بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای احسان عارفیان رشته ویروس شناسی پزشکی رساله دکتری خود را با عنوان: « بررسی نقش MicroRNA های ویروسی HSV-1 در کنترل فاکتورهای رونویسی تنظیم کننده ژنهای IE موثر در القـای خفتگی » در تاریخ ۱۳۹۰/۱۱/۱۷ 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 طراوت بامداد	
استاد مشاور	دکترمسعود سلیمانی	
استاد ناظر	دکترمهرداد روانشاد	
استاد ناظر	دکترسامان حسین خانی	
استاد ناظر	دکترهاتف سلمانیان	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکترحوریه سلیمانجاهی	

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 آئین‌نامه‌های 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 احسان عارفیان دانشجوی رشته ویروس‌شناسی پزشکی ورودی سال تحصیلی ۸۶ 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 ».

امضاء
تاریخ ۹۱/۳/۲۳

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 ویروس‌شناسی پزشکی است که در سال ۱۳۹۰ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکتر طراوت بامداد ، مشاوره دکتر مسعود سلیمانی 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 ٥ : 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 احسان عارفیان دانشجوی رشته ویروس‌شناسی پزشکی مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته ویروس شناسی پزشکی

عنوان

بررسی نقش MicroRNAهای ویروسی HSV-1 در کنترل فاکتورهای رونویسی تنظیم کننده ژنهای IE موثردر القای خفتگی

نگارش

احسان عارفیان

استاد راهنما

دکتر طراوت بامداد

استاد مشاور

دکتر مسعود سلیمانی

زمستان ۱۳۹۰

تقدیم به :

همسرم به خاطر همه آنچه که بود و

نبودم...

تشکر و قدردانی

در مسیر انجام این پژوهش همواره از راهنمایی ها و کمک های علمی و عملی اساتید بزرگوارم **سرکار خانم دکتر طراوت بامداد** و **آقای دکتر مسعود سلیمانی** برخوردار بوده ام که لازم می دانم از بذل توجه ایشان کمال تشکر را داشته باشم .

از راهنمایی‌ها و مشاورت علمی و دلسوزانه و مساعدت عملی **سرکار خانم دکترحوریه سلیمانجاهی، آقای دکتر امیدرضا فریدانی، آقای دکتر کیهان آزادمنش، آقای دکتر مهرداد روانشاد، آقای دکتر محسن کریمی، آقای دکتر سیامک سمیعی و سرکار خانم دکتر فرزانه صباحی** در مسیر انجام این پایان نامه تشکر می کنم .

همچنین از **آقای دکتر هاتف سلمانیان و دکتر سامان حسین‌خانی** به خاطر راهنمایی ها و قبول زحمت داوری این پایان نامه کمال تشکر را دارم.

در مسیر انجام این پایان نامه همواره از همکاری علمی و پژوهشی دوستان عزیزم آقایان: **یوسف قیصری، امیر آتشی، حمید آقایی بختیاری، محمود نادری، ناصر احمدبیگی، علی فلاح، جعفر کیانی، احسان فراشاهی، علی رحیمیان مشهدی، سید محمد علی شریعتی، سید محمود هاشمی، پرویز فلاح، بهزاد خوانساری‌نژاد، علی تیموری و خانم ها : زهرا مبرا، آتنا حجاری‌زاده، منصوره برزگر، هاجر استیری، فاطمه جمشیدی، لیدا لنگرودی، مرضیه عطار، طیبه هاشمپور و فریده معتمدی** بهره مند بوده‌ام بدین وسیله از تمامی این عزیزان تشکر می نمایم .

و در نهایت لازم می دانم از حسن نظر و همکاری صمیمانه کلیه پرسنل و مدیریت مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته و کارشناسان بخش ویروس شناسی دانشگاه تربیت مدرس کمال تشکر را داشته باشم .

بخشی از این پایان‌نامه در مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته و با حمایت مالی آن مرکز انجام شده‌است که بدین‌وسیله از همکاری این مرکز کمال تشکر را دارد.

چکیده

یکی از ویژگی‌های ویروس HSV-1 توانایی آن در خفته شدن در میزبان برای تمام طول زندگی میزبان و عودهای وقت و بی‌وقت عفونت است. طی فرایند خفتگی ژن‌های فاز لیتیک بیان نمی‌شوند و در عوض ترانسکریپت LAT به همراه DNA ویروس قابل شناسایی است. پس از ساخته‌شدن LAT طی فرایند اسپلایسینگ تعدادی ترانسکریپت کوچک‌تر به همراه اینترون‌های وابسته در هسته مجتمع می‌گردد. خاموش شدن ژن‌های آلفا عامل اصلی ایجاد خفتگی است. ژن‌های آلفا دارای پروموترهایی هستند که توسط فاکتورهای رونویسی این پروموترها فعال می‌گردند و در عدم حضور آن‌ها پروموتر خاموش می‌شود. این کمپلکس فعال ساز پروموتر متشکل از پروتئین ویروسی VP16 و پروتئین‌های سلولی HCF، Oct1، SP1 و GABP می‌باشد. ترانسکریپت LAT در سلول‌های نورونی، پیش‌ساز miRNAهای ویروسی miR-H2، miR-H3، miR-H4، miR-H5، miR-H7 و miR-H8 است که قادرند در سطح بعد از رونویسی بیان ژن‌ها را تنظیم نمایند. در این پژوهش با مطالعات مبتنی بر بیوانفورماتیک نشان داده‌شد که دو ژن Sp1 و HCF-1 از اعضای کمپلکس رونویسی مذکور توسط miRNAهای مشتق از LAT مهار می‌شوند. در ادامه پژوهش با بررسی میزان mRNAی دو ژن مذکور با Real Time PCR همچنین بررسی میزان لوسیفراز متاثر از هدف گیری 3'UTR ژن‌های Sp1 و HCF-1 در آزمون سنجش میزان لوسیفراز و تغییرات پروتئینی Sp1 و HCF-1 در وسترن بلات مشخص شد که دو پروتئین Sp1 و HCF-1 تحت تاثیر بیان miRNAهای مشتق از LAT مهار می‌گردند. علاوه بر این اثرات کاهش این دو فاکتور رونویسی در اثر بیان miRNAهای LATویروس HSV-1 در سلولهای BE-2(c) نیز بررسی شد و مشخص شد در اثر کاهش این دو فاکتور رونویسی سرعت تکثیر در سلول‌های نوروبلاستومای انسانی کاهش یافته و همچنین بیان ژن‌های خاموش کننده تومور و کنترل کننده سیکل سلولی همانند EP300، P15، RBl1 و RBl2 افزایش می‌یابد. از سویی دیگر بیان ژن های فعال کننده سیکل سلولی مثل MAPK-1 و CyclinA2 کاهش می‌یابد.

واژگان کلیدی: ویروس هرپس سیمپلکس، microRNAها، پروتئین Sp1، پروتئین HCF-1، خفتگی ویروس

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱.ویروس هرپس سیمپلکس یک ۲

۱-۱-۱.ساختار ویروس ۲

۱-۱-۲.طبقه بندی ویروس ۳

۱-۱-۳.عفونت زایی هرپس سیمپلکس ۳

۱-۱-۳-۱. بیماری گلو و دهان ٤

۱-۱-۳-۲. بیماری تناسلی ٤

۱-۱-۳-۳. عفونت‌های نوزادی ٥

۱-۱-۳-٤. کراتیت هرپسی ٦

۱-۱-۳-٥. عفونتهای پوستی ٦

۱-۱-۳-٦. عفونت سیستم عصبی مرکزی ٦

۱-۱-٤. اپیدمیولوژی ٦

۱-۱-٥. چرخه زیستی ویروس ۷

۱-۱-٦. مکانیسم فعالیت ژنهای آلفا در فاز لیتیک ویروس ۸

۱-۱-٦-۱. پروتئین تگومنت VP16 ..... ۹

۱-۱-٦-۲. پروتئین فاکتور سلول میزبانی HCF ۱۰

۱-۱-٦-۳. پروتئین فاکتور رونویسی Oct1 ..... ۱۱

۱-۱-٦-٤. پروتئین فاکتور رونویسی GA binding ۱۱

۱-۱-٦-٥. پروتئین فاکتور رونویسی Sp1 ..... ۱۲

۱-۱-۷. خفتگی ویروس ۱۳

۱-۱-۸. عود ویروس ۱۵
۱-۲. زیست شناسی microRNA ها ۱۶
۱-۲-۳.بیوسنتز و مکانیزم عمل میکروRNA ۱۸
۱-۲-٤.مقایسه میکرو RNA با RNA کوچک مداخله گر ۲۰
۱-۲-۵.روش های شناسایی میکروRNA ها ۲۲
۱-۲-۵-۱.کلونینگ مستقیم ۲۲
۱-۲-۵-۲. جستجوی ژنوم با استفاده از رایانه ۲۲
۱-۲-۵-۳. جستجوی میکروRNA ها با استفاده از تکنیک میکرو اری در گونه های مختلف ۲۳
۱-۲-۵-٤. ساخت miRNA به صورت آزمایشگاهی و هدف قرار دادن توالی‌های شناخته شده ژن ۲٤
۱-۳. RNAهای غیر کد کننده کوچک ویروس HSV-1 ..... ۲٤
فصل دوم: مواد و روش‌ها ۲٦
۲-۱.سوال‌های اصلی تحقیق ۲۷
۲-۱-۱.فرضیه‌ها ۲۷
۲-۱-۲.هدف اصلی ۲۷
۲-۱-۳.اهداف فرعی ۲۸
۲-۲. مواد، وسایل و دستگاه های استفاده شده در کل پروژه ۲۸
۲-۲-۱.آنزیم ها ۲۸
۲-۲-۱-۱.برای انجام PCR و RT-PCR و Real Time PCR ۲۸
۲-۲-۱-۲.برای کلون کردن قطعه و تایید وکتور ۲۸
۲-۲-۲.بافرها ۲۸
۲-۲-۳.محیط های کشت ۲۹
۲-۲-۳-۱.محیط کشت و ذخیره سازی باکتری ۲۹
۲-۲-۳-۲.محیط های کشت سلولی ۳۰

۲-۲-٤.آنتی بیوتیک ها ۳۰
۲-۲-۵.پلاسمیدها ۳۰
۲-۲-٦.کیت ها ۳۱
۲-۲-۷.سلول ها ۳۱
۲-۲-۷-۱.سلول های یوکاریوتی ۳۱
۲-۲-۷-۲.سلول های پروکاریوتی ۳۱
۲-۲-۸.سایر مواد ۳۲
۲-۲-۹.وسایل ۳۲
۲-۲-۱۰.دستگاه ها ۳۲
۲-۳.روش ها ۳۲
۲-۳-۱. مطالعات بیوانفورماتیک ۳٤
۲-۳-۱-۱. جستجوی هیبریدهای تمام قد متصل بین miRNAs-mRNAs ۳٤
۲-۳-۱-۲. جستجوی هیبریدهای miRNAs-mRNAs بر اساس اصول اتصال miRNAها ۳۵
۲-۳-۲.سازه ژنی محتوی ژن LAT ۳۷
۲-۳-۲-۱. تهیه سازه ژنی محتوی ژنLAT ۳۷
۲-۳-۲-۲.تکثیر پلاسمیدها ۳۸
۲-۳-۲-۳.تهیه باکتری مستعد شده برای واکنش الکتریکی ۳۸
۲-۳-۲-٤.انتقال الکتریکی پلاسمید ها به باکتری ۳۹
۲-۳-۲-۵.تخلیص پلاسمیدها ٤۰
۲-۳-۲-٦.الکتروفورز پلاسمید تخلیص شده بر روی ژل آگارز ٤۱
۲-۳-۲-۷.ارزیابی کمی میزان پلاسمید ها ٤۱
۲-۳-۲-۸. تایید سازه با هضم آنزیمی pcDNA3-LAT ٤۱
۲-۳-۳ کشت سلول یوکاریوت ٤۳

۲-۳-۳-۱. لاین سلولی HEK293 ..... ٤٣
۲-۳-۳-۲. آماده سازی سلول ها ٤٤
۲-۳-۳-۳. کشت مجدد یاخته ٤٤
۲-۳-۳-٤. انجماد یاخته ها ٤٥
۲-۳-۳-٥.پاساژ یاخته های منجمد ٤٥
۲-۳-٤. ترانسفکشن سلول یوکاریوت ٤٦
۲-۳-٤-۱.ترانسفکشن به روش لیپوفکتامین ٤٦
۲-۳-٤-۲.ترانسفکشن به روش کلسیم فسفات ٤٦
۲-۳-٥.استخراج Total RNA ٤٨
۲-۳-٥-۱.مواد مورد نیاز ٤٨
۲-۳-٥-۲.روش کار ٤٨
۲-۳-٥-۳. کنترل کیفیت استخراج ٤٩
۲-۳-٦.بررسی بیان pcDNA3-LAT ٥٠
۲-۳-٦-۱.انجام واکنش RT-PCR ٥٠
۲-۳-٦-۲.سنجش بیان میکروRNAها به کمک Real Time PCR ٦٠
۲-۳-۷. آنالیزبیان ژنهای هدف microRNAها با Real Time PCR ٦٥
۲-۳-۷-۱.Real time PCR ٦٥
۲-۳-۸.بررسی هدف گیری پروتئین‌های هدف با سنجش لوسیفراز ۷۱
۲-۳-۸-۱. PCR ناحیه 3’UTR ژنهای Sp1 و HCF1 ..... ۷۲
۲-۳-۸-۲.ارزیابی محصولات PCR قطعات Sp1و HCF1 ..... ۷۳
۲-۳-۸-۳.استخراج DNA از ژل ۷٤
۲-۳-۸-٤.کلونینگ محصول PCR به داخلTA vector ۷٦
۲-۳-۸-٥.ترانسفورماسیون به روش شیمیایی ۷۷

۲-۳-۸-۷. استخراج پلاسمید pJET-Sp1/HCF1 ..... ۸۰
۲-۳-۸-۸.تایید فرایند کلونینگ با هضم آنزیمی پلاسمیدها ۸۲
۲-۳-۸-۹.هضم آنزیمی پلاسمیدهای pjet-Sp1 ، pjet-HCF1 و psiCheck-2 ..... ۸۳
۲-۳-۸-۱۰.اتصال آنزیمی قطعات Sp1 و HCF1 به psiCHEK-2 ..... ۸۳
۲-۳-۸-۱۱.انتقال به میزبان باکتریایی DH5α ۸٤
۲-۳-۸-۱۲. انجام Colony PCR برای تایید کلونینگ ۸٤
۲-۳-۸-۱۳.انجام هضم آنزیمی برای تایید کلونینگ ۸۵
۲-۳-۸-۱٤.تعیین توالی پلاسمید نوترکیب ۸۵
۲-۳-۸-۱۵.انجام آزمون لوسیفراز ۸۵
۲-۳-۹. بررسی بیان پروتئینهای HCF1 و SP1 با وسترن بلات ۸۷
۲-۳-۹-۱.تهیه محلول RIPA ۸۷
۲-۳-۹-۲. استخراج پروتئین تام سلولی ۸۸
۲-۳-۹-۳. غلظت‌سنجی پروتئین ۸۸
۲-۳-۹-٤.روش ساخت Blocking Buffer ۸۹
۲-۳-۹-۵. الکتروفورز با استفاده از ژل SDS-PAGE ۸۹
۲-۳-۹-٦.طرز تهیه بافر عمومی x ۵ ..... ۹۰
۲-۳-۹-۷. طرز تهیه بافر Running ۹۰
۲-۳-۹-۸. انتقال از ژل به غشاء PVDF ۹۳
۲-۳-۹-۹.روش تهیه بافر انتقال ۹۳
۲-۳-۹-۱۰.مهار واکنش زمینه ۹۵
۲-۳-۹-۱۱. روش ساخت بافر شستشو و محلول PBS-T ۹۵
۲-۳-۹-۱۲.انکوباسیون با آنتی‌بادی اولیه ۹۵
۲-۳-۹-۱۲.انکوباسیون با آنتی‌بادی ثانویه ۹٦

۲-۳-۹-۱۳.تشخیص سیگنال..... ۹۶
۲-۳-۹-۱٤.آنالیز نتایج با باند دنسیتومتر..... ۹۸
۲-۳-۱۰.بررسی بیان ژن‌های مرتبط با حوزه پایین دست Sp1 و HCF1..... ۹۸
۲-۳-۱۱.شمارش سلولی به وسیله لام نئوبار..... ۹۹
۲-۳-۱۲. بررسی تکثیر و حیات سلولی..... ۹۹
۲-٤. آنالیز آماری..... ۱۰۰
فصل سوم: نتایج و یافته‌ها..... ۱۰۱
۳-۱. نتایج مطالعات بیوانفورماتیک..... ۱۰۲
۳-۱-۱.پیش بینی هدف گیری ژن OCT1 با miRNAهای LAT..... ۱۰٤
۳-۱-۲. پیش بینی هدف گیری ژن VP16 با miRNAهای LAT..... ۱۰٤
۳-۱-۳. پیش بینی هدف گیری ژن HCF1 با miRNAهای LAT..... ۱۰۵
۳-۱-٤. پیش بینی هدف گیری ژن Sp1 با miRNAهای LAT..... ۱۰٦
۳-۱-۵. پیش بینی هدف گیری ژن GABP با miRNAهای LAT..... ۱۰۷
۳-۱-۵-۱. پیش بینی هدف گیری ژن GABPA با miRNAهای LAT..... ۱۰۷
۳-۱-۵-۲. پیش بینی هدف گیری ژن GABPB1 با miRNAهای LAT..... ۱۰۸
۳-۱-۵-۳. پیش بینی هدف گیری ژن GABPB1-V3,4 با miRNAهای LAT..... ۱۰۹
۳-۲. سازه مولد ژن LAT و microRNAهای مربوطه..... ۱۱۰
۳-۲-۱.تایید سازه محتوی ژن LAT، pcDNA3-LAT..... ۱۱۰
۳-۲-۲. بررسی بیان pcDNA3-LAT در داخل سلول HEK293T..... ۱۱۲
۳-۲-۲-۱.تایید بیان ترانسکریپت LAT با RT-PCR..... ۱۱۲
۳-۲-۲-۲. تایید بیان LAT با بررسی حضور miRNAهای LAT با Real Time PCR..... ۱۱۳
۳-۲-۳. بررسی اثر miRNAهای LAT بر روی سطح mRNAی دو ژن Sp1 و HCF1..... ۱۱٤
۳-۲-٤. تولید وکتورهای psiCHEK-Sp1 وpsiCHEK-HCF1..... ۱۱٦

۳-۲-٤-۱. تکثیر قطعات Sp1 و HCF1 ..... ۱۱٦
۳-۲-٤-۲. وارد کردن قطعات به داخل وکتور TA ۱۱۸
۳-۲-٤-۳. تایید کلنی‌های TA با هضم آنزیمی ۱۱۹
۳-۲-٤-٤. انتقال قطعات 3'UTR ژنهای Sp1 و HCF1 از وکتور TA به داخل وکتور psiCHEK .. ۱۲۰
۳-۲-٤-۵. تایید پلاسمیدهای psiCHEK با هضم آنزیمی و توالی‌یابی ۱۲۱
۳-۲-۵. آزمون لوسیفراز برای تایید هدف گیری ژنها توسط miRNAها ۱۲۲
۳-۲-٦. بررسی تغیرات پروتئین‌های Sp1 و HCF1 با وسترن بلات ۱۲۵
۳-۲-۷. مطالعه رفتار miRNAهای LAT در سلولهای نوروبلاستومای انسانی ۱۲۷
۳-۲-۷-۱. بررسی بیان microRNAهای LAT در BE2 (c) ۱۲۷
۳-۲-۷-۲. بررسی ژنهای پایین دست تنظیم Sp1 و HCF1 ..... ۱۲۸
۳-۲-۷-۳. بررسی تکثیر سلولی در حضور miRNAهای LAT ۱۳۰
۳-۲-۷-٤. بررسی تکثیر و وضعیت حیاتی سلولها با MTT ۱۳۱
فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱۳۳
٤-۱. بحث و نتیجه‌گیری ۱۳٤
فهرست منابع ۱٤٤
ضمائم ۱۵۱
ضمیمه الف ۱۵۲
چکیده انگلیسی ۱۵٤

فهرست جداول

جدول ۲-۱. مقادیر مورد استفاده جهت هضم آنزیمی‌پلاسمید pcDNA3-LAT با آنزیم BamHI.... ٤٢

جدول ۲-۲. مقادیر مورد استفاده جهت هضم آنزیمی پلاسمید pcDNA3-LAT با آنزیمXbaI و HindIII..... ٤٢

جدول۲-۳. مواد مورد نیاز برای هر واکنش پلی آدنیلاسیون..... ٦٠

جدول۲-٤. مواد مورد نیاز برای هر واکنش ساخت cDNA..... ٦١

جدول۲-٥. مواد مورد نیاز برای هر واکنش Real Time PCR..... ٦٣

جدول۲-٦. مواد واکنش Real time RT-PCR برای ژن ها..... ٦٩

جدول ۲-۷. برنامه Real Time PCR..... ٧٠

جدول ۲-۸. مقادیر مورد استفاده جهت انجام PCR قطعه 3UTR ژن Sp1..... ٧٢

جدول ۲-۹. مقادیر مورد استفاده جهت انجام PCR قطعه 3UTR ژن HCF1..... ٧٣

جدول ۲-۱۰. چرخه دمایی PCR قطعه HCF-1 و Sp1..... ٧٣

جدول۲-۱۱. مواد موجود در واکنش TA cloning..... ٧٧

جدول۲-۱۲. مقادیر مورد استفاده جهت انجام Colony PCR..... ٨٠

جدول۲-۱۳. چرخه دمایی انجام Colony PCR..... ٨٠

جدول ۲-۱٤. مقادیر مورد استفاده جهت هضم آنزیمی‌پلاسمید pjet-Sp1 و pjet-HCF1..... ٨٢

جدول۲-۱٥. مقادیر مورد استفاده جهت اتصال آنزیمی..... ٨٤

جدول۲-۱٦. مواد تشکیل دهنده ژل پایین..... ٩١

جدول۲-۱۷. مواد تشکیل دهنده ژل پایین..... ٩٢

جدول۳-۱. نتایج بررسی هدف گیری ژن OCT1 با miRNAهای LAT دو نرم‌افزار RNA22 و Targetscan..... ١٠٤

جدول۳-۲. نتایج بررسی هدف گیری ژن VP16 با miRNAهای LAT دو نرم‌افزار RNA22 و Targetscan ۱۰۵
جدول۳-۳. نتایج بررسی هدف گیری ژن HCF1 با miRNAهای LAT دو نرم‌افزار RNA22 و Targetscan ۱۰۶
جدول۳-٤. نتایج بررسی هدف گیری ژن Sp1 با miRNAهای LAT دو نرم‌افزار RNA22 و Targetscan ۱۰۷
جدول۳-۵. نتایج بررسی هدف گیری ژن GABPA با miRNAهای LAT دو نرم‌افزار RNA22 و Targetscan ۱۰۸
جدول۳-٦. نتایج بررسی هدف گیری ژن GABPB1-V1,2 با miRNAهای LAT دو نرم‌افزار RNA22 و Targetscan ۱۰۹
جدول۳-۷. نتایج بررسی هدف گیری ژن GABPB1-V1,2 با miRNAهای LAT دو نرم‌افزار RNA22 و Targetscan ۱۱۰
جدول ۳-۸. پرایمرهای تقاطع اگزونی برای تمایز ترانسکریپت LAT از ژن LAT ۱۱۲
جدول ۳-۹. پرایمرهای مخصوص RealTime PCR نسبی بیان miRNAهای تولید شده توسط LAT ۱۱۳
جدول ۳-۱۰. پرایمرهای مخصوص RealTime PCR نسبی ۱۱۵
جدول ۳-۱۱. پرایمرهای لازم برای PCR و کلون دو قطعه Sp1 وHCF1 به همراه پرایمرهای لازم برای توالی‌یابی هر ژن ۱۱٦
جدول۳-۱۲. لیست گروههای به کار رفته در آزمون لوسیفراز برای ژنSp1 ۱۲۳
جدول۳-۱۳. لیست گروههای به کار رفته در آزمون لوسیفراز برای ژنHCF1 ۱۲۳
جدول۳-۱٤. پرایمرهای تنظیم چرخه سلولی ۱۲۹

فهرست شکل‌ها

شکل۱-۱. فاکتورهای رونویسی سلولی و ویروسی بر روی پروموتر ژنهای IE تشکیل یک کمپلکس واحدی می‌دهند که فرایند رونویسی را تحت کنترل قرار میدهد..... ۹

شکل۱-۲.بیوسنتز و مکانیزم عمل میکرو RNA..... ۱۷

شکل ۱-۳.انواع مهار ژن توسط میکروRNA..... ۱۹

شکل۱-٤. ناحیه LAT مولد ٦ miRNA است که در شکل جایگاه آنها نشان داده شده است..... ۲۵

شکل ۲-۱. نقشه پلاسمیدهای psiCHECK-2 و pcDNA3.1..... ۳۰

شکل ۲-۲: واکنش PCR در تئوری و عمل..... ٦۷

شکل ۲-۳ :منحنی Real time PCR دو نمونه مختلف..... ٦۸

شکل۳-۱.هضم آنزیمی وکتورpcDNA3-LAT با BamHI ۱۱۱

شکل۳-۲.هضم آنزیمی وکتورpcDNA3-LAT با XbaI و HindIII..... ۱۱۱

شکل ۳-۳. RT-PCR ترانسکریپت LAT ترانسفکت شده به سلولهای HEK293T..... ۱۱۲

شکل ۳-٤. گرادیان دمایی برای بهینه سازی PCR ژن Sp1 ..... ۱۱۷

شکل۳-۵. PCR الکتروفورز دوقطعه ژنیSp1 و HCF-1..... ۱۱۸

شکل۳-٦. PCR کلنیهای SP1 و HCF1..... ۱۱۹

۳-۷. هضم وکتورهای TA-Sp1 و TA-HCF1 با دو آنزیم XhoI/ Not1..... ۱۲۰

شکل۳-۸. PCRکلنی برای غربالگری کلنی ها برای هر قطعه..... ۱۲۱

شکل ۳-۹. هضم وکتورهای psiCHEK-Sp1 و psiCHEK-HCF1..... ۱۲۲

شکل۳-۱۰. تصویر وسترن‌بلات برای دو گروه pcDNA3 و pcDNA3-LAT برای سه پروتئین Sp1، HCF1 و β -actin..... ۱۲٦

شکل ۳-۱۱. شمایی از نرم افزار TotalLab V1.1..... ۱۲٦

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱: نتایج Real Time PCR نسبی بیان miRNAهای تولید شده توسط LAT..... ۱۱٤
نمودار ۳-۲. نتایج Real Time PCR نسبی بیان ژنهای Sp1 و HCF1..... ۱۱۵
نمودار ۳-۳. نسبت لومینسانس رنیلای تابیده شده در گروه LAT-Sp1 به فایر فلای همان گروه... ۱۲٤
نمودار ۳-٤. نسبت لومینسانس رنیلای تابیده شده در گروه LAT-HCF1 به فایر فلای همان گروه
..... ۱۲۵
نمودار۳-۵. چگالی نسبی باندهای وسترن بلات..... ۱۲۷
نمودار۳-٦. میزان بیان microRNAهای مشتق از LAT..... ۱۲۸
نمودار۳-۷. بیان ژنهای تنظیم کننده سلولی در سلولهای متاثر از miRNAهای LAT..... ۱۳۰
نمودار۳-۸. شمارش سلولی..... ۱۳۱
نمودار۳-۹. نتایج آزمون MTT برای سنجش وضعیت تکثیر و وضعیت حیاتی سلول‌ها..... ۱۳۲