بسم الله
الرحمن
الرحيم

دانشکده علوم زیستی

رساله دکتری ژنتیک مولکولی

عنوان رساله:

بررسی بیان ژنهای میتوکندریایی و تعدادی از ژنهای هسته‌ای کمپلکس I میتوکندری در افراد مبتلا به بیماری فردریش آتاکسیا

نگارش:
محمد حسین صالحی

استاد راهنما :
دکتر سید مسعود هوشمند

اساتید مشاور:
دکتر مجید صادقی زاده
دکتر شهریار نفیسی

شهریور ۱۳۹۲

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای محمد حسین صالحی دانشجوی مقطع دکتری رشته **ژنتیک** به شماره دانشجویی ۸۷۵۶۵۲۰۱۶ رساله واحدی خود را با عنوان : **بررسی بیان ژنهای میتوکندریابی وهسته ای کمپلکس I میتوکندری بابیشترین نقص دربیماران مبتلابه بیماری فردریش آتاکسیا."** در تاریخ**۱۳۹۲/۶/۵** روز **سه‌یک شنبه** در اتاق شماره **۵۰۰۹** دانشکده **علوم زیستی** 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 می‌کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبهٔ علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	آقای دکترمسعود هوشمند	استادیار	
۲- استاد مشاور	آقای دکتر مجید صادقی زاده	استاد	
۳- استاد ناظر داخلی	آقای دکترسامان حسینخانی	دانشیار	
۴- استاد ناظر داخلی ونماینده تحصیلات تکمیلی	آقای دکتر بهرام محمد سلطانی	استادیار	
۵- استاد ناظر خارجی	آقای دکتر سیدعلیرضا مصباح	دانشیار	
۶-استاد ناظر خارجی	آقای دکتر محمدتقی اکبری	استادیار	

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 پدید 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 دانشجو 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، 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 آئین نامه های 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 تاریخ۸۷/۴/۱ 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 **محمد حسین صالحی** دانشجوی رشته **ژنتیک مولکولی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۷** مقطع **دکتری** دانشکده **علوم زیستی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آئین 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 آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

تاریخ:

امضا:

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (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 پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه دکتری نگارنده در رشته **ژنتیک مولکولی** است که در سال **۱۳۹۲** در دانشکده **علوم زیستی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر **سید مسعود هوشمند** و مشاوره جناب آقایان دکتر **مجید صادقی زاده** و دکتر **شهریار نفیسی** از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت 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 **محمد حسین صالحی** دانشجوی رشته **ژنتیک مولکولی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی:

تاریخ و امضا:

تقدیم به

خوبان زندگی، ***پـــــدر و مـــــادرم*** *که حتی واژه‌ها در میان زحمات و محبتهای بی حد و حصر آنها قاصر است، آنانکه همچون شمع سوختند تا پرتوافشان زندگیم باشند، عزیزانی که لحظه‌ای نیاسودند تا آسودن را فراهم کنند، به پاس سالها تلاش و کوشش، دستان گرمشان را بوسه باران می‌کنم و محبت وجودم را تقدیمشان می‌کنم.*

و تقدیم به خانواده‌ام و دخترم ***شیـــــــدا*** *که مرا در این راه پر فراز و نشیب همراه بودند و هیچگاه کمک و یاری خود را از من دریغ ننموده اند.*

و تقدیم به انسانهایی که در وادی روشن اشاعه فرهنگ اصیل انسانیت قلم می زنند و از جوهر گلبرگهای بوستان ادب بر لوح تشنه طبیعت زیبایی های «ان الله جمیل» را خلق می کنند و نجوای دل را از راه نای نفس ناطقه خود به گوش عالمیان می‌رسانند.

و به آن عزیزی که جهان در انتظار عدالت است و عدالت در انتظار او.

سپاسگزاری

آغاز سخن، سپاس و ستایش پروردگاری که معلم اول است و دانای اعظم و هیچ اثری را امکان وجود نیست مگر به اجازت وجود واجبش. سپاس خدای را که بار دیگر ذره ای از معرفت خود را بر ما نمایان ساخت . اینک که به مهر ایزد یکتا، این دوره تحصیلی را به پایان رسانده‌ام بر خود واجب می‌دانم از تمامی عزیزانی که در کلیه مراحل آزمایشگاهی و پژوهشی این پایان‌نامه مرا یاری کرده اند سپاسگزاری نمایم.

نخست سپاسگزاری خالصانه‌ام را نثار پدر و مادرم و خانواده عزیزم و دخترم **شـــــیدا** می‌نمایم که همواره شمع راه تحصیلم بوده‌اند و با تشویق و دلگرمیهایشان سختی راه را بر من هموار ساختند.

از استاد راهنمای عالیقدرم جناب آقای **دکتر سید مسعود هوشـــمند** که راهنمایی این پایان نامه را بر عهده داشته‌اند و با صبر و شکیبایی و راهنمایی‌های ارزنده خود مرا در انجام این پایان‌نامه یاری نمودند و همواره به عنوان پشتوانه علمی محکمی برایم بوده‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم و برای ایشان و خانواده محترمشان از خداوند متعال توفیق و سلامتی آرزو دارم.

و با تشکر از اساتید مشاورم، جناب آقای **پروفسور مجید صادقی‌زاده** و جناب آقای **دکتر شهریار نفیسی** که خالصانه، بی دریغ و مهربان، رهنمودهای با ارزش و روشنگرشان را نثارم نمودند.

و با تشکر از ریاست محترم دانشکده علوم زیستی، جناب آقای **دکتر خسرو خواجه** که زحمات زیادی برای بنده کشیدند و با تشکر از اساتید محترم گروه ژنتیک ملکولی دانشگاه تربیت مدرس.

و با تشکر از اساتید، کارشناسان، دانشجویان و پرسنل گرانقدر مرکز پزشکی خاص، دکتر **امید آریـــانی** و خانمها: **قاســمی، دهــقان، آراستــه، خلیــلی، سنــجری، دادگــر، قدسی‌نــژاد، بــلالی، رضــایی، آریــن، استادرضــا، اکبــری، آزادفــر، ذوالفقــاری، عربــی، بــراتی، آبــانگر** و آقایان: **مشیــری و باقــری** که در طی این دوره از زحمات و همفکری‌ها و راهنمائیهایشان بهره‌مند بوده‌ام.

و با تشکر ویژه از آقای مهندس **شــاهین نگــاری** که صبورانه و دلسوزانه بنده را راهنمایی کردند.

و با تشکر فراوان از دوستان و همکاران عزیزم در دانشگاه تربیت مدرس: دکتر **نخــعی سیستانی**، دکتر **پنــاهی**، دکتر **وطنــدوست**، دکتر **نــورایی**، دکتر **غــربی**، دکتر **طهمــاسبی** ، خانم **کریــمی** و دوستانی که همواره مورد لطف آنها بوده و همیشه بزرگترین سرمایه‌های این جانب می باشند و تمام کسانی که بی‌دریغ و بدون چشمداشت کمک می‌کنند و عشق می‌ورزند.

در خاتمه زانوی ادب بر زمین می نهم و نگین بوسه بر دستان تمامی عزیزانی که در طول این مدت مدیون همه خوبی ها و بزرگواریهایشان بوده‌ام، می‌فشانم و صمیمانه قدردانی می‌نمایم.

چکیده:

میتوکندری، نقشی حیاتی در متابولیسم سلولی و تولید انرژی دارد. که درون غشاء داخلی میتوکندری با کمک ۵ مجموعه آنزیمی و طی روند فسفریلاسیون اکسیداتیو انجام می‌شود. این زنجیره تنفسی از زیرواحدهای پروتئینی تشکیل شده که برخی توسط DNA میتوکندری و برخی هم توسط DNA هسته رمز می‌شوند. کمپلکس I، پیچیده‌ترین و بزرگترین کمپلکس زنجیره تنفسی است که زیرواحدهای آن توسط DNA میتوکندریایی و DNA هسته رمز می‌گردد. نقص در این کمپلکس به تنهایی و یا با اشتراک با دیگر کمپلکسها فراوانترین نقص در زنجیره تنفسی گزارش شده است. فردریش آتاکسیا (FRDA) شایعترین آتاکسیای وراثتی است که دارای الگوی اتوزومال مغلوب است که محصول ژن FRDA بنام فراتاکسین در سلولهای غنی از میتوکندری بیان می‌شود. گسترش تکرارهای سه نوکلئوتیدی GAA در اینترون اول ژن FRDA بر روی کروموزوم شماره ۹ سبب کاهش بیان mRNA فراتاکسین و در نتیجه کاهش پروتئین فراتاکسین می شود. فقدان فراتاکسین باعث افزایش آهن میتوکندریایی می‌شود و به دنبال آن ایجاد رادیکالهای آزاد در میتوکندری افزایش می‌یابد و باعث صدمه به کمپلکس های زنجیره تنفسی خصوصا کمپلکس I می‌شود. نقص در کمپلکس I زنجیره تنفسی و استرس اکسیداتیوی میتوکندریایی در این بیماری گزارش شده است و اختلال در ژنهای هسته‌ای و میتوکندریایی کدکننده این کمپلکس، کاندیدی برای تاثیرگذاری بر این بیماری می‌باشند که استرس اکسیداتیو بنظر میرسد در بیماریزایی نقش دارد. ما در این مطالعه، نقص در زیرواحدهای میتوکندریایی و تعدادی از زیرواحدهای هسته‌ای کمپلکس I در بیماری فردریش آتاکسیا به تعداد ۲۱ بیمار (۱۲ مرد و ۹ زن) را بررسی نمودیم و الگوی بیان ژنی بیماران را در قیاس با افراد کنترل به تعداد ۲۴ کنترل آنالیز کردیم که در این پژوهش، از روش نسبی کمیت سنجی مبتنی بر استفاده از ژن Reference و با استفاده از تکنیک Real time PCR برای بررسی میزان بیان ژنهای هسته‌ای و میتوکندریایی در افراد مبتلا به بیماری فردریش آتاکسیا استفاده گردید. مطالعات ما در چهار ژن از این ژنهای مورد مطالعه کمبود بیان مشاهده شده را گزارش نمودیم

که این ژنها عبارتند از: ژنهای ND2, ND4L و ND6 از ژنهای میتوکندریایی و ژن NDUFA1 از ژنهای هسته‌ای که میزان کاهش بیان این ژنها از لحاظ آماری t تست و مقدار $P<0.05$ معنی‌دار است. آنالیز آماری بوسیله برنامه GraphPad prism انجام گرفت. نتایج همچنین تغییرات بیانی در سایر ژنها را نیز نشان می‌دهد اما با توجه به مقدار P این تغییرات معنی‌دار نیستند. همچنین زیرواحدهای میتوکندریایی کمپلکس I نسبت به زیرواحدهای هسته‌ای این کمپلکس، الگوی بیانی متفاوتی را نشان داد. الگوی بیانی ژنهای میتوکندریایی و هسته‌ای اشاره به تاثیر تخریب میتوکندریایی و تخریب عصبی بیماری فردریش آتاکسیا دارد.

در این آزمایش همچنین ارتباط این بیماری با بیومارکر FGF21 به همراه دو گروه یکی گروهی که مشکلات میتوکندریایی ندارند به عنوان کنترل منفی و یک گروهی که مشکلات میتوکندریایی دارند به عنوان کنترل مثبت بوسیله تست الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج تست مشخص کرد که میزان این بیومارکر در افراد فردریش بطور معنی‌داری ($P<0.05$) پایینتر از افراد کنترل مثبت و در حد نرمال بود. میزان آن نزدیک به افراد کنترل منفی می‌باشد و تغییراتی نسبت به افراد نرمال دیده نشده است. همچنین در میان افراد کنترل مثبت که مشکلات میتوکندریایی دارند هم میزان غلظت این بیومارکر در زنها به مقدار قابل ملاحظه‌ای بیشتر از مردان بدست آمد. در نهایت می‌توان گفت که بیومارکر FGF21 گزینه مناسبی برای بیماریهای میتوکندریایی می‌باشد اما بیومارکر مناسبی برای بیماری فردریش آتاکسیا نمی‌باشد.

واژگان کلیدی: میتوکندری، کمپلکس I زنجیره تنفسی، فردریش آتاکسیا، بیومارکر FGF21

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست جداول ..... و
فهرست نمودارها .....ز
فهرست اشکال .....ح
فصل اول: مقدمه ۱
۱-۱) بیماری فردریش آتاکسیا ۲
۱-۱-۱) تاریخچه بیماری ۲
۱-۱-۲) خصوصیات بالینی و پاتولوژی بیماری ۳
۱-۱-۳) ژنتیک و بیوشیمیایی بیماری ۶
۱-۱-۴) تستهای ژنتیک ملکولی برای تشخیص فردریش آتاکسیا ۱۱
۱-۱-۵) ارتباط فنوتیپ ـ ژنوتیپ بیماری ۱۲
۱-۱-۶) روشهای درمانی ۱۲
۱-۲) میتوکندری و ساختار آن ۱۴
۱-۲-۱) تاریخچه میتوکندری ۱۴
۱-۲-۲) ساختار میتوکندری ۱۶
۱-۲-۳) فراساختمان میتوکندری ۱۷
۱-۲-۴) خاستگاه میتوکندری ۱۹
۱-۲-۵) اعمال میتوکندری ۲۰
۱-۲-۵-۱) دخالت در متابولیسم مواد ۲۰
۱-۲-۵-۲) دخالت در تجمع مواد ۲۱
۱-۲-۵-۳) دخالت در تنفس سلولی هوازی ۲۲
۱-۲-۶) زنجیره تنفسی و عمل آن: ۲۲
۱-۲-۶-۱) کمپلکس I (NADH دهیدروژناز یا NADH یوبیکینون اکسیدوردوکتاز): ۲۵
۱-۲-۶-۲)کمپلکسII (سوکسینات دهیدروژناز یا سوکسینات یوبیکینون اکسیدوردوکتاز): ۲۶
۱-۲-۶-۳) کمپلکس III (سیتوکروم c ردوکتاز یا یوبیکینول سیتوکروم c ردوکتاز) :..... ۲۶
۱-۲-۶-۴) کمپلکس IV (سیتوکروم Cاکسیداز یا فروسیتوکروم C اکسیژن اکسیدوردوکتاز) : . ۲۷
۱-۲-۶-۵) کمپلکس V (ATP سنتتاز): ۲۷
۱-۲-۷) ژنتیک میتوکندری ۲۷
۱-۲-۷-۱) ژنوم میتوکندریایی ۲۷
۱-۲-۷-۲) وراثت میتوکندریایی ۲۹
۱-۲-۷-۳) هوموپلاسمی و هتروپلاسمی ۳۰

۱-۲-۷-۴) حدآستانه ۳۱
۱-۲-۷-۵) ارتباط ژنوم میتوکندریایی و ژنوم هسته‌ای ۳۲
۱-۲-۷-۶) ناحیه کنترل ۳۲
۱-۲-۷-۸) همانندسازی ژنوم میتوکندری ۳۴
۱-۲-۸) اختلالات میتوکندری ۳۵
۱-۲-۸-۱) عملکرد غیر طبیعی میتوکندی ۳۶
۱-۲-۸-۲) جهش و دسته بندی آنها ۳۸
۱-۲-۸-۲-۱) جهش‌های DNA میتوکندری ۳۹
۱-۲-۸-۲-۱-۱) بازآرایی mtDNA ۴۱
۱-۲-۸-۲-۱-۱-۱) حذف منفرد : ۴۱
۱-۲-۸-۲-۱-۱-۲) مضاعف شدن : ۴۲
۱-۲-۸-۲-۱-۲) جهش‌های نقطه‌ای ۴۲
۱-۲-۸-۲-۱-۲-۱) جهش‌های نقطه‌ای ژنهای کدکننده پروتئین ۴۳
۱-۲-۸-۲-۱-۲-۲) جهش نقطه‌ای ژنهای کدکننده tRNA ۴۳
۱-۲-۸-۲-۲) جهش‌های ژنوم هسته‌ای ۴۳
۱-۲-۸-۲-۳) اختلالات ارتباط‌های بین ژنومی ۴۸
۱-۲-۹) رادیکالهای فعال اکسیژن ۵۰
۱-۲-۱۰) تثبیت جهش در ژنوم میتوکندری ۵۲
۱-۳) اهمیت و اهداف پژوهش ۵۳
فصل دوم : مواد و روشها ۵۶
۲-۱) تهیه نمونه ۵۷
۲-۲) استخراج DNA ۵۸
۲-۲-۱) روش استخراج DNA به روش کیت: ۵۸
۲-۲-۲) خصوصیات آنالیتیکی : ۵۹
۲-۲-۳) روش کـار : ۵۹
۲-۲-۴) تعیین غلظت و کیفیت DNA استخراج شده ۶۰
۲-۸ -۱) اسپکتروفتومتری ۶۱
۲-۳) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) : ۶۲
۲-۳-۱) کلیات : ۶۲
۲-۳-۲) مواد و محلولهای لازم جهت انجام PCR ۶۳
۲-۳-۳) روش کار : ۶۴
۲-۴) PCR اختصاصی ۶۵

۲-۵) الکتروفورز ژل آگارز ۶۶
۲-۵-۱) مواد و محلولهای لازم : ۶۶
۲-۵-۲) مشاهده باندهای DNA بر روی ژل آگارز ۶۷
۲-۶) استخراج RNA به روش کیت ۶۸
۲-۶-۱) مواد لازم: ۶۸
۲-۶-۲) روش کار: ۶۹
۲-۶-۲) تعیین غلظت و کیفیت RNA استخراج شده ۷۰
۲-۷) سنتز cDNA بروش کیت ۷۱
۲-۷-۱) روش کار : ۷۱
۲-۷-۲) واکنش RT-PCR ۷۲
۲-۸) PCR گرادیان ۷۲
۲-۹) Real Time PCR ۷۴
۲-۹-۱) کلیات ۷۴
۲-۹-۲) روش‌های شناسایی در Real time PCR ۷۵
۲-۹-۲-۱) رنگ‌های فلورسنت ۷۵
۲-۹-۲-۲) پروب‌های فلورسنت ۷۷
۲-۹-۳) آنالیزهای کمی در PCR Real time ۷۸
۲-۹-۳-۱) رسم منحنی ذوب ۸۱
۲-۹-۴) آنالیز داده‌ها ۸۲
۲-۹-۴-۱) روش منحنی استاندارد (کمیت‌سنجی مطلق) ۸۲
۲-۹-۴-۲) روش آستانه نسبی (کمیت‌سنجی نسبی) ۸۳
۲-۹-۵) مراحل انجام آزمایش Real Time PCR ۸۳
۲-۹-۵-۱) طراحی پرایمر و قطعه تکثیرشونده ۸۳
۲-۹-۵-۲) بهینه سازی و ارزیابی آزمایش ۸۶
۲-۹-۵-۳) رسم منحنی استاندارد ۸۶
۲-۹-۵-۴) تعیین اختصاصی بودن محصول PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۸۷
۲-۹-۵-۵) مواد و محلولهای لازم ۸۸
۲-۹-۵-۶) روش کار ۸۸
۲-۱۰) تست الایزا: ۹۰
۲-۱۰-۱) کلیات: ۹۰
۲-۱۰-۲) انواع الایزا : ۹۱
۲-۱۰-۳) شیکر الایزا ۹۲
۲-۱۰-۴) شستشودهنده الایزا ۹۳

۲-۱۰-۵) خواننده الایزا ۹۳
۲-۱۰-۶) مواد الایزا: ۹۴
۲-۱۰-۷) روش کار: ۹۴
فصل سوم: نتـــایج ۹۷
۳-۱) بررسی نمونه‌ها ۹۸
۳-۲) استخراج DNA و تعیین کیفیت DNA استخراج شده ۹۸
۳-۳) نتایج PCR مربوط به بیماران ۹۹
۳-۴) استخراج RNA و تعیین کیفیت RNA استخراج شده ۱۰۰
۳-۵) سنتز cDNA و تعیین کیفیت cDNA استخراج شده ۱۰۰
۳-۶) PCR گرادیان ۱۰۱
۳-۷) نتایج مربوط به بیان ژنهای هسته‌ای و میتوکندریایی ۱۰۱
۳-۷-۱) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش برای بیان ژن GAPDH ۱۰۲
۳-۷-۱-۱) منحنی ذوب برای بیان ژن GAPDH ۱۰۳
۳-۷-۱-۲) رسم منحنی استاندارد برای بیان ژن GAPDH ۱۰۴
۳-۷-۲) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش برای بیان ژن NDUFA1 ..... ۱۰۵
۳-۷-۳) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش برای بیان ژن NDUFA4 ..... ۱۰۸
۳-۷-۴) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش برای بیان ژن NDUFA5 ..... ۱۱۰
۳-۷-۵) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش برای بیان ژن NDUFA10 ..... ۱۱۲
۳-۷-۶) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش برای بیان ژن NDUFA12 ..... ۱۱۴
۳-۷-۷) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش برای بیان ژن NDUFB10 ..... ۱۱۶
۳-۷-۸) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش برای بیان ژن NDUFB11 ..... ۱۱۸
۳-۷-۹) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش برای بیان ژن NDUFC2 ..... ۱۲۰
۳-۷-۱۰) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش برای بیان ژن NDUFS2 ..... ۱۲۲
۳-۷-۱۱) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش برای بیان ژن NDUFV1 ..... ۱۲۴
۳-۷-۱۲) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش برای بیان ژن ND1 ..... ۱۲۶
۳-۷-۱۳) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش برای بیان ژن ND2 ..... ۱۲۸
۳-۷-۱۴) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش برای بیان ژن ND3 ..... ۱۳۰
۳-۷-۱۵) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش برای بیان ژن ND4 ..... ۱۳۲
۳-۷-۱۶) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش برای بیان ژن ND4L ۱۳۴
۳-۷-۱۷) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش برای بیان ژن ND5 ..... ۱۳۶
۳-۷-۱۸) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش برای بیان ژن ND6 ..... ۱۳۸
۳-۸) نتایج الایزا ۱۴۰

۳-۹) آنالیز بیان ژنها..... ۱۴۳
۳-۹-۱) آنالیز آماری ۱۴۵
فصل چهارم: بحث ، نتیجه‌گیری و پیشنهادات ۱۴۹
۴-۱) بحث و نتیجه‌گیری ۱۵۰
۴-۲) پیشنهادات..... ۱۵۹
فهرست منابع و مآخذ ۱۶۰

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱ معیار تشخیصی برای FRDA توسط Geoffroy و Harding و همکارانشان ۳

جدول ۱-۲ جهش‌های بیماریزا در ژنهای هسته‌ای کد کننده زیرواحدهای ساختاری میتوکندری ۴۵

جدول ۱-۳ جهش‌های بیماریزا در ژنهای هسته‌ای زنجیره تنفسی ۴۷

جدول ۱-۴ جهش‌های بیماریزا در ژنهای هسته‌ای که روی دستگاه ترجمه میتوکندری اثر دارد ۴۸

جدول ۲-۱ اطلاعات مربوط به جنس، سن شروع و تشخیص و قومیت بیماران ۵۷

جدول ۲-۲ توالی پرایمرهای ژنGAA برای تکثیر ۶۳

جدول ۲-۳ غلظت و حجمهای بهینه شده واکنشگرهای PCR برای حجم نهایی ۲۵ λ ۶۴

جدول۲-۴ اطلاعات مربوط به برنامه، دما و زمان لازم جهت انجام PCR ۶۴

جدول۲-۵ غلظت و حجمهای بهینه شده واکنشگرهای RT- PCR برای حجم نهایی ۲۵ λ ۶۹

جدول ۲-۶ اطلاعات مربوط به برنامه، دما و زمان لازم جهت انجام RT-PCR ۷۰

جدول ۲-۷ توالی پرایمرهای ژنهای هسته‌ای و سایز قطعه ۸۴

جدول ۲-۸ توالی پرایمرهای ژنهای میتوکندریایی و سایز قطعه ۸۴

جدول ۳-۱ نتایج حاصل از تست الایزا ۱۳۹

جدول ۳-۲ نتایج کلی مربوط به تست الایزا ۱۴۰

جدول ۳-۳ محاسبات کمیت سنجی افراد کنترل و بیمار ۱۴۲

جدول ۳-۴ محاسبات برای بدست آوردن دامنه معنی‌دار ی برای ژنهای مورد مطالعه ۱۴۴

جدول ۳-۵ میزان efficiency ، دمای ذوب و سایز amplicon محصولات ژنها ۱۴۵

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۳-۱ ارتباط غلظت بیومارکر در کنترلها و بیماران فردریش ۱۴۰

نمودار ۳-۲ ارتباط غلظت بیومارکر بر اساس تفکیک جنسیتی ۱۴۱

نمودار ۳-۳ میزان میانگین Ct در ژنهای مورد مطالعه در بیماران ۱۴۳

نمودار ۳-۴ میزان Fold change بدست آمده در ژنهای مورد مطالعه ۱۴۳

نمودار ۳-۵ بیان ژن NDUFA1 در نمونه‌های کنترل و بیمار ۱۴۵

نمودار ۳-۶ بیان ژن ND2 در نمونه‌های کنترل و بیمار ۱۴۶

نمودار ۳-۷ بیان ژن ND4L در نمونه‌های کنترل و بیمار ۱۴۶

نمودار ۳-۸ بیان ژن ND6 در نمونه‌های کنترل و بیمار ۱۴۷

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ گسترش تکرارهای سه تایی GAA در اینترون ژن FRDA ۹
شکل ۱-۲ ساختار میتوکندری و ضمائم درون آن ۱۸
شکل ۱-۳ زنجیره تنفسی و کمپلکسهای آنزیمی آن ۲۳
شکل ۱-۴ تولید ATP توسط زنجیره تنفسی به واسطه کمپلکسهای زنجیره تنفسی ۲۵
شکل ۱-۵ ساختاردورشته‌ای ژنوم میتوکندری درانسان و ژنهای کدکننده واحدهای زنجیره ۲۸
شکل ۱-۶ توارث مادری DNA میتوکندری ۲۹
شکل ۱-۷ موقعیت‌های بیماریهای مختلف میتوکندریایی روی ژنوم میتوکندری ۴۴
شکل ۱-۸ بافتهایی که از بیماریهای میتوکندریایی تاثیر می‌پذیرند ۴۹
شکل ۱-۹ تولید ROS در فرآیند فسفریلاسیون اکسیداتیو ۵۱
شکل ۲-۱ نحوه عمل رنگ سایبرگرین I ۷۵
شکل ۲-۲ حد آستانه برای نمودار تکثیر ۷۸
شکل ۲-۳ بهینه سازی دمای anealing برای چند نمونه ۷۹
شکل ۲-۴ نمودار منحنی ذوب و باند الکتروفورز تک محصولی ۸۱
شکل ۲-۵ منحنی استاندارد و میزان کارایی واکنش ۸۶
شکل ۳-۱ DNA استخراج شده به روش کیت ۹۸
شکل ۳-۲ نتایج PCR مربوط به تشخیص بیماری ۹۸
شکل ۳-۳ نتایج RT-PCR ۹۹
شکل ۳-۴ نتایج RT-PCR برای سنتز cDNA ۱۰۰
شکل ۳-۵ نتایج RT-PCR برای گرادیان ۱۰۰
شکل ۳-۶ منحنی تکثیر برای بیان ژن GAPDH ۱۰۱
شکل۳-۷ حد آستانه برای بیان ژن GAPDH ۱۰۲
شکل ۳-۸ پیک ذوب برای بیان ژن GAPDH ۱۰۳
شکل ۳-۹ باند ۲۰۰ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن GAPDH ۱۰۳
شکل ۳-۱۰ منحنی استاندارد بیان ژن GAPDH ۱۰۴
شکل ۳-۱۱ منحنی تکثیر بیان ژن NDUFA1 ۱۰۵
شکل ۳-۱۲ حد آستانه و Ct بیان ژن NDUFA1 ۱۰۵
شکل ۳-۱۳ پیک ذوب محصول بیان ژن NDUFA1 ۱۰۶
شکل ۳-۱۴ باند ۱۱۶ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن NDUFA1 ۱۰۶
شکل ۳-۱۵ منحنی استاندارد بیان ژن NDUFA1 ۱۰۶
شکل ۳-۱۶ منحنی تکثیر بیان ژن NDUFA4 ۱۰۷
شکل ۳-۱۷ حد آستانه و Ct بیان ژن NDUFA4 ۱۰۷
شکل ۳-۱۸ پیک ذوب محصول بیان ژن NDUFA4 ۱۰۸

شکل ۳-۱۹ باند ۱۳۷ جفت بازی مربوط به تکثیر بیان ژن NDUFA4 ۱۰۸
شکل ۳-۲۰ منحنی استاندارد بیان ژن NDUFA4 ۱۰۸
شکل ۳-۲۱ منحنی تکثیر بیان ژن NDUFA5 ۱۰۹
شکل ۳-۲۲ حد آستانه و Ct بیان ژن NDUFA5 ۱۰۹
شکل ۳-۲۳ پیک ذوب محصول بیان ژن NDUFA5 ۱۱۰
شکل ۳-۲۴ باند ۱۵۴ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن NDUFA5 ۱۱۰
شکل ۳-۲۵ منحنی استاندارد بیان ژن NDUFA5 ۱۱۰
شکل ۳-۲۶ منحنی تکثیر بیان ژن NDUFA10 ۱۱۱
شکل ۳-۲۷ حد آستانه و Ct بیان ژن NDUFA10 ۱۱۱
شکل ۳-۲۸ پیک ذوب محصول بیان ژن NDUFA10 ۱۱۲
شکل ۳-۲۹ باند ۱۳۰ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن NDUFA10 ۱۱۲
شکل ۳-۳۰ منحنی استاندارد بیان ژن NDUFA10 ۱۱۲
شکل ۳-۳۱ منحنی تکثیر بیان ژن NDUFA12 ۱۱۳
شکل ۳-۳۲ حد آستانه و Ct بیان ژن NDUFA12 ۱۱۳
شکل ۳-۳۳ پیک ذوب محصول بیان ژن NDUFA12 ۱۱۴
شکل ۳-۳۴ باند ۱۵۶ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن NDUFA12 ۱۱۴
شکل ۳-۳۵ منحنی استاندارد بیان ژن NDUFA12 ۱۱۴
شکل ۳-۳۶ منحنی تکثیر بیان ژن NDUFB10 ۱۱۵
شکل ۳-۳۷ حد آستانه و Ct بیان ژن NDUFB10 ۱۱۵
شکل ۳-۳۸ پیک ذوب محصول بیان ژن NDUFB10 ۱۱۶
شکل ۳-۳۹ باند ۱۸۸ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن NDUFB10 ۱۱۶
شکل ۳-۴۰ منحنی استاندارد بیان ژن NDUFB10 ۱۱۶
شکل ۳-۴۱ منحنی تکثیر بیان ژن NDUFB11 ۱۱۷
شکل ۳-۴۲ حد آستانه و Ct بیان ژن NDUFB11 ۱۱۷
شکل ۳-۴۳ پیک ذوب محصول بیان ژن NDUFB11 ۱۱۸
شکل ۳-۴۴ باند ۲۳۱ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن NDUFB11 ۱۱۸
شکل ۳-۴۵ منحنی استاندارد بیان ژن NDUFB11 ۱۱۸
شکل ۳-۴۶ منحنی تکثیر بیان ژن NDUFC2 ۱۱۹
شکل ۳-۴۷ حد آستانه و Ct بیان ژن NDUFC2 ۱۱۹
شکل ۳-۴۸ پیک ذوب محصول بیان ژن NDUFC2 ۱۲۰
شکل ۳-۴۹ باند ۱۳۷ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن NDUFC2 ۱۲۰
شکل ۳-۵۰ منحنی استاندارد بیان ژن NDUFC2 ۱۲۰
شکل ۳-۵۱ منحنی تکثیر بیان ژن NDUFS2 ۱۲۱
شکل ۳-۵۲ حد آستانه و Ct بیان ژن NDUFS2 ۱۲۱
شکل ۳-۵۳ پیک ذوب محصول بیان ژن NDUFS2 ۱۲۲

شکل ۳-۵۴ باند ۲۱۴ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن NDUFS2 ..... ۱۲۲
شکل ۳-۵۵ منحنی استاندارد بیان ژن NDUFS2 ..... ۱۲۲
شکل ۳-۵۶ منحنی تکثیر بیان ژن NDUFV1 ..... ۱۲۳
شکل ۳-۵۷ حد آستانه و Ct بیان ژن NDUFV1 ..... ۱۲۳
شکل ۳-۵۸ پیک ذوب محصول بیان ژن NDUFV1 ..... ۱۲۴
شکل ۳-۵۹ باند ۱۱۳ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن NDUFV1 ..... ۱۲۴
شکل ۳-۶۰ منحنی استاندارد بیان ژن NDUFV1 ..... ۱۲۴
شکل ۳-۶۱ منحنی تکثیر بیان ژن ND1 ..... ۱۲۵
شکل ۳-۶۲ حد آستانه و Ct بیان ژن ND1 ..... ۱۲۵
شکل ۳-۶۳ پیک ذوب محصول بیان ژن ND1 ..... ۱۲۶
شکل ۳-۶۴ باند ۲۱۶ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن ND1 ..... ۱۲۶
شکل ۳-۶۵ منحنی استاندارد بیان ژن ND1 ..... ۱۲۶
شکل ۳-۶۶ منحنی تکثیر بیان ژن ND2 ..... ۱۲۷
شکل ۳-۶۷ حد آستانه و Ct بیان ژن ND2 ..... ۱۲۷
شکل ۳-۶۸ پیک ذوب محصول بیان ژن ND2 ..... ۱۲۸
شکل ۳-۶۹ باند ۲۷۴ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن ND2 ..... ۱۲۸
شکل ۳-۷۰ منحنی استاندارد بیان ژن ND2 ..... ۱۲۸
شکل ۳-۷۱ منحنی تکثیر بیان ژن ND3 ..... ۱۲۹
شکل ۳-۷۲ حد آستانه و Ct بیان ژن ND3 ..... ۱۲۹
شکل ۳-۷۳ پیک ذوب محصول بیان ژن ND3 ..... ۱۳۰
شکل ۳-۷۴ باند ۱۸۹ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن ND3 ..... ۱۳۰
شکل ۳-۷۵ منحنی استاندارد بیان ژن ND3 ..... ۱۳۰
شکل ۳-۷۶ منحنی تکثیر بیان ژن ND4 ..... ۱۳۱
شکل ۳-۷۷ حد آستانه و Ct بیان ژن ND4 ..... ۱۳۱
شکل ۳-۷۸ پیک ذوب محصول بیان ژن ND4 ..... ۱۳۲
شکل ۳-۷۹ باند ۱۸۶ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن ND4 ..... ۱۳۲
شکل ۳-۸۰ منحنی استاندارد بیان ژن ND4 ..... ۱۳۲
شکل ۳-۸۱ منحنی تکثیر بیان ژن ND4L ۱۳۳
شکل ۳-۸۲ حد آستانه و Ct بیان ژن ND4L ۱۳۳
شکل ۳-۸۳ پیک ذوب محصول بیان ژن ND4L ۱۳۴
شکل ۳-۸۴ باند ۱۹۸ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن ND4L ۱۳۴
شکل ۳-۸۵ منحنی استاندارد بیان ژن ND4L ۱۳۴
شکل ۳-۸۶ منحنی تکثیر بیان ژن ND5 ..... ۱۳۵
شکل ۳-۸۷ حد آستانه و Ct بیان ژن ND5 ..... ۱۳۵
شکل ۳-۸۸ پیک ذوب محصول بیان ژن ND5 ..... ۱۳۶

شکل ۳-۸۹ باند ۹۸ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن ND5 ۱۳۶
شکل ۳-۹۰ منحنی استاندارد بیان ژن ND5 ۱۳۶
شکل ۳-۹۱ منحنی تکثیر بیان ژن ND6 ۱۳۷
شکل ۳-۹۲ حد آستانه و Ct بیان ژن ND6 ۱۳۷
شکل ۳-۹۳ پیک ذوب محصول بیان ژن ND6 ۱۳۸
شکل ۳-۹۴ باند ۱۱۹ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن ND6 ۱۳۸
شکل ۳-۹۵ منحنی استاندارد بیان ژن ND6 ۱۳۸