وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

پایان نامه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی

بررسی اثر بیان ژن SOX2 در دگرتمایز سلول های رنگدانه دار شبکیه (RPE) به سلول های عصبی شبکیه

نگارش

انسیه درباری

استاد راهنما

دکتر زهرا سهیلا سهیلی

استاد مشاور:

حبیب رضانژاد بردجی

بهمن ۹۱

بسم الله الرحمن الرحيم

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

پایان نامه کارشناسی ارشد
رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی

بررسی اثر بیش بیان ژن SOX2 در

دگر تمایز سلول های رنگدانه دار شبکیه (RPE) به سلول های عصبی شبکیه

نگارش

انسیه درباری

استاد راهنما
دکتر زهرا سهیلا سهیلی

استاد مشاور
حبیب رضا نژاد

بهمن ۹۱

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

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی اثر بیش بیان ژن SOX2 در

دگر تمایز سلول های رنگدانه دار شبکیه (RPE) به سلول های عصبی شبکیه

نگارش

انسیه درباری

این پایان نامه در تاریخ ۹۱/۱۱/۲۵ توسط کمیته داوران مورد تایید قرار گرفت و با نمره ۱۹/۸ ارزیابی شد.

استاد راهنما:
زهرا سهیلا سهیلی

استاد مشاور:
حبیب رضانژاد

هیئت داوران محترم:
دکتر علیرضا زمردی پور
دکتر آزیتا پروانه تفرشی
مدیریت اداره تحصیلات تکمیلی:

:

با سپاس از سه وجود مقدس:

آنان که ناتوان شدند تا ما به توانایی برسیم...

موهایشان سفید شد تا ما روسفید شویم...

و عاشقانه سوختند تا گرما بخش وجود ما و روشنگر راهمان باشند...

پدرانمان

مادرانمان

استادانمان

به پاس تعبیر عظیم و انسانیشان از کلمه ایثار و از خود گذشتگی

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش 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 در یغشان که هرگز فرو کش نمی کند

این مجموعه را به پدر و مادر عزیزم تقدیم می کنم.

هم چنین تشکر و سپاس می کنم از :

استاد گرامیم سرکار خانم دکتر زهرا سهیلا سهیلی که بدون راهنمایی های ایشان، تامین این پایان نامه بسیار مشکل بود.

استاد مشاورم جناب آقای حبیب رضانژاد که با یاری ها و راهنمایی های بی چشم داشت ایشان بسیاری از سختی هارا برایم آسان تر نمودند.

جناب آقای دکتر شهرام سمیعی که همواره حمایت های ایشان پشتیبان اینجانب در به اتمام رسیدن این پایان نامه بود.

دوستان عزیزم که در طول این پایان نامه همواره در کنارم بودند.

و در نهایت تشکر می کنم از خواهر و برادرم که در طول این پایان نامه همواره پشیبان و مشوقم بودند.

چکیده فارسی:

هدف:

سلول های اپی تلیالی رنگدانه دار شبکیه (RPE[1]) یک لایه سلول رنگدانه دار در درونی ترین لایه شبکیه تشکیل می دهند. این سلول ها توانایی باز برنامه نویسی و در نتیجه تولید سلول های پیش ساز شبکیه را دارند. SOX2 یک فاکتور رونیسی و یک مارکر مهم برای سلول های پیش ساز عصبی و سلول های بنیادی می باشد و سبب حفظ خاصیت پر توانی سلول های بنیادی می شود.

هدف از این مطالعه تولید سلول های پیش ساز عصبی به وسیله بیش بیان ژن SOX2 در سلول های RPE بوده است.

مواد و روش ها: سلول های RPE از کره چشم انسان جدا شده و در محیط DMEM/F12 همراه با ۲۰٪ از FBS کشت داده شدند، در پاساژهای بعدی این سلول ها در محیط DMEM/F12 همراه با ۱۰٪ FBS کشت داده می شدند. ژن SOX2 در وکتور لنتی ویروسی pLEX-MCS کلون گردید و به وسیله هضم آنزیمی، PCR و تعیین توالی، صحت کلونینگ مورد تایید قرار گرفت. وکتور pLEX-MCS SOX2 به همراه وکتورهای کمکی با روش کلسیم فسفات به سلول های HEK293T ترنسفکت گردید. این سلول ها ویروس را به محیط آزاد کرده و ویرس ها از محیط جمع آوری گردیدند. سلول های RPE با این ویروس ها آلوده گشته و پس از ۹۶ ساعت با آنتی بیوتیک پرومایسین با غلظت µg/mL ۰/۷ مورد تیمار قرار گرفتند. پس از ۷۲ ساعت سلول های آلوده گشته زنده مانند. بیان مارکرهای سلول های پروژنیتور مانند PAX6، CHX10، SOX2، Nestin و هم چنین مارکرهای سلول های عصبی شبکیه مانند Rhodopsin و Thy1 توسط روش های ICC و Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

نتیجه گیری: بیان قوی مارکرهای PAX6، CHX10، SOX2، Nestin به عنوان مارکرهای پروژنیتوری و هم چنین بیان مارکرهای Rhodopsin و Thy1 به عنوان مارکرهای سلول های عصبی شبکیه مشاهده

[1] Retinal Pigment Epithelium

گردید. این نتایج نشان می دهد که بیش بیان ژن SOX2 موجب باز برنامه نویسی و دگر تمایز سلول های RPE به سمت سولهای بنیادین و پروژنیتوری شبکیه می گردد.

کلید واژه: سلول های RPE، SOX2، باز برنامه نویسی، دگر تمایز

فهرست کلی

فصل اول: مقدمه ۱
فصل دوم: بررسی منابع ۲۷
فصل سوم: مواد و روش ها ۳۱
فصل چهارم: نتایج ۶۸
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری و پیشنهادات ۱۰۶
منابع ۱۱۲

فهرست تفصیلی

فصل اول ۱

۱-۱- چشم ۲

۱-۱-۱.لایه خارجی ۲

۱-۱-۱-۱.صلبیه ۲

۱-۱-۱-۲.قرنیه : ۳

۱-۱-۲. لایه میانی (عروقی): ۳

۱-۱-۲-۱. مشمیه: ۳

۱-۱-۲-۲. اجسام مژگانی: ۳

۱-۱-۲-۳. عنبیه ۴

۱-۱-۳.لایه داخلی ۴

۱-۲. شبکیه: ۴

۱-۲-۱. لکه زرد ۵

۱-۲-۲. سلولهایRPE ۵

۱-۲-۲-۱. مارکرهای سلولهای RPE ۸

۱-۲-۲-۱-۱.RPE 65 ..... ۸

۱-۲-۲-۱-۲. سیتوکراتین ۹

۱-۲-۳. سلولهای گانگلیون (RGC) ۱۰

۱-۲-۳-۱. Thy1 ..... ۱۱

۱-۲-۴. سلول های دوقطبی: ۱۲

۱-۲-۵. سلولهای گیرنده نوری ۱۲

۱-۲-۵-۱. Rho ۱۳

۱-۲-۶. بیماری های شبکیه ۱۴

۱-۲-۶-۱. AMD ۱۴

۱-۲-۶-۲. بیماری RP ۱۵
۱-۳. سلول های پرتوان القایی ۱۶
۱-۳-۱. مارکرهای سلولهای پرتوان القایی ۱۶
۱-۳-۱-۱. SOX2 ..... ۱۷
۱-۳-۱-۲. PAX6 ..... ۱۸
۱-۳-۱-۳. CHX10 ..... ۱۸
۱-۳-۱-۴. Nestin ۱۹
۱-۴. ژن درمانی ۱۹
۱-۴-۱. روشهای غیر ویروسی ۱۹
۱-۴-۲. روشهای ویروسی ۲۰
۱-۵. ناقل های لنتی ویروسی ۲۰
۱-۶. ساختار لنتی ویروس ۲۰
۱-۷. ساختار ژنومی لنتی ویروسها ۲۱
۱-۸. چرخه زندگی ویروسها ۲۳
۱-۹. ساختار ناقل های لنتی ویروسی ۲۴
۱-۱۰. تولید لنتی ویروسهای نوترکیب ۲۶
فصل دوم: ۲۷
فصل سوم: ۳۱
۳-۱ محلول ها : ۳۲
۳-۱-۱ بافر Phosphate Buffered Saline 10X (PBS) ۳۲
۳-۱-۲ Fetal Bovine Serum (FBS) ۳۲
۳-۱-۳. Trypsin / EDTA ۳۲
۳-۱-۴ DMEM/F12 (Sigma, Germany) ۳۳
۳-۱-۵. آنزیم دیسپاز(Dispase: 1.1 u/ml), (Gibco, Germany) ۳۳

۳-۱-۶. فانگوزین ۳۴
۳-۱-۷. محلول های لازم برای استخراج Maxiprep: ۳۴
۳-۱-۷-۱. GTE ۳۴
۳-۱-۷-۲. Lysozyme ۳۴
۳-۱-۷-۳. NaOH/SDS ۳۴
۳-۱-۷-۴. KAc 3 M/HCOOH 1.8 M ۳۴
۳-۱-۷-۵. PEG 40 % ۳۴
۳-۱-۷-۶. PEG/LiCl ۳۵
۳-۱-۷-۷. 5T.1E ۳۵
۳-۱-۷-۸. NH_4Ac 7.5 M ۳۵
۳-۱-۸-۱. بافر فسفات با pH = 6.8 ..... ۳۵
۳-۱-۸-۲. NaOH 1 N ۳۵
۳-۱-۸-۳. HBS 10X ۳۶
۳-۱-۸-۴. $CaCl_2$ 2 M ۳۶
۳-۲ تشریح چشم ۳۶
۳-۲-۱ تعویض محیط کشت ۳۷
۳-۲-۲ پاساژ سلولی (Subculturing) ۳۷
۳-۲-۳ فریز کردن سلول ها ۳۸
۳-۲-۴. باز کردن سلول ها از نمونه های فریز شده ۳۹
۳-۲-۵. شمارش سلولی ۳۹
۳-۲-۵-۱ طرز تهیه رنگ مخصوص رنگ آمیزی سلول ها ۴۰
۳-۳. کلونینگ ژن SOX2 در وکتور pLEX-MCS : ۴۱
۳-۳-۱. ترنسفرم ژن SOX2 به باکتری E. coli DH5α ۴۱
۳-۳-۲. استخراج Miniprep از پلاسمید ۴۲

۳-۳-۲-۱. سنجش پلاسمید استخراج شده ۴۴
۳-۳-۳ . هضم آنزیمی از پلاسمید استخراج شده ۴۵
۳-۳-۴. recovery از محصول PCR ۴۶
۳-۳-۵. هضم آنزیمی از وکتور pLEX-MCS ۴۷
۳-۳-۶. recovery از محصول هضم آنزیمی ۴۸
۳-۳-۷. ligation ۴۸
۳-۳-۸ ترنسفرم محصول ligation به باکتری مستعد ۴۸
۳-۳-۹ . colony PCR ۴۹
۳-۳-۱۰- استخراج Miniprep ۴۹
۳-۳-۱۱- مراحل تاییدی پلاسمید کلون شده ۵۱
۳-۳-۱۱-۱. PCR از پلاسمید ۵۱
۳-۳-۱۱-۲. هضم آنزیمی از پلاسمید ۵۱
۳-۳-۱۱-۲. تعیین توالی پلاسمید ۵۱
۳-۳-۱۲-تهیه استوک از باکتری کلون شده ۵۱
۳-۳-۱۱- استخراج Maxiprep از پلاسمید کلون شده ۵۱
۳-۳-۱۱-۱. سنجش پلاسمید استخراج شده ۵۲
۳-۴. ترنسفکت به سلولهای HEK293T به روش کلسیم فسفات ۵۲
۳-۴-۱. کشت سلول های HEK293T ۵۲
۳-۴-۳. وکتورهای مورد نیاز ۵۳
۳-۴-۴. ترنسفکت سلول های HEK293T ۵۵
۳-۴-۵. بررسی ترنسفکشن ۵۵
۳-۵. جمع آوری ویروس ۵۵
۳-۶. بررسی بیان وکتور pLEX-MCS SOX2 ..... ۵۶
۳-۶-۱. سنتز cDNA ۵۶

Conventional RT- PCR.۲-۶-۳. ..... ۵۷
۳-۷. تغلیظ ویروس های جمع آوری شده ۵۸
۳-۸. تست MTT ۵۹
۳-۹. آلوده سازی سلولهای RPE با ویروس های تشکیل شده ۶۰
۳-۱۰. استخراج RNA با استفاده از کیت QiAZOL ۶۰
۳-۱۰-۱. سنجش RNA استخراج شده ۶۱
۳-۱۱۰. طراحی پرایمر ۶۲
۳-۱۲. Real Time PCR ۶۳
۳-۱۲-۱. سنتزcDNA: ۶۳
۳-۱۲-۲. آنالیز داده ها ۶۴
۳-۱۳. تست ایمونو سیتو شیمی (ICC) ۶۵
فصل چهارم: ۶۸
۴-۱. نتایج حاصل از کلونینگ ۶۹
۴-۱-۱. ترنسفرم وکتور PCR2.1 SOX2 ..... ۶۹
۴-۱-۲. recovery از ژن SOX2 ..... ۷۰
۴-۱-۳. recovery وکتور pLEX-MCS ۷۱
۴-۱-۴. ligation ۷۲
۴-۱-۵.تست های تاییدی: ۷۳
۴-۱-۵-۱. PCR از پلاسمید استخراج شده ۷۴
۴-۱-۵-۲ هضم آنزیمی از پلاسمید استخراج یافته ۷۵
۴-۱-۵-۳. تعیین توالی ۷۶
۴-۱-۶. استخراج Maxiprep از پلاسمید کلون شده ۷۷
۴-۲. ترنسفکت سلولهای HEK293T ۷۷
۴-۳. تایید بیان SOX2 در وکتور: ۷۸

۴-۴. ICC از سلول های RPE ۷۹
۴-۵. تعیین غلظت آنتی بیوتیک پرومایسین ۸۰
۴-۵. آلوده سازی سلول های RPE با استفاده از ویروس های ساخته شده ۸۱
۴-۶. بررسی تغییرات مورفولوژی در سلول های RPE ۸۱
۴-۸. نتایج حاصل از استخراج RNA ۸۴
۴-۱۰. پاساژ سلول های آلوده شده با ویروس ۸۵
۴-۱۱. استخراج RNA از سلول های آلوده شده با وکتور pLEX-MCS-SOX2 ..... ۸۵
۴-۹. Real Time PCR ۸۶
۴-۱۲. ICC از سلول های آلوده شده..... ۹۷
۴-۱۳. ICC از سلول های آلوده شده با وکتور ۱۰۳
۴-۱۴. ICC از سلول های RPE بدون نیمار ۱۰۴
بحث و نتیجه گیری و پیشنهادات ۱۰۶
پیشنهادات: ۱۰۱
منابع ۱۰۲

فهرست جدول ها:

جدول ۳-۱. پروفایل دمایی برای SOX2 PCR ۴۶

جدول ۳-۲. نسبت وکتور های ترنسفکشن ۵۵

جدول ۳-۳. محلول ترنسفکشن ۵۵

جدول ۳-۴ : میکس اولیه تهیه شده برای سنتز CDNA ۵۶

جدول ۳-۵ : میکس ثانویه تهیه شده برای سنتز CDNA ۵۷

جدول ۳-۶: مواد لازم جهت انجام Conventional PCR ۵۷

جدول ۳-۷. برنامه دمایی conventional PCR..... ۵۸

جدول ۳-۸. میکس اولیه تهیه شده برای سنتز CDNA ۶۳

جدول ۳-۹. میکس ثانویه تهیه شده برای سنتز CDNA ۶۳

جدول۳-۱۰. آنتی بادی های ثانویه و اولیه ۶۷

جدول ۴-۱. کار آیی پرایمر های Real Time PCR ۸۶

جدول ۴-۲. درصد بیان مارکرها RPE اینفکت شده با وکتور pLEX-MCSSOX2.....۹۷

جدول۴-۳. درصد بیان مارکرهایه در RPE آلوده شده با وکتور..... ۱۰۳

جدول ۴-۴. درصد بیان مارکرها در RPE بدون تیمار..... ۱۰۵

فهرست نمودارها و شکل ها

شکل ۱-۱. آناتومی چشم (eyesite.co.uk) ۲
شکل ۱-۲. آناتومی شبکیه (webvision.med.utah.ed) ۵
شکل۱-۳. نقش پروتئین RPE 65 در چرخه بینایی ۹
شکل۱-۴. ساختار لنتی ویروس ها (biology.kenyon.edu) ۲۱
شکل ۱-۵. ساختار ژنوم لنتی ویروس ها (nature.com) ۲۳
شکل ۱-۶. چرخه زندگی لنتی ویروس ها ۲۴
شکل ۳-۱. وکتور pLEX-MCS SOX2 ۵۳
شکل۳-۲. وکتور pMD2G ۵۴
شکل ۳-۳. وکتور psPAX2 ۵۴
شکل ۴-۱. الکتروفورز مربوط به استخراج miniprep و هضم آنزیمی از PCR2.1 SOX2 ۶۹
شکل ۴-۲. الکتروفورز مربوط به بازیابی از SOX2 ۷۰
شکل ۴-۳. الکتروفورز مربوط به بازیابی از وکتور ۷۱
شکل ۴-۴. الکتروفورز مربوط به colony PCR ۷۲
شکل ۴-۵. الکتروفورز مربوط به استخراج miniprep از وکتور کلون شده ۷۳
شکل ۴-۶. الکتروفورز مربوط به PCR از وکتور کلون شده ۷۴
شکل ۴-۷. الکتروفورز مربوط به هضم آنزیمی از وکتور کلون شده ۷۵
شکل ۴-۸. الکتروفورز مربوط به استخراج Maxiprep از وکتور کلون شده ۷۷
شکل ۴-۹. بیان GFP در سلول های HEK293T ترنسفکت یافته ۷۸
شکل ۴-۱۰. الکتروفورز مربوط به تایید بیان وکتور pLEX-MCS SOX2 ۷۸
شکل ۴-۱۱. مارکر cytokeratin 8/18 در سلول های RPE ۷۹
شکل ۴-۱۲. مارکر cytokeratin 8/18 در سلول هایRPE ۷۹
شکل ۴-۱۳. مارکر RPE65 در سلول های RPE ۷۹
شکل ۴-۱۴. مارکر RPE65 در سلول های RPE ۸۰

نمودار ۴-۱. نمودار حاصل از MTT assay برای تعیین غلظت آنتی بیوتیک پورومایسین..... ۸۰
شکل۴-۱۵.بیان پروتئین GFP در سلول های RPE آلوده شده با ویروس نوترکیب حامل ژن..... ۸۱
شکل ۴-۱۶. تغییر مورفولوژی در سلول های RPE آلوده شده ۸۲
شکل ۴-۱۷. سلولی با مورفولوژی شبیه سلول های دوقطبی ۸۲
شکل۴-۱۸.کلونی های سلولی تشکیل شده در سلول های اینفکت شده..... ۸۳
شکل۴-۱۹ مجموعه ای از .سلول RPE آلوده شده با وکتور..... ۸۴
شکل ۴-۲۰. سلول های RPE بدون تیمار..... ۸۴
شکل ۴-۲۱. الکتروفورز مربوط به RNA استخراج گردیده..... ۸۵
شکل ۴-۲۲. منحنی ذوب آمپلیکون PKCα..... ۸۷
شکل ۴-۲۳. منحنی ذوب آمپلیکون Nestin ۸۷
شکل ۴-۲۴. منحنی ذوب آمپلیکونPax6..... ۸۸
شکل ۴-۲۵. منحنی ذوب آمپلیکون Thy1 ..... ۸۸
شکل ۴-۲۶. منحنی ذوب آمپلیکون CRABPI..... ۸۹
شکل ۴-۲۷. منحنی ذوب آمپلیکون GAPDH..... ۸۹
شکل ۴-۲۸. منحنی ذوب آمپلیکون CHX10..... ۹۰
شکل ۴-۲۹. منحنی ذوب آمپلیکونSOX2..... ۹۰
شکل ۴-۳۰. الکتروفورز مربوط به صحت عملکرد پرایمر ها. ۹۱
نمودار ۴-۲. الگوی بیان SOX2 در سلول های اینفکت ۹۲
نمودار ۴-۳ . الگوی بیان PAX6 در سلول های اینفکت..... ۹۳
نمودار ۴-۴. الگوی بیان CHX10 در سلول های اینفکت..... ۹۴
نمودار ۴-۵. الگوی بیان Thy1 در سلول های اینفکت..... ۹۵
نمودار ۴-۶. الگوی بیان Nestin در سلول های اینفکت..... ۹۶
شکل ۴-۳۱. ایمونو سیتو شیمی سلول های RPE آلوده شده با ویروس برای شناسایی بیان SOX2 ۹۸
شکل ۴-۳۲. ایمونو سیتو شیمی سلول های RPE آلوده شده با ویروس برای شناسایی بیان SOX2.... ۹۸

شکل ۴-۳۳. ایمونو سیتو شیمی سلول های RPE آلوده شده با ویروس برای شناسایی بیان SOX2 .۹۹
شکل ۴-۳۴. ایمونو سیتو شیمیسلول های RPE آلوده شده با ویروس برای شناسایی بیان .PAX6. ۱۰۰
شکل ۴-۳۵. ایمونو سیتو شیمیسلول های RPE آلوده شده با ویروس برای شناسایی بیان CHX10. ۱۰۱
شکل ۴-۳۶. ایمونو سیتو شیمیسلول های RPE آلوده شده با ویروس برای شناسایی بیان Nestin ۱۰۱
شکل ۴-۳۷. ایمونو سیتو شیمی سلول های RPE آلوده شده با ویروس برای شناسایی بیان Rhodopsin.
.....۱۰۲
شکل ۴-۳۸. ایمونو سیتو شیمی سلول های RPE آلوده شده با ویروس pLEX-MCS-SOX2 برای
شناسایی بیان Thy1.....۱۰۳
شکل ۴-۳۹. ایمونو سیتو شیمی سلول های RPE آلوده شده با وکتور برای شناسایی بیان..... ۱۰۴
شکل ۴-۴۰. ایمونو سیتو شیمی سلول های RPE آلوده شده با وکتور برای شناسایی بیان Rho.....،۱۰۴