایمنوگلوبولین بررسی شد. هر کدام از کروموزوم‌های 2p,22q و 14q با فعال‌سازی انکوژن *MYC* توسط جابه‌جایی، حاوی عناصر تحریک کننده در لوکوس ایمنوگلوبولین می‌شوند (Croce, 2008).



شکل ۱-۱- خط زمانی کشف انکوژن‌های ویروسی (Vogt, 2012)

انکوژن‌ها کد کننده‌ی پروتئین‌هایی هستند که کنترل کننده تقسیم سلولی، آپاپتوز و یا هر دوی آنها هستند. آنها می‌توانند به وسیله‌ی تغییرات ساختمانی که حاصل جهش یا اتصال ژنها، توسط کنار هم نشینی عناصر تحریک کننده، و یا به وسیله تحریک فعال شوند. جابه‌جایی و جهش می-تواند به عنوان وقایع اولیه یا در طی پیشرفت تومور اتفاق بیفتد در حالی که تکثیر معمولاً در طی پیشرفت اتفاق می‌افتد (Croce, 2008).

۱-۴-۱ محصولات انکوژن‌ها:

محصولات انکوژن‌ها به شش گروه بزرگ تقسیم می‌شوند: (جدول ۱-۱)

فاکتورهای رونویسی، تغییر دهنده‌های کروماتین، فاکتورهای رشد، گیرنده فاکتور رشد، انتقال دهنده‌های سیگنال.

فاکتورهای رونویسی: اغلب اعضای یک خانواده چند ژنی هستند که در دومین‌های ساختاری متداولی اشتراک دارند. بسیاری از فاکتورهای رونویسی برای فعال شدن به اثر متقابل با دیگر پروتئین‌ها نیاز دارند.

تغییر دهنده‌های کروماتین: تغییر در درجه‌ی فشرده‌سازی کروماتین نقش مهمی را در بیان ژن، همانند سازی و جداسازی کروموزوم ایفا می‌کند. دو نوع آنزیم تغییر دهنده‌ی کروماتین شامل: آنزیم ATP-dependent که جایگاه نوکلئوزوم را تغییر می‌دهد و آنزیم‌های تغییر دهنده‌ی دنباله‌ی N-terminal هیستون‌ها می‌باشند. الگوی تغییر هیستون‌ها یک کد اپی‌ژنتیکی است که مشخص کننده‌ی ارتباط متقابل بین نوکلئوزوم و پروتئین‌های مرتبط با کروماتین می‌باشد.

فعال شدن ساختمانی یک ژن فاکتور رشد در تبدیل بدخیمی می‌تواند شرکت داشته باشد. در بسیاری از سرطان‌ها گیرنده فاکتور رشد دچار تغییر شده است. در بسیاری از تومورها یک حذف در دومین اتصال لیگاند رسپتور فاکتور رشد اپیدرمی منجر به فعال شدن ساختمانی رسپتور در عدم حضور اتصال لیگاند می‌شود.

انتقال دهنده‌های سیگنال: اتصال گیرنده تیروزین کیناز به لیگاند مناسب باعث تنظیم مجدد گیرنده و فسفوریلاسیون خود به خودی تیروزین در بخش داخل سلولی مولکول می‌شود. فسفوریلاسیون خود به خودی فعالیت کیناز گیرنده را بالا می‌برد یا واکنش متقابل رسپتور با دومین‌های پروتئین‌های سیتوپلاسمی را پیش می‌برد. بسیاری از انکوژن‌ها اعضای مسیرهای سیگنال دهی را کد می‌کنند. آنها به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند: پروتئین کینازهای غیر

رسپتوری و پروتئین‌های اتصالی گوانوزین تری فسفات. پروتئین کینازهای غیر رسپتوری خود به دو گروه تیروزین کینازها (*ABL*, *LCK*, *SRC*) و سرین ترئونین کینازها (*AKT*, *RAF1*, *MOS*, *PIM1*) تقسیم می‌شوند (Croce, 2008) .

جدول ۱-۱- محصولات انکوژن‌ها.

مثال	محصولات انکوژن‌ها
FLI1, *ETS* family	فاکتورهای رونویسی
ALL1	تغییر دهنده‌های کروماتین
Platelet-derived growth factor (*PDGF*)	فاکتورهای رشد
epidermal growth factor receptor (*EGFR*)	گیرنده فاکتور رشد
vascular growth factor receptor (*VEGFR*)	
Ras, ABL, AKT, RAF1	انتقال دهنده‌های سیگنال
BCL2	تنظیم کننده آپوپتوز

۲-۴-۱- فعال شدن انکوژن‌ها:

مکانیسم‌های چندگانه‌ی مشخص برای تبدیل پروتوانکوژن‌ها به انکوژن‌ها وجود دارد که می‌تواند کمی (افزایش بیان یک محصول تغییر ناپذیر) و یا کیفی (تولید محصول تغییر یافته) باشد. انواع کمی فعال شدن انکوژن‌ها شامل تکثیر (تکثیر ژنی)، و یا جا به جایی به یک دومین کروماتینی فعال که موجب تنظیم رشد ژن تحت کنترل پروموتورهای مختلف می‌شود، باعث بیان نامناسب ژن می‌شود. انواع کیفی شامل جهش‌های نقطه‌ای یا تولید محصول جدید از یک ژن واهی است (Pappou, 2010).

بازآرایی کروموزوم‌ها: جابجایی و وارونگی کروموزوم اختلالات سیتوژنتیک مشترک در سلول های سرطانی است. در سرطان خون و تومورهای جامد، جابجایی و معکوس شدگی یا عدم تنظیم رونویسی از انکوژن‌ها افزایش یافته است (Croce, 2008). بازآرایی‌های ساختاری بزرگ مانند جابه-

جایی می‌توانند پروتوانکوژن‌ها را به عناصر ژنتیکی دور دست نزدیک کند. با توجه به محل شکستگی، جابه‌جایی به دو روش موجب فعال شدن پروتوانکوژن‌ها می‌شود. اگزون‌های دو ژن مجزا در نتیجه جابه‌جایی، تحت کنترل یک پروموتور قرار می‌گیرند. این نوع ترکیب اگزونی به بیان یک پروتئین ترکیبی شامل عناصر رمز کننده‌ی هر دو ژن منجر می‌شود. در روش دیگر، به واسطه‌ی جابه‌جایی یک ORF[۱] کامل در مجاورت یک پروموتور قوی قرار می‌گیرد (نخعی سیستانی و همکاران، ۱۳۸۹). در سرطان پروستات، الحاق ژنی بین یک ژن که حامل یک پروموتر بسیار فعال در سلول های هدف، و دیگری که حامل فعالیت انکوژنیک (مانند، ERG1) است رخ می دهد (Croce, 2008).

جهش‌ها: هنگامی که یک انکوژن توسط جهش فعال می‌شود، ساختار پروتئین کد شده توسط آن در مسیر افزایش فعالیت تغییر می‌کند. انواع بسیاری از جهش در انکوژنها رخ می دهد (Croce, 2008). جهش‌هایی که پروتوانکوژن‌ها را به انکوژن‌ها تبدیل می‌کنند شامل: تغییرات تک نوکلئوتیدی[۲]، تکثیر یا ازدیاد ژنی[۳]، ترکیب ژنی[۴]، و سایر بازآرایی‌های کروموزومی[۵] است که فعالیت پروتئین‌های ساخته شده توسط پروتوانکوژن‌ها را افزایش می‌دهد. جهش‌های بی‌معنی[۶]، جهش‌های های تغییر دهنده‌ی قاب[۷]، و جهش‌هایی که در جایگاه پردازش روی می‌دهند[۸]، عموماً موجب فعال فعال شدن انکوژن‌ها نمی‌شوند (Thomas *et al*., 2007).

تکثیر ژنی: در سلول‌های سالم پروتوانکوژن‌ها به صورت ژن‌های تک نسخه هستند. به این معنی که یک مکان ژنی واحد که تنها نسخه از هر اگزون، اینترون و توالی تنظیمی دارد. به دلیل طبیعت دیپلوئیدی ژنوم انسان در هر سلول دو نسخه از هر انکوژن وجود دارد که هرکدام روی یک

[1] Open reading frame
[2] Single nucleotide substitution
[3] Amplification
[4] Gene fusion
[5] Chromosomal rearrangements
[6] Nonsense
[7] Frame shift
[8] Splice site mutation