

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

**Mitochondriální nemoci
způsobené genetickými poruchami
 F_1F_0 -ATP syntázy**

RNDr. MUDr. Pavel Ješina, Ph.D.

Habilitační práce

Praha 2017

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval celé řadě svých kolegů z Ústavu dědičných metabolických poruch a Kliniky dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a Oddělení bioenergetiky Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky bez jejichž pomoci a asistence by tato rozsáhlá práce nemohla vzniknout. Velké poděkování také patří mojí rodině a přátelům, kteří jsou pro mě hlavní oporou.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Mitochondrie	1
1.2. Systém oxidativní fosforylace	1
1.3. Mitochondriální F1Fo-ATP syntáza	2
1.3.1. Struktura a funkce F1Fo-ATP syntázy	2
1.3.2. Biogeneze mitochondriální ATPázy	4
1.4. Mitochondriální onemocnění	5
1.4.1. Změny mitochondriálního genomu; mutace v mtDNA	6
1.4.2. Vliv jaderného genomu na mitochondriální onemocnění	7
1.4.3. Mitochondriální onemocnění - poruchy ATPázy	8
1.5. Oxidativní stres u mitochondriálních onemocnění a poruch ATPázy	13
2. Charakteristika a cíle práce	14
3. Klinický průběh mitochondriálních onemocnění způsobených dědičnými poruchami ATPázy	15
3.1. Klinické projevy mitochondriálních poruch ATPázy	15
3.2. Klinické projevy jaderných poruch ATPázy	18
3.3. Prognóza a léčba	21
4. Diagnostické postupy u pacientů s podezřením na poruchu ATPázy	24
4.1. Biochemická vyšetření	24
4.2. Histochemická vyšetření	28
4.3. Speciální funkční a strukturální analýzy mitochondriálního energetického metabolismu	29
4.4. Molekulárně genetická vyšetření	30
4.5. Zobrazovací vyšetření	31
4.6. Diferenciální diagnostika mitochondriálních poruch a defektů ATPázy	32
5. Funkční a strukturální změny u vzácných genetických poruch ATPázy	34
5.1. Izolované deficity ATPázy způsobené mutací v genech pro mitochondriálně kódovanou strukturální podjednotku F ₀ ATPázy.	34
5.2. Izolované deficity ATPázy způsobené mutacemi v genech pro jaderně kódovanou strukturální podjednotku ATPázy	39
5.3. Izolované deficity ATPázy způsobené mutacemi v genech pro jaderně kódované asemblační proteiny pro ATPázu	40
5.4. Kombinované deficity ATPázy způsobené mutacemi v genech pro mitochondriální tRNA	41
5.5. Kombinované deficity ATPázy způsobené poruchou mitochondriální polymerázy γ (POLG)	42
6. Patobiochemie poruch ATPázy	45
6.1. Struktura a funkce ATPázy u ATPázových poruch	45
6.2. Mitochondriální membránový potenciál $\Delta\psi_m$ a tvorba ROS u ATPázových poruch	48
6.3. Oxidativní stres, dysfunkční změny ATPázy a OXPHOS u epilepsii	49
7. Shrnutí	Chyba! Záložka není definována.3
8. Literatura	54
9. Použité zkratky	60
10. Přílohy – vlastní publikace s problematikou poruch ATPázy a mitochondriálních nemocí	62

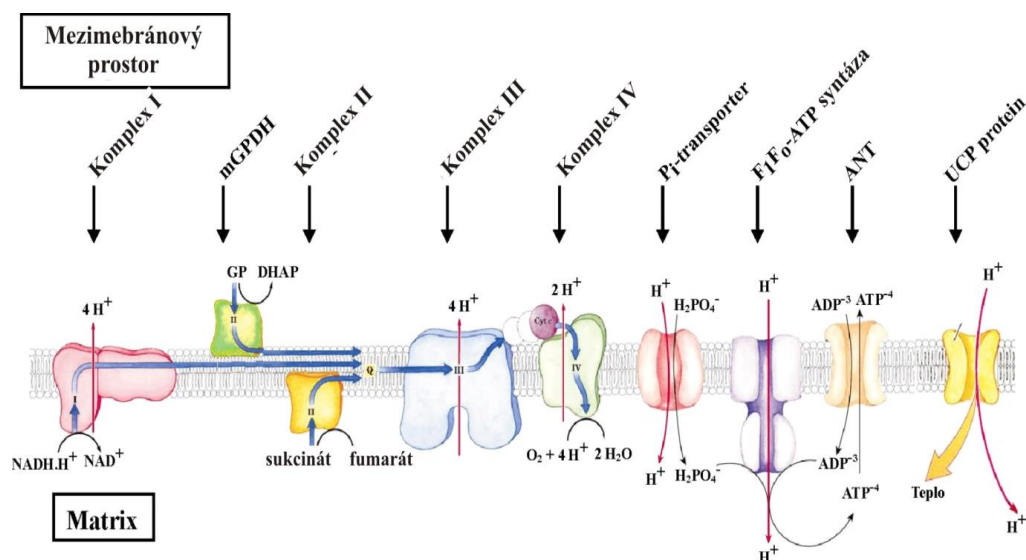
1. Úvod

1.1. Mitochondrie

Mitochondrie jsou přítomny v cytoplazmě většiny eukaryotických buněk a představují vysoce dynamické organely uspořádané jako souvislá síť, která se může měnit v závislosti na metabolicko-energetickém stavu buňky. Mitochondrie jsou spolu s plastidy považovány za endosymbionty původních eukaryot (α -protheobacteria). Změny, které nastaly po ustanovení vzájemného vztahu mitochondrií a bakterií, jako ztráta postradatelných genů a přenos většiny mitochondriálních a bakteriálních genů do jádra, vedly k rozdělení genů mezi dva genomy, jaderný a mitochondriální (mtDNA) (Capaldi 2000). Jedním z nejdůležitějších metabolických pochodů odehrávajících se v mitochondriích je proces oxidativní fosforylace (OXPHOS), který je hlavním zdrojem ATP u vyšších eukaryot a pokrývá až 90 % energetických požadavků savčího organismu. Tento děj probíhá na vnitřní mitochondriální membráně, která obsahuje jednotlivé komplexy dýchacího řetězce, mitochondriální F_1F_0 -ATP syntázu a specifické transportní proteiny regulující průchod molekul přes vnitřní membránu. Fosfolipidová dvouvrstva vnitřní membrány je nepropustná pro ionty, a tím má klíčovou roli v mitochondriální biotransformaci energie tvorbou elektrochemického potenciálu protonového gradientu ($\Delta\mu_{H^+}$), tzv. mitochondriálního membránového potenciálu $\Delta\Psi_m$ (Lehninger 2000).

1.2. Systém oxidativní fosforylace

Systém OXPHOS je tvořen mitochondriální F_1F_0 -ATP syntázou a čtyřmi komplexy dýchacího řetězce – komplex I (NADH:koenzym Q oxidoreduktáza); komplex II (sukcinát:koenzym Q oxidoreduktáza); komplex III (koenzym Q:cytochrom *c* oxidoreduktáza) a komplex IV (cytochrom *c* oxidáza). Na těchto multipodjednotkových komplexech dochází díky vzrůstajícímu redoxnímu potenciálu k postupnému přenosu elektronů ze substrátů až na molekuly kyslíku. Elektrony jsou transportovány mezi komplexy mobilními přenašeči – koenzymem Q a cytochromem *c*. Obrázek 1 znázorňuje pochody na komplexech I, III a IV, které jsou spojeny s přenosem vodíkových protonů (H^+) přes vnitřní mitochondriální membránu z matrix do mezimembránového prostoru za současného využití redukovaných kofaktorů $NADH.H^+$ a $FADH_2$. Tak dochází k tvorbě elektrochemického protonového gradientu ($\Delta\mu_{H^+}$), který je následně využíván F_1F_0 -ATP syntázou k tvorbě molekul ATP (Lehninger 2000).



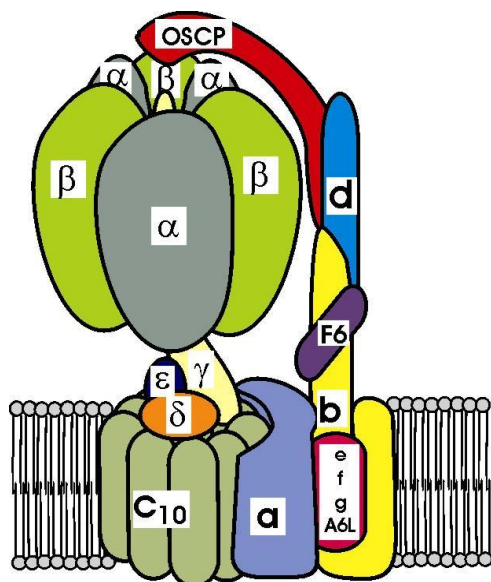
Obrázek 1: Systém oxidativní fosforylace (OXPHOS). Enzymy dýchacího řetězce (komplexy I, II, III a IV) a mitochondriální glycerolfosfátdehydrogenáza (mGPDH) (další zdroj elektronů) přenáší elektrony z NADH.H^+ a FADH_2 na kyslík, současně vytváří protonový gradient přes vnitřní mitochondriální membránu. Protonový gradient je následně využit F_1F_0 -ATP syntázou pro fosforylací ADP, pohání ADP/ATP výměnu (ANT – ADP/ATP transportér) a transport anorganického fosfátu (P_i transportér) do mitochondrie. UCP – uncoupling protein. Převzato z Ješina 2007.

1.3. Mitochondriální F_1F_0 -ATP syntáza

1.3.1. Struktura a funkce F_1F_0 -ATP syntázy

Mitochondriální F_1F_0 -ATP syntáza (ATPáza) (EC 3.6.3.14) je multipodjednotkový enzymatický komplex (komplex V), který se skládá ze dvou subkomplexů: F_1 - a F_0 -ATPázy. F_1 -ATPáza je orientována do mitochondriální matrix, zatímco F_0 -ATPáza se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně. Komplex savčí ATPázy s molekulovou hmotností okolo 600 kDa obsahuje 16 různých typů podjednotek. F_1 -ATPáza (mol. hmotnost cca 370 kDa) je tvořena heterohexamerem podjednotek α a β , které jsou střídavě uspořádány do tvaru kulovité struktury okolo tzv. „centrálního stonku“. V něm je přítomna jedna kopie podjednotka γ (rozkládající se podél celé délky stonku) a dále dvě podjednotky δ a ϵ (vázající se v blízkosti c_{10} -kruhu F_0 -ATPázy). Celou F_1 -ATPázu lze tedy stechiometricky vyjádřit jako $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. F_0 -ATPáza se skládá z homopolymeru 8-10 podjednotek c, uspořádaných do kruhu, a dalších podjednotek a, e, f, g a A6L, které jsou všechny lokalizovány ve vnitřní membráně. Jsou to hydrofobní molekuly, které jsou přítomny po jedné kopii. V membráně jsou zanořeny i 2 transmembránové domény podjednotky b, která následně přechází do matrix jako tzv. "periferní stonek". V něm jsou zastoupeny i další podjednotky F_0 -ATPázy - d, F_6 a OSCP (oligomycin sensitivity-

conferring protein) a dohromady se tyčí podél F_1 -ATPázy do matrix a slouží jako stator celé ATPázy. Spojení matrixové F_1 -ATPázy a membránové F_o -ATPázy je tak uskutečněno pomocí centrálního a periferního stonku. Savčí enzym je složen z podjednotek s celkovou kompozicí F_1 : $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ + IF_1 ; F_o : $abc_{10}defgF_6A6L$ OSCP, organizace podjednotek je ukázána na obrázku 2 (Walker 2013; Junckheere 2012). Malá regulační jednotka IF_1 se váže k F_1 -ATPáze při nízkém pH a zabraňuje změně funkční aktivity enzymu na ATP hydrolyzu. Další proteiny, které jsou asociovány s ATPázou, jsou membránový protein DAPIT (Diabetes-Associated Protein in Insulin-sensitive Tissue) a proteolipid MLQ o velikosti 6,8 kDa (Hejzlarová 2014).



Obrázek 2: Struktura mitochondriální F_1F_o -ATP syntázy. F_1 globulární katalytickou doménu tvoří podjednotky α, β a tři podjednotky centrální stopky γ, δ a ε . F_o doména je složena z oligomeru c , podjednotky $F_o a$ a z podjednotek periferní stopky b, d, F_6 a OSCP (oligomycin sensitivity-conferring protein). Tzv. vedlejší podjednotky (e, f, g a $A6L$) nejsou ukázány jednotlivě, ale všechny jsou v membránové části a pravděpodobně jsou přítomny v poměru 1:1:1:1. Rotor je tvořen centrální stopkou a c_{8-10} -kruhem. Zbylé podjednotky tvoří stator. Převzato z Ješina 2007.

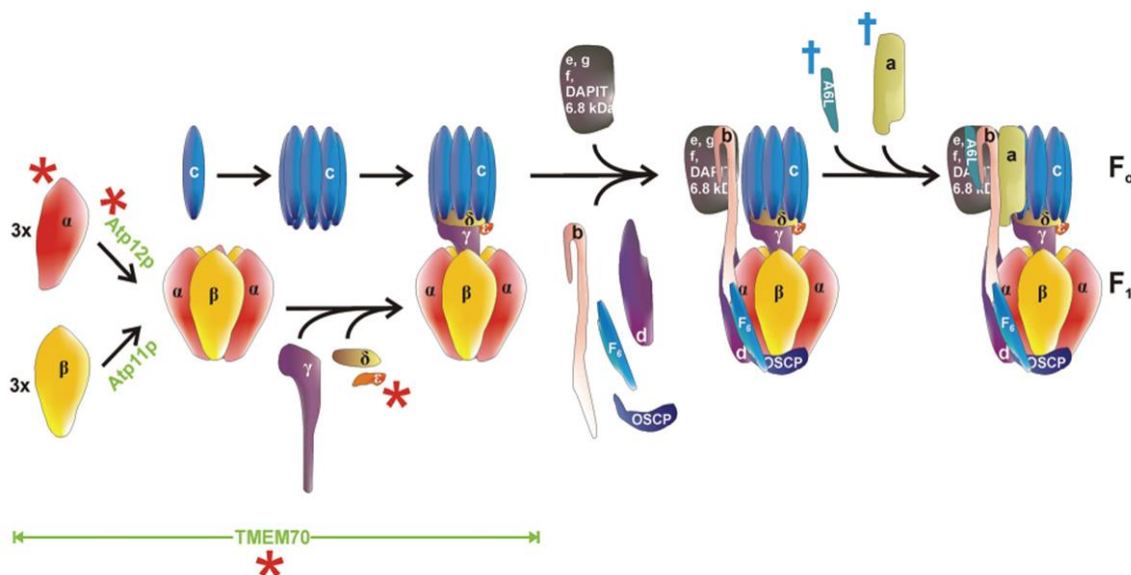
ATPáza je „nanoskopický“ rotující motor, který fosforyluje ADP na ATP. Může však fungovat jako oboustranný rotační motor ve dvou funkčně i konformačně odlišných stavech. Pokud pracuje jako syntáza ATP, pak její F_o -ATPáza přeměňuje elektrochemický gradient protonů na točivý moment, který roztáčí podjednotky γ, δ a ε F_1 -ATPázy. Na základě konformačních změn katalytické domény $\alpha_3\beta_3$ F_1 -ATPázy se generuje ATP z ADP a anorganického fosfátu (P_i). Naopak při hydrolyze ATP převádí F_1 -ATPáza chemickou energii hydrolyzy ATP na točivý moment, který využívá F_o -ATPáza v membráně pro přenos protonů z matrix do mezimembránového prostoru. Celý komplex ATPázy pak funguje jako iontová pumpa. Samotná F_1 -ATPáza je schopna hydrolyzy ATP, ale jelikož nedochází k souběžnému transportu protonů, tak nemůže produkovat ATP (Jonckheere 2012; Noji 1997).

1.3.2. Biogeneze mitochondriální ATPázy

Mitochondriální ATPáza je tvořena podjednotkami kódovanými jadernou DNA, s výjimkou podjednotek F_0a a $A6L$, kódovaných mtDNA. Jaderně kódované podjednotky jsou stejně jako většina jiných mitochondriálních proteinů syntetizovány na volných ribosomech v cytosolu. Proteiny směřující do vnitřní membrány obsahují cílové signální sekvence, které jsou rozpoznávány komplexem TOM (translokáza vnější membrány). Dále je transport směřován ke komplexu TIM (translokáza vnitřní membrány), konkrétně TIM23 (prekurzory směřující do matrix) a TIM22 (proteiny směřující přímo do vnitřní membrány). Ačkoliv jsou podjednotky F_0 -ATPázy bílkovinami vnitřní mitochondriální membrány, dochází k jejich transportu až do matrix přes TIM23, odkud jsou po odštěpení N-koncové sekvence zabudovány do cílového komplexu v membráně (Mokranjac 2005). Celý multipodjednotkový komplex ATPázy je skládán postupně za přispění několika tzv. asambláčnických faktorů. Přesný mechanismus sestavování savčí ATPázy z jednotlivých podjednotek zatím není zcela objasněn a současné poznatky jsou částečně založeny na studiích na kvasinkách (Rak 2009; Jonckheere 2012).

Syntéza F_1 -ATPázy, obou stonků a c-kruhu F_0 -ATPázy probíhají samostatně. Jak ukazuje obrázek č. 3, nejdříve je složen c-kruh, na který se připojí části F_1 -ATPázy a následně periferní stonek (složený z podjednotek b, d, F_6 a OSCP) a membránové podjednotky e, f, g. Jako poslední jsou zabudovány podjednotky F_0a a $A6L$ (Kucharczyk 2009; Rak 2009; Wittig 2010). Složení celého $\alpha_3\beta_3$ hexameru F_1 -ATPázy je komplikovaný proces, při kterém dochází k postupnému navazování podjednotek. Jako první proteiny vyžadované pro sestavení byly u kvasinek popsány dva proteiny, Atp11p a Atp12p; později byly nalezeny geny pro tyto proteiny i v lidském genomu (Wang 2001). Atp12p je zapotřebí pro zabudování volné podjednotky α , zatímco Atp11p umožňuje navázání podjednotky β . Pro připojení F_1 -ATPázy k F_0 -ATPáze je nezbytná podjednotka δ . Zcela nepostradatelnou roli hraje i podjednotka ϵ , která je zapojena do interakce s c-kruhem F_0 -ATPázy (Havlickova 2010; Mayr 2010). Předpokládá se, že nezbytnou součástí v biogenezi ATPázy hraje transmembránový protein 70 (Tmem70), který je nutný pro udržení množství a funkce celého komplexu (Hejzlarova 2011; Cizkova 2008). Dalšími proteiny, zapojenými do tvorby ATPázy, jsou DAPIT a MLQ protein (Jonckheere 2012). V případě sestavování F_0 -ATPázy je situace komplikovaná její složitou fylogenezí, kdy vývojem od bakterie k člověku přibýlo 7 nových podjednotek. U kvasinek byly popsány 3 nezbytné asambláčnické faktory pro syntézu F_0 -ATPázy – Atp10p, Atp23p (nutné

k zabudování podjednotky F_oa) a Atp25p (vedoucí k expresi proteinu Atp9p nezbytného k formaci c-kruhu F_o-ATPázy) (Kucharczyk 2009). Dosud byl popsán lidský homolog pouze pro Atp23p (Osman 2007). Podjednotky F_oa a A6L F_o-ATPázy hrají důležitou roli ve stabilizaci celého holokomplexu. Bylo prokázáno, že ATPázový komplex se organizuje do dimerů a vyšších oligomerů, a to právě interakcí v oblasti F_o-ATPázy. Ve stabilizaci oligomerů je nepostradatelný IF₁ faktor a membránové podjednotky a, e, g, b a A6L, které propojují dvě F₁-ATPázy (Wittig 2010).



Obrázek 3. Biogeneze mitochondriální ATPázy. Proces začíná složením $\alpha_3\beta_3$ hexameru a následným připojením podjednotek γ , δ a ϵ centrální stopky. Nově vytvořená část F₁ je postupně spojena s c-kruhem (intermediát F₁+c) a s dalšími podjednotkami F_o části a periferní stopky. V posledním kroku se připojí podjednotky F_oa a A6L. Červená hvězdička označuje jaderně kódované strukturální podjednotky a asemblační faktory s popsánými izolovanými poruchami ATPázy. Modré křížky označují mitochondriálně kódované podjednotky s nalezenými mutacemi v mtDNA. Atp12p a Atp11p jsou asemblační proteiny ATPázy. Převzato z Hejzlarova 2014.

1.4. Mitochondriální onemocnění

Defekty v mitochondriálním energetickém metabolismu způsobují velké množství závažných lidských onemocnění postihujících zejména energeticky náročné tkáně, a vedou zejména k encefalopatiím a/nebo kardio(myo)patiím (DiMauro 2004). Mitochondriální onemocnění způsobené mutacemi v mtDNA představují významnou část nemocí a na rozdíl od mutací v jaderných genech vykazují řadu odlišností - maternální přenos, zvýšenou mutagenезi genů mtDNA, komplikovanou segregaci a prahový efekt (tzv.threshold) manifestace u heteroplazmických mutací. Patologické změny v mitochondriálním OXPHOS systému mohou být i sekundárního původu, např. při stárnutí, neurodegenerativních onemocněních (např. Wilsonova nemoc, spinální muskulární atrofie) a působením vnějšího prostředí.

1.4.1. Změny mitochondriálního genomu; mutace v mtDNA

Změny v sekvenci mtDNA mohou být dědičné nebo somatické (vytvořené *in situ*). Frekvence mutací mtDNA je 10-20krát větší než u jaderné DNA, a to z důvodu vysokých koncentrací kyslíkových radikálů v mitochondriích, nepřítomnosti intronů v mtDNA a dále nedostatku histonů chránících mtDNA. Dosud bylo identifikováno >250 patogenních bodových mutací, delecí, insercí a přeskupení genech kódujících proteiny a nekódujících regulačních oblastech mtDNA a dalších 300 patogenních mutací v genech pro mitochondriální tRNA a rRNA. Každý rok jsou popsány nové patogenní mutace (viz www.mitomap.org). Mutace přímo v sekvenci mtDNA jsou na potomky přenášeny výhradně z matky, na rozdíl od "replikačních mutací" způsobených poruchou mitochondriální replikace, která je regulována jadernými geny děděných od obou rodičů. Byly popsány autosomálně dominantní i recesivní poruchy funkcí těchto jaderně kódovaných proteinů, které vedou k sekundárním změnám mtDNA, zahrnující syndromy deplece nebo mnohočetné delece mtDNA. Syndromy deplece mtDNA představují kvantitativní abnormality vedoucí k onemocnění, pokud obsah mtDNA klesne pod 30-35 % oproti kontrole (Copeland 2012).

Heteroplazmie, segregace a prahový efekt

Pro mitochondriální onemocnění je typická velká klinická heterogenita příznaků u pacientů se stejnou mutací. Jelikož každá mitochondrie obsahuje v průměru 2-10 kopií mtDNA a většina savčích buněk má stovky mitochondrií, jsou savčí buňky vzhledem k mtDNA polyplazmické (Fernandez 2003). V jedné buňce se tedy vyskytují tisíce molekul mtDNA, jejichž sekvence je identická, tedy tzv. homoplazmická. Dojde-li k mutaci a v buňkách je souběžně přítomna původní (tzv. wild-type) i mutovaná mtDNA, mluvíme o heteroplazmii. Teoreticky může původní mtDNA zcela vymizet a mutovaná mtDNA se stane homoplazmickou.

Mitochondrie jsou během buněčného dělení náhodně segregovány do dceřiných buněk. Během oogeneze tak dochází k rozdělení molekul nemutované a mutované mtDNA do oocytů, při čemž se vytváří spektrum heteroplazmie napříč celou populací oocytů. K této náhodné segregaci dochází díky tzv. fenoménu "hrdla láhve" (bottleneck effect). Ve zralém oocytu je přítomno zhruba 100-150 tisíc molekul mtDNA, které jsou následně během rychlého dělení segregovány do diferenciovaných buněk. Jelikož primární oocyty pocházející z primordiálních zárodečných buněk, obsahují po 10-100 kopiích mitochondrií, dojde tak náhodné segregaci do zralých oocytů nesoucích různé heteroplazmie.

U některých onemocnění je fenotypový projev přímo úměrný množství mutované mtDNA v postižené tkáni. Nicméně ve většině případů je závislost fenotypu na heteroplasmii mutované mtDNA komplikovanější. Velmi důležitým aspektem je tzv. prahový efekt – procento mutace potřebné pro klinický projev nemoci, závislý na energetických požadavcích určité tkáně (Rossignol 1999; 2003).

1.4.2. Vliv jaderného genomu na mitochondriální onemocnění

Mitochondriální poruchy způsobené mutacemi v jaderné DNA jsou velmi početné nejen díky faktu, že mnoho podjednotek OXPHOS je jaderně kódováno, ale zejména proto, že správná biogeneze a funkce OXPHOS vyžaduje mnoho dalších jaderně kódovaných proteinů (Copeland 2012; DiMauro 2004; 2011; 2014). Tyto proteiny jsou zapojeny do -

- 1) správné assemblace a regulace komplexů OXPHOS (např. Atp12p, Tmem70, Surf1, Sco1, Sco2, Cox10, Cox14, Cox15 a další).
- 2) integrity a replikace mtDNA. Poruchy intergenomické signalizace, včetně syndromů spojených s mnohočetnými delecemi a deplecemi mtDNA jsou nejčastější zapříčiněny mutacemi v genech pro mitochondriální polymerázu γ (*POLG*), deoxyguanosinkinázu (gen *DGUOK*), tymidinfosforylázu (gen *TYMP*), tymidinkinázu 2 (gen *TK2*), nebo helikázu (zvanou Twinkle; gen *PEO1*) a dále v genech *SUCLA2*, *SUCLG1*, *RRM2B*, *MPV17*.
- 3) translace mitochondriální RNA – mutace v genech *MRPS16*, *MRPS22*, *RMND1*, *AFG3L2*, *GFMI*, *TUFM*, *PUS1*, *TRMU*, *TACO1* a v genech pro mitochondriální tRNA syntetázu (*SARS2*, *DARS2*, *RARS2*, *YARS2*, a další) (Diodato 2014).
- 4) transportu jaderně kódovaných proteinů z cytoplazmy do mitochondrie - geny pro protein DDP1, protein mezimembránového prostoru účastníci se transportu (gen *TIMM8A*), a mitochondriální chaperonin HSP60.
- 5) Biogeneze fosfolipidové dvojvrstvy – např. porucha syntézy kardiolipinu, vedoucí k Barthově syndromu (gen *TAZ*), nebo mutace v genech *AGK*, *CHKB*, *SERAC1* a *LPINI*.
- 6) fúze a rozdělení mitochondrií - mutace v genech *OPA1*, *MFN2*, *GDAP2*, *DRP1*, *MFF*.

V roce 1995 byla popsána první porucha mitochondriálního dýchacího řetězce jaderného původu (Bourgeron 1995) - mutace v genu *SDHA* postihující komplex II, sukcinátdehydrogenázu. Počet geneticky podmíněných defektů dýchacího řetězce následně velmi rychle rostl a v roce 2001 byly popsány poruchy všech komplexů dýchacího řetězce na základě mutací v jaderné DNA (Shoubridge 2001). Většina z nich má autozomálně

recesivní typ dědičnosti. Byly objeveny jak nemoci způsobené mutacemi v genech pro strukturální podjednotky dýchacího řetězce i pro proteiny podílejících se na biosyntézi a regulaci komplexů dýchacího řetězce – viz výše (DiMauro 2011). Většina těchto nemocí byla zapříčiněna poruchou komplexu I, největšího z komplexů dýchacího řetězce (více než 44 strukturálních podjednotek).

1.4.3. Mitochondriální onemocnění - poruchy ATPázy

Izolované poruchy mitochondriální ATPázy patří klinicky k velmi závažným mitochondriálním poruchám. Nejčastěji jsou způsobeny mutacemi v genech pro strukturální podjednotky ATPázy, které jsou kódovány mitochondriální DNA (tabulka 1). Nejčastěji jsou popisovány missense mutace v genu *MTATP6*, které jsou spojovány jak s těžkou encefalopatií a/nebo kardiomyopatií s časným nástupem obtíží a fatálním průběhem, tak na druhé straně s izolovaným postižením zraku v podobě Leberovy hereditární neuropatie optiku (LHON) nebo s hluchotou a periferní neuropatií projevující se v pozdějším věku. U několika pacientů s kardiomyopatií nebo encefalopatií byly nalezeny patogenní mutace v genu *MTATP8*. Kardiomyopatie jsou hlavním příznakem vzácných mutací nacházejících se v překryvné oblasti pro geny *MTATP6* i *MTATP8* (pozn. z genů *MTATP6* a *MTATP8* vzniká bicistronní transkript mající překryv a jsou exprimovány 2 proteiny) (Hejzlarova 2014).

Tabulka 1 Přehled patogenních mutací v mitochondriálních genech pro strukturální podjednotky ATPázy - podjednotka A6L (gen *MTATP8*) podjednotka F₀a (gen *MTATP6*)

<u><i>MTATP8</i></u>		
m.8381A>G (p.T132A)	diabetes, hluchota	Perucca-Lostanlen 2000
m.8392C>T (p.P136S)	neuropatie	Felhi 2016
m.8403T>C (p.I13T)	neuropatie	Aure 2013
m.8411A>G (p.M16V)	neuropatie	Mkaouar-Rebai 2010
m.8481C>T (p.P40L)	kardiomyopatie	Tansel 2013
<u><i>MTATP8/6</i> (překryv genů <i>MTATP8</i> a <i>MTATP6</i> – pozice 8527-8572)</u>		
m.8527G>A (p.M1V)		Dubot 2004
m.8528T>C (p.W55R; p.M1T)	kardiomyopatie	Ware 2009
m.8529T>C (p.W55X; p.M1M)	kardiomyopatie, neuropatie	Jonckheere 2008
m.8561C>G (p.P66A)	neuropatie	Kytovuori 2016

Tabulka 1 - pokračování

MTATP6

m.8597T>C (p.I24T)	Leigh syndrom	Tsai 2012
m.8611insC (p.P29LfsX36)	encefalomyopatie, ataxie	Jackson 2017
m.8618-8619insT (p.I31fsX63)	NARP	Lopez-Gallardo 2009
m.8668T>C (p.W48R)	LHON	Kumar 2010
m.8719G>A (p.G65X)	neuropatie	Tang 2013
m.8836A>G (p.M104V)	LHON	Abu-Amero 2006
m.8839G>C (p.A105P)	NARP	Blanco-Grau 2013
m.8851T>C (p.W109R)	NARP/MILS	DeMeirleir 1995; Honzik 2013
m.8950G>A (p.V142I)	LHON	Abu-Amero 2006
m.8969G>A (p.S148N)	neuropatie, IgA nefropatie; MLASA	Burrage 2014; Wen 2016
m.8989G>C (p.A155P)	NARP	Duno 2013
m.8993T>G (p.L156R)	NARP/MILS	Holt 1990; Houštěk 1995
m.8993T>C (p.L156P)	NARP/MILS	Rubio-Gozalbo 2000
m.9011C>T (p.A162V)	LHON	Rubio-Gozalbo 2000
m.9025G>G (p.G167S)	neuropatie, Leigh syndrome	Lopez-Gallardo 2014
m.9029A>G (p.H168R)	LHON	Lopez-Gallardo 2014
m.9032T>C (p.L169P)	NARP	Lopez-Gallardo 2014
m.9035T>C (p.L170P)	ataxie	Sikorska 2009
m.9101T>C (p.L192P)	LHON	Lamminen 1995
m.9134A>C (p.E203G)	kardiomyopatie, neuropatie	Honzik 2012
m.9176T>G (p.L217R)	NARP/MILS	Carrozzo 2001; Akagi 2002
m.9176T>C (p.L217P)	NARP/MILS	Thyagarajan 1995; Hung 2007
m.9185T>C (p.L220P)	MILS, ataxie	Moslemi 2005 Castagna 2007
m.9191T>C (p.L222P)	MILS	Moslemi 2005
m.9205_9206del (p.X227M)	neuropatie	Seneca 1996; Ješina 2004

NARP – neuropatie, ataxie a retinitis pigmentosa; MILS – maternálně děděný Leighův syndrom; LHON - Leberovy hereditární neuropatie optiku; MLASA - mitochondriální myopatie, laktátová acidóza a sideroblastická anémie

Nejvíce pacientů nese patogenní missense mutace m.8993T>G v genu *MTATP6*, u které je rozdílný fenotyp vysvětlován různou heteroplazmií. U pacientů se zastoupením mutace vyšším než 90 % se nemoc klinicky projeví jako maternálně děděný Leighův syndrom (MILS) s nástupem obtíží v novorozeneckém věku a těžkou encefalopatií s nekrotickým postižením bazálních ganglií a laktátovou acidózou. Většina novorozenců umírá záhy po porodu. U případů s heteroplazmií pohybující se mezi 70-90% je typická mírnější klinická prezentace, tzv. syndrom NARP - **N**europatie, **A**taxie a **R**etinitis **P**igmentosa. Dále jsou u těchto dětí popisovány laktátová acidóza, progredující hypotonie a neprospívání. K úmrtí dochází nejčastěji v kojeneckém a časném batolecím věku. U matek dětí s výše popsáním klinickým průběhem nemoci je přítomna heteroplazmie pohybující se mezi 50-70 % a v dospělém věku se u nich často rozvinou neurologické příznaky, zejména ataxie a periferní neuropatie. U asymptomatických rodinných příslušníků následně nacházíme různé stupně heteroplazmie pod 50 % (Holt 1990; Houštěk 1995; Baracca 2007).

Mutace m.8993T>C v genu *MTATP6* není tak častá a je spojována s pozdějším nástupem mírnějších příznaků. Podobný charakter mají i další relativně časté mutace m.9176T>G a m.9176T>C, pro které je také typický nález Leighova syndromu nebo bilaterální nekrózy striáta (Carrozzo 2001; Akagi 2012; Ronchi 2011). U mutace m.9176T>C byli popsáni pacienti s neuropatií typu Charcot-Marie-Tooth (Synofzik 2012) nebo pozdním nástupem hereditární spastické paraplegie (Verny 2011). Pro mutaci m.9185T>C je typické podobné spektrum příznaků od časného Leighova syndromu až po neuropatií typu Charcot-Marie-Tooth s pozdním nástupem (Moslemi 2005; Castagna 2007; Pitceathly 2012). Ostatní mutace (např. m.8597T>C, m.8839G>C, m.8851T>C, m.8969G>A, m.8989G>C, m.9035T>C, m.9191T>C, m.9205_9206del) jsou velmi vzácné a jsou popisovány jednotky pacientů s příznaky Leighova syndromu, syndromu NARP, kardiomyopatie a neuropatie s tíží a nástupem závisujícími na heteroplazmií (De Meirleir 1995; Ješina 2004; Moslemi 2005; Sikorska 2009; Tsai 2012; Blanco-Grau 2013; Duno 2013; Honzík 2013).

Obdobně jak byly popsány mutace v jaderných genech pro strukturální podjednotky všech komplexů dýchacího řetězce, tak se i u ATPázy předpokládaly mutace v jaderných genech pro strukturální podjednotky. Mutace v jaderné DNA pro strukturální podjednotky představují velmi vzácnou příčinu poruch mitochondriální ATPázy. Do současnosti byly popsány pouze 2 případy s mutacemi pro 2 strukturální podjednotky ATPázy, a to podjednotky F₁α a F₁ε (Jonckheere 2013; Mayr 2010) a pro 2 faktory důležité pro

biosyntézu ATPázy, proteiny Atp12p a Tmem70 (Tabulka 2). Všechny tyto ATPázové poruchy mají podobný biochemický fenotyp s výrazným snížením množství správně složené a zcela funkční ATPázy.

Tabulka 2 Přehled patogenních mutací v jaderných genech důležitých pro strukturu a biogenezi ATPázy.

<u>ATP5A1</u> – strukturální podjednotka F ₁ α		
c.985C>T/c.-49+418C>T (p.R329C)	těžká neonatální encefalopatie	Jonckheere 2013
<u>ATP5E</u> - strukturální podjednotka F ₁ ε		
c.35A>G (p.Y12C)	těžká periferní neuropatie	Mayr 2010
<u>TMEM70</u> - asemblační protein Tmem70		
kardiomyopatie, encefalopatie, dysmorfie, opožděný vývoj		Hejzlarova 2014
missense mutace: c.494G>A (p.G165D); c.628A>C (p.T210P); c.535C>T (p.Y179H); c.701A>C (p.H234P)		
posun čtecího rámce a předčasný terminační kodón: c.251delTC; c.336T>A (p.Y112X); c.118_119insGT		
(p.S40CFsX11); c.238C>T (p.R80X); c.578_579delCA (p.N198X); c.211-450_317-568del (2290 bp delece); c.349_352del; c.783A>G; c.359delC; g.2436-3789 delece		
sestříhové mutace: c.317-2A>G; c.316+1G>T_		
<u>ATPAF2</u> - asemblační protein Atp12p		
c.280T>A (p.W94R)	encefalopatie, dysmorfie	DeMeirleir 2004; Sperl 2006

První pacient s podezřením na ATPázovou poruchu jaderného původu byl publikován již v 90. letech minulého století (Holme 1992). U dívky s kardiomyopatií, psychomotorickou retardací, laktátovou acidózou a zvýšenou exkrecí 3-methylglutakonové kyseliny v moči byl zjištěn výrazný pokles aktivity ATPázy ve svalu. Tehdy ještě nebyla popsána přesná genetická podstata, ale předpokládala se autozomálně recesivní dědičnost a příčina způsobená mutací v jaderné DNA. O 7 let později byl ve spolupráci s Oddělení bioenergetiky Fyziologického ústavu Akademie věd ČR popsán pacient s kardiomyopatií, fatální laktátovou acidózou a 70% poklesem obsahu ATPázy v kulturách kožních fibroblastů (Houšťek 1999). Studie na cybridech vyloučily mutace v mitochondriální DNA. Následně několik evropských center vytvořilo soubor pacientů se stejnými příznaky a podezřením na poruchu ATPázy jaderného původu (Sperl 2006). V této kohortě byl obsažen i pacient, u kterého byla prokázána mutace v genu *ATPAF2*, kódující důležitý faktor Atp12p pro biosyntézu ATPázy. S využitím homozygotního mapování a sekvenováním kandidátních genů byl v roce 2008 v Ústavu dědičných metabolických poruch VFN v Praze objeveny mutace v genu *TMEM70* u skupiny pacientů s neonatální manifestací těžké laktátové acidózy, hypertrofickou kardiomyopatií a zvýšenou exkrecí 3-

methyglutakonové kyseliny v moči (Čížkova 2008). Prevalentní mutace c.317-2A>G v tomto genu byla zpětně nalezena i u pacienta publikovaného již v roce 1999. Dosud bylo popsáno již více než 50 pacientů s celého světa (Magner 2014). Sekvenováním jaderně kódovaných podjednotek ATPázy byly nalezeny patogenní mutace v genu *ATP5E* pro strukturální podjednotku $F_1\epsilon$ (Mayr 2010). O 3 roky později byly popsány mutace v genu *ATP5A1* pro podjednotku $F_1\alpha$ (Jonckheere 2013).

Jako kombinované ATPázové poruchy označujeme defekty, které vedle ATPázy postihují i další enzymy OXPHOS. Jsou zapříčiněny nejčastěji mutacemi v genech pro mitochondriální tRNA, méně často pro rRNA, a dále mutacemi v jaderných genech, které se podílejí na biogenezi a funkci OXPHOS, replikaci a expresi genů mtDNA (viz 1.4.3.). Mitochondriální DNA kóduje 22 genů pro mitochondriální tRNA, které jsou následně zapojeny do exprese mitochondriálních genů. Více než 60 % všech bodových mutací v mtDNA postihuje právě tRNA (více než 120 dosud popsaných patogenních mutací). Častěji jsou přítomny mutace v tRNA pro leucin, izoleucin, lysin a serin. Nejvíce pacientů bylo popsáno s tzv. syndromem MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red Fibers) způsobených mutací m.8344A>G v tRNA^{Lys}, a syndromem MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes) způsobených mutací m.3243A>G v tRNA^{Leu(UUR)}. Mutace v genech pro tRNA vedou k nedostatečné mitochondriální translaci a postižení funkce a struktury proteinu OXPHOS (James 1996), včetně tkáňově specifického postižení ATPázy (Fornuskova 2008; James 1999). Replikace mitochondriálního genomu probíhá s pomocí jaderně kódované DNA polymeráze γ (POLG). Jako jiné polymerázy typu A, tak i POLG má jak polymerázovou tak i 3'→5' exonukleázovou aktivitu. Patogenní mutace byly popsány nejdříve u pacientů s autozomálně dominantní chronickou progresivní externí oftalmoplegií (CPEO), u kterých byly prokázány mnohočetné delece mtDNA. Následně byly publikovány i recesivní varianty PEO. Recesivně děděné mutace v genu *POLG* jsou popsány u pacientů s Alpers-Hüttenlocherovým syndromem, pro který je typický nález deplece mtDNA (Horvath 2006). Mnohočetné delece a/nebo deplece mtDNA, vznikající sekundárně jako důsledek nerovnováhy v množství mitochondriálních nukleotidů potřebných pro replikaci DNA, nacházíme i u mitochondriální neurogastrointestinální encefalomyopatie (MNGIE) na podkladě mutací v genu pro thymidinfosforylázu.

1.5. Oxidativní stres u mitochondriálních onemocnění a poruch ATPázy

Volné radikály, zejména reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species - ROS), jsou fyziologickými intermediáty v aerobním metabolismu všech buněk. Vznikají v mnoha metabolických drahách, ale největším zdrojem, především v CNS, jsou biochemické procesy v mitochondriích (Murphy 2009). Nezanedbatelný podíl mezi volnými radikály zaujímají také reaktivní formy dusíku (RNS) (Ryan 2014). Jak ROS, tak i RNS hrají duální biologickou roli a při nízkých koncentracích mají důležitou fyziologickou funkci, například v signálních drahách (Sena 2012). Na druhou stranu nadměrný oxidativní stres způsobí poškození buněčných i extracelulárních složek s následnou akumulací dysfunkčních proteinů, produktů lipoperoxidace, poškozené jaderné i mitochondriální DNA a vede k buněčné smrti (Jones 2006; Sayre 2008). K zajištění rovnováhy slouží celá řada antioxidantních enzymatických i neenzymatických procesů. Při některých patologických stavech dochází k nadměrné produkci volných radikálů a endogenní antioxidantní obrana je přetížena. Volné radikály a oxidativní stres s následnou mitochondriální dysfunkcí jsou zapojeny do patogeneze mnoha neurologických nemocí, včetně epilepsie (Patel 2004; Lin 2006; Folbergrova 2012; Rowley 2013).

Tvorba volných radikálů a jejich role při poškození mozku u epilepsie byla již prokázána na modelech křečí jak *in vitro*, tak *in vivo*, a to přímou detekcí ROS nebo měřením nepřímým markerů oxidativního stresu, eventuálně průkazem aktivace antioxidantních mechanismů (Frantseva 2000; Kovacs 2002). Poškození mozku při epileptických stavech má excitotoxický charakter, kdy dochází k zvýšenému uvolnění glutamátu, což vede k nadměrné stimulaci postsynaptických ionotropních glutamátových receptorů s následnou akumulací intracelulárního Ca^{2+} , která spouští patobiochemické procesy zahrnující zvýšenou tvorbu ROS i RNS a mitochondriální dysfunkci včetně poruch OXPHOS (Schindler 1996; Folbergrova 2012; Kann 2007; Bindoff 2012).

Patofyziologické procesy v systému OXPHOS včetně ATPázy byly studovány jak u pacientů s epilepsií, tak na mnoha zvířecích modelech, u nichž byla epilepsie indukována farmakologicky (Kunz 2000; Lee 2008; Waldbaum 2010; Kudin 2002). Bylo prokázáno, že poruchy komplexu I jsou zapojeny do patofyziologických procesů u epilepsie výrazně častěji než poruchy ATPázy a dalších komplexů dýchacího řetězce (Kunz 2000; Ryan 2012). Na druhé straně i u pacientů s těžkým neurologickým postižením na základě poruchy ATPázy způsobené frekventní mutací m.8993T>G byla prokázána zvýšená tvorba ROS (Mattiuzzi 2004; Geromel 2001).

2. Charakteristika a cíle práce

Habilitační práce shrnuje publikační výstupy autora vzniklé v období více než 15 let, jejichž dlouhodobým cílem bylo přispět k objasnění poruch mitochondriální F_1F_0 -ATP syntázy. Výsledky jsou založeny na analýze klinických a laboratorních nálezů u pacientů s poruchami mitochondriálního energetického metabolismu způsobenými dědičnými poruchami ATPázy. Jedná se jak o retrospektivní studie souboru pacientů s mitochondriálními onemocněními, které vznikly spoluprací předních evropských metabolických pracovišť, tak i o kazuistické případy pacientů s dosud nepublikovanými poruchami ATPázy. Experimentální studie byly realizovány především na bioptických/nekroptických vzorcích ze svalových biopsií a na kulturách kožních fibroblastů a od nich odvozených linií transmitochondriálních cybridů. Použité laboratorní metody zahrnují funkční analýzy (enzymologické; měření mitochondriálního membránového potenciálu $\Delta\psi_m$; oxygrafické – měření spotřeby O_2 dýchacím řetězcem), strukturální analýzy (elektroforetické s následnou imunodetekcí pomocí specifických protilátek; imuno/histopatologické analýzy) a molekulárně genetické analýzy (Sangerovo sekvenování genů, Northern a Southern Blot analýzy a PCR). Jednalo se o spolupráci laboratoří Ústavu dědičných metabolických poruch a Kliniky dětského a dorostového lékařství 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze s Oddělením bioenergetiky Fyziologického ústavu Akademie věd ČR, kde autor dlouhodobě pracuje.

Specifickými cíli práce jsou :

- 1) **charakterizovat klinický průběh mitochondriálních onemocnění způsobených poruchami ATPázy**
- 2) **vytvořit přehled diagnostických postupů u pacientů s podezřením na mitochondriální onemocnění, včetně ATPázových poruch**
- 3) **popsat funkční a strukturální změny u vzácných genetických poruch ATPázy, a to**
 - (a) **izolované deficity způsobené mutacemi v genech pro**
 - (i) **strukturální podjednotky ATPázy (mitochondriálně i jaderně kódovanými)**
 - (ii) **proteiny podílející se na regulaci a biogenezi ATPázy**
 - (b) **kombinované deficity ATPázy.**
- 4) **objasnit patobiochemické mechanismy a vliv oxidativního stresu u poruch mitochondriální ATPázy.**

3. Klinický průběh mitochondriálních onemocnění způsobených dědičnými poruchami ATPázy

Klinické projevy poruch mitochondriální ATPázy jsou sice velmi různorodé, ale obvykle jsou v současné době charakterizovány jako mitochondriální encefalokardiomyopatie, které mají často neonatální nástup obtíží (Kucharczyk 2009; Houštek 2004). V našich publikacích jsme se zaměřili na popis klinického spektra příznaků u pacientů s mitochondriálními poruchami ATPázy způsobenými vzácnými mutacemi v genech pro ATPázové podjednotky (izolované poruchy) a mutacemi v mitochondriální tRNA (kombinované poruchy). Dále byly popsány klinické příznaky pacientů s jadernými poruchami ATPázy - způsobenými mutacemi v jaderné DNA, a to v genech kódujících ATPázové podjednotky a proteiny důležité pro biogenezi ATPázy (izolované poruchy) a dále v genech ovlivňujících translaci genů mtDNA (kombinované poruchy ATPázy).

3.1. Klinické projevy mitochondriálních poruch ATPázy

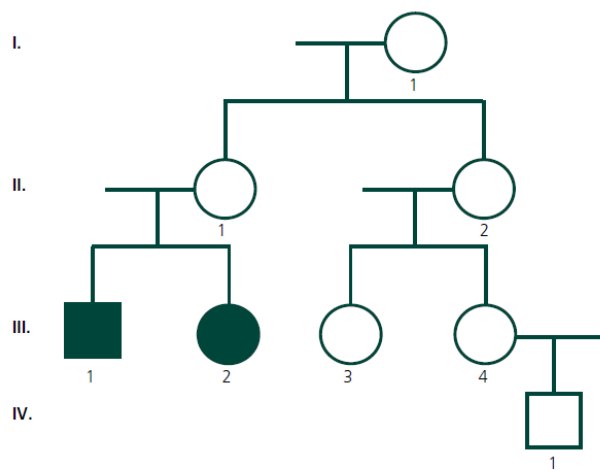
Rozdílný fenotyp pacientů nesoucích stejnou mutaci v mitochondriálním genu je vysvětlován mimo jiné různou heteroplazmií. Bohužel popis klinické manifestace je limitován množstvím popsaných pacientů nesoucích stejnou mutaci, a proto jsou dobře známy projevy u pacientů s častými mutacemi např. m.8993T>G; m.9176T>G nebo m.9185T>C, i v závislosti na heteroplazmii (Baracca 2007; Sgarbi 2006; Carrozzo 2001; Moslemi 2005; Castagna 2007). Cílem našich prací byla proto charakterizace pacientů a jejich rodin nesoucích raritní familiární mutaci s izolovanými poruchami ATPázy mitochondriálního původu.

Popsali jsme pacienta s unikátní mutací, m.9205_9206del v terminačním kodónu genu *MTATP6* pro podjednotku F₀a ATPázy. U pacienta s nekomplikovanou pre- i perinatální anamnézou se rozvinula ve 3 měsíci života těžká encefalopatie s hypotonií, spastickou kvadruparézou a mikrocefalií. Chlapec neprosplával a zastavil se psychomotorický vývoj. Hladina laktátu krvi dosahovala 3,4 mmol/l (norma 0,5-2,1 mmol/l) a v likvoru 4,8 mmol/l (norma 0,5-2,5 mmol/l). Stupeň heteroplazmie v krvi/leukocytech, svalové tkáni a kožních fibroblastech byla více než 98%. Asymptomatická matka i maternální babička měly heteroplazmie v krvi/leukocytech 82%, respektive 16% a v kožních fibroblastech 92%, respektive 9 %. V souladu s biochemickými nálezy můžeme usuzovat, že prahový efekt pro tuto mutaci bude přibližně

90 % heteroplazmie (Ješina 2004 – příloha č. 1).

U druhého dosud publikovaného pacienta s mutací m.8851T>C v genu *MTATP6* jsme rozšířili popis klinických příznaků, které se objevily ve věku 8 měsíců a zahrnovaly hypotonii, ataxii, opoždění psychomotorického vývoje, poruchu sluchu a neprospívání. Vyšetření NMR ukázalo difuzní symetrické hyperintenzivní ložiska v bazálních gangliích a v laboratorních nálezech dominovala laktátová acidóza a zvýšená hladina laktátu v likvoru (3,8-6,4 mmol/l; norma 1,2-2,1 mmol/l). Heteroplazmie mutace byla analyzována v několika dostupných tkáních - sval (97 %), vlasové folikuly (95 %), leukocyty (92 %), buňky močového sedimentu (87 %) a buňky močového sedimentu (87 %). Obdobná hladina heteroplazmie byla dokumentována i prvního publikovaného případu (DeMeirleir 1995). U matky našeho pacienta byla zjištěna heteroplazmie v těchto tkáních - buňky močového sedimentu (85 %), buňky vlasových folikulů (96 %), krev/leukocyty (68 %) a buňky močového sedimentu (69 %). Na rozdíl od zcela zdravé matky prvně popsaného případu, která měla heteroplazmie v krvi 85 %, se u matky našeho probanda rozvinula ve věku 22 let svalová slabost a periferní neuropatie typu Charcot-Marie-Tooth. Asymptomatická sestra našeho pacienta nesla heteroplazmii v různých tkáních v rozmezí 52-60 %. V době diagnózy byla ve věku 7 let a byla zcela zdravá, nicméně nemůžeme vyloučit, že se u ní v dospělém věku nerozvinou neurologické příznaky podobné jako u její matky. Na základě těchto údajů můžeme předpokládat, že prahový efekt se u této mutace bude pohybovat přibližně mezi 85-90% heteroplazmie (Honzík 2013 – příloha č.2).

Závislost klinické manifestace na výši heteroplazmie byla popsána i v další naší publikaci popisující první rodinu v České republice, u které byla zjištěna patogenní mutace m.7512T>C v genu pro mitochondriální tRNA pro serin. Jedná se o kombinovanou poruchu systému OXPHOS zahrnující deficit ATPázy. Klinicky se projevuje myoklonickou epilepsií, senzori-neuronální hluchotou, ataxií a frustními paleocerebelárními příznaky s nástupem v časném dospělém věku. Zobrazení pomocí CT mozku ukázalo kalcifikace v bazálních gangliích. Obrázek č. 4 ukazuje rodokmen popsané rodiny se zjištěným stupněm heteroplazmie v různých tkáních. Matka sourozenců, matka matky i maternální teta a její dcery jsou asymptomatické. Z těchto dat můžeme usuzovat, že prahový efekt pro tuto mutaci se bude pohybovat přibližně kolem 95% (Ješina 2010 – příloha č. 3).



Hladina heteroplazmie mutace 7512T>C					
	krev	bukálního stěr	vlasové folikuly	kožní fibroblasty	svalová biopsie
I.1	68 %	59 %	73 %	ND	ND
II.1	92 %	86 %	ND	94 %	ND
III.1*	91 %	ND	ND	92 %	95 %
III.2*	93 %	92 %	95 %	94 %	95 %
III.3	71 %	74 %	87 %	ND	ND

Obrázek 4 – Rodokmen rodiny s mutací m.7512T>C v genu pro mitochondriální tRNA pro serin, která byla detekována u obou probandů (*) (III.1., III.2), u jejich matky (II.1), babičky (I.1) a sestřenic (III.3). Tabulka uvádí stupně heteroplazmie v různých tkáních. ND – neprovedeno. Převzato z Ješina 2010.

V rozsáhlém souboru 461 pacientů s různými mitochondriálními onemocněními diagnostikovanými na našem a rakouském pracovišti v letech 1992-2010 byla provedena retrospektivní studie klinických příznaků. Izolovaná porucha ATPázy s mitochondriální mutací byla stanovena u 14 pacientů a u 9 z nich s nástupem obtíží v novorozeneckém věku (64 %). Syndrom NARP/MILS na podkladě mutace m.8993T>G v genu *MTATP6* byl zjištěn u 13 pacientů a 7 z nich s neonatální manifestací. V tabulce č. 3 jsou shrnuty klinické příznaky, které zahrnují Leighův syndrom, hypotonii, apnoické pauzy, intrauterinní růstovou retardaci. V této kohortě mitochondriálních pacientů byl diagnostikován i první publikovaný pacient s missense mutací v genu *MTATP6*, m.9134A>G. Klinicky se u něj projevila hypertrofická kardiomyopatie, svalová slabost a laktátová acidóza s nástupem obtíží v novorozeneckém věku. Klinická prezentace tohoto pacienta se odlišuje právě kardiomyopatií, která není zcela typickým nálezem u pacientů s mutacemi v genu *MTATP6*, a je popisována u mutací v genu *MTATP8* anebo u jaderně kódovaných ATPázových poruch. V tomto unikátním souboru novorozenců byl diagnostikován pacient s kombinovanou poruchou na podkladě syndromu MELAS (mutace m.3243A>G v genu pro mitochondriální tRNA^{Leu(UUR)}). Jedná se o jediného pacienta z celkových 57 diagnostikovaných se syndromem MELAS, u kterého byl pozorován zcela atypický nástup obtíží již v novorozeneckém věku (Honzik 2012 – příloha č. 4).

Tab. 3 Klinické příznaky u novorozenců s poruchou ATPázy (Honzik/2012)

Poruchy ATPázy	Prematurita	IUGR	Apnoické pauzy	Hypotonie	HCMF	Leigh syndrom	Křeče	Úmrtí do 3 měsíců
Izolované								
Mitochondriální								
MILS syndrom (m.8993T>G)(n=7)	1/7	4/7	4/7	7/7	2/7	1/1	0/7	0/7
gen <i>MTATP6</i> (m.9134A>G) (n=1)	0/1	1/1	0/1	1/1	1/1	n.	0/1	0/1
Jaderné								
gen <i>TMEM70</i> (n=22)	16/22	15/22	19/21	22/22	18/21	0/12	0/21	10/22
gen <i>ATP5E</i> (n=1)	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1*	0/1	0/1	0/1
Kombinované								
MELAS (m.3243A>G) (n=1)	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1
gen <i>SUC1G1</i> (n=1)	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	n.	0/1	0/1
Pearsonův syndrom (n=2)	0/2	0/2	1/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Alpersův syndrom (n=1)	1/1	0/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Barthův syndrom (n=1)	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1

* hypertrofická kardiomyopatie se rozvinula ve věku 4 let
MILS (maternálně děděný Leighův syndrom); IUGR (intrauterinní růstová retardace); HCMF (hypertrofická kardiomyopatie)

Klinické projevy jaderných poruch ATPázy

V retrospektivní studii jsme charakterizovali klinické a laboratorní příznaky u 14 pacientů s jaderně podmíněnými izolovanými poruchami ATPázy, u nichž nebyla v té době známa přesná genetická příčina (Sperl 2006 – příloha č. 5). U většiny z těchto pacientů byla následně zjištěna porucha proteinu Tmem70. Spoluprací 7 evropských metabolických center jsme vytvořili unikátní kohortu 25 pacientů s izolovaným deficitem ATPázy způsobeným novou poruchou proteinu Tmem70 (Honzik 2010 – příloha č. 6). Souhrn klinických příznaků je obsažen v tabulce č. 4.

Tab. 4 Hlavní klinické příznaky u 25 pacientů s izolovanou poruchou ATPázy zapříčiněnou deficitem proteinu Tmem70

Nástup klinických obtíží během prvního týdne života	23/25
Kraniofaciální dysmorfie	16/24
Mikrocefalie	13/22
Neprospívání, opoždění růstu	17/17 *
Hypotonie	24/25
Ataxie	7/12 §
Extrapyramidové příznaky	3/12 §
Ptóza víček, chronická progresivní externí oftalmoplegie	2/13 §
Strabismus	5/14 §
Opoždění psychomotorického vývoje	13/15 §
Hepatomegalie	14/24
Hypertrofická kardiomyopatie	19/25
Hypospádie	7/13
Kryptorchismus	8/12
Úmrtí	16/25 &

* U 8 dětí, které zemřely časně v novorozeneckém věku, nelze hodnotit. § U 10 dětí, které zemřely časně v kojeneckém věku, nelze hodnotit. & Stav k roku 2010. Převzato z Honzik 2010.

Novorozenecké příznaky zahrnovaly svalovou slabost, nakupení apnoických pauz a rozvoj metabolické laktátové acidózy a hyperamonémií (86 %). U starších dětí je přítomné neprospívání a porucha růstu (100 %), mikrocefalie (59 %), psychomotorická retardace (všichni vyjma jednoho) a strabismus. Progresivní postižení CNS bylo pozorováno u většiny déle žijících pacientů, ale tíže a charakter postižení se velmi lišily. Na rozdíl od mnoha mitochondriálních nemocí není u tohoto typu ATPázové poruchy přítomno postižení zraku. U malého počtu pacientů byla zaznamenána ptóza nebo strabismus. Charakteristickým nálezem je hypertrofická kardiomyopatie, která byla nalezena u 76 %, a

to již během prvních dnů života. U většiny z nich dále již neprogredovala a u 5 dětí došlo k zlepšení funkcí nebo dokonce k vymizení. Kardiomyopatie je výjimečně popisována u dalších izolovaných mitochondriálních poruch ATPázy, vyjma poruch způsobených mutacemi především v genu *MTATP8* (velmi malé množství pacientů) anebo u kombinovaných jaderných ATPázových poruch (např. Bartův syndrom). Naopak chybí u nejčastějších ATPázových poruch způsobených mutacemi v genu pro podjednotku a (např. m.8993T>G, m.9176T>G a m.9185T>C) nebo v jaderně kódované strukturální podjednotce $F_1\epsilon$ nebo jiném asemblačním proteinu Atp12p.

U 16 z 24 pacientů s deficitem Tmem70 byla pospána mírná kraniofaciální dysmorfie, která zahrnovala nízko posazené uši, sedlovitý nos a retrognacii (obr. 5). U pacientky s postižením jiného asemblačního proteinu Atp12p byla taktéž zaznamenána dysmorfie (sedlovitý nos, mikrognacie a velká ústa) a dále těžká novorozenecká encefalopatie s epilepsií a výraznou psychomotorickou retardací a atrofií bazálních ganglií, thalamu, hypoplázie bílé hmoty atrofie kortikální a subkortikální. U pacientů s izolovanými ATPázovými deficity způsobenými mitochondriálními mutacemi ve strukturálních podjednotkách F_0a a A6L, stejně tak jak u pacientky s jaderně podmíněnou poruchou podjednotky $F_1\epsilon$ nebyla kraniofaciální dysmorfie popsána. U více než poloviny chlapců s deficitem Tmem70 byla přítomna hypospádie (koronární nebo penilní); kryptorchizmus byl přítomen u 2/3 chlapců. Tento typ urogenitálních vad není typický u pacientů s mitochondriálními poruchami a pro deficit proteinu Tmem70 je unikátním klinickým příznakem.



Obrázek 5 - Kraniofaciální dysmorfie u 5-letého chlapce a 2-leté dívky s poruchou ATPázy na podkladě deficitu Tmem70: nízko posazené uši, sedlovitý nos, retrognacie. Převzato z Sperl 2006.

Nově jsme popsali klinické projevy u dívky s homozygotní missense mutací c.35A>G v genu *ATP5E* pro podjednotku F₁ε, což je první publikovaný případ tohoto postižení ATPázy (Mayr 2009 – příloha č. 8). Již v prvních dnech života se objevilo obtížené pití a dechové obtíže. V následujících měsících došlo k několika metabolickým rozvratům (hyperamonémie až 500 μmol/l, laktátová acidóza – 3,8 mmol/l) vyvolanými respiračními infekty. Bylo přítomno opoždění motorického i mentálního vývoje. Ve věku 5-6 let došlo ke stabilizaci klinického stavu a v následujících letech ke zlepšení. Ve věku 22 let nacházíme u pacientky mírnou mentální retardací, periferní neuropatii, ataxii, horizontální nystagmus a intolerancí cvičení. I přestože se jedná o závažné postižení ATPázy, tak pacientka s opakovanými metabolickými rozvraty v časném dětském věku dosáhla dospělosti a došlo ke stabilizaci klinického postižení.

3.3. Prognóza a léčba

Ve výše uvedené kohortě 461 pacientů s mitochondriálními nemocemi byla novorozenecké manifestaci nemoci popsána u 129 pacientů (cca 28%). Během prvních 3 měsíců života zemřelo celkem 26 % dětí (nejvíce již v novorozeneckém věku), s mediánem přežití 42 dnů. Izolovaná porucha ATPázy byla diagnostikována u 40 pacientů, z toho z norozeneckou manifestací u 31, tedy přibližně u 78 %, a během prvních 3 měsíců života zemřelo 10. Byli to pouze pacienti s poruchou proteinu Tmem70. Neonatální manifestace patogenní mutace m.8993T>G byla zaznamenána u přibližně 50 % všech pacientů s touto poruchou ATPázy (7/13), a to pod obrazem maternálně děděného Leigh syndromu (MILS). Žádný z pacientů s touto mutací a neonatální manifestací nezemřel v novorozeneckém věku, ale následně v kojeneckém věku zemřelo všech 7 pacientů (průměru v 5,8 ± 2,6 měsících věku; rozsah 3-10 měsíců). Neonatální nástup příznaků byl přítomen i u pacientky s poruchou podjednotky F₁ε ATPázy.

V pozdější studii, kde byl přítomen rozšířený vzorek pacientů s poruchou Tmem70, jsme zdokumentovali nástup obtíží v novorozeneckém věku u 92 % pacientů (23/25). Zbylé 2 děti měly nástup obtíží během časného kojeneckého období. Antenatální projevy (prematurita, intrauterinní růstová retardace) byly dokumentovány u přibližně poloviny pacientů. Deset dětí zemřelo do věku 6 týdnů, 4 děti zemřely během metabolické dekompenzace při akutní gastroenteritidě nebo respiračním infektu do věku 4,5 let.

V novorozeneckém období se projevila i porucha asemblačního proteinu Atp12p (dosud jediné 2 popsané případy – sourozenci) (Sperl – příloha č. 5) (DeMeirleir 2004). V kojeneckém věku se manifestovaly vzácné poruchy ATPázy s patogenními mutacemi v mitochondriální DNA – mikrolece m.9205_9206del nebo m.8851T>C (Ješina 2004; Honzik 2013; přílohy č. 1 a 2).

Na druhou stranu jsme popsali i pacienty s výrazně delší dobou přežívání (v současné době dosáhli věku 15 a 20 let). Jak ukazuje naše práce, pokud pacienti přežijí kritické kojenecké období, frekvence metabolických dekompenzací se může snížit a kardiologické postižení stabilizovat nebo dokonce zlepšit (Honzik 2010 a 2012; Magner 2013 – přílohy č. 4, 6 a 10).

Léčba poruch ATPázy je v současné době limitována na symptomatickou a podpůrnou terapii. V případě metabolické krize, zejména u pacientů s deficitem Tmem70 doprovázených hyperamonémií, je důležitým opatřením zajištění frekventní stravy obohacené o škroby k udržení anabolizmu. V případě parenterálního přístupu se volí infuze glukózy (dle věku a tolerance při pravidelné monitoraci glykémie a hladiny laktátu; maximálně do 3-4 mg/kg/min) a lipidů (až do dávky 3,5 g/kg/den). Pacienti s deficitem Tmem70 jsou extrémně náchylní k hyperglykémii (a to i za fyziologického přísunu glukózy) a při inzulinoterapii dochází často k hyperlaktatémii. V případě hyperamonémie je ke zvážení léčba pomocí scavengeru amoniaku (benzoátu; fenylbutyrátu – Ammonaps ®, glycerolfenylbutyrátu – Ravicti ®), L-argininu nebo N-karbamylglutamátu (Carbaglu ®). Extrakorporální eliminace amoniaku je volena dle hladiny amoniaku a odpovědi na léčbu (při hyperamonémii nad 400-500 $\mu\text{mol/l}$; u starších dětí a dospělých při hladině nad 200-250 $\mu\text{mol/l}$). Metabolická acidóza je korigována podáváním bikarbonátů (Honzik 2010 – příloha č. 6);(Magner 2015). Speciální léčebné přístupy, které se nyní využívají u jiných dědičných metabolických poruch a zahrnují genovou terapii, enzymoterapii nebo substrát redukující léčbu (tzv. SRT – substrate reduction therapy) anebo léčbu pomocí chaperonů, zatím nejsou v případě mitochondriálních chorob aplikovatelné.

Závěr:

Ve spolupráci se zahraničními pracovišti jsme shromáždili unikátní soubor 25 pacientů s poruchou asemblačního proteinu Tmem70, u kterých jsme hodnotili klinické a laboratorní nálezy. Jednalo se o první ucelenou kohortu pacientů s nově popsanou mitochondriální nemocí s izolovanou poruchou ATPázy, která je

charakterizována neonatální manifestací encefalokardiomyopatie s autozomálně recesivním typem dědičnosti.

V našich publikacích jsme dále popsali:

- i) nové pacienty s extrémně vzácnými poruchami ATPázy s mutacemi v genu *MTATP6* pro podjednotku F₀a ATPázy - m.8851T>C a m.9205_9206del v terminačním kodónu genu (obě druhé dosud publikované případy), nová patogenní mutace m.9134A>G;
- ii) první pacientku s novou jadernou poruchou ATPázy způsobenou mutací v genu pro podjednotku F₁ε;
- iii) první rodinu v ČR s kombinovanou poruchou ATPázy způsobenou mutací m.7512T>C v genu pro mitochondriální tRNA pro serin.

Tyto unikátní případy nám rozšiřují spektrum klinických příznaků u ATPázových poruch způsobených různými genetickými příčinami. U mitochondriálně podmíněných poruch hraje významnou roli stupeň heteroplazmie a naše pozorování ukazují, že při hladině přesahující 85-90% dochází k výrazné manifestaci klinických příznaků. Nicméně u matek nesoucích nižší heteroplazmii jsme popsali mírnější (zejména neurologické obtíže) s nástupem v dospělém věku. Na základě těchto pozorování může vyvodit korelát fenotypu (tíže i věk nástupu příznaků) na genotypu podmíněného jak mutací tak i stupněm její heteroplazmie.

Klinické příznaky poruch ATPázy jsou velmi heterogenní, což je dáno i různými genetickými příčinami. Přesto můžeme pozorovat, že u mitochondriálně podmíněných poruch je výraznější neurologické postižení s encefalo(myo)patii, zatímco u jaderně podmíněných poruch dominuje vedle neurologických příznaků i závažná kardiomyopatie.

Prognóza i s ohledem na limity současné léčby je velmi závažná. Většina pacientů umírá v novorozeneckém anebo časném kojeneckém věku. Nicméně jsme popsali i případy pacientů, kteří přežili toto kritické období spojené s opakovanými metabolickými rozvraty, a u nichž došlo ke stabilizaci nebo dokonce ke zlepšení klinických příznaků.

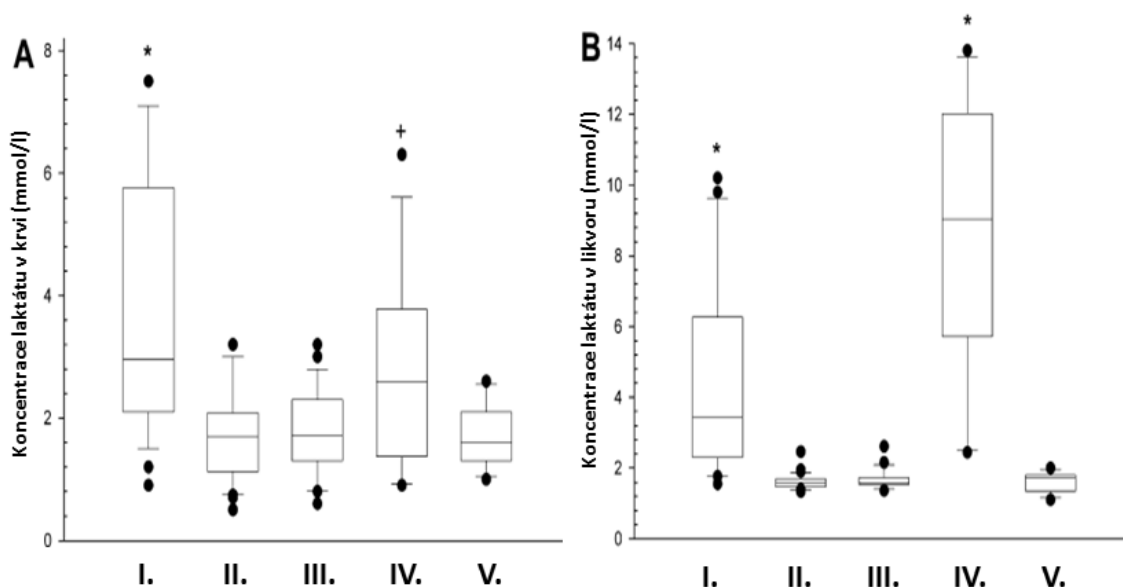
4. Diagnostické postupy u pacientů s podezřením na poruchu ATPázy

Klinické příznaky u pacientů s poruchou ATPázy a obecně s mitochondriálními chorobami jsou velmi různorodé a většinou velmi nespecifické. Diferenciální diagnostika je tedy velmi komplexní a zahrnuje několik diagnostických přístupů. V následující části jsme se proto zaměřili na studium laboratorních nálezů a přípravu diferenciálně diagnostických postupů u pacientů s podezřením na mitochondriální onemocnění včetně poruch ATPázy.

4.1. Biochemická vyšetření

Zvýšená hladina laktátu je důležitý biochemický marker v diferenciální diagnostice u pacientů s podezřením na mitochondriální poruchy. Hladiny laktátu a alaninu jsme hodnotili u dětí s prokázanou mitochondriální poruchou ve srovnání s dětmi po epileptických křečích, s psychomotorickou retardací nebo s meningitidou/meningizmem (Magner 2011 – příloha č. 11). Kohorta dětí s mitochondriálními poruchami zahrnovala i děti s izolovanými poruchami ATPázy (syndrom NARP) a kombinovanými poruchami (syndromy MELAS, MERRF, Alpersův-Hüttenlocherův syndrom na základě mutace v genu *POLG*). Prokázali jsme, že hladina laktátu v krvi byla signifikantně vyšší u pacientů s mitochondriálními poruchami oproti ostatním sledovaným kohortám – průměrná hodnota činila 3,9 mmol/l (rozptyl 1,2-10,1 mmol/l); u izolovaných poruch ATPázy dokonce 4,3 mmol/l (rozptyl 2,1-6,7 mmol/l) (norma 0,5-2,1 mmol/l). Signifikantní zvýšení je dokumentováno i v případě laktátu v mozkomíšním moku 4,4 mmol/l (rozptyl 1,6-10,2 mmol/l); u izolovaných poruch ATPázy 5,5 mmol/l (rozptyl 3,1-7,5 mmol/l) (norma 1,2-2,5 mmol/l) (obr. 6A, B).

Zvýšenou hladinu laktátu jsme prokázali u všech pacientů jak v krvi (14/14 pacientů), tak v moči (norma 0-50 mmol/mol kreatininu) i v mozkomíšním moku (norma 1,2-2,5 mmol/l) u pacientů s izolovanými poruchami ATPázy jaderného původu, kteří byli hodnoceni v naší publikaci (Sperl 2006 – příloha č.5).



Obrázek 6 – Srovnání hladiny laktátu v krvi (A) a mozkomíšním moku (B) u 24 pacientů s mitochondriálními poruchami (I.skupina), 32 dětí s epilepsií (II.skupina), 23 dětí s psychomotorickou retardací (III.skupina), 12 dětí s meningitidou (IV.skupina) a 16 dětí s meningizmem (V.skupina). Vysvětlení - obr. A * $P < 0.001$ u I.skupiny ve srovnání s II., III. a V.skupinou; + $P < 0.028$ u IV.skupiny ve srovnání s II.skupinou. obr. B * $P < 0.001$ u I. a IV.skupiny ve srovnání s II., III. a V.skupinou. Převzato z Magner 2011.

Laktátovou acidózu (hladina $\geq 2,3$ mmol/l) jsme pozorovali i v jiné publikované studii s kohortou pacientů s mitochondriální poruchou manifestující se v novorozeneckém věku, a to u 87 % pacientů (112/129). U všech novorozenců s izolovaným ATPázovým defektem (porucha proteinu Tmem70, podjednotky $F_1\epsilon$ ATPázy, nebo syndrom NARP/MILS) jsme prokázali laktátovou acidózu. Relevantní laboratorní nálezy jsou shrnuty v tabulce 5 (Honzik 2010 a 2012 – přílohy č. 4 a 6)

Mezi další nespecifické biochemické markery u mitochondriálních poruch můžeme řadit zvýšení hladiny amoniaku, zvýšené aktivity jaterních enzymů a kreatinkinázy. Hyperamonémie (> 80 $\mu\text{mol/l}$) byla přítomna u 42 % všech novorozenců s mitochondriální poruchou, ale u kohorty s ATPázovými defekty byla nalezena u 77 %. Hyperamonémie (100-870 $\mu\text{mol/l}$) představovala typický nález u poruchy proteinu Tmem70, která byla zjištěna u 86 % pacientů (12 ze 14) (Honzik 2010; Tesařová 2010 – přílohy č. 6 a 14). Hepatopatie (elevace aktivity AST $> 0,73$ $\mu\text{kat/l}$; ALT $> 1,21$ $\mu\text{kat/l}$) a elevace CK (> 6.6 $\mu\text{kat/l}$) byla nalezena u 35 %, respektive 20 % novorozenců s mitochondriálním onemocněním, v případě ATPázových poruch u 29 %, respektive u 83 % (Honzik 2012 – příloha č. 4).

V rámci užší diferenciální diagnostiky jsou využívána speciální biochemická metabolická vyšetření. Jak jsme dokázali na předchozích studiích (Magner 2011; Sperl 2006 – přílohy 5 a 11), dochází u mitochondriálních poruch k hromadění laktátu, což vede k zvýšení hladiny pyruvátu, který je následně metabolizován alaninaminotransferázou na alanin. Alanin lze tedy využívat jako další biochemický marker pro mitochondriální poruchy. U 63 % novorozenců byla prokázána zvýšená koncentrace alaninu v krvi (norma 150-500 $\mu\text{mol/l}$), v případě poruch ATPázy dokonce u 92 % novorozenců. Průměrná hladina alaninu v mozkomíšním moku u mitochondriálních poruch činila $51 \pm 8 \mu\text{mol/l}$; u izolovaných poruch ATPázy $64 \pm 14 \mu\text{mol/l}$ (norma 0-35 $\mu\text{mol/l}$). Vyšetření profilu organickým kyselin v moči prokázalo u 63 % pacientů s mitochondriálními poruchami zvýšené vylučování některých metabolitů Krebsova cyklu, které zahrnovaly citrát, sukcinát, akonitát, 2-oxoglutarát, malát a fumarát. Ve skupině ATPázových defektů byly metabolity Krebsova cyklu detekovány až u 81 % pacientů. Ve skupině pacientů s izolovaným deficitem ATPázy způsobeným poruchou proteinu Tmem70 byl přítomen u všech (22/22) specifický metabolit v moči, 3-metylglutakonová kyselina (18-460 mg/g kreatininu; norma 0-15 mg/g kreatininu), kterou nacházíme u pacientů s Bartovým syndromem. Zvýšené vylučování methylmalonové kyseliny v moči (461 mg/g kreatininu; norma 0-15 mg/g kreatininu) bylo nalezeno u novorozence s deplečním syndromem na podkladě mutace v genu *SUCLG1* (Magner 2011; Honzík 2010 a 2012 – přílohy č. 4, 6 a 11). Laboratorní nálezy u novorozenců z našeho souboru s ATPázovými poruchami jsou shrnuty v tabulce č. 5.

Tab. 5 Laboratorní nálezy u novorozenců s poruchou ATPázy (Hončík 2012).

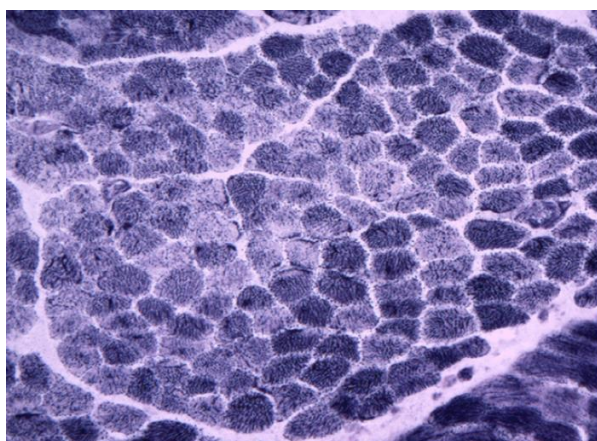
Poruchy ATPázy	↑S-laktát (>2,3 µkat/l)	↑NH ₃ (>80 µmol/l)	↑S-ALT, AST (>0,73 µkat/l; >1,21 µkat/l)	↑S-CK (>6,6 µkat/l)	↑U-Metabolity Krebsova cyklu	↑S-alanin (>500 µmol/l)
Izolované						
Mitochondriální						
MILS syndrom (m.8993T>G)(n=7)	7/7	½	2/7	n.	2/2	2/2
gen <i>MTATP6</i> (m.9134A>G) (n=1)	n.	n.	n.	n.	n.	n.
Jaderné						
gen <i>TMEM70</i> (n=22)	19/19	9/11	4/14	10/12	14/18	17/19
gen <i>ATP5E</i> (n=1)	1/1	n.	n.	n.	1/1	1/1
Kombinované						
MELAS (m.3243A>G) (n=1)	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
gen <i>SUCLG1</i> (n=1)	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1
Pearsonův syndrom (n=2)	2/2	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
Alpersův syndrom (n=1)	1/1	n.	1/1	0/1	1/1	1/1
Barthův syndrom (n=1)	1/1	n.	0/1	0/1	1/1*	1/1

* zvýšené vylučování 3-methylglutakonátu v moči; n.-nevysřetřováno

S-ALT – alaninaminotransferáza v séru; S-AST – aspartátaminotransferáza v séru; NH₃ amoniak v krvi; S-CK – kreatinínáza v séru; metabolity Krebsova cyklu = citrát, akonitát, fumarát, malát, sukcinát, 2-oxoglutarát

4.2. Histochemická vyšetření

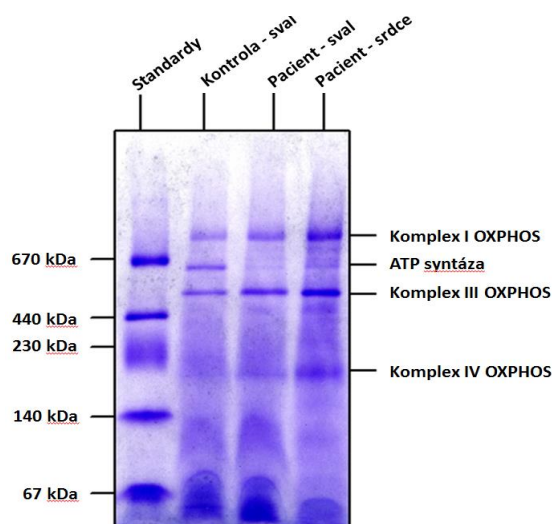
I přes nástup genomiky a zejména masivního rozšíření NGS (next generation sequencing) má i v dnešní době nezastupitelnou roli při diagnostice mitochondriálních onemocnění histologické a speciální histochemické vyšetření vzorků ze svalové biopsie. V práci Souček 2011 (příloha č. 12) jsme charakterizovali základní histopatologické rysy mitochondriálních myopatií. Přítomnost či absence „ragged red fibres“ (RRF) ve vztahu k aktivitě COX a sukcinátdehydrogenázy (SDH) ve svalových vláknech dovoluje v rámci mitochondriálních onemocnění rozlišit několik skupin. Pro izolované poruchy ATPázy je charakteristická absence RRF a normální histochemický obraz aktivity COX (absence tzv. COX negativních vláken). Subsarkolemální akumulace produktu sukcinátdehydrogenázové reakce byla prokázána u některých mitochondriálně podmíněných poruch ATPázy, jako např. u velmi vzácné patogenní mutace m.8851T>C v genu pro podjednotku F₀a ATPázy (obr.7) (Honzik 2013 – příloha č. 2). Histochemické a elektronoptické nálezy ve vzorcích ze svalové biopsie u pacientů s jaderně podmíněnými defekty ATPázy jsou velmi nespecifické, jak popisuje naše práce na souboru 14 pacientů (Sperl 2006 – příloha č. 5), např. strukturálně abnormní mitochondrie, subsarkolemální akumulace produktu sukcinátdehydrogenázové reakce nebo akumulace glykogenu ve svalových vláknech. Je třeba si však uvědomit, že negativní bioptický nálezy, tedy nepřítomnost RRF nebo jiných mitochondriálních abnormit, nemůže mitochondriálních poruchu jednoznačně vyloučit.



Obrázek 7 – Subsarkolemální akumulace produktu sukcinátdehydrogenázové reakce (SDH) ve svalu u pacienta se vzácnou patogenní mutací m.8851T>C v genu pro podjednotku F₀a ATPázy. Histochemické barvení na SDH, 400x zvětšení. Převzato z Honzik 2013.

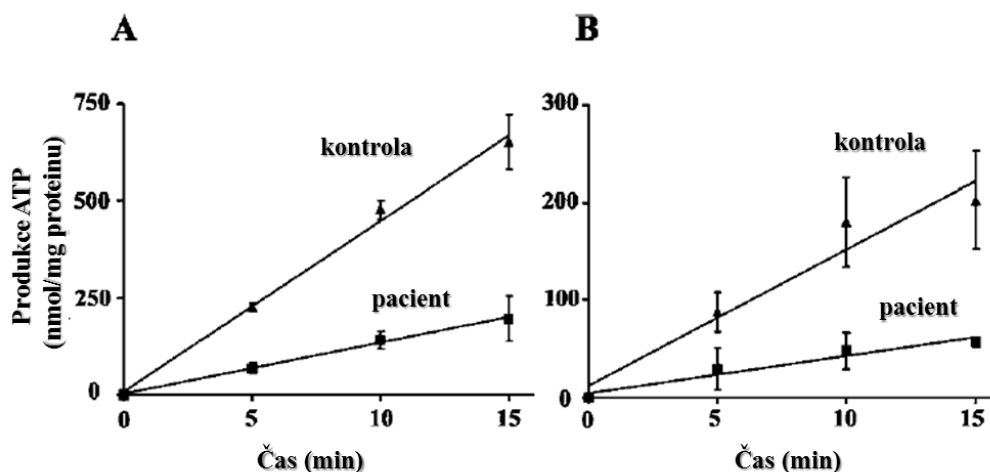
4.3. Speciální funkční a strukturální analýzy mitochondriálního energetického metabolismu

Vzorky ze svalové biopsie, jakožto tkáň s vysokými energetickými nároky, stále zůstávají nenahraditelným materiálem pro speciální laboratorní analýzy. Ve vzorcích jak svalového homogenátu, tak izolovaných mitochondrií běžně provádíme elektroforetické (BlueNative-PAGE, SDS-PAGE) a následné imunochemické detekce celého ATPázového komplexu a dalších enzymů OXPHOS (obr. 8), ale také jednotlivých podjednotek ATPázy.



Obrázek 8 - Elektroforetická analýza vzorků kosterního svalu a srdce pacientů s izolovaným deficitem ATP syntázy (Blue-native polyakrylamidová gelová elektroforéza), kde u pacienta vidíme signifikantní snížení obsahu ATPázy jak v kosterním tak i v srdci. Převzato z Sperl 2006.

Vedle strukturálních analýz jsou prováděny i funkční studie, které zahrnují měření produkce ATP (obr. 9), ATPázovou hydrolytickou aktivitu, měření enzymových aktivit dalších komplexů OXPHOS a oxygrafická měření zahrnující ADP-stimulovanou respiraci (se stanovením oligomycin/aurovertin sensitivních frakcí) - viz studie na našich pacientech, které ukázaly sníženou rychlost respirace/spotřeby kyslíku po přidání ADP, což potvrzuje poruchu ATPázy (obr. 12, str. 41) (Ješina 2004; Hejzlarova 2015; Honzik 2013; Mayr, 2010; Sperl 2006; Dubot 2004; Vojtíšková 2004 – přílohy č. 1, 2, 5, 8, 15-17). Všechny výše uvedené metody měříme i u dalších vzorků - sval, kultivované kožní fibroblasty a u autoptických vzorcích ze srdce, mozku, jater a dalších orgánů.



Obrázek 9 – Produkce ATP v kožních fibroblastech pacient s mutací m.9205_9206del v genu pro podjednotku F_0a . Rychlost produkce ATP byla měřena za přítomnosti 0,5 mM ADP v kulturách kožních fibroblastů pacienta (■) a kontrol (▲). Použité substráty reakce – 10 mM pyruvát a 10 mM malát (A) nebo 10 mM sukcinát (B). Vyprodukované ATP bylo stanoveno v alikvotech s DMSO (dimethylsulfoxid) pomocí luciferázové detekce. Data jsou zobrazena jako průměr \pm S.D. ze 3 nezávislých pokusů. Převzato z Ješina 2004.

4.4. Molekulárně genetická vyšetření

S nástupem finančně i technologicky dostupnějších molekulárně genetických metod je při vysokém podezření na mitochondriální poruchu indikováno sekvenování mitochondriální DNA, eventuálně NGS panelu vybraných genů. Ke konečné confirmaci poruchy ATPázy je vždy využita molekulárně genetická analýza buď sekvenováním celého genu nebo vyšetření prevalentních mutací eventuálně známé mutace, která je přítomna v rodině probanda. Sekvenováním mtDNA jsme objevili velmi raritní, nebo zcela nové mutace v genu *MTATP6* – m. 9205_9206del, m.8851T>C, m.9134A>G nebo genech pro mitochondriální tRNA – m.7512T>C pro tRNA^{Ser}(^{UCN}) (Ješina 2004 a 2010; Honzík 2011 a 2013 – přílohy č. 1-4). Ve skupině pacientů s podezřením na izolovanou poruchu ATPázy (na podkladě výsledků strukturálních a funkčních analýz) provedena další genetická vyšetření. Analýzou expresních profilů bylo u těchto pacientů vybráno několik kandidátních genů. V šesti vybraných rodinách (celkem 8 pacientů) byla následně provedena vazebná analýza (celogenomové homozygotní mapování) a byl identifikován gen *TMEM70* na 8. chromozomu. Jeho sekvenováním byla nalezena mutace c.317-2A>G, která byla na základě komplementačních studií označena jako patogenní. Tato mutace byla následně identifikována v homozygotním stavu celkem u 24 pacientů (Čížková 2008). Deficit ATPázy způsobený patogenními mutacemi v genu *TMEM70* patří mezi nové mitochondriální nemoci s autozomálně recesivním typem dědičnosti.

Z finančních ale i časových důvodů se v současné době volí vyšetření pomocí NGS panelu vybraných genů. V Mitochondriální laboratoři VFN byl vytvořen panel, který obsahuje více než 1000 genů včetně genů pro strukturální podjednotky a asemblační faktory ATPázy.

4.5. Zobrazovací vyšetření

Další diagnostický nástroj, který doplní informace u pacientů s poruchou ATPázy, představují zobrazovací metody, především centrální nervové soustavy. Typický nález, který jsme prokázali i u našich pacientů se syndromem NARP a s unikátními mutacemi m.9205_9206del a m.8851T>C, představoval obraz Leighova syndromu. Jedná se o progresivní neurodegenerativní onemocnění charakterizované symetrickými nekrotizujícími lézemi a hypervaskularitou v bazálních gangliích, thalamu, mozkovém kmeni a prodloužené míše. Vyšetření NMR CNS ukázalo časný rozvoj Leighova syndromu přibližně u 5 % novorozenců s poruchou ATPázy s prokázanou genetickou příčinou (Honzik 2012 – příloha č.4).

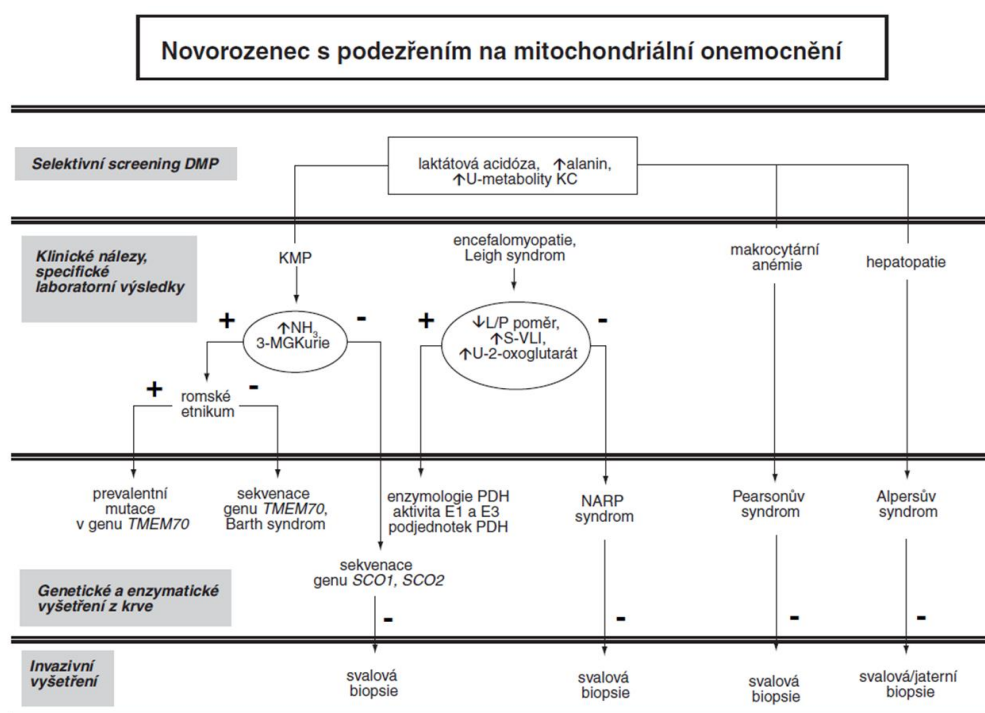
Kalcifikace v bazálních gangliích jsme spolu s hluchotou a epilepsií pozorovali u sourozenců s mutací m.7512T>C v genu pro tRNASer^(UCN) (Ješina 2010 – příloha č.3). Nicméně se jedná o nespécifický projev, který je popisován u řady jiných mitochondriálních poruch (např. Kearns-Sayerův syndrom, u mutace m.7480A>G v genu pro tRNASer^(UCN), ale i u nemetabolických onemocnění – hypoparatyreóza, pseudohypoparatyreóza, kalcifikace při tumorech CNS, Cockaynova syndromu, Fahrovy choroby nebo Aicardie-Goutierova syndromu).

S leukoencefalopatickými změnami na zobrazení pomocí magnetické rezonance se setkáváme u pacientů s kombinovanými poruchami ATPázy. U pacienta se syndromem MNGIE (mitochondriální neurogastrointestinální encefalomyopatie) jsme našli difúzní nespécifické změny v bílé hmotě bilaterálně symetricky (zvýšený signál T2 váženém obrazu a FLAIR a snížený v T1 váženém obrazu), a to supratentoriálně (fronto-temporo-parieto-okcipitálně) i infratentoriálně v mozečku a v kmeni. Změny v bílé hmotě jsou popisovány i u pacientů s další kombinovanou poruchou, syndromem MELAS (Burgetova 2010 – příloha č. 13).

Diagnóza MNGIE může být podpořena radiologickým vyšetřením gastrointestinálního traktu, které ukazuje zpomalenou peristaltiku, dilataci žaludku, gastroparézu, dilataci duodena a/nebo divertikly způsobenými postizením gastrointestinálního traktu (Burgetova 2010 – příloha č. 13).

4.6. Diferenciální diagnostika mitochondriálních poruch a defektů ATPázy

Na základě dat od více než 120 kriticky nemocných novorozenců s potvrzenou mitochondriální poruchou, které zahrnovali detailní popis klinických příznaků a výsledků biochemických a metabolických vyšetření, jsme připravili diferenciálně diagnostický algoritmus (obr. 10). Cílem bylo jejich využití k indikaci specifických enzymologických a/nebo molekulárně genetických vyšetření v dostupných biologických vzorcích, a to bez nutnosti invazivní svalové biopsie (Honzik 2010 – příloha č. 9).



Obrázek 10 – Diferenciálně diagnostický algoritmus u novorozence s podezřením na poruchu mitochondriálního energetického metabolismu, poruchu ATPázy. 3-MGKurie – 3-methylglutakonaturie; PDH – pyruvátdehydrogenáza; S-VLI – hladina valinu, leucinu a izoleucinu v seru; L/P poměr – poměr laktátu ku pyruvátu v krvi; KC – Krebsův cyklus; *SCO1* a *SCO2* – geny pro asemblační faktory COX. Převzato z Honzik 2010.

Jako příklad uvádím následující využití u pacientů s podezřením na nejčastější ATPázové poruchy. Mutační analýza genů *TMEM70* nebo *TAZ* (Barthův syndrom) je indikována u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií se svalovou hypotonií a u chlapců s hypospádií a se současným laboratorním nálezem laktátové acidózy, hyperamonémie a 3-methylglutakonové acidurie. U pacientů s výše uvedenými nálezy, kteří jsou romského etnika, se lze zaměřit přímo na detekci prevalentní mutace c.317-2A>G v genu *TMEM70*. Pokud bude dominantním příznakem encefalomyopatie, eventuálně obraz Leighova

syndromu, a laktátová acidóza je indikováno vyšetření prevalentní mutace m.8993T>G/C v genu *MTATP6* mtDNA, způsobující syndrom NARP/MILS syndrom.

Závěr:

Naše data ukazují, že zvýšená hladina laktátu v různých biologických materiálech (krev, likvoru, moč) je marker mitochondriálních nemocí, včetně poruch ATPázy. Zvýšená hladina laktátu v likvoru může sloužit k odlišení pacientů s mitochondriální poruchou s křečemi od pacientů s epilepsií jiné etiologie, zejména pokud jsou vzorky získány krátce po atace křečí. Dokázali jsme, že není přímá korelace mezi hladinou laktátu v krvi a likvoru a že i normální hladina laktátu v krvi nevylučuje mitochondriální poruchu.

Podobně jako u jiných mitochondriálních onemocnění, nelze jednotlivým klinickým příznakům u poruch ATPázy přesně přiřadit genetické defekty, protože jeden typ mutace může vézt k širokému spektru klinických příznaků a naopak stejný klinický obraz může být vyvolán různými mutacemi. Proto jsme zavedli do praxe celou řadu diagnostických přístupů, založených na biochemických, funkčních, histochemických a molekulárně genetických vyšetření včetně NGS analýzy panelu genů. Sekvenováním mtDNA jsme objevili ve vzorcích našich pacientů velmi raritní, nebo zcela nové mutace v genu *MTATP6* (m. 9205_9206del, m.8851T>C, m.9134A>G), dále v genu pro mitochondriální tRNA (m.7512T>C pro tRNASer^(UCN)) a v jaderném genu pro podjednotku F₁ε ATPázy.

Aplikovali jsme nové diferenciálně diagnostické algoritmy pro rozpoznání mitochondriálních onemocnění s cílem urychlit a zefektivnit diagnostický proces a při současných omezených léčebných možnostech poskytnout genetické poradenství a prenatální diagnostiku v postižených rodinách.

5. Funkční a strukturální změny u vzácných genetických poruch ATPázy

I přestože představují dědičné poruchy ATPázy častou příčinu mitochondriálních poruch, zůstávají znalosti o (pato)biochemii těchto poruch omezené. Abychom jim lépe porozuměli, tak jsme se v několika pracích zaměřili na popis funkčních a strukturálních změn ATPázového komplexu u pacientů s poruchou ATPázy. Jednalo se především o vzácné varianty izolovaných a kombinovaných poruch:

A) Izolované deficity ATPázy zapříčiněné mutacemi v genech pro

1) mitochondriálně kódovanou strukturální podjednotku F₀a ATPázy

- a) mutace m.8527A>G (v iniciačním kodónu)
- b) missense mutace m.8993T>G; m.8851T>C, m.9134A>G
- c) m.9205_9206del (v terminačním kodónu)

2) jaderně kódované geny pro

- a) strukturální podjednotku F₁ε ATPázy
- b) asemblační faktory pro ATPázu - TMEM70; Atp12p

B) Kombinované deficity s postižením ATPázy způsobené mutace v genech pro

- 1) mitochondriální tRNA - narušující expresi mitochondriálně kódovaných genů, včetně pro ATPázu - pro serin tRNA^{Ser(UCN)}
- 2) mitochondriální polymerázu γ (POLG), vedoucí k delecím/deplecím mtDNA a ovlivňující biogenezi ATPázy

5.1. Izolované deficity ATPázy způsobené mutací v genech pro mitochondriálně kódovanou strukturální podjednotku F₀a ATPázy

Mitochondriální ATPáza má dvě podjednotky, které jsou kódovány mtDNA, a to podjednotka F₀a (gen *MTATP6*) a A6L (gen *MTATP8*). V rámci našich studií jsme se zaměřili na patobiochemické změny způsobené různými mutacemi v genu *MTATP6* pro podjednotku F₀a. Nálezy u zcela unikátních mutací jak v iniciačním kodónu (m.8527A>G), tak i v terminačním kodónu (m.9205_9206del) nám pomohli lépe pochopit funkci této podjednotky. Dále jsme rozšířili laboratorní i klinické poznatky u velmi raritních mutací m.8851T>C a m.9134A>G.

Mutace m.8527A>G v genu MTATP6

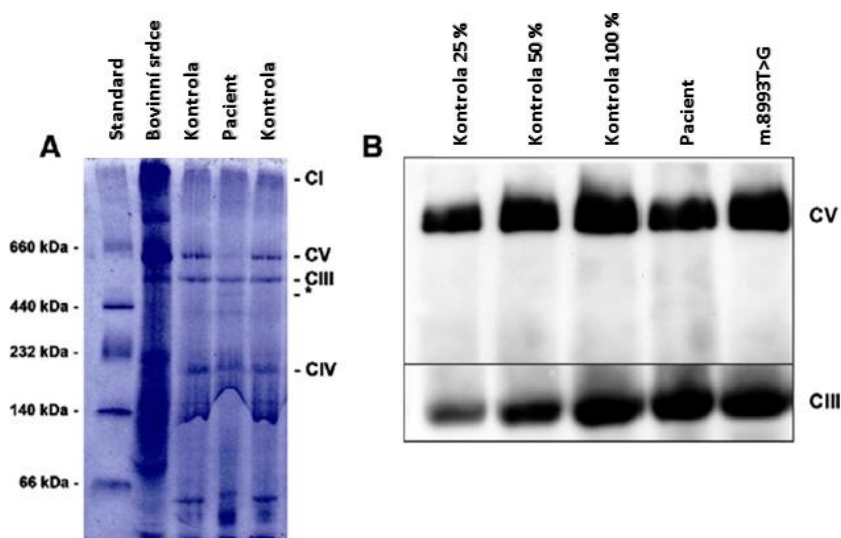
Ve spolupráci s francouzskými kolegy jsme popsali novou mutaci v *MTATP6* genu, která se nachází v iniciačním kodónu (Dubot 2004 – příloha č. 15). Jedná se o mutaci m.8527A>G, která vede k záměně tripletu AUG na GUG, který normálně kóduje aminokyselinu valin. Tato kódující sekvence mtDNA je využívána pro 2 podjednotky ATPázy, podjednotku F₀a i podjednotku A6L. V případě podjednotky A6L nemá mutace m.8527A>G žádný vliv, jelikož se jedná o záměnu na 3. pozici, která není provázena změnou aminokyseliny. Mutace v mtDNA, které modifikují iniciační kodón, jsou velmi vzácné (např. m.3308T>C v genu *ND1* - podjednotka 1 komplexu I; m.7587T>C v genu *COII* - podjednotka 2 komplexu IV (CoxII) (Campos 1997; Clark 1999).

U 22letého mladého muže bylo na základě klinických příznaků, které zahrnovaly hypotonii, opožděný psychomotorický vývoj, axonální neuropatii, retinopatii a oftalmoplegii, a zejména pro histopatologický nálezn ve svalové biopsii (akumulace abnormálních mitochondrií a přítomnost RRF vláken) vysloveno podezření na mitochondriální onemocnění. Sekvenováním mtDNA byla nalezena mutace m.8527A>G s heteroplazmií 97% ve svalové tkáni a kožních fibroblastech. Měřením ve vzorcích kultivovaných kožních fibroblastů jsme neprokázali patogenní efekt na biosyntézu mitochondriálně kódoovaných podjednotek, na velikost ATPázového komplexu ani na množství podjednotky F₀a. Výsledky funkčních analýz nevykazovaly změny v hydrolýze ATP ani ve schopnosti tvorby ATP oproti kontrole. Hodnoty mitochondriálního membránového potenciálu $\Delta\psi_m$ se neodlišovaly od kontrolních vzorků. Lze tedy spekulovat, že kodón GUG může být využit jako alternativní iniciační kodón u lidské mtDNA. U popsané mutace m.3308T>C v iniciačním kodónu genu *ND1* pro podjednotku 1 komplexu I byla prokázána normální aktivita i množství komplexu I a mutace neměla patogenní vliv a uvažuje se tedy o využití jiného kodónu pro methionin, který se nachází v 5' části mRNA, jako alternativní iniciační kodón k translaci. U našeho případu ale nebyl v „downstream“ části mRNA nalezen žádný jiný AUG kodón, který by zastoupil mutovaný. Rozpoznání mRNA a iniciace translace na ribozomech jsou důležité kroky v expresi mitochondriálních genů, které jsou však málo objasněny. Zúčastňuje se ho mnoho mitochondriálních ribosomálních proteinů (tzv. MRP) a dalších faktorů, proto je u našeho případu možný vliv i některého z těchto regulujících faktorů. Jelikož matka nesoucí tutéž mutaci v homoplazmickém zastoupení byla zcela asymptomatická, nevysvětluje samotná tato mutace klinický stav chlapce. Na základě našich výsledků lze konstatovat, že v

případě lidské mtDNA může být kodón GUG využit jako alternativní iniciační kodón v translaci, minimálně v případě genu *MTATP6*.

Mutace m.8851T>C v genu MTATP6

Velmi vzácná mutace m.8851T>C rozšiřuje spektrum missense mutací v genu *MTATP6* (Honzik 2013 – příloha č. 2). Vede k záměně tryptofanu argininem na pozici 109 ve druhém transmembránovém helixu proteinu. V naší práci jsme rozšířili poznatky o biochemických a histopatologických projevech mutace. Ve vzorku ze svalové biopsie byl analyzován obsah a struktura ATPázového komplexu. Pomocí nativní elektroforézy s následným barvením bylo nalezeno částečné snížení celého komplexu a naopak akumulace menších rozpadlých/nesložených částí ATPázy. S využitím monoklonálních protilátek proti podjednotce $F_1\alpha$ jsme ověřili pokles obsahu ATPázy (přibližně na 80 % kontrol) (obr.11).



Obrázek 11 – Elektroforetické analýzy vzorků pacienta s mutací m.8851T>C. (A) Blue Native elektroforéza vzorků svalové biopsie se signifikantním snížením množství ATPázy a přítomností subkomplexů (*). Množství komplexů I, III a IV se neliší oproti kontrole. (B) Western blot s použitím specifické monoklonální protilátky proti $F_1\alpha$ podjednotce ve vzorcích kožních fibroblastů ukázal mírné snížení (na 80 % kontrol). Volné podjednotky $F_1\alpha$ -ATPázy nebyly detekovány. Množství komplexu III bylo stejné u pacienta i kontrol. Převzato z Honzik 2013.

Měřením kapacity mitochondriálního energetického metabolismu v sérii reakcí s využitím značených substrátů [1-14C] pyruvátu, [U-14C] malátu a [1,2-14C] sukcinátu za přítomnosti/absence různých donorů a specifických inhibitorů OXPHOS a Krebsova cyklu jsme prokázali sníženou ATPázovou aktivitu. ADP-stimulovaná respirace měřena na oxygrafu nevykazovala výrazné odchylky od kontrolních vzorků. Histopatologické vyšetření svalu ukázalo subsarkolemální akumulaci SDH reakčního produktu (sukcinát dehydrogenázy) ve svalových vláknech (obr. 7 na str.28).

Jedná se o první popis patobiochemických nálezů u pacienta s touto unikátní patogenní mutací. Tato mutace byla dosud studována pouze na bakteriálním modelu *E.coli*, kde byla nalezena jenom snížená hydrolytická aktivita bez dalších funkčních dopadů na ATPázu (Ogilvie 1999). Předpokládáme, že tato mutace se prezentuje lehčím fenotypem, než jaké známe u ostatních mutací v genu *MTATP6*, kde je popisován klasický Leighův syndrom.

Mutace m.8993T>G a m.9134A>G v genu MTATP6

Již v roce 1990 byla popsána první mutace v genu *MTATP6*, m.8993T>G, která vede k záměně leucinu za arginin (Holt 1990) a v současné době se jedná o nejčastější patogenní mutaci v mitochondriálním genu pro F₀a podjednotku ATPázy. Strukturální studie u pacientů neukázaly změny v biogenezi ATPázového komplexu, který má sníženou tvorbu ATP. Naše práce ukazuje biochemické projevy této mutace, a to pokles syntetické aktivity ATPázy (35-54 % oproti kontrole). To dokumentují i změny mitochondriální membránového potenciálu $\Delta\psi_m$, jehož měření ukázalo minimální změny po přidání ADP (tzv. ADP indukovaný pokles potenciálu $\Delta\psi_m$), což jednoznačně ukazuje na nedostatečné využití potenciálu k tvorbě ATP (Vojtíšková 2004 – příloha č. 16).

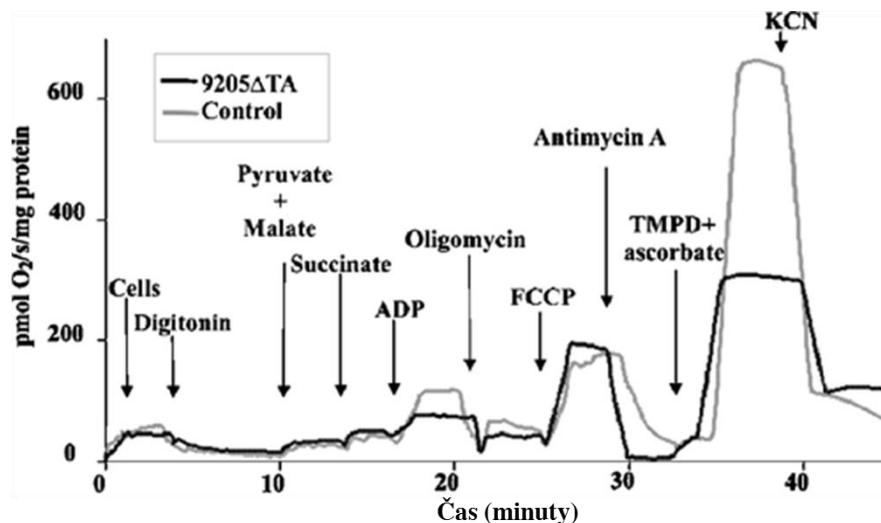
Jako první jsme publikovali novou missense mutaci m.9134A>G v genu *MTATP6*, která vede k záměně glutamátu na glycin na pozici 203 ve velmi konzervované části proteinu. Patobiochemické následky mutace zahrnují snížení produkce ATP a přibližně 50% pokles oligomycin senzitivní ATP hydrolytické aktivity (Honzik 2012 – příloha č. 4).

Mutace m.9205_9206del v genu MTATP6

Popsali jsme velmi vzácnou mutaci v mtDNA – mikrodeleci dvou párů bazí na pozici 9205 a 9206 – m.9205_9206del, která postihuje terminační kodón genu *MTATP6* a zároveň sestřihové místo mezi RNA pro *ATP6* (podjednotka F₀a) a *COX3* (podjednotka III cytochrom *c* oxidázy - COX) (Ješina 2004; Hejzlarová 2015 – přílohy č. 1 a 17). Mutace byla dosud popsána pouze v práci Seneca 1996.

Výsledky vyšetření ukázaly výrazně sníženou produkci ATP (o 70 % oproti kontrole) (obr. 9 na str. 30) a 85% pokles aktivity COX. Hydrolytická schopnost ATPázy zůstala zachována (měřena na vzorku kožních fibroblastů). Přibližně 50% redukce byla zaznamenána jak u ADP stimulované respirace (měřeno na oxygrafu) (obr. 12), tak u ADP indukovaného poklesu mitochondriálního membránového potenciálu $\Delta\psi_m$. Množství podjednotky F₀a ATPázy bylo přibližně 10-ti násobně sníženo a měření syntézy podjednotky F₀a pomocí radioaktivně značeného methioninu [³⁵S-Met] prokázalo cca 9-ti

násobné snížení. Nebyl pozorován fúzní protein podjednotek F_0a a COXIII. Množství některých podjednotek COX bylo také sníženo (zejména mitochondriálně kódované CoxI, CoxII a CoxIII). Strukturální studie pomocí dvourozměrné elektroforézy ukázaly nestabilitu celého ATPázového komplexu, který se rozpadal do subkomplexů, a postižena byla i biogeneze COX.



Obrázek 12 - Spotřeba kyslíku v kožních fibroblastech pacienta s ATPázovou poruchou na podkladě mutace m.9205_9206del (9205 Δ TA) v genu pro podjednotku F_0a . Měření bylo provedeno s využitím vzorků 0,45–0,62 mg proteinu kožních fibroblastů/ml a 0,1 mg digitoninu/mg proteinu. Reakce probíhaly po přidání pyruvátu (5 mM), malátu (1,5 mM), sukcinátu (10 mM), ADP (0,5 mM), oligomycinu (1 μ M), FCCP (1 μ M), antimycinu A (0,2 μ g/ml), askorbátu (5 mM), TMPD (1 mM) a KCN (0,33 mM). Spotřeba kyslíku je vyjádřena jako negativní hodnota první derivace časové změny tlaku kyslíku (pmol O_2 /s/mg proteinu). Převzato z Ješina 2004.

Jelikož se jedná o vzácný typ mutace v terminačním kodónu genu, tak jsme další studie zaměřili na ovlivnění transkripce. Primární polycistronní neprocesovaný transkript i sekundární tricistronní *ATP8-ATP6-COX3* jsou přítomny v mutovaných fibroblastech zcela ve stejném množství jako v kontrolách. Northern blot i kvantitativní RT-PCR ukázaly, že primární transkriptu *ATP8-ATP6-COX3* je štěpen 2-3násobně méně. Mutace tedy ovlivňuje procesování primárního transkriptu a množství maturovaných transkriptů *COX3* a bicistronního *ATP8-ATP6* jsou snížena. Zajímavé bylo zvýšení množství podjednotky A6L (gen *MTATP8*), jejichž translace byla pravděpodobně up-regulována jako určitý kompenzační efekt mutace.

Klinický nález i laboratorní výsledky jasně svědčí pro tíž této mutace, která má vliv jak na ATPázu tak i na COX. Dochází ke snížení syntézy podjednotky F_0a , což vede k tvorbě nekompletního ATPázového komplexu, který je schopen hydrolytické aktivity, ale neumožňuje produkci ATP. Mutace poškozuje i funkci a biogenezi COX. Nálezy u pacienta s touto vzácnou mutací v terminačním kodónu rozšiřují spektrum laboratorních i

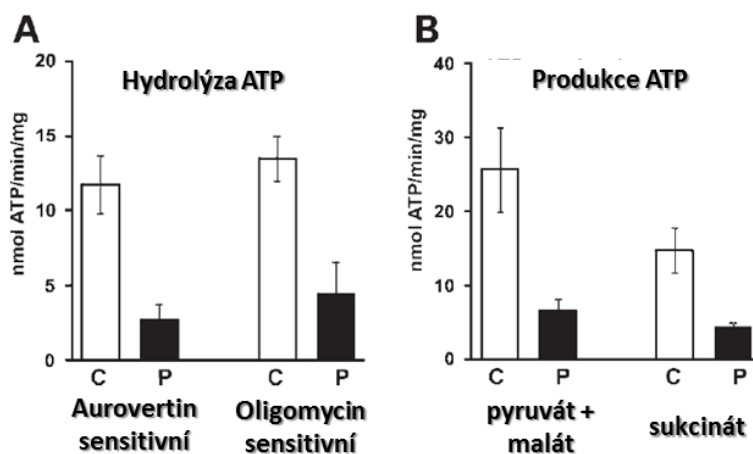
klinických příznaků a zároveň je výborným modelem na studium biogeneze mitochondriální ATPázy.

5.2. Izolované deficity ATPázy způsobené mutacemi v genech pro jaderně kódovanou strukturální podjednotku ATPázy

Izolované poruchy ATPázy na podkladě mutací v jaderných genech pro strukturální podjednotky ATPázy jsou extrémně vzácné. I přestože je většina strukturálních podjednotek ATPázy, až na dvě (podjednotka F_0a a A6L), kódovány jadernou DNA, byly dosud popsány patogenní mutace pouze ve 2 genech, a to podjednotku $F_1\varepsilon$ a $F_1\alpha$ (Mayr 2010 – příloha č. 8);(Jonckheere 2013).

Mutace v genu $ATP5E$ pro podjednotku $F_1\varepsilon$

Ve spolupráci s rakouskými kolegy jsme popsali dosud jediného publikovaného pacienta s mutací v jaderně kódované podjednotce ε , která je součástí F_1 části komplexu ATPázy (Mayr 2004 – příloha č. 8). U pacientky byla pomocí sekvenování nalezena homozygotně missense mutace c.35A>G v 2. exonu genu $ATP5E$. Tato patogenní mutace zapříčiňuje aminokyselinovou záměnu tyrozinu na cystein na 12.pozici ve velmi konzervované části proteinu. Funkční dopady mutace zahrnují 60-70 % pokles aktivity hydrolýzy ATP citlivé na oligomycin i aurovertin a pokles i produkce ATP ve vzorcích kožních fibroblastů (obr. 13). Strukturální analýzy ukázaly výraznou redukci obsahu celého ATPázového komplexu (přibližně o 70-90 %). Nicméně přítomný komplex vykazoval normální velikost a obsahoval zabudovanou podjednotkou $F_1\varepsilon$. Nepozorvali jsme přítomnost různých subkomplexů F_1 části, které by ukazovaly na rozpad komplexu. Lze tedy usuzovat, že zabudovaná mutovaná podjednotka $F_1\varepsilon$ nemá vliv na funkci zbylého ATPázového komplexu, který si zachovává zbytkovou enzymatickou aktivitu jak hydrolytickou tak syntetickou, které proporcionálně odpovídají množství přítomného ATPázového komplexu. Za použití specifických protilátek proti různým podjednotkám ATPázy ($F_1\alpha$; $F_1\beta$; F_0d ; OSCP; F_0a ; F6; F_0c) bylo nalezeno odpovídající snížení i obsahu všech výše uvedených podjednotek ATPázy s výjimkou F_0c , která se nedegraduje a naopak byla přítomna ve zvýšeném množství. Funkční dopady mutované podjednotky $F_1\varepsilon$ na enzymatickou aktivitu zbylé ATPázy nebyly pozorovány.



Obrázek 13 – Měření hydrolyzy a produkce ATP. (A) Hydrolytická aktivita ATPázy citlivá na oligomycin a aurovertin byla měřena v rozmražených fibroblastech. (B) Produkce ATP byla měřena v digitoninem permeabilizovaných vzorcích kožních fibroblastů za použití různých substrátů 10 mM pyruvátu + 2,5 mM malátu nebo 10 mM sukcinátu. Hodnoty představují průměr ± S.D. ze čtyř nezávislých měření u kontrol (C) a pacienta (P). Převzato z Mayr 2004.

5.3. Izolované deficity ATPázy způsobené mutacemi v genech pro jaderně kódované asemblační proteiny pro ATPázu

Na biogenezi ATPázového komplexu se podílí mnoho jaderně kódovaných proteinů. První pacient s patogenní mutací v nově objeveném asemblační proteinu Atp12p byl popsán v pracích jiných autorů a naší skupinou (Sperl 2006 – příloha č. 5); (DeMeirleir 2004). Ve spolupráci s dalšími pracovišti jsme identifikovali další protein, který je zapojen do asemblace ATPázy, transmembránový protein 70 kódovaný genem *TMEM70* na chromozomu 8.

Mutace v genu TMEM70

Ve spolupráci s Fyziologickým ústavem Akademie věd ČR (Odd.bioenergetiky) nalezlo naše pracoviště v roce 2008 u 23 pacientů s poruchou ATPázy novou mutací c.317-2A>G na konci 2.intronu, jakožto první popsanou patogenní mutací v genu *TMEM70* (Čížková 2008). Postupně se rozšířilo spektrum patogenních mutací v genu *TMEM70* (viz tabulka 2 na str.11). Pacienti s touto novou mitochondriální nemocí mají velmi homogenní klinický projev s nástupem již v novorozeneckém věku. U pacientů je přítomna hypertrofická kardiomyopatie, psychomotorická retardace, svalová hypotonie a u chlapců hypospádie. V biochemických nálezech je přítomna laktátová acidóza, 3-methyl glutakonová acidurie a intermitentně hyperamonémie. Jedná se tedy o nový mitochondriální syndrom s autozomálně recesivním typem dědičnosti s neonatální manifestací a s projevy encefalokardiomyopatie. Specifické laboratorní nálezy ukazují

sníženou ADP-stimulovanou respirací (měření pomocí oxygrafu), nízkou aktivitu tvorby ATP. Strukturální analýzy pomocí elektroforetických studií prokázaly signifikantně snížené množství plně složeného ATPázového komplexu (méně než 30%) a naopak nárůst obsahu F₁-ATPázových subkomplexů (Sperl 2006; Honzik 2010 – přílohy č. 5 a 6).

Mutace v genu ATPAF12 (protein Atp12p)

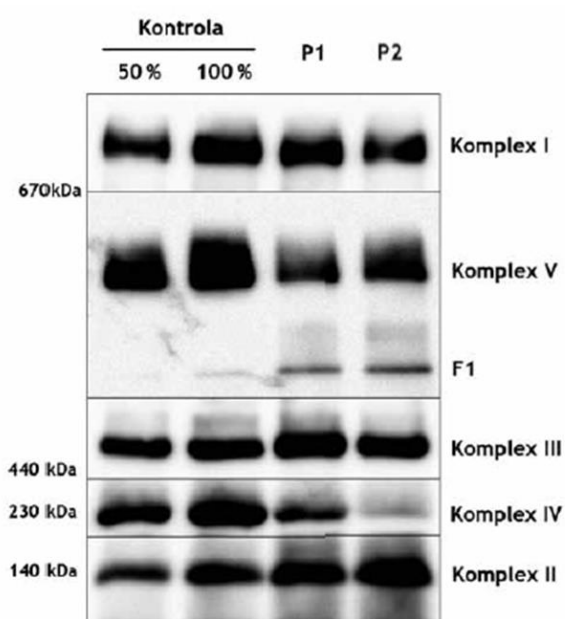
V souboru pacientů publikovaných v naší práci (Sperl 2006 – příloha č. 5) byla u jednoho pacienta nalezena homozygotně mutace c.280T>A v jaderně kódovaném genu *ATPAF2*. Tato mutace vede k záměně neutrálního tryptofanu na bazický arginin v asemblačním proteinu Atp12p, který je nutný pro biogenezi savčí ATPázy. U pacienta byla přítomna těžká novorozenecká encefalopatie s epilepsií a výraznou psychomotorickou retardací, atrofií bazálních ganglií a dysmorfickými rysy (mikrognacie, sedlovitý nos, velká ústa, flekční kontraktury). Laboratorně byla přítomna metabolická laktátová acidóza, zvýšená hladina laktátu v likvoru, zvýšené vylučování 3-methylglutakonové kyseliny v moči. Patogenní mutace v genu pro asemblační protein Atp12p se projevila jak poklesem množství tak i aktivity ATPázy, kdy jaderní tkáň byla více ovlivněna než kosterní svalstvo. Na kvasinkovém modelu bylo později prokázáno, že tato mutace ovlivňuje solibilitu proteinu Atp12p a vede ke zvýšené agregaci proteinu (Meulemans 2010).

5.4. Kombinované deficity ATPázy způsobené mutacemi v genech pro mitochondriální tRNA

Přibližně 2/3 všech bodových mutací v mtDNA je lokalizováno v genech pro mitochondriální tRNA, a z toho více než polovina v tRNA pro 4 aminokyseliny (leucin, lysin, izoleucin a serin).

V naší práci (Ješina 2010 – příloha č. 3) je dokumentována vzácná mutace m.7512T>C v tRNA^{Ser(UCN)}, která byla popsána u první rodiny v České republice. Jelikož dochází k ovlivnění exprese mitochondriálních genů pro strukturální podjednotky OXPHOS včetně ATPázy, tak jsme pomocí strukturálních analýz prokázali postižení množství ATPázy i cytochrom *c* oxidázy. Dále byly přítomny subkomplexy F₁-ATPázy, které nacházíme i u izolovaných poruch ATPázy způsobených mutacemi v mitochondriálním genu pro podjednotku F₀a (obr. 14). Funkční vyšetření v různých tkáních (kožní fibroblasty a kosterní sval) ukázaly sníženou aktivitu komplexu I+III, aktivity ostatních komplexů byly na dolních hranicích aktivit kontrolních vzorků (zejména

komplex IV a komplexy II+III). Histochemické vyšetření prokázalo COX negativních vláknů v bioptickém vzorku ze svalové biopsie, což potvrzuje sníženou aktivitu COX. Klinické a laboratorní projevy jsou popisovány u členů této rodiny, u kterých dosáhla heteroplazmie v různých tkáních více než 90 % (obr. 4 na str.17). V souladu s tímto zjištěním jsou studie u jiných poruch mitochondriální tRNA, kde závislost mezi stupněm heteroplazmie m.8344A>G a funkčním biochemickým fenotypem (aktivitou COX) ukázala na prahový efekt okolo 85 % (Boulet 1992). Obdobné ovlivnění funkce a struktury komplexů OXPHOS jsou popisovány u jiných mutací postihujících i další tRNA. U nejčastější příčiny MELAS (m.3243A>G v tRNA^{Leu(UUR)}) a MERRF (m.8344A>G v tRNA^{Lys}) byly nalezeny snížené aktivity enzymů dýchacího řetězce a snížená tvorba ATP (James 1999). Ovlivnění OXPHOS systému je zmiňováno i u raritnějších mutací (m.7472insC mt tRNA^{Ser(UCN)} u MERRF; m.7512T>C v tRNA^{Ser(UCN)}; m.7497G>A v tRNA^{Ser(UCN)}) (Moolers 2005; Pulkes 2005).



Obrázek 14 – Analýza množství komplexů OXPHOS ve vzorcích ze svalových biopsií u obou pacientů (P1 a P2), kde je prokázáno mírné snížení množství ATPázy (komplex V) a přítomnost aditivních subkomplexů (F1) odpovídajících F₁-ATPáze a signifikantní pokles množství komplexu IV. Převzato z Ješina 2010.

5.5. Kombinované deficity ATPázy způsobené poruchou mitochondriální polymerázy γ (POLG)

Kombinovanou poruchu ATPázy, tedy postižení několika enzymů OXPHOS včetně ATPázy, na základě různých patogenních mutací v genu *POLG*, pro mitochondriální polymerázu γ , dokumentuje práce Ješina (2011 – příloha č. 7). Studovali jsme 3 pacienty, kteří byli složenými heterozygoty pro různé mutace (c.926G>A; c.1399G>A; c.1879C>T; c.2542G>A) s aminokyselinovými záměnami p.[R309H;R627Q], p.[A467T;G848S] a

p.[A467T;P589L]. U všech pacientů bylo přítomno neurologické postižení s atrofií mozku a dále hepatopatie. Snížení obsahu ATPázy (až na 25% úrovně kontrol) bylo nalezeno v mitochondriích z jater a mozku (spolu s komplexy I, III a IV), zatímco ve svalu a srdci byl obsah srovnatelný s kontrolou. Měření aktivit enzymů dýchacího řetězce v jaterních mitochondriích ukázalo snížení aktivit komplexu I, I+III, II+III,III a IV (45-63% kontrol). Histochemické analýza v jaterní biopsii ukázala sníženou aktivitu komplexu IV. Můžeme tedy usuzovat, že mitochondriální depleční syndrom na podkladě deficitu POLG je spojený s postižením strukturálních podjednotek systému OXPHOS, které jsou kódovány mitochondriální DNA. V souladu s literárními údaji se jeví nejcitlivější komplex IV (cytochrom *c* oxidáza), který má 3 podjednotky kódované mDNA (CoxI, Cox II a Cox III). Byli popsáni pacienti se sníženou produkcí ATP při normální hydrolytické aktivitě, což je v souladu s postižením mitochondriálně kódovaných podjednotek ATPázy (zejména F_oa) (de Vries 2007; Schaller 2011). Kombinovaný deficit OXPHOS včetně postižení ATPázy na základě mutací v genu pro mitochondriální polymerázu γ (POLG) spojený s Alpersoným-Huttenlocherovým syndromem se zdá být tkáňově specifický (Tesařová 2004; Schaller 2011; deVries 2008).

Závěr:

První případy izolovaných poruch ATPázy byly popsány v 90.letech minulého století. Během následujících 25 let byli popsáni noví pacienti s patogenními mutacemi v nově objevených genech specifických pro ATPázu. Výsledky našich studií, které popisují funkční a strukturální změny ATPázy u pacientů s velmi vzácnými mutacemi, tak významně přispěly k rozšíření znalostí o biogenezi, funkci a struktuře enzymu.

- i) Ukázali jsme, že mutace v terminačním kodónu genu *MTATP6* pro podjednotku F_oa ATPázy vede k tvorbě nekompletního ATPázového komplexu s omezenou funkcí a představuje zároveň výborný model pro studium biogeneze ATPázy. Dokázali jsme, že vedle poruchy ATPázy vede mutace k poruše cytochrom *c* oxidázy.**
- ii) Výsledky od pacienta s mutací v iniciačním kodónu genu *MTATP6* ukázaly, že v případě lidské mitochondriální DNA může být mutovaný kodón GUG využit jako alternativní iniciační kodón v translaci.**

- iii) Charakterizovali jsme u vzorků pacienta biochemické a patofyziologické následky mutace m.8851T>C v genu *MTATP6*, která byla dosud popsána pouze klinicky anebo jen na kvasinkových a bakteriálních modelech.
- iv) Naše práce ukázala, že protein Tmem70 je novým dosud nepopsaným membránovým proteinem a slouží jako nový asemblační faktor pro ATPázu. Přesný mechanismus zapojení proteinu Tmem70 na asemblaci je zatím neobjasněn, nicméně ukazuje se, že hraje nepostradatelnou roli v její biogenezi.
- v) Role podjednotky F₁ε není zatím plně známa, nicméně na základě našich výsledků předpokládáme, že bude hrát výraznou roli v biosyntéze a složení F₁ části ATPázy a navíc se zdá, že je zapojena do zabudování podjednotky F₀c do struktury rotoru ATPázového komplexu.
- vi) Nálezy u pacientů s mutací m.7512T>C v tRNA^{Ser(UCN)} ukázaly, že tato mutace představuje další příčinu kombinovaných poruch ATPázy a rozšiřuje naše znalosti exprese genů v mitochondriální DNA.
- vii) Porucha mitochondriální polymerázy γ vedoucí ke kombinovaným deficitům OXPHOS včetně postižení ATPázy je tkáňové specifická a dochází k výrazné manifestaci v mozku a játrech.

6. Patobiochemie poruch ATPázy

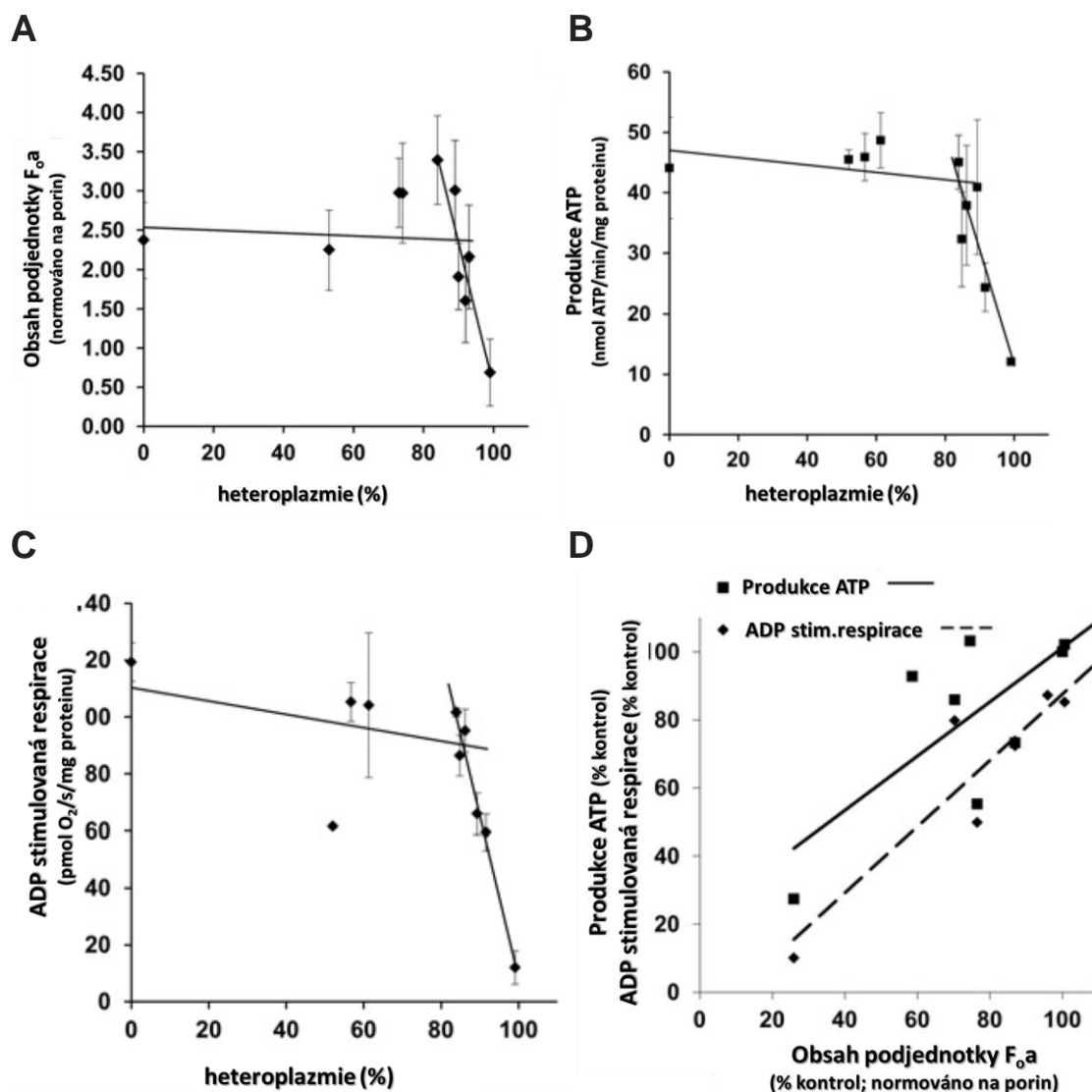
Mitochondriální ATPáza představuje klíčový enzym mitochondriálního energetického metabolismu, jelikož v savčích buňkách produkuje více než 90 % ATP. Její poruchy jsou příčinou závažných mitochondriálních onemocnění, kdy jsou nejvíce postiženy především energeticky náročné orgány, jako jsou nervová soustava, smysly a srdce. U našich pacientů s různými ATPázovými poruchami (jaderně i mitochondriálně podmíněnými) jsme prokázali sníženou schopnost tvorby ATP v mitochondriích (Ješina 2004; Mayr 2010; Sperl 2006; Vojtíšková 2004 – přílohy č. 1, 5, 8 a 16), a proto jsme se zaměřili na objasnění patofyziologických procesů spojených s tímto snížením.

6.1. Struktura a funkce ATPázy u ATPázových poruch

Jaderně kódované izolované poruchy ATPázy ovlivňují strukturu nebo regulaci biogeneze ATPázového komplexu. I přestože mají různou patobiochemickou podstatu, typickým znakem je výrazné snížení obsahu ATPázového komplexu, který má však zachovalou správnou zbytkovou funkci. Můžeme je tedy označit jako „*kvantitativní poruchy*“ ATPázy. A lze u nich očekávat i relativní snížení kapacity tvorby ATP, která se u našich pacientů pohybuje přibližně pod 30 % hodnot u zdravých kontrol. Na myším modelu byla studována kapacita ATP syntázy ve vztahu k aktivitě enzymů dýchacího řetězce. Bylo zjištěno, že i při 80 % inhibici ATPázy je ještě zachována normální ADP stimulovaná respirace, tedy funkce celého OXPHOS systému (Rossignol 1999). Obdobné studie chybí na humánních vzorcích. Naši pacienti s jaderně podmíněnou ATPázovou poruchou, která vede k poklesu obsahu ATPázy i pod 10 %, jsou viabilní, lze tedy předpokládat, že celý energetický mechanismus tvorby ATP má významnou kapacitu a funkční rezervu (Houštěk 2006). Můžeme tedy usuzovat, že mitochondriální energetický metabolismus je u jaderně podmíněných ATPázových poruch méně postižen, než by odpovídalo výraznému poklesu obsahu enzymu.

U poruch ATPázy s mitochondriální dědičností se jedná o postižení podjednotek F_0a a méně často A6L, které ovlivňují funkci protonového kanálu F_0 -části, stabilitu celého ATPázového komplexu a interakci enzymu v suprakomplexových strukturách OXPHOS. Strukturální změny zapříčiněné missense mutacemi nebo mutacemi vedoucími ke snížení množství podjednotek F_0a nebo A6L se velmi zřídka projeví výraznými poklesy množství celého ATPázového komplexu. Biochemické a funkční dopady závisí na míře heteroplasmie dané mutace a většinou se demonstrují až při zastoupení více než 80-90%

množství (Obr. 16A). Analýza závislosti funkčních vlastností ATPázy, ADP-stimulované respirace a ATP syntetické aktivity, na heteroplazmii ukázala výrazný pokles také až při dosažení heteroplazmie přibližně 90% (obr. 16B, C). Tyto nálezy jasně ukazují na velmi podobné prahové hodnoty pro funkční dopady i změny obsahu, které jsou vzájemně korelovány na obrázku č. 16D a mají při tomto vyjádření lineární charakter. Energetická funkce celého OXPHOS systému a dostatečná schopnost tvorby ATP by proto mohly být proporcionálně závislé na dostupném obsahu podjednotek ATPázy (a v tomto případě i cytochrom *c* oxidázy) (Hejzlarova 2015 – příloha č. 17).



Obrázek 16 - (A) Závislost obsahu podjednotky F_0a ATPázy na heteroplazmii mutace *m.9205_9206del*. Podjednotka byla detekována pomocí specifické protilátky a obsah byl normován na porin. (B) Závislost tvorby ATP na heteroplazmii. Produkce ATP byla měřena s využitím luciferázy. (C) Závislost ADP-stimulované respirace na heteroplazmii. Měřeno oxygraficky a vyjádřeno jako oligomycin sensitive porce za využití sukcinátu jako substrátu. (D) Korelace produkce ATP a ADP-stimulované respirace na obsahu podjednotky F_0a ATPázy. Převzato z Hejzlarova 2015.

6.2. Mitochondriální membránový potenciál $\Delta\psi_m$ a tvorba ROS u ATPázových poruch

Při správné funkci respiračního řetězce vzniká protonový gradient na vnitřní mitochondriální membráně a je využíván při tvorbě ATP na ATPáze. Pokud dojde k poruše vedoucí ke zvýšení tohoto gradientu, dochází k hyperpolarizaci membrány, což má za následek zvýšenou tvorbu volných radikálů. Nárůst mitochondriálního membránového potenciálu ($\Delta\psi_m$) nad cca 130 mV je již spojován se zvýšenou tvorbou kyslíkových radikálů (Korshunov 1997). Zaměřili jsme se proto na analýzu $\Delta\psi_m$ u pacientů s poruchou ATPázy pomocí průtokové cytometrie s detekcí fluorescenčního signálu na vzorcích kožních fibroblastů permeabilizovaných digitoninem. U našich pacientů s mutacemi v genu *MTATP6* pro podjednotku F_0 ATPázy (m.8993T>G; m.9205_9206del) jsme prokázali signifikantně zvýšenou hodnotu $\Delta\psi_m$ a obdobné zvýšení $\Delta\psi_m$ jsme našli i u pacientů s jaderně podmíněnými poruchami ATPázy – přibližně o 20 mV a dosahoval tedy vyšších hodnot než 130 mV (Ješina 2007; Houštek 2004; Vojtíšková 2004; Pecinova 2010 – přílohy č. 16, 18-20).

Následně jsme ověřovali, zda nárůst $\Delta\psi_m$ způsobuje i zvýšenou tvorbu ROS, které jsme detekovali fluorometricky za použití sondy CM-H₂DCFDA (chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát). U pacientů nesoucích mutaci m.8993T>G byla již dříve zaznamenána zvýšená tvorba ROS (Mattiuzzi 2004; Houštek 2004; Geromel 2001). U našich pacientů s jaderně (mutace v genu *TMEM70*) i mitochondriálně (mutace m.9205_9206del v genu *MTATP6*) podmíněnými poruchami ATPázy jsme prokázali zvýšenou tvorbu ROS (přibližně 1,8-násobně). Po podání uncoupleru FCCP (Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone) došlo k poklesu ROS (FCCP citlivná porce byla 2xvyšší u pacientů), což potvrdilo mitochondriální původ detekovaných ROS. Nárůst tvorby ROS koreluje s vyšším $\Delta\psi_m$, dosahujícím hodnot přes 130 mV (Pecinova 2010; Ješina 2007 – přílohy č. 19-20); (Mráček 2006).

K zhodnocení antioxidačních procesů jsme studovali enzym mitochondriální superoxiddismutázu (MnSOD/SOD2). Její zvýšená aktivita byla pozorována u pacientů s jadernými poruchami ATPázy. Upregulace a zvýšený obsah MnSOD jsme detekovali u pacienta s ATPázovou poruchou (mutace m.9205_9206del v genu *MTATP6*) (Ješina 2007 – příloha č. 19). Další markerem antioxidačních dějů byl scavenger ROS, glutathion. U pacientů s poruchou ATPázy jsme prokázali jeho signifikantní snížení ve vzorcích kožních fibroblastů oproti kontrolním vzorkům (Pecinova 2010 – příloha č.20).

6.3. Oxidativní stres, dysfunkční změny ATPázy a OXPHOS u epilepsii

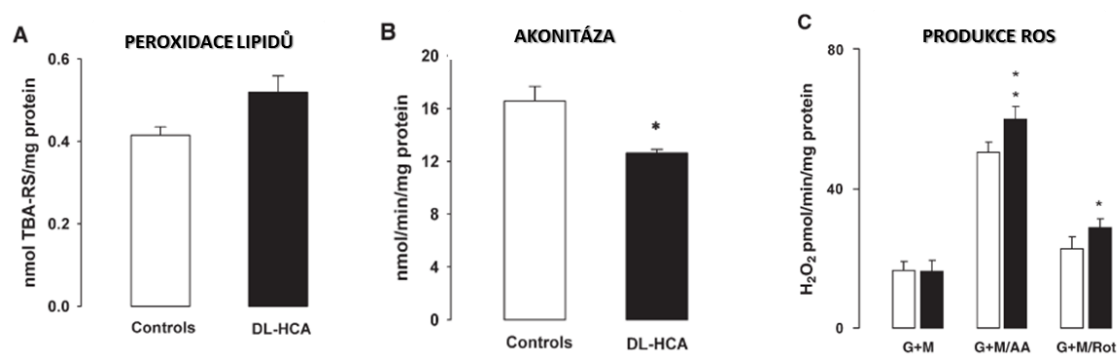
Volné radikály a oxidativní stres s následnou mitochondriální dysfunkcí jsou zapojeny do patogeneze mnoha neurologických nemocí, včetně epilepsie (Patel 2004). U mitochondriálních poruch ATPázy jsme prokázali zvýšenou tvorbu ROS, a proto jsme studovali ovlivnění ATPázy a celého OXPHOS u epilepsie. Ke studii mitochondriálního energetického metabolismu jsme použili čtyři různé zvířecí modely epileptogeneze, kdy jsme generalizované tonicko-klonické křeče indukovali intracerebroventrikulárně aplikovanými látkami (DL-homocysteovou kyselinou, pilokarpinem, kainátem nebo 4-aminopyridinem). V rámci analýzy celého OXPHOS systému, kde jsme prokázali signifikantní snížení aktivity komplexu I beze změny jeho obsahu, jsme analyzovali i mitochondriální ATPázu. Funkční studie ADP-stimulované respirace a poměr respirační kontroly, které odráží spřažení respirace s tvorbou ATP, neprokázaly odchylky od kontrol. S využitím elektroforetických a Westernblot analýz nebyly zaznamenány změny množství a/nebo složení ATPázy. Nepozorovali jsme ani změny množství produkovaného ATP. V souhrnu lze konstatovat, že u těchto epileptických modelů, s prokázanou inhibicí komplexu I, nedochází k ovlivnění energetického metabolismu tvorby ATP, ani ke strukturálním či funkčním změnám ATPázového komplexu (Folbergrová 2007; Folbergrová 2010; Folbergrová 2013 – přílohy č. 21-23).

Na těchto modelech epileptogeneze jsme vedle poruchy mitochondriálního energetického metabolismu analyzovali i oxidativní stres a antioxidační mechanismy. Ke studiu oxidativního stresu bylo použito několika nezávislých metod analýzy:

- markerů oxidativního stresu: peroxidace lipidů, aktivita akonitázy, tvorba 3-nitrotyrozinu, 4-hydroxynonenalu a karbonylovaných proteinů,
- tvorby ROS: markery produkce superoxidového aniontu a peroxidu vodíku,
- aktivit a množství antioxidačních enzymů: mitochondriální superoxiddismutázy (MnSOD/SOD2); cytosolární superoxiddismutázy (CuZnSOD/SOD1), glutationperoxidázy (GPX), glutationredukázy (GR) a katalázy.

Zvýšenou roli oxidativního stresu v patobiochemii poruch mitochondriálního energetického metabolismu jsme doložili všemi uvedenými metodami - zvýšenou peroxidací lipidů, vyšší tvorbou 3-nitrotyrozinu, 4-hydroxynonenalu a karbonylovaných proteinů, zvýšenou produkcí markerů tvorby superoxidového aniontu a peroxidu vodíku

spolu se sníženou aktivitou akonitázy (enzym citlivý na působení ROS) (obr.17). Analýzy hlavních antioxidačních enzymů ukázaly upregulaci superoxiddismutázy (aktivita i množství enzymu), ale aktivita katalázy a glutationperoxidázy zůstala nezměněná. Tato data naznačují, že oxidativní stres u zvířecích modelů s ovlivněním mitochondriální energetického mechanismu je způsoben nejenom zvýšenou tvorbou volných radikálů, ale i limitovanou antioxidační odpovědí (Folbergrová 2007; Folbergrová 2010; Folbergrová 2013; Folbergrová 2016 - přílohy č. 21-24).



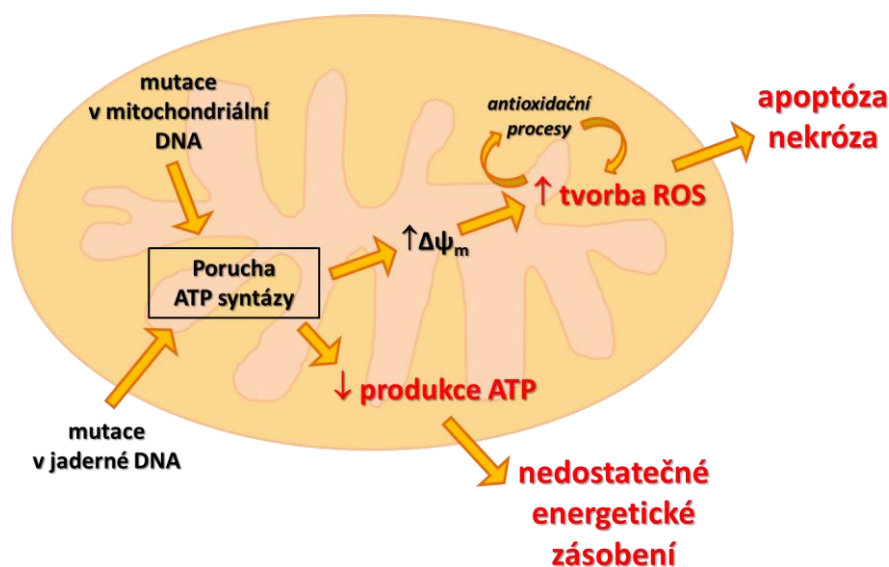
Obrázek 17 - (A) Peroxidace lipidů byla měřena v homogenátu mozkové tkáně jako množství thiobarbiturát reaktivní produktu (TBA-RS). Jedná se o průměr 6 nezávislých měření \pm S.D. $*P < 0,05$ ve srovnání s kontrolami. (B) Aktivita akonitázy byla měřena ve vzorcích izolovaných mitochondrií. Jedná se o průměr 3 nezávislých měření \pm S.D. $*P < 0,05$ ve srovnání s kontrolami. (C) Produkce ROS byla měřena jako tvorba H₂O₂ v rozmražených mitochondriích pomocí oxidace sondy AmpexUltraRed. Použity byly 10 mM glutamát + 3 mM malát (G+M); 1 μ g/ml antimycinu A (AA) a 1 μ M rotenon (Rot). Jedná se o průměr 3 nezávislých měření \pm S.D. $*P < 0,05$; $**P < 0,01$ ve srovnání s kontrolami. Převzato z Folbergrová 2007.

Různé antioxidanty byly využity na buňkách s ATPázovou poruchou (nesoucí patogenní mutaci m.8893T>G), které měly pozitivní efekt na snížení tvorby ROS, zlepšení viability buněk anebo tvorby ATP (Mattiazzi 2004; Geromel 2001). Na základě výše uvedených výsledků jsme se zaměřili na potenciální využití antioxidantů, scavengerů ROS a dalších látek k ovlivnění oxidačního stresu a snížení poškození mitochondriálního energetického metabolismu. Jeho změny jsme u těchto modelů studovali po aplikaci scavengeru volných radikálů Tempolu (mimetikum superoxiddismutázy a antioxidant oxidů dusíku), selektivního scavengeru peroxynitritu FeTPPS (5,10,15,20-tetrakis-(4-sulfonatofenyl) porfyrinát železitý), mimetika superoxiddismutázy MnTMPYP (1-methyl-4-pyridyl)porfyrin pentachlorid manganitý) a antioxidantu resveratrolu (3,5,4'-trihydroxy-transstilben). U všech výše uvedených látek jsme v našich studiích zaznamenali jak signifikantně menší inhibici komplexu I, tak i nižší tvorbu superoxidu. Látky měly tedy

jednoznačně protektivní efekt na mitochondriální energetický metabolismus a zabraňovaly vyšší produkci ROS (Folbergrová 2010; Folbergrová 2016; Folbergrová 2017 – přílohy č. 22, 24-25).

Závěr:

Poruchy ATPázy jsou způsobeny mutacemi v jaderných i mitochondriálních genech. Jaderně podmíněné defekty vedou k tzv. „kvantitativním“ změnám, kdy je přítomno snížené množství funkční ATPázového komplexu. Naopak mitochondriálně podmíněné defekty způsobují tzv. „kvalitativní“ poruchy, kdy je ATPázový komplex zastoupen v dostatečném množství, avšak nekompletní a většinou ztratil svoji ATP syntetickou a/nebo hydrolytickou aktivitu v závislosti na typu mutace. Nezávisle na skutečnosti, zda je snížené množství normálně fungujícího enzymu nebo normální množství ale poškozeného enzymu, dochází ke snížení funkce tvorby ATP. V případě mitochondriálně podmíněných poruch hraje výraznou roli hladina heteroplazmie pro dané mutace a jejich prahový efekt. Zvýšení mitochondriálního membránového potenciálu $\Delta\psi_m$ je pozorováno u obou typů ATPázových poruch a stejně tak i zvýšená tvorba volných radikálů a následná aktivace antioxidantních enzymů (např. mitochondriální superoxidodismutázy). Snížení energetického zásobení tkání a zvýšený oxidativní stres představují nejvýznamnější komponenty patobiochemických procesů u mitochondriálních onemocnění způsobených ATPázovými defekty, které mohou být doprovázeny nekrotickými a apoptotickými procesy (obrázek č. 18).



Obrázek 18 – Patobiochemické procesy u poruch ATPázy. ROS – reaktivní formy kyslíku, $\Delta\psi_m$ mitochondriální membránový potenciál. Převzato z Houštěk 2004.

Zvýšený oxidativní stres hraje výraznou roli v patogenezi mitochondriálních onemocnění včetně defektů komplexu I, ale také v patobiochemických procesech u poruch ATPázy. Na základě našich výsledků lze tedy u poruch mitochondriálního energetického metabolismu včetně poruch ATPázy cílit léčbu na snížení oxidativního stresu.

7. Shrnutí

Díky intenzivnímu výzkumu došlo během poslední dekády k výraznému rozšíření poznatků o mitochondriální ATPáze. Byly popsány první mutace v genech pro strukturální podjednotky, nově byl objeven asemblační protein Tmem70 a popsáno více než 40 nových pacientů s různými patogenními mutacemi. Byly objasněny patobiochemické procesy spojené s energetickou deprivací a zvýšeným oxidativním stresem u poruch ATPázy. Ačkoliv současná medicína zatím nezná účinnou léčbu poruch ATPázy, tak včasná diagnostika a následné genetické poradenství představuje výrazný lékařský přínos pro pacienty a postižené rodiny.

8. Literatura

- ABU-AMERO KK, BOSLEY TM. Mitochondrial abnormalities in patients with LHON-like optic neuropathies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 Oct;47(10):4211-20.
- AKAGI M, INUI K, TSUKAMOTO H, SAKAI N, MURAMATSU T, YAMADA M, MATSUZAKI K, GOTO Y, NONAKA I, OKADA S. A point mutation of mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh syndrome. *Neuromuscul Disord.* 2002 Jan;12(1):53-5.
- AURÉ K, DUBOURG O, JARDEL C, CLARYSSE L, STERNBERG D, FOURNIER E, LAFORÊT P, STREICHENBERGER N, PETIOT P, GERVAIS-BERNARD H, VIAL C, BEDAT-MILLET AL, DROUIN-GARRAUD V, BOUILLAUD F, VANDIER C, FONTAINE B, LOMBÈS A. Episodic weakness due to mitochondrial DNA MT-ATP6/8 mutations. *Neurology.* 2013 Nov 19;81(21):1810-8.
- BARACCA A, SGARBI G, MATTIAZZI M, CASALENA G, PAGNOTTA E, VALENTINO ML, MOGGIO M, LENZA G, CARELLI V, SOLAINI G. Biochemical phenotypes associated with the mitochondrial ATP6 gene mutations at nt8993. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Jul;1767(7):913-9.
- BINDOFF LA, ENGELSEN BA. Mitochondrial diseases and epilepsy. *Epilepsia.* 2012;53Suppl4:92-7. Review.
- BLANCO-GRAU A, BONAVENTURA-IBARS I, COLL-CANTÍ J, MELIÀ MJ, MARTINEZ R, MARTÍNEZ-GALLO M, ANDREU AL, PINÓS T, GARCÍA-ARUMÍ E. Identification and biochemical characterization of the novel mutation m.8839G>C in the mitochondrial ATP6 gene associated with NARP syndrome. *Genes Brain Behav.* 2013 Nov;12(8):812-20.
- BOULET L, KARPATI G, SHOUBRIDGE EA. Distribution and threshold expression of the tRNA(Lys) mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet.* 1992 Dec;51(6):1187-200.
- BOURGERON T, RUSTIN P, CHRETIEN D, BIRCH-MACHIN M, BOURGEOIS M, VIEGAS-PÉQUIGNOT E, MUNNICH A, RÖTIG A. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet.* 1995 Oct;11(2):144-9.
- BURRAGE LC, TANG S, WANG J, DONTI TR, WALKIEWICZ M, LUCHAK JM, CHEN LC, SCHMITT ES, NIU Z, ERANA R, HUNTER JV, GRAHAM BH, WONG LJ, SCAGLIA F. Mitochondrial myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia (MLASA) plus associated with a novel de novo mutation (m.8969G>A) in the mitochondrial encoded ATP6 gene. *Mol Genet Metab.* 2014 Nov;113(3):207-12.
- CAMPOS Y, MARTÍN MA, RUBIO JC, GUTIÉRREZ DEL OLMO MC, CABELLO A, ARENAS J. Bilateral striatal necrosis and MELAS associated with a new T3308C mutation in the mitochondrial ND1 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Sep 18;238(2):323-5.
- CAPALDI RA. The changing face of mitochondrial research. *Trends Biochem Sci.* 2000 May;25(5):212-4.
- CARROZZO R, TESSA A, VÁZQUEZ-MEMIJE ME, PIEMONTE F, PATRONO C, MALANDRINI A, DIONISI-VICI C, VILARINHO L, VILLANOVA M, SCHÄGGER H, FEDERICO A, BERTINI E, SANTORELLI FM. The T9176G mtDNA mutation severely affects ATP production and results in Leigh syndrome. *Neurology.* 2001 Mar 13;56(5):687-90.
- CASTAGNA AE, ADDIS J, MCINNES RR, CLARKE JT, ASHBY P, BLASER S, ROBINSON BH. Late onset Leigh syndrome and ataxia due to a T to C mutation at bp 9,185 of mitochondrial DNA. *Am J Med Genet A.* 2007 Apr 15;143A(8):808-16.
- CÍZKOVÁ A, STRÁNECKÝ V, MAYR JA, TESAROVÁ M, HAVLÍCKOVÁ V, PAUL J, IVÁNEK R, KUSS AW, HANSÍKOVÁ H, KAPLANOVÁ V, VRBACKÝ M, HARTMANNOVÁ H, NOSKOVÁ L, HONZÍK T, DRAHOTA Z, MAGNER M, HEJZLAROVÁ K, SPERL W, ZEMAN J, HOUSTEK J, KMOCH S. TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalomyopathy. *Nat Genet.* 2008 Nov;40(11):1288-90.
- CLARK KM, TAYLOR RW, JOHNSON MA, CHINNERY PF, CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS ZM, ANDREWS RM, NELSON IP, WOOD NW, LAMONT PJ, HANNA MG, LIGHTOWLERS RN, TURNBULL DM. An mtDNA mutation in the initiation codon of the cytochrome C oxidase subunit II gene results in lower levels of the protein and a mitochondrial encephalomyopathy. *Am J Hum Genet.* 1999 May;64(5):1330-9.
- COPELAND WC. Defects in mitochondrial DNA replication and human disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2012 Jan-Feb;47(1):64-74. Review.
- DE MEIRLEIR L, SENECA S, LISSENS W, SCHOENTJES E, DESPRECHINS B. Bilateral striatal necrosis with a novel point mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene. *Pediatr Neurol.* 1995 Oct;13(3):242-6.
- DE MEIRLEIR L, SENECA S, LISSENS W, DE CLERCQ I, EYSKENS F, GERLO E, SMET J, VAN COSTER R. Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12. *J Med Genet.* 2004 Feb;41(2):120-4.

- DE VRIES MC, RODENBURG RJ, MORAVA E, LAMMENS M, VAN DEN HEUVEL LP, KORENKE GC, SMEITINK JA. Normal biochemical analysis of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system in a child with POLG mutations: a cautionary note. *J Inherit Metab Dis*. 2008 Dec;31 Suppl 2:S299-302. doi: 10.1007/s10545-008-0871-4.
- DE VRIES MC, RODENBURG RJ, MORAVA E, VAN KAAUWEN EP, TER LAAK H, MULLAART RA, SNOECK IN, VAN HASSELT PM, HARDING P, VAN DEN HEUVEL LP, SMEITINK JA. Multiple oxidative phosphorylation deficiencies in severe childhood multi-system disorders due to polymerase gamma (POLG1) mutations. *Eur J Pediatr*. 2007 Mar;166(3):229-34.
- DIMAURO S. The many faces of mitochondrial diseases. *Mitochondrion*. 2004 Sep;4(5-6):799-807.
- DIMAURO S. A history of mitochondrial diseases. *J Inherit Metab Dis*. 2011 Apr;34(2):261-76.
- DIMAURO S, SCHON EA, CARELLI V, HIRANO M. The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nat Rev Neurol*. 2013 Aug;9(8):429-44.
- DIODATO D, GHEZZI D, TIRANTI V. The Mitochondrial Aminoacyl tRNA Synthetases: Genes and Syndromes. *Int J Cell Biol*. 2014;2014:787956.
- DUBOT A, GODINOT C, DUMUR V, SABLONNIÈRE B, STOJKOVIC T, CUISSET JM, VOJTISKOVA A, PECINA P, JESINA P, HOUSTEK J. GUG is an efficient initiation codon to translate the human mitochondrial ATP6 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jan 16;313(3):687-93.
- DUNO M, WIBRAND F, BAGGESEN K, ROSENBERG T, KJAER N, FREDERIKSEN AL. A novel mitochondrial mutation m.8989G>C associated with neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa - the NARP syndrome. *Gene*. 2013 Feb 25;515(2):372-5
- FELHI R, MKAOUAR-REBAI E, SFAIHI-BEN MANSOUR L, ALILA-FERSI O, TABEBI M, BEN RHOUMA B, AMMAR M, KESKES L, HACHICHA M, FAKHFAKH F. Mutational analysis in patients with neuromuscular disorders: Detection of mitochondrial deletion and double mutations in the MT-ATP6 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Apr 22;473(1):61-6.
- FERNÁNDEZ-SILVA P, ENRIQUEZ JA, MONTOYA J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol*. 2003 Jan;88(1):41-56. Review.
- FOLBERGROVÁ J, JESINA P, DRAHOTA Z, LISÝ V, HAUGVICOVÁ R, VOJTÍSKOVÁ A, HOUSTĚK J. Mitochondrial complex I inhibition in cerebral cortex of immature rats following homocysteic acid-induced seizures. *Exp Neurol*. 2007 Apr;204(2):597-609.
- FOLBERGROVÁ J, JESINA P, HAUGVICOVÁ R, LISÝ V, HOUSTEK J. Sustained deficiency of mitochondrial complex I activity during long periods of survival after seizures induced in immature rats by homocysteic acid. *Neurochem Int*. 2010 Feb;56(3):394-403.
- FOLBERGROVÁ J, JEŠINA P, NŮSKOVÁ H, HOUSTĚK J. Antioxidant enzymes in cerebral cortex of immature rats following experimentally-induced seizures: upregulation of mitochondrial MnSOD (SOD2). *Int J Dev Neurosci*. 2013 Apr;31(2):123-30.
- FOLBERGROVÁ J, JEŠINA P, KUBOVÁ H, DRUGA R, OTÁHAL J. Status Epilepticus in Immature Rats Is Associated with Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. *Front Cell Neurosci*. 2016; 26;10:136.
- FOLBERGROVÁ J, OTÁHAL J, DRUGA R. Brain superoxide anion formation in immature rats during seizures: protection by selected compounds. *Exp Neurol*. 2012 Jan;233(1):421-9.
- FOLBERGROVÁ J, KUNZ W. Mitochondrial dysfunction in epilepsy. *Mitochondrion*. 2012 Jan;12(1):35-40.
- FORNUSKOVA D, BRANTOVA O, TESAROVA M, STIBUREK L, HONZIK T, WENCHICH L, TIETZEOVA E, HANSIKOVA H, ZEMAN J. The impact of mitochondrial tRNA mutations on the amount of ATP synthase differs in the brain compared to other tissues. *Biochim Biophys Acta*. 2008 May;1782(5):317-25.
- FRANTSEVA MV, VELAZQUEZ JL, HWANG PA, CARLEN PL. Free radical production correlates with cell death in an in vitro model of epilepsy. *Eur J Neurosci*. 2000 Apr;12(4):1431-9.
- GEROMEL V, KADHOM N, CEBALOS-PICOT I, OUARI O, POLIDORI A, MUNNICH A, RÖTIG A, RUSTIN P. Superoxide-induced massive apoptosis in cultured skin fibroblasts harboring the neurogenic ataxia retinitis pigmentosa (NARP) mutation in the ATPase-6 gene of the mitochondrial DNA. *Hum Mol Genet*. 2001 May 15;10(11):1221-8.
- HAVLÍCKOVÁ V, KAPLANOVÁ V, NŮSKOVÁ H, DRAHOTA Z, HOUSTEK J. Knockdown of F₁ epsilon subunit decreases mitochondrial content of ATP synthase and leads to accumulation of subunit c. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jun-Jul;1797(6-7):1124-9.
- HEJZLAROVÁ K, TESAŘOVÁ M, VRBACKÁ-ČÍŽKOVÁ A, VRBACKÝ M, HARTMANNOVÁ H, KAPLANOVÁ V, NOSKOVÁ L, KRATOCHVÍLOVÁ H, BUZKOVÁ J, HAVLÍČKOVÁ V, ZEMAN J, KMOCH S, HOUSTĚK J. Expression and processing of the TMEM70 protein. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jan;1807(1):144-9.
- HEJZLAROVÁ K, MRÁČEK T, VRBACKÝ M, KAPLANOVÁ V, KARBANOVÁ V, NŮSKOVÁ H, PECINA P, HOUSTĚK J. Nuclear genetic defects of mitochondrial ATP synthase. *Physiol Res*. 2014;63 Suppl 1:S57-71. Review.

- HOLME E, GRETER J, JACOBSON CE, LARSSON NG, LINDSTEDT S, NILSSON KO, OLDFORS A, TULINIUS M. Mitochondrial ATP-synthase deficiency in a child with 3-methylglutaconic aciduria. *Pediatr Res.* 1992 Dec;32(6):731-5.
- HOLT IJ, HARDING AE, PETTY RK, MORGAN-HUGHES JA. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet.* 1990 Mar;46(3):428-33.
- HONZIK T, TESAROVA M, VINSOVA K, HANSIKOVA H, MAGNER M, KRATOCHVILOVA H, ZAMECNIK J, ZEMAN J, JESINA P. Different laboratory and muscle biopsy findings in a family with an m.8851T>C mutation in the mitochondrial MTATP6 gene. *Mol Genet Metab.* 2013 Jan;108(1):102-5
- HONZÍK T, TESAROVÁ M, MAYR JA, HANSÍKOVÁ H, JESINA P, BODAMER O, KOCH J, MAGNER M, FREISINGER P, HUEMER M, KOSTKOVÁ O, VAN COSTER R, KMOCH S, HOUSTĚK J, SPERL W, ZEMAN J. Mitochondrial encephalocardio-myopathy with early neonatal onset due to TMEM70 mutation. *Arch Dis Child.* 2010 Apr;95(4):296-301.
- HONZIK, T., TESAROVA, M., MAGNER, M., MAYR, J., JESINA, P., VESELA, K., WENCHICH, L., SZENTIVANYI, K., HANSIKOVA, H., SPERL, W., ZEMAN, J. Neonatal onset of Mitochondrial disorders in 129 patients: Clinical and laboratory characteristics and a new approach to diagnosis (2012) *J Inher Met Dis*, 35 (5), 749-759.
- HONZÍK, T., TESAROVÁ, M., HANSÍKOVÁ, H., WENCHICH, L., VESELÁ, K., JEŠINA, P., MAGNER, M., ZEMAN, J. Clinical symptoms and laboratory data in 75 children with neonatal manifestation of mitochondrial disease: Proposed diagnostic algorithms [Klinické příznaky a laboratorní data u 75 dětí s neonatální manifestací mitochondriálního onemocnění: Návrh diagnostických algoritmů] (2010) *Cesko-Slovenska Pediatrie*, 65 (7-8), pp. 422-431.
- HORVATH R, HUDSON G, FERRARI G, FÜTTERER N, AHOLA S, LAMANTEA E, PROKISCH H, LOCHMÜLLER H, MCFARLAND R, RAMESH V, KLOPSTOCK T, FREISINGER P, SALVI F, MAYR JA, SANTER R, TESAROVA M, ZEMAN J, UDD B, TAYLOR RW, TURNBULL D, HANNA M, FIALHO D, SUOMALAINEN A, ZEVIANI M, CHINNERY PF. Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain.* 2006 Jul;129(Pt 7):1674-84.
- HOUSTĚK J, KLEMENT P, HERMANSKÁ J, HOUSTKOVÁ H, HANSÍKOVÁ H, VAN DEN BOGERT C, ZEMAN J. Altered properties of mitochondrial ATP-synthase in patients with a T->G mutation in the ATPase 6 (subunit a) gene at position 8993 of mtDNA. *Biochim Biophys Acta.* 1995 9;1271(2-3):349-57.
- HOUSTEK J, KLEMENT P, FLORYK D, ANTONICKÁ H, HERMANSKÁ J, KALOUS M, HANSÍKOVÁ H, HOUTKOVÁ H, CHOWDHURY SK, ROSIPAL T, KMOCH S, STRATILOVÁ L, ZEMAN J. A novel deficiency of mitochondrial ATPase of nuclear origin. *Hum Mol Genet.* 1999 Oct;8(11):1967-74.
- HOUSTEK J, MRÁČEK T, VOJTÍSKOVÁ A, ZEMAN J. Mitochondrial diseases and ATPase defects of nuclear origin. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Jul 23;1658(1-2):115-21. Review.
- HUNG PC, WANG HS. A previously undescribed leukodystrophy in Leigh syndrome associated with T9176C mutation of the mitochondrial ATPase 6 gene. *Dev Med Child Neurol.* 2007 Jan;49(1):65-7.
- JACKSON CB, HAHN D, SCHRÖTER B, RICHTER U, BATTERSBY BJ, SCHMITT-MECHELKE T, MARTTINEN P, NUOFFER JM, SCHALLER A. A novel mitochondrial ATP6 frameshift mutation causing isolated complex V deficiency, ataxia and encephalomyopathy. *Eur J Med Genet.* 2017 Jun;60(6):345-351.
- JAMES AM, WEI YH, PANG CY, MURPHY MP. Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations. *Biochem J.* 1996 Sep 1;318 (Pt 2):401-7.
- JAMES AM, SHEARD PW, WEI YH, MURPHY MP. Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations. *Eur J Biochem.* 1999 Jan;259(1-2):462-9.
- JESINA P, TESAROVÁ M, FORNŮSKOVÁ D, VOJTÍSKOVÁ A, PECINA P, KAPLANOVÁ V, HANSÍKOVÁ H, ZEMAN J, HOUSTEK J. Diminished synthesis of subunit a (ATP6) and altered function of ATP synthase and cytochrome c oxidase due to the mtDNA 2 bp microdeletion of TA at positions 9205 and 9206. *Biochem J.* 2004 Nov 1;383(Pt. 3):561-71.
- JEŠINA P. Biochemical and Functional Manifestations of Inherited Disorders of the Mitochondrial F₁F₀ ATP synthase. Praha 2007. Dizertační práce na 1.Lékařské fakultě Univerzity Karlovy.
- JESINA P., VOJTISKOVA A., KAPLANOVA V., HEJZLAROVA K., PECINA P., HOUSTKOVA H., HOUSTEK J. Microdeletion 9205 Delta TA in ATP6 gene of mitochondrial ATP synthase. *J Inher Met Dis*, Supplement; Volume: 30; pages: 74-74; 2007 Aug
- JONCKHEERE AI, HOGEVEEN M, NIJTMANS LG, VAN DEN BRAND MA, JANSSEN AJ, DIEPSTRA JH, VAN DEN BRANDT FC, VAN DEN HEUVEL LP, HOL FA, HOFSTE TG, KAPUSTA L, DILLMANN U, SHAMDEEN MG, SMEITINK JA, RODENBURG RJ. A novel mitochondrial ATP8 gene mutation in a patient with apical hypertrophic cardiomyopathy and neuropathy. *J Med Genet.* 2008 Mar;45(3):129-33.

- JONCKHEERE AI, SMEITINK JA, RODENBURG RJ. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis*. 2012 Mar;35(2):211-25. Review.
- JONCKHEERE AI, RENKEMA GH, BRAS M, VAN DEN HEUVEL LP, HOISCHEN A, GILISSEN C, NABUURS SB, HUYNEN MA, DE VRIES MC, SMEITINK JA, RODENBURG RJ. A complex V ATP5A1 defect causes fatal neonatal mitochondrial encephalopathy. *Brain*. 2013 May;136(Pt 5):1544-54.
- JONES DP. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. *Chem Biol Interact*. 2006 Oct 27;163(1-2):38-53.
- KANN O, KOVÁCS R. Mitochondria and neuronal activity. *Am J Physiol Cell*. 2007; 292(2):C641-57.
- KORSHUNOV SS, SKULACHEV VP, STARKOV AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*. 1997 Oct 13;416(1):15-8.
- KOVÁCS R, SCHUCHMANN S, GABRIEL S, KANN O, KARDOS J, HEINEMANN U. Free radical-mediated cell damage after experimental status epilepticus in hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol*. 2002 Dec;88(6):2909-18.
- KUCHARCZYK R, ZICK M, BIETENHADER M, RAK M, COUPLAN E, BLONDEL M, CAUBET SD, DI RAGO JP. Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jan;1793(1):186-99. Review.
- KUDIN AP, KUDINA TA, SEYFRIED J, VIELHABER S, BECK H, ELGER CE, KUNZ WS. Seizure-dependent modulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2002 Apr;15(7):1105-14.
- KUMAR M, TANWAR M, SAXENA R, SHARMA P, DADA R. Identification of novel mitochondrial mutations in Leber's hereditary optic neuropathy. *Mol Vis*. 2010 Apr 30;16:782-92.
- KUNZ WS, KUDIN AP, VIELHABER S, BLÜMCKE I, ZUSCHRATTER W, SCHRAMM J, BECK H, ELGER CE. Mitochondrial complex I deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*. 2000 Nov;48(5):766-73.
- KYTÖVUORI L, LIPPONEN J, RUSANEN H, KOMULAINEN T, MARTIKAINEN MH, MAJAMAA K. A novel mutation m.8561C>G in MT-ATP6/8 causing a mitochondrial syndrome with ataxia, peripheral neuropathy, diabetes mellitus, and hypergonadotropic hypogonadism. *J Neurol*. 2016;263(11):2188-2195.
- LAMMINEN T, MAJANDER A, JUVONEN V, WIKSTRÖM M, AULA P, NIKOSKELAINEN E, SAVONTOUS ML. A mitochondrial mutation at nt 9101 in the ATP synthase 6 gene associated with deficient oxidative phosphorylation in a family with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Am J Hum Genet*. 1995 May;56(5):1238-40.
- LEE YM, KANG HC, LEE JS, KIM SH, KIM EY, LEE SK, SLAMA A, KIM HD. Mitochondrial respiratory chain defects: underlying etiology in various epileptic conditions. *Epilepsia*. 2008 Apr;49(4):685-90.
- LEHNINGER AL, NELSON D, COX MM, Lehninger Principles of Biochemistry. Hard Cover edition 2000; W H Freeman & Co
- LIN MT, BEAL MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006 Oct 19;443(7113):787-95. Review.
- LÓPEZ-GALLARDO E, SOLANO A, HERRERO-MARTÍN MD, MARTÍNEZ-ROMERO I, CASTAÑO-PÉREZ MD, ANDREU AL, HERRERA A, LÓPEZ-PÉREZ MJ, RUIZ-PESINI E, MONTOYA J. NARP syndrome in a patient harbouring an insertion in the MT-ATP6 gene that results in a truncated protein. *J Med Genet*. 2009 Jan;46(1):64-7.
- LÓPEZ-GALLARDO E, EMPERADOR S, SOLANO A, LLOBET L, MARTÍN-NAVARRO A, LÓPEZ-PÉREZ MJ, BRIONES P, PINEDA M, ARTUCH R, BARRAQUER E, JERICÓ I, RUIZ-PESINI E, MONTOYA J. Expanding the clinical phenotypes of MT-ATP6 mutations. *Hum Mol Genet*. 2014 Dec 1;23(23):6191-200
- MAGNER M, DVORAKOVA V, TESAROVA M, MAZUROVA S, HANSIKOVA H, ZAHOREC M, BRENNEROVA K, BZDUCH V, SPIEGEL R, HOROVITZ Y, MANDEL H, EMINOĞLU FT, MAYR JA, KOCH J, MARTINELLI D, BERTINI E, KONSTANTOPOULOU V, SMET J, RAHMAN S, BROOMFIELD A, STOJANOVIĆ V, DIONISI-VICI C, VAN COSTER R, MORAVA E, SPERL W, ZEMAN J, HONZIK T. TMEM70 deficiency: long-term outcome of 48 patients. *J Inherit Metab Dis*. 2015 May;38(3):417-26.
- MAYR JA, HAVLÍCKOVÁ V, ZIMMERMANN F, MAGLER I, KAPLANOVÁ V, JESINA P, PECINOVÁ A, NUSKOVÁ H, KOCH J, SPERL W, HOUSTEK J. Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 epsilon subunit. *Hum Mol Genet*. 2010 1;19(17):3430-9.
- MAYR JA, PAUL J, PECINA P, KURNIK P, FÖRSTER H, FÖTSCHL U, SPERL W, HOUSTEK J. Reduced respiratory control with ADP and changed pattern of respiratory chain enzymes as a result of selective deficiency of the mitochondrial ATP synthase. *Pediatr Res*. 2004 Jun;55(6):988-94.
- MATTIAZZI M, VIJAYVERGIYA C, GAJEWSKI CD, DEVIVO DC, LENZA G, WIEDMANN M, MANFREDI G. The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. *Hum Mol Genet*. 2004 Apr 15;13(8):869-79.

- MEULEMANS A, SENECA S, PRIBYL T, SMET J, ALDERWEIRLDT V, WAEYTENS A, LISSENS W, VAN COSTER R, DE MEIRLEIR L, DI RAGO JP, GATTI DL, ACKERMAN SH. Defining the pathogenesis of the human Atp12p W94R mutation using a *Saccharomyces cerevisiae* yeast model. *J Biol Chem*. 2010 Feb 5;285(6):4099-109.
- MKAOUAR-REBAI E, KAMMOUN F, CHAMKHA I, KAMMOUN N, HSAIRI I, TRIKI C, FAKHFAKH F. A de novo mutation in the adenosine triphosphatase (ATPase) 8 gene in a patient with mitochondrial disorder. *J Child Neurol*. 2010 Jun;25(6):770-5.
- MOKRANJAC D, NEUPERT W. Protein import into mitochondria. *Biochem Soc Trans*. 2005 Nov;33(Pt 5):1019-23. Review.
- MÖLLERS M, MANIURA-WEBER K, KISELJAKOVIC E, BUST M, HAYRAPETYAN A, JAKSCH M, HELM M, WIESNER RJ, VON KLEIST-RETZOW JC. A new mechanism for mtDNA pathogenesis: impairment of post-transcriptional maturation leads to severe depletion of mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) caused by T7512C and G7497A point mutations. *Nucleic Acids Res*. 2005 Sep 30;33(17):5647-58.
- MOSLEMI AR, DARIN N, TULINIUS M, OLDFORS A, HOLME E. Two new mutations in the MTATP6 gene associated with Leigh syndrome. *Neuropediatrics*. 2005 Oct;36(5):314-8.
- MRÁČEK T, PECINA P, VOJTÍSKOVÁ A, KALOUS M, SEBESTA O, HOUSTEK J. Two components in pathogenic mechanism of mitochondrial ATPase deficiency: energy deprivation and ROS production. *Exp Gerontol*. 2006 Jul;41(7):683-7.
- MURPHY MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009 Jan 1;417(1):1-13.
- NOJI H, YASUDA R, YOSHIDA M, KINOSITA K JR. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature*. 1997 Mar 20;386(6622):299-302.
- OGILVIE I, CAPALDI RA. Mutation of the mitochondrially encoded ATPase 6 gene modeled in the ATP synthase of *Escherichia coli*. *FEBS Lett*. 1999 Jun 18;453(1-2):179-82.
- OSMAN C, WILMES C, TATSUTA T, LANGER T. Prohibitins interact genetically with Atp23, a novel processing peptidase and chaperone for the F1Fo-ATP synthase. *Mol Biol Cell*. 2007 Feb;18(2):627-35.
- PATEL M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med*. 2004 Dec 15;37(12):1951-62.
- PECINOVA A., MRACEK T., PECINA P., JEŠINA P., KALOUS M., HOUŠTĚK J. Increased oxidative stress in fibroblasts from patients with ATP synthase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. Volume 1797, Supplement, July 2010, Page 53
- PERUCCA-LOSTANLEN D, NARBONNE H, HERNANDEZ JB, STACCINI P, SAUNIERES A, PAQUIS-FLUCKLINGER V, VIALETES B, DESNUELLE C. Mitochondrial DNA variations in patients with maternally inherited diabetes and deafness syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 2;277(3):771-5.
- PITCEATHLY RD, MURPHY SM, COTTENIE E, CHALASANI A, SWEENEY MG, WOODWARD C, MUDANOHWO EE, HARGREAVES I, HEALES S, LAND J, HOLTON JL, HOULDEN H, BLAKE J, CHAMPION M, FLINTER F, ROBB SA, PAGE R, ROSE M, PALACE J, CROWE C, LONGMAN C, LUNN MP, RAHMAN S, REILLY MM, HANNA MG. Genetic dysfunction of MT-ATP6 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology*. 2012 Sep 11;79(11):1145-54.
- PULKES T, LIOLITSA D, EUNSON LH, ROSE M, NELSON IP, RAHMAN S, POULTON J, MARCHINGTON DR, LANDON DN, DEBONO AG, MORGAN-HUGHES JA, HANNA MG. New phenotypic diversity associated with the mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) gene mutation. *Neuromuscul Disord*. 2005 May;15(5):364-71.
- RAK M, ZENG X, BRIÈRE JJ, TZAGOLOFF A. Assembly of F0 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jan;1793(1):108-16. Review.
- RONCHI D, BORDONI A, COSI A, RIZZUTI M, FASSONE E, DI FONZO A, SERVIDA M, SCIACCO M, COLLOTTA M, RONZONI M, LUCCHINI V, MATTIOLI M, MOGGIO M, BRESOLIN N, CORTI S, COMI GP. Unusual adult-onset Leigh syndrome presentation due to the mitochondrial m.9176T>C mutation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Aug 26;412(2):245-8.
- ROSSIGNOL R, MALGAT M, MAZAT JP, LETELLIER T. Threshold effect and tissue specificity. Implication for mitochondrial cytopathies. *J Biol Chem*. 1999 Nov 19;274(47):33426-32
- ROSSIGNOL R, FAUSTIN B, ROCHER C, MALGAT M, MAZAT JP, LETELLIER T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J*. 2003 Mar 15;370(Pt 3):751-62. Review.
- ROWLEY S, PATEL M. Mitochondrial involvement and oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Free Radic Biol Med*. 2013 Sep;62:121-31.
- RUBIO-GOZALBO ME, DIJKMAN KP, VAN DEN HEUVEL LP, SENGERS RC, WENDEL U, SMEITINK JA. Clinical differences in patients with mitochondriocytopathies due to nuclear versus mitochondrial DNA mutations. *Hum Mutat*. 2000;15(6):522-32.
- RYAN K, BACKOS DS, REIGAN P, PATEL M. Post-translational oxidative modification and inactivation of mitochondrial complex I in epileptogenesis. *J Neurosci*. 2012 Aug 15;32(33):11250-8.

- RYAN K, LIANG LP, RIVARD C, PATEL M. Temporal and spatial increase of reactive nitrogen species in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2014 Apr;64:8-15.
- SAYRE LM, PERRY G, SMITH MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol.* 2008 Jan;21(1):172-88.
- SCHALLER A, HAHN D, JACKSON CB, KERN I, CHARDOT C, BELLI DC, GALLATI S, NUOFFER JM. Molecular and biochemical characterisation of a novel mutation in POLG associated with Alpers syndrome. *BMC Neurol.* 2011 Jan 14;11:4. doi: 10.1186/1471-2377-11-4.
- SCHINDER AF, OLSON EC, SPITZER NC, MONTAL M. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci.* 1996 Oct 1;16(19):6125-33.
- SENA LA, CHANDEL NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell.* 2012 Oct 26;48(2):158-67.
- SGARBI G, BARACCA A, LENZA G, VALENTINO LM, CARELLI V, SOLAINI G. Inefficient coupling between proton transport and ATP synthesis may be the pathogenic mechanism for NARP and Leigh syndrome resulting from the T8993G mutation in mtDNA. *Biochem J.* 2006 May 1;395(3):493-500.
- SHOUBRIDGE EA. Nuclear genetic defects of oxidative phosphorylation. *Hum Mol Genet.* 2001 Oct 1;10(20):2277-84. Review.
- SHOUBRIDGE EA. Nuclear gene defects in respiratory chain disorders. *Semin Neurol.* 2001;21(3):261-7.
- SIKORSKA M, SANDHU JK, SIMON DK, PATHIRAJA V, SODJA C, LI Y, RIBECCO-LUTKIEWICZ M, LANTHIER P, BOROWY-BOROWSKI H, UPTON A, RAHA S, PULST SM, TARNOPOLSKY MA. Identification of ataxia-associated mtDNA mutations (m.4052T>C and m.9035T>C) and evaluation of their pathogenicity in transmitochondrial cybrids. *Muscle Nerve.* 2009 Sep;40(3):381-94.
- SPERL W, JESINA P, ZEMAN J, MAYR JA, DEMEIRLEIR L, VANCOSTER R, PÍCKOVÁ A, HANSÍKOVÁ H, HOUST'KOVÁ H, KREJCÍK Z, KOCH J, SMET J, MUSS W, HOLME E, HOUSTEK J. Deficiency of mitochondrial ATP synthase of nuclear genetic origin. *Neuromuscul Disord.* 2006 Dec;16(12):821-9.
- SYNOFZIK M, SCHICKS J, WILHELM C, BORNEMANN A, SCHÖLS L. Charcot-Marie-Tooth hereditary neuropathy due to a mitochondrial ATP6 mutation. *Eur J Neurol.* 2012 Oct;19(10):e114-6.
- TANG S, WANG J, ZHANG VW, LI FY, LANDSVERK M, CUI H, TRUONG CK, WANG G, CHEN LC, GRAHAM B, SCAGLIA F, SCHMITT ES, CRAIGEN WJ, WONG LJ. Transition to next generation analysis of the whole mitochondrial genome: a summary of molecular defects. *Hum Mutat.* 2013 Jun;34(6):882-93.
- TANSEL T, PAÇAL F, USTEK D. A novel ATP8 gene mutation in an infant with tetralogy of Fallot. *Cardiol Young.* 2014 Jun;24(3):531-3.
- TESAROVA M, MAYR JA, WENCHICH L, HANSIKOVA H, ELLEDER M, BLAHOVA K, SPERL W, ZEMAN J. Mitochondrial DNA depletion in Alpers syndrome. *Neuropediatrics.* 2004 Aug;35(4):217-23.
- THYAGARAJAN D, SHANSKE S, VAZQUEZ-MEMIJÉ M, DE VIVO D, DIMAURO S. A novel mitochondrial ATPase 6 point mutation in familial bilateral striatal necrosis. *Ann Neurol.* 1995 Sep;38(3):468-72.
- TSAI JD, LIU CS, TSAO TF, SHEU JN. A novel mitochondrial DNA 8597T>C mutation of Leigh syndrome: report of one case. *Pediatr Neonatol.* 2012 Feb;53(1):60-2.
- VERNY C, GUEGEN N, DESQUIRET V, CHEVROLLIER A, PRUNDEAN A, DUBAS F, CASSEREAU J, FERRE M, AMATI-BONNEAU P, BONNEAU D, REYNIER P, PROCACCIO V. Hereditary spastic paraplegia-like disorder due to a mitochondrial ATP6 gene point mutation. *Mitochondrion.* 2011 Jan;11(1):70-5.
- WALDBAUM S, PATEL M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2010 Jan;88(1):23-45.
- WALKER JE. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem Soc Trans.* 2013 Feb 1;41(1):1-16. Review.
- WANG ZG, WHITE PS, ACKERMAN SH. Atp11p and Atp12p are assembly factors for the F(1)-ATPase in human mitochondria. *J Biol Chem.* 2001 Aug 17;276(33):30773-8.
- WARE SM, EL-HASSAN N, KAHLER SG, ZHANG Q, MA YW, MILLER E, WONG B, SPICER RL, CRAIGEN WJ, KOZEL BA, GRANGE DK, WONG LJ. Infantile cardiomyopathy caused by a mutation in the overlapping region of mitochondrial ATPase 6 and 8 genes. *J Med Genet.* 2009 May;46(5):308-14.
- WEN S, NIEDZWIECKA K, ZHAO W, XU S, LIANG S, ZHU X, XIE H, TRIBOUILLARD-TANVIER D, GIRAUD MF, ZENG C, DAUTANT A, KUCHARCZYK R, LIU Z, DI RAGO JP, CHEN H. Identification of G8969>A in mitochondrial ATP6 gene that severely compromises ATP synthase function in a patient with IgA nephropathy. *Sci Rep.* 2016 Nov 4;6:36313.
- WITTIG I, MEYER B, HEIDE H, STEGER M, BLEIER L, WUMAIER Z, KARAS M, SCHÄGGER H. Assembly and oligomerization of human ATP synthase lacking mitochondrial subunits a and A6L. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jun-Jul;1797(6-7):1004-11.

9. Použité zkratky

ADP	adenosindisfosfát
ALT	alaninaminotransferázu
ANT	ADP/ATP transportér
AST	aspartátaminoatransferáza
ATP	adenosintrifosfát
<i>ATPAF2</i>	gen pro asemblační protein Atp2p
<i>ATP5E</i>	gen pro strukturální podjednotku F ₁ ε
<i>ATP5A1</i>	gen pro podjednotku F ₁ α
Atp11p	asemblační protein pro ATPázu
Atp12p	asemblační protein pro ATPázu
CK	kreatinkinázy
CM- H ₂ DCFDA	chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát
CNS	centrální nervová soustava
COX	cytochrom <i>c</i> oxidáza
CuZnSOD/SOD1	cytosolární superoxiddismutáza
DAPIT	membránový protein - Diabetes-Associated Protein in Insulin-sensitive Tissue)
DGUOK	deoxyguanosinkináza
FADH ₂	flavinadenindinukleotid
FCCP	carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FeTPPS	5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyl)porfyrinát železitý
GPX	glutathionperoxidáza
GR	glutathionreduktáza
LHON	Leberovy hereditární neuropatie optiku
MELAS	Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes
MERRF	Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red Fibers
MILS	maternálně děděný Leigh syndrom
MLASA	Mitochondriální myopatie, laktátová acidóza, sideroblastická anémie
mGPDH	mitochondriální glycerolfosfátdehydrogenáza
MNGIE	mitochondriální neurogastrointestinální encefalomyopatie
MnSOD/SOD2	mitochondriální superoxiddismutáza
MnTMPYP	1-methyl-4-pyridyl-porfyrin pentachlorid manganitý
<i>MTATP6</i>	gen pro podjednotku F ₀ a ATPázy
<i>MTATP8</i>	gen pro podjednotku A6L ATPázy
mtDNA	mitochondriální DNA
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NARP	neuropatie, ataxie a retinitis pigmentosa
NGS	sekvenování nové generace
NMR	nukleární magnetická rezonance

OSCP	oligomycin sensitivity-conferring protein
OXPHOS	system oxidativní fosforylace
PAGE	polyakrilamidová gelová elektroforéza (BN – BlueNative; SDS – sodium dodecylsulphate)
PCR	polymerázová řetězová reakce
POLG	mitochondriální polymeráza γ
ROS	reaktivní formy kyslíku
RNS	reaktivní formy dusíku
RRF	ragged red fibres
SDH	sukcinátdehydrogenáza
TIM	translokáza vnitřní membrány
TK2	tymidinkináza 2
Tmem70	asemblační protein pro ATPázu
TOM	translokáza vnější membrány
TYMP	tymidinfosforyláza
$\Delta\mu_H^+$	elektrochemický potenciál protonového gradientu
$\Delta\Psi_m$	mitochondriální membránový potenciál

10. Přílohy – vlastní publikace s problematikou poruch

ATPázy a mitochondriálních nemocí

1. **Ješina P.**, Tesařová M., Fornůsková D., Vojtíšková A., Pecina P., Kaplanová V., Hansíková H., Zeman J., Houštěk J. Diminished synthesis of subunit a (ATP6) and altered function of ATP synthase and cytochrome c oxidase due to the mtDNA 2 bp microdeletion of TA at positions 9205 and 9206 (2004) *Biochem J*, 383 (3), 561-571. (IF = 4,278) (SCI - 38)
2. Honzík T., Tesarova M., Vinsova K., Hansikova H., Magner M., Kratochvilova H., Zamecnik J., Zeman J., **Ješina P.** * Different laboratory and muscle biopsy findings in a family with an m.8851T>C mutation in the mitochondrial MTATP6 gene (2013) *Molecular Genetics and Metabolism*, 108 (1), 102-105. (IF = 2,834) (SCI - 2)
* - autor je korespondujícím autorem publikace
3. **Ješina P.**, Vinšová K., Brantová O., Tesařová M., Hájková Z., Hansíková H., Wenchich L., Honzík T., Magner M., Zámečník J., Ryška P., Zeman J. Myoclonic epilepsy and deafness in sibilings with the 7512T>C mutation in the mitochondrial encoded tRNASer(UCN) gene - Case reports [Myoklonická epilepsie a hluchota u sourozenců s mutací 7512T>C v genu pro mitochondriální tRNASer(UCN) - Kazuistiky] (2010) *Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie*, 73 (1), 68-72. (IF = 0,393) (SCI - 1)
4. Honzík T., Tesarova M., Magner M., Mayr J., **Ješina P.**, Vesela K., Wenchich L., Szentivanyi K., Hansikova H., Sperl W., Zeman J. Neonatal onset of Mitochondrial disorders in 129 patients: Clinical and laboratory characteristics and a new approach to diagnosis (2012) *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35 (5), 749-759. (IF = 4,070) (SCI - 20)
5. Sperl W., **Ješina P.**, Zeman J., Mayr J.A., DeMeirleir L., VanCoster R., Pícková A., Hansíková H., Houšť'ková H., Krejčík Z., Koch J., Smet J., Muss W., Holme E., Houštěk J. Deficiency of mitochondrial ATP synthase of nuclear genetic origin (2006) *Neuromuscular Disorders*, 16 (12), 821-829. (IF = 4,302) (SCI - 43)
6. Honzík T., Tesařová M., Mayr J.A., Hansíková H., **Ješina P.**, Bodamer O., Koch J., Magner M., Freisinger P., Huemer M., Kostková O., Van Coster R., Kmocho S., Houštěk J., Sperl W., Zeman J. Mitochondrial encephalocardio-myopathy with early neonatal onset due to TMEM70 mutation (2010) *Archives of Disease in Childhood*, 95 (4), 296-301. (IF = 2,616) (SCI - 38)
7. **P.Ješina**, T.Honzík, M.Tesařová, H.Hansíková, M.Magner, L.Wenchich, M.Elleder, J.Zeman: Liver Impairment in patients with Alpers-Huttenlocher Syndrome; Abstract Book – APS 2011 – 25.Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft fur Padiatrische Stoffwechselstorungen 9.-11.3.2011, Fulda, Německo
8. Mayr J.A., Havlíčková V., Zimmermann F., Magler I., Kaplanová V., **Ješina P.**, Pecinová A., Nůsková H., Koch J., Sperl W., Houštěk J. Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 ε subunit (2010) *Human Molecular Genetics*, 19 (17), art. no. ddq254, 3430-3439. (IF = 8,058) (SCI - 42)
9. Honzík T., Tesařová M., Hansíková H., Wenchich L., Veselá K., **Ješina P.**, Magner M., Zeman J. Clinical symptoms and laboratory data in 75 children with neonatal

- manifestation of mitochondrial disease: Proposed diagnostic algorithms [Klinické příznaky a laboratorní data u 75 dětí s neonatální manifestací mitochondriálního onemocnění: Návrh diagnostických algoritmů] (2010) *Cesko-Slovenska Peditrie*, 65 (7-8), pp. 422-431. (*SCI - 3*)
10. Magner M., **Ješina P.**, Klement P., Lorenčík D., Vobruba V., Zeman J., Honzík T. Importance of early diagnostics of inherited metabolic disorders in neonatal age [Význam časně diagnostiky dědičných metabolických poruch s manifestací v novorozeneckém věku] (2013) *Cesko-Slovenska Peditrie*, 68 (1), pp. 3-11. (*SCI - 1*)
 11. Magner, M., Szentiványi, K., Švandová, I., **Ješina, P.**, Tesařová, M., Honzík, T., Zeman, J. Elevated CSF-lactate is a reliable marker of mitochondrial disorders in children even after brief seizures (2011) *European Journal of Paediatric Neurology*, 15 (2), 101-108. (*IF = 2,123*) (*SCI - 8*)
 12. Souček, O., **Ješina, P.**, Zeman, J., Elleder, M., Hůlková, H., Lukáš, Z. Histopathological diagnosis of mitochondrial myopathies - Indications and the utility of muscle biopsy [Histopatologická diagnostika mitochondriálních myopatií - Indikace a přínos svalové biopsie] (2011) *Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie*, 74 (4), 428-436. (*IF = 0,372*)
 13. Burgetová A., **Ješina P.**, Vaněčková M., Mašek M., Hostaša P., Honzík T., Seidl Z. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) - A case report of the rare disease with radiological findings [Mitochondriální neurogastrointestinální encefalomyopatie (MNGIE) - Kazuistika vzácného onemocnění s radiologickými nálezy] (2010) *Ceska Radiologie*, 64 (4), pp. 295-300.
 14. Tesarova M; Honzik T; Hansikova H; Kostkova O; Hajkova Z; **Jesina P**; Zeman J. Hyperammonemic crises in patients with F1F0-ATP synthase deficiency due to mutation in TMEM70. *Mitochondrion* (2010) Volume: 10 Issue: 2 Pages: 207-207 Meeting Abstract: 28
 15. Dubot A., Godinot C., Dumur V., Sablonnière B., Stojkovic T., Cuisset J.M., Vojtiskova A., Pecina P., **Ješina P.**, Houstek J. GUG is an efficient initiation codon to translate the human mitochondrial ATP6 gene (2004) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313 (3), 687-693. (*IF = 2,904*) (*SCI - 21*)
 16. Vojtíšková, A., **Ješina, P.**, Kalous, M., Kaplanová, V., Houštěk, J., Tesařová, M., Fornůsková, D., Zeman, J., Dubot, A., Godinot, C. Mitochondrial Membrane Potential and ATP Production in Primary Disorders of ATP Synthase (2004) *Toxicology Mechanisms and Methods*, 14 (1-2), 7-11. (*IF = 0,464*) (*SCI - 12*)
 17. Hejzlarová K, Kaplanová V, Nůsková H, Kovářová N, **Ješina P**, Drahotka Z, Mráček T, Seneca S, Houštěk J. Alteration of structure and function of ATP synthase and cytochrome c oxidase by lack of Fo-a and Cox3 subunits caused by mitochondrial DNA 9205delTA mutation. *Biochem J*. 2015 Mar 15;466(3):601-11. (*IF = 3,562*) (*SCI - 4*)
 18. Houštěk, J., Pícková, A., Vojtíšková, A., Mráček, T., Pecina, P., **Ješina, P.** Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase (2006) *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1757 (9-10), 1400-1405. (*IF = 4,237*) (*SCI - 69*)
 19. **Ješina P.**; Vojtiskova A.; Kaplanova V.; Hejzlarova K.; Pecina P.; Houstkova H.; Houstek J.: Microdeletion 9205ΔTA in ATP6 gene of mitochondrial ATP synthase; *J of Inherit Metab Disease* (2007); Volume: 30, Supplement: 1 Pages: 74-74

20. Pecinova A.; Mracek T.; Pecina P.; **Jesina P.**; Kalous M.; Houstek J.: Increased oxidative stress in fibroblasts from patients with ATP synthase deficiency Conference: 16th European Bioenergetics Conference Location: Old Lib Univ Warsaw, Warsaw, POLAND Date: JUL 17-22, 2010 *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* (2010) Volume: 1797 Supplement: S Pages: 53-53
21. Folbergrova J., **Ješina P.**, Drahotka Z., Lisý V., Haugvicová R., Vojtíšková A., Houštěk J.: Mitochondrial complex I inhibition in cerebral cortex of immature rats following homocysteic acid-induced seizures. *Exp Neurol* 204 (2007) 597-609. (**IF = 3,982**) (**SCI - 29**)
22. Folbergrova J., **Ješina P.**, Haugvicová R., lisý V., Houštěk J.: Sustained deficiency of mitochondrial complex I activity during long periods of survival after seizures induced in immature rats by homocysteic acid. *Neurochem Int* (2010) 394-403 (**IF = 3,601**) (**SCI - 25**)
23. Folbergrova J., **Ješina P.**, Nůsková H., Houštěk J.: Antioxidant enzymes in cerebral cortex of immature rats following experimentally-induced seizures: upregulation of mitochondrial MnSOD (SOD2). *Int J Devl Neuroscince* (2013) 123-130 (**IF = 2,918**) (**SCI - 5**)
24. Folbergrova J., **Ješina P.**, Kubová H., Druga R., Otáhal J.: Status Epilepticus in Immature Rats Is Associated with Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. *Front Cell Neurosci* (2016) 10:216 (**IF = 4,609**) (**SCI - 2**)
25. Folbergrova J.* et **Jesina P.***, Kubová H, Otáhal J.: Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in immature brain during epileptogenesis: The protective effect of resveratrol *Int. J. of Molecular Sciences*, in press 2017, (**IF = 3,226**)

* - autoři se stejným podílem na prvoautorství