

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

Ar Lī sindromu saistīto mitohondriālās DNS variantu ietekme
uz gēnu ekspresiju

Maģistra darbs

Autors: Diāna Livčāne

Stud. apl. Nr. dl17044

Darba vadītājs: Dr. biol. Inna Iņāškina

RĪGA 2022

KOPSAVILKUMS

Lī sindroms ir reta iedzimta progresējoša neurodeģeneratīva mitohondriālā slimība, kas parasti sāk izpausties jau zīdaiņa vecumā vai agrā bērnībā. Lī sindromu var izraisīt izmaiņas gan kodola, gan mitohondriju genomā. Patogēni varianti mitohondriju genomā var ietekmēt kodola gēnu ekspresiju caur mitohondriju atgriezenisko regulāciju.

Maģistra darba mērķis bija noskaidrot divu, ar Lī sindromu saistītu, mitohondriālās DNS (mtDNS) variantu ietekmi uz gēnu ekspresiju. Tika veikta transkriptoma analīze transmitohondriālo citoplazmatisko hibrīdu (cibrīdu) šūnu līnijām, kas saturēja divus ar Lī sindromu saistītus mtDNS variantus, pārbaudīta abu patogēno variantu heteroplazmijas stabilitāte, veikta *digital droplet* PCR apstākļu optimizācija un veikta RNS sekvencēšanas rezultātu validācija ar *Selfie-digital* PCR metodi.

Trīs gēniem tika noteikta nozīmīgi izmainīta ekspresija pacienta A cibrīdu šūnu līnijā, homoplazmiska varianta m.9185T>C klātbūtnē. Pacienta B cibrīdu šūnu līnijās, varianta m.13513G>A 50% un 70% heteroplazmijas klātbūtnē, nozīmīgi izmainīta ekspresija bija 84 gēniem, no kuriem 31 gēna regulācija bija izmainīta vairāk nekā četras reizes. Heteroplazmijas līmenis saglabājās stabils laika gaitā visām pētāmajām šūnu līnijām. Gēniem (*TCEA3*, *SEL1L3*, *ABCG1*, *GRID1*, *GRM2*, *DYDC2*, *HKDC1* un *DHRS2*) transkriptoma analīzes rezultātiem atbilstoša tendence tika novērota vienā no *Selfie*-dPCR atkārtojumiem. Tikai viens gēns *FABP3* apstiprināja transkriptoma analīzes rezultātiem atbilstošu tendenci abos atkārtojumos.

Atslēgas vārdi: Mitohondriālā DNS, Lī sindroms, mitohondriju atgriezeniskā regulācija, gēnu ekspresija

SUMMARY

Leigh syndrome is a rare inherited progressive neurodegenerative mitochondrial disease that usually manifests in infancy or early childhood. Leigh syndrome can be caused by changes in either the nuclear or mitochondrial genomes. Pathogenic variants in the mitochondrial genome may affect the expression of nuclear genes through mitochondrial retrograde regulation.

The aim of the master's thesis was to investigate the effects of two mitochondrial DNA (mtDNA) variants, associated with Leigh syndrome, on gene expression. Transcriptome analysis of transmitochondrial cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines harbouring either of the two variants was performed, heteroplasmic status of both pathogenic variants was evaluated, conditions of digital droplet PCR were optimized, and results obtained during RNA sequencing were validated by Selfie-digital PCR.

Three genes had significantly altered expression in the cybrid cell line of patient A, in the presence of the homoplasmic variant m.9185T>C. In cybrid cell lines of patient B, in the presence of 50% and 70% heteroplasmy of variant m.13513G>A, 84 genes had significantly altered expression, of which the regulation of 31 genes was altered more than fourfold. Heteroplasmy levels remained stable in all cell lines during culturing. A trend consistent with results obtained in transcriptome analysis was observed in one of the Selfie-dPCR experiments for eight genes (*TCEA3*, *SEL1L3*, *ABCG1*, *GRID1*, *GRM2*, *DYDC2*, *HKDC1*, and *DHRS2*). For only one gene, *FABP3*, a trend consistent with transcriptome analysis results was confirmed in both replicates.

Keywords: Mitochondrial DNA, Leigh syndrome, mitochondria retrograde signalling, gene expression

SATURS

SATURS.....	4
DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI	5
IEVADS	6
1. LITERATŪRAS APSKATS	7
1.1. Mitohondriju struktūra un funkcijas	7
1.2. Mitohondriālais genoms	10
1.3. Mitohondriālās DNS varianti.....	13
1.4. Mitohondriālās slimības.....	15
1.5. Lī sindroms	15
1.6. Mitohondriju atgriezeniskā regulācija	20
2. MATERIĀLI UN METODES.....	23
2.1. Materiāli.....	23
2.1.1. Ķīmiskie reaģenti.....	23
2.1.2. Oligonukleotīdi.....	24
2.1.3. Materiāli	26
2.1.4. Aparatūra	27
2.1.5. Šūnu līnijas	27
2.2. Metodes.....	28
2.2.1. Šūnu kultivēšana.....	28
2.2.2. DNS izdalīšana no šūnu kultūrām	28
2.2.3. Sangerā sekvenēšana	29
2.2.4. RNS izdalīšana no šūnu kultūrām	30
2.2.5. Transkriptoma bibliotēku sagatavošana un nākamās paaudzes sekvenēšana.....	31
1.2.8. Datu analīze	37
3. REZULTĀTI	38
3.1. Transkriptoma analīze cibrīdu šūnu kultūrās.....	38
3.2. Heteroplazmijas stabilitātes pārbaude	42
3.3. ddPCR apstākļu optimizācija.....	42
3.4. RNS sekvenēšanas rezultātu pārbaude ar <i>Selfie</i> -dPCR.....	44
4. DISKUSIJA	46
5. SECINĀJUMI	52
PATEICĪBAS	53
LITERATŪRAS SARAKSTS	54
PIELIKUMS.....	63

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

ATF - adenožintrifosfāts
ROS - reaktīvāk skābekļa formas
mtDNS - mitohondriālā dezoksiribonukleīnskābe
NADH - nikotīnamīda adenīdinukleotīds
FADH₂ - flavīna adenīdinukleotīds
OXPHOS - oksidatīvā fosforilēšana
ETC - elektronu transporta ķēde
C - komplekss
ADP - adenožīndifosfāts
kb - kilobāzes
tRNS - transporta ribonukleīnskābe
rRNS - ribosomālā ribonukleīnskābe
bp - bāzu pāri
nDNS - kodola dezoksiribonukleīnskābe
mtSSB - mitohondriju vienpavediena saistošais proteīns
mtTFA - mitohondriālais transkripcijas faktors A
mtTFB - mitohondriālais transkripcijas faktors B
POLG - DNS polimerāze γ
POLRMT - mitohondriālā RNS polimerāze
TWINKLE - mitohondriālā DNS helikāze
O_H - H-pavediena replikācijas sākuma vieta
O_L - L-pavediena replikācijas sākuma vieta
HSP1 un HSP2 - H-pavediena transkripcijas promoteri 1 un 2
LSP - L-pavediena transkripcijas promoters
mRNS - matricas ribonukleīnskābe
BER - bāzu izgriešanas labošanas (*base excision repair*) mehānisms
CNS - centrālā nervu sistēma
MR - magnētiskā rezonanse
MERRF - miokloniskā epilepsija ar mikroskopiski izmainītām muskuļšķiedram
Cibrīdi - citoplazmatiskie hibrīdi
LHON - Lēbera hereditārā optiskā neiropātija
PCR - polimerāzes ķēdes reakcija
cDNS - komplementārā DNS
RT - reversā transkriptāze
Selfie-dPCR - *Selfie-digital* PCR
dPCR - digitālā PCR (*digital* PCR)

IEVADS

Lī sindroms (*Leigh syndrome*) ir reta iedzimta progresējoša neurodeģeneratīva slimība. Tā ir visizplatītākā bērniem sastopamā mitohondriālā slimība, kas parasti sāk izpausties jau zīdaiņa vecumā vai agrā bērnībā. Lī sindroma gadījumā galvenokārt tiek skarta centrālā nervu sistēma (CNS). Neuroloģiskie simptomi klīniski var izpausties, kā hipotonija, psihomotorās attīstības aizture vai regresija, distonija, spasticitāte, krampju lēkmes, kustību traucējumi un ataksija. Lī sindromam ir raksturīgi simetriski, bilaterāli bojājumi CNS, kas var atrasties dažādās smadzeņu daļās.

Ģenētiski Lī sindroms ir īpaši heterogēna mitohondriālā slimība. Līdz šim patogēni varianti Lī sindroma pacientiem ir identificēti vairāk nekā 75 gēnos – gan kodola, gan mitohondriju genomā. Vairums šo gēnu kodē oksidatīvās fosforilēšanas (OXPHOS) sistēmas kompleksu subvienības vai agregācijas faktoros.

Šūnā nepārtraukti norisinās mitohondriju un kodola komunikācija. Komunikāciju virzienā no mitohondrijiem uz kodolu sauc par atgriezenisko regulāciju. Mitohondriālo slimību gadījumā atgriezenisko regulāciju var aktivēt dažādi faktori, piemēram, OXPHOS sistēmas disfunkcija un no tās izrietošās izmaiņas mitohondriju fizioloģijā, kuru cēlonis ir izmaiņas mitohondriālajā DNS. Patogēni varianti mitohondriju genomā var ietekmēt kodola gēnu ekspresiju caur mitohondriju atgriezenisko regulāciju.

Maģistra darba mērķis bija noskaidrot divu ar Lī sindromu saistītu mitohondriālās DNS variantu ietekmi uz gēnu ekspresiju. Mērķa sasniegšanai tika izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Veikt transkriptoma profila analīzi divu pacientu transmitohondriālo citoplazmatisko hibrīdu šūnu līnijām, kas satur Lī sindromam raksturīgus mitohondriālās DNS variantus.
2. Pārbaudīt abu patogēno variantu heteroplazmijas stabilitāti.
3. Veikt *digital droplet* PCR apstākļu optimizāciju.
4. Veikt RNS sekvenčēšanas rezultātu validāciju ar *Selfie-digital* PCR metodi.

Maģistra darbs tika izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā laikā no 2020. gada septembra līdz 2022. gada aprīlim. Darbs tika izstrādāts FLPP projekta nr. 2018/1-0180 „Mitohondriālās DNS mutāciju un variantu ar nezināmu efektu raksturošana un analīze, izmantojot transmitohondriālos citoplazmatiskos hibrīdu šūnu modeļus” ietvaros.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Mitohondriju struktūra un funkcijas

Mitohondriji ir augsti specializētas organellas, kas atrodas vairumā eikariotisko šūnu (van der Giezen & Tovar, 2005). Apmēram pirms 1,5 miljardiem gadu mitohondriji attīstījās no brīvi dzīvojošām α -proteobaktērijām. Visticamāk tās endocitozes ceļā uzņēma arheju izcelsmes saimniekšūnas, izveidojot endosimbiozi starp abiem organismiem (Roger et al., 2017).

Mitohondriji ir nelielas organellas, to izmērs var variēt no 0,5 līdz 3 μm (Shami et al., 2021). Mitohondrijiem ir raksturīga daudzveidīga forma atkarībā no šūnu tipa, šūnu cikla fāzes un metaboliskajiem vai šūnas signāliem. Atšķiras gan to vispārējā (platums, garums, apaļums), gan to ultrastruktūras (mitohondriālo membrānu organizācijas) morfoloģija (Giacomello et al., 2020). Atkarībā no šūnas enerģētiskajām vajadzībām mitohondriji var būt atrodami, kā individuālas organellas vai savienojušies veidojot tīklu, kā arī citoplazmā tie var būt izvietoti nevienmērīgi (Collins et al., 2002).

Mitohondrijiem raksturīgā mainība un spēja pielāgoties, kas ietver to morfoloģiju un iekššūnas novietojumu, tiek dēvēta par mitohondriju dinamiku. Divi galvenie mitohondriju dinamikas mehānismi ir mitohondriju dalīšanās (*fission*) un saplūšana (*fusion*) (Chiu et al., 2021). Tiek domāts, ka saplūdušos mitohondrijos ir aktīvāka matriksa komponentu apmaiņa un adenozintrifosfāta (ATF) produkcija ir efektīvāka. Turpretī, reaktīvās skābekļa formas (ROS) vairāk veidojas fragmentētos mitohondrijos. Tomēr fragmentācija ir svarīga, lai nodrošinātu, ka šūnu dalīšanās procesā mitohondriji tiktu vienmērīgi sadalīti starp meitšūnām (Giacomello et al., 2020).

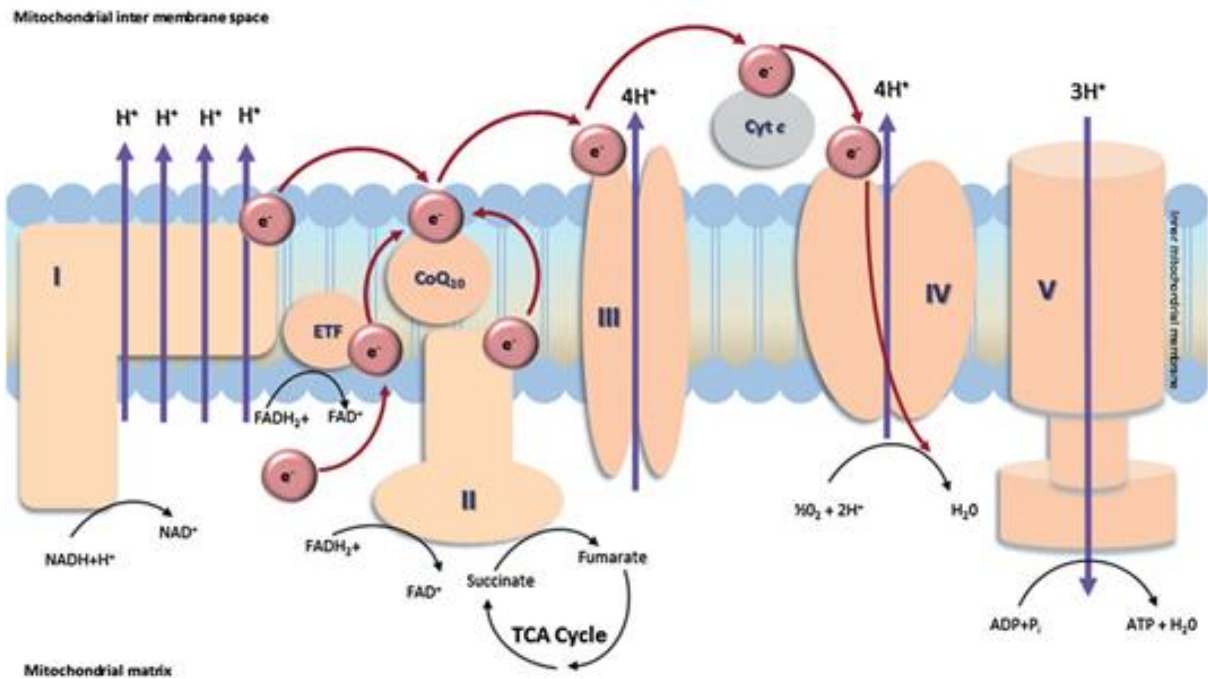
Cilvēkos vienā somatiskajā šūnā mitohondriju skaits var variēt no 200 līdz 2000. Savukārt vienā olšūnā var būt līdz pat 100 000 mitohondriju, bet spermatozoīdi satur aptuveni no 50 līdz 75 mitohondrijiem (Hirata et al., 2002; Pieczenik & Neustadt, 2007). Skeleta un sirds muskuļos, smadzenēs un aknās ir visvairāk mitohondriju, jo to šūnām ir jānodrošina augsta metaboliskā aktivitāte. Nobrieduši eritrocīti ir vienīgās cilvēka šūnas, kuras nesatur mitohondrijus (Cohen & Gold, 2001).

No citoplazmas mitohondriji ir atdalīti ar divām membrānām – ārējo membrānu (~7 nm biezumā) un iekšējo membrānu (~5 nm biezumā) (Shami et al., 2021). Ārējā membrāna ir galvenokārt caurlaidīga, limitējot difūziju molekulām, kas lielākas par ~5000 Da. Tā ir kā platforma, kas nodrošina šūnu signālceļu krustošanos un to pārnesi uz mitohondrijiem. Mitohondriju ārējā membrāna izveido membrānu kontakta vietas ar citiem šūnas nodalījumiem, piemēram, ar endoplazmatisko tīklu, plazmatisko membrānu, peroksisomām, endosomām un

lizosomām (Giacomello et al., 2020). Starp ārējo un iekšējo membrānu atrodas starpmembrānu telpa (Protasoni & Zeviani, 2021). Iekšējā mitohondriju membrāna atdala starpmembrānu telpu no mitohondriju matriksa un veido kristas – dziļas, pleomorfas membrānas ieloces, kas ievijas matriksā (Giacomello et al., 2020). Kristas palielina iekšējās membrānas virsmas laukumu (Shami et al., 2021). Atšķirībā no ārējās membrānas, caur iekšējo brīvi var pārvietoties tikai skābekļa, ogļskābās gāzes un ūdens molekulas. Mitohondriālo membrānu selektivitāte veicina elektroķīmiskā gradienta veidošanos starp tām, kas nepieciešams ATF ražošanai, kā arī cieši regulē dažādu jonu koncentrācijas, piemēram, kalcija, kas izmantots šūnu signālu pārvadīšanā (Protasoni & Zeviani, 2021). Matriksā ir lokalizēta mitohondriālā DNS (mtDNS), kā arī tajā notiek dažādi procesi, piemēram, mtDNS replikācija un transkripcija, mitohondriālo proteīnu biosintēze, Krebsa cikla reakcijas, taukskābju β -oksidācija u.c. (Collins et al., 2002).

ai gan viszināmākā mitohondriju funkcija ir enerģijas ražošana, pēdējās desmitgadēs tie ir kļuvuši pazīstami, arī kā signalizējošas organelas. Svarīga loma mitohondrijiem ir arī citu fizioloģisku funkciju nodrošināšanā, piemēram, apoptozē, kalcija homeostāzē un dzels-sēra klāsteru sintēzē (Kühlbrandt, 2015).

Galvenā šūnai nepieciešamās enerģijas produkcija norisinās mitohondrijos. Lai optimizētu ATF ražošanu, glikolīze ir apvienota ar Krebsa jeb trikarbonskābju ciklu, kas ir aerob process un norisinās mitohondriju matriksā (Protasoni & Zeviani, 2021). Glikolīzes laikā no glikozes tiek veidots piruvāts, kas tiek transportēts uz mitohondriju matriksu un tur pārveidots par acetil-koenzīmu A. Acetil-koenzīms A pēc tam piedalās Krebsa ciklā, un katra pilnā cikla laikā tiek iegūtas trīs nikotīnamīda adenīdinukleotīda (NADH) un viena flavīna adenīdinukleotīda ($FADH_2$) molekulas (Kühlbrandt, 2015). Šīs molekulas var tikt izveidotas arī taukskābju β -oksidācijas procesā, kas norisinās matriksā (Kastaniotis et al., 2017). Turpmāk NADH un $FADH_2$ molekulas var tikt izmantotas oksidatīvajā fosforilēšanā (OXPHOS), kuras laikā tiek iegūts vislielākais daudzums ATF molekulu. OXPHOS sistēmu (1.1.attēls) veido četri elektronu transporta ķēdes (ETC) kompleksi un ATF sintāze jeb komplekss V (CV) (Protasoni & Zeviani, 2021). Kompleksā I (CI) tiek oksidēts NADH, kompleksā II (CII) tiek oksidēts $FADH_2$, kā arī sukcināts tiek oksidēts par fumarātu. Oksidācijas procesa laikā ubihinons uzņem atbrīvotos elektronus un transportē tos uz kompleksu III (CIII). Citohroms c elektronus no CIII pārnes un kompleksu IV (CIV), kurā tos izmanto O_2 reducēšanai par H_2O (Pieczenik & Neustadt, 2007). Elektronu atbrīvotā enerģija kompleksos I, III un IV tiek izmantota protonu transportam no matriksa uz starpmembrānu telpu. Tā rezultātā rodas protonu gradients, veidojot atšķirīgas pH vērtības matriksam (pH 7,9–8) un starpmembrānu telpai (pH 7,2–7,4) (Kühlbrandt, 2015). Ar protonu gradienta palīdzību tiek darbināta ATF sintāze, kas fosforilē adenozīna difosfātu (ADP) par ATF (Pieczenik & Neustadt, 2007).



1.1 attēls. Oksidatīvās fosforilēšanas sistēma mitohondrijos (Kanabus et al., 2014).

Figure 1.1 .Oxidative phosphorylation system in the mitochondria (Kanabus et al., 2014).

Mitohondriji patērē lielāko daļu skābekļa, kas šūnā tiek izmantots ATF produkcijai, un normālas OXPHOS sistēmas darbības laikā aptuveni 0,2–2% izmantotā skābekļa tiek pārvērsti reaktīvajās skābekļa formās (ROS), piemēram, superoksīda radikālī, ūdeņraža peroksīdā u.c. Tiek uzskatīts, ka vairums ROS veidojas ETC kompleksos I un III, elektroniem atbrīvojoties no NADH un FADH (Harper et al., 2004). Ja superoksīda dismutāzes nav spējīgas gana ātri ROS pārveidot par ūdeni, rodas oksidatīvie traucējumi un ROS uzkrājas mitohondrijos. ROS var radīt bojājumus mtDNS, ETC enzīmiem, proteīniem, lipīdiem (Pieczenik & Neustadt, 2007).

Svarīga loma mitohondrijiem ir arī apoptozes regulācijā. Apoptozes ceļš šūnā var būt ārējs jeb nāves receptoru vai iekšējs jeb mitohondriju apoptozes ceļš. Iekšēji stresa signāli vai bojājumi var iniciēt mitohondriālo apoptozi, kā rezultātā tiek aktivēts BH3, kas inhibē anti-apoptotiskos BCL-2 proteīnus (Tait & Green, 2013). Sekojoši tiek aktivēti BAX un BAK proteīni, kas noved pie mitohondriju ārējās membrānas permeabilizācijas un no starpmembrānu telpas izklūst proteīni, kas var aktivēt kaspāzes. To proteīnu skaitā ir citohroms c, kas saistoties ar APAF1 faktoru un kaspāzi 9 izveido apoptosomu. Tālāk tiek aktivēta kaspāze 3 un uzsākts šūnas nāves izpildes ceļš, kā rezultātā degradējas kodola un citoskeleta proteīni, fragmentējas DNS un izveidojas apoptotiskie ķermeņi (Bock & Tait, 2020).

proteīni, kurus kodē kodola gēni un kuri tiek pēc tam importēti mitohondrijos (Calvo et al., 2016).

Starp mitohondriālajiem gēniem nav intronu, nekodējošās sekvences starp gēniem ir tikai pāris bāzu pāru (bp) garumā vai to vispār nav. Daži gēni daļēji pārklājas viens ar otru, piemēram, *MT-ND4L/4* un *MT-ATP8/6*. Lai gan starp gēniem nav nekodējošo reģionu, izņēmums mtDNS ir 1,1 kb garais kontroles reģions jeb D-cilpa (Chinnery & Hudson, 2013). D-cilpa satur L- un H-pavedienu transkripcijas promoterus, H-pavediena replikācijas sākuma vietu un divus hipervariablus rajonus (HV1 un HV2) (Tuppen et al., 2010).

Atkarībā no audu enerģijas patēriņa vajadzībām, katrā organisma šūnā atrodas aptuveni no 100 līdz 10 000 mtDNS kopijām (Patenanan et al., 2016). Mitohondrijos DNS kopiju skaits tiek stingri regulēts un dažādos audos tas var laika gaitā mainīties (Wallace, 2010). Atšķirībā no kodola DNS (nDNS), mtDNS nepasargā histoni, taču tā ir sakārtota nukleoproteīnu struktūrās, kuras sauc par nukleoīdiem (Sharma et al., 2019). Nukleoīdos mtDNS molekulas ir saistītas kopā ar mitohondriju vienpavediena DNS saistošo proteīnu (mtSSB), mitohondriālajiem transkripcijas faktoriem A un B (mtTFA un mtTFB), DNS polimerāzi γ (POLG) un mitohondriālo RNS polimerāzi (POLRMT). Katrā nukleoīdā var būt 6 – 10 mtDNS kopijas un tie parasti ir saistīti pie iekšējās membrānas (Kukat et al., 2015). Viena šūna var saturēt aptuveni 1000 nukleoīdu (Kühlbrandt, 2015).

Mitohondriālās replisomas sastāvā ir mitohondriālā DNS helikāze TWINKLE, POLG, mtSSB un POLRMT. Zīdītāju šūnās mtDNS ķēžu replikācija norisinās asinhroni, izmantojot pavedienu pārvietošanas (*strand-displacement*) mehānismu. Abu pavedienu sintēze turpinās nepārtraukti un netiek izveidoti Okazaki fragmentiem līdzīgi replikācijas produkti (Peter & Falkenberg, 2020). mtDNS replikācija sākas no H-pavediena replikācijas sākumu vietas (O_H), kas atrodas D-cilpā. Pa H-pavedienu pārvietojas POLG un TWINKLE, kas atšķetina abus DNS pavedienus, tikmēr mtSSB saistās pie brīvā H-pavediena to pasargājot, lai POLRMT neizveidotu nespecifiskus fragmentus. Pēc apmēram 11 kb replisoma ir sasniegusi L-pavedienu replikācijas sākumu vietu (O_L). Šajā mirklī sākotnējais H-pavediens izveido stumbra-cilpas (*stem-loop*) struktūru. Cilpas reģions satur vairākus dT-atlikumus, no kuriem POLRMT sāks praimera sintēzi. Praimera sintēze pēc iniciācijas turpinās aptuveni 25 nukleotīdus (nt), kad POLRMT tiek aizstāta ar POLG, un sākas L-pavediena sintēze. Katra pavediena sintēze beidzas, kad atkal ir sasniegti attiecīgie replikācijas sākuma punkti (Falkenberg & Gustafsson, 2020; Peter & Falkenberg, 2020). Vēl nesen tika domāts, ka par mtDNS replikāciju un labošanu ir atbildīga tikai POLG. Tomēr ir vismaz četras citas DNS polimerāzes, kuras piedalās mtDNS uzturēšanā: DNS polimerāze beta, polimerāze teta, polimerāze zeta un PrimPol (Krasich & Copleand, 2017).

Transkripcijas kompleksu mitohondrijos veido POLRMT, mtTFA un mtTFB, aktivators (TFB2M), elongācijas faktors (TEFM) un mitohondriālais transkripcijas terminācijas faktors (MTERF1) (Bouda et al., 2019). Ir trīs mitohondriālie transkripcijas promoteri, no kuriem tiek sākta katra pavediena transkripcija – divi H-pavediena transkripcijas promoteri (HSP1 un HSP2) un L-pavediena transkripcijas promoters (LSP). No HSP2 un LSP tiek radīti policistroniski transkripti teju visa mitohondriālā genoma garumā, kas tiek apstrādāti, lai iegūtu individuālas tRNS un mRNS molekulas. Savukārt transkripti no HSP1 producē tikai divas tRNS, mt-tRNS^{Phe} un mt-tRNS^{Val}, un divas rRNS - 12S un 16S (Falkenberg et al., 2007). mtTFA un mtTFB ir nepieciešams piesaistīties pie specifiskām sekvencēm pirms HSP1, HSP2 un LSP, lai POLRMT varētu uzsākt transkripcijas procesu (Bouda et al., 2019).

Visu 13 mitohondriju kodēto proteīnu translācija norisinās mitohondriju ribosomās jeb mitoribosomās. To proteīnus daļēji kodē mtDNS (*MT-RNR1*, *MT-RNR2*), taču mitoribosomām ir nepieciešams vēl 81 kodola kodēts proteīns. Mitoribosomu veido mazā 28S (mtSSU) un lielā 39S (mtLSU) subvienība (D'souza & Minczuk, 2018). Proteīnu sintēzes procesu veido trīs daļas: iniciācija, elongācija un terminācija. Lai translācija tiktu uzsākta ir nepieciešami divi mitohondriālie iniciācijas faktori, mtIF1 un mtIF3. Iniciācija sākas ar mtIF3 atdalīšanos no mitoribosomas, lai varētu izveidoties iniciācijas komplekss. Sekojoši mRNS tiek saistīts ar mtSSU, starta kodonam atrodoties mitoribosomas peptidil pozīcijā (Smits et al., 2010). Vairāki elongācijas faktori kontrolē peptīdu pagarināšanos, piemēram, mitohondriālie elongācijas faktori Tu, Ts un G1 (mtEFTu, mtEFTs, mtEFG1). Tie saista tRNS ar mitoribosomu, lai pievienotu aminoskābes un ļautu iepriekš pievienotajām pārvietoties pa vienu pozīciju uz priekšu. Translācijas termināciju veic mitohondriālais atbrīvošanas faktors 1a (mtRF1a), kura uzdevums ir atpazīt terminācijas kodonus un topošais peptīds tiktu atbrīvots no gala tRNS (D'souza & Minczuk, 2018).

Starp universālo un mitohondriju ģenētisko kodu pastāv vairākas atšķirības. Mitohondrijos ir četri terminācijas kodoni, UAG, UAA, AGG un AGA, taču pēc universālā koda AGA un AGG kodē arginīnu. UGA universāli ir terminācijas kodons, bet mitohondrijos tas kodē triptofānu, un AUA kodē nevis izoleicīnu, bet gan metionīnu (Rooijers et al., 2013).

mtDNS ir vairāk pakļauta oksidatīvajiem bojājumiem, ņemot vērā tās tuvumu iekšējai membrānai, kur atrodas OXPHOS sistēma. Mitohondrijos pastāv DNS labošanas mehānismi, tomēr tie nav tik robusti un nesatur visas sastāvdaļas, kas atrodamas nDNS labošanas mehānismos (Sharma et al., 2019). Parasti maza izmēra bojājumus, piemēram, oksidētas un alkilētas DNS bāzes, mitohondrijos izlabo bāzu izgriešanas labošanas (BER, *base excision repair*) mehānisms. Mitohondrijos ir sastopamas septiņas no vienpadsmit glikozilāzēm, kas

veic BER. Arī DNS polimerāze beta ir spējīga veikt mtDNS labošanu. Tomēr proteīni, kas kodolā veic neatbilstošu bāzu labošanu, nav atrasti mitohondrijos (Prakash & Doublie, 2015).

1.3. Mitohondriālās DNS varianti

mtDNS labošanas mehānismi ir pielāgoti ROS radītajiem oksidatīvajiem bojājumiem un tam, ka tā ir organizēta nukleoīdos. Par spīti tam, mutācijas mitohondriju genomā ir sastopamas 10-17 reizes biežāk nekā kodola genomā (Chinnery & Hudson, 2013; Tuppen et al., 2010).

Izmaiņas mitohondriju genomā var iedalīt punktveida variantos vai liela izmēra delēcijās. Punktveida variantus tālāk var sadalīt viena nukleotīda polimorfismos (tranzīcijās un transversijās), insercijās un delēcijās (Wallace, 2010). Oksidatīvie bojājumi var izraisīt bāzu modifikācijas, cukura atlikumu bojājumus un DNS pavedienu pārrāvumus. Vieni no sastopamākajiem bāzu bojājumiem ir 7,8-dihidroksi-8-okso-20-dezoksiguanozīns (8-okso-dG) un timīna glikoli. Piemēram, 8-okso-dG dēļ POLG nepareizi ievieto adenīna bāzi pretī oksidētajam guanīnam, kā rezultātā pēc nākamās replikācijas rodas G>T un C>A transversijas (Prakash & Doublie, 2015). Savukārt, tranzīcijas G>A un C>T parasti ir sekas kļūdainai POLG darbībai replikācijas laikā vai arī, kad citozīns spontāni deaminējas par uracilu un nepareizi sapārojas ar adenīnu, izveidojot G>A tranzīciju (Zheng et al., 2006). Parasti punktveida varianti ir novērojami tRNS un rRNS gēnos, un tiek pārmantoti, taču tie var būt arī radušies *de novo* (Wallace, 2010). Punktveida delēcijas nereti sporādiski parādās agrā attīstības stadijā, un būs sastopamas visās skarto audu šūnās (Schon et al., 2012). Liela izmēra delēcijas var aptvert vairākus gēnus, variējot izmērā no 1 līdz 8 kb. Tās visbiežāk ir spontāni radušās un netiek nodotas nākamajām paaudzēm. Ja skartajos audos ir vairākas dažāda garuma delēcijas, to cēlonis var būt pārmantotas mutācijas nDNS gēnos, kas atbild par mtDNS uzturēšanu un replikāciju (Falkenberg & Gustafsson, 2020). Vairums delēciju atrodas starp O_H un O_L, un var rasties gan mtDNS replikācijas, gan labošanas procesā (Tuppen et al., 2010).

mtDNS varianti var būt neitrāli, patogēni vai adaptīvi. Neitrāli varianti mitohondriju genomā tiek uzkrāti spontāni un neizmaina tā funkciju. Patogēni varianti noved pie mitohondriju funkciju traucējumiem un var izraisīt mitohondriālās sasilšanas. Adaptīvi varianti var potenciāli mainīt mtDNS kodētos produktus, tomēr šīs izmaiņas konkrētajos apstākļos ir labvēlīgas (Lawless et al., 2020). Varianti var potenciāli būt patogēni, ja bāzu nomaiņa atrodas funkcionāli svarīgā mtDNS rajonā. Piemēram, izmaiņas proteīnus kodējošajos gēnos var nelabvēlīgi ietekmēt kāda OXPHOS sistēmas kompleksa darbību. Patogēni varianti mitohondriālās tRNS gēnos var ietekmēt translācijas procesu, samazinot normāli funkcionējošu

tRNS pieejamību mitohondrijos (Tuppen et al., 2010). Visssmagāk patogēni mtDNS varianti ietekmē tieši orgānus un audus, kuriem ir īpaši nepieciešama efektīva ATF produkcija, piemēram, muskuļus un nervus (Ylikallio & Soumalainen, 2012).

Ja visas šūnā esošās mtDNS molekulas ir ģenētiski identiskas, tā ir homoplazmija. Turpretī, ja šūnā ir gan normālas (*wild type*), gan mutantas mtDNS molekulas, tā ir heteroplazmija. Parasti mitohondriālās saslīmšanas gadījumā mtDNS molekulas ir heteroplazmiskā stāvoklī (Gomes et al., 2021). Heteroplazmijas līmenis var būt atšķirīgs vienu audu dažādās šūnās, starp dažādiem audiem, kā arī starp vienas ģimenes dažādiem indivīdiem. Klīnisko simptomu parādīšanos heteroplazmijas gadījumā nosaka normālo un mutanto mtDNS molekulu attiecība (Sharma et al., 2019). Lai būtu novērojams bioķīmiskais defekts un patogēnā varianta efekts izpaustos fenotipiski, šūnās mutantajām mtDNS molekulām ir jāsasniedz noteikts līmenis, ko sauc par sliekšņa līmeni, kas tipiski variē no 60% līdz 90% (Tuppen et al., 2010). Ja heteroplazmijas gadījumā ir sasniegts sliekšņa līmenis, tas nozīmē, ka mutantās molekulas ir klonāli izplatījušās un normālās mtDNS molekulas vairs nav spējīgas kompensēt mutanto molekulu nodarītos bojājumus (Alston et al., 2017). Homoplazmiski patogēni punktveida varianti mtDNS, kas skar tikai vienu orgānu vai vienu audu tipu, parasti izraisa salīdzinoši vieglu bioķīmisku defektu. Tie var skart arī vairākus vai visus audus, taču tādā gadījumā iznākums bieži ir letāls (Stewart & Chinnery, 2015). Heteroplazmiski punktveida varianti visbiežāk skar vairākas orgānu sistēmas, piemēram, perifēro nervu sistēmu, muskuļus, sirdi un endokrīnos orgānus. Tas, kādā mērā orgāni tiek ietekmēti, ir saistīts ar heteroplazmijas līmeni (DiMauro et al., 2013).

Mitohondrijiem ir raksturīga mitotiskā segregācija. Šūnu dalīšanās procesā mtDNS molekulas tiek nejauši sadalītas pa meitsūnām, kā rezultātā meitsūnās mainās normālo un mutanto mtDNS molekulu attiecība un līdz ar to mainās arī fenotips. Līdz ar to pacientiem, kuru slimības pamatā ir traucētas mitohondriju funkcijas, slimības fenotipiskās izpausmes var laika gaitā pastiprināties (Tuppen et al., 2010).

Vairākums izmaiņu mitohondriju genomā ir neitrālas. Plaši izplatīti, iedzimti mtDNS varianti ir izveidojuši noturīgas populāciju apakšgrupas, kuras dēvē par haplogrupām. Katrai haplogrupai ir raksturīgi kopīgi polimorfismi, kas laika gaitā uzkrājušies un izplatījušies, senajiem cilvēkiem migrējot uz ziemeļiem (Torroni et al., 2006). Pirmās haplogrupas L0, L1, L2 un L3 izveidojās Āfrikā apmēram 150000 – 200000 gadus p.m.ē. No L3 izveidojās M un N haplogrupas, kuras vienīgās izplatījās uz citām pasaules daļām. No N izveidojās haplogrupas I, W un X, kas raksturīgas Eiropas centrālajai un dienvidu daļai, bet no N atzarojoties R haplogrupai, izveidojās Ziemeļeiropai raksturīgās H, U, K, J un T haplogrupas. Savukārt, no N haplogrupas Āzijā izveidojās C, D un G, bet no M atzarojās A, B un F haplogrupas. A, C un D

haplogrupas bija sastopamas Sibīrijas ziemeļaustrumos, un vēlāk kopā ar B haplogrupu izplatījās pa Ziemeļameriku, Centrālameriku un Dienvidameriku (Wallace, 2005).

1.4. Mitohondriālās slimības

Mitohondriālās slimības ir klīniski heterogēnu primāro mitohondriālo traucējumu grupa, kas vissmagāk skar audus un orgānus ar augstu enerģijas patēriņu. Klīniskie simptomi var skart tikai vienu orgānu, gan arī būt multisistēmiski, tie var parādīties gan agrā bērnībā, gan vēlāk dzīvē (Alston et al., 2017). Dati par mitohondriālo slimību izplatību atšķiras. Izplatība starp pieaugušiem cilvēkiem ir aptuveni no 12 līdz 23 gadījumiem uz 100000 cilvēku (Gorman et al., 2015). Tiek domāts, ka vidējā izplatība starp bērniem ir aptuveni no 5 līdz 14 gadījumiem uz 100000 bērnu (Schaefer et al., 2019; Skladal et al., 2003).

Līdz šim ir identificēti vairāk nekā 300 gēni, kas ir saistīti ar mitohondriālajām slimībām: 36 mtDNS gēni un 295 nDNS gēni (Thompson et al., 2020). Lielākā daļa no šiem gēniem ir tieši iesaistīti specifiski OXPHOS sistēmas bioģenēzē, pārējie to ietekmē netieši vai ir iesaistīti citās šūnas funkcijās (Frazier et al., 2019). Mitohondriju genomā identificēti vairāk nekā 300 patogēnu variantu (McCormick et al., 2018).

Ar mitohondriālajām slimībām saistīti nDNS varianti var tikt pārmantoti pēc jebkura Mendēļa likuma - autosomāli recesīvi, autosomāli dominanti vai ar X hromosomu saistītie. Patogēni, slimību izraisoši varianti mtDNS tiek mantoti tikai pa mātes līniju, jo tikai olšūnas mitohondriji nonāk embrijā. Gan mantoti, gan *de novo* varianti var rezultēties saslimšanā (McCormick et al., 2018).

1.5. Lī sindroms

Lī sindroms (*Leigh syndrome*) ir reta iedzimta progresējoša neurodeģeneratīva slimība. Pirmo reizi to kā subakūtu nekrotizējošu encefalomielopātiju aprakstīja britu neiropatologs Deniss Arčibalds Lī (*Denis Archibald Leigh*), veicot pēcnāves izmeklējumus septiņus mēnešus vecam zēnam, kuram bija tādi progresējoši neiroloģiski simptomi, kā attīstības regresija, bulbārā paralīze, ekstremitāšu spasticitāte un miegainība (Leigh, 1951; Schubert & Vilarinho, 2020).

Lī sindroms ir visizplatītākā bērniem sastopamā mitohondriālā slimība. Tiek lēsts, ka tas skar aptuveni 1 no 40000 dzīvi dzimušiem zīdaiņiem (Baertling et al., 2014). Augstāka

sastopamība, līdz pat 1 no 2000, ir novērojama Farēru salās un izolētā populācijā Kvebekas apkārtnē ciltstēva variantu dēļ (Carrozzo et al., 2007).

Pirmie simptomi tipiski sāk parādīties vecumā no 3 līdz 12 mēnešiem. Nereti simptomi sāk izpausties pēc akūtas vīrusa infekcijas, bet sindroms var būt iestājies jau prenatāli (Sofou et al., 2014). Par vēlīnu Lī sindroma sākumu uzskata pirmo simptomu parādīšanos ne tikai pieaugušā vecumā, bet arī vēlāk bērnībā (pēc 1-2 gadu vecuma) un pusaudžu gados, jo apmēram 80% pacientu Lī sindroms tiek konstatēts līdz 2 gadu vecumam. Tā kā šis sindroms vairumā gadījumu fenotipiski ir novērojams zīdaiņiem un maziem bērniem, tas var radīt grūtības diagnozes uzstādīšanā vecākiem bērniem, pusaudžiem un pieaugušajiem, kurus slimība nav skārusi pirmajos dzīves mēnešos vai gados. Taču tikai maza daļa Lī sindroma pacientu sasniedz vecumu virs desmit gadiem (Finsterer, 2008).

Klīniski Lī sindroms var izpausties atšķirīgi atkarībā no vecuma, kurā sāk parādīties simptomi. Visbiežāk sastopamā prenatālā anomālija ir intrauterīna augšanas aizkavēšanās, bērnam piedzimstot mazākam nekā sagaidāms attiecīgajā grūtniecības nedēļā. Neuroloģiskie simptomi var būt mikrocefālija, intrakraniālas cistas, baltās vielas anomālijas, kontraktūras un palielināti sirds kambari (Sofou et al., 2014). Vairums prenatālo pazīmju nav specifiskas un tās var izraisīt arī citas monogēnas, neuroloģiskas slimības, aneiploīdijas un augļa infekcijas (Baertling et al., 2014).

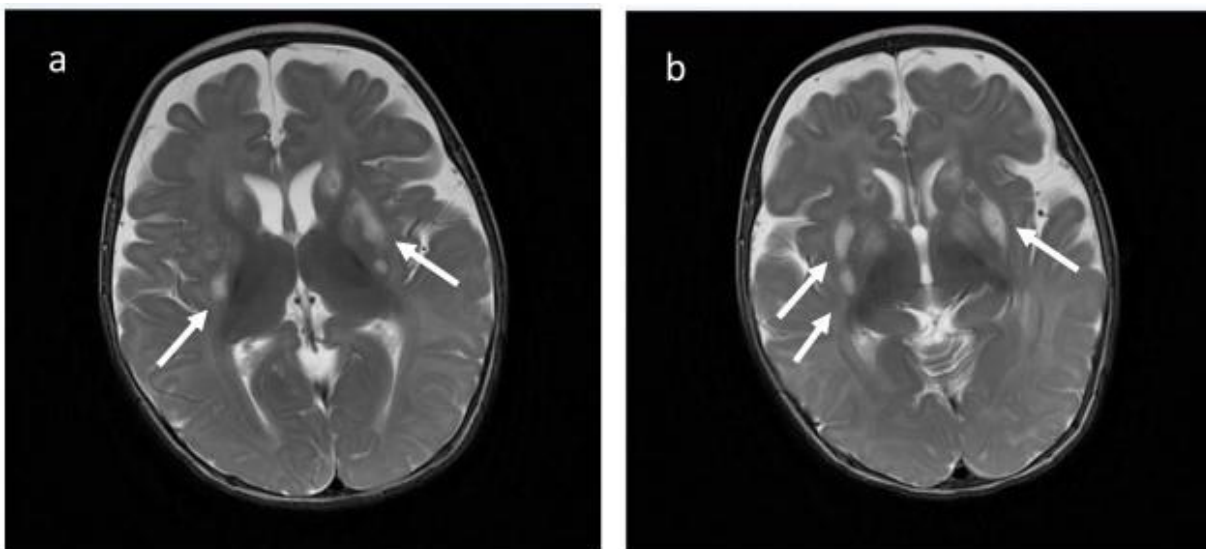
Lī sindroma gadījumā galvenokārt tiek skarta centrālā nervu sistēma (CNS). Neuroloģiskie simptomi klīniski var izpausties, kā hipotonija, psihomotorās attīstības aizture vai regresija, distonija, spasticitāte, lēkmes, kustību traucējumi, ataksija, galvaskausa nervu paralīze, dzirdes zudums. Ja tiek skarts smadzeņu stumbrs, var rasties elpošanas problēmas (hipo- vai hiperventilācija, neregulāra elpošana, apnoja), apgrūtināta rīšana un termoregulācijas traucējumi (hipo- vai hipertermija) (Baertling et al., 2014; Sofou et al., 2014). Lī sindroma pacientiem var būt novērojamas arī ne neuroloģiskas manifestācijas, piemēram, sirdsdarbības traucējumi (hipertrofiska kardiomiopātija, aritmija), kuņģa-zarnu trakta (vemšana, disfāģija, gastrīts), hepatoloģiski (aknu mazspēja, strukturālas anomālijas) un nieru darbības traucējumi (tubulopātija), anēmija (Gerards et al., 2016).

Tipiski Lī sindroms sāk izpausties zīdaiņa vecumā, taču var tikt novērotas nespēciskas pazīmes, piemēram, nespēja attīstīties un attīstības aizkavēšanās, hipotonija, pastāvīga vemšana (Ruhoy & Saneto, 2014). Lī sindromam ir raksturīgi akūti neuroloģiski un nereti sistēmiski traucējumi, zināmi kā “dekompensācija”, kas ir saistīti ar psihomotorās attīstības traucējumiem, atpalcību vai regresu. Dekompensācija mēdz būt novērojama pēc infekcijas slimības. Pēc tās var sekot daļēja atlabšana, taču pilnīga atgriešanās iepriekšējā attīstības stāvoklī ir reti sastopama. Vairumam pacientu stāvoklis pakāpeniski pasliktinās, kā laikā var būt dažī stabili

periodi (Gerards et al., 2016). Līdzīgas pazīmes, kā agrīnam Lī sindromam, ir novērojamas arī, kad tas sāk izpausties divu vai trīs gadu vecumā. Maziem bērniem rodas grūtības staigāt, novērojama arī distonija un disartrijs (Finsterer, 2008).

Vecākiem Lī sindroma pacientiem ir novērojamas tādas klīniskās pazīmes kā disartrijs, ataksija, spasticitāte un patoloģiski redzes traucējumi. Lai gan simptomi pieaugušajiem mēdz būt netipiski, reizēm pat bez neiroloģiskiem traucējumiem, lielākajā daļā gadījumu galvenās izpausmes ietilpst Lī sindroma spektrā (McKelvie et al., 2012).

Diagnostikai tiek izmantotas attēlveidošanas metodes, lai novērtētu bojājumus CNS (Saneto et al., 2008). Veicot magnētiskās rezonanses (MR) tomogrāfiju, ir iespējams noteikt Lī sindromam raksturīgos simetriskos, bilaterālos bojājumus (1.3. attēls), kas var atrasties dažādās smadzeņu daļās, piemēram, bazālajos ganglijos, talāmā, smadzeņu stumbrā, *corpus nigra*, sarkanajos kodolos, smadzeņu baltajā vielā un garozā, muguras smadzenēs (Bonfante et al., 2016). Bazālie gangliji tipiski tiek ietekmēti pirms smadzeņu stumbra (Alves et al., 2020). Ar MR spektroskopijas palīdzību ir iespējams izmērīt laktāta koncentrācijas izmaiņas. Lī sindroma gadījumā bojātajās smadzeņu daļās ir iespējams novērot paaugstinātu laktāta koncentrāciju. Tomēr dažiem pacientiem laktāta koncentrācijas paaugstinājums ir ticis konstatēts arī normāla izskata pelēkajā un baltajā vielā (Sijens et al., 2008).



1.3.attēls. Smadzeņu MR attēli (*axial T2-weighted acquisition* (a, b)), kas parāda Lī sindromam raksturīgus bilaterālus bojājumus (baltās bultas) bazālajos ganglijos (Schubert & Vilarinho, 2020).

Figure 1.3. MRI images (*axial T2-weighted acquisition* (a, b)) of the brain showing bilateral lesions (white arrows) in the basal ganglia characteristic of Leigh syndrome (Schubert & Vilarinho, 2020).

Smadzeņu bojājumu veidošanos var ietekmēt dažādi faktori, kuru cēlonis ir OXPHOS sistēmas darbības traucējumi un kam seko ATF sintēzes samazināšanās. Šūnām ar augstu enerģijas pieprasījumu, piemēram, pelēkās vielas neironos, tas izraisa stresa stāvokli (Baertling et al., 2016). Neironu disfunkcija veicina glikozes procesu un laika gaitā notiek neiro-pila vakuolizācija, ko veicina arī lokālas pH izmaiņas pārmērīgas laktāta produkcijas rezultātā. Papildus tam neironu bojājumu veidošanos arvien vairāk izraisa asinsvadu hipertrofija un ROS produkcija (Lake et al., 2015). Smadzeņu bojājumi var laika gaitā mainīties un attīstīties (Baertling et al., 2016).

Ģenētiski Lī sindroms ir īpaši heterogēna mitohondriālā slimība. Līdz šim patogēni varianti Lī sindroma pacientiem ir identificēti vairāk nekā 75 gēnos - gan kodola, gan mitohondriju genomā (1.4. attēls). Vairums šo gēnu kodē kādu no OXPHOS sistēmas kompleksu subvienībām vai proteīnus, kas nepieciešami, lai nodrošinātu subvienību agregāciju, aktivitāti un stabilitāti (Lake et al., 2016). Izmaiņas šajos gēnos rezultējas viena vai vairāku OXPHOS sistēmas enzīmu deficītā vai samazina to aktivitāti. Izjaukts piruvāta metabolisms un koenzīma Q deficīts arī ir saistīti ar Lī sindromu (Schubert & Vilarinho, 2020).

Lī sindroma iedzimšana ir atkarīga no genoma, kurā notikusi mutācija. Tas tiek iedzimts autosomāli recesīvi, ja izmaiņa bijusi nDNS, bet mantots pa mātes līniju, ja – mtDNS. Lielākajai daļai pacientu Lī sindroms ir patogēnu izmaiņu nDNS dēļ, taču aptuveni 25% pacientu tā cēlonis ir mutācija mtDNS (Ruhoy & Saneto, 2014).

Visbiežāk Lī sindromu izraisa CIV jeb citohroma c oksidāzes (COX) darbības traucējumi (Gerards et al., 2016). Līdz pat 75% pacientu ar CIV deficītu ir patogēnie varianti kodola gēnā *SURF1*, kurš kodē COX agregācijas faktoru (*assembly factor*). Rezultātā veidojas pārāk īss, nefunkcionāls SURF1 proteīns un tiek samazināta CIV izveidošana (Wedatilake et al., 2013).

Otrs biežākais Lī sindroma cēlonis ir CI deficīts, sastopams aptuveni no 35% līdz 50% pacientu. Patogēni varianti ir atrasti CI subvienību kodējošos mtDNS gēnos *MT-ND1*, *MT-ND2*, *MT-ND3*, *MT-ND4*, *MT-ND5* un *MT-ND6*, un 13 nDNS gēnos, tai skaitā sešos no septiņiem centrālo subvienību kodējošiem gēniem, un agregācijas faktoru kodējošos gēnos *NDUFAF2*, *NDUFAF5*, *NDUFAF6* un *FOXRED1* (Koene et al., 2012). Lielākoties patogēni varianti šajos gēnos izraisa CI aktivitātes samazināšanos, jo izveidotie CI ir nepietiekami funkcionāli vai nefunkcionāli, neietekmējot citu kompleksu aktivitāti (Bakare et al., 2021).

CII deficīts ir salīdzinoši rets Lī sindroma cēlonis (Schubert & Vilarinho, 2020). Ar Lī sindromu tiek saistīti patogēni varianti divos kodola gēnos - *SDHA*, kas kodē CII subvienību, un *SDHAF1*, kas kodē CII agregācijas faktoru (Ohlenbusch et al., 2012).

Biochemical Deficiency	Genes
Pyruvate dehydrogenase	<i>PDHA1</i> ^a , <i>PDHB</i> , <i>PDHX</i> , <i>DLAT</i> , <i>DLD</i> , <i>LIPT1</i> , <i>LIAS</i> , <i>TPK1</i> , <i>SLC19A3</i> , <i>SLC25A19</i>
Complex I	<i>MTND1</i> ^b , <i>MTND2</i> ^b , <i>MTND3</i> ^b , <i>MTND4</i> ^b , <i>MTND5</i> ^b , <i>MTND6</i> ^b , <i>NDUFV1</i> , <i>NDUFV2</i> , <i>NDUFS1</i> , <i>NDUFS2</i> , <i>NDUFS3</i> , <i>NDUFS4</i> , <i>NDUFS7</i> , <i>NDUFS8</i> , <i>NDUFA1</i> ^a , <i>NDUFA2</i> , <i>NDUFA9</i> , <i>NDUFA10</i> , <i>NDUFA12</i> , <i>NDUFAF2</i> , <i>NDUFAF5</i> , <i>NDUFAF6</i> , <i>FOXRED1</i>
Complex II	<i>SDHA</i> , <i>SDHAF1</i>
Coenzyme Q ₁₀	<i>PDSS2</i>
Complex III	<i>UQCRCQ</i> , <i>BCS1L</i> , <i>TTC19</i>
Complex IV	<i>MTCO3</i> ^b , <i>NDUFA4</i> , <i>SURF1</i> , <i>COX10</i> , <i>COX15</i> , <i>SCO2</i> , <i>PET100</i> , <i>LRPPRC</i> , <i>TACO1</i> , <i>ETHE1</i>
Complex V	<i>MTATP6</i> ^b
Combined OXPHOS defects—pathway affected	
Mitochondrial DNA maintenance	<i>FBXL4</i> , <i>POLG</i> , <i>SUCLA2</i> , <i>SUCLG1</i>
Mitochondrial translation	Δ mtDNA ^c , <i>MTTI</i> ^b , <i>MTTK</i> ^b , <i>MTTL1</i> ^b , <i>MTTV</i> ^b , <i>MTTW</i> ^b , <i>MTFMT</i> , <i>GTPBP3</i> , <i>TRMU</i> , <i>EARS2</i> , <i>FARS2</i> , <i>IARS2</i> , <i>NARS2</i> , <i>GFM1</i> , <i>GFM2</i> , <i>TSFM</i> , <i>C12orf65</i> , <i>PNPT1</i>
Disease genes that cause secondary impairment of mitochondrial energy generation	
OXPHOS \pm PDHc	<i>HIBCH</i> , <i>ECHS1</i> , <i>SERAC1</i> , <i>AIFM1</i> ^a
Biotinidase	<i>BTBD</i>

Except as indicated, all genes are associated with autosomal recessive inheritance. Supplementary Table contains additional information on the role of each gene product.

^aX-linked inheritance.

^bMaternal inheritance.

^cSporadic inheritance.

OXPHOS = oxidative phosphorylation; PDHc = pyruvate dehydrogenase complex; Δ mtDNA = mtDNA deletion.

1.4. attēls. Gēni, kuros varianti izraisa Lī sindromu vai Lī līdzīgo sindromu (Lake et al., 2016).
Figure 1.4. Genes in which variants cause Leigh syndrome or Leigh-like syndrome (Lake et al., 2016).

Lai gan reti sastopams, arī CIII deficīts ir aprakstīts, kā Lī sindroma cēlonis. CIII deficītu var izraisīt patogēni varianti divos nDNS gēnos, kuri kodē šī kompleksa agregācijas faktorus: *BCS1L* un *TTC19*. Rezultātā neveidojas funkcionāls CIII, jo nav funkcionāli atbilstošie agregācijas faktori (Ghezzi et al., 2011; Morán et al., 2010).

Patogēni varianti, kas izraisa Lī sindromu un rada CV jeb ATF sintāzes darbības traucējumus, atrodas mtDNS gēnā *MT-ATP6*, kas kodē ATF sintāzes F0 subvienību (Ganetzky et al., 2019). Izmaiņas šajā gēnā ir biežākais cēlonis pa mātes līniju mantotajam Lī sindromam un sastopams aptuveni 5-10% pacientu (Ruhoy & Saneto, 2014).

Lī sindroma pacientiem ir konstatēti arī patogēni varianti gēnos, kas atbild par mtDNS replikāciju vai translāciju. Šādi varianti var izraisīt mtDNS deplēciju vai traucēt translācijas procesu, kas rezultātā var radīt kombinētu OXPHOS sistēmas deficītu (Lake et al., 2016). Galvenokārt ar mtDNS deplēciju saistīta Lī sindroma cēloņi ir patogēni varianti gēnos *SUCLA2*

vai *SUCLG1*, kuri kodē subvienības sukcinil-koenzīma A (sukcinil-CoA) sintāzei, kas Krebsa ciklā sukcinil-CoA pārveido par sukcinātu. Samazināta sukcinil-CoA sintāzes aktivitāte traucē tai mijiedarboties ar nukleozīdu difosfātu kināzi, kas regulē nukleotīdu pieejamību mitohondrijos, tādējādi veicinot mtDNS deplēciju (Elpeleg et al., 2005).

1.6. Mitohondriju atgriezeniskā regulācija

Lielākā daļa mitohondrijiem nepieciešamo proteīnu ir kodēti kodola genomā un importēti mitohondrijos, tāpēc mitohondriju funkcija ir tieši atkarīga no kodola gēnu transkripcijas. Tādēļ šūnā nepārtraukti norisinās mitohondriju un kodola komunikācija. Komunikāciju virzienā no kodola un mitohondrijiem dēvē par tiešo jeb anterogrado regulāciju. Savukārt, komunikāciju virzienā no mitohondrijiem uz kodolu sauc par atgriezenisko jeb retrogrado regulāciju (English et al., 2020).

Tiešo signālu pārvadīšana ir nepieciešama, lai atbilstoši regulētu mitohondriju bioenerģētiku un uzturētu funkcionālu mitohondriju populāciju (Quirós et al., 2016). Šie molekulārie signālceļi spēj pielāgot mitohondriju skaitu, aktivitāti un morfoloģiju un ir iesaistīti tādos procesos kā mitohondriju bioģenēze, saplūšana un dalīšanās, kustīgums un mitofāģija (Soledad et al., 2019). Atgriezenisko signālu apmaiņa ir nozīmīga homeostāzes uzturēšanai, atspoguļojot mitohondriju aktivitāti un šūnas metabolisko statusu. Stress šūnā var izmainīt atgriezeniskos signālos, kā rezultātā var būt novērojama šūnas adaptācija vai nāve (Jazwinski, 2013). Pirmo reizi mitohondriju atgriezeniskā regulācija tika aprakstīta raugos 1987.gadā (Parikh et al., 1987).

Vieni no signālceļiem, ar kuriem zīdītāju šūnās tiek saistīta atgriezeniskā regulācija ir mTOR (*mammalian target of rapamycin*) un AMPK (*AMP-activated protein kinase*) (English et al., 2020). Enerģētiskā stresa apstākļos atgriezeniskā regulācija tiek veikta inhibējot mTOR aktivitāti (Lerner et al., 2013). AMPK signālceļu var aktivēt palielināta adenozinmonofosfāta (AMF)/ATF attiecība, kas veicina transkripcijas ko-aktivatora PGC-1 α (*proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 α*) aktivāciju. Ir zināms, ka PGC-1 α stimulē mitohondriju bioģenēzi un šūnas metabolismu (Cagin & Enriquez, 2015). Citi stresa cēloņi šūnā arī var izraisīt AMPK signālceļa aktivāciju, piemēram, hipoksija, oksidatīvais stress, glikozes trūkums, Krebsa cikla, ETC vai ATF sintāzes inhibitori (Kahn et al., 2005).

Izmainīta NAD⁺/NADH attiecība mitohondrijos var ietekmēt sirtuīnu (SIRT) aktivitāti un regulēt atgriezenisko atbildi. SIRT ir NAD-atkarīgas histonu/proteīnu deacetilāzes. Piemēram, SIRT3 var saistīties pie kodola proteīna Ku70, kas piesaista pro-apoptotisko proteīnu BAX, pasargājot šūnu no stresa izraisītas apoptozes (Soledad et al., 2019).

Dažādi stresori, kas skar mtDNS vai tieši ietekme ETC vai OXPHOS sistēmu, var inducēt kalcija jonu (Ca^{2+}) atkarīgo atgriezenisko regulāciju. Šādu stresoru ietekmē tiek samazināts mitohondriju membrānas potenciāls, kas var traucēt Ca^{2+} uzņemšanu mitohondrijos un potenciāli atbrīvot Ca^{2+} citoplazmā, ja to koncentrācija matriksā ir augsta (Soledad et al., 2019). Palielināta Ca^{2+} koncentrācija citoplazmā var aktivēt gan Ca^{2+} regulēto kināzi CaMKIV (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV*), kas savukārt var aktivēt CREB (*cAMP-response element binding protein*), gan MAP (*mitogen-activated protein*) kināzes ERK1 un ERK2 (*extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2*) (Cagin & Enriquez, 2015).

Vairāki transkripcijas faktori arī ir iesaistīti atgriezeniskās atbildes veidošanā. Transkripcijas faktors FOXO (*Forehead box O*) nodrošina mitohondriālo antioksidantu enzīmu transkripciju un palīdz inducēt mitofāgiju, lai atbrīvotos no bojātiem mitohondrijiem (Kim & Koh, 2017). STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) regulē kodola gēnu ekspresiju, kā arī darbojas, kā mitohondriju disfunkcijas sensors, jo tas tiek pakļauts ROS oksidatīvajai iedarbībai (Meier & Larner, 2014). Paaugstināts ROS daudzums spēj aktivēt transkripcijas faktoros NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) un NFE2L2 (*nuclear factor erythroid 2-like 2*). NF- κ B aktivācija veicina šūnu proliferāciju un izdzīvošanu, NFE2L2 aktivācija sekmē antioksidantu gēnu ekspresiju citosolā un mitohondrijos (English et al., 2020; Nguyen et al., 2009). Faktori NRF1 (*nuclear respiratory factor 1*), ERR α (*estrogen-related receptor*), CREB un YY1 (*Yin Yang 1*) spēj regulēt nDNS gēnu ekspresiju un netieši arī mtDNS kodētos gēnus, tā rezultātā regulējot mitohondriju darbību un oksidatīvo kapacitāti (Cagin & Enriquez, 2015).

Mitohondrijos uzkrājoties nepareizas konformācijas proteīniem var tikt aktivēta mtUPR (*mitochondrial unfolded protein response*), kas ir atgriezeniskās mitohondriju-kodola komunikācijas veids. mtUPR atbild par mitohondriālā proteoma kvalitātes kontroli, kā arī spēj veicināt peptīdu izdalīšanos no mitohondrijiem, kas var ietekmēt kodola gēnu transkripciju (Qureshi et al., 2017).

Mitohondriālo slimību gadījumā atgriezenisko regulāciju var aktivēt dažādi faktori, OXPHOS sistēmas disfunkcija un no tās izrietošās izmaiņas mitohondriju fizioloģijā, netipiska mitohondriju dinamika, samazināts mitohondriju membrānas potenciāls, mitofāgija u.c. (Granat et al., 2020). Variants m.8344A>G gēnā *MT-TK*, kas kodē tRNS^{Lys}, izraisa mioklonisko encefalomiopātiju ar laktacidozi un insultam līdzīgām epizodēm (MERRF). Šī varianta dēļ neveidojas funkcionāls proteīns un ir traucēta mitohondriju elpošana. MERRF transmitohondriālo citoplazmatisko hibrīdu (cibrīdu) šūnu modeļos, kas saturēja m.8344A>G, mitohondriju elpošanas deficīts inducēja CaMKIV aktivēšanu, kas sekojot proteīnu fosforilācijai aktivē CREB (Arnould et al., 2002).

Variants m.11778G>A gēnā *MT-ND4* ir biežākais Lēbera hereditārās optiskās neiropātijas cēlonis (LHON). Giordano et al ir aprakstījis, ka slimības nesekartiem varianta m.11778G>A nesējiem ir augstāks mtDNS kopiju skaits un palielināta transkripcijas faktoru TFAM, NRF1 un PPRC1 (*PPARG Related Coactivator 1*) ekspresija salīdzinājumā pret pacientiem ar LHON (Giordano et al., 2014). PPRC1 ir faktoru NRF1 un TFAM *upstream* transkripcijas ko-aktivators, kuri ir nozīmīgi mitohondriju bioģenēzes regulatori. Efektīvāka mitohondriju bioģenēze varētu būt izskaidrojums nepilnīgai LHON penetrancei (Chen et al., 2015).

Picard et al. aprakstīja, ka punktveida mutācijas mtDNS šūnās var izraisīt atšķirīgu bioķīmisko un transkripcionālo efektu. Viņu rezultāti parādīja, ka dažādi varianta m.3243A>G heteroplazmijas līmeņi veido krasi atšķirīgus nDNS un mtDNS gēnu ekspresijas profilus, kā cēlonis ir izmaiņas signālu pārvades mehānismos un epigēnētiskajā regulācijā. Individīdi, kuriem m.3243A>G heteroplazmijas līmenis ir 10-30%, klīniskais fenotips var izpausties kā diabēts vai reizēm kā autisma spektra pazīmes, 50-90% heteroplazmijas līmenis parasti izpaužas kā encefalomiopātijas, bet heteroplazmijas līmenis virs 90% var izraisīt Lī sindromu vai prenatālo nāvi (Picard et al., 2014).

Tomēr līdz šim rezultāti publicētajos pētījumos atšķiras. Daudzi mitohondriju atgriezeniskās regulācijas ceļi zīdītāju šūnās nav pilnīgi izprasti un aprakstīti. Novēroto gēnu ekspresijas profilu ievērojami ietekmē vairāki faktori, piemēram, kāda ir mitohondriju disfunkcija, mtDNS heteroplazmijas līmenis, slimības skarto audu tips (Horan & Cooper, 2014).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Materiāli

2.1.1. Ķīmiskie reaģenti

Darbā izmantotie ķīmiskie reaģenti un reaģentu komplekti apkopoti 2.1. tabulā.

2.1. tabula
Ķīmiskie reaģenti.
Table 2.1.
Chemical reagents.

Reaģents	Ražotājs, valsts
<i>GlutaMAX DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)</i> barotne	Thermo Fisher Scientific, ASV
<i>Anti-Anti</i> antibiotikas (<i>Antibiotic-Antimycotic 100x</i>)	Invitrogen, ASV
FBS (<i>Foetal bovine serum</i>)	Sigma Aldrich, Šveice
PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	Sigma Aldrich, Šveice
Tripsīns	Sigma Aldrich, Šveice
Etīdija bromīds	Sigma Aldrich, Šveice
96% etanols	SIA "Jaunpagasts Plus"
<i>MagMax Multi-Sample DNA kit</i> DNS izdalīšanas reaģentu komplekts	Thermo Fisher Scientific, ASV
<i>10x Pfu</i> buferis ar MgSO ₄	Thermo Fisher Scientific, ASV
<i>Pfu DNA polymerase</i> polimerāze	Promega, ASV
10 mM dNTP maisījums	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
Oligonukleotīdi	Metabion, Vācija
Trihidroksiaminometāns (TRIS)	Amresco, ASV
Etilēndiamīntetraetiķskābe (EDTA)	Thermo Fisher Scientific, ASV
Agarozē	Sigma, ASV
<i>1kb DNA Ladder</i> garuma marķieris	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
<i>6x Blue DNA Loading Dye</i> krāsviela	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
<i>Buffer Exo I</i> 10x eksonukleāzes I buferis	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
<i>FastAP</i> termojutīga sārmainā fosfatāze	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
<i>Exo I</i> eksonukleāze I	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
5x sekvenēšanas buferis	Applied Biosystems, ASV
<i>Big Dye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix</i>	Applied Biosystems, ASV
Nātrijs acetāts	Sigma Aldrich, Šveice
<i>HI - DI™</i> formamīds	Applied Biosystems, ASV
<i>RNeasy Mini Kit</i> RNS izdalīšanas reaģentu komplekts	QIAGEN Science, ASV
<i>RNase-Free DNase Set</i> reaģentu komplekts	QIAGEN Science, ASV
<i>Low Input RiboMinus Eukaryote System v2</i> reaģentu komplekts	Thermo Fisher Scientific, ASV
<i>Ion Total RNA-Seq Kit v2</i> reaģentu komplekts	Thermo Fisher Scientific, ASV

2.1. tabulas turpinājums
 Ķīmiskie reaģenti.
 Continuation of the table 2.1.
 Chemical reagents.

<i>Agilent RNA 6000</i> reaģentu komplekts	Agilent Technologies, ASV
<i>Qubit™ RNA assay kit</i> RNS kvantifikācijas komplekts	Thermo Fisher Scientific, ASV
<i>Qubit™ DNA assay kit</i> DNS kvantifikācijas komplekts	Thermo Fisher Scientific, ASV
<i>DireCtQuant 100ST</i> DNS/RNS/proteīnu šķīdināšanas reaģents	DireCtQuant, Spānija
<i>5x RT</i> buferis	Thermo Fisher Scientific, ASV
<i>Maxima H Minus</i> reversā transkriptāze	Thermo Fisher Scientific, ASV
<i>Ribolock</i> RNāzes inhibitors	Thermo Fisher Scientific, ASV
<i>QX200 ddPCR EvaGreen Supermix</i>	Biorad, ASV
<i>HindIII</i> restrikcijas enzīms	Thermo Fisher Scientific, ASV
<i>ddPCRTM Buffer Control for EvaGreen</i> buferis	Bio-Rad, ASV
<i>ddPCR Droplet Generation Oil for EvaGreen</i>	Bio-Rad, ASV

2.1.2. Oligonukleotīdi

mtDNS fragmentu amplificēšanai ar polimerāzes ķēdes reakciju (PCR) tika izmantoti oligonukleotīdi jeb praimeru (tiešie (for), reversie (rev)), kas ir specifiski tieši mtDNS un nesaistās pie nDNS. Darbā izmantotie mtDNS specifiskie praimeru apkopoti 2.2.tabulā.

2.2. tabula
 mtDNS amplifikācijai izmantotie PCR praimeru.
 Table 2.2.
 PCR primers used for mtDNA amplification.

Variants	mtDNS fragments	Praimeris	Nukleotīdu secība 5'-3'	Fragmenta garums, bp
m.9185 T>C	PCR	8910 for ^a 10648 rev ^b	CTTACCACAAGGCACACCTACA GGCACAATATTGGCTAAGAGGG	1738
	Sekv. PCR	8942 for 9411 rev	CCATACTAGTTATTATCGAAACC CTTGGTATGTGCTTTCTCGTG	200-500
m.13513 G>A	PCR	11977 for ^b 13830 rev ^b	CTCCCTCTACATATTTACCACAAC AAGTCCTAGGAAAGTGACAGCGA	1853
	Sekv. PCR	13261 for 13805 rev	CAACTAGGACTCATAATAGTTAC GCTGTGAGTTTTAGGTAGAGG	200-500

^a – praimeru no Torroni et al., 2001

^b – praimeru no Ramos et al., 2009

Praimeri, kas tika speciāli izveidoti priekš *Selfie-digital* PCR, ir apkopoti 2.3.tabulā. Praimeri tika izveidoti izmantojot *Primer-BLAST*, lai optimālā praimeru piesaistīšanās temperatūra būtu 60°C un maksimālais amplikona garums būtu 110 bāzes. Tika izvēlēti praimeru, ka amplificē eksona sekvenču viena eksona ietvaros (Podlesniy & Trullas, 2017).

2.3. tabula
Selfie-digital PCR izmantotie praimeru.
 Table 2.3.
 Primers used for *Selfie-digital* PCR.

Gēns	Amplikona garums (bp)	Praimera virziens	Nukleotīdu secība 5'-3'
<i>DYDC2</i>	61	for	GCTTTGGAAATTGCCTGGCCC
		rev	GGGTCACTGGGCCGAACCTT
<i>TCEA3</i>	96	for	AGGAAGAAGAAAGAGGAAGCGCTGA
		rev	ACCATCCCACTCAGACAGAGTTCA
<i>GRID1</i>	91	for	CTCTCGGCCCTGGAGATGGG
		rev	AGGTGCTGACCGAGAGCTGG
<i>HKDC1</i>	100	for	TGGGGGAGATTGTGCGGCAG
		rev	TCGAAGATGCCCTGGTCCG
<i>SEL1L3</i>	87	for	GCTGTTCTGGGGGCAGCAAG
		rev	GGATCCTCCGTCTCCAGGGC
<i>DHRS2</i>	85	for	GGGCTGGTTTCATCCCTGTGC
		rev	TACCCGGTTAGCCAGGACGC
<i>FABP3</i>	74	for	CCTTGCACGCCTGCTCTCTT
		rev	GTGCCCAGGAAAGCGTCCAC
<i>RYR3</i>	65	for	CGACCAGGTGGACCCCTTCC
		rev	AAGAAGAGGCCAGCCCACC
<i>GRM2</i>	82	for	GGCCATGGGATCGCTGCTTG
		rev	CAGCACCTTCTTGGCTGGGC
<i>DPYSL4</i>	74	for	TGGTCCTTCTGGTGGCGTT
		rev	GTCGTCAGCCGGTGTTCATGC
<i>ABCG1</i>	80	for	ATGACGGAGCCCAAGTCGGT
		rev	AGCAGGTCCGTCTCAGTGGC

2.1.3. Materiāli

Darbā izmantotie materiāli apkopoti 2.4.tabulā.

2.4. tabula
Materiāli.
Table 2.4.
Materials.

Materiāls	Raksturojums	Ražotājs, valsts
Automātiskās pipetes	0,2 – 2 µl 1 – 10 µl 20 µl 100 µl 200 µl 1000 µl	Gilson, Francija
Automātiskā 8 kanālu pipete	1 – 20 µl	Thermo Fisher Scientific, Somija
<i>E4 Multi Pipette E8-200XLS+</i> automātiskā 8 kanālu pipete	20 – 200 µl	Mettler, ASV
Pipešu uzgaļi ar filtru <i>TR LTS</i>	200 µl	Mettler, ASV
Pipešu uzgaļi ar filtru	10 µl 20 µl 100 µl 200 µl 1000 µl	SARSTEDT, Vācija
Cimdi	Nitrila	Med Comfort, Vācija
Stobriņi (<i>safe lock</i>)	1,5 ml, 2 ml	SARSTEDT, Vācija
PCR stobriņi	0,2 ml	DELTA LAB, Spānija
8 PCR stobriņu virknes <i>Thermo - Strip</i>	0,2 ml	Thermo Fisher Scientific, Lielbritānija
Seroloģiskās pipetes	2 ml, 5 ml, 10 ml	SARSTEDT, Vācija
<i>TC Flask T25</i> kultivēšanas flasks	Cell+, vented cap	SARSTEDT, Vācija
<i>TC Flask T75</i> kultivēšanas flasks	Cell+, vented cap	SARSTEDT, Vācija
<i>TC Plate 24 well</i> kultivēšanas plate	Cell+	SARSTEDT, Vācija
<i>TC Plate 6 well</i> kultivēšanas plate	Cell+	SARSTEDT, Vācija
Apaļā šūnu kultivēšana plate	Cell+, 100x20 mm	SARSTEDT, Vācija
Stobriņi	15 ml, 50 ml	SARSTEDT, Vācija
DG8 kārtridžu turētājs	QX200™	Bio-Rad, ASV
DG8™ kārtridži	QX200/QX100	Bio-Rad, ASV
DG8™ gumijas blīves	QX200/QX100	Bio-Rad, ASV
ddPCR plates	96 bedrīšu	Bio-Rad, ASV
<i>Heat Seal</i> caurdurama folija platēm	QX200/QX100	Bio-Rad, ASV
<i>Ion PI™ Chip</i>	Ion Proton™ System	Thermo Fisher Scientific, ASV
<i>Agilent RNA 6000 Chip</i>	High Sensitivity	Agilent Technologies, ASV

2.1.4. Aparatūra

Darbā izmantotā aparatūra apkopota 2.5.tabulā.

2.5. tabula
Aparatūra.
Table 2.5.
Equipment.

Aparatūra	Ražotājs, valsts
Laminārs <i>Biowizard</i>	KOJAIR, Vācija
Gaismas mikroskops <i>Leica DM IL</i>	Leica, Vācija
Saldētava (-80°C)	SANYO Electric Co., Japāna
Centrifūga <i>Centrifuge 5804</i>	Eppendorf, Vācija
Centrifūga <i>Centrifuge 5415 D</i>	Eppendorf, Vācija
Maisītājs <i>Vortex – Genie 2</i>	Scientific Industries, ASV
Mikroviļņu krāsns <i>NT-261M</i>	NOVA, ASV
Horizontālā elektroforēzes iekārta <i>GelHaus GH-200</i>	General Biosystem, Koreja
Barošanas bloks <i>Electroforesis Power Supply EPS 500/400</i>	Pharmacia, Zviedrija
UV transluminators <i>UVT-20 M/W</i>	HeroLab, Vācija
Fotografēšanas aparatūra	GE HealthCare Lifesciences, Japāna
Sausais termostats <i>Thermo-Block TDB-120</i>	Biosan, Latvija
Elektriskie svāri <i>KERN 440 – 35N</i>	Kern & Sohn GmbH, Vācija
Programmējams termostats <i>GeneAmp® PCR System9700</i>	Applied Biosystems, ASV
Spektrofotometrs <i>Nanodrop® ND-1000</i>	NanoDrop Technologies, ASV
Kapilārā elektroforēzes iekārta <i>ABI PRISM 3130 xl Genetic Analyzer</i>	Applied Biosystems, ASV
<i>2100 Bioanalyzer Instrument</i>	Agilent Technologies, ASV
<i>Qubit 2.0</i> fluorimetrs	Invitrogen, ASV
<i>Ion Proton™ System</i> sekvenēšanas iekārta	Thermo Fisher Scientific, ASV
<i>QX200™ Droplet Generator</i> iekārta	Biorad, ASV
Termoplašu laminētājs <i>ALPS 25</i>	Thermo Fisher Scientific, Lielbritānija
Programmējams termostats <i>T100™ Thermal Cycler</i>	Bio-Rad, ASV
<i>QX200™ Droplet Reader</i> iekārta	Bio-Rad, ASV

2.1.5. Šūnu līnijas

Darba izstrādē tika izmantotas jau iepriekš izveidotas transmitohondriālo citoplazmatisko hibrīdu (cibrīdu) šūnu līnijas. Cibrīdu izveidei tika izmantotas no cilvēka kaulu osteosarkomas 143B iegūtas p0 šūnas un trombocīti no diviem pacientiem ar Lī sindromu un veselām kontrolēm, kā aprakstīts iepriekš (Chomyn, 1996; Lin et al., 2012). Pacientu cibrīdu šūnu līnijas ir apkopotas 2.6.tabulā.

2.6. tabula
 Pacientu cibrīdu šūnu līnijas.
 Table 2.6.
 Patient cybrid cell lines.

Pacients	Variants	Gēns	Heteroplazmijas līmenis
A	m.9185 T>C	MT-ND5	100% mut.
B	m.13513 A>G	MT-ATP6	wild type (m.13513A) 50% m.13513A>G 70% m.13513A>G

Pacienta A cibrīdu šūnu līnijai (m.9185 T>C) iepriekš nebija izdevies izveidot *wild type* šūnu populāciju, ar kuru salīdzināt mutantās cibrīdu šūnu līnijas transkriptomu. Tāpēc turpmākiem eksperimentiem tika izmantotas kontroles cibrīdu šūnu līnijas ar Eiropai raksturīgajām haplogrupām: U5b, T2b, V1a un U. Pacienta A haplogrupa ir U4, bet pacienta B – H3.

2.2. Metodes

2.2.1. Šūnu kultivēšana

Cibrīdu šūnas tika kultivētas *GlutaMAX DMEM* barotnē, kurai pievienots 10% FBS un *Antibiotic – antimycotic 100x* antibiotiku maisījums. Vidē tika uzturēta 37 °C temperatūra un 5% CO₂ koncentrācija. Šūnām sasniedzot ~70 – 80% konfluenci, daļa tika pārnesta jaunā kultivēšanas flaskā. Pasāžu maiņai tika izmantots 1x tripsīns (šķaidīts ar PBS attiecībā 1:9). Barotne tika atjaunota reizi divās dienās.

2.2.2. DNS izdalīšana no šūnu kultūrām

No pacientu šūnu līnijām, aptuveni 1 ml šūnu suspensijas tika ievākts priekš DNS izdalīšanas. Šūnas tika ievāktas divas reizes - pirmo reizi pāris dienas pēc atkausēšanas, otro reizi pēc ilgāka kultivēšanas perioda. Genomiskā DNS no cibrīdu šūnām tika izdalīta, izmantojot komerciālu DNS izdalīšanas komplektu *MagMax Multi-Sample DNA kit*, vadoties pēc ražotāja norādījumiem (adsorbcijas metode ar magnētiskajām lodītēm). DNS koncentrācija tika noteikta izmantojot spektrofotometru *Nanodrop® ND-1000*.

2.2.3. Sangera sekvenēšana

Pirmā PCR ar ārējiem praimeriem tika veikta, lai amplificētu konkrētus mtDNS fragmentus, kas satur attiecīgos Lī sindroma variantus – m.9185T>C un m.13513G>A (skatīt 2.2.tabulu). Kopējais reakcijas tilpums ir 50 µl, kura sastāvā ir:

- 5 µl 10x *Pfu* buferis ar MgSO₄;
- 1 µl 10 mM dNTP maisījums;
- DNS (50 ng/µl);
- 0,4 µl *Pfu* polimerāze (2,5 U/µl);
- 2 µl praimeru maisījums (for + rev) (10 µM);
- līdz 50 µl H₂O.

Reakcijas apstākļi ir norādīti 2.7.tabulā:

2.7. tabula.
PCR apstākļi.
Table 2.7.
PCR conditions.

	Sākuma denaturācija	35 cikli			Beigu sintēze
		Denaturācija	Hibridizācija	Sintēze	
Temperatūra	95 °C	95 °C	62 °C	72 °C	72 °C
Laiks (sek.)	60	30	30	180	420

PCR produkti tika vizualizēti, veicot 1% agarozes gela elektroforēzi. Pēc tam PCR produkti tika attīrīti no neizmantotajiem mononukleotīdiem un praimeriem, tos apstrādājot ar fermentiem *FastAP* un *Exo I*. Kopējais reakcijas tilpums ir 20 µl, kura sastāvā ir:

- 10 µl PCR produkta;
- 2 µl 10x *Buffer Exo I*;
- 0,5 µl *Exo I* (20 U/µl);
- 1 µl *FastAP* (1 U/µl);
- 6,5 µl H₂O.

Reakcijas maisījumu tika ievietots programmējamā termostatā, kurā tas tika inkubēts 15 minūtes 37°C temperatūrā un pēc tam 15 minūtes 80°C temperatūrā, lai inaktivētu enzīmus.

Sekvenēšanas PCR ar iekšējiem praimeriem (skatīt 2.3.tabulu) kopējais reakcijas tilpums ir 10 µl, kura sastāvā ir:

- 1 µl 5x sekvenēšanas buferis;
- 0,5 µl *Big Dye*;
- 2 µl attīrīts PCR produkta;
- 2 µl praimeris (5µM);

- 4,5 µl H₂O.

Sekvenēšanas PCR apstākļi ir norādīti 2.8. tabulā.

2.8. tabula.
Sekvenēšanas PCR apstākļi.
Table 2.8.
Sequencing PCR conditions.

	25 cikli		
	Denaturācija	Hibridizācija	Sintēze
Temperatūra	96 °C	56 °C	60 °C
Laiks (sek.)	10	5	240

Sekvenēšanas PCR produktu attīrīšanai tika izmantota izgulsnēšanas metode ar etanolu un nātrija acetātu. Pēc attīrīšanas PCR produktiem tika pievienoti 10 µl formamīda un tie tika karsēti 95°C temperatūrā 5 minūtes. Sekvenēšana tika veikta izmantojot kapilārā gela elektroforēzi ģenētiskajā analizatorā *ABI PRISM 3130 xl Genetic Analyzer*.

2.2.4. RNS izdalīšana no šūnu kultūrām

Šūnas tika savāktas, kad šūnu konfluence sasniedza ~80-90%. Šūnas tika skalotas ar 8-10 ml PBS. Tika pievienoti 2 ml 1x tripsīna un tās tika inkubētas 2-3 min 37 °C. Šūnas tika savāktas un saskaitītas. RNS izdalīšanai tika ievāktas 1x10⁶ šūnas. RNS no šūnām tika izdalīta izmantojot reaģentu komplektu *RNeasy Mini Kit*:

1. Šūnām tika pievienoti 350 µl RLT bufera, lai tās lizētu.
2. Šūnu lizātam tika pievienoti 350 µl 70% etanola, suspensiju sajaucot kārtīgi pipetējot.
3. 700 µl lizāta tika pārnesti uz *RNeasy Mini spin* kolonnu, kas ievietota 2 ml stobriņā. Kolonna tika centrifugēta 1 min 8000 x g.
4. Lai skalotu kolonnu, tai tika pievienoti 350 µl RW1 bufera. Kolonna tika centrifugēta 1 min 8000 x g.
5. Katram paraugam tika sagatavots 10 µl DNāzes un 70 µl RDD bufera šķīdums, ko uzmanīgi sajauc pipetējot un iepilda kolonnā. Kolonnu inkubē istabas temperatūrā 15 min. Šis solis tika atkārtots vēlreiz.
6. Katrai kolonnai tika pievienoti 500 µl RPE bufera. Kolonna tika centrifugēta 1 min 8000 x g. Šis solis tika atkārtots vēlreiz, centrifugējot kolonnu 2 min.
7. Kolonna tika ievietota 2 ml stobriņā un centrifugēta 4 min pie maksimāliem apgriezieniem, lai žāvētu kolonnas membrānu.

8. Kolonna tika ievietota 1,5 ml stobriņā (*non-stick*). Uz kolonnas membrānas centra tika pievienoti 30 µl RNāzes brīva ūdens. Kolonna tika centrifugēta 1 min pie maksimāliem apgriezieniem, lai eluētu RNS.
9. Caurplūdušais šķīdums tika vēlreiz pievienots kolonnas membrānai un kolonna tika centrifugēta 1 min pie maksimāliem apgriezieniem, lai eluētu RNS.
10. Eluētā RNS tika pārnesta jaunā stobriņā (*non-stick*) un uzglabāta -70 °C.

RNS koncentrācija tika mērīta izmantojot *Qubit™ RNA High Sensitivity (HS) assay kit*. Izdalītās RNS integritāte tika pārbaudīta, nosakot RNS integritātes skaitli (RIN, *RNA integrity number*) izmantojot *Agilent 2100 Bioanalyzer* sistēmu. RIN jābūt pēc iespējas tuvāk skaitlim 10.

2.2.5. Transkriptoma bibliotēku sagatavošana un nākamās paaudzes sekvenēšana

Ribosomālās RNS deplēcija tika veikta izmantojot reaģentu komplektu *Low Input Ribominus Eukaryote System v2*, vadoties pēc ražotāja norādījumiem un apstrādājot 500 nanogramus (ng) totālās RNS no katra parauga. Transkriptoma bibliotēku sagatavošana tika veikta izmantojot reaģentu komplektu *Ion Total RNA-Seq Kit v2*.

2.2.5.1. RNS fragmentēšana

RNS fragmentēšana ar RNāzi III:

1. 0,2 ml PCR stobriņos tika sagatavots reakcijas maisījums, kura sastāvā ir :
 - 8-10 µl RNS parauga (500 ng) un H₂O;
 - 1 µl *10x RNase III Reaction Buffer*;
 - 1 µl *RNase III*;
2. Reakcijas maisījums tika inkubēts 10 min 37 °C.
3. Uzreiz pēc inkubācijas tika pievienoti 20 µl H₂O, paraugam esot uz ledus.

Fragmentētās RNS attīrīšana:

1. Stobriņos tika pievienoti un sajaukti 5 µl nukleīnskābes saistošas lodītes *Nucleic Acid Binding Beads* un 90 µl šķīduma *Binding Solution Concentrate*.
2. 30 µl fragmentētās RNS tika pievienoti magnētiskajām lodītēm. Pēc tam tika pievienoti 100 µl 100% etanola un inkubēti 5 min istabas temperatūrā.

3. Stobriņi tika ievietoti magnētiskajā statīvā. Atbrīvojas no supernatanta.
4. Lodītēm tika pievienoti 150 µl mazgāšanas šķīduma *Wash Solution Concentrate* un tās tika inkubētas 30 s. Atbrīvojas no supernatanta un atļauj lodītēm nožūt 1-2 min.
5. Lai eluētu RNS no lodītēm, tām tika pievienoti 12 µl 37 °C silts H₂O un tās tika inkubētas 1 min istabas temperatūrā.
6. Stobriņi tika ievietoti magnētiskajā statīvā uz 1 min un eluētā RNS tika pārnesta jaunā stobriņā.

Fragmentētās RNS novērtēšana:

1. RNS koncentrācija tika noteikta, izmantojot *Qubit™ RNA assay kit* reaģentu komplektu un *Qubit 2.0* fluorometru.
2. RNS fragmentu (paraugu atšķaidot ar H₂O 1:10) garums tika noteikts, izmantojot *Agilent RNA 6000* reaģentu komplektu un *Agilent 2100 Bioanalyzer* sistēmu.

2.2.5.2. Transkriptoma bibliotēku sagatavošana

RNS hibridizēšana un ligēšana:

1. 0,2 ml PCR stobriņos uz ledus tika sagatavots hibridizācijas maisījums, kura sastāvā ir:
 - 2 µl *Ion Adaptor Mix v2*;
 - 3 µl *Hybridization Solution*;
 - 3 µl fragmentētās RNS.
2. Hibridizācijas reakcija tika veikta programmējamā termostatā, iestatot reakcijas apstākļus: 65 °C 10 min, 30 °C 5 min.
3. 0,2 ml PCR stobriņos uz ledus tika sagatavots RNS ligēšanass maisījums, kura sastāvā ir:
 - 8 µl hibridizācijas reakcijas produkta;
 - 10 µl *2X Ligation Buffer*;
 - 2 µl *Ligation Enzyme Mix*.
4. Ligēšanas reakcija tika veikta programmējamā termostatā, iestatot reakcijas apstākļus: 30 °C 30 min.

Komplementārās DNS (cDNS) sintēze ar reversās transkripcijas reakciju:

1. 0,2 ml PCR stobriņos uz ledus tika sagatavots RT reakcijas maisījums, kura sastāvā ir:
 - 4 µl *10X RT Buffer*;

- 10 µl 2,5 mM dNTP maisījums;
 - 2 µl *Ion RT Primer v2*;
 - 8 µl H₂O.
2. 16 µl RT reakcijas maisījumam tika pievienoti 20 µl ligācijas reakcijas produkta un inkubēti 70 °C 10 min.
 3. Iepriekš sagatavotajam maisījumam tika pievienoti 4 µl *10X SuperScript III Enzyme Mix*, un RT reakcija tika veikta, inkubējot paraugus 42 °C 30 min.

cDNS attīrīšana:

1. Stobriņos tika pievienoti un sajaukti 5 µl nukleīnskābes saistošas lodītes *Nucleic Acid Binding Beads* un 120 µl šķīduma *Binding Solution Concentrate*.
2. 40 µl RT reakcijas produkta tika pievienoti 60 µl H₂O un sajaukti ar magnētiskajām lodītēm. Pēc tam pievieno 100 µl 100% etanola un inkubē 5 min istabas temperatūrā.
3. Stobriņi tika ievietoti magnētiskajā statīvā. Atbrīvojas no supernatanta.
4. Lodītēm tika pievienoti 150 µl *Wash Solution Concentrate* un tās tika inkubētas 30 s. Atbrīvojas no supernatanta un atļauj lodītēm nožūt 1-2 min.
5. Lai eluētu RNS no lodītēm, tām tika pievienoti 12 µl 37 °C silts H₂O un tās tika inkubētas 1 min istabas temperatūrā.
6. Stobriņi tika ievietoti magnētiskajā statīvā uz 1 min un eluētā RNS tika pārnesta jaunā stobriņā.

cDNS amplifikācija:

1. 0,2 ml PCR stobriņos tika sagatavots PCR maisījums, kura sastāvā ir:
 - 45 µl reakcijas maisījums *Platinum PCR SuperMix High Fidelity*;
 - 1 µl 3'-indeksa praimera *Ion Xpress™ RNA 3' Barcode Primer* (izvēloties no indeksiem BC01–BC16);
 - 6 µl cDNS.
2. Stobriņus ievieto programmējamā termostatā. PCR apstākļi ir norādīti 2.9. Tabulā.

2.9. tabula.
PCR apstākļi.
Table 2.9.
PCR conditions.

		2 cikli			14 cikli			
Temperatūra	94 °C	94 °C	50 °C	68 °C	94 °C	62°C	68 °C	68 °C
Laiks (min)	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	5

Amplificētās cDNS attīrīšana:

1. Stobriņos tika pievienoti un sajaukti 5 µl nukleīnskābes saistošas lodītes *Nucleic Acid Binding Beads* un 180 µl šķīduma *Binding Solution Concentrate*.
2. 53 µl cDNS amplifikācijas produkta tika pievienoti pie magnētiskajām lodītēm. Pēc tam pievieno 100 µl 100% etanola un inkubē 5 min istabas temperatūrā.
3. Stobriņi tika ievietoti magnētiskajā statīvā. Atbrīvojas no supernatanta.
4. Lodītēm tika pievienoti 130 µl mazgāšanas šķīduma *Wash Solution Concentrate* un tās tika inkubētas 30 s. Atbrīvojas no supernatanta un atļauj lodītēm nožūt 1-2 min.
5. Lai eluētu RNS no lodītēm, tām tika pievienoti 12 µl 37 °C silts H₂O un tās tika inkubētas 1 min istabas temperatūrā.
6. Stobriņi tika ievietoti magnētiskajā statīvā uz 1 min un eluētā cDNS tika pārnesta jaunā stobriņā.

Amplificētās cDNS novērtēšana:

1. cDNS koncentrācija tika mērīta, izmantojot *Qubit™ dsDNA HS Assay Kit* reaģentu komplektu un *Qubit 2.0* fluorometru.
2. cDNS (paraugu atšķaidot ar H₂O 1:10) garums tika noteikts, izmantojot *Agilent DNA 1000 kit* reaģentu komplektu un *Agilent 2100 Bioanalyzer* sistēmu.

Sekvencēšana tika veikta izmantojot *Ion Proton™ System* sekvencēšanas iekārtu un *Ion PI™ Chip*. Visi eksperimenti tika veikti divos bioloģiskajos atkārtojumos.

2.2.6. Šūnu lizāta sagatavošana izmantojot *DireCtQuant 100ST* šķīdināšanas reaģentu

Cībrīdu šūnas tika iesētas 24 bedrīšu platē, 1x10⁴ šūnas bedrītē, katra šūnu līnija trīs atkārtojumos. Šūnas tika kultivētas līdz sasniedza ~90% konfluenci bedrītē. No katras līnijas šūnas tika ievāktas trīs reizes.

1. Barotne tika pilnībā aizvākta ar pipeti.
2. Katrā bedrītē tika pievienoti 372 µl *DireCtQuant 100ST* DNS/RNS/proteīnu šķīdināšanas reaģenta. Šūnas tika suspendētas, intensīvi pipetējot.
3. Šūnu lizāts tika pilnībā savākts un pārnests 1,5 ml stobriņā.
4. Šūnu lizāts tika inkubēts 90°C 3 min un pēc tam atdesēts līdz istabas temperatūrai.

2.2.7. cDNS sintēze

1. RNS/ DNS/ proteīnu saturošais šūnu lizāts kontroles tika atšķaidīts divdesmit reizes, bet intereses gēnu pārbaudei tas tika atšķaidīts divas reizes. Vienādi tilpumi atšķaidītā šūnu lizāta un gēnam specifiskā reversā praimera (2,5 μ M) tika sajauti 0,2 ml PCR stobriņā un inkubēti 70 °C 5 min un atdzesēti līdz istabas temperatūrai.
2. Reversās transkripcijas reakcija tika veikta dublikātos – viens dublikāts saturēja reverso transkriptāzi (RT+), otrs dublikāts to nesaturēja (RT-). Reakcijas kopējais tilpums ir 5 μ l, kura sastāvā ir:
 - 1 μ l 5x RT bufera;
 - 0,5 μ l dNTP;
 - 0,125 μ l *Ribolock*;
 - 0,25 μ l *Maxima H Minus* reversās transkriptāzes (+) vai 5x RT bufera (-);
 - 2 μ l parauga-praimera maisījuma;
 - 1,125 μ l H₂O.

Reversās transkripcijas apstākļi ir norādīti 2.10. tabulā.

2.10. tabula.
Reversās transkripcijas apstākļi.
Table 2.10.
Reverse transcription conditions.

Temperatūra	55 °C	55 °C	60 °C	85 °C
Laiks (min)	10	10	10	5

2.2.8. Selfie-digital PCR

Selfie-digital PCR (*Selfie*-dPCR) metode balstās uz digitālās PCR (dPCR, *digital* PCR) metodes principu. dPCR atļauj kvantificēt absolūto RNS molekulu skaitu, kas tika transkribētas no viņu pašu kodējošā gēna, izmērot ar dPCR amplificēto DNS daudzumu paraugā, kas satur neattīrītas RNS un DNS molekulas, pirms un pēc reversās transkripcijas. Vispirms interesējošā gēna absolūtais kopiju skaits paraugā tiek noteikts pirms reversās transkripcijas, izmantojot gēnam specifisku praimeru pāri. Pēc tam, izmantojot to pašu praimeru pāri, tajā pašā paraugā pēc reversās transkripcijas tiek noteikts gēna un tā transkriptu absolūtais kopiju skaits. Pēc tam matemātiski tiek aprēķināts transkribēto molekulu daudzums uz vienu hromosomālā gēna kopiju. Par cik šī metode kvantificē precīzu kodējošā gēna transkripcijas produktivitātes profilu, to dēvē par *Selfie-digital* PCR (Podlesniy & Trullas, 2017).

1. Reakcijas maisījumu sagatavo 0,2 ml astoņu PCR stobriņu rindā. Reakcijas kopējais tilpums ir 25 µl, kura sastāvā ir:
 - 12,5 µl 2x *EvaGreen Supermix*;
 - 1 µl *Hind III* restriktāzes;
 - 1 µl tiešā praimera (2,5 µM);
 - 5 µl reversās transkripcijas produkta;
 - 5,5 µl H₂O.
2. Maisījumu samaisa, centrifugē un pārnes DG8 kārtidža vidējā rindā.
3. Kārtidža rindā, kas paredzēta eļļai, ienes 70 µl *ddPCR Droplet Generation Oil for EvaGreen*. Kārtidžam uzliek DG8 gumijas blīvi un to ievieto *QX200™ Droplet Generator* iekārtā.
4. 40 µl izveidotās lodīšu emulsijas pārnes 96 bedrīšu platē. Plati aizver, piekausējot tai foliju un ievieto programmējamā termostatā.

Reakcijas apstākļi norādīti 2.11.tabulā.

2.11. tabula.
dPCR apstākļi.
Table 2.11.
dPCR conditions.

	Inicializācija	40 cikli (2 /sek.)		Signālu stabilizācija	
		Denaturācija	Hibridizācija/ sintēze		
Temperatūra	95	95	60	4	90
Laiks (min)	5	0,5	1	5	5

Gēna amplikoni katrai šūnu līnijai tiek veikti divos tehniskajos atkārtojumos. Reprezentatīvs paraugu izkārtojums 96 bedrīšu platē dPCR reakcijai ir redzams pielikumā (2. pielikums).

Nukleīnskābju kvantificēšana:

Pēc amplifikācijas ar dPCR plate tika ievietota *QX200™ Droplet Reader* iekārtā. Tajā lodītes tiek saskaitītas, tās laižot cauri kapilāram gar fluorescences detektoru, līdzīgi kā plūsmas citometrijā. Tiek noteikta signāla amplitūda un lodīšu izmērs.

2.2.9. Datu analīze

Ar kapilāro elektroforēzi iegūtie sekvencēšanas dati tika analizēti, izmantojot ģenētisko analizatoru *ABI PRISM 3130 xl Genetic Analyzer*, apstrādāti programmā *Lasergene SeqMan Pro v.7.1.0 (44.1) (DNASTAR, Inc.)*, salīdzināti ar mtDNS references sekvenci rCRS (*Revised Cambridge Reference Sequence*) (<http://mitomap.org/MITOMAP>) un rediģēti programmā *Lasergene EditSeq Pro v.7.1.0 (44) (DNASTAR, Inc.)*.

RNS sekvencēšanas datu bioinformātiskā analīze tika veikta Latvijas Biomedicīnas pētījumu uz studiju centra Bioinformātikas nodaļā. Sekvencēšanas nolasījumu adapteri tika nogriezti ar *Cutadapt* (Martin, 2011). Lai nolasījumus iekļautu turpmākajā analīzē, to minimālajam garumam bija jābūt 42 bp, un nolasījumi, kas sakrīta ar rRNS, tika noņemti ar *Sortmerna* programmatūras palīdzību (Kopylova et al., 2012). Izmantojot programmatūru *STAR 2.7.1a* (Dobin et al., 2012), sekvencēšanas nolasījumi tika salīdzināti ar cilvēka genoma references sekvenci GRCh38.p12 un nolasījumu skaits tika aprēķināts ar *HTSEQ-count* (Anders et al., 2015). Nolasījumu skaits tika normalizēts un atšķirīgi ekspresētie gēni tika noteikti izmantojot programmatūru *R* ar paketi *Bioconductor package DESeq2* (Love et al., 2014). Korekcija tika veikta ar *Benjamini-Hochberg* procedūru un nozīmīgi ekspresētie gēni tika noteikti ar absolūto $\log_{2}FC > 2$ un FDR (*false discovery rate*) $< 0,05$.

Selfie-dPCR paraugi tika analizēti, izmantojot *QX200™ Droplet Reader* un atbilstošu programmatūru *QuantaSoft (Version 1.7.4, Bio-Rad)*. Iegūtie dati tika apstrādāti, izmantojot *Microsoft Excel*. RNS transkriptu skaits uz vienu gēna kopiju tika aprēķināts, izmērīto amplikonu skaitu reakcijā bez reversās transkriptāzes (RT-) atņemot no amplikonu skaita reakcijā ar reverso transkriptāzi (RT+) un dalot ar (RT-).

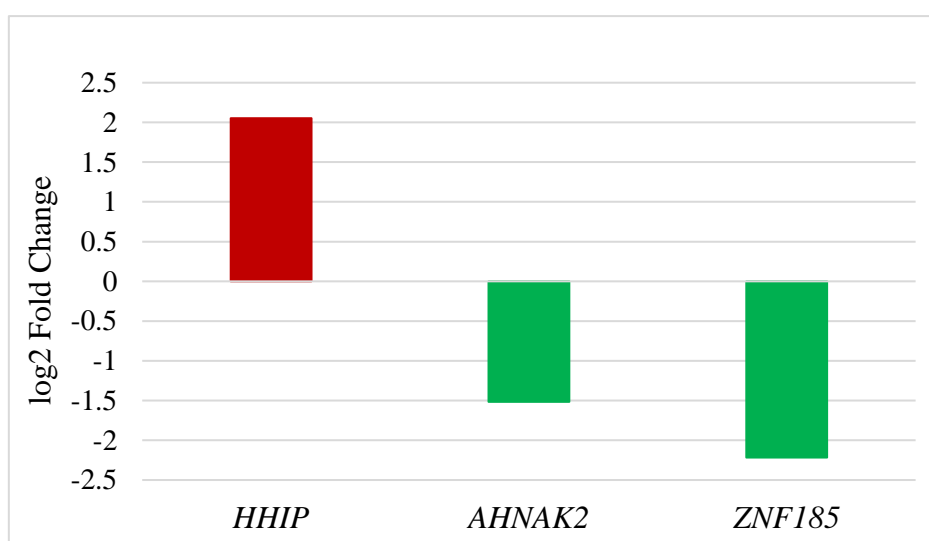
3. REZULTĀTI

3.1. Transkriptoma analīze cibrīdu šūnu kultūrās

Lai noskaidrotu divu Lī sindromam raksturīgo mtDNS variantu, m.9185T>C un m.13513G>A, ietekmi uz kodola gēnu ekspresiju, tika veikta transkriptoma profila analīze divu pacientu, A un B, transmitohondriālo cibrīdu šūnu līnijām. Pacientu cibrīdu šūnas RNS izdalīšanai tika savāktas attiecīgās pasāžās (p): m.9185T>C 100% mut (p4, p5), m.13513G wt (p6, p12), m.13513G>A 50% mut (p7, p12), m.13513G>A 70% mut (p7, p10). Kontroles cibrīdu šūnas tika ievāktas p5, p3, p9 un p6.

Pacienta A cibrīdu šūnas variantu m.9185T>C saturēja homoplazmiskā stāvoklī, un iepriekš nebija izdevies izveidot wild type līniju. Tāpēc to transkripcijas profils tika salīdzināts ar apvienotiem (*pooled*) datiem no četrām kontroles cibrīdu šūnu līnijām ar Eiropai raksturīgām mtDNS haplogrupām, U5b, T2b, V1a un U.

Transkriptoma analīze atklāja, ka statistiski nozīmīgi izmainīts (adj.p<0,05) ekspresijas līmenis bija tikai trīs gēniem (3.1. attēls). Gēns *HHIP* bija lejupregulēts, gēni *AHNAK2* un *ZNF185* bija augšupregulēti.

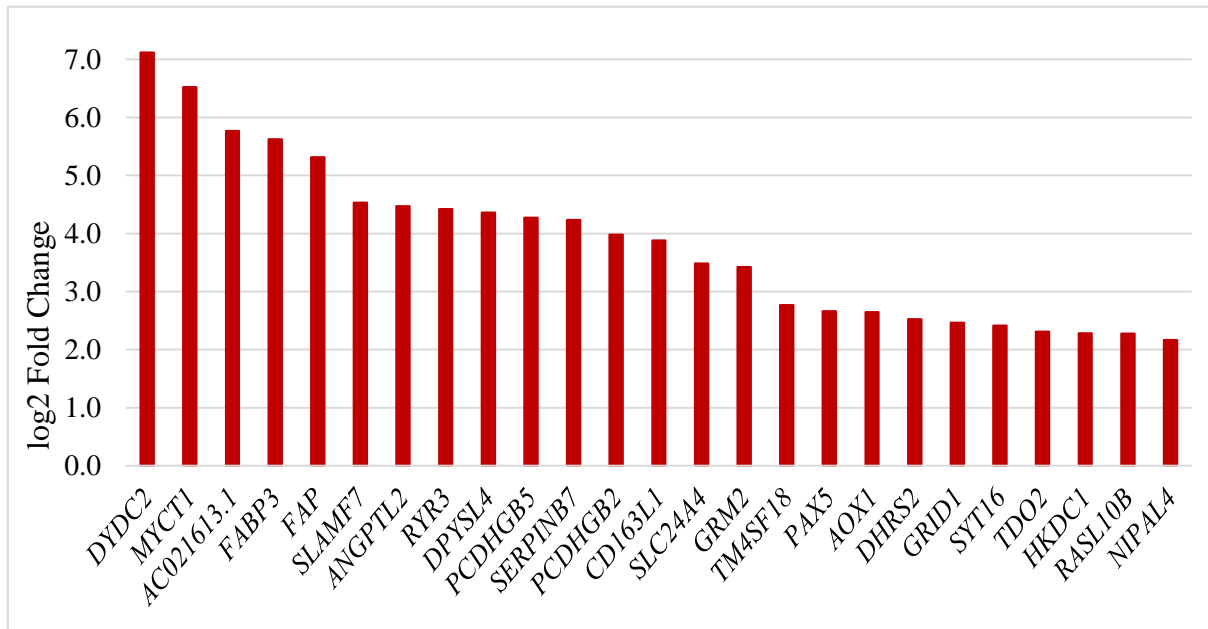


3.1. attēls. Gēni, kuriem tika novērota izmainīta ekspresija pacienta A cibrīdu šūnu līnijā variantā m.9185T>C klātbūtnē (sarkana krāsa - lejupregulēts, zaļa krāsa - augšupregulēts).

Figure 3.1. Genes in which altered expression was observed in the presence of variant m.9185T> C in the patient A cybrid cell line (red - downregulated, green - upregulated).

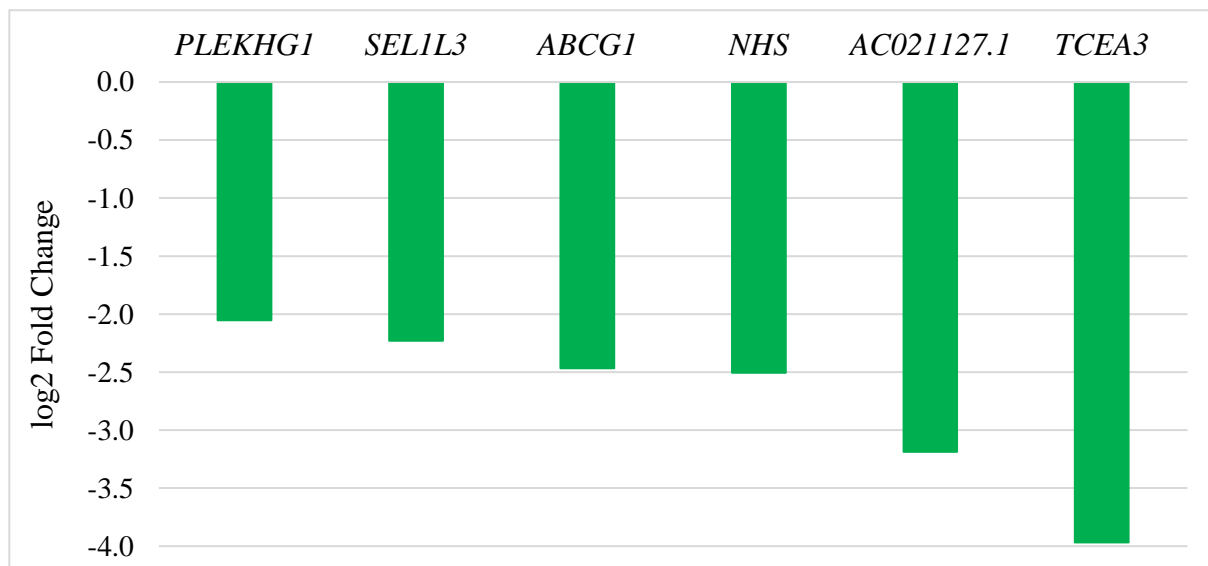
Pacienta B dažādas cibrīdu šūnu līnijas variantu m.13513G>A saturēja gan 50%, gan 70% heteroplazmiskā stāvoklī. Divu līniju transkripcijas profili tika salīdzināti kopā pret wild

type līniju. Transkriptoma analīze atklāja, ka 84 gēniem mutantajās cibrīdu šūnu līnijās bija statistiski nozīmīgi ($\text{adj.p} < 0,05$) izmainīts ekspresijas līmenis salīdzinot pret *wild type* cibrīdu šūnu līniju. 31 gēnam regulācija bija izmainīta četras reizes - 25 gēni bija lejupregulēti ($\log_2 \text{Fold Change} > 2$) (3.2. attēls) un seši gēni bija augšupregulēti ($\log_2 \text{Fold Change} < -2$) (3.3. attēls).



3.2. attēls. Lejupregulētie gēni pacienta B cibrīdu šūnu līnijās varianta m.13513G>A 50% un 70% heteroplazmijas klātbūtnē.

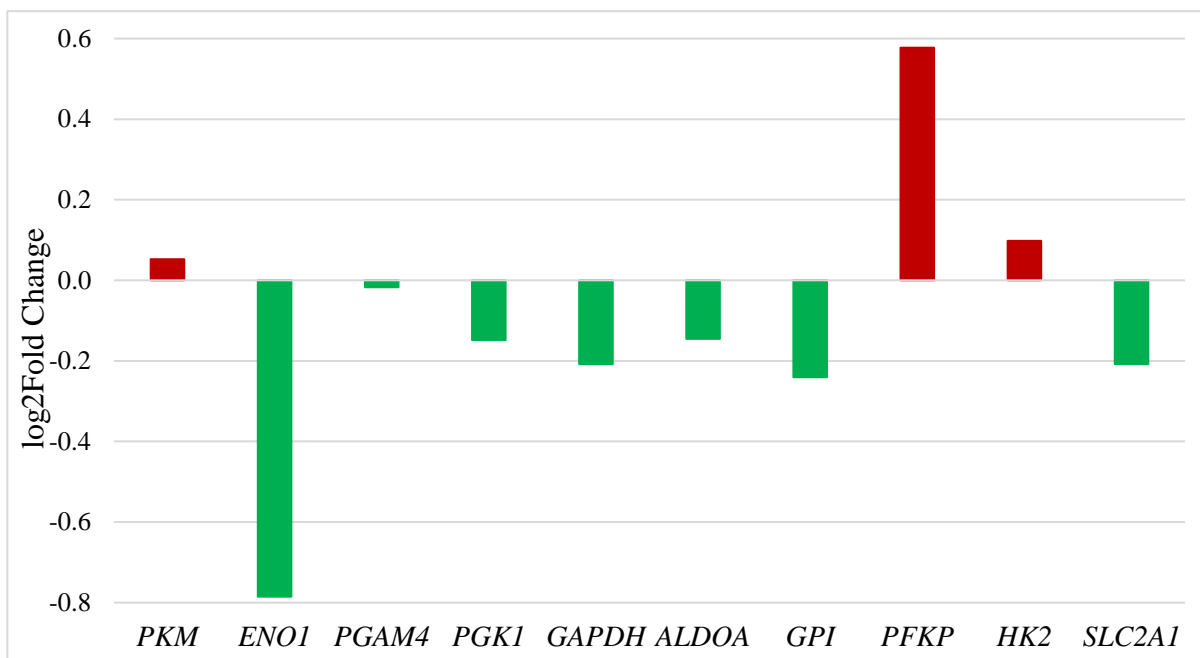
Figure 3.2. Downregulated genes in patient B cybrid cell lines in the presence of 50% and 70% heteroplasmic variant m.13513G> A.



3.3. attēls. Augšupregulētie gēni pacienta B cibrīdu šūnu līnijās varianta m.13513G>A 50% un 70% heteroplazmijas klātbūtnē.

Figure 3.3. Upregulated genes in patient B cybrid cell lines in the presence of 50% and 70% heteroplasmic variant m.13513G> A.

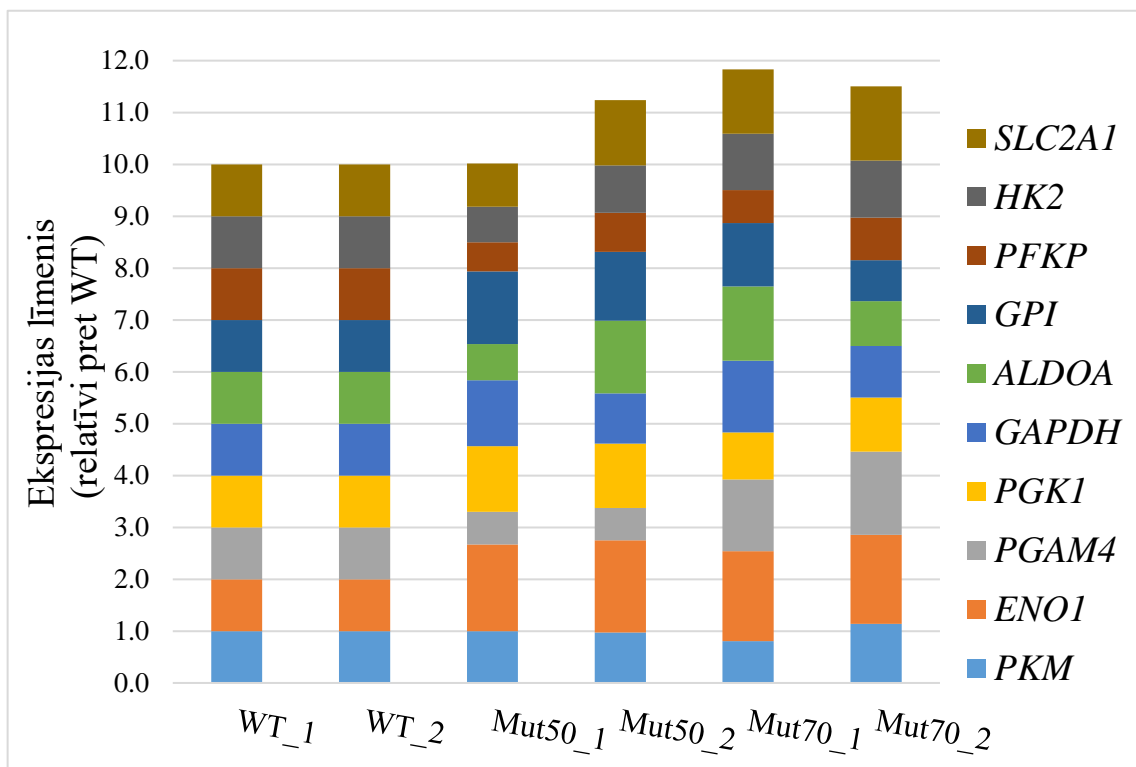
Tika salīdzināta ekspresija gēniem, kuri kodē kādu no glikolīzes enzimatiskajiem soļiem, pacienta B cibrīdu šūnu līnijās. Glikolīzes gēnu ekspresija (3.4. attēls) nebija izmainīta statistiski nozīmīgi ($\text{adj.}p > 0,05$), kā arī nevienam no tiem regulācija nebija izmainīta vismaz divas reizes ($\log_2\text{Fold Change} < \pm 1$). Gēni *PKM*, *PFKP* un *HK2* bija lejupregulēti. Gēni *ENO1*, *PGAM4*, *PGKI*, *GAPDH*, *ALDOA*, *GPI* un *SLC2A1* bija augšupregulēti.



3.4. attēls. Izmaiņas glikolīzes gēnu ekspresijā pacienta B cibrīdu šūnu līnijās varianta m.13513G>A 50% un 70% heteroplazmijas klātbūtnē.

Figure 3.4. Changes in expression level of glycolysis genes in patient B cybrid cell lines in the presence of 50% and 70% heteroplasmic variant m.13513G>A.

Lai gan izmaiņas glikolīzes gēnu ekspresijā, salīdzinot kopā abas heteroplazmiskās šūnu līnijas ar wild type līniju, nebija būtiskas, tika pārbaudīts, vai ir novērojama kāda atšķirība starp abām mutantajām cibrīdu līnijām tās analizējot atsevišķi. Wild type šūnu līnijas RNS sekvencēšanas abu atkārtojumu normalizētie nolasījumi tika pielīdzināti skaitlim viens. Mutanto cibrīdu šūnu līniju glikolīzes gēnu ekspresijas līmenis tika izteikts relatīvi pret wild type līniju (3.5. attēls).

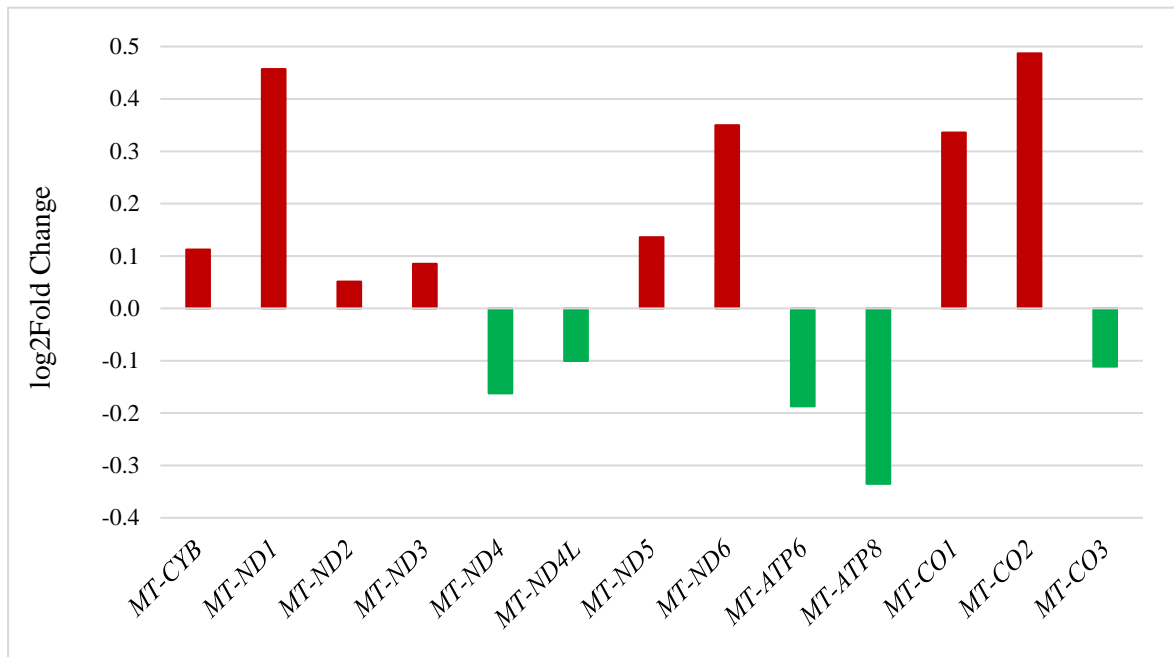


3.5. attēls. Glikolīzes gēnu ekspresijas līmenis pacienta B cibrīdu šūnu līnijās.

Figure 3.5. Expression level of glycolysis genes in patient B cybrid cell lines.

Dažiem glikolīzes gēniem bija novērojamas atšķirības ekspresijā starp līnijām, kuras bija konsistentas abos atkārtojumos. Piemēram, gēns *ENO1* heteroplazmiskajās pacienta B cibrīdu šūnu līnijās bija ekspresēts par 60-70% vairāk nekā wild type līnijā. Gēns *PGAM4* 50% heteroplazmiskajā līnijā bija ekspresēts par 40% mazāk nekā wild type līnijā, bet 70% heteroplazmiskajā līnijā tas bija ekspresēts par 40-60% vairāk. Gēns *PFKP* heteroplazmiskajās pacienta B cibrīdu šūnu līnijās bija ekspresēts par 20-40% mazāk nekā wild type līnijā. Taču viesiem glikolīzes gēniem bija redzamas atšķirības normalizēto nolasījumu skaitā starp atkārtojumiem.

Tika apskatīta arī varianta m.13513G>A ietekme uz mitohondriju transkriptomu. Nevienam no mitohondriālajiem gēniem ekspresija nebija izmainīta statistiski nozīmīgi ($\text{adj.}p > 0,05$). Salīdzinot kopā pacienta B cibrīdus ar m.13513G>A 50% un 70% heteroplazmijas līmeni pret wild type šūnu līniju, tikai diviem gēniem regulācija izmainīta divas reizes. Tie bija mitohondriālie tRNS gēni *MT-TN* ($\log_2\text{Fold Change } 1,04$) un *MT-TD* ($\log_2\text{Fold Change } 1,74$) un tie bija lejupregulēti. Mitohondriālo mRNS gēnu ekspresija ir redzama 3.6. attēlā. Gēns *MT-ATP6*, kurā atrodas variants m.13513G>A ir augšupregulēts heteroplazmiskajās cibrīdu šūnu līnijās salīdzinājumā ar wild type šūnu līniju.



3.6. attēls. Mitohondriālo mRNS gēnu ekspresija pacienta B cibrīdu šūnu līnijās varianta m.13513G>A 50% un 70% heteroplazmijas klātbūtnē.

Figure 3.6. Expression of mitochondrial mRNA genes in patient B cybrid cell lines in the presence of 50% and 70% heteroplasmic variant m.13513G>A.

3.3. Heteroplazmijas stabilitātes pārbaude

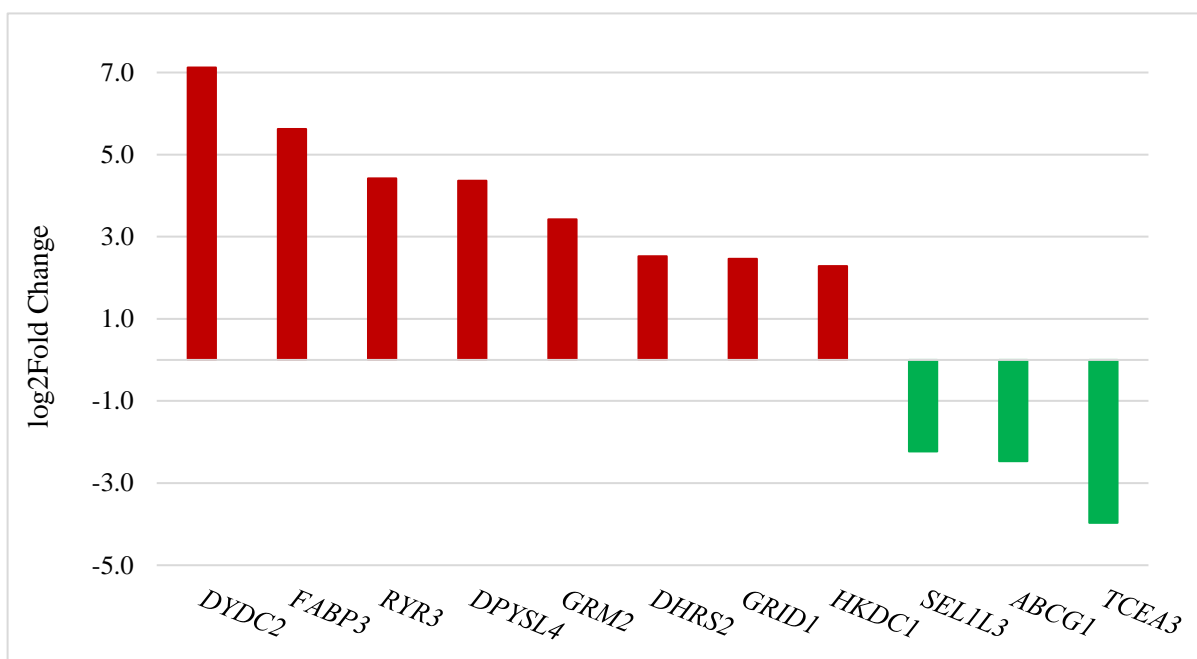
Visām darbā izmantotajām mutantajām cibrīdu šūnu kultūrām tika veikta Sangera sekvenčēšana, lai pārliecinātos, ka kultivēšanas laikā nav mainījies heteroplazmijas līmenis. Pacientu cibrīdu šūnas DNS izdalīšanai tika savāktas attiecīgās pasāžās (p): m.9185T>C 100% mut (p4, p15), m.13513G>A 50% mut (p5, p17), m.13513G>A 70% mut (p5, p17).

Iegūtie dati apstiprināja, ka varianta m.9185T>C homoplazmiskais stāvoklis laika gaitā nebija mainījies pacienta A cibrīdu šūnu līnijā. Kā arī varianta m.13513G>A, heteroplazmijas līmenis laika gaitā nebija mainījies pacienta B cibrīdu šūnu līnijās.

3.4. ddPCR apstākļu optimizācija

No 31 gēna, kuriem bija būtiski izmainīta ekspresija pacienta B heteroplazmiskajās cibrīdu šūnu līnijās, tika atlasīti 11 gēni, kas ir iesaistīti dažādos fizioloģiskos procesos šūnā. Ar vēža fizioloģiju saistītie gēni tika izslēgti, jo izmaiņas to ekspresijā varētu būt saistītas ar

143B osteosarkomas šūnām, kas tika izmantotas p0 šūnu izveidošanā. Priekš Selfie-dPCR izvēlētie gēni ir apkopoti 3.7. attēlā.



3.7. attēls. Validācijai atlasītie intereses gēni pacienta B cibrīdu šūnu līnijās.

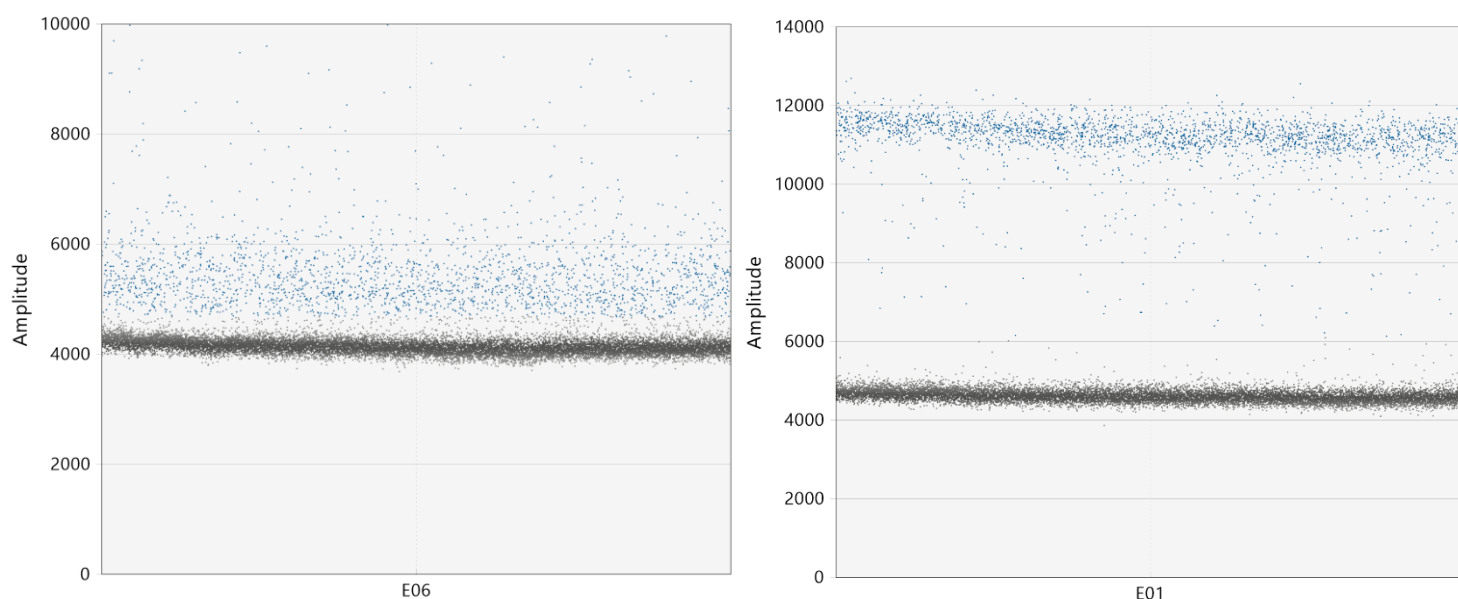
Figure 3.7. Genes of interest selected for validation in patient B cybrid cell lines.

Pēc gēnu atlasē tika veikts praimeru dizains un optimālākā amplikona (ddPCR produkta) piemeklēšana intereses gēniem. Praimeri tika dizainēti tā, lai to optimālā piesaistīšanās temperatūra būtu 60°C, amplikona garums no 70 līdz 120 bp un tie amplificētu PCR produktu viena eksona ietvaros.

Kopā priekš intereses gēniem tika izveidoti 23 praimeru pāri (1. pielikums). Katram gēnam bija vismaz divi praimeru pāru varianti, diviem gēniem bija trīs praimeru pāru varianti.

Izmantojot pacienta B *wild type* cibrīdu šūnu lizātu, katrs praimeru pāris tika izmēģināts, vai tas ar *Selfie*-dPCR spēj veiksmīgi producēt gēna fragmenta amplikonus. Kontroles gēniem šūnu lizāts tika atšķaidīts desmit reizes, bet intereses gēniem lizāts tika atšķaidīts divas reizes. Šūnu lizāta atšķaidīšana bija nepieciešama, lai reakcija nebūtu piesātināta un iegūstot rezultātus programmatūrā *QuantaSoft* būtu skaidri nošķiramas amplikonu saturošās pozitīvās lodītes (zilās) un negatīvās lodītes (pelēkās).

Izmantojot lielāko daļu praimeru pāru, tika veiksmīgi iegūti gēnu amplikoni. No viena gēna vairākiem amplikoniem tika izvēlēts tas, kas parādīja lielāko izšķirtspēju. Piemēram, 3.8. attēlā ir redzami divi gēna *HKDC1* amplikoni ar dažādiem praimeriem. Turpmākiem eksperimentiem katra kontroles un intereses gēna pārbaudei tika izvēlēts viens praimeru pāris, un šie praimeru pāri ir apkopoti 2.3. tabulā.



3.8. attēls. Gēna *HKDC1* ampliconi: pa kreisi - neoptimāls amplicons ar praimeru pāri *HKDC1_73*, pa labi - optimāls amplicons ar praimeru pāri *HKDC1_100*.

Figure 3.8. *HKDC1* gene amplicons: left - non-optimal amplicon with primer pair *HKDC1_73*, right - optimal amplicon with primer *HKDC1_100*.

3.5. RNS sekvencēšanas rezultātu pārbaude ar *Selfie*-dPCR

Lai pacienta B cibrīdu šūnu līnijās pārbaudītu dažādu gēnu transkripcijas līmeņa izmaiņas, kas bija noteiktas veicot RNS sekvencēšanas analīzi, tika izmantota *Selfie*-dPCR metode. Gēni, kuru ekspresija tika pārbaudīta ar *Selfie*-dPCR metodi ir redzami 3.7.attēlā.

No katras pacienta B cibrīdu šūnu līnijas tika sagatavoti trīs šūnu lizāti ar *DireCtQuant 100ST* DNS/RNS/proteīnu šķīdināšanas reaģentu. *Selfie*-dPCR tika veikta trīs atkārtojumos, katrā izmantojot lizātu no vienas šūnu ievākšanas reizes. Tomēr turpmāk salīdzināti tika pirmie divi *Selfie*-dPCR atkārtojumi. *Selfie*-dPCR rezultāti ir apkopoti 3.9. attēlā.

Seši gēni pirmajā atkārtojumā vismaz vienā no heteroplazmiskajām līnijām demonstrēja transkriptoma analīzes tendenci - gēni *TCEA3* (50% heteroplazmiskajā līnijā), *SELIL3* (50% heteroplazmiskajā līnijā) un *ABCG1* (50%, 70% heteroplazmiskajās līnijās) bija augšupregulēti, bet gēni *GRID1* (70% heteroplazmiskajā līnijā), *FABP3* un *GRM2* (70% heteroplazmiskajā līnijā) bija lejupregulēti. Četri gēni otrajā atkārtojumā vismaz vienā no heteroplazmiskajām līnijām demonstrēja transkriptoma analīzes tendenci - gēni *DYDC2*, *HKDC1*, *DHRS2*, *FABP3* bija lejupregulēti.

Tikai viens gēns abos *Selfie*-dPCR atkārtojumos gan 50%, gan 70% heteroplazmiskajā pacienta B cibrīdu šūnu līnijā atspoguļoja vispārējo tendenci, ko parādīja transkriptoma analīze - gēns *FABP3* bija lejueregulēts salīdzinot ar *wild type* līniju. Rezultāti no diviem *Selfie*-dPCR atkārtojumiem bija krasi atšķirīgi.

Regulācija pēc transkriptoma analīzes	<i>Selfie</i> -dPCR				
	Atkārtojums	Gēns	Transkripti uz gēnu		
			WT	Mut50	Mut70
lejup	1	<i>DYDC2</i>	0.43	0.49	0.45
	2		0.20	0	0
augšup	1	<i>TCEA3</i>	0	0.51	0
	2		0	0	0
lejup	1	<i>GRID1</i>	0.37	1.23	0.23
	2		0	0	1.08
lejup	1	<i>HKDC1</i>	0	0	0
	2		3.12	0.68	0.72
augšup	1	<i>SEL1L3</i>	0.02	0.59	0
	2		0	0	0
lejup	1	<i>DHRS2</i>	0	0.41	0
	2		2.87	0.27	0.23
lejup	1	<i>FABP3</i>	0.27	0.12	0.19
	2		0.12	0	0
lejup	1	<i>RYR3</i>	0	0.42	0
	2		0	0	0
lejup	1	<i>GRM2</i>	0.08	0.44	0
	2		0	0.55	0
lejup	1	<i>DPYSL4</i>	0.02	0.18	0
	2		0	0	0
augšup	1	<i>ABCG1</i>	0	0.75	0.19
	2		1.03	0	0.06

3.1. tabula. *Selfie*-dPCR rezultāti (sarkans - lejueregulēts, zaļš - augšuperegulēts, oranžs - ekspresija nemainās salīdzinot ar *wild type* (WT)).

Table 3.1. *Selfie*-dPCR results (red - downregulated, green - upregulated, orange - expression remains unchanged compared to *wild type* (WT)).

4. DISKUSIJA

Abi pacienti Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra I.Īņaškinas laboratorijas redzeslokā nonāca projekta “Iedzimtu neiromuskulāro slimību jaunu diagnostisko testu izstrāde” (Nr. 2010/0223/2DP/2.1.1.1.0/10/APIA/VIAA/025) ietvaros. Šiem pacientiem ar aizdomām par mitohondriālo saslimšanu iepriekš laboratorijā tika veikta pilna mtDNS sekvencēšana.

Pacients A bija septiņus mēnešus veca meitene no Latvijas. 2012.gadā viņa tika nosūtīta uz ģenētisko konsultāciju ar refraktārām lēkmēm. Meitenes vecāki nebija radniecīgi, un ģimenes anamnēzē nebija iedzimtas saslimšanas. Piecu mēnešu vecumā pacientei pirmo reizi tika novērotas vispārīgi krampji, kuras kļuva biežākas un intensīvākas, kā arī neuzlabojās pēc pret-epilepsijas terapijas. Laboratorijas izmeklējumi konstatēja paaugstinātu laktāta līmeni asinīs un paaugstinātu Krebsa cikla metabolītu un metilmalonskābes saturu urīnā. Plazmas aminoskābju analīzē konstatēja paaugstinātu alanīna saturu. Piecu mēnešu vecumā smadzeņu MR rezultāti bija normāli, taču ar elektroencefalogrāfiju tika noteikta multifokālā epilepsija. Septiņu mēnešu vecumā nebija novērojami psihomotorās attīstības traucējumi.

Fiziskajā pārbaudē trīs gadu vecumā pacientei A tika konstatēta mikrocefālija (galvas apkārtmērs 46 cm (zem 5.procentiles)). Viņa bija spējīga sēdēt bez atbalsta, taču nebija spējīga patstāvīgi staigāt. Viņai tika novērota vispārēja hipotonija, kāju spasticitāte, bilaterāla roku distonija un stereotipiskas kustības. Smadzeņu MR atklāja smadzeņu stumbra, bazālo gangliju un baltās vielas iesaisti, kā arī tika noteikts samazināts smadzeņu stumbra un smadzenīšu tilpums (Pelnenā et al., 2018).

Pacientei A tika līdzī sekots divus gadus, kuru laikā viņas stāvoklis smagi pasliktinājās. Trīs gadu vecumā bija novērojami smagi psihomotorās attīstības traucējumi un meitene nebija spējīga runāt, kaut gan tika ievērota ketogēnā diēta un regulāri tika lietoti mitohondriālo vitamīnu kokteiļi.

Pacients B bija četrus gadus vecs zēns no Latvijas. 2009.gadā 6 mēnešu vecumā viņš tika nosūtīts uz ģenētisko konsultāciju. Jau no trīs mēnešu vecuma zēnam bija novērojama attīstības aizture, muskuļu hipotonija un psihomotorās attīstības traucējumi. Sešu mēnešu vecumā zēnam sākās vispārīgi krampji. Zēna vecāki nebija radniecīgi, un ģimenes anamnēzē nebija iedzimtas saslimšanas. Tika noteikta klīniskā diagnoze, Vesta sindroms (*West syndrome*), un tika uzsākta *Depakine* (nātrija valproāta) terapija. Lēkmes norimās ap viena gada vecumu, kad *Depakine* terapija tika nomainīta uz *Vigabatrin* (vigabatrīns) terapiju. Viena gada vecumā tika konstatēta šķielēšana un redzes asuma traucējumi.

Pacients B sāka rāpot un sēdēt 16 mēnešu vecumā, un divu gadu vecumā sāka staigāt, tomēr nestabili. Zēnam bija novērota runas attīstības kavēšanās un pirmos vārdus viņš spēja pateikt trīs gadu vecumā. Pirmie laboratorijas izmeklējumi tika veikti sešu mēnešu vecumā, un tika konstatēts paaugstināts laktāta līmenis venozajās asinīs un cerebrospinālajā šķidrumā. Plazmas aminoskābju analīzē konstatēja paaugstinātu alanīna saturu. Smadzeņu MR zēnam tika veikta divas reizes. Pirmā reize bija 6 mēnešu vecumā, kad tika atrasta *corpus callosum* hipoplāzija. Otrā reize bija četru gadu vecumā, kad tika konstatēti simetriski, hiperintensīvi bojājumi laterālajos kodolos. Šie atklājumi liecināja par iespējamu mitohondriālo saslīmšanu, piemēram, Lī sindromu.

Sešu gadu vecumā pacientam B joprojām bija novērojama ataksiska gaita, difūza muskuļu hipotonija, šķielēšana un optiskā nerva atrofija. Runas spēja mēreni uzlabojās, zēna vārdu krājums palielinājās un viņš bija spējīgs formulēt īsus teikumus. Bija novērojami viegli līdz vidēji intelektuālās attīstības traucējumi (Pelnenā et al., 2018).

Pacienta B klīniskais stāvoklis uzlabojās pēc terapijas saņemšanas, kas sastāvēja no vigabatrīna, koenzīma-Q10 un B vitamīnu kompleksa. Zēns pabeidza pirmo klasi skolā bērniem ar īpašām vajadzībām.

Veicot pilnu mtDNS sekvencēšanu pacientei A, tika atklāts patogēns variants m.9185T>C gēnā *MT-ATP6*. Šis variants izraisa aminoskābju nomaiņu no leicīna uz prolīnu. Pacienta A asinīs varianta m.9185T>C heteroplazmijas līmenis bija 95%. Analizējot mtDNS pacientes mātes asinīs un muskuļu šūnās, patogēnais variants netika atrasts.

Veicot pilnu mtDNS sekvencēšanu pacientam B tika atklāts patogēns variants m.13513G>A gēnā *MT-ND5*. Šis variants izraisa aminoskābju nomaiņu no asparagīnskābes uz asparagīnu. Pacienta B asinīs varianta m.13513G>A heteroplazmijas līmenis bija 60%. Analizējot mtDNS pacienta mātes un brāļa asinīs, patogēnais variants netika atrasts.

Gan variants m.9185T>C, gan variants m.13513G>A ir iepriekš aprakstīti saistībā ar Lī sindromu, kas ir īpaši heterogēna mitohondriālā slimība.

Variantu m.9185T>C pirmo reizi aprakstīja Moslemi et al. septiņus gadus vecam zēnam ar vieglu Lī sindroma fenotipu. Heteroplazmijas līmenis asinīs bija 85% un muskuļos virs 97% (Moslemi et al., 2005). Šis variants ir bijis ziņots gan agrīna, gan vēlīna Lī sindroma gadījumos (Castagna et al., 2007; Takada et al., 2020). Individīdiem, kuriem Lī sindroma cēlonis ir m.9185T>C, ir raksturīgi tādi klīniskie simptomi kā mēreni līdz smagi attīstības traucējumi, lēkmes, hipotonija un vājums, ataksija un ptoze. Varianta heteroplazmijas līmenis asinīs tipiski ir virs 90% (Takada et al., 2020). Saneto un Singh ir aprakstījuši gadījumu, kad Lī sindroms 3 gadus vecam bērnam sāka izpausties pēc vīrusa infekcijai līdzīgas saslīmšanas, un simptomi saasinājās pēc vēl vienas saslīmšanas epizodes vairākus gadus vēlāk (Saneto & Singh, 2010).

Variants m.13513G>A pirmo reizi tika aprakstīts pacientam ar mitohondriālo encefalomiopātiju ar laktātacidozi un insultam līdzīgām epizodēm (MELAS) (Santorelli et al., 1997). Šī varianta patogenitāte un klīniskais fenotips ir daudzveidīgs. Tas ir bijis aprakstīts arī saistībā ar Lī-līdzīgo sindromu, Lī sindromu, Volfa Parkinsona Vaita (*Wolff-Parkinson-White*) sindromu un kardiomiopātiju, kā arī saistībā ar LHON/MELAS pārklāšanās sindromu (Chol et al., 2003; Hsieh et al., 2011; Wang et al., 2008).

Iepriekš laboratorijā abu pacientu cibrīdu šūnu kultūrām tika veikti OXPHOS sistēmas enzīmu aktivitāšu mērījumi, kā arī respirometrijas analīze. Pacienta A cibrīdu šūnas uzrādīja normālas OXPHOS sistēmas kompleksu I – IV aktivitātes, tomēr veicot respirometrijas analīzi tajās tika konstatēta samazināta oksidatīvās fosforilēšanas efektivitāte salīdzinot ar kontroles cibrīdu šūnu līnijām. Variants m.9185T>C atrodas gēnā *MT-ATP6*, kas kodē subvienību ATF sintāzei, bet tajā laikā laboratorijā vēl nebija izstrādāta metode, lai veiktu ATF sintāzes aktivitātes mērījumus. Pacienta B cibrīdu šūnu līnijās OXPHOS sistēmas kompleksi I, IV un I+III tika noteikta aktivitāšu samazināšanās palielinoties varianta m.13513G>A heteroplazmijas līmenim. Respirometrijas mērījumos šūnu līnijā ar 70% heteroplazmiju konstatēja ar kompleksu I saistīto skābekļa patēriņa samazināšanos.

Pacienta A cibrīdu šūnu līnijā ar homoplazmisko variantu m.9185T>C nozīmīgi izmainīta ekspresija bija tikai trīs gēniem. Gēns *HHIP* kodē proteīnu HHIP (*hedgehog-interacting protein*), kas ir mugurkaulnieku specifisks *Hedgehog* signālu inhibitors. Tas saista *Hedgehog* saimes proteīnus, kuri ir iesaistīti embrionālās attīstības procesos. Gēns *AHNAK2* kodē AHNAK nukleoproteīnu 2, kas ir liela izmēra nukleoproteīns. Tam ir potenciāla loma kalcija signālu pārvadīšanā, jo tas saistās ar kalcija kanālu proteīniem. Gēns *ZNF185* kodē LIM-domēna cinka pirkstu proteīnu, kas ir aktīva-citoskeleta saistīts proteīns un tam ir loma proteīnu-proteīnu mijiedarbībās un nukleīnskābju saistīšanā. Tas ir iesaistīts tādos procesos kā šūnu proliferācija, diferenciācija un apoptoze. Tā kā pacienta A cibrīdu šūnās gēnu skaits, kuriem bija būtiski izmainīta regulācija, bija mazs, šī līnija turpmāk netika dziļāk analizēta un RNS sekvencēšanas rezultāti netika validēti ar *Selfie*-dPCR.

Pacienta B mutantajās cibrīdu šūnu līnijās nozīmīgi izmainīta regulācija bija 84 gēniem, no kuriem 31 regulācija bija izmainīta vairāk nekā divas reizes ($-2 > \log_2 \text{Fold Change} > 2$). Gēns *DYDC2* kodē DY30 domēnu saturošo proteīnu 2 (*DPY30 domain containing 2*). Šis proteīns ir iesaistīts tādos bioloģiskos procesos kā hromatīna *silencing* telomērās un histonu HS-K4 metilācija. Gēns *MYCT1* kodē MYC mērķa proteīnu 1 (*MYC target 1*). Ir iesaistīts hematopoētisko cilmes šūnu homeostāzē. Gēns *AC02163.1* kodē jaunu garās nekodējošās RNS (lncRNS) transkriptu. Gēns *FABP3* kodē taukskābju saistošo proteīnu 3 (*fatty acid binding protein 3*). Tas ir iesaistīts tādos procesos kā garo ķēžu taukskābju metabolisms un transports.

Gēns *FAP* kodē fibroblastu aktivācijas proteīnu alfa (*fibroblast activation protein alpha*). Šis proteīns ir iesaistīts fibroblastu augšanas kontrolē, audu atjaunošanā un epitēlija kancerogēnēzē. Gēns *SLAMF7* kodē SLAM saimes proteīnu 7 (*SLAM family member 7*). Iesaistīts tādos procesos kā adaptīvās imūnatbildes veidošana, dabīgo galētājšūnu aktivēšana, šūnu adhēzija. Gēns *ANGPTL2* kodē *ANGPTL2 (angiopoietin like 2)* proteīnu. *ANGPTL2* ir angiopoetīniem līdzīgs glikoproteīns, kuram ir loma angiogēnēzē. Gēns *RYR3* kodē rianodīna receptoru 3 (*ryanodine receptor 3*). Tā funkcija ir kalcija atbrīvošana no iekššūnas kalcija krātuvēm. Gēns *DPYSL4* kodē *DPYSL4 (dihydropyrimidinase like 4)*. Tas nodrošina filamīna saistīšanās aktivitāti un tam ir loma nervu sistēmas attīstībā un šūnu migrācijā. Gēns *PCDHGB5* kodē *PCDHGB5 (protocadherin gamma subfamily B, 5)* proteīnu. Tas ir potenciāls no kalcija atkarīgas šūnu adhēzijas proteīns, kuram ir loma smadzeņu neironu savienojumu izveidošanā un uzturēšanā. Gēns *SERPINB7* kodē serpin saimes B proteīnu 7 (*serpin family B member 7*), kuram ir serpīna tipa endopeptidāzes inhibitora aktivitāte. Gēns *PCDHGB2* kodē *PCDHGB2 (protocadherin gamma subfamily B, 2)* proteīnu, kuram ir līdzīga loma šūnā, kā *PCDHGB5*. Gēns *CD163L1* kodē *CD163L1 (CD163 molecule like 1)* proteīnu. *CD163L1* ir no *SRCR (scavenger receptor cysteine-rich)* proteīnu saimes, kuri galvenokārt ir atrodamī ar imūnsistēmu saistītās šūnās. Gēns *SLC24A4* kodē *SLC24A4 (solute carrier family 24 member 4)* proteīnu. *SLC24A4* pieder pie no kālija atkarīgās nātrija/kalcija apmaiņas proteīnu saimes. Tam ir loma kalcija, nātrija/kālija antiportera aktivitātē un simportera aktivitātē. Gēns *TM4SF18* kodē *TM4SF18 (transmembrane 4 L six family member 18)* proteīnu. L6 saimes proteīni ir zināmi, kā pozitīvi audzēju augšanas un metastāžu regulatori dažādos vēža tipos. Gēns *PAX5* kodē *PAX5 (paired box 5)* proteīnu. *PAX5* ir transkripcijas faktors, kas ir iesaistīts histonu H3-K9 metilācijas negatīvā regulācijā, kā arī negatīvi regulē RNS polimerāzes II veikto transkripciju. Gēns *GRID1* kodē *GRID1 (glutamate ionotropic receptor delta type subunit 1)* proteīnu, kas veido glutamāta receptora subvienību. *GRID1* ir loma glutamāta receptoru aktivitātē, ligandu un transmieteru kontrolētajā jonu kanālu aktivitātē. Gēns *SYT16* kodē sinaptogamīnu 16 (*synaptotagmin 16*), kuram ir loma vezikulu transportā un sekrēcijā ne neironālos audos. Gēns *TDO2* kodē triptofāna 2,3-dioksigenāzi (*tryptophan 2,3-dioxygenase*), kas ir hēma enzīms ar svarīgu lomu triptofāna metabolismā. Gēns *HKDC1* kodē heksokināzes domēnu saturošo proteīnu1 (*hexokinase domain containing 1*). Šim proteīnam ir loma glikozes metabolismā hepatisko lipīdu akumulācijā. Gēns *RASL10B* kodē *RASL10B (RAS like family 10 member B)* proteīnu. Tas ir iesaistīts peptīdu hormonu sekrēcijas regulācijā un arteriālā spiediena regulācijā. Gēns *NIPAL4* kodē *NIPA domēnu saturošo proteīnu 4 (NIPA like domain containing 4)*. Tas ir membrānas receptors, kura loma ir magnija jonu transports.

Gēns *PLEKHG1* kodē PLEKHG1 (*pleckstrin homology and RhoGEF domain containing G1*) proteīnu. Tam ir loma guanilnukleotīdu apmaiņas faktora aktivitātē un tas ir iesaistīts guanoziltrifosfāta mediētajā signālu pārvadīšanā. Gēns *SEL1L3* kodē SEL1L saimes proteīnu 3 (*SEL1L family member 3*). SEL1L3 pieder pie proteīnu kompleksa, kas nepieciešami nepareizi salocīto proteīnu transportam no endoplazmatiskā tīkla uz citoplazmu. Gēns *ABCG1* kodē ABCG1 (*ATP-binding cassette sub-family G member 1*) proteīnu. Tas ir iesaistīts dažādu molekulu transportā caur ārpusšūnas un iekššūnas membrānām. Gēns *NHS* kodē NHS (*NHS actin remodeling regulator*) proteīnu. Tas ir iesaistīts dažādu orgānu, tai skaitā smadzeņu, attīstības regulācijā, kā arī tas var regulēt aktīna pārveidošanu un šūnu morfoloģiju. Gēns *AC021127.1* kodē jaunu lncRNS transkriptu. Gēns *TCEA3* kodē transkripcija elongācijas faktoru A3 (*transcription elongation factor A3*). Tas ir nepieciešams efektīvai RNS polimerāzes II transkripcijas pagarināšanai.

Pētot gēnu ekspresijas izmaiņas ir jāņem vērā, ka izmantotais šūnu modelis var ietekmēt transkripcijas profilu. Daļa gēnu, kuriem tika konstatēta izmainīta ekspresija pacienta B mutantajās cibrīdu šūnu līnijā, ir saistīti ar vēža fizioloģiju. Piemēram, gēni *MYCT1*, *FAP* un *TM4SF18*. Tas bija sagaidāms, jo cibrīdu šūnu izveidošanai tika izmantotas 143B osteosarkomas šūnas.

Ja šūnās ir zema OXPHOS sistēmas darbības efektivitāte vai ir samazināta mitohondriālo gēnu transkripcija, kā kompensācijas mehānisms šūnās var tikt inducēta glikolīzes gēnu transkripcija. Picard et al. novēroja, ka cibrīdu šūnu līnijās ar dažādiem MELAS varianta m.3243A>G heteroplazmijas līmeņiem glikolīzes gēnu ekspresijas līmenis krasi atšķiras salīdzinot ar *wild type* līniju. Cibrīdu šūnās, kas saturēja variantu m.3243A>G 50-90% heteroplazmijas līmenī, glikolīzes gēnu ekspresija bija izteikti augstāka nekā *wild type* šūnu līnijā, liecinot, ka cibrīdu šūnas ATF iegūšanai pārslēdzas no pārsvarā OXPHOS metabolisma uz glikolīzes metabolismu. Tomēr pacienta B cibrīdu šūnu līnijās, kas saturēja variantu m.13513G>A 50% un 70% heteroplazmijas līmenī, glikolīzes gēnu ekspresija mutantajās cibrīdu līnijās bija tikai minimāli izmainīta salīdzinot ar *wild type* šūnu līniju. Iespējams, ja analīzei papildus esošajām šūnu līnijā būtu bijušas pieejamas pacienta B cibrīdu šūnu līnijas ar zemāku un augstāku heteroplazmijas līmeni, varētu novērot izmaiņas glikolīzes gēnu ekspresijā.

Variants m.13513G>A gēnā *MT-ND5* izraisa aminoskābju nomaiņu no asparagīnskābes uz asparagīnu. Pacienta B mutantajās cibrīdu šūnu līnijās divi mitohondriālās tRNS gēni, *MT-TN*, kas kodē asparagīnu un *MT-TD*, kas kodē asparagīnskābi, bija lejueregulēti divas reizes, kas visdrīzāk ir sagādīšanās.

Kultivējot šūnas, kas satur kādu mtDNS variantu heteroplazmiskā stāvoklī, ir nepieciešams pārbaudīt, vai varianta heteroplazmijas līmenis ir tāds pats kā kultivēšanas sākumā. mtDNS replikācija nav atkarīga no šūnas cikla un replikācijas laikā mtDNS tiek segregēta pa meitšūnām, līdz ar to heteroplazmijas līmenis ir dinamisks. Tas var laika gaitā mainīties gan mitotiskās šūnās, gan pēc-mitotiskās šūnās vai audos (Nissanka & Moraes, 2020). Tāpēc kultivējot heteroplazmiskas šūnu līnijas, nedrīkst izslēgt iespēju, ka laika gaitā varētu būt mainījies heteroplazmijas līmenis.

Pēc rezultātu analīzes bija redzams, ko, iespējams, vajadzēja mainīt sākotnējā eksperimentu dizainā. Analīzei pieejamajās cibrīdu šūnu līnijās pētītie patogēnie varianti bija līdzīgā heteroplazmijas līmenī, kā pacientiem. Ideālā gadījumā, lai pilnīgāk novērtētu ar Lī sindromu saistīto variantu m.9185T>C un m.13513G>A ietekmi uz gēnu ekspresiju, transkriptoma analīzes veikšanai būtu pieejamas vēl dažas cibrīdu šūnu līnijas ar dažādu šo variantu heteroplazmijas līmeni. Taču cibrīdu līniju izveides process ir laikietilpīgs un nav garantijas, ka tiks iegūtas šūnu populācijas ar vēlamo mutantās mtDNS daudzumu.

Lai iegūtu statistiski ticamākus un precīzākus rezultātu, kā arī, lai izvairītos no datu variācijas starp atkārtojumiem, būtu nepieciešams palielināt atkārtojumu skaitu katrā eksperimentā. RNS sekvencēšana katrai šūnu līnijai tika veikta divos replikātos, un sekvencēšanas nolasījumu skaits krasi atšķīrās starp replikātiem. Katrai šūnu līnijai RNS sekvencēšanu būtu bijis ieteicams veikt vismaz četros tehniskajos atkārtojumos. Abu mutanto pacienta B cibrīdu šūnu līniju transkriptoma dati tika apvienoti, lai salīdzinātu ar *wild type* līniju, bet būtu bijis noderīgi katru līniju analizēt atsevišķi.

Lai uzlabotu *Selfie*-dPCR rezultātus un samazinātu to variāciju starp atkārtojumiem, vairākas eksperimenta daļas būtu bijis ieteicams mainīt. Iespējams, vajadzēja saskaitīt šūnas pirms lizēšanas ar *DireCtQuant 100ST* DNS/RNS/proteīnu šķīdināšanas reaģentu, lai uz katru eksperimentu būtu iegūts vienāds šūnu daudzums, kaut gan tas netika rekomendēts. Vajadzēja vairāk atkārtojumu katram gēnam viena eksperimenta ietvaros, piemēram, katrā eksperimentā katru gēnu likt dubultā, izmantojot katras līnijas lizātu. Vai arī katras līnijas visus trīs iegūtos šūnu lizātus vajadzēja izmantot vienā eksperimentā. Veicot *Selfie*-dPCR rezultātu apstrādi varēja bieži novērot, ka RT+ bedrītēs bija mazāk gēna/gēna amplikona kopiju nekā RT-bedrītēs. Iespējams reversā transkriptāze nedarbojās ar vienādu efektivitāti.

Trešajā atkārtojumā principā nevienam gēnam nebija novērojama ekspresija. Tas vēl vairāk liek domāt par tehniskām problēmām tieši ar reverso transkriptāzi. Papildus tam, nekoncekvences dPCR iegūtajos datos, iespējams, bija saistītas ar tehniskajām problēmām, kas bija radušās ar *QX200™ Droplet Reader* iekārtu.

5. SECINĀJUMI

1. Pacienta A cibrīdu šūnu līnijā, homoplazmiska varianta m.9185T>C klātbūtnē, nozīmīgi izmainīta bija trīs gēnu ekspresija.
2. Pacienta B cibrīdu šūnu līnijās, varianta m.13513G>A 50% un 70% heteroplazmijas klātbūtnē, nozīmīgi izmainīta bija 84 gēnu ekspresija, no kuriem 31 gēna regulācija bija izmainīta vairāk nekā četras reizes.
3. Heteroplazmijas līmenis saglabājās stabils laika gaitā visām pētāmajām šūnu līnijām.
4. No 11 gēniem, kas tika izvēlēti transkriptoma analīzes datu validācijai, sešiem (*TCEA3*, *SEL1L3*, *ABCG1*, *GRID1*, *FABP3* un *GRM2*) novēroja transkriptoma analīzes rezultātiem atbilstošas tendences pirmajā Selfie-dPCR atkārtojumā un četriem gēniem (*DYDC2*, *HKDC1*, *DHRS2*, *FABP3*) – otrajā atkārtojumā. Tikai viens gēns *FABP3* apstiprināja transkriptoma analīzes rezultātiem atbilstošu tendenci abos atkārtojumos.

PATEICĪBAS

Vēlos īpaši pateikties savai darba vadītājai Dr. biol. Innai Inaškinai par pacietību un palīdzību darba izstrādē. Liela paldies Dr. biol. Pāvelam Zajakinam no Bioinformātikas nodaļas par transkriptoma datu apstrādi. Paldies arī MSc.biol. Dītai Kiderei par atbalstu un padomiem darba tapšanas procesā. Paldies arī visiem pārējiem par atbalstu.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- Alston, C. L., Rocha, M. C., Lax, N. Z., Turnbull, D. M., & Taylor, R. W. (2017). The genetics and pathology of mitochondrial disease: Mitochondrial genetic disease. *Journal of Pathology*, *241*, 236–250. <https://doi.org/10.1002/path.4809>
- Alves, C. A. P. F., Teixeira, S. R., Martin-Saavedra, J. S., Guimarães Gonçalves, F., Io Russo, F., Muraresku, C., McCormick, E. M., Falk, M. J., Zolkipli-Cunningham, Z., Ganetzky, R., Vossough, A., Goldstein, A., & Zuccoli, G. (2020). Pediatric Leigh Syndrome: Neuroimaging Features and Genetic Correlations. *Annals of Neurology*, *88*(2), 218–232. <https://doi.org/10.1002/ana.25789>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, *31*(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Arnould, T., Vankoningsloo, S., Renard, P., Hubion, A., Nianane, N., Demazy, C., Remacle, J., & Raes, M. (2002). CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation. *The EMBO Journal*, *21*(1), 53–63.
- Baertling, F., Klee, D., Haack, T. B., Prokisch, H., Meitinger, T., Mayatepek, E., Schaper, J., & Distelmaier, F. (2016). The many faces of paediatric mitochondrial disease on neuroimaging. In *Child's Nervous System* (Vol. 32, Issue 11, pp. 2077–2083). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00381-016-3190-3>
- Baertling, F., Rodenburg, R. J., Schaper, J., Smeitink, J. A., Koopman, W. J. H., Mayatepek, E., Morava, E., & Distelmaier, F. (2014). A guide to diagnosis and treatment of Leigh syndrome. In *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* (Vol. 85, Issue 3, pp. 257–265). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-304426>
- Bakare, A. B., Lesnefsky, E. J., & Iyer, S. (2021). Leigh Syndrome: A Tale of Two Genomes. *Frontiers in Physiology*, *12*.
- Bock, F. J., & Tait, S. W. G. (2020). Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 21, Issue 2, pp. 85–100). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>
- Bonfante, E., Koenig, M. K., Adejumo, R. B., Perinjelil, V., & Riascos, R. F. (2016). The neuroimaging of Leigh syndrome: case series and review of the literature. In *Pediatric Radiology* (Vol. 46, Issue 4, pp. 443–451). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00247-015-3523-5>
- Bouda, E., Stapon, A., & Garcia-Diaz, M. (2019). Mechanisms of mammalian mitochondrial transcription. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, *28*(9), 1594. <https://doi.org/10.1002/PRO.3688>
- Cagin, U., & Enriquez, J. A. (2015). The complex crosstalk between mitochondria and the nucleus: What goes in between? In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 63, pp. 10–15). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.01.026>
- Calvo, S. E., Clauser, K. R., & Mootha, V. K. (2016). MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D1251–D1257. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV1003>

- Carrozzo, R., Carlo Dionisi-Vici, C., Steuerwald, U., Luciola, S., Deodato, F., di Giandomenico, S., Bertini, E., Franke, B., Kluijtmans, L. A. J., Meschini, M. C., Rizzo, C., Piemonte, F., Rodenburg, R., Santer, R., Santorelli, F. M., van Rooij, A., Vermunt-de Koning, D., Morava, E., & Wevers, R. A. (2007). SUCLA2 mutations are associated with mild methylmalonic aciduria, Leigh-like encephalomyopathy, dystonia and deafness. *Brain*, *130*, 862–874.
- Castagna, A. E., Addis, J., McInnes, R. R., Clarke, J. T. R., Ashby, P., Blaser, S., & Robinson, B. H. (2007). Late onset Leigh syndrome and ataxia due to a T to C mutation at bp 9,185 of mitochondrial DNA. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *143*(8), 808–816. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31637>
- Chen, C., Chen, Y., & Guan, M.-X. (2015). A peep into mitochondrial disorder: multifaceted from mitochondrial DNA mutations to nuclear gene modulation. *Protein & Cell*, *6*(12), 862–870.
- Chinnery, P. F., & Hudson, G. (2013). Mitochondrial genetics. *British Medical Bulletin*, *106*, 135–159. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldt017>
- Chiu, Y.-H., Lin, S.-C., Kuo, C.-H., & Li C.-J. (2021). Molecular Machinery and Pathophysiology of Mitochondrial Dynamics. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*(743892).
- Chol, M., Lebon, S., Bénit, P., Chretien, D., de Lonlay, P., Goldenberg, A., Odent, S., Hertz-Pannier, L., Vincent-Delorme, C., Cormier-Daire, V., Rustin, P., & Rötig, A. (2003). The mitochondrial DNA G13513A MELAS mutation in the NADH dehydrogenase 5 gene is a frequent cause of Leigh-like syndrome with isolated complex I deficiency. *Journal of Medical Genetics*, *40*, 188–191. www.jmedgenet.com
- Chomyn, A. (1996). Platelet-mediated transformation of human mitochondrial DNA-less cells. *Mitochondrial Genetics and Gene Manipulation*, *264*, 334–338.
- Cohen, B. H., & Gold, D. R. (2001). Mitochondrial cytopathy in adults: what we know so far. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, *68*(7), 625–642. <https://doi.org/10.3949/CCJM.68.7.625>
- Collins, T. J., Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO Journal*, *21*(7), 1616–1627. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/21.7.1616>
- DiMauro, S., Schon, E. A., Carelli, V., & Hirano, M. (2013). The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nature Reviews: Neurology*, *9*(8), 429–444.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2012). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics Advance Access*, *29*(1), 15–21. <http://code.google.com>
- D'souza, A. R., & Minczuk, M. (2018). Mitochondrial transcription and translation: overview. *Essays in Biochemistry*, *62*, 309–320. <https://doi.org/10.1042/EBC20170102>
- Elpeleg, O., Miller, C., Hershkovitz, E., Bitner-Glindzicz, M., Bondi-Rubinstein, G., Rahman, S., Pagnamenta, A., Eshhar, S., & Saada, A. (2005). Deficiency of the ADP-Forming Succinyl-CoA Synthase Activity Is Associated with Encephalomyopathy and Mitochondrial DNA Depletion. In *Am. J. Hum. Genet* (Vol. 76).

- English, J., Son, J. M., Cardamone, M. D., Lee, C., & Perissi, V. (2020). Decoding the rosetta stone of mitonuclear communication. In *Pharmacological Research* (Vol. 161). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105161>
- Falkenberg, M., & Gustafsson, C. M. (2020). Mammalian mitochondrial DNA replication and mechanisms of deletion formation. In *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 55, Issue 6, pp. 509–524). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1818684>
- Falkenberg, M., Larsson, N. G., & Gustafsson, C. M. (2007). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 76, pp. 679–699). <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060305.152028>
- Finsterer, J. (2008). Leigh and Leigh-Like Syndrome in Children and Adults. In *Pediatric Neurology* (Vol. 39, Issue 4, pp. 223–235). <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2008.07.013>
- Frazier, A. E., Thorburn, D. R., & Compton, A. G. (2019). Mitochondrial energy generation disorders: Genes, mechanisms, and clues to pathology. *Journal of Biological Chemistry*, 294(14), 5386–5395. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.809194>
- Ganetzky, R. D., Stendel, C., McCormick, E. M., Zolkipli-Cunningham, Z., Goldstein, A. C., Klopstock, T., & Falk, M. J. (2019). MT-ATP6 mitochondrial disease variants: Phenotypic and biochemical features analysis in 218 published cases and cohort of 14 new cases. In *Human Mutation* (Vol. 40, Issue 5, pp. 499–515). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/humu.23723>
- Gerards, M., Sallevelt, S. C. E. H., & Smeets, H. J. M. (2016). Leigh syndrome: Resolving the clinical and genetic heterogeneity paves the way for treatment options. In *Molecular Genetics and Metabolism* (Vol. 117, Issue 3, pp. 300–312). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.12.004>
- Ghezzi, D., Arzuffi, P., Zordan, M., da Re, C., Lamperti, C., Benna, C., D’Adamo, P., Diodato, D., Costa, R., Mariotti, C., Uziel, G., Smiderle, C., & Zeviani, M. (2011). Mutations in TTC19 cause mitochondrial complex III deficiency and neurological impairment in humans and flies. *Nature Genetics* 2011 43:3, 43(3), 259–263. <https://doi.org/10.1038/ng.761>
- Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., & Scorrano, L. (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 21, Issue 4, pp. 204–224). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0210-7>
- Giordano, C., Iommarini, L., Giordano, L., Maresca, A., Pisano, A., Valentino, M. L., Caporali, L., Liguori, R., Deceglie, S., Roberti, M., Fanelli, F., Fracasso, F., Ross-Cisneros, F. N., D’adamo, P., Hudson, G., Pyle, A., Yu-Wai-Man, P., Chinnery, P. F., Zeviani, M., ... Carelli, V. (2014). Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber’s hereditary optic neuropathy. *Brain*, 137(2), 335–353. <https://doi.org/10.1093/brain/awt343>
- Gomes, T. M. B., Ng, Y. S., Pickett, S. J., Turnbull, D. M., & Vincent, A. E. (2021). Mitochondrial DNA disorders: from pathogenic variants to preventing transmission. *Human Molecular Genetics*, 30(20). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab156>

- Gorman, G. S., Schaefer, A. M., Ng, Y., Gomez, N., Blakely, E. L., Alston, C. L., Feeney, C., Horvath, R., Yu-Wai-Man, P., Chinnery, P. F., Taylor, R. W., Turnbull, D. M., & McFarland, R. (2015). Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Annals of Neurology*, *77*(5), 753–759. <https://doi.org/10.1002/ana.24362>
- Granat, L., Hunt, R. J., & Batema, J. M. (2020). Mitochondrial retrograde signalling in neurological disease. *Philosophical Transactions of the The Royal Society of London*, *375*(1801).
- Harper, M. E., Bevilacqua, L., Hagopian, K., Weindruch, R., & Ramsey, J. J. (2004). Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling. *Acta Physiologica Scandinavica*, *182*(4), 321–331. <https://doi.org/10.1111/J.1365-201X.2004.01370.X>
- Hirata, S., Hoshi, K., Shoda, T., & Mabuchi, T. (2002). Spermatozoon and mitochondrial DNA. In *Reproductive Medicine and Biology* (Vol. 1).
- Horan, M. P., & Cooper, D. N. (2014). The emergence of the mitochondrial genome as a partial regulator of nuclear function is providing new insights into the genetic mechanisms underlying age-related complex disease. In *Human Genetics* (Vol. 133, Issue 4, pp. 435–458). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00439-013-1402-4>
- Hsieh, Y. T., Yang, M. T., Peng, Y. J., & Hsu, W. C. (2011). Central retinal vein occlusion as the initial manifestation of LHON/MELAS overlap syndrome with mitochondrial DNA G13513A mutation - Case report and literature review. *Ophthalmic Genetics*, *32*(1), 31–38. <https://doi.org/10.3109/13816810.2010.531880>
- Jazwinski, S. M. (2013). The retrograde response: When mitochondrial quality control is not enough. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1833, Issue 2, pp. 400–409). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.02.010>
- Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D., & Hardie, D. G. (2005). AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. In *Cell Metabolism* (Vol. 1, Issue 1, pp. 15–25). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2004.12.003>
- Kanabus, M., Heales, S. J., & Rahman, S. (2014). Development of pharmacological strategies for mitochondrial disorders. *British Journal of Pharmacology*, *171*, 1798–1817. <https://doi.org/10.1111/bph.2014.171.issue-8>
- Kastaniotis, A. J., Autio, K. J., Kerätär, J. M., Monteuuis, G., Mäkelä, A. M., Nair, R. R., Pietikäinen, L. P., Shvetsova, A., Chen, Z., & Hiltunen, J. K. (2017). Mitochondrial fatty acid synthesis, fatty acids and mitochondrial physiology. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* (Vol. 1862, Issue 1, pp. 39–48). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.08.011>
- Kim, S., & Koh, H. (2017). Role of FOXO transcription factors in crosstalk between mitochondria and the nucleus. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *49*(4), 335–341. <https://doi.org/10.1007/s10863-017-9705-0>
- Koene, S., Rodenburg, R. J., van der Knaap, M. S., Willemsen, M. A. A. P., Sperl, W., Laugel, V., Ostergaard, E., Tarnopolsky, M., Martin, M. A., Nesbitt, V., Fletcher, J., Edvardson, S., Procaccio, V., Slama, A., van den Heuvel, L. P. W. J., & Smeitink, J. A. M. (2012). Natural disease course and genotype-phenotype correlations in Complex I deficiency caused by nuclear gene defects: What we learned from 130 cases. In *Journal*

- of Inherited Metabolic Disease* (Vol. 35, Issue 5, pp. 737–747).
<https://doi.org/10.1007/s10545-012-9492-z>
- Kopylova, E., Noé, L., & Touzet, H. (2012). SortMeRNA: Fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, 28(24), 3211–3217.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts611>
- Krasich, R., & Copeleand, W. C. (2017). DNA polymerases in the mitochondria: A critical review of the evidence. *Frontiers in Bioscience*, 22, 692–709.
- Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S12915-015-0201-X>
- Kukat, C., Davies, K. M., Wurm, C. A., Spähr, H., Bonekamp, N. A., Kühl, I., Joos, F., Polosa, P. L., Park, C. B., Posse, V., Falkenberg, M., Jakobs, S., Kühlbrandt, W., & Larsson, N. G. (2015). Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(36), 11288–11293.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1512131112/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Lake, N. J., Bird, M. J., Isohanni, P., & Paetau, A. (2015). Leigh Syndrome: Neuropathology and Pathogenesis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 74(6), 482–492. <http://jnen.oxfordjournals.org/>
- Lake, N. J., Compton, A. G., Rahman, S., & Thorburn, D. R. (2016). Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes. In *Annals of Neurology* (Vol. 79, Issue 2, pp. 190–203). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/ana.24551>
- Lawless, C., Greaves, L., Reeve, A. K., Turnbull, D. M., & Vincent, A. E. (2020). The rise and rise of mitochondrial DNA mutations. In *Open Biology* (Vol. 10, Issue 5). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rsob.200061>
- Leigh, D. (1951). Sunacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 14(216).
- Lerner, C., Bitto, A., Pulliam, D., Nacarelli, T., Konigsberg, M., van Remmen, H., Torres, C., & Sell, C. (2013). Reduced mammalian target of rapamycin activity facilitates mitochondrial retrograde signaling and increases life span in normal human fibroblasts. *Aging Cell*, 12(6), 966–977. <https://doi.org/10.1111/accel.12122>
- Lin, T. K., Lin, H. Y., Chen, S. der, Chuang, Y. C., Chuang, J. H., Wang, P. W., Huang, S. T., Tiao, M. M., Chen, J. B., & Liou, C. W. (2012). The creation of cybrids harboring mitochondrial haplogroups in the taiwanese population of ethnic Chinese background: An extensive in vitro tool for the study of mitochondrial genomic variations. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2012/824275>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12).
<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Martin, M. (2011). Cutadapt Removes Adapter Sequences From High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet.Journal*, 17, 10–12. <http://www-huber.embl.de/users/an->

- McCormick, E. M., Muraresku, C. C., & Falk, M. J. (2018). Mitochondrial Genomics: A Complex Field Now Coming of Age. *Current Genetic Medicine Reports*, 6(2), 52–61. <https://doi.org/10.1007/s40142-018-0137-x>
- McKelvie, P., Infeld, B., Marotta, R., Chin, J., Thorburn, D., & Collins, S. (2012). Late-adult onset Leigh syndrome. In *Journal of Clinical Neuroscience* (Vol. 19, Issue 2, pp. 195–202). <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2011.09.009>
- Meier, J. A., & Lerner, A. C. (2014). Toward a new STATE: The role of STATs in mitochondrial function. In *Seminars in Immunology* (Vol. 26, Issue 1, pp. 20–28). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.12.005>
- Morán, M., Marín-Buera, L., Carmen Gil-Borlado, M., Rivera, H., Blázquez, A., Seneca, S., Vázquez-López, M., Arenas, J., Martín, M. A., & Ugalde, C. (2010). Cellular pathophysiological consequences of BCS1L mutations in mitochondrial complex III enzyme deficiency. *Human Mutation*, 31(8), 930–941. <https://doi.org/10.1002/humu.21294>
- Moslemi, A. R., Darin, N., Tulinius, M., Oldfors, A., & Holme, E. (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>
- Nguyen, T., Nioi, P., & Pickett, C. B. (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 284, Issue 20, pp. 13291–13295). <https://doi.org/10.1074/jbc.R900010200>
- Nissanka, N., & Moraes, C. T. (2020). Mitochondrial DNA heteroplasmy in disease and targeted nuclease-based therapeutic approaches. *EMBO Reports*, 21(3). <https://doi.org/10.15252/embr.201949612>
- Ohlenbusch, A., Edvardson, S., Skorpen, J., Bjornstad, A., Saada, A., Elpeleg, O., Gartner, J., & Brockmann, K. (2012). Leukoencephalopathy with accumulated succinate is indicative of SDHAF1 related complex II deficiency. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 7(69).
- Parikh, V. S., Morgan, M. M., Scott, R., Clements, S. L., & Butow, R. A. (1987). The Mitochondrial Genotype Can Influence Nuclear Gene Expression in Yeast. *Science*, 235(4788), 576–580.
- Patenanan, A. N., Wu, T. H., Chiou, P. Y., & Teitell, M. A. (2016). Modifying the Mitochondrial Genome. *Cell Metabolisms*, 23, 785–796.
- Pelna, D., Burnyte, B., Jankevics, E., Lace, B., Dageyte, E., Grigalioniene, K., Utkus, A., Krumina, Z., Rozentale, J., Adomaitiene, I., Stavusis, J., Pliss, L., & Inashkina, I. (2018). Complete mtDNA sequencing reveals mutations m.9185T>C and m.13513G>A in three patients with Leigh syndrome. *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 29(7), 1115–1120. <https://doi.org/10.1080/24701394.2017.1413365>
- Peter, B., & Falkenberg, M. (2020). TWINKLE and other human mitochondrial DNA helicases: structure, function and disease. *Genes*, 11(408).
- Picard, M., Zhang, J., Hancock, S., Derbeneva, O., Golhar, R., Golik, P., O’Hearn, S., Levy, S., Potluri, P., Lvova, M., Davila, A., Lin, C. S., Perin, J. C., Rappaport, E. F.,

- Hakonarson, H., Trounce, I. A., Procaccio, V., & Wallace, D. C. (2014). Progressive increase in mtDNA 3243A>G heteroplasmy causes abrupt transcriptional reprogramming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(38), E4033–E4042. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414028111>
- Pieczenik, S. R., & Neustadt, J. (2007). Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Experimental and Molecular Pathology*, *83*(1), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2006.09.008>
- Podlesniy, P., & Trullas, R. (2017). Absolute measurement of gene transcripts with Selfie-digital PCR. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08270-w>
- Prakash, A., & Doublé, S. (2015). Base Excision Repair in the Mitochondria. *Journal of Cellular Biochemistry*, *116*(8), 1490–1499. <https://doi.org/10.1002/jcb.25103>
- Protasoni, M., & Zeviani, M. (2021). Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(586).
- Quirós, P. M., Mottis, A., & Auwerx, J. (2016). Mitonuclear communication in homeostasis and stress. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 17, Issue 4, pp. 213–226). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.23>
- Qureshi, M. A., Haynes, C. M., & Pellegrino, M. W. (2017). The mitochondrial unfolded protein response: Signaling from the powerhouse. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 292, Issue 33, pp. 13500–13506). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.791061>
- Ramos, A., Santos, C., Alvarez, L., Nogués, R., & Aluja, M. P. (2009). Human mitochondrial DNA complete amplification and sequencing: A new validated primer set that prevents nuclear DNA sequences of mitochondrial origin co-amplification. *Electrophoresis*, *30*(9), 1587–1593. <https://doi.org/10.1002/elps.200800601>
- Roger, A. J., Muñoz-Gómez, S. A., & Kamikawa, R. (2017). The Origin and Diversification of Mitochondria. In *Current Biology* (Vol. 27, Issue 21, pp. R1177–R1192). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.015>
- Rooijers, K., Loayza-Puch, F., Nijtmans, L. G., & Agami, R. (2013). Ribosome profiling reveals features of normal and disease-associated mitochondrial translation. *Nature Communications*, *4*. <https://doi.org/10.1038/ncomms3886>
- Ruhoy, I. S., & Saneto, R. P. (2014). The genetics of Leigh syndrome and its implications for clinical practice and risk management. *The Application of Clinical Genetics*, *7*, 221–234.
- Saneto, R. P., Friedman, S. D., & Shaw, D. W. W. (2008). Neuroimaging of mitochondrial disease. In *Mitochondrion* (Vol. 8, Issues 5–6, pp. 396–413). <https://doi.org/10.1016/j.mito.2008.05.003>
- 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>
- Santorelli, F. M., Tanji, K., Kulikova, R., Shanske, S., Vilarinho, L., Hays, A. P., & Dimauro, S. (1997). Identification of a Novel Mutation in the mtDNA ND5 Gene Associated with MELAS. In *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* (Vol. 238).

- Schaefer, A., Lim, A., & Gorman, G. (2019). Epidemiology of Mitochondrial Disease. In *Diagnosis and Management of Mitochondrial Disorders* (pp. 63–79). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-05517-2_4
- Schon, E. A., Dimauro, S., & Hirano, M. (2012). Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet*, *13*(12), 878–890. <https://doi.org/10.1038/nrg3275>
- Schubert, M. B., & Vilarinho, L. (2020). Molecular basis of Leigh syndrome: A current look. In *Orphanet Journal of Rare Diseases* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-1297-9>
- Shami, G. J., Cheng, D., Verhaegh, P., Koek, G., Wisse, E., & Braet, F. (2021). Three-dimensional ultrastructure of giant mitochondria in human non-alcoholic fatty liver disease. *Scientific Reports*, *11*. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82884-z>
- Sharma, N., Pasala, M. S., & Prakash, A. (2019). Mitochondrial DNA: Epigenetics and environment. In *Environmental and Molecular Mutagenesis* (Vol. 60, Issue 8, pp. 668–682). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/em.22319>
- Sijens, P. E., Smit, G. P. A., Rödiger, L. A., van Spronsen, F. J., Oudkerk, M., Rodenburg, R. J., & Lunsing, R. J. (2008). MR spectroscopy of the brain in Leigh syndrome. *Brain and Development*, *30*(9), 579–583. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2008.01.011>
- Skladal, D., Halliday, J., & Thorburn, D. R. (2003). Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain*, *126*(8), 1905–1912. <https://doi.org/10.1093/brain/awg170>
- Smits, P., Smeitink, J., & van den Heuvel, L. (2010). Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, *2010*. <https://doi.org/10.1155/2010/737385>
- Sofou, K., de Coo, F. M., Isohanni, P., Ostergaard, E., Naess, K., de Meirleir, L., Tzoulis, C., Uusimaa, J., de Angst, I. B., Lönnqvist, T., Pihko, H., Mankinen, K., Bindoff, L. A., Tulinius, M., & Darin, N. (2014). A multicenter study on Leigh syndrome: disease course and predictors of survival. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *9*(52). <http://www.ojrd.com/content/9/1/52>
- Soledad, R. B., Charles, S., & Samarjit, D. (2019). The secret messages between mitochondria and nucleus in muscle cell biology. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 666, pp. 52–62). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.03.019>
- Stewart, J. B., & Chinnery, P. F. (2015). The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: Implications for human health and disease. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 16, Issue 9, pp. 530–542). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg3966>
- Tait, S. W. G., & Green, D. R. (2013). Mitochondrial Regulation of Cell Death. *Cold Springs Harbor Perspectives in Biology*, *5*(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008706>
- Takada, R., Tozawa, T., Kondo, H., Kizaki, Z., Kishita, Y., Okazaki, Y., Murayama, K., Ohtake, A., & Chiyonobu, T. (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 and Development*, 42(1), 69–72.
<https://doi.org/10.1016/j.braindev.2019.08.006>

- Thompson, K., Collier, J. J., Glasgow, R. I. C., Robertson, F. M., Pyle, A., Blakely, E. L., Alston, C. L., Olahova, M., McFarland, R., & Taylor, R. W. (2020). Recent advances in understanding the molecular genetic basis of mitochondrial disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 43, 36–50.
- Torrioni, A., Achilli, A., Macaulay, V., Richards, M., & Bandelt, H. J. (2006). Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. In *Trends in Genetics* (Vol. 22, Issue 6, pp. 339–345).
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.04.001>
- Torrioni, A., Rengo, C., Guida, V., Cruciani, F., Sellitto, D., Coppa, A., Calderon, F. L., Simionati, B., Valle, G., Richards, M., Macaulay, V., & Scozzari, R. (2001). Do the Four Clades of the mtDNA Haplogroup L2 Evolve at Different Rates? In *Am. J. Hum. Genet* (Vol. 69).
- Tuppen, H. A. L., Blakely, E. L., Turnbull, D. M., & Taylor, R. W. (2010a). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797, 113–128.
- Tuppen, H. A. L., Blakely, E. L., Turnbull, D. M., & Taylor, R. W. (2010b). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1797(2), 113–128. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2009.09.005>
- van der Giezen, M., & Tovar, J. (2005). Degenerate mitochondria. In *EMBO Reports* (Vol. 6, Issue 6, pp. 525–530). <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400440>
- Wallace, D. C. (2005). The mitochondrial genome in human adaptive radiation and disease: On the road to therapeutics and performance enhancement. *Gene*, 354(1-2 SPEC. ISS.), 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.05.001>
- Wallace, D. C. (2010). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. In *Environmental and Molecular Mutagenesis* (Vol. 51, Issue 5, pp. 440–450).
<https://doi.org/10.1002/em.20586>
- Wang, S. B., Weng, W. C., Lee, N. C., Hwu, W. L., Fan, P. C., & Lee, W. T. (2008). Mutation of Mitochondrial DNA G13513A Presenting with Leigh Syndrome, Wolff-Parkinson-White Syndrome and Cardiomyopathy. *Pediatrics and Neonatology*, 49(4), 145–149. [https://doi.org/10.1016/S1875-9572\(08\)60030-3](https://doi.org/10.1016/S1875-9572(08)60030-3)
- Wedatilake, Y., Brown, R. M., Mcfarland, R., Yaplito-Lee, J., Morris, A. A. M., Champion, M., Jardine, P. E., Clarke, A., Thorburn, D. R., Taylor, R. W., Land, J. M., Forrest, K., Dobbie, A., Simmons, L., Aasheim, E. T., Ketteridge, D., Hanrahan, D., Chakrapani, A., Brown, G. K., & Rahman, S. (2013). SURF1 deficiency: a multi-centre natural history study. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(96). <http://www.ajrd.com/content/8/1/96>
- Ylikallio, E., & Soumalainen, A. (2012). Mechanisms of mitochondrial diseases. *Annals of Medicine*, 44, 41–59.
- Zheng, W., Khrapko, K., Coller, H. A., Thilly, W. G., & Copeland, W. C. (2006). Origins of human mitochondrial point mutations as DNA polymerase γ -mediated errors. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 599(1–2), 11–20.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.12.012>

PIELIKUMS

1. pielikums
Selfie-dPCR praimeri

	Praimera nosaukums	amplikon a garums	Nukleotīdu secība 5'-3'			Praimera nosaukums	amplikona garums	Nukleotīdu secība 5'-3'
1	DYDC2-61F	61	GCITITGAAATGCTGGGCC	13		FABP3-74F	74	CCITTGACGGCTGCTCTCT
	DYDC2-61R		GGGTCACTGGGCCGAACCTT			FABP3-74R		GTGCCCAGGAAAAGCGTCCAC
2	DYDC2-66F	66	TGGCAGAGGTGGCGAAGGTT	14		FABP3-87F	87	GTGGCCAGCATGACCAAGCC
	DYDC2-66R		AATGATAAAGCCAGTGAGCCAGGT			FABP3-87R		TGTGTCTTGAAGGTGCTGTGTGT
3	TCEA3-96F	96	AGGAAGAAGAAAGAGGAAGCGCTGA	15		RYR3-65F	65	CGACCAGGTGGACCCCTTCC
	TCEA3-96R		ACCATCCCACTCAGACAGAGTTCA			RYR3-65R		AAGAAGAGGCCAGCCCCACC
4	TCEA3-99F	99	ACTCTGTCTGAGTGGGATGGTATGA	16		RYR3-77F	77	AGCCCGGTTTACAGGTTCTCC
	TCEA3-99R		CCAAATTAGGCTCCCCCATTAACCA			RYR3-77R		GGGAATCTCGGGGCTCTGCT
5	GRID1-91F	91	CTCTCGGCCCTGGAGATGGG	17		RYR3-90F	90	CAGGGGCCGGGTACACAGAG
	GRID1-91R		AGGTGCTGACCGAGAGCTGG			RYR3-90R		GACCCCGCTCCCACCAGTAG
6	GRID1-68F	68	CATCAGGGCCCCAGCAGCAAC	18		GRM2-82F	82	GGCCATGGGATCGCTGCTTG
	GRID1-68R		GCACTGCATGGAGGGCATGG			GRM2-82R		CAGCACCTTCTTGGCTGGGC
7	HKDC1-100F	100	TGGGGGAGATTGTGCGGCAG	19		GRM2-81F	81	TCTGGGAGCAGAGGTTCCGC
	HKDC1-100R		TCGAAGATGCCCTTGGTCCG			GRM2-81R		CCTGCTCAAAGGGCACAGCC
8	HKDC1-73F	73	CGTGGTGAAGGAGGTGTGCG	20		DPYSL4-74F	74	TGGTCTTCTCTGGTGGCGTT
	HKDC1-73R		TATAGGGCCAGGCCAGCAC			DPYSL4-74R		GTCGTCAGCCCGGTGTCATGC
9	SEL1L3-87F	87	GCTGTCTGGGGCAGCAAG	21		DPYSL4-80F	80	GCCTGCTGCGACTACTCCCT
	SEL1L3-87R		GGATCTCCGTCTCCAGGGC			DPYSL4-80R		TTGACCAGGGCCCTCCAGCTC
10	SEL1L3-97F	97	GTGGTTCGCCCTGCTTGGCTT	22		ABCG1-80F	80	ATGACGGAGCCC AAGTCGGT
	SEL1L3-97R		TGGCCTCCAGCTCTCGGTTT			ABCG1-80R		AGCAGGTCCGCTCTCAGTGCC
11	DHRS2-85F	85	GGGCTGGTTTTCATCCCTGTGC	23		ABCG1-94F	94	AGGGGGCCGCTCCTCATCAAC
	DHRS2-85R		TACCCGGTTAGCCAGGACGC			ABCG1-94R		TGCGGCAGCAGCATGTCATC
12	hDHRS2-60F	60	CAAGACAGCGCTGCTGGGTC					
	DHRS2-60R		ATGTCTTGGGGGCCAGCTC					

2. pielikums
ddPCR plates izkārtojums

Sample ID:	WT						Mut_50						Mut_70							
	RT+		RT-		RT+		RT-		RT+		RT-		RT+		RT-		RT+		RT-	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	HKDC1 100 +	HKDC1 100 +	HKDC1 100 -	HKDC1 100 -	HKDC1 100 +	HKDC1 100 +	HKDC1 100 -	HKDC1 100 -	HKDC1 100 +	HKDC1 100 +	HKDC1 100 -	HKDC1 100 -	HKDC1 100 +	HKDC1 100 +	HKDC1 100 -	HKDC1 100 -	HKDC1 100 +	HKDC1 100 +	HKDC1 100 -	HKDC1 100 -
B	SEL1L3 87 +	SEL1L3 87 +	SEL1L3 87 -	SEL1L3 87 -	SEL1L3 87 +	SEL1L3 87 +	SEL1L3 87 -	SEL1L3 87 -	SEL1L3 87 +	SEL1L3 87 +	SEL1L3 87 -	SEL1L3 87 -	SEL1L3 87 +	SEL1L3 87 +	SEL1L3 87 -	SEL1L3 87 -	SEL1L3 87 +	SEL1L3 87 +	SEL1L3 87 -	SEL1L3 87 -
C	DHRS2 85 +	DHRS2 85 +	DHRS2 85 -	DHRS2 85 -	DHRS2 85 +	DHRS2 85 +	DHRS2 85 -	DHRS2 85 -	DHRS2 85 +	DHRS2 85 +	DHRS2 85 -	DHRS2 85 -	DHRS2 85 +	DHRS2 85 +	DHRS2 85 -	DHRS2 85 -	DHRS2 85 +	DHRS2 85 +	DHRS2 85 -	DHRS2 85 -
D	FABP3 74 + +	FABP3 74 + +	FABP3 74 - -	FABP3 74 - -	FABP3 74 + +	FABP3 74 + +	FABP3 74 - -	FABP3 74 - -	FABP3 74 + +	FABP3 74 + +	FABP3 74 - -	FABP3 74 - -	FABP3 74 + +	FABP3 74 + +	FABP3 74 - -	FABP3 74 - -	FABP3 74 + +	FABP3 74 + +	FABP3 74 - -	FABP3 74 - -
E	RYR3 65 + +	RYR3 65 + +	RYR3 65 - -	RYR3 65 - -	RYR3 65 + +	RYR3 65 + +	RYR3 65 - -	RYR3 65 - -	RYR3 65 + +	RYR3 65 + +	RYR3 65 - -	RYR3 65 - -	RYR3 65 + +	RYR3 65 + +	RYR3 65 - -	RYR3 65 - -	RYR3 65 + +	RYR3 65 + +	RYR3 65 - -	RYR3 65 - -
F	GRM2 82 + +	GRM2 82 + +	GRM2 82 - -	GRM2 82 - -	GRM2 82 + +	GRM2 82 + +	GRM2 82 - -	GRM2 82 - -	GRM2 82 + +	GRM2 82 + +	GRM2 82 - -	GRM2 82 - -	GRM2 82 + +	GRM2 82 + +	GRM2 82 - -	GRM2 82 - -	GRM2 82 + +	GRM2 82 + +	GRM2 82 - -	GRM2 82 - -
G	DYPSL4 74 +	DYPSL4 74 +	DYPSL4 74 -	DYPSL4 74 -	DYPSL4 74 +	DYPSL4 74 +	DYPSL4 74 -	DYPSL4 74 -	DYPSL4 74 +	DYPSL4 74 +	DYPSL4 74 -	DYPSL4 74 -	DYPSL4 74 +	DYPSL4 74 +	DYPSL4 74 -	DYPSL4 74 -	DYPSL4 74 +	DYPSL4 74 +	DYPSL4 74 -	DYPSL4 74 -
H	ABCG1 80 +	ABCG1 80 +	ABCG1 80 -	ABCG1 80 -	ABCG1 80 +	ABCG1 80 +	ABCG1 80 -	ABCG1 80 -	ABCG1 80 +	ABCG1 80 +	ABCG1 80 -	ABCG1 80 -	ABCG1 80 +	ABCG1 80 +	ABCG1 80 -	ABCG1 80 -	ABCG1 80 +	ABCG1 80 +	ABCG1 80 -	ABCG1 80 -

Maģistra darbs „Ar Lī sindromu saistīto mitohondriālās DNS variantu ietekme uz gēnu ekspresiju” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Diāna Livčāne

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr. biol. Inna Iņāškina

Recenzents: Dr. biol. Artūrs Ābols

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē

Lietvede:

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. 1, vērtējums

Komisijas sekretārs: