



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی فسا  
معاونت تحقیقات و فناوری

دانشکده پزشکی

پایان نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان:

بررسی عملکرد ژن درمانی با استفاده از پروموتر اختصاصی بافت و تنظیم میکرو RNA های ۱۴۳ و ۱۴۵ در سرطان کولورکتال

نگارش:

فاطمه باغبان

استاد راهنما اول:

دکتر اکبر فرجادیفر

استاد راهنمای دوم:

دکتر علی قنبری اسد

تیرماه ۱۳۹۹

شماره پایان نامه:

۱۱۷

# چکیده فارسی:

## سابقه و هدف:

سرطان کولورکتال یکی از سرطانهای شایع در جهان است. بیماران در مراحل پیشرفته اغلب متاستاز ایجاد می کنند که نیاز به شیمی درمانی دارند و معمولاً پاسخ ضعیفی نشان می دهند، میزان بقا کم دارند. ژن درمانی خودکشی می تواند به عنوان یک درمان جدید برای درمان سرطان به کار رود اما به دلیل سمیت ناشی از بیان غیر انتخابی ژن کشنده در سلول های نرمال مانع اصلی استفاده از آن شده است. برای این منظور استفاده از پروموتور اختصاصی بافت جهت بیان هدفمند ژن کشنده پیشنهاد می شود. ما در این مطالعه به دنبال آن هستیم که با استفاده از پروموتور اختصاصی بافت و نواحی مکمل miRNA هایی که در سلول نرمال بیان بالایی دارند، بیان ژن کشنده را در سلول سرطانی محدود نماییم.

## روش بررسی:

برای آزمایش این فرضیه، ما مکمل اهداف miR-143 و miR-145 را در ناحیه 3' UTR ژن خودکشی HSV-TK که توسط پروموتور A33 هدایت می شود با نام وکتور pGL3-miR، کلون نمودیم. همچنین از وکتور pGL3 که در آن تمام نواحی موجود در وکتور pGL3-miR وجود داشت به جز نواحی مکمل میکرو RNA ها به عنوان کنترل عملکرد نواحی مکمل میکرو RNA استفاده شد. عملکرد آن ها در لاین های سلولی سرطان کولون (HT-29 و نرمال در محیط *in vitro* با کمک MTT assay، luciferase assay و فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

## نتایج:

نتایج نشان داد که بیان ژن لوسیفراز در سل لاین های سرطانی HT-29 ترانسفکت شده با وکتور pGL3-miR، اختلاف معنادار نسبت به بیان آن در سل لاین HEK293 به عنوان سلول کنترل بود نشان داد. ( $p < 0,05$ ) نتایج تکثیر سلولی نشان داد که در سلول نرمال ترانسفکت شده با سازه pGL3-miR و تیمار با دارو گانسیکلوویر به صورت اختصاصی عمل نموده و سلول نرمال از بین نرفته است. نتایج فلوسایتومتری نشان داد که بیشترین میزان آپاپتوز در سلول های سرطانی ترانسفکت شده با سازه های pGL3-miR و pGL3 و تیمار با دارو گانسیکلوویر صورت گرفته است که اختلاف معنی دار نشان نداد، در حالی که میزان آن در سلول های نرمال ترانسفکت شده با سازه ژنی pGL3-miR در مقایسه با سلول های نرمال کنترل اختلاف معنی دار نشان داد ( $p < 0,05$ ).

## بحث و نتیجه گیری:

این نتایج نشان داد که استفاده از پروموتور اختصاصی بافت/تومور به همراه مکمل miRNA منجر به بیان انتخابی TK در سلول های سرطانی و نه در سلول نرمال شده است. با توجه به نتایج بیان ژن کشنده تیمیدین کیناز تحت کنترل پروموتور A33 می توان از آن برای ژن درمانی اختصاصی سرطان کولورکتال استفاده نمود. هم چنین، بیان ژن کشنده تیمیدین کیناز تحت کنترل پروموتور A33 و مکمل miR-143 و miR-145 سبب افزایش اختصاصیت بیان ژن کشنده در سلول سرطانی کولورکتال گردید.

**کلمات کلیدی:** ژن درمانی خودکشی، پروموتور اختصاصی A33، miR-143 و miR-145.

## Abstract:

Colorectal cancer is one of the most common cancers in the world. Patients in advanced stages often develop metastases that require chemotherapy and usually show poor response, low survival rates. Suicide gene therapy can be used as a new treatment for cancer, but due to the cytotoxicity of non-selective expression of the suicide gene in normal cells, it has become a major barrier to its use. For this purpose, it is recommended to use a tissue-specific promoter to purposefully express the suicide gene. In this study, we seek to limit the expression of the suicide gene in cancer cells by using tissue-specific promoters and complementary of miRNAs that are highly expressed in normal cells. In order to test this hypothesis, we cloned miR-143 and miR-145 targets in the 3'UTR region of HSV-TK suicide gene which is driven by A33 promoter, called the pGL3-miR vector. Also, the pGL3 vector, in which all the areas in the pGL3-miR vector were present, except for the micro-RNA complementary regions, was used as the control function of the micro-RNA complementary regions. Their function was evaluated in colorectal cancer (HT-29) and normal cell lines in vitro by using luciferase assay, MTT assay and flow cytometry. The results showed that the expression of luciferase gene in HT-29 cancer cell lines transfected with pGL3-miR vector showed a significant difference in expression in HEK293 cell line as a control cell ( $p < 0.05$ ). The results of cell viability showed that in the normal transfected cell with pGL3-miR vector and treatment with Gancyclovir drug, it acted exclusively and the normal cell was not destroyed. Flow cytometry results showed that the highest rate of apoptosis was in transfused cancer cells with pGL3-miR vector and treatment with Gancyclovir drug ( $p < 0.05$ ), However, its rate in normal cells transfected with pGL3-miR vector did not show a significant difference compared to normal control cells. These results showed that the use of a tissue / tumor specific promoter with miRNA complementary resulted in selective Thymidine kinase expression in cancer cells and not in normal cells. According to the results of the expression of the suicide gene thymidine kinase under the control of A33 promoter, it can be used for specific gene therapy for colorectal cancer. Also, the expression of the suicide gene thymidine kinase under the control of promoter A33 and complement miR-143 and miR-145 increased the specificity of suicide gene expression in colorectal cancer cells.

**Key Words:** suicide gene therapy, specific promoter, miR-143, miR-145.