بسم الله الرحمن الرحيم

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی جانوری گرایش تکوینی

مکانیسم مهار GSK3 در تکثیر و تمایز سلول های پیش ساز عصب مشتق از سلول های بنیادی پرتوان القائی با استفاده از کوچک مولکول

نگارش:

فرشته سرقلی

اساتید راهنما:

دکتر حمید گورابی

دکتر حسین بهاروند

استاد مشاور:

دکتر سحر کیانی

تقدیم به

مولایم

امام حسین علیه السلام

چکیده

مقدمه: سلول های پیش ساز عصب دارای توان خود نوزایی و تمایز به رده های نورونی و گلیالی هستند. بنابراین این سلول ها این قابلیت را دارند که در سلول درمانی بیماری های سیستم عصبی که در اثر از بین رفتن های سلول ها ایجاد می شوند، به کار روند. برای استفاده از این سلول ها در درمان بیماری های سیستم عصبی با مشکلاتی مواجه هستیم، از جمله تکثیر این سلول ها و تمایز جهت دار آن هاست. برای این که تکثیر و تمایز سلول های پیش ساز عصب را افزایش دهیم، اثر مهار گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ (GSK3) را به وسیله ی کوچک مولکول CHIR99021 بررسی کردیم.

مواد و روش ها: سلول های پیش ساز عصب انسانی از سلول های پرتوان القائی انسانی تهیه شد. کوچک مولکول CHIR99021 برای مهار GSK3 استفاده شد و برای بررسی برهمکنش GSK3 با مسیر های دیگر از کوچک مولکول های DAPT، XAV939 و Pifithrin α به ترتیب برای مهار سیگنالینگ Notch، β-catenin و p53 استفاده شد. تکثیر سلول ها با استفاده از تست MTT تعیین شد و برای بیان KI67 فلوسایتومتری انجام شد. برای بررسی بیان ژن و پروتئین به ترتیب از QPCR و ایمونوفلوروسنس استفاده شد.

نتایج: آنالیز داده های تست MTT و KI67 نشان داد که CHIR99021 تکثیر سلول های پیش ساز عصب مشتق از سلول های بنیادی پرتوان القائی را طی ۱۰ پاساژ افزایش داد و بررسی کاریوتایپ آن ها پایداری کروموزوم ها را تایید کرد.

Pifithrin α اثری روی تکثیر سلول ها نداشت در حالی که DAPT و XAV939 تکثیر را کاهش دادند. بیان ژن های *HES1* و *HES5* (ژن های مربوط به سیگنالینگ Notch) و *CYCLIND1* و *C-MYC* (فاکتور های رونویسی مرتبط با β-catenin) در سلول های پیش ساز عصب که CHIR99021 را دریافت کرده بودند به طور معنی دار در مقایسه با گروه DAPT و XAV939 و کنترل افزایش یافت. در روند تمایز، CHIR99021، باعث افزایش نورون زایی شد. DAPT اثری بر نورون زایی سلول های پیش ساز عصب که CHIR99021 دریافت کرده بودند نداشت در حالی که XAV939 نورون زایی را به طور کامل در این گروه مهار کرد. بیان ژن های نورونی مثل *NGN3* و *MAP2* و نیز ژن های دوپامینرجیکی مثل *TH*، *LMX1A*، *LMX1B* و *NURR1* در اثر حضور CHIR99021 افزایش یافت.

نتیجه گیری: نتایج ما نشان می دهد که مهار GSK3 از طریق افزایش سطح β-catenin و فعال کردن Notch تکثیر سلول های پیش ساز عصب مشتق از سلول های پرتوان القائی را افزایش می دهد. همچنین CHIR99021 تمایز نورونی به سمت سرنوشت نورونی را از طریق افزایش پایداری β-catenin و درنتیجه افزایش بیان ژن های پیش برنده ی نورونی مثل *NEUROD1* و *NGN3* پیش برد و بیان ژن های دوپامینرجیک را افزایش داد.

کلمات کلیدی: سلول های پیش ساز عصب، کوچک مولکول، گلیکوژن سنتاز کیناز۳، تمای

تقدیر و تشکر

حمد و سپاس مخصوص خدا است که پروردگار جهانیان است. هم اوست آغاز و پایان و ظاهر و باطن. خدایی که صاحب علم است و از تنها اوست که اسرار عالم را می داند. و غیر از او به علم احاطه ندارد مگر به اذنش.

با سپاس از استاد ارجمند آقای دکتر حمید گورابی که با وجود مشغله ی فراوان، در این پایان نامه مرا همراهی کردند.

با سپاس از معلم و استاد عزیزم آقای دکتر حسین بهاروند که روش و اخلاق تحقیق را از ایشان آموختم .

سپاس از استاد مهربان و دلسوزم دکتر سحر کیانی که در تمام مدت تحقیق از مشورت هایشان بهره مند بودم و مساعدت های دوستانه ایشان همواره یاریم کرده.

سپاس از دوستان عزیزم در گروه عصب که در خوشی ها و ناخوشی ها کنارم بودند و در سختی های کار به من دلگرمی و امید دادند: آقایان علی فتحی، علی پویا، ابراهیم شهبازی، علی رهجویی و خانم ها شیوا نعمتی، فهیمه خیاطان، آزاده زهبی، لیلا ستاریان.

قدر دانی می کنم از پرسنل خوب پزوهشگاه رویان و دانشگاه علم و فرهنگ به خاطر همراهی کم نظیرشان، به ویژه:

مسئول محترم آزمایسگاه تمایز آقای پورنصر و کارشناس آزمایشگاه آقای انصاری

پرسنل مهربان و وظیفه شناس آزمایشگاه مولکولی خانم ها صمدیان و مرادمند

پرسنل خوب آزمایشگاه فلوسایتومتری آقایان جان زمین و سامانی و خانم خسروانی

تشکر از مدیر داخلی آزمایشگاه ها آقای مقیمی

خانم مسعودی در آزمایشگاه ژنتیک به خاطر مساعدت هایشان در تهیه ی کاریوتایپ سلول ها

آقای چهرازی در اپیدمیولوژی که در آنالیز آماری داده ها از مشورت هایشان بهره مند شدم

آموزش رویان خانم ها کشفی و ذوقی و آقای حیدری

پرسنل خوب کتابخانه آقایان لطفی پناه و سازوار

خانم تهرانی و آقای فرحناک در دانشگاه علم و فرهنگ

دوستان مهربانم در آزمایشگاه تمایز و همکلاسی های عزیزم خصوصا" خانم ها لیلا ستاریان و مریم میریونسی

قدر دانی و سپاس فراوان از پدرو مادر مهربانم که حمایت ها و مهربانی های بی دریغ شان پیمودن راه را برایم هموار کرد هرچند که تشکر آز آنان در کلام نگنجد.

قدر دانی می کنم از همسر فداکار و مهربانم که با صبر کم نظیرش همراهیم کرد.

فهرست مطالب

فصل اول ۱۶

مقدمه و مروری بر مطالعات ١٦
١-١سلول های پیش ساز عصب ١٧
١-١- ١تعریف و منشأ ١٧
١-١-٢ اهمیت و عملکرد سلول های پیش ساز عصب در تکوین و بلوغ ١٩
١-١-٣ اهمیت سلول های پیش ساز عصب در سلول درمانی ٢٠
١-٢-مسیرهای سیگنالینگ کنترل کننده تکثیر و تمایز سلول های پیش ساز عصب ٢٢
١-٢-١اهمیت مسیرهای سیگنالینگ در سلول های پیش ساز عصب ٢٢
١-٢-٢ مسیرهای سیگنالینگ دخیل در تکثیر و تمایز سلول های پیش ساز عصب ٢٢
١-٣ کوچک مولکول ها ٣٢
١-٣-١ کوچک مولکول ها و مهار GSK3 ..... ٣٢
١-٤ GSK3 و نورون زایی ٣٤
١-٤-١ مروری بر مطالعات انجام شده در زمینه نقش GSK3 در نورون زایی ٣٤
١-٤-٢ مکانیسم مهار GSK3 در افزایش نورون زایی ٣٤
فصل دوم ٣٦
مواد و روش ها ٣٦
٢-١ بررسی مهار GSK3 در تکثیر سلول های پیش ساز عصب انسانی ٣٨
٢-١-١ کشت و پاساژ سلول های پیش ساز عصب ٣٨
٢-١-٢ گروه های سلولی مورد مطالعه ٣٩
٢-١-٣ بررسی تکثیر سلولی توسط تست MTT[1] ٤٠
٢-١-٤ بررسی بیان پروتئین KI67 ..... ٤١
٢-١-٥ رنگ آمیزی PKH26 ..... ٤٢
٢-٢ بررسی افزایش تکثیر طی پاساژ ٤٢
٢-٢-١ بررسی کاریوتایپ سلول ها بعد از ١٠ پاساژ ٤٢
٢-٢-٢ بررسی بیان ژن بعد از ١٠ پاساژ ٤٤
٢-٢-٣ بررسی بیان پروتئین بعد از ١٠ پاساژ به روش ایمونوفلوروسنس ٤٤

۲-۳ بررسی مکانیسم مهار GSK3 در تکثیر سلول های پیش ساز عصبی ٤٦
۲-۳-۱ گروه های سلولی مطالعه شده ٤٦
۲-۳-۲ بررسی بیان ژن به وسیلهQPCR ٤٧
۲-۳-۳ روش انجام QPCR ٤٧
۲-٤ بررسی مهار GSK3 در تمایز سلول های پیش ساز عصب ٥٤
۲-٤-۱ گروه های سلولی مورد مطالعه ٥٤
۲-٤-۲ بررسی بیان ژن و پروتئین ٥٥
۲-٥ بررسی مکانیسم مهارGSK3 در تمایز سلول های پیش ساز عصب ٥٦
۲-٥-۱ گروه های سلولی مورد مطالعه ٥٦
۲-٥-۲ بررسی بیان ژن و پروتئین ٥٦
۲-٦ بررسی ماهیت نورون های تمایز یافته بر اساس مهار GSK3 ..... ٥٧
۲-٦ آنالیز آماری داده ها ٥٧
فصل سوم ٥٨
نتایج ٥٨
۳-۱ بررسی مهار GSK3 با استفاده از CHIR99021 در تکثیر سلول های پیش ساز عصب ٥٩
۳-۱-۱ بررسی تکثیر سلولی با استفاده از تست MTT ٥٩
۳-۱-۲ بررسی تعداد سلول های در حال تکثیر ٥٩
۳-۱-۳ بررسی سرعت تقسیم سلول ها ٦٠
۳-۲ بررسی افزایش تکثیرسلول های پیش ساز عصبا مهار GSK3 طی ۱۰ پاساژ ٦٤
۳-۲-۱ بررسی خصوصیات سلول های پیش ساز عصب از نظر بیان ژن و پروتئین بعد از ۱۰ پاساژ کشت با مهار GSK3 ..... ٦٤
۳-۲-۲ بررسی کاریوتایپ سلول ها بعد از ۱۰ پاساژ ٦٥
۳-۲-۳ بیان پروتئین NESTIN به عنوان مارکر عمومی پیش ساز عصببعد از ۱۰ پاساژ ادامه داشت ٦٩
۳-۳ بررسی مکانیسم مهار GSK3 در تکثیر سلول های پیش ساز عصب ۷۰
۳-۳-۱ بررسی های سلولی ۷۰
۳-۳-۲ بررسی های مولکولی برای بیان ژن های هدف β-catenin ۷۲

۳-۳-۳ بررسی های مولکولی برای بیان ژن های هدف سیگنالینگ Notch ۷٤
۳-٤ بررسی مهار GSK3 در تمایز سلول های پیش ساز عصب ۷۵
۳-۵ بررسی مکانیسم مهار GSK3 در تمایز سلول های پیش ساز عصب ۷۸
۳-۵-۱ بررسی های سلولی ۷۸
۳-۵-۲ بررسی های مولکولی برای بیان ژن ۷۸
۳-٦ بررسی ماهیت نورون های تمایز یافته در اثر مهار GSK3 ..... ۸۲
۳-٦-۱ بررسی های سلولی ۸۲
۳-٦-۲ بررسی های مولکولی برای بیان ژن ۸۳
فصل چهارم ۸۵
بحث و پیشنهادات ۸۵
٤-۱ بحث ۸٦
٤-۲ نتیجه گیری ۹۵
٤-۳ پیشنهادات ۹٦
منابع ۹۷

فهرست جدول ها

جدول ۱-۱ ..... ۱۹

جدول ۲-۱ ..... ۳۸

جدول ۲-۲ ..... ٤٤

جدول ۲-۳ ..... ٤٤

جدول ۲-٤ ..... ۵۲

جدول ۲-۵ ..... ۵٤

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱ ..... ۱۷

شکل ۱-۲ ..... ۱۸

شکل ۱-۳ ..... ۲۲

شکل ۱-٤ ..... ۲٦

شکل ۱-٥ ..... ۳۰

شکل ۱-٦ ..... ۳۲

شکل ۱-۷ ..... ۳۲

شکل ۲-۱ ..... ٥۱

شکل ۳-۱ ..... ٦۰

شکل ۳-۲ ..... ٦۱

شکل ۳-۳ ..... ٦۲

شکل ۳-٤ ..... ٦٥

شکل ۳-٥ ..... ٦٥

شکل ۳-٦ ..... ٦٦

شکل ۳-۷ ..... ٦۷

شکل ۳-۸ ..... ٦۸

شکل ۳-۹ ..... ۷۰

شکل ۳-۱۰ ..... ۷۲

شکل ۳-۱۱ ..... ۷٤

شكل ٣-١٢ ..... ٧٥

شكل ٣-١٣ ..... ٧٦

شكل ٣-١٤ ..... ٧٩

شكل ٣-١٥ ..... ٨٠

شكل ٣-١٦ ..... ٨١

شكل ٣-١٧ ..... ٨٢

شكل ٣-١٨ ..... ٨٣

شكل ٤-١ ..... ٩٠

شكل ٤-٢ ..... ٩٣

پیشگفتار

در این مطالعه دو هدف را دنبال می کنیم. اول اینکه بتوانیم با روشی ایمن تکثیر سلول های پیش ساز عصب مشتق از سلول های بنیادی پرتوان القائی را در محیط آزمایشگاه افزایش دهیم. با افزایش تکثیر سلول های پیش ساز عصب، می توان آن ها را به تعداد کافی جهت کاربرد های درمانی گسترش داد.

همچنین قصد داریم با استفاده از کوچک مولکول تمایز نورونی را در مقابل تمایز گلیالی افزایش دهیم. افزایش توان نورون زایی سلول های پیش ساز عصب در کاربرد های درمانی حائز اهمیت است. از نورون های تمایز یافته برای درمان بیماری های سیستم عصبی که همراه با تخریب سلول هستند می توان استفاده کرد. در این بیماری ها انواع خاصی از سلول های عصبی از بین می روند.

با توجه به مطالعات انجام شده GSK3 به عنوان مولکول هدف برای دست یابی به این اهداف انتخاب شد. در این مطالعه به دنبال پاسخ به سوالات زیر هستیم:

۱) آیا می توان با مهار GSK3 با استفاده از کوچک مولکول CHIR99021 تکثیر سلول های پیش ساز عصب مشتق از سلول های بنیادی پرتوان القائی را افزایش داد؟

۲) **مهار** GSK3 با استفاده از کوچک مولکول CHIR99021 از طریق چه مکانیسم درون سلولی تکثیر سلول های پیش ساز عصب مشتق از سلول های پرتوان القائی را افزایش می دهد؟

۳) آیا می توان با مهار GSK3 با استفاده از کوچک مولکول CHIR99021 نورون زایی سلول های پیش ساز عصب مشتق از سلول های بنیادی پرتوان القائی را افزایش داد؟

٤) مهار GSK3 با استفاده از کوچک مولکول CHIR99021 از طریق چه مکانیسم درون سلولی نورن زایی سلول های پیش ساز عصب مشتق از سلول های پرتوان القائی را افزایش می دهد؟

۵) ماهیت نورون های تولید شده در اثر مهار GSK3 چیست؟

فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات

۱-۱سلول های پیش ساز عصب

۱-۱- ۱تعریف و منشأ

سلولهای پیش ساز عصب (سلولهای بنیادی عصبی) سلولهایی چند توان هستند که دارای قابلیت خودنوزایی بوده و میتوانند سلول های اصلی سیستم عصبی مرکزی، یعنی نورونها، گلیا ها را تولید کنند [۱].

اکتشاف سلولهای بنیادی عصبی ریشه در مطالعات تکوین عصبی بی مهرگان دارد [۲]. مطالعات اولیه منجر به جداسازی سلول های شبه بنیادی از سیستم عصبی مرکزی و محیطی جنین پستانداران گردید [۳-۷] . بعد از آن سلول های بنیادی از نقاط متفاوت جنین جدا شد (شکل۱-۱ الف). سپس سلول های بنیادی عصبی بالغ در دو ناحیه اصلی نورون زا در مغز بالغ : هیپوکامپ و ناحیه زیر بطنی[1] و نواحی غیر نورون زا شامل نخاع یافت شد [۸-۱۰] . سه مدل برای شرح سلول های بنیادی عصبی وجود دارد:

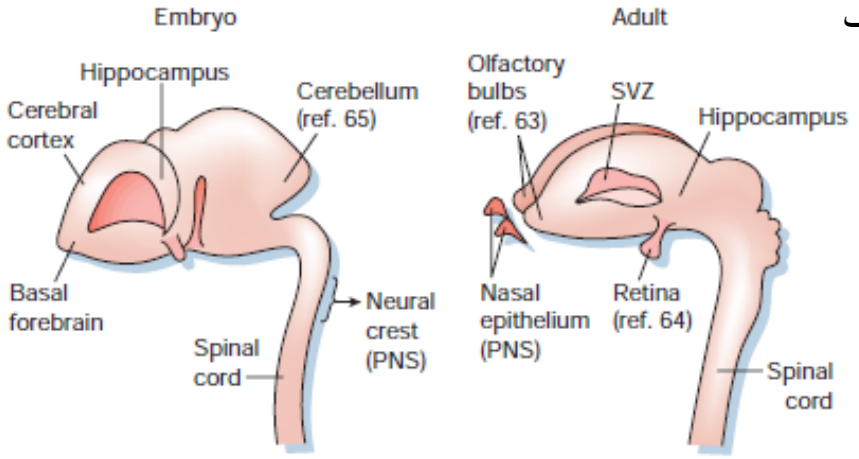
۱. همه سلول های صفحه عصبی[2] سلول های بنیادی هستند.
۲. سلول های بنیادی جمعیت کوچکی از سلول های صفحه عصبی را تشکیل میدهند که در آن توزیع شده است.
۳. سلول های بنیادی جمعیت کوچکی از سلول های صفحه عصبی را تشکیل میدهند که در نواحی ویژه ای مثل خط میانی یا لبه های کناری قرار گرفته اند (شکل۱-۱ ب) [۱۱]. پس سلول های پیش ساز عصب از صفحه ی عصبی منشا میگیرند.طی تکوین قسمتی از اکتودرم پشتی برای تبدیل شدن به صفحه عصبی تخصصی میشود که سلول های این ناحیه با ظاهر استوانه ای شکلشان از سلول های کناری قابل تشخیص هستند. به این ناحیه از جنین صفحه عصبی میگویند که به لوله ی عصبی[3] تبدیل میشود و سیستم عصبی مرکزی جنین را می سازد [۱۲].

1.Subventricular zone

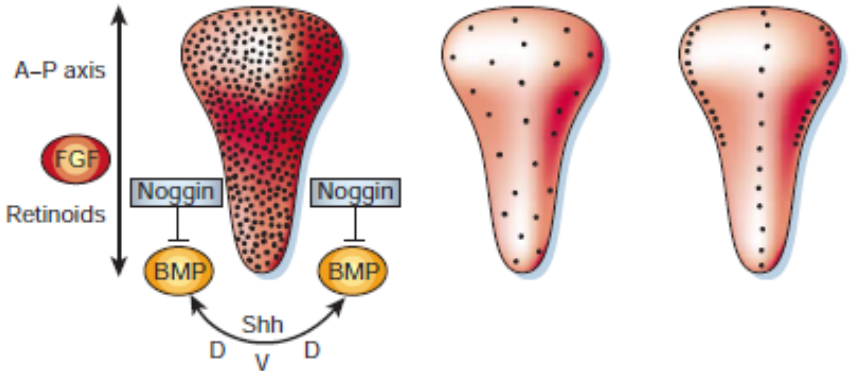
2.Neural plate

3.Neural tube

الف



ب

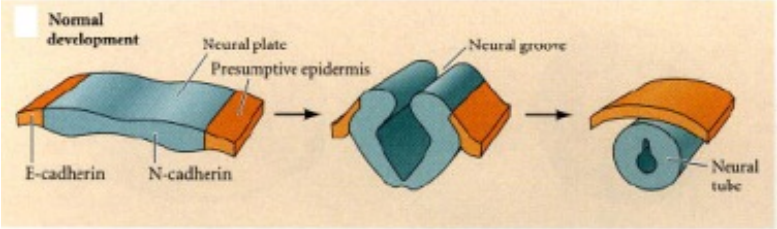


شکل ۱-۱. جداسازی سلول های بنیادی عصبی. الف) مناطق اصلی که سلول های بنیادی عصبی از سیستم عصبی مرکزی جنینی و بالغ جداسازی شد .ب) سه مدل که سلول های بنیادی را در صفحه عصبی مهره داران توضیح میدهد. فاکتور هایی مثل ناگین[۱]، رتینوئیک اسید[۲]، سونیک هجحاک[۳] که الگوی پشتی-شکمی و خلفی-قدامی را تععین میکنند ویژگی های موضعی این سلول های بنیادی را القا میکنند [۲] .

1.Noggin

2.Retinoic acid

3.Sonic hedehog



شکل ۱-۲. **تشکیل لوله ی عصبی**. سلول های صفحه ی عصبی با بیان کادهرین های نوع N از دیگر سلول های اکتودرم پشتی متمایز میشوند. سپس با چین خوردن از اکتودرم پشتی جدا شده و لوله ی عصبی را ایجاد میکند [۱۲].

۱-۱-۲ اهمیت و عملکرد سلول های پیش ساز عصب در تکوین و بلوغ

سلول های پیش ساز عصب در طی تکوین جنینی ویژگی های موضعی شان را از طریق القائاتی که از فاکتورهای مثل سونیک هجحاک [۱]، پروتئین ریخت زای استخوانی[۲]، فاکتور رشد فیبروبلاستی[۳] و رتینوییک اسید دریافت میکند به دست می آوردند. سپس این سلول ها به انواع مختلف نورون، آستروسایت و الیگودندروسایت های موجود در سیستم عصبی مرکزی تبدیل میشوند [۲].

در دوران بلوغ این سلول ها را در نواحی محدودی از سیستم عصبی مرکزی داریم که پیشتر به آن اشاره شد. سلول های پیش ساز عصب توانایی تکثیر و تمایز خود را در این نواحی تا دوران بلوغ حفظ میکنند و دارای نقش های عملکردی مهمی هستند، مثلا" در هیپوکامپ در ایجاد حافظه اهمیت دارند. سلول های پیش ساز موجود در ناحیه ی زیر بطنی تکثیر یافته و به بولب بویایی مهاجرت کرده و در آنجا به سلول های بالغ تمایز می یابند.

1.Sonic hedgehog

2.Bone morphogenic protein (BMP)

3.Fibroblast growth factor (FGF)

۱-۱-۳ اهمیت سلول های پیش ساز عصب در سلول درمانی

سلول درمانی فرایندی است که در آن سلول های جدیدی به منظور درمان یک بیماری به یک بافت معرفی می شود. سلول های پیش ساز عصب به عنوان منبع مهمی برای درمان بیماریهای عصبی که همراه با تخریب سلولی هستند [1] مطرح میباشند . (در جدول ۱-۱ بیماری های مهم سیستم عصبی همراه با سلول های آسیب دیده ذکر شده است).

جدول۱-۱بیماری های سیستم عصب

بیماری	علت بیماری	منبع
هانتینگتون	striatal medium spiny projection neurons	[۲]
پارکینسون	از بین رفتن سلول های دوپامین ساز در ناحیه سیاه مغز میانی	[۱۳]
آسیب های نخاعی	آسیب های ایجاد شده در اثر ضربه یا تصادف	[۲]
آسیب های وارد شده	آسیب های ایجاد شده در اثر ضربه یا تصادف	[۲]

1. *Neurodegenerative diseases*