

بہ نام ایزد یکتا

۱۰۷۷۹۲

۱۷۱۱۰۷۹۳
۱۷۱۰۱۱۵



دانشگاه شهید بهشتی

دانشکده علوم زیستی

پایان نامه کارشناسی ارشد ژنتیک

بررسی اثر خاموش سازی ژن بتا کاتنین در سلولهای سرطان کولن

HT-29 از طریق *RNAi*

خشایار فرخ زاد

اساتید راهنما:

دکتر مهدی فروزنده مقدم

دکتر شیرین فریور

تیر ۸۷

کتابخانه تخصصی زیست‌شناسی
شهرود

۱۱۳۸۷ / ۱۰۱ - ۵

۱۰۷۷۹۲



دانشگاه شهید بهشتی

بسمه تعالی

تهران ۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳ اوین

تلفن: ۲۹۹۰۱

« صورتجلسه دفاع پایان نامه دانشجویان دوره کارشناسی ارشد »

بازگشت به مجوز دفاع ۲۰۰/۱۹۶۲/ت/د مورخ ۸۷/۳/۲۵ جلسه هیأت داوران
ارزیابی پایان نامه آقای خشایار فرخ زاد به شماره شناسنامه ۲۷۰۶ صادره از تهران
متولد ۱۳۶۲ دانشجوی دوره کارشناسی ارشد ناپیوسته رشته زیست شناسی - ژنتیک
با عنوان: ^{سازی} بررسی اثر خاموش ژن بتا کاتنین بر سلولهای سرطان کلون از طریق روش RNAi

به راهنمایی:

خانم دکتر شیرین فریور
آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم

طبق دعوت قبلی در تاریخ ۱۳۸۷/۴/۹ تشکیل گردید و براساس رأی هیأت داوری و با
عنایت به ماده ۲۰ آئین نامه کارشناسی ارشد مورخ ۷۵/۱۰/۲۵ پایان نامه مزبور با
نمره ۱۹٫۲۵ و درجه عالی مورد تصویب قرار گرفت.

۱- استاد راهنما: خانم دکتر شیرین فریور

۲- استاد راهنما: آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم

۳- استاد داور: آقای دکتر سید یوسف سیدنا

۴- استاد داور و نماینده تحصیلات تکمیلی: آقای دکتر مسعود شیدائی

تقدیم به خانواده و دوستانم.

سپاس گزاری

با سپاس فراوان از استاد ارجمند جناب آقای دکتر فروزنده که با صبر و بردباری فراوان همواره در انجام این پایان نامه من را راهنمایی و کمک فرمودند و همچنین از راهنمایی ها و کمک های استاد گرامی خانم دکتر فریور تشکر و قدرانی می گردد.

همچنین از همیاری و همفکری های خانم دکتر رجبی بسیار سپاسگزارم و از دانشجویان گروه بیوتکنولوژی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس هم تشکر مینمایم.

چکیده

سرطان کلون از شایع ترین سرطانها است که سالانه حدود ۱۵۰۰۰۰ مورد در آمریکا گزارش می شود (حدود ۱۰٪ کل سرطانها). در ۷۰-۸۰٪ این موارد اختلال در فعالیت ژن *APC* دیده می شود. اختلال در فعالیت ژن *APC* باعث افزایش سطح بتاکاتنین سلولی می شود. بتاکاتنین با عامل رونویسی *LEF/TCF* برهم کنش دارد که نقش مهمی در کنترل بیان برخی ژن های تقسیم سلولی دارد مثل *Cyclin D1*, *c-myc*. ژن *Aldose Reductase* هم در برخی سرطانهای کلون افزایش بیان دارد. مطالعات نشان می دهد که کنترل *Aldose Reductase* توسط دارو باعث کاهش سرعت رشد این سرطانها می شود. بنابراین کاهش بیان ژن *Aldose Reductase* و β -*catenin* می توان باعث کاهش سرعت تکثیر سلولهای سرطانی شد.

در این راستا ما از *RNAi* که یک قدرتمند جهت خاموش کردن بیان ژن است استفاده کردیم. در این روش از *dsRNA*هایی (21-23 bp) که دارای توالی همولوگ با *mRNA* ژن هدف می باشند استفاده می شود. و انتقال آنها به داخل سلولهای مورد نظرباعث تخریب *mRNA* مورد نظر می گردد. سپس میزان بیان ژن با استفاده از *Real-time PCR* بررسی می شود.

در این تحقیق میزان خاموشی β -*catenin* و *Aldose Reductase* توسط *siRNA* از طریق اندازه گیری بیان ژن در رده سلولی سرطان کلون (*HT-29*) تعیین شد و تاثیر آن بر تکثیر سلول بررسی شد. سلولهای *HT-29* با غلظتهای مختلف *siRNA* ضد این دو ژن ترانسفکت شدند و بیان آنها و روند تکثیر سلولها پس از ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت تعیین گردید. بیشترین کاهش بیان (۸۵-۸۰٪) برای β -*catenin* در غلظت *siRNA* 50pMol/ml بعد از ۴۸ ساعت مشاهده گردید و برای *Aldose Reductase* (۵۰-۴۵٪) در غلظت *siRNA* 50pMol/ml بعد از ۴۸ ساعت بدست آمد. بررسی تکثیر سلولها پس از تیمار برای هر ژن کاهش سرعت تکثیر ۲۵-۳۰٪ را نسبت به سلولهای کنترل نشان داد. تیمار هم زمان ضد هر دو ژن پس از ۷۲ ساعت باعث کاهش سرعت تکثیر ۴۰٪ نسبت به سلولهای کنترل شد که نشان می دهد تیمار هم زمان اثر طولانی مدت بیشتری دارد.

واژگان کلیدی: *RNA Interference (RNAi)*, *Real-time PCR*, *Beta-Catenin* و سرطان کلون

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فهرست مطالب	أ
فصل ۱	۸
1-1-1-1 <i>RNAi</i>	۹
1-1-1-1 معرفتی:	۹
2-1-1-1 مکانیزمهای <i>RNAi</i>	۱۱
3-1-1-1 <i>RNAi</i> در سلولهای پستانداران	۱۳
4-1-1-1 <i>RNAi</i> پایدار	۱۴
5-1-1-1 محدودیتهای <i>RNAi</i>	۱۵
1-5-1-1 اثرات غیراختصاصی و خارج از هدف <i>RNAi</i>	۱۵
2-5-1-1 تحریک <i>Interferon</i> توسط <i>siRNA</i>	۱۶
3-5-1-1 طراحی الیگو نوکلئوتیدهای <i>siRNA</i>	۱۸
6-1-1-1 کاربردهای تحقیقاتی <i>RNAi</i>	۱۹
7-1-1-1 ارتباط با سرطان	۲۱
8-1-1-1 کاربردهای درمانی	۲۲
9-1-1-1 نتیجه گیری	۲۲
I-2-1 سرطان کلون	۲۳
1-2-1-1 <i>β-catenin</i>	۲۴
1-1-2-1 مسیرهای <i>β-catenin</i>	۲۶
2-1-2-1 اجزای مسیرهای <i>β-catenin</i> و سرطانزایی کلورکتال	۲۶
3-1-2-1 ناپایداری کروموزوم (CIN) در سرطان کلون	۲۸
4-1-2-1 نتیجه گیری	۲۹
2-2-1-1 <i>Aldose Reductase</i>	۳۰
1-2-2-1 معرفتی:	۳۰
2-2-2-1 اثبات نقش آلدوز ردوکتاز در سرطان کلون	۳۱

- ۳۳.....کاهش رشد سلولهای سرطان کلون تحت القای عوامل رشد:.....
- ۳۳.....کاهش افزایش تولید *PGE2* تحت القای عوامل رشد توسط بازدارنده های آبشار سیگنالینگ فعالسازی *NF-kB*.....
- ۳۳.....اثریازداری آلدوز ردوکتاز بر روی سیگنالینگ تحت القای *lipid aldehyde* در سلولهای *CaCo2*.....
- ۳۴.....*AR siRNA* مانع رشد تومور سرطان کلون در موشهای *nude* می شود:.....
- ۳۴.....نقشهای *COX-2*.....
- ۳۶.....*1-2-2-8* نتیجه گیری.....
- ۳۷.....*Real-time PCR*.....
- ۳۸.....*Real-time PCR* مورد استفاده در *I-3-1* مفاهیم.....
- ۴۰.....روش های آشکار سازی در *Real-Time*.....
- ۴۰.....استفاده از رنگهای فلوروسنت.....
- ۴۱.....گروه یک.....
- ۴۱.....گروه دوم.....
- ۴۱.....گروه سوم.....
- ۴۲.....استفاده از پروبهای اختصاصی.....
- ۴۲.....تجزیه و تحلیل اطلاعات کمی.....
- ۴۲.....تعیین کمیت مطلق.....
- ۴۳.....تعیین کمیت نسبی.....
- ۴۴.....فصل ۲ مواد و روشها.....
- ۴۵.....۱-۲ مواد.....
- ۴۵.....*2-1-1* بافرها.....
- ۴۵.....*2-1-1-1* بافرهای الکتروفورز *DNA*.....
- ۴۵.....*2-1-1-2* سایر بافرها.....
- ۴۶.....*2-1-2* محیطهای کشت سلولی.....
- ۴۶.....*RPMI 1640* محیط.....
- ۴۶.....*DMEM* محیط.....
- ۴۶.....*2-1-2-3* محیط فریزینگ سلولها.....
- ۴۷.....تریپسین.....
- ۴۷.....آنتی بیوتیک.....
- ۴۷.....گلوتامین.....
- ۴۷.....*2-1-3* پرایمرها.....

۴۸	2-1-4 رده ی سلولی <i>HT-29</i>
۴۸	2-1-5- <i>siRNA</i>
۴۸	2-1-6 وسایل.....
۴۸	2-1-7 دستگاه‌ها.....
۴۹	2-1-8 روش ها.....
۴۹	۱-۸-۱-۲- انجام واکنش <i>PCR</i> و بهینه سازی آن بر روی <i>cDNA</i> ی بدست آمده از سلولها.....
۵۰	۲-۸-۱-۲- کشت سلول های <i>HT-29</i>
۵۰	۳-۸-۱-۲- انجام سلولها:.....
۵۰	۴-۸-۱-۲- ذوب سلولهای منجمد.....
۵۱	۹-۱-۲- شمارش سلولها:.....
۵۱	2-1-10 ترانسفکشن با روش <i>Lipofectamine 2000</i>
۵۳	2-1-11- تخلیص <i>RNA</i>
۵۴	۱۲-۱-۲- بررسی کیفیت <i>RNA</i> استخراج شده.....
۵۴	۱-۱۲-۱-۲- اسپکتروفتومتری:.....
۵۴	۲-۱۲-۱-۲- الکتروفورز ژل آگارز:.....
۵۴	۱۳-۱-۲- خالص سازی <i>RNA</i> با استفاده از آنزیم <i>DNase</i>
۵۵	2-1-14 واکنش رونویسی معکوس (ساخت <i>cDNA</i> با استفاده از آنزیم <i>M-MuLV</i>).....
۵۵	۱۵-۱-۲- انجام واکنش <i>Real-time RT-PCR</i> با استفاده از <i>SYBER GreenI (SG)</i>
۵۷	۱۶-۱-۲- مقایسه نسبی بیان ژنها.....
۵۸	۱۷-۱-۲- آنالیز آماری.....
۵۹	فصل ۳ نتایج.....
۶۰	۱-۳- بهینه سازی شرایط کشت سلول.....
۶۰	3-2- بهینه سازی غلظت <i>siRNA</i> و <i>Lipofectamin 2000</i>
۶۵	۳-۳- استخراج <i>RNA</i> و <i>cDNA</i> سازی.....
۶۵	۴-۳- بهینه سازی شرایط واکنش <i>PCR</i>
۶۷	۱-۴-۳- تنظیمات <i>Real time PCR</i>
۶۷	۱-۴-۳-۱- بهینه سازی واکنش در <i>Real time PCR</i>

۶۹	۳-۴-۱-۲- رسم منحنی های اتاندارد <i>Real time-PCR</i>
۷۴	۳-۵- نتایج <i>Real time PCR</i>
۷۶	3-6- بررسی تغییرات میزان بیان ژنهای بتا کاتنین و آلدوز ردوکتاز در اثر تیمارها در بازه های زمانی مختلف:.....
۸۱	۳-۶-۱- بررسی تغییر بیان ژن بتا کاتنین.....
۸۱	۳-۶-۲- بررسی تغییر بیان ژن آلدوز ردوکتاز :.....
۸۲	۳-۶-۳- بررسی تغییر بیان ژن های بتا کاتنین و آلدوز ردوکتاز در اثر تیمار همزمان <i>siRNA</i> ضد هر دو ژن:.....
۸۴	۳-۷-۱- تاثیر کاهش بیان ژنهای بتا کاتنین و آلدوز ردوکتاز بر سرعت و میزان رشد سلولهای <i>HT-29</i> :.....
۸۵	۳-۷-۱- تغییررشد ۲۴ ساعت پس از تیمار.....
۸۶	۳-۷-۱- تغییررشد ۴۸ ساعت پس از تیمار.....
۸۷	۳-۷-۲- تغییررشد ۷۲ ساعت پس از تیمار.....
۹۰	فصل ۴ بحث.....
۹۳	فصل ۵ پیشنهادات.....
۹۵	B۰-مراجع.....

فهرست شکل‌ها

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱: مسیرهای خاموشی <i>RNA</i>	۱۳
شکل ۲-۱: ده نوع سرطان اول از نظر کشندگی و موارد جدید گزارش شده در سال ۲۰۰۸ در آمریکا با توجه به جنسیت	۲۴
شکل ۳-۱: مسیر سیگنالینگ <i>Wnt</i> و تنظیم برهمکنش <i>APC-β-catenin</i>	۲۷
شکل ۴-۱: اجزای نمودار تکثیر در <i>Real-time PCR</i>	۳۸
شکل ۵-۱: نمودار <i>Ct</i> بارقت های سریال	۳۹
شکل ۶-۱: مکانیسم عمل رنگهای فلورسنت	۴۰
شکل ۷-۱: شکل فضایی اتیدیوم برماید در بین دو رشته <i>DNA</i>	۴۱
شکل ۱-۳: میانگین تعداد سلولها در هر تیمار <i>24 h</i> پس از ترانسفکشن	۶۳
شکل ۲-۳: میانگین تعداد سلولها در هر تیمار <i>48 h</i> پس از ترانسفکشن	۶۳
شکل ۳-۳: میانگین تعداد سلولها در هر تیمار <i>72 h</i> پس از ترانسفکشن	۶۴
شکل ۴-۳: میانگین تعداد سلولهای تیمارها در سه زمان ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت.	۶۴
شکل ۵-۳: الکتروفورز محصول <i>PCR</i> آلدوز ردوکتاز که تک باند ۱۲۱ جفت بازی مورد انتظار دیده شد	۶۶
شکل ۶-۳: الکتروفورز محصول <i>PCR</i> بتا کاتین که تک باند ۸۶ جفت بازی مورد انتظار دیده شد	۶۶
شکل ۷-۳: الکتروفورز محصول <i>PCR</i> بتا اکتین که تک باند ۱۳۱ جفت بازی مورد انتظار دیده شد	۶۷
شکل ۸-۳: نمودار تکثیر همزمان هر سه ژن	۶۸
شکل ۹-۳: نمودار <i>melt</i> همزمان هر سه ژن	۶۹
شکل ۱۰-۳: نمودار تکثیر منحنی استاندارد ژن آلدوز ردوکتاز	۷۰
شکل ۱۱-۳: نمایش خصوصیات واکنش منحنی استاندارد ژن آلدوز ردوکتاز	۷۰
شکل ۱۲-۳: نمودار <i>melt</i> ژن آلدوز ردوکتاز.	۷۱
شکل ۱۳-۳: نمودار تکثیر منحنی استاندارد ژن بتا اکتین	۷۱
شکل ۱۴-۳: نمایش خصوصیات واکنش منحنی استاندارد ژن بتا اکتین	۷۲

- شکل ۳-۱۵: نمودار *melt* ژن بتا اکتینین. ۷۲
- شکل ۳-۱۶: نمایش خصوصیات واکنش منحنی استاندارد ژن بتا کاتنین ۷۳
- شکل ۳-۱۷: نمایش خصوصیات واکنش منحنی استاندارد ژن بتا کاتنین ۷۳
- شکل ۳-۱۸: نمودار *melt* ژن بتا کاتنین ۷۴
- شکل ۳-۱۹: نمودار تکثیر ژن بتا کاتنین ۷۵
- شکل ۳-۲۰: نمودار تکثیر ژن آلدوز ردوکتاز ۷۵
- شکل ۳-۲۱: نمودار تکثیر ژن بتا اکتینین. ۷۶
- شکل ۳-۲۲: نمایی از نتیجه اندازه گیری نسبی بیان آلدوز ردوکتاز توسط برنامه *Rotor-Gene 6*. ۷۷
- شکل ۳-۲۳: نمایی از نتیجه اندازه گیری نسبی بیان بتا کاتنین توسط برنامه *Rotor-Gene 6*. ۷۷
- شکل ۳-۲۴: نمودار میزان کاهش بیان تیمارهای ضد بتا کاتنین (%). در زمانهای مختلف ۸۱
- شکل ۳-۲۵: نمودار میزان کاهش بیان تیمارهای ضد آلدوز ردوکتاز (%). در زمانهای مختلف ۸۲
- شکل ۳-۲۶: نمودار میزان کاهش بیان توسط تیمار همزمان ضد بتا کاتنین و آلدوز ردوکتاز (%). در زمانهای مختلف ۸۳
- شکل ۳-۲۶: نمودار کلی میزان کاهش بیان نسبت به کنترل در زمانهای مختلف ۸۴
- شکل ۳-۲۸: نمودار میزان کاهش رشد تیمارها (*Pmol/ml*) پس از ۲۴ ساعت ۸۶
- شکل ۳-۲۹: نمودار میزان کاهش رشد تیمارها (*Pmol/ml*) پس از ۴۸ ساعت ۸۷
- شکل ۳-۳۰: نمودار میزان کاهش رشد تیمارها (*Pmol/ml*) پس از ۷۲ ساعت ۸۸
- شکل ۳-۳۱: نمودار میزان کاهش رشد تیمارها (*Pmol/ml*) نسبت به کنترل در زمانهای مختلف ۸۹

فهرست جدول‌ها

صفحه	عنوان
۴۷	جدول ۱-۲: توالی پرایمرهای به کار رفته
۴۹	جدول ۲-۲: سیکل‌های واکنش <i>PCR</i>
۴۹	جدول ۳-۲: اجزای مورد نیاز برای انجام <i>PCR</i> بر روی <i>cDNA</i> تهیه شده
۵۲	جدول ۴-۲: شرایط پیشنهاد شده ترانسفکشن توسط تولید کننده
۵۶	جدول ۵-۲: برنامه زمانی مراحل واکنش <i>Real-time PCR</i> برای ژنوم دو ویروس
۵۷	جدول ۶-۲: اجزای لازم برای واکنش <i>Real-time PCR</i>
۵۷	جدول ۷-۲: جدول برنامه زمانی <i>Melting</i>
۶۱	جدول ۱-۳: پنج تیمار بررسی شده
۶۲	جدول ۲-۳: میانگین و انحراف معیار تعداد سلول‌های تیمارها در سه زمان ۲۴ و ۴۸ و ۷۲
۶۸	جدول ۳-۳: سیکل‌های واکنش <i>Real time PCR</i>
۷۸	جدول ۴-۳: میانگین و انحراف معیار مقدار کاهش بیان هر تیمار
۷۹	جدول ۵-۳: بررسی معنی درآ بودن اختلاف میان تیمارها و زمانهای بررسی شده
۸۰	جدول ۶-۳: جدول آنالیز اختلاف میان تیمارها
۸۵	جدول ۷-۳: میانگین میانگین تغییر رشد سلول ها در اثر هر تیمار در زمانهای مختلف

No table of contents entries found.

فصل ۱

مقدمه

RNAi -1-1

1-1-1- معرفی:

در سالهای اخیر *RNAi* به یک ابزار ارزشمند برای خاموش کردن ژنها و غربالگری عملکرد ژنومی در سطح گسترده تبدیل شده است. مثلاً استفاده از *RNAi* برای یافتن نقش بیان آنکوژنها در رده سلولی لوسمی و تایید پتانسیل درمانی *RNAi* برای درمان این اختلال خونی موفق بوده است. برای پیشرفت این کاربردها مهم است که فرایند *RNAi* و محدودیتهای آن را به خوبی درک کنیم. [۱]

این یافته که مولکولهای *RNA* دو رشته ای غیر کد کننده کوچک می توانند بر بیان ژنهایی که توالی مکمل داشته باشند اثر بگذارند منجر به شناسایی خانواده بزرگی *RNA* تنظیمی که *microRNA* نامیده شدند شد. در پستانداران صدها *miRNA* شناسایی شده است که در برخی بافتهای خاص یا مراحل خاص نمو بیان می شوند. *miRNA* هایی که عملشان معلوم شده است هم در گیاهان و هم حیوانات تنظیم کننده جنبه های مختلف کنترل نمو هستند. [۲]

RNAi اولین بار در نماتود *C.elegans* توسط *Fire* و همکاران شناسایی شد که دیدند *RNA* دو رشته ای (*dsRNA*) در تحریک خاموشی در یک توالی مشخص موثرتر از *RNA* آنتی سنس تک رشته ای است که تا آن هنگام برای این کار استفاده می شد. مطالعه بیشتر نشان داد که تزریق *dsRNA* به کرم منجر به خاموشی سیستمیک ژن هدف می شود که این خاموشی به نسل بعد هم منتقل می شود. برخلاف خاموشی استوکیومتری در نتیجه *RNA* آنتی سنس، اثرات خاموشی *RNAi* توسط تعداد کمی *dsRNA* به ازای هر سلول رخ می داد. در حالی که برخی سیستمهای مدل مثل گیاهان این خصوصیات ارثی و سیستمیک خاموشی را با *C.elegans* مشترک دارند برخی دیگر مثل دروزوفیل و سیستمهای پستانداران در هنگام معرفی *dsRNA* خاموشی ژن هدف را به صورت موقتی از خود نشان می دهند. [۱]

RNAi اولین بار در گیاهان به عنوان یک واکنش ایمنی به آلودگی ویروس توصیف شد. در ۱۹۲۸ دیده شد که وقتی گیاه تنباکو با ویروس *ring spot* تنباکو آلوده می شود برگهای بالایی در مقابل اثرات آلودگی مقاومت نشان می دهند.

امروزه می دانیم که پیشسازهای *dsRNA* تولید شده هنگام آلودگی ویروس دستگاه *RNAi* را فعال می کنند تا بیان ژنهای مکمل خاموش شود، در نتیجه ایمنی به ویروس حاصل می شود. این دفاع در مقابل مواد ژنتیکی خارجی یکی از مسیرهای فیزیولوژیک القا شده توسط *dsRNA* در انواع موجودات یوکاریوتی از جمله قارچها، گیاهان و حیوانات است. با اختلافات کوچکی همه این واکنشها توسط یک مسیر مشترک *RNAi* انجام می شوند که شامل تبدیل *dsRNA* به قطعات دو رشته ای کوتاه *22bp* با انتهای خاص می شود. همچنین مکانیزم *RNAi* می تواند با وارد کردن *dsRNA* سنتزی تحریک شود که وسیله مناسبی برای خاموشی *in vivo* ژنها ایجاد می کند. [۱]

علاوه بر خاموشی سیتوپلاسمی بیان ژن خارجی فعال شده توسط *dsRNA* خارجی (ویروسی)، سیستم *RNAi* مسئول خاموشی *mRNA* های سلولی توسط *microRNAs* (*miRNA*) درون سلولی هم هست. *miRNA* ها *RNA* های کوچک غیرکد کننده هستند که حاوی نواحی تکراری معکوس و مکمل اند. این تکرارها باعث تشکیل ساختار سنجاق سری دو رشته ای می شوند که مکانیزم *RNAi* را تحریک می کنند. در گیاهان *miRNA* ها اغلب از طریق برش *mRNA* های همولوگ عمل می کنند. اما در انسانها *miRNA* ها اغلب بیان ژن را از طریق هدف قرار دادن نواحی تقریباً مکمل در بخش غیرترجمه شونده *3'UTR* تنظیم می کنند که باعث اختلال در ترجمه می شود. تعداد زیادی *miRNA* شناخته شده اند مثلاً کلونینگ *DNA* و پیشگویی کامپیوتری حدود صد *miRNA* برای دروزوفیل^۱ *C. elegans* پیشنهاد می کنند و ژنومهای مهره داران حدود ۲۵۰ *miRNA* دارند. در حالی که تعداد زیادی *miRNA* شناسایی شده است، *mRNA* هدف آنها و اهمیت عملکرد نهایی تعداد کمی از آنها مشخص شده است. [۳، ۴]

با این وجود بر اساس یافته ها به نظر می رسد که نقش فیزیولوژیک *miRNA* راهنمایی بیان ژنهای دخیل در فرایندهایی مثل زمان تمایز، سرنوشت سلول و مرگ سلولی است. در سلولهای هماتوپوئیک *miRNA* هایی شناسایی شده اند که تمایز *lineage* را کنترل می کنند. همچنین ممکن است آنها در *etiology* لوسمی مزمن سلولهای *B* نقش داشته باشند. [۱]

نوع سوم خاموشی ژن در پاسخ به *dsRNA* شامل تنظیمات *DNA* سلولی و هیستونها و بسته بندی آنها به هتروکروماتین غیرفعال و متراکم است. به نظر می آید محرک این نوع پاسخ *siRNA* های مرتبط با تکرار باشد که توسط هیبرید شدن رونوشت با توالی های تکراری مثل ترانسپوزونها^۲ و ترانسژنهای تکراری است، در نتیجه این نوع *RNAi* می تواند نمایانگر یک مکانیزم دفاع سلولی در مقابل اثرات عوامل ژنتیک خارجی مثل ترانسپوزون باشد. [۱]

^۱ *drosophila*

^۲ *transposon*

RNAi انقلابی در زمینه مشخص کردن نقش ژنها ایجاد کرده است. پیشرفت پروژه های ژنومی عظیم نیاز به روشی برای مشخص کردن عمل هر ژن را نشان داده است. بررسی های از دست رفتن عمل^۱ با استفاده از آنتی سنس و *homologous recombination* دشوار هستند و موفقیت آنها متغیر است. *RNAi* روش سریعی برای کاهش *mRNA* با توالی خاصی را فراهم کرده است. [۴]

Napoli و *Jorgensen* اولین افرادی بودند که در ۱۹۹۸ پدیده هایی از نوع *RNAi* گزارش کنند هدف تحقیق آنها این بود که مشخص کنند آیا *chalcone synthase (CHS)*، یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز فلاونوئید^۲، آنزیم محدود کننده در بیوسنتز آنتوسیانین^۳ است. مسیر آنتوسیانین مسئول رنگ بنفش در گل اطلسی است. در تلاش برای ایجاد اطلسی بنفش *Napoli* و *Jorgensen* بیان *CHS* را افزایش دادند که منجر به اطلسی سفید شد که نتیجه غیرمنتظره ای بود. مقدار *CHS* آنها نصف اطلسی های طبیعی بود که نشان داد ترانس ژن باعث کاهش بیان *CHS* طبیعی شده است. در ۱۹۹۲ *Macino* و *Romano* پدیده مشابهی در *Nearospora crassa* گزارش کردند به این صورت که وارد کردن توالی های *RNA* همولوگ باعث کاهش ژن اصلی می شد. خاموشی *RNA* در حیوانات اولین بار توسط *kemphues* و *CaCo* مشاهده شد که دیدند وارد کردن *sense RNA* یا آنتی سنس از *par-1 mRNA* منجر به تجزیه پیغام *par-1* در *C.elegans* می شود. در آن زمان استفاده از *antisense* برای قطع بیان ژن شایع بود و تصور می شد که عملکرد آن از طریق هیبرید شدن *mRNA* سلول با مکمل خود منجر به *RNA* دو رشته ای می شود که مانع ترجمه می شود یا باعث هدف قرار گرفتن توسط ریبونوکلازهای سلول می شود. جالب اینجا بود که وقتی *Guo* و همکاران در آزمایشات کنترل فقط از *par-1 sense RNA* استفاده کردند که با رونوشت سلولی هیبرید نمی شد باز هم پیغام *par-1* دچار تجزیه می شد. این یافته باعث تحقیقات و نظریات جدید شد. [۴]

۱-۱-۲- مکانیزمهای *RNAi*

کشف خاموشی القا شده توسط *dsRNA* در *C.elegans* اجازه داد ژنهای لازم برای *RNA* در نماتود شناسایی شوند. مقایسه این ژنها با ژنهای مربوط به فرایندهای خاموشی مختلف نشان داد که همه دارای یک مسیر اصلی مشترک هستند. اختلافات کوچکی در این مسیرها وجود دارد که بسته به گونه می تواند تغییر کند. همچنین منبع *dsRNA* محرک

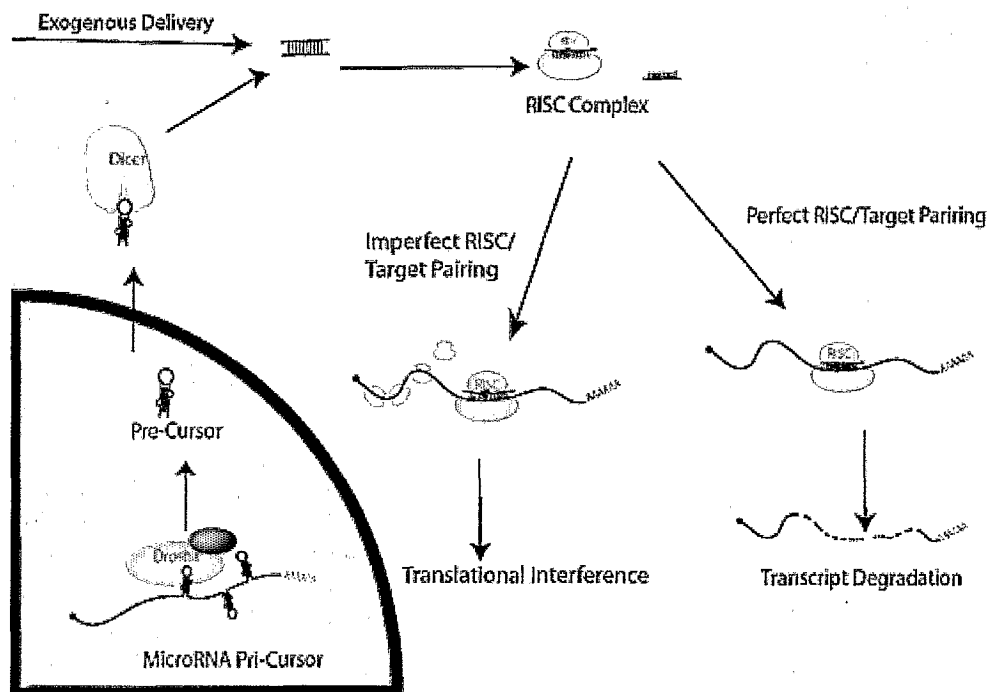
¹ loss of function

² flavinoid

³ anthocyanin

اهمیت دارد. *dsRNA* می تواند به طور مصنوعی وارد شود یا *miRNA* داخلی باشد یا محصول جانبی ویروسی باشد و یا رونوشت اضافی ترانس ژن باشد که همه پس از شناسایی به *siRNA* های ۲۳-۲۱ نوکلئوتیدی توسط یک آنزیم *RNase-III* مانند به نام *Dicer* برش داده می شوند. همولوگهای *Dicer* در *S.pombe* (اما نه *S.cerevisice*)، *C.elegans*، دروزوفیل، گیاهان و پستانداران یافت می شود. گونه های مختلف دارای تعداد مختلفی همولوگ *Dicer* و یا پروتئینهای مرتبط حاوی نواحی متصل شونده به *dsRNA* هستند که *dsRNA* ها را از منابع متفاوت شناسایی می کنند. مثلاً در دروزوفیل پروتئین *Dicer-1* بر پیشسازهای *miRNA* عمل می کند و *Dicer-2* بر *dsRNA* های بلند اثر می گذارد. در *A.thaliana* چهار همولوگ *Dicer* هست که با هم عمل می کنند تا انواع مختلف *dsRNA* را برش دهند. تاکنون یک *Dicer* اصلی در پستانداران شناخته شده است. *dsRNA* برش شده توسط *Dicer* تولید *siRNA* هایی می کند که دارای نوکلئوتید اضافی در '۳ و یک انتهای '۵ فسفریله است، که هر دو برای فعالیت ضروری اند. عمل *Dicer* در دروزوفیل وابسته به *ATP* است و به یک ناحیه فعال هلیکاز^۱ نیاز دارد. برخلاف آن به نظر می رسد *Dicer* انسانی نیازی به *ATP* ندارد. عمل بر روی *miRNA* یک مرحله ابتدایی دارد که رونوشت بلند اولیه توسط یک اندونوکلئاز *RNaseIII* مانند دیگر، *Drosha* که درون هسته عمل می کند برش داده می شوند سپس *miRNA* پیشساز به سیتوپلاسم منتقل می شود تا *Dicer* روی آن اثر کند. سپس محصولات کوچک برش توسط *Dicer* در مجموعه های چند زیر واحدی عمل کننده قرار داده می شوند. بسته به نوع و منشا *dsRNA* مجموعه های عمل کننده متفاوتی تشکیل می شوند که دارای نتیجه نهایی متفاوتی هستند. *siRNA* ها در مجموعه خاموش کننده رونویسی تحت القای *RNA (RITS)* قرار می گیرند و تنظیمات کروماتین را هدایت می کنند. مجموعه های حاوی *miRNA* معمولاً *miRNPs* نامیده می شوند و تجزیه *mRNA* هدف (در گیاهان) یا کاهش رونویسی (در حیوانات) را هدایت می کند. *siRNA* های سنتزی یا آنهایی که از *dsRNA* های بلند طبیعی مشتق شده اند در کمپلکس خاموش تحت القای *RNA (RISC)* قرار می گیرند و برش *RNA* های هدف را هدایت می کنند. *RISC* دارای نواحی هلیکاز، اگزونوکلئاز، آندونوکلئاز و یابنده همولوژی است. *RISC* اولیه غیر فعال می ماند تا توسط باز شدن *siRNA* دو رشته ای از طریق فعالیت هلیکازی مجموعه و جدا شدن رشته *sense* از مولکول *dsRNA* فعال شود. مجموعه فعال *siRNA/RISC* توالی همولوگ *mRNA* را هدف قرار می دهد و در ناحیه همولوگ با *siRNA* را برش می دهد. این برش توسط فعالیت آندونوکلئازی *RISC* فعال انجام می شود. [۱، ۳، ۵]

¹ Helicase



شکل ۱-۱: مسیرهای خاموشی RNA: پیش سازهای dsRNA بلند و shRNA یا miRNA توسط آنزیم متصل شونده به dsRNA و RNaseIII مانند Dicer به واسطه های dsRNA 21-23bp تبدیل می شوند. اینها در نهایت باز می شوند و در مجموعه RISC قرار می گیرند که برش RNA را هدایت می کند و یا در یک مجموعه miRNA-effector به نام miRNP قرار می گیرند که کاهش ترجمه را هدایت می کند. (mRNA هدف توسط 5' cap و دم پلی A شناخته می شوند). [۳]

۱-۱-۳ RNAi در سلولهای پستانداران

برای بررسی عملکرد یک ژن از کار انداختن ژنهای مشخص و بررسی اثر آنها بسیار مفید می تواند باشد. در سیستمهای پستانداران این کار از طریق ایجاد مدل‌های knock-out در موش انجام شده است. با اینکه این روش موثر است اما نقاط ضعفی دارد. اولاً بیان ژن را در کل موجود از کار می اندازد و نمی توان از آن برای بررسی رشد و نمو و یا اثر در سلولهای خاص استفاده کرد. دوماً ایجاد مدل‌های knock-out هزینه و زمان زیادی می برد. از نظر تئوری این مشکلات می توانند با به کار بردن تکنیکهای RNAi برای خاموشی بیان ژن در سیستمهای پستانداران زنده برطرف شوند. ابتدا تصور می شد این کار ممکن نباشد زیرا ورود مولکولهای dsRNA به سلولهای سالم پستانداران باعث فعال شدن یک واکنش ایمنی ضد ویروسی می شود که منجر به قطع کلی ترجمه پروتئین و تورم می شود. با این وجود در ۲۰۰۱ Elbashir و همکاران و

caplen و همکاران توانستند نشان دهند که *RNAi* در پستانداران از طریق بیان داخل سلولی یا سنتز مصنوعی محصولات مشابه *Dicer* (*siRNA*) های دو رشته ای (21-23bp)، که وارد سلول شوند ممکن است. با از بین بردن *dsRNA* های بلند آنها مانع فعال شدن واکنش ایمنی شدند که توسط سیستم اینترفرون^۱ کنترل می شود و تنظیم کننده آن پروتئین کیناز *PKR* است که توسط *dsRNA* فعال می شود. [۱، ۳، ۶]

۱-۱-۴- *RNAi* پایدار

وارد کردن *21bp siRNA* اجازه استفاده موفق تکنولوژی *RNAi* را در سیستمهای پستانداران می دهد. اما این روش موقت است و فنوتیپ به دست آمده پس از چند دور تقسیم از دست می رود که احتمالاً به علت کاهش غلظت *siRNA* است. [۱، ۵]

در حالی که این روش برای بررسی های کوتاه مدت موثر است نمی تواند جایگزین مدل‌های *knock-out* شود یا برای بررسی های از دست رفتن عمل^۲ دقیق استفاده شود. این در موجوداتی مثل *C. elegans* یا *N. crassa* مشکلی نیست زیرا در آنها سنتز *siRNA* به کمک *RNA-dependant- RNA polymerase* ادامه پیدا می کند. در این سیستمها فنوتیپ حاصل نه تنها حفظ می شود بلکه به نسل‌های بعد هم منتقل می شود البته اثر آن کم کم کاهش می یابد. یک نقطه ضعف دیگر بررسی های موقت با *siRNA* هزینه سنتز *siRNA* است که از فواید تکنیک می کاهد. برای حل این مشکلات سیستمی برای بیان پایدار *siRNA* ایجاد شده است. با الگوبرداری از ساختار *miRNA* های طبیعی وکتورهای بیانی طراحی شدند که منجر به سنتز *siRNA* در سلول می شوند. در اغلب موارد قطعه وارد شده شامل یک توالی نوکلئوتیدی که مکمل هدف است می شود و به دنبال یک قطعه فاصله دهنده قرار می گیرد و سپس مکمل معکوس توالی هدف قرار دارد. هنگام رونویسی یک ساختار سنجاق سری با ساقه *19bp* به نام *shRNA* حاصل می شود که توسط *DICER* به *siRNA* تبدیل می شود که وارد مکانیزمهای خاموش کننده توالی هدف می شود. پروموتورهای پلیمراز *III* مثل *T* یا *U6* در ابتدا برای تولید *siRNA* هایی که خصوصیات لازم برای یک *siRNA* موثر را داشته باشند به کار برده شدند. این خصوصیات شامل عدم حضور دم پلی *A* و یک سیگنال پایان دارای *3'overhang* می شود. همچنین وکتورهای بیانی تحت اثر پلیمراز *II* ساخته شده اند که اجازه بیان تنظیم شده *siRNA* را می دهند. [۱، ۷، ۸]

¹ interferon

² loss-of-function