دانشگاه سیستان و بلوچستان

تحصیلات تکمیلی

پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی-ژنتیک

عنوان:

بررسی متیلاسیون و بیان ژن CTLA4 در بیماران مبتلا به ناخنک چشم

اساتید راهنما:

دکتر درمحمد کردی تمندانی

دکتر محمد اریش

تحقیق و نگارش:

اسماعیل محمد ابراهیمی

(این پایان نامه از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه سیستان و بلوچستان بهره مند شده است)

بهمن ۱۳۹۲

بسمه تعالی

این پایان نامه با عنوان **بررســی متیلاســیون و بیان ژن CTLA4 در بیماران مبتلا به ناخنک چشــم** قسـمتی از برنامه آموزشـی دوره کارشـناسـی ارشـد رشته **زیست شناسی-ژنتیک** توسط دانشجو **اسماعیل محمد ابراهیمی** با راهنمایی استاد پایان نامه **دکتر درمحمد کردی تمندانی، دکتر محمد اریش** تهیه شده اسـت. اسـتفاده از مطالب آن به منظور اهداف آموزشـی با ذکر مرجع و اطلاع کتبی به حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه سیستان و بلوچستان مجاز می باشد.

اسماعیل محمد ابراهیمی

این پایان نامه **۶** واحد درسـی شناخته می شود و در تاریخ **۱۳۹۲/۱۱/۲۸** توسط هیئت داوران بررسی و درجه.. ..... به آن تعلق گرفت.

	نام و نام خانوادگی	**امضاء**	**تاریخ**
استاد راهنما:	دکتر درمحمد کردی تمندانی		
استاد راهنما:	دکتر محمد اریش		
داور ۱:	دکتر محمدحسین سنگتراش		
داور ۲:	دکتر محمد هاشمی		

نماینده تحصیلات تکمیلی:

دانشگاه سیستان و بلوچستان

تعهدنامه اصالت اثر

اینجانب اسماعیل محمد ابراهیمی تعهد می کنم که مطالب مندرج در این پایان‌نامه حاصل کار پژوهشی اینجانب است و به دستاوردهای پژوهشی دیگران که در این نوشته از آن استفاده شده است مطابق مقررات ارجاع گردیده است. این پایان نامه پیش از این برای احراز هیچ مدرک هم سطح یا بالاتر ارائه نشده است.

کلیه حقوق مادی و معنوی این اثر متعلق به دانشگاه سیستان و بلوچستان می باشد.

نام و نام خانوادگی دانشجو: اسماعیل محمد ابراهیمی

امضاء

تقدیم به آنان که

ناتوان شدند تا به توانایی برسم

موهایشان سپید شد تا روسفید شوم

و عاشقانه سوختند تا گرمابخش وجودم و روشنگر راهم باشند...

پدر و مادرم

سپاسگزاری

«سپاس خدای را که هر چه دارم از اوست»

امید به آنکه توفیق دهد جز به خدمت خلق نکوشم...

استاد گرانقدر، جناب آقای «دکتر درمحمد کردی تمندانی»، از زحمات بی‌دریغ جنابعالی و راهنمایی‌های ارزشمند شما در طول دوران تحصیلی و همچنین در امر پژوهش پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد، که همواره روشنگر مسیر و مایه آرامش و دلگرمیم بود، نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

همچنین لازم میدانم از زحمات شایسته پزشک ارجمند، جناب آقای «دکتر محمد اریش»، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، که با حمایت‌های مادی و معنویشان مسیر مرا در امر پژوهش این پایان‌نامه همواره نمودند، نهایت تشکر و قدردانی را بعمل آورم.

از «خانواده عزیزم» که لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه‌های یکتا و زیبای زندگیم، مدیون حضور سبز آن‌هاست، بی نهایت سپاسگزارم.

جای آنست که از دوستان بسیار مهربانم آقایان «مهندس حسین خورشیدیان» و «مهندس مرتضی مالکی» و همچنین سرکار خانم «مریم موسوی»، که با همراهی و همدلیشان در تمامی مراحل انجام پژوهش این پایان‌نامه، تحمل سختی‌های مسیر را بر من هموار و دوستی را نه به کلام بلکه بعمل در حقم تمام کردند، بی‌نهایت تشکر و قدردانی کنم.

«بهترین دوست‌ها، در سخت‌ترین روزها در کنارمان می‌مانند، بی‌دریغ و بی‌منت...»

در پایان از خداوند منان برای تمامی این عزیزان آرزوی سلامتی و توفیق روزافزون دارم.

چکیده

ناخنک چشم یک ضایعه‌ی چشمی در انسان است که شیوع آن در جمعیت جهانی حدود ۲٪ برآورد شده است. این بیماری در مراحل پیشرفته، در نتیجه‌ی رشد ضایعه فراتر از محور تقارن مردمک چشم، می‌تواند منجر به اختلالات بینایی و در نهایت از بین رفتن کامل بینایی شود. عامل به وجود آورنده‌ی این بیماری و سازوکار دقیق بیماری‌زایی آن، هنوز به طور کامل شناخته شده نیست. بر اساس مطالعات اپی‌ژنتیکی صورت گرفته برروی این بیماری، نقش فاکتورهای محیطی، از جمله مهم‌ترین آن‌ها، تابش‌های فرابنفش نور خورشید، در ایجاد این ضایعه‌ی خوش‌خیم چشمی، مورد تاکید بوده است. بافت مهاجم ناخنک چشم، یک بافت شبه توموری است. سلول‌های T کشنده مربوط به سیستم ایمنی تطبیقی، در بدو امر سلول‌های توموری و مهاجم را شناسایی کرده و مورد حمله قرار می‌دهند. فعالیت این سلول‌ها به واسطه‌ی سیگنال‌های تحریک کننده و بازدارنده تنظیم می‌شود، که در نتیجه‌ی تحریک دو مولکول گلیکوپروتئینی سطحی در سطح این سلول‌ها، یعنی CD28 و CTLA4 ایجاد می‌شود. CTLA4 یک مولکول تعدیل کننده‌ی ایمنی است که با کاهش پاسخ‌های سلول T و افزایش آستانه‌ی فعالیت آن، نقشی حیاتی در حفظ تولرانس محیطی سلول T بازی می‌کند. در این پژوهش، به بررسی برخی تغییرات اپی‌ژنتیکی (متیلاسیون و بیان) ژن CTLA4، در DNA و cDNA استخراج شده از نمونه‌های بافت ناخنک چشم مربوط به بیماران مبتلا به این عارضه پرداخته شد. نمونه‌های بافت چشم مربوط به بیماران مبتلا به ناخنک چشم و افراد سالم به عنوان گروه کنترل، از جمعیت استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری شد. متیلاسیون پروموتر ژن CTLA4، توسط تکنیک MSP، در نمونه‌ی DNA استخراج شده از بافت چشم مربوط به ۷۵ فرد بیمار مبتلا به ناخنک چشم و ۷۰ فرد کنترل سالم بررسی شد. سطح بیان این ژن نیز توسط تکنیک Real-Time PCR در دو گروه شامل cDNA استخراج شده از ۲۳ نمونه‌ی بافت ناخنک و ۲۰ نمونه‌ی بافت سالم مورد بررسی قرار گرفت. در مورد تغییرات متیلاسیون پروموتر ژن CTLA4، از لحاظ آماری بین افراد گروه بیمار در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. در مورد تغییرات بیان ژن CTLA4، در بین دو گروه بیمار و کنترل، تفاوتی معنی دار مشاهده گردید، به این صورت که سطح بیان ژن CTLA4 در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل، افزایش نشان داد (P_{value}=۰/۰۰۹). این تحقیق نشان داد که سطح بیان ژن CTLA4 در افراد مبتلا به ناخنک چشم، در مقایسه با افراد سالم به شکل قابل توجهی افزایش می‌یابد. از آن‌جا که تغییرات متیلاسیون پروموتر این ژن، در بین دو گروه بیمار و کنترل، تفاوت معنی داری نشان نداد، احتمالا سازوکارهای ناشناخته‌ی دیگری در تغییر سطح بیان این ژن مشارکت دارند.

کلمات کلیدی: ناخنک چشم، ژن CTLA4، اپی‌ژنتیک، متیلاسیون DNA، بیان ژن، ایمنی تطبیقی، سلول T کشنده.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه ۱

فصل دوم: مروری بر منابع ۴

۲-۱- تاریخچه‌ی علم ژنتیک ۵

۲-۱-۱- یافته‌های مندل ۵

۲-۱-۲- کشف اسیدهای نوکلئیک ۶

۲-۱-۳- اهمیت هسته‌ی سلول در وراثت ۶

۲-۱-۴- کشف کروموزوم‌ها ۷

۲-۱-۵- DNA: ماده‌ی وراثتی ۷

۲-۱-۶- کشف ساختار سه بعدی DNA ۸

۲-۲- رمزگان ژنتیکی ۱۰

۲-۳- اصل اساسی ژنتیک ۱۰

۲-۴- برخی تعاریف مهم در علم ژنتیک ۱۱

۲-۵- اپی‌ژنتیک ۱۲

۲-۵-۱- متیلاسیون DNA ۱۵

۲-۵-۲- آنزیم‌های DNA-متیل ترانسفراز ۱۸

۲-۶- بیماری ناخنک چشم ۱۹

۲-۷- ریخت شناسی ۲۰

۲-۸- نشان‌ویژگی‌ها و عوارض بیماری ۲۱

۲-۹- سبب شناسی بیماری ۲۱

۲-۱۰- شیوع و پراکندگی بیماری ۲۵

۲-۱۱- شیوه‌های درمانی بیماری ۲۵

۲-۱۲-پیشگیری از ابتلا به بیماری ۲۶

۲-۱۳- ژن مورد مطالعه در این پژوهش: ژن CTLA4 ..... ۲۷

۲-۱۳-۱- CD28، یک پارالوگ مهم برای ژن CTLA4 ..... ۲۸

۲-۱۳-۲- NFκB، یک هدف قاطع فعالیت مهاری CTLA4 ..... ۳۰

۲-۱۳-۳- فعال شدن NFκB با تحریک آنتی‌ژنی TCR ۳۱

۲-۱۳-۴- نقش NFκB در تحریک رونویسی ژن‌های پیش-التهابی ۳۲

۲-۱۳-۵- ارتباط میان التهاب و تومورزایی ۳۳

فصل سوم: مواد و روش‌ها ۳۵

۳-۱- نمونه‌های مورد مطالعه ۳۶

۳-۲- استخراج DNA از نمونه‌های بیوپسی ۳۶

۳-۳- تعیین غلظت و خلوص DNA ۳۶
۳-۴- بررسی کیفیت DNA استخراج شده با ژل آگاروز ۳۷
۳-۵- بی‌سولفیت کردن نمونه‌های DNA ۳۷
۳-۶- روش انجام PCR جهت بررسی متیلاسیون ژن مورد مطالعه ۳۸
۳-۶-۱- روش انجام MSP برای ژن CTLA4 ..... ۳۹
۳-۷- استخراج RNA ۴۰
۳-۸- تبدیل RNA به cDNA ۴۰
۳-۹- بررسی بیان ژن با استفاده از روش Real-Time PCR ۴۰
۳-۹-۱- مراحل انجام Real-Time PCR ۴۳
فصل چهارم: نتایج ۴۵
۴-۱- نتایج بررسی تغییرات متیلاسیون ژن CTLA4 ..... ۴۶
۴-۲- نتایج بررسی تغییرات بیان ژن CTLA4 ..... ۴۸
فصل پنجم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادات ۵۲
۵-۱- بیان مسئله ۵۳
۵-۲- مشاهدات ۵۴
۵-۲-۱- تغییرات متیلاسیون ۵۵
۵-۲-۲- تغییرات بیان ۵۵
۵-۳- بحث و نتیجه‌گیری ۵۵
۵-۴- نوآوری‌ها ۵۶
۵-۵- پیشنهادات ۵۶
فهرست مراجع ۵۹
پیوست‌ها ۶۰
پیوست (الف) استخراج DNA از نمونه‌های بیوپسی ۶۱
الف- ۱- محلولهای مورد نیاز ۶۱
الف-۲- روش کار ۶۱
پیوست (ب) تعیین غلظت و خلوص DNA ۶۳
پیوست (ج) ژل آگاروز ۶۴
ج-۱-بافرهای مورد نیاز ۶۴
پیوست (د) بی سولفیت کردن DNA ۶۶
د-۱- بی سولفیت کردن DNA با استفاده از روش دستی ۶۶
د-۲- بی سولفیت کردن DNA با استفاده از کیت ۶۷
پیوست (هـ) استخراج RNA بوسیله کیت RNXplus ۶۹
پیوست (و) نحوه تبدیل RNA به cDNA با استفاده از کیت Vivantis ۷۰

فهرست جدول‌ها

عنوان جدول **صفحه**

جدول۳-۱. مشخصات سن و جنسیت نمونه‌های مورد مطالعه ۳۶
جدول۳-۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت بررسی وضعیت متیلاسیون ژن CTLA4 ..... ۳۹
جدول۳-۳. مواد مورد استفاده جهت انجام واکنش MS-PCR ۳۹
جدول۳-۴. برنامه‌ی دمایی MS-PCR ۳۹
جدول۳-۵. پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Real-Time PCR ۴۳
جدول۳-۶. مواد مورد استفاده برای واکنش Real-Time PCR ۴۳
جدول۳-۷. برنامه‌ی دمایی Real-Time PCR ۴۳
جدول ۴-۱. مقایسه‌ی وضعیت متیلاسیون ژن CTLA4 بین دو گروه بیمار و کنترل ۴۸
جدول ۴-۲. مقایسه‌ی تغییرات بیان ژن CTLA4 بین دو گروه بیمار و کنترل ۴۹
جدول ۴- ۳. بررسی رابطه‌ی میان تغییرات الگوی متیلاسیون و الگوی بیان ژن CTLA4 در دو گروه بیمار و کنترل
Error! Bookmark not defined......
جدول ج-۱. مقادیر مورد نیاز جهت تهیه بافر TAE ۶۴
جدول و-۱. cDNA Synthesis Mix ۷۰
جدول و-۲. Primer Mixture ۷۰

فهرست شکل‌ها

عنوان شکل **صفحه**

شکل۲-۱. گرگور مندل به همراه نتایج آزمایش‌های وی ۶
شکل۲-۲. واتسون و کریک به همراه مدل پیشنهادی آن‌ها برای ساختار سه بعدی DNA ۸
شکل۲-۳. تصویر روزالین فرانکلین به همراه عکس پراش پرتو X برروی بلور DNA، تهیه شده توسط این دانشمند ۹
شکل۲-۴. رمزگان ژنتیکی DNA ۹
شکل۲-۵. اصل اساسی ژنتیک: DNA→mRNA→Protein ۱۰
شکل۲-۶. نشانه‌های اپی‌ژنتیکی معروف؛ گروه‌های متیل و استیل با اتصال به توالی‌های تنظیمی ژن و یا با اتصال به پروتئین‌های هیستونی، سبب خاموش و روشن شدن ژن می‌شوند ۱۴
شکل۲-۷. بازهای متیله‌ی موجود در ساختار طبیعی DNA ۱۵
شکل۲-۸. واکنش متیلاسیون سیتوزین توسط آنزیم DNA-متیل ترانسفراز ۱۶
شکل۲-۹. متیلاسیون سیتوزین در توالی‌های دی‌نوکلئوتیدی CpG موجود در نواحی تنظیمی ژن (جزایر CpG)، سبب خاموش و غیرفعال شدن ژن می‌شود ۱۷
شکل۲-۱۰. واکنش تبدیل باز سیتوزین به تیمین ۱۸
شکل۲-۱۱. متیلاسیون باز سیتوزین ۱۸
شکل۲-۱۲. متیلاسیون حفاظت شده توسط متیل‌ترانسفراز Dnmt1 ..... ۱۹
شکل۲-۱۳. متیلاسیون ازنوپدید توسط متیل‌ترانسفرازهای Dnmt2 و Dnmt3 ..... ۱۹
شکل۲-۱۴. ناخنک چشم ۲۰
شکل۲-۱۵. بخش‌های مورفولوژیکی ناخنک چشم ۲۱
شکل۲-۱۶. نقش تابش‌های فرابنفش در بیماری‌زایی ناخنک چشم ۲۳
شکل۲-۱۷. چند عامل محیطی مهم و تاثیرگذار در بیماری‌زایی ناخنک چشم ۲۴
شکل۲-۱۸. نوار ناخنک چشم ۲۵
شکل۲-۱۹. روش «پیوند بافت ملتحمه‌ای مشتق از خود» ۲۶
شکل۲-۲۰. ساختار مناسب لنز در عینک‌های آفتابی ویژه، این عینک‌ها تقریبا تمامی پرتوهای پرانرژی و مضر موجود در تابش‌های خورشیدی را منعکس می‌کنند ۲۷
شکل۲-۲۱. جایگاه ژن CTLA4 برروی کروموزوم شماره ۲ ..... ۲۷
شکل۲-۲۲. الف) نمایی شماتیک از مولکول گلیکوپروتئینی CTLA4 و بخش‌های سازنده‌ی آن، ب) موتیف سه بعدی بخش پروتئینی مولکول CTLA4 ..... ۲۸
شکل۲-۲۳. CTLA4 و CD28، دو پذیرنده‌ی غشائی مهم در سلولT که فعالیت‌های آن را تنظیم می‌کنند ۲۹

شکل۲-۲۴. مقایسه‌ی قابلیت اتصال گلیکوپروتئین‌های CTLA4 و CD28 به لیگاندهای خانواده‌ی B7 (CD80 و CD86) ۳۰
شکل۲-۲۵. مهار فعال سازی NFκB، توسط مکانیسم‌های مهاری احتمالی CTLA4 ..... ۳۱
شکل۲-۲۶. فعال سازی NFκB به واسطه‌ی تحریک TCR، طی مسیرهای سیگنالینگ پیچیده ۳۲
شکل۲-۲۷. فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی خانواده‌ی NFkB و تحریک رونویسی ژن‌های پیش-التهابی ۳۳
شکل۲-۲۸. نقش فاکتور رونویسی NFκB در گسترش تومورزایی ۳۴
شکل ۳-۱. ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده روی ژل آگاروز ۳۷
شکل ۳-۲. تبدیل سیتوزین به یوراسیل ۳۷
شکل ۳-۳. نمایش شماتیک از تکنیک MSP ۳۸
شکل ۳-۴. مراحل تبدیل سیتوزین به یوراسیل طی واکنش بی‌سولفیت شدن DNA توسط بی‌سولفیت سدیم ۳۸
شکل ۳-۵. الف) ساختار شیمیایی، ب)نمودار اسپکتروفوتومتری رنگدانه SYBR® Green ۴۱
شکل ۳-۶. نمودار Rn برحسب CT ۴۲
شکل ۳-۷. الف) نمودار تکثیر، ب) منحنی ذوب نمونه‌ی مورد مطالعه در Real-Time PCR ۴۴
شکل ۴-۱. تعیین دمای بهینه‌ی پرایمرها با گرادیان دمایی ۴۶
شکل ۴-۲. تصویر نمونه‌های غیرمتیله (۱)، متیله/غیرمتیله (۲) و متیله (۳) برای ژن CTLA4، به همراه Ladder، روی ژل آگاروز ۴۷
شکل ۴-۳. نمودار مقایسه‌ی درصد فراوانی نمونه‌های متیله، متیله/غیرمتیله، غیرمتیله برای ژن CTLA4 بین دو گروه بیمار و کنترل ۴۷
شکل ۴-۴. تعیین دمای بهینه‌ی فعالیت پرایمرهای بیان، با تکنیک RT-PCR ۴۸
شکل ۴-۵. (الف) نمودار تکثیر، (ب) منحنی ذوب ژن CTLA4 برای نمونه‌های بیمار ۴۹
شکل ۴-۶. الف) نمودار تکثیر، ب)منحنی ذوب ژن CTLA4 برای نمونه‌های کنترل ۵۰
شکل ۴-۷. الف) نمودار تکثیر، ب) منحنی ذوب ژن 18sRNA برای نمونه‌های بیمار و کنترل ۵۰
شکل ۴-۸. تصویر محصولات RT-PCR، برروی ژل آگاروز ۵۱

فهرست علائم

علامت	نشانه	علامت	نشانه
bp	جفت باز	λ_{max}	حداکثر طول موج
M	متیله	^{o}C	درجه سانتیگراد
U	غیرمتیله	gr	گرم
Tm	دمای ذوب	min	دقیقه
µl	میکرولیتر	sec	ثانیه
mM	میلی‌مولار	nm	نانومتر
nM	نانومولار	ml	میلی‌لیتر
pmol	پیکومول		

فصل اول

مقدمه

ژنتیک و محیط، همواره رابطه‌ای تنگاتنگ در تعیین همه جانبه‌ی نشان‌ویژگی‌های زیست شناختی موجودات زنده داشته‌اند. برهم‌کنش این دو می‌تواند با اعمال تغییرات پایدار و برگشت‌پذیر در پتانسیل بیان ژن‌ها و بدون ایجاد تغییر در توالی DNA،کیفیت این نشان‌ویژگی‌های زیستی را تغییر دهد. یک ژن بسته به عملکرد ویژه‌ای که در سلول‌های مختلف یک جاندار دارد، سطح بیان متفاوتی را بروز می‌دهد. هرگونه تغییر در الگوی طبیعی بیان ژن‌ها، در بافت‌ها و سلول‌های مختلف، پیامدهایی را به دنبال دارد؛ که از جمله‌ی آن می‌توان به تغییر شرایط فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ظاهری بافت و یا سلول، اشاره کرد. این تغییرات در صورت تداوم و تشدید می‌تواند به انواع بیماری‌ها و اختلالات منجر شود. در میان وضعیت‌های وابسته به آسیب‌شناسی چشم، بیماری ناخنک چشم انسان یکی از بحث برانگیزترین بیماری‌های چشمی است. ناخنک چشم، یک وضعیت مزمن چشمی در انسان است که با پیشروی زائده‌ای گوشتی و مثلثی شکل، از پیاز ملتحمه به سمت قرنیه‌ی چشم مشخص می‌شود. در مراحل اولیه علائم بیماری با احساس جسم خارجی و سوزش و تحریک مزمن چشم شروع شده و در مراحل بعدی در نتیجه‌ی پیشرفت بیماری، اختلال در بینایی، کاهش تدریجی قدرت بینایی و نهایتا از دست دادن کامل بینایی می‌تواند عارض گردد. این عارضه، در مناطقی با اقلیم گرم‌وخشک و گردوخاکی، مانند استان «سیستان و بلوچستان»، زیاد گزارش می‌شود. این ضایعه به راحتی توسط عمل جراحی از روی بافت چشم برداشته می‌شود، اما؛ یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های آن خاصیت عودکنندگی پس از جراحی است که در ۵۰٪ موارد، ضایعه پس از عمل جراحی مجددا شکل می‌گیرد. عامل ایجاد کننده‌ی این بیماری و سازوکار دقیق بیماری‌زایی آن هنوز به طور کامل شناخته شده نیست، اما؛ بر اساس تحقیقات متعدد صورت گرفته در این زمینه، احتمالا تابش‌های پرانرژی فرابنفش خورشید، عامل اصلی در بیماری‌زایی ناخنک می‌باشد، چراکه این تحقیقات نشان می‌دهد، شیوع این بیماری در مناطقی که بیشتر در معرض این تابش‌ها هستند، متداول‌تر است. تابش پرتوهای پرانرژی فرابنفش، به صورت مستقیم و یا بازتاب، به چشم می‌تواند در ساختار مولکولی سلول‌های اپی‌تلیوم چشم، تغییراتی ایجاد کرده و رشد بی رویه‌ی سلول‌ها، ساختار پارانشیمی و رگ‌زایی بیش از اندازه را در ناخنک سبب شود؛ که مجموعه‌ی این ویژگی‌ها، بافت ناخنک را به یک بافت توموری شبیه می‌سازد.

لنفوسیت‌های T کشنده، سلول‌های سیستم ایمنی تطبیقی هستند، که در بدو امر، سلول‌های توموری را که جایگزین سلول‌های طبیعی شده‌اند، شناسایی کرده و مورد حمله قرار می‌دهند. فعالیت این سلول‌ها، توسط گلیکوپروتئین‌های موجود در سطح آن‌ها، یعنی؛ CTLA4 و CD28 تنظیم می‌شود. باند شدن CD28 با لیگاند، مخابره‌ی پیام‌های تحریک کننده‌ی پاسخ‌های ایمنی سلول T و همچنین تکثیر آن را به دنبال دارد. این فعالیت توام با تحریک کنندگی CD28، با عملکرد بازدارندگی CTLA4 در تقابل است. CTLA4 یک تنظیم کننده‌ی منفی حیاتی برای پاسخ‌های ایمنی با واسطه‌ی سلول T می‌باشد. CTLA4 یک مولکول تعدیل کننده‌ی ایمنی است، که با کاهش پاسخ‌دهی سلول T و افزایش آستانه‌ی فعالیت آن، نقشی حیاتی در حفظ تولرانس محیطی سلول T بازی می‌کند.

امروزه بررسی هایپرمتیلاسیون پروموتر ژن‌ها، افق‌های نوینی را در جهت دست‌یابی به مارکرهای مولکولی، در بیماری‌های مختلف گشوده است. بررسی مولکولی تغییرات اپی‌ژنتیک ژن‌ها در بیماری‌ها، می‌تواند در تشخیص اولیه و پیش‌آگهی از بیماری، و در نتیجه به کارگیری روش‌های درمانی کارآمد در مراحل اولیه‌ی بیماری؛ نقش مهمی ایفا کند. در این پژوهش به بررسی برخی تغییرات اپی‌ژنتیکی (متیلاسیون و بیان) ژن CTLA4 در نمونه‌های مربوط به بافت چشم بیماران مبتلا به ناخنک چشم پرداخته شده است.

فصل دوم

مروری بر منابع

۲-۱- تاریخچه‌ی علم ژنتیک

ژنتیک[۱] شاخه‌ای از علوم زیستی است که به مطالعه‌ی انتقال صفات وراثتی در موجودات زنده می‌پردازد. ژن‌ها[۲] عناصر وراثتی هستند که علاوه بر تعیین صفات موروثی، در انتقال آن‌ها از نسلی به نسل دیگر مشارکت می‌کنند. علم زیست‌شناسی اگرچه به صورت توصیفی از قدیمی‌ترین علومی بوده که بشر به آن توجه داشته است، اما از حدود یک قرن پیش این علم وارد مرحله‌ای شد که بعدها آن را «ژنتیک» نامیدند. این امر انقلاب بزرگی در علم زیست‌شناسی پدید آورد.

در قرن هجدهم میلادی، عده‌ای از پژوهشگران بر آن شدند که نحوه‌ی انتقال صفات وراثتی را از نسلی به نسل دیگر بررسی کنند، اما؛ به دو دلیل مهم فعالیت‌های آن‌ها نتیجه‌ای به دنبال نداشت، یکی عدم انتخاب صفات مناسب و دیگری نداشتن اطلاعات کافی در زمینه‌ی ریاضیات.

۲-۱-۱- یافته‌های مندل

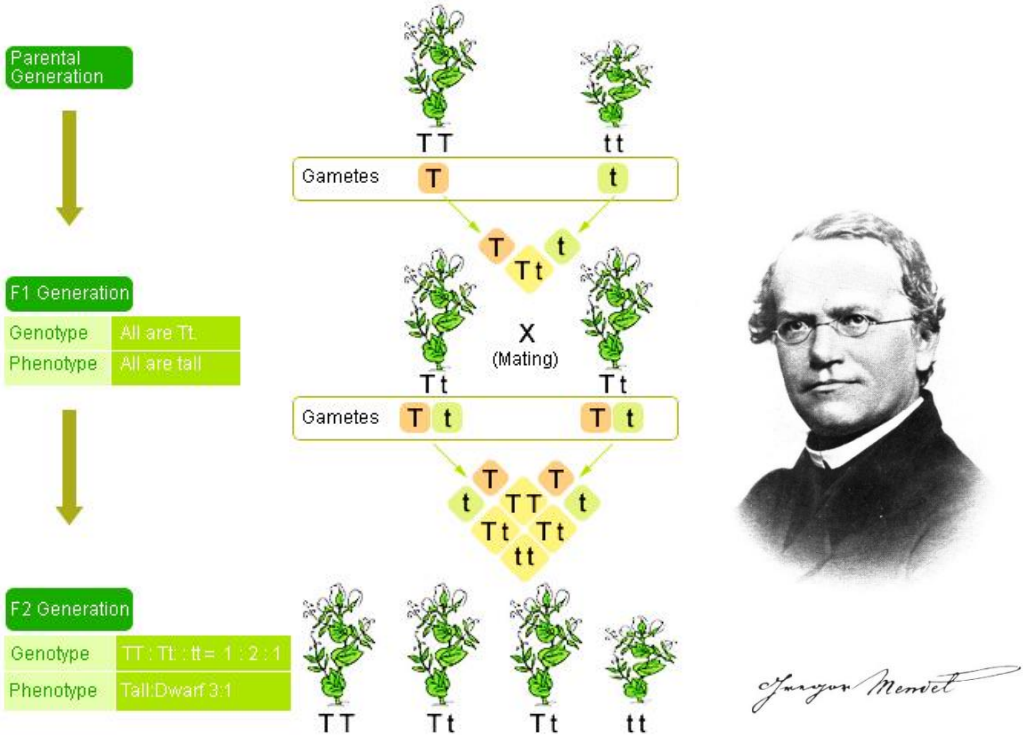
در دهه‌ی ۱۸۶۰ میلادی، عناصر وراثتی و برخی قوانین حاکم بر انتقال آن‌ها از نسلی به نسل دیگر، برای نخستین بار توسط یک کشیش اتریشی به نام Gregor Mendel، در حین انجام آزمایش‌هایی برروی گیاه نخودفرنگی[۳] کشف شد. مندل یافته‌های خود را در قالب تعداد محدودی قوانین عددی تفسیر نمود و اذعان داشت که عناصر وراثتی بر مبنای این قوانین از والدین به فرزندان منتقل می‌شوند.

نتایج کارهای وی در سال ۱۸۶۰ میلادی انتشار یافت، اما؛ متاسفانه به دلیل فضای سیاسی حاکم در آن دوران، جامعه‌ی علمی توجه چندانی به یافته‌های وی نداشت و نتایج کارهای وی به تدریج به دست فراموشی سپرده شد.

در سال ۱۹۰۰ میلادی، کشف مجدد قوانین ارائه شده از سوی مندل توسط درویس، شرماک و کورنز باعث شد که نظریات او مورد توجه و قبول قرار گرفته و مندل به عنوان «پدر علم ژنتیک» شناخته شود.

---

[۱] Genetics [۲] Gene [۳] *Pisum sativum*



شکل۲-۱. گرگور مندل به همراه نتایج آزمایش‌های وی

۲-۱-۲- کشف اسیدهای نوکلئیک[۱]

سه سال بعد در سال ۱۸۶۹ میلادی، Friedrich Miescher یک نوع جدید ماده‌ی اسیدی ضعیف را درون سلول‌های زنده کشف کرد که در هسته‌ی اسپرم ماهی قزل‌آلا[۲] و سلول‌های سفید خون بسیار فراوان بود. وی در آن زمان به هیچ وجه نمی‌دانست که ماده‌ی اسیدی مکشوف او می‌تواند ماده‌ی شیمیایی سازنده‌ی ژن‌ها باشد.

اسید ضعیف میشر، ماده‌ی شیمیایی سازنده‌ی ژن‌ها، اکنون DeoxyriboNucleic Acide (DNA) نامیده می‌شود. هرچند ارتباط میان DNA و وراثت تا اواسط قرن بیستم اثبات نشد.

۲-۱-۳- اهمیت هسته‌ی سلول در وراثت

اهمیت هسته‌ی سلول در وراثت در سال ۱۸۷۰ میلادی آشکار شد، با این مشاهده که هسته‌ی سلول‌های زایشی نر و ماده در جریان لقاح[۳] باهم ترکیب می‌شوند. این مشاهده این ذهنیت را ایجاد می‌کرد که چیزی درون هسته‌ی اسپرم و تخمک وجود دارد که مسئول به ارث رسیدن صفات است.

---

۱ Nucleic Acid ۲ Salmon fish ۳ Fertilization

۲-۱-۴- کشف کروموزوم‌ها

پیشرفت مهم دیگر، کشف اشیاء ریسمان‌گونه درون هسته بود که در صورت رنگ‌آمیزی با رنگ‌های اختصاصی، زیر میکروسکوپ نوری قابل مشاهده می‌شدند. این اشیاء ریسمان‌مانند، کروموزوم[۱] نام گرفت. کروموزوم‌ها یک رفتار تفکیک شوندگی منحصر به فرد دارند. تفکیک کروموزومی این اطمینان را حاصل می‌کند که هر سلول دختری در جریان تقسیم سلولی[۲]، نسخه‌های مشابه کروموزومی را دریافت کند. در سال ۱۹۰۰ میلادی مشخص شد که تعداد کروموزوم‌های هر گونه ثابت است، در حالی که تعداد کروموزوم‌ها در بین گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد. ویژگی‌های کروموزوم‌ها، این ذهنیت را ایجاد کرد که آن‌ها حامل ژن‌ها هستند.

۲-۱-۵- DNA: ماده‌ی وراثتی

در سال ۱۹۲۰ میلادی، شواهد بیشتر و بیشتری، وجود یک ارتباط نزدیک میان DNA و ماده‌ی ژنتیکی را گمانه‌زنی می‌کرد. مطالعات همراه با رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی، نشان داد که DNA به همراه برخی از پروتئین‌ها، در کروموزوم‌ها حضور دارد. همچنین پژوهش‌های به عمل آمده افشاء کرد که تمامی سلول‌های یک گونه‌ی مفروض، محتوی میزان ثابتی از DNA هستند، در حالی که میزان و نوع پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های زیستی، به شکل قابل ملاحظه‌ای در انواع رده‌های سلولی متفاوت است. شواهد غیر مستقیم برای اینکه ژن‌ها از جنس DNA هستند، رد می‌شد؛ چرا که آنالیزهای شیمیایی بی پایه و اساس از DNA، می‌گفت که DNA تنوع ژنتیکی مورد نیاز برای یک ماده‌ی ژنتیکی را ندارد. در مقابل پروتئین‌ها به عنوان مجموعه‌ی بسیار متنوعی از مولکول‌ها شناخته می‌شدند. در نتیجه بر اساس این مفروضات اشتباه، به صورت گسترده‌ای پذیرفته شده بود که پروتئین‌ها ماده‌ی ژنتیکی هستند و DNA صرفا چهارچوب ساختمانی کروموزوم‌ها را فراهم می‌کند. مقارن با این تفکر رایج که ژن‌ها از جنس پروتئین‌ها هستند، آزمایش‌هایی در راستای رد این مفروض و اثبات اینکه DNA ماده‌ی ژنتیکی است، صورت گرفت. از جمله‌ی این آزمایش‌ها می‌توان به آزمایش گریفیت و همکارانش برروی دو گونه‌ی کپسول‌دار (S) و بدون کپسول (R) باکتری مولد ذات الریه «استرپتوکوکوس نومونیا[۳]» که نشان داد عاملی سبب تغییر شکل گونه‌ی بدون کپسول (R) به گونه‌ی کپسول‌دار (S) می‌شود، همچنین آزمایش آوری و همکارانش که نشان داد عامل ترانسفورماسیون باکتری استرپتوکوکوس نومونیا، DNA است، و در نهایت آزمایش‌های هرشی و چس که بیان داشت ماده‌ی وراثتی باکتریوفاژ T_2 نیز DNA است؛ اشاره کرد. نهایتا در نتیجه‌ی تحقیقات به عمل آمده طی سال‌ها، مشخص شد که DNA ماده‌ی اصلی وراثت است.

---

[۱] Chromosome

[۲] Cell division

[۳] *Streptococcus pneumoniae*