

نوروپاتی ارثی عصب بینایی لبر: آیا تغییرات ژنتیکی در چرخه اسید فولیک نقشه در ابراز جهشهای ژنهای میتوکندری دارد؟

سید احمد آل یاسین*، محمد غضنفری و مسعود هوشمند

تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه ژنتیک پزشکی

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۲۳ تاریخ پذیرش: ۸۹/۴/۲۷

چکیده

نوروپاتی ارثی عصب بینایی لبر (LHON) بیماری ارثی با ضعف بینایی چشمها و فقدان دید مرکزی می باشد. علت اولیه فقدان دید، جهش در DNA میتوکندریایی است. اگر چه تأثیر فاکتورهای ژنتیکی و یا اپی ژنتیکی ثانویه ناشناخته ای نیز در نوروپاتی آن پیشنهاد می شود. این مطالعه برای اولین بار پلی مورفیسم ژنهای فولات و ریسک فاکتور ژنتیکی ثانویه LHON را در صورت وجود مورد بررسی قرار می دهد. پلی مورفیسمهای معمول ژنهای متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) (C677T, A1298C) و متیونین سنتاز ردوکتاز (MTRR) (A66G) در ۲۱ نمونه بیمار و ۱۵۰ نمونه کنترل مورد مطالعه قرار گرفت. ارتباط معنی داری بین سندروم LHON با پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR ($P < 0.001$) و A66G ژن MTRR ($P < 0.001$) و ارتباطی منفی با پلی مورفیسم A1298C ژن MTHFR ($P = 0.769$) مشاهده شد. این مطالعه اولین گزارشی است که نقش مهم پلی مورفیسمهای C677T و A66G را در اتیولوژی سندروم LHON بیان می کند. و بدین صورت می تواند در فهم بهتر مکانیسمهای دخیل در تخریب نورونی، فقدان بینایی LHON و درمان بیماران کمک می کند.

واژه های کلیدی: LHON، MTHFR، MTRR، فولات، فولیک اسید.

*نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۵۸۰۳۸۳ پست الکترونیکی: sogand@nigeb.ac.ir

مقدمه

فولات، بین میتوکندری و مشتقات فولات ارتباط نزدیکی وجود دارد. چرخه فولات میتوکندریایی در تمامی فرآیندهای زیستی در سلولهای پستانداران شرکت دارد و پیشنهاد شده است که آنتی فولاتها می توانند اثر سیتوتوکسیک خود را بر این ارگانها بگذارند (۲۲). فرم فعال فولات، تتراهیدروفولات (THF) است که موقعیت اکسیداسیونی کربنی متفاوتی را به وسیله آنزیمهای موجود در سیتوزول و میتوکندری ایجاد می کند (۱ و ۱۹). آنزیمهای مهم در چرخه متابولیسم فولات محصول ژنهای متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) و متیونین سنتاز ردوکتاز (MTRR) می باشند که به عنوان دو آنزیم

جهشهای DNA میتوکندریایی در نوکلئوتیدهای ۳۴۶۰، ۱۱۷۷۸، ۱۴۴۸۴ و ۱۴۴۵۹ به عنوان جهشهای اولیه نوروپاتی ارثی عصبی لبر (LHON) با فنوتیپهای مشابه یا متفاوت مشخص شده است (۲، ۱۲، ۱۵، ۲۱ و ۲۴). این جهشهای اولیه می تواند باعث کمبود انرژی و آسیب نورونی ناشی از مکانیسمهای آگزوسیتوتوکسیک در بیماران گردد. اگرچه امکان دارد برای ایجاد فقدان بینایی در بیماران LHON کافی نباشد (۷ و ۸). در ضمن توضیح کاملی در بیان علت شدت نوروپاتی در عصب بینایی و فقدان دید ارائه نشده است و به نظر می رسد که تأثیر فاکتورهای ثانویه و ناشناخته ژنتیکی یا محیطی ثانویه وجود داشته باشد (۳، ۶، ۱۴ و ۲۱). در متابولیسم سلولی

متیونین را جهت متیلاسیون دوباره هموسیستئین به متیونین، در سطح فعال نگاه می‌دارد. این پلی‌مورفیسم در موقعیت ۶۶ ژن MTRR است که ایزولوسین را جایگزین متیونین می‌کند و بدین ترتیب باعث کاهش فعالیت آنزیم مربوطه و افزایش میزان هموسیستئین می‌شود (۱۰، ۲۵). این پلی‌مورفیسمها از رایج‌ترین پلی‌مورفیسمهای ژنهای مربوطه گزارش شده‌اند که بیشترین تأثیر را در کاهش فعالیت آنزیمی ایفاء می‌کنند.

هدف از این مطالعه، مقایسه فراوانی سه پلی‌مورفیسم A1298C و C677T ژن MTHFR و A66G ژن MTRR در میان بیماران LHON که فاقد قدرت بینایی هستند و گروه کنترل بود تا ارتباط بین متابولیسم فولات و LHON مشخص گردد.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه‌ها و مطالعه بیماران LEBER: تعداد ۱۴۰ بیمار با فقدان بینایی جهت بررسی جهشهای mtDNA مرتبط با LHON در واحد تشخیص ژنتیکی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری در تهران، مورد آزمایش قرار گرفتند که از این تعداد، ۲۱ بیمار LHON تشخیص داده شد. نمونه‌های کنترل از ۱۵۰ فرد سالم بدون سابقه بیماری میتوکندریایی یا نابینایی در خود و بستگانشان در محدوده سنی ۴۰-۲۰ سال مطابق گروه سنی بیماران به دست آمد. DNA از لئوسیت‌های خون با روش استخراج نمک استاندارد، جداسازی و تا زمان آغاز بررسی ژنوتیپی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بررسی جهش mtDNA بر اساس Jun et al, 1994 و Johns et al, 1990 صورت گرفت (۵، ۹، ۱۰ و ۱۱). چهار جهش ۱۱۷۷۸، ۳۴۶۰، ۱۴۴۸۴ و ۱۴۴۵۹ در زیر واحدهای ۱، ۴ و ۶ ژن NADH دهیدروژناز با روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه توسط کمیته اخلاق زیستی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری مورد تأیید قرار گرفت.

کلیدی به ترتیب در سنتز ۵- متیل‌تتراهیدروفولات و متیونین نقش دارند.

متیل‌تتراهیدروفولات فرم حلقوی فولات است که به عنوان دهنده متیل جهت متیلاسیون دوباره هموسیستئین به وسیله آنزیم متیونین سنتاز وابسته به ویتامین B12، و تبدیل آن به متیونین عمل می‌کند (۴ و ۲۰).

در گزارشات بسیاری به نقش جهش ژن فولات در بروز ناهنجاریهای تخریبی نورونی اشاره شده است (۱۷ و ۱۸). برای شناسایی بهتر فاکتورهای ژنتیکی دخیل در اتیولوژی LHON، به مطالعه جهش ژنهای فولات در تعدادی از نمونه‌های LHON ایرانی که نسبت به دیگران از فراوانی بسیار بالای پلی‌مورفیسم ژن فولات برخوردار بودند، پرداخته شد.

از رایج‌ترین پلی‌مورفیسمهای ژن MTHFR تبدیل سیتوزین (C) به تیمیدین (T) در موقعیت نوکلئوتیدی ۶۷۷، باعث جایگزینی والین به آلانین، افزایش مقاومت گرمایی MTHFR و کاهش فعالیت آنزیم می‌شود. در ژنوتیپ هتروزیگوت C/T حدود ۳۵ درصد و ژنوتیپ هموزیگوت T/T ۷۰ درصد فعالیت آنزیم در مقایسه با ژنوتیپ نرمال C/C کاهش می‌یابد (۱۳ و ۲۵). جهش معمول دیگر در موقعیت ۱۲۹۸ ژن MTHFR است که باعث جایگزینی آلانین به گلوتامات می‌شود. در جهش یافته‌های هموزیگوت با ژنوتیپ C/C، کاهش متوسط فعالیت آنزیمی و هیچ تغییری در مقاومت گرمایی آن مشاهده نمی‌شود (۱۳). نقص جدی در ژن MTHFR، ناهنجاریهای دستگاه عصبی، اختلال در میلینه شدن عصب و بیماریهای عروقی را در پی دارد و همچنین به عنوان یک ریسک فاکتور برای نقص لوله عصبی و دیگر بیماریهای مربوط به سیستم عصبی مانند آلزایمر و پارکینسون و نیز در دیستروفی عصب بینایی مانند بیماری بهجت گزارش شده است (۱۶، ۱۷، ۱۸، ۲۰ و ۲۵). پلی‌مورفیسم سوم در ژن متیونین سنتاز ردوکتاز (MTRR) است که آنزیم سنتزکننده

۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت جداسازی رشته های DNA از یکدیگر، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه برای اتصال پرایمر به DNA و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت طویل سازی رشته DNA صورت گرفت. سیکلها ابتدا با ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه جداسازی رشته های DNA از یکدیگر آغاز شد و در انتها با ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه تکمیل طویل سازی رشته DNA به اتمام رسید. جهت بررسی جهش C677T، محصول PCR آن در معرض هضم آنزیم برشی *HinfI* (Roche, Germany) قرار گرفت. حضور این پلی مورفیسم، یک جایگاه برش برای آنزیم *HinfI* به وجود می آورد که با ایجاد دو قطعه DNA با طولهای ۱۰۸ bp و ۱۴۷ bp پس از الکتروفورز مشخص شد. واکنش PCR برای پلی مورفیسمهای A1298C و A66G مشابه شرایط اعمال شده برای پلی مورفیسم C677T ژن *MTHFR* صورت گرفت به استثناء دمای اتصال آغازگر که در ۵۵ درجه انجام گردید. قطعه تکثیر شده به طول ۱۶۳ bp برای پلی مورفیسم A1298C با آنزیم برش دهنده *MboII* هضم شد (Fermentas, Vilna, Lithuania) که جایگزینی C به A یکی از چهار جایگاه برش آنزیم *MboII* را از بین می برد. عدم مشاهده برش با حضور چهار قطعه (۱۸، ۳۱، ۳۰ و ۸۴ bp) در افراد جهش یافته به جای پنج قطعه (۱۸، ۳۱، ۲۸، ۳۰ و ۵۶ bp) در هموزیگوت های سالم مشخص می شود. جهت اثبات وجود پلی مورفیسم A66G در ژن *MTRR*، محصول PCR آن با طول ۱۵۴ bp توسط آنزیم اندونوکلاز *NdeI* هضم شد (Fermentas, Vilna, Lithuania). جایگزینی A به G یک جایگاه برشی دیگر برای این آنزیم به وجود می آورد که با حضور دو قطعه با طولهای ۲۴ و ۱۳۰ bp در افراد جهش یافته هموزیگوت به جای یک قطعه ۱۵۴ bp در هموزیگوت های سالم مشخص می شود (۱۰). قطعات حاصل از هضم آنزیمی روی ژل پلی اکریلامید ۱۲ درصد بررسی شدند. جهت شناسایی مشخصه های محصولات

جدول ۱- جهشهای DNA میتوکندریایی و پلی مورفیسمهای C677T و A1298C ژن *MTHFR* و پلی مورفیسم A66G مربوط به ژن *MTRR* در ۲۱ نمونه بیمار سندروم LHON.

	DNA میتوکندریایی	پلی مورفیسم		
		C677T	A1298C	A66G
۱	11778	TT	CC	GG
۲	11778	TT	CA	GA
۳	11778	TT	CA	GA
۴	11778	TC	CA	GA
۵	11778	TC	CA	GA
۶	11778	TC	AA	GA
۷	11778	CC	AA	GA
۸	11778	CC	CA	GA
۹	11778	CC	CA	GG
۱۰	11778	TT	AA	GG
۱۱	11778	CC	AA	GA
۱۲	11778	TC	AA	GA
۱۳	11778	TC	AA	AA
۱۴	11778	TC	CA	GA
۱۵	11778	TT	AA	GA
۱۶	11778	CC	CC	GA
۱۷	3460	TC	CC	GG
۱۸	3460	CC	CA	GA
۱۹	3460	TC	AA	GG
۲۰	14484	CC	CC	GG
۲۱	14459	TC	CA	GA

بررسی پلی مورفیسم ژنهای *MTHFR* و *MTRR*: در ۲۱ بیمار LHON و ۱۵۰ نمونه کنترل، پلی مورفیسمهای معمول C677T و A1298C ژن *MTHFR* (GeneID: 4524) و A66G ژن *MTRR* (GeneID: 4552) مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تکثیر قطعه ۲۵۴ bp حاوی کدون ۶۷۷ مربوط به ژن *MTHFR*، آغازگرهای مستقیم و معکوس به ترتیب با توالیهای (5' gcc tct cct gac tgt cat cc3') و (5' gga gct tat ggg etc tcc tg3') طراحی شدند و آغازگرهای تکثیر کننده قطعات حاوی جهشهای A1298C ژن *MTHFR* و A66G ژن *MTRR* بر اساس مقالات موجود به دست آمد (۵). PCR در ۳۲ سیکل دمای

PCR سه نمونه تعیین توالی شدند و تشابه توالی آنها با استفاده از BLAST (NCBI) با توالیهای انسانی به تأیید رسید.

جدول ۲- فراوانی ژنوتیپی و آنالیزهای آماری پلی مورفیسمهای A66G و A1298C، C677T در دو گروه بیمار و کنترل.

پلی مورفیسم	نمونه بیمار	نمونه کنترل	(مربع کای) ارزش آماری
	تعداد (درصد)		
MTHFR 677 CC	۷ (۳۳/۳)	۹۲ (۶۱/۳)	۰/۰۰ (۱۱/۲۵)
MTHFR 677 CT	۹ (۴۲/۹)	۵۰ (۳۳/۳)	
MTHFR 677 TT	۵ (۲۳/۸)	۸ (۵/۳)	
MTHFR 1298 AA	۸ (۳۸/۱)	۶۷ (۴۴/۷)	۰/۶۹ (۰/۸۳)
MTHFR 1298 AC	۹ (۴۲/۹)	۶۴ (۴۲/۷)	
MTHFR 1298 CC	۴ (۱۹)	۱۹ (۱۲/۷)	
MTRR 66 AA	۱ (۴/۸)	۴۷ (۳۱/۳)	۰/۰۰ (۱۴/۱۴)
MTRR 66 AG	۱۴ (۶۶/۷)	۹۳ (۶۲)	
MTRR 66 GG	۶ (۲۸/۶)	۱۰ (۶/۷)	

۱-۳). فراوانی اللی پلی مورفیسمهای A1298C، C677T و A66G در میان کروموزومهای نمونه های بیمار به ترتیب ۴۵ درصد (۱۹/۴۲)، ۴۰ درصد (۱۷/۴۲) و ۶۲ درصد (۲۶/۴۲) به دست آمد در حالی که این مقادیر در نمونه های کنترل به ترتیب برابر با ۲۲ درصد (۶۶/۳۰۰)، ۳۴ درصد (۱۰۲/۳۰۰) و ۳۷/۶ درصد (۱۱۳/۳۰۰) محاسبه شد (جدول ۲).

فراوانی ژنوتیپهای C/C، C/T و T/T مربوط به پلی مورفیسم C677T در نمونه های بیمار به ترتیب ۳۳/۳ درصد، ۴۲/۹ درصد و ۲۳/۸ درصد و این مقادیر در نمونه های کنترل برابر با ۶۱/۳ درصد، ۳۳/۳ درصد و ۵/۳ درصد به دست آمد.

نتایج ژنوتایپینگ پلی مورفیسم A66G ژن MTRR در نمونه های بیمار، ۴/۸ درصد، ۶۶/۷ درصد و ۲۸/۶ درصد به ترتیب برای ژنوتیپهای A/A، A/G و G/G، و این فراوانیها در نمونه های کنترل ۳۱/۳ درصد، ۶۲ درصد و

بررسی های آماری: فراوانی اللی برای هر ژنوتیپ با شمارش الیها محاسبه شد. مقایسه فراوانی اللی در دو گروه بیمار و کنترل با استفاده از تست χ^2 Pearson و جهت انجام بررسیهای بیشتر از نرم افزار SPSS (Chicago, Illinois) استفاده شد.

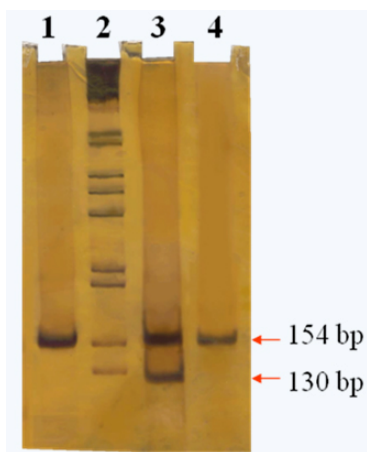
نتایج

تعداد ۲۱ بیمار دارای سندروم LHON بر اساس علائم بالینی و آزمایشات پاراکلینیکی، جهت شرکت در بررسی جهشهای mtDNA تشخیص و تأیید شدند. جهشهای mtDNA در بیماران به صورت ۱۱۷۷۸ در ۱۶ مورد، ۳۴۶۰ در ۳ مورد و ۱۴۴۵ و ۱۴۴۸۴ هر کدام یک مورد مشخص شدند (جدول ۱). نمونه های بیمار از مناطق جغرافیایی متفاوت در ایران که هیچ ارتباط ژنتیکی با یکدیگر نداشتند، جمع آوری شده بودند.

ژنوتیپ پلی مورفیسمهای A66G و A1298C، C677T در ۲۱ نمونه بیمار و ۱۵۰ نمونه کنترل مشخص شد (شکلهای

ستون ۳: هتروزیگوت، ستون ۴: هموزیگوت طبیعی، ستون ۵: هموزیگوت موتانت

بر اساس بررسی های آماری ارتباط معنی داری برای پلی مورفیسمهای C677T ($P=0/0$) و A66G ($P=0/0$) در نمونه های بیمار و کنترل به دست آمد، ولی این ارتباط برای پلی مورفیسم A1298C مشاهده نشد ($P=0/69$). فراوانی بروز همزمان الیهای TT/TC پلی مورفیسم C677T و الی GG/AG پلی مورفیسم A66G به شکل قابل ملاحظه ای ($P=0/0$) در میان نمونه های بیمار (۶۱/۹ درصد) بیشتر از نمونه های کنترل (۲۶ درصد) بود. این نتایج با گزارشات قبلی که بیان می داشت، پلی مورفیسمهای C677T و A66G به طور قابل ملاحظه ای میزان هموسیستئین را افزایش می دهند در حالی که پلی مورفیسم A1298C هیچ تأثیری در این امر ندارد، همخوانی داشت.



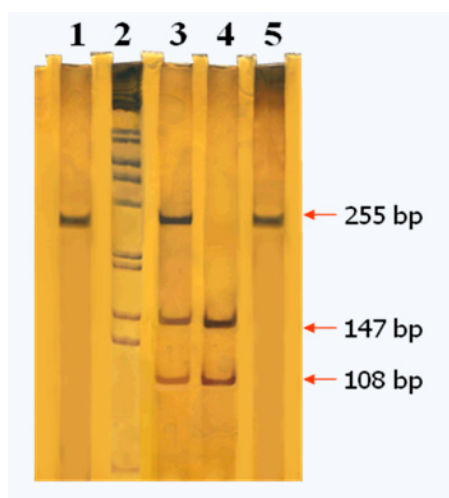
شکل ۳- PCR-RFLP پلی مورفیسم MTRR A66G به وسیله آنزیم *NdeI*، ستون ۱: محصول PCR، ستون ۲: مارکر اندازه، ستون ۳: هتروزیگوت، ستون ۴: هموزیگوت طبیعی

بحث

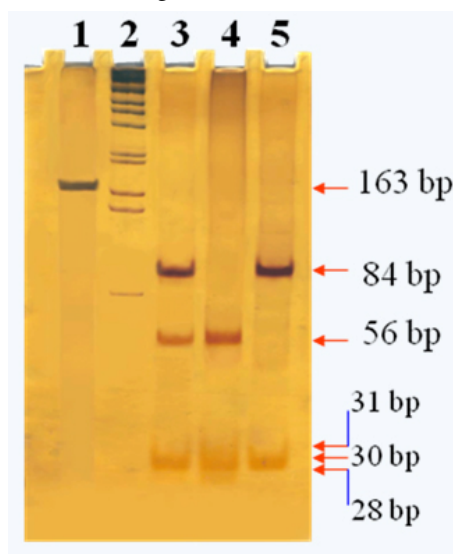
این مطالعه، ارتباط معنی دار پلی مورفیسمهای C677T و A66G را با سندروم LHON با ارزش آماری $P=0/0$ تأیید می کند و نقش شان را در اتیولوژی سندروم LHON موثر می داند. جهش ژنهای فولات همچنین مضمون به دخالت در عملکرد نادرست سلولی، میتوکندریایی و تنفسی می

۶/۷ درصد به دست آمد. بر طبق بررسیهای صورت گرفته، فراوانی ژنوتیپ T/T پلی مورفیسم C677T و G/G مربوط به A66G در میان بیماران تقریباً ۴ برابر بیشتر از گروه کنترل به دست آمد.

فراوانی ژنوتیپ جهش یافته C/C پلی مورفیسم A1298C در نمونه های بیمار (۱۹ درصد) بیشتر از نمونه های کنترل (۱۲/۷ درصد) به دست آمد ولی فراوانی ژنوتیپ A/C در این دو گروه یکسان بود.



شکل ۱- PCR-RFLP پلی مورفیسم MTHFR C667T به وسیله آنزیم *HinfI*، ستون ۱: محصول PCR، ستون ۲: مارکر اندازه، ستون ۳: هتروزیگوت، ستون ۴: هموزیگوت موتانت، ستون ۵: هموزیگوت طبیعی



شکل ۲- PCR-RFLP پلی مورفیسم MTHFR A1298C به وسیله آنزیم *MboII*، ستون ۱: محصول PCR، ستون ۲: مارکر اندازه،

فولات در موش باعث تخریب میتوکندری و دیواره مویرگهای غشاء مغز می شود. نظریه ای مبنی بر این است که استرس اکسیداتیو ممکن است به DNA و عملکرد میتوکندری در افراد LHON آسیب برساند (۷) و تغییر در متابولیسم فولات استرس اکسیداتیو را القاء می کند. ارتباط این دو جهش ژنی تخریب میتوکندریایی را افزایش می دهد و کمبود انرژی در افراد LHON باعث عملکرد غیر عادی عصب بینایی می شود. در بررسیهای آماری در فراوانیهای ژنوتیپی MTHFR C677T و MTRR A66G میان بیماران LHON و گروه کنترل تفاوت معنی داری مشاهده شد. این مشاهدات در فهم اتیولوژی و پاتولوژی مولکولی بیماری LHON مفید بوده و می تواند در شناخت فرآیند بیوشیمیایی جهت درمان آینده بیماران LHON کمک کند.

باشند. آنزیمهای وابسته به فولات در سیتوپلاسم و میتوکندری یافت می شوند و چرخه های متابولیکی آنها در فرآیند زیستی سلولهای پستانداران دخالت دارند (۱، ۲۳). از این رو نقص در متابولیسم میتوکندریایی ناشی از جهش mtDNA در بیماران LHON که با جهش ژنهای دخیل در چرخه فولات نیز مرتبط است، با تحت تأثیر قرار دادن انتقال الکترون، عملکرد غیر طبیعی میتوکندری و کاهش سطح ATP می تواند در شدت نوروپاتی LHON و تخریب عصب بینایی دخیل باشد. پروتئین MTRR از دسته FNR انتقال دهنده الکترون است و با ردوکتاز P450 سیتوکروم انسانی ۳۸ درصد مشابهت نشان می دهد (۹). عملکرد MTRR در انتقال الکترون و همولوژی آن با ژنهای NADPH می تواند نقش احتمالی جهش MTRR A66G را در نقص انتقال الکترون پیشنهاد کند. کمبود

منابع

- Al-Gazali LI, Padmanabhan R, Melnyk S, et al 2001. Abnormal folate metabolism and genetic polymorphism of the folate pathway in a child with Down syndrome and neural tube defect. *Am J Med Genet*;103(2):128-32.
- Chalmers RM, Schapira AH 1999. Clinical, biochemical and molecular genetic features of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim Biophys Acta*;1410(2):147-58.
- Chinnery PF, Andrews RM, Turnbull DM, Howell NN 2001. Leber hereditary optic neuropathy: Does heteroplasmy influence the inheritance and expression of the G11778A mitochondrial DNA mutation? *Am J Med Genet*;98(3):235-43.
- Di Pietro E, Sirois J, Tremblay ML, MacKenzie RE 2002. Mitochondrial NAD-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase is essential for embryonic development. *Mol Cell Biol*;22(12):4158-66.
- Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, et al 1999. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. *J Nutr*;129(9):1656-61.
- Howell N 1997. Leber hereditary optic neuropathy: mitochondrial mutations and degeneration of the optic nerve. *Vision Res*;37(24):3495-507.
- Howell N, Mackey DA 1998. Low-penetrance branches in matrilineal pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet*;63(4):1220-4.
- Huoponen K 2001. Leber hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic findings. *Neurogenetics*;3(3):119-25.
- Johns DR 1990. The molecular genetics of Leber's hereditary optic neuropathy. *Arch Ophthalmol*; 108(10):1405-7.
- Johns DR, Heher KL, Miller NR, Smith KH 1993. Leber's hereditary optic neuropathy. Clinical manifestations of the 14484 mutation. *Arch Ophthalmol*;111(4):495-8.
- Jun AS, Brown MD, Wallace DC 1994. A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. *Proc Natl Acad Sci U S A*;91(13):6206-10.
- leber T 1871. Ueber hereditaere und congenital angelegte Sehnevenleiden. *Graefes Arch. Ophthal*;17:249-291.
- Leclerc D, Wilson A, Dumas R, et al 1998. Cloning and mapping of a cDNA for methionine

- synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci U S A*;95(6):3059-64.
14. Mackey D, Howell N. Tobacco amblyopia. *Am J Ophthalmol* 1994;117(6):817-9.
 15. Mashima Y, Hiida Y, Oguchi Y, Kudoh J, Shimizu N 1993. High frequency of mutations at position 11778 in mitochondrial ND4 gene in Japanese families with Leber's hereditary optic neuropathy. *Hum Genet*;92(1):101-2.
 16. Mills JL, Kirke PN, Molloy AM, et al 1999. Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. *Am J Med Genet*;86(1):71-4.
 17. Ou CY, Stevenson RE, Brown VK, et al 1996. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am J Med Genet*;63(4):610-4.
 18. Ozkul Y, Evereklioglu C, Borlu M, et al 2005. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism in Behcet's patients with or without ocular involvement. *Br J Ophthalmol*;89(12):1634-7.
 19. Parry TE 1994. Folate responsive neuropathy. *Presse Med*;23(3):131-7.
 20. Pietrzik K, Bronstrup A 1997. The role of homocysteine, folate and other B-vitamins in the development of atherosclerosis. *Arch Latinoam Nutr*;47(2 Suppl 1):9-12.
 21. Riordan-Eva P, Sanders MD, Govan GG, Sweeney MG, Da Costa J, Harding AE 1995. The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. *Brain*;118 (Pt 2):319-37.
 22. Sprecher H, Barr HM, Slotky JI, Tzukerman M, Eytan GD, Assaraf YG 1995. Alteration of mitochondrial gene expression and disruption of respiratory function by the lipophilic antifolate pyrimethamine in mammalian cells. *J Biol Chem*;270(35):20668-76.
 23. Surtees R, Leonard J, Austin S 1991. Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid S-adenosylmethionine in inborn errors of methyl-transfer pathway. *Lancet*;338(8782-8783):1550-4.
 24. Wallace DC, Singh G, Lott MT, et al 1988. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*;242(4884):1427-30.
 25. Wilson A, Platt R, Wu Q, et al 1999. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab*;67(4):317-23.

Leber hereditary optic neuropathy: Dose Folate pathway gene alterations influence the expression of mitochondrial DNA mutation?

Aleyasin A., Ghazanfari M. and Houshmand M.

Medical Genetic Group, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Leber hereditary optic neuropathy (LHON) is an inherited form of bilateral optic atrophy and loss of central vision. The primary cause of vision loss is mutation in the mtDNA however unknown secondary genetic and/or epigenetic risk factors are suggested to influence its neuropathology. In this study folate gene polymorphisms has examined as possible LHON secondary genetic risk factor in Iranian patients. Common polymorphisms in methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) (C677T and A1298C) and methionine synthase reductase (MTRR) (A66G) genes have been tested in 21 LHON patients and 150 normal controls. Strong linkages have been observed between LHON syndrome and C677T of the MTHFR ($P < 0.001$) and A66G of the MTRR ($P < 0.001$) genes. However, no significant linkage was found between A1298C ($P = 0.69$) of the MTHFR gene and LHON syndrome. This is the first study that shows MTHFR C677T and MTRR A66G polymorphisms play role in the etiology of LHON syndrome. This finding may help in better understanding of mechanisms involved in neural degeneration and vision loss of LHON and better treatment of patients.

Keywords: LHON, MTHFR, MTRR, Folate, Folic acid.