

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů



Soňa Koničková

Patofyziologické dopady poruch mitochondriální F_1F_0 ATP syntázy
Patho-physiological consequences of mitochondrial F_1F_0 ATP synthase disorders

Bakalářská práce

Vedoucí práce:
RNDr. Alena Pecinová, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

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

V Praze, 6.8.2024

Soňa Koničková

Poděkování

Mé poděkování patří mojí skvělé vedoucí RNDr. Aleně Pecinové, PhD. za odborné vedení při práci, za její trpělivost a za všechny připomínky. Práce byla podpořena projektem Národní institut pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Program EXCELES, ID: LX22NPO5104) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

Abstrakt

Mitochondriální F_1F_0 ATP syntáza je klíčový enzym, který syntetizuje většinu buněčného ATP v rámci procesu oxidační fosforylace. Oxidačně-fosforylační aparát je úzce spjat s důležitými metabolickými dráhami, a proto poruchy ATP syntázy vedou k vážným metabolickým onemocněním, které se většinou projevují ve velmi raném věku. V závislosti na typu defektu dochází ke změnám funkce mitochondrií, které mohou ovlivnit buněčný metabolismus odlišným způsobem. Cílem bakalářské práce je shrnout dosavadní znalosti o důsledcích různých poruch mitochondriální F_1F_0 ATP syntázy pozorované u pacientů. Jsou zhodnoceny dopady těchto defektů na funkci mitochondrií (např. tvorbu membránového potenciálu nebo vznik reaktivních forem kyslíku) a také na celkový buněčný metabolismus.

Klíčová slova:

mitochondrie, mitochondriální F_1F_0 ATP syntáza, buněčný metabolismus, mitochondriální onemocnění

Abstract

Mitochondrial F_1F_0 ATP synthase is a crucial enzyme that synthesizes the majority of cellular ATP and is part of a process called oxidative phosphorylation. This process is closely connected with important metabolic pathways in the cell, hence defects of the ATP synthase usually lead to serious metabolic disorders manifesting at a very early age. Based on the type of the enzyme defect, the mitochondrial function is affected leading to various changes in the cellular metabolism. The aim of this bachelor thesis is to summarize our knowledge about consequences of mitochondrial F_1F_0 ATP synthase disorders reported in patients. Emphasis is placed on how these defects impact the function of mitochondria (e.g. the formation of the membrane potential or production of reactive oxygen species) and on the whole cellular metabolism.

Key words:

mitochondria, mitochondrial F_1F_0 ATP synthase, cellular metabolism, mitochondrial disorders

Seznam použitých zkratk

3-MGA	3-methyl glutakonová acidurie
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
ATPAF1	asemblační faktor 1 F1 domény mitochondriální ATP syntázy
ATPAF2	asemblační faktor 2 F1 domény mitochondriální ATP syntázy
bp	base pair; párování bází
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
DAPIT	diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissues; protein asociovaný s diabetem ve tkáních regulovaných inzulinem
FAD	flavinadenindinukleotid
gDNA	genomová deoxyribonukleová kyselina
IF1	inhibiční faktor 1
MMP	mezimembránový prostor
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NARP	neuropatie, ataxie, retinitis pigmentosa
nDNA	jaderná deoxyribonukleová kyselina
OCR	oxygen consumption rate; míra spotřeby kyslíku
OSCP	oligomycin sensitive conferral protein; protein zodpovědný za citlivost vůči oligomycinu
OXPHOS	oxidativní fosforylace
ROS	reactive oxygen species; reaktivní formy kyslíku
TCA	tricarboxylic acid cycle; cyklus trikarboxylových kyselin aneb citrátový cyklus
TIM	translocase of the inner membrane; translokáza vnitřní membrány mitochondrie
TMEM70	transmembránový protein 70
TMEM242	transmembránový protein 242
TOM	translocase of the outer membrane; translokáza vnější membrány mitochondrie
VMM	vnitřní mitochondriální membrána

Obsah

Úvod.....	1
Mitochondriální F_1F_0 ATP syntáza.....	2
Oxidační fosforylace	5
Elektron transportní řetězec.....	5
Mitochondriální syntéza ATP	7
Defekty mitochondriální F_1F_0 ATP syntázy	8
Defekty ATP syntázy způsobené mutacemi v mtDNA.....	8
Patogenní mutace v genech <i>MT-ATP6</i> a <i>MT-ATP8</i>	10
Patogenní mutace v překryvu genů <i>MT-ATP6</i> a <i>MT-ATP8</i>	14
Defekty ATP syntázy způsobené mutací v nDNA.....	16
Autozomálně recesivní mutace nDNA.....	16
Patogenní mutace v genech katalytického hexameru	16
Patogenní mutace v genech centrálního stonku.....	17
Patogenní mutace v genech periferního stonku.....	17
Patogenní mutace v genech pro asemblační faktory	19
Autozomálně dominantní mutace nDNA	22
Patogenní mutace v genech katalytického hexameru.....	22
Patogenní mutace v genu <i>c</i> podjednotky	23
Závěr.....	24
Seznam použité literatury.....	26

Úvod

V lidských buňkách slouží jako hlavní energetický zdroj pro udržování chodu a růstu buňky molekula ATP. Největší produkce této molekuly probíhá v mitochondriích. Zde je umístěn proces oxidační fosforylace skládající se z elektron transportního řetězce a mitochondriální F_1F_0 ATP syntázy (ATP syntázy).

Na komplexech elektron transportního řetězce dochází k oxidaci koenzymů a odebírají se z nich elektrony, které putují řetězcem komplexů. Přesouváním elektronů se uvolňuje energie využitá komplexy na transport protonů z matrix do mezimembránového prostoru, čímž vzniká elektrochemický gradient protonů na vnitřní membráně. Utvořený protonový gradient je využíván ATP syntázou k fosforylaci molekuly ADP na ATP.

Komplexy respiračního řetězce a ATP syntáza jsou enzymy složené z vícero podjednotek, ty mohou být kódované v jaderném, nebo mitochondriálním genomu. Skládání enzymatických komplexů asistují asemblační faktory, jejichž role je zásadní ve správném a funkčním poskládání podjednotek dohromady.

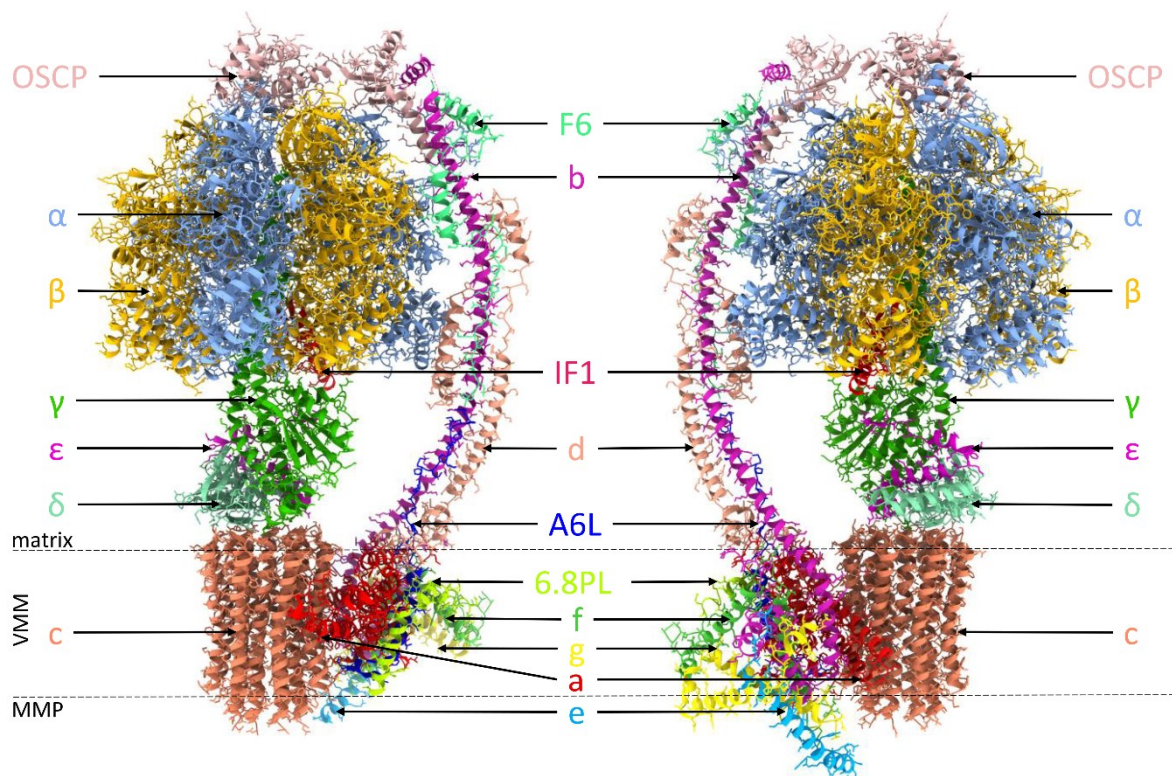
V případě výskytu mutace v genu pro podjednotky nebo asemblační faktory může následkem toho dojít k poruše enzymu, kdy není schopen správně vykonávat svoji funkci a může být narušená interakce jednotlivých podjednotek nebo komplexů. V návaznosti může být ovlivněn proces oxidační fosforylace, dopad se odvíjí od způsobu postižení komplexu a také do jaké míry byl pozměněn. Může tedy dojít např. k hromadění redukovaných koenzymů, menšímu budování protonového gradientu, omezené produkci ATP, rozpřažení syntézy ATP od využívání protonového gradientu atd., čímž se může jako následek pozměnit metabolismus v celé buňce.

Na úrovni organismu pak může docházet k různě závažným patologiím, postižené jsou zejména tkáně, kde je vysoká spotřeba energie, např. nervová tkáň, srdeční či kosterní svalová tkáň. Projevy sahají od samovolných svalových stahů částí těla, problémů s koordinací pohybů a opožděného vývoje až po potenciálně fatální encefalo-kardio-myopatie. Porucha se prezentuje zpravidla během dětství, běžně už od prvních týdnů života.

Mitochondriální F₁F₀ ATP syntáza

Hlavním producentem ATP je ATP syntáza lokalizovaná na vnitřní mitochondriální membráně a katalyzuje syntézu z ADP a anorganického fosfátu. ATP je nukleotid, v jehož struktuře jsou fosfáty na sebe vázány makroergní vazbou, při štěpení této vazby se uvolňuje velké množství energie využitelné jinde. Nejeftivnějším zdrojem ATP je proces oxidační fosforylace, dalšími dráhami, kde se produkuje ATP je např. dráha glykolýzy nebo cyklus trikarboxylových kyselin.

V lidských mitochondriích se vyskytuje na vnitřní membráně ATP syntáza typu F, která se skládá ze dvou hlavních domén, F₁ a F₀ (Obrázek 1). F₁ doména je hydrofilní a nachází se v matrix, tato oblast obsahuje katalytická místa pro syntézu ATP na katalytickém hexameru, který je složený z tří α a tří β podjednotek. Dále doména obsahuje centrální stoněk, na který je přenášen rotační pohyb z membránové části, je v kontaktu s $\alpha_3\beta_3$ hexamerem a pomocí své rotace stoněk mění konformace podjednotek hexameru a tím i konformaci katalytických míst. Aby se katalytická hlava neotáčela spolu s centrálním stonkem, je potřeba přítomnost periferního stonku. Na jednom konci je zabudován do membrány a spojen s F₀ doménou, druhým koncem v matrix udržuje katalytický hexamer statický pomocí podjednotky OSCP.



Obrázek 1 – Složení podjednotek monomeru F₁F₀ ATP syntázy. F₁ doména: katalytický hexamer (3 × α , 3 × β) a centrální stoněk (γ , δ , ϵ), F₀ doména: membránové podjednotky (a, 8 × c, A6L, e, f, g, DAPIT, 6.8PL) a periferní stoněk (b, d, F6, OSCP). Umístění enzymu ve vnitřní mitochondriální membráně (VMM) je znázorněno přerušovanými čarami (MMP = mezimembránový prostor). Vytvořeno v ChimeraX podle (Lai, 2023), DAPIT není zobrazen (Protein Data Bank: model 8H9S – Human ATP synthase state 1 (combined), <https://doi.org/10.2210/pdb8H9S/pdb>).

F₀ doména je zabudovaná ve vnitřní membráně a její součástí je podjednotka a a prstenec 8 podjednotek c, které společně zprostředkovávají průchod protonů skrz membránu. Prstenec se během tohoto procesu pootáčí a rotace je přenášena na centrální stonek. Zbylé podjednotky mají roli ve stabilizaci komplexu a jeho upevnění v membráně a interakcí některých podjednotek dochází k dimerizaci ATP syntázy (Kuhlbrandt, 2019). Jak bylo zmíněno, domény jsou tvořeny většími částmi, které jsou složeny z jednotlivých podjednotek, přehled podjednotek a jejich genů je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1 – Přehled podjednotek F₁F₀ ATP syntázy (převzato a upraveno z (Lai, 2023)).

Doména	Část	Podjednotka	Gen
F ₁	katalytický hexamer	3 × α	<i>ATP5F1A</i>
		3 × β	<i>ATP5F1B</i>
	centrální stonek	γ	<i>ATP5F1C</i>
		δ	<i>ATP5F1D</i>
		ε	<i>ATP5F1E</i>
F ₀	membránové podjednotky	a	<i>MT-ATP6</i>
		8 × c	<i>ATP5MC1, ATP5MC2, ATP5MC3</i>
		A6L	<i>MT-ATP8</i>
		e	<i>ATP5ME</i>
		f	<i>ATP5MF</i>
		g	<i>ATP5MG</i>
		DAPIT	<i>ATP5MK</i>
		6.8PL	<i>ATP5MJ</i>
	periferní stonek	b	<i>ATP5PB</i>
		d	<i>ATP5PD</i>
		F6	<i>ATP5PF</i>
		OSCP	<i>ATP5PO</i>

Všechny uvedené podjednotky, až na dvě výjimky, jsou kódované v jaderném genomu. Znamená to, že po transkripci v jádře a translaci na ribozomech v cytoplazmě vzniká prekurzor proteinu, který obsahuje N-koncovou signální sekvenci pro směřování do mitochondrie (von Heijne, 1986) a který bývá udržován v nesloženém stavu pomocí cytosolických chaperonů (Young, 2003). Jakmile je prekurzor proteinu transportován k mitochondrii, interaguje s TOM komplexem (z angl. translocase of the outer membrane), čímž se dostane do mezimembránového prostoru. Pokud prekurzor potřebuje cestovat dál, musí nalézt komplex TIM (z angl. translocase of the inner membrane). Prekurzory podjednotek vyhledají TIM23 (Bauer, 1996) a dojde k jejich translokaci skrz nebo do vnitřní membrány, čemuž napomáhá i mitochondriální forma Hsp70, ta poté drží prekurzor i v matrix a případně napomáhá jeho

složení (Kang, 1990). Signální sekvence v tuto chvíli splnila svůj účel a je odštěpena mitochondriálními peptidázami.

V mitochondriální DNA (mtDNA) se zachovalo kódování pouze pro dvě podjednotky ATP syntázy – α (*MT-ATP6*) a β (*MT-ATP8*). Jejich geny se částečně překrývají, je proto možné, že jedna mutace ovlivní 2 podjednotky naráz (Fearnley & Walker, 1986). Aparát pro jejich transkripci a translaci si mitochondrie nese v matrix (Anderson, 1981), jsou po syntéze připraveny pro skládání s jaderně kódovanými podjednotkami.

Asemblace holoenzymu prochází sérií intermediátů, přičemž momentálně není jednoznačně jasné, jak celý proces probíhá. Skládání ATP syntázy začíná nezávislou formací membránového prstence z 8 monomerů podjednotky c , zároveň složením F_1 katalytického hexameru spolu s centrálním stonkem. Pravděpodobně následuje sestavení periferního stonku, existuje vícero variant drah, které vedou ke stejnému intermediátu, a momentálně není jasné, jaká z těchto drah je dominantní a za jakých podmínek (He, 2020). Patrně je běžnější výskyt dráhy využívající subkomplex $b-e-g$ a subkomplex F_1-c prstence, které pozoroval i Fujikawa a kol. (Fujikawa, 2015).

Od počátku je na katalytickou hlavici navázán dimer IF1 (inhibiční faktor) a to na rozhraní podjednotek α a β (Mimura, 1993). Pro savčí IF1 bylo objeveno, že blokuje hydrolýzu ATP a brání spotřebě ATP v prostředí narušeného membránového potenciálu, čímž nastává pokles pH v matrix. Při nastolení podmínek vhodných pro syntézu ATP, tj. vznikající elektrochemický gradient protonů, IF1 disociuje, tím je uvolněno ATP vázané v katalytickém místě, které už nadále není „uvězněné“ v neměnicích se podjednotkách (Pedersen, 1981; Penin, 1988; Pullman & Monroy, 1963). Bylo také publikováno, že IF1 inhibuje i syntézu ATP a inhibice tak funguje oběma směry (Garcia-Bermudez, 2015; Husain & Harris, 1983). Poměrně nedávno vyšly výsledky od Carrola a kol., kde bylo stanoveno, že IF1 je striktně jednosměrný inhibitor hydrolýzy ATP a na syntézu vliv nemá (Carroll, 2024), je však stále potřeba více studií pro definitivní stanovení funkce IF1.

IF1 je tedy vázán i v rámci zmíněného intermediátu, který postrádá už pouze podjednotky a , β , 6.8PL a DAPIT. Jako další se vkládají mitochondriálně kódované podjednotky a a β , buď samostatně v jakémkoli pořadí, nebo současně. Tak dojde ke vzniku nestabilního komplexu, který už vykazuje částečné spřažení s protonovým gradientem. Stabilizaci komplexu zajistí podjednotka 6.8PL, zároveň se odpojuje IF1 a připojuje DAPIT a vzniká tak aktivní ATP syntáza (He, 2018).

Skládání asistují pomocné faktory, bez kterých by asemblace nemohla být úspěšně dokončena. Do zásadního kroku tvorby hexameru jsou zapojeny ATPAF1 a ATPAF2 (Wang, 2001), dalším asistujícím proteinem je FMC1 homolog, který interaguje s ATPAF2 a nejspíš napomáhá jeho funkci a stabilitě (Lefebvre-Legendre, 2001; Li, 2017). Spojování monomerů podjednotky c do oligomeru usnadňují faktory TMEM70 a TMEM242 (Carroll, 2021; Kovalcikova, 2019). Pro ostatní fáze asemblace nejsou zatím známy další asistující faktory.

Bylo dokázáno, že v savcích mitochondriích se ATP syntáza vyskytuje jako dimer propojený v membránové části enzymu (Schagger & Pfeiffer, 2000). U lidských mitochondrií se předpokládá, že dimerizace se uskutečňuje po vsunutí podjednotek a, A6L a 6.8PL do membránové části, důležitým komponentem pro udržení dimeru je podjednotka DAPIT (He, 2018). Právě interakce podjednotek 6.8PL obou monomerů zprostředkovávají vznik dimeru typu tzv. front-to-back, kde rotační osy procházející c prstencem svírají mezi sebou ostrý úhel, což bylo pozorováno v mitochondriích hlodavců i lidí (He, 2020; Strauss, 2008). Tato teorie koreluje se vzorem dimeru ATP syntázy pozorovaného v tuřích mitochondriích (Spikes, 2020), ale nelze zatím s jistotou potvrdit, jak přesně dimery lidské ATP syntázy vznikají ani jaká je jejich struktura. Byla však vyvrácena teorie o stabilizování dimeru ATP syntázy pomocí dimeru IF1, jehož velikost neumožňuje natáhnutí mezi katalytickými hlavami obou monomerů syntázy (Carroll, 2024).

Dimery ATP syntáz byly u savců pozorovány v záhybech mitochondriálních krist, kde se vytváří řady až o 80 dimerech za sebou (Strauss, 2008). Strauss a další teoretizují, že se takto přispívá k zakřivení vnitřní mitochondriální membrány a že záhyby membrány fungují jako pasti na protony, tudíž by v těchto oblastech mohly ATP syntázy fungovat efektivněji. Takové teorie vznikaly už dříve na základě pozorování z mitochondrií kvasinek (Paumard, 2002).

Oxidační fosforylace

ATP syntáza je součástí systému oxidační fosforylace (OXPHOS), který se nachází na vnitřní membráně mitochondrie. Složkami OXPHOS jsou kromě ATP syntázy komplexy elektron transportního řetězce, které oxidují metabolity vzniklé při degradaci nutrientů a zároveň tvoří elektrochemický gradient na membráně, který je využíván ATP syntázou k tvorbě ATP (Mitchell, 1961).

Elektron transportní řetězec

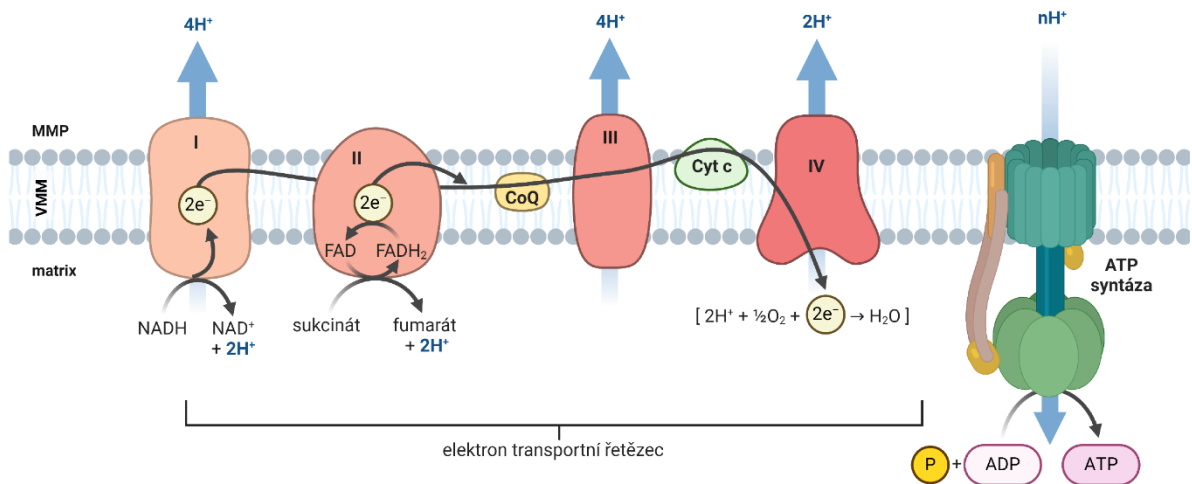
Elektron transportní řetězec oxiduje NADH a sukcinát (Obrázek 2), které se tvoří v cyklu trikarboxylových kyselin (TCA). Vstupním metabolitem TCA je acetylkoenzym A, který je získaný z drah rozkládající živiny na jednodušší látky. Cukry jsou rozebrány na jednotlivé molekuly glukózy, která vstupuje do metabolické dráhy glykolýzy v cytosolu buněk a tuky jsou rozkládány v procesu β -oxidace odehrávající se v peroxisomech a mitochondriích. Elektrony získané oxidací substrátů se přesouvají skrz sérii redoxních center a postupně se uvolňuje energie, která je využita na transport protonů z matrix do mezimembránového prostoru.

Konkrétně, NADH je oxidován na komplexu I aneb NADH:ubichinon oxidoreduktáze, komplexem prochází 2 elektrony a jsou předány na ubichinon (aneb koenzym Q), čímž vzniká redukováná forma zvaná ubichinol. Komplex pumpuje 4 protony za každou dvojici elektronů. Komplex II, jinak také zvaný sukcinát dehydrogenáza, je součástí TCA a oxiduje sukcinát na fumarát. Dva elektrony redukují FAD,

který je kovalentně vázán v komplexu a poté se přesouvají na ubichinon za vzniku ubichinolu, tentokrát ale nejsou pumpovány žádné protony.

Akceptorem elektronů z ubichinolu je komplex III, celým názvem ubichinol:cytochrom c oxidoreduktáza, takto se ubichinol oxiduje zpět na ubichinon, komplex redukuje cytochrom c procesem zvaným Q cyklus. Vzhledem k tomu, že cytochrom c je jedoelektronový přenašeč, musí na komplexu proběhnout dva po sobě jdoucí Q cykly. V prvním cyklu se z ubichinolu odebere 1 elektron a je přenesen na cytochrom c, který se odděluje od komplexu, druhý elektron je přenesen přes molekuly hemu na ubichinon za vzniku semichinonu, který je nestabilní a neodpojí se od komplexu. V druhém cyklu se děje to samé s tím rozdílem, že semichinon je redukován na ubichinol, který může vstupovat ke komplexu III coby donor elektronů. V průběhu dvojice Q cyklů jsou přeneseny celkem 4 protony skrz membránu.

Cytochrom c se pohybuje s jedním elektronem od komplexu III ke komplexu IV, cytochrom c:dioxid oxidoreduktáze. Zde je redukována molekula kyslíku (finální elektronový akceptor) na vodu. Výsledně je tedy spotřebováno po čtyřech protonech v redukcí kyslíku na vodu a další čtyři protony jsou pumpovány do mezimembránového prostoru (Nicholls & Ferguson, 2013).



Obrázek 2 – Schématické znázornění oxidační fosforylace na vnitřní mitochondriální membráně (VMM). Elektrony jsou transportovány z redukováných koenzymů na koenzymem Q (CoQ) na komplex III, odtud probíhá jedoelektronový přenos na komplex IV pomocí cytochromu c (Cyt c). Na transportu protonů do mezimembránovém prostoru (MMP) se podílí komplexy I, III a IV, protonový gradient je využíván ATP syntázou k fosforylaci ADP na ATP.

Mitochondriální syntéza ATP

Během syntézy ATP jsou protony translokovány zpět do matrix přes podjednotku a, která naléhá na prsteneček z 8 podjednotek c. Podjednotka a obsahuje dvojici polokanáľů na straně přikloněné k prstenci. Polokanáľy neprostupují naskrz celou membránou, jedná se o vstupní kanál na straně mezimembránového prostoru a o výstupní kanál na straně matrix. Podjednotka v místě odpovídajícím těmto kanálům obsahuje záporně nabitě pole díky 2 glutamátovým zbytkům, aGlu145 a aGlu203, na straně matrix přispívá zápornému náboji navíc i aspartátový zbytek, aAsp224. Mezi těmito zápornými oblastmi je kladně nabitě pole vlivem zbytku argininu (aArg159). Na podjednotkách c je na vnější straně prstence důležitý glutamát, cGlu58. Zmiňované aminokyseliny jsou v podjednotkách evolučně konzervované a tudíž podstatné pro funkci (Lai, 2023).

Příjem protonů ze strany mezimembránového prostoru probíhá pravděpodobně na principu Grotthussova mechanismu (Cukierman, 2006; Lai, 2023). Proton je přijat na aGlu203 ve vstupním kanálu a předán na cGlu58, prsteneček se pootočí (proti směru hodinových ručiček z pohledu matrix) do hydrofobního prostředí membrány. Jakmile se do oblasti výstupního kanálu dostane protonovaný cGlu58 (po uražení téměř celé kružnice prstence), proton je uvolněn do výstupního kanálu. Uvolnění je podporováno nejspíš spojením více jevů – vyšším pH matrix oproti mezimembránovému prostoru (Kuhlbrandt, 2019), záporně nabitými zbytky aminokyselin aGlu145 a aAsp224 ve výstupním kanálu a kladně nabitou aArg159 na následující pozici (tato pozice je odděľující mezi zápornými oblastmi kanálů) (Lai, 2023).

Pohyb vyvinutý rotací c prstence se přenáší na připojenou γ podjednotku centrálního stonku. Vrchol γ podjednotky je ve spojení s katalytickým hexamerem, rotuje uprostřed šestice podjednotek a tím cyklicky mění jejich konformaci. Katalytická místa syntézy ATP jsou tři a vyskytují se na rozhraní α a β podjednotky v jednom ze tří základních stavů: β_E nemá navázaný žádný substrát, β_{AD} váže ADP a β_{TP} váže ATP (Abrahams, 1994). Místa vůči sobě zaujímají úhel 120° a cyklicky se jejich stavy střídají.

Vzhledem k rozdílným počtům podjednotek v rotujícím prstenci (8 c podjednotek) a v katalytickém hexameru (3 α a 3 β podjednotky) musí docházet k dynamickému spřažení této asymetrie. U jiných organismů byla pozorována řešení tohoto problému strukturálními změnami v periferním nebo centrálním stonku, případně v molekulách lipidů v blízkosti enzymu. Úpravou struktury těchto částí se evokují v podjednotkách katalytického hexameru přechodné stavy mezi zmíněnými 3 základními, u různých organismů jsou jejich počty různé (Guo & Rubinstein, 2022; Montgomery, 2021; Murphy, 2019; Sobti, 2020). Na lidské ATP syntáze byl prozatím charakterizovaný jeden přechodný stav a to mezi stavy β_{AD} a β_E , tento přechodný stav má navázané ADP, ale volněji než v základním stavu β_{AD} . Zároveň s tímto pozorováním bylo navrženo možné řešení symetrické neshody v počtu podjednotek pro dosažení spřažení prstence s hexamerem – torzní ohýbání celého komplexu, především však γ podjednotky (Lai,

2023). Další pozorování struktury podjednotek při aktivitě ATP syntázy a charakterizování dalších podstavů je nutné pro lepší pochopení spřažení částí enzymu.

Defekty mitochondriální F_1F_0 ATP syntázy

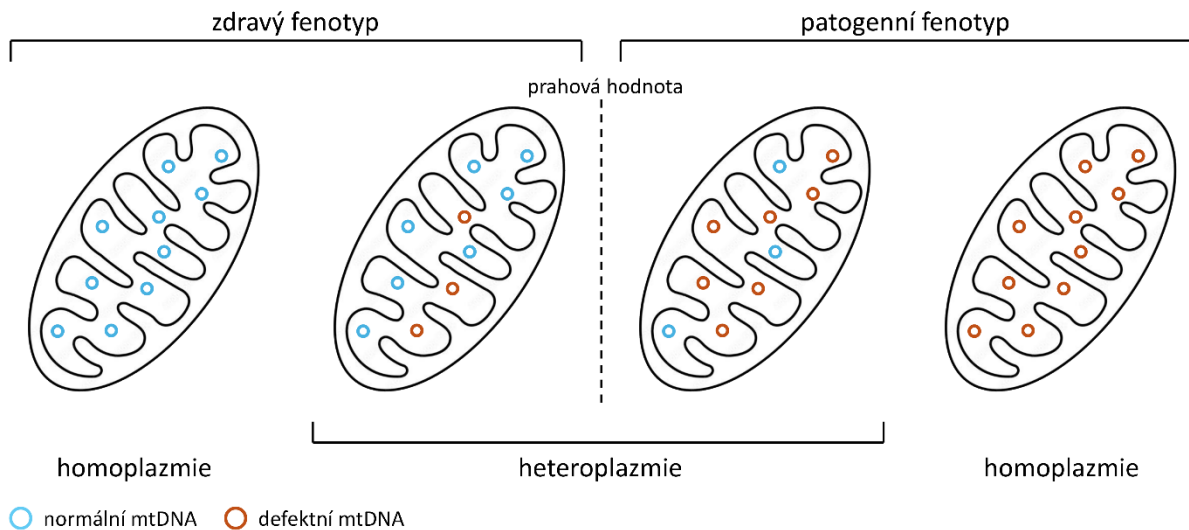
Projevy způsobené poruchou ATP syntázy spadají pod mitochondriální onemocnění. Poškození ATP syntázy většinou ovlivní i celý buněčný metabolismus, problémem tedy nemusí být pouze pozměněné množství vznikajícího ATP. Snížené využití protonového gradientu ATP syntázou může vést k pomalejšímu přesunu elektronů respiračním řetězcem, který pak nemá kapacitu oxidovat metabolity. Také se zvyšuje pravděpodobnost úniku elektronů na kyslík, vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) a nárůstu oxidačního stresu (Mracek, 2006; Murphy, 2009). Je zasažen metabolismus a buňky se snaží nahradit nedostatky, např. nedostatečnou produkci ATP pomocí ATP syntázy kompenzují navýšením glykolytické aktivity (Park, 2019). Nejvíce náchylné tkáně na výskyt defektů jsou takové, kde jsou požadavky na velké množství energie, např. nervová a svalová tkáň. Projevy obvykle začínají ve velmi raném věku v rozsahu od novorozenců po děti školního věku, existují ale i výjimky, kdy se poruchy začaly objevovat až v dospělosti. Někteří jedinci mohou žít bez větších komplikací např. s mimovolnými svalovými stahy nebo lehčím mentálním postižením, je však nemálo případů, kdy jsou pacienti od narození zasaženi těžkými fenotypy ze spektra encefalopatií a kardiomyopatií, které končí úmrtím (Tauchmannova, 2024).

Vzhledem k duálnímu původu genů kódujících podjednotky ATP syntázy je možné mutace v těchto genech rozdělit na mitochondriální a jaderné. Nejdéle jsou známy poruchy plynoucí z mtDNA, protože sekvenace mitochondriálního genomu byla podstatně jednodušší než jaderného genomu (nDNA). Mutace v jaderném genomu vedoucí k mitochondriálním onemocněním byly více studovány až s nástupem sekvenování nové generace (Stenton & Prokisch, 2020). I když je mtDNA oproti nDNA náchylnější k poškození zejména vlivem ROS produkovaných respiračním řetězcem (Richter, 1988) a nemá propracovaný opravný systém pro poškozenou DNA, tak pouze ~15 % mitochondriálních onemocnění mezi pediatrickými pacienty je způsobeno mutacemi v mtDNA (Galber, 2021). Všechny nahlášené mutace způsobující mitochondriální onemocnění shromažďuje databáze MITOMAP (*MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database.*, 2024), ne všechny objevené mutace jsou však potvrzené coby patogenní.

Defekty ATP syntázy způsobené mutacemi v mtDNA

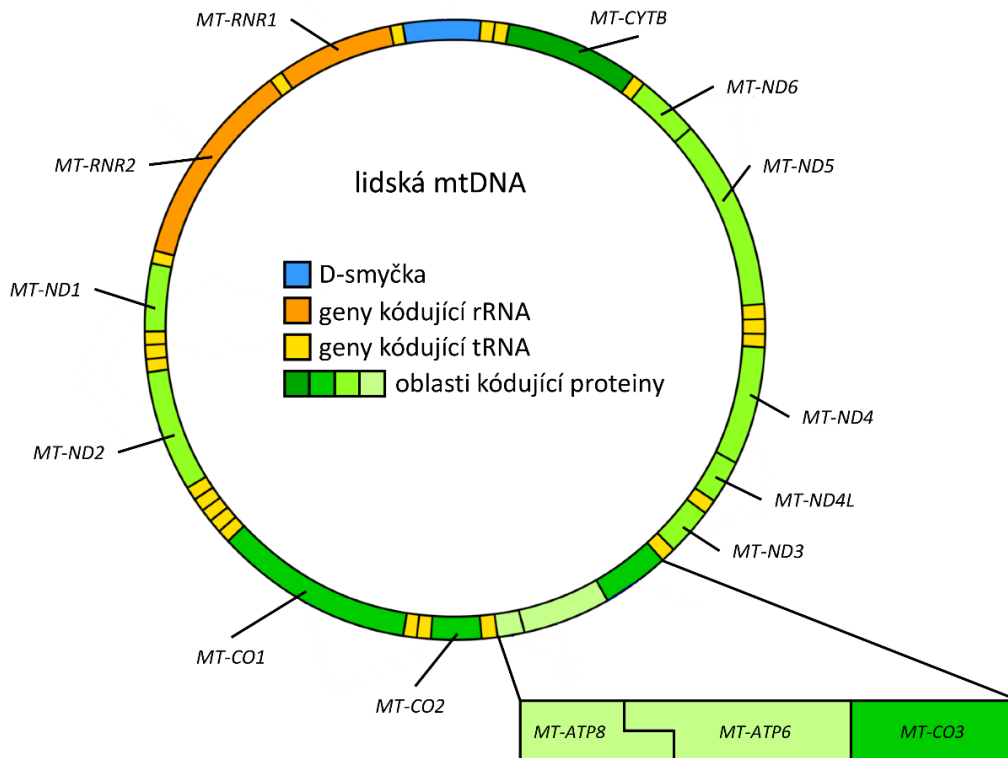
Mitochondriální genom je děděn výhradně od matky v rámci mitochondrií obsažených ve vajíčku. S tím souvisí míra postižení, protože každé vajíčko může obsahovat jiný poměr „zdravých“ a mutovaných kopií mtDNA, také nazývaný heteroplazmie. Vznikající plod tak může být v pořádku, nebo se u něj projeví symptomy o síle odvíjející se od hodnoty heteroplazmie (Obrázek 3). Ukazuje se, že míra heteroplazmie a intenzita symptomů na sobě nejsou závislé lineárně, ale až při přesáhnutí určité prahové

hodnoty heteroplazmie se začne projevovat patologický fenotyp (Rossignol, 2003). Situace, kdy jsou všechny kopie mtDNA shodné, ať už jsou zdravé, nebo zasažené stejnou variantou mutace, se nazývá homoplazmie. Zpravidla bývají patogenní homoplazmické případy závažnější než heteroplazmické případy. Zároveň je důležité, že se míra heteroplazmie může lišit mezi jednotlivými tkáněmi, což má vliv na fenotyp.



Obrázek 3 – Schéma heteroplazmie mtDNA. Heteroplazmie je definovaná jako procento mutované mtDNA, pokud mitochondrie obsahuje 100 % zdravé nebo mutované mtDNA, jedná se o tzv. homoplazmii. Prahová hodnota určuje množství mutované DNA, kdy dochází k manifestaci patologického fenotypu.

Mitochondriálně kódované podjednotky ATP syntázy jsou dvě, podjednotka a kódovaná genem *MT-ATP6* a podjednotka A6L kódovaná genem *MT-ATP8*. Tyto geny se částečně překrývají (Obrázek 4), tedy transkripce genu pro podjednotku a začíná v genu pro A6L, sdílí tak pár desítek párů bází (Fearnley & Walker, 1986). Je možné, že při výskytu mutace je zasažen jeden z proteinů, ale mohou být zasaženy oba naráz.



Obrázek 4 – Schéma lidské mtDNA s vyznačením 2 genů kódující rRNA a 13 genů kódujících podjednotky OXPHOS, zvýrazněný je tricistronní úsek genů *MT-ATP8*, *MT-ATP6*, *MT-CO3*, kde *MT-ATP8* a *MT-ATP6* geny mají překryv.

Patogenní mutace v genech *MT-ATP6* a *MT-ATP8*

Frekvence mutací v genu *MT-ATP8* je velmi nízká, bylo jich popsáno jen 12 a žádná z nich nebyla potvrzena jako patogenní (*MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database.*, 2024). Oproti tomu v genu *MT-ATP6* kódující podjednotku a bylo popsáno mnoho variant s různými projevy, mají však společné, že se často manifestují jako neurodegenerativní onemocnění (Tabulka 2).

Nejčastější mutací v *MT-ATP6* je m.8993T>G, která vede k záměně leucinu 156 za arginin (p.Leu156Arg) a byla popsána ve stovkách pacientů (shrnutí v (Tauchmannova, 2024)). Věk nástupu symptomů je velmi nízký a to během prvních měsíců života (Stendel, 2020), běžným fenotypem jsou Leigh nebo NARP syndromy (Ng, 2019; Stendel, 2020; Uziel, 1997). Typicky se Leigh syndrom (aneb subakutní nekrotizující encefalopatie) manifestuje při heteroplasmii přesahující 90 %. Zpočátku se objevuje zvracení, průjem a problémy s polykáním, což u novorozenců vede k neprosívání, postupně se přidává psychomotorická retardace, degenerují bazální ganglia a rozvíjí se respirační obtíže. Mírnější projevy má NARP syndrom (neuropatie, ataxie, retinitis pigmentosa¹), který obvykle bývá u pacientů se 70 až 90% heteroplazmií.

¹ Retinitis pigmentosa je degenerativní onemocnění sítnice projevující se ztrátou periferního vidění, eventuelně vede až k celkovému zhoršení zraku a v některých případech slepotě.

Tabulka 2 – Shrnutí mutací v mitochondriálním genu *MT-ATP6* zapojeném do defektů ATP syntázy.

Varianta genu (mtDNA) a proteinu	Věk nástupu	Buněčný fenotyp	Reference
<i>MT-ATP6</i>			
m.8611_8612insC p.Leu29ProfsTer36	~1R	↓↓↓ množství podjednotky a, ↓↓↓ stabilita ATP syntázy, ↓↓↓ produkce ATP	(Jackson, 2017)
m.8612T>C p.Leu29Pro	při *-5R	∅	(Ganetzky, 2019; Panwala, 2022)
m.8618-8619insT p.Thr33HfsTer63	1-4R	↓↓ množství ATP syntázy, ↑ množství subkomplexů, ↓↓↓ produkce ATP, ↑ produkce ROS	(Bugiardini, 2020; Lopez-Gallardo, 2009)
m.8782G>A p.Gly86Ter	25R	↑↑ množství subkomplexů, ↓↓ produkce ATP, ↓↓ OCR, ↑ produkce ROS	(Bugiardini, 2020)
m.8839G>C p.Ala105Pro	35R	↓↓ membránový potenciál	(Blanco-Grau, 2013)
m.8851T>C p.Trp109Arg	~1-22R	↓↓ množství ATP syntázy	(De Meirleir, 1995; Honzik, 2013; Wong, 2020)
m.8969G>A p.Ser148Asn	před * -15R	- množství ATP syntázy, ↓↓ produkce ATP, ↑ produkce ROS	(Berhe, 2018; Burrage, 2014; Isohanni, 2018; Wen, 2016)
m.8989G>C p.Ala155Pro	~30R	↓↓ produkce ATP	(Duno, 2013)
m.8993T>C p.Leu156Pro	7M - 40R	↓ produkce ATP, ↑↑ produkce ROS	(Tauchmannova, 2024)
m.8993_8994TG>CA p.Leu156Pro	∅	∅	(Wong, 2020)
m.8993T>G p.Leu156Arg	při * - 40R	↓↓↓ produkce ATP, ↑↑ produkce ROS	(Tauchmannova, 2024)
m.9032T>C p.Leu169Pro	3M - dospělost	↑ množství subkomplexů, ↓ produkce ATP, ↑ produkce ROS	(Knight, 2020; Lopez-Gallardo, 2014)
m.9035T>C p.Leu170Pro	6M - 19R	↓↓ produkce ATP, ↑↑↑ produkce ROS	(Capiou, 2022; Ng, 2019; Pfeffer, 2012; Sikorska, 2009)
m.9127-9128delAT p.Ile201ProfsTer2	10R	↓↓ produkce ATP	(Mordel, 2017)
m.9134A>G p.Glu203Gly	při *	↓↓ produkce ATP	(Honzik, 2012)
m.9155A>G p.Gln210Arg	∅	- množství ATP syntázy, - produkce ATP	(Adema, 2016; Bergs, 2022)
m.9176T>C p.Leu217Pro	1-30R	- množství ATP syntázy, ↓↓ produkce ATP, ↑ produkce ROS	(Tauchmannova, 2024)
m.9176T>G p.Leu217Arg	5M - 3R	↓↓↓ produkce ATP	(Akagi, 2002; Carrozzo, 2001; Larson, 2019)
m.9185T>C p.Leu220Pro	při * - 32R	↓ množství ATP syntázy, ↓ produkce ATP, ↑ produkce ROS	(Tauchmannova, 2024)
m.9191T>C p.Leu222Pro	4M	↓ produkce ATP	(Moslemi, 2005)
m.9205delTA Ter-Met	3D - 3M	↓↓↓ množství ATP syntázy	(Jesina, 2004; Seneca, 1996)

Narození (*), den (D), týden (T), měsíc (M), rok (R), neznámé (∅), normální (-), snížení (mírné ↓, střední ↓↓, velké ↓↓↓), zvýšení (mírné ↑, střední ↑↑, velké ↑↑↑), spotřeba kyslíku (OCR).

Analýza tkání pacientů odhalila relativně normální množství ATP syntázy (Garcia, 2000), která má ale velmi nízkou aktivitu. Kvůli porušené podjednotce a, což vede k neschopnosti ATP syntázy translokovat protony skrz polokanály, značně vzrostl membránový potenciál. Zároveň byla naměřena zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku (Baracca, 2007) zřejmě způsobená zvýšeným membránovým potenciálem (Murphy, 2009).

Existují výjimky, které se vymykají klasické manifestaci m.8993T>G mutace. Např. u pětičlenné rodiny byla zjištěna 90% heteroplazmie této varianty, ale projevy jako mentální retardace, epileptické záchvaty, ataxie či nedoslýchavost (Tsao, 2001) neodpovídají typickým symptomům Leigh syndromu ani NARP syndromu.

Varianty m.8993T>C a m.8993TG>CA (tato jen u jednoho pacienta, (Wong, 2020)) vedou ke stejné aminokyselinové záměně, p.Leu156Pro (Ardissonne, 2023; Aure, 2013; Baracca, 2007; Craig, 2007; de Vries, 1993; Morava, 2006; Ng, 2019; Rantamaki, 2005; Stendel, 2020; Wei, 2018). Projevují se obvykle o něco později než předchozí zmíněná varianta, stále se ale nemoc manifestuje před 10. narozeninami jedince (Stendel, 2020). Fenotyp pacientů je mírnější, zahrnuje symptomy nejen NARP syndromu, ale i např. poruchy učení. U některých pacientů byla popsána mírně snížená syntéza ATP a zvýšená produkce ROS.

NARP syndrom je spojován s několika dalšími mutacemi. Varianta m.8989G>C (záměna p.Ala155Pro) se na buněčné úrovni projevovala sníženou aktivitou ATP syntázy (Duno, 2013). Mutace m.9032T>C způsobující substituci p.Leu169Pro se manifestuje jako NARP syndrom doplněný o různé encefalopatie. V buňkách bylo pozorováno snížení produkce ATP, mírné zvýšení volných subkomplexů a lehce zvýšená produkce ROS (Knight, 2020; Lopez-Gallardo, 2014). Delece dvou nukleotidů, m.9127-9128delAT, způsobuje výskyt předčasného STOP kodonu a tím zkrácený protein. Pacientovi byla zjištěna snížená hydrolytická i syntetická aktivita ATP syntázy (Mordel, 2017). Množství enzymu nebylo zjišťováno u žádných z těchto pacientů.

Jinou častou pozicí, ve které se objevují mutace, je 9176 s variantami m.9176T>G (p.Leu217Arg) a m.9176T>C (p.Leu217Pro). Záměna za arginin (Akagi, 2002; Carrozzo, 2001; Larson, 2019) je o něco závažnější, nemoc se projevuje v prvních letech života zejména jako Leigh syndrom. V tkáních pacienta s 95% heteroplazmií byl pozorován výrazný pokles aktivity ATP syntázy (Carrozzo, 2001), u ostatních pacientů funkce ATP syntázy a její vliv na buněčný fenotyp studovány nebyly. Pouze jedna osoba se dožila dospělosti, zbylí pacienti zemřeli před dosáhnutím adolescence.

Substituce leucinu 217 za prolin je častější než za arginin, liší se ale tím, že je to varianta homoplazmická téměř ve všech případech, navzdory tomu se věk nástupu pohybuje až od školních let do dospělosti a fenotyp je mírnější (Bardakjian & Scherer, 2019; Campos, 1997; Hu, 2020; Ng, 2019; Ogawa, 2017; Ronchi, 2011; Stendel, 2020; Synofzik, 2012; Thyagarajan, 1995; Verny, 2011; Wei, 2018). Mutace postihuje zejména srdeční a kosterní svaly, případně nervový systém a většina osob s touto variantou

přežívá do vysokého věku dle posledních lékařských prohlídek. Množství ATP syntázy je normální, je však poznamenána syntéza ATP a nepatrně se zvyšuje produkce reaktivních forem kyslíku.

Méně častá je např. varianta m.8969G>A vedoucí k záměně p.Ser148Asn (Berhe, 2018; Burrage, 2014; Isohanni, 2018; Wen, 2016). Symptomy zahrnovaly encefalopatie, myopatie a kardiomyopatie, zasaženy byly i ledviny či játra. Byla naměřena normální úroveň ATP syntázy, její snížena produkce ATP a mírný vzrůst produkce ROS. Další mutace m.9155A>G (p.Gln210Arg) vede k mírnému fenotypu mitochondriálně děděného diabetu a hluchoty (Adema, 2016; Bergs, 2022), přičemž množství a také aktivita ATP syntázy byla normální.

Varianta m.9185T>C (p.Leu220Pro) je jednou z dalších nejpočetnějších variant genu pro podjednotku a (Aure, 2013; Brum, 2014; Castagna, 2007; Childs, 2007; Ng, 2019; Ogawa, 2017; Panosyan, 2017; Pfeiffer, 2012; Piekutowska-Abramczuk, 2018; Pitceathly, 2012; Saneto & Singh, 2010; Stendel, 2020; Synofzik, 2012; Takada, 2020; Wei, 2018; Yu, 2018). Oproti předchozím uvedeným variantám je zde odlišnost v množství ATP syntázy, které bývá u pacientů naměřeno snižené, nejspíš protože defekt v podjednotce a narušuje stabilitu komplexu. Analýza ukazuje také sníženou produkci ATP syntázy, naopak aktivita elektron transportního řetězce se zvyšuje spolu s produkcí ROS. Pacienti jsou téměř vždy homoplazmičtí a symptomy se začínají objevovat ve školním věku nebo později. Soubor projevů je velmi variabilní a obsáhlý, mezi nejčastější patří Leigh nebo NARP syndrom, dále hrozí zvýšené riziko selhání ledvin a dýchacího systému. Je také možný výskyt Wolf-Parkinson-White syndromu, při němž dochází k předčasné excitaci srdečních komor vinou doplňkové dráhy.

Následující mutace jsou podstatně vzácnější, také vedou k nestabilnímu komplexu ATP syntázy. Missense mutace² m.8782G>A (p.Gly86Ter) nalezená u dvojice pacientů vyvolává fenotyp encefalomyopatií (Bugiardini, 2020). Obě osoby vykazují heteroplazmii v rozmezí 11 až 71 % v závislosti na testované tkáni. Testováním patientského materiálu byl zpozorován vyšší výskyt subkomplexů ATP syntázy, celkové množství enzymu nebylo výrazně snižené a další analýza odhalila přítomnost mutované podjednotky a v komplexu. Porucha asemblace koreluje se zvyšující se heteroplazmií, která je z testovaných tkání nejvyšší ve svalech, kde se projevuje patologický fenotyp. Syntetická aktivita enzymu je snižená, ať už z důvodu nesložených komplexů, tak z důvodu neprostupování protonů podjednotkou a. Spotřeba kyslíku buňkou se snížila, slabě narostla produkce ROS. Další ukázkou missense mutace je varianta m.8851T>C vedoucí k záměně p.Trp109Arg (De Meirleir, 1995; Honzik, 2013; Wong, 2020) a projevující se také fenotypem encefalomyopatií. Kromě sníženého množství ATP syntázy nebylo u pacientů nic dalšího měřeno.

Zajímavý vliv má inserce cytosinu v pozici 8611 (m.8611-8612insC), kdy se změní prolin 29 na leucin a dojde k posunu čtecího rámce, což způsobí vznik předčasného STOP kodonu a vzniká zkrácená verze

² Missense mutace je substituční bodová mutace, kdy změna kodonu vede ke změně aminokyseliny.

podjednotky a (Jackson, 2017). Pacientka trpí encefalopatiemi a neobvykle také žlučovými kameny a problémy s udržení tělesné teploty. V tkáních byl zjištěn akutní pokles podjednotky a, v návaznosti snížená stabilita ATP syntázy a produkce ATP byla nízká.

Neobvyklý je i případ homoplazmické delece dvou nukleotidů (m.9205delTA), která způsobuje poškození správného STOP kodonu genu pro podjednotku a také ovlivňuje místo sestřihu transkriptu mezi *MT-ATP6* a sousedícím *MT-CO3*, který kóduje podjednotku pro cytochrom c oxidázu (Jesina, 2004; Seneca, 1996). Chybné transkripty ovlivňují jak ATP syntázu, tak cytochrom c oxidázu, oba enzymy mají pozměněnou nebo poškozenou asemblaci, což vede ke sníženému množství komplexů, objevuje se více subkomplexů ATP syntázy. Aktivita obou enzymů je kvůli tomu snížena.

Další popsané mutace v *MT-ATP6* jsou sporadické, většinou nalezené pouze u jednoho pacienta. Patří mezi ně varianty m.8839G>C (p.Ala105Pro) (Blanco-Grau, 2013), m.9035T>C (p.Leu170Pro) (Capiau, 2022; Ng, 2019; Pfeiffer, 2012; Sikorska, 2009), m.9134A>G (p.Glu203Gly) (Honzik, 2012), m.9191T>C (p.Leu222Pro) (Moslemi, 2005) a m.8611_8612insC (p.Leu29Pro s předběžným STOP kodonem po 36 aminokyselinách) (Bugiardini, 2020; Lopez-Gallardo, 2009). Manifestují se většinou jako Leigh syndrom nebo NARP syndrom, ojediněle jsou doplněny o další encefalopatie, diabetes, poruchy učení či poškození ledvin. Byla naměřena snížená produkce ATP syntázy, u některých pacientů byl zjištěn nárůst v produkci ROS nebo menší membránový potenciál.

Patogenní mutace v překryvu genů *MT-ATP6* a *MT-ATP8*

Mutace v oblasti překryvu genů pro podjednotky a a A6L mohou ovlivnit obě z podjednotek (Obrázek 4), což vede k narušení struktury komplexu, u pacientů jsou běžně pozorovány snížené hladiny ATP syntázy a zvýšená akumulace subkomplexů enzymu v důsledku oslabené stability komplexu. V podjednotce A6L jsou popsané varianty lokalizovány v části nacházející se v matrix, kde dochází k interakci s dalšími podjednotkami periferního stonku. Narušením těchto interakcí je zasaženo do asemblace komplexu a tím k hromadění subkomplexů (Tabulka 3).

Nejběžnější variantou je m.8528T>C. Jedná se o missense mutaci způsobující záměnu p.Trp55Arg u podjednotky A6L a p.Met1Thr u podjednotky a (Ware, 2009). U obou podjednotek se drasticky snižuje exprese, což vede ke značnému snížení množství komplexu ATP syntázy a hromadění nespecifických subkomplexů, syntéza ATP je značně omezena (Imai, 2016). U pacientům byla zjištěna laktátová acidóza a 3-methylglutakonová acidurie (3-MGA) a dále se u nich vyskytují různé varianty kardiomyopatií. Fenotyp této varianty se prokázal fatální u pacientů s poměrně vysokou heteroplazmií, pohybující se nad 80 % ve fibroblastech, krvi, srdci, svalecth a slinách. Asymptomatické matky se stejnou variantou neměly hodnoty heteroplazmie přesahující 25 %. Nedávno byl popsán homoplazmický pacient s touto variantou, který zemřel ve věku 3 měsíců na srdeční selhání (Zigman, 2021).

Méně častou mutací je např. m.8529G>A, která nemá vliv na podjednotku a, ale v podjednotce A6L se projevuje jako p.Trp55Arg stejně jako u minulé varianty (Jonckheere, 2008). Podjednotka A6L není

zásadní pro funkci ATP syntázy jako podjednotka a, přesto je tato varianta patogenní. Fenotyp je i přes vysokou heteroplazmii (>90 %) relativně mírný, manifestuje se mentální retardací, kardiomyopatií a ochrnutými okohybnými svaly. V patientských tkáních byl potvrzen mírný pokles ATP syntázy a velký nárůst subkomplexů.

Další 2 varianty v této oblasti jsou na stejné pozici, m.8561C>G mění u podjednotky a p.Pro12Arg a u podjednotky A6L p.Pro66Ala (Kytovuori, 2016) a m.8561C>T způsobuje změnu podjednotky a p.Pro12Leu a podjednotky A6L p.Pro66Ser (Fragaki, 2019). Fenotypy jsou podobné, jedná se hlavně o encefalopatie a u m.8561C>G se přidává hypergonadotropní hypogonadismus, čímž byl narušen pohlavní vývoj pacientů. Analýzou tkání bylo kromě úbytku ATP syntázy a akumulace subkomplexů pozorováno, že produkce ATP je snížena. Popsané případy byly homoplazmické nebo vysoce heteroplazmické, i tak jsou fenotypy poměrně mírné, pacienti s m.8561C>G variantou se dožili důchodového věku.

Tabulka 3 – Shrnutí mutací v překryvu genů *MT-ATP6* a *MT-ATP8* zapojených do defektů ATP syntázy.

Varianta genu (mtDNA) a proteinu	Věk nástupu	Buněčný fenotyp	Reference
<i>MT-ATP6/MT-ATP8</i>			
m.8528T>C p.Met1Thr/p.Trp55Arg	6T	↓↓↓ syntéza podjednotek a a A6L, ↓↓↓ množství ATP syntázy, ↓↓↓ produkce ATP	(Imai, 2016; Ware, 2009; Zigman, 2021)
m.8529G>A Ø/p.Trp55Ter	~4R	↓ množství ATP syntázy, ↑↑ množství subkomplexů	(Jonckheere, 2008)
m.8561C>T p.Pro12Leu/p.Pro66Ser	4M	↓ množství ATP syntázy, ↑↑ množství subkomplexů, ↓ produkce ATP	(Fragaki, 2019)
m.8561C>G p.Pro12Arg/p.Pro66Ala	5-23R	↑ množství subkomplexů	(Kytovuori, 2016)

Narození (*), den (D), týden (T), měsíc (M), rok (R), neznámé (Ø), normální (-), snížení (mírné ↓, střední ↓↓, velké ↓↓↓), zvýšení (mírné ↑, střední ↑↑, velké ↑↑↑), spotřeba kyslíku (OCR).

Defekty ATP syntázy způsobené mutací v nDNA

Mutace v mtDNA genech kódujících podjednotky ATP syntázy představují menší část z popsaných mutací způsobujících mitochondriální onemocnění. Většina defektů ATP syntázy je zapříčiněná mutacemi v jaderném genomu, který kóduje nejen strukturní podjednotky ATP syntázy, ale i asemblační faktory asistující složení komplexu.

Každý rok je navyšován počet mutací v jaderných genech asociovaných s poruchami ATP syntázy. Většina mutací v genech zapojených do struktury a funkce ATP syntázy je autozomálně recesivní (Stenton & Prokisch, 2020). V posledních letech s rozvojem sekvenování nové generace byly ale popsány případy mutací s autozomálně dominantní dědičností (Ganetzky, 2022; Lines, 2021; Nasca, 2023; Neilson, 2022; Zech, 2022).

Autozomálně recesivní mutace nDNA

Pod autozomálně recesivní mutace se řadí takové mutace, kdy je přítomná jedna varianta mutace na obou alelách genu, je tzv. homozygotní, nebo kdy jsou různé varianty mutací na obou alelách, jedná se o tzv. složenou heterozygotní mutaci. Najdeme je v genech pro strukturní podjednotky mitochondriální ATP syntázy α , δ , ϵ , DAPIT a OSCP (Tabulka 4) a v genech pro její asemblační faktory (Tabulka 5).

Patogenní mutace v genech katalytického hexameru

Prozatím byly autozomálně recesivní mutace popsány jen na podjednotce α , nikoli na β podjednotce. Mutace c.962A>G (p.Tyr321Cys) v genu *ATP5F1A* způsobila u novorozence mikrocefalii, plicní hypertenzi a srdeční selhání, po třech měsících zemřel (Lieber, 2013). Ve svalu pacienta byl zjištěn kombinovaný defekt komplexů OXPHOS (aktivity některých komplexů byly sníženy), pravděpodobně v důsledku sníženého množství mtDNA. Podrobněji byla mutace namodelována v kvasinkách, kde bylo zjištěno snížené množství mtDNA, což odpovídá snížené aktivitě komplexů ve svalu, a snížen byl i membránový potenciál na vnitřní membráně. Varianta p.Tyr321Cys podjednotky α tedy zřejmě sekundárně ovlivňuje stabilitu mtDNA a tím i expresi mitochondriálních genů. Stejnou mutaci zdělila i sestra zkoumaného pacienta od jejich heterozygotní matky (stav otce neznámý) a zemřela po 15 měsících života s mikrocefalií.

S fatálními následky je spojená i složená heterozygotní varianta c.985C>T + c.-49 + 418C>T (p.Arg329Cys) u dvou potomků zdravých rodičů (Jonckheere, 2013). Oba novorozenci umřeli několik týdnů po narození kvůli těžké encefalopatii způsobující záchvaty a kvůli nedovyvinutým plicím. V krvi ani moči nebyly navýšeny obvyklé metabolity ukazující na mitochondriální onemocnění. Při pohledu na buněčný fenotyp bylo zjištěno velmi malé množství složené ATP syntázy, podjednotka α chybí téměř kompletně u obou jedinců. Hydrolytická aktivita enzymu byla taktéž snížena, hodnoty nedosahovaly ani poloviny hodnoty dolní hranice kontrolního rozmezí. Pro obě děti byla genetická vada fatální, jejich zdravý otec nesl stejnou heterozygotní missense mutaci c.985C>T (p.Arg329Cys). Při analýze informace matky bylo zjištěno, že intron 1 genu *ATP5F1A* obsahuje mutaci c.-49 + 418C>T, která vede

ke snížení exprese genu zhruba o polovinu. V jejím případě to vedlo ke zdravému fenotypu, protože produkt genu byl nepoškozený, pouze ho bylo méně. V kombinaci s alelou od otce to však u jejich dětí způsobilo, že *ATP5F1A* gen byl exprimován méně a pouze jako vadná varianta s p.Arg329Cys záměnou, což vedlo k patologickému fenotypu.

Patogenní mutace v genech centrálního stonku

V genu *ATP5F1D* pro podjednotku δ byly nalezeny dvě varianty, c.245C>T (p.Pro82Leu) a C.317T>G (p.Val106Gly) (Olahova, 2018). Oba pacienti (každý nesoucí jinou variantu genu) trpí 3-MGA, hyperamonemií a laktátovou acidózou. Novorozenec s p.Pro82Leu substitucí manifestoval projevy hned 2. den po narození, navíc během prvních let života trpěl kardiomyopatií. Druhý pacient mající p.Val106Gly záměnu začal jevit symptomy až po 4. roce života, kdy se rozvinula akutní encefalopatie spuštěná nachlazením s horečkami. O rok později u něj přetrvávala 3-MGA a rychlé vyčerpání při fyzické aktivitě, periodicky nastávala letargie a zvracení. Při modelování defektních variant podjednotky δ lze vidět, že se značně mění předpovídaná struktura proteinu. V buňce dochází ke špatné vazbě na γ podjednotku a tím k nízké stabilitě centrálního stonku, bez kterého se nesloží zbytek komplexu, jak je vidět na sníženém množství podjednotek ATP syntázy. Výjimkou je právě δ podjednotka, která se nevyužitá hromadí a není odbourávána. Analýza hydrolytické aktivity komplexu na modré nativní elektroforóze ukázala, že defektní ATP syntáza má výrazně sníženou aktivitu na 5 % (p.Pro82Leu) nebo 16 % (p.Val106Gly) oproti kontrolám.

Patogenní záměna c.35A>G (p.Tyr12Cys) byla popsána v genu *ATP5F1E* pro podjednotku ϵ , která stejně jako podjednotka δ podporuje stabilitu centrálního stonku. První objevený pacient trpěl od narození opakovanými metabolickými krizemi a projevy nervosvalového onemocnění (Mayr, 2010; Sperl, 2006). Později byli objeveni další dva jedinci s touto mutací (Zech, 2022), kteří mají podobné symptomy, zejména laktátovou acidózu a formy myopatie. Na buněčné úrovni (Mayr, 2010) byl pozorován závažný pokles množství ATP syntázy, ale ukazuje se, že toto malé množství holoenzymu obsahuje normální kompozici podjednotek. Akumuluje se značné množství agregovaných podjednotek c ve vnitřní membráně, které nejsou součástí F_1 -c subkomplexu, tudíž chybná podjednotka ϵ brání správnému propojení prstence s centrálním stonkem. Redukované množství ATP syntázy negativně ovlivňuje produkci ATP. Pro všechny tři pacienty platí, že se jejich stav ustálil, nebo dokonce zlepšil během života.

Patogenní mutace v genech periferního stonku

Závažná varianta je na genu *ATP5MK* kódující protein DAPIT. Dochází zde k mutaci místa sestříhu, c.87+1G>C, kdy je výsledně přeskočen třetí exon genu, což vede k absenci funkčního proteinu (Barca, 2018). Čtyři pacienti s touto variantou byli diagnostikováni během kojeneckého věku s Leigh syndromem, všichni trpěli opožděným vývojem a ataxií. Absence podjednotky DAPIT vedla k omezení dimerizace ATP syntázy, monomery holoenzymu se vyskytovaly v normálním množství. Naměřená produkce ATP je snížená, je však otázka, zda se tak děje právě kvůli neschopnosti tvořit dimery a jejich

vlivu na podobu vnitřní mitochondriální membrány nebo kvůli vadnému spřažení využití protonového gradientu a ATP syntézy. 2 pacienti zemřeli ve věku 6 a 9 let, zbylí 2 byli naživu v době vydání článku.

Další ukázkou složené heterozygotní varianty je c.34C>T + c.329-20A>G v genu *ATP5PO* pro podjednotku OSCP (Zech, 2022). Mutace c.34C>T zděděná od matky je typu nonsense³, jejím výsledkem je 12 aminokyselin dlouhý polypeptid (p.Gln12*) oproti správným 213 aminokyselinám. Od otce byla zděděna mutace místa sestříhu, c.329-20A>G, vedoucí k vynechání exonu 5 a exonů 4+5. Novorozeneček trpěl horečkami, epileptickými záchvaty, hypotonií a zvýšenou koncentrací laktátu v mozkomíšním moku. Zdravotní kontrola v 2. roce života odhalila dystonii, opožděný vývoj a rozvinutou mikrocefalii. Nebyla snížena pouze exprese podjednotky OSCP, ale ovlivněny byly i podjednotky e, d, F6 a A6L. Množství holoenzymu ATP syntázy bylo značně sníženo, na druhou stranu narostlo množství nespecifických subkomplexů. Aktivita enzymu nebyla měřena. Pacient zemřel v 6 letech po sérii epileptických záchvatů trvajících hodiny.

Jiná varianta genu pro OSCP byla popsána u tří pacientů. Mutace c.87+3A>G se nachází v místě sestříhu, což vedlo k přeskočení exonu 2 genu *ATP5PO* a expresi kratší a nefunkční podoby proteinu (Ganapathi, 2022). Všichni pacienti trpěli Leigh syndromem doprovázeným kardiomyopatiemi nebo progresivními epileptickými encefalopatiemi. Analýza fibroblastů pacientů ukázala výrazně redukované množství ATP syntázy. Absence OSCP podjednotky vedla k degradaci dalších podjednotek periferního stonku a ostatní podjednotky ATP syntázy byly naopak akumulované. Důsledkem bylo hromadění subkomplexů a snížená produkce ATP. Dva pacienti se dožili pouze 6 měsíců, třetí byl v době publikace tříletý.

³ Nonsense mutace je substituční bodová mutace vedoucí ke změně kodonu na terminační, translace je ukončena předčasně a vzniká kratší protein.

Tabulka 4 – shrnutí autozomálně recesivních mutací v jaderných genech strukturních podjednotek zapojených do defektů ATP syntázy.

Varianta genu (cDNA) a proteinu	Věk nástupu	Buněčný fenotyp	Reference
ATP5F1A			
c.962A>G p.Tyr321Cys	pří *	↓↓ aktivita elektron transportní řetězec, úbytek mtDNA	(Lieber, 2013)
c.985C>T + c.-49 + 418C>T p.Arg329Cys + §	pří *	↓↓↓ množství ATP syntázy, ↓↓ produkce ATP, ↓ OCR	(Jonckheere, 2013)
ATP5F1D			
c.245C>T p.Pro82Leu	2D	↓ množství ATP syntázy, ↓↓↓ produkce ATP	(Olahova, 2018)
c.317T>G p.Val106Gly	4R	↓↓ množství ATP syntázy, ↓↓ produkce ATP	(Olahova, 2018)
ATP5F1E			
c.35A>G p.Tyr12Cys	pří *	↓↓↓ množství ATP syntázy, ↓↓↓ produkce ATP, ↓ OCR	(Mayr, 2010; Zech, 2022)
ATP5MK			
c.87+1G>C exon 3 přeskočen	2-18M	– množství monomeru ATP syntázy, ↓↓↓ množství dimeru, ↓↓ produkce ATP	(Barca, 2018)
ATP5PO			
c.34C>T + c.329-20A>G p.Gln12Ter + §§	1-28D	↓↓ množství ATP syntázy, ↑↑ množství subkomplexů	(Zech, 2022)
c.87+3A>G exon 2 přeskočen	1-28D	↓↓ množství ATP syntázy, ↑↑ množství subkomplexů, ↓↓↓ produkce ATP	(Ganapathi, 2022)

Narození (*), den (D), týden (T), měsíc (M), rok (R), neznámé (Ø), normální (-), snížení (mírné ↓, střední ↓↓, velké ↓↓↓), zvýšení (mírné ↑, střední ↑↑, velké ↑↑↑), spotřeba kyslíku (OCR). § – substituce v intronu 1 negativně ovlivňující expresi *ATP5F1A* genu, §§ – abnormální sestřih genu vedoucí k vynechání exonu 5 a 4+5 vedoucí ke snížení množství transkriptu *ATP5PO*.

Patogenní mutace v genech pro asemblační faktory

Kromě defektů ve strukturních podjednotkách ATP syntázy mohou enzym přímo ovlivnit i mutace vyskytující se v asemblačních faktorech tohoto enzymu (Tabulka 5). Nesprávné sestrojení komplexu vede k poklesu v produkci ATP. Všechny popsané mutace se týkají pouze proteinů ATPAF2 a TMEM70, v jiných asistujících faktorech (ATPAF1, FMC1, TMEM242) zatím žádné mutace u lidí objeveny nebyly (*MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database.*, 2024).

V genu *ATPAF2* byla charakterizována jediná odlišná varianta a to c.280T>A (De Meirleir, 2004). Následkem této mutace je nahrazen tryptofan bez náboje za zásaditý arginin (p.Trp94Arg), což pravděpodobně vede ke špatné interakci s podjednotkou α a tím pádem k poruše složení katalytického hexameru. Novorozeně postižené touto mutací mělo dysmorfní tělní znaky (velká ústa, výrazný kořen nosu, zmenšená dolní čelist, permanentně ohnuté prsty a končetiny bez možnosti narovnat v kloubu), zvýšenou hladinu laktátu v krvi i mozkomíšním moku, 3-MGA a rozvinula se encefalopatie. Množství nativní ATP syntázy i její aktivita byly v tkáních pacienta značně sniženy, stejně jako množství podjednotek α , β , δ , d a OSCP. Po 14 měsících pacient umřel.

Asemblační faktor *TMEM70* má mnoho patogenních variant způsobených delecemi, substitucemi, inzercemi nebo složenými heterozygotními mutacemi, které mohou vést k posunu čtecího rámce, případně změnám v sestřihu transkriptu. Nejběžnější variantou je c.317-2A>G, která způsobí změnu v místě sestřihu intronu 2 a tím vznik nefunkčního *TMEM70*, jak bylo popsáno u desítek osob (shrnutí v (Tauchmannova, 2024)). Typicky se projevuje už v těhotenství růstovou restrikcí plodu, případně je také snížené množství plodové vody, příznaky ale mohou být odhaleny až po porodu. Brzo se objevují projevy metabolických problémů, jako laktátová acidóza, 3-MGA a hyperamonémie. Eventuelně se mohou rozvinout dodatečné příznaky jako dysmorfické znaky obličeje a šilhání, zvětšení jater, kýla, kardiomyopatie, neurosvalové poruchy a mozkové defekty (atrofie, mikrocefalie, epilepsie, retardace). Množství ATP syntázy bylo ve fibroblastech pacientů výrazně sníženo, enzym byl však správně složený. Nižší množství enzymu vedlo k redukcí jeho hydrolytické a syntetické aktivity a ke snížené aktivitě buněčné respirace po přidání substrátu ADP (Cizkova, 2008). Fenotyp způsobený touto variantou je závažný a více než polovina jedinců zemřela v nízkém věku, ve většině případech na srdeční selhání nebo akutní metabolickou krizi, kdy se v krvi nahromadí toxické metabolity doprovázené hypoglykemií. Několik pozorovaných pacientů se dožilo adolescence, což nabízí myšlenku, že pokud pacient překoná kritickou dobu během 1. roku života, značně se prodlouží jeho střední délka života (Honzik, 2010).

Jiné varianty genu *TMEM70* byly nalezeny vždy jen u pár pacientů s projevy obdobnými těm u nejběžnější varianty, případy jsou různě závažné. Fenotypy jsou způsobeny mutacemi různých druhů, nejčastější jsou mutace v místě sestřihu (Tabulka 5). Jedná se většinou o bialelické mutace, kdy defekt jedné z alel vede k chybnému sestřihu a přeskočení exonu 2 genu *TMEM70*, na druhé alele dojde k mutaci vedoucí k aminokyselinové záměně v proteinu, k jeho zkrácení nebo prodloužení.

Na *TMEM70* knock-out myším modelu bylo ukázáno, že množství ATP syntázy je sníženo a část enzymu je nekompletní. F₁ doména a periferní stonek jsou sestaveny, ale chybí složený c prstenec (Kovalcikova, 2019). Bez asemblačního faktoru se c podjednotky hůře zabudovávají do membrány a nejsou ani volně akumulovány. V souladu s publikovanými výsledky, analýza vzorků některých pacientů s mutacemi v *TMEM70* genu ukázala velký pokles množství ATP syntázy a/nebo snížení produkce ATP (Tabulka 5).

Tabulka 5 – shrnutí mutací v jaderných genech asemblačních faktorů zapojených do defektů ATP syntázy.

Varianta genu (cDNA/gDNA) a proteinu	Věk nástupu	Buněčný fenotyp	Reference
ATPAF2			
c.280T>A p.Trp94Arg	pří *	↓↓↓ množství ATP syntázy, ↓↓ produkce ATP	(De Meirleir, 2004)
TMEM70			
c.105dupT p.Val36CysfsTer52	pří *	∅	(Staretz-Chacham, 2019)
c.141delG/c.316+1G>A p.Pro48ArgfsTer2/ exon 2 přeskočen	pří *	↓↓↓ množství ATP syntázy	(Hirono, 2019)
c.211-450_317-568del delece 2290 bp v exonu 2	1D	↓↓↓ množství ATP syntázy	(Tort, 2011)
c.238C>T p.Arg80Ter	pří *	↓↓ produkce ATP	(Diodato, 2015; Magner, 2015; Spiegel, 2011)
g.2436-3789 delece exon 2 přeskočen	4D	↓↓↓ množství ATP syntázy	(Jonckheere, 2011)
c.316+1G>T exon 2 přeskočen	před *	∅	(Magner, 2015; Spiegel, 2011)
c.317-2A>G exon 2 přeskočen	pří * - 1R	↓↓↓ množství ATP syntázy, ↓↓↓ produkce ATP	(Tauchmannova, 2024)
c.317-2A>G /c.118_119insGT exon 2 přeskočen / p.Ser40CysfsTer11	před *	↓↓↓ množství ATP syntázy, ↓↓↓ produkce ATP	(Cameron, 2011; Cizkova, 2008; Honzik, 2010; Magner, 2015)
c.317-2A>G/c.251delC exon 2 přeskočen / ∅	2R	∅	(Magner, 2015)
c.317-2A>G /c.349_352del exon 2 přeskočen / p.Ile117AlafsTer36	2R	↓↓↓ množství ATP syntázy, ↓↓ produkce ATP	(Diodato, 2015)
c.317-2A>G/c.470T>A exon 2 přeskočen / ∅	∅	∅	(Magner, 2015)
c.317-2A>G/c.494G>A exon 2 přeskočen / p.Gly165Asp	pří *	↓↓↓ množství ATP syntázy	(Scaglia, 2002; Shchelochkov, 2010)
c.317-2A>G/c.628A>C exon 2 přeskočen / p.Tyr210Pro	pří *	↓↓↓ množství ATP syntázy, ↓↓ produkce ATP	(Torraco, 2012)
c.317-2A>G/c.783A>G exon 2 přeskočen / p.Ter261Trpext17	8M	↓↓↓ množství ATP syntázy, ↓ produkce ATP	(Diodato, 2015)
c.336T>A p.Tyr112Ter	před *	↓↓↓ produkce ATP	(Spiegel, 2011)
c.359delC ∅	∅	∅	(Magner, 2015)
c.535C>T p.Tyr179His	pří *	∅	(Atay, 2013; Magner, 2015)
c.563T>C p.Leu188Pro	pří *	∅	(Mackay, 2023)
c.578_579delCA p.Asn198Ter	před *	↓↓↓ produkce ATP	(Magner, 2015; Spiegel, 2011)

Narození (*), den (D), týden (T), měsíc (M), rok (R), neznámé (∅), normální (-), snížení (mírné ↓, střední ↓↓, velké ↓↓↓), zvýšení (mírné ↑, střední ↑↑, velké ↑↑↑), base pair (bp, aneb párování bázi).

Autozomálně dominantní mutace nDNA

Jako autozomálně dominantní označíme takové mutace, kde je zmutovaná jen jedna ze dvou alel genu a vede k patologickému fenotypu. Nedávno byly popsány mutace tohoto typu dědičnosti na podjednotkách α , β a γ (Tabulka 6). Přestože se jedná o dominantní dědičnost, v závislosti na míře penetrance dané mutace se patologie nemusí vždy projevit, příbuzní postiženého jedince mohou tedy být pouze přenašeči mutace.

Patogenní mutace v genech katalytického hexameru

U některých jedinců bylo s věkem pozorováno zmírnění fenotypu způsobeného patogenní mutací. Takové případy lze pozorovat např. u pacientů s mutací c.620G>A (p.Arg207His) v genu pro α podjednotku (Lines, 2021; Zech, 2022). Čtyři jedinci byli během prvních týdnů života diagnostikováni s neprospíváním a opožděným psychomotorickým vývojem, odporem ke krmení a dále s hyperamonemií a laktátovou acidózou. Provedené testy na fibroblastech pacientů ukázaly, že množství ATP syntázy není změněné, snižena je selektivně pouze podjednotka α . To vysvětluje sníženou hydrolytickou aktivitu enzymu, nezpůsobilo to ale nijak výrazný pokles buněčné spotřeby kyslíku (Lines, 2021). U všech těchto pacientů projevy téměř vymizely s dovršením 2. roku života, přetrvala jen nízká hladina laktátu.

Další mírný fenotyp, i když přetrvávající během života, byl pozorován u missense variant c.1000A>C (p.Thr334Pro) a c.1445T>C (p.Val482Ala) genu *ATPF1B*, který kóduje podjednotku β (Nasca, 2023). Každá z variant připadá na jednu ze dvou rodin. Obě varianty se projeví jako dystonie, mimovolné svalové stahy, a to zejména končetin. Věk nástupu se liší od raného dětství po adolescenci, postupem času se dystonie rozšiřuje na další končetiny, případně hrudník. Na první pohled jsou od sebe tyto dvě mutace v genu poměrně vzdáleny, stejně jako aminokyseliny ve výsledném proteinu. Threonin 334 se nachází na vnitřní straně proteinu v blízkosti aktivního místa, zatímco valin 482 je na vnější straně podjednotky. Analýzou patientských fibroblastů se ukázalo, že pro obě varianty platí nezměněné množství ATP syntázy oproti kontrole. Vzhledem k poloze záměny se dalo očekávat, že produkce ATP bude výrazně snížena u varianty p.Thr334Pro. Na druhou stranu, p.Val482Ala varianta se neprojevila snížením aktivity enzymu, ale zdá se, že má vliv na využití membránového potenciálu, který je snížen. Většina tkání v těle s těmito změnami nemá problém, projevují se ale v tkáních citlivější na dostupnost energie, v tomto případě v kosterním svalu. U obou rodin lze pozorovat jedince, kteří jsou nositeli mutace bez klinického fenotypu, což značí neúplnou penetranci defektu.

Závažnější příznaky vykazuje varianta c.1004T>C (p.Leu335Pro) pro podjednotku β nalezená u novorozenech jednovaječných dvojčat (Ganetzky, 2022). Byla narozena růstově opožděná, během 2 měsíců se vyvinulo neprospívání navzdory nadměrnému krmení a později byl stav doplněn o nepolevující tachypnoe, opakující se hypertermii a celkové opoždění vývoje. Při pohledu na fibroblasty dvojčat bylo zjištěno, že buňky spotřebovávají oproti kontrole znatelně více kyslíku, také je v porovnání

s kontrolou snížený membránový potenciál v mitochondrii. Stejný trend byl vidět při expresi varianty v HeLa a A375 buněčných liniích. Zřejmě se záměna p.Leu335Pro v katalytickém hexameru ATP syntázy projevuje špatnou interakcí β podjednotky s γ podjednotkou centrálního stonku, rotace stonku nemění konformaci hexameru, takže se nesyntetizuje normální množství ATP a protony prochází komplexem „na prázdno“. Energie získaná oxidací substrátů je uvolňovaná ve formě tepla vedoucího k hypertermii. Pacienti pocítují hlad a snaží se získat energii pro svou funkci. Vzhledem k prokluzování ATP syntázy se snižuje membránový potenciál, který je kompenzován zvýšenou aktivitou elektron transportního řetězce a tedy zvýšenou spotřebou kyslíku, což u pacientů vede k tachypnoe.

Výsledně dochází k hypermetabolismu se zvýšenou mitochondriální respirací rozpřaženou od syntézy ATP. Případ je klinickými projevy podobný Luftově syndromu z 60. let, jedné z prvních zaznamenaných mitochondriálních poruch. Pacientem byla 35letá žena s hypermetabolismem a vykazovala podobné symptomy (Luft, 1962). Příznaky byly přítomné od dětství, ale nebyly bohužel dokumentovány podrobně. Co je hlavní, není znám molekulární původ jejího onemocnění.

Patogenní mutace v genu c podjednotky

Dystonie není limitovaná pouze na defekty β podjednotky, najdeme ji také u patogenních variant genu pro podjednotku c, *ATP5MC3*. Substituce c.318C>G (p.Asn106Lys) byla pozorována ve dvou nezávislých rodinách a v obou byli jedinci vykazující dystonii nebo spastickou paraplegii. Opět se v obou rodinách ukázala neúplná penetrance u zdravých přenašečů. Podjednotka c je kódována 3 různými geny lišícími se jen v signální sekvenci pro transport do mitochondrie, u členů rodin se vyskytuje jen mutace v *ATP5MC3*, je tedy možné, že zdraví jedinci neznámým mechanismem favorizují transkripci z nepoškozených *ATP5MC1* a *ATP5MC2*. Ve fibroblastech pacientů byla ukázaná mírně snížená hydrolytická aktivita ATP syntázy (Neilson, 2022). Podobně se projevuje i varianta c.319C>G (p.Pro107Ala), dystonie je doprovázena opožděným vývojem, není znám buněčný fenotyp (Zech, 2022). Poslední varianta je c.236G>T (p.Gly79Val), kdy pacient trpí dystonií dolních končetin, opožděným psychomotorickým vývojem a zvýšenou koncentrací laktátu v krvi. Zde bylo v buňkách detekováno nižší množství ATP syntázy a její hydrolytická aktivita byla výrazně snížena (Zech, 2022). Asparagin 106 a prolin 107 leží ve vysoce konzervované oblasti ovlivňující napojení na F_1 část enzymu, u varianty p.Asn106Lys bylo ukázáno, že aktivita komplexu je snížena. Glycin 79 je umístěn na styčné ploše dvou c podjednotek, které spolu drží hydrofobními interakcemi, záměna aminokyseliny pravděpodobně vede k narušení stability prstence (Zech, 2022).

Tabulka 6 – shrnutí autozomálně dominantních mutací v jaderných genech strukturních podjednotek zapojených do defektů ATP syntázy.

Varianta genu (cDNA) a proteinu	Věk nástupu	Buněčný fenotyp	Reference
ATP5F1A			
c.545G>A p.Arg182Gln	Ø	Ø	(Zech, 2022)
c.620G>A p.Arg207His	1-3T	– množství ATP syntázy, ↓↓↓ produkce ATP, ↓ OCR	(Lines, 2021; Zech, 2022)
c.1037C>T p.Ser346Phe	Ø	Ø	(Zech, 2022)
ATP5F1B			
c.1000A>C p.Thr334Pro	2-15R	– množství ATP syntázy, ↓↓↓ produkce ATP, ↓ membránový potenciál	(Nasca, 2023)
c.1004T>C p.Leu335Pro	2M	↑ OCR, ↓ membránový potenciál, rozpřažení spotřeby kyslíku od produkce ATP	(Ganetzky, 2022)
c.1445T>C p.Val482Ala	5R	– množství ATP syntázy, ↓ produkce ATP, ↓↓ membránový potenciál	(Nasca, 2023)
ATP5MC3			
c.236G>T p.Gly79Val	Ø	↓↓ množství ATP syntázy, ↓↓ produkce ATP	(Zech, 2022)
c.318C>G p.Asn106Lys	7R	↓ produkce ATP	(Neilson, 2022; Zech, 2022)
c.319C>G p.Pro107Ala	Ø	Ø	(Zech, 2022)

Narození (*), den (D), týden (T), měsíc (M), rok (R), neznámé (Ø), normální (–), snížení (mírné ↓, střední ↓↓, velké ↓↓↓), zvýšení (mírné ↑, střední ↑↑, velké ↑↑↑), spotřeba kyslíku (OCR).

Závěr

Doposud bylo popsáno velké množství variant v genech pro strukturní podjednotky a asemblační faktory mitochondriální F_1F_0 ATP syntázy s projevy postihující zejména tkáň vyžadující velké množství energie, jako kosterní a srdeční svalovina nebo nervová tkáň. Počet identifikovaných patogenních mutací v jaderných genech značně vzrostl díky rozšířenému používání sekvenování nové generace. Díky tomu může být u pacientů s mitochondriálním onemocněním věnována větší pozornost molekulárním mechanismům, které fenotyp způsobují. Studium mechanismu defektů a lepší pochopení procesů v buňce pak může být posléze využito při hledání vhodné terapie.

Zde popsané patogenní varianty ústí v poruchy ATP syntázy rozdílných charakterů, které jsou odpovědné za patologické fenotypy. Komplex může být zcela složený, ale není schopen plnit svou funkci, jako se tomu děje u některých variant genu *MT-ATP6* pro podjednotku a, která kvůli defektu obtížněji translokuje protony a tím hůře pohání produkci ATP. Jiným typem poruchy ATP syntázy je překážka v asemblaci nebo stabilitě komplexu. Bez funkčních asemblačních faktorů (ATPAF2, TMEM70) je složeno jen malé množství funkčního enzymu, což vede k nedostatečné tvorbě ATP. Podobně, při výskytu mutací v genech pro strukturní podjednotky ATP syntázy (a, δ , ϵ , OSCP) může dojít k narušení interakcí s okolními podjednotkami a tím k poklesu stability celého komplexu. Opět

dochází ke snížení množství funkční ATP syntázy a poklesu produkce ATP, naopak se akumulují subkomplexy neschopné syntetické aktivity.

Novým typem defektu ATP syntázy je závada v katalytickém hexameru, kde se nachází aktivní místa pro syntézu ATP. Jedná se o autozomálně dominantní mutace v podjednotkách α a β , které vedou ke snížení produkce ATP, přestože množství ATP syntázy není výrazně sníženo. Dochází pravděpodobně ke zhoršené vazbě substrátů do aktivního místa, výsledné fenotypy jsou převážně mírné. Důležitou výjimkou jsou pacienti s mutací v genu *ATP5F1B* kódujícím β podjednotku (p.Leu335Pro), kteří mají poměrně závažný fenotyp. Změna v β podjednotce vede ke zhoršené interakci s γ podjednotkou centrálního stonku, takže rotující stonek „prokluzuje“ v hexameru a syntéza ATP je nedostatečná. Aktivita elektron transportního řetězce roste spolu s translokací protonů ATP syntázou, což vede u pacientů k hypermetabolismu.

V budoucím výzkumu by bylo vhodné se věnovat podrobnějšímu studování buněčného fenotypu objevených patogenních variant pro lepší pochopení fungování mitochondrie a zjištění mechanismů, jak se v buňce obnovuje metabolická homeostáza.

Seznam použité literatury

* značí přehledové články

- Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R. a kol. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, 370(6491), 621-628. <https://doi.org/10.1038/370621a0>
- Adema, A. Y., Janssen, M. C., & van der Heijden, J. W. (2016). A novel mutation in mitochondrial DNA in a patient with diabetes, deafness and proteinuria. *Neth J Med*, 74(10), 455-457. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27966441>
- Akagi, M., Inui, K., Tsukamoto, H. a kol. (2002). A point mutation of mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh syndrome. *Neuromuscul Disord*, 12(1), 53-55. [https://doi.org/10.1016/s0960-8966\(01\)00242-5](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(01)00242-5)
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G. a kol. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457-465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>
- Ardissone, A., Ferrera, G., Lamperti, C. a kol. (2023). Phenotyping mitochondrial DNA-related diseases in childhood: A cohort study of 150 patients. *Eur J Neurol*, 30(7), 2079-2091. <https://doi.org/10.1111/ene.15814>
- Atay, Z., Bereket, A., Turan, S. a kol. (2013). A novel homozygous TMEM70 mutation results in congenital cataract and neonatal mitochondrial encephalo-cardiomyopathy. *Gene*, 515(1), 197-199. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.11.044>
- Aure, K., Dubourg, O., Jardel, C. a kol. (2013). Episodic weakness due to mitochondrial DNA MT-ATP6/8 mutations. *Neurology*, 81(21), 1810-1818. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000436067.43384.0b>
- Baracca, A., Sgarbi, G., Mattiazzi, M. a kol. (2007). Biochemical phenotypes associated with the mitochondrial ATP6 gene mutations at nt8993. *Biochim Biophys Acta*, 1767(7), 913-919. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.05.005>
- Barca, E., Ganetzky, R. D., Potluri, P. a kol. (2018). USMG5 Ashkenazi Jewish founder mutation impairs mitochondrial complex V dimerization and ATP synthesis. *Hum Mol Genet*, 27(19), 3305-3312. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy231>
- Bardakjian, T., & Scherer, S. S. (2019). A MT-ATP6 Mutation Causes a Slowly Progressive Myeloneuropathy. *J Neuromuscul Dis*, 6(3), 385-387. <https://doi.org/10.3233/JND-190400>
- Bauer, M. F., Sirrenberg, C., Neupert, W. a kol. (1996). Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell*, 87(1), 33-41. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81320-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81320-3)
- Bergs, P. M. J., Maas, D. M., Janssen, M. C. H. a kol. (2022). Feasible and clinically relevant outcome measures for adults with mitochondrial disease. *Mol Genet Metab*, 135(1), 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.12.010>
- Berhe, S., Heeney, M. M., Campagna, D. R. a kol. (2018). Recurrent heteroplasmy for the MT-ATP6 p.Ser148Asn (m.8969G>A) mutation in patients with syndromic congenital sideroblastic anemia of variable clinical severity. *Haematologica*, 103(12), e561-e563. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.199109>
- Blanco-Grau, A., Bonaventura-Ibars, I., Coll-Canti, J. a kol. (2013). Identification and biochemical characterization of the novel mutation m.8839G>C in the mitochondrial ATP6 gene associated with NARP syndrome. *Genes Brain Behav*, 12(8), 812-820. <https://doi.org/10.1111/gbb.12089>
- Brum, M., Smedo, C., Guerreiro, R. a kol. (2014). Motor Neuron Syndrome as a New Phenotypic Manifestation of Mutation 9185T>C in Gene MTATP6. *Case Rep Neurol Med*, 2014, 701761. <https://doi.org/10.1155/2014/701761>
- Bugiardini, E., Bottani, E., Marchet, S. a kol. (2020). Expanding the molecular and phenotypic spectrum of truncating MT-ATP6 mutations. *Neurol Genet*, 6(1), e381. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000381>
- Burrage, L. C., Tang, S., Wang, J. a kol. (2014). Mitochondrial myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia (MLASA) plus associated with a novel de novo mutation (m.8969G>A) in the mitochondrial encoded ATP6 gene. *Mol Genet Metab*, 113(3), 207-212. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.06.004>

- Cameron, J. M., Levandovskiy, V., Mackay, N. a kol. (2011). Complex V TMEM70 deficiency results in mitochondrial nucleoid disorganization. *Mitochondrion*, 11(1), 191-199. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.09.008>
- Campos, Y., Martin, M. A., Rubio, J. C. a kol. (1997). Leigh syndrome associated with the T9176C mutation in the ATPase 6 gene of mitochondrial DNA. *Neurology*, 49(2), 595-597. <https://doi.org/10.1212/wnl.49.2.595>
- Capiau, S., Smet, J., De Paepe, B. a kol. (2022). Clinical Heterogeneity in MT-ATP6 Pathogenic Variants: Same Genotype-Different Onset. *Cells*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/cells11030489>
- Carroll, J., He, J., Ding, S. a kol. (2021). TMEM70 and TMEM242 help to assemble the rotor ring of human ATP synthase and interact with assembly factors for complex I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118(13). <https://doi.org/10.1073/pnas.2100558118>
- Carroll, J., Watt, I. N., Wright, C. J. a kol. (2024). The inhibitor protein IF(1) from mammalian mitochondria inhibits ATP hydrolysis but not ATP synthesis by the ATP synthase complex. *J Biol Chem*, 300(3), 105690. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.105690>
- Carrozzo, R., Tessa, A., Vazquez-Memije, M. E. a kol. (2001). The T9176G mtDNA mutation severely affects ATP production and results in Leigh syndrome. *Neurology*, 56(5), 687-690. <https://doi.org/10.1212/wnl.56.5.687>
- Castagna, A. E., Addis, J., McInnes, R. R. a kol. (2007). Late onset Leigh syndrome and ataxia due to a T to C mutation at bp 9,185 of mitochondrial DNA. *Am J Med Genet A*, 143A(8), 808-816. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31637>
- Childs, A. M., Hutchin, T., Pysden, K. a kol. (2007). Variable phenotype including Leigh syndrome with a 9185T>C mutation in the MTATP6 gene. *Neuropediatrics*, 38(6), 313-316. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1065355>
- Cizkova, A., Stranecky, V., Mayr, J. A. a kol. (2008). TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalomyopathy. *Nat Genet*, 40(11), 1288-1290. <https://doi.org/10.1038/ng.246>
- Craig, K., Elliott, H. R., Keers, S. M. a kol. (2007). Episodic ataxia and hemiplegia caused by the 8993T>C mitochondrial DNA mutation. *J Med Genet*, 44(12), 797-799. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.052902>
- Cukierman, S. (2006). Et tu, Grotthuss! and other unfinished stories. *Biochim Biophys Acta*, 1757(8), 876-885. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2005.12.001>
- De Meirleir, L., Seneca, S., Lissens, W. a kol. (2004). Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12. *J Med Genet*, 41(2), 120-124. <https://doi.org/10.1136/jmg.2003.012047>
- De Meirleir, L., Seneca, S., Lissens, W. a kol. (1995). Bilateral striatal necrosis with a novel point mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene. *Pediatr Neurol*, 13(3), 242-246. [https://doi.org/10.1016/0887-8994\(95\)00184-h](https://doi.org/10.1016/0887-8994(95)00184-h)
- de Vries, D. D., van Engelen, B. G., Gabreels, F. J. a kol. (1993). A second missense mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh's syndrome. *Ann Neurol*, 34(3), 410-412. <https://doi.org/10.1002/ana.410340319>
- Diodato, D., Invernizzi, F., Lamantea, E. a kol. (2015). Common and Novel TMEM70 Mutations in a Cohort of Italian Patients with Mitochondrial Encephalomyopathy. *JIMD Rep*, 15, 71-78. https://doi.org/10.1007/8904_2014_300
- Duno, M., Wibrand, F., Baggesen, K. a kol. (2013). A novel mitochondrial mutation m.8989G>C associated with neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa - the NARP syndrome. *Gene*, 515(2), 372-375. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.066>
- Fearnley, I. M., & Walker, J. E. (1986). Two overlapping genes in bovine mitochondrial DNA encode membrane components of ATP synthase. *EMBO J*, 5(8), 2003-2008. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04456.x>
- Fragaki, K., Chaussenot, A., Serre, V. a kol. (2019). A novel variant m.8561C>T in the overlapping region of MT-ATP6 and MT-ATP8 in a child with early-onset severe neurological signs. *Mol Genet Metab Rep*, 21, 100543. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2019.100543>
- Fujikawa, M., Sugawara, K., Tanabe, T. a kol. (2015). Assembly of human mitochondrial ATP synthase through two separate intermediates, F1-c-ring and b-e-g complex. *FEBS Lett*, 589(19 Pt B), 2707-2712. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.006>

- Galber, C., Carissimi, S., Baracca, A. a kol. (2021). The ATP Synthase Deficiency in Human Diseases. *Life (Basel)*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/life11040325>
- Ganapathi, M., Friocourt, G., Gueguen, N. a kol. (2022). A homozygous splice variant in ATP5PO, disrupts mitochondrial complex V function and causes Leigh syndrome in two unrelated families. *J Inherit Metab Dis*, 45(5), 996-1012. <https://doi.org/10.1002/jimd.12526>
- Ganetzky, R. D., Markhard, A. L., Yee, I. a kol. (2022). Congenital Hypermetabolism and Uncoupled Oxidative Phosphorylation. *N Engl J Med*, 387(15), 1395-1403. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2202949>
- Ganetzky, R. D., Stendel, C., McCormick, E. M. a kol. (2019). MT-ATP6 mitochondrial disease variants: Phenotypic and biochemical features analysis in 218 published cases and cohort of 14 new cases. *Hum Mutat*, 40(5), 499-515. <https://doi.org/10.1002/humu.23723>
- Garcia-Bermudez, J., Sanchez-Arago, M., Soldevilla, B. a kol. (2015). PKA Phosphorylates the ATPase Inhibitory Factor 1 and Inactivates Its Capacity to Bind and Inhibit the Mitochondrial H(+)-ATP Synthase. *Cell Rep*, 12(12), 2143-2155. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.052>
- Garcia, J. J., Ogilvie, I., Robinson, B. H. a kol. (2000). Structure, functioning, and assembly of the ATP synthase in cells from patients with the T8993G mitochondrial DNA mutation. Comparison with the enzyme in Rho(0) cells completely lacking mtdna. *J Biol Chem*, 275(15), 11075-11081. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.11075>
- Guo, H., & Rubinstein, J. L. (2022). Structure of ATP synthase under strain during catalysis. *Nat Commun*, 13(1), 2232. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29893-2>
- He, J., Carroll, J., Ding, S. a kol. (2020). Assembly of the peripheral stalk of ATP synthase in human mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(47), 29602-29608. <https://doi.org/10.1073/pnas.2017987117>
- He, J., Ford, H. C., Carroll, J. a kol. (2018). Assembly of the membrane domain of ATP synthase in human mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(12), 2988-2993. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722086115>
- Hirono, K., Ichida, F., Nishio, N. a kol. (2019). Mitochondrial complex deficiency by novel compound heterozygous TMEM70 variants and correlation with developmental delay, undescended testicle, and left ventricular noncompaction in a Japanese patient: A case report. *Clin Case Rep*, 7(3), 553-557. <https://doi.org/10.1002/ccr3.2050>
- Honzik, T., Tesarova, M., Magner, M. a kol. (2012). Neonatal onset of mitochondrial disorders in 129 patients: clinical and laboratory characteristics and a new approach to diagnosis. *J Inherit Metab Dis*, 35(5), 749-759. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9440-3>
- Honzik, T., Tesarova, M., Mayr, J. A. a kol. (2010). Mitochondrial encephalocardio-myopathy with early neonatal onset due to TMEM70 mutation. *Arch Dis Child*, 95(4), 296-301. <https://doi.org/10.1136/adc.2009.168096>
- Honzik, T., Tesarova, M., Vinsova, K. a kol. (2013). Different laboratory and muscle biopsy findings in a family with an m.8851T>C mutation in the mitochondrial MTATP6 gene. *Mol Genet Metab*, 108(1), 102-105. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.11.002>
- Hu, C., Li, X., Zhao, L. a kol. (2020). Clinical and molecular characterization of pediatric mitochondrial disorders in south of China. *Eur J Med Genet*, 63(8), 103898. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2020.103898>
- Husain, I., & Harris, D. A. (1983). ATP synthesis and hydrolysis in submitochondrial particles subjected to an acid-base transition. Effects of the ATPase inhibitor protein. *FEBS Lett*, 160(1-2), 110-114. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80947-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80947-8)
- Imai, A., Fujita, S., Kishita, Y. a kol. (2016). Rapidly progressive infantile cardiomyopathy with mitochondrial respiratory chain complex V deficiency due to loss of ATPase 6 and 8 protein. *Int J Cardiol*, 207, 203-205. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.01.026>
- Isohanni, P., Carroll, C. J., Jackson, C. B. a kol. (2018). Defective mitochondrial ATPase due to rare mtDNA m.8969G>A mutation-causing lactic acidosis, intellectual disability, and poor growth. *Neurogenetics*, 19(1), 49-53. <https://doi.org/10.1007/s10048-018-0537-9>
- Jackson, C. B., Hahn, D., Schroter, B. a kol. (2017). A novel mitochondrial ATP6 frameshift mutation causing isolated complex V deficiency, ataxia and encephalomyopathy. *Eur J Med Genet*, 60(6), 345-351. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.04.006>

- Jesina, P., Tesarova, M., Fornuskova, D. a kol. (2004). Diminished synthesis of subunit a (ATP6) and altered function of ATP synthase and cytochrome c oxidase due to the mtDNA 2 bp microdeletion of TA at positions 9205 and 9206. *Biochem J*, 383(Pt. 3), 561-571. <https://doi.org/10.1042/BJ20040407>
- Jonckheere, A. I., Hogeveen, M., Nijtmans, L. G. a kol. (2008). A novel mitochondrial ATP8 gene mutation in a patient with apical hypertrophic cardiomyopathy and neuropathy. *J Med Genet*, 45(3), 129-133. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.052084>
- Jonckheere, A. I., Huigsloot, M., Lammens, M. a kol. (2011). Restoration of complex V deficiency caused by a novel deletion in the human TMEM70 gene normalizes mitochondrial morphology. *Mitochondrion*, 11(6), 954-963. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.08.012>
- Jonckheere, A. I., Renkema, G. H., Bras, M. a kol. (2013). A complex V ATP5A1 defect causes fatal neonatal mitochondrial encephalopathy. *Brain*, 136(Pt 5), 1544-1554. <https://doi.org/10.1093/brain/awt086>
- Kang, P. J., Ostermann, J., Shilling, J. a kol. (1990). Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*, 348(6297), 137-143. <https://doi.org/10.1038/348137a0>
- Knight, K. M., Shelkowitz, E., Larson, A. A. a kol. (2020). The mitochondrial DNA variant m.9032T > C in MT-ATP6 encoding p.(Leu169Pro) causes a complex mitochondrial neurological syndrome. *Mitochondrion*, 55, 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.08.009>
- Kovalcikova, J., Vrbacky, M., Pecina, P. a kol. (2019). TMEM70 facilitates biogenesis of mammalian ATP synthase by promoting subunit c incorporation into the rotor structure of the enzyme. *FASEB J*, 33(12), 14103-14117. <https://doi.org/10.1096/fj.201900685RR>
- Kuhlbrandt, W. (2019). Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases. *Annu Rev Biochem*, 88, 515-549. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-110903>
- Kytovuori, L., Lipponen, J., Rusanen, H. a kol. (2016). A novel mutation m.8561C>G in MT-ATP6/8 causing a mitochondrial syndrome with ataxia, peripheral neuropathy, diabetes mellitus, and hypergonadotropic hypogonadism. *J Neurol*, 263(11), 2188-2195. <https://doi.org/10.1007/s00415-016-8249-2>
- Lai, Y., Zhang, Y., Zhou, S. a kol. (2023). Structure of the human ATP synthase. *Mol Cell*, 83(12), 2137-2147 e2134. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.04.029>
- Larson, A. A., Balasubramaniam, S., Christodoulou, J. a kol. (2019). Biochemical signatures mimicking multiple carboxylase deficiency in children with mutations in MT-ATP6. *Mitochondrion*, 44, 58-64. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.01.001>
- Lefebvre-Legendre, L., Vaillier, J., Benabdelhak, H. a kol. (2001). Identification of a nuclear gene (FMC1) required for the assembly/stability of yeast mitochondrial F(1)-ATPase in heat stress conditions. *J Biol Chem*, 276(9), 6789-6796. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009557200>
- Li, Y., Jourdain, A. A., Calvo, S. E. a kol. (2017). CLIC, a tool for expanding biological pathways based on co-expression across thousands of datasets. *PLoS Comput Biol*, 13(7), e1005653. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005653>
- Lieber, D. S., Calvo, S. E., Shanahan, K. a kol. (2013). Targeted exome sequencing of suspected mitochondrial disorders. *Neurology*, 80(19), 1762-1770. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182918c40>
- Lines, M. A., Cuillerier, A., Chakraborty, P. a kol. (2021). A recurrent de novo ATP5F1A substitution associated with neonatal complex V deficiency. *Eur J Hum Genet*, 29(11), 1719-1724. <https://doi.org/10.1038/s41431-021-00956-0>
- Lopez-Gallardo, E., Emperador, S., Solano, A. a kol. (2014). Expanding the clinical phenotypes of MT-ATP6 mutations. *Hum Mol Genet*, 23(23), 6191-6200. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu339>
- Lopez-Gallardo, E., Solano, A., Herrero-Martin, M. D. a kol. (2009). NARP syndrome in a patient harbouring an insertion in the MT-ATP6 gene that results in a truncated protein. *J Med Genet*, 46(1), 64-67. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.060616>
- Luft, R., Ikkos, D., Palmieri, G. a kol. (1962). A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest*, 41(9), 1776-1804. <https://doi.org/10.1172/JCI104637>

- Mackay, L., Gijavanekar, C., Streff, H. a kol. (2023). Novel phenotype of aortic root dilatation and late-onset metabolic decompensation in a patient with TMEM70 deficiency. *Am J Med Genet A*, 191(5), 1366-1372. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.63131>
- Magner, M., Dvorakova, V., Tesarova, M. a kol. (2015). Erratum to: TMEM70 deficiency: long-term outcome of 48 patients. *J Inherit Metab Dis*, 38(3), 583-584. <https://doi.org/10.1007/s10545-015-9833-9>
- Mayr, J. A., Havlickova, V., Zimmermann, F. a kol. (2010). Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 epsilon subunit. *Hum Mol Genet*, 19(17), 3430-3439. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq254>
- Mimura, H., Hashimoto, T., Yoshida, Y. a kol. (1993). Binding of an intrinsic ATPase inhibitor to the interface between alpha- and beta-subunits of F1FoATPase upon de-energization of mitochondria. *J Biochem*, 113(3), 350-354. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124050>
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191, 144-148. <https://doi.org/10.1038/191144a0>
- MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. (2024). Retrieved 30.7.2024 from <http://www.mitomap.org/>
- Montgomery, M. G., Petri, J., Spikes, T. E. a kol. (2021). Structure of the ATP synthase from *Mycobacterium smegmatis* provides targets for treating tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118(47). <https://doi.org/10.1073/pnas.2111899118>
- Morava, E., Rodenburg, R. J., Hol, F. a kol. (2006). Clinical and biochemical characteristics in patients with a high mutant load of the mitochondrial T8993G/C mutations. *Am J Med Genet A*, 140(8), 863-868. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31194>
- Mordel, P., Schaeffer, S., Dupas, Q. a kol. (2017). A 2 bp deletion in the mitochondrial ATP 6 gene responsible for the NARP (neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa) syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*, 494(1-2), 133-137. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.066>
- Moslemi, A. R., Darin, N., Tulinius, M. a kol. (2005). Two new mutations in the MTATP6 gene associated with Leigh syndrome. *Neuropediatrics*, 36(5), 314-318. <https://doi.org/10.1055/s-2005-872845>
- Mracek, T., Pecina, P., Vojtiskova, A. a kol. (2006). Two components in pathogenic mechanism of mitochondrial ATPase deficiency: energy deprivation and ROS production. *Exp Gerontol*, 41(7), 683-687. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.02.009>
- Murphy, B. J., Klusch, N., Langer, J. a kol. (2019). Rotary substates of mitochondrial ATP synthase reveal the basis of flexible F(1)-F(o) coupling. *Science*, 364(6446). <https://doi.org/10.1126/science.aaw9128>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417(1), 1-13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Nasca, A., Mencacci, N. E., Invernizzi, F. a kol. (2023). Variants in ATP5F1B are associated with dominantly inherited dystonia. *Brain*, 146(7), 2730-2738. <https://doi.org/10.1093/brain/awad068>
- Neilson, D. E., Zech, M., Hufnagel, R. B. a kol. (2022). A Novel Variant of ATP5MC3 Associated with Both Dystonia and Spastic Paraplegia. *Mov Disord*, 37(2), 375-383. <https://doi.org/10.1002/mds.28821>
- Ng, Y. S., Martikainen, M. H., Gorman, G. S. a kol. (2019). Pathogenic variants in MT-ATP6: A United Kingdom-based mitochondrial disease cohort study. *Ann Neurol*, 86(2), 310-315. <https://doi.org/10.1002/ana.25525>
- Nicholls, D. G., & Ferguson, S. J. (2013). *Bioenergetics* (4th ed.). Academic press.
- Ogawa, E., Shimura, M., Fushimi, T. a kol. (2017). Clinical validity of biochemical and molecular analysis in diagnosing Leigh syndrome: a study of 106 Japanese patients. *J Inherit Metab Dis*, 40(5), 685-693. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0042-6>
- Olahova, M., Yoon, W. H., Thompson, K. a kol. (2018). Biallelic Mutations in ATP5F1D, which Encodes a Subunit of ATP Synthase, Cause a Metabolic Disorder. *Am J Hum Genet*, 102(3), 494-504. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.01.020>

- Panosyan, F. B., Tawil, R., & Herrmann, D. N. (2017). Episodic weakness and Charcot-marie-tooth disease due to a mitochondrial MT-ATP6 mutation. *Muscle Nerve*, 55(6), 922-927. <https://doi.org/10.1002/mus.25453>
- Panwala, T. F., Garcia-Santibanez, R., Vizcarra, J. A. a kol. (2022). Childhood-Onset Hereditary Spastic Paraplegia (HSP): A Case Series and Review of Literature. *Pediatr Neurol*, 130, 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2022.02.007>
- Park, J. O., Tanner, L. B., Wei, M. H. a kol. (2019). Near-equilibrium glycolysis supports metabolic homeostasis and energy yield. *Nat Chem Biol*, 15(10), 1001-1008. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0364-9>
- Paumard, P., Vaillier, J., Coulary, B. a kol. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J*, 21(3), 221-230. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.221>
- Pedersen, P. L., Schwerzmann, K., & CintrÓN, N. (1981). Regulation of the Synthesis and Hydrolysis of ATP in Biological Systems: Role of Peptide Inhibitors of H⁺-ATPases. In (pp. 149-199). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-152511-8.50011-6>
- Penin, F., Di Pietro, A., Godinot, C. a kol. (1988). Fate of nucleotides bound to reconstituted Fo-F1 during adenosine 5'-triphosphate synthesis activation or hydrolysis: role of protein inhibitor and hysteretic inhibition. *Biochemistry*, 27(25), 8969-8974. <https://doi.org/10.1021/bi00425a014>
- Pfeffer, G., Blakely, E. L., Alston, C. L. a kol. (2012). Adult-onset spinocerebellar ataxia syndromes due to MTATP6 mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83(9), 883-886. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-302568>
- Piekutowska-Abramczuk, D., Rutyna, R., Czyzyk, E. a kol. (2018). Leigh syndrome in individuals bearing m.9185T>C MTATP6 variant. Is hyperventilation a factor which starts its development? *Metab Brain Dis*, 33(1), 191-199. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0122-1>
- Pitceathly, R. D., Murphy, S. M., Cottenie, E. a kol. (2012). Genetic dysfunction of MT-ATP6 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology*, 79(11), 1145-1154. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182698d8d>
- Pullman, M. E., & Monroy, G. C. (1963). A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *J Biol Chem*, 238, 3762-3769. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14109217>
- Rantamaki, M. T., Soini, H. K., Finnila, S. M. a kol. (2005). Adult-onset ataxia and polyneuropathy caused by mitochondrial 8993T-->C mutation. *Ann Neurol*, 58(2), 337-340. <https://doi.org/10.1002/ana.20555>
- Richter, C., Park, J. W., & Ames, B. N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(17), 6465-6467. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.17.6465>
- Ronchi, D., Bordoni, A., Cosi, A. a kol. (2011). Unusual adult-onset Leigh syndrome presentation due to the mitochondrial m.9176T>C mutation. *Biochem Biophys Res Commun*, 412(2), 245-248. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.076>
- Rossignol, R., Faustin, B., Rocher, C. a kol. (2003). Mitochondrial threshold effects. *Biochem J*, 370(Pt 3), 751-762. <https://doi.org/10.1042/BJ20021594>
- Saneto, R. P., & Singh, K. K. (2010). Illness-induced exacerbation of Leigh syndrome in a patient with the MTATP6 mutation, m. 9185 T>C. *Mitochondrion*, 10(5), 567-572. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.05.006>
- Scaglia, F., Scheuerle, A. E., Towbin, J. A. a kol. (2002). Neonatal presentation of ventricular tachycardia and a Reye-like syndrome episode associated with disturbed mitochondrial energy metabolism. *BMC Pediatr*, 2, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2431-2-12>
- Schagger, H., & Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J*, 19(8), 1777-1783. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1777>
- Seneca, S., Abramowicz, M., Lissens, W. a kol. (1996). A mitochondrial DNA microdeletion in a newborn girl with transient lactic acidosis. *J Inherit Metab Dis*, 19(2), 115-118. <https://doi.org/10.1007/BF01799407>
- Shchelochkov, O. A., Li, F. Y., Wang, J. a kol. (2010). Milder clinical course of Type IV 3-methylglutaconic aciduria due to a novel mutation in TMEM70. *Mol Genet Metab*, 101(2-3), 282-285. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.07.012>

- Sikorska, M., Sandhu, J. K., Simon, D. K. a kol. (2009). Identification of ataxia-associated mtDNA mutations (m.4052T>C and m.9035T>C) and evaluation of their pathogenicity in transmitochondrial cybrids. *Muscle Nerve*, 40(3), 381-394. <https://doi.org/10.1002/mus.21355>
- Sobti, M., Walshe, J. L., Wu, D. a kol. (2020). Cryo-EM structures provide insight into how E. coli F(1)F(o) ATP synthase accommodates symmetry mismatch. *Nat Commun*, 11(1), 2615. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16387-2>
- Sperl, W., Jesina, P., Zeman, J. a kol. (2006). Deficiency of mitochondrial ATP synthase of nuclear genetic origin. *Neuromuscul Disord*, 16(12), 821-829. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2006.08.008>
- Spiegel, R., Khayat, M., Shalev, S. A. a kol. (2011). TMEM70 mutations are a common cause of nuclear encoded ATP synthase assembly defect: further delineation of a new syndrome. *J Med Genet*, 48(3), 177-182. <https://doi.org/10.1136/jmg.2010.084608>
- Spikes, T. E., Montgomery, M. G., & Walker, J. E. (2020). Structure of the dimeric ATP synthase from bovine mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(38), 23519-23526. <https://doi.org/10.1073/pnas.2013998117>
- Staretz-Chacham, O., Wormser, O., Manor, E. a kol. (2019). TMEM70 deficiency: Novel mutation and hypercitrullinemia during metabolic decompensation. *Am J Med Genet A*, 179(7), 1293-1298. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61138>
- Stendel, C., Neuhofer, C., Floride, E. a kol. (2020). Delineating MT-ATP6-associated disease: From isolated neuropathy to early onset neurodegeneration. *Neurol Genet*, 6(1), e393. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000393>
- Stenton, S. L., & Prokisch, H. (2020). Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. *EBioMedicine*, 56, 102784. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102784>
- Strauss, M., Hofhaus, G., Schroder, R. R. a kol. (2008). Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J*, 27(7), 1154-1160. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.35>
- Synofzik, M., Schicks, J., Wilhelm, C. a kol. (2012). Charcot-Marie-Tooth hereditary neuropathy due to a mitochondrial ATP6 mutation. *Eur J Neurol*, 19(10), e114-116. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2012.03812.x>
- Takada, R., Tozawa, T., Kondo, H. a kol. (2020). Early infantile-onset Leigh syndrome complicated with infantile spasms associated with the m.9185 T > C variant in the MT-ATP6 gene: Expanding the clinical spectrum. *Brain Dev*, 42(1), 69-72. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2019.08.006>
- Tauchmannova, K., Pecinova, A., Houstek, J. a kol. (2024). Variability of Clinical Phenotypes Caused by Isolated Defects of Mitochondrial ATP Synthase (Review). *Physiol Res*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39016153>
- Thyagarajan, D., Shanske, S., Vazquez-Memije, M. a kol. (1995). A novel mitochondrial ATPase 6 point mutation in familial bilateral striatal necrosis. *Ann Neurol*, 38(3), 468-472. <https://doi.org/10.1002/ana.410380321>
- Torraco, A., Verrigni, D., Rizza, T. a kol. (2012). TMEM70: a mutational hot spot in nuclear ATP synthase deficiency with a pivotal role in complex V biogenesis. *Neurogenetics*, 13(4), 375-386. <https://doi.org/10.1007/s10048-012-0343-8>
- Tort, F., Del Toro, M., Lissens, W. a kol. (2011). Screening for nuclear genetic defects in the ATP synthase-associated genes TMEM70, ATP12 and ATP5E in patients with 3-methylglutaconic aciduria. *Clin Genet*, 80(3), 297-300. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01650.x>
- Tsao, C. Y., Mendell, J. R., & Bartholomew, D. (2001). High mitochondrial DNA T8993G mutation (<90%) without typical features of Leigh's and NARP syndromes. *J Child Neurol*, 16(7), 533-535. <https://doi.org/10.1177/088307380101600716>
- Uziel, G., Moroni, I., Lamantea, E. a kol. (1997). Mitochondrial disease associated with the T8993G mutation of the mitochondrial ATPase 6 gene: a clinical, biochemical, and molecular study in six families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 63(1), 16-22. <https://doi.org/10.1136/jnnp.63.1.16>
- Verny, C., Guegen, N., Desquret, V. a kol. (2011). Hereditary spastic paraplegia-like disorder due to a mitochondrial ATP6 gene point mutation. *Mitochondrion*, 11(1), 70-75. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.07.006>
- von Heijne, G. (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J*, 5(6), 1335-1342. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04364.x>

- Wang, Z. G., White, P. S., & Ackerman, S. H. (2001). Atp11p and Atp12p are assembly factors for the F(1)-ATPase in human mitochondria. *J Biol Chem*, 276(33), 30773-30778. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104133200>
- Ware, S. M., El-Hassan, N., Kahler, S. G. a kol. (2009). Infantile cardiomyopathy caused by a mutation in the overlapping region of mitochondrial ATPase 6 and 8 genes. *J Med Genet*, 46(5), 308-314. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.063149>
- Wei, Y., Cui, L., & Peng, B. (2018). Mitochondrial DNA mutations in late-onset Leigh syndrome. *J Neurol*, 265(10), 2388-2395. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-9014-5>
- Wen, S., Niedzwiecka, K., Zhao, W. a kol. (2016). Identification of G8969>A in mitochondrial ATP6 gene that severely compromises ATP synthase function in a patient with IgA nephropathy. *Sci Rep*, 6, 36313. <https://doi.org/10.1038/srep36313>
- Wong, L. C., Chen, T., Schmitt, E. S. a kol. (2020). Clinical and laboratory interpretation of mitochondrial mRNA variants. *Hum Mutat*, 41(10), 1783-1796. <https://doi.org/10.1002/humu.24082>
- Young, J. C., Hoogenraad, N. J., & Hartl, F. U. (2003). Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell*, 112(1), 41-50. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01250-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01250-3)
- Yu, X. L., Yan, C. Z., Ji, K. Q. a kol. (2018). Clinical, Neuroimaging, and Pathological Analyses of 13 Chinese Leigh Syndrome Patients with Mitochondrial DNA Mutations. *Chin Med J (Engl)*, 131(22), 2705-2712. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.245265>
- Zech, M., Kopajtich, R., Steinbrucker, K. a kol. (2022). Variants in Mitochondrial ATP Synthase Cause Variable Neurologic Phenotypes. *Ann Neurol*, 91(2), 225-237. <https://doi.org/10.1002/ana.26293>
- Zigman, T., Sikic, K., Petkovic Ramadza, D. a kol. (2021). ATP synthase deficiency due to m.8528T>C mutation - a novel cause of severe neonatal hyperammonemia requiring hemodialysis. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 34(3), 389-393. <https://doi.org/10.1515/jpem-2020-0396>