

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Buněčná a vývojová biologie

Studijní obor: Fyziologie buňky



Bc. Tomáš Zdobinský

Studium systému oxidativní fosforylace u vzácných typů mitochondriálních onemocnění

Oxidative phosphorylation system in rare types of mitochondrial diseases

Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Markéta Tesařová, PhD.

Konzultant: Mgr. Jana Křížová

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 8. 2019

Podpis

Poděkování:

Rád bych poděkoval své školitelce Ing. Markétě Tesařové, Ph.D. za její neutuchající trpělivost, vstřícnost a cenné rady. Dále pak Mgr. Janě Křížové a Mgr. Lucii Zdražilové za pomoc při pronikání do tajů respirometrie a ostatním členům laboratoře za metodické a jiné rady a vytvoření přátelského pracovního prostředí. Prof. MUDr. Jiřímu Zemanovi a RNDr. Haně Hansíkové za možnost působení v Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch.

Za teoretické i praktické rady při statistickém vyhodnocení výsledků děkuji RNDr. Václavu Čapkovi Ph.D.

Především však děkuji své rodině a přátelům za jejich skutečně neobyčejnou podporu po celou dobu studia.

Práce byla podpořena grantem Ministerstva zdravotnictví ČR AZV 17-30965A a institucionální podporou Univerzity Karlovy PROGRES Q26/LF1/3.

Abstrakt

Buňky savců jsou ve svém bioenergetickém metabolismu závislé na produkci ATP především pomocí systému oxidační fosforylace (OXPHOS). Poruchy správné funkce OXPHOS mohou vést ke vzniku dědičných mitochondriálních onemocnění s různou závažností a rozmanitými projevy. Nejvážněji bývají zasaženy tkáně s vysokými energetickými nároky, které jsou však obtížně dostupné pro biochemická a jiná vyšetření. Cílem práce bylo především charakterizovat dopady mutací sedmi různých genů (*OPA1*, *DARS2*, *NDUFS8*, *NR2F1*, *HTRA2*, *MGME1*, *POLG*) na bioenergetický metabolismus a strukturu mitochondrií kožních kultivovaných fibroblastů osmi pacientů s mitochondriálním onemocněním. Hlavní použitou metodou bylo měření spotřeby kyslíku permeabilizovanými buňkami pomocí vysoce citlivé polarografie. Tímto způsobem byly zjištěny výrazné změny v respiraci fibroblastů čtyř pacientů. U dvou z nich a dvou dalších linií byly pomocí fluorescenční mikroskopie zjištěny změny morfologie mitochondriálního retikula oproti kontrolám při použití různých kultivačních podmínek. Kožní fibroblasty jsou relativně snadno dostupné a nabízí řadu výhod pro účely diagnostiky i studia. Výsledky této práce ilustrují možnosti jejich využití mj. pro validaci potenciálních kauzálních mutací mitochondriálních onemocnění, především však v kombinaci s dalšími metodami a tkáněmi.

Klíčová slova: mitochondrie, oxidativní fosforylace, vysoce citlivá polarografie

Abstract

In their bioenergetic metabolism mammalian cells are primarily dependent on ATP production through the oxidative phosphorylation system (OXPHOS). Defects of OXPHOS function can lead to occurrence of mitochondrial disorders with different severity and diverse symptoms. Most severely affected are usually tissues with high energy demand which are also difficult to access for biochemical and other examinations. The aim of this thesis was mainly to characterize the effects of mutations in seven different genes (*OPA1*, *DARS2*, *NDUFS8*, *NR2F1*, *HTRA2*, *MGME1*, *POLG*) on bioenergetic metabolism and mitochondrial network structure of skin fibroblasts from eight different patients diagnosed with mitochondrial disorders. The main method used was measurement of oxygen uptake by permeabilized cells using highly sensitive polarography. Significant changes in fibroblast respiration of four patients were found. Changes in mitochondrial network morphology were found in two of those and two other patient cell lines compared to controls using fluorescent microscopy and different cultivating conditions. Skin fibroblasts are relatively easy to obtain and offer a number of benefits for both diagnostic and study purposes. The results of this work illustrate the possibilities of their use for validation of potential causal mutations of mitochondrial diseases and other purposes, especially in combination with other methods and tissues.

Key words: mitochondria, oxidative phosphorylation, highly sensitive polarography

Seznam použitých zkratek

zkratka	český výklad	z anglického
143B	buněčná linie odvozená od lidského osteosarkomu	
2D-AGE	dvourozměrná agarozová gelová elektroforéza	2 dimensional agarose gel electrophoresis
7S-DNA	třetí řetězec DNA v oblasti D smyčky mtDNA	
ADOA	autosomálně dominantní atrofie zrakového nervu	autosomal dominant optic atrophy
ADOA+	syndrom ADOA s dalšími příznaky	autosomal dominant optic atrophy +
adPEO	autosomálně dominantní progresivní externí oftalmoplegie	
AHS	Alpers-Huttenlocherův syndrom	
angl.	anglicky	
ANS	spektrum ataxie neuropatie	ataxia-neuropathy spectrum
arPEO	autosomálně recesivní progresivní externí oftalmoplegie	
ARS	aminoacyl-tRNA-syntetáza	
ATB	antibiotický a antimykotický roztok	
ATCC		American Type Culture Collection
ATP	adenosintrifosfát	
<i>C10orf2</i>	alternativní název genu <i>TWNK</i>	
CCCP	karbonylkyanid 3-chlorofenylhydrazon	
CI, CII, CIII, CIV	komplexy dýchacího řetězce I–IV	complex I-IV
CJs	místa přechodu hraniční membrány v kristy	cristae junctions
CMOS	typ senzoru digitálního fotoaparátu	complementary metal-oxide semiconductor
CMT2A	Charcot-Marie-Toothova choroba typu 2A	
CNS	centrální nervový systém	

COSCOFA	konvenční strand-coupled asociovaný s Okazakiho fragmenty	conventional strand-coupled Okazaki fragment associated
COX	cytochrom-c-oxidáza	
CPEO	chronická progresivní externí oftalmoplegie	
CSB1-3	konzervovaný sekvenční blok 1-3	conserved sequence block
D-loop	díplacement loop	
<i>DARS2</i>	gen mitochondriální aspartyl-tRNA- syntetázy	
DMEM		Dulbecco's Modified Eagle medium
DMSO	dimethylsulfoxid	
DNA	deoxyribonukleová kyselina	
DNA2	ATP-dependentní helikáza/nukleáza DNA replikace	DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease
<i>DNM1L</i>	gen proteinu Drp1	dynamamin 1 Like
Dnm2	dynamamin 2	
DOA	dominantní optická atrofie	
DOA+	syndrom DOA s dalšími příznaky	
Drp1	protein příbuzný dynaminu 1	dynamamin-related protein 1
dsDNA	dvouvláknová DNA	double strand DNA
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová	ethylenediaminetetraacetic acid
EEG	elektroencefalografie	
EMG	elektromyografie	
ER	endoplasmatické retikulum	
ETC	dýchací řetězec	electron transport chain
FAD, FADH ₂	flavinadeninukleotid, oxidovaná a redukována forma	
<i>FARS2</i>	gen mitochondriální fenylalanyl- tRNA-syntázy	
Fas	FS-7 asociovaný povrchový antigen	FS-7-associated surface antigen
FASTK	serin/threonin kináza aktivovaná Fas	Fas-activated serine/threonine kinase
FBS	fetální hovězí sérum	fetal bovine serum

FCCP	karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazon	
Fe-S centrum	železo-sirné centrum	
FEN1	endonukleáza specifická pro struktury přesahů 1	flap structure-specific endonuclease 1
FH2	doména homologní forminu 2	formin homology 2
Fzo	protein homologní mitofuzinu u <i>Drosophila melanogaster</i>	fuzzy onion
Fzo1	protein homologní mitofuzinu u <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	fuzzy onion 1
GARS	gen glycyl-tRNA-syntetázy	
GAU	peptid kódovaný mtDNA bez známé funkce	gene antisense ubiquitous
GED	GTPázová efektorová doména	
Gly	Glycin	
GTP	guanosintrifosfát	
H řetězec	těžký řetězec	heavy
HeLa	buněčná linie odvozená od nádoru děložního krčku	
HR1	proteinová doména tvořící nadšroubovicové struktury	heptad repeat 1
HR2	proteinová doména tvořící nadšroubovicové struktury	heptad repeat 2
HSP	promotor těžkého řetězce	heavy strand promoter
IAP	inhibitor apoptózy	inhibitor of apoptosis
IBM	vnitřní hraniční membrána	inner boundary membrane
IMS	mezimembránový prostor	inter-membrane space
INF2	invertovaný formin obsahující FH2 a WH2 doménu	inverted formin, FH2 and WH2 domain containing
INS-1	linie odvozená od β buněk potkana	insulin secreting 1
KARS	gen lysyl-tRNA-syntetázy	
L řetězce	lehký řetězec	light
I-OPA1	dlouhá forma OPA1	long-OPA1

LA	laktátová acidóza	
LBSL	leukoencefalopatie s postižením mozkového kmene, míchy a zvýšeným laktátem	leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and lactate elevation
LHON	Leberova hereditární optická neuropatie	
<i>LIG3</i>	gen DNA ligázy III	
LS	Leighův syndrom	
LSP	promotor lehkého řetězce	light strand promoter
Lys	lysin	
MCHS	spektrum dětské myocerebrohepatopatie	childhood myocerebrohepatopathy spectrum
MELAS	syndrom mitochondriální encefalomyopatie, laktátové acidózy a epizod podobných mozkové příhodě	mitochondrial encephalomyopathy and lactic acidosis and stroke-like episodes syndrome
MEMSA	syndrom myoklonické epilepsie, myopatie a sensorické ataxie	myoclonic epilepsy myopathy sensory ataxia
MFF	faktor mitochondriálního štěpení	mitochondrial fission factor
Mfn1	mitofusin 1	
Mfn2	mitofusin 2	
MGME1	exonukleáza údržby mitochondriálního genomu 1	mitochondrial genome maintenance exonuclease 1
MICOS	proteinový komplex zajišťující strukturu CJs	mitochondrial contact site and cristae organizing system
MiD49	protein mitochondriální dynamiky o hmotnosti 49 kDa	mitochondrial dynamics proteins of 49 kDa
MiD51	protein mitochondriální dynamiky o hmotnosti 51 kDa	mitochondrial dynamics proteins of 51 kDa
MIRAS	syndrom mitochondriální recesivní ataxie	mitochondrial recessive ataxia syndrome
MNGIE	mitochondriální neurogastrointestinální	

	encefalopatie	
MOTS-c	peptid kódovaný mtDNA	mitochondrial-derived peptide
mRNA	mediátorová RNA	messenger RNA
<i>MT-ATP8, MT-ATP6</i>	geny podjednotek komplexu V v mtDNA	
<i>MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3</i>	geny podjednotek komplexu IV v mtDNA	
<i>MT-CYB</i>	gen cytochromu <i>b</i>	
<i>MT-ND1, MT-ND2, MT-ND3, MT-ND4, MT-ND4L, MT-ND5, MT-ND6</i>	geny podjednotek komplexu I v mtDNA	
mtDNA	mitochondriální DNA	
MTERF1	mitochondriální transkripční terminační faktor 1	mitochondrial transcription termination factor 1
mtPAP	mitochondriální polyA polymeráza	
MTS	mitochondriální cílicí sekvence	mitochondrial targeting sequence
mtSSB	mitochondriální protein vázající jednořetězcovou DNA	mitochondrial single-stranded DNA-binding protein
N2, N5, N6a	železo-sírná centra komplexu I	
NADH	nikotinamidadenindinukleotid	
NARP	neurogení slabost, ataxie a retinitis pigmentosa	Neurogenic muscle weakness, ataxia and retinitis pigmentosa
NCR	nekódující oblast mtDNA	non-coding region
ND1, ND2, ND4L, ND5, ND5, ND6	podjednotky komplexu I kódované mtDNA	
nDNA	jaderná DNA	nuclear DNA
NDUFAB1, NDUFS8, NDUFV1	podjednotky komplexu I	
NR2F1	jaderný receptor 1 podrodiny 2, skupiny F	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1
O _H	počátek replikace těžkého řetězce mtDNA	origin of heavy strand repliacation
O _L	počátek replikace lehkého řetězce	orogin of light strand replication

	mtDNA	
OMA1	mitochondriální metaloproteáza	
OPA1	GTPáza OPA1	optic atrophy 1
Ori-b	alternativní počátek replikace těžkého řetězce mtDNA	
Ori-Z	oblast možného počátku replikace mtDNA	ori zone
OXPPOS	oxidační fosforylace	oxidative phosphorylation
PBS	fosfátový pufr s NaCl	phosphate buffered saline
PD-(D/E)XK	superrodina nukleáz	
PDZ	vazebná proteinová doména	PSD-95, Dlg1, ZO-1
PEO	progresivní externí oftalmoplegie	
PEO1	alternativní název genu <i>TWNK</i>	progressive external ophthalmoplegia 1
PINK1	mitochondriální serin/threonin kináza	PTEN-induced kinase 1
PMR	psychomotorická retardace	
PMSF	polymethylsulfonylfluorid	
PolB, PolH, PolQ, PolZ	DNA-polymeráza B, H, Q, Z	
POLG	katalytická podjednotka polymerázy gamma	
POLG2	pomocná podjednotka polymerázy gamma	
pre-mRNA	prekurozor mRNA	
PrimPol	primáza a DNA řízená polymeráza	primase and DNA directed polymerase
RecB	podrodina nukleáz	
RITOLS	inkorporace ribonukleotidů v celém opožďujícím se řetězci	ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand
RNA	ribonukleová kyselina	
RPA	jaderný protein vázající jednořetězcovou DNA	replication protein A
RRF	drsná červená vlákna	ragged red fibers
rRNA	ribozomální RNA	

s-OPA1	krátká forma OPA1	short OPA1
SANDO	syndrom senzorické ataxie, neuropatie, dysartrie a oftalmoplegie	sensory ataxia-neuropathy- dysarthria-ophthalmoplegia
SCAE	spinocerebelární ataxie s epilepsií	spinocerebellar ataxia with epilepsy
SDH	sukcinátdehydrogenáza	
SDM	model vytěsňování řetězce	strand-displacement model
SIMH	stresem vyvolaná hyperfúze mitochondrií	stress-induced mitochondrial hyperfusion
siRNA	malá interferující RNA	small interfering RNA
ssDNA	jednovláknová DNA	single strand DNA
<i>SURF1</i>	gen asemblačního faktoru komplexu IV	surfeit locus protein 1
T+E	trypsin + EDTA	
TAS	sekvence asociovaná s terminací	termination associated sequence
TEFM	mitochondriální transkripční elongační faktor	Transcription Elongation Factor, Mitochondrial
TFAM	mitochondriální transkripční faktor A	transcription factor A, mitochondrial
TFB2M	mitochondriální transkripční faktor B2	transcription factor B2, mitochondrial
<i>TMEM70</i>	gen proteinu nutného k biogenezi komplexu V	transmembránový protein 70
TMPD	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-p- phenylenediamin	
TOP1MT	DNA topoisoméráza I, mitochondriální	DNA topoisomerase I, mitochondrial
tRNA	transferová RNA	
tRNA ^{Met} , tRNA ^{Phe} ,	transferová RNA metioninu,	
tRNA ^{Val}	fenylalaninu, valinu	
<i>TWINK</i>	gen helikázy TWINKLE	

UPR	odpověď na nesbalené proteiny	unfolded protein response
UV-C	krátkovlnné ultrafialové záření	ultraviolet C
WES	sekvenování celého exomu	whole-exome sequencing
WGS	sekvenování celého genomu	whole-genome sequencing
WH2	proteinová doména vázající aktin	WASP-homology 2
WS	Westův syndrom	
XIAP	X vázaný inhibitor apoptózy	X-Linked Inhibitor Of Apoptosis
YME1L	mitochondriální metaloproteáza	YME1 like 1 ATPase

Obsah

1	TEORETICKÝ ÚVOD	1
1.1	MITOCHONDRIE.....	1
1.1.1	<i>Dynamika mitochondrií</i>	<i>3</i>
1.2	MITOCHONDRIÁLNÍ GENOM, REPLIKACE	10
1.2.1	<i>Mitochondriální genom</i>	<i>10</i>
1.2.2	<i>Modely replikace mitochondriální DNA</i>	<i>12</i>
1.2.3	<i>Proteiny replikace mitochondriální DNA.....</i>	<i>14</i>
1.2.4	<i>Odstranění primerů a ukončení replikace mitochondriální DNA</i>	<i>16</i>
1.3	MITOCHONDRIÁLNÍ PROTEOSYNTÉZA	19
1.3.1	<i>Mitochondriální transkripce, modifikace RNA.....</i>	<i>19</i>
1.3.2	<i>Aminoacyl-tRNA-syntetázy v mitochondriích</i>	<i>20</i>
1.3.3	<i>Mitochondriální translace.....</i>	<i>21</i>
1.4	OXIDAČNÍ FOSFORYLACE	21
1.4.1	<i>Mitochondriální komplex I a poruchy jeho funkce.....</i>	<i>24</i>
1.4.2	<i>Superkomplexy vnitřní mitochondriální membrány.....</i>	<i>25</i>
1.5	MITOCHONDRIÁLNÍ ONEMOCNĚNÍ.....	26
1.5.1	<i>Diagnostika mitochondriálních onemocnění</i>	<i>28</i>
1.5.2	<i>Měření spotřeby kyslíku</i>	<i>29</i>
2	CÍLE PRÁCE	36
3	MATERIÁL A METODY	37
3.1	MATERIÁL	37
3.1.1	<i>Buněčné linie.....</i>	<i>37</i>
3.1.2	<i>Použité chemikálie</i>	<i>39</i>
3.1.3	<i>Použité přístroje.....</i>	<i>41</i>
3.2	METODY	42
3.2.1	<i>Kultivace fibroblastů.....</i>	<i>42</i>
3.2.2	<i>Skladování, rozmrazování, sklizení a zamrazování fibroblastů.....</i>	<i>42</i>
3.2.3	<i>Respirometrie</i>	<i>43</i>
3.2.4	<i>Barvení a fotografování mitochondriálního retikula</i>	<i>45</i>
4	VÝSLEDKY	47
4.1	POSOUZENÍ FUNKCE MITOCHONDRIÍ POMOCÍ MĚŘENÍ RESPIRACE NA ÚROVNI KOŽNÍCH KULTIVOVANÝCH FIBROBLASTŮ. .	47
4.1.1	<i>Vliv věku a kultivačních podmínek na respiraci kontrolních linií.....</i>	<i>47</i>
4.1.2	<i>Respirace kožních kultivovaných fibroblastů pacientů s mitochondriálními poruchami.</i>	<i>49</i>
4.2	POSOUZENÍ MORFOLOGIE MITOCHONDRIÁLNÍHO RETIKULA FIBROBLASTŮ PŘI KULTIVACI ZA RŮZNÝCH PODMÍNEK.....	59

5	DISKUSE.....	62
5.1	Vliv věku na respiraci.....	62
5.2	RESPIRACE FIBROBLASTŮ PACIENTŮ S MITOCHONDRIÁLNÍMI PORUCHAMI	63
5.2.1	<i>Výsledky polarografických měření u buněk pěstovaných v mediu s obsahem galaktózy</i>	<i>70</i>
5.3	MORFOLOGIE MITOCHONDRIÁLNÍHO RETIKULA FIBROBLASTŮ PACIENTŮ S MITOCHONDRIÁLNÍMI PORUCHAMI.....	72
6	SHRnutí.....	75
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	76
8	PŘÍLOHY	CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.
8.1	HODNOTY RESPIRACE DĚTSKÝCH KONTROLNÍCH LINIÍ FIBROBLASTŮ PO KULTIVACI V MEDIU S OBSAHEM GLUKÓZY ..	CHYBA!
	ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.	
8.2	POMĚRY RESPIRACE DĚTSKÝCH KONTROLNÍCH LINIÍ FIBROBLASTŮ PO KULTIVACI V MEDIU S OBSAHEM GLUKÓZY	CHYBA!
	ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.	
8.3	HODNOTY RESPIRACE DĚTSKÝCH KONTROLNÍCH LINIÍ FIBROBLASTŮ PO KULTIVACI V MEDIU S OBSAHEM GALAKTÓZY	CHYBA!
	ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.	
8.4	POMĚRY RESPIRACE DĚTSKÝCH KONTROLNÍCH LINIÍ FIBROBLASTŮ PO KULTIVACI V MEDIU S OBSAHEM GALAKTÓZY .	CHYBA!
	ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.	
8.5	HODNOTY RESPIRACE DOSPĚLÝCH KONTROLNÍCH LINIÍ FIBROBLASTŮ PO KULTIVACI V MEDIU S OBSAHEM GLUKÓZY.	CHYBA!
	ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.	
8.6	POMĚRY RESPIRACE DOSPĚLÝCH KONTROLNÍCH LINIÍ FIBROBLASTŮ PO KULTIVACI V MEDIU S OBSAHEM GLUKÓZY ...	CHYBA!
	ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.	
8.7	HODNOTY RESPIRACE DOSPĚLÝCH KONTROLNÍCH LINIÍ FIBROBLASTŮ PO KULTIVACI V MEDIU S OBSAHEM GALAKTÓZY	CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.
8.8	POMĚRY RESPIRACE DOSPĚLÝCH KONTROLNÍCH LINIÍ FIBROBLASTŮ PO KULTIVACI V MEDIU S OBSAHEM GALAKTÓZY	CHYBA!
	ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.	
8.9	HODNOTY RESPIRACE FIBROBLASTŮ PACIENTŮ PO KULTIVACI V MEDIU S OBSAHEM GLUKÓZY	CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.
8.10	POMĚRY RESPIRACE FIBROBLASTŮ PACIENTŮ PO KULTIVACI V MEDIU S OBSAHEM GLUKÓZY	CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.
8.11	HODNOTY RESPIRACE FIBROBLASTŮ PACIENTŮ PO KULTIVACI V MEDIU S OBSAHEM GALAKTÓZY	CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.
8.12	POMĚRY RESPIRACE FIBROBLASTŮ PACIENTŮ PO KULTIVACI V MEDIU S OBSAHEM GALAKTÓZY	CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.

1 Teoretický úvod

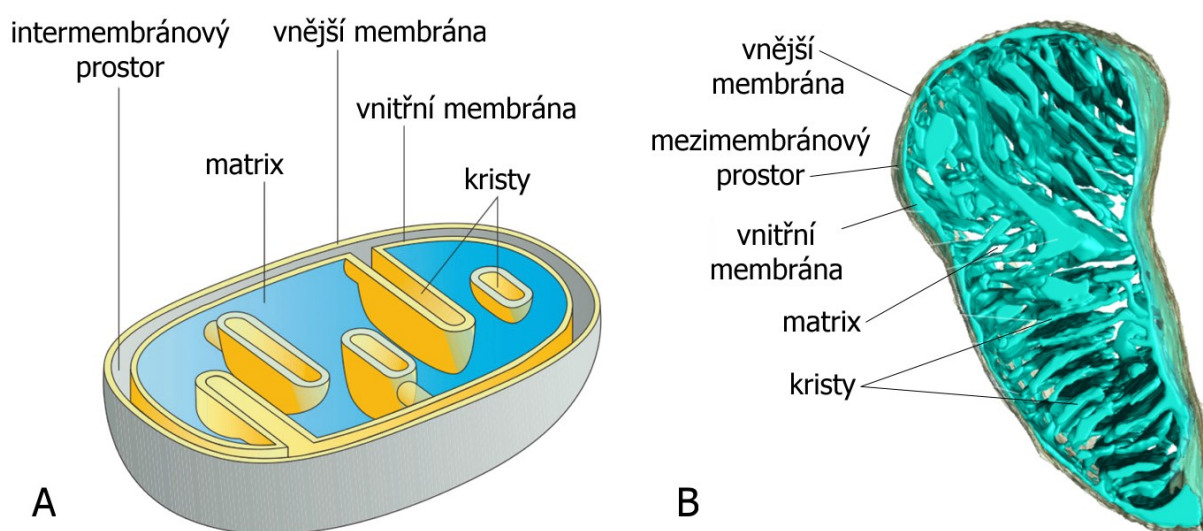
1.1 Mitochondrie

Mitochondrie jsou membránové organely přítomné v buňkách téměř všech eukaryotních organismů (Karnkowska et al., 2016). Jejich název vychází z řeckých slov *mitos* (vlákno) a *chondros* (zrno) a poprvé byly izolovány v roce 1948 (Krasich and Copeland, 2017). Mitochondrie zabírají asi 30 % objemu kardiomyocytu, avšak jejich celkové množství v buňce se může měnit až třicetkrát podle studované tkáně a ve většině buněk tvoří dynamické retikulum (kapitola 1.1.1) nebo řádově stovky jednotlivých organel (Kukat et al., 2011). Nejdůležitější a nejlépe prozkoumanou funkcí mitochondrií je produkce více než 90 % celkového ATP buňky v procesu zvaném oxidační fosforylace (OXPHOS) (Krasich and Copeland, 2017). Při něm jsou přenášeny elektrony na molekulový kyslík prostřednictvím elektron-transportního řetězce, jenž sestává ze 4 proteinových komplexů a dvou mobilních přenašečů (ubichinon a cytochrom *c*) za vzniku vody a gradientu protonů na vnitřní mitochondriální membráně. Tento gradient je následně využit pátým komplexem, F_1F_0 -ATPázou (ATP-syntázou) při katalýze vzniku ATP (kapitola 1.4)(Mitchell, 1961). Mitochondrie však hrají roli také v řadě dalších metabolických drah a buněčných procesů, jako např. oxidace mastných kyselin, Krebsův a močovinový cyklus, glukoneogeneze, ketogeneze, netřesová termogeneze, metabolismus aminokyselin a lipidů, syntéza hemu, steroidů a železo-sírných center, homeostáza vápníku, apoptóza, vrozená imunita, autofagie, redox signalizace, reprogramming a udržování kmenových buněk a regulace buněčného cyklu (El-Hattab and Scaglia, 2016; Katajisto et al., 2015; Picard et al., 2016). Krebsův a mitochondriální folátový cyklus navíc poskytují kofaktory a metabolity pro anabolické dráhy metabolismu deoxyribonukleotidů, syntézy glutathionu, metylačních reakcí aj. (Locasale, 2013).

Mitochondrie vznikly pravděpodobně endosymbiotickou událostí bakterie z příbuzenstva dnešního rodu *Rickettsia* s předkem dnešních eukaryotních organismů před 1,5–2 miliardami let (Wang and Wu, 2015). Jednou z hlavních stop prokaryotního původu mitochondrií je přítomnost mitochondriálního genomu v podobě cirkulární dvouvláknové molekuly mtDNA o délce 16569 bp (Andrews et al., 1999). V průběhu dlouhé evoluce Eukaryot však došlo ke ztrátě většiny genů bakteriálního předka této organely nebo k jejich transportu do jádra a dnešní mitochondrie tak více než 99 % z >1000 proteinů potřebných ke své funkci importují z cytosolu (Calvo et al., 2016). Lidská mitochondriální DNA dnes obsahuje pouze 37 genů, z toho 13 kóduje proteinové podjednotky komplexů OXPHOS (1.2.1) (Andrews et al., 1999). Pouze přibližně 150 nDNA kódovaných proteinů je přímo zapojeno při produkci ATP (Gorman et al., 2016), zbývající zastávají rozličné funkce, jako je asemblace a stabilizace komplexů OXPHOS, replikace a údržba mtDNA (kapitola 1.2.3), transkripce

mtDNA a zpracování mitochondriální mRNA, produkce mitochondriálních proteinů, včetně ribosomálních proteinů, aminoacyl-tRNA-syntetáz a proteinů úpravy mitochondriálních tRNA (kapitola 1.3), buněčná signalizace nebo zajišťování morfologie a dynamiky mitochondrií (Calvo et al., 2016; Picard et al., 2016).

Mitochondrie jsou charakteristické svojí dvojitou membránou, přičemž vnější mitochondriální membrána (outer mitochondrial membrane, OMM) pokrývající mitochondrii a tvořící ohraničení vůči cytosolu je hladká, zatímco vnitřní mitochondriální membrána (inner mitochondrial membrane, IMM) je zprohýbaná do útvarů zvaných kristy, zvětšujících její povrch (Obrázek 1) (Vogel et al., 2006). Prostor ohraničený vnitřní mitochondriální membránou se pak nazývá mitochondriální matrix.



Obrázek 1: Struktura mitochondriálních membrán. Vlevo: schéma mitochondriální dvojité membrány a kompartmentů mitochondrie. Vpravo: tomogram mitochondrie srdeční svalové buňky myši získaný kryoelektronovou mikroskopií. Vnitřní mitochondriální membrána tyrkysově, vnější membrána šedě. Převzato a upraveno dle (Kuhlbrandt, 2015)

Vnější mitochondriální membrána obsahuje velké množství proteinů umožňujících průchod malých molekul, zároveň však chrání zbytek buňky před reaktivními formami kyslíku, vznikajícími v mitochondriích, kontaktem s mtDNA, která má imunogenní účinky (Zhang et al., 2010) a molekulami vyvolávajícími apoptózu (Li et al., 1997).

Vnitřní mitochondriální membránu je možné rozdělit na vnitřní hraniční membránu (inner boundary membrane, IBM) pod vnější mitochondriální membránou, s níž ohraničuje mezimembránový prostor (inter-membrane space, IMS), kristy vybíhající jako hluboké invaginace do matrix a cristae junctions (CJs), místa přechodu IBM v kristy (Vogel et al., 2006). Nejdůležitější součástí membrány krist jsou komplexy OXPHOS (Gilkerson et al., 2003). Morfologie krist, jejich množství, tloušťka a otevřenost CJs se mění podle podmínek prostředí a potřeb buňky. Při kultivaci buněk v mediu s neglykolytickými substráty, jako je např. galaktóza, stoupá počet krist spolu se

zvyšujícím se množstvím proteinů OXPHOS a superkomplexů respiračního řetězce (Patten et al., 2014). Podobně při nedostatku živin se snižuje tloušťka krist, což zřejmě umožňuje efektivnější tvorbu dimerů ATP-syntázy a tím i funkci OXPHOS (Cogliati et al., 2013; Gomes et al., 2011). Zúžení krist také v některých situacích omezuje uvolnění proapoptotické molekuly cytochromu c do cytosolu, na této regulaci se důležitým způsobem podílí protein OPA1, jemuž se věnuje kapitola 1.1.1.2 (Frezza et al., 2006). S tímto dějem souvisí cristae junctions, otvory o průměru přibližně 20–50 nm na bázi krist, které spojují jejich vnitřní prostor s mezimembránovým prostorem. Jejich tvorbu a udržování zajišťuje proteinový komplex zvaný MICOS (mitochondrial contact site and cristae organizing system). Genetické odstranění komponent tohoto komplexu vede k narušení struktury vnitřní mitochondriální membrány a normálního a růstu buněk (Bohnert et al., 2015). Právě pro OPA1 byla ukázána přímá interakce s podjednotkami MICOS a jeho epistatický vztah při určování stability a počtu CJs (Glytsou et al., 2016).

1.1.1 Dynamika mitochondrií

Dynamika mitochondrií zahrnuje především dělení a splývání (fúzi) mitochondrií, v širším smyslu však také transport a mitofagii, tj. cílené odstranění některých mitochondrií prostřednictvím autofagické dráhy. Dělení mitochondrií je zásadní mj. v G2/M fázi buněčného cyklu, kdy umožňuje přibližně rovnoměrné rozdělení mitochondrií do obou dceřiných buněk (Taguchi et al., 2007). Zároveň se uplatňuje v procesech jako je buněčná motilita a migrace (Ferreira-da-Silva et al., 2015). Mitochondriální fúze na druhé straně zřejmě umožňuje výměnu obsahu mitochondrií včetně mtDNA a proteinů replikace a údržby mitochondriálního genomu, přičemž bylo ukázáno, že změny jejich stechiometrie vedou ke vzniku mutací nebo poklesu obsahu mtDNA (Chen et al., 2010). V souladu s tím je známo, že mutace genů kódujících proteiny mitochondriální fúze (kapitola 1.1.1.2) způsobují hromadění mutací mtDNA a snížení obsahu mtDNA (Hudson et al., 2008; Vielhaber et al., 2013). Změny fúze a dělení mitochondrií pak umožňují segregaci poškozených či nefunkčních mitochondrií a jejich odstranění v procesu mitofagie (zvláštní případ autofagie). Je to právě absence mitochondriální fúze mezi zdravými mitochondriemi a mitochondriemi obsahujícími mutantní mtDNA, která toto oddělení umožňuje (Enriquez et al., 2000). Nesprávně fungující mitochondrie jsou následně cíleně odstraněny pomocí mitofagie mj. na základě jejich sníženého membránového potenciálu (Youle and Narendra, 2011).

Nejlépe prostudovaná dráha mitofagie využívá proteiny PINK1 a Parkin, jejichž dysfunkce je silně implikovaná v některých případech autosomálně recesivní formy Parkinsonismu (Pickrell and Youle, 2015). PINK1 je kináza, která je za normálních okolností importována dovnitř mitochondrie a degradována. Vzhledem k tomu, že import mitochondriálních proteinů je závislý na membránovém potenciálu, způsobí depolarizace hromadění PINK1 na vnější mitochondriální membráně. Takto

nahromaděný PINK1 fosforyluje vícero proteinů včetně ubikvitinu, což způsobí navázání a aktivaci E3 ubikvitinligázy Parkin (Okatsu et al., 2015). To vede k ubikvitinylaci řady proteinů vnější mitochondriální membrány, což má za následek jejich degradaci prostřednictvím 26S proteasomu, vedoucí k cílení mitochondrie do autofagosomu (Sarraf et al., 2013). Zdá se, že tímto způsobem může mitofagie hrát zásadní úlohu mj. v mitochondriálních poruchách způsobených mutacemi mtDNA (kapitola 1.5) tím, že brání zvyšování hladiny heteroplazmie (Suen et al., 2010).

Morfologie mitochondriálního retikula se neustále přizpůsobuje metabolickým a jiným podmínkám. Mírný stres způsobuje vznik vysoce propojeného retikula elongovaných mitochondrií, buněčnou odpověď někdy nazývanou SIMH (Stress-Induced Mitochondrial Hyperfusion, stresem vyvolaná hyperfúze mitochondrií). Může se jednat o stres vyvolaný UV-C zářením, inhibicí RNA transkripce prostřednictvím actinomycinu D nebo translace pomocí cycloheximidu (Gomes et al., 2011). Nejobvyklejší je však zřejmě stres metabolický. U kvasinek kultivovaných v nefermentovatelných podmínkách, nutících buňky k vyšší aktivitě OXPHOS pro zajištění buněčného energetického metabolismu, dochází k elongaci mitochondriálního retikula (Egner et al., 2002). Podobného efektu je možné dosáhnout u lidských buněk při kultivaci v mediu bez glukózy s obsahem galaktózy, deoxyglukózy (Rossignol et al., 2004), nebo nedostatkem živin (Gomes et al., 2011), nemusí to tak ovšem být vždy a je také možné, že rozdílnost výsledků závisí na metodologii vyhodnocení morfologie mitochondrií (Agier et al., 2012). Existují návrhy, že elongované mitochondrie jsou efektivnější v produkci ATP (Skulachev, 2001), především se však zdá, že propojené retikulum stericky brání autofagické degradaci mitochondrií v zájmu udržení bioenergetiky v metabolicky náročných podmínkách (Gomes et al., 2011).

Naopak při dlouhodobém stresu, nedostatku živin, apoptóze nebo nekróze dochází k fragmentaci mitochondriálního retikula prostřednictvím několika různých signálních drah (Slupe et al., 2013). Souvislostí s předchozím odstavcem o mitofagii je pak ubikvitinylace proteinů mitochondriální fúze E3 ligázou Parkin následovaná jejich degradací a převahou proteinů zajišťujících dělení mitochondrií (Tanaka et al., 2010). Mitochondriální fúze, dělení a mitofagie tedy zajišťují rovnováhu mezi udržováním funkčního stavu mitochondrií mj. zajišťováním správné stechiometrie proteinů údržby a replikace mtDNA, odstraňováním poškozených organel a jejich nahrazováním biogenezí nových (Youle and van der Bliek, 2012). Při posuzování funkčního stavu mitochondriální fúze a dělení je důležité, že inhibice jednoho z těchto procesů vyvolá převahu druhého a naopak a že momentální stav mitochondriálního retikula přímo nevypovídá o tom, s jakou účinností probíhají (Malka et al., 2005).

Všechny proteiny dynamiky mitochondrií jsou jaderně kódované, nejdůležitější z nich jsou pak velké GTPázy z rodiny dynaminů. Ty jsou známé svou schopností oligomerizace a následné indukce změny morfologie membrán, ať už jejich konstrikcí a následným oddělením, nebo navozením jejich

splývání. Jsou to především proteiny Drp1 a Dnm2 pro dělení mitochondrií (Lee et al., 2016), Mfn1 a Mfn2 pro fúzi vnější membrány (Brandt et al., 2016) a OPA1 pro fúzi vnitřní mitochondriální membrány (Song et al., 2009).

1.1.1.1 Dělení mitochondrií

Hlavním proteinem dělení mitochondrií je nejspíš Drp1 (dynamamin related protein 1, protein příbuzný dynaminu, gen *DNM1L*, 12p11.21, 66,451 bp, 21 exonů) (Smirnova et al., 2001), zdá se však, že není sám schopen dokončit oddělení membrán a vyžaduje aktivitu proteinu Dnm2 (dynamamin 2) (Lee et al., 2016), jehož význam byl ale v nedávné době zpochybněn (Kamerkar et al., 2018). Drp1 obsahuje N-terminální GTPázovou doménu, střední doménu, variabilní doménu (také B-insert) a C-terminální GTPázovou efektorovou doménu (GED). Zřejmě tvoří spirálovité oligomerní útvary na povrchu mitochondrií a za hydrolýzy GTP je zaškrucuje (Kamerkar et al., 2018). Byly objeveny čtyři proteinové receptory umožňující vazbu Drp1 na vnější mitochondriální membránu, MFF (mitochondrial fission factor, faktor mitochondriálního štěpení), MiD49, MiD51 (mitochondrial dynamics proteins of 49/51 kDa, protein mitochondriální dynamiky o hmotnosti 49, resp. 51 kDa) a FIS1 (fission 1, štěpení 1) (Palmer et al., 2013).

Inhibice funkce Drp1 pomocí RNA interference vede k výskytu hyperfúzního mitochondriálního retikula (Smirnova et al., 2001). Drp1 je zřejmě vyžadován pro správný vývoj placenty a nervové soustavy a genový knockout *DNM1L* je embryonálně letální u myši, přičemž myši embryonální fibroblasty (MEFs) odvozené od těchto zvířat vykazují významné narušení morfologie mitochondrií (Ishihara et al., 2009). Knockout cílený na mozek dospělých myši nezpůsobí neurodegeneraci, ale naruší kognitivní funkce (Oettinghaus et al., 2016). Naopak overexprese *DNM1L* vede k fragmentaci mitochondrií a vyšší citlivosti vůči stimulům vyvolávajícím apoptózu (Lee et al., 2004). Farmakologická inhibice Drp1 navozuje elongaci mitochondrií a snižuje citlivost vůči apoptóze (Estaquier and Arnoult, 2007). Bylo ukázáno, že FIS1 není nezbytně potřebný pro dělení mitochondrií a zdá se, že funkci adaptoru pro Drp1 zastává pouze v určitých buněčných typech nebo za specifických podmínek. Jeho knockdown způsobí elongaci mitochondrií, zatímco overexprese vede ke zvýšené fragmentaci (Shen et al., 2014). Za normálních podmínek zřejmě závisí navázání Drp1 na vnější membránu mitochondrií především na MFF, jeho knockout způsobí elongaci mitochondrií a overexprese fragmentaci (Loson et al., 2013). Role MiD49 a MiD51 je méně jasná, přičemž bylo např. ukázáno, že MiD51 knockout může vést jak k elongaci, tak fragmentaci mitochondriálního retikula (Palmer et al., 2011; Zhao et al., 2011). Mutace *DNM1L* mohou způsobit letální poruchu vývoje mozku s řadou dalších možných příznaků (Yoon et al., 2016). Patogenní mutace byly identifikovány i v genech kódujících proteiny Dnm2, MFF a MiD49 (Bartsakoulia et al., 2018; Bitoun et al., 2005; Koch et al., 2016).

Důležitou roli v dělení mitochondrií hraje endoplasmatické retikulum (ER). Bylo ukázáno, že obaluje místa budoucího dělení a snižuje průměr mitochondrie v těchto místech z 300–500 nm na přibližně 150 nm, čímž zřejmě umožňuje vytvoření oligomerního prstence Drp1 (Friedman et al., 2011). Adaptory Drp1 jako MFF, MiD49 a MiD51 jsou před dělením koncentrovány v těchto kontaktních místech mitochondrií a ER (Osellame et al., 2016). V tomto ději pravděpodobně hraje důležitou roli i aktinový cytoskelet (De Vos et al., 2005), především pod vlivem proteinů vyvolávajících nukleaci aktinu INF2 (Inverted Formin, FH2 And WH2 Domain Containing, invertovaný formin obsahující FH2 a WH2 doménu) a Spire1C (Korobova et al., 2013; Manor et al., 2015), ale i dalších (Rehklau et al., 2017). Drp1 navíc *in vitro* váže F-actin, což podporuje jeho oligomerizaci a GTPázovou aktivitu (Ji et al., 2017). Do míst kontaktu mitochondrií a ER jsou lokalizovány nukleoidy obsahující mtDNA (kapitola 1.2) a zdá se, že proces dělení je přímo spřažen s replikací mitochondriálního genomu v těchto místech, což by mohlo poskytovat mechanismus přibližně rovnoměrného rozdělení mtDNA do obou vznikajících organel (Lewis et al., 2016).

Zatím není příliš dobře známo, jakým způsobem dochází ke konstrikcii a rozdělení vnitřní mitochondriální membrány. Bylo pozorováno zaškrcení IMM nebo dokonce rozdělení prostoru matrix bez přerušení vnější mitochondriální membrány u kvasinky (Legesse-Miller et al., 2003), *Caenorhabditis elegans* (Labrousse et al., 1999) i savců (Fujioka et al., 2012). Možnou roli v tomto procesu hraje protein OPA1 (kapitola 1.1.1.2), konkrétně jeho krátká forma s-OPA1. Bylo zjištěno, že overexprese OPA1 může vyvolat fragmentaci mitochondriálního retikula a zároveň, že s-OPA1 kolokalizuje s místy dělení mitochondrií (Anand et al., 2014). Přejmenším v případě prvního z dějů se zdá, že je regulován vstupem Ca^{2+} iontů do mitochondrií vedoucím k poklesu membránového potenciálu, což má za následek štěpení OPA1 za vzniku krátké formy proteázou OMA1 (kapitola 1.1.1.2) (Cho et al., 2017).

1.1.1.2 Fúze mitochondrií

Fúze mitochondrií je zajišťována především třemi velkými GTPázami, Mfn1 (mitofusin-1) a Mfn2 (mitofusin-2) pro vnější mitochondriální membránu a OPA1 (Mitochondrial Dynamitin Like GTPase, mitochondriálnímu dynamitinu podobná GTPáza) pro fúzi vnitřní mitochondriální membrány (Song et al., 2009). Určitou zatím neznámou roli zřejmě hrají i jiné proteiny, jako FBXL4 (F-box and leucine-rich repeat 4) (Huemer et al., 2015). Jejich mutace způsobují řadu mitochondriálních onemocnění často doprovázených mimo jiného mutacemi a sníženým množstvím mtDNA (Hudson et al., 2008; Vielhaber et al., 2013).

Frekvence mitochondriální fúze závisí na buněčném typu a nejspíš je méně častá v tkáni než buněčné kultuře (Eisner et al., 2014). Obecně probíhá s frekvencí přibližně 5–20 min na jednu událost a mitochondrii, přičemž se zdá, že přibližně 20 % kontaktů mitochondrií vyústí ve fúzi (Twig et al.,

2008). Není zcela jasné, jakým způsobem je koordinována fúze vnější a vnitřní mitochondriální membrány. U kvasinky existuje protein Ugo1p, který propojuje homology Mfn a OPA1 a tím sladuje jejich funkci (Sesaki and Jensen, 2004). Chemickým zásahem je sice možné u buněk savců oba procesy oddělit, fyziologická relevance tohoto jevu je však nejistá (Malka et al., 2005).

Homolog Mfn byl poprvé charakterizován u *Drosophila melanogaster* jako Fzo1 (Hales and Fuller, 1997) a později také u kvasinky (Hermann et al., 1998). Mfn1 (3q26.33, 47,253 bp, 17 exonů) je 741 aminokyselinových zbytků dlouhý, zatímco Mfn2 (1p36.22, 33,335 bp, 19 exonů) je dlouhý 757 zbytků. Oba proteiny sdílí 64 % identických zbytků. Dlouhou dobu se myslelo, že oba proteiny jsou umístěny ve vnější mitochondriální membráně dvěma transmembránovými doménami, s N-koncem obsahujícím GTPázovou a HR1 (heptad repeat) domény a C-koncem obsahujícím HR2 (heptad repeat 2) doménu směrem do cytosolu (Rojo et al., 2002). Oba proteiny tvoří homotypické i heterotypické komplexy na membránách splývajících mitochondrií před fúzí, následuje přiblížení obou membrán a zvětšení kontaktní plochy a fúze obou membrán umožněná hydrolýzou GTP vyvolávající konformační změnu mitofusinů (Brandt et al., 2016). Bylo navrženo několik modelů funkce Mfn proteinů při fúzi membrán mitochondrií (Huang et al., 2017), nedávné poznatky však zpochybňují výše popsanou topologii založenou na znalosti kvasinkového ortologu Fzo1 (Low et al., 2009) a ukazují na topologii novou s jednou transmembránovou doménou a HR2 doménou v mezimembránovém prostoru (Mattie et al., 2018). Mutace Mfn2 způsobují Charcot-Marie-Toothovu chorobu typu 2A (Charcot-Marie-Tooth disease Type 2A, CMT2A), periferní neuropatii projevující se především distální svalovou slabostí a atrofií a dalšími symptomy, která může být asociovaná s delecemi a sníženým množstvím mtDNA (Vielhaber et al., 2013). Dále byly nalezeny u pacientů s autosomálně dominantní optickou atrofií a dalšími symptomy (ADOA+, viz níže)(Rouzier et al., 2012).

Protein OPA1 (3q29, 104,668 bp, 32 exons) se nachází v mezimembránovém prostoru mitochondrií. Alternativním sestřihem exonů 4, 4b a 5b mRNA OPA1 vzniká 8 variant o délce 924–1014 aminokyselinových zbytků. Těchto osm variant je možné nalézt ve všech tkáních, ovšem v různém množství, přičemž varianty obsahující exon 4 jsou obecně více zastoupeny. Exon 4 je evolučně konzervovaný, zatímco exony 4b a 5b jsou charakteristické pro obratlovce (Olichon, Elachouri, et al., 2007). Na N konci se nachází mitochondriální cílicí sekvenční (mitochondrial targeting sequence, MTS), za ní transmembránová doména procházející IMM následovaná HR doménou. V mezimembránovém prostoru jsou dále tři domény typické pro dynaminy, GTPázová doména, střední doména a GTPázová efektorová doména (Olichon, Elachouri, et al., 2007). Po importu a ukotvení do vnitřní membrány dochází k odštěpení MTS pomocí mitochondriální procesující peptidázy (mitochondrial processing peptidase, MPP), čímž vzniká dlouhá forma proteinu, l-OPA1. Ta může být dále štěpena na dvou místech, v oblasti exonu 5 metaloproteázou OMA1 nebo exonu 5b metaloproteázou YME1L, čímž vzniká solubilní krátká forma s-OPA1 (Ehse et al., 2009). Čtyři

isoformy obsahující exon 4b jsou vždy zcela štěpeny na krátkou formu. Zatímco YME1L je konstitutivně aktivní a reaguje na množství ATP a stimulaci oxidační fosforylace (Mishra et al., 2014), OMA1 se aktivuje při disipaci mitochondriálního membránového potenciálu ve stresu nebo při dysfunkci mitochondrií, což vede k jejich fragmentaci, a následně se autokatalyticky degraduje (Baker et al., 2014). Je známo, že pro správnou funkci v dynamice mitochondrií je třeba určitý vyrovnaný poměr dlouhých a krátkých forem OPA1 (Anand et al., 2014).

Fúze vnitřní mitochondriální membrány ovšem není jediný proces, v němž OPA1 zřejmě hraje roli. Dále se podílí především na organizaci krist vnitřní mitochondriální membrány, s čímž pravděpodobně souvisí i jeho funkce v apoptóze (Cogliati et al., 2013; Frezza et al., 2006), údržbě mitochondriálního genomu (Elachouri et al., 2011; Hudson et al., 2008), skládání a efektivní funkci superkomplexů respiračního řetězce a celého systému oxidační fosforylace (kapitola 1.4)(Cogliati et al., 2013) nebo Ca²⁺ homeostáze (Fulop et al., 2015). Funkce jednotlivých izoform a dlouhých a krátkých variant OPA1 v těchto procesech je nejasná. Genový knockout *OPA1* je embryonálně letální u myši a fibroblasty odvozené od hemizygotních myši s jednou alelou kódující nefunkční zkrácený protein vykazují výrazně fragmentované mitochondriální retikulum (Davies et al., 2007). Podobně působil knockout či knockdown u různých savčích linií (Griparic et al., 2004; Lee et al., 2004; Song et al., 2009), zatímco při nadexpresi *OPA1* byla ukázána jak fragmentovaná, tak elongovaná morfologie retikula (Griparic et al., 2004; Misaka et al., 2002). I ve fibroblastech pacientů s patogenními mutacemi *OPA1* byla zjištěna fragmentace retikula spojená se zvýšenou mitofagií (Liao et al., 2017), což je v souladu s pozorováním u myších embryonálních fibroblastů postrádajících funkční *OPA1* (Rambold et al., 2011), stejně jako se zjištěním, že nadexprese *OPA1* v buňkách INS-1 odvozených od insulin sekretujících beta buněk potkana inhibuje proces mitofagie (Twig et al., 2008). Knockout i knockdown *OPA1* dále naruší normální strukturu krist (Cogliati et al., 2013), což vede mimo jiné k vyšší citlivosti vůči stimulům vyvolávajícím apoptózu a snazšímu uvolňování cytochromu c a spuštění apoptotické kaskády (Frezza et al., 2006; Griparic et al., 2004). Podobně je tomu opět i u fibroblastů nesoucích patogenní mutace (Olichon, Landes, et al., 2007). Naopak nadexprese způsobí zvýšení počtu krist a redukci jejich šířky (Cogliati et al., 2013), spolu s nižší senzitivitou k apoptóze (Frezza et al., 2006). Tento efekt pravděpodobně souvisí také s pozorovanou vyšší odolností vůči ischemickému poškození srdečních buněk (Varanita et al., 2015), zároveň však bylo ukázáno, že umělé zvýšení množství *OPA1* stabilizuje komplexy dýchacího řetězce a zvyšuje účinnost oxidační fosforylace a dokonce potlačuje projevy patogenních mutací v genech kódujících podjednotku komplexu I, resp. IV u dvou myších modelů mitochondriálních onemocnění (Civiletto et al., 2015). Knockout *OPA1* způsobí pokles obsahu mitochondriální DNA (Chen et al., 2010), méně častý je tento jev ve vláknech příčně pruhované svaloviny pacientů s mutacemi *OPA1* (Spiegel et al., 2016), u nichž se ovšem často nachází delece v mtDNA (Hudson et al., 2008).

Původně se mělo za to, že k mitochondriální fúzi jsou potřeba jak dlouhé, tak krátké formy OPA1, podobně jako je tomu u kvasinky (DeVay et al., 2009), ovšem v případě dvojitého knockoutu YME1L a OMA1 znemožňujícího normální vznik s-OPA1 nacházíme vysoce propojené retikulum (Anand et al., 2014). Stejně tak buňky exprimující pouze neštěpitelnou dlouhou formu OPA1 vykazují funkční mitochondriální fúzi, ovšem jejich mitochondrie zůstávají fragmentované (Del Dotto et al., 2017; Song et al., 2009). Přestože buňky exprimující pouze krátkou formu vykazují určitou fúzi mitochondrií, s-OPA1 sama nezajistí jejich normální morfologii (Del Dotto et al., 2017), ovšem její přítomnost ji akceleruje v kombinaci s dlouhou formou (Ban et al., 2017). Funkce jednotlivých isoformů lze dohadovat z výsledků pokusů, při nichž bylo selektivně sníženo množství jednotlivých exonů, přičemž v případě exonu 4 došlo ke ztrátě membránového potenciálu mitochondrií a fragmentaci retikula, zatímco v případě exonu 4b i 5b došlo k navození apoptózy (Olichon, Elachouri, et al., 2007). Zároveň bylo zjištěno, že N-konec OPA1 spolu s exonem 4b se nejspíš podílí na vazbě nukleoidů obsahujících mtDNA (kapitola 1.2.1) k vnitřní mitochondriální membráně a absence isoformů obsahujících tento exon je spojena s deplecí mtDNA (Elachouri et al., 2011). Selektivní exprese kterékoliv z isoformů OPA1 v myších embryonálních fibroblastech vede k obnově struktury krist a superkomplexů dýchacího řetězce i ATP-syntázy a množství mtDNA, přičemž s-OPA1 bez přítomnosti dlouhé formy účinněji odstraní defekty respirace a správné funkce superkomplexů než obráceně (Del Dotto et al., 2017; Lee et al., 2017). K plnému obnovení morfologie mitochondrií je pak zapotřebí exprese minimálně dvou isoformů umožňujících vznik s-OPA1 i l-OPA1 v určitém poměru (Del Dotto et al., 2017).

V roce 2000 bylo zjištěno, že mutace *OPA1* způsobují autosomálně dominantní atrofii optického nervu (ADOA), progresivní onemocnění způsobující slepotu (Delettre et al., 2000). ADOA byla popsána v roce 1959 (KJER, 1959) a dochází při ní ke ztrátě gangliových buněk sítnice, jejichž axony tvoří *nervus opticus* vedoucí do mozku, způsobující progresivní ztrátu zrakové ostrosti (Delettre et al., 2000). Jedná se pravděpodobně o nejčastější dědičnou optickou neuropatii v přibližně 60 procentech případů způsobenou mutací *OPA1* s prevalencí nejméně 1:50000 (Yu-Wai-Man, Griffiths, Burke, et al., 2010). Závažnost se pohybuje od subklinického fenotypu až po úplnou ztrátu zraku a věk nástupu se různí od narození až po více než 60 let (Baris et al., 2003; Nochez et al., 2009). Jsou známy i výjimečné případy spontánního zotavení (Cornille et al., 2008). Později se ukázalo, že k ADOA se při mutaci tohoto genu mohou přidávat mnohé další projevy, včetně sensorineurální hluchoty, ataxie, myopatie, chronické progresivní externí oftalmoplegie (PEO) a periferní neuropatie (Hudson et al., 2008). Tato syndromická forma, která se objevuje asi u 20 % pacientů s mutací *OPA1* (Yu-Wai-Man, Griffiths, Gorman, et al., 2010), se někdy označuje ADOA+. Jako samostatný syndrom se pak dá označit časná a závažná autosomálně recesivní forma často odpovídající klinickými projevy Behrovu syndromu. Ten se projevuje atrofií *nervi optici* s časným nástupem, spinocerebelární degenerací, ataxií, periferní

neuropatií, gastrointestinální dysmotilitou a zpomaleným vývojem (Carelli et al., 2015). Častým projevem mutací *OPA1* je také akumulace delecí v mtDNA především ve vláknech kosterní svaloviny (Hudson et al., 2008), výjimečně i deplece mitochondriální DNA zjištěná ve svalech (Spiegel et al., 2016) či leukocytech pacientů (Kim et al., 2005).

V současné době je známo přibližně 550 mutací *OPA1*, přičemž asi 65 % je patogenních (Ferre et al., 2015). Z nich více než dvě třetiny se nachází v konzervované GTPázové doméně nebo GED. Zhruba 50 % patogenních mutací přitom způsobuje posun čtecího rámce a předčasné ukončení translace, v těchto případech je hlavním patologickým mechanismem haploinsuficience způsobená úplnou ztrátou funkce mutované alely (Ferre et al., 2015). U pacientů se syndromickou variantou ADOA+ se ovšem častěji vyskytují dominantně negativní substituční mutace (Yu-Wai-Man, Griffiths, Burke, et al., 2010), zatímco v případě Behrova syndromu je častá kombinace patogenní varianty způsobující ADOA s mírnější samostatně neškodnou (hypomorfní) mutací (Carelli et al., 2015). Toto pravidlo, kdy nesyndromická ADOA je způsobována haploinsuficiencí zkrácením proteinu jedné alely, ADOA+ s nástupem obvykle v rané dospělosti dominantně negativní záměnovou mutací a závažnější Behrův syndrom s počátkem před třetím rokem života má svůj původ v bialeické kombinaci patogenní a hypomorfní mutace, má ovšem i své výjimky (Yu-Wai-Man, Griffiths, Gorman, et al., 2010).

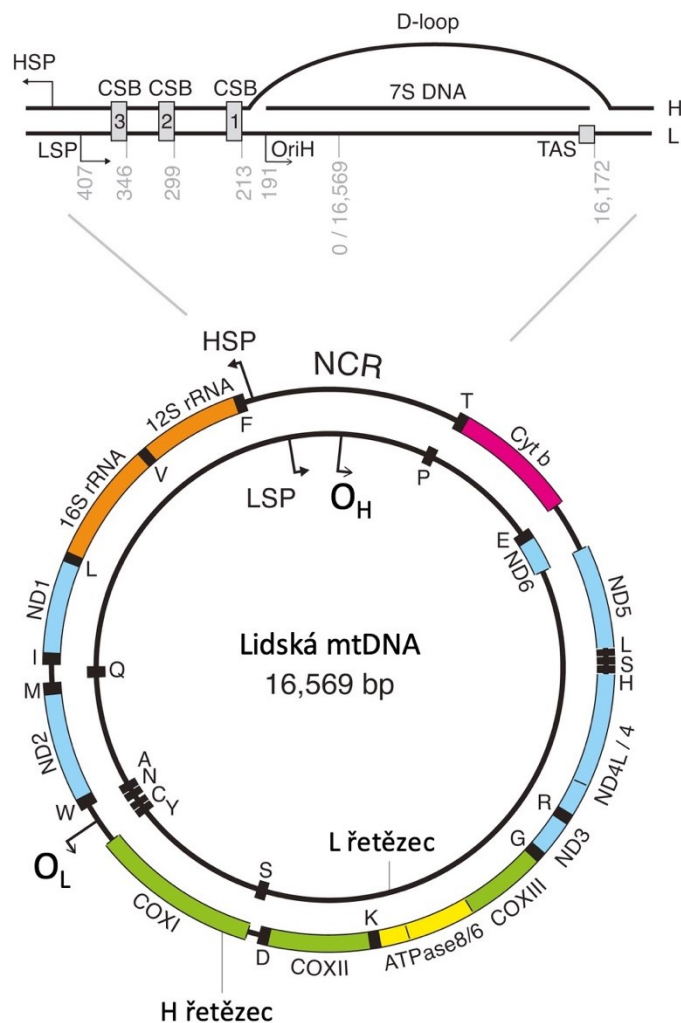
1.2 Mitochondriální genom, replikace

1.2.1 Mitochondriální genom

Mitochondriální DNA byla poprvé objevena v roce 1963 v mitochondriích ptačího embrya a ve stejném roce izolována z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (NASS and NASS, 1963; SCHATZ, 1963). V případě člověka se jedná o 16659 nt dlouhou cirkulární molekulu (Andrews et al., 1999), která je v buňce přítomna ve stovkách až tisících kopiích (Kukat et al., 2011) (Obrázek 2). Nese pouze 37 genů, z nichž 13 kóduje proteinové podjednotky komplexů I, III, IV a V systému oxidační fosforylace (*MT-ATP6*, *MT-ATP8*, *MT-CO1*, *MT-CO2*, *MT-CO3*, *MT-CYB*, *MT-ND1*, *MT-ND2*, *MT-ND3*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, *MT-ND5*, *MT-ND6*), 2 kódují mitochondriální ribosomální RNA a 22 mitochondriální tRNA (Andrews et al., 1999). Kromě těchto proteinů a RNA mitochondriální genom možná kóduje i 3 krátké peptidy zvané humanin, *GAU* a *MOTS-c* (Faure et al., 2011; Lee et al., 2015; Maximov et al., 2002). Oba řetězce mitochondriální DNA je v důsledku rozdílného nukleotidového složení možné rozdělit v gradientu chloridu cesného, čímž získáme lehký (L, light) a těžký (H, heavy) řetězec (Welter et al., 1988).

Mitochondriální genom je velmi úsporně uspořádaný, neobsahuje introny a velmi málo nekódující DNA. Největším nekódujícím úsekem je nekódující oblast (NCR, non-coding region) o rozsahu přibližně 1000 bp, obsahující transkripční promotory pro oba řetězce, zvané LSP (light strand

promoter, promotor lehkého řetězce) a HSP (heavy strand promoter, promotor těžkého řetězce), tradiční počátek replikace těžkého řetězce O_H , a tři konzervované oblasti zvané CSB1–3 (conserved sequence block, konzervovaný sekvenční blok) (Andrews et al., 1999). V úseku mezi O_H a sekvencí asociovanou s ukončením replikace (TAS, termination associated sequence) se často objevuje přibližně 650 nt dlouhý třetí řetězec DNA, zvaný 7S-DNA, který vzniká zřejmě předčasným ukončením replikace těžkého řetězce. Tato třívláknová oblast se potom nazývá D-loop (displacement loop) (Doda et al., 1981). Mitochondriální DNA je uspořádaná spolu s řadou proteinů do útvarů velikosti zhruba 100 nm obsahujících nejčastěji jednu kopii mitochondriálního genomu, zvaných nukleoidy (Kukat et al., 2011). Hlavním proteinem sbalování mtDNA je TFAM (Transcription Factor A, Mitochondrial; mitochondriální transkripční faktor A) (Kukat et al., 2011), ovšem v nukleoidu nalézáme řadu dalších proteinů replikace a údržby mitochondriálního genomu. Kromě toho nukleoidy obsahují i proteiny vnitřní mitochondriální membrány (Hensen et al., 2014) a zdá se, že jsou umístěny na její matrixové straně, přičemž v místech kontaktu endoplasmatického retikula a mitochondrií, označujících budoucí dělení, se koncentrují nukleoidy, jejichž mtDNA prochází replikací (Elachouri et al., 2011; Lewis et al., 2016) (kapitola 1.1.1.1).



Obrázek 2: Lidský mitochondriální genom. Cirkulární dvouvláknová DNA skládající se z lehkého (L) a těžkého (H) řetězce. **Nahoře:** hlavní nekódující oblast (NCR) obsahující D-smyčku, replikační počátek těžkého řetězce, promotor těžkého (HSP) a lehkého (LSP) řetězce a tři oblasti konzervované sekvence (CSB1-3). TAS – sekvence asociovaná s terminací replikace. **Dole:** mapa lidského mitochondriálního genomu. Barevné označení genů: komplex I modře, komplex III růžově, komplex IV zeleně, komplex V žlutě, rRNA geny oranžově, tRNA geny černě. Převzato a upraveno dle (Uhler and Falkenberg, 2015).

Mitochondriální DNA u lidí vykazuje maternální dědičnost (Pyle et al., 2015), přestože se zdá, že ve výjimečných případech může být předávána oběma rodiči (Luo et al., 2018). Mutace v mitochondriální DNA mohou způsobit mitochondriální onemocnění, pokud zastoupení mutovaných molekul (zvané heteroplasmie) přesáhne přibližně 60–70 % (de Laat et al., 2012) (kapitola 1.5).

1.2.2 Modely replikace mitochondriální DNA

V současné době existují tři hlavní modely vysvětlující proces replikace mitochondriální DNA. První z nich se nazývá strand-displacement model (SDM, model vytěsňování řetězce), někdy také asynchronní, navržený v roce 1972 na základě elektronmikroskopických pozorování mtDNA myších buněk v kultuře (Robberson et al., 1972). Podle tohoto modelu replikace probíhá na obou řetězcích

kontinuálně, začíná počátkem replikace těžkého řetězce (O_H) na pozici 191 a pokračuje jednosměrně pouze na tomto vlákně přibližně 11000 bp, do oblasti mezi geny mitochondriálních tRNA pro cystein a asparagin. Zde dojde průběhem replikace těžkého řetězce k odhalení počátku replikace lehkého řetězce (O_L), který zaujme „stem-loop“ strukturu a umožní tvorbu primeru a zahájení replikace lehkého řetězce (Fuste et al., 2010). Primery mitochondriální DNA jsou zřejmě tvořeny mitochondriální RNA-polymerázou POLRMT (Fuste et al., 2010), která vykazuje *in vitro* primázovou aktivitu (Wanrooij et al., 2008), přičemž začátek primeru těžkého řetězce možná odpovídá LSP a v oblasti O_H (Holmes et al., 2015) (popř. alternativního počátku replikace Ori-b (Yasukawa et al., 2005)) dochází k přechodu mezi syntézou RNA a DNA (Holmes et al., 2015). Je však zároveň možné, že k tomuto přechodu dochází již dříve, v oblasti okolo CSB2 (Nicholls et al., 2014), a zjištěné 5' konce nově vzniklého těžkého řetězce se do oblasti tradičních počátků replikace dostávají až v průběhu procesu odstraňování primerů a ligace, jenž je popsán níže. Během replikace je dle SDM jednovláknová DNA pokryta proteinem mtSSB (mitochondrial single-stranded DNA-binding protein, mitochondriální protein vážící jednořetězcovou DNA), který brání vzniku nechtěných sekundárních struktur, působení nukleáz a také náhodné primázové aktivitě na odhaleném řetězci (Miralles Fuste et al., 2014; Wanrooij et al., 2008). To podporuje i zjištění, že mtSSB je v buňkách přítomen v dostatečném množství na kompletní pokrytí těžkého řetězce během replikace a závěry experimentů s využitím imunoprecipitace chromatinu, které ukázaly, že mtSSB váže pouze těžký řetězec a vykazuje gradient zastoupení směrem od O_H přesně, jak by se dalo očekávat na základě SDM (Miralles Fuste et al., 2014).

Druhým modelem je RITOLS (ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand, inkorporace ribonukleotidů v celém opožďujícím se řetězci), resp. konkrétní varianta nazývaná někdy „bootlace“ model (angl. tkanička do bot), při níž jsou k odhalenému parentální těžkému řetězci hybridizovány zpracované molekuly RNA vzniklé transkripcí. Ty podle výsledků pokusů s metabolickým značením nevznikají v průběhu replikace, ale jsou použity již dříve existující molekuly (Reyes et al., 2013). Tento model má poměrně silnou podporu výsledků získaných pomocí dvourozměrné agarozové gelové elektroforézy (2D-AGE) vysvětlených a přehledně shrnutých jeho autory (Yasukawa and Kang, 2018). Dále bylo ukázáno, že je možné izolovat replikační intermediáty pomocí monoklonální protilátky specifické pro RNA/DNA hybridní dvouřetězce a pomocí elektronové mikroskopie byly pozorovány zcela dvouřetězcové replikační intermediáty, které se změnily na částečně jednořetězcové po přidání RNázy H, enzymu specificky štěpícího RNA v hybridní molekule RNA/DNA (Pohjoismaki et al., 2010). Naopak citlivost vůči RNáze H byla snížena, pokud byl před izolací proveden krok kovalentně provazující nukleové kyseliny. To naznačuje, že hybridní dvouřetězcové intermediáty byly přítomny již před počátkem extrakce a nevznikly tedy až v jejím průběhu nebo po ní hybridizací mitochondriálních RNA k jednovláknovým úsekům DNA (Reyes et al.,

2013). Dříve pozorované částečně jednořetězcové intermediáty naopak mohou vzniknout při izolaci mtDNA (Pohjoismaki et al., 2010).

V roce 2000 byl navržen další model replikace, nejčastěji nazývaný krátce strand-coupled, někdy také COSCOFA (conventional strand-coupled Okazaki fragment associated, konvenční strand-coupled asociovaný s Okazakiho fragmenty). Dle tohoto modelu začíná replikace z mnoha počátků v široké oblasti nazývané ori zone (Ori-Z) a pokračuje obousměrně na obou řetězcích, kontinuálně na vedoucím a s využitím Okazakiho fragmentů na opožďujícím se vlákně, podobně jako v jádře (Holt et al., 2000). Je možné, že tento způsob replikace je využíván pouze v některých tkáních nebo za určitých podmínek, častěji byl například pozorován u buněčné linie 143B nebo u 143B i HeLa buněk po odebrání inhibitorů mtDNA replikace, což vede k rychlému obnovení množství mitochondriální DNA (Holt et al., 2000; Yasukawa et al., 2005). V srdeční tkáni a v menším množství také v mozku byly navíc pozorovány zcela jiné čtyřcestné replikační intermediáty (Pohjoismaki et al., 2009), které se navíc objevují i u zimničky (*Plasmodium*) nebo rostlin (Backert and Borner, 2000; Preiser et al., 1996). Všechny výše zmíněné možnosti byly pak pozorovány v různých tkáních myši (Herbers et al., 2019), je tedy pravděpodobné, že replikace mtDNA skutečně probíhá rozdílným způsobem v závislosti na buněčném typu anebo metabolickém stavu buňky.

1.2.3 Proteiny replikace mitochondriální DNA

Pro replikaci mitochondriální DNA je potřeba řada různých proteinů. Minimální replisom pro replikaci mtDNA podobných molekul dostatečné délky *in vitro* tvoří polymeráza gamma, resp. její katalytická podjednotka POLG (kódovaná genem *POLG*) a pomocná podjednotka POLG2 (*POLG2*), dále mitochondriální helikáza Twinkle (gen *TWINK* neboli *C10orf2*, také *PEO1*) a mtSSB (viz výše) (Korhonen et al., 2004). Mnohé další proteiny se však zřejmě účastní tohoto procesu a jsou potřebné pro jeho úspěšné dokončení, mj. TOP1MT (DNA topoisomerase I, mitochondrial, DNA topoisomerase I, mitochondriální), POLRMT, RNáza H1, DNA ligáza III (kodovaná genem *LIG3*), DNA2 (DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2, ATP-dependentní helikáza/nukleáza DNA replikace), MGME1 (mitochondrial genome maintenance exonuclease 1, exonukleáza údržby mitochondriálního genomu 1), PrimPol (primase and DNA directed polymerase, primáza a DNA řízená polymeráza) nebo FEN1 (flap structure-specific endonuclease 1, endonukleáza specifická pro struktury přesahů 1) (Fuste et al., 2010; Kornblum et al., 2013; Yasukawa and Kang, 2018).

Pro účely této práce je zásadním proteinem, resp. proteinovým komplexem polymeráza gamma. Ta je podle všeho jedinou replikativní DNA polymerázou v mitochondriích (Lestienne, 1987). Přestože minimálně u pěti dalších polymeráz (PrimPol, PolB, PolZ, PolH a PolQ) existují důkazy o jejich funkci v této organelle, žádná z nich však není esenciální pro replikaci mtDNA a nemůže nahradit POLG (shrnuto v (Krasich and Copeland, 2017)). Lokalizace POLG do mitochondrií byla poprvé ukázána

v roce 1977 (Bolden et al., 1977). Později byla potvrzena mikroskopickými pozorováními s použitím protilátek resp. proteinu značeného GFP (Davis et al., 1996; Spelbrink et al., 2000). Polymeráza gamma patří do rodiny A DNA polymeráz spolu s bakteriální polymerázou I (Ito and Braithwaite, 1991). Holoenzym polymerázy gamma se skládá z jedné katalytické podjednotky POLG kódované genem *POLG* (15q26.1, 23,491 bp, 23 exonů) a dvou pomocných podjednotek POLG2 (*POLG2*, 17q23.3, 26,283 bp, 8 exons) a vykazuje 5'-3' polymerázovou, 3'-5' exonukleázovou a 5' dRP lyázovou aktivitu (Szymanski et al., 2015). Dvě asymetricky umístěné pomocné podjednotky, proximální a distální, umožňují pevnější vazbu DNA, resp. vyšší katalytickou aktivitu a procesivitu enzymu a potlačují exonukleázovou aktivitu (Szymanski et al., 2015). POLG obsahuje od N-konce 3'-5' exonukleázovou (aminokyselinové zbytky 26–418), spojovací (linker, 419–755) a 5'-3' polymerázovou doménu (756–1239). Polymeráza gamma je vysoce přesná s frekvencí chybovosti méně než 1×10^{-6} (Longley et al., 2001).

Myší genový knockout ukázal, že jak katalytická, tak pomocná podjednotka jsou esenciální pro embryogenezi (Hance et al., 2005; Humble et al., 2013). Myší modely s mutacemi v exonukleázové doméně vykazují předčasné stárnutí a 2500× vyšší frekvenci mutací v mtDNA (Vermulst et al., 2007). Podobný efekt byl již dříve demonstrován u kvasinky (Foury and Vanderstraeten, 1992) a kultivovaných lidských buněk (Spelbrink et al., 2000).

Mutace v genu *POLG* jsou nejčastější příčinou mitochondriálních onemocnění způsobených změnou jaderného genomu s více než 300 objevenými patogenními mutacemi (<http://tools.niehs.nih.gov/polg/>). První patogenní mutace *POLG*, způsobující progresivní externí oftalmoplegii, byla nalezena v roce 2001 (Van Goethem et al., 2001). Od té doby byly mutace v tomto genu spojeny mimo jiné s následujícími onemocněními: Alpers-Huttenlocherův syndrom (AHS), mitochondriální neurogastrointestinální encefalopatie (MNGIE), syndrom myoklonické epilepsie, myopatie a sensorické ataxie (myoclonic epilepsy myopathy sensory ataxia, MEMSA), autosomálně recesivní progresivní externí oftalmoplegie (arPEO), autosomálně dominantní progresivní externí oftalmoplegie (adPEO), spektrum dětské myocerebrohepatopatie (childhood myocerebrohepatopathy spectrum, MCHS) a spektrum ataxie-neuropatie (ataxia-neuropathy spectrum, ANS), jenž zahrnuje syndrom mitochondriální recesivní ataxie (mitochondrial recessive ataxia syndrome, MIRAS), syndrom sensorické ataxie, neuropatie, dysartrie a oftalmoplegie (sensory ataxia-neuropathy-dysarthria-ophthalmoplegia, SANDO) a spinocerebelární ataxii s epilepsií (spinocerebellar ataxia with epilepsy, SCAE) (El-Hattab et al., 2017).

Alpers-Huttenlocherův syndrom (AHS) je autosomálně recesivní mitochondriální onemocnění s prevalencí přibližně 1:50000 a dobou nástupu obvykle mezi 2. a 4. rokem. Vyznačuje se progresivní encefalopatií, nevladatelnou epilepsií, psychomotorickou regresí, hepatopatií, ataxií a tkáňově specifickou deplecí mtDNA. Pacienti se zřídka dožívají více než 10 let (Euro et al., 2011). Nejčastěji

bývá způsoben právě mutacemi *POLG* (Euro et al., 2011), ovšem podobný fenotyp byl pozorován i u mutací v genech mitochondriálních aminoacyl-tRNA-syntetáz katalyzujících připojení fenylalaninu, prolinu a asparaginu k příslušným tRNA (Elo et al., 2012; Sofou et al., 2015). Zdá se, že recesivní mutace způsobující AHS jsou v rámci *POLG* sdruženy do pěti shluků, což může být užitečné pro diagnostiku nově objevených mutací (Euro et al., 2011).

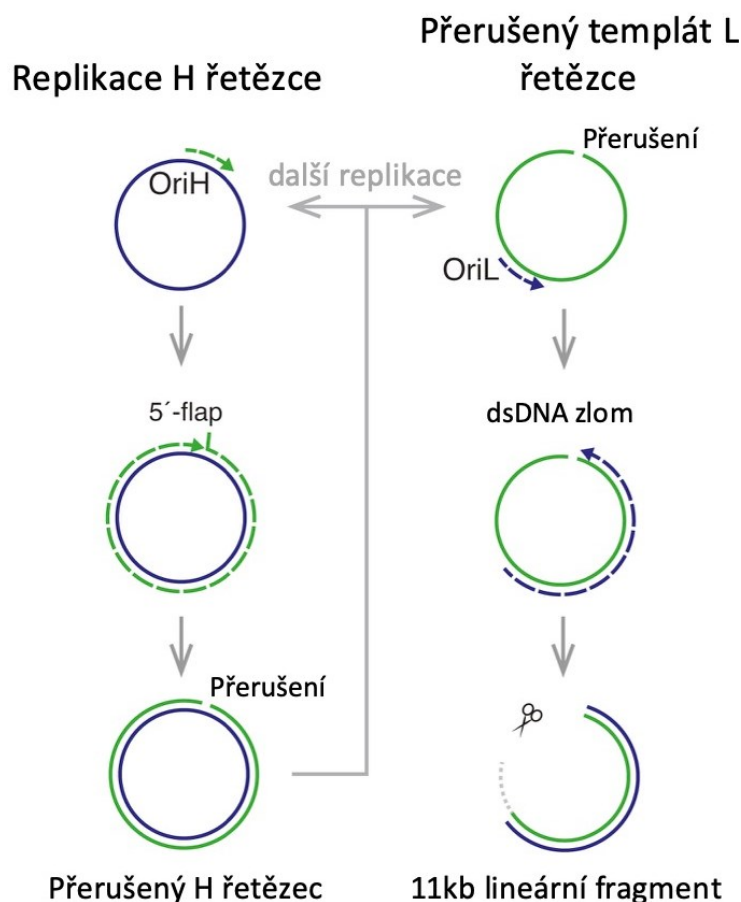
1.2.4 Odstranění primerů a ukončení replikace mitochondriální DNA

Často přehlíženou, ale pro účely této práce důležitou, součástí replikace mtDNA je její ukončení, včetně odstranění primerů a ligace nově vzniklé lineární molekuly do kruhové podoby. Zdá se, že v mitochondriích existuje velmi dlouhý primer replikace dlouhého řetězce začínající v místě promotoru lehkého řetězce (kapitola 1.2.2). Není však zcela jasné, kde dochází k přechodu mezi syntézou RNA a DNA. Tento primer je před ukončením replikace a ligací potřeba odstranit. K tomu slouží v buňce enzymy zvané RNázy H, které mají schopnost štěpit RNA řetězec delší než 4 nt v hybridní molekule RNA/DNA (Nowotny et al., 2008). U savců se vyskytují dvě RNázy H, čistě jaderná RNáza H2 a RNáza H1, která má dva možné počátky translace, v důsledku čehož může nebo nemusí obsahovat mitochondriální cílovou sekvenci (Holmes et al., 2015; Nowotny et al., 2008). RNáza H však není schopna odstranit poslední dva nukleotidy někdejšího primeru a nechává tak krátký RNA přesah vyžadující další enzymatickou aktivitu pro úplné dokončení replikace (Nowotny et al., 2008). V tuto chvíli přichází na řadu důležitá aktivita DNA polymerázy, která je schopna vytěsnit krátký přesah bez přítomnosti helikázy. Pokud tento přesah není odstraněn jiným enzymem, dojde po krátké době k odbourání posledních nukleotidů nově syntetizované DNA exonukleázovou aktivitou polymerázy a jejímu návratu na původní místo. Tento proces se někdy nazývá idling (angl. volnoběh) (Garg et al., 2004). Všechny tyto aktivity vykazuje i polymeráza gamma (Macao et al., 2015).

Existuje několik modelů odstranění primerů v mitochondriích. První předpokládá, že většina primeru až na poslední dva nukleotidy je odstraněna RNázou H1. Ve chvíli, kdy polymeráza gamma dorazí k 5' konci někdejšího primeru, vytěsní krátký přesah, který je ihned odštěpen nukleázou, jako např. FEN1 nebo MGME1. Druhý model nepředpokládá zapojení RNázy H1, ale postupné odstranění primeru opakovanou tvorbou přesahů aktivitou polymerázy gamma a jejich štěpením pomocí FEN1. MGME1 není schopná štěpit RNA přesahy pokud se ihned ve směru 3' od nich nenachází DNA (Kornblum et al., 2013). Tento model se však zdá velmi neefektivní a v jeho neprospěch hovoří nejistá funkce FEN1 v mitochondriích (Kazak et al., 2013), skutečnost, že RNáza H1 je zřejmě nepostradatelná v replikaci mtDNA (Holmes et al., 2015), a další zjištění ukazující na nezbytnou funkci MGME1 uvedená níže po vysvětlení posledního modelu.

Ten předpokládá delší rozvinutí dvouřetězce za účasti helikázy ze strany primeru až do oblasti, kde jsou obě vlákna tvořena DNA. Na tento dlouhý přesah je navázán mtSSB, což však nejspíš

představuje překážku pro využití FEN1, jejíž aktivita je možná inhibována jeho přítomností, podobně jako ji inhibuje jaderný protein RPA (replication protein A, protein replikace A) (Ayyagari et al., 2003). V takovém případě by mohla být využita kombinovaná aktivita DNA2 a MGME1. DNA2 podporuje syntézu DNA polymerázou gamma vytvářející přesah, není však schopná jej následně odštěpit v celé jeho délce (Gloor et al., 2012), což je aktivita, kterou by mohla zajišťovat právě MGME1. Tento model podporuje i pozorování, že u kultivovaných fibroblastů postrádajících funkční MGME1 dochází k posunu 5' konců nově syntetizovaných těžkých řetězců DNA do oblasti CSB2, což by mohlo přibližně odpovídat původnímu místu přechodu mezi RNA primerem a syntézou DNA (Nicholls et al., 2014). Dalším vodítkem ve prospěch posledního modelu by mohlo být zjištění, že v buňkách pacientů s mutací *MGME1* se nachází přibližně 11 kb dlouhé lineární fragmenty mtDNA, které by mohly vznikat způsobem vysvětleným na Obrázku 3 (Nicholls et al., 2014). Podobné fragmenty se vyskytují i u myší s mutací v exonukleázové doméně POLG, mají ale 5' konec posunutý přibližně o 600 nt dále, což je zřejmě způsobeno tím, že DNA polymeráza bez funkční exonukleázové domény neprovádí správným způsobem výše popsaný idling a vytváří příliš rychle příliš dlouhé přesahy, které jsou následně degradovány. Přítomnost lineárních fragmentů zase odkazuje na důležitost správného průběhu idling pro úspěšné dokončení ligace mtDNA (Bailey et al., 2009).



Obrázek 3: Model vysvětlující vznik 11 kb dlouhého lineárního fragmentu při poruchách odstranění primerů nebo ligace. Jakmile dosáhne replikující POLG 5' konce nascentního těžkého řetězce (přerušovaná zelená čára), vytvoří se dočasný 5' přesah. Pokud není odstraněn nukleázami nebo je narušena exonukleázová aktivita polymerázy gamma, dojde k narušení ligace a vzniku zlomu. V následujícím kole replikace dojde k ukončení replikace L řetězce jakmile replikační vidlička dosáhne zlomu, čímž vznikne dvouřetězcový zlom v okolí počátku replikace těžkého řetězce. Jednovláknová část H řetězce je odstraněna (vpravo dole) za vzniku lineárního fragmentu o délce přibližně 11 kb. Převzato a upraveno dle (Uhler and Falkenberg, 2015).

MGME1 je kódována stejnojmenným genem (20p11.23, 22,529 bp, 8 exonů). Patří do podrodiny RecB nukleáz PD-(D/E)XK, obsahuje mitochondriální cílovou sekvenci a byla ukázána její mitochondriální lokalizace. MGME1 účinněji štěpí ssDNA než dsDNA, neštěpí však RNA a to ani v hybridních RNA/DNA molekulách. Je ovšem schopna štěpit DNA v molekule obsahující RNA/DNA přechod, jako například právě replikační intermediáty na 3'konci primerů (Kornblum et al., 2013). MGME1 může štěpit jak 5', tak 3' přesahy a zvyšuje exonukleázovou aktivitu polymerázy gamma (Nicholls et al., 2014). Mutace *MGME1* byly nalezeny u pacientů s velmi rozdílnými fenotypy. Šest jedinců s bíalelickými mutacemi vykazovalo myopatii s PEO a respiračním selháním s nástupem ve věku 10-36 let a s delecemi anebo sníženým množstvím mtDNA v kosterní svalovině (Kornblum et al., 2013). Homozygotní delece s posunem čtecího rámce mohou naproti tomu způsobit progresivní cerebelární ataxii s mikrocefalií, *fundus albiguttatus* a počátkem v raném dětství (Hebbar et al.,

2017). Fibroblasty pacientů vykazují spektrum mutací a změn mtDNA včetně delecí, deplece a akumulace 7S-DNA. Naopak genový knockdown *MGME1* u HeLa buněk pomocí siRNA překvapivě nezpůsobil žádnou změnu v množství mtDNA a to ani v kombinaci s FEN1 nebo DNA2 (Kornblum et al., 2013).

1.3 Mitochondriální proteosyntéza

Jak bylo uvedeno v jiných kapitolách této práce, většina proteinů plnicích rozmanité funkce v mitochondriích je kódována jadernými geny a k jejich biosyntéze dochází transkripcí v jádře a následnou translací v cytosolu. Třináct centrálních hydrofobních podjednotek komplexů systému oxidační fosforylace (kapitola 1.4) je však kódováno geny v mtDNA a v mitochondrii tak probíhá vlastní proteosyntéza. Jedním z jejích specifíků je skutečnost, že všechny proteiny, které zajišťují mitochondriální transkripci a translaci a s nimi související děje, pochází z cytosolu (a jsou kódovány v jádře), zatímco všechny tRNA i rRNA vznikají transkripcí mtDNA (a následnými modifikacemi) (Andrews et al., 1999; D'Souza and Minczuk, 2018). Důležitost tohoto procesu podtrhuje i skutečnost, že asi jedna třetina případů mitochondriálních onemocnění je zřejmě způsobena narušením mitochondriální transkripce nebo translace (Boczonadi and Horvath, 2014). Vysvětlení procesu proteosyntézy v mitochondriích níže je zjednodušené a uvedený soubor zúčastněných proteinů není kompletní se zaměřením především na nejdůležitější hráče anebo proteiny, jejichž porucha je spojena s mitochondriálním onemocněním. Větší pozornost je pak věnována mitochondriálním aminoacyl-tRNA-syntetázám, které mají zvýšenou důležitost pro tuto práci.

1.3.1 Mitochondriální transkripce, modifikace RNA

Proces mitochondriální transkripce a následného zpracování primárního transkriptu je do značné míry odlišný od jaderného protějšku. Probíhá na každém řetězci z jednoho promotoru v nekódující oblasti mitochondriální DNA (kapitola 1.2.1) a je polycistronní. Primární transkript vzniklý přepisem z promotoru lehkého řetězce tvoří podklad syntézy osmi tRNA a podjednotky MT-ND6 komplexu I, zatímco druhý řetězec mtDNA zajišťuje vznik všech ostatních mitochondriálně kódovaných proteinů a RNA, včetně zbývajících tRNA a dvou rRNA (Chang and Clayton, 1984). Mitochondriální RNA-polymeráza POLRMT vykazuje významnou podobnost s polymerázami bakteriofágů T3 a T7 (Ringel et al., 2011), na rozdíl od nich však není schopna zahájit transkripci bez dalších proteinových faktorů. Těmi jsou především mitochondriální transkripční faktor A (TFAM, Transcription Factor A, Mitochondrial) (Kanki et al., 2004) a mitochondriální transkripční faktor B2 (TFB2M) (Posse and Gustafsson, 2017). Elongaci RNA pak udržuje mitochondriální transkripční elongační faktor (TEFM, Transcription Elongation Factor, Mitochondrial), který pravděpodobně také zajišťuje, aby nedošlo k jejímu předčasnému ukončení v oblasti CSB2 (kapitola 1.2.2) (Posse et al., 2015). Terminace

transkripce se účastní mj. protein MTERF1 (Mitochondrial Transcription Termination Factor 1, mitochondriální transkripční terminační faktor 1) (Yakubovskaya et al., 2010).

Vzhledem k uspořádání genů v mtDNA obsahuje vzniklý polycistronní transkript přepis genů proteinových podjednotek OXPHOS a rRNA oddělených úseky kódujícími mitochondriální tRNA (Andrews et al., 1999). Aktivitou RNázy P a RNázy Z na 5', resp. 3' konci tRNA kódujících oblastí tak dojde k oddělení všech kódujících regionů, což bývá nazýváno tRNA Punctuation Model (interpunkční model tRNA) (Brzezniak et al., 2011; Holzmann et al., 2008). Ten však nezajišťuje veškerou nukleázovou aktivitu při zpracování mitochondriální RNA a někdy je potřeba další štěpení, na němž se zřejmě podílí mj. proteiny ze skupiny FASTK (Fas-activated serine/threonine kinase, serin/threonin kináza aktivovaná Fas) (Boehm et al., 2017). Po rozštěpení primárního transkriptu jsou všechny vzniklé RNA kromě MT-ND6 polyadenylovány na svém 3' konci mitochondriální polyA polymerázou (mtPAP, Mitochondrial Poly(A) Polymerase). Zatímco u bakterií je polyadenylace signálem k degradaci příslušné RNA, u eukaryotních organismů zajišťuje stabilitu jaderných mRNA. V mitochondriích je pak její vliv závislý na konkrétní mRNA, která je takto modifikována (Tomecki et al., 2004). Navíc v mitochondriích probíhají další modifikace RNA, jako například přidání nukleotidů CCA na 3' konce tRNA (Nagaike et al., 2001) a řada dalších (D'Souza and Minczuk, 2018).

1.3.2 Aminoacyl-tRNA-syntetázy v mitochondriích

Proces aminoacylace tRNA v mitochondriích zajišťuje 19 aminoacyl-tRNA-syntetáz (ARS) importovaných z cytosolu, z nichž 17 je specifických pouze pro mitochondrie, zatímco syntetázy kódované geny *GARS* a *KARS* (Gly, Lys) vznikají využitím alternativního počátku translace, resp. alternativním sestřihem pre-mRNA cytosolických enzymů (Bonfond et al., 2005; Tolkunova et al., 2000). Mitochondrie neobsahují specifickou ARS pro připojení glutaminu na příslušnou tRNA, k tomu dochází prvotní aminoacylací kyselinou glutamovou a následnou transaminací na glutamin (Echevarria et al., 2014). Patogenní mutace byly nalezeny v genech všech mitochondriálních ARS a ve většině případů se vyznačují postižením centrální nervové soustavy (Sissler et al., 2017).

DARS2 je gen mitochondriální aminoacyl-tRNA-syntetázy, jejímiž substráty jsou aspartát a příslušná tRNA^{Asp}. Jedná se o syntetázu z třídy 2 aktivní ve formě dimeru (Bonfond et al., 2005). Její mutace způsobují výhradně leukoencefalopatii s postižením mozkového kmene, míchy a zvýšeným laktátem (LBSL, leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and lactate elevation). Příčina tohoto onemocnění byla původně identifikována v roce 2007 u jeho lehčí formy vyznačující se progresivní ataxií, spasticitou a poruchou funkce míchy. Specifické jsou nálezy nukleární magnetické rezonance v bílé hmotě v okolí mozkových komor a v oblastech některých drah v mozkovém kmeni a míše (Scheper et al., 2007). K původním nálezům se za poslední roky přidaly mj. i případy s počátkem v raném dětství, rychlou progresí a brzkým úmrtím (Steenweg et al., 2012).

Všichni známí pacienti jsou složení heterozygoti pro dvě patogenní mutace nebo v malém množství případů homozygoti. Více než 90 % z nich pak nese sestřihovou mutaci v intronu 2 způsobující absenci exonu 3 v mRNA v kombinaci s další mutací (van Berge et al., 2014; Scheper et al., 2007).

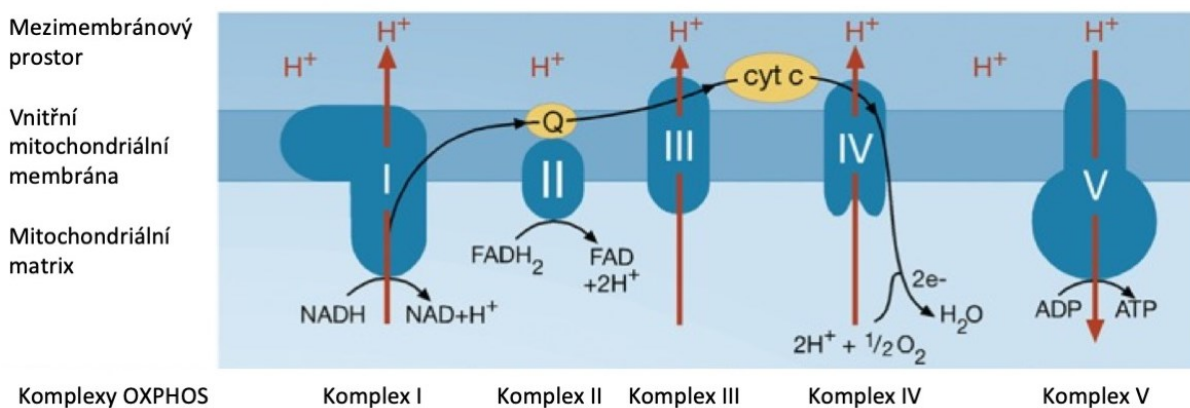
1.3.3 Mitochondriální translace

Mitochondriální ribozom obsahuje přibližně 80 polypeptidových podjednotek, o 36 více než jeho bakteriální protějšek, avšak pouze 2 rRNA (16S, 12S) (Greber et al., 2015). Zdá se, že 5S RNA může být v mitochondriálním ribozomu nahrazena tRNA, u člověka tuto funkci plní tRNA^{Val} (Rorbach et al., 2016), u jiných organismů tuto funkci zastává např. tRNA^{Phe} (Greber et al., 2015). Mitochondriální mRNA člověka neobsahují 5' netranslatovanou oblast, která se v cytosolu podílí na regulaci počátku translace, byly však identifikovány specifické proteinové translační aktivátory pro některé mRNA (Weraarpachai et al., 2009). Mitochondrie obsahují pouze jednu tRNA^{Met} využívanou pro iniciaci translace i v jejím průběhu. Iniciační tRNA^{Met} je však po své aminoacylaci modifikována formylací methioninového zbytku (Spencer and Spremulli, 2005). Byly nalezeny specifické proteinové faktory iniciace mitochondriální translace jako mtIF2 a mtIF3 (Mitochondrial Translational Initiation Factor 2/3, mitochondriální faktor iniciace translace 2, resp. 3,) (Gaur et al., 2008), elongace (Hammarstrand et al., 2001) i jejího ukončení (Lind et al., 2013). mRNA genů *MT-CO1* a *MT-ND6* neobsahují na 5' konci stop kodon UAA ani UAG, místo toho se zde nachází kodony AGA resp. AGG, odpovídající v univerzálním genetickém kódu aminokyselině argininu, které však nejsou k jejímu zařazení využity v žádném mitochondriálním genu. Spekuluje se, že k terminaci v tomto případě dochází posunem čtecího rámce na konci translace o jeden nukleotid (Temperley et al., 2010).

1.4 Oxidační fosforylace

Lidské buňky denně vyprodukují asi 50 kg ATP, z nichž asi 80 % vzniká v mitochondrii při procesu tzv. oxidační fosforylace (Kuhlbrandt, 2015). Ten využívá mechanismu zvaného chemiosmóza (Mitchell, 1961) a v mitochondriích má dvě hlavní složky (Obrázek 4). První z nich se nazývá dýchací neboli elektron-transportní řetězec (ETC, electron transport chain) a skládá se ze 4 hlavních proteinových komplexů (komplex I neboli NADH-ubichinonreduktáza, komplex II neboli sukcinátdehydrogenáza, komplex III neboli ubichinol-cyt c-reduktáza a komplex IV neboli cytochrom-*c*-oxidáza). V něm jsou elektrony získané především v Krebsově cyklu v podobě redukováných koenzymů NADH a FADH₂ předávány mezi redoxními centry komplexů se vzrůstajícím redox potenciálem od přibližně -340 mV pro flavin mononukleotid (FMN) komplexu I po 340 mV binukleárního centra hemu a₃/CuB komplexu IV. Nakonec jsou použity k redukci molekulového kyslíku s redoxním potenciálem přibližně 820 mV na dvě molekuly vody (Papa et al., 2012). Přenos elektronů mezi komplexy zajišťují dva mobilní přenašeče, hydrofobní ubichinon, pohybující se ve vnitřní mitochondriální membráně a předávající

elektrony na komplex III, a cytochrom c, malý protein s navázanou hemovou skupinou pohybující se v mezimembránovém prostoru a zajišťující přenos mezi komplexem III a IV (CRANE et al., 1957). Uvolněná energie je při průchodu elektronů využívána komplexy I, III a IV pro transport protonů přes vnitřní mitochondriální membránu ve směru z matrix do mezimembránového prostoru. Vzniklý gradient, za fyziologických podmínek odpovídající asi 0,6–0,8 rozdílu pH a potenciálu 180 mV na vnitřní membráně (Kuhlbrandt, 2015), je následně využit komplexem V neboli F_1F_0 -ATP-syntázou ke katalýze vzniku ATP (Sambongi et al., 1999). Vzhledem k tomu, že elektrony koenzymu $FADH_2$, který je součástí komplexu II, jsou předávány na ubichinon o redoxním potenciálu přibližně 0 mV bez současného přenosu protonů přes membránu, mají při svém celkovém průchodu respiračním řetězcem menší výtěžek ve formě protonového gradientu. Zde je potřeba zdůraznit, že nomenklatura komplexů a vůbec pojetí ETC jakožto řetězce může být zavádějící. O funkční řetězec se jedná až právě od ubichinonu ke komplexu IV, zatímco ubichinon je redukován (na ubichinol) jak komplexem I, tak komplexem II, zároveň však také méně často zmiňovanými enzymy (ETF:ubichinon-oxidoreduktáza, glycerol-3-P-dehydrogenáza, dihydroororátdehydrogenáza, cholindehydrogenáza, prolindehydrogenáza, sulfid:chinon-reduktáza) (Enriquez and Lenaz, 2014). Komplexy systému oxidační fosforylace se nachází v oblasti křist vnitřní mitochondriální membrány (Vogel et al., 2006).



Obrázek 4: Schéma komplexů systému oxidační fosforylace na vnitřní mitochondriální membráně: Systém oxidační fosforylace tvoří pět hlavních komplexů. Komplexy I – IV přijímají elektrony z Krebsova cyklu a dalších drah ve formě redukováných koenzymů. Předávají je mezi sebou pomocí mobilních přenašečů koenzymu Q (Q) a cytochromu c ve směru stoupajícího redox potenciálu až na molekulový kyslík za vzniku dvou molekul vody. Komplexy I, III a IV zároveň vytváří gradient protonů na vnitřní mitochondriální membráně, který využívá komplex V ke katalýze vzniku ATP. V obrázku jsou zanedbány stechiometrie protonů a elektronů, blíže viz text. Převzato a upraveno dle (Alston et al., 2017).

Výše popsaný mechanismus představuje tzv. spáženou respiraci, při níž by byla veškerá energie protonového gradientu využita na tvorbu ATP. Za fyziologických podmínek však přibližně 15–50 % respirace připadá na zpětný přechod protonů přes membránu bez současné produkce ATP, jev zvaný

protonový leak (angl. průsak). Ten je možné kvantifikovat měřením respirace po přidání oligomycinu, inhibitoru ATP-syntázy (Rolfe et al., 1999). Komplexu I, který je velmi důležitý pro tuto práci, se věnuje 1.4.1, zde se krátce zmíním o ostatních komplexech a s nimi asociovaných onemocněních.

Komplex II neboli sukcinátdehydrogenáza je z pohledu biochemických drah v mitochondrii součástí jak Krebsova cyklu, tak dýchacího řetězce. Obsahuje čtyři proteinové podjednotky A, B, C a D, všechny kódované jadernými geny. Podjednotka B obsahuje 3 železo-sírná centra zatímco podjednotka A kovalentně vázaný flavinadeninukleotid. Dva elektrony oxidace sukcinátu jsou přeneseny na FAD a následně přes Fe-S centra na ubichinon (Sun et al., 2005). Přestože mutace genu kódujícího podjednotku A byla vůbec první identifikovanou patogenní mutací komplexu ETC (Bourgeron et al., 1995), poruchy funkce komplexu II jsou málo časté. Představují přibližně 2–8 % mitochondriálních onemocnění, přičemž nejčastěji postihují centrální nervovou soustavu a srdce (Jain-Ghai et al., 2013). Klinicky zajímavá je asociace heterozygotních mutací s některými druhy rakoviny (Timmers et al., 2009).

Komplex III katalyzuje oxidaci ubichinolu a postupnou redukci dvou molekul cytochromu *c* za současného přenosu čtyř protonů do mezimembránového prostoru v procesu zvaném Q cyklus (Mitchell, 1976). Skládá se z jedenácti různých podjednotek, z nichž jedna je kódována mtDNA (cytochrom *b*), o celkové hmotnosti přibližně 240 kDa. Obsahuje čtyři prostetické skupiny účastnící se redox reakcí (jedno železo-sírné centrum, cyt $b_L(566)$, cyt $b_H(560)$, cyt c_1), a v mitochondriální membráně se nachází v podobě homodimeru (Iwata et al., 1998). Mutace mitochondriálního genu *MT-CYB* jsou spojeny především s intolerancí cvičení, ale také kardiomyopatií nebo encefalomyopatií (Lott et al., 2013), zatímco zpomalený vývoj, encefalopatie, laktátová acidóza, porucha jater a ledvin a svalová slabost jsou asociovány s mutacemi ve čtyřech dalších jaderných genech kódujících podjednotky komplexu III (Mordaunt et al., 2015).

Komplex IV neboli cytochrom-*c*-oxidáza katalyzuje redukci molekuly O_2 na dvě molekuly vody za přispění elektronů jednotlivě přijatých od čtyř molekul redukováného cytochromu *c* a čtyř vodíkových protonů z mezimembránového prostoru. Současně provádí transport čtyř protonů přes membránu na jednu redukovanou molekulu kyslíku (Papa et al., 1991). Skládá se ze 14 podjednotek, z nichž tři jsou kódovány mtDNA (Balsa et al., 2012). Mutace podjednotek komplexu IV způsobují mitochondriální onemocnění, častěji jsou však zasaženy proteiny biogeneze komplexu IV, např. více než 80 mutací v genu *SURF1* způsobuje závažný Leighův syndrom (Wedatilake et al., 2013).

Komplex V neboli ATP-syntáza se skládá ze dvou hlavních částí, matrixové F_1 a membránové F_0 , vzájemně spojených centrálním a periferním stonkem. Katalyzuje vznik ATP z anorganického fosfátu a ADP za spotřeby membránového protonového gradientu, přičemž stechiometrie reakce je mimo jiné závislá na počtu vícenásobně se vyskytující podjednotky *c* v F_0 , který se napříč organismy liší, u člověka jich je osm (Watt et al., 2010). Katalytická funkce je zajištěna tokem protonů ve směru

gradientu přes F_0 doménu způsobujícím rotaci prstence c podjednotek přenášenou podjednotkou γ do F_1 domény, kde způsobuje konformační změnu β podjednotky zajišťující katalýzu (Sambongi et al., 1999). Defekt mitochondriální ATP-syntázy je nejčastěji způsoben mutací genu *TMEM70*, kódujícím transmembránový protein potřebný k biogenezi komplexu. Ta může způsobit kardiomyopatii, laktátovou acidózu, encefalopatii nebo šedý zákal (Spiegel et al., 2011).

1.4.1 Mitochondriální komplex I a poruchy jeho funkce

Mitochondriální komplex I neboli NADH-ubichinonreduktáza katalyzuje oxidaci NADH za současné redukce ubichinonu na ubichinol a translokace čtyř protonů přes vnitřní mitochondriální membránu (Fiedorczuk et al., 2016). Jeho celkový tvar je vysoce konzervovaný a připomíná písmeno L s hydrofilním ramenem v prostoru matrix a hydrofobním membránovým ramenem. Bakteriální komplex I obsahuje pouze 14 různých podjednotek, sedm v každém z obou ramen, a má hmotnost přibližně 550 kDa (Efremov et al., 2010). Tyto podjednotky tvoří v komplexu savců tzv. core (angl. jádro), přičemž sedm hydrofobních podjednotek core nacházejících se v membránovém rameni je kódováno mtDNA a jejich názvy začínají ND, zatímco všechny jaderně kódované podjednotky mají název začínající NDUF. Oproti bakteriálnímu komplexu je mitochondriální komplex I savců tvořen celkem 44 různými podjednotkami, přičemž podjednotka NDUFAB1 je zastoupena dvakrát, při hmotnosti přibližně 980 kDa (Fiedorczuk et al., 2016). Většina těchto přídatných podjednotek je potřeba pro správné složení a stabilitu komplexu (Stroud et al., 2016).

Primárním akceptorem elektronů z NADH je flavinmononukleotid v podjednotce NDUFV1. Následně jsou elektrony předávány mezi sedmi železo-sirnými centry vázanými centrálními podjednotkami matrixového ramene až k centru N2, odkud jsou předávány na ubichinon (Fiedorczuk et al., 2016). V komplexu I se nachází i osmé železo-sirné centrum, jeho funkce však není jistá (Birrell et al., 2013). V membránovém rameni byly identifikovány 4 motivy podobné antiportérům, které pravděpodobně transportují po jednom protonu při katalytickém cyklu. Tři z nich jsou tvořeny podjednotkami ND2, ND4 a ND5 (Efremov and Sazanov, 2011) a jeden podjednotkami ND1, ND6 a ND4L (Baradaran et al., 2013). Mechanismus fungování komplexu I a propojení toku elektronů mezi redoxními centry s transportem protonů přes vnitřní mitochondriální membránu je velmi důležité a nedořešené téma, rozbor několika navržených modelů však neodpovídá rozsahu této práce (Fiedorczuk and Sazanov, 2018).

Poruchy funkce mitochondriálního komplexu I tvoří asi 30 % případů mitochondriálních onemocnění dětí, z nich asi 70–80 % je způsobeno mutacemi genů jaderně kódovaných podjednotek. Mutace byly nalezeny ve všech mitochondriálních genech kódujících hydrofobní podjednotky membránové domény a minimálně ve 20 genech jaderně kódovaných podjednotek (Fiedorczuk and Sazanov, 2018). Přestože klinické projevy pacientů se liší, obecná prognóza při defektu komplexu I je

špatná. 50 % pacientů umírá v prvních dvou letech života a 75 % se nedožívá 10 let (Fiedorczuk and Sazanov, 2018). Mezi nejčastější syndromy způsobené mutacemi podjednotek komplexu I patří Leberova hereditární optická neuropatie (LHON, kapitola 1.5), syndrom mitochondriální encefalomyopatie, laktátové acidózy a epizod podobných mozkové příhodě (MELAS, mitochondrial encephalomyopathy and lactic acidosis and stroke-like episodes syndrome) a Leighův syndrom.

Leighův syndrom, také nazývaný subakutní nekrotizující encefalomyelopatie, je nejčastější mitochondriální onemocnění u dětí. Nejčastěji se objevuje mezi 3 měsíci a dvěma roky věku a může být způsoben mutacemi ve více než 75 genech. Projevuje se neuromotorickou regresí s následkem smrti selháním dýchání a typickým obrazem při vyšetření mozku pomocí magnetické rezonance (Lake et al., 2016).

Bez zajímavosti není prostorové rozdělení mutací způsobujících jednotlivá onemocnění v rámci mitochondriálního komplexu I, kdy většina mutací způsobujících Leighův syndrom se nachází v genech podjednotek matrixového ramene, zatímco mutace způsobující LHON se objevují především v genech membránových podjednotek (Fiedorczuk and Sazanov, 2018).

Jednou z podjednotek účastnících se přenosu elektronů z NADH na ubichinon je NDUF58. Tato podjednotka ve své centrální části váže železo-sírná centra N5 a N6a a mutace způsobující změny aminokyselinových zbytků v jejich blízkosti pravděpodobně způsobí narušení toku elektronů. N-konec NDUF58 umístěný periferně daleko od zbytku podjednotky obsahuje dva amfipatické helixy s neznámou funkcí, změna jejich aminokyselinového složení ale způsobuje progresivní externí oftalmoplegii nebo Leighův syndrom (Marina et al., 2013). Pravděpodobně se tedy podílí na skládání nebo stabilitě komplexu (Fiedorczuk et al., 2016). NDUF58 je současně jaderně kódovanou podjednotkou komplexu I, s níž byl Leighův syndrom spojen vůbec poprvé (Loeffen et al., 1998).

1.4.2 Superkomplexy vnitřní mitochondriální membrány

Výše popsaná situace komplexů dýchacího řetězce by odpovídala tzv. fluidnímu modelu neboli modelu náhodných srážek (Hackenbrock et al., 1986). Podle něho se komplexy ETC volně pohybují v membráně krist a elektrony jsou mezi nimi přenášeny pomocí ubichinolu, resp. cytochromu *c*. Tento dlouhou dobu přijímaný model nahradil dřívější model pevný, u něhož se předpokládalo, že komplexy respiračního řetězce spolu s ATP-syntázou jsou spolu spojeny do jedné pevné struktury pro zajištění maximální katalytické efektivity po sobě jdoucích reakcí (Chance et al., 1963). V roce 2000 se zdálo, že možná dojde k obnovení staršího modelu, když byla poprvé pozorována asociace komplexů I, III a IV pomocí modré nativní polyakrylamidové gelové elektroforézy při použití proteinů získaných z buněk kvasinky *S. cerevisiae* a srdce tura domácího (Schagger and Pfeiffer, 2000). Později byla podobná pozorování opakována u jiných druhů z různých skupin organismů (Acin-Perez et al., 2008; Krause et al., 2004) a jinými metodami (Acin-Perez et al., 2008; Davies et al., 2018). Nejčastěji

pozorovaný superkomplex v buňkách savců se stechiometrií $I_1III_2IV_1$ byl pojmenován respirasom a byly získány první strukturní údaje pomocí kryoelektronové mikroskopie (Davies et al., 2018). Přestože pomocí elektronové mikroskopie a společnou izolací bylo zjištěno, že součástí superkomplexů je i ubiquinon a cytochrom c (Acin-Perez et al., 2008; Davies et al., 2018), což by odpovídalo původnímu pevnému modelu, kinetická měření právě pro ubiquinon ukázala, že se v membráně vyskytuje v několika populacích, které však nejsou přísně odděleny a pouze část je vázaná na superkomplexy (Blaza et al., 2014). Vytvořen tak byl model plasticity, podle něhož je část komplexů dýchacího řetězce součástí superkomplexů, zatímco část se pohybuje volně v membráně a obě skupiny jsou v dynamické rovnováze.

Funkce superkomplexů není jistá. Jednou z teorií je vyšší efektivita katalytického mechanismu navazujících komplexů, čemuž by nasvědčovala i přítomnost vázaných přenašečů. Zároveň bylo zjištěno, že v nepřítomnosti komplexů III a IV se významně snižuje stabilita a množství komplexu I, vzájemná stabilizace je tedy další z možností (Schagger et al., 2004). Poměr superkomplexů vůči volným komplexům je navíc zřejmě přesně regulován a mění se podle dostupnosti živin (Lapiente-Brun et al., 2013) nebo diferenciačního stavu buňky (Beutner et al., 2014).

Také komplexy ATP-syntázy asociují do větších celků. Jedná se především o dimery spojené pod určitým úhlem, čímž zřejmě zakřivují membránu. Současně s tím se dimery samovolně uspořádávají do řad na hranách krist, jejichž vzniku pravděpodobně napomáhají (Davies et al., 2012). O tom svědčí i narušená struktura krist při provedení genového knockoutu podjednotek zodpovědných za vzájemnou vazbu monomerů (Davies et al., 2012) a skutečnost, že prokaryotní organismy obvykle nedisponují ani těmito podjednotkami, ani strukturami dopovídajícími kristám.

1.5 Mitochondriální onemocnění

Mitochondriální onemocnění tvoří heterogenní skupinu dědičných poruch energetického metabolismu mitochondrií, nejčastěji postihujících tkáň, orgány a orgánové systémy s vysokou energetickou náročností. Mezi ty patří například nervová tkáň, tedy jak centrální, tak periferní nervový systém, příčně pruhovaná svalovina, srdeční svalovina, endokrinní systém, játra nebo ledviny (Alston et al., 2017; Gorman et al., 2016). Často se vyskytují jako multisystémová onemocnění zasahující mnoho různých orgánů, výjimečně mohou však mít i izolované projevy, např. Leberova hereditární optická neuropatie (LHON), postihující gangliové buňky sítnice a způsobující významně zhoršené vidění až ztrátu zraku především v centru zorného pole (Jay, 1990), nebo izolovaná myopatie či chronická progresivní externí oftalmoplegie (CPEO) (Taylor et al., 2004). Věk nástupu vykazuje zvláštní rozdělení se dvěma vrcholy, jedním do tří let věku a druhým širším od konce dospívání do čtvrté dekády života (Gorman et al., 2016), mitochondriální onemocnění ale může

propuknout i později, především v případě CPEO, ale také například progresivní externí oftalmoplegie způsobené mutací *OPA1* (kapitola 1.1.1.2) (Nochez et al., 2009).

Specifikem mitochondriálních onemocnění je rozmanitost možných forem dědičnosti. Vyskytuje se dědičnost autosomálně dominantní, autosomálně recesivní, X vázaná, ale přidává se i dědičnost maternální způsobená maternální dědičností mitochondriálního genomu (Pyle et al., 2015) (kapitola 1.2.1). S ní souvisí jev zvaný heteroplasmie, znamenající přítomnost více než jedné varianty mitochondriální DNA v dané buňce. Aby došlo k projevu onemocnění způsobeného mutací mitochondriální DNA, musí heteroplasmie, tedy zastoupení mutované formy, překročit určitou hranici. Ta se liší podle konkrétní mutace a dalších podmínek ovlivňujících mitochondriální energetiku v daném buněčném typu, včetně jaderného genotypu nebo např. pohlaví (Frazier et al., 2019), často však bývá okolo 60–70 % (de Laat et al., 2012). Stejná mutace může na základě různé heteroplasmie navíc způsobovat různá onemocnění, jako je tomu u záměny m.8993T>G. Ta způsobuje při heteroplasmii přibližně 70–90 % neurogení svalovou slabost, ataxii a *retinitis pigmentosa* (NARP, Neurogenic muscle weakness, ataxia and retinitis pigmentosa), zatímco při více než 90 % mutovaných molekul mtDNA způsobuje závažnější Leighův syndrom (kapitola 1.4.1) a při méně než 70 % bývají pacienti asymptomatictí (White et al., 1999). Situace je ovšem ještě složitější. Stejně jako mutace jaderného genomu se mohou i mutace mtDNA objevovat sporadicky, tj. vznikat *de novo* v průběhu embryonálního vývoje nebo v zárodečných tkáních matky bez detekovatelného výskytu v jejích tkáních běžně dostupných pro vyšetření. Avšak zatímco bodové mutace mtDNA bývají v přibližně 75 % případů zděděné, velké delece vznikají v naprosté většině *de novo* a pravděpodobnost přenosu na potomka je méně než 10 % (Sallevelt et al., 2017). Složitá dědičnost je pouze jednou z komplikací při diagnostice mitochondriálních onemocnění.

Doposud bylo identifikováno přibližně 300 jaderných genů, jejichž mutace způsobují mitochondriální onemocnění (viz (Frazier et al., 2019) pro kompletní seznam všech identifikovaných jaderných i mitochondriálních genů do roku 2017), tento počet se však každým rokem zvyšuje. Od roku 2012 do roku 2017 bylo průměrně identifikováno 22 takových genů ročně. Proteiny a RNA, které tyto geny kódují, mohou spadat do mnoha různých skupin podle toho, jakým způsobem ovlivňují správnou funkci mitochondrií. Mimo jiné se jedná přímo o podjednotky komplexů respiračního řetězce a ATP-syntázy, jejich asemblační faktory a mobilní přenašeče ETC, stejně jako proteiny zajišťující jejich biogenezi. Dále proteiny údržby, replikace a exprese mitochondriálního genomu, proteiny dynamiky mitochondrií, mitochondriální homestázy a kontroly kvality, včetně proteinů s funkcí v apoptóze a mitofagii, a další (Frazier et al., 2019; Gorman et al., 2016).

Prevalence dětských mitochondriálních onemocnění činí přibližně 5–15 případů na sto tisíc narozených (Skladal et al., 2003). Prevalence u dospělých byla nedávno vyhodnocena u pacientů z regionu severovýchodní Anglie jako 9,6, respektive 2,9 na 100000 zvláště pro onemocnění

způsobená mutacemi v mitochondriální a jaderné DNA (Gorman et al., 2015). Tento nepoměr, kdy je přibližně 75 % mitochondriálních onemocnění dospělých způsobeno mutacemi v mtDNA, je u dětských pacientů obrácen a mutace mitochondriálního genomu zde způsobují pouze 20–25 % případů, zatímco většina pacientů vykazuje bialeické autosomálně recesivní mutace (Skladal et al., 2003) (tak, jak je tomu i u všech pacientů v této práci až na jednoho).

1.5.1 Diagnostika mitochondriálních onemocnění

Určení molekulární příčiny mitochondriálních onemocnění je i přes pokroky v poslední době stále náročným úkolem. To ilustruje i úspěšnost 30–60 % v určení kauzálních mutací v posledních letech (Taylor et al., 2014; Wortmann et al., 2015). Diagnostika na základě klinických projevů je složitá kvůli malé korelaci mezi genotypem a fenotypem pacientů, kdy například Leighův syndrom, nejčastější mitochondriální onemocnění v dětství, může být způsoben mutací více než 75 různých genů (Lake et al., 2016) (kapitola 1.4.1). Naopak nejčastěji mutovaným jaderným genem této skupiny nemocí je zřejmě *POLG*, jehož mutace však způsobují minimálně 7 různých syndromů (El-Hattab et al., 2017) (kapitola 1.2.3). Po vyslovení podezření na mitochondriální onemocnění obvykle následuje jednak řada dalších specializovaných vyšetření mj. oftalmologických (Ronnback et al., 2013), neurologických (včetně magnetické resonance, EEG a EMG a mnoha dalších (Bonfante et al., 2016)) a jiných a zároveň řada laboratorních stanovení metabolitů především v krvi, moči a mozkomíšního moku (Shaham et al., 2010; Wortmann et al., 2013). I po provedení této série diagnostických testů byla až donedávna před přistoupením k molekulárně genetickým metodám obvykle indikována biochemická měření a další pozorování na tkáních získaných biopsií, přičemž nejčastěji se jednalo o tkáň svalovou. Zahrnovala histologická a histochemická vyšetření, kdy například modifikované Gomoriho barvení umožňuje detekci takzvaných ragged red fibers (RRF, drsná červená vlákna), představujících jeden z charakteristických histopatologických nálezů mitochondriálních onemocnění vznikající v důsledku proliferace mitochondrií pod sarkolemou svalových vláken jako kompenzačního mechanismu bioenergetického defektu (Moraes et al., 1992). Často používanou histochemickou metodou je sledování funkce komplexu IV cytochrom-*c*-oxidázy (COX), obsahujícího podjednotky kódované mtDNA, v kombinaci s komplexem II sukcinátdehydrogenázou (SDH) s podjednotkami kódovanými výhradně jadernou DNA. Kombinace obou reakcí na jednom preparátu umožňuje často identifikaci vláken s mitochondriální dysfunkcí způsobenou defekty mtDNA viditelných pro jejich sníženou aktivitu COX v kombinaci s normální aktivitou SDH (Sciacco et al., 1994). Další využití materiálu svalové biopsie zahrnuje především stanovení aktivit komplexů oxidační fosforylace *in vitro* spektrofotometrickými metodami (Kirby et al., 2007), případně množství jednotlivých komplexů a superkomplexů nebo jejich asemblačních intermediátů.

Konečná molekulární diagnóza je stanovena sekvenačními metodami, které dnes většinou přicházejí na řadu dříve než je indikována biopsie svalu. V současné době umožňuje vyšší dostupnost metod nové generace častější použití sekvenace celého exomu (Wortmann et al., 2015) (WES, whole exome sequencing) popřípadě genomu (WGS, whole genome sequencing) (Hartmannova et al., 2016) na úkor sekvenace omezeného počtu kandidátních genů (Alston et al., 2016). To sebou však nese překážku v podobě validace zjištěných mutací jako příčiny daného onemocnění. Kombinací sekvenačních a výše uvedených laboratorních metod je pak WES s následným srovnáním virtuálního panelu kandidátních genů s možným rozšířením při nenalezení pravděpodobné kauzální mutace (Wortmann et al., 2015).

Vzhledem k náročnosti svalové biopsie především pro dětské pacienty a dostupnosti WES a WGS je snaha vyvinout metody validace kauzálních mutací využívající snáze dostupné buněčné typy, jako jsou kožní fibroblasty a izolované lymfocyty, které se k diagnostice některých mitochondriálních onemocnění využívají již delší dobu (Robinson, 1996). Především při porovnávání výsledků získaných použitím těchto buněk s výsledky z jiné tkáně, např. svaloviny, je potřeba opatrnosti, neboť mutace některých genů nemusí mít stejný efekt na aktivity enzymů respiračního řetězce v různých tkáních (Tetreault et al., 2015).

1.5.2 Měření spotřeby kyslíku

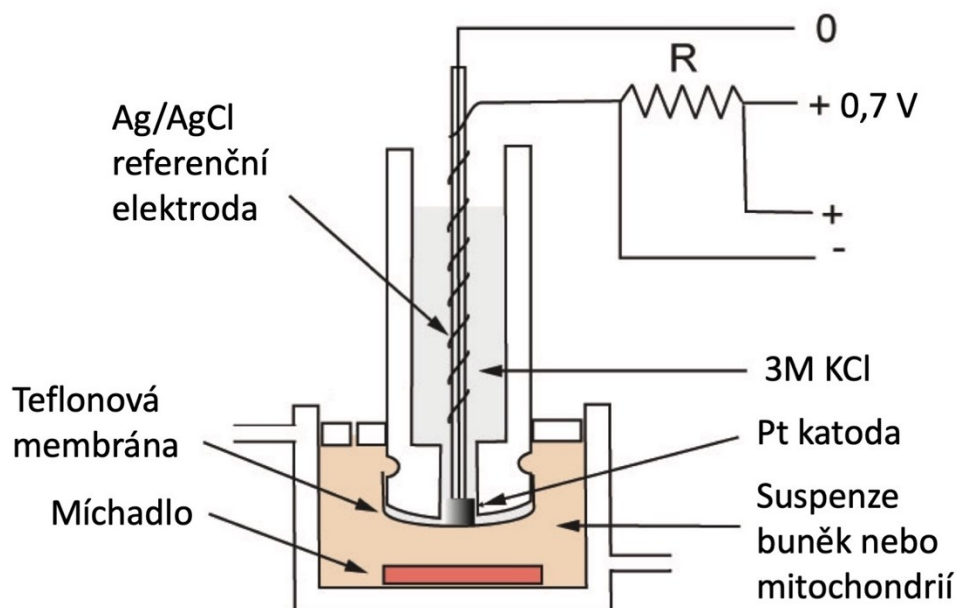
Jak je popsáno v kapitole 1.4, v procesu oxidační fosforylace je kyslík redukován na komplexu IV na vodu za využití elektronů procházejících elektron-transportním řetězcem a protonů v matrix. Měření úbytku kyslíku v uzavřeném systému obsahujícím izolované mitochondrie nebo celé buňky tak může být použito k posouzení funkčního stavu OXPHOS a mitochondrií (Brand and Nicholls, 2011). Měření spotřeby kyslíku izolovanými mitochondriemi je dlouhodobě nejpoužívanější postup, nabízející řadu benefitů oproti použití intaktních buněk, ovšem je třeba počítat i s řadou nevýhod. Výhodami izolovaných mitochondrií pro respirometrické měření je v první řadě relativní jednoduchost systému a kontrolované podmínky. To je způsobeno především tím, že nedochází k jejich ovlivňování stavem cytosolu, a možností přímého přidávání substrátů a dalších chemikálií do média, které je v kontaktu s mitochondriemi, resp. systémem oxidační fosforylace díky propustnosti vnější mitochondriální membrány. Metody izolace a měření jsou velmi dobře a dlouhodobě zavedeny (Wettmarshausen and Perocchi, 2017). Hlavními nevýhodami je pak obtížná interpretace výsledků vzhledem k zcela nefyziologickým podmínkám a absenci kontextu zbytku buňky. Při izolaci mitochondrií dochází k rozbití složitého mitochondriálního retikula (kapitola 1.1), z čehož může pramenit poškození funkce mitochondrií (Brand and Nicholls, 2011). Intaktní buňky nenabízí zdaleka takovou kontrolu nad podmínkami mitochondriální respirace. Vědecký pracovník kontroluje pouze extracelulární podmínky, protože řada substrátů a chemikálií používaných pro studium funkce mitochondrií (jako

například ADP nebo cytochrom *c*) se může do buňky dostávat různou rychlostí v závislosti na mnoha podmínkách, nebo přes membránu nepřechází vůbec. Není tak možné dosáhnout stále stejných saturujících koncentrací používaných při výzkumu izolovaných mitochondrií. Intaktní buňky nabízí výrazně větší fyziologickou relevanci, ale interpretace výsledků může být opět složitá, tentokrát kvůli vysoké komplexitě systému (Ost et al., 2018).

Zajímavým kompromisem je měření respirace permeabilizovaných buněk či svalových vláken (Kuznetsov et al., 2008). Použitím chemikálií specificky interagujících s cholesterolem, který se v membránách mitochondrií nachází pouze ve velmi malém množství, ovšem v plasmatické membráně buněk je ho řádově více (Comte et al., 1976), dojde k narušení difuzní bariéry plasmalemy a promíchání cytosolu a respiračního média, v němž se buňky nachází. Je tak možné kontrolovat řadu podmínek podobně jako při analýze respirace izolovaných mitochondrií, je však zároveň lépe zachována struktura mitochondriálního retikula, stejně jako interakce s cytoskeletem (De Vos et al., 2005), jádrem (Dzeja et al., 2002) nebo endoplasmatickým retikulem (Friedman et al., 2011). Důležité je použití nejnižší potřebné koncentrace látky interagující s cholesterolem (např. digitonin, saponin, filipin, α -tomatin, α -solanin nebo β -escin), aby nedošlo k narušení integrity vnější mitochondriální membrány (Kuznetsov et al., 2008). Přidáním cytochromu *c* bez následného významného zvýšení rychlosti respirace je provedena kontrola její celistvosti.

Jedním z nejpoužívanějších nástrojů měření rychlosti respirace buněk a izolovaných mitochondrií je Clarkova kyslíková elektroda (Obrázek 5). Ta se skládá z platinové katody a argentchloridové anody v 3M roztoku chloridu draselného. Ten je od měřicí komory přístroje oddělen teflonovou membránou umožňující průchod kyslíku. Na katodě dochází k redukci kyslíku za spotřeby vodíkového protonu a vzniku vody. Výsledný elektrický proud je závislý na množství kyslíku v roztoku KCl resp. respiračním mediu v měřicí komoře, díky čemuž je možné měřit změnu koncentrace rozpuštěného O_2 (Nicholls, 2013).

Současná podoba nejčastěji používaného přístroje Oxygraph-O2k byla navržena v roce 2001. Umožňuje měření ve dvou promíchávaných komorách o objemu 2 nebo nověji i 0,5 ml za stálé teploty s přesností ± 0.05 °C a současného přidávání respiračních substrátů a dalších chemikálií jako inhibitorů komplexů respiračního řetězce nebo rozpřahovačů. Současná podoba přístroje umožňuje zároveň měřit produkci reaktivních forem kyslíku, membránový potenciál mitochondrií, koncentraci Ca^{2+} nebo produkci ATP (Doerrier et al., 2018).



Obrázek 5: Schéma Clarkovy kyslíkové elektrody. Skládá se z argentchloridové anody a platinové katody v roztoku KCl odděleném od prostoru respirujících buněk teflonovou membránou propustnou pro kyslík. Na katodě dochází k redukci kyslíku, přičemž výsledný elektrický proud je závislý na jeho množství v roztoku KCl resp. respiračním mediu v měřicí komoře, díky čemuž je možné měřit změnu koncentrace rozpuštěného O_2 . Převzato a upraveno dle (Nicholls, 2013).

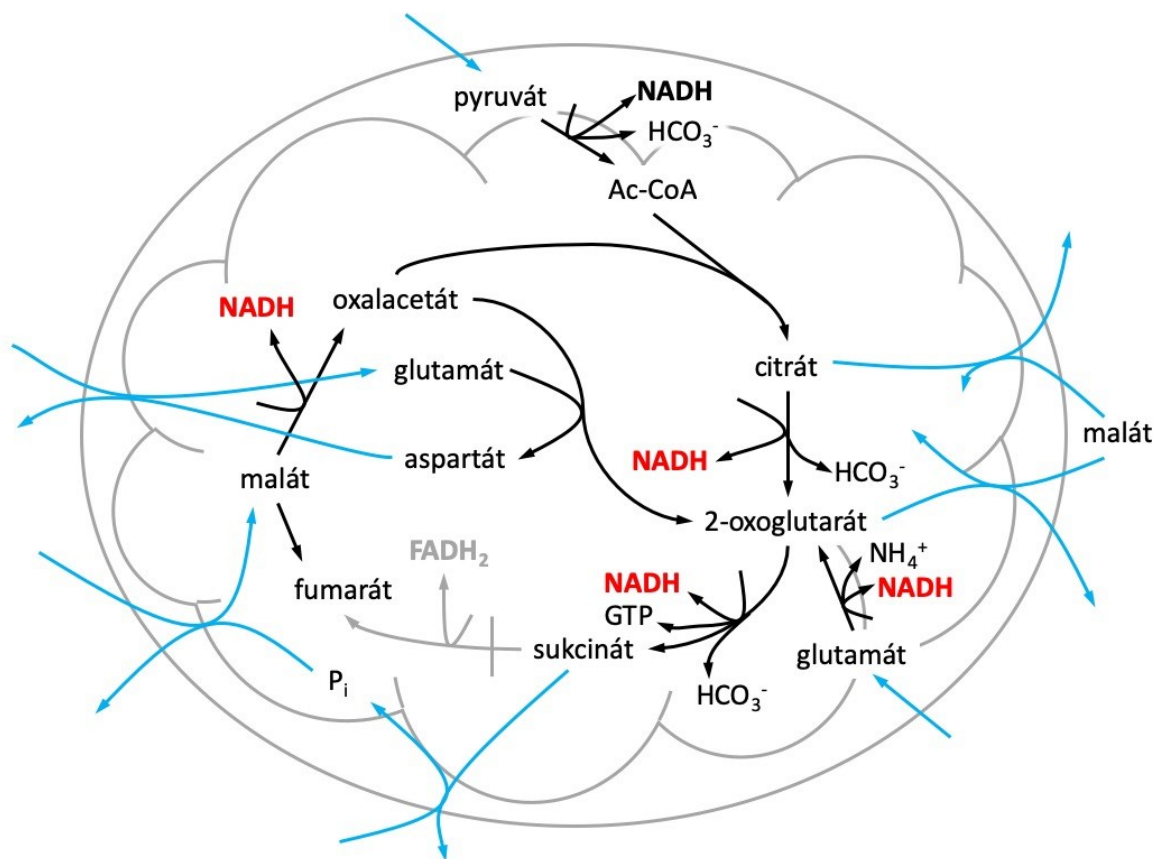
1.5.2.1 Komplex I- a komplex II-dependentní substráty

Přidávání substrátů, inhibitorů a rozpřahovačů nám umožňuje sledovat respiraci za mnoha různých funkčních stavů mitochondrií, z nichž některé jsou vysvětleny v jiných kapitolách. Na tomto místě je potřeba přiblížit především dva z nich, a totiž respiraci závislou na substrátech poskytujících elektrony pro komplex I, resp. komplex II dýchacího řetězce. Jak bylo vysvětleno v kapitole 1.4, dýchací řetězec využívá elektrony redukováných koenzymů vznikajících především v citrátovém cyklu. Tyto elektrony se dostávají do dýchacího řetězce na dvou místech, z NADH prostřednictvím komplexu I a z $FADH_2$ díky komplexu II (Obrázek 4). Při měření spotřeby kyslíku můžeme izolovat respiraci závislou právě na toku elektronů začínajícím na jednom z těchto komplexů pomocí přidavku správné kombinace substrátů a inhibitorů.

Po přidání malátu a pyruvátu dochází k transportu těchto substrátů do mitochondrií různými způsoby (Obrázek 6). Pyruvát je transportován pomocí pyruvátového přenašeče výměnou za hydroxylový ion do matrix mitochondrie a zde je využit pyruvátdehydrogenázovým komplexem k tvorbě acetylkoenzymu A (Bricker et al., 2012). Malát je do matrix transportován výměnou za fosfát, citrát nebo 2-oxoglutarát (Monne et al., 2013). Acetylová skupina acetyl-CoA je předána na oxalacetát za vzniku citrátu, ten může být transportován mimo mitochondrii výměnou za malát (viz výše), nebo dále oxidován přes isocitrát na 2-oxoglutarát. Ten je buď opět exportován 2-oxoglutarátovým přenašečem antiportem za malát, nebo zpracováván na sukcinyl-CoA a sukcinát.

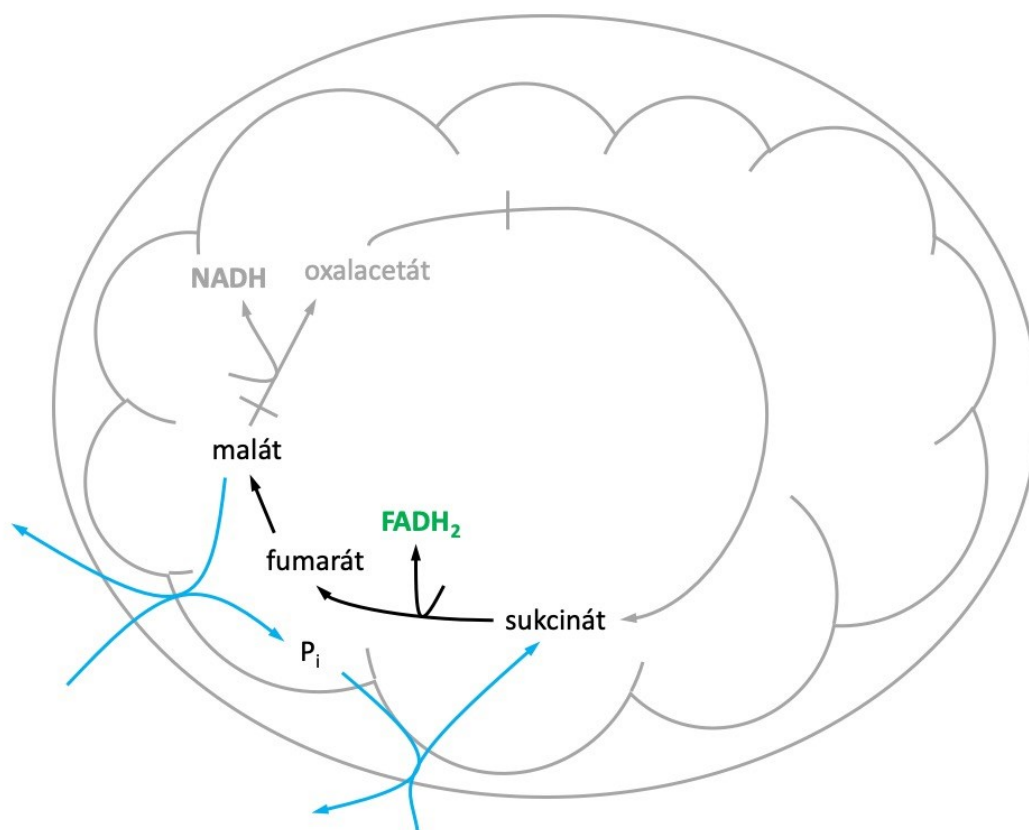
Důležité je, že ve dvou z výše popsaných reakcí vzniká redukovaný koenzym NADH jako substrát komplexu I. Přídavek malátu mezitím jednak poskytne oxalacetát pro citrátsyntázovou reakci (za vzniku další molekuly NADH) a zároveň zpětným tokem na fumarát inhibuje sukcinátdehydrogenázovou reakci nadbytkem jejího produktu. Tímto mechanismem je díky nadbytku substrátů možný průběh reakcí Krebsova cyklu produkujících NADH bez toho, aby docházelo k jeho uzavření při dehydrogenaci sukcinátu a vzniku FADH₂ jako koenzymu komplexu II (Gnaiger, 2007).

Pokud spolu s malátem a pyruvátem přidáme glutamát, opět dojde k několika dějům směřujícím k respiraci závislé na elektronech z komplexu I. Glutamát je transportován buď výměnou za aspartát nebo, v některých buněčných typech, antiportem s hydroxylovým iontem (Amoedo et al., 2016). V mitochondriích umožňuje zaprvé spotřebu oxalacetátu a tím vznik NADH v malátdehydrogenázové reakci, přičemž vzniká aspartát a 2-oxoglutarát (Jiang et al., 2016). Aspartát se dostává z mitochondrie výměnou za glutamát a 2-oxoglutarát má podobný osud jako v minulém odstavci. Zadruhé může být glutamát v mitochondrii zpracován také glutamátdehydrogenázou za vzniku 2-oxoglutarátu, NH₄⁺ a NADH (Mastorodemos et al., 2005). Těmito způsoby přispívá glutamát k produkci NADH (Gnaiger, 2007).



Obrázek 6: Zjednodušené schéma stavu citrátového cyklu po přidání pyruvátu, malátu a glutamátu k izolovaným mitochondriím nebo permeabilizovaným buňkám. Celkově dochází k tvorbě NADH, jehož prostřednictvím se dostávají elektrony do dýchacího řetězce přes komplex I za současné inhibice komplexu II. Ve schématu jsou pro zjednodušení pominuty některé meziproducty Krebsova cyklu, náboj molekul krom HCO_3^- a také případný symport protonů s některými substráty. Černé šipky vyjadřují chemické reakce, zatímco modré šipky znázorňují transport chemikálií přes mitochondriální membránu. Detailní vysvětlení viz text.

Přítomnost sukcinátu jako přímého substrátu sukcinátdehydrogenázy má jasný vliv na to, prostřednictvím kterého z komplexů se budou dostávat potřebné elektrony do respiračního řetězce. Pouhá přítomnost sukcinátu (a ADP) bez jiných substrátů má jisté další důsledky (Obrázek 7). Průběhem následujících dvou reakcí Krebsova cyklu dochází k hromadění oxalacetátu, který je účinným inhibitorem sukcinátdehydrogenázy. Pokud je spolu se sukcinátem do komory oxygrafu přidán rotenon jako specifický inhibitor NADH-ubichinonreduktázy, nedochází ke spotřebě NADH vznikajícího při malátdehydrogenázové reakci, čímž je tato reakce zastavena. Malát je transportován z mitochondrie výměnou za fosfát (Fiermonte et al., 1998). Tímto způsobem je udržen průběh sukcinátdehydrogenázové reakce a tedy i respirace závislé na mitochondriálním komplexu II (Gnaiger, 2007).



Obrázek 7: Zjednodušené schéma stavu citrátového cyklu po přidání sukcinátu a rotenonu k izolovaným mitochondriím nebo permeabilizovaným buňkám. Celkově dochází k předávání elektronů do dýchacího řetězce prostřednictvím komplexu II. Ve schématu jsou pro zjednodušení pominuty některé meziproducty Krebsova cyklu, náboj molekul krom HCO_3^- a také případný symport protonů s některými substráty. Černé šipky vyjadřují chemické reakce, zatímco modré šipky znázorňují transport chemikálií přes mitochondriální membránu. Detailní vysvětlení viz text.

1.5.2.2 Volba kultivačního media

Lidské buňky v kultuře pěstované v běžném DMEM mediu s koncentrací glukózy 4,5 g/l využívají k produkci energie a zajištění metabolismu především glykolytickou dráhu za současné produkce odpadního pyruvátu a laktátu do media (Robinson et al., 1992). Při nahrazení glukózy v mediu stejnou koncentrací galaktózy je omezena glykolytická produkce ATP v důsledku omezeného metabolického toku od galaktózy ke glukóze-6-P a naopak dochází ke zvýšení aktivity oxidační fosforylace, množství komplexů a superkomplexů respiračního řetězce, elongaci mitochondrií a zvýšení množství krist vnitřní mitochondriální membrány (Cogliati et al., 2013; Patten et al., 2014; Robinson et al., 1992; Rossignol et al., 2004). Tohoto jevu se především v minulosti využívalo k diagnostice mitochondriálních onemocnění s defektem funkce systému oxidační fosforylace. Buňky pacientů mají zhoršenou možnost produkce ATP za podmínek neumožňujících jeho tvorbu glykolytickou cestou, v důsledku čehož docházelo během několika dní u fibroblastů ke snížení rychlosti růstu a odumření (Robinson et al., 1992). Tento jednoduchý test bohužel neidentifikuje

mírné ale fyziologicky významné defekty mitochondriálního metabolismu, dodnes se však tato technika využívá například při identifikaci nových genů potřebných pro správnou funkci mitochondriální oxidační fosforylace a tedy růst v mediu s galaktózou (Arroyo et al., 2016) a při výzkumu dopadů mutací mnoha různých proteinů způsobujících mitochondriální onemocnění.

2 Cíle práce

Cílem diplomové práce je funkční charakterizace dopadu vybraných vzácných genetických příčin poruch OXPHOS (2× porucha mtDNA replikace, 2× dynamika mitochondriální sítě, 1× strukturální podjednotky komplexů OXPHOS, 1× mitochondriální translace, 1× transkripční faktor, 1× mitochondriální proteáza) v kožních kultivovaných fibroblastech pomocí vysoce citlivé polarografie během kultivace za různých podmínek. Porovnání získaných dat s věkově odpovídajícími kontrolami a navržení možného postupu potvrzení patogenity daných mutací.

Dílčí cíle jsou:

1. Zjistit, jak se projevují různé kategorie mutací způsobujících mitochondriální onemocnění na funkci OXPHOS v kožních kultivovaných fibroblastech a to při kultivaci v mediu obsahujícím glukózu nebo galaktózu.
2. Zhodnotit vhodnost použitých metod pro validaci potenciálně patogenních mutací zjištěných sekvenováním.
3. Zjistit, jak se tyto mutace projevují na struktuře mitochondriálního retikula fibroblastů kultivovaných v mediu obsahujícím glukózu nebo galaktózu.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Buněčné linie

Všechny kožní kultivované fibroblasty použité pro založení buněčných kultur a následná měření byly získány biopsií na základě informovaného souhlasu. Celkem bylo tímto způsobem použito pět linií kontrolních fibroblastů a kultury fibroblastů od osmi různých pacientů (Tabulka 1 a Tabulka 2)

3.1.1.1 Kontrolní linie fibroblastů

Jako kontrolní vzorek bylo použito pět linií fibroblastů uvedených v Tabulce 2. Linie K1 a K2 byly zakoupeny (American Type Culture Collection, USA) jako fibroblasty zdravého novorozence v roce 2008, resp. 2014. Linie K3 a K4 pochází od dětských pacientů, u nichž nebylo potvrzeno mitochondriální onemocnění. Buňky linie K5 byly dobrovolně poskytnuty zdravou dospělou ženou.

Tabulka 1: Přehled kontrolních linií fibroblastů

Název linie	Věk v době odběru fibroblastů	Původ
K1	<1 (novorozenec)	komerční
K2	<1 (novorozenec)	komerční
K3	3	neg. pacient
K4	1	neg. pacient
K5	28	zdravá žena, dobrovolník

neg. pacient – pacient, u něhož nebylo prokázáno mitochondriální onemocnění

3.1.1.2 Linie fibroblastů pacientů s mitochondriální poruchou

Do práce bylo zahrnuto osm linií kožních kultivovaných fibroblastů pacientů s mitochondriálními poruchami způsobenými mutacemi v sedmi různých jaderných genech. Pacienti 1 a 2 jsou sourozenci nesoucí stejné mutace (Tabulka 2)

Tabulka 2: Přehled pacientů s mitochondriální poruchou zahrnutých do diplomové práce.

Pacient	Věk v době odběru fibroblastů	Genetická diagnóza	Klinické projevy
P1	<1 r	<i>OPA1</i> c.[1062_1064delAGA];[1768C>T], p.[Glu354del];[Arg590Trp]	PMR, LS, porucha sluchu a zraku, kardiomyopatie hypotonie, LA, mikrocefalie, epilepsie, † 12,5 m
P2	7 m	<i>OPA1</i> c.[1062_1064delAGA];[1768C>T], p.[Glu354del];[Arg590Trp]	PMR, hypotonie, LA, kortikální atrofie, kardiomyopatie, † 10 m
P3	2 r	<i>DARS2</i> c.[228-10C>A];[1894C>T], p.[Arg76Serfs*5];[Arg632*]	LBSL, epilepsie, mozečková symptomatologie, neuropatie, postupný regres vývoje
P4	2 r	<i>NDUFS8</i> c.[160C>T];[457T>C], p.[Arg54Trp];[Cys153Arg]	těžká PMR, LS, encefalomyopatie, hepatopatie, LA
P5	1 r	<i>NR2F1</i> AD <i>de novo</i> , c.[317G>A];[=], p.Cys106Tyr	WS, atrofie n. optici, porucha sluchu, PMR, hypotonie, nystagmus, anemie
P6	6 t	<i>HTRA2</i> c.[895_896insG];[895_896insG], p.Ala299Glyfs*4	myoklonus, hypotonie, hypoplasie n. optici, porucha sluchu, mikrocefalie, hyperferritinémie, 3-methylglutakonové acidurie, † 2,5 m
P7	<1 r	<i>MGME1</i> c.[794C>T];[971G>A], p.[Thr265Ile];[Arg324Gln]	PMR, WS, porencefalie, atrofie CNS, PVL, LA, hyperamonemie, † 4 r
P8	1 r	<i>POLG</i> c.[1399G>A];[1766C>T], p.[Ala467Thr];[Pro589Leu]	Alpers-Huttenlocherův syndrom, atrofie mozku, hypotonie, dyskineze, myoklonus, hepatopatie, LA, † 22 m

r-roky, m-měsíce, t-týdny, †-pacient zemřel, PMR-psychomotorická retardace, LS-Leighův syndrom, LA-laktátová acidóza, WS-Westův syndrom, CNS-centrální nervový systém, PVL-periventrikulární leukomalacie, LBSL-leukoencefalopatie s postižením mozkového kmene, míchy a zvýšeným laktátem

3.1.2 Použité chemikálie

ADP	Sigma-Aldrich (USA)
Antimycin A	Sigma-Aldrich (USA)
Askorbát sodný	Sigma-Aldrich (USA)
Azid sodný	Sigma-Aldrich (USA)
Chlorid draselný	Penta (ČR)
Chlorid hořečnatý hexahydrát	Sigma-Aldrich (USA)
Chlorid sodný	Sigma-Aldrich (USA)
Cytochrom c	Sigma-Aldrich (USA)
Deoxycholát sodný	Sigma-Aldrich (USA)
Digitonin	Sigma-Aldrich (USA)
DMSO	Sigma-Aldrich (USA)
EDTA	Sigma-Aldrich (USA)
Ethanol (96%)	Dr. Kulich Pharma (ČR)
FCCP	Sigma-Aldrich (USA)
Fosforečnan draselný	Penta (ČR)
Galaktóza	Merck (Německo)
Glukóza	Sigma-Aldrich (USA)
Glutamát sodný	Sigma (USA)
Hydroxid draselný	Penta (ČR)
Hydroxid sodný	Dr. Kulich Pharma (ČR), Penta (ČR)
L-Glutamin	Sigma-Aldrich (USA)
Malát	Sigma-Aldrich (USA)
MitoTracker® Red	Thermo Fisher Scientific
Oligomycin	Sigma-Aldrich (USA)
PMSF	Sigma-Aldrich (USA)
Rotenon	Sigma-Aldrich (USA)
Sukcinát sodný	Sigma-Aldrich (USA)
TMPD	Sigma-Aldrich (USA)
Tris-HCl	Sigma-Aldrich (USA)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (USA)
Uhlíčitan sodný	Sigma-Aldrich (USA), Penta (ČR)
Vinan sodnodraselný	LACHEMA (ČR)

3.1.2.1 Použité komerčně dodávané roztoky

Antibiotický a antimykotický roztok (ATB)	Biosera (Francie)
DMEM bez glukózy a L-Glutaminu	PAN-Biotech (Německo)
DMEM se stabilním L-Glutaminem	PAN-Biotech (Německo) Biochrom (Německo) Coring (USA) Life Technologies (USA)
FBS	GE Healthcare Life Sciences (USA)
FBS dialyzované	PAA Laboratories (Rakousko)
Folin-Ciocalteuovo činidlo	Penta (ČR)
PBS	Lonza (USA)
PIC	Sigma-Aldrich (USA)
Trypsin + EDTA (T + E)	Sigma-Aldrich (USA)

3.1.2.2 Použité v laboratoři připravené roztoky

KCl medium	80mM KCl, 10mM Tris-HCl, 3mM MgCl ₂ .6H ₂ O, 1mM EDTA, 5mM K ₃ PO ₄
RIPA	50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0,1% (w/v) SDS, 1% (w/v) deoxycholát sodný
Roztok Lowry A	0,4% (w/v) NaOH, 2% (w/v) Na ₂ CO ₃
Roztok Lowry B	0,5% (w/v) CuSO ₄
Roztok Lowry C	1% (w/v) vinan sodnodraselný

3.1.3 Použité přístroje

Analytické váhy HA-120M	Helago (Japonsko)
Autokláv MAC-235EX	Sanyo (Japonsko)
Autokláv MLS-3020U	Sanyo (Japonsko)
Centrifuga Rotanta 460R	Hettich Zentrifugen (Německo)
Centrifuga Universal 320R	Hettich Zentrifugen (Německo)
Centrifuga Universal 32R	Hettich Zentrifugen (Německo)
CMOS kamera ORCA-Flash4.0 LT+	Hamamatsu (Japonsko)
Laminární box Air Clean	AirClean Systems (Německo)
Mikropipety	Eppendorf (Německo)
	Gilson (USA)
	Nichiryo (Japonsko)
	Thermo Fisher Scientific (USA)
Mikroskop Eclipse Ti2	Nikon (Japonsko)
Oxygraph O2k	Oroboros (Rakousko)
pH metr 913 pH Meter	Metrohm (Švýcarsko)
Spektrofotometr UV-2401PC	Shimadzu (Japonsko)
Termostat CO ₂ incubator	Sanyo (Japonsko)
Termostat Heratherm IMC 18	Thermo Fisher Scientific (USA)
Termostat TCH 100	Laboratorní přístroje Praha (ČR)
Vortex 2x ³	Velp Scientifca (Itálie)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (USA)

3.2 Metody

3.2.1 Kultivace fibroblastů

3.2.1.1 Kultivace fibroblastů v mediu s glukózou

Fibroblasty pacientů i kontrolní linie byly standardně kultivovány v lahvích o ploše dna 75 cm² při teplotě 37 °C a v atmosféře obsahující 5 % CO₂ (CO₂ incubator, Sanyo) v mediu DMEM obsahujícím glukózu, stabilní L-Glutamin, 10% (v/v) FBS a 1% (v/v) ATB do konfluencie 90–100 %, kdy byly pasážovány. Po odebrání media bylo dno lahve opláchnuto 3–5 ml PBS a přidáno 1,5 ml T + E a lahev byla ponechána při 37 °C a atmosféře 5% CO₂ po dobu 10 minut (CO₂ incubator, Sanyo). Po kontrole uvolnění buněk z kultivační plochy (mikroskop Eclipse Ti2, Nikon) bylo k buňkám přidáno 20 ml media DMEM obsahujícího glukózu, stabilní L-Glutamin, 10% (v/v) FBS a 1% (v/v) ATB, dno láhve opláchnuto a obsah resuspendován. Přibližně 11,5 ml suspenze buněk v mediu bylo přeneseno do nové láhve a rozprostřeno po kultivační ploše.

3.2.1.2 Kultivace fibroblastů v mediu s galaktózou

Pro účely objasnění efektu kultivace buněk bez přítomnosti glukózy v mediu obsahujícím galaktózu byly buňky pěstovány dle postupu výše na požadovaný počet lahví. Při konfluenci 60–70 % bylo odebráno medium a kultivační plocha 3× opláchnuta 3–5 ml PBS. Následně bylo přidáno 10 ml media DMEM s 1% (v/v) ATB bez obsahu glukózy, FBS a L-Glutaminu. Takto byly buňky ponechány po dobu 6 hodin při 37 °C v 5% CO₂ (CO₂ incubator, Sanyo). Poté bylo medium odebráno a kultivační plocha opláchnuta 3–5 ml PBS. Následně bylo přidáno 12 ml media DMEM bez obsahu glukózy s 10 % dialyzovaného FBS, 1% ATB, 25mM (4,5 g/l) galaktózou a 2mM L-glutaminem (0,58 g/l). Buňky byly kultivovány dalších 5 dnů při 37 °C a 5% CO₂ (CO₂ incubator, Sanyo), poté bylo provedeno respirometrické měření nebo příprava na barvení a mikroskopické pozorování (3.2.4)

3.2.2 Skladování, rozmrazování, sklizení a zamrazování fibroblastů

Fibroblasty byly uchovávány v tekutém N₂ při –196 °C. Před zamražením bylo nejprve odebráno medium a kultivační plocha byla opláchnuta 3–5 ml PBS, poté přidáno 1,5 ml T + E a lahev byla ponechána při 37 °C a atmosféře 5% CO₂ po dobu 10 minut (CO₂ incubator, Sanyo). Po kontrole uvolnění buněk z kultivační plochy (mikroskop Eclipse Ti2, Nikon) bylo k buňkám přidáno 12 ml DMEM s 10% (v/v) FBS a 1% (v/v) ATB, dno láhve opláchnuto a obsah resuspendován a přenesen do 15ml centrifugační zkumavky. Centrifugace probíhala při 300 g a 23 °C po dobu 5 minut (centrifuga Universal 32R, Hettich Zentrifugen). Po odstranění supernatantu byl sediment resuspendován v 1,8 ml media DMEM s 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) ATB a 7,5% (v/v) DMSO a přendán do kryozkumavky.

Kryozkumavky byly po dobu 24 hodin uchovávány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v nádobě CoolCell® a poté přeneseny do $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pro další kultivaci byl obsah kryozkumavky nejprve rozmrazen při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (termostat Heratherm IMC 18, Thermo Fisher Scientific) a poté přenesen do kultivační láhve s plochou dna 75 cm^2 obsahující 10 ml media DMEM s 10% (v/v) FBS a 1% (v/v) ATB. Takto byly buňky uchovávány při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a atmosféře 5% CO_2 (CO_2 incubator, Sanyo) kejpzději do druhého dne, kdy bylo medium odebráno a nahrazeno 12 ml stejného media (pro odstranění DMSO). Buňky byly dále kultivovány dle 3.2.1

3.2.3 Respirometrie

3.2.3.1 Sklizení fibroblastů pro účely respirometrie

Pro respirometrické měření byly použity buňky ze 4–5 lahví s kultivační plochou 75 cm^2 na komoru přístroje Oxygraph O2k. Buňky byly sklizeny při konfluenci 70–80 % po provedení fotografické dokumentace stavu (mikroskop Eclipse Ti2, Nikon; CMOS kamera ORCA-Flash4.0 LT+, Hamamatsu). Medium bylo odebráno a kultivační plocha opláchnuta 3–5 ml PBS. Poté bylo přidáno 1,5 ml T + E a lahve byly ponechány při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut (CO_2 incubator, Sanyo). Následně bylo do kultivačních lahví vráceno medium, buňky byly resuspendovány a suspenze přenesena do 50ml centrifugační zkumavky. Centrifugace probíhala při 300 g a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut (centrifuga Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen). Po odstranění supernatantu byl sediment resuspendován v malém objemu chlazeného PBS a následně bylo přidáno dalších 20 ml chlazeného PBS. Suspenze byla centrifugována při 300 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut. Poté byl opět odebrán supernatant, sediment resuspendován v chlazeném PBS a suspenze přenesena do 15ml centrifugační zkumavky. Po další centrifugaci při 300 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut byl odstraněn supernatant a sediment resuspendován v 50 ul chlazeného PBS. Ze vzniklé suspenze bylo odebráno 20 ul pro účely měření koncentrace proteinů (3.2.4)

3.2.3.2 Respirometrické měření

Pro účely respirometrického měření s vysokým rozlišením byl použit přístroj Oroboros Oxygraph 2k. Komory přístroje byly před měřením promyty 3× destilovanou vodou a následně po dobu 30 minut 96% etanolem. Všechna měření probíhala v komorách o objemu 2 ml. Po dalším promytí destilovanou vodou bylo do každé komory přidáno 2,1 ml respiračního media KCI a komory byly ponechány po dobu sklizení buněk za stálého míchání při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně bylo z komory odebráno množství media odpovídající objemu přidávané suspenze buněk (přibližně 40-50 ul, podle výtěžku při sklizení, 3.2.2.1) a po uzavření komor a ustálení spotřeby kyslíku byly přidávány substráty a inhibitory a jiné chemikálie dle Tabulky 3.

Tabulka 3: Pořadí a koncentrace chemikálií přidávaných v průběhu respirometrických měření.

	Přidávaná chemikálie	Přidávané množství	Koncentrace zásobního roztoku	Výsledná koncentrace v komoře
1.	Digitonin	0,5–2 µl	8,1mM	2,025 – 8,1µM
2.	Pyruvát	20 µl	1M	10mM
3.	Malát	6 µl	1M	3mM
4.	Glutamát	20 µl	1M	10mM
5.	ADP + Mg ²⁺	4 µl	500mM + 300mM	1 + 0,6mM
6.	Sukcinát	20 µl	1M	10mM
7.	Cytochrom c	5 µl	1mM	2,5µM
8.	Rotenon	1 µl	0,5mM	0,25µM
9.	Oligomycin	0,2–0,4 µl	2,5mM	0,25–0,5µM
10.	FCCP	0,2–0,4 µl	1mM	0,1–0,2µM
11.	Antimycin A	1 µl	1mM	0,5µM
12.	Askorbát sodný	25 µl	200mM	2,5mM
13.	TMPD	45 µl	40mM	0,9mM
14.	Azid sodný	5 µl	4M	10mM

3.2.3.3 Vyhodnocení

Výsledná respirace po přidání jednotlivých chemikálií byla vztažena na množství proteinu v komoře určené Lowryho metodou stejně jako (Marková, 2015), a výsledky byly zpracovány v programu DatLab 5 a DatLab 7 (Oroboros). Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí obecného lineárního modelu se smíšenými efekty v programu Statistica 13 (TIBCO). Jako pevný efekt byla použita skupina kontrola/pacient, jako náhodný efekt potom identifikátor každé ze tří nebo čtyř kontrolních linií fibroblastů, dle typu měření. Výsledné p hodnoty byly upraveny Bonferroniho korekcí dle počtu sledovaných parametrů. Grafy byly vytvořeny v programu MS Excel (Microsoft).

Pro lepší posouzení jednotlivých aspektů respirace kontrol a pacientů bylo vždy srovnáváno šest parametrů vzniklých odečítáním a dělením hodnot spotřeby kyslíku (Tabulka 4)

Parametr OXPPOS odpovídá respiraci po přidání sukcinátu dle pořadí výše a odečtení respirace po přidání antimycinu A.

Parametr CI odpovídá respiraci převážně závislé na funkci komplexu I (viz kapitola 1.5.2.1) po přidání ADP a odečtení respirace po přidání antimycinu A.

Parametr CII odpovídá respiraci po přidání sukcinátu a odečtení respirace po přidání antimycinu A.

Parametr CIV odpovídá respiraci po přidání TMPD a odečtení rychlosti úbytku kyslíku po přidání azidu sodného.

Vzhledem ke zvolenému pořadí přidávání substrátů a inhibitorů umožňujícímu oddělené sledování spřažené respirace závislé na komplexu I a II není možné získat běžně udávanou leak respiraci po přidání oligomycinu (viz kapitola 1.4). Sledovaný parametr leak odpovídá respiraci po přidání oligomycinu, která je však v důsledku dřívějšího přidavku rotenonu závislá převážně na funkci komplexu II, a odečtení respirace po přidání antimycinu A

Obdobně není možné získat často udávanou hodnotu rezervní respirační kapacity, parametr FCCP odpovídá respiraci po přidání FCCP a odečtení respirace po přidání antimycinu A.

Konečných šest parametrů uváděných ve výsledcích této práce a příslušných grafech odpovídá OXPHOS a podílům výše uvedených parametrů CI, CII, CIV, leak a FCCP touto hodnotou.

Tabulka 4: Sledované parametry respirace

Parametr	Vysvětlení
OXPHOS	Suc
CI	P+M+G – AmA
CII	Suc – AmA
CIV	Asc + TMPD – AmA
leak	Omy – AmA
FCCP	FCCP – AmA
CI/OXPHOS	
CII/OXPHOS	
CIV/OXPHOS	
leak/OXPHOS	
FCCP/OXPHOS	

Suc, P+M+G, AmA, Suc, Asc + TMPD, Omy, FCCP – rychlost spotřeby kyslíku po přidání sukcinátu, glutamátu, antimycinu A, sukcinát, TMPD, oligomycinu, FCCP (viz Tabulka 3)

3.2.4 Barvení a fotografování mitochondriálního retikula

Pro účely zhodnocení morfologie mitochondriálního retikula u buněk kultivovaných v mediu DMEM s obsahem glukózy i galaktózy (kapitoly 3.2.1.1, 3.2.1.2) bylo provedeno barvení fluorescenční sondou MitoTracker® Red (Thermo Fisher Scientific). Do jamek 24 jamkové destičky, na sklíčka, bylo přidáno přibližně 10 kapek media DMEM s glukózou nebo galaktózou. Po trypsinizaci (stejně jako 3.2.1.1) bylo k buňkám přidáno 5 ml příslušného media a z výsledné suspenze bylo v různém množství 10–50 µl přemístěno do tří jamek s mediem. Po dvou až pěti dnech bylo nejprve odebráno

medium z jamek zvolených pro barvení (dle množství buněk na sklíčku) a dno jamky se sklíčkem bylo dvakrát opatrně opláchnuto PBS. Následně bylo přidáno 250 μ l 10nM fluorescenční sondy předem naředěné příslušným médiem DMEM s glukózou nebo galaktózou. Takto byly buňky inkubovány 15 minut ve tmě při teplotě 37 °C a 5 % CO₂ (CO₂ incubator, Sanyo). Následně byl odstraněno medium s fluorescenční barvou a dno jamky se sklíčkem bylo opatrně opláchnuto PBS. Buňky byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem (Eclipse Ti2, Nikon) po excitaci světlem vlnové délky 543 nm a fotografovány CMOS kamerou ORCA-Flash4.0 LT+ (Hamamatsu). K vyvolání fotografií ve formátu .tif byl použit software NIS-Elements (Nikon).

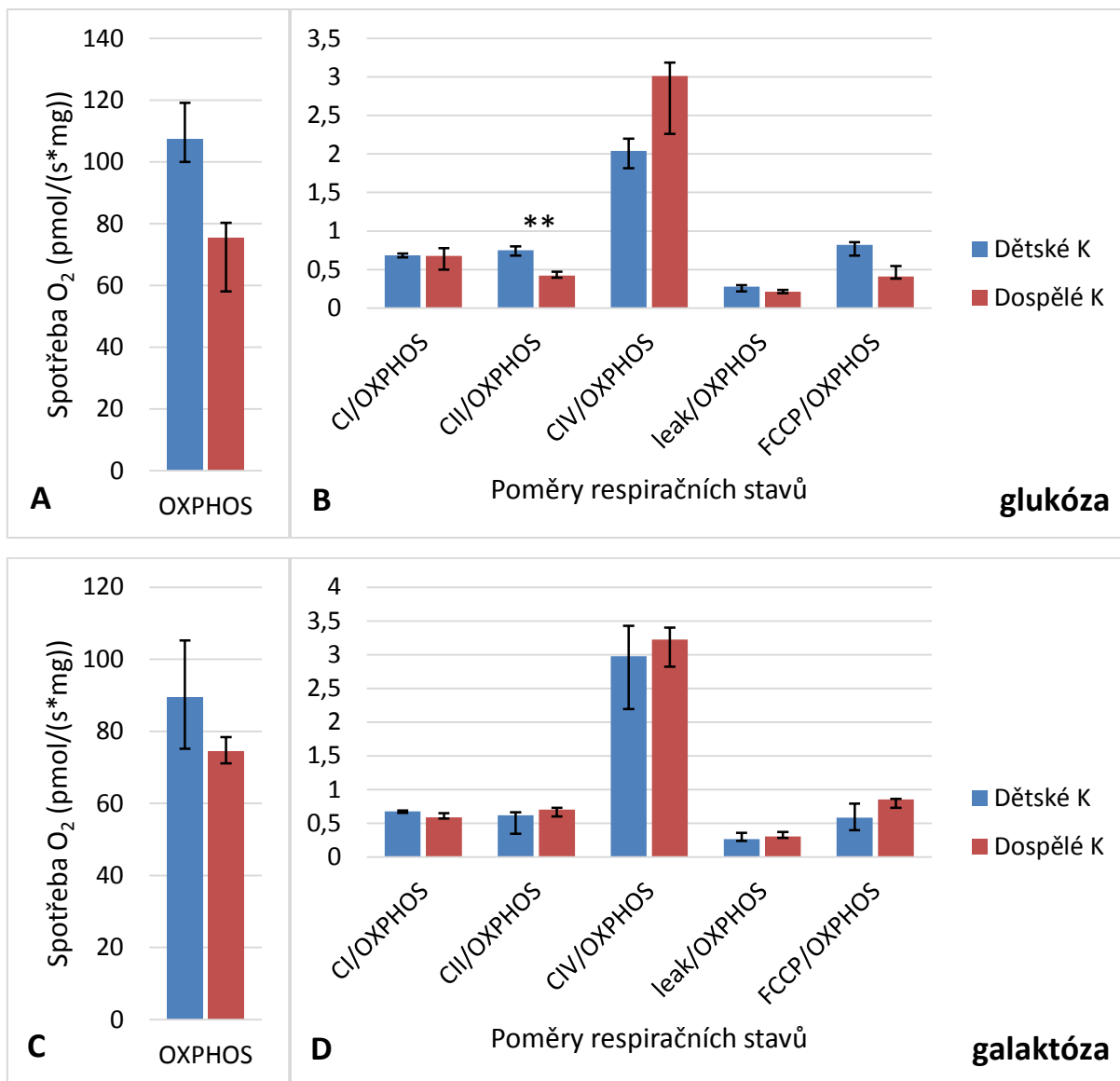
4 Výsledky

4.1 Posouzení funkce mitochondrií pomocí měření respirace na úrovni kožních kultivovaných fibroblastů.

Respirace fibroblastů kontrol i pacientů byla měřena po trypsinizaci pomocí přístroje Oxygraph O2k (Oroboros) v KCl respiračním mediu (viz kapitola 3.2.3). K buňkám byly přidávány metabolické substráty, inhibitory a další látky v pořadí digitonin, pyruvát, malát, glutamát, ADP, sukcinát, cytochrom c, rotenon, oligomycin, FCCP, antimycin A, askorbát, TMPD a azid sodný (Tabulka 3). Pro lepší posouzení jednotlivých aspektů respirace kontrol a pacientů bylo vždy srovnáváno šest parametrů vzniklých odečítáním a dělením hodnot spotřeby kyslíku (kapitola 3.2.3.3, Tabulka 3 a 4)

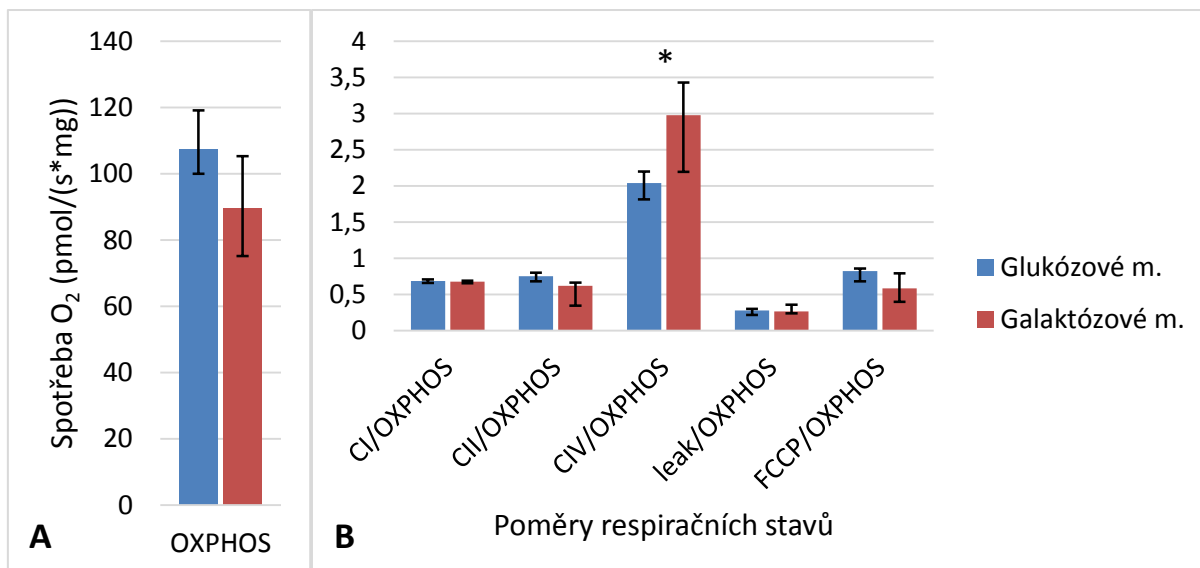
4.1.1 Vliv věku a kultivačních podmínek na respiraci kontrolních linií

Na základě předchozích zjištění v naší laboratoři ohledně vlivu doby kultivace na respiraci fibroblastů (Marková, 2015) byly pro měření respirace použity nejnižší možné pasáže fibroblastů i pacientů i kontrolních buněk s maximální hodnotou P16, resp. P+10 v případě neznámé pasáže v době původního zamražení buněk. Jako první jsem srovnával respiraci fibroblastů dospělých a dětských kontrol, abych ověřil vliv věku na respiraci tohoto buněčného typu a také oprávněnost použití věkově odpovídajících kontrol pro porovnání s liniemi pacientů. Jak je vidět na Grafu 1, významně odlišná byla relativní respirace závislá na komplexu II při kultivaci v mediu obsahujícím glukózu. Na základě těchto výsledků byly nadále pro srovnání použity pouze dětské kontroly lépe odpovídající věku pacientů, v textu i grafech.



Graf 1: Srovnání respirace kožních kultivovaných fibroblastů dětských a dospělých kontrolních linií. **A:** úplná spřažená respirace v mediu s glukózou. **B:** poměry respiračních stavů v mediu s glukózou. **C:** úplná spřažená respirace v mediu s galaktózou. **D:** poměry respiračních stavů v mediu s galaktózou. Je vidět snížená relativní respirace závislá na komplexu II fibroblastů dospělých kontrol oproti dětským v mediu s glukózou. Výsledky jsou medián z 14 měření pro dětské a 3 měření pro dospělé kontroly v mediu s glukózou resp. 11 měření pro dětské a 3 měření pro dospělé kontroly v mediu s galaktózou. Chybové úsečky odpovídají prvnímu resp. třetímu kvartilu. ****p<0,01.** Popis respiračních stavů viz text.

Dále jsem provedl srovnání respirace dětských kontrol za různých stavů po kultivaci v mediu s glukózou nebo galaktózou, abych zjistil, jestli podmínky kultivace ovlivňují funkci mitochondrií kontrolních linií fibroblastů (Graf 2). Byla zjištěna zvýšená relativní spotřeba kyslíku po přidání askorbátu a TMPD, závislá na funkci komplexu IV. Oproti očekávanému zvýšení (Patten et al., 2014) nebyla zjištěna statisticky významná změna celkové spřažené respirace (OXPHOS) u buněk pěstovaných v mediu s obsahem galaktózy.



Graf 2: Srovnání respirace kožních kultivovaných fibroblastů dětských kontrolních linií pěstovaných za přítomnosti glukózy resp. galaktózy. A: úplná spřažená respirace. B: poměry respiračních stavů v mediu s glukózou. Je vidět zvýšená relativní respirace závislá na komplexu IV fibroblastů kultivovaných v mediu s glukózou oproti kultivaci v mediu s galaktózou. Výsledky jsou medián z 14 měření pro glukóзовé medium a 11 měření pro medium galaktóзовé. Chybové úsečky odpovídají prvnímu resp. třetímu kvartilu. * $p < 0,05$. Popis respiračních stavů viz text.

4.1.2 Respirace kožních kultivovaných fibroblastů pacientů s mitochondriálními poruchami.

Pomocí vysoce citlivé polarografie byla sledována respirace permeabilizovaných fibroblastů pacientů s diagnostikovanými mitochondriálními onemocněními a porovnána s respirací fibroblastů věkově odpovídajících kontrol. Srovnáváno bylo šest parametrů blíže vysvětlených v kapitole 3.2.3.3.

Významně snižená byla celková spřažená respirace prostřednictvím společné aktivity komplexu I a II u pacientů P2 (mutace v genu *OPA1*), P4 (*NDUFS8*), P5 (*NR2F1*) a P8 (*POLG*) (Grafy 4, 6, 7 a 10). Podobný trend je sledován u všech ostatních pacientů, stejně jako u všech měření fibroblastů kultivovaných v mediu obsahujícím galaktózu namísto glukózy, nikde však nedosahuje statistické významnosti (Grafy 3–10).

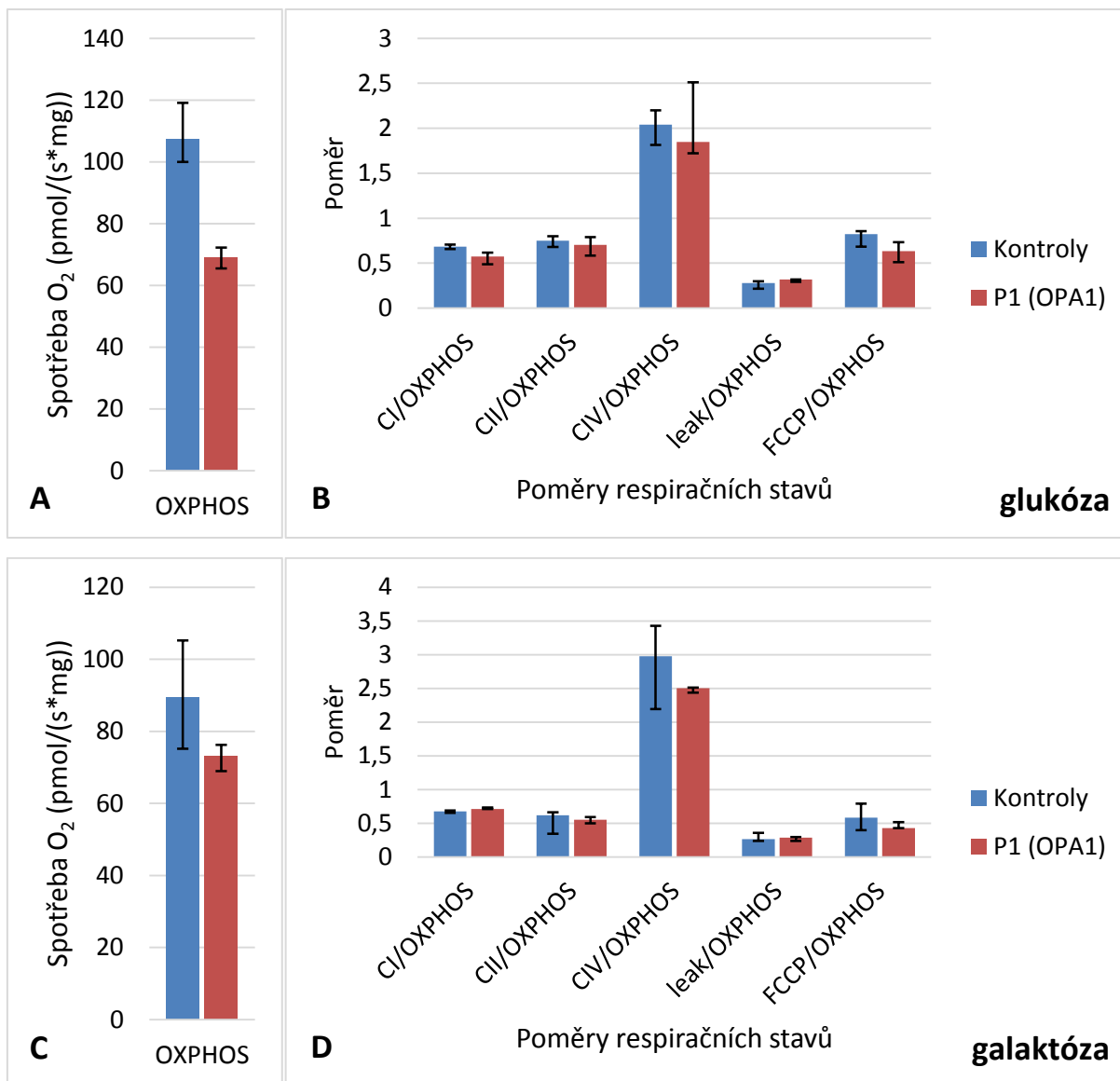
U pacienta P2 (*OPA1*) nebyla zjištěna významná změna žádného z relativních parametrů respirace (Graf 4), což ukazuje na nespecifický nebo kombinovaný defekt energetického metabolismu mitochondrií. Případně by se mohlo jednat o celkově snížené množství normálně fungujících mitochondrií, vzhledem k použité metodě vyhodnocení pomocí měření množství proteinů ve vzorku (kapitola 3.2.3.3).

U pacienta P4 (*NDUFS8*) s mutací genu jedné z centrálních podjednotek komplexu I byla v souladu s očekáváním zjištěna snížená respirace po přidání pyruvátu, malátu, glutamátu a ADP

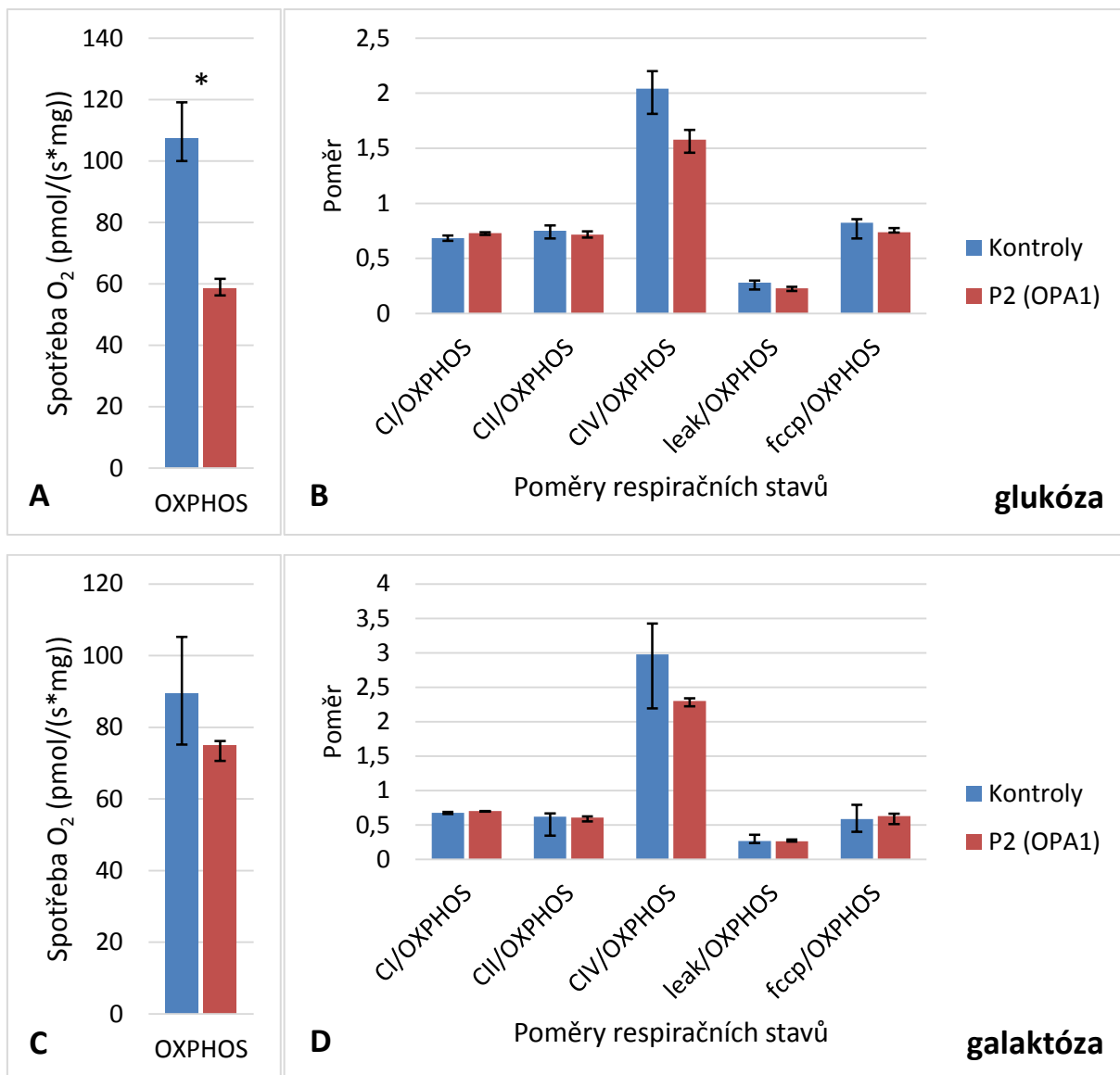
relativně vůči celkové spřažené respiraci (Graf 6). Tento efekt zdánlivě vymizel při srovnání respirace buněk pacienta a kontrolních buněk pěstovaných v mediu s galaktózou (viz kapitola 3.2.1).

Měření respirace fibroblastů pacienta P5 (*NR2F1*) kultivovaných v mediu s obsahem glukózy ukázalo kromě dříve uvedené snížené celkové respirace pomocí komplexu I i II také výrazně zvýšenou relativní rychlost spotřeby kyslíku po přidání askorbátu a TMPD (Graf 7). Podobný trend je vidět i u buněk pěstovaných v mediu s galaktózou, nedosahuje však statistické významnosti.

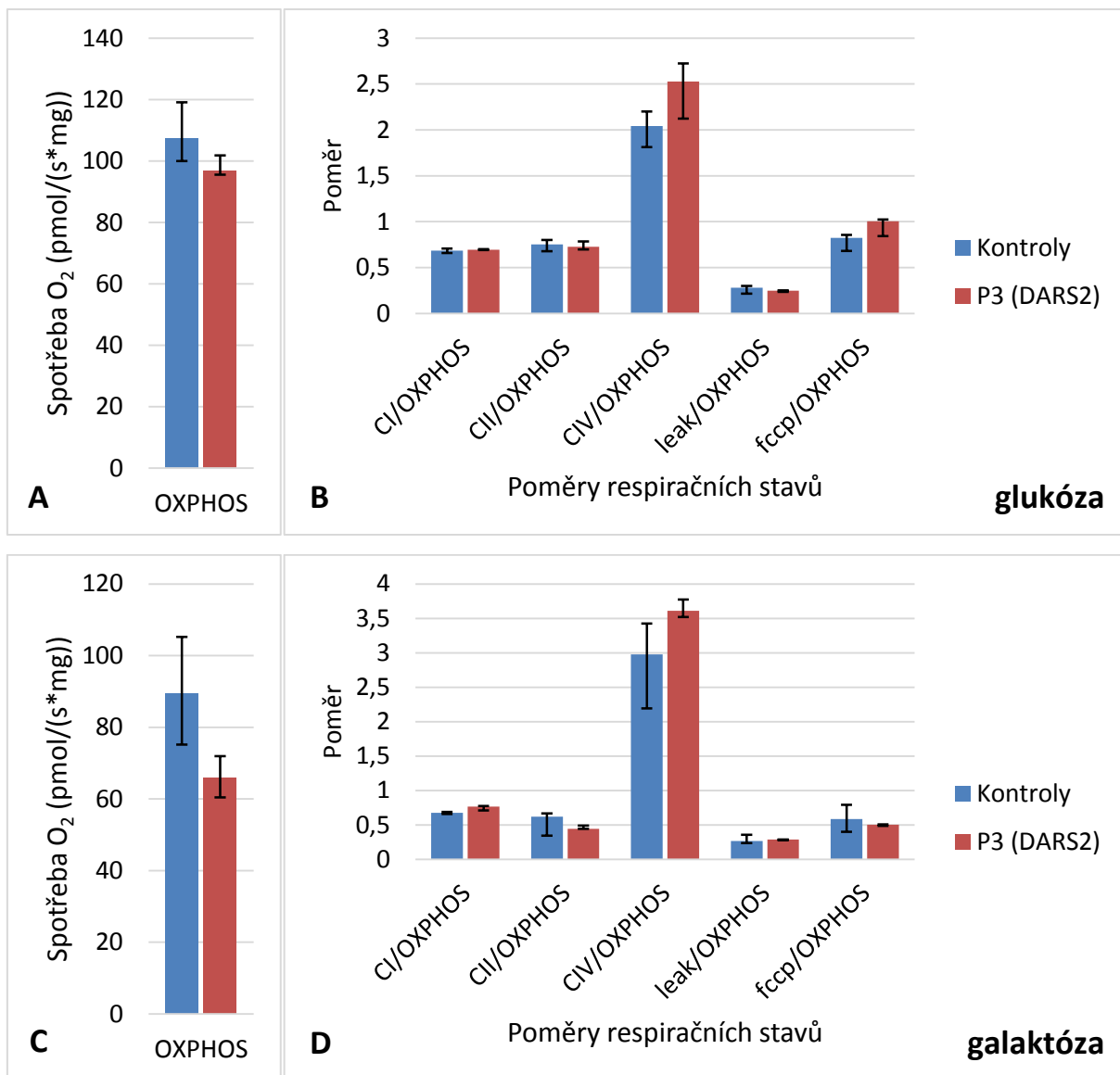
Fibroblasty pacienta P8 (*POLG*) vykazovaly kromě výše uvedeného překvapivě sníženou relativní respiraci prostřednictvím komplexu II spolu se zvýšenou relativní rychlostí spotřeby kyslíku po přidání askorbátu a TMPD poskytujících elektrony pro aktivitu komplexu IV (Graf 10). Tento efekt byl opět pozorován pouze u buněk pěstovaných v mediu s obsahem glukózy.



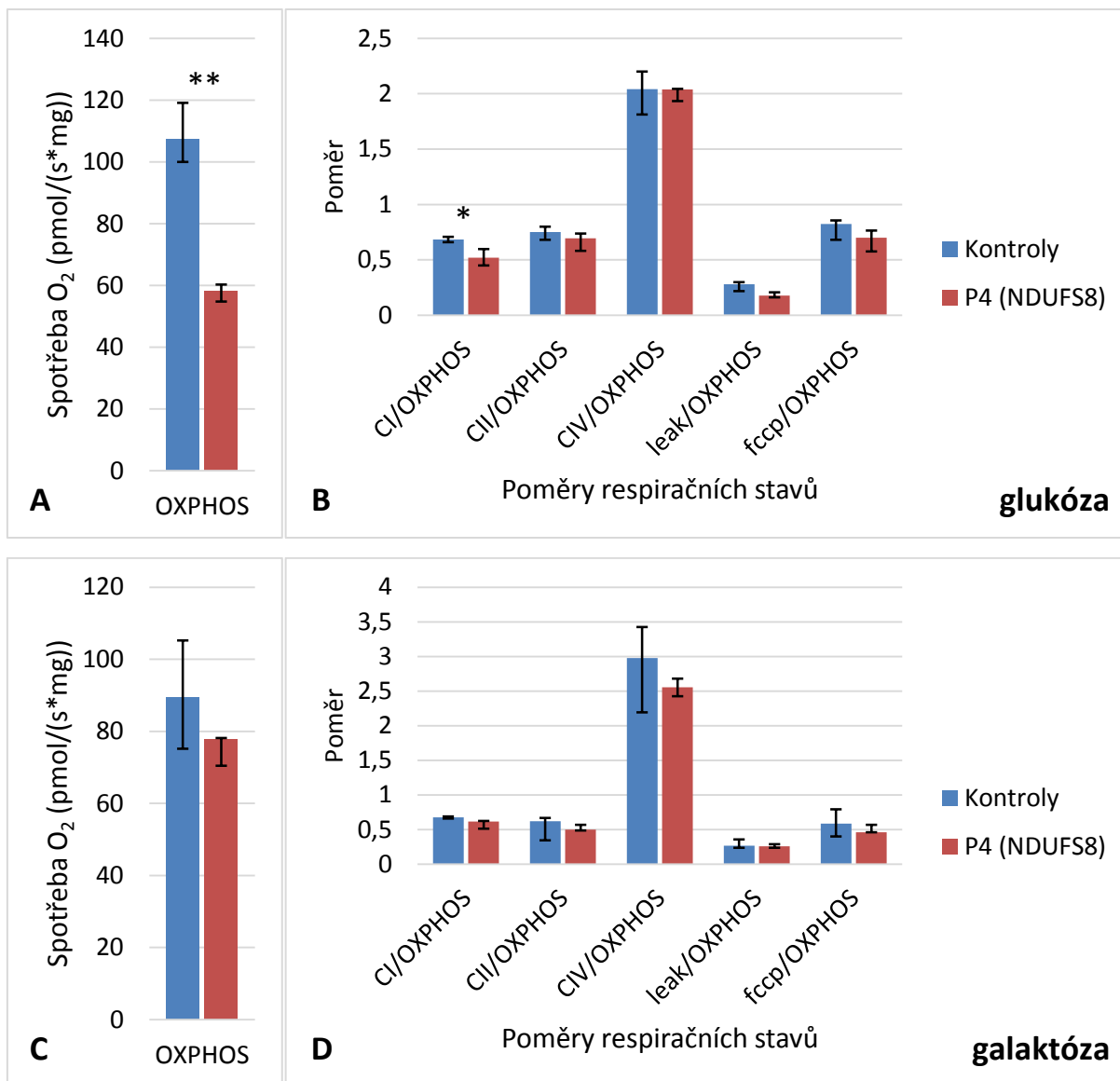
Graf 3: Srovnání respirace kožních kultivovaných fibroblastů dětských kontrolních linií a pacienta P1 s mutací v genu OPA1. A: úplná spřažená respirace v mediu s glukózou. B: poměry respiračních stavů v mediu s glukózou. C: úplná spřažená respirace v mediu s galaktózou. D: poměry respiračních stavů v mediu s galaktózou. Žádný z rozdílů mezi pacientem a kontrolou zde nedosahuje statistické významnosti. Výsledky jsou medián ze 14 měření kontrolních fibroblastů a 3 měření buněk pacienta v mediu s glukózou resp. 11 měření kontrolních a 3 měření buněk pacienta v mediu s galaktózou. Chybové úsečky odpovídají prvnímu resp. třetímu kvartilu. Popis respiračních stavů viz text.



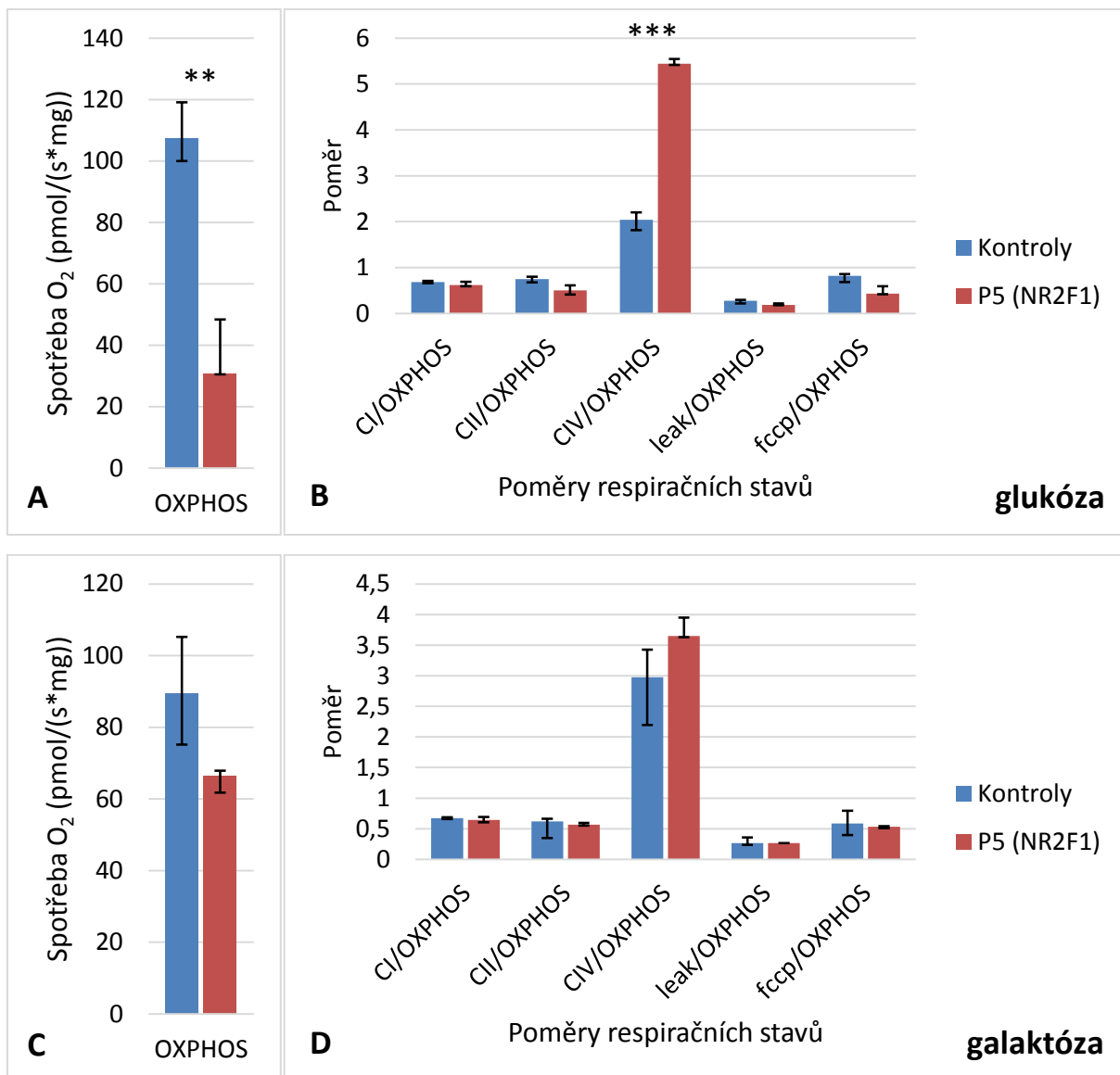
Graf 4: Srovnání respirace kožních kultivovaných fibroblastů dětských kontrolních linií a pacienta P2 s mutací v genu OPA1. **A:** úplná spřažená respirace v mediu s glukózou. **B:** poměry respiračních stavů v mediu s glukózou. **C:** úplná spřažená respirace v mediu s galaktózou. **D:** poměry respiračních stavů v mediu s galaktózou. Je vidět významný rozdíl spřažené respirace pacienta oproti kontrole u buněk kultivovaných v mediu s glukózou. Výsledky jsou medián ze 14 měření kontrolních fibroblastů a 3 měření buněk pacienta v mediu s glukózou resp. 11 měření kontrolních a 3 měření buněk pacienta v mediu s galaktózou. Chybové úsečky odpovídají prvnímu resp. třetímu kvartilu. * $p < 0,05$. Popis respiračních stavů viz text.



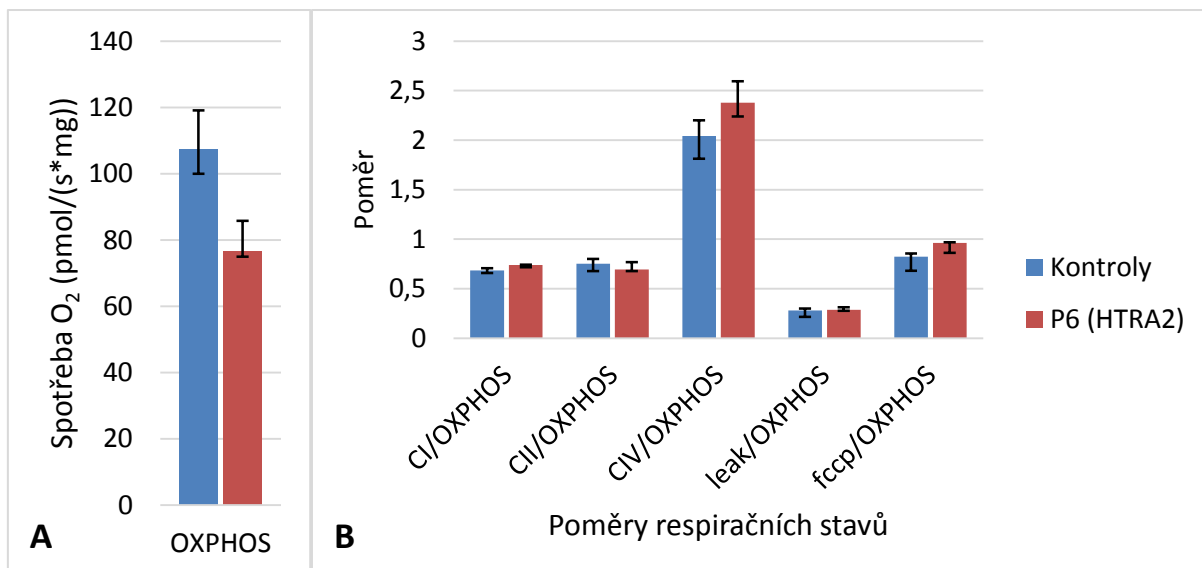
Graf 5: Srovnání respirace kožních kultivovaných fibroblastů dětských kontrolních linií a pacienta P3 s mutací v genu DARS2. **A:** úplná spřažená respirace v mediu s glukózou. **B:** poměry respiračních stavů v mediu s glukózou. **C:** úplná spřažená respirace v mediu s galaktózou. **D:** poměry respiračních stavů v mediu s galaktózou. Žádný z rozdílů mezi pacientem a kontrolou zde nedosahuje statistické významnosti. Výsledky jsou medián ze 14 měření kontrolních fibroblastů a 3 měření buněk pacienta v mediu s glukózou resp. 11 měření kontrolních a 3 měření buněk pacienta v mediu s galaktózou. Chybové úsečky odpovídají prvnímu resp. třetímu kvartilu. Popis respiračních stavů viz text.



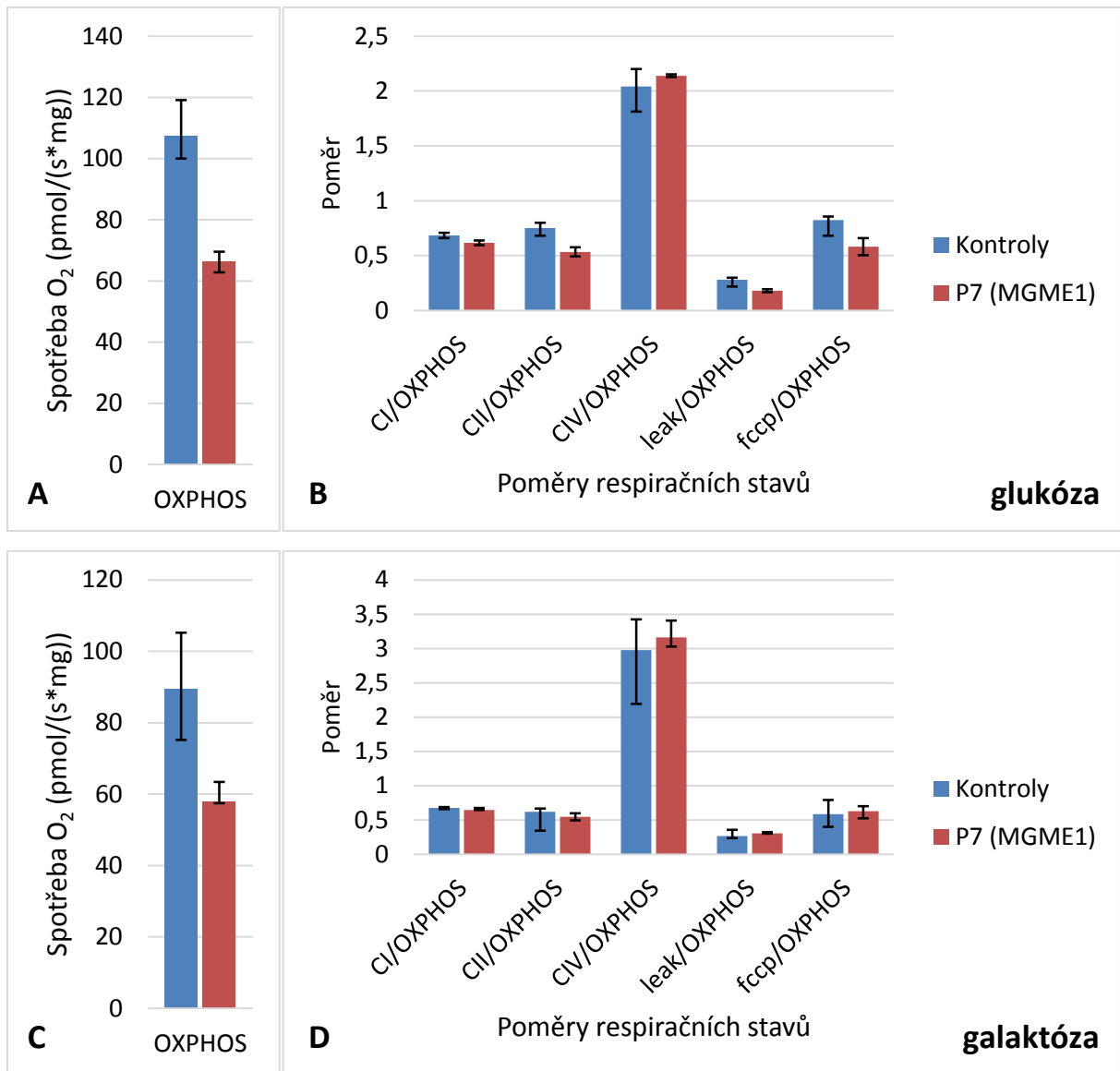
Graf 6: Srovnání respirace kožních kultivovaných fibroblastů dětských kontrolních linií a pacienta P4 s mutací v genu NDUFS8. A: úplná spřažená respirace v mediu s glukózou. B: poměry respiračních stavů v mediu s glukózou. C: úplná spřažená respirace v mediu s galaktózou. D: poměry respiračních stavů v mediu s galaktózou. Vidíme snížení celkové spřažené respirace pacienta oproti kontrole spolu se sníženou relativní respirací prostřednictvím komplexu I po kultivaci v mediu s glukózou. Výsledky jsou medián ze 14 měření kontrolních fibroblastů a 5 měření buněk pacienta v mediu s glukózou resp. 11 měření kontrolních a 3 měření buněk pacienta v mediu s galaktózou, s výjimkou CIV/OXPHOS (2 měření). Chybové úsečky odpovídají prvnímu resp. třetímu kvartilu. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Popis respiračních stavů viz text.



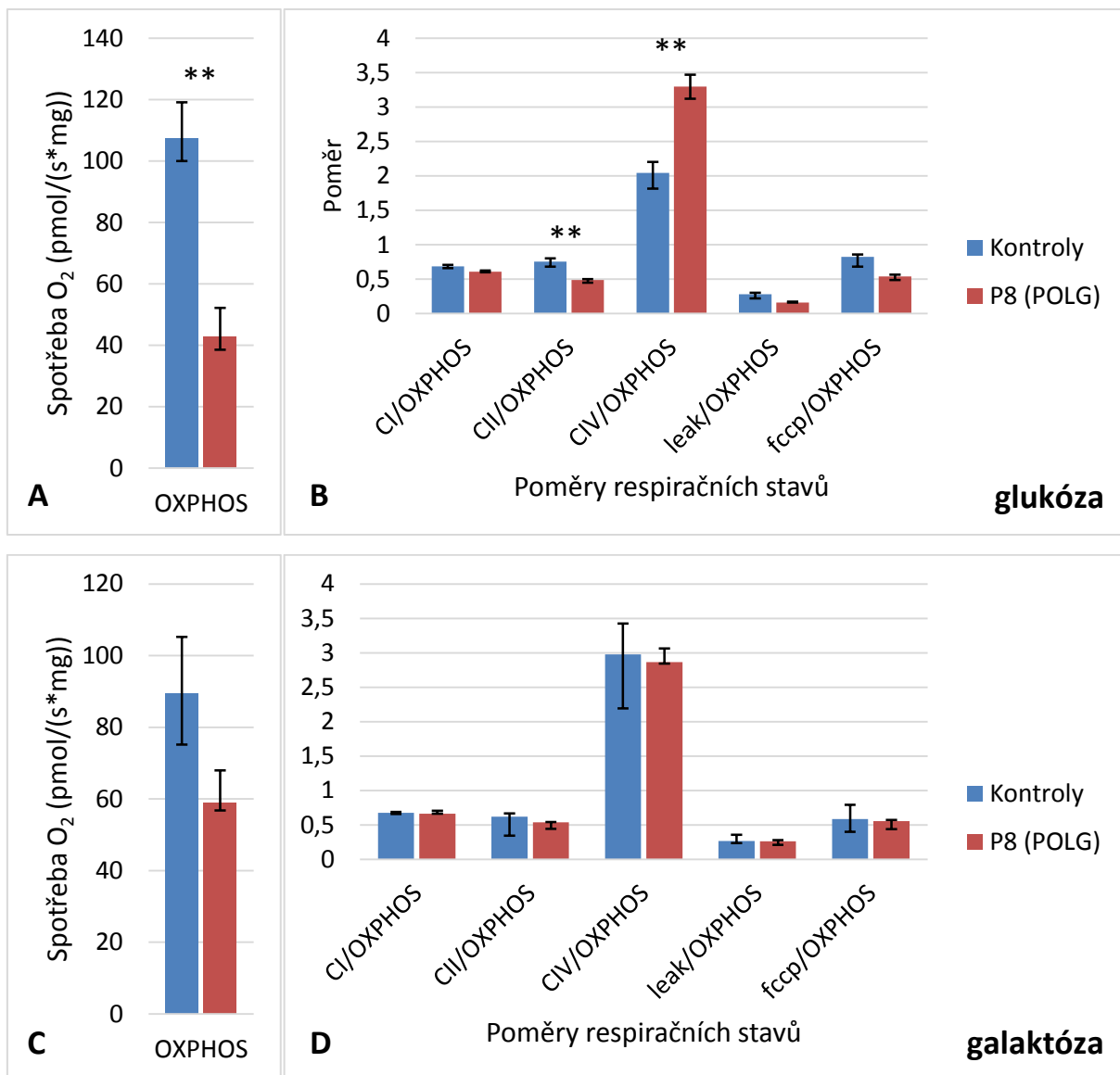
Graf 7: Srovnání respirace kožních kultivovaných fibroblastů dětských kontrolních linií a pacienta P5 s mutací v genu NR2F1. A: úplná spřažená respirace v mediu s glukózou. B: poměry respiračních stavů v mediu s glukózou. C: úplná spřažená respirace v mediu s galaktózou. D: poměry respiračních stavů v mediu s galaktózou. U pacienta je snižená celková spřažená respirace a zároveň zvýšena relativní respirace po přidání askorbátu a TMPD. Výsledky jsou medián ze 14 měření kontrolních fibroblastů a 3 měření buněk pacienta v mediu s glukózou resp. 11 měření kontrolních a 3 měření buněk pacienta v mediu s galaktózou, s výjimkou leak/OXPHOS (1 měření). Chybové úsečky odpovídají prvnímu resp. třetímu kvartilu. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. Popis respiračních stavů viz text.



Graf 8: Srovnání respirace kožních kultivovaných fibroblastů dětských kontrolních linií a pacienta P6 s mutací v genu HTRA2. A: úplná spřažená respirace v mediu s glukózou. **B:** poměry respiračních stavů v mediu s glukózou. Žádný z rozdílů mezi pacientem a kontrolou zde nedosahuje statistické významnosti. V důsledku malého množství materiálu a pomalého růstu buněk nebyla u tohoto pacienta provedena měření po kultivaci v mediu s galaktózou. Výsledky jsou medián ze 14 měření kontrolních fibroblastů a 3 měření buněk pacienta. Chybové úsečky odpovídají prvnímu resp. třetímu kvartilu. Popis respiračních stavů viz text.



Graf 9: Srovnání respirace kožních kultivovaných fibroblastů dětských kontrolních linií a pacienta P7 s mutací v genu MGME1. A: úplná spřažená respirace v mediu s glukózou. **B:** poměry respiračních stavů v mediu s glukózou. **C:** úplná spřažená respirace v mediu s galaktózou. **D:** poměry respiračních stavů v mediu s galaktózou. Žádný z rozdílů mezi pacientem a kontrolou zde nedosahuje statistické významnosti. Výsledky jsou medián ze 14 měření kontrolních fibroblastů a 2 měření buněk pacienta v mediu s glukózou resp. 11 měření kontrolních a 3 měření buněk pacienta v mediu s galaktózou. Chybové úsečky odpovídají prvnímu resp. třetímu kvartilu. ** $p < 0,01$. Popis respiračních stavů viz text.



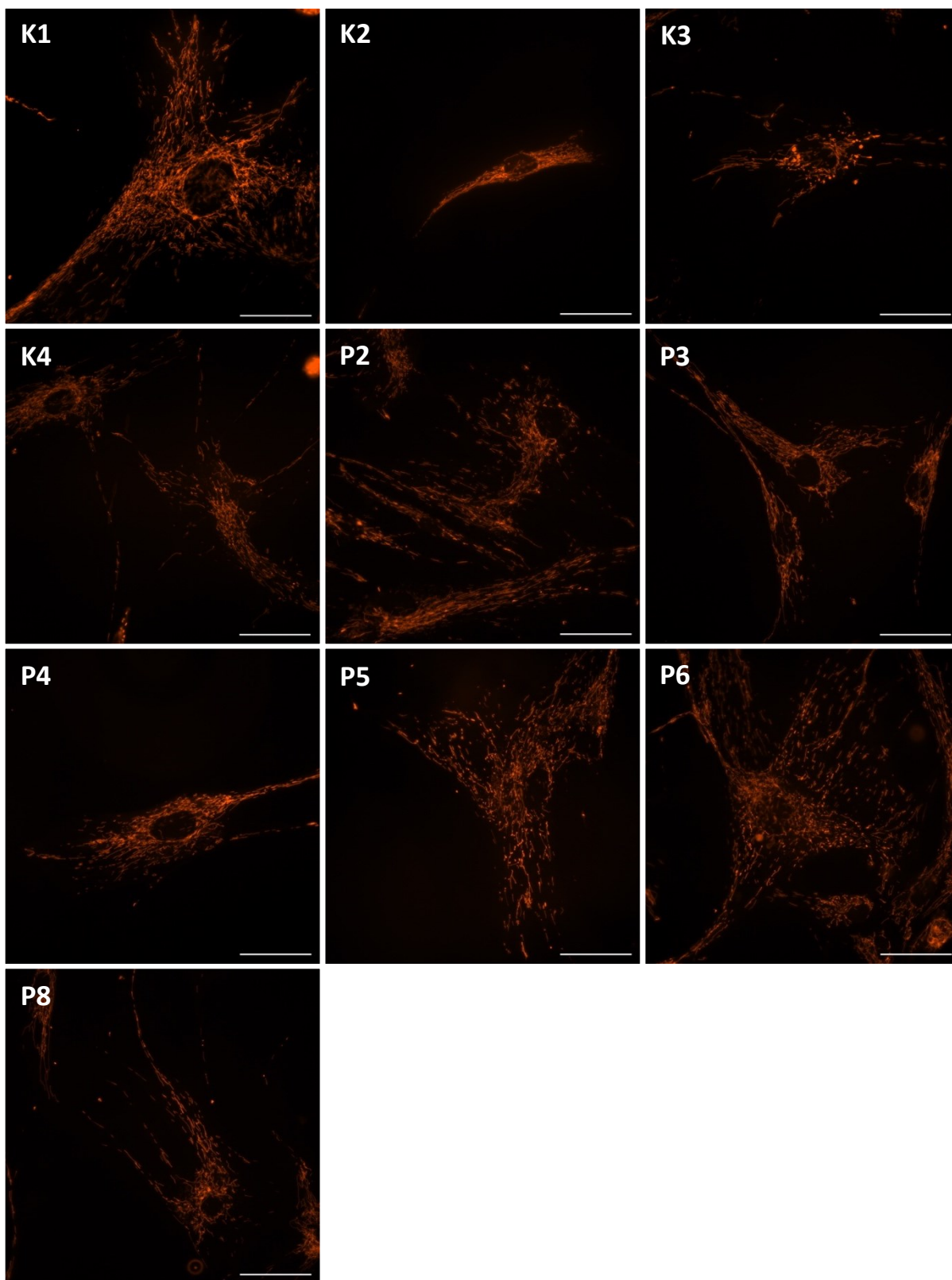
Graf 10: Srovnání respirace kožních kultivovaných fibroblastů dětských kontrolních linií a pacienta P8 s mutací v genu POLG. A: úplná spřažená respirace v mediu s glukózou. **B:** poměry respiračních stavů v mediu s glukózou. **C:** úplná spřažená respirace v mediu s galaktózou. **D:** poměry respiračních stavů v mediu s galaktózou. Po kultivaci v mediu s glukózou je snížena celková spřažená respirace buněk pacienta oproti kontrole spolu se sníženou relativní respirací prostřednictvím komplexu II. Výsledky jsou medián ze 14 měření kontrolních fibroblastů a 3 měření buněk pacienta v mediu s glukózou resp. 11 měření kontrolních a 3 měření buněk pacienta v mediu s galaktózou. Chybové úsečky odpovídají prvnímu resp. třetímu kvartilu. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. Popis respiračních stavů viz text.

4.2 Posouzení morfologie mitochondriálního retikula fibroblastů při kultivaci za různých podmínek

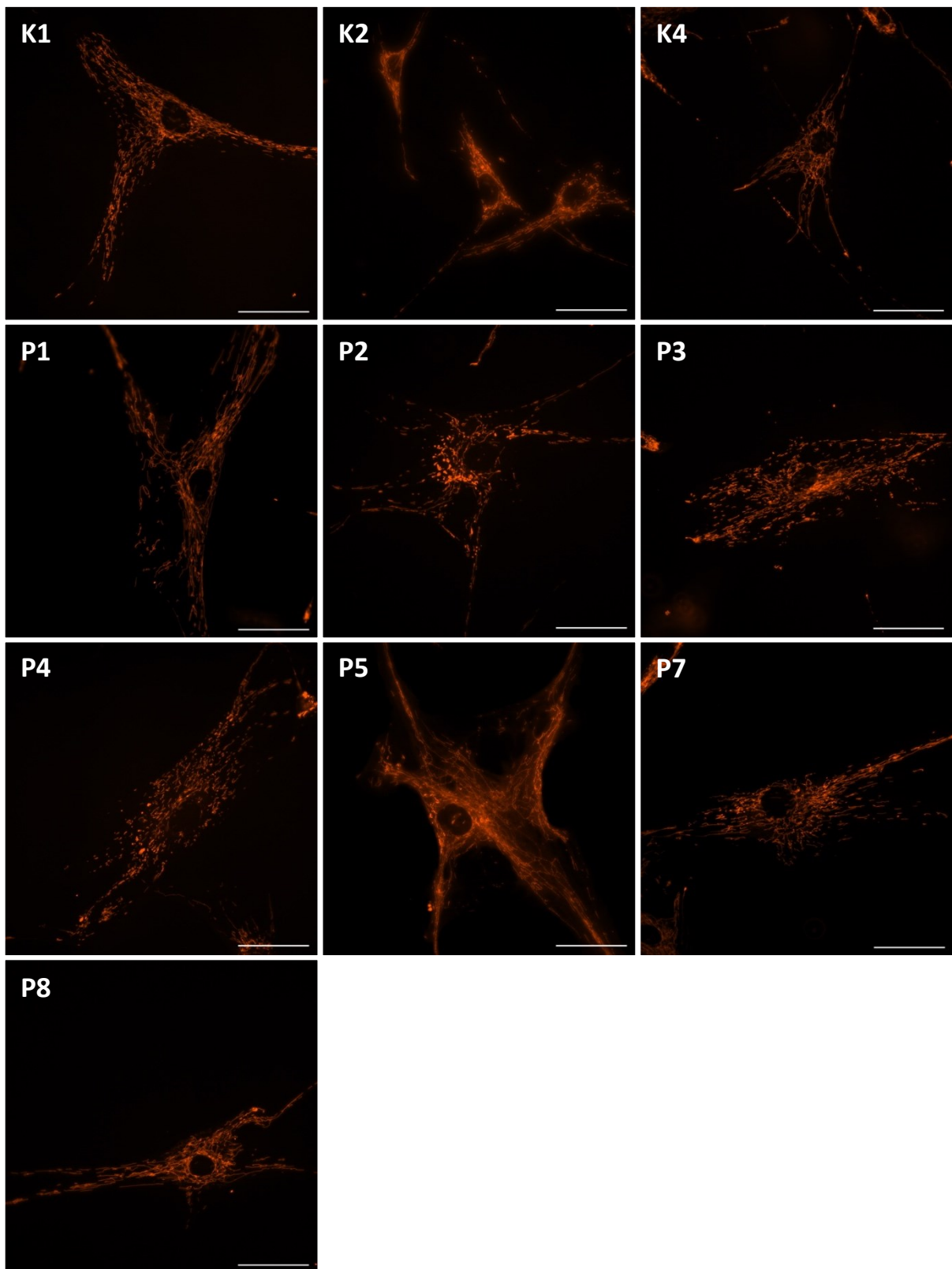
Pro účely zhodnocení morfologie mitochondriálního retikula u buněk kultivovaných v mediu DMEM s obsahem glukózy i galaktózy (kapitola 3.2.1.1, 3.2.1.2) bylo provedeno barvení fluorescenční sondou MitoTracker® Red (Thermo Fisher Scientific). Ta je transportována do matrix na základě membránového potenciálu a umožňuje tak sledovat morfologii mitochondriálního retikula i u živých buněk (Chazotte, 2011). Buňky byly poté pozorovány fluorescenčním mikroskopem (Eclipse Ti2, Nikon) po excitaci světlem vlnové délky 543 nm. Vzhledem k tomu, že u některých mitochondriálních onemocnění je možné pozorovat změny morfologie mitochondrií při působení metabolického stresu (Agier et al., 2012), byl postup barvení a následné mikroskopie aplikován i na fibroblasty kultivované v mediu s 25mM galaktózou.

Po kultivaci v mediu s obsahem glukózy byly barveny a fotografovány kontrolní fibroblasty 1–4 a buňky pacientů P2 (mutace genu *OPA1*), P3 (*DARS2*), P4 (*NDUFS8*), P5 (*NR2F1*), P6 (*HTRA2*) a P8 (*POLG*) (Obrázek 8). Za těchto podmínek vykazoval oproti kontrolám K1, K2 a K4 převážně fragmentované retikulum pouze pacient P6 (*HTRA2*), přičemž i mezi buňkami pacientů P4 (*NDUFS8*) a P5 (*NR2F1*) se často vyskytovaly ty s fragmentovaným retikulem. Kontrolní linie fibroblastů K3 vykazovala nezanedbatelné zastoupení buněk s velkými kulatými mitochondriemi. Tato morfologie nebyla pozorována u žádné jiné kontrolní linie a byla velmi ojedinělá i u všech pacientů.

Po kultivaci v mediu s obsahem galaktózy byly barveny a fotografovány kontroly K1, K2 a K4 a fibroblasty pacientů P1 (mutace genu *OPA1*), P2 (*OPA1*), P3 (*DARS2*), P4 (*NDUFS8*), P5 (*NR2F1*), P7 (*MGME1*) a P8 (*POLG*) (Obrázek 9). Buňky kontroly K4 vykazovaly častěji elongované a vysoce propojené mitochondrie, zatímco mitochondriální retikulum linií K1 a K2 bylo normální a srovnatelné se stavem po kultivaci v mediu s glukózou. Většina buněk pacienta P5 (*NR2F1*) vykazovala výrazně propojené a elongované retikulum, zatímco u pacientů P3 (*DARS2*) a P4 (*NDUFS8*) se častěji než u kontrol vyskytovaly buňky s fragmentovaným retikulem a u pacienta P1 (*OPA1*) byly zastoupeny jak buňky s mírně elongovanými, tak morfologicky normálními mitochondriemi. Menší část buněk pacienta P2 (*OPA1*) obsahovala velké zakulacené mitochondrie do určité míry podobné těm u K3 po kultivaci na mediu s glukózou.



Obrázek 8: Mitochondriální retikulum značené pomocí MitoTracker® Red po kultivaci v mediu s glukózou. Část buněk kontrolní linie K3 vykazuje morfologii s velkými kulatými mitochondriemi. Retikulum buněk pacienta P6 a částečně také pacientů P4 a P5 je fragmentované oproti kontrolám K1, K2 a K4. Reprezentativní fotografie vybrány vždy z více než dvaceti fotografií. Měřítka 50 μm .



Obrázek 9: Mitochondriální retikulum značené pomocí MitoTracker® Red po kultivaci v mediu s galaktózou. Větší část buněk kontrolní linie K4 obsahuje elongované a propojené mitochondrie ve srovnání s výsledky při použití media s glukózou. Retikulum buněk pacienta P5 je většinou výrazně elongované, u pacienta P1 je pak mírně elongované pouze u některých buněk. U P3 a P4 se častěji vyskytují fragmentované mitochondrie, zatímco u P2 část buněk obsahuje mitochondrie zvětšené a zakulacené. Reprezentativní fotografie vybrány vždy z více než dvaceti fotografií. Měřítka 50 μm .

5 Diskuse

Mitochondriální onemocnění jsou charakteristická mimo jiné svými heterogenními projevy na fungování různých tkání a přestože nejvýznamněji obvykle zasahují orgánové systémy s vysokými energetickými nároky, jako jsou nervový systém, srdce, svaly, endokrinní žlázy nebo játra (Alston et al., 2017), využití kožních kultivovaných fibroblastů pro jejich studium stejně tak jako pro potřeby diagnostiky patří k dlouho zavedeným metodickým postupům (Agier et al., 2012; Nochez et al., 2009; Robinson, 1996). Fibroblasty mají pro tyto účely především výhodu snazšího získávání a kultivace oproti většině často používaných tkání, jako například kosterní svalovině. Ve srovnání s moderními metodami měření produkce ATP (Layec et al., 2009) nebo spotřeby kyslíku (Hamaoka et al., 1996) ve svalovině *in vivo* mají pak některé metody analýzy funkce na kožních fibroblastech výhodu menších požadavků na technickou expertizu i vybavení. Cílem této práce bylo zhodnotit dopady několika vybraných mutací způsobujících mitochondriální onemocnění s nástupem v dětském věku na funkci a morfologii mitochondrií v kožních kultivovaných fibroblastech. Dále posoudit možnosti použitých metod ve validaci potenciálních kauzálních mutací nalezených molekulárně biologickými metodami u pacientů s předpokládaným mitochondriálním onemocněním.

5.1 Vliv věku na respiraci

Změny ve funkci mitochondrií v průběhu stárnutí a zároveň jejich vliv na tento proces jsou v biologii intenzivně studovaným tématem. Dle takzvané mitochondriální teorie stárnutí dochází v průběhu života k akumulaci poškození způsobených reaktivními formami kyslíku (ROS), které v mitochondriích vznikají především činností komplexů I a III dýchacího řetězce (Frazier et al., 2019; Gorman et al., 2016). Ty mohou narušovat lipidové složky membrán, proteiny i nukleové kyseliny, mezi nimi také mtDNA, která se nachází v blízkosti místa jejich vzniku. Zvýšený výskyt mutací mtDNA v závislosti na přibývajícím věku byl zjištěn v mnoha lidských tkáních jako kosterní svalovina, mozek či srdce, přestože podíl ROS na jejich vzniku je nejistý (Kennedy et al., 2013). Změny ve funkci mitochondrií v závislosti na stáří jedince v době odběru byly ukázány i u lidských kultivovaných fibroblastů, mezi nimi i snížení jak spřažené tak rozpřažené respirace u buněk osob starších čtyřiceti let (Greco et al., 2003).

Za účelem zhodnocení významu použití věkově odpovídajících kontrolních buněk pro analýzu námi zvolenou metodou byla porovnána respirace fibroblastů zdravých jedinců dětského a dospělého věku kultivovaných v mediu s obsahem glukózy nebo galaktózy. U fibroblastů dospělých byla zjištěna významně snížená respirace závislá na sukcinátu jako substrátu komplexu II v porovnání dětskými kontrolami. Na základě těchto výsledků byly pro další měření použity kontrolní kmeny pocházející od dětí věkově srovnatelných s pacienty.

5.2 Respirace fibroblastů pacientů s mitochondriálními poruchami

Oxidační fosforylace za normálních okolností produkuje naprostou většinu ATP v organismu (Krasich and Copeland, 2017) a je tak centrálním a životně důležitým metabolickým dějem mitochondrií. Její správný průběh může však být narušen mutacemi genů, jejichž produkty působí na fungování mitochondrií na řadě různých úrovních.

Jaderným transkripčním faktorem ovlivňujícím svou aktivitou mj. správnou funkci mitochondrií je zřejmě protein **NR2F1**. Ten patří mezi takzvané orphan (angl. sirotek) jaderné receptory, neboť přestože obsahuje dvě vysoce konzervované domény, DNA a ligand vázající doménu (Qiu et al., 1995), právě jeho fyziologický ligand zůstává neznámý. DNA vázající doména obsahuje dva konzervované motivy zinkového prstu a NR2F1 je schopen v podobě dimeru vázat tzv. přímé repetice GGTCa oddělené proměnlivým počtem jednoho až pěti nukleotidů. Kromě toho může tvořit dimery i s dalšími proteiny ze superrodiny jaderných receptorů jako například s receptorem retinové kyseliny (RAR), receptorem thyroideálních hormonů (TR) nebo receptorem vitamínu D (Montemayor et al., 2010). NR2F1 může fungovat jako aktivátor nebo inhibitor transkripce, v závislosti na buněčném kontextu, mimo jiné vazbou dalších transkripčních faktorů (Hall et al., 1995) či korepresorů jako například histondeacetyláz (Smirnov et al., 2000). Bylo ovšem zjištěno, že většina jeho cílových míst v genomu vykazuje acetylaci lysinu 9 histonu 4 spolu s rozvolněnou strukturou chromatinu (Montemayor et al., 2010). NR2F1, resp. jeho homolog u myši, je důležitým regulátorem vývoje centrální nervové soustavy a byl ukázán jeho vliv na migraci neuronů, vývoj axonů a jejich elongaci, kontrolu nad diferenciací nervových progenitorových buněk a určení specifické identity jednotlivých oblastí mozkové kůry s různou funkcí (Parisot et al., 2017). Důležitou funkci má zřejmě ve vývoji oka (Tang et al., 2010), a během embryogeneze je exprimován i v gonádách, kůži, plicích, ledvinách, žaludku, slinivce, prostatě nebo slinných žlázách (Pereira et al., 1995).

Mutace v genu *NR2F1* způsobují Bosch-Boonstra-Schaaf atrofii optického nervu, vyznačující se dále vývojovým zpožděním, mentálním postižením, hypotonií, oromotorickými poruchami sání, žvýkání nebo polykání a dalšími méně častými projevy. Ve většině případů mají pacienti jednu dominantní bodovou mutaci v DNA vázající doméně, stejně jako pacient P5 v této práci, přestože především u lehčích forem byly objeveny mutace v ligand vázající doméně nebo delece celého genu (Chen et al., 2016). To by mohlo být vysvětleno dominantně negativním efektem mutované formy při tvorbě dimeru, navíc v důsledku tvorby heterodimerů s dalšími jadernými receptory by mohlo docházet k ovlivnění řady jiných transkripčních aktivit. V roce 2018 byla poprvé ohlášena porucha funkce mitochondrií u pacienta s mutací v DNA vázající doméně NR2F1 (Martin-Hernandez et al., 2018). Autoři ukázali silně narušenou schopnost mutovaného proteinu indukovat transkripci a především sníženou aktivitu mitochondriálního komplexu IV ve svalové tkáni. To je na první pohled

ve výrazném rozporu s výsledky mnou provedených měření. Fibroblasty pacienta P5 vykazovaly významně sníženou celkovou spřaženou respiraci a nápadně zvýšenou relativní potřebu kyslíku po přidání askorbátu a TMPD.

V roce 2010 bylo identifikováno 182 potenciálních cílových genů *NR2F1* (Montemayor et al., 2010), mezi nimi i geny důležité pro funkci mitochondrií, například *TIMM23*, mající zásadní funkci v transportu jaderně kódovaných proteinů do mitochondrií (Bauer et al., 1999), a další jako *SLCA25A1* (transport citrátu do mitochondrií), *ECHS1* (β -oxidace a metabolismus aminokyselin) nebo *MRPL45* (podjednotka mitochondriálního ribozomu) (Greber et al., 2015; Montemayor et al., 2010). Na základě jeho pravděpodobné funkce v regulaci exprese genů důležitých pro řadu procesů v mitochondriích je možné spekulovat, že mutace *NR2F1* ve fibroblastech by mohly způsobit celkově sníženou respiraci v důsledku narušení procesů metabolicky předcházejících oxidační fosforylaci nebo důležitých pro její správný průběh a celkovou funkci mitochondrií. Toto narušení by se potom z různých důvodů nemuselo projevit na relativní respiraci komplexu IV, mimo jiné proto, že mu jsou v době měření dodávány elektrony z TMPD nezávisle na většině ostatních dějů v mitochondrii. Výrazné zvýšení parametru CIV/OXPHOS pak může být zdánlivé právě kvůli celkově snížené spřažené respiraci (OXPHOS). Pokud porovnáme absolutní hodnoty respirace pacienta P5 a kontrol po přidání askorbátu a TMPD a odečtení respirace po přidání NaN_3 , zjistíme, že průměrná rychlost spotřeby kyslíku se liší velmi málo (225,6 pro kontroly a 231,4 $\text{pmol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$ pro pacienta, viz Přílohy). Možností je i mírná kompenzační nadregulace komplexu IV. Rozdíl oproti zjištění ve svalové tkáni je možné vysvětlit rozmanitou funkcí *NR2F1* v závislosti na tkáni a buněčném typu, mj. právě díky interakcím s dalšími jadernými receptory. Složitý vztah mezi konkrétní mutací *NR2F1*, aktivitami a množstvím komplexů dýchacího řetězce v různých tkáních a výslednou respirací podtrhují i další analýzy provedené pracovníky Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch. Ty ukázaly normální aktivitu komplexu IV dýchacího řetězce ve svalové tkáni, avšak významně zvýšenou aktivitu komplexu III a enzymu citrátsyntázy. Ve fibroblastech byla zjištěna normální aktivita komplexů I, II a IV ale výrazně snížené množství cytochrom-c-oxidázy. Vliv mutací *NR2F1* na metabolismus mitochondrií v různých tkáních tak vyžaduje další ověření.

OPA1 je protein známý především svou funkcí ve fúzi vnitřní mitochondriální membrány (kapitola 1.1.1.2) (Song et al., 2009), hraje však roli v řadě dalších procesů v mitochondriích. Je důležitý v regulaci morfologie krist (Cogliati et al., 2013), údržby mitochondriálního genomu (Elachouri et al., 2011) a byl ukázán i jeho pravděpodobný přímý kontakt s komplexem dýchacího řetězce a vliv na jejich správné skládání a funkci (Agier et al., 2012; Cogliati et al., 2013). Jedná se také o jeden z nejstudovanějších genů, jehož mutace způsobují mitochondriální onemocnění, s přibližně 400 známými patogenními variantami (Ferre et al., 2015). Pacienti P1 a P2 jsou oba složenými heterozygoty pro mutace v GTPázové doméně a střední doméně proteinu a odpovídají těžké

recesivní formě onemocnění způsobené mutací *OPA1* podobné Behrovu syndromu (Carelli et al., 2015). Byla provedena celá řada studií zabývajících se funkcí systému oxidační fosforylace ve fibroblastech pacientů s mutacemi v tomto genu. Agier et al. zkoumali fibroblasty čtyř pacientů, z nichž však tři vykazovali izolovanou formu optické atrofie a jeden těžší syndromickou dospělou formu s autosomálně dominantním původem (Agier et al., 2012). Spektrofotometrická měření ukázala sníženou aktivitu komplexu IV ve svalové tkáni, avšak pouze u pacientů s izolovanou atrofií optického nervu. Polarografická analýza neprokázala změny ve funkci oxidační fosforylace permeabilizovaných fibroblastů na základě respirace po přidání pyruvátu a glutamátu ani sukcinátu (Agier et al., 2012). Zároveň v rozporu s mým pozorováním zaznamenali u fibroblastů pacientů elongovanou morfolologii mitochondrií a následnou fragmentací po kultivaci v mediu s galaktózou. Minimálně dvě publikace ukazují na možné narušení spřažení dýchacího řetězce a produkce ATP. Cornille et al. zaznamenali sníženou respiraci po přidání FCCP spolu se zvýšenou spotřebou kyslíku při inhibici ATP-syntázy pomocí oligomycinu u pacienta s izolovanou atrofií optického nervu způsobenou mutací v transmembránové doméně *OPA1* (Cornille et al., 2008). Fibroblasty pacienta měly významně elongované mitochondriální retikulum oproti kontrolním buňkám. Podobně Chevrollier et al. zjistili zvýšenou respiraci po přidání oligomycinu u fibroblastů řady pacientů s izolovanou i syndromickou autosomálně dominantní optickou atrofií spolu s normální aktivitou komplexu I, sníženou aktivitou komplexu IV a zvýšenou aktivitou ATP-syntázy (Chevrollier et al., 2008). U fibroblastů několika pacientů s mutacemi způsobujícími předčasně ukončení translace *OPA1* proteinu byla zjištěna snížená produkce ATP po přidání pyruvátu a malátu s nevýznamným snížením při použití kombinace rotenonu a sukcinátu. Morfologie mitochondriálního retikula byla u těchto buněk srovnatelná s kontrolami při kultivaci v mediu s obsahem glukózy, při použití galaktózy však docházelo k fragmentaci a vzniku velkých balónovitých mitochondrií (Zanna et al., 2008).

Zdá se tedy, že projevy mutací *OPA1* na funkci i morfolologii mitochondrií fibroblastů mohou být rozmanité, což je v souladu s existencí spektra odlišných fenotypů pacientů stejně jako s podílem proteinu *OPA1* na více různých procesech v mitochondriích. Mechanismy zodpovědné za vznik autosomálně recesivní formy onemocnění s počátkem v dětském věku se však zdají být obecně méně prozkoumané. V mých měřeních vykazovaly fibroblasty pacientů P1 i P2 sníženou celkovou spřaženou respiraci, rozdíl oproti kontrolám však dosahoval významnosti pouze u buněk P2. Respirace po přidání oligomycinu byla spíše nižší, stále však srovnatelná s kontrolními kmeny. Tyto výsledky spolu s absencí jednoznačné fragmentace mitochondriálního retikula po kultivaci na mediu s obsahem galaktózy by mohly naznačovat jiný mechanismus působení recesivních mutací. Například narušení morfologie krist by mohlo souviset s rozpadem superkomplexů dýchacího řetězce a kombinovaným defektem oxidační fosforylace (Cogliati et al., 2013). U pacienta P1 bylo pracovníky Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch zjištěno snížené množství komplexů III, IV a V ve svalové tkáni,

ovšem aktivity komplexů byly kromě kombinované aktivity komplexu II a III v normě. Spektrofotometricky stanovené aktivity komplexů ve fibroblastech byly normální s pouze mírně sníženým množstvím komplexu IV. Množství mitochondriální DNA ve svalové tkáni bylo mírně snížené ovšem v rámci běžného rozptylu zdravých kontrol do jednoho roku věku.

HTRA2 je serinová proteáza mezimembránvého prostoru mitochondrií, kde se zřejmě podílí na procesu kontroly kvality mitochondriálních proteinů a zabraňuje hromadění nesprávně složených bílkovin (Goo et al., 2014). Zároveň však dochází za určitých podmínek k její translokaci do cytosolu, kde se podílí na spuštění apoptózy několika možnými způsoby. Hlavním z nich je patrně degradace antiapoptotických proteinů jako například XIAP (X-Linked Inhibitor Of Apoptosis, X vázaný inhibitor apoptózy) vedoucí k aktivaci kaspázové dráhy (Seong et al., 2004), může však působit i způsobem nezávislým na kaspázách (McCormick et al., 2008). Kromě toho se účastní i drah kontroly kvality mitochondrií a mitofagie, mj. regulací mitochondriální morfologie prostřednictvím interakce s proteinem OPA1 (Kieper et al., 2010). HTRA2 ve své plné podobě obsahuje od N-konce proteinu mitochondriální cílovou sekvenci (MTS), transmembránovou doménu, motiv vázající IAP proteiny, proteázovou doménu a PDZ doménu. Pravděpodobně však podléhá štěpení vlastní aktivitou na pozici alaninu 133, tedy za transmembránovou doménou, čímž se z ní stává solubilní protein mezimembránvého prostoru (Seong et al., 2004). Fibroblasty myších embryí postrádající funkční HTRA2 vykazují vyšší citlivost vůči apoptóze spolu se sníženým mitochondriálním membránovým potenciálem a množstvím ATP, což ukazuje na možnou důležitou funkci v energetickém metabolismu mitochondrií (Jones et al., 2003).

HTRA2, resp. poruchy jeho funkce zřejmě hrají důležitou roli v několika neurodegenerativních onemocněních, jako je Parkinsonova, Alzheimerova nebo Huntingtonova choroba (Su et al., 2019). V nedávné době byly odhaleny první případy recesivního onemocnění v raném dětství způsobeného úplnou ztrátou této proteázy v důsledku mutací obou alel (Mandel et al., 2016; Olahova et al., 2017), stejně jako je tomu pravděpodobně u pacienta P6. Ta vede k závažné neurodegeneraci a úmrtí v prvních měsících věku. Společným znakem je mj. 3-methylglutakonové acidurie, která se vyskytuje u mnohých mitochondriálních onemocnění (Wortmann et al., 2013). Ve všech testovaných případech byly zjištěny normální aktivity komplexů dýchacího řetězce ve svalové tkáni a pouze minimální změny v množství podjednotek i zcela sestavených komplexů jak ve fibroblastech, tak svalových vláknech (Mandel et al., 2016; Olahova et al., 2017). Stejně tak respirace fibroblastů byla nezměněna oproti kontrolním buňkám (Mandel et al., 2016). Přestože Oláhová et al. ukázala změnu v rovnováze mezi krátkými a dlouhými formami proteinu OPA1 (v souladu s jeho dříve pozorovanou interakcí s HTRA2), mitochondriální retikulum všech studovaných fibroblastů mělo normální morfologii (Mandel et al., 2016; Olahova et al., 2017). V obou případech byla posuzována také citlivost fibroblastů pacientů vůči podnětům vyvolávajícím apoptózu s pozitivním výsledkem oproti kontrolním buňkám.

V souladu s výše uvedenými poznatky nevykazovaly fibroblasty pacienta P6 významnou změnu respirace. Je tedy pravděpodobné, že hlavní úlohu v patogenezi onemocnění má funkce HTRA2 v apoptóze, vůči níž jsou zvláště citlivé právě buňky vyvíjející se nervové soustavy (Kole et al., 2013). Dále je možné, že případná porucha mitochondriálního energetického metabolismu při mutaci *HTRA2* se projeví pouze na fungování energeticky náročných tkání, jako je právě tkáň nervová.

POLG patří ke genům, jejichž mutace způsobující mitochondriální onemocnění mají vůbec nejrozmanitější účinky (kapitola 1.2.3). To platí i přesto, že většina pacientů sdílí podobný charakter mutací způsobujících poruchu funkce polymerázy gamma. Nejčastěji se jedná o složené heterozygoty s jednou mutací v polymerázové doméně a druhou ve spojovací doméně, která je v kontaktu s pomocnými podjednotkami POLG2. Vůbec nejobvyklejší mutací polymerázové domény je substituce p. Ala467Thr, kterou nalézáme i u pacienta P8 (Tang et al., 2011). Alanin 467 se nachází v hydrofobním jádře palcové domény polymerázy a hydroxylová skupina threoninu v tomto místě pravděpodobně narušuje právě tuto vlastnost (Euro et al., 2011). To je v souladu se zjištěním, že protein s touto záměnou si zachovává pouze 4 % své polymerázové aktivity a má narušenou interakci s pomocnými podjednotkami (Chan et al., 2005). Zajímavé je, že v homozygotní podobě má tato mutace, i přes zjevné omezení funkce proteinu, mírnější projevy než právě ve výše popsané kombinaci. To je možná způsobeno dalším oslabením spolupráce s POLG2 (Tzoulis et al., 2006). I druhá mutace pacienta P8 p. Pro589Leu nacházející se právě ve spojovací doméně, je známa z literatury, ovšem pouze v kombinaci se záměnou p. Pro587Leu na stejné alele a p. Trp748Ser na druhém chromosomu (Ashley et al., 2008). Mutace *POLG* mohou ale nemusí být spojeny s nálezy delecí v mtDNA nebo snížení jejího celkového množství jak ve svalu, tak fibroblastech pacientů a totéž platí pro změněné aktivity komplexů oxidační fosforylace (Ashley et al., 2008; Blok et al., 2009). U pacienta P8 nebyla provedena žádná analýza mtDNA v tkáních a vyšetření kožních fibroblastů pracovníky Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch neukázalo změny množství ani aktivity komplexů OXPHOS.

Snížená relativní respirace po přidání sukcinátu jakožto substrátu komplexu II může působit velmi překvapivě vzhledem k tomu, že sukcinátdehydrogenáza jako jediný z komplexů neobsahuje žádnou podjednotku kódovanou mitochondriální DNA. Něco podobného však není v literatuře zcela neznámé. Blok et al. zjistili specificky sníženou aktivitu komplexu II v játrech pacienta s homozygotní mutací p. Ala467Thr, autoři tomuto jevu ovšem nevěnovali větší pozornost (Blok et al., 2009). V případě výsledků respirometrického měření uváděných v této práci je možné spekulovat nad vlivem zbývajících komplexů dýchacího řetězce a především působení superkomplexů. Carossa et al. měřili kombinovanou aktivitu komplexů I + III a II + III získaných z hybridních buněk nesoucích 18 bp delecii v mtDNA spojenou s defektem funkce komplexu III a mitochondriálním onemocněním (Carossa et al., 2014). Zjistili, že přestože izolovaná aktivita komplexu II byla zvýšená, v důsledku poruchy funkce

následujícího komplexu III došlo ke snížení kombinovaných aktivit, které bylo ovšem výraznější pro komplexu II + III. To je možné vysvětlit právě existencí superkomplexů, kdy v případě nedostatku komplexu III by byla jeho velká část vázána s komplexem I, využívajíc částečně oddělené populace ubichinonu, což by neumožnilo tak významný tok elektronů ze sukcinátdehydrogenázy (Enriquez, 2016). K podobnému závěru došli i Lapuente-Brun et al., když sledovali respiraci a aktivity komplexů dýchacího řetězce u myších fibroblastů se sníženou expresí podjednotek komplexu III (Lapuente-Brun et al., 2013). Zjistili, že za těchto podmínek je zřejmě všechen komplex III sekvestrován komplexem I, následkem čehož bylo jeho volné množství pod detekčním limitem použité elektroforetické metody. Dále byla snížena respirace permeabilizovaných fibroblastů po přidání sukcinátu v kombinaci s rotenonem i kombinovaná aktivita komplexů II + III. Tímto předpokladem je možné vysvětlit sníženou relativní respiraci po přidání substrátu komplexu II na základě narušené funkce dalšího komplexu dráhy, který obsahuje podjednotky kódované v mitochondriální DNA.

Zjištění, že mutace **MGME1** způsobují mitochondriální onemocnění, patří k relativně nedávným (Kornblum et al., 2013) a doposud je známo velmi málo o jejich působení na mitochondriální energetický metabolismus v buňkách pacientů. Kornblum et al. zjistili snížení enzymových aktivit komplexů I a IV dýchacího řetězce ve svalové tkáni (Kornblum et al., 2013), ovšem pouze u některých pacientů. U pacienta P7 byla pracovníky Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch zjištěna snížená aktivita komplexu I a III a kombinovaná aktivita komplexů I + III v kožních fibroblastech, zatímco ve svalové tkáni byla snížená aktivita komplexů II, IV a kombinovaná aktivita I + III i II + III. Elektroforetická analýza ukázala snížené množství komplexů I, III, IV a V v mitochondriích svalové tkáně. Polarografické měření respirace svalových vláken bylo z důvodu malého množství materiálu provedeno pouze po přidání substrátů komplexu IV a ukázalo výrazně sníženou rychlost spotřeby kyslíku proti kontrolnímu materiálu. Mezi další zjištění u ostatních pacientů s mutací v tomto genu patří mnohačetné delecce mtDNA ve svalové tkáni, krevních buňkách a moči (Kornblum et al., 2013), stejně jako celkově snížený obsah mtDNA v příčně pruhované svalovině (Kornblum et al., 2013; Taylor et al., 2014). Vyšetření provedená v naší laboratoři neprokázala přítomnost delecí mitochondriální DNA ve svalu ani fibroblastech pacienta. Stanovení množství mtDNA nebylo provedeno z důvodu malého množství potřebného materiálu. Spektrum klinické závažnosti onemocnění u známých pacientů s mutací v genu **MGME1** je široké, od pozdního nástupu ve věku 35 let (Kornblum et al., 2013), přes dětské případy (Hebbar et al., 2017) až po případy úmrtí do tří let od narození (Taylor et al., 2014). Zasažena bývá hlavně tkáň nervová a svalová.

Respirometrická měření provedená pro tuto práci neprokázala významné změny v mitochondriálním metabolismu kožních kultivovaných fibroblastů, přestože je možné rozlišit podobné trendy jako v případě buněk pacienta s mutací v dalším genu replikace a údržby

mitochondriálního genomu, *POLG*, což by mohlo naznačovat společný mechanismus patogeneze. Význam a příčiny těchto výsledků by bylo dobré ověřit opakovaným měřením a dalšími metodami.

DARS2 byl prvním genem mitochondriální aminoacyl-tRNA-syntetázy, v němž byla nalezena mutace způsobující mitochondriální onemocnění (Scheper et al., 2007). Mutace způsobují výhradně leukoencefalopatii s postižením mozkového kmene, míchy a zvýšeným laktátem (LBSL, kapitola 1.3.2), přičemž ostatní tkáně ani kultivované buňky pacientů dle dosavadních poznatků nevykazují defekty oxidační fosforylace (Konovalova and Tynismaa, 2013). Mutace aminoacyl-tRNA-syntetáz zřejmě způsobují zpomalení procesu translace, které vede k akumulaci nesprávně sbalených proteinů a spuštění odpovědi na nesbalené proteiny (UPR, unfolded protein response) (Wang and Kaufman, 2016). Právě neurony CNS patří mezi buněčné typy vysoce citlivé vůči tomuto druhu stresu (Sheng, 2014). Většina pacientů s LBSL nese mutaci v druhém intronu genu *DARS2* způsobující nesprávné vystřížení exonu 3 s následkem posunu čtecího rámce a předčasného ukončení translace, v kombinaci s jinou mutací v druhé alele (van Berge et al., 2014), stejně jako je tomu u pacienta P3 v této práci. Předpokládá se, že sestřihová mutace částečně umožňuje vznik funkčního proteinu („leaky“ mutace), zatímco mutace druhé alely plně zabraňuje její funkci (van Berge et al., 2014). To je také v souladu s genotypem pacienta P3 s druhou mutací způsobující předčasný vznik STOP kodonu. Bylo zjištěno, že efektivita správného zařazení exonu 3 u tohoto typu mutací je nižší právě v nervových buňkách oproti jiným buněčným typům (van Berge et al., 2012). V souladu s výše uvedenými informacemi nebyla zjištěna významná změna respirace fibroblastů pacienta P3. Biochemické analýzy provedené pracovníky Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch ukázaly pouze velmi mírně sníženou kombinovanou aktivitu komplexů I + III a normální množství všech komplexů systému oxidační fosforylace ve fibroblastech.

NDUFS8 je jednou z centrálních podjednotek hydrofilního ramene komplexu I dýchacího řetězce obsahující dvě železo-sírná centra podílející se na transportu elektronů z NADH na ubichinon (Fiedorczuk et al., 2016). Pacient P4 je složený heterozygot pro mutace p. Arg54Trp a p. Cys153Arg. Cystein na pozici 153 se přímo účastní vazby jednoho z atomů železa druhého železo-sírného centra a jeho záměna za arginin pravděpodobně vede ke ztrátě této struktury a tím také funkce této podjednotky (Fiedorczuk et al., 2016). N-konec NDUFS8 obsahuje dva amfipatické helixy, které jsou v kontaktu s podjednotkami NDUFA13, NDUFA3 a NDUFA7 (Fiedorczuk et al., 2016) a spekuluje se o jejich funkci ve stabilizaci celého komplexu nebo předpokládaného vzájemného pohybu obou jeho ramen (Fiedorczuk and Sazanov, 2018). Na důležitost této periferní části proteinu ukazují i výsledky biochemických měření provedených na tkáních pacientů s homozygotními mutacemi způsobujícími záměnu některého z aminokyselinových zbytků, které se zde nachází. Marina et al. zjistili 29% aktivitu komplexu I ve svalové tkáni pacienta s homozygotní mutací p. Arg54Trp ve srovnání s kontrolním vzorkem (Marina et al., 2013). Podobně i homozygotní záměna p. Glu63Gln nacházející se v této

oblasti způsobila snížený poměr aktivit komplexu I a citrát syntázy na 8 a 54 % ve svalové tkáni resp. fibroblastech pacienta (Haack et al., 2012). V téže studii byl zahrnut i pacient s podobnou kombinací mutací jako pacient P4. Jednalo se o záměnu p. Arg77Trp v jednom z periferních helixů a p. Ala159Asp poblíž druhého železo-sírného centra. Poměr aktivity komplexu I a citrát syntázy byl v tomto případě na úrovni 52 % ve fibroblastech a 38 % ve svalovině. Možným důsledkem mutací genů podjednotek NADH-ubichinonreduktázy včetně *NDUFS8* je narušení skládání celého komplexu. Verkaart et al. zjistili 15% množství správně složeného komplexu I a 20 % aktivity ve fibroblastech pacienta s mutací *NDUFS8* ve srovnání s kontrolními buňkami (Verkaart et al., 2007), zatímco fibroblasty dalšího pacienta vykazovaly téměř nedetekovatelné zastoupení úplného komplexu (Ugalde et al., 2004). Část těchto poznatků je v kontrastu s výsledky biochemických vyšetření u pacienta P4 provedených pracovníky Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch. Vyšetření svalové tkáně ukázalo sníženou aktivitu komplexu I ale také sníženou kombinovanou aktivitu komplexů I + III a II + III, zatímco v kultivovaných fibroblastech byly zjištěny aktivity srovnatelné s kontrolními buňkami pro komplex I, II i IV. Bylo provedeno také polarografické měření respirace svalových vláken, které v souladu s mutacemi u pacienta ukázalo na výrazně sníženou respiraci po přidání pyruvátu a malátu.

Při měření spotřeby kyslíku permeabilizovanými fibroblasty pacienta kultivovanými v mediu s obsahem glukózy byla zjištěna snížená úplná spřažená respirace stejně jako relativní respirace po přidání kombinace pyruvátu, malátu, glutamátu a ADP. To je v souladu s očekáváním na základě molekulárně genetické diagnózy, ovšem v rozporu s některými dalšími výsledky naší laboratoře. Mechanismus působení mutací genu podjednotky *NDUFS8* komplexu I v jednotlivých tkáních tak ke svému plnému objasnění vyžaduje další studium. Jednou z možností je, že na vině jsou opět interakce jednotlivých komplexů v rámci superkomplexů. Bylo zjištěno, že ke správnému sestavení a fungování komplexu I je potřeba přítomnost komplexů III a IV stejně jako cytochromu c (Schagger et al., 2004; Vempati et al., 2009). Pokud je mi známo, žádný podobný efekt působící opačným směrem však nebyl doposud pozorován.

5.2.1 Výsledky polarografických měření u buněk pěstovaných v mediu s obsahem galaktózy

Lidské kožní kultivované fibroblasty pěstované v mediu s vysokým obsahem glukózy získávají většinu ATP pro své fungování prostřednictvím glykolýzy. Při kultivaci v mediu, kde je glukóza nahrazena galaktózou, je buňka nucena většinu ATP syntetizovat pomocí oxidační fosforylace. Toho bylo především dříve využíváno k diagnostice mitochondriálních onemocnění, kdy buňky pacientů se závažným defektem OXPHOS nebyly schopny růstu v takovém mediu a postupně odumíraly

(Robinson, 1996). Dodnes je však tato metoda používána např. pro určování dosud neznámých mitochondriálních proteinů potřebných pro tuto dráhu produkce ATP (Arroyo et al., 2016).

Z těchto důvodů bylo jako jedno z médií ke kultivaci buněk pro účely respirometrie použito medium neobsahující glukózu ovšem s přidanou galaktózou v koncentraci 25 mmol/l. Předpokládal jsem, že dojde k nadregulaci proteinů oxidační fosforylace u kontrolních buněk, zatímco buňky, jejichž mitochondriální energetický metabolismus je narušen, nebudou schopny podobného přizpůsobení, čímž dojde ke zvýraznění rozdílů respirace mezi oběma skupinami fibroblastů. Proto bylo velmi překvapivé, že za těchto podmínek nebyl potvrzen žádný z výsledků měření respirace ani nebyl zjištěn žádný další významný rozdíl mezi buňkami pacientů a kontrolními kmeny. To může mít několik důvodů. Doba kultivace buněk v mediu s obsahem galaktózy v délce pěti dnů byla zvolena na základě předchozích experimentů v naší laboratoři, při nichž byl zjištěno, že k některým změnám v buněčném metabolismu, regulaci genové exprese a proliferaci buněk dochází až po takto dlouhé době (Kedrová, 2014). Některé publikace však ukazují, že k největšího zvýraznění rozdílů mezi buňkami pacientů a zdravých jedinců je dosaženo v kratším časovém horizontu. Např. u fibroblastů pacientů s mutací v genu *OPA1* byl pozorován významný rozdíl v produkci ATP oproti kontrolním buňkám pouze při kultivaci v mediu s galaktózou po dobu 24 hodin, nikoliv však po 48 nebo 72 hodinách (Zanna et al., 2008).

Hlavním důvodem tohoto nečekaného výsledku se však zdá být vysoká variabilita výsledků měření kontrolních linií po kultivaci v mediu s obsahem galaktózy. To potvrzuje mj. i skutečnost, že průměr poměrů směrodatných odchylek všech šesti sledovaných parametrů u kontrolních buněk pěstovaných s galaktózou/glukózou je 1,51. Je možné, že na vině je rozdílný původ kontrolních buněk K1 a K2 oproti fibroblastům K3 a K4 (kapitola 3.1.1.1). Zatímco kmeny K1 a K2 byly zakoupeny jako komerčně prodávané a s vysokou pravděpodobností pochází od skutečně zdravého novorozence, K3 a K4 (z nichž pouze K4 byly použity při sledování vlivu galaktózy v mediu) jsou buňky dětských pacientů, u nichž vzniklo podezření na mitochondriální onemocnění, které se neprokázalo. Není vyloučeno, že energetický metabolismus těchto buněk byl odlišný oproti fibroblastům zcela zdravých jedinců, což se projevilo na pozorované variabilitě. Například úplná spřažená respirace (parametr OXPHOS) byla oproti kontrolám významně snižena u čtyř pacientů po předchozí kultivaci v mediu s glukózou, žádný významný rozdíl se však nepodařilo ukázat po použití media s galaktózou. Průměrná hodnota tohoto parametru buněk K1 a K2 je 103 pmol/(s*mg), zatímco pro kmen K4 činí 74,3 pmol/(s*mg).

Pro příští experimenty je tedy velmi důležitá správná volba kontrolních buněk, přičemž je potřeba zajistit, aby fibroblasty nebo jiný kontrolní materiál pocházely od skutečně zdravých jedinců, zároveň je však výhodné, pokud dostatečně zachycují běžnou variabilitu zdravé populace.

5.3 Morfologie mitochondriálního retikula fibroblastů pacientů s mitochondriálními poruchami

Změněná morfologie retikula, často v podobě jeho fragmentace, byla pozorována u řady mitochondriálních onemocnění způsobených jak mutací genu kódujícího některý z proteinů dynamiky mitochondrií (Chevrollier et al., 2008; Zanna et al., 2008), tak i jinými mutacemi způsobujícími defekt funkce systému oxidační fosforylace (Duvezin-Caubet et al., 2006). Jednou z možných příčin je neschopnost udržení normálního membránového potenciálu, způsobující aktivaci proteázy OMA1 a následné kompletní štěpení proteinu OPA1 na jeho krátkou formu (Baker et al., 2014; Ehses et al., 2009) (viz kapitola 1.1.1.2). V některých případech bylo pozorováno, že efekt mutace na morfologii mitochondriálního retikula ve srovnání s kontrolními buňkami je zvýrazněn kultivací v mediu obsahujícím galaktózu (Zanna et al., 2008). Naopak u buněk bez poruchy mitochondriální funkce dochází ke vzniku výrazně elongovaných mitochondrií (Rossignol et al., 2004), ani to však nemusí být pravidlem a v některých experimentech byla pozorována nezměněná morfologie (Zanna et al., 2008) nebo fragmentace mitochondriálního retikula při kultivaci v mediu s galaktózou i u buněk použitých jako kontrolní (Agier et al., 2012).

Guillery et al. testovali vliv defektů systému oxidační fosforylace na morfologii mitochondrií fibroblastů pomocí selektivních inhibitorů (Guillery et al., 2008). Zjistili, že inhibice kterékoli z komplexů I-V způsobí částečnou fragmentaci retikula, ovšem nejzávažnější účinek mělo narušení membránového potenciálu pomocí CCCP, v souladu s vysvětlením výše. Současně pozorovali, že fibroblasty většiny pacientů s izolovanými defekty komplexů OXPHOS vykazovaly za běžných podmínek normální propojené retikulum, pokud však byla inhibována glykolýza nahrazením glukózy v mediu deoxyglukózou, došlo u některých z nich k fragmentaci mitochondrií v závislosti na závažnosti defektu stanovené pomocí polarografického měření spotřeby kyslíku. Podobně bylo zjištěno, že v případě mutací genu *NDUFS8* podjednotky komplexu I je míra fragmentace mitochondriálního retikula závislá na závažnosti defektu zjištěného měřením aktivity NADH-ubichinonreduktázy (Distelmaier et al., 2009). Pacient P4 (mutace genu *NDUFS8*) je jedním ze čtyř pacientů, u jejichž fibroblastů byla zjištěna významná změna celkové respirace. Zároveň tyto buňky jako jediné vykazovaly fragmentovanou morfologii mitochondrií za obou kultivačních podmínek.

Fibroblasty pacienta P6 (mutace v genu *HTRA2*) měly retikulum fragmentované oproti kontrolním buňkám při kultivaci v mediu s obsahem glukózy. Dřívější pozorování podobný vliv mutací neukázala, ovšem byla zjištěna změna v poměru krátkých a dlouhých forem proteinu OPA1 (Olahova et al., 2017), který se podílí na regulaci morfologie a dynamiky mitochondrií (kapitola 1.1.1.2). Je možné, že dosud nezaznamenaná homozygotní mutace pacienta P6 způsobující předčasné ukončení

translace má ještě významnější vliv na rovnováhu proteinů dynamiky mitochondrií, tato hypotéza ovšem nebyla doposud testována.

Buňky pacienta P3 s mutací v genu *DARS2* vykazovaly fragmentované mitochondriální retikulum pouze v případě jejich dřívější kultivace v mediu s obsahem galaktózy. To je v kontrastu se zdánlivě méně významnými změnami energetického metabolismu stanovenými pomocí respirometrie. Možné vysvětlení zřejmě tkví v odlišné účasti funkčního metabolismu syntézy ATP a schopnosti udržení membránového potenciálu na výsledné struktuře mitochondrií v buňce, jak je nastíněno také v posledním odstavci této podkapitoly. Jinou nejspíš však méně pravděpodobnou možností je zatím neobjevená funkce této mitochondriální aminoacyl-tRNA-syntetázy na morfologii mitochondriálního retikula, která by významně neovlivňovala energetický metabolismus ve fibroblastech, ovšem byla narušena zde studovanými mutacemi i v tomto buněčném typu. Bylo zjištěno, že cytosolické aminoacyl-tRNA-syntetázy mohou kromě své základní funkce v proteosyntéze zastávat také jiné funkce v buňce (Guo et al., 2010). Podobně je známo, že např. některé mitochondriální proteiny se účastní dalších dějů v jádře (Monaghan and Whitmarsh, 2015), a v nedávné době bylo objeveno, že většina aminoacyl-tRNA-syntetáz včetně některých mitochondriálních je syntetizována ve více sestřihových variantách, z nichž některé nejsou katalyticky aktivní, je tedy opět možné, že plní jiné funkce nezávislé na proteosyntéze (Lo et al., 2014).

Nečekanou kombinací byl výskyt fragmentovaných mitochondrií buněk pacienta P5 (mutace v genu *NR2F1*) pěstovaných v mediu s obsahem glukózy s následnou elongací a vznikem vysoce propojeného retikula při použití media s obsahem galaktózy. Proteiny dynamiky mitochondrií jsou regulovány mnoha různými drahami. Nejen při svém vzniku nebo například proteolytickým štěpením, jako je tomu u proteinu OPA1 (kapitola 1.1.1.2 (Ehse et al., 2009)), ale také mnoha dalšími posttranslačními modifikacemi, mj. fosforylací, SUMOylací, acetylací, ubikvitinylací nebo připojením N-acetylglukosaminu prostřednictvím atomu kyslíku (Knott et al., 2008; Makino et al., 2011; Samant et al., 2014). Je možné, že *NR2F1* ovlivňuje některou z těchto drah a narušení jeho funkce má rozdílné a nečekané důsledky při různých podmínkách kultivace. V rámci omezeného množství publikací popisujících vliv *NR2F1* na funkci mitochondrií se však nepodařilo dohledat experimentální výsledky, které by tuto domněnku podporovaly. Bylo by dobré mikroskopická pozorování zopakovat a v případě podobných výsledků prozkoumat funkci tohoto proteinu v regulaci morfologie mitochondrií v lépe kontrolovaných podmínkách, například za použití transgenních buněčných modelů.

O tom, do jaké míry je zvolená metoda hodnocení morfologie mitochondriálního retikula informativní při aplikaci na daný buněčný typ za těchto podmínek, nejspíš vypovídají výsledky pozorování fibroblastů pacientů P1 a P2. Přestože se jedná o bratry nesoucí stejnou kombinaci mutací v genu *OPA1*, morfologie mitochondriálního retikula v buňkách kultivovaných v mediu s obsahem galaktózy byla poměrně odlišná. To by mohlo být způsobeno vysokou citlivostí vůči

individuálnímu genetickému pozadí buněk, ale spíše vůči podmínkám a velmi konkrétnímu provedení přípravy. Na základě toho soudím, že pro budoucí aplikaci by bylo užitečné zařadit nezávislé opakování těchto pozorování pro ověření správnosti prvotních výsledků.

Významná část kontrolních buněk K3 vykazovala poměrně neobvyklou strukturu mitochondrií při předchozí kultivaci v mediu s glukózou (Obrázek 8). Velké, zakulacené až balónovité mitochondrie nejsou neznámé u buněk pacientů s mitochondriálním onemocněním (Zanna et al., 2008). Fibroblasty K3 mají svůj původ u pacienta, který byl v Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch testován pro podezření na mitochondriální onemocnění, které se však neprokázalo. I tak je ovšem možné, že morfologii mitochondrií ovlivnila neobjevená změna metabolismu oproti běžné populaci. Bylo by jistě zajímavé sledovat vliv kultivace v druhé variantě media na strukturu mitochondrií těchto buněk, z důvodu malého množství materiálu však nebyly fibroblasty K3 do této druhé části mikroskopických pozorování zahrnuty.

Při srovnávání výsledků mikroskopických pozorování podobného druhu s výsledky ostatních metod zaměřených na mitochondriální energetický metabolismus je třeba pamatovat, že propojenost mitochondriálního retikula je závislá spíše právě na schopnosti buňky udržet membránový potenciál, než na funkční produkci ATP (Guillery et al., 2008). Z tohoto důvodu by mohlo být v kombinaci se zde prezentovanými výsledky užitečné přímé zjištění mitochondriálního membránového potenciálu u zkoumaných fibroblastů.

Přestože všechny pacienty, jejichž kožní fibroblasty byly součástí diplomového projektu, postihlo poměrně závažné onemocnění s nástupem v raném dětství, u čtyř buněčných linií z osmi se nepodařilo ukázat významnou změnu v respiraci pomocí zvolené metody. To vypovídá o poměrně nízké senzitivitě pro použití k diagnostickým účelům, která se poněkud zvýší na 75 % v případě kombinace s výsledky mikroskopických pozorování. Otázkou však zůstává diagnostická specifita, kterou není možné na základě prezentovaných výsledků stanovit.

Interpretace výsledků těchto metod a jejich použití v klinické praxi může být složité z mnoha různých důvodů. Vyšetření pacientů s mutacemi některých genů mohou poskytovat nekonzistentní výsledky podle typu studované tkáně (Tetreault et al., 2015). To také ztěžuje možnost validace mutací v genech s předpokládanou funkcí v témže buněčném procesu či metabolické dráze nalezených molekulárně genetickými metodami. Mnohé proteiny mohou navíc mít více různých funkcí, což může působit na výsledky vyšetření nečekaným způsobem (Monaghan and Whitmarsh, 2015).

V kontrastu s tím některé z prezentovaných výsledků ukazují na možné doposud neznámé, zajímavé a potenciálně důležité mechanismy působení studovaných mutací a tím nabízí další směry pro případné pokračování výzkumu.

6 Shrnutí

V diplomové práci byl zhodnocen vliv patogenních mutací v několika různých genech na mitochondriální energetický metabolismus kožních kultivovaných fibroblastů pomocí vysoce citlivé polarografie. Dále byly sledovány změny struktury mitochondrií u těchto buněk.

1. Opakovaně byla změřena respirace 4 kontrolních linií fibroblastů získaných od dětí a jednoho kmene fibroblastů od zdravého dospělého jedince. Srovnáním byly zjištěny změny v respiraci buněk osob různého věku.
2. Pomocí vysoce citlivé polarografie byl charakterizován vliv mutací na systém oxidační fosforylace fibroblastů osmi pacientů s mitochondriálním onemocněním
 - U fibroblastů jednoho z pacientů s mutací v genu *OPA1* byla zjištěna snížená celková spřažená respirace ukazující na kombinovaný defekt OXPHOS.
 - U buněk pacienta s mutací genu podjednotky *NDUFS8* komplexu I byla potvrzena očekávaná snížená relativní respirace po přidání substrátů poskytujících elektrony prostřednictvím NADH-ubichinonreduktázy.
 - Fibroblasty pacienta s mutací v genu *NR2F1* vykazovaly sníženou respiraci za všech respiračních stavů kromě stavu po přidání askorbátu a TMPD.
 - U buněk pacienta s mutací v genu *POLG* kódujícím katalytickou podjednotku mitochondriální replikativní DNAPolymerázy byla zjištěna snížená celková spřažená respirace a relativní respirace po přidání substrátu komplexu II dýchacího řetězce.
3. U fibroblastů pacientů s mutacemi v genech *DARS2*, *NDUFS8*, *NR2F1* a *HTRA2* byly zjištěny změny struktury mitochondrií pomocí fluorescenční mikroskopie ve srovnání s kontrolními buňkami.
4. Byl studován vliv různých kultivačních podmínek na funkci a strukturu mitochondrií fibroblastů pacientů. Nepodařilo se ukázat výraznější rozdíl respirace buněk pacientů oproti kontrolním buňkám při použití media s obsahem galaktózy ve srovnání s mediem s glukózou. Pro podobný druh analýz bude třeba najít jiné kultivační podmínky.

Závěrem lze říci, že měření spotřeby kyslíku kožními fibroblasty pacientů za účelem ověření potenciálních kauzálních mutací lze zřejmě aplikovat pouze v některých případech. Svůj význam může mít především při nemožnosti snadného získání vzorků jiných tkání. Dále se může uplatnit především při studiu účinku konkrétních mutací některých genů.

7 Seznam použité literatury

*sekundární zdroj

- *Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M.L., Perez-Martos, A. and Enriquez, J.A. (2008), "Respiratory active mitochondrial supercomplexes.", *Molecular Cell*, United States, Vol. 32 No. 4, pp. 529–539.
- Agier, V., Oliviero, P., Laine, J., L'Hermitte-Stead, C., Girard, S., Fillaut, S., Jardel, C., et al. (2012), "Defective mitochondrial fusion, altered respiratory function, and distorted cristae structure in skin fibroblasts with heterozygous OPA1 mutations.", *Biochimica et Biophysica Acta*, Netherlands, Vol. 1822 No. 10, pp. 1570–1580.
- Alston, C.L., Howard, C., Olahova, M., Hardy, S.A., He, L., Murray, P.G., O'Sullivan, S., et al. (2016), "A recurrent mitochondrial p.Trp22Arg NDUFB3 variant causes a distinctive facial appearance, short stature and a mild biochemical and clinical phenotype.", *Journal of Medical Genetics*, England, Vol. 53 No. 9, pp. 634–641.
- Alston, C.L., Rocha, M.C., Lax, N.Z., Turnbull, D.M. and Taylor, R.W. (2017), "The genetics and pathology of mitochondrial disease.", *The Journal of Pathology*, England, Vol. 241 No. 2, pp. 236–250.
- *Amoedo, N.D., Punzi, G., Obre, E., Lacombe, D., De Grassi, A., Pierri, C.L. and Rossignol, R. (2016), "AGC1/2, the mitochondrial aspartate-glutamate carriers.", *Biochimica et Biophysica Acta*, Netherlands, Vol. 1863 No. 10, pp. 2394–2412.
- Anand, R., Wai, T., Baker, M.J., Kladt, N., Schauss, A.C., Rugarli, E. and Langer, T. (2014), "The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission.", *The Journal of Cell Biology*, United States, Vol. 204 No. 6, pp. 919–929.
- Andrews, R.M., Kubacka, I., Chinnery, P.F., Lightowlers, R.N., Turnbull, D.M. and Howell, N. (1999), "Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA.", *Nature Genetics*, Vol. 23 No. 2, p. 147.
- Arroyo, J.D., Jourdain, A.A., Calvo, S.E., Ballarano, C.A., Doench, J.G., Root, D.E. and Mootha, V.K. (2016), "A Genome-wide CRISPR Death Screen Identifies Genes Essential for Oxidative Phosphorylation.", *Cell Metabolism*, United States, Vol. 24 No. 6, pp. 875–885.
- Ashley, N., O'Rourke, A., Smith, C., Adams, S., Gowda, V., Zeviani, M., Brown, G.K., et al. (2008), "Depletion of mitochondrial DNA in fibroblast cultures from patients with POLG1 mutations is a consequence of catalytic mutations.", *Human Molecular Genetics*, England, Vol. 17 No. 16, pp. 2496–2506.
- Ayyagari, R., Gomes, X. V, Gordenin, D.A. and Burgers, P.M.J. (2003), "Okazaki fragment maturation in yeast. I. Distribution of functions between FEN1 AND DNA2.", *The Journal of Biological*

- Chemistry*, United States, Vol. 278 No. 3, pp. 1618–1625.
- Backert, S. and Borner, T. (2000), “Phage T4-like intermediates of DNA replication and recombination in the mitochondria of the higher plant *Chenopodium album* (L.)”, *Current Genetics*, United States, Vol. 37 No. 5, pp. 304–314.
- Bailey, L.J., Cluett, T.J., Reyes, A., Prolla, T.A., Poulton, J., Leeuwenburgh, C. and Holt, I.J. (2009), “Mice expressing an error-prone DNA polymerase in mitochondria display elevated replication pausing and chromosomal breakage at fragile sites of mitochondrial DNA.”, *Nucleic Acids Research*, England, Vol. 37 No. 7, pp. 2327–2335.
- Baker, M.J., Lampe, P.A., Stojanovski, D., Korwitz, A., Anand, R., Tatsuta, T. and Langer, T. (2014), “Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics.”, *The EMBO Journal*, England, Vol. 33 No. 6, pp. 578–593.
- Balsa, E., Marco, R., Perales-Clemente, E., Szklarczyk, R., Calvo, E., Landazuri, M.O. and Enriquez, J.A. (2012), “NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain.”, *Cell Metabolism*, United States, Vol. 16 No. 3, pp. 378–386.
- Ban, T., Ishihara, T., Kohno, H., Saita, S., Ichimura, A., Maenaka, K., Oka, T., et al. (2017), “Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin.”, *Nature Cell Biology*, England, Vol. 19 No. 7, pp. 856–863.
- Baradaran, R., Berrisford, J.M., Minhas, G.S. and Sazanov, L.A. (2013), “Crystal structure of the entire respiratory complex I.”, *Nature*, England, Vol. 494 No. 7438, pp. 443–448.
- Baris, O., Delettre, C., Amati-Bonneau, P., Surget, M.-O., Charlin, J.-F., Catier, A., Derieux, L., et al. (2003), “Fourteen novel OPA1 mutations in autosomal dominant optic atrophy including two de novo mutations in sporadic optic atrophy.”, *Human Mutation*, United States, Vol. 21 No. 6, p. 656.
- Bartsakoulia, M., Pyle, A., Troncoso-Chandia, D., Vial-Brizzi, J., Paz-Fiblas, M. V, Duff, J., Griffin, H., et al. (2018), “A novel mechanism causing imbalance of mitochondrial fusion and fission in human myopathies.”, *Human Molecular Genetics*, England, Vol. 27 No. 7, pp. 1186–1195.
- Bauer, M.F., Gempel, K., Reichert, A.S., Rappold, G.A., Lichtner, P., Gerbitz, K.D., Neupert, W., et al. (1999), “Genetic and structural characterization of the human mitochondrial inner membrane translocase.”, *Journal of Molecular Biology*, England, Vol. 289 No. 1, pp. 69–82.
- van Berge, L., Dooves, S., van Berkel, C.G.M., Polder, E., van der Knaap, M.S. and Scheper, G.C. (2012), “Leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation is associated with cell-type-dependent splicing of mtAspRS mRNA.”, *The Biochemical Journal*, England, Vol. 441 No. 3, pp. 955–962.
- van Berge, L., Hamilton, E.M., Linnankivi, T., Uziel, G., Steenweg, M.E., Isohanni, P., Wolf, N.I., et al. (2014), “Leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and lactate

- elevation: clinical and genetic characterization and target for therapy.”, *Brain : A Journal of Neurology*, England, Vol. 137 No. Pt 4, pp. 1019–1029.
- Beutner, G., Eliseev, R.A. and Porter, G.A.J. (2014), “Initiation of electron transport chain activity in the embryonic heart coincides with the activation of mitochondrial complex 1 and the formation of supercomplexes.”, *PloS One*, United States, Vol. 9 No. 11, p. e113330.
- Birrell, J.A., Morina, K., Bridges, H.R., Friedrich, T. and Hirst, J. (2013), “Investigating the function of [2Fe-2S] cluster N1a, the off-pathway cluster in complex I, by manipulating its reduction potential.”, *The Biochemical Journal*, England, Vol. 456 No. 1, pp. 139–146.
- Bitoun, M., Maugenre, S., Jeannet, P.-Y., Lacene, E., Ferrer, X., Laforet, P., Martin, J.-J., et al. (2005), “Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy.”, *Nature Genetics*, United States, Vol. 37 No. 11, pp. 1207–1209.
- Blaza, J.N., Serreli, R., Jones, A.J.Y., Mohammed, K. and Hirst, J. (2014), “Kinetic evidence against partitioning of the ubiquinone pool and the catalytic relevance of respiratory-chain supercomplexes.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, Vol. 111 No. 44, pp. 15735–15740.
- Blok, M.J., Van Den Bosch, B.J., Jongen, E., Hendrickx, A., De Die-Smulders, C.E., Hoogendijk, J.E., Brusse, E., et al. (2009), “The unfolding clinical spectrum of POLG mutations”, *Journal of Medical Genetics*, Vol. 46 No. 11, pp. 776–785.
- *Boczonadi, V. and Horvath, R. (2014), “Mitochondria: impaired mitochondrial translation in human disease.”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Netherlands, Vol. 48, pp. 77–84.
- Boehm, E., Zaganelli, S., Maundrell, K., Jourdain, A.A., Thore, S. and Martinou, J.-C. (2017), “FASTKD1 and FASTKD4 have opposite effects on expression of specific mitochondrial RNAs, depending upon their endonuclease-like RAP domain.”, *Nucleic Acids Research*, England, Vol. 45 No. 10, pp. 6135–6146.
- Bohnert, M., Zerbes, R.M., Davies, K.M., Muhleip, A.W., Rampelt, H., Horvath, S.E., Boenke, T., et al. (2015), “Central role of Mic10 in the mitochondrial contact site and cristae organizing system.”, *Cell Metabolism*, United States, Vol. 21 No. 5, pp. 747–755.
- Bolden, A., Noy, G.P. and Weissbach, A. (1977), “DNA polymerase of mitochondria is a gamma-polymerase.”, *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 252 No. 10, pp. 3351–3356.
- Bonfante, E., Koenig, M.K., Adejumo, R.B., Perinjelil, V. and Riascos, R.F. (2016), “The neuroimaging of Leigh syndrome: case series and review of the literature.”, *Pediatric Radiology*, Germany, Vol. 46 No. 4, pp. 443–451.
- Bonnefond, L., Fender, A., Rudinger-Thirion, J., Giege, R., Florentz, C. and Sissler, M. (2005), “Toward

- the full set of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases: characterization of AspRS and TyrRS.”, *Biochemistry*, United States, Vol. 44 No. 12, pp. 4805–4816.
- Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., Bourgeois, M., Viegas-Pequignot, E., Munnich, A., et al. (1995), “Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency.”, *Nature Genetics*, United States, Vol. 11 No. 2, pp. 144–149.
- *Brand, M.D. and Nicholls, D.G. (2011), “Assessing mitochondrial dysfunction in cells.”, *The Biochemical Journal*, England, Vol. 435 No. 2, pp. 297–312.
- Brandt, T., Cavellini, L., Kuhlbrandt, W. and Cohen, M.M. (2016), “A mitofusin-dependent docking ring complex triggers mitochondrial fusion in vitro.”, *ELife*, England, Vol. 5, available at:<https://doi.org/10.7554/eLife.14618>.
- Bricker, D.K., Taylor, E.B., Schell, J.C., Orsak, T., Boutron, A., Chen, Y.-C., Cox, J.E., et al. (2012), “A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, Drosophila, and humans.”, *Science (New York, N.Y.)*, United States, Vol. 337 No. 6090, pp. 96–100.
- Brzezniak, L.K., Bijata, M., Szczesny, R.J. and Stepien, P.P. (2011), “Involvement of human ELAC2 gene product in 3' end processing of mitochondrial tRNAs.”, *RNA Biology*, United States, Vol. 8 No. 4, pp. 616–626.
- Calvo, S.E., Clauser, K.R. and Mootha, V.K. (2016), “MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins.”, *Nucleic Acids Research*, England, Vol. 44 No. D1, pp. D1251-7.
- Carelli, V., Sabatelli, M., Carrozzo, R., Rizza, T., Schimpf, S., Wissinger, B., Zanna, C., et al. (2015), “‘Behr syndrome’ with OPA1 compound heterozygote mutations.”, *Brain: A Journal of Neurology*, England, January.
- Carossa, V., Ghelli, A., Tropeano, C.V., Valentino, M.L., Iommarini, L., Maresca, A., Caporali, L., et al. (2014), “A novel in-frame 18-bp microdeletion in MT-CYB causes a multisystem disorder with prominent exercise intolerance.”, *Human Mutation*, United States, Vol. 35 No. 8, pp. 954–958.
- Chan, S.S.L., Longley, M.J. and Copeland, W.C. (2005), “The common A467T mutation in the human mitochondrial DNA polymerase (POLG) compromises catalytic efficiency and interaction with the accessory subunit.”, *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 280 No. 36, pp. 31341–31346.
- Chance, B., Estabrook, R.W. and Lee, C.P. (1963), “Electron Transport in the Oxysome.”, *Science (New York, N.Y.)*, United States, Vol. 140 No. 3565, pp. 379–380.
- Chang, D.D. and Clayton, D.A. (1984), “Precise identification of individual promoters for transcription of each strand of human mitochondrial DNA.”, *Cell*, United States, Vol. 36 No. 3, pp. 635–643.
- Chazotte, B. (2011), “Labeling mitochondria with MitoTracker dyes.”, *Cold Spring Harbor Protocols*,

- United States, Vol. 2011 No. 8, pp. 990–992.
- Chen, C.-A., Bosch, D.G.M., Cho, M.T., Rosenfeld, J.A., Shinawi, M., Lewis, R.A., Mann, J., et al. (2016), “The expanding clinical phenotype of Bosch-Boonstra-Schaaf optic atrophy syndrome: 20 new cases and possible genotype-phenotype correlations.”, *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, United States, Vol. 18 No. 11, pp. 1143–1150.
- Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y.E., Chomyn, A., Prolla, T.A., McCaffery, J.M. and Chan, D.C. (2010), “Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations.”, *Cell*, United States, Vol. 141 No. 2, pp. 280–289.
- Chevrollier, A., Guillet, V., Loiseau, D., Gueguen, N., de Crescenzo, M.-A.P., Verny, C., Ferre, M., et al. (2008), “Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect.”, *Annals of Neurology*, United States, Vol. 63 No. 6, pp. 794–798.
- Cho, B., Cho, H.M., Jo, Y., Kim, H.D., Song, M., Moon, C., Kim, H., et al. (2017), “Constriction of the mitochondrial inner compartment is a priming event for mitochondrial division.”, *Nature Communications*, England, Vol. 8, p. 15754.
- Civiletto, G., Varanita, T., Cerutti, R., Gorletta, T., Barbaro, S., Marchet, S., Lamperti, C., et al. (2015), “Opa1 overexpression ameliorates the phenotype of two mitochondrial disease mouse models.”, *Cell Metabolism*, United States, Vol. 21 No. 6, pp. 845–854.
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M.E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., et al. (2013), “Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency.”, *Cell*, United States, Vol. 155 No. 1, pp. 160–171.
- Comte, J., Maisterrena, B. and Gautheron, D.C. (1976), “Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria. Comparison with microsomes.”, *Biochimica et Biophysica Acta*, Netherlands, Vol. 419 No. 2, pp. 271–284.
- Cornille, K., Milea, D., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Zazoun, L., Guillet, V., El Achouri, G., et al. (2008), “Reversible optic neuropathy with OPA1 exon 5b mutation.”, *Annals of Neurology*, United States, Vol. 63 No. 5, pp. 667–671.
- CRANE, F.L., HATEFI, Y., LESTER, R.L. and WIDMER, C. (1957), “Isolation of a quinone from beef heart mitochondria.”, *Biochimica et Biophysica Acta*, Netherlands, Vol. 25 No. 1, pp. 220–221.
- *D’Souza, A.R. and Minczuk, M. (2018), “Mitochondrial transcription and translation: overview.”, *Essays in Biochemistry*, England, Vol. 62 No. 3, pp. 309–320.
- Davies, K.M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gomez, J.D. and Kuhlbrandt, W. (2012), “Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, Vol. 109 No. 34, pp. 13602–13607.
- Davies, K.M., Blum, T.B. and Kuhlbrandt, W. (2018), “Conserved in situ arrangement of complex I and

- III2 in mitochondrial respiratory chain supercomplexes of mammals, yeast, and plants.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, Vol. 115 No. 12, pp. 3024–3029.
- Davies, V.J., Hollins, A.J., Piechota, M.J., Yip, W., Davies, J.R., White, K.E., Nicols, P.P., et al. (2007), “Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function.”, *Human Molecular Genetics*, England, Vol. 16 No. 11, pp. 1307–1318.
- Davis, A.F., Ropp, P.A., Clayton, D.A. and Copeland, W.C. (1996), “Mitochondrial DNA polymerase gamma is expressed and translated in the absence of mitochondrial DNA maintenance and replication.”, *Nucleic Acids Research*, England, Vol. 24 No. 14, pp. 2753–2759.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., et al. (2000), “Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy.”, *Nature Genetics*, United States, Vol. 26 No. 2, pp. 207–210.
- DeVay, R.M., Dominguez-Ramirez, L., Lackner, L.L., Hoppins, S., Stahlberg, H. and Nunnari, J. (2009), “Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion.”, *The Journal of Cell Biology*, United States, Vol. 186 No. 6, pp. 793–803.
- *Distelmaier, F., Koopman, W.J.H., van den Heuvel, L.P., Rodenburg, R.J., Mayatepek, E., Willems, P.H.G.M. and Smeitink, J.A.M. (2009), “Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease.”, *Brain : A Journal of Neurology*, England, Vol. 132 No. Pt 4, pp. 833–842.
- Doda, J.N., Wright, C.T. and Clayton, D.A. (1981), “Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, Vol. 78 No. 10, pp. 6116–6120.
- Doerrier, C., Garcia-Souza, L.F., Krumschnabel, G., Wohlfarter, Y., Meszaros, A.T. and Gnaiger, E. (2018), “High-Resolution FluoRespirometry and OXPHOS Protocols for Human Cells, Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Muscle, and Isolated Mitochondria.”, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, United States, Vol. 1782, pp. 31–70.
- Del Dotto, V., Mishra, P., Vidoni, S., Fogazza, M., Maresca, A., Caporali, L., McCaffery, J.M., et al. (2017), “OPA1 Isoforms in the Hierarchical Organization of Mitochondrial Functions.”, *Cell Reports*, United States, Vol. 19 No. 12, pp. 2557–2571.
- Duvezin-Caubet, S., Jagasia, R., Wagener, J., Hofmann, S., Trifunovic, A., Hansson, A., Chomyn, A., et al. (2006), “Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology.”, *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 281 No. 49, pp. 37972–37979.

- Dzeja, P.P., Bortolon, R., Perez-Terzic, C., Holmuhamedov, E.L. and Terzic, A. (2002), "Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, Vol. 99 No. 15, pp. 10156–10161.
- Echevarria, L., Clemente, P., Hernandez-Sierra, R., Gallardo, M.E., Fernandez-Moreno, M.A. and Garesse, R. (2014), "Glutamyl-tRNAGln amidotransferase is essential for mammalian mitochondrial translation in vivo.", *The Biochemical Journal*, England, Vol. 460 No. 1, pp. 91–101.
- Efremov, R.G., Baradaran, R. and Sazanov, L.A. (2010), "The architecture of respiratory complex I.", *Nature*, England, Vol. 465 No. 7297, pp. 441–445.
- Efremov, R.G. and Sazanov, L.A. (2011), "Structure of the membrane domain of respiratory complex I.", *Nature*, England, Vol. 476 No. 7361, pp. 414–420.
- Egner, A., Jakobs, S. and Hell, S.W. (2002), "Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, Vol. 99 No. 6, pp. 3370–3375.
- Ehses, S., Raschke, I., Mancuso, G., Bernacchia, A., Geimer, S., Tondera, D., Martinou, J.-C., et al. (2009), "Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1.", *The Journal of Cell Biology*, United States, Vol. 187 No. 7, pp. 1023–1036.
- Eisner, V., Lenaers, G. and Hajnoczky, G. (2014), "Mitochondrial fusion is frequent in skeletal muscle and supports excitation-contraction coupling.", *The Journal of Cell Biology*, United States, Vol. 205 No. 2, pp. 179–195.
- *El-Hattab, A.W., Craigen, W.J. and Scaglia, F. (2017), "Mitochondrial DNA maintenance defects", *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, Elsevier B.V., Vol. 1863 No. 6, pp. 1539–1555.
- *El-Hattab, A.W. and Scaglia, F. (2016), "Mitochondrial cytopathies", *Cell Calcium*, Elsevier Ltd, Netherlands, Vol. 60 No. 3, pp. 199–206.
- Elachouri, G., Vidoni, S., Zanna, C., Pattyn, A., Boukhaddaoui, H., Gaget, K., Yu-Wai-Man, P., et al. (2011), "OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution", *Genome Research*, Vol. 21 No. 1, pp. 12–20.
- Elo, J.M., Yadavalli, S.S., Euro, L., Isohanni, P., Gotz, A., Carroll, C.J., Valanne, L., et al. (2012), "Mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase mutations underlie fatal infantile Alpers encephalopathy.", *Human Molecular Genetics*, England, Vol. 21 No. 20, pp. 4521–4529.
- *Enriquez, J.A. (2016), "Supramolecular Organization of Respiratory Complexes.", *Annual Review of Physiology*, United States, Vol. 78, pp. 533–561.

- Enriquez, J.A., Cabezas-Herrera, J., Bayona-Bafaluy, M.P. and Attardi, G. (2000), "Very rare complementation between mitochondria carrying different mitochondrial DNA mutations points to intrinsic genetic autonomy of the organelles in cultured human cells.", *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 275 No. 15, pp. 11207–11215.
- Enriquez, J.A. and Lenaz, G. (2014), "Coenzyme q and the respiratory chain: coenzyme q pool and mitochondrial supercomplexes.", *Molecular Syndromology*, Switzerland, Vol. 5 No. 3–4, pp. 119–140.
- Estaquier, J. and Arnoult, D. (2007), "Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis.", *Cell Death and Differentiation*, England, Vol. 14 No. 6, pp. 1086–1094.
- Euro, L., Farnum, G.A., Palin, E., Suomalainen, A. and Kaguni, L.S. (2011), "Clustering of Alpers disease mutations and catalytic defects in biochemical variants reveal new features of molecular mechanism of the human mitochondrial replicase, Pol gamma.", *Nucleic Acids Research*, England, Vol. 39 No. 21, pp. 9072–9084.
- Faure, E., Delaye, L., Tribolo, S., Levasseur, A., Seligmann, H. and Barthelemy, R.-M. (2011), "Probable presence of an ubiquitous cryptic mitochondrial gene on the antisense strand of the cytochrome oxidase I gene.", *Biology Direct*, England, Vol. 6, p. 56.
- Ferre, M., Caignard, A., Milea, D., Leruez, S., Cassereau, J., Chevrollier, A., Amati-Bonneau, P., et al. (2015), "Improved locus-specific database for OPA1 mutations allows inclusion of advanced clinical data.", *Human Mutation*, United States, Vol. 36 No. 1, pp. 20–25.
- Ferreira-da-Silva, A., Valacca, C., Rios, E., Populo, H., Soares, P., Sobrinho-Simoes, M., Scorrano, L., et al. (2015), "Mitochondrial dynamics protein Drp1 is overexpressed in oncocytic thyroid tumors and regulates cancer cell migration.", *PloS One*, United States, Vol. 10 No. 3, p. e0122308.
- Fiedorczuk, K., Letts, J.A., Degliesposti, G., Kaszuba, K., Skehel, M. and Sazanov, L.A. (2016), "Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I.", *Nature*, England, Vol. 538 No. 7625, pp. 406–410.
- Fiedorczuk, K. and Sazanov, L.A. (2018), "Mammalian Mitochondrial Complex I Structure and Disease-Causing Mutations.", *Trends in Cell Biology*, England, Vol. 28 No. 10, pp. 835–867.
- Fiermonte, G., Palmieri, L., Dolce, V., Lasorsa, F.M., Palmieri, F., Runswick, M.J. and Walker, J.E. (1998), "The sequence, bacterial expression, and functional reconstitution of the rat mitochondrial dicarboxylate transporter cloned via distant homologs in yeast and *Caenorhabditis elegans*.", *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 273 No. 38, pp. 24754–24759.
- Foury, F. and Vanderstraeten, S. (1992), "Yeast mitochondrial DNA mutators with deficient proofreading exonucleolytic activity.", *The EMBO Journal*, England, Vol. 11 No. 7, pp. 2717–

2726.

- *Frazier, A.E., Thorburn, D.R. and Compton, A.G. (2019), "Mitochondrial energy generation disorders: genes, mechanisms, and clues to pathology.", *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 294 No. 14, pp. 5386–5395.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G. V, Rudka, T., Bartoli, D., et al. (2006), "OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion.", *Cell*, United States, Vol. 126 No. 1, pp. 177–189.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J. and Voeltz, G.K. (2011), "ER tubules mark sites of mitochondrial division.", *Science (New York, N.Y.)*, United States, Vol. 334 No. 6054, pp. 358–362.
- Fujioka, H., Tandler, B. and Hoppel, C.L. (2012), "Mitochondrial division in rat cardiomyocytes: an electron microscope study.", *Anatomical Record (Hoboken, N.J. : 2007)*, United States, Vol. 295 No. 9, pp. 1455–1461.
- Fulop, L., Rajki, A., Maka, E., Molnar, M.J. and Spat, A. (2015), "Mitochondrial Ca²⁺ uptake correlates with the severity of the symptoms in autosomal dominant optic atrophy.", *Cell Calcium*, Netherlands, Vol. 57 No. 1, pp. 49–55.
- Fuste, J.M., Wanrooij, S., Jemt, E., Granycome, C.E., Cluett, T.J., Shi, Y., Atanassova, N., et al. (2010), "Mitochondrial RNA polymerase is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication.", *Molecular Cell*, United States, Vol. 37 No. 1, pp. 67–78.
- Garg, P., Stith, C.M., Sabouri, N., Johansson, E. and Burgers, P.M. (2004), "Idling by DNA polymerase delta maintains a ligatable nick during lagging-strand DNA replication.", *Genes & Development*, United States, Vol. 18 No. 22, pp. 2764–2773.
- Gaur, R., Grasso, D., Datta, P.P., Krishna, P.D. V, Das, G., Spencer, A., Agrawal, R.K., et al. (2008), "A single mammalian mitochondrial translation initiation factor functionally replaces two bacterial factors.", *Molecular Cell*, United States, Vol. 29 No. 2, pp. 180–190.
- Gilkerson, R.W., Selker, J.M.L. and Capaldi, R.A. (2003), "The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation.", *FEBS Letters*, England, Vol. 546 No. 2–3, pp. 355–358.
- Gloor, J.W., Balakrishnan, L., Campbell, J.L. and Bambara, R.A. (2012), "Biochemical analyses indicate that binding and cleavage specificities define the ordered processing of human Okazaki fragments by Dna2 and FEN1.", *Nucleic Acids Research*, England, Vol. 40 No. 14, pp. 6774–6786.
- Glytsou, C., Calvo, E., Cogliati, S., Mehrotra, A., Anastasia, I., Rigoni, G., Raimondi, A., et al. (2016), "Optic Atrophy 1 Is Epistatic to the Core MICOS Component MIC60 in Mitochondrial Cristae Shape Control.", *Cell Reports*, United States, Vol. 17 No. 11, pp. 3024–3034.
- *Gnaiger, E. (2007), "Mitochondrial pathways and respiratory control", *An Introduction to OXPHOS*

Analysis. 4th Ed. Mitochondr Physiol Network, Vol. 19, p. 80.

- Van Goethem, G., Dermaut, B., Löfgren, A., Martin, J.J. and Van Broeckhoven, C. (2001), "Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions", *Nature Genetics*, Vol. 28 No. 3, pp. 211–212.
- Gomes, L.C., Di Benedetto, G. and Scorrano, L. (2011), "During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability.", *Nature Cell Biology*, England, Vol. 13 No. 5, pp. 589–598.
- Goo, H.-G., Rhim, H. and Kang, S. (2014), "HtrA2/Omi influences the stability of LON protease 1 and prohibitin, proteins involved in mitochondrial homeostasis.", *Experimental Cell Research*, United States, Vol. 328 No. 2, pp. 456–465.
- *Gorman, G.S., Chinnery, P.F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., et al. (2016), "Mitochondrial diseases.", *Nature Reviews. Disease Primers*, England, Vol. 2, p. 16080.
- Gorman, G.S., Schaefer, A.M., Ng, Y., Gomez, N., Blakely, E.L., Alston, C.L., Feeney, C., et al. (2015), "Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease.", *Annals of Neurology*, United States, Vol. 77 No. 5, pp. 753–759.
- Greber, B.J., Bieri, P., Leibundgut, M., Leitner, A., Aebersold, R., Boehringer, D. and Ban, N. (2015), "Ribosome. The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial ribosome.", *Science (New York, N.Y.)*, United States, Vol. 348 No. 6232, pp. 303–308.
- Greco, M., Villani, G., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Papa, S. and Attardi, G. (2003), "Marked aging-related decline in efficiency of oxidative phosphorylation in human skin fibroblasts.", *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, United States, Vol. 17 No. 12, pp. 1706–1708.
- Griparic, L., van der Wel, N.N., Orozco, I.J., Peters, P.J. and van der Bliek, A.M. (2004), "Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria.", *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 279 No. 18, pp. 18792–18798.
- Guillery, O., Malka, F., Frachon, P., Milea, D., Rojo, M. and Lombes, A. (2008), "Modulation of mitochondrial morphology by bioenergetics defects in primary human fibroblasts.", *Neuromuscular Disorders : NMD*, England, Vol. 18 No. 4, pp. 319–330.
- *Guo, M., Yang, X.-L. and Schimmel, P. (2010), "New functions of aminoacyl-tRNA synthetases beyond translation.", *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, England, September.
- Haack, T.B., Haberberger, B., Frisch, E.-M., Wieland, T., Iuso, A., Gorza, M., Strecker, V., et al. (2012), "Molecular diagnosis in mitochondrial complex I deficiency using exome sequencing.", *Journal of Medical Genetics*, England, Vol. 49 No. 4, pp. 277–283.

- Hackenbrock, C.R., Chazotte, B. and Gupte, S.S. (1986), "The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport.", *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, United States, Vol. 18 No. 5, pp. 331–368.
- Hales, K.G. and Fuller, M.T. (1997), "Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase.", *Cell*, United States, Vol. 90 No. 1, pp. 121–129.
- Hall, R.K., Sladek, F.M. and Granner, D.K. (1995), "The orphan receptors COUP-TF and HNF-4 serve as accessory factors required for induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by glucocorticoids.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, Vol. 92 No. 2, pp. 412–416.
- Hamaoka, T., Iwane, H., Shimomitsu, T., Katsumura, T., Murase, N., Nishio, S., Osada, T., et al. (1996), "Noninvasive measures of oxidative metabolism on working human muscles by near-infrared spectroscopy.", *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, United States, Vol. 81 No. 3, pp. 1410–1417.
- Hammarsund, M., Wilson, W., Corcoran, M., Merup, M., Einhorn, S., Grandner, D. and Sangfelt, O. (2001), "Identification and characterization of two novel human mitochondrial elongation factor genes, hEFG2 and hEFG1, phylogenetically conserved through evolution.", *Human Genetics*, Germany, Vol. 109 No. 5, pp. 542–550.
- Hance, N., Ekstrand, M.I. and Trifunovic, A. (2005), "Mitochondrial DNA polymerase gamma is essential for mammalian embryogenesis.", *Human Molecular Genetics*, England, Vol. 14 No. 13, pp. 1775–1783.
- Hartmannova, H., Piherova, L., Tauchmannova, K., Kidd, K., Acott, P.D., Crocker, J.F.S., Oussedik, Y., et al. (2016), "Acadian variant of Fanconi syndrome is caused by mitochondrial respiratory chain complex I deficiency due to a non-coding mutation in complex I assembly factor NDUFAF6.", *Human Molecular Genetics*, England, Vol. 25 No. 18, pp. 4062–4079.
- Hebbar, M., Girisha, K.M., Srivastava, A., Bielas, S. and Shukla, A. (2017), "Homozygous c.359del variant in MGME1 is associated with early onset cerebellar ataxia.", *European Journal of Medical Genetics*, Netherlands, Vol. 60 No. 10, pp. 533–535.
- Hensen, F., Cansiz, S., Gerhold, J.M. and Spelbrink, J.N. (2014), "To be or not to be a nucleoid protein: A comparison of mass-spectrometry based approaches in the identification of potential mtDNA-nucleoid associated proteins", *Biochimie*, Elsevier Masson SAS, Vol. 100 No. 1, pp. 219–226.
- Herbers, E., Kekalainen, N.J., Hangan, A., Pohjoismaki, J.L. and Goffart, S. (2019), "Tissue specific differences in mitochondrial DNA maintenance and expression.", *Mitochondrion*, Netherlands, Vol. 44, pp. 85–92.
- Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J. and Shaw, J.M. (1998), "Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p.", *The Journal of Cell*

- Biology*, United States, Vol. 143 No. 2, pp. 359–373.
- Holmes, J.B., Akman, G., Wood, S.R., Sakhuja, K., Cerritelli, S.M., Moss, C., Bowmaker, M.R., et al. (2015), “Primer retention owing to the absence of RNase H1 is catastrophic for mitochondrial DNA replication.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, Vol. 112 No. 30, pp. 9334–9339.
- Holt, I.J., Lorimer, H.E. and Jacobs, H.T. (2000), “Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA.”, *Cell*, United States, Vol. 100 No. 5, pp. 515–524.
- Holzmann, J., Frank, P., Loffler, E., Bennett, K.L., Gerner, C. and Rossmannith, W. (2008), “RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme.”, *Cell*, United States, Vol. 135 No. 3, pp. 462–474.
- Huang, X., Zhou, X., Hu, X., Joshi, A.S., Guo, X., Zhu, Y., Chen, Q., et al. (2017), “Sequences flanking the transmembrane segments facilitate mitochondrial localization and membrane fusion by mitofusin.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, Vol. 114 No. 46, pp. E9863–E9872.
- Hudson, G., Amati-bonneau, P., Blakely, E.L., Stewart, J.D., He, L., Schaefer, A.M., Griffiths, P.G., et al. (2008), “Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia , ataxia , deafness and multiple mitochondrial DNA deletions : a novel disorder of mtDNA maintenance”, Vol. 2, available at:<https://doi.org/10.1093/brain/awm272>.
- Huemer, M., Karall, D., Schossig, A., Abdenur, J.E., Al Jasmi, F., Biagosch, C., Distelmaier, F., et al. (2015), “Clinical, morphological, biochemical, imaging and outcome parameters in 21 individuals with mitochondrial maintenance defect related to FBXL4 mutations.”, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, United States, Vol. 38 No. 5, pp. 905–914.
- Humble, M.M., Young, M.J., Foley, J.F., Pandiri, A.R., Travlos, G.S. and Copeland, W.C. (2013), “Polg2 is essential for mammalian embryogenesis and is required for mtDNA maintenance.”, *Human Molecular Genetics*, England, Vol. 22 No. 5, pp. 1017–1025.
- Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S.O., Masuda, K., Otera, H., et al. (2009), “Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice.”, *Nature Cell Biology*, England, Vol. 11 No. 8, pp. 958–966.
- Ito, J. and Braithwaite, D.K. (1991), “Compilation and alignment of DNA polymerase sequences.”, *Nucleic Acids Research*, England, Vol. 19 No. 15, pp. 4045–4057.
- Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., et al. (1998), “Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex.”, *Science (New York, N.Y.)*, United States, Vol. 281 No. 5373, pp. 64–71.
- Jain-Ghai, S., Cameron, J.M., Al Maawali, A., Blaser, S., MacKay, N., Robinson, B. and Raiman, J. (2013), “Complex II deficiency--a case report and review of the literature.”, *American Journal of*

- Medical Genetics. Part A*, United States, Vol. 161A No. 2, pp. 285–294.
- *Jay, B. (1990), “Leber’s hereditary optic neuropathy”, *Eye*, Vol. 4 No. 3, pp. vii–vii.
- Ji, W.-K., Chakrabarti, R., Fan, X., Schoenfeld, L., Strack, S. and Higgs, H.N. (2017), “Receptor-mediated Drp1 oligomerization on endoplasmic reticulum.”, *The Journal of Cell Biology*, United States, Vol. 216 No. 12, pp. 4123–4139.
- Jiang, X., Wang, J., Chang, H. and Zhou, Y. (2016), “Recombinant expression, purification and crystallographic studies of the mature form of human mitochondrial aspartate aminotransferase.”, *Bioscience Trends*, Japan, Vol. 10 No. 1, pp. 79–84.
- Jones, J.M., Datta, P., Srinivasula, S.M., Ji, W., Gupta, S., Zhang, Z., Davies, E., et al. (2003), “Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant mice.”, *Nature*, England, Vol. 425 No. 6959, pp. 721–727.
- Kamerkar, S.C., Kraus, F., Sharpe, A.J., Pucadyil, T.J. and Ryan, M.T. (2018), “Dynamamin-related protein 1 has membrane constricting and severing abilities sufficient for mitochondrial and peroxisomal fission.”, *Nature Communications*, England, Vol. 9 No. 1, p. 5239.
- Kanki, T., Nakayama, H., Sasaki, N., Takio, K., Alam, T.I., Hamasaki, N. and Kang, D. (2004), “Mitochondrial nucleoid and transcription factor A.”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, United States, Vol. 1011, pp. 61–68.
- Karnkowska, A., Vacek, V., Zubacova, Z., Treitli, S.C., Petrzalkova, R., Eme, L., Novak, L., et al. (2016), “A Eukaryote without a Mitochondrial Organelle.”, *Current Biology : CB*, England, Vol. 26 No. 10, pp. 1274–1284.
- Katajisto, P., Dohla, J., Chaffer, C.L., Pentimikko, N., Marjanovic, N., Iqbal, S., Zoncu, R., et al. (2015), “Stem cells. Asymmetric apportioning of aged mitochondria between daughter cells is required for stemness.”, *Science (New York, N.Y.)*, United States, Vol. 348 No. 6232, pp. 340–343.
- Kazak, L., Reyes, A., He, J., Wood, S.R., Brea-Calvo, G., Holen, T.T. and Holt, I.J. (2013), “A cryptic targeting signal creates a mitochondrial FEN1 isoform with tailed R-Loop binding properties.”, *PLoS One*, United States, Vol. 8 No. 5, p. e62340.
- Kedrová, K. (2014), *Dopad Izolovaného Deficitu F1FO-ATP Syntázy Na Ostatní Komplexy Oxidační Fosforylace v Kožních Fibroblastech v Závislosti Na Podmínkách Kultivace.*, Univerzita Karlova v Praze.
- Kennedy, S.R., Salk, J.J., Schmitt, M.W. and Loeb, L.A. (2013), “Ultra-sensitive sequencing reveals an age-related increase in somatic mitochondrial mutations that are inconsistent with oxidative damage.”, *PLoS Genetics*, United States, Vol. 9 No. 9, p. e1003794.
- Kieper, N., Holmström, K.M., Ciceri, D., Fiesel, F.C., Wolburg, H., Ziviani, E., Whitworth, A.J., et al. (2010), “Modulation of mitochondrial function and morphology by interaction of Omi/HtrA2 with the mitochondrial fusion factor OPA1”, *Experimental Cell Research*, Elsevier Inc., Vol. 316

No. 7, pp. 1213–1224.

- Kim, J.Y., Hwang, J.-M., Ko, H.S., Seong, M.-W., Park, B.-J. and Park, S.S. (2005), “Mitochondrial DNA content is decreased in autosomal dominant optic atrophy.”, *Neurology*, United States, Vol. 64 No. 6, pp. 966–972.
- Kirby, D.M., Thorburn, D.R., Turnbull, D.M. and Taylor, R.W. (2007), “Biochemical assays of respiratory chain complex activity.”, *Methods in Cell Biology*, United States, Vol. 80, pp. 93–119.
- KJER, P. (1959), “Infantile optic atrophy with dominant mode of inheritance: a clinical and genetic study of 19 Danish families.”, *Acta Ophthalmologica. Supplementum*, Denmark, Vol. 164 No. Supp 54, pp. 1–147.
- Knott, A.B., Perkins, G., Schwarzenbacher, R. and Bossy-Wetzell, E. (2008), “Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration.”, *Nature Reviews. Neuroscience*, England, Vol. 9 No. 7, pp. 505–518.
- Koch, J., Feichtinger, R.G., Freisinger, P., Pies, M., Schrodler, F., Iuso, A., Sperl, W., et al. (2016), “Disturbed mitochondrial and peroxisomal dynamics due to loss of MFF causes Leigh-like encephalopathy, optic atrophy and peripheral neuropathy.”, *Journal of Medical Genetics*, England, Vol. 53 No. 4, pp. 270–278.
- *Kole, A.J., Annis, R.P. and Deshmukh, M. (2013), “Mature neurons: equipped for survival.”, *Cell Death & Disease*, England, Vol. 4, p. e689.
- *Konovalova, S. and Tynismaa, H. (2013), “Mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases in human disease.”, *Molecular Genetics and Metabolism*, United States, Vol. 108 No. 4, pp. 206–211.
- Korhonen, J.A., Pham, X.H., Pellegrini, M. and Falkenberg, M. (2004), “Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro”, *The EMBO Journal*, Vol. 23 No. 12, pp. 2423–2429.
- Kornblum, C., Nicholls, T.J., Haack, T.B., Scholer, S., Peeva, V., Danhauser, K., Hallmann, K., et al. (2013), “Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease.”, *Nature Genetics*, United States, Vol. 45 No. 2, pp. 214–219.
- Korobova, F., Ramabhadran, V. and Higgs, H.N. (2013), “An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2.”, *Science (New York, N.Y.)*, United States, Vol. 339 No. 6118, pp. 464–467.
- *Krasich, R. and Copeland, W.C. (2017), “DNA polymerases in the mitochondria: A critical review of the evidence.”, *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, United States, Vol. 22, pp. 692–709.
- Krause, F., Reifschneider, N.H., Vocke, D., Seelert, H., Rexroth, S. and Dencher, N.A. (2004), “‘Respirasome’-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach.”, *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 279 No. 46, pp. 48369–48375.
- *Kuhlbrandt, W. (2015), “Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes.”,

- BMC Biology*, England, Vol. 13, p. 89.
- Kukat, C., Wurm, C.A., Spahr, H., Falkenberg, M., Larsson, N.-G. and Jakobs, S. (2011), "Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, Vol. 108 No. 33, pp. 13534–13539.
- Kuznetsov, A. V, Veksler, V., Gellerich, F.N., Saks, V., Margreiter, R. and Kunz, W.S. (2008), "Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells.", *Nature Protocols*, England, Vol. 3 No. 6, pp. 965–976.
- de Laat, P., Koene, S., van den Heuvel, L.P.W.J., Rodenburg, R.J.T., Janssen, M.C.H. and Smeitink, J.A.M. (2012), "Clinical features and heteroplasmy in blood, urine and saliva in 34 Dutch families carrying the m.3243A > G mutation.", *Journal of Inherited Metabolic Disease*, United States, Vol. 35 No. 6, pp. 1059–1069.
- Labrousse, A.M., Zappaterra, M.D., Rube, D.A. and van der Bliek, A.M. (1999), "C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane.", *Molecular Cell*, United States, Vol. 4 No. 5, pp. 815–826.
- *Lake, N.J., Compton, A.G., Rahman, S. and Thorburn, D.R. (2016), "Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes.", *Annals of Neurology*, United States, Vol. 79 No. 2, pp. 190–203.
- Lapuente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acin-Perez, R., Latorre-Pellicer, A., Colas, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., et al. (2013), "Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain.", *Science (New York, N.Y.)*, United States, Vol. 340 No. 6140, pp. 1567–1570.
- Layec, G., Bringard, A., Le Fur, Y., Vilmen, C., Micallef, J.-P., Perrey, S., Cozzone, P.J., et al. (2009), "Reproducibility assessment of metabolic variables characterizing muscle energetics in vivo: A 31P-MRS study.", *Magnetic Resonance in Medicine*, United States, Vol. 62 No. 4, pp. 840–854.
- Lee, C., Zeng, J., Drew, B.G., Sallam, T., Martin-Montalvo, A., Wan, J., Kim, S.-J., et al. (2015), "The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance.", *Cell Metabolism*, United States, Vol. 21 No. 3, pp. 443–454.
- Lee, H., Smith, S.B. and Yoon, Y. (2017), "The short variant of the mitochondrial dynamin OPA1 maintains mitochondrial energetics and cristae structure.", *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 292 No. 17, pp. 7115–7130.
- Lee, J.E., Westrate, L.M., Wu, H., Page, C. and Voeltz, G.K. (2016), "Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division.", *Nature*, England, Vol. 540 No. 7631, pp. 139–143.
- Lee, Y., Jeong, S.-Y., Karbowski, M., Smith, C.L. and Youle, R.J. (2004), "Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis.", *Molecular*

- Biology of the Cell*, United States, Vol. 15 No. 11, pp. 5001–5011.
- Legesse-Miller, A., Massol, R.H. and Kirchhausen, T. (2003), “Constriction and Dnm1p recruitment are distinct processes in mitochondrial fission.”, *Molecular Biology of the Cell*, United States, Vol. 14 No. 5, pp. 1953–1963.
- Lestienne, P. (1987), “Evidence for a direct role of the DNA polymerase gamma in the replication of the human mitochondrial DNA in vitro.”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, United States, Vol. 146 No. 3, pp. 1146–1153.
- Lewis, S.C., Uchiyama, L.F. and Nunnari, J. (2016), “ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells.”, *Science (New York, N.Y.)*, United States, Vol. 353 No. 6296, p. aaf5549.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X. (1997), “Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade”, *Cell*, Vol. 91 No. 4, pp. 479–489.
- Liao, C., Ashley, N., Diot, A., Morten, K., Phadwal, K., Williams, A., Fearnley, I., et al. (2017), “Dysregulated mitophagy and mitochondrial organization in optic atrophy due to OPA1 mutations.”, *Neurology*, United States, Vol. 88 No. 2, pp. 131–142.
- Lind, C., Sund, J. and Aqvist, J. (2013), “Codon-reading specificities of mitochondrial release factors and translation termination at non-standard stop codons.”, *Nature Communications*, England, Vol. 4, p. 2940.
- Lo, W.-S., Gardiner, E., Xu, Z., Lau, C.-F., Wang, F., Zhou, J.J., Mendlein, J.D., et al. (2014), “Human tRNA synthetase catalytic nulls with diverse functions.”, *Science (New York, N.Y.)*, United States, Vol. 345 No. 6194, pp. 328–332.
- *Locasale, J.W. (2013), “Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle.”, *Nature Reviews. Cancer*, England, Vol. 13 No. 8, pp. 572–583.
- Loeffen, J., Smeitink, J., Triepels, R., Smeets, R., Schuelke, M., Sengers, R., Trijbels, F., et al. (1998), “The first nuclear-encoded complex I mutation in a patient with Leigh syndrome.”, *American Journal of Human Genetics*, United States, Vol. 63 No. 6, pp. 1598–1608.
- Longley, M.J., Nguyen, D., Kunkel, T.A. and Copeland, W.C. (2001), “The fidelity of human DNA polymerase gamma with and without exonucleolytic proofreading and the p55 accessory subunit.”, *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 276 No. 42, pp. 38555–38562.
- Loson, O.C., Song, Z., Chen, H. and Chan, D.C. (2013), “Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission.”, *Molecular Biology of the Cell*, United States, Vol. 24 No. 5, pp. 659–667.
- Lott, M.T., Leipzig, J.N., Derbeneva, O., Xie, H.M., Chalkia, D., Sarmady, M., Procaccio, V., et al. (2013), “mtDNA Variation and Analysis Using Mitomap and Mitomaster.”, *Current Protocols in*

- Bioinformatics*, United States, Vol. 44, pp. 1.23.1-26.
- Low, H.H., Sachse, C., Amos, L.A. and Lowe, J. (2009), "Structure of a bacterial dynamin-like protein lipid tube provides a mechanism for assembly and membrane curving.", *Cell*, United States, Vol. 139 No. 7, pp. 1342–1352.
- Luo, S., Valencia, C.A., Zhang, J., Lee, N.-C., Slone, J., Gui, B., Wang, X., et al. (2018), "Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, Vol. 115 No. 51, pp. 13039–13044.
- Macao, B., Uhler, J.P., Siibak, T., Zhu, X., Shi, Y., Sheng, W., Olsson, M., et al. (2015), "The exonuclease activity of DNA polymerase gamma is required for ligation during mitochondrial DNA replication.", *Nature Communications*, England, Vol. 6, p. 7303.
- Makino, A., Suarez, J., Gawlowski, T., Han, W., Wang, H., Scott, B.T. and Dillmann, W.H. (2011), "Regulation of mitochondrial morphology and function by O-GlcNAcylation in neonatal cardiac myocytes.", *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, United States, Vol. 300 No. 6, pp. R1296-302.
- Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombes, A. and Rojo, M. (2005), "Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes.", *EMBO Reports*, England, Vol. 6 No. 9, pp. 853–859.
- Mandel, H., Saita, S., Edvardson, S., Jalas, C., Shaag, A., Goldsher, D., Vlodaysky, E., et al. (2016), "Deficiency of HTRA2/Omi is associated with infantile neurodegeneration and 3-methylglutaconic aciduria.", *Journal of Medical Genetics*, England, Vol. 53 No. 10, pp. 690–696.
- Manor, U., Bartholomew, S., Golani, G., Christenson, E., Kozlov, M., Higgs, H., Spudich, J., et al. (2015), "A mitochondria-anchored isoform of the actin-nucleating spire protein regulates mitochondrial division.", *ELife*, England, Vol. 4, available at:<https://doi.org/10.7554/eLife.08828>.
- Marina, A. Della, Schara, U., Pyle, A., Moller-Hartmann, C., Holinski-Feder, E., Abicht, A., Czermin, B., et al. (2013), "NDUFS8-related Complex I Deficiency Extends Phenotype from 'PEO Plus' to Leigh Syndrome.", *JIMD Reports*, United States, Vol. 10, pp. 17–22.
- Marková, M. (2015), *Expresa Vybraných Defektů Oxidativní Fosforylace Na Úrovni Kultivovaných Fibroblastů*, Univerzita Karlova v Praze.
- Martin-Hernandez, E., Rodriguez-Garcia, M.E., Chen, C.-A., Cotrina-Vinagre, F.J., Carnicero-Rodriguez, P., Bellusci, M., Schaaf, C.P., et al. (2018), "Mitochondrial involvement in a Bosch-Boonstra-Schaaf optic atrophy syndrome patient with a novel de novo NR2F1 gene mutation.", *Journal of Human Genetics*, England, Vol. 63 No. 4, pp. 525–528.
- Mastorodemos, V., Zaganas, I., Spanaki, C., Bessa, M. and Plaitakis, A. (2005), "Molecular basis of human glutamate dehydrogenase regulation under changing energy demands.", *Journal of*

- Neuroscience Research*, United States, Vol. 79 No. 1–2, pp. 65–73.
- Mattie, S., Riemer, J., Wideman, J.G. and McBride, H.M. (2018), “A new mitofusin topology places the redox-regulated C terminus in the mitochondrial intermembrane space.”, *The Journal of Cell Biology*, United States, Vol. 217 No. 2, pp. 507–515.
- Maximov, V., Martynenko, A., Hunsmann, G. and Tarantul, V. (2002), “Mitochondrial 16S rRNA gene encodes a functional peptide, a potential drug for Alzheimer’s disease and target for cancer therapy.”, *Medical Hypotheses*, United States, Vol. 59 No. 6, pp. 670–673.
- McCormick, A.L., Roback, L. and Mocarski, E.S. (2008), “HtrA2/Omi terminates cytomegalovirus infection and is controlled by the viral mitochondrial inhibitor of apoptosis (vMIA).”, *PLoS Pathogens*, United States, Vol. 4 No. 5, p. e1000063.
- Miralles Fuste, J., Shi, Y., Wanrooij, S., Zhu, X., Jemt, E., Persson, O., Sabouri, N., et al. (2014), “In vivo occupancy of mitochondrial single-stranded DNA binding protein supports the strand displacement mode of DNA replication.”, *PLoS Genetics*, United States, Vol. 10 No. 12, p. e1004832.
- Misaka, T., Miyashita, T. and Kubo, Y. (2002), “Primary structure of a dynamin-related mouse mitochondrial GTPase and its distribution in brain, subcellular localization, and effect on mitochondrial morphology.”, *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 277 No. 18, pp. 15834–15842.
- Mishra, P., Carelli, V., Manfredi, G. and Chan, D.C. (2014), “Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation.”, *Cell Metabolism*, United States, Vol. 19 No. 4, pp. 630–641.
- Mitchell, P. (1961), “Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism.”, *Nature*, England, Vol. 191, pp. 144–148.
- Mitchell, P. (1976), “Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems.”, *Journal of Theoretical Biology*, England, Vol. 62 No. 2, pp. 327–367.
- *Monaghan, R.M. and Whitmarsh, A.J. (2015), “Mitochondrial Proteins Moonlighting in the Nucleus.”, *Trends in Biochemical Sciences*, England, Vol. 40 No. 12, pp. 728–735.
- *Monne, M., Miniero, D.V., Iacobazzi, V., Bisaccia, F. and Fiermonte, G. (2013), “The mitochondrial oxoglutarate carrier: from identification to mechanism.”, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, United States, Vol. 45 No. 1–2, pp. 1–13.
- Montemayor, C., Montemayor, O.A., Ridgeway, A., Lin, F., Wheeler, D.A., Pletcher, S.D. and Pereira, F.A. (2010), “Genome-wide analysis of binding sites and direct target genes of the orphan nuclear receptor NR2F1/COUP-TFI.”, *PLoS One*, United States, Vol. 5 No. 1, p. e8910.
- Moraes, C.T., Ricci, E., Bonilla, E., DiMauro, S. and Schon, E.A. (1992), “The mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike

- episodes (MELAS): genetic, biochemical, and morphological correlations in skeletal muscle.”, *American Journal of Human Genetics*, United States, Vol. 50 No. 5, pp. 934–949.
- Mordaunt, D.A., Jolley, A., Balasubramaniam, S., Thorburn, D.R., Mountford, H.S., Compton, A.G., Nicholl, J., et al. (2015), “Phenotypic variation of TTC19-deficient mitochondrial complex III deficiency: a case report and literature review.”, *American Journal of Medical Genetics. Part A*, United States, Vol. 167 No. 6, pp. 1330–1336.
- Nagaike, T., Suzuki, T., Tomari, Y., Takemoto-Hori, C., Negayama, F., Watanabe, K. and Ueda, T. (2001), “Identification and characterization of mammalian mitochondrial tRNA nucleotidyltransferases.”, *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 276 No. 43, pp. 40041–40049.
- NASS, M.M. and NASS, S. (1963), “INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS. I. FIXATION AND ELECTRON STAINING REACTIONS.”, *The Journal of Cell Biology*, United States, Vol. 19, pp. 593–611.
- *Nicholls, D.G. (2013), *Bioenergetics*, Academic Press.
- Nicholls, T.J., Zsurka, G., Peeva, V., Scholer, S., Szczesny, R.J., Cysewski, D., Reyes, A., et al. (2014), “Linear mtDNA fragments and unusual mtDNA rearrangements associated with pathological deficiency of MGME1 exonuclease.”, *Human Molecular Genetics*, England, Vol. 23 No. 23, pp. 6147–6162.
- Nochez, Y., Arsene, S., Gueguen, N., Chevrollier, A., Ferre, M., Guillet, V., Desquiret, V., et al. (2009), “Acute and late-onset optic atrophy due to a novel OPA1 mutation leading to a mitochondrial coupling defect.”, *Molecular Vision*, United States, Vol. 15, pp. 598–608.
- Nowotny, M., Cerritelli, S.M., Ghirlando, R., Gaidamakov, S.A., Crouch, R.J. and Yang, W. (2008), “Specific recognition of RNA/DNA hybrid and enhancement of human RNase H1 activity by HBD.”, *The EMBO Journal*, England, Vol. 27 No. 7, pp. 1172–1181.
- Oettinghaus, B., Schulz, J.M., Restelli, L.M., Licci, M., Savoia, C., Schmidt, A., Schmitt, K., et al. (2016), “Synaptic dysfunction, memory deficits and hippocampal atrophy due to ablation of mitochondrial fission in adult forebrain neurons.”, *Cell Death and Differentiation*, England, Vol. 23 No. 1, pp. 18–28.
- Okatsu, K., Koyano, F., Kimura, M., Kosako, H., Saeki, Y., Tanaka, K. and Matsuda, N. (2015), “Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor.”, *The Journal of Cell Biology*, United States, Vol. 209 No. 1, pp. 111–128.
- Olahova, M., Thompson, K., Hardy, S.A., Barbosa, I.A., Besse, A., Anagnostou, M.-E., White, K., et al. (2017), “Pathogenic variants in HTRA2 cause an early-onset mitochondrial syndrome associated with 3-methylglutaconic aciduria.”, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, United States, Vol. 40 No. 1, pp. 121–130.

- Olichon, A., Elachouri, G., Baricault, L., Delettre, C., Belenguer, P. and Lenaers, G. (2007), "OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis.", *Cell Death and Differentiation*, England, Vol. 14 No. 4, pp. 682–692.
- Olichon, A., Landes, T., Arnaune-Pelloquin, L., Emorine, L.J., Mils, V., Guichet, A., Delettre, C., et al. (2007), "Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: relevance to ADOA pathogenesis.", *Journal of Cellular Physiology*, United States, Vol. 211 No. 2, pp. 423–430.
- Osellame, L.D., Singh, A.P., Stroud, D.A., Palmer, C.S., Stojanovski, D., Ramachandran, R. and Ryan, M.T. (2016), "Cooperative and independent roles of the Drp1 adaptors Mff, MiD49 and MiD51 in mitochondrial fission.", *Journal of Cell Science*, England, Vol. 129 No. 11, pp. 2170–2181.
- *Ost, M., Doerrier, C., Gama-Perez, P. and Moreno-Gomez, S. (2018), "Analysis of mitochondrial respiratory function in tissue biopsies and blood cells", *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, Vol. 21 No. 5, pp. 336–342.
- Palmer, C.S., Elgass, K.D., Parton, R.G., Osellame, L.D., Stojanovski, D. and Ryan, M.T. (2013), "Adaptor proteins MiD49 and MiD51 can act independently of Mff and Fis1 in Drp1 recruitment and are specific for mitochondrial fission.", *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 288 No. 38, pp. 27584–27593.
- Palmer, C.S., Osellame, L.D., Laine, D., Koutsopoulos, O.S., Frazier, A.E. and Ryan, M.T. (2011), "MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery.", *EMBO Reports*, England, Vol. 12 No. 6, pp. 565–573.
- Papa, S., Capitanio, N., Capitanio, G., De Nitto, E. and Minuto, M. (1991), "The cytochrome chain of mitochondria exhibits variable H⁺/e⁻ stoichiometry.", *FEBS Letters*, England, Vol. 288 No. 1–2, pp. 183–186.
- *Papa, S., Martino, P.L., Capitanio, G., Gaballo, A., De Rasmio, D., Signorile, A. and Petruzzella, V. (2012), "The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria.", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, United States, Vol. 942, pp. 3–37.
- Parisot, J., Flore, G., Bertacchi, M. and Studer, M. (2017), "COUP-TFI mitotically regulates production and migration of dentate granule cells and modulates hippocampal Cxcr4 expression.", *Development (Cambridge, England)*, England, Vol. 144 No. 11, pp. 2045–2058.
- Patten, D.A., Wong, J., Khacho, M., Soubannier, V., Mailloux, R.J., Pilon-Larose, K., MacLaurin, J.G., et al. (2014), "OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand.", *The EMBO Journal*, England, Vol. 33 No. 22, pp. 2676–2691.
- Pereira, F.A., Qiu, Y., Tsai, M.J. and Tsai, S.Y. (1995), "Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF): expression during mouse embryogenesis.", *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, England, Vol. 53 No. 1–6, pp. 503–508.

- *Picard, M., Wallace, D.C. and Burrelle, Y. (2016), "The rise of mitochondria in medicine.", *Mitochondrion*, Netherlands, Vol. 30, pp. 105–116.
- Pickrell, A.M. and Youle, R.J. (2015), "The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease.", *Neuron*, United States, Vol. 85 No. 2, pp. 257–273.
- Pohjoismaki, J.L.O., Goffart, S., Tynismaa, H., Willcox, S., Ide, T., Kang, D., Suomalainen, A., et al. (2009), "Human heart mitochondrial DNA is organized in complex catenated networks containing abundant four-way junctions and replication forks.", *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 284 No. 32, pp. 21446–21457.
- Pohjoismaki, J.L.O., Holmes, J.B., Wood, S.R., Yang, M.-Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Bailey, L.J., et al. (2010), "Mammalian mitochondrial DNA replication intermediates are essentially duplex but contain extensive tracts of RNA/DNA hybrid.", *Journal of Molecular Biology*, England, Vol. 397 No. 5, pp. 1144–1155.
- Posse, V. and Gustafsson, C.M. (2017), "Human Mitochondrial Transcription Factor B2 Is Required for Promoter Melting during Initiation of Transcription.", *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 292 No. 7, pp. 2637–2645.
- Posse, V., Shahzad, S., Falkenberg, M., Hallberg, B.M. and Gustafsson, C.M. (2015), "TEFM is a potent stimulator of mitochondrial transcription elongation in vitro.", *Nucleic Acids Research*, England, Vol. 43 No. 5, pp. 2615–2624.
- Preiser, P.R., Wilson, R.J., Moore, P.W., McCreedy, S., Hajibagheri, M.A., Blight, K.J., Strath, M., et al. (1996), "Recombination associated with replication of malarial mitochondrial DNA.", *The EMBO Journal*, England, Vol. 15 No. 3, pp. 684–693.
- Pyle, A., Hudson, G., Wilson, I.J., Coxhead, J., Smertenko, T., Herbert, M., Santibanez-Koref, M., et al. (2015), "Extreme-Depth Re-sequencing of Mitochondrial DNA Finds No Evidence of Paternal Transmission in Humans.", *PLoS Genetics*, United States, Vol. 11 No. 5, p. e1005040.
- Qiu, Y., Krishnan, V., Zeng, Z., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Gibson, L., Yang-Feng, T., et al. (1995), "Isolation, characterization, and chromosomal localization of mouse and human COUP-TF I and II genes.", *Genomics*, United States, Vol. 29 No. 1, pp. 240–246.
- Rambold, A.S., Kostecky, B. and Lippincott-Schwartz, J. (2011), "Together we are stronger: fusion protects mitochondria from autophagosomal degradation.", *Autophagy*, United States, Vol. 7 No. 12, pp. 1568–1569.
- Rehklau, K., Hoffmann, L., Gurniak, C.B., Ott, M., Witke, W., Scorrano, L., Culmsee, C., et al. (2017), "Cofilin1-dependent actin dynamics control DRP1-mediated mitochondrial fission.", *Cell Death & Disease*, England, Vol. 8 No. 10, p. e3063.
- Reyes, A., Kazak, L., Wood, S.R., Yasukawa, T., Jacobs, H.T. and Holt, I.J. (2013), "Mitochondrial DNA replication proceeds via a 'bootlace' mechanism involving the incorporation of processed

- transcripts.”, *Nucleic Acids Research*, England, Vol. 41 No. 11, pp. 5837–5850.
- Ringel, R., Sologub, M., Morozov, Y.I., Litonin, D., Cramer, P. and Temiakov, D. (2011), “Structure of human mitochondrial RNA polymerase.”, *Nature*, England, Vol. 478 No. 7368, pp. 269–273.
- Robberson, D.L., Kasamatsu, H. and Vinograd, J. (1972), “Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediates in mouse L cells.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, Vol. 69 No. 3, pp. 737–741.
- *Robinson, B.H. (1996), “Use of fibroblast and lymphoblast cultures for detection of respiratory chain defects.”, *Methods in Enzymology*, United States, Vol. 264, pp. 454–464.
- Robinson, B.H., Petrova-Benedict, R., Buncic, J.R. and Wallace, D.C. (1992), “Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts.”, *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, United States, Vol. 48 No. 2, pp. 122–126.
- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D. and Lombes, A. (2002), “Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo.”, *Journal of Cell Science*, England, Vol. 115 No. Pt 8, pp. 1663–1674.
- Rolfe, D.F., Newman, J.M., Buckingham, J.A., Clark, M.G. and Brand, M.D. (1999), “Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR.”, *The American Journal of Physiology*, United States, Vol. 276 No. 3, pp. C692-9.
- Ronnback, C., Milea, D. and Larsen, M. (2013), “Imaging of the macula indicates early completion of structural deficit in autosomal-dominant optic atrophy.”, *Ophthalmology*, United States, Vol. 120 No. 12, pp. 2672–2677.
- Rorbach, J., Gao, F., Powell, C.A., D’Souza, A., Lightowlers, R.N., Minczuk, M. and Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. (2016), “Human mitochondrial ribosomes can switch their structural RNA composition.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, Vol. 113 No. 43, pp. 12198–12201.
- Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J. and Capaldi, R.A. (2004), “Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells.”, *Cancer Research*, United States, Vol. 64 No. 3, pp. 985–993.
- Rouzier, C., Bannwarth, S., Chausseot, A., Chevrollier, A., Verschueren, A., Bonello-Palot, N., Fragaki, K., et al. (2012), “The MFN2 gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy ‘plus’ phenotype.”, *Brain : A Journal of Neurology*, England, Vol. 135 No. Pt 1, pp. 23–34.
- Sallevelt, S.C.E.H., de Die-Smulders, C.E.M., Hendrickx, A.T.M., Hellebrekers, D.M.E.I., de Coo, I.F.M., Alston, C.L., Knowles, C., et al. (2017), “De novo mtDNA point mutations are common and have a low recurrence risk.”, *Journal of Medical Genetics*, England, Vol. 54 No. 2, pp. 73–83.
- Samant, S.A., Zhang, H.J., Hong, Z., Pillai, V.B., Sundaesan, N.R., Wolfgeher, D., Archer, S.L., et al.

- (2014), "SIRT3 deacetylates and activates OPA1 to regulate mitochondrial dynamics during stress.", *Molecular and Cellular Biology*, United States, Vol. 34 No. 5, pp. 807–819.
- Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., et al. (1999), "Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F₀F₁): direct observation.", *Science (New York, N.Y.)*, United States, Vol. 286 No. 5445, pp. 1722–1724.
- Sarraf, S.A., Raman, M., Guarani-Pereira, V., Sowa, M.E., Huttlin, E.L., Gygi, S.P. and Harper, J.W. (2013), "Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization.", *Nature*, England, Vol. 496 No. 7445, pp. 372–376.
- Schagger, H., de Coo, R., Bauer, M.F., Hofmann, S., Godinot, C. and Brandt, U. (2004), "Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I.", *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 279 No. 35, pp. 36349–36353.
- Schagger, H. and Pfeiffer, K. (2000), "Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria.", *The EMBO Journal*, England, Vol. 19 No. 8, pp. 1777–1783.
- SCHATZ, G. (1963), "THE ISOLATION OF POSSIBLE MITOCHONDRIAL PRECURSOR STRUCTURES FROM AEROBICALLY GROWN BAKER'S YEAST.", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, United States, Vol. 12, pp. 448–451.
- Scheper, G.C., van der Klok, T., van Anandel, R.J., van Berkel, C.G.M., Sissler, M., Smet, J., Muravina, T.I., et al. (2007), "Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation.", *Nature Genetics*, United States, Vol. 39 No. 4, pp. 534–539.
- Sciacco, M., Bonilla, E., Schon, E.A., DiMauro, S. and Moraes, C.T. (1994), "Distribution of wild-type and common deletion forms of mtDNA in normal and respiration-deficient muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy.", *Human Molecular Genetics*, England, Vol. 3 No. 1, pp. 13–19.
- Seong, Y.-M., Choi, J.-Y., Park, H.-J., Kim, K.-J., Ahn, S.-G., Seong, G.-H., Kim, I.-K., et al. (2004), "Autocatalytic processing of HtrA2/Omi is essential for induction of caspase-dependent cell death through antagonizing XIAP.", *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 279 No. 36, pp. 37588–37596.
- Sesaki, H. and Jensen, R.E. (2004), "Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion.", *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 279 No. 27, pp. 28298–28303.
- Shaham, O., Slate, N.G., Goldberger, O., Xu, Q., Ramanathan, A., Souza, A.L., Clish, C.B., et al. (2010), "A plasma signature of human mitochondrial disease revealed through metabolic profiling of spent media from cultured muscle cells.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, Vol. 107 No. 4, pp. 1571–1575.
- Shen, Q., Yamano, K., Head, B.P., Kawajiri, S., Cheung, J.T.M., Wang, C., Cho, J.-H., et al. (2014),

- “Mutations in Fis1 disrupt orderly disposal of defective mitochondria.”, *Molecular Biology of the Cell*, United States, Vol. 25 No. 1, pp. 145–159.
- Sheng, Z.-H. (2014), “Mitochondrial trafficking and anchoring in neurons: New insight and implications.”, *The Journal of Cell Biology*, United States, Vol. 204 No. 7, pp. 1087–1098.
- *Sissler, M., Gonzalez-Serrano, L.E. and Westhof, E. (2017), “Recent Advances in Mitochondrial Aminoacyl-tRNA Synthetases and Disease.”, *Trends in Molecular Medicine*, England, Vol. 23 No. 8, pp. 693–708.
- Skldadal, D., Halliday, J. and Thorburn, D.R. (2003), “Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children.”, *Brain : A Journal of Neurology*, England, Vol. 126 No. Pt 8, pp. 1905–1912.
- Skulachev, V.P. (2001), “Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables.”, *Trends in Biochemical Sciences*, England, Vol. 26 No. 1, pp. 23–29.
- Slupe, A.M., Merrill, R.A., Flippo, K.H., Lobas, M.A., Houtman, J.C.D. and Strack, S. (2013), “A calcineurin docking motif (LXVP) in dynamin-related protein 1 contributes to mitochondrial fragmentation and ischemic neuronal injury.”, *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 288 No. 17, pp. 12353–12365.
- Smirnov, D.A., Hou, S. and Ricciardi, R.P. (2000), “Association of histone deacetylase with COUP-TF in tumorigenic Ad12-transformed cells and its potential role in shut-off of MHC class I transcription.”, *Virology*, United States, Vol. 268 No. 2, pp. 319–328.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L. and van der Bliek, A.M. (2001), “Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells.”, *Molecular Biology of the Cell*, United States, Vol. 12 No. 8, pp. 2245–2256.
- Sofou, K., Kollberg, G., Holmstrom, M., Davila, M., Darin, N., Gustafsson, C.M., Holme, E., et al. (2015), “Whole exome sequencing reveals mutations in NARS2 and PARS2, encoding the mitochondrial asparaginyl-tRNA synthetase and prolyl-tRNA synthetase, in patients with Alpers syndrome.”, *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, United States, Vol. 3 No. 1, pp. 59–68.
- Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J.M., Frey, T.G. and Chan, D.C. (2009), “Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion.”, *Molecular Biology of the Cell*, United States, Vol. 20 No. 15, pp. 3525–3532.
- Spelbrink, J.N., Toivonen, J.M., Hakkaart, G.A., Kurkela, J.M., Cooper, H.M., Lehtinen, S.K., Lecrenier, N., et al. (2000), “In vivo functional analysis of the human mitochondrial DNA polymerase POLG expressed in cultured human cells.”, *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 275 No. 32, pp. 24818–24828.
- Spencer, A.C. and Spremulli, L.L. (2005), “The interaction of mitochondrial translational initiation factor 2 with the small ribosomal subunit.”, *Biochimica et Biophysica Acta*, Netherlands, Vol.

1750 No. 1, pp. 69–81.

- Spiegel, R., Khayat, M., Shalev, S.A., Horovitz, Y., Mandel, H., Hershkovitz, E., Barghuti, F., et al. (2011), "TMEM70 mutations are a common cause of nuclear encoded ATP synthase assembly defect: further delineation of a new syndrome.", *Journal of Medical Genetics*, England, Vol. 48 No. 3, pp. 177–182.
- Spiegel, R., Saada, A., Flannery, P.J., Burte, F., Soiferman, D., Khayat, M., Eisner, V., et al. (2016), "Fatal infantile mitochondrial encephalomyopathy, hypertrophic cardiomyopathy and optic atrophy associated with a homozygous OPA1 mutation.", *Journal of Medical Genetics*, England, Vol. 53 No. 2, pp. 127–131.
- Steenweg, M.E., van Berge, L., van Berkel, C.G.M., de Coo, I.F.M., Temple, I.K., Brockmann, K., Mendonca, C.I.P., et al. (2012), "Early-onset LBSL: how severe does it get?", *Neuropediatrics*, Germany, Vol. 43 No. 6, pp. 332–338.
- Stroud, D.A., Surgenor, E.E., Formosa, L.E., Reljic, B., Frazier, A.E., Dibley, M.G., Osellame, L.D., et al. (2016), "Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I.", *Nature*, England, Vol. 538 No. 7623, pp. 123–126.
- *Su, X.J., Huang, L., Qu, Y. and Mu, D. (2019), "Progress in research on the role of Omi/HtrA2 in neurological diseases.", *Reviews in the Neurosciences*, Germany, Vol. 30 No. 3, pp. 279–287.
- Suen, D.-F., Narendra, D.P., Tanaka, A., Manfredi, G. and Youle, R.J. (2010), "Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic hybrid cells.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, Vol. 107 No. 26, pp. 11835–11840.
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., et al. (2005), "Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II.", *Cell*, United States, Vol. 121 No. 7, pp. 1043–1057.
- Szymanski, M.R., Kuznetsov, V.B., Shumate, C., Meng, Q., Lee, Y.-S., Patel, G., Patel, S., et al. (2015), "Structural basis for processivity and antiviral drug toxicity in human mitochondrial DNA replicase.", *The EMBO Journal*, England, Vol. 34 No. 14, pp. 1959–1970.
- Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T. and Mihara, K. (2007), "Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission.", *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 282 No. 15, pp. 11521–11529.
- Tanaka, A., Cleland, M.M., Xu, S., Narendra, D.P., Suen, D.-F., Karbowski, M. and Youle, R.J. (2010), "Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin.", *The Journal of Cell Biology*, United States, Vol. 191 No. 7, pp. 1367–1380.
- Tang, K., Xie, X., Park, J.-I., Jamrich, M., Tsai, S. and Tsai, M.-J. (2010), "COUP-TFs regulate eye development by controlling factors essential for optic vesicle morphogenesis.", *Development*

- (Cambridge, England), England, Vol. 137 No. 5, pp. 725–734.
- Tang, S., Wang, J., Lee, N.-C., Milone, M., Halberg, M.C., Schmitt, E.S., Craigen, W.J., et al. (2011), “Mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: an ever expanding molecular and clinical spectrum.”, *Journal of Medical Genetics*, Vol. 48 No. 10, pp. 669–81.
- Taylor, R.W., Pyle, A., Griffin, H., Blakely, E.L., Duff, J., He, L., Smertenko, T., et al. (2014), “Use of whole-exome sequencing to determine the genetic basis of multiple mitochondrial respiratory chain complex deficiencies.”, *JAMA*, United States, Vol. 312 No. 1, pp. 68–77.
- *Taylor, R.W., Schaefer, A.M., Barron, M.J., McFarland, R. and Turnbull, D.M. (2004), “The diagnosis of mitochondrial muscle disease.”, *Neuromuscular Disorders : NMD*, England, Vol. 14 No. 4, pp. 237–245.
- Temperley, R., Richter, R., Dennerlein, S., Lightowlers, R.N. and Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. (2010), “Hungry codons promote frameshifting in human mitochondrial ribosomes.”, *Science (New York, N.Y.)*, United States, Vol. 327 No. 5963, p. 301.
- Tetreault, M., Fahiminiya, S., Antonicka, H., Mitchell, G.A., Geraghty, M.T., Lines, M., Boycott, K.M., et al. (2015), “Whole-exome sequencing identifies novel ECHS1 mutations in Leigh syndrome.”, *Human Genetics*, Germany, Vol. 134 No. 9, pp. 981–991.
- Timmers, H.J.L.M., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Mannelli, M. and Pacak, K. (2009), “Clinical aspects of SDHx-related pheochromocytoma and paraganglioma.”, *Endocrine-Related Cancer*, England, Vol. 16 No. 2, pp. 391–400.
- Tolkunova, E., Park, H., Xia, J., King, M.P. and Davidson, E. (2000), “The human lysyl-tRNA synthetase gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial enzymes by means of an unusual alternative splicing of the primary transcript.”, *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 275 No. 45, pp. 35063–35069.
- Tomecki, R., Dmochowska, A., Gewartowski, K., Dziembowski, A. and Stepień, P.P. (2004), “Identification of a novel human nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase.”, *Nucleic Acids Research*, England, Vol. 32 No. 20, pp. 6001–6014.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J.A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., et al. (2008), “Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy.”, *The EMBO Journal*, England, Vol. 27 No. 2, pp. 433–446.
- Tzoulis, C., Engelsens, B.A., Telstad, W., Aasly, J., Zeviani, M., Winterthun, S., Ferrari, G., et al. (2006), “The spectrum of clinical disease caused by the A467T and W748S POLG mutations: a study of 26 cases.”, *Brain : A Journal of Neurology*, England, Vol. 129 No. Pt 7, pp. 1685–1692.
- Ugalde, C., Janssen, R.J.R.J., van den Heuvel, L.P., Smeitink, J.A.M. and Nijtmans, L.G.J. (2004), “Differences in assembly or stability of complex I and other mitochondrial OXPHOS complexes in inherited complex I deficiency.”, *Human Molecular Genetics*, England, Vol. 13 No. 6, pp. 659–

667.

- *Uhler, J.P. and Falkenberg, M. (2015), "Primer removal during mammalian mitochondrial DNA replication.", *DNA Repair*, Netherlands, Vol. 34, pp. 28–38.
- Varanita, T., Soriano, M.E., Romanello, V., Zaglia, T., Quintana-Cabrera, R., Semenzato, M., Menabo, R., et al. (2015), "The OPA1-dependent mitochondrial cristae remodeling pathway controls atrophic, apoptotic, and ischemic tissue damage.", *Cell Metabolism*, United States, Vol. 21 No. 6, pp. 834–844.
- Vempati, U.D., Han, X. and Moraes, C.T. (2009), "Lack of cytochrome c in mouse fibroblasts disrupts assembly/stability of respiratory complexes I and IV.", *The Journal of Biological Chemistry*, United States, Vol. 284 No. 7, pp. 4383–4391.
- Verkaart, S., Koopman, W.J.H., van Emst-de Vries, S.E., Nijtmans, L.G.J., van den Heuvel, L.W.P.J., Smeitink, J.A.M. and Willems, P.H.G.M. (2007), "Superoxide production is inversely related to complex I activity in inherited complex I deficiency.", *Biochimica et Biophysica Acta*, Netherlands, Vol. 1772 No. 3, pp. 373–381.
- Vermulst, M., Bielas, J.H., Kujoth, G.C., Ladiges, W.C., Rabinovitch, P.S., Prolla, T.A. and Loeb, L.A. (2007), "Mitochondrial point mutations do not limit the natural lifespan of mice.", *Nat. Genet*, Vol. 39 No. 4, pp. 540–543.
- Vielhaber, S., Debska-Vielhaber, G., Peeva, V., Schoeler, S., Kudin, A.P., Minin, I., Schreiber, S., et al. (2013), "Mitofusin 2 mutations affect mitochondrial function by mitochondrial DNA depletion.", *Acta Neuropathologica*, Germany, Vol. 125 No. 2, pp. 245–256.
- Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W. and Reichert, A.S. (2006), "Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane.", *The Journal of Cell Biology*, United States, Vol. 175 No. 2, pp. 237–247.
- De Vos, K.J., Allan, V.J., Grierson, A.J. and Sheetz, M.P. (2005), "Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission.", *Current Biology: CB*, England, Vol. 15 No. 7, pp. 678–683.
- *Wang, M. and Kaufman, R.J. (2016), "Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease.", *Nature*, England, Vol. 529 No. 7586, pp. 326–335.
- Wang, Z. and Wu, M. (2015), "An integrated phylogenomic approach toward pinpointing the origin of mitochondria.", *Scientific Reports*, England, Vol. 5, p. 7949.
- Wanrooij, S., Fusté, J.M., Farge, G., Shi, Y., Gustafsson, C.M. and Falkenberg, M. (2008), "Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 105 No. 32, pp. 11122–11127.
- Watt, I.N., Montgomery, M.G., Runswick, M.J., Leslie, A.G.W. and Walker, J.E. (2010), "Bioenergetic

- cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, Vol. 107 No. 39, pp. 16823–16827.
- Wedatilake, Y., Brown, R.M., McFarland, R., Yaplito-Lee, J., Morris, A.A.M., Champion, M., Jardine, P.E., et al. (2013), “SURF1 deficiency: a multi-centre natural history study.”, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, England, Vol. 8, p. 96.
- Welter, C., Meese, E. and Blin, N. (1988), “Rapid step-gradient purification of mitochondrial DNA.”, *Molecular Biology Reports*, Netherlands, Vol. 13 No. 2, pp. 117–120.
- Weraarpachai, W., Antonicka, H., Sasarman, F., Seeger, J., Schrank, B., Kolesar, J.E., Lochmuller, H., et al. (2009), “Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome.”, *Nature Genetics*, United States, Vol. 41 No. 7, pp. 833–837.
- Wettmarshausen, J. and Perocchi, F. (2017), “Isolation of Functional Mitochondria from Cultured Cells and Mouse Tissues.”, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, United States, Vol. 1567, pp. 15–32.
- White, S.L., Collins, V.R., Wolfe, R., Cleary, M.A., Shanske, S., DiMauro, S., Dahl, H.H., et al. (1999), “Genetic counseling and prenatal diagnosis for the mitochondrial DNA mutations at nucleotide 8993.”, *American Journal of Human Genetics*, United States, Vol. 65 No. 2, pp. 474–482.
- Wortmann, S.B., Kluijtmans, L.A.J., Rodenburg, R.J., Sass, J.O., Nouws, J., van Kaauwen, E.P., Kleefstra, T., et al. (2013), “3-Methylglutaconic aciduria--lessons from 50 genes and 977 patients.”, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, United States, Vol. 36 No. 6, pp. 913–921.
- Wortmann, S.B., Koolen, D.A., Smeitink, J.A., van den Heuvel, L. and Rodenburg, R.J. (2015), “Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice.”, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, United States, Vol. 38 No. 3, pp. 437–443.
- Yakubovskaya, E., Mejia, E., Byrnes, J., Hambardjieva, E. and Garcia-Diaz, M. (2010), “Helix unwinding and base flipping enable human MTERF1 to terminate mitochondrial transcription.”, *Cell*, United States, Vol. 141 No. 6, pp. 982–993.
- *Yasukawa, T. and Kang, D. (2018), “An overview of mammalian mitochondrial DNA replication mechanisms”, *Journal of Biochemistry*, Vol. 164 No. 3, pp. 183–193.
- Yasukawa, T., Yang, M.Y., Jacobs, H.T. and Holt, I.J. (2005), “A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA”, *Mol Cell*, Vol. 18 No. 6, pp. 651–662.
- Yoon, G., Malam, Z., Paton, T., Marshall, C.R., Hyatt, E., Ivakine, Z., Scherer, S.W., et al. (2016), “Lethal Disorder of Mitochondrial Fission Caused by Mutations in DNM1L.”, *The Journal of Pediatrics*, United States, Vol. 171, pp. 312–313.

- *Youle, R.J. and van der Bliek, A.M. (2012), "Mitochondrial fission, fusion, and stress.", *Science (New York, N.Y.)*, United States, Vol. 337 No. 6098, pp. 1062–1065.
- *Youle, R.J. and Narendra, D.P. (2011), "Mechanisms of mitophagy.", *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, England, Vol. 12 No. 1, pp. 9–14.
- Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P.G., Burke, A., Sellar, P.W., Clarke, M.P., Gnanaraj, L., Ah-Kine, D., et al. (2010), "The prevalence and natural history of dominant optic atrophy due to OPA1 mutations.", *Ophthalmology*, United States, Vol. 117 No. 8, pp. 1538–46, 1546.e1.
- Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P.G., Gorman, G.S., Lourenco, C.M., Wright, A.F., Auer-Grumbach, M., Toscano, A., et al. (2010), "Multi-system neurological disease is common in patients with OPA1 mutations.", *Brain : A Journal of Neurology*, England, Vol. 133 No. Pt 3, pp. 771–786.
- Zanna, C., Ghelli, A., Porcelli, A.M., Karbowski, M., Youle, R.J., Schimpf, S., Wissinger, B., et al. (2008), "OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion.", *Brain : A Journal of Neurology*, England, Vol. 131 No. Pt 2, pp. 352–367.
- Zhang, Q., Raouf, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., et al. (2010), "Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury.", *Nature*, England, Vol. 464 No. 7285, pp. 104–107.
- Zhao, J., Liu, T., Jin, S., Wang, X., Qu, M., Uhlen, P., Tomilin, N., et al. (2011), "Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission.", *The EMBO Journal*, England, Vol. 30 No. 14, pp. 2762–2778.