١١٥٠١٨

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته‌ی علوم سلولی و مولکولی گرایش ژنتیک

بررسی وضعیت بیان ژن های پراکسی زومی در مقایسه با ژن های *Oct4* و *Nanog* در طول تمایز عصبی سلولهای P19

استادان راهنما:

دکتر کامران قائدی

دکتر شهناز رضوی

استاد مشاور:

دکتر محمد حسین نصر اصفهانی

پژوهشگر:

مرضیه موج بافان

مرکز اطلاعات و مدارک علمی دانشگاه
تهیه مدارک

۱۳۸۸/۴/ ۶

اسفند ماه ۱۳۸۷

۱۱۵۰۱۸

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات،
ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع
این پایان نامه متعلق به دانشگاه اصفهان است.

هزینه های مصرفی این پایان نامه بر مبنای قرارداد
شماره ۴-۱۴۸ مورخ ۸۷/۲/۲۹ از بودجه تحقیقاتی
پژوهشکده رویان تامین گردیده است.

شیوه نگارش پایان نامه
رعایت شده است
تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی سلولی مولکولی گرایش ژنتیک

خانم مرضیه موج بافان

بررسی وضعیت بیان ژن های پراکسی زومی در مقایسه باژن های *Oct4* و *Nanog* در طول تمایز عصبی سلولهای P19

در تاریخ ۸۷/۱۲/۱۹ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه ..عالی..... به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای اول پایان نامه دکتر کامران قائدی با مرتبه‌ی علمی استادیار امضا

۲- - استاد راهنمای دوم پایان نامه دکتر شهناز رضوی با مرتبه‌ی علمی دانشیار امضا

۲- استاد مشاور پایان نامه دکتر محمد حسین نصراصفهانی با مرتبه‌ی علمی دانشیار امضا

۳- استاد داور داخل گروه منوچهر توسلی خورزانی با مرتبه‌ی علمی استادیار امضا

۴- استاد داور خارج از گروه دکتر محمد ربانی با مرتبه‌ی علمی دانشیار امضا

امضای مدیر گروه

به نام یگانه خالق هستی

آدم به زمین آید، این حادثه رؤیا نیست　　این فرصت بی تکرار عشق است، معما نیست

در آغاز خداوند مهربان را سپاس می گویم

که باز مرا در ثانیه ها و لحظه ها یاری کرد. سپاس خدا را به اندازه همه سپاسی که نزدیکترین فرشتگان و گرامی ترین بندگان و پسندیده ترین ستایش کنندگان او را ستایش کرده اند، سپاسی که بر سپاس های دیگر برتری داشته باشد مانند برتری که پروردگار نسبت به آفریدگان دارد .

و با سپاس از

استاد گرامی جناب آقای دکتر قائدی که مرا در کاری که به انجام رسیده است، دلیل و راهنما بوده اند. بضاعت علمی خود را وام دار ایشانم که مرا مشتاقانه هدایت کرده و همواره پشتیبان من بوده اند.

سرکار خانم دکتر رضوی به پاس راهنمایی های دلسوزانه شان در راهنمایی این پروژه.

جناب آقای دکتر نصر اصفهانی که امکان انجام این پروژه را در پژوهشکده رویان فراهم نموده و همواره راهنمایی ها و تجربیاتشان راهگشای این پروژه بود.

استاد داور محترم داخل گروه جناب آقای دکتر توسلی

استاد داور خارج گروه جناب آقای دکتر ربانی

تمامی اساتید گرامی گروه زیست شناسی به ویژه بخش ژنتیک جناب آقای دکتر ولیان، جناب آقای دکتر متولی باشی و سرکار خانم دکتر حجتی که در تمام مراحل تحصیل مرا از رهنمودهای پربارشان بهره مند گردانیدند و امیدوارم همچون گذشته در تلاش جدی و مسئولانه خود پر دوام بمانند.

همکاران محترم پژوهشکده رویان اصفهان خانم کرمعلی، تنهایی، کربلایی، نعمت اللهی، ربیعی، فروزان و تولایی که انجام این پروژه بدون مساعدت های بی دریغ این عزیزان میسر نبود. همچنین سایر دوستان و همکاران این مرکز که مرا در انجام این طرح یاری دادند.

دوستان عزیزم سرگل، مریم، زهرا، نجمه، ثریا، لادن، سحر، هدی، فاطمه، زینب و دیگر همکلاسی هایم به پاس همراهی ها و مهربانی هایشان.

تقدیم به

آنان که بسان خورشید، آسمان زندگی ام را نورانی کرده اند؛

دو ستاره پرفروغی که از درخشندگی در شب های تار من نهراسیدند و در پیچ و خم مسیر کمال همواره یار و مددکارم بوده اند؛

کسانی که همیشه و در همه جا مایه افتخار و اعتبار من بوده و هستند؛

مادر مهربانم که آئینه تمام نمای شور زندگی است؛ او که دلخوشی های امروزم را مدیون تشویق های دیروز و دلواپسی های همیشگی اش هستم.

پدر عزیزم که مفهوم بی دریغ مهربانی و صداقت است؛ او که وسعت افق های پیش رویم، همه از نگاه های بلندش روشن می شود.

برادران عزیزم به پاس همدلی، همراهی و محبت هایشان که روزگاری سراسر سعادت و نیکبختی را برایشان آرزومندم.

...و تقدیم به همه سبزاندیشانی که شوق دانستن، طعم حیاتشان است.

چکیده:

پراکسی زوم‌ها اندامک هایی هستند که تقریبا درتمام یوکاریوت ها یافت می شوند و در متابولیسم اسید های چرب و پلاسمالوژن ها و دیگر متابولیت ها شرکت دارند،همچنین آن ها نقش مهمی در عصب زایی بازی می‌کنند. پروتئین های ماتریکس پراکسی زومی بر روی پلی ریبوزوم های موجود در سیتوزول سنتز شده و با استفاده از دو سیگنال PTS1 و PTS2 به سمت پراکسی زوم هدف گیری می شوند.

در نقص های بیوژنز پراکسی زومی، اختلالات نورولوژیکی جدی در بیماران مشاهده می شود. به منظور درک بهتر ارتباط عملکرد پراکسی زوم ها در طول عصب زایی ، در این تحقیق، به بررسی تغییر بیان سه ژن پراکسی زومی *PEX3*، *PEP* و کاتالاز در حین نوروژنز پرداخته شد. رده سلولی کارسینومای جنینی P19 جهت انجام این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت زیرا این رده سلولی، رده سلولی مفیدی است که به راحتی می تواند با استفاده از رتینوئیک اسید و ایجاد تجمعات سلولی به عصب متمایز شود.

بیان ژن های پراکسی زومی مثل *PEP* که یک پروتئین پراکسی زومی جدید است و به تازگی شناخته شده، کاتالاز به عنوان یک پروتئین موجود در ماتریکس پراکسی زوم و *PEX3* به عنوان ژن موجود در غشاء پراکسی زوم در سطح mRNA بررسی شد و به منظور اطمینان از تمایز این سلول ها به عصب، بیان ژن های نشانگر پرتوانی مثل *Oct4* و *Nanog* و ژن های عصبی و پیش ساز عصبی مثل *PAX6*، *Ngn1* و *Map2* نیز بررسی گردید.

RNA کل از سلول های P19 استخراج شد و سنتز cDNA صورت گرفت و بررسی بیان ژن های مذکور به صورت نیمه کمی با استفاده از RT-PCR انجام شد.

داده های حاصله از این مطالعه نشان داد که بیان ژن های پرتوانی *Oct4* و *Nanog* کاهش یافت و بیان ژن های عصبی و پیش ساز عصبی *PAX6*،*Ngn1* و *Map2* افزایش یافت. بیان ژن های *PEX3* و *PEP* افزایش یافت و بیان ژن کاتالاز دستخوش کاهش شد.

در کنار این تحقیق، سلول های P19 با استفاده از پلاسمید pUcD2SRαMCS.hygro. PTS2-EGFP ترانسفکت شدند و رده سلولی پایدار بیان کننده این پلاسمید ایجاد شد. از این رده سلولی در جهت بررسی بیان EGFP هنگام تمایز آن به دیگر سلول ها استفاده خواهد شد.

در مجموع، نتایج نشان داد که افزایش بیان *PEX3* ، به عنوان یک ژن دخیل در بیوژنز پراکسی زوم ها در حین تمایز عصبی القا شده با رتینوئیک اسید، نشانگر افزایش تعداد پراکسی زوم هاست که در حین نوروژنز لازم است زیرا یکی از عملکردهای اصلی پراکسی زوم ها، بیوسنتز پلاسمالوژن هاست.

بیان کاتالاز، به عنوان یک آنزیم آنتی اکسیدان، کاهش می یابد که این مسئله می تواند نتیجه حضور بتامرکاپتواتانول، که حذف کننده گونه های واکنشگر اکسیژن است، در محیط کشت سلول های P19 باشد که قادر است آن ها را از محیط کشت در طول نوروژنز حذف کند. بیان *PEP*، این ژن جدید، در طول تمایز عصبی القا شده با رتینوئیک اسید افزایش می یابد.

واژگان کلیدی: پراکسی زوم، تمایز نورونی، *Ngn1*، *PAX6*، *PEP*

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه

۱-۱- کشف پراکسی زوم ۱
۱-۲- ساختمان پراکسی زوم ۳
۱-۳- اختلالات مرتبط با پراکسی زوم ۴
۱-۴- پراکسین ها ۵
۱-۵- ورود پروتئین ماتریکس پراکسی زوم ۸
۱-۶- انتقال لیپید به پراکسی زوم ها ۸
۱-۷- پروتئین های غشایی پراکسی زوم ۹
۱-۸- استرس اکسیداتیو و پراکسی زوم ها ۱۰
۱-۸-۱- مضرات و فواید گونه های واکنشگر اکسیژن ۱۰
۱-۸-۲- پراکسی زوم ها و ROS ۱۱
۱-۸-۳- پاسخ پراکسی زوم ها به استرس اکسیداتیو ۱۴
۱-۹- کاتالاز ۱۵
۱-۱۰- پروتئین PEP ۱۷
۱-۱۱- سیستم های انتقال DNA ۱۸
۱-۱۲- روش های مکانیکی و الکتریکی ۲۰
۱-۱۳- روش های شیمیایی ۲۲
۱-۱۴- هیگرومایسین B ۲۴
۱-۱۵- کشت سلول و رده‌های سلولی ۲۵
۱-۱۶- سلول های بنیادی ۲۷
۱-۱۷- منشأ سلول های بنیادی ۲۹
۱-۱۸- سلول های بنیادی ۲۹
۱-۱۸-۱- سلول بنیادی جنینی ۲۹
۱-۱۸-۲ سلول بنیادی بالغ ۳۰
۱-۱۸-۳- سلول های تراتوکارسینومای جنینی ۳۲
۱-۱۸-۳-۱ سلول های P19 ۳۳

عنوان | صفحه

۱-۱۸-۳-۲- منشا سلول های P19 ..... ۳۳
۱-۱۸-۳-۳- Oct4 ..... ۳۴
۱-۱۸-۳-۴- Nanog ۳۵
۱-۱۸-۳-۵- SSEA-1 ..... ۳۵
۱-۱۸-۳-۶- تمایز سلول های P19 ..... ۳۶
۱-۱۹- رتینوئیک اسید ۳۶
۱-۱۹-۱- مکانیسم عمل رتینوئیک اسید ۳۷
۱-۲۰- نشانگرهای عصبی ۳۸
۱-۲۰-۱- Ngn-1 ..... ۳۸
۱-۲۰-۲- PAX6 ..... ۳۹
۱-۲۰-۳- MAP2 ..... ۳۹
۱-۲۰-۴- NCAM ۴۰
۱-۲۱- اهداف ۴۲

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱- تجهیزات و دستگاه ها ۴۳
۲-۲- مواد مصرفی و نحوه ساخت ۴۵
۲-۲-۱- وکتور ۴۵
۲-۲-۲- محیط‌های کشت ۴۶
۲-۲-۲-۱- محیط کشت باکتریایی 2xYT ۴۷
۲-۲-۲-۲- محیط کشت سلول های P19 ..... ۴۷
۲-۲-۲-۳- محیط کشت Neurobasal و مکمل ۴۸
۲-۲-۳- آنتی‌بیوتیک ۴۹
۲-۲-۴-الکتروفورز ژل آگارز ۵۰
۲-۲-۴-۱- بافر الکتروفورز 50 X TAE ۵۰
۲-۲-۴-۲- اتیدیوم بروماید ۵۰
۲-۲-۴-۳- بافر بارگیری ۵۱
۲-۲-۴-۴- مارکرهای اندازه DNA ۵۲

عنوان | صفحه

۲-۲-۴-۵- روش الکتروفورز ۵۳
۲-۲-۵- تکنیک PCR ۵۴
۲-۲-۵-۱- طراحی پرایمر ۵۴
۲-۲-۵-۲- مواد مورد نیاز برای PCR و سنتز cDNA ۵۵
۲-۲-۵-۳- روش انجام تکنیک PCR ۵۶
۲-۲-۵-۴- بهینه‌سازی PCR ۶۰
۲-۳- روش ها و تکنیک ها ۶۱
۲-۳-۱- بخش سلولی ۶۱
۲-۳-۱-۱- تهیه، نگهداری، پاساژ و انجماد سلول های P19 ..... ۶۱
۲-۳-۱-۲- ذوب سلول های P19 ..... ۶۱
۲-۳-۱-۳- پاساژ سلول های P19 ..... ۶۲
۲-۳-۱-۴- انجماد سلول های P19 ..... ۶۲
۲-۳-۱-۵- پاساژ و شمارش سلولی جهت ترانسفکشن ۶۳
۲-۳-۱-۶- ترانسفکشن ۶۴
۲-۳-۱-۷- تولید رده سلولی پایدار ۶۵
۲-۳-۱-۸- ایمنوسایتوشیمی و رنگ‌آمیزی سلولی ۶۶
۲-۳-۱-۸-۱- رنگ آمیزی سلول های P19 ترانسفکت شده علیه آنتی بادی کاتالاز ۶۷
۲-۳-۱-۸-۲- رنگ آمیزی سلول های P19 ترانسفکت شده علیه آنتی بادی SSEA-1 ..... ۶۸
۲-۳-۱-۸-۳- رنگ آمیزی سلول های P19 ترانسفکت شده علیه آنتی بادی NCAM ۶۹
۲-۳-۱-۹- پوشاندن کف پتری دیش ها به وسیله آگارز ۰/۲٪ ۶۹
۲-۳-۱-۱۰- تمایز سلول های P19 به سمت سلول های عصبی ۷۰
۲-۳-۱-۱۱- آماده سازی نمونه ها جهت استخراج RNA ۷۱
۲-۳-۲- بخش مولکولی ۷۱
۲-۳-۲-۱- استخراج RNA ۷۱
۲-۳-۲-۲- تعیین کیفیت و غلظت DNA و RNA به روش اسپکتروفتومتری ۷۲
۲-۳-۲-۳- تیمار با DNAase I ۷۳
۲-۳-۲-۴- ساخت cDNA ۷۳

عنوان صفحه

۲-۳-۲-۵- استخراج پلاسمید ۷۵

فصل سوم: نتایج

نتایج بخش سلولی ۷۷
۳-۱- مرفولوژی سلول های P19 ۷۷
۳-۲- تمایز سلول های P19 معمولی به سمت عصب ۷۸
۳-۲-۱- تشکیل تجمعات سلولی ۷۸
۳-۳-۲- کاشتن تجمعات سلولی ها ۷۸
۳-۳- نتایج رنگ آمیزی و ایمونوسایتوشیمی ۷۹
۳-۳-۱- نتایج رنگ‌آمیزی سلولهای P19 معمولی ۷۹
۳-۳-۱-۱- رنگ آمیزی علیه آنتی بادی NACM ۷۹
۳-۳-۱-۲- رنگ آمیزی علیه آنتی بادی SSEA-1 ۸۰
۲-۳-۲- رنگ آمیزی سلول های ترانسفکت شده ۸۱
۲-۳-۲-۱- رنگ آمیزی علیه آنتی بادی کاتالاز ۸۱
۲-۳-۲-۲- رنگ آمیزی علیه آنتی بادی SSEA-1 ۸۲
نتایج بخش مولکولی ۸۲
۳-۴- بهینه سازی شرایط RT-PCR ۸۲
۳-۴-۱- بهینه سازی شرایط RT-PCR ژن های PEX3 و کاتالاز ۸۲
۳-۴-۲- بهینه سازی شرایط RT-PCR ژن های Oct4 و Nanog ۸۳
۳-۴-۳- بررسی نیمه کمی جهت بهینه سازی PCR ژن ها ۸۵
۳-۵- نتایج حاصل از RT-PCR مربوط به سلول های P19 معمولی در حین عصب زایی ۸۷
۳-۵-۱- نتایج حاصل از RT-PCR مربوط به ژن بتاتوبولین ۸۸
۳-۵-۲- نتایج حاصل از RT-PCR مربوط به ژن های پرتوانی Oct4 و Nanog ۸۹
۳-۵-۳- نتایج حاصل از RT-PCR مربوط به ژن های پیش ساز عصبی ۹۰
۳-۵-۴- نتایج حاصل از RT-PCR مربوط به ژن عصبی MAP2 ۹۲
۳-۵-۵- نتایج حاصل از RT-PCR مربوط به ژن های پراکسی زومی PEX3 و کاتالاز ۹۳
۳-۵-۶- نتایج حاصل از RT-PCR مربوط به ژن پراکسی زومی PEP ۹۴
۳-۶- بررسی نیمه کمی ژن ها در حین عصب زایی ۹۴

عنوان | صفحه

۳-۶-۱- نتایج بررسی نیمه کمی ژن های پرتوانی Oct4 و Nanog ۹۵
۳-۶-۲- نتایج بررسی نیمه کمی ژن های پیش ساز عصبی ۹۵
۳-۶-۳- نتایج بررسی نیمه کمی ژن عصبی MAP2 ..... ۹۶
۳-۶-۴- نتایج بررسی نیمه کمی ژن های پراکسی زومی PEX3 و کاتالاز ۹۷
۳-۶-۵- نتایج بررسی نیمه کمی ژن PEP ۹۸
۳-۷- نتایج حاصل از RT-PCR مربوط به سلول های P19 ترانسفکت شده ۹۹
۳-۷-۱- نتایج حاصل از RT-PCR مربوط به ژن بتا توبولین ۹۹
۳-۷-۲- نتایج حاصل از RT-PCR مربوط به نشانگر EGFP ۱۰۰
۳-۷-۳- نتایج حاصل از RT-PCR مربوط به ژن های پرتوانی Oct4 و Nanog ۱۰۰
۳-۸- آماده سازی پلاسمید ۱۰۱
۳-۹- ترانسفکشن گذرا ۱۰۱
۳-۱۰- ترانسفکشن پایدار ۱۰۲

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴-۱- بحث ۱۰۴
۴-۲- بررسی ارتباط بین بیماری های نورولوژیکی و پراکسی زوم ۱۰۵
۴-۳-نقش رتینوئیک اسید در نوروژنز ۱۰۵
۴-۴- نقش PEX3 در پراکسی زوم و نوروژنز ۱۰۶
۴-۵- نقش کاتالاز در پراکسی زوم و نوروژنز ۱۰۷
۴-۶- نقش PEP در پراکسی زوم و نوروژنز ۱۰۸
۴-۷- تغییر بیان ژن های پرتوانی و عصبی ۱۰۹
۴-۸- رده سلولی پایدار بیان کننده PTS2-EGFP ۱۱۰
۴-۹- پیشنهادات ۱۱۱
پیوست شماره ۱- نتایج حاصل از بررسی های SPSS مربوط به ژن Oct4 ..... ۱۱۲
پیوست شماره ۲- نتایج حاصل از بررسی های SPSS مربوط به ژن Nanog ۱۱۳
پیوست شماره ۳- نتایج حاصل از بررسی های SPSS مربوط به ژن Ngn1 ..... ۱۱۴
پیوست شماره ۴- نتایج حاصل از بررسی های SPSS مربوط به ژن PAX6 ..... ۱۱۵
پیوست شماره ۵- نتایج حاصل از بررسی های SPSS مربوط به ژن MAP2 ..... ۱۱۶

عنوان صفحه

پیوست شماره ۶- نتایج حاصل از بررسی های SPSS مربوط به ژن PEX3 ..... ۱۱۷
پیوست شماره ۷- نتایج حاصل از بررسی های SPSS مربوط به ژن کاتالاز ۱۱۸
پیوست شماره ۸- نتایج حاصل از بررسی های SPSS مربوط به ژن PEP ۱۱۹
پیوست شماره ۹- تصاویر رنگی موجود در متن ۱۲۰
منابع و ماخذ ۱۲۳

فهرست شکل‌ها

عنوان صفحه

شکل۱-۱- پراکسین ۵

شکل۱-۲ -تصویر شماتیک آنزیم های پراکسی زومی که سبب تولید و حذف ROS می شوند ۱۲

شکل۱-۳ - تصویر شماتیک مسیرهای انتقال DNA با سه مانع بزرگ ۲۰

شکل۱-۴ - ساختار آنتی بیوتیک هیگرومایسین B ۲۴

شکل۲-۱ -نقشه ژنتیکی وکتور بیانی pUcD2SRαMCS ۴۶

شکل۲-۲ - ساختار اتیدیوم بروماید ۵۱

شکل۲-۳ - نشانگر DNA ۵۲

شکل۲-۴- روش قرار دادن شانه درون ژل و بار نمودن نمونه ها روی ژل ۵۳

شکل۳-۱- مرفولوژی معمول سلول های P19 با بزرگنمایی های متفاوت ۷۷

شکل۳-۲- مرفولوژی تجمعات سلولی در مراحل مختلف تیمار با رتینوئیک اسید و کاهش سرم ۷۸

شکل۳-۳- مراحل شکل گیری عصب بعد از کاشتن تجمعات سلول ۷۹

شکل۳-۴- سلول های P19 رنگ آمیزی شده علیه NCAM ۸۰

شکل۳-۵ - تصویر رنگ‌آمیزی سلولهای P19 علیه SSEA-1 ..... ۸۰

شکل۳-۶ - تصویر رنگ‌آمیزی سلولهای P19 ترانسفکت شده با استفاده از آنتی بادی کاتالاز ۸۱

شکل۳-۷- تصویر رنگ‌آمیزی سلولهای P19 ترانسفکت شده با استفاده از آنتی بادی SSEA-1 ..... ۸۲

شکل۳-۸- بهینه سازی دمایی RT-PCR مربوط به ژن های PEX3 و کاتالاز ۸۳

شکل۳-۹- بهینه سازی تعداد سیکل های RT-PCR مربوط به ژن های PEX3 و کاتالاز ۸۳

شکل۳-۱۰- بهینه سازی شرایط دمایی RT-PCR مربوط به ژن های Oct4 و Nanog ۸۴

شکل۳-۱۱- بهینه سازی تعداد سیکل های RT-PCR مربوط به ژن های Oct4 و Nanog ۸۵

شکل۳-۱۲- نمودار ترسیمی توسط نرم افزار Gene Tool ۸۶

شکل۳-۱۳- نمودار ترسیمی توسط نرم افزار Gene Tool ۸۶

شکل۳-۱۴- نمودار ترسیمی توسط نرم افزار Gene Tool ۸۷

شکل۳-۱۵- نمودار ترسیمی توسط نرم افزار Gene Tool ۸۷

شکل۳-۱۶- نتایج RT-PCR مربوط به ژن بتاتوبولین در مراحل مختلف عصب زایی سلول های P19 ..... ۸۸

عنوان صفحه

شکل۳-۱۷- نتایج RT-PCR مربوط به ژن های Oct4 و Nanog در مراحل مختلف عصب زایی سلول های P19 ..... ۹۰
شکل۳-۱۸- نتایج RT-PCR مربوط به ژن های Ngn1 و PAX6 در مراحل مختلف عصب زایی سلول های P19 ..... ۹۱
شکل۳-۱۹- نتایج RT-PCR مربوط به ژن MAP2 در مراحل مختلف عصب زایی سلول های P19 ..... ۹۲
شکل۳-۲۰- نتایج RT-PCR مربوط به ژن های PEX3 و کاتالاز در مراحل مختلف عصب زایی سلول های P19 ..... ۹۳
شکل۳-۲۱- نتایج RT-PCR مربوط به ژن PEP در مراحل مختلف عصب زایی سلول های P19 ..... ۹۴
شکل۳-۲۲- بررسی نیمه کمی بیان ژن های Oct4 و Nanog ۹۵
شکل۳-۲۳- بررسی نیمه کمی بیان ژن های Ngn1 و PAX6 ..... ۹۶
شکل۳-۲۴- بررسی نیمه کمی بیان ژن های MAP2 ..... ۹۷
شکل۳-۲۵- بررسی نیمه کمی بیان ژن های PEX3 و کاتالاز با استفاده از نرم افزار SPSS ۹۸
شکل۳-۲۶- بررسی نیمه کمی بیان ژن PEP با استفاده از نرم افزار SPSS ۹۸
شکل۳-۲۷- RT-PCR مربوط به ژن بتا توبولین در سلول های P19 معمولی و ترانسفکت شده P19 ..... ۹۹
شکل۳-۲۸- RT-PCR مربوط به ژن EGFP در سلول های P19 معمولی و ترانسفکت شده P19 ..... ۱۰۰
شکل۳-۲۹- RT-PCR مربوط به ژن های پرتوانی در سلول های P19 معمولی و ترانسفکت شده P19 ..... ۱۰۱
شکل۳-۳۰- تصویر لام های فیکس شده ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن ۱۰۲
شکل۳-۳۱- کلونی سلولی ترانسفکت شده واجد بیان پایدار وکتور ۱۰۳

فهرست جدول‌ها

عنوان صفحه

جدول۱-۱- بیماری‌های وراثتی پراکسی زوم ۴

جدول۱-۲- آنزیم هایی پراکسی زومی که ROS را تجزیه می کنند ۱۳

جدول۱-۳- آنزیم هایی پراکسی زومی که ROS تولید می کنند ۱۳

جدول۱-۴- معرفی برخی از رده‌های سلولی نامیرا شامل نام اختصاری، نام کامل، موجود زنده و منشأ آنها ۲۶

جدول۲-۱- دستگاه های مورد نیاز ۴۳

جدول۲-۲- مواد مورد نیاز ۴۵

جدول۲-۳- فرمول محیط کشت ۴۷

جدول۲-۴- فرمول محیط DMEM ۴۸

جدول۲-۵- فرمول محیط Neurobasal و مکمل ۴۹

جدول۲-۶- غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها ۵۰

جدول۲-۷- پرایمرها و مشخصات آنها ۵۴

جدول۲-۸- مواد و مقادیر مورد نیاز برای واکنش PCR ۵۵

جدول۲-۹- مواد و مقادیر مورد نیاز برای استخراج RNA، تیمار با DNaseI و سنتز cDNA ۵۶

جدول۲-۱۰- برنامه تعیین شده جهت PCR ژن های مختلف ۵۷

فصل اول

مقدمه

۱-۱ کشف پراکسی زوم

پراکسی زوم ها، اندامک های یوکاریوتی تک‌غشائی هستند که در تمام سلول های یوکاریوتی، بجز آرکوزوآها وجود دارند و دارای عملکردهای متنوع می‌باشند. این اندامک ها مکانیسم‌های بیوژنتیکی مشابهی دارند و در بدو امر (۱۹۵٤) از طریق مرفولوژیک تشخیص داده شدند و سپس (در سال ۱۹٦۵) عملکرد آن ها مورد بررسی واقع گردید (Heiland and Erdmann, 2005; Rottensteiner and Theodoulou, 2006; Brown and Baker, 2003). در سال ۱۹۵٤، Johannes Rhodin در سلول های کلیه موش، اندامک های کوچکی در حد ۰/۵ میکرومتر شناسایی و آن ها را میکروبادی نامید. در سال ۱۹٦۵، Christian de Duve فعالیت پراکسیداسیونی این میکروبادی ها را شناسایی کرد و نام پراکسی زوم را برای ساختارهای فوق پیشنهاد کرد (Knoll *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2000)

معمولاً پراکسی زوم ها حاوی ماتریکسی هستند که درون آن پروتئین های محلول در آب وجود دارد. پراکسی زوم ها دارای آنزیم های متنوعی هستند که این آنزیم ها شامل کاتالاز، آنزیم‌های دخیل در β اکسیداسیون اسیدهای چرب بسیار طویل و نیز آنزیم هایی که در سنتز پلاسمالوژن ها نقش دارند، می باشد. پراکسی زوم ها درمراحل مختلف اکسیداسیون اسیدهای آمینه D و L، اسیداوریک، الکل ها، پلی‌آمین،

α هیدروکسی‌اسیدها، دی‌کربوکسیلیک اسیدها و پیپکولیک اسیدها، گلی‌اکسی لات و پروستاگلاندین‌ها و همچنین در بیوسنتز کلسترول، گلیسرولیپیدها و اسیدهای صفراوی نقش دارند (Knoll *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001; Ishikawa *et al.*, 2001; Knoll *et al.*, 2000.).

سه عملکرد پراکسی زوم ها که در بین اورگانیسم هایی که از نظر تکاملی از یکدیگر دورتر می باشند حفظ شده است، بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب، تنفس بر اساس هیدروژن پراکسید و دفاع در برابر استرس های اکسیداتیو می باشد. نقش های اختصاصی این اندامک به اورگانیسم و نوع سلول بستگی دارد و پراکسی زوم ها در اعمالی نظیر اکسیداسیون اسیدهای چرب و تولید و حذف پراکسید هیدروژن ها و همچنین در بتا اکسیداسیون ترکیبات معطر و حلقوی، سنتز ایزو پرنوئیدها، پنی سیلین، لیزین، بتائین گلیسین، متابولیسم پورین ها و پیریمیدین ها و کاتابولیسم پلی آمین ها، D-آمینواسیدها و متانول نیز دخیلند. بسته به نوع اورگانیسم، این اندامک ها در چرخه گلی اکسی لات، مسیر پنتوز فسفات و تنفس نوری شرکت دارند و اخیرا نقش های کلیدی برای پراکسی زوم ها در سیگنالینگ و تکوین شناخته شده است. تنوع فعالیت، اغلب در اختصاصی شدن پراکسی زوم ها انعکاس می یابد، خصوصا در گیاهان و نیز در تریپانوزوم ها. بسیاری مسیرهای متابولیکی پراکسی زوم منجر به تولید پراکسید هیدروژن می شود. تجزیه بعدی این ترکیب سمی توسط کاتالاز یک روند اساسی است که تقریبا در تمام پراکسی زوم ها رخ می دهد (Wanders, 2004; Kovacs *et al.*, 2002; Kovacs *et al.*, 2003; Hogenboom *et al.*, 2002).

پراکسی زوم ها در پستانداران واجد دو مسیر بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب و یک مسیر آلفا اکسیداسیون اسید چرب هستند که روی گروه خاصی از لیپید ها که توسط مسیرهای بتا اکسیداسیون میتوکندریایی به طور ضعیفی اکسیده می شوند، عمل می کنند. این لیپید ها شامل اسیدهای چرب با زنجیره بسیار بلند، دی کربوکسیلیک اسیدها ی با زنجیره بلند، اسیدهای چرب با زنجیره شاخه دار(مثل فیتانیک اسید که به پریستانیک اسید اکسیده می شود و سپس وارد مسیر بتا اکسیداسیون می شود)، اسیدهای دی و تری هیدروکسی کوپروستانیک و پروستانوئیدها می باشند(Baes *et al.*, 2000).

به علاوه پراکسی زوم ها برای بیوسنتز کلسترول نیز لازمند. در گذشته تصور می شد که مسیر بیوسنتز کلسترول در سیتوزول و شبکه اندوپلاسمی انجام می شود، گرچه امروزه عقیده بر آن است که اغلب آنزیم های درگیر در بیوسنتز کلسترول تقریبا منحصرا در پراکسی زوم ها واقعند (Aboushadi *et al.*, 1999).

۱-۲ ساختمان پراکسی زوم

پراکسی زوم ها اندامک های کروی شکل داخل سلولی، به قطر ۱-۰/۱میکرومترمی باشند(Ferrer *et al.*, 2005; Schrader *et al.*, 2000).

۱. پراکسی زوم دارای چندین پروتئین غشایی ویژه است:

- PMP70[1] پروتئین غشایی متعلق به خانواده بزرگ پروتئین های انتقالی به نام ATP- Cassette Binding یا (ABC) می‌باشد.
- تعدادی از پروتئین های غشایی در انتقال مولکول های مختلفی که از نظر اندازه و بار الکتریکی با هم تفاوت دارند، نقش دارند.
- پروتئین های مذکور، همچنین دارای نواحی انتهایی با اسید آمینه‌های هیدروفوبیک و شش قطعه پیچ خورده در غشاء هستند که با نواحی هیدروفیلیک حاوی ATP همراه است.

۲. بیشترین و مهمترین آنزیم پراکسی زومی، کاتالاز است:

- در حدود ٤٠٪ کل پروتئین های پراکسی زوم را کاتالاز تشکیل می‌دهد.
- کاتالاز فعال یک ترامر حاوی هم است.
- کاتالاز به منظور اکسیداسیون سوبستراهایی مثل اتانول از پراکسید هیدروژن استفاده می کند.
- کاتالاز، همچنین، مقادیر اضافی پراکسیدهیدروژن را تجزیه می کند.

۳. گروه دیگر آنزیم های پراکسی زومی، اکسیدازها هستند:

- اکسیدازهای پراکسی زومی، اکسیدازهای فلاوینی نامیده می‌شوند زیرا برای فعالیت از فلاوین به عنوان کوآنزیم بهره می‌برند.
- مثال های ویژه در این رابطه، اورات اکسیدازها، D آمینو اسیداکسیدازها و L آمینو اسید اکسیدازها و آسیل کوآکسیداز می‌باشند.
- این اکسیدازها، سوبستراهای خود را اکسید کرده و اکسیژن را به پراکسید هیدروژن احیاء می کنند.

---

[1] - Peroxisomal Membrane Protein