بسم الله
الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای شعبان علیزاده رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون رساله دکتری خود را با عنوان: بررسی تاثیر mir-451 و mir-155 بر القای تمایز اریتروئیدی در سلول بنیادی رویانی انسانی در تاریخ ۸۹/۱۲/۱۱ 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 راهنمای اصلی	دکتر سعید کاویانی	
استاد راهنمای دوم	دکتر مسعود سلیمانی	
استاد مشاور	دکتر ناصر امیری زاده	
استاد مشاور	دکتر علی اکبر پورفتح اله	
استاد ناظر	دکتر مهرداد نوروزی نیا	
استاد ناظر	دکتر مینا ایزدیار	
استاد ناظر	دکتر کامران علی مقدم	
اسناد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر سعید آبرون	

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 1- 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 2- 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 3- 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 آئین‌نامه-های مصوب انجام شود.

ماده 4- 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 5- این آیین‌نامه در 5 ماده و یک تبصره در تاریخ87/4/1 در شورای پژوهشی و در تاریخ 87/4/23 در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ 87/7/15 شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **شعبان علیزاده** دانشجوی رشته **هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون** ورودی سال تحصیلی1386 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 ».

امضا

تاریخ

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 1 : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده 2 : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون** است که در سال 1389 در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر سعید کاویانی و دکتر مسعود سلیمانی** ، مشاوره **دکتر ناصر امیری زاده و دکتر علی اکبر پورفتح اله** از آن دفاع شده است.

ماده 3 : 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 4 : در صورت عدم رعایت ماده 3، 50% بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده 5 : 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 4 را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده 6 : اینجانب **شعبان علیزاده** دانشجوی رشته **هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

شعبان علیزاده

تاریخ و امضا

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون

عنوان

بررسی تاثیرmir-451و mir-155 بر القای تمایز اریتروئیدی در سلول بنیادی رویانی انسانی

نگارش

شعبان علیزاده

اساتید راهنما

دکتر سعید کاویانی

دکتر مسعود سلیمانی

اساتید مشاور

دکترناصرامیری زاده

دکترعلی اکبر پورفتح اله

زمستان 1389

برگ سبزی است تقدیم به:

اساتید عزیزم که هرچه از خوبیشان بگویم کم گفته ام

(دکتر سعید کاویانی، دکتر مسعود سلیمانی، دکتر سعید آبرون، دکتر علی اکبر پـورفتح الـه، دکتـر مهرداد نوروزی نیا و دکتر ناصر امیری زاده)

پدر و مادر عزیزم که هرچه دارم از دعای خیر آنهاست

همسر صبور و فداکارم که همیشه حامی و پشتیبانم بوده است.

براداران وخواهران عزیزم که مهربانانه یاریم کردند.

و تمامی سفید پوشان عرصه تشخیص و در مان

تشکر و قدردانی

با تقدیر و تشکر فراوان از اساتید ارجمند که مرا برای همیشه مرهون خود گرداندند:

جناب اقای دکتر سعید کاویانی و جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی که با صداقتی بی شائبه در تمام مراحل به ثمر رساندن این رساله مرا راهنمایی و یاری فرمودند.

جناب آقای دکتر علی اکبر پورفتح اله و دکتر ناصر امیری زاده که با علو طبع قبول زحمت نموده و یاری رسان من بوده اند .

مدیریت محترم گروه هماتولوژی جناب آقای دکتر سعید آبرون که به حق مساعدتی بی نظیر و دلسوزانه داشتند و از ایشان بسیار آموختم.

ناظرین محترم این رساله (جناب آقای دکتر سعید آبرون ، آقای دکتر نوروزی نیا، خانم دکتر مینا ایزدیار،آقای دکتر کامران علی مقدم) که قبول زحمت فرموده و مساعدتی کم نظیر داشتند.

ریاست محترم دانشکده ،معاونت محترم آموزشی دانشکده ،معاونت محترم پژوهشی دانشکده

تمامی پرسنل و کارکنان محترم دانشکده ، بخصوص گره هماتولوژی (سرکار خانم رهنمایی، خانم شوکتی، آقای موسویان،خانم دباغی و سایر دوستان و همکاران)

تمامی مسئولین، اساتید و محققین شرکت فناوری بن یاخته که مساعدتی کم نظیر داشتند

و با تقدیر فراوان از دانشجویان گروه هماتولوژی مدرس بخصوص آقایان و خانمها خمیسی پور، آتشی، احمدبیگی، نیکوگفتار، مصاحبی، محمدی، کوهکن، آزاد،اله بخشیان،فرشدوستی و سایرین

تمامی اساتید ، همکاران و دوستانم در دانشگاه علوم پزشکی تهران

و تمامی کسانی که به من آموختند و در پیشرفت و شکوفایی استعدادها تلاش می کنند

چکیده

microRNA ها مولکولهایRNA کوچک غیر کدکننده ای هستند که توسطRNA POL II رونویسی شده و پس از پردازشهای مختلف توسط کمپلکسRISC عمل می کنند. نقش این مولکولها در پروسه های متعدد سلولی از قبیل پرولیفراسیون، تمایز، آپوپتوزیس و سرطان اثبات شده است. تمایز سلوهای خونی پروسه پیچیده ای است که فاکتورهای رونویسی مختلف و همچنین miRNA های متعدد درآن نقش دارند مطالعات اخیر کاهش سطحmir-155 و افزایشmir-451 را در طی تمایز پیش سازهای خونی به رده اریتروئیدی نشان داده اند. دراین مطالعه تاثیر افزایشmir-451و سرکوب mir155 در سلولهای پرتوانه القایی انسانی(hips) از نظر بیان شاخصهای رده اریتروئیدی بررسی گردید.

سلولهای پرتوانه القایی انسانی(hips) پس از تایید وضعیت پرتوانگی ،مورد استفاده قرار گرفتند. افزایشmir-451 با استفاده از کلون نمودن پیشسازmir-451 در وکتور رتروویروسی و سرکوب mir-155 با استفاده از آنتی سنسLNA mir-155 صورت گرفت و سپس افزایش mir-451 با روشmiRNA Quantitative RT-PCR تایید شد. در نهایت بیان شاخصهای رده اریتروئیدی با روشRT-PCR و فلوسیتومتری بررسی شد.

سرکوبmir-155 و افزایشmir-451 در سلولهای پرتوانه القایی و اجسام رویانی(EB) مشتق از این سلولها در روزهای گوناگون ترکیب مختلفی از بیان هموگلوبین ها و شاخصهای رده اریتروئیدی را نشان داد. بیان سطحی گلیکوفورینA (CD235) و CD34 با فلوسیتومتری تمایز را در این سلولها تایید نمود.

یافته ها نشان می دهد کهmir-451 و mir-155 اجزاء کلیدی در تمایز رده اریتروئیدی از سلولهای پرتوانه القایی هستند. بر طبق دانسته های ما، این مطالعه اولین مطالعه ای است که نشان دهنده قدرت ایجاد تمایز رده اریتروئید از سلولهای رویانی بدون استفاده از فاکتورهای رشد می باشد. با مطالعات بیشتر و شناسایی ژنهای هدف miRNA های دخیل در روندهای تمایز اریتروئیدی می توان در آینده از پتانسیل های تشخیصی و درمانی آنها بخصوص در ژن درمانی و پزشکی ترمیمی بهره برد.

کلمات کلیدی: miRNA،mir-451،mir-155، سلولهای پرتوانه القایی انسانی(hips)، رده اریتروئیدی

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته 1

1-1. کلاسهای مختلف RNA 2

1-1-2.RNAهای غیر کد کننده 2

1-2.بیوژنز miRNA و تنظیم آن 4

1-2-1.پردازش miRNA در هسته 4

1-2-2.شکسته شدن pri-miRNA 5

1-2-3.مرحله ورود به سیتوپلاسم 6

1-2-4.پردازش توسط Dicer 7

1-2-5.عملکرد (function) 9

1-3.تفاوت وشباهت miRNAو siRNA 10

1-4.بیان miRNA ها 11

1-5.تکنیکهای شناسایی miRNAs 11

1-6.miRNAها ونقش ان در پروسه های بیولوژیکی وبیماریها 13

1-6-1.MiRNAدر سرطان 14

1-6-2.انکوژنها 14

1-6-3.تومور ساپرسورها 14

1-7.miRNA در هماتوپویز طبیعی وغیر طبیعی 15

1-7-1.miRNA ها در هماتوپویز طبیعی 15

1-7-2.mi RNA ها و اریتروپوئز 17

1-7-2-1. miR-221,miR-222 18

1-7-2-2. miR-24 18

1-7-2-3. miR-223 19

1-7-2-4. miR-150 19

1-7-2-5. miR-15a 20

1-7-2-6. miR-144/451 20
1-7-3. بیان miRNA ها در گلبولهای قرمز در حال گردش 22
1-7-4. miRNA و بیماری های اریتروئیدی 23
1-7-5. پروفایل بیان miRNA در طول اریتروپوئز سلول های +CD34 24
1-8. برنامه ریزی مجدد سلولی و سلولهای پرتوانه القایی 26
1-8-1. مدلهای ایجاد پرتوانگی 28
1-8-2. روشهای ایجاد سلولهای پرتوانه القایی(iPS) 28
1-8-3.کاربرد سلولهای پرتوانه القایی(iPS) در درمان 29
1-8-4. استفاده از سلولهای پرتوانه القایی در بالین 30
1-8-4-1.آنمی داسی شکل 30
1-8-4-2.بیماری پارکینسون 31
1-8-4-3.هموفیلیA 31
1-8-4-4.انفارکتوس قلبی 31
1-9.خونسازی و تولید گلبولهای قرمز 32
1-10.سلولهای پایه ای (stem cells) 32
1-10-1.Long term (LT-HSC) 33
1-10-2.Short term (ST-HSC) 33
1-11.انواع خونسازی 34
1-11-1.تمایز سلولهای هماتوپویتیک 35
1-11-2.مراحل تولید گلبولهای قرمز از استم سل هماتوپویتیک 36
1-12.اریتروپویز 39
1-13.تولید سلولهای اریتروئیدی از استم سلهای رویانی انسانی(hESC) و سلولهای پرتوانه القایی انسانی(hiPS) 40
1-14.اریتروپویز در مغز استخوان 40

1-15.تولید سلولهای اریتروئیدی از استم سلهای رویانی(hESC)..... 43
1-16.تولید پیش سازهای هماتوپویتیک ازسلولهای پرتوانه القایی انسانی hiPSC..... 44
1-17.تاریخچه،(مرور و نقد تحقیقات گذشته) 48
1-18.ضرورت انجام این مطالعه..... 51
1-19.سوالات اصلی تحقیق..... 52
1-20. اهداف..... 52
1-21.فرضیات..... 53
1-22. جنبه های نوآوری..... 53

فصل دوم: مواد و روشها 54
2-1. مواد، وسایل و دستگاه ها..... 55
2-1-1وسایل 55
2-1-2مواد مورد استفاده..... 55
2-1-3کیت های مورد استفاده..... 57
2-1-4دستگاه ها..... 58
2-2.طرز تهیه بافرها ، معرف ها و محیط های مورد استفاده 59
2-2-1.PBS 1X..... 59
2-2-2.بافر تریس-EDTA (TE) 59
2-2-3.بافرTAE 50 X..... 60
2-2-4.EDTA 0.5 M..... 60
2-2-5.گلیسیرول 60%..... 61
2-2-6.کلرور کلسیم0.1 M..... 61
2-2-7.کلرور کلسیم 2مولار(Cacl2, 2M) 61
2-2-8.بافر(2X) HEPES 61

2-2-9.استوک آمپی سیلین..... 62
2-3.محیط های مورد استفاده..... 62
2-3-1.محیط Lysogeny broth (LB) 62
2-3-2.محیط LB-Agar..... 63
2-3-3.محیط RPMI..... 63
2-3-4.محیط DMEM..... 63
2-3-5.محیط کشت لایه تغذیه کننده(feeder layer)..... 64
2-3-6.محیط سلولهای بنیادی ر ویانی و سلولهای پرتوانه القایی(iPS)..... 64
2-4.استخراج DNA..... 65
2-4-3.شرایط نمونه گیری و نگهداری جهت تخلیص DNA 67
2-4-4.تعیین خلوص و غلظت DNA و کنترل کیفی آن 68
2-5.استخراج RNA..... 69
2-5-1.ارزیابی کمی و کیفی RNA استخراج شده 70
2-5-1-1.اندازه گیری مقدار RNA 70
2-5-1-2.بررسی کیفی RNA 70
2-6.سنتزcDNA برای انجام واکنشهایRT-PCR با کیتBioer..... 71
2-6-1.انواع پرایمر مورد استفاده در سنتز cDNA 71
2-6-1-1. Oligo (dT)..... 71
2-6-1-2.پرایمرهای تصادفی..... 71
2-6-1-3.پرایمرهای اختصاصی توالی(SSP)..... 72
2-6-2.پروتکل..... 72
2-7.PCR و اصول کلی 73
2-7-1.مواد لازم برای انجام PCR 73
2-7-1-1. پرایمر 73

2-7-1-2. DNA الگو 74
2-7-1-3. DNA پلی مراز (مقاوم به حرارت)..... 74
2-7-1-4. بافر PCR 74
2-7-1-5. دزوکسی نوکلئوتیدتری فسفات (d NTP)..... 75
2-7-1-5. منیزیوم ($MgCL_2$) 75
2-7-2.مراحل PCR..... 75
2-7-3.تکثیر قطعه pre-mir-451..... 76
2-7-3-1.مطالعات بیوانفورماتیک و طراحی پرایمر..... 76
2-7-3-2.مواد استفاده شده برای تکثیر قطعهpre-mir-451 در واکنش PCR..... 76
2-7-3-3.برنامه PCR..... 77
2-8.الکتروفورز و اصول آن..... 78
2-8-1.اصول رنگ آمیزی ژل آگارز 78
2-8-2.بافر مورد استفاده در الکتروفورز 79
2-9.پلاسمیدها..... 80
2-9-1.کشت باکتری حاوی پلاسیمد و استخراج پلاسمید..... 81
2-9-2.ارزیابی پلاسمیدای استخراج شده..... 82
2-9-2-1.الکتروفورز پلاسمید 82
2-9-2-2.قرائت در بیوفتومتر..... 83
2-9-3.روش تغلیظ پلاسمید در صورت نیاز..... 83
2-10.برش آنزیمی پلاسمید Psuperو محصول PCR مربوط بهPre-mir-451..... 83
2-11.روش استخراج محصولات الکتروفورز از ژل آگاروز و clean up..... 84
2-12.واکنش اتصال قطعه تکثیر یافته به پلاسمید مورد نظر(Ligation)..... 86
2-13.روش تهیه باکتریهای مستعد(Competent)..... 87
2-14.روش Transformation..... 88

2-15.روشهای تایید پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه مورد نظر 89
2-15-1.انجامColony PCR..... 89
2-15-2.انجام برش آنزیمی..... 90
2-15-3.تعیین توالی پلاسمید نوترکیب در محدوده قطعه وارد شده..... 91
2-16.Packaging و تولید ویروس با استفاده از روش کلسیم فسفات..... 91
2-16-1.کشت و آماده سازی سلولهایPackaging (HEK 293 T)..... 92
2-16-2.تهیه مخلوط پلاسمیدها جهت Packaging..... 93
2-16-3.تهیه محلول واکنشی کلسیم فسفات..... 93
2-16-4.تعیین تیتر رتروویروس نوترکیب..... 94
2-17.بخش سلولی مطالعه..... 96
2-17-1.روش فریز سلولهای مورد استفاده در این تحقیق..... 96
2-17-2.روش دفریز سلولهای مورد استفاده در این تحقیق..... 96
2-17-3.کشت و تکثیر سلولهای بنیادی القایی(iPS)..... 97
2-17-3-1.طرز تهیه رقتهایbfgf..... 97
2-17-4.روش کشت و غیرفعال نمودن(inactivation) سلولهایSNL..... 98
2-17-5.پاساژ سلولهایiPS..... 99
2-17-6.روشهای تاییدیiPS..... 100
2-17-6-1.رنگ آمیزی آلکالن فسفاتاز..... 100
2-17-6-1-1.تهیه معرفهای رنگ..... 100
2-17-6-2.تایید با RT-PCR..... 101
2-18.روش تولیداجسام رویانی (Embryonic body) 101
2-19.انتقال ژن miR-451 به سلول های پرتوانه القایی (iPS) و اجسام امبریونیک(EB)..... 102
2-20.Mercury LNA^{TM} miRNA inhibitor..... 102
2-20-1.کاربردMercury LNA^{TM} miRNA inhibitor 103

2-20-2.روش تهیه سوسپانسیون Mercury LNA^{TM} miRNA inhibitor 103
2-20-3.روش Transfection..... 104
2-21.بررسی انتقال miRNA و عملکرد آن..... 105
2-21-1.سنتز miRNA 1st-Strand cDNA..... 105
2-21-2.مراحل سنتز miRNA cDNA..... 107
2-21-3.miRNA QPCR Master Mix..... 109
2-21-3-1.رنگ Eva Green..... 109
2-21-3-2.کنترلهای لازم برای انجام واکنش miRNA QPCR..... 110
2-21-3-3.استفاده از رنگ رفرانس (Reference dye)..... 110
2-21-3-4.گرد آوری داده ها با ترمال سایکلر اسپکتروفتومتریک..... 110
2-21-3-5.واکنش QPCR..... 111
2-22.روشهای بررسی اثرات تنظم افزایشی mir-451 و کاهشی mir-155..... 112
2-22-1.بررسی بیان ژن هموگلوبین های مختلف..... 112
2-22-2.سنجش کلونی (colony assay) در سلولهای iPS تحت تاثیر با ویروس mir-451..... 113
2-22-3.فلوسیتومتری..... 114
2-22-3-1.روش بررسی CD34..... 114
2-22-3-2.روش بررسی CD235..... 114

فصل سوم: نتایج 116
3-1. یافته های بیوانفورماتیک در مورد mir-451 و mir-155..... 117
3-2.کیفیت DNA استخراج شده..... 121
3-3.کنترل کیفی RNA استخراج شده..... 122
3-4.کنترل کیفی پلاسمیدهای مورد استفاده..... 123
3-5.نتایج واکنش PCR جهت تکثیر قطعه pri-miR-451..... 124

3-6.نتایج هضم آنزیمی پلاسمیدpSuperretoPuro..... 126
3-7.نتایج هضم آنزیمی قطعهpri-miR-451..... 126
3-8.نتایج مربوط به تایید محصول کلون سازی..... 127
3-8-1.نتیجه مربوط به Colony PCR به منظور انتخاب کلنی های مثبت..... 127
3-8-2.هضم آنزیمی جهت تایید کلونهای مثبت..... 128
3-8-3.تعیین توالی(sequencing) 129
3-9.نتایج تولید ویروس..... 131
3-10.نتایج مربوط به سلولهایiPS..... 133
3-10-1.نتایج حاصل از تشکیل اجسام شبه رویانی(Embryonic body) 134
3-10-2.تایید ژنهایPluripotency سلولهایiPS..... 135
3-10-3.رنگ آمیزی آلکالن فسفاتاز جهت تاییدiPS..... 136
3-11.نتایج انتقال ویروسmir-451 و آنتی سنس mir-155 به همراهscramble مربوطه..... 137
3-11-1.نتایج ارزیابی تاثیرات افزایشmir-451 و کاهش mir-155 بر سلولهایK562..... 137
3-11-2.نتایج ارزیابی تاثیرات افزایشmir-451 و کاهش mir-155 بر سلولهایiPS..... 139
3-11-2-1.الف)تاثیر miRNAها بر اجسام رویانی(EB) حاصل از سلولهایiPS..... 139
3-11-2-1-1.اثر منفردmir-155 inhibitor..... 139
3-11-2-1-1-1.فلوسیتومتری سلولهایEB..... 140
3-11-2-1-2.اثر منفرد mir-451 و توام mir-451 در اجسام رویانی(EB)..... 141
3-11-2-1-2-1.بررسی الگوی بیانmir-451 بعد از انتقال ویروس..... 141
3-11-2-1-2-2.فلوسیتومتری سلولهای EB روز 7و14..... 143
3-11-2-1-2-3.نتایج فلوسیتومتری مربوط به اجسام رویانی (EB) تحت تاثیر بـا mir-451 و mir155 inhibitor..... 147
3-11-2-2.ب)تاثیر miRNAها بر سلولهایiPS به صورت مستقیم..... 149
3-11-2-2-1.اثر منفردmir-155 inhibitor..... 149

3-11-2-2-2،اثر منفرد mir-451 150
3-11-2-2-2-1،بررسی الگوی بیان mir-451 بعد از انتقال ویروس..... 150
3-11-2-2-2-3،اثر توام mir-451 و mir-155 inhibitor..... 151
3-11-2-2-3-1،تغییرات مرفولوژیک..... 151
3-11-2-2-3-2،تغییرات بیانی زنجیره های هموگلوبین و سایر ژنها..... 152
3-11-2-2-3-3،فلوسیتومتری..... 153
3-11-2-3،نتایج سنجش کلونی..... 154

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها 157
4-1،بحث و مقایسه مطالعات..... 158
4-2،نتیجه گیری..... 172
4-3،پیشنهادها..... 174
فهرست منابع 175
چکیده انگلیسی 185

فهرست جداول

جدول1-1. miNAهای دخیل در اریتروپویز..... 23

جدول1-2. روشهای تاییدی پرتوانگی در مدل موشی و انسانی..... 27

جدول1-3. روشهای ایجاد سلولهای پروانه القایی با فاکتورهای پرتوانگی اکتوپیک..... 28

جدول2-1. مقادیر مواد لازم برای تهیهPBS 1X 59

جدول2-2. مقادیر مواد لازم برای تهیهTE 59

جدول2-3. مقادیر مواد لازم برای تهیهTAE 50X..... 60

جدول2-4. مقادیر مواد لازم برای تهیهEDTA 0.5 M..... 60

جدول2-5. مقادیر مواد لازم برای تهیهHEPES 2X..... 61

جدول2-6. مقادیر مواد لازم برای تهیهLB..... 62

جدول2-7. مقادیر مواد لازم برای تهیهLB-Agar..... 63

جدول2-8. مقادیر مواد لازم برای تهیه محیط کشت لایه تغذیه کننده..... 64

جدول2-9.مقادیر مواد لازم برای تهیه محیط کشتiPS..... 64

جدول2-10. چرخه دمایی سنتزcDNA..... 72

جدول2-11. مقادیر مواد لازم برای تهیهPCR Master mix 77

جدول2-12. چرخه دمایی PCR اولیه mir-451..... 77

جدول2-13. مقادیر مورد استفاده جهت هضم آنزیمی‌پلاسمید pRETRO 84

جدول 2-14. مقادیر مورد استفاده جهت هضم آنزیمی‌قطعه pri-miR-451..... 84

جدول2-15. مقادیر مواد لازم برای واکنشligation..... 86

جدول2-16. مقادیر مواد لازم برای تهیهcolony PCR master mix 89

جدول2-17. چرخه دمایی colony PCR..... 90

جدول2-18. مقادیر مورد استفاده جهت هضم آنزیمی‌پلاسمید کلون مثبت باbglII , Hind III 91

جدول2-19. مقادیر مورد استفاده جهت هضم آنزیمی‌پلاسمید کلون مثبت با EcoR1 , Hind III 91
جدول2-20.مقادیر مواد لازم برای تهیهmaster mix syber Green 95
جدول2-21.چرخه دمایی واکنشabsolute real time PCR..... 95
جدول2-22. ظرفیت محیط و تعداد سلول لازم برای کشت در پلیت های مختلف..... 99
جدول2-23. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای تاییدpluripotency..... 101
جدول2-24. مقادیر لازم برای ترانسفکشن در پلیت های مختلف کشت..... 105
جدول2-25. مقادیر مواد لازم برای تهیه مخلوط اولیه جهت واکنش پلی آدنیلاسیون..... 108
جدول2-26. مقادیر مواد لازم برای تهیه مخلوط کلی واکنش سنتزmiRNA cDNA..... 108
جدول2-27..مقادیر مواد لازم برای تهیهmiRNA real time PCR master mix 111
جدول2-28.چرخه دمایی واکنشmiRNA real time PCR..... 111
جدول2-29. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در بررسی تمایز اریتروئیدی..... 112
جدول2-30. چرخه دمایی واکنشPCR هموگلوبینها و سایر ژنهای تمایز اریتروئیدی..... 113
جدول3-1. نتایج غلظت و OD مربوط به کنترل کیفیDNA ژنومی..... 121
جدول3-2. نتایج غلظت و OD مربوط به کنترل کیفیRNA..... 122

فهرست نمودارها

نمودار3-1. تغییرات زنجیره آلفا و زتا در سلولهایK562..... 138

نمودار 3-2. تغییراتmir-451 در سلولهایEB در روزهای 3و 7و 14.. 141

نمودار 3-3. تغییراتmir-451 در سلولهایiPS در روزهای 7و10و21..... 150