

MITOHONDRIJ I MITOHONDRIJSKE BOLESTI

Nives Pećina-Šlaus^{1,2}, Anja Kafka^{1,2}, Niko Njirić²

¹Zavod za biologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; ²Laboratorij za neuroonkologiju Hrvatski institut za istraživanje mozga, Šalata 3, HR-10000 Zagreb

Adresa za dopisivanje:

Prof. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus

Zavod za biologiju,

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,

Šalata 3, 10 000 Zagreb,

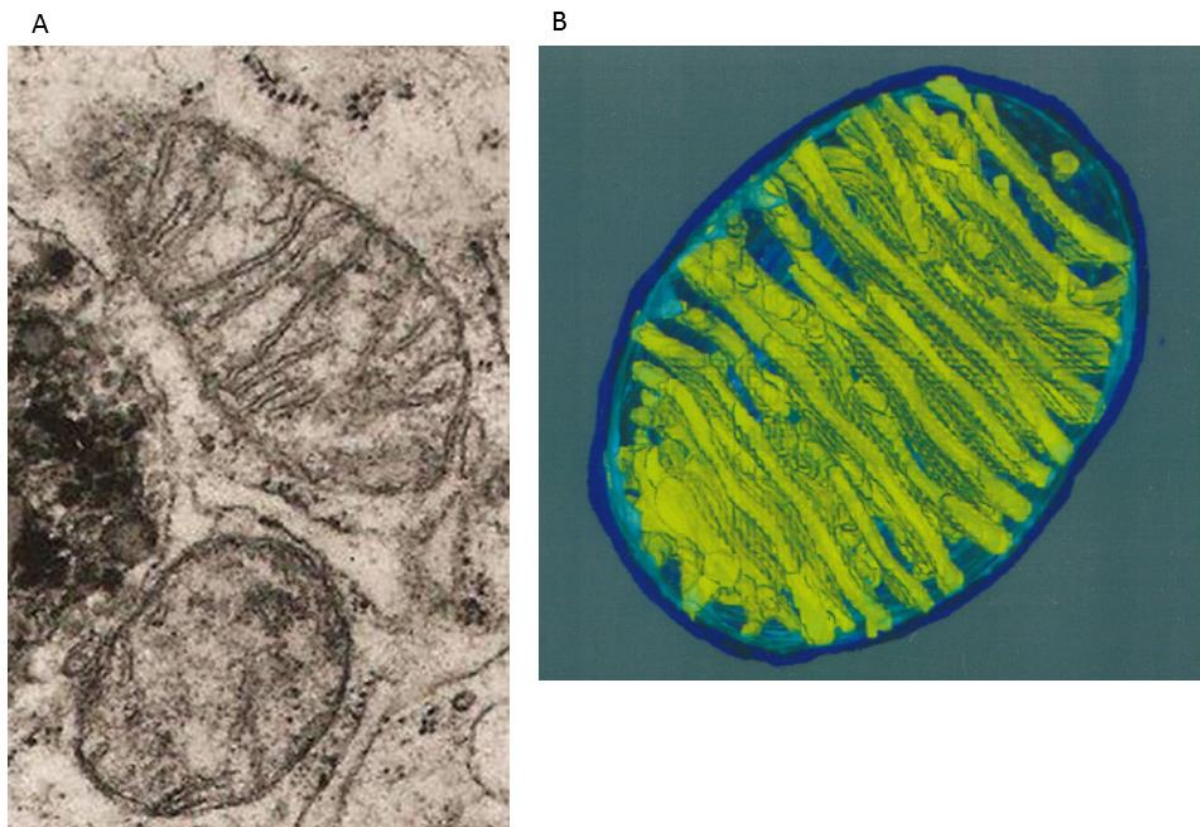
e-mail: nina@mef.hr, tel. 4590 201

Sažetak

Kratak nastavni tekst o mitohondriju, njegovoj staničnoj funkciji i bolestima u ljudi koje uzrokuju mutacije mitohondrijske DNA (mtDNA) počeli smo pisati prije 5 godina. Nažalost tekst nismo uspjeli završiti i čekao je u „ladici“ (kompjuterskoj memoriji) niz godina dok autori ne nađu vremena. Ove godine ponovo smo otkrili ovaj naš tekst i odlučili ga završiti, međutim kada smo potražili literaturu ostali smo zapanjeni količinom novih saznanja o ovoj malenoj organeli. Spoznaje o osnovnim funkcijama u normalnoj staničnoj fiziologiji produbile su se do nevjerojatnih detalja. Novi znanstveni radovi o molekularnim komponentama vanjske i unutrašnje mitohondrijske membrane vrve novim molekulama, a spoznaje o uzrocima brojnih mitohondrijskih bolesti pokazuju da je klasično poimanje uloge mitohondrija kao generatora energije samo vrh ledenog brijega. Ovaj nastavni tekst koji su napisali student medicine, znanstvena novakinja i profesorica medicinske biologije govori o starim i novim ulogama mitohondrija u stanici i ljudskom zdravlju.

Ultrastruktura i funkcija mitohondrija

Struktura mitohondrija koja je predstavljena u svakom udžbeniku temelji se na konsenzusu postignutom još davne 1960. godine, a na temelju tada dostupne metodologije – elektronske mikroskopije. Znanstvenici su se složili da se mitohondriji sastoje od vanjske i unutrašnje membrane, intermembranskog prostora, te središnjeg mitohondrijskog matriksa. Unutrašnja membrana invaginira čineći mitohondrijske kriste (lat. *cristae*) što uvelike povećava njenu funkcionalnu površinu. Prvi prikaz ultrastrukture mitohondrija potekao je od pionirskih radova elektronske mikroskopije Paladea (1952), Sjostrand (1953) i njihovih kolega. Funkcija mitohondrija uvelike je definirana njegovom dvostrukom membranom (Slika 1A).



Slika 1. A. Prikaz mitohondrija pod elektronskim mikroskopom. Vidljiv je dvostruki membranski sustav u kojem unutarnja membrana oblikuje nabore (kriste) koji se protežu u matriks mitohondrija, B. Elektronsko mikroskopska tomografija mitohondrija živčane stanice (B preuzeto iz Perkins i sur. J Struct Biol 1997;119:260-72).

Novija istraživanja dala su detaljnija saznanja o ultrastrukturi i makromolekularnim komponentama vanjske i unutrašnje membrane ove organele. Elektronsko mikroskopska tomografija i elektronska krio tomografija izuzetno su moćne tehnike za istraživanja detaljnih staničnih struktura i makromolekularnih kompleksa. Tehnike daju najveće 3D rezolucije (~ 4 nm), a temelje se na velikom broju snimaka (tomografa) u različitim smjerovima projekcije, koji se dobivaju nagibom (engl. *tilt*) objekta oko jedne ili više osi. Nakon digitalizacije i poravnavanja serija projekcijskih slika rekonstruirana se trodimenzionalni objekt. Takva trodimenzionalna slika otkrila je novosti u strukturi mitohondrija (Slika 1B). Pronađeno je da vanjska i unutrašnja membrana leže vrlo blizu jedna drugoj i daju ukupnu debljinu od 22 nm, dok prostor između dvije membrane (intermembranski prostor) nije veći od 8–10 nm. Kriste se formiraju tako da unutrašnja membrana invaginira kroz uske tubularne otvore nazvane *cristae junctions*. Primijećena su i mjesta kontakta unutrašnje i vanjske membrane s ukupnom debljinom od 14 nm. Ova dodirna mjesta igraju ključnu ulogu u transportu proteina u mitohondrij. Dodirna mjesta smještena su u blizini *cristae junctions* tako da omogućuju brzi transport proteina u kriste. Molekularni izgled *cristae junctions* dugo je vremena bio enigmatičan. Danas međutim znamo da se radi o uskim strukturama nalik vratu koje odlikuje visok stupanj membranske zakrivljenosti. Unutrašnju mitohondrijsku membranu možemo podijeliti na membranu koja čini kriste i membranu koja se proteže između pojedinih kristi tzv. unutrašnju graničnu membranu (IBM od engl. inner boundary membrane). Stoga možemo reći da *cristae junctions* povezuju IBM i kriste. Godine 2011. došlo je do velikih otkrića u strukturi *cristae junctionsa* kada su 3 neovisna istraživanja otkrila proteinski kompleks nazvan MICOS koji je neophodan za ispravnu morfologiju kristi. Značajna su otkrića da su promjene u proteinskom sastavu MICOSa čovjeka pronađene u bolesnika sa Downovim sindromom, epilepsijom i Parkinsonovom bolešću. Također zna se da MICOS ulazi u interakciju sa drugim proteinima odgovornima za bolesti čovjeka kao npr. DISC1 (Disrupted in schizophrenia 1), DNAJC11 (DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C11). Molekularni sastav mitohondrijskih membrana razlikuje se i pokazuje izuzetnu dinamičnost, te se danas intenzivno istražuje. Vanjska membrana sadrži relativno visoke koncentracije proteina porina. Porini tvore pore u vanjskoj membrani čineći ju propusnom za molekule do 5 000 Da. Ioni, metaboliti, male molekule, ATP, ADP s lakoćom kroz nju difundiraju. Ulazak većih proteina i molekula koje također treba prenijeti kroz vanjsku membranu u mitohondrij ostvaruje se putem vezanja njihove signalne sekvence na veliki

protein zvan translokaza koji ih onda aktivno prenosi kroz vanjsku membranu. Ovisno o njihovom unutarmitohondrijskom odredištu proteini sadrže različite specifične signalne sekvence (tzv. sorting signals). Danas se zna da postoji barem pet različitih puteva kojima proteini ulaze u mitohondrij. Međutim, za veliku većinu proteina put preko translokaze vanjske membrane (TOM, od engl. *Translocase of the outer mitochondrial membrane*) glavni je ulaz u mitohondrij. Permeabilnost vanjske membrane regulirana je anionskim kanalom ovisnim o voltima (VDAC od engl. *voltage-dependent anion channel*) i drugim molekularnim transporterima kao npr. proteinom translokatorom od 18 kDa (TSPO). Važno je napomenuti da je vanjska mitohondrijska membrana koja se u brojnim znanstvenim radovima skraćeno naziva OMM (od engl. *outer mitochondrial membrane*) povezana s raznim drugim staničnim komponentama. Njeni proteini uključeni su u apoptozu, unutarstanične signalne puteve, vezanje na ER, autofagiju i mitofagiju. Povezivanje vanjske mitohondrijske membrane s membranom endoplazmatskog retikuluma tvori strukturu nazvanu MAM (od engl. *Mitochondria-Associated ER-membrane*). Vanjska membrana važna je jer vrši izmjenu molekula između citosola i ostalih staničnih organela kao npr. endoplazmatskog retikuluma.

Unutrašnja membrana okviruje središnji dio ove organele, mitohondrijski matriks, i vrlo je nepropusna čineći svojevrsnu barijeru za prolaz molekula. Propustiti će samo vodu, kisik i ugljični dioksid. Treba također napomenuti da dijelovi unutrašnje mitohondrijske membrane koji tvore kriste, te oni koji su u blizini vanjske membrane imaju različit sastav proteina zbog razlike u funkciji ova dva dijela unutrašnje membrane. Proteini koji moraju ući u matriks prenose proteinski kompleksi unutrašnje membrane. U sastavu tih kompleksa brojne su translokaze smještene u unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani koje zajednički zovemo TIM (od engl. *Translocase of the inner membrane*). Na mjestima gdje su vanjska i unutrašnja membrana blisko smještene kompleksi za prijenos proteina također su u bliskom dodiru kako bi ostvarili svoju funkciju.

Četvrti mitohondrijski funkcijski odjeljak je matriks mitohondrija. To je viskozna tekućina puno gušća od citoplazme koja sadrži brojne metabolite, ione, enzime (među kojima prevladavaju oni potrebni za ciklus limunske kiseline), ribosome, te nekoliko kopija mitohondrijske DNA.

Biokemijske procese koji se odvijaju u mitohondriju u ovom tekstu nećemo detaljno opisivati. Međutim, treba reći da su dva osnovna procesa kojima stanica razgrađuje glukozu i

masne kiseline stvarajući prijeko potreban ATP, ciklus limunske kiseline (Krebsov ciklus) i oksidativna fosforilacija. Piruvat nastao iz glukoze u citosolu stanice ulazi u mitohondrij i nakon pretvorbe u acetil CoA ulazi u ciklus limunske kiseline koji se odvija u matriksu. Slično tomu u ciklus limunske kiseline također će ući i acetil CoA nastao oksidacijom masnih kiselina. Tako nastaju spojevi nosači elektrona, koenzim NADH i redoks kofaktor FADH₂. Nosači elektrona mogu primiti i davati elektrone u oksido-redukcijskim reakcijama. To njihovo svojstvo biti će korisno tijekom procesa koji slijede – prijenosa elektrona respiratornim lancem, tj. oksidativne fosforilacije. Oksidativna fosforilacija (OXPHOS) proces je koji se odvija na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani gdje je smještena mašinerija od preko 80 različitih polipeptida, organiziranih u pet transmembranskih kompleksa znanih i kao nosači elektrona. Elektroni nastali oksidacijom masti i ugljikohidrata, uzastopnim nizom oksido-redukcijskih reakcija prenose se preko serije elektronskih nosača do molekularnog kisika. Ovakav prijenos elektrona zajedno sa nosačima naziva se također i transportni lanac elektrona, a ponekad i respiratorni lanac. Time dolazi do pumpanja protona (vodikovih iona H⁺) kroz unutrašnju membranu mitohondrija u intermembranski prostor i posljedičnog stvaranja elektrokemijskog gradijenta. Transmembranski kompleks broj V mitohondrijska je ATP sintaza koja će na kraju sintetizirati ATP. ATP sintaza posjeduje kanal kroz koji se protoni vraćaju natrag u matriks, te fosforilacijom ADP stvara ATP. Nedavno su elektronskom kriotomografijom vizualizirani i dimeri enzima ATP sintaze tog završnog stvaratelja ATPa koji je smješten u unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani.

Pretvarajući elektrokemijski gradijent protona preko unutrašnje mitohondrijske membrane u energiju kemijskih veza, mitohondrijska ATP sintaza stvara većinu staničnog ATPa, te univerzalne stanične energetske monete koja pokreće vitalne stanične procese. Kemijska energija neophodna je za procese koji uključuju sintezu novih molekula (ugljikohidrata, proteina, lipida), za mehanički rad (dioba stanice, mišićna kontrakcija), za provedbu aktivnog transporta, staničnu sekreciju, održavanje akcijskog potencijala (npr. živčane stanice) i još mnoge druge. Kako bismo ilustrirali značaj mitohondrija dovoljno je reći da odrastao zdrav čovjek dnevno proizvede oko 50 kg ATPa.

Mitohondrijska DNA

Evolucijsko porijeklo mitohondrija kao mikroorganizama koje je endocitozom unijela veća eukariotska prastanica jedan je od najuspješnijih primjera evolucijske simbioze.

Mikroorganizam je bio zaštićen, a za uzvrat stanica je dobila znatno više energije (čak 90% energije stanica dobiva iz ATPa nastalog oksidativnom fosforilacijom u mitohondriju). Vlastita DNA koju mitohondrij posjeduju u svom matriksu uz brojne druge molekularne indicije upućuje na ovo porijeklo. Endosimbiotska hipoteza koju je još 70tih godina prošlog stoljeća predložila Lynn Margulis potvrđena je danas na više razina. Slična bakterijskoj, mitohondrijska DNA (mtDNA) kružna je dvolančana molekula DNA koja ima vlastitu ekspresiju i regulaciju. Točnije, mtDNA kodira za sve tipove RNA i neke od mitohondrijskih proteina i koju nasljeđujemo neovisno od jezgrinih gena. Stoga za mtDNA govorimo da su to geni izvan jezgre, da se nasljeđuje nemendelovski, ili citoplazmatski, ili da se radi o nasljeđivanju po majci, što su sve sinonimi za mtDNA ili način njena nasljeđivanja.

Mitohondrijska DNA razlikuje se u veličini od vrste do vrste. Tako je najmanji poznati mitohondrijski genom onaj parazita malarije čovjeka *Plasmodium falciparum* veličine samo 6 kb sa samo 3 gena koji kodiraju bjelančevine. Životinjske stanice imaju male mitohondrijske genome, tako malene da su danas u potpunosti sekvencionirani mtDNA čovjeka, miša i krave (svi veličine 16,5 kb). mtDNA sekvencirana je 1981. godine i ta sekvenca naziva se Cambridge referentna sekvenca. Iako je broj mitohondrija po stanici velik, a mtDNA po stanici broji 1000-100 000 kopija, svejedno je ukupna količina mtDNA prema jezgrinoj DNA malena i iznosi manje od 1%. mtDNA mitohondrija animalnih stanica vrlo je kompaktna, pa je tako i njena organizacija također vrlo ekonomična: ne sadrži introne, neki od gena se preklapaju, i svaki baš svaki par baza pripada nekom genu, posjeduje tzv. D petlju - regiju mtDNA na kojoj se odvija inicijacija DNA replikacije. Kompletna nukleotidna sekvenca mišje i ljudske mtDNA pokazuje visok stupanj homologije. Humana mtDNA (SLIKA 2) organizirana je u 13 genskih regija koje kodiraju proteine podjedinica respiratornog lanca, a one uključuju gen za citokrom b, gene za 3 podjedinice citokrom oksidaze i gen za jednu podjedinicu ATPaze, te gene za 7 podjedinica NADH dehidrogenaze. Osim ovih gena sadrži i 22 gena za tRNA i 2 za rRNA. Na mtDNA postoje i 2 hipervarijabilna područja koja pokazuju veliku raznolikost od čovjeka do čovjeka, te služe za identifikaciju pojedinih osoba u sudskoj medicini ili populacijskoj genetici.

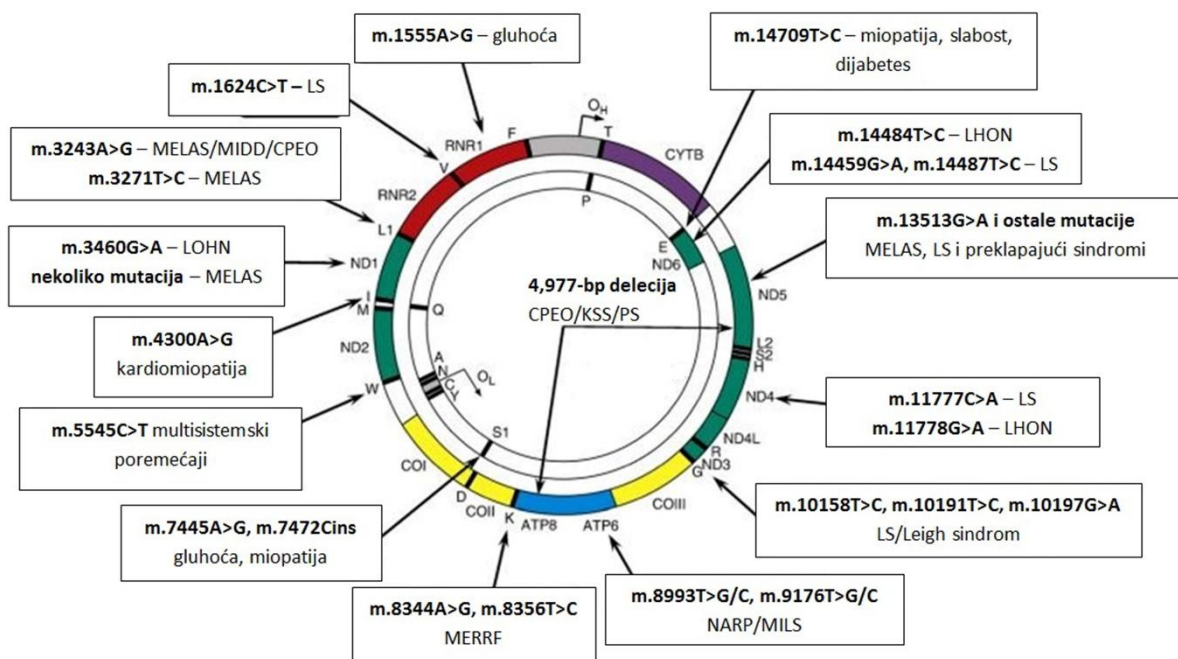
Citoplazmatske organele, pa tako i mitohondriji, sadrže proteine kodirane jezgrinim genomom, sintetizirane u citosolu i specifično transportirane do ili kroz membranu organele. Za razliku od ostalih organela mitohondriji (kao i kloroplasti u biljnim stanicama) imaju

sposobnost i vlastite sinteze proteina u samoj organeli, a kodiranih mitohondrijskom DNA. Osim proteina mitohondriji također sami sintetiziraju i svoje nukleinske kiseline. Oko 10% proteina ove organele sintetizira se u mitohondriju, a ostatak proteina mora se transportirati iz citosola u organelu. Proteini sintetizirani u citosolu po uputi jezgrine DNA ulaze u mitohondrij posttranslacijskim procesima. Ti proteini su u obliku prekursora koji je za 12-70 aminokiselina duži od zrelog proteina. Ova proteinska sekvenca naziva se vodeća sekvenca (od engl. leader sequence) i odgovorna je za prvobitno prepoznavanje na vanjskoj membrani mitohondrija. Prvi stupanj ulaska proteina je vezanje za receptor smješten na vanjskoj membrani. Ovaj receptor pušta prolazak proteina kroz transportni kanal. Postoje različiti receptori: neki su specifični za pojedini protein, dok drugi proteini prolaze kroz opće transportne kanale. Vodeća sekvenca prolazi kroz membranu i biva pocijepana proteazom iz organele. Ulazak proteina teče sve dok cijeli protein nije prebačen kroz membranu za što je neophodna hidroliza ATPa. Vodeće sekvence su obično hidrofilne i sadrže potpunu informaciju za lokalizaciju proteina mitohondrija na specifično mjesto. Nakon sinteze u citosolu dolazi do pravilnog namatanja proteina kojim oni zadobivaju namotanu tzv. od engl. *folded* konformaciju, međutim kada protein ulazi u mitohondrij on se mora izravnati, da bi nakon ulaska ponovo zadobio namotanu konformaciju. Ovo krajnje namatanje zahtijeva pomoć proteina poznatijih pod imenima molekularni chaperoni ili chaperonini. Najvažniji dio aktivnosti u mitohondrijskom matriksu čovjeka povjeren je dvama chaperonima, kodiranim genima HSPA9 (Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 9) i HSPD1 (Heat Shock Protein Family D (Hsp60) Member 1), potrebnih kako bi mitohondrijski proteini postigli svoju pravu konformaciju.

Funkcije mitohondrija nisu samo u metabolizmu oksidativne fosforilacije, ova organela važna je i kao regulator apoptoze, kontroli koncentracije kalcija u citosolu, glavni su izvor endogenih reaktivni kisikovih spojeva (ROS, od engl. *reactive oxygen species*). Sudjeluju i u drugim biokemijskim putevima, kao npr. u pojedinim etapama ciklusa uree, te su odgovorni za biogenezu klastera željezo-sumpor.

Uloga mitohondrija u apoptozi vrlo je značajna. Unutrašnji put prijenosa apoptotskih signala naziva se još i mitohondrijski put. Ovaj put integrira signale nastale raznim staničnim stresorima. I sami mitohondriji sadrže brojne pro-apoptotske signale od kojih je sigurno najpoznatiji AIF (*Apoptosis Inducing Factor*), Smac, DIABLO i svakako citokrom C. Osobito

značajan događaj u indukciji apoptoze je izlazak citokroma C iz mitohondrija u citosol. Djelovanjem proapoptotskih Bcl-2 proteina u mitohondrijskoj membrani dolazi do stvaranja specifičnih pora u engleskoj literaturi nazvanih PT pore (od *Permeability Transition*). Kroz PT pore iz mitohondrija izlaze molekule zvane AIF, Smac, DIABLO i citokrom C. Citokrom C ulazi u interakciju s proteinom Apaf-1, što će aktivirati kaspazu 9, a potom i kaspazu 3. Formira se kasposom (apoptosom) – multiproteinski kompleks koji se sada sastoji od citokroma C, Apaf-1, prokaspaze 9 i ATPa i koji stanicu odvodi u apoptozu.



Slika 2. Mitohondrijska DNA i mitohondrijskih bolesti u ljudi. Prikazane su najpoznatije mutacije koje uzrokuju mitohondrijske bolesti. CPEO (chronic progressive external ophthalmoplegia)-kronična progresivna vanjska oftalmoplegija; LHON (Leber hereditary optic neuropathy)-Leberova hereditarna optička neuropatija; LS (Leigh syndrome)-Leighov sindrom; MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes)-mitohondrijska miopatija, encefalopatija, laktična acidoza, epizode slične moždanom udaru; MERRF (myoclonic epilepsy and ragged red fibres)-mioklonična epilepsija i crvena pokidana vlakna; MILS (maternally inherited Leigh syndrome)-Leighov sindrom naslijeđen od majke; NARP (neurogenic weakness, ataxia, and retinitis pigmentosa)-neurogenska slabost, ataksija i retinitis pigmentosa; PS (Pearson syndrome)-Pearsonov sindrom. (Prilagođeno prema Tuppen i sur. *Biochim Biophys Acta* 2010;1797:113-28).

Mitohondrijske bolesti

Mutacije mtDNA prepoznate su kao važni uzrok bolesti koje zajedničkim imenom zovemo mitohondrijske bolesti. Mitohondrijske bolesti su grupa klinički heterogenih bolesti zajednički definiranih gubitkom stanične energije radi neispravne oksidativne fosforilacije. Od vremena prve mutacija mtDNA čovjeka sa patološkim posljedicama otkrivene 1988. godine do danas, lista mutacija i bolesti uzrokovanih promjenama mitohondrija svakim danom sve je duža. Promjene mtDNA čovjeka su danas funkcionalno i genetički vezane uz čitav niz bolesti čovjeka. Jedan od razloga velike kompleksnosti i heterogenosti mitohondrijskih bolesti svakako je i uključenost obaju genoma i mitohondrijskog i jezgrinog u njihovom nastanku.

Nasljedna oštećenja mtDNA uzrokuju nasljedne mitohondrijske bolesti. To su rijetki sindromi uzrokovani oštećenjima brojnih tkiva. Tkivna oštećenja slijede redoslijed osjetljivosti tkiva na energetske manjak. Najčešća su oštećenja očnog živca i središnjeg živčanog sustava, zatim skeletnih mišića i srca, stanica gušteračinih Langerhasovih otočića, bubrega i jetre. Stoga se mitohondrijske bolesti općenito očituju slijepoćom, poremećajima središnjeg živčanog sustava (epileptički grčevi, neurogena mišićna slabost, poremećaji pokreta), smanjenjem mišićne snage, slabošću srca i poremećajima drugih organa. Mutacije mtDNA samo u specifičnom tkivu očituju se odgovarajućim poremećajima funkcije u tom tkivu kao npr. miopatija uzrokovana mutacijama mtDNA u mišićnim stanicama. Najčešće se znakovi nasljednih mitohondrijskih bolesti pojave poslije 20 godine života i pogoršavaju se sa starošću. To se tumači akumulacijom dodatnih stečenih mutacija mtDNA koje se pribrajaju već postojećim nasljednim, te s vremenom sve više onemogućavaju oksidativnu fosforilaciju. U teškim slučajevima mitohondrijske bolesti očituju se uskoro nakon rođenja, i to hipoventilacijom, laktičnom acidozom, znacima teških oštećenja SŽS i poremećajima rada srca, te bolesnici umiru u dojenačkoj dobi. Mitohondrijske bolesti ne nasljeđuju se po Mendelovim zakonima, jer citoplazma zigote sadrži nekoliko stotina tisuća molekula majčine mtDNA, dok spermij unese tek nekoliko molekula očevih mtDNA. Mehanizmi kojima se selektivno eliminiraju očevi mitohondriji još uvijek su nepoznati. Nedavna istraživanja provedena na *C. elegans* pokazala su da očevi mitohondriji ubrzano gube integritet svoje unutrašnje membrane odmah nakon fertilizacije. Pokazalo se da proces eliminacije očevih mitohondrija uvelike ovisi o mitohondrijskoj endonukleazi G, točnije endonukleazi CPS-6. Ova endonukleaza premješta se nakon oplodnje iz intermembranskog prostora u matriks i

razgrađuje mtDNA očevih mitohondrija. Posljedično dolazi do raspadanja unutrašnje membrane i samog mitohondrija. Pokusi su također pokazali da je proces razgradnje očevih mitohondrija važan za normalan animalni razvoj, jer u slučajevima odgođenog uklanjanja očevih mitohondrija dolazi do povećanja embrionalne letalnosti.

Tablica 1. Kombinacija sljedećih simptoma i nalaza sugerira na mitohondrijsku bolest. Vrlo je malo specifičnih simptoma. Preporuka je posumnjati na mitohondrijsku bolest kada su zahvaćena tri ili više organska sustava.

Simptomi i nalazi koji jako upućuju	Mišić	bol, grčenje, hipotonija, rasčupana crvena vlakna ('ragged red fibers'), nedostatak citokrom oksidaze, progresivna vanjska oftalmoplegija, ptoza
	Metabolizam	povišena razina laktata u cerebrospinalnom likvoru, laktacidoza u krvi
	Mozak	magnetna rezonanca otkriva hiperintenzivna područja na T2/FLAIR sekvenci u području bazalnih ganglija, infarkti često u parieto-okcipitalnoj regiji. Kalcifikacija bazalnih ganglija. Hemipareza i/ili hemianopija. Demencija, zaostajanje u razvoju; migrene, napadaji
	Oklo	pigmentna retinopatija, gubitak vida, ptoza, oftalmoplegija
	Srce	kardiomiopatija bez vidljivog uzroka, srčani blok
	Bubreg	oštećenja tubula, renalna tubularna acidoza
	Krv	sideroblastična anemija sa vakuoliziranim eritrocitnim i leukocitnim prekursorima
	Mozak	demencija, mioklonus, ataksija, fokalni napadaji, glavobolje
	Oklo	katarakta, atrofija optičkog živca
	Simptomi i nalazi koji se mogu vezati uz mitohondrijsku bolest	Uho
Gušterača		disfunkcija egzokrine gušterače
Probavni sustav		atrofija resica, epizodno povraćanje , gastrointestinalni problemi
Endokrini sustav		diabetes (oba tipa I i II), hipoparatiroidizam, nedostatak hormona rasta
Koštana srž		sideroblastična anemija, vakuolizacija, pancitopenija
Jetra		disfunkcije jetre bez drugog objašnjenja, hipoglikemija

Za razliku od nasljednih, stečena oštećenja mitohondrija poglavito nastaju učinkom kisikovih reaktivnih spojeva (ROS) u koje spadaju i slobodni radikali kisika. Procesom oksidativne fosforilacije nastaje veliki broj intermedijera kisika, spojeva poznatih pod imenom oksidansi ili slobodni radikali kisika. Poremećaj u ravnoteži oksidacijsko-redukcijskih procesa uzrokovati

će njihovo prekomjerno stvaranje. Ako elektroni u vanjskoj ljusci molekule nisu sparni molekula je nestabilna i potencijalno opasna. Slobodni radikali kao što su O^{2-} , OH^- , H_2O_2 na različite načine oštećuju stanične dijelove. Učinak slobodnih radikala je veći na mitohondrijsku DNA nego na jezgrin genom, jer organela ne sadrži mehanizme za popravak DNA kao što je to slučaj sa jezgrinom DNA.

Najteže su pogođena tkiva koja zahtijevaju visoke razine proizvodnje energije. S obzirom da bolesti mtDNA mogu oponašati tako mnogo nevezanih poremećaja, otkrivanje pravog uzroka puno je sporije u pacijenata sa multisistemskim bolestima. U Tablici 1 prikazi su simptomi koji upućuju na mitohondrijski uzrok.

Iako su moderne molekularno genetičke tehnike omogućile veliki napredak u dijagnozi i karakterizaciji specifičnih molekularnih oštećenja, za liječenje većine mitohondrijskih bolesti za bolesnike još uvijek nema definitivne biokemijske terapije. Stoga se razmatra mogućnost genske terapije mitohondrijske DNA. Kako bi spriječili prijenos štetnih mutacija mitohondrijske DNA majke na potomstvo predloženi pristup genske terapije je transplantacija majčine jezgrine DNA iz majčine jajne stanice u jajnu stanicu donora čija citoplazma sadrži zdrave mitohondrije, a koja je prethodno enukleirana (uklonjena joj je jezgra). Rezultirajući embrio tzv. embrio tri osobe (*three person embryo*) sadrži mitohondrijske gene zdrave donorice i jezgrinu DNA majke i oca. Iako se u većini zemalja za ovu potencijalnu gensku terapiju mitohondrijskih bolesti još uvijek čeka odobrenje, krajem 2016. godine u Velikoj Britaniji rođena je prva beba uporabom ove tehnike.

Ukratko ćemo opisati neke od značajnijih mitohondrijskih bolesti i tipove mutacija koje ih uzrokuju.

Leighov sindrom

Leighov sindrom je progresivna neurodegenerativna bolest koja nastaje zbog deficita oksidativnog metabolizma uzrokovanog mutacijama u mitohondrijskoj ili jezgrinoj DNA. Mutacije mitohondrijske DNA slijedeće su točkaste mutacije: m.8993T>C, m.8993T>G, m.10158T>C i m.10191T>C. Mutacija na mjestu 8993, sa zamjenom T>C/G u mtDNA se nalazi u genu MTATP6 koji kodira za ATP sintazu 6 (Slika 2.). Mutacija ove ATP sintaze dovodi do povećane proizvodnje slobodnih kisikovih reaktivnih spojeva (ROS) i smanjene proizvodnje energije. Druga poznata mutacija mtDNA je ona u gena za NADH dehidrogenazu 3. Radi se o

supstituciji T>C na mjestu 10158 ili T>C na mjestu 10191 što dovodi do defekta mitohondrijskog kompleksa I. Mutacije gena SURF1 jezgrine DNA (više od 40 različitih mutacija) uzrokuju bolest zbog defekta citokrom oksidaze c – unutar mitohondrijskog kompleksa IV. Patološke promjene uzrokovane mutacijama najizrazitije zahvaćaju moždano deblo, diencefalon i bazalne ganglije, uzrokujući simetrične nekrotične lezije sive i bijele tvari. Radiološki se uočava cistična degeneracija supstancije nigre, periakveduktalne sive tvari i putamena. Klinička slika bolesti je heterogena, no karakterističan je početak simptoma u dojenaštvu ili ranoj predškolskoj dobi. Najčešće se javljaju psihomotorna retardacija, konvulzije, hipotonija, distonija, ataksija, nistagmus i respiratorna disfunkcija. Bolest brzo napreduje, te većina djece umire u ranom djetinjstvu.

Kearns-Sayreov sindrom

Kearns-Sayreov sindrom (KSS) je rijetka progresivna mitohondrijska bolest koju karakterizira trijas: retinitis pigmentoza, progresivna vanjska oftalmoplegija i početak bolesti prije 20. godine. Klinički pregled otkriva tzv. sol i papar retinopatiju posteriornog fundusa oka. KSS je sporadična multisistemska mitohondrijska bolest koja može uzrokovati i teška oštećenja srčane kondukcije što može dovesti do smrti. Neurološki simptomi koje pacijenti oboljeli od KSS imaju su: oftalmoplegija, retinopatija, cerebelarna ataksija, supklinička neuropatija, kognitivna zaostalost i gluhoća. Osim neuroloških, postoje simptomi od strane drugih organskih sustava: kardiomiopatija, kompletni srčani blok, endokrinopatije i disfagija. Za razliku od drugih mitohondrijskih bolesti, epilepsija i moždani udar nisu uobičajeni za KSS. Morfološke promjene u mozgu u pacijenata sa KSS pogađaju podjednako bijelu i sivu tvar, uzrokujući spongiformnu degeneraciju. Bijela tvar je promijenjena u svim dijelovima središnjeg živčanog sustava, a siva predominantno u malom mozgu. Degenerativne promjene cerebelluma najčešće uključuju Purkinjeove stanice. Oligodendrociti su također podložni oštećenju, zbog naglašene ovisnosti o mitohondrijskom metabolizmu.

Uzrok nastanka bolesti velike su sporadične pojedinačne delecija u mitohondrijskog genoma koje obuhvaćaju od 1000 do 10000 nukleotida. Najčešća delecija, koja se javlja u jedne trećine oboljelih od Kearns-Sayreovog sindroma, zahvaća 4997 nukleotida, odnosno 12 mitohondrijskih gena. Iste promjene mogu uzrokovati i Pearsonov sindrom (Slika 2.).

Pearsonov sindrom

Pearsonov sindrom se javlja u dojenačkoj dobi, a obilježen je disfunkcijom hematopoetskih stanica i egzokrinom insuficijencijom pankreasa. U Pearsonovom sindromu se u koštanoj srži nalaze ring sideroblasti. U pacijenata s ovim rijetkim sindromom može doći do pada broja krvnih stanica sve tri loze: anemija, leukopenija, trombocitopenija, uz simptome karakteristične za ta stanja. Egzokrina insuficijencija pankreasa dovodi do malapsorpcije i posljedično do zaostatka u rastu. Oko polovice djece umire od Pearsonovog sindroma u dojenačkoj ili predškolskoj dobi, a u mnogih koji prežive će se kasnije razviti Kearns-Sayreov sindrom. Kao što je već u prethodnom odjeljku spomenuto bolest uzrokuju velike delecije mtDNA.

Leberova nasljedna optička neuropatija

Leberova nasljedna optička neuropatija (LHON) mitohondrijska je nasljedna bolest karakterizirana bilateralnim gubitkom centralnog vida u ranom odraslom dobu. LHON je prvi puta opisao Thomas Leber 1871. godine kao obiteljsku neuro-oftamološku bolest, a zanimljivo je da je upravo LHON prva kod koje je prepoznat uzrok točkasta mutacija mitohondrijskog genoma.

LHON je organ-specifična bolest koja dovodi do slabljenja vida zbog rapidnog odumiranja optičkog živca. Bolest je uzrokovana točkastim mutacijama mitohondrijske DNA. Najčešće mutacije (više od 95%) su: m.11778G>A (MT-ND4 gen koji kodira 4. podjedinicu NADH dehidrogenaze), m.3460G>A (MT-ND1 gen za 1. podjedinicu NADH dehidrogenaze), i m.14484T>C (MT-ND6 gen za 6. podjedinicu NADH dehidrogenaze). Posljedica mutacija jest apoptoza ganglijskih stanica retine i atrofija njihovih aksona. Prisutne su i mikroangiopatija retinalnih krvnih žila s peripapilarnim teleangiektazijama i pseudoedemom optičkog diska. Bolest se najčešće javlja u srednjoj životnoj dobi, a mnogostruko je češća u muškaraca. Započinje akutnim ili subakutnim, bezbolnim slabljenjem vida na jedno oko, nakon kojeg unutar par tjedana do mjeseci bude zahvaćeno i drugo oko. Gubitak vida je centralan, utječe na oštrinu i raspoznavanje boja, sa slabljenjem funkcija kao što su čitanje i raspoznavanje lica.

MELAS sindrom (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes)

Mitohondrijska encefalopatija, laktacidoza i epizode nalik moždanom udaru (MELAS) jest naziv za rijedak multisistemski sindrom koji najčešće pogađa živčani sustav i mišiće. Najčešći

klinički pokazatelj sindroma MELAS jesu epizode nalik moždanom udaru, koje se često javi i prije 20. godine života. Njih karakterizira migrenska glavobolja kao prodromalni simptom, mišićna slabost jedne strane tijela (hemipareza), promjena stanja svijesti, smetnje vida i konvulzije. Progresijom bolesti dolazi do gubitka vida, nepokretnosti i demencije. Većina ljudi također ima i povišene razine laktata u serumu (laktacidoza), što posljedično uzrokuje mučninu, abdominalnu bol, povraćanje, slabost mišića i poteškoće s disanjem. Rjeđe posljedice bolesti su: mioklonizmi, ataksija, gubitak sluha, dijabetes, te srčani i bubrežni problemi. Najčešća mutacija koja pogađa 80% bolesnika sa sindromom MELAS jest točkasta mutacija m.3243A>G. Mutacija je smještena u genu MTTL1 koji kodira za mitohondrijsku tRNA. Međutim poznate su i druge mutacije u genu za ovu tRNA kao i u genima za druge mitohondrijske tRNA, te genima koji kodiraju proteine koje također uzrokuju sindrom MELAS. To su mutacije: supstitucija na poziciji m.3271T>C također u genu MTTL1; m.1642G>A u genu MTTV za drugu mitohondrijsku tRNA; m.9957T>C u genu MTCO3 za citokrom oksidazu III; zatim nekoliko mutacija m.12770A>G, m.13045A>C, m.13513G>A, m.13514A>G koje se sve nalaze u genu MTND5 za podjedinicu 5 mitohondrijske NADH-dehidrogenaze. Mutacija u genu MTND1 za podjedinicu 1 mitohondrijske NADH-dehidrogenaze su m.3697G>A, m.3946G>A i m.3949T>C. Patološke promjene uzrokovane ovim mutacijama su najizraženije kao mikroinfarkti u parijetalnom, temporalnom i okcipitalnom režnju mozga. Karakteristično za njih je da su mnogostruki, asimetrične raspodjele i ne prate vaskularnu distribuciju. S vremenom dolazi do kortikalne atrofije i ventrikularne dilatacije. Često se nalaze i kalcifikati u području bazalnih ganglija te znakovi propadanja Purkinjeovih stanica u malom mozgu.

Kronična progresivna vanjska oftalmoplegija

Kronična progresivna vanjska oftalmoplegija je jedna od najčešćih mitohondrijskih bolesti. Obilježena je slabošću očnih mišića, a uzrokovana pojedinačnim ili mnogostrukim velikim delecijama mtDNA, ili rjeđe točkastim mutacijama mtDNA. Primarni genetički događaji su velike delecije mitohondrijske DNA, te mutacije u mitohondrijskim genima za tRNA ili onima koji kodiraju proteine (e.g. MTTL1, MTTI and MTND4). Točkaste mutacije koje uzrokuju kroničnu progresivnu vanjsku oftalmoplegiju su: m.3243A>G (kao i u MELAS sindromu) i m.12316G>A u genu za mitohondrijsku tRNA. Sekundarne mutacije koje uzrokuju bolest višestruke su delecije gena POLG, C10orf2, RRM2B, i SLC25A4 smještenih u jezgri DNA.

Glavna patomorfološka promjena koja se nalazi u očnim mišićima bolesnika s kroničnom progresivnom vanjskom oftalmoplegijom jest manjak citokrom oksidaze c. Također je primjetno subsarkolemalno nakupljanje abnormalnih mitohondrija. Klinička slika se sastoji od progresivne oftalmopareze i ptoze. Ptoza je vodeći simptom, najprije je asimetrična, no progresijom bolesti postaje bilateralna. Ostala obilježja bolesti uključuju miopatiju i opću slabost, a ovi simptomi se javljaju u većine bolesnika.

Neuropatija, ataksija, retinitis pigmentoza (NARP)

NARP jest naziv kliničkog sindroma koji predstavlja kombinaciju simptoma. Periferna neuropatija je glavna oznaka ove bolesti uz dodatne neurološke komplikacije koje uključuju ataksiju, retinitis pigmentozu, zaostajanje u razvoju, napadaje i demenciju. Patološki nalaz je sličan onom u Leighovom sindromu, s dodatkom retinitis pigmentoze, odnosno progresivnom degeneracijom pigmentnog epitela mrežnice. Simptomi počinju u djetinjstvu ili mlađoj odrasloj dobi, a sastoje se od senzorne neuropatije, slabosti udova, problemima s ravnotežom i koordinacijom pokreta, te smetnji vida. Mnogi bolesnici razviju demenciju, a manji broj ima smetnje sluha, konvulzije i disfunkciju provodne muskulature srca. NARP je kao i Leighov sindrom uzrokovan točkastom mutacijom mitohondrijske DNA, m.8993T>G u genu MT-ATP6 za ATP-sintazu 6. Opseg mitohondrija zahvaćenih mutacijom utječe na klinički fenotip i pojavu bolesti u djetinjstvu.

Mioklona epilepsija s *ragged-red fibers* (MERRF)

Mioklona epilepsija s iskidanim mišićnim vlaknima (od engl. *ragged-red fibers*, MERRF) je teška neurodegenerativna mitohondrijska bolest. Ova progresivna bolest manifestira se u djetinjstvu ili ranom odraslom dobu nakon do tada normalnog razvoja. Klinička slika je obilježena mioklonizmima popraćenim napadajima. Manifestacije bolesti uključuju mioklonu epilepsiju, miopatiju karakteriziranu gubitkom mišićnih vlakana u proksimalnoj muskulaturi udova, cerebelarnu ataksiju, atrofiju optičkog živca, gubitak sluha i slabljenje propriocepcije zbog periferne senzomotorne neuropatije. Ove promjene uzrok su teške invalidnosti pacijenata s MERRF-om. Češća je i pojava Wolf-Parkinson-White aritmije i brojnih lipoma u vratnoj regiji. Klinička slika može međutim jako varirati od osobe do osobe, pa čak i unutar obitelji ovisno o broju mitohondrija zahvaćenih mutacijom i opskrbljenošću pojedinih tkiva mitohondrijima. Dijagnoza se bazira na karakterističnom, ali ne i patognomoničnom, patološkom nalazu biopsije mišića sa disfunkcionalnim mitohondrijima u obliku crvenih čupavih vlakana (*ragged-red fibers*). Ova pojava se temelji na subsarkolemalnom nakupljanju

mitohondrija. Danas se bolest dijagnosticira uporabom imunohistokemijske detekcije citokrom c oksidaze i dehidrogenaze u mišićima.

MERRF je uzrokovan točkastom mutacijom u mitohondrijskom genomu. Najčešća mutacija koja se javlja u 80% slučajeva jest supstitucija m.8344A>G, u genu MTTK koji kodira mitohondrijsku tRNA_{Lys}. Gubitak neurona u bolesnika sa mutacijom m.8344A>G najizraženiji je u nucleus dentatus, no zabilježen je i u mnogim drugim područjima središnjeg živčanog sustava. Rjeđe mutacije koje uzrokuju MERRF nalaze se u genima MTTL1, MTTH ili MTTT1 koji također kodiraju za tRNA.

Literatura

1. Bernardi P, Di Lisa F, Fogolari F, Lippe G. From ATP to PTP and Back: A Dual Function for the Mitochondrial ATP Synthase. *Circ Res* 2015;116:1850-1862. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306557.
2. Callaway E. Three-person embryos may fail to vanquish mutant mitochondria. *Nature* 533, 445–446 (26 May 2016) doi:10.1038/nature.2016.19948
3. Cooper GM, Hausman RE. Stanica: molekularni pristup (10 poglavlje). Urednik: Sinauer AD. 6. izdanje, Sunderland, Massachusetts USA, 2013, ISBN 978-0-87893-964-0
4. Cree LM, Samuels DC, Chinnery PF. The inheritance of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:1097-102. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.03.002.
5. Davies KM, Daum B, Gold VA, Mühleip AW, Brandt T, Blum TB, Mills DJ, Kühlbrandt W. Visualization of ATP synthase dimers in mitochondria by electron cryo-tomography. *J Vis Exp* 2014;14:51228. doi: 10.3791/51228.
6. Ernster L, Schatz G. Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol* 1981;91:227s-255s.
7. Gray MW. Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4:a011403. doi: 10.1101/cshperspect.a011403.
8. Hajnsek S, Petelin Gadze Z. Progressive myoclonus epilepsies, priručnik. Urednici: Hajnsek S, Petelin Gadze Z, Medicinska naklada, Zagreb, 2015, ISBN: 0-553-57777-8
9. Horga A, Pitceathly RD, Blake JC, Woodward CE, Zapater P, Fratter C, Mudanohwo EE, Plant GT, Houlden H, Sweeney MG, Hanna MG, Reilly MM. Peripheral neuropathy predicts nuclear gene defect in patients with mitochondrial ophthalmoplegia. *Brain*. 2014;137:3200-12. doi:10.1093/brain/awu279.
10. Horvath SE, Rampelt H, Oeljeklaus S, Warscheid B, van der Laan M, Pfanner N. Role of membrane contact sites in protein import into mitochondria. *Protein Sci* 2015;24:277-97. doi: 10.1002/pro.2625.
11. Jayashankar V, Mueller IA, Rafelski SM. Shaping the multi-scale architecture of mitochondria. *Curr Opin Cell Biol* 2016;38:45-51. doi: 10.1016/j.ceb.2016.02.006.
12. Kirby DM, McFarland R, Ohtake A, Dunning C, Ryan MT, Wilson C, Ketteridge D, Turnbull DM, Thorburn DR, Taylor RW. Mutations of the mitochondrial ND1 gene as a cause of MELAS. *J Med Genet* 2004;41:784-9.
13. Koenig MK. Presentation and Diagnosis of Mitochondrial Disorders in Children. *Pediatr Neurol* 2008;38:305–313. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2007.12.001.

14. Lightowers RN, Taylor RW, Turnbull DM. Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? *Science* 2015;349:1494-1499. doi: 10.1126/science.aac7516.
15. Pećina-Šlaus N. Genetičko molekularni aspekti apoptoze – zajedničko obilježje svih živih organizama. *Acta Med Croatica* 2009;63:13-19.
16. Perkins G, Renken C, Martone ME, Young SJ, Ellisman M, Frey T. Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol* 1997;119:260-72.
17. Phillips MJ, Voeltz GK. Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016;17:69-82. doi: 10.1038/nrm.2015.8.
18. Sertić J. Molekularna dijagnostika genetičkih bolesti – Klinički bolnički centar Zagreb. *Paediatr Croat* 2016;60:53-57.
19. Tornroth-Horsefield S, Neutze R. Opening and closing the metabolite gate. *PNAS* 2008;105:19565–19566. doi: 10.1073/pnas.0810654106.
20. Tuppen HA, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta* 2010;1797:113-28. doi: 10.1016/j.bbabi.2009.09.005.
21. Turnbull HE, Lax NZ, Diodato D, Ansorge O, Turnbull DM. The mitochondrial brain: From mitochondrial genome to neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802:111-21. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.07.010.
22. van der Laan M, Horvath SE, Pfanner N. Mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Curr Opin Cell Biol* 2016;41:33-42. doi: 10.1016/j.ceb.2016.03.013.
23. Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ, Nikoskelainen EK. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy, *Science* 1988;242:1427–1430.
24. Zhou Q, Li H, Li H, Nakagawa A, Lin JL, Lee ES, Harry BL, Skeen-Gaar RR, Suehiro Y, William D, Mitani S, Yuan HS, Kang BH, Xue D. Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization. *Science*. 2016;353(6297):394-9. doi: 10.1126/science.aaf4777.