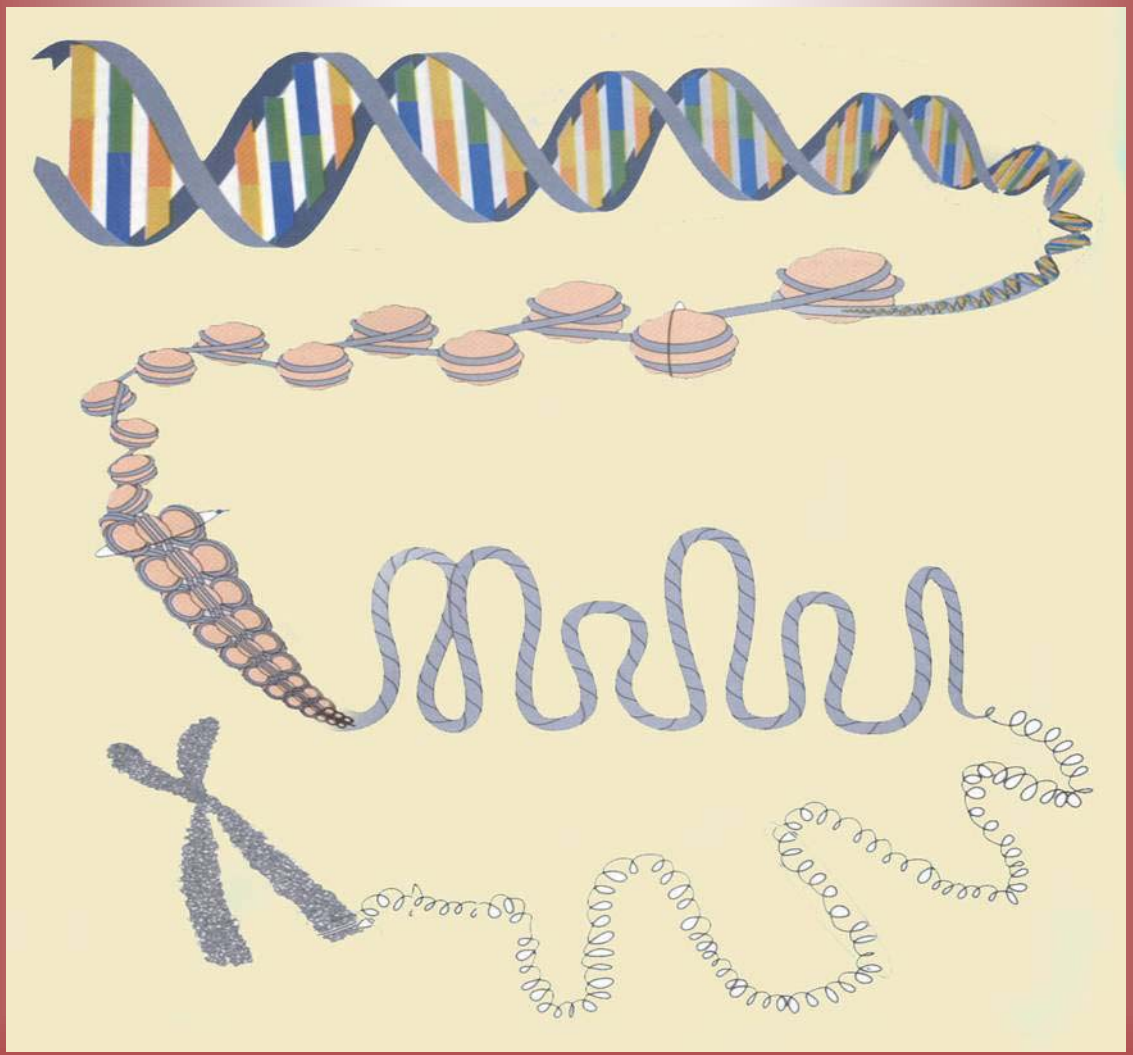
SHAHEED BEHESHTI
UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES &
HEALTH SERVICES

Reform

مقدمات علوم پایه ۲
ژنتیک



مهر ماه ۱۳۸۴

بسم الله الرحمن الرحيم

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل ۱

اساس کروموزومی وراثت..... ۲
سازمان کروموزوم انسان..... ۴
انواع کروماتین..... ۷
اشکال کروموزومها..... ۸
انواع کروموزومهای انسان..... ۹
کاریوتیپ ۱۱
غیرفعال شدن کروموزوم X ۱۳
موزائیسم فنوتیپی و جسم بار ۱۳
لزوم غیر فعال شدن کروموزوم X در زنان..... ۱۶

فصل ۲

تقسیمات سلولی..... ۱۸
میتوز..... ۱۹
اهمیت ژنتیکی میوز..... ۲۵
گامت‌زائی..... ۲۶
اسپرم‌زائی..... ۲۶
تخمک‌زائی..... ۲۶
لقاح..... ۲۷
مرگ سلولی (اپوپتوز)..... ۲۹

فصل ۳

ناهنجاریهای کروموزومی..... ۳۳
ناهنجاریهای تعدادی کروموزوم..... ۳۵
تریپلوئیدی و تتراپلوئیدی..... ۳۵
انیوپلوئیدی..... ۳۶
ناهنجاریهای ساختمانی کروموزوم..... ۳۷
نوترتیبی‌های ساختمانی نامتعادل..... ۳۷
حذف..... ۳۸
مضاعف شدن..... ۳۹
کروموزومهای مارکر و حلقه‌ای..... ۳۹
ایزوکروموزوم..... ۴۰
کروموزومهای دایسنتریک..... ۴۱
نوترتیبی های ساختمانی متعادل..... ۴۱
واژگونی..... ۴۱
جابجای..... ۴۲
جابجائی دو جانبه..... ۴۳
جابجائی رابرتسونی..... ۴۴
دخول..... ۴۶
موزائیسم کروموزومی..... ۴۶
بروز ناهنجاریهای کروموزومی در جامعه..... ۴۷
مولهای هیداتی فرم و تراتومهای تخمدانی..... ۴۹
موزائیسم جفتی محدود..... ۴۹
دو جنسی..... ۵۰
دو جنسی حقیقی..... ۵۰
دو جنسی کاذب..... ۵۰
ابهام جنسی..... ۵۰
سندرمهای ناپایداری کروموزومی..... ۵۱
نشانه‌گذاری ژنومی و میکرودیلیشن..... ۵۲

فصل ٤

۱- تعریف ژن ۵۶
DNA ۵۷
RNA ۵۷
پروتئین ۵۷
ساختار پایه ای یک ژن ۵۸
ساختار ژن هسته ای ۵۸
ژن های ساختمانی ونقش آنها در حیات سلول ۵۹
چگونگی مکانیسم بیان ژن ۶۱
علل تنوع بیان ژن ۶۲
- N – مریستولاسیون ۶۳
- پرینیلاسیون ۶۳
- عناصر متحرک ژنتیکی ۶۳
- نوترکیبی ژنتیکی و جهش ۶۵
- تکرارهای متوالی ۶۵
توارث میتوکندریایی ۶۶
ژنتیک مولکولی میتوکندری ۶۷
DNA میتوکندری و بیماریهای انسانی ۶۹
۲- ژنوم پروکاریوتها ۷۱
پلاسمید ۷۳
منشاء پلاسمید ۷۴
۳- خانواده ژنی ۷۸
سوپر ژن فامیلی ۷۹
ژن کلاستر ۷۹
۴- چند شکلی ژن(پلی مورفیسم ژنی) ۷۹
- توالی های تکراری پراکنده ۷۹
- تکرارهای متوالی ۸۰
- مینی ساتیلایت ۸۰
۵- همانند سازیDNA ۸۲
اصول همانند سازی DNA ۸۲
DNA ،دو رشته مارپیچ حلقوی باکتری ۸۵
منع کننده های سنتز DNA ۸۷
۶- رونویسی ۸۷
۷- ترجمه–ترجمه و رمز ژنتیکی ۹۱

۸- ریبوزوم ها ۹۳
۹- منابع ۹۵

فصل ۵

بخش اول

۱- انجام کاریوتایپ ۹۷
۲ - کشت سلولی کروموزوم Chromosomal Analysis ۹۷
۳ - قدرت تفکیک بالا High Resolution ۹۹
۴ - سیتوژنتیک ملکولی FISH ۹۹
۵ -روشهای نواری Banding system ۹۹
۶ - روش نواری فلورسنت Q ۹۹
۷ - روش نواری C- هتروکروماتین Constitutive ۹۹
۸ - نوارهای G (G- Banding) ۱۰۰
۹ - نوارهای R (R – Banding) ۱۰۱
۱۰ - باربادی Barr Body ۱۰۱
۱۱- تشخیص پیش از تولد ۱۰۲
۱۲- کاربرد های تشخیص پیش از تولد ۱۰۳
۱۳- روش های تشخیص پیش از تولد ۱۰۳
۱۴- نمونه برداری از پرز های کوریونیک ۱۰۴
۱۵- آلفا فیتو پروتئین ۱۰۴
۱۶- مایع آمونیوتیک – آمینوسنتز ۱۰۵
۱۷- کوردو سنتز یا نمونه گیری از خون بند ناف ۱۰۶
۱۸- فتوسکوپی ۱۰۷
۱۹- پلاسنتوسنتز ۱۰۷

بخش دوم

مقدمه ۱۰۸
PCR یک روش تکثیر DNA بدون استفاده از سلول زنده ۱۰۸
مراحل انجام واکنش PCR ۱۰۹
طراحی پرایمر و تکثیر اختصاصی زنجیره DNA ۱۱۰
کاربردهای متداول روش PCR ۱۱۱

کاربرد PCR در شناسایی جهش ها ۱۱۱
شناسایی جهش های شناخته شده ۱۱۲
افتراق آللها به روش اندازه گیری طول قطعه DNA و یا استعداد آلل به تأثیر آنزیم شکننده ۱۱۳
افتراق آللها با توجه به استعداد آنها به القا محل اثر گذاری آنزیم محدودگر ۱۱٤
کاربرد PCR در شناسایی مارکرهای چند شکلی ۱۱۴
الف) شناسایی چند شکلی های محل های آنزیم های محدودگر (RSPs) ۱۱۴
ب) شناسایی چند شکلی های کوتاه تکرار شونده (STRPs) ۱۱۵
شناسایی آلل های اختصاصی با استفاده از روش ARMS ۱۱۶
کاربرد Taq Man™ assay در شناسایی جهش های شناخته شده ۱۱۷
شناسایی جهش های ناشناخته ۱۱۸
روش بررسی ساختار چند شکلی های مولکول DNA تک رشته ای (SSCP) ۱۲۸
اصول روش SSCP ۱۱۸
روش شناسایی پروتیین های ناقص (PTT) ۱۲۰
اصول روش PTT ۱۲۰
روش توالی یابی DNA ۱۲۳
کاربرد PCR در ایجاد جهش اختصاصی در ژنوم سلول ۱۲۷
الف) جهش زایی در سلول (In vivo mutagenesis) ۱۲۷
ب) جهش زایی آزمایشگاهی (In vitro mutagenesis) ۱۲۷

فصل ٦

۱ – موتاسیون در مولکولهای DNA ۱۲۹
۲ – موتاسیون در کدونهای اسید آمینه ۱۳۰
- Silent Mutation ۱۳۰
- Non sense Mutation ۱۳۰
Missense mutation ۱۳۱
- Frameshift Mutation ۱۳۱
۳ – اصلاح موتاسیون ۱۳۲
۴ – اصلاح DNA ۱۳۳
۵ – تعمیر دیمر تیمین – تیمین ۱۳۴
۶ – تعمیر بازها ۱۳۵
۷ – تعمیرات استخراجی ۱۳۶
۸ – ژنتیک سرطانها ۱۳۶
- پروتوانکوژنها و انکوژنها ۱۳۷
- ژن های سرکوبگر تومور Tumor Suppressor Gene ۱۳۸
- سرطانهای ارثی و غیر ارثی ۱۳۹

فصل ۷

مقدمه ۱۴۱
شناسایی ژن های بیماریزا در انسان ۱۴۲
اصول و تدابیر اتخاذ شده در شناسایی ژن های بیماریزا ۱۴۲
شناسایی ژن با رویکرد عدم وابستگی به اطلاعات مربوط به محل قرار گیری ژن بر روی کروموزوم- کشف ژن بیماریزا بر اساس آگاهی از محصول پروتیینی آن ۱۴۳
استفاده از الیگونوکلئوتید های اختصاصی در کشف ژن ۱۴۳
استفاده از آنتی بادی های اختصاصی در کشف ژن ۱۴۳
شناسایی ژن بیماری زا بر اساس آگاهی از توالی مولکول DNA ۱۴۴
کشف ژن بر اساس آگاهی از محل تقریبی ژن بر روی ناحیه ای از کروموزوم ۱۴۴
مراحل انجام روش Positional cloning ۱۴۴
استفاده از روشهای آماری مانند روش پیوستگی غیر تعادلی(Linkage disequilibrium) ۱۴۴
شناسایی ژن با استفاده توام از بانک های اطلاعاتی و رسم نقشه آن ۱۴۵
اتخاذ رویکرد انتخاب محل ژن بر روی کروموزوم بر اساس استفاده توام نقشه فیزیکی ژن و بیان و عملکردآن ۱۴۵
تایید ژن انتخاب شده ۱۴۶

فصل ۸

مقدمه ... ۱۴۸
مروری بر منابع الکترونیکی علمی و اطلاعاتی معتبر جهان ۱۴۸
سایت های اصلی و معتبر در حوزه علوم پزشکی (ژنتیک) ۱۴۹
سایت اصلی فن آوری زیستی (NCBI) ۱۵۱
سایت علمی انتشارات مقالات در حوزه پزشکی (PubMed) ۱۵۱
سایت علمی Medline ۱۵۱
سایت علمی بیماریهای وراثتی مندلی (OMIM) ۱۵۱
بانک اطلاعاتی ژن (GenBank) ۱۵۲

مقدمه :

امروزه بر هر فارغ التحصیل رشته پزشکی واجب است و ضرورت دارد تا از علوم پایه و بخصوص علم ژنتیک بحد کافی بهره مند باشد تا در امر تشخیص و درمان و طرق پیشگیری از بروز بیماریها با در نظر گرفتن زمینه وراثتی و یا عوامل موثر در تظاهر آن بیماری توانائی برتری از خود نشان دهند .
درسنامه حاضر ، سعی بر این دارد که علاوه بر آشنائی دانشجویان ، با این اصول پایه ای از علم ژنتیک با موارد دیگری نیز آشنا شوند . شناخت بیماریهای ژنتیکی اعم از وراثتی یا غیر آن ، کاربرد تکنیک ها و روش های نوین تشخیص آنها بصورت پره ناتال یا پس از آن ، مشاوره ژنتیک در راستای پیشگیری از وقوع بیماریهای ژنتیکی وکاهش نرخ جمعیت بیمار و وابسته ، روش استفاده از منابع اطلاعاتی از طریق شبکه الکترونی و وب سایت ها ، نحوه برقراری ارتباط با مراکز تخصصی دنیا در جهت حمایت و مراقبت ، تربیت ، درمان همه از اهداف این درسنامه می باشند . امید اینکه استفاده بهینه از این درسنامه بعنوان Pilotدر این دانشگاه مورد استفاده سایر دانشگاههای علوم پزشکی ایران قرار گیرد .

اسامی مولفین به ترتیب حروف الفبا

سر کار خانم دکتر فرخنده پور اسماعیلی

جناب آقای دکتر نور محمد قیاسوند

جناب آقای دکتر ابوالفضل موفق

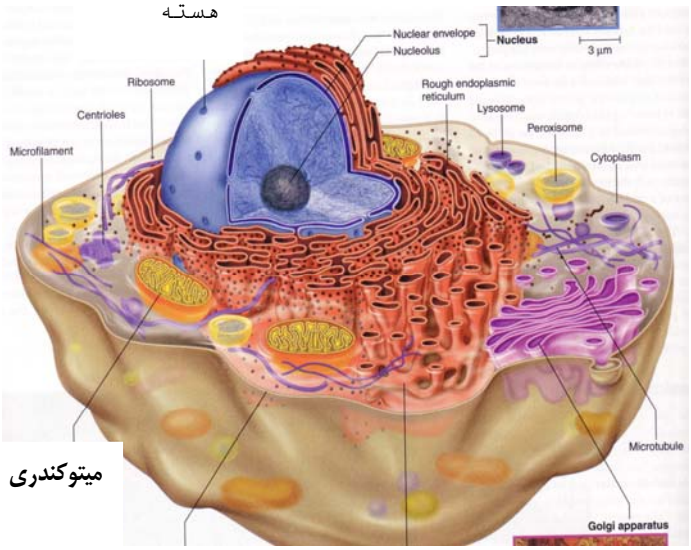
جناب آقای دکتر وحید رضا یاسایی

فصل اول

اساس کروموزومی وراثت

اساس کروموزومی وراثت
Chromosomal Basis of Inheritance

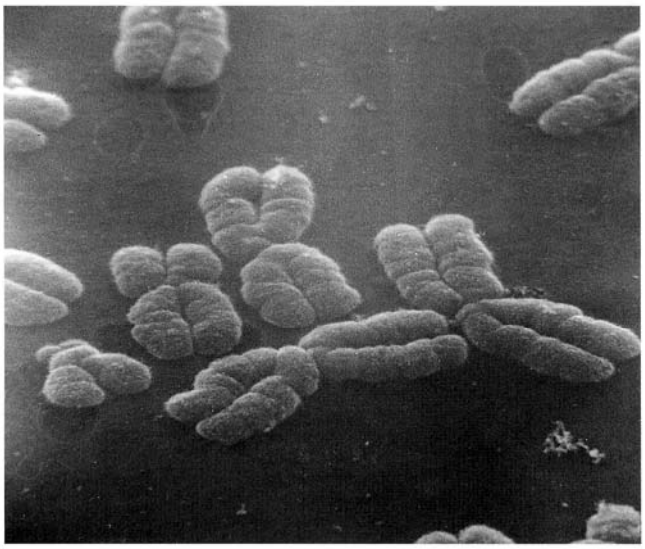
درک چگونگی وراثت نیاز به درک ساختمان و کار ماده وراثتی و سازمان یافتن آن در **کروموزومها**، چگونگی انتقال کروموزومها از سلولی به سلول دیگر در طی تقسیم سلولی و از نسلی به نسل دیگر در طی تولید مثل، چگونگی بیان ژنها و همچنین اطلاع از طبیعت موتاسیون دارد. **ژنوم** هر سلول شامل تمام مواد ژنتیکی موجود در آن می باشد که در انسان شامل DNA هسته و DNA میتوکندری ها است (شکل ۱-۱).
ژنوم انسان شامل مقادیر زیادی دی اکسی‌ریبونوکلئیک اسید (DNA) است که حاوی اطلاعات ژنتیکی لازم برای مشخص کردن تمام جوانب جنین‌زائی، تکامل، رشد، متابولیسم، تولیدمثل و بسیاری از رفتارها می‌باشد و شامل DNA هسته و DNA میتوکندریهاست.



شکل ۱-۱

DNA هسته یا ژنوم هسته در زایگوت شامل ۲۳ جفت کروموزوم (شکلهای ۲-۱ و ۱۱-۱) و در گامت شامل ۲۳ کروموزوم متفاوت است که حاوی حدود ۳۰۰۰۰ ژن می باشد . ژنها بصورت اطلاعات یا کدهائی درتوالی DNA در کروموزومها قرار گرفته‌اند.

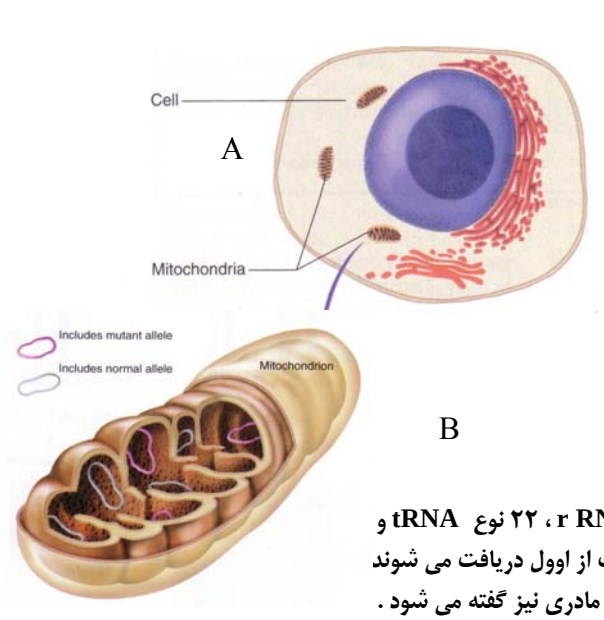
در هر سلول، ژنوم هسته بصورت رشته های کروماتین بسته‌بندی شده است که در آن DNA ژنومی با انواع متعددی از پروتئین‌های کروموزومی در آمیخته است. بعضی از پروتئین‌های یافت شده در کروماتین دارای نقش ساختمانی هستند، در حالیکه بعضی دیگر در تنظیم بیان ژنها نقش دارند. بجز در زمان تقسیم سلول، کروماتین در سرتاسر هسته پخش شده است و در زیر میکروسکوپ بصورت شبکهٔ کروماتین دیده می‌شود. اما وقتی سلول تقسیم می‌شود، مواد هسته‌ای متراکم شده و بصورت کروموزومهای قابل مشاهده با میکروسکوپ ظاهر می‌شوند (شکل۲-۱) . بنابراین کروموزومها بعنوان ساختمانهای مشخص و مجزا تنها در مراحل خاصی از سیکل سلولی دیده می‌شوند.

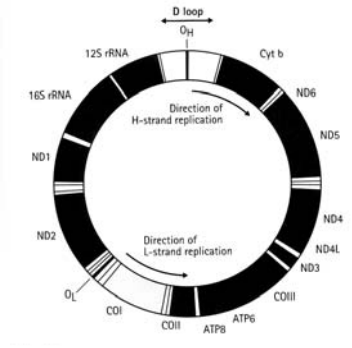


شکل ۲-۱

ژنها بصورت خطی در طول کروموزوم قرار دارند و در هر کروموزوم طبیعی هر ژنی یک محل معینی را اشغال می‌کند که لکوس(locus) نامیده می شود . نقشه ژنی(gene map) هر کروموزوم برای هر گونه‌ای مشخص است و در تمام افراد یک گونه یکسان است. مثلاً نقشهٔ ژنی همهٔ کروموزومهـای شـمارهٔ یـک طبیعـی همهٔ انسانها یکسان است.

هر سلول حاوی تعداد زیادی میتوکندری (شکلA ۳-۱) و هر میتوکندری حاوی تعدادی کروموزوم میتوکندری می باشد (شکلB ۳-۱). کروموزوم میتوکندری ، دو رشته ای و حلقوی است که DNA میتوکندری (mtDNA) یا ژنوم میتوکندری نیز نامیده می شود (شکلC۳-۱) .





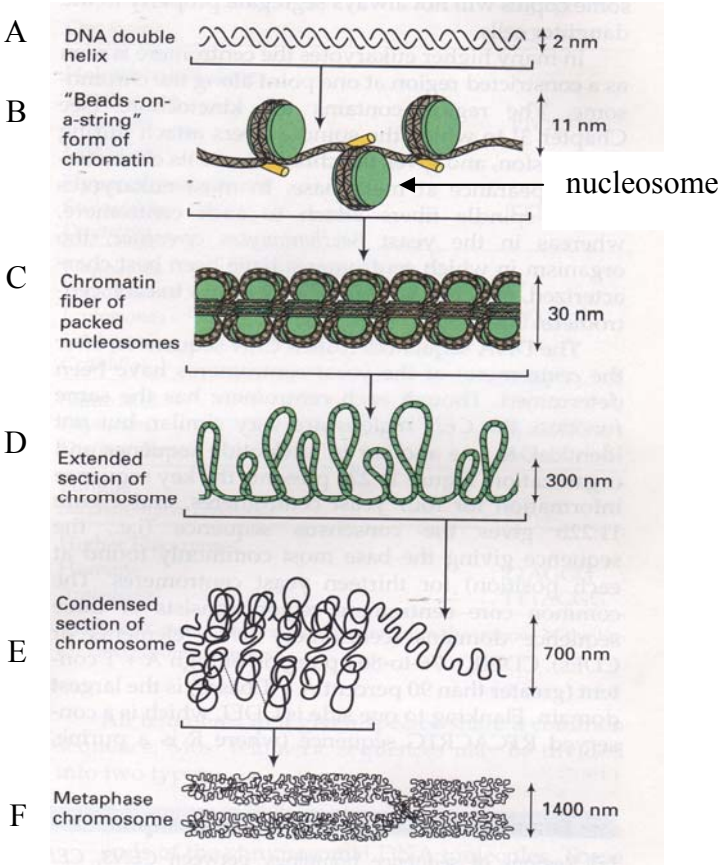
شکل۳-۱

ژنوم میتوکندری ۳۷ ژن را کد می کند : ۲ نوع r RNA ، ۲۲ نوع tRNA و انرژی سلول شرکت دارند . تقریبا تمام میتوکندریهای زایگوت از اوول دریافت می شوند ژن آنها در میتوکندری قرار دارد توارث سیتوپلاسمی یا توارث مادری نیز گفته می شود .

سازمان کروموزوم انسان

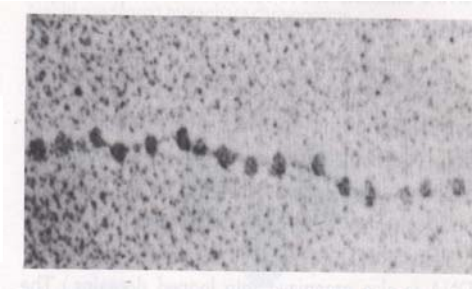
هر سلول سوماتیک طبیعی انسان دارای ۴۶ کروموزوم است و هر کروموزوم حاوی یک مولکول DNA دو رشته‌ای طویل خطی می‌باشد.(شکل A ۴-۱) در کروموزومها، ملکولهای DNA برهنه نیستند. هر مولکول DNA با گروهی از پروتئین‌های کروموزومی موسوم به هیستون‌ها و گروهی هتروژن از پروتئین‌های غیرهیستونی کمپلکسی بنام کروماتین تشکیل می‌دهند. بنظر می‌رسد این پروتئینها در هدایت رفتار طبیعی کروموزومی و همچنین بیان مناسب ژنها نقش اساسی دارند .

پنج نوع عمده پروتیین هیستونی وجود دارد که نقش اساسی در بسته‌بندی صحیح DNA و رشته های کروماتین دارند: دو کپی از هر کدام از چهار هیستون H_3, H_2B, H_2A و H_4 تشکیل یک اکتامر octamer یا هستهٔ هیستونی را می‌دهند که یک قسمتی از DNA بطول ۱۴۰ جفت باز حدود دو بار مثل نخ به دور آن می‌پیچد (شکل B۔ ۴-۱) و مجموعهء به نام نوکلئوزوم حاصل میشود (شکل B ۴-۱). نوکلئوزوم واحد ساختمانی رشته کروماتین است . پنجمین هیستون، H1، به ناحیه بین نوکلئوزومی (DNA واسط یا spacer DNA) متصل می‌شود ودر آن خم ایجاد می کند . مقدار DNA موجود در نوکلئوزوم و ناحیه واسط در حدود ۲۰۰ جفت باز می‌باشد. نوکلئوزومها به رشتهٔ کروماتین ظاهر تسبیح مانندی می‌دهند (شکلA ۵-۱).

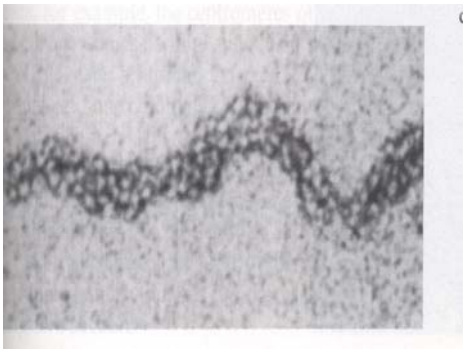


شکل۴-۱ : سطوح پی در پی بسته‌بندی و تراکم کروماتین در یک کروموزوم.

شکل ۵-۱:



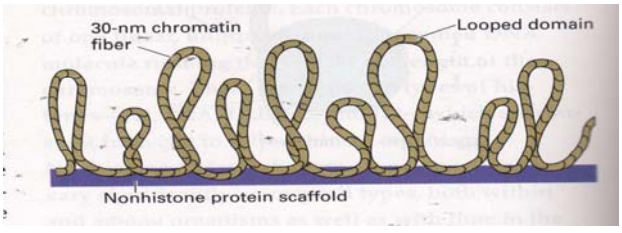
A
قطر ۱۱ نانومتر : عکس میکروسکوب الکترونی از دانه های نوکلئوزوم که معادل شمای ارائه شده در شکل B - ۱-۳ است .



B
قطر ۳۰ نانومتر عکس میکروسکوب الکترونی از دانه های نوکلئوزوم که معادل شمای ارائه شده در شکل C ٤-۱ است:

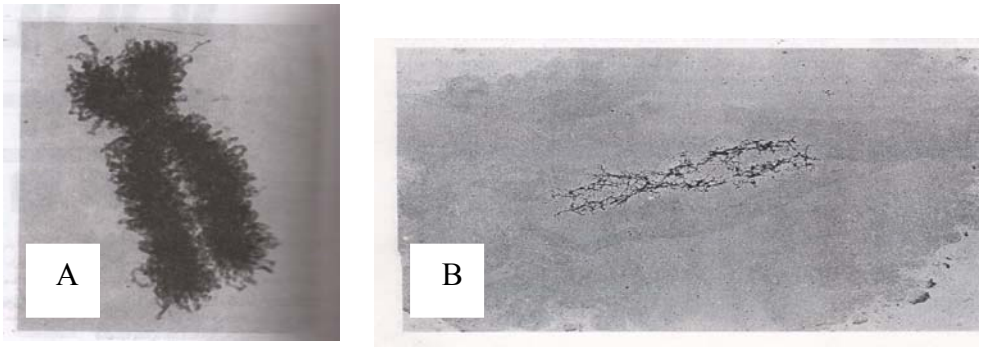
کروموزومها در طی مراحل مختلف سلولی به طور متناوب فشرده و باز می‌شوند : کروموزومها در مرحلهء اینترفاز نسبتاً باز و در مرحله متافاز بسیار متراکم می باشند . با این حال کروموزومها حتی در مرحله اینترفاز، دارای فشردگی زیادی می باشند. رشته کروماتین که واحد تشکیل دهنده آن نوکلئوزوم می باشد در زیر میکروسکوپ الکترونی بصورت رشته نسبتاء ضخیمی بقطر ۳۰ نانومتر بنظر می‌رسد (شکل C ۴-۱ و B ۵-۱). این رشته سیلندری که رشته کروماتین نامیده می شود ، واحد اساسی شبکه کروماتین را تشکیل می دهد . خود رشته های کروماتین ، حلقه‌ها loops و مناطقی domain را بوجود می‌آورند که با فواصلی در حدود ۱۰۰ کیلو باز یا بیشتر به یک ماتریکس پروتئینی غیرهیستونی متصل شده‌اند و رشته ی بقطر حدود ۳۰۰ نانومتر بوجود میاورد (شکل D- ۴-۱ و شکل۶-۱). در طی متراکم شدن کروموزوم، این رشته روی خود جمع شده و رشته ی ۷۰۰ نانومتری را بوجود میاورد (E ۴-۱). از رویهم پیچ و تاب خوردن رشته های ۷۰۰ نانومتری کروموزومهای قابل رویت پروفازی و متافازی بوجود میایند (اشکال F ۴-۱ ، ۲- ۱ و ۴-۲).

چنین فرض شده است که حلقه ها(loops) در حقیقت واحدهای عملکردی همانندسازی DNA یا کپی‌برداری ژنی یا هر دو آن هستند و نواحی اتصال این حلقه‌ها به ماتریکس در طول DNA کروموزوم ثابت است. بنابراین ممکن است قسمتی از کنترل بیان ژن به چگونگی قرار گرفتن DNA و ژنها در کروموزومها و اتصال آنها به پروتئین‌های کروموزومی موجود در ماتریکس بستگی داشته باشد.



شکل ۶-۱

وقتی که یک کروموزوم متافازی تحت تأثیر موادی قرار دهیم که قسمت عمده پروتئین‌های رشتهء کروماتین برداشته شود، DNA موجود در هر کروموزوم باز و قابل دیدن می‌شود. وقتی DNA یک کروموزوم متافازی بدین طریق آزاد شود، حلقه‌های طویل DNA قابل مشاهده شده و چارچوب (scaffold) یا اسکلت کروموزوم متافازی نیز دیده میشود (شکل ۷B-۱).



شکل۷-۱ : A- کروموزوم دست نخورده متافازی:حلقه‌های DNA در لبه های کروماتیدهای خواهری قابل مشاهده‌اند.

B- میکروگراف الکترونی کروموزوم متافازی هضم شده که چارچوب کروموزوم و حلقه‌های DNA آن قابل مشاهده‌اند.

توالیهای بیهمتا و تکراری در کروموزومهای انسان

نواحی مختلف کروموزومها از لحاظ سازمانی و عملیاتی یکسان نیستند. بعضی نواحی کروموزوم دارای محتوی بالائی از ژنها هستند که نواحی غنی از ژن gene-rich نامیده میشوند. بعضی نواحی دیگر ژنوم دارای محتوی پائینی از ژنها میباشند، یعنی فقیر از ژن میباشند. بنابراین، معمولا کم یا زیاد شدن نواحی کروموزومی غنی از ژن از نظر بالینی اثرات شدیدتری از کم یا زیاد شدن نواحی هم اندازه ولی فقیر از ژن بوجود میاورد. چنین بنظر می رسد که کمتر از ده درصد DNA ژنوم انسان از ژن تشکیل شده است و بقیه ژنوم با اینکه پروتئینی را کد نمی کند ولی برای حفظ و فعالیت ژنوم اهمیت دارد .

حدود سه چهارم ژنوم حاوی DNA یکتا (Unique DNA) یا تک کپی single copy می‌باشد، یعنی تنها یک نسخه از توالی نوکلئوتیدهای آن در ژنوم هاپلوئید وجود دارد. باقیمانده ژنوم حاوی کلاسهای متعددی از DNA تکراری repetitive DNA می‌باشد که توالی نوکلئوتیدهای آن صدها تا میلیونها بار در ژنوم تکرار شده‌اند. بنظر می‌رسد که توالی‌های DNA تکراری ژنوم در ایجاد و حفظ ساختمان کروموزومها و فعالیت سلولی و استقرار آنها در هسته نقش داشته باشند. خانواده‌های DNA تکراری که در سرتاسر ژنوم پراکنده‌اند بطور واضحی در پزشکی اهمیت دارند. جابجائی و نقل و انتقال بعضی از توالی های تکراری علت بسیاری از جهش‌ها در بیماریهای وراثتی می‌باشد (مثل هیپرکلسترولمی).

انواع کروماتین

در یوکاریوتها، ملکولهای DNA دو رشته‌ای و بسیار طویل می‌باشند و هر کدام با تقریباً هم وزن خود از پروتئینهای هیستونی (بازی) و مقدار کمتری پروتئینهای غیرهیستونی (اغلب اسیدی) و مقدار اندکی RNA، رشته‌های کروماتین را بوجود میآورند. پروتئینهای غیرهیستونی شامل آنزیمهای دخیل در همانندسازی، ترمیم و نوترکیبی کروموزومها و همچنین پروتئینهای دخیل در نسخه‌برداری و تنظیم بیان ژنها می‌باشد. پروتئینهای هیستونی از عوامل اصلی متراکم نمودن DNA در سلول است و موجب می‌شوند که حدود ۲ متر دپلکس DNA در هستهٔ هر یک از سلولهای سوماتیک بصورت رشته‌های کروماتین و کروموزوم جایگزین شود.

رشته‌های کروماتین در مرحله اینترفاز کمترین تراکم و بیشترین فعالیت خود را دارند. البته در هر سلول قسمتی از کروماتین غیرفعال است و نسخه‌برداری نمی‌شود و از بقیه قسمتها متراکم‌تر است و هتروکروماتین (Heterochromatin) نامیده می‌شود. کروماتینی که فعال است و نسخه‌برداری می‌شود یوکروماتین (Euchromatin) نامیده می‌شود و رنگ‌پذیری کمتری از هتروکروماتین دارد. یوکروماتین قبل از هتروکروماتین همانندسازی می کند .

هتروکروماتین بر دو نوع است: هتروکروماتین دائمی (Constitutive Heterochromatin) که همواره متراکم و غیرفعال است و هتروکروماتین موقتی (Facultative Heterochromatin) که در بعضی سلولها و بافتها متراکم و غیرفعال و در بعضی دیگر فعال و فاقد تراکم بوده و از روی آن نسخه‌برداری انجام می‌گیرد. مانند ژنهای آنزیمهای کبدی که در کبد فعال و در دیگر بافتها غیرفعالند. نمونه دیگر هتروکروماتین موقت کروموزوم X غیر فعال در سلولهای پستانداران مؤنث است که در سلولهای سوماتیک قسمت اعظم آن هتروکروماتینه و غیرفعال است و اندام بار (Barr body) را ایجاد می‌کند (شکل ۱۳-۱). این هتروکروماتین در هنگام اووژنز از حالت تراکم خارج می‌شود و بصورت X غیرهتروکروماتین در اوولها ظاهر می‌شود تا بتواند در زایگوت و در دو هفتهٔ اول حیات رویان نسخه‌برداری فعال داشته باشد. در سلولهای سوماتیک، کروموزومهای X غیر فعال آخرین کروموزومهایی هستند که همانندسازی می‌کنند.

هر کروموزوم قبل از همانندسازی بصورت یک رشتهٔ کروماتینی است که حاوی یک ملکول DNA دو رشته‌ای می‌باشد و پس از همانندسازی در مرحله S بصورت دو رشتهٔ کروماتینی بهم چسبیده موازی درمی‌آیند که با میکروسکوپ نوری از یکدیگر قابل تمیز نیستند. به این رشته‌های کروماتینی کروماتیدهای خواهری (sister chromatids) گفته می‌شود و هر کدام دارای یک ملکول DNA دو رشته‌ای می‌باشند. کروماتیدهای خواهری معمولاً از لحاظ طول و توالی بازها یکسان بوده و در محل سانترومرهایشان بهم متصل می‌باشند. این مجموعه در مرحلهٔ متافاز به حداکثر تراکم خود می‌رسد بطوریکه کروماتیدهای خواهری از یکدیگر قابل تمیز بوده و مجموعهٔ آنها به شکلی که کروموزوم متافازی نامیده می‌شود با میکروسکوپ قابل رؤیت است (شکلهای ۲-۱ و ۷-۱) .

سانترومر یک ناحیهٔ غنی از AT با تکرارهایی از حدود ۱۳۰ جفت باز است که میل اتصال زیادی با چندین پروتئین ویژه دارد که مجموعاً کینتوکور (Kinetochore). را تشکیل می‌دهند. کینتوکور ساختمانی ضروری برای اتصال کروموزومها به دوک تقسیم و در نتیجه استقرار آنها در استوای سلول در متافاز و جدا شدن و انتقال آنها به قطبین سلول در آنافاز می‌باشد. منطقهٔ سانترومر و اطراف آن که حاوی هتروکروماتین دائمی است در اواخر مرحله S همانندسازی می‌کند.

در انتهاهای هر کروموزوم یا ملکول DNA توالیهای کوتاه تکرار شدهٔ غنی از TG وجود دارد که تلومر (telomere) نامیده می‌شود. در انسان تلومرها دارای تعداد متغیری از توالی تکرار شدهٔ 5′-TTAGGG-3 می‌باشند و هر تلومر از چندین کیلو باز تشکیل شده است. باید توجه داشت که تلومر برای تکمیل همانندسازی DNA در انتهای 5′ رشته‌های DNA جدید ضروری می‌باشد.

هر سلول سوماتیک طبیعی انسان پس از خاتمهٔ همانندسازی DNA ، از نظر محتوای ژنتیکی حالت تتراپلوئیدی دارد: هر کروموزوم آن بصورت یک جفت کروماتید خواهری در آمده است و هر یک از کروماتیدها حاوی همهٔ اطلاعات ژنتیکی کروموزوم والد می باشد . ممکن است بین کروماتیدهای خواهری کراسینگ اور رخ دهد (Sister Chromatid Exchange=SCE) (شکل ۱۲-۳) ، ولی از آنجا که کروماتیدهای خواهری از نظر ژنتیکی کاملاً یکسان می‌باشند تبادل قطعات بین آنها هیچگونه پیامد ژنتیکی ندارد. البته اگر بر اثر کراسینگ‌اور نامتساوی، قطعات مبادله شده مساوی نباشند برای قطعهٔ DNA درگیر در یکی از کروماتیدها حذف (deletion) و در دیگری تضاعف (duplication) رخ می‌دهد (شکل ۴-۳) .

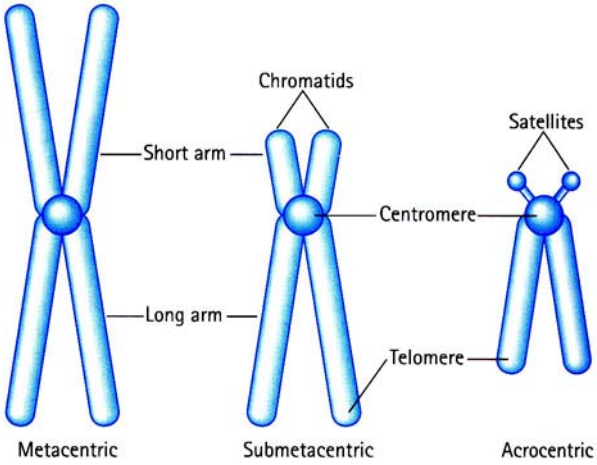
اشکال کروموزومها

شکل کروموزوم را محل سانترومر آن مشخص میکند. از این لحاظ چهار نوع کروموزوم وجود دارد (شکل ۸-۱):
کروموزوم های Telocentric که در آنها سانترومر در یک انتها واقع شده است و کروموزوم یک بازو دارد . این شکل کروموزوم در انسان وجود ندارد.

کروموزوم هایAcrocentric که در آنها سانترومر تقریبا در انتهای کروموزوم واقع شده است و کروموزوم دارای یک بازوی کوچک (p) و یک بازوی بلند (q) می باشد. البته ممکن است بازوی کوچک این کروموزومها در بررسی کروموزومی دیده نشود و یا بصورت یک ماهواره و دورتر از سانترومر در کروموزومهای متافاز دیده شود. در بعضی موارد اتصال ماهواره با سانترومر به وضوح قابل دیدن نیست. بازوی کوچک acrocentric ها حاوی ژنهای rRNA بصورت تکراری است. در انسان کروموزومهای ۱۳ ، ۱۴ ، ۱۵ ، ۲۱ و ۲۲ جزو این گروهند.

کروموزوم های Metacentric که در آنها سانترومر در وسط کروموزوم قرار دارد ودو بازوی کروموزوم مساویند. کروموزومهای ۱،۳،۱۹و۲۰ جزو این گروه اند.

کروموزوم هایSubmetacentric که در آنها سانترومر در وسط کروموزوم قرار ندارد و دو بازو کاملا مشخص ولی نامساویند. بقیه کروموزوم های انسان از این نوعند.



شکل ۸-۱

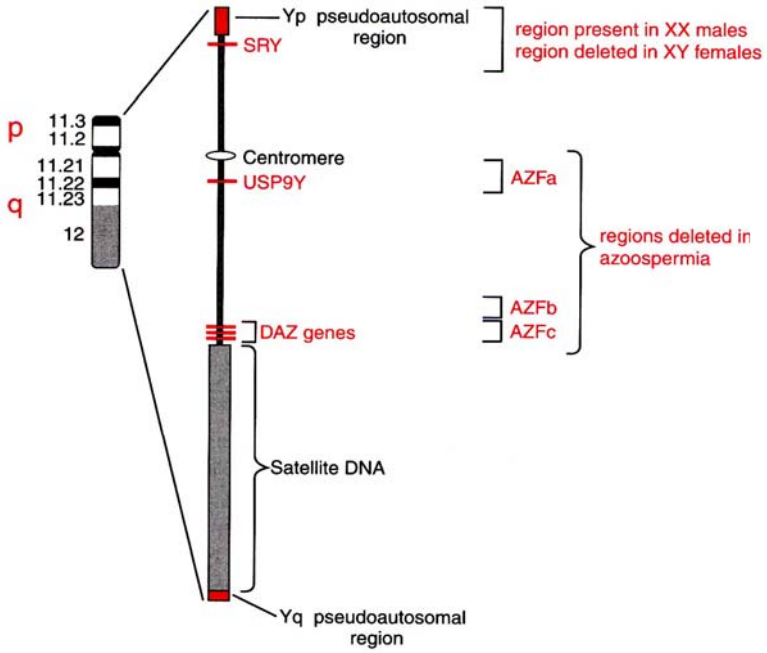
انواع کروموزومهای انسان

به استثنای سلولهای ژرمینال (germline cells)، بقیه سلولهای تشکیل‌دهندهٔ بدن هر فرد سلولهای سوماتیک Somatic cells نامیده می‌شوند. در هسته هر یک از سلولهای سوماتیک انسان ۴۶ کروموزوم یا ۲۳ جفت کروموزوم وجود دارد . به اعضا هر جفت کروموزوم که از نظر اندازه ، شکل ، انواع و نقشه ژنها یکسانند کروموزومهای همولوگ یا همتا گفته می‌شود. هریک از کروموزومهای غیر همولوگ انواع خاصی از ژنها را حمل می‌کند و کروموزوم های غیر همولوگ از لحاظ محتوای ژنی متفاوتند .

کروموزومهای همولوگ دارای ژنهای یکسان در توالی یکسان هستند ولی ممکن است از لحاظ اللها (Alleles) متفاوت باشند. یکی از هر زوج همتا از پدر و دیگری از مادر به ارث می‌رسد. از این ۲۳ جفت، ۲۲ جفت در مردان و زنان مشابه هستند که اتوزومها autosomes نامیده می‌شوند . اتوموزوم ها براساس اندازه از بزرگترین (کروموزوم شماره ۱) تا کوچکترین (کروموزومهای ۲۱ و ۲۲) شماره‌گذاری شده‌اند (شکل۱۱-۱). یک جفت باقیمانده، کروموزومهای جنسی X و Y هستند: XX در زنان و XY در مردان.

جنسیت در زمان لقاح یعنی زمانی که اسپرم وارد اوول می شود تعیین می گردد. اگر زایگوت حاوی کروموزوم Y طبیعی باشد ، جنس مذکر و در غیر اینصورت جنس مونث بوجود می آید. نقش Y در تعیین جنسیت مربوط به یکی از ژنهای آن بنام TDF (Testis Determining Factor) است که در منطقه ای از کروموزوم بنام SRY (Sex-determining Region of Y) قرار دارد (شکل۹-۱) . وجود SRY موجب تمایز بافت گنادی اولیه به بیضه و تکامل جنین به سمت مذکر می شود . بیضه علاوه بر تستوسترون که برای پیدایش و تکامل اندامهای جنسی مذکر لازم است، مقداری هورمون anti-mullerian نیز تولید می کند که مانع پیدایش Mullerian duct (که تخمدان را به رحم وصل میکند)در جنین مذکر می شود.

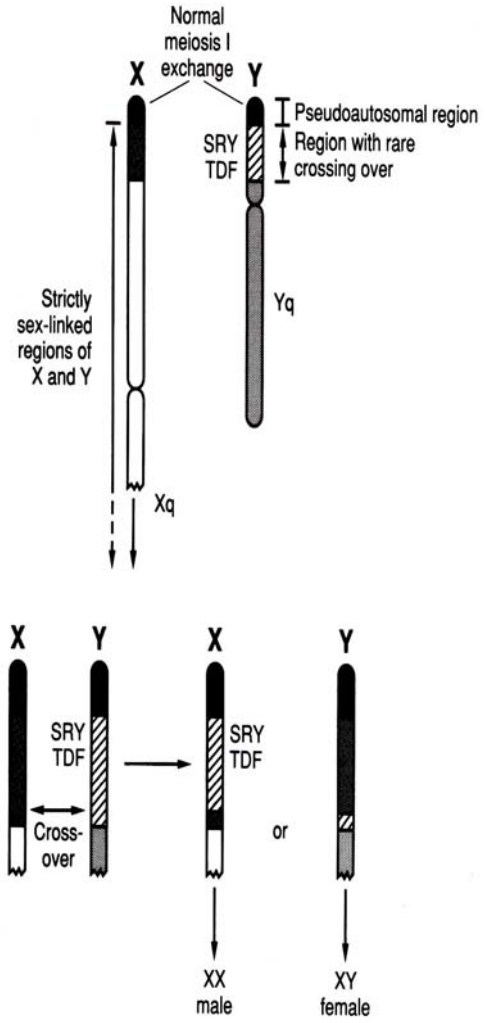
ژن TDF تا هفته ششم جنین فعال نمی شود و به همین دلیل تفاوت جنسی ظاهری بین جنینهای مونث و مذکر بعد از هفته ششم آشکار می شود. تفاوت جنسی جنین مونث و مذکر در حدود ۱۵-۱۲ هفتگی با سونوگرافی قابل تشخیص است.



شکل۹-۱

کروموزومهای X و Y در اغلب ژنها متفاوتند ولی در قسمت کوچکی تشابه توالی دارند و به همین دلیل همی‌لوگ hemilog نامیده میشوند (شکل۱۰-۱) . ژنهای که بطور طبیعی در کروموزوم Y وجود داشته ولی در X وجود نداشته ژنهای Holandric نامیده می شوند. تا بحال نقشه ۲۳ عدد از این ژنها تهیه شده است. از جمله ژنهای هلندریک، علاوه بر TDF تعدادی ژن است که برای باروری مرد لازم است .

در دو انتهای Y دو منطقه کوچک همولوگ با دو منطقه کوچک در دو انتهای X وجود دارد که مناطق اتوزومال کاذب pseudoautosomal regions نامیده می شوند . این مناطق محلهای طبیعی وقوع کراسینگ اور بین کروموزوم های X و Y است. وقوع کراسینگ اور در این مناطق برای جدایی صحیح کروموزومهای جنسی ضروری است. وقوع کراسینگ اور بین X و Y در خارج از این مناطق می تواند موجب پیدایش کروموزومهای غیرطبیعی شود (شکل ۱۰-۱) که باعث بروز فنوتیپهای غیرطبیعی در حاملین خود می شود، مثلا انتقال ژن TDF از کروموزوم Y به کروموزوم X و به ارث بردن این کروموزومهای غیرطبیعی موجب پیدایش مردان XX و زنان XY میگردد که نابارورند .

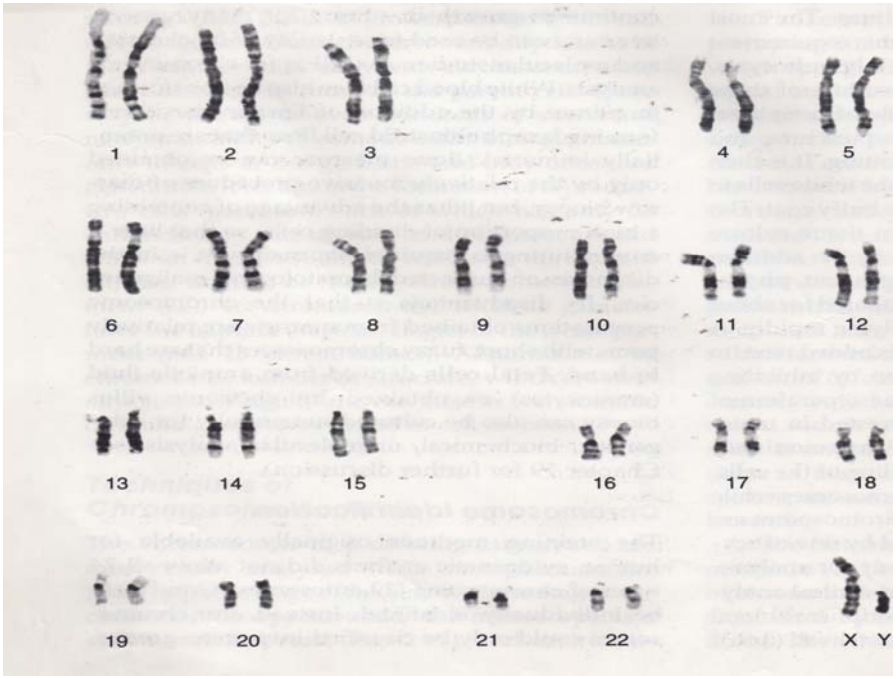


شکل۱۰-۱

کاریوتیپ Karyotype

کروموزومهای یک سلول انسان را می توان در متافاز یا پرومتافاز میتـوز و پـس از طـی اقـدامات آزمایـشگاهی خاصی که در فصول بعد به آنها اشاره خواهد شد مشاهده و بررسی نمود . در این مراحل هر کرومـوزوم دارای دو کروماتید خواهری است که در ناحیه سانترومر بهم متصل شده‌اند . سانترومر یا جمع شـدگی اولیـه primary constriction، یک نشانه سیتولوژیک است که در انسان هر کروموزوم را به دو بـازو، بـازوی کوتـاه یـا P و بازوی بلند یا q تقسیم می‌کند (شکل ۸-۱ و شکل ۱۱-۱). برخی از کروموزومها را می‌توان براساس طول آنها و همچنین بوسیله موقعیت سانترومر (شکل آنها) از دیگرکروموزومها تمیز داد .

برای تهیه کاریوتیپ karyotype ، از گسترهٔ متافازی رنگ آمیزی شده عکس گرفته، سپس عکـس هر یک از کروموزوم ها را طبق دسته‌بندی استاندارد روی کارت مخـصوص مـی چـسبانند . محـصول نهـائی و کامل شده این اقدام را کاریوتیپ karyotype می‌نامند (شکل۱۱-۱) . برای تهیه کاریوتیپ می توان از برنامـه های کامپیوتری ویژه نیز استفاده نمود و بررسی و آنالیزی کروموزومی را با سرعت و دقت بیشتری انجام داد کـه در فصول بعد به آنها اشاره خواهد شد .



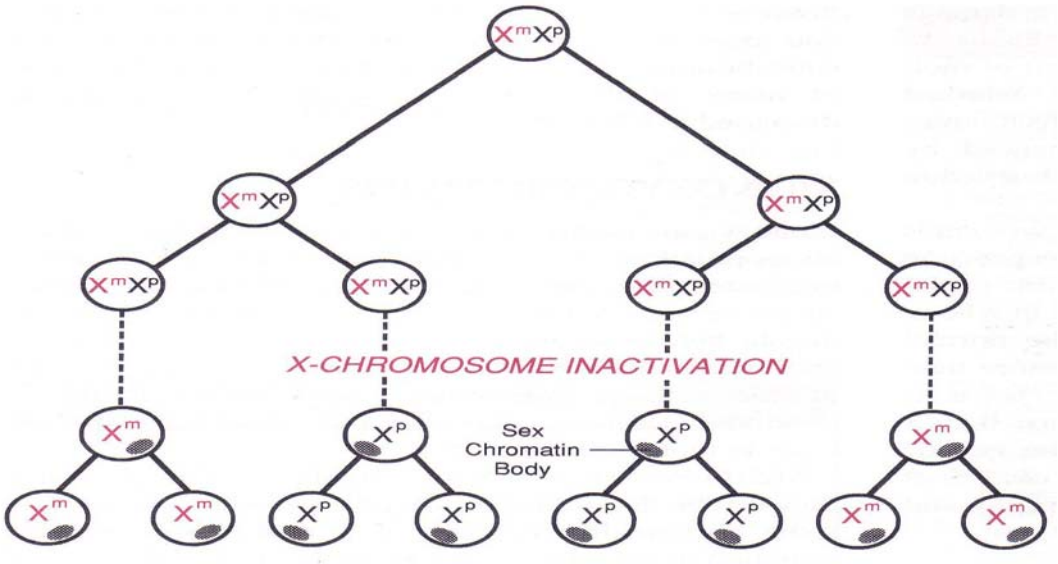
شکل ۱۱-۱ : کاریوتیپ یک مرد(XY , 46) با رنگ‌آمیزی نواربندی گیمسا (نواربندی G) . کروموزومها در مرحله پرومتافاز میتوز هستند و طبق طبقه‌بندی استاندارد مرتب و شماره‌گذاری شده است . کروموزوم‌های X و Y جداگانه نشان داده شده‌اند.

هر کروموزوم در متافاز به حداکثر تراکم خود می‌رسد، بطوریکه طول آنها در حدود $\frac{1}{1000}$ اندازه کاملاً باز شده DNA آنها است. وقتی که گسترهٔ کروموزومی رنگ می‌شود صدها نوار در کروموزومها قابل تشخیص خواهد بود. بعد از متافاز و تکمیل میتوز از تراکم کروموزومها کاسته شده و آنها بصورت شبکهٔ کروماتین در هسته اینترفازی در می‌آید . (شکلهای۳ـ۲).

غیرفعال شدن کروموزوم X

X- inactivation یا Lyonization

کاریوتیپ زن 46, XX و مرد 46, XY است. فرض کنیم ژنوتیپ زنی Aa باشد و ژن A در کروموزوم X واقع شده باشد . در رویان مونث هر دو کروموزوم X تا روز سیزدهم رویانی برای ژن A فعالند. اما در روز ۱۴-۱۳ در سلول های این رویان به طور تصادفی X-inactivation رخ می دهد، بطوریکه در بعضی از سلولها X پدری و در بعضی دیگر X مادری غیر فعال می شود (شکل ۱۲-۱).



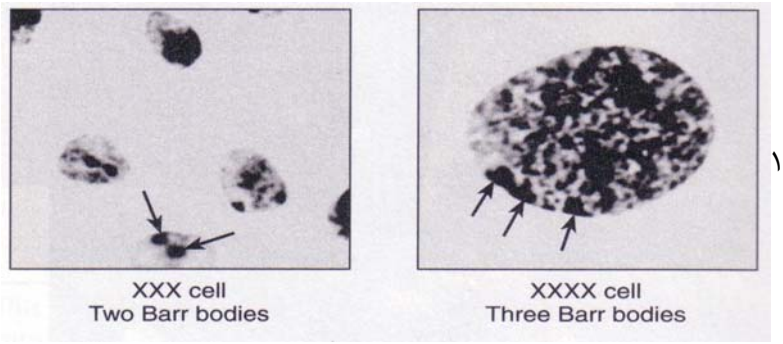
شکل ۱۲-۱

موزائیسم فنوتیپی و جسم بار Barr body

در کروموزوم X غیر فعال، حدود ۸۰ ٪ ژنها غیر فعال می شوند و حدود ۲۰٪ دیگر با توجه به تمایز بافتی فعال خواهند بود. با توجه به این مثال، ژن A جزو ۸۰٪ ژنهای کروموزوم X غیر فعال است که به صورت هتروکروماتین، Barr body را تشکیل داده است. لذا در بعضی از سلول ها الل A و در بعضی دیگر الل a غیر فعال می شود. لذا همراه X-inactivation موزایک فنوتیپی پدیدار میشود. اما اگر ژن B جزو ۲۰٪ ژنهایی بود که فعال میماند ، تمام بافتهایی که ژن B در آنها فعال میماند و هیچکدام از اللهای B و b غیر فعال نمیشوند و تمام بافت فنوتیپ Bb را نشان میداد.

Barr body هتروکروماتین موقت است که در سلولهای سوماتیک دیده می شود ولی سلول های ژرمینال فاقد آن میباشند. فعال بودن یا نبودن کروموزوم X در سلولهای سوماتیک موروثی است. یعنی اگر در سلولی به طور تصادفی X مادری غیر فعال شود تمام سلولهایی که از تقسیم میتوزی آن حاصل میشود حاوی X مادری غیر فعال هستند(شکل ۱۲-۱).

در پستانداران در هر سلول سوماتیک تنها یک X فعال میماند و بقیه بصورت هتروکروماتین یا Barr body در میایند (شکل ۱۳-۱). تعداد Barr bodies در هر سلول سوماتیک برابر است با تعداد کروموزومهای X آن منهای یک (جدول ۱-۱).



شکل ۱۳-۱

جدول ۱-۱

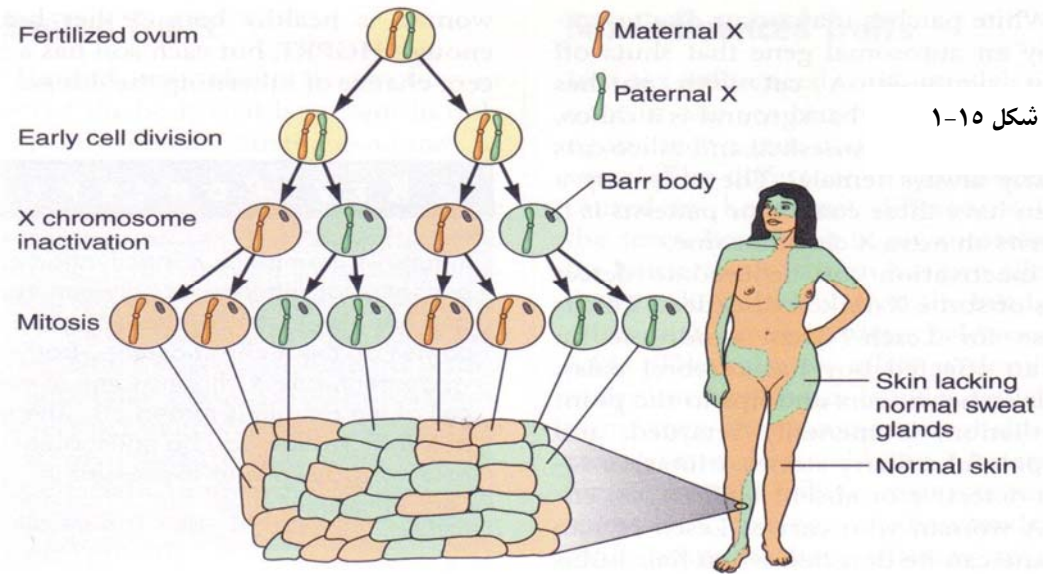
Sex Chromosomes and the Barr Body

Sexual phenotype	Karyotype	Barr bodies
Male	46,XY; 47,XYY	0
	47,XXY; 48,XXYY	1
	48,XXXY; 49,XXXYY	2
	49,XXXXY	3
Female	45,X	0
	46,XX	1
	47,XXX	2
	48,XXXX	3
	49,XXXXX	4

در گربه های Calico رنگ مو در قسمت های مختلف بدن متفاوت است و حالت موزائیک فنوتیپی دارد (شکل ۱۴-۱). در بعضی قسمت های بدن این گربه ها الل A و در بعضی قسمت های دیگر الل a فعال است. قریب به اتفاق این گربه ها ماده این اند ولی ندرتا در بین آنها گربه های XXY هم دیده می شود.

شکل ۱۴-۱

در انسان، در بیماری anhydrotic ectodermal dyplasia ، غدد عرق در سطح پوست وجود ندارند. ژن این بیماری در کروموزوم X وقع است و به همین دلیل معمولا در مردان دیده می شود. زنان هتروزیگوت حالت موزاییک فنوتیپی دارند (شکل ۱۵-۱)، یعنی بخشی از بدن آنها از نظر فنوتیپی A است و غدد عرق دارد و بخشی دیگر a است که فاقد غدد عرق است.



شکل ۱۵-۱

موزاییک فنوتیپی در مورد فعالیت G6PD نیز دیده می شود: همهء گلبولهای قرمز پسران مبتلا به فاویسم فاقد آنزیم G6PD است و در زنان هتروزایگوت Gg حدود ۵۰٪ گلبولهای قرمز دارای فعالیت G6PD و حدود ۵۰٪ دیگر فاقد فعالیت این آنزیم می باشند.

زنان برای ژن های کروموزوم x یا هموزیگوت هستند یا هتروزیگوت ، ولی مردان برای این ژنها همیزایگوت می باشند و به همین دلیل خصوصیات مغلوب درمردان بیشتر بروز می کند. برای بروز خصوصیات مغلوب در زنان معمولا آن ها باید برای الل مغلوب هموزایگوت باشند. البته گاهی اوقات پدیده غیر فعال شدن کروموزوم X حالتی را پیش می آورد که بعضی از زنان هتروزایگوت بر اثر تصادفا غیر فعال شدن الل طبیعی در اغلب سلولهایشان، ممکن است به درجاتی بیماری را نشان دهد.

X-inactivation در صورتیکه هر دو X نرمال باشند تصادفی است. ولی اگر یکی از آنها ناقص و یا درگیر یک translocation شده باشد تصادفی نخوهد بود و مطابق شکل ۱۶-۱ عمل خواهد شد و کروموزوم X نرمال فعال میماند.

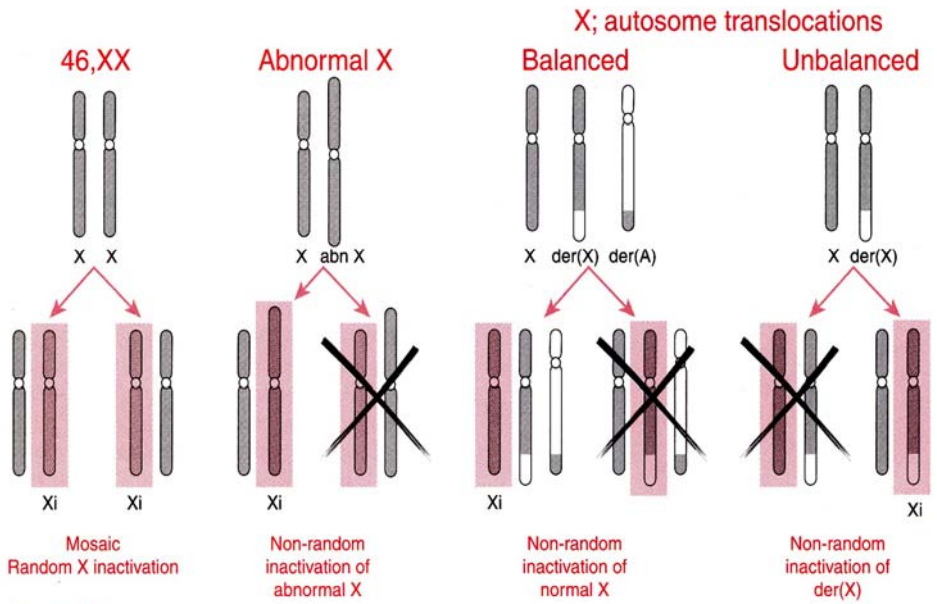


Figure 10–16. Nonrandom X chromosome inactivation in karyotypes with abnormal X chromosomes or X;autosome translocations. Normal female cells (46,XX) undergo random X inactivation; resulting tissues are a mosaic of two cell populations in which either the paternal or maternal X is the inactive X (Xi, indicated by red box). Individuals carrying a structurally abnormal X (abn X) or X;autosome translocation in a balanced or unbalanced state show nonrandom X inactivation in which virtually all cells have the same X inactive. The other cell population is inviable and/or at a growth disadvantage because of genetic imbalance and is thus underrepresented or absent. See text for further discussion. der(X) and der(A) represent the two derivatives of the X;autosome translocation.

شکل ۱۶-۱

لزوم غیر فعال شدن کروموزوم x در زنان

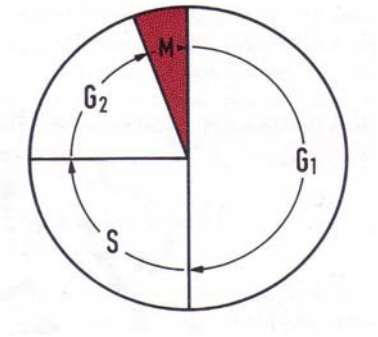
کروموزوم X کروموزم بزرگی است که حاوی تعداد زیادی ژن است، در حالیکه کروموزوم Y کوچک است و حاوی تعداد معدودی ژن است . اما می بینیم که زنان XX و مردان XY هر دو طبیعی اند. لذا این تفاوت مقدار ماده ی ژنتیکی زنان و مردان باید به نحوی جبران شود. اضافه ماده ی ژنتیکی موجود در زنان نسبت به مردان با غیر فعال شدن کروموزوم X کنار گذاشته میشود. این پدیده موجب میشود که در زنان و مردان از اغلب ژنهای موجود در کروموزم X به یک تعداد فعال باشد، و به همین دلیل به آن جبران دزی dosage compensation نیز گفته میشود.

فصل دوم

تقسیمات سلولی

تقسیمات سلولی

گونه انسان زندگی خود را از یک اووم Ovum لقاح یافته یا زیگوت Zygote آغاز می‌کند، که یک سلول دیپلوئید است و تمام سلولهای بدن (حدود 10^{14} سلول) با تقسیمات میتوزی از آن بوجود می‌آید. میتوز برای رشد و تمایز ضروری است و تنها قسمت کوچکی از سیکل سلولی را اشغال می‌کند (شکل ۱ـ۲).



شکل ۱ ـ ۲: یک چرخهٔ سلول سوماتیک: میتوز (M) کوتاهترین مرحله در این چرخه است و طی آن محتوای ژنتیکی سلول که طی مرحله S دو برابر شده است به دو نصف برابر تقسیم می‌شود. مجموع مراحل G1 ، S و G2 اینترفاز نامیده می‌شود.

بلافاصله بعد از تقسیم میتوز، سلولها وارد یک مرحله بعد میتوزی بنام G1 می‌شود. بعضی سلولها مدتهای طولانی، روزها یا حتی سالها در مرحله G1 باقی می‌مانند و بعضی دیگر این مرحله را در عرض چند ساعت طی می‌کنند.

اگرچه مکانیسمهای مولکولی اداره کننده مدت چرخه سلولی و طول زمان میتوز بخوبی معلوم نشده است، ولی پیشرفت و اتفاقات چرخه سلولی بوسیله یکسری نقاط بازرسی checkpointsکنترل می‌شود که طول زمان هر مرحله میتوز را معین می‌کند (شکل۱۰-۲). از حساسترین نقاط بازرسی، نقاط بازرسی دقت سنتز DNA و همینطور تجمع و اتصال یک شبکه میکروتوبولی کارآمد برای تسهیل حرکت کروموزومها می‌باشد. اگر آسیب به ژنوم جدی باشد و این آسیب توسط عوامل بازرسی تشخیص داده شود ، این عوامل بازرسی مانع پیشرفت چرخه سلولی می شود تا ترمیم صورت بگیرد و یا اگر آسیب فوق‌العاده و غیر قابل ترمیم باشد، سلول را به سوی مرگ برنامه‌ریزی شده یا آپوپتوز apoptosis هدایت می‌کند.

مرحله بعد از G1، مرحله S است که طی آن سنتز DNA صورت می‌گیرد. در طی این مرحله هر کروموزوم که در مرحله G1 حاوی یک مولکول DNA دو رشته‌ای بود همانند سازی می‌کند و تبدیل به یک کروموزوم می‌شود که از دو کروماتید خواهری sister chromatids (شکل ۲-۱ و ۳-۲) تشکیل شده و هر یک از آنها یک کپی از مولکول DNA دو رشته‌ای اولیه را دارد. دو کروماتید خواهری در ناحیه سانترومر centromere بهمدیگر متصل شده‌اند . این ناحیه از DNA بهمراه تعدادی پروتئین اختصاصی تشکیل کینتوکور kinetochore را می‌دهد. کینتوکور محل اتصال کروموزوم به میکروتوبولهای دوک تقسیم است. منطقهٔ سانترومر در آخرین لحظات مرحله S همانندسازی می‌کند.

پس از مرحله S و دو برابر شدن DNA ، سلول وارد مرحله G2 می‌گردد. طی این مرحله سلول با تولید RNA و پروتئین، به آرامی بزرگتر می‌گردد بطوریکه در انتهای G2 محتوای سلول تقریباً دو برابر شده و سلول وارد میتوز می‌شود .

مراحل G1 ، S و G2 با هم اینترفاز را تشکیل می‌دهند. در سلولهای در حال تقسیم انسان، مرحله اینترفار ۱۶ تا ۲۴ ساعت طول می‌کشد در حالیکه میتوز در عرض ۱ تا ۲ ساعت انجام می‌شود (شکل ۱ ـ ۲).

طول مدت سیکل سلولی در سلولهای بافتهای مختلف متفاوت است. بعضی از انواع سلولها مثل نورونها و گلبولهای قرمز بعد از اینکه تمایز یافتند. دیگر تقسیم نمی‌شوند و از مرحله G1 وارد G0 می‌شوند و تا مرگ در آن مرحله متوقف می‌شوند (شکل ۲-۲). بعضی سلولها مثل سلولهای کبدی ممکن است وارد مرحله G0 بشوند اما در شرایط خاصی از این مرحله خارج شده و مجدداً وارد مرحله G1 شده و به سیکل سلولی خود ادامه دهند.

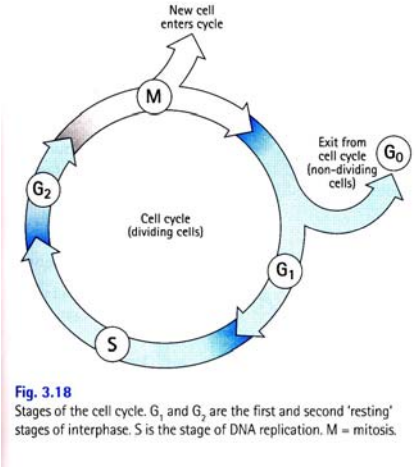


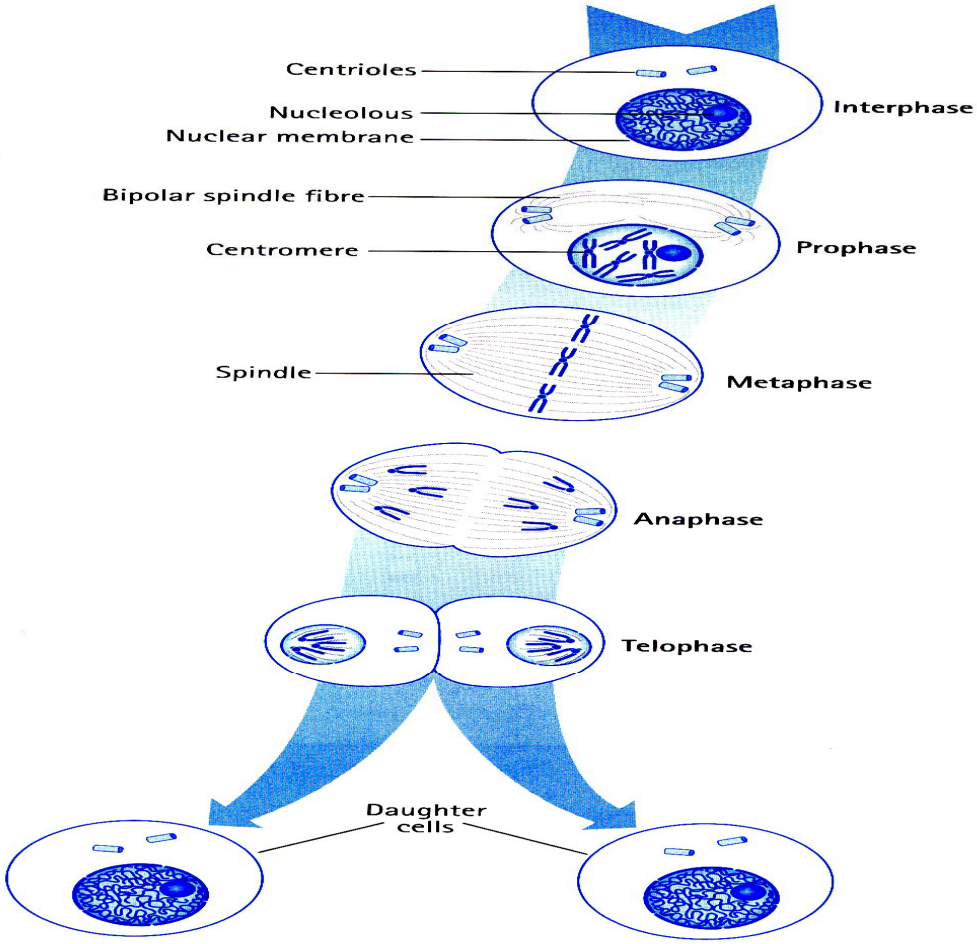
Fig. 3.18
Stages of the cell cycle. G_1 and G_2 are the first and second 'resting' stages of interphase. S is the stage of DNA replication. M = mitosis.

شکل ۲-۲

میتوز Mitosis

در سلولی که قرار است تقسیم شود تشکیلات وسیعی بوجود می‌آید تا اطمینان حاصل شود که به هر یک از دو سلول دختر، یک سری کامل از اطلاعات ژنتیکی منتقل شود : یعنی یک کروماتید خواهری از هر یک از کروموزومها به هر سلول دختر منتقل می‌شود (شکل ۳ ـ ۲). فرآیند توزیع یک کپی از هر کروموزوم به هر سلول دختر تفکیک کروموزومی chromosome segregation نامیده می‌شود. اهمیت دقت این فرآیند با مشاهده ارتباط بین خطاهای میتوزی در توزیع کروموزومها و پیدایش برخی سندروم های کروموزومی و بافتهای سرطانی روشن می‌شود. روند میتوز پیوسته است اما پنج مرحله مشخص پروفاز، پرومتافاز، متافاز، آنافاز و تلوفاز در آن دیده می‌شود.

پروفاز Prophase: تقسیم میتوز با مرحله پروفاز آغاز می‌شود و با متراکم شدن تدریجی کروموزومها، ناپدید شدن هستک‌ها و پیدایش رشته‌های دوک تقسیم میتوزی mitotic spindle مشخص می‌شود (شکل۳-۲). یک جفت مرکز سازمان دهنده میکروتوبولی که سانتروزوم centrosomes نامیده می‌شوند، کانونهائی را تشکیل می‌دهند بنام سانتریول centriole . سانتریولها در قطبین سلول جای می‌گیرند و سازماندهی میکروتوبولها را هدایت می کنند .



شکل ۳-۲

پرومتافاز Prometaphase : وقتی کـه غـشا هـسته از بـین مـی‌رود و کروموزومهـا در سـلول پراکنـده می‌گردند و میکروتوبولهای دوک تقسیم به کینتوکور کروموزوم ها متصل می‌شوند، سلول وارد مرحلـه پرومتافـاز می‌شود . در این مرحله کروموزومها شروع به حرکت به طرف اسـتوای سـلول مـی‌کننـد (فرآینـدی کـه تجمـع congression نامیده می‌شود) . در این مرحله باز هم کروموزومها متراکم‌تر می‌شوند (شکل۴-۲) ولی هنـوز به نهایت تراکم خود نمی‌رسند، لذا تعداد بندهای کروموزومی در این مرحله بیـشتر از مرحلـه متافـاز اسـت. ایـن تفاوت بندینگ در شکل ۴-۲ دیده می شود.

متافاز Metaphase: در متافاز کروموزومها که به حداکثر تراکم خود رسیده اند، بوسیله نیروی اعمال شـده توسط میکروتوبولهای در صفحه استوائی سلول مستقر و مرتب شده اند (شکل۳-۲). کروموزومها در مرحله متافاز و پرومتافاز میتوز قابل بررسی و آنالیز می باشند .

شکل ٤-٢:
کاهش تعداد بندهای کروموزوم X از پروفاز، پرومتافاز تا متافاز.

آنافاز Anaphase: در این مرحله کروماتیدهای خواهری از ناحیه سانترومر از یکدیگر جدا شده و به عنوان کروموزومهای دختری ، به قطبین سلول حرکت می کنند (شکل۳- ۲).

تلوفاز Telophase: در تلوفاز به دور کروموزومهای موجود در هر قطب سلول غشاء هسته تشکیل می شود و هر هسته به تدریج ظاهر مرحله اینترفاز خود را می‌یابد (شکل ۳-۲).

برای تکمیل فرآیند تقسیم سلولی پس از تلوفاز ، سیتوپلاسم بوسیله فرآیندی که **سیتوکینز** cytokinesis نامیده می‌شود تقسیم می‌شود (شکل۳-۲) و دو سلول دختر کامل بوجود می آید که هر یک دارای هسته‌ای حاوی کلیه اطلاعات ژنتیکی سلول مادر هستند.

میوز Meiosis

میتوز تقسیم سلول سوماتیک است که با آن بدن رشد می‌کند و تمایز می‌یابد و سلولهای مرده و آسیب‌دیده را جایگزین می‌کند. نتیجه تقسیم میتوز دو سلول دختر است که از نظر کروموزومی و ژنی با سلول اجدادی یکسان هستند (2n). میوز شکل خاصی از تقسیم سلولی است که بوسیله آن سلولهای ژرمینال دیپلوئید تبدیل به گامت‌های هاپلوئید می‌شوند. میوز دارای یک دوره سنتز DNA است که دو دوره تفکیک کروموزومی و تقسیم سلول را در پی دارد (شکلهای ۵ـ۲ و۶-۲). سلولهای ژرمینال خود از سلول تخم در پی یک سری تقسیمات میتوزی بوجود آمده‌اند .و دست‌خوش میوز می‌شوند .

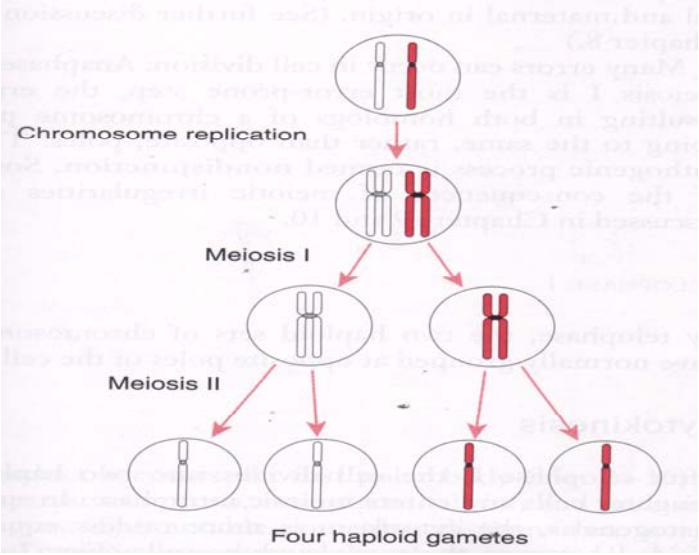
تقسیم میوز تنها یکبار در سلولهای ژرمینال رخ می‌دهد. نتیجه میوز تولید سلولهای جنسی (گامتها gametes) می‌باشد که هر کدام تنها ۲۳ عدد کروموزوم دارند: شامل یکی از هر نوع اتوزوم و یک کروموزوم جنسی (کروموزوم X یا Y) ، اختلال در ساختمان و یا تعداد در کروموزومها که از نظر بالینی مهم است ، می‌تواند هم در سلولهای سوماتیک و هم در سلولهای ژرمینال بر اثر اشتباه در تقسیم سلولی رخ دهد..

گامتهای مرد و زن تاریخچه متفاوتی دارند . اما اگر چه زمان تقسیمات آنها متفاوت می‌باشد، ولی توالی وقایع آنان یکسان است. دو تقسیم متوالی میوزی، میوز I و میوز II نامیده می‌شود. میوز I تقسیم کاهشی reduction division نیز نامیده می‌شود . در این تقسیم در پی جفت شدن کروموزومهای همتا در پروفاز و جدا شدن آنها در آنافاز میوز I، تعداد کروموزومها از دیپلوئید به حالت هاپلوئید درمی‌آید !! کروموزومهای X و

Y اگر چه همتا نیستند، اما قطعات همتائی در انتهای بازوی بلند و کوتاه خود دارند که در این نواحی با هم جفت می‌شوند .

میوز I از این جهت هم قابل ملاحظه است که پدیدهٔ نوترکیبی Recombination (کراسینگ‌اور crossing over میوزی) در آن رخ می‌دهد (شکل ۶-۲). در این فرآیند، قطعات همتای DNA بین کروماتیدهای همتا با هم مبادله می‌شوند تا هیچیک از گامت‌های تولید شده در میوز مشابه همدیگر نباشند تا در جامعه تنوع ژنتیکی بیشتری بوجود آید .

کراسینگ اور در به هم‌پیچیدگی و درگیری فیزیکی (asmachi) دو کروموزوم همتا تا مرحله متافاز I و تفکیک صحیح آنها در آنافاز I نقش مهمی دارد. نارسائی در نوترکیبی صحیح می‌تواند منجر به جدائی زودرس و عدم تفکیک صحیح کروموزومها در میوز I گردد، که یک علت برای فراوانی ناهنجاریهای کروموزومی مثل سندرم‌دان می‌باشد .



شکل ۵ـ ۲: نمایش ساده شده میوز ، شامل یک دوره همانندسازی DNA، که دو دوره تفکیک کروموزومی را در میوز I و میوز II در پی دارد.

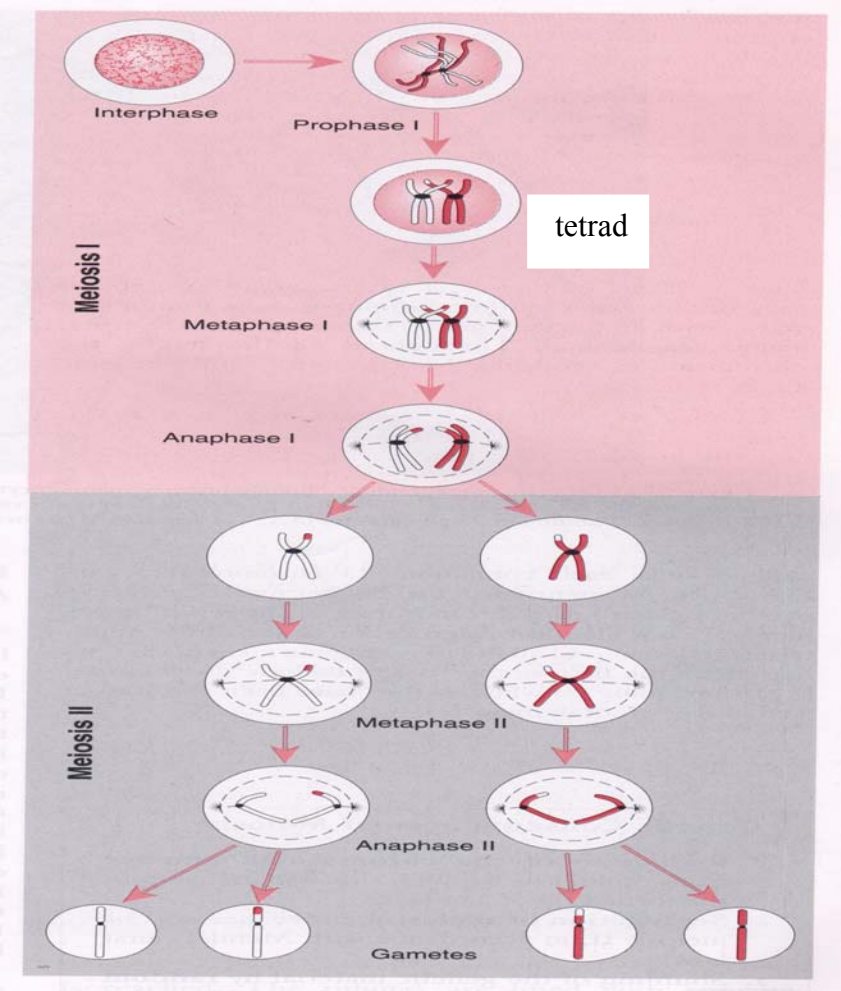
میوز I : مرحله‌ای نسبتاً طولانی و پیچیده ای شامل مراحل زیر است (شکل ۶-۲):

پروفاز I : پروفاز میوز I فرآیند پیچیده‌ای است که نتایج ژنتیکی مهمی در پی دارد. پروفاز I مراحل مختلف و مشخصی به شرح زیر دارد :

لپتوتین Leptotene: کروموزومها که در فاز S همانندسازی کرده‌اند، بصورت رشته‌های نازکی که شروع به متراکم شدن کرده‌اند قابل مشاهده هستند. در این مرحله دو کروماتید خواهری هر کروموزوم چنان در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند که از یکدیگر قابل تفکیک نیستند و بصورت دو تایی دیده نمی‌شوند.

زیگوتین Zygotene . در این مرحله، کروموزومهای همتا در تمام طول خود نقطه به نقطه با هم جفت می‌شوند، پدیده جفت شدن یا سیناپس Synapsis معمولاً خیلی دقیق است و توالی‌هائی از DNA که مسئول یک عمل هستند (مثلا یک ژن) در طول کروموزوم در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند. بررسیهای میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که در این مرحله کروموزومهای همتا در طول خود بوسیله یک ساختمان روبانی شکل پروتئینی بنام کمپلکس سیناپسی Synaptonemal complex بهمدیگر متصلند. کمپلکس سیناپسی برای فرآیند نوترکیبی ضروری است.

پاکیتین Pachytene: در این مرحله سیناپس بین کروموزومهای همتا کامل می‌شود و هر جفت از



شکل ۶ -۲: نمایش دیاگرامی میوز و نتایج آن. یک جفت کروموزوم و یک کراسینگ‌اور نشان داده شده است تا منجر به چهار گامت متفاوت شود. کروموزومها در طی اینترفاز همانندسازی می‌کنند و همین که سلول وارد پروفا میوز I می‌شود، شروع به متراکم شدن می‌کند. در میوز I کروموزومها سیناپس کرده و دچار نوترکیبی می‌شوند . کیاسماتاً chiasmata در کروماتیدهای همتا در متافاز قابل مشاهده است و سانترومرهای همولوگ به قطبین کشیده می شوند . مبادله بین همولوگها بر اثر کراسینگ‌اور بصورت تعویض قطعات سیاه و سفید دیده می‌شود. بعد از تکمیل میوز I و سیتوکینز، میوز II با تقسیمی شبیه به میتوز رخ می‌دهد که در آن سانترومرهای خواهری جدا شده و به طرف قطبین مخالف (آنافاز II)حرکت می‌کنند و نهایتاچهار محصول هاپلوئیدی تولید می‌شود .

کروموزومهای همتا بصورت یک بی‌والانت bivalent ظاهر می‌شود که به آن تتراد Tetrad نیز می‌گویند (حاوی چهار کروماتید). کراسینگ‌آور در پاکی تن رخ می‌دهد و کمپلکس سیناپسی شروع به تخریب می‌کند. کراسینگ اور باعث تبادل قطعات کروموزومی بین همولوگها و ایجاد نوترکیبی می شود .

دیپلوتین Diplotene: بعد از نوترکیبی، کمپلکس سیناپسی ناپدید می‌شود، و در این مرحله دو جزء هر بی‌والانت شروع به جدا شدن از همدیگر می‌کنند. اما چهار کروماتید هر بی‌والانت در نقطه یا نقاطی روی

یکدیگر قرار میگیرند و کیاسما Chiasma را بوجود می آورند (شکل ۶-۲) . تعداد متوسط کیاسماها در اسپرماتوسیت انسان در حدود ۵۰ عدد یعنی چندین کیاسماها برای هر بی‌والانت می‌باشد. در اوایل این مرحله محل هر کیاسما تقریباً معرف محل کراسینگ‌اور می‌باشد.

دیاکینز: در این مرحله کروماتیدها مشخص‌تر می‌شوند و کیاسماها بتدریج طی پدیدهٔ Terminalization از سانترومر دور و به انتهاهای بازوهای کروموزوم نزدیکتر می‌شوند.

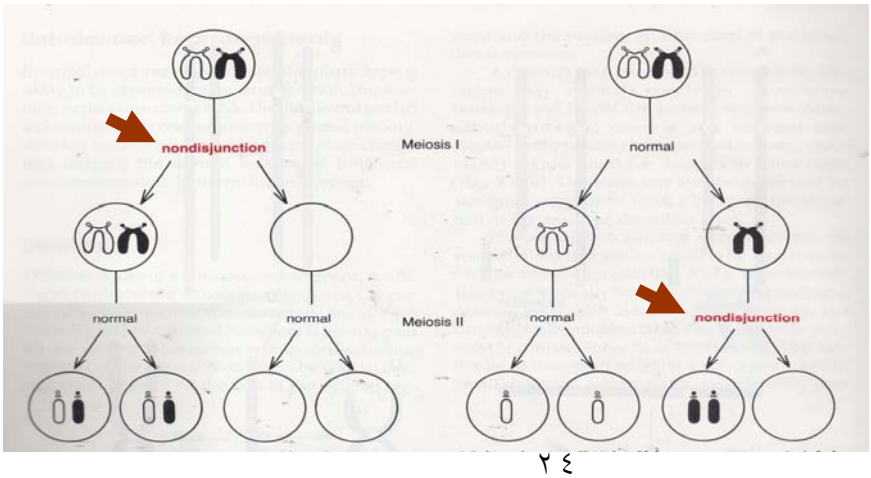
متافاز I

مانند میتوز، غشاء ناپدید شده، دوک تقسیم تشکیل می‌شود و تترادها در استوای سلول مستقر می‌شوند بطوریکه سانترومرهای همولوگها بطرف قطبین جهت می‌گیرد.

آنافاز I

دو عضو هر بی‌والانت از هم جدا می‌شوند و هر جفت کروماتید ـ که ممکن است براثر کراسینگ‌اور دیگر خواهری نباشند ـ بوسیله دوک تقسیم بطرف قطبین کشیده می‌شوند. به این فرآیند اصطلاحاً جدا شدن صحیح کروموزومی disjunction می‌گویند. بنابراین تعداد کروموزومها نصف می‌شود و هر محصول سلولی میوز I، دارای تعداد کروموزومهای هاپلوئید است. البته هر کروموزوم در این مرحله متشکل از دو کروماتید است و از نظر محتوای ژنتیکی دیپلوئید است بی والانتهای مختلف بطور مستقل از هم جدا می‌شوند و در نتیجه، کروموزومهای مادری و پدری بصورت اتفاقی از هم تفکیک می‌شوند (independent assortment) و تعداد حالات احتمالی ترکیبات کروموزومی برای ۲۳ جفت کروموزوم 2^{23} عدد (بیش از ۸ میلیون) می‌باشد. در حقیقت، انواع گامتهای که یک فرد می تواند تولید کند (بعلت وقوع کراسینگ‌اور در هر تتراد) ، عملاً بسیار بیشتر از 2^{23} است. زیرا بر اثر کراسینگ اور هر کروماتید دارای قطعاتی از هر یک از زوج کروموزومهای والدینی می‌باشد.

در طی تقسیم سلولی خطاهای فراوانی می‌تواند رخ دهد و آنافاز میوز I پرخطاترین مرحله میوز است، مثلاً ممکن است دو کروموزوم همتا، به طرف یکی از قطبین بروند. به این فرآیند پاتولوژیک عدم جدا شدن صحیح کروموزومی nondisjunction می‌گویند که مولد اغلب ناهنجاریهای کروموزومی تعدادی در انسان مثل سندرم‌داون می‌باشد.



شکل ۷-۲: محصولات مختلف وقوع نادیسجانکشن در میوز I (سمت چپ) و میوز II (سمت راست) در اسپرماتوژنز: اگر اشتباه در میوز I رخ دهد، نیمی از گامتها دارای دو کروموزوم ۲۱ و نیم دیگر فاقد کروموزوم ۲۱ می‌باشند. ولی اگر در میوز II رخ دهد، دو گامت‌طبیعی، یکی حاوی دو کروموزوم ۲۱ و دیگری فاقد کروموزوم ۲۱ می‌باشد.

تلوفاز I

در تلوفاز، دو سری جفت کروماتید در دو قطب مخالف سلول جای گرفته‌اند و بـدور کروموزومهـای واقـع در هـر قطب غشاء هسته ایجاد می‌شود.

سیتوکینز

بعد از تلوفاز I، سلول به دو سلول دختری بنام اسپرماتوسیت ثانویه تقسیم شده و وارد اینترفاز میوزی مـی‌شـود. در اسپرم‌زایی سیتوپلاسم تقریباً بطور مساوی بین این دو سلول دختری تقـسیم مـی‌شـود (شـکل ۶-۲)، امـا در تخمک‌زائی یکی از سلولهای دختری (اووسیت ثانویه) تقریباً تمام سیتوپلاسم را دریافت می‌کند و سـلول دیگـر تبدیل به اولین جسم قطبی می‌شود (شکل ۸ ـ ۲). اینترفاز میوزکوتاه است و میوز II فوراً شروع می‌شـود. نقطـه قابل توجهی که این اینترفاز میوزی را از اینترفاز میتوزی متمایز می‌کند این اسـت کـه در بـین اولـین و دومـین تقسیم میوزی فاز S وجود ندارد (یعنی DNA سنتز نمی‌شود).

میوز II

میوز II در پی میوز I و بدون همانندسازی DNA صورت می‌گیرد و مانند یک میتـوز معمـولی، کروماتیـدها از یکدیگر جدا شده و یک کروماتید از هر کروموزوم به هر سلول دختر منتقل می شود . میوز II نیز دارای مراحـل پروفاز ، متافاز ، آنافاز و تلوفاز است و محصول نهایی آن چهار سلول هاپلوئیـد اسـت کـه هـر یـک حـاوی ۲۳ کروموزوم است (شکل ۶ـ ۲). البته به علت دسته‌بندی مستقل کروموزومهـا و همچنـین بعلـت کراسـینگ‌اور در میوز I ، ژنوم سلولهای حاصل از نظر اطلاعات ژنتیکی متفاوت می‌باشند. تفکیـک الـل‌هـای مختلـف پـدری و مادری هر یک از ژنها، در طی اولین یا دومین تقسیم میوزی صورت می‌گیرد و به ترتیب به عدم وقوع یـا وقـوع کراسینگ‌اور در نقطه ای بین آن ژن و سانترومر در میوز I بستگی دارد. به عبـارت دیگـر اگـر کراسـینگ اور در طی پروفاز I اتفاق نیافتد الل های مختلف پدری و مادری در میوزII از یکدیگر جدا میشوند.

اهمیت ژنتیکی میوز

۱ـ کاهش تعداد کروموزومها از دیپلوئید به هاپلوئید یک مرحله ضروری برای تشکیل گامتهاست.

۲ـ تفکیک اللها، در میوز I یا میوز II طبق قانون اول مندل و انتقال یک نسخه از هر ژن (الل) به هر گامت

۳ـ نوترکیبی مواد ژنتیکی بعلت انتقال تصادفی کروموزومهای همتای پدری و مادری طبق قانون دوم مندل

٤ـ نوترکیبی بیشتر مواد ژنتیکی بوسیله کراسینگ‌اور که وقوع آن برای تأمین جدا شدن صحیح کروموزومی نیـز ضروری می‌باشد.

اهمیت بیولوژیکی میوز در حفظ ثبات تعداد کروموزومی از یک سلول به سلول فرزند و از یک نسل بـه نسل بعدی می‌باشد. ارتباط پزشکی با این فرآیندها در خطاهائی است که در تقسیم سـلول رخ دهـد و منجـر بـه تشکیل فردی یا سلولهایی با تعداد کروموزومهای غیرطبیعی شود.

میوز با عدم جدا شدن صحیح کروموزومی nondisjunction، بخصوص در تخمک‌زائی، شـایعترین مکانیسم جهشی در گونه انسان است که مسئول جنین‌هایی با کروموزومهای غیرطبیعی در حداقل چندین درصد

از تمام حاملگی‌ها است. در بین حاملگی‌هائی که تا پایان دوره خود بقا می‌یابد، ناهنجاریهای کروموزومی یکی از علت‌های نقص‌های مادرزادی، مرگ جنین و عقب ماندگی ذهنی هستند.

میتوز نیز با عدم جدا شدن صحیح کروموزومی در ایجاد بیماریهای ژنتیکی سهیم می‌باشد. عدم جدا شدن صحیح کروموزومی بلافاصله بعد از لقاح در جنین در حال تکامل می‌تواند منجر به موزائیسم کروموزومی شود که می‌تواند سندرمهائی مانند ترنر یا داون را ایجاد کند.

گامت‌زائی

سلولهای ژرمینال اولیه در طی ششمین هفته تکامل جنینی ، از آندودرم کیسه زرده به نواحی تناسلی مهاجرت می‌کنند و با مشارکت با سلولهای سوماتیک، گنادهای اولیه را تشکیل می‌دهند . گناهای اولیه براساس ترکیب کروموزومی سلولها (XY یا XX) ممکن است بصورت بیضه یا تخمدان تمایز یابند . تخمک‌زائی homogametic و اسپرم‌زائی heterogametic هر دو محصول میوزند اما در جزئیات و زمان اختلافات مهمی دارند که می‌تواند دارای نتایج ژنتیکی و بالینی متفاوتی برای فرزندان باشد. میوز در افراد مؤنث یکبار در اوایل دوران جنینی و در تعداد معدودی از سلولها شروع می‌شود. در مقابل میوز در افراد مذکر پس از بلوغ جنسی در بسیاری از اسپرماتوسیتها شروع شده و در سرتاسر زندگی یک مرد ادامه می‌یابد.

مطالعه میوز انسان بصورت مستقیم بسیار مشکل است. در زنان، بخشی از مراحل میوز در تخمدان جنین صورت می‌گیرد که دسترسی به آن بسیار مشکل است. ولی بررسی مراحل بعد که پس از لقاح صورت می‌گیرد آسانتر است. دسترسی به سلولهای بیضه‌ای برای مطالعه میوز در مردان سهل‌تر است، زیرا بیوپسی بیضه در بررسی عقیمی مردان در بسیاری از کلینیک‌ها انجام می‌شود.

اسپرم‌زائی

بعد از بلوغ جنسی، اسپرم sperm (اسپرماتوزوآ spermatoza) در لوله‌های منی‌ساز بیضه مرد تشکیل می‌شود. لوله‌های منی ساز بوسیله اسپرماتوگونی‌هائی spermatogonia که در مراحل مختلف تمایز قرار دارند پوشیده شده‌اند. این سلولها پس از یک سری تقسیمات میتوز متوالی از سلولهای ژرمینال بوجود آمده‌اند. آخرین محصول تقسیمات میتوزی سلولهای ژرمینال اسپرماتوسیت اولیه primary spematocyte است، که پس از میوز I دو اسپرماتوسیت ثانویه secondary spermatocytes را تولید کند. اسپرماتوسیت ثانویه بسرعت دستخوش میوز II می‌گردد و هر کدام دو اسپرماتید spermatids هاپلوئید تشکیل می‌دهند. پس از تغییراتی بصورت اسپرم تمایز می‌یابند. در انسان تمام فرآیند اسپرماتوژنز ۶۴ روز طول می‌کشد .

تخمک‌زائی

برخلاف اسپرم‌زائی که پس از بلوغ شروع میشود، تخمک‌زائی تقریباً در موقع تولد تکمیل شده است. این فرآیند در شکل ۱۰ ـ ۲ نشان داده شده است. تخمک از تکامل اووگونی oogonia بوجود می‌آید. اووگونی‌ها سلولهائی در بافت قشری تخمدان هستند که بعد از حدود ۳۰ تقسیم میتوزی از سلولهای

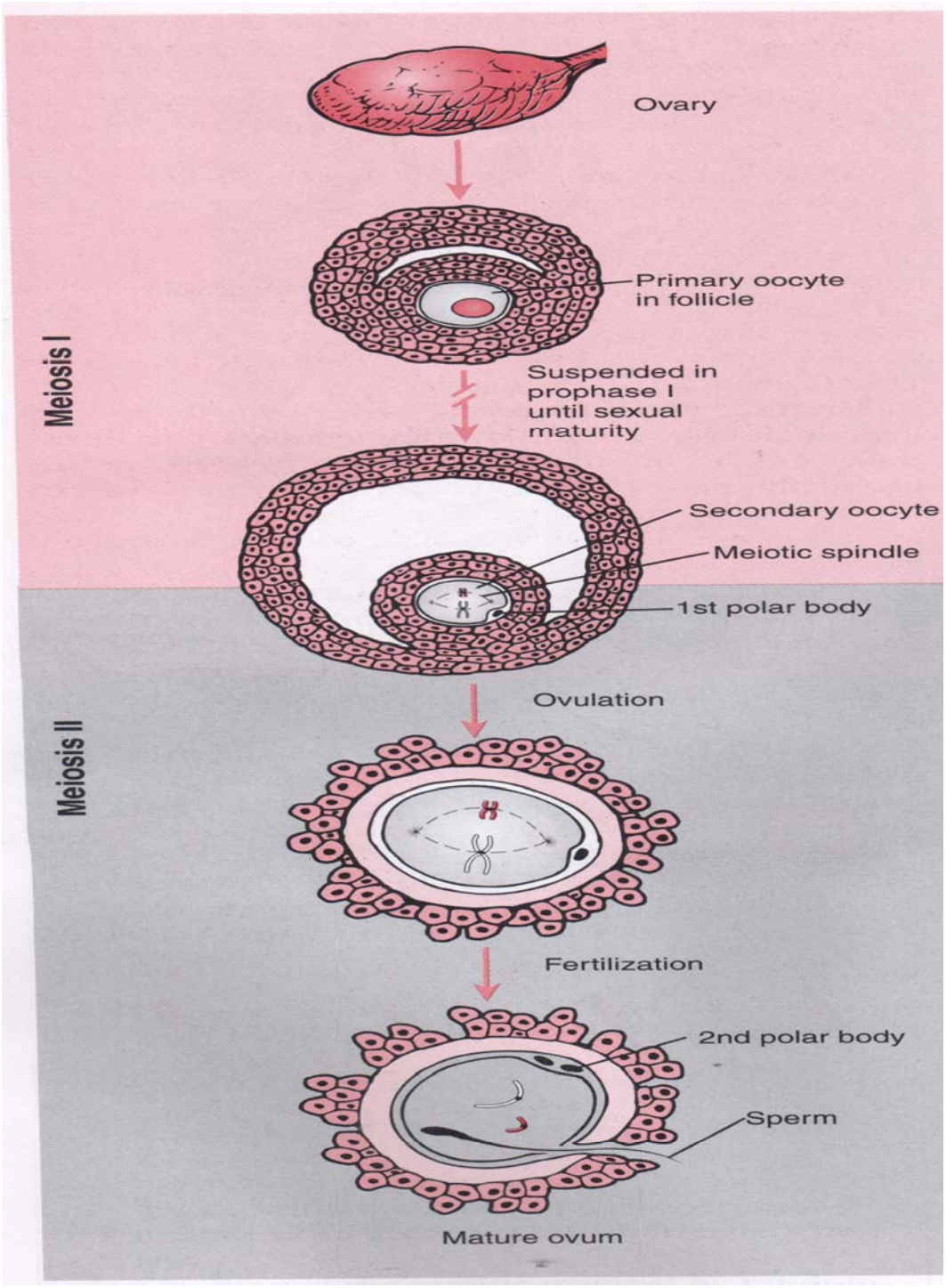
ژرمینال اولیه (primordial germ cells) بوجود آمده‌اند. در حدود سومین ماه تکامل جنینی، اووگونی‌های جنین شروع به تکامل می‌کنند و اووسیت اولیه primary oocytes را تشکیل می‌دهند. در حدود ۲/۵ میلیون اووسیت در زمان تولد وجود دارد، اما اکثر آنها تحلیل رفته و در نهایت تنها در حدود ۴۰۰ عدد از آنها تا سنین باروری باقی می‌ماند. در زمان تولد اووسیت‌های اولیه همگی به مرحله پروفاز I می‌رسند و آنهائی که تحلیل نمی‌روند، سالها در این مرحله باقی می‌مانند.

بعد از اینکه زن به بلوغ جنسی رسید، فولیکول بالغ می‌شود و اوولاسیون رخ می‌دهد. هر اووسیت اولیه بسرعت میوز I را تکمیل کرده و یک اووسیت ثانویه حاوی اغلب سیتوپلاسم و ارگانهای آن و اولین جسم قطبی را بوجود می آورد . میوز II بلافاصله شروع می‌شود و در طی اوولاسیون به مرحله متافاز II می‌رسد و در آن مرحله متوقف می شود تا مراحل بعدی میوز II را پس از لقاح تکمیل نماید .

لقاح

فرآیند لقاح معمولاً در داخل لوله‌های رحمی انجام می گیرد . اگر چه ممکن است تعداد زیادی اسپرم وجود داشته باشد، با این حال وقتی که یک اسپرم وارد اووم می‌شود، یک سری وقایع بیولوژیکی بکار می‌افتد که از ورود اسپرمهای بعدی جلوگیری می‌کند.

تکمیل میوز II و تشکیل دومین جسم قطبی بعد از لقاح صورت می‌گیرد (شکل۸ ـ ۲). پس از لقاح، هسته های هاپلوئید (هسته های تخمک و اسپرم) تشکیل پیش هسته‌ها Pronuclei را می‌دهند که هر کدام بطور مستقل اقدام به همانندسازی DNA خود می‌کنند. این پیش هسته‌های دیپلوئید سپس متحد شده و هسته سلول تخم یا زیگوت را بوجود می‌آورند. زیگوت فوراً مبادرت به تقسیم میتوز می‌کند و از آن دو سلول دختر دیپلوئید بوجود می‌آید و از این طریق روند تکامل جنینی آغاز می‌شود. اگر چه تکامل جنینی با تشکیل سلول تخم شروع می‌شود (آبستنی)، در پزشکی طول مدت آبستنی معمولاً از تاریخ آخرین عادت ماهانه مادر که بطور متوسط در حدود ۱۴ روز قبل از آبستنی است محاسبه می‌گردد.


Ovary
Primary oocyte
in follicle
Suspended in
prophase I
until sexual
maturity
Meiosis I
Secondary oocyte
Meiotic spindle
1st polar body
Ovulation
Meiosis II
Fertilization
2nd polar body
Sperm
Mature ovum

شکل ۸-۲

مرگ سلولی (اپوپتوز Apoptosis)

برخی از سلولهای بدن مرتب در حال تقسیم شدن هستند ولی اغلب دیگر سلولها تنها در صورت لزوم از فاز GO خارج شده و تقسیم می‌شوند، در غیراینصورت پس از مدتی دچار مرگ می‌شوند. برای تکامل طبیعی و حفظ سلامتی مرتب تعداد سلولهای سوماتیک خاصی توسط میتوز افزایش می‌یابد و همچنین برای ایجاد شکل طبیعی اندامهای مختلف بدن طی تکامل و سپس حفظ سلامتی ، سلولهایی باید حذف شوند. همانطور که یک مجسمه‌ساز برای ساختن مجسمهٔ موردنظرش باید هنرمندانه از نقاط و نواحی خاصی اقدام به حذف بخشی از گل یا خمیر نماید و به نواحی دیگری اضافه کند، در تکامل جنین و تشکیل اندامها نیز چنین روندی حاکم است. مثلاً تشکیل یک پا از پیدایش یک بافت مثلثی شکل بدون انگشت شروع می‌شود و سپس در طول تکامل از طریق مرگ سلولهای معینی ، انگشتان ظاهر می‌شوند (شکل ۹-۲). حذف سلولهای اضافی از طریق نوعی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده بنام اپوپتوز انجام می‌شود (شکل ۱۱-۲). این پدیده لازمه پیدایش همه اندامها از جمله حفره های بدن مانند روده ها است .

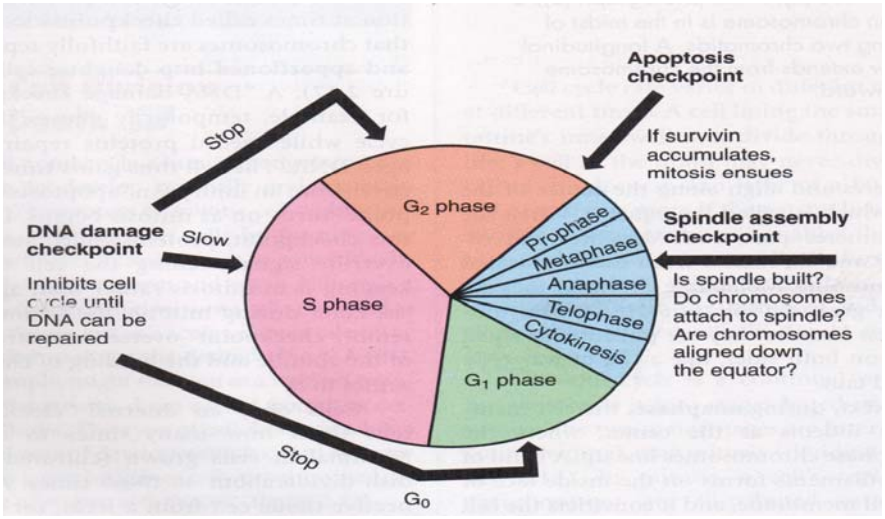
اپوپتوز یک پدیدهٔ طبیعی است که تحت کنترل دقیق عوامل ژنتیکی قرار دارد و دوش به دوش میتوز در تمام دوران حیات فرد صورت می‌گیرد. ژنهای متعددی در کنترل اپوپتوز دخالت دارند و وقوع جهش در ژنهای کنترل اپوپتوز، می‌تواند متناسباً موجب پیدایش کودکانی با نقصهای مادرزادی خاصی مثل انگشتان بهم چسبیده (Synductyly) یا کودکانی با مقعد بسته (imporforated anus) می‌شود. طی تقسیمات میتوز متوالی، از زایگوت تریلیونها سلول بوجود می‌آید که همزمان و همراه با اپوپتوز موجب تکامل و پیدایش اندامها و بافتهای مختلف می‌شود.

شکل ۹-۲

تعداد و سرعت تشکیل سیکل سلولی و میتوز تحت کنترل دقیقی قرار دارد، بطوریکه کاهش شدید میتوز، می‌تواند با عدم ترمیم زخمها یا حداقل تأخیر در این روند ، حیات فرد را به خطر اندازد یا در صورت

میتوزهای بسیار زیاد، در فرد توده‌های غیرطبیعی ایجاد شود و از این طریق حیات فرد را بخطر اندازد. لذا سلامتی فرد حاصل تعادل بین میتوز و اپوپتوز است که تکامل و ترمیم را از بدو حیات تا مرگ تضمین می‌کنند.

در طول سیکل سلولی نقاط بازرسی (Checkpoints) متعددی وجود دارد تا صحت همانندسازی DNA، تقسیم کروموزومها و سرعت سیکل سلولی را کنترل و تنظیم نماید (شکل ۱۰-۲). مثلاً در «نقطهٔ بازرسی صدمه به DNA»، در صورت صدمه جدی به DNA، از پیشرفت ادامهٔ سیکل سلولی تا ترمیم DNA جلوگیری می‌شود. در طی میتوز، در «نقطهٔ بازرسی تشکیل دوک تقسیم»، وجود رشته‌های دوک و اتصال کروموزومها به آنها بازرسی می‌شود تا در صورت آماده نبودن اجزاء لازم، سیکل سلولی متوقف شود. به عبارت دیگر همزمان با میتوز و فعالیتهای مربوطه، یک کنترل اپوپتوزی نیز در سلول فعال می‌شود تا اگر صدمات وارد شده به سلول، زیاد و قابل ترمیم نباشد موجب مرگ سلول صدمه دیده می‌گردد.



شکل ۱۰-۲

اپوپتوز پدیده‌ای است که فوراً سلول محکوم به مرگ را به قطعاتی کوچک که فاگوسیتها آنها را می‌بلعند تقسیم می‌کند (شکل ۱۱-۲). اپوپتوز دارای مراحل خاصی است و زمانی آغاز می‌شود که «رسپتورمرگ»، در سطح سلول محکوم به فنا، علامت مرگ را دریافت کرده باشد. سپس بدون درنگ آنزیمهای خاصی بنام Caspases در درون سلول فعال می‌شوند و اجزاء و محتویات سلول را به قطعات کوچک و مجزایی تقسیم می‌کنند. این آنزیمهای کشنده یکباره اقدامات زیر را انجام می‌دهند:

۱ـ تخریب رشته‌ها و فیلمانهایی که اسکلت درونی سلول را تشکیل می‌دهند، بطوریکه ارگانلهای سلول، بویژه هسته در سیتوپلاسم سقوط می‌کنند و همزمان مادهٔ ژنتیکی در درون هسته متراکم می‌شود.

۲ـ تخریب آنزیمهای همانندسازی و ترمیم DNA

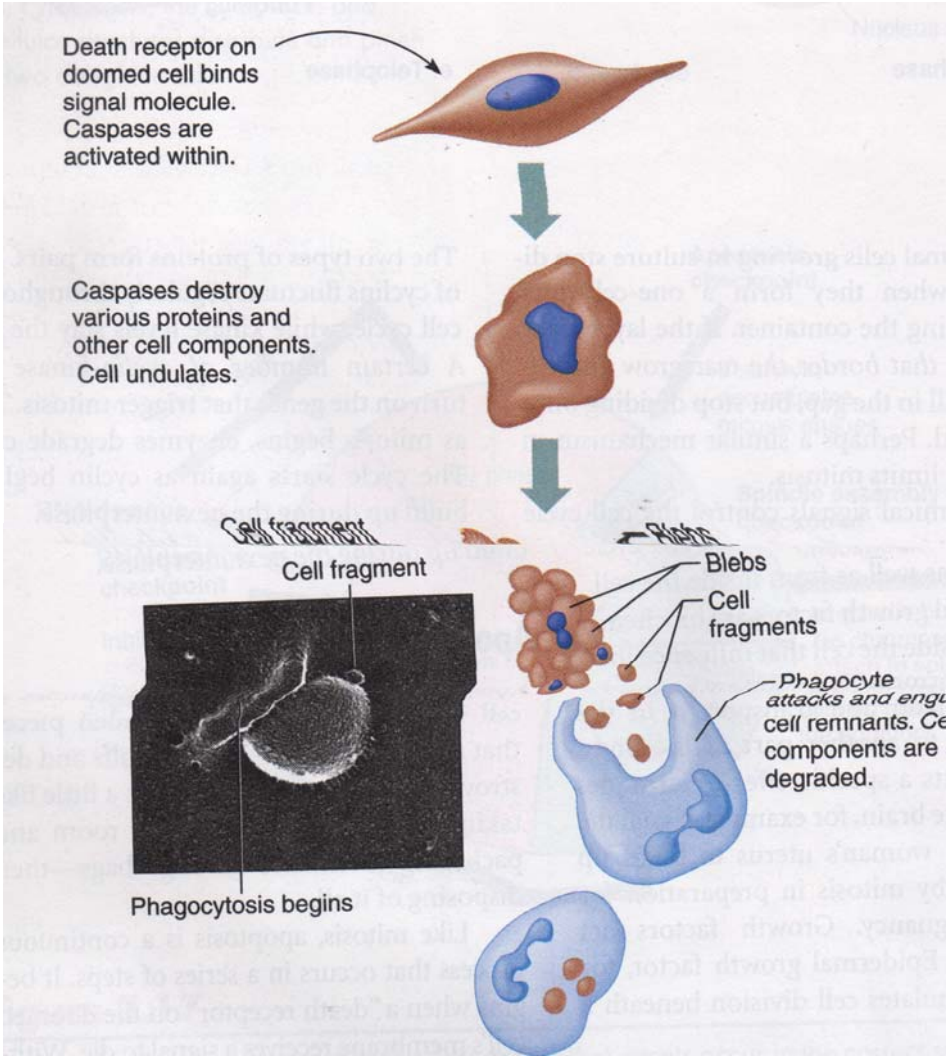
۳ـ فعال نمودن آنزیمهایی که DNA را قطعه قطعه می‌کنند

٤ـ از بین بردن توانایی سلول برای اتصال به سلولهای دیگر

۵ـ انتقال نوع معینی فسفولیپید از سطح درونی غشاء سلول به سطح بیرونی آن که موجب دعوت فاگوسیتها می‌شود.

سلولی که در اوج اپوپتوز قرار دارد از بیرون دارای خصوصیات ظاهری ویژه‌ای است (شکل ۱۱-۲): از آنجا که تماس این سلول با سلولهای دیگر قطع شده است، گرد و کروی می‌شود، هستهٔ آن پاره شده و کروموزومهایش قطعه قطعه می‌شوند، غشاء سیتوپلاسمی دچار پستی و بلندیهای متعددی می‌شود و سلول پاره پاره شده و به ذرات کروی کوچکی تبدیل می‌شود. این قطعات سلولی مورد حملهٔ فاگوسیتها قرار گرفته و در کمتر از یکساعت توسط آنها بلعیده می‌شوند.

از مراحل ابتدایی رویان به بعد میتوز و اپوپتوز با هماهنگی با یکدیگر رخ می‌دهند، بطوریکه بافتها و اندامها نه دچار رشد بیش از حد می‌شوند و نه تخریب می‌شوند، مثلا کبد شکل خود را در تمام عمر حفظ می‌کند. میتوز موجب ترمیم خراشها و زخمها می‌شود و اپوپتوز موجب حذف سلولهای صدمه دیده مثلا توسط آفتاب می‌شود که در غیر اینصورت ممکن است سرطانی شوند.



شکل ۱۱-۲

فصل سوم

ناهنجاریهای کروموزومی

ناهنجاریهای کروموزومی
Chromosomal Aberations

ناهنجاریهای کروموزومی ممکن است تعدادی و یا ساختمانی باشند و ممکن است یک یا چند اتوزوم، کروموزوم جنسی و یا هر دو را بطور همزمان درگیر کند. شایعترین نوع ناهنجاری کروموزومی آنیوپلوئیدی aneuploidy است که در آن تعداد کروموزومها از حالت طبیعی (euploidy) کمتر یا بیشتر است و همیشه با اختلال نمو فیزیکی یا مغزی یا هر دو همراه می‌باشد، مثل مونوزومی X یا تریزومی ۲۱. جابجایی متقابل reciprocal translocation (مبادله دو جانبه قطعات غیرهمولوگ) نیز نسبتاً شایع می‌باشد و ممکن است هیچ اثر فنوتیپی در حامل خود نداشته باشد، یا اینکه ممکن است موجب افزایش ریسک سقط جنین یا نقص در فرزندان گردد.

جنبه‌های بالینی و اجتماعی ناهنجاریهای کروموزومی عظیم و مهم می‌باشد. فراوانی نسبی ناهنجاریهای کروموزومی تعدادی و ساختمانی که در سقطهای خودبخودی، در جنین‌های مادران مسن‌تر از ۳۵ سال که مایع آمنیوتیک آنها آنالیز شده‌اند و در نوزادان زنده مشاهده شده، در جدول ۱ ـ۳ نشان داده شده است.

Abnormal karyotype	First-trimester abortuses	Fetuses of mothers > 35 years	Live births
Total incidence	1/2	1/50	1/160
Percentage of abnormalities			
Numerical abnormalities (aneuploidy, polyploidy)	96%	85%	60%
Structural abnormalities			
balanced	—	10%	30%
unbalanced	4%	5%	10%

جدول ۱ ـ ۳: بروز ناهنجاریهای کروموزومی در مراحل مختلف زندگی جنین و بعد از تولد

ناهنجاریهای کروموزومی با استفاده از یک سری از اختصارات و اصطلاحات توصیف شده‌اند. تعدادی از اختصارات و مثالهایی برای کاریوتایپ غیرطبیعی در جدول ۲ ـ۳ فهرست شده است.

Abbreviation	Meaning	Example	Condition
		46,XX	Normal female karyotype
		46,XY	Normal male karyotype
cen	centromere		
del	deletion	46,XX,del(5p)	Female with cri du chat syndrome due to deletion of part of short arm of one chromosome 5
der	derivative chromosome	der(1)	Translocation chromosome derived from chromosome 1 and containing the centromere of chromosome 1
dic	dicentric chromosome	dic(X;Y)	Translocation chromosome containing centromeres from both the X and the Y chromosomes
dup	duplication		
fra	fragile site	46,Y,fra(X)(q27.3)	Male with fragile X chromosome
i	isochromosome	46,X,i(Xq)	Female with isochromosome for the long arm of the X chromosome
ins	insertion		
inv	inversion	inv(3)(p25q21)	Pericentric inversion of chromosome 3
mar	marker chromosome	47,XX,+mar	Female with an extra, unidentified chromosome
mat	maternal origin	47,XY,+der(1)mat	Male with additional der(1) translocation chromosome inherited from his mother
p	short arm of chromosome		
pat	paternal origin		
q	long arm of chromosome		
r	ring chromosome	46,X,r(X)	Female with ring X chromosome
rcp	reciprocal translocation		
rob	Robertsonian translocation		
t	translocation	46,XX,t(2;8)(q21;p13)	Female with balanced translocation between chromosome 2 and chromosome 8, with breaks in 2q21 and 8p13
ter	terminus	46,X,Xq⁻(pter→q21:)	Female with partial deletion of the long arm from Xq21 to Xqter (nomenclature shows the portion of the chromosome that is present)
+	gain of	47,XX,+21	Female with trisomy 21
−	loss of	45,XX,−14,−21,+t(14q21q)	Normal female carrier of a Robertsonian translocation between the long arms of chromosomes 14 and 21; karyotype is missing a normal 14 and a normal 21
		4p−	Chromosome 4 with a portion of the short arm deleted
:	break	5qter→5p15:	Deleted chromosome 5 in a patient with cri du chat syndrome, with a deletion breakpoint in band p15
::	break and join	2pter→2q21::8p13→8pter	Description of der(2) portion of t(2;8)
/	mosaicism	46,XX/47,XX,+8	Female with two populations of cells, one with a normal karyotype and one with trisomy 8

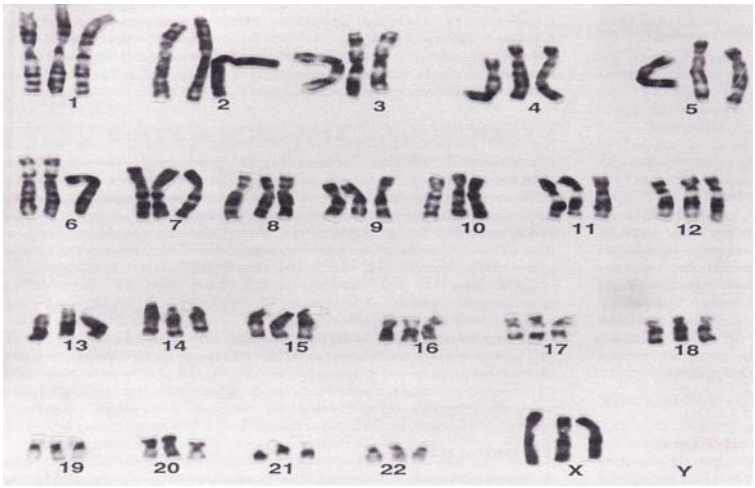
جدول ۲ ـ۳ : بعضی از اختصاراتی که برای توصیف کروموزومها و ناهنجاریهای آنها استفاده می‌شوند و مثالهـای مربوط آنها

ناهنجاریهای تعدادی کروموزوم
Chromosomal Numerical Aberrations

ناهنجاری تعدادی کروموزومی به شکلهای مختلف دسته‌بندی می‌شوند که در اینجا به یک نوع آن اشاره می‌شود: به تعداد کروموزومها به غیر از ۴۶، هتروپلوئیدی (heteroploidy) می‌گویند. یک مضرب صحیح از تعدادکروموزومهای هاپلوئید (n) را یوپلوئید euploid، (مثل ۲n، ۳n، ۴n) و کم یا زیاد شدن یک یا چندین کروموزوم را **آنیوپلوئیدی** (aneuploidy) می‌گویند (مثل ۲n+۱). به موارد پلی پلوئید غیر طبیعی در انسان **پولیپلوییدی** (polyploidy) گفته میشود مانند تریپلوئیدی و تتراپلوئیدی.

تریپلوئیدی و تتراپلوئیدی
Triploidy and Tetraploidy

علاوه بر شماره دیپلوئید (2n) که مختص سلولهای سوماتیک طبیعی است، در انسان دو حالت یوپلوئیدی دیگر، تری‌پلوئیدی (3n) (شکل ۱-۳) و تتراپلوئیدی (4n) نیز گزارش شده. البته جنینهای تتراپلوئید زنده متولد نمی‌شوند ولی برخی نوزادان تریپلوئیدی می‌توانند زنده بدنیا بیایند ولی زود می‌میرند. تریپلوئیدی اکثراً ناشی از لقاح یک اوول با دو اسپرم (dispermia) می‌باشد. نارسایی در یکی از تقسیمات میوزی که منجر به تولید اوول یا اسپرم دیپلوئید می‌گردد نیز درصدی از موارد را تشکیل می‌دهد.



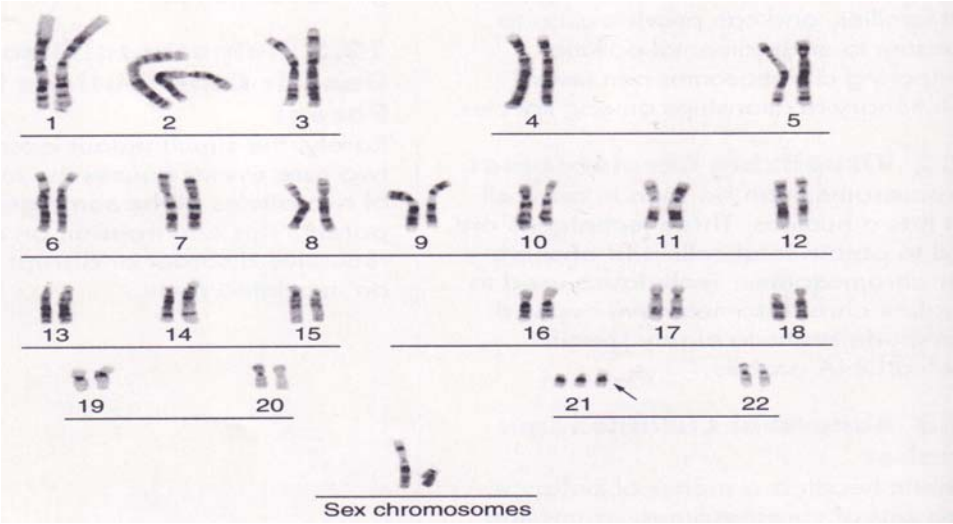
شکل ۱-۳

تأثیر فنوتیپی کاریوتایپ تریپلوئیدی بستگی به منبع سری کروموزوم اضافی دارد: زایگوت تریپلوئید با یک سری اضافی از کروموزومهای پدری یک partial hydatidiform moles را تشکیل می‌دهد. اما زایگوتی که یک سری کروموزوم اضافهء مادری را دارد به جنینی ناقص تبدیل میشود و بطور خودبخودی در اوایل حاملگی سقط می‌شود. تتراپلوئیدها همیشه 92, XXYY یا 92,XXXX هستند و این امر می تواند ناشی از اختلال در تقسیم زیگوت باشد.

انیوپلوئیدی

آنیوپلوئیدی شایعترین و از لحاظ بالینی مهمترین نوع اختلال کروموزومی در انسان است و در ۳ تا ۴ درصد از تمام حاملگی‌های شناخته شده رخ می‌دهد. اکثر بیماران آنیوپلوئید، تری‌زومی trisomy (سه عدد از یک کروموزوم به جای یک جفت) و تعدادی نیز مونوزومی monosomy (یک عدد بجای یک جفت) هستند. تری‌زومی و مونوزومی هر دو عوارض وخیم فنوتیپی دارند.

تری‌زومی برای هر قسمت ژنوم می‌تواند وجود داشته باشد، اما تری‌زومی برای کل یک کروموزوم بندرت با حیات سازگار است. شایعترین تری‌زومی در نوزادان زنده بدنیا آمده تری‌زومی ۲۱ است و در ۹۵ درصد بیماران ۴۷ کروموزوم وجود دارد (شکل۲-۳). تنها مونوزومی کامل برای کروموزوم X در سندرم ترنر دیده شده است. مونوزومی کامل هر یک از کروموزومهای اتوزوم کشنده است.



شکل ۲-۳: کاریوتیپ یک بیمار مذکر با سندرم دان که ۳ کپی از کروموزوم ۲۱ را نشان می‌دهد.

مهمترین علت آنیوپلوئیدی عدم جدائی صحیح کروموزومی nondisjunction در یکی از دو تقسیم میوز مخصوصاً میوز I است. عواقب عدم جدائی صحیح کروموزومها در میوز I و میوز II متفاوت است (شکل ۷-۲) . اگر اشتباه در طی میوز I رخ دهد، گامت ۲۴ کروموزومی، حاوی اعضای پدری و مادری کروموزومهای درگیر می‌باشد. اگر عدم جدائی در میوز II رخ دهد، گامت ۲۴ کروموزوم حاوی دو کپی از کروموزوم پدری یا مادری خواهد بود (اگر بخواهیم بطور دقیق‌تر بگوئیم، مطالب اشاره شده تنها به سانترومر پدری و مادری اشاره دارد، چون که نوترکیبی بین کروموزومهای همولوگ معمولاً در اوایل میوز Iرخ می‌دهد و منجر به تبادلات قطعات بین کروماتیدها می‌شود. مکانیسم دیگر، جدا شدن زودتر از موعد کروماتیدهای خواهری در طی میوز I بجای میوز II می‌باشد. اگر این اتفاق بیافتد، کروماتیدهای جدا شده ممکن است تصادفاً وارد اووسیت یا جسم قطبی شوند و موجب تولید گامت‌های نامتعادل گردند.

تمایل یک جفت کروموزوم به عدم جدائی صحیح با تعداد یا مکان کراسینگ‌اور یا هردوی آنها در میوز I ارتباط دارد. یک جفت کروموزوم فاقد یا با تعداد خیلی کم کراسینگ‌اور یا با کراسینگ‌اور خیلی نزدیک به

تلومر، ممکن است خیلی بیشتر از کروموزومهایی با تعداد و توزیع مناسب نوترکیبی دچار عدم جدائی صحیح کروموزومی گردد.

غیر از منوزومی و تری‌زومی انواع پیچیده‌تری از آنیوپلوئیدی نیز گزارش شده است. یک گامت ممکن است یک نماینده اضافی از بیش از یک کروموزوم داشته باشد. عدم جدایی صحیح کروموزومها ممکن است در دو تقسیم میوزی متوالی یا بطور تصادفی در گامتهای مؤنث و مذکر به طور همزمان اتفاق می‌افتد و منجر به زایگوتی با شماره کروموزومی غیر معمول می‌شود. عدم جدایی صحیح کروموزومی در یک تقسیم میتوزی بعد از تشکیل زیگوت هم می‌تواند رخ دهد. اگر این اتفاق در مرحله اولیه تقسیم زیگوت رخ دهد، ممکن است باعث موزائیسم با اهمیت بالینی گردد، اما اگر در فرد بالغ رخ دهد ممکن است اهمیت بالینی چندانی نداشته باشد.

ناهنجاریهای ساختمانی کروموزوم
Chromosomal Structural Aberrations

ناهنجاریهای ساختمانی انواع متعددی دارد و به صور مختلف دسته بندی می شوند . در زیر به نوعی از دسته بندی های ناهنجاریهای ساختمانی اشاره می گردد :

ناهنجاریهای ساختمانی بر اثر شکستهای کروموزومی که موجب اتصال مجدد قطعات کروموزومی ولی با ترتیبی جدید و غیرطبیعی می‌شوند بوجود می آیند . به همین دلیل به ناهنجاریهای ساختمانی نوترتیبی های ساختمانی(Structural Rearrangements) نیز گفته می شود که انواع متعددی دارد. نوترتیبی می‌تواند به طرق مختلف اتفاق بیافتد، و در مجموع کمتر از آنیوپلوئیدی شایع است (جدول ۳-۳). بطورکلی، ناهنجاریهای ساختمانی در حدود ۱ مورد در ۴۰۰ تولدها وجود دارد. مبادلات بین کروموزومی خودبخودی با فراوانی پائین رخ می‌دهد، ولی بوسیله بعضی مواد شکننده کروموزوم (clastogen) مثل، اشعه یونیزه کننده، بعضی عفونتهای ویروسی و بسیاری از مواد شیمیایی القاء می‌شوند. مانند ناهنجاریهای تعدادی، نوترتیبی‌های کروموزومی ممکن است در تمام سلولهای یک فرد یا به صورت موزائیسم وجود داشته باشند . نوترتیبی‌های ساختمانی ممکن است متعادل یا نا متعادل باشند . در نوترتیبی‌های ساختمانی متعادل ژنوم دارای مجموعه کاملی از مواد کروموزومی است ولی در نوترتیبی‌های ساختمانی نامتعادل مواد ژنتیکی کم، اضافی و یا ناقص میباشد. در بعضی موارد ممکن است نوترتیبی ساختمان یک ژن را تخریب کند و فرد حامل را به یک بیماری تک‌ژنی مبتلا کند، مثل مردانی که براثر جابجایی بین X و اتوزوم مبتلا به دیستروفی عضلانی دوشن شده‌اند.

نو ترتیبی های ساختمانی نامتعادل
Unbalanced Rearrangement

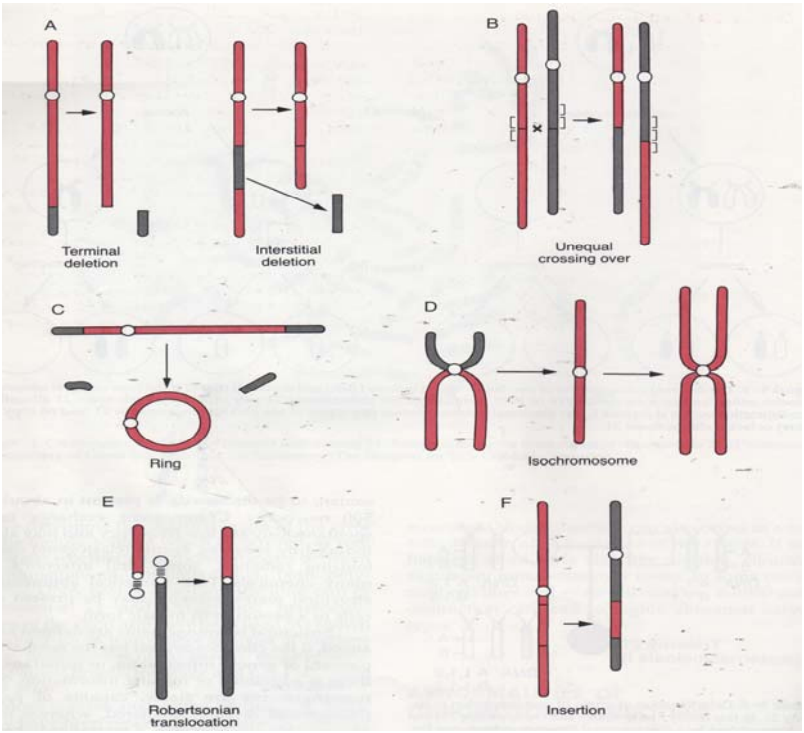
در موارد زیادی منشاء نوترتیبی های ساختمانی نامتعادل تقسیم میوز و گامتوژنز در افراد سالم و حامل نوترتیبی های ساختمانی متعادل می باشد . در برخی از موارد نوترتیبی های نامتعادل به ارث نرسیده و حاصل موتاسیون های کروموزومی de novo در زایگوت یا در گامتوژنز والدین با کاریوتایپ طبیعی می باشند . در این قسمت مهمترین نوترتیبی های ساختمانی نامتعادل اشاره می شود :

حذف
Deletion

حذف یعنی از دست رفتن قطعه‌ای از کروموزوم که می‌تواند منجر به کروموزوم و ژنوم نامتعادل می‌گردد (شکل A ۳-۳). یک فرد حامل حذف کروموزومی در رابطه با اطلاعات ژنتیکی حذف شده مونوزومی می‌باشد. عواقب بالینی عموماً منعکس کننده haploinsufficiency می‌باشد (یعنی عدم کفایت یک کپی از ماده ژنتیکی برای انجام فعالیتهایی طبیعی که با دو کپی تأمین می‌شود) و این عوارض ظاهراً بستگی به اندازه قطعه حذف شده و تعداد و عمل ژنهای موجود در آن دارد. حذفهای اتوزومی قابل مشاهده با سیتوژنیتیک در ۱ در هر ۷۰۰۰ تولد زنده دیده می‌شود.

یک حذف ممکن است انتهایی یا میانی باشد. حذفها ممکن است حاصل دو شکست در کروموزوم و از دست رفتن یک قطعه استریک acentric باشد یا حاصل کراسینگ‌اور نابرابر میان کروموزومهای همولوگ یا کروماتیدی خواهری بد جفت شده باشد (شکل B ۳-۳). حذف نیز می‌تواند از طریق تفکیک میوزی یک جابجایی یا واژگونی متعادل بوجود آید که بعداً توضیح داده می‌شود.

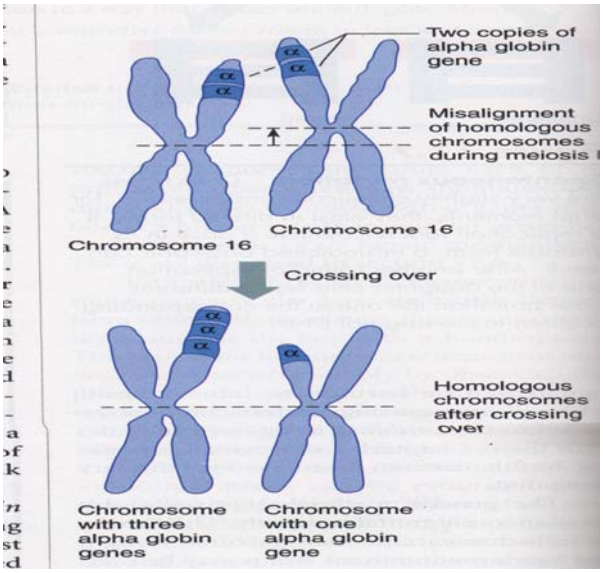
وقتی که احتمال حذفهای کوچک یا میکرودیلیش وجود دارد نمی‌بایست از بررسی نواری معمولی استفاده نمود. تکنیک نواری با قدرت تفکیک بالا و همچنین FISH می‌تواند حذفهایی را آشکار سازند که در گسترهٔ معمولی دیده نمی‌شوند. برای قابل تشخیص بودن سیتوژنتیکی حذف بوسیله نواربندی با قدرت تفکیک بالا، یک حذف باید حداقل ۲۰۰۰ تا ۳۰۰۰ کیلو باز باشد، اما حذف‌های کوچکتر را می‌توان با FISH با استفاده از پروب اختصاصی موردنظر شناسایی کرد.



شکل ۳-۳: نوترتیبی ساختمانی کروموزومها: A، حذفهای انتهایی و میانی که هر کدام، یک قسمت استریک تولید می‌کنند. B، کراسینگ‌اور نابرابر میان قطعات کروموزومهای همولوگ یا بین کروماتیدهای خواهری. C، کروموزوم حلقه‌ای با دو قطعه استریک. D، تولید ایزوکروموزوم برای بازوی بلند یک کروموزوم. E، جابجایی روبرت سونی بین دو کروموزوم اکروسنتریک. F، دخول یک قطعه از یک کروموزوم به درون یک کروموزوم غیرهمولوگ.

مضاعف شدن
Duplication

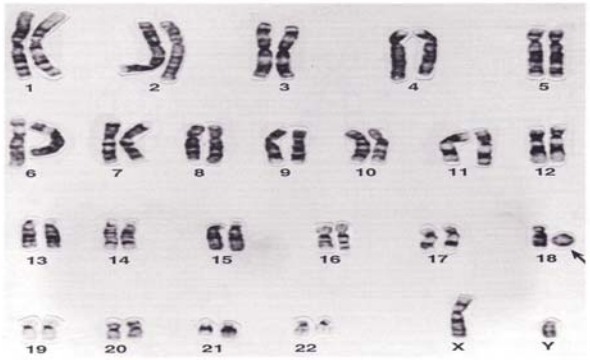
مضاعف شدن مثل حذف می‌تواند از یک کراسینگ‌اور نابرابر (شکل ۴-۳) یا تفکیک غیرطبیعی در میوز در یک حامل جابجایی یا واژگونی منشاء بگیرد. بطورکلی مضاعف شدن خیلی کم اثرتر از حذف می‌باشد. البته مضاعف شدن اگر باعث عدم تعادل کروموزومی یا تخریب ژنی گردد، اغلب منجر به بعضی از ناهنجاریهای فنوتیپی می‌شود. مضاعف شدن قسمتی از یک کروموزوم باعث تری‌زومی ناقص آن قسمت می‌شود و حذف آن منجر به مونوزومی ناقص می‌شود و هر تغییری که تعادل طبیعی ژنها را مختل کند، می‌تواند منجر به تکامل غیرطبیعی جنین گردد.



شکل ۴-۳

کروموزومهای مارکر و حلقه‌ای
Marker and Ring Chromosomes

کروموزومهای مارکر کروموزومهایی خیلی کوچک وغیرقابل طبیعی میباشند، که اغلب در موزائیک کروموزومی دیده می‌شوند و معمولاً اضافه بر تعداد کروموزومهای طبیعی وجود دارند. اغلب کروموزومهای مارکر حاوی هتروکروماتین‌های سانترومریک ولی فاقد توالی تلومر می‌باشند، لذا میبایست کروموزومهایی کوچک و حلقوی باشند (شکلهای ۵-۳).

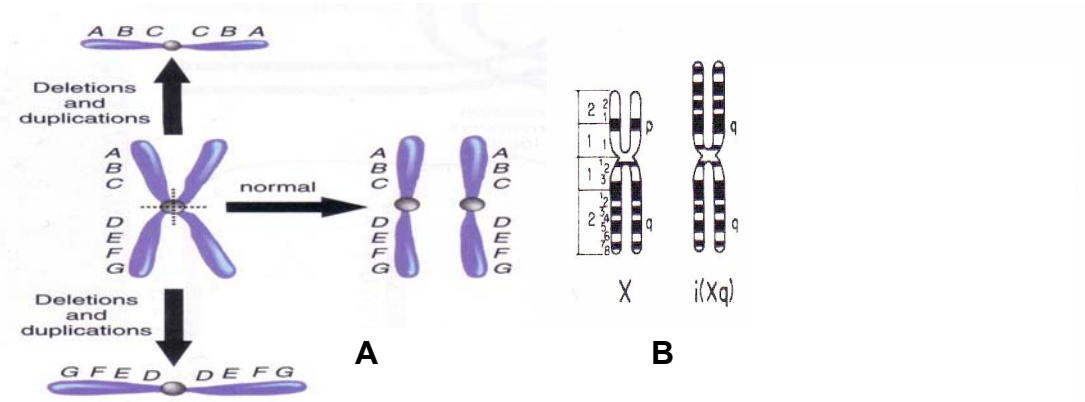


شکل ۵-۳

ایزوکروموزوم
Isochromosome

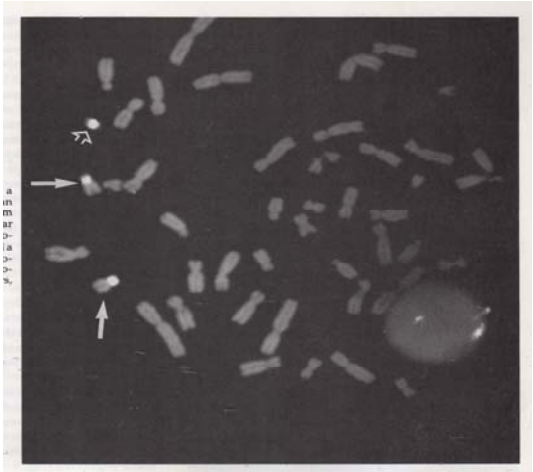
یک ایزوکروموزم ، کروموزمی است که دو بازوی آن کروماتیدهای خواهری یکدیگرند . (شکلهای D ۳-۳ و A۶-۳). مثلاً در یک کروموزوم پس از همانندسازی، بازوهای P کروماتیدهای خواهری حذف شوند و بازوهای q و سانترومر با هم یک کروموزوم ایجاد کنند. یک شخص ۴۶ کروموزومی حامل یک ایزوکروموزوم برای یک بازوی کروموزوم در گیر منوزومی جزئی و برای بازوی دیگر تری‌زومی جزئی خواهد بود. یک شخص ۴۷ کروموزومی با دو همولوگ طبیعی، و یک ایزوکروموزوم ، برای بازوی درگیر در ایزوکروموزوم ، تترازومیک است.

برای تشکیل ایزوکروموزوم، دو مکانیسم ذکر شده است: (۱) تقسیم عرضی سانترومر و (۲) مبادله یک بازو با بازوی دیگر در کروماتیدهای خواهری. شایعترین ایزوکروموزوم، ایزوکروموزوم بازوی بلند کروموزوم X است که به صورت i(Xq) نوشته میشود و در بعضی از افراد مبتلا به سندرم ترنر دیده می‌شود (شکل B۶-۳).



شکل ۶-۳

ایزوکروموزوم برای تعدادی از اتوزومها نیز توصیف شده است، مانند ایزوکروموزوم بازوی کوتاه کروموزوم ۱۸ که بصورت i(18p). نمایش داده میشود (شکل ۷-۳). ایزوکروموزمها در کاریوتایپ تومورها دیده شده‌اند.



شکل ۷-۳ : کروموزوم مارکر i(18p): ایزوکروموزوم بازوی کوتاه کروموزوم ۱۸، بوسیله هیبریداسیون in situ فلورسانت با استفاده از DNA پروب اختصاصی برای سانترومر کروموزوم ۱۸ مشخص شده است. پیکان توخالی i(18p) را نشان می‌دهد، پیکان‌های سفید دو کروموزوم طبیعی ۱۸ را نشان می‌دهد.

کروموزومهای دایسنتریک
Dicentric Chromosomes

یک دی‌سانتریک نوعی نادر از کروموزوم غیرطبیعی است که در آن دو قطعه کروموزوم از کروموزومهای مختلف و یا از دو کروماتید خواهری هر کدام با یک سانترمر و یک انتهای چسبنده در انتهاها به هم متصل می‌شوند. دی‌سانتریک‌ها ممکن است علی‌رغم داشتن دو سانترومر طی میتوز پایدار بمانند زیرا یکی از دو سانترومر غیرفعال می گردد یا هر دو سانترومر همیشه حرکت خود را به طرف یک قطب در طی آنافاز هماهنگ کنند. چنین کروموزومهایی دی‌سانتریک کاذب pseudodicentric نامیده می‌شوند که معمولاً در کروموزوم‌های جنسی دیده می‌شوند.

نوترتیبی متعادل
Balanced Rearrangement

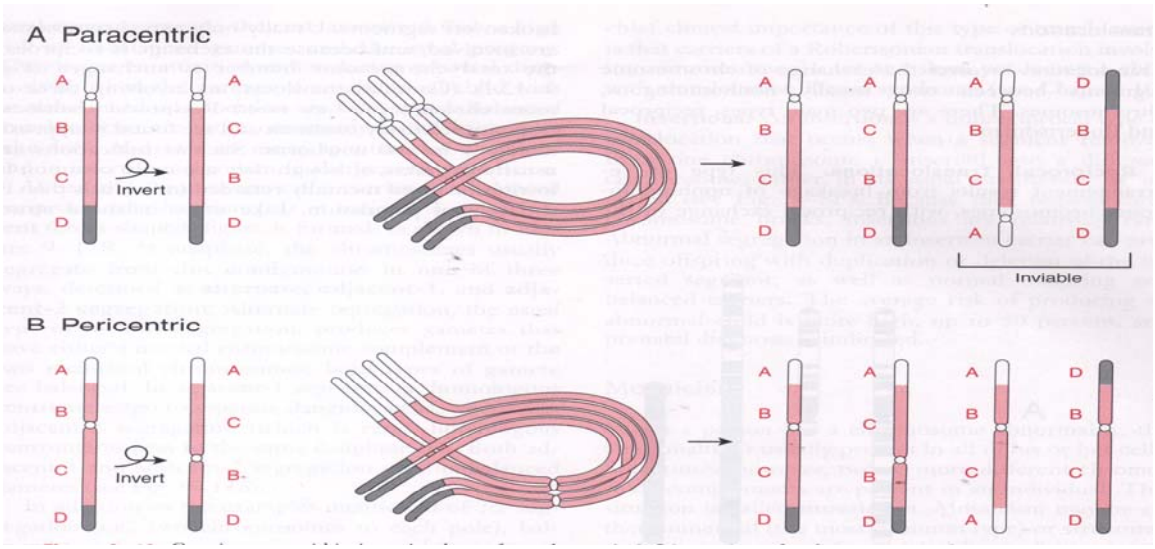
در نوترتیبی کروموزومی متعادل اثرات فنوتیپی دیده نمیشود، زیرا با اینکه مواد ژنتیکی بطور متفاوت دسته‌بندی و سازمان‌دهی شده است، ولی تمام مواد ژنتیکی بصورت طبیعی وجود دارد. نوترتیبی ساختمانی حتی وقتی متعادل است، یک تهدید برای نسل بعد می‌باشد، زیرا حاملین آن با فراوانی بالایی گامتهای غیرمتعادل تولید می‌کنند و در نتیجه در معرض خطر داشتن فرزندان غیرطبیعی با کاریوتیپ نامتعادل می‌باشند و بسته به نوع نوترتیبی این ریسک می‌تواند از ۱ الی ۲۰ درصد باشد

واژگونی
Inversion

یک واژگونی موقعی ایجاد می‌شود که در یک کروموزوم دو شکست رخ دهد و قطعه بین شکست‌ها مجدداً بطور واژگون در کروموزوم مستقر شود. واژگونی بر دو نوع می‌باشد: **پاراسنتریک** paracentric (سانترومر را شامل نمی‌شود)، که در آن هر دو شکست در یک بازوی کروموزوم ایجاد می‌شود (شکل ۸A-۳) و **پری‌سنتریک** pericentric (شامل سانترومر) که در آن یک شکست در هر بازو رخ می‌دهد (شکل ۸ B-۳). چون واژگونی‌های پاراسنتریک تغییری در نسبت بازوهای کروموزوم ایجاد نمی‌کنند، آنها را تنها می‌توان با روش نواری یا FISH شناسایی نمود. واژگونی‌های پری‌سنتریک را با بررسیهای سیتوژنتیک آسانتر می‌توان مشخص نمود، زیرا آنها علاوه بر موارد فوق ممکن است در نسبت بازوهای کروموزومها نیز تغییر ایجاد کنند.

یک واژگونی بصورت یک نوترتیبی متعادل سبب یک فنوتیپ غیرطبیعی در حاملین نمیشود،، ولی حامل هر یک از انواع این نوع واژگونی‌ها در خطر تولید گامتهای غیرطبیعی است که ممکن است منجر به تولید فرزندانی با واژگونی نامتعادل یا دیگر نوترتیبی‌های غیرمتعادل گردد. زمانیکه یک واژگونی در یک کروموزوم موجود باشد، وقتیکه کروموزومهای همولوگ در میوز I جفت می‌شوند، یک لوپ واژگونی برای قطعهٔ درگیر تشکیل می‌شود. اگر چه نوترکیبی تا حدی در لوپ واژگونی، سرکوب می‌شود ولی وقتی که اتفاق می‌افتد می‌تواند منجر به تولید گامت‌های غیرمتعادل گردد. وقتی که واژگونی پاراسانتریک باشد، کروموزومهای نوترکیب نامتعادل یا سانترومر ندارند یا دیسنتریک هستند، که معمولا منجر به تولید فرزندان زنده نمی گردد (شکل ۸A-۳). بنابراین خطر اینکه یک حامل واژگونی پاراسنتریک یک بچه زنده با کاریوتایپ غیرطبیعی بدنیا آورد

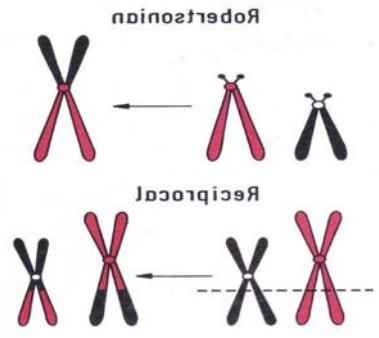
بسیار پائین است. از طرف دیگر یک واژگونی پری‌سنتریک می‌تواند منجر به تولید گامتهای نامتعادل با مضاعف شدن یا کمبود قطعاتی از کروموزوم گردد (شکل B ۸-۳). هر واژگونی پری‌سنتریک با یک خطر خاص همراه است، واژگونی‌های بزرگ پری‌سنتریک به احتمال بیشتر از واژگونی های کوچکتر باعث فرزندان نوترکیب قابل حیات می‌شوند. زیرا قطعات نامتعادل در فرزندان نوترکیب در واژگونی‌های بزرگ کوچکتر است ، ولی کلاً می‌توان احتمال نقص در فرزندان افراد حامل را حدود ۱۰ـ۵ درصد تخمین زد.



شکل ۸-۳: کراسینگ‌اور درون حلقه‌های واژگونی که در میوز I در حاملین یک کروموزوم با قطعهٔ B-C واژگون شده، تشکیل شده است (ترتیب A-C-B-D بجای A-B-C-D). A، واژگونی پاراسنتریک: گامتهایی که بعد از میوز دوم تشکیل شده‌اند یا کپی کروموزومی طبیعی (A-B-C-D) ، یا کپی کروموزوم با واژگونی متعادل (A-B-C-D) را دارند. زیرا محصولات استریک و دی‌سنتریک ناپایدارند B، واژگونی پری‌سنتریک: گامتهایی که بعد از میوز II تشکیل شده‌اند ممکن است طبیعی، متعادل یا نامتعادل باشند. گامتهای نامتعادل حاوی یک کپی از کروموزوم درگیر با قطعهٔ اضافه شده یا حذف شده می‌باشند (A-B-C-A یا A-B-C-D).

جابجای Translocation

جابجایی مبادله قطعات کروموزومی غیرهمولوگ است که معمولاً بین دو کروموزوم غیرهمولوگ رخ میدهد. دو نوع اصلی جابجایی وجود دارد: جابجائی رابرتسونی Robertsonian (شکل A ۹-۳) و جابجائی دو جانبه Reciprocal (شکل B ۹-۳).



A

B

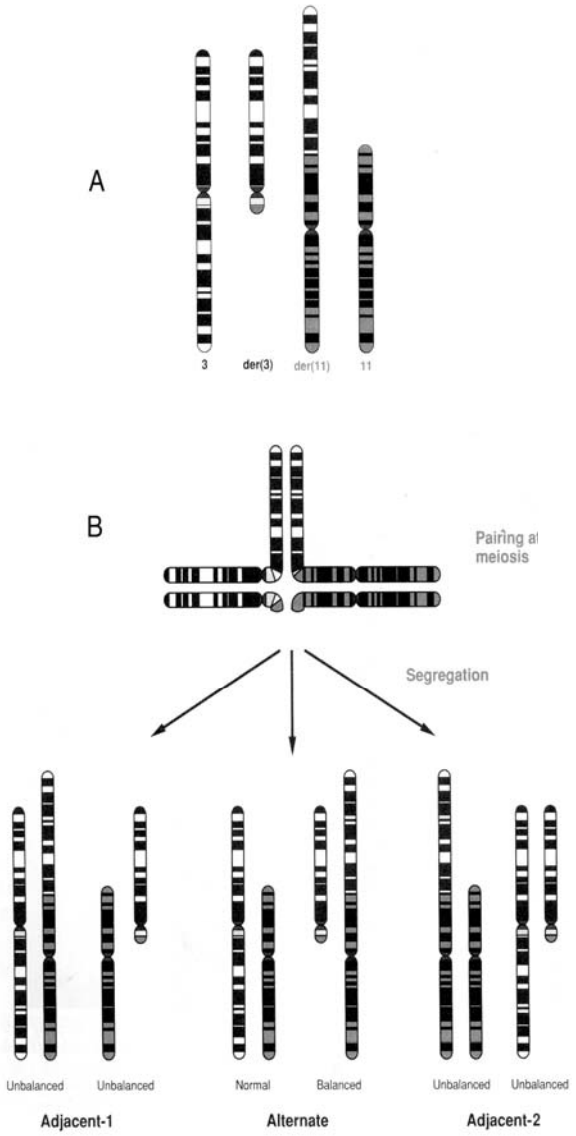
۹-۳ : انواع جابجایی: A – رابرتسونی و B – دو جانبه.

جابجائی دو جانبه: این نوع از نوترتیبی حاصل شکسته شدن کروموزومهای غیرهمولوگ و مبادله دو جانبه قطعات شکسته شده، بدون حذف ماده ژنتیکی از سلول است. معمولاً دو کروموزوم درگیر می‌شوند و تعداد کل کروموزومها تغییر نمی‌کند (شکلهای B ۹-۳ و A ۱۰-۳).

جابجایی دو جانبه نسبتاً شایع و تقریباً به نسبت ۱ در هر ۶۰۰ نوزاد دیده می‌شود. این جابجایی‌ها معمولاً در افرادی که در مراکز نگهداری معلولین ذهنی نگهداری می‌شوند شایعتر از جمعیت معمولی می‌باشد. مانند دیگر نوترتیبی‌های متعادل، آنها نیز با خطر بالایی برای تولید گامت‌های نامتعادل و فرزندان غیرطبیعی همراه می‌باشند. آنها طی تشخیص قبل از زایمان یا وقتی که والدین یک کودک غیرطبیعی با یک جابجایی نامتعادل، کاریوتایپ می‌شوند کشف می‌شوند. جابجایی متعادل در زوجهایی که دو یا تعداد بیشتری سقط خودبخودی داشته‌اند و همچنین در مردان ناباور شایعتر از جمعیت معمولی می‌باشد.

در میوز موقعیکه کروموزومهای یک فرد حامل جابجایی دو جانبه متعادل سیناپس می‌شوند. یک شکل چهار محوری quadrivalent صلیبی شکل تشکیل می‌دهند (شکل B۱۰-۳). در آنافاز، کروموزومها ممکن است به یکی از سه طریق زیر تفکیک (segregate) شوند: (۱) تفکیک متناوب (alternate)، (۲) تفکیک مجاور ۱ (adjacent-1) و (۳) تفکیک مجاور ۲ (adjacent-2) . تفکیک متناوب در میوز، تولید گامتهایی با وضعیت کروموزومی طبیعی یا کروموزومهایی با جابجایی دو جانبه متعادل می‌کند. در تفکیک مجاور ۱، سانترومرهای همولوگ به سلولهای دختری جداگانه می‌روند. در حالیکه در تفکیک مجاور ۲ (که نادر و قابل اغماض است)، سانترومرهای همولوگ به یک سلول دختری می‌روند؛ هر دو تفکیک مجاور ـ ۱ و مجاور ـ ۲، گامتهای نامتعادل ایجاد می‌کنند (شکل B۱۰-۳).

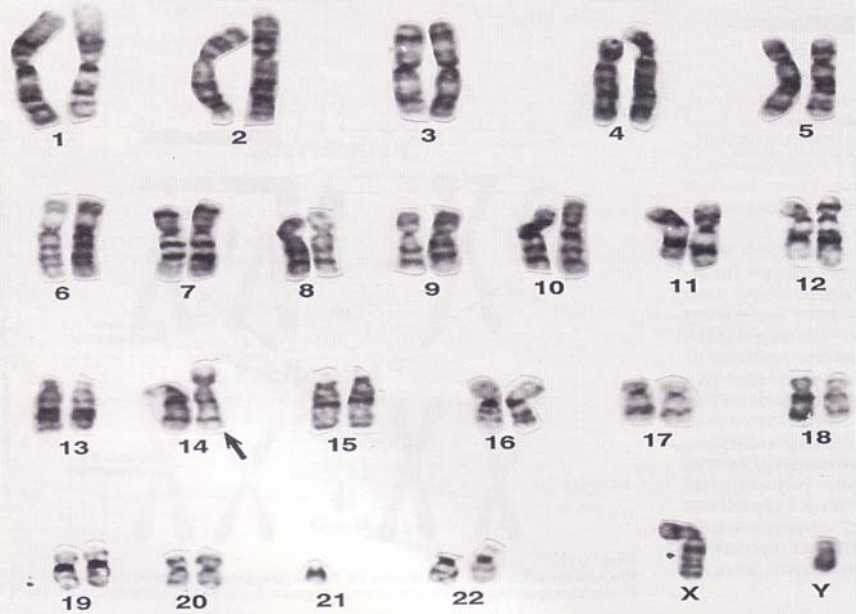
علاوه بر تفکیکهای فوق که تفکیک کروموزومی ۲:۲ (دو کروموزوم در هر قطب سلول) نامیده می‌شود، کروموزومها ممکن است ندرتاً بصورت ۳:۱ تفکیک شده و موجب تولید گامتهایی با ۲۲ یا ۲۴ کروموزوم شوند. بررسی FISH اسپرمهای مردان حامل جابجایی متعادل و واژگونی متعادل، نشان می‌دهد که حدود نیمی از اسپرمها کاریوتایپ نامتعادل دارند و این یافته با درصد کاریوتایپ نامتعادل در نوزادان این مردان تفاوت زیادی دارد. چرا؟



شکل ۱۰-۳: دیاگرام یک جابجایی متعادل بین کروموزوم‌های ۳ و ۱۱، t(3;11) (q12; p15.5)و سینابس همولوگها در میوز و تفکیک کروموزومی 2:2 که منجر به تولید گامتهای متعادل (alternate) یا نامتعادل (adjacent-2 و 1- adjacent) می‌شود.

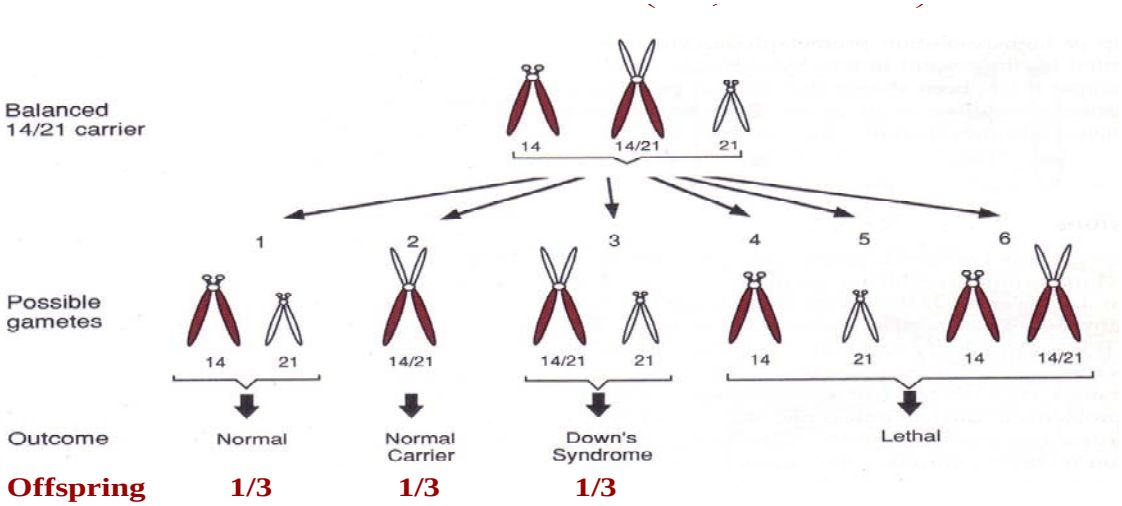
جابجائی رابرتسونی
Robertsonian translocation

در این نوع نوترتیبی دو کروموزم اکروسنتریک در ناحیه سانترومر شکسته، دو بازوی بلند آنها بهم متصل شده و یک کروموزوم بزرگ بوجود میاورند و بازوهای کوتاه آنها حذف می‌شود (شکلهای E ۳-۳ ، A ۹-۳ و ۱۱-۳). کاریوتایپ متعادل تولید شده در این جابجائی، فقط ۴۵ کروموزوم دارد و حاوی کروموزوم حاصل از جابجایی است که از بازوهای بلند دو کروموزوم درگیر تشکیل شده است. کروموزوم حاصل از جابجایی رابرتسونی می‌تواند بصورت مونوسنتریک یا دیسنتریک باشد که در اینصورت یکی از آنها غیرفعال خواهد بود و به محل شکست در کروموزومهای اکروسانتریک بستگی دارد. اگر چه جابجایی رابرتسونی بین همه کروموزومهای اکروسنتریک دیده شده است، دو تای آنها (13q/14q, 14q/21q) شایعترین نوع نوترکیبی کروموزومی در انسان می‌باشد.



شکل۱۱-۳: جابجائی رابرت سونین 14q/21q در یک مرد با کاریوتایپ 45,XY,t14/21

اگر چه یک فرد حامل جابجایی رابرتسونی با کاریوتاپ 45,XY,t(14/21) (شکل۱۱-۳) از نظر فنوتیپی طبیعی است، ولی احتمال بالائی برای تولید گامتهای نامتعادل و سپس جنینها و فرزندان غیرطبیعی دارد. اهمیت بالینی این نوع جابجایی این است که حاملین جابجایی رابرتسونی که کروموزوم ۲۱ را درگیر می‌کند، دارای ریسک بالایی برای تولید گامتهای نامتعادل وتولید فرزندان مبتلا به سندرم دان می‌باشند(شکل ۱۲-۳).



شکل ۱۲-۳: تولید انواع گامتها و فرزندان توسط یک فرد سالم ناقل t(14/21).

دخول
Insertion

دخول یک نوع جابجایی یک جانبه است و هنگامی رخ می‌دهد که یک قطعه میانی از یک کروموزوم جدا شده و وارد کروموزوم دیگری شود (شکل F ۳-۳). چون دخول نیازمند سه شکست کروموزومی می‌باشد، نسبتاً نادر است. تفکیک کروموزومها در یک فرد حامل دخول، می‌تواند فرزندانی غیرطبیعی با یک قطعه مضاعف یا حذف شده از قطعه درگیر، و نیز فرزندانی طبیعی و یا حاملی متعادل ایجاد کند. میانگین خطر تولید یک بچه غیرطبیعی نسبتاً بالا و به حدود ۵۰ درصد می‌رسد و اندیکاسیون تشخیص قبل از تولد دارد.

موزائیسم کروموزومی
Choromosomal Mosaicism

به وجود دو یا تعداد بیشتری وضعیت کروموزومی (کاریوتایپ) مختلف در یک فرد موازئیسم کروموزومی می‌گویند. موزائیسم کروموزومی ممکن است تعدادی یا ساختمانی باشد که نوع تعدادی آن شایعتر است.

یک علت شایع موزائیسم، عدم جدائی صحیح کروموزومی در طی اولین تقسیمات میتوزی زایگوت می‌باشد. برای مثال، یک زیگوت با یک کروموزوم ۲۱ اضافی ممکن است کروموزوم اضافی خود را در طی تقسیم میتوزی در بخشی از سلولها از دست بدهد و فردی موزائیک 46,XX/47,XX+21 بوجود آید. همچنین ممکن است از زایگوتی طبیعی فردی موزائیک 46,XX/47,XX+21 بوجود آید. ارزیابی اهمیت بالینی موزائیسم اغلب مشکل است، مخصوصاً اگر قبل از تولد تشخیص داده شده باشد. اثر موزائیسم بر روی فرد حامل به زمان وقوع عدم جدایی صحیح کروموزومی، کروموزوم درگیر، و بافت‌های درگیر و نسبت این بافتها بستگی دارد. مسئله مهم در موزائیسم این است که نسبت کاریوتیپ‌های کروموزوومی مختلف که در بافت مورد آنالیز دیده می‌شود (برای مثال، آمنیوسیت یا لنفوسیت کشت شده)، لزوماً بیانگر نسبتهای موجود در دیگر بافت‌ها یا جنین نمی‌باشد. در مطالعات آزمایشگاهی، متخصصین سیتوژنتیک تلاش می‌کنند که بین موزائیسم واقعی موجود در افراد و موزائیسم کاذب psedomosaicism که در آن موزائیسم یا شدت آن در کشت سلولی بالا می‌رود، تمایز قائل شوند. تمایز همیشه ساده یا مطمئن نیست. موزائیسم در مطالعات سیتوژنتیک ویلی‌های کورونیک بطور نسبی شایع می‌باشد و می‌تواند منجر به خطا در تفسیر تشخیص قبل از زایمان شود.

در ارتباط با موازئیسم کروموزومی به دو نکته اشاره می‌شود:

(۱) افراد موزائیک بدون علائم کلینیکی معمولاً شناسائی نمی‌شوند، لذا شیوع آماری موزائیسم در جامعه کمتر از شیوع واقعی آن است.

(۲) شدت بیماری در افراد موزائیک از شدت بیماری در افراد تری‌زومی یا مونوزومی کمتر است. این تفاوت شدت در مبتلایان به سندرمهای داون و ترنر بخوبی دیده شده است.

بروز ناهنجاریهای کروموزومی در جامعه

بروز انواع اختلالات کروموزومی در بررسی تعدادی از جوامع تعیین شده است (جدول ۳ ـ ۳). اختلالات عمده تعدادی کروموزومها، شامل سه تری‌زومی اتوزومی (۲۱، ۱۸ و ۱۳) و چهار نوع آنیوپلوئیدی کروموزوم جنسی (45, X ؛ 47, XXY؛ 47, XYY و 47, XXX) می‌باشد و تریپلوئیدی و تتراپلوئیدی از موارد نادر است.

Type of Abnormality	Number	Approximate Incidence
Sex Chromosome Abnormalities in 37,779 Males		
Total	98	1/385 male births
47,XXY	35	1/1080
47,XYY	35	1/1080
Other	28	1/1350
Sex Chromosome Abnormalities in 19,173 Females		
Total	29	1/660 female births
45,X	2	1/9600
47,XXX	20	1/960
Other	7	1/2740
Autosomal Numerical Abnormalities in 56,952 Infants		
Total	82	1/695 live births
Trisomy 21	71	1/800
Trisomy 18	7	1/8140
Trisomy 13	3	1/19,000
Triploidy	1	1/57,000
Structural Abnormalities in 56,952 Infants (Autosomes and Sex Chromosomes)		
Total	144	1/395 live births
Balanced rearrangements		
Robertsonian	51	1/1120
Other	59	1/965
Unbalanced rearrangements	34	1/1675
All Chromosome Abnormalities (Autosomes and Sex Chromosomes)	353	1/160 live births

Data from Hook EB, Hamerton JL (1977). The frequency of chromosome abnormalities detected in consecutive newborn studies, differences between studies, results by sex and by severity of phenotypic involvement. *In* Hook EB, Porter IH (eds) Population cytogenetics: Studies in humans. Academic Press, New York, pp. 63–79.

جدول ۳ ـ ۳: بروز ناهنجاریهای کروموزومی در بررسی نوزادان

میزان بروز ناهنجاریهای کروموزومی در نوزادان حدود یک در ۱۶۰ تولد (۰/۷ درصد) می‌باشد که در جدول ۳ـ ۳ براساس نوع ناهنجاریهای تعدادی کروموزومهای جنسی و اتوزومها و نوترتیبی‌های ساختمانی متعادل و غیرمتعادل طبقه‌بندی شده‌اند. اکثر ناهنجاریهای اتوزومی را می‌توان در هنگام تولد تشخیص داد، اما اکثر ناهنجاریهای کروموزوم X بجز سندرم ترنر، تا بلوغ قابل تشخیص نیستند.

نوترتیبی‌های متعادل از نظر بالینی قابل تشخیص نمی‌باشند، مگر اینکه یک فرد حامل نوترتیبی دچار سقط جنین شود و یا کودکی با وضعیت کروموزومی نامتعادل تولید کند که مبتلا به اختلالاتی مانند دیس‌مورفیسم و یا تأخیر در رشد فیزیکی و یا مغزی باشد و برای یافتن منشاء این ناهنجاریها بیمار و در موارد مثبت، والدین او نیز بررسی کروموزومی شوند.

فراوانی ناهنجاریهای کروموزومی در سقطهای خودبخودی حدود ۵۰ درصد می‌باشد و انواع این ناهنجاریها با آنهایی که در نوزاد زنده دیده می‌شود متفاوت است (جدول۴ ـ ۳ و ۵ ـ ۳). یکی از شایعترین

کاریوتایپها در جنینهای سقط شده، 45, X (سندرم ترنر) است که تقریباً در ۲۰ درصد سقطهای خودبخودی با کاریوتایپ غیرطبیعی ولی در کمتر از یک درصد نوزادان زنده با کاریوتایپ غیرطبیعی دیده می‌شود. ناهنجاریهای کروموزومی جنسی دیگری مانند 47,XXX که در نوزادان زنده بدنیا آمده نسبتا شایع‌اند در سقطها نادر می‌باشد.

جدول ٤ ـ ٣

Frequencies of Chromosome Abnormalities in Spontaneous Abortions

Type	Frequency (Approximate) (Percent)
Aneuploidy	
45,X	20
Autosomal monosomy	<1
Autosomal trisomy	
Total	52
Trisomy 16	16
Trisomy 18	3
Trisomy 21	5
Trisomy 22	5
Other trisomies	23
Triploidy	16
Tetraploidy	6
Structural Rearrangements	4

Data chiefly from Boué A, Boué J, Gropp A (1985) Cytogenetics of pregnancy wastage. Ann Rev Genet 14:1–57.

تفاوتهای دیگری در توزیع انواع تری‌زومی‌ها در سقطها و نوزادان وجود دارد: برای مثال، تری‌زومی ۱۶ حدود یک سوم تری‌زومی‌های سقط شده را شامل می‌شود، اما هرگز در تولدهای زنده دیده نمی‌شود. در جدول ۵ ـ ۳ انواع ناهنجاریهای کروموزومی و تخمین نسبت آنها در ده هزار حاملگی نشان داده شده است.

جدول ۵ ـ ۳

Outcome of 10,000 Conceptions

Outcome	Conceptions	Spontaneous Abortions		Live Births
		No.	*Percent*	
Total	10,000	1500	15	8500
Normal Chromosomes	9200	750	8	8450
Abnormal Chromosomes				
Total	800	750	94	50
Triploid/tetraploid	170	170	100	—
45,X	140	139	99	1
Trisomy 16	112	112	100	—
Trisomy 18	20	19	95	1
Trisomy 21	45	35	78	10
Trisomy, other	209	208	99.5	1
47,XXY, 47,XXX, 47,XYY	19	4	21	15
Unbalanced rearrangements	27	23	85	4
Balanced rearrangements	19	3	16	16
Other	39	37	95	2

مولهای هیداتی فرم و تراتومهای تخمدانی

گاهی اوقات در یک حاملگی غیرطبیعی، بجای جفت یک توده شبیه خوشه انگور بنام کیست هیداتید hydatid cyst بوجود می‌آید که حاصل رشد غیرطبیعی ویلی‌های کوریونی می‌باشد. به این توده مول mole گفته می‌شود. مول ممکن است کامل و بدون وجود جنین یا جفت طبیعی باشد و یا ناقص باشد که با بقایایی از جفت یا شاید یک جنین کوچک آتروفی شده همراه باشد.

اکثر مولهای کامل دیپلوئید و با کاریوتایپ 46,XX هستند و کروموزومها تماماً منشاء پدری دارند. چنین مولهایی ممکن است از لقاح یک اسپرم با فرمول 23,X و تخمکی فاقد هسته ایجاد شود و سپس طی یک دور همانند سازی DNA کروموزومهای اسپرم دو برابر شده و سلول دیپلوئید گردد. چنین تصور می‌شود که فقدان مشارکت هستهٔ مادری، مسئول تکامل غیرطبیعی زایگوت و بافت های حاصل از آن است که معمولا فاقد بافت جنینی می باشد. در تراتوم تخمدانی ovarian teratomas، تومورهای خوش‌خیم که از سلولهای 46,XX حاصل می‌شوند، تنها حاوی کروموزومهای مادری می‌باشند . لذا رشد و تکامل طبیعی جنین نیازمند مشارکت ژنتیکی گامتهای پدری و مادری می‌باشد.

برخلاف مولهای کامل، مولهای ناقص تریپلوئید هستند؛ در دو سوم موارد سری کروموزومهای اضافی منشاء پدری دارند. مقایسه مواردی با منشاء پدری و مادری نشان می‌دهد که در هر دو مورد تکامل جنین بشدت غیرطبیعی است، اما نقص‌ها در موارد منشاء پدری با منشاء مادری متفاوتند. یک سری اضافی از کروموزومهای پدری منجر به تولید تروفوبلاست فراوان، اما تکامل خیلی کم جنین می‌شود، در حالیکه یک سری کروموزوم مادری اضافی باعث کندی شدید رشد جنینی با یک جفت فیبروتیک کوچک می‌گردد چنین به نظر می‌رسد که ژنوم پدری مخصوصاً برای تکامل خارج جنینی و ژنوم مادری برای تکامل جنینی مهم‌تر می‌باشد. اختصاصی بودن اثرات کروموزوم های پدری و مادری ، مثال دیگری از نشانه‌گذاری ژنومی است که در صفحات آینده به آن اشاره شده است .

موزائیسم جفتی محدود
Confined Placental Mosaicism

یک نوع خاص از موزائیسم کروموزومی این است که کاریوتایپ جفت برای یک ناهنجاری کروموزومی موزائیک باشد، ولی کاریوتیپ جنین نرمال باشد. برای مثال، جفت ممکن است 46,XX/47,XX,+15 باشد، در حالیکه جنین ممکن است 46, XX باشد. این حالت، که موزائیسم جفتی محدود نامیده می‌شود، ممکن است منجر به تولید جنینی با فنوتیپ غیرطبیعی گردد زیرا ممکن است هر دو کپی کروموزوم ۱۵ جنین از یک والد منشأ بگیرند. تفسیر آن این است که زایگوت ترمی‌زومی ۱۵ بوده و در قسمتی که منجر به تشکیل جنین شده است، یک کپی از کروموزوم ۱۵ گم شده است و بر حسب تصادف، کروموزوم از دست رفته ممکن است تنها کپی منشأ گرفته از یکی از والدین باشد و منجر به دایزومی تک‌والدینی شود.

فنوتیپ غیرطبیعی در جنین یا نوزادان بدنیا آمده را در بسیاری از موارد می‌توان با حضور ژنهای خاموش ونشانه‌گذاری شده در دایزومی تک والدینی توضیح داد. احتمال موزائیسم جفتی محدود را نباید در آزمایشگاههای سیتوژنتیک قبل از تولد از نظر دور داشت. مثلاً در مثال مذکور، نتیجهٔ ظاهراً نرمال بررسی کروموزومی جنین با استفاده از سلولهای آمنیونی، فنوتیپ غیرطبیعی نوزاد را توضیح نمی‌دهد.

دو جنسی
Hermaphroditism

دو جنسی در انسان بر دو نوع است، دو جنسی حقیقی و دو جنسی کاذب.

دو جنسی حقیقی
True Hermaphroditism

تعیین جنسیت (نر یا ماده) به حضور یا غیبت کروموزوم Y بستگی دارد (شکل ۹-۱). در غیاب Y (تعداد کروموزومهایX به هر تعداد که باشد) فرد جنسیت مونث دارد . مثلا فرد 45,X زنی است مبتلا به سندرم ترنر. اما کسی که کاریو تایپ 46,XY/45,X دارد فردی است که از نظرکروموزومی دو جنسی است و ممکن است از نظر فنوتایپی و گنادی نیز دو جنسی باشد. به این صورت که در ناحیه لگن در یک سمت بیضه و در سمت دیگر تخمدان یا بافتی شبیه تخمدان داشته باشد. فنوتایپ ظاهری و آلت تناسلی خارجی این فرد هر چه که باشد این فرد مبتلا به دو جنسی حقیقی است . وضعیت فنوتایپ ظاهری افراد مبتلا به هرمافرو دیسم حقیقی بسته به گناد غالب ، می تواند بیشتر به یکی از دو جنس شبیه باشد.

دو جنسی کاذب
Pseudo Hermaphroditism

بعضی افراد دارای وضعیت کروموزومی(chromosomal sex) یک جنس و گناد مربوط به همان جنس میباشند، اما دارای فنوتایپ و ظاهر جنسی(phenotypic sex) جنس مخالف می باشند . مثلا افراد 46,XY که فاقد حساسیت به تستوسترون می باشند دارای بیضه بوده ولی آلت تناسلی خارجی زنانه دارند (دو جنسی کاذب مرد) یا افراد 46,XX که دارای تخمدان و رحم بوده و به علت تولید مادرزادی زیاد اندروژن ظاهر تناسلی شبیه بسران دارند (دو جنسی کاذب زن). در دو جنسی کاذب بیمار تنها دارای یکی از غدد جنسی (بیضه یا تخمدان) می باشد .

ابهام جنسی
Sexual Ambiguity

بعضی از افراد یا به خاطر ابتلا به دو جنسی حقیقی یا کاذب و یا اختلالاتی دیگر از نظر اندام تناسلی خارجی وضعیت مشخص و واضحی ندارند یعنی اعلام اینکه نوزاد دختر است یا پسر مشکل می باشد. این افراد دارای برخی علائم جنسی مونث و برخی علائم جنسی مذکر می باشند . برای این افراد بررسی کروموزومی الزامی است و پس از تعیین جنسیت کروموزومی (chromosomal sex) و کاوش برای تعیین نوع گناد، باید هر چه زودتر به اصلاح هورمونی و یا آناتومیکی انها در جهت جنسیتی که موفق تر خواهد بود اقدام نمود . غیر از جنسیت فنوتیپیکی وکروموزومی (ژنتیکی) موضوع مهم دیگر ، هویت جنسی (gender sex) است، یعنی فرد خود را متعلق به چه جنسی بداند. اگر اصلاح هورمونی و یا آناتومیکی نوزاد مبتلا به دو جنسی کاذب دیر صورت پذیرد، فردی که میشد در نوزادی به صورت مونث اصلاح شود و میتوانست یک زندگی اجتماعی نسبتاً طبیعی داشته باشد اگر در ده سالگی شناسائی و آنگاه اقدام به اصلاح فنوتیپ او نمایند چون تا این سن هویت

جنسی او با جنسیت فنوتیپیکی او شکل گرفته است، اغلب در تطبیق رفتار با فنوتیپ جنسی جدید خود مشکل دارد و از نظر روانی و اجتماعی دچار مشکلات عدیده ی میگردد.

سندرمهای ناپایداری کروموزومی
Chromosome Instability Syndromes

سندرمهای تک ژنی نادری وجود دارد که در آنها ناهنجارهای سیتوژنتیکی افزایش می یابد. در هر یک از این اختلالات، یک بررسی کروموزومی مفصل می‌تواند یک روش تشخیصی مهم باشد. ماهیت نقص کروموزومی و احتمالاً نقص زمینه‌ای ملکولی در همانندسازی یا ترمیم DNA، در هر یک از این اختلالات متفاوت می‌باشد. برای مثال، سندرم بلوم Bloom syndrome بوسیله یک نقص در DNA هلیکاز ایجاد می‌شود و منجر به افزایش قابل توجه نوترکیبی سوماتیکی و مبادله بین کروماتیدهای خواهری (شکل ۱۳ ـ۳) وحتی نو ترتیبی rearrangement (شکل ۱۴ـ۳) می‌شود. در مجموع، این اختلالات اتوزومی سندرمهای ناپایداری کروموزومی chromosome syndromes instability نامیده می‌شوند .تعدادی از سندرمهای ناپایدار کروموزومی با افزایش بدخیمی همراه‌اند.

شکل ۱۳ ـ۳

شکل ۱۴-۳

سندرم ICF (Immunodeficiency Centromeric Instability) ، که با نقص ایمنی ، بدشکلی چهره و ناپایداری سانترومر مشخص می‌شود بوسیله نقص در یکی از متیل ترانسفرازهای DNA ایجاد می‌شود که برای ایجاد و نگهداری الگوهای طبیعی متیلاسیون DNA در ژنوم، مثلاً در 5-methylcytosine، لازم است.

نشانه‌گذاری ژنومی و میکرودیلیشن
Genomic Imprinting and Microdeletion

نشانه‌گذاری ژنومی یک پدیدهٔ epigenetic است که موجب تفاوت در بیان یک ژن یا یک منطقه از ژنوم در یکی از جنسهای مؤنث یا مذکر طی گامتوژنز می‌شود. باین پدیده نشانه‌گذاری والدینی parental imprinting نیز گفته می‌شود. در نشانه‌گذاری والدینی یک نسخه از یک ژن که از یکی از والدین (مثلاً پدر) به ارث می‌رسد بیان نمی‌شود و «خاموش» است و نسخهٔ دیگر همان ژن که از والد دیگر (مثلاً مادر) به ارث می‌رسد خاموش نیست و بیان می‌شود. با اینکه هنوز مکانیزم نشانه‌گذاری والدینی مشخص نشده است ولی: (۱) بنظر می‌رسد که نشانه‌گذاری مناطق خاصی از ژنوم توسط متیله شدن آن نواحی صورت می‌گیرد و (۲) طرح مناطق نشانه‌گذاری شده در زنان و مردان متفاوت است، مثلاً برای یک ژن معین همیشه نسخهٔ پدری نشانه‌گذاری می‌شود و نسخهٔ مادری بیان می‌شود و برای یک ژن دیگر بر عکس است.

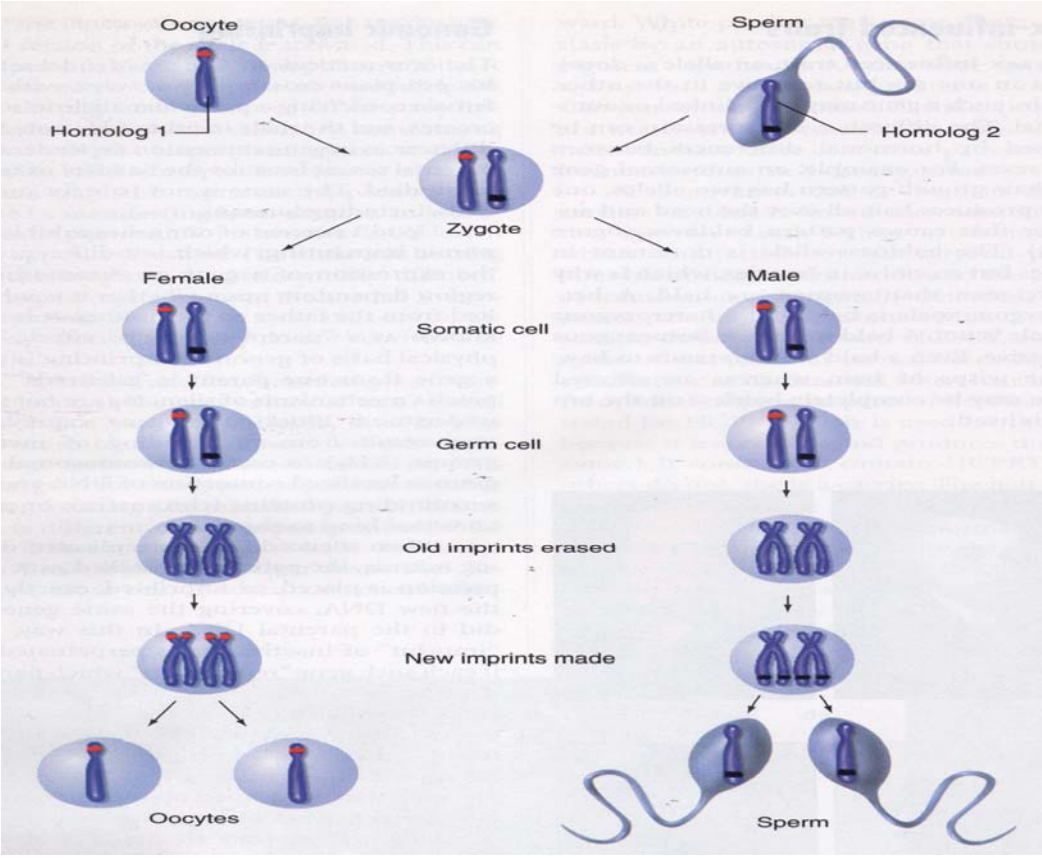
کروموزومهای پدری و مادری زایگوت، هر کدام با طرح خاص خود نشانه‌گذاری والدینی شده‌اندو این طرح در اغلب موارد طی میتوز و همانندسازی‌های مکرر در سلولهای سوماتیک ثابت می‌ماند، یعنی این طرح از سلولی به سلول دیگر به ارث می‌رسد. اما در میوز متیلاسیون مناطق نشانه‌گذاری شده حذف می شود و بسته به نوع گناد، کروموزومها با طرح جدید متیله و نشانه‌گذاری والدینی می‌شوند (شکل۱۵-۳).

یک مثال از نشانه‌گذاری ژنومی مربوط به سندرمهای Prader-Willi (PW) و Angelman است که اغلب حاصل حذفهای کوچکی (microdeletions) از یک منطقهٔ خاص از کروموزوم شمارهٔ ۱۵ (15q11-13) می‌باشند. مبتلایان به سندرم .P.W افرادی چاق، فاقد بلوغ جنسی، معلول ذهنی با دستها و پاهایی کوچک می‌باشند. در افراد سالم برخی از ژنهای منطقه 15q11-13 از جمله ژن PW در کروموزوم ۱۵ پدری بیان می شود و در کروموزوم ۱۵ مادری خاموش است. لذا در اغلب موارد، سندرم .P.W بعلت یک میکرودیلیشن در 15q11-13 پدر بوجود می‌آید.

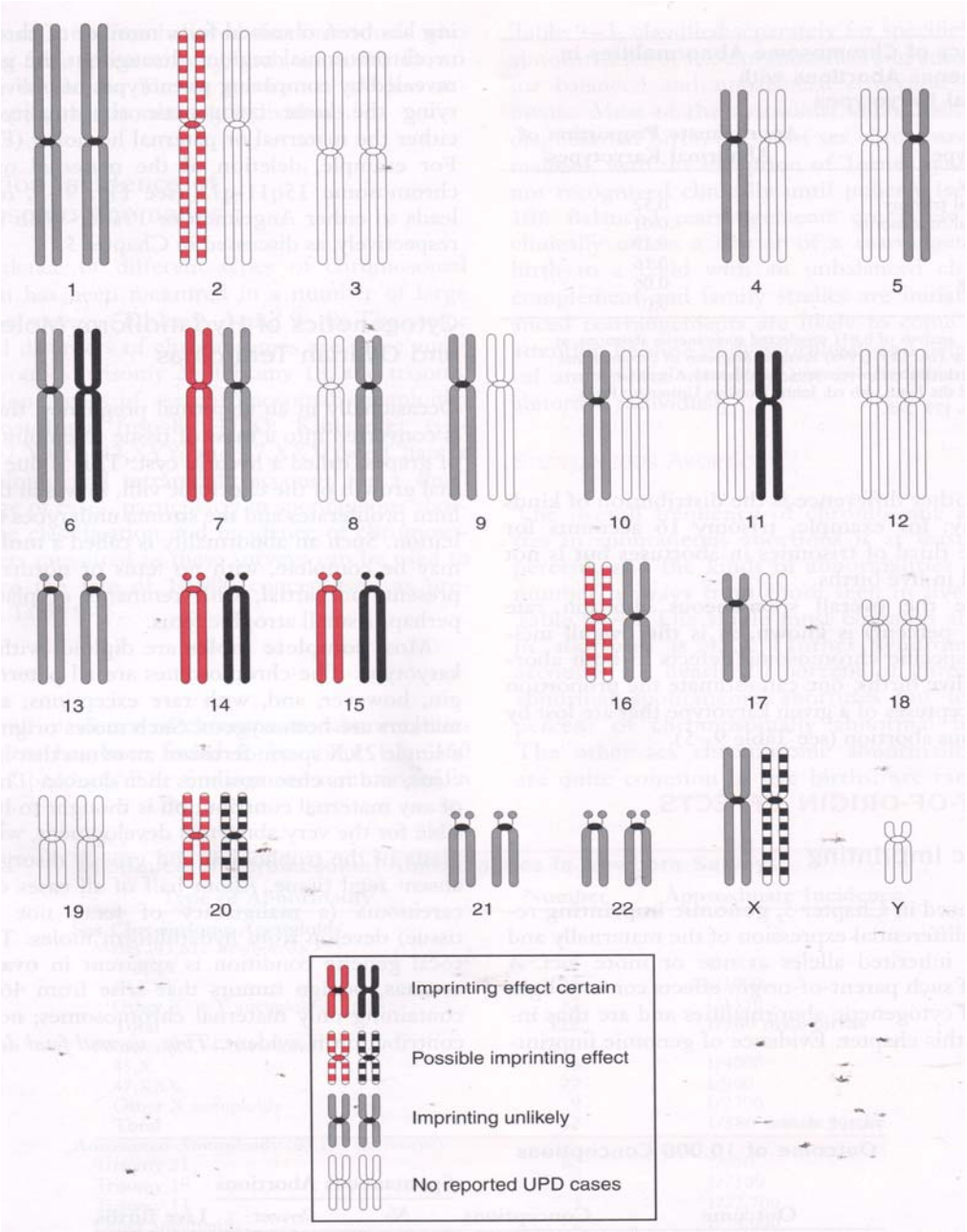
از طرف دیگر برخی از ژنهای منطقهٔ 15q11-13 در زنان بیان می‌شوند ولی در کروموزوم ۱۵ مردان خاموش است. حذف بخشی از اینگونه ژنها از منطقهٔ 15q11-13 کروموزوم ۱۵ و انتقال چنین کروموزومی از مادر موجب ابتلا فرزند به سندرم انجلمن Angelman میشود. در سندرم Angelman آرواره بزرگ و تونوس عضلانی کم بوده و مبتلایان اغلب ظا هر خندان داشته و مبتلا به معلولیت ذهنی شدید میباشند. در اغلب موارد، سندرم انجلمن حاصل حذف بخشی از 15q11-13 مادر است.

البته در تعدادی از موارد، مبتلایان به سندرمها .P.W و Angelman حاصل حذف بخشی از منطقهٔ 15q11-13 نیستند، بلکه حاصل دایزومی تک والدینی (uniparental disomy) برای کروموزوم شمارهٔ ۱۵ می‌باشند.

شواهد نشانه‌گذاری والدینی ا ز نواحی کروموزومی متعددی در کروموزومها در سراسر ژنوم انسان بدست آمده است که حاصل مقایسه فنوتیپهای افراد حامل حذفهای یکسان در همولوگهای پدری یا مادری بوده است. چنین بنظر می‌رسد که حدود ۱٪ ژنوم دچار نشانه‌گذاری والدینی می‌شود و تا بحال این پدیده در بیش از ۳۰ ژن و در کروموزومهای متعددی کشف شده است (شکل ۱۶–۳). غیر از دو سندرم فوق، بیماریهای دیگری مثل دیابت شیرین، اُتیسم و بعضی سرطانها در ارتباط با نشانه‌گذاری والدینی می‌باشند.



شکل ۱۵–۳ در اوولی که در تشکیل زایگوت شرکت کرده است، ژنی در بازوی کوتاه همولوگ ۱کروموزوم 5 طی اووژنز خاموش یا نشانه‌گذاری شده است و در اسپرم ژنی در بازوی بلند همولوگ ۲ کروموزوم 5 طی اسپرماتوژنز نشانه‌گذاری شده است. این کروموزومها پس از تشکیل زایگوت طرحهای نشانه‌گذاری والدینی خود را طی تقسیمات متوالی تا پیدایش فرد بالغ در سلولهای سوماتیک او حفظ می‌کند. اما طی میوز فرد حاصله، نشانه‌های مناطق قبلاً نشانه‌گذاری شده کروموزومهای 5 حذف می‌شوند، تا اگر فرد حاصله مذکر باشد در همهٔ کروموزومهای 5 ژن واقع در بازوی بلند نشانه‌گذاری شود، و اگر مؤنث باشد ژن واقع در بازوی کوتاه در همهٔ کروموزومهای 5 نشانه‌گذاری شوند و به این صور به گامتها و به نسل بعد منتقل شود .



شکل ۱۶-۳

Refrences:

1-Thompson & Thompson Genetics in Medicine, 6th Edition: by Robert L. Nussbaum, Roderick R. McInnes, and Huntington F. Willard (2004)

2-Human Genetics: Concepts and Applications, 6th Edition: by Ricki Lewis and Ricki Lewis (2004)

3-Emery's Elements Of Medical Genetics, 12th Edition: by Peter D. Turnpenny, Sian Ellard (2005)

فصل چهارم

ساختمان و عمل ژن

تعریف ژن:

مقدمه:

ژن‌ها برای اولین بار توسط مندل، کشیش اتریشی قرن نوزدهم میلادی که قوانین اولیه وراثت را بر پایه شواهد و آزمایشهایش بر روی گیاه نخودفرنگی فرمول‌بندی کرد، تعریف شدند.

مندل ژن‌ها را به عنوان واحدهای فرضی مسئول قوای قابل مشاهده یک موجود زنده درنظر گرفت. ما این قوا را فنوتیپ می‌نامیم. در ژنتیک حیوانی بخصوص در ژنتیک پزشکی، فنوتیپ یک مفهوم تقریباً منفی دارد و معمولاً برای اشاره به یک نقص یا بیماری بکار می‌رود. مندل مطالعات خودش را با مشاهدهٔ نحوهٔ وراثت گل‌ها، شکل دانه‌ها، و همچنین خواص سادهٔ گیاه نخودفرنگی آغاز کرد. او بدرستی حدس زد که هریک از والدین، یک نسخه از یک ژن برای هر صفت مشخص را به اشتراک می‌گذارد اما نسخه‌های مختلف یک ژن یا "آلل" در جمعیت وجود دارد. بعضی از این آلل‌ها بصورت "غالب"[1] عمل می‌کنند بطوری که وجود آنها کافی است تا باعث بوجود آمدن فنوتیپ خاصی شود بدون درنظر گرفتن آلل دیگر که توسط والد دیگر به اشتراک گذاشته شده است.
بقیه آلل‌ها بصورت "مغلوب"[2] عمل می‌کنند و نیاز دارند تا والد دیگر یک آلل مشابه باشتراک بگذارد تا فنوتیپ خاصی بروز کند. ما مجدداً به بحث الگوهای مندلی جدا شدن آلل‌ها خواهیم پرداخت و خواهیم دید که چگونه این مفاهیم ساده که ابتدا در گیاه استفاده شده‌اند عیناً برای بیماریهای ژنتیکی انسان قابل استفاده خواهند بود.

یک ژن با محل فیزیکی یالوکوسی از یک کروموزوم که مربوط به سکانس خاص از یک مولکول DNA باشد مطابقت دارد.

آنچه از بحث اصلی در زیست شناسی مولکولی و ژنتیک برداشت می‌شود این حقیقت است که یک ژن با ترکیبی شیمیایی در DNA کدگذاری شده است و DNA به صورت یک نسخه کاراً مد از نوع RNA رونویسی می‌شود و اینکه RNA بصورت یک پروتئین ترجمه شده و نهایتاً بصورت مولکولی، مسئول اثرگذاری بر فنوتیپ است.

[1] Dominant
[2] Recessive

DNA

مندل و متخصصین اولیه علم ژنتیک یک مدل پیچیده ژنتیکی را بدون اطلاع از اساس فیزیکی ژن طراحی کردند. بنابراین، مقصود این کتاب آن نیست که به صورت مفصل جنبه‌های بیوشیمیایی ژنتیک را بررسی کند معذلک، بررسی اجمالی بعضی از اصول ژنتیک مولکولی هردو کار ما را آسانتر می‌کند.

ساختار فیزیکی ژن، DNA است. سه جزء تشکیل دهنده و مولکول DNA عبارتنداز: اسکلت فسفودی استری، باز شیمیایی آلی، واحد کربوهیدراتی دی اکسی ریبوز که دو جزء قبلی را بهم پیوند می‌دهد. چهار باز مختلف در ساختار DNA وجود دارد. آدنین A، گوانین (G) پورین هستند و از دو حلقه تشکیل شده‌اند درحالیکه تیمین (T) و سیتوزین (C) پیریمیدنیهای تک حلقه‌ای هستند.

DNA معمولاً از دو رشته تشکیل شده است که بصورت مارپیچی دو رشته در هم پیچیده شده و بوسیله جفت بازهای مکمل در کنار هم نگه داشته شده‌اند. یک باز پورین با یک پریمیدین جفت می‌شود. بنابراین A با T و C با G جفت باز تشکیل می‌دهند. هر کروموزوم یک مولکول طویل DNA است. از آنجائیکه هر رشته از مولکول DNA به مولکول DNA دیگر توسط پیوندهای غیر کوالان متصل شده است بنابراین امکان تجزیه آن به دو رشته سازنده خود نیز وجود دارد.

RNA :

DNA کدکننده یک ژن به نسخه‌های موقتی RNA پیامبر یا mRNA ترجمه می‌شود که عملکرد آنها به ترجمه پروتئین می‌انجامد. مولکول RNA، به جز چند استثناء، شبیه DNA است. اول آنکه، RNA عموماً تک‌رشته‌ای است. یک مولکول منفرد می‌تواند روی خودش تا بخورد تا ساختمانهای پیچیده دوم و سوم را تشکیل می‌دهد. دوم اینکه، به جای تیمین، RNA از باز یوراسیل (U) استفاده می‌کند. سوم اینکه، کربوهیدرات پایه‌ای RNA، ریبوز، حاوی یک گروه هیدروکسیل اضافی در موقعیت ۲َ است. RNA پلیمراز، مثل DNA پلیمراز، DNA را در جهتَ ۳ ۵ سنتز می‌کند.

رونوشت اولیه RNA در هسته ساخته می‌شود. سپس ویرایش روی آن صورت می‌گیرد تا توالی‌های اینترونی که کدکننده پروتئین نیستند و احتمالاً باقی مانده تاریخ تکامل ژن می‌باشند، حذف شوند و سپس برای ترجمه به سیتوپلاسم منتقل می‌شوند.

تمام RNA پلیمرازها و DNA پلیمرازها اسید نوکلئیک را در جهت ' ۳ ← ' ۵ سنتز می‌کنند.

پروتئین‌ها :

پروتئین‌ها، پلی پپتیدهایی متشکل از واحدهای ساختمانی بنام اسیدهای آمینه هستند. ۲۰ اسید آمینه مختلف در سنتز پروتئین‌ها شرکت دارند. در حین ترجمه روی ریبوزوم‌ها در سیتوپلاسم، توالی RNA در کدون‌های سه بازی خوانده می‌شود. در کل ۶۴ کدون سه‌تایی وجود دارد. از آنجایی که تنها ۲۰ اسید آمینه در ساختار پروتئین

شرکت دارند و هر اسید آمینه با یک یا چند کدون سه‌تایی ممکن شناسایی می‌شود، از این لحاظ، کدهای اضافی وجود دارد. سپس پروتئین‌ها از انتهای آمین به انتهای کربوکسیل سنتز می‌شوند تا هنگامی که با یکی از سه کد پایانی مواجه شوند. در اینجا سنتز زنجیره پلی پپتیدی پایان می‌پذیرد و پروتئین از ریبوزوم آزاد می‌شود. آنگاه، پروتئین ممکنست بصورت پس ترجمه‌ای دستخوش تغییراتی شود[۳] و سپس در بخش مناسب داخل سلول ذخیره شده و یا به محیط خارج سلولی ترشح شود.

پروتئین‌ها از انتهای آمین (N) به سمت انتهای کربوکسیل (C) سنتز می‌شود.

ساختار پایه‌ای یک ژن :

تمام ژن‌ها ترکیبات بازی یکسان دارند (شکل ۱-۴) و منطقه ۵' حاوی عناصر پروموتر[۴] و افزایش‌دهنده[۵] است که مسئول علامت گذاری محل شروع ژن و محل اتصال RNA پلیمراز و دیگر فاکتورهای رونویسی می‌باشد. بلافاصله پس از نقطه شروع رونویسی[۶] جایگاه اتصال ریبوزوم قرار دارد. این قسمت رونویسی می‌شود و اجازهٔ شناسایی mRNA توسط ریبوزوم را برای ترجمه نهایی یک پروتئین می‌دهد به فاصله بسیار کوتاه پشت جایگاه اتصال ریبوزوم، کدون آغازی ATG (AUG در mRNA) قرار دارد که میتونین آغازین را کد می‌کند.

اکثر ژنهای انسانی توسط اینترونها منقطع شده‌اند. منظور توالی‌هایی است که حامل اطلاعات برای ژن نیستند و باید قبل از بلوغ mRNA و ورود آن به سیتوپلاسم برای ترجمه حذف شوند. در انتهای توالی کد کننده توالی یکی از سه کدون پایانی وجود دارد (TAA، TAG، TGA و در mRNA: UAA، UAG، UGA). ناحیه ۳' حاوی علامت پلی آدنیلاسیون است که توسط آنزیمهایی که دم پلی A[۷] را به mRNA متصل می‌کنند شناخته می‌شود.

ساختمان ژن هسته‌ای :

ژن‌ها مناطقی از DNA هستند واحد ساختمانی ژن نوکلئوتید است هر نوکلئوتید نمایندهٔ یک باز آلی (A=آدنین، C= سیتوزین، T=تیمین، و G=گوانین) است. اکثر ژن‌های انسانی از بخش‌های مجزایی ساخته شده‌اند که به آن‌ها اگزون (Exon) و اینترون (Intron) می‌گویند. بعضی از این قطعات مسئول کد اطلاعات مربوط به سنتز پروتئین هستند به این قطعات اگزونی (ORF یا Open Reading Frame) می‌گویند. پس هر اگزون می‌تواند هر دو بخش کدکننده و غیرکدکننده را داشته باشد. این بحث درخصوص

---

[۳] Post translational modification
[۴] Promoter
[۵] Enhancer
[۶] Transcription Intiation Site
[۷] Poly A tail

اگزون اول و آخرین اگزون اکثر ژن‌های یوکاریوتی صادق است. این نواحی به Untranslated region ´3 و ´5 یا (´3UTR و ´5UTR) نیز معروفند. ´5 UTR معمولاً با RNA پلیمراز در رونویسی یک ژن همکاری کرده و ترجمه نمی‌شود.

گاه خود اینترون کد می‌شود و ترانس کریپت یا رونویسی آن در پردازش RNA (Splicing) دخالت می‌کند. در بعضی اینترون‌ها هم توالی‌هایی یافت شده که در تنظیم (Regulation) الگوبرداری نقش دارند. این نواحی با تاخوردگی خاص مجاور توالی‌های تنظیمی ´5UTR قرار گرفته و شرایط ژن را برای استقرار RNA پلیمراز و سایر عوامل تنظیم کننده فراهم می‌آورند. هر ژن یک ناحیه شروع دارد که با توالی نوکلئوتیدی که بنام پروموتر معروف است مشخص می‌گردد. انتهای هر ژن پیام ختم الگوبرداری را در خود دارد. معمولاً در فاصله بین دو ژن نوکلئوتیدهای تکراری مانند GA قرار می‌گیرند که در شروع الگوبرداری یا توقف (Repression) عمل ژن نقش دارند.

هر ژن کدکننده یک پپتید کامل، اطلاعات مربوط به سنتز را ابتدا در غالب RNA و سپس با ترجمه mRNA در سیتوپلاسم به پپتید موردنظر تبدیل می‌کند.

تمام ژن‌ها در جهت ´3 ⟵ ´5 الگوبرداری و ترجمه می‌شوند. توالی‌های نوکلئوتیدی که در بخش پروموتر هر ژن قرار دارد می تواند محل شناسایی اختصاصی هورمونها، کمپلکس هورمون–رسپتور، آنزیم‌ها و پروتئین‌هایی بنام فاکتور الگوبرداری (transcription factor) باشد . این فاکتورهای پروتئینی که معمولاً کمپلکسی از اجزاء پروتئینی متفاوت هستند با توالی‌های نوکلئوتیدی پروموتر برخورد کرده، و پس از آن ساختمان یک ژن آمادهٔ الگوبرداری می‌شود و یا با حضور فاکتورهای پروتئینی دیگری خاموش می‌ماند. درحقیقت شکل فضایی خاصی که نوکلئوتیدها با ردیف شدن کنار یکدیگر پیدا می‌کنند (DNA topology) و حفره‌های بزرگ و کوچک DNA را بوجود می‌آورند (Major and minor grooves) به تنظیم بیان ژن کمک می‌کند.

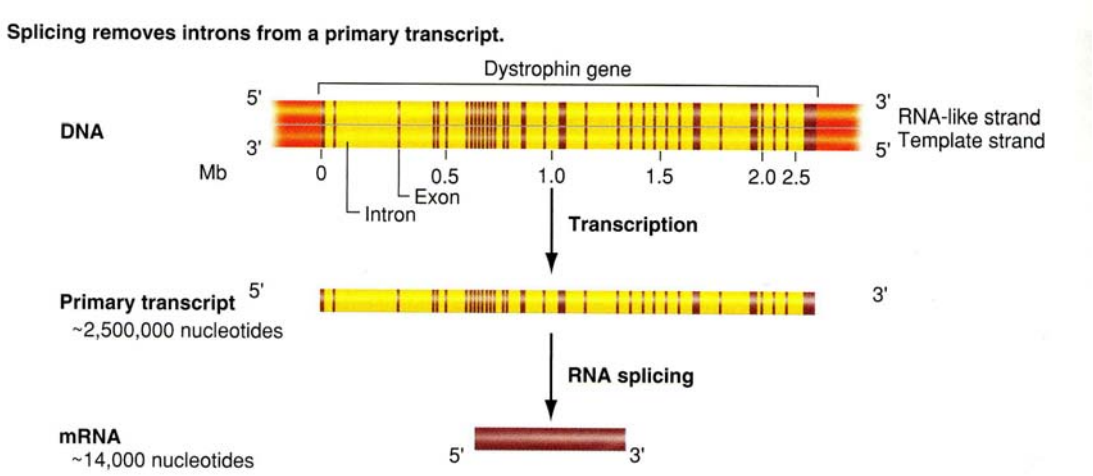
اگر فرض کنیم بین ۳۰ تا ۳۵ هزار ژن در انسان موجود باشد با توجه به طول متفاوت ژن ها ، ژنوم انسان طولی قریب ۶×۱۰^{۹} جفت باز در هر سلول سوماتیک و ۳×۱۰^{۹} جفت باز در هر سلول هاپلوئید خواهد داشت .

ژن‌های ساختمانی و نقش آنها در حیات سلول :

ژن‌های ساختمانی (structural genes) در مقابل ژن‌های تنظیم کننده (Regulaory genes) ژن‌هایی هستند که محصول پروتئینی آن‌ها مستقیماً در ساختمان سلول، اجزاء سلول و غیره نقش دارد. بعنوان مثال ژن‌های β گلوبین (بتاگلوبین) از کروموزوم ۱۱ و α گلوبین (آلفا گلوبین) از کروموزوم ۱۶ ژن ساختمانی هستند. این ژن‌ها در زمان‌های متفاوت رشد و نمای جنینی بیان می‌شوند. در افراد بالغ ژن‌های گلوبین جنینی حضور دارند ولی فاقد عملکرد بوده و بیان نمی‌شوند و تنها ژن گلوبین بالغ بیان می‌شود. ژن‌های α و β گلوبین را از یک خانوادهٔ ژنی (Gene Family) می‌دانند. این دو گروه ژنی به لحاظ ساختمانی بسیار شبیه هم هستند ولی الزاماً روی یک نوع کروموزوم و در یک لوکوس خاص قرار نگرفته و حتی به لحاظ فیزیکی نزدیک هم نیز واقع نشده‌اند. ژن‌های δ و γ و ε گلوبین در زمان رشد و نمای جنینی فعالند. جهش، حذف و

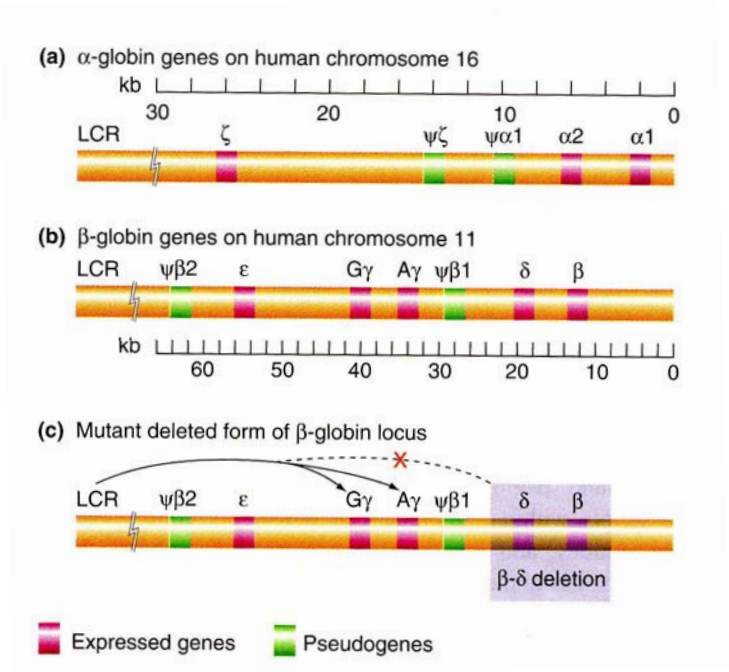
یا هرگونه نقصی در ژن‌های یاد شده می‌تواند موجب توقف سنتز پروتئین، تولید گلوبین ناقص یا غیرفعال شود که عوارض آن را در فصل مربوط به خود خواهید خواند.(شکل ۲-۴)

ژن‌های کدکننده توبولین که در تشکیل دوک تقسیم سلولی دخالت دارند، ژن‌های کدکننده پروتئین‌های کانال‌های غشایی، ژن دیستروفین و ژن کلاژن از دیگر ژن‌های ساختمانی هستند که صدمه به هریک می‌تواند آثار جبران‌ناپذیری در حیات و سلامت یک فرد به بار آورد.



شکل (۱-۴):

ژن دیستروفین انسانی: مثال بسیار خوبی برای پردازش RNA. اگرچه طول ژن دیستروفین۲۵۰۰ کیلوباز (2500kb) است mRNA آن تنها ۱۴۰۰ کیلو باز(1400 kb) طول دارد.بیش از ۸۰ اینترون آن از رونوشت اولیه (Primary transcript) حذف شده و بعد از تکمیل پردازش mRNA بالغ به وجود می آید.



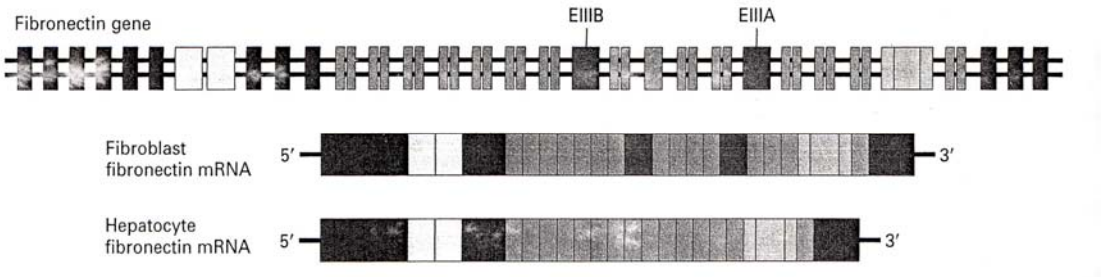
شکل(۲-۴):ژنهای αوβ گلوبین در دو کلاسترژنی روی دو کروموزم متفاوت ۱۱و۱۶

چگونگی و مکانیسم بیان ژنی (Gene Expression) :

بیان یک ژن یعنی خوانده شدن اطلاعات موجود روی آن بصورت RNA و نهایتاً پـروتئین. بنـابراین مـی‌تـوان گفت بیان ژن دو مرحله‌ای است اول الگوبرداری از روی توالی نوکلئوتیدی یک ژن در DNA و انتقـال آن بـه روی رشته RNA که قابلیت انتقال بـه سیتوپلاسـم را پیـدا مـی‌کننـد. دوم) ترجمـه RNA سیتوپلاسـمی بـا میانجیگری ریبوزوم‌ها به پروتئین.

بیان یک ژن ارتباط مستقیم با توالی‌های خاص پروموتر دارد. این توالی‌ها با تـرانس کریپـشن فاکتورهـا و سـایر تحریک کننده‌ها (stimulators) مانند هورمون‌ها و کمپلکس هورمون رسپتور در یک ارتباط دو طرفه موجب بیان مثبت یا منفی ژن می‌شوند. در بیان مثبت ژنی ارتباط این عوامل با پروموتر موجب اتصال RNA پلیمراز و سایر پروتئین‌های دیگر در رونویسی می‌شود. به دنبال آن آنزیم RNA پلیمـراز بطـرف ´۳ ژن حرکـت کـرده و سنتز یک رشته RNA از رشته مکمل DNAاش شروع می‌شود. زمانی که RNA پلیمراز به ردیف خـاص از نوکلئوتیدها می‌رسد شکل فضایی (هرپین)، نوع نوکلئوئیدهای قبلی و بعدی (فراوانـی A یـا T) موجـب ضـعیف شدن و جدا شدن آنزیم از DNA شده درنتیجه الگوبرداری خاتمه می‌یابد.

RNA بوجود آمده در یوکاریوتها اغلب RNAای هتـروژن بـوده و نـواحی اگـزون و اینتـرون هـر دو را دارد. RNA هتروژن (mRMA) باید پردازش شود. به این منظور نوکلئوتیدهای خاصی در دو پایانه هـر اینتـرون (GU در شروع و AG در انتها) موجب شناسایی کمپلکس پروتئینی خاصی می‌شوند که ارتباط با آنها نهایتاً بـه قطع و حذف اینترونها و بهم پیوستن اگزون‌ها منجر می‌شود. نوع پردازش و اگزونهایی که بهم متصل مـی‌شـوند می‌تواند متفاوت باشد (Alternative splicing) درنتیجه اطلاعات متفاوتی برای کد یـک پـروتئین شـکل می‌گیرد. (شکل ۳-۴)

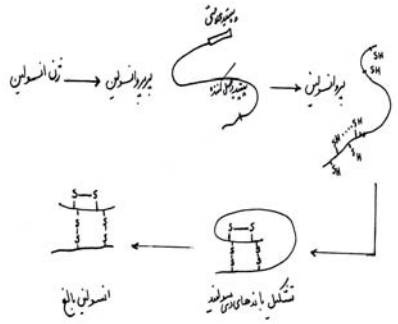


(شکل ۳-٤) : پردازش با اختصاص بافتی رونوشت اولیه فیبرونکتین در فیبروبلاستها و هپاتوسیتها

علل تنوع بیان ژن:

علت اصلی تنوع در بیان یک ژن یوکاریوتی پردازش متفاوت hnRNA آن ژن است. چون این تغییرات پس از رونویسی اتفاق می‌افتد به آن تغییرات پس از رونویسی (Posttranscriptional modification) می‌گویند. یک مثال بسیار شناخته شده از این نوع را در تولید آنتی‌بادی‌های متنوعی مشاهده می‌کنیم که به دنبال بیان یک ژن واحد λ یا k در همراهی با رشته بزرگ مولکول آنتی‌بادی تشکیل می‌شوند. پردازش متنوع موجب پیوست اگزون‌های متفاوتی از رشته‌های کوتاه می‌گردد که نهایت مولکول آنتی‌بادی با محل اتصال برای یک نوع آنتی‌ژن بخصوص تولید می‌شود.

گاه mRNA بالغ با ردیف کامل اگزون هایش وارد سیتوپلاسم می‌شود. در سیتوپلاسم به کمک ریبوزومها به رشتهٔ کامل پپتیدی تبدیل می‌گردد ولی بخش یا بخش‌هایی از آن قبل از اینکه شکل فضایی اصلی خود را پیدا کند حذف می‌شود. بعنوان مثال پپتید علامتی (Signal peptide) که خود اگزون واحدی دارد حذف می‌شود و باقی رشته یا دچار تغییرات دیگر هم می‌شود و یا بدون تغییرات اضافی با تشکیل پیوندهای دی سولفید (S-S) شکل سه‌بعدی نهایی خود را پیدا می‌کند. این تغییرات را پس از ترجمه (post translational modification) می‌گویند. در بیان ژن انسولین این نوع تغییرات به شرح زیر ملاحظه می‌شود:(شکل ۴-۴)

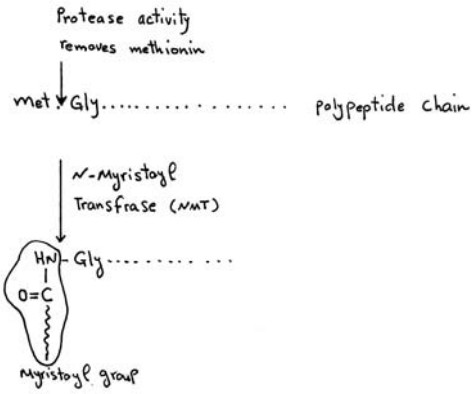


(شکل ۴-۴) : تغییرات پس از ترجمه انسولین . پرپروانسولین ابتدا پپتید علامتی را از دست داده و داخل شبکه اندوپلاسمی می‌شود. در این شبکه پروانسولین با تاخوردگی روی خود دو اگزون ابتدایی و انتهایی مولکول را کنار هم قرار داده و موجب تشکیل پیوندهای دی‌سولفید در این نواحی شده سپس بخش بینابینی مولکول بنام پپتید اتصال دهنده تیز حذف شده و انسولین کامل بطرف شبکه گلژی حرکت و نهایتاً ترشح می شود.

از دیگر تغییرات پس از ترجمه یک پروتئین که باعث تنوع بیان ژن می‌شود مریستولاسیون و پرینیلاسیون است.

: N-Myristoylation

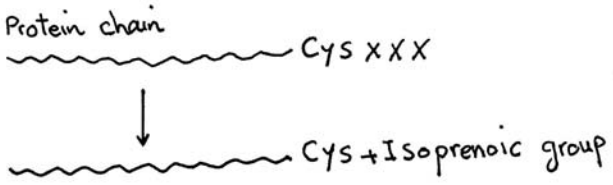
مریستول COA یک نوع لیپید است با اتصال این لیپید به ابتدای یک رشته پلی پپتیدی پس از حذف میتونین شروع، پلی پپتید یا پروتئین تولید شده توانایی اتصال به غشاء پلاسمایی سلول را خواهد داشت. (شکل ۵-۴)



(شکل ۵-۴) : مریستولاسیون

: Prenylation

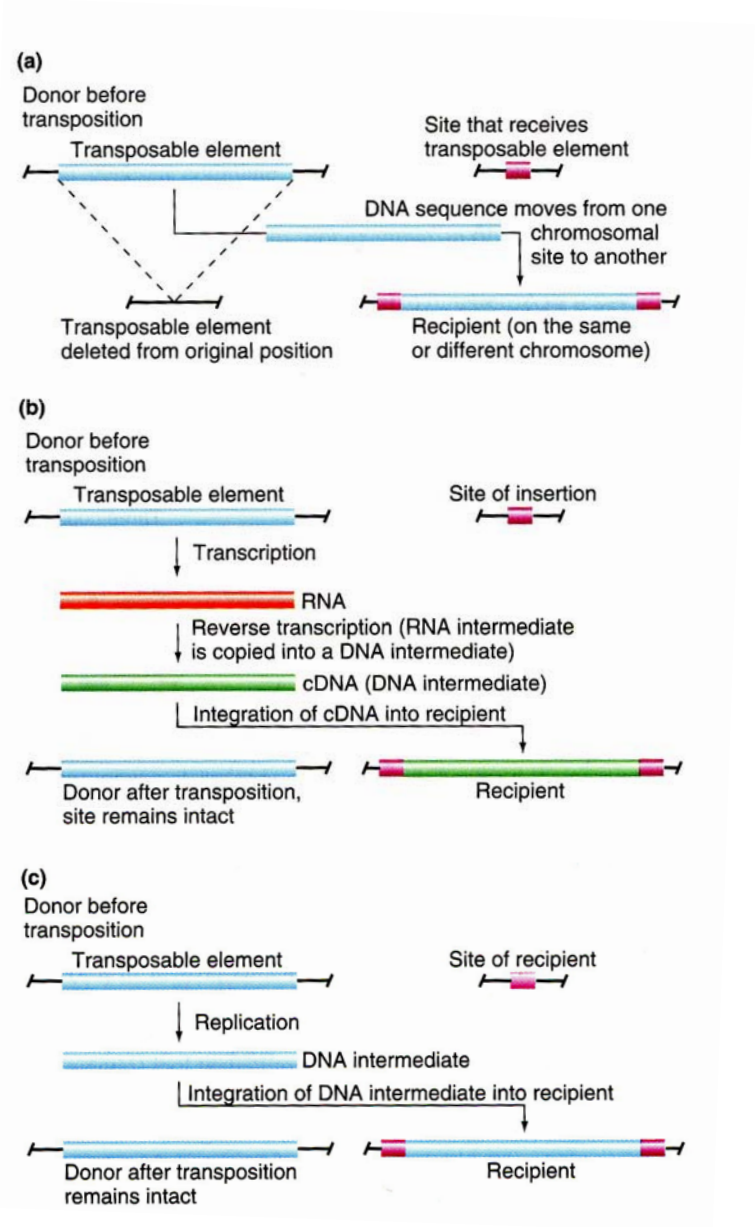
بعضی پروتئین‌ها برای اتصال به بخش داخلی غشاء پلاسمایی یا قسمت داخلی غشاء هسته در C ترمینال خود از طریق یک پیوند تیواتر (-S-) به یک گروه ایزوپرنوئیک متصل می‌شوند مثل پروتئین "Ras". (شکل ۶-۴)



(شکل ۶-۴) : پرینیلاسیون

عناصر متحرک ژنتیکی (Transposale elements) :

این عناصر از دیگر عوامل تنوع ژنتیکی هستند. این مولکول‌ها قطعات دو رشته‌ای خطی DNA می‌باشند که همواره در ژنوم یوکاریوت‌ها بصورت ادغام شده یافت می‌شوند عناصر متحرک اولین بار در گونه‌ای از ذرت و بعد در دروزوفیلا کشف شدند . طول آنها بین kb ۱۰-۲ متغیر بوده و به تعداد ۱۰-۵ کپی در هر سلول وجود دارند(شکل ۷-۴). در انسان و مخمر بعدها کشف گردیدند. بنابراین با جابجایی این قطعات در بین ژنها ممکنست ژن یا ژنهایی غیرفعال شده و یا برعکس بیان آنها تحریک شود.



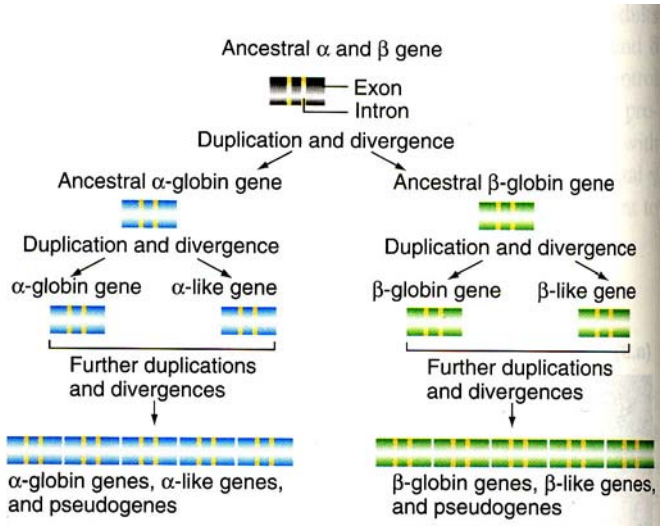
شکل (۷-۴): دوپلیکاسیون به کمک ترانسپوزیشن . سه احتمال ممکن

جهش و نوترکیبی ژنتیکی (Genetic Recombination , mutation) :

به تغییر ژن یا تغییر محصول ژن منجر می‌شوند. نوترکیبی ژنتیکی (G. **Recombination**) موجب نوترکیبی‌های ژنی با فراوانی غیرقابل باور می‌گردد. دلسیون (Deletion) و مضاعف شدن (Duplication) یک ژن پس از ابقاء در سلول‌های دختر موجب تولید پروتئین‌هایی با نقش کاملاً جدید می‌شوند. ژنهای اکتین (Actin) برای انواع مختلف سلولهای قابل انقباض یا ژنهای مختلف کلاژن (Collagen) برای انواع مختلف بافت پیوندی مثال‌هایی برای این نوع مکانیسم ژنتیکی هستند.

تکرار های متوالی (Tandem Repeats):

تکرارهای متوالی را می‌توان یکی دیگر از عوامل تنوع ژنتیکی دانست. بدلایل مختلفی ممکنست از یک ژن همانندسازی مکرر صورت بگیرد و باز هم به دلایل متعدد ممکنست قطعات DNA در نواحی مختلفی شکسته شده و مجدداً در جایی دیگر بهم متصل شوند و باعث به وجود آمدن چندین کپی متوالی از یک ژن گردند که به آن تکرارهای متوالی یک ژن می‌گویند. این تکرارهای ژنی ممکنست در اثر نوترکیبی نابجا بین کروموزوم‌های همولوگ به جای دیگری از ژنوم منتقل شده و اساس نوترکیبی و نوترتیبی‌های جدید را فراهم آورد. در چنین حالاتی امکان بوجود آمدن تکثیر (DNA Amplification) بسیار زیاد است و این همان روندی است که می‌تواند باعث افزایش کپی‌های ژنهای پروتو-انکلوژن شده و موجب تحریک و ایجاد سرطان گردد (promotion Of Cancer). خانوادهٔ ژنی گلوبین (Globin Gene family) مثال خوبی از این تکرارهای متوالی ژنی است. همولوژی غیرقابل انکار ساختمان و ترادف اسید آمینه‌های ژن‌های گلوبین امروزی نشانگر آنست که همهٔ آن‌ها از یک ژن اجدادی مشترک مشتق شده‌اند. گرچه تعدادی از انواع جدید این خانوادهٔ ژنی جایگاههای متفاوتی را در ژنوم پستانداران اشغال میکند. مولکول هموگلوبین این امکان را به موجودات بزرگ جثه می‌دهد تا دیگر اکسیژن را تنها از سطح بدن خود جذب نکنند. شکل بسیار ابتدایی هموگلوبین حدود ۱۵۰ اسید آمینه دارد که در بسیاری از کرم‌های دریایی، حشرات و ماههای ابتدایی یافت شده است. مولکول هموگلوبین در مهره داران عالیتر از دو نوع رشته گلوبین شکل می‌گیرد و بنظر می‌رسد ۵۰۰ میلیون سال پیش ضمن تکامل ماهی‌ها، یکسری جهش‌های ژنی و دوپلیکشن‌ها (مضاعف شدن) اتفاق افتاده که منجر به حصول دو ژن گلوبین مختلف گشته است. این دو ژن زنجیره‌های α و β گلوبین را در ژنوم هر فرد کد می‌کنند (شکل۸-۴). در مهره‌داران عالیتر امروزی، هر مولکول هموگلوبین کمپلکسی است از ۲ زنجیرهٔ α و دو زنجیرهٔ β . چهار محل اتصال اکسیژن در مولکول $\alpha_2\beta_2$ بهم برخورد کرده و به محض اتصال با اکسیژن و آزاد کردن آن یک تغییر آلوستریک در مولکول ایجاد می‌شود.



شکل(۸-۴): تکامل خانواده ژنی گلوبین. مضاعف شدن ژن اجدادی و به دنبال آن انشعاب محصولات دوپلیکاسیون مجزا رده ژنهای α وβ گلوبین را به وجود می آورد.دوپلیکاسیون های بیشتر و انشعابهای جدید درون هر رده به تولید دو دسته ژن و شبه زن خانواده گلوبین می انجامد.

عمل آزادسازی اکسیژن در بافت ها مسلماً زمانیکه دو زنجیره هموگلوبین بجای یک زنجیره باشد بهتر انجام می‌گیرد. در طول جریان تکاملی دو زنجیرهٔ β هم جهش یافته و یک رشته شبه β بوجود آورده است که در جنین دیده می‌شود. این رشته برآیند بسیار بالاتری نسبت به هموگلوبین بالغ در حمل اکسیژن دارد و موجب انتقال اکسیژن از مادر به جنین می‌شود. این رشته β هم جهش یافته و دو ژن جدید ε, γ را به وجود آورده است. هموگلوبین β بالغ هم در طول تکامل میمون‌ها جهش یافته و ژن δ را پدید آورد که $\alpha_2\delta_2$ را در میمون‌های بالغ تشکیل می‌دهد. هریک از این ژنهای مضاعف شده با جهش‌های نقطه‌ای تغییراتی یافته و درنتیجه محتوای مولکول هموگلوبین نهایی را دستخوش تغییر نموده است. مناطق تنظیم کننده ژنی که زمان و میزان بیان ژنی را تحت کنترل دارند نیز تغییر یافته‌اند. دستاوردهای این تغییرات و دو پلیکاسیون‌های ژنی جدایی زنجیره‌های گلوبین از یکدیگر می‌باشد.

توارث میتوکندریایی (Mitochondrial Inheritance) :

در اوایل قرن ۲۰ کشف DNA میتوکندری و کلروپلاست موجب کشف فاکتورهای وراثتی خارج از هسته گردید گیاه‌شناس آلمانی (Card correns) از اولین کسانی بود که با مطالعهٔ گیاهان قوانین و اصول مندلی را دوباره کشف می‌کرد. در مطالعات اولیه مشخص گشت که کدام یک از این دو ارگانل مسئول توارث غیرهسته‌ای هستند. بعدها با مطالعهٔ مخمرها (yeast) که فاقد سیستم کلروپلاست هستند نقش میتوکندری و اهمیت آن در توارث غیرهسته‌ای مشخص گردید.

توارث از طریق ارگانل‌ها غیرمندلی است و توزیع آلل‌ها به طور غیریکسان صورت می‌گیرد. از آمیختن(Cross) تخمک گیاهان سبز و دانه گرده گیاهان سفید، نسل اول همه گیاهان سبز شدند و در نسل دوم که کراس بین $F_1 \times F_1$ صورت گرفت ماده‌ها و پایه های نرهمه سبز شدند. ولی تمام افراد حاصل از آمیختن پایه های نر سبز و ماده سفید ، رنگ سفید نشان می دادند .

آزمون مشابهی در گیاهان دیگر صورت گرفت و نتیجه گرفتند که فاکتورهایی کـه در اوول هـست بـه نـسل‌هـا منتقل شده و موجب بروز رنگ سبز در آنها میشود. در یوکاریوت‌های عالی معمولاً ایـن انتقـال غیرهـسته‌ای از طریق ماده (f) صورت می‌گیرد. تحقیقات اخیر نشان داده کـه تعـدادی از بیمـاری‌هـای انـسانی را نقـص‌هـای میتوکندریایی باعث میشود و در بعضی موارد این نقص‌ها بدلیل موتاسیون‌هـایی در mt DNA اسـت. یکـی از این بیماری‌هانقص وراثتی بینایی لبر[8] است.

که کوری ناگهانی در افراد بزرگسال راموجب می‌شود. از نظر فیزیولوژیک این بیماری بعلت مرگ عـصب بینـایی است و در سطح مولکولی به موتاسیون‌هایی مربوط است که در هریک از ژن‌های میتوکندریایی اتفـاق مـی‌افتـد. هریک از این موتاسیون‌ها یک اسید آمینه رادر یکی از پروتئین‌های میتوکندریایی تغییـر مـی‌دهـد کـه درنتیجـه موجب کاهش فرایند فسفوریلاسیون اکسیداتیو می‌شود. این کاهش (reduction) بقـدری بـزرگ اسـت کـه برای تخریب عمل عصب بینایی و کوری نهایی کفایت می کند .

هنوز معلوم نیست که چرا این اثر کشنده فقط به عصب بینایی ارتباط داده شده، شاید سلول‌های عصبی به طـور خاصی به توقف متابولیسم هوازی (aerobic) حساسند. LHON از طریق مادر به ارث می‌رسد. مورد دیگـر pearson marrow-pancreas syndrome است که بخاطر موتاسیون در mtDNA بوجود مـی‌آیـد. عوارض آن از بین رفتن سلول‌های مغز استخوان در زمان بچگی است و کشنده می‌باشد. Deletion بزرگی در mtDNA موجب آن است.

افراد مبتلا به این سندرم هرگز والدین مبتلا ندارند بنابراین این deletion احتمالاً به طور خودبخودی در حـین رشد و نمای جنین و در حین اووژنز مادر به وقوع می‌پیونـدد. افـرادی بـا ایـن بیمـاری مخلـوطی از mtDNA طبیعی و حذفی دارند که خود نمونه‌ای از هتروپلاسمی (Heteroplasmy) میتوکندریایی است. افـرادی کـه برای این حذف ژنوم میتوکندری هموپلاستیک باشند و سیندرم فوق را نـشان دهنـد هرگـز مـشاهده نـشده‌انـد، احتمالاً بدلیل وجود اثرات تجمعی جهش های میتوکندری های موتانت اینها معمولاً در اوایل دوران رشـد و نمـا می‌میرند.

ژنتیک مولکولی میتوکندری:

mtDNA در دهۀ ۱۹۶۰ با مشاهدۀ فیبرهای شبیه DNA در میتوکندری‌ها کشف گردید. با مطالعۀ گونه‌های مختلفی تاکنون توانسته‌اند مولکول‌های mtDNA را مورد بررسـی، تجزیـه و تحلیـل قـرار دهنـد و سـکانس نوکلئوتیدی کامل آن را (در این گونه‌ها) مشخص کنند .

طول مولکول‌های mtDNA در حیوانات مهره‌دار بـین kb ۲۵۰۰- ۱۶ متغیـر اسـت. بنظـر مـی‌رسـد در هـر میتوکندری چندین کپی از DNA وجود دارد و چون هر سلول یوکاریوتی تعـداد زیـادی میتوکنـدری دارد پـس تعداد مولکول‌های mtDNA زیادی در هر سـلول وجـود خواهـد داشـت. (حـدود ۱۰[8] کپـی از mtDNA در اووسیت مهره‌داران). سلول‌های سوماتیک تعداد کمتری دارنـد (۱۰۰۰ یـا کمتـر) . اکثـر mtDNA دو زنجیـرۀ

[8] Leber's hereditary optic neuropathy"(LHON)

حلقوی هستند اما در بعضی گونه‌ها مثل کلامیدوموناس رنهار دئی خطی می‌باشند. ولی نوع حلقوی بیشتر مطالعه شده است.

در مهره‌داران حدود ۳۷ ژن مجزا که در یک حلقه DNA kb ۱۷-۱۶ قرار دارند کشف شده است. بین این ژن‌ها یا فضایی وجود ندارد یا فضای بسیار کوچکی هست. در گیاهان به خاطر وقوع نوترکیبی درون مولکولی یا Intramolecular Recombination، ژن‌ها از هم جدا شده‌اند و در دو حلقهٔ متفاوت قرار می‌گیرند.

در انسان مولکول mtDNA حدود bp ۱۶۶۵۹ طول دارد و ۳۷ ژن در روی آن شناسایی شده است. از جمله این ژن‌ها: ۲ ژن کدکنندهٔ RNAهای ریبوزومی، ۲۲ ژن کدکننده tRNAهای مختلف، ۱۳ ژن کدکنندهٔ پلی پپتیدهای درگیر در فسفوریلاسیون اکسیداتیو می باشد .

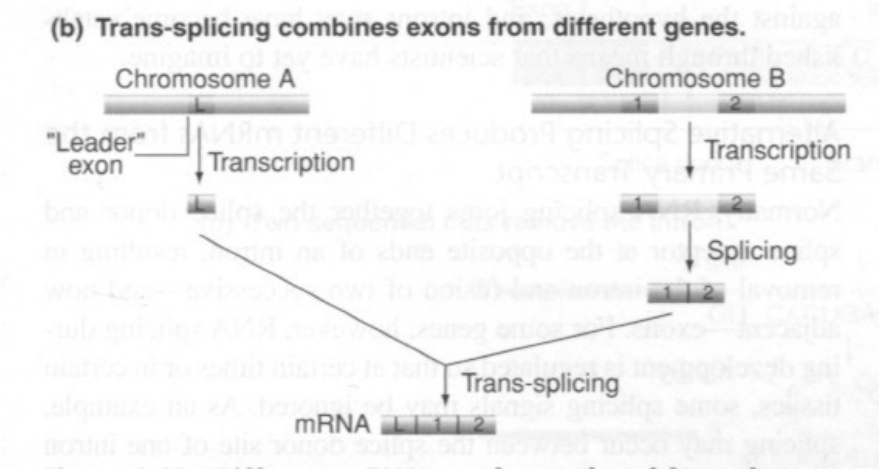
mtDNA موش، گاو و گوسفند و قورباغه شبیه به انسان است که نشانهٔ حفظ (Conservative) آن بین مهره‌داران است . در بی‌مهرگان هم mtDNA هم اندازهٔ mtDNA مهره‌داران است ولی به لحاظ ژنتیکی متفاوت میباشد. به نظر میرسد که نوترتیبی‌های ساختمانی ژن‌ها (Structural rearrangement) در مولکول mtDNA موجب این تفاوتها شده است. در mtDNA انسان یک رشته (H) از دانسیتهٔ بیشتری نسبت به رشته دیگر (L) برخوردار است. (در محلول قلیایی). هر دو رونویسی می‌شوند، نقطهٔ شروع رونویسی (Transcription Initiation Site) در بالا دست (upstream) ژن tRNA فنیل آلانین قرار دارد. نسخه برداری از رشته H موجب کد ۲ rRNA و ۱۴ tRNA و ۱۲ پلی‌پپتید می‌شود. درحالیکه نسخه‌برداری از رشتهٔ L در همین ناحیه موجب کد ۸ عدد tRNA و یک پلی‌پپتید می‌گردد.

هر ترانس کریپت بریده می‌شود تا tRNA را از RNA های ریبوزومی و mRNA ها جدا کند و سپس mRNAها پلی آدنیلیت می‌شوند. سپس هر mRNA به کمک ریبوزوم‌های میتوکندریایی و ترکیبی از tRNA های ریبوزومی و هسته‌ای به پلی پپتیدهایی ترجمه می‌شوند.

عمل ترجمه در میتوکندری مثل آنچه در سیتوزول اتفاق می‌افتد است، بجز اینکه بعضی کدون‌ها معنای دیگری دارند. AGA و AGG در mtDNA پستانداران کدون‌های ختم هستند درحالیکه در سیتوزول باعث جایگزینی آرژنین در رشته پلی‌پپتیدی می‌شوند. (یعنی کدون آرژنین هستند.)

UGA که در سیتوزول کدون ختم ترجمه است در میتوکندری کدون شروع میتونین است. بنابراین مشاهده می‌شود که کد ژنتیکی آنچنان هم همه شمول (universal) نیست. عقیده بر این است که در حین تکامل و به مرور زمان ، میتوکندری‌ها کد ژنتیکی خود را تغییر داده و از شکل یک ارگانیسم زندهٔ آزاد، بصورت یک موجود وابسته درآمده‌اند. یعنی زمانی که شاید یک میلیارد سال قبل وارد یوکاریوتها شده است.

در مورد رونویسی میتوکندری‌ها اطلاعات زیادی در دست نیست. اما در مخمر .mt RNA پلیمراز یک پلی‌پپتید واحد است که توسط یک ژن هسته‌ای (هستهٔ یوکاریوت) کد می‌شود. بنابراین کوچکتر از RNA .Pol، E.coli است. mt RNA گیاهان معمولاً پس از سنتز تصحیح می‌شود و $U \rightarrow C$ تبدیل می‌شود. در پروتوزآ gRNA (guide RNA) ها که مولکولهای کوچکی هستند، موجودند که در mtRNA edit دخالت دارند. اینها مکمل ترانس کریپت‌های mtDNA هستند. در بعضی میتوکندری‌ها بروش Trans-splicing، mtRNA تغییراتی پیدا می‌کند. این ترانس اسپلایسینگ وقتی اتفاق می‌افتد که قطعات یک ژن در کل mtDNA پراکنده باشند. هر قطعه ژن به طور مستقل رونویسی می‌شود و سپس اگزون‌های قطعات ژنی بهم متصل می‌شوند (از طریق ترانس). (شکل۹-۴)



(شکل ۹-۴) : ترانس اسپلایسینگ.در این حادثه نادر اگزون های ژن های مختلف بهم پیوسته و یک mRNA کامل بوجود می آید .

بعنوان مثال در گندم ژن Nad1 که ساب یونیتی از NADH reductase را کد می‌کند (یکی از پروتئین‌های فسفوریلاسیون اکسیداتیو) ۴ قطعه دارد و هر قطعه در بخشی از مولکول mtDNA قرار دارد. آنچه از بهم پیوستن اگزون‌های این قطعات بهم به وجود می‌آید یک mRNA واحد است که پروتئین مزبور را کد می‌کند.

باید توجه داشت که محصول ژن‌های میتوکندریایی با همکاری محصولات ژنی هسته‌ای که وارد میتوکندری می‌شوند به وجود می آیند. مثلاً mtrRNA + پروتئین‌های ریبوزومی که ژن‌های هسته‌ای کد کرده و داخل میتوکندری شده‌اند ریبوزوم‌های میتوکندری را می‌سازند.

بسیاری از پلی‌پپتیدهایی که برای متابولیسم هوازی (aerobic) لازمند در سیتوزول (هسته‌ای) سنتز می‌شوند که شامل: ساب یونیتهای تعدادی از پروتئین‌های درگیر در فسفوریلاسیون اکسیداتیو نظیر ATPase که مسئول اتصال انرژی متابولیسم هوازی به ATP است. به هرحال چون بعضی از ساب یونیتهای این پروتئین در میتوکندری سنتز شده‌اند، پروتئین کامل مخلوطی است از محصولات ژنی میتوکندریایی و هسته ای . این ترکیب پیشنهاد می‌کند که سیستمهای ژنتیکی میتوکندریایی و هسته‌ای بعضی مواقع همکاری کرده و مقادیر مناسب محصولات خود را می‌سازند. مکانیسم‌های مولکولی احتمالی این همکاری مورد تحقیق می‌باشد.

بنابراین برای عملکرد دقیق و صحیح میتوکندری همکاری بین هسته و میتوکندری لازم است.

: Mt DNA and Human disease

موتاسیون‌های بسیار جزئی در ارتباط با تغییرات ساختمانی mtDNA وجود دارند . در بعضی موارد این تغییرات به حذف کامل این DNA انجامیده است. تحقیقات اخیر نشان داده است که تعدادی از بیماری‌های انسانی بخاطر نواقص میتوکندریایی بوجود می‌آید. این نواقص به دلیل موتاسیون‌هایی است که در mtDNA ایجاد می‌شود.

به جدول زیر جهت آشنایی با تعددای از این بیماریها توجه فرمائید .

MITOCHONDRIAL DISORDERS: CLINICAL SYNDROMES

Myopathy syndromes
Infantile myopathies
Fatal: mtDNA depletion
"Later-onset": mtDNA depletion
Inflammatory myopathy
: Mpl mtDNA deletionsInclusion body myositis
mtDNA depletion: "Later-onset"
: Mpl mtDNA deletionsPM + COX- muscle fibers
: mt ATPase6NARP/MILS
Neoplasms
Neuropathy syndromes
: MFN2; 1p36CMT 2A2
: GDA P1; 8q21CMT 4A
Sporadic; Recessive Sensory neuropathy:
: ATPase 7a; Xq12Occipital horn syndrome
Ophthalmoplegia, External (PEO)
: Multiple mtDNA deletionsDominant
: mtDNA point mutationsMaternal
: mtDNA depletion; Multiple mtDNA deletions Recessive
: Single mtDNA deletionSporadic
? Immune (HyperThyroid)
Optic atrophy
Paraganglioma
: SDH Subunit D; 11q23PGL1
: SDH Subunit C; 1q21PGL3
: SDH Subunit B; 1p36PGL + Pheochromocytoma
Parkinson's
: mtDNA deletionPearson's
: mtDNARhabdomyolysis
Selenium deficiency
Spastic paraparesis
: Paraplegin; 16q24SPG7
: HSPD1; 2q24SPG13
: Ornithine transporter; 13q14 HHH
: TK2; 16q22Spinal muscular atrophy
: 1p34Stuve-Wiedemann syndrome
(SIDS): mtDNA tRNA LeuSudden infant death
Systemic disorders
Toxic
AZT (Zidovudine)
Copper
Germanium
MELAS Valproate: Precipitates seizures in
: ATPase 7B; 13q14Wilson's disease
Wolfram
; 4p16WFS1
; 4q22WFS2

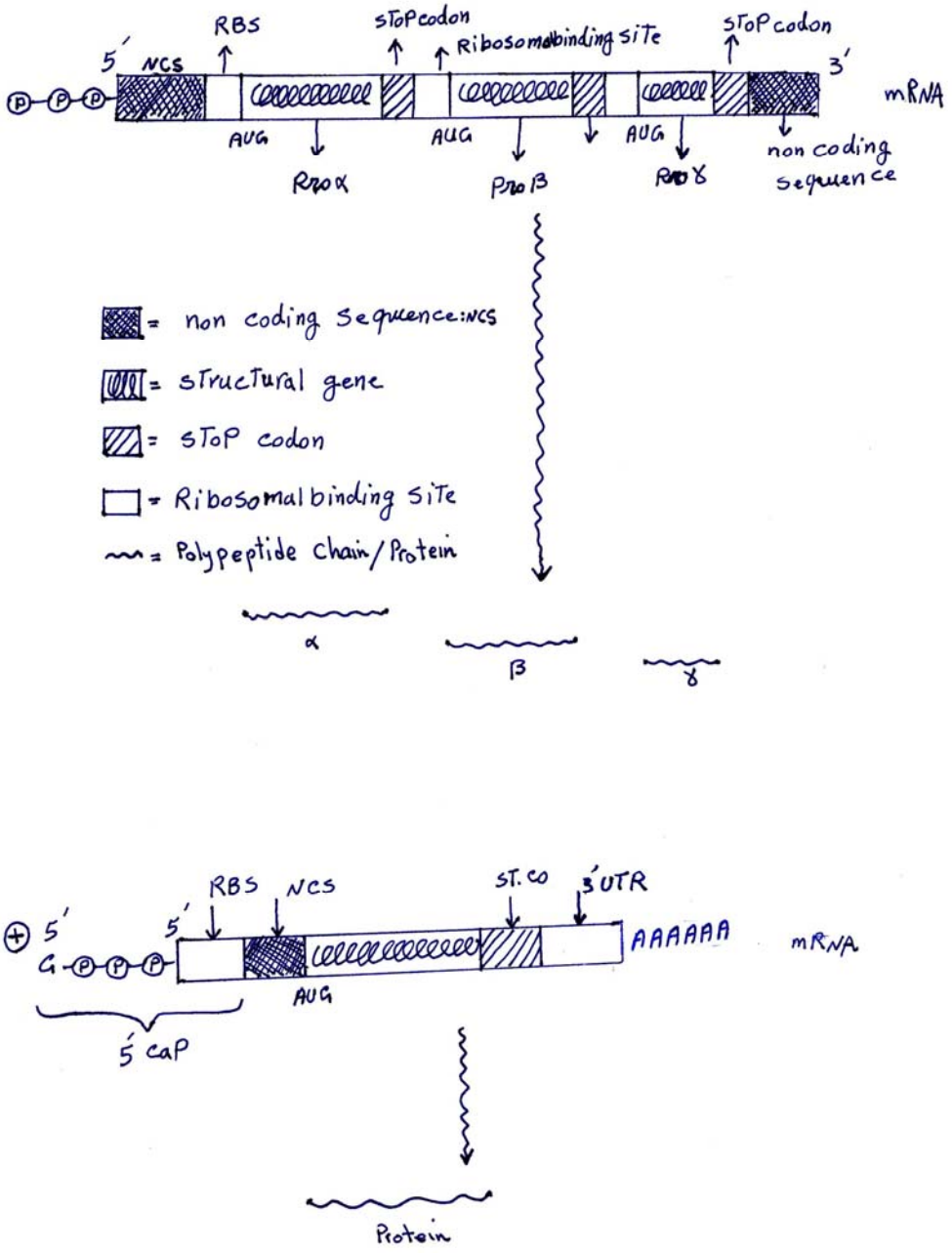
Adult onset
: NDUFV1; 11q13Alexander disease
Alzheimer/Parkinsonism
: Nuclear mutationsAmino Acid disorders
Ataxias
: Tafazzins; Xp28Barth
Cardiomyopathy
Carnitine disorders
Cartilage-Hair hypoplasia
CNS
Infantile & Childhood onset
Syndromes
: Nuclear mutationCongenital muscular dystrophy
Cramps
Deafness
Maternal (mtDNA): Point mutations
): tRNAMERRF; MELAS; HAM Syndromic (
: 12s rRNANon-syndromic & amino-glycoside induced
Nuclear mutations
: WFS1; 4p16DIDMOAD
: DDP protein; Xq22Deafness-Dystonia
Diabetes
Dystonia
Encephalopathies
Fatigue & Exercise intolerance
: Frataxin; 9q13Friedreich ataxia
Functional defects
Gastrointestinal
: mtDNA tRNA SerHAM
Huntington's chorea
Hypoglycemia
: mtDNA & Nuclear mutationsInfantile CNS
: Single mtDNA deletionKearns-Sayre
: mtDNA NADH-Dehydrogenase +Leber's optic neuropathy
: mtDNA & Nuclear mutationsLeigh's syndrome
Leukodystrophy
Longevity
Maple syrup urine disease
: mtDNA tRNA Leu + otherMELAS
: ATPase 7a; Xq12Menkes
: mtDNA tRNA Lys & SerMERRF
: Thymidine phosphorylase; 22q13MNGIE
: mtDNA tRNA Lys & NuclearMultiple symmetric lipomatosis
Myalgias
Myoglobinuria

«توفیق انسان بودن را با پیروزی در هیچ کاری برابر مکن.»

ژنوم پروکاریوت ها :

زمانیکه صحبت از پروکاریوتها به میان می‌آید بیشتر سخن از باکتریهاست که انـدازه متوسـط آنهـا بـین μm ۱۰-۱ است، در مقایسه با سلولهای یوکاریوتی که بزرگی آنها بین μm ۱۰۰-۵ می باشد پروکاریوتها معمـولاً دارای DNA دو زنجیره حلقوی هستند که در فضای از ازسیتوپلاسم بنام نوکلئوئید[9] قرار دارد و در یک یا چنـد نقطه به بخش داخلی غشاء سیتو پلاسمی وصل است DNA باکتری با $۴/۶ * ۱۰^۶$ bp بیش از یک میلیمتـر یعنی ۱۰۰۰ برابر بزرگتر از اندازه جسم باکتری است لذا باید متراکم شود تا در ایـن فـضای کوچـک جـا گیـرد . پروتئین های اسپرمین (با ۴ بار مثبت) و اسپرمیدین (با ۳ بار مثبت) از پلی آمید های هستند که موجب تراکم DNA باکتری مـی شـوند . ژن هـای یـک بـاکتری بـصورت متـوالی در یـک مجموعـه ژنـی بنـام اوپـران (Operon) قرار گرفته اند معمولا یک سیستم تنظیـک کننـده شـامل پرومـوتر (Promoter) و اپراتـور (operator) که خود بخشی از پروموتر است کنترل بیان این مجموعه ژنی را بعهده دارند . در این مجموعـه هر ژن (cistron) همزمـان بـا ژن هـای مجـاورش در یـک جهـت رونویـسی مـی شـود . رونـویس حاصـله (mRNA) بدلیل ساختمان خاصی که دارد (وجود توالی های شناسایی ریبوزوم ، تـوالی هـای شـروع و خـتم ترجمه) به تعدداد ژن های که رونویس آنها است مولکول پلی پپتیدی را کد می کنـد (شـکل ۱۰-۴) بخـشهای اینترونی آنطور که در یوکاریوتهاست در پروکاریوتها دیده نمی‌شود. به دلیل فقدان یک مجموعـه بـه نـام هـسته تنها کروموزومها داخل سیتوپلاسم قرار گرفته‌اند و همانجا مورد الگوبرداری (Transcription) قرار گرفتـه و در همانجا در حین الگوبرداری ترجمه از آنها صورت می‌گیرد و پروتئینهای تولید شده مورد بهره‌بـرداری مـستقیم سلول قرار می‌گیرند. درحالیکه در سلولهای یوکاریوتی DNA کمیت بالایی دارد و حدوداً ۱۰۰۰ برابـر بیـشتر از DNA یک باکتری تیپیک است (منجمله سلول انسانی). طول DNA آنقدر بزرگ است کـه احتمـالاً بخـاطر حفظ آن از شکستگیها و نابودی پروتئینهای بنام هیستون که تنها در یوکاریوتها موجودند به DNA متصل شده و آن را پیچیده و بصورت کروموزوم در می آورد.تراکم بالای DNA در کروموزومها بخش مهمـی از آمـادگی سلول جهت تقسیم سلولی می‌باشد. وجود غشاهای هسته‌ای موجب حفظ و نگهداری بیـشتر سـاختمان DNA می‌شود. غشاها همچنین DNA را از طویل شدن ناخواسته زمانیکـه سایتواسـکلتون حرکـت مـی‌کنـد و نیـز از تغییرات شیمیایی که در سیتوپلاسم اتفاق می‌افتد در امان می‌دارد. همچنین غشاهای هـسته باعـث مـی‌شـود ۲ مرحله بسیار مهم و بحرانی در بیان اطلاعات ژنتیکی یعنی: ۱)DNA ترانس کریپشن که طی آن RNA تولید می‌شود و ۲) ترجمه RNA که طی آن پروتئین سنتز صورت می‌گیرد از هم جدا شوند.

[9] Nucleoid

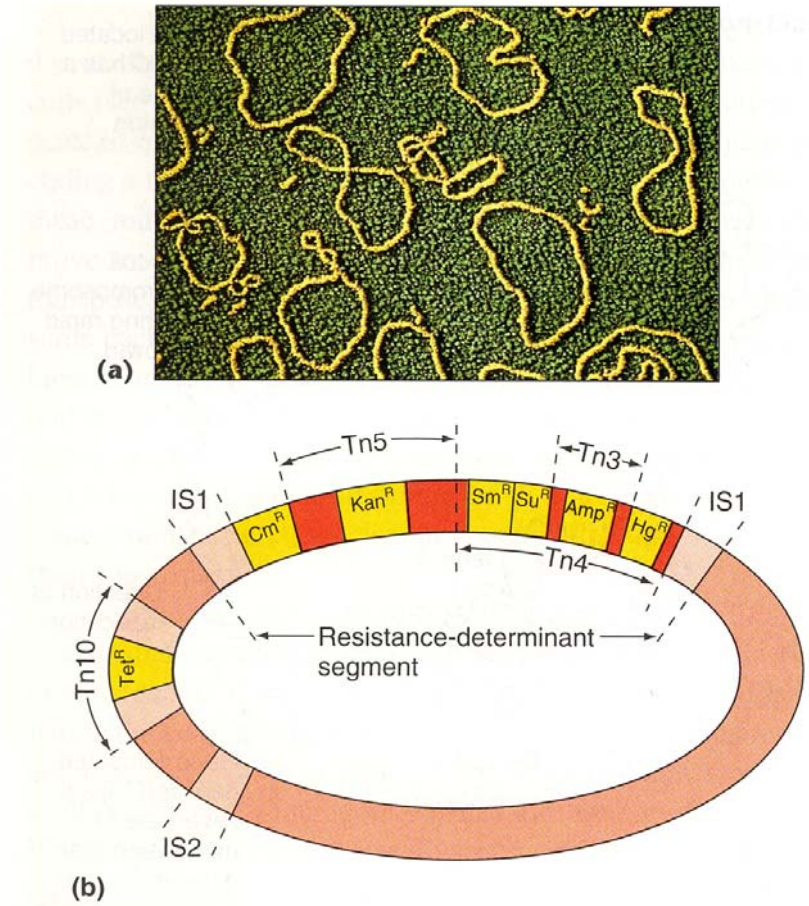


(شکل ۱۰-۴) : RNA در پروکاریوت (بالا) و یوکاریوت (پایین) . در پروکاریوتها عکس یوکاریوتها، ۵َend چندین محل اتصال ریبوزوم دارد (Shine-Dalgarno-sequence) در داخل رشته mRNA که هریک به سنتز یک پروتئین متفاوت کمک می‌کند. در سلول یوکاریوتی RNA ای که به وجود می‌آید ابتدا process می‌شود و سپس با تغییراتی که می‌یابد (post transcription modification) از هسته به سیتوپلاسم منتقل می‌شود. (شکل ۱۰-۴ : مقایسه RNA پروکاریوتی و یوکایوتی) اگرچه هر دو mRNA با یک گروه تری فسفات در ۵َend سنتز می‌شوند مولکول mRNA یوکاریوتی بلافاصله یک cap-۵َ لازم دارد این بخش، بخشی از ساختمانیست که بوسیله sub unit کوچک ریبوزومی (SRS) مورد شناسایی قرار می‌گیرد.

پلاسمید:

مقدمه:

هر وقت صحبت از Recombinat DNA Technolgy/Genetic Engineering یا کلونینگ ژنی می‌شود ناگزیر از آوردن کلمه Vector یا ناقل هستیم. ناقل در حقیقت آن مولکول نوکلئیک اسیدی است (دو زنجیره یا تک زنجیره) که تمام یا بخشی از ژن مورد مطالعهٔ ما را در خود حمل می‌کند تا آن را جهت تکثیر (Amplify) و یا بیان و ترجمه به سیستم سلولی پروکاریوتیک یا یوکاریوتیک برده و در آنجا با استفاده از دارایی سلول میزبان (host cell) به فعالیت در جهات ذکر شده بپردازد. یکی از این ناقلین پلاسمیدها هستند.(شکل۱۱-۴) منشأ اصلی آنها ممکنست mtDNA و یا ترانسپوزونهای اولیه باشند. هر نوع پلاسمیدی دارای میزبان اختصاصی است یعنی سلولی که بتواند آن را نگهدارد، DNA یا ژنوم آن را تخریب نکند و به او (پلاسمید) اجازهٔ همانندسازی، بیان (expression) و ترجمه ترانس کریپت هایش را بدهد.



(شکل ۱۱-۴) : پلاسمید ها حلقه های کوچکی از DNA دو رشته هستند a) تصویر میکروسکوپ الکترونی مولکول های DNA پلاسمید را نشان می دهد . b) بعضی پلاسمید ها ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی متعددی دارند . (زرد Cm^R و Sm^R برای کلرآمفینیکل ، Kan^R برای کانامایسین ، Sm^R برای استرپتومایسین ، Su^R برای سولفون آمید ، Amp^R برای آمپی سیلین ، Hg^R برای جیوه ، Tet^R برای تتراسایکلین

منشأ پلاسمیدها:

نظرات متفاوتی پیرامون منشاء پلاسمید مطرح است . از جمله به دو مورد زیر اشاره می کنیم

۱- mitochandial DNA ، که در یوکاریوتهای واجد که میتوکندری قابل طرح است.

۲- ترانسپزون ها (Transposon) یا عناصر متحرک قطعات DNA متحرک در ژنوم پرو یا یوکاریوتی هستند که احتمالاً خودشان در طول گذشت زمان و تکامل از قطعه قطعه شدن DNA ژنومی بوجود آمده‌اند.

پلاسمیدها مولکولهای DNA یا RNA هستند که بصورت آزاد یا ادغام در ژنوم میزبان خود یافت می‌شوند. اولین پلاسمیدهای پیدا شده از سلولهای گیاهی به دست آمدند که به viroid معروف شدند این RNAها داخل میزبان حلقوی شده و بدون کت پروتئینی در میزبان می‌زیسته‌اند.

DNA پلاسمیدهای خطی هم احتمالاً مانند ترانسپوزونها (موتورهای دو زنجیره خطی DNA که در یوکاریوت و پروکاریوتها فقط به شکل ادغام با ژنوم میزبان دیده شده و تحت کنترل ژنوم میزبان همانندسازی میکنند.) در دو انتها دارای IR تکرار های واژگون هستند که همین ترادفهای نوکلئوتیدی موجب شناسایی آنزیمهای integrase (Recambinaze) قرار گرفته و موجب وصل به و یا فصل از کروموزوم میزبان می‌شوند. بیشتر پلاسمیدهای مورد استفاده در کلونینگ ، زنجیره‌ای حلقوی کوچک از DNA هستند پلاسمیدها از Kb ۲۰۰-۲ طول دارند بزرگترین پلاسمید پیدا شده تا Kb ۱۰۰ طول دارد. در مهندسی ژنتیک معمولاً از پلاسمیدهای کوچک که ساخته دست انسانند (منشاء گرفته از پلاسمیدهای طبیعی) استفاده می‌گردد. (پلاسمیدهای طبیعی از سلولهای یوکاریوتی یا پروکاریوتیکی مختلف را در شرایط متنوع محیطی جدا می‌کنند. بخش‌های بزرگی از ژنوم آنها را حذف می‌کنند تنها قطعه‌ای از ژنوم پلاسمید را نگهمیدارند که مثل نقطه شروع همانند سازی و یا ژنهای مقاومت و ... مورد استفاده در کلونینگ یا شناسایی نوترکیبها داشته باشد بجای توالی های حذف شده ترادفهایی اضافه می‌کنند که بوسیله آنزیم های محدود گرد[10] (RE.) شناسایی شده و در کلون کردن قطعه DNA مورد مطالعه بکار می‌آیند. ژنهای پلاسمیدها معمولاً کوچک بوده و هر پلاسمید ممکنست تا ۳۰ ژن داشته باشد .

پلاسمیدها انواع مختلفی دارند براساس اینکه چه نوع ژنی را حمل می‌کنند ممکنست بیماریزا (Virolence) باشند که در این صورت میزبان خود را پاتوژن کرده و توکسین تولید می‌کنند که موجب مرگ سلول می‌شود (توکسین ترشحی بوسیله باکتری سازنده با مرگ سلولهای مجاور همراه است .

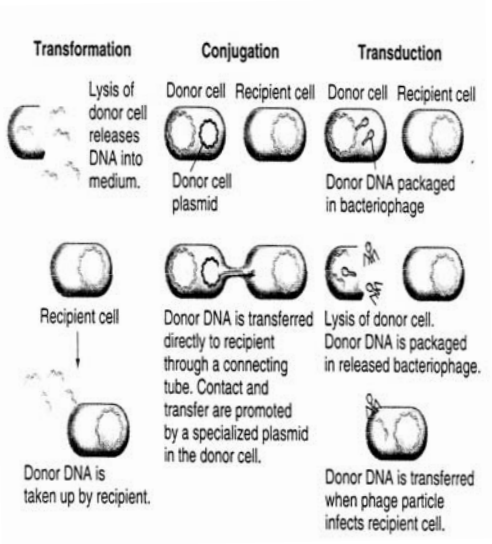
ممکنست پلاسمیدها ژنهای تولید باکتریوسین داشته باشند که موجب تخریب غشاء پلاسمایی و یا RNA/DNA میگردد. (این ترکیبات هم سلولهای مجاور را مورد هضم و تخریب قرار میدهند). از دیگر انواع پلاسمیدها می‌توان (Metabulic plasmid) را نام برد. این گروه حاوی ژنهایی هستند که بیان و ترجمه آنها موجب تولید مواد تخریب کننده (Degrade substances) می‌شود. بعنوان مثال آنها که به میزبان قدرت شکستن و یا هضم ترکیبات آلیفاتیک، آروماتیک، فنولی، روغنی و حشره‌کش‌ها و یا قندها را داده و نتیجه آن سالم و تمیزسازی محیط زیست است. بعضی هم در سمبیوزیز دخالت دارند.

[10] Restriction Enzymes

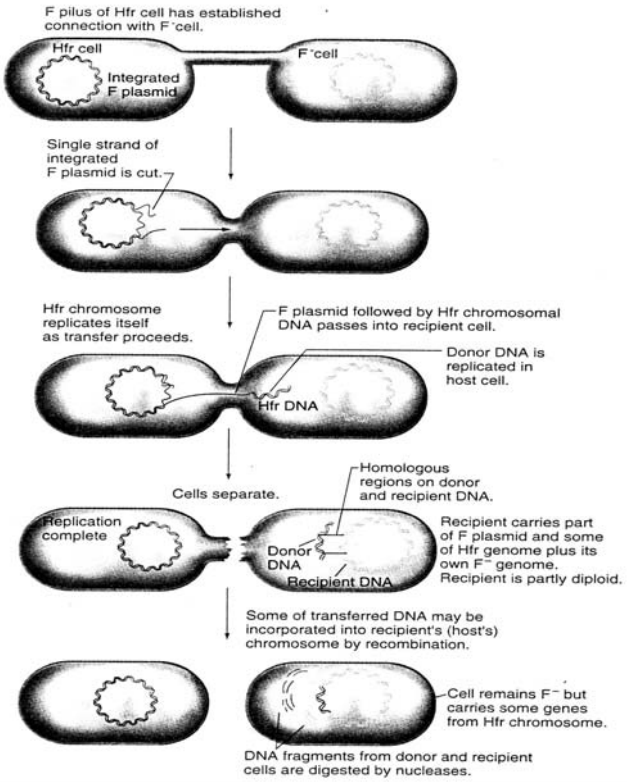
پلاسمیدهایی هم هستند که بنام "عامل لقاح" (Fertilily factor) معروفند. اینها موجب Conjugation یا الحاق دو باکتری بهم می‌شوند که در اثر آن مواد ژنتیکی یک سلول مـی‌توانـد وارد سـلول دیگـر شـود. ایـن پلاسمیدها دو نوع ژن یکی برای اتـصال دارنـد کـه تولیـد Fpilus را مـی‌کنـد و دیگـری ژنـی اسـت بـرای(Plasmid transfer)که موجب انتقال یک زنجیرهٔ پلاسمید ۲ زنجیره از f^+cell به F^-cell می‌شود. نتیجه این الحاق و انتقال تبدیل شدن $F^-cell \rightarrow F^+cell$ است که حال خـود دهنـده (Donor)مـی‌باشـد. (شکل ۱۲-۴) و (شکل ۱۳-۴)

در مورد ترانسفورمیشن تجارب Lederberg و Tatum , L مطالعه شود .

در ترانسفورمیشن DNA لخت وارد سلول (Competent Cell) میشود. و در کروموزوم آن ادغام شده و توسط سلولهای دیگر میتواند اخذ شود.



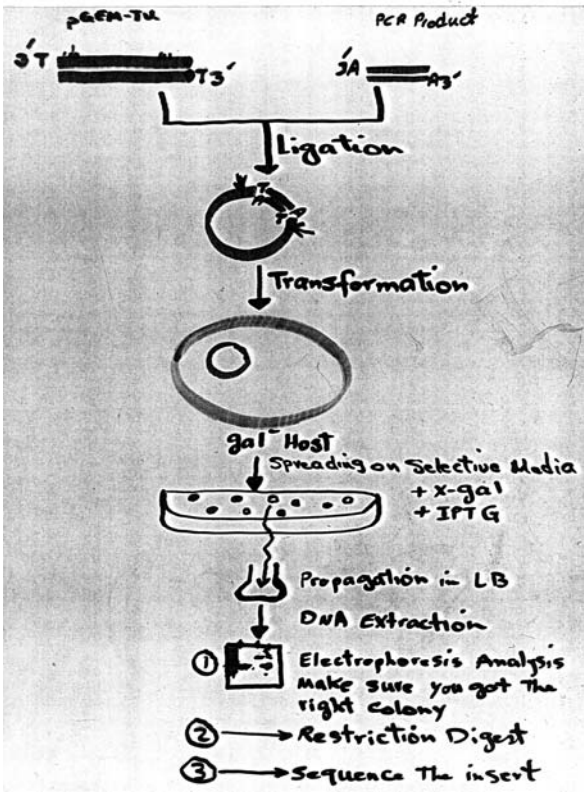
(شکل ۱۲-۴) : سه مکانیسم از انتقال ژن در باکتری . از چپ به راست : ترانسفورمیشن ، کنجوگیشن ، ترانسداکشن



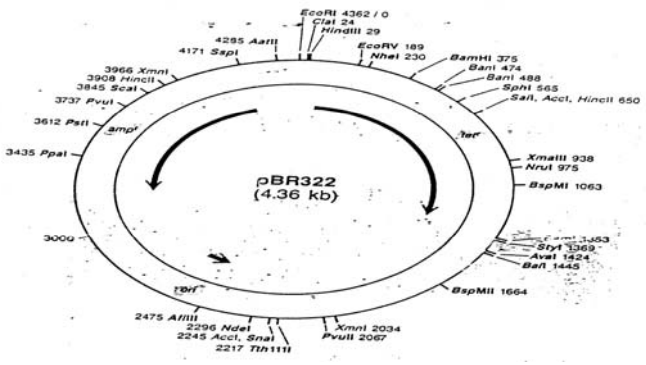
(شکل۱۳-۴) : انتقال ژن از طریق ارتبـاط بـاکتری دهنـده Hfr و گیرنده F^-

فاژی که جهت انتقال ژن یا بخشی از ژن مورد مطالعه مورد استفاده قرار می‌گیرد می‌تواند با لیز باکتری میزبان پلاک در سطح محیط کشت ایجاد کند و از رنگ آبی یا سفید می‌توان فاژهای نوترکیب را شناسایی کرد. مکانیسم عمل در پروکاریوتها می‌تواند بصورت Insogenic هم باشد که ژنوم فاژ در ژنوم میزبان ادغام شده و تحت کنترل همانندسازی میزبان و کروموزوم آن واقع می‌شود. در یوکاریوت فاژ پس از ساختن کپسید و پیچیدن ژنوم خود در آن توسط قطعه‌ای از غشاء پلاسمایی سلول میزبان که حاوی پروتئین‌های کت ویروس هستند احاطه شده و بصورت ویروس یا فاژ کامل Bud off می‌شوند پس غشاء دو لایه آن از سلول میزبان است. (شکل۱۴- ۴) و (شکل ۱۲ -۴)

Transfection عمومی یا اختصاصی : در حالت عمومی فاژ در هر جای ژنوم میزبان ادغام می‌شود. در نوع دوم در ژنها یا توالی های خاص داخل می‌شود. و در هر دو صورت در هنگام loop out شدن ژنوم میزبان امکان آن وجود دارد که بخشی از ژنوم میزبان را کنده با خود ببرد و سلولهای دیگر را بعد از آلودگی خاصیت جدید ببخشد. همانطورکه اشاره گردید پلاسمیدها معمولاً مولکولهای ۲ زنجیرهٔ حلقوی DNA هستند. طول آنها متفاوت و از Kb ۲۰۰-۲ میرسد. در مهندسی ژنتیک یا Recombinant DNA Tech این پلاسمیدهای طبیعی بزرگ مولکول ، کوچک شده و بجای نوکلئوتیدهایی که از آنها حذف می‌شود ترادفهای نوکلئوتیدی خاصی بعنوان سایتهای هضم آنزیمی مکانهای شروع همانند سازی ، پروموتر و یا کد های ختم و غیره در آنها تعبیه می‌شود. PBR322 که از این پلاسمیدهاست طول آن bp ۴۳۶۲ است و برای تهیه سریع قطعات DNA نوترکیب کلون شده بکار می‌رود. این پلاسمید حاوی ۲ ژن مقاومت آنتی بیوتیکی برای تتراسایکلین Tet^R و امپی سیلین AMP^R و تعدادی سایت اختصاصی برای REهای مختلف است.



(شکل ۱۴-۴) : یک تجربه ترانسفورمیشن این پلاسمید یک مکان شروع برای همانند سازی آزاد درون سلول میزبان دارد. محل هضم آنزیمی (R. site) برای کلونینگ و یا ساب کلونینگ restriction fragments مورد استفاده قرار می‌گیرد.



(شکل ۱۵-۴): رسم شماتیک پلاسمید دو رشته ای pBR322

دو فلش در جهات مختلف رسم شده نشان دهندهٔ دو زنجیرهٔ Antiparallel پلاسمید هستند. (شکل ۱۵-۴) بنابراین میزبان یا سلولی که جهت تکثیر پلاسمید نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرد باید فاقد ژنهای مقاومت فوق باشد حال اگر این سلولها با موفقیت ترانسفورم شوند مقاومت مربوطه را نشان می‌دهند.

کلونینگ سایت معمولاً در هر دو ژن tet^R و Amp^R قرار داده شده است. حال چنانچه .RE این محل کلونینگ (Cloning site) را ببرد و Forgin DNA در آن قرار داده شود و Ligase آنها را بهم بچسباند پلاسمید نوترکیب مقاومت خود را به آن آنتی بیوتیک از دست میدهد. ولی هنوز ژن مقاومت دیگر را دارد. چنانچه باکتری را ترانسفورم کند آن باکتری تنها یک نوع مقاومت از خود نشان می‌دهد.

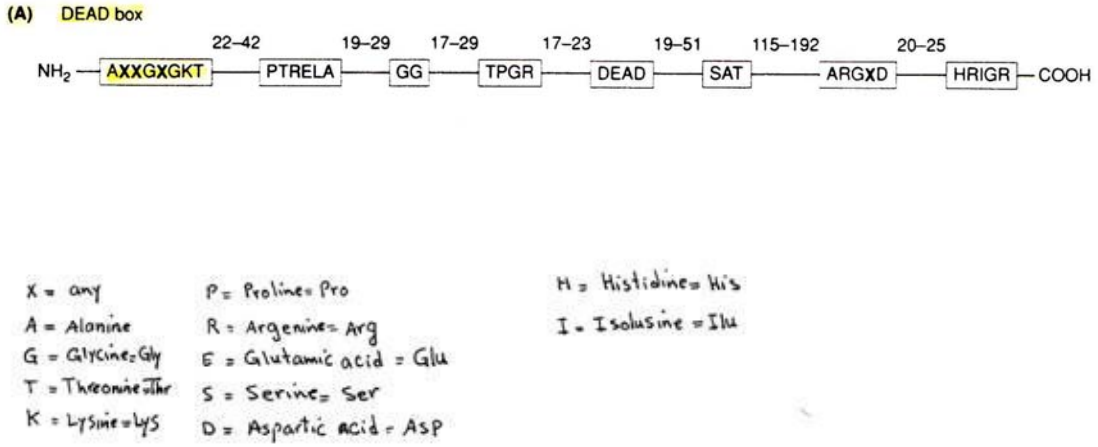
Plasmides

Extra cellular elements
Independantly replicating elements
Have DNA/RNA
With nucleotide seq. As origin of Replication
Unable to make their protein coat
Unable to survive outside of a host cell
Unable to move from one cell to another
Could integrate into host chromosome
Their length between 2-200 kb
Different in the type of information they carry
Contain resistance genes against antibiotics & heavy metal ions.
May contain genes coding for Toxins e.g.colchicim.
Advantage of (E.coli + plasmid) to E.coli –plasmide due to the presence of transcription and translation genes.
Some with heigh copy No. some with low copy No.
So (plasmids Are :)
Exrachromosomal genetic elements Of both prokaryatic and ukaryotic systems including their biological behavior, molecular structure, genetic function, gene products, and are used as genetic tools.

خانواده ژنی :

ژن‌هایی را از یک خانوادهٔ ژنی می‌دانند که درصد بالایی از شباهت توالی‌های DNA دارند. این ژن‌ها را معمولاً با استفاده از روش تعیین توالی DNA (DNA sequencing)، هیبریداسیون DNA (Southern Blot) و PCR[11] تشخیص می‌دهند. شباهت نوکلئوتیدی بسیار بالایی در یک منطقه خاص از DNA نیز موجب دسته بندی گروهی ژن تحت عنوان خانوادهٔ ژنی می‌شود جمله می‌توان از خانوادهٔ ژنی rRNA و هیستون‌ها را نام برد. مناطق ، منطقه مشابه ژنهای هر خانواده در طول تکامل بشدت حفظ شد بدون تغییر باقی مانده است. از منطقه مشابه معمولا بعنوان پراب (probe) برای شناسایی سایر اعضاء یک خانوادهٔ ژنی استفاده می‌شود.

اعضاء بعضی خانواده‌های ژنی ممکنست ارتباط یا اشتراک در سطح توالی DNA نداشته باشند ولی محصول ژنی آنها عمل مشترکی دارد و مناطق کوچک از DNA در آنها شدیداً حفظ شده است. بعنوان مثال خانوادهٔ ژنی Dead box (DEAD box gene family) شامل ژن‌هایی می‌باشد که همه عمل RNA هلیکیزی دارند. بخش مشترک این ژن‌ها یک قطعه ۸ اسید آمینه‌ای است که Dead هم جزء آنست. لازم به ذکر است که RNA هکیلیزها در تغییر شکل یا ساختمان دوم RNA و یا در پردازش RNA دخالت دارند. (شکل ۱۶-۴)



شکل ١٦-٤) : خانواده ژنی DEAD

[11] Polymerase Chain Reaction

سوپرژن فامیلی:

در این خانواده‌های ژنی، اعضاء یا ژن‌ها محصولاتی با عمل نسبتاً مشابه کد می‌کنند بدون اینکه هیچگونه همولوژی معنی‌داری در سطح DNA یا توالی اسید آمینه (amino acid matif) حفظ شده‌ای داشته باشند. در این مورد ژنهای سیستم HLA, T4, T8 و خانوادهٔ ژنی ایمنوگلوبولین که همه محصولاتی با عملکرد در سیستم ایمنی دارند از مثالهای بارزند.

ژن کلاستر:

بعضی از خانواده‌های ژنی از یک یا چند مجموعه ژنی (Cluster gene) تشکیل می‌شوند. این مجموعه‌های ژنی در مکان‌های خاصی از زیر تقسیمات کروموزومی قرار دارند و چون در اثر مضاعف شدن مکرر ژن (Tandem gene duplication) بوجود می‌آیند اغلب شبه ژنهای غیرفعالند. بعنوان مثال می‌توان از Major Ribosomal genes نام برد که واحدهای تکرارشونده و بزرگ DNA را دارند (به تصویر ژنهای α و β گلوبین مراجعه شود).

چند شکلی ژنی (Gene polymorphism) :

هر تغییری در توالی DNA یک لوکوس، ممکنست آلل متفاوتی از آن DNA لوکوس را بوجود می‌آورد به این ترتیب بدلیل تعدد جهش‌ها یا تغییرات حاصله در یک لوکوس که آلل‌های متفاوتی از آن را بوجود می‌آورد به آن لوکوس پلی‌مورف و به آلل‌ها یا تنوعات لوکوسی DNA پلی مورفیسم یا پلی مورفیسم ژنی اطلاق می‌گردد. پلی مورفیسم DNA را می‌توان در توالی‌های تکراری پراکنده و توالی‌های تکراری متوالی مشاهده نمود.

توالی‌های تکراری پراکنده(Dispersed Repititive) :

این توالی‌های DNA معمولاً بطور پراکنده در ژنوم یوکاریوتها از جمله انسان دیده می‌شوند. SINES (Short interspresed sequence) با طولی کمتر از ۵۰۰ bp بصورت تک کپی در فواصل ژنوم انسانی قرار دارند. توالی‌های Alu از این گروه هستند. این توالی‌ها محلی برای رستریکشن آنزیم AluI دارند که به پلی مورفیسم آنها (وجود یا عدم وجود Alue I.R.S) کمک می‌کند.
LINES (long interspresed sequence) گروه دیگری از توالی‌های تکراری پراکنده‌اند که طول تقریبی برابر ۱/۵ kb دارند. اینها نیز بصورت پراکنده و تک کپی در فواصل ژنوم قرار دارند. این توالی‌ها دارای محل برش آنزیم محدودگر L1 هستند که پلی مورفیسم آنها را تشدید می‌کند.

تکرارهای متوالی (Tandem Repeats) :

میکروساتلایتها (Microsatellites) از تکرار متوالی ۲ یا ۳ نوکلوتید تشکیل شده‌اند و به شدت پلی مورف هستند. در سندرم X شکننده (Fragile - x) توالی‌های تکراری CGG و در دیستروفی عضلانی تکرارهای سه نوکلئوتید CTG اساس پلی‌مورفیسم ژنی می‌باشند. (جدول ۱-۴)
SSRS (Simple sequence Repeats) که از ۳ الی ۴ جفت باز تشکیل شده‌اند و در بخش‌های کد کننده (coding)وغیر کد کننده (Noncoding) DNA قرار دارند از تکرارهای متوالی هستند که موجب پلی مورفیسم ژنی می‌شوند.

ریز قمر (Minisatellites) :

این اصطلاح به تکرارهای پشت سر هم ۱۰ جفت باز اطلاق می‌گردد. این ساتلایتها معمولاً در پایانه‌های کروموزومی قرار دارند. از این قمرها در انگشت نگاری DNA (DNA figerprinting) بعنوان پرابهای محلی (insitu probes) استفاده می‌شود.

Duplication یا Deletion توالی‌های بلند DNA باعث افزایش کراس اوور نابجای توالی‌های DNAی غیر آلل کروماتیدها می‌شود.

بنابراین تکرارهای متوالی و پراکنده یا حذف آنها کراس اوور نابجا را در بین ژنهای غیر آلل کروماتیدهای خواهری تشدید می‌کند.

Triplet Repeat Disorders

Disease	mRNA Repeat	Normal Number of Copies	Disease Number of Copies	Symptoms
Fragile X syndrome	CGG or CCG	6–50	200–2,000	Mental retardation, large testicles, long face
Friedreich ataxia	GAA	6–29	200–900	Loss of coordination and certain reflexes, spine curvature, knee and ankle jerks
Haw River syndrome	CAG	7–25	49–75	Loss of coordination, uncontrollable movements, dementia
Huntington disease	CAG	10–34	40–121	Personality changes, uncontrollable movements
Jacobsen syndrome	CGG	11	100–1,000	Poor growth, abnormal face, slow movement
Myotonic dystrophy	CTG	5–37	80–1,000	Progressive muscle weakness; heart, brain and hormone abnormalities
Spinal and bulbar muscular atrophy	CAG	14–32	40–55	Muscle weakness and wasting in adulthood
Spinocerebellar ataxia (3 types)	CAG	4–44	40–130	Loss of coordination

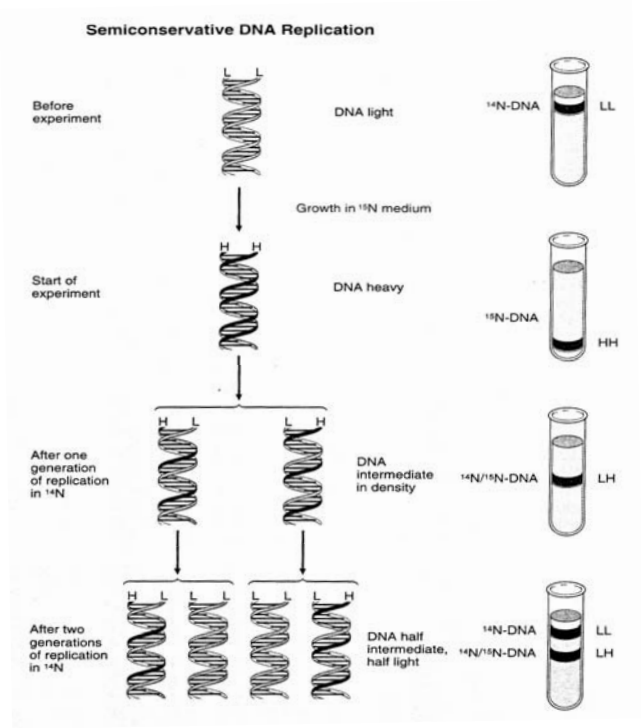
(جدول ١-٤) : تکرار های متوالی ٣ نوکلئوتیدی و اختلالات ژنتیکی مربوط به آنها

همانندسازی DNA (DNA Replication):

محتویات شیمیایی مادهٔ DNA در پرو ویوکاریوتها مشابه است. لذا همانندسازی در این دو گروه با تفاوتهایی که در این فصل ذکر خواهد شد با مکانیسم مشابهی صورت می‌گیرد.

اصول همانندسازی DNA:

معمولاً همانندسازی از دو رشته DNA به صورت دو جانبه (Bidirectional) صورت می‌گیرد . پیشرفت چنگال همانندسازی در دو جهت ایجاب می‌کند که در یکی از رشته‌های DNA همانندسازی به صورت مداوم، بدون وقفه از ۵َ به ۳ِ صورت گیرد (Leading strand) در حالیکه در رشته دیگر (Lagging strand) همانندسازی قطعه قطعه در جهت ۵َ به۳ِ انجام می‌گیرد و سپس این قطعات (Okazaki fragment) توسط آنزیم لیگاز به هم وصل می‌شوند. هر نقطه‌ای از دو رشته DNA که همانندسازی در آنجا آغاز می‌شود نقطه شروع همانند سازی نام دارد. در پروکاریوتها مانند یک باکتری تیپیک که تنها یک کروموزوم حلقوی شامل دو رشته DNA مارپیچ دارند تنها یک نقطه شروع برای همانندسازی وجود دارد (Ori.C)درحالیکه در طول هر کروموزوم سلول یوکاریوتی تعداد زیادی نقطه شروع همانندسازی قرار دارد. سنتز DNA در هر نقطه به طور جداگانه و با فواصل زمانی متفاوت که به ساختمان DNA در این مناطق مربوط می‌شود شروع شده، تکمیل می‌گردد و درنهایت تمام مناطق سنتز شده DNA به هم متصل می‌شوند. این اتصال به معنای تکمیل همانندسازی منطقه بین دو بخش مجاور سنتز شده می‌باشد. حاصل همانندسازی در هر دو گروه پروکاریوت و یوکاریوت دو برابر شدن ماده ژنتیکی DNA است. در انجام همانندسازی آنزیم‌های متعددی دخالت دارند از جمله توپوایزومرازها (Topoisomerase) که با قطع پیوندهای فسفودی استر موجب باز شدن مارپیچ DNA و فراپیچشهای DNA (Supper coil) می‌شوند لذا DNA با ساختمان آزاد در دسترس لیگاز (Ligase) قرار می‌گیرد، آنزیم (Helicase)با استفاده از انرژی حاصل از هیدرولیز ATP پیوندهای هیدروژنی بین بازهای آلی دو رشته را شکسته و موجب آزاد شدن تک رشته‌های DNA می‌شود سپس DNA پلی‌مراز (DNApolymerase) که آنزیمی برای قرار دادن



(شکل ۱۷-۴) : آزمایشات Meselson و Stahl . این دو نفر ثابت کردند همانند سازی نیمه حفاظتی است .

dNTPs [12]در جریان ساخته شدن یک رشته جدید از DNA می‌باشد وارد عمل می‌شود.در پروکاریوت ها هر دو رشته DNA مادر توسط یک مولکول DNA پلی‌مراز دایمر سنتز می‌شود، در حالیکه در یوکاریوت DNA پلیمراز های متفاوتی مانند α و δ عهده دار همانند سازی هستند . همانندسازی DNA در یوکاریوتها از جمله سلول‌های انسانی به دلیل وجود ارتباطهای پروتئینی با DNA و ارتباط پروتئین-پروتئین در سطح DNA نسبت به همانندسازی یک سلول باکتری به مراتب پیچیده‌تر است. از طرفی DNA انسان حدود یک متر طول دارد (ژنوم هسته‌ای) . برای شروع همانندسازی ابتدا هر سلول لازم است وارد مرحله S تقسیم سلولی شود و تنظیم سنتز DNA در طول کروموزوم، در سطح واحدهای همانندسازی (Replication unit) و شروع سنتز قطعات اوکازاکی انجام گیرد. هر نقطه شروع همانندسازی در فاصله زمانی کوتاهی حدود ۳۰ ثانیه از نقطه شروع قبلی خود فعال می‌شود. در سلول‌های جنینی که رشد تقسیمی سریعی داشته و مراحل G_1 و G_2 تقسیم سلول تقریباً در آنها حذف می‌شود حدود 10^6 یعنی حدود یک میلیون ori.site وجود دارد درحالیکه در سلول‌های سوماتیک تنها ده درصد ori . site ها فعال بوده و بالنتیجه صورت همانندسازی و نهایت تقسیم سلولی در این سلول‌ها به مراتب کندتر است. در زیر خلاصه مکانیسم همانندسازی را مشاهده می‌کنیم:

۱-سنتز DNA نیمه حفاظتی است (Semi conservative) بدین معنا که هر مولکول جدید واجد یک رشته DNA تازه سنتز شده و یک رشته مادری می‌باشد.

۲-همانندسازی در محل ori.site دو طرفه است.

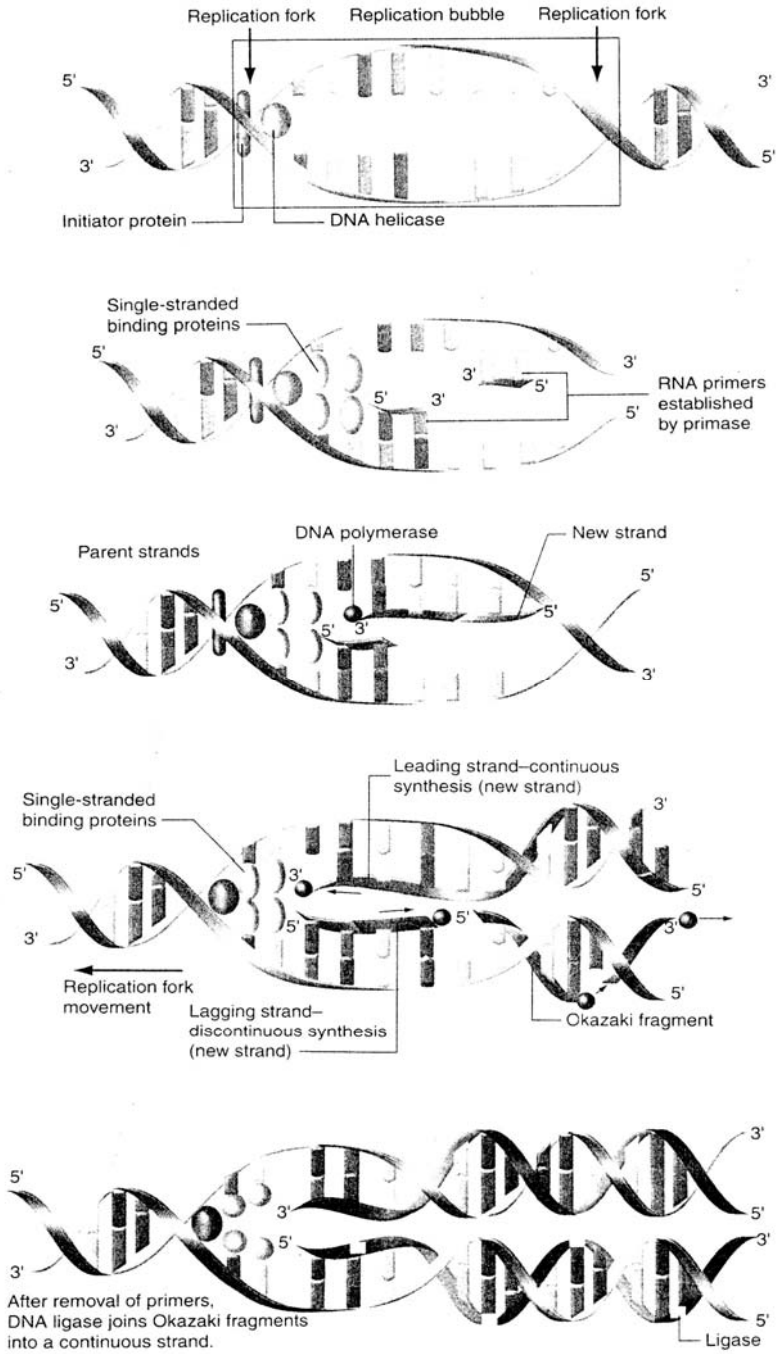
۳-یک رشته (Lead.st) به طور مداوم و رشته مکمل آن (Lag.st.) در ابتدا به صورت قطعه قطعه همانندسازی می‌شود.

۴-آنزیم پریماز (primase) در هر دو رشته ، قطعه شروع به نام RNA پرایمر را می‌سازد.

۵-RNA پرایمر در اختیار DNA پلی مراز قرار می‌گیرد تا سنتز را با استفاده از الگوی DNA مادر ادامه دهد.

۶-حذف RNA پرایمر و تکمیل آن توسط DNA پلی مراز صورت می گیرد .(شکل۱۷-۴) و (شکل ۱۸ -۴)

[12] dinucleotide triphosphate



(شکل ۱۸ – ۴) : مراحل مختلف همانند سازی DNA از بالا به پایین : باز شدن دو رشته ای توسط DNA هلیکیز ، اتصال پروتئین های SSBP به تک رشته های مادری ایجاد شده و تشکیل پرایمر ها برای رشته ی رهبر (Leading) و قطعه اکازاکی ، شروع فعالیت DNA پلی مراز ، پیشرفت همانند سازی در دو رشته ، حذف پرایمر ها و عمل لیگاز در اتصال قطعات اکازاکی .

تفاوت‌هایی از ژنوم انسانی و باکتری

	باکتری E.Coli	Human Fibers
اندازه ژنوم	۳×۱۰^{۶} bp	۳×۱۰^{۹} bp کل ژن های انسان بین ۳۰ تا ۳۵ هزار در نظر گرفته می شود
زمان دو برابر شدن	۲۰ دقیقه	حدود ۲٤ ساعت
زمان فاز S تقسیم سلولی	حدود ۲۰ دقیقه	حدود ۸ ساعت
تعداد مکان های شروع همانند سازی	۱	۵۰۰۰۰
سرعت همانند سازی	۵۰۰ نوکلئوتید در ثانیه	۵۰ نوکلئوتید در ثانیه
میزان اشتباهات همانند سازی	$۱۰^{-۸}$	$۱۰^{-۱۰}$

DNA دو رشته مارپیچ حلقوی باکتری (Single replication eye):

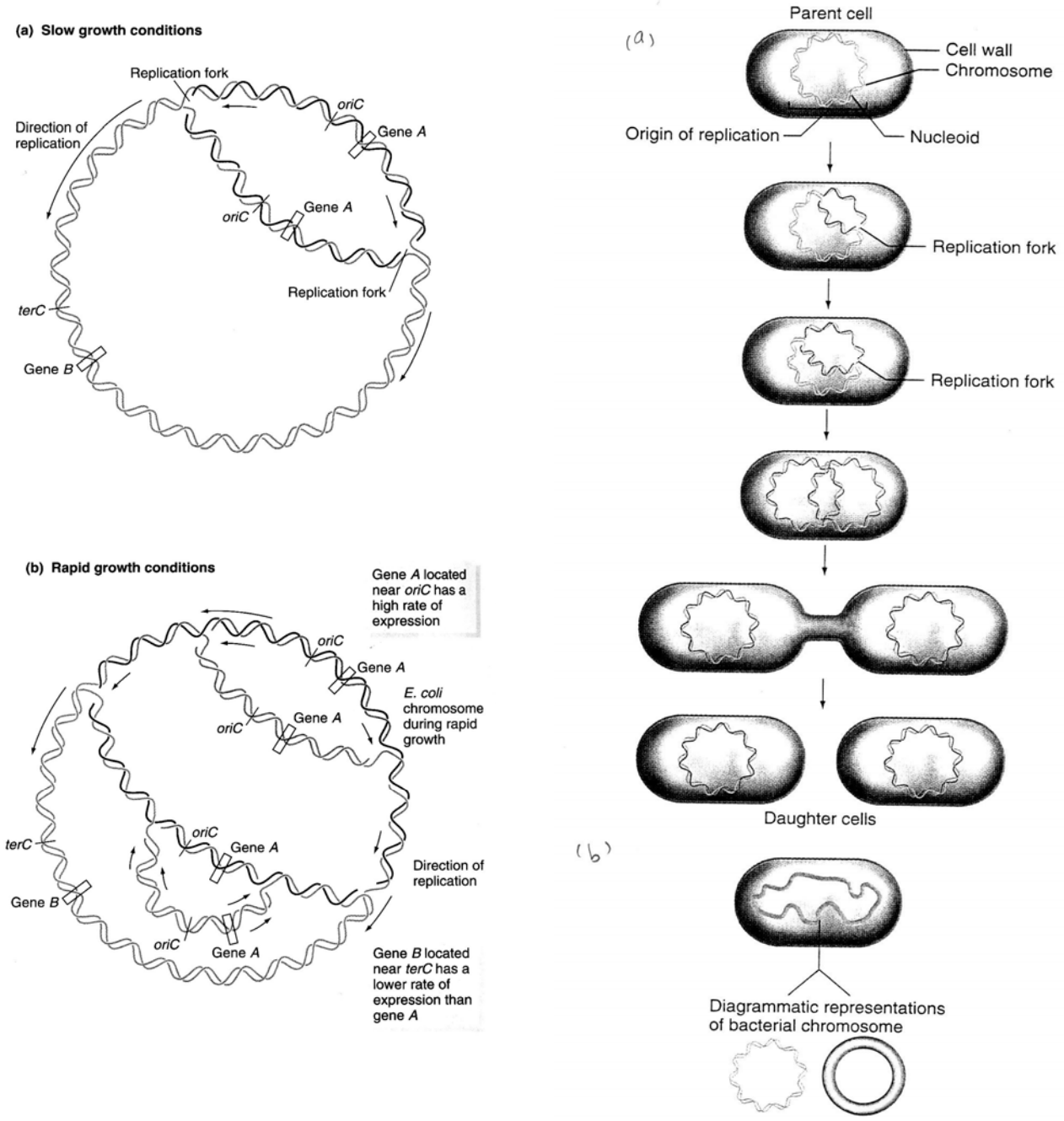
سنتز DNA در باکتری به کمک سه نوع آنزیم انجام می‌شود:

۱) DNA پلی‌مراز III که سنتز دو رشته را به عهده دارد

۲) DNA پلی‌مراز I که RNA پرایمرها را حذف می‌کند و محل خالی را پر می‌سازد

۳) DNA لیگاز که 3'OH و 5'P آزاد را به هم متصل می‌کند. (شکل۱۹-۴)

در سلول های عالی تر مثل سلولهای انسانی DNA پلی مراز α در کمپلکسی با پریماز رشته (Lag.st) را می‌سازد و DNA پلی‌مراز β در تعمیر DNA ساخته شده دخالت دارد، DNA پلی‌مراز δ در همانندسازی lead.st شرکت دارد.



(شکل ۱۹-۴) : کروموزوم باکتری . تصویر سمت راست نحوه تقسیم سلولی و همانند سازی DNA در باکتری ، تـصویر سـمت چپ همانند سازی در نقطه شروع (Ori . C) شروع می شود و تا نقطه ختم (ter . C) ادامه می یابد . فلش جهت حرکـت چنگال همانند سازی را نشان می دهد . a) در شرایط ضعیف رشد ، نقطه شروع تنها یکبار در هر چرخه سلول روشن می شود b) در شرایط سریع رشد ، همانند سازی بارها شروع و سلول تقسیم می شود در نتیجه نسخه های بیشتری از ژن های نزدیـک ناحیـه ای شروع نسبت به ژن های نزدیک ناحیه ختم تولید می شود .

منع کننده های سنتز DNA:

آمفی دیکولین (Amphidicolin) از موادی است که مانع انجام همانندسازی می‌شود. این ماده آنالوگ NTPها است.

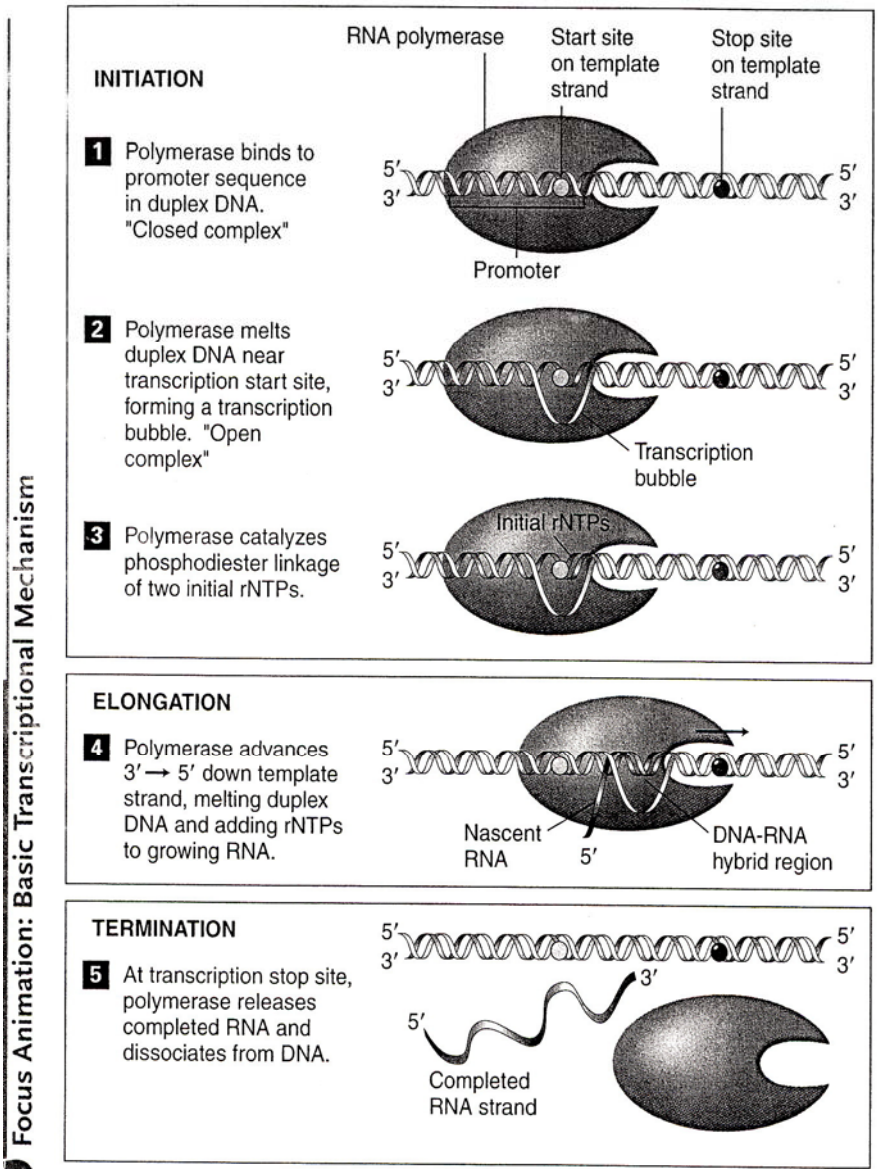
بوتیل فنل (Butyl phenol dGTP) هم ماده‌ای است که مانع فعالیت DNA پلی‌مراز می‌شود. سنتز دو پایانه هر کروموزوم خطی مانند کروموزوم‌های انسان با کمک تلومراز و توسعه ناحیه تلومرو استفاده از توالی‌های نوکلئوتیدی اضافی تلومر به عنوان پرایمر برای ساختن انتهای رشته .lag.st انجام می‌گیرد قابل ذکر است که تلومراز با فراوانی بالایی در سلول‌های جنینی وجود دارد تا از مرگ سلول‌ها پس از هر بار تقسیم سلولی جلوگیری کند زیرا در هر بار تقسیم سلولی ۵۰ تا ۲۰۰ نوکلئوتید از ناحیه انتهای کروموزوم حذف می‌شود و تلومراز مانع این کاهش طولی ژنوم می گردد. در سلول‌های سوماتیک تقریباً تلومراز وجود ندارد و به همین دلیل است که بعد از چندین تقسیم سلول‌ها به طرف پیری (Senescence) رفته، توانایی تقسیم را از دست می‌دهند و نهایت می‌میرند. بعضی ویروسها و موتاژن‌های شیمیایی قادراند سلولهای فاقد تلومراز را ترانسفورم کرده و تلومراز آنها را فعال کنند درنتیجه این سلولها رشد و تقسیم نامحدود داشته، نامیرا می‌شوند و فرکانس آنیوپلوئیدی (Aneuploidy)در آنها بالا می‌رود. همچنین مشاهده شده است که ۹۰ ٪ سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلولهای نرمال سطوح بالاتری از فعالیت تلومراز دارند.

رونویسی (Transcription) :

رونویسی یک ژن به معنای انتقال اطلاعات ژنتیکی از DNA به صورت مولکولی از جنس RNA است . ماشین سنتز پروتئین متشکله از ریبوزوم‌ها، tRNA و آنزیم‌های خاص در سیتوپلاسم توانایی برگردان این اطلاعات را در قالب توالی اسیدهای آمینه و نهایتاً پلی پپتید داشته باشد.

مکانیسم انجام رونویسی و پردازش RNA :

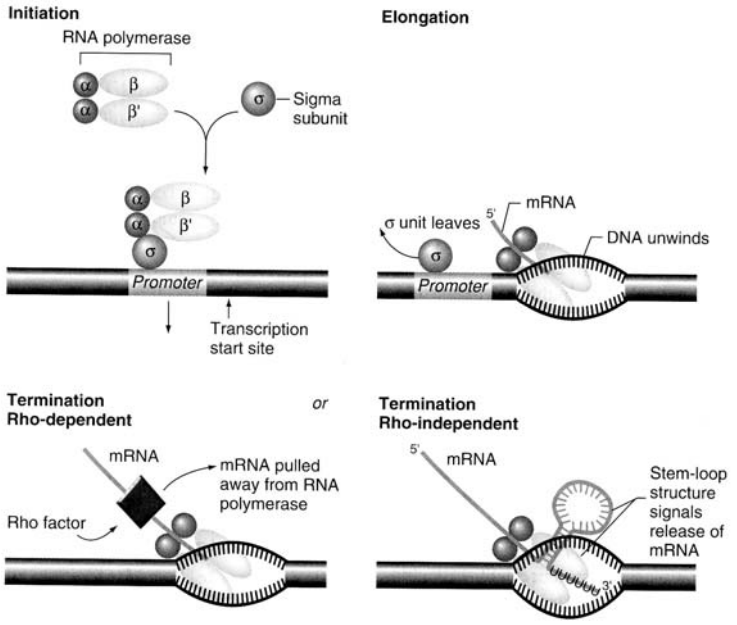
رونویسی در جهت ۵َ به ۳َ تنها از یک رشته DNA (Sense Strand) صورت می‌گیرد و رشته مخالف (Antisense) تنها به عنوان الگوی انتقال اطلاعات در دسترس آنزیم RNA پلی‌مراز می‌باشد. DNA پلی‌مراز با استفاده از DNA به عنوان الگو rNTP ها را که شامل A؛ آدنین، U : یوراسیل، G : گوانین، C : سیتوزین می‌باشند در حین رونویسی در رشته RNA قرار می‌دهد. RNA پلی مراز فاقد قدرت اگزونوکلئازی از ۵َ ↔ ۳َ است (درحالیکه DNA پلی‌مراز توانائی اگزونوکلئازی مذکور را دارد). درنتیجه خطائی که در مولکول RNA حین سنتز رخ می‌دهد مثل آنچه در حین همانندسازی DNA رخ می‌دهد تصحیح نمی‌شود: اثر خطاهای ناشی از رونویسی به مراتب کمتر از خطاهای همانندسازی است زیرا یک اشتباه رونویسی تنها بخش کوچکی از کل بیان ژنی خاص را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اما یک اشتباه حین همانندسازی اگر تعمیر نشود، بخشی از وراثت آن سلول می‌شود و تمامی بیان آن ژن را در هر زمان تحت تأثیر قرار می‌دهد. RNA که مولکولی تک رشته است می‌تواند با تا خوردگی روی خود (Folding) ساختمانهای دوم و سوم شامل لوپ (Loop) و هرپین (Hairpin) را به وجود می‌آورد.



(شکل ۲۰-۴) مکانیسم رونویسی . یک مولکول RNA برای یک رشته ای DNA دو رشته مارپیچ ساخته شده است . رونویسی در هسته رخ می دهد . سپس RNA از منافذ هسته گذشته به سیتوپلاسم وارد می شود و در آنجا ترجمه صورت می گیرد .

در حقیقت جفت نشدن بازهای ریبونوکلئوتیدی مکمل در مناطقی که در هر تاخوردگی روبروی هم قرار می‌گیرند اتفاق می‌افتد. در باکتری تمام محصولات رونویسی یعنی rRNA، tRNA و mRNA توسط یک RNA پلی‌مراز به وجود می‌آیند درحالیکه در یک سلول انسانی RNA پلی‌مراز I بیشتر rRNA ، RNA پلی‌مراز mRNA II و hnRNA ، RNA پلی مراز tRNA III، 5S RNA و سایر RNAهای کوچک را رونویسی می‌کند.

جهت انجام رونویسی هر مولکول RNA پلی مراز باید ابتدا پروموتر (promoter) را تشخیص دهد سپس به رشته الگو متصل شود، مارپیچ DNA را باز کند و از رشته الگو برای رونویسی استفاده کند. همچنین پس از انجام رونویسی این آنزیم باید قادر به تشخیص علائم ختم (Termination signal) باشد. و توانایی پاسخ به علائم تنظیم کننده (Regulatory signals) را داشته باشد. حرکت و پیشرفت ۵َ به ۳َ RNA پلی‌مراز در طول واحد رونویسی (Transcription unit) یعنی توالی‌هایی که رونویسی می‌شوند نیاز به انرژی دارند. پس ملاحظه می‌کنیم که برای انجام تمام فعالیتهای ذکر شده مولکول آنزیم باید بزرگ و پیچیده باشد و از زیرواحدهایی تشکیل شده باشند که هریک مرحله مختلفی را انجام می‌دهد. (شکل۲۱-۴) و (شکل۲۰ -۴)



(شکل ۲۱ -۴) : نقش RNA پلیمراز در رونویسی . آنزیم پلیمراز به کمک فاکتور سیگما به توالی نوکلئوتیدی پروموتر می چسبد تا الگو برداری را آغاز کند . به محض اینکه کپی برداری DNA به RNA شروع شود ، RNA پلیمراز در طول DNA جهت طویل نمودن رونویس مربوطه حرکت می کند . لذا فاکتور سیگما آزاد می شود . زمانی که فاکتور ρ (rho) توالی خاصی از mRNA را شناسایی کند و پیام را از آنزیم جدا کند و یا یک ساختمان سنجاقی شکل (Stem Loop) در mRNA شکل گیرد (علامت ختم مستقل از فاکتور ρ) آنزیم و پیام رها می شود .

در مرحله اول بیان یک ژن یوکاریوتی مثل یک ژن انسانی RNAای بزرگ مولکول (hnRNA) سنتز می‌شود که در همان محل هسته پردازش شده و به RNAی قابل انتقال به سیتوپلاسم تغییر شکل و ساختمان می‌دهد (mRNA). به نظر می‌رسد قبل از اینکه پردازش hnRNA اتفاق افتد و اینترون‌ها از آن حذف شوند طی دو مرحله ابتدا بخشی به نام Cap یا کلاهک (7 methyl Guanosine) به انتهای ۵´ و سپس توالی از آدنین (poly A addition) به انتهای ۳´ اضافه می‌شود این RNA پس از پردازش به سیتوپلاسم رفته و موضوع ترجمه قرار می‌گیرد. اما در پروکاریوتها مانند یک سلول باکتری تنها بخش‌های اگزونی (کدکننده) وجود دارند. پس از رونویسی توالی کوتاهی از DNA، همچنان که رونویسی ادامه دارد (بدون هیچگونه تغییر و یا افزایش نوکلئوتیدی به ساختمان RNA) ترانس کریپت حاصله موضوع ترجمه ریبوزومها قرار می‌گیرد. (شکل ۲۲ – ۴) .

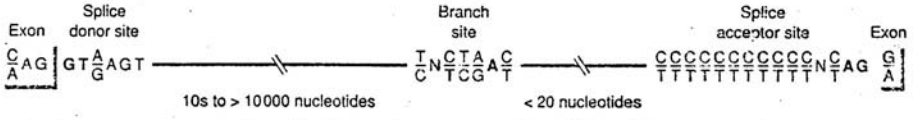
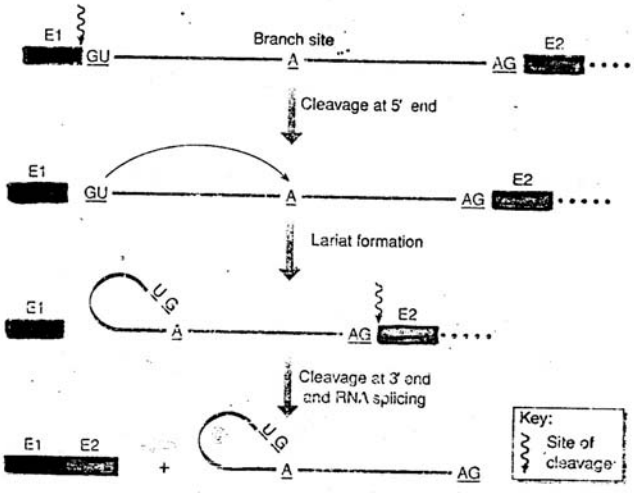


Figure : Consensus sequences at the splice donor, splice acceptor and branch sites in introns of complex eukaryotes.



(شکل ۲۲ –۴) : مراحل پردازش mRNA . تصویر بالا : توالی های با اهمیت در یک اینترون . تصویر پایین : اجزاء کمپلکس پروتئین – RNA هسته ای کوچک (snRNPs) مستقیما در پردازش شرکت دارند . U_1snRNP ناحیه شروع پردازش (Splice donor site) را شناسایی کرده به آن متصل می شود . اتصال از نوع پیوندی بازی بین RNA این کمپلکس و RNA است . پایانه '5 این کمپلکس توالی UACUUAC را دارد که با توالی ناحیه شروع (sds) یعنی GUAAGUA مکمل هستند . سپس U_2snRNP ناحیه انشعاب را با همین مکانیسم (پیوند باز های RNA موجود در این پروتئین و بازهای DNA) تشخیص داده ، بر هم کنش بین U_1snRNP و U_2snRNP دو ناحیه قابل پردازش را بهم نزدیک میکنند . سپس یک کمپلکس از snRNP شامل U_4 و U_5 و U_6snRNP به کمپلکس U_1-U_2snRNP متصل می شود . در مجمع این روند موجب قطع اتصال اینترون از دو جهت شده و دو اگزون مجاور بهم پیوند می خورد .

ترجمه (Translation) :

ترجمه عبارت است از برگردان زبان توالی نوکلئوتیدهای mRNA به توالی اسیدهای آمینه که سازنده پلی پپتید هستند. ۳ نوکلئوتید رمز یک اسید آمینه است. باتوجه به وجود ۴ نوع نوکلئوتید $۴^۳=۶۴$ یعنی ۶۴ کد مختلف برای رمز اسیدهای آمینه می‌تواند باشد. از آنجا که تنها ۲۰ اسید آمینه و ۶۴ کد ژنتیکی وجود دارد بنابراین هر اسید آمینه ممکنست بیش از یک کدون یا رمز ژنتیکی را به خود اختصاص دهد. (جدول رمز ژنتیکی ملاحظه شود)

ترجمه و رمز ژنتیکی:

در سیتوپلاسم، mRNA ، با عمل مولکول tRNA ، که هر کدام مخصوص یک اسید آمینه خاص هستند، به پروتئین ترجمه می شود. این مولکولهای استثنائی، هر کدام تنها ۶۰ تا ۱۰۰ نوکلئوتید طول دارند و مسئول انتقال درست اسید های آمینه از سیتو پلاسم به رشته پلی پپتیدی در حال رشد می باشند این عمل در طول حرکت ریبوزوم روی mRNA صورت می گیرد . سنتز پروتئین در ریبوزومها رخ می دهد، ماکرومولکولهای پیچیده ای که از rRNA (که بوسیله ژنهای RNA ریبوزومی ۱۸S و ۲۸S کد می شوند) و پروتئین های ریبوزومی متعددی ساخته شده اند (شکل ۸-۳).

کلید ترجمه رمزی است که اسیدهای آمینه ویژه هر ترکیب سه تائی بازی مجاور هم در mRNA را معین می کند. هر دسته باز سه تائی یک کدون (codon) است که برای یک اسید آمینه خاص اختصاصی است (جدول ۱-۳). از نظر تئوری ترتیب بازها در طول یک زنجیره پلی نوکلئوتیدی به اشکال فوق العاده زیادی امکانپذیر است. برای هر جایگاه چهار احتمال وجود دارد (C،T،A یا G) ، بنابراین ۴^n ترکیب احتمالی در توالی n باز وجود دارد. برای ۳ باز، $۴^۳$ یا ۶۴ ترکیب سه تائی احتمالی وجود دارد. این ۶۴ کدون رمز ژنتیکی (genetic code) را تشکیل می دهند.

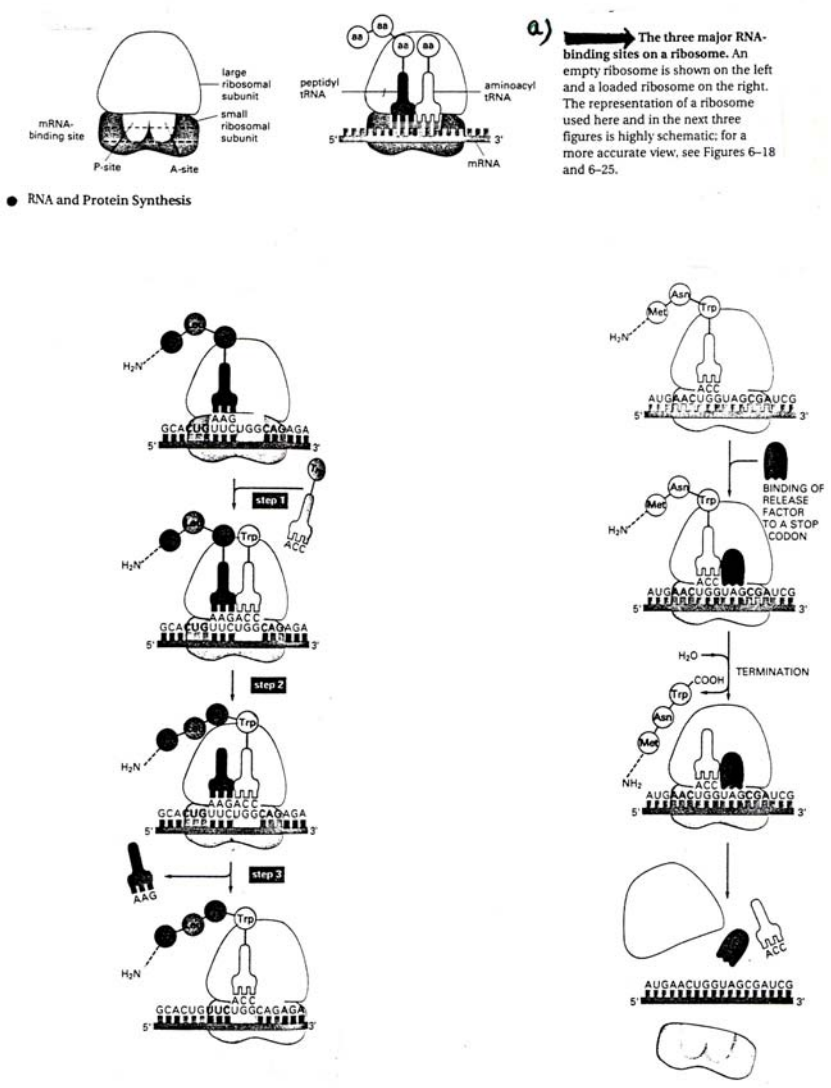
بدلیل آنکه تنها ۲۰ اسید آمینه و ۶۴ کدون ممکن وجود دارد، بیشتر اسیدهای آمینه با بیش از یک کدون مشخص می شوند؛ از این رو گفته می شود که رمزهای ژنتیکی منحط degenerate هستند، برای مثال، باز موجود در جایگاه سوم یک کدون می تواند یکی از دو باز پورین (آدنین یا گوانین) یا یکی از دو باز پیریمیدین (تیمین یا سیتوزین) یا در بعضی موارد یکی از چهار باز باشد، بدون اینکه پیام رمز تغییر کند (جدول ۱-۳ را ببنید). لوسین و آرژنین هر کدام با ۶ کدون مختلف مشخص می شوند.تنها متیوتین و تریپتوفان هرکدام یک کدون منحصر بفرد دارند. سه تا از کدونها، کدون ایست stop (یا بی معنی non- sense) نامیده می شوند چون که ختم ترجمه mRNA در این نقطه مشخص می شود.

ترجمه mRNA همیشه از کدونی آغاز می شود که با متیونین مشخص می گردد. بنابراین میتونین اولین از طرف انتهای آمین زنجیره پلی پپتیدی است ، اگر چه قبل از اینکه سنتز پروتئین کامل گردد ، معمولا متیونین از رشته پلی پپتید جدا می شود . کدون متیونین (کدون آغاز ، AUG) چارچوب قابل خواندن (reading frame) ، را تعیین می کند؛ هر یک از کدونهای بعدی به نوبت خوانده می شوند تا توالی اسید آمینه را در

پروتئین مشخص نماید . رابط مولکولی بین کدونها و اسید های آمینه مولکولهای اختصاصی tRNA هستند . در یک محل خاص بر روی هر tRNA یک آنتی کدون (anticodon) ۳ بازی وجود دارد که مکمل یک کدون خاص بر روی mRNA می باشد . اتصال بین کدون و آنتی کدون ، اسید آمینه مناسب برای جایگاه بعدی را برای اتصال به انتهای کربوکسیل رشته پلی پپتیدی در حال رشد بر روی ریبوزوم فراهم می آورد . آنگاه ریبوزوم در طول رشته mRNA دقیقا باندازه ۳ باز حرکت می کند و کدون بعدی را براساس شناسایی tRNA بعدی حامل اسید آمینه دیگر ، در دسترس زنجیر در حال رشد tRNA قرار می دهد . بنابراین پروتئینها از انتهای آمینی به طرف انتهای کربوکسیلی سنتز می شوند که مطابق با ترجمه mRNA از جهت ´۵ به ´۳ است .

همانطوریکه قبلا اشاره شد ، وقتی mRNA در یک چهارچوب قابل خواندن با یک کدون ایست , UAA UAG یا UGA مواجه می شود ، ترجمه خاتمه می یابد (هرکدام از کدونهای ایست ، چهار چوبهای قابل خواندن Reading Frame بی استفاده هستند که خوانده نمی شود و بر ترجمه اثری ندارد) . آنگاه پلی پپتید کامل شده از ریبوزوم آزاد می گردد و ریبوزوم آماده می شود تا سنتز پروتئین دیگری را آغاز نماید .

در سنتز پروتئین علاوه بر وجود mRNA و اسیدهای آمینه به ارگانل ریبوزوم هم نیاز است. tRNA ها ، RNAهای کوچک مولکول (۹۰-۷۰ نوکلئوتید) و قابل حلی هستند که گرچه توالی‌های بازی آنها بسیار متفاوت است دارای اشکال و اعمال مشترکی هستند. tRNA بعنوان یک آداپتور در سنتز پروتئین عمل می‌کند. آنتی کدون (Anticodon) که توالی ۳ نوکلئوتید در یکی از ۳ لوپ ساختمان tRNA می‌باشد مسئول شناسایی کدون‌های ۳ تایی mRNA و جفت شدن با آن‌ها و از طرفی مسئول انتقال یک اسید آمینه خاص در رشته تازه ساخته شود پروتئین است. حداقل ۶۱ نوع tRNA مختلف برای ۶۱ کدون اسید آمینه وجود دارد. (شکل۲۳-۴)



(شکل ۲۳– ۴) : مراحل مختلف سنتز پروتئین

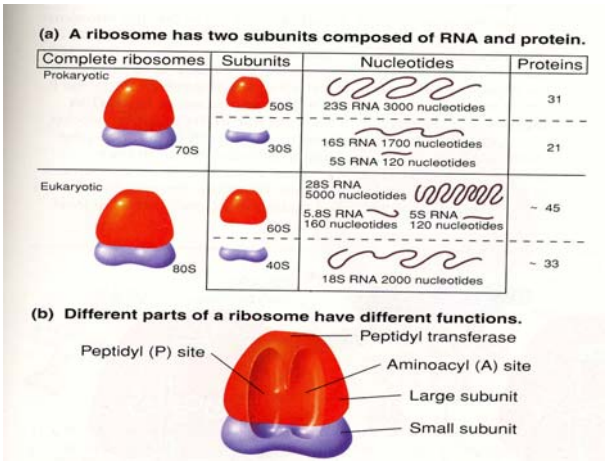
ریبوزوم‌ها:

این ارگانل‌ها از دو زیرواحد بزرگ و کوچک پروتئینی در ترکیب با rRNAهای ۴۰ S و ۵۰ S ساخته شده‌اند.
سنتز پروتئین طی مراحل زیر انجام می‌گیرد:

۱–شروع (initiation) که ریبوزوم به محلی نزدیک انتهای ´۵ mRNA متصل می‌شود و اولین اسید آمینه را در مقابل کدون مربوطه قرار میدهد.

۲–طویل شدن (Elongation) : ریبوزوم در جهت ´۳ ← ´۵ مولکول mRNA حرکت کرده یکی یکی کدون‌ها را توسط tRNA مخصوص می‌خواند و رشته پلی‌پپتیدی را در جهت آمینو به کربوکسی ترمینال سنتز می‌کند.

۳–ختم (Termination) :ریبوزومها با رسیدن به توالی‌های ختم (Stop codons) متوقف شده، زیر واحدهای آن از هم جدا شده و در سیتوپلاسم رها می‌شود. پروتئین از رشته mRNA جدا می‌گردد. کدون‌های ختم معمولاً UGA، UAG و UAA هستند. (شکل۲۴–۴)



(شکل ۲۴-۴) : ریبوزوم : محل سنتز پلی پپتید . a) یک ریبوزوم دو زیر واحد دارد که هر یک از rRNA و پروتئین های مختلفی ساخته شده است b) ابتدا زیر واحد کوچک به mRNA متصل می شود . زیر واحد بزرگ عمل پپتیدیل ترانسفرازی دارد که شکل یابی پیوند های پپتیدی در رشته در حال رشد پلی پپتید را به عهده دارد . دو زیر واحد تواما مکانهای اتصال A و p برای tRNA را تشکیل می دهند .

منع کننده‌های سنتز پروتئین: آنتی‌بیوتیک‌ها به مناطق مختلفی از ریبوزوم متصل شده و از سنتز پروتئین در مراحل مختلف جلوگیری می‌کنند.

تاثیر بر سنتز پروتئین	زیر واحدی که به آن متصل می‌شود	ارگانیسم هدف	دارو
منع شروع سنتز، موجب غلط خواندن mRNA	۳۰ S	پروکاریوت	استرپتومایسین
منع اتصال tRNA بر اسید امینه خاص	۳۰ S	پروکاریوت	تتراسایکلین
منع انتقال پپتید	۵۰ S	پروکاریوت	کلر آمفنیکل
منع انتقال پپتید	۶۰ S	یوکاریوت	سیکلوهگزامید
منع انتقال از محل A به P ریبوزوم	۵۰ S	پروکاریوت	اریترومایسین
ختم زودرس	۶۰S و ۵۰S	پرویوکاریوت	پورومایسین

پروتئین‌ها پس از ترجمه ممکنست دچار تغییراتی شوند که به برخی از آنها در بخش تنوع ژنتیکی و علل آن اشاره شده است.

Refrences :

1- Peter Turnpenny & Sian Ellard Emery's Elements Of Medical Genetics 12th ed . 2005 , Elsevier Ltd .

2- Ricki Lewis . "Human Genetics ". 6th ed . 2005 , McGraw – Hill Companies

3- Leland H.Hartwell . { and Others} . Genetics : From Genes To Genomes . 2004 , McGraw – Hill Companies

فصل پنجم

روشهای آزمایشگاهی تشخیصی و کاربردی در ژنتیک پزشکی

بخش اول

انجام کاریوتایپ:

در مرحله انترفاز DNA های کروموزومها همانند سازی (Replicate) مـی کننـد، امـا کروموزومهـا تنهـا در اوائل دوران میتوز به دو کروموزوم مجزا (Double – Structure) تقسیم می شـوند، ایـن کروموزومهـا در این مرحله کروماتیدهای خواهر نامیده می شود که دارای دو بازوی بلند و نازک می باشـد کـه بـه تـدریج بطـور محکم حلقه حلقه شده به صورت بازوی کوتاه و ضخیم درآمده و به وسیله سانترومر بهم می چسبند.

کشت سلولی کروموزوم (Chromosomal Analysis) :

برای کشت سلولی مناسبترین بافت، سلولهای خونی می باشد، از طرف دیگر از مغز استخوان هم بطـور مـستقیم می توان برای بدست آوردن کروموزوم استفاده کرد.

از طریق لایه ای از پوست هم می توان به این عامل (کروموزوم) دست یافت.

یک نمونه خون محیطی Peripheral Blood از وریدهای دسـت و یـا پـشت دسـت گرفتـه و بـا 0.1ml هپارین مخلوط کرده که از لخته شدن جلوگیری شود. سپس با محلولهائی که شامل تمـام آمینواسـیدها ، نمکهـا (ماده کشت سلولی) مخلوط کرده به محیط کشت سرم AB یا از گوساله Fetal Bovin Serum به مقـدار ۳۰٪ – ۱۶٪ به همین محیط کشت ماده محرکه میتوز بنام فیتوهماگلوتنین (PHA) 0.1ml مخلوط کـرده و شیشه حاوی تمام مواد ذکر شده را در محیط $37^{\circ}C$ Co2 5% بمـدت ۷۲–۷۰ سـاعت قـرار داده تـا سـلولها سریعتر افزایش پیدا کنند بعد از مدت ۷۲–۷۰ ساعت به محیط کلشی سین Colchicin اضافه کـرده و مـدت یک ساعت محتویات کشت را دوباره در $37^{\circ}C$ قرار داده که سلولها را در مرحله متافـاز ثابـت نگـه دارد بعـد بـا سانتریفوژ کردن محتویات، تمام قسمت محلول را بیرون ریخته و به سلولهای بـاقی مانـده محلـول هیپوتونیـک Kcl (به مقدار 5ml) را اضافه می کنیم (بـرای بزرگتـر و بـاد کـردن کروموزومهـا) و بمـدت ۱۵ دقیقـه ایـن محتویات را $37^{\circ}C$ باقی خواهند ماند و بعد سانتریفوژ کرده و محلول را بیرون ریخته و دوباره به سلولهای بـاقی مانده در ته Test Tube فیکسیتو Fixative افزوده و بعد برای مطالعه کروموزومی سلولها را روی لام مـورد مطالعه قرار خواهیم داد.

در ادامه بحث کشت کروموزومی این نکات ضروری به نظر می رسد که در کـشت سـلولی بطـور معمـول بـرای بررسی کروموزومی از سلولهای لنفوسیتهای کوچک استفاده می شود زیرا این سلولها به سهولت در اثـر تحریـک با (PHA) شروع به تقسیم می کنند. با توقف تقسیم در مرحله متافاز، کروموزومها مجـزا شـده و در مجـاورت هوا خشک می شوند.

از کشت فیبروبلاستها برای مطالعه موزائیسم و از محتویات مغـز اسـتخوان بـرای تـشخیص بیماریهـای خـونی استفاده می کنند. متد کشت مایع آمینوتیـک و کـشت فیبروبلاسـت یکـی اسـت و در مـدت یـک هفتـه آنـالیز سیتولوژیک کامل می شود.

زودترین روش آنالیز کروموزومهای جنینی، بیوپسی از ویلوس کوریونیک است، این بیوپسی با راهنمائی سونوگرافی در هفته ۱۱-۸ حاملگی انجام می گیرد. تکنیکهای پیشرفته رنگ آمیزی، باندهای هر کروموزوم را با مختصات ویژه در طرحهای روشن و تاریک (درخشان و تیره) نشان می دهد.

ظهور این باندها به ترکیب زوج بازهای ساختمانی DNA و انتشار انواع پروتئینهای هیستونی و غیر رنگ آمیزی با مشتقات کوئین اکرین در زیر میکروسکوپ با نور اولتراویوله ظاهر می شود.

در انجام سریع آن در ابتدای بارداری است. در ویلوسهای کوریونی تعداد زیادی یاخته های در حال تقسیم با سرعت بالا وجود دارد . بنابراین طی چند ساعت پس از نمونه برداری، بررسی کروموزومی تعیین می گردد.

در مرحله متافاز در کوتاهترین حد از طول خود می باشد که در عکس برداری به فرم زوج های کروموزومی مرتب می شوند. اکثر آزمایشگاهها از هر نمونه ۱۰ تا ۴۰ کاریوتایپ در مرحله متافاز تهیه می کنند و در صورت شک به موزائیسم تعداد سلولهای بیشتر و از بافت های مختلف نمونه برداری و آنالیز می کنند در صورت نیاز به تفسیر بیشتر و دقیق تر کروموزومی، آنها را در مرحله پروفاز و پرومتاقاز High Resolution آزمایش می کنند.

زیرا در این مرحله طول کروموزومها بیشتر بوده و تعداد زیادی باند را می توان بررسی کرد.

تعداد کروموزومها دیپلوئید انسان ۴۶ عدد حاوی ۲۳ جفت است. تعداد کروموزومها در هاپلوئید ۲۳ عدد و حاوی گامت ها است هر کروموزوم در مرحله متافاز دارای دو عدد کروماتید (DNA) می باشد که مختصات مرفولوژی مشخص شده ای با توجه به موقعیت سانترومتر نسبت به بازوهای کوتاه و بلند دارد. سه نمونه از اشکال طبیعی مختصات کروموزومی ، کروموزومهای ۲۰،۱۹،۳،۱ (متا سانتریک)، شماره های ۱۳-۱۴-۱۵-۲۱-۲۲ و Y کروموزوم (اکروسانتریک) و بقیه کروموزومها ساب متاسانتریک است بازوی کوتاه همه کروموزومهای اکروسانتریک به غیر از کروموزوم Y یک توده ثانوی ضمیمه Satellite دارند.

در توصیف یک کاریوتایپ به منظور جلوگیری از اشتباه از اصلاحات استاندارد استفاده می شود. در گزارش نتیجه کاریوتایپ اول تعداد کل کروموزوم ها، بعد جنس کروموزوم و بعد اختلالات آن را می نویسند. بازوی کوتاه کروموزوم ها با علامت p و بازوی بلند با علامت q مشخص می شود. ماده کروموزومال افزوده شده با علامت (+) و ماده از دست رفته با علامت (-) نشان داده می شود که از افزایش یا کاهش شامل کل کروموزوم باشد این علامت در قبل از شماره کروموزوم مختل، و اگر افزایش یا کاهش شامل بخشی از طول کروموزوم باشد این علامت در بعد از شماره کروموزوم مختل قرار گیرد.

کروموزومهای مبتلا به یک ترانسلوکاسیون را در داخل پرانتز نوشته و کلمه t را قبل از پرانتز می نویسند مثل t(9;22) که در سرطان خون خوش خیم شایع می باشد. همچنین در حال حاضر نواحی موجود در داخل کروموزومها با ذکر مختصات باندها توصیف می شود، و هر بازوی کروموزوم را به نواحی جزء و زیر جزء تقسیم می کنند طوری که می توان محل شکسته را در کروموزوم معین کرده و اختلالات آن را با دقت بیشتر توصیف کرد.

قدرت تفکیک بالا High Resolution:

کروموزومها در مرحله اولیه میتوز یعنی پروفاز بررسی می شود ، یعنی موقعی که کروموزوم ها هنوز متراکم نشده اند . در کروموزومهای پروفاز و پرومتافاز ، در یک سری هاپلوئید (۲۳ کروموزوم) ۸۰۰ تا ۱۲۰۰ باند یا نوارمشاهده می شود که می تواند برای شناسائی اختلالات ساختمانی مورد استفاده قرار گیرد ، مثلا برای تشخیص نقایص ساختمانی (Duplication , Deletion) جزئی در سرطانهای خون و تومورها در حالی که در نمونه های استاندارد در متافاز کروموزومهای هاپلوئید حدودا ۴۰۰ نوار را نشان می دهند.

سیتوژنتیک ملکولی FISH

آزمونهای تشخیصی جدید توانایی های مارا در ردیابی اختلالات سیتوژنتیک افزایش داده اند . در تکنیک (Fluorescence in situ Hybridization) با استفاده از نشانگرهای DNA (DNA Probe) میتوان هر کدام از کروموزومها را به طور مجزا تشخیص داد وتجزیه تحلیل سیتوژنتیک با کمک این روش به تقسیم سلولی وابسته نیست و می تواند در هسته هائی که در اینترفاز هستند انجام گیرد ، در حالی که تکنیک های تجزیه و تحلیل و بررسی سیتوژنتیک باید روی سلولهای مرحله پروفاز و متافاز انجام گیرد .

روشهای نواری (Banding System) :

روش نواری فلورسنت Q :

Casperson کاسپرسن و همکاران اولین کسانی بودند که رنگ آمیزی را با کوئین اکرین موستارد برای سیستم باندینگ مورد استفاده قرار دادند. با این رنگ آمیزی و استفاده از نور ماوراء بنفش کروموزومها بصورت نوارهای تاریک و روشن درخشان رنگ می گیرند. قسمتی از بازوی بلند کروموزوم Y خاصیت فلورسنت شدید دارد و حتی در حالت انترفاز نیز خصوصیت رنگ پذیری و درخشندگی خود را حفظ نموده و به صورت نقطه روشن براق در داخل هسته سلولی خود نمائی می کند که به نام جسم Y معروف است و می توان به راحتی در سلولهای سوماتیک آن را دید.

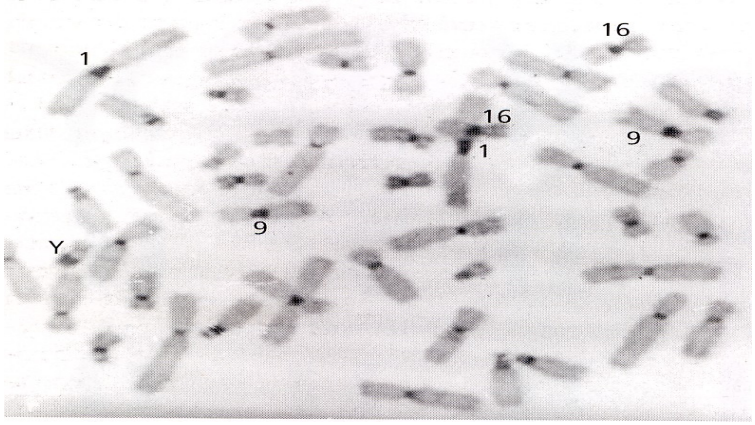
روش نواری C(C-Banding) – (هتروکروماتین Constiutive):

هتروکروماتین های موجود در مجاورت سانترومر، تلومرها و همچنین در سازمان دهندگان هسته ای پایدار بوده و به آنها هتروکروماتین های ساختمانی گویند تعداد آنها زیاد می باشد و از هتروکروماتین های اختیاری که تعداد آنها کم بوده و ذاتاً یوکروماتین هستند باید متمایز دانست. هتروکروماتین های ساختمانی در انترفاز و پروفاز قابل رؤیت بوده و در متافاز ظاهر نمی شوند بنابراین برای مشاهده آنها باید از رنگ آمیزی خاصی استفاده کرد. در بیشتر گونه های پستانداران هتروکروماتین های ساختمانی در نزدیکی سانترومر واقع اند.

این روش نواری (C-Banding) در شناسائی کروموزومهای ۱-۹-۱۶ و Y می تواند بسیار مورد استفاده واقع شود. هتروکوماتین نوعی کروماتین است که در مرحله تقسیمی یعنی انترفاز بصورت توده ای همچنان باقی مانده و رنگ تیره بخود می گیرند. هتروکروماتین شامل ترادفات تکراری DNA می باشد. شاید ۱۰٪ از کل ژنوم انسان بصورت ترجمه نشده قرار دارند و این ترادفات ترجمه نشده به صورت چندین هزار و یا میلیون بار

تکرار شود این تکرار مکررات ترادفات DNA که ترجمه نشده اند را می توان هتروکروماتین ساختمانی (Structural Heterochromatin)لقب داد. نوع دیگر هتروکروماتین اختیاری (Facultative) هستند که در کروموزوم X پستانداران دیده می شود.

اهمیت هتروکروماتین را می توان به تکامل کروموزوم مرتبط دانست. در کراسینگ اوور نقش آن توسط محققین بررسی شده است، نقش دیگر هتروکروماتین را می توان در جدائی سانترمرها مورد توجه قرار داد.تکامل اشخاص به کمیت و کیفیت هتروکروماتین می تواند بستگی داشته باشد. تغییرات در هتروکروماتین می تواند در باروری اهمیت داشته باشد، هتروکروماتین می تواند مقاومت کروموزوم را در زمان تقسیم میتوز تحت الشعاع خود قرار دهد تغییرات در هتروکروماتین کروموزومهای ۱-۹-۱۶ می تواند باعث سرطانهای خونی گردد.



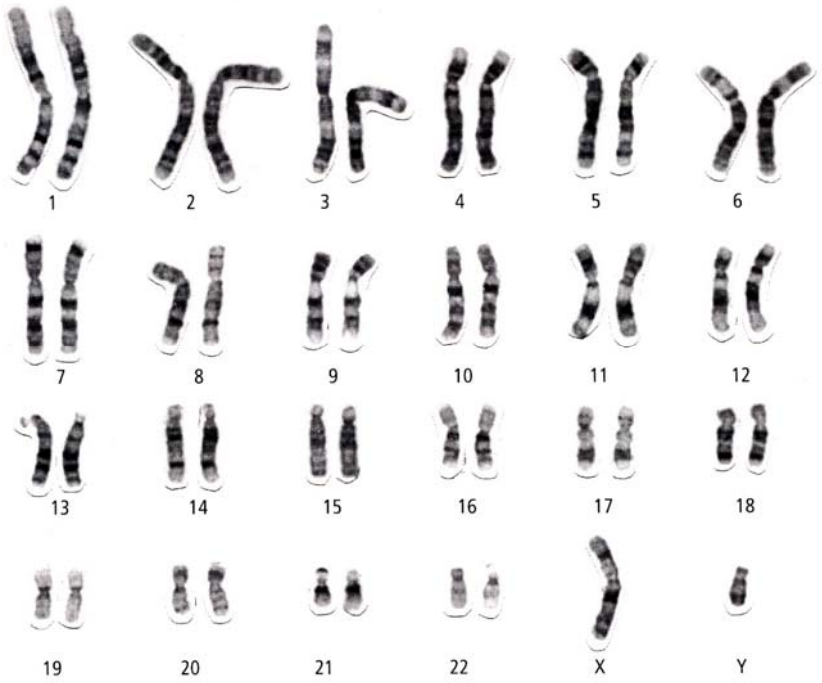
روش نواری C

نوارهای G (G-Banding) :

این روش اطلاعات بیشتری نسبت به نوار Q بدست می دهد. برای شناسائی کروموزومها و تغییرات ساختمانی آنها مورد استفاده قرار می گیرد. در این روش از محلول تریپسین و سپس رنگ گیمسا استفاده می شود.

گیمسا باندینگ (بندهای G) تکنیکی است که به طور گسترده برای رنگ آمیزی روتین کروموزومهای پستانداران استفاده می شود . معمول ترین روشها برای بدست آوردن این رنگ آمیزی ، مجاورت کردن اسلایدها با یک پروتئاز مثل تریپسین می باشد . بندهای مثبت G نسبتا غنی ازپروتئین های دی سولفیدی هستند در حالیکه بندهای منفی G محتوی سولفیدریل می باشند . با استفاده ازالگوی نواری گیمسا در کروموزومهای متافازی (هاپلوئید) انسان حدود ۴۰۰ نوار باندینگ را می توان مشاهده نمود . د رحالی که در کروموزومهای پروفازی (High Resolution) و یا تفکیک بالا تعداد ۱۲۰۰ – ۸۰۰ نوار قابل رویت می باشد . با استفاده از تکنیک گیمسا در انالیز کروموزومی حذف و یا اضافه شدن حدود Kb ۴۰۰۰ قابل تشخیص است . تشخیص نقایص بسیار جزئی تر و کوچک تر را می توان با استفاده از روش High Resolution بررسی کرد .

روش نواری G می تواند نتیجه تفاوت هیستونها و دیگر پروتئین های کروموزوم باشد. در روش G-, T=A banding به صورت بسیار زیادی دیده می شوند (A = T Rich) .



نوار G

نوارهای R-Banding R :

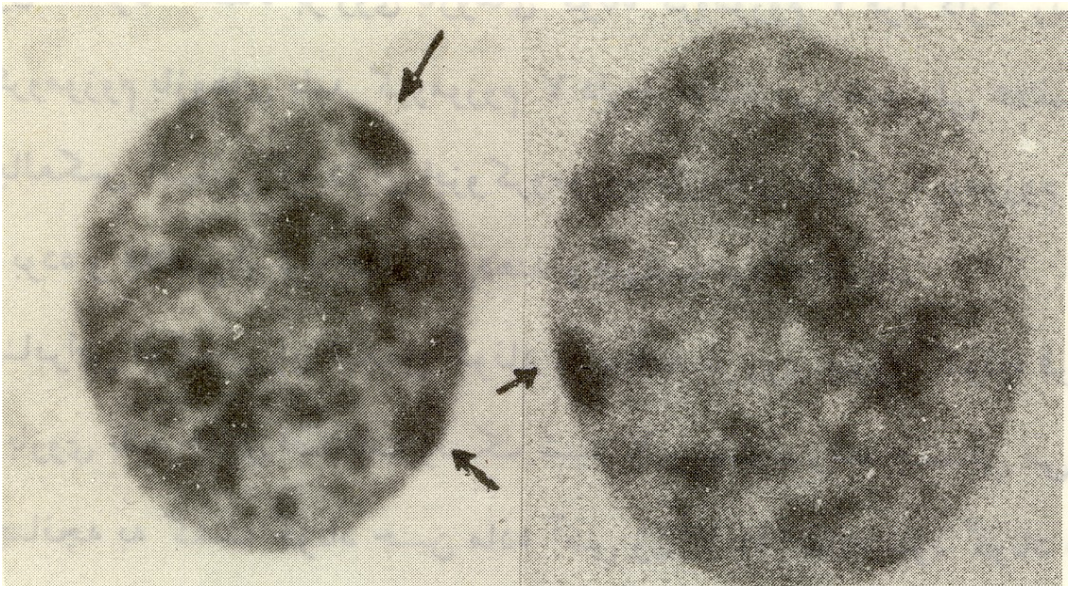
نوارهای Reverse – R الگویی را نشان می دهند که عکس نوارهای G است، یعنی قسمت های روشن نواری G تیره و قسمت تیره آن روشن می شوند. کاربرد PH پائین (۴/۵-۴) و سپس درجه حرارت بالا (۸۸ درجه سانتیگراد) در محلول یک مول Na H2So4 جهت ایجاد نوار R لازم است. یک روش مهم پیشرفته جدید کروموزومی در مرحله تاخیری پروفاز است

بار بادی (Barr's Body):

کروماتین جنسی و یا Barr Body د رمردان طبیعی منفی و در زنان مثبت است . باربادی عبارت است از یکی از کروموزومهای X در زنان طبیعی که از نظر ژنتیکی غیر فعال است. غیر فعال شدن یکی از کروموزومهای X در روزهای اولیه تشکیل جنین ، زمان تشکیل بلاستوسیت (Blastocyte) صورت می گیرد . غیر فعال شدن ممکن است در کروموزوم مادری و یا کروموزوم پدری در دوران جنینی اتفاق بیفتد . پدیده متیلاسیون در غیر فعال شدن ژنها در کروموزوم X غیر فعال شدن نقش اساسی دارد . ثابت شده است که تمامی یک کروموزوم X غیر فعال در خانم ها به طور کامل غیر فعال نیست و بخشی از ژنها در این کروموزومها فعال است . بنابراین بهتر است به جای X غیر فعال ، X نیمه فعال به کار ببریم .

ابتدا دهان را با آب شتشو داده و خشک کنید . توسط یک لام کاملا تمیز و ضد عفونی شده از سطح داخلی گونه لایه ای از بافت پوششی دهان را به طوری به آرامی جدا کنید که به بافت دهان صدمه ای وارد نگردد . لام را چندین بار با الکلهای ۷۰ و ۵۰ درصد مورد شستشو قرار می دهیم . لام را به ظرف اسید کلریدریک ۵ یا ۶ نرمال منتقل می کنیم و بعد با رنگ آبی تولوئیدین به مدت ۱۲ دقیقه قرار می دهیم و بعد با الکلهای ۵۰ و ۷۰ و

۱۰۰ درصد شستشو می دهیم . لام بعد از پوشش با لامل برای بررسی جسم بار کـه در مجـاورت غـشاء هـسته دیده خواهد شد و سیتوپلاسم بیرنگ می شود و قابـل تـشخیص اسـت . آزمـایش باربـادی را مـی تـوان بـرای تشخیص ابهام جنسی و فنوتیپ مبهم در افراد از جمله سندرم هـای Klinfelter ، سـوپر مـرد ، سـرپر زن ، ترنر ، مردانی با آرایش کروموزومی 46xxو سویر ، TFS و غیره به کار ببریم .



هسته سلول دست راست دارای یک جسم بار (پیکان) و سلول دست چپ دو کروماتین (کرومـوزوم X غیـر فعـال) جنـسی را نشان می دهد .

تشخیص پیش از تولد

امروزه چندین روش برای تشخیص پیش از تولد "Prenantal Diagnosis" مورد استفاده قرار می‌گیرد و هر کدام در تشخیص بیماریهای ویژه‌ای کاربرد دارد . اولتراسونوگرافی روشی نسبتاً دقیق و کاملاً بی‌خطر است کـه اکثـراً در سـه ماهه دوم حاملگی کاربرد دارد. مورد یـابی (اسـکرین نمـودن) سـرم خـون مـادر بـرای افـزایش یـا کـاهش غلظـت آلفافیتوپروتئین (Maternal Serum Alpha Feto Protein) روشی کاملاً بی خطر ولی کیفی اما بـه دلیـل عدم وجود خطر و کم هزینه بودن ، بسیار رایج است و امروزه به عنوان روشی مرجع و رفرانس برای تعیین اندیکاسـیون آمینوسنتز در موارد ویژه به کار می‌رود، آمینوسنتز روشی است با خطر Risk حدود نیم درصـد کـه در سـه ماهـه سـوم حاملگی اطلاعات ارزشمندی را در طیف وسیع از بیماریها در اختیارمان می‌گـذارد. نمونـه بـرداری از پرزهـای کوریـون CVS و تهیه سلولهای تروفوبلاست که به شدت در حال تقسیم متیوز هستند ، روشی با خطر حدود ۲٪ ولی قابل اجـرا در سه ماهه اول First trimester حاملگی است . کوردوستنز روشی با خطر حدودا ۴-۳٪ است که در سه‌ماهه دوم و سوم قابل اجراست هرچند که کار بردهای محدودتری دارد. فتوسکوپی نیز که مشاهد مستقیم اندامهای جنین ، روشی بسیار اختصاصی و حساس است ولی خطر آن حدوداً ۳٪ است . بیوپسی رویانی مهمترین و دقیق‌ترین و کاملترین روش برای تشخیص پیش از تولد می‌باشد که در آینده‌ای نه چندان دور روش مرجع و معمول خواهد شد.

اولین آزمایشاتی که به منظور تشخیص بیماریها و عوارض جنین انجام گرفت، مربوط به بیماری ناسازگاری Rh (اریتروبلاستوز جنینی) بود که بیش از چهل سال پیش در ۱۹۵۲ میلادی توسط Bevis با آزمایش مایع امنیوتیک انجام گرفت، از آن زمان تاکنون روشها، آزمایشها و تئوریهای فراوانی برای بررسی و معاینات دقیقتر جنین در تمام مراحل رویانی و فتال انجام گرفت تا از بروز هرگونه ضایعه جبران ناپذیر بعد از تولد نظیر ناقص الخلقه‌ها ، عقب ماندگان جسمی و ذهنی ، نوزادان مبتلا به سندرمهای خطرناک متابولیکی و ژنتیکی و غیره ممانعت به عمل آید . در بسیاری از این موارد نیز چاره‌ای جز اختتام حاملگی وجود ندارد زیرا مثلاً برای درمان جنین مبتلا به آنسفالی هیچ کاری جز سقط نمی‌توان انجام داد زیرا صددرصد مرده بدنیا خواهد آمد و چه بسا خطراتی عدیده مادر را نیز تهدید می‌کند. تشخیص پیش از تولد همواره با سقط جنین همراه نیست بلکه در بعضی موارد نیز تشخیص پیش از تولد جنبه درمانی دارد که مهم‌ترین مثال آن بررسی میزان بلوغ ریه‌های جنین در زایمانهای زودرس و همچنین تشخیص عفونتهای داخل رحمی و درمان آنهاست. گاهی نیز یک تشخیص اولیه و سریع اجازه درمان به موقع و مناسب تری را می‌دهد که نوزاد را از بسیاری مخاطرات و حتی مرگ می‌رهاند. بهترین مثال فنیل کتونوری PKU است که تشخیص پیش از تولد، در مواردیکه والدین با سقط موافق نیستند می‌تواند نوزاد را از ابتلا به علایم بیماری نظیر عقب ماندگی شدید ذهنی و غیره برهاند. نکته مهم دیگر ژن درمانی Gene Therapy است که آینده بشریت را دگرگون خواهد ساخت.

کاربردهای (اندیکاسیونهای)تشخیص پیش از تولد

درموارد زیر باید اقدام به تشخیص پیش از تولد نمود.

۱- زوجهائی با سابقه فرزند(یا فرزندان) مبتلا به بیماری ژنتیکی و توارثی قابل توجه و خطرناک .

۲- زوجهائیکه یکی از آنها (و یا بندرت هردو) واجد یک ترانسلوکاسیون بالانس باشند.

۳- زوجهایی که در خانواده یکی از آنها(یا هردو) بیماری توارثی قابل توجهی وجود دارد یا داشته است.

۴- زوجهائی که مورد یابی (اسکرین نمودن یا غربالگری) اجتماعی،آنها را درگروه پرخطر داشتن فرزندی با اختلال ارثی مربوطه قرارداده است(نظیر تالاسمی در برخی از نواحی شمال کشورمان).

روشهای تشخیص پیش از تولد

اولتراسونوگرافیultrasonography

استفاده از امواج مافوق صوتی (اولتراسون) با فرکانس بسیار بالا به خصوص با استفاده از روشهای تصویرسازی Imaging توانسته است بسیاری از اختلالات و نقایص آناتومیکی و ژنتیکی و مادرزادی جنین را عمدتاً در سه ماهه دوم حاملگی آشکار کند ، به بیانی ساده یک واحد تولید کننده امواج ماوراء صوتی با کمک یک واسط (نظیر ژل یا روغن مخصوص) برروی محل مورد نظر گذاشته می‌شود. این واحد مبدل Transducerامواج صوتی با فرکانس زیاد تولید می‌کند. این امواج وارد نسوج بدن شده و بسته به میزان تراکم و دانسیته و ویسکوزیته نسج (نظیر توپر یا خالی بودن) منعکس و برگردانده می‌شود. واحد فوق امواج منعکس شده(اکوها) را دریافت و تقویت نموده و آنها را برروی مونیتور نشان داده و در نهایت برروی فیلم ثبت می‌کند. باتوجه به بی ضرر بودن امواج اولتراسوند برروی انساج مادر و جنین ، کاربرد این روش حتی در بررسی حاملگی‌های طبیعی نیز روز به روز بیشتر می‌شود. درحاملگی‌های طبیعی بررسی میزان رشد و بقای جنین تعیین سن حاملگی Gestational age تعیین موقعیت جفت ، چند قلو بودن و غیره توسط

اولتراسوند انجام می‌گیرد. اولتراسوند یک بخش اساسی و اجباری در تمام روشهایی است که باید از تورفوبلاست و مایع آمنیون و غیره نمونه برداری انجام شود و بنابراین به طور مستقیم و غیر مستقیم در تمامی آزمایشات پیش از تولد بخصوص در اختلالات مادرزادی نقش دارد. اختلالاتی نظیر نقایص لوله عصبی باز (Open Neural Tube Defects) ، البته باید توجه داشت که امروزه اولین قدم تشخیص درONTD بررسی میزان افزایش MSAFP است که اولتراسوند را به میزان زیادی تحت پوشش قرارداده است. انومالیها و مالفورماسیونهای جنینی ، مرگ داخلی رحمی در حاملگی‌های نابجا(اکتوپیک) می‌تواند در هفته‌های ۱۷ تا ۲۰ وهیدروسفالی در هفته‌های بالاتر حاملگی تشخیص داده شود. استفاده از High Resolution Ultrasonography باعث شده که قدرت این روش در تشخیص اختلالات مغز، انواع بیماریهای قلبی، شکافهای لب و کام، میکروفتالمی و غیره بطور قابل توجهی افزایش یابد. مثال Symdrome Down - Osteogenesis Imperfecta.

نمونه برداری از پرزهای کوریونیک Chorionic Villus Sampling

نمونه‌برداری از پرزهای ویلوزیته‌های کوریون از طریق کانال گردن رحمی Transcervical برای اولین بار در سال ۱۹۶۰انجام گرفت در تکنیک ترانس سرویکال- تحت راهنمایی اولتراسوند و شرایط استریل و بی حسی لیدوکائین ۱٪ یک کاتتر نمره باریک از راه واژینال و دهانه رحم به فضای دسی دو آ- کویون فروبرده شده و سپس عمل آسپیراسیون انجام می‌گیرد. CVS زمانی که بین هفته‌های ۷-۱۲ حاملگی انجام می‌گیرد ، خطر بسیار کمی حدود ۲/۲٪ در بعضی اوقات نمی توان نمونه برداری را از طریق کانال واژینال و دهانه رحم انجام داد (مثلا در موارد واژینیت) واژنیسیسموس و غیره، در این موارد نمونه‌برداری از طریق جدار شکم مادر انجام گرفته و به CVS جدار شکمی یاترانس ابدومینال Transabdominal CVS معروف است میزان عفونت در ترانس ابدومنیال بسیار کمتر از ترانس سرویکال است. سلولهای تروفوبلاست در CVS نسبت به آمینوسیتها از قدرت تقسیم بسیار بالاتری برخوردار هستند و به همین دلیل در خیلی از موارد بدون کشت قابل بررسی کروموزومی هستند زیرا به حد کافی سلول در مرحله متافاز دارند و در هر حال اگر نیازی هم به کشت باشد، کوتاه مدت است و همچنین به دلیل زمان نمونه‌برداری و سرعت انجام آزمایشات، اختتام حاملگی در سه ماهه اول امن‌تر و سهلتر است. در مقالات مختلف در رابطه با میزان خطرات CVS ، نظریات متفاوتی به چشم می خورد ولی آنچه که مسلم است اولاً این خطرات چندان بیشتر از آمینوسنتز نیستند(مثلاً ۲/۲٪ در برابر ۱٪ ، میزان سقط خودبخودی در سه ماهه اول حاملگی به دلیل اختلالات ژنتیکی بالاست و CVS اکثراً برای اختلالات ژنتیکی به کار رفته و در همین سه ماهه اول انجام می‌گیرد.

آلفا فیتوپروتئین

AFP آلفافیتوپروتئین . این ماده در جنین توسط کبد،دستگاه گوارش و کیسه زرده سنتز شده و در مایع آمنیوتیک ظاهر می‌شود. در بیماریهای انسفالی ،مننگوسل ، انسفالوسل و اومفالوس مقدار آن در مایع آمینوتیک افزایش می‌یابد . شایع ترین موارد اندازه گیری AFP حاملگی‌هایی هستند که فرزند قبلی آنها آنسفالی، مننگوسل و انسفالوسل داشته‌است (این بیماریها ارثی نیستند). میزان AFP در سندرم مکل که اتوزومال مغلوب است بالا است. این سندرم با انسفالوسل ، کلیه پلی کیستیک ، پلی داکتیلی، شکاف لب، کام و آنومالی‌های دستگاه تناسلی و چشم همراه است. در سندرم نفروز مادرزادی که اتوزومال مغلوب می‌باشد. اندازه AFP بالاست.

میزان AFP در هفته ۱۸-۱۴ حاملگی به حداکثر میزان خود می‌رسد و سپس بطور دائم روبه کاهش می‌رود به موارد افزایش AFP در مایع آمنیوتیک عبارتند از وجود خود جنین در مایع آمنیوتیک آلودگی خون جنین ، مرگ جنین ،حاملگی دوقلو ، ناهنجاریهای جنین (امفالوسل) اگر سطح سرمی AFP زنان حامله به دو برابر سطح متوسط طبیعی برسد در آن صورت بایستی با راهنمایی سونوگرافی آمینوسنتز صورت گیرد.

استفاده از AFP برای بیماریابی علاوه بر نقص لوله عصبی بایستی شامل مالفورماسیون هائی مثل امفالوسل، عقب افتادگی رشد و دوقلوئی نیز شود. بیماری تای – ساکس(Tay-Sachs) را که ناشی از نقص در آنزیم هگزوز آمینیداز (Hexosamindase)است در نظر بگیرید. به خاطر نقص آنزیمی ماده‌ای موسوم به گانگلیوزید به طور فرایند‌ه‌ای درون یاخته های عصبی انباشته و نهایتاً منجر به کوری ، فلج و عقب ماندگی شدید ذهنی می‌شود. بچه‌های مبتلا معمولاً قبل از ۵ سالگی می‌میرند . آنزیم غیر طبیعی معمولاً به گرما حساس است ودر یاخته های خونی یا پوستی حاملین سالم بیماری و نیز در یاخته‌های جنینی به دست آمده توسط آمینوسنتز وجود آن را می‌توان تعیین کرد. توانایی تشخیص و سقط جنینهای مبتلا در کاهش شیوع مرض تای – ساکس بویژه در جمعیتهایی که از نظر ابتلا در ریسک بالایی به سر می‌برند نقش مؤثری داشته‌اند.

نیمی از تقریباً ۲۰۰ نوع خطای مادرزادی متابولیسمی را که نقص ژنتیکی دقیق آنها شناخته شده است. امروزه با تشخیص پیش از تولد می‌توان تعیین کرد. بقیه از این جهت قابل آزمون نیستند که ژنهای ناقص در یاخته های جنینی حاصل از آمنیوسنتز تجلی نمی‌یابند به عنوان مثال در بیماری گلبولهای داسی شکل، زنجیرهٔ غیر طبیعی بتا تنها در گلبولهای قرمز وجود دارد که دسترسی به آنها توسط آمنیوسنتز مقدور نیست.

مایع آمنیوتیک – آمینوسنتزAmniocentesis

آمینوسنتز عبارت است از آسپیره نمودن مایع آمنیوتیک از طریق جدار شکم مادراست که ترجیحاً بین هفته‌های ۱۴-۱۶ انجام می‌گیرد، زیرا قبل از آن میزان حجم مایع برای آسپیراسیون کافی نیست و دیرتر از آن هم بتدریج سلولهای مایع آمنیون (آمینوسیت‌ها) قدرت تقسیم سلولی خود را از دست می‌دهند. مسئله مهم آلوده شدن مایع آمنیوتیک با خون مادر است که بشدت هم در آزمایشات ستیوژنتیک و هم آنالیز DNA اختلال ایجاد خواهد کرد. در آزمایشگاه مایع آمنیوتیک سانتریفوژ شده و دو محصول اصلی آن استخراج می‌شود اول خود مایع خالص آمنیوتیک که برای آزمایشات بیوشیمیائی و ایمونولوژی استفاده می‌شود و دوم سلولهای مایع آمینوتیک (آمینوسیت‌ها) که برای کشت سلولی (به منظور دو گروه آزمایشات سیتوژنتیک در ناهنجاریهای کروموزومی و ارزیابی آنزیمهای سلولی در اختلالات متابولیکی و یا مستقیماً (بدون کشت) برای آنالیز DNA توسط روشهایی نظیر Polymerase) Chain Reaction) PCR و تعیین طیف وسیعی از بیماریهای ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از مهمترین آزمایشات بیوشیمیائی مایع آمینوتیک خالص (بدون سلول) تعیین تغییرات جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر است و در ارزیابی بیماری ناسازگاری RH مادر و جنین که(می‌تواند منجر به اریترو بلاستوز جنینی شود) کاربرد دارد و دیگری آزمایش پایداری کف Foam Stabilty Assay و تعیین نسبت لیستین به اسفنگو میلین (LS) است که برای بررسی میزان بلوغ ریه‌های جنین در تمام مواردی که احتیاج به زایمان زودرس است ، به کار می‌رود . این دو آزمایش مربوط به اواخر سه ماهه سوم ، بارداری است. اندازه‌گیری غلظت آلفا فیتو پروتئین در مایع آمنیوتیک که از مهمترین آزمایشات تشخیص پیش از تولداست بحث و بررسی شد. ولی نکته مهم در این است که کاهش MSAFP در ناهنجاریهای کروموزومی که سر دسته آنها سندرم داون است اثبات شده است. سندرم ادوارد (تریزومی ۱۸) و

آنوپلوئیدیهای دیگر در اثر کاهش MSAFP می‌باشد. مارکرهای دیگری نیز در سرم مادر برای پیشگوئی سندرم داون تاکنون معرفی شده‌اندنظیر بتاپروتئین آزاد hCG CA-125 ولی هیچکدام از دقت ترکیب توأم MSAFPو سن مادر برخوردار نبوده‌اند .

آمینوسیت ها را می‌توان کشت داد سپس مورد آزمایشات سیتوژنتیک قرارداد . آزمایش ستیوژنتیک رایج فعلی بصورت کشت دادن چند روزه آمینوسیت ها (تا به مرحله متافاز برسند) و سپس تأثیر کلشی سین Colchicine برای متوقف کردن فعالیت دوک تقسیم میتوز در مرحله متافاز است. انگاه پس از سانتریفوژ کردن توسط محلول هیپوتونیک کروموزومها را آزاد کرده و پس از فیکس کردن آنها را در سطح لام میکروسکوپ قرارداده و رنگ آمیزی می‌کنند . روشهای مختلفی برای رنگ آمیزی و بررسی کروموزومها وجود دارد. روش رنگ آمیزی فلوئورسانس Q-banding بااستفاده از کیناکرین موستارد و یا ترکیبات مشابه آن و بررسی باندهای درخشان Q با میکروسکوپ فلوئورسنت ، روشی مرجع برای دسته بندی استاندارد کروموزومهاست. تکنیک رنگ آمیزی گیمسا G - banding که در آن ابتدا توسط آنزیم تریپسین، پروتئین کروموزومها را دناتوره کرده و سپس با گیمسا رنگ آمیزی می‌کنند ، روش معمول و روتین فعلی سیتوژنتیک است که در آن نوارهای تیره معادل نوارهای درخشان روش فلوئورسانس و برعکس است. بررسی کروموزومها در مرحله پروفاز Prophase که شامل مراحل ابتدائی متافاز هم می‌شود باعث ابداع تکنیک باندینگ با قدرت تفکیک بالا High Resolution شده است. در این تکنیک به جای حدود ۳۰۰ الی ۴۰۰ عدد باند کروموزومی که در آزمایش روتین G- banding مشاهده می‌شود بین ۸۰۰–۱۲۰۰ باند ایجاد شده و بنابراین کوچکترین حذفها deletion و ناهنجاریهای ساختمانی کروموزومی را می‌توان تشخیص داد. و اما مهمترین آزمایشاتی که امروزه برروی DNA آمینوسیتها انجام می‌گیرد (که امروزه بتدریج تروفوبلاستهای ، CVS جایگزین آن می‌شوند)، آزمون استخراج DNA از هسته سلولها، تکثیر نمودن ژن با ژنهای مورد نظر و یا مکانهای اثر آنزیمهای محدود کننده Restriction Enzymeاست . نتیجه این تکثیر Amplification را می‌توان با چندین روش مورد بررسی دقیق قرارداد . به این ترتیب می‌توان تقریباً تمام بیماریهای تک ژنی را تشخیص داد

کوردوسنتز یا نمونه‌گیری از خون بند ناف Cordocentesis

کوردوسنتز معمولاً بعد از هفته ۱۷ حاملگی انجام می‌گیرد. برای کوردوسنتز توسط راهنمایی اولتراسوند ، قدرت تفکیک بالا High Resolution مکان دقیق بند ناف و عروق آنرا تعیین می‌کنند و سپس سطح شکم کاملاً ضد عفونی شده و مبدل اولتراسوند (درون یک کیسهٔ استریل) ، روی شکم مادر گذاشته می‌شود و بخش جفتی بند ناف دوباره تعیین محل می‌شود، سپس یک سوزن نخاعی نمرهٔ ۲۰ تا ۲۵ و طول ۹ تا ۱۷ سانتیمتر در پلان سونوگرافیک فرد برده شده و آنقدر پایین می‌رود تا به بند ناف برسد و آنگاه نمونه‌گیری انجام می‌گیرد. اگر حرکات جنین مزاحمت ایجاد کند از پانکرونیوم 3mg/kg./ وزن جنین) برای فلج موقت جنین استفاده می‌شود که فاقد عوارض جانبی روی جنین و مادراست. میزان ۱ الی ۸ میلی لیتر خون پونکسیون می‌شود . نمونه خون بند ناف عمدتاً در تشخیص عفونتهای جنین اهمیت دارد. مهمترین این عفونتها، عبارتند از سرخجه – توکسوپلاسموز، ویروس واریسلا – زوستر و ویروس ایدز HIV در مورد ویرویس HIV ، چون لنفوسیتهای CD4 جنین از هفته ۱۳ به بعد قابل شناسایی است، بنابراین کوردوسنتز باید بعد از این زمان انجام شده و مسئله امکان آلودگی مادر به جنین را نیز در نظر داشت ،آنگاه مبادرت به عمل نموده و لنفوسیتهای جنین را از نظر ژنوم HIV بررسی کرد. برخلاف عفونتهای ذکر شده تا اینجا آمینوسنتز همانند کوردوسنتز آزمایش باارزشی برای تشخیص ستیومگالو ویروس است. از الکتروفوزر هموگلوبین جنین می‌توان

برای تشخیص پیش از تولد تمام هموگلوبینوپاتی ها استفاده کرد. عفونتهائی مثل هموگلوبینوپاتی‌ها و اختلالات انعقادی را می‌توان توسط استخراج DNA و تکثیر مکانهای مورد نظر DNA با تکنیک PCR و الکتروفـوزر روی ژن آگـارز تشخیص داد به طوری که امروزه این روش روشی استاندارد برای آنمی راسی شکل تالاسمی‌هـا، همـوفیلی‌هـا و غیـره محسوب می‌شود.

فئتوسکوپی Fetoscipy

فتوسکوپی تکنیکی بسیار اختصاصی است که مشاهده مستقیم داخلی رحمی جنین را امکانپذیر ساخته و اجازه دسترسی به عروق بند ناف و ارگانهای جنینی را داده و معمولاً در سه ماهه دوم حاملگی ، زمانی که مایع آمینوتیک شفاف و جنین نسبتاً کوچک است انجام می‌گیرد. برای انجام این عمل ابتدا با دادن آرام بخـش قـوی، مـادر را آمـاده عمـل سـاخته و سپس جنین و موقعیت جفت و غیره را توسط اولتراسوند با تفکیک بالا می‌سـنجند و آنگـاه یـک کـاتول Cannula همراه با سوزن تروکار ۱۳ میلی متری به فضای آمینوتیک فرو میکنند سپس سوزن را بیرون کشیده و یـک آندوسـکوپ فیبروپتیک Fibreoptic Endoscopic جایگزین آن می‌کنند، توسط فتوسکوپ ، پزشک می‌توان تمـام انـدامهای جنین را در یک میدان دید 2/4 سانتیمتر مربعی مشاهده کند. خطر این روش زیاد اسـت . تمـام آزمایـشات کـه توسـط فتوسکوپ انجام می‌گیرد می‌تواند توسط روشهائی با استفاده از سوزنهای ظریف و اولتراسوند نیز انجام شود.

پلاسنتوسنتز Placentocentesis

پلاسنتوسنتز عبارت از نمونه‌گیری خون جنینی از طریق جفت و بعد از هفتـه ۱۸ حـاملگی اسـت کـه اولـین بـار بـرای تشخیص هموگلوبینوپاتی‌های ارثی انجام شد، روشی است پر خطر ۶/۵٪ که ابتدا آمینوسنتز و بعد CVS به طور کامل جای آنرا گرفتند

بیوپسی رویانی در آزمایشگاه In Vitro Embryonic جدیدترین و کاملترین روش تشخیص پیش از تولد، بیوپـسی از اولین سلولهای رویانی است. در این تکنیک ابتدا در شرایط خارج از بدن In vitro عمل لقاح را انجام داده و سـپس جنین را کشت می‌دهند . وقتی که تعداد سلولهای رویانی به ۸ الی ۱۶ سلول رسید، یکی دو تـا از سـلولها را برداشـته و برحسب نوع بیماری یا اختلال آن را مورد آزمایشات آنالیز DNA توسط PCRو یا سیتوژنتیک (روتـین و FISH) و غیره قرار می‌دهند. درصورت عدم وجود اختلال و یا بیماری ، رویان مورد نظر در جدار رحم کاشته می‌شود. بزرگتـرین مشکل این روش بالا بودن عدم موفقیت حاملگی است و بزرگترین مزیت این روش عـدم نیـاز آن بـه اختتـام حـاملگی سقط است.

بخش دوم- ابزارهای ژنتیک مولکولی

مقدمه

اختراع واکنش زنجیره پلیمرازی (Polymerase Chain Reaction=PCR) باعث بروز انقلابی در علم ژنتیک مولکولی از طریق تکثیر سریع غیرجنسی (cloning) و بررسی مولکول DNA شد. از زمانیکه اولین گزارش ها در اواسط دهه ۱۹۸۰ میلادی این روش جدید آزمایشگاهی را تشریح کردند، کاربردهای زیادی در تحقیقات علوم پایه و بالینی برای این روش ارائه شده است.

دو روش اصلی دیگر آزمایشگاهی در ژنتیک مولکولی، بنام های توالی یابی DNA *(DNA Sequencing)* و جهش زایی داخل آزمایشگاهی *(In vitro mutagenesis)* می توانند با روش های آزمایشگاهی مولکولی که اساس آنها بر استفاده از روش PCR و یا عدم استفاده از آن می باشد بطور توأم بکار گرفته شوند.

PCR یک روش تکثیر DNA بدون استفاده از سلول زنده

PCR یک روش آزمایشگاهی سریع و کارآمد برای تکثیر قطعه ای از یک مولکول DNA شناخته شده از کل ژنوم سلول می باشد. این روش معمولاً برای تکثیر قطعه DNA اختصاصی از بین یک مجموعه ناهمگن از توالی های متعدد DNA مانند تمام ژنوم سلول و یا یک مجموعه ای از توالی های DNA مکمل (cDNA) مورد استفاده قرار می گیرد.

برای تکثیر چنین قطعه ای از مولکول DNA، به اطلاعات اولیه توالی DNA مورد نظر جهت طراحی دو عدد الیگونوکلئوتید (پرایمر) که برای قطعه DNA مورد نظر اختصاصی و حاوی توالی ۱۵ تا ۲۰ نوکلئوتید است نیاز می باشد.

بعد از افزودن پرایمر (در لوله آزمایش) به نمونه DNA آماده شده، آنها بطور اختصاصی به توالی های DNA مورد نظر متصل و در حضور آنزیم DNA پلی مراز مقاوم به حرارت و پیش ماده های DNA (چهار نوع دکسی نوکلئوتید تری فسفات dATP , dCTP, dGTP, dTTP) ساخت زنجیره جدید DNA که مکمل رشته های DNA مورد نظر از قطعه بزرگ و اصلی DNA ژنومیک می باشد آغاز می شود (شکل 5-1A).

نامگذاری روش RCR تحت عنوان "واکنش زنجیره ای" بعلت الگو قرار گرفتن رشته های DNA جدید ساخته شده برای تولید زنجیره های DNA در سیکل های بعدی واکنش PCR می باشد. بعد از حدود ۲۵ سیکل از واکنش PCR، محصول بدست آمده علاوه بر نمونه اصلی DNA اولیه شامل 10^5 نسخه از توالی DNA اختصاصی مورد نظر خواهد بود. تولید و افزایش زنجیره های جدید در روند واکنش تا سیکل سوم بصورت تصاعد حسابی و از آن به بعد تا سیکل آخر (۲۵) به شکل تصاعد هندسی است (شکل 5-1B).

لذا تولید صحیح زنجیره های جدید مورد نظر در سیکل های اولیه اهمیت بسیار زیادی داشته و چنانچه اشکالی در سیکل های اولیه رخ دهد ادامه روند واکنش با مشکلات اساسی روبرو و ساخت زنجیره DNA متوقف خواهد شد. در صورت انجام واکنش موفقیت آمیز، محصول آن بر روی ژل آگاروز و با استفاده از روش الکتروفورزیس قابل مشاهده می باشد.

مراحل انجام واکنش PCR

استفاده از یک آنزیم DNA پلی مراز مقاوم به حرارت در واکنش PCR بدلیل رخداد واکنش های متوالی شیمیایی PCR در سه مرحله و بشرح زیر می باشد.

۱- مرحله گشودن زنجیره های DNA (Denaturation step) که معمولاً در مورد ژنوم انسانی در دمای ۹۵-۹۳ درجه سانتیگراد رخ می دهد.

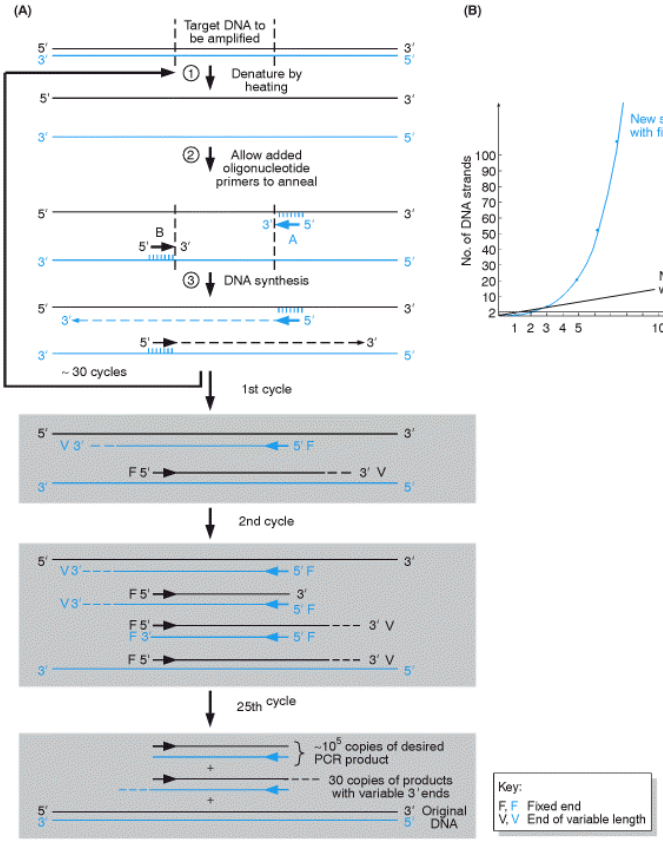
۲- مرحله اتصال مجدد زنجیره DNA (Reannealing step) که معمولاً در درجه حرارت ۵۰ تا ۷۰ درجه سانتیگراد انجام می شود.

۳- مرحله سنتز زنجیره DNA (Extension step) که معمولاً در درجه حرارت ۷۰ تا ۷۵ سانتیگراد انجام می شود.

با توجه به طیف حرارتی مورد استفاده در سه مرحله فوق الذکر، آنزیم DNA پلیمراز می بایست به تغییرات حرارتی در طی واکنش PCR مقاوم باشد تا با عملکرد مناسب و ثابت خود، رشته های DNA بدرستی ساخته شوند. این آنزیم از میکرو ارگانیسم هایی (باکتری) که بطور طبیعی در چشمه های آب جوشان زندگی می کند استخراج می شود.

برای مثال آنزیم Taq DNA polymerase که از باکتری Thermus aquaticus بدست می آید تا دمای ۹۴ درجه سانتیگراد دارای فعالیت ثابت و دمای فعالیت مطلوب آن ۸۰ درجه سانتیگراد می باشد.

شکل A,B ۱- ۵ : روند واکنش PCR جهت تکثیر مولکول DNA با استفاده از الیگونوکلئوتیدهای مشخص



توضیحات: پرایمرهای A وB مکمل توالی DNA مورد نظر می باشند که در دو جهت مخالف جلوبر و عقب بر فعالیت نموده و در نواحی بالادستی و پایین دستی قطعه مورد نظر قرار گرفته اند.پرایمرهای متصل شده در روند تولید مولکول DNA مشارکت نموده و بخشی از توالی زنجیره DNA جدید خواهند بود. سیکل اول واکنش باعث تولید دو رشته DNA جدید می شود که ناحیه '5 آن ثابت و ناحیه '3 آن متغیر است. این دو رشته جدید الگویی برای ساخت زنجیره جدید در سیکل دوم با طول مورد نظر خواهند بود. بطوریکه ناحیه '5 زنجیره توسط پرایمر مشخص شده و ناحیه '3 آن ثابت ثابت می باشد چرا که ساخت زنجیره نمی تواند به توالی بعد از پرایمر در زنجیره مخالف ادامه یابد. بعد از چند سیکل مقدار محصول PCR با طول ثابت بسیار زیاد شده بطوریکه تعداد زنجیره های جدید ساخته شده با طول متغیر قابل اغماض خواهد بود.

طراحی پرایمر و تکثیر اختصاصی زنجیره DNA

ساخت اختصاصی زنجیره DNA بستگی به عوامل متعددی از جمله شناسایی و اتصال صحیح پرایمرها به توالی مکمل DNA مورد نظر دارد. در اغلب مواردی که نمونه DNA مورد نظر از کل ژنوم سلول پستاندار می باشد، طراحی دو پرایمر حاوی حدود ۲۰ نوکلئوتید برای انجام واکنش کافی خواهد بود. طراحی و استفاده از این تعداد نوکلئوتید بعنوان پرایمر، احتمال اتصال نادرست و تصادفی تمامی توالی یک پرایمر بطور صحیح بر روی قطعه مکمل ژنوم سلول را بسیار کم می کند و حتی این اتفاق برای اتصال نادرست و اتفاقی همزمان هر دو پرایمر در هر دو جهت ساخت زنجیره DNA بسیار کمتر می باشد.

اگر چه انتخاب شرایط مناسب باعث اتصال صحیح پرایمرها به قطعه DNA مورد نظر می شود، با اینحال مواردی از تکثیر نادرست قطعه DNA می تواند رخ بدهد. این مورد به خصوص در شرایطی که توالی یک یا هر دو پرایمر شامل توالی های DNA تکرار شونده باشد مشاهده می شود. لذا طراحی پرایمرها باید بگونه ای باشد تا از اتصال به توالی های تکرار شونده به خصوص یک نوکلئوتید در طول زنجیره DNA مورد نظر جلوگیری کند. اتصال تصادفی در قسمت انتهایی پرایمر(3' end) نیز بسیار حایز اهمیت می باشد. محصولات نادرست می تواند از اتصال نادرست دو رشته پرایمر و DNA هدف حادث شود مگر اینکه قسمت انتهایی پرایمر (3' end) بطور کامل و صحیح به DNA هدف متصل شود. تدابیر متعددی برای اختصاصی کردن واکنش و تولید محصول صحیح می تواند بکار گرفته شود که یکی از آنها استفاده از پرایمرهای تو در تو *(Nested Primers)* می باشد. در این روش ، مقدار کمی از محصول PCR اولیه بعنوان منبع (نمونه) DNA بهمراه یک جفت پرایمر متفاوت که نسبت به پرایمرهای اصلی تا حدودی در قسمت پایین دستی آن طراحی شده اند، مورد استفاده قرار می گیرد.

همچنین در طراحی پرایمر می بایست از انتخاب توالی های دارای تکرار و یا دارای ساختمانهای ثانویه نوکلوتیدی پرهیز شود.

مزایا و محدودیت های روش PCR

از مزایای مهم روش PCR بعنوان یک روش تکثیر غیرسلولی ماده ژنومی، سرعت و حساسیت زیاد و توانایی تولید مقادیر قابل توجه ماده ژنتیکی حتی از مقادیر کم و یا نامناسب ژنوم سلولی می باشد.

از محدودیت های این روش می توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- نیاز به اطلاعات اولیه توالی بازهای آلی قطعه مورد نظر

۲- توانایی تکثیر و ساخت قطعات کوچک DNA (معمولاً ساخت قطعات ۵kb تا ۰/۱)

۳- تولید مقادیر کم محصول (در مقیاس صنعتی و انبوه)

۴- همانند سازی نامطمئن از DNA مورد نظر (در موارد نادری گزارش شده است)

در طی روند واکنش PCR، آنزیم Taq DNA polymerase ممکن است باز آلی نادرستی را در طول رشته DNA در حال ساخت قرار دهد و لذا نمی توان بین رخداد جهش واقعی و جهش ناشی از نادرستی عملکرد واکنش PCR افتراقی قائل شد.

در محیط آزمایشگاهی آنزیم معمولی DNA polymerase قادر به خواندن و اصلاح زنجیره DNA را از جهت '5→'3 نیست، لذا احتمال اشتباه در سنتز زنجیره DNA وجود خواهد داشت. امروزه با تولید آنزیم های جدید و با ایجاد توان فعالیت آنزیم در جهت '5→'3 این نقیصه تا حدود زیادی برطرف شده است.
در محیط in vivo (در داخل سلول زنده) بطور طبیعی آنزیم Taq DNA polymerase در هر دو جهت '5→'3 و '3→'5 دارای فعالیت می باشد و چنانچه در طی همانند سازی، که شایعترین زمان رخداد جهش در سلول می باشد، اشتباهی در ساخت زنجیره DNA رخ دهد آنزیم DNA polymerase با خاصیت proof reading خود قبل از اضافه نمودن یک باز آلی در طول زنجیره در حال ساخت DNA ، ابتدا باز آلی قبلی را کنترل کرده و چنانچه اشتباهی در ساخت آن رخداده باشد آنرا اصلاح و سپس باز آلی بعدی را در طول زنجیره قرار می دهد. لذا بطور طبیعی همانند سازی ماده ژنومی سلول بدون نقص انجام می شود.

کاربردهای متداول روش PCR

اگر چه حدود دو دهه از اختراع روش PCR می گذرد ولی ساده گی ، توانمندی و سرعت این روش آزمایشگاهی در بین سایر روش های ژنتیک مولکولی باعث شده که طیف وسیعی از کاربردهای آن مشخص شود. در ادامه به توصیف تعدادی از آنها می پردازیم.

۱- شناسایی جهش ها (شناخته شده و یا ناشناخته)
۲- جهش زایی و بررسی عملکرد ژنها و پلی پپتید ها
۳- تولید پلی پپتید (آنزیم، هورمونها و . . .)
۴- شناسایی ژن ها

کاربرد PCR در شناسایی جهش ها

استفاده از PCR برای شناسایی جهش ها در ژنهای مرتبط با یک صفت خاص (بیماری) در قطعاتی از توالی DNA یک رویکرد اساسی است. تکثیر قطعه مناسبی از یک ژن باعث می شود که اجرای سریع یک تست ژنتیکی برای شناسایی وجود جهش مرتبط با بروز بیماری در تعداد زیادی از افراد امکان پذیر بشود.
به طور کلی روشهای آزمایشگاهی مورد استفاده جهت شناسایی جهش ها، به دو دسته اصلی تحت عناوین Scanning methods و Screening methods تقسیم بندی می شود.
لفظ Scanning methods برای روشهایی کاربرد دارد که توسط آنها تغییری ناشناخته در ژنوم مورد شناسایی قرار می گیرد.
عبارت Screening methods برای روشهایی استفاده می شود که توسط آنها یک تغییر شناخته شده شناسایی می شود.
جهش ها را می توان از نظر بررسی مولکولی به دو دسته اصلی شناخته شده و ناشناخته تقسیم نمود. با استفاده از روش PCR به تنهایی و با تغییرات اندک در طراحی پرایمرها می توان انواع جهش های شناخته شده را شناسایی کرد. این روش ها را تحت عناوین RFLP، ARMS، RSPs و غیره نامگذاری می کنند.
برای شناسایی جهش های ناشناخته علاوه بر انجام PCR باید از روش های تشخیصی دیگر از جمله SSCP ، DGGE، CSGE، PTT ، DNA Sequencing و غیره استفاده نمود. در این روش ها توالی

نوکلئوتیدهای در تمام طول زنجیره DNA مورد نظر بصورت انفرادی مورد بررسی قرار می گیرند. بعضی از روش های فوق الذکر در مباحث مربوطه توضیح داده خواهند شد.

در انتخاب یک روش مناسب آزمایشگاهی جهت شناسایی یک جهش، فاکتورهای متعددی تأثیر گذار می باشند از جمله:

۱- نوع جهش
۲- محل رخداد جهش
۳- طول قطعه DNA/RNA/cDNA مورد بررسی
۴- نوع آزمایش (تحقیقاتی یا تشخیصی- بالینی)
۵- هزینه آزمایش و منابع حمایتی بیمه ای
۶- منابع مالی و وجود تجهیزات جدید در دسترس

لذا روش مورد نظر می بایست با در نظر گرفتن فاکتورهای فوق انتخاب شود.
سپس محصول PCR توسط روش های مناسب جهش یابی که معمولاً توانایی بررسی ۲۰۰ نوکلئوتید را دارند، مورد بررسی مولکولی قرار می گیرد. اندازه متوسط اگزون (قطعات کد کننده پروتیین) در ژنوم انسانی حدود ۱۸۰ نوکلئوتید می باشد اما در مواردیکه اگزون ها خیلی بزرگ هستند (بطور مثال اگزون ۱۱ در ژن BRCA1, 2 و اگزون ۱۵ در ژن APC) می بایست از پرایمرهای متعدد با طراحی اختصاصی (همپوشانی قطعات) استفاده کرد تا تمام طول اگزون تکثیر و مورد بررسی مولکولی قرار گیرد.
از طریق روش PCR همچنین می توان سریعاً یک توالی از cDNA را به منظور شناسایی جهش تکثیر نمود. لذا در مواردیکه هنوز ساختار توالی اینترون- اگزون یک ژن شناخته نشده شناسایی جهش ها در cDNA ممکن است تنها راه باشد. برای اینکار، ابتدا mRNA از یک بافت مناسب (مانند سلولهای لنفوسیت خون) استخراج، سریعاً با روش RT-PCR به cDNA تبدیل و سپس مورد بررسی مولکولی قرار می گیرد.
بطور کلی امروزه در سراسر جهان متداولترین و حساسترین روش تشخیصی جهش ها روش توالی یابی DNA (DNA Sequencing) می باشد. این روش قادر است همه انواع جهش ها را با حساسیت بیش از ۹۵٪ در طول یک قطعه DNA با توالی حدود هزار نوکلئوتید و با سرعت زیاد شناسایی نماید.

شناسایی جهش های شناخته شده

اساساً روش های آزمایشگاهی مولکولی جهت شناسایی تغییرات ژنوم به دو گروه اصلی تقسیم می شوند.

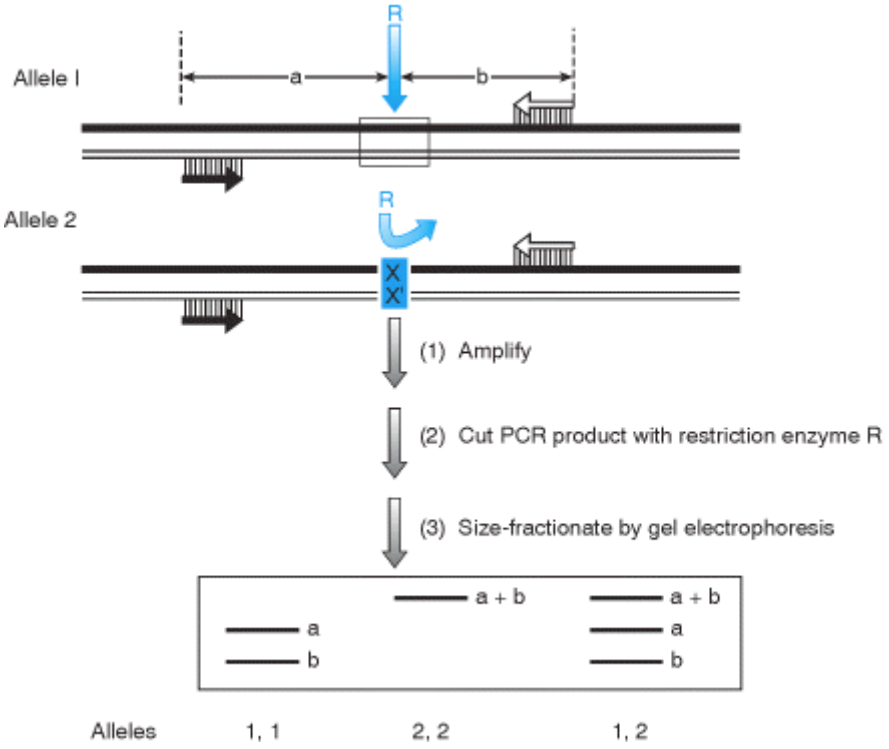
۱- روش های آزمایشگاهی برای شناسایی جهش ها و یا تفاوت های شناخته شده در ژنوم
۲- روش های آزمایشگاهی برای شناسایی جهش ها و یا تفاوت های ناشناخته در ژنوم

از آنجاییکه مقادیر استخراج شده ماده ژنتیکی به اندازه کافی نیست که بتوان آنرا بطور مستقیم مورد بررسی قرار داد لذا در اکثر موارد ابتدا قطعه مورد نظر با استفاده از روش PCR تکثیر شده و سپس با استفاده از روش های تشخیصی دیگر، خصوصیات و توالی ژنوم مورد بررسی و شناسایی دقیق قرار می گیرد.

افتراق آللها به روش اندازه گیری طول قطعه DNA و یا استعداد آلل به تأثیر آنزیم شکننده
(Allelic discrimination by size or susceptibility to restriction enzyme)

حذف و یا اضافه شدن تعداد کم نوکلئوتید در طول یک ژن مانند حذف سه نوکلئوتید (F508 del) که در بیماری شایع فیبروز کیستیک (cystic fibrosis) رخ می دهد می تواند به آسانی با استفاده از روش PCR شناسایی شود. در این روش از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده در حوالی نواحی جهش یافته استفاده و چنانچه رخداد جهش باعث تغییر محل اثرگذاری آنزیم قطع کننده بشود، آلل سالم و جهش یافته می تواند با استفاده از آنزیم شکننده بر اساس اندازه و رویت آنها بر روی ژل آگاروز از یکدیگر افتراق داده شوند (شکل ۲– ۵).

(شکل ۲–۵): کاربرد PCR در شناسایی چند شکلی های محل آنزیم های محدودگر

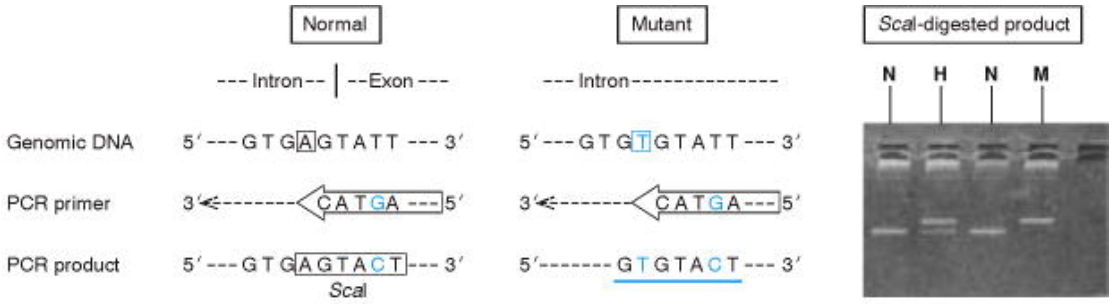


توضیحات: همانطور که در شکل نشان داده شده آلل های ۱و ۲ با وجود یک پلی مورفیسم از یکدیگر متمایز شده که محل آنرا برای شناسایی توسط یک انزیم محدودگر نوکلئازی تغییر می دهد.
آلل ۱ دارای محل فوق الذکر و آلل ۲ فاقد آن می باشد. پرایمر اختصاصی به آسانی برای تکثیر این قطعه قابل طراحی می باشد. بطوریکه با قرار گرفتن در نواحی بالا و پایین دستی محل شناسایی آنزیم محدودگر قطعه کوچک حاوی محل مورد نظر را در فرآیند PCR تولید می کنند. پس از تکثیر، محصول PCR با آنزیم محدودگر شکسته و برروی ژل آگاروز یا پلی آکریل آمید مورد بررسی قرار می گیرد.

افتراق آللها با توجه به استعداد آنها به القا محل اثر گذاری آنزیم محدودگر
(Allelic discrimination by susceptibility to an artificially introduced restriction site)

حتی اگر یک جهش باعث تغییر در محل اثر گذاری آنزیم محدود گر (شکننده) نشود، می توان با استفاده از روش PCR و پرایمر های اختصاصی محل اثر آنزیم شکننده را قطعه مورد نظر ایجاد کرد (شکل ۳ – ۵). این رویکرد یک نوع جهش زایی داخل آزمایشگاهی است (برای توضیحات بیشتر به مبحث کاربرد PCR در ایجاد جهش اختصاصی در انتهای این فصل مراجعه نمایید).

شکل ۳ – ۵: القا مصنوعی یک محل تشخیصی برای اثر گذاری آنزیم محدودگر



توضیحات: رخداد جهش A به T در محل اتصال اینترون به اگزون ۴ ژن FACC (بیماری آنمی فانکونی) هیچگونه تغییری در ایجاد یا تخریب محل اثر گذاری آنزیم شکننده نکرده است.

همانطور که در شکل نشان داده شده است با طراحی و بکارگیری پرایمر اختصاصی که در یک نوکلئوتید (G) با قطعه مربوطه متفاوت است می توان هر دو نمونه سالم و جهش یافته را تکثیر کرد. استفاده از این پرایمر یک توالی AGTACT که محل اثر گذاری برای آنزیم شکننده ScaI می باشد را در محصول PCR در هر دو نمونه سالم و جهش یافته ایجاد می کند.

شکل سمت راست، نحوه عملکرد آنزیم محدودگر ScaI را بر روی محصولات PCR با ژنوتیپ های هموزیگوت سالم(N)، هتروزیگوت(H) و هموزیگوت جهش یافته(M) نشان می دهد.

کاربرد PCR در شناسایی مارکرهای چند شکلی
(PCR permits rapid genotyping for polymorphic markers)

الف) شناسایی چند شکلی های محل های آنزیم های محدودگر (RSPs)

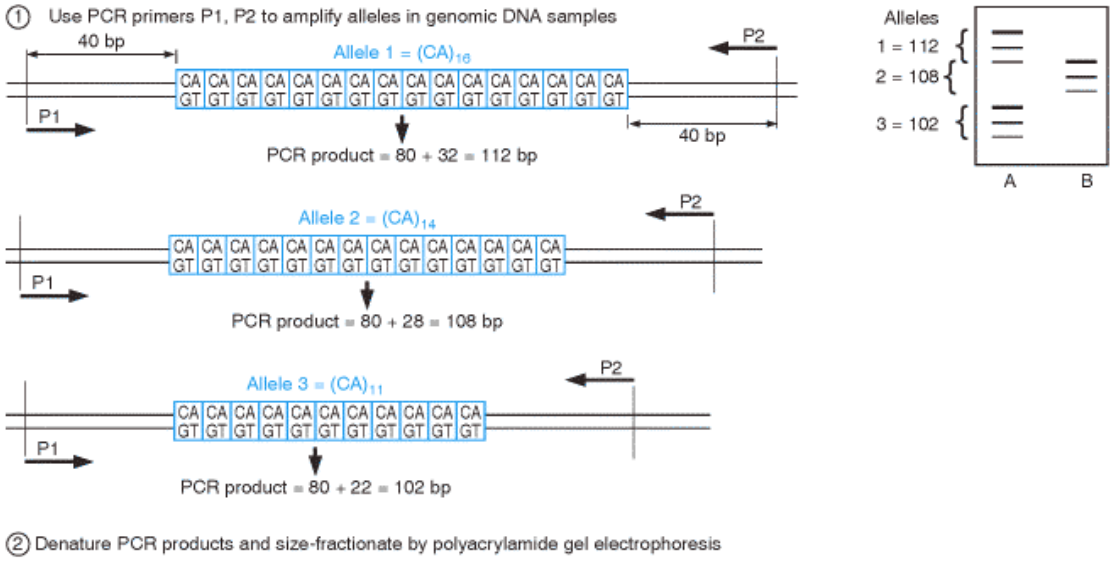
چند شکلی های نواحی آنزیم هـای محـدودگر (restriction site polymorphisms=RSPs) باعـث وجود یا فقدان نواحی مربوطه در توالی مولکول DNA می شود. این چند شـکلی هـا مـی توانـد توسـط روش RFLP و Southern blot hybridization شناسایی شـوند. بعنـوان یـک روش جـایگزین، مـی تـوان مستقیماً توسط PCR توالی های چند شکلی RSPs در ژنوتیپ فرد را شناسایی کرد. در این روش بـا طراحـی پرایمرهای اختصاصی در توالی های بالادستی محل های قطع کننده آنزیمی (polymorphic sites) قطعه مورد نظر تکثیر و سپس محصول PCR توسط آنزیم مناسب قطع کننده برش داده می شود. نهایتاً با استفاده از روش الکتروفورزیس و ژل آگاروز یا پلی آکریل آمید محل های چند شکلی شناسایی می شوند (شکل ۲–۵).

ب) شناسایی چند شکلی های کوتاه تکرار شونده (STRPs)

چند شکلی های کوتاه تکرار شونده (STRPs) یا مارکرهای ریز ماهواره ای (microsatellite marker) شامل توالی های کوچک از یک تا چهار نوکلئوتید تکرار شونده در اغلب آلل ها می باشند. برای مثال تکرارهـای CA/TG زمانیکه بیش از ۱۲ بار تکرار شود و نیز تکرارهای ۳ تایی و ۴ تایی امروزه بطور فزآینـده ای بعنـوان مارکرهای چند شکلی در ژنوم انسانی برای بررسی وجود صفات و یا بیماری ها مورد استفاده قرار می گیرند.

در این موارد روش PCR بعنوان یک روش متداول جهت شناسایی نقاط چند شکلی کوتاه تکرار شونده در ژنوم انسانی مورد استفاده قرار می گیرد. برای این منظور از پرایمرهای خاصی که در برگیرنده نقاط تکرار شونده چنـد شکلی باشد استفاده و پس از تکثیر قطعه DNA مورد نظر، افزایش تعداد این نقاط تکرار شوند که باعـث ازیـاد طول قطعه شده براحتی توسط روش الکتروفورزیس بر روی ژل آگاروز و یا پلی آکریـل آمیـد قابـل شناسـایی و اندازه گیری می باشند (شکل ۳– ۵).

شکل ۳ – ۵: کاربرد PCR در شناسایی چند شکلی های مارکرهای کوچک (STRPs)



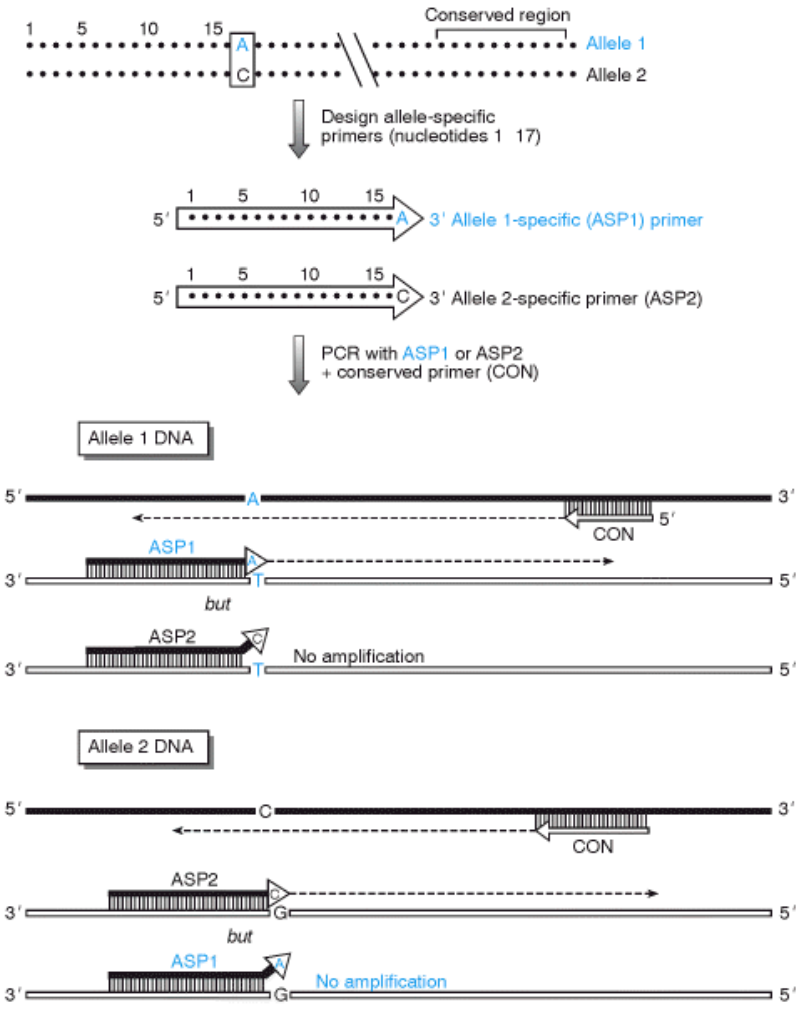
توضیحات:در این شکل شناسایی چند شکلی های نوکلئوتیدی دو تایی تکرار شونده (CA)/(TG) توسط PCR نشان داده شده است. در این شکل ۳ آلل که در تعداد تکرار (CA)/(TG) با یکدیگر متفاوت هستند مشاهده می شود. در شکل سمت راست هر آلل با یک باند اصلی در قسمت بالا و ۲ باند فرعی در قسمت پایین مشخص شده بطوریکه افراد A و B به ترتیـب دارای ژنوتیـپ های A(1,3); B(2,2) می باشند.

شناسایی آلل های اختصاصی با استفاده از روش ARMS

(Amplification Refractory Mutation System)

با استفاده از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی می توان تغییر یک نوکلئوتید را در یک زنجیره DNA شناسایی نمود. این روش یک نوع PCR برای بررسی یک آلل اختصاصی است که در آن پرایمرها برای نمونه سالم وجهش یافته بگونه ای طراحی می شوند که در آخرین نوکلئوتید (3' end) با هم متفاوت باشند.

از آنجاییکه انجام واکنش در مرحله سوم PCR (DNA synthesis) نیازمند و بسیار وابسته به جفت شدن صحیح آخرین نوکلئوتید (3' end) پرایمر و زنجیره مکمل DNA هدف می باشد، لذا چنانچه جهشی در مولکول DNA رخ دهد آنزیم Taq DNA polymerase قادر به سنتز زنجیره DNA نخواهد بود. چرا که آخرین نوکلئوتید پرایمر و DNA با هم جفت نمی شود (شکل ۴ – ۵). از این خاصیت برای شناسایی آلل های چند شکلی (polymorphic alleles) استفاده می شود، امروزه این روش بیشتر برای شناسایی جهش های اختصاصی بیماری زا بکار گرفته می شود.(شکل ۴ – ۵): کاربرد PCR در شناسایی آلل های اختصاصی



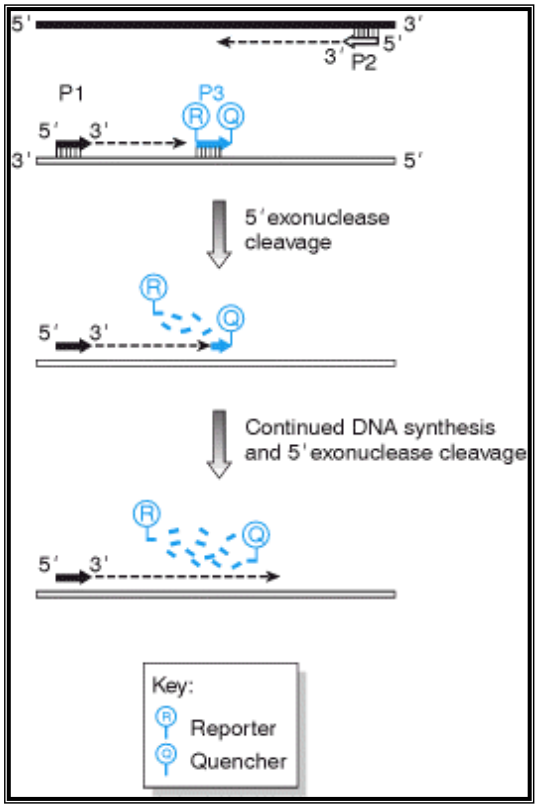
توضیحات: پرایمرهای اختصاصی آللیک ASP1 و ASP2 به گونه ای طراحی شده اند که مشابه توالی دو آلل در ناحیه قبل از محل نوکلئوتید متفاوت بوده و نوکلئوتید انتهایی پرایمرها دقیقا مشابه توکلئوتید متفاوت در دو آلل باشند. پرایمر ASP1 کاملا به توالی مکمل خود درآلل ۱ متصل و باعث تکثیر آن رشته از مولکول DNA شامل توالی خود پرایمر خواهد شد. لکن نوکلئوتید C در ناحیه انتهایی 3' پرایمر ASP2 با نوکلئوتید T در توالی آلل ۱ جفت نمی شود و لذا ادامه ساخت آلل مربوطه امکان پذیر نمی باشد. از طرف دیگر پرایمر ASP2 بطور کامل مکمل آلل ۲ بوده و لذا ساخت آلل ۲ بدرستی انجام می شود.

کاربرد Taq Man™ assay در شناسایی جهش های شناخته شده

اساس این روش بر مبنای فعالیت Taq DNA polymerase می باشد . این آنزیم عموماً فاقد فعالیت اگزونوکلئازی از جهت 5'→3' و کنترل و اصلاح گسترش زنجیره DNA در حال ساخت در مرحله سوم PCR می باشد. محققین از این خاصیت آنزیم استفاده کرده و روش Real time PCR را ابداع کردند.

در این روش که نوع خاصی از PCR می باشد از سه عدد پرایمر استفاده می شود. بطوریکه پرایمر سوم تا حدودی در قسمت پایین دستی پرایمرهای متعارف طراحی و برای یک آلل، اختصاصی می باشد. این پرایمر اضافی حامل یک گروه متوقف کننده (blocking group) یا (quencher group) در قسمت انتهایی (3' end) خود می باشد لکن این پرایمر در ساخت زنجیره DNA نقشی ندارد. همچنین در قسمت ابتدایی خود (5' end) حامل یک گروه fluorogenic group برچسب دار حاوی ماده فلورسانس می باشد (شکل ۵ – ۵). زمانیکه پرایمر بالادستی جلوبرنده ساخت زنجیره DNA را آغاز می کند، آنزیم پلی مراز طویل شدن زنجیره را تا مواجهه با پرایمر سوم ادامه داده و با توجه به فعالیت اگزونوکلنازی 5'→3' خود پرایمر سوم که به آلل اختصاصی متصل شده را تخریب کرده و باعث آزاد شدن نوکلئوتید فلورسانس و جدایی از گروه خاموش کننده (Quencher Group) می شود.

این آزاد سازی باعث تغییر و افزایش رنگ فلورسانس در محیط شده که توسط کامپیوتر ثبت می شود. در هر بار سنتز زنجیره این عمل اتفاق می افتد و دستگاه کامپیوتر و نرم افزار مربوطه آنرا ثبت می کند. چنانچه تعداد زیادی نمونه همزمان تکثیر PCR شود، نرم افزار مربوطه توان مقایسه نمونه ها را بصورت هموزیگوت سالم، هموزیگوت جهش یافته و هتروزیگوت جهش یافته دارا بوده و آنها را به اشکال مختلف از جمله بصورت نموداری و گرافیکی نمایش می دهد.(شکل ۵ – ۵): شمایی از روند انجام روش Taq Man™



توضیحات: در این روش علاوه بر دو عدد پرایمر متداول P2, P1 که برای قطعه DNA مورد نظر اختصاصی هستند از پرایمر سوم (P3) برای اتصال اختصاصی به قطعه مورد نظر در ناحیه پایین دستی P1 نیز استفاده می شود. به پرایمر P3 دو ماده رنگی فلورسانس با طول موجهای متفاوت به نامهای reporter dye (R) که به انتهای 5' و quencher dye (D) که به انتهای 3' می چسبد اضافه می کنند. از آنجاییکه انتهای 3' پرایمر P3 بسته شده لذا این پرایمر نمی تواند در سنتز زنجیره DNA نقشی ایفا کند. در طی فرآیند PCR ، آنزیم Taq DNA Polymerase سنتز زنجیره جدید را توسط پرایمر P1 آغاز می کند و زمانیکه در طی فرآیند PCR به پرایمر P3 میرسد بعلت داشتن فعالیت اگزونوکلنازی 5'→3' آنرا از انتهای 5' تخریب کرده و نهایتا مولکول یکپارچه پرایمر و مواد رنگی متصل شده نیز تخریب و نور فلورسانس reporter dye در محیط بیشتر آزاده شده که توسط دستگاه مربوطه دریافت و ثبت می شود.

شناسایی جهش های ناشناخته

تاکنون روش های آزمایشگاهی متعددی برای شناسایی جهش ها ابداع شده است. هر یک از این روش ها دارای مزایا و محدودیت هایی است که با توجه به شرایط و خصوصیات قطعه و جهش مورد نظر انتخاب و استفاده می شوند. در این قسمت سه روش مهم و متداول بکار گرفته شده در آزمایشگاههای تشخیصی ژنتیک مولکولی برای شناسایی طیف وسیعی از تغییرات مولکول DNA شرح داده می شوند.

روش بررسی ساختار چند شکلی های مولکول DNA تک رشته ای (SSCP) *(Single Strand Conformation Polymorphism assay)*

این روش بطور متداول در آزمایشگاههای تشخیصی ژنتیکی به لحاظ آسان و کم هزینه بودن آن مورد استفاده قرار می گیرد. در این روش ابتدا قطعه مورد نظر توسط روش PCR تکثیر شده و سپس محصول آن طی فرآیند خاصی بر روی ژل پلی آکریل آمید و روش الکتروفورزیس مورد بررسی قرار می گیرد. همانطور که از اسم این روش انتظار می رود، شناسایی تغییرات بر اساس شکل فضایی مولکول DNA تک رشته ای طبیعی و جهش یافته انجام می شود. چنانچه تغییری در یک یا دو رشته DNA رخ دهد شکل فضایی و ساختمان ثانویه مولکول DNA تغییر خواهد کرد که توسط روش الکتروفورزیس قابل شناسایی و مشاهده می باشد(شکل۸ – ۵). بعضی از شرایط فیزیکی (درجه حرارت محیط) و شیمیایی (غلظت گلیسرین و یا نسبت ماده پلی آکریل آمید به بیس در ژل) بر روی ساختمان ثانویه مولکول DNA، حرکت آن بر روی ژل و میزان شناسایی جهش تأثیر گذار است. لذا حساسیت این روش به فاکتورهای متعدد محیطی و شیمیایی بستگی زیادی داشته و برای توالی های مولکول DNA کمتر از ۳۰۰ نوکلئوتید بین ۷۰ تا ۸۰ درصد می باشد. بهترین اندازه زنجیره DNA برای بهره مندی بیشتر و حساسیت بالاتر از این روش حدود ۲۰۰ نوکلئوتید می باشد. چنانچه طول زنجیره DNA بیش از ۳۰۰ نوکلئوتید باشد حساسیت این روش به میزان قابل توجهی کاهش می یابد و لذا توصیه می شود از روش های آزمایشگاهی دیگری برای شناسایی جهش های ناشناخته استفاده شود.

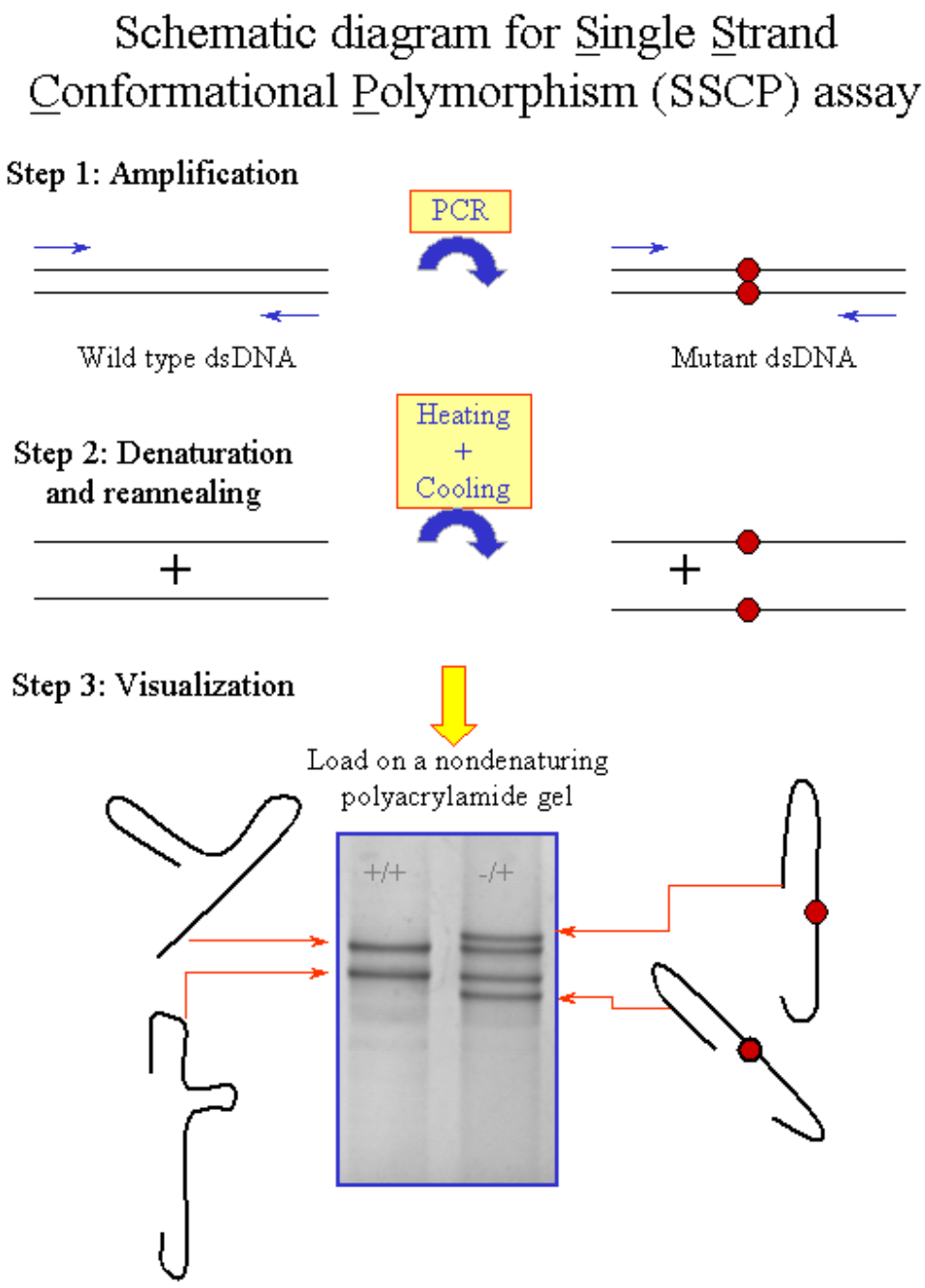
اصول روش SSCP

نمونه سالم و مشکوک (مورد آزمایش) توسط PCR و با استفاده از ژنوم سلولی تکثیر و در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد بمدت ۱۰ دقیقه حرارت داده می شود تا زنجیره های دو رشته ای مولکول DNA (محصول PCR) از یکدیگر باز شوند، سپس تیوب ها را سریعاً در ظرف محتوی پودر یخ قرار داده تا زنجیره های باز شده مجدداً به یکدیگر متصل شوند. در طی این فرآیند تعدادی از زنجیره های تک رشته ای مکمل و نه همه آنها مجدداً به یکدیگر متصل و مولکول DNA دو رشته ای با ساختمان فضایی جدید تشکیل می شود. لذا در لوله آزمایشگاهی (تیوب حاوی محصول PCR) مجموعه ای از مولکول های DNA تک رشته ای و دو رشته ای وجود خواهد داشت.

با استفاده از پروتکل خاص و استفاده از بافرهای مخصوص، محصول این فرآیند بر روی ژل پلی آکریل آمید با غلظت مشخص و استفاده از روش الکتروفورزیس مورد بررسی قرار می گیرد. زنجیره های تک و دو رشته ای DNA بر اساس ساختمان ثانویه فضایی خود با سرعت های مختلف بر روی ژل حرکت کرده و با مقایسه

نمونه های طبیعی و مورد آزمایش مـی تـوان نمونـه هـای جهـش یافتـه را شناسـایی کـرد. بطوریکـه بـر روی ژل پلی آکریل آمید، مولکول های DNA تک رشته ای در بالای ژل و مولکول های DNA دو رشـته ای در پایین ژل مشاهده خواهند شد(شکل ۶- ۵).

(شکل ۶ – ۵): شمایی از روند انجام روش SSCP



چنانچه مشخصات کامل جهش مورد سوال باشد، نمونه مورد نظر با استفاده از روش توالی یابی DNA مورد بررسی قرار می گیرد. چرا که روش SSCP فقط قادر به شناسایی وجود و یا فقدان تغییرات در قطعه مورد آزمایش می باشد و نمی تواند خصوصیت و نوع جهش را مشخص نماید.
بطور خلاصه می توان گفت روش SSCP براساس افتراق و میزان حرکت مولکول های تک رشته ای DNA طبیعی و جهش یافته بر روی ژل پلی آکریل آمید است.
مولکول های DNA تک رشته ای با توالی اختصاصی، وضعیت و شکل سه بعدی خاصی خواهند داشت. تغییر حتی یک باز (نوکلئوتید) در طول زنجیره DNA اثرات زیادی در ساختمان و شکل فضایی سه بعدی مولکول مربوطه داشته، و سرعت حرکت مولکول بر روی ژل پلی آکریل آمید را تغییر داده و باعث افتراق آن از نمونه های دیگر می شود.

روش شناسایی پروتیین های ناقص (PTT)

(Protein Truncation Test)

تغییرات در ژن ها ممکن است در قطعات کوچک و یا بزرگ کد کننده (اگزون) رخ دهد . برای شناسایی این جهش ها ، بسته به نوع جهش و اندازه اگزون روش آزمایشگاهی مناسب انتخاب می شود.
جهش هایی که منجر به تولید کدون متوقف کننده (UAA , UGA , UAG) ساخت زنجیره پلی پپتیدی بشوند باعث ساخت پروتیین های ناقص و ایجاد بیماری می شوند. برای شناسایی این نوع جهش ها از روش آزمایشگاهی بنام تست شناسایی پروتیین ناقص (Protein Truncation Test- PTT) استفاده می شود . این روش قادر به شناسایی انواع جهش ها از جمله نوع Nonsense , Frameshift , Splice Site که همه آنها نهایتا" باعث تولید پروتیین ناقص شده می باشد. لکن با این روش نمی توان جهش های نوع Missense را تشخیص داد.

اصول روش PTT

PTT یک روش آزمایشگاهی جهت ساخت و بررسی زنجیره پلی پپتیدی است که در سه مرحله و بشرح زیر انجام می شود.
الف) ساخت و تکثیر DNA ژنومیک توسط PCR و یا mRNA و استفاده از روش RT-PCR
ب) ساخت زنجیره پلی پپتیدی با استفاده از کیت آزمایشگاهی اختصاصی
ج) بررسی و شناسایی زنجیره پلی پپتیدی ساخته شده با استفاده از روش الکتروفورزیس نوع SDS-PAGE

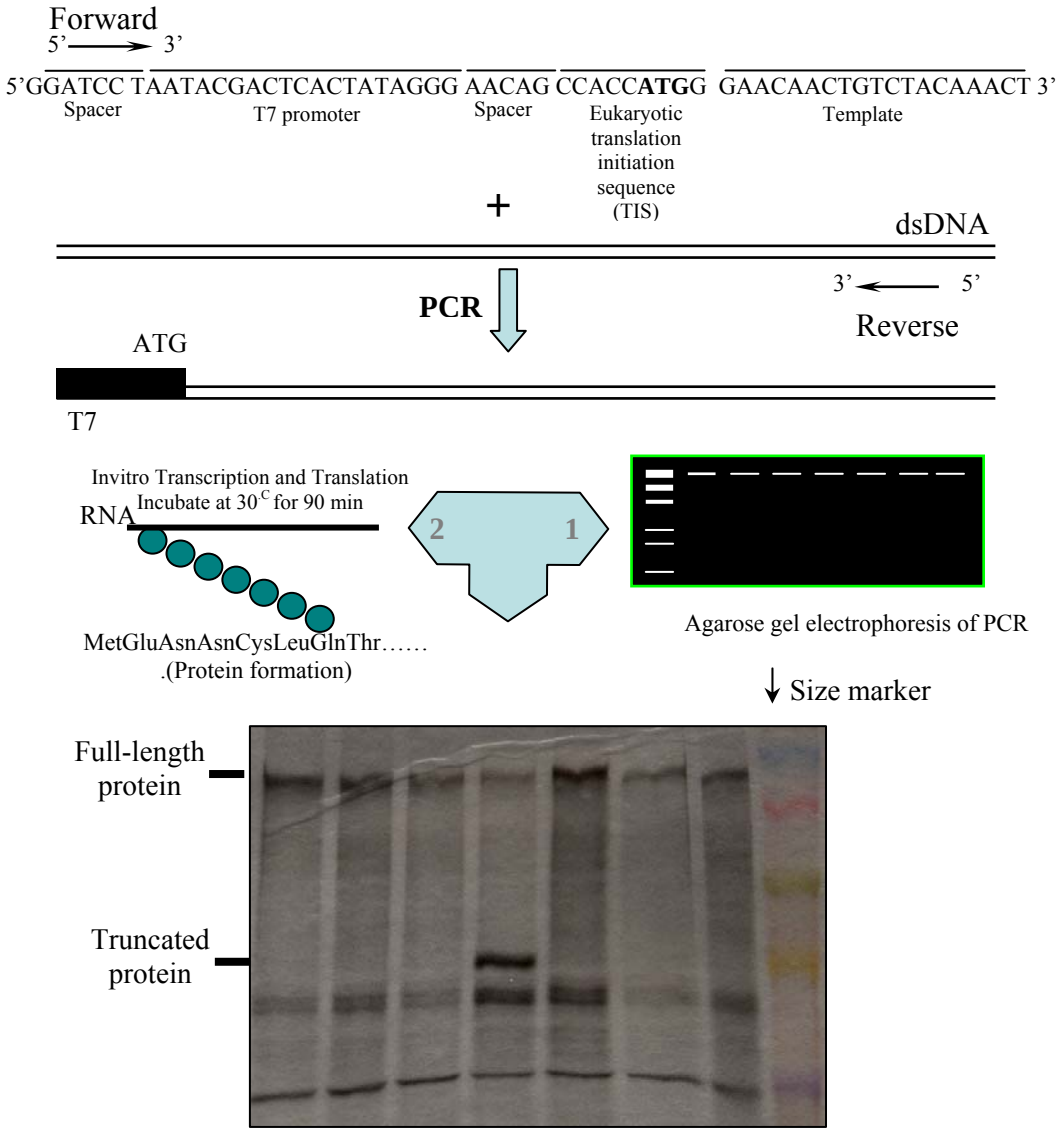
مراحل فوق الذکر در شکل (۷ –۵) نشان داده شده است.
برای انجام مرحله دوم و سوم این روش ابتدا می بایست از انجام موفقیت آمیز مرحله اول با بررسی محصول PCR توسط الکترو فورزیس و با استفاده از ژل آگاروز مطمئن شد. آنگاه در صورت وجود محصول PCR قابل قبول، با استفاده از کیت تجارتی مربوطه پروتیین مربوطه تولید می شود. جهش هایی که منجر به کدون های متوقف کننده بشوند از ساخت زنجیره کامل پروتیین جلوگیری کرده که با انجام مرحله سوم زنجیره پلی پپتیدی ساخته شده ناقص توسط ژل الکتروفورزیس (ژل پلی آکریل آمید دو دسیل سولفات SDS PAGE)

شناسایی می شود. در صورت نیاز به اطلاع از ماهیت و مشخصات جهش، نمونه PCR توسط روش توالی یابی DNA مورد بررسی قرار می گیرد.

نکته: همانطور که در شکل زیر مشاهده می شود پرایمر جلو برنده شامل قسمتهای خاص از جمله پروموتور فاژ T7 و کدون ATG می باشد که در فرآیند ترجمه مولکول DNA (محصول PCR) به زنجیره پلی پپتیدی نقش بسزایی دارند.

میزان حساسیت (Sensitivity) این تست حدود ۹۵ ٪ و میزان اختصاصی بودن آن (Specificity) ۱۰۰٪ می باشد. این روش قادر به بررسی قطعات بزرگ اگزون ها تا اندازه ۵۰۰۰ نوکلئوتید طی انجام یک آزمایش (واکنش) می باشد.

شکل (۷ –۵): شمای یک طرح کلی از روند آزمایش شناسایی پروتیین های ناقص



Analyzed on SDS-PAGE 6% and visualized by autoradiography of the ^{35}S-labeled proteins

جدول شماره ۱: کاربرد روش PTT در شناسایی جهش های بیماریزا در بیماری های خاص

Disease	% Truncating Mutations**	Gene
Familial Adenomatous Polyposis	95%	APC
Hereditary desmoid disease	100%	APC
Ataxia telangiectasia	90%	ATM
Hereditary breast and ovarian cancer	90%	BRCA1
	90%	BRCA2
Cystic Fibrosis	15%	CFTR
Duchenne Muscular Dystrophy	95%	DMD
Fanconi anaemia	80%	FAA
Hunter Syndrome	~50%	IDS
Hereditary non-polyposis colorectal cancer	~80%	hMSH2
	~70%	hMLH1
Neurofibromatosis type 1	50%	NF1
Neurofibromatosis type 2	65%	NF2
Polycystic Kidney Disease	95%	PKD1

***The percentage of truncating mutations reported which should be detectable using PTT.*

روش توالی یابی DNA

(Dideoxy DNA sequencing, Chain Termination, Sanger method)

روش توالی یابی DNA حساس ترین و بهترین روش برای بررسی و شناخت زنجیره و توالی مولکـول DNA می باشد. تا قبل از آغاز هزاره سوم میلادی، این روش با استفاده از ژل پلی آکریل آمیـد و روش الکتروفـورزیس انجام می شد. لکن امروزه با پیشرفت های بدست آمده به خصوص به جهت نیاز اجرای پروژه ژنوم انسانی، ایـن روش از نظر تکنولوژی ارتقـاء یافتـه و بـه صـورت اسـتفاده مـستقیم محـصول PCR و بـدون بکـارگیری ژل الکتروفورزیس انجام می شود.

دستگاه اتوماتیک پیشرفته حاوی فیبرهای نوری، اشعه لیزر و نـرم افـزار بـسیار پیـشرفته بـوده و تحـت عنـوان Capillary DNA Sequencing machine به بازار توسط شرکت های معتبر آمریکایی و اروپایی ارائه می شود. با استفاده از این دستگاه می توان بطور همزمان ۳۸۴ عدد نمونه را در زمانی کمتر از چند ساعت بطـور دقیق و صحیح مورد بررسی و توالی یابی قرار داد. (شکل ۸ – ۵)

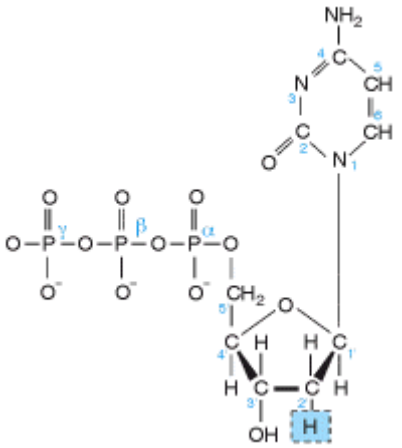
شکل ۸ – ۵: دستگاه Capillary DNA Sequencing

در این مبحث به روش توالی یابی DNA با استفاده از روش الکتروفورزیس می پردازیم.

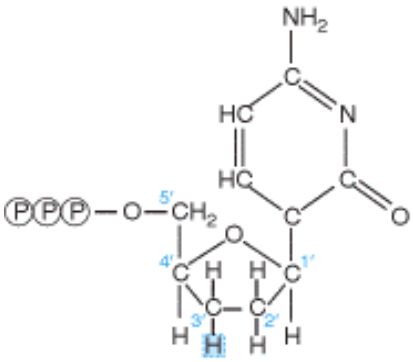
توالی یابی DNA یک روش آزمایشگاهی برای ساخت زنجیره DNA به طریق آنزیماتیک است که در حضور بازهای آلی اختصاصی چهارگانه (ddNTP) ختم کننده ساخت زنجیره DNA انجام می شـود. در ایـن روش براساس استفاده از روش PCR، بازهای آلی ddNTP و یک عـدد پرایمـر، زنجیـره تـک رشـته ای DNA ساخته می شود. اگر چه می توان مستقیما" از ژنوم کامل سلول جهت توالی یابی قطعه مورد نظر اسـتفاده نمـود، لکن استفاده از محصول PCR بعنوان ماده مورد نظر باعث افزایش کیفیت نتایج خواهد شد.

قابـل ذکـر اینکـه سـاخت زنجیـره تـک رشـته ای در ایـن مـورد بـصورت خطـی(linear) و نـه هندسـی (exponential) خواهد بود.

اساس توالی یابی DNA بر استفاده از بازهای آلی اختصاصی ddNTP استوار است. این بـاز هـا فاقـد گـروه هیدروکسیل (OH) در کربن شماره ۳ علاوه بر کربن شماره ۲ قند ریبوز نوکلئوتید می باشند (شکلA ۱۱-۵).
برای انجام PCR در روش توالی یابی DNA از کیت اختصاصی و تجارتی (شامل آنـزیم Taq , ddNTP DNA polymerase نشاندار رنگی چهارگانه، dNTP معمولی و بافر)، یک عدد پرایمر و نمونه ژنوم سلول استفاده می شود. مشارکت بازهای آلی اختصاصی ddNTP و dNTP معمولی در ساخت زنجیره تـک رشـته ای DNA بصورت تصادفی می باشـد. چـون بـاز هـای آلـی اختـصاصی ddNTP بـه لحـاظ فقـدان گـروه هیدروکسیل (OH) در کربن شماره ۳ خود قادر به ایجاد و اتـصال باننـد فـسفو دی اسـتر بـه نوکلئوتیـد بعـدی شرکت کننده در روند ساخت زنجیره نمی باشند لذا در محل مشارکت این نوع بازها (ddNTP) ساخت زنجیره متوقف می شود (شکلA, B ۹ - ۵).



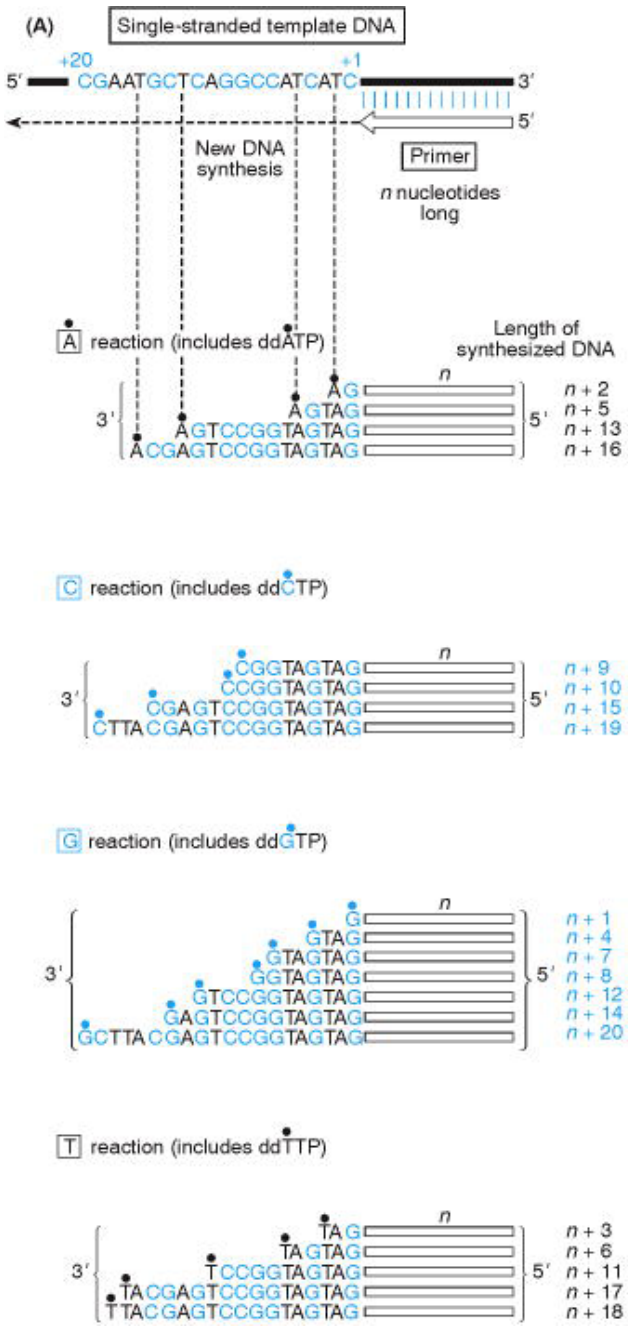
شـکل B ۹-۵: سـاختمان یـک مولکول دکسی نوکلئوتید (2' دکسی سیتیدین 5' تری فسفات =dCTP)



شـکل A ۹-۵: سـاختمان یـک مولکول دی دکسی نوکلئوتید (2',3' دی دکسی سیتیدین 5' تری فسفات

طول زنجیره ساخته شده می تواند شامل طیف متغیری از یک نوکلئوتید و یا طول کامل زنجیره مورد نظر باشـد. لذا در هر سیکل PCR توالی های DNA به اندازه های متفاوت سـاخته مـی شـود. نهایتـاً محـصول PCR شامل مجموعه ای از زنجیره های DNA است که دارای انتهای 5' مشترک و انتهـای 3' متفـاوت مـی باشـد (شکل ۱۰ - ۵).

شکل ۱۰ – ۵: اصول توالی یابی DNA به روش دی دکسی



توضیحات: توالی یابی DNA به روش دی دکسی بر اساس ساخت زنجیره DNA تک رشته ای جدید و مشارکت تصادفی باز های آلی اختصاصی ddNTP استوار است.

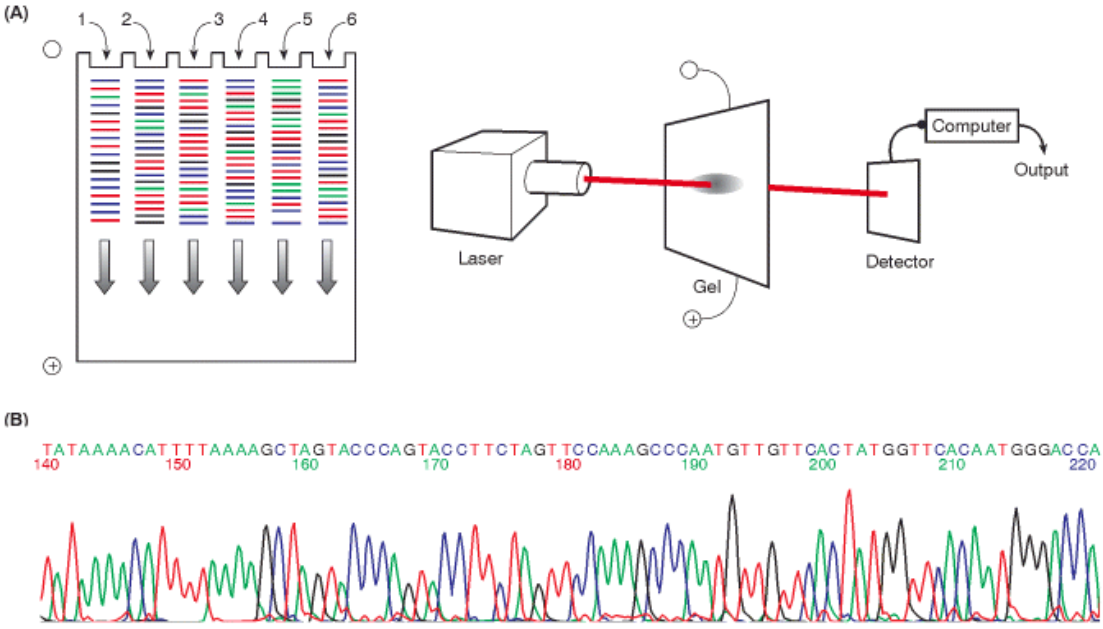
پرایمر ها بطور اختصاصی به ناحیه $3'$ مولکول DNA مورد نظر متصل شده و ساخت زنجیره مکمل DNA را در جهت نشانداده شده در شکل فوق آغاز می کند. چهار واکنش با استفاده از چهار نوع dNTPs و یک

ddNTP بطور همزمان انجام می شود. رقابت بین نوکلئوتید های ddNTP و dNTPs در تشکیل زنجیره جدید DNA باعث ایجاد مجموعه ای از زنجیره ها با طول های متفاوت می شود. زنجیره های ساخته شده دارای انتهای $5''$ همسان (که با توالی پرایمر ها مشخص می شود) و انتهای $3''$ متغیر می باشند که بستگی به محل قرارگیری ddNTP در زنجیره دارد (در شکل فوق بصورت دایره های توپر نمایش داده شده است).

سپس محصول PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید و با استفاده از روش الکتروفورزیس مورد بررسی و توالی یابی قرار می گیرد. قطعات کوچکتر، سریعتر و از انتهای ژل خارج شده بطوریکه مولکول DNA به اندازه یک نوکلئوتید که نشاندهنده اولین نوکلئوتید انتهای '5 زنجیره می باشد در ابتدا و بدنبال آن توالی های بزرگتر از انتهای ژل خارج می شود. در محل خروج زنجیره یک حس گر لیزری قرار گرفته که عبور نوکلئوتیدهای نشاندار را شناسایی و علامت مربوطه را به دستگاه تحلیل گر (کامپیوتر) ارسال می کند (شکل A ۱۱ – ۵).

کامپیوتر با استفاده از نرم افزار پیشرفته علائم دریافتی را تجزیه و تحلیل کرده و نهایتاً توالی زنجیره DNA بصورت منحنی هایی بشکل زیر به نمایش در می آید (شکلB ۱۱ – ۵).

شکلA, B ۱۱ – ۵ : شمایی از روند سیستم خودکار توالی یابی DNA



کاربرد PCR در ایجاد جهش اختصاصی در ژنوم سلول

(In vitro site-specific mutagenesis)

ایجاد جهش اساساً یک فن آوری کاربردی و مهم در علم ژنتیک مولکولی است. در این روش توالی بازهای آلی زنجیره DNA در آزمایشگاه و بصورت مصنوعی تغییر داده می شود و سپس تغییر در زنجیره پلی پپتیدی و عملکرد آن را در سلول بررسی می کنند. جهش زایی می تواند بصورت *In vivo* (در مدل های حیوانی و یا در سلول زنده کشت داده شده) ، *In vitro* (در آزمایشگاه) و یا در یک محل از پیش تعیین شده (site-directed mutagenesis) انجام شود.

الف) جهش زایی در سلول (In vivo mutagenesis)

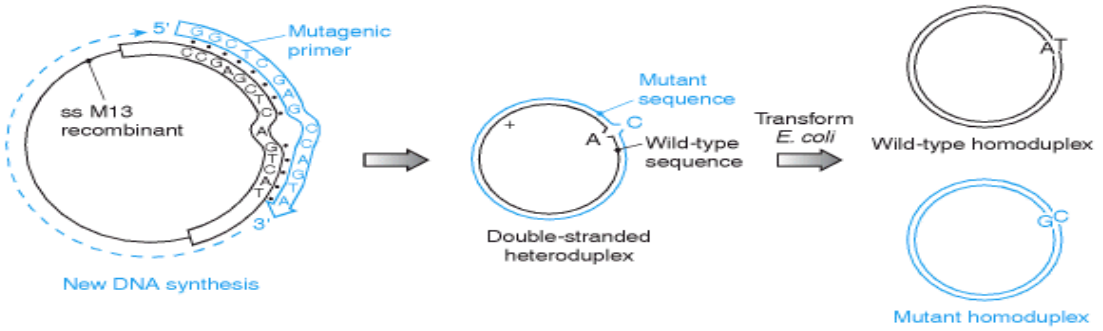
در این روش می توان تغییرات ژنتیکی در سلولهای موش نر را از طریق در معرض قرار دادن آن با مقادیر زیاد یک ماده جهش زا مانند ethyl nitrosurea (ENU) ایجاد و اثرات ارگانیک و بافتی آنرا مانند ایجاد سرطان و یا تغییر عملکرد یک عضو مانند بیضه ها را بررسی کرد.

ب) جهش زایی آزمایشگاهی (In vitro mutagenesis)

اساسا این روش یک رویکرد جهش زایی تصادفی است که می تواند بشکل یک کتابخانه جهش های جدید را در خود نگهداری کند. در بسیاری از موارد که عملکرد یک ژن و یا یک اسید آمینه خاص در یک زنجیره پلی پپتیدی مورد نظر می باشد و نیز برای آگاهی از اثرات بیولوژیک یک جهش نوع missense و نحوه بیماریزایی آن در یک ژن بیماریزای شناخته شده استفاده از این روش بسیار کمک کننده است.

در یک رویکرد کلی یک ژن یا بخشی از cDNA ژنوم سلول را به داخل ویروس M13 یا وکتور فاژمید (Phagemid Vector) وارد کرده و سپس اثرات مولکول DNA نوترکیب تک رشته ای که بخشی از ژنوم ویروس می باشد را مورد بررسی قرار می دهند. در این روش از یک پرایمر اختصاصی که مکمل توالی DNA در ژن مورد نظر بوده لکن یک نوکلئوتید آن در محلی که می خواهیم جهش ایجاد شود متفاوت می باشد، استفاده می گردد. با استفاده از پرایمر جهش دار ساخت زنجیره جدید DNA بطور کامل و حاوی محل جهش یافته انجام می شود. این زنجیره دو رشته ای DNA جدید هم اکنون دو رشته ای است و می تواند برای تغییر شکل دادن ژنوم سلول های یوکاریوتیک و نیز شناسایی جهش بوسیله روش های آزمایشگاهی تشخیصی مولکولی مورد استفاده قرار گیرد. این رویکرد یک روش مهم برای آگاهی از عملکرد یک آمنیو اسید یا پلی پپتید جدید در داخل سلول زنده می باشد (شکل ۱۲– ۵).

شکل ۱۲– ۵: جهش زایی با استفاده از پرایمر نا جور (mismatch) برای تکثیر غیر سلولی زنجیره DNA دو رشته ای جهش دار



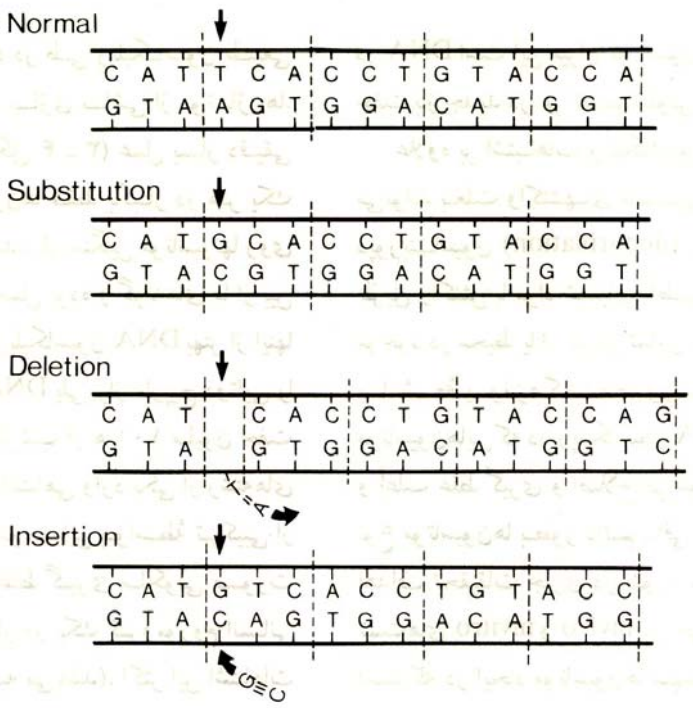
فصل ششم

تغییرات ژنتیکی ، مکانیسم آثار بالینی آنها و ژنتیک سرطان

موتاسیون در مولکولهای DNA

هر نوع تغییری که در نوکلئوتیدهای DNA بوجود آید بنام موتاسیون (Mutation) نامیده می شود . این تغییرات ممکن است بنوعی باشند که باعث اختلالاتی در فنوتیپ موجود زنده گردند ، در حالیکه تعدادی از این تغییرات می تواند باعث اختلالات کم یا زیاد در فنوتیپ و حتی موجب مرگ سلولها و موجود زنده گردند ، انواعی دیگر از آنها اصولا در فنوتیپ موثر نیستند (ساکن) . از طرف دیگر در مراحل همانند سازی DNA تعدادی از این تغییرات ممکنست ایجاد شوند که با مکانیسم خاصی که بنام تعمیر DNA نامیده می شود اصلاح شود . به تجربه ثابت شده است که عواملی مانند گرما ، تابش انواع اشعه ها ، مواد شیمیائی ، داروها می تواند در تغییرات در ساختمان DNA موثر باشد . تغییرات ساختمانی می تواند در مناطق بین ژنها و یا در داخل ژن اتفاق افتد .

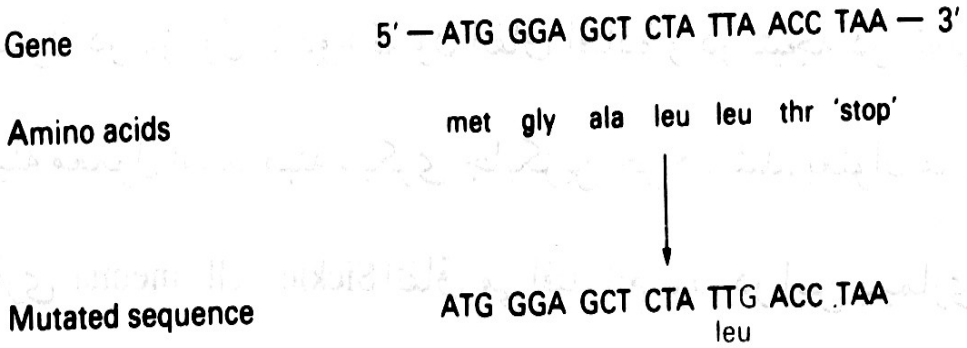
۱ – جابجائی یک باز (Point Mutation) – در این نوع موتاسیون یک باز حذف و جای خود را به باز جدیدی می دهد ، اگر هر دو باز از یک جنس شیمیائی باشند یعنی هر دو از نوع بازهای پورین (G,A) یا هر دو از نوع بازهای پیریمیدین (T,C) باشند به این نوع جابجائی Transition و یا انتقالی گویند . نوع دیگر جابجائی عبارتست از جایگزینی یک باز پورین به جای باز پیریمیدین و یا بالعکس مانند جایگزینی باز سیتوزین (C) و یا تیمین (T) به جای باز گوانین (G) و یا بالعکس . این نوع جابجائی بنام Transversion نامیده می شود .



مثالهایی از موتاسیون

موتاسیون در کدونهای اسید آمینه (Silent Mutation)

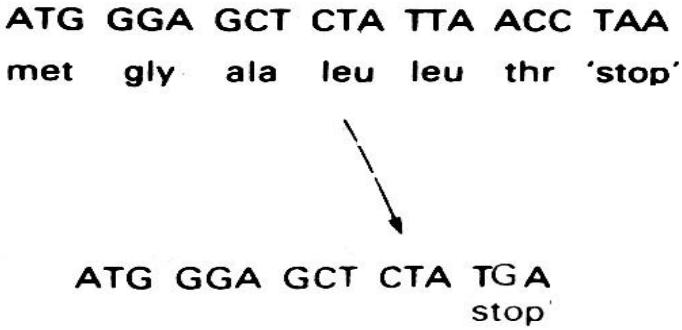
می دانیم که هر اسید آمینه معمولا بیش از یک کدون دارد (غیر از اسید آمینه تریپتوفان و متیونین که هر کدام یک کدون دارند) و از طرف دیگر کلیه کدونها یک اسید آمینه در دو باز اول مشترک هستند مثلا کدونهای اسید آمینه لوسین عبارتند از CTA,TTA,TTG,CTT,CTC,CTG . حال اگر در روی ژن مربوطه موتاسیون از نوع جابجائی یک باز با باز دیگر اتفاق افتد و این موتاسیون در محل باز سوم این کدونها حادث گردد ، مثلا TTA به TTG تبدیل شود کدون اخیر نیز همان کدون اسید آمینه لوسین است . بنابراین این نوع موتاسیون در فنوتیپ موجود زنده تاثیری نخواهد گذاشت .



موتاسیون ساکن

Nonsense Mutation

سه کدون UAG,UAA,UGA کدونهای پایانی هستند و وجود آنها نشانه پایان ترجمه تولید پروتئین است ، حال اگر بعلت موتاسیون یک کدون اسد آمینه تبدیل به کدون پایانی گردد ، ترجمه درآن ناحیه پایان خواهد گرفت و در نتیجه زنجیره پلی پپتید از آن ناحیه به بعد دیگر ساخته نخواهد شد . بعنوان مثال چنانچه کدون UAA (لوسین) به جای باز (U) باز (G) قرار گیرد ، این کدون تبدیل به UGA که یک کدون پایانی است تبدیل خواهد شد . نتیجه آن اینست که زنجیره پلی پپتید در ان ناحیه تمام خواهد شد . در حقیقت زنجیره مزبور کوتاه تر از معمول شده و قبل از رسیدن به کدون پایانی به اتمام خواهد رسید .



موتاسیون Nonsense

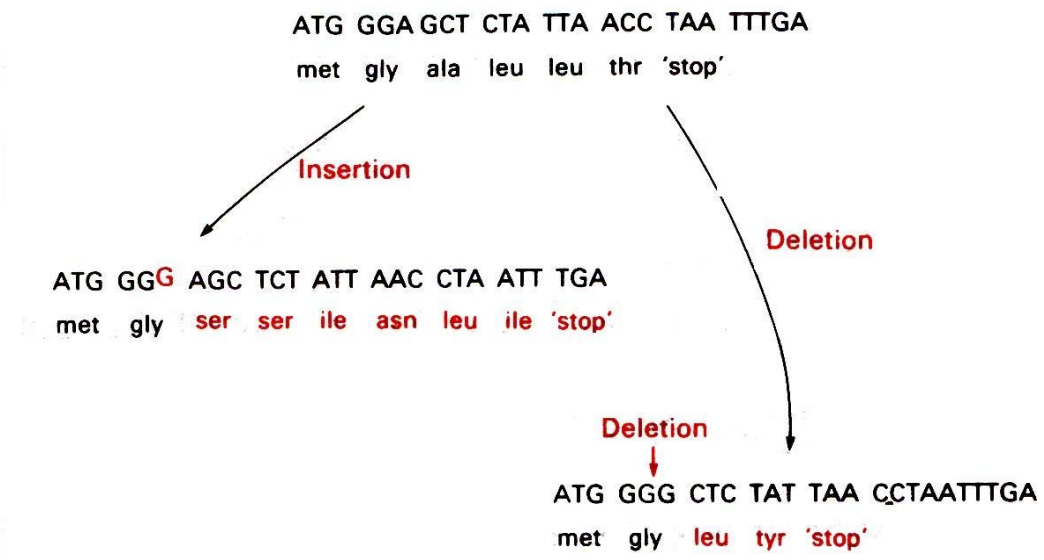
Missense Mutation

این نوع موتاسیون باعث می شود که کدون اسید آمینه به کدون اسید آمینه دیگری تبدیل شود . در اثر تغییر یک نوکلئوتید به نوکلئوتید دیگر که منجر به تغییر اسم اسید آمینه شود . معمولا این نوع موتاسیون در باز اول یا دوم کدون اتفاق افتاده و در نتیجه در زنجیره پلی پپتید حاصله به جای اسید آمینه معمول اسید آمینه دیگری جایگزین خواهد شد . بعنوان مثال می توان از موتاسیون در بیماری داسی شکل کم خونی نام برد . در این بیماری اسید آمینه گلوتامیک اسید GAG به کدون اسید آمینه والین GTG در ردیف ششم زنجیره گلوبین گلوتامیک اسید ، اسید آمینه والین قرار می گیرد .

Frameshif Mutation

نوع خاصی از حذف یا اضافه شدن باز در یک کدون ، باین ترتیب که در داخل یک کدون یک باز از آن حذف می گردد و یا بلعکس یک باز جدید به آن کدون اضافه می شود ، با توجه به اینکه هر کدون از سه نوکلئوتید (سه باز آلی) تشکیل می شود ، بنابراین این نوع تغییر ، سبب می شود که در ساختمان نوکلئوتیدهائی که بعد از این کدون قرار دارد ، یک باز جابجا گردد . بنابراین اختلال فنوتیپی بسیار زیادی ایجاد خواهد شد .

اگر موتاسیون در مناطقی اتفاق افتد که آن مناطق کنترل ژن را بعهده دارند ، چنین جهشها ئی می تواند باعث از بین رفتن کنترل ژن گردد . موتاسیون در مناطقی که نسخه برداری ژن شروع می شود ، می تواند باعث تاخیر یا از بین رفتن نسخه برداری گردد . موتاسیون در نقاط مختلف اکسون ژن باعث تغییرات فنوتیپی می شود و چنانچه موتاسیون در مرز بین اکسون واینترون اتفاق افتد می تواند در فرآیند Splicing و تشکیل mRNA موثر باشد . زیرا که اینترون از طرف ´۵ با نوکلئوتیدهای GT شروع می شود و این ناحیه بنام Donnor نامیده می شود در حالیکه انتهای دیگر اینترون ´۳ به دی نکلئوتید AG ختم می شود و بنام Acceptor نامیده می شود و این دو ناحیه در Splicing که در مرحله نسخه برداری اتفاق می افتد بسیار موثر است .



موتاسیون Frame shift

اصلاح موتاسیون

بعضی موتاسیونها بعلت ایجاد موتاسیون دوم اصلاح می شوند ، برای مثال اگر بعلت Point Mutation کدون اسید آمینه لوسین در روی DNA که TTA می باشد به TTT تغییر می یابد , یعنی بجای باز آدنین باز دیگری (تیمین T) قرار گیرد . می دانیم که TTT (فنیل آلانین) است بنابراین در این نقطه از زنجیره پلی پپتیدی باید بجای اسید آمینه لوسین اسید آمینه فنیل آلانین قرار گیرد ، حال اگر یک موتاسیون دوم اتفاق افتد ، به این معنی که TTT به CTT تغییر یابد ، با توجه به اینکه این کدون اخیر باز هم کدون اسید آمینه لوسین می باشد ، بنابر این با موتاسیون دوم موتاسیون اصلاح شده است . انواع دیگر موتاسیون دوم ، از جمله موتاسیون در آنتی کدونهای tRNA و غیره . اگر موتاسیون ترمیم نشود ، میزان مرگ و میر و یا اختلالات شدید فنوتیپی به حد باور نکردنی بالا خواهد بود . خوشبختانه مکانیسم هائی در سلول موجودات زنده وجود دارد که با کمک آنزیم های خاصی سلولها می توانند بسیاری از موتاسیونها را اصلاح نمایند و به این ترتیب از ایجاد اختلالات فنوتیپی جلوگیری نمایند . در بعضی بیماریها مکانیسم تعمیر DNA در سلول دچار اختلال شده و بنابراین سبب اختلالات شدید بالینی می شود . برای مثال بیماری گزرودرمای رنگی (XP) . این بیماران شدیدا به نور خورشید حساس هستند . در نتیجه DNA پوست این افراد دچار شکستگی شده ، از طرف دیگر آنزیم های خاصی در انسان (لیگاز) وجود دارد که باعث ترمیم DNA در پوست این افراد خواهد شد.

اصلاح DNA

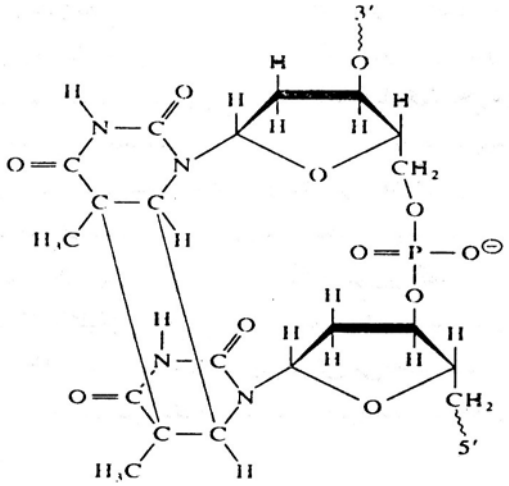
عمل همانند سازی به وسیله DNA پلی مراز III از دقت بالائی برخوردار است ، ولی به هر حال این کار با اشتباهاتی نیز همراه است . اعمال اگزونوکلئازی که برای DNA پلی مرازها گفته شد ، در واقع برای جلوگیری از همین اشتباهات و یا حداقل کاهش آنها انجام می گیرد . برطرف کردن اشتباهات در همانند سازی DNA را اصلاح DNA (Proofreading) می گویند . DNA پلی مراز III در هنگام همانند سازی به میزان $^{-۴}$ ۱۰(یک نولکئوتید از هر ۱۰۰۰۰ نوکلئوتید) دچار اشتباه می شود . این عدد ممکن است کوچک به نظر آید ، ولی اگر طول DNA در Ecoli در حدودbp $۱۰^{۶} \times 5$ باشد ، در هر بار همانند سازی در حدود ۵۰۰ تغییر در ژنوم Ecoli بوجود می آید که این مقدار بسیار زیادی است ، ولی عمل اصلاح DNA این مقدار را کاهش می دهد . در بین اجزاء مختلف آنزیم DNA پلی مراز III وظیفه اصلی اصلاح DNA به عهده زیر واحد ε می باشد . این زیر واحد خاصیت اگزونوکلئازی در جهت $3' \rightarrow 5'$ دارد و می تواند آخرین نوکلئوتید اضافه شده به زنجیره در حال ساخت DNA را از ان جدا نماید . هر گاه یک نوکلئوتید اشتباه به انتهای زنجیره در حال ساخت اضافه شود ، چون باز اشتباه نمی تواند به خوبی با باز مقابل خود جفت شود ، در نتیجه قطر مارپیچ در محل باز اشتباه بیشتر شده و این علامتی برای زیر واحد ε است تا نوکلئوتید اشتباه را خارج کند . پس از خارج شدن نوکلئوتید اشتباه ، بار دیگر DNA پلی مراز III یک نوکلئوتید صحیح به جای آن قرار می دهد و همانند سازی ادامه می یابد . عمل اصلاح DNA نیز گاهی دچار اشتباه می شود . میزان این اشتباه ^{۳}۱۰تعیین شده است و چون عمل همانند سازی نیز به میزان ^{۴}۱۰ دچار اشتباه می شود برآیند این دو اشتباه برابر با $۱۰^{۷} = ۱۰^{۳} \times ۱۰^{۴}$ خواهد بود و چون ژنوم Ecoli برابر با bp ۵×۱۰^{۶} است پس در هر بار همانند سازی تقریبا فقط یک نوکلئوتید از ژنوم EColi تغییر می کند که این خود نشان دهنده دقت بسیار بالای همانند سازی می باشد .

همچنین عمل دیگری که باید در حین همانند سازی انجام گیرد ، اتصال قطعات اوکازاکی در رشته پیرو (Lagging) می باشد . پس از اینکه چند قطعه اوکازاکی در طول رشته پیرو (Lagging) ساخته شد . قطعات RNA اولیه موجود درابتدای هر یک از قطعات اوکازاکی یا بوسیله آنزیم RNAase H برش داده و خارج می شوند و یا اینکه این قطعات بوسیله اگزونوکلئازی آنزیم DNA پلی مرازI خارج می شوند . سپس آنزیم DNA پلی مرازI فواصل خالی ایجاد شده را پر می کند . آنزیم DNA پلی مراز I فقط می تواند پیوند به صورت $5' \rightarrow 3'$ بین dNTP و رشته در حال ساخت ایجاد نماید و وقتی فاصله پر می شود آخرین نوکلئوتید به صورت $3'$- OH آزاد باقی می ماند و از طرف دیگر نیز یک گروه فسفات ۵ وجود دارد و DNA پلی مراز I نمی تواند این دو گروه را به هم پیوند بزند . این عمل نیاز به آنزیم دیگری دارد که لیگاز (Ligase ، پیوند دهنده) نامیده می شود .

لیگاز خاصیت پلی مرازی ندارد و فقط بین $3'$- OH و فسفات ۵ آزاد پیوند برقرار می نماید و انرژی مورد نیاز برای عمل خود را نیز از ATP به دست می آورد . این آنزیم با وزن مولکولی d ۷۷۰۰۰ به NAD بعنوان کوآنزیم نیاز دارد.

تعمیر دیمر تیمین – تیمین

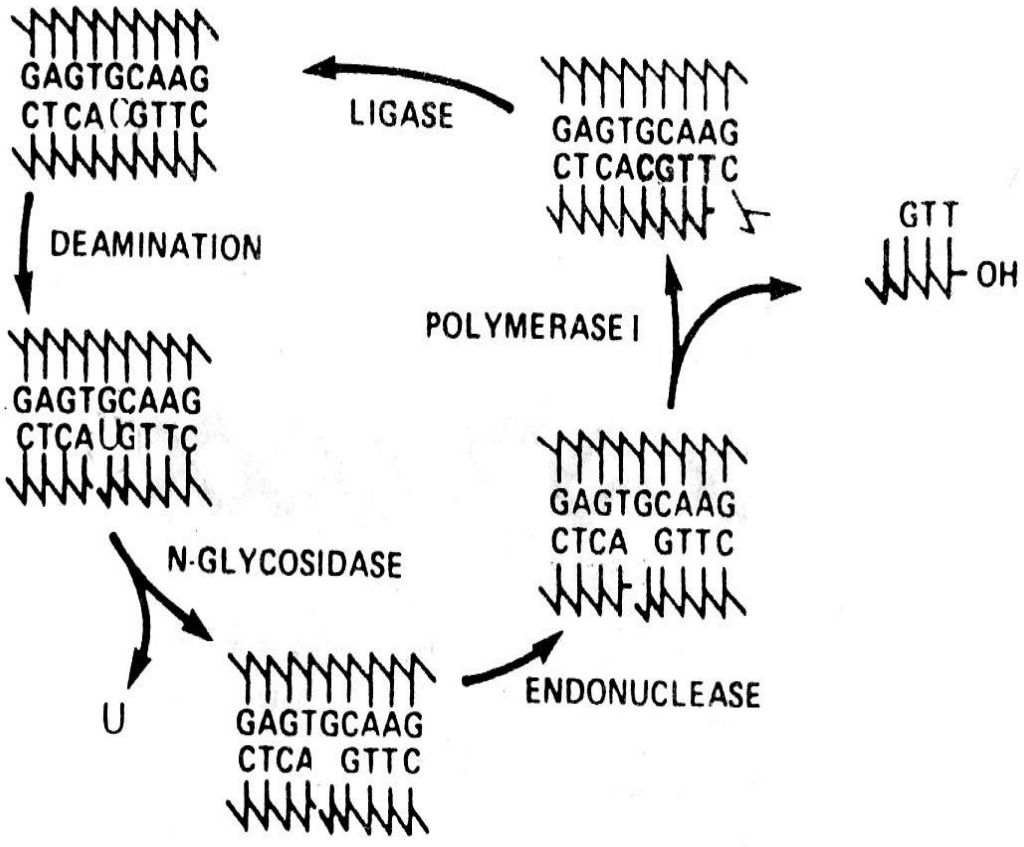
ایجاد دیمر تیمین – تیمین مهمترین اثر تخریبی اشعه UV بر روی DNA می باشد . هنگامی که اشعه UV به DNA می تابد ، دو مولکول باز تیمین که در یک رشته کنار هم قرار گرفته اند به هم متصل می شوند و این باعث تغییر شکل مولکول دو رشته ای DNA می شود . به این تغییر مولکول DNA در اثر اشعه UV دیمریزاسیون نوری (Photodimerization) گفته می شود. دیمر تیمین مانع همانند سازی و نسخه برداری می شود و باید تعمیر شود تا سلول بتواند اعمال طبیعی خود را انجام دهد . تعمیر دیمر در بسیاری از یوکاریوتها و پروکاریوتها با مکانیسم مشابهی انجام می گیرد . برای اینکار یک آنزیم خاص ، مکان حضور دیمر تیمین بر روی مارپیچ DNA را شناسائی می کند و به آن متصل می شود . کمپلکس DNA – پروتئین حاصل خاصیت جذب نور دارد و در اثر جذب نور واکنش تشکیل دیمر تیمین درجهت معکوس انجام می شود و دو باز تیمین از هم جدا می شوند . به دلیل فعال شدن این واکنش در اثر نور ، به آن فعالسازی نوری (Photoreaction) گفته می شود ، چرا که این واکنش فقط در مجاورت نور انجام میشود . در صورتی که به سلولها اشعه UV تابانیده شود و سپس در محل تاریک قرار گیرند ، در اثر عدم وجود نور دیمرهای تیمین تعمیر نخواهد شد و سلولها خواهند مرد . همچنین در بیماری گزرودرماپیگمنتازوم (Xeroderma pigmentasome) که یک بیماری ارثی می باشد آنزیم تعمیر کننده دیمرهای تیمین وجود ندارد در نتیجه این افراد شدیدا مستعد ابتلا به سرطان مخصوصا سرطانهای پوستی می باشند . زیرا پوست در معرض تابش آفتاب که حاوی اشعه UV است قرار دارد .



دیمریزاسیون نوری تیمین های مجاور

تعمیر بازها (Hydrolytic Deamination)

ساختمان بازهای آلی DNA نشان می دهد که بازهای آدنین ، گوانین و سیتوزین هر کدام یک عامل آمینی (NH_2) بر روی خود دارند . در بعضی از موارد در اثر واکنشهای هیدرولیز این عامل آمینی از روی بازهای فوق برداشته می شود که به این واکنش دآمینه شدن هیدرولیزی (Hydrolytic Deamination) گفته می شود . در اثر دآمینه شدن آدنین به هیپوگزانتین ، گوانین به گزانتین و سیتوزین به اوراسیل تبدیل می شوند . برای برداشتن این بازهای دآمینه شده آنزیمهای خاصی موسوم به DNA گلیکوزیلاز (DNA glycosylase) وارد عمل می شوند . برای هر باز دآمینه شده یک آنزیم خاص مورد نیاز می باشد . برای مثال باز اوراسیل بوسیله آنزیم اوراسیل N گلیکوزیلاز برداشته می شود . این آنزیم ها از دسته گلیکوزیلازها هستند و از دسته نوکلئازها نمیباشند در نتیجه در اثر فعالیت این آنزیمها رشته DNA نمی شکند بلکه پیوند گلیکوزیدی بین قند دزوکسی ریبوز و باز آلی شکسته شده و باز آلی خارج می شود . در اثر این عمل یک جایگاه خالی ایجاد می شود که اگر مربوط به سیتوزین (یک باز پیریمیدین) باشد به آن جایگاه آپیریمیدین و اگر مربوط به آدنین و گوانین باشد به آن جایگاه آپورین گفته می شود . پس از اینکه باز آلی دآمینه شده بوسیله N- DNA – گلیکوزیلاز برداشته شد یک آنزیم آندونوکلئاز خاص محل خالی را شناسائی و رشته DNA را به اندازه یک باز برش می دهد . سپس آنزیم DNA پلیمراز محل را پر می کند و DNA لیگاز بار دیگر شکاف رشته را می بندد.



تعمیر دآمیناسیون بازهای آلی DNA

تعمیر استخراجی

تغییرات DNA به موارد فوق خلاصه نمی شوند بلکه شامل موارد متعدد دیگری نیز می شوند . اگر قرار بود برای هر تغییر DNA یک آنزیم خاص وجود داشته باشد، تعداد آنزیمهای موثر در تعمیر DNA بسیار زیاد می شد . برای حل این مشکل یک سیتم تعمیر غیر اختصاصی نیز شناسائی شده است که تغییرات DNA را بطور غیر اختصاصی تعمیر می کند . اساس کار این سیستم بر تغغیر شکل مارپیچ DNA می باشد . برای اینکار در مرحله اول DNA تغییر یافته یا به عبارتی تخریب شده بوسیله یک اندونوکلئاز شناسائی می شود و این اندونوکلئاز دو طرف ناحیه تخریب شده را برش می دهد بطوریکه یک قطعه اولیگونوکلئوتیدی با طولی حدود ۱۳- ۱۲ نوکلئوتید از یک رشته از DNA خارج می شود . آنزیم مسئول اینکار در E.coli به نام UVrABC شناسائی می شود . پس از خارج شدن این قطعه ۱۳ -۱۲ نوکلئوتیدی از داخل DNA آنزیم های DNA پلی مراز به روشی که برای قطعات اوکازاکی گفته شد (در مورد پرایمر) ناحیه خالی ایجاد شده را پر می کنند و آنزیم DNA لیگاز نیز پیوند نهائی را برقرار می سازد و به این ترتیب DNA تعمیر می شود . نظر به اینکه این روش با خارج شدن یک قطعه از DNA همراه است به آن تعمیر استخراجی (Excision Repair) گفته می شود.

ژنتیک سرطانها

سرطان یک واژه فراگیر است . سرطان شامل بیماریهای منفرد فراوانی است که از انواع سلولهای مختلف تشکیل شده است . ولی این سلولها عوامل مشترک بسیاری دارند . آنها به طرز عجیبی فعال و پر انرژی هستند . سلولهای سرطانی رشد بسیار زیادی دارند . شکل و اندازه این سلولها کاملا متفاوت با سلولهای طبیعی است . ژنهایی که تحت تاثیر Gene amplification قرار گرفته اند ، تکثیر این سلولها بی پایان ودائمی است و بنابراین جاودانی هستند .

نئوپلاسم (تومور یا ضایعه سرطانی بافتی غیر طبیعی) متشکل از سلولهائی است که رشدی بیش از حد و ناهماهنگ با سایر بافتهای بدن دارد و پس از حذف محرک یا محرک‌های ایجاد کننده آن همچنان با سرعت به رشد خود ادامه می‌دهد. این ضایعه یا توده غیر طبیعی بی هدف به میزبان حمله می‌برد و عملا خود مختار می‌شود.

ایجاد سرطان چه به واسطه عوامل محیطی و چه به دلیل استعدادهای خانوادگی – ارثی اصولا با یکسری تغییرات ژنتیکی در سلولهای سرطانی همراه است که پایه و اساس آن موتاسیونهای سرطانزا است .

ضایعات سرطانی همگی از یک سلول موتاسیون یافته منشاء می گیرند (منوکلونال هستند) . این موتاسیونها محرک رشد سلول اند و به سلول قابلیت فرار از کنترل را می دهند . موتاسیونهای سرطان زا در دو گروه اصلی از ژن های طبیعی بدن بروز می کنند که عبارتند از ۱- پروتوانکوژنها ۲ – ژن های سرکوبگر تومور.

پروتوانکوژنها و انکوژنها

پروتوانکوژنها ژن های طبیعی هستند که در صورت تغییر ، بیان نامناسب یا بیان بیش از اندازه می توانند به بروز نئوپلاسم منجر شوند .

ژن های طبیعی که انکوژن ویروسی از آن بوجود می آید ، پروتو انکوژن (پیش انکوژن) نامیده می شود .

ژنهائی که باعث بروز سرطان می شوند (سرطانزا) نام دارند (انکو به معنی سرطان، و در زبان یونانی به معنی توده یا انبوه است) .

تاکنون بیش از۶۰ انکوژن کشف شده است . یکی از انکوژنهائی که به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است انکوژن myc نام دارد . معمولا انکوژن myc در سلولهای جوان در حال تکثیر به صورت فعال و در سلولها ی پیرتر غیر فعال اند . ولی این انکوژنها باعث رشد سریع و غیر قابل کنترل می شود . بارها نشان داده شده است که انکوژن myc در سلولهای سرطانی افزایش می یابد .

انکوژن ها برای اولین بار در ویروس های خاصی کشف شدند که عامل ایجاد تومورها در حیوانات بودند . بعدا معلوم شد که انکوژن های ویروسی در واقع ژنهای طبیعی بودند که در فرآیند انتقال از حیوان (میزبان) به ویروس تغییر یافته اند .

محل پیوند DNA رترو ویروسها به کروموزوم سلول میزبان بصورت شانسی می باشد و ممکنست گاه مجاور یک ژن پروتو انکوژن قرار گیرد ، در این حال ژن مزبور در مرحله نسخه برداری ، مناطق اینترون خود را از دست می دهد و در نتیجه ، ویروس ، هنگام ترک سلول میزبان ، حامل ژنی است که فاقد مناطق اینترون است و به صورت انکوژن در آمده است .

RSV از دسته رترو ویروسها می باشد، این نوع ویروس ها حامل RNA می باشند . در ژنوم RSV ژنی وجود دارد که Src نام دارد (Src مخفف Sarcoma می باشد) . این ژن توانائی ایجاد سرطان را دارد . به همین جهت به این نوع ژنها ، ژنهای انکوژن Oncogene می گویند .

انکوژنها چنانچه در سلولهای زیگوت (germ cell) بروز کرده باشند می توانند نسل به نسل انتقال یابند . در این صورت ، یک استعداد غالب برای ابتلا به سرطان وجود خواهد داشت .

تاکنون بیش از ۱۰۰۰ پروتوانکوژن در ژنوم طبیعی انسان شناخته شده است . این ژنها تا زمانی که در وضعیت طبیعی خود تحت کنترل می‌باشند موجب بروز نئوپلاسم نمی‌شوند.در واقع آنها ژن‌هایی طبیعی و لازم هستند که نقش مهمی در رشد و تمایز سلولی دارند. از بین پروتوانکوژنهای شایع می‌توان به ژنهای C- jun , C- ras,C-erb,C – Src اشاره کرد. به عنوان مثال ژن C-erbرسپتور فاکتور رشد اپیدرمال را کد می‌کند .

برای اینکه یک پروتوانکوژن به یک انکوژن (ژن سرطانزا) تبدیل شود راههای مختلفی وجود دارد از قرا ر :

۱ – Point Mutation: به عنوان مثال بروز موتاسیون نقطه ای در C- ras آن را به یک انکوژن تبدیل می کند .

۲ – Structural alteration: به واسطه جابجائی کروموزومی مثلا جابجائی t(9;22) در CML که دو پروتوانکوژن abl و bcr جابجا می شوند و حاصل نهائی آن پروتئین ترکیبی جدید خواهد بود .

۳ – Gene Amplification: دراین حالت تعداد کپی های یک پروتوانکوژن افزایش می یابد و چنانچه این کپی ها پر تعداد باشند می توان آنها را در یک کروموزوم به صورت مناطق با رنگ یکنواخت مشاهده کرد .

۴ – فعال شدن پروتوانکوژن توسط یک ژن پیش برنده (Promotor) فعال ترند. مثلا وقتی ژن پیش برنده یک رتروویروس نزدیک یک پروتوانکوژن یا درون آن جای گیرد. رترویروسها حامل رشته های RNA می‌باشند. بعد از ورود این ویروسها به سلول میزبان،آنزیم Reverse Transcriptase که توسط یکی از ژنهای ویروس تولید می‌شود ، سبب تبدیل رشته RNA به DNA می‌شود. سپس DNA بصورت رشته های دو گانه در می آید و وارد کروموزوم سلول میزبان می‌گردد، دراین حالت بنام پرو ویروس نامیده می‌شود . ویروسها در بروز سرطان انسانی نیز ممکنست دخالت داشته باشند و حدود ۲۰ درصد از سرطانهای انسانی بطور مستقیم و یا غیرمستقیم بعلت دخالت ویروسها ایجاد می‌شوند.در این رابطه از ویروسهای زیر می‌توان نام برد.

۱ – ویروس پاپیلومای انسانی یا HPV که در سرطان های تناسلی دخالت دارند .

۲ – ویروس T Cell Leukemia یاHTLV-I که عامل مستعدکننده برای سرطان سلولهای T می باشد .

۳ – Epstein – Barr Virus یا EBV که در ایجاد بورکیت لنفوما نقش دارند .

۴ – ویروس هپاتیت B یا HBV که در بروز سرطان کبد دخالت دارند .

۵ – ویروس Human Immuno Deficiency که باعث ایدز در انسان می شود و اختلال شدید در سیستم دفاعی بدن ایجاد می کند . ثابت شده است که این بیماران در مقایسه با افراد سالم ، آمادگی بیشتری برای ابتلا به سرطانهای مختلف دارند .

ژن های سرکوبگر تومور Tumor Suppressor Gene

ژنهای سرکوبگر تومور ژنهایی طبیعی اند که عملکرد آنها مانع پیدایش نئوپلازی میشود وعدم حضور یا غیر فعال شدن آنها موجب بروز نئوپلاسم می گردد. در حالیکه محصولات پروتوانکوژنها باعث تسریع رشد می گردند ، محصولات ژنهای مهار کننده تومور بطور غیر طبیعی مانع رشد غیر طبیعی و تغییر شکل بسوی بدخیمی می شوند ، و تنها زمانیکه فعالیت هر دو الل از دست رفته باشد در بدخیمی نقش منفی ایفا می کند . بعبارت دیگر بر خلاف جهش های پروتوانکوژنها که از نظر عمل غالب هستند ، جهش های ژنهای مهار کننده تومور مغلوب می باشند .

ژن P53 نمونه بارزی از این ژنهاست . متداول ترین آسیب DNA در تومورهائی که در بیش از ۵۰ در صد سرطانها دیده می شود ، جهش هائی که در ژن P53 رخ می دهد . این ژن رمز گذار پروتئینی با جرم مولکولی ۵۳ کیلودالتون است که در هسته اتصال پیدا می کند و در غلظت های بالا ، باعث خودکشی یاخته ، یعنی apoptosis می شود . یک جهش در ژن P53 چه به شکل حذف قطعه ای بزرگ و چه به شکل جهش نقطه ای Point Mutation پروتئین حاصل از ژن را به آن اندازه تغییر می دهد که از توانائی اش در القای نقش خودکشی یاخته جلوگیری کند . ژن سرکوبگر سرطان مهم دیگری که در واقع یکی از نخستین ژن های کشف شده از این نوع می باشد ، ژن رتینو بلاستوما (Rb) است ، که موتاسیون در این ژن با رتینوبلاستوما ، سرطان ریه و سایر تومورها همراه است.

توارث در سرطان

ریسک بروز سرطان در وابستگان کم است و فقط ۵ درصد سرطانها یک روند خانوادگی دارند . البته در این مورد که جمعیت خاص مستعد ابتلا به بدخیمی هستند ، شکی نیست (مثلا سرطان Penis در مردهای کاستاریکا

بعلت عدم ختنه) . سرطانهای غیر ارثی در سلولهای سوماتیک رخ می دهد ، محدود به یک سلول و فرزندان همان سلول خواهد بود و سرطان در خانواده به ارث نمی رسد .
تومورهای ارثی نسبت به انواع غیر ارثی در سنین پائین تری بروز می کنند و بیشتر به صورت چند نفر می باشد . انواع غیر ارثی بصورت منفرد است و در سنین بالاتر خواهد بود.
تومور ویلمز حدود ۸۵٪ از تومورهای کلیه را در کودکان شامل می شود و به دو صورت ارثی و غیر ارثی بروز می نماید . در موارد ارثی که حدود ۱ درصد از کل موارد این بیماری را تشکیل می دهد ، معمولا تومور در هر دو کلیه ایجاد می شود ، در حالیکه در نوع غیر ارثی غالبا تومور بصورت یکطرفه می باشد . در اکثر موارد موتاسیون بصورت حذف قسمتی از ژن در آدرس کروموزوم 11p13 می باشد . این ژن از نوع TSG می باشد و به اختصار WT نامیده می شود. رتینوبلاستوما در دو سال اول زندگی بروز می کند . تقریبا در ۴۰ درصد موارد ارثی است و به صورت اتوزومال غالب رخ می دهد . در ۵ درصد بیماران حذف کروموزومی در آدرس ژنی 13q14 اتفاق می افتد و د ر۴۰ در صد تکنیک های مولکولی یک حذف بسیارکوچک را در همان محل کروموزومی نشان می دهد . تشخیص قبل از تولد و تشخیص موارد فامیلی در افراد بدون علامت با استفاده از روشهائی مثل RFLP ممکن است . این سرطان در سلولهای شبکیه چشم ایجاد می شود . مردمک چشم این بیماران بعلت رشد تومور ، بصورت شیشه ای درمی آید . در صورت عدم درمان تومور بصورت عصب بینائی رشد کرده و در نهایت ایجاد ضایعات سرطانی مغز و متاستازهائی در نواحی استخوان – کبد و سایر نقاط بدن می شود . معمولا در موارد ارثی یک چشم مبتلا می شوند در حالیکه در نوع غیر ارثی ، هر دو چشم مبتلا می شود و د رسنین بالا بروز خواهد کرد . سرطان پستان شایع ترین سرطان در میان زنان آمریکائی است . فاکتورهای دوران بارداری و باروری نشان می دهد که ممکن است وجود هورمونها برای بروز تغییرات بدخیمی مهم باشد . ریسک ابتلا به سرطان سینه در وابستگان درجه اول بیمار سه برابر افزایش می یابد . اگر دونفر از وابستگان درجه اول فردی به بیماری مبتلا باشند این ریسک ده برابر افزایش می یابد . به نظر می رسد که در خانواده هایی که چند نفر مبتلا وجود دارد ، بیماری به صورت اتوزومال غالب به ارث برسد و معمولا با سرطان تخمدان همراه است . ریسک سرطان پستان درافرادی که تخمدان های آنها فعال نیست کاهش می یابد . ریسک سرطان پستان در مواردی که قاعدگی دیررس و یائسگی زود باشد کاهش می یابد . ریسک دراز مدت در افرادی که زود بچه دار می شوند نیز کاهش می یابد . اگرچه این سرطان در مردان نادر است ، خانواده هایی مشخص شده اند که در آنها پدر و پسر و یا پدر و دختر هر دو مبتلا به بیماری بوده اند . ظاهرا در خانواده هائی که تعداد مبتلایان به سرطان پستان زیاد است عامل مستعد کننده می تواند از مردی که در ظاهر بدون علامت است از نسلی به نسل بعد منتقل شود .

Refrences:

1- Michael Connor and Malcolm Ferguson. Medical Genetics, 5 th ed.2005, Blackwell Science

2-Elaine Johnsen and Arthur Mange.Basic Human Genetics.Second ed.Sinauer Asso Inc.2005

3- Daniel L,Hastl, Elizabeth W.Jones. Genetics analysis of Genes and Geromes. Fifth ed.2005 Jones and Bantlett Rublication.

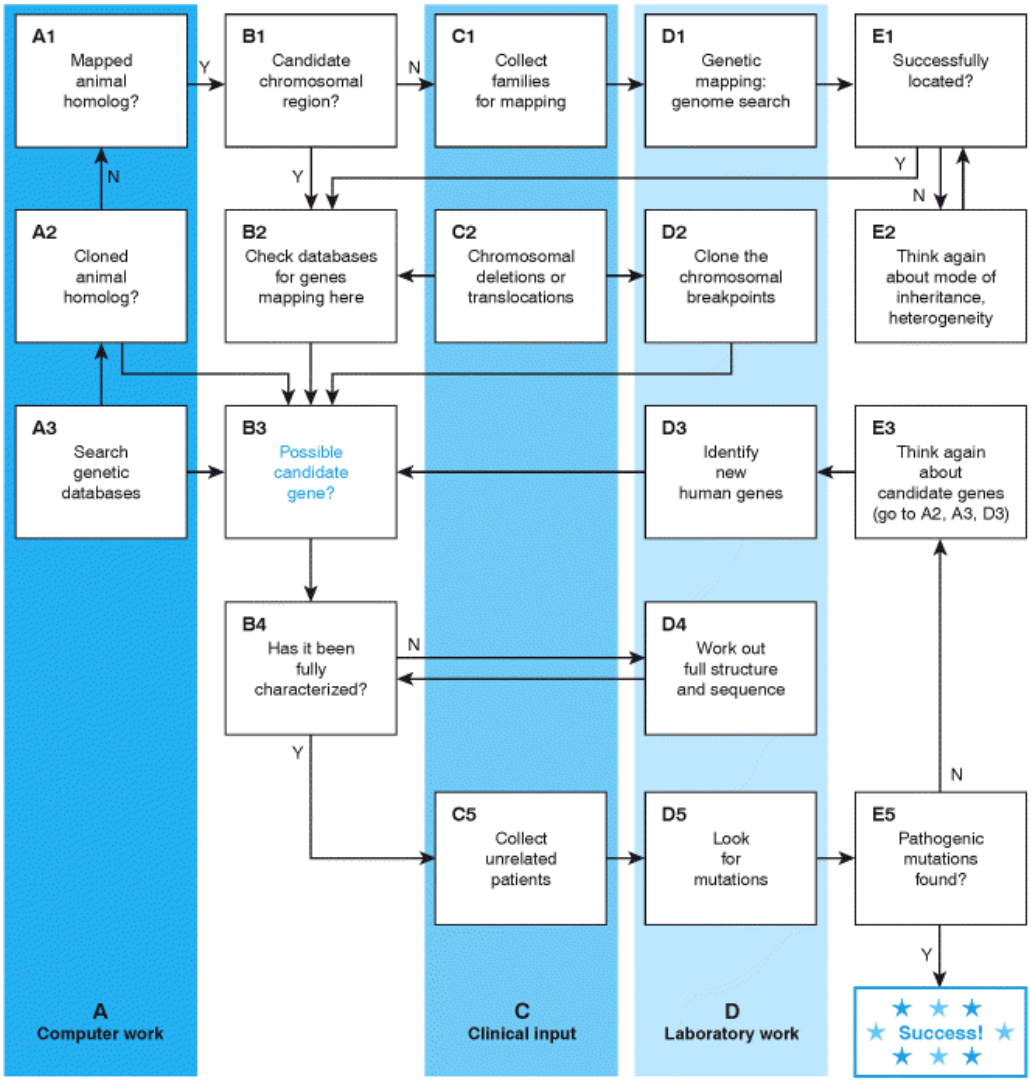
فصل هفتم

روشهای شناسایی ژنهای بیماریزا در انسان

مقدمه

در طی دو دهه گذشته روش های مختلفی برای شناسایی ژنها بکار گرفته شده است (شکل ۱– ۷). اگر چـه در دهه ۱۹۹۰ میلادی متداول ترین روش برای شناسایی ژنها، روش Positional cloning بـود، امـا در سـال ۱۹۹۵ که اجرای پروژه ژنوم انسانی آغاز شد روش DNA sequencing بطور عام توسط کشورهای شـرکت کننده در این پروژه برای توالی یابی کل ژنوم انسان مورد استفاده قرار گرفت و تا سال ۲۰۰۰ میلادی کـه پـیش نویس اولیه نقشه ژنوم انسان تهیه شد، بیش از ۹۸٪ توالی ژنوم انسان بررسی و حدود ۲۵ هزار ژن شناسایی شد. این پروژه بزرگ با استفاده از فن آوری های PCR و DNA Sequencing انجام شد.

شکل ۱– ۷: شمایی از رویکرد ها و مسیر ها ی بکار گرفته شده در شناسایی ژنها



شناسایی ژن های بیماریزا در انسان

(Identifying Human Disease Gene)

شاید عبارت شناسایی مولفه های ژنتیکی صفات در انسان برای این فصل مناسب تر باشد ، چرا که بعضی از صفات مندلی مانند کوررنگی رنگ قرمز و سبز ممکن است بعنوان یک تفاوت طبیعی تلقی شود تا وجود یک بیماری .

اگر چه بسیاری از تفاوت های ژنتیکی، که تا حدودی باعث افزایش استعداد انسان به بیماریهای غیر مندلی شایع می شوند، تحت عنوان ژنهای بیماریزا نامگذاری شده اند، لکن این تفاوت ها لزوما باعث بروز بیماری نمی شوند. بطور کلی و برای همه صفات ژنتیکی شناخته شده، روش های ارایه شده در این فصل می تواند برای کشف توالی های DNA مرتبط با بروز بیماری مورد استفاده قرار گیرد. این تفاوت ها ممکن است در بسیاری از ژن ها ولی نه در همه ۲۵۰۰۰ ژن انسان یافت شوند .

بعضی از ژن ها در رشد و تکامل رویان حیاتی هستند و رخداد جهش در آنها باعث مرگ رویان می شود . در سایر موارد ، از بین رفتن عملکرد یک ژن ممکن است بطور طبیعی تاثیری بر رخداد یک صفت یا بیماری نداشته باشد چرا که سایر ژن های غیر مشابه فعالیت ژن تخریب شده را بطور مشابه انجام می دهند.

اصول و تدابیر اتخاذ شده در شناسایی ژن های بیماریزا

رویکرد و روش های شناسایی ژن های بیماری زا بموازات شناسایی آنها تغییر کرده است. قبل از سال ۱۹۸۰ میلادی تعداد محدودی از ژن های بیماریزا در انسان شناسایی و موفقیت هایی اولیه از طریق آگاهی از اصول بیوشیمیایی بیماری ها و تخلیص پروتیین ها حاصل شدند. در دهه ۱۹۸۰ میلادی پیشرفت های بدست آمده در فن آوری DNA نوترکیب منجر به یک رویکرد جدید در شناسایی ژنها بنام Positional Cloning شد. با این رویکرد جدید و با تلاش بسیار، شناسایی ژن های بیماریزا از نظر تعداد رو به فزونی گذاشت و با اختراع روش PCR و استفاده آن در مطالعات پیوستگی (linkage studies) و غربالگری ژنها از نظر وجود جهش ها منجر به شناسایی آسانتر ژن های بیماریزا با رویکرد Positional Cloning شد.

اگر چه امروز پروژه ژنوم انسان به اتمام رسیده و تمامی ژنهای انسان شناخته شده است لکن در طی سالهای اجرایی آن، استفاده از اطلاعات بدست آمده در شناسایی ژن ها با رویکرد فوق الذکر بسیار مفید واقع و باعث شد هر هفته ژن بیماریزای جدیدی کشف گردد .

شکل ۱ – ۷ بعضی از مسیر هایی را که برای شناسایی ژنهای بیماریزا در انسان مورد استفاده قرار گرفته نشان می دهد . اگر چه این شکل به نظر پیچیده می آید لکن این بعلت فقدان یک روش استاندارد برای کشف ژنها می باشد. همه این مسیر ها بر اساس جهش یابی در ژن مورد نظر استوار است لکن یک محل شروع مشخص و یا یک مسیر کلی برای شناسایی ژنها وجود ندارد.

بطور کلی دو روش اصلی برای کشف ژنها مورد استفاده قرار گرفته است.

الف) روش های که بدون آگاهی و با عدم وابستگی به اطلاعات قرار گیری ژن بر روی کروموزوم مورد نظر بکار گرفته می شوند .
ب) روش های که بر اساس اطلاعات و آگاهی از محل تقریبی ژن بر روی کروموزوم استفاده می شوند .
تا بحال بیشتر ژنها با استفاده از روش دوم (ب) و با آگاهی از محل کروموزومی و خصوصیات ژن کشف شده اند .

شناسایی ژن با رویکرد عدم وابستگی به اطلاعات مربوط به محل قرار گیری ژن بر روی کروموزوم- کشف ژن بیماریزا بر اساس آگاهی از محصول پروتیینی آن

زمانیکه اساس بیوشیمیایی بیماری شناخته شده باشد، تلخیص و آگاهی نسبی از خصوصیات محصول پروتیینی ژن مورد نظر امکان پذیر خواهد بود . برای این منظور از دو روش الیگونوکلئوتید های اختصاصی ژن و آنتی بادی اختصاصی استفاده می شود.

استفاده از الیگونوکلئوتید های اختصاصی در کشف ژن

این روش بر اساس توانایی و امکان تخلیص مقادیر کافی پروتیین و توالی یابی زنجیره اسیدهای آمینه مربوطه می باشد . در این روش باندهای اختصاصی پپتیدی در محصول پروتیینی توسط آنزیم های پروتئولیتیک مانند تریپسین (شکننده انتهای کربوکسیلیک آمینواسید های لیزین و یا آرژنین) و مواد شیمیایی دیگر مانند سیانوژن بروماید (شکننده انتهای کربوکسیلیک آمینواسید های متیونین) شکسته و توالی آمینو اسیدها در هر زنجیره پپتیدی بدست آمده از طریق انجام یک سری از واکنشهای شیمیایی تکراری توسط یک دستگاه توالی یاب اتوماتیک آمینو اسید ها مشخص می شود. در هر سیکل توالی یابی، زنجیره پپتیدی توسط مواد شیمیایی که به انتهای نیتروژنی (N-Terminal) زنجیره می چسبد شکسته و توسط روش کروماتوگرافی شناسایی می شود. در پایان فرآیند توالی یابی، توالی های متعدد هم پوشان آمینو اسید ها که زنجیره های یکسان هم پوشانی دارند مشخص شده و با اتصال این قطعات مشابه توالی یک زنجیر بلند از آمینو اسیدها بدست می آید. این روش در کشف ژن مرتبط به بیماری هموفیلی A مورد استفاده قرار گرفته است. به هر حال این رویکرد به اطلاعات اولیه در خصوص توالی زنجیره پلی پپتیدی نیاز مبرمی دارد .

استفاده از آنتی بادی های اختصاصی در کشف ژن ها

هنگامیکه مقادیر بسیار محدودی از پروتیین طبیعی در دسترس می باشد ، استفاده از آنتی بادی اختصاصی در کشف ژن مربوطه کاربرد خواهد داشت .
پروتیین و یا یک پپتید تخلیص شده با یک مولکول قدرتمند ایمنوژنیک هاپتن (Hapten) مانند هموسیانین در هم آمیخته می شود و ترکیب مربوطه به یک حیوان آزمایشگاهی نظیر خرگوش و یا یک موش تزریق می شود. مولکول هاپتن سلولهای لنفوسیت B و پروتیین یا پپتید مورد نظر ما سلولهای لنفوسیت کمک کننده T را فعال کرده و باعث تولید آنتی بادی در بدن حیوان می شوند. آنتی بادی تولید شده برای پروتیین و یا پپتید مورد نظر ما اختصاصی بوده و با روش های متعدد و مرسوم می توان آنرا تخلیص و از روی توالی زنجیره آمینه اسید آن به توالی cDNA و ژن مربوطه پی برد.

شناسایی ژن بیماری زا بر اساس آگاهی از توالی مولکول DNA

این روش اکثرا" زمانی که محقق بخواهد از نوع جهش ژنتیکی در یک ژن اختصاصی که باعث بروز بیماری می شود آگاه شود مورد استفاده قرار می گیرد .

یکی از کاربرد های مهم این روش، کلون کردن ژنهای با توالی های تکرار شونده نوکلئوتیدی سه تایی (expanded trinucleotide repeat) می باشد. از این روش در کشف ژن SCA8 مرتبط با بروز بیماری آتاکسی اسپانیو سربرال استفاده شده است .

کشف ژن بر اساس آگاهی از محل تقریبی ژن بر روی ناحیه ای از کروموزوم

در این رویکرد شناسایی ژن صرفا" بر اساس اطلاع از محل تقریبی ژن بر روی کروموزوم انجام می شود . اولین ژن با این روش در سال ۱۹۸۶ شناخته شد و پس از آن زمان ژنهای مهم بیماری زا مانند ژن های مرتبط با بروز بیماریهایی نظیر دیستروفی عضلانی دوشن، فیبروز کیستیک، بیماریهای هانتینگتون، بیماری پلی کیستیک کلیه در بالغین، سرطان کولورکتال، سرطان پستان و غیره یکی پس از دیگری کشف شدند .

بهرحال استفاده از روش کلی Positional Cloning در شناسایی ژنها کاری سخت و دشوار است. تا سال ۱۹۹۵ فقط ۵۰ ژن مرتبط با بیماریهای ارثی توسط این روش کشف شد. در ادامه چند روش مهم و متداول در این رویکرد ارایه می شود.

مراحل انجام روش Positional cloning

در مرحله اول ، محل تقریبی ژن بر روی کروموزوم که تا حد ممکن به واقعیت نزدیک باشد، تعیین می شود بطوریکه منطقه ای به وسعت ۱۰ میلیون نوکلئوتید (10 Mb) یا بیشتر انتخاب می شود. در مرحله دوم ، تعداد نمونه زیادی از اعضای خانواده های مبتلا تهیه و جهت DNA مارکرهای خاص و چند شکلی های آن در منطقه کروموزومی مورد بررسی قرار می گیرند.

این DNA مارکرها ممکن است بصورت چند شکلی های چند تایی یا حتی تک نوکلئوتیدی در منطقه انتخابی کروموزمی و در اعضای خانواده های انتخاب شده دیده شود. این موضوع بستگی به دقت در رسم نقشه فیزیکی محل انتخاب شده کروموزومی دارد . بطوریکه هر چه رسم آن به واقعیت نزدیک تر باشد احتمال کشف ژن مورد نظر بیشتر خواهد بود.

استفاده از روشهای آماری مانند روش پیوستگی غیر تعادلی (Linkage disequilibrium)

استفاده از این روش در ترسیم نقشه فیزیکی ژن بر روی کروموزوم می تواند کمک کننده باشد. این موضوع در کشف ژن مرتبط با فیبروز کیستیک نشان داده شده است. این روش آماری بخصوص هنگامیکه نمونه های زیادی از خانواده های مبتلای غیر خویشاوند در جمعیتی که پیشینه مشترکی داشته مورد آزمایش قرار گیرند می تواند بسیار کمک کننده باشد. زمانیکه جهش یکسانی در یک جمعیت با پیشینه مشترک وجود داشته باشد شناسایی ژن بیماریزا ساده خواهد بود و هر چه تعدد این جهش ها بیشتر باشد احتمال کشف ژن واقعی مرتبط با بیماری بیشتر خواهد بود .

شناسایی ژن با استفاده توام از بانک های اطلاعاتی و رسم نقشه آن

همانطور که در شکل ۱ – ۷ نشان داده شده ، ژنهای شناخته شده در مناطق انتخاب شده کروموزومی می تواند از طریق جستجو در بانک های اطلاعاتی موجود کشف شود . اگر هیچیک از ژنهای که تاکنون در محل انتخاب شده کروموزومی کشف شده مورد نظر ما نباشد و یا بعد از انجام آزمایشات جهش یابی ، هیچگونه جهشی در آن پیدا نشود ، آنگاه می بایست به دنبال یک ژن جدید و اختصاصی بود . هم اکنون با اتمام پروژه ژنوم انسان دیگر نیازی به کشف ژنها نیست و تمامی ژن ها و محل آنها بر روی کروموزوم ها مشخص شده لکن آنچه نیاز امروز جامعه علمی است آگاهی از ارتباط ژنهای کشف شده با بروز بیماری ها و نحوه عملکرد آنها است.

آنچه حایز اهمیت بسزایی است آگاهی از اثر یک ژن معیوب اختصاصی در بروز یک پاتولوژی اختصاصی در یک بافت خاص می باشد چرا که بسیاری از ژنها در تعداد زیادی از بافت ها بیان می شوند . این در حالی است که ممکن است عملکرد توام چند ژن باعث بروز یک فنوتیپ (بیماری) شود و یا تغییر یک نوکلئوتید در یک ژن خاص باعث بروز فنوتیپ اختصاصی شود.

تکنولوژی های جدید مانند Protein/RNA/DNA Microarray دانشمندان را در جهت فهم و درک واقعی عملکرد ژنها و نحوه بیماریزایی آنها بسیار یاری نموده و بنظر می رسد استفاده توام از اطلاعات بدست آمده از پروژه ژنوم انسانی و تکنولوژیهای جدید در دهه های آینده، افق تازه ای را برای درمان بسیاری از بیماریها، بخصوص سرطان بگشاید .

اتخاذ رویکرد انتخاب محل ژن بر روی کروموزوم بر اساس استفاده توام نقشه فیزیکی ژن و بیان و عملکرد آن

اگر چه دو رویکرد فوق الذکر که بر اساس آگاهی از محل تقریبی ژن بر روی کروموزوم و یا بدون وابستگی به این اطلاعات در اصول با هم کاملا متفاوت و مجزا هستند لکن در واقع بیشتر ژنهای بیماری زا از طریق آگاهی از محل تقریبی آنان شناخته شده اند. کشف ژنها بر اساس رویکرد عدم وابستگی به محل تقریبی ژن بر روی کروموزوم ندرتا موفقیت آمیز بوده چرا که شناخت نحوه بیماریزایی مولکولی یک ژن بسیار پیچیده است .

پیش گویی در خصوص عملکرد بیوشیمیایی یک ژن بیماریزای ناشناخته اغلب زمانیکه ژن مربوطه کشف می شود اشتباه خواهد بود. لذا بهتر است در خصوص اثرات بیماریزایی یک جهش در یک ژن محتاطانه صحبت و پیشگویی کنیم. برای مثال می توان از ژنهای ردوپسین (Rhodopsin) و فیبریلین (Fibrilin) نام برد .

جهش در ژن ردوپسین احتمالا با نقایص بینایی همراه خواهد شد اما نمی توان پیشگویی کرد که باعث چه نوع اختلالات ارثی شبکیه می شود . بطور مشابه در خصوص ژن فیبریلین نمی توان پیشگویی کرد که تغییرات این ژن باعث کدامیک از انواع اختلالات بافت همبند می شود . تاکنون بیش از ۱۰۰ نوع اختلالات بافت همبند مرتبط با تغییرات این ژن شناخته شده است . از سوی دیگر ، استفاده محض از رویکرد شناسایی ژن بر اساس محل تقریبی آن بر روی کروموزوم کافی نیست چرا که مناطق انتخاب شده شامل تعداد بسیار زیادی ژن می باشد که بررسی همه ژنها و جهش های موجود در آنها کاری وقت گیر و بسیار دشوار است . لذا این رویکرد می

بایست همراه با اطلاعات دیگر نظیر نحوه بیان و عملکرد احتمالی ژن و یا مشابهات توالی آن با ژن مشابه در سایر گونه ها بصورت توام استفاده گردد.

تایید ژن انتخاب شده

در انتهای این فرآیند و استفاده از همه این روش ها و رویکرد ها که منجر به تعیین و انتخاب اولیه یک ژن مرتبط با بیماری می شود می بایست بطور اختصاصی نمونه افراد مبتلا از نظر وجود نوع جهش ها مورد بررسی مولکولی قرار گیرد . امروزه شناسایی جهش
های بیماریزا توسط روش های آزمایشگاهی متعددی انجام می شود . شناسایی جهش ها در افراد مبتلای غیر خویشاوند قویا نشاندهنده صحت ژن انتخاب شده می باشد. لکن برای تایید علمی و رسمی آن نیاز به اقدامات دیگری از جمله بازیابی فتوتیپ طبیعی (Restoration of normal phenotype) و ساخت یک مدل حیوانی (موش) مبتلا به بیماری می باشد (Production of a mouse model of the disease).

شناسایی یک ژن بیماریزا شرایط را برای مطالعات بعدی فراهم می کند . بطوریکه توانایی تشخیص جهش ها می بایست بلافاصله در کیلنیک های مشاوره ژنتیک و تشخیص زود هنگام بیماری مورد استفاده قرار گیرد . این مهمترین کاربرد کشف ژن ها می باشد لکن آگاهی از نحوه بیماریزای مولکولی ژن ممکن است راهی را برای آگاهی از بیماریهای مرتبط و نهایتا درمان بهتر و ژن تراپی در آینده بگشاید .

فصل هشتم

ژنتیک مدرن

مقدمه

پیشرفت های عظیم علمی بشر در چند دهه گذشته در تمامی علوم مرهون استفاده از فن آوری پیشرفته مخابراتی و ماهواره ای است. کشف و اختراعات جدید توأم با انتشار سریع آنها بگونه ای است که بشر امروزی به دشواری قادر به درک صحیح همه این رخدادها می باشد. بطوریکه شاید بتوان اذعان نمود، در هیچ برهه ای از تاریخ، عدم آماده گی بشر برای آگاهی و درک رخدادهای جدید علمی تا به این حد نبوده است. بدین لحاظ دانشمندان و محققین زیادی تلاش می کنند به موازات این رخداد های علمی راهکارهای مناسبی را نیز برای بیان و انتقال صحیح آنها به جامعه بشری ارایه نمایند.

ژنتیک بعنوان یکی از علوم شگفت انگیز در سالهای اخیر شاهد تحولات شگرفی بوده بطوریکه روزانه صدها مقاله جدید در خصوص ژنتیک و مسائل بیولوژی سلولی در بانکهای اطلاعاتی پزشکی معتبر دنیا ثبت می شود. از رخدادهای بسیار مهم در این رشته در دهه گذشته می توان به سه پروژه بزرگ ژنوم انسان، پروژه سلولهای بنیادی و پروژه شبیه سازی انسان اشاره نمود. به نظر می رسد نتایج این سه پروژه حیات بشر را در قرن حاضر بطور چشمگیری متحول سازد.

در این فصل از کتاب به اهمیت استفاده از شبکه اینترنت و سایت های علمی مرتبط با ژنتیک مولکولی انسانی می پردازیم.

صرف نظر از اینکه شما دانشجوی پزشکی و یا یک محقق هستید، شما به اطلاعات ژنتیکی صحیح و کامل نیاز خواهید داشت. برای آگاهی از محل قرار گیری ژنها بر روی کروموزوم ها، ساختمان ژنها، انواع جهش های کشف شده و محل و زمان بیان ژنها در مرحله تکاملی جنین و غیره به این اطلاعات نیازمند هستید. اطلاعات شما باید به روز باشد و بتوانید سریعاً به آنها دسترسی داشته باشید، شبکه اینترنت این امکان را برای شما فراهم می کند.

مروری بر منابع الکترونیکی علمی و اطلاعاتی معتبر جهان

اطلاعات موجود در شبکه اینترنت با اطلاعات چاپ شده در ژورنال های عملی کاملاً متفاوت است. اگر چه این اطلاعات ممکن است خوب، ضعیف، بد و حتی گاهی گمراه کننده باشند لکن امروزه بانکهای اطلاعاتی با کیفیت بسیار بالا در اختیار متخصصین ژنتیک قرار گرفته است. آدرس تعدادی از این بانکها در جدول شماره یک آورده شده که استفاده از آنها برای دانشجویان علاقمند به رشته ژنتیک مولکولی انسانی می بایست یک الویت باشد. این بانک های اطلاعاتی بطور دائم در حال بهینه سازی بوده و با ایجاد ارتباط با بانک های مشابه دیگر، اطلاعات بسیار کاملی را در اختیار استفاده کنندگان قرار می دهد و لذا آدرس های مندرج در جدول شماره یک در آینده ممکن است تغییر کند که بطور خودکار به آدرس های جدید متصل می شوند.

هر یک از صفحات اینترنت دارای یک اسم شناسایی اختصاصی بنام *Uniform Resource Locator (URL)* می باشد. URLs آدرس صفحات اینترنت را تحت عنوان *http:// اسم فایل* تشکیل می دهند. این نحوه نامگذاری بعنوان یک زبان استاندارد برای ایجاد ارتباط در شبکه اینترنت استفاده می شود.

وارد کردن آدرس http://www.ebi.ac.uk در جستجو گر شبکه اینترنت (web browser) صفحه اصلی انستیتو بیو انفورماتیک اروپا را بر روی مانیتور کامپیوتر ظاهر می سازد (شکل ۱– ۸).

شکل ۱– ۸: تصویر صفحه اصلی سایت اینترنتی انستیتو بیو انفورماتیک اروپا

با (انتخاب) هر یک از دکمه ها، یک صفحه اینترنت دیگر که با صفحه اصلی (Home Page) مرتبط است بر روی صفحه مانیتور ظاهر می شود و لذا شما نیازی به دانستن آدرس اختصاصی صفحات مرتبط به صفحه اصلی ندارید.

سایت های اصلی و معتبر در حوزه علوم پزشکی (ژنتیک)

با استفاده از شبکه اینترنت شما به اکثر اطلاعات ژنتیکی انسان دسترسی خواهید داشت. این اطلاعات هم بصورت توالی اسیدهای نوکلئیک و هم بصورت نقشه های کروموزومی در بانک های اطلاعاتی نگهداری می شود. جدول شماره یک در خصوص بعضی از سایت های اصلی و مهم علوم زیستی – پزشکی جهان اطلاعاتی را ارایه نموده که توضیحات مختصری در خصوص تعدادی از این سایت ها در ادامه آورده شده است. اطلاعات مندرج در این سایت ها به اندازه کافی نیاز شما را بعنوان دانشجو بر آورده می کند.

جدول شماره ۱: مشخصات وب سایت های علمی معتبر (ژنتیک)

Logo	Name	Website
	National Institutes of Health (NIH	http://www.nih.gov/
	The National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
	National Library of Medicine	http://www.nlm.nih.gov/
	PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/
	MEDLINE	http://medline.cos.com/
	OMIM	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM
	National Cancer Institute	http://www.cancer.gov/
	Ensembl	http://www.ensembl.org/
	Genome Database	http://www.gdb.org/
	European Bioinformatics Institute	http://www.ebi.ac.uk/Information/
	GeneReviews	http://www.geneclinics.org
	Health & Biomedical Information	http://www.hbi.ir

سایت اصلی فن آوری زیستی (NCBI)

این سایت علمی بسیار معتبر علمی در سال ۱۹۸۸ تاسیس و در حال حاضر دارای دو ارتباط الکترونیکی اختصاصی با کتابخانه ملی پزشکی (National Library of Medicine) و سازمانهای ملی طب (National Institutes of Health) آمریکا و نیز چند زیر مجموعه اصلی از جمله بانکهای اطلاعاتی مولکولی متعدد، سایت علمی OMIM، سایت علمی PubMed و BLAST می باشد. این سایت بطور دایم در حال ارتقا و نوآوری است.

سایت علمی انتشارات مقالات در حوزه پزشکی (PubMed)

سایت PubMed در سال ۱۹۵۰راه اندازی شده و یکی از خدمات کتابخانه ملی پزشکی آمریکا می باشد. این سایت یکی از منابع الکترونیکی بسیار غنی علمی با بیش از ۱۵ میلیون مقاله پزشکی و زیستی – پزشکی بصورت خلاصه و در بسیاری از موارد بصورت کامل می باشد. این سایت فهرستی از کلیه مجلات پزشکی معتبر دنیا را ارایه داده و روزانه با درج مقالات جدید ارتقا می یابد.

سایت علمی Medline

سایت Medline در سال ۱۹۶۵ راه اندازی شد و در حال حاضر شامل تقریبا" ۱۱ میلیون پرونده تهیه شده از بیش از ۷۳۰۰ نوع منابع انتشاراتی مختلف می باشد. با تمهیدات نرم افزاری بکار گرفته شده در سایت امکان جستجوی آسان برای کاربران و انتقال مطالب مورد نظر در قالب های مختلفی در رایانه شخصی فراهم شده است. شاید بتوان ای بانک اطلاعاتی را جامع ترین منبع اطلاعات پزشکی و زیستس محسوب نمود.

مقالات چاپ شده در مجلات علمی به بهترین نحو در سایت مدلاین آورده شده و از طریق شبکه اینترنت و یا بصورت خدمات اطلاعاتی در لوح های فشرده قابل دسترس می باشد.

استفاده از سایت مدلاین یک روش اصولی برای دستیابی به مقالات منتشر شده علمی و خلاصه همه مقالات منتشر شده در هزاران مجله بیومدیکال (زیستی – پزشکی) می باشد که به روش های گوناگون از جمله نام نویسنده، نام مقاله، کلید واژه و غیره قابل جستجو می باشد. بسیاری از کتابخانه ها در سراسر دنیا برای دریافت اطلاعات این بانک چه بصورت چاپی و چه بصورت لوح فشرده (CD-ROM) عضو این بانک می باشند. لذا می توان از طریق شبکه اینترنت بطور رایگان به اطلاعات این بانک دسترسی یافت.

سایت علمی بیماریهای وراثتی مندلی (OMIM)

یک سایت اختصاصی اطلاعات ژنتیک انسان، بانک اطلاعاتی بسیار مفید Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) می باشد که دربردارنده تعداد زیادی (بیش از ۶۵۰۰ نوع) از صفات و خصوصیات مندلی در انسان می باشد.

این بانک در ابتدا توسط پروفسور Victor Mckusick در دانشگاه جان هاپکینگز تاسیس و شامل یک بانک اطلاعاتی بهینه بیش از ۶۵۰۰ صفات مندلی در انسان است و بطور دائم در حال ارتقا و به روز شدن می باشد. آدرس این بانک در جدول شماره یک آورده شده است. OMIM یک نقطه شروع ضروری برای کسب اطلاعات در خصوص بیماری ها و صفات طبیعی در انسان که بصورت مندلی به ارث می رسند می باشد.

در این بانک برای هر صفت (بیماری) یک شماره شش رقمی و بعنوان کد شناسایی در منابع علمی ژنتیک اختصاص یافته است. بطوریکه برای بیمار آکندروپلازیا شماره MIM 100800 و بیماری هانتیگتون MIM 143100 اختصاص یافته است.

اولین رقم این شماره شش رقمی نشان دهنده نوع توارث صفت (بیماری) و بشرح زیر می باشد.

۱- صفت (بیماری) به ارث رسیده بصورت اتوزوم غالب می باشد.
۲- صفت (بیماری) به ارث رسیده بصورت اتوزوم مغلوب می باشد.
۳- صفت (بیماری) به ارث رسیده بصورت وابسته به جنس X می باشد.
۴- صفت (بیماری) به ارث رسیده بصورت وابسته به جنس Y می باشد.
۵- صفت (بیماری) به ارث رسیده توسط ژنوم متیوکندریایی به ارث می رسد.
۶- صفات اتوزومی که بعد از سال ۱۹۹۴ به بانک اطلاعاتی افزوده شده است.

بانک اطلاعاتی OMIM با روش های گوناگون از جمله شماره، اسم صفت (بیماری)، اسم نویسنده و یا هر لغت درون متن قابل جستجو می باشد. همچنین بین OMIM و بانک های اطلاعاتی علمی دیگر ارتباط الکترونیکی متعددی وجود دارد. لذا با ورود به OMIM می توان به اطلاعات متنوع و زیادی دسترسی یافت.

مطالب این بانک (OMIM) معمولاً شامل یک بحث ژنتیکی در خصوص صفت (بیماری) ویک لیست از منابع رفرانس مربوطه می باشد. ولی در مورد وضعیت کلینیکی صفت و یا بیماری مطلبی ارائه نمی کند.

بانک اطلاعاتی ژن (GenBank)

سایت ژن بانک (GenBank) یکی از زیر مجموعه سایت های مربوط به NIH (جدول شماره یک) می باشد که شامل مجموعه ای از اطلاعات مربوط به توالی DNA است که در اختیار عموم قرار دارد. هر دو ماه اطلاعات آن به روز می شود. این بانک بخشی از بانک اطلاعاتی بین المللی مربوط به توالی DNA است که شامل بانک های توالی DNA ژاپن ، اروپا و آمریکا می باشد. اطلاعات ای بانک روزانه و بصورت شبکه ای بین سه کشور آمریکا، کشور های اروپایی و ژاپن تبادل و به روز می شود.

ژن بانک شامل توالی های کامل ژنوم موجودات (که تعداد آنها در حال افزایش است)، توالی ژنهای اختصاصی و تعداد زیادی از کلون های ناشناخته می باشد. هر فردی به آسانی می تواند به توالی DNA و یا پروتیین شناخته شده مورد نظر دسترسی یابد. محققین می توانند با استفاده از این بانک و نرم افزارهای موجود در ژن بانک، تفاوت و تشابهات ژنوم موجودات را مقایسه و بررسی می کنند.

هر پرونده موجود در این بانک شامل توصیف مختصری از توالی DNA ، نام و طبقه گونه مربوطه و جدولی از خصوصیات نواحی کد کننده پروتیین و سایر اطلاعات مهم زیست شناختی مربوط به DNA مورد نظر مانند نواحی رونویسی ، محل های رخداد جهش ها و یا تغییرات و تکرار توالی ها را بیان می کند. توالی پروتیینی مربوطه در جدول جداگانه ای آورده شده است. منابع علمی مربوط به همه توالی های DNA انتشار یافته بهمراه شماره اختصاصی آن در مدلاین نیز آورده شده است.بطور خلاصه اینکه، همه دانشجویان علاقمند به این رشته می بایست از اینترنت بطور مناسب و جامع استفاده کنند.

Refrences:

1- Human Molecular Genetics Third Edition, Tom Strachan and Andrew P.Read (2003). ISBN: 0815341822