دانشکده کشاورزی

علوم دامی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته علوم دامی

گرایش ژنتیک و اصلاح نژاد دام

عنوان

تعیین توالی ناحیه بسیار متغیر ۱ (HVR-I) از DNA میتوکندری مرغ مازندرانی

استادان راهنما

دکتر صادق علیجانی

دکتر نصراله پیرانی

استاد مشاور

دکتر جلیل شجاع غیاث

پژوهشگر

رامین رضازاده گلی

بهمن ماه ۹۰

نام خانوادگی: رضازاده گلی	**نام**: رامین
عنوان پایان نامه: تعیین توالی ناحیه بسیار متغییر ۱ (HVR-I) از DNA میتوکندری مرغ مازندرانی	
استادان راهنما: دکتر صادق علیجانی و دکتر نصراله پیرانی	**استاد مشاور**: دکتر جلیل شجاع
مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **دانشگاه**: تبریز **دانشکده**: کشاورزی **رشته**: علوم دامی **گرایش**: ژنتیک و اصلاح دام	
تاریخ فارغ التحصیلی:	**تعداد صفحات**:
کلید واژه: مرغ مازندرانی ، توالی یابی ، مرغ بومی ، میتوکندری، PCR	

چکیده: گونه های مرغ به طور گسترده در سراسر جهان پخش شده و نقش آنها در جامعه عموماً به عنوان منبع مواد غذایی و یا برای سرگرمی‌است. مرغ بومی در کشورهای در حال توسعه یک منبع مفید برای شناسایی، ژن جدید در میتوکندری و ژنوم هسته ای فراهم می کند. توالی یابی ژنوم میتوکندری یکی از بهترین و رایج‌ترین روش‌ها برای طبقه بندی ژنتیکی جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم، بررسی امکان اشتقاق گونه-های مختلف از یک جد مشترک، مطالعه رابطه فیلوژنی هر موجود با سایر گونه‌ها و نژادها و دستیابی به راهکارهایی برای حفظ ذخایر ژنتیکی می‌باشد. بخش HVR1 از DNA میتوکندری (mtDNA) برای تعداد ۲۰ فرد از مرغ بومی مازندران توالی‌یابی شد. توالی ۴۵۵ نوکلئوتید اول برای تجزیه و تحلیل مورد استفاده قرار گرفت. شش هاپلوتیپ در نمونه‌ها شناخته شد. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک نشان داد که همه نمونه‌های مرغ بومی در یک زیر شاخه گروه بندی شدند. سپس توالی مازندرانی با سایر نژادهای دیگر از سراسر دنیا مقایسه شد. توالی‌های نژادهای دیگر از بانک ژن بدست آمد. نتایج نشان داد که این نژاد با نژادهای لگهورن سفید، پلیموتراک سفید، بومی مرند، نیوهمپشایر ونیز مرغ بومی آذربایجان نزدیکی بیشتری دارد. در نهایت توالی مازندرانی در بانک ژن ثبت شد. و این نژاد برای اولین بار به جهان معرفی شد.

مقدمه ۱
۱- بررسی منابع ۲
۱-۱- میتوکندری ۲
۱-۲- میتوکندری در گذر زمان ۳
۱-۳- منشأ میتوکندری در سلول‌های یوکاریوتی ۴
۱-۴- تعداد میتوکندری‌ها در سلول ۵
۱-۵- جایگاه میتوکندری ۵
۱-۶- توارث میتوکندری ۶
۱-۷- آستانه هتروپلاسمی ۶
۱-۸- نقش زیستی و فعالیت فیزیولوژیکی میتوکندری ۷
۱-۸-۱- سنتز پروتئین ۷
۱-۸-۲- ذخیره مواد در میتوکندری ۸
۱-۸-۳- متابولیسم اسیدهای چرب ۹
۱-۸-۴- فسفوریلاسیون اکسیداتیو ۹
۱-۹- ساختار ژنوم میتوکندری ۱۰
۱-۱۰- ناحیه D-Loop ۱۲
۱-۱۱- نواحی HVR1 و HVR2 ..... ۱۲
۱-۱۲- تقسیم میتوکندری ۱۲
۱-۱۳- کنترل مادری وراثت میتوکندری ۱۳
۱-۱۴- کاربردهای ژنوم میتوکندری ۱۴

۱-۱۵- مزایای ژنوم میتوکندری در تشخیص گونه‌ها و رسم درخت فیلوژنی ۱۵
۱-۱۶- هاپلوتیپ و هاپلوگروه ۱۷
۱-۱۷- تفاوت DNA میتوکندری با DNA هسته ۱۷
۱-۱۸- همانند سازی ژنوم میتوکندری ۱۸
۱-۱۹- رونویسی ژنوم میتوکندری ۱۸
۱-۲۰- ترجمه ژنوم میتوکندری ۱۹
۱-۲۱- تعیین توالی بازهای DNA ۱۹
۱-۲۲- علل سرعت بالای جهش در mtDNA ۲۳
۱-۲۳-PCR ۲۳
۱-۲۳-۱- دمای واسرشت ۲۵
۱-۲۳-۲- دمای اتصال ۲۵
۱-۲۳-۳- دمای طویل شدن ۲۶
۱-۲۴- موارد استفاده PCR ۲۷
۱-۲۴-۱- تکثیر از RNA ۲۷
۱-۲۴-۲- تکثیر از ترادف های مجهول به وسیله PCR معکوس ۲۸
۱-۲۴-۳- تعیین توالی همگن در DNA ۲۸
۱-۲۴-۴- تشخیص بیماری ۲۸
۱-۲۴-۵- انگشت نگاری DNA ۲۹
۱-۲۴-۶- تکامل مولکولی ۳۰
۱-۲۵- روش‌های جلوگیری از آلودگی PCR ۳۰

۱-۲۶- توده‌های مرغ خانگی بومی ایران ۳۱
۱-۲۷- درخت فیلوژنی ۳۳
۱-۲۸- بانک ژن ۳۴
۱-۲۹- نرم افزارها و برنامه‌های مورد استفاده ۳۵
۱-۳۰- کارهای انجام شده در زمینه توالی یابی mtDNA ۳۶
۲- فصل دوم ۴۷
۲- مواد و روش‌ها ۴۸
۲-۱- توده مورد بررسی ۴۸
۲-۲- جمع آوری نمونه‌ها ۴۸
۲-۳- استخراج DNA ۴۸
۲-۴- مراحل استخراج DNA ۴۹
۲-۵- آزمایش کمی و کیفی DNA استخراج شده ۵۰
۲-۵-۱- نحوه اسپکت کردن ۵۱
۲-۶-PCR ۵۲
۲-۶-۱- مواد و محلول های مورد نیاز ۵۲
۲-۶-۲- روش انجام کار با PCR ۵۳
۲-۶-۳- برنامه حرارتی PCR ۵۴
۲-۷- خالص سازی محصولات PCR ۵۵
۲-۷-۱- مراحل خالص سازی ۵۶
۲-۸- ارسال نمونه ها برای تعیین توالی ۵۷

۳- فصل سوم ۵۸
۳-۱- استخراج DNA ۵۹
۳-۲- کیفیت سنجی DNA ۵۹
۳-۳-PCR ۵۹
۳-۴- خالص سازی محصولات PCR ۶۰
۳-۵- توالی یابی قطعه مورد نظر ۶۰
۳-۶- به دست آوردن توالی معکوس برای هر نمونه ۶۱
۳-۷- تعیین توالی Consensus (توالی توافقی) ۶۱
۳-۸- مقایسه توالی Consensus مرغ مازندرانی با استفاده از رویه Blast از طریق NCBI . ۶۱
۳-۹- تجزیه و تحلیل توالی Consensus ۶۴
۳-۱۰- بررسی تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی ۶۷
۳-۱۱- ثبت توالی در بانک ژن ۶۷
۳-۱۲- رسم درخت فیلوژنی ۶۸
۳-۱۳- نتیجه گیری کلی ۷۱
۳-۱۴- پیشنهادات ۷۳

فهرست جداول

جدول ۳-۱- فراوانی نوکلئوتیدی توالی Consensus ۶۵
جدول ۳-۲- فراوانی نوکلئوتیدی توالی معکوس ۶۶
جدول ۳-۳- تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی ۶۷

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱- شکل شماتیک میتوکندری و جایگاه آن در سلول ۳

شکل ۱-۲- نقش میتوکندری در تولید پروتئین ۸

شکل ۱-۳- نقش میتوکندری در فسفوریلاسیون اکسیداتیو ۱۰

شکل ۱-۴- ژنوم میتوکندری، جایگاه ژن‌ها و ناحیه D-Loop ۱۱

شکل ۱-۵- نواحی HVR1 و HVR2 ..... ۱۲

شکل ۱-۱۶- مراحل حرارتی مختلف در PCR را نشان می‌دهد. ۲۷

شکل ۱-۸- هاپلوتیپ های بدست آمده برای مرغ نیجریه ۳۹

شکل ۱-۹- درخت فیلوژنی رسم شده برای مرغ نیجریه ۴۰

شکل ۱-۱۰- پراکندگی گروه‌های هاپلوتیپی مرغ در آسیا ۴۲

شکل ۱-۱۱- زیر شاخه های به دست آمده برای مرغ کره‌ای ۴۵

شکل ۲-۱- توده مرغ مازندرانی ۴۸

شکل ۲-۲- دستگاه PCR ۵۳

شکل ۲-۲-۳- میکرو تیوب مورد استفاده در آزمایش ۵۴

شکل ۳-۱- الکتروفورز محصولات PCR. قطعات تکثیر شده در محدود باندهای ۶۰۰ تا ۷۰۰ قرار دارند (L: DNA اندازه ۱۰۰ جفت بازی) ۶۰

شکل ۳-۲- توالی توافقی بدست آمده برای نمونه های مرغ مازندرانی ۶۱

شکل ۳-۳- نمودار فراوانی توالی Consensus ۶۵

شکل ۳-۴- نمودار فراوانی نوکلئوتیدی توالی معکوس ۶۶

شکل ۳-۵- درخت فیلوژنی رسم شده برای نمونه‌های مرغ مازندرانی ۶۹

شکل ۳-۶- درخت فیلوژنی رسم شده برای نژاد مازندرانی و سایر نژادهای دریافتی از بانک ژن موجود در هر شاخه نشان دهنده درصد وقوع بوت استراپ است). ۷۰

مقدمه

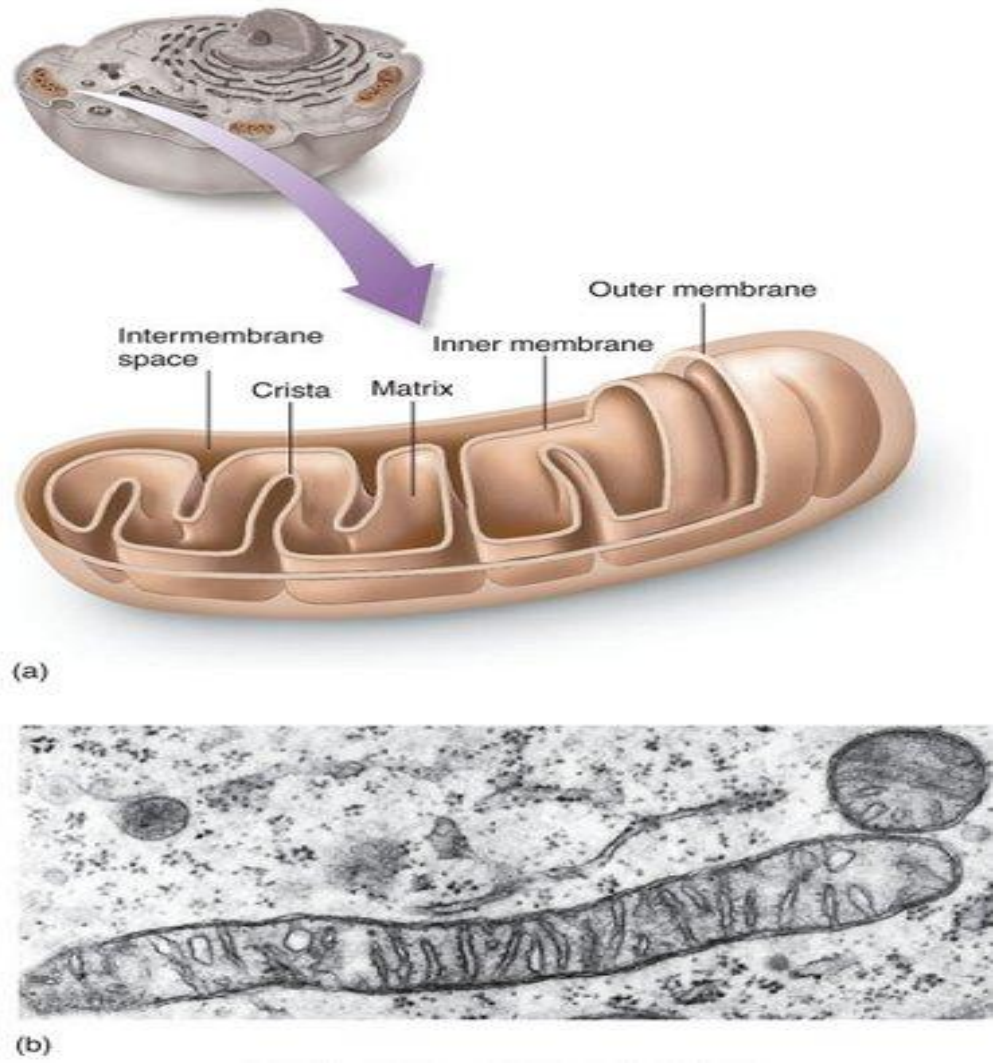
اکثر پژوهش‌ها نشان می‌دهد که مرغ خانگی از یک جد واحد منشعب شده است. مرغ جنگلی قرمز گالوس گالوس گالوس[1] که در جنوب شرقی آسیا زیست می‌کند، منشأ مرغ اهلی محسوب می‌شود (آکیشینونومیا و همکاران ۱۹۹۴). در کشور ایران مرغ نسبت به دیگر حیوانات اهلی گسترش بیشتری یافته است. بنابراین نقش مهمی در تأمین گوشت و تخم‌مرغ روستاییان و افراد کم درآمد بازی می‌کند. کسب دانش در مورد توزیع تنوع ژنتیکی مرغ در ایران می‌تواند برای استراتژی حفاظت و بهره‌برداری از منابع ژنتیکی مرغ بومی مفید باشد. تنوع نژادی مرغ‌های محلی عمدتاً بر اساس فنوتیپ از جمله رنگ پر، شکل تاج، وزن بلوغ، وزن تخم‌مرغ و قابلیت تولید مثلی گزارش می‌شود. این نوع دسته‌بندی اطلاعات بسیار محدودی در مطالعه واریانس ژنتیکی و تنوع نژادی در اختیار می‌گذارد. mtDNA به طور موفقیت آمیزی برای تخمین تنوع ژنتیکی در مرغان آسیایی استفاده شده است (نیو ۲۰۰۲). DNA میتوکندری مرغ (mtDNA) داری ۱۶۷۷۵ جفت باز است (دستجاردیان و مورایز ۱۹۹۰). پلی‌مورفیسم در mtDNA در مقایسه با DNA هسته بسیار بالاست. نرخ تکاملی در آن ۵ الی ۱۰ برابر سریع‌تر از DNA هسته است (براون ۱۹۸۲). مناطق مختلف mtDNA با نرخ‌های متفاوتی تکامل یافته است (ساسون ۱۹۹۱)، که از آن یک مارکر خوب برای مطالعه تنوع ژنتیکی داخل گونه‌ای ساخته است. بخشی از ژنوم میتوکندری ناحیه D-Loop[2] می‌باشد که دارای دو ناحیه بسیار متغیر HVR1[3] و HVR2[4] می‌باشد و هیچ ژنی را کد نمی‌کند و نسبت به جاهای دیگر mtDNA سرعت تکامل بالاتری دارد. این خاصیت آن را به یک وسیله مفید برای آنالیز فیلوژئوگرافیک تبدیل می‌کند. mtDNA در بیشتر گونه‌ها دارای وراث مادری است و دست خوش نوترکیبی نمی‌شود. این ویژگی به این معناست که هر مولکول به عنوان یک کل که معمولاً دارای سابقه شجره‌ای واحد از طرف جد خود می‌باشد، می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. در این تحقیق توالی ناحیه HVR1 از mtDNA مرغ بومی مازندرانی برای مطالعه تنوع ژنتیکی این توده و ارتباط آن با سایر نژادهای اهلی بررسی شده است.

1- Gallus gallus gallus
2- Displacement- Loop
3- Hypervariable Region 1
4- Hypervariable Region 2

بررسی منابع

۱-۱- میتوکندری

میتوکندری یک اندامک دو غشایی است که در بیشتر سلول‌های یوکاریوتی یافت می‌شود، اما در بیرون هسته و در سیتوپلاسم قرار دارد. در حیوانات در یک سلول بدنی ۱۰۰۰ الی ۲۰۰۰ میتوکندری وجود دارد. میتوکندری با تبدیل انرژی مواد غذایی به انرژی شیمیایی فعالیت و عملکرد یک سلول را کنترل می‌کند . همچنین میتوکندری نقش مهمی در دیگر فعالیت‌های متابولیسمی بازی می‌کند. همانند تنظیم مرگ سلولی، تأمین چرخه میانی گلوتامات برای سلول‌های عصبی، تکثیر سلولی، تنظیم شرایط سلولی، سنتز هم و سنتز استروئید. قوی‌ترین فرضیه در مورد منشأ میتوکندری این است که این اندامک در اثر همزیستی با باکتری (به احتمال زیاد α باکتریوم) وارد سلول شده است. به طور جالب توجه اندازه ژنوم میتوکندری طی همزیستی در طول سالیان متمادی کاهش یافته و شاید ۱۰۰ بار کوچک‌تر از ژنوم اولیه شده است. بنابراین شامل پراهمیت ترین ژن‌ها است. برای مثال در انسان فقط ۳۷ ژن در میتوکندری کد برداری و رونویسی می‌شود. بیشتر ژن‌های میتوکندری به هسته منتقل شده‌اند. تقریباً ۱۰۰ الی ۱۵۰ ژن فعال از میتوکندری به هسته منتقل شده است. به تازگی تحقیقات علمی و پزشکی یافته که وضعیت عملکردی میتوکندری در کیفیت اسپرماتوزوئید و اووسیت شرکت دارد و نقش مهمی در لقاح و توسعه جنین بازی می‌کند. سلول‌های تخمک ۱۰۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰۰ میتوکندری دارند در حالی که این رقم در اسپرم ۱۰۰ الی ۱۰۰۰ است که بیشتر در قسمت دم قرار دارد و در حین لقاح از بین می‌رود. بنابراین بدون توجه به ماهیت- خواه ما نر باشیم یا ماده- ما میتوکندری را از مادرمان به ارث می‌بریم. در شکل ۱- ۱ ساختمان میتوکندری و جایگاه آن در سلول نشان داده شده است.



شکل ۱-۱- شکل شماتیک میتوکندری و جایگاه آن در سلول

۱-۲- میتوکندری در گذر زمان

مطالعات اولیه انجام شده بر روی میتوکندری به حدود سال ۱۸۹۴ میلادی باز می‌گردد ، در آن سال ریچارد آلتمن آلمانی میتوکندری را بیوبلا ست یا جایگاه زنده نامید. وی بیان کرد که بین واکنش‌های اکسایش و احیا در سلول و میتوکندری رابطه وجود دارد. او تصور می‌کرد که این ارگان‌های شبه باکتری موجودات ریز اولیه‌ای هستند که درون سلول‌ها زندگی می‌کنند. در سال ۱۸۹۷ بندا با بررسی‌های بیشتر آنها را میتوکندری نامید. نام میتوکندری ترکیبی از دو واژه Mito به معنای رشته و Chondrion به معنای دانه است.چون این

اندامک اغلب رشته‌ای یا به صورت دانه‌های کوچک در سیتوپلاسم دیده می‌شود. از این تاریخ به بعد میتوکندری مورد مطالعات فراوان قرار گرفت. کندی و لنینگر در سال ۱۹۴۹ نشان دادند که میتوکندری آنزیم‌های فسفوریلاسیون اکسیداتیو چرخه اسید سیتریک و اکسیداسیون اسیدهای چرب را دارا می‌باشد . ناس در سال ۱۹۶۳ وجود DNA در میتوکندری را توسط میکروسکوپ الکترونی نشان داد. از اواخر دهه ۱۹۸۰ تا کنون، بر شمار بیماری‌های مرتبط با اختلال در ژنوم میتوکندریایی افزوده می‌شود. توالی یابی ژنوم میتوکندری انسان در سال ۱۹۸۱ توسط آندرسون و همکاران که به طول ۱۶۵۶۷جفت باز بود، انجام گرفت. امروزه برای بسیاری از گونه‌ها و نژادهای مختلف جانوری توالی کامل DNA میتوکندری شناخته شده است که بر مبنای آن فاصله ژنتیکی و سرعت تکامل قابل محاسبه است.

۱-۳- منشأ میتوکندری در سلول‌های یوکاریوتی

شواهد فسیلی نشان می‌دهد موجودات تک سلولی در دوران اولیه حیات بر روی زمین فاقد اندامک‌های درون سلولی بوده‌اند و یا اندامک‌های بسیار کوچک داشتند. مرگ جلبک‌های سبز- آبی که در ابتدای حیات در کره زمین تسلط داشته‌اند پس از ۱/۵میلیون سال با آزاد سازی مقدار زیادی اکسیژن باعث افزایش اکسیژن اقیانوس‌ها و اتمسفر شد و امکان زندگی در محیط‌های اکسیژن دار را برای سایر موجودات سلولی فراهم آورد.

بر اساس تئوری هم زیستی درون سلولی مراحل سیر تکاملی یوکاریوت ها به شرح زیر است:

۱- اکسیژن تولید شده توسط جلبک‌های سبز- آبی که محصول فرایند فتوسنتز بود اکسیژن موجود در جو را فراهم نمود.

۲- هم‌زمان با جلبک‌های سبز- آبی، باکتری‌ها (سلول‌های پروکاریوتی) رشد و گسترش پیدا کردند که بعضی از آن‌ها توانایی زندگی هوازی را به دست آوردند.

۳- سلول‌های بی هوازی و هتروتروف، باکتری‌های هوازی را در بر گرفتند و به داخل سلول خود بردند و هم زیستی دو طرفه را آغاز کردند.

در این هم زیستی دو طرفه از یک سو مواد غذایی مورد نیاز باکتری هوازی در بر گرفته شده توسط سلول میزبان تأمین می‌شد و از طرف دیگر سلول میزبان انرژی مورد نیاز خود را از فعالیت هوازی آن باکتری بدست می‌آورد که این همزیستی سر آغاز فعالیت میتوکندری‌ها در سلول محسوب می‌شود. در این تئوری باکتری هوازی در بر گرفته شده میتوکندری اولیه نام داشت که در نهایت با گذشت زمان و سیر تکاملی میتوکندری اولیه به یک اندامک درون سلولی تخصص یافته در سلول‌های یوکاریوتی تبدیل شد.

شواهدی که تئوری همزیستی درون سلولی را تأیید می‌کنند عبارتند از:

۱- میتوکندری‌ها تنها اندامک درون سلولی هستند که اندازه آنها به باکتری‌ها نزدیک‌تر است.
۲- میتوکندری‌ها همانند بسیاری از باکتری‌ها غشای سیتوپلاسمی دو لایه دارای مولکول‌های چربی هستند.
۳- مولکول‌های rRNA میتوکندری به مولکول‌های rRNA ی باکتری‌ها شباهت بیشتری دارند.
۴- تقسیم و تکثیر میتوکندری در فرایند مشابه تولید مثل باکتری‌ها انجام می‌گیرد.
۵- مولکول DNA مستقل میتوکندری نشان دهنده زندگی مستقل آن در گذشته است.

۱-۴- تعداد میتوکندری‌ها در سلول

هر سلول ممکن است شامل صدها تا هزاران میتوکندری باشد که در سیتوپلاسم سلول وجود دارد. تعداد میتوکندری در سلول بر حسب نوع سلول و مرحله عمل سلول ممکن است متفاوت باشد. به طور کلی کبد، تخمدان و ماهیچه بافت‌های غنی از میتوکندری هستند. در یک سلول کبدی بیشترین تعداد و در حدود ۱۰۰۰ تا ۱۶۰۰ میتوکندری وجود دارد. کم‌ترین تعداد میتوکندری در بافت لنفی است و نیز گلبول قرمز بالغ فاقد این اندامک می‌باشد. در سلول‌های گیاهی تعداد میتوکندری کمتر از جانوری است زیرا بسیاری از اعمال میتوکندری به وسیله کلروپلاست انجام می‌شود (چینری و همکاران،۲۰۰۰).

۱-۵- جایگاه میتوکندری

همان طور که در شکل ۱-۱ دیده می‌شود، میتوکندری‌ها اغلب در اطراف هسته دیده می‌شوند. در طول میتوز، میتوکندری‌ها در مجاورت دوک هسته جمع می‌شوند و در پایان تقسیم در دو سلول دختر، پراکنش

تقریباً یکسانی پیدا می‌کنند. میتوکندری‌ها در داخل سلول‌ها جابجا شده و خود را به جایی که نیاز به ATP بیشتر است، می‌رسانند.

۱-۶- توارث میتوکندری

در موجودات با تولید مثل جنسی میتوکندری منحصراً از مادر به ارث می‌رسد. میتوکندری موجود در اسپرم بعد از لقاح در طول Embryogenesis از بین می‌رود، همچنین بیشتر میتوکندری اسپرم در دم آن قرار دارد که برای جلو راندن اسپرم قدرت لازم را ایجاد می‌کند. بعضی مواقع دم در طول لقاح از بین می‌رود. مکانیسم دیگر برای توجیه توارث تک والدی mtDNA مکانیسم Dilution است. یک تخم شامل ۱۰۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰۰ میتوکندری است در حالی که یک اسپرم شامل فقط ۱۰ تا ۱۰۰ میتوکندری است. اما در هنگام لقاح میتوکندری اسپرم وارد تخمک نمی‌شود و این تنها هسته اسپرم است که وارد تخمک می‌شود در نتیجه DNA هسته زیگوت از هر دو والد است در حالی که mtDNA فقط از طرف مادر است. بنابراین اگر مادر دارای جهش در ژنوم میتوکندری خود باشد آن را به تمام نوزادان خود انتقال می‌دهد. با این حال توارث پدری در دروزوفیلا و موش و توارث دو والدی هم در بعضی گونه‌ها مشاهده شده است.

۱-۷- آستانه هتروپلاسمی

هر سلول ممکن است بر حسب نوع سلول و فاز سلولی دارای چندین میتوکندری باشد. این امر باعث می‌شود امکان حضور هم‌زمان بیش از یک نوع ژنوم میتوکندری در یک سلول وجود داشته باشد. اگر بیش از ۹۹/۹ درصد میتوکندری ها در یک سلول دارای ژنوم یکسان باشند به آن هوموپلاسمی[1] گویند. در غیر این صورت حضور هم‌زمان بیش از یک نوع ژنوتیپ mtDNA (یعنی ترکیبی از ژنوتیپ‌های جهش یافته و غیر جهش یافته) باعث هتروپلاسمی[2] می‌شود. در حالت عادی مولکول‌های mtDNA یک رده همگی یکسان هستند اگر جهشی در سلول اتفاق بیفتد در هنگام میتوز به طور تصادفی mtDNA ها به سلول‌های دختر به ارث می‌رسند در حالی که نسخه‌های یکسانی از ژنوم هسته به ارث می‌رسند. بعد از چندین تقسیم، نسبت

1- Homoplasmy
2- Heteroplasmy

مولکول‌های mtDNA نرمال و جهش یافته می‌تواند به سمت هوموپلاسمی در جهت نرمال خالص و یا جهش یافته خالص تغییر یابد که به این حالت اثر گلوگاه ژنتیکی می‌گویند. برای ظهور علائم و اختلالات بافتی میزان ژنوم میتوکندری جهش یافته در سلول‌های یک بافت بایستی از یک حد آستانه عبور کند که به آن آستانه هتروپلاسمی می‌گویند.

۱-۸- نقش زیستی و فعالیت فیزیولوژیکی میتوکندری

۱-۸-۱- سنتز پروتئین

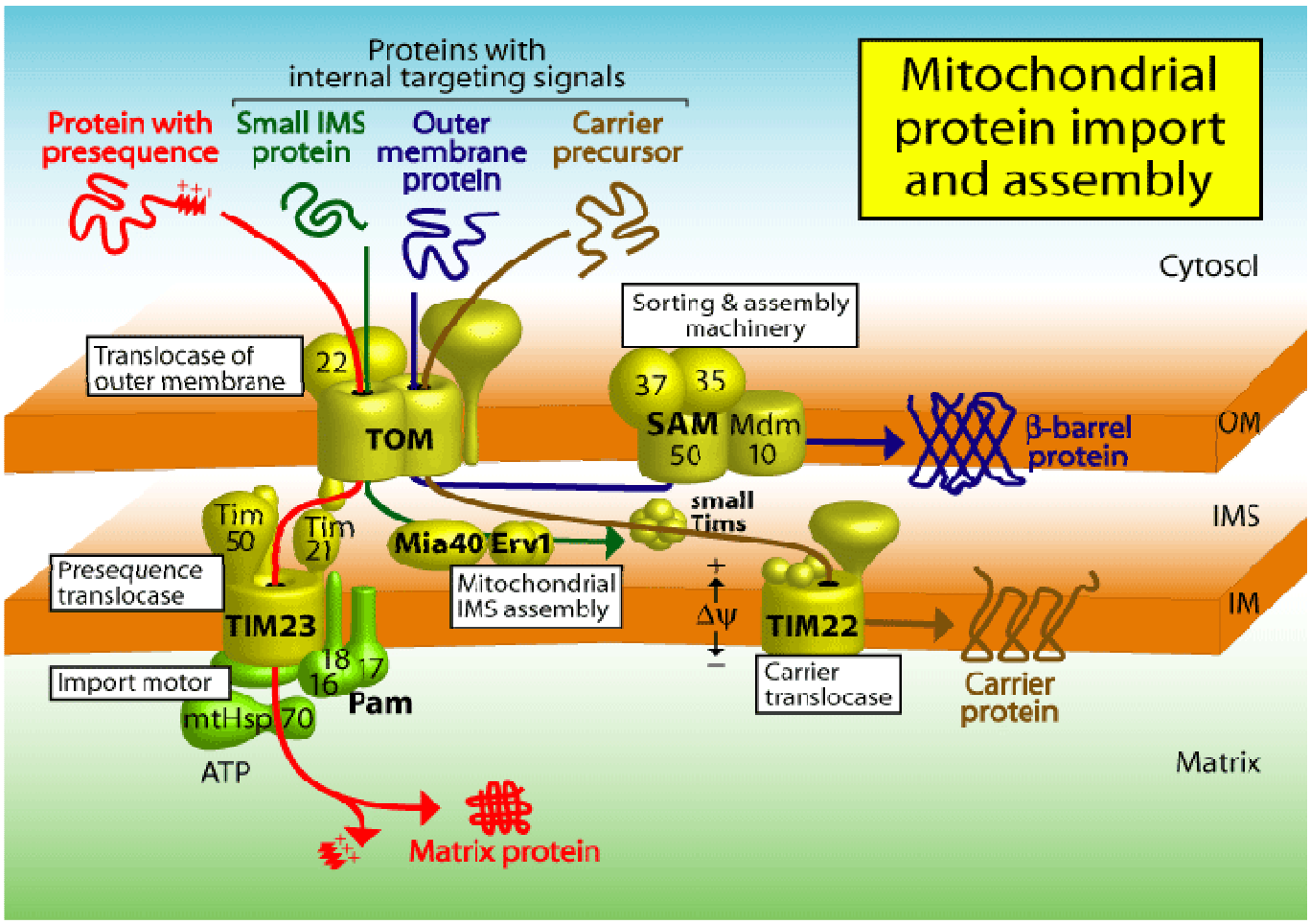
مطالعات گوناگون نشان می‌دهد که صدها پروتئین در یک میتوکندری وجود دارد. این پروتئین‌ها در تعداد زیادی از واکنش‌های شیمیایی غیر از فسفوریلاسیون اکسیداتیو شرکت می‌کنند به عنوان مثال در سنتز اسیدهای آمینه، نوکلئوتیدها، کوانزیم های فولات، آهن و ... . غشاهای میتوکندری در واقع جایگاه انتقال الکترون و سنتز ATP می‌باشند. پیرووات دهیدروژناز در ماتریکس میتوکندری پیرووات را به استیل COA و CO_2 تبدیل می‌کند. در هر دور از چرخه اسید سیتریک، استیل COA با سیترات چهار کربنی به اگسالواستات تبدیل شده طی یک سری واکنش‌هایی که دو مولکول CO_2 آزاد کرده و سه مولکول NADH و یک مولکول $FADH_2$ تولید می‌کند. الکترون‌ها از NADH و $FADH_2$ از طریق حاملین الکترون در غشای داخلی میتوکندری به O_2 منتقل شده و دوباره NADH و $FADH_2$ تولید می‌کنند. مرحله بعدی حرکت الکترون‌ها مربوط می‌شود به پمپ پروتون‌ها در عرض غشای داخلی که نتیجه آن تولید بیشتر ATP از اکسیداسیون هوازی گلوکز است (امتیازی،۱۳۸۶).

در نتیجه اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری استیل COA تولید می‌شود که وارد چرخه اسید سیتریک می‌شود و تولید کوآنزیم‌های کاهنده‌ی NADH و $FADH_2$ می‌کند. اکسیداسیون بعدی استیل COA و کوآنزیم‌های کاهنده برای تولید ATP انجام می‌شود.

در بیشتر سلول‌های یوکاریوتی اکسیداسیون اسیدهای چرب مخصوصاً اسیدهای چرب با زنجیره بلند در پروکسیزم اتفاق می‌افتد و به تولید ATP منجر نمی‌شود در نتیجه انرژی آزاد شده به گرما تبدیل می‌شود.

الکترون‌های آزاد شده در طول اکسیداسیون پروکسیمال اسیدهای چرب برای H_2O_2 استفاده می‌شود که به وسیله کاتالاز به H_2O و O_2 تجزیه می‌شود.

میزان گلیکولیز و چرخه اسید سیتریک که بستگی به نیاز سلول به ATP دارد بوسیله مهار یا تحریک آنزیم‌های مختلف کنترل می‌شود. این فرایند پیچیده، فعالیت مسیر گلیکولیز و چرخه اسید سیتریک را هماهنگ می‌کند و منتج به ذخیره گلوکز به شکل گلیکوژن یا چربی به هنگامی که ATP زیاد است می‌شود.



شکل ۱-۲- نقش میتوکندری در تولید پروتئین

۱-۸-۲- ذخیره مواد در میتوکندری

میتوکندری ها می‌توانند در فضای داخلی خود مواد مختلفی را انباشته کنند که این مواد عبارتند از: آب،

ترکیبات آهن دار، چربی‌ها، پروتئین‌ها و کاتیون ها. در اثر ذخیره این مواد، میتوکندری‌ها اغلب به حالت یک غشایی و شبیه باکتری‌های کوچک دیده می‌شوند و به تدریج، کریستاها محو می‌شوند اما بعد از حذف این مواد دوباره به حالت اول برمی‌گردند.

۱-۸-۳- متابولیسم اسیدهای چرب

یکی از راه‌های تولید اسیدهای چرب، سیستم میتوکندریایی می‌باشد که عکس عمل اکسیداسیون یا تجزیه آن‌ها می‌باشد.

میتوکندری ها هم چنین در گوارش چربی‌ها دخیل هستند. در هنگام گرسنگی میتوکندری‌ها به طرف ذرات چربی خم‌شده و آنزیم‌های میتوکندریایی شروع به هضم چربی و آزادسازی انرژی می‌کنند.

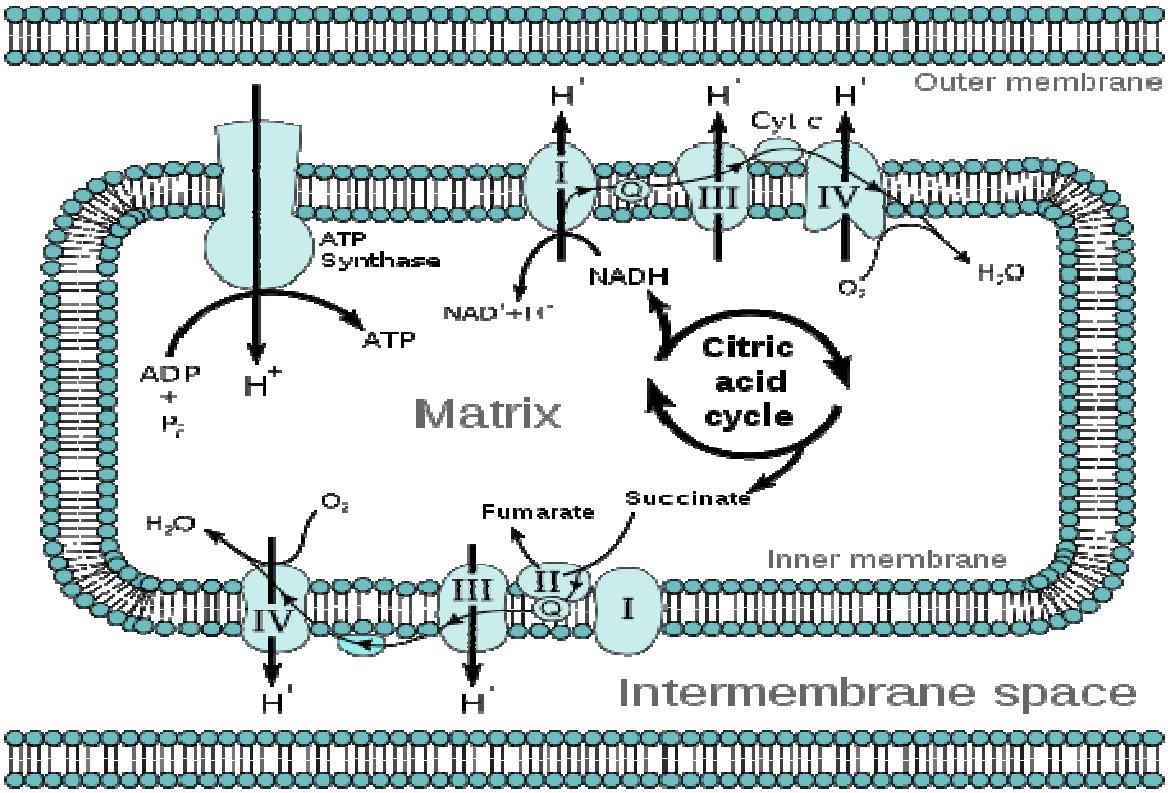
۱-۸-۴- فسفوریلاسیون اکسیداتیو

میتوکندری‌ها در سلول‌های یوکاریوتی امروزی نقش تنفس هوازی (فسفوریلاسیون اکسیداتیو) را بر عهده دارند، که آخرین مرحله از تنفس سلولی است.

در تنفس هوازی، میتوکندری با تجزیه قند پیرووات و تبدیل آن به دی‌اکسیدکربن، بخش اصلی ATP مورد نیاز سلول یوکاریوتی را تولید می‌کند.

وجود اکسیژن برای حیات سلول‌های یوکاریوتی بسیار مهم است، چون میتوکندری از اکسیژن به عنوان آخرین مولکول پذیرنده الکترون استفاده می‌کند و این انتقال الکترون در نهایت منجر به تولید ATP می‌شود.

بر این اساس میتوکندری در تمام سلول‌های یوکاریوتی وجود دارد، اما نه به تعداد یکسان. به عنوان نمونه در سلول‌های بافت عضلانی و یا کبد- که نیاز به انرژی بیشتری دارند- میتوکندری بیشتری نسبت به سلول‌های بافت استخوانی که نیاز کمتری به انرژی دارند وجود دارد. در شکل ۱-۳ نقش میتوکندری در فسفوریلاسیون نشان داده شده است.



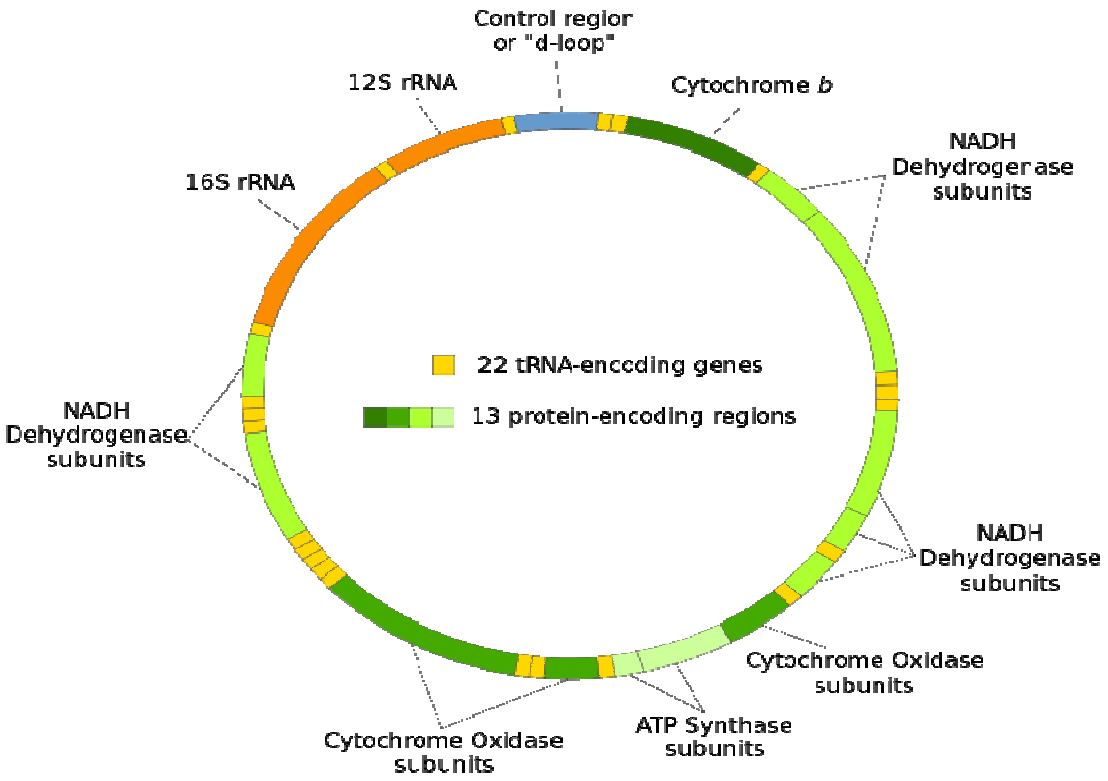
شکل ۱-۳- نقش میتوکندری در فسفوریلاسیون اکسیداتیو

۱-۹- ساختار ژنوم میتوکندری

میتوکندری تنها اندامک درون سلولی دارای DNA است. جایگاه ژنوم میتوکندری در ماده زمینه‌ای میتوکندری و گاهی چسبیده غشای داخلی آن است. اندازه ژنوم آن در جانداران مختلف در محدوده ۱۴ تا ۲۶ کیلو باز است. کم‌ترین طول حدود ۵۹۶۷ جفت باز در پارازیت مالاریای انسانی[1] و بیشترین طول در گیاهان خشکی حدود ۲۰۰ کیلو باز می‌باشد. اندازه عمومی آن در اکثر مهره‌دارن ۵۰۰ ± ۱۶۰۰ جفت باز است. ژنوم میتوکندری در پستانداران حدود $۱۰^{۱۰}$ – $۱۰^{۵}$ برابر کوچک‌تر از ژنوم هسته‌ای اما جهش پذیری آن ۱۵ بار بیشتر از ژنوم هسته‌ای است. به دلیل این که DNA پلیمراز میتوکندریایی فاقد خاصیت Proof-Reading می‌باشد. سرعت جایگزینی نوکلئوتید ها در ژنوم میتوکندری حیوانات عالی تقریباً ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از ژنوم هسته است. ژنوم میتوکندری اغلب موجودات، حلقوی دو رشته است و همانند سازی در آن به دلیل حلقوی

1- Plasmodium falciparum

بودن آن از یک نقطه شروع و در دو جهت ادامه می‌یابد. ژنوم میتوکندری فاقد پروتئین‌های هیستونی می‌باشد و بسیار فشرده است و ۹۴٪ آن را نواحی کد کننده تشکیل می‌دهد. در ساختار ژنوم میتوکندری هیچ اینترونی بین ژن‌ها وجود ندارد و حتی در بعضی نقاط ژن‌ها روی هم افتادگی دارند. ژنوم میتوکندری دارای دو رشته L (زنجیره سبک) و H (زنجیره سنگین) است. ۹ ژن توسط رشته سبک و ۲۸ ژن توسط رشته سنگین حمل می‌شوند. در گونه‌های جانوری ژنوم میتوکندریایی ۳۷ ژن را کد می‌کند که شامل ۲۲ ژن کد کننده tRNA، ۱۳ ژن کد کننده زنجیره تنفسی و ۲ ژن کد کننده rRNA می‌باشد. ژنوم میتوکندری مستقل از ژنوم هسته است. بعضی از پروتئین‌های میتوکندری در هسته نیز رمز می‌شوند و پس از ساخته شدن در سیتوزول، وارد میتوکندری می‌شوند. مطالعات دقیق نشان می‌دهد جهش در ژنوم میتوکندری بسیار مخرب و کشنده می‌باشد. جهش‌های DNA میتوکندری بیشتر سبب نقص در زنجیره تنفسی می‌شود.



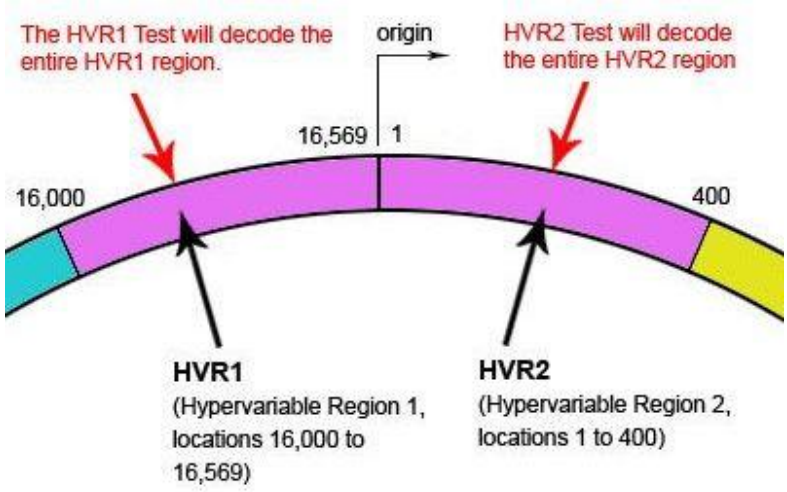
شکل ۱-۴- ژنوم میتوکندری، جایگاه ژن‌ها و ناحیه D-Loop

۱-۱۰- ناحیه D-Loop

منطقه‌ای در ژنوم میتوکندری وجود دارد که ژن رمز کننده پروتئین ندارد و جهش می‌تواند در آنجا تجمع یابد. این منطقه، ناحیه D-Loop نام دارد (آندرسون ۱۹۸۱). ناحیه D-Loop شروع همانند سازی را بـه وسـیله تنظیم فعالیت پروتئین‌ها و آنزیم‌های مختلف که به وسیله ژن‌های هسته کد می‌شوند، کنتـرل مـی‌کنـد. تـوالی ناحیه کنترل در گونه‌های مختلف حیوانات بسیار متفـاوت اسـت و دارای دو ناحیـه متغیـر HVR1 و HVR2 است. این ناحیه دارای پروموتورهایی برای همانند سازی رشته L و H است. به خاطر تکامل سریع آن، تـوالی ناحیه کنترل برای بررسی تنوع ژنتیکی و ارزیابی روابط میان گونه‌ها بسیار ارزشمند است.

۱-۱۱- نواحی HVR1 و HVR2

شکل ۱- ۵ نشان دهنده دو ناحیه بسیار متغیر HVR1 و HVR2 در D-Loop است. به دلیل این کـه ایـن دو ناحیه کد کننده هیچ پروتئینی نیستند و در شروع رونویسی هم نقش ندارند، جهش‌های ایجاد شده در آنهـا بدون تغییر و ایجاد مشکل ابقا شده و به نسل بعد منتقل می‌شود.



شکل ۱-۵- نواحی HVR1 و HVR2

۱-۱۲- تقسیم میتوکندری

تقسیم و تکثیر میتوکندری در فرایند تقسیم دوتایی شبیه تولید مثل باکتری‌ها صـورت مـی‌گیـرد. تقسـیم

دوتایی نوعی تولید مثل غیر جنسی است که به تولید زاده‌های یکسان منجر می‌شود. در تولید مثل غیر جنسی فقط یک والد شرکت دارد. تقسیم دو تایی به دنبال همانند سازی DNA صورت می‌گیرد و طی آن سلول به دو قسمت تقسیم می‌شود. در پی این تقسیم دو میتوکندری دختری حاصل می‌شود. در واقع سلول مادری به دو قسمت تقسیم می‌شود.

۱-۱۳- کنترل مادری وراثت میتوکندری

سه تئوری برای توضیح وراثت مادری میتوکندری در پستانداران وجود دارد.

تئوری رقیق سازی[1] mtDNA : سلول تخم پستانداران دارای ۱۰۰۰۰۰ کپی mtDNA است. در حالی که اسپرم دارای ۱۰۰ الی ۱۵۰ مولکول mtDNA است. بر اساس این تئوری، نسبت میتوکندری پدری در برابر مادری ۱۰۰ به ۱ است. البته این به معنای آن نیست که میتوکندری پدری نمی‌تواند وارد سیتوپلاسم اووسیت در مرحله لقاح شود. گیلنستن و همکاران (۱۹۹۱) با استفاده از PCR کشف کردند که وراثت پدری مولکول‌های mtDNA در موش‌ها روی می‌دهد. بنابراین تئوری رقیق کردن نمی‌تواند وراثت مادری را توضیح دهد.

تئوری تخریب اکسیداتیو[2]: آلن و همکاران (۱۹۹۶) پیشنهاد کردند که میتوکندری‌های اسپرم به وسیله سیتوپلاسم اووسیت شناسایی می‌شوند و در آنجا تخریب می‌شوند زیرا تخریب اکسیداتیو میتوکندری‌های اسپرم در حین عبور از دستگاه تناسلی خارجی انجام می‌شود. به هر حال باروری مصنوعی در محیط آزمایشگاهی این فرضیه را تأیید نمی‌کند. زیرا شواهد نشان می‌دهد که سرعت تخریب اکسیداتیو کند است.

سوتوسکی و همکاران (۲۰۰۴) توضیح قابل قبولی در مورد وراثت مادری mtDNA پیشنهاد کردند. آنها از منی گاو نر و تخمک گاو ماده استفاده کردند و مشاهدات خود در مورد وراثت مادری میتوکندری در پستانداران را گزارش کردند. آنها مشاهده کردند که میتوکندری‌های اسپرم در همه جای سیتوپلاسم اووسیت وجود دارند و بعداً در معرض پروتئولیز قرار می‌گیرند و از بین می‌روند. بنابراین تخریب میتوکندری پدری در

1- Dilution Theory
2- Oxidative Damage Theory