دانشگاه آزاد اسلامی
واحد تبریز

دانشکده علوم پایه - گروه ژنتیک

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد"M.Sc. "

رشته: ژنتیک

عنوان:

بررسی میزان بیان ژن های miR-296-5p و miR-512-5p در بیماران مبتلا به سرطان پستان در استان اردبیل و ارتباط آن ها با بیان ژن hTERT و فعالیت تلومرازی

استاد راهنما:
دکتر سید سعید حسینی اصل

نگارش:
رامیز نوبخت

زمستان ۱۳۹۸

محل تائید امور پایان نامه ها

تعهد نامه اصالت پایان نامه

۹۸/۱۱/۸

اینجانب ...امیرنوبخت... دانش آموخته مقطع ...کارشناسی ارشد... به شماره دانشجویی ...۹۸۲۵۵۴۳۸... در رشته ...ژنتیک... که در تاریخ ..... از پایان نامه خود تحت عنوان : ..... با کسب نمره ..... و درجه ..... دفاع نموده ام، بدین وسیله متعهد می شوم که:

۱- این پایان نامه حاصل تحقیق و پژوهش انجام شده توسط اینجانب بوده و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران (اعم از پایان نامه، کتاب ، کتاب ، مقاله و ....)استفاده نموده ام مطابق ضوابط و رویه های موجود، نـام منبع مـورد استفاده و سایر مشخصات آن را در فهرست ذکر و درج کرده ام.

۲- این پایان نامه قبلا برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی (هم سطح ، پایین تر یا بالاتر) در سایر دانشگاهها و موسسات آموزش عالی ارائه نشده است.

۳- چنانچه بعد از فراغت از تحصیل ، قصد استفاده و هرگونه بهره برداری اعم از چاپ کتاب، ثبت اختراع و .... از این پایان نامه داشته باشم، از حوزه معاونت پژوهشی واحد مجوزهای مربوطه را اخذ نمایم.

۴- چنانچه در هر مقطع زمانی خلاف موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن را بپذیرم و واحد دانشگاهی مجاز است با اینجانب مطابق ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت ابطال مدرک تحصیلی ام هیچگونه ادعایی نخواهم داشت.

نام و نام خانوادگی دانشجو:

امضا امیرنوبخت

فرم تایید رساله / پایان نامه

((برای صحافی))

با عنایت به درخواست انجام اصلاحات و موارد ذکر شده در جلسه دفاع برای رساله / پایان نامه خانم / آقای ...امیرنوبخت... دانشجوی رشته ...ژنتیک... به شماره دانشجویی ...۹۵۰۲۵۴۳۸... صحافی رساله / پایان نامه از نظر اینجانبان بلامانع میباشد.

نام و نام خانوادگی استاد راهنما (اول)	امضاء و تاریخ
نام و نام خانوادگی استادراهنما(دوم)	امضاء و تاریخ
نام و نام خانوادگی استاد مشاور(اول)	امضاء و تاریخ
نام و نام خانوادگی استادمشاور(دوم)	امضاء و تاریخ
نام و نام خانوادگی استاد داور (داخلی)	امضاء و تاریخ
نام و نام خانوادگی استادداور(خارجی)	امضاء و تاریخ

((الصاق این برگ در صحافی پایان نامه الزامی میباشد))

باسمه تعالی

صورت جلسه دفاع

یدات خداوند متعال، جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد/ دکترای حرفه‌ای خانم/ آقای **رامیز نوبخت** به شماره دانشجویی: **۹۵۰۲۵۴۵۳۸** دانشجوی رشته:
م پایه گرایش: **ژنتیک** مقطع: **کارشناسی ارشد** با عنوان: **بررسی میزان بیان ژن های miR-۲۹۶-p۵ و miR-۵۱۲-p۵ در بیماران مبتلا به**
لان پستان در استان اردبیل و ارتباط آن ها با بیان ژن hTERT و فعالیت تلومرازی با حضور اعضاء هیئت داوران در دانشگاه آزاد اسلامی واحد
تشکیل گردید.

نام و نام خانوادگی اعضاء هیئت داوری	سمت	امضاء اعضاء هیئت داوری
دکتر سید سعید حسینی اصل	استاد راهنمای اول	
	استاد مشاور اول	
کتر ملکی مسعود	استاد داور داخلی	
کتر مشایخی محمدرضا	استاد داور خارجی	
کتر رحیم مهاری	مدیر گروه	

فاع از پایان نامه در تاریخ **۹۸/۱۱/۰۸** با حضور اعضای فوق برگزار و با درجه خوب به تصویب رسید.

این قسمت توسط اداره پژوهش و فناوری دانشکده تکمیل می‌شود.

ه حاصل از ارزشیابی مقاله / مقالات / تولیدات علمی دانشجو برابر ضوابط محاسبه و مجموع نمره دفاع و مقاله با درجه .....خوب..... به
رسید.

س اداره پژوهش و فناوری دانشکده **علیرضا مجدخیابانی** ۹۹/۲/۶	**امضاء رئیس دانشکده** **حسن رفاقت خواجه**	**معاون پژوهش و فناوری** **دکتر حسن رسولی سقای**

اطلبوا العلم من المهد الی اللحد

دانشگاه آزاد اسلامی تبریز
دانشکده علوم پایه

Islamic Azad University

Tabriz Branch

Faculty of Science – Department of Genetic

M.Sc. Thesis

in Genetic

Subject

Evaluation of the expression of miR-296-5p and miR-512-5p genes in breast cancer patients in Ardabil province and their relationship with hTERT gene expression and telomerase activity

Supervisor

Dr. Sayed Saeed Hosseini Asl

By

Ramiz Nobakht

Winter 2020

چکیده:

زمینه و هدف : سرطان پستان رشد مهار نشده سلول های غیر طبیعی است که در بافت های مختلف پستان رخ میدهد.

آنزیم تلومراز مسئول افزایش طول تلومر میباشد و این امر در ۹۰٪ سلول های سرطانی وجود دارد. hTERT زیر واحد تنظیم کننده تلومراز است و نقش مهمی در فعال سازی تلومراز دارد . micro RNA ها تنظیم کننده های جدیدی برای خاموش سازی ژن ها هستند و میتوانند بیان ژن hTERT را بوسیله اتصال به مناطق 3` UTR تنظیم کند. این مطالعه برای بررسی میزان بیان mir-296-5p و mir-512-p5در بیماران مبتلا به سرطان پستان در استان اردبیل و ارتباط آنها با بیان ژن hTERT و فعالیت تلومرازی طراحی شده است.

روش کار: نمونه گیری از زنانی که واجد سرطان پستان بودند صورت گرفت که در مجموع ۳۰ نمونه بافت سرطانی همراه با نمونه حاشیه بیماران جمع آوری شد. بعد از استخراج micro RNA ، سنتز cDNA انجام شد. بعد از طراحی پرایمر برای micro RNA ها واکنش Real time انجام شد. همچنین برای اندازه گیری فعالیت تلومراز از TRAP Assay کیفی استفاده شد.

یافته ها: آنالیز داده های Real time مشخص کرد که میزان بیان mir-296-5p و mir-512-p5 در نمونه های سرطانی درمقایسه با نمونه های کنترل بطور معنی داری کاهش پیدا کرد. همچنین نتایج ما نشان داد که کاهش بیان این دو micro RNA باعث افزایش فعالیت تلومرازی شد.

بحث و نتیجه گیری: براساس نتایج بدست آمده ، mir-296-5p وmir-512-p5 میتواند فعالیت تلومرازی در سرطان پستان را هدف قرار دهد بطوری که در مطالعه ما کاهش بیان این دو micro RNA اثر معکوس بر فعالیت تلومرازی گذاشته و باعث افزایش فعالیت تلومرازی میشود. بنابراین میتوان نتیجه گرفت که هدف قرار دادن این دو micro RNA به عنوان یک بیومارکر می تواند ابزار درمانی مناسبی برای درمان سرطان پستان باشد.

کلمات کلیدی: mir-296-5p، mir-512-5p ، فعالیت تلومرازی ، بافت سرطان پستانی.

فهرست مطالب:

عنوان ..... صفحه

فصل اول:کلیات تحقیق

۱-۱- مقدمه: .....

۱-۲- کلیات : ۲

۱-۲-۱- ژنتیک سرطان ارثی پستان: ۴

۱-۲-۲- Micro RNA ها: ۴

۱-۲-۳- ساختار ژنی و بیوژنز miRNA ۵

۱-۲-۴- مکانیسم عمل miRNA ۵

۱-۲-۵- تاریخچه ی کشف miRNA : ۷

۱-۲-۶- miRNA و سرطان: ۸

۱-۲-۷- ژن های دخیل در سرطان پستان: ۹

۱-۲-۸- miR های دخیل در سرطان پستان: ۹

۱-۲-۹- کاربرد miR : ۱۰

۱-۲-۱۰- مکانیسم های ناتنظیمی miR : ۱۱

۱-۲-۱۱- نقص در ماشین بیوژنز miR : ۱۱

۱-۲-۱۲- روش های درمانی با miRNA : ۱۲

۱-۲-۱۳- مزایا و معایب درمان با miR : ۱۲

۱-۲-۱۴- ساختار تلومر و پروتیین های تنظیم کننده آن ۱۵

۱-۲-۱۵- عملکرد تلومر: ۱۵

۱-۲-۱۶- عملکرد تلومراز : ۱۹

۱-۲-۱۷- فعالیت هلیکازی تلومر: ۲۱

۱-۲-۱۸- مشکل انتهایی همانند سازی: ۲۳

۱-۲-۱۹- اختلال عملکرد تلومر و نامیرایی : ۲۴

۱-۲-۲۰- مهار تلومر و تلومراز راهکاری برای درمان سرطان: ۲۵

۱-۳- بازنگری متون ۲۷

۱-۴- ضرورت انجام تحقیق: ۲۹

۱-۵- اهداف پژوهش: ۳۲

۱-۶- اهداف اختصاصی : ۳۲

۱-۷- فرضیه ها: ۳۲

۱-۸-متغییر های تحقیق : ۳۲

۱-۹- تعریف اصطلاحات: ۳۳

فصل دوم:مواد و روش کار

۲-۱- وسایل لازم ۳۵
۲-۱-۱- وسایل لازم جهت نمونه گیری ۳۵
۲-۱-۲- وسایل لازم جهت جداسازی RNA ۳۵
۲-۱-۳- مواد لازم جهت استخراج Micro RNA ۳۶
۲-۱-۴- مواد لازم جهت استخراج پروتئین ۳۶
۲-۱-۵- مواد لازم جهت سنتز cDNA ۳۶
۲-۱-۶- مواد لازم جهت Real time ۳۶
۲-۱-۷- مواد لازم برای PCR ELISA | ۳۷
۲-۲ طراحی پرایمر و استم لوپ و Blast: ۳۸
۲-۳- نمونه برداری و روش نمونه گیری: ۴۱
۲-۳-۱- معیارهای ورود بیماران ۴۱
۲-۳-۲- معیارهای خروج بیماران ۴۱
۲-۳-۳- ملاحضات اخلاقی ۴۲
۲-۴- روش کار ۴۲
۲-۴-۱- جداسازی بافت سرطانی از بافت ۴۲
۲-۴-۲- استخراج:Micro RNA از بافت با ترایزول ۴۲
۲-۴-۳- TRAP Assay) Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA کیفی) ۴۴
۲-۴-۴- استخراج پروتئین از بافت با ترایزول: ۴۴
۲-۴-۵- پروتکل تکثیر تکرار تلومریک (واکنش TRAP) ۴۶
۲-۴-۶- هیبریداسیون و روش ELISA ۴۷
۲-۴-۷- بررسی کمی RNA های استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری: ۴۸
۲-۴-۸- ساخت CDNA برای RNA و micro RNA: ۴۸
۲-۴-۹- کنترل سنتز cDNA ۴۹
۲-۴-۱۰- مراحل انجامReal - time PCR ۵۰
۲ - ۴ - ۱۰ - ۱ بهینه سازی واکنش ۵۱
۲-۴-۱۱- الکتروفورز محصولات روی ژل آگارز: ۵۳
۲-۵- آنالیز آماری ۵۴

فصل سوم :نتایج و بحث

۳-۱- آنالیز کمی و کیفی RNA ۵۶
۳-۲- مشخص کردن غلظت پرایمرها در واکنش Real time ۵۶

۳-۳- سنجش ذوب ۶۱
۳-۴- نتیجه های بیان micro RNA و فعالیت تلومرازی ، تجزیه و تحلیل آماری ۶۳
۳-۵- مقایسه بیان ژن mir - 296 - 5p در دو گروه افراد دارای سرطان پستان و گروه کنترل ۶۴
۳-۶- مقایسه بیان ژن mir - 512 - 5p در دو گروه افراد دارای سرطان پستان و گروه کنترل ۶۵
۳-۷- بررسی نتایج ارتباط بین بیان ژن های mir-296-5p و mir-512-5p با فعالیت تلومرازی ۶۷
۳-۸- بحث و نتیجه گیری ۷۰
۳-۹- نتیجه گیری نهایی ۷۳
۳-۱۰- پیشنهادات ۷۳
منابع ۷۴

فهرست شکل ها:

عنوان ..... صفحه

شکل ۱-۱ مسیر سنتز و بیوژنیز miRNA(۱۸) ۷

شکل ۱-۳ : ساختار شیمیایی ریبونوکلئوتیدهای بهینه شده (۳۵) ۱۴

شکل ۱-۴- ساختار تلومر و پروتئین های مرتبط (۴۳) ۱۶

شکل ۱-۵: تلوزوم:شامل DNA و مجموعه پروتیینی شلترین میباشد. این کمپلکس شامل ۲ پروتیین اصلی به نام های TRFIو TRF2 و پروتیین های فرعی به نام هایTIN2 ، RAPI، POT1، TPP1، میباشد.(۶۳) ۱۷

شکل ۱-۶- حلقه تلومری و حلقه جانشینی و پروتئین های مرتبط (۴۰) ۱۸

شکل ۱-۷- فرم باز و بسته تلومر (۴۰) ۱۹

شکل ۱-۸- ساختمان تلومراز. تلومراز از دو جز تشکیل شده است. ۱- پروتئین ۲ RNA. تلومراز یک آنزیم ریبونوکلئوپروتئینی است. (۴۱). ۲۲

شکل ۱-۹- نحوه اتصال تلومراز و تلوزوم (۵۵) ۲۲

شکل ۱-۱۰ :ارتباط طول تلومر و تعداد دفعات تقسیم سلولی. به دلیل عدم فعالیت تلومراز در سلول های طبیعی تلومر کوتاه تر میشود. به دلیل افزایشبیان تلومراز در سلول های زایا و سرطانی تلومر کوتاه نمیشود(..... ۲۶

۳-۲ طراحی پرایمر و استم لوپ و Blast: ۳۸

شکل ۳-۲- نحوه اتصال stem loop به Micro RNA ۳۹

شکل ۳-۲- بررسی mir-296-54 روی ژل با ladder50bp ۵۸

شکل ۳-۳- بررسی mir-512-5p روی ژل برای Ladder50 bp ۵۹

شکل ۳-۴- بررسی U6 روی ژل چاهک دوم ، پنجم و هفتم Ntc می باشد با Ladder 100bp ۶۰

فهرست جدول ها:

عنوان ..... صفحه

جدول ۲-۱ توالی universal برای Stem loop و پرایمر reverse ۳۸

جدول ۲-۲- توالی پرایمر Forward و Reverse و Stem loopهای اختصاصی ۳۹

جدول ۲-۳ توالی های پرایمر U6 Reverse و U6 Forward ۴۰

جدول ۲-۴ توالی پرایمر Probe و Reverse و Forward برای hTERT ۴۰

جدول ۲-۵ تولی پرایمر ß-Actin Probe و ß-Actin Reverse و ß-Actin Forward ۴۰

جدول ۲-۶ طول باند های محصول PCR ۴۱

جدول ۲-۷ سیکل دمایی برای PCR در TRAP Assay ۴۷

جدول ۲-۸ ساخت cDNA برای RNA ۴۸

جدول ۲-۹ ساختcDNA برای micro RNA ۴۹

جدول ۲-۱۰ سیکل دمایی برای PCR cDNA ۴۹

جدول ۲-۱۱ Master Mix لازم جهت PCR برای کنترل cDNA ۵۰

جدول ۲-۱۲ سیکل دمایی برای PCR cDNA کنترل ۵۰

جدول ۲-۱۳- مواد مورد نیاز جهت بیانmiR-296-5p در Real-Time PCR ۵۱

جدول ۲-۱۴-مواد مورد نیاز جهت بیانmiR-512-5p در Real-Time PCR ۵۲

جدول ۲-۱۵ مواد مورد نیاز جهت بیان hTERT در Real-Time PCR ۵۲

جدول ۲-۱۶ سیکل دماییhTERT و mir-512-5p وmiR-296-5p در Real-Time PCR ۵۳

جدول ۳-۱ نتایج آزمون کلموگروف اسمیرنوف برای بررسی نرمال بودن داده ها ۶۴

جدول ۳-۲ مقایسه بیان ژن mir - 296 - 5p در دو گروه هدف و کنترل ۶۴

جدول ۳-۳ مقایسه بیان ژن mir - 512 - 5p در دو گروه هدف و کنترل ۶۶

جدول ۳-۴- مقایسه ارتباط بیان ژن های mir-296-5p و mir-512-5p با فعالیت تلومرازی ۶۷

جدول ۳-۵ نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت تلومرازی در نمونه های سرطان پستان ۶۸

فهرست نمودار:

صفحه

نمودار ۳-۱- منحنی ذوب مربوط به پرایمر 100 pmol ۵۷

نمودار ۳-۲ منحنی تکثیر پرایمر 100 pmol ۵۷

نمودار ۳-۳ منحنی ذوب برای سه نمونه cDNA برای پرایمر mir-296-5p به همراه نمونه های Ntc(نمودار نارنجی)..... ۵۸

نمودار ۳-۴ نمودار تکثیر سه نمونه cDNA برای پرایمر mir-296-5p به همراه نمونه های Ntc(نمودار نارنجی)..... ۵۸

نمودار ۳-۵- منحنی ذوب سه cDNA برای پرایمر mir-512-5p به هر ماه نمونه Ntc (نمودار سبز).. ۵۹

نمودار ۳-۶- منحنی استاندارد برای سه نمونه cDNA برای پرایمر mir-512-5p به همراه نمونه Ntc (نمودار سبز)..... ۵۹

نمودار ۳-۷- منحنی ذوب سه cDNA برای پرایمر U6 به همراه نمونه Ntc (نمودار بنفش)..... ۶۰

نمودار ۳-۸- منحنی تکثیر سه 3DNA برای پرایمر U6 به همراه نمونه Ntc (نمودار بنفش) ۶۰

نمودار ۳-۹A) منحنی ذوب بررسی بیان mir-296-5p در نمونه سرطانی B) منحنی ذوب بررسی بیان mir-296-5p در نمونه نرمال ۶۱

نمودار ۳-۱۰A) منحنی ذوب بررسی بیان mir-512-5p در نمونه سرطانی B) منحنی ذوب بررسی بیان mir-512-5p در نمونه نرمال ۶۲

نمودار ۳-۱۱A) منحنی ذوب بررسی بیان U6در نمونه سرطانی B) منحنی ذوب بررسی بیان U6 در نمونه نرمال..... ۶۳

نمودار ۳-۱۲- میزان بیان ژن mir - 296 - 5p در دو گروه سرطان پستان و گروه کنترل..... ۶۵

نمودار ۳-۱۳ میزان بیان ژنmir-512-5p در دو گروه سرطان پستان و گروه کنترل ۶۶

نمودار ۳-۱۴ آنالیز همبستگی ریگرسیون خطی نشان داد که بین سطح بیانmir - 296 - 5p و فعالیت تلومراز همبستگی وجود داشته بطوری که بیان mir - 296 - 5p رابطه آماری معکوس و معنی داری با فعالیت تلومراز دارد. ۶۸

نمودار ۳-۱۵ آنالیز همبستگی ریگرسیون خطی نشان داد که بین سطح بیانmir-512- 5p و فعالیت تلومراز همبستگی وجود داشته بطوری که بیان mir-512-5p رابطه آماری معکوس و معنی داری با فعالیت تلومراز دارد..... ۶۹