مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۱۸، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۸۹
صفحه: ۸۳-۷۸

Journal of Shaheed Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 18, No 2, Jun/Jul 2010
Pages: 78-83

جهش جدید هموپلاسمیک T4216C میتوکندریایی در افراد ایرانی مبتلا به بیماری فردریش اتاکسیا

محمد مهدی حیدری*[۱]، مهری خاتمی[۲]

۲،۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یزد

تاریخ دریافت:۱۳۸۸/۹/۲۲ تاریخ پذیرش:۱۳۸۸/۱۲/۶

چکیده

مقدمه: نقایص میتوکندری در بیماری فردریش اتاکسیا (FRDA) در بسیاری از مطالعات گزارش شده است. بیماری فردریش اتاکسیا یک بیماری تحلیل یابنده اعصاب با وراثت اتوزومال مغلوب است که در نتیجه کاهش بیان فراتاکسین علایم بیماری بروز می‌یابد. کاهش تولید فراتاکسین باعث افزایش آهن و افزایش رادیکالهای آزاد در میتوکندری شده و به نوبه خود باعث کاهش فعالیت زنجیره تنفسی می‌شود. عامل تعدیل کننده دیگر در بیماری فردریش اتاکسیا، نقص‌های DNA میتوکندریایی (mtDNA) است. از این رو توجه ما به بررسی تغییرات نوکلئوتیدی ژنوم میتوکندری در افراد بیمار متمرکز شد که می‌تواند در نقص زنجیره تنفسی دخالت داشته باشد و باعث کاهش تولید ATP می گردد.

روش بررسی: در این مطالعه، ژن NADH دهیدروژناز I(ND1) از ژنوم میتوکندری با تکنیک PCR- TTGE مورد بررسی قرار گرفت و پس از یافتن الگوی باندی متفاوت، جهت شناسایی جهش دقیق نمونه‌ها برای تعیین توالی ارسال شد.

نتایج: با بررسی روی ۲۰ بیمار، ۱ جهش جدید (T4216C) مشاهده گردید که برای اولین بار در بیماری فردریش اتاکسیا معرفی شده است. جهش T4216C باعث تغییر اسید آمینه تیروزین به هیستیدین در موقعیت ۳۱۳ ژن ND1 شده و نتایج حاصل از مطالعات بیوانفورماتیک نشان می‌دهد که ششمین زنجیره آلفا این پروتئین از بین می‌رود.

نتیجه‌گیری: از نظر آماری این جهش در ژن ND1 در افراد بیمار نسبت به افراد کنترل بیشتر دیده شد($P<۰/۰۰۱$). بنابراین این جهش ممکن است یک فاکتور مستعدکننده‌ای باشد که به همراه عوامل محیطی در پیشرفت بیماری و کاهش سن شروع بیماری موثر است.

واژه‌های کلیدی: فردریش اتاکسیا- DNAی میتوکندریایی- ژن NADH دهیدروژناز I (ND1)- جهش ژنی

* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۸۱۲۲۶۴۹-۰۳۵۱، پست الکترونی: Heidarimm@yazduni.ac.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-31]

مقدمه

فردریش اتاکسیا (FRDA) شایع‌ترین ناهماهنگی حرکتی وراثتی (۱/۵۰۰۰۰ تولد زنده در بین سفید پوست‌ها) است که دارای الگوی وراثت اتوزومال مغلوب است(۱). از نظر بالینی بیماری باعث تحلیل اعصاب پیشرونده و کاردیومیوپاتی و در ۱۰٪ موارد نیز باعث دیابت می‌شود(۲). سن شروع معمولا سنین بلوغ است و چون بیماری پیشرونده است و اندام‌ها را درگیر می‌کند فرد مبتلا در حدود بیست سالگی نیاز به ویلچر دارد. بدشکلی پاها، آتروفی چشمی و کری نیز در این بیماران دیده می‌شود(۳). ژن درگیر در FRDA در تمام سلول‌ها بیان می‌شود اما سطح بیان در بافت‌های مختلف در مراحل مختلف تکوینی متفاوت است. محصول ژن FRDA بنام فراتاکسین(Frataxin) در سلول‌های غنی از میتوکندری مانند کاردیوسیت‌ها و نورون‌ها به مقدار زیاد بیان می‌شود. گسترش تکرار سه نوکلئوتیدی GAA در اینترون اول ژن FRDA سبب کاهش بیان mRNAی فراتاکسین و در نتیجه کاهش پروتئین فراتاکسین می‌شود(۴). گرچه مکانیسم دقیق عمل فراتاکسین مشخص نیست ولی مطالعات نشان می‌دهد که کاهش فراتاکسین باعث افزایش آهن آزاد در میتوکندری می‌گردد. مطالعات بر روی مخمر ساکرومایسز سرویزیه، مکانیسم فقدان فراتاکسین را تقریباً آشکار کرده است. حذف ژن هومولوگ فراتاکسین در مخمر (YHF1) نشان دهنده نقص‌هایی در تنفس و فقدان DNAی میتوکندریایی مخمر است(۵).

میتوکندری، اندامک میله‌ای شکل است که در همه سلول‌های انسانی دیده می‌شود و مسئول تولید ATP ضروری سلول است. میتوکندری حاوی ژنوم ۱۶/۵ Kb است و دارای ۲۲ ژن tRNA و ۲ ژن RNAی ریبوزومی است که برای ترجمه در میتوکندری لازم است و ۱۳ ژن رمز کننده زیرواحدهای زنجیره فسفوریلاسیون اکسیداتیو را هم دارد(۶). تغییرات نوکلئوتیدی در DNAی میتوکندریای (mtDNA) باعث اختلال در عملکرد کمپلکس‌های زنجیره‌ای تنفسی می‌شود. یکی از علل جهش در ژنوم میتوکندری وجود رادیکال‌های آزاد است که در میتوکندری سلول‌های بیماران فردریش آتاکسیا در اثر افزایش آهن آزاد ایجاد می‌شود(۷). کاهش فعالیت زنجیره تنفسی میتوکندریایی در بسیاری از بیماری‌های نورودژنریتیو از جمله آلزایمر (AD)(۸)، پارکینسون (PD)(۹) مولتیپل اسکلروزیس (MS)(۱۰) و فردریش اتاکسیا (FRDA)(۱۱) گزارش شده است. هدف این مطالعه ، یافتن جهش‌های ژن ND1 در بیماران فردریش اتاکسیای ایرانی بود. این بررسی با استفاده از روش PCR-TTGE و تعیین توالی این ژن‌ها و همچنین مطالعات بیوانفورماتیک برای یافتن اثر این جهش‌ها بر روی پروتئین‌ها و بیماری‌زایی آنها انجام گردید.

روش بررسی

بیماران: حجم نمونه در این مطالعه مورد شاهدی که با توجه به توان ۸۰٪ و سطح اطمینان ۹۵٪ و با در نظر گرفتن P=٪۴۵ و d=٪۴ محاسبه شد، در این مطالعه حدود ۳۰ بیمار از بیمارستان شریعتی با تشخیص بالینی فردریش اتاکسیا از طرف متخصص بالینی جهت انجام آزمایشات ژنتیک فرستاده شد. پس از انجام مشاوره ژنتیک و آزمایش مولکولی ژن فراتاکسین مشخص شد که از این تعداد بیمار فقط ۲۰ مورد دارای گسترش تکرارهای GAA در اینترون خود بودند و مابقی به علت نداشتن گسترش تکرارهای ۳ تایی GAA، از این مطالعه کنار گذاشته شدند(۱۲). علائم بالینی شبیه بیماری فردریش اتاکسیا ممکن است ناشی از بیماریهای دیگر از جمله بیماری کمبود ویتامین E باشد. از این ۲۰ بیمار ۱۰ بیمار زن و ۱۰ بیمار مرد بودند که برای هر یک از آنها شجره‌نامه رسم شد و وراثت اتوزومال مغلوب تأیید گردید. در این مطالعه از ۲۵ فرد بعنوان گروه شاهد که هیچ علامت بیماری فردریش اتاکسیا را نداشته و همچنین سابقه بیماری‌های میتوکندریایی را هم نداشتند، استفاده شد.

متوسط سن بیماران و افراد شاهد به ترتیب ۱۰-۳۲ و ۱۲-۳۴ می‌باشد. متوسط سن شروع بیماری FRDA، ۴/۵±۱۲/۲ (SD±متوسط) تعیین شد. تعداد تکرارهای n(GAA) مشاهده شده در هر دو آلل بیماران از ۲۵۶ تا ۹۹۱ تکرار مشخص گردید. بیمارانی که دارای تکرارهای بیشتری بودند اغلب اختلالاتی در رفلکس‌های عمیق تاندونی و پا (pes cavus) و یافته‌های ECG نشان می‌دادند.

تعیین تکرارهای GAA در اینترون اول ژن FRDA : استخراج DNA از خون با استفاده از کیت DNAfast از شرکت ژن

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-31]

فناوران انجام شد. قسمتی از اینترون اول ژن FRDA که حاوی تکرارهای گسترش یافته GAA است توسط یک جفت پرایمر بنام‌های 5200Eco و 5200Not تکثیر یافت و پس از تخمین اندازه آنها بر روی ژل با استفاده از فرمول 457+3n که n معادل تعداد تکرارهای GAA می‌باشد تعداد تکرارها تعیین گردید.

TTGE و تعیین توالی: از روش TTGE برای تشخیص جهش‌های هتروپلاسمیک از هموپلاسمیک در ژنوم میتوکندری استفاده می‌شود. حساسیت این تکنیک بسیار بالاست بطوری که می‌تواند حتی جهش‌های میتوکندریایی با ۴٪ هتروپلاسمی در قطعه‌ای به طول kb ۱ تشخیص دهد(۱۳). در این روش بعد از تکثیر قطعه توسط PCR، محصول را در ۹۵ درجه سانتیگراد حرارت داده و اجازه می‌دهیم تا قطعات تک رشته‌ای به آهستگی سرد شوند. در این حالت قطعات هترودوپلکس DNA تشکیل می‌شود. هر یک از رشته‌های هترودپلکس DNA حاصل دارای یک باز متفاوت می‌باشند که قادر به جفت شدن نیستند. برای شناسایی این هترودوپلکس DNA، در ژل پلی اکریل‌آمید و با استفاده از دستگاه Dcode که یک شیب افزاینده حرارتی را ایجاد می‌کند الکتروفورز انجام می‌شود. قطعات هترودوپلکس با توجه به نقطه ذوبی که با استفاده از نرم‌افزار Winmelt (شرکت Bio-rad) مشخص می‌شود، الگوی باندی متفاوتی را در ژل نسبت به حالت نرمال نشان می‌دهد که وجود یک تغییر نوکلئوتیدی نامعلوم را مشخص می‌کند. در پی آن برای شناسایی دقیق تغییرات نوکلئوتیدی، نمونه‌ها جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) فرستاده شد. از این طریق تعداد محدود و دقیقی از قطعات PCR که دارای جهش می‌باشند جهت تعیین توالی شدند. جدول ۱، توالی پرایمر و شرایط PCR را مشخص می‌کند و جدول ۲، شرایط واکنش TTGE را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از تعیین توالی، جهت یافتن تغییرات ژنتیکی با بانک اطلاعاتی ژنوم میتوکندری انسان MtDB 2009 بررسی گردید.

مطالعات بیوانفورماتیک: با مقایسه نتایج حاصل از تعیین توالی با MtDB 2009، تغییرات نوکلئوتیدی مشخص گردید. معیار گزارش شدن یا نشدن یک جهش نیز، این بانک اطلاعاتی می‌باشد. در صورتی که تغییر نوکلئوتیدی در این بانک حتی در بیماری دیگری غیر از فردریش اتاکسیا قبلاً ثبت شده باشد، تحت عنوان جهش گزارش شده ارائه گردیده است. برای تعیین چگونگی حفاظت تکاملی این تغییرات در موجودات دیگر نیز از نرم افزار DNA Star (برنامه همردیفی DNA) استفاده شد. این نرم افزار توالی ژن ND1 را با ژن‌های معادل خود در گونه‌های دیگر مانند شامپانزه، گاو، سگ، اسب و موش هم ردیف می‌کند.

برای بررسی اثر تغییر اسیدهای آمینه بر روی ساختار پروتیئن‌های داخل غشایی از برنامه سیستم پیشگویی ساختار پروتئین SOSUI از سایت ذیل استفاده گردید.

http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html

آنالیز آماری: تست آماری فیشر (Fisher's exact) برای تعیین ارتباط بین دو گروه شاهد و بیمار مورد استفاده قرار گرفت، $P<0/05$ نیز بعنوان اهمیت آماری بکار برده شد. محاسبات با استفاده از نرم افزار GraphPad انجام گرفت.

نتایج

برای ژن ND1 (ژن کد کننده زیر واحدهای کمپلکس I زنجیره تنفسی میتوکندری) پرایمر طراحی شد و شرایط PCR تعیین گردید (جدول ۱). آنالیز TTGE برای ۲۰ بیمار و ۲۵ فرد شاهد انجام گردید (جدول ۲). در آنالیز TTGE، وجود چندین باند نشان‌دهنده حالت هتروپلاسمی است و تغییر جایگاه یک باند نسبت به حالت نرمال در افراد کنترل نشان‌دهنده حالت هموپلاسمی برای آن جهش می‌باشد(شکل ۱). قطعات DNA یی که در آنالیز TTGE دارای تغییر جایگاه باندی بودند جهت تعیین توالی فرستاده شدند. سپس توالی قطعات حاصل، با توالی ثبت شده میتوکندری در بانک اطلاعاتی (MtDB) مقایسه گردید. آنالیز TTGE در ۲۰ بیمار، ۱ جهش هموپلاسمیک در ناحیه رمزکننده ژن ND1 را در ۴ بیمار و ۱ نفر از افراد شاهد نشان داد. پس از تعیین توالی، جهش T4216C در ژن ND1 شناسایی گردید. مقایسه با بانک اطلاعات میتوکندری مشخص گردید که این جهش در بیماری‌های دیگر گزارش شده ولی در بیماری فردریش آتاکسیا برای اولین بار شناسایی شده است. جهش T4216C باعث تغییر اسید آمینه تیروزین به هیستیدین می‌شود.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-31]

جدول ۱: توالی پرایمر و شرایط تکثیر ژن ND1

قطعه	اندازه (bp) نام و موقعیت پرایمرها	شرایط واکنش	PCR برنامه	توالی پرایمرها (۵'-۳')
ND1	۵۳۹ ONP 168: 4111 ONP 65: 4650	Buf: 2.5, Mg: 0/7, DNTP: 0/7, P: 0/6, DNA: 0.6, taq: 0/25 µl	95:50", 60: 50", 72: 35" (30 cycle); 72: 10'	F CTGTTCTTATGAATTCGAACA R GGAAATACTTGATGGCAGCT

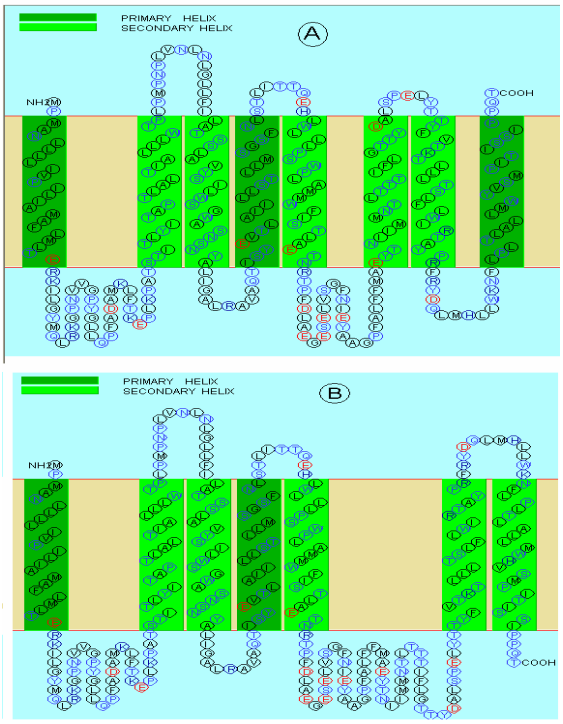
جدول ۲: شرایط انجام آزمون TTGE برای محصولات تکثیر شده.

نام قطعه	اندازه (bp)	محدوده دمایی(°C)	میزان افزایش دما (° C/h)	درصد ژل آکریل آمید
ND1	۵۳۹	۵۷-۶۴	۱/۶	۶

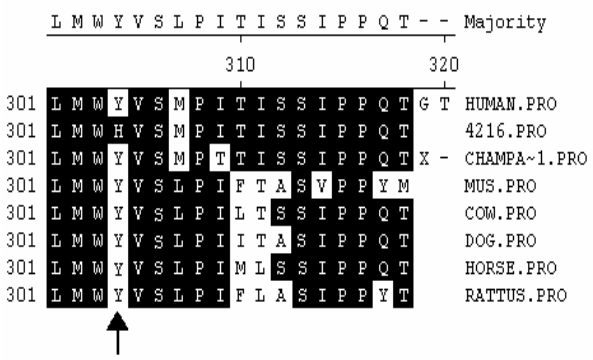
بحث

گسترش توالی‌های تکراری در بسیاری از بیماری‌های نورودژنریتیو از جمله بیماری‌هایی مانند دیستروفی میوتونیک، X شکننده، هانتیگتون و FRDA شایع است(۱۲). تمام ۲۰ بیمار دارای گسترش تکرارهای GAA در اینترون I ژن FRDA بودند.

گرچه عملکرد پروتئین فراتاکسین هنوز دقیقا مشخص نیست ولی فقدان آن باعث افزایش آهن میتوکندریایی می‌شود و در نتیجه استرس‌های اکسیداتیو در میتوکندری افزایش می‌یابد. DNAی میتوکندری می‌تواند بعنوان یک فاکتور تعدیل کننده بیماری فردریش اتاکسیا تصور شود. کمپلکس NADH یوبی کوئینون‌ردوکتاز(NADH-ubiquinone oxidoreductase) (کمپلکس I) اولین و بزرگترین کمپلکس زنجیره تنفسی است که از حداقل ۴۵ زیر واحد تشکیل شده است. mtDNA، ۷ تا از ۴۵ زیر واحد کمپلکس I را رمز گذاری می کند که شامل NDهای ۱، ۲، ۳، ۴، L ۴، ۵ و ۶ است (ND نشان دهنده NADH دهیدروژناز است). زیر واحدهای ND، تشکیل پوسته هیدروفوبیک داخل غشاء را می‌دهند و پروتئین‌های آب دوست آهن- سولفور را احاطه می کنند. کمپلکس I، باعث اکسیده شدن NADH از ماتریکس میتوکندری و احیا یوبی کوئینون(Ubiquinone) می گردد که تولید بخشی از شیب پروتونی مورد نیاز برای سنتز ATP می کند(۷،۱۴،۱۵).



شکل ۱: ساختار پروتئین ND1 در غشاء میتوکندری در حالت نرمال(A) و حالت جهش یافته T4216C(B)



شکل ۲: هم ردیفی تغییر نوکلئوتیدی جدید T4216C در ژن ND1

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-31]

با انجام تست TTGE و تعیین توالی برای ژن ND1، ۱ تغییر نوکلئوتیدی شناسایی گردید (T4216C). از نظر آماری این جهش در ژن ND1 در افراد بیمار نسبت به افراد کنترل بیشتر دیده شد(P<۰/۰۰۱).

جهش T4216C سبب تغییر اسید آمینه تیروزین به هیستیدین در موقعیت ۳۱۳ ژن ND1 می‌گردد. پس از بررسی با نرم افزار پیش‌بینی کننده SOSUI مشخص شد که این جهش باعث حذف ششمین زنجیره آلفا می‌گردد. این وضعیت امکان دارد در عملکرد این زیر واحد کمپلکس I اثر قابل توجه‌ای داشته باشد. این جهش در ناحیه‌ای قرار دارد که از نظر تکاملی تقریباً حفاظت شده است (شکل ۲) همچنین در بیماری‌های دیگر میتوکندری نظیر: سندرم‌های Leigh، Leber، LHON، دیابت توارثی و سندرم ناشنوایی نیز گزارش شده است(۱۶،۱۷). از این رو، این جهش ممکن است یک فاکتور مستعدکننده‌ای باشند که به همراه فاکتورهای محیطی در پیشرفت بیماری و کاهش سن شروع بیماری اثر داشته باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه طرح پژوهشی مصوب دانشگاه یزد و با حمایت مالی آن دانشگاه انجام گرفته است که بدینوسیله مراتب امتنان خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه اعلام می‌داریم. از آقای دکتر شهریار نفیسی فوق تخصص مغز و اعصاب از بیمارستان شریعتی که بیماران را جهت این مطالعه ارجاع داده‌اند تشکر و قدردانی می‌شود و نیز از تمام بیماران شرکت کننده در این طرح قدردانی می‌شود.

منابع:

1- Delatycki MB, Williamson R, Forrest SM. ***Friedreich ataxia: an overview***. J Med Genet. 2000; 37: 1-8.

2- Wood NW. ***Diagnosing Friedreich's ataxia.*** Arch Dis Child 1998;78: 204-7.

3- Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, Cova L, Hindelang C, Jiralerspong S, et al. ***Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes.*** Hum Mol Genet 1997; 6:1771-80.

4- Campuzano V, Monermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, et al. ***Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion***. Science 1996;271:1423-7.

5- Foury F, Talibi D. ***Mitochondrial control of iron homeostasis: A genome wide analysis of gene expression in a yeast frataxin deficient mutant.*** J Biol Chem 2001;276:7762-8.

6- Koutnikova H, Campuzano V, Foury F, Dolle P, Cazzalini O, Koenig M. ***Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin.*** Nat Genet 1997;16:345-51.

7- Larsson NG, Clayton DA. ***Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders.*** Annu Rev Genet 1995; 29: 151-78.

8- Kish SJ, Bergeron C, Rajput A, Dozic S, Masdrogiacomo F, Chang L. ***Brain cytochrome oxidase in Alzheimers disease.*** J Neurochem 1992;59:776-9.

9- Schapira, AHV, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. ***Mitochondrial complex I deficiency in Parkinsons disease.*** J Neurochem 1990;54: 823- 7.

10- Lu F, Selak M, O'Connor J, Croul S, Lorenzana C, Butunoi C, et al. ***Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in lesions of multiple sclerosis***. J Neurol Sci 2000;177:95- 103.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-31]

11- Bradley J, Blake JC, Chamberlain S, Thomas PK, Cooper JM, Schapira AHV. ***Clinical Biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia.*** Hum Mol Genet 2000;9(2):275-82.

12- Harding AE. ***Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features.*** Brain 1981;104:589-620.

13- Wong LJC, Liang MH, Kwon H, Park J, Bai RK, Tan DJ. ***Comprehensive scanning of the entire mitochondrial genome for mutations.*** Clin Chem 2002; 48:1901-12.

14- Schapira AHV. ***Mitochondrial disease***. Lancet 2006;368:70-82.

15- Mancuso M, Nardini M, Micheli D, Rocchi A, Nesti C, Giglioli NJ, et al. ***Lack of association between mtDNA haplogroups and Alzheimer's disease in Tuscany.*** Neurol Sci 2007; 28:142-7.

16- MITOMAP: ***a human mitochondrial genome database;*** 2009 [cited 2009 May 23]. Available from: http://www.mitomap.org/.

17- Ugalde C, Hinttala R, Timal S, Smeets R, Rodenburg RJT, Uusimaa J, et al. ***Mutated ND2 impairs mitochondrial complex I assembly and leads to Leigh Syndrome.*** Mol Gen Meta 2007;90: 10-4.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-31]