

# **Aplikační oblasti organelové DNA**

---

**Vzácné lidské choroby**

**Forenzní vědy**

**Chloroplastové genové  
inženýrství**

**Samčí sterilita ve šlechtění  
rostlin**

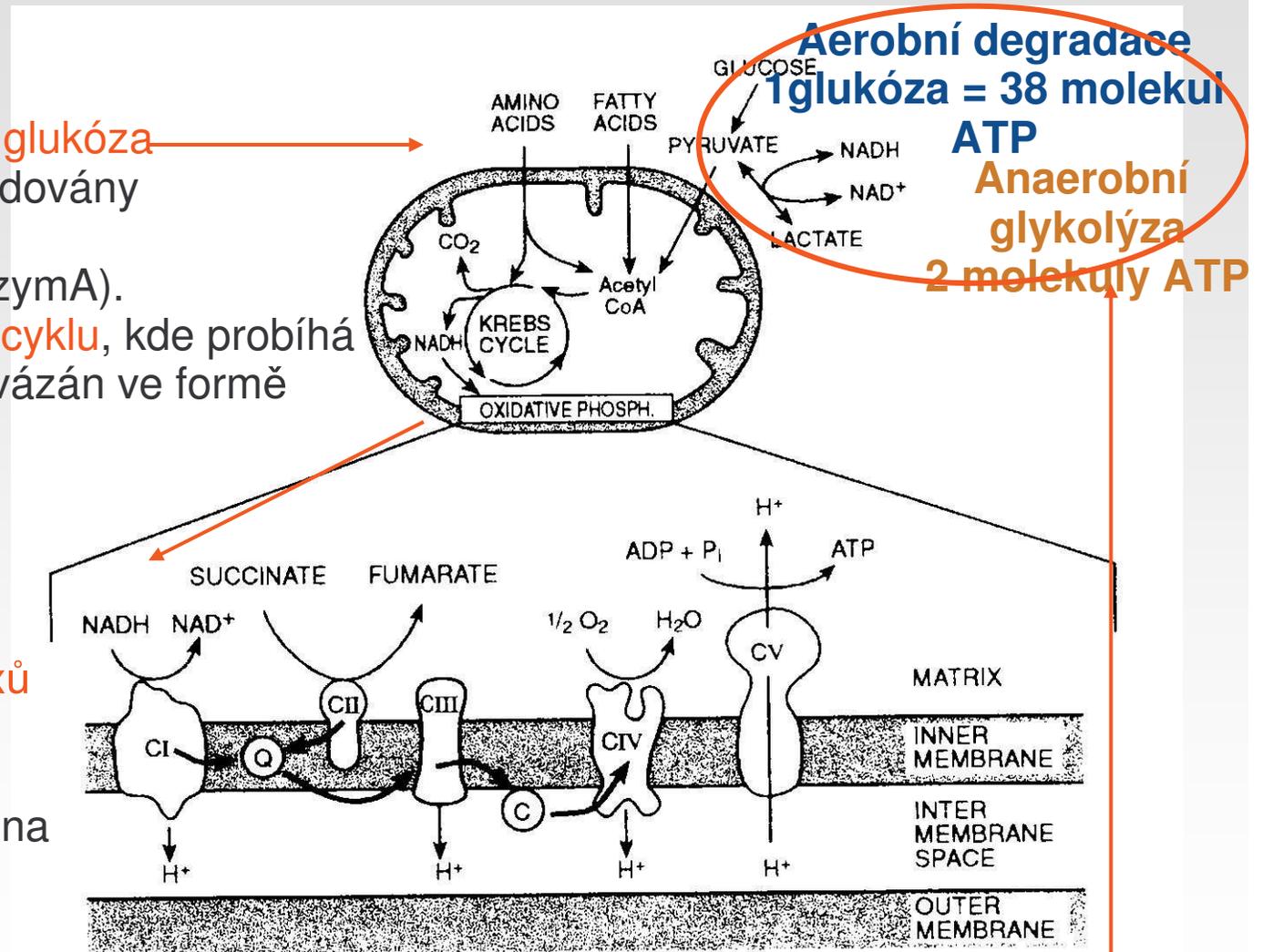
# Vzácné lidské choroby jsou způsobeny mitochondriálními mutacemi

Aminokyseliny, mastné kyseliny a glukóza vstupují do mitochondrií a jsou oxidovány

za tvorby **acetyl CoA** (acetyl koenzymA). Acetyl CoA vstupuje do **Krebsova cyklu**, kde probíhá **oxidační kaskáda**. Její výtěžek je vázán ve formě redukovaného **koenzymu NADH** (nicotinamid adenin dinukleoid).

NADH přenáší své redukční ekvivalenty na **5 enzymových komplexů** CI až CV.

Silné šipky ukazují **tok elektronů v respiračním řetězci**, který probíhá na vnitřní **mitoch. membráně**.



NADH dehydrogenáza

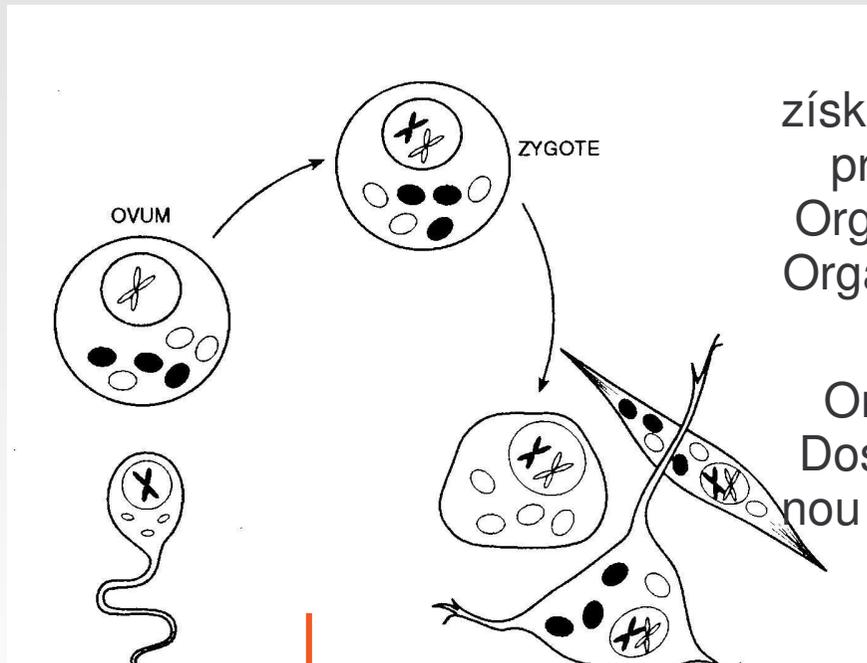
Sukcinyl dehydrogenáza

Cytochrom C oxidoreduktáza

Cytochrom C oxidáza

ATP syntáza

# Mutace a heteroplazmie



## Zygota

získává velký počet organel  
prostřednictvím vajíčka  
Organely s mutací – černé  
Organely bez mutace – bílé

## Tkáně

Organely se množí autonomně  
Dospělý jedinec má buňky s různou směsí normálních a abnormálních organel

## heteroplazmie

V případě mutací způsobujících choroby mohou mít různé tkáně různé množství mutantní a normální mtDNA. Děti jedné matky tak mohou mít odlišné fenotypy v závislosti na množství mutantní mtDNA v jednotlivých tkáních

# Historie

---

- ❑ **1962** První zpráva o lidské chorobě v důsledku narušené energetické aktivity mitochondrií. Symptomy **demence**.
  - ❑ **Souvislosti mezi poruchou energetické aktivity mitochondrií a degenerativními postiženími mozku, myokardu i kosterních svalů, ledvin a žláz s vnitřní sekrecí.**  
Názor, že příčinou jsou **mutace jaderných genů**.
  - ❑ **80. léta 20. st.** prokázáno, že **mutace mitochondriálních genů** způsobují poruchy syntézy proteinů, jejichž prostřednictvím je tvořena  $H^+$ -ATPáza. **Důsledek** narušení účinnosti komplexu respiračních reakcí, neboli tvorby energie v buňce.
  - ❑ **Choroby způsobené dysfunkcí mitochondrií jsou popisovány až od roku 1988.**
-

# Genetická klasifikace mitochondriálních chorob

---

## ❑ Defekty v jaderné DNA

Defekty v transportu a využití substrátu

Defekty v importu proteinů

Defekty v Krebsově cyklu

Defekty v oxidačně-forforylačních krocích

Defekty v respiračním řetězci

## ❑ **Defekty v mtDNA (genech)**

Velká přeuspořádání mtDNA – delece a duplikace

Bodové mutace mtDNA

= defekty v respiračním řetězci

(viz. Komplexy enzymů s podjednotkami kódovanými  
mtDNA)

---

---

## **☐ Defekty v komunikaci mezi mtDNA a jadernou DNA**

Tvorba opakovaných delecí mtDNA

Ztráta mtDNA

Defekty v respiračním řetězci (komplexy s podjednotkami kódovanými mtDNA)

## **☐ Získané defekty mtDNA**

Toxiny

Léčiva – zidovudin

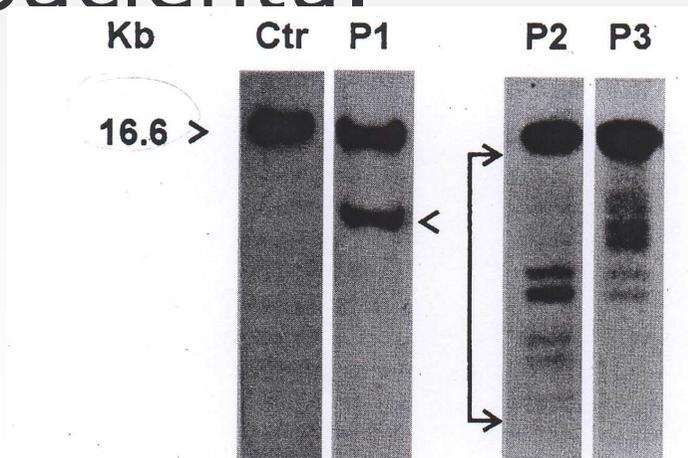
Stárnutí

---

# Typy genových defektů mitochondriálních chorob

## □ Velká přeuspořádání mtDNA

**1988 Holt** a kol. koexistence normální a mutantní mtDNA s jednou velkou delecí (především) ve svalstvu pacientů.



### Diagnostika podle délky fragmentů mtDNA

Ctrl mtDNA standard

P1 mtDNA standard + mtDNA s delecí (kratší fragment)

P2, P3 vícenásobné delece

P2 30 let

P3 60 let = s věkem se zvyšuje množství mutantní mtDNA

## □ **Bodové mutace mtDNA**

Diagnostika - všechny tkáně včetně leukocytů

Mutace genu pro 12S rRNA, nukleotid 1555, A-G. homoplazmie, hluchota.

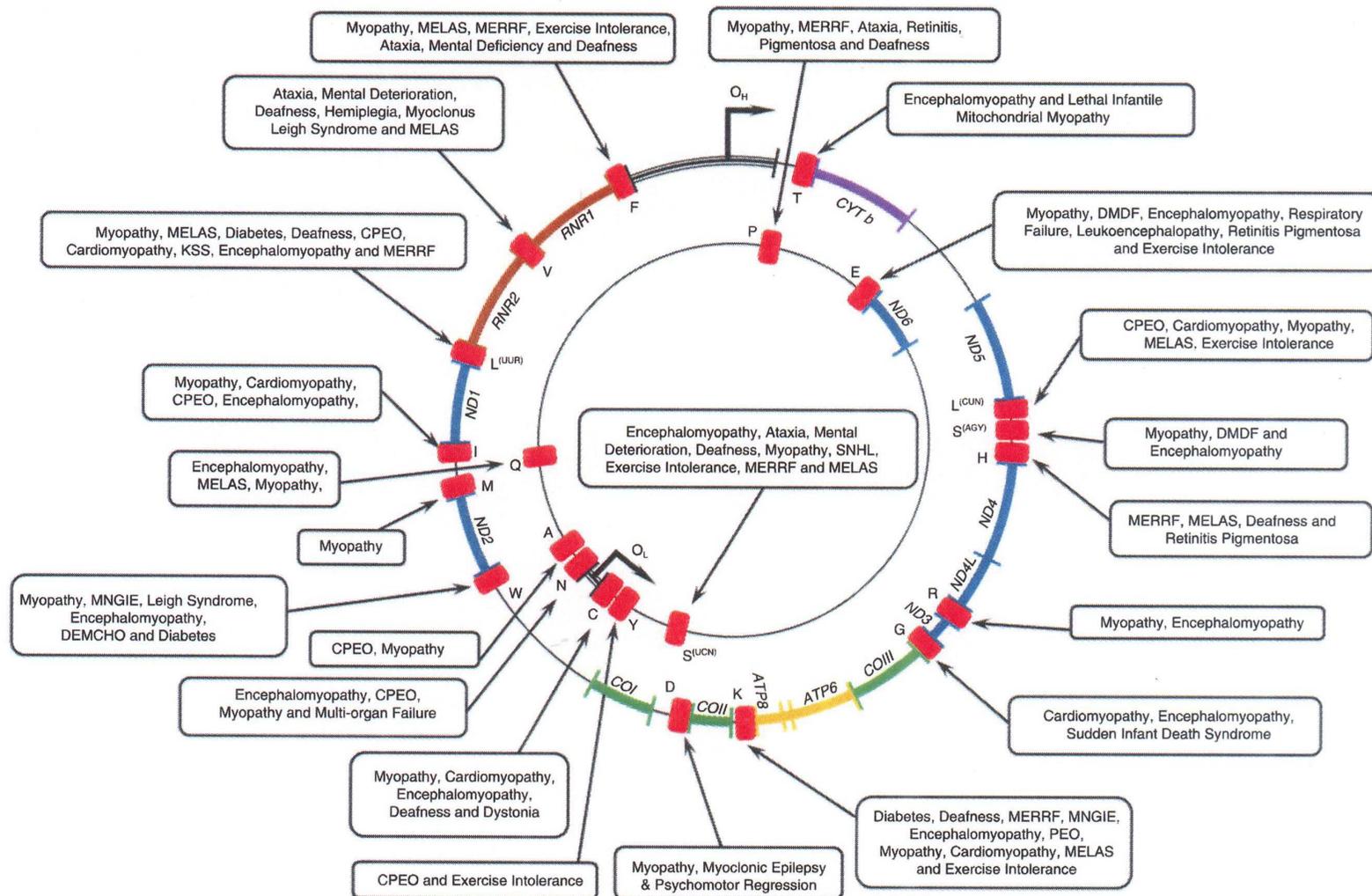
22 genů tRNA – identifikována řada substitucí

tRNA pro Leu, nt 3243 A-G

Onemocnění MELAS

Příznaky: opakované záchvaty mrtvice před dosažením 40 let, často již v dětství, demence, hluchota. Asi 1-2% pacientů s diabetes mellitus má tuto bodovou mutaci v genu pro tRNA.

# Mutace v 22 genech mtDNA pro tRNA





# Neurologické příznaky mitochondriálních chorob

---

- Obrna okohybných svalů
  - Poškození zrakového nervu
  - Mozková mrtvice u mladého člověka
  - Křeče
  - Svalové poškození
  - Únava, neschopnost fyzické zátěže
  - Ataxie – porucha koordinace pohybů
  - Demence
  - Periferní neuropatie – potížení nervů
  - Kalcifikace bazálních ganglií
-

# Projevy poškození orgánů

---

- Poruchy vedení srdečního vzruchu
- Kardiomyopatie<sup>1</sup>
- Diabetes mellitus
- Šedý zákal
- Laktátová acidóza<sup>2</sup>
- Poškození ledvinných glomerulů
- Poškození sluchu
- Poškození jater
- Poškození slinivky břišní
- Intestinální pseudoobstrukce<sup>3</sup>
- Epizodické zvracení
- Pancytopenie<sup>4</sup>
- Deprese

<sup>1</sup>Úbytek a ochabování příčně pruhovaného svalstva.

<sup>2</sup>Nadbytek kyseliny mléčné v séru. Laktát je syntetizován při anaerobní glykolýze a při oxidativním aerobním metabolismu je rychle odbouráván. Defekty mitochondrií vedou k poruchám oxidativního metabolismu a tím k hromadění laktátu.

<sup>3</sup>Poruchy vyprazdňování střeva    <sup>4</sup>Současný pokles všech typů krevních tělísek.

# Chronická externí oftalmoplegie

---

## CPEO

- ❑ Genetický základ – bodové mutace v tRNA
  - ❑ Paralýza okohybných svalů (oftalmoplegie)
  - ❑ V pokročilejším stádiu i svalů dolních končetin
  - ❑ Mikroskopické vyšetření - svalová vlákna se jeví jako "potrhaná"
-

# Kearns-Sayrův syndrom

---

## KSS

- ❑ Genetický základ - delece v různých pozicích mtDNA
  - ❑ V dětském věku - žádné symptomy, objevují se až v dospělosti (po 20. roku)
  - ❑ Ztráta vidění- choroba retinis pigmentosa. Sítnice nefunguje jak má – nejdříve jsou nefunkční okrajové buňky tyčinky (špatné vidění za šera, v noci). Později jsou zasaženy i čípky = zrakové buňky ve středu oka = narušení barevného vidění.
  - ❑ Ztráta sluchu
  - ❑ Srdeční choroby – vady
  - ❑ Demence, malý vzrůst
  - ❑ Ataxie
  - ❑ Čím větší je podíl mtDNA s delecí, tím rozsáhlejší jsou symptomy
  - ❑ = neuromuskulární choroba
-

# Leberova dědičná oční neuropatie

---

## LHON

- ❑ Mutace v mt genech pro respirační proteiny: *ND1, ND2, ND4, ND5, ND6, CO1, cytb*
  - ❑ Přes 50% případů je způsobeno v určité pozici genu kódujícího jednu podjednotku NADH dehydrogenázy
  - ❑ Postihuje oční nerv, náhlá ztráta zraku u jednoho nebo obou očí Průměrný věk ztráty vidění je 27 let
  - ❑ Srdeční dysrytmie
  - ❑ Výskyt vzácný 1:50000
  - ❑ Maternální dědičnost **X** většinou zjištěna u mužů, druh interakce genů vázaných na X-chromosom s mtDNA
-

# Leighův syndrom

---

- ❑ Mutace genu *ATPasa6* pro podjednotku mitochondriální ATP syntetázy
  - ❑ Projevy již v dětském věku, nemoc je letální:
  - ❑ Progresivní ztráta motorických a verbálních schopností
  - ❑ Postupná degenerace bazálních ganglií
  - ❑ Neurogenní svalová slabost
-



# Maternálně dědičná myopatie a kardiomyopatie

---

## MMC

- ❑ Myopatie - skupina chorob projevující se postupným úbytkem a ochabováním příčně pruhovaného svalstva
  - ❑ Kardiopatie - trvalé poškození srdečního svalu, zbytnění a rozšíření komor a srdeční slabost
-

# Myoklonická epilepsie s “potrhanými” svalovými vlákny

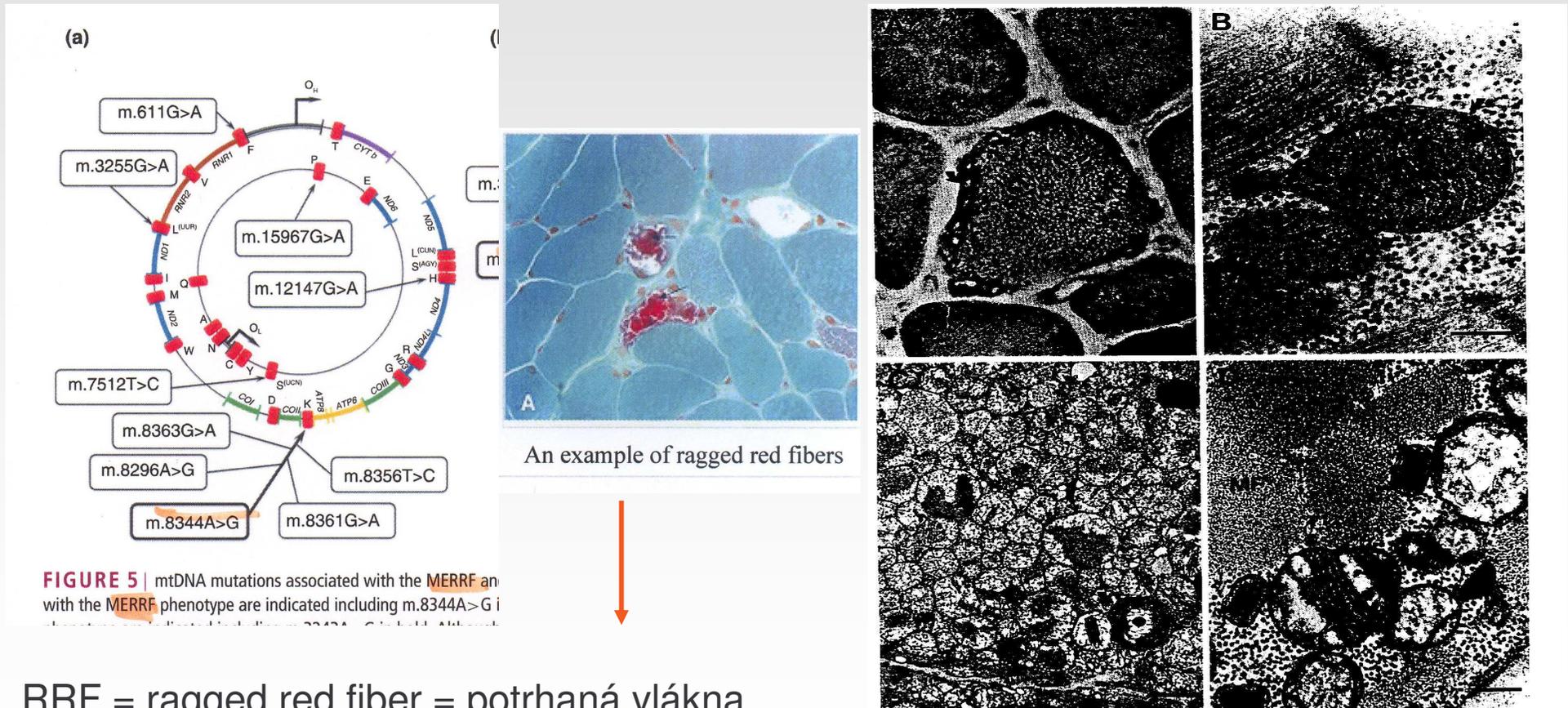
---

## MERRF

- ❑ Poruchy centrální nervové soustavy, kostry a srdeční činnosti
  - ❑ Epileptické křeče, svalové záškuby
  - ❑ Ataxie – nedostatečná koordinace svalů
  - ❑ Hluchota, demence
  - ❑ Při mikroskopickém vyšetření vypadají svalová vlákna jako “potrhaná”.
-

# MERRF

- ❑ Mutace genu pro tRNA pro lysin, tranzice A-G
- ❑ Tato záměna zněmožňuje plnou kapacitu translace mtDNA v organele, což vede krůzným projevům poruchy.



RRF = ragged red fiber = potrhaná vlákna

Diagnostika ve vzorku tkáně svalu po biopsii: RRF obklopují normální svalová vlákna.

Ultrastruktura mitochondrií je změněna: jsou zvětšené, zvyšuje se jejich počet, mají defektní systém krist

# Neurogenní svalová ochablost s ataxií a retinis pigmentosa

---

## NARP

- ❑ Neuromyopatie, ataxie a *retinis pigmentosa* degenerace retinálního neuroepitelu,
  - ❑ atrofie zrakového nervu
  - ❑ pigmentové změny na sítnici
-

# ***Získané poruchy mitochondriálního genomu***

---

- ❑ Postupné hromadění mutací mitochondriálního genomu s následnou poruchou funkce mitochondrií bylo označeno za možnou příčinu **Alzheimerovy nebo Parkinsonovy nemoci** a jiných degenerativních chorob stáří.
  - ❑ Mutace postihující gen pro tRNA řídící transport glutaminu je považována za příčinu vzniku asi 5% případů Alzheimerovy choroby v evropské populaci.
-

# AIDS

---

- ❑ Antivirové přípravky = substráty virové DNA-polymerázy, zabudování do virového genomu, poruchy replikace viru
  - ❑ Vedlejší účinky léků na mtDNA
  - ❑ Lék **zidovudin** – u pacientů myopatie
  - ❑ **zalcitabin** – neuropatie
  - ❑ **didanosin** – zánět slinivky (u 23% pacientů)
  - ❑ Zabíjecí lék: **fialuridin** - hepatopatie (jaterní choroby)
  - ❑ **Lamivudin** – nezpůsobuje poškození mitochondrií, minimum nežádoucích účinků
-

# Mitochondrie a smrt buňky

---

- ❑ Mitochondriální stárnutí
  - ❑ 10x častější vznik mutací než v jaderné DNA
  - ❑ Nadbytek volných radikálů
  - ❑ Degenerativní choroby
  - ❑ Stárnutí organismu
  - ❑ poruchy paměti, sluchu, zraku, pokles vitality a obranyschopnosti
-

# Mt DNA a forenzní vědy

---

## ❑ **Výhody**

- ❑ Vysoký počet kopií mtDNA (kvantita)
  - ❑ Nedochází k rekombinaci (stabilita)
  - ❑ Maternální dědičnost
  - ❑ **Využití:** rutinní analýzy mtDNA starých kostí, zubů, částí vlasů a chlupů (lidské i zvířecí)
  - ❑ **Hypervariabilní oblasti**
  - ❑ **HV1** (nt 16024–16365) a **HV2** (73–340)
-

# Analýza hypervariabilních oblastí mt genomu

