دانشکده علوم زیستی

رساله دکتری رشته: زیست شناسی گرایش: ژنتیک

عنوان رساله:

تاثیر بیان microRNA-375 بر القای تمایز پانکراسی در سلولهای بنیادی پرتوان القا شده انسانی

نام دانشجو:

ریحانه لحمی

استاد راهنما(اصلی):

دکتر محمد حسین صنعتی

استاد راهنما(دوم):

دکتر مسعود سلیمانی

تیرماه ۱۳۹۲

بسم الله الرحمن الرحيم

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم **ریحانه لحمی** دانشجوی مقطع **دکتری** رشته **ژنتیک** به شماره دانشجویی **۸۷۵۶۵۲۰۱۵** تحت عنوان : **" تاثیر بیان microRNA-375 برالقا تمایز سلول های پانکراسی در سلول های بنیادی پرتوان القا شده "** در تاریخ **۱۳۹۲/۰۴/۱** روز **شنبه** ساعت **۱۰:۳۰** در اتاق شماره **۵۰۰۹** دانشکده **علوم زیستی** ارائه کردند.

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

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبهٔ علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	آقای دکتر محمدحسین صنعتی	دانشیار	
۲- استاد راهنمای دوم	آقای دکتر مسعود سلیمانی	دانشیار	
۳- استاد مشاور	آقای دکتر مهردا د بهمنش	دانشیار	
۴- استاد ناظر داخلی	آقای دکتر مجید صادقی زاده	استاد	
۵- استاد ناظر داخلی	آقای بهرام محمد سلطانی	استادیار	
۶- استاد ناظر خارجی	آقای دکتر سعید کاویانی	دانشیار	
۷- استاد ناظر خارجی	آقای دکتر غلامرضا خمیسی پور	استادیار	
۸- نماینده تحصیلات تکمیلی	آقای دکتر بهرام محمد سلطانی	استادیار	

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 دانشجو 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، 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 آئین نامه 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 ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/٤/۱ 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 رسول احمدی دانشجوی رشته زیست شیمی ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۷ مقطع دکتری دانشکده علوم زیستی متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آئین 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 آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا:

تاریخ: ۹۲/۱۴/۵

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (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 پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

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

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه ~~کارشناسی ارشد~~/ رساله دکتری نگارنده در رشته شیمی تجزیه است که در سال ۱۳۹۲ در دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی ~~سرکار خانم~~/جناب آقای دکتر محمدرضا یاسینی و ~~خانم~~/جناب آقای دکتر محمدحسن ضیقمی، مشاوره ~~سرکار خانم~~/جناب آقای دکتر مهرداد بهمنش و مشاوره سرکار خانم/جناب آقای دکتر ــــ از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت 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 ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب ریحانه لحمی دانشجوی رشته شیمی تجزیه مقطع دکتری تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: ریحانه لحمی

تاریخ و امضا: ۹۲/۱۲/۵

تقدیم به خانواده عزیزم:

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است

به پاس قلب های بزرگشان که فریاد رس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند.

بدون شک جایگاه و منزلت معلم، اجّل از آن است که در مقام قدردانی از زحمات بی شائبه ی او، با زبان قاصر و دست ناتوان، چیزی بنگاریم. اما از آنجایی که تجلیل از معلم، سپاس از انسانی است که هدف و غایت آفرینش را تامین می کند و سلامت امانت هایی را که به دستش سپرده اند، تضمین؛ از اساتید با کمالات و شایسته؛ جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی و دکتر محمد حسین صنعتی که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند؛از استاد گرامی جناب آقای دکتر مهرداد بهمنش که زحمت مشاوره این رساله را متقبل شدند و از اساتید محترم گروه ژنتیک، جناب آقای دکتر مجید صادقی زاده، دکتر بهرام محمد سلطانی و دکتر سید جواد مولا کمال تشکر و قدردانی را دارم. باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

با تقدیر و درود فراوان خدمت خانواده بسیار عزیز، دلسوز و فداکارم که پیوسته جرعه نوش جام تعیلم و تربیت، فضیلت و انسانیت آنها بوده ام و همواره چراغ وجودشان روشنگر راه من در سختی ها و مشکلات بوده است.

و با سپاس بی دریغ خدمت دوستان مهربانم و همه کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم یاری نموده اند.

دانشکده علوم زیستی

رساله دکتری رشته: زیست شناسی گرایش: ژنتیک

عنوان رساله:

تاثیر بیان microRNA-375 بر القای تمایز پانکراسی در سلولهای بنیادی پرتوان القا شده انسانی

نام دانشجو:

ریحانه لحمی

استاد راهنما(اصلی):

دکتر محمد حسین صنعتی

استاد راهنما(دوم):

دکتر مسعود سلیمانی

استاد مشاور:

دکتر مهرداد بهمنش

تیرماه ۱۳۹۲

چکیده

پیوند islet های پانکراسی به عنوان یکی از بهترین روشهای درمان دیابت نوع ۱ به شمار می‌رود. سلولهای بنیادی پرتوان القا شده انسانی (hiPSCs) که به سلولهای بنیادی رویانی شباهت دارند، امکان تولید سلولهای شبه islet مولد انسولین اختصاصی بیمار را از سلولهای سوماتیک طی برنامه‌ریزی مجدد سرنوشت سلولی فراهم می‌کنند. اما روشهای کنونی اغلب بر پایه استفاده از چندین سایتوکاین و بازدازنده مختلف برای هدایت تمایز به سمت رده پانکراسی تکیه دارند. از آنجاکه تولید این القاکننده‌های تمایز مستلزم صرف هزینه‌های بالاست، کاربرد روشهای مذکور برای اهداف کلینیکی محدود می‌گردد.

با توجه به نقش میکروRNAها به عنوان عوامل کلیدی در مراحل مختلف نمو پانکراس، در این مطالعه از یک روش جدید و مقرون به صرفه برای پیشبرد تمایز پانکراسی در سلولهای hiPS از طریق بیش بیان miR-375 در غیاب فاکتورهای رشد استفاده گردید. پس از تایید خاصیت پرتوانگی سلولهای hiPS، بررسی تمایز پانکراسی در سلولهای تیمار شده با وکتورهای لنتی‌ویروسی واجد miR-375 و الیگونوکلئوتیدهای antimiR-375 صورت گرفت و میزان بیان این میکروRNA با انجام miRNA quantitative RT-PCR در طول دوره تمایز ارزیابی شد.

نتایج حاصل از بررسیهای مورفولوژیکی، آنالیز ایمنوسیتوشیمی و تعیین پروفایل بیانی مارکرهای اختصاصی اندوکرینی با qRT-PCR در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ نشان داد که سلولهای شبه islet از تمایز سلولهای بیش بیان کننده miR-375 به دست آمده است. کلاسترهای حاصل با ترشح انسولین به افزایش غلظت گلوکز پاسخ دادند که توانایی عملکردی آنها را in vitro نشان می‌دهد.

طبق دانسته های ما، این مطالعه برای اولین بار روشی را ارائه می‌دهد که بر اساس آن میکروRNAها می‌توانند جایگزینی مناسب برای سایتوکاینها و بازدارنده ها در القای تمایز پانکراسی در سلولهای hiPS باشند. این روش می تواند بررسی نقش میکروRNAها در تخصص‌یافتگی پانکراس را تسهیل کند و امکان استفاده از سلولهای iPS اختصاصی بیمار برای سلول درمانی دیابت نوع ۱ را افزایش دهد.

واژگان کلیدی: دیابت، سلولهای بنیادی پرتوان القایی انسانی، miRNA، miR-375، تمایز پانکراسی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. پانکراس ۲

۱-۲. خصوصیات و عملکردهای سلولهای بتا پانکراسی ۴

۱-۳. ارگانوژنز پانکراس ۶

۱-۳-۱. فاکتورهای رونویسی و تمایز پانکراس ۱۰

۱-۴. میکروRNAها ۱۶

۱-۴-۱. کشف میکروRNAها ۱۶

۱-۴-۲. سازمان‌یافتگی ژنومی و ساختار ژنی miRNA ۱۷

۱-۴-۳. بیوژنز و بلوغ miRNA ۱۸

۱-۴-۴. مکانیسم کنترل پس از رونویسی ۲۲

۱-۵. میکروRNAها و پانکراس ۲۳

۱-۵-۱. میکروRNAها و نمو پانکراس ۲۴

۱-۵-۲. میکروRNAها و بازسازی پانکراس ۲۵

۱-۵-۳. میکروRNAها در تکثیر سلول بتا ۲۶

۱-۵-۴. میکروRNAها در عملکرد islet ۲۷

۱-۵-۵. میکروRNAها در آپاپتوز islet و دیابت ۲۷

۱-۶. دیابت ملیتوس ۲۹

۱-۶-۱. راهکارهای درمانی دیابت ۳۲

۱-۷. کاربرد سلولهای بنیادی در درمان دیابت ۳۳

۱-۷-۱. سلولهای بنیادی پانکراسی ۳۴

۱-۷-۲. سلولهای بنیادی کبدی ۳۶

۱-۷-۳. سلولهای بنیادی مغز استخوان ۳۶
۱-۷-۴. سلولهای بنیادی رویانی ۳۸
۱-۸. سلولهای بنیادی پرتوان القایی ۳۹
۱-۸-۱. منابع سلولی برای تولید iPSCs ۴۰
۱-۸-۲. ژنهای برنامه‌ریزی مجدد ۴۰
۱-۹. روشهای برنامه‌ریزی مجدد ۴۱
۱-۹-۱. سیستم ویروسی ۴۲
۱-۹-۲. سیستم غیرویروسی ۴۳
۱-۱۰. سلولهای بنیادی پرتوان القایی و دیابت ۴۴
۱-۱۱. تاریخچه (مرور و نقد تحقیقات گذشته) ۴۶
۱-۱۲. ضرورت انجام این مطالعه ۵۲
۱-۱۳. سوالات اصلی تحقیق ۵۳
۱-۱۴. اهداف ۵۴
۱-۱۵. فرضیات ۵۴
۱-۱۶. جنبه‌های نوآوری ۵۵

فصل دوم: مواد و روشها ۵۶
۲-۱. دستگاهها، وسایل و مواد مورد استفاده ۵۷
۲-۱-۱. دستگاهها ۵۷
۲-۱-۲. وسایل ۵۸
۲-۱-۳. مواد مورد استفاده ۵۸
۲-۱-۴. کیت‌های مورد استفاده ۶۰
۲-۲. روش تهیه بافرها، معرفها و محیط‌های مورد استفاده ۶۱
۲-۲-۱. روش تهیه اتیلن دی امینو ترا استیک اسید (EDTA) ۶۱

۲-۲-۲. روش ساخت محلول Tris-Hcl ۶۱
۲-۲-۳. محلول تریس ـ اتیلن دی آمین تترا استیک (TE) ۶۱
۲-۲-۴. بافر TAE (Tris-acetate-EDTA) ۶۲
۲-۲-۵. PBS (Phosphate buffered saline) ۶۲
۲-۲-۶. محلول کلرید کلسیم ($CaCl_2$) ۶۳
۲-۲-۷. گلیسرول ۶۳
۲-۲-۸. استوک آمپی‌سیلین ۶۳
۲-۳. محیط‌های مورد استفاده ۶۴
۲-۳-۱. محیط LB ۶۴
۲-۳-۲. محیط LB-Agar ۶۴
۲-۳-۳. محیط DMEM ۶۵
۲-۳-۴. محیط کشت لایه تغذیه‌کننده ۶۵
۲-۳-۵. محیط کشت سلولهای بنیادی پرتوان القایی ۶۵
۲-۴. تخلیص DNA ۶۶
۲-۴-۱. نمونه‌گیری ۶۶
۲-۴-۲. استخراج DNA ۶۶
۲-۴-۳. نگهداری DNA استخراج شده ۶۸
۲-۴-۴. ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج شده ۶۸
۲-۵. استخراج RNA ۶۸
۲-۵-۱. تعیین غلظت و خلوص RNA استخراج شده ۷۰
۲-۶. سنتز cDNA ۷۰
۲-۶-۱. روش انجام سنتز cDNA ۷۱
۲-۷. تکنیک PCR ۷۲
۲-۷-۱. اصول کلی روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR) ۷۲

۲-۷-۲. تکثیر قطعه pri-miR-375 ۷۳
۲-۷-۲-۱. مطالعات بیوانفورماتیک و طراحی پرایمرها ۷۳
۲-۷-۲-۲. تکثیر قطعه pri-miR-375 ۷۳
۲-۸. الکتروفورز و اصول آن ۷۵
۲-۸-۱. رنگ‌آمیزی ژل آگاروز ۷۵
۲-۸-۲. مارکرهای اندازه DNA ۷۶
۲-۸-۳. لودینگ بافر ۷۶
۲-۸-۴. بافر الکتروفورز ۷۷
۲-۸-۵. روش انجام الکتروفورز ۷۷
۲-۹. پلاسمیدها ۷۸
۲-۹-۱. کشت باکتری حاوی پلاسمید و استخراج پلاسمید ۷۹
۲-۹-۲. ارزیابی کمی و کیفی پلاسمیدهای استخراج شده ۸۱
۲-۹-۲-۱. الکتروفورز پلاسمیدهای تخلیص شده ۸۱
۲-۹-۲-۲. اندازه گیری میزان جذب نوری پلاسمید ۸۱
۲-۹-۳. روش تغلیظ پلاسمید ۸۱
۲-۱۰. برش آنزیمی پلاسمید pCDH و محصول PCR واجد توالی pri-miR-375 ۸۲
۲-۱۱. پاکسازی محصولات هضم آنزیمی ۸۳
۲-۱۲. واکنش اتصال قطعه تکثیر یافته به پلاسمید مورد نظر ۸۴
۲-۱۳. روش تهیه باکتریهای مستعد ۸۵
۲-۱۴. ترنسفورماسیون ۸۶
۲-۱۵. روشهای اسکرین کلونهای باکتری حامل پلاسمید نوترکیب ۸۸
۲-۱۵-۱. انجام Colony PCR ۸۸
۲-۱۵-۲. انجام برش آنزیمی روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلونهای باکتریایی ۸۹
۲-۱۵-۳. تعیین توالی پلاسمید نوترکیب ۹۰

۲-۱۶. بسته‌بندی و تولید ویروس نوترکیب ۹۰
۲-۱۶-۱. کشت و آماده سازی سلولهای بسته‌بندی‌کننده ویروس (HEK 293 T) ۹۰
۲-۱۶-۲. ترنسفکشن سلولهای بسته‌بندی‌کننده ۹۱
۲-۱۶-۳. تعیین تیتر لنتی‌ویروس نوترکیب ۹۲
۲-۱۷. کشت و تکثیر سلولهای بنیادی پرتوان القایی ۹۳
۲-۱۸. روشهای جداسازی، پاساژ، فریز و دفریز کردن MEFs ۹۳
۲-۱۸-۱. روش تهیه لایه تغذیه‌کننده از MEFs ۹۵
۲-۱۹. پاساژ سلولهای iPS ۹۶
۲-۲۰. تستهای تاییدی iPS ۹۸
۲-۲۰-۱. رنگ‌آمیزی آلکالاین فسفاتاز (AP) ۹۸
۲-۲۰-۱-۱. آماده‌سازی PBST و محلول رنگ‌آمیزی AP ۹۸
۲-۲۰-۲. تایید بیان ژنهای پرتوانگی با RT-PCR ۹۹
۲-۲۱. تولید اجسام رویانی (EB) از سلولهای iPS ۹۹
۲-۲۲. تیمار سلولهای iPS با لنتی‌ویروسهای واجد توالی miR- 375 ۱۰۰
۲-۲۳. تیمار سلولهای iPS با الیگونوکلئوتید antimiR-375 ۱۰۱
۲-۲۳-۱. miRCURY LNA™ microRNA inhibitors ۱۰۱
۲-۲۳-۲. روش تهیه سوسپانسیون miRCURY LNA™ microRNA inhibitors ۱۰۲
۲-۲۳-۳. روش ترنسفکشن و بهینه سازی آن ۱۰۲
۲-۲۳-۴. ترنسفکشن الیگونوکلئوتیدهای LNA ۱۰۳
۲-۲۵. بررسی کارآیی انتقال miRNA ۱۰۳
۲-۲۵-۱. روش سنتز miRNA 1st-Strand cDNA واکنش miRNA QPCR ۱۰۳
۲-۲۵-۲. واکنش miRNA QPCR ۱۰۶
۲-۲۵-۲-۱. کنترلهای لازم برای انجام واکنش miRNA QPCR ۱۰۷
۲-۲۵-۲-۲. استفاده از رنگ مرجع ۱۰۷

۲-۲۵-۲-۳. روش انجام واکنش QPCR ۱۰۷
۲-۲۶. بررسی تمایز پانکراسی ۱۰۸
۲-۲۶-۱. رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی مارکرهای اختصاصی اندوکرینی ۱۰۹
۲-۲۶-۲. بررسی بیان مارکرهای اختصاصی islet به روش QRT-PCR ۱۱۰
۲-۲۶-۳. ارزیابی ترشح انسولین در پاسخ به گلوکز ۱۱۲
۲-۲۷. بررسی کمی بیان ژن MTPN ۱۱۳

فصل سوم: نتایج ۱۱۴
۳-۱. نتایج مربوط به تهیه ناقل لنتی‌ویروسی ۱۱۵
۳-۱-۱. استخراج DNA از خون محیطی ۱۱۵
۳-۱-۲. نتایج PCR برای تکثیر قطعه pri-miR-375 ۱۱۶
۳-۱-۳. نتایج ارزیابی کمی و کیفی پلاسمیدهای استخراج شده ۱۱۷
۳-۱-۴. نتایج هضم آنزیمی پلاسمید pCDH و محصول PCR واجد توالی pri-miR-375 ۱۱۷
۳-۲. تستهای تایید کلونهای باکتری حامل پلاسمید نوترکیب ۱۱۹
۳-۲-۱. نتایج PCR برای اسکرین کلونهای نوترکیب ۱۱۹
۳-۲-۲. نتایج هضم آنزیمی پلاسمیدها جهت تایید کلونهای مثبت ۱۱۹
۳-۲-۳. نتایج تعیین توالی کلونهای نوترکیب ۱۲۰
۳-۳. نتایج تولید ذرات لنتی‌ویروسی ۱۲۲
۳-۳-۱. استخراج پلاسمیدهای psPAX2 و pMD2.G ۱۲۲
۳-۳-۲. تعیین تیتر ویروسهای تولید شده ۱۲۳
۳-۴. نتایج مربوط به آزمایشات سلولی ۱۲۴
۳-۴-۱. جداسازی و کشت MEFs ۱۲۴
۳-۴-۲. کشت سلولهای iPS ۱۲۶
۳-۴-۳. تولید اجسام رویانی ۱۲۶

۳-۵. نتایج مربوط به تستهای تاییدی iPS ۱۲۷
۳-۵-۱. رنگ‌آمیزی آلکالاین فسفاتاز (AP) ۱۲۷
۳-۵-۲. بیان ژنهای پرتوانگی با RT-PCR ۱۲۸
۳-۶. نتایج ارزیابی کارآیی تیمار سلولها با ویروس نوترکیب تولید شده ۱۲۹
۳-۶-۱. بررسی بیان GFP در سلولهای آلوده شده با وکتور لنتی‌ویروسی ۱۲۹
۳-۶-۲. بررسی الگوی بیان miR-375 پس از انتقال ویروس ۱۳۰
۳-۶-۳. بررسی میزان بیان ژن MTPN پس از تیمار سلولها با لنتی‌ویروس واجد miR-375 ۱۳۱
۳-۶-۴. نتایج بهینه سازی و ارزیابی کارآیی ترنسفکشن الیگونوکلئوتیدها به سلولها ۱۳۲
۳-۶-۵. بررسی الگوی بیان miR-375 بر اثر انتقال الیگونوکلئوتید antimiR-375 ۱۳۳
۳-۶-۶. بررسی میزان بیان ژن MTPN پس از ترنسفکشن سلولها با antimiR-375 ۱۳۴
۳-۷. نتایج بررسی تمایز پانکراسی ۱۳۵
۳-۷-۱. نتایج بررسی کیفی و کمی محصولات استخراج RNA ۱۳۵
۳-۷-۲. بررسی بیان مارکرهای اختصاصی islet با رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی ۱۳۶
۳-۷-۳. بررسی پروفایل بیانی مارکرهای اختصاصی islet با QRT-PCR ۱۳۸
۳-۷-۴. نتایج ارزیابی میزان تولید انسولین در پاسخ به گلوکز ۱۴۱
۳-۸. نتایج بررسی مورفولوژیک ۱۴۲

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱۴۴
۴-۱. بحث و مقایسه مطالعات ۱۴۵
۴-۲. نتیجه‌گیری ۱۶۰
۴-۳. پیشنهادها ۱۶۳
فهرست منابع ۱۶۴
چکیده انگلیسی ۱۷۷

فهرست جدولها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه بافر TE ۶۱

جدول ۲-۲. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه بافر TAE ۶۲

جدول ۲-۳. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه بافر PBS 1X ۶۲

جدول ۲-۴. مقادیر و مواد لازم جهت تهیه محیط LB ۶۴

جدول ۲-۵. مقادیر و مواد لازم جهت تهیه محیط LB-Agar ۶۴

جدول ۲-۶. مواد و مقادیر لازم برای تهیه محیط کشت لایه تغذیه‌کننده ۶۵

جدول ۲-۷. مواد و مقادیر لازم برای تهیه محیط کشت iPS ۶۶

جدول ۲-۸. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت سنتز cDNA ۷۱

جدول ۲-۹. چرخه دمایی سنتز cDNA ۷۱

جدول ۲-۱۰. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه PCR mix ۷۴

جدول ۲-۱۱. چرخه دمایی PCR برای تکثیر pri-miR-375 ۷۴

جدول ۲-۱۲. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت هضم آنزیمی پلاسمید pCDH ۸۲

جدول ۲-۱۳. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت هضم آنزیمی قطعه pri-miR-375 ۸۲

جدول ۲-۱۴. مقادیر و مواد لازم برای واکنش اتصال ۸۴

جدول ۲-۱۵. مواد و مقادیر مورد نیاز برای تهیه colony PCR mix ۸۸

جدول ۲-۱۶. چرخه دمایی colony PCR ۸۹

جدول ۲-۱۷. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده از کلونهای مثبت با BamHI و XbaI ۹۰

جدول ۲-۱۸. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت کشت سلولهای iPS ۹۶

جدول ۲-۱۹. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای تایید پرتوانگی سلولهای iPS ۹۹

جدول ۲-۲۰. مواد و مقادیر مورد نیاز برای تهیه مخلوط اولیه واکنش پلی‌آدنیلاسیون ۱۰۴

جدول ۲-۲۱. مواد و مقادیر مورد نیاز برای تهیه مخلوط کلی واکنش سنتز miRNA cDNA ۱۰۵
جدول ۲-۲۲. برنامه دمایی مورد استفاده جهت سنتز miRNA cDNA ۱۰۶
جدول ۲-۲۳. مواد و مقادیر مورد نیاز برای تهیه miRNA real time PCR mix ۱۰۸
جدول ۲-۲۴. چرخه‌های دمایی واکنش miRNA real time PCR ۱۰۸
جدول ۲-۲۵. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای QRT-PCR مارکرهای اختصاصی islet ۱۱۱
جدول ۲-۲۶. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش QRT-PCR ۱۱۱
جدول ۲-۲۷. برنامه چرخه دمایی واکنش QRT-PCR ژنهای اختصاصی islet ۱۱۲
جدول ۳-۱. درصد سلولهای ترنسفکت شده با غلظتهای مختلف LNA FITC-Scramble و لیپوفکتامین ۱۳۲
جدول ۳-۲. نتایج غلظت و OD مربوط به کنترل کیفی RNA ۱۳۵

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۳-۱. نتایج miRNA QRT-PCR جهت بررسی بیان miR-375 در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ترنسداکشن ۱۳۰

نمودار ۳-۲. نتایج QRT-PCR مربوط به بیان MTPN mRNA پس از تیمار با ویروس pCDH در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ ..... ۱۳۱

نمودار ۳-۳. نتایج miRNA QRT-PCR جهت بررسی بیان miR-375 پس از ترنسفکشن الیگونوکلئوتیدهای anti-miR-375 در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ ..... ۱۳۳

نمودار ۳-۴. نتایج QRT-PCR مربوط به بیان MTPN mRNA پس از ترنسفکشن الیگونوکلئوتیدهای anti-miR-375 در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ ..... ۱۳۴

نمودار ۳-۵. پروفایل بیانی ژنهای مرتبط با islet طی القای تمایز ۱۴۱

نمودار ۳-۶. ترشح انسولین در پاسخ به گلوکز ۱۴۲

فهرست شکلها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱. موقعیت پانکراس در بدن و سلولهای مختلف تشکیل‌دهنده آن ۳

شکل ۱-۲. مراحل تبدیل پروانسولین به انسولین ۵

شکل ۱-۳. کنترل ترشح انسولین در پاسخ به گلوکز، هورمونها و تنظیم‌کننده‌های فارماکولوژیکی ۶

شکل ۱-۴. مراحل نمو پانکراس ۸

شکل ۱-۵. مقایسه زمان‌بندی مراحل مختلف نمو پانکراس در موش و انسان ۹

شکل ۱-۶. بیان فاکتورهای رونویسی در مراحل مختلف تمایز به رده اندوکرینی ۱۴

شکل ۱-۷. توزیع ساختاری ژنهای miRNA در ژنوم ۱۸

شکل ۱-۸. نمایی از مراحل بیوژنز miRNA در سلول ۲۱

شکل ۱-۹. نقش میکروRNAها در فرآیندهای سلولی مختلف مرتبط با پانکراس ۲۴

شکل ۱-۱۰. عوارض بالینی دیابت در اندامهای مختلف ۲۹

شکل ۱-۱۱. تولید سلولهای iPS در انسان ۴۰

شکل ۱-۱۲. روشهای برنامه ریزی مجدد برای القای سلولهای بنیادی پرتوان القایی از سلولهای سوماتیک بالغ ۴۳

شکل ۱-۱۳. مراحل تولید کلاسترهای شبه islet از سلولهای iPS ۴۸

شکل ۱-۱۴. پروتکل تمایز سلولهای بنیادی پرتوان القایی به سلولهای مولد انسولین ۴۹

شکل ۱-۱۵. ساختار و توالی پیش‌ساز miR-375 ۵۱

شکل ۲-۱. نقشه پلاسمید pCDH-CMV-MCS-EF1α-copGFP ۷۸

شکل ۲-۲. نقشه پلاسمید psPAX2 ۷۸

شکل ۲-۳. نقشه پلاسمید pMD2.G ۷۹

شکل ۳-۱. نمونه‌ای از الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده بر روی ژل آگاروز ۱٪ ۱۱۵

شکل ۳-۲. نتایج الکتروفورز محصولات PCR قطعه miR-375 بر روی ژل آگاروز قبل از بهینه‌سازی ۱۱۶

شکل ۳-۳. نتایج الکتروفورز محصولات PCR بهینه‌سازی شده قطعه miR-375 ۱۱۶