بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای مهدی آزاد رشته . **خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون** رساله **دکتری** خود را با عنوان « **مقایسه وضعیت متیلاسیون در پروموتور گروهی از ژنها در سلولهای بنیادی CD_{34}^{+} قبل و پس از تمایز به رده اریتروییید در حضور میر ۴۵۱** » در تاریخ **۱۳۹۱/۷/۲۵** ارائه کردند.

بدینوسیله 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 سعید کاویانی	
استاد مشاور	دکترمهرداد نوروزی نیا	
استاد مشاور	دکتریوسف مرتضوی	
استاد ناظر	دکترعلی اکبر پور فتح اله	
استاد ناظر	دکترامیر آتشی	
استاد ناظر	دکترمرتضی کریم پور	
استاد ناظر	دکترفرخنده بهجتی	
نماینده تحصیلات تکمیلی	دکترمسعود سلیمانی	

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 بدید 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 ۴- 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 ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ 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 **مهدی آزاد** دانشجوی رشته **خونشناسی آزمایشگاهی و بانک خون** ورودی سال تحصیلی **۸۷** 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 ۹۱/۸/۶

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 **خونشناسی آزمایشگاهی و بانک خون** است که در سال **۹۱** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **آقای دکتر سعید کاویانی**، مشاوره **آقایان دکتر مهرداد نوروزی نیا و دکتر یوسف مرتضوی** 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 ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : 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 ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **مهدی آزاد** دانشجوی رشته **خونشناسی آزمایشگاهی و بانک خون** 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 خونشناسی آزمایشگاهی و بانک خون

عنوان

مقایسه وضعیت متیلاسیون در پروموتور گروهی از ژنها در سلولهای بنیادی $CD34^+$ قبل و پس از تمایز به رده اریتروییید در حضور میر ۴۵۱

نگارش

مهدی آزاد

استاد راهنما

دکتر سعید کاویانی

اساتید مشاور

دکتر مهرداد نوروزی نیا

دکتر یوسف مرتضوی

پاییز ۱۳۹۱

تقدیم به :

اگر قابل باشد تقدیم میکنم به آقا امام رضا و نیز همسر صبور و خانواده خوبم که در تمام مراحل زندگی، حامی و همراه من بوده اند.

تشکر و قدردانی:

از اساتید محترم گروه خونشناسی دانشگاه تربیت مدرس، آقایان دکتر مسعود سلیمانی، دکتر مهرداد نوروزی نیا، دکتر امیر آتشی، دکتر یوسف مرتضوی و استاد محترم راهنما جناب آقای دکتر سعید کاویانی، دانشجویان مقطع ارشد و دکتری گروه هماتولوژی، آقای دکتر مهدی شکری و سرکار خانم دکتر ناهید آزاد، آقایان دکتر مجید فرشدوستی و دکتر شعبان علیزاده، آقای دکتر سعید شهرابی، سرکار خانم نرگس اسکندری و همه عزیزانی که در این مسیر دشوار، همواره در سختیها، یار و همراه و مشفق من بوده اند نهایت تشکر و قدردانی را دارم. همینطور از همسر دلسوزم سرکار خانم مرضیه یاری و پدر و مادر نازنینم صمیمانه ممنون و سپاس گزارم.

چکیده:

مطالعات انجام شده روی مکانیسمهای تکوینی و تکاملی گلبولهای قرمز منجر به دستیابی بشر به مفاهیم پایه و مهمی در ارتباط با مکانیسمهای عمومی تنظیم بیان ژن و شکل گیری بافتها شده است. تمایز اختصاصی به رده اریتروئید و هر رده دیگری، شدیداً وابسته به تنظیم در سطح بیان ژن و فاکتورهای کنترلی خاص نظیر سیتوکین ها، فاکتورهای نسخه برداری ویژه، عناصر کنترل کننده چرخه سلولی، تکثیر، آپوپتوز و عناصر سیگنالینگ داخل سلول میباشد که گروهی از این فاکتورهای حیاتی در خونسازی عبارتند از: vHL ، RUNX-3 ، E Cadherin ، p16INK4a و p15INK4b .حال آنکه یکی از مکانیسم های مهم مرتبط با چگونگی تنظیم تمایز بافتی توسط فاکتورهای نسخه برداری خاص رده و دیگر عناصر دخیل در این پروسه ها، یک کلاس بزرگ از RNA های کوچک غیر کد کننده به نام Micro RNAs می باشد که بیان mRNA های کد کننده پروتئینهای عملکردی را تنظیم می کنند. امروزه نیز بحث اپی ژنتیک به عنوان یک اصل غیرقابل انکار در تنظیم تمایز بافتی مطرح شده است که یکی از مکانیسم های مهم در رابطه با آن، متیلاسیون پروموتور ژنها و فاکتورهای نسخه برداری می باشد که در نهایت منجر به خاموش شدن ژنهای مورد نظر می گردد. در این مطالعه ابتدا سلولهای بنیادی از خون بند ناف جدا شده و در آنها پس از کشت، وضعیت متیلاسیون در پروموتور ژنهای مذکور بررسی شد. سپس با استفاده از miR-451، سلولهای بنیادی CD_{34}^{+} جدا شده، به سمت رده اریتروبید تمایز داده شد و در نهایت در آنها وضعیت متیلاسیون روی پروموتور همان ژنها مجددا بررسی شده و در شرایط قبل و بعد از تمایز مورد مقایسه قرار گرفت. روش انتقال میر با استفاده از لیپوفکتامین بوده است. ضمناً جهت تایید اینکه همه تغییرات الگوی متیلاسیون بعد از تمایز، صرفاً مربوط به miR-451 بوده، این تغییرات را در شرایطی که تمایز در حضور EPO و بدون miR-451 صورت گرفته نیز مورد بررسی قرار دادیم. پس از انجام MSP برای هر کدام از ژنها، مشخص شد که P15 دارای متیلاسیون نسبی و بیان متوسط در مرحله قبل از تمایز سلولی بوده که وضعیت متیلاسیون آن در مرحله بعد از تمایز با هر دو عامل miR-451 و EPO نیز به همین منوال میباشد. ضمنا بیان ژن P15، در مرحله بعد از تمایز با miR-451، کاهش و در حضور EPO، افزایش میابد. ژن دیگر یعنی P16 نیز قبل از تمایز، فاقد متیلاسیون و دارای بیان کامل است که در مرحله بعد از تمایز، در حضور هر دو نوع عامل تمایزی، دارای متیلاسیون نسبی میباشد و در حضور miR-451 نیز با کاهش بیان مواجه میگردد. ژنهای Ecad و Runx3 نیز دارای متیلاسیون نسبی و بیان متوسط در مراحل قبل و بعد از تمایز سلولی در حضور miR و اریتروپویتین میباشند. ضمنا بیان هر دو ژن، در مرحله بعد از تمایز در حضور miR-451 افزایش میابد و در حضور EPO نیز، بیان Ecad، افزایش و بیان Runx3، کاهش میابد. ژن دیگر یعنی vHL نیز قبل و بعد از تمایز در حضور هر دو عامل تمایزی، فاقد متیلاسیون و دارای بیان کامل است که از نظر میزان بیان در مرحله بعد از تمایز در حضور تنها miR-451، با افزایش بیان مواجه میگردد.

کلمات کلیدی: متیلاسیون- سلولهای بنیادی- ژنهای سرکوبگر تومور- رده اریتروییدی- miR-451

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته..... ۱

۱-۱. مقدمه..... ۲

۱-۲. سلولهای بنیادی..... ۴

۱-۲-۱. سلولهای بنیادی هماتوپویتیک..... ۷

۱-۲-۱-۱. LT-HSC(Long term)..... ۷

۱-۲-۱-۲. ST-HSC(Short term)..... ۷

۱-۲-۲. الگوی تمایز سلولهای هماتوپویتیک..... ۸

۱-۳. خونسازی..... ۹

۱-۳-۱. انواع خونسازی..... ۱۰

۱-۳-۲. تولید RBC از سلولهای بنیادی هماتوپویتیک..... ۱۱

۱-۴. مروری بر فاکتورهای نسخه برداری و سایر عناصر دخیل در خونسازی..... ۱۴

۱-۵. مروری بر MicroRNAs ۲۴

۱-۵-۱. RNA های غیر کد کننده..... ۲۴

۱-۵-۲. بیوژنزmiRNA ۲۶

۱-۵-۳. عملکرد miRNAs ۳۰

۱-۵-۴. بیان miRNA ها..... ۳۱

۱-۵-۵. وضعیت بیانmiRNA ها در گلبولهای قرمز ۳۲

۱-۵-۶. نقش miRNA در هماتوپویز..... ۳۳

۱-۵-۶-۱. miRNAها در هماتوپویز طبیعی..... ۳۳

۱-۵-۶-۲. mi RNA ها و اریتروپوئز..... ۳۵

۱-۵-۶-۲-۱. miR-221,miR-222 ..... ۳۶

۱-۵-۶-۲-۲. miR-24 ..... ۳۷

۱-۵-۲-۶-۳. miR-223 ..... ۳۸
۱-۵-۲-۶-۴. miR-150 ..... ۳۸
۱-۵-۲-۶-۵. miR-15a ۳۹
۱-۵-۲-۶-۶. miR-144/451 ..... ۳۹
۱-۵-۷. پروفایل بیانmiRNA در طول اریتروپوئز سلول های$CD34^+$ ۴۱
۱-۵-۸. تکنیکهای شناسایی miRNAs ۴۳
۱-۵-۹. miRNA ها و نقش آنها در پروسه های بیولوژیکی و بیماریها..... ۴۴
۱-۶. اپی ژنتیک و مکانیسمهای آن..... ۴۵
۱-۶-۱. نقش توارث در اپی ژنتیک..... ۴۷
۱-۶-۲. اثرات محیط در اپی ژنتیک..... ۴۸
۱-۶-۳. ارتباط اپی ژنتیک با اختلالات..... ۴۹
۱-۶-۴. اپی ژنتیک و سرطان..... ۴۹
۱-۶-۵. اپی ژنتیک و پیری..... ۵۰
۱-۶-۶. اپی ژنتیک و اختلال اثر گذاری ژنومی..... ۵۰
۱-۶-۷. اپی ژنتیک و سایر بیماریها..... ۵۱
۱-۶-۷. استیلاسیون هیستون ها..... ۵۱
۱-۶-۸. فسفریلاسیون هیستون..... ۵۲
۱-۶-۹. یوبی کوئیتیناسیون هیستون..... ۵۲
۱-۶-۱۰. سیموئیلاسیون هیستون (SUMO)..... ۵۲
۱-۶-۱۱. متیلاسیون هیستونها..... ۵۳
۱-۶-۱۲. متیلاسیون DNA و بیان ژن..... ۵۴
۱-۶-۱۴. مکانیسم های متیلاسیون..... ۵۶
۱-۶-۱۵. کنترل متیلاسیون DNA ۵۸

۱-۶-۱۶. روش های بررسی الگوی متیلاسیون DNA ۶۰
۱-۶-۱۷. PCR اختصاصی متیلاسیون (MSP)..... ۶۲
۱-۷. مروری بر تاریخچه..... ۶۳
۱-۸. ضرورت انجام تحقیق..... ۶۶
۱-۹. سوالات اصلی تحقیق..... ۶۷
۱-۱۰. اهداف..... ۶۸
۱-۱۱. فرضیات..... ۶۹
۱-۱۲. جنبه های نواوری..... ۶۹
فصل دوم: مواد و روش‌ها..... ۷۰
۲-۱. تجهیزات مورد استفاده..... ۷۱
۲-۲. مواد مصرفی..... ۷۳
۲-۳. بافرها، محیط های کشت و محلولها..... ۷۴
۲-۳-۱. PBS 1X ۷۴
۲-۳-۲. بافر تریس EDTA (TE) ۷۴
۲-۳-۳. بافرTAE 50 X ۷۵
۲-۳-۴. استوک آمپی سیلین..... ۷۵
۲-۴. محیط های مورد استفاده..... ۷۶
۲-۴-۱. محیط RPMI ۷۶
۲-۴-۲. محیط DMEM ۷۶
۲-۴-۳. استوک L-گلوتامین ۷۶
۲-۴-۴. تهیه محیط مناسب برای تکثیر سلولهای بنیادی..... ۷۶
۲-۴-۵. محیط IMDM ۷۷
۲-۴-۶. محیط OPTI-MEM ۷۷

۲-۴-۷. تهیه محیط تمایزی انتخابی..... ۷۷
۲-۵. کیت ها..... ۷۸
۲-۶. مطالعات بیوانفورماتیک..... ۷۹
۲-۶-۱. بررسی توالی و انتخاب جزایر CpG ۷۹
۲-۶-۲. طراحی پرایمرها..... ۷۹
۲-۷. تخلیص سلولهای بنیادی CD34+ از خون بند ناف..... ۸۲
۲-۷-۱. جداسازی مجموعه سلولهای تک هسته از خون بند ناف..... ۸۲
۲-۷-۲. جداسازی سلولهای CD34+ از مجموعه سلولهای تک هسته ای بند ناف..... ۸۴
۲-۷-۳. شمارش سلولهای CD 34 مثبت..... ۸۵
۲-۸. تکثیر سلولهای CD34+ ۸۵
۲-۹. القای تمایز به رده اریتروبید در حضور miR-451..... ۸۵
۲-۱۰. القای تمایز به رده اریتروبید در حضور EPO ۸۶
۲-۱۱. تایید تمایز موفق به رده اریتروبید..... ۸۶
۲-۱۲. تخلیص و جداسازی DNA ۸۷
۲-۱۲-۱. مبانی تخلیص DNA ۸۷
۲-۱۲-۲. بررسی کیفیت DNA ۸۹
۲-۱۲-۳. روشهای متداول استخراج DNA ۹۰
۲-۱۳-۳-۱. استخراج DNA به روش نمک اشباع (Salting out)..... ۹۰
۲-۱۲-۳-۲. تخلیص DNA به روش (Boiling method)..... ۹۱
۲-۱۲-۳-۳. تخلیص DNA با استفاده از کیت کیاژن..... ۹۲
۲-۱۳. تخلیص و جداسازی RNA ۹۳
۲-۱۳-۱. تخلیص RNA به روش بایوزول..... ۹۳
۲-۱۳-۲. تخلیص RNA با کیت کیاژن..... ۹۴

۲-۱۳-۳. بررسی کیفیت RNA ۹۶
۲-۱۴. پردازش DNA بمنظور MSP ۹۶
۲-۱۴-۱.بی سولفاید کردن DNA با روش کیت..... ۹۶
۲-۱۴-۲. محدودیت ها و مشکلات بی سولفاید کردن..... ۹۸
۲-۱۵. تولید cDNA بمنظور Real-Time ۹۹
۲-۱۵-۱. سنتز cDNA با استفاده از کیت ۱۰۰
۲-۱۶. اصول Polymerase Chain Reaction ۱۰۱
۲-۱۶-۱. مراحل PCR ۱۰۳
۲-۱۶-۲. دمای annealing پرایمرها ۱۰۴
۲-۱۶-۳. روش انجام PCR ۱۰۴
۲-۱۷. اصول Methylation-Specific PCR ۱۰۵
۲-۱۷-۱. تهیه کنترل مثبت برای MSP ۱۰۶
۲-۱۸. اصول Quantitative Real-Time PCR ۱۰۷
۲-۱۸-۱. تعیین غلظت DNA با رنگهای فلوسایتومتری.....۱۰۸
۲-۱۸-۲. تعیین غلظت DNA با شاخص های الیگونوکلئوتیدی فلوسایتومتری.....۱۰۸
۲-۱۹. الکتروفورز ژل و اصول آن.....۱۱۰
۲-۱۹-۱. اصول رنگ آمیزی ژل آگارز.....۱۱۱
۲-۱۹-۲. بافر مورد استفاده در الکتروفورز.....۱۱۲
۲-۱۹-۳. بافر بارگذاری (Loading buffer).....۱۱۲
۲-۱۹-۴. منبع تغذیه الکتروفورز.....۱۱۳
۲-۲۰. بررسی وضعیت متیلاسیون ژنهای موردمطالعه.....۱۱۳
۲-۲۰-۱. MSP با پرایمرهای متیله (M).....۱۱۳
۲-۲۰-۲. MSP با پرایمرهای غیرمتیله (U).....۱۱۵

۲-۲۱. بررسی بیان ژنی با استفاده از Real-Time PCR ۱۱۷
۲-۲۲. تایید افزایش بیان miR-451 در سلولهای تمایزی..... ۱۱۸
۲-۲۲-۱. سنتز miRNA 1st-Strand cDNA ۱۱۸
۲-۲۲-۲. مراحل سنتزmiRNA cDNA ۱۲۱
۲-۲۲-۳. انجام Real-Time با miRNA QPCR Master Mix ۱۲۲
۲-۲۲-۳-۱. رنگ Eva Green ۱۲۳
۲-۲۲-۳-۲. کنترلهای لازم برای انجام واکنشmiRNA QPCR..... ۱۲۳
۲-۲۲-۳-۳. استفاده از رنگ رفرانس..... ۱۲۳
فصل سوم: نتایج و یافته‌ها ۱۲۴
۳-۱. نتایج فلوسایتومتری و PCR در تایید تمایز به اریتروئید..... ۱۲۵
۳-۱-۱. نتایج فلوسایتومتری برای سلولهای غیرتمایزی روز صفر..... ۱۲۵
۳-۱-۲. نتایج فلوسایتومتری برای سلولهای تمایزی در حضور miR451 ..... ۱۲۶
۳-۱-۳. نتایج فلوسایتومتری برای سلولهای تمایزی در حضور EPO ۱۲۷
۳-۱-۴. نتایج PCR برای سلولهای روز صفر و تمایزی با miR451 ..... ۱۲۸
۳-۱-۵. نتایج PCR برای سلولهای روز صفر و تمایزی با EPO ۱۲۹
۳-۲. نتایج MSP برای ژنهای مورد مطالعه ۱۳۰
۳-۲-۱. نتایج MSP برای سلولهای غیرتمایزی روز صفر..... ۱۳۰
۳-۲-۲. نتایج MSP برای سلولهای روز هفت و تمایزی با miR451 ..... ۱۳۲
۳-۲-۳. نتایج MSP برای سلولهای روز هفت و تمایزی با EPO بعنوان کنترل..... ۱۳۵
۳-۴. نتایج بررسی های مربوط به بیان ژن ۱۳۷
۳-۴-۱. نتایج Real-Time برای سلولهای غیرتمایزی در مقابل سلولهای تمایزی با miR451 ..... ۱۳۷
۳-۴-۲. نتایج Real-Time برای برای سلولهای غیرتمایزی در مقابل سلولهای تمایزی با EPO بعنوان کنترل..... ۱۴۲

۳-۵. نتایج miRNA Q-PCR ۱۴۸

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادات..... ۱۵۷

۴-۱. بحث و نقد مطالعات گذشته..... ۱۵۸

۴-۲. نتیجه گیری ۱۸۵

۴-۳. پیشنهادات..... ۱۸۶

فهرست منابع..... ۱۸۸

چکیده انگلیسی..... ۲۰۳

فهرست جداول

جدول ۲-۱. مقادیر مواد لازم برای تهیه PBS 1X ۷۴

جدول ۲-۲. مقادیر مواد لازم برای تهیه TE ۷۵

جدول ۲-۳. مقادیر مواد لازم برای تهیه TAE 50X ۷۵

جدول ۲-۴. توالی پرایمرهای متیله و غیر متیله اختصاصی ژن های مورد مطالعه در MSP ۸۱

جدول ۲-۵. توالی پرایمرهای Real Time-PCR برای ژن های مورد مطالعه..... ۸۲

جدول ۲-۶. تهیه Master mix ۱۰۴

جدول ۲-۷. تفکیک قطعات DNA با سایزهای متفاوت در ژل آگارز..... ۱۱۱

جدول ۲-۸. مواد و مقادیر واکنشی MSP با پرایمر M برای همه ژنها..... ۱۱۴

جدول ۲-۹. برنامه دمایی MSP با پرایمر M برای ژن P15 ..... ۱۱۴

جدول ۲-۱۰. برنامه دمایی MSP با پرایمر M برای ژن P16 ..... ۱۱۴

جدول ۲-۱۱. برنامه دمایی MSP با پرایمر M برای ژن Ecad ۱۱۴

جدول ۲-۱۲. برنامه دمایی MSP با پرایمر M برای ژن vHL ۱۱۵

جدول ۲-۱۳. برنامه دمایی MSP با پرایمر M برای ژن Runx3 ..... ۱۱۵

جدول ۲-۱۴. مواد و مقادیر واکنشی MSP با پرایمر U برای همه ژنها ۱۱۵

جدول ۲-۱۵. برنامه دمایی MSP با پرایمر U برای ژن P15 ..... ۱۱۶

جدول ۲-۱۶. برنامه دمایی MSP با پرایمر U برای ژن P16 ..... ۱۱۶

جدول ۲-۱۷. برنامه دمایی MSP با پرایمر U برای ژن Ecad ۱۱۶

جدول ۲-۱۸. برنامه دمایی MSP با پرایمر U برای ژن vHL ۱۱۶

جدول ۲-۱۹. برنامه دمایی MSP با پرایمر U برای ژن Runx3 ..... ۱۱۷

جدول ۲-۲۰. مواد و مقادیر واکنشی quantitative Real Time-PCR ۱۱۷

جدول ۲-۲۱. برنامه دمایی quantitative Real Time-PCR ۱۱۸

جدول ۲-۲۲. مقادیر مواد لازم برای تهیه مخلوط اولیه جهت واکنش پلی آدنیلاسیون ۱۲۱

جدول ۲-۲۳. مقادیر مواد لازم برای تهیه مخلوط کلی واکنش سنتزmiRNA cDNA ۱۲۲

جدول ۳-۱. نتایج عددی Real-Time، برای ژنهای مورد مطالعه، قبل و پس از تمایز با miR-451 ..... ۱۴۰

جدول ۳-۲. نتایج عددی Real-Time، برای ژنهای مورد مطالعه، قبل و پس از تمایز با اریتروپویتین ۱۴۶

جدول ۳-۳. نتایج عددی Q-PCR miRNA، برای miR451، قبل و پس از تمایز..... ۱۵۳

جدول ۳-۴. نتایج عددی Q-PCR miRNA، در حضور Scramble..... ۱۵۳

جدول ۴-۱. مرور مختصر بر ژنهای مشترک و اختصاصی رده که در پیشسازهای غیر متعهد و متعهد خونساز بیان میشوند ۱۶۸

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱. مقادیر CT حاصل از Real-Time PCR، قبل و پس از تمایز در حضور miR451 ..... ۱۴۰

نمودار ۳-۲. مقادیر نرمالسازی شده بیان ژن، قبل و پس از تمایز در حضور miR451 ..... ۱۴۱

نمودار ۳-۳. نسبت کالیبر شده بیان ژن ، پس از تمایز به قبل از آن (در حضور miR451) ۱۴۱

نمودار ۳-۴. مقادیر CT حاصل از Real-Time PCR، قبل و پس از تمایز در حضور اریتروپویتین ۱۴۶

نمودار ۳-۵. مقادیر نرمالسازی شده بیان ژن، قبل و پس از تمایز در حضور اریتروپویتین ۱۴۷

نمودار ۳-۶. نسبت کالیبر شده بیان ژن ، پس از تمایز به قبل از آن (در حضور اریتروپویتین)..... ۱۴۸

نمودار ۳-۷. مقادیر CT حاصل از Q-PCR miRNA برای miR-451، قبل و پس از تمایز ۱۵۴

نمودار ۳-۸. مقادیر CT حاصل از Q-PCR miRNA در حضور Scramble، قبل و پس از تمایز ۱۵۴

نمودار ۳-۹. مقادیر نرمالسازی شده بیان miR451، قبل و پس از تمایز ۱۵۵

نمودار ۳-۱۰. مقادیر نرمالسازی شده بیان miR-451 در حضور Scramble، قبل و پس از تمایز..... ۱۵۵

نمودار ۳-۱۱. نسبت کالیبر شده بیان miR451، پس از تمایز به قبل از آن..... ۱۵۶

نمودار ۳-۱۲. نسبت کالیبر شده بیان miR-451 در حضور Scramble، پس از تمایز به قبل از آن..... ۱۵۶

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱. خصوصیات اصلی سلولهای بنیادی ۵

شکل ۱-۲. نمای شماتیک از تمایز یک سلول هماتوپویتیک..... ۸

شکل ۱-۳. نمای شماتیک از انواع خونسازی طی شکلگیری جنین در انسان..... ۱۱

شکل ۱-۴. مراحل مختلف تولید گلبول قرمز بالغ از سلولهای بنیادی هماتوپویتیک..... ۱۲

شکل ۱-۵. نمایی شیمیاتیک از ریزمحیط مغز استخوان..... ۱۳

شکل ۱-۶. فاکتورهای رونویسی دخیل در تولید سلوهای مختلف خونی..... ۱۴

شکل ۱-۷. پروسه بیوژنز miRNA ۳۰

شکل ۱-۸. عملکرد miRNA ۳۱

شکل ۱-۹. الگوی بیانmiRNA در بافتهای مختلف بدن..... ۳۲

شکل ۱-۱۰. الگوی بیان miRNA در تمایز سلولهای خونساز..... ۳۵

شکل ۱-۱۱. هیپوتز کد هیستونی برای مکانیسمهای مختلف اپی ژنتیک..... ۴۷

شکل ۱-۱۲. مکانیسمهای متیلاسیون..... ۵۸

شکل ۱-۱۳. نحوه انتقال متیل توسط آنزیمهای متیل ترانسفراز..... ۶۰

شکل ۲-۱. شمایی از واکنش MSP ۱۰۶

شکل ۲-۲. روشهای مختلف انجام Real-Time ۱۰۹

شکل ۳-۱. میزان بیان مارکر CD34، بر روی سلولهای غیر تمایزی روز صفر که از خون بند ناف جدا شده است..... ۱۲۶

شکل ۳-۲. میزان بیان مارکر (Transferrin receptor(CD71، بر روی سلولهای روز هفتم تمایز که مربوط به تمایز در حضور miR-451 میباشد..... ۱۲۷

شکل ۳-۳. میزان بیان مارکر (Transferrin receptor(CD71، بر روی سلولهای روز هفتم تمایز که مربوط به تمایز در حضور اریتروپویتین میباشد..... ۱۲۸

شکل ۳-۴. نتیجه PCR پس از تمایز با miR451 ..... ۱۲۹

شکل ۳-۵. نتیجه PCR پس از تمایز با EPO ۱۳۰

شکل ۳-۶. نتایج MSP برای ژنهای مورد مطالعه در سلولهای غیرتمایزی. دماهای مختلف برای ژنهای متفاوت بصورت گرادیان تامین شده است..... ۱۳۱

شکل ۳-۷. نتایج MSP برای ژنهای P15 و P16 در سلولهای روز هفت پس از تمایز با miR451 . دماهای مختلف برای حالتهای متفاوت بصورت گرادیان تامین شده است..... ۱۳۲

شکل ۳-۸. نتایج MSP برای ژن Runx3 در سلولهای روز هفت پس از تمایز با miR451. دماهای مختلف برای حالتهای متفاوت بصورت گرادیان تامین شده است..... ۱۳۳

شکل ۳-۹. نتایج MSP برای ژن Ecad در سلولهای روز هفت پس از تمایز با miR451. دماهای مختلف برای حالتهای متفاوت بصورت گرادیان تامین شده است..... ۱۳۴

شکل ۳-۱۰. نتایج MSP برای ژن vHL در سلولهای روز هفت پس از تمایز با miR451. دماهای مختلف برای حالتهای متفاوت بصورت گرادیان تامین شده است..... ۱۳۴

شکل ۳-۱۱. نتایج MSP برای وضعیت متیله ژنهای موردنظر در سلولهای روز هفت پس از تمایز با EPO. دماهای مختلف برای حالتهای متفاوت بصورت گرادیان تامین شده است..... ۱۳۵

شکل ۳-۱۲. نتایج MSP برای وضعیت متیله ژنهای موردنظر در سلولهای روز هفت پس از تمایز با EPO. دماهای مختلف برای حالتهای متفاوت بصورت گرادیان تامین شده است..... ۱۳۶

شکل ۳-۱۳. نتایج MSP برای ژنهای مورد مطالعه در سلولهای تمایزی روز هفت با واسطه EPO. دماهای مختلف برای ژنهای متفاوت بصورت گرادیان گذاشته شده است..... ۱۳۶

شکل ۳-۱۴. نتایج Amplification Plot برای ژنهای مورد مطالعه در Real-Time، قبل و پس از تمایز در حضور miR-451 ..... ۱۳۸

شکل ۳-۱۵. نتایج Melting Curve برای ژنهای مورد مطالعه در Real-Time، قبل و پس از تمایز در حضور miR-451 ..... ۱۳۹

شکل ۳-۱۶. نتایج Amplification Plot برای گروه اول از ژنهای مورد مطالعه در Real-Time، قبل و پس از تمایز در حضور اریتروپویتین..... ۱۴۲