شبكة المعلومات الجامعية

بسم الله الرحمن الرحيم

شبكة المعلومات الجامعية

شبكة المعلومات الجامعية

التوثيق الالكتروني والميكروفيلم

شبكة المعلومات الجامعية

جامعة عين شمس

التوثيق الإلكتروني والميكروفيلم

قسم

نقسم باللّه العظيم أن المادة التي تم توثيقها وتسجيلها
علي هذه الأقراص المدمجة قد أعدت دون أية تغيرات

يجب أن

تحفظ هذه الأقراص المدمجة بعيدا عن الغبار

شبكة المعلومات الجامعية

بعض الوثائق الأصلية تالفة

شبكة المعلومات الجامعية

بالرسالة صفحات
لم ترد بالأصل

A Genotyping and Posttranscriptional regulatory Genetic Study Of The Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 *(CTLA4)* Gene Associated With Type 1 Diabetes Disease In EGYPT

By

Hatem Mohamed Saleh

Under Supervision

Prof. Bahia Ryiad (Cairo University – Egypt)

Prof Mohamed Sayed Salama (AinShames Univesity- Egypt)

Department of Biochemistry

Faculty of Science

Cairo University

2010

Degree of Doctor of Philosophy in Biochemitry - Genetics

PhD Thesis

Cairo University

Faculty of Science

Chemistry Department

A Genotyping and Posttranscriptional Regulatory Mechanism study of The Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 *(CTLA4)* Gene Associated with Type 1 Diabetes Disease in EGYPT

Ph.D Thesis

Hatem Mohmed Saleh

A dissertation submitted in partial fulfilment of the requirements of Cairo University -Egypt for the degree of Doctor of philosophy in Biochemistry

Under Supervision

1- Prof.Dr. Bahia Riad Abdou
Professor of Organic Chemistry
Chemistry Department
Faculty of Science
Cairo University

2- Prof.Dr. Mohamed Sayed Salama
Professor of Molecular Biology
Biochemistry Department
Dean of the Faculty of Science
Ainshams University

Faculty of Science
Cairo University
Egypt

2010

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to thank…….

My supervisors Prof. *Bahia Riad* (Professor of Organic Chemistry)- Faculty of Science- Cairo university and Prof. *Mohamed Sayed Salama* .Professor of Molecular Biology - Dean of faculty of science - Ainshams university – for their emotional enthusiasm which has been invaluable throughout the project and during the writing of the thesis.

DAAD Organization office in Cairo, Prof. *Ingo Hansmann* , Prof. and Prof. *Monika Hagmann* , first to invite me to join their lab and to work on unconventional topics during my time there. It has been a great learning experience, second for giving me the opportunity to perform this research project by my hands in their lab at *Halle/Wittenberg* University- *Humangenetik und Medizinische Biologie* Institute - Germany. Their constant supportive cooperation and guidance have been invaluable throughout the genotyping research and during my stay in Germany in 2006.

Prof. *Cisca Wijmenga* and Prof. *B.C. Kolemann* – Utrecht university – The Netherlands, They were a constant support, answering questions and helping solve technical problems throughout the entire project.

I direct my special thanks and I am so grateful for the great efforts done by the eminent Prof..Dr. *Constantin Polychronakos*- McGill University – Canada for his continuing help and his sincere help to write my thesis and publish the papers . I own to him and his marvellous effort done to make the fruitful cooperation in writing the thesis.

The members of the Third world Association for Science (TWAS) and Chinese Academy of Science (CAS) who have given me support and have provided such a great chance to conduct my research of PhD thesis in new trend of research in China 2007.

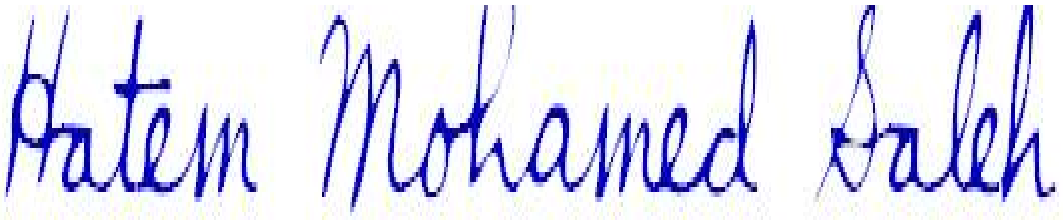
Members of the Shanghai Institute of Biological Sciences – Pharmacogenomics Lab of Prof. Wei Jun Ma who provided the HEK293, Jurkat cell lines and luciferase reporter gene used in this study.

I would like to dedicate this thesis to my family who have supported me throughout my time at university inside or aboard Egypt.

Hatem Mohamed Saleh Thesis 2010

All my love and thanks to my family specially my Parents, in the loving memory of my Mom, my father , my brother and twin sisters , for their support and encouragements to take the challenge to let me discuss this thesis, even if it meant having a death separated between us! My greetings to you my father even though you are now dead and I could not be with you when you died but your inspiration and your love surrounding me and I know how much you are proud of me and how your emotions to see me with my PhD degree, God bless your soul and wishing meet you soon!

Hatem Mohamed Saleh



2009

Summary

Name: Hatem Mohamed Saleh Mohamed Saleh
Nationality: Egyptian
Date and Place of brith: 20/10/1971 Cairo
Degree: Ph.D
Specilaization : Biochemistry – Human Genetics

Supervisior: 1- Prof.Dr. Bahia Riad abdou

2- Prof.Dr. Mohamed Sayed Salama.

Title of thesis: A Genotyping and Posttranscriptional Regulatory Mechanism Study of the Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 *(CTLA4)* Gene Associated With Type 1 Diabetes Disease in EGYPT.

Summary: Type 1 diabetes (T1D) is an organ-specific autoimmune disease characterized by T cell-mediated destruction of pancreatic islets. T cell proliferation is negatively regulated by cytotoxic lymphocyte antigen-4 (CTLA-4). CTLA-4 polymorphisms are associated with T1D in some but not all populations. We investigated the prevalence of the selected single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the entire CTLA-4 gene sequence and di-nucleotide repeats polymorphism $(AT)_n$ of 3'UTR region in the *CTLA4* gene with the 396 Egyptian patients ≤ 14 years old and 396 control subjects >24 years old, with a similar ratio of males to females in both groups. Genotyping study was performed using single strand conformation polymorphism (SSCP), polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), Genescan, DNA sequencing techniques and haplotype analysis on the selected SNPs was performed. Moreover, we investigated the role of the $(AT)_n$ of 3' UTR on CTLA4 expression, mRNA stability and protein expression via Real time PCR , Western blotting and Luciferase reporter gene assays. The final goal was to contribute to the understanding of the mechanisms that negatively regulate T cell activation by CTLA4 gene and contribute to the development of T1D disease among Egyptian population.

ملخص الرسالة باللغة العربية

الاسم: حاتم محمد صالح محمد الجنسية: مصرى
تاريخ وجهة الميلاد: 1971/10/20 –القاهرة
الدرجة:الدكتوراة
التخصص: كيمياء حيوية التخصص الدقيق:الوراثة البشرية
المشرفون:(1)أ.د/ بهية رياض عبده التوقيع:
(2)أ.د/ محمد سيد سلامة التوقيع:

عنوان الرسالة: دراسة الطفرات الوراثية وميكانيزم ما بعد النسخ للحمض الريبوزى النووى لجين (ستأل أيه 4)المصاحب لمرض السكر النوع الاول فى مصر.

ملخص الرسالة:

يعد مرض السكر النوع الأول مرضاً عضوياً مناعياً مزمناً نتيجة مهاجمة خلايا"تى"المناعية للبنكرياس فى الجسم.ولقد وجد أن جين(سى تى ال أيه 4)هو المتحكم سلبياً فى عمل خلايا" تى" المناعية عن طريق تثبيطها بعد أداء مهمتها المناعية.لقد أجريت العديد من الدراسات لهذا الجين على الشعوب والاعراق المختلفة المصابة بالمرض فوجد أن الطفرات الوراثية لهذا الجين تكون سبب لحدوث المرض ومصاحبة لشيوع مرض السكر النوع الأول، بينماهناك العديد من الدراسات على نفس النسق من شعوب واعراق مختلفة تناقض الامر وتنفى حدوثه نهائياً.كان لزاماً إجراء دراسة على هذا الجين فى الشعب المصرى عن طريق:- أولاً:دراسة معدل ذيوع انتشار بعض الطفرات الجينية الاحادية المختارة بعناية على كامل التتابع الجينى للجين مع الطفرة ثنائية التتابع المتكررة فى منطقة 3'غير منسوخة جينياً من الحمض النووى على فئة من المرضى المصابيين بالمرض من المصريين أعمارهم 14؟عاماً فى مقابل فئة من الاصحاء المصريين اعمارهم 24 ؟عاماً بنفس معدلات المقارنة الاحصائية للجنس بحيث يتساوى عدد الذكور والاناث(1:1)وقد استخدم تقنيات الوراثة مثل الرحلان الكهربى للتغير الفراغى للشق الوراثى أحادى التركيب وطريقة القطع بالإنزيمات محددة القواطع الجينية والماسح الجينلتكرارات التتابع الجينى والمقياس الرباعى للتتابع الجينى للحمض النووى منزوع الأوكسجين مع الطرق الاحصائية لبيان مدى ارتباط الطفرات الجينية.

ثانياً لقد تم دراسة تأثير منطقة التتابع الثنائى المتكرر فى منطقة 3'غير منسوخة من الجين على كل من التعبير الجينى والبروتينى ومدى ثبات الحمض الريبوزى النووى المستنسخ من الجين محل الدراسة بأستخدام تقنيات متطورة مثل التفاعل البوليمرزى التسلسلى ذو القياس اللحظى ، وطريقة نموذج نقط ويستيرن للبروتين، إختبار الجين المعيارى الضوئى اللوسيفيرزى.ولقد ساعدت نتائج البحث على فهم وتفسير ميكانزمات التحكم فى خلايا"تى"المناعية بواسطة الجين محور الدراسة فى كيفية حدوث مرض السكر النوع الأول فى الشعب المصرى..

ABBREVIATIONS

AITD: Autoimmune Thyroid Disease
AH: Autoimmune Hypothyroidism
APC: Antigen Presenting Cell
ARE: AU-rich element
ASPs: Affected Sibling Pairs
BAC: Bacterial Artificial Chromosome
CHIP: Chromatin Immunoprecipitation
CMV: Cytomegalovirus
CTLA4: Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
DC: Dendritic Cell
EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay
ER: Endoplasmic Reticulum
ERK: Extra-cellular-signal-regulated kinase
EST: Expressed Sequence Tag
FBAT: Family-based association test
FP: Fluorescence Polarization
GD: Graves' disease
HBAT: haplotype-Based association test
HLA: Human Leukocyte Antigen
HMG: High-Mobility Group
HtSNPs: Haplotype Tag SNPs
ICOS: Inducible Co-stimulator
IFN-y: Interferon-gamma
Ig: Immunoglobulin
IL-2: Interleukin-2
INS: Insulin
LD: Linkage Disequilibrium
LEF1: Lymphocyte Enhancer Factor-1
MHC: Multi-HistoCompatibility
MS: Multiple Sclerosis
NOD: Non-Obese Diabetic
PBMCs': Peripheral Blood Mononuclear cells
PCR: Polymerase Chain Reaction
PFA: Paraformaldehyde
PHA: Phytohemagglutinin
PMA: Phorbol Myristate Acetate
RT: Reverse Transcriptase
rRNA:ribosomal RNA
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEM: Standard Error of the Mean
SLE: Systemic Lupus Erythematosus
SNP: Single nucleotide polymorphism
SNuPe: Single Nucleotide Primer Extension
SP: Signal Peptide
SPP: Signal peptide peptidase
SRP: Signal recognition particle
T1D: Type 1 Diabetes
T2D:Type 2 Diabetes
TCF1: T-cell Factor
TCR: T-cell receptor
TDT: Transmission Disequilibrium Test
TNF-a: Tumor Necrosis factor-alpha
TNF: Tumor Necrosis Factor
Treg's: Regulatory T cells,
VNTR: Variable Number of Tandem Repeats
18S rRNA:18 Svedbergs ribosomal RNA subunit

CONTENTS

Hatem Mohamed Saleh Thesis 2010

List of Figures