

بررسی تغییرات بیان برخی ژن‌های هدف تغییرات اپی ژنتیکی در طی پیر شدن دستگاه عصبی مرکزی در دروزوفیلا ملانوگاستر

Investigation of expression level of few target genes for epigenetic modification during central nervous system aging in *Drosophila melanogaster*

محمد کیخا^۱، محمد حدادی^{*۱}

۱- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل،
زابل، ایران

Keikha M¹, Haddadi M^{*1}

1- Graduated MSc Student, Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of
Science, University of Zabol, Zabol, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.haddadi@uoz.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۱/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۱۸)

چکیده

افزایش سن با مرگ نورون‌ها همراه است و بیشتر بیماری‌های عصبی نظیر آلزایمر، پارکینسون و هانتینگتون نیز در سنین بالا اثرات بالینی خود را نشان می‌دهند. مرگ نورونی ناشی از فرایندهای دخیل در بیماری‌های عصبی و فرایند پیری شباهت‌های زیادی دارند. از این جمله استرس اکسیداتیو است که به عنوان یک عامل آسیب‌زننده سلولی موجب تخریب سلول‌های عصبی شده و در شرایط بیماری با ایجاد اکسیداسیون DNA موجب از دست رفتن نواحی هتروکروماتینه کروموزوم‌های سلول‌های عصبی و بیان بیش از نیاز برخی ژن‌ها شده که به تدریج مرگ نورونی را در پی خواهد داشت. بررسی مقایسه‌ای بیان برخی ژن‌های هدف این گونه تغییرات اپی ژنتیکی در طول فرایند پیر شدن با آنچه که در شرایط بیماری عصبی رخ می‌دهد حائز اهمیت‌های بالینی متعددی است. مگس سرکه (دروزوفیلا ملانوگاستر) به دلیل دارا بودن بیش از ۷۵ درصد ژن‌های بیماری‌زای انسانی و همین‌طور دستگاه عصبی مرکزی ساده مدل بسیار عالی برای چنین مطالعاتی است. در این مطالعه، وجود اختلاف در بیان برخی از ژن‌های تحت تنظیم اصلاحات اپی ژنتیکی ساختار کروماتین طی فرایند پیری در بافت مغز مگس‌های سرکه تیپ وحشی در دو گروه سنی ۴ روزه و ۴۰ روزه توسط تکنیک qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفته و با نتایج گزارش شده مطالعه همین گروه از ژن‌ها در مدل تائوپاتی مگس سرکه مقایسه شد. نتایج بیانگر کاهش بیان ژن‌های گروه دیگر از ژن‌ها شامل *CG15661*، *Ir41a*، *CG15115*، *Nvd* و *Uif* در گروه مگس‌های ۴۰ روزه بود در حالی که بیان *Gprk1* و *Ints3*، *Dscam1*، *CG40006* افزایش بیان همراه با افزایش سن را نشان دادند. سطح بیان ژن *Snap25* بدون تغییر مانده بود. این تغییرات بیان ژن‌ها متفاوت از تغییرات گزارش شده در مورد مدل تائوپاتی مگس سرکه بوده و بیانگر تفاوت مسیرهای تنظیمی اپی ژنتیکی دخیل در مرگ نورون‌ها در شرایط بیماری با روند پیری طبیعی دستگاه عصبی است.

واژه‌های کلیدی

پیری مغز

تائوپاتی

تنظیم‌های اپی ژنتیکی

مگس سرکه

پیری فرآیندی است که تقریباً در همه موجودات زنده اعم از تک سلولی و پر سلولی در دو سطح سلول و ارگانیسم رخ می‌دهد. (Stewart et al. 2005). در واقع، پیری یک فرایند عمومی، ذاتی، پیش‌رونده و آسیب‌رسان است که با تجمع تدریجی آسیب‌های مختلف و کاهش کارایی عملکردی و هموستاز در سلول‌ها و بافت‌ها، در طی زمان همراه است (Wheeler and Kim 2011). مکانیسم‌های مطرح در ایجاد پیری شامل تجمع آسیب‌های DNA، تولید زیاد رادیکال‌های آزاد، کوتاه شدن و اختلال در عملکرد تلومر، آپوپتوز، آتروفی سلول‌های بنیادی، جهش‌های سوماتیک، انحراف در مسیر هورمونی، اختلال در نظم سوخت‌وساز بدن، پیری سلول و تغییر نشانه گذاری‌های اپی‌ژنتیکی هستند (Moskalev et al. 2014). اپی‌ژنتیک به‌عنوان تغییرات رخ داده در ژنوم بدون هیچ تغییر اساسی در توالی DNA تعریف می‌شود. بخشی از این تغییرات ارثی هستند و به نسل‌های بعدی نیز منتقل می‌شوند (Bird 2007). تنظیم اپی‌ژنتیک بیان ژن، یکی از مکانیسم‌های حیاتی است که عدم تعادل مشاهده شده در بیان ژن در طول پیری را توضیح می‌دهد (Callaway 2014). افزایش سن به تدریج باعث اختلال در بیان ژن و در نتیجه اختلال در هموستاز و فعالیت‌های فیزیولوژیکی می‌شود (Cao et al. 2001). از سوی دیگر، همانند فرایند پیر شدن، بیماری‌های عصبی نیز در دهه‌های پایانی عمر انسان شدت یافته و علائم پاتولوژیک را بروز می‌دهند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که ناهنجاری‌های عصبی می‌توانند تغییرات نامناسب اپی‌ژنتیکی را در ساختار کروموزوم‌های سلول‌های عصبی ایجاد کرده و به این شکل آن‌ها را از بین ببرند. با اینکه تغییرات اپی‌ژنتیکی برای تکامل و تمایز ضروری هستند، آن‌ها همچنین می‌توانند در طول زندگی به‌وسیله مکانیسم‌های غیرتصادفی مانند پاسخ به استرس، تغییرات محیطی یا به‌واسطه خطاهای تصادفی رخ دهند. بنابراین نقش مهمی در روند پیری سلول خواهند داشت (Calvanese et al. 2009).

امروزه حیوانات مدل کاربرد فراوانی در شناسایی ژن‌های مؤثر و مکانیسم‌های ملکولی در ایجاد بیماری و مسیرهای درمانی دارند. در این میان مزایای استفاده از مگس سرکه برای مطالعه پیری به‌طور خاص شامل: طول عمر نسبتاً کوتاه (حدود ۳ ماه)، سهولت

نگهداری، امکان دستکاری محیطی و ژنتیکی آسان، تکنیک‌های ژنتیک مولکولی قدرتمند، دسترسی به توالی ژنوم کامل مگس سرکه و موفقیت اثبات شده در کالبد شکافی پدیده‌های زیستی پیچیده مانند تکوین می‌شود (Helfand and Rogina 2003). به‌علاوه، پیکر مگس سرکه بالغ به‌طور کامل از سلول‌های متفاوت پساتوزی (postmitotic) به‌وجود می‌آید و هیچ سلول دیگری به‌جز سلول‌های غدد جنسی و چند سلول در روده تقسیم نمی‌شود (Ito and Hotta 1992). این ویژگی امکان مناسبی برای مطالعات گسترده مربوط به پیری را فراهم می‌کند.

(Frost et al. 2014) نشان دادند که بیان نسخه جهش یافته ژن تائو انسانی در نورون‌های سیستم عصبی مرکزی مگس‌های سرکه با ایجاد استرس اکسیداتیو و القای اکسیداسیون DNA موجب کاهش سطح H3K9me2 و حذف عمومی نواحی هتروکروماتین (global chromatin relaxation) در ژنوم سلول‌های عصبی شده و بیان ژنی را دستخوش تغییر کرده است. این تیم پژوهشی با انجام بررسی‌های مولکولی تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با کاهش سطح H3K9me2 توانستند افزایش معناداری را در بیان گروه ژنی شامل Ago3, CG15115, CG15661, J41a, nvd و uif تایید و گزارش کنند. این ژن‌ها از دسته ژن‌های با بیان کم یا بدون بیان در مغز مگس سرکه دسته‌بندی شده‌اند (Celniker et al. 2009) و حذف کروماتین موجب افزایش بیان آن‌ها شده است. با این وجود، بیان ژن‌های CG40006, Dscam, Gprk1, IntS3 و Snap25 با حذف کروماتین تغییری نکرده است (Frost et al. 2014). این امر بیانگر تاثیر سمیت تائو بر ژن‌هایی است که بیان آن‌ها با فرایند هتروکروماتینه شدن کاهش می‌یابد.

مطالعه اجمالی در مورد خصوصیات ژن‌های مذکور، عملکرد مولکولی آن‌ها و همین‌طور زمان بیان حداکثرشان در طول مراحل متفاوت چرخه زندگی مگس‌های سرکه از طریق پایگاه داده‌های زیستی مربوط به مگس سرکه www.flybase.org انجام شد تا بتوان تغییرات بیان ناشی از افزایش سن را تفسیر نمود.

ژن *nvd* در *flybase* یک ژن کدکننده پروتئین در مگس سرکه است. دارای یک رونوشت (Transcript) و یک زنجیره پلی‌پپتیدی است. پروتئین Neverland دارای فعالیت اکسیژناسیون و همچنین فعالیت اکسیدوردوکتاز است و کلسترول را به 7-

رونویسی و پردازش snRNAهای کوچک هسته‌ای می‌باشد. ژن *Gprk1* در مگس سرکه کدکننده G پروتئین گیرنده کیناز ۱ است. بیشترین بیان آن در مراحل مختلف جنین طی مراحل ۰۰-۰۶ و ۱۲-۲۴ ساعت مشاهده شد. این ژن ارتوگ دو ژن انسانی به نام‌های *GRK2* (G protein-coupled receptor kinase 2) و *GRK3* (G protein-coupled receptor kinase 3) است که ژن *GRK2* کدکننده G پروتئین گیرنده کیناز ۲ و ژن *GRK3* کدکننده G پروتئین گیرنده کیناز ۳ است.

ژن *Dscam1* یک ژن کدکننده پروتئین در مگس سرکه است که دارای تنوع رونوشتی زیادی است. در واقع ۷۵ رونوشت و ۷۵ زنجیره پلی‌پپتیدی دارد و برای آن ۱۵۶ آلل گزارش شده است. بیشترین مقدار بیان در مراحل جنین در ساعت ۰۰-۰۶ ساعت مشاهده شد. پروتئین آن عضو سوپر خانواده Immunoglobulin است. پروتئین‌های خانواده پروتئین‌های ایمونوگلوبولین Transmembrane Dscam (مولکول چسبندگی سلول سندرم داون) که در اتصال، انقباض و چسبندگی نقش دارند. (Dscam Down syndrome cell-adhesion molecule) این ژن دارای ۲۳ ارتولوگ انسانی است که مهم‌ترین آن‌ها *DSCAM* و *DSCAML1* هستند. ژن *Snap25* در مگس سرکه روی کروموزوم شماره ۳ (3L) در ناحیه ۲۴،۰۷۴،۱۸۰ تا ۲۴،۲۹۹،۲۰۵ به طول ۲۲۵/۰۳ kb قرار دارد. ژن *snap25* با نماد *Dmel\Snap25* (CG40452, FBgn0011288) یک ژن کدکننده پروتئین است. دارای ۲ رونوشت و ۲ زنجیره پلی‌پپتیدی است. بیشترین بیان این ژن در مراحل پس از بلوغ مشاهده شده است. پروتئین آن از خانواده SNAP (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein) می‌باشد که از پروتئین‌های غشایی متصل به سیتوپلاسم هستند و در حمل و نقل و زیکول و ترشح انتقال دهنده‌های عصبی و آغاز فعالیت سیناپسی نقش دارند. این ژن دارای دو ارتولوگ انسانی به نام‌های *SNAP23* و *SNAP25* است.

بنابراین ما نیز در پژوهش پیش‌رو برآن شدیم تا با بررسی و مقایسه میزان بیان ژن‌های هدف این اصلاحات اپی‌ژنتیکی در مگس‌های وحشی جوان (۴ روزه) و پیر (۴۰ روزه) به چشم‌اندازی روشن‌تر در مورد ارتباط ناهنجاری‌های آسیب‌زننده

dehydrocholesterol تبدیل می‌کند. بیشترین بیان این ژن در مراحل مختلف جنین‌زایی، در طول دوره لارو، در دوره شفیره، در مراحل بالغ حشره ماده مشاهده شده است. ژن *Uif* دارای ۶ رونوشت است کدکننده پروتئین عبوری غشا در سلول‌های اپی‌تلیال است و حداکثر بیان آن در سه مرحله لاروی و همین‌طور دوره شفیرگیست. ژن *CG15115* یک ژن کدکننده پروتئین است و دارای یک رونوشت و یک زنجیره پلی‌پپتیدی است. برای آن ۳ آلل گزارش شده است. بیشترین بیان در مراحل پایانی لارو، در مراحل اولیه بلوغ مشاهده شد. تا کنون عملکرد و نقش بیولوژیک این ژن شناخته نشده است.

ژن *Ir41a* در مگس سرکه با نماد *Dmel\Ir41a* نام‌گذاری شده است. این ژن کدکننده گیرنده یونوتروپیک (Ionotropic Receptors) است. گیرنده‌های یونوتروپیک بیان شده در نورون‌های حسی به‌طور عمده به‌عنوان کانال‌های یونی عمل می‌کنند. این گیرنده‌ها یک زیرخانواده‌ی گیرنده‌ی گلوتمات یونوتروپیک هستند که گلوتمات را درگیر نمی‌کنند. حداکثر بیان این ژن در طی مراحل جنینی ۱۲-۲۴ ساعته در طول دوره لارو و در مراحل بعد از لارو مشاهده شده است. پروتئین ژن *CG15661* از خانواده UDP-glycosyltransferase family هستند. در انتقال غلظت‌های گلیکوزیل از قندهای نوکلئوتیدی فعال به انواع مختلف مولکول‌های پذیرنده هیدروفوب (aglycones) دخالت دارند. این فرایند نقش مهمی در سم‌زدایی، تشکیل کوتیکول، رنگ‌دانه و التهاب دارد. بیان در مراحل اولیه لاروی، در مراحل بعد از تولد، در مراحل رشد بزرگسالان هر دو جنس مشاهده شد. این ژن دارای ۲۲ ارتولوگ انسانی از جمله *UGT1A1* می‌باشد.

ژن *CG40006* دارای یک رونوشت و یک زنجیره پلی‌پپتیدی است. بیشترین بیان ژن در مراحل بعد از بلوغ مشاهده شده است. پروتئین آن از خانواده CD36 است. عملکرد مولکولی آن ناشناخته است. فرآیندهای زیست‌شناختی که درگیر آن هستند نیز شناخته شده نیستند.

ژن *IntS3* (*Integrator 3*) یک ژن کدکننده پروتئین در مگس سرکه است. یک رونوشت دارد و بیشترین میزان بیان ژن در مراحل بعد از تولد مشاهده شده است. پروتئین آن زیرواحد complex integrator 3 است که یک کمپلکس درگیر در

مواد و روش‌ها

سلولی و فرایند پیرشدن نوروها با تکیه بر مفهوم اپی ژنتیک برسیم.

در این مطالعه از مگس‌های وحشی Oregon K استفاده شد. مگس‌ها از آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه زابل تهیه شدند. بر اساس روش توضیح داده شده قبلی (Haddadi et al. 2014) تعداد ۵۰ مگس سرکه نر و ماده بالغ به محیط کشت تازه منتقل شده تا تخم‌ریزی کنند. پس از گذشت ۲ ساعت مگس‌ها را از محیط کشت خارج کرده و با انتقال محیط کشت به انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اجازه می‌دهیم تا تخم‌ها مراحل چرخه زندگی را طی کنند. با خروج اولین مگس‌های بالغ از سفیره مرحله جمع‌آوری آن‌ها آغاز می‌شود. حشرات بالغ جمع‌آوری شده در هر روز به ویال‌های محیط کشت جدید منتقل شده و تاریخ جمع‌آوری یادداشت می‌شود. این مگس‌ها هر پنج روز به محیط کشت جدید منتقل شده تا به سن مطلوب (۴ یا ۴۰ روز) برسند.

برای استخراج RNA ۵۰-۴۰ عدد مگس از هر گروه سنی را بیهوش کرده و سر آن‌ها را جدا شد. سرها را داخل میکروتیوب ریخته و توسط ازلت مایع منجمد نموده و با استفاده از محلول Trizol استخراج RNA به روش دستی انجام شد (Haddadi et al. 2013). در نهایت نمونه‌های RNA استخراج شده با ۳۰-۵۰ میکرولیتر آب RNaseFree مخلوط شده و بلافاصله به فریزر -۸۰ منتقل شد.

کیفیت RNA استخراج شده توسط ژل الکتروفورز بررسی شد. باید توجه داشت که ماهیت کلی و ساختار RNAهای ریبوزومی در حشرات و مگس سرکه متفاوت از پستانداران و انسان است. جز 28s حشرات از دو قسمت مجزا تشکیل شده است که توسط پیوند هیدروژنی به هم وصل شده است. این اتصالات هیدروژنی در طی الکتروفورز بروی ژل می‌تواند بسته به شرایط الکتروفورز از بین رفته و حالت اسمیرمانندی بروی ژل دیده شود. بنابراین امکان مشاهده باند تک و متمایز در برخی نمونه‌ها وجود ندارد. جهت بررسی کمی RNA استخراج شده و تعیین غلظت نمونه‌ها از دستگاه اسپکتروفتومتر (نانودراپ ۲۰۰۰) استفاده شد. رشته

مکمل یا cDNA با استفاده از RNA استخراج شده به‌عنوان رشته الگو توسط آنزیم ترانس کریپتاز معکوس ساخته شد. در طی این واکنش پرایمرها با ایجاد انتهای کریوکسیلی آزاد سبب تکثیر رشته مکمل DNA می‌شوند. از کیت سنتز cDNA شرکت کیژن جهت سنتز رشته مکمل با بهره‌گیری از پرایمرهای غیر اختصاصی استفاده شد.

جهت طراحی پرایمرها در مگس سرکه از پایگاه اطلاعاتی FlyPrimerBank استفاده شد. پرایمرهای مناسب توسط برنامه آنالیز Primer3 طراحی شدند. پس از طراحی، پرایمرها از نظر میزان self-dimer، درصد CG، تشکیل لوپ و Hetero-dimer در برنامه Oligo Analyzer از سایت www.idtdna.com چک شدند. با استفاده از این پایگاه اطلاعاتی پرایمرها برای ژن‌های مورد نظر و ژن *Rp49* (کدکننده یک پروتئین ریبوزومی در مگس سرکه) به‌عنوان ژن رفرنس طراحی شد و توالی هر پرایمر در جدول ۱ ارائه شده است.

در واکنش Real Time PCR، از سایبرگرین برای ردیابی محصولات واکنش استفاده شد. حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. مواد استفاده شده و مقادیر آن‌ها در جدول ۲ ذکر شده است. واکنش‌ها در دستگاه Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR طبق برنامه جدول ۳ انجام شد. به‌منظور حصول اطمینان از تکثیر اختصاصی ناحیه هدف، منحنی ذوب محصولات در انتهای واکنش توسط دستگاه در دمای ۹۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد رسم شد.

برای آنالیز داده‌ها از روش مقایسه نسبی استفاده شد و میزان بیان ژن *rp49* به‌عنوان کنترل داخلی لحاظ شد. تفاوت نسبی در میزان بیان ژن در نمونه‌های مورد بررسی با نمونه کنترل از طریق فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. با استفاده از فرمول‌های فوق، بیان ژن مورد نظر در نمونه‌های مورد بررسی و کنترل داخلی به‌دست آمده و با هم مقایسه می‌شوند (Livak and Schmittgen 2001). با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism v.8.1 ابتدا با انجام تست Shapiro-Wilk توزیع نرمال داده‌ها تایید شد (سطح معنی‌داری بیشتر از ۰/۰۵) سپس آزمون ANOVA یک طرفه برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها استفاده شد. حداقل سطح معنی‌داری ۰/۰۵ لحاظ شد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای بررسی بیان ژن‌های مورد نظر در مگس سرکه

طول محصول (bp)	دما ی ذوب	توالی پرایمر	نوع پرایمر	نام ژن
۱۴۷	۵۹/۲	CATTGGAAAGCGAGGTGGTC	رفت	Nvd
	۵۸/۸۴	GCACACGATTGATGGTCCAA	برگشت	
۱۴۳	۵۷/۹۸	AACTCTTCAGATCCCTCAACAATTA	رفت	CG15115
	۵۹/۸۹	ACCTGTTTCGCACATCCAGT	برگشت	
۲۰۰	۵۹/۹	CGCTTGCATTTCACCGATT	رفت	Ir41a
	۶۰/۱۱	GCAAAGTGACCGAATGGCAG	برگشت	
۱۵۴	۵۹/۷۱	CCTTCGCCATCTCATCGATTATTAC	رفت	CG15661
	۵۹/۳۱	TGTTCCAGTCAGAAGGAGGC	برگشت	
۱۵۵	۶۰	ATCTGGGTTGAGCACAGACG	رفت	CG40006
	۶۰/۱۱	GTTTGCCTTGGATTGGCTCG	برگشت	
۹۴	۶۱/۳۵	GCGAGGTACAGTCATAAGCATGG	رفت	Dscam1
	۵۹/۶۶	GGCCTTGGTAGGGTCCATTT	برگشت	
۱۷۰	۵۹/۷۵	AAGTCAGAATGCCAGCGGAT	رفت	Snap25
	۶۰/۳۴	AAGTGTTTGAATCCCTGCCTC	برگشت	
۱۱۳	۶۰	ACGCCTTTAGATGGAACAGCA	رفت	IntS3
	۵۸/۶۵	ACGAACGCTCGAATTTCTCC	برگشت	
۱۹۸	۵۹/۷۷	CGAACCCGAAGTCTAGACAAGT	رفت	Uif
	۵۸/۶۳	GCGCAGTTCCCAACCATT	برگشت	
۹۴	۶۱/۳۵	GCGAGGTACAGTCATAAGCATGG	رفت	Gprk1
	۵۹/۶۶	GGCCTTGGTAGGGTCCATTT	برگشت	
۱۰۷	۵۶	ATGCTAAGCTGTGCGACAAATC	رفت	Rp49
	۵۴/۶	GTTCGATCCGTAACCGATGT	برگشت	

جدول ۲- مواد و مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش qRT PCR

ماده	حجم (میکرولیتر)
Syber Green II	۱۰
ROX	۰/۰۲
Primer Forward	۰/۲
Primer Reverse	۰/۲
dH2O	۷/۸

جدول ۳- شرایط واکنش PCR

زمان	دما (درجه سانتی گراد)	مرحله	تعداد سیکل
۱۰ دقیقه	۹۵	واششت سازی اولیه	۱
۱۵ ثانیه	۹۵	واششت سازی	
۱ دقیقه	۶۰	اتصال پرایمرها	۳۵
۳۰ ثانیه	۷۲	گسترش	
۱۰ دقیقه	۷۲	گسترش نهایی	۱

نتایج و بحث

با توجه به نمودارهای تکثیر ژن و نتایج حاصل از آنالیز داده‌های qReal-time PCR در نمونه‌های ۴ روزه و مقایسه آن‌ها با مگس‌های ۴۰ روزه، تغییرات میزان بیان ژن‌های هدف در سه

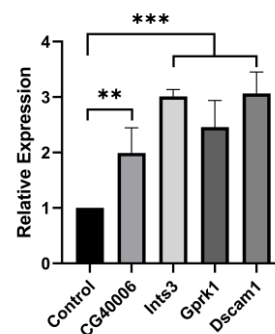
گروه دسته‌بندی شدند. دسته نخست ژن‌هایی‌اند که با افزایش سن مگس‌های سرکه، بیان آن‌ها در دستگاه عصبی مرکزی کاهش یافته بود. دسته دیگر شامل ژن‌هایی است که افزایش سن موجب افزایش بیان‌شان شده است و دسته سوم تغییر بیان معنی‌داری را در دو گروه سنی نشان نمی‌دهد.

در میان ژن‌هایی که با افزایش سن، کاهش بیان داشتند، ژن CG15115 بیشترین میزان کاهش را داشته و تقریباً به صفر رسیده است. کاهش بیان ژن uif در رتبه دوم است. بیان ژن‌های Ira41a و CG15661 به نصف کاهش پیدا کرده در حالی‌که ژن nvd به میزان ۲۵ درصد نسبت به گروه ۴ روزه کاهش یافته و در واقع کمترین کاهش بیان را نشان می‌دهد (شکل ۱). در گروه دوم ژن‌ها که با پیر شدن مگس‌ها بیان‌شان افزایش یافته است، ژن‌های Dscam1 و Gprk1 افزایش سه برابری در بیان را نسبت به گروه کنترل نشان دادند در حالی‌که ژن‌های Gprk1 و CG40006 به میزان دو برابر افزایش یافته‌اند (شکل ۲).

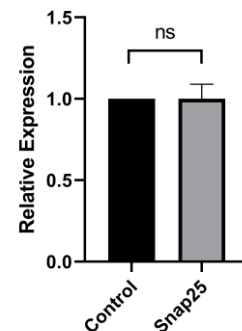
ژن *Snap25* تنها عضو گروه سوم است که تفاوت بیانی را در میان گروه ۴ روزه و ۴۰ روزه مگس‌های سرکه نشان نمی‌دهد (شکل ۳).

نتیجه‌گیری کلی

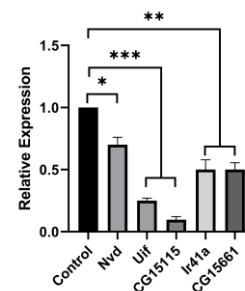
پیری حاصل تخریب تدریجی ساختارهای سلولی و اختلالات عملکردی آن‌هاست که به مرور موجب مرگ موجودات زنده می‌شود. سیستم عصبی جانوران، هومئوستازی و سازگاری موجود را در پاسخ به تغییرات محیطی تنظیم می‌کند. بنابراین اختلال در فرایندهای عصبی می‌تواند روند پیری را سرعت ببخشد (Omelyanchuk et al. 2015). همان‌طور که پیشتر گفته شد بیان نسخه جهش‌یافته ژن تائو انسانی در دستگاه عصبی مرکزی مگس سرکه در طی مدل‌سازی بیماری آلزایمر (تائوپاتی) باعث تغییر بیان ژن‌ها در این ارگانیسم می‌شود که این تغییرات به دلیل تغییر در الگوهای اپی‌ژنتیکی ناشی از حذف برخی نواحی هتروکروماتینه ژنوم است (Frost et al. 2014). در این تحقیق بر آن شدیم تا تاثیر افزایش سن بر روی میزان بیان این ژن‌ها را مورد بررسی قرار دهیم چرا که مگس سرکه یک مدل ایده آل برای مطالعات مربوط به پیری و ناهنجاری‌های عصبی است (Haddadi 2018). میزان بیان ۱۰ ژن در مگس سرکه شامل *CG40006*, *Dscam*, *Gprk1*, *Ints3*, *Snap25*, *CG15115*, *CG15661*, *Ir41a*, *nvd*, *uif* در دو گروه سنی ۴ روز و ۴۰ روز بررسی شد. میزان بیان این ژن‌ها در طی مدل‌سازی بیماری آلزایمر (تائوپاتی) نیز دستخوش تغییر می‌شود. با توجه به نتایج حاصل از آزمایشات انجام شده و سنجش بیان ژن‌های مورد نظر سه حالت مشاهده شد. حالت اول: ژن‌هایی که با افزایش سن، بیان آن‌ها نیز افزایش پیدا کرد که شامل ژن‌های *CG40006*, *Dscam1*, *Ints3* و *Gprk1* می‌باشد. افزایش بیان این ژن‌ها باعث کاهش متابولیسم و فعالیت سلولی می‌شود و موجود زنده را به سمت پیر شدن پیش می‌برد. درواقع می‌توان افزایش در بیان این گروه از ژن‌ها را به عنوان کاهش‌دهنده طول عمر از طریق شتاب روند پیری معرفی کرد. حاصل این تغییر بیان، کاهش فعالیت‌های متابولیکی و سیگنالی و افزایش تجمع آسیب‌ها درون سلول‌ها می‌باشد که در نهایت موجب بروز پیری می‌شود. حالت دوم: ژن‌هایی که با افزایش سن، بیان آن‌ها کاهش پیدا کرد که شامل ژن‌های *Nvd*, *CG15115*



شکل ۱- نتایج بررسی ژن‌هایی که با افزایش سن کاهش بیان داشتند. مقایسه بیان نسبی ژن‌های *Uif*, *Nvd*, *CG15115*, *Ir41a* و *CG15661* در بافت مغزی مگس‌های ۴۰ روزه با مگس‌های ۴ روزه (کنترل) بیانگر کاهش معنادار سطح بیان آن‌ها بود. بیشترین کاهش مربوط به ژن‌های *Uif* و *CG15115* است. *، **، *** به ترتیب نشانگر تفاوت معنادار در سطح ۰/۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ است.



شکل ۲- بررسی ژن‌هایی که با افزایش سن افزایش بیان داشتند. بیان نسبی ژن‌های *CG40006*, *Ints3*, *Gprk1* و *Dscam1* در بافت مغزی مگس‌های ۴۰ روزه در مقایسه با مگس‌های ۴ روزه (کنترل) بیانگر افزایش معنادار سطح بیان آن‌ها بود. بیشترین افزایش بیان مربوط به ژن‌های *Ints3* و *Dscam1* است. *، **، *** به ترتیب نشانگر تفاوت معنادار در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ است.



شکل ۳- نتایج بررسی ژن‌هایی که با افزایش سن تفاوت بیان نداشتند. بیان نسبی ژن *Snap25* در بافت دستگاه عصبی مرکزی مگس‌های ۴۰ روزه در مقایسه با مگس‌های ۴ روزه (کنترل) تفاوت معناداری ندارد.

از پیری با آنچه که در بیماری‌های عصبی رخ می‌دهد باشد. نکته جالب توجه اینجاست که ژن‌هایی که کاهش بیان نشان داده‌اند مانند ژن *Nvd*، در متابولیسم سلولی و ژن *CG15661* در انتقال پیام عصبی در نورون‌ها نقش دارند. از طرف دیگر، با افزایش سن، افزایش بیان در ژن‌هایی نظیر *IntS3* که در رونویسی و پردازش snRNAهای هسته‌ای نقش دارند، باعث مهار بیان ژن‌ها می‌شود. با توجه به این که متابولیسم و سیگنالینگ نوری دو فرآیند مهم بیولوژیکی هستند که تحت تاثیر پیری قرار می‌گیرند، بنابراین بررسی توام تأثیر این دو عامل بر روی طول عمر مگس سرکه می‌تواند از جمله اهداف تحقیقات آینده باشند.

Uif و *CG15661* و *Ir41a* می‌باشد. پیش‌بینی می‌شود کاهش بیان این ژن‌ها سبب ایجاد تغییرات نامطلوب در سلول‌ها و پیشروی روند پیری در مگس سرکه شود. حالت سوم: ژن *Snap25* که با افزایش سن تغییر چندانی در بیان آن مشاهده نشد. این موضوع می‌تواند به علت بی‌اثر بودن تغییرات اپی‌ژنتیکی حاصل از فرایند پیرشدن روی این ژن یا خطای آزمایشگاهی در هنگام بررسی بیان آن باشد. این نتایج نشان می‌دهد که با افزایش سن، بیان این ژن‌ها دچار تغییرات می‌شود که این تغییرات با آنچه که در مدل‌های تائوپاتی مگس سرکه مشاهده شده است کاملاً متفاوت است. این امر می‌تواند به دلیل تغییرات متفاوت در الگوهای اپی‌ژنتیکی ناشی

منابع

Stewart EJ, Madden R, Paul G and Taddei F (2005) Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PLoS biology* 3: e45.
Wheeler HE and Kim SK (2011) Genetics and genomics of human ageing. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 366: 43-50.
Moskalev A, Aliper A, Smit-McBride Z, Buzdin A and Zhavoronkov A (2014) Genetics and epigenetics of aging and longevity. *Cell Cycle* 13: 1063-1077.
Bird A (2007) Perceptions of epigenetics. *Nature* 447:396.
Callaway E (2014) Epigenomics starts to make its mark. *Nature News* 508: 22.
Cao SX, Dhahbi JM, Mote PL and Spindler SR (2001) Genomic profiling of short-and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 10630-10635.
Calvanese V, Lara E, Kahn A and Fraga MF (2009) The role of epigenetics in aging and age-related diseases. *Ageing research reviews* 8: 268-276.
Helfand SL and Rogina B (2003) Genetics of aging in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Annual review of genetics* 37: 329-348.
Ito K and Hotta Y (1992) Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology* 149: 134-148.

Frost B, Hemberg M, Lewis J and Feany MB (2014) Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation. *Nature neuroscience* 17: 357-366.
Haddadi M, Jahromi SR, Sagar BC, Patil RK, Shivanandappa T and Ramesh SR (2014) Brain aging, memory impairment and oxidative stress: a study in *Drosophila melanogaster*. *Behavioural brain research* 259: 60-69.
Celniker SE, Dillon LA, Gerstein MB, Gunsalus KC, Henikoff S, Karpen GH, Micklem G (2009) Unlocking the secrets of the genome. *Nature* 459: 927-930.
Haddadi M, Jahromi SR, Shivanandappa T and Ramesh SR (2013) *Decalepis hamiltonii* root extract attenuates the age-related decline in the cognitive function in *Drosophila melanogaster*. *Behavioural brain research* 249: 8-14.
Omelyanchuk LV, Shaposhnikov MV and Moskalev AA (2015) *Drosophila* nervous system as a target of aging and anti-aging interventions. *Frontiers in genetics* 6: 89.
Haddadi M (2018) *Drosophila melanogaster* as a Model to Study Human Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Basic Science in Medicine* 3: 9-12.