sina-pub.ir

اصول ژنتیکی و پاتولوژی بیماری میتوکندریایی

چکیده :

میتوکندری، ارگانل ها (اندام) های دو غشایی می باشند که در همه سلول های یوکاریوتی هسته دار موجود هستند و مسئول تولید انرژی سلولی در شکل ATP می باشند. کارکرد میتوکندری تحت کنترل ژنتیکی مضاعف- ژنوم میتوکندری 16-6 کیلو بازی با تنها 37 ژن و ژنوم هسته می باشد که باقی مانده 1300 پروتین میتوپروتئوم را کد گذاری می کند. اختلال میتوکندریایی به دلیل مشکلات در ژن های میتوکندریایی هسته ای یا دی ان ای میتوکندری اتفاق افتاده و می توان در کودکی یا بزرگ سالی در ارتباط با هتروژنیته بالینی وجود داشته باشد و علایم آن بر یک اندام یا بافت و یا مشارکت چند سیستمی اثر دارد. هیچ درمانی برای بیماری میتوکندری برای طیف وسیعی از بیماران میتوکندریایی وجود ندارد و یک تشخیص ژنتیک برای مشاوره ژنتیک و محاسبه میزان خطرعود لازم بوده و می تواند بر مدیریت بالینی بیماران اثر بگذارد. راهبرد های توالی یابی نسل جدید ، از ابزاری مهم در کشف ژن های بیماری جدید و تشخیص بیماران بالینی می باشد: جهش ها در بیش از 250 ژن موجب بروز بیماری میتوکندریایی شده و مشخصات بیو شیمیایی، هیستوشیمیایی، ایمنو سیتوشیمی و نوروپاتولوژیکی این بیماران منجر به بهبود راهبرد های آزمون تشخیصی و فنون تشخیصی جدید شده است. این مقاله بر چشم انداز های ژنتیکی فعلی مرتبط با بیماری میتوکندریایی قبل از تاکید بر پیشرفت ها در مطالعه پاتولوژی میتوکندری در دو اندام بالینی - عضله های اسکلتی و مغز، متمرکز است.

کلمات کلیدی : میتوکندری بیماری میتوکندری؛ mtDNA؛ نقص زنجیره تنفسی؛ تشخیص ژنتیکی؛ آسیب شناسی عضلانی.

ایمونوهیستوشیمی؛ مغز و اعصاب

مقدمه

میتوکندری ها ارگانل های دو غشایی موجود در سلول های یوکاریوتی هسته دار می باشند و مسئول فرایند های سلول یمختلف از جمله هموستازی کلسیم، بیوژنز خوشه آهن- گوگرد، اپوپتوزیس(مرگ پیش بینی شده سلول)

sina-pub.ir

و تولید انرژی سلولی از طریق فسفو ریلاسیون اکسایشی، می باشند(1-2). با منشا باکتریایی، یک رابطه همزیستی تاریخی تکامل می یابد که در طی آن میتوکندری به اجزای تشکیل دهنده سلول های یوکاریوتی تبدیل می شود(3). نیای آن ها از مواد ژنتیکی چند رونوشتی گرفته می شود(DNA میتوکندریایی) و تعداد رونوشت بین افراد و در میان بافت های مختلف از یک فرد متغیر است. مولکول mtDNA حلوق ی 16.6 کیلو بازی، 13 زیر واحد از اجزای OXPHOS، 22 t-RNA میتوکندریایی و دو زیر واحد از میتروبیوزوم ها را کد کذاری می کنند(4). به علاو، متوپروتئوم مستلزم 1300 پروتین کد گذاری شده هسته ای برای تولید، تجمیع و پشتیبانی از کمپلکس هایOXPHOS مولتی متریک و فرایند های میتوکندریایی کمکی است. دلیل این است که اختلال میتوکندریایی می تواند ناشی از مشکلات mtDNA یا ژن هسته ای باشد و به عنوان شرط اولیه یا مادرزادی و و یک اثر وابسته به سن در نظر کرفته می شود که به موتاسیون سوماتیک نسبت داده شده است(6).

اصطلاح چتر" بیماری میتوکندریایی" اشاره به گروه ناهمگن بالینی از اختلالات میتوکندریایی اصلی دارد که در آن بافت ها و اندام هایی که بیشتر تحت تاثیر قرار می گیرد، انواعی هستند که دارای تقاضای بالاترین انرژی می باشد. علایم بالینی در کودکی و یا بزرگ سالی ظهور می یابند و می تواند بر یک اندام به صورت ایزوله و یا چند سیستمی اثر داشته باشد(7). حداقل شیوع بیماری در بزرگ سالان حدود 12.5 در هر 100000 (8) می باشد و 4.7 در هر 1000000 کودک است. یک کمبود کلی همبستگی های ژنوتیپی- فنوتیپی در بسیاری از اختلالات میتوکندریایی وجود دارد که ایجاد یک تشخیص ژنتیکی می کند که می تواند یک فرایند پیشرفته بوده و می تواند برای بسیاری از بیماران مبهم باشد. این مقاله، اطلاعاتی دقیق در خصوص سه زمینه ای ارایه می کند که پیشرفت های عمده ای را در دانش در طی سال های اخیر نشان داده است. نظیر ژنتیک مولکولی، پاتولوژی ماهیچه و نوتروپاتولوژی که مرتبط با بیماری میتوکندریایی است و موید روش جدیدی است که موجب بهبود تشخیص بیماران با بیماری میتوکندریایی با هدف ارایه گزینه هایی برای خانواده های در معرض خطر شرایط غیر قابل درمان می شود.

اصول ژنتیکی بیماری میتوکندریایی

بیماری میتوکندریایی ناشی از mtDNA

sina-pub.ir

بر خلاف دی ان ای هسته ای که دیپلوییید است و از قوانین وراثت مندلی پیروی می کند، mtDNA به طور مادری به ارث می رسد(11). ماهیت چند رونوشتی از mtDNA منجر به ایجاد هتروپلاسمی می شود، که یک بعد منحصر به فرد از ژنتیک مرتبط با mtDNA بوده و زمانی رخ می دهد که ترکیبی از مولکول های موتانت و mtDNA نوع وحشی وجود دارند. بر عکس، هتروپلاسمی زمانی رخ می دهد که همه مولکول های mtDNA دارای یک ژنوتیپ می باشند. جهش های هتروپلاسمیک دارای استانه متغیری می باشند یعنی میزان تحمل مولکول های mtDNA ناقص توسط سلول(12). وقتی که بار جهش بیش از این آستانه باشد، اختلال متابولیک و علایم بالینی رخ می دهد. جهش های نقطه ای و حذف mtDNA بزرگ مقیاس بیانگر دو مورد از رایج ترین عوامل بیماری mtDNA می باشند که اولی از طرف مادربه ارث می رسد و دومی در طی رشد جنین ظهور می یابند.

جهش های نقطه ای mtDNA

جهش های نقطه ای mtDNA(از جمله موتاسیون ها)، یک عامل مهم بیماری انسانی با شیوع جمعیت یک در 200 می باشد(13) موتاسیون ها در هر ژن mtDNA گزارش شده اند و ممکن است با علایم بالینی متغیر از ناشنوایی حسی عصبی تا MLEAS باشد که ویژگی های برجسته آن شامل انسفالوپاتی میتوکندری، اسیدوز لاکتیک، و سکته مغزی منجر به ایجاد مشکلاتی می شود. علایم بالینی می توانند در کودکی اتفاق بیفتد و موتاسیون ها می توانند موروثی و یا جدید باشند. مشکلات mtDNA انتقال داده شده مادری در مادران با موتاسیونmtDNA خانوادگی پایین تر از استانه مورد نیاز برای اختلال سلولی بوده و این در حالی است که اوسیت ها دارای بار های جهش متغیر می باشد و این ناشی از فشار های انتخابی بیماری های میتوکندریایی است(15). به این ترتیب پیش بینی ریسک عود برای حاملگی های اینده، غیر ممکن است، و این در حالی است که تست بافت های جنینی با استفاده از بیوپسی پرز های جفتی می تواند یک شاخص دقیق از هتروپلاسمی mtDNA را در جنین ایجاد کند که اطلاعاتی را در خصوص گزینه های تولید مثلی ارایه می کند. خطر عود موتاسیون های نقطه ای mtDNA بسیار پایین است به جز خطر موزاییسم ژرم لاین در اوسیت های مادری(14).

حذفیات mtDNA بزرگ مقیاس

حذفیات mtDNA بزرگ مقیاس دارای فراوانی جمعیت 1.5/1000000(8) با سه فنوتیپ اصلی می باشد: اپتالاموپلژیا مزمن خارجی (PEO) (~65٪ موارد)، سندرم کرنز (KSS) (~30٪ موارد) و سندرم پیرسون. سندرم

sina-pub.ir

پیرسون شدید ترین علایم مربوط به mtDNA بزرگ مقیاس می باشد: بیماران در مراحل اولیه کمخونی سیدروبلاستیک و اختلال در عملکرد پانکراس قرار داشته و این وضعیت در کودکی می تواند کشنده باشد(18). بیماران KSS پایین تر از 20 سالگی مبتلا به رتینوپاتی رنگیزه و PEO می باشد و از این روی شامل دارای ویژگی چند سیستمی از جمله میوپاتی، آتاکسی، و یا نقص قلبی قلبی است.PEO، یک علایم خوش خیم می باشد که به حذفیات mtDNA نسبت داده می شود و افتالموپلژی، پتوز، و میوپاتی می باشد(19). بر خلاف ارایش ژنی هسته ای، حذفیات mtDNA بزرگ مقیاس در طی رشد جنین رخ داده و دارای نرخ وقوع ریسک پایین می باشد(20). زنان دارای مشکلات بالینی که دارای حذف mtDNA بزرگ مقیاس هستند دارای خطر انتقال ریسک پایین بوده و ازمایش پری ناتال برای حاملگی های در معرض خطر می باشد.

موتاسیون های mtDNA ثانویه

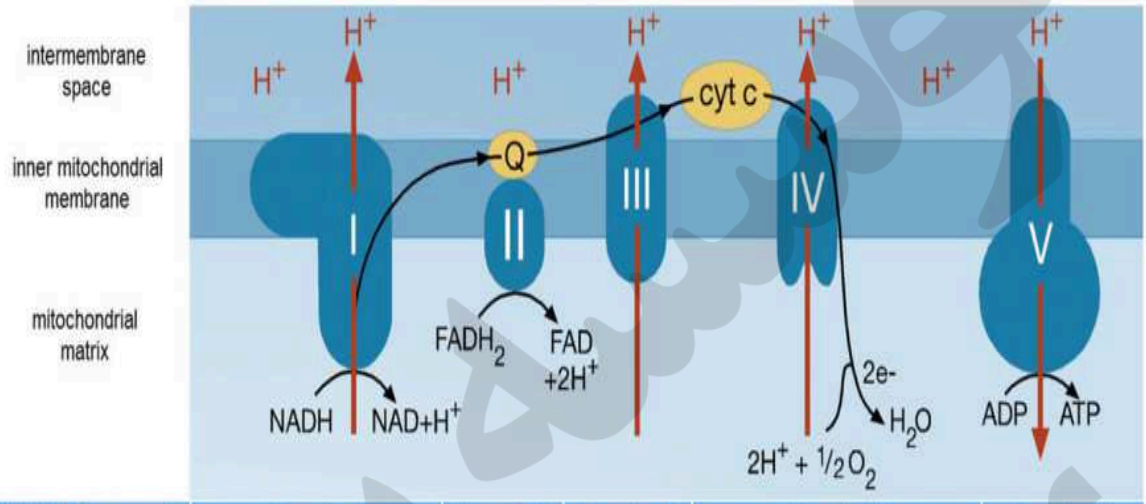
حذفیات mtDNA بزرگ مقیاس و و موتاسیون های نقطه ای بیانگر مشکلات mtDNA اولیه می باشد با این حال مشکلات ثانویه، از عوامل رایج بیماری میتوکندریایی می باشد. نگه داری mtDNA، رونویسی و یا ترجمه پروتین و یا فرایند کمکی نظیر ورود میتو کندری می تواند موجب ایجاد اثرات mtDNA کمی و یا کیفی شود. این ناشی از جهش های موثر بر ژن های هسته ای می باشد و توارث در حالت مندلی رخ می دهد.

بیماری میتوکندریایی ناشی از ژن های میتوکندریایی هسته ای

اکثریت ژن های کد کننده میتوپروتئوم در هسته ژنوم قرار داشته و از الگو های توارث مندلی تبعیت می کنند. موارد وراثت غالب و نغلوب در منابع گزارش شده اند(21-24). اولین موتاسیون ژن میتوکندریایی هسته ای در 1995 در SDHA شناسایی شد که کد کننده زیر واحد ساختاری کمپلکس 2 است و پیشرفت زیادی در کشف ژن های کاندید بیماری میتوکندریایی صورت گرفته است. رویکرد های پروتئومیک و ترانسکریپتومیک قابل تعمیم به بیماری انسان برای کشف کاندید های جدید می باشد . رویکرد سنتی تحلیل لینکاژ با استفاده از اعضای خانواده، مسیر را برای راهبرد های توالی یابی موازی ارایه کرده است از جمله توالی یابی اگزوم و یا سینگلتون ها و یا ژن های بیماری جدید هنوز پس از 20 سال نیز وجود دارند. از 1300 پروتین در میتوپروتئوم، موتاسیون ها در بیش از 250 ژن گزارش شده اند و هر دو ژن ها و مکانیسم های جدید شامل ژن هایی هستند که در بیماری انسان نقش دارند. بدیهی است که فنوتیپ های بالینی شدید تر با مشکلات مغلوب به دلیل تغییر سطوح هتروپلاسمی

sina-pub.ir

در بافت های بالینی و اثرات تفکیک کننده موتاسیون های مغلوب ارتباط دارد. از این روی موتاسیون های mtDNA در بزرگ سالان دیده می شود، در حالی که نقائص ژن هسته ای در موارد کودکان نشان داده شده است(31).



OXPHOS Component	Complex I	Complex II	Complex III	Complex IV	Complex V
mtDNA structural subunit genes	***MTND1***[120] ***MTND2***[121] ***MTND3***[122] ***MTND4***[123] ***MTND4L***[124] ***MTND5***[125] ***MTND6***[126]	-	***MTCYB***[127]	***MTCO1***[128] ***MTCO2***[129] ***MTCO3***[130]	***MTATP6***[131] ***MTATP8***[132]
Nuclear structural subunit genes	***NDUFS1***[133] ***NDUFS2***[134] ***NDUFS3***[135] ***NDUFS4***[136] *NDUFS5* ***NDUFS6***[137] ***NDUFS7***[138] ***NDUFS8***[139] ***NDUFA1***[140] ***NDUFA2***[141] *NDUFA3 NDUFA5 NDUFA6 NDUFA7 NDUFA8* ***NDUFA9***[142] ***NDUFA10***[143] ***NDUFA11***[21] ***NDUFA12***[144] ***NDUFA13***[145] *NDUFAB1* ***NDUFV1***[146] ***NDUFV2***[147] ***NDUFV3*** *NDUFB1 NDUFB2* ***NDUFB3***[148] *NDUFB4 NDUFB5 NDUFB6 NDUFB7 NDUFB8* ***NDUFB9***[149] *NDUFB10* ***NDUFB11***[150] *NDUFC1 NDUFC2*	***SDHA***[25] ***SDHB***[151] *SDHC* ***SDHD***[152]	***UQCRB***[153] *UQCRC1* ***CYC1***[156] ***UQCRC2***[154] *UQCRFS1 UQCRH* ***UQCRQ***[155] *UQCR10 UQCR11*	***COX4***[157] *COX5A COX5B* ***COX6A***[57] ***COX6B***[158] *COX6C COX7A* ***COX7B***[159] *COX7C* ***COX8***[160]	***ATP5A1***[76] *ATP5B ATP5C1 ATP5D* ***ATP5E***[161] *ATP5F1 ATP5G1 ATP5G2 ATP5G3 ATP5H ATP5I ATP5O ATP5J ATP5J2 ATP5L ATP5L2*
Assembly factor and ancillary protein genes	***NDUFAF1***[162] ***NDUFAF2***[163] ***NDUFAF3***[164] ***NDUFAF4***[165] ***NDUFAF5***[166] ***NDUFAF6***[167] *NDUFAF7* ***FOXRED1***[168] ***ACAD9***[30] *ECSIT* ***NUBPL***[168] ***TMEM126B***[28, 37] *TIMMDC1 C17orf89*	***SDHAF1***[41] *SDHAF2 SDHAF3 SDHAF4*	***BCS1L***[49] ***LYRM7***[169] *UQCC1* ***UQCC2***[170] ***UQCC3***[171] ***TTC19***[172] *PTCD2*	*COA1* ***COA3***[173] *COA4* ***COA5***[174] ***COA6***[175] *COA7* ***COX10***[176] *COX11* ***COX14***[177] ***COX15***[178] *COX16 COX17 COX18 COX19* ***COX20***[179] ***SCO1***[180] ***SCO2***[181] ***SURF1***[182] *PET117* ***LRPPRC***[183] ***PET100***[184] ***CEP89***[185] ***TACO1***[186] *OXA1L* ***APOPT1***[187] ***NDUFA4***[53] ***FASTKD2***[188]	*ATPAF1* ***ATPAF2***[189] ***TMEM70***[58]

شکل 1: شماتیکی از کمپلکس های OXPHOS، زیر واحد های آن ها و فاکتور های کمکی. کمپلکس های پروتین مولتی مور الکترون های 1-4 در امتداد زنجیره تنفسی بوده و با کاهش یا احیای کوانزیم کوفاکتور Q_{10} (Q) و سیتوکروم تسهیل می شوند. انتقال الکترون با انتقال پروتون در غشای میتوکندری درونی برای تولید نیروی پروتون بوده و ناشی از کمپلکس V (سینتاز ATP) برای سنتز ATP می باشد. شناسایی کمپلکس های OXPHOS، زیر واحد های ساختای را شناسایی کرده اند که یا توسط کد گذاری mtDNA و یا هسته

sina-pub.ir

شناسایی شده است و بسیاری از پروتین های هسته ای در مونتاژ کمپلکس، بیوژنز و یا کار کرد کمکی نقش دارند. ژن هایی که در آن ها موتاسیون نشان داده شده است، به صورت بولد بوده و اولین گزارش از موتاسیون های بیماری به رنگ آبی است.

بیماری میتوکندریایی ناشی از ژن های میتوکندریایی هسته ای: اختلال کمپلکس زنجیره تنفسی

شواهد بیو شیمیایی و هیستوشیمی یک اختلال کمپلکس زنجیره تنفسی حاکی از وجود موتاسیون هایی می باشد که بر زیر واحد ساختاری و یا فاکتور کمکی یکی از کمپلکس های OXPHOS تاثیر دارد. دانش ما در خصوص زیر واحد های ساختاری و فاکتور های کمکی برای هر کمپلکس، در شکل 1 خلاصه شده است.

اختلال کمپلکس 1 ایزوله شده

کمپلکس 1(دی هیدروژناز NADH)، متشکل از 44 زیر واحد ساختاری با حداقل 14 عامل کمکی می باشد. اختلال کمپلکس 1 ایزوله شده بیانگر یک فنوتیپ بیو شیمیایی برای 30 درصد بیماران کودک است گه در آن ها 70 تا 80 درصد دارای نقص ژنی هسته ای می باشد. علایم بالینی مرتبط با اختلال کمپلکس 1 ناهمگن می باشند و این در حالی است که پیش آگهی بسیار ضعیف بوده و دارای پیشرفت سریع می باشد. لاکتیک اسیدوسیز یک ویژگی رایج می باشد و این در حالی است که با سایر علایم، کاردیومیوپاتی یا لوکودستروفی همراه است. موتاسیون ها در 19 از 37 زیر واحد ساختاری شناسایی شده اند و در 10 مورد از 14 فاکتور شناسایی شده دیده می شوند. اگرچه استثنائات کمی نظیر موتاسیون های *NDUFB3* p.Trp22Arg و p.Gly212Val *TMEM126B*[36] و. جهش فاندر *NDUFS6* p.Cys115Tyr وجود دارد. این مطالعات نشان داده اند که اکثریت موتاسیون های نقص کمپلکس 1 به صورت خصوصی و غیر نوترگیب می باشند(39). موتاسیون های NDUFS2 و ACAD9 نسبت زیادی از تشخیص را شامل می شوند و این در حالی است که نشان می دهد که تغییرات تشخیصی ژنتیکیک ناشی از مجموعه داده های توالی یابی نسل جدید تشخیصی بزرگ تر می باشند(40).

نقص کمپلکس 2 ایزوله شده

سوکسینات دهیدروژناز بر خلاف سایر کمپلکس های سیستم OXPHOS میتوکندریایی، توسط هسته کد گذاری می شوند و در هر دو زنجیره تنفسی و چرخه اسید کربوکسیلیک برای احیای ابیکوینن به یوبیکونیل نقش دارد.

sina-pub.ir

نقص کمپلکس 2 نادر می باشد و کم تر از 50 بیمار در این رابطه گزارش شده اند. جهش های دو اللی با علایم متابولیک مادرزادی گزارش شده اند که بر سیستم عصبی مرکزی و یا قلب (کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک، لکودیستروفی، سندرم لی، و انسفالوپاتی) [43] تاثیر دارند و این در حالی است که موتاسیون های هتروزایگوس با ابتلا به سرطان، به خصوص فئوکروموسیتوم و پاراگانگلیوم [44] همراه است. اگرچه SDH، دارای روابط فنوتیپی-ژنوتیپی مجزایی می باشد،(SDHB/SDHC/SDHD/SDHAF2) از این روی یک هم پوشانی فنوتیپی وجود دارد که به تشخیص تومور برای موتاسیون های SDHx تاثیر دارند(45-46).

نقص کمپلکس 3 ایزوله شده

سیتوکروم اکسیدوردوکتاز، کمپلکس 3 از زنجیره تنفسی، به عنوان هومو دیمر برای انتقال الکترون از ابیکینول به سیتوکروم ب و سپس سیتوکروم پ استفاده می شود. کمپلکس 3 متشکل از 11 زیر واحد ساختاری علاوه بر دو گروه هم و پروتین گوگرد اهن ریسکه می شود. حساسیت در فنوتیپ بالینی گزارش شده برای بیش از 40 درصد بیماران با موتاسیون ها در ژن *MTCYB* mtDNA با این حال کاردیو میوپاتی و انسفالو میپاتی نیز گزارش شده است(47).

موتاسیون های پاتوژنیک در چهار مورد از زیر واحد های ساختاری کد گذاری شده با هسته علاوه بر پنج عامل ساختاری گزارش شده است و علایم شامل تاخیر در رشد، انسفالوپاتی، اسیدوز لاکتیک، اختلال عملکرد کبد، توبولوپاتی کلیوی، و ضعف عضلانی [48،49]. است.

نقص کمپلکس 4 ایزوله شده

اکسیداز سیتوکروم c، کمپلکس 4 از زنجیره تنفسی در غشای میتوکندریایی داخلی قرار داشته و به عنوان دیمر با دو مکان پیوندی عمل کرده و دارای دو کروه هم، یک یون منزیم و یک یون روی همراه است. کمپلکس 4 پروتون ها را در غشای میتوکندریایی درونی پمپاژ کرده و نقش مهمی در ایجاد نیروی محرک برای استفاده از سینتاز ATP وجود داشته و الکترون در زنجیره تنفسی را اهدا می کند. کمپلکس 4 دارای سه زیر واحد ساختاری بوده و حداقل دارای 26 پروتین اضافی دخیل در بیوژنز می باشد(51).

NDUFA4 به صورت ژن زیر واحد کمپلکس 1 توصیف شده و به کمپلکس 4 نیز تخصیص داده می شود و بر اساس مطالعات کارکردی گزارش شده باحضور اختلال NDUFA4 در بیکاران با کمبود COX، موتاسیون ها در

sina-pub.ir

زیر واحد های COX ساختاری گزارش شده است. برخی از پروتین ها بر پروتین بیوژنز تاثیر دارد. برخی از پروتین ها ارتباط نزدیکی با ابعاد خاصی از بیوژنز COX دارد که در بیوژنز COX2 وابسته به مس نقش دارد. از نظر بالینی، علایم بر قلب و CNS تاثیر دارد و این در حالی است که فنوتیپ های چاکروت ماری توت با واریانت های COX6A1 دو اللی ارتباط دارد(57).

نقص کمپلکس v ایزوله شده

سینتاز ATP، کمپلکس V، یک موتور مولکولی مولتی موری میباشد که منجر به تحریک تولید ATP از طریق فسفو ریلاسیون ADP می گردد. با استفاده از نیروی پروتون تولید شده با انتقال الکترون و پمپاژ پروتون با زنجیره تنفسی، کمپلکس 600 کیلو دالتون متشکل از 13 زیر واحد متفاوت است. نقص ها تنها در چهار کمپلکس هسته ای گزارش شده است که با فنوتیپ های بالینی متغیر همراه بوده اند. رایج ترین نقص ها از جمله TMEM70 از جمله موتاسیون TMEM70 منجر به کاردیمیوپاتی و اسیدوسیز لاکتیک می شود. و این در حالی است که انسفالوپاتی در جمعیت های دیگر گزارش شده است.

بیماری میتوکندریایی ناشی از ژن های هسته ای: نقص زنجیره تنفسی چندگانه

کارکرد میتوکندری با 1300 ژن هسته ای تنظیم می شود: این ژن های هسته ای با دستگاه رونوشتی سیتوسیولیک تنظیم شده و توالی هدف یابی میتوکندری موجب اختلال در انتقال پروتین های ترجمه شده به میتوکنری می شود. این شامل رونویسی mRNA مربوط به میتوکندری (به عنوان مثال POLRMT [60])، تعمیر و نگهداری DNA میتوکندری (به عنوان مثال POLG [61])، تنظیم استخر dNTP میتوکندری (به عنوان مثال RRM2B [62])، سیگنالینگ سلولی (به عنوان مثال SIRT1 [63])، و ترجمه پروتئین مشتق شده mtDNA می باشد. زیر گروه های مختلف پروتین ها در ترجمه ژن میتوکندری نقش دارد: سنتز t-RNA امینو اسیل میتوکندری مسئول مولکول t-RNA میتوکندری با اسید امینه مناسب (به عنوان مثال AARS2 [64])، پروتئین های درگیر در پردازش RNA (به عنوان مثال MTPAP [65])، پروتئین mitoribosomal (به عنوان مثال MRPL44 [66])، و پروتئین های درگیر در tRNA میتوکندری (به عنوان مثال TRMU [67]) بحث می شوند. نقص در بیش تر از 250 ژن میتوکندری هسته ای با نقص زنجیره تنفسی و بیماری میتوکندری بالینی همراه بوده است. مسیر تشخیص ژنتیکی برای این اختلالات پیچیده می باشد و WES موفق ترین راهبرد است(68).

sina-pub.ir

بیماری میتوکندریایی غیر OXPHOS

همه بیماری های میتوکندریایی، شواهدی را از اختلال انزیم زنجیره تنفسی ندارند ولی سایر شواهد در خصوص بیماری میتوکندریایی نظیر سطوح بالای لاکتات، تغییرات مغز تصویر برداری و مشارکت مولتی سیستم وجود دارد. عوامل ژنتیکی شامل انزیم های ناقص در چرخه کربس یا انتقال کوفاکتور هستند.

تحلیل ژنتیک مولکولی بیماری میتوکندریایی

در نبود درمان های موثر، ارایه یک روش تشخیص ژنتیکی موجب تسهیل مشاوره ژنتیکی ودسترسی به گزینه های تولید مثلی برای بیماران و خانواده های آن ها می شود. با توجه به اندازه کوچک ژنوم mt-DNA، این در بیماران بیماری میتوکندریایی برای خارج کردن نقص mt-DNA قبل از ژن های هسته ای توالی یابی می شود. تست مبتنی بر NGS شایع تر شده است و از این روی یک شاخص صحیحی از هتروپلاسمی mt-DNA ارایه می کند. فناوری های NGS یک خط لوله ازمایش ژنتیکی در ازمایشگاه ژنتیگ تشخیصی می باشد که با توالی یابی ژن های کاندید بر روی تحلیل توالی همراه است. طیف وسیعی از گزینه ها امروزه اجرا می شود. راهبرد های NGS مبتنی بر پانل در ارایه تشخیص ژنتیکی موفق بوده اند. طبقه بندی بر اساس فنوتیپ بالینی با هتروژنیته ژنتیگی پیچیده می باشد.

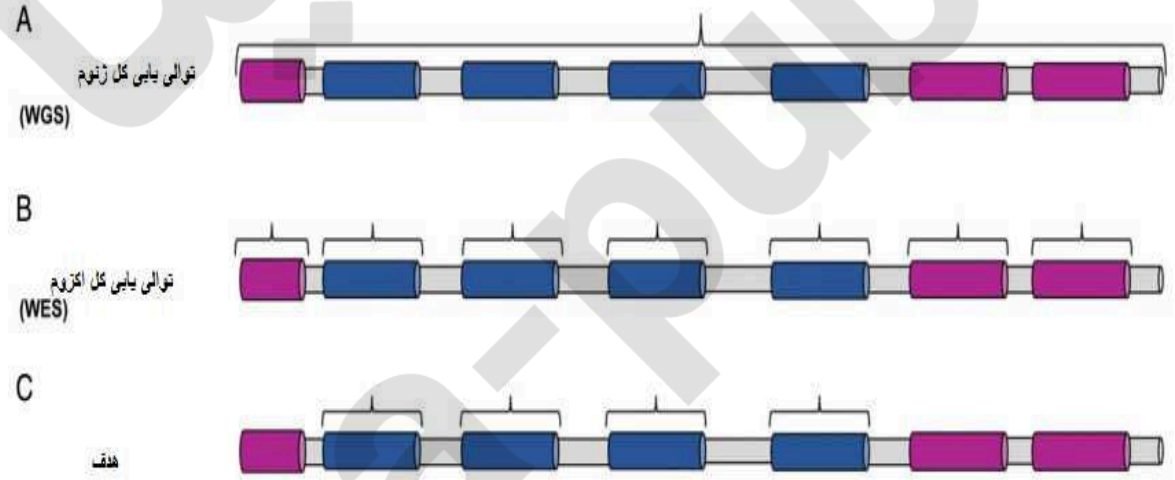
علی رغم اطلاعات قبلی در ازمون های تحقیقاتی و افزایش دسترسی NGS برای ازمایشگاه های تشخیصی یک راه حل برای این مسئله وجود دارد که به طور موثق بر اساس تحلیل اختلالات مندلی استفاده شده است. تحلیل داده های WES برای بیماران فاقد تشخیص پس از تحلیل پانلی مجازی را می توان در شرایط تحقیقاتی انجام داد. در واقع، بیشتر ژن های کاندید در پانل های مجازی تشخیصی ریشه در ژن هایی دارد که در آسیب شناسی انشان نقش دارند از جمله فنوتیپ های بالینی میتو کندریایی هتروژنوس نظیر کاردیومیوپاتی با موتاسیون هایی شناسایی شده در AARS2 [78], MRPL3 [79], MTO1 [80] و ACAD9 است. ژن های کاندید جدید در شرایط تحقیقاتی کشف شده اند و یکی از موفقیت های بارز در این زمینه مربوط به بیمارانی هستند که موتاسیون هایی را در TMEM126B داشته و یک ژن کاندید با پروفایل کمپلکس مبتنی بر تحقیق حفظ می شود. به طور مشابه شناسایی پروتین های میتوکندریایی پیش بینی شده دیگر راهبرد مهم برای شناسایی ژن های کاندید بیماری می باشد

sina-pub.ir

بررسی پاتولوژی ماهیچه ای مرتبط با بیماری میتوکندریایی

همان طور که بحث شد، بررسی ازمایشگاهی بیماری میتوکندری پیچیده می باشد و الگوریتم ها از رویکرد چند رشته ای با استفاده از مطالعات کارکردی و بالینی برای تحلیل ژنتیکی استفاده می کنند(81). اگرچه اختلالات میتوکندریایی با طیف وسیعی از علایم بالینی همراه است، به دلیل نیاز های متابولیکی بالا، ماهیجه به شدت تحت ناثیر قرار می گیرد. در هر دو سناریو، مشارکت و نقش ماهیچه ناشی از جهش هایی در ژن های هسته ای یا mtDNA می باشند و ارتباط با مراحل بافت شناسی موجب می شود تا این جایگزینی برای مطالعه اختلالات میتوکندریایی چند سیستمی باشد. مراکز تشخیصی متخصص در زمینه اختلالات میتوکندری از فنون متعدد برای ارزیابی کارکرد میتوکندریایی از جمله ارزیابی فعالیت های OXPHOS میتوکندریایی میتوکندری نقش دارد. به علاوه، تنها کمپلکس های 1 تا 4 را می توان در ماهیچه منجمد ارزیابی کرد.

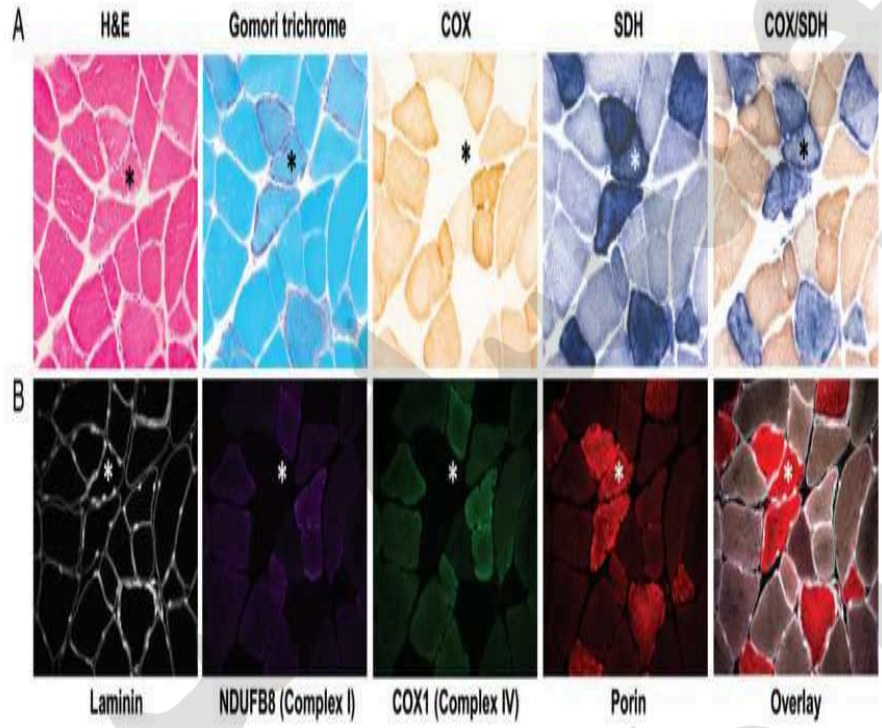
بررسی بافت شناسی و هیستو شیمی ماهیچه می تواند شواهدی را در خصوص پاتولوژی میتوکندری ارایه کند. هامتوکسی لین و ائوزین و سویه های تری کروم گاموری، مورفولوژی ماهیچه را ارزیابی کرده و اطلاعاتی در خصوص اندازه فیبر و وجود هسته های مرکزی ارایه می کند که از شاخصه های اصلی ماهیچه می باشند.



شکل 2: راهبرد های NGS به کار رفته در تشخیص ژنتیکی بیماری میتوکندری. الف: WGS همه مناطق کدکذاریو غیر کد گذاری ژنوم را تحلیل می کندب: WES تنها اگزون ها را علاوه بر مرز های اینترون اگزون کد گذاری می کند پ: بخش هدف، موجب تسهیل توالی یابی منطقه ژنومی یا فهرستی از ژن های بیماری می شود.

sina-pub.ir

مناطق اینترونی/ غیر کد گذاری به رنگ خاکستری هستند، اگزون ها به رنگ آبی و اگزون های ژن های غیر کد کننده صورتی می باشند

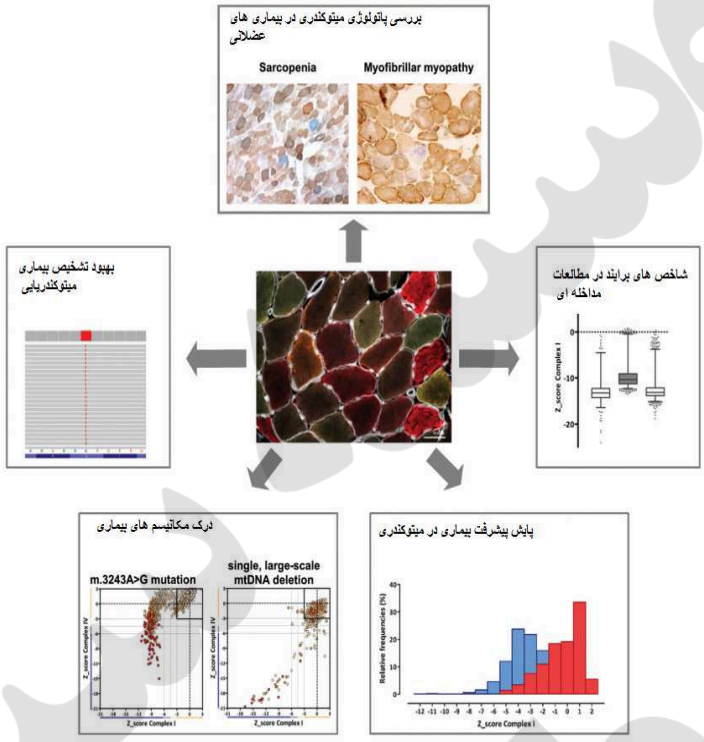


شکل 3: نقاط هیستولوژیکی، هیستوشیمی و ایمنو هیستوشیمی پاتولوژی میتوکندری در بیماری مرتبط با mtDNA. الف: بخش های ماهیچه اسکلتی از بیماری با یک حذف بزرگ مقیاس mtDNA با H&E لکه گذاری شده و تریکروم برای ارزیابی مورفولوژی و وجود RRF ها. COX، SDH و واکنش های هیستوشیمیایی COX/SDH، انباشت میتوکندری و نقص COX نشان داده شده است. یک فیبر فاقد COX، انباشت کانونی میتوندری ساکرومال را در اطراف فیبر نشان داده و موجب تنظیم کاهشی بیان هر دو پروتین های کمپلکس I و IV شده است.

این روش امکان سنجش کمی دقیق دو جزء OXPHOS یعنی کمپلکس های 1 و 4 را همراه با نشانگر میتوکندری نشان می دهد. کمی سازی نیمه خودکار تعداد زیادی از فیبر های ماهیچه ای با لامینین برای تعریف مرز های الیاف تسهیل می شود. تحلیل تصویر بر اساس اندازه گیری شدت، افزایش صحت و پایایی می باشد. هنگام بهینه ساز یتشخیص ایمنی انتی بادی ها برای ارزیابی کمپلکس 3 و کمپلکس 5 برای کمی سازی کارایی

sina-pub.ir

تنفسی میتوکندری در بخش های ماهیچه ای، پتانسیل زیادی در کاربرد های تحقیقی و تشخیصی را نشان می دهد.



شکل 4: کاربرد های فعلی و اینده تست ایمنو فلورسنس OXPHOS چهار تایی. با توجه به ظرفیت استفاده از سطوح کمپلگس 1 و 4، و اجزای OXPHOS، یک سطح الیاف نشان می دهد که تست ایمنو فلورسنس را می توان در زمینه های مختلف فعالیت های پژوهشی و تشخیصی به کار برد. ما از این روش در شرایط تشخیصی عمل می کنیم.

نوروپاتولوژی مرتبط با بیماری میتوکندریایی

علایم نورولوژیکی ، معمولا رایج هستند و در بیماران با بیماری میتوکندریایی بسیار مخرب می باشند از جمله ناشنوایی حسی عصبی، آتاکسی مخچه، نوروپاتی محیطی، زوال عقل، صرع (81). در سال های اخیر، تعدادی از مطالعات نوروپاتولوژیکی ، ویزگی های نورودژنراسیون را در بیماران با بیماری میتوکندری نشان داده اند و این منجر به توسعه ابزار های جدید برای درک مکانیسم های اختلال عصبی و مرگ سلول شده اند

اطلاعات جدید در خصوص مکانیسم های نورودژنراسیون

sina-pub.ir

با تحقیقات نوروپاتولوژیکی، مغز بیماران با بیماری میتوکندریایی، علایم کاهش سلول عصبی، زخم های قشری و اتروفی و ناهنجاری های OXPHOS را در سلول های باقی مانده نشان می دهند. بیماران با جهش هتروپلاسمی m.3243A>G و فنوتیپ MELAS، اغلب موجب توسعه تکروزیس قشری در سطح مغز می شود. از این روی زخم های ایسکمی را می توان در مغز مشاهده کرد.پیشنهاد شده است که این زخم ها در طی دوره های شبه سکته تکامل می یابند و با ناهنچاری های تنفسی نیز در نورون ها اغاز می شوند. به این ترتیب سکته هار ا می توان با الکترو انسفالوگرافی در بیمارانی تشخیص داد که دارای یک دوره سکته مانند است. اگرچه تغییرات نکروتیک با موتاسیون m.3243A>G همراه بوده اند، لازم به ذکر است که بیماران دارای نقص های ژنتیکی و موتاسیون POLG مغلوب با اتوزومی موجب توسعه زخم های قشری شده و این نشان دهنده این است که مکانیسم های مشترکی در این خصوص نقش دارند. مطالعات اخیز نشان داده اند که اسیب پذیری نورون های GABAergic پایه و اساس برانگیختگی نورون می باشد زیرا تنظیم کاهشی زیر واحد های OSPHOS را می توان در کمپلکس های 1 و 4 مشاهده کرد. سایر تئوری ها نشان می دهند که ترکیب میتوکندری ناهنجار و وجود ناهنجاری های زنجیره تنفسی در میکرووازوگالپر مغزی منجر به اختلال مغزی می شود. اگرچه مکانیسم های دقیق شناخته شده نیستند، وجود زخم ها در مغز منعکس کننده یک فرایندی هستند که منجر به زوال نورونی می شود.

مخچه نقش مهمی در بیماری های میتوکندریایی ایفا می کند و بسیاری از بیماران، اتاکسی مغزی را توسعه می دهند. از دیدگاه نوروپاتولوژیکی، مخچه ، علایم زخم مشابه را با موارد مشاهده شده در قشر نشان می دهند. مطالعات اخیر، تنظیم کاهشی زیر واخد های پروتینی متشکل از کمپلکس 1 را در سلول های پارکینج و سیناپس GABAergic نشان داده اند. شواهدی در خصوص مدل سازی شبکه نورونی با دندریتیک، اژدر آکسون، و تغییر تراکم سیناپسی وجود دارد.(1-7-1099. همبستگی بین شدت از دست رفت سلولی یا سطح هیتروپلاسمی MTDNA در نورون ها وجود ندارد(110).

بیماران دارای حذف mt-DNA بزرگ مقیاس موجب توسعه KSS شد و با دیملینه شدن ماده سفید مغز ارتباط دارد از جمله مخچه، نخاع و ساقه مغز(111). از بین رفتن ملین را می توان به آسیب پذیری الیگو دندروسیت های بالغ ، میلین تولید گلیا، که در آن از دست دادن فعالیت زنجیره تنفسی ناشی از حذف mtDNA باعث

sina-pub.ir

الیگودندرولیپاتی دیستال و از دست دادن میلین خواهد شد(112). این مسئله مشخص نیست که چرا حذف mtDNA بر الیگو دندروسیت ها اثر دارد

به طور خلاصه، مطالعات نوروپاتولوژیکی نشان داده اند که از دست رفت سلول نورون از طریق دو فرایند متفاوت رخ می دهد: یک رویداد حاد نظیر زخم های شبه سکته و یا از بین رفتن سلول ها. شواهدی در خصوص انباشت پروتین در نورون ها وجود ندارد و از این روی تنظیم کاهشی زیر واحد کمپلکس 1 وجود داشته و همبستگی بین از دست رفت سلولی و هتروپلاسمی mtDNA در نورون های باقی مانده وجود دارد.

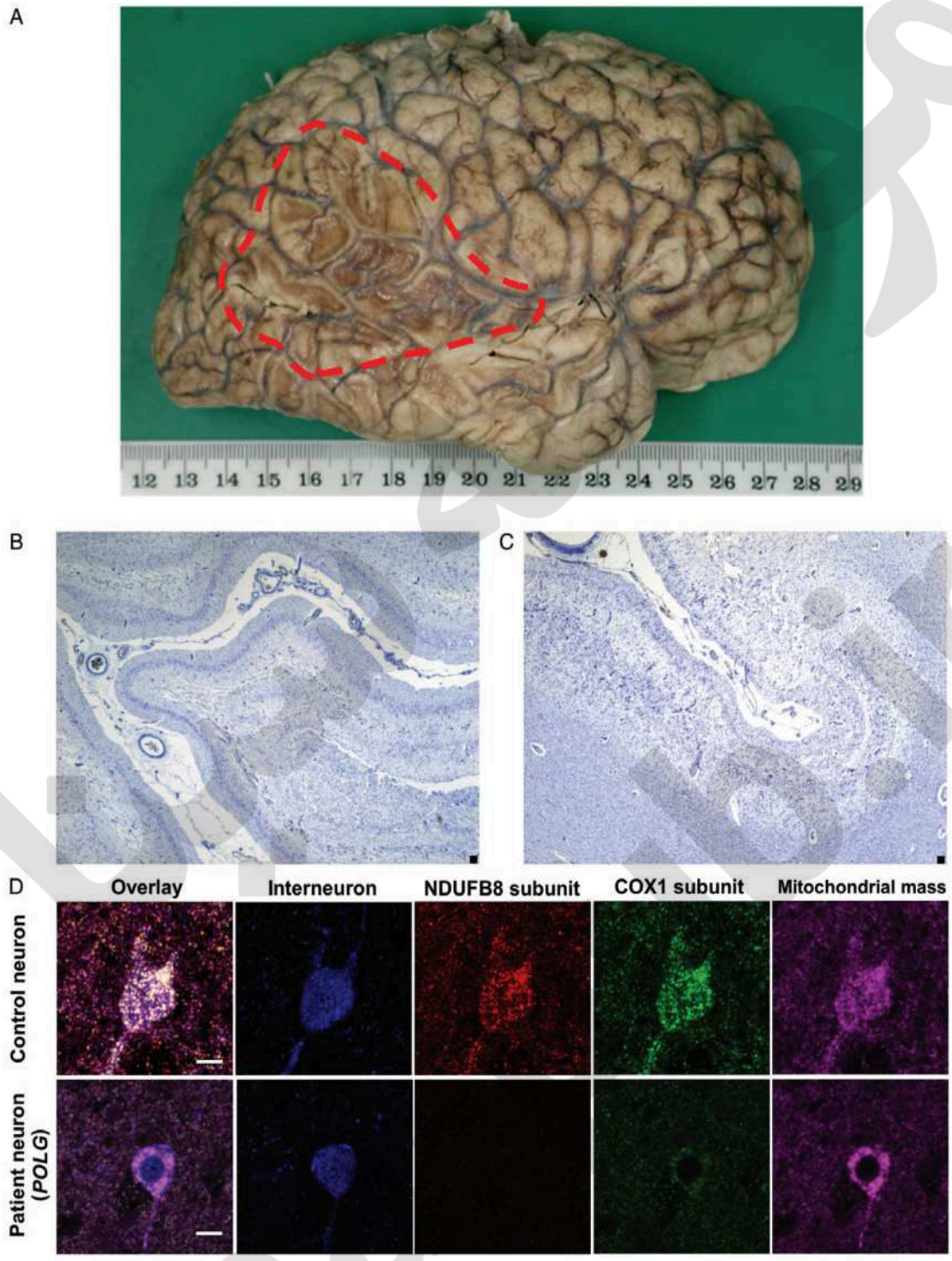
ابزارهایی برای کمک به مطالعه نوروپاتولوژی میتوکندری

اخیرا تعدادی از روش های جدید برای ارایه اطلاعات بیشتر در خصوص مکانیسم های نورودژنریزاسیون به خصوص درک رویداد های منجر به از بین رفتن سلول های نورونی برگشت ناپذیر توسعه یافته اند. هیدروژل بافت هیبریداسیون زمینه را برای بررسی حجم زیادی از مواد فراهم می کنند. به این ترتیب امکان درک اسیب پذیری عصبی در بیماری میتوکندری وجود دارد. توسعه اخیر فناوری سلول های بنیادین امکان ترانسفکشن سلولی را در فیبرولاست های بیماران با چهار عوامل رونویسی کلیدی می دهد. این سلول ها به نورون ها و سلول های گلیال تمایز شده و از این روی امکان درمان های جایگزین وجود دارد. به علاوه تعدادی از مدل های موش تراژنی استفاده کننده از فناوری Cre/Lox می توانند از اهمیت زیادی در درک مکانیسم های بیماری برخوردار باشند(117-119).

چالش های اینده

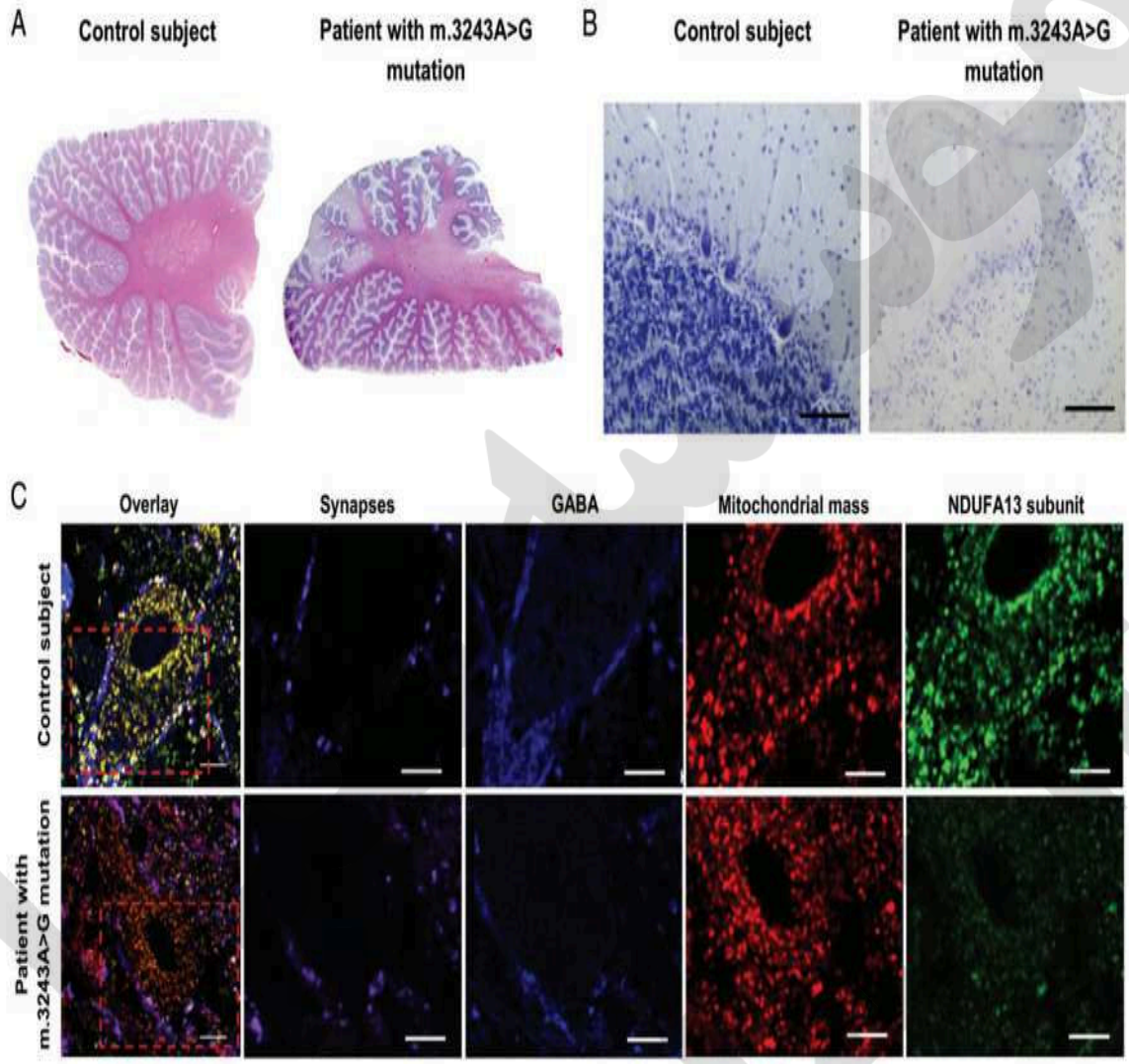
توسعه یک درمان موثر برای بیماری میتوکندری، یک چالشی است که بستگی به ترکیب دانش بالینی از پیشرفت بیماری، مکانیسم های ژنتیکی و ویژگی های نوروپاتولوژیکی در بیماری های میتوکندری دارد. مطالعات هیستوپاتولوژیکی و ژنتیگ مولکولی می توانند اطلاعاتی را در خصوص توسعه سیستم های مدل بیماری برای تعیین مکانیسم ها ودرمان و بهبود زندگی بیماران با بیماری میتوکندری ارایه کند

sina-pub.ir



شکل 5: تغییرات نوروپاتولوژیکی مرتبط با سکته در بیماران با بیماری میتوکندریایی الف: نکروزیس قشری وسیع موثر بر لوب گیجگاهی، اوسیپیتال و اهیانه در مغز از یک بیمار دارای موتاسیون m.3243A>G. تحلیل میکروسکوپی یک اتروفی، میکرو اواکیولاسیون و از بینر فتن افت عصبی در قشر فرونتال ب: رنگ امیزی بنفش در قشر اهیانه با یک بیمار با موتاسیون m.8344A>G

sina-pub.ir



شکل 6: پاتولوژی مغزی در بیماران با موتاسیون m.3243A>G الف: مناطق نکروزیس در قشر مغزی یک بیمار در مقایسه با مخچه ب: افت نورونی موثر بر سلول های گرانول در قشر. پ: در نورون های هسته ای و در سیناپس های GABAergic