18- Zullo Sj., Gene therapy of mitochondrial DNA mutations: a brief, biased history of allotropic 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 mitochonrial matrix space: a possible novel site for gene replacement therapy, Somatic cell and Mol.Genet., 22(6):489-98 (1996).

22- Weissig V., Cationic bolasomes 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 cytoplast, 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 bolasomes with delocalized charge center a structer 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.Controll.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 mouce 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 antiishemic drugs, Advanced drug delivery reviews, 49: 151-74 (2001).

39- Sanda A., Bystandar effects of nucleoside analogs phosphorylation in the cytosol or mitochondria, Biochem and Biophy.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).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

(۱۹). از آنجا که موثروکارا بودن هردارویا ژن درمانی به رها شدن ماکرومولکول فعال زیستی، به اندام صحیح ونوع سلولی مناسب و نیز قرارگرفتن درمکان 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(۱۱و۳۷و۳۸). 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 دیپلوییدی ممکن است یک یا دو نسخه از یک ژن معیوب وجود داشته باشد. از طرفی عدم نوترکیبی همساخت (homologous recombination) درmtDNA و عدم وجود اثرات اطرافی 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(۱۹و۳۹و۴۰) .

علیرغم تمام مطالب مورد اشاره در بالا و با تاکید براینکه 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).

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 approache, 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).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

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 لیگاندهای ویژه برای گیرنده RNA می تواند یک دستاورد درمانی جدید ارایه کند(۳٤).

شایان تاکید است یکی از کاربردهای ژن درمانی مستقیم، وارد کردن ژن هسته ای به میتوکندری است. ازاین رو، ژن بیگانه وارد شده به میتوکندری، ژنی می باشدکه مکان اصلی آن درهسته است. می توان این ژن را بین دو مولکول tRNA که پردازش می شود قرار داد. ازاین 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 (ازواکنش های ٥ آنزیمی درکبد) 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 وغددپستانی به مقدار کم تولید می شود. این فرم ثانویه توسط هسته کد وسپس وارد میتوکندری می شود. دانشمندان فرم فعال AI را از طریق ژن درمانی وارد میتوکندی 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 ومرگ سلولی ازطریق آپوتوزدارد(۱۳).دربیماری های انسان ودرپیری (آسیب- های اکسیداتیو و رادیکال های آزاد) نیز حائز اهمیت است. این اندامک هم موتور حیات سلول و هم موتور مرگ سلولی به شمار می رود. در نتیجه هدفی راهبردی برای درمان های دارویی در آینده محسوب می شود.

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 دربین دوغشاء قرار داشته ودرمرگ 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 (۱۳و۳٦). 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 درحال حاضر و البته در مراحل مقدماتی و آزمایشی می باشد، امادرآینده، می توان باوارد 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، ازجمله 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

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

آن معادل سمیت ناقلینی می باشد که برای ژن درمانی هسته استفاده می شوند و به طور تجاری دردسترس 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 توالیmtDNA جهش یافته متصل می شود. در نتیجه از همانند سازی توالی جهش یافته ممانعت به عمل می آید. این امر موجب می شود که نسخه هایmtDNA 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(۳۳).

درانتقالPNA ها، سیستم ها یا ماشین انتقال میتوکندریایی بسیار مهم می باشد (۹و۱۹) .

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 آنRNAها با بار منفی ازغشاء آب گریز میتوکندری عبورمی کنند، پیشنهاد شده است (۳٤).

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 میتوکندریایی (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 وبررسی tRAN ها درسیتوپلاسم و میتوکندری، tRNA عمومی را نشان نداده است که درهردو 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 ٥، tRNA نقش دارد) می باشد. هر دو مجموعه، RNA (ریبونوکلئو پروتئین) هستند که پروتئین های آن توسط هسته رمزدهی می شود. مقدارRNA مربوط بهMRP 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 وهردو شکل سیتوزولی و میتوکندریایی آن توسط یک ژن واحد هسته ای رمزدهی می شود. همچنین مشاهده شده که rRNA٥s (باطول ۱۲۰ باز) که توسط هسته رمزدهی می شود، در میتوکندری هم وجود دارد به نحوی که اگر پایانهٔ N آن نیز تغییر کند باز هم وارد میتوکندری می شود. از این رو حضورش به دلیل وجود توالی راهنما درپایانهٔ N نیست (۳٤).

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.
٤- استفاده ازRNA به عنوان آنتی سنس.
٥- ورود RNA در شماری از پروتیستاها (protists) مانند تریپانوزوم وapicomplexaus، که عوامل بیماریزای بالینی هستند،

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

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

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

راه حل دیگر، اتصال توالی رهبر (علامت رهبر) به اینتین است دراین صورت توالی پایانهٔ C مربوط به اینتین که به پایانهٔ 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، راهکارجدید (و البته محدود) برای ژن درمانی بیماریهای میتوکندریایی محسوب می شود. دراین زمینه، توضیح مختصری خالی از فایده نیست:

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

آنزیم محدود کنندهٔ SmaI به دلیل وجود جهش mt ۸۹۹۳T >G که موجب جابجایی 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 میتوکندری و بیان آن در میتوکندری و در نتیجه تصحیح فنوتیپ بیماری زا متکی می باشد. دراین 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 وTIM (ترانس لوکازهای غشاء خارجی و غشاء داخلی میتوکندری) اطلاعات بسیار اندکی در دست است. یک امکان حمل اسیدنوکلئیک 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 وبسیار اولیه است اما به مشابه یک فن برای ژن درمانی میتوکندریایی، دارای توانایی بالقوه است (۱۰و۲۰) .

راههای ژن درمانی مستقیم میتوکندریایی:

الف) استفاده از تفنگ های پرتاب کننده

نخستین تلاش ها برای انتقال مستقیم DNA بیگانه به میتوکندری، براستفاده 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 درشرایط invitro سیتوپلاست حاوی میتوکندری سالم را به سلول دیگری که دارای نقص میتوکندری بود وارد کردند و سلول های cybrid (Cy: Cytoplasmic, brid: hybnid) 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

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

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 درساکارومیس سروزیه واجد ۷۶ اسید آمینه) به دست آمد(۲۰).

ب- دانشمندان مشاهده کردند که حمل پروتئین از پایانهٔ N (یعنی زمانی که ترجمه هنوز ادامه دارد) آغاز می شود. بنابراین، فرآیندهای ترجمه وانتقال به طور همزمان صورت می گیرد. همگامی امر انتقال با 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 وبه این امر کمک می کند(۳).

ج- راهکاردیگر مطالعهٔ چگونگی انتقال این پروتئین ها در اندامگان های دیگر است. تفاوت کلید رمز ژنتیکیmtDNA 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 درحیوانات 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 هاله 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 مجموعهٔ 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 مجموعهٔ ۳و٤ در این موجود کافی است. درواقع 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:

۱- ظرفیت پمپ پروتون مجموعه ۳و٤، در محیط invivo کافی نمی باشد.

۲- اغلب اختلالات میتوکندریایی حاصل جهش درtRNA می باشد.

۳- دوژن سیتوکروم b از مجموعه ۳ و زیر واحد یک ازمجموعه ٤ در تمام ژنوم های میتوکندریایی که تا به امروزتعیین توالی شده اند وجود داشته است. درواقع آب گریزی زیاد این دو، مانع ازانتقال آنها به هسته در طول تکامل شده است. بنابراین، این روش حداقل در مورد این دو پروتئین پاسخگو نمی باشد(۲۰).

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

اینتین (Intein) که نخستین بار در ۱۹۹۰ کشف شد پروتئینی است که دارای خاصیت ویرایش کننده اینترون ها می باشد یعنی دارای خاصیت Self splicing است وخود می تواند اینترون های خود را حذف کند. اینتین ها پس از ترجمه از پروتئین جدا شده و توسط پیوندهای پپتیدی اگزتین ها (exteins) را به هم وصل می کنند. با آنکه اغلب اینتین ها در بو باکتری ها (eubacteria) و آرکی باکتریها (archaeabacteria) یافت شده اند، ٦ مورد از آنها در یوکاریوتها نیز شناخته شده اند که ۲ عدد آن مربوط به ژنوم هسته ای مخمر است. مشخص شده است که اینتین برای اتصال به اگزتین به توالی ویژه ای ازاگزتین نیاز ندارد وتنها نیاز آن است که اسید آمینه ای که پایانهٔ C مربوط به اینتین به آن متصل می شود سرین، سیستئین یا ترئونین باشد. خاصیت اندوپپتیدازی اینتین در واقع به تعدادی اسید آمینه محدود می شود که در هر دو انتهای اینتین وجود دارد. قرار دادن اینتین در بین دوقلمروی 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 تاخورده شود. این امر موجب کاهش آب گریزی پروتئین وسریعتر شدن انتقال می گردد (۲۰) .

مسئله ای که باید به آن توجه داشت سرعت بالای اینتین ها در ویرایش می باشد. یکی از دستاوردها در این زمینه، مهیا کردن شرایط برای اینتین 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 اینتین را طوری طراحی کرد که در PH سیتوزول غیر فعال و در PH اسیدی میتوکندری فعال باشد (۲۲) .

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

غشاء درونی شناسایی شده و توسط آنها از منفذ هیدروفیلی غشاء درونی عبور می کند و وارد میتوکندری می شود. دردرون ماتریکس، توالی راهنما توسط پروتئازهای درون میتوکندری جدا می گردد و پس از آن، پروتئین دوباره تاشدگی 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 برژن درمانی هسته دارای شماری مشکلات می باشد که سبب گرایش دانشمندان به ژن درمانی مستقیم گردیده است(۹و۱۶) .

مشکلات ژن درمانی غیر مستقیم و راه حل های آن

۱- درmtDNA ، 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 پروموتر 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 ۳۷ ژن است که تنها ۱۳ عدد آن مربوط به پلی پپتیدهای زیر واحد زنجیره تنفسی می باشد و ۲٤ عدد باقیمانده، رمز کنندهRNA 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 mtDNA مربوط بهtRNA (۲۲عددtRNA 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 پروتوزوآ وجو 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، ریبونوکلئیک 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 دهندهٔ مخمر، قادر است کهtRNA مخمر را وارد خود کند (۲۲) .

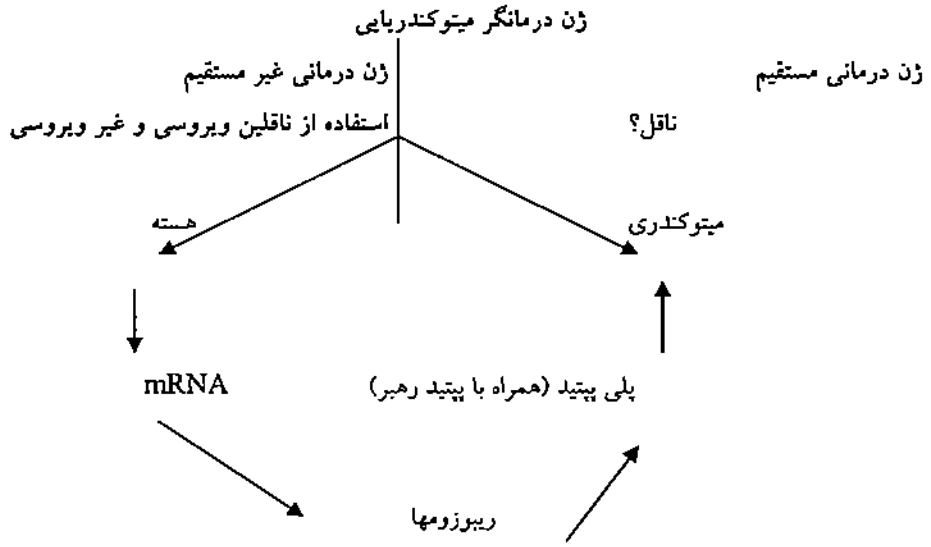
۳- مشخص شده است که ۱۳پروتئین رمز شونده توسط mtDNA بسیار آب گریز (hydrophobic) هستند. این ویژگی موجب می شود که این پروتئین ها توسط ماشین واردات میتوکندری (ماشین انتقال پروتئین) قادر به وارد شدن به میتوکندری نباشند. بنابراین به نظر می رسد که این پروتئین ها در محل فعالیت خود (میتوکندری) سنتز می شوند (۱٦و۲۰و۲۲). 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 بهunfolding مورد نیاز برای انتقال مقاوم هستند(۲۰).

٤- 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 ازمیتوکندری به هسته چرا زمانی که به این ۱۳ژن رسیده است ظاهراً متوقف شده است(۲۰) ؟

۵- فرضیهٔ دیگر بیان می دارد که بیان ترانس ژنها تنها زمانی لازم می باشد که زیست زایی میتوکندری ضروری باشد (۱۸و۲۰).

تفاوت کلید رمز ژنتیکی مسئله ای است که به راحتی می توان برآن 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:

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]



از دستاوردهای ژن درمانی مستقیم،معرفی DNA ی آنتی سنس (antisense DNA) به میتوکندری می باشد که این DNA، مکمل منطقه دارای جهش درmtDNA می باشد در نتیجه به آن ناحیه متصل شده و مانع از همانندسازی mtDNA جهش یافته می شود. ازاین 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 دو غشاء (میتوکندری) می باشند.

۳- استفاده از آبدانک های (vesicles) ویژه میتوکندری به منظور رها کردن مولکول مورد نظر در درون میتوکندری (۵).

٤- با توجه به اینکه درون سلول، میتوکندری ها پیوسته درحال ادغام شدن وجدا 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 (۱۹،۵).

ژن درمانی غیر مستقیم میتوکندریایی

این روش ژن درمانی نخستین بار در سال ۱۹۹۰ به کار گرفته شد. درواقع هدف، وارد کردن mtDNA بیگانه به هسته (به جای میتوکندری) می باشد. بر روی ژن بیگانه ابتدا باید دو اصلاح صورت گیرد:

نخست: ازآنجا 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 برعلیه 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 آلوتوپیک (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 پایانهٔ N این پروتئین ها (۲۰تا۶۰ 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 گیرندهٔ 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

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

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 ازاختلالات میتوکندریایی مشتمل برمواردزیروجود 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 (۱٤).

دارو درمانی:

از درمان های اولیه موفق می توان به درمان میوپاتی با نقص در مجموعهٔ ۳ توسط آسکوربات (ascorbate) و منادیون (menadione)، درمان میوپاتی چشمی با کوآنزیم Q (coenzymeQ=CoQ) و با سوکینات به اضافه کوآنزیم Q، درمان بیماران قلبی باCoQ ودرمان لاکتیک اسیدوز (lactic acidosis) با دی کلرواستات (dichloroacetate) اشاره کرد (٤).

شماری دارو شناخته شده اندکه 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 ستز mtDNA موجب خالی شدن سلول های در حال تقسیم ازmtDNA می شود. میزانmtDNA درسلول های بافت های مختلف بسته به نیازآنها به انرژی متفاوت است این میزان متفاوت، عامل تعیین کننده حساسیت بافت های مختلف به داروهایی است که با mtDNA ارتباط داشته یادرگیر هستند. سلول های برخی بافت ها مانند عضله می توانند در پاسخ به تغییرات انرژی، میزانmtDNA خود را حتی تا ٥ 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.

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 پلیمراز میتوکندریایی، مهارکننده های توپوایزومراز میتوکندریایی، داروهای انترکاله شونده در mtDNA ، داروهای غیر انترکاله شونده درmtDNA وکاتیون های لیپوفیلی می باشد(۱٥).

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 درmtDNA 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 رابسته می باشد که چنین ناقلینی هنوز غیر قابل دسترس هستند (۹) .

به طور کلی، دونوع متفاوت ژن درمانی در میتوکندری مد نظر است (۱۰و۱٦-۱۸) :

۱- ژن درمانی مستقیم (direct mitochondrial gene therapy) . دراین روش ژن یا DNA به طورمستقیم درمیتوکندری است که درنتیجه آن، رونویسی و ترجمه ژن درمانگر نیز درون میتوکندری باید تحقق یابد.

۲- ژن درمانی غیر مستقیم (indirect mitochondrial gene therapy). دراین 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. درمرحله پایانی فرآوردهٔ ژن درمانگر باید وارد

۳- میتوکندری شود تا در آنجا فعالیت خود را انجام دهد.

خلاصه روشهای اشاره شده در نمودار زیر آمده است:

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

پراکسی نیتریت 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 وتباهی عصبی، افزایش می یابد.

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

مرگ سلولی نکروزی و آپوتوز :

اخیراً روشن شده است ک میوکندری هم در آپوتوز (apoptosis) و هم در نکروزه شدن سلول نقش محوری دارد. مرگ سلولی براثر نکروزه شدن در پاسخ به آسیب حاد بوده و نتیجه آن سریع می باشد. این رخداد موجب مرگ غیر قابل کنترل همراه با لیزسلولی 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 آپوتوز، برنامه مرگ سلولی فعال می شود. این امر موجب تخریب ساختار سلولی توسط خود سلول شده و توسط سلول های اطراف فاگوسیتوزه می گردد. و در نتیجه ترکیبات خطرناک به بیرون و اطراف سلول نشت نمی کند و از این رو پاسخ التهابی نیز مشاهده نمی شود . آپوتوز 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 آپوتوز و نکروزه شدن قراردادی است. کامل شدن آپوتوز نیاز به ATP دارد و چنانچه پس از شروع آپوتوز سطح ATP از یک سطح آستانه پایین بیاید، فرایند آپوتوز متوقف شده و نکروزه شدن صورت می گیرد. میتوکندری در ورود سلول به آپوتوز نقش دارد. سلول ها مجبور هستند که به نحو برگشت ناپذیر وارد آپوتوز شوند، اگر کاسپاز (Caspase) فعال شود. کاسپاز، سیستئین پروتئاز است که در قالب پیش شکل های غیر فعال در سیتوپلاسم حضور دارد وتوسط 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 سیتو پلاسم، سیتوکروم C با Apaf-۱ و پیش کاسپاز ۹ واکنش داده و پیش کاسپاز ۹ فعال شده، پروکاسپاز ۳ را نیز فعال می کند و در نتیجه آپوتوز القا می شود. اینکه چگونه میتوکندری، سیتوکروم C را رها می کند ناشناخته است، امابه دنبال تحریک پیش آپوتوزی، 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 آپوتوز (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 آپوتوز می شود(۱۱و۱۳).

مشکلات بیماریزائی 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 دردست 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 نتیجهٔ 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 درشمال فنلاند مشخص شد که فراوانیG ۴۳ A ۳۲ (MELAS) دراین ناحیه، ۱۶/۳ در هر صد هزار می باشد. در مطالعهٔ مربوط به شمال شرق انگلیس مشاهده کردند که حداقل شیوع جهش های بیماریزا در جمعیت ۱۲/۸۴ در هر صدهزار 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 بیمای های میتوکندریایی، کمیاب نبوده و فراوانی آنها در حدود بیماری های متابولیک و بسیار شایع تر از دیستروفی عضلانی می باشد . همچنین با کرهٔ هانتینگتون وMotor neuron قابل مقایسه هستند.

تشخیص پیش از تولد نیز مشکلاتی را به همراه دارد:

۱- جهش های مشاهده شده در آزمون های آمنیوسیتوز (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).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

دارای حذف در منطقه شروع همانندسازی بین O_H و O_L می باشند. ۳۰تا ۵۰ ٪ از بیماران حذف ۱۳np تکرار مستقیم ۵′ ACC TCC CTC ACC A ۳′ از ۸٤٦۸ تا ۱۳٤٤٦ را نشان می دهندکه موجب حذف۴۹۹۷ 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 دربافت 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 بیوپسی 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 بالائی از mtDNA حذف شده مشاهده می شود.

اغلب بیماران دارای میوپاتی چشمی و سندرم Pearson دارای حذف می باشند، اما سه مورد از دوتاشدن mtDNA نیز گزارش شده است. در دو مورد همراه میوپاتی چشمی، دیابت ملیتوس نیز گزارش شده است که منطقه مضاعف شده از CoII تا cytb بوده و O_H و O_L را در بر می گرفته است. در یک بیمار با سندرمPearson ، مضاعف شدگی دردوسوم ژنوم و شامل هردو منشاء همانندسازی مشاهده شده است. زیاد شدن مولکول mtDNA را که دارای مضاعف شدگی است و در نتیجه نسبت به شکل طبیعی بزرگتراست، می توان به این صورت توجیه کرد که وجود دو منشاء همانندسازی، اجازه همانندسازی آن را به میزان دو برابر بایشتر نسبت به شکل طبیعی، مهیا کرده است (٤).

د) جهش در تعداد نسخه:

کاهش تعدادنسخه های mtDNA، موجب نقص در زنجیره تنفسی و در نتیجه کشنده بودن آن در نوزادان و کودکان، و ایجاد لاکتیک اسیدوز و نقص در کبد، کلیه و عضله را می نماید. تقلید فنوتیپ کاهش تعداد mtDNA درافراد 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 تعدادmtDNA موجب کاهش فرآورده های ژن mtDNA می شود اما در محصولات nDNA کاهشی مشاهده نمی شود(٤).

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 درmtDNA می باشند. تمام حذفها نیز در نواحی تکرار مستقیم می باشد. این مسئله به دلیل سرخوردن چنگال همانندسازی دراین نواحی است و از آنجا که تمام پروتئین های مورد نیاز برای زیست زایی میتوکندری توسط هسته رمزدهی می شوند این افراد احتمالا" دارای جهش درnDNA درژنهای رمزکننده آنزیم های همانندسازی mtDNA و در نتیجه اختلال عمل این آنزیم ها می باشند(٤).

درحدود ۱۰۰ زیرواحد زنجیره تنفسی توسط nDNA رمز دهی می شود که جهش در آنها می تواند هر ۵ مجموعهٔ آنزیمی زنجیره تنفسی را تحت تأثیر قرار دهد. نخستین جهش بیماری زا در ژن هسته ای رمز کننده زیر واحد فلاووپروتئین SDH، در دو هم پدر مادر با سندرم Leigh و نقص در مجموعهٔ دو گزارش شد. جهش و مضاعف شدگی در ژن هسته ای رمز کننده زیر واحد ۱۸ KD مجموعهٔ یک در کودکانی با اختلالات چند سیستمی کشنده و نقص در مجموعه یک دیده شده است. ژنهای هسته ای مسئول ایجادبیماریadPEO(Autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia) می باشند و توسط آزمایش های پیوستگی ژنی ، درگیری جایگاه های ژنی 10q23.3-24.3و 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 (Fricdrich's ataxia) از اختلالات میتوکندریایی به شمار می روند. آتاکسی فردریک دارای وراثت مغلوب آتوزومی است ودلیل آن جهش درژنFrataxin (افزایش سه تایی های بازی اینترونی) می باشد.علائم آن دیستروفی وهیپرتروفی کاردیومیوپاتی،ازبین رفتن بازتاب(reflex) تاندون و آتاکسی پیشرونده درپا می باشد. Frataxin یک پروتئین میتوکندریایی است که نقش آن، تنظیم انتقال آهن میتوکندریی می باشد. به هنگام کمبودFrataxin، آهن درماتریکس میتوکندری انباشته می شود و موجب افزایش تولید ROS (Reactive

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

MERRF :

این بیماری همراه با نقص در مجموعهٔ ۱و٤ فسفریلاسیون اکسیداتیو بوده و دارای علائمی مانند اختلال در الکتروفیزیولوژی مغز، از بین رفتن حس عصب شنوائی، عقب ماندگی ذهنی، اختلال در تنفس، انبساط عضله قلب و اختلال کلیه و صرع غیر قابل کنترل می باشد. بیماری ازنوع هتروپلاسمی است. اغلب جهش ۸۳٤٤ np و درنتیجه تغییر حلقهٔ TΨC از tRNA lys مشاهده می شود. این امر موجب کاهش سنتز پروتئین (ترجیحاً کاهش سنتز زیر واحدهای مجموعه های ۱و٤) می شود. زیرا اکثر زیر واحدهای این دو مجموعه توسط میتوکندری رمزدهی می شود.

سطح آنزیم های فسفریلاسیون اکسیداتیو با افزایش سن در بیماران MERRF کاهش می یابد. بنابراین برای اینکه افراد جوان (زیر ۲۰سال) فنوتیپ کامل بیماری را نشان دهند. لازم است که ۹۵٪ mtDNA آنها جهش یافته باشد و افرادی که دارای ۸۵٪ mtDNA جهش یافته هستند، طبیعی هستند. سالمندان بین ٦۰تا۷۰ سال با ۸۵٪ یا حتی ٦۳٪ ، mtDNA جهش یافته، فنوتیپ بیماری را نشان می دهند. بنابراین افراد دارای MERRF معمولاً هنگام تولد طبیعی هستند. افراد دارایMERRF ، 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، قرمزرنگ شده و به آن RRF می گویند(٤).

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 درمجموعه ۱ می باشد. ۸۰٪ افراد هتروپلاسمی و دارای جهش A۳۲٤۳ G هستندکه موجب تغییر حلقه دی هیدرویوریون در tRNA leu (UUR) می شود و درنتیجه مانع ختم رونویسی tRNAleu و ژن rRNA پایین دست آن می شود. این افراد دارای ناشنوایی مادرزادی، دیابت ملیتوس وPEO (Progressive External Ophthalmoplegia) می باشند (٤).

MMC:

اختلال مادرزادی و همراه با میوپاتی و کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک می باشد. نقص در مجموعه های ۱و٤ مشاهده شده است. جهش در ۳۲٦۰ np در حلقه آنتی کدون tRNA leu (UUR) دیده شده است. بیماری ازنوع هتروپلاسمی بوده و وابستگی به سن (پیری) درآن دیده نشده است (٤).

LIMM:

علائم آن شامل کاردیومیوپاتی، RRF (ragged red fibres)، لاکتیک اسیدوزو نقص عصبی می باشد. به دلیل اختلالات تنفسی، افراد در ماههای نخست تولد دچار مرگ می شوند. جهش ٤۳۱۷ در tRNA Ile و جهش ۱۵۹۲۳ و ۱۵۹۲٤ حلقه آنتی کدون tRNA thr در آن گزارش شده است(٤).

Ocular Myopathy:

علایم آن شامل پایین افتادگی پلک چشم، لرزه و رعشه و فلج عضله چشم و میوپاتی می باشد. جهش ۸۳۳٤ در tRNA lys وجهش ۳۲٤۲ در tRNA leu(UUR) برای آن گزارش شده است. دریک مورد جهش ۱۲۲٤٦ در tRNA ser (GCU) همراه با جهش ۱۲۳۰۸ در tRNA leu (UAG) و جهش ۱۰۰۰٦ درtRNA Gly گزارش شده است. جهش (UAG) tRNA leu به تنهایی نیز در یک مورد گزارش شده است(٤).

ج) جهش درون پیوسته- حذف

در یک سوم تمام حالتها حذف ۲ تا۸ کیلو باز ازmtDNA که حذف عمومی ٤۹۷۷bp نامیده می شود، گزارش شده است. به طور معمول بافت های وسیعی از کودکان مبتلا دارای حذف mtDNA می باشد واختلالات 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 ازmtDNA حذف شده در عضله ومغز هستند اگر چه که این وضعیت را در خون نشان نمی دهند. شاید تقسیم سریع بافت هایی مانند مغزاستخوان موجب کاهش آن می شود اما دربافت های پس از میتوز تجمع آن مشاهده می شود.

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

افراد با سندرم Pearson Marrow / Pancreas دارای Pancytopenia (از بین رفتن تمام سلول های خونی)، فیبروز در پانکراس، آتروفی طحال و مرگ در کودکی می باشند. افرادی که زنده می مانند فنوتیپKSS 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. ۹۵٪ افراد

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

جهش درmtDNA :

جهش های mtDNA وبیماری های حاصل از آن در چهاردسته، 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- delition 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(٤) .

الف) جهش های بد معنی:

این جهش ها می تواند در ژنهای مجموعه تنفسی رخ دهند، اما معمولاً به طور ترجیحی بر مسیرهای بینائی 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 درپی مرگ عصب بینائی، نابینائی پیش می آید . درمبتلایان، دید مرکزی به سرعت در هر دو چشم از بین می رود اما دید محیطی برجای می ماند. نابینایی به طور معمول در حدود سنین ۲۷ سالگی رخ می دهد. فراوانی مردها به زنها ٤ به ۱ است. بیماران، دارای نقص قلبی و رفتارهای غیر طبیعی همراه با تباهی در گانگلیاهای پایه بوده و فلج می باشند.

مجموعهٔ ۱(ND1,ND2,ND4,ND5) و سیتوکروم b دراین بیماری درگیر است. ازاین رو، نابینائی به دلیل مهارزنجیره انتقال الکترون می باشد. که هم ژنوم میتوکندریایی و هم ژنوم هسته ای در آن نقش دارد. حذف در کروموزوم X نیزموجب 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 بینایی مردان در مقایسه با زنان بالاتر است. بنابراین، حدآستانه در آنها پایین تر می باشد. مهارکننده های محیطی (سمی) نیز بامهار زنجیره انتقال الکترون می توانند موجب LHON شوند ازاین مواد می توان به سیانید ومنوکسیدکربن co اشاره کرد.

۹۵٪ بیماران دارای یکی از سه جهش در نوکلئوتیدهای ۱۱۷۷۸، ۳٤٦۰ وC ۱٤٤۸٤ T در ND6 می باشند.

نخستین و مهمترین جهش در نوکلئوتید شماره ۱۱۷۷۸ می باشد که مربوط به ژن رمزکننده ND4 بوده و تغییر اسیدآمینه آرژنین به هیستیدین در موقعیت ۳٤۰ راموجب 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 اسیدآمینه بسیار حفاظت شده و با فعالیت شیمیـــــایی مهم می شود. در بسیاری از شجره های LHON، این جهش، هوموپلاسمی است. در ۵۸٪ شجره ها، این جهش، پراکنده و در ۱٤٪، هتروپلاسمی با ظهور نابینایی (در زمانی که تقسیمات سلول موجب می گردد که درتمام 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 مجموعهٔ ۳ می باشد.

پنج جهش دیگر زمانی که در میانکش با جهش های دیگر هستند درLHON 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 (٤).

NARP

جهش درژن 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 ۱۵٦ می گردد. این بیماری درشکل هتروپلاسمی گزارش شده است. بین سطح mtDNA جهش یافته و شدت بیماری و علایم آن، ارتباط وجود دارد. وجود مقادیر بالایی از mtDNA جهش یافته موجب سندرمleigh با عوارض شدید می گردد که دراوایل زندگی (کودکی) علایم آن ظاهر می شود. در حالی که مقادیر پایین از mtDNA جهش یافته موجب ایجاد سندرمNARP با عوارض اولیه دیررس و علایم ملایـــــــم می شود. سندرمLeigh همان bilateral Striatal necrosis می باشد(٤).

ب) جهش هاي زيست زايي

جهش درژن هايي كه مسئول توليد tRNA و rRNA هستند دراين گروه قرار مي گيرد. بيماري هاي حاصل توسط اين جهش ها شامل موارد زير مي باشد: Myoclonic epilepsy & ragged red fibers = MERRF

Mitochondrial encephalomyopathy lactic acidosis & strokelike symptoms=MELAS

matemaly inherited myopathy and cardiomyopathy= MMC

Lethal infantile mitochondrial myopathy=LIMM و ocular myopathy

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

با توجه به نکات بالا، میزان تغییرات تدریجی تکامل زیستی ژنوم mtDNA نیز بسیار بالاتر ازژنوم هسته ای است. تکامل زیستی بالا، موجب ایجاد واریته های مختلف زیاد در بین افراد و جمعیت ها شده است. به طور مثال، در دو فردی که تفاوت بیاراندکی (به طور مثال، حداکثر تفاوت 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 یا SNP (single nucleotide polymorphism=SNP) در ژنوم هسته ای به این فشردگی و تراکم نمی باشد(٤).

۷- عدم نوترکیبی درmtDNA :

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 (۱۹٦۲) است که درآن 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 دراین 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).

اگرچهmtDNA در ۱۹٦۳ کشف شد اما جهش های آن تا ۱۹۸۸ گزارش نشده بود. دراین 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 ٤ مجموعهٔ ۱ (ND4) از میتوکندری را در خانواده های دارای (leber hereditary optic neuropathy = LHON) شناسایی کردند. پس ازآن ودرحدود 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 واضافه شدن بازی را نیز اضافه کرد که درابتدا توسط گروه Anita Harding مشخص شد و سپس و به سرعت، شکلهای بسیاری از فلج های خارجی چشمی پیشرفت کننده نیز شناسایی گردید(۳).

بیماری های میتوکندریایی را از نظر بیوشیمیایی می توان به سه گروه تقسیم کرد(۹و۱۰) :

۱- اختلال درآنزیم 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 هایtRNA وrRNA 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 دربالا هستند، موضوع ژن درمانی هسته – سیتوپلاسم می باشدکه درادامه مطلب به آن پرداخته شده است. در نقص های میتوکندریایی، اندام هایی مانند قلب، کبد، کلیه، مغز وسیستم عصبی مرکزی، عضلات اسکلتی، پانکراس وغدد آندوکرین که نیاز به انرژی بالا دارند بیشترآسیب می بینند. بنابراین گروههای معمول ازبیماری های mtDNA ، بیماری های عصبی– عضلانی و بیماری های تباه 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 زایی یک جهش جدید را تقویت کرده یا آن جهش را حفظ می کند. اثبات بیماری زایی برای جهش های هوموپلاسمی بسیار مشکلتر از هتروپلاسمی است. سه عامل محیط، 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 ازآنها توسط هسته رمزدهی می شود. پروتئین های بخش های دیگر میتوکندری نیز توسط هسته رمزدهی می شود. در نتیجه وجود جهش چه درnDNA و چه در mtDNA می تواند موجب بیماری های میتوکندریایی شود. از این رو اختلالات میتوکندریایی حاصل از نقص درnDNA دارای الگوی توارثی آتوزومی می باشند. درحالی که اختلالات میتوکندریایی حاصل از نقص درmtDNA ، دارای وراثت مادری هستند (۳).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

نتیجه mtDNA از طریق اووسیت دریافت می شود، بنابراین مادری که دارای جهش درmtDNA می باشد آن را به تمام فرزندانش (اعم از دختر و پسر) انتقال می دهد، اما تنها دخترانش آن را به فرزندانشان منتقل می کنند(۳).

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 .ازاین رو، فردی که دارای جهش در mtDNA است معمولا دارای دو جمعیت از mtDNA: جمعیت طبیعی(نوع "وحشی") وجمعیت جهش یافته خواهد بود. وجود همزمان بیش ازیک نوع ازmtDNA را در سلول، بافت یا شخص، هتروپلاسمی (heteroplasmy) می گویند. درمواردی 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 درحالی که جهش های بیماریزای غیر یکنواخت (متغیر) از موارد هتروپلاسمی می باشند زیرا هوموپلاسمی برای mtDNA جهش یافته، معمولا کشنده است (۳).

به منظور ظهور علایم واختلالات بافتی، حضور شماری ازmtDNA جهش یافته ضروری به نظرمی رسد.

یعنی میزانmtDNA جهش یافته دربافت مورد نظر بایستی از یک حد آستانه عبور کند. اثر آستانه ای زمانی ظاهرمی شود که پایینترین غلظت mtDNA جهش یافته دریافت بیشترین اثر را برروی متابولیسم هوازی داشته باشد. و درنتیجه منجر به متابولیسم غیر هوازی (گلیکولیز) گردد. درواقع 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 ازmtDNA جهش یافته به سلول های دختر وارد می شود. حال اگر در یک سلول دختر، اکثرmtDNA های وارد شده طبیعی باشند، فنوتیپ بیماری در آن سلول تغییر کرده و چنین سلولی علایم بیماری رانشان نمی دهد. سلول های حاصل از آن نیز به همین ترتیب (و درحالی که اکثرDNA های آنها طبیعی باشد)، سالم خواهند بود. اما سلولی که اکثرmtDNA های جهش یافته را دریافت کرده باشد، فنوتیپ و علایم 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 درطول زمان های مختلف، تنوع مشاهده می شود، یعنی اینکه نقص هایmtDNA درخلال 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 mt DNA جهش یافته را به ارث می برند(۳).

٤- فشردگی mtDNA :

mtDNA پستانداران فاقد اینترون 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 (درشکل 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 رمزی ژنتیکی mtDNA، با کلید های رمز ژنتیکیnDNA که معمول عموم جانداران است، متفاوت می باشد (۱) .

٦- آسیب پذیری mtDNA :

به دلایل متفاوتی، رخداد جهش درmtDNA ، درمجموع، ده بار بیشتر از ژنوم هسته ای است. شماری ازدلایل به قرارزیراست:

الف – عدم وجودهیستون ها درmtDNA. یادآوری می نماید که هیستون ها ازDNA محافظت می کنند (۱).

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

ج- فراوانی رادیکال های آزاد اکسیژن – که ازجمله فرآورده های فرعی مسیرفسفریلاسیون اکسیداتیو هستند- در میتوکندری و درنتیجه 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 اینترون است. در ژنوم هسته ای توالی های بازی غیر رمزدار (اینترونی) بسیاری (درمجموع حدود ۹۹٪) وجود دارد (۸).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

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

باقیمانده زیرواحدهای 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 ازبین غشاء عبور می کنند. این پپتید راهنما پس از انتقال پروتئین به میتوکندری، توسط پروتئازها 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 رشتهٔ mtDNA از نظر محتوای بازی باهم متفاوت هستند. رشته سنگین (heavy=H) بیشتر دارای G و رشتهٔ سبک (light=L) بیشتر د ارای C می باشد. عمل رشتهٔ H الگو برداری ۱۶s rRNA و ۱۲s و ۱۲ پلی پپتید و ۱۴ عدد tRNA است. رشته L، الگوبرداری پلی پپتیدND6 و ۸ عددtRNA را برعهده دارد. هررشته 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 حلقهٔ D (Displacement) گویند و تنها ناحیهٔ غیر رمزدار در mtDNA است. ناحیهٔ حلقهٔ D شامل پروموتر(promoter=P) برای رونویسی هر دورشته mtDNA می باشد. پروموتر مربوط به رشتهH از نوکلئوتید۵۶۷-۵۴۷ وپروموتر مربوط به رشته L، ازنوکلئوتید ۴۴۵-۳۹۲ می باشد. همچنین، سه توالی حفظ شده CSBIIT:۳۴۶-۳۶۳, CSBII:۲۹۹-۳۱۵ و CSBI:۲۱۳-۲۳۵ و توالی TAS (Termination Associated Sequence) یا ۱۶۱۷۲-۱۶۱۴۷ نیز دراین ناحیه قرار گرفته است. حلقهٔ D یک منطقه سه رشته ای را شکل می دهد که رشته سوم یک قطعه جدیدH به نام Vs DNA می باشد. Vs DNA با استفاده از پرایمرRNA، از منطقه PL رونویسی شده وتانزدیک CSBII پیش رفته و سپس توسط RNA ase میتوکندریایی به نامMRP، که عمل آن پردازش RNA است، شکافته می شود. سنتز Vs DNA ازCSBII شروع می شود و در TAS ختم می گردد. اندازه آن ۷۰۰np است . سنتز رشته H از VsDNA شروع می شود ودرجهت عقربه ساعت ادامه یافته و زمانی که دوسوم ژنوم را طی کرد به منشاء همانندسازی رشته L (OL, np ۵۷۲۱-۵۷۹۸) می رسد. سنتز رشتهL نیز با یک پریماز ویژه که ۵/۸s 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 دوجهته اما غیر همزمان است. از آنجا که mtDNA ابرمارپیچ (super-coiled) است، همانند سازی و رونویسی می تواند توسط برومیداتیدیوم (ethidium bromide) مهار شود .

ژنوم میتوکندری ، فاقد اینترون بوده و بسیار فشرده می باشد و اغلب mRNA های آن فاقد توالی های ترجمه نشدنی انتهای ۵′ و ۳′ می باشند . درابتدای mRNA ها ، کلید رمز آغاز کننده ودرانتهای آنها کلید رمز ایست قرار دارد و بایانهٔ پلی A پس از رونویسی به آنها اضافه می شود. رونوشت رشته H، تولید مقادیر زیادی رونوشت rRNA می کند.

مانند باکتری ها، سنتز پروتئین در میتوکندری، بااسیدآمینه فرمیل متیونین شروع می شود. عوامل طویل کننده آن مشابه باکتری هاست و به مهار کننده های ریبوزوم باکتری چون کلرامفنیکل (chloramphenicole=CAP) حساس می باشد. شایان ذکر است که میتوکندری با دیگر اندامگان ها در داشتن کلیدهای رمز ژنتیکی متفاوت است، به طور مثال درمیتوکندری کلیدهای رمز ایست UGA و UGG برای تریپتوفان و کلیدهای رمز مربوط به آرژنین یعنی AGA و AGG برای ختم زنجیره استفاده می شود. چون اغلبmRNAهای 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 پلیمرازگاما (۷) ونیز عوامل رونویسی ویژه مانند mt TFA (نام دیگرآن 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 ۱و۲، هلیکاز، پروتئین های متصل شونده به DNA تک رشته ای، DNA وRNA اندونوکلئازها و نوکلئوزید کینازها می باشد(۴).

تفاوت ژنتیک میتوکندریایی باژنتیک مندلی:

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

۱- **توارث مادری:**

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

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]

مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
سال ۶۳، شماره ۱۰، صفحات ۷۹۱ تا ۸۱۳ (۱۳۸٤)

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

دکتر محمدرضا نوری دلوئی*، 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، شمـــــــار 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 ازطریق مصنوعی شناخته نشده، درنتیجه 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 دردست بودن ناقلین مناسب اختصاصی برای میتوکندری می باشد. در مقاله مروری حاضر با استفاده از منابع جدید و معتبر فراوان به معرفی روش 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 درمیتوکندری رها کنند وازطرفی نباید آن را درطول آندوسیتوز رها سازند. مدت های طولانی است که می دانیم ترکیبات آمفی فیل دارای مرکز باردار کاتیونی چون ردامین ۱۲۳و 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 نظـــــر می رسد که این ناقل می تواند به منظور رهاسازی اختصاصی ژن ها در میتوکندری استفاده شود.

مقدمه

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

میتوکندری نخستین اندامگان سلولی است که ارتباط آن با بیماری های انسانی مشخص شد. بدین ترتیب که Luft و همکاران در سال ۱۹٦۲ شواهدی مبنی بر بدکاری میتوکندری در بیماران دارای

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-21]