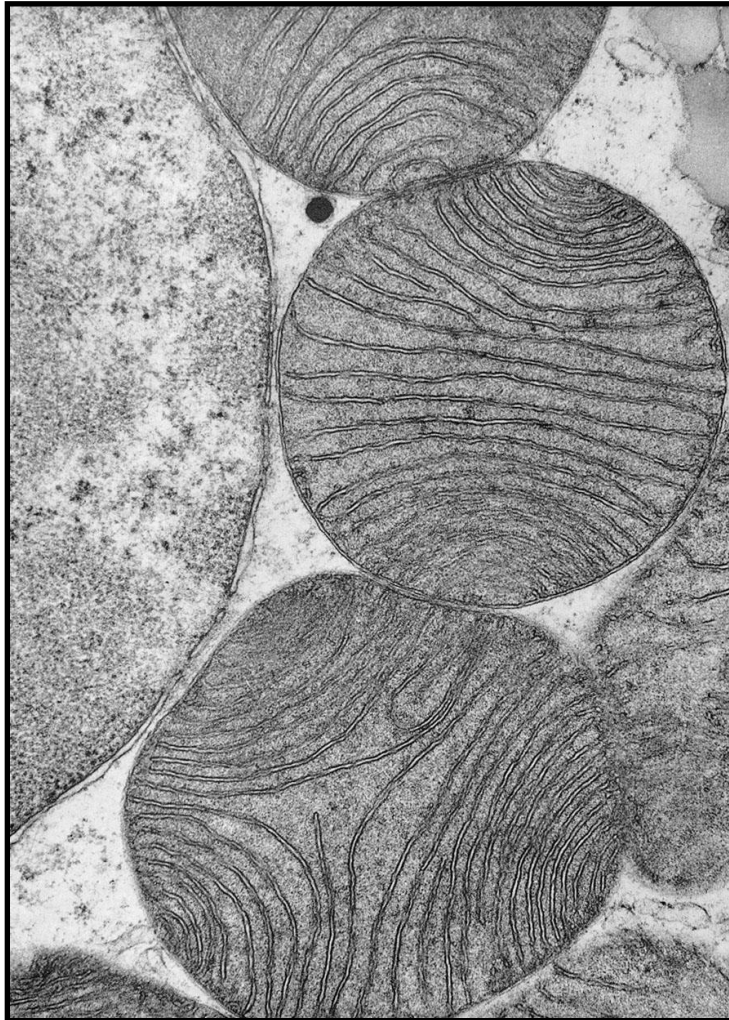


Patologie mitochondriální oxidativní fosforylace (*DMP:1/3500*)



cca 1000 mitochondrií/v buňce

Metabolické dráhy intermediárního metabolismu

- *Zdroj redukovaných koenzymů*
(PDH, FA_BOX, Krebsův cyklus)
- **OXPHOS** (*ATP, NAD⁺*)
- ...

Buněčná signalizace (*ROS, ...*)

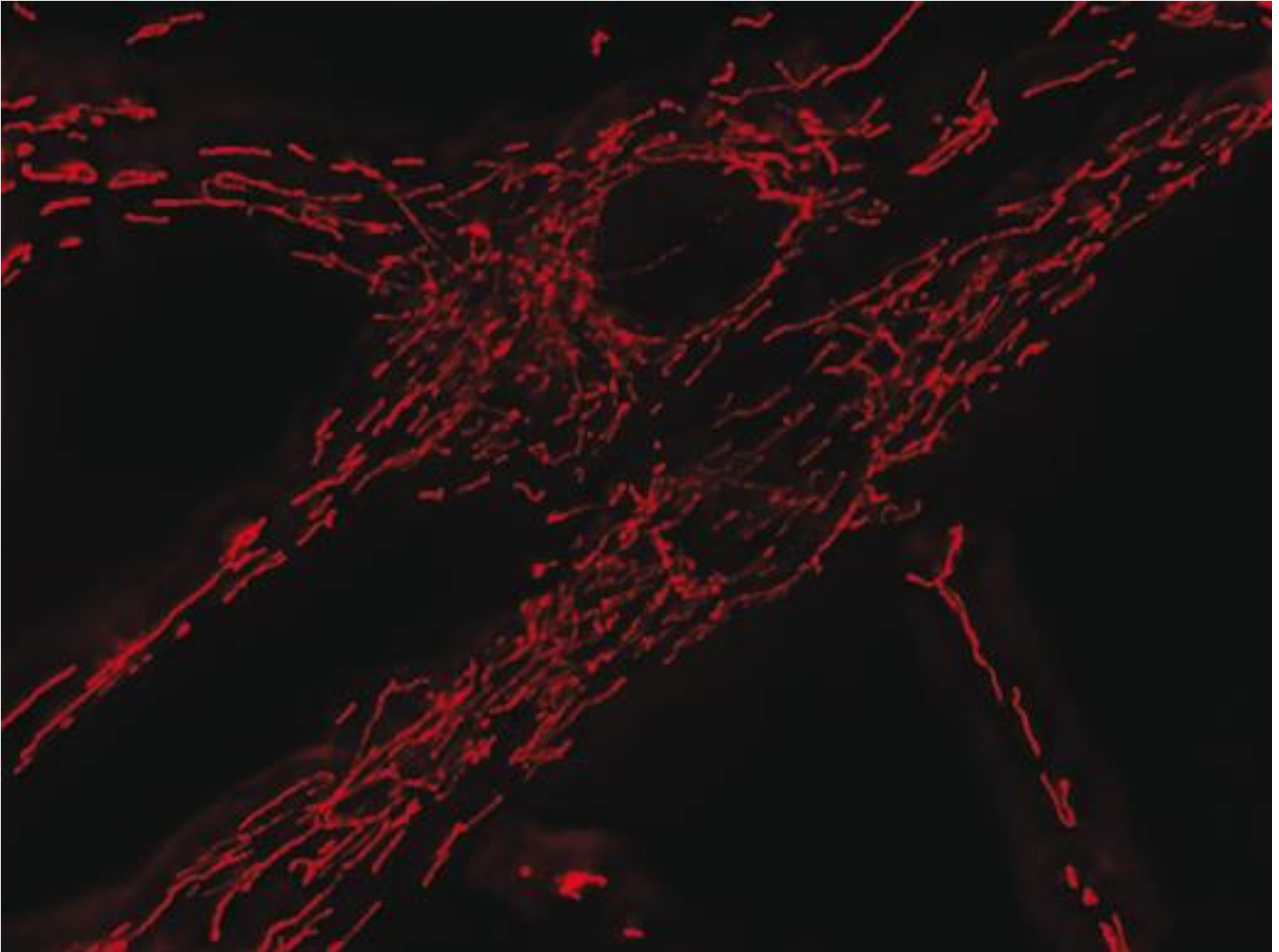
Indukce apoptózy (*vnitřní cestou*)

Stárnutí buněk

Neurodegenerativní onemocnění

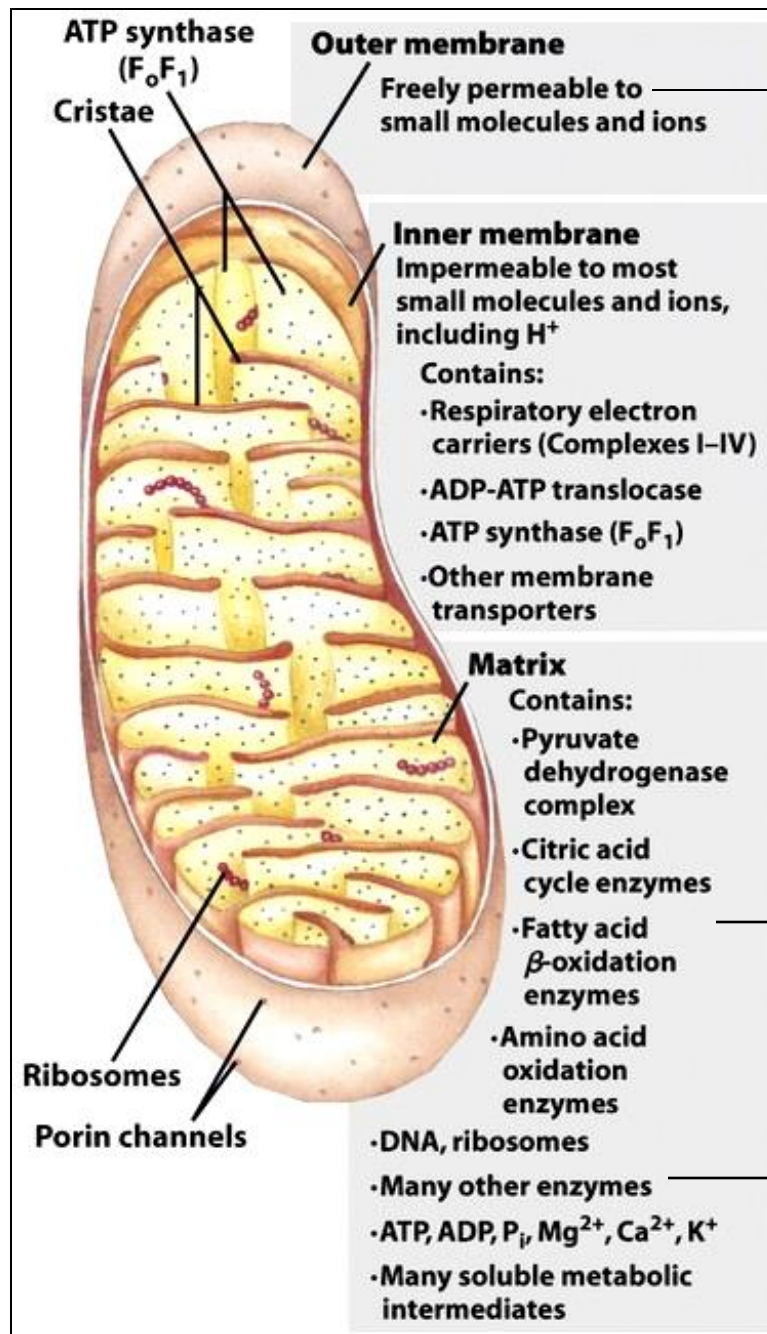
Nádorová onemocnění

mitochondriální síť



Pro a anti-
apoptotické
faktory

Ca²⁺



do 5kDa

mtDNA, mRNA, tRNA, rRNA

nukleoidy (mtDNA agregáty)

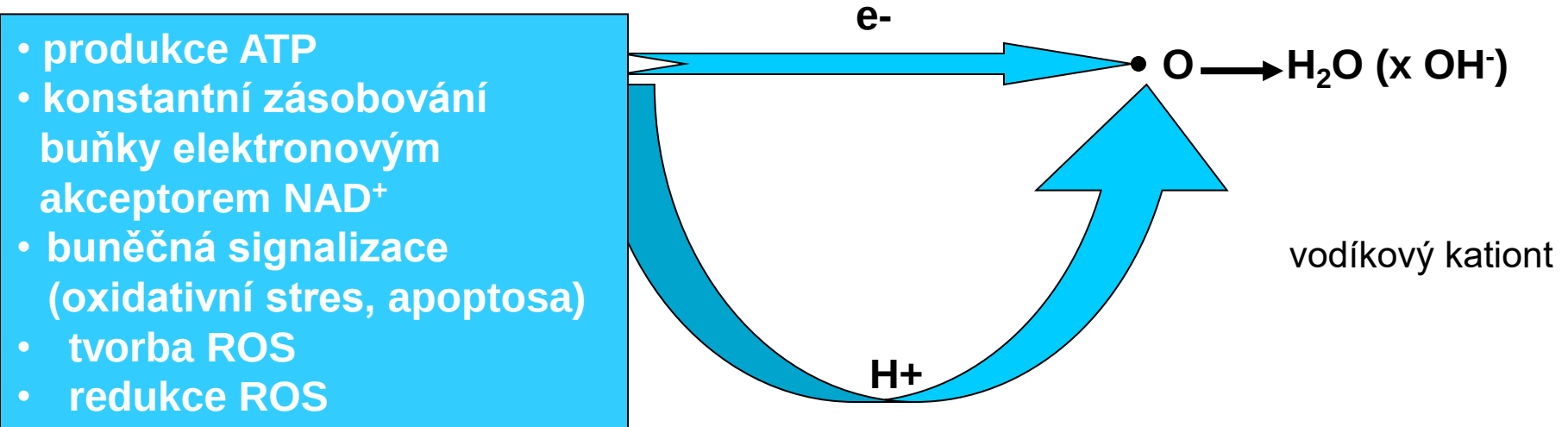
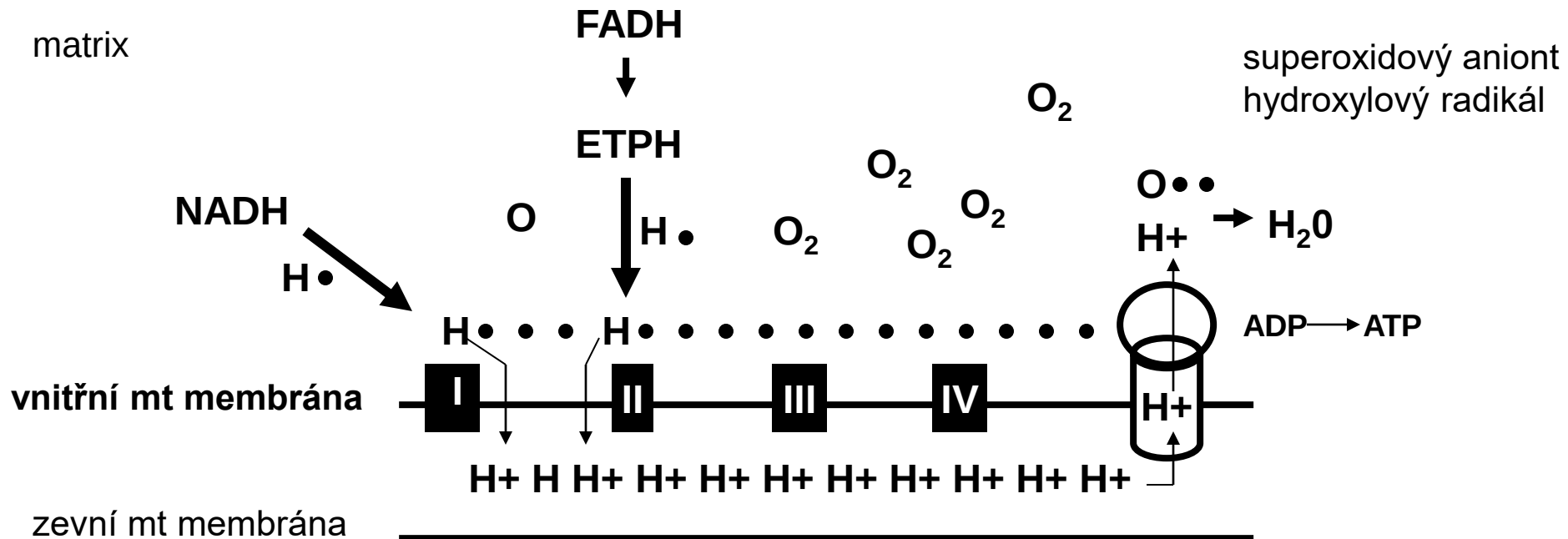
transkripčně/translační jednotky
asociované s vnitřní mt membránou

OXPHOS

redukováné koenzymy
(NADH) pro OXPHOS

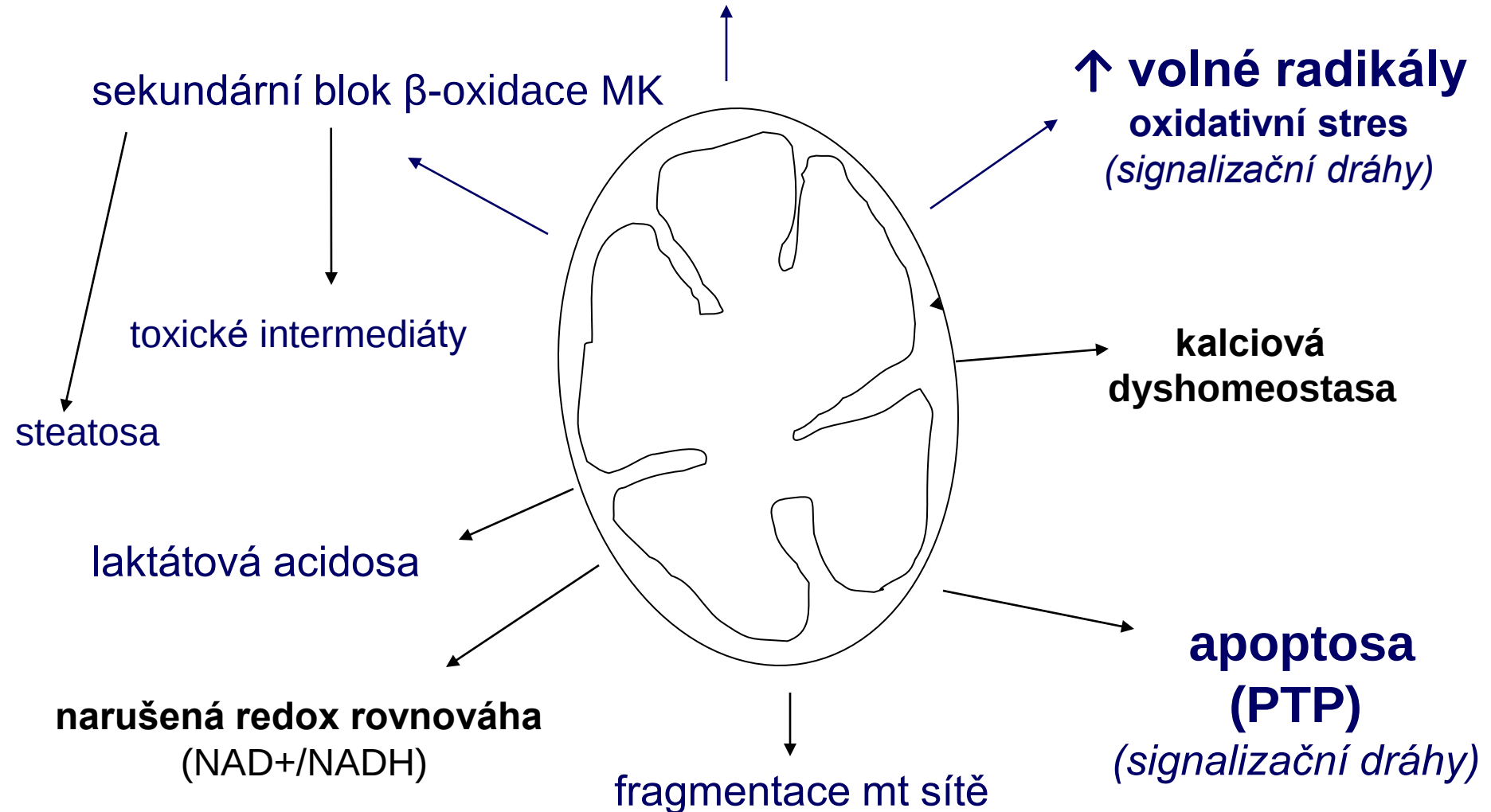
exprese mt genů

OXPHOS = respirační řetězec + ATP-syntáza

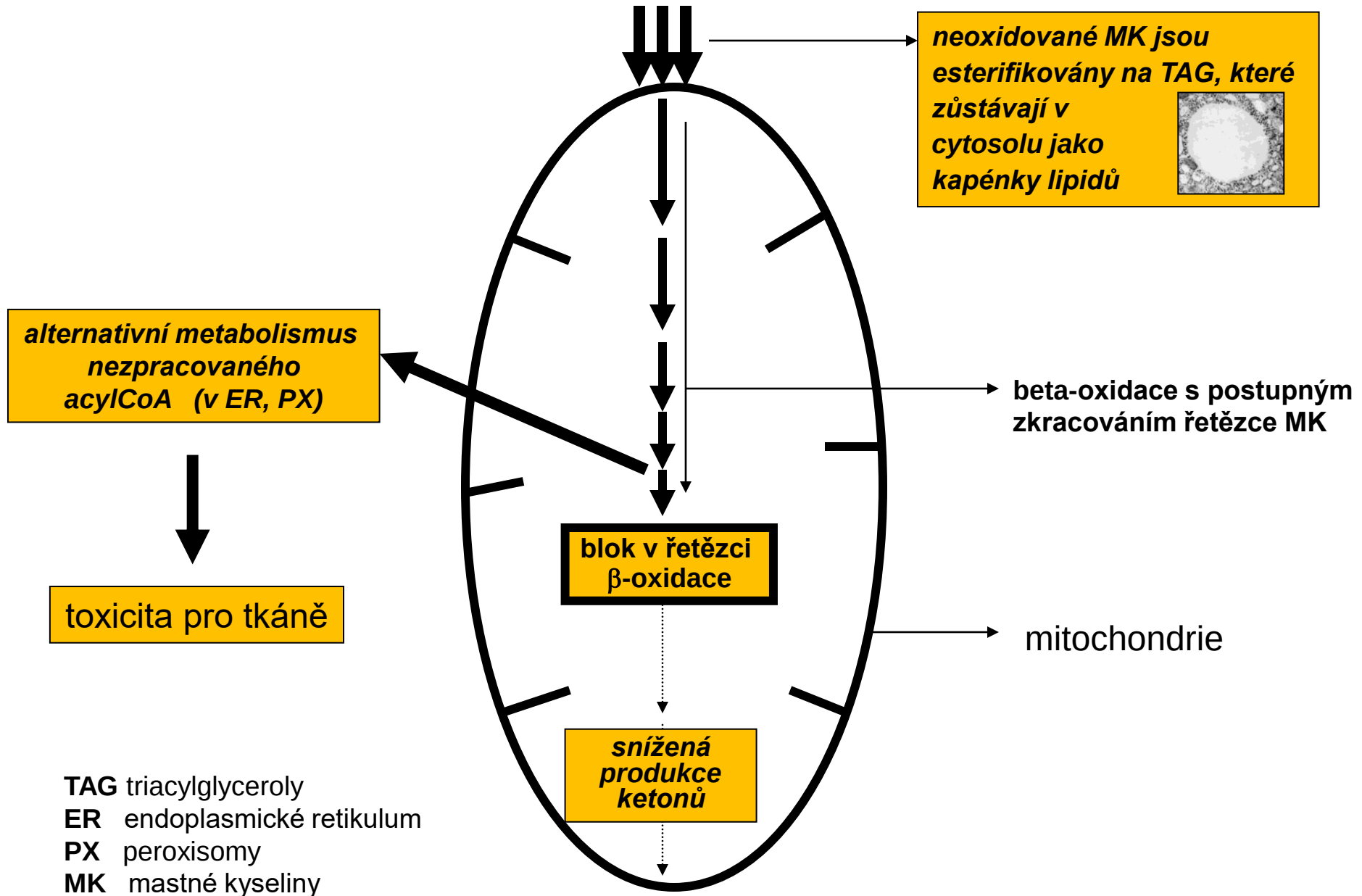


Mechanismy buněčné alterace u poruch OXPHOS

ATP deplece

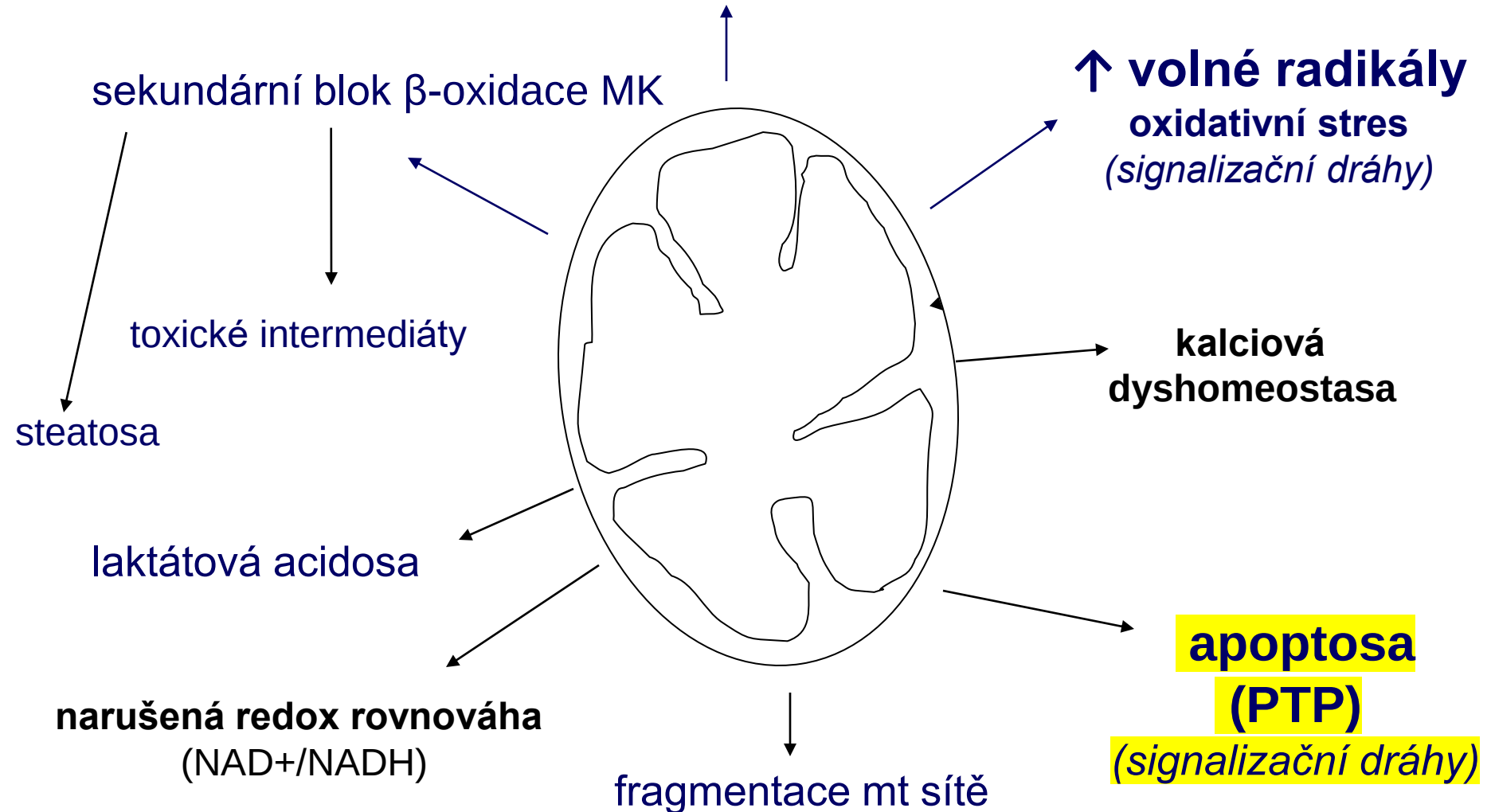


zjednodušené schema základních procesů u poruch mitochondriální β -oxidace

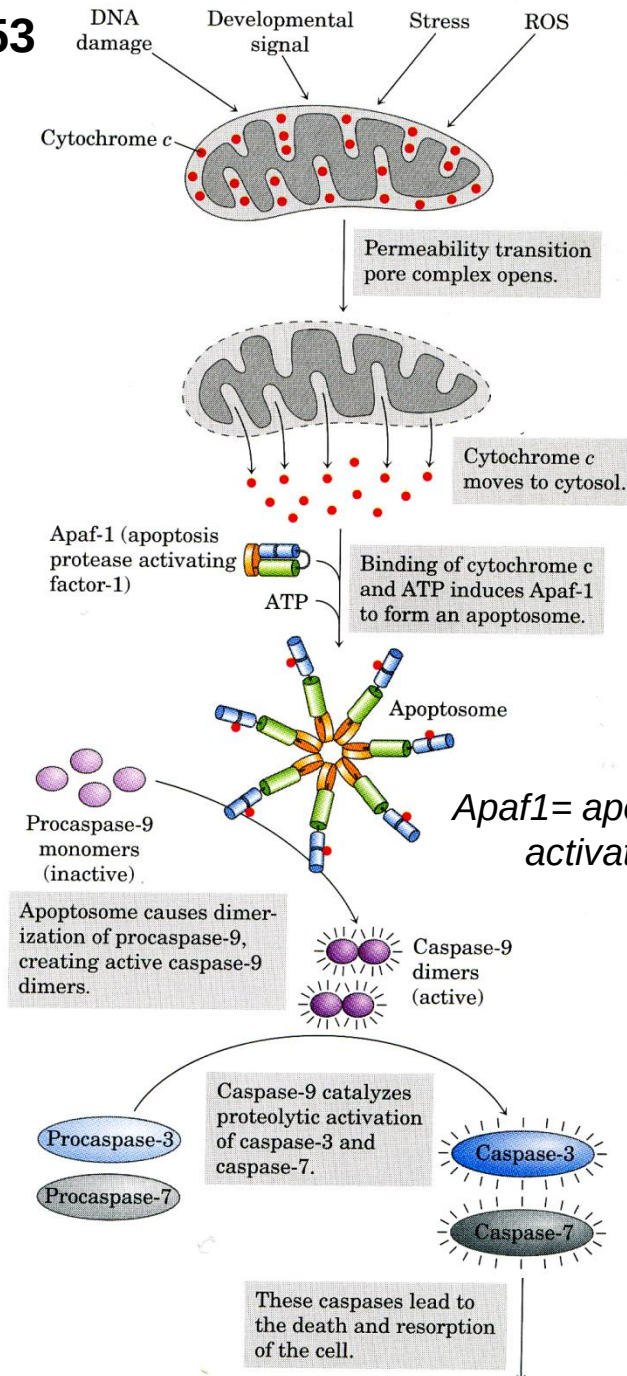


Mechanismy buněčné alterace u poruch OXPHOS

ATP deplece



p53



- DNA damage (p53)

↓ **mt-membrane potential**

- *calcium ions*

- **oxidative stress (ROS)**

OXPHOS inhibition

opening of PTP

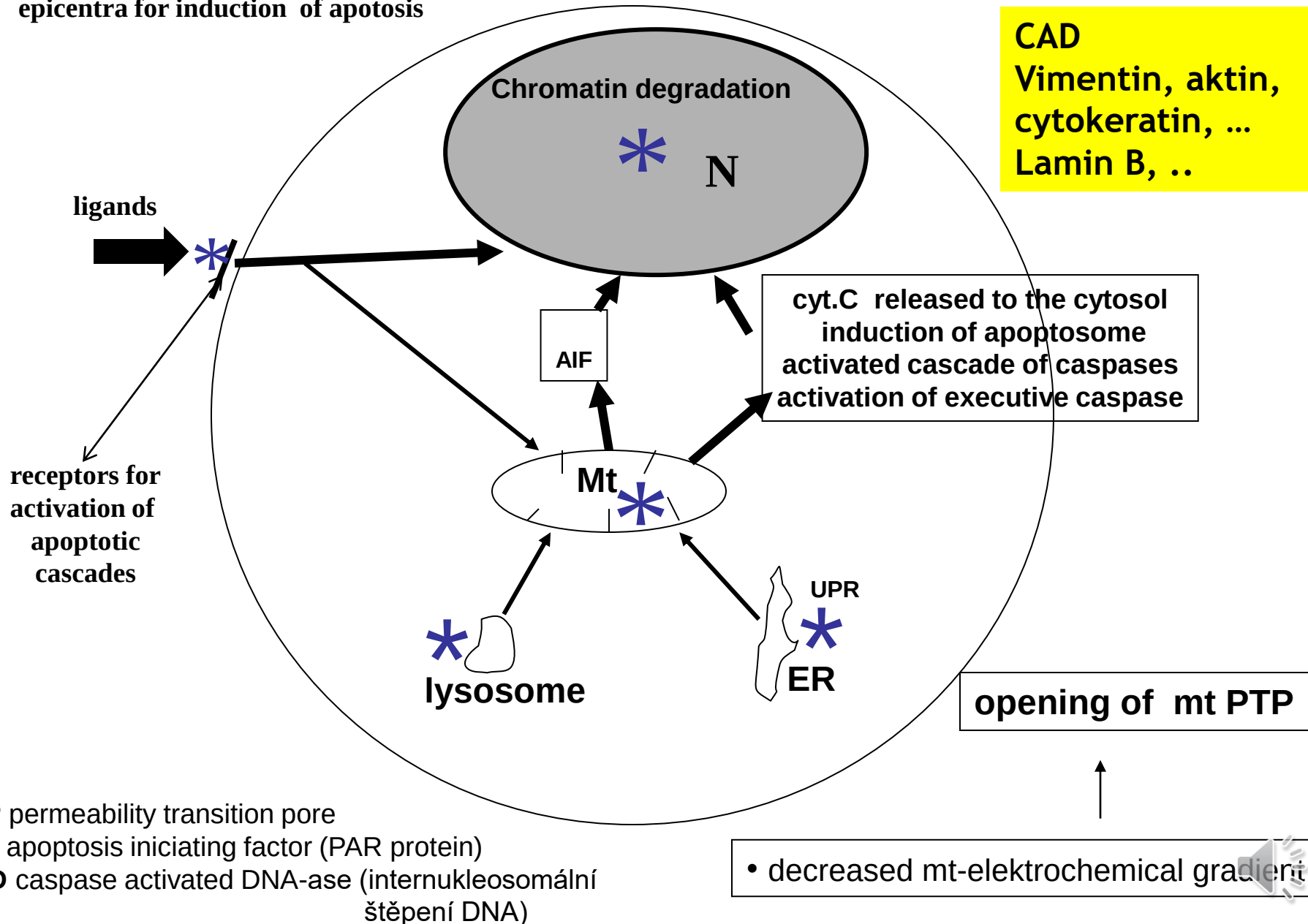
PTP=permeability transition pores

cytochrome c → binds cytosolic Apaf1
→ procaspases activation (**9** → **3**)

nucleus
chromatin degradation

Mitochondrie v sobě integruje signály pro iniciaci apoptosy

* epicentra for induction of apoptosis



encefalopatie
neurologické symptomy

oftalmopatie
ptóza víček

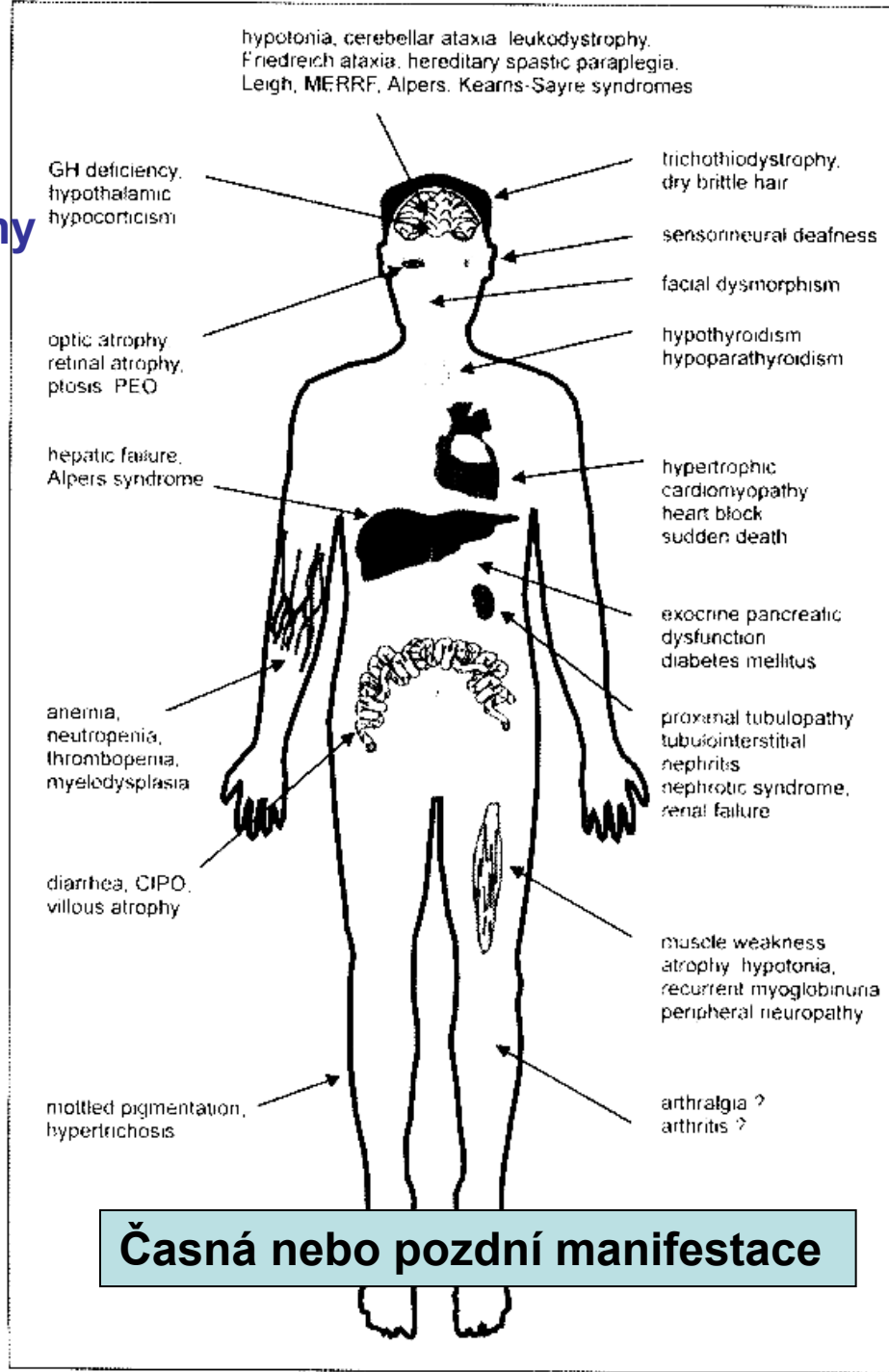
hepatopatie

poruchy
krvetočvorby

gastroenteropatie

endokrinopatie

kožní příznaky



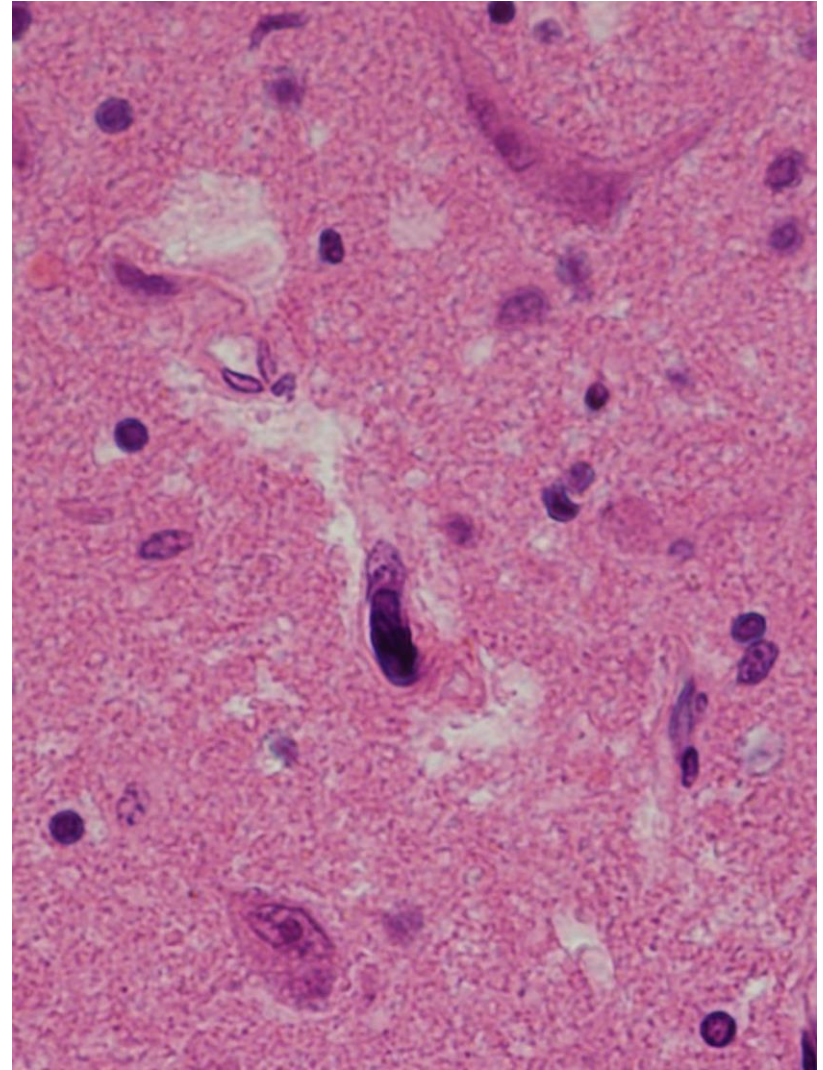
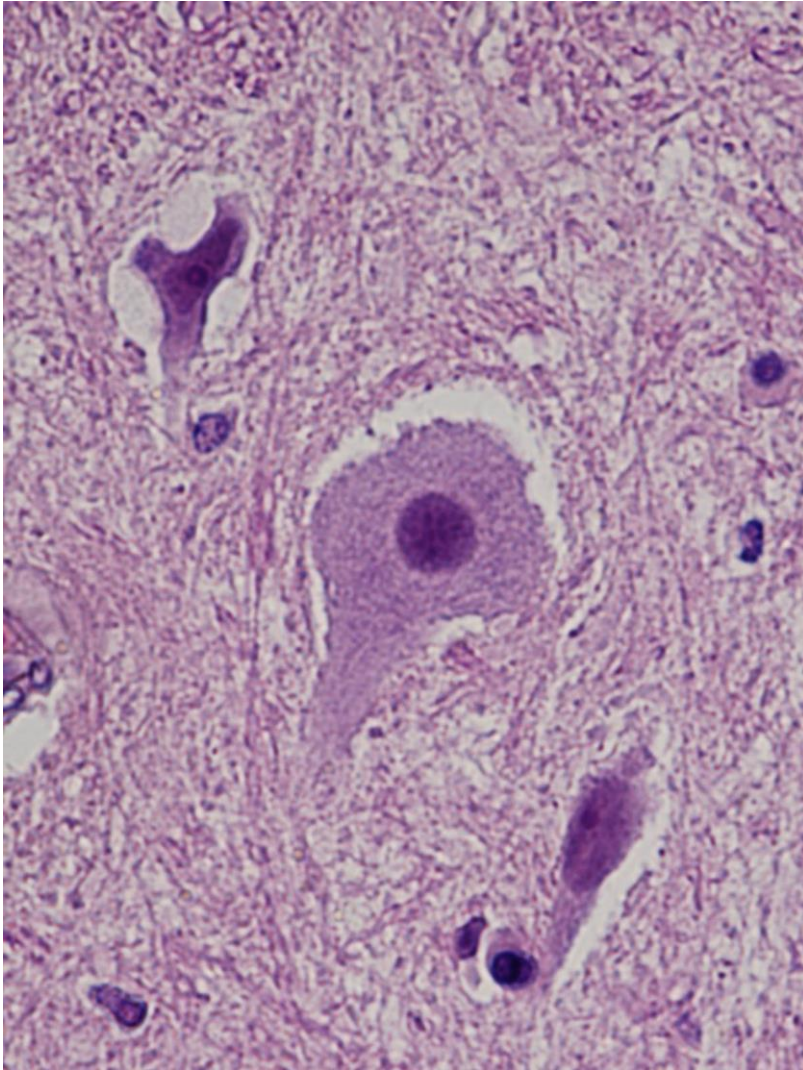
poruchy sluchu

kardiomyopatie

nefropatie

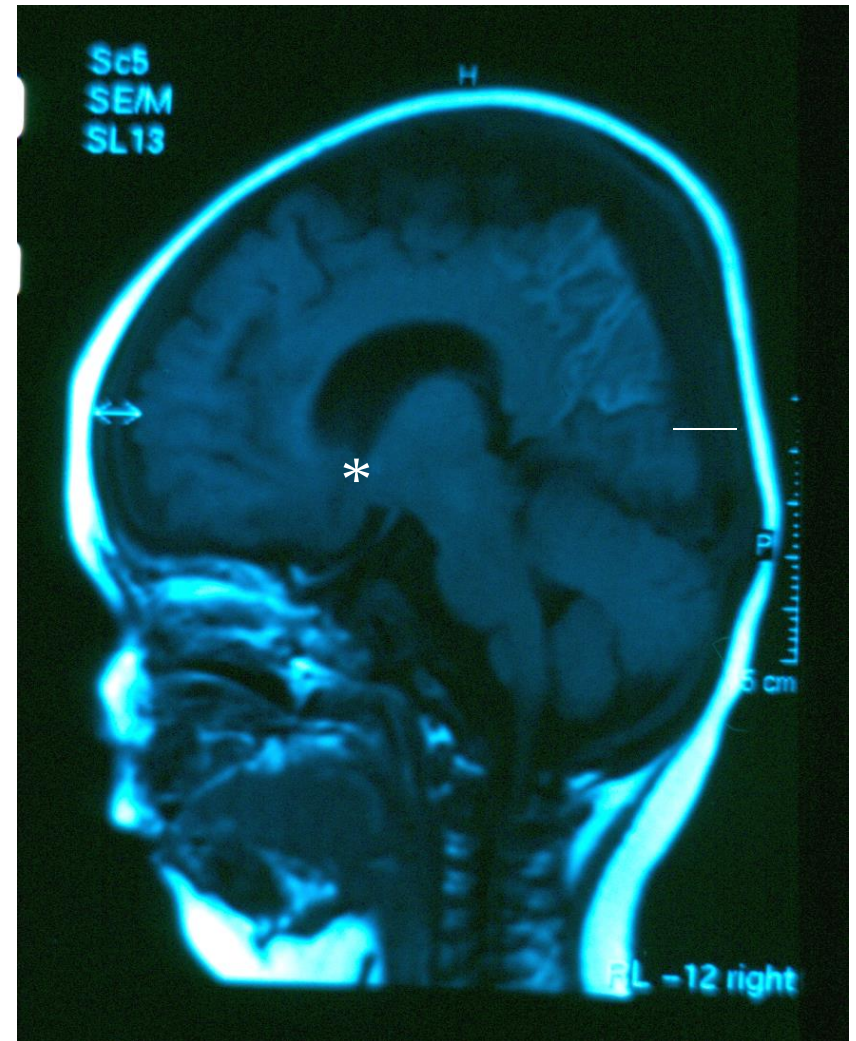
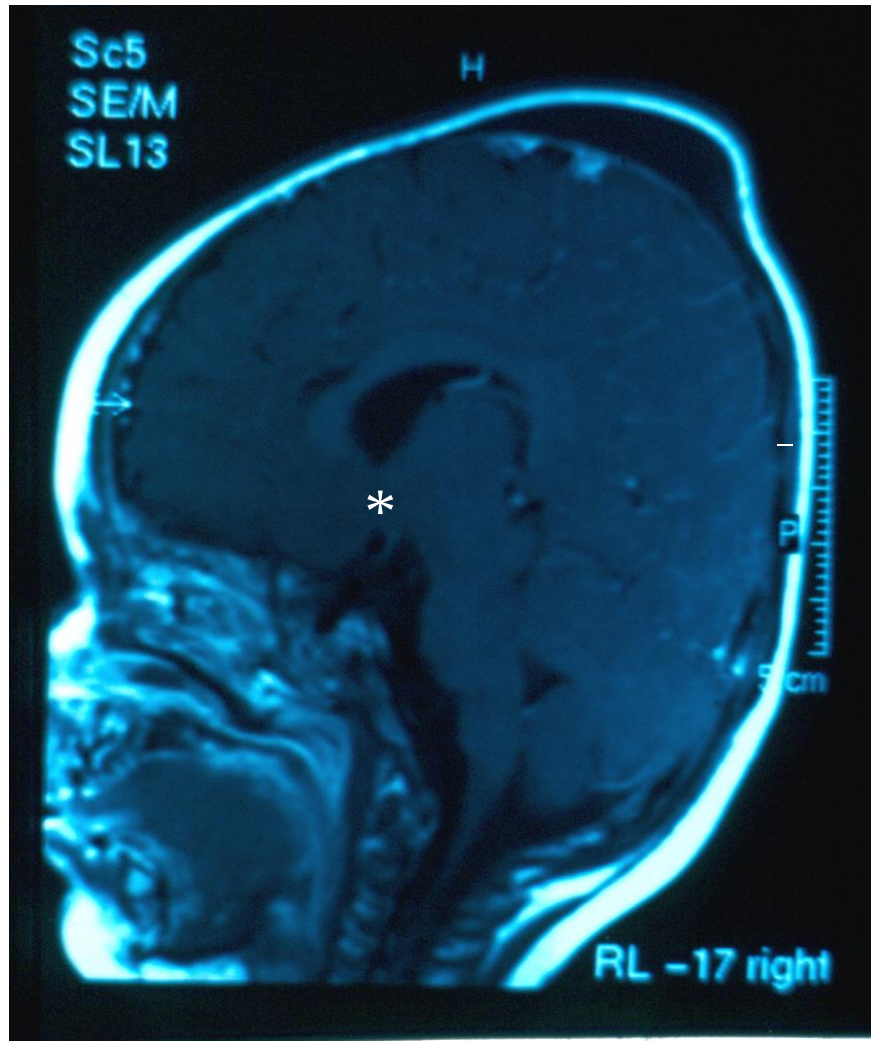
myopatie

Časná nebo pozdní manifestace



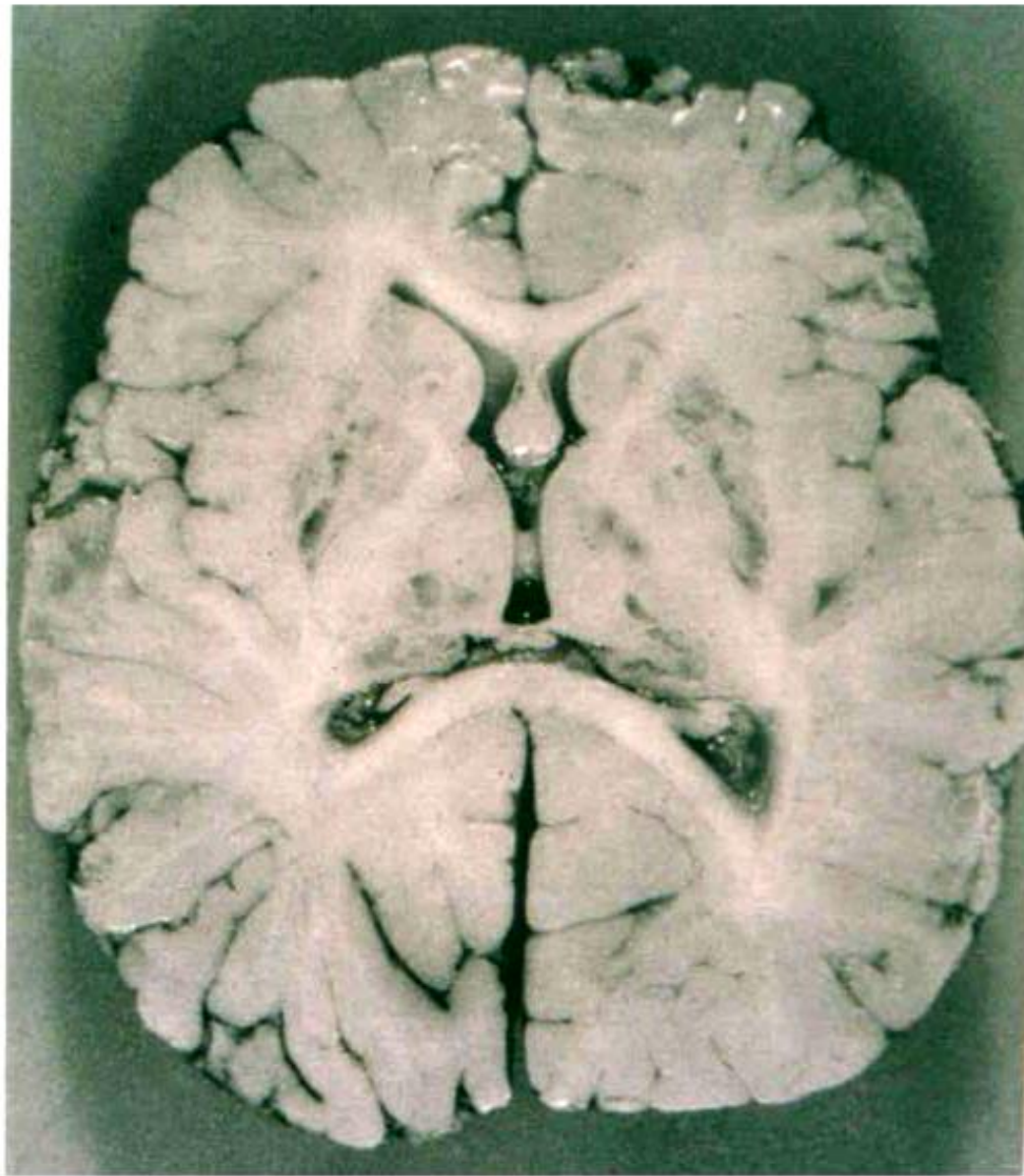
Neurodegenerace / neurodeplece

mtDNA deplece

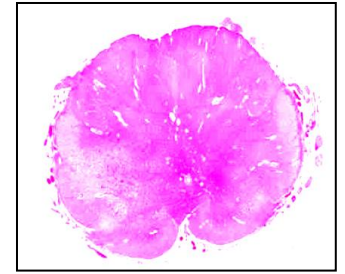


Progresivní úbytek mozkové hmoty
po 1 měsíci.

Leigh disease



MS

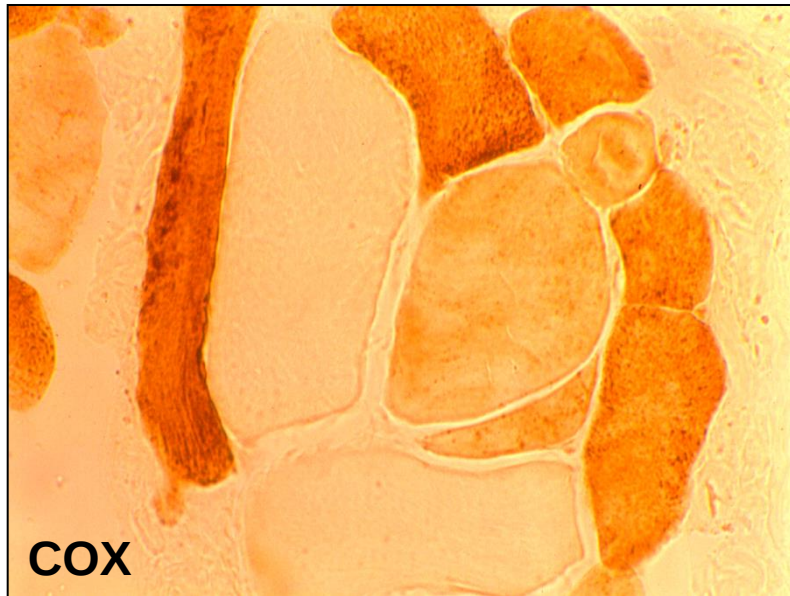


CRBL hemisféra

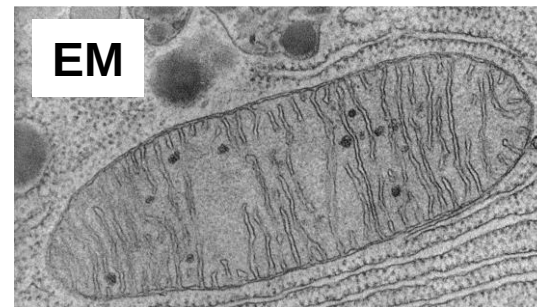
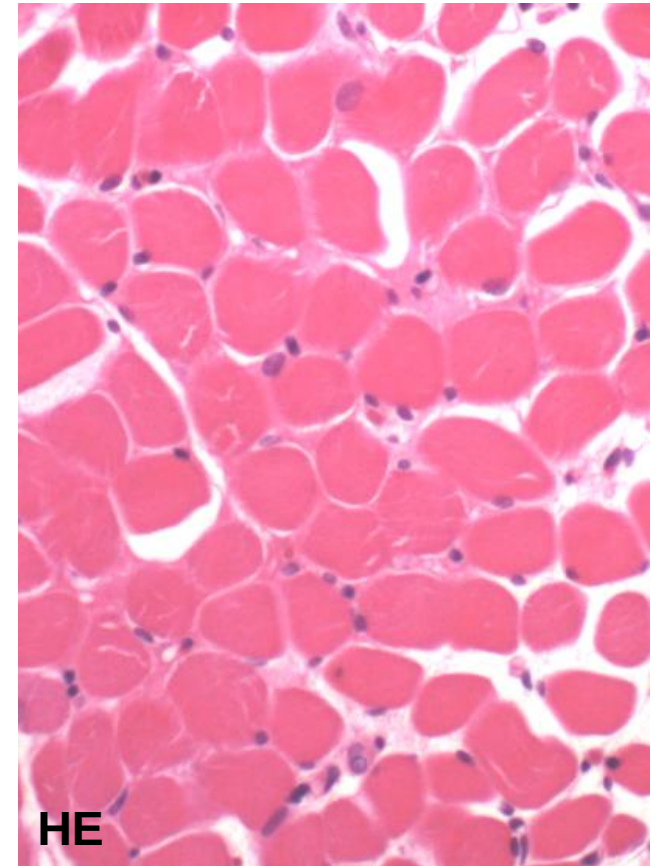


mitochondriální encephalomyelopatie se symetrickými nekrosami
akutní regresivní ložiskové změny

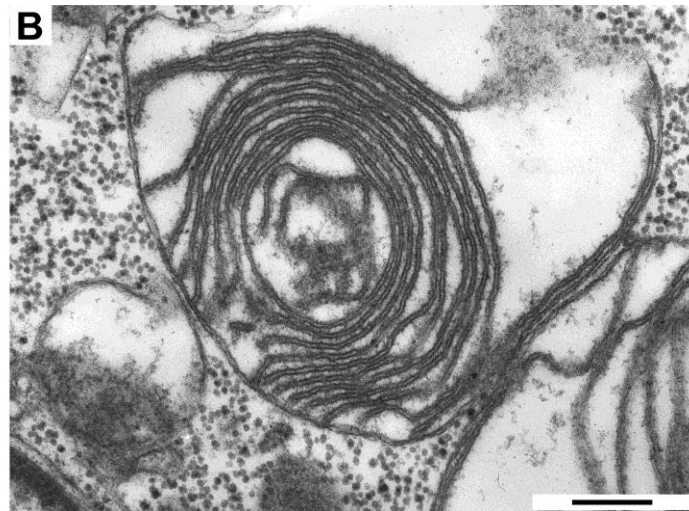
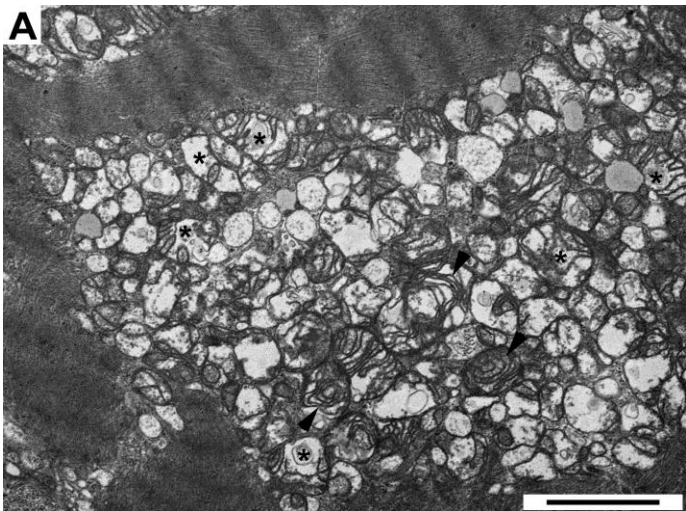
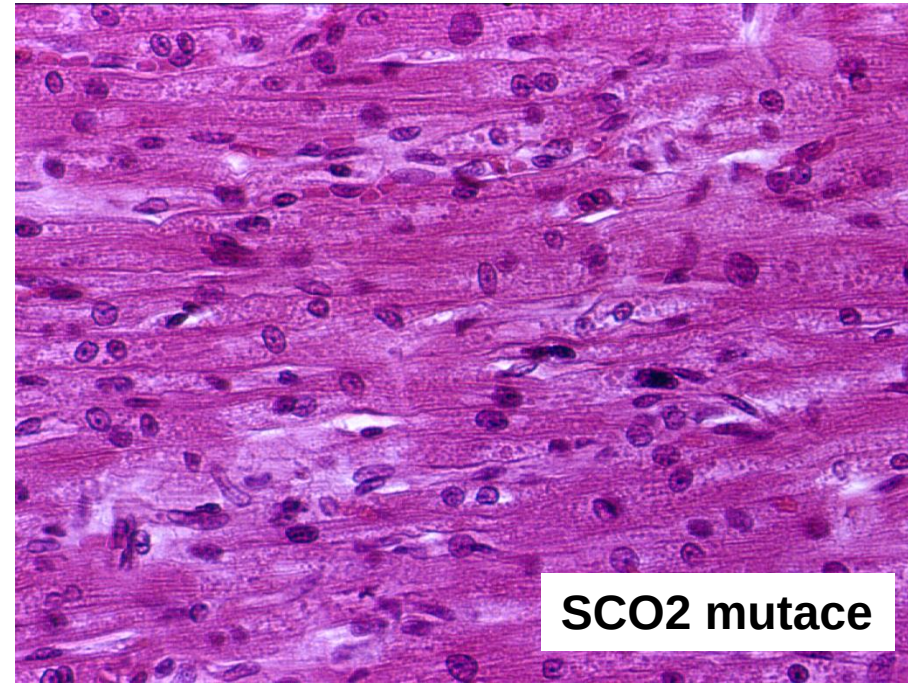
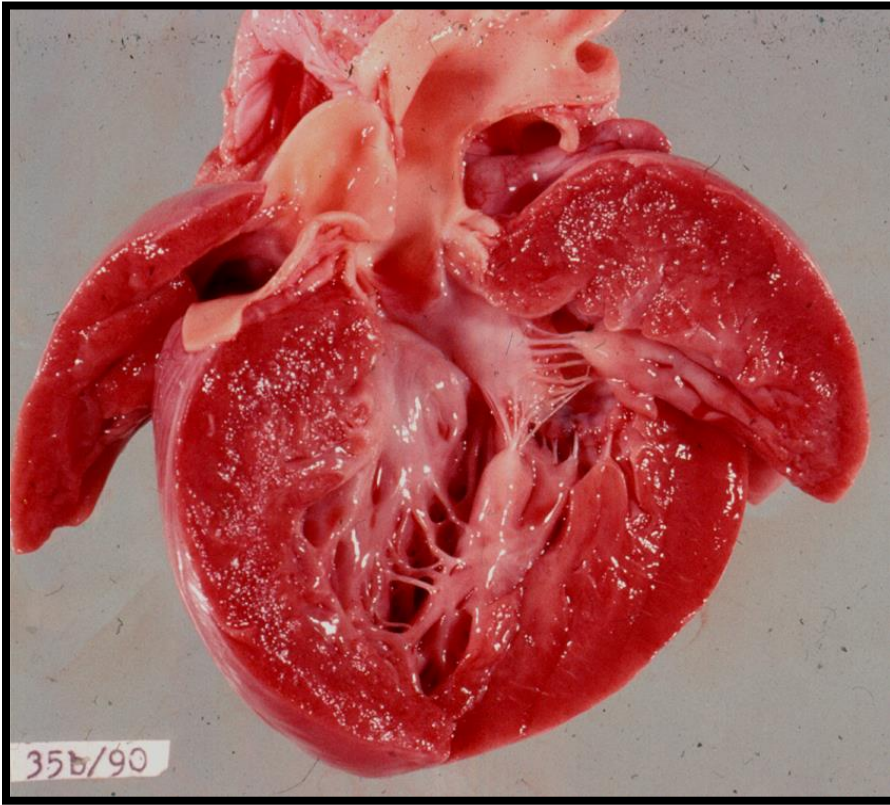
Mitochondriální myopatie



Kosterní sval-norma

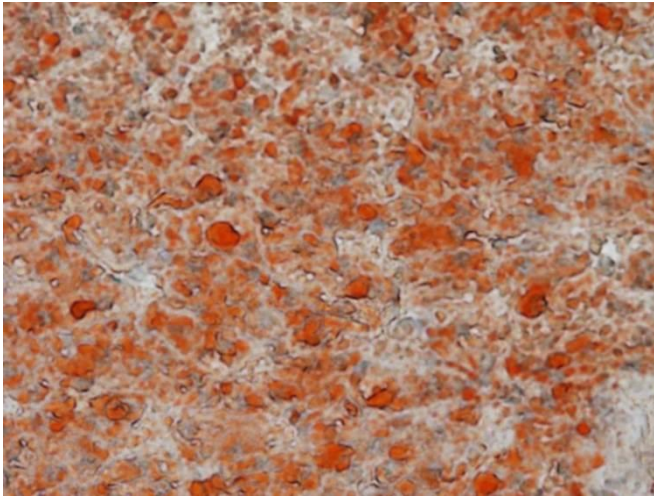


Hypertrofická kardiomyopatie

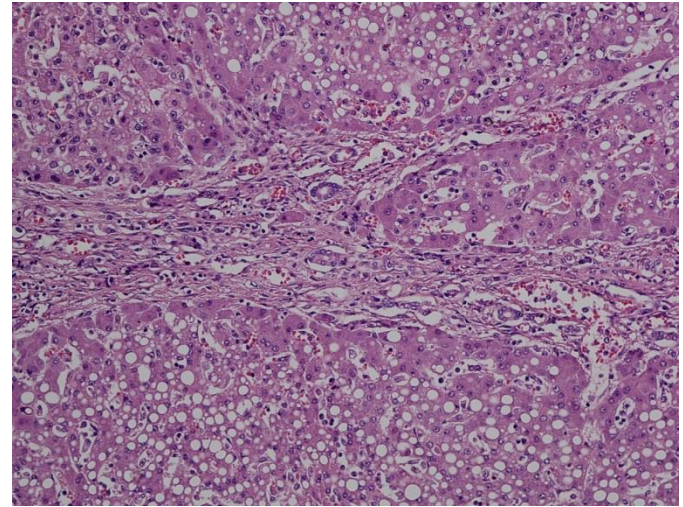


Impact of isolated
ATP synthase
deficit due to
TMEM70
mutations on
mitochondrial
ultrastructure.

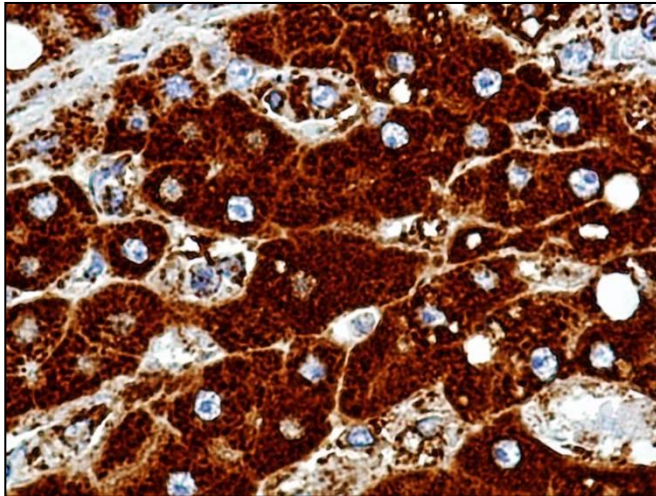
Mitochondriální hepatopatie



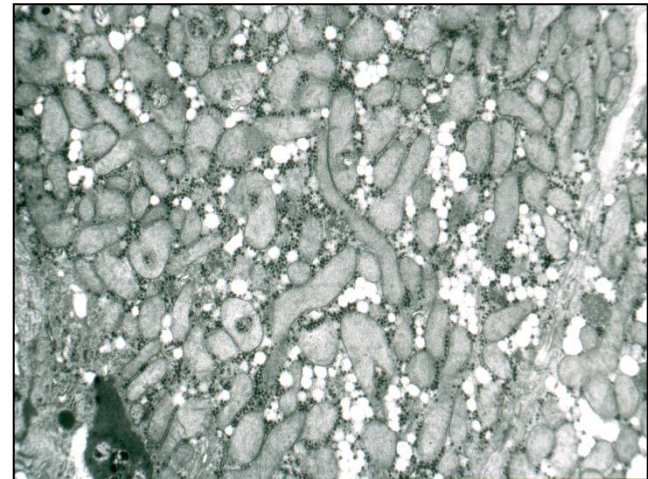
***ATP-syntáza (gDNA);
Oil Red O***



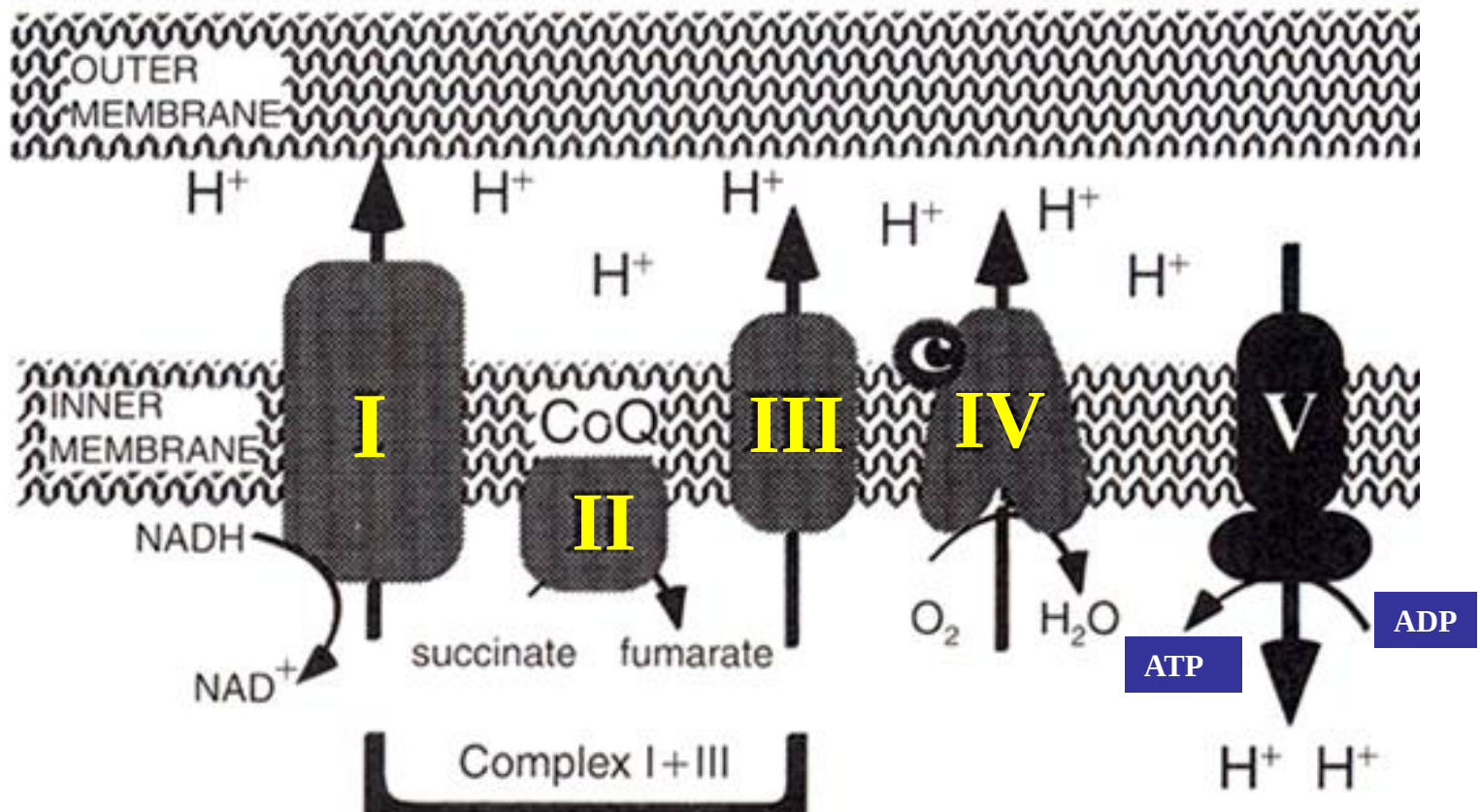
***mtDNA deplece (POLG);
cirhóza a steatóza***



mtDNA deplece, mt IHC

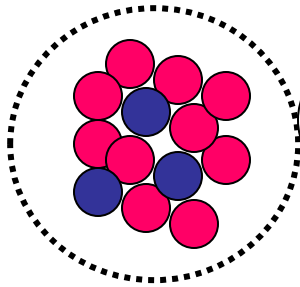


mtDNA deplece, EM

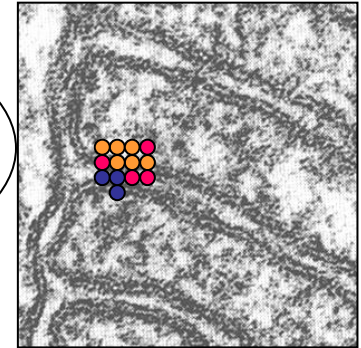


	Mt DNA	gDNA
Complex I (NADH CoQ red.)	7	40
Complex II (succinate CoQ red.)	0	4
Complex III (CoQ cytochrome c red.)	1	10
Complex IV (cytochrome c oxidase)	3	10
Complex V (ATP synthase)	2	10

Řada různých proteinů – 1 enzymový deficit

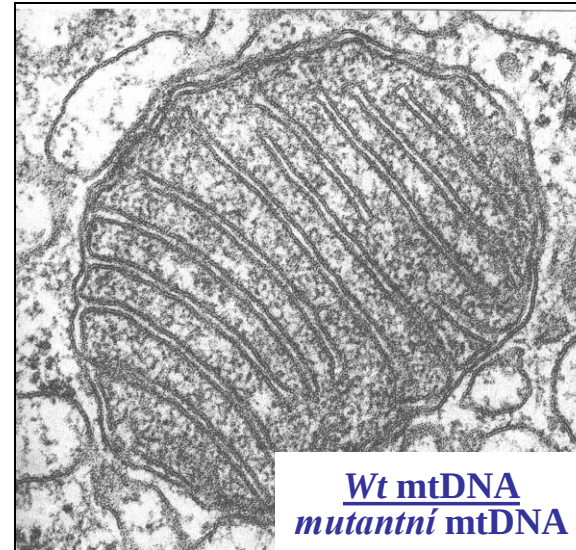
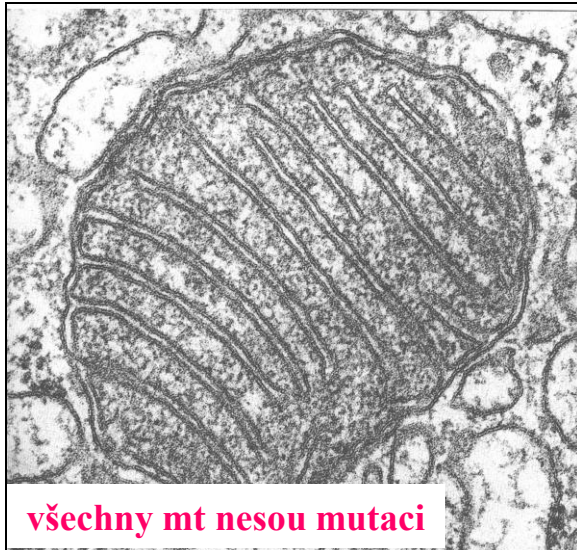


Jeden enzymový komplex
Jedna enzymatická funkce (COX)
13 podjednotek
(každá z nich nezbytná)



● 10 podjednotek kodovaných **gDNA**

● 3 podjednotky kodované **mtDNA**



**13 různých defektů vedoucích
k jednomu typu enzymového deficitu**

jaderný genom

x

mitochondriální genom

diploidní
aneuploidita patologická
↑ transkripce
replikace synchronní
paternální/maternální genom
heterozygocie/homozygocie
efektivní reparace
introny

polyploidní
variabilita běžná
amplifikace
replikace asynchronní
maternální původ
stupeň heteroplasmie
minimální schopnost reparace



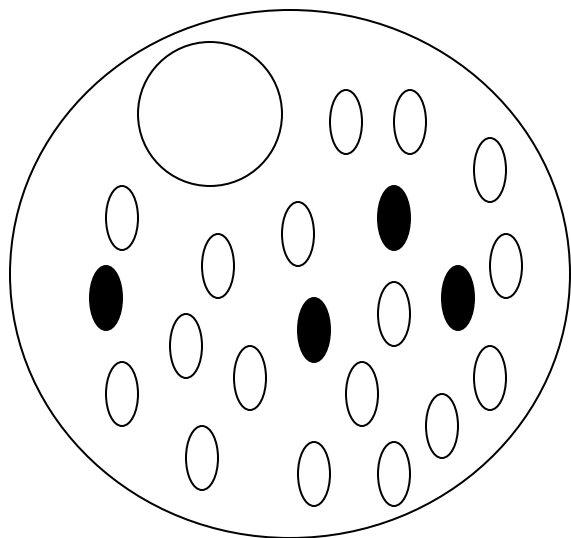
10-20x ↑ frekvence
mutací v mtDNA

cca 1000 mitochondrií/v buňce
10-20 kopií mt DNA v 1 mitochondrii
= cca 10-20 000 mtDNA/v buňce

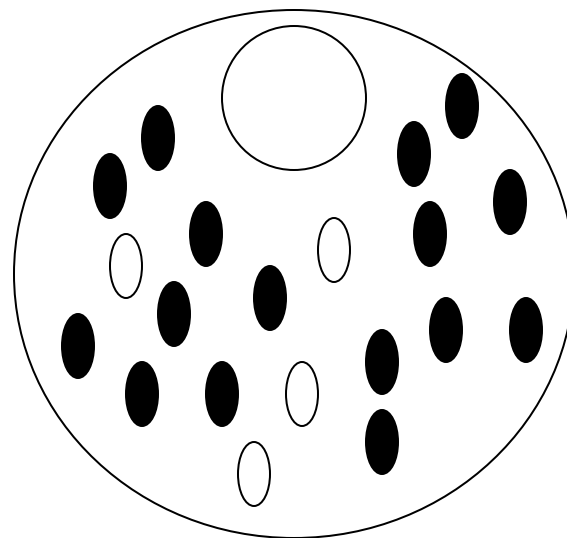
Principy mitochondriální genetiky

- maternální dědičnost mt DNA mutací (cytoplasmický původ mtDNA)
- → **replikativní segregace mutace v čase** → **heteroplazmie** →
→ **mozaikovitý charakter defektu**
- +absence efektivních reparativních mechanismů mtDNA
- → **mutace klonálně proliferuje v čase**
- úroveň oxidativní fosforylace v buňce je výsledkem funkce všech mitochondrií v buňce
- → **prahová exprese OXPHOS defektu**
- *nárůst somatických mutací v mtDNA s věkem (ROS)*

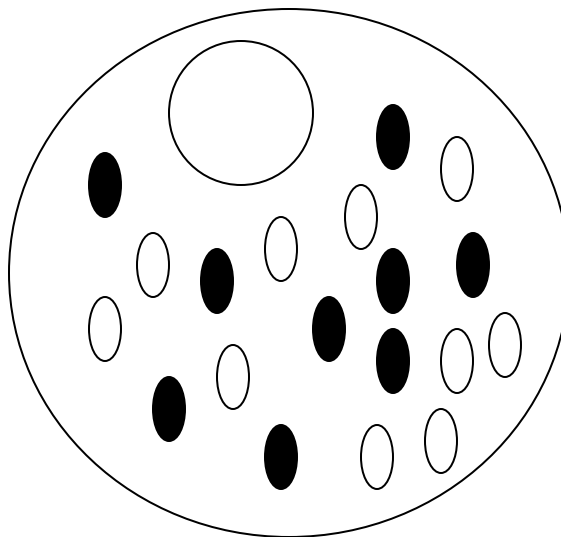
Stupeň heteroplasmie pro mtDNA mutaci



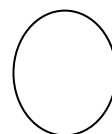
Nízký stupeň heteroplasmie
pro mt DNA mutaci



Vysoký stupeň heteroplasmie
pro mt DNA mutaci

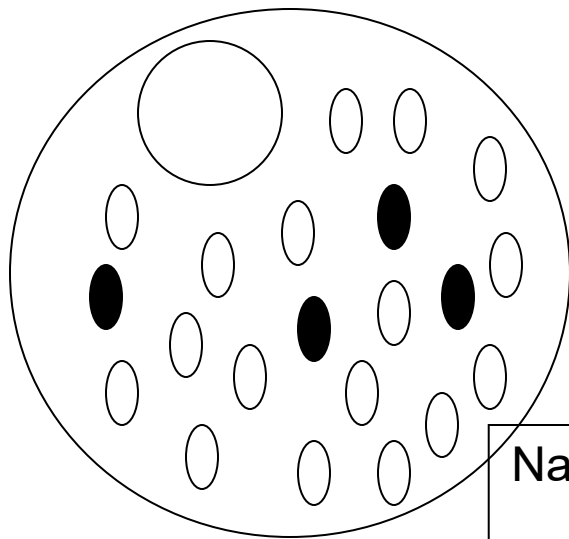


mutantní mt

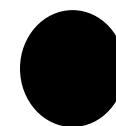
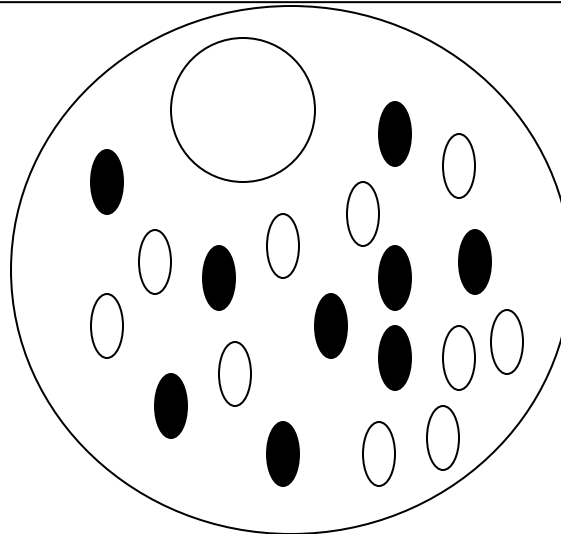
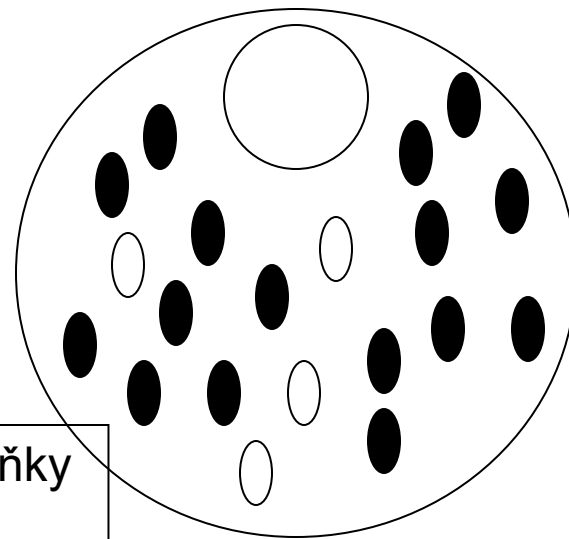


wt mt

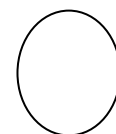
Prahová exprese OXPHOS defektu v buňkách



Narušení respiračních fcí buňky
při dosažení množství
mutantních mtDNA kopií
60-90%.



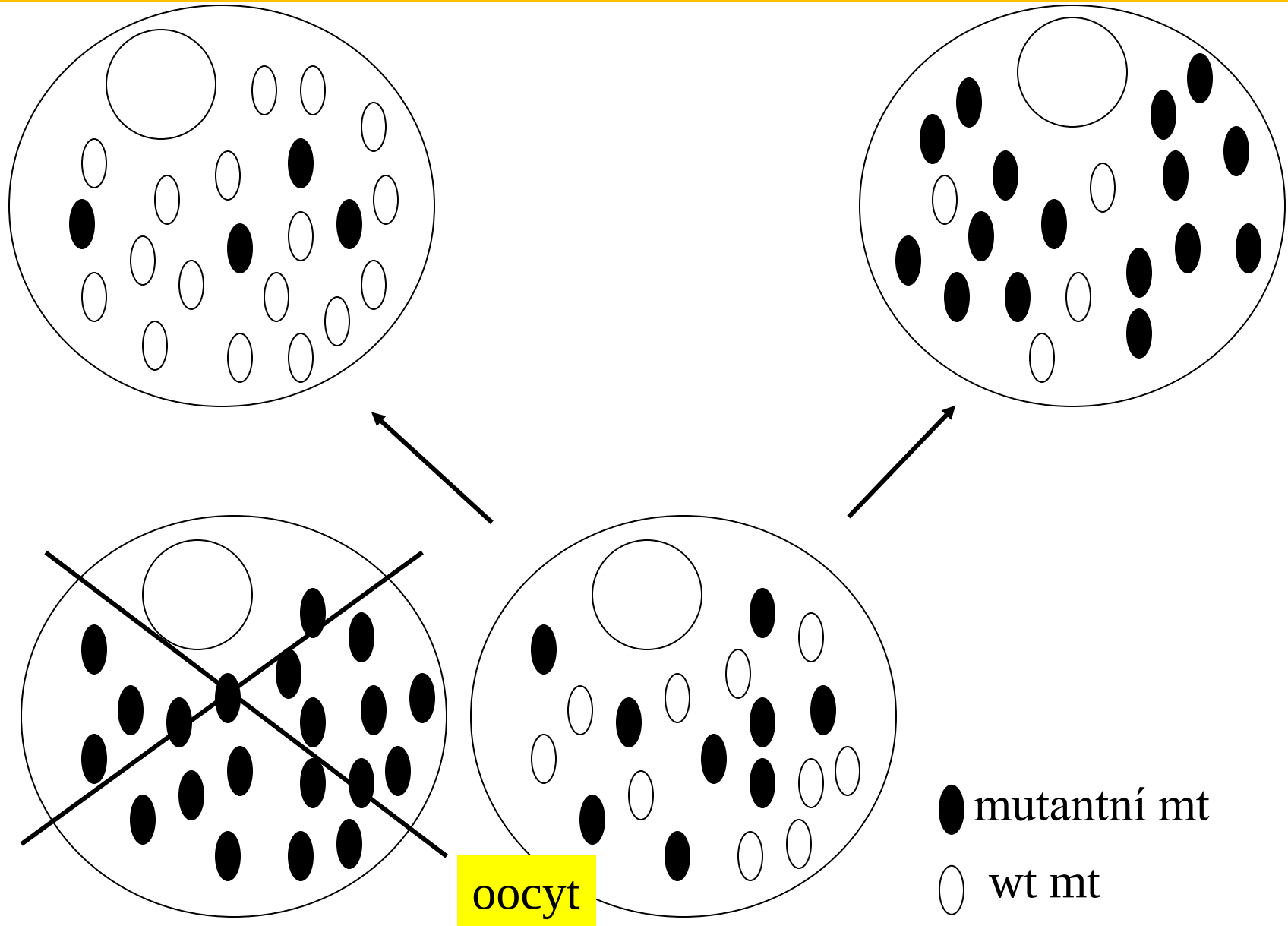
mutantní mt



wt mt

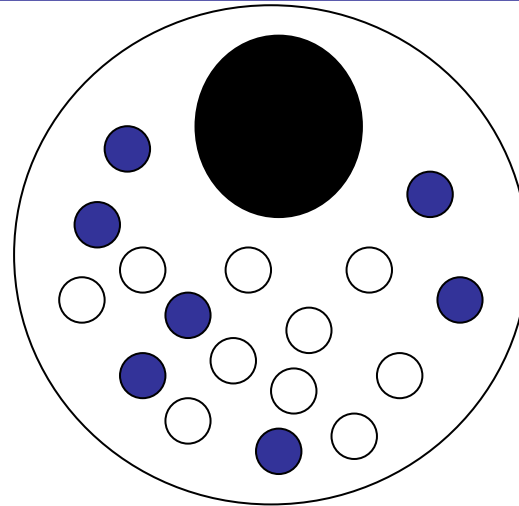
OXPHOS defekt (← mt DNA mut.) - propagace během buň. dělení

Replikativní segregace mutace v čase



Replikativní segregace mutace v čase

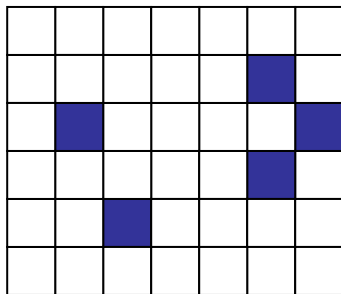
fertilizovaný oocyt



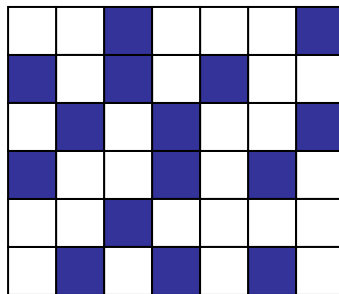
● mutantní mt

○ wt mt

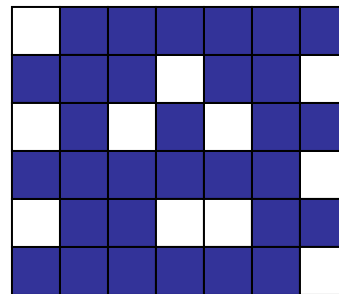
mozaikovitý typ postižení



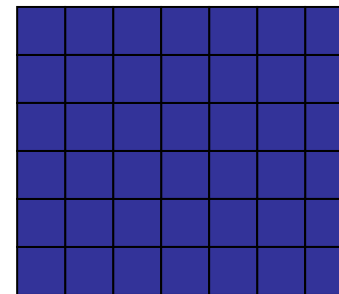
orgán I



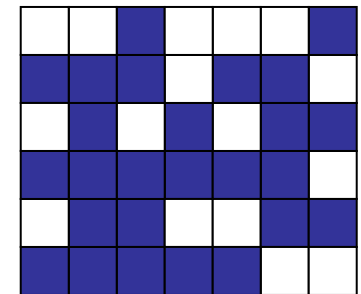
orgán II



orgán III

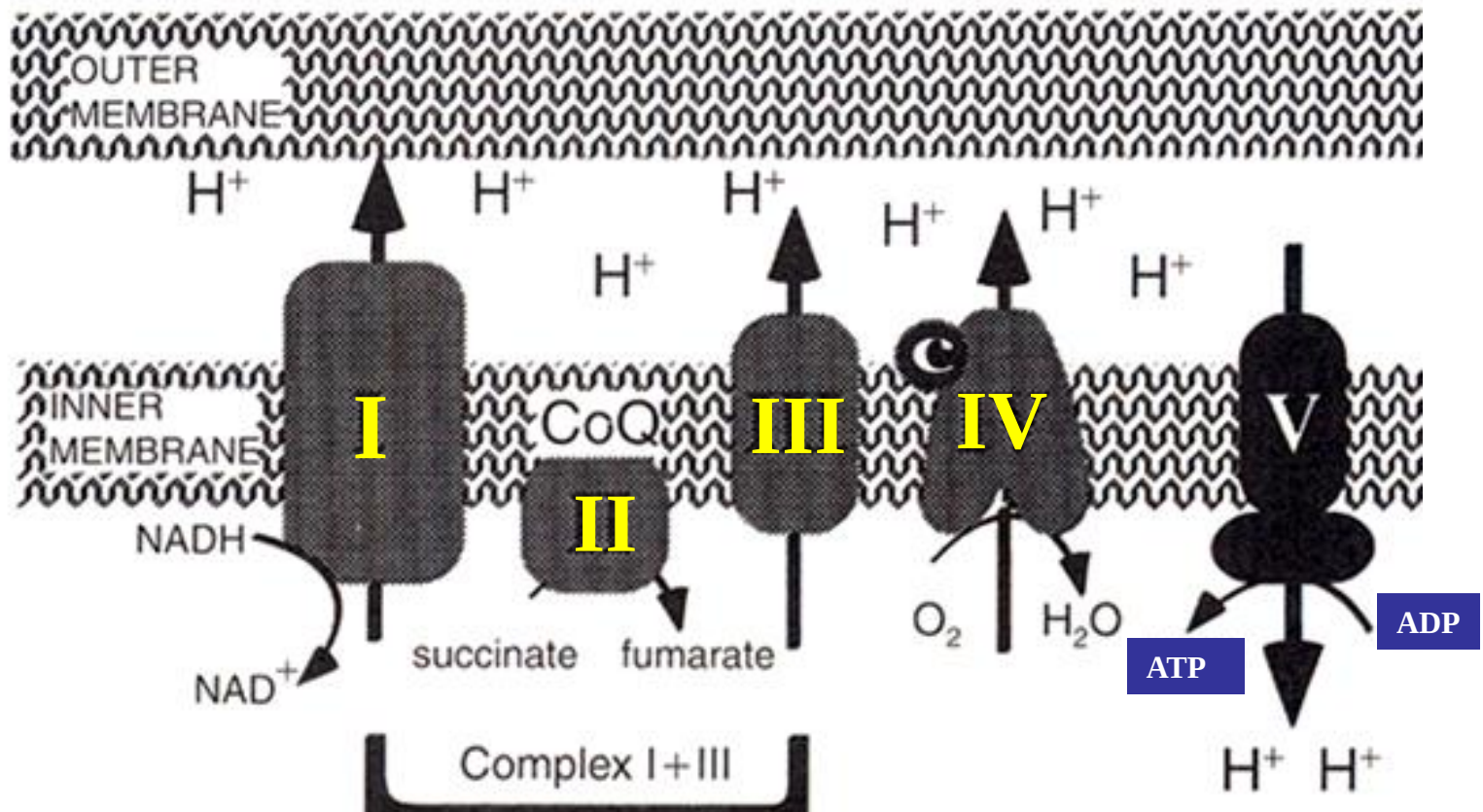


orgán IV



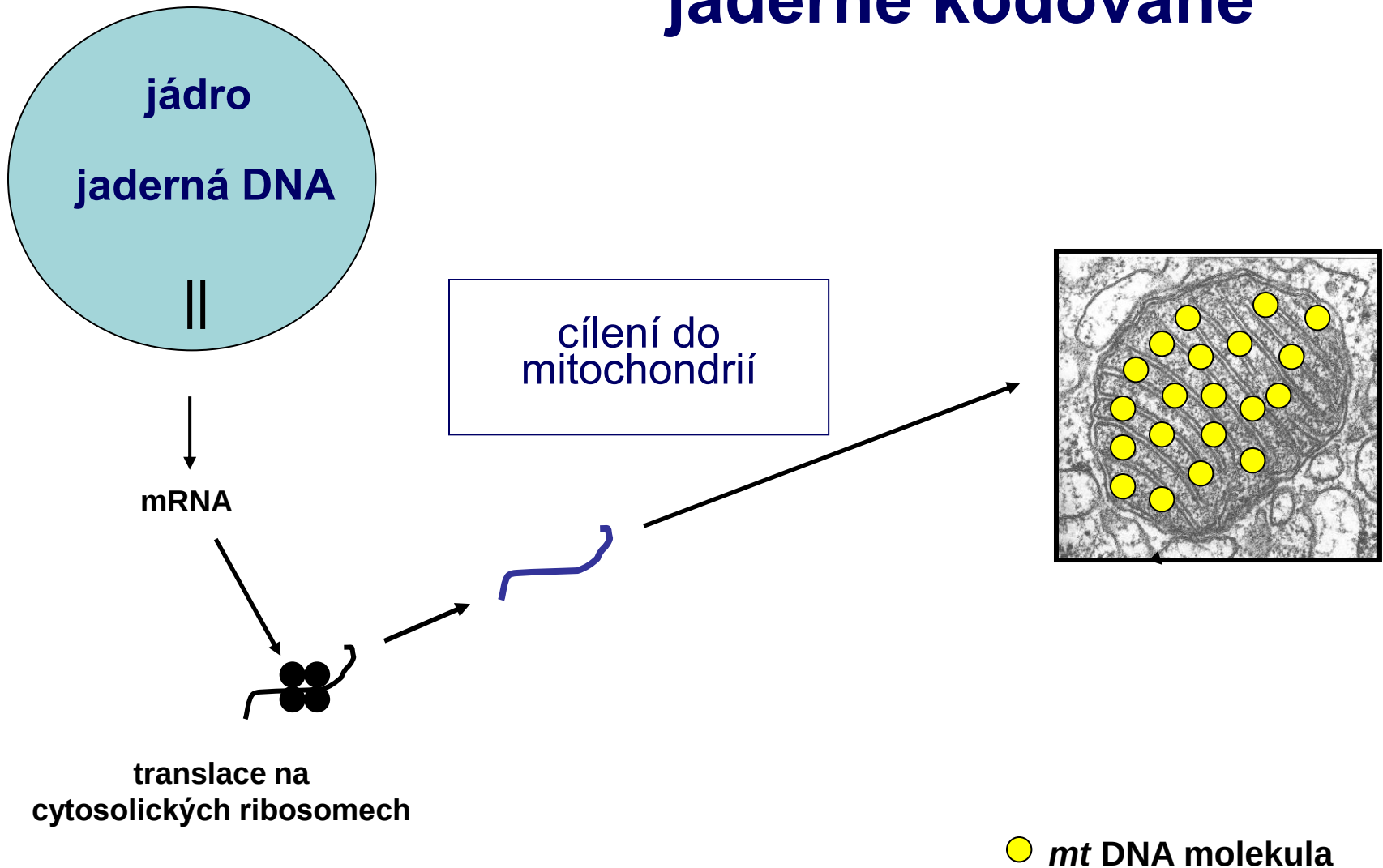
orgán V

způsobující mozaikovitý charakter OXPHOS defektu



	Mt DNA	gDNA
Complex I (NADH CoQ red.)	7	40
Complex II (succinate CoQ red.)	0	4
Complex III (CoQ cytochrome c red.)	1	10
Complex IV (cytochrome c oxidase)	3	10
Complex V (ATP synthase)	2	10

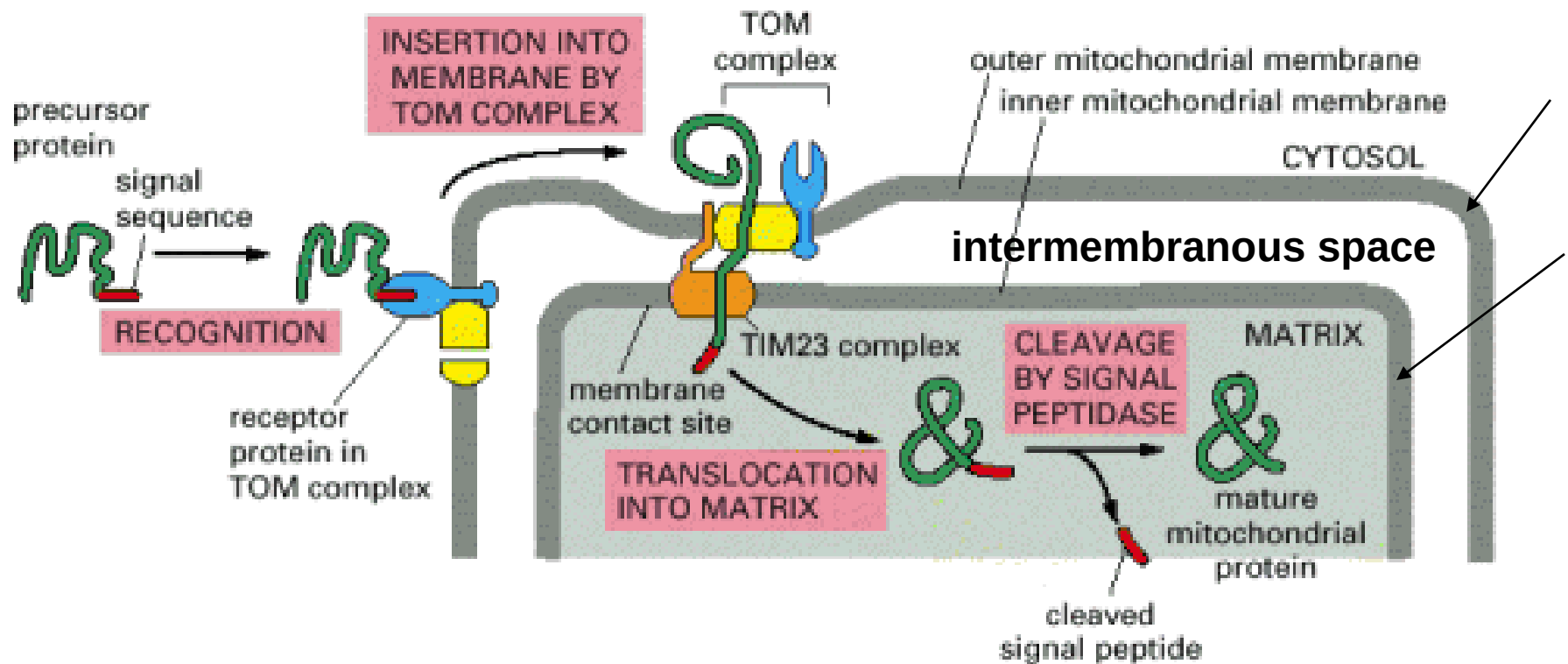
mitochondriální proteiny jaderně kodované



Tab 12-3 AMK signální sekvence

FUNCTION OF SIGNAL SEQUENCE	EXAMPLE OF SIGNAL SEQUENCE
Import into nucleus	-Pro-Pro- Lys-Lys-Lys-Arg-Lys -Val-
Export from nucleus	- Leu -Ala- Leu -Lys- Leu -Ala-Gly- Leu -Asp- Ile -
Import into mitochondria	*H ₃ N-Met-Leu-Ser-Leu- Arg -Gln-Ser-Ile- Arg -Phe-Phe- Lys -Pro-Ala-Thr- Arg -Thr-Leu-Cys-Ser-Ser- Arg -Tyr-Leu-Leu-
Import into plastid	*H ₃ N-Met-Val-Ala-Met-Ala-Met-Ala- Ser -Leu-Gln- Ser-Ser -Met- Ser-Ser -Leu- Ser -Leu- Ser-Ser -Asn- Ser -Phe-Leu-Gly-Gln-Pro-Leu- Ser -Pro-Ile- Thr -Leu- Ser -Pro-Phe-Leu-Gln-Gly-
Import into peroxisomes	- Ser-Lys-Leu -COO ⁻
Import into ER	*H ₃ N-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser- Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu -Gln-Leu-Thr- Lys -Cys- Glu -Val-Phe-Gln-
Return to ER	- Lys-Asp-Glu-Leu -COO ⁻

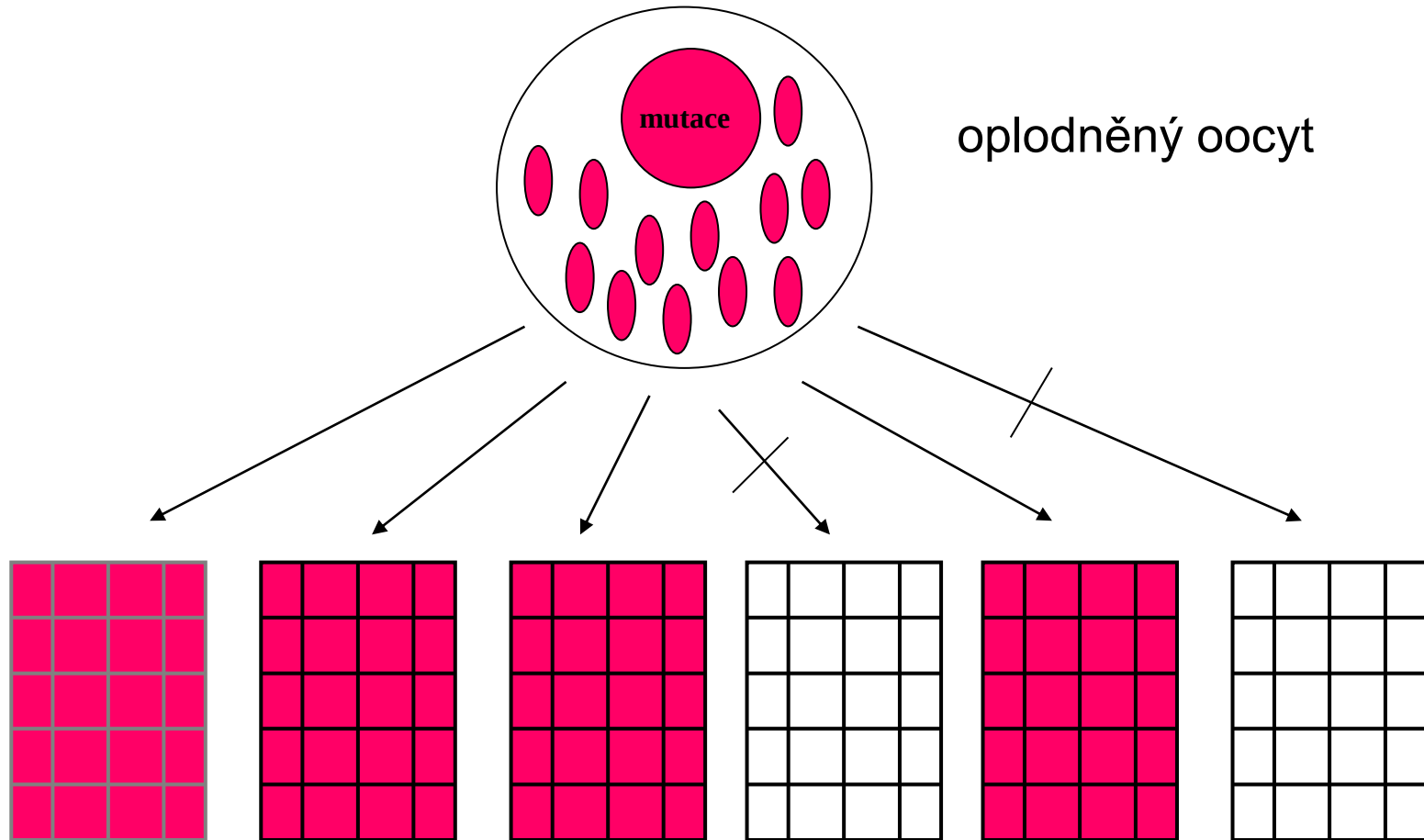
Some characteristic features of the different classes of signal sequences are highlighted in color. Where they are known to be important for the function of the signal sequence, positively charged amino acids are shown in *red* and negatively charged amino acids are shown in *green*. Similarly, important hydrophobic amino acids are shown in *yellow* and hydroxylated amino acids are shown in *blue*. *H₃N indicates the N-terminus of a protein; COO⁻ indicates the C-terminus.



**Kontaktní místa mezi zevní/vnitřní mt membránou
receptory, transmembránové translokátory, chaperony**

Mutace v jaderné DNA

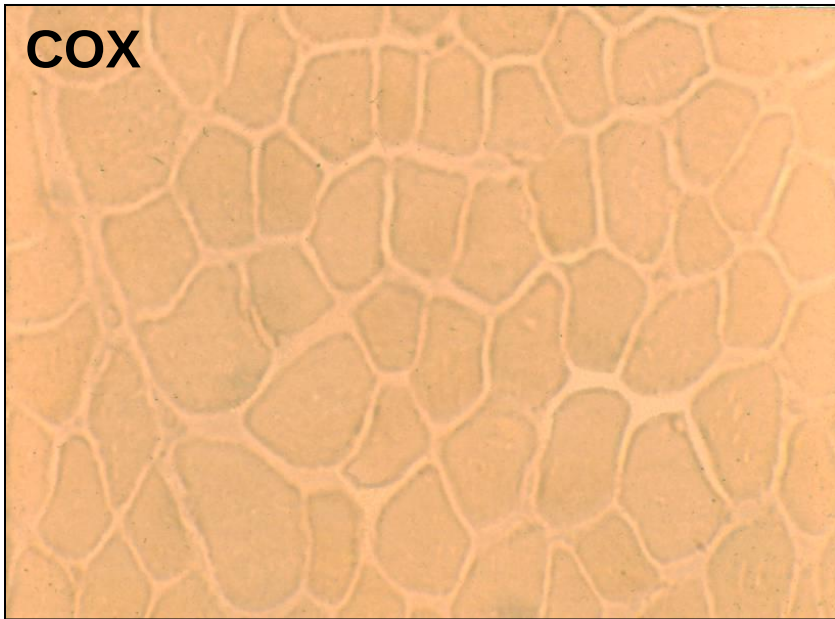
uniformní propagace mutace do všech mt a buněk



uniformní postižení buněk v rámci jednoho orgánu

Mohou být přítomné rozdíly mezi orgány

COX



Kosterní svaly

gDNA (SURF1)

infantilní průběh
(úmrtí v 1 roce věku)

uniformní charakter

COX



mtDNA (MELAS)

adultní průběh
(projevy ve 45 letech věku)

**mozaikovitý obraz
heteroplasmie**

gDNA

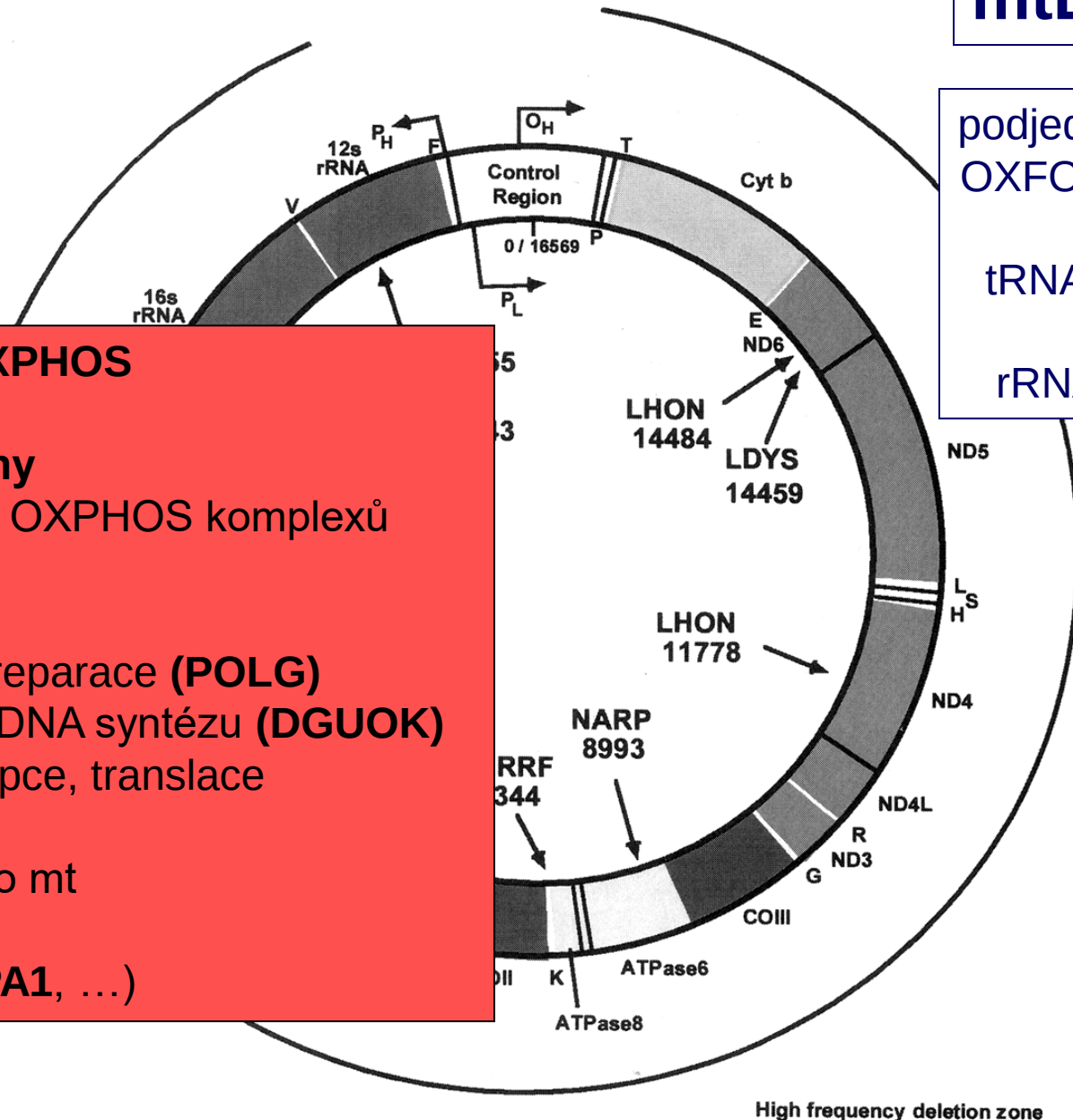
mtDNA

podjednotky
OXFOS (13)

tRNA (22)

rRNA (2)

- 74 podjednotek OXPHOS
- **asemblační proteiny**
- funkčnost a stabilita OXPHOS komplexů (**frataxin**, ...)
- mtDNA replikace a reparace (**POLG**)
- přísun dNTP pro mtDNA syntézu (**DGUOK**)
- regulace mt transkripce, translace
- transport proteinů do mt
- mt fuze/štěpení (**OPA1**, ...)



mtDNA

**podjednotky
OXPHOS (13)**

tRNA (22)

rRNA (2)

**podjednotky
OXPHOS (13)**

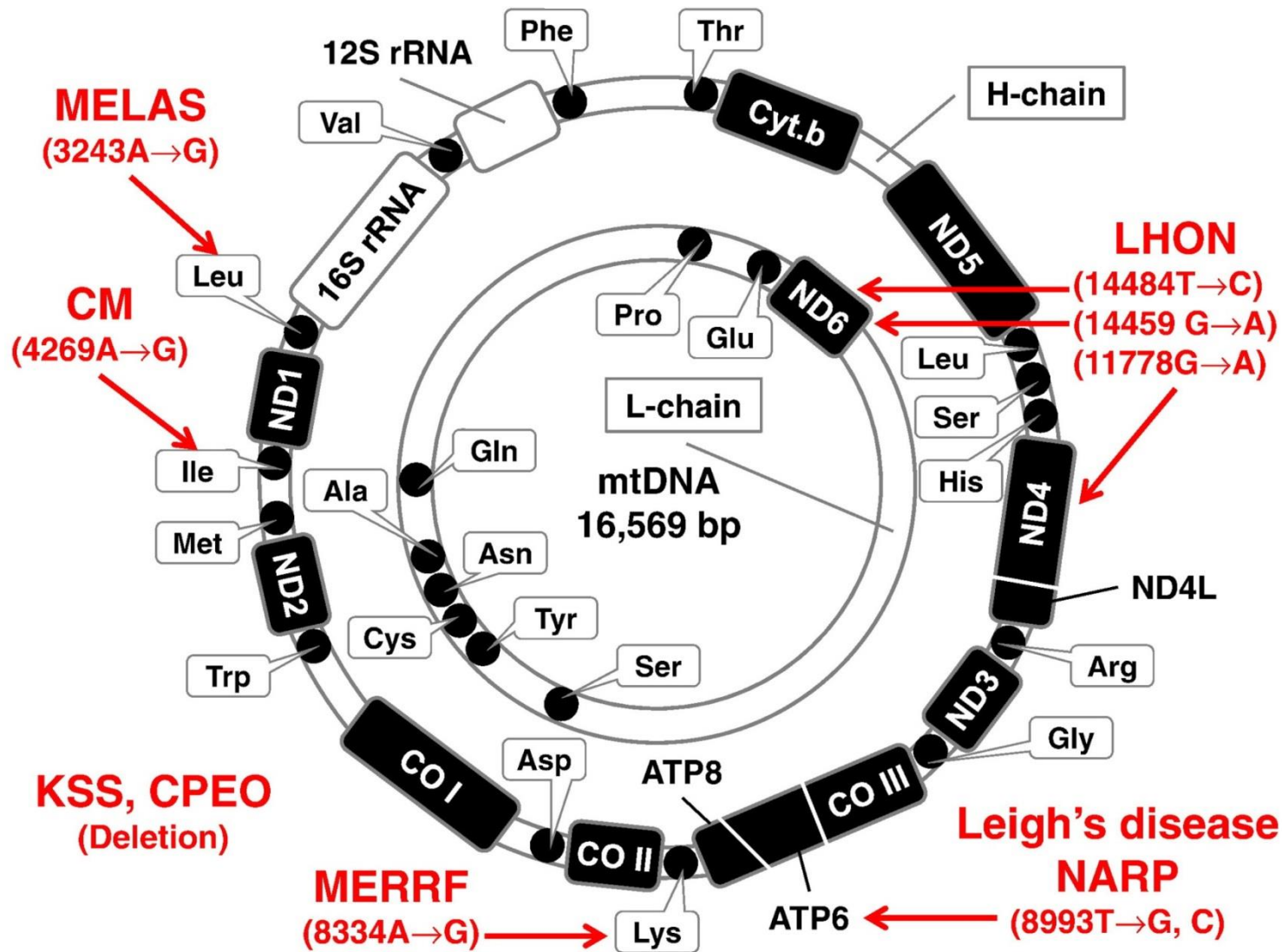
tRNA (22)

rRNA (2)

**podjednotky
OXPHOS (13)**

tRNA (22)

rRNA (2)



MERRF: myoclonic epilepsy and ragged red fibres

point mtDNA mutation in a gene for **tRNA** (heteroplasmic mutations for lysine in position 8344)

MELAS: myoclonic encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes

point mtDNA mutation in a gene for **tRNA** (heteroplasmic mutations for leucine in position 3243)

LS: Leigh's sndrome (encephalopathy)

point mutation in position 8993 in the gene for **subunit 6 ATP-synthase (mtDNA)** with high degree of heteroplasmy

gDNA (flavoprotein **subunit of complex II, complex I** subunit, mutation in **SURF1** → COXd)

NARP: neurogenic muscle weakness, ataxia, retinitis pigmentosa

homoplasmic **point mutation** in position 8993 in the gene for **subunit 6 ATP-synthase (mtDNA)**

LHON: Leber's hereditary optic neuropathy

point mutations in mtDNA encoded subunits of complex I, III or IV:

most frequently homoplasmic mutations for ND4 (11778), ND2 (3460);

other pathologic mutations in genes for cytochrome b (15257), and COX I (7444)

Kearns-Sayers syndrome – progressive external ophthalmoplegia and pigmentary retinopathy

multiple heteroplasmic spontaneous **deletions in mtDNA**

CPEO: chronic progressive external ophthalmoplegia (onset after 20 years of age)

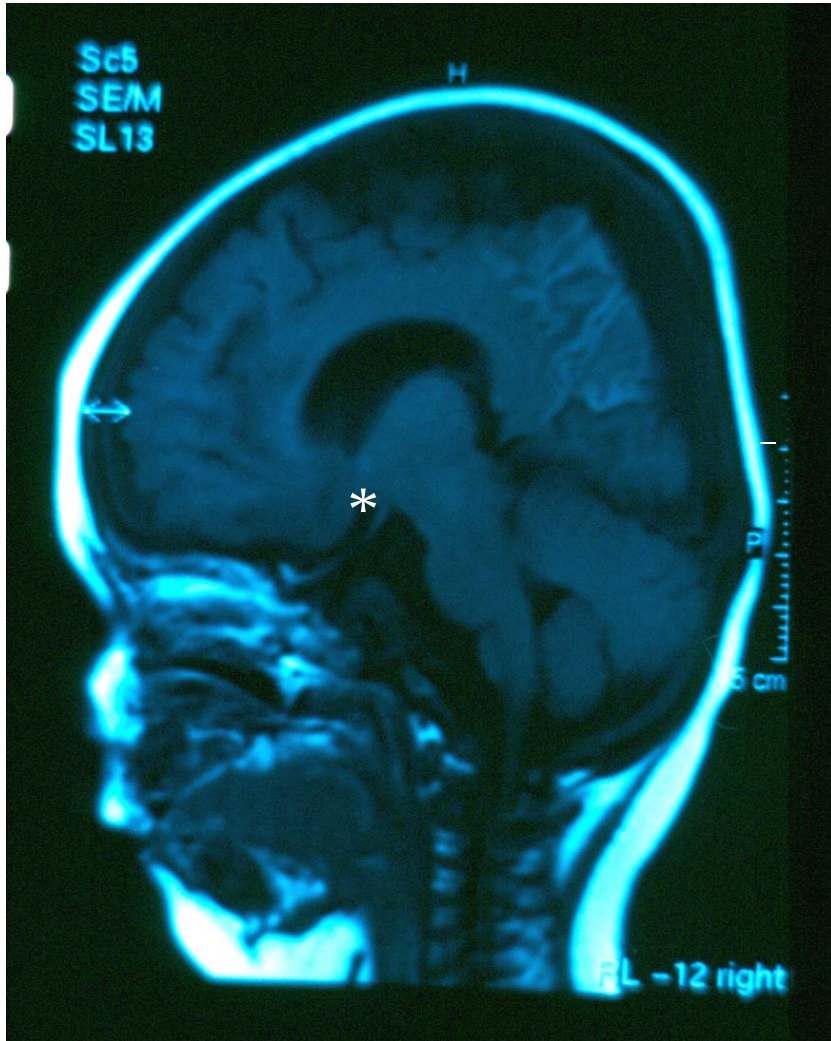
multiple heteroplasmic spontaneous **deletions in mtDNA**

Pearson syndrome: sideroblastic anemia with vacuolated ***bone marrow*** precursors associated with exocrine pancreatic insufficiency, enteropathy, diabetes mellitus and renal Fanconi syndrome (liver involvement possible)

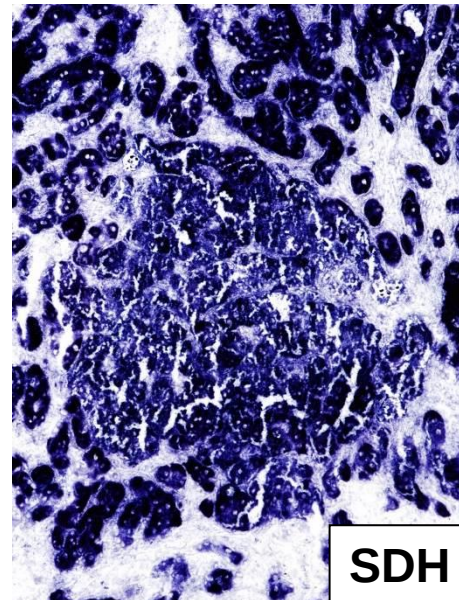
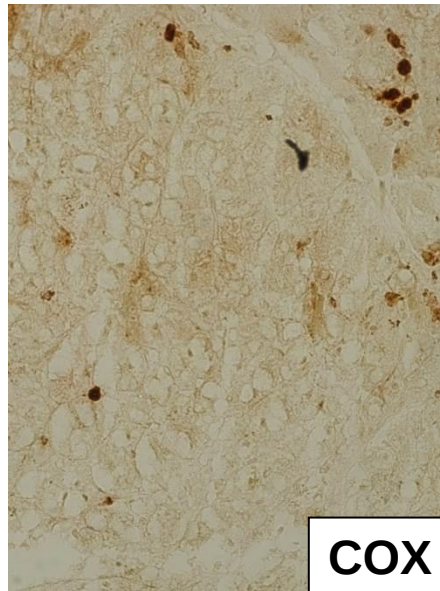
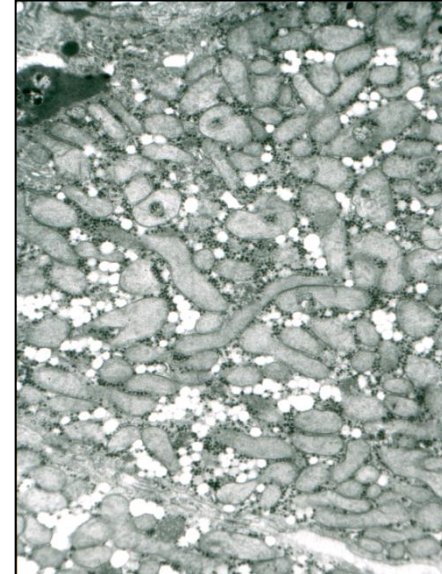
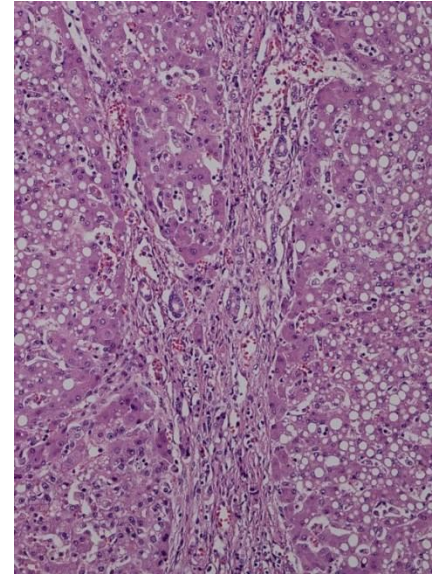
heteroplasmic spontaneous **deletions in mt DNA**

mtDNA deplece (POLG)

Hepatopatie



Progresivní úbytek
mozkové hmoty



encefalopatie
neurologické symptomy

oftalmopatie
ptóza víček

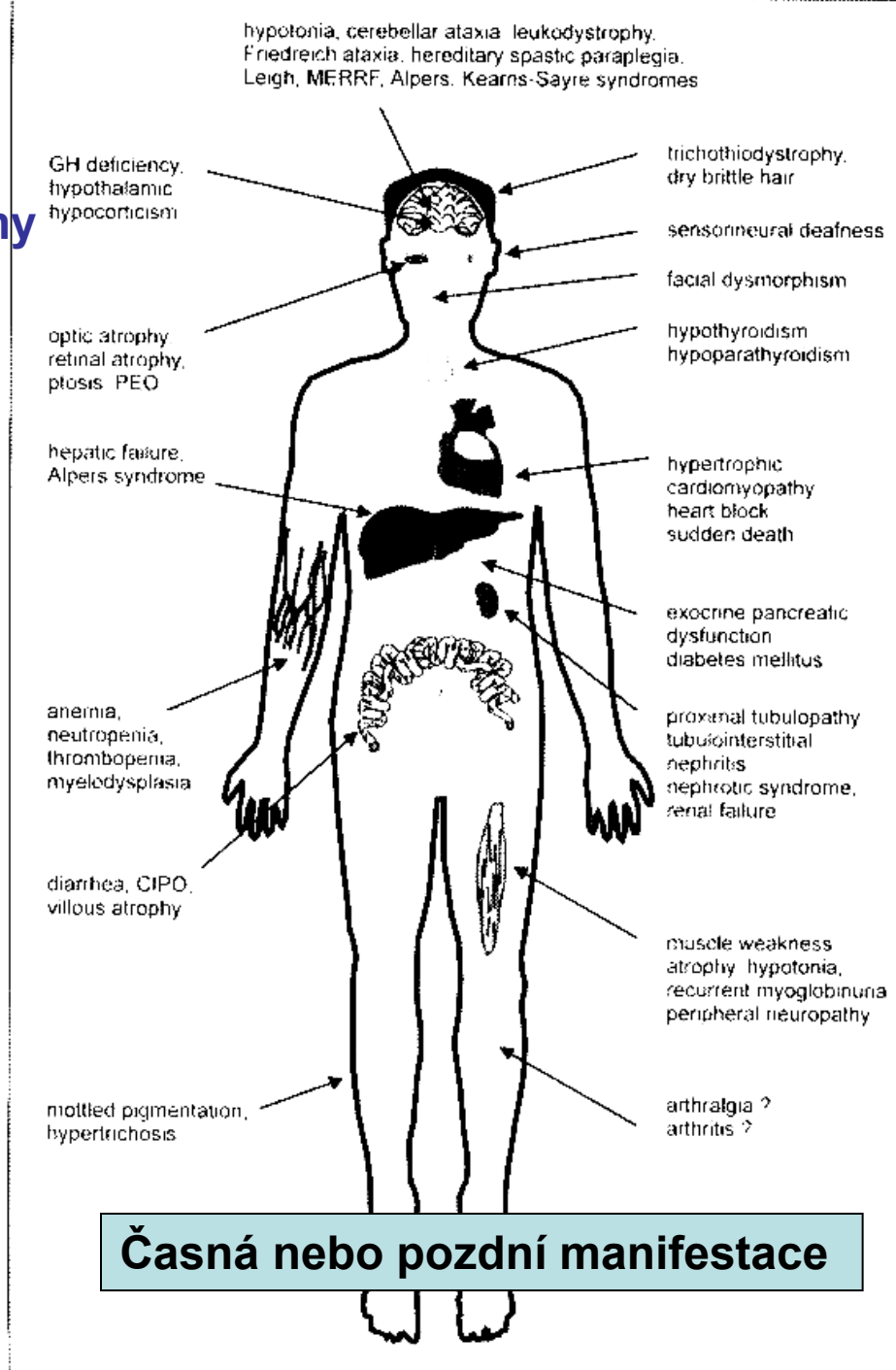
hepatopatie

poruchy
krvetočvorby

gastroenteropatie

endokrinopatie

kožní příznaky



poruchy sluchu

kardiomyopatie

nefropatie

myopatie

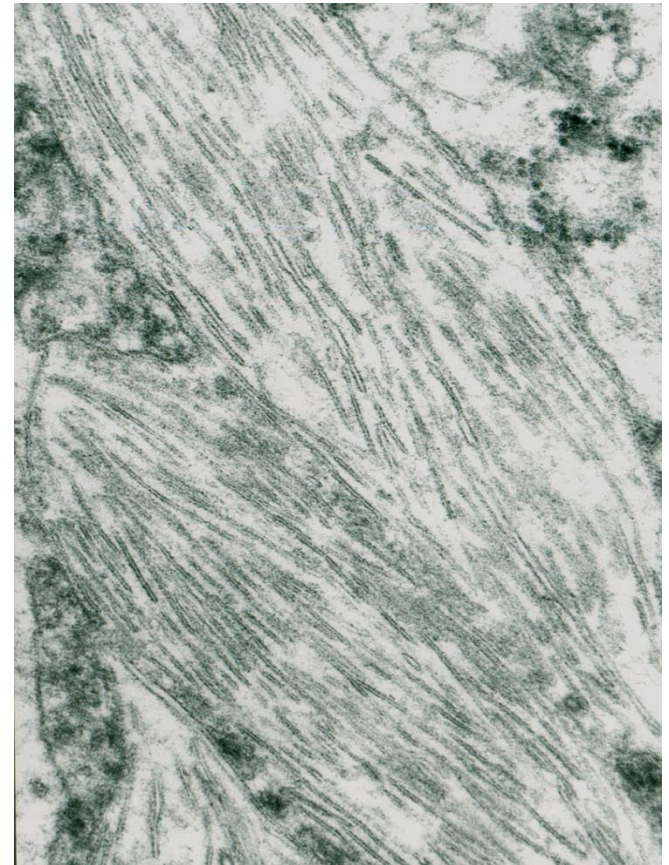
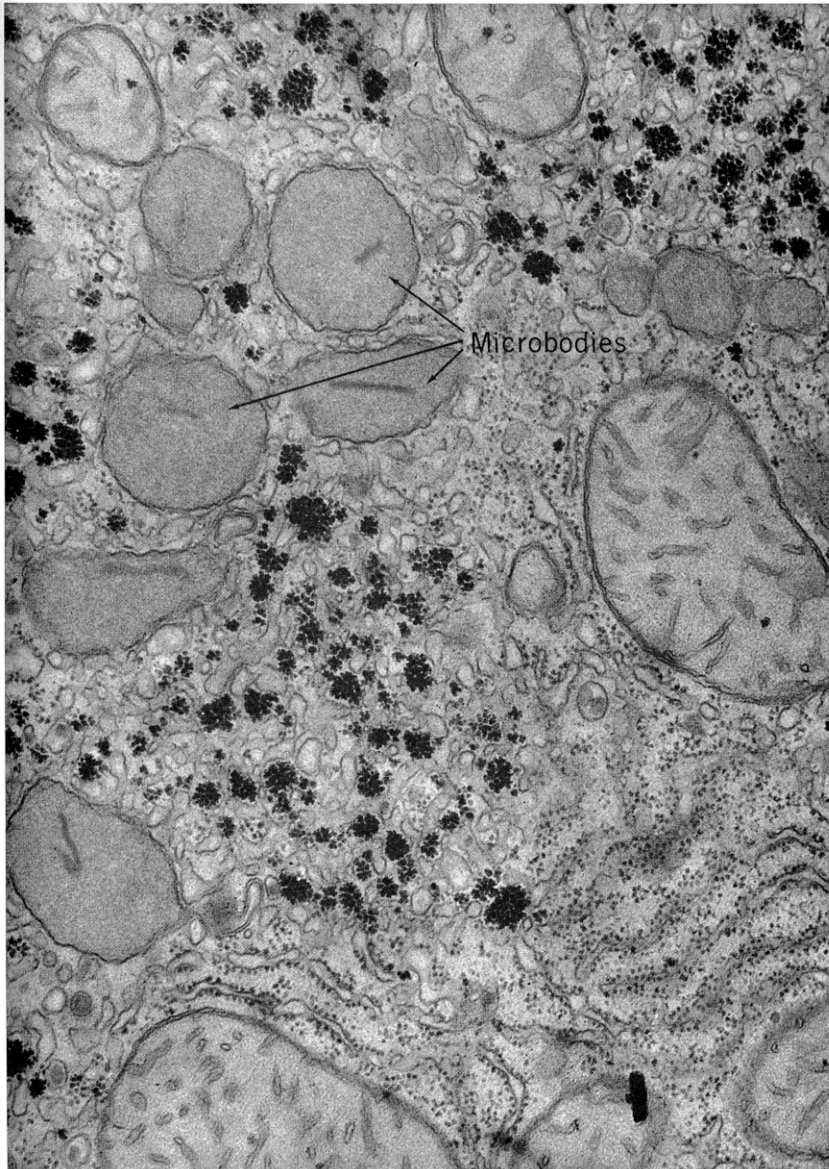


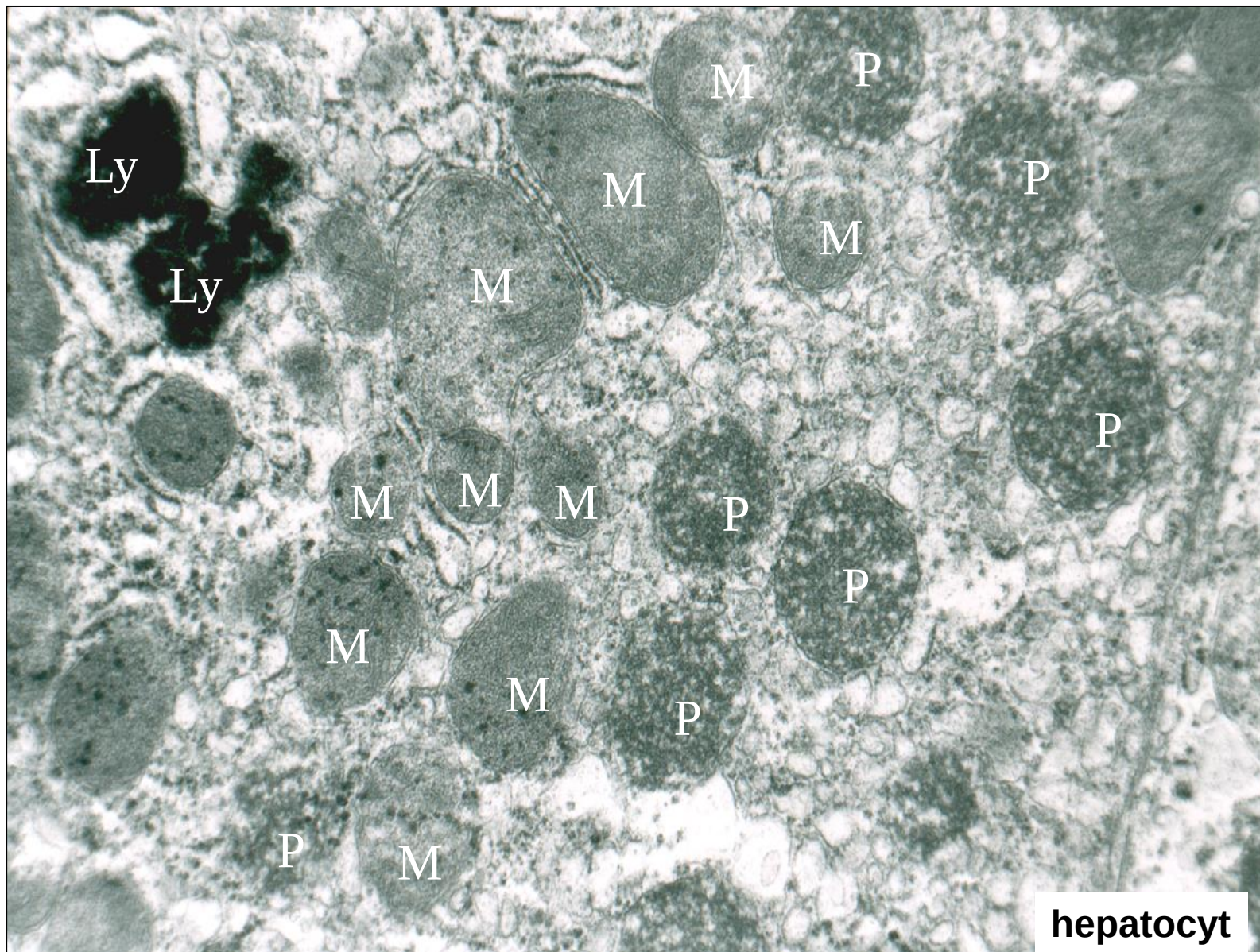
?

Nádech, prosím.

Peroxisomy

a peroxisomální poruchy



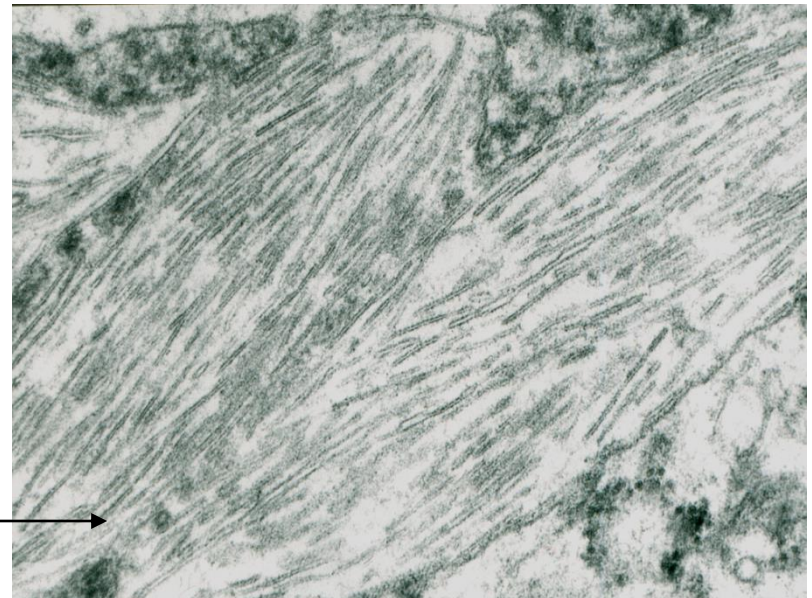
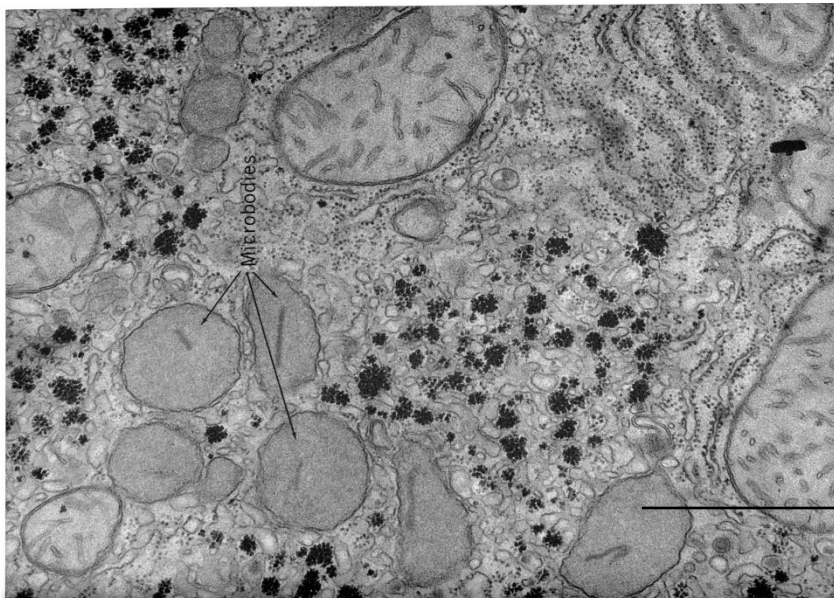


Lysosomy (Ly), mitochondrie (Mt), peroxisomy (P)

100 -1000 Px/buňka

Aspekty peroxisomální biologie promítající se do patologie peroxisomálních onemocnění

1. Úloha Px v metabolismu lipidů a jejich vliv na složení a funkci lipidních membrán v buňce.
2. Principy peroxisomální biogenesy
(Peroxisome Biogenesis Disorders)



Peroxisomální proteom

= produkt cca. 80 genů kódovaných jadernou DNA

Peroxisomální proteiny:

- proteiny peroxisomální matrix (enzymy - katalytická funkce) (60%)
 - peroxisomální membránové proteiny (strukturální proteiny)
 - peroxiny = cytosolické nebo integrální membránové Px proteiny (30%)
- import peroxisomálních membránových a matrixových proteinů do peroxisomů

Peroxiny jsou esenciální pro peroxisomální biogenezu.

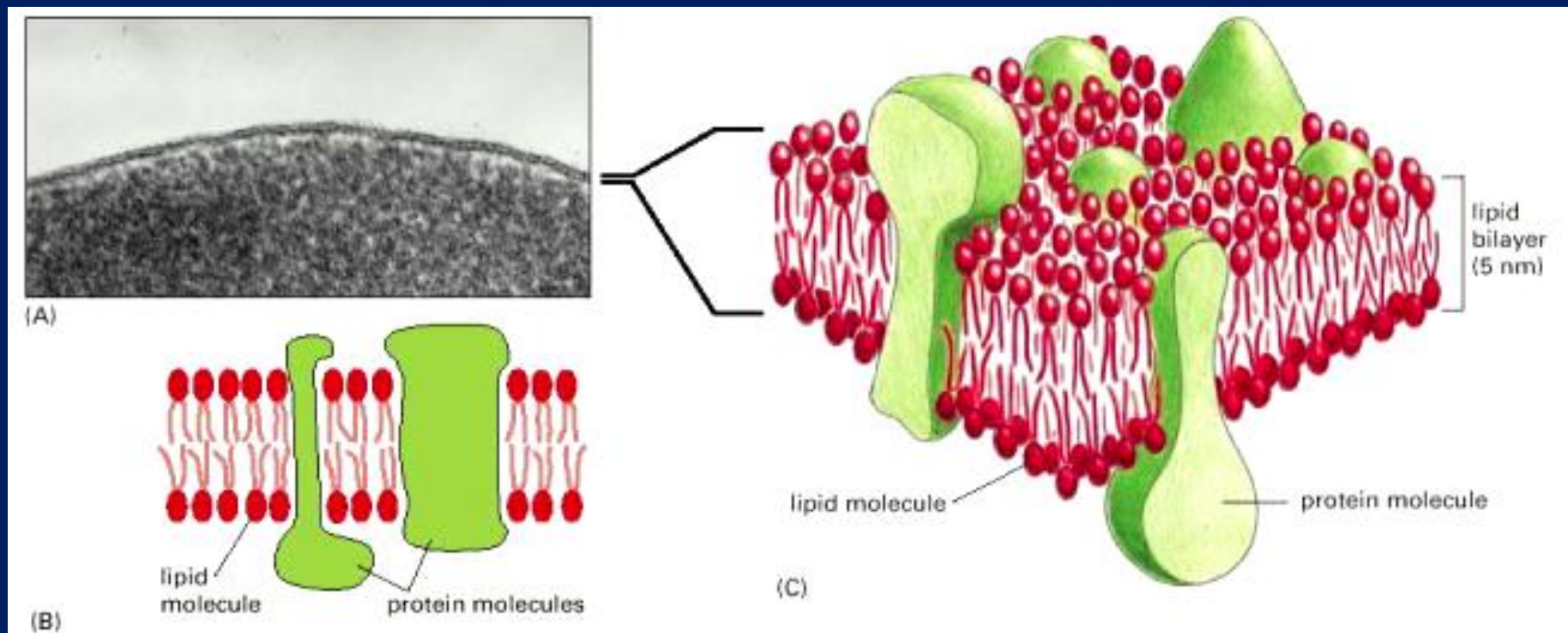
Peroxisomální metabolické dráhy

Degradační

- **oxidace** substrátů pomocí oxidáz s využitím O₂ (oxidázy)
→ H₂O₂ (ethanol, xenobiotika, AMK ...)
- **BOX (β-oxidace)** MK s velmi dlouhým řetězcem (**VLCFA**)
C24-26, dikarboxylických MK, větvených MK, PG

Syntetické

syntéza glycerolu, cholesterolu, plasmalogenů, ŽK, prostaglandinů, ...



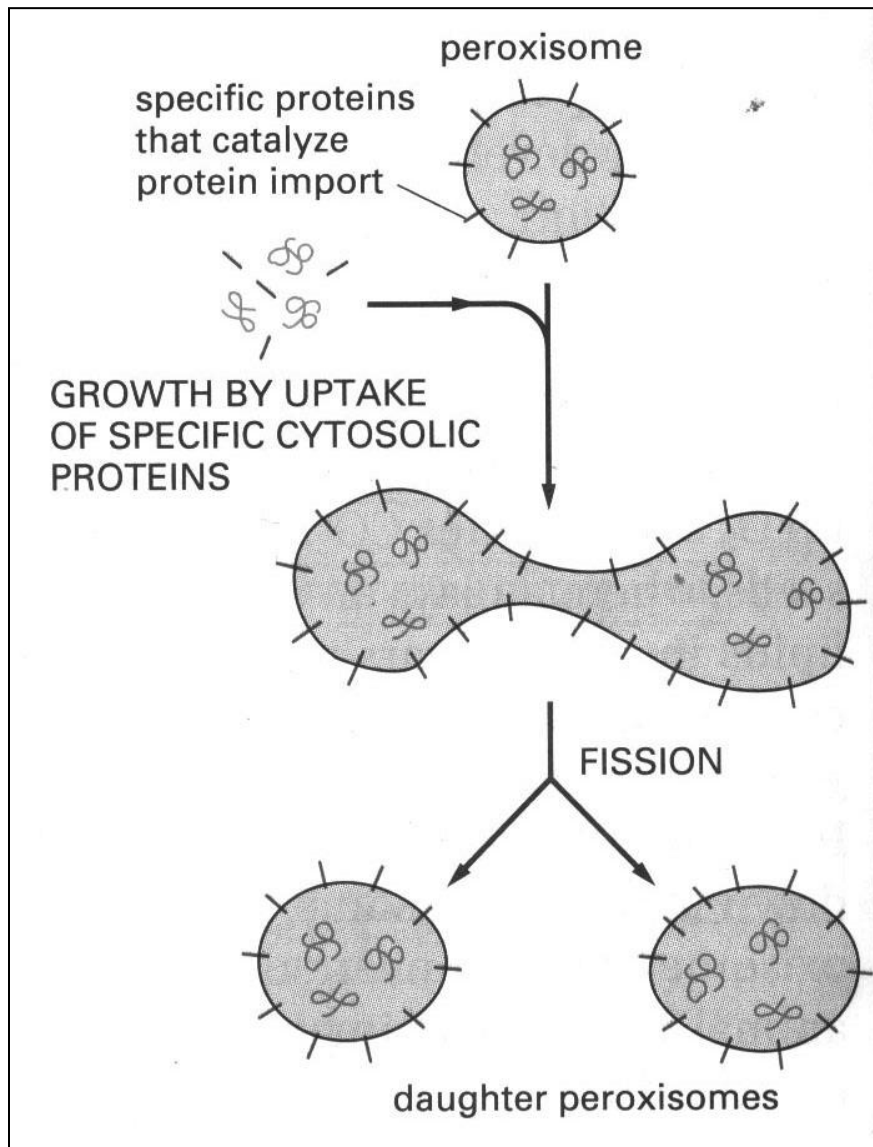
- Fyzikální vlastnosti a stabilita buněčných membrán jsou závislé na jejich lipidním složení
- Některé regulační proteiny vázány k buněčné membráně pomocí mastné kyseliny (palmitoylace)

Generalizovaný charakter Px defektů

Preferenčně postižené buněčné typy a struktury

- vysoký obrát lipidních membrán – oligodendroglie
↓
myelin (MK, plasmalogeny)
- neurony (závislé na lipidním složení membrán: ggl, GSL, C, SF)
- intenzivní lipidní metabolismus
 - hepatocyty (ŽK, ...)
 - Leydigovy bb. (CH)
 - kůra nadledvin (CH)
- vysoký obsah Px v buňkách renálních tubulárních epitelii

Peroxisomální biogeneza



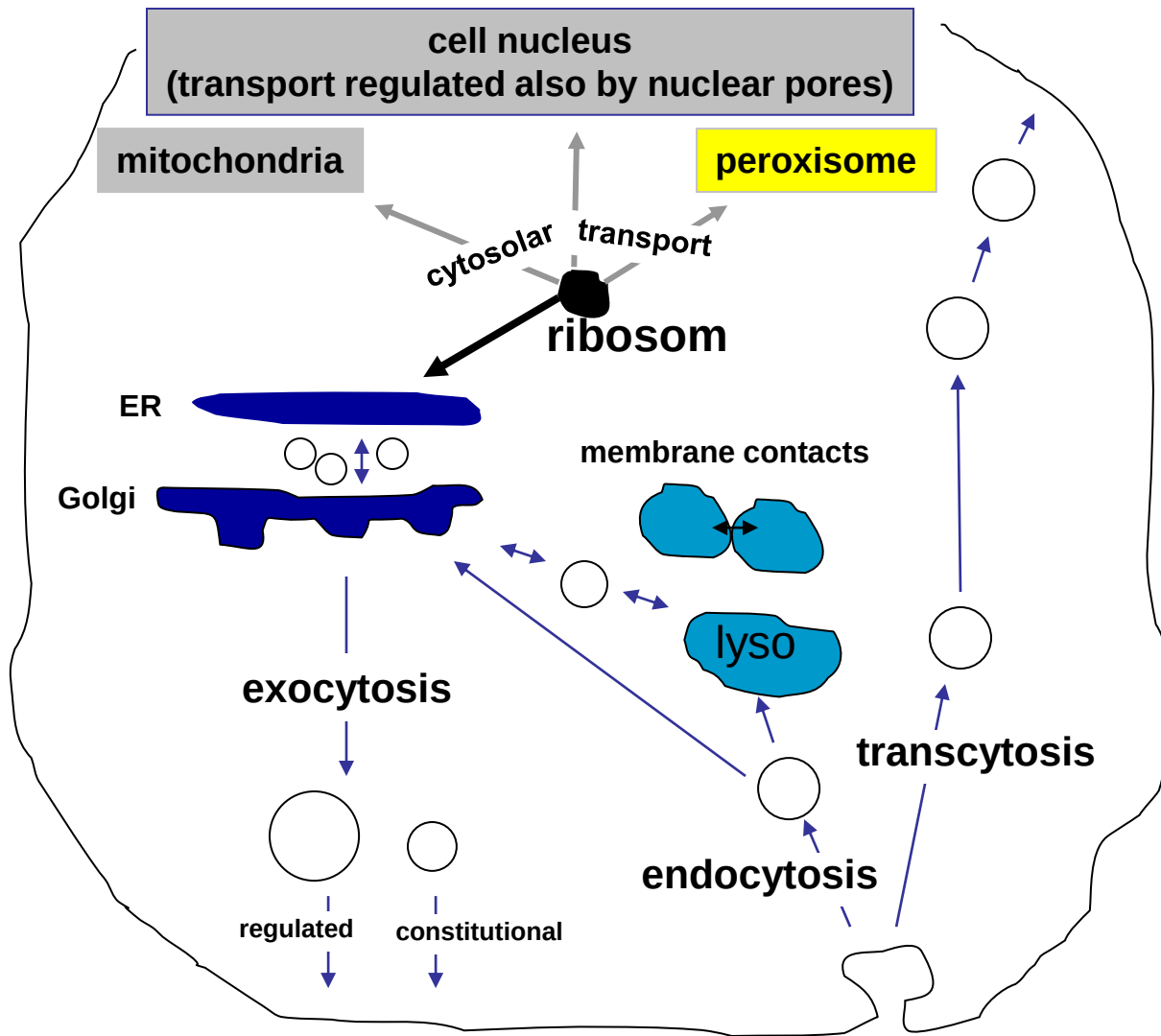
vznik z preexistujícího peroxisomu

transport Px strukturálních
a enzymatických proteinů

Růst

Štěpení

Dceřinné peroxisomy



Cílení proteinů v buňce

Příklad peroxisomální signální AMK sekvence

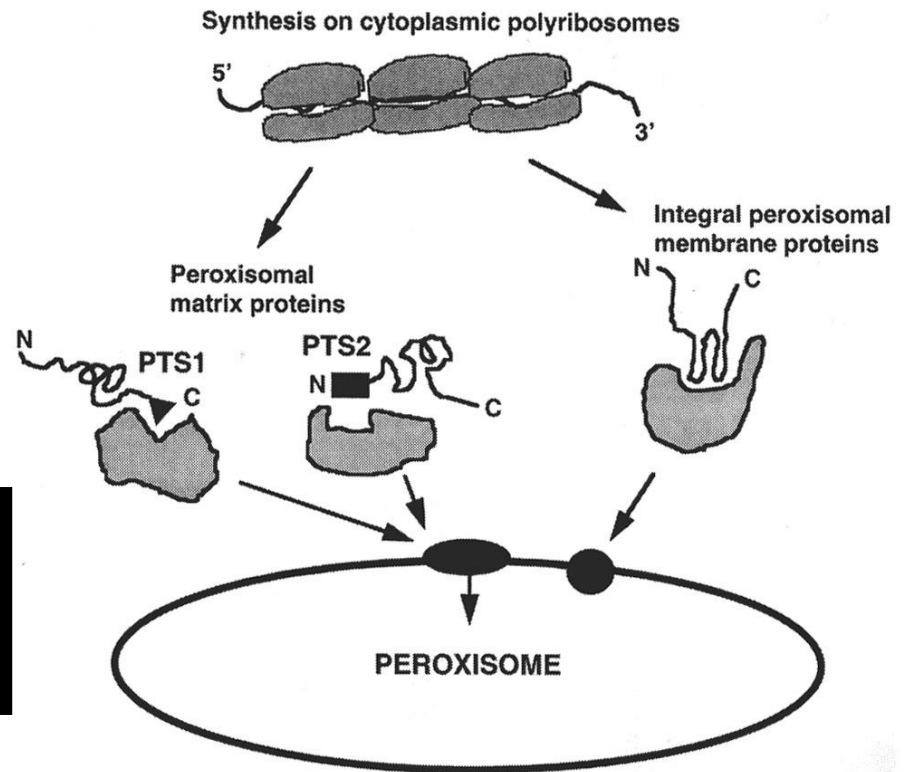
FUNCTION OF SIGNAL SEQUENCE	EXAMPLE OF SIGNAL SEQUENCE
Import into nucleus	-Pro-Pro- Lys-Lys-Lys-Arg-Lys -Val-
Export from nucleus	- Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Gly-Leu -Asp-Ile-
Import into mitochondria	*H ₃ N-Met-Leu-Ser-Leu- Arg -Gln-Ser-Ile- Arg -Phe-Phe- Lys -Pro-Ala-Thr- Arg -Thr-Leu-Cys-Ser-Ser- Arg -Tyr-Leu-Leu-
Import into plastid	*H ₃ N-Met-Val-Ala-Met-Ala-Met-Ala- Ser -Leu-Gln- Ser-Ser -Met- Ser-Ser -Leu- Ser -Leu- Ser-Ser -Asn- Ser -Phe-Leu-Gly-Gln-Pro-Leu- Ser -Pro-Ile- Thr -Leu- Ser -Pro-Phe-Leu-Gln-Gly-
Import into peroxisomes	- Ser-Lys-Leu -COO ⁻
Import into ER	*H ₃ N-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser- Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala -Thr-Glu-Ala- Glu -Gln-Leu-Thr- Lys -Cys- Glu -Val-Phe-Gln-
Return to ER	- Lys-Asp-Glu-Leu -COO ⁻

Some characteristic features of the different classes of signal sequences are highlighted in color. Where they are known to be important for the function of the signal sequence, positively charged amino acids are shown in *red* and negatively charged amino acids are shown in *green*. Similarly, important hydrophobic amino acids are shown in *yellow* and hydroxylated amino acids are shown in *blue*. *H₃N indicates the N-terminus of a protein; COO⁻ indicates the C-terminus.

Peroxisomální biogenesa

peroxisomal targeting sequences (PTS)
v enzymech a membránových proteinech

cytosolické receptory/transportéry



- PEX5=receptor pro PTS1
- PEX7=receptor pro PTS2
- *import peroxisomálních membránových proteinů (PEX3, PEX16, PEX19)*
- *Import peroxisomálních enzymů (PEX5, PEX7)*
- *docking faktory pro cytosolické peroxinové transportéry (PEX13)*
- *translokace enzymů přes Px membránu (PEX2, PEX10, PEX12)*
- *recyklace PTS1 a PTS2 receptorů mezi cytosolem a Px (PEX1, PEX6, PEX26)*

I. Isolované deficity peroxisomálních enzymů (> 20)

enzymopatie

← mutace v genu kodujícím protein esenciální pro jednu enzymatickou funkci

ZTRÁTA FUNKCE JEDNOHO ENZYMU

- **poruchy peroxisomální β -oxidace MK**
- **isolované poruchy syntézy plasmalogenů**
- **defekty syntézy žlučových kyselin**
- ...

X - ALD

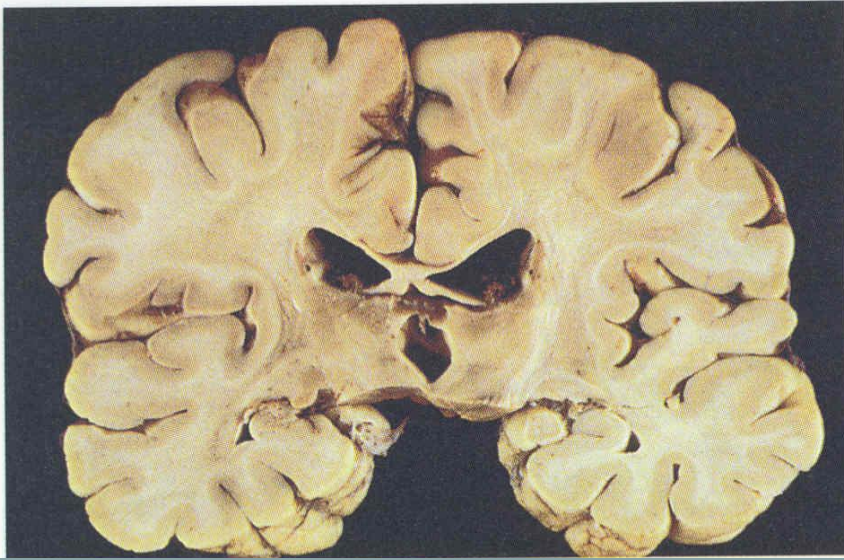
X-vázaná adrenoleukodystrofie

- **defekt beta-oxidace VLCFA**
- **inkorporace C24/26 VLCFA do lipidů**
- **modifikace lipidního složení buněčných membrán**
(změna fyzikálních parametrů a následná instabilita)

Zvýšené VLCFA v tkáních a tělních tekutinách
Generalizovaná porucha lipidních membrán

Atrofie kůry nadledvin
Leukodystrofie (demyelinizace)
Časně poruchy migrace neuronů

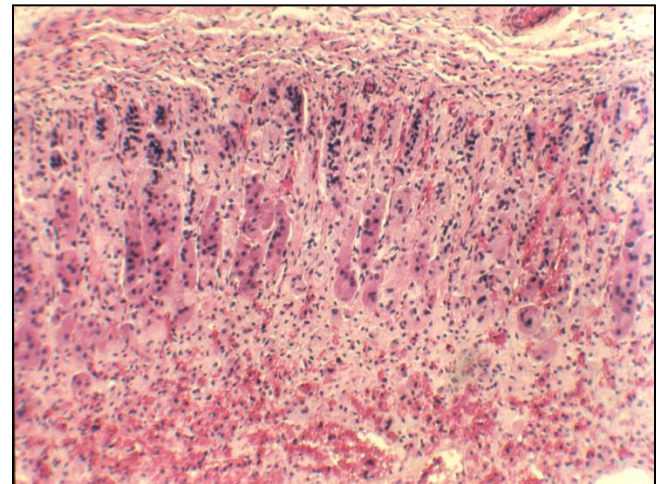
X-vázaná adrenoleukodystrofie



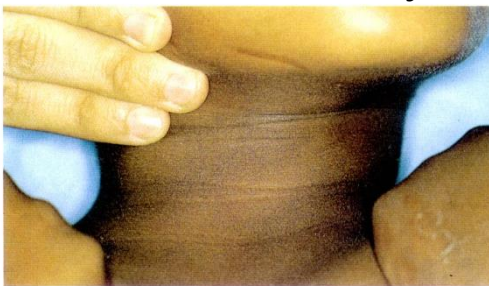
- demyelinizace (leukodystrofie)
- časně poruchy migrace neuronů



atrofie kůry nadledvin



Addisonův sy.



II. Poruchy tvorby peroxisomů

Peroxisome Biogenesis Disorders (PBD)

← mutace v genech kodujících peroxiny (PEX)

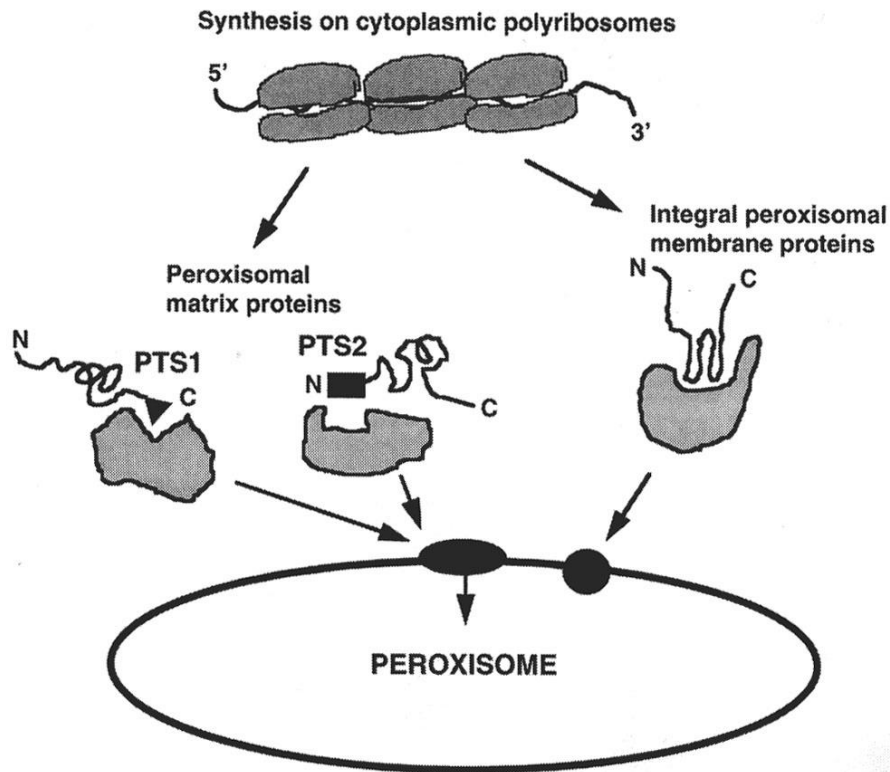
- IIa. Sdružené poruchy importu Px enzymů
(komplexní funkční poruchy-mnohočetné enzymové peroxisomální deficiency).
- IIb. Poruchy importu Px strukturálních proteinů
(absence/redukce/těžké strukturální abnormality Px v buňce)

II. Poruchy tvorby peroxisomů

Peroxisome Biogenesis Disorders (PBD)

← mutace v genech kodujících peroxiny (PEX)

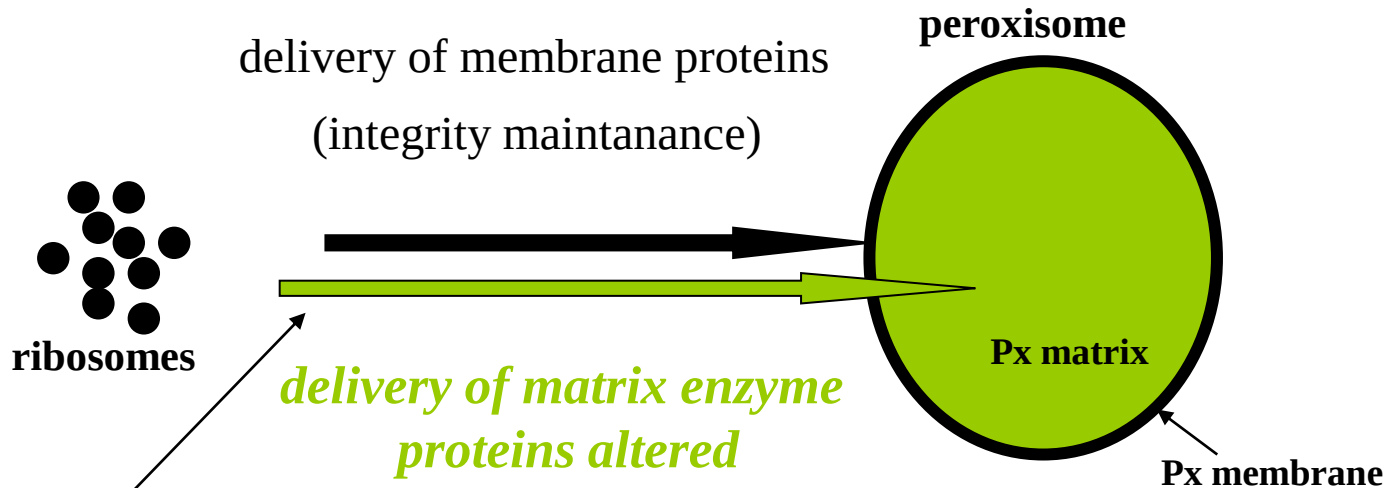
- IIa. Sdružené poruchy importu Px enzymů
(komplexní funkční poruchy-mnohočetné enzymové peroxisomální deficiency).
- IIb. Poruchy importu Px strukturálních proteinů
(absence/redukce/těžké strukturální abnormality Px v buňce)



- PEX5 = receptor pro PTS1
- PEX7 = receptor pro PTS2

Fig. 129-4 The biogenesis of peroxisomal proteins. Peroxisomal matrix proteins and integral peroxisomal membrane proteins are synthesized on free, cytoplasmic polyribosomes and are imported posttranslationally from the cytoplasm. Peroxisomal proteins contain discrete targeting information. The peroxisomal targeting signals that direct the proteins into the peroxisome matrix are the C-terminal PTS1 and the N-terminal PTS2. The molecular nature of targeting of the integral peroxisomal membrane proteins has yet to be resolved. Newly synthesized peroxisomal matrix proteins and peroxisomal membrane proteins appear to be recognized by distinct, predominately cytoplasmic receptors. The import of matrix and membrane proteins requires additional, distinct sets of peroxisomal membrane proteins.

Ila. Komplexní defekty importu peroxisomálních enzymů

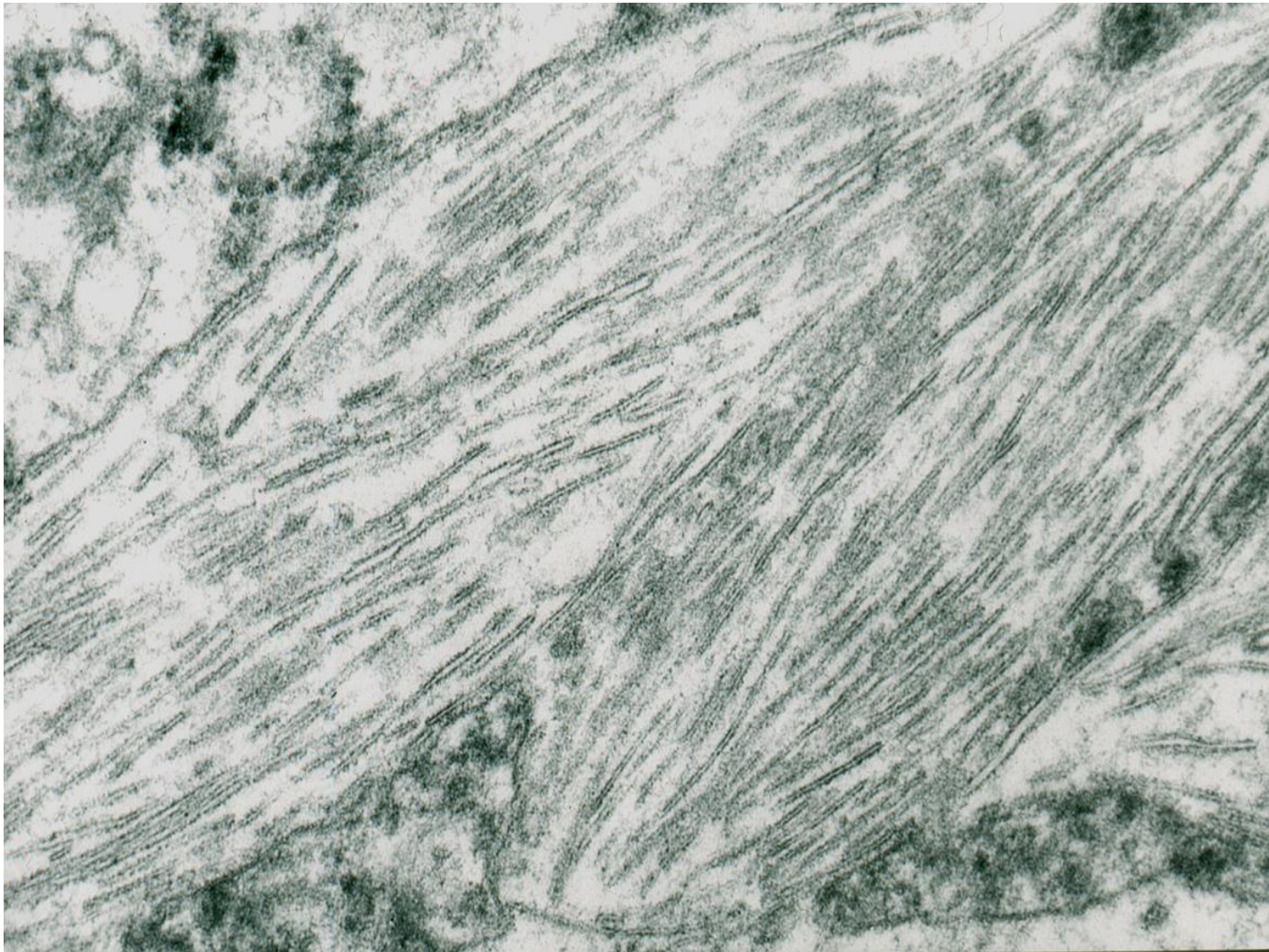


PEX regulující import enzymů do Px matrix

- PEX5=receptor pro PTS1
- PEX7=receptor pro PTS2 (RCDP I)

Mutace vedou k mnohočetným enzymovým deficitům v Px.

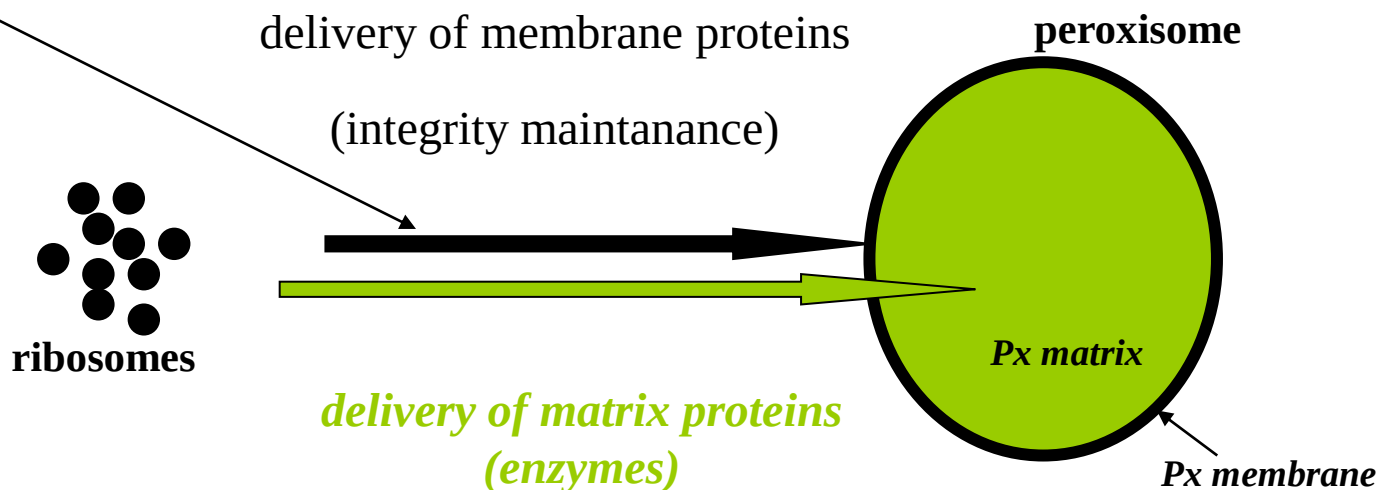
Zbytky peroxisomálních membrán („ghosts“)



membrane „leaflets“ in peroxisomal deficiency
(macrophage in adrenal cortex)

IIb. Defekty importu peroxisomálních strukturálních proteinů

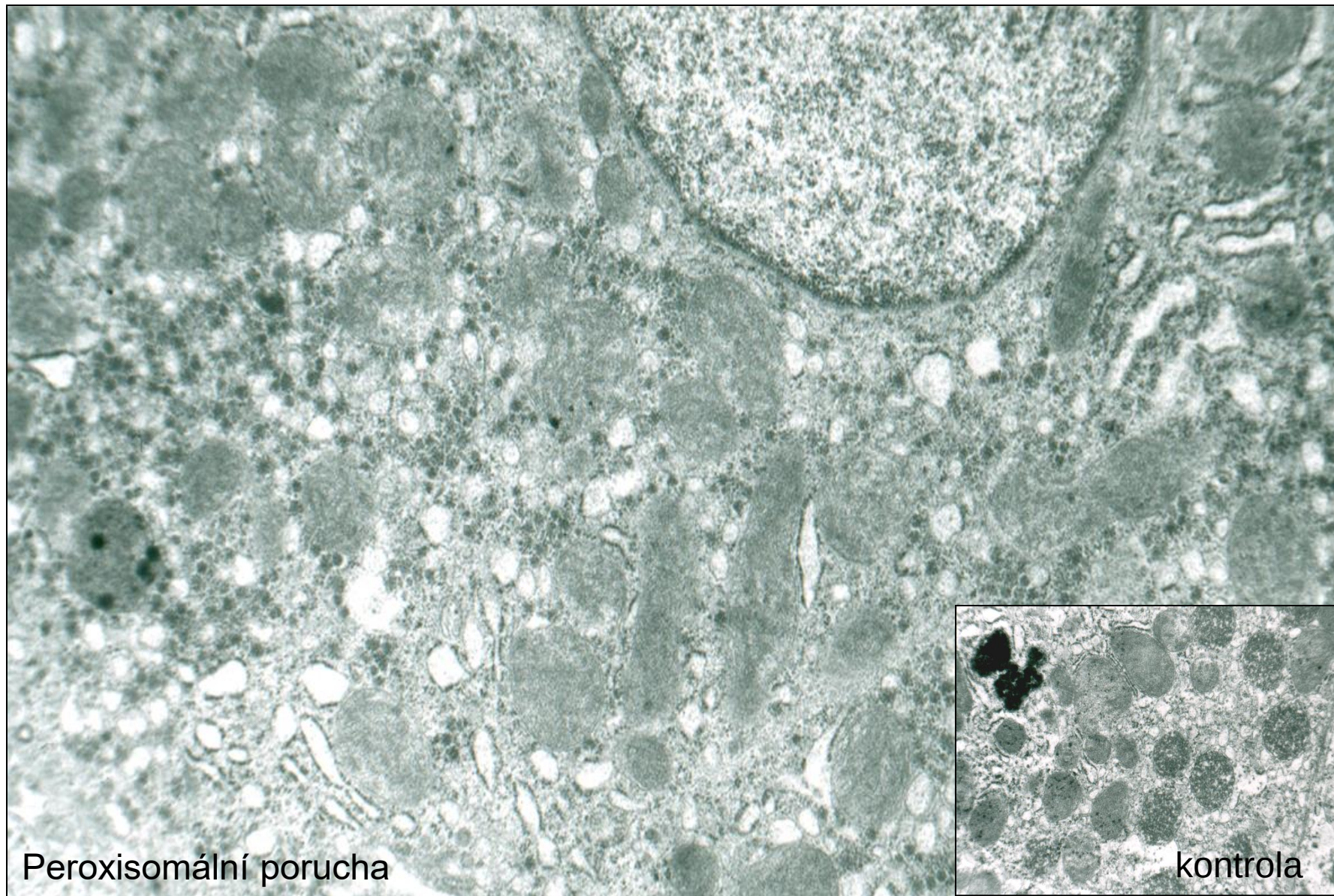
PEX regulující import proteinů Px membrán



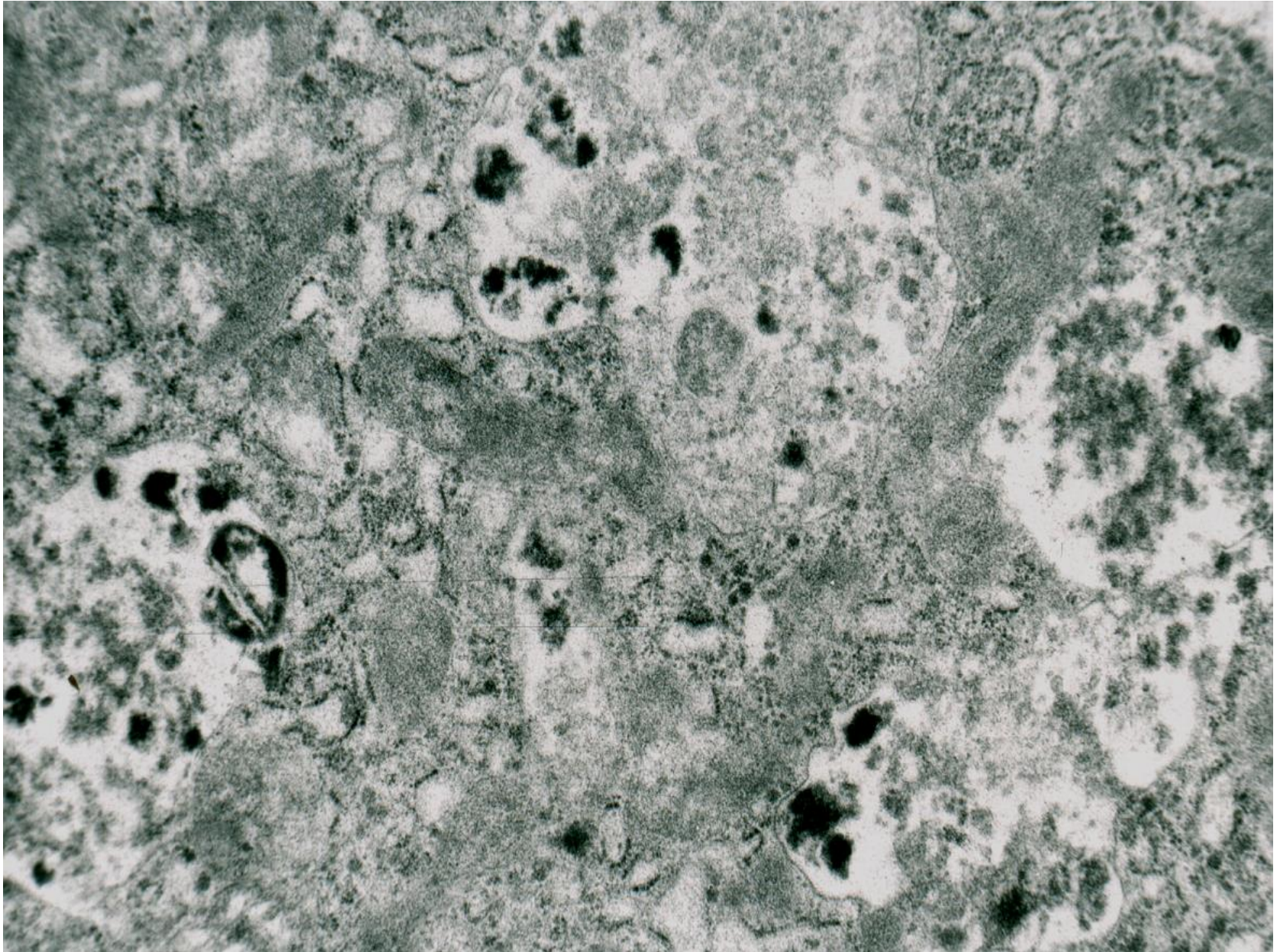
*import peroxisomálních membránových proteinů
(PEX3, PEX16, PEX19)*

Mutace způsobují absenci peroxisomů v buňce.

Absence peroxisomů



Aberantní peroxisomy u Zellwegerova syndromu



Poruchy tvorby peroxisomů

- absence produktů syntézy
(cholesterol, plasmalogeny, glycerolipidy, žlučové kyseliny, ...)
- hromadění substrátů pro degradaci
(VLCFA C24-26 v buněčných membránách, v cytosolu a ECT)
- vznik toxických intermediátů při bloku degradace/narušení syntézy

intermediáty C27 BA → disrupce PM a $\uparrow$ mt ROS

Poruchy tvorby peroxisomů

- **multiorgánové poruchy** se
- závažným postižením **nervového** systému
(defekty migrace a diferenciacie neuronů,
postdevelopmentální neurodegenerace)
- **interference s vývojem**
(atrofie a dysplazie mozku, renální cysty, kraniofaciální a
kosterní abnormality)
- opožděná **myelinizace**
- atrofie **kůry nadledvin**
- cholestatická **hepatopatie** (redukce C24 BA, ↓ tok BA do žluči)

Poruchy tvorby peroxisomů

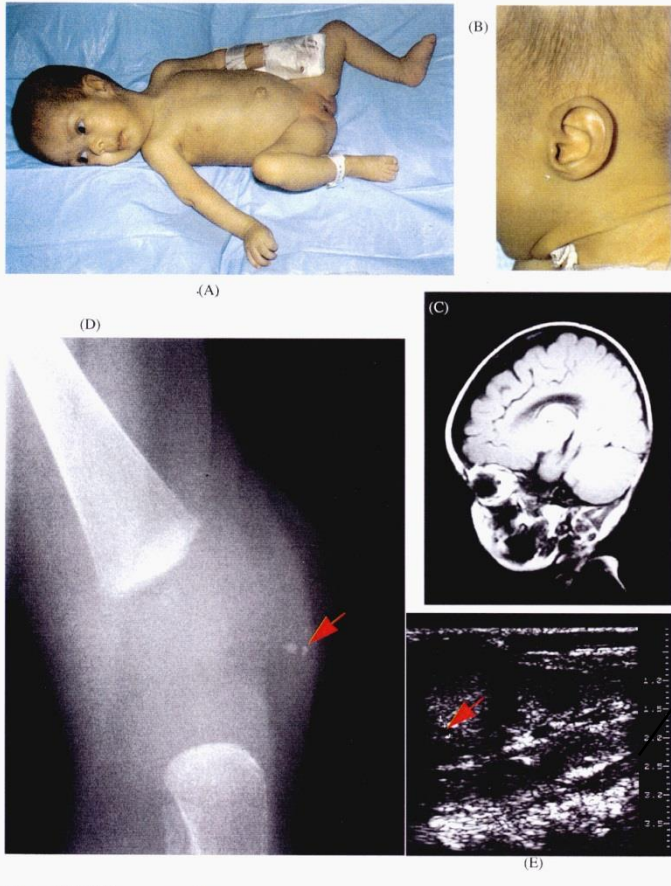
← mutace v genech pro peroxiny (PEX)

- **Zellwegerův sy.**
- Neonatální adrenoleukodystrofie
- Infantilní Refsumova choroba
- Rhizomelická chondrodysplasia punctata typu 1

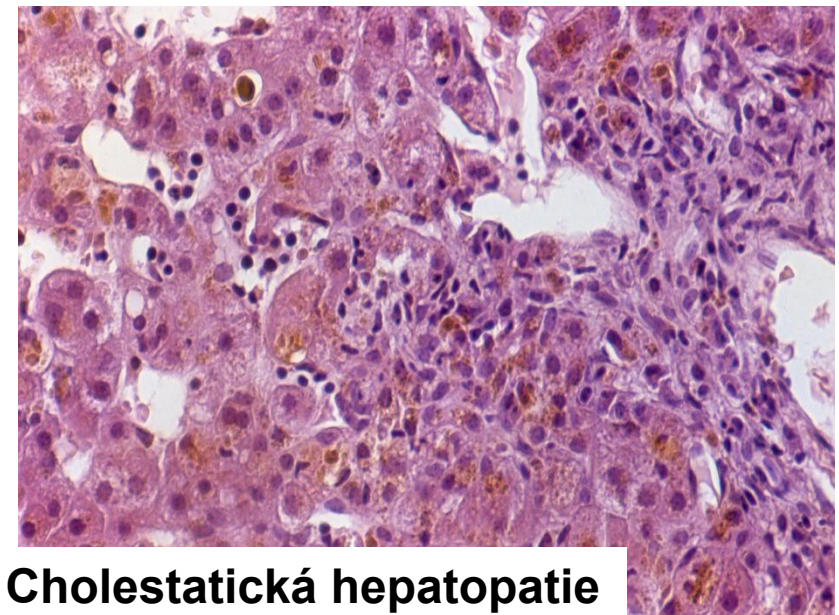
Zellwegerův sy.

Renální cysty

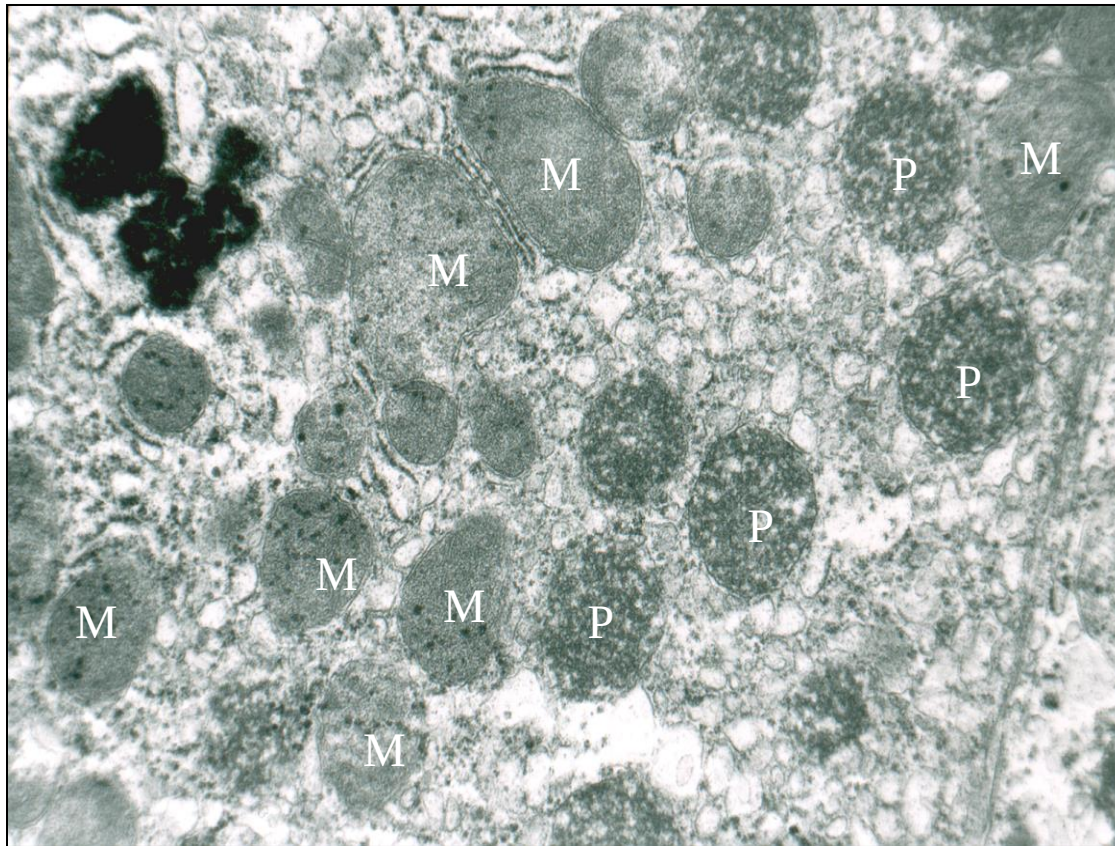
Hypotonie, PMR,
parciální agenese corpus callosum,
atrofie mozku,
opožděná myelinizace.
kraniofaciální abnormity.



Kloubní kalcifikace



Cholestatická hepatopatie



Biogenesis peroxisomů
(štěpení) a modelace
mitochondriální sítě
(štěpení) využívají
některé totožné proteiny

**Onemocnění charakterizované společnou poruchou
mitochondriálního a peroxisomálního štěpení**
(mutace v dynaminu-podobné GTPase)