

بررسی فراوانی جهش‌های DNA میتوکندریایی در دیابت نوع دو

باقر لاریجانی^۱، مسعود هوشمند*^۲، قمر سلطان‌دراج^۲، فرزانه درویش‌زاده^۱

چکیده

مقدمه: میتوکندری یکی از ارگان‌های داخل سلولی است که DNA مخصوص به خود دارد. تا کنون تعدادی بیماری ناشی از جهش mtDNA گزارش شده است. یکی از این جهش‌ها، جهش A3243G و حذف 5kb می‌باشد. عواقب این جهش‌های ژنی طیفی از بیماری‌ها را بوجود می‌آورد که یکی از آنها دیابت نوع ۲ است. هدف از این مطالعه تعیین جهش A3243GtRNA^{Leu} و حذف 5kb در بیماران دیابتی نوع ۲ می‌باشد.

روش‌ها: DNA ۱۳۰ بیمار دیابت نوع ۲ که میزان انسولین آنها اندازه‌گیری شده بود، استخراج گردید. از روش‌های تعیین توالی، SSCP, PCR – RFLP در بررسی A3243GtRNA^{Leu} و از روش PCR multiplex در تعیین حذف 5kb استفاده شد و با ۴۰ فرد سالم مقایسه شد.

یافته‌ها: در هیچ‌کدام از بیماران مورد مطالعه جهش A3243GtRNA^{Leu} و حذف 5kb مشاهده نشد. ولی درشش بیمار جهش ژنی A3314 در منطقه mt NPI دیده شد.

نتیجه‌گیری: جهش A3314 در منطقه حفاظت شده ژنوم جانداران قرار دارد و تا به حال گزارش نشده است پس اهمیت زیادی دارد و تحقیقات بیشتری را می‌طلبد. تعیین جهش‌های ژنی میتوکندریایی و درصد هتروپلاسمی آن در تعیین میزان خطر ابتلا به دیابت قبل از بروز علائم بالینی بسیار مؤثر است.

واژگان کلیدی: دیابت قندی نوع ۲، میتوکندری، A3243G، mtDNA، 5kb

۱- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

***نشانی:** کیلومتر ۱۷ اتوبان کرج، بلوار پژوهش، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری؛ تلفن: ۴۵۸۰۳۹۰؛ نمابر: ۴۵۸۰۳۹۹؛ پست

الکترونیکی: massoudh@NIGEB.ac.ir

مقدمه

دیابت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های غدد درون‌ریز می‌باشد که تولید یا عملکرد انسولین یا هر دوی آنها در این بیماری دچار اشکال می‌شود [۲۱].

عمل اصلی انسولین، پایین آوردن قند خون و فعال کردن سامانه ذخیره‌سازی مواد غذایی مختلف در بافت‌های بدن می‌باشد، بنابراین در صورت بروز هر یک از اشکالات اشاره شده در مورد انسولین، قند خون بالا می‌رود که در صورت عدم کنترل در دراز مدت موجب بروز عوارضی چون بیماری‌های قلبی عروقی، آسیب چشم، کلیه و اعصاب خواهد شد [۳۲].

امروزه بر اساس تقسیم‌بندی جدید، دیابت به نوع ۱، نوع ۲، دیابت حاملگی و انواع متفرقه تقسیم می‌شود. در ابتدا به بیماری دیابت وجود دو عامل ژنتیک و محیط ضروری است. بروز همزمان دیابت نوع ۲ در دو قلوهای همسان مدرک مستدلی از نقش ژن‌ها در بروز دیابت شیرین نوع ۲ می‌باشد [۵۴]. برای اولین بار در سال ۱۹۹۲ نقش اساسی میتوکندری در تثبیت گلوکز خون آشکار و در سال ۱۹۹۶، دیابت میتوکندریایی شناسایی شد [۶۷].

با کمک روش‌های مولکولی، علت بیماری را جهش A3243G tRNA_{leu} و حذف 5kb در DNA میتوکندریایی شناسایی کردند.

کل DNA میتوکندری یک سلول تنها حدود یک درصد از کل DNA آن را شامل می‌شود. یکی از ویژگی‌های mtDNA جهش‌پذیری قابل ملاحظه آن می‌باشد. اولین جهش‌های بیماری‌زای mtDNA در اوایل دهه ۱۹۹۰ شناسایی شد. محدوده بیماری بالینی ناشی از جهش‌های mtDNA متنوع می‌باشد. این جهش‌ها اغلب سبب نقص عملکردی در زنجیره تنفسی می‌شوند. به طوری که در این زنجیره، آنزیم‌های غیر طبیعی هم تولید می‌گردند. [۸-۱۰]. اختلال در متابولیسم گلوکز به دنبال نقایص آنزیمی، نشانه‌ای از جهش در mtDNA می‌باشد [۱۰]. جهش نقطه‌ای A3243G tRNA_{leu} در mtDNA بسته به میزان جهش باعث بیماری‌های

MELAS و Leiqh و دیابت می‌شود [۱۱ و ۱۲]. مطالعاتی در آسیا انجام شده و میزان این جهش در جمعیت دیابتی بیماران آسیایی ۳-۱ درصد گزارش شده است [۱۱ و ۱۲]. در ایران در این زمینه تا به حال مطالعه‌ای انجام نشده است. با توجه به این که تشخیص و درمان زود هنگام دیابت به هر علت اهمیت شایانی دارد و با در نظر گرفتن این مهم که تشخیص اولیه این بیماری با تعیین جهش در پیشگیری یا تأخیر بروز دیابت مؤثر است. این مطالعه طرح‌ریزی شد و هدف اصلی آن تعیین جهش‌های mtDNA در ناحیه A3243G tRNA_{leu} و حذف 5kb در ۱۳۰ بیمار دیابتی نوع دو می‌باشد.

روش‌ها

۱۳۰ بیمار دیابتی نوع ۲ مراجعه کننده به درمانگاه دیابت بیمارستان شریعتی بعد از تأیید علائم بالینی و آزمایشگاهی و تشخیص قطعی دیابت، توسط پزشک معالج انتخاب و به واحد خونگیری ارجاع شدند. ۴۰ فرد غیر دیابتی نیز که به سایر درمانگاه‌های بیمارستان شریعتی مراجعه کرده بودند و سابقه فامیلی دیابت نداشتند؛ به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. پس از اخذ رضایتنامه کتبی از بیماران، پرسشنامه‌ای شامل اطلاعات فردی، سیر بیماری و سابقه فامیلی تکمیل شد و بر اساس آن بیماران به چند گروه تقسیم شدند. ۱- دیابت با توارث مادری (۴ مورد) ۲- دیابت با توارث پدری (۵ مورد) ۳- دیابت با توارث مادری و پدری (۶ مورد) ۴- سابقه خانوادگی دیابت در خویشاوندان درجه ۲ یا ۳ ۵- بدون هیچ سابقه فامیلی

به علاوه در میان بیماران، ۲ بیمار دیابت با شروع زودرس (MODY)، ۴ بیمار با مشکلات حاد قلبی، ۸ بیمار با رتینوپاتی، ۲ بیمار با فلج عصب چشم و ۴ بیمار با دیابت به دنبال GDM مشاهده شد.

برای استخراج DNA میتوکندریایی، ۵ ml خون از بیماران و گروه کنترل گرفته شد. سه میلی‌لیتر از خون به درون فالكون‌های حاوی ۳۰۰ cc محلول EDTA منتقل شد. با توجه

گردیدند. محل انجام کلیه آزمایش‌های ژنتیکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری بود.

یافته‌ها

در این تحقیق ۱۳۰ بیمار دیابتی نوع ۲ با میانگین سنی (50 ± 5) و ۴۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل بدون هیچ گونه سابقه فامیلی دیابت با میانگین سنی (45 ± 5) انتخاب شدند.

به کمک رادیوایمونواسی میزان انسولین بیماران اندازه‌گیری شد و از نظر میزان انسولین بیماران به سه گروه تقسیم شدند.

۱ - انسولین در حد طبیعی ($0/64 - 0/16$ ng/mlt) (۹۶ مورد)

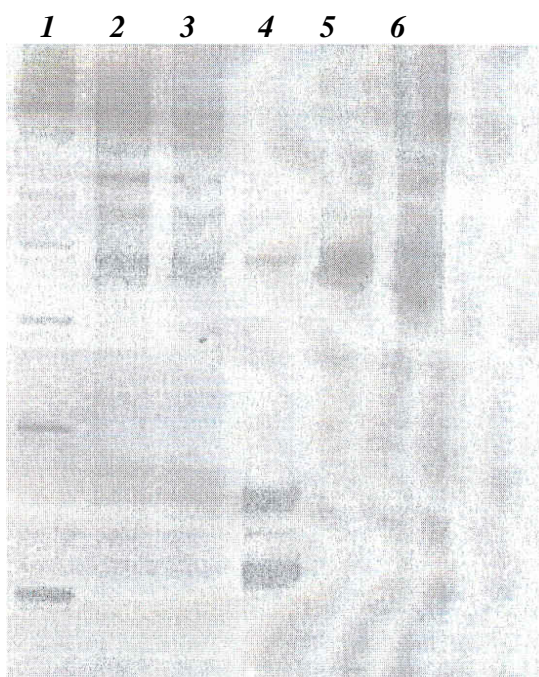
۲ - انسولین بیشتر از حد طبیعی (۳۰ مورد)

۳ - انسولین کمتر از حد طبیعی (۴ مورد)

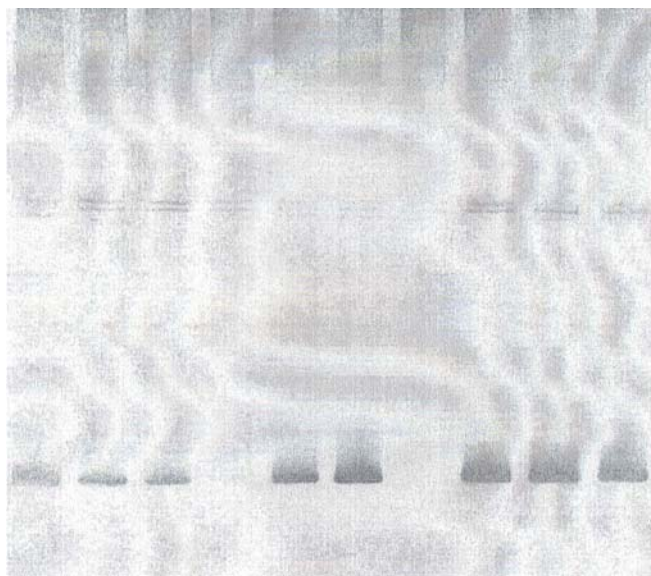
نمونه‌های PCR - RFLP (برای عمل هضم با آنزیم 1 Apa) بر روی ژل آکرپلامید ۸٪ برده شد. در هیچ‌یک از بیماران جهش A3243G مشاهده نشد (شکل ۱).

به این که به نظر می‌رسد میتوکندری در محل رها سازی انسولین از گرانول‌های ترشح کننده آن وجود داشته و می‌تواند در میزان ترشح انسولین تأثیر بگذارد؛ بنابراین برای تعیین ارتباط بین جهش A3243G و تغییر عملکرد سلول‌های پانکراس مترشح انسولین، دو میلی‌لیتر از خون نیز برای اندازه‌گیری سطح انسولین با روش رادیوایمونواسی استفاده گردید. با روش نمک اشباع، DNA از نمونه خون استخراج شد. DNA حاصل تغلیظ شد تا با توجه به غلظت حاصل بتوان مقدار مناسبی از آن را برداشت نمود. پس از آن نمونه‌ها برای انجام DNA sequencing برای شرکت macro gene کره ارسال شد.

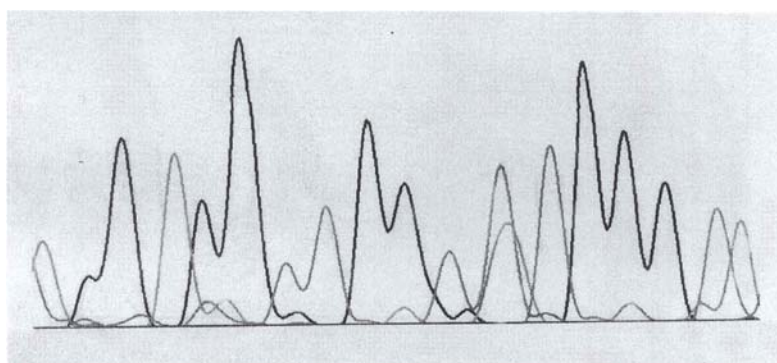
برای تشخیص جهش A3243G از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR استاندارد) و روش‌های تکمیلی RFLP با آنزیم 1 Apa و SSCP عمل شد و در تعیین حذف 5kb با روش PCR multiplex، قطعه مورد نظر تکثیر یافت. پس از آن نمونه‌های DNA با دستگاه ABI 3/0 تعیین توالی



شکل ۱- چاهک شماره ۱: DNA labor، چاهک شماره ۴: نمونه RFLP نمونه کنترل مثبت با قطعه ۲۳۷bp و قطعات ۱۱۰ و ۱۲۷bp، چاهک شماره ۶: RFLP نمونه کنترل منفی قطعه ۲۳۷kb

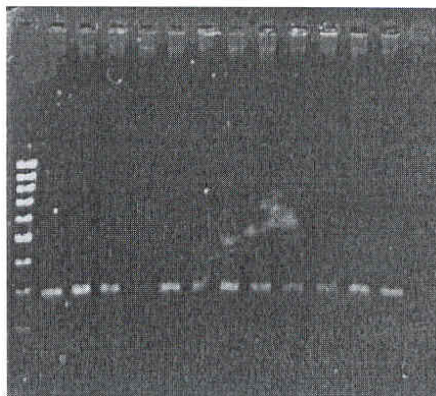


شکل ۲- نتیجه SSCP. چاهک شماره ۳: کنترل منفی در ۶ بیمار باند مشکوک دیده شد. در ۳ بیمار و کنترل منفی باند مشکوکی دیده نشد.



شکل ۳- نمودار حذف نوکلئوتید A3314

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



شکل ۴- DNA ladder چاهک شماره ۴: چاهک شماره ۲: کنترل مثبت با قطعه ۹۰۰ bp و ۲۷۹ bp ، چاهک شماره ۱۳: کنترل منفی در مابقی چاهک‌ها نمونه بیمار با

آزاد موجب شکست ریشه‌های DNA و در نتیجه حذف و جهش نقطه‌ای در آن می‌شوند. از آنجایی که پروتیین رمز شده mtDNA با پروتیین رمز شده DNA هسته‌ای در درون میتوکندری ترکیب می‌شوند، در صورت بروز جهش در mtDNA، اشکالاتی در عملکرد یا ساختار آنزیم‌هایی زنجیره تنفسی ایجاد می‌شود، در نتیجه تولید ATP کاهش یافته و رادیکال‌های آزاد (ROS) بوجود می‌آیند که در نهایت صدمات بیشتری به میتوکندری وارد می‌کنند [۱۶، ۱۷]. امروزه ROS یکی از مهمترین عوامل جهش‌زای mtDNA محسوب می‌شوند [۱۸، ۱۹]. مطالعاتی دیگر در مورد سایر جهش‌های mtDNA انجام شده و نتایجی بدست آمده است [۲۰]. در بیماران دیابتی با جهش A3243G، سلول‌های β بیشترین درصد هتروپلاسمی را نشان می‌دهند و این سلول‌ها در بررسی جهش بسیار مناسبند. متقاعد نمودن بیمار برای انجام بیوپسی پانکراس و عضلات برای بررسی مشکل است پس ممکن‌ترین راه تشخیص، استفاده از خون بیمار است. بنابراین در این مطالعه پس از اندازه‌گیری میزان انسولین خون بیماران، DNA از لکوسیت‌های خون آنها استخراج شده و بیماران با روش PCR استاندارد PCR/RFLP، PCR/SSCP، تعیین توالی، mtDNA multiplex PCR مورد مطالعه قرار گرفتند. در بیماران مورد مطالعه پس از انجام آزمایش‌ها، جهش نقطه‌ای A3243G و حذف 5kb مشاهده نشد اما ۶ بیمار حذف A3314 را نشان دادند که تا کنون گزارش نشده است. این حذف در منطقه ND1 (mtDNA) قرار دارد و از لحاظ تکاملی ناحیه کاملاً حفاظت شده ژنوم جانداران می‌باشد. به دلیل این‌که حذف A3314 آمینواسیدهای بعد از خود را تغییر می‌دهد، موجب تغییر ساختار پروتیین ناحیه ND1 خواهد شد. در میان بیماران دارای این حذف، دو بیمار عارضه شدید قلبی داشتند. پاسخ به این پرسش که حذف این ژن عامل بیماری دیابت است یا خیر و یا دیابت منجر به این حذف شده است یا نه نیاز به بررسی‌های مولکولی و بیوشیمیایی بیشتری دارد.

عدم تشخیص حذف 5kb و جهش نقطه‌ای A3243G را می‌توان به دلیل هتروپلاسمی کمتر از ۰/۵٪ دانست، زیرا

در ناحیه tRNA^{leu} جهش‌های متعددی گزارش شد (ناحیه داغ یا hot spot) بنابراین نمونه‌های PCR تکثیر شده و پس از آن به روش single strand conformation polymorphism بر روی ژل آکرلامید ۱۰٪ برده شد. در ۶ بیمار ۳ بانده مشکوک دیده شد (شکل ۲). سپس نمونه‌های مشکوک تعیین توالی شدند.

نتیجه تعیین توالی

حذف نوکلئوتیدی A در موقعیت A3314 که یک ناحیه محافظت شده در جانوران است، دیده شد. ۲ بیمار از ۶ بیمار دارای این حذف، دچار عارضه شدید قلبی بوده و بی‌نظمی در میزان انسولین را نشان دادند. در یک نفر از همین ۶ بیمار افزایش شدید و در یک نفر کمبود شدید انسولین دیده شد (شکل ۳).

جهت تشخیص حذف 5kb، نمونه multiplex بر روی ژل آکارز ۳٪ برده شد که در هیچ‌یک از بیماران حذفی مشاهده نشد (شکل ۴).

بحث

میتوکندری، منبع انواع اکسیژن‌های باز فعال شده^۱ است. حدود ۱/۵ - ۱ درصد از اکسیژن مصرف شده در فرایند فسفریلاسیون اکسیداتیو تبدیل به ROS می‌شود. آنزیم دسموتاز سوپر اکسیداز، آنیون سوپر اکسید (OH) را به H₂O₂ تبدیل می‌کند که توسط آنزیم‌های کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز تبدیل به اکسیژن و آب می‌شود. فقدان یا نقصان عملکرد این آنزیم حفاظتی موجب تجمع H₂O₂ و در نهایت تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل می‌شود [۱۴، ۱۳]. چون مولکول‌های mtDNA به صورت گذرا به غشای داخلی میتوکندری متصل می‌شوند، به طور گسترده در معرض اکسیداسیون قرار گرفته و آسیب می‌بینند [۱۵]. به دلیل سازوکارهای ضعیف میتوکندریایی، فقدان هیستون‌ها در mtDNA و سیستم ترمیمی محدود mtDNA ۱۰ تا ۲۰ برابر بیشتر از DNA هسته‌ای آسیب می‌بیند [۱۶]. رادیکال‌های

¹ Reactive Oxygen species

دارند و برای پیشگیری از اشکال پیچیده دیابت و دیابت بارداری (جهش A3243G در بیماران دیابت حاملگی به مراتب بیشتر از سایر بیماران دیابتی گزارش شده است) اهمیت شایانی دارد، بنابراین ما توجه بیشتر به تعیین جهش‌های mtDNA در بیماران دیابتی که به طور معمول در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی انجام نمی‌شود را پیشنهاد می‌دهیم.

روش PCR/RFLP با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید، هتروپلاسمی در حد ۱٪ و روش PCR-SSCP هتروپلاسمی در حد ۵/۰٪ را تعیین می‌نماید. کاهش نفوذ ژنتیکی، بروز متغیر (متفاوت) جهش در شرایط قومی و نژادی خاص بیماران مورد بررسی را می‌توان از علل این یافته در نظر گرفت. از آنجایی که بررسی جهش در پیش‌گیری از بروز هیپرگلیسمی در فرزندان بیماران دیابتی که اختلالات ژنتیکی

مآخذ

1. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. American Diabetes Association: clinical practice recommendations 2002. *Diabetes Care*. 2002; 25(Suppl): S1-147.
۲. عزیزی، فریدون، فیزیولوژی غدد مترشحه داخلی چاپ سوم، انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۱۳۶۹، ص ۱۰-۳۵.
3. Tusie Luna MT. Genetics of type 2 diabetes mellitus: genes implicated in early onset diabetes. *Rev Invest Clin*. 2000; 52: 296-305.
4. So WY, Ng MC, Lee SC, Sanke T, Lee HK, Chan JC. Genetics of type 2 diabetes mellitus, *Hong Kong Med J*. 2000; 6: 69-76.
5. Santorelli FM, Sciacco M, Tanji K, Shanske S, Vu TH, Golzi V, Griggs RC, et al, Multiple mitochondrial DNA deletions in sporadic inclusion body myositis: a study of 56 patients. *Ann Neurol*. 1996; 39: 789-95.
6. Maassen JA. Mitochondrial diabetes: pathophysiology, clinical presentation, and genetic analysis. *Am J Med Genet*. 2002; 115: 66-70.
7. Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya EV, Trounce I, Polak MA, Koontz DA, Wallace DC. Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nat Genet*. 1992; 1: 11-5.
۸. علی‌یاری زنوز، نوید، ژنتیک در پزشکی تامپسون و تامپسون. اساس مولکولی و بیوشیمیایی بیماری‌های ژنتیک، انتشارات تیمورزاده، ۱۳۸۱، فصل ۱۲، صفحه: ۲۸۰-۲۷۴.
9. Lu CY, Lee HC, Fahn HJ, Wei YH. Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutat Res*. 1999; 423: 11-21.
10. Ohkubo K, Yamano A, Nagashima M, Mori Y, Anzai K, Akehi Y, Nomiya R, et al. Mitochondrial gene mutations in the tRNA(Leu(UUR)) region and diabetes: prevalence and clinical phenotypes in Japan. *Clin Chem*. 2001; 47: 1641-8.
11. Katagiri H, Asano T, Ishihara H, Inukai K, Anai M, Yamanouchi T, et al. Mitochondrial diabetes mellitus: prevalence and clinical characterization of diabetes due to mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene mutation in Japanese patients. *Diabetologia*. 1994; 37: 504-10.
12. Kadowaki T, Kadowaki H, Mori Y, Tobe K, Sakuta R, Suzuki Y, et al. A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. *N Engl J Med*. 1994; 330: 962-8.
13. Houshmand M. Mitochondrial DNA mutations pathogenicity and inheritance. *Iranian Biotechnology journal*, 2003; 1: 1-18.
14. Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980; 77: 6715-9.
15. Rustin P, von Kleist-Retzow JC, Vajo Z, Rotig A, Munnich A. For debate: defective mitochondria, free radicals, cell death, aging-reality or mytochondria? *Mech Ageing Dev*. 2000; 114: 201-6.
16. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1410: 103-23.
17. Maechler P, Wollheim CB. Mitochondrial signals in glucose-stimulated insulin secretion in the beta cell. *J Physiol*. 2000; 15: 529 Pt 1: 49-56.

18. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 514-9.
19. Bohlega S, Tanji K, Santorelli FM, Hirano M, al-Jishi A, DiMauro S. Multiple mitochondrial DNA deletions associated with autosomal recessive ophthalmoplegia and severe cardiomyopathy *Neurology*. 1996; 46:1329-34.
20. Vialettes BH, Paquis-Flucklinger V, Pelissier JF, Bendahan D, Narbonne H, Silvestre-et al. Phenotypic expression of diabetes secondary to a T14709C mutation of mitochondrial DNA. Comparison with MIDD syndrome (A3243G mutation): a case report. *Diabetes Care*. 1997; 20: 1731.