ایران

بسم الله الرحمن الرحیم

۳۲۲۱۷

۱۳۷۹ /۱۱/ ۲۰

دانشگاه تهران

مرکز اطلاعات علمی ایران
تهیه مدارک

دانشکده علوم

موضوع:

بررسی جهش‌های بیماریزا در افراد مبتلا به لبر (یک بیماری ارثی عصب چشم)

نگارش:

شاهین میری لواسانی

اساتید راهنما:

۵۲۹۱

دکتر الهه الهی

دکتر مسعود هوشمند

استاد مشاور:

دکتر احمد آل‌یاسین

پایان‌نامه

برای دریافت درجهٔ کارشناسی‌ارشد

رشتهٔ علوم سلولی و مولکولی

شهریور ۷۹

۳۲۲۱۷

« بسمه تعالی »

اره تحصیلات تکمیلی دانشگاه

حترماً باطلاع می‌رساند که جلسه دفاع از پایان‌نامه **دوره کارشناسی ارشد** خانم / آقای محسن مرادی لاسانی

حت عنوان: بررسی چشم‌حان بینا زیرا در افراد عقبلا به کرکت بیماری عصب چشم

در تاریخ ۷۹/۱۰/۱۹ در محل دانشکده علوم دانشگاه تهران برگزار گردید.

هیأت داوران براساس کیفیت پایان‌نامه، استماع دفاعیه و نحوهٔ پاسخ به سوالات، پایان‌نامه ایشان را برای دریافت

درجه کارشناسی ارشد در رشته فیزیک گرایش حالات جامد معادل با هشت واحد با نمرهٔ ۱۹/۵

به درجهٔ عالی مورد تأیید قرار دارد.

هیأت داوران

	نام و نام خانوادگی	مرتبهٔ دانشگاهی - دانشگاه
۱- استاد راهنما	دکتر مسعود محمد کمند	استادیار دانشگاه تهران
۲- استاد مشاور	دکتر احمد اله‌ال هاشمی	دانشیار دانشگاه تهران
۳- استاد مدعو		
۴- استاد مدعو		
۵- نماینده تحصیلات تکمیلی گروه		

سرپرست تحصیلات تکمیلی گروه

۷۹/۷/۱۷

مدیر گروه

۷۹/۷/۱۷

سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده

تقدیم به

پدرم،

که نامش تداوم مهرمندانهٔ پشت‌گرمی و صفاست.

و مادرم،

که رویای تمام نشدنی باغ ایثار و ازخودگذشتگی است.

چکیده:

DNA میتوکندری انسان (mtDNA) مولکولی است حلقوی و شامل ۱۶۵۶۹ جفت نوکلئوتید که کدکنندهٔ ۱۳ پروتئین از کمپلکس‌های آنزیمی زنجیرهٔ تنفّسی، ۲۲ عدد tRNA و ۲ عدد rRNA می‌باشد. در هر سلول هزاران نسخه از mtDNA وجود دارد و یک جهش می‌تواند در تمام (هموپلاسمی) و یا در تعدادی از مولکول‌های mtDNA (هتروپلاسمی) اتّفاق بیفتد. توارث mtDNA مادری است یعنی تنها مادر، mtDNA را به فرزندان خود منتقل می‌کند. چنانچه مادر هتروپلاسمی باشد، فرزندان وی در نسل اوّل ممکن است سهم متفاوتی از mtDNA نرمال و یا جهش‌یافته را به ارث ببرند. جهش‌های mtDNA انواع متفاوتی از بیماریها نظیر بیماری آسیب عصب چشم ارثی لبر (LHON) را سبب می‌شوند. LHON بیماری است که سبب نابینایی حاد دائمی در جوانان ۳۰ - ۲۰ سال می‌گردد. یکی از جهش‌های بیماریزای زیر در DNA میتوکندری (در محل‌های G11778A، G3460A، T14484C، G14459A) تقریباً در تمام خانواده‌های مبتلا به LHON دیده شده است. بعنوان اوّلین تحقیق در ایران، ما ۳ جهش نقطه‌ای در محل‌های G11778A و G3460A و T14484C را در ۱۲ بیمار مشکوک به LHON با استفاده از روش‌های PCR و RLFP بررسی کردیم. جهش G11778A در ۳ خانوادهٔ ایرانی مبتلا به LHON مشخّص گردید. اوّلین بیمار پسری ۲۸ ساله بود که بینایی خود را از سنّ ۲۴ سالگی بطور پیشرونده از دست داد. وی، چهار برادر و چهار خواهر دارد که همگی این جهش را دارا هستند. برادر کوچکتر وی (۲۱ ساله) نیز مشکل بینایی دارد. تمام اقوام مادری وی نیز جهش مذکور را دارند. دوّمین بیمار پسری ۲۹ ساله است که از سنّ ۲۶ سالگی بینایی خود را بصورت پیشرونده از دست داده است. برادر بزرگتر وی (۳۵ ساله) که کاملاً نابیناست نیز جهش G11778A را داراست. علائم بیماری وی از سنّ ۲۵ سالگی آغاز گشته است. مادر آنها نیز همین جهش را داراست. سوّمین بیمار پسری است ۲۷ ساله که از سنّ ۲۴ سالگی بینایی خود را بتدریج از دست داد. تمام برادران و مادر وی نیز جهش مذکور را دارند. برادر جوانتر وی (۱۶ ساله) نیز مشکل بینایی دارد. جهش در هر سه خانوادهٔ مذکور بصورت هموپلاسمیک بوده است. هیچ زنی با وجود دارا بودن جهش G11778A در این سه خانواده، علائم بیماری را نشان ندادند.

سپاسگزاری

حمد و سپاس پروردگاری که مرا توان بخشید تا علم بیاموزم و قطره‌ای از این دریای عظیم و پرخروش باشم، گرچه هر زبانی از شکر نعمت‌هایش قاصر است.

از پدر و مادر عزیزم که بدون یاری و محبّت‌های بی‌پایانشان پیمودن این راه میسّر نبود و از جبران زحمات و فداکاریهای بی‌دریغشان ناتوانم از صمیم قلب سپاسگزارم.

از زحمات بی‌وقفه و دلسوزانهٔ سرکار خانم دکتر الهه الهی که روشنی راه بودند و استاد فرزانه جناب آقای دکتر مسعود هوشمند، استادی که قدم به قدم در تمام مشکلات همپای من بودند و شیرینی مسیر را برایم میسّر گردانیدند و استاد ارجمند، جناب آقای دکتر احمد آل‌یاسین که در طول دوره از مشاورت ارزندهٔ ایشان بی‌بهره نبودم، نهایت تشکّر را دارم.

همچنین از جناب آقای دکتر محمّدحسین صنعتی، ریاست محترم مرکز ملّی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی کمال امتنان را دارم.

از جناب آقای دکتر طبسی و پزشکان محترم بخش چشم‌پزشکی بیمارستان فارابی که در این راه زحمات زیادی را در جهت هماهنگی با بیماران و ارسال نمونهٔ خون آنان متقبّل شدند تشکّر میکنم.

از جناب آقای دکتر سنجری و پزشکان محترم درمانگاه چشم بیمارستان حضرت رسول (ص) و همچنین جناب آقای دکتر شمس که در رابطه با ارسال نمونهٔ بیماران قبول زحمت نموده‌اند قدردانی می‌نمایم.

از دوست عزیزم جناب آقای مهندس حمید مهاجر که صمیمانه در انجام مراحل کامپیوتری این پژوهش مرا یاری دادند و همچنین دوست عزیزم جناب آقای علی شیخی‌نژاد نهایت تشکّر را دارم.

از دوستان خوبم جناب آقای مهدی دشتبان و سرکار خانم فاطمه شریف‌پناه که بدون کمک‌های فکری و عملی ایشان انجام این پژوهش برایم میسّر نبود بسیار سپاسگزارم.

از همکاران و دوستان خوبم در بخش کلینیک پزشکی مرکز ملّی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی که همواره مرا مورد لطف و محبّت‌های خویش قرار دادند قدردانی مینمایم.

از مسئولین دلسوز و دوستان عزیزم در مرکز ملّی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی‌که امکانات انجام این پژوهش را فراهم نمودند بخصوص سرکار خانم احترام السادات میرقاسمی که زحمت تهیّهٔ عکس و اسلایدهای این کار رامتقبّل شده‌اند کمال تشکّر را دارم.

از همکلاسی‌ها و دوستان خوبم در گروه زیست‌شناسی سلولی - مولکولی دانشگاه تهران نهایت تشکّر را دارم که با ایجاد محیطی علمی موجب شدند با صفا و صمیمیّت این دوره را سپری کنم.

در پایان از کلیّهٔ عزیزانی که به هر نحوی در پیشبرد این پژوهش مرا همراهی کرده‌اند کمال تشکّر و امتنان رادارم که بی‌شک اجرای این پژوهش بدون همکاری این عزیزان میسّر نبود، لذا این سرانجام را مرهون لطف و مساعدت این بزرگواران دانسته و موفقیّت روز افزون آنان را از درگاه باری‌تعالی خواستارم.

به امیّد شفای همهٔ بیماران بخصوص بیمارانی که ضمن انجام این پایان‌نامه شناسایی و علّت بیماری آنان تشخیص داده شد.

فهرست مطالب

عنوان — صفحه

۱)مقدمه ۱

۱-۲)تاریخچه ۱

۱-۲)میتوکندری ۳

۱-۳)زنجیرهٔ تنفسی ۷

۱-۴)زنجیرهٔ تنفسی و عمل آن ۸

۱-۵)ژنوم میتوکندری (mtDNA) ۱۷

۱-۵-۱)توارث mtDNA ۱۹

۱-۵-۲)همانندسازی ۲۱

۱-۵-۳)رونویسی ۲۲

۱-۵-۴)ترجمه ۲۵

۱-۶)اختلالات میتوکندری ۲۹

۱-۶-۱) جهش ۲۹

۱-۶-۱-۱) جهشهای DNA میتوکندری ۲۹

۱-۶-۱-۱-۱) حذف ۳۰

۱-۶-۱-۱-۲) جهش‌های نقطه‌ای ژن‌های tRNA ۳۲

۱-۶-۱-۱-۳) جهشهای نقطه‌ای ژن‌های کد کننده پروتئین ۳۴

۱-۶-۱-۲) جهش ژنهای هسته‌ای ۳۵

۱-۶-۱-۳) ارتباط بین ژنی ۳۶

۱-۶-۲) عملکرد غیرطبیعی میتوکندری ۳۷

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱-۷) علائم بالینی، بیوشیمیائی و ژنتیکی مولکولی بیماری آسیب ۴۰

عصب چشم ارثی لبر(LHON)..... ۴۰

۱-۷-۱)مقدمه ۴۰

۱-۷-۲) ژنتیک..... ۴۲

۱-۷-۲-۱) جهش‌های بیماری‌زای mtDNA مرتبط با LHON..... ۴۲

۱-۷-۲-۲) جهش‌های ثانویه mtDNA:..... ۴۶

۱-۷-۳) علائم بالینی LHON مرتبط با جهش‌های بیماری‌زا..... ۴۸

۱-۷-۳-۱) ابتلای بیشتر مردان و گستره سنی در آغاز بیماری..... ۴۸

۱-۷-۳-۲) نقص بینایی ۴۸

۱-۷-۳-۳) تغییرات در نقص بینایی مرتبط با جهش‌های بیماری زایی LHON ۵۰

۱-۷-۳-۴) نشانه‌های اضافی..... ۵۱

۱-۷-۴) علائم بالینی بیماری شبیه به LHON مشاهده شده در ارتباط با..... ۵۳

دیگر جهش‌های mtDNA..... ۵۳

۱-۷-۵) تجزیه و تحلیل شجره‌نامه‌ها (پیشینه‌های نژادی) در LHON ۵۴

۱-۷-۶) توضیحات پیشنهادی برای میزان بالاتر ابتلای مردان ونسبت..... ۵۶

افراد کاهش یافته در LHON..... ۵۶

۱-۷-۶-۱) لوکوس حساس به فقدان بینایی مرتبط باکروموزوم X..... ۵۶

۱-۷-۶-۲) نقص فعالیت زنجیره تنفسی میتوکندری ۵۷

۱-۷-۶-۳) هتروپلاسمی mtDNA..... ۶۰

۱-۷-۶-۴) عوامل زیست محیطی ۶۱

فهرست مطالب

عنوان — صفحه

۱-۷-۶-۵) خود ایمنی ۶۳

۱-۷-۷) نتیجه‌گیری ۶۴

۱-۸)علائم کلینیکی معمول در بیماری‌های میتوکندریال ۶۷

۱-۹)ارزیابی آزمایشگاهی بیماریهای میتوکندریال ۶۹

۱-۹-۱)ژنتیک مولکولی: ۶۹

۱-۹-۲) بیوشیمی ۷۰

۱-۹-۳) بیوپسی عضله ۱۰

۱-۱۰) اهداف ۷۲

۲) مواد و روشها ۷۳

۲-۱) تهیهٔ نمونهٔ خون ۷۳

۲-۲) استخراج DNA ۷۴

۲-۳)تعیین غلظت DNA ۷۶

۲-۴)واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) ۷۷

۲-۴-۱)کلیات ۷۷

۲-۴-۲) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۸۱

۲-۵)الکتروفورز کردن DNA (روی ژل آگارز) ۸۸

۲-۶)چند شکلی بودن طول قطعات حاصل از هضم با آنزیمهای محدود کننده (RFLP) ۹۱

۲-۷) الکتروفورز برروی ژل پلی آکریل آمید ۹۳

فهرست مطالب

عنوان — صفحه

۳) نتایج ۹۷

۳-۱) تهیه DNA الگو برای واکنش PCR ۹۷

۳-۲)واکنش RFLP-PCR ۹۸

۳-۲-۱)جهش G۱۱۷۷۸A ۹۸

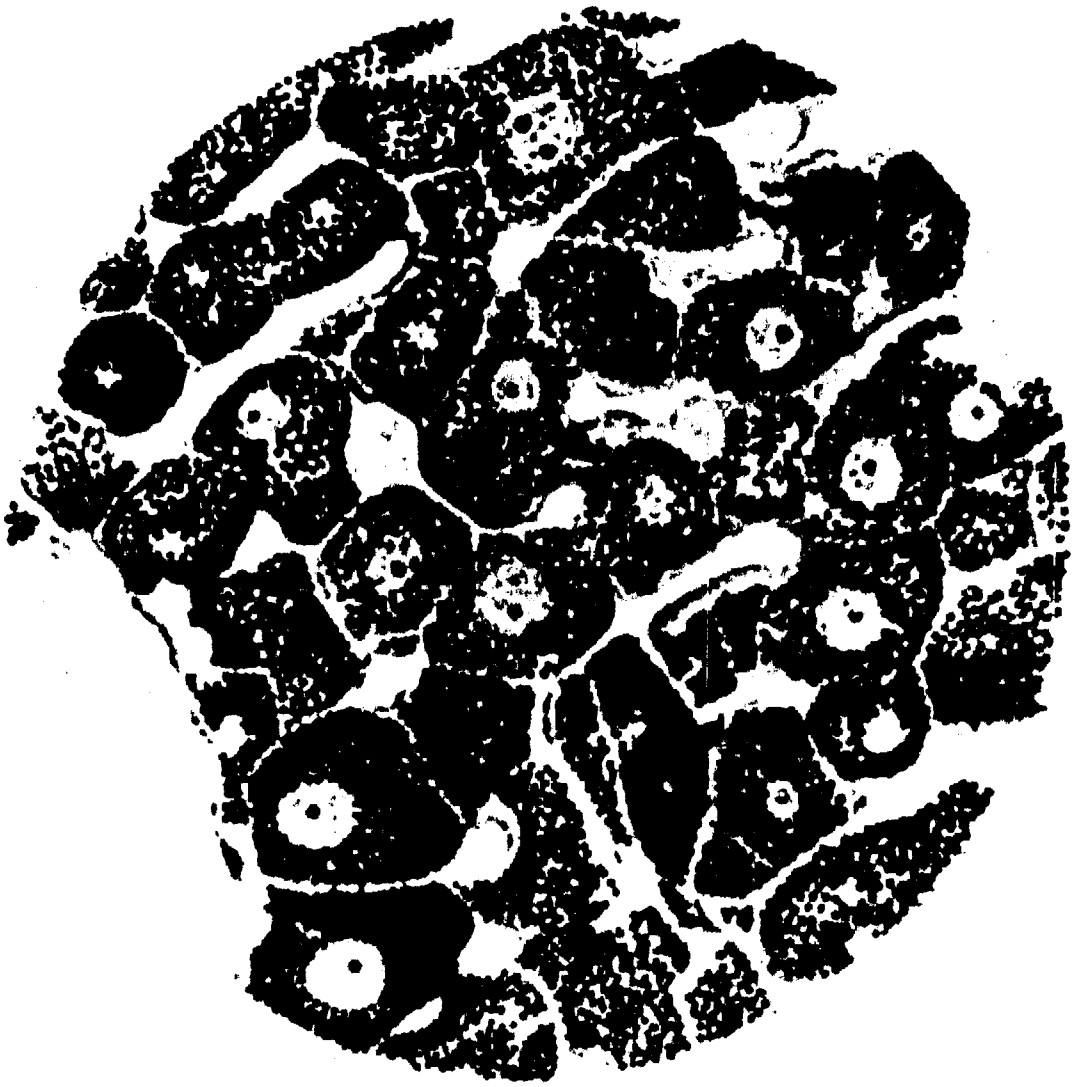
۳-۲-۳) جهش G۳۴۶۰A ۱۰۶

۳-۲-۳) جهش T۱۴۴۸۴C ۱۰۸

۴) بحث ۱۱۰

فصل اول

مقدمه



Allmann. Elementarorganismen.

Taf II A

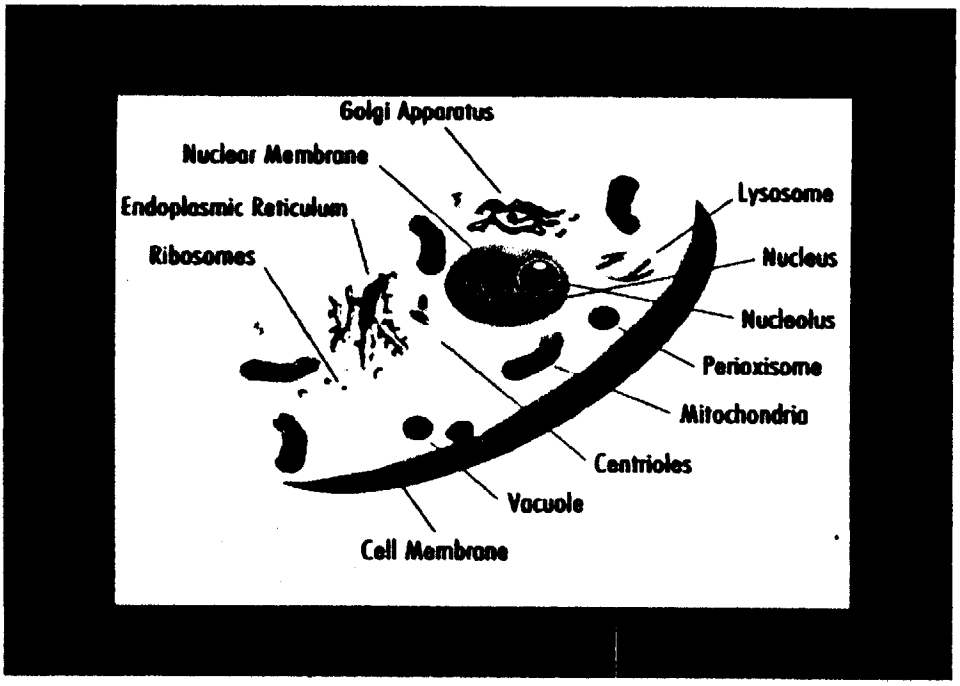
۱)مقدمه

۱-۲)تاریخچه

اوّلین شناخت از میتوکندری بعنوان یک اندامک درون سلولی بیش از ۱۰۰ سال پیش توسط آلتمن[۱] (۱۸۹۰) صورت گرفت (شکل ۱). او تصوّر میکرد که این ارگانهای شبیه باکتری، موجودات ریز اولیه‌ای هستند که درون سلولها زندگی می‌کنند. بندا[۲] (۱۸۹۸) در هنگام اسپرماتوژنز اجسام رشته مانند درون سلولی را میتوکندری (میو به معنای رشته و کندریون به معنای دانه) نام نهاد. بتدریج روشهایی برای جدا سازی میتوکندری‌های سالم و دست نخورده ابداع شد و کندی[۳] و لنینگر[۴] (۱۹۴۹) نشان دادند که میتوکندری، آنزیم‌های فسفوریلاسیون اکسیداتیو، چرخه اسید ستیریک و اکسیداسیون اسیدهای چرب را در بردارد. پیشرفت غیرمنتظره زمانی اتفاق افتاد که ناس و ناس[۵] در سال ۱۹۶۳ وجود DNA در میتوکندری را توسط میکروسکوپ الکترونی نشان دادند(۱).

اوّلین گزارش از اختلال فسفریلاسیون اکسیداتیو در سال ۱۹۶۲ توسط لوفت[۶] و همکارانش منتشر شد (۲). بیمار زنی با افزایش متابولیسم شدید مربوطه به ناهماهنگی فسفوریلاسیون اکسیداتیو بود. تحقیقات شامل مطالعات بیوشیمیایی برروی میتوکندری عضله و مطالعات میکروسکوپ نوری و الکترونی برروی عضلات اسکتی بود (۲).

1-Altman
2-Benda
3-Kennedy
4-Lehninger
5-Nass & Nass
6-Luft



شکل ۱-۱ : نمایش یک سلول حیوانی و میتوکندرهای موجود درآن (Internet).

تحقیقات ژنتیک مولکولی بیماریهای میتوکندریال با پیدایش حذف [۱] در DNA میتوکندری (mtDNA) آغاز گشت. در سال ۱۹۸۸ حذفهای بزرگ و منفردی بصورت هتروپلاسمی [۲] (ترکیبی از DNA میتوکندری‌های نرمال و جهش یافته در یک فرد) در DNA میتوکندری بافت عضلانی چندین بیمار عضلانی [۳] دیده شد (۳). این حذف‌ها که تا حدود هفت هزار باز (Kb) طول داشتند در DNA میتوکندری فیبروبلاست و لنفوسیت دیده نشدند. چنین مطالعاتی مشخّص نمود که اوّلاً حالت هتروپلاسمی در DNA میتوکندری انسان دیده می‌شود و ثانیاً عامل بوجود آمدن بعضی از بیماری‌های انسانی ، اختلال در ژنوم میتوکندری است

1-Deletion

2-Heteroplasmic

3-Mitochondrial Myopathy