١٣٢٨٥

١٠٤١٧

۸۷/۹/۱۰۰۱۷۷
۸۷/۹/۲۶

دانشکده علوم پایه

رساله دوره دکتری ژنتیک (مولکولی)

عنوان:

بررسی ارتباط بین گسترش تکرار GAA در ژن FRDA با تغییرات ژنتیکی و بیوشیمیایی کمپلکس I زنجیره تنفسی میتوکندریایی در بیماران فردریش آتاکسیا (FA)

نگارش:

محمد مهدی حیدری

استاد راهنما:

دکتر سید مسعود هوشمند

اساتید مشاور:

دکتر سامان حسینخانی

دکتر شهریار نفیسی

شهریور ۱۳۸۷

۱۳۸۷/۹/۱۲

۱۰۴۱۶

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پایه

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای **محمدمهدی حیدری** رساله واحدی خود را باعنوان: «**بررسی ارتباط بین گسترش تکرار GAA در ژن FRDA با تغییرات ژنتیکی و بیوشیمیایی کمپلکس I زنجیره تنفسی میتوکندریایی در بیماران فردریش آتاکسیا (FA)**» در تاریخ ۸۷/۶/۲۶ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می کند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	آقای دکتر سیدمسعود هوشمند	استادیار	
۲- استاد مشاور	آقای دکتر سامان حسینخانی	دانشیار	
۳- استاد مشاور دوم	آقای دکتر شهریار نفیسی	استادیار	
٤- استاد ناظر داخلی	آقای دکتر مجید صادقی‌زاده	دانشیار	
٥- استاد ناظر داخلی	آقای دکترمهرداد بهمنش	استادیار	
٦- استاد ناظر خارجی	آقای دکتر محمود تولایی	استادیار	
۷- استاد ناظر خارجی	آقای دکتر سعید مروتی	استادیار	
۸- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	آقای دکتر سیدجواد مولی	دانشیار	

انشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پایه

بسمه تعالی

آیین‌نامهٔ چاپ 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، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادهٔ ۲ در صفحهٔ سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند

«کتاب حاضر حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی‌ارشد/رسالهٔ دکتری نگارنده در رشتهٔ ژنتیک (مولکولی) است که در سال ۱۳۸۷ در دانشکدهٔ علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکارخانم /جناب آقای دکتر سید مسعود هوشمند ، مشاورهٔ سرکارخانم/جناب آقای دکتر سامان حسنانی و مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر محمدرضا نفیسی از آن دفاع شده است.»

مادهٔ 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 اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادهٔ ۴- درصورت عدم رعایت مادهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ‌شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس ، تادیه کند.

مادهٔ ۵- دانشجو تعهد و قبول می‌کند درصورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادهٔ ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه‌شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادهٔ ۶- اینجانب محمدمهدی حیدری دانشجوی رشته ژنتیک (مولکولی) مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی:
تاریخ و امضا:
محمدمهدی حیدری
۸۷/۶/۱۸

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی 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 هیات علمی، دانشجویان، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه‌ها / رساله‌های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره‌برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستورالعمل‌های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشند.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین نامه های مصوب انجام می‌شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

تقدیم به پدر و مادر عزیزتر از جانم و همسر مهربان و فداکارم

که با سرچشمه های زلال مهر و محبت بی دریغ خود باعث به ثمر

رسیدن تلاشم شدند

و تقدیم به تمام کسانی که در طول دوران تحصیلم همواره مرا

مورد لطف و عنایت خویش قرار دادند.

تشکر و قدردانی

" زندگی صحنه ی یکتای هنرمندی ماست هر کسی نغمه خود خواند و از صحنه رود
صحنه پیوسته بجاست خرم آن نغمه که مردم بسپارند به یاد"

سپاس و ستایش کردگار یکتایی راست که ذات بی کرانش سرشار از دانش است و چه با سخاوت از این خوان بی همتا، بشر را موهبتی شگرف ارزانی داشت و دریای کمالات خود را به روی ما گشود.
سپاس به درگاه آن یگانه معبود ازلی که در تمام لحظات، سایه لطف و رحمت بی کرانش در پهنه هستی ام گسترده بود و در سایه عنایتش توفیق تعقل و تامل یافتم.
اجرا و تدوین این رساله مدیون راهنمایی، مساعدت و حمایت بزرگوارانی است که بی شک بدون یاری آنان طی مسیر دشوارتر می نمود. لذا بر خود لازم می دانم تا مراتب سپاسگزاری خود را نسبت به کلیه عزیزانی که مرا در مراحل مختلف رساله یاری فرمودند، ابراز دارم.
از استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر سید مسعود هوشمند که همواره با رهنمودهای ارزشمند خویش، روشنگر مسیر تحقیق بودند، بی نهایت سپاسگزارم.
از اساتید فرهیخته و گرامی جناب آقای دکتر سامان حسینخانی و جناب آقای دکتر شهریار نفیسی که زحمت مشاوره رساله را بر عهده داشتند و از محضر هر دو ایشان استفاده کردم، متشکرم.
از اساتید ارجمند آقای دکتر صادقی زاده ، آقای دکتر بهمنش ، آقای دکتر تولایی و آقای دکتر مروتی که زحمت مطالعه و داوری رساله را بر عهده داشتند و همچنین از تمامی اساتید بزرگوارم در مقاطع مختلف تحصیلی که همواره از وجودشان کسب فیض نموده ام سپاسگزارم.
از خانواده عزیزم پدر صبور و مادر مهربانم و همچنین همسر فداکارم و پسر دلبندم، علیرضا، به خاطر محبتها و الطاف بی دریغشان و حمایت و پشتیبانیشان، بی نهایت متشکرم. مخصوصا از همسر عزیزم سپاسگزارم که همیشه مشوق، همراه و یاورم هستند و خوشبختی ام را مدیون اویم.
از کارشناسان محترم آزمایشگاه ژنتیک مرکز پزشکی خاص، خانم ها رستمی، دهقان، خلیلی و طالب زاده که با مساعدت های خویش باعث تسریع در انجام رساله شدند، تشکر می نمایم.
در نهایت از تمامی دوستان و هم رشته ای های مهربانم که در این دوره مرا یاری رساندند، سپاسگزاری می نمایم.
از ایزد متعال سلامتی و توفیق یکایک عزیزان را در تمامی مراحل زندگی مسئلت دارم.

محمد مهدی حیدری
شهریور ماه ۱۳۸۷

خلاصه:

فردریش اتاکسیا (FRDA) یک بیماری نورودژنرتیو با وراثت اتوزومال مغلوب است که علت آن نقص در میزان پروتئین فراتاکسین می باشد. کاهش میزان فراتاکسین باعث افزایش میزان آهن در میتوکندری شده و در نتیجه رادیکال های آزاد در میتوکندری بالا می رود و باعث اختلال در کمپلکس های زنجیره تنفسی می شود. گسترش تکرارهای سه تایی GAA در اولین اگزون فراتاکسین باعث کاهش نسخه برداری از آن می شود. هدف ما در این مطالعه بررسی ارتباط گسترش تکرار GAA در ژن FRDA با اختلالات ژنتیکی و بیوشیمیایی در کمپلکس I زنجیره تنفسی بیماران فردریش اتاکیسا بود.

در این مطالعه ، میزان فعالیت کمپلکس I زنجیره تنفسی (آنزیم NADH فروسیاند ردوکتاز) و ATP داخل سلولی را در لنفوسیت های جدا شده از بیماران (۱۲ نفر) و افراد کنترل سالم (۲۵) اندازه گیری شد و چون DNA ی میتوکندری را بعنوان عامل تعدیل کننده در بیماری FRDA در نظر می گیرند ما تغییرات نوکلئوتیدی را در mtDNA که سبب نقایص زنجیره تنفسی و کاهش ATP سلولی می شود مورد بررسی قرار دادیم. با بررسی ۲۰ بیمار، ما یک حذف ۸/۶ kb در ۱۱ بیمار با استفاده از Mulitple PCR و ساترن بلاتینگ پیدا کردیم. برای یافتن تغییرات نوکلئوتیدی نیز از روش TTGE استفاده شد و در پی یافتن باندی که نسبت به باند نرمال دارای تغییر است آن نمونه جهت یافتن دقیق جهش تعیین توالی شد. برخی از مطالعات نشان می دهد که تعداد کپی mtDNA در سلول های بیماران فردریش اتاکسیا کاهش می یابد و DNA پلی مراز گاما (POLG) در همانند سازی آن دخالت دارد. بر اساس این موضوع تکرارهای CAG در ژن POLG در ۲۰ بیمار و ۴۹ کنترل مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج ما نشان می دهد که فعالیت کمپلکس I و ATP داخل سلولی در بیماران نسبت به افراد کنترل کاهش رانشان می دهد ($p=0.001$) و یک ارتباط قوی بین کاهش فعالیت کمپلکس I و کاهش ATP داخل سلولی وجود دارد ($r=0.93$; $p<0.002$). در مجموع از این ۲۰ بیمار، ۳۲ جهش در ژن های ND یافت شد که ۱۶ (۵۱/۶٪) جدید بوده و ۱۵ (۴۸/۳٪) جهش قبلا در بیماری های دیگر گزارش شده است. میزان جهش نیز در ژن های ND بیماران بسیار بالاتر از افراد کنترل سالم است ($p <0.001$) و یک ارتباط معکوس بین تعداد جهش ها در ND و سن شروع بیماری یافت شد. یک ارتباط معکوس با اهمیت آماری بالا بین تکرارهای CAG و سن شروع بیماری یافت شد ($r = -0.81$) .

این مطالعه پیشنهاد می کند که نقص بیوشیمی فعالیت کمپلکس I و تولید ATP و جهش های ژن ND و نا پایداری تکرار CAG در ژن POLG می تواند بعنوان یک فاکتور مستعد کننده بیماری ست که به همراه عوامل خطری محیطی ممکن است در کاهش سن شروع و پیشرفت بیماری نقش داشته باشد.

کلمات کلیدی:

بیماری فردریش اتاکسیا؛ فعالیت کمپلکسI؛ ATP داخل سلولی؛ mtDNA؛ سلول لنفوسیت؛ ژنهای ND؛ ژن POLG؛ جهش؛ TTGE.

عنوان | صفحه

فصل اول: مقدمه ۱
۱-۱ تاریخچه ۲
۱-۲- خصوصیات بالینی ۳
۱-۳- ژنتیک و بیوشیمی بیماری ۵
۱-۴- نقش فراتاکسین در مدلهای مخمری ۹
۱-۵- تست های ژنتیک مولکولی برای تشخیص فردریش اتاکسیا ۱۰
۱-۶- ارتباط فنوتیپ-ژنوتیپ بیماری ۱۱
۱-۷- روشهای درمانی ۱۱
۱-۸- میتوکندری ۱۳
۱-۸- ۱- ساختار و عملکرد میتوکندری ۱۵
۱-۸- ۲- غشاء داخلی میتوکندری ۱۶
۱-۸- ۳- ژنوم میتوکندری ۱۶
۱-۸- ۴- خصوصیات ویژه mtDNA ۱۹
۱-۸- ۵- سازمانبندی ژنوم میتوکندری ۱۹
۱-۸- ۶- میزان بالای موتاسیون ۲۱
۱-۸- ۷- وراثت مادری ۲۲
۱-۸-۸- ماشین همانندسازی mtDNA ۲۲
۱-۹- DNA پلیمراز گاما (POLG) ۲۳
۱-۱۰- جهش های DNAی میتوکندریایی ۲۵
۱-۱۱- کمپلکسهای میتوکندری ۲۸
۱-۱۱-۱-کمپلکس I (NADH یوبی کوئینون اکسیدوردوکتاز) ۲۹
۱-۱۱-۲- کمپلکس II (سوکسینات یوبی کوئینون اکسیدوردوکتاز) ۳۰
۱- ۱۱-۳- کمپلکس III (یوبی کوئینون- سیتوکروم c اکسیدوردوکتاز) ۳۱
۱-۱۱-۴- کمپلکس IV (سیتوکروم c اکسیداز) ۳۱
۱-۱۲- روشهای آزمایشگاهی استفاده شده برای غربالگری بازآرایی های بزرگ شامل حذف های ژنوم میتوکندری ۳۱
۱-۱۲-۱- تشخیص حذف های ژنوم میتوکندری با آنالیز PCR ۳۲

۱-۱۲-۲- آنالیز ساترن بلات ۳۲
۱-۱۳- روش های آزمایشگاهی مورد استفاده برای غربالگری جهش های نقطه ای ناشناخته ۳۳
۱-۱۳-۱- TTGE(Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis)..... ۳۴
۱-۱۳-۲- تعیین توالی ۳۷
۱-۱۴- تعیین میزان هتروپلاسمی در mtDNA دارای جهش های نقطه ای ۳۷
۱-۱۵- مشخصات جهش های بیماریزا ۳۸
۱-۱۶- اندازه گیری ATP توسط لوسیفراز ۳۹
۱-۱۷- مروری بر مطالعات گذشته ۴۰
۱-۱۷-۱- ارتباط بیماریهای نورودژنرتیو با میتوکندری ۴۰
۱-۱۸- هدف ۴۴
فصل دوم: مواد و روش ها ۴۵
۲-۱- تهیه محلولها و بافرها ۴۶
۲-۲- مشخصات بیماران ۵۱
۲-۲-۱- جمع آوری نمونه ۵۲
۲-۲-۲- استخراج DNA تام سلولی از بیماران و افراد کنترل ۵۲
۲-۲-۳- بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده ۵۳
۲-۲-۴- UV اسپکتروفتومتری ۵۴
۲-۲-۵- الکتروفورز ژل آگارز ۵۵
۲-۲-۶- PCR ۵۶
۲-۲-۶-۱- شرایط طراحی پرایمر ۵۶
۲-۳- تعیین گسترش تکرار سه تایی GAA به روش PCR ۵۷
۲-۴- تشخیص حذف های ژنوم میتوکندری در بیماران ۵۸
۲-۴-۱- روش Multiplex PCR ۵۸
۲-۴-۲- آنالیزهای بلاتینگ جهت تایید نتایج واکنش های PCR ۶۲
۲-۴-۲-۱- تکثیر ناحیه D-loop ۶۲
۲-۴-۲-۲- استخراج DNA از ژل با استفاده از کیت Diatom DNA Elution ۶۳

۲-۴-۲-۳- ساخت پروب برای ناحیه D-loop میتوکندری ۶۵
۲-۴-۲-۲- نقطه گذاری DNA ۶۶
۲-۴-۲-۵- مرحله پیش از همبند شدن و همبند شدن ۶۷
۲-۴-۲-۶-مرحله آشکار سازی ۶۹
۲-۴-۳- ساترن بلاتینگ ۷۲
۲-۵- تشخیص جهش های نقطه ای هتروپلاسمی و هموپلاسمی در ژنوم میتوکندری .. ۷۳
۲-۵-۱-روش TTGE (Temporal temperature gradient gel electrophoresis) ... ۷۳
۲-۵-۱-۱- تکثیر قطعات مورد نظر از ژنوم میتوکندری برای آنالیز TTGE ۷۳
۲-۵-۱-۲- دناتوراسیون و رناتوراسیون محصولات PCR ۷۶
۲-۵-۱-۳- آماده کردن ژل آکریل آمید برای الکتروفورز در روش TTGE ۷۶
۲-۵-۱-۴- تعیین محدوده دمایی و میزان افزایش دما در هر ساعت طی TTGE ۷۸
۲-۵- واکنش های PCR برای تعیین توالی قطعات DNA دارای جهش ۸۰
۲-۶- انجام Mispairing PCR-RFLP ۸۳
۲-۶-۱- هضم DNA توسط آنزیم EcoRI ۸۴
۲-۷- روش جداسازی گلبولهای تک هسته ای خون محیطی (Ficolymph) ۸۵
۲-۸- اندازه گیری غلظت پروتئین به روش بردفورد (Bradford assay) ۸۶
۲-۹- سنجش فعالیت کمپلکس I (آنزیم NADH- فروسیانید ردوکتاز) ۸۷
۲-۱۰- استخراج ATP داخل سلولی و اندازه گیری آن ۸۹
۲-۱۱- بررسی تکرار سه نوکلئوتیدی CAG ژن DNA پلی مراز گاما (POLG) ۹۰
فصل سوم: نتایج ۹۱
۳-۱- مشاوره ژنتیک با بیماران و رسم شجره ۹۲
۳-۲- تعیین تکرارهای GAA در اینترون اول ژن FRDA ۹۲
۳-۳- انجام Multiplex PCR جهت مطالعه حذف های ژنوم میتوکندری ۹۵
۳-۴- آنالیز ساترن بلات ۹۷
۳-۵- اندازه گیری فعالیت کمپلکس I (NADH فروسیانید ردوکتاز) لنفوسیت های جدا شده از افراد بیمار و کنترل ۹۸
۳-۶- اندازه گیری ATP داخل سلولی در بیماران ۹۹

۳-۷- بررسی تکرار سه تایی CAG در ژن پلی مراز گاما (POLG) ۱۰۱
۳-۸- انجام TTGE جهت مطالعه جهش های نقطه ای ژنوم میتوکندری ۱۰۲
۳-۹- تعیین توالی قطعات دارای جهش های نقطه ای ۱۰۵
۳-۱۰- هم ردیفی (Alignment) جهش های تغییر نوکلئوتیدی ۱۰۸
۳-۱۱- روش Misspairing PCR- RFLP ۱۱۱
فصل: چهارم بحث ۱۱۴
۴-۱- فعالیت کمپلکس I زنجیره تنفسی میتوکندری (NADH فروسیانید ردوکتاز) ... ۱۱۶
۴-۲- اندازه گیری میزان ATP داخل سلولی بیماران FRDA ۱۱۹
۴-۳- حذف های ژنوم میتوکندری در فردریش اتاکسیا ۱۲۱
۴-۴- بررسی تکرارهای سه تایی CAG در ژن DNA پلی مراز گاما (POLG) ۱۲۲
۴-۵- جهش های تغییر جفت بازی در ژنوم میتوکندری افراد مبتلا به فردریش اتاکسیا ۱۲۴
۴-۵-۱- زیر واحد ND1 (NADH dehydrogenase subunit 1) ۱۲۷
۴-۵-۲- زیر واحد ND2 (NADH dehydrogenase subunit 2) ۱۲۹
۴-۵-۳- زیر واحد ND4L (NADH dehydrogenase subunit 4L) ۱۳۰
۴-۵-۴- زیر واحد ND4 (NADH dehydrogenase subunit 4) ۱۳۱
۴-۵-۵- زیر واحد ND5 (NADH dehydrogenase subunit 5) ۱۳۲
۴-۵-۶- زیر واحد ND6 (NADH dehydrogenase subunit 6) ۱۳۳
۴-۵-۹- جهش در ژن $tRNA^{Lue}$ میتوکندریایی ۱۳۴
۴-۶- تفسیر یافته های تغییرات توالی: جهش یا پلی مورفیسم؟ ۱۳۴
۴-۷- نتیجه گیری ۱۳۷
۴-۸- پیشنهادات ۱۴۰
منابع ۱۴۲
خلاصه انگلیسی ۱۵۶

فصل اول

مقدمه

فصل اول: مقدمه

۱-۱- تاریخچه

این بیماری از این جهت بنام فردریش اتاکسیا[1] (FRDA) نامیده می شود که در سالهای ۱۸۶۳ تا ۱۸۷۷ پنج مقاله توسط نیکولاس فردریش[2] در مورد آن انتشار یافت. در این سری مقاله ها فردریش شرایط ۹ عضو از سه خانواده را توصیف کرد. گزارش های اولیه او دال بر سن شروع بیماری در زمان بلوغ بود و آنها علائمی چون ناهماهنگی حرکتی[3]، فقدان عصب حسی، ضعف ماهیچه، Scoliosis، بد شکلی پاها[4] و علائم قلبی گزارش کردند. فقدان رفلکس تاندونی توسط دانشجوی فردریش بنام Erb در سال ۱۸۷۵ گزارش شد(۱). آقای فردریش بر طبیعت فامیلی FRDA توجه کرد و با آنالیز جدا سازی[5] ، وراثت اتوزومال مغلوب را بدست آورد. میزان بالای ازدواج همخونی در خانواده مبتلا این وراثت را تایید می کرد. FRDA شایعترین اتاکسیا وراثتی است (۲). قبل از آنکه تشخیص مولکولی وجود داشته باشد، شیوع آن ۱ در ۵۰۰۰۰ افرد سالم و شیوع ناقلین در حدود ۱:۱۱۰ تخمین زده می شد (۳). بسیاری از مطالعات اخیر بر اساس اطلاعات مولکولی شیوع

[1] -Friedreich's ataxia
[2] -Nicholaus Friedreich
[3] - Ataxia
[4] - Foot deformity
[5] -Segregation

بیشتری را پیشنهاد می کند (۴، ۵ و ۶). بر اساس آزمایش ژن FRDA در ۱۷۵ فرد سالم در آلمان میزان ناقلین ۱:۶۰ تا۱:۹۰ تخمین زده شد. شیوع بیماری در آسیا و افریقا پایین تر است (۷).

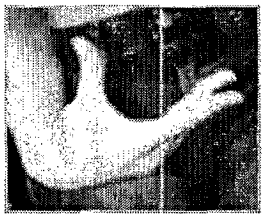
۱-۲- خصوصیات بالینی

خصوصیات بالینی FRDA آنهایی است که در جدول ۱-۱ بعنوان معیار تشخیصی آورده شده است. خصوصیات بالینی اصلی شامل ناهماهنگی حرکتی دستها و پاها، فقدان رفلکس اندامهای تحتانی، کاهش یا فقدان حس تعادل و کاردیومیوپاتی، kyphoscoliosis و بدشکلی پاها خصوصیت شایع ولی غیر ضروری آنها است (شکل ۱-۱). استفاده از معیار تشخیصی دقیق برای اطمینان از بیمارانی که سابقه FRDA دارند و همچنین مطالعات مولکولی ضروری است. مواردی از FRDA که دارای تمام علائم فوق باشند FRDA کلاسیک نامیده می شود و آنهایی که فاقد معیارهای ضروری هستند را غیر کلاسیک گویند (۸).

جدول ۱-۱: معیار تشخیصی برای FRDA توسط Geoffroy et al و Harding . معیار تشخیصی Harding جالب توجه تر است زیرا باعث تشخیص زود هنگام بیماری می شود.

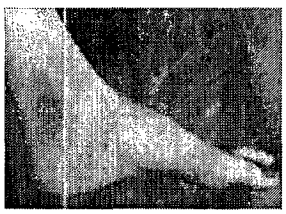
معیار	Geoffroy et al, 1976	Harding, 1981
اولیه (ضروری برای تشخیص)	۱) سن شروع قبل از پایان بلوغ، ۲) ناهماهنگی حرکتی پاها، ۳) دیس آرتریا، ۴) فقدان حس تعادل، ۵) فقدان رفلکس تاندونی در پاها، ضعف پاها	۱) سن شروع قبل از ۲۵ سالگی است، ۲) ناهماهنگی حرکتی مداوم اندامی دست و پاها، ۳) فقدان حرکت سریع زانو و قوزک پا.
ثانویه	۱) پاسخهای ماهیچه بازکننده کف پایی، ۲) pes cavus، ۳) scoliosis ۴) کاردیومیوپاتی	۱) دیس آرتریا، ۲) پاسخهای ماهیچه بازکننده کف پایی
علائم دیگر		اگر علائم ثانویه وجود نداشت، علائم زیر باید وجود داشته باشد: ۱) یک خواهر یا برادر از معیارهای اولیه و ثانویه رنج می برند.۲) سرعت انتقال متوسط عصب حرکتی بیشتر از ۴۰ m/s باشد آنرا از موارد نوع ۱ وراثتی نوروپاتی حسی و حرکتی (HMSN) مستثنی می کند.

فردریش اتاکسیا (FRDA) شایع ترین اتاکسیای وراثتی (۱/۳۰۰۰۰ تولد زنده در بین سفید پوست ها) است که دارای الگوی اتوزومال مغلوب است (۹). بیماری باعث نورودژنریتیو پیشرونده و کاردیومیوپاتی می شود و در ٪۱۰ موارد دیابت نیز ایجاد می شود (۱۰). سن شروع معمولا حدود بلوغ است و چون بیماری پیشرونده است و اندام ها را درگیر می کند تا بیست سالگی نیاز به ویلچر می باشد. بدشکلی پاها، آتروفی چشمی، و کری نیز در این بیماران دیده می شود (۱۱). ژن درگیر در FRDA در تمام سلولها بیان می شود اما سطح بیان در بافت های مختلف در مراحل مختلف تکوین متفاوت است. محصول ژن FRDA بنام فراتاکسین[1] در سلولهای غنی از میتوکندری مانند کاردیوسیتها و نورون ها به مقدار زیاد بیان می شود. گسترش تکرار سه نوکلئوتیدی GAA در اینترون اول ژن FRDA سبب کاهش بیان mRNA ی فراتاکسین و در نتیجه کاهش پروتئین فراتاکسین می شود (۱۲).



Friedreich`s hand

kyphoscoliosis



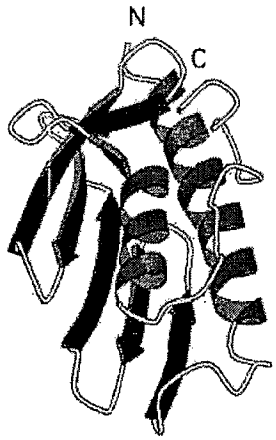
Pes cavus

شکل ۱-۱: قسمتهای مختلف بدن درگیر در بیماری فردریش اتاکسیا.

[1] -Frataxin

۱-۳- ژنتیک و بیوشیمی بیماری

ژن بیماری فردریش اتاکسیا، FRDA (FXN,X25) مستقیما در پاتوژنز بیماری دخالت دارد. این ژن حاوی ۷ اگزون است (۵a-۱، ۵b، ۶) که ۴۰ کیلوباز طول دارد و در ناحیه q۱۳-۱۲ ۹ قرار دارد کد می شود (۱۰، ۱۳). شایع ترین رونوشت آن از اگزونهای ۵a-۱ بدست می آید که پروتئینی بنام فراتاکسین کد می کند (شکل ۱-۲) . فراتاکسین انسانی پروتئین ۲۱۰ اسید آمینه ای است که پروتئین بوسیله توالی ویژه میتوکندری در انتهای -N به ماتریکس میتوکندری وارد می شود (۱-۵۵ اسید آمینه) (۱۲).



شکل ۱-۲: ساختار سه بعدی پروتئین فراتاکسین.

با یک پردازش الترناتیو، اگزون ۵b نیز می تواند نسخه برداری شود و پروتئین ۱۷۱ اسید آمینه ای بدست آید. اگزون ۶ غیر کد کننده است. ناحیه حفظ شده از نظر تکاملی از اسید آمینه ۱۴۱ تا ۱۶۷ است که توسط اگزون های ۴ و ۵b در *C. Elegans* و *S.Cerevisiae* کد گذاری می شود.Campuzano و همکارانش با نورترن بلاتینگ نشان دادند که بالاترین سطح بیان ژن FRDA در قلب است و سطح متوسط در کبد، ماهیچه اسکلتی و پانکراس است. مطالعات مشابه دیگر در سیستم عصبی مرکزی نشان داد که بالاترین بیان در طناب

عصبی و کمترین سطح بیان در مخچه و مقدار خیلی کمتر در قشر مخچه وجود دارد. سطح mRNA فراتاکسین بسیار کم بوده و یا قابل شناسایی نیست (۱۴). علاوه بر این سطح پروتئین در بافتهای گوناگون افراد بیمار مانند مخچه، قشر مخچه و بافت ماهیچه ای و لنفوبلاستها پایین است اما فاقد آن نمی باشد. یک ارتباط معکوس بین اندازه تکرار GAA و مقدار پروتئین فراتاکسین در لنفوبلاستها وجود دارد (۱۵). مطالعات بر روی جنین موش نشان داد که بیان فراتاکسین از روزهای ۱۰ تا ۱۴ افزایش می یابد (۱۶، ۱۷). مطالعات نشان می دهد که کاهش سطح mRNA نتیجه مهار نسخه برداری است و نه اختلال در پروسه بعد از نسخه برداری. سطح mRNA ارتباط معکوس با اندازه تکرار GAA دارد (۱۸، ۱۹). همانندسازی پلاسمیدهایی با ناحیه GAA تکرار حدود ۲۵۰ در سلولهای COS-7 در مقایسه با پلاسمیدهای حاوی طول کوتاهتر GAA بطور قابل ملاحظه ای مهار می شود (۱۸).

توالی تکراری سبب شکل جدید دیگری از ساختار DNA بنام "DNA چسبنده[1] " می شود و باعث مهار نسخه برداری در شرایط in vivo و in vitro می شود. در انسان های بالغ، فراتاکسین اساسا در قلب ، پانکراس، کبد، ماهیچه، تیموس و بافت چربی بیان می شود (۱۳) و چون بیشتر این سلولها غیر تقسیمی هستند بنابراین صدمه به آنها قابل جایگزینی نیست. (۲۰)

همانند بیماری های تکرار سه نوکلئوتیدی، تکرار GAA که باعث FRDA می شود در انتقال از والدین به فرزندان ناپایدار است. انتقال مادری ممکن است باعث بزرگتر یا کوچکتر شدن آلل شود. در مقابل، اندازه تکرار GAA همیشه کاهش می یابد موقعی که از طریق پدر به فرزندان انتقال می یابد (۱).

۹۶ درصد بیماران با FRDA برای تکرار گسترش GAA در اینترون ۱ در ژن FRDA هموزیگوس هستند و تقریبا در ۴ درصد بیماران FRDA هتروزیگوس مرکب برای گسترش GAA در یک آلل و غیر فعال شدن الل

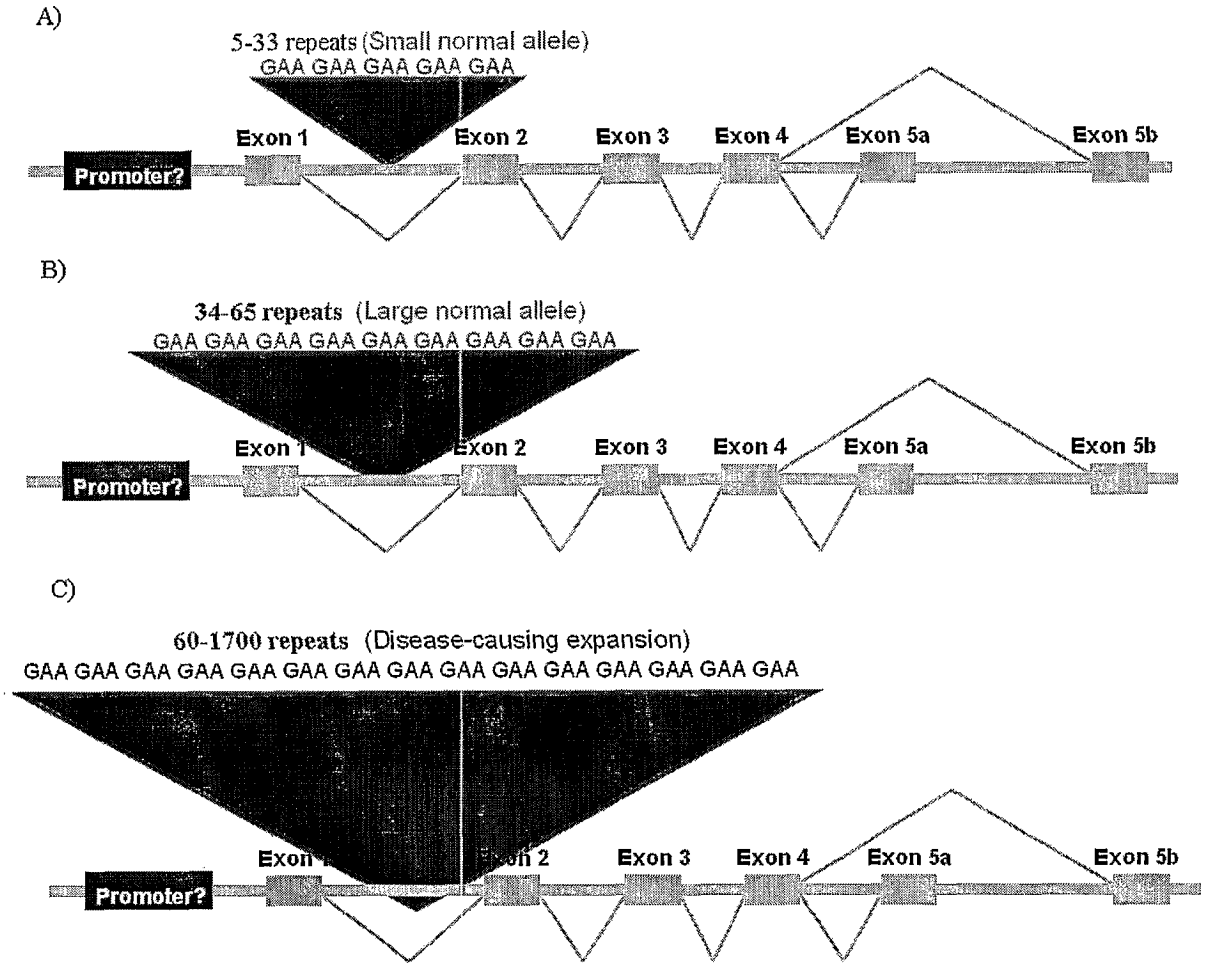
[1] - Stick DNA

دیگر در اثر جهش هستند (۲۱). سه دسته آلل بر اساس تعداد تکرار GAA در اینترون ۱ ژن FRDA وجود دارد (۲۲-۲۴):

- آلل نرمال: ۵ تا ۳۳ تکرار GAA . بیشتر از ۸۰ درصد الل ها حاوی کمتر از ۱۲ تکرار (نرمال کوتاه) و تقریبا ۱۵درصد دارای ۱۲تا ۳۳ تکرار (نرمال بلند) هستند. الل نرمال بیشتر از ۲۷ تکرار نادر است.
- آلل های نرمال مستعد به موتاسیون[1] : ۳۴ تا ۶۵ تکرار GAA. این الل ها با بیماری همراه نیستند اما ممکن است در حین انتقال والدینی گسترش یافته و اللهای مسبب بیماری ایجاد شود. گسترش الل پیش موتاسیون گاهی ۱۰ برابر اندازه اولی شده و می تواند در انتقال مادری و پدری رخ دهد.
- اللهای با نفوذ کامل: ۶۰ تا ۱۷۰۰ تکرار GAA . اکثر الل های گسترش یافته بین ۶۰۰ و ۱۲۰۰ تکرار است (شکل ۱-۳).

در بیماران ارتباطی بین سن شروع، پیشرفت بیماری و تعداد تکرارهای GAA وجود دارد. این موضوع پیشنهاد می کند که طول گسترش با میزان فراتاکسین در بیماران و شدت بیماری تعدیل می شود. لوکوسیتهای خون محیطی بیماران FRDA دارای ۱۳ درصد تا ۳۰ درصد mRNA ی فراتاکسین و حامل های FRDA دارای تقریبا ۴۰ درصد نسبت به افراد کنترل می باشند. حاملهای بدون علامت همچنین کاهش سطح mRNA از خود نشان می دهند (۲۵). مقدار فراتاکسین در لاین سلولی لنفوبلاستید افراد بیمار FRDA در گزارشات مختلف بین ۴ تا ۲۹ درصد (۱۵) و ۶ تا ۸ درصد (۲۶) سطح فراتاکسین افراد کنترل متفاوت است. تاکنون اطلاعاتی مبنی بر سطح واقعی پروتئین در بیماران FRDA در شرایط in vivo گزارش نشده است.

[1] - Mutable normal (permutation) alleles



شکل ۱-۳: گسترش تکرار های سه تایی GAA در اینترون ۱ ژن FRDA.

واضح است که بافتهایی که غنی از میتوکندری هستند و میزان بیان پروتئین فراتاکسین در آنها زیاد است، به فعالیت فسفوریلاسیون اکسیداتیو وابستگی زیادی دارند (۱۵). در قلب بیماران FRDA سطح آهن افزایش یافته و همچنین فعالیت پروتئین آهن- سولفور (Fe-S) کاهش می یابد (۲۷). پروتئین Fe-S حساسیت ویژه ای به رادیکالهای آزاد دارد (۲۸) و فقدان پروتئین Fe-S احتمالا بخاطر استرس سطح غیر طبیعی آهن در میتوکندری است. سلولهای فاقد فراتاکسین همچنین حساسیت شدیدی به اکسیدانت ها از خود نشان می