

עבודת גמר ברפואה - MD Thesis

נושא עבודת גמר : הקשר בין הימצאות שינויים ב-DNA המיטוכונדריאלי לבין הפרעות פסיכוטיות באוכלוסייה מבודדת מבחינה גנטית בישראל.
Susceptibility of psychotic disorders to changes of mitochondrial DNA in a small inbreeding rural population in Israel

שם הסטודנטית המציעה : רונה בורלא מסיימת שנה ו' בשנה"ל : תשע"ב

כתובת קבועה : קק"ל 36 גבעתיים טלפון סלולרי: 054-7364629

שמות המדריכים: ד"ר יואב כהן, המרכז הירושלמי לבריאות הנפש, בי"ח "איתנים", המעבדה לפסיכיאטריה ביולוגית, המרכז הרפואי "הדסה" עין כרם

דרגה אקדמית של המדריך הבכיר : מרצה בכיר קליני

שם האוניברסיטה נותנת המנוי : האוניברסיטה העברית בירושלים

מקום ביצוע העבודה : המעבדה לפסיכיאטריה ביולוגית, המרכז הרפואי "הדסה" עין כרם, ירושלים

הפרעות פסיכוטיות

שכיחותן של הפרעות פסיכוטיות הינה כ 3-5% באוכלוסייה, והן כוללות בתוכן את מחלת הסכיזופרניה, הפרעות ביפולאריות, הפרעות סכיזואפקטיביות, דיכאון פסיכוטי והפרעות אחרות. הפסיכוזה מהווה הפרעה בתפיסת המציאות, ומתבטאת פעמים רבות בהלוצינציות, דלוזיות או מחשבות לא מאורגנות. מצבים פסיכוכימיים גורמים לאגיטציה, אגרסיביות, אימפולסיביות וצורות אחרות של סיכון ופגיעה בתפקוד (1,2). האטיולוגיה למחלות אלו עדיין איננה ידועה, אך ברור כי קיים בהן מרכיב גנטי משמעותי מעבר להשפעה הסביבתית. המודל המתאים לדרך ההורשה הוא פוליגני, המניח כי גנים רבים מעורבים באטיולוגיה וכל אחד מהם תורם חלק קטן לפנוטיפ (3). ישנן גישות רבות לאיתור גנים אילו, העיקרית ביניהן כיום היא בדיקת אסוציאציה בין אתרים פולמורפיים בגנום הגרעיני, בהם השינוי הוא בחומצת גרעין בודדה (Single Nucleotide Polymorphism - SNP), לבין הפנוטיפ של סכיזופרניה ומחלות ביפולאריות. גישות אחרות מנסות לחפש קשר בין מחלות שהתורשה שלהן ידועה ותסמינים פסיכיאטרים. דוגמא אחת כזו היא חקר מחלות מיטוכונדראליות (4,5).

מספר גורמים תומכים בהשערה לפיה התורשה של הפרעות פסיכוטיות הינה בחלקה מיטוכונדראלית:

- בספרות מצויים תיאורי מקרים בהם בהפרעות פסיכוטיות שונות נמצאו הפרעות בתפקוד המיטוכונדריאלי (6).
- מחקרים שנערכו בעבר הראו כי בחלק מהמחלות המיטוכונדראליות קיימים סימפטומים פסיכיאטריים כחלק מהתסמונת (6).
- תסמיני סכיזופרניה אצל נשים מופיעים בגיל מאוחר לעומת גברים, דבר המאפשר להן להתחתן וללדת ילדים לפני התפרצות המחלה. מכאן שבהורשה אימהית של מוטציה מיטוכונדראלית התורמת לאטיולוגיה של המחלה יש יותר סיכוי להתגברות על הסלקציה השלילית המתרחשת עקב ירידה בפוריות של החולים.
- העברת וריאנטים שונים של mtDNA באותו אדם (הטרופלזמיה – ראו בהמשך), וביטוי דיפרנציאלי שלהם ברקמות שונות יכולה להסביר חלק מההטרוגניות האטיולוגית של המחלות הפסיכוטיות (7,8).

המיטוכונדריה

המיטוכונדריון הינו אברון המוקף בשכבה כפולה של ממברנה, המשחק תפקיד משמעותי בהתפתחות ותפקודו התקין של האורגניזם. המיטוכונדריון מעורב בהומיאוסטאזיס התאי בהפקת אנרגיה, ביפור סיזן תוך תאי ואפופטוזיס. בנוסף הוא משתתף במטאבוליזם של פחמימות, חומצות אמינו, שומנים, נוקלאוטידים וכולסטרול (6, 9).

מאפיין ייחודי למיטוכונדריה הוא קיום גנום מיטוכונדריאלי (mtDNA) המופרד מהגנום הגרעיני. החומר הגנטי מורכב מ 16,569 בסיסים המסודרים בcircular double strand, ואילו מקודדים למרכיבים החיוניים למערכת הנשימה המיטוכונדריאלית. התפקוד התקין של מערכת הנשימה המיטוכונדריאלית דורש גנים המקודדים הן בגנום המיטוכונדריאלי והן בגנום הגרעיני (7).

עקב תפקידה, למיטוכונדריה תפקיד מרכזי ברקמות צורכות אנרגיה כגון מוח ושריר. בתא ביצית (oocyte) קיימים עד 100,000 עותקים של מיטוכונדריה, לעומת הספרמטוזואה המכילה כ 16 עותקים של מיטוכונדריה המושמדים לאחר ההפריה. עובדה זו היא הגורם לכך שהמיטוכונדריה האימהית מהווה את מקור התורשה המיטוכונדריאלית לעובר (10).

לגנום המיטוכונדריאלי מספר מאפיינים השונים מהגנום הגרעיני: 1. תורשה אימהית 2. שוני ברצף בין ה-DNA ל-mtDNA הגרעיני. 3. שיעור מוטציות גבוה פי 10-5 מזה של ה nuclear DNA. זאת משום שה-DNA המיטוכונדריאלי אינו קשור בהיסטונים וקיים בו ריכוז גבוה של reactive oxygen species - הגורם עם הגיל להצטברות מוטציות רבות יותר ב mtDNA מאשר ב-DNA הגרעיני. מוטציה הקיימת בכל המיטוכונדריה בתא נקראת מוטציה הומופלזמית. אם חלק מהמיטוכונדריות מכילות DNA פגום והשאר מכילות wild type DNA, המוטציה מכונה הטרופלזמית. הפנוטיפ הסופי והתבטאות המחלה תלויים בגן המושפע, סוג המוטציה, תלות האיבר הפגוע בצריכת אנרגיה, ובמוטציות הטרופלזמיות ביחס המוטציות ל wild type (7, 11). מאפיין כמעט ייחודי למות, הוא הסתמכותו המוחלטת על גליקוליזה ופוספורילציה חמצונית לייצור ATP, ולכן פתולוגיות מיטוכונדריאליות יהיו בעלות השפעה רבה בתחומים נוירולוגיים ופסיכיאטריים (7, 12).

להלן דוגמאות למספר מחקרים שבוצעו בשנים האחרונות ותומכים בהשערה אודות מעורבות החומר התורשתי המיטוכונדריאלי באטיולוגיה של הפרעות פסיכוטיות כגון סכיזופרניה ומחלות ביפולאריות:

• Rollins et al (6,13) ביצעו ניתוח וריאנטים שונים של רצפי mtDNA בדגימות מוח של חולים

במחלת הסכיזופרניה ובמחלות סכיזואפקטיביות ($N=77$) ובקבוצות בקרה זהות גיל. תוצאת

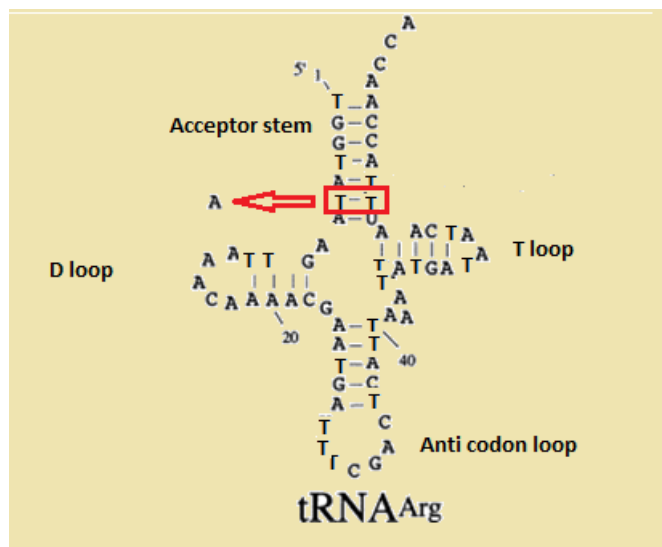
המחקר העיקרית היתה שינוי רב יותר של רצף ה mtDNA בחולי סכיזופרניה בהשוואה לקבוצת הביקורת.

- Ueno et al (14) ניתחו תוצאות ריצוף mtDNA של 93 חולי סכיזופרניה מיפן ומצאו שלושה
- non-synonymous homoplasmic variants הנמצאים ב MTATP6, גן המעורב בייצור ATP - שלא נראו בקבוצת הביקורת. הם גם זיהו שלושה וריאנטים הטרופלזמים חדשים.
- Munakata et al [2007] (4): במחקר שנערך רוצף כל הגנום המיטוכונדריאלי מתאי דם לבנים שנלקחו ממשפחה עם הפרעות כגון מחלות ביפולריות, דיכאון מגיורי, נטייה להתאבדות והפרעות פסיכוטיות אחרות. בהשוואה עם רצף mtDNA אנושי מוכר, נמצאו 34 החלפות בסיסים. 32 מתוכם מוכרים כשינויים פולימורפיים ושני ממצאים חדשים: m.3394T>C, m.9115A>G.
- Kato et al [2000] (15): באמצעות ריאקצית RFLP-PCR נבדק האתר הפולימורפי 5178 A/C ב DNA המיטוכונדריאלי אצל 145 נבדקים בעלי מחלה בי-פולרית, ובקבוצת ביקורת שכללה 184 נבדקים. שיעור המוטציה בקבוצת הנבדקים החולים היה 64.8% ($p < 0.05$) לעומת קבוצת הביקורת (53.2%). המוטציה נמצאה יותר בחולים עם הפרעה ביפולארית מסוג II (75.6%). התוצאות הציעו כי פולימורפיזם בנקודה 5178 ב mtDNA מתבטא ברגישות מוגברת למחלות ביפולאריות עקב שינויי באנרגיה המטאבולית המוחית (16).

בעבודה קודמת של המעבדה לפסיכיאטריה ביולוגית ב"הדסה" משנת 2010, שבוצעה באוכלוסייה קטנה וסגורה בעלת הומוגניות גנטית. רוצף הגנום המיטוכונדריאלי של נבדק אחד בשלמותו, אשר על פי ההיסטוריה המשפחתית שלו עלה חשד לקיום מחלה בתורשה מיטוכונדריאלית (ראו תרשים א'). בהורשה מיטוכונדריאלית ניתן לצפות שאם חולה תעביר לילדיה את המחלה, זכרים ונקבות כאחד (בניגוד להורשה על כרומוזום X – אז הבנים חולים כולם, ואילו הבנות צפויות להיות לפחות בחלקן בריאות). כפי שגם נצפה במשפחה זו, האב הבריא אינו גורם משפיע על התחלואה, מאחר והמיטוכונדריון החולה מתקבל מהאם. נבדק זה נבחר מכיוון שהתחלואה אצלו היתה הקשה ביותר בהשוואה לאחיו (ולאמו).

בעבודה נמצאו 4 מוטציות חדשות, ולאחר השוואה עם rCRS (revised Cambridge Reference Sequence) וסינון של וריאנטים ידועים שנמצאו בעבר, נשארו שני ממצאים חדשים:

1. T10410A - מוטציה הומופלזמית (מלאה) המצוייה באתר המקודד ל tRNA של החומצה האמינית ארגינין בזרוע המקבלת (acceptor stem):בגן זה מוכר פולימורפיזם בנקודה 10410 בו מוחלף הנוקליאוטיד T עם C. בעבר נערכו מספר מחקרים במטרה למצוא משמעות קלינית לפולימורפיזם זה. במחקר שבוצע בשנת 1994 נבדק הקשר בין מחלת אלפר למוטציה הקיימת, אך לא הוכח קשר מובהק (17). במחקר אחר ב 2008 נבדק הקשר בין החלפת הנוקליאוטיד T ל C לדפורמציה של האמיגדלה (10410T>c) – אך לא נמצא קשר ישיר (18). לעומת זאת באתר הסמוך – 10406, נתגלתה מוטציה בה הוחלף הנוקליאוטיד G בבסיס A, שהראה קשר למחלה מיטוכונדריאלית אצל ילד בן 6 עם חולשת שריר והפרעות רגשיות שאובחנו כתסמונת אספרגר (19). לכן, למרות שהמוטציה T10410C מהווה פולימורפיזם שאינו קשור בסימפטומטים, הרי שהחלפה של קשר T ב A יוצרת קישור שעלול לפגוע במבנה המרחבי של ה tRNA בצורה שתשנה את התפקוד התקין של המולקולה.



על פי מודל Watson Crick בין כל שני בסיסים קיימים 2 או 3 קשרי מימן, היוצרים את "מבנה הסולם" המשמעותי ליצירת מולקולת ה RNA. בתרשים מסומנת באדום מוטציה שאינה מאפשרת קישור תקין בין בסיסים, העלולה להביא לשינויים בתפקוד המולקולה ולביטויים קליניים של מחלה מיטוכונדריאלית (19).

2. A10995C - מוטציה הטרופלסמית באתר ND4 – הגן המקודד לקומפלקס הנשימה התאית I, או בשמו התפקודי NADH הידרוגנאז. השינוי שנגרם כתוצאה ממוטציה זו הוא החלפת החומצה האמינית מס' 79 מאלאנין לגלוטמאט.

קיים ספקטרום רחב של מחלות הקשורות לתהליך הנשימה התאית. מחקרים בעבר הראו כי פעילות יתר של קומפלקס 1 נראתה באסוציאציה להפרעות פסיכוטיות שונות (20). המחלות לרוב משפיעות על תאים בעלי צריכת אנרגיה גבוהה דוגמת תאי שריר ומוח (21). לדוגמא, מוטציה הטרופלזמית של החלפת נוקלאוטיד במיקום 340 בגן זה גורמת למחלת Leber hereditary optic neuropathy המאופיינת על ידי אובדן ראייה מרכזי בילטרלי (22). בנוסף, מוטציות שונות ב-ND4 מוכרות כגורמות ל-MELAS, ובמחקר פוסט-מורטם אחד נמצאו במוח חולה בסכיזופרניה (23). לא תוארה בעבר מוטציה באתר הקרוב ל-10995.

בבדיקת המשך של ממצאים אילו שנערכה בעבר, התברר כי שאר האחאים והאם מאותה משפחה נושאים אף הם את שתי המוטציות הנ"ל, כפי שצפוי בהורשה מיטוכונדראלית.

מטרות המחקר:

בדיקת הקשר בין המצאות המוטציות המיטוכונדראליות T10410A ו-A10995C לבין אבחנה של מחלות פסיכוטיות באוכלוסייה הומוגנית ומבודדת מבחינה גנטית, מכפר המוצא של המשפחה בה נמצאו המוטציות.

השערת המחקר:

1. במטופלים הסובלים מהפרעות פסיכוטיות באוכלוסייה מבודדת זו, תמצא שכיחות גבוהה של אחת המוטציות, ההנחה היא שמבין השתיים מדובר במוטציה ההטרופלסמית A10995C. הנחה זו מתבססת על מחקרים קודמים שבוצעו בתחום (4,6,7), ועל ההנחה שמוטציה מסוג זה יכולה להסביר הופעה של הפרעה פסיכיאטרית ללא סימנים נוספים של מחלה מיטוכונדראלית.
2. השערה חלופית היא כי המוטציות הן ייחודיות למשפחה הספציפית.

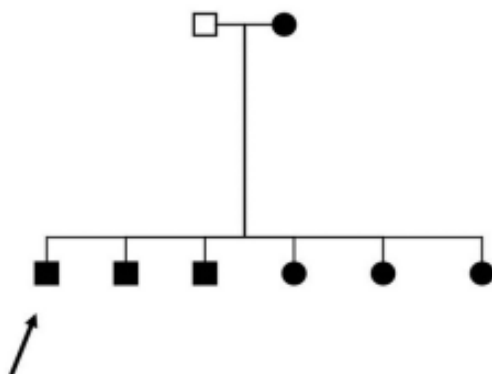
1. חומרים ושיטות

אוכלוסייה

מאפיינים

אוכלוסיית המחקר נאספה בכפר מוסלמי אחד בישראל. על פי מסורת שבעל פה (שאושרה ע"י מחקר הפלוטיפים על כרומוזום Y בקרב האוכלוסייה הזו (24)) מקורה של אוכלוסיית הכפר באב אחד וארבעת בניו (ממוצא קווקז) שחיו לפני 250 שנים. עד לאחרונה, צאצאי הכפר העדיפו נישואים בתוך קהילתם. באוכלוסייה המדוברת ישנה שכיחות גבוהה של תסמונות גנטיות ומוטציות של הפרעות שכיחות. לא ידועה ההיארעות המדוייקת של תחלואה פסיכיאטרית בכפר, אך על פי משרד הבריאות בישראל, 71 חולים אושפזו בין השנים 1948 ל 2000. מספרים אלה (1.4%) שווים לשיעור באוכלוסייה הכפרית היהודית באיזור, ונמוכים מהשיעור באוכלוסייה הכללית בישראל באותה תקופה (2.3%). יתכן כי חוסר תיעוד של תחלואה פסיכיאטרית גבוהה היא הסיבה לכך שלא נרשמה תחלואה מוגברת באוכלוסייה זו. למרות זאת, המקרים המתועדים והעובדה שמדובר באוכלוסייה מבודדת גנטית הופכים אותה למתאימה למחקר. מחקר קודם של המעבדה מצא אסוציאציה בין איזורים גנטיים שונים לבין הפרעות פסיכוטיות בכפר (24). המשפחה הספציפית המשמשת כמשפחת אינדקס נבחרה על בסיס החשד לתורשה מיטוכונדראלית של מחלה אפקטיבית. המשפחה מכילה 7 בני משפחה (אם וכל ששת ילדיה) אשר בכולם קיים ביטוי של הפרעה אפקטיבית פסיכוטית (מחלה ביפולרית, הפרעה סכיזואפקטיבית) או דיכאון. הנבדק בעבודה הקודמת נבחר מאחר והתחלואה אצלו היתה הקשה ביותר.

תרשים א' – עץ משפחתי של הנבדקים החשודים במחלה מיטוכונדראלית:



בחירת הנבדקים

למחקר גויסו 94 נבדקים, מתוכם 52 חולים הסובלים מהפרעות פסיכיאטריות מגוורות, רובן הפרעות פסיכוטיות, ועוד 42 נבדקים בריאים הקרובים לחולים קרבה מדרגה ראשונה. לאלה נוספו 19 נבדקים בריאים ללא הפרעה פסיכיאטרית או קרבה מדרגה ראשונה לחולים. נעשה מאמץ לאתר את כל החולים במחלה פסיכיאטרית קשה בכפר דרך מרפאות ומחלקות שמטפלות באוכלוסייה זו. הנבדקים החולים עברו בדיקה על ידי ראיון חצי מובנה SADS-L המקובל לבדיקת הפרעות פסיכיאטריות בהקשר גנטי (25), והתקבלה הרשאה לעבור על מסמכיהם ותייעוד מחלתם. אבחנה בוצעה בעזרת שתי שיטות אבחון: הקריטריונים המופיעים ב DSM-IV (המדריך הסטטיסטי והאבחוני של איגוד הפסיכיאטרים האמריקאי, מהדורה 4) (26) וה RDC (27), זאת על ידי שני קלינאים מנוסים בתחום בריאות הנפש.

הכנת ה-DNA ועיבוד הגנוטיפים

באמצעות שיטות סטנדרטיות (Phenol-chloroform) מוצה DNA מתאי דם לבנים, הכולל גנום גרעיני ומיטוכונדריאלי.

T10410A (המוטציה ההומופלסמית)

על מנת לבצע הגברה באמצעות PCR תוכננו זוג פריימרים באמצעות התכנה primer3 (ראו רצפי פריימרים בטבלה מס' 1) (28). תוצרי ההגברה הורצו בגיל agarose (Sigma, ארה"ב) 2% עם אתידיום ברומיד ונצפו במנורת UV על מנת לוודא חיתוכם באתר המתאים. בהמשך נשלחו התוצרים לריצוף באמצעות ABI Automated DNA Analyzer 3700 (ABII, ארה"ב) במרכז לטכנולוגיות גנומיות, בפקולטה למדעי החיים של האוני' העברית בגבעת רם בירושלים. הרצף פוענח באמצעות תוכנת 5 Sequencher והשוואה בוצעה בתוכנה זו מול רצף היחס של קיימברידג' - rCRS (revised Cambridge Reference Sequence) בגירסתו המעודכנת (29).

A10995C (המוטציה ההטרופלזמית)

מקטעי ה DNA המכילים את המוטציה ההטרופלזמית עברו הגברה באמצעות PCR. תוצר ה- PCR כ) 300-500 בסיסים) – הודגר עם אנזים הרסטריקציה Cac8 I (BioLabs, ארה"ב), החותכים באתרים

פולימורפיזם ידועים בשיטת ה-RFLP או Restriction Fragment Length Polymorphisms. המוטציה מוגדרת ע"י חיתוך או אי-חיתוך בצירופי SNPs ברחבי האיזור המקודד של ה-mtDNA (30). טרם ביצוע העבודה כוילה מערכת ה-RFLP מנת לאשר את תקינות והתאמת אנזים הרסטרקציה לאתרים הפולימורפים.

במקטע בעל 500 בסיסים המכיל את המוטציה A10995C קיימים שני אתרי רסטרקציה של האנזים Cac8 I כאשר אחד מהם עובר בעמדת המוטציה. ברצף שאינו מכיל את המוטציה היה חיתוך מלא של שני האתרים והתקבלו שלושה מקטעים בגדלים 143bp, 198bp ו 159bp. ברצף שבו קיימת המוטציה אתר הרסטרקציה הראשון לא נחתך וקיבלנו שני מקטעים בגודל 143bp ו 357bp.

המקטעים - תוצרי הרסטרקציה - הורצו בגיל agarose (Sigma, ארה"ב) 2% עם אתידיום ברומיד, ותוצאות ההרצה באלקטרופורזה נצפו בצילום מנורת UV. לפי גודל המקטע ניתן להעריך אם האנזים חתך באתר הידוע או לא.

(טבלה מספר 1) : רצפי הפריימרים ל-PCR

רצף הפריימרים (F קדימה, R אחורה)	
primer_F: TTAATTTTAATAATCAACACCCTCCT primer_R: GGCATAGTAGGGAGGATATGAGGT	T10410A
primer_F: ACAACCACCCACAGCCTAAT primer_R: TTGTTGGCTCAGGAGTTTGA	A10995C

שיטות סטטיסטיות:

טרם קבלת התוצאות נקבע כי ניתוח התוצאות יתבצע באמצעות מבחן χ^2 או מבחן פישר (שהינו מדויק למדגמים בעלי מספרים קטנים). הערכת עצמת המחקר נעשתה על סמך ההבדל הצפוי בשכיחות המוטציה בין חולים לבריאים. מחקרים קודמים מראים כי שכיחות SNPs שונים בהפרעות פסיכוטיות נראתה

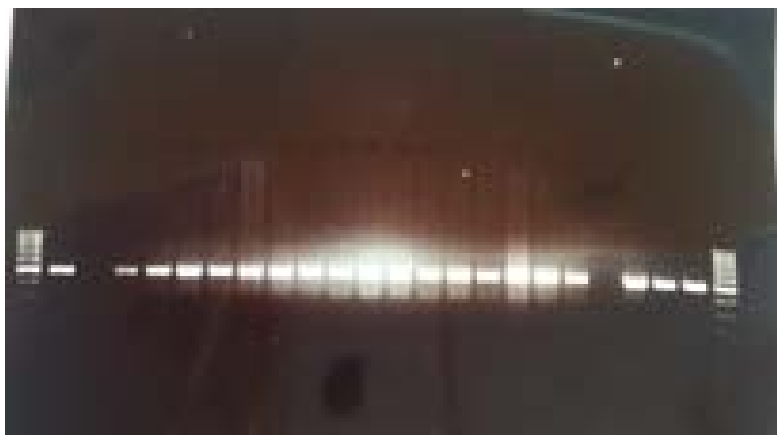
בממוצע עד ל 60-70% נבדקים שונים. על מנת שההבדל בין הקבוצות יהיה מובהק סטטיסטית עם עצמה של 80%, היה צורך ב 52 נבדקים חולים כאשר 61% יהיו נשאי המוטציה, ו 61 בריאים עם 37% בעלי המוטציה ($p \leq 0.05$).

תוצאות

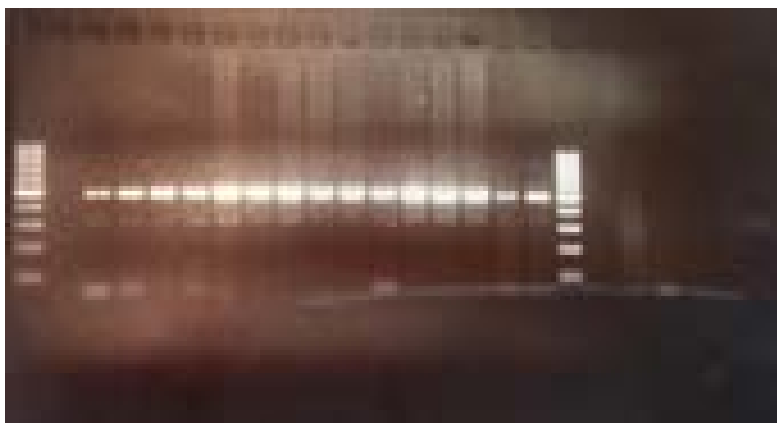
T10410A (מוטציה הומופלסמית)

תוצאות ריאקציית PCR מקדימה ל sequencing מודגמות בלוחות 1 ו 2 :

(לוח 1)



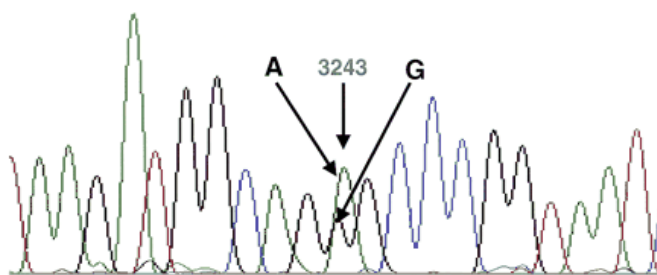
(לוח 2)



הסולם בשני צידי התמונה מייצג מקטעים בני 100, 200, 300 bp וכן הלאה. המקטעים שהוגברו נראים כפס מואר בודד בטור. בלוח 1 ו 2 ניתן לראות פסים אחידים באורך כ 500 bp המייצגים את הסגמנטים הזחים המכילים את המוטציה ההומופלסמית.

5748_47-om-538502-M27	GCCACTAATAATTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_57-om-543500-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_33-om-531500-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_22-om-527500-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_46-om-537500-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_42-om-534501-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_52-om-541500-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_44-om-536500-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_23-om-528500-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
example - Copy - Copy (3)	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_35-om-532500-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_43-om-534510-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_40-om-533501-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_19-om-529500-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_38-om-533401-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_41-om-534500-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_34-om-532400-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_31-om-530500-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_45-om-536500-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_04-om-40504-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_17-om-525501-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_16-om-520400-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_50-om-538000-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_51-om-540401-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_53-om-541501-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_13-om-523505-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_26-om-528503-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_39-om-54110-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_54-om-541500-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_27-om-528504-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_30-om-530401-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
5748_28-om-529500-M27	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																										
57 frag bases selected at consensus position 10,437	<table border="1"> <tr> <td>10340</td> <td>10350</td> <td>10360</td> <td>10370</td> <td>10380</td> <td>10390</td> <td>10400</td> <td>10410</td> <td>10420</td> <td>10430</td> <td>10440</td> <td>10450</td> <td>10460</td> </tr> <tr> <td>GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	10340	10350	10360	10370	10380	10390	10400	10410	10420	10430	10440	10450	10460	GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT												
10340	10350	10360	10370	10380	10390	10400	10410	10420	10430	10440	10450	10460															
GCCACTAATAAGTTATGTCATCCCTCTTAATTAATCATCATCCTAGCCCTAAGTCTGGCCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGITTTAAACAAAACGAATGATTTCGACT																											

לוח 3 מוצגים הרצפים סביב איזור המוטציה ההומופלזמית - T10410A, לאחר ביצוע הריצוף. המוטציה שנמצאה בעבודה הקודמת נמצאת בתוך מקטע ה example (מודגשת בצבע) ומסומנת באות A בעוד ששאר המקטעים מקורם בדגימות אחרות. דגימות ללא מוטציות מראות את הבסיס T.

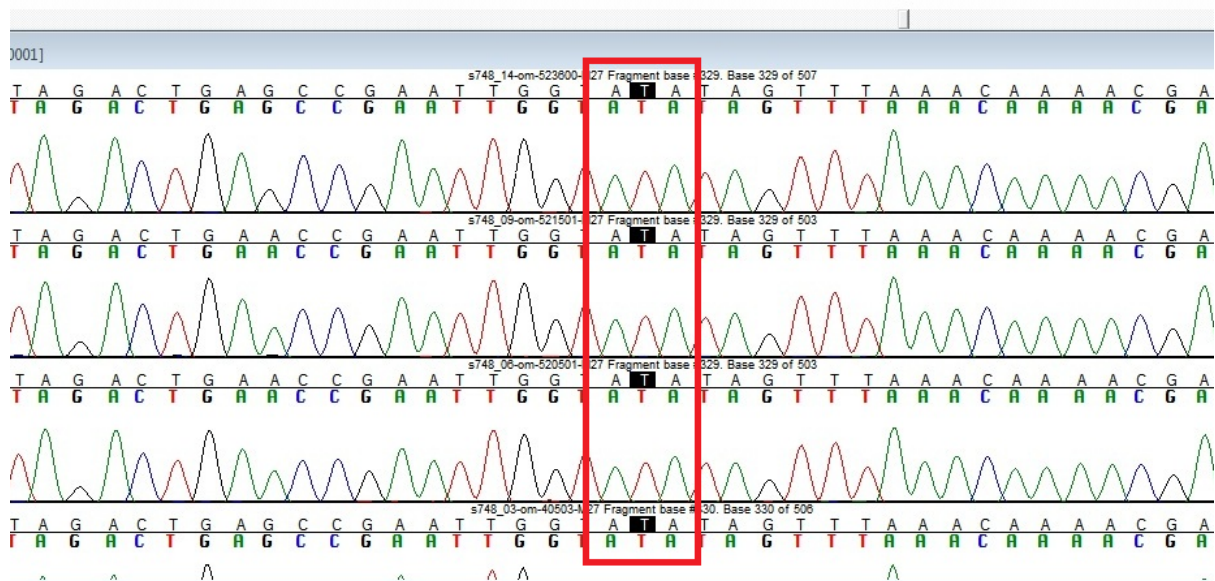


לוח 4 הינו דוגמא המובאת מהספרות לכרומוטוגרמה המציגה מוטציה הטרופלזמית. כל צבע מייצג נוקלאוטיד אחר וכאשר קיימות תוצאות רבות עם נוקלאוטיד יחיד יתבטא הדבר כקו בודד. כאשר קיימים במקביל שני (ואף יותר) נוקלאוטידים שונים במיקום זהה (SNP's) ניתן לראות שני קווים אשר גובהם נקבע על פי כמות הנוקלאוטידים אותם הם מייצגים. בדוגמא הנ"ל נראה כי במיקום 3243 נמצאת כמות

גדולה של דגימות עם הנוקלאוטיד A, וכמות מועטה יותר של דגימות עם הנוקלאוטיד G. כאשר קיים קו בודד בצבע יחיד הדבר מצביע על קיום מוטציה הומופלואמית בה כל הדגימות מכילות את אותה המוטציה, או דגימות המכילות את הנוקלאוטיד מרצף ה wild type.

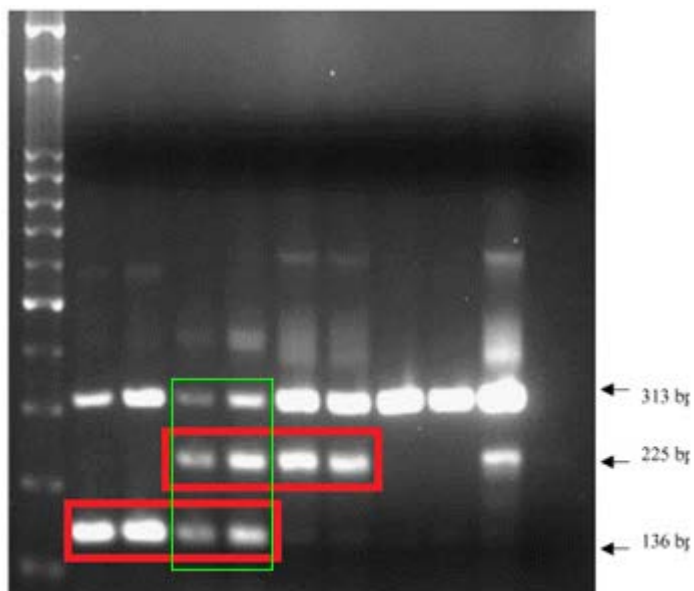
(לוח 5)

```
.GCTGGCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGTTTAAACAAAACGAATGATTTCGACTCATTAAATTATGATAATCATA1
.GCTGGCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAGCCGAATTGGTAATAGTTTAAACAAAACGAATGATTTCGACTCATTAAATTATGATAATCATA1
.GCTGGCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGTTTAAACAAAACGAATGATTTCGACTCATTAAATTATGATAATCATA1
.GCTGGCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGTTTAAACAAAACGAATGATTTCGACTCATTAAATTATGATAATCATA1
370      10380      10390      10400      10410      10420      10430      10440      10450      10460      10470
.GCTGGCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTAATAGTTTAAACAAAACGAATGATTTCGACTCATTAAATTATGATAATCATA1
```



לוח 5 מדגים את תוצאות הריצוף T10410A בכרומוסומוגרמה. קיום קו אחד מעיד על כך שלא נמצאו SNP's באתר זה.

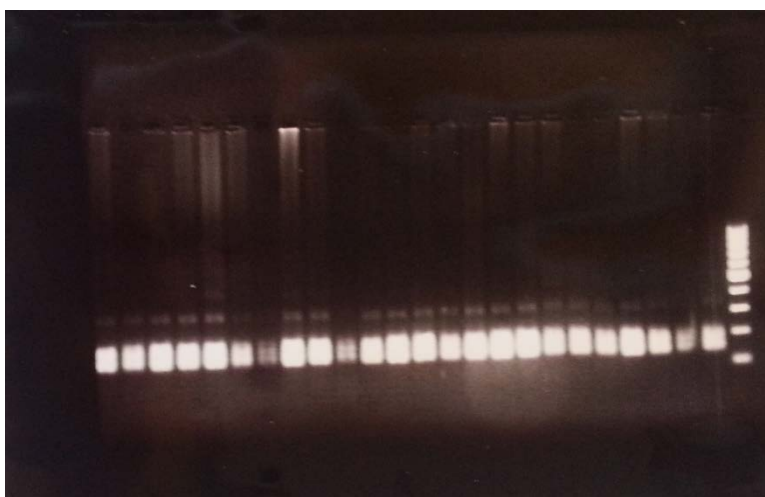
בסה"כ בבדיקה הכוללת נמצאו 7 דגימות בהן הנוקלאוטיד T התחלף ל A - כולן שייכות למשפחת הנבדק הראשון. בכל שאר קבוצות הנבדקים נמצא הנוקלאוטיד T ולכן ניתן לראות אמפליטודה בודדה בצבע יחיד. אם היינו מוצאים קיום כמות משמעותית של נוקלאוטיד A בקבוצות הבדיקה השונות (מוטציה הטרופלסמית), הרי שהיינו רואים גם קו ירוק בגובה המתאים לכמות היחסית של המוטציה בתאים הנבדקים.



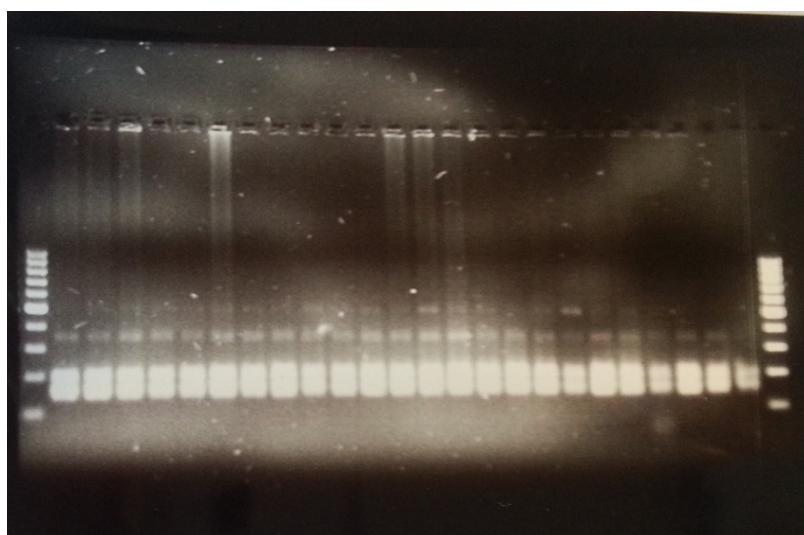
בלוח 6 מובאת דוגמא מהספרות לדרך הצגת תוצרי ריאקציית RFLP לאחר חיתוך אנזימים. השונות במיקום הפסים הבהירים מעידה כי בחלק מהדגימות קיימת מוטציה הנותנת מקטעים באורך 136 ו 225 בסיסים (מלבנים אדומים) לעומת המצב התקין בו קיימים מקטעים בעלי 313 בסיסים. ייצוג פרטים עם 313, 225 ו 136 לעומת 313 ו 225 מצביע על מצב של הטרופלזמיה (במלבן הירוק).

בניסוי מקדים שנערך על מנת לכייל את מערכת ה RFLP, הורצו אנזימי הרסטרקציה על דגימות ידועות לקיום המוטציה בהשוואה לדגימות ביקורת שלא כללו מוטציה (הדגימות אינן מובאות כאן).

(לוח 7)



(לוח 8)



לוחות 7 ו- 8 מציגים חלק מתוצרי ריאקציית RFLP שנערכו לאיתור המוטציה A10995C. כל טור מדגים DNA מוגבר של נבדק אחד. הפסים הלבנים מהווים את המקטעים שנוצרו לאחר אנזימי הרסטרקציה. הסולם מייצג מקטעים בני 100, 200, 300 בסיסים כל אחד, וכן הלאה. האנזימים חתכו בנקודה יחידה אצל בעלי המוטציה ההטרופולזמית ויצרו מקטעים בגדלים שונים.

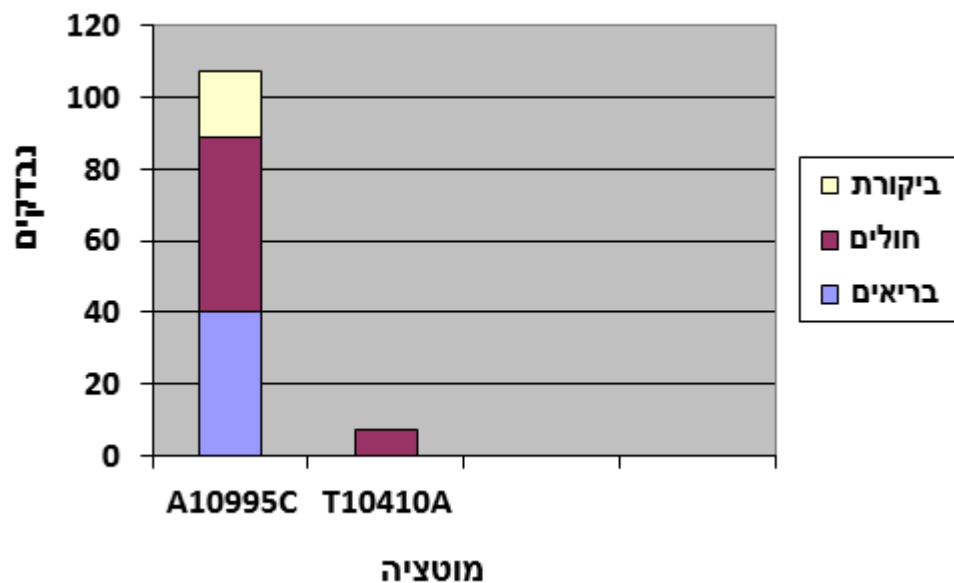
בלוחות 7 ו- 8 רואים תוצרים בגודל של כ- 200 bp ו- 150bp. הראשון מייצג את מקטע ה- 198bp האחרון מייצג תערובת של מקטעים גדלים 143bp ו- 159bp. שני בנדים אלה מעידים על עותקים של דני"א מיטוכונדריאלי שעברו חיתוך מלא.

בכל הנבדקים מופיע בנד נוסף קצת יותר חלש בגודל של 350bp- המייצג את מקטע ה357bp. בנד זה מעיד על קיום כמות קטנה יותר של עותקי דנ"א מיטוכנדיאלי שבהם הייתה המוטציה עם חיתוך אנזימטי אחד בלבד וקבלת מקטע ארוך יותר.

למעשה ניתן לראות שלכל הנבדקים הייתה תערובת של שני סוגי הרצפים – עם מוטציה ובלעדיה: מה שמצביע כי כל הפרטים נושאים את המוטציה ההטרופלזמית הזו.

יש לציין כי בחלק מהדוגמאות קיים מקטע חלש מאוד בגודל של כ 500bp. מקטע זה מייצג כמות קטנה של תוצאות ה PCR שלא הספיקה להגיב עם האנזים. זוהי תופעה אופיינית ומתרחשת הרבה פעמים בריאקציית RFLP.

גרף מספר 1



בגרף זה מתוארות תוצאות הניסוי.

- המוטציה A10995C (הטרופלזמית): על פי התוצאות, 100% מהפרטים – חולים, בריאים ונבדקי הביקורת היו בעלי המוטציה ההטרופלזמית שנבדקה.
- המוטציה T10410A (הומופלזמית): בקבוצת הבריאים ובקבוצת הביקורת לא נראתה המוטציה ההומופלזמית. בקבוצת החולים נראו 7 חולים עם המוטציה ההומופלזמית, כולם שייכים למשפחת המקור.

ניתוח סטטיסטי

טרם ביצוע העבודה הוחלט להשתמש במבחן χ^2 או מבחן פישר. לאחר קבלת התוצאות התברר כי לא ניתן להריץ את המבחנים הנ"ל לאור חוסר ההתפלגות בקיום המוטציות. מאחר ואין מבחן סטטיסטי המתאים לסיטואציה, המסקנות כלדלקלן:

- המוטציה T10410A: היות והמוטציה לא נמצאה בכל קבוצות המחקר, אפשר להסיק כי היא אינה קשורה למחלה באוכלוסית הכפר ובאוכלוסיה הכללית. יתכן ובקבוצות גדולות היינו מוצאים היארעות של המוטציה T10410A והיו נמצאים הבדלים קטנים בין קבוצות שונות. סביר להניח שגם במצב כזה שכיחות המוטציה היתה כה נדירה, שלא היינו מוצאים עדות למובהקות סטטיסטית המוכיחה קשר למחלה. אפשרות נוספת העולה מתוצאות אלו היא כי המוטציה T10410A, בשילוב עם גורמים נוספים היחודיים למשפחת הנבדק, מהווה פרה-דיספוזיציה להפרעות פסיכוטיות רק במשפחה זו.

- מוטציה A10995C: היות והמוטציה נמצאה בכל קבוצות המחקר, אפשר להסיק כי היא אינה קשורה למחלה. יתכן ובקבוצות גדולות בהרבה היו נצפים הבדלים קטנים בין הקבוצות, אולם היות שנראה כי השכיחות כל כך נפוצה, ספק אם היתה חשיבות לאחת המוטציות הללו כמוטציה המהווה סמן למחלה.

דין

A10995C (מוטציה הטרופלזמית)

התוצאות מדגימות את קיום המוטציה A10995C (ההטרופלזמית) בכל הנבדקים, ללא אבחנה בין קבוצות הביקורת, החולים או הבריאים. תוצאות אלו למעשה שוללות את הקשר בין המוטציה ההטרופלזמית ב mtDNA לבין קיומן של הפרעות פסיכוטיות, וזאת בניגוד להשערת המחקר הראשונית אשר התבססה על פי מחקרים קודמים כי קיים קשר בין מוטציות הטרופלזמיות ב DNA מיטוכונדריאלי להפרעות פסיכוטיות. באופן מפתיע, דווקא המוטציה ההומפלסמית מעלה את האפשרות לקשר פוליגנטי (ראו בהמשך). חשוב לציין כי מאחר וה DNA המיטוכונדריאלי שנבדק נלקח אך ורק מתאי הדם הלבנים, ייתכן ודגימת רקמות שונות כגון מוח ושריר היו מניבות תוצאות שונות עם התפלגות מוטציות שונה. יש לציין כי כיום ניתן לבצע ביופסיה נאזאלית עם הרדמה מקומית. בפרוצדורה מהירה ובטוחה זו, הצליחו

להגיע לעצב האולפקטורי ובכך למעשה לספק דגימה ממערכת העצבים המרכזית על מנת לחקור מרקרים אצל חולי סכיזופרניה (31). שימוש בשיטה זו יכול לענות במחקר עתידי על ההסבר המוצע לעיל לחוסר הקשר שנמצא.

T10410A (מוטציה הומופלזמית)

בבחינת התוצאות נראה כי המוטציה ההומופלזמית T10410A לא נראתה בקבוצת החולים או הבריאים, מלבד שבעת הנבדקים השייכים לאותה משפחה. לאור התיאוריה כי מקורן של הפרעות פסיכוטיות הינו שילוב סביבתי ופוליגנטי, בהחלט ייתכן כי קיומה של המוטציה במשפחה היווה גורם אטיולוגי נדיר וייחודי שתורם להתפתחות ההפרעות הפסיכוטיות. במשפחה זו אף ייתכן ומדובר במוטציה מנדלית פשוטה שתורמה לכך.

ניתן לבצע מספר מחקרים על מנת לבסס את ההשערה:

- בדיקת בקרה במשפחת האם על מנת לברר את קיומה של המוטציה בבריאים קרובי משפחה.
- בדיקת קיום המוטציה בחולים קרובי משפחה של האם – כגון נשים הלוקות בהפרעות פסיכוטיות או צאצאיהן.
- מאחר ומחקרים אחרים הוכיחו את חשיבותה של החלפת הנוקלאוטיד T ב C הגורמת למחלות מיטוכונדריאליות עקב החלפת החומצה האמינית (17) ניתן לבצע מחקר המשך הבודק את משמעות החלפת הנוקלאוטיד T ב A והשפעתו של שינוי זה מבחינה התפקוד של tRNA לארגינין.

מגבלות המחקר:

1. לשיטת ה RFLP מספר חסרונות באיתור מוטציה מיטוכונדריאלית הטרופלזמית. בהשוואה לשיטות רדיואקטיביות, אתידיום ברומיד הינו בעל רגישות נמוכה – ולכן כאשר כמות המוטציות הנקודתיות נמוכה מ 10% עלולה להתקבל תשובת false negative. מעבר לכך, קיימת האפשרות שיתבצע חיתוך חלקי על ידי אנזימי הרסטרקציה שיתרום לתת אבחנה של ההטרופלזמיות. בנוסף, חלקים לא ספציפים של PCR עלולים להפריע לדיוק האנאליזה. במידה והיו קיימים אמצעים, ניתן היה להשתמש בשיטת ה qRT-PCR הנחשבת יותר רגישה, לא רדיואקטיבית, ומתבצעת בשלב אחד בלבד ולכן מונעת טעויות שכפול PCR (32).

2. מאחר ויתכן שוני בהתפלגות מיטוכונדריות הנושאות מוטציה הטרופלסמית בין רקמות שונות, לא ניתן לשלול את קיום המוטציה ההומופלסמית אצל הנבדקים ברקמות אחרות כגון מוח ושריר, או התפלגות שונה של כמות הביטוי של המוטציה ההטרופלסמית ברקמות אילו.

סיכום

מחקרים רבים נערכו על מנת לחפש את הגורמים האטיולוגיים להפרעות פסיכוטיות קשות. מרבית ההשערות לגבי האטיולוגיה הגנטית של הפרעות אלו מתמקדות ברצף הגנום הגרעיני, אך בשנים האחרונות החלה מגמה למציאת מנגנונים גנטיים נוספים התורמים למחלה. גישה התופסת תאוצה הנה חקר ה-DNA המיטוכונדריאלי, המורש אימהית, אשר לו השפעה רבה על תכונות ומחלות בבני האדם. חשיבותו וייחודו של DNA המיטוכונדריאלי מעלה את הסברה כי שינויים ברצף ה-mtDNA התקין יכולים לגרום לתסמינים פסיכיאטריים. זאת, בעיקר משום שיצור האנרגיה במיטוכונדריה הינו קריטי לפעילות תקינה של מערכת העצבים המרכזית. קשיים במחקרים גנטיים בפסיכיאטריה נובעים במיוחד מהקושי להגדיר את הפנוטיפ הבסיסי למחלה, ומהטרוגניות האוכלוסייה המביאה לצורך במדגמים גדולים.

המחקר שבוצע הינו מחקר מסוג case control. מטרתו היתה להוכיח קשר מובהק בין מוטציות ב-mitochondrial DNA (mtDNA) ובין המצאות מחלה אפקטיבית או הפרעה פסיכוטית. העבודה מהווה המשך לעבודה משנת 2010, בה נתגלו שתי מוטציות - הטרופלזמית והומופלזמית, ב-mtDNA של נבדק השייך למשפחה בה אם ושישה אחים חולים בהפרעה אפקטיבית מגיורית. המשפחה הינה חלק מאוכלוסייה מבודדת והומוגנית מבחינה גנטית דבר המאפשר התגברות על מגבלות במחקרים גנטיים בהפרעות פסיכיאטריות.

במחקר הנוכחי השתתפו 113 פרטים, 52 חולים ו-42 בריאים עם קבוצת ביקורת שכללה 19 בריאים שאינם קרובי משפחה של החולים. כל אחת מהקבוצות נבדקה לשתי המוטציות. לשם איתור המוטציה ההומופלזמית בוצע שכפול של הדגימות באמצעות PCR ובהמשך ריצוף המקטעים. המוטציה ההטרופלזמית אותרה על ידי שכפול באמצעות PCR ובהמשך חיתוך הדגימות באמצעות RFLP עם הרצה בגיל.

בבדיקת התוצאות נראה כי המוטציה ההטרופלזמית נתגלתה ב-100% מהנבדקים בכל הקבוצות, בעוד כי המוטציה ההומופלזמית לא נראתה באף אחד מהנבדקים בשלוש הקבוצות פרט לחולים במשפחת המוצא. לאור תוצאות אלו נראה כי לא ניתן להוכיח את הקשר בין המוטציה ההטרופלזמית להפרעות פסיכוטיות.

לעומת זאת, קיום המוטציה ההומופלסמית באופן מבודד בכל הפרטים במשפחה מעלה את האפשרות לקשר ספציפי למשפחה זו. חשוב לציין כי הדגימות נלקחו מתאי הדם הלבנים וייתכן כי דגימות מרקמות דוגמת שריר או רקמה עצבית יתנו תוצאות אחרות עם התפלגות מוטציות שונה. בנוסף ניתן לבצע אנאליזה של תפקיד המוטציה ההומופלסמית על מנת לקבוע את השפעתה על תפקוד ה-tRNA.

Abstract

During the last decades many genetic studies were conducted in order to find the etiology of psychotic disorders. Until recently, nuclear genome was the main target of these studies. In recent years researchers have begun to explore different mechanism of those diseases. It was suggested that mitochondrial DNA (mtDNA) has a significant role in psychotic disorders. mtDNA is maternally inherited, and was proven to be associated with psychiatric disorders in the past. The mitochondria produce energy which is responsible for necessary regulatory activity of the central nerve system. Thus it is plausible that minor changes in the normal mtDNA sequence can cause psychotic symptoms.

Difficulties in psychiatric genetic studies derive from the problematic definition of the disease phenotype. Another problem is population heterogeneity which raises the need for large sampling.

This study is a case control study. Its purpose was to verify a statistically significant association between n mtDNA mutations and the presence of affective or psychotic disorder. The research follows a study conducted in 2010 which found heteroplasmic and homoplasmic mtDNA mutations in a family containing a mother and six brothers with major affective disorders. The family is part of a genetically-isolated rural Muslim population from Israel, which was studied in hope overcome the limitations mentioned above.

The sample consisted of 113 individuals: 52 patients affected with major psychiatric disorders, 42 healthy relatives of these patients and 19 healthy controls. Each group was tested for the presence of both mutations.

In order to locate the homoplasmic mutation T10410A, we used PCR for amplification and sent the product for further sequencing. Since this method does not have the same yield with heteroplasmic mutations, for A10995C we used RFLP (restriction fragment length polymorphism) method for the PCR products which separates the fragments according to size.

Results showed the presence of the heteroplasmic mutation A10995C in 100% of the individuals, leading to the conclusion that there is no association between the mutation and the presence of psychotic disorder.

However, results pertaining the homoplasmic mutation T10410A showed the existence of the mutation only in the original family, which suggests that it might be a rare cause of disease, unique to this pedigree.

In order to explore this issue there are several options: since the samples were taken from white blood cells it is possible that different tissues, such as muscle or central nerve system will show a different distribution of the mutation. In addition it is recommended to perform an analysis of the biological function for the t-RNA with the mutation.

1. Jim van Os, MD, PhD, MRCPsych; Manon Hanssen, MA; Rob V. Bijl, MA, PhD; Wilma Vollebergh, MA, PhD Prevalence of Psychotic Disorder and Community Level of Psychotic Symptoms, *Arch Gen Psychiatry*, 2001;58(7):663.
2. Perälä J, Suvisaari J, Saarni SI, Kuoppasalmi K, Isometsä E, Pirkola S, Partonen T, Tuulio-Henriksson A, Hintikka J, Kieseppä T, Härkänen T, Koskinen S, Lönnqvist J, Lifetime prevalence Arch Gen Psychiatry. 2007;64(1):19. of psychotic and bipolar I disorders in a general population, *Arch Gen Psychiatry*. 2007;64(1):19
3. PV Gejman, AR Sanders, and J Duan, The Role of Genetics in the Etiology of Schizophrenia *Psychiatr Clin North Am*. 2010 March ; 33(1): 35–66. doi:10.1016/j.psc.2009.12.003.
4. Fernando Scaglia, The role of mitochondrial dysfunction in psychiatric disease, developmental disabilities, research reviews, 16: 136 – 143 (2010).
5. Shastry BS, SNP alleles in human disease and evolution, *J Hum Genet* (2002), 47:561-566.
6. Rollins B, Martin MV, Sequeira PA, Moon EA, Morgan LZ, et al. (2009) Mitochondrial Variants in Schizophrenia, Bipolar Disorder, and Major Depressive Disorder. *PLoS ONE* 4(3): e4913. doi:10.1371/journal.pone.0004913 Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder.
7. Verge B, Alonso Y, Valero J, Miralles C, Vilella E, Martorell L, Mitochondrial DNA (mtDNA) and schizophrenia, *Eur Psychiatry*. 2011 Jan;26(1):45-56. Epub 2010 Oct 25.
8. Doi N, Hoshi Y, Persistence problem in schizophrenia and mitochondrial DNA, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007 Jan 5;144B(1):1-4.
9. Copeland WC. Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Annu Rev Med* 2008;59:131–46.
10. Peter B. Jones, Peter Buckley, with contributions of David Kessler, *Schizophrenia*, Churchill Livingstone Elsevier , 2006 ISBN 0443 102503
11. Heteroplasmy." *A Dictionary of Biology*. 2004. *Encyclopedia.com*. (April 18, 2012).
12. Jana Hroudová, MPharm* and Zdeněk Fišar, PhD Connectivity between mitochondrial functions and psychiatric disorder spcn_2178 *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2011; 65: 130–141.

13. Bandelt H, Macaulay V, Richards M. Human mitochondrial DNA and the evolution of homo sapiens. In: Gross HJ, editor. *Nucleic acids and molecular biology*, Leipzig, Germany: Springer; 2006. p. 3–5.
14. Ueno H, Nishigaki Y, Kong QP, Fuku N, Kojima S, Iwata N, Ozaki N, Tanaka M, Analysis of mitochondrial DNA variants in Japanese patients with schizophrenia, *Mitochondrion*. 2009 Nov;9(6):385-93. Epub 2009 Jun 27.
15. Kato T, Kunugi H, Nanko S, Kato N, Association of bipolar disorder with the 5178 polymorphism in mitochondrial DNA, *Am J Med Genet*. 2000 Apr 3;96(2):182-6.
16. Kaplan & Sadock's *Synopsis of Psychiatry: Behavioral Sciences/Clinical Psychiatry*, 10th Edition, Lippincott Williams & Wilkins , Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
17. Hayashi J, Ohta S, Kagawa Y, Takai D, Miyabayashi S, et al. Functional and morphological abnormalities of mitochondria in human cells containing mitochondrial DNA with pathogenic point mutations in tRNA genes. *J Biol Chem*. 1994;269:19060–19066
18. Yamasue, H., Kakiuchi, C., Tochigi, M., Inoue, H., Suga, M., Abe, O., Yamada, H., Sasaki, T., Rogers, M. A., Aoki, S., Kato, T. and Kasai, K. (2008), Association between mitochondrial DNA 10398A>G polymorphism and the volume of amygdala. *Genes, Brain and Behavior*, 7: 698–704. doi: 10.1111/j.1601-183X.2008.00408.x
19. Jühling F, Mörl M, Hartmann RK, Sprinzl M, Stadler PF, Pütz J: tRNAdb 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucl. Acids Res*. 2009; 37 (s1); D159-D162.
20. Dror N, Klein E, Karry R, Sheinkman A, Kirsh Z, Mazor M, Tzukerman M, Ben-Shachar D. State-dependent alterations in mitochondrial complex I activity in platelets: a potential peripheral marker for schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2002;7(9):995-1001.
21. Pancrudo J, Shanske S, Coku Jet al.: Mitochondrial myopathy associated with a novel mutation in mtDNA. *Neuromuscul. Disord*. 2007; 17; 651–65
22. Lee JC, Gutell RR (2004). "Diversity of base-pair conformations and their occurrence in rRNA structure and RNA structural motifs". *J. Mol. Biol.* 344 (5): 1225–49.
23. Marchbanks RM, Ryan M, Day IN, Owen M, McGuffin P, Whatley SA: A mitochondrial DNA sequence variant associated with schizophrenia and oxidative stress. *Schizophr Res*. 2003; 65(1); 33-8.
24. Kohn Y, Danilovich E, Filon D et al.: Linkage Disequilibrium in the DTNBP1 (Dysbindin) Gene Region and on Chromosome 1p36 Among Psychotic Patients From

- a Genetic Isolate in Israel: Findings From Identity by Descent Haplotype Sharing Analysis, *Am J Med Genet B* 2004; 128B (1); 65 – 70.
25. Spitzer RL, Endicott J.: Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia-Lifetime Version (SADS-L). New York: New York State Psychiatric Institute, 1978.
 26. American Psychiatric Association.: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edn. (DSM-IV). Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994.
 27. Spitzer RL, Endicott J, Robins E: Research diagnostic criteria: Rationale and reliability. *Arch Gen Psychiatry* 1978; 35; 773–782.
 28. Krawetz S, Misener S (eds): *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press, 1999; p 365-386
 29. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N.: Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 1999; 23(2):147.
 30. Amar S, Shamir A, Ovadia O: Mitochondrial DNA HV lineage increases the susceptibility to schizophrenia among Israeli Arabs; *Schizophrenia Research* 2007; 94; 354–358
 31. Mor E., Kano S., Colantuoni C., Sawa A., Navon R., Shomron N. (2013). MicroRNA-382 expression is elevated in the olfactory neuroepithelium of schizophrenia patients. *Neurobiol. Dis.* 55, 1–10 10.1016/j.nbd.2013.03.011
 32. Ota M, Asamura H, Oki T, Sada M. Restriction enzyme analysis of PCR products. *Methods Mol Biol*. 2009;578:405-14

חתימת המדריכים

חתימת התלמיד

תודות:

תודה רבה לשני המנחים שליוו אותי בעבודה זו: ד"ר יואב כהן, שהנחה ותמך לאורך כל הדרך, ולד"ר עמרי טלטש, שמהרגע הראשון תכנן, לימד ועזר ברגעים הקריטיים. בלעדיהם לא הייתה מתקיימת עבודה זו.