

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی

گرایش: علوم سلولی و مولکولی

## عنوان:

**بررسی مقایسه‌ای بیان ژن *WDR5* در سلول‌های بنیادی بالغ مزانشیمی مشتق از**

**چربی انسانی پس از القای تمایز**

استادان راهنما:

دکتر مریم مقدم متین

دکتر احمد رضا بهرامی

استاد مشاور:

دکتر ناصر سنجر موسوی

تحقیق و تألیف:

مصطفی حق جو

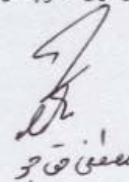
زمستان ۱۳۹۲

#### اظهار نامه

اینجانب مصطفی حق جو دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی گرایش علوم سلولی مولکولی دانشگاه فردوسی مشهد نویسنده پایان نامه " بررسی مقایسه ای بیان ژن *WDR5* در سلول‌های بنیادی بالغ مزانشیمی مشتق از چربی انسانی پس از القای تمایز " متعهد می شوم:

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تا کنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می باشد و مقالات مستخرج با نام دانشگاه فردوسی مشهد و یا Ferdowsi University of Mashhad به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تاثیر گذار بوده اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است، اصول رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

امضاء دانشجو:



مصطفی حق جو

#### مالکیت نتایج و حقوق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

با توجه به خصوصیات کاربردی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در عرصه‌های مختلف، از جمله پزشکی ترمیمی، و چشم اندازه‌های درمانی که برای این سلول‌ها متصور می‌شوند، شناخت مکانیسم‌های دخیل در خودنوزایی و بنیادینگی این سلول‌ها ضروری به نظر می‌رسد. از آنجایی که تنظیم اپی ژنتیکی ساختار کروماتین در حافظه سلول، و بنابراین هویت هر سلول مهم است، مطالعه پروتئین‌های دخیل در این فرایند در سلول‌های مذکور حائز اهمیت می‌باشد. دمین‌های دو ظرفیتی (حاوی نشانه‌های هیستونی H3K4me3 و H3K27me3) در هویت بنیادی سلول‌های ES دارای نقش بارزی هستند، از سوی دیگر با توجه به نقش کلیدی فاکتور WDR5 در برقراری نشانه H3K4me3، و ارتباط این نشانه اپی ژنتیکی با فعالسازی ژنی، ارتباط این فاکتور در سطح بیان ژن با بنیادینگی AdMSCs مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ارتباط بیان این فاکتور با بیان ژن‌های *OCT4* و *HIF-1α* در سلول‌های AdMSCs تیمار شده با رتینوئیک اسید و همچنین تیمار شده با ترکیبات مقلد هایپوکسی شامل کلرید کبالت، دسفری اکسامین و والپروئیک اسید مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور AdMSCs انسانی از نمونه‌های بافتی حاصل از لیپوساکشن استحصال و کشت گردید. سپس سلول‌ها با ترکیب رتینوئیک اسید (که سبب القاء تمایز می‌شود)، و ترکیبات مقلد هایپوکسی یعنی کلرید کبالت، دسفری اکسامین و والپروئیک اسید مورد تیمار قرار گرفتند. در مراحل بعد به ترتیب استخراج RNA از این سلول‌ها، سنتز cDNA و در نهایت بررسی بیان ژن با روش real time PCR نسبی انجام گرفت. بیان ژن *WDR5* با تیمار رتینوئیک اسید کاهش و با تیمارهای کلرید کبالت، دسفری اکسامین و والپروئیک اسید افزایش یافت. بنابراین بیان ژن *WDR5* با هدایت AdMSCs به سمت تمایز کاهش یافته و با حالت تمایز نیافته این سلول‌ها در ارتباط می‌باشد. با توجه به اینکه نتایج نشان دادند که بیان ژن *OCT4* در AdMSCs قابل تشخیص نیست، مکانیسم کنترل بیان ژن *WDR5* و به تبع آن مکانیسم‌های اپی ژنتیکی که این پروتئین در آن‌ها دخیل است، می‌بایست در این سلول‌ها متفاوت از سلول‌های ES باشد.

در مرحله بعد بیان ژن *HIF-1α* با تیمارهای شیمیایی مورد مطالعه در این تحقیق، توسط روش real time PCR نسبی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان ژن *HIF-1α* با تیمارهای رتینوئیک اسید و کلرید کبالت کاهش و پس از تیمار با والپروئیک اسید افزایش یافته، و در مورد تیمار دسفری اکسامین تفاوت معنی داری مشاهده نشد. با در نظر گرفتن اینکه در مقالات افزایش بیان فاکتور *HIF-1α* با تیمارهای کلرید کبالت و دسفری اکسامین در سطح پروتئین، و نه در سطح RNA، گزارش شده، مطالعات بیشتر در زمینه ارتباط بیان ژن *WDR5* با سطح پروتئین *HIF-1α* ضروری می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی، نشانه‌های هیستونی، ترکیبات مقلد هایپوکسی، بیان ژن، تمایز، خودنوزایی

---

AdMSCs	Adipose-derived mesenchymal stem cells
ALP	Alkaline phosphatase
ASCs	Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BM-MSCs	bone marrow derived mesenchymal stem cells
BMPs	Bone morphogenetic proteins
CBX2	Chromobox homologue 2
CHD	Chromobox homologue
ChIp	chromatin immunoprecipitation
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DFX	Desferrioxamine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle`s medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNMTs	DNA methyltransferases
EBs	Embryoid bodies
EtBr	Ethidium Bromide
EED	Embryonic ectoderm development
ESCs	Embryonic stem cells
EZH2	Enhancer of zeste homologue 2
FBS	Fetal bovine serum
GFP	Green fluorescent protein
HATs	Histone acetylases
HDACs	Histone deacetylases
HDMs	Histone demethylases
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor-1
HMTs	Histone methyltransferases
HP1	Heterochromatin protein 1
iPSCs	Induced pluripotent stem cells
KMT	Histone H3K4 methylase
MLL	Mixed-lineage leukaemia
OCT4	octamer-binding transcription factor 4

---

PBS	Phosphate-buffered saline
PcG	Polycomb group
PEV	Position-effect variegation
POU5F1	POU domain, class 5 transcription factor 1
PRC2	Polycomb repressive complex 2
PREs	Polycomb repressive elements
PTMs	Post-translational modifications
qRT-PCR	Quantitative reverse-transcription PCR
RA	Retinoic Acid
RBBP4	Retinoblastoma-binding protein 4
RPM	Rotation per minute
siRNA	Short interfering RNA
SOX2	SRY-box containing gene 2
SUZ12	Suppressor of zeste homologue 12
SVF	Stroma-vascular fraction
TBP	TATA-box binding protein
TrxG	Trithorax group
VPA	Valproic acid
WDR5	WD repeat domain 5
Win	WDR5-interacting

عنوان	صفحه
چکیده.....	آ
واژه‌نامه.....	ب
فهرست مطالب.....	ث
فهرست شکل‌ها.....	ذ
فهرست جدول‌ها.....	ز

### فصل اول: کلیات

۱-۱- کلیات اپی ژنتیک.....	۲
۱-۱-۱- مکانیسم‌های اپی ژنتیک.....	۳
۱-۱-۱-۱- متیلاسیون DNA.....	۳
۱-۱-۲- تغییرات هیستونی.....	۴
۱-۱-۳- وارینت‌های هیستونی.....	۶
۱-۲- قرارگیری هیستون‌ها در کروماتین پس از همانندسازی.....	۸
۱-۳- تکثیر نشانه‌های اپی ژنتیکی.....	۹
۱-۴- اختلاف رنگ متأثر از جایگاه.....	۱۱
۱-۵- TrxG و PcG دینامیک کروماتین را تنظیم می‌کنند.....	۱۲
۱-۵-۱- دینامیک کروماتین حافظه رونویسی و سرطان را تنظیم می‌کند.....	۲۰
۱-۵-۲- Mixed lineage leukaemia.....	۲۲
۱-۶- فاکتور WDR5 و نقش این فاکتور.....	۲۴
۲-۱- سلول‌های بنیادی - کلیات.....	۳۱
۲-۱-۱- انواع سلول‌های بنیادی از نظر منشاء.....	۳۲
۲-۲- ویژگی سلول‌های بنیادی.....	۳۳
۲-۳- اهمیت و کاربرد سلول‌های بنیادی.....	۳۵
۲-۳-۱- تحقیقات فعلی و چشم اندازهای آینده.....	۳۶

عنوان	صفحه
۱-۲-۴- سلول‌های بنیادی مزانشیمی.....	۳۶
۱-۴-۲-۱- منابع مختلف دسترسی به سلول‌های بنیادی مزانشیمی.....	۳۷
۱-۲-۴-۲- سلول‌های بنیادی/استرومایی مزانشیمی مشتق از چربی.....	۴۱
۱-۲-۴-۳- ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی.....	۴۲
۱-۲-۴-۴- پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم.....	۴۴
۱-۳- سلول‌های بنیادی و تغییرات اپی‌ژنتیک.....	۴۷
۱-۳-۱- الگوی اپی‌ژنتیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی در کشت.....	۴۹
۱-۳-۲- پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی از دیدگاه اپی‌ژنتیک.....	۵۱
۱-۴- هایپوکسی.....	۵۳
۱-۵- معرفی ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه.....	۵۴
۱-۵-۱- والپروئیک اسید.....	۵۴
۱-۵-۲- کلرید کبالت.....	۵۴
۱-۵-۳- دسفری اکسامین.....	۵۴
۱-۵-۴- رتینوئیک اسید.....	۵۵
۱-۶- هدف از این تحقیق.....	۵۵
۱-۷- فرضیات تحقیق.....	۵۶

### فصل دوم: مواد و روش‌ها

۱-۲- تجهیزات، وسایل و مواد مورد استفاده.....	۵۸
۱-۲-۲- استریل کردن وسایل و محلول‌ها.....	۶۱
۱-۲-۳- محیط‌های کشت مورد استفاده در کشت سلول‌ها.....	۶۲
۱-۳-۲- محیط کشت ذخیره DMEM با گلوکز پایین برای کشت MSCs.....	۶۲
۱-۳-۲- محیط کشت ذخیره DMEM با گلوکز بالا برای کشت NTERA2.....	۶۳



## فهرست مطالب

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۶۳	۲-۳-۳- محیط‌های کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم مورد استفاده برای کشت سلول‌ها.....
۶۴	۲-۴-۴- محلول‌ها و بافرها.....
۶۴	۲-۴-۱- روش تهیه آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات (DEPC).....
۶۴	۲-۴-۲- تهیه محلول نمکی فسفات (PBS).....
۶۵	۲-۴-۳- طرز تهیه محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز برای الکتروفورز ژل آگارز.....
۶۵	۲-۴-۳-۱- تهیه محلول EDTA.....
۶۵	۲-۴-۳-۲- بافر الکتروفورز TAE.....
۶۶	۲-۴-۳-۳- محلول اتیدیوم بروماید.....
۶۶	۲-۴-۳-۴- بافر بارگذاری.....
۶۷	۲-۴-۴- روش تهیه محلول‌های مورد استفاده به عنوان تیمارهای شیمیایی.....
۶۷	۲-۵-۵- استحصال و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان.....
۶۸	۲-۵-۱- جمع آوری بافت چربی.....
۶۸	۲-۵-۲- شستشوی بافت چربی.....
۶۸	۲-۵-۳- هضم کلاژنازی.....
۶۹	۲-۵-۴- مرحله جدا کردن سلول‌های تک هسته‌ای (MNCs) از بافت چربی.....
۷۰	۲-۶-۶- کشت سلول‌ها.....
۷۰	۲-۶-۱- کشت و نگهداری سلول‌های NTERA2.....
۷۱	۲-۶-۲- تعویض محیط کشت سلول‌ها.....
۷۱	۲-۷-۷- انجماد سلول‌ها.....
۷۲	۲-۸-۸- خروج سلول‌ها از حالت انجماد سلولی.....
۷۳	۲-۹-۹- بررسی بیان ژن‌های <i>OCT4</i> و <i>HIF-1α</i> ، <i>WDR5</i> در کشت‌های سلولی.....
۷۳	۲-۹-۱- استخراج RNA تام با استفاده از محلول RNX-Plus.....
۷۴	۲-۹-۲- تعیین کیفیت و غلظت RNA.....

عنوان	صفحه
۱-۲-۹-۲- تهیه ژل آگارز ۱/۲٪	۷۴
۲-۲-۹-۲- الکتروفورز بر روی ژل آگارز	۷۵
۱۰-۲- تیمار نمونه‌های RNA توسط آنزیم DNase I	۷۵
۱-۱۰-۲- مراحل تیمار با DNase I	۷۶
۱۱-۲- انجام واکنش رونویسی معکوس	۷۶
۱-۱۱-۲- مراحل سنتز cDNA	۷۷
۲-۱۱-۲- تأیید صحت سنتز cDNA با استفاده از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)	۷۷
۳-۱۱-۲- مراحل انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز	۷۹
۴-۱۱-۲- الکتروفورز محصولات PCR	۸۱
۱۲-۲- بررسی بیان ژن‌های <i>OCT4</i> و <i>HIF-1α</i> ، <i>WDR5</i> با روش Real time PCR	۸۱
۱۳-۲- تحلیل آماری داده‌ها بوسیله نرم افزار SPSS	۸۲

### فصل سوم: نتایج

۱-۳- کلیات	۸۴
۲-۳- تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی	۸۵
۳-۳- ریخت شناسی سلول‌ها	۸۶
۱-۳-۳- ریخت شناسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی در محیط کشت	۸۶
۲-۳-۳- ریخت شناسی سلول‌های NTERA2 در محیط کشت	۸۸
۴-۳- تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی با مواد مختلف	۸۹
۵-۳- نتایج حاصل از real time PCR	۸۹
۱-۵-۳- نتایج حاصل از تعیین کیفیت نمونه‌های RNA استخراج شده	۸۹
۱-۱-۵-۳- نتایج حاصل از تعیین غلظت و خلوص نمونه‌های RNA	۸۹
۲-۵-۳- نتایج حاصل از بررسی آلودگی DNA ژنومی در RNA تیمار شده با DNase I	۹۱

عنوان	صفحه
۳-۵-۳- نتایج حاصل از سنتز cDNA.....	۹۲
۳-۵-۴- بهینه سازی شرایط PCR و بررسی عملکرد صحیح و اختصاصی آغازگرها.....	۹۲
۳-۵-۵- بررسی بیان ژن های <i>WDR5</i> ، <i>HIF-1α</i> و <i>OCT4</i> به روش real time PCR نسبی.....	۹۳
۳-۵-۵-۱- نتایج حاصل از بررسی کارایی واکنش real time PCR برای ژن های مورد مطالعه.....	۹۳
۳-۵-۵-۲- نتایج حاصل از رسم منحنی ذوب.....	۹۴
۳-۵-۵-۳- نتایج حاصل از مقایسه بیان ژن های <i>WDR5</i> ، <i>HIF-1α</i> و <i>OCT4</i> در AdMSCs پس از تیمارهای مختلف.....	۹۵
۳-۵-۵-۱- نتایج حاصل از مقایسه بیان ژن <i>WDR5</i> در AdMSCs پس از ۳ و ۶ روز تیمار با RA.....	۹۶
۳-۵-۵-۲- نتایج حاصل از مقایسه بیان ژن <i>HIF-1α</i> در AdMSCs پس از ۳ و ۶ روز تیمار با RA.....	۹۷
۳-۵-۵-۳- نتایج حاصل از مقایسه بیان ژن <i>WDR5</i> در AdMSCs پس از تیمار با $CoCl_2$ ، DFX و VPA.....	۹۸
۳-۵-۵-۴- نتایج حاصل از مقایسه بیان ژن <i>HIF-1α</i> در AdMSCs پس از تیمار با $CoCl_2$ ، DFX و VPA.....	۹۹
۳-۵-۵-۴- نتایج حاصل از مقایسه بیان ژن <i>WDR5</i> در NTERA2 پس از تیمار با RA.....	۱۰۰
۳-۵-۵-۲- نتایج حاصل از مقایسه بیان ژن <i>OCT4</i> در NTERA2 پس از ۵ و ۶ روز تیمار با RA.....	۱۰۰
<b>فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری</b>	
۴-۱- مقدمه.....	۱۰۳
۴-۲- واریانت های رونوشت ژن <i>WDR5</i> .....	۱۰۴
۴-۳- بررسی مطالعه حاضر و مطالعات دیگر.....	۱۰۵
۴-۴- پیشنهادها.....	۱۱۳
منابع و مأخذ.....	۱۱۶

## فهرست شکل ها

### عنوان

- شکل ۱-۱ خصوصیات یک دمین کروماتینی ..... ۸
- شکل ۱-۲ کمپلکس های PcG و TrxG رونویسی را به شیوه های مخالف تحت تأثیر قرار می دهند ..... ۱۹
- شکل ۱-۳ دینامیک کروماتین، حافظه رونویسی و سرطان را تنظیم می نماید ..... ۲۱
- شکل ۱-۴ متیلاسیون هیستونی و رونویسی ..... ۲۳
- شکل ۱-۵ متیلاسیون هیستون H3K4 توسط COMPASS مخمر و کمپلکس های شبه COMPASS ..... ۲۵
- شکل ۱-۶ اساس ساختاری شناسایی هیستون H3 توسط WDR5 ..... ۲۷
- شکل ۱-۷ مقایسه سلول های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان و بافت چربی از لحاظ ریخت شناسی ..... ۳۸
- شکل ۱-۸ مقایسه الگوی فنوتیپیک سلول های مزانشیم جدا شده از منابع مختلف ..... ۳۹
- شکل ۱-۹ مقایسه ریخت شناسی و تمایز سلول های مزانشیم جدا شده از منابع مختلف ..... ۴۰
- شکل ۱-۱۰ مدل توان تمایزی سلول های نشأت گرفته از سلول های مزانشیمی مغز استخوان انسان ..... ۴۵
- شکل ۱-۲ جایگاه و موقعیت اتصال آغازگرها بر روی توالی های ژنی مرتبط با آنها ..... ۷۹
- شکل ۱-۳ بررسی تمایز AdMSCs به سلول های چربی و استخوان و سنجش فعالیت آلکالین فسفاتازی ..... ۸۶
- شکل ۲-۳ ریخت شناسی سلول های بنیادی مزانشیمی پس از استحصال از بافت چربی ..... ۸۷
- شکل ۳-۳ ریخت شناسی سلول های NTERA2 در بزرگنمایی های مختلف ..... ۸۸
- شکل ۴-۳ بررسی کیفیت نمونه هایی از RNA استخراج شده از سلول های تیمار نشده و تیمار شده ..... ۹۰
- شکل ۵-۳ بررسی آلودگی DNA ژنومی در نمونه هایی از RNA تیمار شده با DNase I ..... ۹۱
- شکل ۶-۳ مرحله تأیید ساخت cDNA به کمک انجام PCR برای ژن *TBP* به عنوان ژن کنترل ..... ۹۲
- شکل ۷-۳ الکتروفورز محصول PCR ژن های *OCT4* و  $\beta$ -*ACTIN*، *HIF-1 $\alpha$* ، *WDR5* ..... ۹۳
- شکل ۸-۳ میزان کارایی واکنش های real time PCR برای آغازگرهای استفاده شده ..... ۹۴
- شکل ۹-۳ منحنی های ذوب محصول PCR ژن های *TBP* و  $\beta$ -*ACTIN*، *HIF-1 $\alpha$* ، *WDR5* ..... ۹۵
- شکل ۱۰-۳ نمودار بیان ژن *WDR5* پس از ۳ و ۶ روز تیمار با RA ..... ۹۶
- شکل ۱۱-۳ نمودار بیان ژن *WDR5* پس از ۳ و ۶ روز تیمار با RA ..... ۹۷
- شکل ۱۲-۳ نمودار بیان ژن *HIF-1 $\alpha$*  پس از ۳ و ۶ روز تیمار با RA ..... ۹۷

## فهرست شکل‌ها

### عنوان

- شکل ۳-۱۳ نمودار بیان ژن *HIF-1α* پس از ۳ و ۶ روز تیمار با RA..... ۹۸
- شکل ۳-۱۴ نمودار بیان ژن *WDR5* پس از تیمار با  $CoCl_2$ ، DFX و VPA..... ۹۸
- شکل ۳-۱۵ نمودار بیان ژن *HIF-1α* پس از تیمار با  $CoCl_2$ ، DFX و VPA..... ۹۹
- شکل ۳-۱۶ نمودار بیان ژن *WDR5* در NTERA2 پس از تیمار با رتینوئیک اسید..... ۱۰۰
- شکل ۳-۱۷ نمودار بیان ژن *OCT4* در NTERA2 پس از تیمار با رتینوئیک اسید..... ۱۰۱
- شکل ۴-۲ مکانیسم پیشنهادی Ang و همکاران برای برهمکنش بین Oct4 و Wdr5..... ۱۰۷

## فهرست جدول‌ها

### عنوان

جدول ۱-۱	دسته بندی کمپلکس‌های PcG و TrxG	۱۵
جدول ۱-۲	تجهیزات، وسایل و مواد مورد استفاده	۵۸
جدول ۲-۲	مواد مورد نیاز برای تهیه محلول PBS	۶۴
جدول ۳-۲	مواد مورد نیاز محلول ذخیره بافر TAE به ازاء یک لیتر	۶۵
جدول ۴-۲	مواد مورد نیاز جهت تهیه بافر سنگین کننده (type II-6x)	۶۶
جدول ۵-۲	ترکیبات مورد استفاده به عنوان تیمارهای شیمیایی	۶۷
جدول ۶-۲	مواد و وسایل مورد نیاز جهت استحصال و کشت AdMSCs	۶۷
جدول ۷-۲	مواد و وسایل مورد نیاز برای کشت سلول‌ها	۷۰
جدول ۸-۲	مواد و وسایل مورد نیاز برای کشت سلول‌های NTERA2	۷۰
جدول ۹-۲	مواد و وسایل مورد نیاز جهت استخراج RNA	۷۳
جدول ۱۰-۲	مواد مورد نیاز برای تعیین کیفیت و غلظت RNA	۷۴
جدول ۱۱-۲	مواد مورد نیاز جهت تیمار RNA با DNase I	۷۵
جدول ۱۲-۲	مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش رونویسی معکوس	۷۶
جدول ۱۳-۲	مشخصات آغازگرهای مورد مطالعه	۷۸
جدول ۱۴-۲	واکنشگرهای مورد استفاده در PCR	۸۰
جدول ۱۵-۲	برنامه زمانی و دمایی PCR برای تکثیر ژن <i>TBP</i>	۸۰
جدول ۱۶-۲	برنامه زمانی و دمایی PCR برای تکثیر ژن‌های <i>OCT4</i> و <i>HIF-1α</i> ، <i>WDR5</i>	۸۱
جدول ۱۷-۲	مواد مورد نیاز برای واکنش real time PCR نسبی	۸۱
جدول ۱۸-۲	برنامه زمانی و دمایی real time PCR برای تکثیر <i>OCT4</i> و <i>HIF-1α</i>	۸۲
جدول ۱۹-۲	برنامه زمانی و دمایی real time PCR برای تکثیر <i>WDR5</i>	۸۲
جدول ۱-۳	در صد بیان نشانگرهای سطحی بر روی سلول‌های استحصال شده	۸۵
جدول ۲-۳	سنجش غلظت و خلوص نمونه‌هایی از RNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ	۹۰

# فصل اول

## مقدمه

## ۱-۱- کلیات اپی ژنتیک

تکوین صحیح ارگانسیم‌های پرسلولی مستلزم این است که انواع سلول‌های مختلف از یکدیگر متمایز شده و تخصصی شوند. این بدان معنا است که این سلول‌ها علی‌رغم داشتن توالی‌های ژنومی یکسان، الگوی بیان ژنی بسیار متفاوتی را ارائه می‌دهند، و می‌بایست هویت سلولی‌شان در طی تقسیمات سلولی حفظ گردد. حال این سؤال مطرح می‌گردد که چگونه الگوهای بیان ژنی مختص به یک سلول خاص، شکل گرفته و در طی تقسیمات متوالی حفظ می‌گردد. اکنون می‌دانیم که کلید این معما اپی ژنتیک است. اپی ژنتیک عبارتست از اطلاعات پایدار و قابل توارث که متمایز از توالی DNA بوده و توسط مکانسیم‌های اختصاصی شکل می‌گیرد. این مکانسیم‌ها شامل متیلاسیون DNA، مولکول‌های RNA مداخله‌گر کوچک<sup>۱</sup>، وارینت‌های هیستونی<sup>۲</sup> و تغییرات پس از ترجمه هیستون‌ها<sup>۳</sup> (PTMs) می‌باشند. با این وجود تاکنون تنها در مورد متیلاسیون DNA ثابت شده که به شکل پایدار بین تقسیمات سلولی به ارث می‌رسد (Wigler et al., 1981). اگر چه انتظار می‌رود که برخی PTMs هیستونی در انتقال اطلاعات اپی ژنتیکی شرکت کنند، و برخی دیگر در فرایند رونویسی مشارکت کرده و سایرین احتمالاً در "عملکردهای ساختاری" درگیر می‌باشند (Berger et al., 2009; Trojer and Reinberg, 2006).

<sup>1</sup> Small interfering RNAs

<sup>2</sup> Histone variants

<sup>3</sup> Histone post-translational modifications



## ۱-۱-۱-۱- مکانیسم‌های اپی ژنتیک

تنظیم بیان ژن در سطح اپی ژنتیک، از طریق تغییر ساختار کروماتین اتفاق می افتد که در نتیجه آن دسترسی فاکتورهای رونویسی و دیگر تنظیم کننده‌ها به ژن‌ها تغییر می‌کند. این تغییرات، بیان ژن را بوسیله تسهیل باز شدن DNA (یوکروماتین) جهت انجام فرایند رونویسی یا متراکم کردن DNA (هتروکروماتین) جهت مهار رونویسی، تنظیم می‌کنند. از دست رفتن تنظیمات کروماتینی مناسب، طی تکوین جنینی می‌تواند منجر به مرگ جنین گردد (Li et al., 1992; Surani et al., 2007; Tachibana et al., 2002). در ذیل خلاصه‌ای از مکانیسم‌های اصلی دخیل در تنظیمات اپی ژنتیک ارائه شده است.

## ۱-۱-۱-۱-۱- متیلاسیون DNA

متیلاسیون DNA پستانداران الگوی نامتوازی در ژنوم دارد (Bird, 2002). متیلاسیون DNA شامل اضافه شدن گروه متیل به کربن ۵ ( $m^5C$ ) باز سیتوزین در نواحی غنی از دی نوکلئوتید CpG و بطور متقارن در دو رشته DNA می‌باشد. این نواحی غنی از دی نوکلئوتید CpG که جزایر CpG نامیده می‌شوند، در نواحی پروموتوری بسیاری از ژن‌های انسان یافت می‌شوند (Bird et al., 1987). بطور کلی متیلاسیون DNA پروموتوری باعث مهار ژن مربوطه می‌شود (Kass et al., 1997; Song et al., 2005) هر چند که این ارتباط همیشه به همین شکل بسیار ساده نیست (Weber et al., 2007).

DNA متیل ترانسفرازها (DNMTs) باعث متیله شدن نواحی CpG می‌شوند. دو نوع DNMT3a و DNMT3b مسؤل متیلاسیون de novo در طی تکوین جنینی و تمایز سلولی می‌باشند (Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005). در طی تقسیم سلولی نوع دیگری DNMT به نام DNMT1، DNA نیمه متیله را شناسایی کرده و باعث متیله شدن رشته مقابل رشته متیله می‌شود (Jaenisch and Bird, 2003). متیلاسیون DNA برای بسیاری از فرایندها از قبیل مهار طولانی مدت بیان ژن (Hoffman and Hu, 2006; Klose and Bird, 2006)، تکوین مناسب (Morgan et al., 2005; Young and Beaujean, 2004)، غیر فعال شدن کروموزوم X (Hellman and Chess, 2007) و نقش پذیری ژنومی (Tremblay et al., 1995) ضروری می‌باشد.

## ۱-۱-۱-۲- تغییرات هیستونی

کروماتین، که متشکل از DNA و پروتئین است، به حالتی اشاره دارد که DNA و این پروتئین‌ها درون هسته سلول یوکاریوت بسته بندی می‌شوند. همچنانکه در بالا شرح داده شد، متراکم شدن کروماتین می‌تواند بسیار اندک بوده (یوکروماتین) که فرایند رونویسی ژن را تسهیل می‌نماید و یا این فشردگی بسیار شدید باشد (هتروکروماتین) که مهار بیان ژن را تسهیل می‌کند. نوکلئوزوم واحد پایه‌ای و اساسی کروماتین می‌باشد که متشکل از دو زیر واحد از هر نوع ۴ هیستون (H2A, H2B, H3, H4) به شکل یک اکتامر هیستونی و نیز ۱۴۷ جفت باز DNA که دور این اکتامر پیچیده است، می‌باشد. هیستون‌ها پروتئین‌های کوچک بازی هستند که به استثناء انتهای N، غالباً در طبیعت به شکل کروی می‌باشند. هر هیستون مرکزی یک دنباله انتهایی آمینو دارد که از نوکلئوزوم بیرون زده (Luger et al., 1997) و می‌تواند زمینه‌ای برای تغییرات پس از ترجمه مثل استیلاسیون، متیل‌اسیون، فسفریلاسیون و مونوبوبیکوئیتیل‌اسیون و دیگر مواردی که کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، باشد (Kouzarides, 2007; Vaquero et al., 2003). به دنبال ترجمه، پروتئین‌های هیستونی متحمل انواعی از تغییرات شیمیایی می‌شوند که به طرق مختلف می‌توانند در تنظیم بیان ژن‌ها نقش داشته باشند (Kouzarides, 2007). شایعترین تغییرات هیستونی مورد بررسی، استیل‌اسیون و متیل‌اسیون هیستون‌ها می‌باشند.

نظریه کد هیستونی پیشنهاد می‌کند که تغییرات مجزا، بر روی یک یا تعدادی از دنباله‌های هیستونی، به شکل مجزا یا به شکل ترکیبی تشکیل کد هیستونی را می‌دهند که بوسیله سایر پروتئین‌ها خوانده شده و منجر به اتفاقات پائین دستی مجزایی می‌شود (Lennartsson and Ekwall, 2009; Strahl and Allis, 2000). کد هیستونی می‌تواند موقتی و یا پایدار باشد. اگر پایدار باشد بعنوان تغییرات توارث پذیر در نظر گرفته می‌شود (Lennartsson and Ekwall, 2009; Turner, 2000). تنظیمات اپی ژنتیک ناشی از تغییرات هیستونی در طبیعت پویا و از نظر وراثتی پیچیده می‌باشند. بعنوان مثال، متیل‌اسیون ریشه‌های لیزینی که بوسیله آنزیم هیستون متیل ترانسفراز (HMTs) کاتالیز می‌شود، می‌تواند در ارتباط با فعال سازی و یا مهار رونویسی باشد (Kouzarides, 2002). تری متیل‌اسیون لیزین شماره ۴ هیستون ۳ (H3K4me3) نشانه یوکروماتین و فعال بودن ژن می‌باشد در حالی که H3K27me3 و H3K9me3 نشانه هتروکروماتین و مهار

بیان ژن می‌باشد. تصور بر این است که H3K27me3 در ارتباط با بنیادینگی سلول‌های بنیادی می‌باشد (Schwartz and Pirrotta, 2007; Simon and Kingston, 2009). چرا که دمتیلاسیون H3K27 تمایز سلولی را القا می‌کند (Agger et al., 2007; De Santa et al., 2007; Lan et al., 2007). از جمله پیچیدگی‌های دیگر تغییرات هیستونی، می‌توان به توانایی HMTs جهت متیلاسیون H3K9 به منظور مهار بیان ژن اشاره کرد که وابسته به حالت متیلاسیون ریشه‌های لیزینی مجاور در H3 می‌باشد (Nishioka et al., 2002; Wu and Sun, 2006). هیستون متیل ترانسفرازها (HMTs) و هیستون دمتیلازها (HDMs) به شکل متوالی جهت تعیین سطح متیلاسیون لیزین هیستونی موجود درون یک سلول، فعالیت می‌کنند (Zardo et al., 2008).

استیلاسیون هیستونی، یکی دیگر از تغییرات هیستونی است که به شکل گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. فعالیت‌های متضاد هیستون استیلازها (HATs) و هیستون داستیلازها (HDACs) مسؤل سطح استیلاسیون هیستون‌های سلولی می‌باشند (Zardo et al., 2008). بطور کلی، استیلاسیون ریشه‌های لیزینی هیستون‌ها منجر به فعال شدن ژن و داستیلاسیون آنها منجر به غیر فعال شدن بیان ژن می‌شود. استیلاسیون H3K9 (H3K9ac) و استیلاسیون H4K16 (H4K16ac) شایعترین علامت ژن‌های فعال در ناحیه یوکروماتین می‌باشند (Collas et al., 2008). اگر چه تغییرات هیستونی عمدتاً بوسیله تغییر ساختار کروماتین فعالیت می‌کنند، تغییرات ویژه‌ای (همانند H3K4me3 و H3K9ac) همچنین از طریق بکارگیری تنظیم کننده‌های ساختار کروماتین نقش خود را ایفا می‌کنند (Bernstein et al., 2006; Schubeler et al., 2004; Zhao et al., 2007).

## ۱-۱-۱-۳- وارینت‌های هیستونی

بطور کلی اکتامرهای هیستونی حاوی هیستون‌های H2A, H2b, H3 و H4 هستند، اما چندین نوع دیگر از این پروتئین‌ها وجود دارند. برای مثال، واریانت H2A.Z در نواحی یوکروماتینی یافت شده و ممکن است نقش مهمی در تغییر منطقه، به وضعیت آماده<sup>۴</sup> برای رونویسی داشته باشد، اگرچه برای حفظ فعالسازی ژنی غیر ضروری است (Santisteban et al., 2000). در مقابل، واریانت macroH2A روی کروموزوم X غیرفعال فراوان بوده (Costanzi and Pehrson, 1998)، که ارتباط آن با تشکیل هتروکروماتین اختیاری را نشان می‌دهد. CENP-A و Cid مگس سرکه انواع دیگری از هیستون H3 هستند که درون نوکلئوزوم‌ها در نواحی سانترومیری یافت می‌شوند (Henikoff et al., 2000; Malik and Henikoff, 2001). علاقه زیادی در مورد واریانت H3 یعنی H3.3 متمرکز بوده است. این واریانت مستقل از همانندسازی DNA درون کروماتین جای می‌گیرد. یعنی بی شباهت به H3.1 که در طول فاز S سنتز شده و جای‌گیری می‌کند. واریانت H3.3 در جایگاه‌های رونویسی غنی می‌باشد (Ahmad and Henikoff, 2002a; Ahmad and Henikoff, 2002b) و همچنین در سلول‌های نان سیکلینگ، مثل نورون‌ها (Bosch and Suau, 1995)، میوتوب‌ها (Wunsch et al., 1987) و لنفوسیت‌های انسانی (Wu et al., 1983) انباشته می‌گردد.

خصوصیات دیگر کروماتین، فضای بین نوکلئوزوم‌ها (که بعنوان nucleosome occupancy شناخته می‌شود) و موقعیت خود کروماتین در هسته می‌باشند.

استفاده از کروماتین ایمونوپرسیپیتیشن و بدنبال آن ریزآرایه (ChIP-chip) یا توالی یابی (ChIP-seq) تصویری نسبی از نمای کلی کروماتین شامل موقعیت PTMs هیستونی و واریانت‌های هیستونی، الگوهای متیلاسیون DNA و نوکلئوزوم اکیوپنسی فراهم کرده است. بعلاوه کشف دمین‌های پروتئینی که بطور خاص یک تغییر هیستونی مشخص را شناسایی می‌کنند شامل کرومودمین‌ها<sup>۵</sup>، برومودمین‌ها<sup>۶</sup> هومئودمین‌های

<sup>4</sup> Poised

<sup>5</sup> Chromodomains

موتیفی که حدود ۶۰ اسید آمینه طول داشته، در ابتدا در پروتئین‌های PcG و HPI د. ملانوگاستر کشف شد، که در پروتئین‌های تنظیم کننده کروماتین متنوعی حضور دارد.

<sup>6</sup> Bromodomains

موتیفی که به لایزین‌های استیله شده بر روی دنباله‌های هیستونی متصل می‌گردد.