

پایان‌نامه برای دریافت درجه پایان‌نامه کارشناسی ارشد
رشته زیست‌شناسی گرایش سلولی و مولکولی

کلون سازی و بیان پروتئین *noggin* انسانی نو ترکیب متصل به *GFP spark* در رده سلولهای سرطانی سینه

پژوهشگر:

آزاده اقوامی تهرانی

استادان راهنما:

دکتر سعید لطیفی نوید

پروفسور صابر زهری

استاد مشاور:

دکتر محسن سقا

شهریور ۱۳۹۸

کلون سازی و بیان پروتئین **noggin** انسانی نو ترکیب متصل به **GFP spark** در رده

عنوان و نام پدیدآور: سلولهای سرطانی سینه / آزاده اقوامی تهرانی

استادان راهنما: دکتر سعید لطیفی نوید و پروفسور صابر زهری

استاد مشاور: دکتر محسن سقا

تاریخ دفاع:

تعداد صفحات: ۱۰۲ ص

شماره پایان نامه: نام گروه / شماره پایان نامه

چکیده:

هدف: سرطان پستان شایعترین سرطان در بین زنان ایران و جهان می باشد و به عنوان دومین عامل مرگ در دنیا شناخته شده است. یکی از ویژگی های سلولهای سرطانی قابلیت متاستاز آنهاست که عامل بیش از ۹۰٪ مرگ و میر ناشی از سرطان است. BMPs پروتئینهای مهمی هستند که متعلق به ابرخانواده TGFβ می باشند و نقش مهمی در تنظیم تمایز، تکثیر، حرکت و حیات سلول دارند و به هم خوردن تنظیم آن ها می تواند منجر به تومورزایی و پیشرفت تومور گردد. BMP ها بیان بالایی در تومورها دارند. این پروتئینها اثرات متناقضی در سرطان های مختلف و مراحل متعدد آن از جمله در EMT (Epithelial mesenchymal transition) و رگزایی دارند که به ریز محیط توموری بستگی دارد؛ بعبارت دیگر بسته به نوع سرطان هم می توانند تحریک کننده و هم مهار کننده باشند. BMP4 می تواند تهاجم و تخریب ماتریکس در سرطان پستان را از طریق افزایش بیان MMP2 و MMP9 تحریک کند و در انواع متعدد رده های سلولی سرطان پستان باعث مهاجرت می گردد. NOGGIN یک مولکول پیام رسان است که BMP4 را در طول تکوین مهار می کند. پلی پپتید ترشحي NOGGIN به اعضای ابرخانواده TGFβ از جمله BMP2، BMP4 و BMP7 متصل می شود و آنها را غیر فعال می کند و از اتصال آنها به گیرنده شان ممانعت می کند در واقع آنتاگونیست BMP هاست.

روش شناسی پژوهش: در این مطالعه وکتور بیانی pCMV3-C-GFPspark حاوی cDNANoggin انسانی تهیه شد. پس از انتقال DNA نو ترکیب به درون باکتری *Ecoli* DH5α تکثیر پلاسمید همراه با cDNA Noggin انجام شد و خالص سازی پلاسمید صورت گرفت، سپس پلاسمید نو ترکیب خالص شده به درون رده سلولهای سرطانی پستانی MCF7 از طریق الکتروپوریشن منتقل شد.

یافته ها و نتیجه گیری: ژن Noggin به صورت متصل به GFPspark در درون سلولهای MCF7 بیان شد و به خاطر وجود این مارکر فلورسانس، بر اساس تراکم نقاط سبز رنگ در درون سلولهای MCF7 توسط میکروسکوپ فلورسانس شناسایی شد. وجود این پروتئین از طریق SDS-PAGE نیز رهگیری گردید.

واژه های کلیدی: GFP , Noggin , MCF7, BMPs , EMT

۱- مقدمه و هدف

۱-۱- سرطان چیست؟

سرطان بیماری است که شاخصه‌ی آن رشد غیر قابل کنترل و گسترش سلولهای غیر طبیعی در بدن است که اگر این بیماری در بدن پخش شده و کنترل نشود در نهایت منجر به مرگ می‌گردد. عامل ایجاد سرطان می‌تواند بیرونی باشد، مانند استعمال دخانیات، عوامل عفونی، عوامل شیمیایی و تشعشع و یا داخلی باشد مانند: جهش‌های ژنتیکی، هورمون‌ها و شرایط ایمنولوژیکی فرد. این عوامل با همدیگر یا به دنبال هم می‌توانند در شروع یا پیشرفت سرطان موثر باشند. گسترش و پیشرفت اکثر سرطان‌ها نیازمند چندین مرحله است که در طی سالیان متمادی رخ می‌دهد. از هر ۸ مرگ، یک مرگ در اثر سرطان رخ می‌دهد و دومین علت مرگ در کشورهای توسعه یافته است. همانند کشورهای در حال توسعه سبک زندگی کشورهای غربی از قبیل سیگار کشیدن، مصرف بالای چربی‌های اشباع و غذاهای پر کالری و کاهش فعالیت بدنی، میزان شیوع سرطان را در کشورهای غربی افزایش داده است (Garcia, Jemal et al. 2007).

تقریباً هر بافتی از بدن می‌تواند دچار سرطان شود، حتی بعضی از بافت‌ها می‌توانند چندین نوع بدخیمی ایجاد کنند که هر کدام ویژگی‌های منحصر به فردی دارند، اما درعین حال مراحل پایه‌ی این بدخیمی‌ها یکسان است. در واقع اصطلاح سرطان "cancer" به بیشتر از ۱۰۰ نوع از این بیماری بر می‌گردد. حدود ۳۰ تریلیون سلول نرمال به صورت پیچیده و کمپلکس در بدن سالم وجود دارد که هر کدام تکثیر دیگری را کنترل می‌کنند و هر سلول طبیعی فقط زمانی می‌تواند تکثیر شود که از سلولهای مجاورش دستور لازم را دریافت کند و این همکاری برای حفظ اندازه و معماری مناسب هر بافت لازم است. اما سلولهای سرطانی طبق این رویه عمل نمی‌کنند؛ آن‌ها به کنترل‌های معمول که برای تکثیر وجود دارد بی‌تفاوت شده و از دستورات داخلی خود پیروی می‌کنند و قابلیت‌های خاصی از قبیل: مهاجرت از جایگاه تومور اولیه، تهاجم و دست‌اندازی به بافتها و ایجاد توده‌هایی در جایگاه دور بدن را به دست می‌آورند. این سلولهای بدخیم با گذشت زمان بدخیم‌تر شده و نهایتاً "بعد از درگیری بافتها و ارگانها، کشنده خواهند بود. ترانسفورماسیون یک سلول که باعث بدخیمی می‌شود در نتیجه‌ی تجمع جهش‌ها

در دسته های خاصی از ژنهای این سلولها است (Weinberg 1996). زمانیکه سرطان به مرحله ی متاستاز رسید به درمان ها مقاوم می شود در حالیکه درصد بالایی از مبتلایان به سرطان در همان مراحل ابتدایی قابل درمان هستند. بنابراین درمان تومور اولیه برای جلوگیری از شروع فرم متاستازیک ضروری به نظر می رسد (Devita, Lawrence et al. 2018).

۱-۱-۱- درجه بندی تومور

درجه بندی تومور بر اساس گسترش بیماری در زمان تشخیص صورت می گیرد و برای انتخاب نوع درمان ضروری است. یکی از راههای دسته بندی سرطان براساس Grade سلول سرطانی است و پاتولوژیست ها، براساس مورفولوژی سلول توموری آن ها را طبقه بندی می کنند. براین اساس، درجه ی یک تومور به میزان تمایز و رشد سلول های سرطانی آن بر می گردد و اینکه چقدر از لحاظ تمایزی با سلول عادی تفاوت دارد. هر چه سلول ها به سلول نرمال شبیه تر باشند سرعت تکثیر کم تری دارند و شانس موفقیت درمان بیشتر است.

G1 – (well differentiated) – low grade: سلولهای سرطانی تفاوت کمی با سلولهای

طبیعی دارند و رشد آرامی تری دارند و معمولا به خوبی تمایز یافته اند.

G2 – (moderately differentiated) – intermediate grade: سلول ها شباهتی به

سلول های نرمال ندارند و میزان رشدشان کمی بیشتر از سلولهای نرمال است.

G3 – (poorly differentiated) – high grade: سلولهای توموری نسبت به سلولهای

نرمال بسیار غیر طبیعی به نظر می آیند و سرعت تکثیر بالایی دارند و در اوایل مرحله ی انتشار هستند (Admin 2016).

یکی از سیستمهای درجه بندی سرطان، سیستم درجه بندی (Metastatic spread ,

TNM (Tumor, Nude involvement) است که بر اساس درجه تومور (stage) آن است که بر پایه ی اندازه ی تومور اولیه و موقعیت آن و اینکه آیا در سایر اندامها پخش شده است یا نه انجام می شود.

اندازه و میزان گسترش تومور اولیه $Tumor = (T)$ ، درگیری یا عدم درگیری غدد لنفاوی $Nude\ involvement = (N)$ و وجود یا عدم وجود متاستاز به اندام دورتر $Metastatic = (M)$ spread. نتایج بدست آمده از این سه معیار، مرحله ی (stage) سرطان هر فرد را تعیین می کند. بعد از اینکه TNM تومور تعیین شد از شماره ی I تا V درجه بندی می شود. درجه ی I شروع تومور و درجه ی V تومور پیشرفته را نشان می دهد (کاظمی و همکاران، ۱۳۹۴).

۱-۲- عوامل موثر در پیش آگهی سرطان

شناخت فاکتورهای پیش آگهی، تاثیر مهمی در نتیجه و درمان خواهد داشت. این عوامل فهم

بیشتر تاریخچه ی سرطان و پیش بینی نتیجه به دنبال درمان را افزایش می دهند. این فاکتورها به پزشک این اجازه را می دهد که برای هر سرطان درمان اختصاصی را بکار بگیرد. از این عوامل می توان به این موارد اشاره کرد.

سن بیمار: سن بیمار و شرایط سلامت عمومی در شروع درمان تا حدودی تعیین کننده ی پیش آگهی هستند. نوزادان و سالخوردهگان دارای پیش آگهی ضعیف هستند.

نوع سرطان: برخی از سرطان ها پیش آگهی خوبی دارند، در حالی که بعضی سرطان ها متاستازیک و تهاجمی هستند و میزان مرگ و میر بالایی دارند.

محل سرطان: محل قرار گیری غدد سرطانی در پیش آگهی آن موثر است.

مرحله ی سرطان: پیش آگهی در مراحل اولیه بسیار مهم تر است نسبت به مراحل بالاتر که به بافت های دیگر متاستاز داده است.

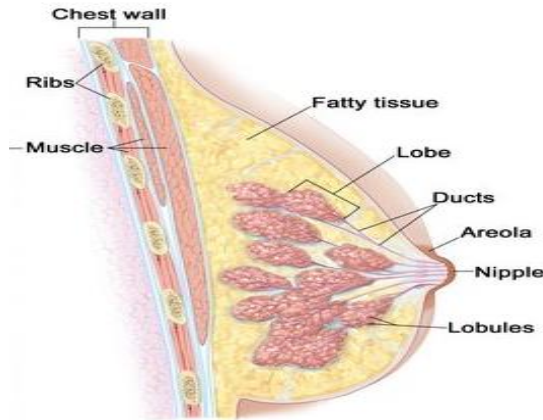
درجه ی تومور: سرطان هایی که تمایز کمتری دارند و یا درجات بالاتری دارند پیش آگهی ضعیفی دارند.

از فاکتورهای دیگر وضعیت درگیری غدد لنفاوی، سایز تومور و میزان تکثیر آن را می توان نام برد (Gospodarowicz, Hermanek et al. 1995)

۳-۱- بیولوژی پستان

هر غده پستانی شامل ۲۵-۱۵ لوب از نوع لوبهای آلوئولار می باشد که وظیفه ی آن ها ترشح شیر است. هر لوب توسط بافت همبند متراکم به همراه مقادیر فراوانی بافت چربی از سایر لوب ها جدا می شود و دارای یک مجرای خارج کننده ی شیری مخصوص به خود می باشد. هر کدام از این مجاری ۲ تا ۴/۵ سانتی متر طول دارند و مستقل در نوک پستان باز می شوند. نوک پستان دارای ۱۵ تا ۲۵ سوراخ منفذ دار به قطر ۰/۵ میلیمتر می باشد. ساختار بافتی غدد پستانی بر اساس جنس، سن و وضعیت های فیزیولوژیک متفاوت خواهد بود. قبل از بلوغ غدد پستانی در هر دو جنس شامل سینوس های شیری در نزدیکی نوک پستان و مجاری منشعب خیلی کوچک خارج شده از این سینوس ها می باشند. در دختران در خلال بلوغ، سطح بالای استروژن سبب رشد پستان ها می گردد که ناشی از تجمع بافت چربی و طویل شدن سیستم مجاری می باشد. در زنان بالغ غیر حامله هر لوب غده پستانی شامل لوبول های زیادی است که گاهی اوقات واحد های لوبولار مجرای انتهایی (Terminal Duct Lobular Unit) TDLU خوانده می شوند. هر لوبول چندین واحد کوچک و منشعب دارد. سینوس های شیری توسط بافت پوششی مکعبی مطبق و مجاری شیری و مجاری انتهایی با بافت پوششی مکعبی ساده و دسته هایی از سلولهای میو اپی تلیال پوشیده می شوند. سیستم مجرا توسط بافت همبند سست پر عروق احاطه شده و بافت همبند متراکم کم سلول نیز لوب ها را از هم جدا می کند. در

مرحله ی پیش از قاعدگی چرخه ی تولید مثلی بافت همبند پستان، متورم شده و پستان ها اندکی بزرگتر می شوند (Mescher and Junqueira 2009).



شکل ۱-۱- آناتومی پستان. نوک پستان و هاله اطراف آن در خارج پستان نشان داده شده است. لوبها، لوبولها، مجاری شیری و دیگر قسمتها در داخل پستان دیده می شود.

۴-۱- سرطان پستان

در بیشتر موارد سرطان پستان از سلولهای اپیتلیال لوبول های انتهایی غدد منشا می گیرد. شایع ترین آن کارسینومای تهاجمی مجاری است که در آن سلولهای نئوپلازی مجاری داخل لوبولی یا شاخه های کوچکتر مجاری لاکتی فروس استرومای اطراف را مورد تهاجم قرار می دهند و یک توده ی قابل لمس را ایجاد می کنند.

۱-۴-۱- تاریخچه سرطان پستان

بیماری سرطان پستان از دوران باستان در انسان تشخیص داده شد و به نظر می رسد نخستین بار در مصر باستان مشاهده و درمان شده است. در سال های ۱۶۰۰ سال پیش از میلاد اطلاعاتی از این بیماری در متون پزشکی مصریان (پاپیروس) به نام ادوین اسمیت ثبت شده است. طبق نوشته های این متون، در آن زمان برای درمان این بیماری قسمتی از پستان که تومور در آن ناحیه لمس می شده، سوزانده یا داغ می شد. در سال ۴۶۰ پیش از میلاد، بقراط از بیماری سرطان به عنوان یکی از امزاج چهارگانه ی بدن نام برد و دلیل آن را افزایش سودا دانست. او برای سرطان نام (karkinus) را برگزید که یک کلمه ی یونانی به معنای خرچنگ است زیرا تومورها شبیه پاهای خرچنگ ظاهری شاخک مانند دارند.

در سال ۲۰۰ پس از میلاد گالن برای درمان آن از داروهایی مانند تریاک، گوگرد و انواع ضماد استفاده کرد. در سال ۱۳۷۵ میلادی هنری لودرن، پزشک پیشروی فرانسوی ادعا کرد؛ برداشتن

تومور سرطانی از طریق جراحی می تواند به درمان بیماری کمک کند. این شیوه تا قرن بیستم میلادی ادامه یافت و یکی از گزینه های موجود برای درمان سرطان پستان بود. در سال ۱۸۹۵، جورج بیستون دریافت با برداشتن تخمدان ها که عامل اصلی ترشح استروژن و پروژسترون هستند تومورها کوچک می گردند ولی پس از برداشتن تخمدان ها، غدد فوق کلیوی وظیفه ی تولید استروژن را در این زنان به عهده می گیرند.

در سال ۱۹۵۲ میلادی چارلز هاجینز و رالف لفت اقدام به برداشتن غدد فوق کلیوی و غده هیپوفیز به عنوان منابع تولید استروژن نمودند (ISNA 1392). رادیوتراپی و شیمی درمانی در سال ۱۹۳۰ و ۱۹۴۰ به منظور آسیب های کمتر درمان سرطان صورت گرفت و به روشهای رایج تشخیصی و درمان شامل ماموگرافی، جراحی غدد پستانی و هورمون تراپی کمک کرد. (Mandell 2005)

۲-۴-۱- انواع سرطان پستان

سرطان های پستان به دو دسته تقسیم می شوند کارسینوما و سارکوما. در کارسینوما منشأ سرطان از سلولهای اپی تلیالی (مجاری و لوبولها) است اما در سارکوما سلولهای سرطانی از بافت پیوندی، ماهیچه ای و چربی منشأ می گیرند (Kelly, Kim et al. 2003). انواع مختلف سرطان پستان شامل سرطان پستان غیر تهاجمی، تهاجمی و متاستاز دهنده می باشد.

۱-۲-۴-۱- کارسینوما ی داکتال در محل (DCIS (Ductal Carcinoma In Situ

سرطان پستان غیر تهاجمی یا پیش تهاجمی است که سلولهای مجاری دچار تغییراتی شده و به سلولهای سرطانی تبدیل می شوند ولی هنوز محدود به مجاری شیری هستند و به بافت اطراف پستان دست اندازی نکرده اند (Welch, Woloshin et al. 2008).

۲-۲-۴-۱- کارسینوما ی داکتال مهاجم (IDC (Infiltrating Duct Carcinoma

نوع رایج سرطان پستان است، از یک مجرای شیری شروع شده و به دیواره ی مجرای رسد و سپس در بافت چربی پستان رشد می کنند و قادرند از طریق سیستم لنفی و گردش خون به بیرون از بافت پستان راه یابند و در مناطق دیگر بدن گسترش یابند. سرطان از نوع IDC در تصاویر ماموگرام به صورت توده ای متشکل از اجسام میله ای شکل نازک متشعشع شده از کناره ها دیده می شود و در معاینات فیزیکی توده ی سفت و سختی لمس می شود (Welch, Woloshin et al. 2008).

۳-۲-۴-۱- کارسینوما ی لوبولار مهاجم (ILC (Invasive Lobular Carcinoma

از غدد تولید کننده ی شیر منشأ می گیرند و مانند IDC می توانند به سایر بخشهای بدن

گسترش یابند. از هر ۱۰ سرطان تهاجمی پستان یکی از نوع ILC است. تشخیص ILC نسبت به IDC در ماموگرافی دشوارتر است (Welch, Woloshin et al. 2008).

۴-۲-۱- کارسینومای پستان التهابی (IBC (Inflammatory Breast Cancer

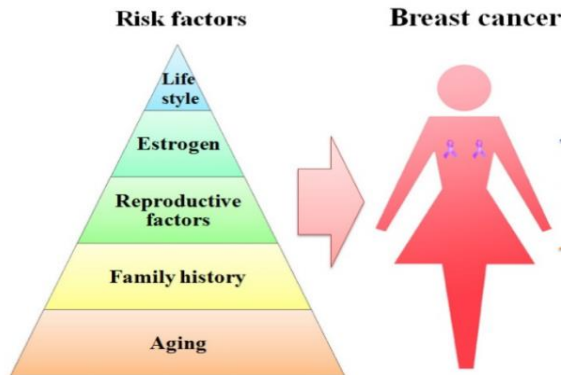
از موارد غیررایج سرطان پستان تهاجمی محسوب می شود که حدود ۱-۳٪ کل سرطان های پستان را شامل می شود که معمولاً "تومور منفردی دیده نمی شود و در مراحل پایین معمولاً" با عفونت پستان اشتباه گرفته می شود. تشخیص این نوع سرطان بسیار سخت تر از انواع دیگر است به همین خاطر شانس بیشتری برای گسترش دارد (Welch, Woloshin et al. 2008).

۴-۳-۱- علائم سرطان پستان

از علائم سرطان پستان، می توان به موارد زیر اشاره کرد: توده یا تورم در پستان، ترقوه یا زیر بغل، ضخیم شدن پوست و قرمزی، گرما و خارش پوست پستان، تغییرات نوک پستان، ترشح از نوک پستان، درد و تغییر در اندازه و شکل پستان هم می تواند حاکی از سرطان باشد (Koo, von Wagner et al. 2017).

۴-۴-۱- ریسک فاکتورها در ابتلا به سرطان پستان

سن، از مهم ترین فاکتورهای خطر ساز در ابتلا به سرطان پستان است زیرا افزایش سن، شیوع سرطان را افزایش می دهد به همین علت ماموگرافی برای خانمهای ۴۰ سال به بالا پیشنهاد می شود. سابقه ی خانوادگی بیماری بخصوص در اقوام درجه یک، تراکم بالای بافت پستانی، دوز بالای پرتو درمانی قفسه ی سینه و صورت قبل از ۳۰ سال، سیگار کشیدن و مصرف الکل در سن پایین ریسک ابتلا را افزایش می دهد. از عوامل دیگر، فاکتور تولید مثلی (reproductive factors) است از قبیل عادت ماهیانه در سن پایین و یائسگی دیر هنگام، که ریسک ابتلا را افزایش می دهد. فاکتور تولید مثلی قویاً با ER در ارتباط است. از عوامل دیگر که ریسک سرطان پستان را افزایش می دهد، استروژن اندوژنوس و آگروژنوس است که استروژن اندوژنوس توسط تخمدان قبل از یائسگی تولید می شود و استروژن آگروژنوس هم توسط قرص های ضد بارداری و هورمون درمانی دریافت می شود. از فاکتورهای دیگر سبک زندگی افراد است. زندگی مدرن و رژیم غذایی با چربی زیاد مخصوصاً چربی اشباع و چاقی بعد از سن یائسگی ریسک ابتلا را افزایش می دهد. همچنین از عوامل دیگر خطر ساز می توان به نداشتن فرزند و تولد اولین فرزند بعد از ۳۰ سالگی اشاره کرد شکل (۱-۲). شیردهی مخصوصاً اگر بیشتر از یک سال باشد، انجام حرکات ورزشی، معاینات دوره ای ماموگرافی و داشتن وزن متعادل ریسک ابتلا به سرطان پستان را کاهش می دهد (Sun, Zhao et al. 2017).



شکل ۱-۲- نمای شماتیک از ریسک فاکتورها در سرطان پستان. سبک زندگی، استروژن، فاکتورهای تولید مثلی، سابقه ی خانوادگی و سن ۵ عامل مهم در ابتلا به سرطان پستان است.

۵-۴-۱- اپیدمیولوژی سرطان پستان در ایران و جهان

سرطان پستان شایعترین سرطان در میان زنان جهان با حدود ۱/۷ میلیون مورد جدید تشخیص داده شده در سال ۲۰۱۲ می باشد. بیش از نصف این مورد در کشورهای در حال توسعه رخ داده است که حدود ۸۲ درصد جمعیت جهان را تشکیل می دهد (Garcia, Jemal et al. 2007).

سرطان پستان دومین و بیشترین سرطان مشترک در مردان و زنان جهان می باشد و بیشترین سرطان تشخیص داده شده در بین زنان در ۱۴۰ کشور از ۱۸۴ کشور است و اولین علت مرگ زنان در جهان و ۶۰٪ مرگ ها در کشورهای در حال توسعه (آمریکای شمالی، اروپا، استرالیا، نیوزیلند و ژاپن) را نیز شامل می شود (Rafiemanesh, Salehiniya et al. 2016). بالاترین میزان شیوع در کشورهای اروپای شرقی و غربی، استرالیا، نیوزیلند و آمریکای شمالی دیده شده است (Jemal, Bray et al. 2011). در سال ۱۹۹۰، حدود ۵۹٪ سرطان پستان بیشتر در کشورهای در حال توسعه (آمریکای شمالی، اروپا، استرالیا، نیوزیلند و ژاپن) دیده می شد. در کشورهای آسیایی شیوع این بیماری پایین تر از کشورهای غربی است و در استرالیا از هر ۱۰ نفر یک نفر مبتلا می شوند و در مالزی از هر ۲۰ نفر یک نفر مبتلا می شوند (Pathy, Yip et al. 2011). میزان شیوع در سطح جهان ۳۹ نفر به ازای ۱۰۰۰۰۰ نفر و در ایران ۲۴ نفر به ازای ۱۰۰۰۰۰ نفر می باشد (Mousavi, Gouya et al. 2009).

مطالعات در ایران نشان می دهد که میزان شیوع در گروههای سنی ۴۴-۴۰، ۴۹-۴۵ و ۵۹-۵۵ سال با میانگین سالانه ی به ترتیب ۶/۲، ۳/۵ و ۵/۳ در حال افزایش است (Tazhibi, Dehkordi et al. 2014). مطالعات دیگر نشان داد که (Infiltrating Duct Carcinoma)

IDC= بیشترین مورفولوژی مشترک سرطان پستان در ایران است (Naghibi, Shojaizadeh et al. 2013).

۶-۴-۱- ژنتیک مولکولی سرطان پستان

سرطان پستان و سرطان های بدخیم دیگر در نتیجه ی تغییرات ژنتیکی سلول های نرمال و یا شاید تغییرات غیر ژنتیکی (اپی ژنتیکی) آنها در میانکنش با سلول های توموری، از قبیل سلول های ایمنی، رگی و استرومایی به وجود می آید (Nowell 1976). ناپایداری ژنتیکی خواه ارثی باشد یا نه، در نتیجه تغییرات وسیع ژنتیکی است از قبیل از دست رفتن ژن، تکثیر ژنی، موتاسیون نقطه ای و جابجایی های کروموزومی. بعضی از این تغییرات می تواند روی ژن های کلیدی که در حیات، تکثیر، مهاجم، حرکت، مقاومت به درمان و دیگر مشخصه های ایجاد کننده ی بدخیمی نقش دارند تاثیر داشته باشد.

این ناهنجاری ژنومی در سرطان پستان می تواند شامل از دست رفتن ناهمگونی (از دست رفتن ژن) و تغییرات در تعداد کپی ژن باشد که به نظر می رسد باعث افزایش انتقال از حالت هایپر پلازیا به Ductal Carcinoma In Situ (DCIS) می شود (Waldman, DeVries et al. 2000). از ژن های کلیدی می توان به انکوژن ها و ژن های سرکوب کننده ی تومور TSGs=(Tumor Suppressor Genes) اشاره کرد.

۷-۴-۱- انکوژن های دخیل در سرطان پستان

انکوژن ها، ژن هایی هستند که فعال شدن آنها باعث توسعه سرطان می گردد. فعال شدن می تواند از طریق تکثیر ژنی، موتاسیون نقطه ای و جابجا شدن کروموزومی باشد.

۱-۷-۴-۱- انکوژن Her-2:

HER-2 (Human epidermal receptor 2) که به عنوان HER-2/neu یا erbB-2 شناخته شده است ژنی است که در روی کروموزوم 17q قرار دارد و رسپتور تراغشایی تیروزین کینازی که یک فاکتور رشد است را کد می کند که این رسپتور فاکتور رشد با اتصال لیگاند به آن فعال می شود (Yarden and Sliwkowski 2001) و یا اگر به طور خودکار تراکم این رسپتور روی سطح غشا به اندازه ی ای باشد که باعث دایمریزه شدن و اتوفسفریلاسیون این رسپتور گردد منجر به فعال شدن آبشارهای انتقال چند گانه و مسیرهای مختلف می گردد، از جمله این مسیرها (MAPK= (mitogen – activated protein kinase) و PI3K= (3-kinase AKt) است که در تکثیر، رگزایی، تغییرات میانکنش های سلول - سلول، افزایش حرکت سلولی، متاستاز و مقاومت به آپتوز نقش دارند (yarden, 2002). انکوژن HER-2 در 20%-30% سرطان های

پستان تهاجمی، تکثیر و افزایش بیان می‌یابد (Slamon, Clark et al. 1987).

۲-۴-۱- سایکلین‌ها و تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی :

ورود به چرخه سلولی و تکثیر فعال، یک فرآیند بسیار تنظیم شده است. کینازهای وابسته به سایکلین (CDKs= Cyclin-Dependent Kinases) دسته‌ای از پروتئین‌ها هستند که در سرتاسر چرخه سلولی موجودند، پس از فعال شدن می‌توانند پروتئین‌های دیگر را فسفریله کنند. پروتئین رتینوبلاستوما (PRb) اولین چک‌کننده‌ی چرخه است که اجازه می‌دهد سلول از فاز استراحت G_0 وارد سیکل فعال و میتوز شود. سطح بیان سایکلین D و سایکلین E در هر چرخه سلولی متناوب است و هر دو نقش کلیدی در پیشروی سلول از فاز G_1 به S دارند (Vermeulen, Van Bockstaele et al. 2003).

ژن‌های کدکننده‌ی سایکلین D روی کروموزوم 11q13 قرار دارند و در ۴۰٪ - ۵۰٪ سرطان‌های پستان تهاجمی، افزایش بیان پیدا می‌کنند. افزایش بیان سایکلین E، باعث هایپر فسفریلاسیون (PRb) و عبور از این نقطه چک‌کننده‌ی چرخه سلولی و در نتیجه افزایش تکثیر می‌گردد (Steege and Zhou 1998).

۳-۴-۱- انکوژن c-myc:

این انکوژن در روی کروموزوم 8q24 قرار دارد و فسفوپروتئین هسته‌ای را کد می‌کند که به عنوان تنظیم‌کننده‌ی رونویسی در تکثیر سلولی، تمایز و آپاپتوز نقش دارد (Nass and Dickson 1997). این انکوژن در ۲۵٪ - ۱۵٪ سرطان‌های پستان تکثیر و افزایش بیان می‌یابد و یک چهره‌ی تهاجمی داشته و در مقاومت به شیمی‌درمانی نقش دارد (Carroll, Swarbrick et al. 2002).

جدول ۱-۱- انکوژن‌های دخیل در سرطان پستان، عملکرد و اهداف درمانی شان

Oncogene	Function	Targeted therapy
<i>HER-2</i>	Tyrosine kinase receptor	Anti HER-2 antibodies (trastuzumab, pertuzumab) Kinase inhibitors (CI-1003, EKB-569, lapatinib) <i>E1A</i> adenoviral gene therapy
<i>Ras</i>	G-protein	Farnesyl transferase inhibitors (tipifarnib)
<i>PI3K</i>	Kinase	Rapamycin/rapamycin analogues (CCI-779, RAD 001, AP23573)
<i>Akt</i>	Kinase	
<i>EIF-4E</i>	Initiator of protein translation	
<i>Cyclin D1</i>	Cell-cycle mediator	Flavopiridol, UCN-01 (7-OH staurosporine),
<i>Cyclin E</i>	Cell-cycle mediator	Ro 31-7453, specific CDK inhibitors
<i>c-myc</i>	Transcription factor	Antisense
<i>c-fos</i>		

۸-۴-۱- ژن‌های سرکوب کننده ی تومور (Tumor suppressor genes)

از دست رفتن فعالیت این دسته از ژن‌ها، سبب ایجاد تومورهای بدخیم می گردد. این ژن‌ها معمولاً تنظیم کننده های منفی رشد یا دیگر فعالیت‌های سلول هستند که تهاجم و پتانسیل متاستازیک از قبیل چسبندگی سلولی و تنظیم فعالیت پروتئازی را کنترل می کنند. برطبق فرضیه دو ضربه‌ای آلفرد نادسون در مورد رتینوبلاستوما، برای اینکه فنوتیپ بدخیم ایجاد شود باید هر دو آلل‌های این ژن از دست برود. برای سرطانی شدن لازم است که متحمل یک جهش در یک آلل و یک حذف شدگی در آلل باقیمانده شوند (Knudson 1971). در بعضی موارد ممکن است جهش در ژن‌های سرکوب کننده‌ی تومور رخ ندهد ولی می توانند با مکانیسم‌های دیگر، باعث تداخل در بیان یا عملکرد این ژنها شوند مانند متیلاسیون پروموتور که باعث مهار رونویسی و افزایش تخریب پروتئازومی می گردد و یا باعث ایجاد ناهنجاری‌هایی در پروتئین‌های دیگر که با محصول این ژن میانکنش دارند می شود.

۱-۸-۴-۱- P53

جهش‌های p53 در بیش از نیمی از همه ی سرطان‌های انسانی و در حدود ۳۰٪-۲۰٪ سرطان‌های پستان رخ می‌دهد (Hollstein, Sidransky et al. 1991). ژن p53 در روی کروموزم 17p قرار دارد که در شرایط طبیعی تنظیم مکانسیم‌های تقسیم سلولی را به عهده دارد. در شرایط نرمال، ژن p53 تنظیم کننده‌ی مکانسیم تقسیم سلولی است. در هنگام آسیب DNA، P53 فعال شده می‌تواند به طور مستقیم با DNA میانکنش داده تا رونویسی از ژن‌هایی که مسئول ترمیم DNA هستند صورت بگیرد و به طور موقت چرخه سلولی را در G1 یا مرحله G2/M متوقف کرده تا DNA قبل از اینکه وارد میتوز گردد، ترمیم شود. همچنین P53 قادر

است با مسیرهای سلولی دیگر میانکنش دهد و آنها را وارد آپتوز یا تمایز نماید (Lane et al , 1994). چون پروتئین P53 یک پروتئین چند کاره (multi functional) است و جهش در دومین‌های مختلف پیامدهای خاصی را به دنبال خواهد داشت، از این ژن به عنوان یک مارکر پیش‌بینی کننده‌ی دسته II در سرطان پستان استفاده می‌شود (Fitzgibbon, Page et al. 2000).

۲-۸-۴-۱- SKP2 و P27

از دیگر ژن‌های سرکوب کننده‌ی تومور هستند که تنظیم کننده‌های منفی چرخه سلولی بوده و از دست رفتن فعالیتشان باعث بدخیمی می‌گردد. P27 متعلق به خانواده‌ای مهار کننده‌ی پروتئین کیناز وابسته به سیلکین CKIs = Cyclin-dependent protein kinase inhibitor است که به عنوان cip/kip شناخته می‌شوند.

عموماً CKIs به آرامی چرخه سلولی را پیش می‌برند و P27 قادر است به تعدادی از کمپلکس‌های منحصر به فرد سیکلین CDK متصل شده و فعالیتشان را متوقف کند، مخصوصاً می‌تواند سلول را از مرحله G1 به سمت توقف (arrest) پیش ببرد. P27 نقش‌های زیادی دارد از جمله تعدیل مقاومت دارویی، تمایز سلولی و حفاظت از التهاب (St Croix, Florenes et al. 1996). فقدان P27 ممکن است باعث انتقال سلول از حالت نرمال به سمت فنوتیپ پیش بدخیمی و سپس بدخیمی گردد (Fredersdorf, Burns et al. 1997).

SKP2 (S- phase Kinase – associated protein) پروتئین همراه با کیناز مرحله S، برای تخریب P27 به واسطه‌ی یوبی کوئیتیناسیون لازم است و در سرطان پستان $HER-2^{-}$ و ER^{-} افزایش بیان می‌یابد.

۳-۸-۴-۱- BRCA1

بر پایه آنالیز خانواده‌هایی که سرطان پستان متعدد داشتند، مشخص شد که این ژن روی کروموزوم 17q21 قرار دارد. جهش BRCA-1 در بیشتر از ۵۰٪ همه سرطان‌های پستانی که زیر سن ۴۰ سال هستند رخ می‌دهد اما در افرادی که در سابقه‌ی خانوادگی آن‌ها ۴ مورد یا بیشتر سرطان پستان وجود دارد احتمال ابتلا به بیش از ۹۰٪ افزایش می‌یابد (Ford, Easton et al. 1995).

BRCA-1 که دارای نقش سرکوب کننده‌ی تومور است، پروتئینی را کد می‌کند که دارای دومینهای متعدد و دو توالی تکراری در انتهای کربوکسیل است شبیه آنچه در بسیاری از آنزیم‌های ترمیم کننده‌ی DNA از جمله Rad 9 دیده می‌شود (Scully, Chen et al. 1997).

بیش از ۲۰۰ جهش در BRCA-1 دیده شده است که در سر تا سر طول ژن رخ می‌دهد اگر چه بعضی مناطق به عنوان نقاط داغ جهش محسوب می‌شوند (Couch, DeShano et al. 1997). شدت بیماری بستگی به جایگاه جهش دارد، جهش‌هایی که در انتهای ناحیه آمینی یا کربوکسیلی رخ می‌دهد شدت تکثیر بالاتری را موجب می‌شود (Sobol, Stoppa-Lyonnet et al. 1996). به طور میانگین، تومورهای ناشی از جهش BRCA-1 درجه‌ی تومور بالاتری دارند (Breast Cancer Linkage Consortium 1997).

BRCA-2-1-4-8-4

ژن BRCA-2 در بسیاری از خصوصیات با BRCA-1 مشترک است اگر چه از لحاظ ساختمانی شباهتی با هم ندارند. پروتئین BRCA-2 به Rad 51 و پارالوگش برای درستی تعمیر DNA متصل می‌شود که برای اصلاح اشتباهات رشته الگوی کروماتید خواهری لازم است. هر دو ژن وقتی دچار جهش می‌شوند ریسک بالای در ایجاد هم سرطان پستان و هم سرطان تخمدان به وجود می‌آورند.

بیش از ۱۰۰ جهش منحصر به فرد BRCA-2 تا به حال شناسایی شده است که بیشتر آن‌ها به علت ایجاد پروتئین‌های نابالغ دم بریده (truncation) است. همانطور که در جهش BRCA-1 مشاهده شده، جهش BRCA-2 با ایجاد تومور با درجه بالا که در BRCA-1 دیده شده در ارتباط نمی‌باشد، اما در سلول‌های بدخیم توبول‌های کمتری تشکیل می‌شود (Breast Cancer Linkage Consortium 1997). جهش BRCA-2 همچنین افزایش ریسک ابتلا به سایر سرطان‌ها را نیز افزایش می‌دهد از جمله ملانوما، سرطان پروستات، سرطان معده و سرطان صفراوی. پروفایل بیان ژن تفاوت‌های معنی داری را در تومورهای ناشی از جهش BRCA-1 و BRCA-2 نشان می‌دهد (Hedenfalk, Duggan et al. 2001).

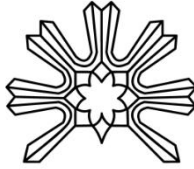
BRCA-2-1-4-8-5

ژن‌های سرکوب کننده‌ی تومور دیگری که نیز در سرطان پستان شناسایی شدند. براساس شیوع سرطان پستان در خانواده‌هایی که سابقه‌ی ابتلا به این سرطان در آنها بالاست و هیچ جهشی از ژن‌های BRCA-1 یا BRCA-2 در آن‌ها شناسایی نشده است، وجود ژن BRCA-3 به عنوان فرضیه در نظر گرفته شده است؛ اگر چه هیچ جایگاه قوی نیز برای این ژن پیدا نشده است (Kerangueven, Essioux et al. 1995).

PTEN-1-4-8-5-1

PTEN ژنی است که با کد کردن فسفاتازی، به عنوان تنظیم کننده‌ی منفی AKT عمل

Title and Author:	Cloning and Expression of Recombinant Human Noggin Protein fused with GFP spark in Breast Cancer Cell line/ Azadeh Aghvami Tehrani
Supervisor:	Dr. S. Latifi-Navid & Dr. S. Zahri
Graduation date:	17.9.2019
Number of pages:	102
Abstract	
<p>Research Aim: Breast cancer metastasis is the expansion of cancer cells to tissues beyond where the tumor initially forms. During this process, the epithelial cells transform to mesenchymal cells (EMT) by different signaling pathway including TGFβ1 superfamily protein (such as BMPs). This study was aimed at cloning and overexpressing of NOGGIN protein, as a potent BMP antagonist in breast cancer cells.</p> <p>Research method: The human breast cancer cell line, MCF7 was grown in DMEM^{HG}+10% FBS at 37^oC with 5% CO2 to reach up to 70-80% confluency. The harvested cells underwent to transient transfection with pCMV3-NOG-GFPspark including GFP as a reporter gene gene which was already transformed in DH5α bacterial cells and subjected to PCR by using the specific primers. Then, the transfected cells examined 24h post- electroporation by using epifluorescent microscopy.</p> <p>Findings & Conclusion: pCMV3-<i>noggin</i>-GFPspark had been cloned successfully in DH5α and PCR confirmed the extracted plasmid containing the desired fragment (<i>noggin</i> +<i>GFP</i> sequences). Our results also showed that the highly expression of NOGGIN protein following transient transfection in MCF-7 and expression of the gene were studied by the SDS-PAGE electrophoresis.</p>	
Keywords: BMPs, EMT, GFP, MCF7, <i>noggin</i>	



University of Mohaghegh Ardabili
Faculty of science
Department of Biology

Thesis submitted in partial fulfillment for the degree of
M.Sc. in Cellular and Molecular Biology

***Cloning and Expression of Recombinant
Human Noggin Protein Fused with GFP
spark in Breast Cancer Cell line***

By:
Azadeh Aghvami Tehrani

Supervisor:
Dr. S. Latifi-Navid
Dr. S. Zahri

Advisor:
Dr. M. Sagha

Sep 2019