

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Marek Šípek

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Lidská mitochondriální DNA a její mutace

Bakalářská práce

2023

Marek Šípek

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Human Mitochondrial DNA and it's Mutations

Bachelor thesis

2023

Marek Šípek

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Marek Šípek**
Osobní číslo: **C19299**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Lidská mitochondriální DNA a její mutace**
Téma práce anglicky: **Human Mitochondrial DNA And Its Mutations**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši o zadaném tématu.
- 2) Definujte téma z genetického hlediska.
- 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: **18. prosince 2021**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen 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

v.r. Marek Šípek

Poděkování:

Rád bych touto cestou vyjádřil poděkování Mgr. Lucii Stříbrné, Ph.D. za její cenné rady, doporučení a trpělivost při vedení mé bakalářské práce.

ANOTACE

Lidská mitochondriální DNA je kruhová dvouvlákná molekula DNA, která se dědí výhradně po maternální linii, tedy po matce. Mutace v mtDNA mohou způsobit různá onemocnění, jako jsou mitochondriální myopatie, optická neuropatie nebo ztráta sluchu. Tyto mutace se vyskytují častěji než mutace jaderné DNA, pravděpodobně kvůli vysokému výskytu oxidačního poškození v mitochondriích.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mitochondrie, mitochondriální DNA, mutace mtDNA, mitochondriální onemocnění, diagnostika mitochondriálního onemocnění, léčba mitochondriálního onemocnění

TITLE

Human Mitochondrial DNA and its mutations

ANNOTATION

Human mitochondrial DNA is circular double-stranded DNA molecule that is exclusively inherited after maternal lineage, therefore from the mother. Mutations in mtDNA can result in range of diseases, including mitochondrial myopathies, optic neuropathy or hearing loss. These mutations occur more frequently than mutations in nuclear DNA, likely due to the high rate of oxidative damage in mitochondria.

KEYWORDS

Mitochondria, mitochondrial DNA, mutations of mitochondrial DNA, mitochondrial diseases, diagnostics of mitochondrial diseases, treatment of mitochondrial disease

OBSAH

| | |
|--|----|
| SEZNAM OBRÁZKŮ..... | 11 |
| SEZNAM ZKRATEK..... | 12 |
| TERMINOLOGIE..... | 16 |
| ÚVOD..... | 17 |
| 1 MITOCHONDRIE..... | 18 |
| 1.1 Evoluce mitochondrií..... | 19 |
| 1.2 Struktura mitochondrií..... | 20 |
| 1.3 Funkce mitochondrií..... | 21 |
| 2 MITOCHONDRIÁLNÍ DNA..... | 24 |
| 2.1 Struktura mitochondriální DNA..... | 24 |
| 2.2 Replikace, transkripce a translace..... | 25 |
| 2.3 Mateřská dědičnost mitochondriální DNA..... | 28 |
| 2.4 Mutace mitochondriální DNA..... | 30 |
| 2.5 Mitochondriální onemocnění..... | 30 |
| 2.6 Využití mitochondriální DNA..... | 31 |
| 3 MUTACE MITOCHONDRIÁLNÍ DNA..... | 32 |
| 3.1 Vznik a původ mutací..... | 32 |
| 3.2 Typy patogenních mutací..... | 32 |
| 3.2.1 Bodové mutace..... | 33 |
| 3.2.1.1 Sporadický a dědičný vznik bodové mutace..... | 33 |
| 3.2.2 Delece..... | 34 |
| 3.2.2.1 Sporadický a dědičný vznik delece..... | 35 |
| 3.3 Onemocnění spojené s mitochondriálními mutacemi..... | 35 |
| 3.3.1 Bodové mutace a jejich důsledky..... | 36 |
| 3.3.1.1 Mutace typu A3243G..... | 36 |
| 3.3.1.2 Mutace typu T12297C..... | 36 |
| 3.3.1.3 Mutace typu A4269G..... | 37 |
| 3.3.1.4 Mutace typu A8344G..... | 37 |
| 3.3.1.5 Mutace typu G8363A..... | 37 |
| 3.3.1.6 Leighův syndrom..... | 38 |
| 3.3.1.7 Mutace typu T8528C..... | 38 |
| 3.3.1.8 Mutace typu G3337A..... | 38 |

| | | |
|---------|---|-----------|
| 3.3.1.9 | Leberova dědičná neuropatie | 39 |
| 3.3.2 | Delece a jejich důsledky | 39 |
| 3.3.2.1 | Pearsonův syndrom..... | 39 |
| 3.3.2.2 | Kearnsův–Sayreův syndrom..... | 40 |
| 3.3.3 | Mitochondriální dysfunkce a její vztah k onemocněním | 40 |
| 3.3.3.1 | Parkinsonova nemoc | 40 |
| 3.3.3.2 | Alzheimerova choroba..... | 40 |
| 4 | DIAGNOSTIKA A LÉČBA MITOCHONDRIÁLNÍCH ONEMOCNĚNÍ | 42 |
| 4.1 | Technologie nové generace sekvenování | 42 |
| 4.2 | Technologie OMICS | 43 |
| 4.3 | Biochemické vyšetření..... | 44 |
| 4.4 | Léčba mitochondriálních nemocí | 45 |
| 4.4.1 | Genetické nůžky..... | 46 |
| 4.5 | Výskyt mitochondriálních onemocnění ve světě a u nás | 46 |
| 5 | ZÁVĚR | 48 |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|--|-----------|
| Obrázek 1 - Struktura mitochondrie | 18 |
| Obrázek 2 - Krebsův cyklus..... | 22 |
| Obrázek 3 - Schematické znázornění mitochondriální DNA..... | 24 |
| Obrázek 4 - Schéma replikace mtDNA | 26 |
| Obrázek 5 - Popis autofagie u druhu <i>C. elegans</i> | 29 |
| Obrázek 6 - Vzor dědičnosti mtDNA v rodině..... | 29 |
| Obrázek 7 - Genotypový a fenotypový vztah..... | 36 |

SEZNAM ZKRATEK

| | | |
|-------------------|---|---|
| A | adenin | adenin |
| AD | Alzheimerova choroba | Alzheimer's disease |
| ADP | adenosindifosfát | adenosine diphosphate |
| ATP | adenosintrifosfát | adenosine triphosphate |
| C | cytosin | cytosin |
| CO ₂ | oxid uhličitý | carbon dioxide |
| CSB2 | Sekvenční blok 2 | sequential block 2 |
| CPEO | chronická progresivní externí oftalmoplegie | Chronic Progressive External Ophthalmoplegia |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina | deoxyribonucleic acid |
| DNA2 | DNA2 nukleáza | DNA2 nuclease |
| EGT | endosymbiotické genové přenosy | endosymbiotic gene transfers |
| ELISA | enzymatická imunoassay | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay |
| EFG2 | mitochondriální ribosomální recyklační faktor G2 | Ribosome recycling factor G2, Mitochondrial |
| ETC | elektronový transportní řetězec | electron transport chain |
| FADH ₂ | flavinadenindinukleotid | flavin adenine dinucleotide |
| FEN1 | klapková endonukleáza 1 | Flap endonuclease 1 |
| G | guanin | guanin |
| GGQ | Gly-Gly-Gln tripeptid | Gly-Gly-Gln tripeptide |
| GFM1 | mitochondriální prodlužovací faktor G1 | Elongation factor G1, Mitochondrial |
| GTP | guanosintrifosfát | guanosine triphosphate |
| H ₂ O | voda | water |
| HGT | horizontální genové přenosy | horizontal gene transfers |
| HSP | promotor těžkého řetězce | the heavy-strand promotor |
| HSP1 | promotor těžkého řetězce 1 | the heavy-strand promoter 1 |

| | | |
|---------|---|---|
| HSP2 | promotor těžkého řetězce 2 | the heavy-strand promoter 2 |
| IMM | vnitřní membrána mitochondrií | Inner mitochondrial membrane |
| KSS | Kearnsův-Sayreovův syndrom | Kearns-Sayrer's syndrom |
| LHON | Leberova dědičná neuropatie zrakového nervu | Leber's Hereditary Optic Neuropathy |
| LSP | Promotor lehkého řetězce | the light-strand promoter |
| MELAS | mitochondriální encefalomyopatie, laktátová acidóza a příhody podobné mrtvici | Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes |
| MERRF | myoklonická epilepsie s roztrhanými červenými vlákny | Myoclonic epilepsy with ragged red fibres |
| MGME 1 | mitochondriální genom a udržovací exonukleáza 1 | mitochondrial genome and maintenance exonuclease 1 |
| MITRAC | mitochondrie syntetizované a importované podjednotky respiračního řetězce | mitochondria-synthesized and imported respiratory-chain subunits |
| MPC | vícejaderná kontraktilní buňka | Multinucleated contractile cell |
| MTERF 1 | mitochondriální terminační faktor 1 | Termination factor 1, Mitochondrial |
| MT-ND6 | mitochondriálně kódovaná NADH-ubichinon oxidoreduktázová podjednotka 6 | Mitochondrially Encoded NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 6 |
| MT-TK | mitochondriálně kódované TRNA-Lys | Mitochondrially Encoded TRNA-Lys |
| MT-TL 1 | mitochondriálně kódované TRNA-Leu | Mitochondrially Encoded TRNA-Leu |
| mtDNA | mitochondriální DNA | mitochondrial DNA |
| mtIF 2 | mitochondriální iniciační faktor 2 | Initiation factor 2, Mitochondrial |
| mtIF 3 | mitochondriální iniciační faktor 3 | Initiation factor 3, Mitochondrial |
| mtRNAP | faktorově závislá RNA polymeráza | factor-dependent RNA polymerase |
| mtRF1 | mitochondriální uvolňovací faktor | Mitochondrial Translation Release Factor |
| mtRRF | mitochondriální ribozomální recyklační faktor | Mitochondrial Ribosome Recycling Factor |
| mtssb | mitochondriální jednovláknový vazebný protein | Mitochondrial Single-Stranded DNA Binding Protein |
| NADH | nikotinamidadenin dinukleotidfosfát | nicotinamide adenine dinucleotide phosphate |

| | | |
|----------------|--|--|
| NGS | sekvenování nové generace | New generation sequencing |
| nDNA | jaderná DNA | Nuclear DNA |
| O ₂ | kyslík | oxygen |
| OMICS | vědní obory známé neformálně jako omika jsou různé disciplíny v biologii, jejichž názvy končí příponou – omika | The branches of science known informally as omics are various disciplines in biology whose names end in the suffix - omics |
| OXPHOS | oxidativní fosforylace | oxidative phosphorylation |
| PCR | polymerázová řetězová reakce | Polymerase chain reaction |
| PD | Parkinsonova nemoc | Parkinson´s diseases |
| PDH | pyruvát dehydrogenáza | pyruvate dehydrogenase |
| POLRMT | mitochondriální RNA polymeráza | RNA Polymerase, Mitochondrial |
| POLy | Polymeráza | Polymerase |
| POLy A | Polymeráza A | Polymerase A |
| POLy B | Polymeráza B | Polymerase B |
| PS | Pearsonův syndrom | Pearson´s syndrom |
| RNA | ribonukleová kyselina | ribonucleic acid |
| rRNA | ribosomální RNA | Ribosomal RNA |
| RP | pigmentová retinopatie | Retinitis pigmentosa |
| ROS | reaktivní formy kyslíku | Reactive Oxygen Species |
| SLSMD | rozsáhlé mitochondriální delece DNA | Large-Scale Mitochondrial DNA Deletions |
| T | thymín | thymín |
| TACO1 | translační aktivátor cytochromu c oxidázy 1 | Translational activator of cytochrome c oxidase 1 |
| TEFM | Faktor prodloužení transkripce | Transcription elongation factor |
| TFAM | mitochondriální transkripční faktor A | Transcription Factor A, Mitochondrial |
| TFB2M | mitochondriální transkripční faktor B2 | Transcription Factor B2, Mitochondrial |

| | | |
|------|--|---|
| TFEM | mitochondriální transkripční elongační faktor | Transcription Elongation Factor, Mitochondrial |
| tRNA | transferázová RNA | Transfer RNA |
| TUFM | mitochondriální prodlužovací faktor Tu | Elongation factor Tu, Mitochondrial |
| UAA | Stop kodon UAA | Stop codon UAA |
| UAG | Stop kodon UAG | Stop codon UAG |
| WGS | celogenomové sekvenování | Whole genom sequencing |

TERMINOLOGIE

Apoptóza – zánik buňky; programovaná buněčná smrt

Biogeneze – vznik organismu z organismů jemu podobných

Biomarker – indikátor stavu nebo události v biologickém systému

Biparentální mitochondriální dědičnost – zdědění mitochondriální genetické informace od obou rodičů

Delece mtDNA – úbytek mtDNA

Diferenciace buněk – proces vyžívání a rozlišování, během něhož jednotlivé buňky získávají specializované vlastnosti a funkce

Divoký typ DNA – termín používaný k popisu genu, pokud se nachází v jeho přirozené, nemutované formě

Exprese genu – proces, kdy se genetická informace, obsažená v genu, projeví jako fenotyp

Fagocytóza – proces, kdy buňka pohlcuje pevné částice z okolního prostředí

Fenotyp – soubor pozorovatelných znaků jedince, který je výsledkem jeho genotypu a působení prostředí

Genetický drift – stálá nebo náhodná změna ve frekvenci genů populace za jednotku času

Genom – veškerá genetická informace uložená v DNA

Haplotyp – kombinace alel, jež odkazuje na různá místa sekvence DNA

Helikáza – enzym, který při replikaci DNA rozvíjí dvoušroubovici DNA

Heteroplazmie – smíšená populace mutantních a normálních molekul mtDNA v jedné buňce

ÚVOD

Lidská mitochondriální DNA se od 90. let minulého století začala více dostávat do popředí a stala se genetickým artefaktem, který lze využít i v ostatních vědních oborech. Mitochondriální DNA se velmi často využívá např. v lékařské a forenzní genetice, kriminalistice, evoluční či systematické biologii. Tato bakalářská práce se zaměřuje především na lidskou mitochondriální DNA a její mutace. Cílem této práce je přiblížit a sjednotit nejnovější a dostupné informace o mitochondriích, o mitochondriální DNA a jejích mutacích. V této práci jsou uvedeny i diagnostické postupy, které jsou nezbytné k odhalení a určení diagnózy mitochondriálního onemocnění.

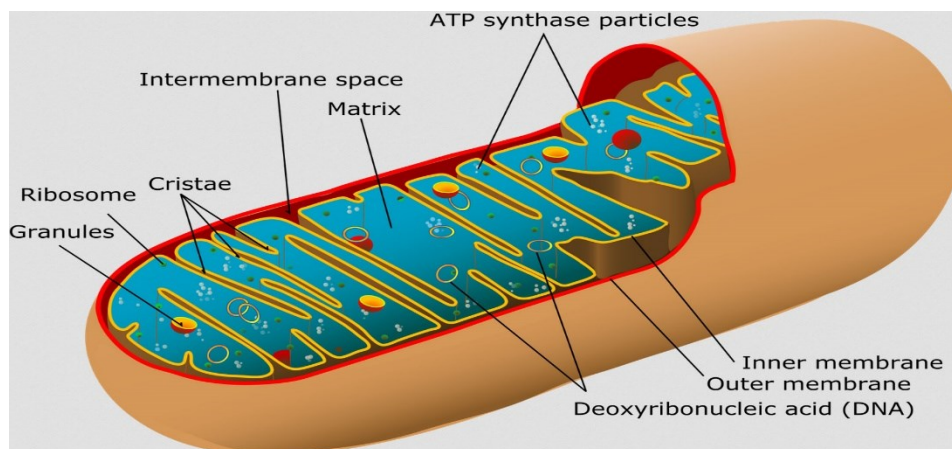
1 MITOCHONDRIE

Mitochondrie jsou organely endosymbiotického původu, které jsou obklopeny dvojitou membránou, (viz Obr. 1). Mitochondriální buňky jsou rozhodující pro řadu buněčných funkcí, jako je buněčný metabolismus, signalizace a apoptóza nebo produkce ATP oxidační fosforylací. S ostatními organelami se nacházejí v eukaryotických buňkách. Eukaryotická buňka je definována jako základní stavební a funkční jednotka všech organismů. Je rozlišována na živočišnou a rostlinnou buňku [1, 2].

Živočišná buňka obsahuje jádro a cytoplazmu, kterou obklopuje plazmatická membrána. Tato membrána způsobuje oddělení cytoplazmy od extracelulárního prostoru. Jejich charakteristickým znakem je organizace do membránově vázaných kompartmentů, neboli do endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu, endozómů, lysozómů, peroxizómů a mitochondrií. U většiny živočišných buněk nacházíme také řasinky. Endoplazmatické retikulum je podle současných poznatků zodpovědné taktéž za koordinaci zásadních procesů a homeostázy [2, 3].

Rostlinná buňka je odlišná od živočišné ve výskytu buněčné stěny, která obsahuje celulózu a další polysacharidy. Další odlišností jsou plastidy a plazmodezmy [4].

U eukaryot žijících v prostředí s nízkým obsahem kyslíku byly mitochondriální funkce do různé míry omezeny. V závislosti na existenci dýchacího řetězce, produkce vodíku a schopnosti vyrábět ATP byly mitochondriální organely rozděleny do 5 tříd, takzvaně do klasické aerobní mitochondrie, anaerobní mitochondrie, vodík produkující mitochondrie, hydrogenozóm a mitozóm [5].



Obrázek 1 - Struktura mitochondrie; DNA, ribozomy (ribosomes), DNA, Granule (Granulas), částice ATP syntetázy, matrix, vnější membrána (outer membrane), vnitřní membrána (inner membrane), mezimembránový prostor (intermembrane space), kristy (cristae). Převzato z [6]

1.1 Evoluce mitochondrií

V evoluci mitochondrií hrála největší roli endosymbióza, díky ní se pravděpodobně vyvinuly eukaryotické buňky do dnešní podoby [7].

Fenomén endosymbiózy neboli existence jednoho organismu ve druhém, hluboce ovlivnil evoluci života a nadále utváří ekologii nesčetných druhů. Určitá buňka působí jako hostitel a přijímá menší buňku, využívá k tomu fagocytózu či pinocytózu. Alternativně může endosymbiont využít specializované mechanismy pro vstup do cytoplazmy hostitelské buňky. Za úspěšného sjednocení endosymbionta do cytoplazmy hostitelské buňky dojde k jeho přetvoření za vzniku organely s jedinečnými vlastnostmi. Endosymbiont vytěží z jeho vztahu ochranu před případnými predátory, dále přístup k prostředí bohaté na živiny. Hostitelská buňka taktéž získává výhodu z tohoto vztahu v podobě nutriční cesty. Obecný předpoklad je, že právě tímto způsobem se vyvinula jednobuněčná eukaryota, a to z prokaryotických buněk, z domény starověkých *Archea* nebo primitivního eukaryotického předka. I když byla teorie endosymbiózy v roce 1920 odmítnuta buněčnými biology, v roce 1960 byla znovu přijata. Endosymbióza se využila i v případě charakteristiky a studia mnohobuněčných eukaryot [7, 8].

Literatura nabízí hned několik důkazů o endosymbióze. Jedním z nich je strukturní a funkční podobnost bakteriální DNA s mitochondriálními a chloroplastovými organelami. Další vychází z podobnosti bakteriálního biochemického aparátu, který je schopný produkovat ATP oxidativní fosforylací či fotosyntézou. Teorii endosymbiózy podporuje i senzitivita prokaryotických, chloroplastových a mitochondriálních ribozomů na podobné reagencie proti bakteriím. Nejvýznamnějším důkazem je, že organely mitochondrií a chloroplastů nejsou způsobilé vyvíjet se *de novo*. Namísto toho se zdvojují podobným způsobem jako je binární dělení [7, 9].

Jeden z nejpodstatnějších důkazů podpory této teorie pochází z organelových genomů. Organely mají tendenci uchovávat miniaturizovaný prokaryotický chromozóm kódující 200 proteinů nebo méně v případě plastidů, 63 proteinů nebo méně v případě mitochondrií. Navzdory této redukci genomu se obě organely nacházejí v řádu 2000 proteinů. Rozpor mezi počtem proteinů, které organely kódují a počtem proteinů, které obsahují je obecně vysvětlen teorií endosymbiózy, která zahrnuje přenos genů do jádra neboli endosymbiotický přenos genů (EGT). V průběhu evoluce bylo mnoho genů přeneseno z organel do chromozómů jejich hostitele. V raných fázích evoluce organel, před vynálezem zařízení pro import proteinů, které umožňovalo plastidům a mitochondriím importovat proteiny z cytosolu, se přenesené geny buď

staly pseudogeny, nebo se projevily jako cytosolické proteiny. S příchodem importu organelových proteinů mohly přenesené geny získat potřebné expresní a cílové signály, které by byly zaměřeny zpět na organelu, ze které byl získán jaderný gen [7].

Endosymbiotické genové přenosy se vyznačují přenosem a trvalým sjednocením genetického materiálu z endosymbionta do jádra hostitelské buňky. Jedním z důležitých faktorů EGT je vyvolání genové převahy hostitele, dále spuštění cytoplazmatických spojení a umožnění vhodné kontroly nad biosyntetickou kapacitou endosymbiontů. EGT se také může projevit ve fyziologických a strukturních změnách endosymbiontů. Jedná se o druh horizontálních genových přenosů (HGT) [10].

Předpokládá se, že k endosymbióze předchůdce mitochondrií došlo jenom jednou, kdežto u endosymbiózy chloroplastů, která vedla ke generaci moderních chloroplastů, došlo i několikrát. Tato mnohonásobná evoluce chloroplastů směřovala k různým stupňům endosymbiózy, což mělo za důsledek odlišné zaměření různých prvků, rostlin a řas. Na rozdíl od tohoto faktu se mitochondriální anatomie zdá být podobná u různých druhů. Výjimku tvoří pouze výskyt mitozónů a hydrogenozómů u některých prvků a organismů. Mitochondrie jsou považovány za endosymbiotickou rodovou linii proteobakterií a chloroplasty jsou vyvinuté formy sinic [7, 9].

Další z teorií původu mitochondrií je teorie vodíku. Ta vyvolává metabolickou symbiózu mezi doménou *Archea* produkující metan a α -proteobaktériemi. V tomto případě vzniká eukaryotická buněčná komplexnost po endosymbióze. Obě teorie jak teorie vodíku, tak teorie endosymbiózy zahrnují rozsáhlý přenos genu z α -proteobaktérie do archeálního hostitele a evoluci systému pro cílení proteinů kódovaných jádrem na endosymbionta, který se transformoval na organelu [8].

Zatím žádná z teorií o původu mitochondrií nebyla doposud uznána za jedinou správnou. Vzhledem ke skutečnosti, že se stále objevují nová data, dále se pracuje na variantách původních teorií a vznikají i teorie nové [11].

1.2 Struktura mitochondrií

Mitochondrie jsou organely protáhlého tvaru se zaoblenými konci. Vyznačují se dvojitou membránou. Rozdělují se na vnější a vnitřní membránu, vnější je porézní a volně průchozí pro ionty a malé molekuly bez náboje přes membránové proteiny (poriny), které tvoří póry. Jakékoliv větší molekuly, zejména proteiny, jsou převáděny speciálními translokázami. Vnitřní membrána je těsná difuzní bariéra pro všechny ionty a molekuly. Ty se mohou

transportovat pouze pomocí specifických transportních proteinů, z nichž každý je selektivní pro konkrétní iont nebo molekulu. Vnitřní membrána je místo, kde probíhá oxidační fosforylace v sadě membránových proteinových komplexů. Dále obsahuje proteinové komplexy F_1-F_0 , který je zodpovědný za syntézu adenosintrifosfátu (ATP) [12].

Vnitřní a vnější membrány mitochondrií vymezují tři kompartmenty uvnitř organely, z nichž každá má svou odlišnou roli a odpovídající proteinové složky. Je to mitochondriální matrix, která je místem replikace mtDNA, transkripce, biosyntézy proteinů a četných enzymatických reakcí. Dále zde najdeme mezimembránový prostor, o šířce 10-20 nm. Vnitřní membrána tvoří záhyby, nazývané *cristae*, které zasahují hluboko do matrice. *Cristae* definují poslední kompartment, *crista lumen*. Membrány *cristae* obsahují většinou plně sestavené komplexy elektronového transportního řetězce. Obsahují velké množství malého rozpustného nosného proteinu cytochromu c. Mitochondriální *cristae* jsou tedy hlavním místem přeměny biologické energie u všech eukaryot nevyužívající fotosyntézu [13].

Mitochondrie jsou dynamické organely, které tvoří komplexní síť trubicovitých struktur. Podstupují fúze a štěpení, aby vytvořily specifickou mitochondriální morfologickou síť podle potřeb buněčné energie, metabolického stavu buňky nebo se přizpůsobily buněčným podnětům. Mitochondriální fúze umožňuje organelám sdílet metabolity, proteiny a mtDNA a hyperfúzní mitochondriální morfologie je spojena s mechanismem obrany, který zvyšuje přežití buněk. Naproti tomu, zatímco fragmentace mitochondrií je často spojena s mitochondriální dysfunkcí a buněčnou smrtí, tento proces je také vyžadován pro mitochondriální pohyblivost [13, 14].

1.3 Funkce mitochondrií

Mitochondrie jsou převážně známé pro výrobu energie ve formě ATP. Ale nejsou jen výrobci energie, slouží také jako signální organela podílející se na mnoha dalších fyziologických funkcích, včetně apoptózy, syntézy hemových a železo-sírových klastrů a homeostázy vápníku [13].

Hlavní zdroj energie v buňkách pochází z defosforylace molekuly ATP na molekulu adenosindifosfátu (ADP). Aby byl tento proces udržitelný, buňka potřebuje používat živiny k regeneraci použitých molekul ATP. Molekula glukózy se v důsledku mnoha chemických reakcí postupně rozpadá na oxid uhličitý a její atomy vodíku se odizolují, ty se pak používají ke sloučení s kyslíkem a vzniká tak voda. První fáze tohoto děje je nezávislá na mitochondriích, je anaerobní a probíhá v cytosolu. Takto je popisován děj glykolýzy, při níž vznikají pouze dvě

Dalším způsobem výroby NADH a FADH₂ je využití procesu známého jako β-oxidace mastných kyselin, kdy je mastná kyselina přeměněna na mastný acyl-CoA a poté na kyselinu karnitinovou, aby mohla vstoupit do mitochondrií. Nakonec je znovu přeměněna na acyl-CoA. V organele se acyl-CoA s dlouhým řetězcem rozkládá na molekuly acetyl-CoA a vzniká jeden NADH a jeden FADH₂ pro každý pár uhlíků hydrolyzovaných z acylového řetězce [16].

Mitochondrie také hrají roli v regulaci buněčné smrti neboli apoptóze, která je nutná pro embryonální vývoj a řadu fyziologických funkcí. Apoptóza vede k řízené a programované buněčné smrti, která se může objevit jako reakce na různá poškození či stresory, např. jako poškození DNA, oxidační stres, imunitní reakce a na absenci určitých růstových faktorů, případně jako přirozená součást vývoje a stárnutí [17].

Za syntézu hemu a homeostázu vápníku jsou tedy zodpovědné mitochondrie. Pro transport a skladování kyslíku, přenos signálů a metabolismus léků a steroidů je důležitý hem neboli porfyrin, který obsahuje železo. Je nezbytný pro buněčné dýchání. Je také začleněn do několika podjednotek elektronového transportního řetězce. Jako signální molekula se ve velké míře používá vápník. Z tohoto důvodu je i jeho regulace kritická. Dále se využívá jeho zvýšená hladina na stimulaci syntézy ATP [13, 18].

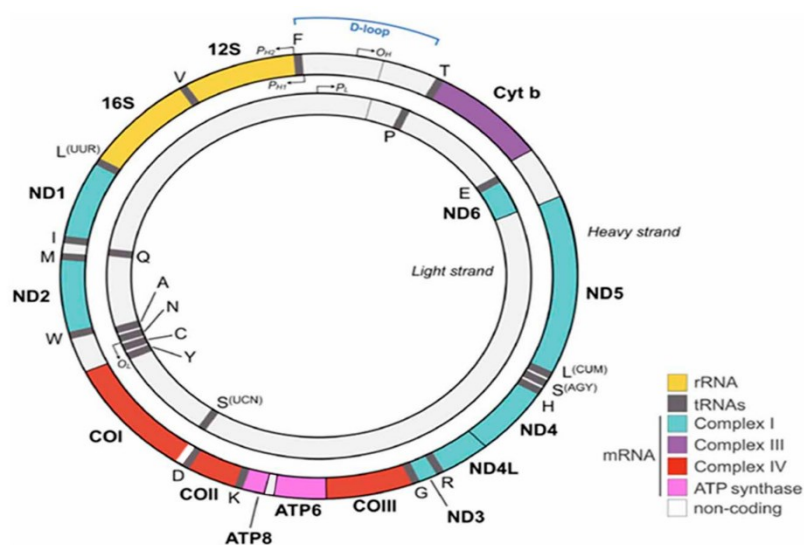
Enzymatický mechanismus provádějící buněčné dýchání neboli elektronový transportní řetězec (ETC), se skládá ze čtyř proteinových komplexů vložených do IMM a dvou mobilních nosičů elektronů, a to koenzymu Q a cytochromu c. Elektrony jsou transportovány z elektronových nosičů redukované během glykolýzy a Krebsova cyklu (NADH a FADH₂) na koenzym Q a cytochrom c, a nakonec přenesen na O₂, ze kterého se následně tvoří H₂O. Energie uvolněná tímto řetězcem redoxních reakcí vede ke generování elektrochemického protonového gradientu napříč IMM, který je využíván komplexem V, komplexem F₁ – F₀ nebo ATP syntetázou pro generování ATP [13, 19].

2 MITOCHONDRIÁLNÍ DNA

Dle výše uvedeného jsou mitochondrie tzv. semiautonomní organely, které produkují potřebné ATP k fungování buněčných funkcí a slouží jako centra zpracovávající metabolity, buněčné signalizace a regulaci apoptózy. K působení těchto funkcí se mitochondrie spoléhají na genetickou informaci ve svém genomu, tzv. na kruhovou mtDNA [20].

2.1 Struktura mitochondriální DNA

Každá buňka obsahuje 100 až 10000 kopií mtDNA, která je úměrně závislá na energetické náročnosti specifické tkáně. Lidská mitochondriální DNA má délku 16 569 párů bází a je uspořádána do dvouvláknové kruhové struktury, neobsahuje introny a je polycistronní, (viz Obr. 3). Jedná se přibližně o 1 500 genů, které byly během evoluce přeneseny do hostitelské buňky. Tímto způsobem došlo k vytvoření genomu jaderné DNA. Z celkového počtu genů je kódováno pouze 37 genů, 2 ribozomální RNA (rRNA) (12 S a 16 S) a 22 molekul transferové RNA (tRNA) a 11 mediátorových ribonukleových kyselin mRNA, přeložených na 13 proteinů. Všechny tyto proteiny jsou základními složkami systému tzv. oxidační fosforylace. Zbytek mitochondriálního genomu, který se v současné době odhaduje na 1 158 proteinů, je kódován jádrem v důsledku laterálního přenosu mitochondriálních genů. Tento evoluční tlak na redukci mtDNA znamená, že lidská mtDNA obsahuje jedinou nekódující oblast, a to oblast nazývanou se vytěšňovací smyčka nebo D-smyčka a oblasti překrývající se genů. D-smyčka je jako jediná na rozdíl do celé mtDNA třívláknová [21, 22, 23].



Obrázek 3 - Schematické znázornění mitochondriální DNA (mtDNA). Každý gen kódující proteiny je označen barevným pruhem a všechny geny kódující podjednotky stejného komplexu jsou reprezentovány stejnou barvou. rRNA jsou označeny žlutě a tRNA šedě. Převzato z [13].

Mitochondriální DNA (mtDNA) je ve formě nukleotidů, tedy komplexů jedné molekuly mtDNA s řadou proteinů, které jsou spojeny vnitřní membránou. Podle jejich složení se rozlišují řetězce mtDNA na těžký H-řetězec a lehký L-řetězec, z nichž každý obsahuje svůj vlastní původ replikace a promotory pro transkripci. L-řetězec obsahuje 9 genů kódovaných mateřskou mtDNA, které jsou bohaté především na cytosin. Zbývajících 28 genu je na H-řetězci, který je bohatý na guanin. H-řetězce mají počátek syntézy právě v D-smyčce, která obsahuje i jeho dva promotory – HSP1 a HSP2. Nukleotidy také obsahují mtDNA polymerázu, vazebné proteiny TWINKLE a mtSSB a helikázu mtDNA [23].

2.2 Replikace, transkripce a translace

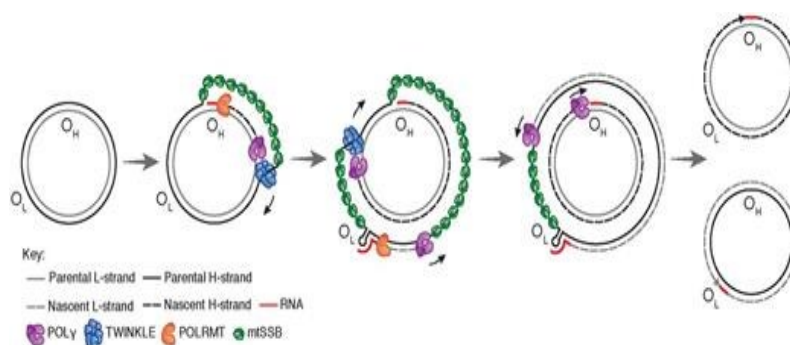
Během buněčného dělení se jaderná DNA replikuje pouze jednou a na rozdíl od ní se mtDNA replikuje nepřetržitě, nezávisle na buněčném cyklu a také v nedělících se buňkách. Takové buňky jsou především vlákna kosterního svalstva a centrální neurony. [21].

Proteinový komplex zodpovědný za syntézu DNA se nazývá replisome. Jádrem odpovědi je DNA polymeráza- γ ($POL\gamma$), která je zodpovědná za syntézu DNA. $POL\gamma$ je heterotrimer tvořený katalytickou podjednotkou ($POL\gamma A$). Tato podjednotka funguje jako vysoce přesný korektor nově syntetizované DNA. Procesivita $POL\gamma A$ je zvýšena dvěma kopiemi přídatné podjednotky ($POL\gamma B$), které interagují se substrátem DNA. Aby měl $POL\gamma$ přístup k DNA a replikoval ji, je nutné, aby byla DNA nejprve odmotána. To je prováděno helikázou Twinkle. Twinkle, který funguje jako 5'-3' DNA helikáza, je nutný pro narušení vodíkových vazeb, které drží dvě vlákna DNA pohromadě. Twinkle způsobí duplexní denaturaci mtDNA, a odvíjení a oddělení vláken. Aktivita Twinkle i $POL\gamma$ je zvýšena mitochondriálním jednovláknovým proteinem vázajícím DNA, tzv. mtSSb. Dále je tento protein vyžadován pro stabilizaci. Mitochondriální RNA a mitochondriální transkripční faktor A (TFAM) jsou potřebné pro mitochondriální transkripci a také pro tvorbu RNA primerů k zahájení replikace DNA $POL\gamma$ [23, 24, 25].

Pro replikaci mtDNA byly navrženy různé mechanismy, přičemž asynchronní replikace je nejvhodnějším modelem. V tomto mechanismu, který se také nazývá model posunutí vláken, dva počátky replikace směřují odpověď k zahájení syntézy DNA, ale iniciace na obou koncích neprobíhá současně. Replikace mtDNA je iniciována syntézou H-vláknem na O_H . Když syntéza H-vláknem dosáhne O_L , O_L sekvence je vystavena a přijme strukturu kmenové smyčky. Ta je rozpoznána mtRNAP, který následně iniciuje syntézu primerů. Syntéza L-vláknem je iniciována z O_L a postupuje pozpátku. Proto je mtDNA obousměrná, ale asynchronní. RNA

pokrývá rodičovské H-vlákno, které je přemístěno během replikace a prodlouženého intervalu mezi zahájením syntézy H-vlákna a L-vlákna [21, 23, 24, 25].

Replikace mtDNA musí být ukončena při O_H a O_L kde $POL\gamma$ pokračuje v syntéze, což vede k posunu RNA primerů a vytvoření tzv. lalokového meziprojektu. Následně jsou RNA primery odstraněny RNázou. Samotná RNáza je však nedostatečná, protože tento enzym nemůže odstranit poslední dva ribonukleotidy na křižovatce RNA-DNA. Zbývající RNA a DNA v meziprojektu jsou odstraněny nukleázami DNA2, FEN1 a MGME1. Jakmile jsou odstraněny, $POL\gamma$ může prodloužit nebo vyjmout konec a ukončit replikaci (viz Obr. 4) [24, 25].



Obrázek 4 - Schéma replikace mtDNA. Převzato z [24].

Mitochondriální transkripce se dá rozdělit na tři fáze, a to na iniciaci, prodloužení a ukončení. Transkripce mitochondriálního genomu pochází z hlavní nekódující oblasti obsahující promotory L-vlákna (LSP) a H-řetězce (HSP). Promotor lehkého řetězce řídí transkripci osmi tRNA a genu MT-ND6. Na těžkém vlákne byly historicky navrženy dva H-vláknové dvoupromotorové systémy. HSP1 transkripce vytváří transkript obsahující tRNA^{Phe}, tRNA^{Val} a dvě rRNA (12S a 16S). Zatímco transkripce z HSP2 generuje transkript, který pokrývá téměř celý genom. Iniciací transkripce v mitochondriích je řízena DNA dependentní RNA polymerázou nazývanou POLRMT. Iniciací transkripce vyžaduje spolupráci POLRMT s mitochondriálním transkripčním faktorem A a mitochondriálním transkripčním faktorem B2 (TFB2M). TFAM je protein vázající DNA, který kromě aktivace transkripce také balí DNA do nukleoidu. TFB2M byl vyroben v důsledku genové duplikace. Nedávné důkazy ukazují, že v komplexu iniciace transkripce TFAM rekrutuje POLRMT k promotérovi prostřednictvím svého N-koncového rozšíření [26, 27, 28].

POLRMT vyžaduje dodatečný faktor prodloužení transkripce (TEFM) pro fázi prodloužení. Rekombinantní TEFM silně podporuje procesivitu POLRMT, protože stimuluje tvorbu delších transkriptů *in vitro*. Také vyčerpání TEFM v živých buňkách vede ke snížení

produktů prodloužení promotoru a distální transkripce. Transkripce z LSP je často předčasně ukončena kolem konzervovaného sekvenčního bloku 2 (CSB2). CSB2 je hlavní nekódující oblast mitochondriálního genomu. Molekula RNA byla navržena, aby hrála klíčovou roli při přípravě replikace DNA. Mnohočetná RNA připravuje přechodová místa DNA a ta se shlukují kolem CSB2. Schopnost TEFM zrušit předčasné ukončení transkripce byla navržena tak, aby fungovala jako přechod od replikace k transkripci primárního přepisu. Nedávné strukturální práce ukázaly, že TEFM obsahuje pseudonukleázové jádro, které tvoří "posuvnou svorku" kolem mtDNA za transkribujícím POLRMT. To interaguje s POLRMT prostřednictvím své C-koncové domény [27].

Mechanismus ukončení transkripce HSP je stále nejasný. Již dříve bylo zmíněno, že mitochondriální terminační faktor 1 (MTERF1) ohýbá mtDNA spojující místo promotoru HSP1 a jeho místo ukončení. MTERF1 by pak indukoval ukončení transkripce převrácením báze a odvíjením DNA. Tento model byl původně navržen k vysvětlení 50krát vyššího výskytu mitochondriálních rRNA. Novější důkazy však tuto hypotézu vyvracejí. Jejich zvýšený výskyt je pravděpodobně spíše výsledkem zvýšené stability než přítomností jiného promotoru. Navíc bylo také nedávno prokázáno, že transkripce z LSP je předčasně ukončena MTERF1 na 3'-konci sekvence kódování mt-rRNA. Vazba MTERF1 na toto místo zabraňuje progresi replikační vidlice do genů mt-rRNA během jejich transkripce [26, 29, 30].

Podobně jako transkripce i translace má tři stejné fáze, ale má i čtvrtou, a to recyklaci ribozómů. Mitochondriální translace je plně závislá na různých nukleárně kódovaných regulačních proteinech. V lidských mitochondriích řídí iniciaci translace mitochondriální iniciační faktory mtIF2 a mtIF3. Během iniciace mtIF3 umístí AUG nebo AUA iniciační kodony mRNA na peptidylové místo. Stejně jako ve všech systémech syntézy proteinů je translace v mitochondriích iniciována zbytkem methioninu. Mitochondrie se však liší tím, že pouze jedna tRNA se používá jak pro iniciaci, tak pro prodloužení [27, 31].

Translace v lidských mitochondriích se liší od cytoplazmy nebo kvasinkových mitochondrií částečně kvůli absenci 5'-nepřeložených oblastí na mRNA, genově specifických RNA (ty působí jako regulační prvky) a kvůli absenci intronů. Na rozdíl od regulace v kvasinkách se musí proteinové faktory vázat přímo na mitochondriální transkript a ovlivňovat genovou expresi. Například proteinové faktory, jako jsou TACO1, MITRAC [27, 31, 32].

Prodloužení translace je zprostředkováno mitochondriálními prodlužovacími faktory, TUFM a GFM1. Při prodloužení tvoří TUFM komplex s GTP a aminoacylovou tRNA.

Nasměruje tRNA na místo akceptoru, kde se báze tRNA páruje s mRNA v místě kodon-antikodon. Tvorbu peptidové vazby katalyzuje hydrolýza GTP. Děj, kdy se mRNA pohybuje o jeden kodon, způsobuje GFM1. Ten také způsobuje translokaci peptidyl-tRNA z místa akceptoru do místa výstupu a také způsobuje uvolnění deacetylované tRNA z peptidylového místa. [27, 31, 32].

Ukončení mitochondriální translace je nakonec vyvoláno přítomností stop kodonu v akceptoru. U lidí byly identifikovány čtyři mitochondriální proteiny s homologií k faktorům uvolňujícím ribozom, včetně mtRF1, mtRF1a a další. Tyto faktory jsou charakterizovány přítomností tripeptidového GGQ, který propůjčuje peptidyl-tRNA hydrolázovou aktivitu. Strukturální analýza mtRF1 ukázala, že je schopen rozpoznat UAA a UAG stop kodony, zaměřené na ribozomy s volným místem akceptoru. mtRF1a katalyzuje hydrolýzu peptidylové tRNA na UAA a UAG stop kodonech. mtRF1a byl navržen jako dostatečný pro ukončení translace všech 13 polypeptidů kódovaných mtDNA [27, 33].

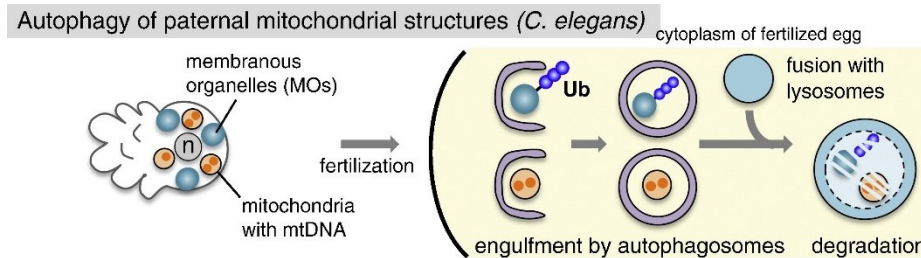
Konečně, po uvolnění polypeptidu, mitochondriální ribozomální recyklační faktory, mtRRF a EFG2 katalyzují uvolňování mRNA, deacetylovaných tRNA a ribozomálních podjednotek [27, 33].

2.3 Mateřská dědičnost mitochondriální DNA

Mitochondriální DNA je přenášena výhradně po mateřské linii, i když byly objeveny i ojedinělé případy přenosu po otcovské linii. Lidská DNA je děděna z 99 % po matce, mtDNA otce je eliminována [34, 35].

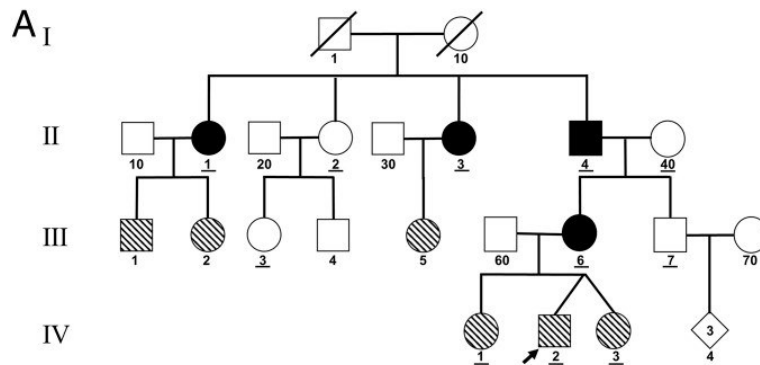
Spermie, které vstupují do cytoplazmy oocytů při oplodnění, dočasně koexistují v zygotě spolu s přebytkem mateřských mitochondrií, obsahují genetický materiál mtDNA otce. Nicméně otcovské mitochondrie jsou eliminovány a nejsou přenášeny na potomky. Byly navrženy dvě hypotézy, hypotéza „Ředícího mechanismu“ a „Aktivní degradace“, které vysvětlují mechanismus základu mateřské dědičnosti mtDNA. Podle „Ředícího mechanismu“ je otcovská mtDNA, která je přítomna při mnohem nižším počtu mitochondrií (cca 100), je jednoduše zředěna přebytkem mtDNA oocytů, jenž obsahuje až 100 000 mitochondrií. A tímto důsledkem je stěží detekovatelná u potomků. Na druhé straně hypotéza „Aktivní degradace“ předpokládá, že samotná otcovská mtDNA nebo její mitochondrie jsou selektivně degradovány, a to buď před, nebo po oplodnění, aby se aktivně zabránilo přenosu otcovské mtDNA na další generaci. Tato hypotéza využívá procesu autofagie společně s molekulami ubikvitinu, které označují mitochondrie spermií. Díky tomuto procesu, při kterém

autofagozomy vstřebají otcovské mitochondrie po oplození, dochází k jejich degradaci v lysozómech. Autofagie využívá ubikvitin-proteazomové dráhy. Z degradace je tedy dosaženo pouze mateřské dědičnosti mtDNA. Doposud není znám důvod, proč musí být otcovské mitochondrie odstraněny. Tato hypotéza je ilustrována na Obr. 5 [34, 35, 36].



Obrázek 5 - Popis autofagie u druhu *Caenorhabditis elegans*, kde jsou otcovské mitochondrie a membránové organely pohlceny autofagozomy a po oplodnění se zaměřují na lysozomální degradaci. Ubikvitinace je detekovatelná na membránových organelách. Převzato z [34].

Jak bylo již výše uvedeno, může se objevit případ přenosu po otcovské linii. Jednalo se konkrétně o 4letého chlapce, který byl vyšetřen pro únavu, bolest svalů a hypotonii. Z důvodu podezření na mitochondriální poruchu byl vyšetřen on i jeho rodina, a bylo provedeno celkové sekvenování mtDNA. Ačkoli tato analýza neodhalila žádné patogenní mutace ani dispozice pro ně, odhalila přítomnost mateřské a otcovské mtDNA. V celé linii této rodiny byly odhaleny čtyři případy přítomnosti obou rodičovských mtDNA z 11 testovaných, (viz Obr. 6) [37].



Obrázek 6 - Vzor dědičnosti mtDNA v rodině. Černě vyplněné symboly označují čtyři členy rodiny ukazující obou rodičovský přenos mtDNA a diagonálně vyplněné označují šest členů taktéž s přenosem obou rodičovských mtDNA, ale bez mitochondriální nemoci. Převzato z [37].

Dále byly testovány další dvě nezávislé rodiny. I u těch byla nalezena přítomnost obou rodičovských mtDNA, ale mitochondriální onemocnění nebylo prokázáno. Stále ale otcovská dědičnost zůstává výjimkou. K formulování závěru jsou zapotřebí další studie a identifikace případů [37].

2.4 Mutace mitochondriální DNA

Mitochondriální DNA má desetinásobně větší pravděpodobnost vzniku mutace než jaderná DNA (nDNA). Její poškození, způsobené reaktivními formami kyslíku (ROS) nebo radiací je mnohem závažnější a trvalejší v porovnání s nDNA, a to z důvodu nedostatečné schopnosti opravy genomu. mtDNA se nachází v blízkosti vnitřní mitochondriální membrány a komplexů oxidační fosforylace (OXPHOS), kde je možné poškození díky vystavení se vysokým hladinám ROS. Pokud dojde ke vzniku mutace v mtDNA, dojde k vytvoření intracelulární populace mutantních a normálních molekul tzv. heteroplazmie. Při dělení se mutantní mtDNA náhodně rozdělí, čemuž se říká replikativní segregace a díky této vlastnosti se může v dalších buněčných liniích procento mutantních mtDNA snížit nebo zvýšit, případně se dostat zpátky do normálního stavu. Tento stav se nazývá homoplazmie. Díky této skutečnosti je výsledné onemocnění fenotypu závislé na poměru mutantních a normálních molekul v buňkách tkáně. Nadměrné mutace mtDNA mohou vést k onemocněním spojeným s funkcí mitochondrií. V současnosti bylo zjištěno, že mnoho nemocí je spojeno s mutacemi mtDNA a většina mateřských onemocnění mtDNA se může přenášet na své potomky [38, 39, 40].

Nedávné výsledky studií ovšem naznačují, že dysregulovaná mitochondriální dynamika a mutace způsobené replikací mtDNA mohou vést ke stárnutí a také zvyšující se mutace mtDNA zvyšují rychlost stárnutí. Mutace v mtDNA mohou být buď dědičné, nebo sporadicky získané v průběhu života. Zděděné mutace jsou náhodně segregovány mezi primárními oocyty a mezi různými tkáněmi. Studie hodnotící mutační zátěž v různých tkáních plodu prokázala, že mutační zátěž je ve všech tkáních podobná. Od roku 1988, kdy byla popsána první lidská mutace mtDNA, bylo identifikováno několik mutací mtDNA a s nimi spojené mtDNA onemocnění [40].

2.5 Mitochondriální onemocnění

Při objevení první mutace mtDNA, byly objeveny i nemoci s nimi spojené. První z nich byla Leberova dědičná neuropatie zrakového nervu, která byla objevena v roce 1988. Doposud se objevilo kolem 330 mutací mtDNA. Tyto mutace jsou původci celé skupiny onemocnění. Nejčastější jsou poruchy zraku, sluchu, demence, mrtvice, cukrovka a další. Proces, díky kterému se hromadí mutační mtDNA, nazýváme klonální expanze, která je považována za jeden z faktorů, které přispívají k rozvoji mnoha forem mitochondriálního onemocnění. Kromě toho důkazy naznačují, že funkční důsledky klonálně expandovaných mutací mtDNA mohou přispět k patogenitě u jiných onemocnění souvisejících s věkem, jako je Parkinsonova choroba. Pro

biology zabývající se mutacemi mitochondrií je tento proces klíčový, protože představuje potenciální terapeutickou cestu, která může být aplikována na celou řadu onemocnění [38, 41].

2.6 Využití mitochondriální DNA

V archeologii se mitochondriální DNA stala zásadním nástrojem pro výzkum evoluce lidstva. Je odolnější vůči degradaci oproti nDNA a to hlavně díky její malé velikosti a specifické kruhové formě. Mitochondriální DNA je také zásadní pro studium příbuznosti mezi jednotlivými skupinami organismů. Dle současných studií lze říci, že mtDNA lze potenciálně využít jako biologický marker mitochondriální dysfunkce [42].

3 MUTACE MITOCHONDRIÁLNÍ DNA

3.1 Vznik a původ mutací

Mutace v mitochondriích mohou vznikat z různých zdrojů, včetně chyb během replikace, expozicím mutagenů nebo karcinogenům a defektům mitochondrií. Zejména mitochondriální DNA je náchylná k mutacím kvůli její blízkosti k reaktivním formám kyslíku (ROS) generovaných během oxidační fosforylace. ROS mohou způsobit oxidační poškození mtDNA, což vede k akumulaci mutací v čase. Kromě toho mohou defekty mitochondrií vést k akumulaci poškozených molekul mtDNA, které se mohou replikovat a přispět k vývoji mutací [42, 43].

Ve srovnání s mechanismy regulujícími replikaci mtDNA jsou reparační dráhy mtDNA méně charakterizovány. Kromě toho jsou opravné mechanismy DNA v mitochondriích špatně rozlišeny ve srovnání s opravou jaderné DNA. Přesto je stále jasnější, že mitochondrie vykazují reparační aktivity mtDNA, i když s klíčovými rozdíly ve srovnání s jadernými drahami. Zatímco jaderná DNA je chráněna opravně orientovanou údržbou, molekuly mtDNA jsou buď opraveny, nebo degradovány. Dále je oprava mitochondriálního genomu omezena z důvodu neschopnosti kódovat proteiny zodpovědné za opravu mtDNA [42].

Mutace v mtDNA mohou být buď dědičné, nebo sporadicky získané v průběhu života. Zděděné mutace jsou náhodně segregovány. U jedinců, kteří zdědí nízkou mutační zátěž, není pravděpodobné, že by patologie mitochondriálního onemocnění vznikla v průběhu života, příp. nevznikne vůbec. Načasování nástupu mitochondriálního onemocnění je proměnlivé a patologie může být heterogenní postihující některé tkáně nebo části tkání či buněk, ale ne jiné. Sporadicky získané mutace vznikají v jediné molekule mtDNA v jedné buňce a vyskytují se během zdravého stárnutí, poruchy údržby mtDNA a řady dalších onemocnění. Tato jediná mutovaná molekula mtDNA je pak buď ztracena z buňky, nebo klonálně expanduje na vyšší úroveň [38].

3.2 Typy patogenních mutací

Poškození nebo replikační chyby mtDNA mají za následek bodové mutace nebo přeskupení (translokace) či ztrátu genetického materiálu (delece), které mohou být buď dědičné, nebo sporadické. Mutace vykazují vysokou variabilitu, a to hlavně z pohledu věku, závažnosti symptomů a postižení orgánů pacienta. V důsledku OXPHOS, které vyžadují značné množství energie, může docházet k významnému poškození tkání, jako např. u nervosvalového

systemu a centrální nervové soustavy. Dané mutace se vyznačují rozdílností mutační zátěže a úrovní heteroplazmie. Dále lze říci, že jednotlivé varianty mutací budou mít i daný průběh klinických symptomů, a tak se u každého pacienta mohou lišit [41].

3.2.1 Bodové mutace

Bodové mutace se nejčastěji vyskytují v genech proteinů, a to, jak v tRNA tak i v rRNA. tRNA však obsahuje tyto mutace nejčastěji [41].

Mechanismus, kterým jsou vytvářeny bodové mutace mtDNA ve tkáních, je spojen s náchylností mtDNA k poškození způsobené ROS. A to kvůli její těsné blízkosti dýchacího řetězce v mitochondriální matrici. Poškození DNA vyvolané ROS způsobuje modifikace bází, dvojitě a jedno řetězcové zlomy. Nejčastěji hlášenými bazickými lézemi jsou thyminglykoly a 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosin. Tato léze je považována za nejvíce mutagenní, která může způsobit, že mtDNA polymeráza nesprávně začlení bázi adenin (A) naproti oxidovanému guaninu (G). Toto nesprávné zařazení vede k přechodu z guaninu a cytosinu na thymin a adenin (G:C na T:A). Avšak z nedávné analýzy mutačních spekter mtDNA v buňkách vychází, že není v souladu s předpokládaným vzorcem poškození vyvolaným ROS. Místo toho jsou nejčastěji hlášenými mutacemi přechody z guaninu a cytosinu na adenin a thymin (G:C na A:T). Přechody jsou s větší pravděpodobností výsledkem chyb polymerázy- γ , nebo spontánní deaminací cytosinu na uracil, který se pak chybně páruje s adeninem, což vede k přechodu guaninu na adenin [38].

3.2.1.1 Sporadický a dědičný vznik bodové mutace

Sporadicky získané bodové mutace mtDNA jsou nejčastějšími klonálně expandovanými mutacemi v mitotických tkáních. Ty byly detekovány, když se sekvenovaly jednotlivé buňky z normálního stárnoucího bukalního epitelu a zjistilo se, že podskupina těchto buněk obsahuje mtDNA bodové mutace na vysokých úrovních. Dále se ukázalo, že náhodný genetický drift je příčinou populační dynamiky bodových mutací. Náhodné genetické driftové modely naznačují, že klonální expanze mutované molekuly mtDNA na vysoké hladiny v buňce je relativně pomalý proces, a že počáteční mutační události musí nastat v raném stadiu života. Tyto mutace v raném stadiu života se pak náhodně šíří replikací mtDNA a segregací při buněčném dělení, nebo jsou ztraceny. Po sobě jdoucí cykly tohoto procesu umožňují, aby se mutované molekuly mtDNA staly dominantními druhy v některých buňkách, což vede k mozaikové formě buněčných defektů OXPHOS, které jsou pozorovány ve stárnoucích lidských mitotických tkáních [38].

Kromě toho má většina mitotických tkání vysokou míru obratu a je udržována kmenovými buňkami s dlouhou životností. Mutace mtDNA, které se v těchto kmenových buňkách klonálně rozšiřují, se pak budou reprodukovat v jejich potomstvu. Ve tkáních, jako jsou játra, prostata, žaludek a tlusté střevo, to vede k velkým klonálním shlukům buněk s identickými mutacemi mtDNA a souvisejícími defekty OXPHOS. V rámci četných studií, které poskytují důkazy o tom, že mutace mtDNA se klonálně rozšiřují a způsobují mozaikový vzorec defektů OXPHOS ve stárnoucích lidských buňkách, jejich funkční důsledky nebyly dosud zcela objasněny [38].

Na rozdíl od akumulace somatických mutací mtDNA ve stárnoucích tkáních se zjistilo, že některé zděděné bodové mutace mtDNA jsou ztraceny po celý život v rychle se dělících buňkách včetně krevních buněk, buněk bukalní sliznice a epitelu tlustého střeva, zatímco zůstávají stabilní v postmitotických tkáních. Není však známo, zda pokles mutační zátěže mtDNA v rychle se dělících buňkách je výsledkem náhodného genetického driftu nebo výsledkem aktivní selekce proti funkčně škodlivým variantám [38].

3.2.2 Delece

Delece se obvykle nacházejí mezi počátky replikace těžkého a lehkého vlákna mtDNA. Delece neboli ztráta je výsledkem replikace mtDNA nebo její opravou. Původně bylo navrženo, že se delece vytvářejí během replikace. Tento model předpokládá, že mtDNA je replikována asynchronním mechanismem vlákna a že lehké vlákno se vychýlí tak, že 3' opakování lehkého vlákna se rekombinuje na 5' konec těžkého vlákna. Tím se vytvoří jednovláknová smyčka, která je náchylná k přerušení a degradaci. Později byla navržena alternativní hypotéza, která naznačuje, že delece mtDNA vznikají během opravy mtDNA dvou řetězcových zlomů rekombinací segmentových duplikací. Ty jsou vytvořené aktivitou exonukleázy při dvou řetězcových zlomech. Avšak nejnovější studie tyto hypotézy nepotvrzují. Studie z roku 2019 naznačuje, že tvoření delecí nastává při rekombinacích během aktivní syntézy DNA s L-vláknem. Tato studie je zajímavější z důvodu detekce delecí mtDNA s přímými opakováními, nedokonalemi opakováními anebo žádnými opakováními. Jako takové se nyní předpokládá, že delece mtDNA vznikají buď rekombinacích během aktivní syntézy DNA s L-vláknem, nebo opravou dvouřetězcových zlomů [38].

3.2.2.1 Sporadický a dědičný vznik delece

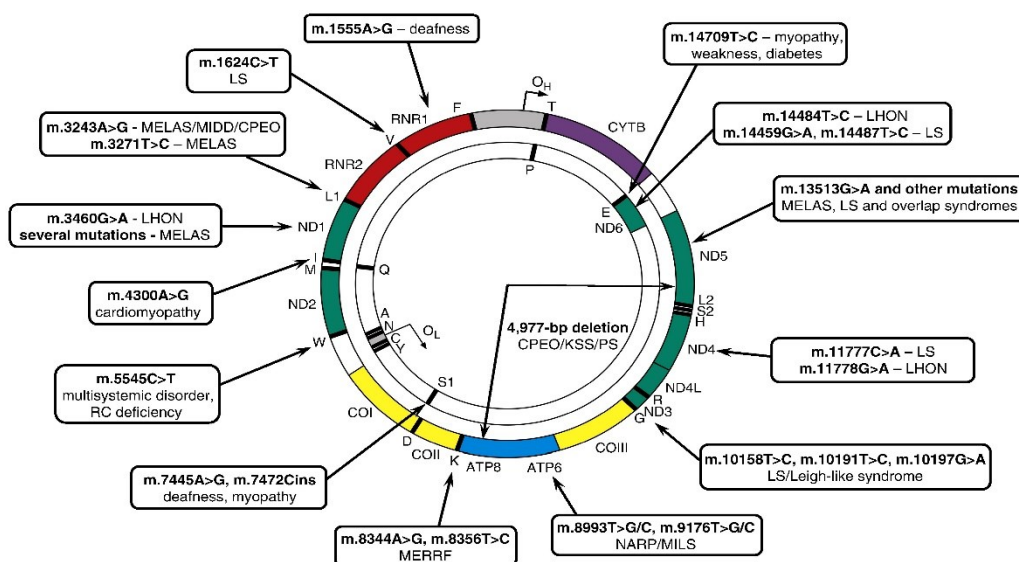
Na rozdíl od bodových mutací mtDNA jsou sporadicky získané delece mtDNA nejčastěji klonálně expandovanou mutací mtDNA v postmitotických buňkách. Vysoké hladiny klonálně expandovaných delecí mtDNA byly nalezeny v populacích *substantia nigra*, *hippocampus*, *striatum* a *medulla spinalis* u starších pacientů s přidruženými onemocněními, taktéž byly objeveny ve vláknech kosterního svalstva. Tyto hromadící se delece mtDNA vedou k mitochondriální dysfunkci [38].

Podobně jako u bodových mutací mtDNA existuje rozdíl v tom, co se děje u zděděných a sporadicky získaných delecí mtDNA. Zděděné delece mtDNA nenalezneme v krevních buňkách. V postmitotických tkáních se však zdá, že zděděné deleční zátěže mtDNA jsou udržovány po celý život nebo klonálně expandovány. V jednotlivých svalových vláknech byly zjištěny vysoké hladiny delecí mtDNA, které jsou spojeny s deficitem dýchacího řetězce. Vysoké hladiny zděděných delecí mtDNA byly také detekovány v neuronech [38].

3.3 Onemocnění spojované s mitochondriálními mutacemi

Mitochondriální DNA kóduje proteiny systému oxidační fosforylace. Mitochondriální mutace tedy mohou změnit aktivitu tohoto systému. Nejvíce se mění produkce ATP, která se sníží, a produkce ROS, která se naopak zvýší. Dále nastávají změny v homeostáze vápníku. Tyto změny přispívají k vývinu mitochondriálního onemocnění [44].

Jak už bylo řečeno, mitochondriální mutace jsou nejvíce spojené s neurologickými poruchami, poruchami tkání, mitochondriální dysfunkcí. Nejvíce objeované mutace spojované s mitochondriálními onemocněními, včetně jejich klinických projevů jsou vyobrazeny na Obr. 7 [44].



Obrázek 7 - Genotypový a fenotypový vztah u mitochondriálního onemocnění. Dvouvláknový lidský mitochondriální genom se zvýrazněnými místy běžných mutací mtDNA. Převzato a upraveno z [44].

3.3.1 Bodové mutace a jejich důsledky

3.3.1.1 Mutace typu A3243G

Tato bodová mutace v mtDNA je nejrozšířenější mutací mtDNA a vede k nukleotidové substituci guaninu za adenin v nukleotidu 3243 (A – adenin, G – guanin, mezi nimi je uvedeno číslo nukleotidu) v genu leucin tRNA. Mutace A3243G je spojena s 80 % pacientů se syndromem MELAS. MELAS neboli mitochondriální encefalomyopatie, laktátová acidóza a epizody podobné mrtvici zahrnují onemocnění s tímto označením. Tento syndrom je také spojen s nejméně 12 dalšími mutacemi genu mtDNA. MELAS syndrom je klinicky charakterizován abnormálním vývojem, laktátovou acidózou, přerušovaným zvracením, záchvaty, epizodami podobnými mrtvici a hemiparézou nebo kortikální slepotou. Asi 20–38 % pacientů s MELAS může vykazovat srdeční postižení [45, 46].

Mutace A3243G může být součástí multisystémového postižení, ale zřídka je přítomna jako jediný klinický projev kardiomyopatie. Byly popsány i další fenotypy jako CPEO, hluchota a *diabetes mellitus* dědičný matkou [45, 46].

3.3.1.2 Mutace typu T12297C

Tato mutace byla poprvé diagnostikována v roce 1999. Studie deseti dětí, které pocházejí z osmi nepříbuzných rodin s dilatační kardiomyopatií. Mutace T12297C (T – thymín, C – cytosin, mezi nimi je uvedeno číslo nukleotidu) byla identifikována u dvou sourozenců nepříbuzných rodičů s dilatační kardiomyopatií a endokardiální fibroelastózou. Tato nově

identifikovaná mutace byla u obou pacientů hojně rozvinutá a heteroplazmatická. Stejná mutace byla také hlášena u 36letého muže, který se echokardiograficky projevil městnavým srdečním selháním a rozšířenými komorami. Ultrastrukturální studie tkání ukázaly proliferaci mitochondrií s širokou škálou změn tvaru a velikosti. Mutace byla heteroplazmatická [45].

3.3.1.3 Mutace typu A4269G

Prvním pacientem, který byl s touto mutací diagnostikován, byl 18letý chlapec s malým vzrůstem, který nakonec zemřel v důsledku srdečního selhání. Chlapec zpočátku vykazoval ve věku 4 let epilepsii, multiorgánovou dysfunkci a později se u něj vyvinula dilatační kardiomyopatie. Ve studii byla mutace A4269G (A – adenin, G – guanin, mezi nimi uvedeno číslo nukleotidu) nalezena v indexovém případě bez mutace nalezené v kontrolních skupinách. Poté bylo zjištěno, že mutace bodu A4269G zcela inhibuje syntézu proteinů v mitochondriích, a proto vede ke snížení respirační aktivity [45].

3.3.1.4 Mutace typu A8344G

Mutace A8344G (A – adenin, G – guanin, mezi nimi uvedeno číslo nukleotidu) je typicky spojována se syndromem MERRF (myoklonická epilepsie s roztrhanými červenými vlákny). Multisystémová porucha je charakterizována myoklonem, generalizovanou epilepsií, slabostí, ataxií a roztrhanými červenými vlákny. Pacienti s diagnózou MERRF obvykle bývají pacienti dětského věku, ale i pacienti v raném období dospělosti. Nedávný přehled pacientů ukázal, že u 22 % pacientů se vyvinula kardiomyopatie. Mutace A8344G se také vyskytuje v jiných klinických fenotypech, jako je Leighův syndrom, myoklonus nebo myopatie s truncálními lipomy a proximální myopatie [47].

3.3.1.5 Mutace typu G8363A

Tato mutace byla poprvé popsána ve dvou rodinách s mateřskou hypertrofickou kardiomyopatií. Pozitivní na tuto mutaci pacient byl chlapec ze Španělska, který vykazoval srdeční selhání a kognitivní regresi ve věku 8 let a zemřel na kardiorepirační zástavu ve věku 17 let. Sourozenec pacienta vykazoval mírné vývojové zpoždění, slabost pánevního pletence a hypertrofickou kardiomyopatii ve věku 4 let. Ve druhé rodině byl pacient 44letý Američan, u kterého se vyvinula progresivní ztráta sluchu ve věku 35 let. Později se objevila řada klinických příznaků, které zahrnovaly potíže s chůzí, nezřetelnou řeč, dušnost a bolest na hrudi. Pacientova dcera měla vrozenou hypertrofickou kardiomyopatii a těžkou mentální retardací. Komplexní systematický přehled týkající se klinických a molekulárních údajů o mutaci G8363A (G –

guanin, A – adenin, mezi nimi uvedeno číslo nukleotidu) v 6 studiích ukázal, že u 4 ze 41 pacientů s různou úrovní mutační zátěže v krvi se vyvinula kardiomyopatie [45, 48].

3.3.1.6 Leighův syndrom

Leighův syndrom neboli nekrotizující encefalomyelopatie, je charakterizován progresivní neurodegenerativní poruchou, která postihuje jak kojence, tak i dospělé. Jedním z hlavních diagnostických kritérií je přítomnost degenerace mozkového kmene s bazálními gangliemi nebo bez nich. Představuje jedno z progresivních neurodegenerativních onemocnění spojených s abnormální tvorbou mitochondriální energie. Mutace mtDNA T8993G a T8993C (T – thymin, G – guanin, T – thymin, C – cytosin, mezi nimi uvedeno číslo nukleotidu) představují 10 – 20 % mutací Leighova syndromu a další mutace mtDNA (např. C1624T, C11777A, C14487T, T10158C, T10191C, atd.) tvoří dalších 10 – 20 % mutací Leighova syndromu. Extraneurologické příznaky mohou zahrnovat srdeční postižení a zejména hypertrofickou kardiomyopatii [45].

3.3.1.7 Mutace typu T8528C

Tato mutace byla nalezena u čtyř nepříbuzných dětí s infantilní hypertrofickou kardiomyopatií a multisystémovým onemocněním. Sekvenování celého mitochondriálního genomu odhalilo novou mitochondriální mutaci T8528C (T – thymin, C – cytosin, mezi nimi je uvedeno číslo nukleotidu). Tato mutace vede ke změně ATPázy 6 a 8 a vede ke kardiomyopatii, pokud je téměř homoplazmatická. Pozice 8528 se nachází v překrývající se oblasti kódující podjednotky ATPázy 6 a ATPázy 8 a změna nukleotidů vede ke změně iniciace methioninu na threonin v podjednotce ATPázy 6, čímž se ruší začátek translace. Nedávná studie Imai et al. (2016) informovala o případu japonského pacienta s mutací T8528C, který zemřel na rychle progresivní kardiomyopatii do 5,5 měsíce věku, což dokazuje, že mutace je vysoce heteroplazmatická v myokardu zhruba z 90 % a syntéza proteinů ATPázy 6 a 8 byla v srdci narušena. Dále byla potvrzena mutace T8528C v krvi pomocí Sangerova sekvenování a také kvantitativní PCR ukázala vysokou míru heteroplazmy v krevní DNA (88%) [45, 49].

3.3.1.8 Mutace typu G3337A

Studie Zifa z roku 2008 oznámila novou mutaci G3337A (G – guanin, A – adenin, mezi nimi uvedeno číslo nukleotidu) v mitochondriálním genu NADH dehydrogenázy-1 u dvou nepříbuzných pacientů. Prvním pacientem bylo děvče, které vyžadovalo resuscitaci při narození. Tento novorozenec měl respirační dysfunkci a byl hypotonický. Srdeční nálezy zahrnovaly *aneurysma intra aurikulární přepážky* a zúžení plicní tepny a některé rysy

naznačující kardiomyopatii. Druhou pacientkou byla 65letá žena s *diabetes mellitus*, u které se projevovala tato genetická mutace bolestí na hrudi a dušností. Echokardiogram ukázal hypertrofií levé komory. Ve studii byla mutace 100 % homoplazmatická jak v krvi pacientů, tak v krvi matky a babičky prvního pacienta. Mutace G3337A nebyla detekována u 150 kontrolních jedinců. Jedná se tedy o vzácnou mutaci [50].

3.3.1.9 Leberova dědičná neuropatie

Leberova dědičná neuropatie zřetelného nervu neboli „Syndrom LHON“ byl objeven v roce 1988 a spojen s bodovými mutacemi, tím se stal vůbec prvním onemocněním v historii spojeným s mutacemi. V současné době se u více než 3 % pacientů na celém světě vyskytují tři klíčové primární mutace postihující podjednotky m.460 1G > A v genu MT-ND11, m.778 4G > A v genu MT-ND14 a m.484 6T > C v genu MT-ND90. Existuje však také rostoucí seznam vzácných zcela nových mutací mtDNA. Syndrom LHON působí na zřetelný nerv a dochází k jeho poškození, což se projevuje ztrátou centrálního vidění. Onemocnění se projevuje od 18 do 40let života a převážně postihuje muže. Kromě ztráty zraku se mohou objevit pohybové poruchy, migréna a roztroušená skleróza [51].

3.3.2 Delece a jejich důsledky

3.3.2.1 Pearsonův syndrom

Pearsonův syndrom (PS) byl poprvé popsán v roce 1979 Howardem Pearsonem jako porucha refrakterní sideroblastické anémie s vakuolizací prekurzorů kostní dřeně a exokrinní dysfunkcí pankreatu. PS je unikátní primární mitochondriální onemocnění, které se typicky projevuje těžkou hypoproliferativní anémií v raném dětství. Následovanou progresivními příznaky a multiorgánovými dysfunkcemi včetně laktátové acidózy, pankreatické insuficience, renální tubulopatie, svalové hypotonie a endokrinních poruch. PS je způsoben jednotlivými rozsáhlými mtDNA delecemi (SLSMD) různé velikosti a umístění. SLSMD se také vyskytují u dětí nebo mladých dospělých s chronickou progresivní externí oftalmoplegií (CPEO) nebo Kearns-Sayreovým syndromem (KSS) [52].

Většina pacientů umírá před dosažením 6 let věku. V poslední době je PS věnována zvýšená pozornost v důsledku vývoje nových terapií, které mohou být potenciálně aplikovány u dětí s tímto vzácným onemocněním. Ačkoli převážná většina případů PS je sporadická a způsobená somatickou mutační příhodou během časného embryonálního vývoje, existuje několik zpráv o matkách s CPEO, které měly děti s PS [52].

3.3.2.2 Kearnsův–Sayreův syndrom

Mitochondriální encefalomyopatie je skupina onemocnění, která jsou důsledkem mitochondriální dysfunkce zahrnující centrální nervový systém, endokrinní systém, myokard, kosterní svalstvo a další vícenásobné systémy. Kearnsův–Sayreův syndrom (KSS) je vzácný typ mitochondriální encefalomyopatie, který byl poprvé popsán v roce 1958 a charakterizován progresivní externí oftalmoplegií a *retinitis pigmentosa* (RP). Pacienti obvykle mají symptomy před 20. rokem života a vykazují další příznaky, včetně srdeční blokády, cerebelární ataxie a koncentrace bílkovin v mozkomíšním moku [53].

3.3.3 Mitochondriální dysfunkce a její vztah k onemocněním

Deficity v mitochondriální biogenezi mohou přispět k mitochondriální dysfunkci u mnoha neurodegenerativních onemocnění, včetně Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, Huntingtonovy choroby. Dále způsobují stárnutí buněk, při zvýšené akumulaci mutovaných mtDNA. Následné události mitochondriální dysfunkce, které způsobuje smrt neuronálních buněk, nejsou zcela rozklíčovány. Neurodegenerativní proces zahrnuje oxidační stres z produkce ROS (reaktivní formy kyslíku). Mitochondrie jsou nejen hlavním zdrojem produkce ROS, ale také cílem jejich zvýšené expozice. Pokud je mitochondriální biogeneze nedostatečná, expozice ROS se zvyšuje zvýšenou produkcí a sníženou mírou tolerance [54].

3.3.3.1 Parkinsonova nemoc

Parkinsonova choroba (PD) je druhým nejčastějším neurodegenerativním onemocněním, které postihuje přibližně 1% populace ve věku nad 60 let. PD je charakterizována tuhostí, třesem a posturální nestabilitou. Zatímco etiologie PD je stále neznámá, mitochondriální dysfunkce byla navržena jako přispívající faktor PD. Rotenon a MPTP, kteří podporují vznik symptomů podobných PD a tvorbu proteinových agregátů obsahujících α -synuklein. Studie v roce 2006 ukázaly, že dopaminergní neurony starších lidí mají vysoké hladiny delecí mtDNA. To bylo dále pozorováno u pacientů s PD v časném stádiu. Tato pozorování naznačují, že dopaminergní neurony se blíží prahu pro biochemický defekt a buněčnou smrt. Díky těmto pozorováním byl pak stanoven Alpha-synuklein jako nejslibnější biomarker pro Parkinsonovu nemoc [55].

3.3.3.2 Alzheimerova choroba

Jedná se o nejčastější progresivní neurodegenerativní onemocnění s pozdním nástupem (AD), kdy se defekty cytochromu *c* oxidázy podílejí na progresi onemocnění. Fragmenty amyloidu beta ($A\beta$) tvoří cytotoxické plaky, které se častěji vyskytují v kůře a

hipokampu. Mitochondriální funkce je negativně ovlivněna těmito fragmenty. Díky tomu bylo zaznamenáno, že mitochondriální dysfunkce je důsledkem toxicity A β . Stejně jako u PD je problémem při hodnocení poškození mtDNA u pacientů pozdní stadium progresse onemocnění AD, kdy neurony s vysokou úrovní poškození mtDNA již mohly být ztraceny. Při hodnocení pacientů v časném stádiu AD bylo pozorováno zvýšení frekvence mutací mtDNA v hipokampu. Biomarkery jsou právě fragmenty A β [56].

4 DIAGNOSTIKA A LÉČBA MITOCHONDRIÁLNÍCH ONEMOCNĚNÍ

Diagnostikování mitochondriálních mutací může být obtížné kvůli heterogenitě mitochondriálního genomu, přítomnosti jak divokého typu, tak mutovaných molekul mtDNA v téže buňce a variability počtu kopií mtDNA mezi tkáněmi. Nicméně, pokroky v molekulárních technikách vedly ke vzniku různých metod pro detekci a kvantifikaci mtDNA mutací v klinických vzorcích [57].

Jedním z běžných postupů je sekvenování celého mitochondriálního genomu pomocí technologií nové generace sekvenování (NGS). Tento postup umožňuje detekci jak známých, tak nových mutací mtDNA, stejně jako identifikaci heteroplasmatických mutací, které existují jako směs mutovaných a divokých molekul mtDNA v buňce. Další techniky, jako je polymerázová řetězová reakce (PCR), která určuje konkrétní oblasti mtDNA následovaná Sangerovou sekvenací, mohou být také použity k detekci známých mutací v cílených oblastech mitochondriálního genomu [57, 58, 59].

Kromě těchto technik mohou být biochemické testy použity k měření funkce mitochondrií a detekci přítomnosti mitochondriální dysfunkce spojené s mtDNA mutacemi. Např. měření aktivit respiračního řetězce nebo mitochondriálního membránového potenciálu mohou poskytnout informace o funkčním stavu mitochondrií ve vzorcích pacientů. Přestože došlo k pokroku, diagnostikování mitochondriálních mutací zůstává obtížné a pro přesnou diagnózu je často nutné kombinovat molekulární a biochemické přístupy. V některých případech mohou být vyžadovány svalové biopsie nebo jiné tkáňové vzorky pro analýzu, protože počet kopií mtDNA a míra mutace mohou mezi tkáněmi kolísat. Kromě toho mohou být nutná genetická poradenství a rodinné studie k určení dědičnosti mtDNA mutací u postižených jednotlivců a jejich rodin [57, 58].

4.1 Technologie nové generace sekvenování

Sekvenování nové generace (NGS) se odkazuje na skupinu vysoce propustných sekvenačních technologií divokého typu mtDNA, které umožňují rychlou a nákladově efektivní analýzu velkého množství sekvencí DNA nebo RNA. NGS zásadně změnil oblast genomiky a stal se nezbytným nástrojem pro výzkum a klinické aplikace [59].

V kontextu mitochondriálních mutací může být NGS použito k sekvenování celého mitochondriálního genomu nebo konkrétních oblastí zájmu, jako jsou mitochondriální tRNA

geny nebo D-loop oblast, což je nekódová oblast mitochondriálního genomu, která obsahuje regulační prvky pro replikaci a transkripci. NGS může detekovat jak známé, tak nové mutace mtDNA, stejně jako přítomnost heteroplasmických mutací, které existují jako směs mutovaných a divokého typu mtDNA molekul v buňce [59, 61].

Technologie NGS lze také použít k detekci přestavění mitochondriálního genomu, jako jsou velkoústupové delece nebo duplikace, které jsou běžně spojeny s mitochondriálními chorobami. Sekvenování celého genomu (WGS) může poskytnout ještě komplexnější analýzu tím, že sekvenuje jak jaderný, tak mitochondriální genom, což umožňuje identifikaci jaderně kódovaných genů, které jsou zapojeny do funkce mitochondrií [61].

NGS má několik výhod oproti tradičnímu Sangerovu sekvenování, včetně větší propustnosti, vyšší citlivosti a nižší nákladů na pár bází. Platformy NGS mohou generovat miliony čtení v jednom běhu, což umožňuje detekci vzácných variant a poskytuje komplexnější pohled na mitochondriální genom. NGS také umožňuje detekovat nízkonákladovou heteroplasmii, která by mohla být přehlížena tradičními sekvenačními metodami. Přestože má NGS několik výhod, existují určité omezení. Jedním z výzev je přesnost sekvenačních dat, zejména v oblastech mitochondriálního genomu, které jsou obtížné k sekvenování kvůli homopolymerovým úsekům nebo strukturálním variantám. Další výzvou je interpretace dat, zejména v případech, kdy jsou detekovány nové varianty nebo kdy je klinický význam varianty nejistý [59, 61].

4.2 Technologie OMICS

Technologie OMICS se vztahují k množině výkonných nástrojů, které umožňují široce rozsáhlou analýzu biologických molekul, jako jsou DNA, RNA, proteiny a metabolity. Zahrnují podobory, jako jsou genomika, transkriptomika, proteomika a metabolomika. Tyto technologie způsobily zásadní převrat v oblasti molekulární biologie a mají značný potenciál pro rozvoj našeho porozumění a pochopení biologickým systémům a nemocem. Jedním z klíčových přínosů technologií OMICS je jejich schopnost poskytnout komplexní pohled na biologické systémy. Např. genomika se vztahuje ke studiu celého genomu, včetně všech genů a nekódujících oblastí. Díky vývoji technologií vysoké propustnosti se nyní dá genomová analýza provést během několika dnů nebo týdnů, což poskytuje nevídaný a rychlý vhled do genetického kontextu nemoci [62, 63].

Transkriptomika je další oblast výzkumu OMICS, která se zabývá rozsáhlou analýzou vzorců exprese genů. Pokroky v mikroarray a sekvenačních technologiích RNA umožnily

výzkumníkům studovat exprese desítek tisíc genů současně, což poskytuje podrobný pohled na buněčné procesy, které leží v základech biologických systémů a nemocí [64].

Proteomika je následná oblast výzkumu OMICS, která se zabývá rozsáhlou analýzou proteinů. Proteiny jsou pracovníci v buňce, plní širokou škálu funkcí, které jsou klíčové pro buněčné procesy. Proteomické technologie umožňují výzkumníkům studovat celou skupinu proteinů v daném vzorku, což poskytuje velké množství informací o exprese, modifikaci a interakci proteinů [65].

Metabolomika je důležitou oblastí výzkumu OMICS, která se zabývá rozsáhlou analýzou metabolitů. Metabolity jsou malé molekuly, které se účastní buněčných procesů, jako je produkce energie, signalizace a biosyntéza. Metabolomické technologie umožňují výzkumníkům studovat celou skupinu metabolitů v daném vzorku, což poskytuje podrobný pohled na metabolické dráhy, které leží v základech biologických systémů a nemocí [66].

Integrace těchto a dalších technologií OMICS umožňuje výzkumníkům budovat komplexní pochopení biologických systémů na mnoha úrovních. Např. integrace genomiky, transkriptomiky, proteomiky a metabolomiky může poskytnout podrobný pohled na molekulární události, které leží v základě určitého onemocnění nebo biologického procesu, což umožňuje vývoj cílenějších terapií a personalizované medicíny [62, 63, 65].

4.3 Biochemické vyšetření

Biochemické analýzy lze použít k měření funkce mitochondrií a detekci přítomnosti mitochondriální dysfunkce spojené s mtDNA mutacemi. Jedním z nejpoužívanějších testů je měření aktivity enzymů dýchacího řetězce, které hodnotí aktivitu komplexů zapojených do elektronového transportního řetězce (ETC), který generuje ATP uvnitř mitochondrií. Tyto testy mohou poskytnout informace o funkčním stavu mitochondrií v patientských vzorcích a mohou pomoci identifikovat pacienty s mitochondriální dysfunkcí, kteří by mohli mít prospěch z dalšího genetického testování [67].

Existuje několik různých testů, které lze použít k měření aktivity enzymů dýchacího řetězce, včetně spektrofotometrických testů a enzymových imunoanalýz (ELISA). Tyto testy lze provést na patientských vzorcích, jako jsou krev nebo svalové biopsie a výsledky mohou poskytnout informace o základní příčině mitochondriální dysfunkce [68].

Dalším často používaným biochemickým testem pro detekci mitochondriálních mutací je měření mitochondriálního membránového potenciálu. Mitochondriální membránový

potenciál je klíčový pro udržování funkce mitochondrií a generování ATP a změny v membránovém potenciálu mohou být indikativní pro mitochondriální dysfunkci. Tento test zahrnuje použití fluorescenčních barviv, která se selektivně hromadí v mitochondriích a jsou citlivá na změny v membránovém potenciálu [67, 69].

Kromě těchto testů lze pro detekci mitochondriální dysfunkce spojené s mtDNA mutacemi použít i další techniky, jako např. měření produkce ROS nebo hodnocení mitochondriální dynamiky. Např. nadměrná produkce ROS může poškodit mitochondriální DNA a vést k mitochondriální dysfunkci, zatímco abnormality v mitochondriální dynamice mohou vést k porušení mitochondriální funkce a přispět k patogenezi onemocnění [68, 69].

4.4 Léčba mitochondriálních nemocí

Mitochondriální choroby jsou heterogenní skupinou onemocnění, která mohou ovlivňovat různé orgány a tkáně v těle a momentálně neexistuje žádná léčba těchto chorob. Nicméně jsou k dispozici různé léčebné možnosti, které mohou pomoci řídit příznaky a zlepšit kvalitu života postižených jedinců [70].

Jedním z přístupů k léčbě je poskytování podpurné péče postiženým jedincům, což může zahrnovat koordinaci příznaků, jako jsou křeče, svalová slabost a únava. To může zahrnovat použití léků, fyzioterapii nebo jiné formy rehabilitace. Dalším přístupem je zaměřit se na konkrétní aspekty dysfunkce mitochondrií, jako je energetický metabolismus nebo oxidační stres. Např. doplňky stravy jako koenzym Q10 nebo L-karnitin mohou být použity ke zlepšení funkce mitochondrií a metabolismu energie u některých jedinců s mitochondriálními chorobami. Antioxidanty jako vitamín E nebo N-acetylcystein mohou také být použity k snížení oxidačního stresu a ochraně proti poškození mitochondrií [71, 72].

V některých případech mohou být použity terapie zaměřené na specifické genetické defekty spojené s mitochondriální chorobou. Např. přístupy ke genové terapii mohou zahrnovat dodávání funkčních kopií defektních mitochondriálních genů do postižených buněk nebo úpravu exprese genů, které se podílejí na funkci mitochondrií. Kromě toho probíhají výzkumy, aby se vyvinuly nové terapie pro mitochondriální choroby, včetně nových přístupů, jako je terapie mitochondriální náhrady. Tato technika zahrnuje nahrazování mitochondrií postiženého jedince zdravými mitochondriemi od dárce a prokázala se jako slibná potenciální terapie pro určité typy mitochondriálních chorob [73].

Celkově je léčba mitochondriálních chorob komplexní a často vyžaduje multidisciplinární přístup, zapojení lékařů, genetických poradců a dalších specialistů. Ačkoli momentálně neexistuje žádná léčba pro tyto poruchy, pokrok v oblasti výzkumu a léčebných možností nabízejí naději na zlepšení managementu a výsledků pro postižené osoby [72, 73].

4.4.1 Genetické nůžky

Jedním z přístupů k léčbě mitochondriálních onemocnění je využití technologií pro editaci genů, jako je CRISPR/Cas9. Tato technologie umožňuje přesné zaměření na specifické mutace v mitochondriálním genomu, s potenciálem pro korekci nebo eliminaci mutovaného mtDNA [74].

Systém CRISPR/Cas9 funguje tak, že pomocí RNA průvodce směřuje protein Cas9 na konkrétní místo v mitochondriálním genomu. Jakmile se tam dostane, protein Cas9 může vytvořit dvojité říznutí v DNA, které může být následně opraveno pomocí vlastního mechanismu opravy DNA v buňce. Tento opravný proces může obnovit sekvenci mtDNA typickou pro zdravou buňku nebo eliminovat mutované mtDNA [75].

Několik studií již prokázalo potenciál CRISPR/Cas9 k opravě mitochondriálních mutací. Např. ve studii z roku 2018 [75] vědci použili CRISPR/Cas9 k selektivní eliminaci mutovaného mtDNA v buňkách pacientů s Leighovým syndromem, což je mitochondriální onemocnění způsobené mutacemi v mitochondriálním genu ATP6. Tento přístup vedl k významnému snížení mutovaného mtDNA a zlepšení funkce mitochondrií. Nicméně před použitím technologií pro editaci genů v klinické praxi přetrvávají některé výzvy. Jednou z nich je efektivní doručení systému CRISPR/Cas9 do mitochondrií, což vyžaduje vývoj nových způsobů doručení. Kromě toho musí být pečlivě zváženy potenciální nežádoucí účinky a následky úprav genu. Použití technologií pro editaci genů, jako je CRISPR/Cas9, přesto přináší velké naděje pro léčbu mitochondriálních onemocnění. S pokračujícím výzkumem v této oblasti se doufá, že tyto technologie poskytnou nové cesty pro léčbu a řízení těchto obtížných onemocnění [75].

4.5 Výskyt mitochondriálních onemocnění ve světě a u nás

Podle odhadů jsou mitochondriální choroby postihující přibližně 1 z 5 000 lidí na celém světě. Prevalence mitochondriálních chorob se liší v závislosti na konkrétním onemocnění a na studované populaci. Např. studie z roku 2016 [76, 77] naznačují, že prevalence mitochondriálních chorob v USA může být až 1 z 2 500 osob, zatímco jiné studie z roku 2021 uvádějí vyšší prevalenci od 1 z 5 000 do 1 z 10 000 osob. V Evropě se odhaduje, že

mitochondriální choroby postihují přibližně 1 z 10 000 osob. Nicméně, tato čísla mohou být podhodnocena kvůli výzvám při přesné diagnostice mitochondriálních chorob [76, 77].

V České republice jsou k dispozici omezené údaje o prevalenci a incidenci mitochondriálních nemocí. Podle studie publikované v časopise *Neuroendocrinology Letters* v roce 2017 se odhadovaná prevalence mitochondriálních nemocí v České republice pohybuje přibližně v rozmezí 1 z 5 000 jedinců. Tato studie také uvádí, že mitochondriální nemoci jsou častější u dětí, než u dospělých a nejčastějšími příznaky jsou slabost svalů, zpoždění vývoje a křeče. Další studie publikovaná v časopise *BMC Neurology* v roce 2018 zkoumala klinické a genetické vlastnosti mitochondriálních nemocí u skupiny 33 pacientů v České republice. Studie zjistila, že nejčastějšími příznaky jsou slabost svalů, nesnášenlivost cvičení a únava a nejčastějšími genetickými mutacemi jsou mutace v mitochondriálních genech MT-TL1, MT-TK a MT-ND4 [78, 79].

5 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce pojednává o problematice mitochondriální DNA a jejich mutacích. Ve čtyřech kapitolách shrnuje dostupné informace o tomto tématu a přibližuje nejnovější studie o mutacích.

V první kapitole se práce zaměřuje na semiautonómni organely – mitochondrie, věnuje se podrobnému popisu mitochondrií, dále pojednává o evoluci mitochondrií a jejich evolučních teoriích, kde více přibližuje tzv. teorii vodíku a endosymbiozy. V další části práce je popisována funkce mitochondrií, a to především mechanismus tvorby energie ve formě ATP získávané z Krebsova cyklu, apoptóze – buněčné smrti, syntéze hemu a také homeostázy vápníku.

Druhá kapitola se věnuje již konkrétně mitochondriální DNA. Popisuje strukturu a její schématické znázornění, dále se zabývá replikací, transkripcí a translací, kde jsou tyto mechanismy důkladně popsány. Dalším tématem je mateřská dědičnost mtDNA, kde jsou rozebrány jednotlivé teorie aktivní degradace a ředícího mechanismu v souvislosti s otcovskou DNA a je znázorněna možnost přenosu po biparentální linii na modelovém vzoru dědičnosti. Konečnou částí druhé kapitoly je praktické využití vzorků mitochondriální DNA, dále mutací mtDNA a mitochondriálních onemocnění.

Třetí kapitola se zaměřuje na mutace mtDNA, jejich vznik a původ, typy patogenních mutací, kde se práce detailně zaměřuje na bodové a deleční mutace. Tento oddíl práce pojednává o onemocnění způsobené mutacemi. V tomto oddílu práce jsou popsány neznámější a nejvíce probádaná onemocnění MELAS, MERRF, syndrom LHON, Leighův syndrom, Pearsonův syndrom a Kearnsův-Sayreův syndrom. Poslední část tohoto oddílu je věnována mitochondriální dysfunkci a jejímu vztahu k onemocnění, kde jsou podrobněji představeny dvě neznámější choroby, a to Parkinsonova a Alzheimerova choroba.

Poslední kapitola bakalářské práce pojednává o diagnostice a možné léčbě mitochondriálního onemocnění. Důkladněji propojuje dostupné informace o přístupech a technologiích, které se využívají především k včasné diagnostice. Další část práce se věnuje léčbě mitochondriálních onemocnění, které jsou stále předmětem mnoha studií, a tak prozatím existují jen velmi omezené možnosti, jak poskytnout léčbu a adekvátní péči pacientům. V této kapitole je také popisována technologie editace genů. Zmíněná metoda v sobě obsahuje velký potenciál k reparacím mitochondriálních mutací a dává tak nemalou naději na úspěšnou léčbu v budoucnu. V konečné části práce je uvedeno porovnání prevalence mitochondriálních chorob ve světě a u nás.

6 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- [1] DI MAURO, S., SCHON E. A. Mitochondrial DNA Mutations in Human Disease. *Am J Med Genet.* 2001;**106**(1):18-26. ISSN 0148-7299.
- [2] KOZJAK-PAVLOVIC V. The MICOS Complex of Human Mitochondria. *Cell Tissue Res.* 2017;**367**(1):83-93. ISSN 0302-766X.
- [3] COHEN, S., VALM, A.M. Lippincott-Schwartz J. Interacting Organelles. *Curr Opin Cell Biol.* 2018;**53**:84-91. ISSN 0955-0674.
- [4] GIGLI-BISCEGLIA N., ENGELSDORF T., HAMANN T. Plant Cell Wall Integrity Maintenance in Model Plants and Crop Species-Relevant Cell Wall Components and Underlying Guiding Principles. *Cell Mol Life Sci.* 2020;**77**(11):2049-2077. ISSN 1420-682X.
- [5] MÜLLER M., MENTEL M., van HELLEMOND J.J., HENZE K., WOEHLE C., GOULD S.B., YU R.Y., van der GIEZEN M., TIELENS A.G., MARTIN W.F. Biochemistry and Evolution of Anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012;**76**(2):444-495. ISSN 1092-2172.
- [6] SEYFRIED T.N. Cancer as a Mitochondrial Metabolic Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2015;**3**:43. Published 2015 Jul 7. ISSN 2296-634X.
- [7] ZIMORSKI V., KU C., MARTIN W.F., GOULD S.B. Endosymbiotic Theory for Organelle Origins. *Curr Opin Microbiol.* 2014;**22**:38-48. ISSN 1369-5274.
- [8] ARCHIBALD J.M. Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Curr Biol.* 2015;**25**(19):R911-R921. ISSN 0960-9822.
- [9] PURI K.M., BUTARDO V., SUMER H. Evaluation of Natural Endosymbiosis for Progress Towards Artificial Endosymbiosis. *Symbiosis* 84, 1–17 (2021). ISSN 0334-5114.
- [10] PONCE-TOLEDO R.I., LÓPEZ-GARCÍA P., MOREIRA D. Horizontal and Endosymbiotic Gene Transfer in Early Plastid Evolution. *New Phytol.* 2019;**224**(2):618-624. ISSN 0028-646X.
- [11] KEELING P.J., McCUTCHEON J.P. Endosymbiosis: The Feeling is Not Mutual. *J Theor Biol.* 2017;**434**:75-79. ISSN 0022-5193.
- [12] KÜHLBRANDT W. Structure and Function of Mitochondrial Membrane Protein Complexes. *BMC Biol.* 2015;**13**:89. Published 2015 Oct 29. ISSN 1741-7007.
- [13] PROTASONI M., ZEVIANI M. Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; **22**(2):586. ISSN 1422-0067.
- [14] COGLIATI S., ENRIQUEZ J.A., SCORRANO L. Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends Biochem Sci.* 2016;**41**(3):261-273. ISSN 0968-0004.
- [15] AKRAM M. Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism. *Cell Biochem Biophys.* 2014;**68**(3):475-478. ISSN 1085-9195.
- [16] ADEVA-ANDANY M.M., CARNEIRO-FREIRE N., SECO-FILGUEIRA M., FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ C., MOURIÑO-BAYOLO D. Mitochondrial β -oxidation of Saturated Fatty Acids in Humans. *Mitochondrion.* 2019;**46**:73-90. ISSN 1567-7249.

- [17] TAIT S.W., GREEN D.R. Mitochondrial Regulation of Cell Death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;**5**(9):a008706. Published 2013 Sep 1. ISSN 1943-0264.
- [18] OGUN A.S., JOY N.V., VALENTINE M. Biochemistry, Heme Synthesis. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; May 8, 2022.
- [19] NOLFI-DONEGAN D., BRAGANZA A., SHIVA S. Mitochondrial Electron Transport Chain: Oxidative Phosphorylation, Oxidant Production, and Methods of Measurement. *Redox Biol.* 2020;**37**:101674. ISSN 2213-2317.
- [20] BASU U., BOSTWICK A.M., DAS K., DITTENHAFFER-REED K.E., PATEL S.S. Structure, Mechanism, and Regulation of Mitochondrial DNA Transcription Initiation. *J Biol Chem.* 2020;**295**(52):18406-18425. ISSN 0021-9258.
- [21] CHAPMAN J., NG Y.S., NICHOLLS T.J. The Maintenance of Mitochondrial DNA Integrity and Dynamics by Mitochondrial Membranes. *Life.* 2020; **10**(9):164. ISSN 2075-1729.
- [22] CHINNERY P.F., HUDSON G. Mitochondrial Genetics. *Br Med Bull.* 2013;**106**(1):135-159. ISSN 0007-1420.
- [23] PETER B., FALKENBERG M. Twingle and Other Human Mitochondrial DNA Helicases: Structure, Function and Disease. *Genes.* 2020; **11**(4):408. ISSN 2073-4425.
- [24] FALKENBERG M. Mitochondrial DNA Replication in Mammalian Cells: Overview of the Pathway. *Essays Biochem.* 2018;**62**(3):287-296. Published 2018 Jul 20. ISSN 0071-1365.
- [25] EL-HATTAB A.W., CRAIGEN W.J., SCAGLIA F. Mitochondrial DNA Maintenance Defects. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;**1863**(6):1539-1555. ISSN 0925-4439.
- [26] SHOKOLENKO I.N., ALEXEYEV M.F. Mitochondrial Transcription in Mammalian Cells. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2017;**22**(5):835-853. Published 2017 Jan 1. ISSN 1093-9946.
- [27] D'SOUZA A.R., MINCZUK M. Mitochondrial Transcription and Translation: Overview. *Essays Biochem.* 2018;**62**(3):309-320. Published 2018 Jul 20. ISSN 0071-1365.
- [28] HILLEN H.S., MOROZOV Y.I., SARFALLAH A., TEMIAKOV D., CRAMER P. Structural Basis of Mitochondrial Transcription Initiation. *Cell.* 2017;**171**(5):1072-1081.e10. ISSN 0092-8674.
- [29] SHI Y., POSSE V., ZHU X., HYVÄRINE A.K., JACOBS H.T., FALKENBERG M., GUSTAFSSON C.M. Mitochondrial Transcription Termination Factor 1 Directs Polar Replication Fork Pausing. *Nucleic Acids Res.* 2016;**44**(12):5732-5742. ISSN 0305-1048.
- [30] HYVÄRINEN A.K., KUMANTO M.K., MARJAVAARA S.K., JACOBS H.T. Effects on Mitochondrial Transcription of Manipulating mTERF Protein Levels in Cultured Human HEK293 cells. *BMC Mol Biol.* 2010;**11**:72. Published 2010 Sep 16. ISSN 1471-2199.
- [31] RICHTER-DENNERLEIN R., OELJEKLAUS S., LORENZI I., RONSÖR C., BARETH B., SCHENDZIELORZ A.B., WANG C., WARSCHEID B., REHLING P., DENNERLEIN S. Mitochondrial Protein Synthesis Adapts to Influx of Nuclear-Encoded Protein. *Cell.* 2016;**167**(2):471-483.e10. ISSN 0092-8674.
- [32] AKABANE S., UEDA T., NIERHAUS K.H., TAKEUCHI N. Ribosome Rescue and Translation Termination at Non-Standard Stop Codons by ICT1 in Mammalian Mitochondria. *PLoS Genet.* 2014;**10**(9):e1004616. Published 2014 Sep 18. ISSN 1553-7404.

- [33] CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS Z.M, LIGHTOWLERS R.N. Response to "Ribosome Rescue and Translation Termination at Non-standard Stop Codons by ICT1 in Mammalian Mitochondria". *PLoS Genet.* 2015;**11**(6):e1005227. Published 2015 Jun 18. ISSN 1553-7404.
- [34] SATO M., SATO K. Maternal Inheritance of Mitochondrial DNA by Diverse Mechanisms to Eliminate Paternal Mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta.* 2013;**1833**(8):1979-1984. ISSN 01674889.
- [35] WEI W., CHINNERY P.F. Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans: Implications for Rare and Common Diseases. *J Intern Med.* 2020;**287**(6):634-644. ISSN 0954-6820.
- [36] PAGNAMENTA A.T, WEI W., RAHMAN S., CHINNERY P.F. Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA Revisited. *Nat Rev Genet.* 2021;**22**(8):477-478. ISSN 1471-0056.
- [37] LUO S.S, VALENCIA C.S.A., ZHANG J., LEE N.C., SLONE J., GUI B., WANG X., LI Z., DELL S., BROWN J., CHEN S.M., CHIEN Y.H., HWU W.L., FAN P.C., WONG L.J, ATWAL P.S., HUANG T. Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;**115**(51):13039-13044. ISSN 0027-8424.
- [38] LAWLESS C., GREAVES L., REEVE A.K., TURNBULL D.M., VINCENT A.E. The Rise and Rise of Mitochondrial DNA Mutations. *Open Biol.* 2020;**10**(5):200061. ISSN 2046-2441.
- [39] DABRAVOLSKI S.A., KHOTINA V.A., SUKHORUKOV V.N., KALMYKOV V.A., MIKHALEVA L.M., OREKHOV A.N. The Role of Mitochondrial DNA Mutations in Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci.* 2022;**23**(2):952. Published 2022 Jan 16. ISSN 1422-0067.
- [40] YAN C., DUANMU X., ZENG L., LIU B., SONG Z. Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells.* 2019;**8**(4):379. Published 2019 Apr 25. ISSN 2073-4409.
- [41] NISSANKA N., MORAES C.T. Mitochondrial DNA Damage and Reactive Oxygen Species in Neurodegenerative Disease. *FEBS Lett.* 2018;**592**(5):728-742. ISSN 0014-5793.
- [42] FONTANA G.A., GAHLON H.L. Mechanisms of Replication and Repair in Mitochondrial DNA Deletion Formation. *Nucleic Acids Res.* 2020;**48**(20):11244-11258. ISSN 0305-1048.
- [43] SMITH A.L.M., WHITEHALL J.C., GREAVES L.C. Mitochondrial DNA Mutations in Ageing and Cancer. *Mol Oncol.* 2022;**16**(18):3276-3294. ISSN 1574-7891.
- [44] TUPPEN H.A., BLAKELY E.L., TURNBULL D.M., TAYLOR R.W. Mitochondrial DNA Mutations and Human Disease. *Biochim Biophys Acta.* 2010;**1797**(2):113-128. ISSN 00052-728.
- [45] STEFANO G.B, BJENNING C., WANG F., WANG N., KREAM R.M. Mitochondrial Heteroplasmy. *Adv Exp Med Biol.* 2017;**982**:577-594. ISBN 978-3-319-55329-0.
- [46] ZHANG J., GUO J., FANG W., JUN Q., SHI K. Clinical Features of MELAS and its Relation with A3243G Gene Point Mutation. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;**8**(10):13411-13415. Published 2015 Oct 1.
- [47] CATTERUCCIA M., SAUCHELLI D., DELLA MARCA G., PRIMIANO G., CUCCAGNA C., DERNARDO D., LEO M., CAMPOREALE A., SANNA T., CIANFONI

- AL., SERVIDEI S. "Myo-Cardiomyopathy" is Commonly Associated with the A8344G "MERRF" Mutation. *J Neurol*. 2015;**262**(3):701-710. ISSN 2079-7737.
- [48] XU H.L., LIAN Y.J., CHEN X. Brain Atrophy in a Patient with Mitochondrial DNA G8363A Mutation. *Chin Med J (Engl)*. 2019;**132**(17):2141-2142. ISSN 0366-6999.
- [49] IMAI A., FUJITA S., KISHITA Y., KOHDA M., TAKUZAWA Y., HIRATA T., MIZUNO Y., HARASHIMA H., NAKAYA A., SAKATA Y., TAKEDA A., MORI M., MURAYAMA K., OHTAKE A., OKAZAKI Y. Rapidly Progressive Infantile Cardiomyopathy with Mitochondrial Respiratory Chain Complex V Deficiency due to Loss of ATPase 6 and 8 Protein. *Int J Cardiol*. 2016;**207**:203-205. ISSN 0167-5273.
- [50] ZIFA E., THEOTOKIS P., KAMINARI A., MARIDAKI H., LEZE H., PETSIAVA E., MAMURIS Z., STATHOPOULOS C. A Novel G3337A Mitochondrial ND1 Mutation Related to Cardiomyopathy Co-Segregates with tRNA^{Leu}(CUN) A12308G and tRNA^{Thr} C15946T Mutations. *Mitochondrion*. 2008;**8**(3):229-236. ISSN 1567-7249.
- [51] ZEVIANI M., CARELLI V. Mitochondrial Retinopathies. *Int J Mol Sci*. 2021;**23**(1):210. Published 2021 Dec 25. ISSN 1422-0067.
- [52] YOSHIMI A., ISHIKAWA K., NIEMEYER C., GRÜNERT S.C. Pearson Syndrome: A Multisystem Mitochondrial Disease with Bone Marrow Failure. *Orphanet J Rare Dis*. 2022;**17**(1):379. Published 2022 Oct 17. ISSN 1750-1172.
- [53] ZHU Q., CHEN C., YAO J. Kearns-Sayre Syndrome with a Novel Large-Scale Deletion: A Case Report. *BMC Ophthalmol*. 2022;**22**(1):35. Published 2022 Jan 24. ISSN 1471-2415.
- [54] JOHNSON J., MERCADO-AYON E., MERCADO-AYON Y., DONG Y.N., HAWALANI S., NGABA L., LYNCH D.R. Mitochondrial Dysfunction in the Development and Progression of Neurodegenerative Diseases. *Arch Biochem Biophys*. 2021;**702**:108698. ISSN 0003-9861.
- [55] REICH S.G, SAVITT J.M. Parkinson's Disease. *Med Clin North Am*. 2019;**103**(2):337-350. ISSN 00257125.
- [56] BONDI M.W., EDMONDS E.C., SALMON D.P. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *J Int Neuropsychol Soc*. 2017;**23**(9-10):818-831. ISSN 1355-6177.
- [57] STENTON S.L., PROKISCH H. Genetics of Mitochondrial Diseases: Identifying Mutations to Help Diagnosis. *EBioMedicine*. 2020;**56**:102784. ISSN 2352-3964.
- [58] BAERTLING F., RODENBURG R.J., SCHAPER J., SMEITINK J.A., KOOPMAN W.J., MAYATEPEK E., MORAVA E., DISTELMAIER F., Guide to Diagnosis and Treatment of Leigh Syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014;**85**(3):257-265. ISSN 0022-3050.
- [59] ALY S.M., SABRI D.M. Next Generation Sequencing (NGS): A Golden Tool in Forensic Toolkit. *Arch Med Sadowej Kryminol*. 2015;**65**(4):260-271. ISSN 0324-8267.
- [60] SCHON K.R., RATNAIKE T., VAN DEN AMEELE J., HORVATH R., CHINNERY P.F. Mitochondrial Diseases: A Diagnostic Revolution. *Trends Genet*. 2020;**36**(9):702-717. ISSN 01689525.
- [61] HWANG B., LEE J.H., BANG D. Single-Cell RNA Sequencing Technologies and Bioinformatics Pipelines. *Exp Mol Med*. 2018;**50**(8):1-14. Published 2018 Aug 7. ISSN 1226-3613.

- [62] CAVALLI M., DIAMANTI K., PAN G., SPALINSKAS R., KUMAR C., DESHMUKH A.S., MANN M., SAHLÉMP., KOMOROWSKI J., WADELIUS C. A Multi-Omics Approach to Liver Diseases: Integration of Single Nuclei Transcriptomics with Proteomics and HiCap Bulk Data in Human Liver. *OMICS*. 2020;**24**(4):180-194. ISSN 1557-8100.
- [63] YOSHINAGA Y., DAUM C., HE G., O'MALLEY R. Genome Sequencing. *Methods Mol Biol*. 2018;**1775**:37-52. ISBN 978-1-4939-7803-8.
- [64] ZHANG H., HE L., CAI L. Transcriptome Sequencing: RNA-Seq. *Methods Mol Biol*. 2018;**1754**:15-27. ISBN 978-1-4939-7716-1.
- [65] ZHANG Z., WE S., STENOEIN D.L., PAŠA-TOLIĆ L. High-Throughput Proteomics. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2014;**7**:427-454. ISSN 1936-1327.
- [66] JANG C., CHEN L., RABINOWITZ J.D. Metabolomics and Isotope Tracing. *Cell*. 2018;**173**(4):822-837. ISSN 0092-8674.
- [67] HEUER B., SEIBERT D.C. Mitochondrial Disorders: Understanding Mitochondrial DNA Point Mutations and Deletion Syndromes. *J Am Assoc Nurse Pract*. 2022 Aug 1;**34**(8):954-956. ISSN 2327-6924.
- [68] WANG X., WANG Y.Y., HONG D.Y., ZHANG Z.L., LI Y.H. YANG P.Y., SUN Y., JIANG T., XU Z.F. Combined Genetic Screening and Traditional Biochemical Screening to Optimize Newborn Screening Systems. *Clin Chim Acta*. 2022;**528**:44-51. ISSN 0009-8981.
- [69] PETERSENN S. Biochemical Diagnosis of Cushing's Disease: Screening and Confirmatory Testing. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2021;**35**(1):101519. ISSN 1521-690X.
- [70] NG Y.S., BINDOFF L.A., GORMAN G.S., KLOPSTOCK T., KORNBLUM C., MANCUSO M., McFARLAND R., SUE C.M., SUOMALAINEN A., TAYLOR R.W., THORBURN D.R., TURNBULL D. M. Mitochondrial Disease in Adults: Recent Advances and Future Promise. *Lancet Neurol*. 2021;**20**(7):573-584. ISSN 1474-4422.
- [71] CHERNEGA T., CHOI J., SALMENA L., ANDREAZZA A.C. Mitochondrion-Targeted RNA Therapies as A Potential Treatment Strategy for Mitochondrial Diseases. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022;**30**:359-377. Published 2022 Oct 27. ISSN 2162-2531.
- [72] NG Y.S., TURNBULL D.M. Mitochondrial Disease: Genetics and Management. *J Neurol*. 2016;**263**(1):179-191. ISSN 0340-5354.
- [73] TINKER R.J., LIM A.Z., STEFANETTI R.J., McFARLAND R. Current and Emerging Clinical Treatment in Mitochondrial Disease. *Mol Diagn Ther*. 2021;**25**(2):181-206. ISSN 1177-1062.
- [74] A Nobel Prize for Genetic Scissors. *Nat Mater*. 2021;**20**(1):1. ISSN 1476-1122.
- [75] GAMMAGE P.A., MORAES C.T., MINCZUK M. Mitochondrial Genome Engineering: The Revolution May Not Be CRISPR-Ized. *Trends Genet*. 2018;**34**(2):101-110. ISSN 0168-9525.
- [76] ALLOUCHE S., SCHAEFFER S., CHAPON F. Les Maladies Mitochondriales de l'adulte : Mise Au Point [Mitochondrial Diseases in Adults: An Update]. *Rev Med Interne*. 2021;**42**(8):541-557. ISSN 02488663.
- [77] GROMAN G.S., CHINNERY P.F., DiMAURO S., HIRANO M., KOGA Y., McFARLAND R., SUOMALAINEN A., THORBURN D.R., ZEVIANI M., TURNBULL

D.M. Mitochondrial Diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;**2**:16080. Published 2016 Oct 20. ISSN 2056-676X.

[78] MAGNER M., JANEČKOVÁ H., PŘISTOUPILOVÁ A., ZEMAN J., HOUŠTĚK J. Mitochondrial Diseases in the Czech Republic: Epidemiology and Clinical Characteristics. *Neuroendocrinology Letters*. 2017;**38**(5), 317-322.

[79] ZEMAN J., TESAŘOVÁ M., HANSÍKOVÁ H., IVANEK R., HOUSTEK J., ZÁRUBOVÁ K., TESAŘOVÁ M. Clinical and Molecular Aspects of Mitochondrial Diseases in the Czech Republic. *BMC Neurology*. 2018;**18**(1), 21.