

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

پایان نامه کارشناسی ارشد
رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی

تولید موش تراریخت با بیش بیان واریانت OCT4B1

نگارش
مرضیه ناصری

استاد راهنما
دکتر مریم کبیر سلمانی

استادان مشاور
دکتر سید جواد مولی
دکتر مریم شاه علی

بهمن ۱۳۹۰

حق استفاده از مفاد پایان نامه برای پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری محفوظ است.



پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

رساله جهت دریافت کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی

تولید موش تراریخت با بیش بیان واریانت OCT4B1

نگارش

مرضیه ناصری

این پایان نامه توسط کمیته داوری مورد تایید قرار گرفته و با درجه عالی ارزیابی گردید.

استاد راهنما: سرکار خانم دکتر مریم کبیرسلمانی

استاد مشاور: جناب آقای دکتر سید جواد مولی

استاد مشاور: سرکار خانم دکتر مریم شاه علی

داور داخلی: سرکار خانم دکتر فرزانه صابونی

داور خارجی: جناب آقای دکتر مجید صادقی زاده

سرپرست آموزش: جناب آقای دکتر حسین شهبانی ظهیری

چکیده

کلیدواژه ها

OCT4B1، سلول‌های بنیادی جنینی^۱، موش تراریخت^۲، پرتوانی^۳، خودبازسازی^۴

OCT4 یکی از فاکتورهای رونویسی خانواده POU، با نقش کلیدی در تنظیم حالت خودبازسازی و پرتوانی سلولی در سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های سرطانی جنینی، به عنوان تنظیم‌کننده کلیدی و مارکر ویژه سلول‌های پرتوان در *in vitro* و *in vivo* شناخته شده است و بیان آن برای رشد و تکوین جنینی پستانداران ضروری است. OCT4 انسانی دارای سه واریانت بالقوه OCT4A، OCT4B و OCT4B1 می‌باشد. در بررسی‌های آزمایشگاهی که تاکنون بر روی واریانت جدید OCT4B1 صورت گرفته، کاهش بیان آن در طی تمایز و ارتباط آن با آپوپتوز و تومورزایی گزارش شده است.

از آنجائیکه بررسی عملکرد یک ژن در یک موجود کامل (*in vivo*)، بهترین شیوه مطالعه و نتایج حاصل از آن معتبرتر از روش‌های آزمایشگاهی (*in vitro*) است، هدف ما در این تحقیق، تلاش برای تولید موش تراریختی با بیش بیان OCT4B1، به عنوان مدلی برای رفع بسیاری از ابهامات موجود در عملکرد OCT4B1 در مراحل تکوین و همچنین بررسی نقش این واریانت در سرطانی‌زایی در شرایط *in vivo* بود. بدین منظور، ابتدا دو سازه pCMV-OCT4B1cDNA و pMMTV- OCT4B1cDNA طراحی و تهیه گردید. سپس سازه‌ها با روش الکتروپوریشن به سلول‌های بنیادی جنینی انتقال یافت تا از این سلول‌ها در تولید کایمرا استفاده شود. اما ترانسفکشن سلول‌های ES موشی با هیچ یک از دو سازه مذکور به ایجاد رده سلولی پایدار با بیش بیان OCT4B1 منتهی نشد. نتایج qRT-PCR و وسترن بلات حاکی از کاهش چشمگیر بیان OCT4 اندوژنوس در این سلول‌ها بود و این احتمالاً به دلیل تداخل بیان OCT4B1 با OCT4 اندوژنوس بوده است. همچنین پس از میکرواینجکشن سازه‌ها به پیش هسته نر تخمک لقاح یافته و انتقال آنها به اویداکت موش حامله کاذب، با غربالگری در سطح DNA ژنومی و رونویسی، موش‌های تراریخت جداسازی شدند. به این ترتیب مدل موشی دارای بیش بیان OCT4B1 برای مطالعات بعدی در دسترس قرار گرفت.

¹ Embryonic stem cells

² Transgenic mouse

³ pluripotency

⁴ Self renewal

صفحه	فهرست	بخش
۱	مقدمه	۱
۴	بررسی منابع	۲
۸	ساختار و عملکرد OCT4	۱-۲
۱۰	تنظیم بیان OCT4	۲-۲
۱۱	واریانت های OCT4	۳-۲
۱۴	واریانت OCT4B1	۴-۲
۱۶	مدل موشی	۵-۲
۱۷	مزایای تولید موش های تراریخت	۶-۲
۱۸	روش های تولید موش تراریخت	۷-۲
۲۱	در انتخاب وکتور و ساخت سازه ترانس ژن چه مواردی را باید در نظر گرفت؟	۸-۲
۲۴	مواد و روش ها	۳
۲۵	بخش مولکولی	۱-۳
۲۵	مواد بخش مولکولی	۱-۱-۳
۲۵	مواد شیمیایی	۱-۱-۱-۳
۲۵	آنتی بیوتیک ها	۲-۱-۱-۳
۲۶	باکتری ها	۳-۱-۱-۳
۲۶	پلاسمیدها	۴-۱-۱-۳
۲۷	آغازگرها (پرایمرها)	۵-۱-۱-۳
۲۷	کیت های آزمایشگاهی	۶-۱-۱-۳
۲۸	آنزیم ها	۷-۱-۱-۳
۲۹	مارکرها	۸-۱-۱-۳
۲۹	محلول ها	۹-۱-۱-۳
۲۹	محلولهای لازم جهت استخراج پلاسمید (مقیاس کوچک)	۱-۹-۱-۱-۳

۳۰	تهیه آب تیمار شده با DEPC	۲-۹-۱-۱-۳
۳۱	متعادل کردن یا تنظیم PH فنول	۳-۹-۱-۱-۳
۳۱	متعادل کردن یا تنظیم PH فنول برای استخراج DNA	۱-۳-۹-۱-۱-۳
۳۱	متعادل کردن یا تنظیم PH فنول برای استخراج RNA	۲-۳-۹-۱-۱-۳
۳۲	محلول های لازم برای الکتروفورز DNA روی ژل آگارز	۴-۹-۱-۱-۳
۳۲	محلول TBE	۱-۴-۹-۱-۱-۳
۳۲	محلول TAE	۲-۴-۹-۱-۱-۳
۳۲	محلول اتیدیوم برماید	۳-۴-۹-۱-۱-۳
۳۲	بافرلودینگ	۴-۴-۹-۱-۱-۳
۳۲	محلول ذخیره IPTG	۵-۹-۱-۱-۳
۳۳	محلول ذخیره X - Gal	۶-۹-۱-۱-۳
۳۳	محلول های لازم برای وسترن بلائینگ	۷-۹-۱-۱-۳
۳۳	رقت های استاندارد BSA	۱-۷-۹-۱-۱-۳
۳۳	محلول برادفورد (5X)	۲-۷-۹-۱-۱-۳
۳۳	محلول اکریل آمید- بیس اکریل آمید (۰.۳۰٪ : ۰.۰۸٪)	۳-۷-۹-۱-۱-۳
۳۴	ژل پلی اکریل آمید جدا کننده (۱۲/۵٪)	۴-۷-۹-۱-۱-۳
۳۴	ژل پلی اکریل آمید جمع کننده (۰.۵٪)	۵-۷-۹-۱-۱-۳
۳۵	بافر مهاجرت بالا	۶-۷-۹-۱-۱-۳
۳۵	بافر مهاجرت پایین	۷-۷-۹-۱-۱-۳
۳۵	Sample Buffer (2X)	۸-۷-۹-۱-۱-۳
۳۵	بافر ترانسفر	۹-۷-۹-۱-۱-۳
۳۶	بافر (10X) TBS	۱۰-۷-۹-۱-۱-۳
۳۶	محلول TBST	۱۱-۷-۹-۱-۱-۳
۳۶	محلول بلوک کننده	۱۲-۷-۹-۱-۱-۳
۳۶	Stripping Buffer	۱۳-۷-۹-۱-۱-۳
۳۷	محیط های کشت باکتری	۱۰-۱-۱-۳
۳۷	محیط کشت مایع LB (Luria-Bertani)	۱-۱۰-۱-۱-۳
۳۷	محیط کشت جامد LB Agar	۲-۱۰-۱-۱-۳
۳۷	محیط نگهداری باکتری ها	۳-۱۰-۱-۱-۳

۳۸	روش های بخش مولکولی	۲-۱-۳
۳۸	استخراج RNA	۱-۲-۱-۳
۳۸	استخراج RNA از سلول ها با کیت	۱-۱-۲-۱-۳
۳۸	تعیین غلظت DNA و RNA و خلوص آن	۲-۲-۱-۳
۳۹	واکنشهای زنجیره ای پلی مرز (PCR)	۳-۲-۱-۳
۳۹	مواد و مراحل انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)	۱-۳-۲-۱-۳
۳۹	DNA الگو	۱-۱-۳-۲-۱-۳
۴۰	داکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP)	۲-۱-۳-۲-۱-۳
۴۰	کلرید کلسیم (MgCl ₂)	۳-۱-۳-۲-۱-۳
۴۰	آنزیم Taq DNA Polymerase	۴-۱-۳-۲-۱-۳
۴۰	سولفات منیزیم (MgSO ₄)	۵-۱-۳-۲-۱-۳
۴۱	آنزیم TaKaRa La Taq	۶-۱-۳-۲-۱-۳
۴۱	پرایمرها (آغازگرها)	۷-۱-۳-۲-۱-۳
۴۱	دمای جفت شدن پرایمرها (Ta)	۸-۱-۳-۲-۱-۳
۴۱	مراحل PCR	۲-۳-۲-۱-۳
۴۳	خالص سازی محصول PCR با استفاده از کیت	۴-۲-۱-۳
۴۳	ساخت cDNA	۵-۲-۱-۳
۴۴	الکتروفورز DNA	۶-۲-۱-۳
۴۴	الکتروفورز ژل آگارز	۱-۶-۲-۱-۳
۴۴	رنگ آمیزی ژل آگارز با اتیدیوم بروماید	۲-۶-۲-۱-۳
۴۴	بازیافت قطعات DNA از روی ژل آگارز با استفاده از کیت	۳-۶-۲-۱-۳
۴۵	اتصال قطعات DNA	۷-۲-۱-۳
۴۵	کشت باکتری	۸-۲-۱-۳
۴۵	تهیه باکتریهای مستعد برای پذیرش DNA پلاسمیدی خارجی	۹-۲-۱-۳
۴۵	سلولهای مستعد تازه	۱-۹-۲-۱-۳
۴۶	سلولهای مستعد منجمد شده (Frozen)	۲-۹-۲-۱-۳
۴۷	انتقال پلاسمید به درون باکتری	۱۰-۲-۱-۳
۴۷	غربال کردن کلونهای واجد پلاسمید نو ترکیب	۱۱-۲-۱-۳
۴۷	غیر فعال شدن ژن	۱-۱۱-۲-۱-۳

۴۷	حساسیت و مقاومت کلون‌ها به آنتی بیوتیک	۱-۱-۱۱-۲-۱-۳
۴۸	α -Complementation	۲-۱-۱۱-۲-۱-۳
۴۹	روش quick check	۲-۱۱-۲-۱-۳
۵۰	استخراج DNA پلاسمیدی	۱۲-۲-۱-۳
۵۰	استخراج DNA پلاسمیدی در مقیاس کم	۱-۱۲-۲-۱-۳
۵۰	استخراج DNA پلاسمیدی با روش شکستن قلیایی	۱-۱-۱۲-۲-۱-۳
۵۱	استخراج DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت	۲-۱-۱۲-۲-۱-۳
۵۱	تهیه پلاسمیدهای بدست آمده در مقیاس بالا	۲-۱۲-۲-۱-۳
۵۲	برش آنزیمی DNA توسط آنزیم های برش دهنده اختصاصی	۱۳-۲-۱-۳
۵۲	واکنش برش آنزیمی DNA با یک آنزیم	۱-۱۳-۲-۱-۳
۵۲	واکنش برش آنزیمی DNA با دو آنزیم	۲-۱۳-۲-۱-۳
۵۳	غیر فعال کردن آنزیم	۳-۱۳-۲-۱-۳
۵۳	وسترن بلات	۱۴-۲-۱-۳
۵۳	استخراج پروتئین کل سلول	۱-۱۴-۲-۱-۳
۵۳	سنجش غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد	۲-۱۴-۲-۱-۳
۵۴	الکتروفورز پروتئین‌ها	۳-۱۴-۲-۱-۳
۵۵	انتقال پروتئین‌ها بر روی کاغذ PVDF	۴-۱۴-۲-۱-۳
۵۶	ایمونوبلاستینگ	۵-۱۴-۲-۱-۳
۵۶	Stripping	۶-۱۴-۲-۱-۳
۵۷	آنتی بادی‌ها	۷-۱۴-۲-۱-۳
۵۷	استخراج DNA ژنومی از دم موش های تراریخت	۱۵-۲-۱-۳
۵۹	بخش سلولی	۲-۳
۵۹	محیط های مورد نیاز برای بخش سلولی	۱-۲-۳
۵۹	بافر PBS	۱-۱-۲-۳
۵۹	محلول تریپسین ۰.۰۲۵٪، ۱mM EDTA	۲-۱-۲-۳
۵۹	محیط DMEM	۳-۱-۲-۳
۶۰	استخراج و کشت سلول های فیروبلاست جنینی موشی	-۲-۲-۳
۶۲	مواد و وسایل لازم	۱-۲-۲-۳
۶۲	روش کار	۲-۲-۲-۳

۶۲	جداسازی MEFs از جنین موش	۱-۲-۲-۲-۳
۶۴	فریز کردن سلول های MEF	۲-۲-۲-۲-۳
۶۵	ذوب کردن سلول های MEF	۳-۲-۲-۲-۳
۶۵	غیر فعال سازی سلول های MEF	۴-۲-۲-۲-۳
۶۶	کشت سلول های بنیادی جنینی (ES)	۳-۲-۳
۶۷	مواد و وسایل لازم	۱-۳-۲-۳
۶۷	کشت سلول های بنیادی جنینی (ES) بر روی لایه تغذیه کننده	۲-۳-۲-۳
۶۷	ذوب کردن سلول های بنیادی جنینی	۱-۲-۳-۲-۳
۶۸	پاساژ سلول های ES (روی MEF)	۲-۲-۳-۲-۳
۶۸	فریز کردن سلول های ES (روی MEF)	۳-۲-۳-۲-۳
۶۹	کشت سلول های بنیادی جنینی (ES) به روش مستقل از لایه تغذیه کننده	۳-۳-۲-۳
۶۹	انتخاب نوع سلول	۱-۳-۳-۲-۳
۶۹	ژلاتینه کردن کف پلیت ها	۲-۳-۳-۲-۳
۷۰	ذوب کردن سلول های ES (بدون MEF)	۳-۳-۳-۲-۳
۷۰	پاساژ سلول های ES (بدون MEF)	۴-۳-۳-۲-۳
۷۱	فریز کردن سلول های ES	۵-۳-۳-۲-۳
۷۱	سوپراوانولاسیون موش های ماده	۴-۲-۳
۷۲	لیپوفکشن سلول های HEK293T	۵-۲-۳
۷۲	ترانسفکشن سلول های بنیادی جنینی با سازه های حاوی ژن مورد نظر	۶-۲-۳
۷۲	باز کردن حفره شکمی و موقعیت اندام های تولید مثلی جنس ماده	۷-۲-۳
۷۴	جمع آوری زیگوت ها و حذف سلول های کومولوس با استفاده از هیالورونیداز	۸-۲-۳
۷۶	میکرواینجکشن تخمک های لقاح یافته با سازه pMMTV-OCT4B1cDNA	۹-۲-۳
۷۷	انتقال جنین های تراریخت به اویداکت موش مادر خوانده	۱۰-۲-۳
۷۹	وازکتومی موش های نر	۱۱-۲-۳
۸۱	نتایج	۴
۸۲	مراحل همسانه سازی cDNA ژن OCT4B1	۱-۴

۸۲	انجام PCR از cDNA ژن OCT4B1	۱-۱-۴
۸۳	همسانه سازی cDNA ژن OCT4B1 در پلاسمید t-vector	۲-۱-۴
۸۴	انتقال cDNA ژن OCT4B1 از پلاسمید t-vector به پلاسمید pcDNA3	۳-۱-۴
۸۵	انتقال سازه IRES-EGFP به پلاسمید OCT4B1-pcDNA3	۴-۱-۴
۸۷	تصویر شماتیک از وکتورهای طراحی شده	۵-۱-۴
۸۸	تهیه پلاسمیدهای بدست آمده در مقیاس بالا	۲-۴
۸۸	خطی کردن سازه حاوی ژن OCT4B1 به همراه پروموتور CMV	۳-۴
۸۹	کشت سلول های بنیادی جنینی	۴-۴
۸۹	استخراج و کشت سلول های فیروبلاست جنینی موشی (MEF)	۱-۴-۴
۹۰	کشت سلول های بنیادی جنینی موشی بر روی سلول های MEF	۲-۴-۴
۹۱	لیپوفکشن سلول های HEK293T با سازه های مورد نظر برای اطمینان از صحت سازه ها	۵-۴
۹۲	ترانسفکشن سلول های بنیادی جنینی با سازه های مورد نظر	۶-۴
۹۳	ترانسفکشن سلول های بنیادی جنینی با استفاده از دستگاه الکتروپوریشن Neon	۱-۶-۴
۹۵	بررسی اثر سمیت EGFP در مرگ کلنی ها	۷-۴
۹۶	بررسی اثر شدت پالس ها در مرگ کلونی ها	۸-۴
۹۷	بررسی اثر بیان cDNA ژن OCT4B1 در مرگ کلنی ها	۹-۴
۹۷	استخراج RNA از سلول های ES کنترل و ES ترانسفکت شده با استفاده از کیت و ساخت cDNA	۱۰-۴
۹۸	بررسی کاهش بیان mRNA ی OCT4 اندوژنوس در نتیجه بیش بیان mRNA ی OCT4B1	۱۱-۴
۱۰۱	بررسی کاهش بیان پروتئینی OCT4 در نمونه های ترانسفکت شده در مقایسه با کنترل با استفاده از وسترن بلائینگ	۱۲-۴
۱۰۲	مراحل تولید موش تراریخت با استفاده از تزریق سازه ها به پیش هسته نر زیگوت	۱۳-۴
۱۰۲	واژکتومی موش های نر	۱-۱۳-۴
۱۰۲	آماده کردن موش های مادرخوانده	۲-۱۳-۴
۱۰۳	میکرواینجکشن به درون تخمک لقاح یافته	۳-۱۳-۴

۱۰۳	انتقال جنین ها درون اویداکت موش های مادرخوانده	۴-۱۳-۴
۱۰۳	غربالگری موش های تراریخت	۵-۱۳-۴
۱۰۳	غربالگری موش های تراریخت در سطح ژنومی	۱-۵-۱۳-۴
۱۰۵	غربالگری موش های تراریخت در سطح رونویسی	۲-۵-۱۳-۴
۱۰۶	بحث و پیشنهادات	۵
۱۰۷	بحث و نتیجه گیری	۱-۵
۱۱۴	پیشنهادات	۲-۵
۱۱۶	منابع	۶

صفحه	فهرست	جدول
۲۶	فهرست سویه‌های E.coli استفاده شده در تحقیق	جدول ۱-۳
۲۶	فهرست پلاسمیدهای استفاده شده در این تحقیق	جدول ۲-۳
۲۷	فهرست پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق	جدول ۳-۳
۲۸	فهرست کیت های استفاده شده در تحقیق	جدول ۴-۳
۲۸	فهرست آنزیم های استفاده شده در تحقیق	جدول ۵-۳
۲۹	فهرست آنزیم های برش دهنده محدودالایتر استفاده شده در این تحقیق	جدول ۶-۳
۴۲	شرایط واکنش های PCR به کار گرفته شده در این تحقیق	جدول ۷-۳
۵۷	لیست آنتی بادی های استفاده شده در این تحقیق	جدول ۸-۳
۶۴	محیط کشت سلول های فیروبلاست جنینی موش	جدول ۹-۳
۶۸	محیط کشت سلول های ES	جدول ۱۰-۳
۸۸	غلظت نمونه های همسانه سازی شده پس از استخراج پلاسمید در مقیاس بالا	جدول ۱-۴
۹۲	شرایط استفاده شده برای الکتروپوریشن با دستگاه BioRad GenePulse	جدول ۲-۴
۹۳	شرایط استفاده شده برای الکتروپوریشن با دستگاه Neon™ Transfection System	جدول ۳-۴
۹۹	غلظت cDNA و RNA های حاصل از سلول های ترانسفکت شده و میزان الگوی استفاده شده برای ژن OCT4 و ژن خانگی سلول ها (β2M)	جدول ۴-۴

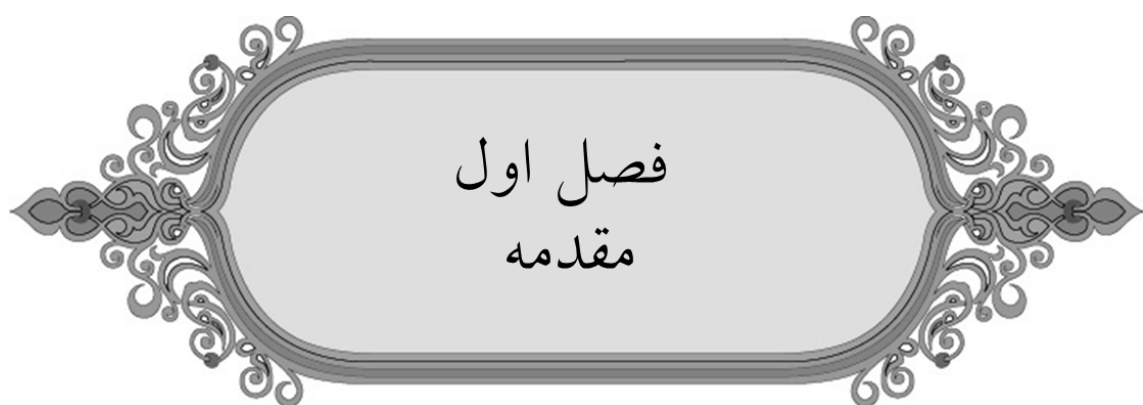
صفحه	فهرست	شکل
۶	مراحل بیان OCT4 در طول رشد جنین	شکل ۱-۲
۸	تصویر شماتیک ساختار پروتئینی OCT4 و دمین های آن	شکل ۲-۲
۱۰	عناصر تنظیمی قرار گرفته در بالادست ژن OCT4	شکل ۳-۲
۱۲	تصویر شماتیک ژن OCT4 انسانی و ایزوفرم های پروتئینی حاصل از آن	شکل ۴-۲
۱۳	ساختار mRNA ی OCT4B	شکل ۵-۲
۱۵	ساختار mRNA ی OCT4B1	شکل ۶-۲
۱۹	تزریق DNA به داخل پرونوکلئوس با روش میکرواینجکشن	شکل ۷-۲
۲۰	یکی از روش های تولید کایمرا با تزریق سلول های تراریخت به درون بلاستوسیست	شکل ۸-۲
۵۴	مارکر پروتئینی (PageRuler™ Prestained Protein Ladder)	شکل ۱-۳
۵۵	ترتیب قرارگیری اجزای مختلف در تانک ترانسفر	شکل ۲-۳
۷۳	کشتن موش به روش جابجا کردن مهره گردن	شکل ۳-۳
۷۳	نحوه باز کردن حفره شکمی و موقعیت اندام های تناسلی ماده	شکل ۴-۳
۷۵	نحوه جدا کردن پرده مزومتر از اویداکت و نحوه جداکردن اویداکت	شکل ۵-۳
۷۶	تصویر شماتیک اویداکت و اجزای تشکیل دهنده آن و نحوه خارج کردن تخمک ها از آن	شکل ۶-۳
۷۶	میکرواینجکشن سازه به پیش هسته نر تخمک	شکل ۷-۳
۷۸	چگونگی برش پوست و خارج ساختن اویداکت	شکل ۸-۳
۷۸	تصویر شماتیک از انتقال جنین به درون اویداکت	شکل ۹-۳
۸۰	چگونگی برش پوست و خارج ساختن اجزای تناسلی نر به منظور انجام وازکتومی	شکل ۱۰-۳
۸۰	واکتومی موش های نر	شکل ۱۱-۳
۸۲	نتیجه PCR از cDNA ژن OCT4B1	شکل ۱-۴
۸۳	تست quick check	شکل ۲-۴

۸۴	پلاسمید استخراج شده در کنار کنترل منفی (پلاسمید بدون تغییر)	شکل ۳-۴
۸۶	تست quick check	شکل ۴-۴
۸۷	تصویر شماتیک سازه طراحی شده حاوی پروموتور CMV	شکل ۵-۴
۸۷	تصویر شماتیک سازه طراحی شده حاوی پروموتور MMTV	شکل ۶-۴
۸۸	تصویر پلاسمید خطی شده در کنار پلاسمید کروی	شکل ۷-۴
۸۹	جنین ۱۲/۵ روزه موش	شکل ۸-۴
۹۰	کشت سلول های بنیادی جنینی موشی بر روی سلول های فیروبلاست جنینی	شکل ۹-۴
۹۰	کشت سلول های بنیادی جنینی موشی بر روی سلول های فیروبلاست جنینی	شکل ۱۰-۴
۹۱	تصاویر حاصل از لیپوفکشن سلول های HEK293T با سازه های مورد نظر	شکل ۱۱-۴
۹۴	تصاویر کلنی های ES ترانسفکت شده با سازه pCMV – OCT4B1cDNA	شکل ۱۲-۴
۹۴	تصاویر کلنی های ES ترانسفکت شده با سازه pMMTV – OCT4B1cDNA پس از القا با دگزامتازون	شکل ۱۳-۴
۹۵	تصویر یک کلونی ترانسفکت شده در حال مرگ در مقایسه با کلونی ترانسفکت نشده	شکل ۱۴-۴
۹۵	تصاویر کلنی های ترانسفکت شده با پلاسمید pIRES2-EGFP	شکل ۱۵-۴
۹۶	تصویر کلونی ترانسفکت شده با پلاسمید pIRES2-EGFP، که هیچ اثری از مرگ در آن دیده نمی شود	شکل ۱۶-۴
۹۶	تصاویر سلول هایی که بدون حضور DNA پالس داده شدند	شکل ۱۷-۴
۹۷	نمونه ای از نتایج استخراج RNA از سلول ها	شکل ۱۸-۴
۹۸	نتیجه PCR از سلول های ES کنترل و ES ترانسفکت شده	شکل ۱۹-۴
۱۰۰	نتیجه PCR از سلول های ترانسفکت شده در زمان های مختلف به همراه کنترل برای ژن OCT4	شکل ۲۰-۴
۱۰۰	نتیجه PCR برای ژن خانگی (β 2M) برای نمونه های ترانسفکت شده در زمان های متفاوت پس از ترانسفکشن به همراه کنترل	شکل ۲۱-۴
۱۰۲	نتیجه حاصل از وسترن بلاتینگ برای پروتئین OCT4 به همراه β -actin به عنوان ژن خانگی	شکل ۲۲-۴
۱۰۴	نتیجه PCR از DNA ژنومی موش های حاصل از انتقال جنین های	شکل ۲۳-۴

تراریخت به اویداكت موش های مادر خوانده

شکل ۴-۲۴ نتیجه PCR از موش های نسل F1

شکل ۴-۲۵ نتایج حاصل از غربالگری موش های تراریخت در سطح رونویسی



سلول های بنیادی بالغ^۱، خزانه کوچک اما موثر و پایداری از سلول های تمایز نیافته هستند که در بسیاری از بافت های بالغ بدن وجود دارند؛ سلول های مذکور با خاصیت خودبازسازی^۲ و چندتوانی^۳، از یک سو مسئول فرایندهای جبرانی و احیای بافت های آسیب دیده و از سوی دیگر، هدف اصلی تغییرات اپی ژنتیکی و ژنتیکی می باشند که می توانند در نهایت منجر به ایجاد سلول های بنیادی سرطانی شوند. خصوصیات منحصر به فرد سلول های بنیادی سرطانی، باعث فرار آن ها از روش های درمانی نظیر شیمی درمانی و پرتودرمانی می شود. به همین دلیل، طبیعت درمان ناپذیر بسیاری از تومورهای توپر^۴ پیشرونده را به این سلول ها نسبت می دهند.

مطالعات اخیر نشان داده است که فاکتورهای نسخه برداری ویژه سلول های بنیادی نظیر OCT4، Nanog و SOX2 نقش مهمی در پایداری عملکرد سلول های بنیادی سرطانی به عهده دارند و اهداف بسیار مهمی در جهت تشخیص و مهار تکثیر این سلول ها به شمار می روند.

OCT4 یکی از اعضای خانواده POU، با نقش محوری اش در تنظیم شبکه های خودبازسازی و پرتوانی^۵ سلولی در سلول های بنیادی جنینی^۶ (ES) و سلول های سرطانی جنینی^۷ (EC) متمایز شده و به عنوان تنظیم کننده کلیدی و مارکر ویژه سلول های پرتوان در *in vitro* و *in vivo* شناخته شده است. این فاکتور یکی از پروتئین های ضروری و تنظیم کننده های اصلی تکوین پستانداران بوده و علاوه بر کمک به تنظیم نسخه برداری دیگر ژن های ضروری برای تکوین موجود، توسط لوپ های فیدبک منفی و مثبت، نسخه برداری خود را نیز تحت تاثیر قرار می دهد. OCT4 انسانی دارای سه واریانت بالقوه OCT4A، OCT4B و OCT4B1 - واریانت OCT4B1 در سال ۲۰۰۸ توسط اطلسی و همکاران شناسایی شده است - می باشد.

در بررسی های آزمایشگاهی که تاکنون بر روی واریانت جدید OCT4B1 صورت گرفته، کاهش بیان این واریانت در طی تمایز و ارتباط آن با آپوپتوز و تومورزایی مشخص شده است، اما از آنجائیکه بررسی عملکرد یک ژن در یک موجود کامل (*in vivo*)، بهترین شیوه مطالعه و نتایج حاصل از این بررسی معتبرتر از هر روش آزمایشگاهی دیگری است، علاوه بر این با توجه به اینکه در میان

¹ adult stem cells

² self renewal

³ multipotency

⁴ solid tumor

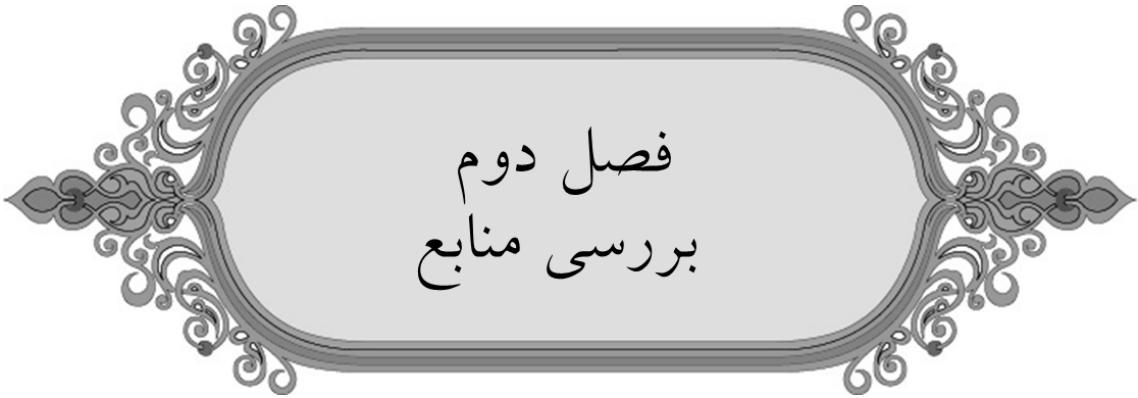
⁵ pluripotency

⁶ embryonic stem cells

⁷ embryonic carcinoma

حیوانات آزمایشگاهی، موش به دلیل نزدیکی ژنتیکی و نحوه پاتوژنز بیماری ها و همچنین سادگی نسبی در دستکاری و انتقال جنین موش به رحم موش مادر خوانده، بعنوان بهترین مدل برای تولید حیوان تراریخت معرفی شده است. بنابراین هدف از این تحقیق، تلاش برای تولید موش تراریختی دارای بیش بیان OCT4B1 بود که به عنوان یک مدل، بتوان بسیاری از ابهامات موجود در عملکرد OCT4B1 را در مراحل تکوین موجود مرتفع کرد و همچنین نقش این واریانت را در سرطانزایی در شرایط *in vivo* مورد بررسی قرار داد.

البته ذکر این موضوع حائز اهمیت است که این واریانت توسط پژوهشگران ایرانی شناسایی شده و همچنین اغلب بررسی های آزمایشگاهی که تاکنون بر روی آن انجام گرفته نیز به دست محققان ایرانی صورت پذیرفته است. بعلاوه، پژوهشگران دیگر نیز می توانند در آینده از این حیوان تراریخت به عنوان مدل بیماری استفاده کنند.



فصل دوم
بررسی منابع

۲- بررسی منابع

سلول های بنیادی، سلول هایی هستند که با دو ویژگی اساسی شناخته می شوند: توانایی خودبازسازی^۱ و داشتن پتانسیل تمایز به سلول های مختلف (پرتوانی^۲). این سلول ها از لحاظ منشا استخراج به سه دسته تقسیم می شوند: سلول های بنیادی جنینی^۳ (ES)، سلول های بنیادی بالغ^۴ و سلول های بنیادی بند ناف^۵. این سلول ها از لحاظ سطح پتانسیل تمایزی با یکدیگر متفاوتند (Evans and Kaufman, 1981).

سلول های بنیادی بالغ، سلول های تمایز نیافته ای هستند که در سراسر بدن بعد از مرحله رشد و نمو جنینی یافت می شوند؛ این سلول ها دارای خاصیت خودبازسازی و چندتوانی می باشند. در واقع، سلول های مذکور ذخایر سلولی هستند که از یک سو، مسئول فرایندهای جبرانی و احیای بافت های آسیب دیده می باشند و از سوی دیگر، هدف اصلی تغییرات اپی ژنتیکی و ژنتیکی می باشند که می توانند در نهایت منجر به ایجاد سلول های بنیادی سرطانی^۶ شوند. شواهدی مبنی بر وجود این سلول ها در بسیاری از انواع تومورهای توپر نظیر سرطان سینه، تخمدان، مغز، کولون، پانکراس، پروستات و ریه بدست آمده است. سلول های بنیادی سرطانی با ویژگی هایی از جمله سرعت تقسیم بسیار کند و وجود سیستم پمپی کارا (نظیر ABC^۷ و MDR1^۸) از دیگر جمعیت های سلول های توموری متمایز می شوند. در حقیقت، خصوصیات مذکور باعث مقاومت این سلول ها به روش های درمانی متداول نظیر شیمی درمانی و پرتودرمانی شده و این روش ها تنها توان از بین بردن سلول های نیمه تمایز یافته حاصل از آن ها را داشته، در حالیکه این سلول ها همچنان باقی می مانند و در برگشت مجدد سرطان پس از قطع درمان و همچنین بروز متاستاز های احتمالی نقش عمده ای دارند. به همین دلیل، طبیعت درمان ناپذیر بسیاری از تومورهای توپر پیشرونده را به این سلول ها نسبت می دهند (Wiestler et al., 2007).

مطالعات اخیر نشان داده است که فاکتورهای نسخه برداری ویژه سلول های بنیادی نظیر OCT4، Nanog و SOX2 نقش مهمی در پایداری عملکرد سلول های بنیادی سرطانی به عهده دارند و

¹ self-renewal

² pluripotency

³ embryonic stem cells

⁴ adult stem cells

⁵ fetal stem cells

⁶ cancer stem cells

⁷ ATP binding cassette transporter (ABC)

⁸ Multi-drug resistance 1 (MDR1)