بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای بهمن دلالت رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون رساله دکتری خود را با عنوان « بررسی تاثیر miR-223 و Antisense miR-181b بر القا تمایز میلوئیدی در سلولهای بنیادی خونساز لوکمیک (لاین NB4) و سلولهای بنیادی خونساز نرمال » در تاریخ ۱۳۹۰/۱۱/۲۹ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر مسعود سلیمانی	
استاد مشاور	دکتر علی اکبر پور فتح اله	
استاد مشاور	دکتر یوسف مرتضوی	
استاد ناظر	دکتر سعید کاویانی	
استاد ناظر	دکترمهرداد نوروزی نیا	
استاد ناظر	دکتر کامران علی مقدم	
استاد ناظر	دکتر احمد قره باغیان	
نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر سعید آبرون	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه-های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **بهمن دلالت** دانشجوی رشته **هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۷** مقطع **دکتری** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا بهمن دلالت

تاریخ ۱۳۹۰/۱۱/۲۹

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون** است که در سال **۱۳۹۰** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر مسعود سلیمانی** ، مشاوره **دکتر علی اکبر پورفتح اله** و **دکتر یوسف مرتضوی** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ٤ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب **بهمن دلالت** دانشجوی رشته **هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

بهمن دلالت

تاریخ و امضا ۱۳۹۰/۱۱/۲۹

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون

عنوان

بررسی تاثیر miR-223 و Antisense miR-181b برالقا تمایز میلوئیدی در سلولهای بنیادی خونساز لوکمیک (لاین NB4) و سلولهای بنیادی خونساز نرمال

نگارش

بهمن دلالت

استاد راهنما

دکتر مسعود سلیمانی

اساتید مشاور

دکتر علی اکبر پورفتح اله

دکتر یوسف مرتضوی

زمستان ۱۳۹۰

تقدیم به :

اساتید محترم گروه خون شناسی و دانش پژوهان

خانواده عزیزم

همسرم و خانواده محترمشان

به پاس تمامی فداکاریهایشان

رضایتشان همه آرزویم است

تشکر و قدردانی

اکنون که در سایه الطاف بیکران الهی این تحقیق پایان پذیرفت، وظیفه خود می‌دانم از عزیزانی که مرا در این خصوص یاری کرده‌اند سپاسگزاری کنم. تشکر ویژه و قدردانی خود را از استاد گرامی آقای دکتر مسعود سلیمانی که در تمام مراحل به ثمر رساندن این رساله مرا راهنمایی و یاری فرمودند ابراز می دارم و از خداوند متعال سلامتی و طول عمر برای ایشان و خانواده محترمشان مسئلت دارم.

از جناب آقای دکتر علی اکبر پورفتح اله و جناب آقای دکتر یوسف مرتضوی که در مشاوره و اجرای مراحل مختلف رساله مرا همراهی نمودند نهایت تشکر و قدردانی را ابراز می دارم.

از اساتید محترم گروه خون شناسی جناب آقای دکتر سعید آبرون، جناب آقای دکتر سعید کاویانی و دکتر مهرداد نوروزی نیا که در طول تحصیل افتخار شاگردیشان را داشته ام تشکر و قدردانی می نمایم. از آقای دکتر مهرگان ابراهیمی که زحمت مشاوره آماری و انجام محاسبات را تقبل کردند تشکر می‌کنم.

از ریاست محترم دانشکده، معاونت محترم آموزشی دانشکده، معاونت محترم پژوهشی دانشکده، تمامی پرسنل و کارکنان محترم دانشکده، کارشناسان محترم گروه سرکار خانم آزیتا رهنمایی و آمنه شوکتی و دانشجویان محترم گروه هماتولوژی که در طی اجرای رساله زحمات زیادی را متقبل شده اند تشکر و قدر دانی می نمایم.

از دوستان عزیزم در دانشگاه تربیت مدرس آقایان دکتر غلام رضا خمیسی پور،دکتر ناصر احمد بیگی، دکتر شعبان علیزاده، دکتر مهدی اله بخشیان، مجید مصائبی، و خانم کوهکن تشکر می نمایم.

از دوستان گرانقدر در انستیتو پاستور آقایان دکتر مهدوی ، دکتر سعیدی و دکتر آزادمنش که همکاری صمیما نه ای در آنالیز فلوسایتومتری مبذول داشته اند کمال تشکر را دارم.

تشکر ویژه و قدردانی از دکتر بابک ارجمند، دکتر حمید رضا آقایان، سرکار خانم فرشته محمدی و مژگان حسن پور به پاس تمامی زحماتشان در این رساله می نمایم.

در انتها از تمامی دوستانی که در اینجا نام آنها ذکر نشده است تقدیر و تشکر نموده و از خداوند متعال برای تمامی این عزیزان آرزوی موفقیت می نمایم.

چکیده

انواع سلولهای خونی بدن انسان بطـور مـداوم توسـط سـلولهای بنیـادی خونسـاز تحـت فرآینـد شـناخته شـده هماتوپوئزیس تولید می شود. در AML تجمع سلولهای لوکمیک از یک نقص در روند تبدیل پیشسازها به سـلولهای بالغ ایجاد می شود. miRNA ها از نظر سطح کنترل در سطح بالاتری نسبت به فاکتورهای رونویسی قرار می گیرنـد. آنها فرآیندهای فیزیولوژیکی و تکاملی متنوعی را از طریق تنظیم ترجمه و پایداری mRNA هـا اعمـال مـی کننـد . دراین مطالعه نقش عملکردی افزایشmiR-223 و سرکوب miR-181b در تمایز سلولهای خونساز لوکمیـک (رده سلولی NB4) و سلولهای بنیادی خونساز نرمال به سمت رده میلوئیدی بررسی گردید. نمونه خون جهت جداسازی سلول‌های $CD133^{+}$ از بند ناف نوزادانی که به صورت زایمان طبیعی متولد شده بودند، جمع آوری شد. سلول هـای $CD133^{+}$ به روش ایمونومگنتیک جدا و تعداد سلول‌های جدا شده با لام نئوبار شمارش شد. افزایش miR-223 با استفاده از کلون نمودن پیشسازmiR-223 در وکتور لنتی ویروسی و سرکوب miR-181b با استفاده از آنتـی سـنس LNA miR-181b صورت گرفت. با استفاده از رنگ آمیزی رایت- گیمسـا، ریخـت شناسـی سـلول و تمـایز آنهـا ارزیابی شد. همچنین بیان شاخصهای مرتبط با تمایز و بلوغ رده میلوئیدی با روش فلوسیتومتری بررسی شد. افـزایش miR-223 و سرکوب miR-181b با روش miRNA Quantitative RT-PCR تایید شد. نتایج مـا نشـان داد که تیمار سلولهای NB4 و سلولهای بنیادی خونساز نرمال با LNA-antimiR-181b و lentiviral precursor of miR-223 باعث تمایز سلولی و گرانولوپوئزیس می شـود. بیـان سـطحی شاخصـهای رده میلوئیـدی CD11b ،CD13 ، CD14 ، CD15 و CD33 با فلوسیتومتری تمایز را در این سلولها تایید نمود. در مجموع نتـایج حاصـل از این تحقیق نشان داد که سرکوب miR-181b و افزایش miR-223 در سلولهای NB4 و سلولهای بنیادی خونساز نرمال باعث القائ تمایز و بلوغ نهایی این سلولها به سمت رده میلوئیدی می شود.

بر طبق دانسته های ما، این مطالعه اولین مطالعه ای است که نشان دهنده قدرت ایجاد تمایز رده میلوئید از سلولهای بنیادی خونساز با استفاده از کاهش و افزایش microRNA می باشد. برای درک و شناسایی ژنهای هدف miRNA های دخیل در روندهای تمایز میلوئیدی، بررسی های بیشتری نیاز است.

واژگان کلیدی: miRNA ، سلولهای بنیادی خونساز ،تمایز میلوسیتی ، miR-223, NB4 و Antisense miR-181b

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱.مقدمه ۲

۱-۲.خصوصیات زیست شناسی UCB ٤

۱-۲-۱.مزایا و محدودیت های استفاده از سلولهای بنیادی خون بند ناف ٥

۱-۳.سلول بنیادی خونساز ٦

۱-۳-۱.تعریف HSC ٦

۱-۳-۲.تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی ٦

۱-۳-۳.جداسازی و خالص سازی HSC ۸

۱-۳-٤. نشانگرهای سطحی سلول بنیادی خونساز ۹

۱-٤.انواع RNA ۱۰

۱-٥.بیوژنز miRNA و تنظیم آن ۱۱

۱-٥-۱.عملکرد و بیان miRNA ها ۱۳

۱-٦.روشهای شناسایی miRNAs ۱٤

۱-۷.miRNA ها و نقش آن در فرآیند های بیولوژیکی و بیماریها ۱٦

۱-۷-۱.miRNA در سرطان ۱٦

۱-۷-۲.انکوژنها ۱۷

۱-۷-۳.سرکوبگرهای تومور ۱۷

۱-۸.miRNA در خونسازی طبیعی ۱۸

۱-۸-۱.miRNA ها و میلوپوئزیس ۲۰

۱-۸-۱-۱.miR-223 ..... ۲۰

۱-۸-۱-۲.miR-27 ..... ۲۱

۱-۹.مهارگر LNA-antimiR ۲۱
۱-۹-۱.کاربرد مهارگر LNA-antimiR ۲۲
۱-۱۰.انتقال ژن..... ۲۲
۱-۱۱.لوسمی پرومیلوسیتیک حاد ۲٤
۱-۱۱-۱.درمان و پیش آگهی APL ۲۵
۱-۱۱-۲.ناهنجاری های کروموزومی و ایمنوفنوتیپ APL ۲۸
۱-۱۲.تاریخچه، مرور و نقد تحقیقات گذشته ۲۸
۱-۱۳.ضرورت انجام این مطالعه ۳۰
فصل دوم: مواد و روشها ۳۲
۲-۱.طرز تهیه بافرها، معرف ها و محیط های مورد استفاده ۳۳
۲-۱-۱.PBS 1X ۳۳
۲-۱-۲.بافر تریس-EDTA (TE) ۳٤
۲-۱-۳.بافر TAE 50X..... ۳٤
۲-۱-٤.EDTA 0.5 M..... ۳۵
۲-۱-۵.گلیسرول ٦۰٪ ۳۵
۲-۱-٦.کلرور کلسیم 0.1 M ۳۵
۲-۱-۷.کلرور کلسیم ۲ مولار ۳٦
۲-۱-۸.بافر HEPES (2X) ۳٦
۲-۱-۹.استوک آمپی سیلین ۳٦
۲-۱-۱۰.طرز تهیه ژل آگارز ۱ درصد ۳۷
۲-۲.محیط های مورد استفاده ۳۸
۲-۲-۱.محیط LB ۳۸
۲-۲-۲.محیط LB Agar ۳۹
۲-۳.روش تهیه سلولهای تک هسته ای از خون کامل ۳۹

۲-۳-۱.تهیه DNA برای تکثیر قطعه ٤٠
۲-۳-۲.تعیین خلوص و غلظت DNA و کنترل کیفی آن ٤١
۲-٤.استخراج RNA ٤١
۲-٤-۱.ارزیابی کمی و کیفی RNA استخراج شده ٤٢
۲-٤-۱-۱.اندازه گیری مقدار RNA ٤٢
۲-٤-۱-۲.بررسی کیفی RNA ٤٣
۲-٥.پلاسمیدها ٤٤
۲-٦.تکثیر قطعه pre-miR-223 ..... ٤٥
۲-٦-۱.مطالعات بیوانفورماتیک و طراحی پرایمر ٤٥
۲-٦-۲.مواد استفاده شده برای تکثیر قطعه pre-miR-223 در واکنش PCR ٤٦
۲-٦-۳.برنامه PCR ٤٦
۲-٦-٤.ارزیابی محصول PCR قطعه pri-miR-223 ..... ٤٧
۲-٦-٥.استخراج DNA از ژل آگارز و Clean up ٤٨
۲-٦-٦.هضم آنزیمی قطعه pri-miR-223 و پلاسمید pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP ٤٩
۲-٦-۷.اتصال آنزیمی قطعه pri-miR-223 و pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP ٥٠
۲-٦-۸.روش تهیه باکتری های مستعد ٥١
۲-٦-۹.روش Transformation ٥٢
۲-۷.Packaging و تولید ویروس با استفاده از روش کلسیم فسفات ٥٣
۲-۷-۱.کشت و آماده سازی سلول های HEK 293T (Packaging) ٥٣
۲-۷-۲.تهیه مخلوط پلاسمیدها جهت Packaging ٥٣
۲-۷-۳.تهیه محلول واکنشی کلسیم فسفات ٥٤
۲-۷-٤.تعیین تیتر لنتی ویروس نوترکیب ٥٥
۲-۸.روشهای تایید پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه مورد نظر ٥٥
۲-۸-۱.انجام Colony PCR برای تایید کلونینگ ٥٥

۲-۸-۲.انجام برش آنزیمی برای تایید کلونینگ ۵۷
۲-۸-۳.تعیین توالی پلاسمید نوترکیب ۵۷
۲-۹.کشت باکتری حاوی پلاسمید و استخراج پلاسمید ۵۷
۲-۹-۱.ارزیابی پلاسمید استخراج شده ۵۹
۲-۹-۱-۱.الکتروفورز پلاسمید ۵۹
۲-۹-۱-۲.قرائت در بیوفتومتر ۵۹
۲-۱۰.بخش سلولی مطالعه ۵۹
۲-۱۰-۱.جداسازی سلول های $CD133^+$ از خون بند ناف ۵۹
۲-۱۰-۱-۱.جداسازی سلول های تک هسته ای از خون بند ناف ۵۹
۲-۱۰-۱-۲.جداسازی سلول های $CD133^+$ با استفاده از تکنیک ایمنومگنتیک ٦۱
۲-۱۰-۲.تکثیر سلول های بنیادی خونساز $CD133^+$ ٦۲
۲-۱۰-۳.تایید فنوتیپ سلول های بنیادی خونساز ٦۲
۲-۱۰-٤.انتقال ژن miR-223 به سلولهای بنیادی خونساز و سلولهای NB4 ..... ٦۲
۲-۱۱.روش تهیه سوسپانسیون Mercury LNA miRNA inhibitor ٦٤
۲-۱۱-۱.روش Transfection ٦٤
۲-۱۲.بررسی اثرات انتقال ژن miR-223 به سلولهای بنیادی خونساز و سلولهای NB4 ..... ٦٥
۲-۱۲-۱.سنتز miRNA 1st-Strand cDNA ٦٦
۲-۱۲-۲.انجام miRNA QPCR Master Mix ٦٦
۲-۱۳.روشهای بررسی اثرات تنظیم افزایشی miR-223 و کاهشی miR-181b ٦۷
۲-۱۳-۱.بررسی مورفولوژی سلولها ٦۷
۲-۱۳-۲.فلوسیتومتری ٦۷
۲-۱۳-۲-۱.روش بررسی شاخص ها ٦۸
۲-۱٤.آنالیز آمای ٦۸
فصل سوم: نتایج و یافته ها ٦۹

۳-۱.یافته های بیوانفورماتیک در مورد miR-223 ..... ۷۰

۳-۲.کنترل کیفی پلاسمید های مورد استفاده ۷۱

۳-۳.نتایج واکنش PCR جهت تکثیر قطعه pri-miR-223 ..... ۷۲

۳-٤.نتایج هضم آنزیمی پلاسمید CD511B-1 ..... ۷۳

۳-۵.نتایج هضم آنزیمی قطعه pri-miR-223 ..... ۷٤

۳-٦.نتایج مربوط به تایید محصول کلون سازی ۷۵

۳-٦-۱.نتیجه مربوط به Colony PCR به منظور انتخاب کلون های مثبت ۷۵

۳-٦-۲.هضم آنزیمی جهت تایید کلونهای مثبت ۷٦

۳-٦-۳.تعیین توالی (sequencing) ۷۷

۳-۷.نتایج تولید ویروس ۷۸

۳-۸.نتایج مربوط به سلول های بنیادی خونساز ۷۹

۳-۹.نتایج انتقال ویروس miR-223 و آنتی سنس miR-181b ۸۰

۳-۹-۱.نتایج ارزیابی تاثیر افزایش miR-223 و کاهش mir-181b بر سلولها ۸۲

۳-۹-۱-۱.بررسی تغییرات مورفولوژیک سلول های NB4 تیمار شده و مقایسه آن با کنترل..... ۸۲

۳-۹-۱-۲.بررسی تغییرات مورفولوژیک سلولهای $CD133^+$ تیمار شده و مقایسه آن با کنترل..... ۸۷

۳-۹-۱-۳.فلوسایتومتری سلولهای NB4 ..... ۹۱

۳-۹-۱-٤.فلوسایتومتری سلولهای بنیادی خونساز ۹۱

۳-۹-۱-۵.بررسی الگوی بیان miR-223 بعد از انتقال ویروس و بیان miR-181b متعاقب استفاده از مهارگر LNA-antimiR-181b در سلولهای NB4 ..... ۹۲

۳-۹-۱-٦.بررسی الگوی بیان miR-223 بعد از انتقال ویروس و بیان miR-181b متعاقب استفاده از مهارگر LNA-antimiR-181b در سلولهای بنیادی خونساز ۹۳

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۹۵

٤-۱.بحث و نتیجه گیری ۹٦

٤-۲.پیشنهادات ۱۰۲

فهرست منابع ۱۰۳
چکیده انگلیسی ۱۱۰

فهرست جداول

جدول ۲-۱.مقادیر مواد لازم برای تهیه PBS 1X ۳۳

جدول ۲-۲.مقادیر مواد لازم برای تهیه TE ۳٤

جدول ۲-۳.مقادیر مواد لازم برای تهیه TAE 50X ۳٤

جدول ۲-٤.مقادیر مواد لازم برای تهیه EDTA 0.5 M ۳۵

جدول ۲-۵.مقادیر مواد لازم برای تهیه HEPES 2X ۳٦

جدول ۲-٦.مقادیر مواد لازم برای تهیه LB ۳۸

جدول ۲-۷.مقادیر مواد لازم برای تهیه LB-Agar ۳۹

جدول ۲-۸.مقادیر مواد لازم برای تهیه PCR Master mix ٤٦

جدول ۲-۹.چرخه دمایی PCR اولیه miR-223 ..... ٤۷

جدول ۲-۱۰.مقادیر مورد استفاده جهت هضم آنزیمی پلاسمید pCDH-MCV-MCS-EF1-co .. ٤۹

جدول ۲-۱۱.مقادیر مورد استفاده جهت هضم آنزیمی قطعه pri-miR-223 ..... ٤۹

جدول ۲-۱۲.مقادیر مورد استفاده جهت اتصال آنزیمی قطعه pri-miR-223 به وکتور pCDH- .. ۵۰

جدول ۲-۱۳.مقادیر مورد استفاده جهت انجام Colony PCR ۵٦

جدول ۲-۱٤.چرخه دمایی انجام Colony PCR ۵٦

جدول ۲-۱۵.مقادیر مواد لازم برای تهیه miRNA real time PCR master mix ٦٦

جدول ۲-۱٦.چرخه دمایی واکنش miRNA real time PCR ٦۷

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱. شمارش افتراقی سلول های NB4 ..... ۸٦

نمودار ۳-۲.بررسی آنتی ژن های میلوئیدی سطح سلول NB4 و سلو ل های تمایز یافته ۹۱

نمودار ۳-۳.بررسی آنتی ژن های میلوئیدی سطح سلول $CD133^{+}$ و سلولهای تمایز یافته ۹۲

نمودار ۳-٤.تغییرات miR-223 و miR-181b در سلولهای NB4 ..... ۹۳

نمودار ۳-۵.تغییرات miR-223 و miR-181b در سلولهای بنیادی خونساز ۹٤

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱.نمایی از مراحل بیوژنز miRNA در سلول ۱۲

شکل ۱-۲.نقش mirNAدر تمایز سلولهای مختلف سیستم خونساز ۲۰

شکل ۲-۱.نقشه پلاسمید pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP ٤٤

شکل ۲-۲.نقشه پلاسمید pMD.G ٤٥

شکل ۳-۱.توالی pre-miR-223 ..... ۷۰

شکل ۳-۲.الکتروفورز پلاسمید CD511B-1 در ژل آگارز ۱٪ ۷۱

شکل ۳-۳.الکتروفورز محصول PCR مربوط به miR-223 در ژل آگارز ۲٪ ۷۲

شکل ۳-٤.الکتروفورز محصول برش پلاسمید CD511B-1 در ژل آگارز ۱٪ ۷۳

شکل ۳-٥.الکتروفورز محصول برش PCR مربوط به miR-223 در ژل آگارز ۲٪ ۷٤

شکل ۳-٦.الکتروفورز محصول Colony PCR مربوط به miR-223 ..... ۷٥

شکل ۳-۷.الکتروفورز محصول برش کلون مثبت مربوط به miR-223 با آنزیم های EcoRI ۷٦

شکل ۳-۸.نتیجه خوانش تعیین توالی مربوط به کلون مثبت miR-223 ..... ۷۷

شکل ۳-۹.نتایج تعیین تیتر ویروس پس از ۳ روز بر روی سلولهای 293T در رقت $۱۰^{۳}$ ۷۸

شکل ۳-۱۰.نمای میکروسکوپی سلول های بنیادی خونساز $CD133^{+}$ با بزرگنمایی ۱۰۰× ۷۹

شکل ۳-۱۱.نتایج فلوسایتومتری سلول های بنیادی خونساز $CD133^{+}$ ۷۹

شکل ۳-۱۲.بیان پروتئین GFP در سلولهای لوکمیک NB4 ترانسداکت شده با لنتی ویروس ۸۰

شکل ۳-۱۳.بیان پروتئین GFP در سلولهای بنیادی خونساز $CD133^{+}$ ترانسداکت شده با لنتی.... ۸۱

شکل ۳-۱٤.سلولهای NB4 تیمار شده با لنتی ویروس miR-223 ..... ۸۳

شکل ۳-۱٥.سلولهای NB4 تیمار شده با لنتی ویروس miR-223 و LNA-antimiR-181b ۸۳

شکل ۳-۱٦.سلولهای NB4 تیمار شده با لنتی ویروس کنترل ۸٤

شکل ۳-۱۷.سلول های NB4 بدون تیمار ۸٤

شکل ۳-۱۸.سلول های NB4 تیمار شده با LNA-antimiR-181b ۸٥

شکل ۳–۱۹.سلول های NB4 تیمار شده با Scrambled ۸۵
شکل ۳–۲۰.سلول های بنیادی خونساز $CD133^+$ تیمار شده با لنتی ویروس miR-223 ..... ۸۸
شکل ۳–۲۱.سلول های $CD133^+$ تیمار شده با لنتی ویروس miR-223 و LNA-antimiR-181b.. ۸۸
شکل ۳–۲۲.سلول های بنیادی خونساز $CD133^+$ تیمار شده با لنتی ویروس کنترل ۸۹
شکل ۳–۲۳.سلول های بنیادی خونساز $CD133^+$ تیمار نشده ۸۹
شکل ۳–۲٤.سلول های بنیادی خونساز $CD133^+$ تیمار شده با LNA-antimiR-181b ۹۰
شکل ۳–۲۵.سلول های بنیادی خونساز $CD133^+$ تیمار شده با Scrambled ۹۰
شکل ۳–۲٦.نتایج آنالیز شده و منحنی ذوب اندازه گیری miR-223 در سلولهای NB4 و سلولهای بنیادی خونساز تیمار شده با ویروس کد کننده miR-223 ..... ۹٤

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. مقدمه

در طول تکامل موجودات پرسلولی، سلولها ویژگیهای ساختمانی و عملکردی شان را از طریق فرآیندی که تمایز نامیده می شود بدست می آورند. معمولاً سرطان بدلیل ناهنجاری در تمایز سلول بوجود می آید بطوریکه پتانسیل سلولهای تقسیم شونده همراه با تمایز، پیری یا آپپتوزیس از دست رفته و سلولها نامیرا می شوند. اکثر این سلولها بطور کامل برنامه تمایز را از دست می دهند در دهه گذشته اسیدهای ریبونکلوئیک غیر کد کننده کوچکی به نام miRNA ها کشف شدند که شامل ۱۸-۲۵ نوکلئوتید می باشند که نقش بسیار مهمی را در تنظیم ترجمه و پایداری mRNA های هدف ایفائ می کنند و در فرآیند تمایز شرکت می کنند. اخیراً بیش از ۱۴۰۰ miRNA در انسان شناسایی شده است[۱-۴].

مطالعات قبلی نشان دادند که در بسیاری از انواع سرطان بیان miRNA ها از تنظیم خارج می شوند[۵]. لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (APL[1]) بواسطه سد تمایزی در مرحله پرومیلوسیتیک در طول گرانولوپوئزیس، جهشهای ژنی و جابجایی های کروموزومی تشخیص داده می شود. چندین miRNA توسط کمپلکس هایPML-RARA/ RXRA در سلولهای APL مهار شده و سطح بیان آنها بطور متفاوتی دستخوش تغییر می شوند. NB4 یک سل لاین لوسمی پرومیلوسیتیک حاد انسانی است که خصوصیات APL با PML-RARα کد شونده توسط جابجایی کروموزوم ۱۵ و ۱۷ را نشان می دهد. توسعه روش هایی جهت فعال کردن مسیر های طبیعی تمایز در سلولهای بدخیم با

[1] Acute Promyelocytic Leukemia