

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Sabina Paracková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Gen SURF1 a Leighův syndrom
Bakalářská práce

2023

Sabina Paracková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Sabina Paracková**
Osobní číslo: **C20364**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Gen SURF1 a Leighův syndrom**
Téma práce anglicky: **Gen SURF1 and Leigh Syndrome**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši o Leighově syndromu a Genu SURF1.
- 2) Definujte téma z hlediska genetického a lékařského.
- 3) Pro vytvoření kompilačního textu využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Lucie Stříbrná, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Bakalářskou práci s názvem „Gen SURF1 a Leighův syndrom“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2023

Sabina Paracková v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Lucii Stříbrné Ph.D. za ochotu, přátelský přístup a cenné rady, které mi poskytovala v průběhu psaní této práce. Také bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu po celou dobu studia.

ANOTACE

Gen SURF1 se nachází na q raménku chromozómu 9 a kóduje tvorbu proteinu Surf1. Tento protein hraje významnou roli v oxidativní fosforylaci. Oxidativní fosforylace je proces, kterým organismy přeměňují energii z potravy do formy, kterou jejich buňky dokáží využít. Protein Surf1 se nachází na vnitřní membráně mitochondrií v eukaryotních buňkách. Mutace genu SURF1 vedou k různým onemocněním spojených s poruchou produkce mitochondriální energie, např. k Charcot-Marie-Toothově chorobě. Mutace genu SURF1 může být i jednou z příčin vzniku Leighova syndromu. Tento syndrom je poměrně vzácným neurodegenerativním onemocněním s heterogenními genetickými i klinickými příznaky. Jeho heterogenita je způsobena různými možnostmi genetického přenosu i faktem, že se s ním pojí více než 75 jaderných genů. V současnosti je u postižených pacientů pozorováno vícero příznaků, a proto neustále probíhají studie se záměrem zlepšení diagnostiky i léčby. Léčba spočívá pouze v tlumení jednotlivých příznaků onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA

Gen SURF1, protein Surf1, Charcot-Marie-Toothova choroba typu 4, Leighův syndrom, Leigh-like syndrom

TITLE

Gene SURF1 and Leigh Syndrome

ANNOTATION

The SURF1 gene is located on the q arm of chromosome 9 and codes for the production of the Surf1 protein. This protein plays an important role in oxidative phosphorylation. Oxidative phosphorylation is the process by which organisms convert energy from food into a form that its cells can use. Surf1 protein is located on the inner membrane of mitochondria in eukaryotic cells. Mutations in the SURF1 gene lead to various diseases associated with impaired mitochondrial energy production, e.g. Charcot-Marie-Tooth disease. A mutation of the SURF1 gene can also be one of the causes of Leigh syndrome. This syndrome is a relatively rare neurodegenerative disease with heterogeneous genetic and clinical symptoms. Its heterogeneity is caused by different possibilities of genetic transmission and the fact that more than 75 nuclear genes are associated with it. Currently, several symptoms are observed in affected patients, which is why studies are constantly being conducted with the aim of improving diagnosis and treatment. The treatment consists only in suppressing the individual symptoms of the disease.

KEYWORDS

SURF1 Gene, Surf1 Protein, Charcot-Marie-Tooth Disease Type 4, Leigh Syndrome, Leigh-like Syndrome

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	12
TERMINOLOGIE.....	14
ÚVOD.....	16
1 GEN SURF1	18
1.1 Struktura genu	18
1.1.1 Chromozóm 9	18
1.1.1.1 Filadelfský chromozóm	18
1.1.1.2 Kleeftstra syndrom	19
1.2 Fyziologická funkce.....	20
1.2.1 Protein Surf1	20
1.2.2 Nejnovější model pro zkoumání role proteinu Surf1 v biogenezi COX.....	20
1.3 Klonování genu SURF1	21
1.3.1 Vývoj vytvoření zvířecího modelu	21
1.3.2 Velký zvířecí model.....	22
1.3.2.1 TALEN – efekторы podobné transkripčnímu aktivátoru nukleáz	23
1.3.2.2 CRISPR/Cas9	23
1.4 Interakce SURF1 genu.....	23
2 DETEKCE GENU SURF1 POMOCÍ KOLORIMETRICKÉHO BIOSENZORU .25	
2.1 Reagencie a přístroje.....	25
2.2 Příprava transparentní 96 jamkové destičky	25
2.3 Práce s kolorimetrickým biosenzorem	26
2.4 Význam detekce SURF1 pro časnou diagnostiku	27
2.5 Kolorimetrický biosenzor a detekce genu SURF1	27
3 PODMIŇUJÍCÍ CHOROBY A SYNDROMY GENU SURF1.....	29
3.1 Charcot-Marie-Toothova choroba typu 4.....	29
3.1.1 Charcot-Marie-Toothova choroba typu 4K	29

3.2	Diabetes mellitus typu II.....	31
3.3	Léčba pomocí IGF-1	31
3.4	Genová terapie pomocí TSHA-104.....	32
4	LEIGHŮV SYNDROM.....	34
4.1	Mitochondrie	34
4.2	Příčiny a symptomy Leighova syndromu	35
4.3	X-vázaná recesivní porucha	36
4.3.1	Heteroplazmická mutační zátěž u LS spojeného s mtDNA.....	37
4.4	Typy Leighovy syndromu.....	39
4.4.1	Časný nástup	39
4.4.2	Pozdní nástup.....	41
4.5	Preimplantační genetická diagnostika	42
4.6	Léčba	43
5	LEIGH-LIKE SYNDROM	44
5.1	Leigh-like syndrom s fenotypem způsobeným m.1091T>C v MT-ND3.....	44
5.2	Mutace v TMEM126B	47
6	ZÁVĚR	48
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	50

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 1: Intragenní duplikace genu EHMT1 vedoucí ke Kleefstra syndromu.....	19
Obr. 2: Proces přípravy a detekce pomocí kolorimetrického biosenzoru.....	26
Obr. 3: Absorbanční odezvy fragmentu genu SURF1	28
Obr. 4: Hypersenzitivní léze v obou <i>putamen</i> 42letého probanda s CMT	30
Obr. 5: Histologické vyšetření svalu – porovnání kontrolního vzorku a vzorku probanda s onemocněním CMT.....	30
Obr. 6: Molekulární charakterizace pacienta a matky	37
Obr. 7: Elektroferogramy získané Sangerovým sekvenováním MT-ATP6 s použitím krve pacienta a rodičů	41
Obr. 8: Sekvenční elektroforegramy ukazující substituci na m.9176T>C	42
Obr. 9: Rodokmen pacientky a jejího nevlastního bratra	45
Obr. 10: Svalová biopsie pacienta z pravého musculus quadriceps femoris.....	46
Tab. 1: Detekce fragmentu genu SURF1 v naředěných vzorcích séra pomocí navrhnutého kolorimetrického biosenzoru	28

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AAV 9	adeno-asociovaný vir sérotypu 9 (Adeno Associated Virus 9)
ATP	adenosintrifosfát
CMT4	Charcot-Marie-Toothova choroba (typu 4)
CMT4K	Charcot-Marie-Toothova choroba (typu 4K)
CNS	centrální nervová soustava
COX	cytochrom c oxidáza
CRISPR/Cas9	Shlukovaná pravidelně rozložená krátká palindromická repetice, RNA-řízená Cas9 nukleáza (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)
IGF-1	inzulín-podobný růstový faktor 1 (Insulin-like Growth Factor 1)
IVF	In vitro fertilizace (In vitro Fertilization)
LS	Leighův syndrom
MITRAX komplex	mitochondriální translační regulační systém komplexu cytochrom c oxidázy
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleóza
MT-ND3	mitochondriálně kódovaná NADH dehydrogenáza 3 (Mitochondrially Encoded NADH Dehydrogenase3)
nDNA	nukleární deoxyribonukleóza
OXPHOS	oxidativní fosforylace (Oxidative Phosphorylation)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PNS	periferní nervová soustava
PTGES3	prostaglandin E syntáza 3 (Prostaglandin E Synthase 3)
Surf1	Surfeit Locus Protein 1
SURF1	název genu, více možností překladu

TALE	efektory podobné transkripčnímu aktivátoru (Transcription Activator-like Effector)
TALEN	efektory podobné transkripčnímu aktivátoru nukleáz (Transcription Activator-like Effector Nuclease)
TSHA	genové terapie společnosti Taysha (Taysha Gene Therapies)

TERMINOLOGIE

Apgar skóre	označení pro mezinárodně užívaný bodovací systém novorozenců používaný k posouzení zdravotního stavu novorozence
Ataxie	neurologický symptom, porucha koordinace pohybů
Dystonie	tvořena přetrvávajícími svalovými stahy, které způsobují kroucení a opakované pohyby nebo abnormální postavení postižených částí těla
Endoderm	vnitřní zárodečný list
Exom	část genomu tvořená exony (sekvence vytvářející mRNA po vystřížení)
Fokální záchvat	záchvat bez ztráty vědomí, kdy si pacient uvědomuje, co se kolem něho děje
Heteroplazie	variabilita
Homolazie	analogie
Hyperlaktacidémie	podporuje rozvoj acidémie a tím snižuje rozpustnost kyseliny močové v krvi
Hyperlaxita	nadměrná pohyblivost kloubů
Hypotonie	patologicky snížený svalový tonus
Jejunum	lačník; část tenkého střeva
Karnitin	látka tvořící se v lidském mozku, játrech a ledvinách, která pomáhá tělu přeměňovat tuk na energii
Konkatemer	je dlouhá souvislá DNA molekula, která obsahuje více kopií stejné sekvence DNA spojených do série
Léze	oblast orgánu/tkáně, která je narušena v důsledku onemocnění nebo zranění
Mozkové pedinkuly	struktury na přední straně středního mozku, obsahují smyslové a motorické nervové trakty
Myalgie	bolest svalů, jejím zdrojem může být jakýkoli sval v těle

Nystagmus	rytmický kmitavý pohyb oční bulvy
Palpebrální štěrbin	mezera mezi horním a dolním víčkem
Ptóza	stav, kdy jedno nebo obě víčka ovisají a tím blokuje zrak
Putaminum	struktura uložena v lidském mozku blízko thalamu, která hraje důležitou roli v různých vyšších neurologických funkcích
Retrakce	stažení, zkrácení
Retrakce	zkrácení, stažení
Rhabdomyolýza	syndrom rozpadu příčně pruhovaného svalstva, který je charakterizován průnikem intracelulárního obsahu svalových vláken do cirkulace a extracelulární tekutiny
Spasticita	komplexní porucha svalového napětí příčně pruhovaných svalů
Strabismus	osy vidění obou očí nesměřují současně k fixovanému bodu
Synkopa	náhlé a krátko trvající bezvědomí pacienta, nejčastější příčinou je arytmie
Transgen	gen, který byl přenesen přirozenou cestou nebo pomocí genového inženýrství z jednoho organismu do druhého
Tropismus	orientace živých organismů podle nějaké stimulace, podráždění nebo podnětu, beze změny místa (Velký lékařský slovník On-Line, 2023)

ÚVOD

Mitochondrie jsou semiautonomní organely nacházející se v eukaryotních buňkách, ve kterých probíhá proces oxidativní fosforylace. Oxidativní fosforylace má několik částí, přičemž její poslední, a přitom nejdůležitější je komplex IV, označovaný též jako COX – cytochrom c oxidáza. Jedná se o membránový komplex složený z enzymů. Díky tomuto komplexu se oxiduje cytochrom c, čímž se získává energie. Ta se využívá k tvorbě protonového gradientu. Za správné sestavení COX je odpovědný protein Surf1, který je kódován genem SURF1. Jeho porucha způsobuje různá onemocnění, např. svalovou slabost v Charcot-Marie-Toothově chorobě typu 4, přičemž právě podtyp 4K je způsoben mutací genu SURF1. Mutace tohoto genu může vést i k poruchám metabolické signalizace inzulínu a může vést k *diabetes mellitus* typu II.

Gen SURF1 se nachází na chromozómu 9, který se v každé somatické buňce vyskytuje ve dvou kopiích a kóduje převážně geny, které slouží ke tvorbě proteinů. Změny v tomto chromozómu, či už ve struktuře nebo počtu kopií mají různé nežádoucí účinky jako je vznik tzv. Filadelfského chromozómu nebo vzácnou genetickou poruchu označovanou Kleeftstra syndrom.

Fragmenty genu SURF1 byly detekovány pomocí kolorimetrického biosenzoru v roce 2021. Celá studie proběhla z důvodu sledování a zkoumání Leighova syndromu. Tento syndrom je způsoben v převážné části mutací SURF1 genu.

Leighův syndrom je vzácná heterogenní neurologická porucha. Je způsobena poškozením mitochondriální produkce energie a může se na ní podílet i mutace SURF1 genu. Leighův syndrom patří mezi jeden z nejčastějších projevů mitochondriální energetické poruchy v dětství. Jeho prevalence je v populaci uváděna 1:40 000. V současnosti tento syndrom zahrnuje klinicky i geneticky heterogenní skupinu dědičných neurodegenerativních poruch, který se u každého pacienta může projevit jinými fenotypovými příznaky. Často se projevuje poruchami centrální nervové soustavy, opožděným psychomotorickým vývojem, oftalmologickými abnormalitami, ataxií a spasticitou. Příznaky Leighova syndromu většinou nastupují před druhým rokem života. Tento typ Leighova syndromu je označován jako klasický neboli s Leighův syndrom časným nástupem, popřípadě subakutní nekrotizující encefalopatie. V případě, že se projevy objeví v pozdějším věku, tak se jeho projevy onemocnění liší a onemocnění se označuje jako Leighův syndrom s pozdním nástupem. Genetický základ Leighova syndromu tvoří více jak 75 genů. Všechny tyto geny byly identifikovány u pacientů s téměř všemi vzory mendelovské i nemendelovské dědičnosti.

Ze skupiny Leighova syndromu se vyčlenil ještě jeden specifický syndrom, označovaný jako Leigh-like syndrom. Základem tohoto syndromu je Leighův syndrom (nezáleží na tom, či s časným nebo pozdním nástupem) s přidruženými postiženími periferní nervové soustavy a jinými ne-neurologickými komplikacemi, např. malý vzrůst, anémie, zvracení a průjem.

1 GEN SURF1

Gen SURF1 můžeme v literatuře a vědeckých studiích nalézt i pod jménem SURF-1 nebo surfeit 1 (Liu, R., 2020). Nalézáme ho na chromozómu 9 (MedlinePlus: SURF1 gene, 2016). Varianty tohoto genu jsou přítomny ve všech eukaryotních buňkách. (Quadalti *et al.*, 2017)

1.1 Struktura genu

Gen SURF1 se nachází na chromozómu 9, na q raménku v pozici 34.2 a má 9 exonů. Nachází se v shluku surfeit genů (označení pro geny SURF1 – SURF6). Surfeit geny jsou těsně spojené. Sdílí obousměrný promotor se SURF2 na opačném řetězci. (SURF1, 2022)

1.1.1 Chromozóm 9

Lidský genom obsahuje v každé somatické buňce 46 chromozómů, které jsou rozděleny do 23 párů. Každá somatická buňka má tedy dvě kopie chromozómu 9. Jedna kopie chromozómu od každého rodiče.

Chromozóm 9 je tvořen přibližně 141 miliony stavebních bloků párů bází. Představuje přibližně 4,5 % celkové DNA v buňkách. Chromozóm 9 dle nejnovějších studií obsahuje pravděpodobně 800 až 900 genů, které slouží pro tvorbu proteinů.

Změny ve struktuře nebo počtu kopií chromozómu 9 mohou mít různé účinky. Mezi nejčastější patří psychomotorická retardace, výrazné rysy obličeje a neobvyklý tvar hlavy či opožděný vývoj.

Ze syndromů mohou změny na chromozómu 9 podmiňovat např. LS nebo velmi vzácný Kleeftstra syndrom.

Při translokaci genetického materiálu mezi chromozómy 9 a 22 dochází ke vzniku Filadelfského chromozómu. Přítomnost Filadelfského chromozómu indukuje rozvoj chronické myeloidní leukemie. (MedlinePlus, 2020)

1.1.1.1 Filadelfský chromozóm

Tumorigeneze je vícestupňový proces a k transformaci normální buňky na buňku rakovinnou je nutno dokončení sekvencí událostí. Jedním z hlavních kroků k odhalení rakoviny je identifikace onkogenů. Onkogenní poškození buňky pocházejí z buněčných genů (protoonkogenů). Ty jsou následně mutovány a chromozomální translokací vedou ke vzniku aktivního fúzního proteinu. Jedním z řady těchto proteinů je signální kináza. Normální genové

produkty řídí přežití buněk, jejich proliferaci i diferenciaci. Onkogeny mají stejné schopnosti a onkogenové produkty deregulují kontroly těchto procesů. (Brown, 2022)

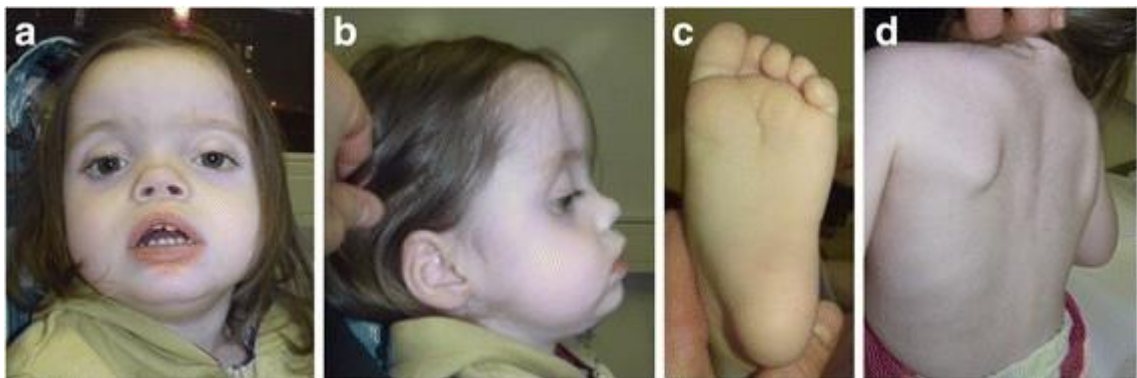
Filadelfský chromozóm je derivovaný chromozóm 22 a představuje onkogen. Jedná se o jednu z nejčastějších abnormalit u pacientů s chronickou myeloidní leukémií. Jeho detekce je nezbytná pro stanovení diagnózy i plánování chemoterapie. (Naik *et al.*, 2016)

Předpokládá se, že původní buňkou pro chronickou myeloidní leukémií je hematopoetická kmenová buňka. Na rozdíl od normálních hematopoetických kmenových buněk jsou potomky leukemických kmenových buněk v chronické fázi onemocnění převážně neutrofilů. (Brown, 2022)

1.1.1.2 Kleefstra syndrom

Kleefstra syndrom je poměrně dobře zdokumentovaná genetická porucha. Je charakterizována základními fenotypickými rysy jako psychomotorická retardace, svalová hypotonie a obličejový dysmorfismus (viz Obr. 1). Až v 75 % výskytu Kleefstra syndromu je příčinou mikrodelece v chromozómní oblasti 9q34, která vede k částečné nebo úplné ztrátě genu EHMT1. V ostatních případech je příčinou většinou heterozygotní intragenní mutace se ztrátou funkce v genu EHMT1. Zatím neexistuje jasná korelace genotypu a fenotypu týkající se pacientů s mikrodelecemi v 9q34 a intragenními mutacemi v EHMT1. V různých studiích byly popsány duplikace celého nebo částečného genu EHMT1, ale žádná z duplikací nebyla striktně intragenní a nevedla k fenotypu Kleefstra syndromu.

EHMT1 je gen kódující methyltransferázu, která je specifická pro lysin-9 histonu H3 a je součástí transkripčního faktoru E2F6. Tento transkripční faktor může potlačovat genovou transkripci. (Schwaibold *et al.*, 2014)



Obr. 1: Intragenní duplikace genu EHMT1 vedoucí ke Kleefstra syndromu. Fotografie pacienta ve věku 11-12 let. Hlavní rysy obličeje dívky (a, b) byly brachycefalie, výrazné čelo, nadměrně vzdálené oči s mírně svažujícími se palpebrálními štěrbinami, malý nos s antevertovanými choanami a hluboko posazeným kořenem nosu, hluboko posazené rotované uši a plně tváře. Přední část chodidel byla hluboce vrásčitá (c) a pacient měl ochlupené záda (d). (Upraveno podle: Schwaibold *et al.*, 2014)

1.2 Fyziologická funkce

Gen SURF1 nese informace pro tvorbu proteinu Surf1, který hraje podstatnou roli v oxidativní fosforylaci. Oxidativní fosforylace je proces, kterým se energie z potravy přeměňuje do formy využitelné buňkami.

Protein Surf1 je lokalizován na vnitřní membráně mitochondrií (Prospec, 2016). Je odpovědný za správné sestavení jednoho z proteinových komplexů nebo enzymů, které se účastní oxidativní fosforylace. Jedná se o komplex IV. (Liu, 2020)

1.2.1 Protein Surf1

Proteiny jsou svou chemickou podstatou biomolekuly. Jsou přítomny ve všech živých organismech a podílejí se na různých chemických procesech v organismu. Díky svým vlastnostem a schopnostem jsou nezbytné pro život.

Proteiny se skládají z aminokyselin spojených dohromady v dlouhých řetězcích. Proteiny mají primární strukturu, kterou určuje pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Jejich sekundární strukturou je geometrické uspořádání řetězce, a to α -helix nebo β -skládaný list. Terciární strukturou proteinů je prostorové uspořádání molekuly, které je podmíněno interakcemi mezi vedlejšími skupinami řetězce, a to vodíkovými můstky, nepolárními interakcemi, elektrostatickými silami nebo disulfidickými můstky. Kvartérní strukturou se rozumí prostorové uspořádání podjednotek proteinů z více než jednoho řetězce.

Denaturace proteinů je děj, při kterém dochází k narušení sekundární, terciární a kvartérní struktury.

Mitochondrie patří mezi hlavní zdroje buněčné ATP v organismu. ATP je produkováno v oxidativní fosforylaci. Jednou z nejdůležitějších složek oxidativní fosforylace je COX (cytochrom c oxidáza). COX je terminálním enzymem dýchacího řetězce a katalyzuje přenos elektronů na kyslík. Biogeneze savčí COX je regulovaný proces, který vyžaduje mnoho doplňkových proteinů včetně Surf1. Jeho absence vede ke snížení množství holoenzymu COX a to zapříčiňuje snížení jeho aktivity. (Rodriguez *et al.*, 2022)

Lidský Surf1 protein obsahuje 300 aminokyselin. Zkrácené mutace v N-terminálních nebo centrálních, případně i C-terminálních oblastech má za následek nestabilitu proteinu, což vede k poruše COX aktivity v SURF1-deficientních buněčných liniích. (Quadalti *et al.*, 2017)

1.2.2 Nejnovější model pro zkoumání role proteinu Surf1 v biogenezi COX

V roce 2022 proběhl pokus o sestavení modelu pro zkoumání zapojení proteinu Surf1 v biogenezi COX.

Byly analyzovány fibroblasty pacientů, kde byly nalezeny funkční změny enzymu COX sestaveného v nepřítomnosti SURF1. Funkční změny se týkaly především vyšší aktivity transportu elektronů, zeslabeného čerpání protonů a snížené afinity ke kyslíku. Z tohoto důvodu byly dále zkoumány vlastnosti COX na myším modelu SURF1KO. V tomto modelu byly nalezeny podobné funkční změny jako u lidských buněk. Analýza kofaktorů hemu v COX ukázala, že svalové mitochondrie SURF1KO obsahují stejné hladiny hemu a a b, zatímco kontrolní obsahovaly převážně výhradně hem a. Kvůli rozdílům v sestavení COX mezi myši a člověkem byl zkonstruován lidský model SURF1KO v buňkách HEK293. Tento model umožnil studovat hemylaci COX. Během počáteční charakterizace modelu bylo potvrzeno, že se jednalo o zobrazení ovlivněnou sestavu a obsah COX. Ovlivněno bylo také buněčné dýchání. To se shodovalo s charakteristikami z předchozích studií. Tyto studie byly provedeny na fibroblastech pacientů. (Rodriguez *et al.*, 2022)

Díky pozitivním výsledkům byl získán přesný model pro další studium biogeneze COX a jeho metabolických adaptací.

1.3 Klonování genu SURF1

V posledních desetiletích bylo provedeno vícero pokusů o vytvoření zvířecího modelu s deficitem SURF1, avšak výsledky byly kontroverzní. (Quadalti *et al.*, 2017)

1.3.1 Vývoj vytvoření zvířecího modelu

Jeden z prvních zvířecích modelů je model rekombinantní myši SURF1^{-/-}. Původně byla tato studie založená na vyvrácení názoru, že snížená mitochondriální funkce a zvýšený oxidační stres souvisí s kratší délkou života. Homozygotní myši SURF1^{-/-} vykazovaly významný pokles aktivity komplexu IV mitochondriálního transportního řetězce elektronů. Myši SURF1^{-/-} tedy vykazovaly významný nedostatek COX a mírné zvýšení hladiny laktátu v krvi, ale nebyly schopny rekapitulovat hlavní klinické příznaky u člověka. (Ai-Ling *et al.*, 2013)

V modelu SURF1 *Danio rerio* (Dáňo pruhované, sladkovodní kaprovitá ryba) se ukázal deficit COX se srdečnými a endodermálními vývojovými defekty spojený s abnormálním chováním při plavání a zvýšenou apoptózou v zadním mozku a neurální trubici. (Baden, 2007)

V modelu *Drosophila melanogaster* (Octomilka obecná) je nepřítomnost SURF1 smrtelný u larev, ty však vykazují defekty ve všech komplexech mitochondriálního dýchacího řetězce, stejně jako narušený svalový vývoj. V případě modelu *Drosophila* s omezením

na CNS vede nepřítomnost SURF1 k izolovanému nedostatku COX u dospělých jedinců. (Daré *et al.*, 2014)

Na základě výše zmíněných malých zvířecích modelech, jejich neúčinnost a neschopnost napodobit hlavní rysy lidského organismu přiměla vědce k vytvoření tzv. velkého zvířecího modelu. (Quadalti *et al.*, 2017)

1.3.2 Velký zvířecí model

Sus scrofa (Prase divoké) se v posledním dvacetiletí využívá jako zvířecí model v biomedicínských výzkumných programech s různým zaměřením. Prasata sdílejí s lidmi poměrně mnoho anatomických i fyziologických rysů, včetně genetické podobnosti (např. lidské a prasečí proteiny extrahované z prasečích fibroblastů vykazovaly až 80% identitu a 87% podobnost s lidskými). Z tohoto důvodu jsou využívána jako model pro zkoumání mnoha lidských nemocí.

Byla určena kompletní sekvence prasečího genu SURF1, následně byla narušena v primárních fibroblastových buněčných liniích pomocí TALEN a CRISPR/Cas9 genomových editačních systémů. (Quadalti *et al.*, 2017)

Prasata SURF1^{-/-} se vyznačovala svalovou slabostí a značně zkrácenou délkou života, spolu se zvýšenou perinatální mortalitou ve srovnání s heterozygotními SURF1^{+/-} a divokými sourozenci. Nebyl však detekován žádný zjevný nedostatek COX v tkáních SURF1^{-/-} jedinců. Díky histochemické analýze však byl objeven deficit COX v klcích *jejunum*. Sekvenování celkové mRNA ukázalo, že několik genů kódujících podjednotky COX bylo významně deregulováno v kosterních svalech. Následně neuropatologické nálezy naznačily zpoždění CNS novorozených selat SURF1^{-/-}. (Quadalti *et al.*, 2017)

Celkově bylo vytvořeno 38 samců SURF1^{-/-}, z nichž se třináct (34 %) narodilo mrtvých. Jedenáct z dvaceti pěti jedinců zemřelo ve stejný den narození, a to v důsledku závažného klinického fenotypu – silný třes, zcela chybějící nebo slabý sací a zakořeňovací reflex. Šest selat SURF1^{-/-} žilo šest až devět dní a neurologické vyšetření odhalilo zhoršenou retrakci zadní končetiny začínající od třetího dne. Tyto reflexy byly normální u věkově odpovídajících SURF1^{+/-} jedinců. V následujících dnech se u selat SURF1^{-/-} rozvinulo neprospívání a projevil se potíže s polykáním, slabé nebo chybějící sací a zakořeňovací reflexy, neschopnost rozpoznávat potravu, slabý přírůstek na váze, často spojený s průjemem a změněným vnímáním okolního prostoru s tendencí ublížit si. (Quadalti *et al.*, 2017)

Ve dvou případech byla dvě selata SURF1^{-/-} po porodu od prasnice odebrána a bylo o ně staráno pomocí jednotky intenzivní péče s podmínkami umělé výživy. Tato selata žila

déle než ostatní. Jedno dvacet devět dní a druhé osmdesát dní. Jedno sele pocházelo z kolonie upravené pomocí CRISPR/Cas9 a druhé z kolonie TALEN. Obě vykazovala obličejový dysmorfismus – kratší nos, oboustranný pokles očních víček, slabost obličejových svalů, třes těla se svalovou slabostí, dýchací problémy a výrazně snížený růst. Obě selata uhynula na sepsi, která byla podpořena kritickým stavem zvířat v posledních dnech před smrtí. Infekční agens, která způsobila smrt obou selat, byla detekována pouze u těchto dvou zvířat. To svědčí o vážném oslabení a následnou poruchou funkce imunitního systému.

Ke kontrole bylo využito čtrnáct samců SURF1^{+/-} a dvanáct samic SURF1^{+/-} podle stejných postupů. Ukázalo se, že jsou fenotypově normální bez klinických příznaků pozorovaných u zvířat SURF1^{-/-}. (Quadalti *et al.*, 2017)

1.3.2.1 TALEN – efekторы podobné transkripčnímu aktivátoru nukleáz

TALE jsou proteiny z rostlinných patogenních bakterií *Xanthomonas*. Jsou vpravovány do rostlinných buněk. Tam se lokalizují v jádře a vážou se na cílové promotory, přičemž indukují genovou expresi. Klíčem k jejich specifické a programovatelné vazbě na DNA je oblast centrální repetice. Ta se skládá z variabilního počtu tandemových repetit o délce 33–35 aminokyselin. (Becker a Boch, 2021)

TALEN (TALE nukleázy) je první zařízení navržené a postavené tak, aby se s vysokou přesností účinností zaměřovalo na jakýkoli specifický genomický lokus. Následně byl TALEN rychle využit pro editaci genomu v plodinách, hospodářských zvířatech a nemodelových organismech. Díky tomu byl TALEN využit jako nástroj pro úpravu genomu – v roce 2015 zachránil lidský život vyléčením rakoviny a v roce 2019 byla na trhu dostupná první plodina s upraveným genomem. (Becker a Boch, 2021)

1.3.2.2 CRISPR/Cas9

Úpravy genomu jsou závislé na selektivním rozpoznání cílových míst. K zobrazování v živých buňkách se k přímému studiu chování využívá CRISPR/Cas9 a TALEN. Nižší účinnost Cas9 je zatížena lokálním vyhledáváním na nespécifických místech v heterochromatinových oblastech.

V jednomolekulovém zobrazování ve studii publikované v r. 2020 je TALEN až pětkrát účinnější než Cas9 v heterochromatinových oblastech genomu. (Jain *et al.*, 2020)

1.4 Interakce SURF1 genu

SURF1 má celkem 11 binárních interakcí protein-protein. Z těchto interakcí je 8 komplexních. Mezi geny, které s ním interagují, patří COA1, COA3, COX6C, COX14, PTGES3, SLC25A5. (Prospec, 2016)

COA1 je gen kódující protein COX sestavující homolog 1. Ten se nachází na membráně mitochondrií. V imunitním kontextu bylo zjištěno, že má jen malou specifitu. Jedná se o nepříznivý marker rakoviny jater. Protein je komponentou MITRAC komplexu, který reguluje sestavení COX. (Mick *et al.*, 2012)

COA3 je gen kódující protein COX sestavující homolog 3. Nalézáme ho na membráně mitochondrií a je odpovědný za cytoplazmatickou expresi s granulárním vzorem ve všech tkáních. Tento protein se řadí mezi příznivé prognostické markery u karcinomu děložního čípku a karcinomu ledvin, stejně jako u karcinomu endometria. Stejně jako protein kódovaný genem COA1, patří protein genu COA3 k základní složce komplexu MITRAC.

COX6C je gen, který kóduje protein COX, podjednotku 6C. Zmíněný protein se řadí do skupiny metabolických proteinů lokalizovaných na membráně mitochondrií. Protein je již podle názvu součástí COX, která je terminálním enzymem mitochondriálního dýchacího řetězce.

COX14 je gen kódující poměrně malý, jednopřechodový transmembránový protein lokalizovaný v mitochondriích. Zmíněný protein se podílí při koordinaci počátečních kroků sestavování podjednotky COX a také hraje významnou roli při sestavování podjednotky COX I holoenzymu. Mutace zapříčiňují nedostatek mitochondriálního komplexu IV. (Uhlén *et al.*, 2015)

PTGES3 je gen kódující enzym, který přeměňuje prostaglandin endoperoxid H2 na prostaglandin E2. Jedná se o nejvíce exprimovaný enzym v COX/PG dráze, a to jak u laminárních, tak i bazálních epiteliálních buňkách v tkáni prsu. Díky této vlastnosti se v současnosti využívá jeho exprese k prognóze s přežitím rakoviny prsu. Zvýšená exprese PTGES3 v mikroprostředí nádoru totiž významně korelovala s množstvím CD8+ T leukocytů, což naznačuje jeho možnou imunomodulační roli v mikroprostředí nádoru. (Adekeye *et al.*, 2022)

SLC25A5 je RNA gen, při jehož expresi se ukázalo, že je významně regulována v adipogenní diferenciaci. Delece tohoto genu vedla k potlačení exprese genů souvisejících s adipogenezí, snížila se akumulace triacylglycerolů a došlo k výraznému snížení exprese proteinu oxidativní fosforylace a produkce ATP. (Wang *et al.*, 2022)

2 DETEKCE GENU SURF1 POMOCÍ KOLORIMETRICKÉHO BIOSENZORU

V roce 2021 byly publikovány výsledky studie, v níž pomocí kolorimetrického biosenzoru pro ultrasenzitivní stanovení vědci detekovali gen SURF1 založený na duální DNA-indukované kaskádové hybridizační reakci.

Pro tuto studii byl vyvinut jednoduchý a ultrasenzitivní kolorimetrický biosenzor pro detekci fragmentů genu SURF1. Fragmenty genu se zkoumaly z důvodu výskytu LS v populaci. Na tomto syndromu se podílí značnou částí právě mutace SURF1 genu. (Yu *et al.*, 2021)

2.1 Reagencie a přístroje

Pro experimentální provedení byly použity syntetické DNA oligonukleotidy čínské společnosti Generay Biotech Co., Ltd. Čistota těchto oligonukleotidů byla zajištěná pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Všechny tyto oligonukleotidy byly rozpuštěny v Tris/ethylendiamintetraoctovém pufru o pH 8,0 a skladovány při 80 °C. Od společnosti Solarbio Science & Technology Co. byl zakoupen streptavidin, transparentní 96 jamková destička, hovězí sérový albumin, jednosložkový substrátový roztok, kyselina citronová, bezvodý hydrogenfosforečnan sodný, Tris/ethylendiamintetraoctový pufr, fosfátem pufrovaný roztok, 20 SSC (fyziologický roztok – citrát sodný) hybridizační pufr, Tween-20 a 6-merkaptto-1-hexanol. Od britské společnosti Abcam byly zakoupeny anti-digoxinové protilátky.

Kolorimetrický test byl proveden na automatickém enzymovém imunoanalyzátoru Tecan F50 ve Švýcarsku a charakterizace byla prováděna na elektrochemické pracovní stanici CHI760D v Shanghai ChenhuaIndustries Co. v Číně. (Yu *et al.*, 2021)

2.2 Příprava transparentní 96 jamkové destičky

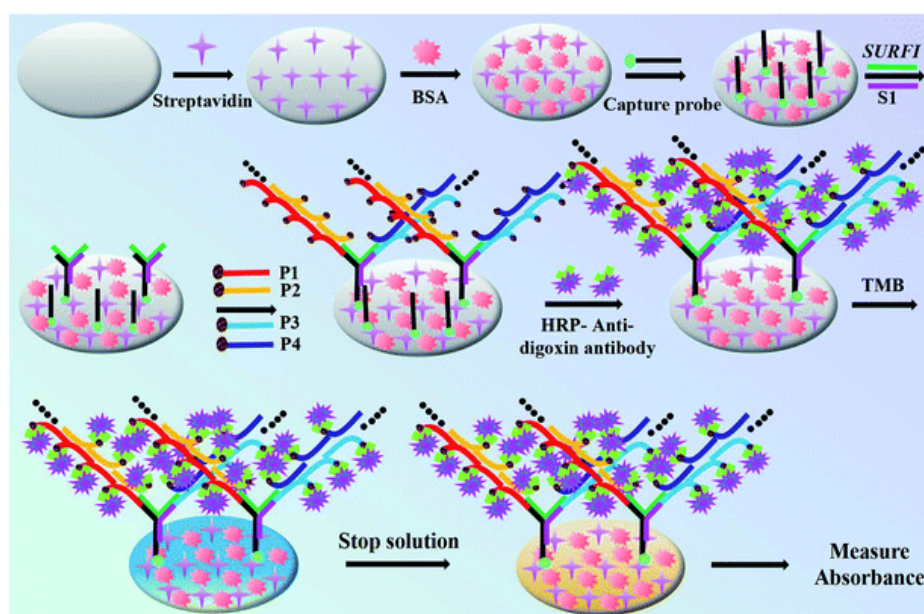
Streptavidin byl zředěn na koncentraci 10 mg/ml ve směsi 100mM fosfátovém pufru a 50 mM kyselině citronové o pH 5. Poté bylo přidáno 100 µl zředěného streptavidinu do každé jamky. Destičky byly vloženy do uzavřeného, zvlhčeného inkubátoru přes noc při teplotě 35 °C. Po vyjmutí byly destičky promyty 0,01M fosfátovým pufr, který obsahoval 0,05% Tween-20. Roztok fosfátového pufru se 100 µl 0,1% hovězího sérového albuminu byl přidán do každé jamky, aby se zabránilo nespecifické vazbě. Pak byly destičky uloženy na 30 minut při laboratorní teplotě. Následně byly promyty 0,01 M fosfátovým

puftrem ve směsi s 0,05% Tween-20 a sušily se při pokojové teplotě. Nakonec byly destičky uzavřeny s absorbentem vlhkosti a skladovány při teplotě 4 °C. (Yu *et al.*, 2021)

2.3 Práce s kolorimetrickým biosenzorem

Biotinem značená záchytná sonda byla imobilizována na streptavidinem značeném na průhledném povrchu 96 jamkové destičky (viz Obr. 2). Následně se do reakčního systému přidaly cílové fragmenty SURF1 a pomocná sonda S1, čímž se vytvořila struktura „Y“ se záchytnou sondou. K dosažení vysoce účinné amplifikace signálu byly využity digoxinem značené sondy P1, P2, P3 a P4, které vyvolaly duální DNA-indukovanou kaskádu hybridizační reakce na „Y“ struktuře povrchu 96 jamkové destičky. Detekční sondou na povrchu byla kombinována HRP anti-digoxinová protilátka. Díky tomu se vytvořila kolorimetrická odpověď na fragment SURF1 v přítomnosti TMB. Detekční limit pro SURF1 byl až $1,73 \cdot 10^{-14}$ M.

Výše zmíněný postup byl úspěšně aplikován při detekci SURF1 ve vzorcích lidského séra, proto se do budoucnosti předpokládá, že se bude tento postup uplatňovat při analýze genových fragmentů a včasné diagnostice klinických onemocnění. (Yu, *et al.*, 2021)



Obr. 2: Proces přípravy a detekce pomocí kolorimetrického biosenzoru. Povrch 96 jamkové destičky byl potažen streptavidinem a byl přidán hovězí sérový albumin. Následně byly přidány fragmenty genu SURF1, pak pomocná sonda S1. Digoxinem značené sondy P1, P2, P3 a P4 po přidání vyvolaly duální DNA-indukovanou kaskádu. Aby se vytvořila kolorimetrická odpověď, byla přidána detekční sonda, která byla na povrchu kombinována HRP antidigoxinovou protilátkou. Tím se vytvořila kolorimetrická odpověď genu SURF1 v přítomnosti TMB. Následně byl přidán stop roztok a byla proměřena absorbance. (Převzato z: Yu *et al.*, 2021)

2.4 Význam detekce SURF1 pro časnou diagnostiku

LS se řadí mezi mitochondriálně dědičná onemocnění způsobená genovými mutacemi. Tyto genové mutace ovlivňují produkci mitochondriální energie. LS se projevuje neurologickými poruchami, metabolickými abnormalitami a předčasnou smrtí. Výzkum provedl analýzu přežití u 142 pacientů s variantami SURF1 mutacemi. Dle výzkumu průměrný věk úmrtí byl 5,4 let. Z tohoto důvodu je nutná rychlá a citlivá detekce genu SURF1, která umožní teoretický základ pro časnou diagnostiku a monitorování pacientů s LS. (Yu *et al.*, 2021)

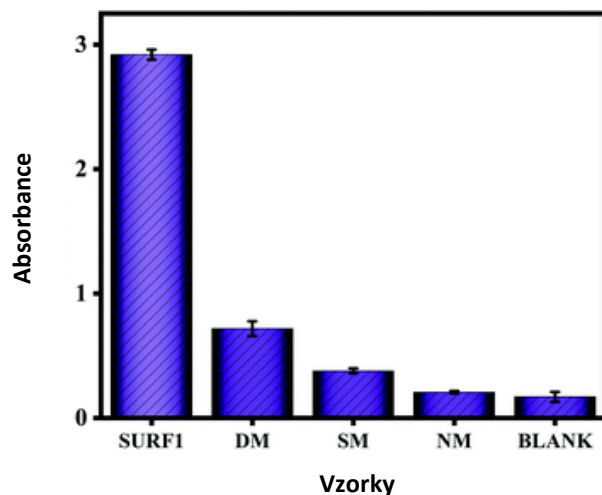
2.5 Kolorimetrický biosenzor a detekce genu SURF1

Biosenzory na principu kaskádové hybridizační reakce jsou často používány při detekci oligonukleotidů, proteinů a rakovinných buněk. Biosenzory zesilují signál, mají jednoduchou obsluhu, nízkou cenu a izotermické vlastnosti.

Dlouhá struktura konkatemeru tvořená kombinací krátkých fragmentů DNA prostřednictvím specifických interakcí a propojená spouštěcím spojením s DNA byla imobilizována na povrchu tohoto vyvinutého biosenzoru.

Pro ověření citlivosti navrženého kolorimetrického biosenzoru navrženého speciálně pro tuto studii byly signály odezvy absorbance na gen SURF1 porovnány pomocí detekce se třemi různými oligonukleotidy (včetně jednobázové chybně spárované sekvence, dvoubázové chybně spárované sekvence a nekomplementárních oligonukleotidů), (viz Obr. 3). Při koncentraci 1 nM různých oligonukleotidů a po přidání cílového genového fragmentu SURF1 byl vyvolán absorbanční signál. Odezva tohoto signálu byla při měření SURF1 mnohem vyšší než při měření ostatních oligonukleotidů a slepé kontroly. To dokazuje, že navržený biosenzor účinně rozlišuje různé oligonukleotidové sekvence, vykazuje vynikající specifitu, dokonce je možné s jeho pomocí rozlišit jednu neshodu bází.

Za optimálních podmínek byly vzorky 1nM cílového genu SURF1 určovány pětkrát denně, po dobu pěti po sobě následujících dní, čím se ověřila reprodukovatelnost intra- a mezi-denního testu. (Yu *et al.*, 2021)



Obr. 3: Absorbanční odezvy fragmentu genu SURF1. Porovnání absorbanční odezvy fragmentu genu SURF1 s dvojitou nesprávně spárovanou sekvencí (DM), chybně spárovanou sekvencí jedné bázi (SM), nekomplementárních oligonukleotidů (NM) a slepé kontroly. (Upraveno podle: Yu *et al.*, 2021)

Pro ověření detekční schopnosti kolorimetrického biosenzoru byl v komplikovaných biologických vzorcích proveden test výtěžnosti v lidském séru pomocí metody standardního přídatku. Sérum pocházelo z nemocnice *The Fourth Hospital of Shijiazhuang (Affiliated Obstetrics and Gynecology Hospital of Hebei Medical University)* v Číně, což bylo schváleno etickým výborem nemocnice v Shijiazhuang, přičemž poskytovatelé séra byli plně informováni. Fragменты genu SURF1 o různé koncentraci byly přidány do zdravého lidského séra (toto sérum bylo desetkrát zředěno pomocí fosfátového pufru). Dle údajů uvedených v Tabulce 1 dosahovala výtěžnost vysoké procento. To znamená nízký matricový efekt metody a možnost použít ji pro detekci komplikovaných biologických vzorků. (Yu *et al.*, 2021)

Tab. 1: Detekce fragmentu genu SURF1 v naředěných vzorcích séra pomocí navrhnutého kolorimetrického biosenzoru. (Upraveno podle: Yu *et al.*, 2021)

Číslo vzorku séra	Nejvyšší hodnota (M)	Testovaná hodnota (M)	Zotavení (%)
1.	$1,0 \times 10^{-13}$	$9,817 \times 10^{-14}$	98,17
2.	$1,0 \times 10^{-12}$	$1,159 \times 10^{-12}$	115,87
3.	$1,0 \times 10^{-11}$	$9,616 \times 10^{-12}$	96,16
4.	$1,0 \times 10^{-10}$	$9,172 \times 10^{-11}$	91,72
5.	$1,0 \times 10^{-9}$	$1,050 \times 10^{-9}$	104,95
6.	$1,0 \times 10^{-8}$	$1,072 \times 10^{-8}$	107,15

3 PODMIŇUJÍCÍ CHOROBY A SYNDROMY GENU SURF1

3.1 Charcot-Marie-Toothova choroba typu 4

CMT4 je autozomálně recesivní demyelinizační nemoc, jejíž hlavním projevem je svalová slabost. Projevuje se většinou ve svalech vzdálenějších od středu těla, tedy distálních regionech. Méně častý je projev ve svalech blíže k trupu – proximálních. U pacientů se mohou také objevit změny v pocitech při dotyku, bolestech a zvucích nebo okolní teplotě. Dále se mohou rozvinout také příznaky jako šedý zákal a zakalení oční čočky nebo hluchota. Příznaky se projevují v různé míře, a to od mírných projevů až po velmi závažné. Lidé s CMT4 mají závažnější příznaky než lidé s Charcot-Marie-Toothovou chorobou typu 1 a s Charcot-Marie-Toothovou chorobou typu 2.

Rozeznáváme celkem 10 podtypů CMT4. Každý z nich je způsoben různými genetickými mutacemi, přičemž každá mutace má své vlastní charakteristické příznaky. Pro prognózu i léčbu je nutné správné určení podtypu CMT4 a porozumění rozdílů mezi nimi. (Carvalho, 2022)

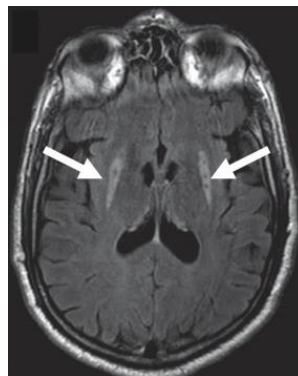
3.1.1 Charcot-Marie-Toothova choroba typu 4K

CMT4K je jedním z podtypů CMT4, přičemž tato choroba je způsobena mutací genu SURF1. Jedná se o autozomálně recesivní demyelinizační neuropatii. Je charakterizována svalovou slabostí a atrofií spojenou s poruchou distálního citění. Postižené jsou horní i dolní končetiny. Laboratorní studie ukazují zvýšený deficit laktátu v séru a deficit IV mitochondriálního komplexu. (Echaniz-Laguna *et al.*, 2013)

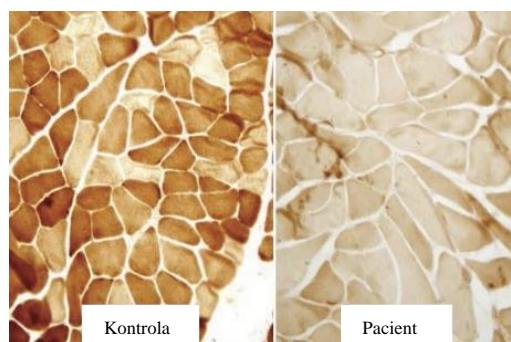
Studie z roku 2013 (Echaniz-Laguna *et al.*) zkoumala, zda jsou mutace v genu SURF1 příčinou onemocnění CMT. Jednalo se o sledování dvou pacientů z geneticky příbuzné rodiny s demyelinizačním autozomálně recesivním CMT4 asociovaným s homozygotní mutací v místě sestřihu v genu SURF1. Pacienti pocházeli z alžírské rodiny.

Jeden z pacientů, 42letý proband se narodil v termínu po standardním ukončení těhotenství. Jeho psychomotorický vývoj probíhal normálně včetně samostatné chůze ve věku 12 měsíců. Poprvé byl vyšetřen ve věku 8 let pro rychlou únavu. Při motorickém vyšetření se u něj projevila středně závažná kyfokolióza, tedy abnormální zakřivení páteře do strany a dozadu. Při dalších motorických testech bylo odhalené mírné ochabování svalů na horních i dolních končetinách a v dolních končetinách si pacient stěžoval na píchání. Elektrodiagnostické vyšetření odhalilo kombinaci extrémně snížených rychlostí vedení, prodlouženou latenci F-vlny (ta je způsobena vedením akčního potenciálu motorickým axonem k tělu neuronu a následnou depolarizací), což je v souladu se závažným

demyelinizačním onemocněním CMT. Biopsie povrchového perorálního nervu odhalila axonální ztrátu a hypomyelizovaná vlákna, což je projevem těžké chronické demyelinizační neuropatie. Po konci vyšetření byla u pacienta diagnostikována CMT. Při fyzikálním vyšetření ve věku 42 let byl pacient schopen chůze bez pomoci, avšak jen 30 metrů z důvodu snadné unavitelnosti. Oproti předešlému motorickému vyšetření se tedy jedná pouze o mírnou progresi. U pacienta se však vyskytla mírná ztráta sluchu. Nebyly pozorovány poruchy dýchání ani polykání, stejně jako žádné patologické reflexy. Hladiny kreatinkinázy v séru byly v referenčním rozmezí. Pacient odmítl neuropsychologické vyšetření. Karyotyp byl normální a nebyly nalezeny žádné mutace v genech PMP22, MPZ, GJB1, GDAP1 ani SH3TC2. Z důvodu pacientova *nystagmu* a ztráty sluchu bylo provedeno MRI mozku (viz Obr. 4). MRI prokázalo hypersenzitivní lézi v obou *putamen*. Následně byly provedeny svalové a kožní biopsie. Histologické vyšetření svalu prokázalo výrazné snížení COX ve všech vláknech (18 % průměrných hodnot), (viz Obr. 5). U kultivovaných fibroblastů byl také detekován deficit COX s 26 % průměrných hodnot. Nebyly identifikovány žádné patologické variace v genech způsobujících deficit komplexu IV. (Echaniz-Laguna *et al.*, 2013)



Obr. 4: Hypersenzitivní léze v obou *putamen* 42letého probanda s CMT. (Upraveno podle: Echaniz-Laguna *et al.*, 2013)



Obr. 5: Histologické vyšetření svalu – porovnání kontrolního vzorku a vzorku probanda s onemocněním CMT. (Upraveno podle: Echaniz-Laguna *et al.*, 2013)

Pozorování vedlo k hypotéze, že mutace v SURF1 mohou být nerozpoznanou příčinou CMT4. Pro potvrzení nebo vyvrácení tvrzení hypotézy se ve výzkumu zkoumal gen SURF1 u celkem 40 pacientů s CMT4, a to po vyloučení mutací ve známých genech CMT4.

U dalšího pacienta s CMT4 byly zjištěny dvě další mutace SURF1. Všichni pacienti vykazovali těžkou periferní neuropatii se začátkem v dětství a laktátovou acidózu. U dvou z výše zmíněných pacientů byla provedena podrobná klinická hodnocení, která zahrnovala věk nástupu příznaků, klinickou anamnézu i s výsledky vyšetření, elektrodiagnostické studie, laktát a studie MRI mozku. Pomocí MRI mozku byly zjištěny abnormality.

Mutace na genu nebyla schopná produkovat normálně sestřížený transkript. To vedlo k absenci SURF1. Komplex IV si však zachoval svou aspoň částečnou funkčnost ve svalu i fibroblastech. (Echaniz-Laguna *et al.*, 2013)

Periferní neuropatie jsou poměrně dobře známou komplikací mtDNA a jaderně kódovaných mitochondriálních genových mutací. Např. pacienti s mutacemi v nukleárně kódovaných mitochondriálních genech jako MFN2 a GDAP1 (jedná se o geny kódující proteiny vnější mitochondriální membrány) obvykle vykazují axonální a demyelinizační formy CMT. (Echaniz-Laguna *et al.*, 2013)

3.2 Diabetes mellitus typu II

Příspěvek mitochondriální dysfunkce k poruchám metabolické signalizace inzulínu je naznačen analýzou genového pole. Ta reguluje mitochondriální produkci ATP a je spojena s inzulínovou rezistencí a *diabetes mellitus* typu II.

U obézních lidí, inzulín-rezistentních a diabetických pacientů se projevuje snížení oxidační kapacity mitochondriálního elektronového transportního řetězce. Genetické faktory, oxidační stres a změny v mitochondriální biogenezi mohou negativně ovlivnit mitochondriální funkci. To vede k inzulínové rezistenci a dále pak k patologickým stavům jako *diabetes mellitus* typu II. (Sádaba *et al.*, 2015)

3.3 Léčba pomocí IGF-1

IGF-1 je jednořetězcový polypeptid. Jeho struktura je velmi podobná (asi 50 %) s proinzulinem. Jedná se pravděpodobně o nejdůležitější regulátor intrauterinního růstu. Tato hypotéza je podpořena zjištěním, že škodlivé mutace souvisí se snížením intrauterinním růstem a vývojem. Růstový hormon reguluje produkci IGF-1 v jaterních tkáních. IGF-1 naopak inhibuje produkci růstového hormonu v procesu negativní zpětné vazby. Za hlavní zdroj IGF-1 jsou považována játra, ale je také produkován v jiných tkáních včetně mozku, varlat, kosterního svalstva, kostí a chrupavek.

IGF-1 interaguje s inzulínem. Sekrece IGF-1 i inzulínu je stimulována příjmem potravy a inhibována hladověním. Velmi podobně jako růstový hormon i IGF-1 hraje významnou roli při citlivosti na inzulín. Receptor pro IGF-1 typu 1, který zprostředkovává biologické účinky IGF-1 má až 60% homologii aminokyselinové sekvence s inzulínovým receptorem. Intracelulární dráhy indukované inzulínem jsou sdíleny s IGF-1.

Je také známé, že IGF-1 je užitečný při záchraně neuronů, hematopoetických buněk a fibroblastů před apoptózou a hraje relativně důležitou roli v regulaci několika neuroendokrinních funkcí. (Sádaba *et al.*, 2015)

3.4 Genová terapie pomocí TSHA-104

TSHA-104 je genová substituční terapie založená na AVV9 kódující lidský protein Surf1 (Taysha Gene Therapies, 2021). AVV9 je jeden z nejstabilnějších a dobře prozkoumaných systémů pro dodávání transgenů. Mezi charakteristické znaky AAV patří jejich nepatogenita, neschopnost vyvolat imunitní odpověď, potenciál dosáhnout exprese transgenů a tropismu pro několik tkání těla. (Pattali *et al.*, 2019)

Surf1 jako součást COX se podílí na metabolické produkci ATP. Při nedostatku Surf1 je narušen celkový energetický metabolismus z důvodu neschopnosti adekvátně vytvářet ATP aerobním dýcháním. Tím se zvyšuje anaerobní dýchání a důsledkem jsou zvýšené hladiny laktátu a klinickému fenotypu LS. Na základě preklinických dat pro TSHA-104 bylo zjištěno, že náhrady genu mohou řešit charakteristické vlastnosti mitochondriální dysfunkce. To znamená, že dodání funkčního genu SURF1 vede k obnovení aktivity COX, mitochondriální funkci a koriguje zvýšené hladiny laktátu v těle. (Taysha Gene Therapies, 2021)

Experiment byl prováděn na myším modelu, kde byla pozorována exprese SURF1 v mozku a míše. Po aplikaci jedné dávky TSHA-104 do intratekálního prostoru (zpravidla se provádí v oblasti lumbální páteře) byla kodonová exprese lidského SURF-1 dostatečně vysoká k účinné obnově aktivity COX v mozku, játrech i svalech myší. Kombinace intratekálního a intravenózního podání nevykazovala žádný přínos oproti samotnému intratekálnímu podání, což vedlo jen k podpoře intratekálního podání. (Taysha Gene Therapies, 2021)

TSHA-104 zvýšil množství mitochondriálně kódované COX čtyři týdny po injekci v CNS i periferních tkáních a zvýšil aktivitu COX v mozku a svalech, v závislosti na dávce. Biochemická aktivita COX korelovala s histologickým obsahem COX. To podporuje regionální aktivitu COX. Po zátěži indukované laktátové acidóze byl TSHA-104 schopen

zachránit zvýšené hladiny laktátu u SURF1 experimentálních myší v závislosti na dávce. Bezpečnostní profil za použití dávkovacího režimu nestanovil žádná rizika související s toxicitou nebo závažným poškozením tkáně zjištěné do jednoho roku po injekci. (Taysa Gene Therapies, 2021)

TSHA-104 má schopnost snižovat laktátovou acidózu vyvolanou cvičením, čímž podporuje mitochondriální funkce při stavech stresu v těchto preklinických modelech. Tímto se zatím TSHA-104 řadí k bezpečným a účinným konceptům při záchraně metabolické dysfunkce u preklinických modelů deficitu SURF1 a podporuje další vývoj pro léčbu LS. (Taysa Gene Therapies, 2021)

4 LEIGHŮV SYNDROM

Jedná se o vzácnou heterogenní neurologickou poruchu, která je způsobena poškozením mitochondriální produkce energie. (Schubert Baldo a Vilarinho, 2020)

Prevalence LS je 1:40 000. (MedlinePlus: Leigh syndrome, 2016)

První popis tohoto syndromu provedl Denis Archibald Leigh v roce 1951, při posmrtném vyšetření sedmiměsíčního chlapce s progresivními neurologickými příznaky. Poté vydal postmortální diagnózu, která byla striktně definována histopatologickými pozorováními, indikativními laboratorními a radiologickými testy.

Biochemické hodnocení a specifický metabolický profil naznačovaly poruchu produkce energie v mitochondriích. (Baertling *et al.*, 2014)

V současnosti se s tímto syndromem pojí více než 75 jaderných genů a počet dalších genů, které jsou zodpovědné za rozvinutí tohoto syndromu, se neustále zvyšuje.

Klasická forma LS většinou nastupuje před druhým rokem života a manifestuje se v novorozeneckém období. (Schubert Baldo a Vilarinho, 2020)

LS patří mezi nejčastější projevy mitochondriální energetické poruchy v dětství. Z hlediska přenosu může jít o dva typy. Prvním typem je X-vázaný syndrom v důsledku jaderného mitochondriálního genomu, druhým typem syndromu je souhra mezi dvěma genomy. To vede k rozmanité heterogenitě a širokému rozsahu exprese genů a propuknutí syndromů od prenatálního období až po dospělost. (Carrol *et al.*, 2013)

V dětství je nejčastějším projevem LS nebo také onemocnění uváděné pod jiným názvem: subakutní nekrotizující encefalopatie. (Yadav a Variar, 2019)

4.1 Mitochondrie

Mitochondrie jsou víceúlohovými a semiautonomními organelami eukaryotních buněk. Skládají se ze dvou membrán a kruhové mtDNA. Mezi jejich nejdůležitější funkce patří produkce buněčné energie. Energii produkují prostřednictvím cyklu trikarboxylových kyselin a elektronového transportního řetězce. Jedná se o funkce pro generování ATP v aerobním metabolismu prostřednictvím OXPHOS. Jakékoli poškození OXPHOS výrazně sníží zásoby energie v orgánech s vysokou energetickou náročností a tím může vyvolat odpovídající symptomy.

Mitochondriální genom se dědí po mateřské linii. Heteroplazmické mutace mtDNA mohou být zděděny matkou, ale podíl mutovaných alel se mezi potomky v rámci jedné generace výrazně liší.

Pokud je zmíněna mtDNA, pak je míněn i multikopiový genom. Pokud existují mutace, mohou ovlivnit různý podíl mtDNA, která je přítomna v každé buňce daného jedince.

Mitochondriální proteom (asi 1500 proteinů) má dvojí genetický původ, a to mitochondriální i jadernou DNA. Mitochondriální DNA je kruhovou molekulou a je děděna výhradně z mateřských mitochondrií. Kóduje 13 proteinů spolu s 22 tRNA a 2rRNA, které jsou nezbytné pro jejich transkripci a translaci.

Mitochondriální poruchy tvorby energie patří mezi nejčastější skupinu vrozených poruch metabolismu v důsledku dysfunkce u OXPHOS (Zhang *et al.*, 2018).

Poruchy udržování mtDNA jsou skupinou mitochondriálních poruch způsobenými genetickými defekty, které zahrnují replikaci a udržování mtDNA, dodávku a rovnováhu nukleotidů, mitochondriální dynamiku a kontrolu kvality, která může vést k depleci mtDNA nebo abnormální akumulaci mnohočetných delecí mtDNA ve všech orgánových tkáních. Poruchy udržování mtDNA mohou být zděděny autozomálně dominantním nebo autozomálně recesivním způsobem a mohou být klasifikovány jako syndrom mnohočetných delecí mtDNA. (Viscomi a Zeviani, 2017)

4.2 Příčiny a symptomy Leighova syndromu

LS v současnosti zahrnuje geneticky a klinicky heterogenní skupinu dědičných neurodegenerativních poruch. U těchto poruch je základním neuroradiologickým znakem bilaterální léze v mozkovém kmeni a bazálních gangliích s heterogenními neurologickými projevy. Mezi tyto projevy patří spasticita, ataxie, dystonie, hypotonie, opožděný vývoj, popřípadě ještě regrese, oftalmologické abnormality (např. optická atrofie, *nystagmus*) a variabilní multisystémové postižení. (Lake *et al.*, 2015)

Genetický základ LS tvoří více než 75 genů, které byly identifikovány jak u postižených pacientů s téměř všemi vzory mendelovské dědičnosti, tak i u dokumentovaných nemendelovských dědičností, a to mitochondriálním přenosem z matky. Většina těchto genů kóduje strukturální proteiny systému OXPHOS uložené na vnitřní mitochondriální membráně prováděné komplexy I až V, nosičem elektronů koenzymem Q a cytochrom c. Tyto geny se podílejí i na případném narušení aktivity pyruvátdehydrogenázy.

U LS tedy mohou být přítomny méně časté defekty, zahrnující mnoho kroků translace mtDNA nebo defekty v udržování mtDNA. (Souza *et al.*, 2019)

4.3 X-vázaná recesivní porucha

Matroklinně dědičný LS představuje asi 10-20 % z diagnostikovaných syndromů Leighova typu. Mutace v komplexu I a komplexu V patří mezi nejčastější příčiny, přičemž nejdůležitější je mutace komplexu V. (Mayorga *et al.*, 2018)

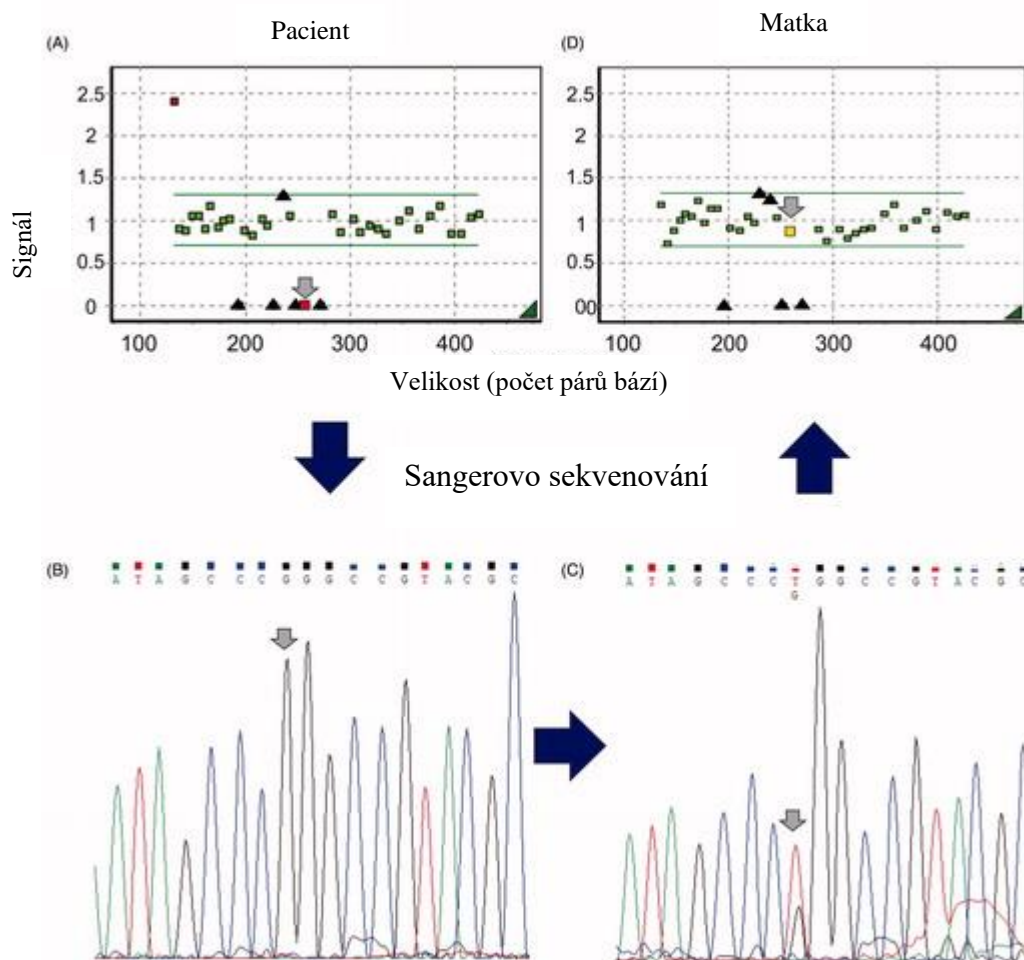
Studie z roku 2018 (Mayorga *et al.*, 2018) se zaměřila na děvče narozené zdravým rodičům z nepříbuzenského sňatku. Ve věku tří měsíců se u ní objevila centrální hypotonie, encefalopatie, hyperlaktacidémie a záchvaty. Trpěla také kardiomyopatií, která vyžadovala léčbu betablokátory. MRI jejího mozku ukázala symetrické nekrotické léze v bazálních gangliích a mozkovém kmeni. Její metabolické biochemické vyšetření ukázalo zvýšené množství kyseliny mléčné, pyrohroznové, jantarové a fumarové v moči. Aminokyseliny v plazmě obsahovaly vysoké hladiny alaninu.

Po zkoumání rodinné anamnézy bylo zjištěno, že nevlastní bratr z matčiny strany, který měl podobné klinické nálezy a zemřel ve věku sedmi měsíců, byl zcela bez určení lékařské diagnózy.

Prvním krokem v molekulární diagnostice mtDNA byla provedena multiplexní amplifikace sondy závislá na ligaci na leukocytární DNA pacienta. Sonda, jejíž úlohou je hybridizace s mtDNA mezi pozicemi m.8957 a m.9023, se ve vzorku pacienta vůbec neamplifikovala (viz Obr. 6A).

Na základě výsledků sondy s úlohou hybridizace mtDNA byla vytvořena spekulace, že se v této oblasti nachází mutace a ta zabraňuje hybridizaci, ligaci a amplifikaci sondy. Následovala sekvence výše zmíněné DNA. Pomocí Sangerova sekvenování pacientova genu MT-ATP6 byla odhalena mutace m.8993T v homoplazii (viz Obr. 6B). DNA matky vykazovala stejnou mutaci v heteroplazii (viz Obr. 6C). (Mayorga *et al.*, 2018)

mtDNA multiplexní amplifikace sondy závislá na ligaci



Obr. 6: Molekulární charakterizace pacienta a matky. Rámečky mezi vodorovnými čarami odpovídají poměrům oblastí přítomných v normálním počtu kopií. Políčka pod nebo nad vodorovnými čarami odpovídají poměrům oblastí, které jsou v analyzovaném vzorku odstraněny, popřípadě duplikovány. Šedé šipky ukazují na sondu m.8957 – m.9023, která byla nalezena bez amplifikačního signálu u pacienta (A), ale s normálním amplifikačním signálem u matky (D). Sangerovo sekvenování MT-ATP6 pacienta a matky ukazují malé šipky, které směřují na mutaci m.8993T nalezenou v homoplazii u pacienta (B) a v heteroplazii u matky (C). (Upraveno podle Mayorga *et al.*, 2018)

4.3.1 Heteroplazmická mutační zátěž u LS spojeného s mtDNA

V tomto případě je LS klasifikován jako Leighovy syndromy spojené s mtDNA a nDNA. Liší se svými genotypy, prevalencí a klinickými rysy. LS spojený s mtDNA je mateřsky dědičný a jeho klinické projevy jsou ovlivněny patogenitou mutantní mtDNA.

Mutační zátěž na fenotyp pacientů je komplexní, protože řada aspektů tohoto syndromu nebyla dosud objasněna, stejně jako je nejasný vztah mezi různými mutacemi a zátěží

heteroplazmických mutantů. Z tohoto důvodu vykazují pacienti s LS spojeným s mtDNA různé klinické projevy v závislosti na jejich mutační zátěži.

Z jedinců pravděpodobně trpících LS zapsaných v *Klinice mitochondriálních chorob v nemocnici Gangham Severance* v městě Soul v Korejské republice bylo vybráno 130 pacientů, kterým byl LS diagnostikován mezi lety 2006 až 2018. Mezi kritéria pro vybrání pacientů patřilo progresivní neurologické onemocnění s motorickým a intelektuálním vývojovým opožděním, příznaky a symptomy onemocnění mozkového kmene a/nebo bazálních ganglií, zvýšená koncentrace laktátu nad referenční rozmezí v krvi a/nebo mozkomíšního moku a bilaterálně symetrické abnormality hyperintenzního signálu v mozkovém kmeni a/nebo bazálních gangliích na snímcích MRI.

Byla sekvenována celá mtDNA pacientů a tím byly objeveny mutace u 31 pacientů. Následně byli ze studie vyloučeni 4 pacienti, protože se u nich nacházela mtDNA s nepotvrzenou patogenitou a takovéto případy nebyly dříve v kazuistikách popsány.

Zbývajících 27 pacientů bylo podrobena dalším testům. U těchto 27 pacientů bylo geneticky zjištěno, že mají LS s mtDNA. 9 z 27 pacientů byli muži. 20 pacientů (74,1 %) vykazovalo první symptom před dosažením věku 24 měsíců, což je v souladu s kritérii pro diagnózu LS s časným nástupem.

Nejčastěji prvním hlášeným příznakem u většiny pacientů bylo zpoždění nebo pokles vývoje, záchvaty, ataxie, hypotonie, porucha vidění a porucha chůze. U všech pacientů se projevovaly problémy s CNS (např. nervový záchvat). Problémy s viděním vykazovalo 59,3 % pacientů a problémy s dýchacím systémem (např. dýchací potíže) mělo 44,4 % pacientů. Relativně vysoké procento pacientů (40 %) trpělo i postižením gastrointestinálního traktu (např. potíže s polykáním). Průměrný věk, ve kterém byl LS pacientům diagnostikován, byl 28 měsíců, přičemž střední časový interval od objevení se prvního příznaku až do klinické diagnózy byl devět měsíců.

Geneticky potvrzené případy LS spojeného s mtDNA byly klasifikovány na základě mutací pozorovaných v šesti genech nebo deseti nukleotidech mtDNA. Mutované mitochondriální geny odpovídající každé změně nukleotidu byly klasifikovány na základě dříve potvrzených patologických variant. 27 pacientů účastníci se studie bylo klasifikováno na základě šesti mutovaných genů. Většina pacientů měla mutace v genu MT-ATP6. Následně se mutace ještě objevovaly v genech MT-ND3 a MT-ND5. Mutace v genech MT-ND1, MT-ND4 a MT-ND6 se vyskytly každá u jiného pacienta samostatně, což znemožnilo srovnávací analýzu.

Podle předchozích studií jsou MT-ATP6, MT-ND3, MT-ND5 a MT-ND6 klasifikovány jako typické klíčové geny u vzniku LS spojeného s mtDNA, protože se s vysokou frekvencí vyskytují po celém světě. (Young-Mock a Ji-Hoon, 2022)

Mutace MT-ATP6 byly hlášeny u 5–10 % všech pacientů s LS. (Lake *et al.*, 2015)

Heteroplazmická mutantní zátěž pacientů se pohybovala od 55,5 % do 100 % s mediánem 96,3 %. MT-ATP6 vykazoval relativně vysokou mutantní zátěž, zatímco MT-ND5 relativně nízkou.

Frekvence mutací mtDNA je přibližně 1 z 200. Tyto mitochondriální poruchy jsou diagnostikovány u 1 z 5 000 až 10 000 živě narozených dětí. LS s mtDNA tvoří 21–34 % všech případů LS. V této studii byl LS spojený s mtDNA potvrzen u 31 ze 130 klinicky diagnostikovaných případů LS. (Young-Mock a Ji-Hoon, 2022)

4.4 Typy Leighovy syndromu

Z let 2006 až 2017 byly z nemocnice *Gangnam Severance Hospital* v Soule použity záznamy o pacientech s LS pro studii, která se zabírala věkem nástupu tohoto onemocnění. Mezi pacienty bylo 89 pacientů (80,9 %) s nástupem onemocnění před věkem dvou let a 21 pacientů (19,1 %) s nástupem po věku dvou let.

Pro studii bylo důležité analyzovat podskupiny dle věku prvního klinického obrazu, věku diagnózy a několik prvních příznaků, které byly významné pro klinické statistiky. Co se týče porovnání těchto dvou skupin, z hlediska diagnostického hodnocení a MRI nevykazovaly žádné významné rozdíly.

Rozdíl byl ale pozorován v klinickém stavu a při poslední návštěvě byly patrné rozdíly v klinické závažnosti. Ve věkové skupině s časným nástupem byl klinický stav závažnější v porovnání se skupinou s pozdním nástupem. Pozdní nástup je však velmi vzácný. (Hong *et al.*, 2020)

4.4.1 Časný nástup

První dítě zdravých a nepříbuzných rodičů japonského původu bez rodinné anamnézy neurodegenerativních onemocnění se narodilo ve 37. týdnu (přesně 37 týdnů a 2 dny) císařským řezem. Jednalo se o děvče s porodní váhou 2698 g a obvodem hlavy 33,5 cm. Apgar skóre bylo 5 v první minutě po narození a 6 v páté minutě po porodu.

Ihned po narození se u děvčete projevila hypotonie a apnoe. Apnoe je chorobný stav, při kterém dochází k opakovanému nekontrolovatelnému zadržení dechu po určitý časový interval. Po dobu dvou dní byla nutná mechanická ventilace.

Její hladina laktátu v krvi byla zvýšená v novorozeneckém období a v celém tomto období měla problémy s krmením.

Po 14 dnech provedené MRI mozku nebylo ničím patologické, avšak vývojové opoždění bylo viditelné již v prvních měsících života. Projevem bylo, že děvčátko nebylo schopné se usmívat nebo sledovat předměty očima.

Ve třech měsících se u ní projevíly opakované fokální záchvaty s tonickým držením končetin. MRI mozku odhalilo cerebrální atrofii a bilaterální léze v bazálních gangliích a v mozkových pedinkulech. Laboratorní testy ukázaly výrazné zvýšení laktátu a pyruvátu. Na základě výše zmíněných nálezů byl diagnostikován LS.

Léčba byla zahájena mitochondriální koktejlou terapií pozůstávající z biotinu, koenzymu Q10, komplexu vitaminů B, vitaminů C a E i karnitinu. Záchvaty byly přechodně kontrolovány podáváním klobazamu.

V šesti měsících se u pacientky vyvinuly shluky tonické extenze horních končetin a s očima driftujícími vzhůru. EEG ukázal multifokální paroxysmální hroty a iktální EEG ukázal vysokonapěťové vlny, které vedly k diagnóze symptomatické epilepsii. Po nasazení terapie adrenokortikotropním hormonem (0,005mg/kg/den) po dobu dvou týdnů její kojenecká symptomatická epilepsie úplně vymizela a její EEG nález se výrazně zlepšil. Během léčby pomocí adrenokortikotropního hormonu však nastal progres v atrofii mozku a hladiny laktátu v krvi se až trojnásobně zvýšily.

Dva měsíce po terapii se symptomatická epilepsie vrátila. Záchvaty už nebylo možné plně kontrolovat, a to ani tehdy, když byl podán lék na léčbu epilepsie.

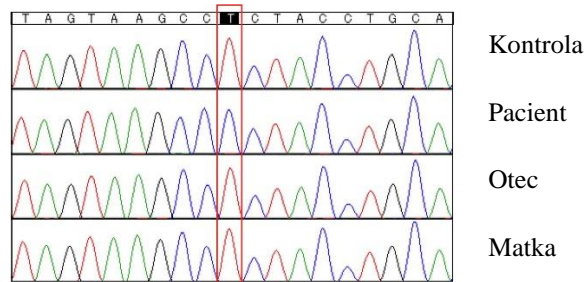
Následně byl zahájen druhý cyklus léčby adrenokortikotropním hormonem (0,01mg/kg/den) po dobu dvou týdnů s postupným snižováním dávky. Co se týče křečí, ty opět rychle ustaly, ale terapie vedla k výrazné atrofii mozku a zvýšení hladin laktátu v krvi.

Pacientka byla ve věku dvou let upoutána na lůžko z důvodu hypotonického ochrnutí všech čtyř končetin a trupu, nebyla schopná navázat oční kontakt a měla polykací potíže.

Pro analýzu mitochondriálních funkcí byla pomocí kožních testů fibroblastů analyzována rychlost spotřeby kyslíku a aktivita respiračních enzymů. Rychlost spotřeby kyslíku činila 59 % (mezní hodnota: 71,6 %) a respirační enzymové aktivity komplexu OXPHOS I-IV byly normální.

Podařilo se identifikovat homoplazmatickou variantu m.9185T>C v pacientčině krvi. Varianta byla viděna ve 28 z 28 sekvenčních čtení. Krev asymptomatické matky byla testována pomocí Sangerova sekvenování a výsledkem bylo zjištění, že postrádá variantu m.9158T>C. I když u této pacientky vznikla homoplazmatická varianta m.9185T>C *de novo*,

v mnoha případech se dědí po maternální linii. Protože vysoká mutační zátěž v postižené tkáni obecně vede k závažnému fenotypu, může rozdíl v mutační zátěži v mozku přispívat ke klinické závažnosti LS spojeného asociovaného s m.9185T>C. Dalším možným faktorem spojeným s progresí onemocnění jsou vlivy prostředí. U sledované pacientky však nebyla pozorována akutní onemocnění ani stresory prostředí, což naznačuje, že faktory prostředí jsou méně pravděpodobně spojeny s progresí onemocnění. (Takada *et al.*, 2019)



Obr. 7: Elektroferogramy získané Sangerovým sekvenováním MT-ATP6 s použitím krve pacienta a rodičů. V krvi pacienta byla identifikována homoplazmická varianta m.9185T>C. Variantní signál nebyl v elektroferogramech rodičů detekován, což naznačuje, že u pacienta vznikla varianta m.9185T>C *de novo*. (Upraveno podle: Takada *et al.*, 2019)

4.4.2 Pozdní nástup

Dříve zdravý, 12letý chlapec byl přijat do nemocnice 12. února 2016 se stížnostmi na pokles očního víčka, chrapot hlasu, horečku a neschopnost chůze a mluvení. Při poklesu očního víčka, chrapotu hlasu a horečce se jednalo o příznaky přetrvávající asi dva měsíce. Později si pacient stěžoval na ospalost, poruchy polykání, slabost končetin. Následovalo respirační a oběhové selhání. Klinické příznaky pacienta se po přijetí do nemocnice rychle zintenzivnily. Úmrtí pacienta následovalo dva měsíce po přijetí do nemocnice na progresivní dysfunkci mozkového kmene.

Co se týče porodu, pacient se narodil koncem pánevním a s porodní hmotností 3250 g, bez vývojového opoždění.

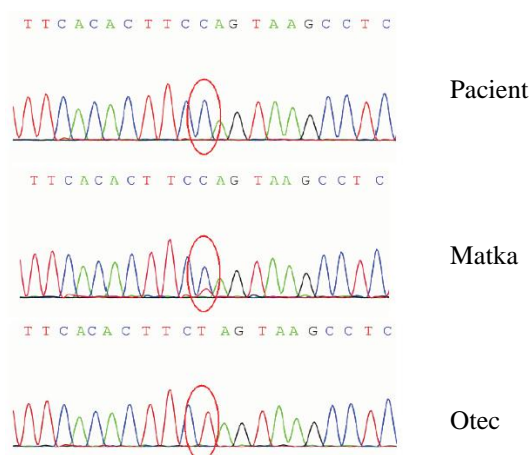
Ve věku 12 let vážil 50 kg a jeho výška byla 156 cm. Rodinná anamnéza, která byla podobná stavu pacienta, byla při jeho přijetí do nemocnice negativní.

U pacienta byly provedeny rutinní testy krve a moči, vyšetření močového sedimentu, rutinní testy stolice. Všechny testy vykazovaly fyziologické výsledky. Hladina laktátu v arteriální plazmě byla mírně zvýšena, hladina amoniaku a cukru byla fyziologická. Ostatní biochemické indexy krve byly fyziologické.

Cytologické a biochemické vyšetření prokázalo normální přítomnost mozkomíšního moku pozitivních protilátek proti acetylcholinu.

Dále byly provedeny testy protilátek na přítomnost *Mycoplasma pneumoniae*, virus *Herpes simplex* a virus Epstein–Barrové, všechny testy byly analyzovány s negativním výsledkem.

Analýza genového sekvenování odhalila T-to-C přechod na nukleotidu 9176 mitochondriálního genu ATPázy 6 (změna aminokyseliny z leucinu na prolin). Jednalo se tedy o pacienta s heteroplazmickou mutací od matky (viz Obr. 8).



Obr. 8: Sekvenční elektroforegramy ukazující substituci na m.9176T>C. Tato substituce byla odhalena ve vzorcích krve pacienta. Varianta této mutace se u pacienta vyskytovala ve zkoumaných tkáních a byla homoplazmická. Mutace byla nalezena také v mateřské krvi na nízké úrovni heteroplazie, ovšem nebyla nalezena ve vzorcích DNA otce pacienta. (Upraveno podle: Takada *et al.*, 2019)

MRI sken mozku ukázal symetrické abnormální signály v bazálních gangliích, mediálním thalamu, v oblasti středního mozku a bilaterální bílé hmotě v oblasti laterálních komor obou hemisfér.

Lékař diagnostikoval LS na základě klinických fenotypů, pozorování laktátové acidózy a cerebrálních lézí i díky analýze sekvenování genů. Na základě vyjádření lékaře se jednalo o LS s neobvykle pozdním nástupem rychle probíhajícími příznaky, který byl zděděn po matce.

Pacient byl léčen dva měsíce antivirotiky a léky na odvodnění (z důvodu snížení intrakraniálního tlaku). Denně mu bylo podáváno 100 mg komplexu vitaminů B, 300 mg vitamínu C, 50 mg vitamínu E, 90 mg koenzymu Q10 a 300 mg karnitinu. (Liang *et al.*, 2021)

4.5 Preimplantační genetická diagnostika

Jedná s o časnou formu prenatalní diagnostiky. Toto genetické testování se provádí na jedné blastomeře ze tří denních embryí, která byla získána po IVF. Do těla matky se přenesou pouze ta embrya, které se prokáží jako zdravá.

Páry, které se rozhodnou pro preimplantační genetickou diagnostiku proto, aby se vyhnuly přenosu genetického onemocnění, musí podstoupit léčbu IVF a intracytoplazmickou injekci spermie. Podobně jako u monogenních onemocnění, jsou PCR protokoly aplikovány na úrovni jedné buňky.

Následující kazuistika popisuje první klinickou zkušenost, která prokázala preimplantační genetickou diagnózu LS v důsledku mutace v SURF1 genu.

Jedná se o případ 42leté ženy. Její anamnézou je ztráta dvou dětí s úmrtím ve věku 5 a 7 let po diagnostikování LS u obou dětí.

Oba rodiče (nedotčení nositelé nt769 G/A mutace v SURF1 genu) požadovali IVF společně s preimplantační genetickou diagnostikou pro LS.

V IVF cyklu ženy bylo dvanáct oocytů. Sedm jich bylo mikroinjikováno a bylo získáno sedm embryí. Preimplantační genetická diagnostika byla provedena pomocí mikromanipulace, tedy odebráním jednotlivých blastomer ze sedmi embryí ve třetí den štěpení pro biopsii. Blastomery byly testovány na mutaci nt769 G/A v genu SURF1 pomocí analýzy polyakrylamidového gelu a amplifikací PCR.

Byla provedena celogenomová amplifikace pro biopsii každé buňky samostatně. Dle výsledku gelu byla nalezena tři embrya heterozygotní a tři homozygotní pro sledovaný gen LS. Jedno embryo nebylo hodnoceno. Pár poté podepsal formulář souhlasu s náhradou 3 embryí.

Jednočetné těhotenství bylo potvrzeno v 7. týdnu těhotenství pomocí ultrasonografie. Po bezproblémovém těhotenství se narodila holčička. (Unsal *et al.*, 2008)

4.6 Léčba

Prvním krokem léčby je kvalitně sledovat specifický fenotyp a věk nástupu. Nástup LS je důležitý pro predikci klinické závažnosti a prognózy. Pro každého pacienta je nutné poskytnout individuální léčbu a individuální protokoly sledování. (Hong *et al.*, 2020)

5 LEIGH-LIKE SYNDROM

Jak je patrné z předchozích kapitol, LS má značnou klinickou i genetickou heterogenitu, což vede k široké škále abnormalit. Leigh-like syndrom je nejenom syndrom v genetickém kontextu vycházející z LS včetně shodných fenotypových projevů, ale jsou k němu přidruženy ještě další. U LS je nejčastěji postižená CNS, což doprovází i psychomotorická retardace. Pacient převážně trpí záchvaty, optickou atrofií, ataxií a respiračním selháním. Pokud se k těmto příznakům připojí i postižení PNS nebo jiné komplikace kromě neurologických (malý vzrůst, *diabetes mellitus*, kardiomyopatie, anémie, zvracení a průjem), jsou tyto symptomy označovány jako Leigh-like syndrom. (Finsterer, 2008)

5.1 Leigh-like syndrom s fenotypem způsobeným m.1091T>C v MT-ND3

V následující kapitole bude jako příklad uvedena kazuistika pacientky s Leigh-like syndromem včetně genealogického kontextu.

Pacientem byla žena, 32 let, s výškou 170 cm a hmotností 120 kg. Byla narozená nepříbuzným rodičům.

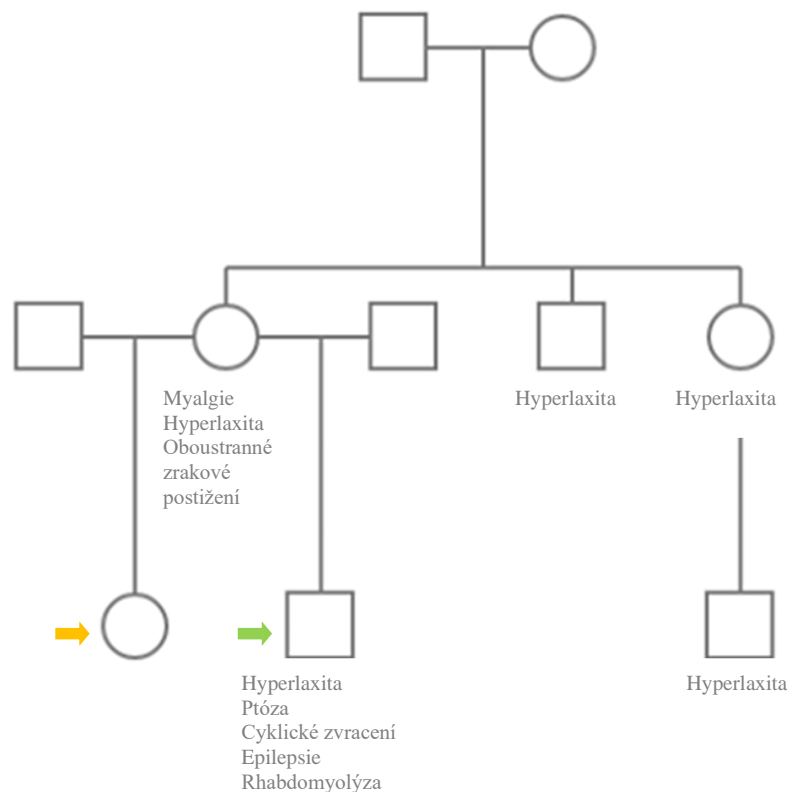
Její anamnéza po narození obsahovala těžkou novorozeneckou žloutenku a opožděný vývoj řeči (až do věku 2 let). Ve věku 3 let byla u pacientky pozorovaná hypermobilita kloubů s opakujícími se podvrtnutími končetin a snadná tvorba modřin. Ve věku 5 let se u ní projevila snížená vytrvalost a cvičením vyvolané pálení svalů, což se zlepšilo po odpočinku, přikládání studených obkladů a doplnění sacharidů. V tomto věku se u ní také začaly projevovat deprese, které byly léčeny antidepresivy od 12 let. Opakující se těžké průjmy byly pozorovány od 6ti let a podařilo se je zastavit až ve věku 26 let po podání *ubiquinolu*. Od 7 let se u ní projevovaly tonicko-klonické záchvaty s frekvencí několikrát ročně, migrény projevující se jednostrannou pulzující bolestí vpravo a také první synkopa, která se časem zvýšila na četnost několikrát denně do věku 14 let. Ve 12 letech byl pacientce diagnostikován hypogonadismus, *pseudotumor cerebri* s papilémem pak ve 14 letech. Od tohoto věku jí bylo diagnostikováno také mírné kognitivní poškození progredující do těžké exekutivní dysfunkce. Ledvinové kameny byly u ní nalezeny ve věku 18 let a celkem čtyřikrát poté. Od 19 let se u pacientky vyskytovala trvalá lymfocytóza a nervová bolest, taky supraventrikulární tachykardie. Holterovo monitorování a studie spánku odhalily recidivující centrální hypoventilaci. Ta se zlepšila aerobním tréninkem a podáním *ubiquinolu*.

Anamnéza dále pokračovala ve výpočtu: hypokorticismus úspěšně léčeným *hydrokortisonem* od 21 let, zvýšeným laktátem od 22 let, neuropatie malých vláken

diagnostikovaná kožní biopsií ve věku 23 let. V 25 letech se u pacientky projevila hemolytická anémie (nízký počet erytrocytů, nízký hematokrit). Pacientce byla provedena splenektomie v 26 letech. Hypogamaglobulinémie byla poprvé pozorována ve 30 letech. Zaznamenané byly také chronicky zvýšené zánětlivé markery, včetně sedimentace erytrocytů, hladina C-reaktivního proteinu byla 110mg/l, velmi vysoké byly i počty CD19.

Rozsáhlé vyšetření autoimunitních onemocnění nepřineslo žádný výsledek.

Co se týče pacientčiny rodiny, tak matka trpěla myalgií, hyperlaxitou a oboustranným zrakovým postižením (viz Obr 9).



Obr. 9: Rodokmen pacientky (oranžová šipka) a jejího nevlastního bratra (zelená šipka). (Upraveno podle: Newstead a Finsterer, 2022)

Nevlastní bratr pacientky (společná matka) trpěl středně těžkou levou ptózou, syndromem cyklického zvracení, epilepsií a syndromem rozpadu příčně pruhovaného svalstva charakterizovaným průnikem intracelulárního obsahu svalových vláken do cirkulace a extracelulární tekutiny (rhabdomyolýza), (viz Obr 9).

K těmto diagnózám se později přidal i horizontální *nystagmus* a ataxie při tandemové chůzi. Studie nervového vedení a jehlová elektromyografie nepřinesly žádné nové informace. CT mozku odhalilo abnormální kalcifikaci a mozková MRI prokázala mírnou periventrikulární hyperintenzitu bílé hmoty spolu s hypointenzivní lézí ve středním mozku.

Nebyl pozorován žádný laktátový pík a hladina kreatinkinázy se nacházela ve fyziologickém rozmezí. Laktát vykazoval mírné zvýšení hodnot, ale hladina pyruvátu byla fyziologická. Poměr laktát/pyruvát byl zvýšený, ale s aerobním tréninkem se upravil. Sérové hladiny kortizolu, adrenokortikotropního hormonu a aldosteronu byly nižší než u zdravého jedince.

Zkoumání moči přineslo ve výsledku nízký obsah organických kyselin (např. glykolová, 3-hydroxypropionová, 2-hydroxyisovalerová, jantarová, methyljantarová, glutarová, jablečná, adipová a citrónová). Na základě tohoto zjištění byla diagnostikována renální tubulární acidóza.

Neuropsychologické testy prokázaly závažnou exekutivní dysfunkci a sníženou rychlost zpracování informací, která se při opakovaném testování zhoršila.

Svalová biopsie prokázala víc než 10 % roztřepených červených vláken spolu s odpovídajícím roztřepenými modrými vlákny při barvení sukcinátdehydrogenázou. Toto barvení taktéž prokázalo 2 % COX negativních vláken, což je mnohem vyšší hodnota, než by se očekávalo u pacienta tohoto věku a odpovídající degeneraci vláken (viz Obr. 10). (Newstead a Finsterer, 2022)



Obr. 10: Svalová biopsie pacienta z pravého *musculus quadriceps femoris – rectus femoris*. Červená šipka označuje COX negativní svalová vlákna. (Upraveno podle: Newstead a Finsterer, 2022)

Genetické vyšetření ve věku 23 let u pacienta odhalilo variantu mtDNA m.10191T>C v MT-ND3 a variantu m.12770A>G v MT-ND5 v buňkách bukové sliznice. Tato varianta byla poté ještě dvakrát potvrzena, a to sekvenováním celého genomu i sekvenováním mtDNA. Matka byla pozitivně testována na variantu m.10191T>C.

Navzdory tomu, že pacient byl triatlonista, závodní para-plavec a jeho příjem byl méně než 1000 kcal/den, měl potíže s hubnutím. Pacient byl v době provádění jednotlivých vyšetření schopen vykonávat všechny činnosti denního života a i přes mírnou progresi byla jeho prognóza hodnocena jako dobrá. (Newstead a Finsterer, 2022)

5.2 Mutace v TMEM126B

TMEM126B obsahuje pět exonů a kóduje složku sestavení mitochondriálního komplexu I. Tato složka je nutná pro sestavení komplexu, avšak není součástí výsledného komplexu mitochondrií. Tyto mutace způsobují izolovaný deficit mitochondriálního komplexu I a mají za následek různorodé klinické fenotypy, např. intolerance zátěže, svalovou slabost, kardiomyopatii a renální tubulární acidózu. Do doby zveřejnění výsledků této studie (2023) bylo celosvětově nalezeno deset pacientů, kteří měli celkem čtyři mutace v TMEM126B. Žádný z pacientů nejevil neurologické potíže.

V této studii byly objeveny dvě nové heterozygotní mutace TMEM126B, a to díky sekvenování.

Pacientka byla přijata na pediatrickou kliniku *University First Hospital* v Pekingu. Její klinická diagnóza Leigh-like syndromu byla stanovena v souladu s doposud získanými informacemi.

Pacientka se narodila do nepříbuzné zdravé čínské rodiny s normálními gestačními a porodními záznamy.

Ve věku 15 měsíců chodila nejistou chůzí a na dva měsíce absolvovala rehabilitační trénink, avšak bez příznivých výsledků.

Ve dvou letech se u ní projevil strabismus v levém oku a přetrvávaly poruchy chůze. Ve třech letech měla slabou svalovou sílu, snížené svalové napětí a trpěla podvýživou. Měla však dobře vyvinuté reflexy a mentální reakce. Obličej pacientky byl žlutý, stejně jako dlaně a chodidla. MRI prokázalo symetrické skvrnitě signální stíny. Elektromyogram odhalil zpomalené vedení senzorigickým nervem na levém povrchovém svalu na zadní straně lýtká a normální vedení motorických nervů. Metabolické vyšetření prokázalo zvýšené hladiny laktátu v krvi spolu se zvýšenou kyselinou hydroxymáseľnou. Zvýšená byla taktěž hladina aspartátaminotranferázy, což naznačovalo zhoršenou funkci jater.

Sekvenování celého exomu a mitochondriální genomové sekvenování bylo provedeno pomocí sekvenátoru *Illumina HiSeq 2000*. DNA byla sekvenována z periferní krve pacientky a kontrola kvality proběhla pomocí elektroforézy na agarovém gelu. Varianta mutace v TMEM126B byla potvrzena pomocí Sangerova sekvenování. (Xiyue *et al.*, 2022)

6 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce pojednává o problematice Genu SURF1 a o jeho mutacích, které mohou způsobovat vážná genetická onemocnění. Mutace v genu SURF1 vedou k různým onemocněním spojených s poruchou produkce mitochondriální energie, např. k Charcot-Marie-Toothově chorobě. Mutace tohoto genu může být i jednou z možných příčin vzniku Leighova syndromu. Tento syndrom je řazen mezi vzácná neurodegenerativní onemocnění s heterogenními genetickými i klinickými příznaky.

Gen SURF1 se nachází na dlouhém raménku q chromozómu 9 na pozici 34.2 a kóduje tvorbu proteinu Surf1. Chromozóm 9 je jedním ze 46 chromozómů v somatické buňce člověka. Obsahuje 9 exonů a je tvořen přibližně 141 miliony párů bází. Při translokaci tohoto chromozómu a chromozómu 22 dochází ke vzniku Filadelfského chromozómu představujícího onkogen, který je zodpovědný ve fenotypovém projevu za vznik chronické myeloidní leukémie.

Gen SURF1 nese genetickou informaci pro stavbu proteinu Surf1. Tento protein hraje významnou roli v oxidativní fosforylaci, která probíhá na vnitřní mitochondriální membráně. Mitochondrie patří mezi hlavní zdroj energie produkované ve formě ATP v organismu. ATP se v organismu získává oxidativní fosforylací. Jednou z nejdůležitějších složek oxidativní fosforylace je COX – cytochrom c oxidáza. Ta katalyzuje přenos elektronů. Absence proteinu Surf1 vede ke snížení množství holoenzymu COX, která katalyzuje přenos elektronů, a to zapříčiňuje snížení její reaktivity.

Pro možnost zkoumání důležitosti a významu SURF1 genu bylo v posledních desetiletích vytvořeno několik zvířecích modelů s deficitem SURF1, avšak výsledky byly poměrně kontroverzní a neuspokojivé.

V roce 2021 byl proveden pokus na detekci tohoto genu s pomocí kolorimetrického biosenzoru. Vědci pro tento účel vyvinuli ultrasenzitivní kolorimetrický biosenzor pro detekci fragmentů SURF1. V této studii (2021) byla úspěšně ověřena reprodukovatelnost metody a citlivost biosenzoru, přičemž výsledky byly uspokojivé.

Gen SURF1 je podmiňujícím faktorem při různých syndromech a onemocněních. Jedním z nejznámějších onemocnění, která jsou podmíněna mutací genu SURF1, je Charcot-Marie-Toothova choroba typu 4K. Tento genetický syndrom je charakterizován svalovou slabostí a atrofií spojenou s poruchou distálního citění. Postiženy bývají jak horní, tak dolní končetiny.

Společnost *Taysha Gene Therapies* představila v roce 2021 novou genovou terapii pod názvem TSHA-104. Tato genová terapie je založena na principu adeno-asociovaném viru sérotypu 9. Jedná se o jeden z nejlépe prozkoumaných systémů, je hodnocen jako stabilní a nepatogenní. Po podání TSHA-104 se zvýšilo množství mitochondriálně kódované COX v myším modelu, který sloužil pro ověření účinnosti. Ze závěru laboratorních zkoušek vyplývá, že TSHA-104 má schopnost snižovat laktátovou acidózu vyvolanou cvičením. Tím podporuje mitochondriální funkci při stavech spojených se stresem ve zkoumaných preklinických modelech. Díky těmto výsledkům se prozatím řadí k bezpečným a účinným konceptům.

Mutace genu SURF1 může být i jednou z příčin Leighova syndromu. Jedná se o vzácnou heterogenní neurologickou poruchu, která je způsobena poškozením mitochondriální produkce energie. S tímto syndromem je v současnosti pojeno více než 75 genů, co znamená širokou heterogenitu jak klinického obrazu, tak jeho manifestaci. Rozeznáváme dva základní typy Leighova syndromu. Klasická forma (časný nástup) se projevuje před druhým rokem života a její následky jsou vážnější než u pozdního nástupu. Druhá forma Leighova syndromu (s pozdním nástupem) je klasifikována při výskytu až po druhém roce života a je velmi vzácná.

Leighův syndrom nemá pevně nadefinované průvodní fenotypové příznaky. Diagnostika probíhá na základě MRI a biochemických testů, případně testů prováděných individuálně v případě každého pacienta. Avšak mezi časté projevy patří bilaterální léze v mozkovém kmeni a bazálních gangliích, poruchy centrální nervové soustavy s psychomotorickou retardací, oftalmologické abnormality, respirační selhávání a variabilní multisystémové postižení.

Leigh-like syndrom je ve své podstatě odvozen od klasického Leighova syndromu, přičemž se u něj přidružují i jiné, málo časté projevy. Zatím co u Leighova syndromu je většinou poškozena centrální nervová soustava, u Leigh-like syndromu je poškozená i periferní nervová soustava a objevují se i jiné komplikace kromě výše zmíněných neurologických projevů, např. malý vzrůst, *diabetes mellitus* typu II, anémie, zvracení a průjem.

Z léčebného hlediska se v těchto případech onemocnění pacientů jedná pouze o tlumení jednotlivých projevů vhodnou medikací.

7 POUŽITÁ LITERATURA

ADEKEYE, A., D. AGARWAL, A. NAYAK a J. TCHOU. PTGES3 Is a Putative Prognostic Marker in Breast Cancer. *Journal of Surgical Research* [online]. 2022, 2022, (271), 154-162 [cit. 2022-12-21]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022480421005618>

AI-LING, L., D. A. PULLIAM, S. S. DEEPA, J. J. HALLORAN, S. A. HUSSONG, R. R. BURBANK, A. BRESNEN, Y. LIU, N. PODLUTSKAYA, A. SOUNDARARAJAN, E. MUIR, T. Q. DUONG, A. F. BOKOV, C. VISCOMI, M. ZEVIANI, A. G. RICHARDSON, H. VAN REMMEN, P. T. FOX a V. GALVAN. Decreased *in vitro* Mitochondrial Function is Associated with Enhanced Brain Metabolism, Blood Flow, and Memory in Surf1-Deficient Mice. *Journal of Cerebral Blood and Flow* [online]. 2013, 2013, (33), 1605-1611 [cit. 2023-02-27]. Dostupné z: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1038/jcbfm.2013.116>

BADEN, K. N., J. MURRAY, R. A. CAPALDI a K. GUILLEMIN. Early Developmental Pathology Due to Cytochrome c oxidase Deficiency Is Revealed by a New Zebrafish Model. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2007, 2007, **282**(48), 34839-34849 [cit. 2023-02-27]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M703528200>

BAERTLING, F., R. J. RODENBURG, J. SCHAPER, J. A. SMEITINK, W. J. H. KOOPMAN, E. MAYATEPEK, E. MORAVA a F. DISTELMAIER. A Guide to Diagnosis and Treatment of Leigh Syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* [online]. 2014, 2014, **85**, 257-265 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://jnnp.bmj.com/content/85/3/257>

BECKER, S. a J. BOCH. TALE and TALEN Genome editing technologies. *Gene and Genome Editing* [online]. 2021, 2021, **2** [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ggedit.2021.10000>

BROWN, G. Hematopoietic and Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells: Multi-Stability versus Lineage Restriction. *Stem Cell Biology and Cancer* [online]. 2022, 2022, **21**(23) [cit. 2023-02-14]. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/21/13570>

CARROL, C. J., V. BRILHANTE a A. SUOMALAINEN. Next-generation sequencing for Mitochondrial Disorders. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2013, 2013, **171**(8),

1837-1853 [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.12469>

CARVALHO, T. *Charcot-Marie-Tooth disease type 4 (CMT4)* [online]. 2022 [cit. 2023-02-22]. Dostupné z: <https://charcot-marie-toothnews.com/charcot-marie-tooth-type-4-cmt4/>

DA-RÉ, C., S. VON STOCKUM, A. BISCONTIN, P. BERNARDI, C. DE PITTÁ a R. COSTA. Leigh Syndrome in *Drosophila melanogaster*: Post-Transcriptional Silencing. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2014, 2014, **289**(42), 29235-29246 [cit. 2023-02-27]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.602938>

ECHANIZ-LAGUNA, A., D. GHEZZI, M. CHASSAGNE, M. MAYENCON, S. PADET, L. MELCHIONDA, I. ROUVET, B. LANNES, D. BOZON, P. LATOUR, M. ZEVIANI a B. M. DE CAMARET. SURF1 Deficiency Causes Demyelinating Charcot-Marie-Tooth Disease. *Neurology* [online]. 2013, 2013, **81**(17) [cit. 2023-02-22]. Dostupné z: <https://n.neurology.org/content/81/17/1523>

FINSTERER, J. Leigh and Leigh-like Syndrome in Children and Adults. *Pediatric Neurology* [online]. 2008, 2008, **39**(4), 223-235 [cit. 2023-05-15]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18805359/>

HONG, C. M., J. H. NA, S. PARK a Y. M. LEE. Clinical Characteristics of Early-Onset and Late-Onset Leigh Syndrome. *Frontiers in Neurology* [online]. 2020, 2020, (11) [cit. 2023-04-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00267>

JAIN, S., S. SHUKLA, C. YANG, M. ZHANG, Z. FATMA, M. LINGAMANENI, S. ABESTEY, S. T. LANE, X. XIONG, Y. WANG, C. M. SCHROEDER, P. R. SELVIN a H. ZHAO. TALEN Outperforms Cas9 in Editing Heterochromatin Target Sites. *Nature Communications* [online]. 2021, 2020, **12**(1) [cit. 2023-03-01]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-20672-5>

LAKE, N. J., A. G. COMPTON, S. RAHMAN a D. R. THORBURN. Leigh Syndrome: One Disorder, More than 75 Monogenic Causes. *Annals of Neurology* [online]. 2016, 2015, **79**(2), 190-203 [cit. 2023-03-27]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ana.24551>

LIANG, J. M., C. J. XIN, G. L. WANG a X. M. WU. Late-onset Leigh Syndrome without Delayed Development in China: A Case Report. *World Journal of Clinical Cases* [online].

2021, 2021, **9**(24), 7133-7138 [cit. 2023-04-12]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34540969/>

LIU, R. *SURF1 Gene* [online]. 2020 [cit. 2022-12-01]. Dostupné z: <https://encyclopedia.pub/entry/4697>

MAYORGA, L., J. A. CUETO, A. P. CORREA, M. J. GUILLAMONDEGUI, M. A. LOOS, V. H. ARAOZ, S. R. LAURITO a M. ROGUÉ. Maternally Inherited Leigh Syndrome Detected by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *Mitochondrial DNA Part B* [online]. 2019, 2018, **4**(1), 530-533 [cit. 2023-03-27]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/23802359.2018.1553510>

MedlinePlus [Internet]: Chromosome 9 [online]. 2020 [cit. 2022-12-02]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/chromozóme/9/#conditions>

MedlinePlus [Internet]: Leigh syndrome [online]. 2016 [cit. 2023-04-14]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/leigh-syndrome/>

MedlinePlus [Internet]: SURF1 gene: *SURF1 cytochrome c oxidase assembly factor* [online]. In: 2016 [cit. 2022-12-03]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/surf1/#resources>

MICK, D. a S. DENNERLEIN, H. WIESE, R. REINHOLD, D. PACHEU-GRAU, I. LORENZI, F. SASARMAN, W. WERAARPACHAI, E. A. SHOUBRIDGE, B. WARSCHEID a P. REHLING. MITRAC Links Mitochondrial Protein Translocation to Respiratory-chain Assembly and Translational Regulation. *Cell* [online]. 2012, 2012, **151**(7) [cit. 2022-12-08]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23260140/>

NAIK, M. K., D. N. MISHRA, S. ROUT, P. PANDA, S. K. PANDA, S. R. DAS, T. MISHRA a C. MOHAPATRA. Philadelphia Chromosome in Pretherapeutic Cases of Chronic Myelogenous Leukemia. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* [online]. 2016, 2016, **1**(7), 206 - 220 [cit. 2023-02-14]. Dostupné z: doi: <https://ijpsr.com/bft-article/philadelphia-chromosome-in-pretherapeutic-cases-of-chronic-myelogenous-leukemia/>

NEWSTEAD, S. M. a J. FINSTERER. Leigh-Like Syndrome With a Novel, Complex Phenotype Due to m.10191T>C in Mt-ND3. *Cereus* [online]. 2022, 2022, **14**(9) [cit. 2023-05-

23]. Dostupné z: <https://www.cureus.com/articles/108448-leigh-like-syndrome-with-a-novel-complex-phenotype-due-to-m10191tc-in-mt-nd3#!/>

PATTALI, R., Y. MOU a X. LI. AAV9 Vector: a Novel Modality in Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *Gene Therapy* [online]. 2019, 2019, (26), 287-295 [cit. 2023-02-27]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41434-019-0085-4>

PROSPEC: Product SURF1 Human [online]. In: 2016 [cit. 2022-12-05]. Dostupné z: <https://www.prospecbio.com/surfeit>

QUADALTI, C., D. BRUNETTI, I. LAGUTINA, R. DUCHI, A. PEROTA, G. LAZZARI, R. CERUTTI, I. DI MEO, M. JOHNSON, E. BOTANNI, P. CROCIARA, C. CORONA, S. GRIFONI, V. TIRANTI, E. FERNANDEZ-VIZARRA, A. J. ROBINSON, C. VISCOMI, C. CASALONE, M. ZEVIANI a C. GALLI. SURF1 Knockout Cloned Pigs: Early Onset of a Severe Lethal Phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease* [online]. 2018, 2017, **1864**(6), 2131-2142 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.03.021>

RODRIGEZ, M. J. S., P. PECINA, K. ČUNÁTOVÁ, M. VRBACKÝ, A. PECINOVÁ, R. SOBOTKA, C. VISCOMI, M. ZEVIANI, T. MRÁČEK aj. HOUŠTĚK. The Role of SURF1 Protein in Cytochrome c oxidase Biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta: Bioenergetics* [online]. 2022, 2022, (1863) [cit. 2022-12-04]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2022.148879>

SÁDABA, M. C., I. MARTÍN-ESTAL, J. E. PUCHE a I. CASTILLA-CORTÁZAR. Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) Therapy: Mitochondrial Dysfunction and Diseases. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease* [online]. 2016, 2015, **1862**(7), 1267 - 1278 [cit. 2023-02-22]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.03.010>

SCHUBERT BALDO, M. a L. VILARINHO. Molecular Basis of Leigh Syndrome: a Current Look. *Orphanet Journal of Rare Disease* [online]. 2020, 2020, **15**(31) [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13023-020-1297-9>

SCHWAIBOLD, E. M. C., M. SMOGAVEC a E. HOBBIEBRUNKEN, L. WINTER, B. ZOLL, P. BURFEIND, K. BROCKMANN a S. PAULI. Intragenic Duplication of EHMT1 Gene Results in Kleefstra Syndrome. *Molecular Cytogenetics* [online]. 2014, 2014, **7**(74) [cit. 2023-02-14]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13039-014-0074-7>

SOUZA, P.V.S., T. BORTHOLIN, C.A.C. TEIXEIRA, D. D. SENEOR, V. D. G. B. MARIN, R. B. DIAS, I. B. FARIAS, B. M. L. BADIA, L. H. L. SILVA, W. B. V. R. PINTO, A. S. B. OLIVEIRA a S. DIMAURO. Leigh Syndrome Caused by Mitochondrial DNA-Maintenance Defects Revealed by Whole Exome Sequencing. *Mitochondrion* [online]. 2019, 2019, **49**, 25-34 [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.06.008>

SURF1: *SURF1 Cytochrome c oxidase Assembly Factor* [Homo sapiens (human)] [online]. In:2022 [cit. 2022-12-03]. Dostupné z: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=\(surf1\[gene\]\)%20AND%20\(Homo%20sapiens\[organ\]\)%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]&sort=weight](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=(surf1[gene])%20AND%20(Homo%20sapiens[organ])%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]&sort=weight)

T. YU, Y. WANG, H. QUAN, Y. MENG, Z. WANG, C. ZHAO, Q. GUO a J. GE. A Colorimetric Biosensor for Ultrasensitive Detection of the SURF1 Gene Based on a Dual DNA-Induced Cascade Hybridization Reaction. *Analytical Methods* [online]. 2021, 2021, (40) [cit. 2022-12-21]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D1AY01102B>

TAKADA, R., T. TOZAWA, H. KONDO, Z. KIZAKI, Y. KISHITA, Y. OKAZAKI, K. MURAYAMA, A. OHTAKE a T. CHIYONOBU. Early Infantile-Onset Leigh Syndrome Complicated with Infantile Spasms Associated with the m.9185 T>C Variant in the MT-ATP6 Gene: Expanding the Clinical Spectrum. *Brain and Development* [online]. 2020, 2019, **42**(1), 69-72 [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2019.08.006>

TAYSHA GENE THERAPIES. Taysha Gene Therapies Announces Publication of Positive Preclinical Data for TSHA-104 Demonstrating Therapeutic Potential in SURF1-associated Leigh Syndrome in *Journal Molecular Therapy: Methods & Clinical Development* [online]. In: 2021, 2021 [cit. 2023-02-27]. Dostupné z: <https://ir.tayshagtx.com/node/7576/pdf>

UHLÉN, M. a L. FAGERBERG, B. M. HALLSTROM, C. LINDSKOG, P. OKSVOLD, A. MARDINOGLU, A. SIVERTSSON, C. KAMPF, E. SJOSTEDT, A. ASPLUND, I. M. OLSSON, K. EDLUND, E. LUNDBERG, S. NAVANI, C. A. SZIGYARTO, J. ODEBERG, D. DJUREINOVIC, J. O. TAKANEN, S. HOBER, T. ALM, P. EDQVIST, H. BERLING, H. TEGEL, J. MULDER, J. ROCKBERG, P. NILSSON, J. M. SCHWENK, M. HAMSTEN, K. VON FEILITZEN, M. FOSBERG, L. PERSSON, F. JOHANSSON, M. ZWAHLEN, G. VON HEIJNE, J. NIELSEN a F. PONTÉN. The Human Protein Atlas: Proteomics. *Tissue-*

based Map of the Human Proteome. *Science* [online]. 2015, 2015 [cit. 2022-12-08]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25613900/>

UNSAL, E., Y. AKTAS, O. UNER, A. BALTACI, S. OZCAN, F. TURHAN, V. BALTACI. Successful Application of Preimplantation Genetic Diagnosis for Leigh Syndrome. *Fertility and Sterility* [online]. 2008, 2008, **90**(5), 2017.e11-2017.e13 [cit. 2023-04-10]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028208014751>

Velký lékařský slovník On-Line [online]. Maxdorf 2023 [cit. 2023-06-05]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz>

VISCOMI, C. a M. ZEVIANI. MtDNA-Maintenance Defects: Syndromes and Genes. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. 2017, 2017, (40), 587-599 [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28324239/>

WANG, F., W. HOU, X. LI, L. LU, T. HUANG, M. ZHU a C. MIAO. SETD8 Cooperates with MZF1 to Participate in Hyperglycemia-Induced Endothelial Inflammation via Elevation of WNT5A Levels in Diabetic Nephropathy. *CELLULAR & MOLECULAR BIOLOGY LETTERS* [online]. 2022, 2022, **27**(1), 1-18 [cit. 2022-12-21]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35350980/>

XIYUE, Z., L. XIAOTING, Z. YUWEI, X. YAOJUN, H. XINYU, D. QIYU, Y. XIAOJIE, R. L. MAHLATSI, Z. LUYI, C. ZHEHUI, L. DONGXIAO, F. HEZHI, L. JIANXIN, Y. YANLING a W. YA. Novel Biallelic Mutations in TMEM126B Cause Splicing Defects and Lead to Leigh-like Syndrome with Severe Complex I Deficiency. *Journal of Human Genetics* [online]. 2023, 2022, **68**, 239-246 [cit. 2023-05-18]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s10038-022-01102-4#ref-CR14>

YADAV, P. a S. VARIAR. Leigh Syndrome: Case Report and Review of Literature. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* [online]. 2019, 2019, **13**(12), 1-3 [cit. 2023-04-10]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/338098849_Leigh_Syndrome_Case_Report_and_Review_of_Literature

YOUNG-MOCK, L. a N. JI-HOON. Heteroplasmic Mutant Load Differences in Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome. *Pediatric Neurology* [online]. 2023, 2022, **138**, 27-32 [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2022.09.006>

ZHANG, H., S. P. BURR a P. F. CHINNERY. The Mitochondrial DNA Genetic Bottleneck: Inheritance and Beyond. *Essays Biochem* [online]. 2018, 2018, **62**(3), 225-234 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1042/EBC20170096>