یک جهش نقطه‌ای جدید در ژن ترانسفر RNA سرین (UCN) میتوکندریائی در یک بیمار مبتلا به کاردیومایوپاتی

سیدکاظم بیدکی Ph.D*، لورنس بیندوف Ph.D**، مارگارت جانسون Ph.D***، رابرت لایت اولرز Ph.D***

* دانشگاه تربیت مدرس ـ دانشکدهٔ علوم پایه ـ بخش ژنتیک

** نروژ ـ برگن ـ بیمارستان هاکلند ـ بخش عصب‌شناسی

*** انگلستان ـ دانشگاه نیوکاسل ـ دانشکده پزشکی ـ بخش عصب‌شناسی

* آدرس مکاتبه: تهران ـ دانشگاه تربیت مدرس ـ دانشکده علوم پایه ـ گروه ژنتیک

چکیده

* **هدف:** بررسی وجود جهش‌های نقطه‌ای در ژنهای ترانسفر RNA(tRNA) در بیماری ۳۰ ساله با علائم بالینی، بیوشیمیائی و هیستوشیمیائی ویژه بیماریهای میتوکندریائی و فاقد هرگونه اختلال حذفی و یا اضافی در DNA میتوکندری(mtDNA).

* **نوع مطالعه:** تجربی ـ کاربردی

* **مواد و روشها:** تکنیکهای ژنتیک مولکولی شامل PCR، RFLP، DNA Sequencing و ....

* **یافته‌ها:** در این بیمار که مبتلا به ضعف عضلانی و کاردیومایوپاتی بود، جهش جدیدی در mtDNA روی ژن کدکننده ترانسفر RNA سرین (UCN) شناسایی شد. این جهش هتروپلاسمیک، به صورت جایگزینی باز آلی C به جای T در موقعیت ۷۴۸۰ که در لوپ آنتی‌کدون tRNA که از نظر تکاملی بسیار پایدار می‌باشد، اتفاق افتاده است. این جهش در هیچکدام از افراد کنترل مشاهده نشد. بررسی mtDNA بدست آمده از سلولهای خونی و عضلانی نشان داد که این جهش در هر دو بافت مزبور وجود دارد. مقدار mtDNA جهش یافته در عضله و گلبولهای سفید خون اندازه‌گیری و مشخص شد که میزان هتروپلاسمی در این بافتها به ترتیب ۷۳٪ و ۳۰٪ است. جهش ۷۴۸۰ در سلولهای خونی بستگان بیمار مشاهده نشد.

مطالعهٔ مقاطع تهیه شده از فیبرهای عضلانی آشکار نمود که فیبرهای عضلانی طبیعی و غیرطبیعی (COX deficient) از نظر محتوای DNA موتان با هم اختلاف فاحشی دارند. فیبرهای با نقص فعالیت آنزیمی سیتوکروم اکسیداز (COX) حاوی بیش از ۹۰٪ mtDNA جهش یافته، بودند در حالی که سطح جهش در فیبرهای عضلانی طبیعی از ۹٪ تا ۶۸٪ متغیر بود.

* **نتیجه‌گیری:** این یافته‌ها نشان داد که جهش ۷۴۸۰ در این بیمار می‌تواند علت اساسی اختلالات مشاهده شده باشد.

گل واژگان: DNA میتوکندریائی (mtDNA)، کاردیومایوپاتی، ترانسفر RNA سرین (UCN)، جهش نقطه‌ای.

مقدمه

بیماریهای میتوکندریائی دارای الگوی وراثت مادری و فنوتیپ ویژه‌ای هستند (۱). جهش‌های مختلف در ژنوم میتوکندریائی موجب ایجاد اختلال در روند انتقال الکترون و واکنشهای اکسیداتیو ـ فسفوریلاسیون شده و میزان تولید انرژی (ATP) را کاهش داده و یا متوقف می‌نمایند (۳، ۲). در نتیجهٔ کاهش تولید ATP در بافتهایی که شدیداً به انرژی نیازمندند بیماریهای گوناگونی ایجاد می‌شود. تابحال ارتباط بیش از پنجاه نوع جهش نقطه‌ای در mtDNA با بروز بیماریهای مختلف میتوکندریائی ثابت شده است که اغلب این بیماریها به شکل اختلالات عصبی و یا عصبی ـ ماهیچه‌ای بروز می‌نمایند (۶، ۵، ۴). برخی از این بیماریها عبارتند از:

نوروپاتی ارثی عصب بینائی لیبرز (LHON)، صرع و تشنج همراه با فیبرهای عضلانی سرخ و راه‌راه (MERRF)، آنسفالومایوپاتی میتوکندریائی با لاکتیک اسیدوز و حملات شبیه سکته مغزی (MELAS)، دیابت، کری و کاردیومایوپاتی (۸، ۷).

در این مطالعه mtDNA استخراج شده از یک فرد مشکوک به بیماری میتوکندریائی با توجه به علائم بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی که شامل ویژگیهای بافت‌شناسی مؤید نقص فعالیت آنزیم سیتوکروم اکسیداز بود، مورد بررسی قرار گرفت. تمام ۲۲ ژن کد کننده ترانسفر RNA و نواحی D-loop و منشاء همانندسازی زنجیرهٔ سبک در این بیمار تعیین ترادف شد و توالی نوکلئوتیدها با توالی نوکلئوتیدی mtDNA طبیعی ارائه شده از سوی اندرسون و همکاران (۹) مقایسه شد.

مواد و روشها

* بیمار، مطالعات هیستوشیمیائی و بیوشیمیائی

بیمار تحت بررسی زن ۳۰ ساله‌ای است دارای علائم بالینی غیرطبیعی،شامل ضعف عضلانی و اختلالات قلبی که در حدود ده سالگی علائم بیماری در او ظاهر شده‌است. ابتدا تصور شدکه وی دچار نوعی بیماری التهابی عضله است ؛اما کم‌کم اختلالات هوشیاری در او پدیدار شد و مشاهدهٔ آتاکسی، احتمال ابتلای او را به نوعی بیماری میتوکندریائی تقویت نمود. در این زمان بیوپسی از عضلهٔ چهار سر ران تهیه شد و مطالعات بیوشیمیائی، هیستوشیمیائی و ژنتیکی روی آن صورت گرفت.

مطالعات هیستولوژیکی و هیستوشیمیائی به کمک میکروسکوپ الکترونی و با رنگ‌آمیزیهای اختصاصی، برای فعالیت آنزیم ATPase و سیتوکروم اکسیداز صورت گرفت و فعالیت کمپلکسهای زنجیره تنفسی میتوکندریهای استخراج شده از این بیوپسی بررسی شد (۱۱، ۱۰).

* مطالعات ژنتیکی

DNA از بافتهای عضلانی و لوکوسیتهای خون برطبق روشهای استاندارد استخراج شد (۱۲). نواحی از ژنوم میتوکندریائی بوسیلهٔ روش PCR تکثیر شد و محصولات PCR از فیلترهای Centricon-100 ساخت شرکت Amicon عبور داده شد. آغازگرهای بیوتینه شده تهیهٔ DNA تک زنجیره‌ای را از محصولات PCR باکمک ذرات مغناطیسی DYNAL (Dynal Beads) ممکن نمودند. ترادف DNA تک‌رشته‌ای بدست آمده با روش تعیین توالی اختتام زنجیره با دای‌داکسی (Dideoxy-chain termination DNA sequencing) مشخص شد(۱۳).

جهش T۷۴۸۰C، جایگاه برش برای آنزیم محدود کننده (Restriction Enzyme) در mtDNA ایجاد نمی‌کند، همچنین جایگاهی را حذف نمی‌کند. بنابراین دو آغازگر الیگونوکلئوتیدی برای تشخیص این جهش و تعیین میزان هتروپلاسمی آن در بافتهای مختلف طراحی شد. آغازگر Sense متشکل از ۲۱ نوکلئوتید است که در آن یک باز نابه‌جا در موقعیت ۷۴۷۸ تعبیه شده است که جایگاهی را برای آنزیم *Nhe*I (G↓CTAGC) در DNA جهش یافته بوجود می‌آورد، یعنی تنها زمانی که جایگزینی باز C به جای T اتفاق افتاده باشد، آنزیم قادر به شناسائی جایگاه برش و قطع رشتهٔ DNA است. این جایگاه آنزیمی در صورتی که مولکول mtDNA طبیعی باشد وجود نخواهد داشت و قطعهٔ mtDNA تکثیر شده بریده نخواهد شد(شکل ۱).

آغازگر Antisense متشکل از ۳۴ نوکلئوتید می‌باشد که ۱۰ نوکلئوتید آن که در انتهای 5′ زنجیره واقعند دارای ترادفی غیر میتوکندریائی هستند. این آغازگر نیز شامل دو باز نابه‌جاست که در موقعیت‌های ۱۱ و ۱۲ آن از سمت 5′ که طبیعتاً با موقعیت‌های ۷۵۷۱ و ۷۵۷۲ از mtDNA جفت می‌شوند، تعبیه شده‌اند. این بازهای نابه‌جا، یک جایگاه دیگر برای آنزیم *Nhe*I بوجود می‌آورند که به عنوان یک جایگاه ناظر جهت سنجش چگونگی فعالیت قطع و برش آنزیم *Nhe*I عمل می‌نماید(شکل ۱).

یک قطعه از mtDNA به طول ۱۱۲bp، در محدودهٔ نوکلئوتیدهای ۷۴۵۹ تا ۷۵۷۱ توسط PCR تکثیر شد. با توجه به وجود ده نوکلئوتید اضافی در انتهای آغازگر Antisense، طول قطعه DNA بدست آمده از PCR برابر ۱۲۲bp شد.

آغازگر Sense:

5′↓ aat cga acc ccc caa agc tag 3′↓

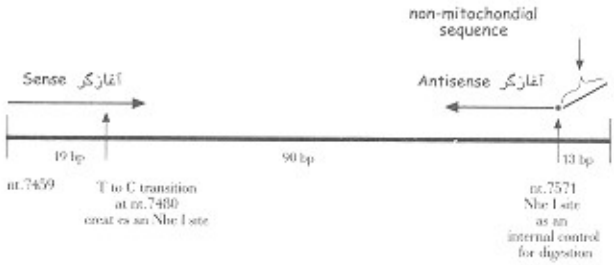
آغازگر Antisense:

5′↓ ACT CAC TAT Agc tag cct ata att taa ctt tga c3′↓

برنامهٔ PCR شامل یک مرحلهٔ آغازین پنج دقیقه‌ای در حرارت ۹۴ درجه سانتیگراد بود که بدنبال آن ۲۹ سیکل دیگر به صورت یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه در ۵۸ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه انجام شد. در سیکل نهایی تکثیر، ۱۰μci از (۳۰۰۰ci/mol) 32p dCTP به لولهٔ PCR اضافه شد و مرحلهٔ بسط نهایی زنجیره به مدت ۸ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. بعد از رسوب دادن DNA، مقدار ۲۵۰۰۰cpm از آن (cerenkov) تحت‌تأثیر ۱۰ واحد آنزیم اندونوکلئاز *Nhe*I ساخت Boehringer Mannheim به مدت ۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. آنزیم *Nhe*I روی قطعهٔ DNA طبیعی (Normal) دارای یک جایگاه برش است، بنابراین رشتهٔ

DNA را به دو قطعهٔ ۱۰۹bp و ۱۳bp تبدیل می‌کند. چنانچه جهش در موقعیت ۷۴۸۰ اتفاق افتاده باشد DNA تکثیر شده توسط PCR بوسیلهٔ آنزیم *Nhel* به سه قطعهٔ ۹۰bp، ۱۹bp و ۱۳bp تبدیل می‌شود.

محصول هضم آنزیمی روی ژل پلی اکریل آمید دناتوره نشده الکتروفورز شد. ژل پس از خشک شدن به درون یک کاست phosphorImager منتقل شده و با درنظر گرفتن نسبت حضور نوکلئوتید dCTP در بندهای ۱۰۹bp، ۹۰bp، میزان mtDNA موتان و درصد هتروپلاسمی توسط نرم‌افزار ImageQuant از شرکت Molecular Dynamics محاسبه شد (شکل ۱).



شکل ۱: تصویر بیانگر انجام RFLP محصولات PCR و برش قطعه‌ای از mtDNA که حاوی ژن tRNA سرین (UCN) است توسط یک آنزیم نوکلئاز می‌باشد. هدف اندازه‌گیری میزان جهش C۷۴۸۰T است.

* مطالعهٔ فیبرهای عضلانی منفرد

مقاطع ۳۰ میکرومتری تهیه شده از فیبرهای عضلانی منجمد روی لام میکروسکوپی پوشیده شده از ژلاتین قرار داده شد و برای بررسی فعالیت آنزیمهای سیتوکروم اکسیداز (COX) و سوکسینات دی‌هیدروژناز (SDH) با دو رنگ دی‌آمینوبنزیدین (DAB) و نیتروبلوتترازولیوم (NBT) رنگ‌آمیزی شد(۱۴).

با این نوع رنگ‌آمیزی فیبرهای عضلانی دارای نقص آنزیمی COX آبی رنگ و فیبرهای عضلانی طبیعی قهوه‌ای دیده می‌شوند. این رنگ‌آمیزی ما را قادر ساخت تا هرکدام از فیبرهای عضلانی را به دقت انتخاب نموده و توسط لوله‌های موئین، ضمن پرهیز از آلودگی با فیبرهای عضلانی مجاور در زیر میکروسکوپ معکوس آنها را استخراج نمائیم.

فیبرهای عضلانی منفرد انتخاب شده به داخل لوله‌های میکروفیوژ در درون ۲۰ میکرولیتر dH2O منتقل و DNA از آن به یکی از طرق زیر استخراج گردید(۱۲):

۱) لولهٔ محتوی فیبر عضلانی به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده می‌شد و مستقیماً برای واکنش PCR مورد استفاده قرار می‌گرفت.

۲) بعد از سانتریفوژ نمودن محتویات لولهٔ میکروفیوژ با حذف تمام ۲۰ میکرولیتر dH2O فیبر عضلانی منفرد بمدت یکساعت در حرارت ۶۵ درجه سانتیگراد تحت‌تأثیر KOH ۲۰۰ میلی مولار و DTT ۵۰ میلی مولار قرار می‌گرفت. با اثر دادن HCl ۲۰۰ میلی مولار و Tris-HCL ۹۰۰ میلی مولار (PH=۸/۳) اثر KOH خنثی می‌شد و در این زمان واکنش PCR به صورتی که قبلاً توضیح داده شد انجام می‌گرفت.

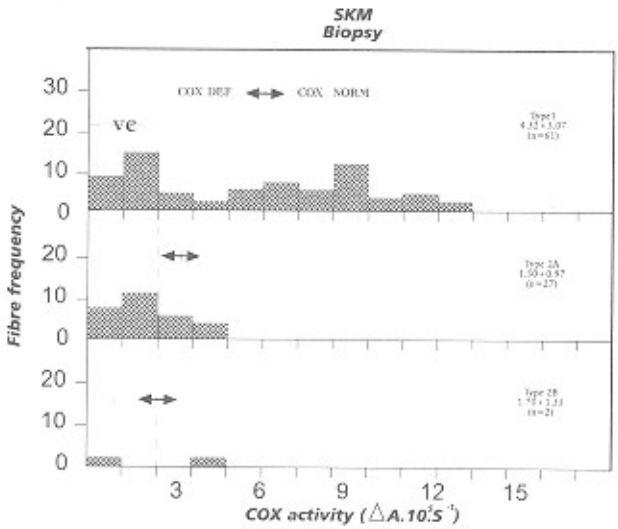
یافته‌ها

* مطالعات هیستوشیمیائی و بیوشیمیائی

در بررسی‌های هیستوشیمیائی بعمل آمده از بیوپسی عضله، مقادیر زیادی فیبرهای عضلانی Ragged-Red و به همان نسبت رشته‌های عضلانی دارای نقص آنزیم سیتوکروم اکسیداز مشاهده شد. اختلالات هیستوپاتولوژیکی شدید نظیر افزایش بیش از اندازه قطر فیبرهای عضلانی که گاهی تا ۱۲۰ میکرومتر نیز می‌رسیدند، همینطور افزایش مقدار بافت پیوندی و چربی در آنها دیده شد. همچنین در بعضی از فیبرهای عضلانی افزایش قطرات چربی آشکارا به چشم می‌خورد.

تقریباً در ۳۰٪ فیبرهای عضلانی تجمع میتوکندری از نوع Ragged-Red دیده شد که در بعضی از آنها پراکندگی میتوکندری حالتی غیر طبیعی داشت؛ یعنی به جای تجمع در حواشی در تمامی نواحی فیبرعضلانی پراکنده بودند.

تعداد قابل ملاحظه‌ای از فیبرهای عضلانی فاقد فعالیت آنزیم سیتوکروم اکسیداز بودند (شکل ۲) و مطالعات بیوشیمیائی کمبود فعالیت کمپلکس‌های I و IV زنجیرهٔ تنفسی در این بیمار را نشان دادند که تأییدی بر تشخیص‌های قبلی بود و در نهایت وجود یک حالت موزائیک از نقص فعالیت زنجیره تنفسی در بین فیبرهای عضلانی را آشکار می‌نمود.



شکل ۲: فعالیت آنزیم سیتوکروم اکسیداز در فیبرهای عضلانی منفرد بیمار: مقطعی از بیوپسی تهیه شده از بیمار تحت آزمایشات میکرواسپکتروفتومتری قرار گرفت. یکصد رشته عضلانی از نظر فعالیت COX مورد مطالعه قرار گرفتند و بر اساس نوع رشته عضلانی و فعالیت آنزیمی روی هیستوگرام آورده شده‌اند. مرز سلامت یا نقص آنزیم و میانگین فعالیت COX با در نظر گرفتن انحراف معیار برای هر یک از انواع فیبرهای عضلانی روی هیستوگرام مشخص شده است.

* مطالعات ژنتیکی

آزمایشات سادرن بلات وجود اختلال طولی در mtDNA بیمار را رد نمود چراکه تنها یک باند متمایز ۱۶/۵ کیلو بازی که نمایندهٔ mtDNA طبیعی بود مشاهده شد و باندهای دیگری که نشان دهندهٔ

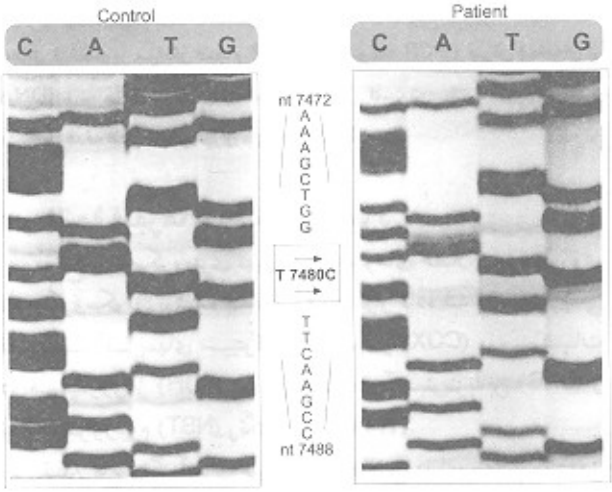
افزایش یا کاهش طول این ژنوم باشد مشاهده نشد.

اندازه‌گیری نسبت ژنوم هسته‌ای و میتوکندریائی در بیمار و مقایسهٔ آن با نمونه‌های کنترل با استفاده از تکنیک‌های هضم آنزیمی و آنالیز PhosphorImager انجام گرفت و نشان داد که نسبت مشابهی از mtDNA و 28S rDNA در بیمار و افراد کنترل وجود دارد که دلیلی روشن بر رد حالت ژن کاستی (mtDNA depletion) در این بیمار بود.

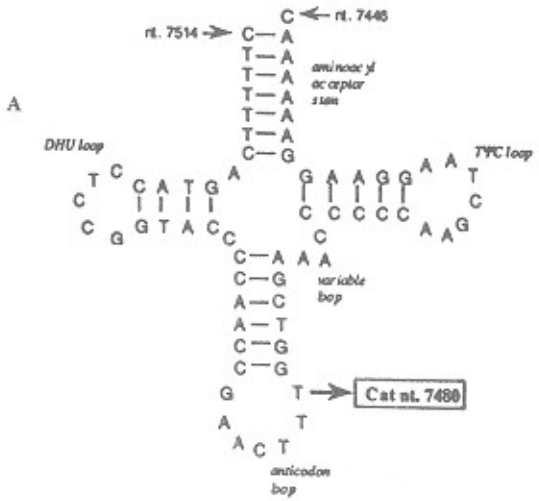
برای پی بردن به اینکه آیا هیچکدام از ژنهای کد کننده ترانسفر RNA در این بیمار جهش یافته‌اند یا خیر، تمام ۲۲ ژن کد کننده tRNA در این بیمار تعیین ترادف شده و توالی بدست آمده با ترادف کمبریج(۹) (ترادف اندرسون) مقایسه شد.

ناحیهٔ D-Loop و ناحیه‌ای که منشاء همانندسازی زنجیره سبک mtDNA در آن واقع است نیز به کمک روشهای RFLP و sequencing مورد بررسی قرار گرفت و تغییر باز آلی در این نواحی از mtDNA مشاهده نشد.

ترادف نوکلئوتیدی تمام ژنهای کد کننده tRNA و نواحی مجاور آنها بررسی و مشخص شد که سه تغییر باز در این نواحی وجود دارد. دو تا از آنها تغییراتی بودند که در ژنهای ND3 و Cytb به ترتیب در موقعیتهای ۱۰۳۹۸ و ۱۴۷۹۸ اتفاق افتاده بودند. نشستن G به جای A در ژن ND3 که در این بیمار مشاهده شد، در افراد دیگر نیز وجود داشت و گزارشهایی مبنی بر پلی‌مورف بودن این تغییر باز، وجود دارد (۱۷، ۱۶، ۱۵). نشستن C به جای T در موقعیت ۱۴۷۹۸ که کدون فنیل آلانین را به کدون لوسین تبدیل می‌کند؛ در بافت عضلانی این بیمار به صورت هموپلاسمیک وجود داشت که به احتمال قوی پلی مورفیسم است (۲۰، ۱۹، ۱۸). سومین تغییر مشاهده شده، جایگزینی هتروپلاسمیکی C به جای T در موقعیت ۷۴۸۰ (شکل ۳) در ژن کد کننده ترانسفر RNA سرین (UCN) بود که در موقعیتی بسیار حساس یعنی روی لوپ آنتی‌کدون این tRNA در محلی که از نظر تکاملی شدیداً پایدار بوده و در بین گونه‌های مختلف نیز ثابت مانده، واقع شده است (شکل ۴).



شکل ۳: تعیین ترداف ژن tRNA سرین نشان می‌دهد که تغییر باز به صورت T به C در سلولهای بافت عضلانی بیمار در موقعیت ۷۴۸۰ از mtDNA به شکل هتروپلاسمیک اتفاق افتاده است.



شکل ۴

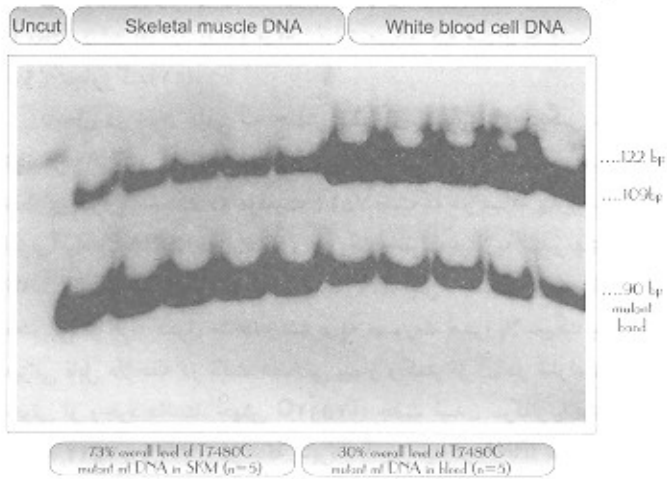
B

		aa stem	TYC stem	TYC loop	TYC stem	x loop	ac stem	ac loop	ac stem		DHU stem	DHU loop	DHU stem		aa stem
Human	C	AAAAAAG	GAAGG	AATCGAA	CCCCC	CAA	AGCTGG	TTTCAAG	CCAACC	C	CATG	GCGTC	CATG	A	CTTTTTC
C.Chm	C	AAAAAAG	GAAGG	AATCGAA	CCCCC	TAA	AGCTGG	TTTCAAG	CCAACC	C	CATG	ACGTC	CATG	A	CTTTTTC
p.chm	C	AAAAAAG	GAAGG	AATCGAA	CCCCC	TAA	AGCTGG	TTTCAAG	CCAACC	C	CATG	ACCCC	CATG	A	CTTTTTC
Gorilla	C	AAAAAAG	GAAGG	AATCGAA	CCCCC	CAA	AGCTGG	TTTCAAG	CCAACC	C	CATG	ACCTT	CATG	A	CTTTTTC
Orangutan	C	AAAAAAG	GAAGG	AATCGAA	CCTCC	TAA	AGCTGG	TTTCAAG	CCAACC	C	CATA	ACCCC	CATG	A	CTTTTTC
Siamang	C	AAAAAAG	GAAGG	AATCGAA	CCCTC	TAA	AACCGG	TTTCAAG	CCAGCC	C	CATA	ACCTT	TATG	A	CTTTTTC
Seal	T	AAGAAAG	GAAGG	AGTCGAA	CCCTC	TGA	AGCTGG	TTTCAAG	CCAACA	C	CATA	ACCCT	TATG	T	CTTTCTC
G.seal	T	AAGAAAC	GAAGG	AGTCGAA	CCCTC	TGA	AGCTGG	TTTCAAG	CCAATA	C	CATA	ACCCT	TATG	T	CTTTCTC
Bovine	T	AAGAAAG	GAAGG	AATCGAA	CCCCC	TAC	TATTGG	TTTCAAG	CCAACA	T	CATA	ACCTC	TATG	T	CTCTCTC
F.whale	C	AAGAAAG	GAAGG	AATCGAA	CCTTC	TCC	CATTGG	TTTCAAG	CCAACA	T	CATA	ATTAC	TATG	T	CTTTCTT
B.whale	C	AAGAAAG	GAAGG	AATCGAA	CCCCC	TCC	CATTGG	TTTCAAG	CCAATA	T	CATA	ACCAC	TATG	T	CTTTCTT
Rat	T	AAGAAAG	GAAGG	AATCGAA	CCCCC	TAC	AACTGG	TTTCAAG	CCAACT	T	CATA	ACCAT	TATG	T	CTTTCTC
Mouse	T	AAGAAAG	GAAGG	AATCGAA	CCCCC	TAA	AATTGG	TTTCAAG	CCAATC	T	CATA	ACCTA	TATG	T	CTTTCTC
Opossum	T	AAGAAAG	GGAGG	AATCGAA	CCCCC	TAA	GATTAA	TTTCAAG	TCAATC	C	CATA	ACCCT	TATG	A	CTTTCTC

شکل ۴: موقعیت جهش T۷۴۸۰C در ترانسفر RNA سرین (UCN). قسمت A. ساختمان ثانوی ترانسفر RNA سرین (UCN) نشان دهندهٔ محل وقوع جهش در لوپ آنتی‌کدون است. جایگزینی باز آلی C به جای T در لوپ آنتی‌کدون اندازه این لوپ را از ۷ نوکلئوتید به ۱ نوکلئوتید کاهش می‌دهد. قسمت B: مقایسه‌ای در گونه‌های مختلف از نظر میزان پایداری نوکلئوتیدها در tRNA سرین (UCN) در طول تکامل صورت‌گرفته است. قسمت سایه دار شده موقعیت جهش ۷۴۸۰ را نشان می‌دهد که در طول تکامل شدیداً پایدار مانده است. حروف آورده شده مخفف کلمات زیر هستند: ساقهٔ aa= ساقهٔ گیرندهٔ آمینواسیل، ساقهٔ ac= ساقهٔ آنتی کدون، لوپ v=لوپ متغیر. C. chem شمپانزه معمولی، P. chem شمپانزه پیگمی، G. seal= فُک خاکستری، F. whale وال فین (نهنگ)، B. whale نهنگ آبی. اگرچه ژن کدکننده ترانسفر RNA سرین (UCN) روی زنجیره سبک mtDNA واقع است در اینجا برای سهولت مقایسه با ترادف اندرسون، ترادف نوکلئوتیدی زنجیرهٔ سنگین mtDNA ارائه شده است.

DNA از بافت عضلانی و گلبولهای سفید خون بیمار تهیه و جهت انجام PCR استفاده شد. پنج واکنش PCR مختلف برای هر کدام از بافتها انجام شد. سیکل آخر PCR در حضور فسفر رادیواکتیو (32p) همچنان که در بخش مواد و روشها توضیح داده شد، انجام گرفت و محصول PCR با استفاده از آنزیمهای محدودکننده (آندونوکلئاز) مورد بررسی قرار گرفت.

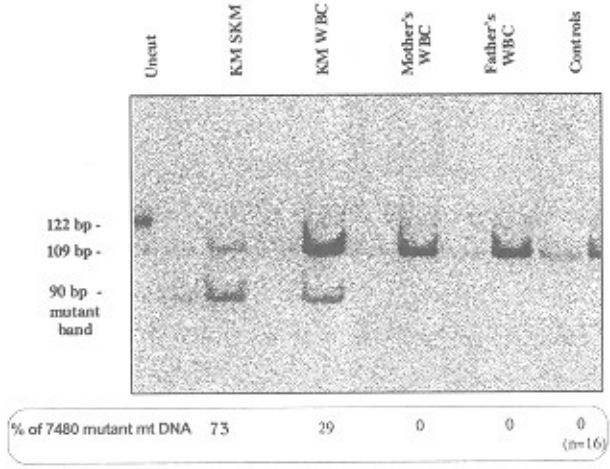
چنانکه در تصویر ۵ که از ژل پلی اکریل آمید گرفته شده است می‌توان دید، هر دو بافت حاوی جهش ۷۴۸۰ هستند اما با میزانی متفاوت از هتروپلاسمی؛ یعنی بافت عضلانی دارای ۷۳٪ هتروپلاسمی و سلولهای خونی حاوی ۳۰٪ هتروپلاسمی برای مولکول mtDNA، موتان است.



شکل ۵: میزان هتروپلاسمی جهش T۷۴۸۰C در SKM و WBC جهت تخمین دقیق‌تر میزان مولکولهای جهش یافته در خصوص هر کدام از بافتهای عضلانی و خونی پنج واکنش PCR انجام شد. اضافه کردن نوکلئوتید دارای فسفر رادیواکتیو در سیکل آخر PCR طبیعت هتروپلاسمیک جهش را در هر دو بافت بررسی شده ثابت نمود. اندازه قطعات بدست آمده از برش DNA بیمار و کنترل در کنار تصویر ژل اکریل آمید دناتوره نشده، آورده شده است.

DNA بدست آمده از نمونه‌های خون تهیه شده از پدر و مادر بیمار که علائم بیماری در آنها دیده نمی‌شد، مورد مطالعه قرار گرفت. جهش ۷۴۸۰ در والدین بیمار مشاهده نشد (شکل ٦).

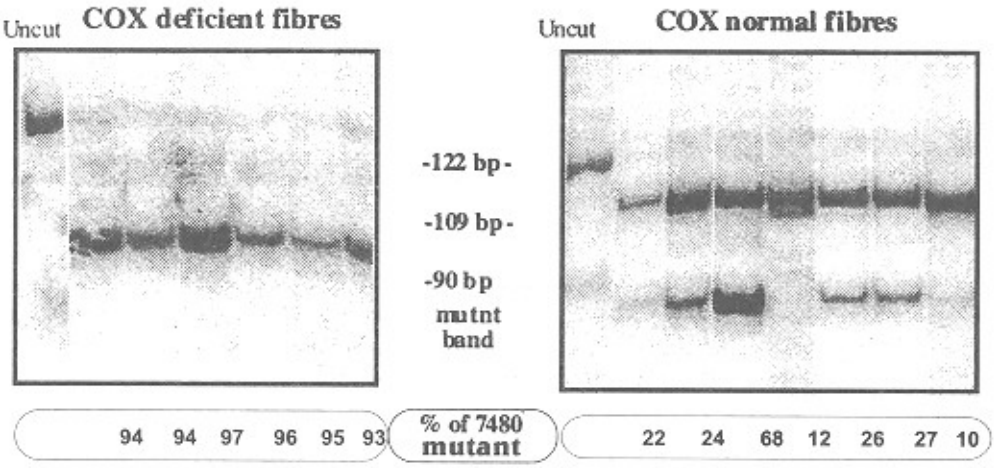
یک گروه از افراد کنترل جهت اثبات حضور یا فقدان جهش مورد مطالعه قرار گرفتند که در هیچ کدام از این افراد جهش موردنظر مشاهده نشد. علاوه بر این چنین جهشی تا به حال در متون علمی نیز گزارش نشده است.



شکل ۶: بررسی افراد کنترل، بیمار و والدین او در خصوص جهش ۷۴۸۰. PCR با استفاده از mtDNA استخراج شده از SKM و WBC بیمار انجام گرفت و در سیکل آخر نوکلئوتید رادیواکتیو اضافه شد. به همین ترتیب mtDNA استخراج شده از گلبولهای سفید والدین بیمار و افراد کنترل سالم نیز جهت انجام PCR داغ استفاده شد. محصولات PCR به روش RFLP مورد بررسی قرار گرفت. اندازه قطعات DNA در کنار تصویر ژل ۱۶٪ پلی اکریل آمید دناتوره نشده، آورده‌شده‌است. درصد پایین هر ستون به کمک بررسی‌های PhosphorImager محاسبه شده است. تعداد افراد کنترل بررسی شده در این آزمایش با n مشخص شده است.

* مطالعهٔ فیبرهای عضلانی منفرد

با استفاده از DNA استخراج شده از فیبرهای عضلانی منفرد، PCR انجام شد. مطالعات نشان داد که فیبرهای با نقص آنزیمی COX ، به میزان بیش از ۹۰٪ mtDNA جهش یافته داشته و محدودهٔ هتروپلاسمی در آنها بین ۹۰/۲ تا ۹۷/۴ درصد متغیر بود. جهش در فیبرهای عضلانی دیگر، بسیار کمتر بود (به میزان ۹ تا ۶۸ درصد)(شکل ۷).



شکل ۷: مطالعات میزان جهش ۷۴۸۰ در فیبرهای با نقص COX و فیبرهای عضلانی طبیعی: مطالعات PCR و RFLP روی فیبرهای عضلانی منفرد طبیعی و معیوب از نظر فعالیت COX انجام گرفت. اندازهٔ قطعات در کنار ژل پلی اکریل آمید ۱۶٪ مشخص شده است. درصدهای عنوان شده حاصل محاسبات PhosphorImager هستند.

بحث

جهش‌های بیماری‌زای شناخته شده و حذف mtDNA در این بیمار مشاهده نشد اما بعد از تعیین توالی قسمتهائی از mtDNA خصوصاً ژنهای کدکننده tRNA یک جابه‌جائی باز سیتوزین با تیمین در ژن ترانسفر RNA سرین (UCN) مشاهده شد. این جابه‌جائی جدید در موقعیت ۷۴۸۰ اتفاق افتاد که در بافت عضلانی بیمار به صورت هتروپلاسمیک وجود داشت، اگر چه تمامی طول mtDNA در این بیمار تعیین ترادف نشد ولی شواهد موجود دال بر بیماریزا بودن این جهش است، چراکه:

۱) این جهش در ناحیه‌ای از mtDNA اتفاق افتاده است که از نظر فعالیت اهمیت ویژه‌ای دارد و یک نوکلئوتید پایدار درلوپ آنتی کدون ترانسفر RNA را که در طول تکامل در گونه‌های مختلف ثابت مانده است، تغییر می‌دهد (شکل ۴).

۲) میزان جهش با شدت بیماری هماهنگ است، بدین نحو که این جهش تنها در ژنوم بیمار مشاهده شد و در بستگان غیر مبتلای او دیده نشد و مقدار آن نیز در بافتهائی که از نظر بالینی و بیوشیمیائی دچار نقص آشکار بودند بیشتر بود، بدین صورت که میزان mtDNA جهش یافته در بافت عضلانی ۷۳٪ و در سلولهای خونی ۳۰٪ محاسبه شد.

۳) جهش مورد نظر در افراد کنترل مشاهده نشد و تابحال نیز در متون علمی جابه‌جائی نوکلئوتیدی در موقعیت ۷۴۸۰ در هیچ یک از رده‌های جمعیتی گزارش نشده است.

۴) جهش ۷۴۸۰ طوری ساختمان ثانویه ترانسفر RNA را تغییر می‌دهد که بیان کنندهٔ اثر مستقیم آن در کاهش فعالیت زنجیره تنفسی و نقصان سنتز پروتئین در میتوکندری باشد.

۵) این جهش به صورت هتروپلاسمیک موجود است و مقدار مولکولهای mtDNA جهش یافته در فیبرهای عضلانی با نقص آنزیمی COX بسیار زیاد است و حجم جهش موجود در فیبرهای عضلانی منفرد با نقص‌های هیستوشیمیائی و بیوشیمیائی موجود در آنها کاملاً هماهنگی دارد.

وجود میزان زیاد mtDNA موتان در عضله می‌تواند نشان دهنده انباشته شدن جهش در این بافت فاقد تقسیم (Post Mitotic)، باشد به طوری که در نهایت حالت همو پلاسمیک در بیمار حاصل شود.

بررسی‌های بعمل آمده از فیبرهای عضلانی منفرد آشکار نمود که جهش ۷۴۸۰ می‌تواند شدیداً فعالیت آنزیمهای درگیر در زنجیرهٔ تنفسی را مختل نماید اما این پدیده موقعی بروز می‌کند که میزان جهش از ۹۰٪ تجاوز کند(۲۱).

تابحال در متون علمی سه جهش نقطه‌ای بیماری‌زای دیگر در ترانسفر RNA سرین (UCN) گزارش شده که یکی از آنها جهش نقطه‌ای هتروپلاسمیک در موقعیت ۷۵۱۲ است که در ساقهٔ پذیرندهٔ اسید آمینه در tRNA اتفاق افتاده و در یک خانواده مبتلا به سندرمهای MERRF/MELAS مشاهده شده است(۲۲). این جهش در تعداد معتنابهی از افراد کنترل مشاهده نشد و به صورت هتروپلاسمیک با میزانی قابل ملاحظه در بافت عضلانی بیمار و کمتر از آن در سلولهای خونی او وجود داشت. جهش T۷۵۱۲C، جفت شدن نوکلئوتیدهای شمارهٔ ۷۵۱۲ و ۷۴۴۹ را در ساقهٔ پذیرنده آمینواسید در tRNA تضعیف می‌نماید؛ یعنی به جای T-A بازهای C-A که با قدرت کمتری با هم جفت می‌شوند در آن موقعیت وجود خواهند داشت. حدس زده شد که ممکن است این تغییر پایداری ساقه پذیرنده آمینواسید را کاهش داده و عملکرد tRNA را مختل نموده و در نتیجه از تولید پلی‌پپتیدهای کد شده توسط mtDNA، کاسته شود.

جهش دوم که در یک فرد مبتلا به کری مشاهده شد در موقعیت ۷۴۴۵ از mtDNA واقع بود(۲۴، ۲۳). این جهش باز آدنین واقع در انتهای 3′ ترانسفر RNA سرین (UCN) را با گوانین جایگزین می‌کند و با این تعویض، یک تغییر خنثی در کدون اختتام ژن سیتوکروم اکسیداز I (COI) بوجود می‌آورد. این جهش در افراد کنترل و در افراد مبتلا به کری که از طرف مادر با بیمار خویشاوندی نداشتند مشاهده نشد. از آنجاکه نوکلئوتید ۷۴۴۵ جزئی از یک کدون در روی هر دو زنجیره سبک و سنگین mtDNA محسوب می‌شود حدس زده شد که جهش در این موقعیت می‌تواند عملکرد tRNA را در روند ترجمه RNA و سنتز پروتئین دچار اختلال نماید.

سومین جهش گزارش شده در tRNA (UCN) اضافه شدن یک سیتوزین به ساقهٔ TψC آنست که در موقعیتهای از ۷۴۶۶ تا ۷۴۷۲ که تماماً سیتوزین می‌باشد وارد شده است (۲۵) این جهش به صورت هتروپلاسمیک وجود داشت و در افراد کنترل نیز مشاهده نشد و چنین عنوان شد که ورود یک سیتوزین اضافی به این ساقهٔ tRNA باعث طویل شدن آن و مختل نمودن عملکرد tRNA می‌شود.

جهش Tv۴۸۰C می‌تواند به عنوان نخستین جهش بیماریزای واقع در لوپ آنتی کدون tRNA سرین مطرح شود. این جهش آخرین نوکلئوتید لوپ آنتی‌کدون را که با ساقهٔ آنتی‌کدون tRNA مجاور است، دچار تغییر می‌نماید و باعث طویل شدن ساقهٔ آنتی کدون tRNA و از بین رفتن ساختمان لوپ آنتی‌کدون می‌شود. در این شرایط حالت جفت بازی بسط یافته و اندازه لوپ آنتی‌کدون، از ۷ نوکلئوتید به یک نوکلئوتید جفت نشده تقلیل می‌یابد، در واقع دیگر، ساختمان لوپ مانندی وجود نخواهد داشت (شکل ۴).

این جهش با ایجاد تغییرات عمده‌ای در ساختمان ثانوی tRNA می‌تواند اختلالات شدیدی در روند سنتز پروتئین داخل میتوکندری و فعالیت کمپلکسهای زنجیره تنفسی ایجاد نماید.

بر همین اساس مطالعات بیوشیمیائی انجام شده، اختلال فعالیت کمپلکسهای I و IV زنجیرهٔ تنفسی در این بیمار را نشان داد و افزایش میزان جهش در فیبرهای عضلانی نیز با ایجاد اختلال در فعالیت آنزیمهای درگیر در روند انتقال الکترون همراه بود.

به نظر می‌رسد که جهش Tv۴۸۰C عملکرد ترانسفر RNA سرین (UCN) را شدیداً مختل می‌نماید، بدین صورت که از خواندن کدونهای روی mRNA عاجز مانده و ممکن است بدلیل تغییر شکل ساختمانی توسط آنزیم ترانسفرRNA ـ آمینواسیل سنتتاز هم شناسایی نشود. در نتیجه از دقت و سرعت عمل tRNA در روند ترجمه کاسته می‌شود.

اگر چه درک بهتر مکانیسم‌های دقیق مسبب اختلال در روند سنتز پروتئین و نقص ایجاد شده در زنجیرهٔ تنفس در این بیمار، مطالعات بیشتری بخصوص در زمینهٔ کشت سلولهای *Rho*° و آزمایشات Cybrid را می‌طلبد، ولی نتایج بدست آمده از بررسیهای بیوشیمیائی و ژنتیکی چنین می‌نماید که جهش Tv۴۸۰C، سبب ایجاد اختلال ساختمانی در لوپ آنتی کدون ترانسفر RNA سرین (UCN) می‌شود و می‌تواند دقت و سرعت عمل tRNA را کاهش داده و در ایجاد و بروز فنوتیپهای غیرطبیعی موجود در بیمار نقش اساسی ایفاء نماید.

منابع

1. Wallace DC, Lott MT; Maternally inherited diseases. Mitochondrial DNA in human pathology. New York, Raven Press. 63: 83, 1992.

2. Hayashi JI, Ohta S, Kikuchi A, et al; Introduction of disease- related mitochondrial DNA deletions into HeLa 2cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10614-10618, 1991.

3. Lauber J, Marsac C, Kadenbach B, et al; Mutations in mitochondrial tRNA genes: A frequent cause of neuromuscular diseases. Nucl. Acids Res. 19(7): 1393-1397, 1991.

4. Wallace DC, Lott Mt, Brown MD, et al; Report of the committee on human mitochondrial DNA. Human gene mapping. Baltimore, Johns Hopkins University Press. 910-945 also available at http:/infinity. gen. emory. edu/mitomap. html, 1995.

5. Nakase H, Moraes CT, Rizzuto R, et al; Transcription and translation of deleted mitochondrial genomes in Kearns-Sayre syndrome: Implications for pathogenesis. Am. J. Hum. Genet. 46:418-427, 1990.

6. Zeviani M, Antozzi C; Mitochondrial disorders: A review. Mol. Hum. Reprod. 3: 133-148, 1997.

7. Sweeney MG, Brockington M, Weston MG, et al; Mitochondrial DNA transfer RNA mutation Leu (UUR) A to G 3260: A second family with myopathy and cardiomyopaty. Q. J. Med. 86: 435-438, 1993.

8. Tiranti V, chariot P, Carella F, et al; Maternally inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNASer(UCN) gene. Hum. Mol. Genet. 4(8): 1421-1427, 1995.

9. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al; Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290: 457-465, 1981.

10. Johnson MA, Bindoff LA, Turnbull DM; Cytochrome c oxidase activity in single muscle fibres: Assay techniques and diagnostic application. Ann. Neurol. 33: 28-35, 1993.

11. Bindoff LA, Birch-Machine M, Cartidge NEF, et al; Mitochondrial function in Parkinson's Disease. Lancet 1: 49, 1989.

12. Bidooki SK, Johnson MA, Chrzanowska -Lightowlers Z, et al; Intarcellular mitochondrialtriplasmy in a patient with two heteroplasmic base changes. Am. J. Hum. Genet. 60:1430-1438, 1997.

14. Weber K, Wilson JN, Taylor L, et al; A new mtDNA mutation showing accumulation with time and restriction to skeletal muscle. Am. J. Hum. Genet. 60: 373-380, 1997.

15. Johns DR, Berman J; Alternative simultaneous complex I mitochondrial DNA mutation in Leber's hereditary optic neuropathy. Biochem. Biophys. Res. Commun. 174: 1324-1339, 1991.

16. Ballinger SW, Schurr TG, Torroni A, et al; SouthEast Asian mitochondrial DNA analysis reveals genetic continuity of ancient mongoloid migrations. Genetics 130: 139-152, 1992.

17. Brown MD, Voljavec AS, Lott MT, et al; Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. Genetics 130: 163-173, 1992_c.

18. Jun AS, Brown MD, Wallace DC; A mitochondrial DNA mutation at nt 14459 of the ND6 gene associated with maternally inherited Laber's hereditary optic neuropathy and dystonia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 6206-6210, 1994.

19. Mackey D, Howell N; A variant of Leber hereditary optic neuropathy characterised by recovery of vision and by an unusual mitochondrial genetic etiology. Am. J. Hum. Genet. 91: 1218-1228, 1992.

20. Lertrit P, Kapsa RMI, Jean-Francois MJB, et al; Mitochondrial DNA polymorphism in disease: A possible contributor to respiratory dysfunction. Hum. Mol. Genet. 3: 1973-1981, 1994.

21. Attardi G, Yoneda M, Chomyn A; Complementation and segregation behavior of disease-causing mitochondrial DNA mutations in cellular model systems. Biochemica et Biophysica Acta. 1271: 241-248, 1995.

22. Nakamura M, Nakato S, Goto Y, et al; A novel point mutation in the mitochondrial tRNA Ser(UCN) gene detected in a family with MERRF/MELAS overlap syndrome. Biochem. Biophys. Res. Commun. 214(1): 86-93, 1995.

23. Reid FM, Vernham GA, Jacobs HT; A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. Hum. Mut. 3: 243-247, 1994_a

24. Reid FM, Venham GA, Jacobs HT; Complete mtDNA sequence of a patient in a maternal pedigree with sensorineural deafness. Hum. Mo. Genet. 3:1435-1436, 1994_b.

25. Tiranti V, Chariot P, Carella F, et al; Maternally inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNASer(UCN) gene. Hum. Mol. Genet. 4(8): 1421-1427, 1995.