

A mitochondriális medicina első 20 éve

Dr. Molnár Mária Judit

Semmelweis Egyetem Molekuláris Neurológiai Klinikai és Kutatási
Központ, Budapest

Bevezetés

Az első mitochondrialis beteget 1962-ben írta le Luft és munkatársa egy fiatal sovány nőbeteg kapcsán, aki normális pajzsmirigy funkció mellett megtartott étvágya ellenére folyamatosan veszítette a testsúlyát. Ennek ellenére a mitochondrialis medicina kezdetét 1988-ra datáljuk, amikor 2 betegség hátterében is a mitochondrialis DNS (mtDNS) mutációját találták. Ez egyik kórkép a Leber típusú hereditær opticus neuropathia volt, a másik mtDNS deléció okozta mitochondrialis myopathia. Az elmúlt 20 évben a molekuláris biológiai technikáknak köszönhetően a mitochondriumok és a betegségek vonatkozásában számos új információ napvilágra került, így ma joggal beszélhetünk a medicina csaknem teljes spektrumát érintő multisystemás betegségről, mely prevalenciája sokkal nagyobb a korábban gondoltnál.

A mitochondriális betegségek molekuláris jellemzése

A mitochondriális cytopathiák a multisystemás betegségek heterogén csoportját alkotják, amelyek gyakran a mitochondriális légzési lánc elégtelensége következtében a központi idegrendszer és a vázizom betegségeit okozzák, de számos egyéb szerv működészavarát is eredményezhetik (1. táblázat).

A mitochondriális betegségek vagy a maternálisan öröklődő mitochondrialis DNS (mtDNS), vagy a nuclearis DNS mutációi következtében jönnek létre (2., 3., 4. táblázat). A nuclearis és a mitochondriális genom hibái következtében kialakuló mitochondrialis betegségek prevalenciája. 1: 5000-re becsülhető. Megközelítőleg 200 betegség hátterében igazoltak

mtDNS mutációt. A nuclearis DNS kutatások tempójának felgyorsulása következtében egyre több nuclearis mitochondriális gén mutációja is összefüggésbe hozható valamely klinikai phenotypussal. A mitochondriális betegségek alosztályokba sorolása számos problémát vet föl a mitochondrialis biológia néhány sajátosságának köszönhetően. Ezek a sajátosságok: az egyes szövetek, sejtek eltérő mitochondrium tartalma, a vad és mutáns mtDNS-ek együttes jelenléte a sejtekben (heteroplasmia); a threshold effektus (a sejtek dysfunkciójához bizonyos heteroplasmia arány elérése szükséges), ugyanazon mtDNS mutáció változatos klinikai képet eredményezhet, nincs egyértelmű phenotypus-genotypus korreláció. Mindezek alapján a klinikai diagnosztika számára a tisztán klinikai alapon történő klasszifikáció a leghasznosabb annak ellenére, hogy sok beteg nem sorolható egyik kategóriába sem.

1. táblázat. A mitochondrialis betegségek leggyakoribb szervi manifestációi

Szerv	Tünet
Központi idegrendszer	Epilepsia, myoclonus, stroke, migrain, mentalis retardatio, affectiv kórképek, dystonia, tremor, chorea, myelopathia, Neuropathia (axonalis, demyelinisatio)
Perifériás idegrendszer	Myopathia, gyengeség, terhelési intolerantia
Vázizom	Vezetési zavarok, cardiomyopathia, ischaemiás eltérések
Szív	
Szem	Ptozis, opticus atrophia, retinopathia, cataracta, glaucoma, retina dystrophia
Hallás	Sensoneuralis halláskárosodás, ototoxicitásra való hajlam
Máj	Hepathopathia
Vese	Tubularis dysfunctio, tubulointestinalis nephropathia, Toni.Fanconi-Debre, Barth syndroma
Pancreas	Diabetes mellitus, exocrin dysfunctio
Endocrin szervek	Alacsony növés, recurráló hypoglycaemia, hypoparathyreoidismus, hypothyreosis, ACTH hiány
Vérképző rendszer:	Vashiányos vérszegénység, pancytopenia, megaloblastos anaemia, thrombopenia, myelodysplasiás syndroma
Gastrointestinalis tractus	Intestinalis pseudoobstructio, episodikus hányás, dysphagia, duodenalis atresia
Bőr	Lipomatosis, zsiros infiltratio, vitiligo, palmomentalis keratoderma

2. táblázat. Az mtDNS hibái következtében kialakuló leggyakoribb betegségek

Phenotypus	Hibás gén
Protein kódoló gén mutatio	
MELAS	ND1
Diabetes mellitus	ND1
LHON és variánsai	ND1, ND4, ND6, ATP6
Motoneuron betegség	COXI
Anemia sideropenica	COXI
Leigh betegség	ATP6, ND1
NARP, MILS	ATP6
Kearns-Sayre syndroma	ATP6
Ataxia	ATP6
Protein synthesis zavarok	
<i>Transzfer RNS mutatiok</i>	
Atypusos CMT phenotypus	tRNALys
Cardiomyopathia	tRNAVal, Ala, Ile, Gly
CPEO, süketség, cardiomyopathia	tRNALeu, Ile, Asp, Lys, Glu
Süketség és/vagy ataxia, myoclonus, dementia	tRNASer
Dementia/chorea	tRNATrp
Depressive betegségek	tRNALeu
Diabetes mellitus + süketség	tRNALys, Glu
Encephalomyopathia	tRNAVal, Leu, Lys, Asp, Trip, Thr
Terhelési intolerancia/myoglobinuria	tRNAPhe
GIT tünetek, süketség, rohamok	tRNALys
Leigh syndroma	tRNAVal, Leu, Trip, Lys
MELAS	tRNAVal, Leu, Ala
MERRF és/vagy ocular tünetek, lipomatosis	tRNALys
Myopathia	tRNAPhe, Leu, Lys, Meth, Trip,
Lys, Prol, Ala	
Peripheriás neuropathia, rhabdomyolysis	tRNALeu
Psychosis, dementia és/vagy parkinsonismus	tRNALeu, Glu
Anemia sideropenica	tRNAIleu
Spinocerebellaris degeneratio	tRNALys
Ribosomal RNS mutatiok	
Aminoglycoside-indukálta süketség	12S
Cardiomyopathia	12S
Alzheimer és Parkinson kór	16S
Rett syndroma	16S
mtDNS deletiok/duplicatiok	
CPEO	
Diabetes mellitus és süketség	
Kearns-Sayre syndroma	

Wolfram syndroma
 Pearson syndroma
 Adrenalis elégtelenség
 CPEO and variánsai
 Diabetes mellitus, Fanconi syndroma
 Infantilis cardiomyopathia

3. táblázat. Nuclearis mutáció okozta légzési lánc complex protein rendellenességek

Phenotypus	Gén	Locus	
Gyerekkori encephalopathia	NDUFS1	2q33-37	Complex I
Encephalopathia	NDUFS2	1q23	
Leigh syndroma	NDUFS7, NDUFS8	19p13, 11q13	
Leukodystrophia, myoclonus epilepsia	NDUFV1	11q13	
Hereditar paraganlioma	SDHB	1p36, 11q23	Complex II
Leigh syndroma	SDHA	5q15	
Gracile syndroma	BCS1L	2q33-37	Complex III
Encephalomyopathia, tubulopathia	COX10	17p13.1	Complex IV
Hepatoketoacidotikus coma	SCO1	17p13.1	
Infantilis cardioencephalomyopathia	SCO2	22q13	
Leigh syndroma	SURF1, LRPPRC	9q34, 2p16	

A mitochondriális betegségek hátterében álló gének és azok mutációi

Az emberi mtDNS cirkuláris, kettősszálú molekula, mely maternalisan öröklődik, 16569 bp-ból áll, 37 ismert gént tartalmaz. A guanin-gazdag nehéz lánc (L) 2 tRNS-t, az I. complex 6 alegységét, a III. complex apocytocrome b-jét, a IV complex legnagyobb alegységeit (COX I, II, III.) és az V. complex 6. és 8. alegységeit kódolja. A cytosin-gazdag könnyű lánc (H) 8 tRNS és az I. complex egy alegységének kódolásáért felelős. A mitochondriális genom által kódolt polypeptidek az oxidatív phosphorylatios rendszer tagjai. A légzési lánc és az oxidatív phosphorylatio többi polypeptidjét a nuclearis DNS kódolja és azok döntően a cytosolban szintetizálódnak. A „displacement regio” (D-loop) rövid nem-kódoló szakaszának kivételével nincsenek nem kódoló génszakaszok (intronok) a H láncon. A humán mitochondriális transzkripció a két nagy promotor régióból indul és a prokaryota szervezetekhez hasonlóan polycystronicus. Az mtDNS replikációja is szokatlan mindkét láncknak van egy replikációt indító helye (OH és OL), és az új DNS lánck szintézise ellenkező irányban történik. Az mtDNS nem rendelkezik

protektív hatású hisztonokkal, repair rendszere fejletlen, így a mutagén ágensekkel szemben rendkívül érzékeny, mutációs rátája kb. 10-szerese a nuclearis DNS-ének. A sejtek osztódásakor a mutáns mitochondriális genomok aránya a mitotikus segregációnak köszönhetően eltérő lehet az egyes leány sejtekben. A mitochondriális genom mutációi (deléciók és pontmutációk) lehetnek germ-line (csírasejt) és szomatikus mutációk. A germ-line mutációk mindig átörökítődnek, ezek képezik az alapját az egyes etnikai csoportok közötti polymorphizmusnak és a primer mitochondriopathiáknak. A szomatikus mutációk az élet során keletkeznek és az életkor előrehaladtával számuk a postmitotikus szövetekben növekszik. Az mtDNS germ-line mutációi lehetnek egyes nagy deléciók, multiplex deléciók, és single nucleotid polymorphizmusok (SNP-k, vagy más néven pontmutációk). A mitochondriális deléciók általában sporadikusan öröklődnek, bár beszámoltak maternalisan öröklődő formákról is. A deléciók mérete 1.3 és 11 kb között ingadozik, lokalizációjuk változó lehet. Leggyakrabban a 4.9 kb nagyságú ún. „common deletion”-t írták le, mely az I-IV komplexet és a közbeeső tRNS-eket kódoló génszakaszt érinti. A mitochondriális genom delécióinak leggyakoribb előfordulását Kearns-Sayre szindrómában, chronicus ophthalmoplegia externában és Pearson szindrómában írták le. Az mtDNS pontmutációi érinthetik a proteinkódoló és a tRNS géneket is. Ez utóbbi következtében több protein működése is károsodhat. A mitochondriális pontmutáció sokféle neurológiai tünetcsoportot eredményezhet, melyek némelyike jól körülhatárolt syndromaként ismert. A protein kódoló gének mutációi következtében leggyakrabban kialakuló kórképek: MELAS, diabetes mellitus – ND1 gén; motoneuron betegség, sideropeniás anaemia – COX1 gén; NARP, MILS, ataxia – ATP6 gén. Egyes kórképek, mint pl. a Leigh szindróma több proteint kódoló gén mutációja (ND1, ATP6) vagy LHON (ND1, ND4, ND6, ATP6) következtében is kialakulhatnak. A tRNS mutációk közül a legismertebbek a MELAS, MERRF, encephalopathiák, myopathiák, depressív kórképek, dementiák, perifériás neuropathiák. A rRNS mutáció következtében aminoglycoside indukálta sükettség, cardiomyopathia, Alzheimer kór, Parkinson kór és Rett szindróma alakulhat ki.

A nuclearis DNS mitochondriális génjei és azok mutációi következtében kialakuló betegségek A mitochondriális funkciót a sejtmag és a mitochondrium DNS molekuláinak koordinált működése határozza meg. A translationális gépezet több nuclearisan determinált polypeptidet és mitochondriálisan kódolt rRNS-t és tRNS-t is tartalmaz, illetve a nagy respiratorikus komplexek mindkét genom által kódolt alegységekből

állnak. A nuclearis DNS (nDNS) kb. 1000 mitochondriális proteint kódol, melyek közül mindössze 67 játszik szerepet a légzési lánc működésében. A nDNS által kódolt mitochondriális proteinek a cytoplasmában szintetizálódnak és specifikus transport rendszer segítségével importálódnak a mitochondriumba. A mitochondriumok azonkívül, hogy a sejtek energia metabolizmusában alapvető szerepet játszanak, számos egyéb cellularis folyamatban is részt vesznek. Biogenezisükben és működésükben a nuclearis és mt genom közötti párbeszéd alapvető fontosságú. Az intergenomikus signalling károsodása a mtDNS-t mind mennyiségileg (mtDNA depletio) mind minőségileg érintheti (többszörös mtDNS deléciós szindrómák). Multiplex delétiókat tartalmazó mtDNS molekulák nagyon kis mennyiségben az egészséges felnőtt szövetekben is megfigyelhetők. Normális feltételek mellett az átrendeződött és vad típusú mtDNS-ek aránya egyensúlyban van, az átrendeződés folyamatosan elvész és újonnan kialakul, de soha nem emelkedik a fiziológián még tolerálható küszöb fölé. Az eddig ismert nuclearis DNS rendellenesség következtében kialakuló mitochondriális betegségeket a 3. és 4. Táblázat tartalmazza. A nuclearis genom számos mutációja okozhat izolált légzési lánc complex deficienciát. Ezek közül néhány betegség szövet specifikus, mint pl. a SURF1 rendellenesség agy specifikus a Leigh szindrómában, a SCO2 és COX15 deficiencia szívizom és agyszövet specifikus az infantilis cardiomyopathiában és cerebralis betegségekben. A COX 10 deficiencia vese betegség, SCO1 hiány májbetegség formájában jelentkezhet. A mitochondriális defektus a mitochondriális membran strukturát károsítja Barth Szindrómában, a mitochondriális protein importatitot „Süketség és dystonia” szindrómában (DDP protein), a mitochondriális motilitást az „Optikus neuropathiában” (OPA1).

A mitochondriális betegségek molekuláris genetikai diagnosztikai lehetőségei

Néhány esetben már a klinikai kép is jellegzetes az illető mitochondriális betegségre (MELAS, MERRF, LHON, SCO2) és a diagnózishoz elegendő a vérből izolált DNS molekuláris genetikai tesztje. A legtöbb esetben azonban nem ilyen könnyű a helyzet és több diagnosztikus procedúrát is be kell iktatni a genetikai vizsgálat elé, mint pl. multimodális elektrofiziológiai vizsgálatok, vér/liquor lactate szint vizsgálat, képpalkotó eljárások, cardiológiai vizsgálat, az izombiopszia hisztológiai, hisztokémiai és biokémiai feldolgozása és a DNS analysis. A molekuláris genetikai tesztek mtDNS Southern blottot, single nucleotide

polymorphizmus (SNP) screeninget, real-time PCR-t, a teljes mitochondriális genom vagy a gyanús nuclearis gén szekvenálását foglalják magukban.

4. táblázat. Nuclearis mutáció okozta nem légzési lánc protein rendellenességek

Phenotypus	Gén	Locus
CPEO	POLG1, ANTI, Twinkle	15q25, 4q34, 10q23
CMT2A	Mitofusin	1q36
Lassú fejlődés	Fumarate hydrolase, pyruvate carboxylase	1q42.1, 11q13
Encephalopathia, hepatomegalia	HMC-CoA-lyase	1pter-p33
Epilepsia, encephalopathia	HMGCS2	1p12-13
Epilepsia, episodikus ataxia, encephalopathia	Pyruvate dehydrogenase	Xp22.2-22.1
Friedreich ataxia	Frataxin	9q13
Hepatopathia, hypotonia	DGUOK	2p13
Spastikus paraplegia	Paraplegin	16q24.3
Hypocarotinaemia, hypolysinaemia	DCAR	8q21.3
Menkes kór	ATPase	Xq12
MNGIE	Thymidin-phosphokinase	22q13.32qter
Mohr-Tranebjærg sz.	DDP1/TIMM8A	Xq22
Parkinson kór	PINK1	1p36
Optikus atrophia	OPA1, OPA2	3q28, 18q12
SMA-szerű myopathia	Thymidine kinase	16q22

Genetikai tanácsadás, prénatalis diagnosztika a mitochondriális betegségekben:

Az mtDNS betegségekben az mtDNS jellegzetességei következtében a genetikai tanácsadás gyakorlatilag lehetetlen. A női ivarsejtek embryo-genezise során az mtDNS transzmissióját az üvegnyakhatás következtében kialakuló random genetikai drift determinálja, így nem tudhatjuk, hogy az mtDNS betegségben szenvedő betegek egyes oocytáiban mennyi a vad és mutans mtDNS molekulák aránya. Ennek köszönhetően a következő generációban a betegség ismétlődésének valószínűsége nem becsülhető. Prénatalis diagnosztikára a terhesség 12. hete után van lehetőség. Ilyen esetekben a 20–30%-nál magasabb heteroplasmia arányú foetusok esetén a terhesség terminációja javasolt (10. közlemény). Figyelembe véve, hogy

az mtDNS betegségben szenvedő anyák sok esetben nehezen vagy spontán nem esnek teherbe, mivel a betegség endokrin rendszerüket is érintheti, további új megoldások iránti igény vetődött föl. Számukra lehetőségként kínálkozik a preimplantációs genetikai diagnosztika (PGD), melynek validálása volt vizsgálataink célja. Sok esetben etikai megfontolások vezetnek ez utóbbi diagnosztika felé a betegeket. A PGD során gyógyszeres ovuláció stimulációt követően in vitro történik a megtermékenyítés. A korai stadiumú embriók (általában 8 sejtés blastomer stadium) 1-1 blastomer sejtjét leválasztják és ezen sejtek PCR alapú genetikai diagnosztikája nyújt információt az embryo genotipusáról. Így az egészséges embriók szelektálhatók és csak ezek kerülnek implantációra.