

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Veronika Helebrandtová

Děti tří rodičů aneb současný pokrok v léčbě mitochondriálních onemocnění

Three-parent babies: Mitochondrial replacement therapies

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Alena Pecinová, Ph.D.

Praha, 2021

Čestné prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca a ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 6.5.2021

Podpis

Poďakovanie

Moje poďakovanie patrí RNDr. Alene Pecinovej, Ph.D. za odborné vedenie, ochotu a cenné rady, ktoré mi počas spracovania bakalárskej práce venovala.

ABSTRAKT

Mitochondrie sú neoddeliteľnou súčasťou živých buniek organizmov, nakoľko majú dôležitú rolu v bunkovom metabolizme, hlavne pri tvorbe energie. V tomto im napomáha unikátna štruktúra, ktorá im umožňuje energiu, uvoľnenú počas oxidácie substrátov, využiť k tvorbe ATP. Mitochondrie obsahujú aj vlastnú DNA (mtDNA), ktorá je maternálne dedená a kóduje hlavne katalytické podjednotky komplexov oxidačnej fosforylácie.

Mitochondriálne poruchy, či už jadrového alebo mitochondriálneho pôvodu, patria medzi časté príčiny dedičných chorôb a postihujú hlavne energeticky náročné tkanivá ako napríklad srdce alebo mozog. Liečba mitochondriálnych ochorení je väčšinou symptomatická a nevedie k úplnému uzdraveniu pacienta. V dôsledku toho v súčasnosti dochádza k hľadaniu nových možností kauzálnej liečby, ako je napríklad génová terapia. U tejto metódy je ale nutné reflektovať pôvod mutácie, teda či ide o jadrovú alebo mitochondriálnu mutáciu.

Génová terapia mitochondriálnych ochorení mtDNA pôvodu je veľmi komplikovaná, preto bola navrhnutá nová liečebná stratégia, metóda mitochondriálnej substitučnej terapie. Podstatou tejto techniky je zabránenie prenosu mutovanej mtDNA z matky na potomka, kedy je do denukleovaného oocytu so zdravými mitochondriami darkyne vnesený jadrový genóm matky s mitochondriálnou poruchou. V takomto prípade sa jedná o tzv. dieťa troch rodičov. Metóda mitochondriálnej substitučnej terapie je v súčasnosti z etických a pato-fyziologických dôvodov povolená len v niektorých krajinách. Aj v dnešnej dobe je potrebných viacero štúdií na doriešenie všetkých koncepčných problémov danej metódy.

ABSTRACT

Mitochondria are essential parts of living cells, as they play a key role in cellular metabolism, especially in energy production. Due to their unique structure, the energy released during the oxidation of the substrates can be used to form the ATP. Mitochondria also contain their own DNA (mtDNA), which is maternally inherited and encodes catalytic subunits of oxidative phosphorylation complexes. Mitochondrial disorders of nuclear or mitochondrial origin, are common causes of inherited diseases and affect mainly the tissues with high energy requirements, such as heart or brain. Treatment of mitochondrial diseases is usually symptomatic and does not lead to complete recovery of the patient. As a result, new causal therapies, such as a gene therapy, are currently investigated. However, using this approach it is necessary to consider the origin of the mutation.

Gene therapy of mitochondrial diseases of mtDNA origin is very complicated, therefore the new treatment strategy, mitochondrial replacement therapy, has been proposed. The principle of this technique is to prevent the transmission of mutated mtDNA from mother to offspring by transferring the nuclear genome of mother with mitochondrial disorder into donor's denucleated oocyte with healthy mitochondria. In this way, the child has genetic information from three parents. Mitochondrial replacement therapy is currently permitted only in some countries due to ethical and patho-physiological reasons. Further investigation is necessary to solve all the conceptual problems of this method.

Zoznam použitých skratiek

ACAD9 ... ACYL – CoA DEHYDROGENÁZA 9

ADP ADENOSÍN DIFOSFÁT

ANT ADENÍNNUKLEOTIDOVÝ PRENÁŠAČ

ATP ADENOSÍN TRIFOSFÁT

CNS CENTRÁLNY NERVOVÝ SYSTÉM

CO₂ OXID UHLIČITÝ

CoQ10 KOENZÝM Q10

CoQH2 UBICHINOL

CPEO CHRONICKÁ VONKAJŠIA PROGRESÍVNA OFTALMOPLÉGIA

CSB SEKVENČNÉ RÁMCE

DNA DEOXYRIBONUKLEOVÁ KYSELINA

D-loop TROJVLÁKNOVÁ VYTESŇOVACIA SLUČKA

ETC ELEKTRÓN TRANSPORTNÝ REŤAZEC

FADH₂ FLAVÍNADENÍNNUKLEOTID

H⁺ PROTÓN VODÍKA

H-VLÁKNO ŤAŽKÉ VLÁKNO REŤAZCA V mtDNA

HSCT KRVOTVORNÉ KMEŇOVÉ BUNKY

ITP IMUNITNÁ TROMBOCYTOPÉNIA

IMS MEDZIMEMBRÁNOVÝ SYSTÉM

IMM VNÚTORNÁ MITOCHONDRIÁLNA MEMBRÁNA

KSS KEARNS – SAYRE SYNDRÓM

LHON LEBEROVA DEDIČNÁ OPTICKÁ NEUROPATIA

MNGIE MITOCHONDRIÁLNA NEUROGASTROINTESTINÁLNA ENCEFALOMYOPATIA

MELAS EPIZÓDY PODOBNÉ CIEVNEJ MOZGOVEJ PRÍHODE

mtDNA MITOCHONDRIÁLNA DNA

MTR MITOCHONDRIÁLNA SUBSTITUČNÁ TERAPIA

MST PRENOS MATERSKÉHO VRETENA

nDNA JADROVÁ DNA

NADH NIKOTÍNAMIDADENÍNNUKLEOTID

NAC N-ACETYLCYSTEÍN

NCR VEĽKÁ NEKÓDUJÚCA OBLASŤ

NGS SEKVENOVANIE NOVEJ GENERÁCIE

OMM VONKAJŠIA MEMBRÁNA MITOCHONDRIÍ

OXPHOS OXIDAČNÁ FOSFORYLÁCIA

PBI/II POLÁRNE TELIESKO I/II

PBT ... PRENOS POLÁRNEHO GENÓMU

PiC FOSFÁTOVÝ PRENÁŠAČ

NT PRONUKLEÁRNY PRENOS

RNA RIBONUKLEOVÁ KYSELINA

ROPA TECHNIKA PRÍJMU OOCYTOV OD PARTNERA

ROS KYSLÍKOVÉ RADIKÁLY

TAS SEKVENCIA SPOJENÁ S TERMINÁCIOU

TCA CITRÁTOVÝ CYKLUS

TIM TRANSLOKÁTOROVÝ KOMPLEX VNÚTORNEJ MEMBRÁNY MITOCHONDRIÍ

TFAM MITOCHONDRIÁLNY TRANSKRIPČNÝ FAKTOR A

TYMP TYMIDÍN FOSFORYLÁZA

tRNA TRANSFEROVÁ RNA

rRNA RIBOZOMÁLNA RNA

VDAC NAPÄŤOVO ZÁVISLÍ ANIÓNOVÝ KANÁL

WES SEKVENOVANIE CELÉHO EXÓNU

WGS SEKVENOVANIE CELÉHO GENÓMU

UCP 1 UNCOUPLING PORTEIN (THERMOGENÍN)

ZFN ... ZINK FINGER NUKLEÁZA

Obsah

1	MITOCHONDRIE	8
1.1	ŠTRUKTÚRA MITOCHONDRIÍ	9
1.2	FUNKCIA MITOCHONDRIÍ	11
1.3	MITOCHONDRIÁLNA GENETIKA	12
1.3.1	MITOCHONDRIÁLNY GENÓM	12
1.3.2	MITOCHONDRIÁLNA DEDIČNOSŤ	13
1.3.3	HETEROPLAZMIA A SEGREGÁCIA mtDNA.....	14
2	MITOCHONDRIÁLNE PORUCHY	16
3	DIAGNOSTIKA MITOCHONDRIÁLNYCH OCHORENÍ	18
3.1	DIAGNOSTIKA PACIENTOV S PODOZRENÍM NA MITOCHONDRIÁLNU PATOLÓGIU.....	18
3.2	PRENATÁLNA DIAGNOSTIKA MITOCHONDRIÁLNYCH OCHORENÍ.....	19
4	LIEČBA MITOCHONDRIÁLNYCH OCHORENÍ.....	20
4.1	FARMAKOLOGICKÝ PRÍSTUP.....	20
4.2	TRANSPLANTÁCIA ORGÁNOV	21
4.3	GÉNOVÁ TERAPIA	22
4.4	MITOCHONDRIÁLNA SUBSTITUČNÁ TERAPIA	23
4.4.1	PRONUKEÁRNY PRENOS (PNT)	23
4.4.2	PRENOS MATERSKÉHO VRETENA (MST).....	24
4.4.3	PRENOS POLÁRNEHO TELIESKA (PBT)	25
5	Záver	27
6	Použitá literatúra.....	28

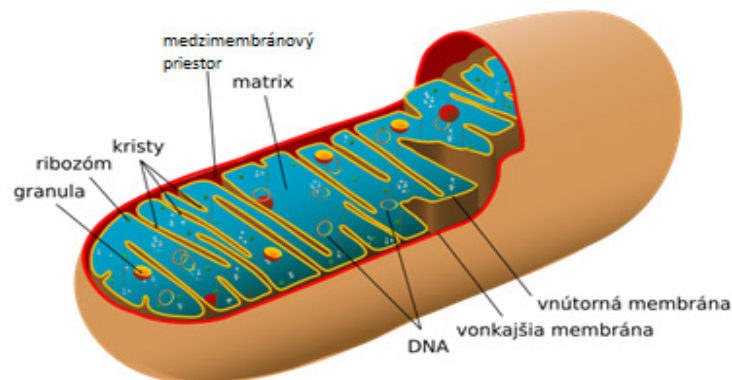
1 MITOCHONDRIE

Mitochondrie (odvodené od gréckych slov *mitos* – „vlákno“ a *chondrin* – „malá granula“) patria medzi charakteristický znak eukaryotických buniek (*eukaryotický* z gréckeho slova *eukaryon* – „pravé jadro“). Nachádzame ich takmer vo všetkých eukaryotických bunkách, konkrétne v cytoplazme. Ide o malé vnútrobunkové semiautonómne dvojmembránové organely, ktoré vyrábajú takmer všetku energiu potrebnú k životu vo forme ATP (adenozín trifosfát). Považujú sa za takzvané „elektrárne“ života (Alberts, Johnson et al. 2002).

Podľa endosymbiotickej teórie sa mitochondrie, plastidy a ďalšie organely vyvinuli z proteobaktérie, splynutím s proto-eukaryotickou bunkou (Margulis 1975). Pre bunku je to výhodné, nakoľko dochádza k väčšej produkcii ATP oproti glykolýze. Aj keď najznámejšou funkciou mitochondrií je tvorba energie, tieto organely sa podieľajú aj na iných procesoch, ako napríklad biosyntetické procesy (syntéza hemu, močovínový cyklus, atď.), skladovanie vápnika, výroba tepla a ďalších.

Množenie mitochondrií je podobné ako u baktérií, ale môžu taktiež fúzovať a tvoriť tak vetviace sa siete – mitochondriálne retikulum. V prípade ich podlhovastého tvaru a vzájomne prepojenej vetviacej sa siete môžu mitochondrie prechádzať do fragmentovaného stavu pomocou štiepenia sa a fúzií počas ich životného cyklu. Vďaka týmto prechodom môžu mitochondrie modulovať svoje funkcie. (Cooper 2000, Alberts, Johnson et al. 2002).

Počet mitochondrií v jednotlivých tkanivách ľudského tela závisí od energetických požiadaviek bunky, typu tkaniva, antioxidantného stavu a ďalších faktorov (Handing, Kezhi et al. 2001). V metabolicky aktívnych tkanivách, ako sú bunky v pečeni, obličkách, svaloch a mozgu, nachádzame veľké množstvo mitochondrií. A práve tieto tkanivá sú najviac poškodené v prípade mitochondriálnych porúch (Voet, Voet et al. 2006).



Obrázok 1 Schematické znázornenie stavby mitochondrie poukazujúce na vonkajšiu membránu a vnútornú membránu. Vnútorná membrána je rozdelená na vnútornú hraničnú membránu a membránu kríst (Alberts, Johnson et al. 2002).

1.1 ŠTRUKTÚRA MITOCHONDRÍÍ

Tvar a veľkosť mitochondrií je značne rôznorodý, avšak ich vnútorná štruktúra je stále rovnaká (viď. obr. 1). Sú to organely, ktoré obsahujú vnútornú mitochondriálnu membránu a vonkajšiu mitochondriálnu membránu, pričom sú zložené z lipoproteínov (50% až 60% proteíny a 40% až 50% lipidy). Obidve membrány sú tvorené z fosfolipidových dvojvrstiev, ktoré nachádzame aj na vonkajšej membráne buniek, pričom každá z membrán má odlišnú formu a účel. Tieto membrány sú od seba oddelené medzimembránovým priestorom (IMS, z ang. intemembrane space). IMS mitochondrií má rozhodujúcu úlohu pri koordinácii rôznych bunkových aktivít, ako napr. regulácia dýchania a metabolické funkcie (Alberts, Johnson et al. 2002).

Vonkajšia membrána (OMM, z ang. outer mitochondrial membrane) pokrýva povrch mitochondrií, je hladká, kontroluje tvar organel a zaisťuje komunikáciu mitochondrie s inými organelami. Hlavným transportným proteínom je pórovitý napät'ovo závislý aniónový kanál (VDAC, z ang. voltage-dependent anion-selective channel) (Chipuk, Bouchier-Hayes et al. 2006). VDAC je primárny transportér nukleotidov, iónov a metabolitov medzi cytosolom a medzimembránovým priestorom (Hoogenboom, Suda et al. 2007). Tvorí póry na báze bielkovín pomocou, ktorých môžu voľne prenikať molekuly do 10kDa. Vo vonkajšej mitochondriálnej membráne taktiež nachádzame mechanizmy na triedenie a zostavovanie proteínov. Narušenie vonkajšej mitochondriálnej membrány vedie k úniku proteínov (napr.

cytochróm c) z medzimembránového priestoru do cytosolu čo následne vedie k apoptóze (Chipuk, Bouchier-Hayes et al. 2006).

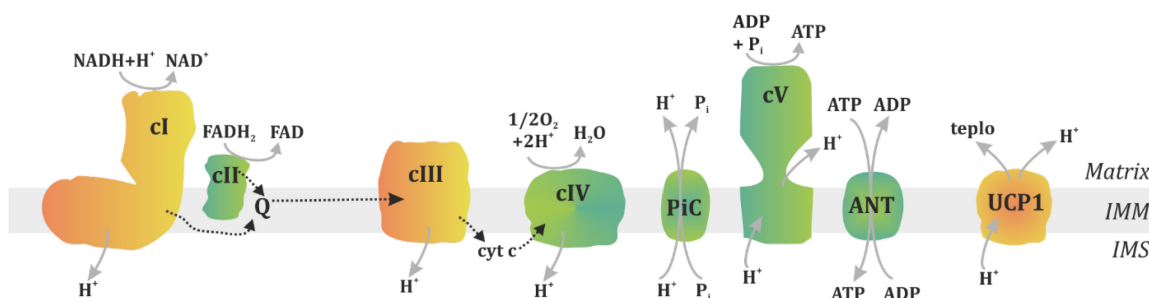
Vnútoraná mitochondriálna membrána (IMM, z ang. inner mitochondrial membrane) sa nachádza pod vonkajšou membránou mitochondrií a je tvorená z dvoch funkčne odlišných úsekov. Prvý úsek je vnútorná hraničná membrána, ktorá susedí s vonkajšou membránou a v druhom úseku je zvlnená do nápadných ohybov, ktoré prenikajú do vnútornej mitochondriálnej matrix, tzv. kríst. Sú to bioenergetické oddelenia, ktorých tvar sa mení na základe fyziologických podmienok. Krísty dávajú IMM charakteristický zvrásnený tvar pričom môžu nadobúdať listový, hrebeňovitý alebo trúbkovitý tvar. Taktiež krísty zväčšujú plochu mitochondrie. Pomocou úpravy tvaru kríst, mitochondrie reorganizujú svoju vnútornú štruktúru (Pangborn and Mary 1942).

Dôležitou súčasťou vnútornej mitochondriálnej membrány je oxidačne fosforylačný aparát (OXPHOS), v ktorom dochádza k tvorbe ATP. Optimálnu aktivitu a organizáciu komplexu OXPHOS zaisťuje lipid kardiolipin, ktorý hrá ústrednú rolu v reakciách a procesoch zapojených do mitochondriálnej funkcie a dynamiky (Pangborn and Mary 1942). V tejto membráne nachádzame viac ako 151 rôznych polypeptidov a vysoký pomer bielkovín k fosfolipidom (približne ide o 1 proteín na 15 fosfolipidov). Preto sú bielkoviny hlavnými faktormi, ktoré určujú celkový tvar mitochondrií a kríst (McMillin and Dowhan 2002). Na rozdiel od vonkajšej membrány je vysoko nepriepustná pre ióny, metabolity, proteíny a pre ich transport sú potrebné špecifické transportéry (Herrmann and Neupert 2000, Youle and van der Bliek 2012).

Vnútorný priestor mitochondrií je tvorený mitochondriálnou matrix (viď. obr.1). V matrix mitochondrií prebiehajú rôzne biochemické procesy vrátane napr. Krebsovho cyklu (Alberts, Johnson et al. 2002). Pôvod mitochondriálnej matrix je pravdepodobne odvodený z cytosolu rannej aeróbnej baktérie. Nachádza sa tu mitochondriálna DNA (mtDNA), ktorá kóduje nielen dôležité štruktúrne gény ale aj gény pre tRNA a rRNA. Tie sú dôležité pre syntézu mtDNA kódovaných proteínov, ktoré sú prichytené na vnútornú membránu (štruktúrou podobné bakteriálnym ribozómom), pričom vlastné formovanie proteínov sa odohráva na povrchu membrány (Rich 2003).

1.2 FUNKCIA MITOCHONDRIÍ

Mitochondrie vyrábajú väčšinu energie, ktorá je nutná pre zaistenie všetkých funkcií bunky. Energia je produkovaná vo forme ATP a ako substráty mitochondrie hlavne využívajú pyruvát (odvodený z metabolizmu glukózy) alebo mastné kyseliny. Ich degradáciou v matrix vzniká NADH a FADH₂ (β-oxidáciou alebo citrátovým cyklom), ktoré sú využívané oxidačne fosforylačným aparátom k tvorbe ATP. OXPHOS je lokalizovaný na IMM a je zložený z komplexov dýchacieho reťazca (komplexy I-IV) a F₁F₀ ATP syntázy (komplex V) (vid' obr.2). Komplexy dýchacieho reťazca sú usporiadané na základe stúpajúceho redoxného potenciálu. Redukované koenzýmy (NADH a FADH₂) vstupujú ku komplexom dýchacieho reťazca, kde dochádza k prevodu elektrónov. Elektróny z NADH sú komplexom I (NADH dehydrogenázou) a z FADH₂ pomocou komplexu II (sukcinát dehydrogenáza) prenesené na mobilný prenášač ubiquinón (CoQ), ktorý sa následne redukuje na ubiquinol (CoQH₂) (Stock, Gibbons et al. 2000). Z CoQH₂ prechádzajú elektróny na komplex III (cytochróm bc₁ komplex) a prostredníctvom prenášača cytochrómu c sú predávané na komplex IV (cytochróm c oxidáza). Z neho následne prejdú na kyslík, finálny akceptor, ktorý je redukovaný na vodu ako konečný produkt (Wittig, Carrozzo et al. 2006).



Obrázok 2 Schematické zobrazenie oxidačne fosforylačného aparátu (OXPHOS). OXPHOS je zložený zo 4 proteínových komplexov (CI-CIV) a ATP syntázy (CV). Elektróny zo substrátov sú transportované prostredníctvom dvoch mobilných nosičov: (i) CoQ, ktorý prijíma elektróny z komplexov I a II a následne sú prenesené do komplexu III. (ii) cytochróm c, ktorý prenáša elektróny z komplexu III do komplexu IV pričom dochádza k redukcii kyslíka na vodu. CI, CIII a CIV transportujú protóny cez IMM a dochádza k tvorbe protónového gradientu. Energia uložená v protónovom gradientu je potom využitá ATP syntázou k fosforylácii ADP. ANT – translokátor ADP/ATP, UCP1 – thermogénin.

Energia uvoľnená pri transporte elektrónov sa využíva k pumpovaniu protónov cez IMM pomocou komplexov I, III a IV. Výsledný elektrochemický gradient protónov je následne využitý k syntéze ATP na komplexe V (Rich 2003). Energia uchovávaná vo forme protónového gradientu môže byť využitá aj u ďalších mitochondriálnych funkcií. Napríklad je využívaná k transportu látok cez membránu do matrix alebo v hedom tuku k produkcii tepla cez mitochondriálny nosič, thermogénin (UCP1). (Nicholls and Lindberg 1973, Mozo, Emre et al. 2005).

1.3 MITOCHONDRIÁLNA GENETIKA

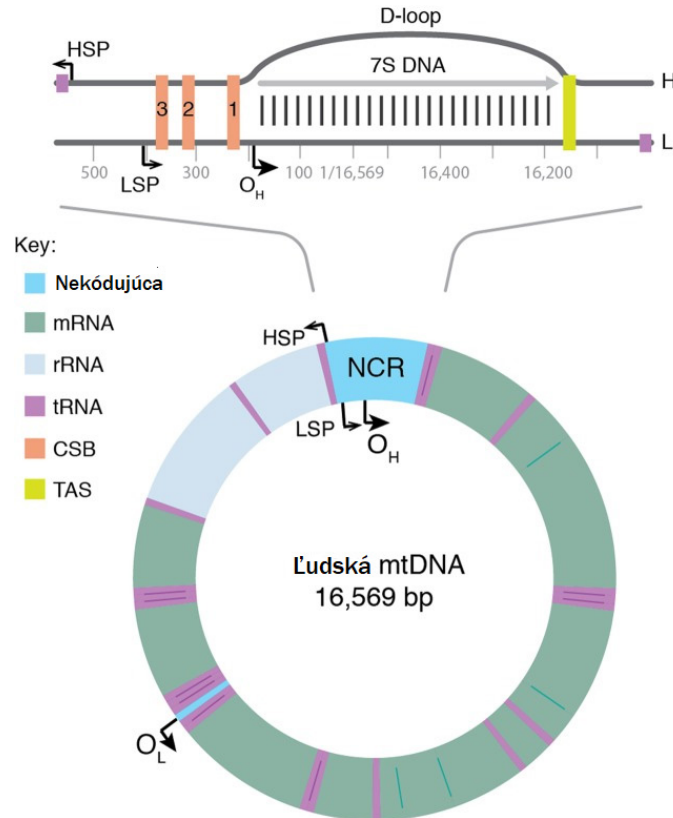
V mitochondriách nachádzame približne 1500 proteínov, pričom väčšina z nich je kódovaných jadrovými génmi. Malá časť génov, približne 2%, je lokalizovaná v mitochondriách. Mitochondriálna DNA u cicavcov kóduje len štruktúrne podjednotky systému OXPHOS a sadu tRNA a rRNA, ktoré sú nevyhnutné pre transláciu a replikáciu mtDNA (Smeitink 2003). Všetky ďalšie proteíny, vrátane translačných faktorov a ribozomálnych proteínov, sú prinášané z cytosolu (Lind, Sund et al. 2013).

1.3.1 MITOCHONDRIÁLNY GENÓM

Sekvencia mtDNA predstavuje extranukleárny genóm eukaryotických buniek (Anderson, Bankier et al. 1981). Celkovo mtDNA kóduje 37 génov, 22 génov pre tRNA, 2 pre rRNA a 13 proteínových podjednotiek, ktoré sú zapojené do OXPHOS (Barshad, Marom et al. 2018) (viď obr. 3). V mitochondriálnej matrix tvorí mtDNA spolu s okolitými proteínmi (Abf2 a TFAM) mitochondriálne nukleoidy, ktoré sú spojené s vnútornou mitochondriálnou membránou (Chen and Butow 2005). U človeka je dĺžka mitochondriálneho genómu (16 659 bp) neporovnateľne menšia oproti jadrovému genómu ($3,29 \times 10^9$ bp). U väčšiny eukaryot je organizovaná ako kruhová molekula zložená z dvoch antiparalelných vlákien a nemá exón – intrónovú štruktúru (Chen and Butow 2005).

Mitochondriálna DNA je tvorená z ťažkého (H, z ang. heavy) a ľahkého (L, z ang. light) vlákna. Ťažké vlákno je bohaté na guanín a kóduje 12 podjednotiek systému OXPHOS, dve rRNA (12S a 16S podjednotku) a 14 tRNA. Ľahké vlákno je bohaté na cytozín a kóduje jednu podjednotku systému OXPHOS a 8 tRNA (Gorman, Chinnery et al. 2016). Oproti jadrovej DNA (nDNA) je mtDNA mimoriadne efektívna, kedy 93% z nej predstavuje kódujúcu oblasť. Jej mutačná rýchlosť je 5 až 10 krát vyššia ako v jadrovom genóme. Väčšia mutačná rýchlosť je dôsledkom väčšej chybovosti mtDNA polymerázy, faktickej absencie reparačných mechanizmov, prípadne pôsobenie reaktívnych foriem kyslíku (ROS). Takto spôsobená vysoká mutabilita má za následok, že mtDNA u ľudí je pomerne široko sekvenčne odlišná (Cremers, van Rijn et al. 1987). V mitochondriálnej DNA nachádzame aj jednu nekódujúcu oblasť, tzv. *D-loop* (trojvláknová vytesňovacia slučka). V nej sa nachádza miesto iniciácie replikácie a miesto pre promotor transkripcie H-reťazca (HSP1 a HSP2). V tejto slučke je ťažký reťazec vytesňovaný fragmentom DNA, ktorý je komplementárny k ľahkému reťazcu, v tomto mieste má mitochondria trojreťazcovú DNA (Falkenberg 2018) (viď. obr. 3).

Aj keď vývoj viedol k tvorbe univerzálneho genetického kódu, existuje stále veľa odchýlok (Jukes and Osawa 1993). V mitochondriách cicavcov nDNA stop kodón UGA kóduje tryptofan zatiaľ čo dva kodóny, AGA a AGG, ktoré v nDNA kódujú arginín predstavujú u mitochondrií stop kodóny (Anderson, Bankier et al. 1981).



Obrázok 3 Schematická mapa ľudskej mtDNA. Genóm kóduje 13 molekúl mRNA, 22 molekúl tRNA a 2 rRNA. Veľká nekódujúca oblasť (NCR) obsahuje promotor ťažkého a ľahkého vlákna, 3 sekvenčné rámčeky (CSB 1-3), počiatok replikácie H-reťazca (O_H) a sekvenciu spojenú s termináciou (TAS). Štruktúra D-loop je tvorená predčasným ukončením syntézy DNA H-reťazca v TAS. Takto vytvorený produkt replikácie krátkych H-reťazcov sa nazýva 7S DNA. Menšie NCR, v smere od O_H obsahuje počiatok replikácie L-reťazca (O_L) prevzaté a upravené z (Falkenberg 2018).

1.3.2 MITOCHONDRIÁLNA DEDIČNOSŤ

Už viac ako 20 rokov je uznávaným faktom, že u cicavcov sa mtDNA prenáša výlučne materskou zárodočnou líniou (Hutchison, Newbold et al. 1974). V bunkách spermií cicavcov je počet kópií mtDNA nízky (50-75) zatiaľ čo v oocytoch cicavcov je počet kópií extrémne vysoký ($> 10^5$ kópií) (Piko and Matsumoto 1976, Fraser, Popkin et al. 1982, Hecht, Liem et al. 1984). U väčšiny cicavcov, vrátane ľudí sa mitochondrie spermií prenášajú do oocyty počas oplodnenia avšak podrobné morfológické štúdie naznačili, že mitochondrie pochádzajúce zo spermií sa eliminujú na začiatku embryogenézy (Ankel-Simons and Cummins 1996).

Nedostatok otcovskej mtDNA môže byť spôsobený (i) zriedením (spermie obsahujú o veľa menej kópií mtDNA ako u neoplodneného vajíčka), (ii) selektívnou ubikvitináciou otcovskej mtDNA. Striktne maternálna dedičnosť mtDNA je využívaná pri genetických analýzach pre zostavovanie fylogenetických stromov v rámci evolúcie človeka. Sekvencia mtDNA sa u ľudí prirodzene líši čo je dané mutáciami, ku ktorým dochádzalo v priebehu evolúcie. Rôzne subpopulácie tvoria tzv. haplotypy, ktoré odpovedajú ich geografickému pôvodu (Chinnery, Thorburn et al. 2000). Haplotypy mtDNA sú spojené s rôznymi fenotypmi a chorobami (Lee, Sun et al. 2017, McManus, Picard et al. 2019).

1.3.3 HETEROPLAZMIA A SEGREGÁCIA mtDNA

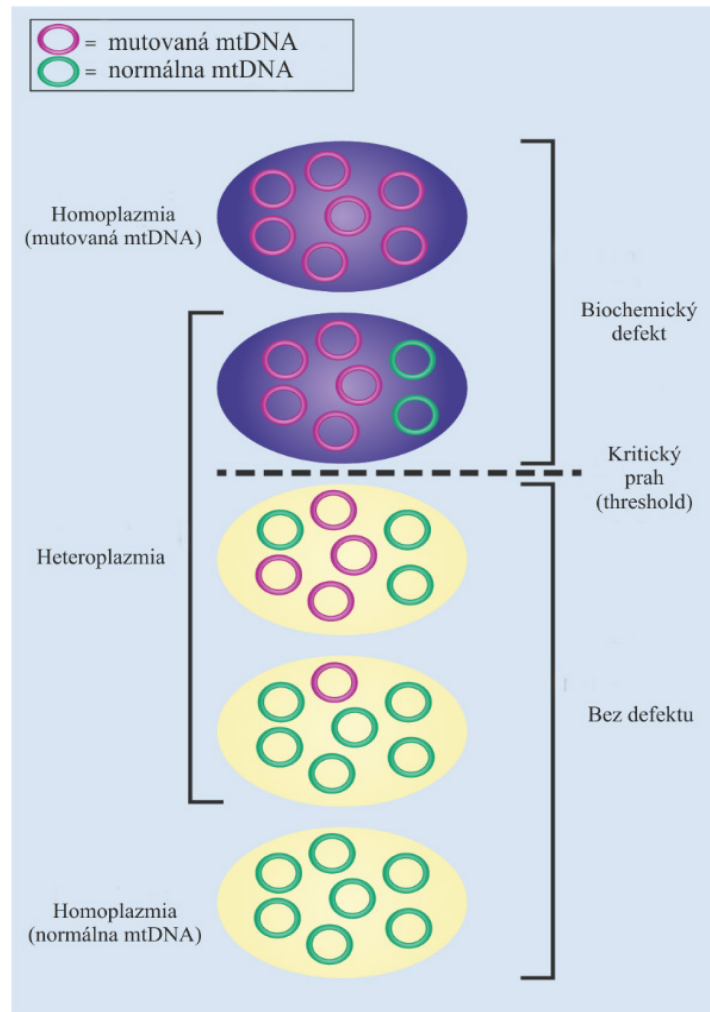
Bunky obsahujú veľké množstvo mtDNA, pričom vo väčšine prípadov je ich sekvencia identická. Pokiaľ sú všetky kópie mitochondriálneho genómu identické, jedná sa o prípad tzv. homoplazmie (Birky 2001). V prípade heteroplazmie ide o zmes molekúl normálnej a mutovanej mtDNA, miera je udávaná v percentách (viď. obr. 4). Heteroplazmia v jednotlivých tkanivách organizmu nemusí byť rovnaká, závisí na čase vzniku mutácie počas vývoja (Nissanka and Moraes 2020). Akonáhle dôjde k navýšeniu hodnôt heteroplazmie nad určitý stupeň, tak hovoríme o takzvanej prahovej hodnote (threshold). Pri prekročení tejto hodnoty môže dôjsť k prejavu mitochondriálneho ochorenia, dochádza k vyústeniu do bunkových defektov.

Nízkoúrovňové heteroplazmatické patogénne mutácie sú v ľudskej populácii bežné (~ 1:200) a väčšina z populácie má heteroplazmatické varianty mtDNA, ktoré sa popri somatických mutáciách *de novo* môžu šíriť v bunkách a tkanivách počas celého života (Li, Schroder et al. 2015, Wei, Tuna et al. 2019). Patogénne mutácie mtDNA sú zvyčajne heteroplazmické, a percento heteroplazmie sa môže meniť ako pri mitotickom tak meiotickom delení. Výsledkom môže byť dieťa, ktoré bude zdravé alebo sa môže narodiť s mitochondriálnou poruchou (Gorman, Chinnery et al. 2016, Nissanka and Moraes 2020).

Miera heteroplazmie u potomka je daná (i) rôznym stupňom heteroplazmie v jednotlivých oocytoch matky a (ii) mtDNA segregáciou po oplodnení, kedy má embryo vo vyvíjajúcich sa tkanivách bunky s rôznym stupňom heteroplazmie mtDNA. Čiastočne je toto možné vysvetliť tým, že po fertilizácii dochádza k veľkej redukcii mtDNA vznikajúcich buniek tzv. mtDNA „bottleneck“ (Nissanka and Moraes 2020).

Medzigeneračný posun mtDNA heteroplazmie môže byť veľký, napr. matka s mutáciou m.3243A>G (18% heteroplazmie v kvadricepse) mala syna s 12% mutovanou mtDNA v krvi,

avšak u matky, ktorá mala mutáciu m.8993T>G (50% heteroplazmie v krvi) mala troch synov s viac ako 87% heteroplazmiou mtDNA (Nissanka and Moraes 2020).



Obrázok 4 Schematický obrázok poukazujúci na heteroplazmiu v prípade biochemického defektu alebo bez defektu (prevzaté a upravené z <https://www.newcastle-mitochondria.com/>).

2 MITOCHONDRIÁLNE PORUCHY

Mitochondriálne poruchy sa ukázali ako častá príčina dedičných chorôb, ktoré sú spôsobené mutáciami ako v jadrových, tak v mitochondriálnych génoch (Schon, Ratnaïke et al. 2020). Aj keď incidencia mutácií nie je veľmi častá, patrí medzi jedny z najbežnejších foriem vrodených chýb metabolizmu. Odhaduje sa, že postihujú najmenej 20 osôb zo 100 000 ľudí (Gorman, Chinnery et al. 2016). K dnešnému dňu bolo viac ako 300 jadrových génov označených ako gény, ktoré spôsobujú tieto poruchy (Stenton and Prokisch 2018). Môžu byť spôsobené bodovými mutáciami kde dochádza k zmene zmyslu čítania kodónu (missense, substitúcia alebo mutácie ovplyvňujúci splicing), deléciami alebo vznikom tzv. nonsense mutácie (vznik stop kodónov) (Chinnery, Elliott et al. 2012).

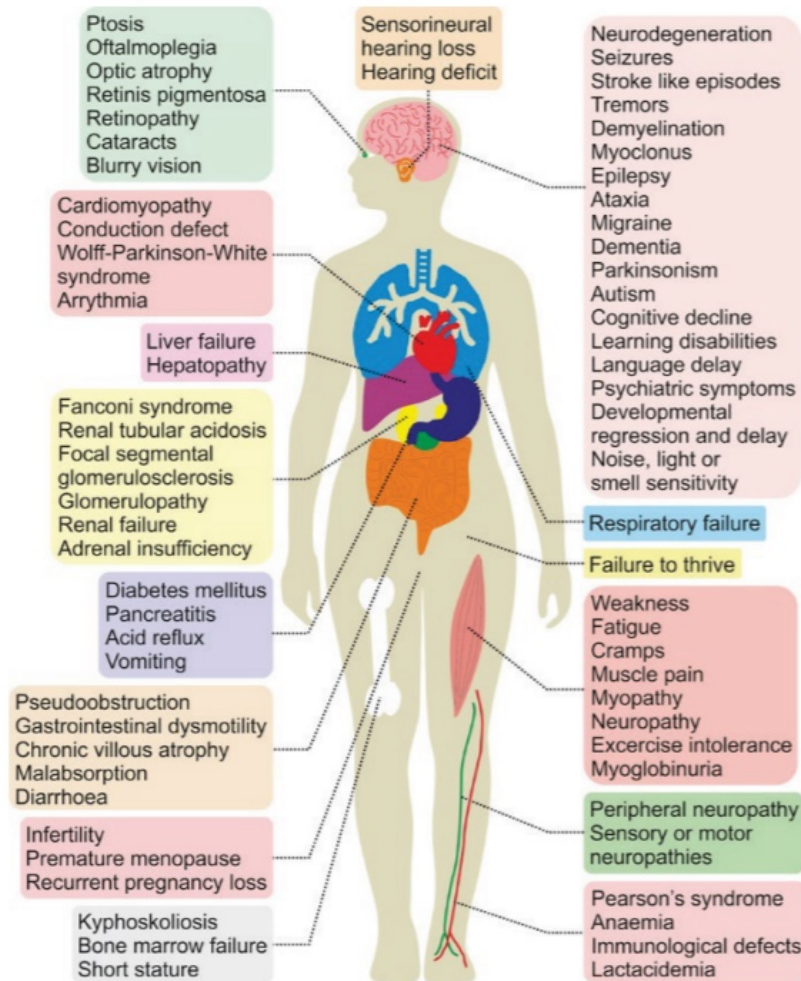
Syndrómy mitochondriálnych chorôb môžu mať veľmi rozmanité genetické pozadie, ako je to napríklad v prípade Leighovho syndrómu. Ide o závažnú neurologickú poruchu spôsobenú mutáciami v 75 génoch lokalizovaných v mitochondriálnych a jadrových genómoch (Lake, Compton et al. 2016). Úroveň heteroplazmie môže taktiež ovplyvniť patológiu daných ochorení.

V mtDNA nachádzame primárne mutácie v génoch kódujúcich proteíny a tRNA, ktoré v konečnom dôsledku vedú k zníženiu bunkovej energie (Chinnery 2000, Ghezzi and Zeviani 2012). Ochorenia spôsobené deléciou sa prejavujú pri nižšom heteroplazmickom prahu (50% až 60%). Vyznačujú sa napríklad pigmentovou degeneráciou sietnice alebo srdcovými a cerebelárnymi ťažkosťami (Kearns-Sayre syndróm - KSS) (Murray, Daryl et al. 2002, Kohoutová and Otová 2017). Môže dochádzať k ovplyvneniu funkcií mitochondrií ako sú (i) OXPHOS, (ii) cyklus kyseliny citrónovej, (iii) β - oxidácia, (iv) poruchy cyklu močoviny alebo (v) spúšťanie apoptózy (Murray, Daryl et al. 2002). Fenotypové spektrum mitochondriálnych porúch je mimoriadne široké a klinické príznaky môžu postihnúť akékoľvek tkanivo, orgán alebo ich kombináciu v akomkoľvek veku (Munnich and Rustin 2001). Postihujú takmer akúkoľvek časť tela, avšak najčastejšie dochádza k ovplyvneniu tkanív s vysokou metabolickou potrebou. Preto sú prítomní pacienti s neurodegeneráciami v mnohých prípadoch v kombinácii s oslabením svalstva, kardiomyopatiou alebo zlyhaním pečene (Schaefer, McFarland et al. 2008, Suomalainen and Battersby 2018).

Medzi bežné klinické príznaky mitochondriálnej choroby, či už ide o mitochondriálny alebo jadrový gén, patria intolerancia na cvičenie, proximálna myopatia, optická atfia, diabetes mellitus, vysoký výskyt potratov v priebehu neskorších fáz tehotenstva atď (vid' obr. 5). Príznaky môžu chýbať u zdravých ľudí, ktorí majú tzv. tiché genetické chyby alebo môžu byť príznaky komplexné u osoby s pokročilým ochorením. Avšak existuje značná klinická

variabilita a mnoho jedincov nie je zaradených do konkrétnej kategórie, nakoľko dochádza k prekryvaniu fenotypov chorôb (Murray, Daryl et al. 2002).

Veľa stavov môže viesť k sekundárnej mitochondriálnej dysfunkcii, pričom môže dochádzať aj k ovplyvňovaniu ďalších chorôb vrátane Alzheimerovej choroby, svalovej dystrofie, cukrovky a rakoviny (Scharfe, Lu et al. 2009).



Obrázok 5 Klinické spektrum mitochondriálnych ochorení - schematický diagram poukazujúci na orgány a zodpovedajúce ochorenie ovplyvnené mitochondriálnou dysfunkciou (prevzaté z (Konarikova, Markovic et al. 2020)).

3 DIAGNOSTIKA MITOCHONDRIÁLNYCH OCHORENÍ

Klinická diagnostika mitochondriálnych ochorení je problematická, v súčasnej dobe sa ale diagnostický proces dramaticky posúva od klinického, histologického a biochemického prístupu k prístupu primárne genetickému. Sekvenovanie mitochondriálneho genómu v kombinácii so sekvenáciou nDNA pomocou tzv. next generation sequencing (NGS) môže poskytnúť rýchlu genetickú diagnózu pre veľkú časť pacientov (Alston, Stenton et al. 2021).

3.1 DIAGNOSTIKA PACIENTOV S PODOZRENÍM NA MITOCHONDRIÁLNU PATOLÓGIU

Vzhľadom na fakt, že diagnostika týchto porúch je obtiažna, bol vyvinutý, systematický prístup, ktorý zahŕňa klinické testy na podrobný popis šírky fenotypu a laboratórne testy zamerané na definíciu základného biochemického defektu. V dôsledku tvorby tohto prístupu boli navrhnuté rôzne diagnostické kritériá ako napríklad modifikované Nijmegenove mitochondriálne diagnostické kritériá, ktoré využívajú klinické, metabolické/zobrazovacie skóre a histologické výsledky svalovej biopsie na určenie pacientov s možnou, pravdepodobnou alebo definitívnou mitochondriálnou poruchou. Tieto kritériá boli prehodnotené v ére NGS pri pacientoch s geneticky potvrdenou mitochondriálnou poruchou (Wolf and Smeitink 2002, Morava, van den Heuvel et al. 2006, Witters, Saada et al. 2018).

V súčasnosti existuje veľké množstvo známych fenokópií mitochondriálnych ochorení. Pokrok v genomickom testovaní poukázal na to, že pacienti s klinických fenotypom a biochemickými abnormalitami, ktoré naznačujú mitochondriálne ochorenie, môžu vykazovať aj ďalšie genetické poruchy. Vysoký index podozrenia na primárne mitochondriálne ochorenia je u pacientov, ktorý vykazujú epizódy podobné mŕtvici v nevaskulárnej distribúcii (pozorované u pacientov s mitochondriálnou encefalopatiou), hyperintenzívne MRI lézie v bazálnych gangliách a/alebo mozgovom kmeni (Leighov syndróm) alebo s vonkajšou progresívnou oftalmoplegiou (CPEO) a myopatiou. Aj napriek tomu veľa pacientov s primárnym mitochondriálnym ochorením môže zostať bez potvrdenia diagnózy danej choroby, nakoľko bez potvrdzujúcich genetických dôkazov môže dôjsť ku chybné stanovenej diagnóze (Parikh, Karaa et al. 2019).

3.2 PRENATÁLNA DIAGNOSTIKA MITOCHONDRIÁLNYCH OCHORENÍ

Prenatálna diagnostika sa vykonáva u žien, u ktorých je podozrenie na mitochondriálne ochorenie, poprípade, ak sa v rodine vyskytol prípad potvrdzujúci toto ochorenie. Jej cieľom je genetická identifikácia génu zodpovedného za mitochondriálne ochorenie. Tá sa vykonáva z amniocytov, potom záleží, či ide o mutáciu v mtDNA alebo nDNA (Nesbitt, Alston et al. 2014).

V prípade mutácie mtDNA je genetická diagnostika veľmi komplikovaná, nakoľko je ťažko predikovateľný stupeň heteroplazmie v bunkách plodu zo stupňa heteroplazmie v amniocytoch. U týchto pacientiek je dôležité vziať do úvahy aj faktory ako sú napr. fenotypová expresia mutácie u príbuzných alebo asociácia medzi genotypom a fenotypom. Okrem presného určenia úrovne mutácie mtDNA vo vzorke fetálnej DNA sú ďalej pacienti kategorizovaní na základe zaťaženia mtDNA mutáciami v postnatálnom období (Marchington, Malik et al. 2010, Nesbitt, Alston et al. 2014).

U mutácií v nDNA je genetická diagnostika pomerne jednoduchá. Okrem genetickej diagnostiky z amniocytov ide o otestovanie celej rodiny, kedy sa hľadajú obe alely príslušného génu. Rodičom sú tak poskytnuté oveľa jasnejšie výsledky o prípadnom mitochondriálnom ochorení ich dieťaťa (Nesbitt, Alston et al. 2014).

4 LIEČBA MITOCHONDRIÁLNYCH OCHORENÍ

Aj keď v posledných desaťročiach došlo k pokroku pochopením molekulárneho základu mitochondriálnych porúch, čo vyústilo do účinného screeningu a diagnostiky daných porúch, nedošlo však k zvýšenému počtu úspechov v liečbe mitochondriálnych ochorení. Počet schválených liekov, ktoré sú vhodné pre tieto poruchy, je stále veľmi nízky (Lightowers, Taylor et al. 2015). Napriek tomu početné terapeutické možnosti liečby, ktoré interferujú s progresiou ochorenia, vykazujú sľubné výsledky. Sú zamerané na rôzne úrovne liečby, od životného štýlu, cez cvičenie a metabolické možnosti liečby až po úpravu genómu. Avšak problémom je prekonanie primárneho enzýmového defektu. V niektorých prípadoch stačí doplniť daný metabolit (napr. CoQ u poruchy biosyntézy CoQ), ale v prípade, kde ide o narušenie priamej produkcie ATP, je prekonanie tohto defektu náročnejšie (Konarikova, Markovic et al. 2020).

Liečba sa významne líši v závislosti od konkrétneho typu, stavu, znakov a symptómov prítomných u daného človeka. Primárnym cieľom liečby je zmiernenie príznakov a spomalenie progresie stavu (Monnot, Gigarel et al. 2011). V rámci prevencie mitochondriálnych ochorení je účinné genetické poradenstvo, najmä vzhľadom na rodinnú anamnézu mitochondriálnych chorôb (Chinnery, Thorburn et al. 2000, Monnot, Gigarel et al. 2011).

4.1 FARMAKOLOGICKÝ PRÍSTUP

Fenotypová rozmanitosť mitochondriálnych ochorení komplikuje situáciu v prípade jej liečby. Ako prvá možnosť pri podozrení na mitochondriálne ochorenie sa predpisujú rôzne druhy vitamínov, kokteíl doplnkov výživy a vitamínov, ktoré sú poskytované pacientovi na obmedzenú dobu (Chinnery and Turnbull 2001, Ginguay and De Bandt 2019). Najčastejšie kokteíl obsahuje L-arginín (na látkovú výmenu), CoQ₁₀ (vo forme CoQ alebo CoQH₂), kreatín (na uľahčenie recyklácie ATP) a L-karnitín (ako antioxidant a zdroj energie) (Enns 2014).

Ďalšími látkami používanými v liečbe mitochondriálnych ochorení sú metabolity zo skupiny vitamínov B, konkrétne thiamín, riboflavín alebo niacín. Tieto metabolity pomáhajú pacientom s defektmi konkrétnych metabolických dráh ako sú napr. pacienti s poruchou metabolizmu thiamínu, u ktorých po liečbe dochádza k zlepšeniu neurologických problémov (Ortigoza-Escobar, Molero-Luis et al. 2016).

KOENZÝM Q₁₀

CoQ₁₀ je vysoko hydrofóbná molekula prítomná vo fosfolipidových membránach, ktorá plní funkciu mobilného elektrónového prenášača medzi radou mitochondriálnych dehydrogenáz a komplexom III a navyše je to silný antioxidant (Awad, Bradley et al. 2018). Pre pacientov s mitochondriálnymi poruchami predstavuje dopĺňanie CoQ₁₀ terapeutický prístup liečby, nakoľko dopĺňanie CoQ₁₀ môže prekonať jeho nedostatočnú prirodzenú produkciu, avšak univerzálny prínos tejto liečby nie je konzistentný (Zhu, Zhao et al. 2011, Hargreaves 2014, Awad, Bradley et al. 2018). Pokiaľ ide o všeobecný prínos tejto liečby pre rôzne typy mutácií, tak štúdie neodhalili priaznivý účinok na sledovaných premenných (Glover, Martin et al. 2010). Avšak na druhej strane, niektoré štúdie nám ponúkajú optimistickejší obraz na túto liečbu. Ku príkladu CoQ₁₀, pyruvát a β – adrenergný receptorový blokátor boli úspešne zavedené u detského pacienta s mutáciou v acyl – CoA dehydrogenáze 9 (ACAD9), ktorá vedie k defektu komplexu I (Zhu, Zhao et al. 2011).

Jedným z kľúčových faktorov pre úspešné využitie CoQ₁₀ pri liečení mitochondriálnych chorôb je správne načasovanie a jeho podanie pacientovi (Horvath 2012). Najdôležitejšia je však jeho biologická dostupnosť, ktorá je obmedzená a líši sa v závislosti od orgánu. Tento fakt podnietil pátranie po umelom analógu CoQ₁₀, ktorý by mal lepšiu rozpustnosť a teda aj biologickú dostupnosť (Acosta, Vazquez Fonseca et al. 2016). Syntetickým analógom CoQ₁₀ je idebenon, ktorý bol uznaný na liečbu Leberovej optickej neuropatie (LHON) (Lyseng-Williamson 2016). Bohužiaľ, menej ako 1% prechádza z pečene do obehu, čo je dôvodom jeho obmedzeného použitia (Konarikova, Markovic et al. 2020).

4.2 TRANSPLANTÁCIA ORGÁNOV

Transplantácia orgánov pri liečbe mitochondriálnych chorôb patrí skôr medzi špecializované invazívne prístupy liečby. Využíva sa aj v prípade iných vrodených vývojových väd metabolizmu a môže dobre slúžiť aj v podmienkach, kde enzýmová dysfunkcia vedie k hromadeniu toxických zlúčenín, čo môže byť vyriešené prostredníctvom transplantácie allogénneho orgánu s nemutovanou formou konkrétneho enzýmu (Tan, Boelens et al. 2019). Najlepším príkladom je mitochondriálna neurogastrointestinálna encefalomyopatia (MNGIE), spôsobená mutáciami v tymidýn fosforyláze (TYMP). Tie vedú k akumulácii tymidínu, deoxyuridínu a mtDNA. Vo veľkej skupine MNGIE pacientov bola vykonaná transplantácia krvotvorných kmeňových buniek (HSCT, z ang. hematopoietic stem-cell transplantation), čo viedla k zlepšeniu biochemických parametrov a klinických príznakov

ochorenia (Halter, Michael et al. 2015). Pomerne vysoká úmrtnosť spojená s HSCT u MNGIE pacientov, viedla k preskúmaniu aj iných stratégií, konkrétne transplantácie pečene, nakoľko pečeň má vysokú expresiu tymidín fosforylázy. Túto liečbu podstúpilo šesť pacientov a vo všetkých prípadoch došlo k vylepšeniu ako biochemických tak aj klinických charakteristík, čo bolo preukázané po kontrole po jednom roku (D'Angelo, Rinaldi et al. 2017, Madhok, Ong et al. 2019, Kripps, Nakayuenyongsuk et al. 2020). Celkovo sa zdá, že transplantácia tkanív je perspektívny prístup.

4.3 GÉNOVÁ TERAPIA

Na rozdiel od ostatných typov liečby, ako sú napr. cvičenie alebo keto diéta, úprava genómu môže vyriešiť skutočnú príčinu mitochondriálnych porúch. Existuje niekoľko možných prístupov pre rôzne typy porúch. Môže ísť o (i) náhradu génu, ktorý je účinný pri monogénných poruchách, (ii) pridanie génu, ktorý môže pomôcť pri komplexných poruchách ako je napr. srdcové zlyhanie, (iii) zmenu génovej expresie prostredníctvom RNA interferencie vedúcej k odstráneniu nefunkčnej RNA, (iv) presnú úpravu genómu pomocou endonukleázy so zink finger nukleázy (ZFN), poprípade CRISPR/CAS9 systémom (Wang and Gao 2014).

Prístupy v úprave jadrových génov mitochondriálnych ochorení sú podobné ako u iných genetických porúch (Romero-Moya, Castaño et al. 2017). Mutácie v mtDNA kódovaných proteínoch nemožno ľahko riešiť editáciou genómu. Riešenie by ale mohla predstavovať allotopitická expresia daného génu (Lewis, Dixit et al. 2020). V prípade mitochondriálnych porúch ako je LHON syndróm je génová terapia sľubným nástrojom pre liečbu (Karaarslan 2019). LHON syndróm v súčasnej dobe patrí medzi bežne zdedené optické neuropatie, u ktorých je génová terapia už vo fáze III klinického testovania. Pacientom s mutáciou v ND4, ktorá je podjednotkou komplexu I, sa do oka aplikuje zmes obsahujúca nosič a vhodne upravenú divokú formu ND4 proteínu (El-Hattab, Zarante et al. 2017). Zistilo sa, že zrak pacientov sa zlepšil a neboli pozorované žiadne vedľajšie účinky (Bouquet, Vignal Clermont et al. 2019).

Tento princíp by sa mohol využiť aj v prípade zníženia hladiny mutovanej mtDNA v embryách v priebehu oplodnenia *in vitro* (Pereira and Moraes 2017). Jedna z prevádzaných štúdií na myších embryách preukázala možnú užitočnosť mitochondriálnych zink finger nukleáz v zabránení prenosu mutovaných mtDNA prostredníctvom zárodočnej línie (McCann, Cox et al. 2018). Podobne mitochondriálne zamerané TALENs (z ang. transcription activator-like effector nucleases), boli testované na modeloch buniek od pacientov s mutáciou v mtDNA.

Oba prístupy spočívajú v zavedení dvojvláknových zlomov do mtDNA a ich následnej eliminácii. Jednou z veľmi sľubných možností umožňujúcich cielejšiu opravu mutovanej mtDNA predstavuje využitie bakteriálneho toxínu s cytidín deaminázovou aktivitou. Ten môže byť pomocou fúzie s DNA väzbovým proteínom nasmerovaný na špecifickú sekvenciu mtDNA a modifikovať ju (Mok, de Moraes et al. 2020). Génová terapia môže predstavovať individualizovanú terapiu vhodnú pre liečbu vrodených mitochondriálnych porúch (Bacman, Williams et al. 2013).

4.4 MITOCHONDRIÁLNA SUBSTITUČNÁ TERAPIA

V súčasnosti sú možnosti, ktoré by mali zabrániť prenosu mitochondriálnych ochorení obmedzené. Patria sem adopcie, darovanie oocytov a indukovaný potrat v prípadoch postihnutých embryí (Zhang, Liu et al. 2017). V rámci liečebného postupu in vitro fertilizácie, ktorý bol zavedený len v nedávnej dobe, sa využíva mitochondriálna substitučná terapia (MRT, z ang. mitochondrial replacement therapy). Ide o relatívne novú a efektívnu techniku na zabránenie dedičnosti mutácií mtDNA. Ak je u matky zistené riziko prenosu mutovanej mtDNA na jej potomka, tak môže využiť techniky mitochondriálneho darčovstva, kedy je využité vajíčko náhradnej matky so zdravou mtDNA, ktorého jadro je nahradené jadrom matky s mutovanou DNA. Týmto spôsobom má potomok jadrovú genetickú informáciu od otca a matky a mitochondriálnu genetickú informáciu od darykyne, jedná sa o tzv. dieťa troch rodičov. Vzhľadom na výsledky mnohých štúdií môže byť mitochondriálna substitučná technika alternatívou nielen pre pacientov s neplodnosťou, ale taktiež umožní ženám s patogénnymi mutáciami v mtDNA generovať zdravé potomstvo (Craven, Tang et al. 2017).

V prípade MRT sú využívané dva základné prístupy, pomocou ktorých sa vykonáva. Ide jednak o pronukleárny prenos a prenos materského vretena. V súčasnej dobe bol zavedený aj tretí prístup, prenos polárneho genómu (Sharma, Singh et al. 2020).

4.4.1 PRONUKLEÁRNY PRENOS

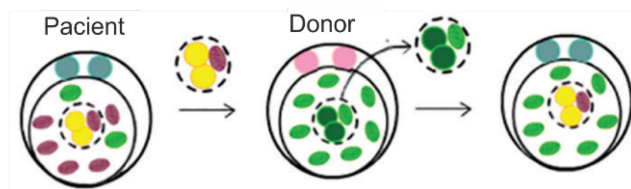
V prípade pronukleárneho prenosu (PNT, z ang. pronuclear transfer) je jadrový materiál odstránený z materského oocytu a je prenesený do darcovskej denukleovanej zygoty, kde sa zdravé mitochondrie nachádzajú v cytoplazme (vid'. obr.6A). Aby sa zabezpečila integrita jadra v PNT, je nevyhnutné prenesenie malého množstva mutovaných mitochondrií, čo môže viesť následne k heteroplazmii (Wolf, Hayama et al. 2017). Preto v rámci tejto liečby existuje riziko vzniku ochorenia, a to v prípade, že dôjde k prenosu viac ako 5% mutantnej mtDNA (David

and Peebles 2008, Tachibana, Sparman et al. 2009, Rai, Craven et al. 2018). Táto metóda liečby bola úspešne použitá u matky, ktorá niesla mutáciu spôsobujúcu Leighov syndróm a mala anamnézu neúspešného tehotenstva. Kľúčové pri PNT je dlhodobé sledovanie (Zhang, Liu et al. 2017).

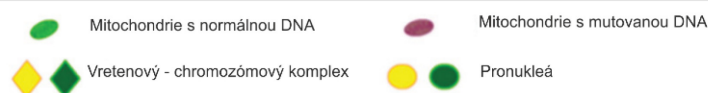
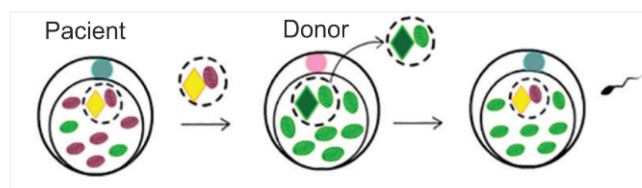
4.4.2 PRENOS MATERSKÉHO VRETENA

V prípade prenosu materského vretena (MST, z ang. maternal spindle transfer) techniky dochádza k jej vykonaniu ešte pred oplodnením (viď. obr.6B). Ide o formu selektívnej reprodukcie, ktorá je podobná prenatalnej diagnostike a predimplantačnej genetickej diagnostike (Inoue 1989). Komplex materského vretena v štádiu metafázy je extrahovaný z chybného vajíčka matky a je transplantovaný do perivitelinneho priestoru enukleovaného darcovského vajíčka so zdravými mitochondriami (Labarta, de Los Santos et al. 2019). Reformované embryo sa transplantuje do lona matky. Tento prístup je oproti PNT výhodnejší nakoľko materské vreteno obsahuje malú cytoplazmu, čo nakoniec znižuje pravdepodobnosť prenosu mutovanej mtDNA (Farnezi, Goulart et al. 2020).

A Pronukleárny prenos



B Prenos materským vretenom

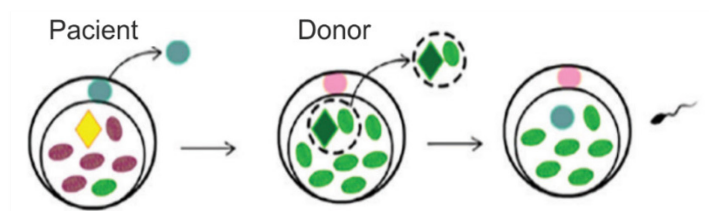


Obrázok 6 (A) schématický diagram poukazuje na prenos nukleónov, kde sú 2 pronukleá odobrané so zygoty s mutovanými mitochondriami a prenesené do denukleovanej zygoty darkyne. (B) Schématické zobrazenie prenosu vretena matky, kde dôjde k jeho preneseniu do oocytu v metafázy II do oocytu darkyne, ktorý už materské vreteno neobsahuje. Následne potom dôjde k oplodneniu rekonštruovaného oocytu (Farnezi, Goulart et al. 2020).

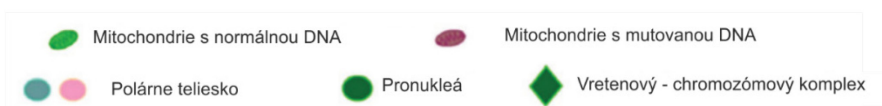
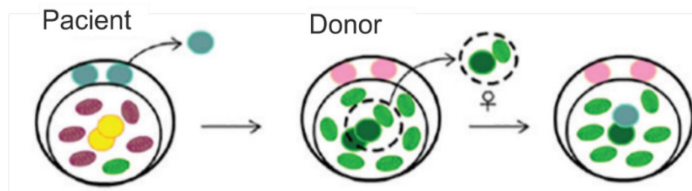
4.4.3 PRENOS POLÁRNEHO TELIESKA

Metóda prenosu polárneho telieska (PBT, z ang. polar body transfer) je považovaná za najvýznamnejší prístup z dôvodu prítomnosti malého množstva mitochondrií, ktoré minimalizujú možnosti prenosu mutovanej mtDNA. Celý jadrový obsah je uzavretý v polárnych telieskach (PB, z ang. polar body). Prvé polárne teliesko (PBI) sa objavuje po ovulácii a druhé polárne teliesko (PBII) vzniká po oplodnení spermiami, pričom obidve obsahujú presnú genetickú kópiu jadra oocytov (vid' obr.7). Pri použití oboch typov transferov (PBI alebo PBII) dochádza k minimálnemu prenosu mtDNA a je tak znížené riziko poškodenia plodu (Wang, Sha et al. 2014, Farnezi, Goulart et al. 2020).

A Prenos polárneho telieska - PBI



B Prenos polárneho telieska - PBII



Obrázok 7 (A) reprezentuje prenos PBI, ktorý je odobraný z oocytu v metafáze II a prevedený do oocytu darkyne, kde došlo k odstráneniu materného vretena. Potom nasleduje oplodnenie rekonštruovaného oocytu. (B) Znázorňuje prenos PBII, ktorý je odobraný zo zygoty pacientky a prenesený do denukleovanej zygoty darkyne (Farnezi, Goulart et al. 2020).

MRT liečba sa tiež ukazuje ako použiteľná v prípade lesbických párov, nakoľko obe ženy v danom páre môžu poskytnúť svoju genetickú časť dieťaťu, pričom jedna prispieva jadrovým genomom a druhá mitochondriálnym. V prípade týchto párov existuje aj technika ROPA (z ang. reception of oocyte from partner - príjem oocytov od partnera), avšak tu nastáva problém, že dieťa je geneticky spojené len s jednou zo žien v danom páre (Cavaliere and Palacios-Gonzalez 2018).

Veľmi diskutovanou témou techník využívajúcich mitochondriálny prenos je kompatibilita jadrového a mitochondriálneho genómu. Bolo publikované, že mitochondriálny prenos môže významne meniť expresiu jadrových génov a ovplyvniť vývoj jedinca, kognitívne správanie a iné (Reinhardt, Dowling et al. 2013). Aj prirodzene sa vyskytujúce zdravé mtDNA haplotypy vykazujú rozdiely v rôznych parametroch a narušenia vysoko koordinovanej interakcie mitochondriálneho a jadrového genómu by mohli viesť k nežiadúcim dopadom na zdravie. Preto bolo doporučené, aby bola dárkyňou žena s rovnakým mitochondriálnym haplotypom ako biologická matka (Pan, Wang et al. 2019).

Ako už bolo zmienené, u MRT môže dôjsť k prenosu mutovanej mtDNA do embrya a tým sa zvyšuje riziko prepuknutia mitochondriálneho ochorenia, prípadne prenosu mutovanej mtDNA do ďalších generácií (Reinhardt, Dowling et al. 2013, Reardon 2016). V súvislosti s prenosom mutovanej mtDNA do ďalšej generácie sa diskutuje možnosť využiť pri tejto technike len mužské embryo. To však predstavuje etický problém, ktorý je riešený v súvislosti s legalizáciou MRT vo väčšine krajín. Napríklad vo Veľkej Británii bolo MRT povolené už v roku 2015 a od roku 2017 je možné aj túto techniku podstúpiť (Gorman, Chinnery et al. 2016, Rahman and Rahman 2018). Oproti tomu v USA táto technika nebola ešte povolená (Reardon 2016). V Českej republike zatiaľ nie je technika mitochondriálneho prenosu legislatívne regulovaná.

5 Záver

Mitochondrie patria medzi dôležité zložky buniek organizmov, nakoľko sú dôležité hlavne pri tvorbe energie. Ide o organelu obsahujúcu vlastnú DNA (mtDNA), ktorá je maternálne dedená a kóduje esenciálne podjednotky komplexov oxidačnej fosforylácie a je zodpovedná za tvorbu ATP. V populácii sa nachádzajú prirodzené genetické rozdiely v sekvencii mtDNA, tzv. mitochondriálne haplotypy. Nakoľko je väčšina mitochondriálnych proteínov kódovaná jadrovým genómom, je interakcia oboch genómov vysoko kooordinovaná. Narušenie tejto interakcie potom môže viesť k nepriaznivým zdravotným dopadom.

Mitochondriálne ochorenia, či už jadrového alebo mitochondriálneho pôvodu, patria medzi veľmi bežné vrodené poruchy metabolizmu a majú život ohrozujúce účinky na potomkov postihnutých rodičov. Postihujú akúkoľvek časť tela, ale hlavne energeticky náročné tkanivá. Tieto ochorenia majú veľmi rôznorodé genetické pozadie a široké klinické spektrum príznakov a ich diagnostika je preto veľmi obtiažna. V poslednej dobe, rozvoj nových sekvenčných techník umožnil zlepšiť identifikáciu génu zodpovedného za pôvod ochorenia.

Rovnako ako diagnostika, tak ani liečba mitochondriálnych ochorení nie je jednoduchá. Donedávna boli najčastejšie využívané hlavne spôsoby ako napr. adopcie, darovanie oocytov alebo indukovaný potrat v prípade postihnutých embryí. S rozvojom molekulárne-biologických metód sa ale objavujú aj nové spôsoby liečby vzniknutého ochorenia, prípadne zabránenie jeho prenosu na potomkov. Medzi najnovšie metódy, ktoré zabraňujú prenosu mutovanej mtDNA patrí mitochondriálna substitučná terapia.

U techník využívajúcich mitochondriálny prenos zúštvá otázkou kompatibilita jadrového a mitochondriálneho genómu. Veľmi diskutované sú aj etické problémy súvisiace s prednostným využitím mužských embryí, ktoré by zabránilo prenosu reziduálnej mutovanej mtDNA do ďalších generácií. Aj cez všetky otázky predstavujú mitochondriálne substitučné terapie jedinú nádej na vznik zdravých potomkov pre veľké množstvo párov.

6 Použitá literatura

- Acosta, M. J., L. Vazquez Fonseca, M. A. Desbats, C. Cerqua, R. Zordan, E. Trevisson and L. Salviati (2016). "Coenzyme Q biosynthesis in health and disease." *Biochim Biophys Acta* **1857**(8): 1079-1085.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2002). *Molecular Biology of the Cell*.
- Alston, C. L., S. L. Stenton, G. Hudson, H. Prokisch and R. W. Taylor (2021). "The genetics of mitochondrial disease: dissecting mitochondrial pathology using multi-omic pipelines." *J Pathol*.
- Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. Smith, R. Staden and I. G. Young (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." *Nature* **290**(5806): 457-465.
- Ankel-Simons, F. and J. M. Cummins (1996). "Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 13859-13863.
- Awad, A. M., M. C. Bradley, L. Fernández-Del-Río, A. Nag, H. S. Tsui and C. F. Clarke (2018). "Coenzyme Q(10) deficiencies: pathways in yeast and humans." *Essays Biochem* **62**(3): 361-376.
- Bacman, S. R., S. L. Williams, M. Pinto, S. Peralta and C. T. Moraes (2013). "Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs." *Nat Med* **19**(9): 1111-1113.
- Barshad, G., S. Marom, T. Cohen and D. Mishmar (2018). "Mitochondrial DNA Transcription and Its Regulation: An Evolutionary Perspective." *Trends Genet* **34**(9): 682-692.
- Birky, C. W., Jr. (2001). "The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models." *Annu Rev Genet* **35**: 125-148.
- Bouquet, C., C. Vignal Clermont, A. Galy, S. Fitoussi, L. Blouin, M. R. Munk, S. Valero, S. Meunier, B. Katz, J. A. Sahel and N. Thomasson (2019). "Immune Response and Intraocular Inflammation in Patients With Leber Hereditary Optic Neuropathy Treated With Intravitreal Injection of Recombinant Adeno-Associated Virus 2 Carrying the ND4 Gene: A Secondary Analysis of a Phase 1/2 Clinical Trial." *JAMA Ophthalmol* **137**(4): 399-406.
- Cavaliere, G. and C. Palacios-Gonzalez (2018). "Lesbian motherhood and mitochondrial replacement techniques: reproductive freedom and genetic kinship." *J Med Ethics* **44**(12): 835-842.
- Cooper, G. M. (2000). "The Cell."
- Craven, L., M. X. Tang, G. S. Gorman, P. De Sutter and B. Heindryckx (2017). "Novel reproductive technologies to prevent mitochondrial disease." *Hum Reprod Update* **23**(5): 501-519.
- Cremers, C., P. van Rijn and B. ter Haar (1987). "Autosomal recessive progressive high-frequency sensorineural deafness in childhood." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **113**(12): 1319-1324.
- D'Angelo, R., R. Rinaldi, L. Pironi, M. T. Dotti, A. D. Pinna, E. Boschetti, M. Capristo, S. Mohamed, M. Contin, L. Caporali, V. Carelli and R. De Giorgio (2017). "Liver transplant reverses biochemical imbalance in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy." *Mitochondrion* **34**: 101-102.

- David, A. L. and D. Peebles (2008). "Gene therapy for the fetus: is there a future?" Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **22**(1): 203-218.
- El-Hattab, A. W., A. M. Zarante, M. Almannai and F. Scaglia (2017). "Therapies for mitochondrial diseases and current clinical trials." Mol Genet Metab **122**(3): 1-9.
- Enns, G. M. (2014). "Treatment of mitochondrial disorders: antioxidants and beyond." J Child Neurol **29**(9): 1235-1240.
- Falkenberg, M. (2018). "Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: overview of the pathway." Essays Biochem **62**(3): 287-296.
- Farnezi, H. C. M., A. C. X. Goulart, A. D. Santos, M. G. Ramos and M. L. F. Penna (2020). "Three-parent babies: Mitochondrial replacement therapies." JBRA Assist Reprod **24**(2): 189-196.
- Fraser, H. M., R. M. Popkin, A. S. McNeilly and R. M. Sharpe (1982). "Changes in pituitary LHRH receptor levels in situations of increased or decreased gonadotrophin secretion in the male rat." Mol Cell Endocrinol **28**(3): 321-331.
- Ghezzi, D. and M. Zeviani (2012). "Assembly factors of human mitochondrial respiratory chain complexes: physiology and pathophysiology." Adv Exp Med Biol **748**: 65-106.
- Ginguay, A. and J. P. De Bandt (2019). "Citrulline production and protein homeostasis." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **22**(5): 371-376.
- Glover, E. I., J. Martin, A. Maher, R. E. Thornhill, G. R. Moran and M. A. Tarnopolsky (2010). "A randomized trial of coenzyme Q10 in mitochondrial disorders." Muscle Nerve **42**(5): 739-748.
- Gorman, G. S., P. F. Chinnery, S. DiMauro, M. Hirano, Y. Koga, R. McFarland, A. Suomalainen, D. R. Thorburn, M. Zeviani and D. M. Turnbull (2016). "Mitochondrial diseases." Nat Rev Dis Primers **2**: 16080.
- Halter, J. P., W. Michael, M. Schüpbach, H. Mandel, C. Casali, K. Orchard, M. Collin, D. Valcarcel, A. Rovelli, M. Filosto, M. T. Dotti, G. Marotta, G. Pintos, P. Barba, A. Accarino, C. Ferrà, I. Illa, Y. Beguin, J. A. Bakker, J. J. Boelens, I. F. de Coö, K. Fay, C. M. Sue, D. Nachbaur, H. Zoller, C. Sobreira, B. Pinto Simoes, S. R. Hammans, D. Savage, R. Martí, P. F. Chinnery, R. Elhasid, A. Gratwohl and M. Hirano (2015). "Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy." Brain **138**(Pt 10): 2847-2858.
- Handing, L., B. Kezhi, Y. Hu, T. Kuang and J. Lin (2001). "Differences between the number and structure of chloroplasts in leaves and non-leaf organs of wheat." Belgian Journal of Botany 121-126.
- Hargreaves, I. P. (2014). "Coenzyme Q10 as a therapy for mitochondrial disease." Int J Biochem Cell Biol **49**: 105-111.
- Hecht, N. B., H. Liem, K. C. Kleene, R. J. Distel and S. M. Ho (1984). "Maternal inheritance of the mouse mitochondrial genome is not mediated by a loss or gross alteration of the paternal mitochondrial DNA or by methylation of the oocyte mitochondrial DNA." Dev Biol **102**(2): 452-461.
- Herrmann, J. M. and W. Neupert (2000). "Protein transport into mitochondria." Curr Opin Microbiol **3**(2): 210-214.
- Hoogenboom, B. W., K. Suda, A. Engel and D. Fotiadis (2007). "The supramolecular assemblies of voltage-dependent anion channels in the native membrane." J Mol Biol **370**(2): 246-255.

- Horvath, R. (2012). "Update on clinical aspects and treatment of selected vitamin-responsive disorders II (riboflavin and CoQ 10)." *J Inherit Metab Dis* **35**(4): 679-687.
- Hutchison, C. A., 3rd, J. E. Newbold, S. S. Potter and M. H. Edgell (1974). "Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA." *Nature* **251**(5475): 536-538.
- Chen, X. J. and R. A. Butow (2005). "The organization and inheritance of the mitochondrial genome." *Nat Rev Genet* **6**(11): 815-825.
- Chinnery, P. F. (2000). *Mitochondrial Disorders Overview*.
- Chinnery, P. F., H. R. Elliott, G. Hudson, D. C. Samuels and C. L. Relton (2012). "Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases." *Int J Epidemiol* **41**(1): 177-187.
- Chinnery, P. F., D. R. Thorburn, D. C. Samuels, S. L. White, H. M. Dahl, D. M. Turnbull, R. N. Lightowlers and N. Howell (2000). "The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both?" *Trends Genet* **16**(11): 500-505.
- Chinnery, P. F. and D. M. Turnbull (2001). "Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders." *Am J Med Genet* **106**(1): 94-101.
- Chipuk, J. E., L. Bouchier-Hayes and D. R. Green (2006). "Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario." *Cell Death Differ* **13**(8): 1396-1402.
- Inoue, S. (1989). "Imaging of unresolved objects, superresolution, and precision of distance measurement with video microscopy." *Methods Cell Biol* **30**: 85-112.
- Jukes, T. H. and S. Osawa (1993). "Evolutionary changes in the genetic code." *Comp Biochem Physiol B* **106**(3): 489-494.
- Karaarslan, C. (2019). "Leber's Hereditary Optic Neuropathy as a Promising Disease for Gene Therapy Development." *Adv Ther* **36**(12): 3299-3307.
- Kohoutová, M. and B. Otová (2017). *Lékařská biologie a genetika (II. díl)*.
- Konarikova, E., A. Markovic, Z. Korandova, J. Houstek and T. Mracek (2020). "Current progress in the therapeutic options for mitochondrial disorders." *Physiol Res* **69**(6): 967-994.
- Kripps, K., W. Nakayuenyongsuk, B. J. Shayota, W. Berquist, N. Gomez-Ospina, C. O. Esquivel, W. Concepcion, J. B. Sampson, D. J. Cristin, W. E. Jackson, S. Gilliland, E. A. Pomfret, M. L. Kueht, R. W. Pettit, Y. A. Sherif, L. T. Emrick, S. H. Elsea, R. Himes, M. Hirano, J. L. K. Van Hove, F. Scaglia, G. M. Enns and A. A. Larson (2020). "Successful liver transplantation in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE)." *Mol Genet Metab* **130**(1): 58-64.
- Labarta, E., M. J. de Los Santos, M. J. Escriba, A. Pellicer and S. Herraiz (2019). "Mitochondria as a tool for oocyte rejuvenation." *Fertil Steril* **111**(2): 219-226.
- Lake, N. J., A. G. Compton, S. Rahman and D. R. Thorburn (2016). "Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes." *Ann Neurol* **79**(2): 190-203.
- Lee, W. T., X. Sun, T. S. Tsai, J. L. Johnson, J. A. Gould, D. J. Garama, D. J. Gough, M. McKenzie, I. A. Trounce and J. C. St John (2017). "Mitochondrial DNA haplotypes induce differential patterns of DNA methylation that result in differential chromosomal gene expression patterns." *Cell Death Discov* **3**: 17062.

- Lewis, C. J., B. Dixit, E. Batiuk, C. J. Hall, M. S. O'Connor and A. Boominathan (2020). "Codon optimization is an essential parameter for the efficient allotopic expression of mtDNA genes." Redox Biol **30**: 101429.
- Li, M., R. Schroder, S. Ni, B. Madea and M. Stoneking (2015). "Extensive tissue-related and allele-related mtDNA heteroplasmy suggests positive selection for somatic mutations." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(8): 2491-2496.
- Lightowers, R. N., R. W. Taylor and D. M. Turnbull (2015). "Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain?" Science **349**(6255): 1494-1499.
- Lind, C., J. Sund and J. Aqvist (2013). "Codon-reading specificities of mitochondrial release factors and translation termination at non-standard stop codons." Nat Commun **4**: 2940.
- Lyseng-Williamson, K. A. (2016). "Idebenone: A Review in Leber's Hereditary Optic Neuropathy." Drugs **76**(7): 805-813.
- Madhok, J., J. Leong and J. Cohn (2019). "Anesthetic Considerations for Liver Transplantation in a Patient with Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalopathy Syndrome." Cureus **11**(6): e5038.
- Margulis, L. (1975). "Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof." Symp Soc Exp Biol(29): 21-38.
- Marchington, D., S. Malik, A. Banerjee, K. Turner, D. Samuels, V. Macaulay, P. Oakeshott, C. Fratter, S. Kennedy and J. Poulton (2010). "Information for genetic management of mtDNA disease: sampling pathogenic mtDNA mutants in the human germline and in placenta." J Med Genet **47**(4): 257-261.
- McCann, B. J., A. Cox, P. A. Gammage, J. B. Stewart, M. Zernicka-Goetz and M. Minczuk (2018). "Delivery of mtZFNs into Early Mouse Embryos." Methods Mol Biol **1867**: 215-228.
- McManus, M. J., M. Picard, H. W. Chen, H. J. De Haas, P. Potluri, J. Leipzig, A. Towheed, A. Angelin, P. Sengupta, R. M. Morrow, B. A. Kauffman, M. Vermulst, J. Narula and D. C. Wallace (2019). "Mitochondrial DNA Variation Dictates Expressivity and Progression of Nuclear DNA Mutations Causing Cardiomyopathy." Cell Metab **29**(1): 78-90 e75.
- McMillin, J. B. and W. Dowhan (2002). "Cardiolipin and apoptosis." Biochim Biophys Acta **1585**(2-3): 97-107.
- Mok, B. Y., M. H. de Moraes, J. Zeng, D. E. Bosch, A. V. Kotrys, A. Raguram, F. Hsu, M. C. Radey, S. B. Peterson, V. K. Mootha, J. D. Mougous and D. R. Liu (2020). "A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing." Nature **583**(7817): 631-637.
- Monnot, S., N. Gigarel, D. C. Samuels, P. Burlet, L. Hesters, N. Frydman, R. Frydman, V. Kerbrat, B. Funalot, J. Martinovic, A. Benachi, J. Feingold, A. Munnich, J. P. Bonnefont and J. Steffann (2011). "Segregation of mtDNA throughout human embryofetal development: m.3243A>G as a model system." Hum Mutat **32**(1): 116-125.
- Morava, E., L. van den Heuvel, F. Hol, M. C. de Vries, M. Hogeveen, R. J. Rodenburg and J. A. Smeitink (2006). "Mitochondrial disease criteria: diagnostic applications in children." Neurology **67**(10): 1823-1826.

- Mozo, J., Y. Emre, F. Bouillaud, D. Ricquier and F. Criscuolo (2005). "Thermoregulation: what role for UCPs in mammals and birds?" Biosci Rep **25**(3-4): 227-249.
- Munnich, A. and P. Rustin (2001). "Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders." Am J Med Genet **106**(1): 4-17.
- Murray, R. K., K. G. Daryl and M. A. P. (2002). Harperova BIOCHEMIE
- Nesbitt, V., C. L. Alston, E. L. Blakely, C. Fratter, C. L. Feeney, J. Poulton, G. K. Brown, D. M. Turnbull, R. W. Taylor and R. McFarland (2014). "A national perspective on prenatal testing for mitochondrial disease." Eur J Hum Genet **22**(11): 1255-1259.
- Nicholls, D. G. and O. Lindberg (1973). "Brown-adipose-tissue mitochondria. The influence of albumin and nucleotides on passive ion permeabilities." Eur J Biochem **37**(3): 523-530.
- Nissanka, N. and C. T. Moraes (2020). "Mitochondrial DNA heteroplasmy in disease and targeted nuclease-based therapeutic approaches." EMBO Rep **21**(3): e49612.
- Ortigoza-Escobar, J. D., M. Molero-Luis, A. Arias, L. Martí-Sánchez, P. Rodriguez-Pombo, R. Artuch and B. Pérez-Dueñas (2016). "Treatment of genetic defects of thiamine transport and metabolism." Expert Rev Neurother **16**(7): 755-763.
- Pan, J., L. Wang, C. Lu, Y. Zhu, Z. Min, X. Dong and H. Sha (2019). "Matching Mitochondrial DNA Haplotypes for Circumventing Tissue-Specific Segregation Bias." iScience **13**: 371-379.
- Pangborn, M. C. and C. Mary (1942). "Isolation and Purification of a serologically Active Phospholipid from Beef Heart." Journal of Biological chemistry 247-256.
- Parikh, S., A. Karaa, A. Goldstein, E. S. Bertini, P. F. Chinnery, J. Christodoulou, B. H. Cohen, R. L. Davis, M. J. Falk, C. Fratter, R. Horvath, M. K. Koenig, M. Mancuso, S. McCormack, E. M. McCormick, R. McFarland, V. Nesbitt, M. Schiff, H. Steele, S. Stockler, C. Sue, M. Tarnopolsky, D. R. Thorburn, J. Vockley and S. Rahman (2019). "Diagnosis of 'possible' mitochondrial disease: an existential crisis." J Med Genet **56**(3): 123-130.
- Pereira, C. V. and C. T. Moraes (2017). "Current strategies towards therapeutic manipulation of mtDNA heteroplasmy." Front Biosci (Landmark Ed) **22**: 991-1010.
- Piko, L. and L. Matsumoto (1976). "Number of mitochondria and some properties of mitochondrial DNA in the mouse egg." Dev Biol **49**(1): 1-10.
- Rahman, J. and S. Rahman (2018). "Mitochondrial medicine in the omics era." Lancet **391**(10139): 2560-2574.
- Rai, P. K., L. Craven, K. Hoogewijs, O. M. Russell and R. N. Lightowlers (2018). "Advances in methods for reducing mitochondrial DNA disease by replacing or manipulating the mitochondrial genome." Essays Biochem **62**(3): 455-465.
- Reardon, S. (2016). "US panel greenlights creation of male 'three-person' embryos." Nature **530**(7589): 142.
- Reinhardt, K., D. K. Dowling and E. H. Morrow (2013). "Medicine. Mitochondrial replacement, evolution, and the clinic." Science **341**(6152): 1345-1346.
- Rich, P. (2003). "Chemiosmotic coupling: The cost of living." Nature **421**(6923): 583.

- Romero-Moya, D., J. Castaño, C. Santos-Ocaña, P. Navas and P. Menendez (2017). "Generation, genome edition and characterization of iPSC lines from a patient with coenzyme Q(10) deficiency harboring a heterozygous mutation in COQ4 gene." Stem Cell Res **24**: 144-147.
- Sharma, H., D. Singh, A. Mahant, S. K. Sohal, A. K. Kesavan and Samiksha (2020). "Development of mitochondrial replacement therapy: A review." Heliyon **6**(9): e04643.
- Schaefer, A. M., R. McFarland, E. L. Blakely, L. He, R. G. Whittaker, R. W. Taylor, P. F. Chinnery and D. M. Turnbull (2008). "Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults." Ann Neurol **63**(1): 35-39.
- Scharfe, C., H. H. Lu, J. K. Neuenburg, E. A. Allen, G. C. Li, T. Klopstock, T. M. Cowan, G. M. Enns and R. W. Davis (2009). "Mapping gene associations in human mitochondria using clinical disease phenotypes." PLoS Comput Biol **5**(4): e1000374.
- Schon, K. R., T. Ratnaik, J. van den Ameele, R. Horvath and P. F. Chinnery (2020). "Mitochondrial Diseases: A Diagnostic Revolution." Trends Genet **36**(9): 702-717.
- Smeitink, J. A. (2003). "Mitochondrial disorders: clinical presentation and diagnostic dilemmas." J Inherit Metab Dis **26**(2-3): 199-207.
- Stenton, S. L. and H. Prokisch (2018). "Advancing genomic approaches to the molecular diagnosis of mitochondrial disease." Essays Biochem **62**(3): 399-408.
- Stock, D., C. Gibbons, I. Arechaga, A. G. Leslie and J. E. Walker (2000). "The rotary mechanism of ATP synthase." Curr Opin Struct Biol **10**(6): 672-679.
- Suomalainen, A. and B. J. Battersby (2018). "Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology." Nat Rev Mol Cell Biol **19**(2): 77-92.
- Tachibana, M., M. Sparman, H. Sritanaudomchai, H. Ma, L. Clepper, J. Woodward, Y. Li, C. Ramsey, O. Kolotushkina and S. Mitalipov (2009). "Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells." Nature **461**(7262): 367-372.
- Tan, E. Y., J. J. Boelens, S. A. Jones and R. F. Wynn (2019). "Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Inborn Errors of Metabolism." Front Pediatr **7**: 433.
- Voet, D., J. G. Voet and C. W. Pratt (2006). Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level.
- Wang, D. and G. Gao (2014). "State-of-the-art human gene therapy: part II. Gene therapy strategies and clinical applications." Discov Med **18**(98): 151-161.
- Wang, T., H. Sha, D. Ji, H. L. Zhang, D. Chen, Y. Cao and J. Zhu (2014). "Polar body genome transfer for preventing the transmission of inherited mitochondrial diseases." Cell **157**(7): 1591-1604.
- Wei, W., S. Tuna, M. J. Keogh, K. R. Smith, T. J. Aitman, P. L. Beales, D. L. Bennett, D. P. Gale, M. A. K. Bitner-Glindzicz, G. C. Black, P. Brennan, P. Elliott, F. A. Flinter, R. A. Floto, H. Houlden, M. Irving, A. Koziell, E. R. Maher, H. S. Markus, N. W. Morrell, W. G. Newman, I. Roberts, J. A. Sayer, K. G. C. Smith, J. C. Taylor, H. Watkins, A. R. Webster, A. O. M. Wilkie, C. Williamson, N. B.-R. Diseases, G. P.-R. D. Pilot, S. Ashford, C. J. Penkett, K. E. Stirrups, A. Rendon, W. H. Ouweland, J. R. Bradley, F. L. Raymond, M. Caulfield, E. Turro and P. F. Chinnery (2019). "Germline selection shapes human mitochondrial DNA diversity." Science **364**(6442).

- Witters, P., A. Saada, T. Honzik, M. Tesarova, S. Kleinle, R. Horvath, A. Goldstein and E. Morava (2018). "Revisiting mitochondrial diagnostic criteria in the new era of genomics." Genet Med **20**(4): 444-451.
- Wittig, I., R. Carrozzo, F. M. Santorelli and H. Schagger (2006). "Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation." Biochim Biophys Acta **1757**(9-10): 1066-1072.
- Wolf, D. P., T. Hayama and S. Mitalipov (2017). "Mitochondrial genome inheritance and replacement in the human germline." EMBO J **36**(15): 2177-2181.
- Wolf, N. I. and J. A. Smeitink (2002). "Mitochondrial disorders: a proposal for consensus diagnostic criteria in infants and children." Neurology **59**(9): 1402-1405.
- Youle, R. J. and A. M. van der Blik (2012). "Mitochondrial fission, fusion, and stress." Science **337**(6098): 1062-1065.
- Zhang, J., H. Liu, S. Luo, Z. Lu, A. Chávez-Badiola, Z. Liu, M. Yang, Z. Merhi, S. J. Silber, S. Munné, M. Konstantinidis, D. Wells, J. J. Tang and T. Huang (2017). "Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease." Reprod Biomed Online **34**(4): 361-368.
- Zhu, L. L., T. Zhao, X. huang, Z. H. Liu, L. Y. Wu, K. W. Wu and M. Fan (2011). "Gene expression profiles and metabolic changes in embryonic neural progenitor cells under low oxygen." Cell Reprogram **13**(2): 113-120.