





جمهوری اسلامی ایران

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

پایان نامه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی

عنوان

بررسی الگوی بیان ژن گیرنده سروتونین (5-HT3A) در سلول های تک

هسته ای خون محیطی در بیماران لوپوس اریتماتوز سیستمیک

نگارش

محمد صابری انوار

استاد راهنما

دکتر قاسم آهنگری

اساتید مشاور

Dr. moncef Zoualia

دکتر شهیندخت سمنگوئی

زمستان ۱۳۸۸

حق استفاده از مفاد پایان نامه برای پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری محفوظ است



پایان نامه ارائه شده برای اخذ مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد

در رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی

عنوان

بررسی بیان ژن گیرنده سروتونین (5-HT₃RA) در سلول های تک هسته ای خون محیطی در بیماران

لوپوس اریتماتوزوس سیستمیک

نگارش

محمد صابری انوار

این پایان نامه توسط کمیته داوران مورد تایید قرار گرفته است و با درجه ----- ارزیابی گردید

..... استاد راهنما: دکتر قاسم آهنگری

..... داور: دکتر سید مسعود هوشمند

..... داور: دکتر مجید صادقی زاده

..... سرپرست آموزش: دکتر حسین شهبانی

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

گروه ژنتیک پزشکی

تقديم به همسر

تقدیر و تشکر:

در اینجا لازم می دانم از تمامی افرادی که در این مدت از راهنمایی های بی دریغشان اینجانب را بهره مند نمودند سپاسگذاری نمایم علی الخصوص جناب آقای دکتر قاسم آهنگری که علاوه بر راهنمایی این پایان نامه همچون معلمی دل سوز علاوه بر درس، راه و رسم بهتر بودن را به این جانب آموختند و از آقایان دکتر سید مسعود هوشمند و دکتر مجید صادقی زاده که زحمت داوری این پایان نامه را پذیرفتند تشکر نمایم.

بر خود فرض می دانم که از خانم ها رئوف زاده، لشگری، ترابی، مظفری، منتظری، سامانیان و آقایان میر فخرایی، طاهری، سمیعی، صادقی کوه پایی، حسین نژاد، لشگری و سایر عزیزانی که در این مسیر بنده را یاری و راهنمایی کردند تقدیر و تشکر نمایم.

در انتها نیز جا دارد از همسر عزیزم که با صبوریش سختی های این مسیر را بر من قابل تحمل کرد و از خانواده عزیزم که زمینه درس و بحث و مطالعه را برای این جانب فراهم کردند کمال تشکر را داشته باشم

چکیده

لوپوس اریتماتوزوس یک بیماری خود ایمنی مرتبط با بافت همبند می‌باشد. لوپوس یک بیماری مزمن، بهبود یابنده، بالقوه کشنده و عود کننده می‌باشد که می‌تواند سیستم‌های مختلف بدن را درگیر نماید و با فراوانی بیشتری در زنان نسبت به مردان رخ می‌دهد. پراکندگی سنی ابتلا به لوپوس عمدتاً ۱۵ تا ۴۵ سال می‌باشد. فاکتورهای متعدد بسیاری شناخته شده است که با بروز لوپوس همراهی نشان داده‌اند از جمله می‌توان HLA، هورمون‌ها، سایتوکاین‌ها، اختلالات سیستم ایمنی و فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی را نام برد، که در سال‌های اخیر به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفته‌اند. نوروایمونواندوکرینولوژی علمی است که به بررسی ارتباط سیستم عصبی، سیستم ایمنی به عنوان دو سوپر سیستم بدن انسان و سیستم غدد درون ریز و ارتباط این سیستم‌ها از طریق نوروترنسمیترها، سایتوکاین‌ها و هورمون‌های غدد درون ریز می‌پردازد

در این تحقیق، ابتدا RNA گویچه‌های سفید خون محیطی افراد سالم و بیمار استخراج گردید و پس از استخراج total mRNA از سلول‌های خونی، به روش Reverse transcriptase PCR، cDNA تام سنتز گردید و در ادامه وجود گیرنده 5HT3RA و ژن خانه دار بتا اکتین به کمک پرایمرهای اختصاصی با استفاده از محصول PCR، مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از دستگاه Light-Cycler غلظت mRNA نمونه‌های سالم و بیمار اندازه‌گیری و مقایسه شد. در انتها نمونه‌ها برای بررسی وجود جهش‌های احتمالی در ژن گیرنده نوع ۳ سروتونین مورد توالی‌یابی قرار گرفتند.

با توجه به نتایج حاصل از آزمایشات صورت گرفته اولاً نشان داده شد که گیرنده نوع ۳ سروتونین در سطح سلول‌های ایمنی موجود در خون محیطی بیان می‌شوند و ثانیاً بعد از بررسی‌های آماری که بر روی داده‌های حاصل صورت گرفت نشان داد شد که بیان این گیرنده در این سلول‌ها افزایش می‌یابد و جهش‌هایی نیز در این گیرنده‌ها مشاهده شد که ارتباطی بین این افزایش بیان و جهش‌های فوق به علت کم بودن تعداد نمونه یافت نشد.

با توجه به نتایج حاصل می توان این گونه نتیجه گیری نمود که افزایش بیان گیرنده نوع ۳ سروتونین در سلول های ایمنی باعث افزایش اثر پذیری آنها از مقدار سروتونین موجود در گردش خون شده که در نهایت منجر به افزایش تقسیم سلولی و واکنش این سلول ها می شود.

می توان نتایج حاصل از این پروژه تحقیقاتی را نه تنها برای کاربردهای بالینی گسترش داد بلکه می توان نتایج آن را در سایر بیماری های خود ایمنی نیز بررسی نمود.

کلمات کلیدی: لوپوس، Real-Time PCR الگوی بیان ژن، گیرنده ی سروتونین (5HT3R).

فهرست مطالب

۱	معرفی
۲	۱-۱- مقدمه:
۴	۲-۱- سیستم ایمنی:
۶	۱-۲-۱- فرآیندهای ایمنی بدن:
۶	۲-۲-۱- عناصر اصلی ایمنی ذاتی:
۶	۳-۲-۱- عناصر ایمنی اکتسابی:
۷	۴-۲-۱- ویژگیهای اصلی پاسخهای ایمنی اکتسابی:
۹	۳-۱- خودایمنی:
۹	۱-۳-۱- اصول و پاتورنز:
۱۲	۲-۳-۱- نقش فاکتورهای ژنتیکی در خود ایمنی:
۱۳	۳-۳-۱- مکانیسم‌های خود ایمنی:
۱۳	۱-۳-۳-۱- ناتوانی در تحمل به خود:
۱۴	۲-۳-۳-۱- MHC و خود ایمنی:
۱۵	۴-۱- لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE)
۱۸	۱-۴-۱- تاریخچه لوپوس:
۲۳	۲-۴-۱- سبب شناسی بیماری SLE:
۲۵	۱-۲-۴-۱- فاکتورهای محیطی:
۲۵	۲-۲-۴-۱- جنسیت مونث:
۲۶	۳-۲-۴-۱- فاکتورهای جغرافیایی، اجتماعی - اقتصادی و نژادی:
۲۷	۴-۲-۴-۱- فاکتورهای ایمونولوژیکی:

- ۲۷..... ۱-۴-۲-۵- توارث:
- ۲۸..... ۱-۴-۳- تشخیص کلینیکی بیماری لوپوس اریتماتوز سیستمیک:
- ۳۰..... ۱-۴-۴- درمان لوپوس اریتماتوز سیستمیک:
- ۳۰..... ۱-۴-۵- نفوذ و بروز بیماری SLE:
- ۳۱..... ۱-۵- سیستم عصبی انسان:
- ۳۲..... ۱-۵-۱- اجزاء سیستم عصبی:
- ۳۲..... ۱-۵-۲- انواع مولکول‌های دخیل در پیام‌رسانی.
- ۳۳..... ۱-۵-۳- نوروترنسمیترها:
- ۳۴..... ۱-۵-۴- سروتونین:
- ۳۵..... ۱-۵-۵- گیرنده‌های سروتونین:
- ۳۸..... ۱-۵-۶- رسپتورهای 5HT₃:
- ۴۱..... ۱-۵-۷- پراکندگی رسپتورهای 5-HT₃:
- ۴۲..... ۱-۵-۸- عمل‌کرد گیرنده‌های 5-HT₃:
- ۴۳..... ۱-۵-۹- مدولاتورهای گیرنده‌ی 5-HT₃:
- ۴۴..... ۱-۵-۱۰- گیرنده‌های هترومریک و هومومریک:
- ۴۵..... ۱-۵-۱۱- ارتباط بیان ژن در سلول‌های خونی و سلول‌های عصبی:
- ۴۵..... ۱-۶- ارتباط سیستم ایمنی و عصبی:
- ۵۰..... ۱-۷- اهداف:
- ۵۱..... مواد و روش‌ها.
- ۵۲..... ۲-۱- مرحله صفر (ورود به طرح):
- ۵۳..... ۲-۲- مرحله اول (نمونه‌گیری):

- ۵۳.....۱-۲-۲ وسایل:.....
- ۵۳.....۲-۲-۲ روش کار:.....
- ۵۴.....۳-۲ مرحله دوم: جداسازی سلول های سفید از خون کامل.....
- ۵۴.....۱-۳-۲ وسایل:.....
- ۵۴.....۲-۳-۲ روش کار:.....
- ۵۶.....۴-۲ مرحله سوم استخراج RNA کامل:.....
- ۵۶.....۱-۴-۲ مواد و لوازم:.....
- ۵۷.....۲-۴-۲ مراحل کار:.....
- ۵۸.....۳-۴-۲ اساس کار استخراج RNA:.....
- ۵۸.....۵-۲ مرحله چهارم: سنتز DNA مکمل:.....
- ۵۸.....۱-۵-۲ مواد و لوازم:.....
- ۵۹.....۲-۵-۲ روند کار:.....
- ۶۰.....۳-۵-۲ اساس کار:.....
- ۶۲.....۶-۲ مرحله پنجم: PCR معمولی برای ژن خانه دار بتا اکتین:.....
- ۶۲.....۱-۶-۲ مواد و لوازم:.....
- ۶۳.....۲-۶-۲ هدف از انجام این مرحله:.....
- ۶۶.....۳-۶-۲ ژل الکتروفورز محصولات PCR:.....
- ۶۶.....۱-۳-۶-۲ طرز تهیه ژل آگارز ۲٪:.....
- ۶۷.....۲-۳-۶-۲ بافر بارگذاری:.....
- ۶۷.....۳-۳-۶-۲ بافر الکتروفورز:.....
- ۶۷.....۴-۳-۶-۲ رنگ آمیزی:.....

۶۸.....	۲-۷-PCR کمی برای ژن بتا اکتین
۶۸.....	۲-۷-۱-لوازم:
۶۸.....	۲-۷-۲-هدف
۶۹.....	۲-۷-۳-انواع
۶۹.....	۲-۷-۴-اساس این کار:
۷۲.....	۲-۷-۴-۱-روش مطلق
۷۲.....	۲-۷-۴-۲-روش نسبی:
۷۲.....	۲-۷-۵-محاسبه Tm محصول:
۷۴.....	۲-۷-۶-نحوه بیان ژن و داده های حاصل از Real-Time PCR:
۷۴.....	۲-۷-۷-آزمایش Real-Time PCR برای ژن بتا اکتین:
۷۷.....	۲-۷-۸-انجام Real-time PCR برای ژن سروتونین 5HT3RA:
۸۰.....	۲-۸-توالی یابی
۸۰.....	۲-۹-بررسی های آماری
۸۱.....	نتایج
۸۲.....	۳-۱-نتایج quantitative PCR
۸۸.....	۳-۲-تصویر ژل الکتروفورز از قطعات مختلف mRNA 5HT3RA
۸۹.....	۳-۳-آنالیز آماری
۹۵.....	بحث و نتیجه گیری
۱۰۵.....	پیشنهادات

۱۰۷.....منابع

۱۱۷.....پیوست ها

فهرست شکل ها

- شکل ۱-۱- سلول های سیستم ایمنی و تقسیم بندی آنها ۵
- شکل ۲-۱- پاتوژن بیماری های خود ایمنی مثل لوپوس اریتماتوزوس سیستمیک ۱۱
- شکل ۳-۱- تصویری تیپیک از یک التهاب پروانه ای در یک فرد لوپوسی ۱۸
- شکل ۴-۱- مدل بیماری برای بیماری های خود ایمنی ۲۴
- شکل ۵-۱- مولکول سروتونین و نام شیمیایی آن ۳۴
- شکل ۶-۱- گیرنده نوع ۳ سروتونین ۳۸
- شکل ۷-۱- مسیر HPA axis ۴۸
- شکل ۱-۲- جداسازی گلبول های سفید از خون کامل به روش فایکول ۵۵
- شکل ۲-۲- انواع روش های سنتز cDNA ۶۱
- شکل ۳-۲- ژل الکتروفورز ژن Beta Actin به همراه 100 bp Ladder ۶۵
- شکل ۴-۲- دستگاه Lightcycler ۷۱
- شکل ۵-۲- crossing point ۷۱
- شکل ۶-۲- crossing point, melting curve & standard curve برای بتا اکتین ۷۶
- شکل ۷-۲- crossing point, melting curve & standard curve برای 5-HT3A ۷۹
- شکل ۱-۳- ژل الکتروفورز از قطعات S1, S2, S3 & S4 ۸۸
- شکل ۲-۳- نمودار دامنه اطمینان غلظت نسبی 5-HT3A mRNA در دو گروه سالم و بیمار ۹۱
- شکل ۳-۳- تغییرات ژنتیکی یافت شده در mRNA 5-HT3A variant 1,2 ۹۲
- شکل ۴-۳- تغییرات ژنتیکی یافت شده در mRNA 5-HT3A variant 1 ۹۳
- شکل ۵-۳- تغییرات ژنتیکی یافت شده در mRNA 5-HT3A variant 1 ۹۴

فهرست جداول

جدول ۱-۱- مربوط به انتی بادی های موجود در SLE	۱۶
جدول ۱-۲- شاخص های تشخیص لوپوس اریتماتوز سیستمیک استخراج شده از انجمن آمریکایی روماتولوژی	۲۹
جدول ۱-۳- همراهی بین بیماریهای خودایمنی و داروها	۲۹
جدول ۱-۴- انواع گیرنده های سروتونین، مکانیسم عملکردی و فعالیت بالقوه آنها	۳۶
جدول ۱-۵- گیرنده نوع ۳ سروتونین و مشخصات آن	۳۷
جدول ۱-۶- دمنین های ساختمانی گیرنده 5-HT3A	۴۰
جدول ۱-۷- طول توالی پپتید راهنما و کد کننده بخش ساختاری گیرنده 5-HT3A	۴۰
جدول ۱-۸- تغییرات شیمیایی اعمال شده بر روی مولکول گیرنده 5-HT3A	۴۰
جدول ۱-۲- چارت مراحل	۵۲
جدول ۲-۲- مراحل استخراج total RNA	۵۷
جدول ۲-۳- مراحل سنتز cDNA	۵۹
جدول ۲-۴- مواد و مقادیر آنها برای PCR بتا اکتین	۶۳
جدول ۲-۵- برنامه دما و زمان PCR برای بتا اکتین	۶۴
جدول ۲-۶- توالی پرایمر های بتا اکتین و مشخصات آن	۶۵
جدول ۲-۷- ترکیبات برای هر Reaction	۷۴
جدول ۲-۸- زمان و دمای برای ژن BA	۷۵
جدول ۲-۹- برنامه زمان دما برای S4, S3, S2, S1	۷۶
جدول ۲-۱۰- پرایمرها و طول قطعات	۷۸

ادامه

- جدول ۳-۱- نتایج **real time PCR** برای بتا اکتین در افراد سالم ۸۲
- جدول ۳-۲- نتایج **real time PCR** برای بتا اکتین در افراد بیمار ۸۳
- جدول ۳-۳- نتایج **Real-Time PCR** برای ژن **5-HT3A** در افراد نرمال ۸۴
- جدول ۳-۴- نتایج **Real-Time PCR** برای ژن **5-HT3A** در افراد بیمار ۸۵
- جدول ۳-۵- تعیین غلظت نسبی **5HT3A/BA** در افراد نرمال ۸۶
- جدول ۳-۶- تعیین غلظت نسبی **5HT3A/BA** در افراد بیمار ۸۷
- جدول ۳-۷- اطلاعات آنالیز آماری ۸۹
- جدول ۳-۸- آزمون **levene** برای برابری واریانس ها ۸۹
- جدول ۳-۹- آزمون **t** برای برابری میانگین ها ۹۰
- جدول ۳-۱۰- جمع بندی آنالیز آماری ۹۰

معرفی

بیماری های خود ایمنی حدود ۵٪ از جمعیت جوامع غربی را در قالب بیش از ۸۰ نوع بیماری مختلف درگیر کرده است. یکی از این ۸۰ نوع بیماری خودایمنی، بیماری لوپوس اریتماتوز سیستمیک می باشد که کمتر از ۱۰٪ جمعیت کشورهای جهان به آن مبتلا می باشند. (ابول عباس، ۲۰۰۶. R.G Lahita 2003). لوپوس نوعی بیماری مزمن، بهبود یابنده، عود کننده و گاهاً کشنده است که بافت های مختلف بدن از جمله مفاصل، پوست، کلیه ها، سلول های خونی، قلب و ریه را درگیر می نماید.

(. Columbia Encyclopedia. Columbia University Press)

نکته مهمی که در مورد این بیماری وجود دارد بار روانی، اجتماعی و اقتصادی قابل توجهی است که بر خانواده افراد مبتلا وارد می شود که این امر ناشی از طبیعت مزمن این بیماری می باشد. لوپوس بیماری است که عمدتاً جمعیت جوان جامعه را درگیر می نماید، معمولاً در زنان، در سن بارداری و شیردهی بیشتر دیده می شود که دلیل آن را ترشح بیشتر هورمون های جنسی می دانند. با وجود مطالعات زیادی که در مورد ارتباط بین ژن ها و بیماری لوپوس انجام شده هنوز دلیل اصلی ایجاد بیماری ناشناخته مانده است. (Anna hellquist 2009) ژن های خاص مثل گیرنده های شبه تول نوع ۸ (TLR8^۱)، کیناز وابسته به گیرنده نوع ۱ اینترلوکین نوع ۱ (IRAK1^۲)، فعال کننده سیگنال و القا کننده رونویسی نوع ۴

^۱ Tool like receptors

^۲ Interleukin-1 receptor-associated kinase 1

(STAT4^۴)، فاکتور تنظیم کننده انترفرون نوع ۵ (IRF5^۴)، دئوکسی سیتوزین مونوفسفات دامیناز نوع ۱ (DCD1^۵)، گیرنده منطقه Fc ایمونوگلوبولین گاما با گرایش کم نوع a^۲ (FCGR2A^۶)، پروتئین داربستی سلول های B با تکرارهای آنکرینی نوع ۱ (BANK1^۷)، اینترلوکین نوع ۱۶ (IL-16^۸)، آنتی ژن لوکوسیتی انسان (HLA^۹) و سیستم کمپلمان جزئی ۲، ۴ و ۱q به همراه بیست ژن دیگر را با این بیماری مرتبط دانسته اند. (Anna hellquist 2009)

در سال های اخیر اصطلاحی تحت عنوان نوروایمنوندوکرینولوژی^{۱۰} وارد مباحث علمی شده است که به بررسی ارتباط سیستم عصبی و ایمنی به عنوان دو سیستم اصلی بدن و سیستم غدد درون ریز و ارتباط این سیستم ها از طریق گیرنده های آنها و واسطه های آنها مثل نوروترنسمیترها، سایتوکاین ها و هورمون های غدد درون ریز می پردازد. اثرات متقابل این دو سیستم از طریق هورمون ها بر یکدیگر و تأثیر عوامل ژنتیکی و محیطی بر این دو سیستم می تواند موجب بروز بیماری های متعدد مانند خود ایمنی و از جمله لوپوس شود.

سیستم سروتونینرژیک و گیرنده هایی که براساس همولوژی ساختمانی و عملکردی جزء خانواده گیرنده

^۳ Signal Transducers and Activators of Transcription

^۴ Interferon regulatory factor 1

^۵ dCMP deaminase

^۶ Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-a

^۷ B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1

^۸ Interlukine 16

^۹ Human histocompatibility complex

^{۱۰} Neuro immuno endocrinology

های نیکوتینی استیل کولین قرار می گیرد. سیستم نوروترنسمیتری مهمی در دستگاه عصبی انسان هستند که آزادسازی و کنترل سایر نوروترنسمیتر ها مثل دوپامین ، گلوتامات، گاما آمینو بوتیریک اسید (¹¹GABA)، اپی نفرین و نور اپی نفرین، استیل کولین و بسیاری از هورمون ها از جمله اکسی توسین، پرولاکتین، وازوپرسین، کورتیزول، کورتیکوسترون و ... و ریتم های طبیعی بدن مثل خواب، میل به غذا، رفتارهای جنسی و... را در اختیار دارد می توانند از طریق تعامل با سیستم های دیگر در بیماری زایی و در درمان بیماری ها نقش داشته باشند. گیرنده ها و ترنسپورترهای سروتونینی نیز که در مسیر انتقال پیام عصبی عمل می کنند، می توانند هم شرایط ایجاد بیماری را فراهم سازند و هم مستقیماً منجر به بیماری شوند. با بررسی و مقایسه الگوی بیان ژن های این گیرنده ها می توان امیدوار بود به درک بیشتری از پاتوژنز بیماری های مثل لوپوس که دلیل اصلی ایجاد آنها هنوز مشخص نشده است، نایل آمد. نتایج اولیه تحقیق حاضر نیز موید این مطلب است که در بیماری لوپوس الگوی بیانی ژن های گیرنده های سروتونین (¹²5HT3R) در افراد بیمار در مقایسه با افراد سالم افزایش می یابد.

۱-۲- سیستم ایمنی:

تعریف قدیمی ایمنی، مصونیت در برابر بیماری ها به ویژه بیماری های عفونی می باشد ولی تعریف دقیق تر آن عبارت است از: واکنش بدن در برابر عوامل بیگانه بیماریزا نظیر میکروبها و عوامل غیر

¹¹ Gamma aminobutyric acid

¹² 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor type 3

بیماری‌ها شامل ماکرومولکول‌هایی از قبیل پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها.

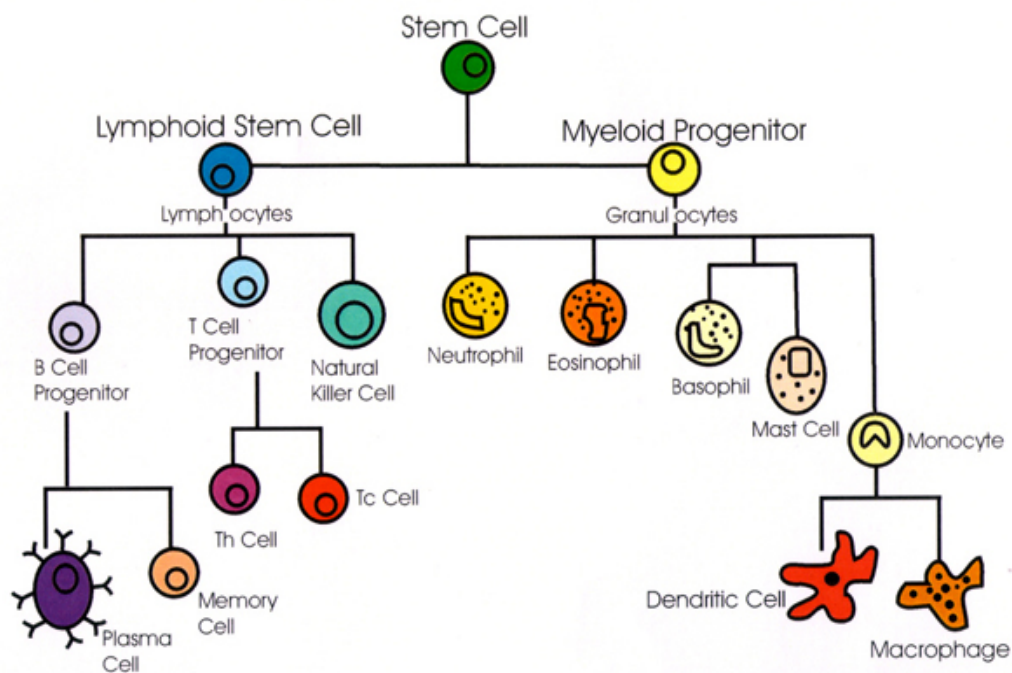
امروزه ایمونولوژی نوین یک علم تجربی است که براساس مشاهدات تجربی به توصیف پدیده‌های

ایمونولوژیک می‌پردازد.

به مجموعه سلول‌ها و مولکول‌های دخیل در ایجاد ایمنی، سیستم ایمنی^{۱۳} و به پاسخ هماهنگ در مقابل

عوامل خارجی و بیگانه، پاسخ ایمنی^{۱۴} گفته می‌شود.

Cells of the Immune System



شکل ۱-۱ سلول‌های سیستم ایمنی و تقسیم بندی آنها

Immune System^{۱۳}

Immune response^{۱۴}