

- 18- Zullo Sj., Gene therapy of mitochondrial DNA mutations: a brief, biased history of allotopic expression in mammalian cells, *Semin.Neurol.*, 2001,21(3):327-35 (2001).
- 19- Muratovska A., Targeting large molecules to mitochondria, *Advanced drug delivery reviews*, 49: 189-98 (2001).
- 20- De Grey Aubrey D.N.J., Mitochondrial gene therapy:an arena for the biomedical use of inteins, *Trends in biotechnology*, 18:394-398 (2000).
- 21- Wissman P.B., Delivery of cytosolic liver Arginase into the mitochondrial matrix space: a possible novel site for gene replacement therapy, *Somatic cell and Mol.Genet.*, 22(6):489-98 (1996).
- 22- Weissig V., Cationic bolosomes with delocalized charge centers as mitochondria-specific DNA delivery system, *Advanced drug delivery reviews*,49:127-49 (2001).
- 23- Kagawa Y., Gene therapy of mitochondrial disease using human cytoplasm, *Gene therapy*, 4(1):6-10 (1997).
- 24- D'Souza GG; Rammohan R; Cheng SM; Torchilin VP and Weissig V; DQAsome-mediated delivery of plasmid DNA toward mitochondria in living cells; *JControl Release*. 19;92 (1-2):189-97(2003).
- 25- D'Souza GG and Weissig V; Approaches to mitochondrial gene therapy; *Curr Gene Ther*;4(3):317-28(2004).
- 26- Taylor RW, Gene therapy for the treatment of mitochondrial DNA disorders, *Expert Opin Biol Ther*;5(2):183-94(2005).
- 27- Murphy M.P., Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria, *Trends in biotechnology*, 15:326-30 (1997).
- 28- Weissig V., DQAsomes: a novel potential drug and gene delivery system made from dequalinium, *Pharm.Res.*, 15(2):334-7 (1998).
- 29- Weissig V., Selective DNA release from DQAsome/DNA complexes at mitochondria-like membrane, *Drug.Del.*, 7:1-5 (2000).
- 30- W. Lewis, Mitochondrial dysfunction and nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy: experimental clarification and persistent clinical questions, *Antiviral. Res.*, 58(3):189-97 (2003).
- 31- Weissig V., DNA binding cationic bolosomes with delocalized charge center a structure study, *S.T.P.Pharma.Sci.*, 11(1):91-6 (2001).
- 32- Weissig V., DQAsome/DNA complexes release DNA upon contact with isolated mouse liver mitochondria, *J.of.Control.Rel.*, 75:401-8 (2001).
- 33- Taylor R.W., Invitro genetic modification of mitochondrial function, *Hum.Reprod.*,15 suppl 2: 79-85 (2000).
- 34- Entelis N.S., RNA delivery into mitochondria, *Advanced drug delivery reviews*, 49:199-215 (2001).
- 35- Wheeler V.C., Modification of the mouse mitochondrial genome by insertion of exogenous gene, *Gene*, 198:203-9 (1997).
- 36- Weissig V., Drug and DNA delivery to mitochondria, *Advanced drug delivery reviews*, 49: 1-2 (2001).
- 37- Moghimi S.M. Recent advances in cellular, sub-cellular and molecular targeting, *Advanced drug delivery reviews*, 41:129-33 (2000).
- 38- Morin D., Mitochondrial as target for antiischemic drugs, *Advanced drug delivery reviews*, 49: 151-74 (2001).
- 39- Sanda A., Bystander effects of nucleoside analogs phosphorylation in the cytosol or mitochondria, *Biochem and Biophys.Res.Com.*, 287:1163-66 (2001).
- 40- Taylor R.W., An antigenomic strategy for treating heteroplasmy mtDNA disorders, *Advanced drug delivery reviews*, 49: 121-25 (2001).

همساخت (homologous recombination) در mtDNA و عدم وجود اثرات اطرافى ها (bystander effect) که در ژن درمانی هسته وجود دارد یعنی تعمیر نقص هسته ای در یک سلول، تکمیل کننده نقص در سلول های اطراف آن که اصلاح نشده اند نیز می باشد مسائل دیگری است که در ژن درمانی میتوکندریایی مشاهده نشده است (۱۹ و ۳۹ و ۴۰).

علیرغم تمام مطالب مورد اشاره در بالا و با تاکید بر اینکه ژن درمانی میتوکندری همچنان مراحل اولیه خود را می گذراند، امیدهای زیادی به آن دوخته شده است تا در آینده ای که چندان دور نیست بتوان از طریق میتوکندری، جلوی پیشروی بسیاری از اختلالات را گرفت.

منابع

- 1- Graff C., Mitochondrial medicine-recent advances, Journal of internal medicine, 246:11-23 (1999).
- 2- Larsson N.G., Revolution in mitochondrial medicine, FEBS letters, 455:199-202 (1999).
- 3- Dimauro S., Mitochondrial DNA:a genetic pandoras box, functional neurology, 16(2):103-116 (2001).
- 4- Wallace D.C., Disease of the mitochondrial DNA, Annu.Rev.Biochem., 61:1175-1212 (1992).
- 5- Turnbull D.M., A roundabout route to gene therapy, Nature genetic, 30:345-6 (2002).
- 6- Smith PM; Ross GF; Taylor RW; Turnbull DM and Lightowlers RN; Strategies for treating disorders of the mitochondrial genome;Biochim Biophys Acta; 1659(2-3):232-9(2004).
- 7- Poulton J., Transmission of mtDNA: cracks in the bottleneck, Am.J.Genet., 57:224-26 (1995).
- 8- Lander E.S., Mitochondrial diseases:gene mapping and gene therapy, cell, 61: 925-26 (1990).
- 9- Weissig V., Mitochondriotropic cationic vesicles: a strategy towards mitochondrial gene therapy, Curr.Pharm.Biotech., 1:325-46 (2000).

(۱۹). از آنجا که موثر و کارا بودن هردارویا ژن درمانی به رها شدن ماکرومولکول فعال زیستی، به اندام صحیح و نوع سلولی مناسب و نیز قرارگرفتن در مکان مناسب سلولی بستگی دارد (ویژگیهایی که نه تنها کارائی روش مربوط را افزایش می دهد بلکه اثرات جانبی آن را نیز کم می کند)؛ میتوکندری نیز یک هدف مناسب به حساب می آید (۱۱ و ۳۷ و ۳۸). در مجموع، بایستی تاکید کرد که ژن درمانی میتوکندری دارای شماری مشکلات اضافه بر ژن درمانی هسته می باشد که در آینده برای فائق آمدن بر آنها باید چاره ای اندیشید. آزاد شدن انتخابی DNA در میتوکندری و ژن درمانی برای چند صد عدد از mtDNA معیوب در هر سلول از جمله چالش ها محسوب میشود. در حالی که در هسته دیپلوئیدی ممکن است یک یا در نسخه از یک ژن معیوب وجود داشته باشد. از طرفی عدم نوترکیبی

10- Wordel T.M., Changes in human mitochondrial genome after treatment of malignant disease, Mutat. Res., 525(1-2):19-27 (2003).

11- Murphy M.P., Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine, Advanced drug delivery reviews, 41: 235-50 (2000).

12- Martin J.B., Gene therapy and pharmacological treatment of inherited neurological disorders, Trends in biotechnology, 13: 28-35 (1995).

13- Beltinger Ch, Mitochondrial amplification of death signals determines thymidine kinase/ganciclovir-triggered activation of apoptosis, Cancer research; Jun15, 60:3212-17 (2000).

14- Dimauro S., Mitochondrial encephalomyopathies therapeutic approach, Neurology Science, 21(5 suppl):5901-8 (2000).

15- Rowe T.C., Mitochondrial DNA metabolism targeting drug, Advanced drug delivery reviews,49:175-87 (2001).

16- Weissig V., Towards mitochondrial gene therapy:DQAsome as a strategy, J.of Drug.Targ., 9(1): 1-13 (2001).

17- Xuehai Ye., Differences in the human and mouse amino-terminal leader peptides of ornithine transcarbamylase affect mitochondrial import and efficacy of adenoviral vectors, Hum.Gene.Ther., 12:1035-46 (2001).

با گسترش دانش امروزی در مورد میتوکندری، تلاش های فارماکولوژیکی نیز درباره آن افزایش یافته و دانش جدیدی تحت عنوان پزشکی میتوکندریایی (Mitochondrial Medicine) شکل گرفته است. رها شدن داروها به طور اختصاصی در میتوکندری هنوز در مراحل اولیه می باشد. مجموعه های منفذی انتقال دهنده میتوکندریایی (mitochondrial permeability transition pore complex=mPTPC) که در بین درغشاء قرار داشته و در مرگ سلولی نقش دارند به عنوان هدف های دارویی برای درمان های سیتوتوکسیک (مانند سرطان) و محافظت سلولی (cytoprotective) نقش دارند و دارای برتری اند.

در نتیجه، با دستکاری انتخابی عمل میتوکندری، می توان سلول ها (وبه طور مثال سلولهای سرطانی) را به طور انتخابی از بین ببرد (۱۳ و ۳۶). با وارد کردن ژن ها به طور انتخابی به میتوکندری می توان عمل آن را دستکاری کرد و نیز به مطالعه بیان ژن ها پرداخت. ژن درمانی میتوکندری در حال حاضر و البته در مراحل مقدماتی و آزمایشی می باشد، اما در آینده، می توان با وارد کردن ژن هایی به میتوکندری که تولید محصولات آنتی اکسیدانت می کنند از آسیب رسانی به میتوکندری پیشگیری کرد و در نتیجه پیری و بسیاری از بیماری های حاصل از جهش در mtDNA را به دلیل رادیکال های آزاد به مبارزه جدی طلبید. همچنین می توان ژنهای هسته ای را وارد میتوکندری کرد و بیان آنها را در درون میتوکندری مشاهده کرد. می توان پروتئین های را که از پیش در میتوکندری وجود ندارد، از جمله سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز را وارد میتوکندری کرد تا موجب تعمیر محصولاتی چون پراکسید هیدروژن و سوپراکسید گردد و در نتیجه، میتوکندری و سلول را از آسیب این مواد حفظ کرد (۱۹).

علاوه بر وارد کردن مولکول های زیستی مانند پلی پپتید و اسیدنوکلئیک می توان مولکول های زیستی مانند پلی پپتید های اصلاح شده، آنالوگ های DNA، موادی که خصوصیات آنزیم ها را تقلید می کنند، داروها، مهار کننده های ویژه آنزیمی، مولکول های پروب و مواد حساس به پرتو را نیز وارد میتوکندری کرد (۱۹). علاوه بر سیستم های جذب RNA و پروتئین، می توان از دیگر سیستمهای جذب میتوکندری مانند جذب اسیدهای چرب، و نیز خصوصیات دیگر میتوکندری مانند وجود مقادیر بالای چربی کاردیو لیپین در غشاء آن برای جهت دار کردن انتخابی ترکیبات به سمت میتوکندری سود جست. همچنین جایگاه های گیرنده های پروتئین در میتوکندری می تواند برای اتصال اختصاصی ترکیبات استفاده شود. همچنانکه پورفیرین (porphyrin) در پرتودرمانی به گیرنده benzodiazapine در غشاء (بیرونی) میتوکندری متصل می شود

نیز در درمان مورد توجه است. در تریپانوزوم ورود RNA با واسطه گیرنده های ویژه RNA صورت می گیرد درحالی که میزبان این انگل، سیستم انتقال tRNA را ندارد و مهار انتقال آن توسط لیگاند های ویژه برای گیرنده RNA می تواند یک دستاورد درمانی جدید ارایه کند (۳۴).

شایان تاکید است یکی از کاربردهای ژن درمانی مستقیم، وارد کردن ژن هسته ای به میتوکندری است. از این رو، ژن بیگانه وارد شده به میتوکندری، ژنی می باشد که مکان اصلی آن در هسته است. می توان این ژن را بین دو مولکول tRNA که پردازش می شود قرار داد. از این روش می توان برای تجزیه و تحلیل عملی مکانیسم ژنتیکی میتوکندری و نیز برای ژن درمانی میتوکندریایی استفاده کرد (۳۵).

یکی از متابولیت های سمی در پستانداران، آمونیاک است که یک فرآورده فرعی در پستانداران است. آمونیاک، توسط چرخه اوره (ازواکتش های ۵ آنزیمی در کبد) به اوره تبدیل می شود و از بدن دفع می شود. بخشی از این چرخه در میتوکندری می باشد در حالی که باقیمانده آن در سیتوپلاسم است. آرژیناز کبدی (L-arginine urea hydrolase=AI) پنجمین آنزیم این چرخه است. در بعضی بیماران مشخص شده است که این آنزیم دچار اختلال شده است. از طرفی یک فرم ثانویه از آرژیناز (AII) نیز شناسایی شده است که در یک سری از ارگان ها مثل کلیه به صورت غالب وجود دارد و نیز در مغز، مجاری روده و گوارشی و غدد پستانی به مقدار کم تولید می شود. این فرم ثانویه توسط هسته کد و سپس وارد میتوکندری می شود. دانشمندان فرم فعال AI را از طریق ژن درمانی وارد میتوکندری کردند و مشاهده کردند که آنزیم بیان شده در میتوکندری نسبت به آنزیمی که در سیتوپلاسم بیان می شود، پایداری بیشتر و نیمه عمر طولانی تری دارد. این نتایج نشان می دهد که نیاز نیست در مورد یک مولکول ما محدود به مکان های طبیعی درون سلول که در طول تکامل به دست آورده است، حداقل در موارد بیماری ها باشیم. چرا که در بعضی موارد نادیده گرفتن قوانین طبیعی، ممکن است نتایج سودمندانه تری را به دنبال داشته باشد (۲۱). چشم اندازی به آینده میتوکندری نقش مهمی در متابولیسم سلول های یوکاریوت از طریق تولید ATP، تنظیم هوموستازی کلسیم سیتوپلاسمی و مرگ سلولی از طریق آپوپتوز دارد (۱۳). در بیماری های انسان و در پیری (آسیب- های اکسیداتیو و رادیکال های آزاد) نیز حائز اهمیت است. این اندامک هم مونور حیات سلول و هم مونور مرگ سلولی به شمار می رود. در نتیجه هدفی راهبردی برای درمان های دارویی در آینده محسوب می شود.

آن RNAها با بار منفی ازغشاء آب گریز میتوکندری عبور می کنند، پیشنهاد شده است (۳۴).

الف) توسط گیرنده های ویژه RNA ب) توسط کانالهای پروتئینی و انتقال همزمان با پیش پروتئین ها. ج) توسط مجموعه های ویژه ریبونوکلئوپروتئینی همراه با پروتئین هایی که باید انتقال یابند. د) توسط منافذ مبتوکندریایی (این روش وابسته به ماشین انتقال پروتئین هاست).

گفته شد که میتوکندری پستانداران قادر به انتقال tRNA نمی باشد. دلیل این امر ظاهراً آن است که ژنوم میتوکندری بیست و دو مولکول tRNA مختلف و ضروری را رمزدهی می کند. همچنین مطالعه و بررسی tRNA ها در سیتوپلاسم و میتوکندری، tRNA عمومی را نشان نداده است که در هر دو بخش وجود داشته باشد. تنها انتقال دو RNA کوچک گزارش شده است که یکی RNase MRP (اندوریبونوکلئاز برای شکست RNA پرایمر در خلال همانندسازی mtDNA) و دیگری RNase P (اندوریبونوکلئازی که در پردازش انتهای 5' tRNA نقش دارد) می باشد. هر دو مجموعه RNA (ریبونوکلئوپروتئین) هستند که پروتئین های آن توسط هسته رمزدهی می شود. مقدار RNA مربوط به MRP در میتوکندری بسیار اندک است. این RNA برای همانند سازی mtDNA ضروری است. ژن mtRNase P در برخی ژنوم های میتوکندریایی دیده شده است، اما در میتوکندری پستانداران مشاهده نشده است و هر دو شکل سیتوزولی و میتوکندریایی آن توسط یک ژن واحد هسته ای رمزدهی می شود. همچنین مشاهده شده که rRNA 5S (باطول ۱۲۰ باز) که توسط هسته رمزدهی می شود، در میتوکندری هم وجود دارد به نحوی که اگر پایانه N آن نیز تغییر کند باز هم وارد میتوکندری می شود. از این رو حضورش به دلیل وجود توالی راهنما در پایانه N نیست (۳۴).

کاربردهای بالینی مربوط به انتقال RNA:

انتقال RNA به میتوکندری، کاربردهای متعددی مشتمل بر موارد زیر دارد:

- ۱- تصحیح کردن نقص mtDNA توسط RNA.
- ۲- وارد کردن RNA به میتوکندری برای تغییر فرآیندهای درون میتوکندری.
- ۳- استفاده از tRNA ی حمل شونده به میتوکندری به عنوان ناقل جهت رها کردن RNA ی بیگانه به میتوکندری.
- ۴- استفاده از RNA به عنوان آنتی سنس.
- ۵- ورود RNA در شماری از پروتئینها (protists) مانند تریپانوزوم و apicomplexaus، که عوامل بیماریزای بالینی هستند،

آن معادل سمیت ناقلینی می باشد که برای ژن درمانی هسته استفاده می شوند و به طور تجاری در دسترس هستند (۱۶و۲۲و۲۹).

با توجه به مطالبی که عنوان شد، می توان گفت که در حال حاضر، DQAsome به عنوان یک ناقل اختصاصی برای ژن درمانی میتوکندری مورد توجه می باشد.

مهار انتخابی DNA جهش یافته:

از دستاوردهایی که امید بزرگی برای بیماران میتوکندریایی است توانایی دانشمندان، در وارد کردن یک اولیگو نوکلئوتید به درون میتوکندری است. این اولیگو نوکلئوتید - آنتی سنس ویژه میتوکندری - به طور اختصاصی به توالی mtDNA جهش یافته متصل می شود. در نتیجه از همانند سازی توالی جهش یافته معانعت به عمل می آید. این امر موجب می شود که نسخه های mtDNA های طبیعی که در همان سلول حضور دارند، افزایش یابد (۲۰).

این مسئله مبتنی براین مشاهده است که mtDNA حتی در بافت های پس از میتوز دارای همانندسازی می باشد و زمانی که کشت سلول با موادی که تعداد mtDNA را کاهش می دهد تیمار می شود، جمعیت های تولید شده، همچنان دارای تعداد طبیعی mtDNA میباشند. ازاین رو، برای ابقاء تعداد نسخه های mtDNA در سلول مکانیسم های وجود دارد.

PNA (Peptide Nucleic Acid)، اسیدهای هسته ای پلی آمیدی سنتزی شبه اولیگو دیاکسی- نوکلئوتیدی هستند که از طریق میانکش استاندارد واتسن - کریک قادر به تشکیل جفت باز می باشند. این مشتقات پلی آمیدی، به جای فسفات دی اکسی ریبوز، دارای پلی مر N- ۲ آمینو اتیل گلیسین می باشند. در نتیجه برای درمان های آنتی ژنومیک نامزد مناسبی محسوب شده و دارای میل ترکیبی برای DNA تک رشته ای مکمل خود هستند. در مجموع، مکمل توالی های کوتاه mtDNA جهش یافته یا دارای حذف می باشند و به این توالی ها متصل شده و مانع از همانند سازی mtDNA جهش یافته می شوند. برای اینکه PNA به طور اختصاصی وارد میتوکندری شود آن را به توالی های راهنمای ویژه میتوکندری متصل می کنند (۲۳).

در انتقال PNA ها، سیستم ها یا ماشین انتقال میتوکندریایی بسیار مهم می باشد (۱۹و۹).

شایان ذکر است که میتوکندری پستانداران قادر به انتقال RNA به درون ماتریکس خود نیست. اگر چه در موجودات دیگر این توانایی وجود دارد. مطالعه چگونگی انتقال RNA به میتوکندری در این موجودات برای استراتژی آنتی ژنومیک مفید است. زیرا RNA نیز یک نوع اسید نوکلئیک است. مکانیسم های متعددی که توسط

میتوکندری و بیان آن در میتوکندری و در نتیجه تصحیح فنوتیپ بیماری را متکی می باشد. در این روش، مشکل حذف mtDNA وجود ندارد اگرچه مشخص نیست که سیستم های ترجمه و رونویسی که برای سیستم DNA حلقوی تکامل یافته اند آن را ترجمه و رونویسی می کنند یا خیر؟ این احتمال نیز وجود دارد که DNA وارد شده به این روش شکل های ساختاری متفاوتی به خود بگیرد.

وارد کردن DNA به میتوکندری، البته کار دشواری است. به نظر می رسد که در انسان حداقل دو گونه RNA کوچک به میتوکندری وارد می شود که مکانیسم های مربوط به آن کما بیش ناشناخته است. همچنین دانش جاری پیرامون پروتئین های سیستم انتقال و واردات میتوکندری ناچیز است و در مورد مجموعه های TOM و TIM (ترانس لوکازهای غشاء خارجی و غشاء داخلی میتوکندری) اطلاعات بسیار اندکی در دست است. یک امکان حمل اسبدنوکلئیک توسط پروتئین های ماشین واردات می باشد. به این نحو که به صورت کووالانت به توالی های اولیگوپپتیدی که قرار است وارد شود، متصل شده و سپس همراه آن انتقال یابد. این راهکار، اگرچه در مرحله جنینی بسیار اولیه است اما به مشابه یک فن برای ژن درمانی میتوکندریایی، دارای توانایی بالقوه است (۲۰۱۰).

راههای ژن درمانی مستقیم میتوکندریایی:

الف) استفاده از تفنگ های پرتاب کننده

نخستین تلاش ها برای انتقال مستقیم DNA بیگانه به میتوکندری، بر استفاده از تفنگ های پرتابی (بمباران سلولها با DNA که در پوششی از تنگستن قرار دارد) استوار بود. پژوهشگران با این روش توفیق یافتند که DNA بیگانه را به میتوکندری مخمر وارد کنند. استفاده از این روش برای سلول های پستانداران موفقیتی را در پی نداشته است (۹).

ب) اتصال سیتوپلاسمی

راهکار دیگر که برای ژن درمانی مستقیم و توسط Kagawa و همکاران به کار گرفته شد اتصال سیتوپلاسمی نام دارد این پژوهشگران در شرایط invitro سیتوپلاست حاری میتوکندری سالم را به سلول دیگری که دارای نقص میتوکندری بود وارد کردند و سلول های cybrid (Cy: Cytoplasmic, brid: hybrid) را تولید کردند. در این روش، سلول توسط تیمار cytochalasin هسته خود را ازدست می دهد و سپس هسته سلول دیگر وارد آن می شود. مشکل این روش این است که ابتدا باید سیتوپلاسم را از mtDNA خالی کرد. وجود هزاران نسخه از mtDNA در یک

شماری از پژوهشگران ایتین های حساس به PH را گزارش کرده اند که در بین آنها ایتین هایی وجود دارد که PH میتوکندری برای فعالیت آنها مناسب و بهینه است. با روش جهش زایی جهت دار می توان ایتین هایی اختصاصی طراحی کرد.

از طرفی چنانچه ایتین به اندازه کافی بزرگ باشد و فرآیند انتقال به طور سریع و همزمان با ترجمه صورت گیرد این امکان است که پایانه N مربوط به ایتین پیش از اینکه پایانه C آن ساخته شود، انتقال یابد. در چنین شرایطی، تا هنگامی که تمام ایتین انتقال نیابد، رخداد قطع (Splicing) نمی تواند صورت گیرد (۲۰).

راه حل دیگر، اتصال توالی رهبر (علامت رهبر) به ایتین است در این صورت توالی پایانه C مربوط به ایتین که به پایانه N پیش پروتئین متصل است به دلیل اتصال توالی رهبر، غیرفعال بوده و قادر به ایفای نقش خود نیست. از این رو تا زمانی که پروتئین در سیتوپلاسم است قادر نیست که فعالیت Splicing را انجام دهد و زمانی که انتقال پیدا کرد توالی رهبر برداشته می شود و اینک می تواند عمل قطع را انجام دهد (۲۰).

مثالی از کاربرد ژن درمانی:

آزاد کردن برخی از آنزیمهای برش دهنده خاص و محدود کننده به میتوکندری، راهکار جدید (و البته محدود) برای ژن درمانی بیماریهای میتوکندریایی محسوب می شود. در این زمینه، توضیح مختصری خالی از قایده نیست:

برخی جهش ها برای آنزیمهای محدود کننده، جایگاه برشی جدیدی ایجاد می کنند. این آنزیمها را می توان با توالی رهبر میتوکندریایی وارد میتوکندری کرد. روشن است که این روش زمانی قابل استفاده است که در mtDNA جهش یافته، جایگاه جدید برش آنزیمی ایجاد گردد (۵).

آنزیم محدود کننده SmaI به دلیل وجود جهش mt ۸۹۹۳T >G که موجب جایجایی leu ۱۵۶ Arg می شود، برای تشخیص ضعف عصبی-عضلانی، آتاکسی و بیماری های Leigh و Pigmentosa retinitis استفاده می شود. توسط ژن درمانی می توان SmaI را وارد میتوکندری کرد زیرا در حالت هتروپلاسمی، mtDNA جهش یافته با mtDNA طبیعی وجود دارد و تنها جهش یافته (و نه mtDNA سالم) است که توسط این آنزیم برش داده می شود. در آزمایشی مشخص شد که نوع طبیعی فعالیت خود را داراست (۵). ژن درمانی مستقیم میتوکندریایی:

روش دیگر برای درمان اختلالات میتوکندریایی، استفاده از ژن درمانی مستقیم میتوکندریایی (direct Mitochondrial gene therapy) است که بر وارد کردن DNA طبیعی به

۱- ظرفیت پمپ پروتون مجموعه ۳ و ۴، در محیط *in vivo* کافی نمی باشد.

۲- اغلب اختلالات میتوکندریایی حاصل جهش در *tRNA* می باشد.

۳- دوزن سیتوکروم *b* از مجموعه ۲ و زیر واحد یک از مجموعه ۴ در تمام ژنوم های میتوکندریایی که تا به امروز تعیین توالی شده اند وجود داشته است. در واقع آب گریزی زیاد این دو، مانع از انتقال آنها به هسته در طول تکامل شده است. بنابراین، این روش حداقل در مورد این دو پروتئین پاسخگو نمی باشد (۲۰).

ه- ساخت و انتقال پروتئین با آب گریزی پایین و اصلاح آن پس از انتقال به میتوکندری.

ایتین (*Intein*) که نخستین بار در ۱۹۹۰ کشف شد پروتئینی است که دارای خاصیت ویرایش کننده ایترون ها می باشد یعنی دارای خاصیت *Self splicing* است و خود می تواند ایترون های خود را حذف کند. ایتین ها پس از ترجمه از پروتئین جدا شده و توسط پیوندهای پهنیدی اگزین ها (*exteins*) را به هم وصل می کنند. با آنکه اغلب ایتین ها در بو باکتری ها (*eubacteria*) و آرکی باکتریها (*archaeobacteria*) یافت شده اند، ۶ مورد از آنها در یوکاریوتها نیز شناخته شده اند که ۲ عدد آن مربوط به ژنوم هسته ای مخمر است. مشخص شده است که ایتین برای اتصال به اگزین به توالی ویژه ای از اگزین نیاز ندارد و تنها نیاز آن است که اسید آمینه ای که پایانه C مربوط به ایتین به آن متصل می شود سرین، سیستئین یا ترئونین باشد. خاصیت اندوپیتیدازی ایتین در واقع به تعدادی اسید آمینه محدود می شود که در هر دو انتهای ایتین وجود دارد. قرار دادن ایتین در بین دو قلمروی آب گریز و یا حتی در درون یک قلمروی آب گریز، موجب فاصله افتادن بین اسید آمینه ها می شود و در نتیجه، آن قلمرو نمی تواند به طور صحیح تاخورد شده شود. این امر موجب کاهش آب گریزی پروتئین و سریعتر شدن انتقال می گردد (۲۰).

مسئله ای که باید به آن توجه داشت سرعت بالای ایتین ها در ویرایش می باشد. یکی از دستاوردها در این زمینه، مهیا کردن شرایط برای ایتین ها به نحوی است که در سیتوزول غیر فعال و در میتوکندری فعال باشند. این کار را می توان با تغییر مشخصه های بیوشیمیایی انجام داد. به عنوان مثال، PH اسیدی میتوکندری بسیار بالاتر از PH در سیتوزول می باشد و می توان ایتین را طوری طراحی کرد که در PH سیتوزول غیر فعال و در PH اسیدی میتوکندری فعال باشد (۲۲).

الف- وصل کردن یک توالی رهبر بسیار بزرگ به پروتئین، به طوری که به ماشین انتقال پروتئین میتوکندری اجازه می دهد که با به کارگیری انرژی زیاد، بتواند آنها را انتقال دهد. این ایده از آنجا سرچشمه گرفت که مشاهده شد پروتئین هایی که توسط هسته رمزدهی می شوند و بسار آب گریز هستند دارای توالی های رهبر بزرگ و غیر معمول می باشند. موفقیت برای انتقال (البته) تنها در مورد پروتئین هایی با اندازه متوسط (مانند پروتئین زیر واحد ۹ از *Atpase* در ساکارومیس سروریزه واجد ۷۶ اسید آمینه) به دست آمد (۲۰).

ب- دانشمندان مشاهده کردند که حمل پروتئین از پایانه N (یعنی زمانی که ترجمه هنوز ادامه دارد) آغاز می شود. بنابراین، فرآیندهای ترجمه و انتقال به طور همزمان صورت می گیرد. همگامی امر انتقال یا ترجمه این امکان را فراهم می آورد که قلمرو آب گریز، پیش از آنکه فرصت کافی برای تاشدگی داشته باشد، انتقال یابد. استفاده از کدون های کمیاب، موجب کندشدن فرایند ترجمه شده و به این امر کمک می کند (۳).

ج- راهکار دیگر مطالعه چگونگی انتقال این پروتئین ها در اندامگان های دیگر است. تفاوت کلید رمز ژنتیکی *mtDNA* تمام گونه های جانوری، دلیل اصلی منع انتقال این ژنها به هسته در خلال تکامل زیستی بوده است، تغییر کلید رمز *UGA* از کلید ایست به تریپتوفان نخستین انحراف و سد در روند تکامل زیستی بوده است. رویدادی که با توقف انتقال ژن در حیوانات و قارچ ها همزمان بوده است. گونه های متفاوت گیاهی که در آنها *mtDNA* همان کلید های رمز ژنتیکی استاندارد هسته را داراست قادر هستند با موفقیت ژنهایی را به هسته انتقال دهند که جانوران در میتوکندری رمزدهی می کنند. اگرچه، چگونگی غلبه بر مشکل آب گریزی، در حاله ای از ابهام قرار دارد (۲۰).

د - جایگزینی پروتئین های واجد آب گریزی پایین با پروتئین های غیر قابل حمل راهکار دیگری است که نخستین بار در مورد مجموعه ۱، به کار رفته است. در برخی از گونه های مخمر مجموعه ۱ تنها شامل یک آنزیم پلی پپتیدی ساده و دارای نقش انتقال الکترون است. اگر چه که قادر به پمپ پروتون نیست و برای پمپ کردن پروتون فعالیت مجموعه ۳ و ۴ در این موجود کافی است. در واقع *NADH* دهیدروژناز بدون قابلیت پمپ پروتون، دارای آب گریزی پایین است که بیشتر توسط هسته رمزدهی می شده است. پژوهش های بعدی نشان داد که سلول های انسانی نیز می توانند مشابه آنچه در بالا اشاره شد و البته با محدودیت هایی اصلاح شوند. این محدودیت ها شامل موارد زیر می باشد:

mtDNA مربوط به tRNA (۲۲ عدد) در برابر ۲ عدد rRNA و ۱۳ پلی پپتید (می باشد) در حالی که شواهدی دال بر انتقال tRNA رمز شده توسط هسته به میتوکندری اندامگان های متفاوت مانند گیاه، مخمر و پروتوزوا وجود دارد اما مکانیسمی طبیعی مبنی بر وارد شدن tRNA سیتوپلاسمی به میتوکندری در سلول های پستانداران گزارش نشده است. هر چند که اطلاعات نشان داده است که میتوکندری، ریبونوکلیک اسیدهای کوچک (دو rRNA کوچک) به استثنای از tRNA را وارد می کند (۹). گروه tarrassav اثبات کردند که میتوکندری جدا شده از انسان که در حالت طبیعی و غیر جدا شده قادر به حمل و وارد کردن tRNA به درون خود نمی باشد در حالت جدا شده و در حضور مقادیر کافی از عامل های انتقال دهنده مخمر، قادر است که tRNA مخمر را وارد خود کند (۲۲).

۳- مشخص شده است که ۱۳ پروتئین رمز شونده توسط mtDNA بسیار آب گریز (hydrophobic) هستند. این ویژگی موجب می شود که این پروتئین ها توسط ماشین واردات میتوکندری (ماشین انتقال پروتئین) قادر به وارد شدن به میتوکندری نباشند. بنابراین به نظر می رسد که این پروتئین ها در محل فعالیت خود (میتوکندری) سنتز می شوند (۱۶ و ۲۰ و ۲۲). زیرا قبل از انتقال توسط ماشین واردات میتوکندری، تاخوردگی (folding) آنها باید توسط چاپرون ها از بین برود. این پروتئین ها به دلیل آب گریزی زیاد به unfolding مورد نیاز برای انتقال مقاوم هستند (۲۰).

۴- براساس یک نظریه، پروتئین های رمز شده توسط میتوکندری برای سیتوپلاسم سمی هستند. از این رو، در میتوکندری سنتز می شوند (۹). چنانچه در سیتوزول سنتز شوند وارد شبکه آندوپلاسمی گردیده و پیش از اینکه وارد میتوکندری شوند از سلول به بیرون ترشح می گردند. شایان ذکر است که پیرامون این نظریه ها، هنوز شواهد کافی وجود ندارد و باید روشن شود که در طول تکامل زیستی، انتقال ژن از میتوکندری به هسته چرا زمانی که به این ۱۳ ژن رسیده است ظاهراً متوقف شده است (۲۰)؟

۵- فرضیه دیگر بیان می دارد که بیان ترانس ژنها تنها زمانی لازم می باشد که زیست زایی میتوکندری ضروری باشد (۲۰۱۸).

تفاوت کلید رمز ژنتیکی مسئله ای است که به راحتی می توان بر آن غلبه کرد، اگر چه موانع دیگر به صورت سدهای غیرقابل حل ظاهر شده اند. تاکید می گردد که برای فائق آمدن به این مشکل ها به ویژه مشکل آب گریزی زیاد این پروتئین ها راه حل های متعددی مشتمل بر موارد زیر طرح شده است:

غشاء درونی شناسایی شده و توسط آنها از منفذ هیدروفیلی غشاء درونی عبور می کند و وارد میتوکندری می شود. در درون ماتریکس، توالی راهنما توسط پروتئین های درون میتوکندری جدا می گردد و پس از آن، پروتئین دوباره ناشدگی صحیح خود را باز می یابد. با اضافه کردن توالی راهنمای مناسب می توان پروتئین را به دیگر بخش های میتوکندری مانند غشا یا فضای بین دو غشاء وارد کرد (۱۹).

برای انتقال DNA به هسته، شماری از ناقلین ویروسی و غیر ویروسی وجود دارند اما در مورد میتوکندری باید به جستجوی ناقلین مناسب بود.

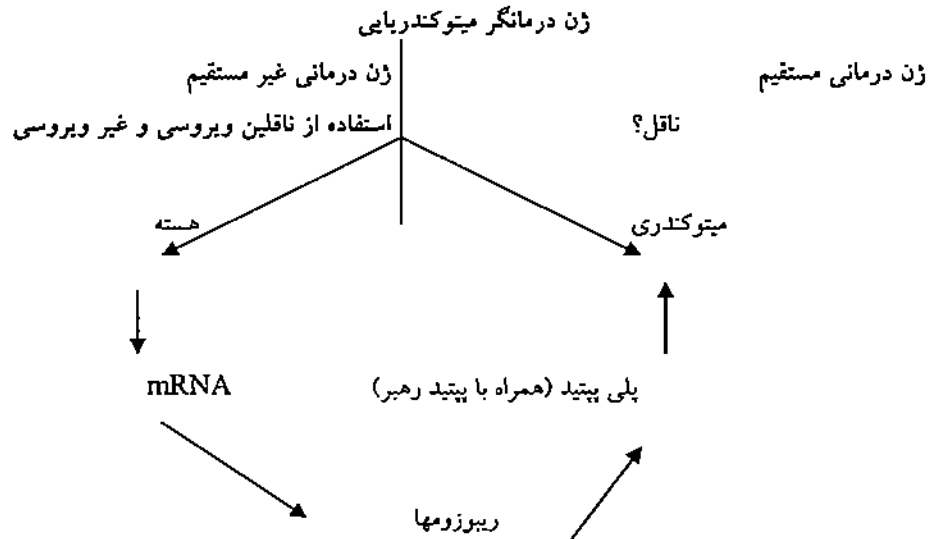
این مشکل موجب شده است که دانشمندان ژن درمانی غیر مستقیم را مورد تامل قرار دهند. اگرچه که ژن درمانی غیر مستقیم نیز و اضافه بر ژن درمانی هسته دارای شماری مشکلات می باشد که سبب گرایش دانشمندان به ژن درمانی مستقیم گردیده است (۱۶۹).

مشکلات ژن درمانی غیر مستقیم و راه حل های آن
۱- در mtDNA، چهار کلید رمز با کلید های رمز هسته ای (universal)، به شرح زیر تفاوت دارند:

ژنوم میتوکندریایی	ژنوم هسته ای	سه حرفی
تریپتوفان	کلید ایست	UGA
کلید ایست	آرژنین	AGG
متیونین	ایزولوسین	AUA
کلید ایست	آرژنین	AGA

ژن های میتوکندریایی دارای کلید رمز UGA به میزان فراوان هستند. بنابراین اگر این ژن ها مستقیماً وارد هسته شوند در آنجا به جای تریپتوفان با کلید ایست مواجه خواهند شد. در نتیجه محصول مورد نظر تولید نخواهد شد. به علاوه، Seward و همکاران نشان دادند که پروموتور زنجیره سنگین mtDNA در ژنوم هسته ای قادر به ایفای نقش خود نمی باشد. این مشاهدات تأیید کننده این مسئله است که سیستم های رونویسی در هسته و میتوکندری سلول های انسانی با هم متفاوت بوده و مستقل از یکدیگر عمل می کنند (۹).

۲- mtDNA دارای ۲۷ ژن است که تنها ۱۳ عدد آن مربوط به پلی پپتیدهای زیر واحد زنجیره تنفسی می باشد و ۲۴ عدد باقیمانده، رمز کننده RNA ها هستند که ۲۲ عدد مربوط به tRNA ها و ۲ عدد آنها مربوط به rRNA می باشد. این RNA ها نیز در سنتز ۱۳ پلی پپتید mtDNA شرکت می کنند و زائد برای آن دسته از پروتئین هایی هستند که از سیتوزول وارد می شوند. در نتیجه اکثر نقص های



میتوکندری) می باشد. بر روی ژن بیگانه ابتدا باید دو اصلاح صورت گیرد:

نخست: از آنجا که کلیدهای رمز ژنتیکی هسته و میتوکندری با هم متفاوتند، کلید های رمز DNA بیگانه باید متناسب با هسته شوند تا ترانس ژن (Transgene)، پروتئین صحیح را رمزدهی کند. دوم، به منظور وارد شدن پروتئین مورد نظر به درون میتوکندری، اضافه شدن یک توالی راهنما به ژن بیگانه ضروری است. برای درمان بر علیه پیری استفاده از این روش مناسب به نظر می رسد (۲۰).

وارد کردن ژن میتوکندری به هسته و سپس ترجمه آن در سیتوپلاسم و وارد شدن آن به میتوکندری توسط توالی راهنما را بیان آلتوپیک (allotopic expression) می گویند (۲۱).

شماری از سیستم های انتقال میتوکندریایی (که برای آنیون، کاتیون، لیپید، پروتئین و اسیدهای نوکلئیک گزارش شده اند)، وجود دارند که دارای این پتانسیل اند که ترکیبات را به طور مستقیم وارد میتوکندری کنند. در بین آنها ماشین انتقال پروتئین به میتوکندری کاربردی ترین ترکیب محسوب می شود. اغلب پپتیدهای میتوکندری، توسط nDNA رمزدهی می شوند و سپس در سیتوپلاسم ترجمه شده و به میتوکندری وارد می شوند. علایم راهنما در پایانه N این پروتئین ها (۲۰ تا ۶۰ اسید آمینه که تشکیل ساختار آلفا هلیکس آمفی پاتیک را می دهد و دارای شماری بار+ می باشد) موجب وارد شدن انتخابی این پروتئین ها به میتوکندری می شود (۷). پس از ترجمه در سیتوپلاسم، تا شدگی (folding) پروتئینی که صلاحیت لازم برای انتقال را کسب کرده است، توسط چاپرون های سیتوپلاسمی از بین می رود. علامت راهنما به گیرنده موجود در غشاء بیرونی میتوکندری متصل شده، و توسط ترانس لوکازهای غشاء بیرونی، پروتئین از منفذ هیدروفیلی موجود در این غشاء عبور می کند. در پی آن توالی راهنما توسط ترانس لوکازهای

از دستاوردهای ژن درمانی مستقیم، معرفی DNA ی آنتی سنس (antisense DNA) به میتوکندری می باشد که این DNA، مکمل منطقه دارای جهش در mtDNA می باشد در نتیجه به آن ناحیه متصل شده و مانع از همانندسازی mtDNA جهش یافته می شود. از این رو، تنها نسخه های طبیعی mtDNA همانند سازی خواهند کرد (۲).

برای رها کردن ماکرومولکول ها به میتوکندری، دست کم چهار راهکار وجود دارد (۵):

- ۱- استفاده از علامت راهنمای ویژه میتوکندری.
- ۲- اتصال مواد میتوکندری دوست به مولکول مورد نظر. این مواد به دلیل پتانسیل بالای غشای میتوکندری به راحتی قادر به عبور از در غشاء (میتوکندری) می باشند.
- ۳- استفاده از آبدانک های (vesicles) ویژه میتوکندری به منظور رها کردن مولکول مورد نظر در درون میتوکندری (۵).
- ۴- با توجه به اینکه درون سلول، میتوکندری ها پیوسته در حال ادغام شدن و جدا شدن از یکدیگرند می توان میتوکندری حاوی mtDNA بیگانه را وارد سلول کرد تا ضمن ادغام شدن با میتوکندری های درون سلول، میتوکندری های سلول، حاوی mtDNA بیگانه گردند (۱۹۵).

ژن درمانی غیر مستقیم میتوکندریایی

این روش ژن درمانی نخستین بار در سال ۱۹۹۰ به کار گرفته شد. در واقع هدف، وارد کردن mtDNA بیگانه به هسته (به جای

بنابراین زمان آستانه ای مورد نیاز است که برای سلول ها و بافت های مختلف متفاوت است. داروهایی که استفاده می شوند شامل مهارکننده های DNA پلیمرز میتوکندریایی، مهارکننده های توپوایزومراز میتوکندریایی، داروهای انترکاله شونده در mtDNA، داروهای غیر انترکاله شونده در mtDNA و کاتیون های لیپوفیلی می باشد (۱۵).

ژن درمانی

علی رغم پیشرفت و گسترش اطلاعات مربوط به نقص های mtDNA در سطوح بیوشیمیایی و ژنتیکی هنوز درمان رضایتبخشی برای توده وسیعی از بیماران در دسترس نمی باشد. بخش عمده این چالش به دلیل این واقعیت است که تقریباً تمام نقص های mtDNA به نحوی با متابولیسم اکسیداتیو درگیر می باشند و برطرف کردن نقص از طریق یک مسیر فرعی با دادن متابولیت حمل کننده انرژی امکان پذیر نیست. این مسئله درمان های بیوشیمیایی را برای بیماران محدود کرده و موجب شده است که دانشمندان به ژن درمانی روی آورند. بدیهی است که ژن درمانی در mtDNA هنوز به طور عمده در سطح نظری مطرح شده است. زیرا به طور مثال هر امکانی برای جایگزینی ژن، به استفاده از ناقلین انتقال دهنده ویژه میتوکندری وابسته می باشد که چنین ناقلینی هنوز غیر قابل دسترس هستند (۹).

به طور کلی، دو نوع متفاوت ژن درمانی در میتوکندری مد نظر است (۱۰-۱۶-۱۸):

- ۱- ژن درمانی مستقیم (direct mitochondrial gene therapy). در این روش ژن یا DNA به طور مستقیم در میتوکندری است که در نتیجه آن، رونویسی و ترجمه ژن درمانگر نیز درون میتوکندری باید تحقق یابد.
- ۲- ژن درمانی غیر مستقیم (indirect mitochondrial gene therapy). در این روش ابتدا ژن طبیعی یا درمانگر را وارد هسته می کنند و سپس از روی آن رونویسی انجام می گیرد و رونوشت حاصل وارد سیتوپلاسم شده و در سیتوپلاسم ترجمه می گردد. در مرحله پایانی فرآورده ژن درمانگر باید وارد
- ۳- میتوکندری شود تا در آنجا فعالیت خود را انجام دهد. خلاصه روشهای اشاره شده در نمودار زیر آمده است:

استفاده از روش های ژنتیک مولکولی برای شناسایی جهش: از روش های ژنتیک مولکولی برای تعیین جهش در ژنوم هسته ای و ژنوم میتوکندری استفاده می شود. شناسایی جهش نقطه ای mtDNA توسط روش واکنش زنجیره ای پلیمرازی (PCR) آسان است در حالی که از روش بلات سائرن (Southern blot) برای تعیین بازآرایی های mtDNA استفاده می شود. یک مشکل در دستاوردهای تشخیصی این است که علی رغم سطح بالای حذف های هتروپلاسمی و جهش نقطه ای در عضله، این جهش ها ممکن است درخون مشخص نشوند (۱).

درمان بیماری های میتوکندریایی:

راههای متفاوتی برای درمان بیماریهای حاصل از اختلالات میتوکندریایی مشتمل بر موارد زیر وجود دارد:

حذف متابولیت سمی، ایجاد پذیرنده های الکترونی مصنوعی، طراحی متابولیت و کمک عامل (cofactor)، ایجاد جاروکننده های رادیکال های اکسیژن؛ درمان های موقتی؛ ژن درمانی و مشاوره ژنتیک (۱۴).

دارو درمانی:

از درمان های اولیه موفق می توان به درمان میوپاتی با نقص در مجموعه ۳ توسط آسکوربات (ascorbate) و منادیون (menadione)، درمان میوپاتی چشمی با کوآنزیم Q (coenzyme Q=CoQ) و با سوکینات به اضافه کوآنزیم Q، درمان بیماران قلبی با CoQ و درمان لاکتیک اسیدوز (lactic acidosis) با دی کلرواستات (dichloroacetate) اشاره کرد (۴).

شماره دارو شناخته شده اند که سلول های پستانداران را از mtDNA تخلیه می کنند. همانند سازی mtDNA در خلال کل چرخه سلولی (حتی در سلول هایی که دیگر در حال تقسیم نیستند) می تواند صورت گیرد. بنابراین، مهار ستر mtDNA موجب خالی شدن سلول های در حال تقسیم از mtDNA می شود. میزان mtDNA در سلول های بافت های مختلف بسته به نیاز آنها به انرژی متفاوت است این میزان متفاوت، عامل تعیین کننده حساسیت بافت های مختلف به داروهایی است که با mtDNA ارتباط داشته یادگیر هستند. سلول های برخی بافت ها مانند عضله می توانند در پاسخ به تغییرات انرژی، میزان mtDNA خود را حتی تا ۵ برابر تغییر دهند سمیت داروها که موجب القاء انتخابی کاهش mtDNA می شود دارای یک تاخیر اولیه است که به زمان لازم برای تغییر تعداد نسخه های mtDNA مربوط می باشد.

پراکسی نیتريت را می کند. میتوکندری دارای سیستمی برای محافظت خود در برابر آسیب اکسیداتیو می باشد.

آسیب های اکسیداتیو میتوکندریایی در شماری از بیماری ها مانند آسیب های حاصل از کم خونی موضعی، بیماری های زوال وتبای عصبی، افزایش می یابد.

محدودیت در رژیم غذایی موجب کاهش آسیب های اکسیداتیو میتوکندریایی می گردد. رخدادی که نمایانگر نقش آسیب های اکسیداتیو در پیری می باشد. بنابراین، محدودیت در رژیم غذایی، افزایش طول عمر پستانداران را در پی دارد (۱۱).

مرگ سلولی نکروز و آپتوز:

اخیراً روشن شده است که میتوکندری هم در آپتوز (apoptosis) و هم در نکروزه شدن سلول نقش محوری دارد. مرگ سلولی بر اثر نکروزه شدن در پاسخ به آسیب حاد بوده و نتیجه آن سریع می باشد. این رخداد موجب مرگ غیر قابل کنترل همراه با لیزسولولی شده و همچنین پاسخ های التهابی را موجب می گردد. تخلیه ATP وارد شدن مقادیر زیادی کلسیم به سلول و آسیب های وسیع میتوکندری از رویدادهایی است که در پی مرگ سلولی نکروزه، رخ می دهند (۱۳). در حالی که در خلال آپتوز، برنامه مرگ سلولی فعال می شود. این امر موجب تخریب ساختار سلولی توسط خود سلول شده و توسط سلول های اطراف فاگوسیتوز می گردد. در نتیجه ترکیبات خطرناک به بیرون و اطراف سلول نشت نمی کند و از این رو پاسخ التهابی نیز مشاهده نمی شود. آپتوز در خلال رشد برای برداشت و حذف سلول های زائد در پاسخ به آسیب های سلولی مانند عفونت ویروسی یا تغییر شکل ها ایجاد می شود. تفاوت بین آپتوز و نکروزه شدن قراردادی است. کامل شدن آپتوز نیاز به ATP دارد و چنانچه پس از شروع آپتوز سطح ATP از یک سطح آستانه پایین بیاید، فرایند آپتوز متوقف شده و نکروزه شدن صورت می گیرد. میتوکندری در ورود سلول به آپتوز نقش دارد. سلول ها مجبور هستند که به نحو برگشت ناپذیر وارد آپتوز شوند، اگر کاسپاز (Caspase) فعال شود. کاسپاز، سیستمین پروتئاز است که در قالب پیش شکل های غیر فعال در سیتوپلاسم حضور دارد و توسط اتوپروتئولیز (auto-proteolysis) فعال می گردد. سپس پروتئولیزهای دیگر فعال می شود و به دنبال هم به صورت آبشاری ادامه یافته و موجب انجام آبشار کاسپاز و مرگ سلول می شود. میتوکندری با آزاد کردن سیتوکروم C از فضای بین دو غشا به سیتوپلاسم، موجب آبشار کاسپاز می شود. در سیتوپلاسم، سیتوکروم C با Apaf-1 و پیش کاسپاز ۹ واکنش داده و پیش کاسپاز ۹ فعال شده، پروکاسپاز ۳ را نیز فعال می کند و در نتیجه آپتوز القا می شود. اینکه چگونه

میتوکندری، سیتوکروم C را رها می کند ناشناخته است، اما به دنبال تحریک پیش آپتوزی، غشاء بیرونی میتوکندری به سیتوکروم و دیگر پروتئین های بین دو غشاء نفوذپذیر می شود. یکی دیگر از پروتئین های فضای بین دو غشاء، پروتئین ۵۰ KD به نام عامل القا کننده آپتوز (apoptosis inducing factor=AIF) می باشد که اگر چه به طور مستقیم موجب فعال شدن کاسپاز سیتوپلاسمی نمی شود اما در عوض در هسته قرار گرفته و موجب القاء آپتوز می شود (۱۳ و ۱۱).

مشکلات بیماریزایی مربوط به اختلالات میتوکندریایی:

در رابطه با این پرسش که چرا نقص در یک مسیر مشابه، موجب ایجاد علائم و نشانه های مختلف و متنوع می شود، پاسخ روشنی در دست نیست. برخی پاسخ ها به ژنتیک میتوکندری به ویژه هتروپلاسمی و اثر آستانه ای اشاره دارند. بدین معنی که بافت های مختلف بیماران با یک نقص مولکولی یکسان می تواند دارای بار جهشی متفاوت باشد و در نتیجه این بار جهشی، برخی از بافت ها از اثر آستانه ای عبور کنند. در حالی که در دیگر بافت ها، بار جهشی به حد آستانه بیماریزایی نرسیده است (۳).

در رابطه با میزان شیوع بیماریهای میتوکندریایی، به سه مطالعه اشاره می شود. این مطالعات در کشورهای اروپای شمالی صورت گرفته است که در آنها مهاجرت اندک بوده و سیستم های مراقبت و بهداشت همگن دارند. در مطالعه ای در شمال فنلاند مشخص شد که فراوانی MELAS (A ۳۲ ۴۳ G) در این ناحیه، ۱۶۳ در هر صد هزار می باشد. در مطالعه مربوط به شمال شرق انگلیس مشاهده کردند که حداقل شیوع جهش های بیماریزا در جمعیت ۱۷/۸۴ در هر صد هزار می باشد. سومین مطالعه مربوط به غرب سوئیس می باشد که روی کودکان پیش دبستانی متمرکز بوده و مشخص شده است که فراوانی بیماری های میتوکندریایی ۱ در هر ۱۱ هزار می باشد. سه مطالعه مذکور نشان می دهد که بیماری های میتوکندریایی، کمابذ نبوده و فراوانی آنها در حدود بیماری های متابولیک و بسیار شایع تر از دیستروفی عضلانی می باشد. همچنین با کرة هانتینگتون و Motor neuron قابل مقایسه هستند. تشخیص پیش از تولد نیز مشکلاتی را به همراه دارد:

- ۱- جهش های مشاهده شده در آزمون های آمینوسیتوز (amniocytes) و یا پرزهای جفت ممکن است در دیگر بافت های جنین نباشند.
- ۲- بار جهشی در نمونه های پیش از تولد ممکن است در همان دوران جنینی یا پس از تولد به دلیل پخش میتوزی (تقسیم در دوران جنینی یا پس از تولد و در نتیجه تغییر میزان میتوکندری در سلول های دختر) تغییر کند (۳).

کاهش تعداد mtDNA در افراد آلوده به ایدز تحت درمان با داروی Zidovudine مشاهده شده است که کاهش mtDNA هم در فرد و هم در ویروس دیده شده است.

کاهش تعداد mtDNA موجب کاهش فرآورده های ژن mtDNA می شود اما در محصولات nDNA کاهشی مشاهده نمی شود (۴).

نقص در ژنهای هسته ای :

برخی میوپاتی های چشمی دارای الگوی وراثتی غالب آتوزومی هستند. مبتلایان در شجره ها به جای یک حذف دارای چند حذف در mtDNA می باشند. تمام حذفها نیز در نواحی تکرار مستقیم می باشد. این مسئله به دلیل سرخوردن چنگال همانندسازی در این نواحی است و از آنجا که تمام پروتئین های مورد نیاز برای زیست زایی میتوکندری توسط هسته رمزدهی می شوند این افراد احتمالاً دارای جهش در nDNA در ژنهای رمزکننده آنزیم های همانندسازی mtDNA و در نتیجه اختلال عمل این آنزیم ها می باشند (۴).

در حدود ۱۰۰ زیرواحد زنجیره تنفسی توسط nDNA رمز دهی می شود که جهش در آنها می تواند هر ۵ مجموعه آنزیمی زنجیره تنفسی را تحت تأثیر قرار دهد. نخستین جهش بیماری زا در ژن هسته ای رمز کننده زیر واحد فلاوپروتئین SDH، در دو هم پدر مادر یا سندرم Leigh و نقص در مجموعه دو گزارش شد. جهش و مضاعف شدگی در ژن هسته ای رمز کننده زیر واحد ۱۸ KD مجموعه یک در کودکانی با اختلالات چند سیستمی کشته و نقص در مجموعه یک دیده شده است. ژنهای هسته ای مسئول ایجاد بیماری Autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia (external ophthalmoplegia) می باشند و توسط آزمایش های پیوستگی ژنی، درگیری جایگاه های ژنی 10q23.3-24.3 و 3p14.1-21.2 اثبات گردیده است (۲).

بیماری ویلسون یا نقص در متابولیسم مس (Spastic paraplegia, Wilson's) با الگوی توارثی مغلوب آتوزومی و آتاکسی فردریک (Friedrich's ataxia) از اختلالات میتوکندریایی به شمار می روند. آتاکسی فردریک دارای وراثت مغلوب آتوزومی است و دلیل آن جهش در ژن Frataxin (افزایش سه تایی های بازی ایترونی) می باشد. علائم آن دیستروفی و هیپرتروفی کاردیومیوپاتی، از بین رفتن بازتاب (reflex) تاندون و آتاکسی پیشرونده در پا می باشد. Frataxin یک پروتئین میتوکندریایی است که نقش آن، تنظیم انتقال آهن میتوکندری می باشد. به هنگام کمبود Frataxin آهن در ماتریکس میتوکندری انباشته می شود و موجب افزایش تولید ROS (Reactive

دارای حذف در منطقه شروع همانندسازی بین O_I و O_{II} باشد. ۳۰ تا ۵۰٪ از بیماران حذف ۱۳np تکرار مستقیم ۳' ACC TCC CTC ACC A ۵' از ۸۴۶۸ تا ۱۳۴۴۶ را نشان می دهند که موجب حذف ۴۹۹۷ bp می شود. مکانیسم هایی که برای حذف ها در منشاء همانندسازی ذکر شده است شامل شکستگی های حاصل از توپوایزومراز و سرخوردن چنگال همانند سازی (Slip replication) می باشد. بسیاری از حذفها، خودبخودی و بدون تاریخچه خویشاوندی می باشد یعنی جهش جدید هستند که در طول رشد صورت می گیرند. بنابراین افراد دارای حذف، دارای تنوع در توزیع حذف ها در بافت های مختلف هستند که بستگی به این دارد که در چه زمانی، حذف دریافت مورد نظر رخ داده باشد.

به دلیل افزایش مولکول دارای جهش حذفی نسبت به مولکول طبیعی، شدت بیماری های حاصل از حذف، با افزایش سن نیز افزایش می یابد. به بیان دیگر، mtDNA دارای حذف نسبت به نوع طبیعی دارای برتری در همانندسازی است، زیرا تمام آنزیم های لازم برای همانندسازی از هسته منشاء می گیرند و میزان همانندسازی mtDNA به طور مستقیم به طول آن بستگی دارد. رنگ آمیزی عضله بیوسی شده در بیماران با میوپاتی چشمی (نقص سیتوکروم C اکسیداز) نشان دهنده فیبرهای عضلانی است که در طول آنها رنگ از مثبت به منفی تغییر می کند. این تغییرات به دلیل میزان سهم mtDNA حذف شده می باشد. در منطقه منفی سیتوکروم C اکسیداز، غلظت های بالایی از mtDNA حذف شده مشاهده می شود.

اغلب بیماران دارای میوپاتی چشمی و سندرم Pearson دارای حذف می باشند، اما سه مورد از دو تا شدن mtDNA نیز گزارش شده است. در دو مورد همراه میوپاتی چشمی، دیابت ملیتوس نیز گزارش شده است که منطقه مضاعف شده از CoII تا cyt b بوده و O_I و O_{II} را در بر می گرفته است. در یک بیمار با سندرم Pearson، مضاعف شدگی در دوسوم ژنوم و شامل هر دو منشاء همانندسازی مشاهده شده است. زیاد شدن مولکول mtDNA را که دارای مضاعف شدگی است و در نتیجه نسبت به شکل طبیعی بزرگتر است، می توان به این صورت توجیه کرد که وجود دو منشاء همانندسازی، اجازه همانندسازی آن را به میزان دو برابر بایستر نسبت به شکل طبیعی، مهیا کرده است (۴).

(د) جهش در تعداد نسخه:

کاهش تعداد نسخه های mtDNA، موجب نقص در زنجیره تنفسی و در نتیجه کشته بودن آن در نوزادان و کودکان، و ایجاد لاکتیک اسیدوز و نقص در کبد، کلیه و عضله را می نماید. تقلب فنوتیپ

MERRF:

این بیماری همراه با نقص در مجموعه اوره فسفریلاسیون اکسیداتیو بوده و دارای علائمی مانند اختلال در الکتروفیزیولوژی مغز، از بین رفتن حس عصب شنوایی، عقب ماندگی ذهنی، اختلال در تنفس، انبساط عضله قلب و اختلال کلیه و صرع غیر قابل کنترل می باشد. بیماری از نوع هتروپلاسمی است. اغلب جهش np 8344 و در نتیجه تغییر حلقه $\text{T}\Psi\text{C}$ از tRNA lys مشاهده می شود. این امر موجب کاهش سنتز پروتئین (ترجیحا) کاهش سنتز زیر واحدهای مجموعه های اوره (۴) می شود. زیرا اکثر زیر واحدهای این دو مجموعه توسط میتوکندی رمزدهی می شود.

سطح آنزیم های فسفریلاسیون اکسیداتیو با افزایش سن در بیماران MERRF کاهش می یابد. بنابراین برای اینکه افراد جوان (زیر ۲۰سال) فوتیپ کامل بیماری را نشان دهند. لازم است که $7/95$ mtDNA آنها جهش یافته باشد و افرادی که دارای $7/85$ mtDNA جهش یافته هستند، طبیعی هستند. سالمندان بین $7/60$ تا $7/85$ سال با $7/85$ یا حتی $7/63$ ، mtDNA جهش یافته، فوتیپ بیماری را نشان می دهند. بنابراین افراد دارای MERRF معمولاً هنگام تولد طبیعی هستند. افراد دارای MERRF، دارای RRF:ragged red fibres می باشند که فیبرهای عضلانی است و به دلیل جهش، دارای اختلال و نقص آنزیم های میتوکندریایی می باشند. فیبرهای عضلانی دارای یک تجمع میتوکندریایی هستند و زمانی که با رنگ گومری تری کروم (Gomori trichrome) رنگ آمیزی شود، قرمز رنگ شده و به آن RRF می گویند (۴).

MELAS

علائم آن، انسفالومیوپاتی، لاکتیک اسیدوز، میوپاتی و تکان های دوره ای می باشد. تکان ها برگشت پذیرند و در قسمت کورتکس و ماده سفید مغز می باشد. معمولاً به دلیل نقص در مجموعه ۱ می باشد. $7/80$ افراد هتروپلاسمی و دارای جهش A3243 G هستند که موجب تغییر حلقه دی هیدروویورین در tRNA leu (UUR) می شود و در نتیجه مانع ختم رونویسی tRNA leu و زن tRNA پایین دست آن می شود. این افراد دارای ناشنوایی مادرزادی، دیابت ملیتوس و PEO (Progressive External Ophthalmoplegia) می باشند (۴).

MMC:

اختلال مادرزادی و همراه با میوپاتی و کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک می باشد. نقص در مجموعه های اوره مشاهده شده است. جهش در np 3260 در حلقه آنتی کدون tRNA leu (UUR) دیده

شده است. بیماری از نوع هتروپلاسمی بوده و وابستگی به سن (پیری) در آن دیده نشده است (۴).

LIMM

علائم آن شامل کاردیومیوپاتی، RRF (ragged red fibres)، لاکتیک اسیدوز و نقص عصبی می باشد. به دلیل اختلالات تنفسی، افراد در ماههای نخست تولد دچار مرگ می شوند. جهش 4317 در tRNA Ile و جهش 15923 و 15924 حلقه آنتی کدون tRNA thr در آن گزارش شده است (۴).

Ocular Myopathy

علائم آن شامل پایین افتادگی پلک چشم، لرزه و رعشه و فلج عضله چشم و میوپاتی می باشد. جهش 8334 در tRNA lys و جهش 3242 در tRNA leu(UUR) برای آن گزارش شده است. در یک مورد جهش 12246 در tRNA ser (GCU) همراه با جهش 12308 در tRNA leu (UAG) و جهش 10006 در tRNA Gly گزارش شده است. جهش (UAG) tRNA leu به تنهایی نیز در یک مورد گزارش شده است (۴).

(ج) جهش درون پیوسته - حذف

در یک سوم تمام حالتها حذف ۲ تا ۸۱ کیلو باز از mtDNA که حذف عمومی 49wbp نامیده می شود، گزارش شده است. به طور معمول بافت های وسیعی از کودکان مبتلا دارای حذف mtDNA می باشد و اختلالات چند سیستمی شدیدی مانند آنمی، ناکافی بودن ترشحات اگزوکرین پانکراس، نفروپاتی، هپاتوپاتی، اگزما، دیابت ملیتوس و دیگر اختلالات آندوکرین را نشان می دهند. بالغین معمولاً دارای سطح بالایی از mtDNA حذف شده در عضله و مغز هستند اگر چه که این وضعیت را در خون نشان نمی دهند. شاید تقسیم سریع بافت هایی مانند مغز استخوان موجب کاهش آن می شود اما دریافت های پس از میتوز تجمع آن مشاهده می شود.

در بیماری KSS (Kearns sayre syndrom) و درمیوپاتی چشمی (پایین افتادگی پلک چشم، میوپاتی، لاکتیک اسیدوز، پیگمانت رتینیت، آنآکسی، نقص در قلب، از بین رفتن حس عصب شنوایی، افزایش پروتئین CSF، عقب ماندگی ذهنی و CEOP (Chronic External Ophthalmoplegia Plus) این نوع درون پیوسته - حذف دیده می شود.

افراد با سندرم Pearson Marrow / Pancreas Pancytopenia (از بین رفتن تمام سلول های خونی)، فیروز در پانکراس، آتروفی طحال و مرگ در کودکی می باشند. افرادی که زنده می مانند فوتیپ KSS را نشان می دهند. افراد مختلف با میوپاتی چشمی و سندرم Pearson دارای حذف mtDNA به اندازه های مختلف و درمکان های متفاوتی می باشند. $7/95$ افراد

جهش در mtDNA:

جهش های mtDNA و بیماری های حاصل از آن در چهار دسته، رده بندی می شوند:

الف) جهش های بدمعنی (missense) (ب) جهش های زیست زایی (biogenesis) و درگیر در سنتز پروتئین (ج) جهش درون پیوسته - حذف (Insertion-deletion mutation) (د) جهش در تعداد نسخه.

جهش ها می توانند خودبخود در دودمان زایشی صورت گیرد و از طریق مادر انتقال یابد یا در سلول های سوماتیکی رخ دهد و موجب شکل پراکنده بیماری شود (۴).

الف) جهش های بد معنی:

این جهش ها می تواند در ژنهای مجموعه تنفسی رخ دهند، اما معمولاً به طور ترجیحی بر مسیرهای بینانی اثر می گذارند. و در بیماری های عصبی - چشمی از جمله

LHON (leber hereditary optic Neuropathy) و

NARP (Neurogenic myopathy ataxia, retinitis)

pigmentosa)، دیده شده اند.

LHON

LHON بیماری مادرزادی دارای عوارض اولیه حاد تا کمی حاد در افراد بالغ است که در پی مرگ عصب بینانی، نابینایی پیش می آید. در مبتلایان، دید مرکزی به سرعت در هر دو چشم از بین می رود اما دید محیطی برجای می ماند. نابینایی به طور معمول در حدود سن ۲۷ سالگی رخ می دهد. فراوانی مردها به زنها ۴ به ۱ است. بیماران، دارای نقص قلبی و رفتارهای غیر طبیعی همراه با تباهی در گانگلیوهای پایه بوده و فلج می باشند.

مجموعه ۱) (ND1, ND2, ND4, ND5) و سیتوکروم b در این بیماری درگیر است. از این رو، نابینایی به دلیل مهار زنجیره انتقال الکترون می باشد. که هم ژنوم میتوکندریایی و هم ژنوم هسته ای در آن نقش دارد. حذف در کوموزوم X نیز موجب این بیماری و در نتیجه فراوانی بالاتر آن در مردان می شود. همچنین جزء بیماری های محدود به جنس محسوب می شود زیرا میزان متابولیسم عصب بینانی مردان در مقایسه با زنان بالاتر است. بنابراین، حد آستانه در آنها پایین تر می باشد. مهار کننده های محیطی (سمی) نیز با مهار زنجیره انتقال الکترون می توانند موجب LHON شوند از این مواد می توان به سیانید و منوکسید کربن CO اشاره کرد.

۹۵٪ بیماران دارای یکی از سه جهش در نوکلئوتیدهای ۱۱۷۷۸، ۳۴۶۰ و C ۱۴۴۸۴ T در ND6 می باشند.

نخستین و مهمترین جهش در نوکلئوتید شماره ۱۱۷۷۸ می باشد که مربوط به ژن رمزکننده ND4 بوده و تغییر اسید آمینه آرژنین به

هیستیدین در موقعیت ۳۴۰ و موجب می شود. این جهش در ۵۰٪ از موارد LHON دیده شده است که موجب حذف محل برش مربوط به آنزیم محدود کننده SfaNI و ایجاد محل برشی جدید برای آنزیم MaeI می شود. به علاوه، موجب تغییر اسید آمینه بسیار حفاظت شده و با فعالیت شیمیایی مهم می شود. در بسیاری از شجره های LHON، این جهش، هوموپلاسمی است. در ۵۸٪ شجره ها، این جهش، پراکنده و در ۱۴٪، هتروپلاسمی با ظهور نابینایی (در زمانی که تقسیمات سلول موجب می گردد که در تمام میتوکندری های سلول جهش رخ داده باشد - هوموپلاسمی-)، دیده شده است.

هشت جهش دیگر درگیر با این بیماری دیده شده است که مربوط به ژنهای مجموعه I و سیتوکروم b از مجموعه ۳ می باشد.

پنج جهش دیگر زمانی که در میانکس با جهش های دیگر هستند در LHON نقش دارند که برخی همراه با ۱۱۷۷۸ نیز می باشند.

به موازات اضافه شدن جهش جدید، توانایی تولید انرژی توسط میتوکندری کاهش یافته و دید کمتر می شود (۴).

NARP

جهش در ژن ATPase6 موجب ایجاد سندرم NARP و سندرم Leigh می شود. بیماری NARP دارای وراثت مادری است. افراد مبتلا، دچار تأخیر در رشد، آتاکسی، عقب ماندگی ذهنی، ضعف عصبی - عضلانی، حساسیت عصبی و حملات ناگهانی می باشند. جهش T ۸۹۹۳ G عامل این بیماری است که موجب تبدیل لوسین به آرژنین در جایگاه ۱۵۶ می گردد. این بیماری در شکل هتروپلاسمی گزارش شده است. بین سطح mtDNA جهش یافته و شدت بیماری و علائم آن، ارتباط وجود دارد. وجود مقادیر بالایی از mtDNA جهش یافته موجب سندرم leigh با عوارض شدید می گردد که در اوایل زندگی (کودکی) علائم آن ظاهر می شود. در حالی که مقادیر پایین از mtDNA جهش یافته موجب ایجاد سندرم NARP با عوارض اولیه دیررس و علائم ملایم می شود. سندرم Leigh همان bilateral Striatal necrosis می باشد (۴).

ب) جهش های زیست زایی

جهش در ژن هایی که مسنول تولید tRNA و rRNA هستند در این گروه قرار می گیرد. بیماری های حاصل توسط این جهش ها شامل موارد زیر می باشد: Myoclonic

epilepsy & ragged red fibers = MERRF

Mitochondrial encephalomyopathy lactic acidosis & strokelike symptoms=MELAS maternally inherited myopathy and cardiomyopathy=MMC

Lethal infantile mitochondrial myopathy=LIMM, ocular myopathy

۱- اختلال در آنزیم هایی که مسئول انتقال سوبستراها از غشاء میتوکندری هستند.

۲- اختلال در آنزیم های مربوط به چرخه های متابولیکی میتوکندری.

۳- نقص در زنجیره تنفسی.

هر چند که میتوکندری شامل مسیرهای متابولیکی بسیاری است اما عبارت اختلالات میتوکندریایی بر بیماری هایی دلالت دارد که نتیجه نقص در زنجیره تنفسی میتوکندری می باشد. زیرا mtDNA تنها ۱۳ پلی پپتید را رمزدهی می کند که همگی مربوط به زنجیره تنفسی بوده و تمام مولکول های tRNA و rRNA های رمز شده توسط آن نیز برای بیان این پلی پپتیدها در ماتریکس به کار می روند. شایان تأکید است که ژن درمانی در میتوکندری نیز بر روی این بخش متمرکز است. و بیماری هایی که مربوط به موارد ۱ و ۲ مورداشاره در بالا هستند، موضوع ژن درمانی هسته - سیتوپلاسم می باشد که در ادامه مطلب به آن پرداخته شده است. در نقص های میتوکندریایی، اندام هایی مانند قلب، کبد، کلیه، مغز و سیستم عصبی مرکزی، عضلات اسکلتی، پانکراس و غدد آندوکراین که نیاز به انرژی بالا دارند بیشتر آسیب می بینند. بنابراین گروههای معمول از بیماری های mtDNA، بیماری های عصبی-عضلانی و بیماری های تباہ کننده عصبی (Neurodegenerative) می باشند. میتوکندری در اختلالات عمومی مانند دیابت ملیتوس، اختلالات قلبی و پارکینسون نیز نقش دارد (۳).

اگر چه نخستین جهش نقطه ای شناخته شده در mtDNA هوموپلاسمی بود (LHON) اما پیشرفت های بعدی نشان داد که اغلب جهش های بیماریزا، هتروپلاسمی هستند. هتروپلاسمی در واقع یک معیاری است که بیماری زا بی جهش جدید را تقویت کرده یا آن جهش را حفظ می کند. اثبات بیماری زا بی جهش های هوموپلاسمی بسیار مشکلتر از هتروپلاسمی است. سه عامل محیطی، هاپلوتیپ mtDNA و زمینه هسته ای، علت نفوذ متغیر و خصوصیات بافتی مختلف در جهش های هوموپلاسمی محسوب می شوند (۳).

زنجیره تنفسی بیش از صد زیر واحد دارد که بسیاری از آنها توسط هسته رمزدهی می شود. پروتئین های بخش های دیگر میتوکندری نیز توسط هسته رمزدهی می شود. در نتیجه وجود جهش چه در nDNA و چه در mtDNA می تواند موجب بیماری های میتوکندریایی شود. از این رو اختلالات میتوکندریایی حاصل از نقص در nDNA دارای الگوی توارثی آتوزومی می باشند. در حالی که اختلالات میتوکندریایی حاصل از نقص در mtDNA، دارای وراثت مادری هستند (۳).

با توجه به نکات بالا، میزان تغییرات تدریجی تکامل زیستی ژنوم mtDNA نیز بسیار بالاتر از ژنوم هسته ای است. تکامل زیستی بالا، موجب ایجاد وارثه های مختلف زیاد در بین افراد و جمعیت ها شده است. به طور مثال، در دو فردی که تفاوت بیاریاندکی (به طور مثال، حداکثر تفاوت ۰.۳٪) باهم دارند، در mtDNA به ازای هر هزار نوکلئوتید دارای چهار تفاوت می باشند یا به طور کلی حدود ۷۰ مورد جابجایی بازی وجود دارد در حالی که تفاوت بازی با SNP (single nucleotide polymorphism=SNP) در ژنوم هسته ای به این فشردگی و تراکم نمی باشد (۴).

۷- عدم نوترکیبی در mtDNA:

رخداد فرآیند نوترکیبی بین مولکول های mtDNA، گزارش نشده است. در نتیجه، آلل های جدید mtDNA تنها توسط جهش های خودبخودی ایجاد می شوند (۱). سهم میتوکندری در بیماری های انسان:

نخستین بیماری میتوکندریایی گزارش شده، بیماری Luft's (۱۹۶۲) است که در آن فرآیند جفت شدن بین زنجیره انتقال الکترون و تولید ATP دچار اختلال می شود. بیماران به دلیل نبود ارتباط برای تولید ATP، حجم بالایی از اکسیژن را از دست می دهند. این انرژی در شکل گرما هدر رفته و تولید عرق فراوان در این افراد می کند. پس از این کشف به زودی معلوم گشت که در بیماران دارای سندرم انسفالومیوپاتی نیز نقص در تولید انرژی وجود دارد (۱).

اگرچه mtDNA در ۱۹۶۳ کشف شد اما جهش های آن تا ۱۹۸۸ گزارش نشده بود. در این سال بود که Holt و همکاران نشان دادند که بیماران دارای میوپاتی میتوکندریایی دارای جهش حذفی در mtDNA می باشند. Wallace و همکاران نیز وجود جهش نقطه ای در ژن رمز کننده زیر واحد ۴ مجموعه ۱ (ND4) از میتوکندری را در خانواده های دارای (Leber hereditary optic neuropathy = LHON) شناسایی کردند. پس از آن و در حدود ۱۲ سال نقشه بیماریزایی mtDNA از یک جهش نقطه ای (۱۹۸۸) به ۱۱۵ جهش نقطه ای در ژانویه ۲۰۰۱ افزایش پیدا کرد. به این رخدادها باید بازآرایی های بی شمار حذفی، دوتاشدگی اضافه شدن بازی را نیز اضافه کرد که در ابتدا توسط گروه Anita Harding مشخص شد و سپس و به سرعت، شکل‌های بسیاری از فلیج های خارجی چشمی پیشرفت کننده نیز شناسایی گردید (۳).

بیماری های میتوکندریایی را از نظر بیوشیمیایی می توان به سه گروه تقسیم کرد (۱۰ و ۹):

های مختلف، تنوع مشاهده می شود، یعنی اینکه نقص های mtDNA در خلال تقسیم های مختلف سلولی می تواند به طور پیوسته از صفر تا ۱۰۰٪ (فعالیت طبیعی) تغییر کند. در نتیجه افرادی با ژنوتیپ هسته ای یکسان مانند دوقلوهای یکسان و یک تخمی دارای ژنوتیپ سیتوپلاسمی متفاوت و در نتیجه فنوتیپ متفاوت می باشند و در پی آن به دلیل هتروپلاسمی و اثر آستانه ای، بافت های متفاوت در یک فرد دارای mtDNA جهش یافته یکسان، درجه های متفاوت از یک اختلال را نشان می دهند. در نتیجه موجب ایجاد تنوع در یک سندرم که حاصل یک جهش یکسان می باشد، می گردد و هم پدر مادرها یا برادرها و خواهرها (Siblings) اغلب سطح متنوعی از mtDNA جهش یافته را به ارث می برند (۲).

۴- فشرده گی mtDNA :

mtDNA پستانداران فاقد ایترون می باشد و هر دو رشته mtDNA حلقوی، به هنگام رونویسی ایجاد یک رونوشت طولانی و بزرگ اولیه را می کند که شامل چندین ژن (در شکل چند سیترونی) می باشد. که در پی آن، طی فرایندهای پردازش، از یکدیگر جدا می شوند (۱).

۵- تفاوت در کلیدهای رمز ژنتیکی :

برخی کلیدهای رمز ژنتیکی mtDNA، با کلید های رمز ژنتیکی nDNA که معمولاً عموم جانداران است، متفاوت می باشد (۱).

۶- آسیب پذیری mtDNA :

به دلایل متفاوتی، رخداد جهش در mtDNA، در مجموع، ده بار بیشتر از ژنوم هسته ای است. شماری از دلایل به قرار زیر است:

الف - عدم وجود هیستون ها در mtDNA، یادآوری می نماید که هیستون ها از DNA محافظت می کنند (۱).

ب- عدم وجود سیستم ها و مکانیسم های تعمیراتی DNA در میتوکندری (۱).

ج- فراوانی رادیکال های آزاد اکسیژن - که از جمله فرآورده های فرعی مسیر فسفریلاسیون اکسیداتیو هستند- در میتوکندری و در نتیجه وجود آسیب های اکسیداتیو حاصل از آن به mtDNA (۱).

د - ژنوم هسته ای دو نسخه هم ساخت از هر یک از دو والد دارد و tRNA و rRNA های آن در نسخه های زیادی وجود دارد. در حالی که mtDNA بسیار متراکم بوده و فاقد ایترون است. در ژنوم هسته ای توالی های بازی غیر رمزدار (ایترونی) بسیاری (در مجموع حدود ۹۹٪) وجود دارد (۸).

نتیجه mtDNA از طریق اروسیت دریافت می شود، بنابراین مادری که دارای جهش در mtDNA می باشد آن را به تمام فرزندان (اعم از دختر و پسر) انتقال می دهد، اما تنها دخترانش آن را به فرزندانشان منتقل می کنند (۲).

۲- آستانه هتروپلاسمی:

برخلاف ژن های هسته ای که هر یک دارای یک الل مادری و یک الل پدری هستند مولکول های mtDNA شامل صدها و هزارها نسخه در هر سلول می باشند. از این رو فردی که دارای جهش در mtDNA است معمولاً دارای دو جمعیت از mtDNA: جمعیت طبیعی (نوع وحشی) و جمعیت جهش یافته خواهد بود. وجود همزمان بیش از یک نوع از mtDNA را در سلول، بافت یا شخص، هتروپلاسمی (heteroplasmy) می گویند. در مواردی که همه mtDNA ها یکسان باشند (بیش از ۹۹/۹٪ جمعیت یکسان باشد) به آن هوموپلاسمی (homoplasmy) گویند. جهش های خنثی (پلی مورفیسم) نیز هوموپلاسمی اند در حالی که جهش های بیماریزای غیر بکنواخت (متغیر) از موارد هتروپلاسمی می باشند زیرا هوموپلاسمی برای mtDNA جهش یافته، معمولاً کشنده است (۳).

به منظور ظهور علائم و اختلالات بافتی، حضور شماری از mtDNA جهش یافته ضروری به نظر می رسد.

یعنی میزان mtDNA جهش یافته دریافت مورد نظر بایستی از یک حد آستانه عبور کند. اثر آستانه ای زمانی ظاهری می شود که پایتترین غلظت mtDNA جهش یافته دریافت بیشترین اثر را بر روی متابولیسم هوازی داشته باشد. و در نتیجه منجر به متابولیسم غیر هوازی (گلیکولیز) گردد. در واقع اثر آستانه ای، به نیاز سلول و بافت به میزان انرژی حاصل از فعالیت میتوکندری بستگی دارد (۷).

۳- توزیع میتوزی

به هنگام تقسیم سلولی، مقداری از mtDNA جهش یافته به سلول های دختر وارد می شود. حال اگر در یک سلول دختر، اکثر mtDNA های وارد شده طبیعی باشند، فنوتیپ بیماری در آن سلول تغییر کرده و چنین سلولی علائم بیماری را نشان نمی دهد. سلول های حاصل از آن نیز به همین ترتیب (و در حالی که اکثر DNA های آنها طبیعی باشد)، سالم خواهند بود. اما سلولی که اکثر mtDNA های جهش یافته را دریافت کرده باشد، فنوتیپ و علائم بیماری را نشان می دهد. بنابراین بسته به اینکه چه تعداد mtDNA طبیعی و چه تعداد جهش یافته وارد سلول دختر شود فنوتیپ آن سلول تغییر می کند. این واقعیت بیانگر این مسئله است که چرا در بیماری های وابسته به میتوکندری در طول زمان

شود و در جهت عقربه ساعت ادامه یافته و زمانی که دوسوم ژنوم را طی کرد به منشاء همانندسازی رشته L (5798-5721 np, OL) می رسد. سنتز رشته L نیز با یک پریماز ویژه که 5/AS rRNA سیتوزولی است شروع می شود و جهت سنتز آن در خلاف جهت رشته H و در طول رشته H آزاد شده می باشد. بنابراین همانندسازی دو جهته اما غیر همزمان است. از آنجا که mtDNA ابرمارپیچ (super-coiled) است، همانند سازی و رونویسی می تواند توسط برومیداتیادیوم (ethidium bromide) مهار شود. ژنوم میتوکندری، فاقد ایترن بوده و بسیار فشرده می باشد و اغلب mRNA های آن فاقد توالی های ترجمه نشدنی انتهایی 5' و 3' می باشند. در ابتدای mRNA ها، کلید رمز آغاز کننده و در انتهای آنها کلید رمز ایست قرار دارد و پایانه پلی A پس از رونویسی به آنها اضافه می شود. رونوشت رشته H، تولید مقادیر زیادی رونوشت tRNA می کند.

مانند باکتری ها، سنتز پروتئین در میتوکندری، با سید آمینه فرمیل متیونین شروع می شود. عوامل طولی کننده آن مشابه باکتری هاست و به مهار کننده های ریبوزوم باکتری چون کلرامفنیکل (chloramphenicol=CAP) حساس می باشد. شایان ذکر است که میتوکندری یا دیگر اندامگان حا در داشتن کلیدهای رمز ژنتیکی متفاوت است، به طور مثال در میتوکندری کلیدهای رمز ایست UGA و UGG برای تریپتوفان و کلیدهای رمز مربوط به آرژینین یعنی AGA و AGG برای ختم زنجیره استفاده می شود. چون اغلب mRNA های میتوکندریایی دارای شمار زیادی از کلید UGA هستند، از این رو در سیتوپلاسم نمی توانند ترجمه شوند، در نتیجه این تفاوت در کلیدهای رمز ژنتیکی موجب می شود که تنها در میتوکندری ترجمه گردند (۴).

میتوکندری دارای DNA پلیمرز گاما (γ) و نیز عوامل رونویسی ویژه مانند mt TFA (نام دیگر آن Tfam) می باشد که این دو پروتئین توسط هسته رمزدهی شده و سپس وارد میتوکندری می شوند. میتوکندری، همچنین واجد دیگر پروتئین های لازم برای همانند سازی مانند DNA پریماز، توپوایزومراز نوع ۱ و ۲، هلیکاز، پروتئین های متصل شونده به DNA تک رشته ای، DNA و RNA اندرونوکلئازها و نوکلئوزید کینازها می باشد (۴).

تفاوت ژنتیک میتوکندریایی با ژنتیک مندلی:

ژنتیک میتوکندریایی با ژنتیک مندلی از جهات متعددی، به ویژه موارد زیر متفاوت است:

۱- توارث مادری:

تخم دارای صد هزار mtDNA است در حالی که اسپرم تنها چندصد عدد دارد. به هنگام لقاح، تمام میتوکندری تخم و در

جهش و از بین رفتن فعالیت هر بخشی از mtDNA موجب می شود که سلول بیش از پیش ظرفیت سنتز ATP خود را از دست بدهد (۱).

باقیمانده زیر واحدهای این مجموعه ها توسط nDNA رمزدهی شده و در سیتوپلاسم ترجمه می گردند و از آنجا وارد میتوکندری می شوند و با زیر واحدهایی که توسط mtDNA رمزدهی می شود مجتمع می شوند. پروتئین های رمز شده توسط هسته، دارای پپتید یا علامت راهنما با بار مثبت در انتهای آمین خود می باشند که موجب هدایت آنها توسط این علامت به سوی میتوکندری گردیده و سپس به گیرنده مربوط به خود متصل شده و از بین غشاء عبور می کنند. این پپتید راهنما پس از انتقال پروتئین به میتوکندری، توسط پروتئینازها جدا می شود. به طور کلی حدود ۱۰۰۰ پروتئین میتوکندریایی متفاوت توسط ژنوم هسته ای رمزدهی می گردد. بنابراین جهش در ژنهای هسته ای می تواند بسیاری از اعمال میتوکندری را مختل کند (۵).

دو رشته mtDNA از نظر محتوای بازی باهم متفاوت هستند. رشته سنگین (heavy=H) بیشتر دارای G و رشته سبک (light=L) بیشتر دارای C می باشد. عمل رشته H الگو برداری rRNA 16S و 12S و پلی پپتید و 14 عدد tRNA است. رشته L، الگو برداری پلی پپتید ND6 و 8 عدد tRNA را برعهده دارد. هر رشته دارای یک نقطه شروع همانندسازی مربوط به خود است که فاصله دو منطقه همانندسازی (مربوط به دورشته) به اندازه دوسوم ژنوم می باشد. از نظر کنترلی، نقطه شروع همانندسازی رشته H، در منطقه مهمی قرار گرفته است که به آن حلقه D (Displacement) گویند و تنها ناحیه غیر رمزدار در mtDNA است. ناحیه حلقه D شامل پروموتور (P=promoter) برای رونویسی هر دو رشته mtDNA می باشد. پروموتور مربوط به رشته H از نوکلئوتید 577-517 و پروموتور مربوط به رشته L، از نوکلئوتید 415-392 می باشد. همچنین، سه توالی حفظ شده CSBI:299-315, CSBIIT:346-373 و CSBI:213-235 و توالی TAS (Termination Associated Sequence) یا 16147-16172 نیز در این ناحیه قرار گرفته است. حلقه D یک منطقه سه رشته ای را شکل می دهد که رشته سوم یک قطعه جدید H به نام Vs DNA می باشد. Vs DNA با استفاده از پرایمر RNA، از منطقه PL رونویسی شده و تانزدیک CSBII پیش رفته و سپس توسط RNA ase میتوکندریایی به نام MRP که عمل آن پردازش RNA است، شکافته می شود. سنتز Vs DNA از CSBII شروع می شود و در TAS ختم می گردد. اندازه آن 700 np است. سنتز رشته H از VsDNA شروع می

ژنتیک مولکولی و ژن درمانی در بیماریهای میتوکندریایی (مقاله مروری)

دکتر محمدرضا نوری دلوثی*، زهرا حاج ابراهیمی**

*گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی تهران

**دانشجوی دکترای ژنتیک دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

پس از کشف اولین بیماری مرتبط با اختلال در ژنوم میتوکندری در اواخر سال های ۱۹۸۰ تاکنون، شمار بیماری های مرتبط با نقص در ژنوم میتوکندریایی رو به افزایش است. با وجود پیشرفت های بی شمار در فهم اختلالات میتوکندریایی چه در سطح ژنتیکی و چه در سطح بیوشیمیایی، هنوز درمان رضایت بخشی برای اکثر این بیماران وجود ندارد. بخش عمده ای از این مسئله به این دلیل می باشد که اکثریت این بیماران دارای نقص در زنجیره تنفسی می باشند که مسئول تولید انرژی می باشد و تاکنون هیچ راه فرعی برای رساندن انرژی به این افراد از طریق مصنوعی شناخته نشده، در نتیجه اکثر توجه ها به سوی ژن درمانی این بیماری ها معطوف بوده است. در حال حاضر، سه راهکار برای ژن درمانی بیماری های میتوکندریایی وجود دارد: مهار تکثیر ژنوم معیوب با استفاده از فناوری آنتی سنس، معرفی ژن سالم به میتوکندری و معرفی ژن سالم به هسته با هدف انتقال محصول پروتئینی ژن سالم به میتوکندری. هر گونه موفقیتی در ژن درمانی میتوکندری بستگی به در دست بودن ناقلین مناسب اختصاصی برای میتوکندری می باشد. در مقاله مروری حاضر با استفاده از منابع جدید و معتبر فراوان به معرفی های جدید ژن درمانی و سیستمهای موجود برای رها شدن اختصاصی ژن به میتوکندری پرداخته شده است. ناقلین اختصاصی میتوکندری باید دارای دو ویژگی باشند: باید ژن موردنظر را به طور اختصاصی در میتوکندری رها کنند و از طرفی نباید آن را در طول آندوسیتوز رها سازند. مدت های طولانی است که می دانیم ترکیبات آمفی فیل دارای مرکز باردار کاتیونی چون رداین ۱۲۳ و دکوالینیوم دارای تجمع داخل میتوکندریایی می باشند. این ترکیبات دارای چربی دوستی کافی همراه با مرکز باردار مثبت هستند. خاصیتی که موجب کاهش تغییرات انرژی آزاد به هنگام انتقال از محیط آبی به محیط هیدروفوب می شود و به هنگام عبور از غشاء میتوکندری به منظور تجمع در میتوکندری مورد نیاز می باشد. اخیرا ناقلی معرفی شده است که از دکوالینیوم ساخته شده و به همین نام نیز نامیده می شود. مطالعات نشان داده است که این ناقل به ژن موردنظر متصل شده و آن را از حمله نوکلئازها محافظت می کند. با توجه به ویژگی ذاتی این ماده برای تجمع در میتوکندری به نظر می رسد که این ناقل می تواند به منظور رهاسازی اختصاصی ژن ها در میتوکندری استفاده شود.

مقدمه

در سلول قرار گرفته است توصیف کرد. جالب توجه است که اغلب شواهد امروزی، این نظریه را تقویت کرده و تأکید دارد که میتوکندری از باکتری های قدیمی مشتق شده است.

میتوکندری تخمین اندامگان سلولی است که ارتباط آن با بیماری های انسانی مشخص شد. بدین ترتیب که Luft و همکاران در سال ۱۹۶۲ شواهدی مبنی بر بدکاری میتوکندری در بیماران دارای

میتوکندری نخستین بار، حدود یکصد سال پیش توسط Altman مشاهده شد. او آن را اندامگان ابتدایی (elementary organism) نامید و میتوکندری را اندامگانی بازندگی آزاد که