دانشگاه تربیت مدرس

باسمه تعالی

طرح تحقیق رساله دکتری

نام و نام خانوادگی دانشجو	شماره دانشجویی	دانشکده	گروه	امضا دانشجو
فاطمه مهاجرانی	۹۷۱۵۰۲۲۰۰۹	علوم زیستی	ژنتیک	
کد ملی: ۰۰۷۴۸۷۶۶۶۱		کد رهگیری ایرانداک:		
ایمیل مدرس: f.mohajerani@modares.ac.ir			شماره تماس: ۰۹۱۲۶۷۶۲۵۲۹	

مشخصات اساتید راهنما و مشاور	نام و نام خانوادگی	رتبه دانشگاهی	محل خدمت	امضا و تاریخ
استاد راهنمای اصلی	مجید صادقی زاده	استاد	دانشگاه تربیت مدرس	
استاد راهنمای دوم (در صورت نیاز)				
درصد سهم استاد راهنمای دوم:				
استاد مشاور ۱	بهرام محمدسلطانی ورنوسفادرانی	دانشیار	دانشگاه تربیت مدرس	
استاد مشاور ۲ (در صورت نیاز)	سجاد شفیعی	دانشیار	دانشگاه علوم پزشکی مازندران	

استاد راهنما: این طرح تحقیق منطبق با برنامه تحقیقاتی مصوب افق ۵ ساله اینجانب میباشد. ☐

عنوان:

ارزیابی عملکرد و ارتباط بیانی ژن *CLEC19A* و microRNAهای کاندید در دودمان‌های سلولی گلیومایی

Title:

Functional analysis and expressional relation of *CLEC19A* gene and candidate microRNAs involved in glioma cell lines

باسمه تعالی

طرح تحقیق رساله دکتری

نام و نام خانوادگی دانشجو	شماره دانشجویی	دانشکده	گروه	امضا دانشجو
فاطمه مهاجرانی	۹۷۱۵۰۲۲۰۰۹	علوم زیستی	ژنتیک	
کد ملی: ۰۰۷۴۸۷۶۶۶۱		کد رهگیری ایرانداک:		
ایمیل مدرس: f.mohajerani@modares.ac.ir		شماره تماس: ۰۹۱۲۶۷۶۲۵۲۹		

مشخصات اساتید راهنما و مشاور	نام و نام خانوادگی	رتبه دانشگاهی	محل خدمت	امضا و تاریخ
استاد راهنمای اصلی	مجید صادقی زاده	استاد	دانشگاه تربیت مدرس	
استاد راهنمای دوم (در صورت نیاز)				
درصد سهم استاد راهنمای دوم:				
استاد مشاور ۱	بهرام محمدسلطانی ورنوسفادرانی	دانشیار	دانشگاه تربیت مدرس	
استاد مشاور ۲ (در صورت نیاز)	سجاد شفیعی	دانشیار	دانشگاه علوم پزشکی مازندران	

استاد راهنما: این طرح تحقیق منطبق با برنامه تحقیقاتی مصوب افق ۵ ساله اینجانب میباشد. ■

عنوان:

ارزیابی عملکرد و ارتباط بیانی ژن *CLEC19A* و microRNAهای کاندید در دودمان‌های سلولی گلیومایی

Title:

Functional analysis and expressional relation of *CLEC19A* gene and candidate microRNAs involved in glioma cell lines

چکیده:

از میان بیماری‌های مختلف همواره سرطان مورد توجه محققان قرار گرفته است و آمارهای جهانی حاکی از افزایش تعداد بیماران مبتلا به سرطان در تمام نقاط جهان است. سرطان سیستم عصبی یکی از انواع سرطان‌های رایج در جهان است و از آنجائیکه سیستم عصبی عملکرد ارگان‌های بدن را تنظیم می کند سلامت آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. شیوع تومورهای مغزی در ۲۰ سال گذشته در همه‌ی سنین افزایش یافته است. با این حال، در افراد بالغ بیش از ۴۰٪ رشد کرده است. در سال‌های اخیر جستجو برای یافتن نشانگرهای جدید بیماری‌های تهاجمی مانند سرطان گلیوبلاستوما ادامه داشته است. در این جستجوها، گروه‌های مولکولی خاصی بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند. اخیرا گروهی از RNAهای کوچک غیرکننده با عنوان microRNAها شناسایی شده‌اند که در تحقیقات مرتبط با سرطان افق جدیدی را پیش روی محققان قرار داده است. از طرفی دیگر، بیان یا عملکرد بسیاری از فرآیندهای زیستی یا مسیرهای پیام‌رسانی می‌تواند توسط یک ژن واحد بعنوان تنظیم کننده‌ی کلیدی تحت کنترل قرار گیرد.

در این مطالعه به بررسی عملکرد ژن *CLEC19A* به همراه شبکه‌ی microRNAهای مرتبط با آن خواهیم پرداخت. با توجه به آنالیزهای بیوانفورماتیکی و یافتن این نکته که ژن *CLEC19A* اختصاصا در دستگاه عصبی مرکزی بیان قابل توجهی دارد، از طریق پایگاه‌های اطلاعاتی لیست تمام microRNAهای مرتبط با این ژن استخراج شد. از بین microRNAهای بدست آمده، پراهمیت‌ترین microRNAها برای ژن مربوطه که Targeting Score بالاتری هم داشتند، انتخاب گردید. برای مطالعه مکانیسم‌های مولکولی و اثبات در آزمایشگاه، رونوشت اصلی ژن *CLEC19A* و پیش‌سازهای تولیدکننده‌ی microRNAها و anti-microRNAهای کاندید در وکتور T/A کلون خواهد شد. سپس ساب‌کلونینگ ژن و پیش‌سازهای مذکور در وکتور بیانی انجام خواهد شد، و پس از ترنسفکت آن‌ها به رده‌های مناسب سلول‌های سرطان مغز بیان ژن *CLEC19A* در شرایط تغییرات بیانی microRNAها و همچنین بیان microRNAها در شرایط تغییرات بیانی ژن *CLEC19A* با استفاده از تکنیک Real-time PCRارزیابی خواهد شد. در نهایت بررسی تهاجم و مهاجرت سلولی با استفاده از تست Transwell assay و Scratch assay و همچنین بررسی چرخه‌ی سلولی و مرگ سلولی با روش‌های فلوسایتومتری PI و Annexin/PI صورت خواهد گرفت

این مطالعه گامی نوین در راستای درک بهتر سرطان مغز و دخالت ژن *CLEC19A* و microRNAهای برهمکنش دهنده با این ژن در ایجاد یا پیشرفت این نوع سرطان‌ها خواهد بود.

کلمات کلیدی:

سرطان مغز، اختصاصیت نورونی، بیوانفورماتیک، *CLEC19A*، microRNA

Abstract:

Among various diseases, cancer has always been of the researchers' interest. Global statistics have shown an increase in the number of cancer patients all over the world. Nervous system cancer is one of the most common cancers in the world. As the nervous system regulates the function of the body's organs, its health is of particular importance. The prevalence of brain tumors has increased at all age groups over the past 20 years. However, it has been increased by more than 40% in adults. In recent years, the research has continued for the new markers of invasive diseases such as glioblastoma. In these studies, certain molecular groups have received more attention. Recently, a group of non-coding small RNAs called microRNAs have been identified, which have opened a new horizon for the researchers in the cancer-related studies. On the other hand, the expression or function of many biological processes or messenger pathways can be controlled by a single gene as a key regulator.

In this study, we will evaluate the function and expression of the *CLEC19A* gene along with its associated microRNA network. Based on the bioinformatics analysis and finding that the *CLEC19A* gene is expressed especially in the central nervous system, a list of all microRNAs associated with this gene was extracted from databases. Among the obtained microRNAs, the most important ones for the relevant gene with higher targeting score were selected. To confirm it in the laboratory, the original copy of the *CLEC19A* gene and the microRNAs-producer constructs and candidate anti-microRNAs will be cloned into the T/A vector.

Then sub-cloning of the gene and constructs will be performed in the expression vector. After transfection into the appropriate brain cancer cell line, the expression of the *CLEC19A* gene under the expression changes of microRNAs and also microRNAs expression under the expression changes of the *CLEC19A* gene will be evaluated using real-time PCR. Finally, the cell migration and invasion will be measured using Transwell assay and Scratch assay. Cell cycle and cell death will be examined by Annexin/PI fluorescence method.

This study is a new step towards a better understanding of brain cancer and the involvement of the *CLEC19A* gene and the microRNAs that interact with this gene in the development or progression of these cancers.

Keywords:
Brain cancer, Neuron-specific, Bioinformatic, *CLEC19A*, microRNA

۱- حوزه(scope)تحقیق وشرح ادبیات زمینه تحقیق(literature review):

سرطان مغز:

مطالعات نشان می‌دهد که انسان همواره در معرض بیماری‌های تهدیدکننده سلامت قرار دارد. از میان این بیماری‌های مختلف همواره سرطان مورد توجه محققان قرار گرفته است و آمارهای جهانی حاکی از افزایش تعداد بیماران مبتلا به سرطان در تمام نقاط جهان است (۱). سرطان سیستم عصبی یکی از انواع سرطان‌های رایج در جهان است، و از آنجاکه سیستم عصبی عملکرد ارگان‌های بدن را تنظیم می‌کند سلامت آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تومورهای سیستم عصبی نوعی نئوپلاسم با چندین زیرگروه مورفولوژیکی هستند که از الگوهای رفتاری متفاوتی پیروی می‌کنند. سرطان‌های سیستم عصبی حدود ۳٪ از کل سرطان‌های جهان را تشکیل می‌دهند که در بین مردان شایع‌تر از زنان می‌باشد (۲). شیوع تومورهای مغزی در ۲۰ سال گذشته در همه‌ی سنین افزایش یافته است. با این حال، در افراد بالغ بیش از ۴۰٪ رشد کرده است. در ایران هر سال حدود ۵۰۸۰۰ مورد جدید سرطان رخ می‌دهد که ۳٫۶۷٪ آن متعلق به مغز است، و تخمین زده می‌شود که ۴٪ از کل مرگ و میر ناشی از سرطان مربوط به این سرطان می‌باشد (۳).

انواع تومورهای مغزی:

تومورهای مغزی رشد سلول‌های غیرطبیعی در مغز است و به دو نوع کلی تقسیم می‌شوند: تومور اولیه و تومور متاستاتیک مغز. تومورهای اولیه در مغز رخ می‌دهند و تمایل به ماندن در آنجا را دارند. این نوع تومورها شامل دو نوع بدخیم و خوش‌خیم هستند. تومورهای متاستاتیک مغز به عنوان سرطان در قسمت‌های مختلف بدن شروع می‌شوند و در مغز گسترش می‌یابند. سرعت رشد تومورهای مغزی می‌تواند متفاوت باشد (۴). طبقه‌بندی انواع تومورهای سیستم عصبی توسط سازمان جهانی بهداشت[1] (WHO) یک سیستم تشخیصی استاندارد و جهانی است. این تومورها را می‌توان از روی ظاهر مورفولوژیکی، بافت‌شناسی کلاسیک، تغییرات ژنتیکی و ... شناسایی کرد. علاوه بر این، درجه‌بندی تومورهای مغزی با توجه به سرعت رشد سلول‌های مغزی از درجه پایین تا بالا طبقه‌بندی می‌شود. WHO تومورهای مغزی را براساس نرخ رشد آن‌ها به چهار درجه (Grade I, II, III and IV) طبقه‌بندی می‌کند. همچنین تومورهای مغزی با توجه به مراحل پیشرفت به چهار مرحله تقسیم می‌شوند (Stage 0, 1, 2, 3 and 4) (۵).

- Acoustic neuroma : تومور غیرسرطانی و معمولا کند است. از گوش داخلی به مغز منتهی می‌شود و از سلول‌های شوآن که عصب را پوشانده‌اند ایجاد می‌شوند. به آرامی رشد می‌کنند و اگر به اندازه‌ی کافی بزرگ شوند عملکردهای حیاتی مغز را مختل می‌کنند. درمان آن با اشعه و برداشتن از طریق جراحی است.
- Astrocytoma : نوعی سرطان که در مغز یا نخاع ایجاد می‌شود. این سرطان در سلول‌هایی که آستروسیت نام دارند و سلول‌های عصبی را پشتیبانی می‌کنند شروع می‌شود. اگر در مغز اتفاق بیفتد سبب تشنج، سردرد و تهوع می‌شود و در نخاع باعث ضعف و ناتوانی می‌شود.

1.World Health Organization

- Choroid plexus carcinoma : یک تومور نادر سرطانی بدخیم است که عمدتا در کودکان رخ می‌دهد. این سرطان در

نزدیکی بافت مغز که مایعات مغزی- نخاعی را ترشح می‌کند، شروع می‌شود. با بزرگ شدن تومور عملکرد مغز مختل می‌شود و باعث ایجاد مایعات اضافی در مغز می شود (هیدروسفالی). تحریک‌پذیری، تهوع، سردرد و استفراغ از دیگر علائم است.

- Craniopharyngioma : نوعی نادر از تومورهای مغزی غیرسرطانی (خوش‌خیم) است. در نزدیکی غده هیپوفیز مغز شروع می‌شود و با افزایش تومور عملکرد این غده تحت تاثیر قرار می‌گیرد. علائم شامل اختلال در بینایی، خستگی، تکرر ادرار، سردرد و.... است. در کودکان و بزرگسالان دیده می‌شود و ممکن است کودکان کمتر از حد طبیعی رشد کنند و کوچکتر از همسالان خودشان باشند.
- Embryonal tumors : تومورهای جنینی سیستم عصبی تومورهای بدخیمی هستند که در سلول‌های جنینی در مغز شروع می‌شود. تومورهای جنینی در هر سنی ممکن است رخ دهد، اما بیشتر در نوزادان و کودکان دیده می‌شود. انواع تومور های جنینی: ۱) مدولوبلاستوما: شایع‌ترین تومور جنینی است. از قسمت تحتانی مخچه شروع می‌شود و از طریق مایع مغزی- نخاعی به مناطق دیگر مغز و نخاع گسترش می‌یابد. ۲) ETMR: تومورهای نادر سرطانی هستند. در نوزادان و خردسالان رخ می‌دهد. این تومورهای تهاجمی اغلب در قسمت‌هایی که تفکر و حرکت ارادی را کنترل می‌کند، رخ می‌دهد. ۳) مدولوپتیلوما: تومورهای سرطانی نادر که در مغز و نخاع نوزادان و خردسالان رخ می دهد. ۴) تومورهای تیراتوئیدی: تومور نادر که اغلب در مخچه نوزادان و کودکان زیر ۳ سال مشاهده می‌شود.
- Ependymoma : در سلول‌های مغز و نخاع شروع می‌شود و در هر سنی ممکن است رخ دهد. اما بیشتر در کودکان و خردسالان رخ می‌دهد و باعث ضعف در قسمت‌هایی از بدن می‌شود که توسط اعصاب کنترل می‌شود.
- Glioblastoma : نوعی سرطان تهاجمی است که می‌تواند در مغز یا نخاع ایجاد شود. گلیوبلاستوما از سلول‌هایی به نام آستروسیت تشکیل می‌شود که سلول‌های عصبی را پشتیبانی می‌کنند. بیشتر در افراد مسن رخ می‌دهد و غالبا درمان‌پذیر نمی‌باشند. علائم شامل سردرد، سرگیجه، تهوع و استفراغ است.
- Glioma : نوعی تومور است که در مغز و نخاع دیده می‌شود. گلیوما در سلول‌های پشتیبان که سلول‌های عصبی را احاطه کرده است، شروع می‌شود. چهار نوع سلول گلیال می‌تواند سبب ایجاد تومور شود: آستروسیتوم، اپاندیموما، گلیوبلاستوما و الیگودندروگلیوما. گلیوما یکی از شایع‌ترین انواع تومورهای اولیه مغز است.
- Medulloblastoma : یک تومور سرطانی بدخیم است که در مخچه شروع می‌شود. در هر سنی می‌تواند رخ دهد، اما بیشتر در کودکان رخ می‌دهد. سبب استفراغ، سرگیجه، خستگی و هماهنگی ضعیف می‌شود.

- Meningioma : توموری است که از مننژ ایجاد می‌شود و مغز، اعصاب و عروق مجاور خودش را فشرده می‌کند. اغلب آهسته و بدون علائم رشد می‌کند و معمولا در خانم‌ها در سنین بالا اتفاق می‌افتد.
- Oligodendroglioma : می‌تواند در مغز یا نخاع ایجاد شود. از الیگودندروسیت‌ها تشکیل می‌شود و در هر سنی ممکن است رخ دهد، اما بیشتر در بزرگسالان رخ می دهد. علائم شامل سردرد، سرگیجه و ضعف است و معمولا با جراحی برداشته می‌شود.
- Pediatric brain tumor : تومور مغزی کودکان است که شامل انواع بدخیم و یا خوش‌خیم می‌باشد. درمان و بهبودی به نوع تومور و محل قرارگیری آن بستگی دارد.
- Pineoblastoma : نوعی سرطان مهاجم و نادر است که در سلول‌های غده پنیال مغز شروع می‌شود. مکان این غده در مرکز مغز می‌باشد و هورمون خواب یا ملانتوئین را ترشح می‌کند. در هر سنی ممکن است رخ دهد، اما اغلب در کودکان رخ می‌دهد. باعث سردرد، خواب‌آلودگی و تغییر در حرکات چشم می‌شود. درمان آن بسیار دشوار است و این بیماری می‌تواند در مغز و مایع مغزی- نخاعی پخش شود، اما به ندرت از سیستم عصبی مرکزی خارج می‌شود. درمان آن شامل جراحی است و گاهی نیز به درمان‌های تکمیلی نیاز است.
- Pituitary tumors : تومورهای هیپوفیزی رشد غیرطبیعی در غده هیپوفیز ایجاد می‌کند. بیشتر این تومورها خوش‌خیم هستند. سطح هورمون‌هایی که از این غده ترشح می‌شود، تغییر می‌کند. گزینه‌های درمانی متعدد برای این نوع تومورها وجود دارد.
- Brain metastases : متاستازهای مغزی وقتی اتفاق می‌افتد که سلول‌های سرطانی از محل خود به مغز پخش می‌شوند. هر سلول سرطانی می تواند در مغز گسترش یابد، اما احتمال متاستاز سرطان های ریه، پستان، روده بزرگ، کلیه و ملانوما بیشتر است. درمان افراد با جراحی و پرتودرمانی است. در بعضی موارد شیمی‌درمانی و ایمونوتراپی نیز مفید می‌باشد. علائم شامل سردرد، تهوع، مشکلات حافظه، سرگیجه و تشنج است (۶).

همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد، گلیوما یکی از شایع‌ترین انواع تومورهای اولیه مغز است. منشا تومورهای آستروسیتوما و گلیوبلاستوما سلول‌های آستروسیت مغز است که سلول‌های عصبی را پشتیبانی می‌کنند. آستروسیتومای ابتدایی دارای درجه II، آستروسیتومای آناپلاستیک دارای درجه III و آستروسیتومای درجه IV گلیوبلاستومای مولتی‌فرم است. در طول ۱۰ سال گذشته، تعداد مطالعات متمرکز بر زیست‌شناسی مولکولی تومورهای منشا گرفته از آستروسیت به‌طور چشمگیری افزایش یافته است و نشانگرهای ژنتیکی متعددی مرتبط با آستروسیتوماها شناسایی شده است. اطلاعات بدست آمده از تحقیقات انجام گرفته، تغییرات ژنتیکی مختلفی را در ارتباط با درجه تمایز آستروسیتوماها شناسایی کرده است (۷).

مهم‌ترین ژن‌ها و مسیرهای درگیر در گلیوما:

طی یافته‌هایی که از مطالعات ژنتیکی بدست آمده است دو خانواده از ژن‌ها در تشکیل تومورها نقش دارند: انکوژن‌ها و ژن‌های سرکوب کننده‌ی تومور. انکوژن‌های فعال، رشد سلول‌های حساس را تخریب می‌کنند. از طرف دیگر، محصولات ژن سرکوبگر تومور رشد سلول را مهار می‌کند. یکی از انکوژن‌هایی که در نوروانکولوژی مورد توجه قرار گرفته است EGFR است. این پروتئین گیرنده‌ی تیروزین کیناز غشایی را به فاکتور رشد اپیدرمی(EGF)، TGF-α و چندین پپتید تحریک کننده‌ی رشد متصل می‌کند. بیان بیش از حد این ژن در ۳۰ تا ۴۰ درصد گلیوبلاستوما گزارش شده است. ژن های CDK، MDM2 و SAS به عنوان مولفه‌های یک آمپیلیکون در کروموزوم ۱۲ در زیر گروه سرطان گلیوبلاستوما شناسایی شده‌اند. به نظر می‌رسد ژن‌های سرکوبگر تومور نقش عمده‌ای در شکل‌گیری گلیومای انسانی دارد. چندین مطالعه گزارش کرده‌اند که جهش در ژن *P53* سبب ایجاد تومورهای آستروسیتوما می‌شود. همچنین حذف‌های هموزیگوت در ناحیه‌ی بازوی کوتاه کروموزوم ۹ نیز سبب گلیومای بدخیم می‌شود (۸).

در زیر رده‌های سرطان گلیوما افزایش ژنتیکی گیرنده‌های تیروزین کیناز (PTK) مانند *PDGFRA* و *EGFR* مشاهده شده است. به نظر می‌رسد اختلال در مسیرهای Hedgehog (HH)، Notch، پروتئین‌های مرفوژنتیکی استخوان (BMPs) و Wnt می‌تواند منجر به افزایش قدرت تومورزایی در سلول‌های بنیادی سرطانی (CSCs) شود و در صورت تعامل این مسیرها با سایر مسیرهای پیام‌رسانی مانند MAPK، NFkβ، PI3K و EGF این سناریو پیچیده‌تر می‌شود. بسیاری از پروتئین‌های ساختاری و یا فاکتورهای رونویسی مانند *OLIG2*، *MYC*، *SOX2*، *MUSASHI1*، *NANOG*، *BMI1*، *NESTIN* و*IDH1* که در سلول‌های بنیادی طبیعی بسیار مهم است می‌توانند در سلول‌های بنیادی گلیوما نیز مهم باشند (۹). آستروسیتوماهای با درجه پایین معمولا در ژن ایزوسیترات دهیدروژناز ۱و۲ (*IDH1,2*) و *P53* دارای جهش هستند، در مقابل مطالعات نشان می‌دهد که گلیوبلاستوما که درجه بالای آستروسیتوما است معمولا بدون جهش در ژن *IDH* رخ می‌دهد (۱۰).

علیرغم وجود مسیرهای متعدد درگیر در تومورهای مغزی مسیرهای مرتبط با نوروتروفین‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. نوروتروفین‌ها پروتئین‌های ترشحی هستند که فرآیندهای متنوعی را در نوروژنز مانند بقای عصبی، رشد و تمایز وابسته به بافت سلولی را بر عهده دارند (۱۱). افزایش بیان *BDNF/TrkB* با درجات بالای سرطان های گلیوما همبستگی نشان داده است، به طوریکه بیان بیش از حد *BDNF* به همراه *TrkB* سبب القا رشد بیش از حد سلول و تهاجمی شدن سلول‌های گلیوما می‌شود. همچنین *BDNF/NT3* از طریق *TrkB-TrkC* به واسطه فعال شدن ERK و AKT سبب افزایش تکثیر سلول‌های توموری در مراحل اولیه می‌شوند (۱۲).

نقش microRNAها در سرطان:

اگرچه درمان استاندارد سرطان‌های مغز شامل جراحی و شیمی درمانی است، بزرگترین مشکل در درمان سرطان مقاومت تومور به درمان و عود مجدد آن است. در سال‌های اخیر جستجو برای یافتن نشانگرهای جدید بیماری‌های تهاجمی مانند سرطان گلیوبلاستوما ادامه داشته است. در این جستجوها، گروه‌های مولکولی خاصی بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. اخیرا گروهی از RNAهای کوچک غیرکننده با عنوان microRNAها شناسایی شده‌اند که در تحقیقات مرتبط با سرطان افق جدیدی را پیش روی محققان قرار داده است (۱۳). microRNAها مولکول‌های کوچک با طول تقریبی ۲۲ نوکلئوتیدی RNA هستند که پروتئین‌های آرگونات را به سمت mRNAهای هدف می‌برند تا ترجمه و پایداری آن‌ها را سرکوب کنند. به طور معمول هدف‌گیری microRNAها، متکی بر جفت شدن ناحیه نشستن[۲] آن (که اغلب بین نوکلئوتیدهای ۲ تا ۷ می‌باشد)، با منطقه mRNA ۳'UTR است (۱۴).

از زمان کشف microRNAها در اوایل سال ۱۹۹۰ تاکنون، هزاران microRNA در میان قلمروهای گیاهان و حیوانات شناسایی شده است (۱۵) که حدود ۲۴۰۰ عدد از آن‌ها تا به امروز برای انسان شناخته شده است (۱۶) . اکنون شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد microRNAها با تنظیم بیان بخش عمده‌ای از ژن‌های کدکننده پروتئین (حدود ۷۰٪)، بر مسیرهای اصلی بیولوژیکی تاثیر می‌گذارند (۱۷) . تقریبا همه microRNAها در گونه‌های نزدیک به هم حفظ شده هستند و بسیاری از آن‌ها هم در گونه‌های دوردست دارای همولوگ هستند (۱۸). بیشتر ژن‌های microRNAها به وسیله RNA Pol II رونویسی می شوند، که سبب ایجاد یک ساختار ساقه- حلقه (Stem-Loop) اولیه با سایزی حدود هزاران تا ده‌ها کیلوباز با نام Pri-miRNA می‌گردد. Pri-miRNA توسط یک مجموعه با چندین پروتئین به نام میکروپروسسور(microprocessor) درون هسته پردازش می‌شود، که اجزای اصلی آن آنزیم ریبونوکلئاز نوع III به نام Drosha و پروتئین DGCR8 می‌باشد. این کمپلکس از طریق برش سبب تشکیل یک پیش ساز حدود ۹۰ نوکلئوتیدی با ساختار سنجاق‌سری به نام Pre-miRNA می‌شود. Pre-miRNA توسط پروتئین Exportin5 شناسایی می‌شود واز طریق مکانیسم وابسته به Ran-GTP به سیتوپلاسم منتقل می‌شود. در مرحله بعد Pre-miRNA توسط نوع دیگری از آنزیم ریبونوکلئاز III به نام Dicer و پروتئین TRBP بریده می‌شود و miRNA بالغ ۲۲ نوکلئوتیدی را ایجاد می‌کند. متعاقبا در سلول‌های انسانی TRBP پروتئین آرگونات (Ago2) را جذب می‌کند و همراه با Dicer یک مجموعه سه‌تایی را تشکیل می‌دهند که شروع به مونتاژ کمپلکس ریبونوکلئوپروتئینی[۳] RISC می‌کند. پس از ملحق شدن کمپلکس RISC به miRNA کمپلکس از طریق میانکنش بین بازهای miRNA و mRNA هدف می‌تواند سبب تخریب یا سرکوب ترجمه‌ی mRNA شود (۲۰-۱۹).

۲.Seed sequence

3.RNA-induced Silencing Complex

گزارش‌های متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد بیش از نیمی از ژن‌های microRNAها در مناطق ژنومی مرتبط با سرطان یا در مناطق شکننده قرار دارند. داده‌های بیانی میکروآرایه‌ها[۴] از طیف وسیعی از بافت‌ها و سلول‌های سرطانی نشان می‌دهد که بیان نابجای microRNAها یک قاعده است نه یک استثنا، و نقش و مشارکت microRNAها در بسیاری از انواع سرطان‌ها حاکی از اهمیت آن‌هاست (۲۱).

۴.microarray

۲- بیان مسأله(research problem):

ژنتیک و سرطان مغز:

تومورهای مغزی یکی از شایع‌ترین دلایل مرگ ناشی از سرطان در کودکان و بزرگسالان هستند. به طوریکه دومین سرطان شایع در کودکان بعد از لوسمی است و نرخ بقای این کودکان با توجه به درجه تومور پس از جراحی بین ۲ تا ۵ سال متغیر است (۲۲). سلول‌های سرطانی مغز در ترکیبات ژنتیکی، متابولیکی و ریزمحیطی متنوع هستند و ناهگونی فنوتیپی و پاسخ‌های متفاوت به درمان را از خود نشان می‌دهند (۲۳). با وجود مطالعات فراوان مبنی بر علت‌شناسی طیف گسترده‌ای از سرطان‌های مغز، هنوز بسیاری از عوامل بوجود آورنده یا پیش‌برنده‌ی این سرطان ناشناخته باقی مانده است. به عنوان مثال بررسی‌های ژنتیکی که در مطالعات مختلف صورت گرفته است نشان می‌دهد که جهش‌های ژنتیکی در سرطان می‌تواند منجر به اختلال در فرآیندهایی نظیر تکثیر سلولی، آپوپتوز، پایداری ژنوم، تنظیمات کروماتین، فرار از ایمنی، پردازش RNA و هموستازی پروتئین شوند (۲۴). مطالعات گسترده مرتبط با ژنوم[۵] (GWAS)، چندین پلی‌مورفیسم[۶] (SNPs) مرتبط با سرطان ابتدایی مغز بر روی کروموزوم‌های ۵، ۷، ۸، ۹، ۱۱، ۲۰ و... را گزارش کرده‌اند (۲۵).

سندرم‌های فامیلی نیز با تومورهای سیستم عصبی در ارتباط هستند. نوروفیبروماتوز نوع ۱ و ۲، توبراسکلروزیس، ون‌هیپل‌لیندا، گورلین و لی‌فرامنی که اغلب با وراثت اتوزومی غالب به ارث می رسند، دارای جهش در ژن‌هایی که در درجه اول به عنوان سرکوب‌کننده تومور عمل می‌کنند، هستند. این جهش‌ها منجر به افزایش حساسیت به تشکیل تومور در ناحیه مغزی می‌شود (۲۶).

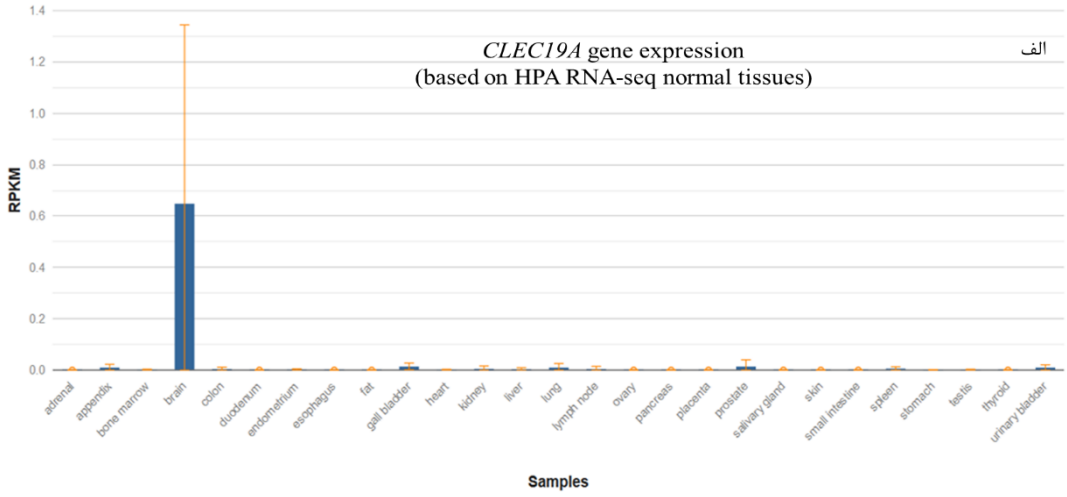
جهش در ژن‌های حیاتی مانند *P53*، *EGFR*، *CDK4*، *CDK6*، *RTEL1*، *PTEN*، *IDH1*، *HIF1α*، *Rb* و اختلال در عملکرد مسیرهایی مانند PI3K-AKT-mTOR، Ras-MAPK، Wnt، Notch و SHH نیز سبب ایجاد تومورهای مغزی گلیوبلاستوما و مدولوبلاستوما می شوند (۲۸-۲۷). همچنین، با توجه به بررسی‌های انجام شده این چنین استنباط می‌گردد که فعالسازی گیرنده‌های Trk باعث فعال شدن یک سری از سیگنال‌های پایین دست از جمله PI3K/Akt، Ras-Raf-MEK-ERK، مسیر PLCγ، EGFR و غیره می‌شود. در نتیجه، این مسیرها از طریق القا رشد سلول‌های سرطانی، تکثیر، بقا، مهاجرت، تغییر ماهیت سلول‌های اپیتلیالی به مزانشیمی و عود، سبب پیشبرد اثرات انکوژنیک سلول‌های سرطانی می‌شوند (۲۹).

از طرفی، بیان یا عملکرد بسیاری از فرآیندهای زیستی[۷] و مسیرهای پیام‌رسانی[۸] می‌تواند توسط یک ژن واحد بعنوان تنظیم‌کننده‌ی کلیدی[۹] تحت کنترل قرار گیرد. همچنین، اطلاعات عملکردی اینگونه ژن‌های تنظیم‌کننده‌ی مسیرهای مرتبط با ایجاد یا پیشرفت سرطان نیز تاکنون به میزان زیادی ناشناخته باقی مانده است. در این مطالعه به بررسی عملکرد ژن *CLEC19A* به‌همراه شبکه‌ی microRNAهای مرتبط با آن خواهیم پرداخت.

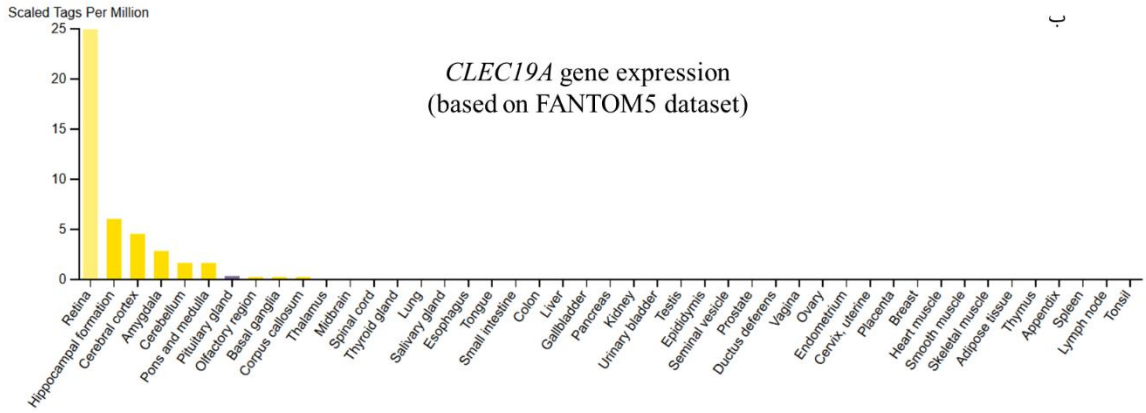
۵.Genome-wide association study
6.Single nucleotide polymorphisms
7.Biological processes
8.Signaling pathways
۹.Master regulator

ژن *CLEC19A*:

گاهی مهار یا افزایش بیان برخی از ژن‌ها سبب ایجاد انواع تومورهای سیستم عصبی می‌شوند. ژن *CLEC19A* که بیان آن از طریق داده‌های RNA-Seq بررسی گردید، تمرکز قابل توجهی در سیستم عصبی مرکزی[۱۰] (CNS) دارد. این ژن بر اساس همولوژی که با ژن‌هایی که دومین C-Lectin دارند، به این نام نامگذاری شده است. خانواده C-Lectin (CLEC) یک گروه بزرگ و متنوع از پروتئین‌های خارج سلولی را تشکیل می‌دهند که وابسته به کلسیم هستند و در چسبندگی سلولی، عملکرد سیستم ایمنی و آپوپتوز فعال هستند. پروتئین لکتین به طور اختصاصی به کربوهیدرات‌ها متصل می‌شود. آن‌ها با اتصال به قسمت‌های خاص قندهای موجود در گلیکوپروتئین‌های غشایی سلول‌ها را جمع‌آوری می‌کنند (۳۱-۳۰).



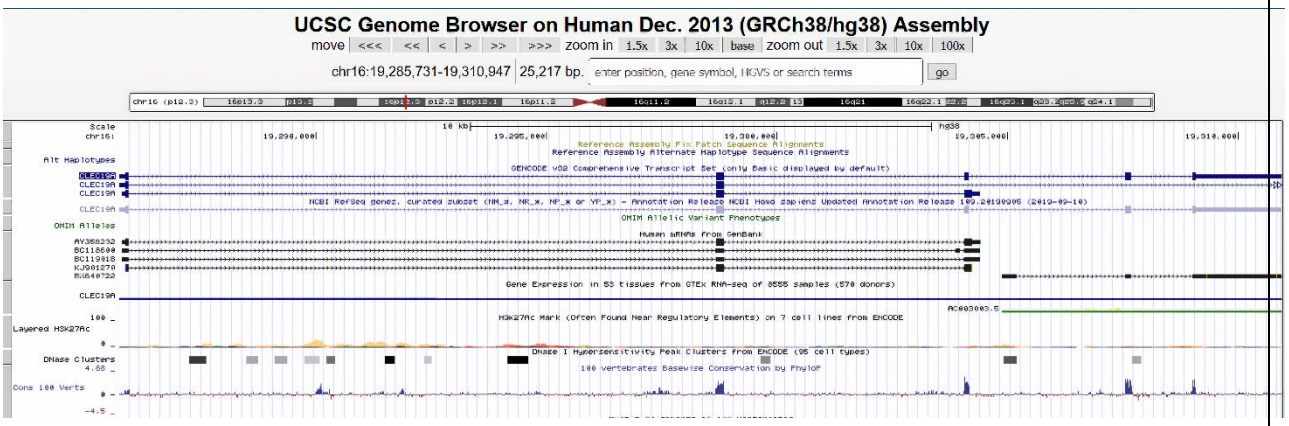
شکل الف- نتایج آنالیز بیان ژن *CLEC19A* حاصل از RNA-seq که از پایگاه داده‌ی NCBI بدست آمده است.



شکل ب- نتایج آنالیز بیان ژن *CLEC19A* حاصل از داده‌های پروژه‌ی FANTOM5

۱۰.Central nervous system

ژن *CLEC19A* تاکنون مورد مطالعه‌ی عملکردی قرار نگرفته است. این ژن روی منطقه‌ی کروموزومی ۱۶□۱۲,۳ با طول ۲۵۲۱۷ باز و بر روی رشته مثبت (سنس) قرار دارد. تنها رونوشت تائید شده‌ی این ژن که بعنوان یک رونوشت کدکننده‌ی پروتئین (mRNA) با شماره‌ی دسترسی NM_001256720.2 شناخته می‌شود، هنوز به تائید آزمایشگاهی نرسیده است. بررسی ساختار این ژن در پایگاه ژنومی UCSC [۱۱] نشاندهنده‌ی چندین رونوشت از این ژن است، که رونوشت اصلی آن دارای ۵ اگزون (۵۶۱ nt) و کدکننده‌ی پروتئینی با ۱۸۶ اسیدآمینه است.



بررسی شماتیکی ساختار اگزون- اینترون ژن *CLEC19A*

microRNAها و تومورهای گلیومایی:

در سال‌های اخیر پیشرفت قابل توجهی بین تحقیقات microRNAها و تومورهای مغزی به ویژه گلیوبلاستوما، آستروسیتوما و مدوبلاستوما صورت گرفته است و افق جدیدی در مورد پاتوژنز این ضایعات ارائه شده است (۳۲). تجزیه و تحلیل داده‌های بیانی یکی از موثرترین روش‌ها برای کشف microRNAهایی با بیان نابجا در ژنوم تومور است. در سه مطالعه مستقل پروفایل بیانی در گلیوبلاستوما مورد بررسی قرار گرفت و در مجموع ۱۷ microRNA دچار افزایش بیان و ۳۳ microRNA دچار کاهش بیان شده‌اند (۳۵-۳۳). علاوه بر این، در یک مطالعه مجموعه‌ای از ۱۴ microRNA مرتبط با پیشرفت بدخیم گلیومای آستروسیتی گزارش شده است (۳۶). طی مطالعات انجام گرفته توسط Medina و همکارانش، ژن‌های miR-221 و miR-222 بر روی کروموزوم X به صورت خوشه‌ای قرار گرفته‌اند. ویژگی و هدف شناسایی مشابهی دارند و اغلب در مراحل ابتدایی گلیوبلاستوما و رده‌های سلولی مرتبط افزایش می‌یابند. بیان بیش از حد miR-221 نیز در آستروسیتومای درجه پایین و آناپلاستیک مشاهده شده است. مطالعات عملکردی نشان‌دهنده‌ی ارتباط miR221/222 با افزایش چرخه‌ی سلولی است که بیان کننده‌ی نقش مهم این دو microRNA در تکثیر سلول‌های توموری می‌باشد (۳۸-۳۷). همچنین Zhang و همکارانش طی آزمایشات خود نشان دادند که miR221/222 از طریق اثر بر روی *P27* و *P57* می‌توانند مسیر سیکل سلولی و رشد سلولی را تحت تاثیر قرار دهند و نیز مسیر

۱۱.University of California Santa Cruz

آپوپتوز را از کار بیندازند. این دو miR با از کار انداختن ژن *PUMA* بقای سلولی را در سرطان‌های گلیومایی تحت تاثیر قرار می‌دهند (۳۹).

در مطالعه‌ای که توسط Habibabadi و همکارانش انجام گرفته است، با استفاده از داده‌های تعیین توالی متعلق به مناطق مختلف مغز ارتباط microRNAها با سطح *BDNF* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است و لیستی از miRNAهایی را که در اختلالات عصبی درگیر بودند ارائه شد. یکی از این miRNAها miR-4729 است که در مسیر Axon guidance نقش دارد(۴۰).

Lan و همکارانش دریافتند که اگزوزوم‌های سرمی بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما می‌توانند باعث تکثیر و تهاجم سلول‌های H4 در شرایط آزمایشگاهی شوند. آن‌ها دریافتند که سطح miR-301a در بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما بالا است، در در عود مجدد این سرطان نیز افزایش می‌یابد. آن‌ها عنوان کردند که این miR از طریق کاهش بیان PTEN ممکن است سبب فعال شدن مسیر پیام‌رسانی AKT و FAK شود (۴۱). همچنین در مطالعه‌ای دیگر، به اهمیت نقش miR-۳۰۱ در تومورزایی اشاره شد. Xiao Yue و همکارانش بیان کردند که miR-301a با هدف قرار دادن SEPT7 و فعال کردن مسیر پیام‌رسانی Wnt/b-catenin سبب تهاجمی شدن سلول‌های گلیوما می‌شود (۴۲).

Cesarini و همکارانش طی مطالعه‌ای بر روی ویرایش ناحیه نشستن miR-589-3p تمرکز کردند. نسخه ویرایش شده این miR مانع از تکثیر سلولی، مهاجرت و تهاجم سلول‌های گلیوبلاستوما می‌شود، این درحالی است که نسخه ویرایش نشده تکثیر و تهاجم را تقویت می‌کند که می‌تواند یک عامل بالقوه تحریک کننده سرطان باشد. آن‌ها نشان دادند که نسخه ویرایش شده این (edi- miR miR-589-3p) به طور خاص ADAM12 را مورد هدف قرار می‌دهد و از تهاجم و مهاجرت سلول جلوگیری می‌کند (۴۳).

تحولات اخیر در تحقیقات سرطان مغز به وضوح نقش مهم ژن‌ها و microRNAها را در سرطان‌زایی نشان می‌دهد. از آنجایی که بسیاری از microRNAها غالبا به صورت متفاوتی در یک تومور مشخص مشاهده می‌شوند و هر microRNA قادر است چندین هدف را تنظیم کند، قابل درک است که چندین مسیر ژنتیکی که توسط microRNAها کنترل می‌شوند دارای نقص هستند و در نتیجه سبب ایجاد تومورهای مغزی می‌شوند.

آنالیزهای بیوانفورماتیکی:

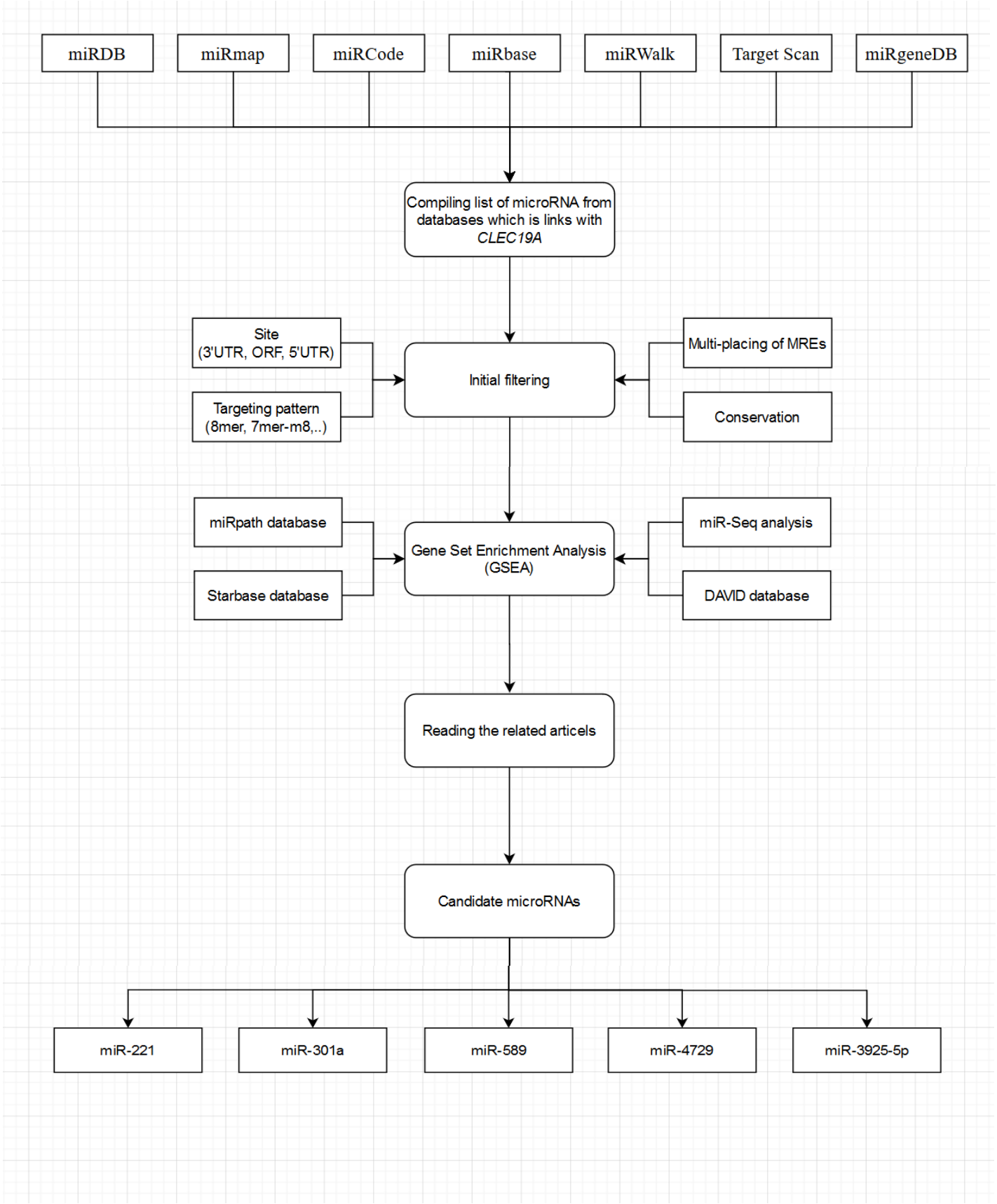
با توجه به آنالیزهای بیوانفورماتیکی و یافتن این نکته که ژن *CLEC19A* در دستگاه عصبی مرکزی بیان می‌شود، ما این ژن را کاندید نمودیم. در قدم بعدی با توجه به نقش بسیار مهم microRNAها از طریق پایگاه های اطلاعاتی miRDB، miRWalk، miRmap، Target Scan Human ، miRbase، miRCode، miRgeneDB و.... لیست کامل microRNAهای مرتبط با *CLEC19A* استخراج شد.

با توجه به نتایج بدست آمده، microRNAهایی که بین آن پایگاه‌های اطلاعاتی مشترک بود انتخاب گردید. از بین این‌ها

پراهمیت‌ترین microRNAها برای ژن مربوطه که Targeting Score بالاتری هم داشتند انتخاب شد. در نهایت با توجه به جایگاه

هدف، Type، میزان حفظ شدگی، (miRNA response elements (MREs، بررسی مقالات، آنالیز داده‌های RNAseq و miRNAseq به microRNAهای miR-301a، miR-221، miR589، miR-4729 و miR-3925-5p رسیدیم.

نتایج طرح حاضر نه تنها بینش جدیدی را در مورد پاتوژنز تومورهای مغزی و درمان ارائه می‌دهند بلکه راهکارهایی را برای یافتن microRNAهای مناسب برای تشخیص، پیش آگهی نیز پیش روی دانشمندان قرار می‌دهد. مطالعات ترکیبی هدفمند mRNA، microRNA، پروتئین و بیوانفورماتیک در مدل‌های in vitro و in vivo می تواند گام مهمی در درمان و شناسایی بیومارکرهای مرتبط بردارد که این موضوع می‌تواند به نفع بیماران سرطانی باشد.


miRDB
miRmap
miRCode
miRbase
miRWalk
Target Scan
miRgeneDB
Compiling list of microRNA from databases which is links with CLEC19A
Site (3'UTR, ORF, 5'UTR)
Targeting pattern (8mer, 7mer-m8,..)
Initial filtering
Multi-placing of MREs
Conservation
miRpath database
Starbase database
Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)
miR-Seq analysis
DAVID database
Reading the related articels
Candidate microRNAs
miR-221
miR-301a
miR-589
miR-4729
miR-3925-5p

۳- پرسش های تحقیق(interrogative sentences):

۱- تغییرات الگوی بیان ژن *CLEC19A* و microRNAهای کاندید (miR-301a، miR-221، miR589، miR-4729 و miR-3925-5p) در سلول‌های گلیوما (N۱۳۲۱، A-۱۷۲ و U87-MG) چگونه می‌باشد؟

۲- اگر بیان microRNAهای کاندید سرکوب شود، بیان *CLEC19A* چه تغییری خواهد کرد؟

۳- تغییر بیان ژن *CLEC19A* چه تاثیری بر تکثیر و تهاجم سلول‌های گلیوما دارد؟

۴- آیا بیش بیان ژن *CLEC19A* توانایی سرکوب بدخیمی در سلول‌های گلیوما را دارا می‌باشد؟

۴-نظریه و فرضیه‌های پژوهشی(research theory and hypothesis):

۱- انتظار می‌رود در سلول‌های گلیوما با درجه‌ی بدخیمی متفاوت بیان ژن *CLEC19A* کاهشی و بیان microRNAهای مرتبط افزایش پیدا کند.

۲- انتظار می‌رود استفاده از anti-miR برای microRNAهای کاندید بیان ژن *CLEC19A* را افزایش دهد.

۳- انتظار می‌رود با افزایش بیان ژن *CLEC19A* درسلول‌های گلیوبلاستوما با درجه بدخیمی بالا، تهاجم و تکثیر کاهش یابد.

۴- روش تحقیق و آزمون فرضیه‌ها(validation and test):

۱- بررسی بیوانفورماتیکی و آنالیز داده‌های حاصل از نرم‌افزارهایی مانند targetscan، miRDB، miRmap، miRWalk و داده‌های RNAseq و miRNAseq به منظور کاندید کردن microRNAهای مناسب

۲- طراحی پرایمر برای تکثیر طول کامل ژن *CLEC19A*(۲۵۴۶□□) که شامل ناحیه کدکننده(۵۶۱□□) و قسمت ۳'UTR (۱۹۱۶□□) می‌باشد، همچنین طراحی پرایمر برای microRNAهای کاندید وanti-miRهای آن

۳- کشت رده‌های مختلف سلول‌های گلیوما شامل ۱□۱۳۲۱، A-172 و U87-MG

۴- ردیابی پروتئین CLEC19A از طریق ساخت fusion پروتئین (GFP-CLEC19A)

۵- ارزیابی بیان ژن *CLEC19A* و microRNAهای کاندید کاندید (miR-301a، miR-۲۲۱، miR589، miR-4729 و miR-3925-5p) در رده‌های مختلف سلول‌های گلیوما با تکنیک Real-time PCR

۶- انتخاب بهترین microRNA از بین پنج microRNAی بررسی شده

۷- تکثیر cDNA ژن *CLEC19A* وکلونینگ آن و پیش‌سازهای تولیدکننده‌ی microRNAی کاندید و همچنین anti-miR آن در وکتور T/A

۸- ساب کلونینگ ژن *CLEC19A* و پیش‌سازهای تولیدکننده‌ی microRNAی کاندید و همچنین anti-miR آن در وکتور بیانی

۹- ترنسفکت آن‌ها به رده‌های مناسب سلول‌های گلیوما (پلازمید کنترل حاوی GFP)

۱۰- استخراج RNA و سنتز cDNA

۱۱- ارزیابی بیان ژن *CLEC19A* و microRNAی کاندید در شرایط تغییرات بیانی microRNA و همچنین ارزیابی بیان microRNA در شرایط تغییرات بیانی ژن *CLEC19A*

۱۲- بیان پروتئین ژن *CLEC19A* توسط SDS PAGE (His-tag Antibody)

۱۳- آنالیز چرخه‌ی سلولی و مرگ سلولی با روش‌های فلوسایتومتری PI و Annexin/PI

۱۴- ارزیابی تهاجم و مهاجرت سلولی با تست های Transwell assay و Scratch assay

۱۵- آنالیز داده‌ها، بررسی‌های آماری، نگارش مقاله و پایان‌نامه

۵- نوآوری‌ها (contributions)و دستاوردهای پژوهش:

تا کنون هیچگونه تحقیقی در مورد ژن *CLEC19A* صورت نگرفته است. در این تحقیق، به مطالعه عملکرد ژن *CLEC19A* در سرطان گلیوما به صورت invitro پرداخته می‌شود. همچنین تا کنون microRNAهای تنظیم کننده‌ی این ژن در هیچ مطالعه‌ای پیش‌بینی و تائید نشده است. در این تحقیق، نه تنها نحوه‌ی تنظیم این ژن بوسیله‌ی microRNAها توسط بیوانفورماتیک سنجیده می‌شود بلکه نحوه‌ی فعالیت *CLEC19A* و microRNA تنظیم کننده‌ی آن در سرطان گلیوما مورد بررسی قرار می‌گیرد که هم از لحاظ یافتن مکانیسم و هم در درمان سرطان گلیوما حائز اهمیت خواهد بود.

این مطالعه گامی نوین در راستای درک بهتر سرطان گلیوما و دخالت ژن CLEC19A و microRNAهای برهمکنش‌دهنده با این ژن در ایجاد یا پیشرفت این نوع سرطان‌هاست.

منابع و مراجع(references) :

1. Nahar, Jesmin, et al. "Brain cancer diagnosis-association rule based computational intelligence approach." 2016 IEEE International Conference on Computer and Information Technology (CIT). IEEE, 2016.
2. FARMANFARMA, KH KALAN, et al. "BRAIN CANCER IN THE WORLD: AN EPIDEMIOLOGICAL REVIEW." World Cancer Research Journal 6 (2019): 5.
3. Bab, Sattar, et al. "Trend of the incidence of brain cancer in Iran and it's 6 geographical regions during 2000-2005." *Pharmacophore* 9.4 (2018): 41-52.
٤. Çınarer, Gökalp, and Bülent Gürsel Emiroğlu. "Classificatin of Brain Tumors by Machine Learning Algorithms." 2019 3rd International Symposium on Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies (ISMSIT). IEEE, 2019.
5. Tandel, Gopal S., et al. "A review on a deep learning perspective in brain cancer classification." Cancers 11.1 (2019): 111.
6. van den Bent, Martin J., et al. "A clinical perspective on the 2016 WHO brain tumor classification and routine molecular diagnostics." *Neuro-oncology* 19.5 (2017): 614-624.
7. Yang, Fuhua, et al. "From astrocytoma to glioblastoma: a clonal evolution study." FEBS Open Bio 10.5 (2020): 744-751.
8. von Deimling, Andreas, David N. Louis, and Otmar D. Wiestler. "Molecular pathways in the formation of gliomas." *Glia* 15.3 (1995): 328-338.
9. Miranda, Ana, et al. "Breaching barriers in glioblastoma. Part I: molecular pathways and novel treatment approaches." *International journal of pharmaceutics* 531.1 (2017): 372-388.
10. Hasselblatt, Martin, et al. "Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype: a dissolving diagnosis." Journal of Neuropathology & Experimental Neurology 77.6 (2018): 422-425.
11. Lawn, Samuel, et al. "Neurotrophin signaling via TrkB and TrkC receptors promotes the growth of brain tumor-initiating cells." *Journal of Biological Chemistry* 290.6 (2015): 3814-3824.
12. Chopin, Valérie, et al. "Neurotrophin signaling in cancer stem cells." *Cellular and molecular life sciences* 73.9 (2016): 1859-1870.
13. Zhang, Baohong, et al. "microRNAs as oncogenes and tumor suppressors." *Developmental biology* 302.1 (2007): 1-12.
14. Chipman, Laura B., and Amy E. Pasquinelli. "miRNA targeting: growing beyond the seed." *Trends in Genetics* 35.3 (2019): 215-222.
15. Kozomara, Ana, Maria Birgaoanu, and Sam Griffiths-Jones. "miRBase: from microRNA sequences to function." Nucleic acids research 47.D1 (2019): D155-D162..
16. Alles, Julia, et al. "An estimate of the total number of true human miRNAs." Nucleic acids research 47.7 (2019): 3353-3364.
17. Paul, Prosenjit, et al. "Interplay between miRNAs and human diseases." Journal of cellular physiology 233.3 (2018): 2007-2018.
18. Lim, Lee P., et al. "The microRNAs of Caenorhabditis elegans." Genes & development 17.8 (2003): 991-1008.
19. O'Brien, Jacob, et al. "Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation." Frontiers in endocrinology 9 (2018): 402.
20. Bushati, Natascha, and Stephen M. Cohen. "microRNA functions." Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 23 (2007): 175-205.
21. Reddy, Kaladhar B. "MicroRNA (miRNA) in cancer." *Cancer cell international* 15.1 (2015): 1-6.
22. Fernández, Iván Sánchez, and Tobias Loddenkemper. "Seizures caused by brain tumors in children." Seizure 44 (2017): 98-107.
23. Mack, Stephen C., et al. "An epigenetic gateway to brain tumor cell identity." Nature neuroscience 19.1 (2016): 10-19.

24. Lawrence, Michael S., et al. "Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types." *Nature* 505.7484 (2014): 495-501.
25. Wu, Qiang, Yanyan Peng, and Xiaotao Zhao. "An updated and comprehensive meta-analysis of association between seven hot loci polymorphisms from eight GWAS and glioma risk." Molecular neurobiology 53.7 (2016): 4397-4405.
26. Farrell, Christopher J., and Scott R. Plotkin. "Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes." *Neurologic clinics* 25.4 (2007): 925-946.
27. Hadjipanayis, Costas G., and Erwin G. Van Meir. "Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies." *Trends in molecular medicine* 15.11 (2009): 519-530.
28. Huse, Jason T., and Eric C. Holland. "Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma." *Nature reviews cancer* 10.5 (2010): 319-331.
29. Meng, Lingbin, et al. "Targeting the BDNF/TrkB pathway for the treatment of tumors." Oncology letters 17.2 (2019): 2031-2039.
30. Zelensky, Alex N., and Jill E. Gready. "The C-type lectin-like domain superfamily." *The FEBS journal* 272.24 (2005): 6179-6217.
31. Drickamer, Kurt. "C-type lectin-like domains." *Current opinion in structural biology* 9.5 (1999): 585-590.
32. Pang, Jesse Chung-sean, et al. "Oncogenic role of microRNAs in brain tumors." Acta neuropathologica 117.6 (2009): 599-611.
33. Ciafre, S. A., et al. "Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma." Biochemical and biophysical research communications 334.4 (2005): 1351-1358.
34. Godlewski, Jakub, et al. "Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal." Cancer research 68.22 (2008): 9125-9130.
35. Silber, Joachim, et al. "miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells." BMC medicine 6.1 (2008): 14.
36. Malzkorn, Bastian, et al. "Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas." Brain pathology 20.3 (2010): 539-550.
37. Conti, Alfredo, et al. "miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II–IV astrocytic tumors." Journal of neuro-oncology 93.3 (2009): 325-332.
38. Medina, Ricardo, et al. "MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival." Cancer research 68.8 (2008): 2773-2780.
39. Zhang, Chun-Zhi, et al. "MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma." Molecular cancer 9.1 (2010): 229.
40. Khani-Habibabadi, Fatemeh, et al. "Novel BDNF-regulatory microRNAs in neurodegenerative disorders pathogenesis: An in silico study." Computational Biology and Chemistry 83 (2019): 107153.
41. an, Fengming, et al. "Serum exosomal miR-301a as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma." Cellular Oncology 41.1 (2018): 25-33.
42. Yue, Xiao, et al. "MiR-301a is activated by the Wnt/β-catenin pathway and promotes glioma cell invasion by suppressing SEPT7." Neuro-oncology 18.9 (2016): 1288-1296.
43. Cesarini, Valeriana, et al. "ADAR2/miR-589-3p axis controls glioblastoma cell migration/invasion." Nucleic acids research 46.4 (2018): 2045-2059.

نکته: لازم است که دانشجو در تعیین عنوان رساله دقت نماید و عنوان مناسبی متناظر و متناسب با محتوای طرح انتخاب کند. یعنی براساس محتوای مسأله و محتوای فرضیه‌های خود، عنوان پژوهش را بازنگری و با دقت اصلاح نماید.

یادآوری: دانشجو موظف است در تنظیم و نگارش رساله دکتری خود، طرح تحقیق مصوب را در فصلی تحت عنوان فصل اول کلیّات و مفاهیم درج نماید.

تذکر ۱: دانشجو موظف است گزارش تفصیلی موضوع پیشنهادی طرح تحقیق رساله خود را، بعد از تاییداستاد راهنما، به صورت تایپ شده به همراه این فرم تحویل دهد. این گزارش باید با نگارشی علمی و دقیق و به دور از زواید تنظیم گردد. اهم مطالب این گزارش عبارتند از: چکیده، تعریف مسئله، سوالات اصلی تحقیق، اهداف، تاریخچه،(مرور و نقد تحقیقات گذشته)، ضرورت، تئوری و فرمول بندی، فرضیات، روش انجام تحقیق، جنبه های نوآوری، فهرست مراجع مورد استفاده، زمانبندی، هزینه های پیش بینی شده

تذکر ۲: گزارش تفصیلی حداکثر در۲۵ صفحه باید تنظیم و پس از تایید استاد راهنما به اداره پژوهشی دانشکده تحویل داده شود، این گزارش مبنای داوری رساله به هنگام دفاع از رساله قرار خواهد گرفت.

دانشکده
علوم زیستی

صورتجلسه شورای تخصصی گروه آموزشی تصویب پروپزال رساله دکتری

طرح تحقیق رساله دکتری خانم **فاطمه مهاجرانی** به شماره دانشجویی **۹۷۵۱۰۲۲۰۰۹** رشته **ژنتیک مولکولی** در تاریخ **۱۳۹۹/۰۶/۱۱** در شورای تخصصی گروه ژنتیک دانشگاه تربیت مدرس با اکثریت آراء به تصویب رسید.

موضوع رساله نظری / تجربی به صورت زیر است

عنوان مصوب: ارزیابی عملکرد و ارتباط بیان miRNA خانواده ... و dec19A در ...

Approved Title:

اعضای شورای تخصصی گروه	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	محل خدمت	رأی داور	امضا
استاد راهنما	دکتر مجید صادقی زاده	استاد	دانشگاه تربیت مدرس	موافق	
استاد مشاور	دکتر بهرام محمدسلطانی ورنوسفادرانی	دانشیار	دانشگاه تربیت مدرس	✓	
استاد داور داخلی	دکتر مهرداد بهمنش	استاد	دانشگاه تربیت مدرس	✓	
استاد داور داخلی (دوم)	دکتر صادق باباشاه	استادیار	دانشگاه تربیت مدرس	✓	
استاد داور خارجی	دکتر مهدی فروزنده مقدم	دانشیار	دانشگاه تربیت مدرس	✓	
استاد داور خارجی (دوم)	دکتر مهدی شمس آراء	دانشیار	پژوهشگاه رنتیک	✓	
مدیر گروه آموزشی/ نماینده گروه	دکتر بهرام محمدسلطانی ورنوسفادرانی		دانشگاه تربیت مدرس	✓	

توضیحات:

تکمیل این قسمت اجباری است:
موضوع رساله طبق لیست پیوست جزء بخش دوم گروه ...۱... بند ...دوم... اولویتهای تحقیقاتی طبق بخشنامه شماره۳۰/۵۱۶۸۲ مورخ ۸۹/۷/۶ و ۳۰/۵۱۱۸۵ مورخ ۸۹/۷/۵ می باشد
عنوان اولویت:

نام ونام خانوادگی مدیرگروه
امضاء وتاریخ
۹۹/۶/۱۱

تکمیل این قسمت اجباری است:
موضوع رساله طبق لیست پیوست جزء بخش دوم گروه ..... بند ..... اولویتهای تحقیقاتی طبق بخشنامه شماره۳۰/۵۱۶۸۲ مورخ ۸۹/۷/۶ و ۳۰/۵۱۱۸۵ مورخ ۸۹/۷/۵ می باشد
عنوان اولویت:

دبیر شورای پژوهشی دانشکده
امضاء وتاریخ

عنوان مصوب:
Approved Title:

کمیته تخصصی گروه					
نام و نام خانوادگی	**عنوان**	**رتبه علمی**	**محل خدمت**	**رای داور**	**امضا**

توضیحات

تکمیل این قسمت اجباری می باشد موضوع پایان نامه طبق لیست پیوست جزء بخش دوم گروه ..... بند ..... اولویتهای تحقیقاتی طبق بخشنامه شماره ۳۰/۵۱۶۸۲ مورخ ۸۹/۷/۶ و ۳۰/۵۱۱۸۵ مورخ ۸۹/۷/۵ می باشد: **عنوان اولویت:**	**امضای مدیر گروه** **تاریخ**

امضاء دبیر شورای پژوهشی دانشکده **تاریخ**	تکمیل این قسمت اجباری می باشد.موضوع پایان نامه طبق لیست پیوست جزء بخش دوم گروه ..... بند ..... اولویتهای تحقیقاتی طبق بخشنامه شماره۳۰/۵۱۶۸۲ مورخ ۸۹/۷/۶ و ۳۰/۵۱۱۸۵ مورخ ۸۹/۷/۵ می باشد: **عنوان اولویت:**

بخش دوم – اولویت های تحقیقاتی

الف- در علوم دینی و معرفتی:

۱- علوم قرآنی و اخلاق اسلامی

۲- فلسفه، الهیات و کلام اسلامی

۳- اندیشه ها و نظریات حقوقی و سیاسی اسلام

ب- در علوم انسانی و هنر:

۱- علوم انسانی شامل:

۱- مهندسی فرهنگی برای شکل دهی فرهنگ توسعه

۲- راهکارهای انسجام بیشتر اقوام و مذاهب ایرانی

۳- روش های بهره گیری از ظرفیت های مهاجران ایرانی

٤- تاریخ علم.

٥- غرب شناسی

٦- بانکداری اسلامی

۷- بیمه اسلامی

۸- مطالعات پیشرفت عدالت محور

۹- علم مدیریت و تصمیم گیری (به خصوص مبانی و الگوی مدیریت اسلامی، مدیریت بحران و مدیریت دانش، افزایش بهره وری به ویژه نیروی انسانی) در حوزه های مختلف

۱۰- راهکارهای مهار مولفه های موثر بر تورم، فقر و بیکاری جهت توسعه ظرفیت های شغلی اقتصاد کشور

۱۱- راهکاری های دستیابی به اقتصاد دانش بنیان و غیروابسته به نفت

۱۲- نحوه آماده سازی برای عضویت ایران در سازمان تجارت جهانی **(WTO)** و سایر معاهدات مرتبط با آن

۱۳- بهبود فضای کسب و کار و رقابت پذیری

۱٤- مدل های مناسب برای رقابتی سازی و خصوصی سازی فعالیت ها در حوزه های مختلف

۱٥- تهیه نقشه باستان شناسی کشور

۱٦- تهیه اطلس ملی گردشگری

۱۷- راه های حمایت اجتماعی و توانمندسازی زنان

۲- هنر شامل:

۱- معماری ایرانی - اسلامی

۲- فیلم

۳- رسانه های دیجیتال و چندرسانه ای

٤- بررسی میزان اثر بخشی رسانه های کشور

٥- خوشنویسی

٦- موسیقی اصیل ایرانی

۷- صنایع دستی

۸- اقتصاد فرهنگ و هنر

پ – علوم پایه شامل:

۱- شتابگرها

۲- ماده چگال

۳- فیزیک پلاسما

٤- اخترشناسی و نجوم

٥- کاتالیست ها

٦- حس گرهای شیمیایی و زیست حس گرها

۷- شیمی

۸- ریاضی

۹- مواد فوتونیکی و نانو مواد فلز پایه

۱۰- موضوعات مطالعاتی و پژوهش نوین که مرتبط با عناوین ذیل اولویت های علوم کاربردی قرار می گیرند.

ت- علوم کاربردی:

۱- زلزله و بلایای طبیعی با تاکید بر پیش بینی و مقابله با زمین لرزه

۲- دریا و اقیانوس شامل:

۱- کشتی سازی و روبات های دریایی

۲- سازه های دریایی

۳- اقیانوس شناسی و بهره گیری از منابع دریایی

۳- فناوری اطلاعات و ارتباطات (ICT) شامل:

۱- راههای توسعه فرهنگ ایرانی – اسلامی در فضای مجازی

۲- فناوری های نو در ارتباطات مخابراتی

۳- فناوری های امنیت در فضای مجازی

٤- بازنگری نظام آموزش در عصر اطلاعات از حیث دیدگاه، محتوا، نرم افزار و سخت افزار

٥- نظام های الکترونیکی (دولت، تجارت، سلامت و نظایر آن) و ارتقاء کمی و کیفی

٦- امنیت شبکه های انتقال داده در کشور

۴- حمل و نقل شامل :

۱- تدوین استراتژی و پژوهش های مرتبط با حمل و نقل مسافر و کالا (درون و برون شهری) از طریق شبکه های یکپارچه با اولویت حمل و نقل ریلی

۲- تدوین مقررات و ضوابط هماهنگ سازی مسائل حمل و نقل، ترافیک و شهرسازی در مطالعات جامع شهری

۳- بررسی راهکارهای کوتاه مدت، میان مدت و بلند مدت مدیریت ترافیک و کاهش تقاضای سفر

۴- تولید و ارتقای کیفیت انواع تجهیزات حمل و نقل متناسب با الگوی یکپارچه سازی حمل ونقل و سبد سوخت

۵- ایمنی حمل و نقل

۶- توسعه روش های تامین منابع پایدار در بخش حمل ونقل

۵- عمران شامل:

۱- بررسی استفاده از پدافند عامل و غیر عامل در طرح های عمرانی

۲- مدیریت خطرپذیری طرح های عمرانی

۳- تهیه و تدوین نظام فنی و اجرایی طرح های عمرانی با تاکید بر توسعه پایدار و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی

۴- بهسازی و مقاوم سازی در طرح های عمرانی و مسکن

۵- پژوهش های مرتبط با طرح جامع مسکن

۶- برق و انرژی شامل :

۱- منابع هیدروکربن (نفت و گاز)

۲- انرژی های نو، تجدید پذیر و پاک (پیل سوختی و فناوری های بهره گیری موثر از انرژی خورشیدی)

۳- انرژی های تجدید پذیر زیستی

۴- مدیریت پسماندها، بازیافت و تبدیل انرژی

۵- کاهش شدت مصرف انرژی

۶- پژوهش ها و فناوری های مرتبط با بهینه سازی مصرف انرژی در کشور

۷- تعیین سبد بهینه انرژی مصرفی کشور

۸- طراحی بنیادی و ساخت انواع نیروگاه

۹- فناوریهای اکتشاف و افزایش ضریب بازیافت از منابع

۱۰- بهره گیری از فناوری غشاء در فرآیندهای نفت، گاز پتروشیمی و محیط زیست

۱۱- توسعه فناوری تبدیلات گازی با ارزش افزوده

۱۲- فناوری های طراحی و ساخت آب شیرین کن، گلخانه و آبگرمکن خورشیدی

۱۳- طراحی و ساخت مولدهای همزمان برق و حرارت کوچک و متوسط

۱۴- تولید برق از وسایل نقلیه و نقلیه و تزریق آن به شبکه

۱۵- راه اندازی کلینیک های آب، برق و انرژی و تاسیس مراکز پایش و سلامت واحدهای صنعتی بزرگ

۱۶- بررسی پدافند غیر عامل در صنعت آب و برق کشور

۱۷- تعیین حریم منابع اب های زیر زمینی در مناطق مرزی کشور و شناسایی آبخوان های مرزی

۷- فناوری هسته ای شامل:

۱- تولید انرژی هسته ای (تحقیقات و توسعه راکتورهای تحقیقاتی و قدرت با استفاده از شکاف و تحقیقات و توسعه راکتورهای تحقیقاتی گداخته)

۲- فناوری چرخه سوخت هسته ای (تحقیقات و توسعه اکتشاف، استخراج، تبدیل غنی سازی، تولید مجتمع سوخت و پسمانداری)

۳- فناوری هسته ای در صنعت، کشاورزی و پزشکی (تحقیقات و توسعه برای بالابردن کیفیت و کمیت محصولات کشاورزی، سترون سازی تجهیزات پزشکی و کاربرد در صنایع، تولید برق، مهندسی نفت، تشخیص و درمانی پزشکی) و بررسی های زیست محیطی

۸- سلامت شامل:

۱- پژوهش ها و فناوری های مرتبط با پیشگیری و ارتقای سلامت

۲- دارو با تاکید بر گیاهان دارویی

۳- کوچک سازی تجهیزات پزشکی

۴- پزشکی مولکولی و ژن درمانی

۵- ایمنی زیستی

۶- شیوه زندگی سالم (ورزش، نشاط، اوقات فراغت، دخانیات و نظایر آن)

۷- حسابداری به منظور لحاظ ملاحظات زیست محیطی در برنامه های توسعه

۸- راهکارهای اجتماعی، امنیتی و درمانی مقابله با انواع اعتیاد

۹- نظام های توانمندسازی اجتماعی (بهزیستی، کمیته امداد و نظایر آن)

۱۰- ارتقای نظام تامین مالی سلامت

۱۱- طراحی الگوی ارائه خدمات به جامعه معلولین

۱۲- مدیریت عوامل خطر زیست محیطی

۱۳- ارتقای سطح سلامت زنان

۹- ***کشاورزی آب و منابع طبیعی شامل:***

۱- مدیریت آب و خاک

۲- شناسایی، ثبت، حفظ و احیای ذخایر ژنتیکی

۳- بهره برداری از تنوع زیستی در تولید ارقام و گونه های مناسب

۴- کاهش تنش های زیستی و غیر زیستی

۵- حفظ، احیاء و بهره برداری از مراتع و جنگل ها

۶- تغییرات اقلیم

۷- امنیت غذا ، آلودگی و ضایعات آن

۸- استفاده از فناوری ها و روش های مدیریتی مدرن در بهینه سازی توزیع و مصرف آب شامل :

۱- حفاظت و ساماندهی نظام های بهره برداری از آب

۲- امکان سنجی به کارگیری روش های نوین تصفیه آب و فاضلاب

۳- توسعه استانداردهای کیفیت آب شرب با توجه به ارتقای سطح بهداشت جامعه

۴- شناسایی منابع آلاینده آب وخاک و ارائه راهکارهای پیشگیری، کنترل کاهش آلودگی ها با تکیه بر فلزات سنگین (به ویژه عناصر جیوه، سرب، کادمیوم و ترکیبات آن ها، آلاینده های آلی پایدار

۹- بهره داری پایدار از آب های نامتعارف شامل :

۱- استفاده مجدد از پساب

۲- مدیریت ریسک و راه های کاهش خسارات ناشی از سیلاب

۱۰- توسعه روشهای نوین آبیاری و زهکشی

۱۱- افزایش حاصلخیزی خاک

۱۲- اصلاح و بهبود نظام های بهره برداری، بازاریابی و توزیع محصولات کشاورزی

۱۳- بهبود نرخ بازدهی سرمایه گذاری محصولات کشاورزی

۱۴- توسعه فعالیت های جانبی در روستاها

۱۵- بهینه سازی الگوی کشت منطقه ای

۱۶- مدیریت ریسک خشکسالی کشاورزی

۱۷- مدیریت عوامل زیان آور زنده و غیر زنده

۱۸- ایمنی غذایی

۱۹- امنیت غذایی

ث- در علوم نوظهور و میان حوزه ای :

۱- **ریز فناوری شامل:** کاربردها از جمله نانومواد، نانو ادوات، تجهیزات ساخت و شناسایی

۲- **زیست فناوری شامل:** کاربردها در پزشکی، سلول های بنیادین، علوم ژنتیک، باکتری ها و ویروس شناسی

۳- **جامعه شناسی زیستی**

۴- **علوم شناختی شامل:**

۱- عصب شناختی

۲- نقشه ذهن

۳- حسگرها

۴- حافظه ها

۵- روانشناسی

۶- فناوری های پردازش

ج- درصنعت و معدن شامل:

۱- اکتشاف و توسعه معادن

۲- معدن،صنایع معدنی و روشهای نوین دراستحصال

۳- صنایع تبدیلی و غذایی

۴- نفوذ فناوریهای نوین در صنایع موجود

۵- صنایع مبتنی بر فناوریهای موثر

۶- توسعه شرکتهای دانش بنیان

۷- خودروهای هایبرید

۸- حلقه های بالاتر ارزش افزوده در کلیه صنایع رایج از قبیل فلزات اساسی، کانیهای غیر فلزی و نظیر آن

۹- تغییر و اصلاح فرآیندهای رایج در صنایع موجود با رویکرد افزایش بهره وری

۱۰- تولید تمیز

۱۱- مدیریت منابع

۱۲- تجاری سازی ریز فناوری در صنعت

۱۳- تجاری سازی زیست فناوری در صنعت

۱۴- رصد فناوری

۱۵- ساخت و تولید پیشرفته شامل:

۱- اتوماسیون و روباتیک

۲- مواد و فناوریهای جدید ساخت و تولید

۱۶- کشتی سازی و روباتهای دریایی

۱۷- هوا و فضا شامل:

۱- به ویژه طراحی، ساخت و پرتاب ماهواره

۲- طراحی و ساخت برخی هواپیماها

۱۸- تولید و ارتقای کیفیت انواع تجهیزات حمل و نقل متناسب با الگوی یکپارچه سازی حمل و نقل و سبد سوخت

۱۹- توسعه مصالح ساختمانی و سبک و مقاوم

۲۰- فناوریهای جدید ساخت و ساز و عمران

۲۱- مواد نو شامل:

۱- پلیمرها و مواد نو ترکیب

۲- مواد مغناطیسی، نیم رساناها و نیم رساناهای مغناطیسی

۲۲- طراحی بنیادی و ساخت انواع نیروگاه

۲۳- فناوری های طراحی و ساخت آب شیرین کن، گلخانه و آبگرمکن خورشیدی

۲۴- تولید داروهای جدید و مهندسی معکوس داروهای وارداتی

۲۵- اکتشاف ذخایر طبیعی