Mutacija mitohondrijske DNA

Ivezić, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:647738

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Preddiplomski studij kemije

Sara Ivezić

Mutacije mitohondrijske DNA

Završni rad

Mentorica: doc.dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik

Neposredna voditeljica: dr.sc. Ana Amić

Osijek, 2018.

SAŽETAK

Mitohondriji su „energetska centrala stanice”, odnosno stanični organeli kojima je glavna uloga proizvodnja energije neophodne za odvijanje svih staničnih procesa (rast, razvoj, metabolizam i dr.). Ove su organele značajne i po tome što sadrže vlastiti DNA materijal. U mitohondrijima, također, dolazi i do stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), agresivnih čestica koje uzrokuju oštećenja mitohondrijske DNA, (mtDNA), odnosno mitohondrijskog genoma. Kao posljedica oštećenja nastaju mutacije mtDNA koje uzrokuju nastanak teških i rijetkih multisistemskih mitohondrijskih poremećaja, sindroma i bolesti koji su većinom specifični za određenu dobnu skupinu. Budući da se mtDNA nasljeđuje od majke, kod mitohondrijskih se bolesti radi o tzv. majčinskom nasljeđivanju. Mutacije mtDNA zahvaćaju brojna tkiva čije energetske potrebe u velikoj mjeri određuju stupanj prisutnosti mutacija. Stoga, bolesti uzrokovane mutacijama mtDNA najčešće pogađaju središnji živčani sustav i mišiće. U ovom će se radu pobliže opisati struktura i funkcija mitohondrija, struktura i nasljeđivanje mtDNA, kao i njihove mutacije i uloga u razvoju mitohondrijskih bolesti.

Ključne riječi: mtDNA, mutacije, majčinsko nasljeđivanje, mitohondrijske bolesti

ABSTRACT

Mitochondria are „central energy station" of the cell, a cellular organelles whose most important role is the production of energy necessary for all cellular processes (cellular growth, development, metabolism, etc.). Significance of these organelles is that they contain their own DNA material. Also, reactive oxygen species (ROS), aggressive particles that cause mitochondrial DNA (mtDNA) damage, *i.e.* the damage of mitochondrial genome, are produced in mitochondria. As a damage result, mtDNA mutations occur and cause the onset of severe and rare multisystem mitochondrial disorders, syndromes and diseases which are usually specific for a particular age group. Since mtDNA is inherited exclusively from mother, mitochondrial diseases are associated with so-called maternal inheritance. mtDNA mutations are present in many tissues, where the energy needs of these tissues largely determine the level of their presence. Therefore, diseases caused by mutations of mtDNA most often affect the central nervous system and muscles. In this work, the structure and function of mitochondria, structure and inheritance of mtDNA, as well as their mutations and the role in development of mitochondrial diseases, are studied.

Keywords: mtDNA, mutations, maternal inheritance, mitochondrial diseases

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. MITOHONDRIJ 2
2.1. Struktura i funkcija mitohondrija 2
2.2. Mitohondrijska DNA (mtDNA) 4
3. MUTACIJE 6
3.1. Tipovi mutacija 6
3.2. Mutacije mtDNA 11
4. MITOHONDRIJSKE BOLESTI 13
4.1. Leighov sindrom 13
4.2. Kearns-Sayreov sindrom 14
4.3. Mitohondrijska encefalopatija, mliječna acidoza i epizode moždanih udara, MELAS sindrom 15
4.4. Kronična progresivna vanjska oftalmoplegija, CPEO 16
4.5. Neurogena mišićna atrofija i retinitis pigmentosa, NARP 16
4.6. Mioklona epilepsija s nepravilnim crvenim vlaknima, MERRF 17
4.7. Alpers-Huttenlocherov sindrom 18
5. ZAKLJUČAK 19
6. LITERATURA 20

1. UVOD

DNA ili deoksiribonukleinska kiselina je važna biološka makromolekula koja prenosi genetske informacije s generacije na generaciju. Spiralnog je oblika (dvostruka uzvojnica), a čini ju veliki broj nukleotida sastavljenih od šećera (deoksiriboza), fosfata i dušičnih baza. Nukleotidi su međusobno povezani 3'→5' fosfodiesterskom vezom. Okosnicu DNA koja ima strukturnu ulogu čine šećeri povezani fosfatima, dok genetičku informaciju prenose dušične baze. DNA uzvojnicu čine dva komplementarna lanca, međusobno povezana vodikovim vezama između komplementarnih parova baza. U DNA se mogu naći dvije baze koje su derivati purina (adenin i gvanin), i dvije koje su derivati pirimidina (citozin i timin). Watson i Crick su otkrili da se gvanin sparuje s citozinom pomoću tri vodikove veze, a adenin i timin pomoću dvije vodikove veze [1].

Mitohondrijska DNA (mtDNA) je kružna, dvolančana molekula DNA slična bakterijskom genomu. Nalazi se u mitohondrijskom matriksu i prenosi se s majke na potomstvo. mtDNA ljudi, životinja i biljaka razlikuje se po veličini. Biljke (više od 200 baznih parova (bp)) i kvasci (80 bp) imaju puno veći mitohondrijski genom od čovjeka i većine životinja (16 bp). No, veliki mitohondrijski genomi većinom se sastoje od nekodirajuće DNA i ne sadrže više genetičkih informacija od manjih genoma [2].

Mutacije su promjene nasljednog materijala (sekvence nukleotida) unutar gena (genske ili točkaste) ili kromosoma (kromosomske), a mogu biti urođene ili stečene. Klasificiraju se u dvije glavne skupine: 1) nasljedne mutacije koje se nasljeđuju od roditelja i koje su prisutne kroz cijeli život, te 2) somatske mutacije koje se pojave u nekom dijelu života i prisutne su samo u određenim stanicama. Mutageneza, odnosno proces nastajanja mutacija, može biti uzrokovana raznim kemijskim, biološkim i fizičkim faktorima koje nazivamo mutagenima. Iako je broj mutagena velik i njima smo stalno izloženi, većina mutacija u općoj populaciji ipak ne rezultira nastankom bolesti [3].

Mitohondrijske bolesti nastaju kao posljedica mutacija mitohondrijske DNA te dovode do nedostataka u oksidacijskoj fosforilaciji koja se odvija u mitohondriju, a glavni je izvor staničnog ATP-a. Neke od njih su mitohondrijska encefalopatija, mliječna acidoza i epizode moždanih udara (MELAS sindrom), Leighov sindrom, kronična progresivna vanjska oftalmoplegija (CPEO), neurogena mišićna atrofija i retinitis pigmentosa (NARP), te mioklona epilepsija s nepravilnim crvenim vlaknima (MERRF) [4]. U daljnjim poglavljima ovoga rada bit će detaljnije opisane ove bolesti i način na koji nastaju.

2. MITOHONDRIJ

Mitohondriji su stanični organeli koji stvaraju najveći dio ATP-a potrebnog za odvijanje staničnih procesa. ATP je glavna energijska „valuta“ stanica jer ima visoki potencijal prijenosa fosforilne skupine što proizlazi iz strukturnih karakteristika same molekule. Mitohondriji su pod dvostrukom genskom kontrolom, putem mitohondrijskog i jezgrinog genoma, te stoga mutacije unutar DNA oba genoma mogu dovesti do poremećaja u radu respiracijskog lanca. Respiracijski lanac sastoji se od četiri kompleksa (I-IV) koji prenose elektrone s NADH i $FADH_2$ na molekulski kisik stvarajući gradijent protona koji pokreće sintezu ATP-a [5]. Uz stvaranje ATP-a, mitohondriji imaju ključnu ulogu i u unutarstaničnoj signalizaciji, reguliranju apoptoze, proizvodnji reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, eng. *reactive oxygen species*)[1] i detoksikaciji, te biosintezi hema i željezo-sumpor klastera [6].

2.1. Struktura i funkcija mitohondrija

Mitohondrij je organel koji tvore: 1) vanjska membrana, 2) intermembranski prostor, 3) unutarnja membrana, te 4) matriks mitohondrija (Slika 1.).

Na unutarnjoj membrani nalazi se pet kompleksa oksidacijske fosforilacije od kojih kompleksi I-IV sudjeluju u prijenosu elektrona. Membrana je nabrana u grebene koji se nazivaju kriste, što čini njezinu funkcionalnu površinu većom. Ona okružuje središnji dio mitohondrija, matriks, te je nepropusna za gotovo sve ione i polarne molekule. Propusna je samo za kisik, vodu i ugljikov dioksid. Može se podijeliti na membranu koja tvori kriste i membranu koja se nalazi između određenih kristi (unutarnja granična membrana). Nalazi se blizu vanjske membrane te su uočena mjesta njihovog dodirivanja koja imaju ulogu u prijenosu proteina u mitohondrij. Veliki protein, translokaza, služi za aktivni prijenos većih proteina i molekula kroz vanjsku membranu na način da se na njega vežu signalne sekvence tih proteina i molekula [6].

Za razliku od unutarnje membrane, mitohondrijski matriks sadrži mnogobrojne anaboličke i kataboličke enzime od kojih najistaknutiji sudjeluju u Krebsovu ciklusu i ß-oksidaciji masnih kiselina. U matriksu se također nalazi mitohondrijska DNA (mtDNA) što znači da mitohondriji posjeduju vlastiti genetski materijal koji je odvojen i drukčiji od

[1] reaktivni kisikovi radikali koji imaju nesparen elektron u vanjskoj elektronskoj ljusci

genoma jezgre stanice [6]. Matriks mitohondrija je viskozna tekućina koja ima veću gustoću od citoplazme i sadrži mnoge ione, enzime, metabolite, ribosome te par kopija mtDNA. Vanjska membrana je prilično propusna za male molekule i ione zbog posjedovanja proteina zvanih porini koji formiraju kanale, te obavlja izmjenu molekula između staničnih organela i citosola. Njezini proteini sudjeluju u unutarstaničnim signalnim putovima, apoptozi i vezanju na endoplazmatski retikulum. Danas je poznato bar pet načina unosa proteina u mitohondrij [7].



Slika 1. Shematski prikaz građe mitohondrija [8].

Dva glavna biokemijska procesa koja se odvijaju u mitohondriju su ciklus limunske kiseline i oksidacijska fosforilacija, u njima se nastavlja razgradnja glukoze i masnih kiselina u svrhu dobivanja ATP-a. U citosolu stanice, iz glukoze nastane piruvat koji ulazi u mitohondrij i pretvara se u acetilkoenzim A (acetil-CoA) koji sudjeluje u ciklusu limunske kiseline u matriksu. Na sličan će način u ciklus limunske kiseline ući i acetil-CoA stvoren oksidacijom masnih kiselina. Formiraju se glavni nosači elektrona, NADH i $FADH_2$, koji daju ili primaju elektrone što je bitno za oksidacijsku fosforilaciju, proces koji se odvija na unutarnjoj membrani mitohondrija. Elektroni prolaze kroz nekoliko nosača do molekularnog kisika pri čemu dolazi do stvaranja gradijenta protona kroz unutarnju mitohondrijsku membranu u intermembranski prostor. Na kraju, mitohondrijski kompleks V, ATP-sintaza, stvara molekule ATP-a [7].

Mitohondrij ima bitnu ulogu u reguliranju apoptoze (programirane stanične smrti) što se naziva i mitohondrijskim putem aktivacije apoptoze. Taj put povezuje razne signale nastale staničnim stresorima, koji mogu regulirati i usmjeravati napredovanje apoptoze. Najpoznatiji signali su faktor za induciranje apoptoze (AIF, eng. *apoptosis inducing*

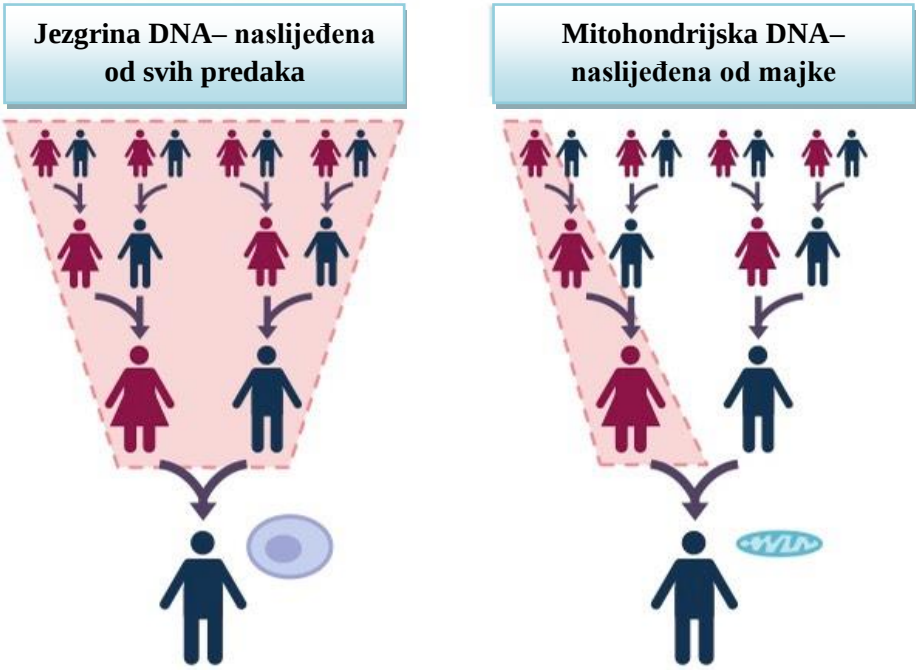
factor), Smac (eng. *second mitochondria-derived activator of caspases*), DIABLO (eng. *direct IAP binding protein with low pI*) i citokrom C. U membrani mitohondrija nalaze se pore nazvane tranzicijske pore kroz koje molekule AIF, citokrom C, Smac i DIABLO izlaze iz mitohondrija u citosol. Citokrom C reagira s proteinom Apaf-1 što dovodi do aktivacije kaspaze 9 i 3, cistein-aspartat proteaza ključnih za proces apoptoze. Zatim nastaje multiproteinski kompleks, apoptosom koji dovodi do stanične smrti [7].

2.2. Mitohondrijska DNA (mtDNA)

Mitohondrijska DNA je dodatni genetski materijal smješten u mitohondriju eukariotskih stanica. Ljudska mtDNA kodira 13 proteina koji su dio transportnog lanca elektrona i sudjeluju u oksidacijskoj fosforilaciji. mtDNA kodira i 16S i 12S rRNA, te 22 vrste tRNA. mtDNA može podleći raznim štetnim mutacijama koje se prenose na sljedeću generaciju preko majke (tzv. majčinsko nasljeđivanje). Smatra se kako i do starenja dolazi zbog nakupljanja mutacija u mtDNA [2]. mtDNA i jezgrina DNA (nDNA od eng. *nuclear DNA*) razlikuju se po svojim osnovnim karakteristikama. mtDNA je za razliku od jezgrine kružna, nasljeđuje se od majke (Slika 2.), ne sadrži ponavljajuće sekvence, te je sačinjena od jedinstvenih sljedova baza [9]. Nadalje, mtDNA je izgrađena od 16,569 bp dok jezgrinu DNA čine 3,3 milijarde bp. Mali mitohondrijski genom nije u stanju samostalno proizvesti sve proteine potrebne za funkcioniranje mitohondrija pa se mitohondrij oslanja na jezgrinu DNA. mtDNA nije uvijena i pakirana u kromatin, a neke nukleotidne baze mogu ujedno biti posljednja baza jednog gena i prva baza sljedećeg gena [10].

Princip nasljeđivanja mtDNA (preko majke) posljedica je načina odvijanja procesa oplodnje. Jajna stanica sadrži oko 100,000 mitohondrija dok spermij ima oko 50–75 mitohondrija od kojih dobiva energiju neophodnu za kretanje, zbog čega se mitohondriji i nalaze u repu spermija. Prilikom oplodnje dolazi do hibridizacije muške i ženske spolne stanice, nakon čega se razgrađuje dio spermija koji nije hibridiziran s jajnom stanicom, a to su vrat i rep spermija, pa su u daljnjoj diobi zigote prisutni samo majčini mitohondriji koji se tako prenose na potomstvo [11].

Zbog načina nasljeđivanja, mtDNA se koristi u istraživanju molekularne evolucije. Tome pridonosi i činjenica da se mtDNA lakše ekstrahira iz fosilnih ostataka. Stoga se pomoću nje može proučavati evolucija i podrijetlo čovjeka što je nemoguće s jezgrinom DNA, zbog nasljeđivanja od oba roditelja i potencijalnih rekombinacija DNA [11].



Slika 2. Razlika u nasljeđivanju mitohondrijske i jezgrine DNA (adaptirano iz [12]).

Poliploidna[2] priroda mitohondrijskog genoma dovodi do dviju značajki mitohondrijske genetike, homoplazmije i heteroplazmije. Homoplazmiju karakteriziraju identične kopije mitohondrijskog genoma, a heteroplazmiju mješavine dvaju ili više genotipova. Neke mutacije mtDNA utječu na sve kopije mitohondrijskog genoma (homoplazmatska mutacija), dok su neke prisutne samo u nekim kopijama (heteroplazmatska mutacija). U slučaju heteroplazmije postoji prag mutacija koji je bitan za kliničku ekspresiju bolesti i biokemijske nedostatke. U većini slučajeva ne postoje dokazi koji upućuju na heteroplazmiju, ali brojni dokazi upućuju na činjenicu da mtDNA neprekidno podliježe mutacijama [13].

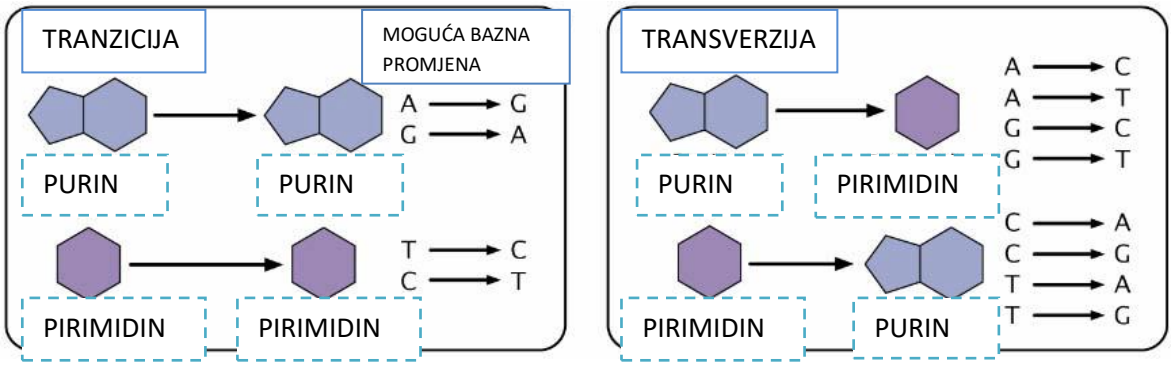
[2] pojava višestrukog broja kromosoma u staničnim jezgrama umjesto normalnog diploidnog

3. MUTACIJE

Mutacije su nasumične promjene genetskog materijala stanice. Proučavanje sekvence humanog genoma rezultiralo je otkrićem brojnih mutacija, a posebno onih koje dovode do razvoja rijetkih bolesti. Utvrđeno je da učestalost mutacija varira od organizma do organizma, te od gena do gena. Također je uočeno da su mutacije češće u organizama s kraćim životnim vijekom nego u onih s dužim. Otkriven je veliki broj načina kojima se uklanja većina mutacija u kodirajućem dijelu genoma zbog čega do mutacija najčešće dolazi u nekodirajućim dijelovima, koji čine i do 98% genoma. Mutacije mogu imati pozitivan, negativan ili neutralan utjecaj na zdravlje čovjeka. Kako su brojne bolesti posljedica mutacije točno određenog dijela ljudskog genoma, istraživanja nastanka i posljedica mutacija od velikog su značaja [14].

3.1. Tipovi mutacija

Mutacije se mogu podijeliti u tri skupine: 1) mutacije s obzirom na strukturu, 2) mutacije s obzirom na način nastanka, i 3) mutacije s obzirom na funkciju. S obzirom na strukturu mutacije se dijele na točkaste mutacije (mikromutacije) i kromosomske mutacije (makromutacije). Točkaste mutacije obuhvaćaju jedan ili nekoliko parova baza [15]. Te su mutacije obično naslijeđene od majke. Mogu se pojaviti unutar gena koji kodiraju proteine, gena tRNA ili rRNA. Više od polovice točkastih mutacija povezanih s bolestima pronađeno je unutar mt-tRNA gena. Točkaste mutacije gena koji kodiraju mitohondrijske proteine ciljano djeluju na funkcioniranje onog dijela respiracijskog lanca uz koji je taj protein vezan, dok mt-tRNA mutacije mogu negativno utjecati na cjelokupnu translaciju u mitohondriju budući da smanjuju dostupnost funkcionalnih mt-tRNA molekula. Točkaste mutacije su većinom heteroplazmatske. Zbog visoke stope mutacija mitohondrijskog genoma, te zbog prisutnosti brojnih obiteljskih ili populacijskih polimorfizama, razlika između neutralne varijante mtDNA (koja ne doprinosi fenotipskim varijacijama) i mutacije koja uzrokuje bolesti često može biti nejasna [5]. Supstitucije baza su najčešći tip točkastih mutacija, a dijele se na tranziciju, gdje može doći do zamjene purina drugim purinom ili pirimidina drugim pirimidinom, te transverziju gdje dolazi do zamjene purina pirimidinom i obrnuto (Slika 3.).



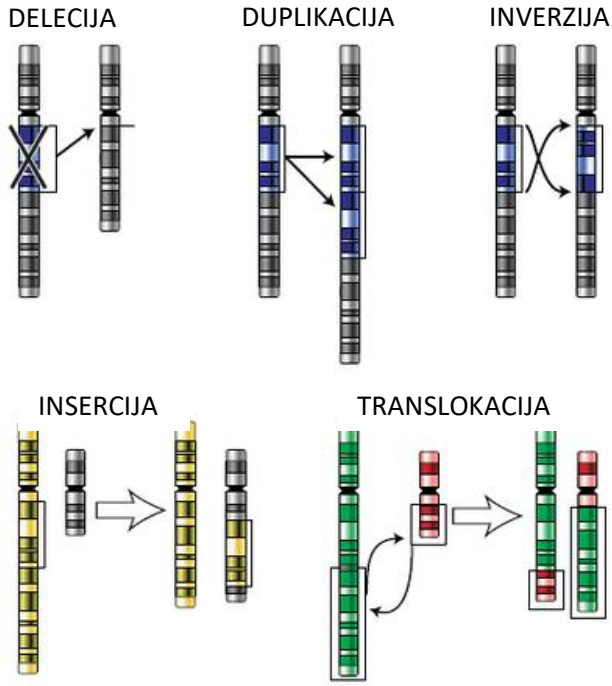
Slika 3. Shematski prikaz mogućih zamjena baza tranzicijom i transverzijom (adaptirano iz [15]).

Supstitucije baza za posljedicu mogu imati *missense*, *nonsense* i *samesense* mutacije. Pogrešne (*missense*) mutacije su odgovorne za 45-50% svih humanih patogenih mutacija. To su mutacije kod kojih dolazi do promjene jednog kodona drugim što dovodi do zamjene jedne aminokiseline drugom u proteinu, čime se mijenja finalni protein i njegova funkcija. Besmislene (*nonsense*) mutacije su mutacije preuranjene terminacije koje su odgovorne za 11% patogenih mutacija. Dolazi također do zamjene jednog kodona drugim. Ovaj oblik mutacije rezultira skraćenim proteinom koji ima promijenjenu funkciju ili uopće ne funkcionira [16]. Istosmislene (*samesense*) mutacije su mutacije koje mijenjaju slijed kodona, ali ne mijenjaju aminokiselinu koju kodon kodira (zbog degeneracije genetskog koda).

„*Frameshift*" mutacije su one koje se javljaju kada dodatak ili gubitak DNA baza mijenja okvir čitanja genetičke šifre. Okvir čitanja genetičke šifre se sastoji od 3 baze čija kombinacija kodira određenu aminokiselinu (kodon). Ako se promijeni redoslijed baza, mijenja se i kodon, a time i aminokiselina. Duplikacije, inverzije, adicije i delecije mogu dovesti do *„frameshift"* mutacije. U točkaste mutacije ubrajaju se i mutacije nekodirajuće DNA [16].

Kromosomske mutacije (makromutacije) su one koje obuhvaćaju dio gena, gen, dio kromosoma, kromosom ili setove kromosoma. Dok mnoge mutacije kromosoma ne uzrokuju gubitke u genetskom materijalu, položaj gena u kromosomu može utjecati na njegovu ekspresiju. Kao i kod genskih mutacija, kromosomske mutacije mogu biti neutralne, štetne, smrtonosne ili čak korisne. Budući da kromosomske mutacije pogađaju puno veće regije DNA, koje nose stotine ili tisuće gena, veća je vjerojatnost da će mutacije biti štetne ili smrtonosne [15].

Postoji više vrsta kromosomskih mutacija, a to su: delecija, translokacija, duplikacija, inverzija, insercija i amplifikacija (Slika 4.) [15]. Inverzija je preraspodjela u kojoj se unutarnji segmenti kromosoma dvaput lome, zakreću za 180˚ i ponovno povezuju. Translokacija je preraspodjela u kojoj acentrični fragmenti dvaju nehomolognih kromosoma razmjenjuju mjesta. U translokaciji i inverziji se kromosomski materijal ne gubi i ne dobiva, već samo dolazi do promjene položaja gena na kromosomima. Delecija je gubitak segmenta unutar kromosoma koji zahtjeva dva mjesta pucanja kromosoma kako bi se segment izdvojio. Manja delecija može ukloniti jedan ili nekoliko baznih parova dok veća delecija može ukloniti cijeli gen ili nekoliko susjednih gena. Duplikacija je ponavljanje segmenta kromosoma. U najjednostavnijem tipu duplikacije, dva segmenta su međusobno susjedna. Insercija je umetanje jednoga ili više nukleotida u kromosomski segment, a amplifikacija je proces kojim se višestruko repliciraju određeni geni ili dijelovi DNA [17].

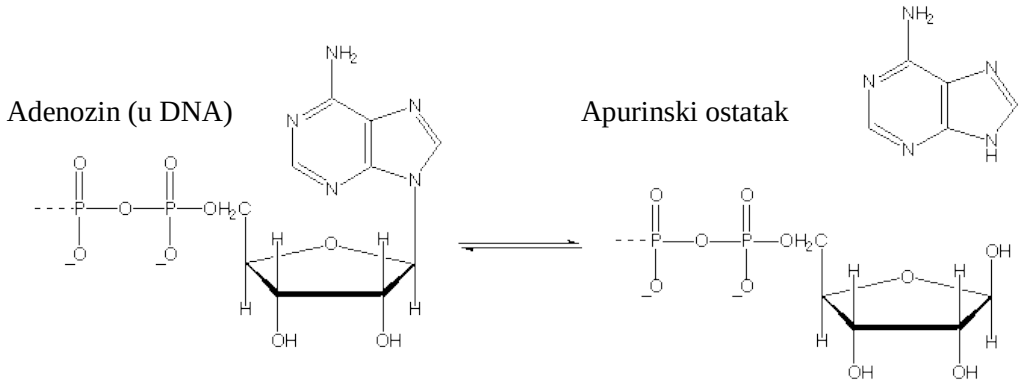


Slika 4. Prikaz kromosomskih mutacija: delecija, duplikacija, inverzija, insercija i translokacija (adaptirano iz [18]).

Mutacije prema načinu nastanka dijelimo na spontane i inducirane. Spontane mutacije nastaju zbog grešaka tijekom replikacije DNA. U njih ubrajamo pogrešno ugrađen nukleotid prilikom replikacije, tautomerizaciju baza, gubitak baza, te deaminaciju.

Učestalost krivo ugrađenih nukleotida je 10^{-9}–10^{-10}. Tautomerizacija baza je spontano pretvaranje amino skupine u imino skupinu uz mijenjanje osobina komplementarnog vezivanja baza. Deaminacija označava gubitak amino skupine. Najčešće se događa na citozinu i češće u jednolančanoj nego u dvolančanoj DNA. Deaminacija može biti i inducirana, na primjer djelovanjem dušikaste kiseline, HNO_2 [15].

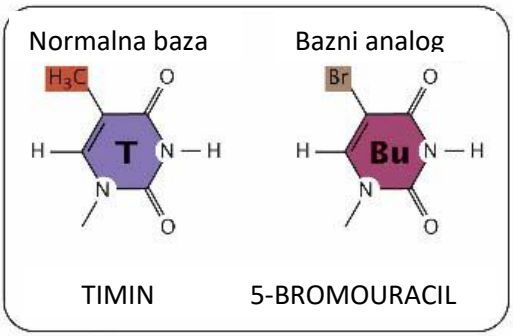
Gubitak baza podrazumijeva depurinaciju (Slika 5.) i depirimidinaciju. Posljedica je spontane hidrolize *N*-glikozidnih veza, te je češći gubitak purina nego pirimidina. Kao i kod deaminacije, gubitak baze se više susreće kod jednolančane DNA. AP mjesto (apurinsko/apirimidinsko mjesto) koje nastaje može zaustaviti replikaciju ili uzrokovati jednolančane lomove [15]. Kod depurinacije, proton se mora vezati na 7-N atom što će potaknuti kidanje veze između 1-C atoma šećera i 9-N atoma purina. Kod depirimidinacije, proton se veže na neki od kisikovih atoma jer dušikov atom amidne veze gotovo i nije bazičan, a bazičnost kisikovog atoma pirimidina je manja nego kod purina. Upravo je razlika u bazičnosti razlog zašto je depurinacija češća od depirimidinacije [5].



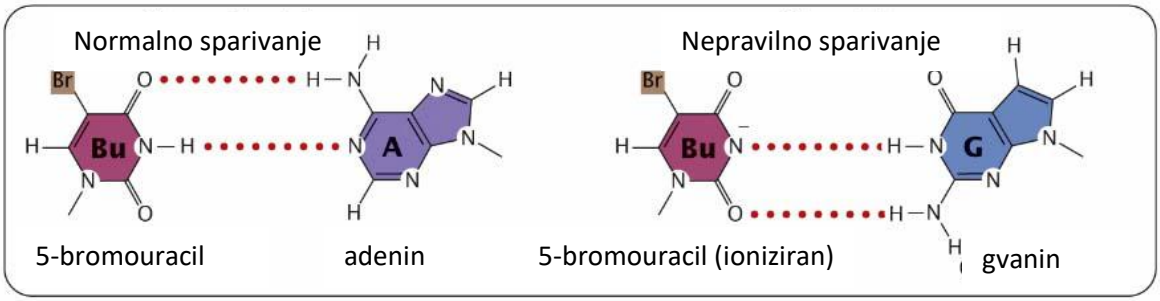
Slika 5. Reakcija depurinacije uslijed gubitka adenina (adaptirano iz [19]).

Inducirane mutacije nastaju kao posljedica fizičkih, kemijskih i bioloških čimbenika. Fizički čimbenici su temperatura i razne vrste zračenja, kemijski čimbenici su razni kemijski spojevi, na primjer kolhicin (alkaloid iz biljke *Colchicumautominale*), a biološki čimbenici su primjerice transpozoni, male sekvence DNA koje se mogu premještati na razne pozicije u genomu (tzv. „skačući geni" ili transpozibilni elementi). Kemijski agensi su alkilirajući spojevi, agensi koji premošćuju DNA, analozi baza i kemijski spojevi koji se metaboliziraju u elektrofilni oblik. Alkilirajući spojevi su elektrofilni spojevi s afinitetom za nukleofilne centre u organskim molekulama. Primjeri

alkilirajućih spojeva su bojni otrovi (*nitrogen mustard*), metilmetasulfonat i etilmetasulfonat. Agensi koji premošćuju DNA kovalentno se vežu na dva mjesta u DNA u istom (intrakalirajući spojevi) ili u suprotnom (interkalirajući spojevi) lancu. Neki od agenasa su dušična kiselina, antibiotici i citostatici, akridinske boje, itd. Pod analozima baza se podrazumijevaju spojevi slični normalnim bazama (Slika 6.) koji se ugrađuju u DNA i krivo sparuju tijekom replikacije (Slika 7.). Primjeri su analozi adenina (pentostatin, kladribin), 5-bromouracil, analozi timina (5-fluorouracil), itd. Zračenja koja mogu dovesti do mutacija su ultraljubičasto zračenje i ionizirajuće zračenje [15].



Slika 6. Sličnost između normalne baze i baznog analoga (adaptirano iz [15]).



Slika 7. Prikaz normalnog i nepravilnog sparivanja baza i analoga baza (adaptirano iz [15]).

Obzirom na funkciju, mutacije se dijele na mutacije gubitka funkcije (eng. *loss of function*), mutacije dobitka funkcije (eng. *gain of function*) i dominantno negativne mutacije (eng. *dominant negative mutation*). Kod mutacije gubitka funkcije, genski produkti imaju smanjenju funkciju ili ju više uopće ne posjeduju. Te su mutacije najčešće

recesivne i aktivnost alela je dostatna za obavljanje aktivnosti.[3] Primjer su hemofilija i srpasta anemija. Iznimka je mutacija haploinsuficijencija u heterozigota gdje smanjena količina normalnog genskog produkta nije dovoljna za normalnu funkciju. Kod mutacija dobitka funkcije, genski produkt je izmijenjen i dobiva novu, abnormalnu funkciju. Te su mutacije dominantne i imaju veću razinu ekspresije i aktivnost. Primjer je Huntingtonova bolest gdje mutirani protein huntingtin stvara stanične nakupine koje imaju neurotoksične učinke, te ahondroplazija, mutacija u FGFR3 (eng. *fibroblast growth factor receptor 3)*, koja dovodi do povećane aktivnosti staničnih receptora i blaže ili teže supresije rasta kostiju. Dominantno negativna mutacija se događa u proteinima dimera ili multimera. U takvom tipu mutacije dolazi do interferiranja mutiranog genskog produkta s funkcijom normalnog produkta. Primjer je bolest lomljivih kostiju koja nastaje kao posljedica mutacije u jednom od dva gena, COL1A1 i COL1A2[4] [15].

Mutacije u nekodirajućoj DNA su tip točkastih mutacija koje se dijele na regulatorne (transkripcijske) mutacije i mutacije prekrajanja. Regulatorne mutacije se događaju u promotoru ili drugoj regulatornoj sekvenci. Posljedica je redukcija mRNA, ali ponekad i povećana transkripcija. Mutacije prekrajanja događaju se u mjestima prekrajanja primarnog transkripta i završavaju poremećajima kao što su zadržavanje introna,[5] *frameshift* mutacije ili gubitak eksona[6] [15].

3.2. Mutacije mtDNA

Zbog neposredne blizine mitohondrijskog genoma kompleksu respiratornog lanca, vjeruje se da je mtDNA podložnija oštećenjima uzrokovanim reaktivnim kisikovim vrstama (ROS) nego jezgrina DNA, na što upućuje i 10–17 puta viša stopa mutacija. Faktorom koji pridonosi visokom stupnju mutacija smatra se i lošije razvijen mehanizam popravka mtDNA i nedostatak zaštitnih histona. Prva patogena mutacija je identificirana 1988. godine. Od tada je otkriveno preko 250 mutacija mtDNA za koje je dokazano da uzrokuju širok raspon bolesti s heterogenim fenotipovima i da se pojavljuju u različitoj životnoj dobi [5].

[3] dva alternativna gena koja određuju istu osobinu, uvijek dolaze u paru
[4] geni koji daju upute za sintezu dijela velike molekule zvane kolagen tipa I
[5] nekodirajući segmenti unutar gena koji se nalaze između kodirajućih segmenata (eksona)
[6] kodirajuća sekvenca gena, a koja se zadržava i u posljednjoj fazi proizvodnje RNA, nakon izrezivanja introna

Mutacije mtDNA uzrokuju razne mitohondrijske bolesti proizašle iz oštećenja brojnih tkiva. Tkiva su podložna mutacijama ovisno o tome koliki je gubitak stanične energije tijekom neispravne oksidativne fosforilacije. Najčešće su neurodegenerativne i neuromuskularne bolesti, oštećenja očnog živca, skeletnih mišića i srca, bubrega, jetre i Langerhasovih otočića gušterače. Na bolest često upućuju sljepoća, poremećaji središnjeg živčanog sustava (epileptički grčevi, poremećaji pokreta), smanjenje mišićne mase, slabost srca i poremećaji drugih organa. Znakovi nasljednih mitohondrijskih bolesti se najčešće pojavljuju nakon 20. godine života i pogoršavaju se starenjem. S godinama se akumuliraju dodatne stečene mutacije na već postojeće nasljedne [7].

Mitohondrijske bolesti koje se pojavljuju u djetinjstvu obično su ozbiljne, ali ne nužno i kobne. Najčešće su posljedica recesivnih mutacija nDNA ili mtDNA, koje su u velikoj mjeri prisutne u mtDNA heteroplazmiji. Uobičajeni simptomi koji se pojavljuju u dječjim bolestima su hipotonija,[7] slabost, nemogućnost napredovanja, disautonomija,[8] umor, povraćanje napadaji i encefalopatija.[9] Nekoliko sindroma mitohondrijskih bolesti koje se javljaju već u djetinjstvu su Leighov sindrom, Alpers-Huttenlocherov sindrom i Pearsonov sindrom [4].

Slično mitohondrijskim bolestima dječjeg uzrasta, bolesti koje se javljaju u odrasloj dobi mogu napredovati na različite načine. Pojava bolesti kod jednog člana obitelji upozorava na mogućnost pojave bolesti kod ostalih članova obitelji. Iako simptomi mnogih odraslih pacijenata ne odgovaraju nekom određenom sindromu, opisi sindroma pomažu u isticanju organskih sustava koji su zahvaćeni bolešću. Neki mitohondrijski sindromi odrasle dobi su Leberova nasljedna optička neuropatija (LHON), Kearns-Sayre sindrom, mitohondrijska encefalopatija, mliječna acidoza i epizode moždanih udara (MELAS sindrom), neurogena mišićna atrofija i retinitis pigmentosa (NARP) i kronična progresivna vanjska oftalmoplegija (CPEO) [4].

[7] smanjenje normalnog tonusa mišića
[8] grupa poremećaja u radu autonomnog živčanog sustava
[9] ne-upalna bolest mozga

4. MITOHONDRIJSKE BOLESTI

Mitohondrijske bolesti su grupa genetičkih poremećaja koji su uzrokovani poremećajima jezgrine i/ili mtDNA. Rjeđi slučajevi upućuju na mutacije *de novo.* Mutacije mtDNA smatraju se odgovornima za 80% mitohondrijskih bolesti odraslih i 20-25% bolesti koje se javljaju u djetinjstvu. Mitohondrijske bolesti su heterogene, mogu se pojaviti u bilo kojoj dobi i mogu se manifestirati velikim rasponom simptoma [4].

4.1. Leighov sindrom

Leighov sindrom je neurodegenerativna bolest koja nastaje kao posljedica nedostataka u oksidativnom metabolizmu. Do pojave bolesti dolazi točkastim mutacijama u mtDNA ili nDNA. U genu *MT-ATP6* koji kodira ATP-sintazu-6, dolazi do zamjene timina citozinom ili gvaninom (T>C/G) što dovodi do povećanog stvaranja ROS i smanjenja energije. Do supstitucije T>C dolazi u genu za NADH-dehidrogenazu-3 što uzrokuje nedostatke u kompleksu I. Više od 40 različitih mutacija nDNA u genu *SURF1*[10] uzrokuje defekte oksidaze citokroma c koja je dio respiratornog lanca [7].

Mutacije uzrokuju patološke promjene koje zahvaćaju moždano deblo, bazalne ganglije i diencefalon. Prvi simptomi ove bolesti se uočavaju u dojenačkoj i ranoj predškolskoj dobi. Prvi znakovi bolesti obično su povraćanje, proljev i poteškoće s gutanjem što onemogućuje normalnu prehranu. Najčešće se javljaju respiratorna disfunkcija, psihomotorna retardacija, hipotonija, ataksija,[11] distonija.[12] Većina oboljele djece umre u ranom djetinjstvu zbog izuzetno brzog napredovanja bolesti [7].

[10] kodira istoimeni protein SURF1 uključen u biogenezu kompleksa citokrom c oksidaze
[11] gubitak koordinacije mišićnih pokreta
[12] nevoljno trzanje, grčenje mišića

4.2. Kearns-Sayreov sindrom

Kearns-Sayreov sindrom je mitohondrijska bolest koja se javlja rijetko, a karakteristična je po tri stvari: javljanju prije 20. godine života, retinitisu pigmentosa i progresivnoj vanjskoj oftalmoplegiji.[13] Kearns-Sayreov sindrom je bolest koja zahvaća više organskih sustava. Najčešći su neurološki poremećaji kao što su oftalmoplegija (Slika 8.), retinopatija,[14] subklinička neuropatija, gluhoća, kognitivna zaostalost i cerebralna ataksija. U drugim organskim sustavima dolazi do kardiomiopatije, srčanog bloka, endokrinopatije[15] i disfagije.[16] Epilepsija i moždani udar nisu karakteristični za Kearns-Sayreov sindrom za razliku od drugih mitohondrijskih bolesti. U mozgu bolesnika dolazi do promjena sive i bijele tvari. Siva tvar je suviše promijenjena u malom mozgu, a bijela tvar se mijenja u svim dijelovima središnjeg živčanog sustava [5,7].



Slika 8. Napredak oftalmoplegije u dječaka s Kearns-Sayreovim sindromom [20].

Bolest uzrokuju delecije mitohondrijskog genoma koje obuhvaćaju od 1000 do 10000 nukleotida. Najčešće dolazi do oštećenja 12 gena, odnosno 4997 nukleotida. Te iste delecije mogu uzrokovati i Pearsonov sindrom[17] [7]. Znanstvenici nisu utvrdili kako delecije dovode do specifičnih znakova i simptoma sindroma, iako su vjerojatno povezani s nedostatkom stanične energije. Nagađa se da su oči posebno pogođene jer ovise o energiji koju dobiju od mitohondrija [5,21].

[13] skupina genetski uvjetovanih očnih stanja
[14] ne-upalno oštećenje mrežnice oka
[15] poremećaj rada endokrinih žlijezda
[16] otežano gutanje
[17] mitohondrijska bolest koju karakterizira sideroblastična anemija i disfunkcija pankreasa

4.3. Mitohondrijska encefalopatija, mliječna acidoza i epizode moždanih udara, MELAS sindrom

MELAS sindrom je rijetka bolest koja pogađa mišiće i živčani sustav. Najčešće se manifestira epizodama nalik moždanom udaru koje se mogu pojaviti i prije 20. godine života. Rani simptomi bolesti uključuju slabost i bol u mišićima, česte glavobolje, gubitak apetita, povraćanje i napadaje. Epizode nalik moždanom udaru uzrokuju privremenu hemiparezu,[18] promjenu stanja svijesti, abnormalnosti vida, napadaje i glavobolje slične migrenama. Ako se moždani udari ponove, mogu uzrokovati oštećenja mozga što vodi do gubitka vida, probleme s kretanjem i gubitak intelektualne funkcije (pojava demencije) [5,22].

Kod većine oboljelih od MELAS sindroma dolazi do nakupljanja mliječne kiseline u tijelu što se naziva laktacidoza. Povećana kiselost u krvi dovodi do povraćanja, bolova u trbuhu, ekstremnog umora, slabosti u mišićima i teškog disanja. Manje česti simptomi bolesti su grčevi u mišićima, ataksija, gubitak sluha, problemi sa srcem i bubrezima, dijabetes i hormonalna neravnoteža [5,22].

Točkaste mutacije dovode do razvoja ovoga sindroma. U 80% bolesnika dolazi do mutacija u genu *MT-TL1* koji kodira tRNA iako do mutacija dolazi i u genima *MT-TV* (geni za poseban oblik tRNA), genu *MT-CO3* (gen za citokrom oksidazu III) te *MT-ND1* (gen za podjedinicu 1 mitohondrijske NADH-dehidrogenaze). Posljedice tih mutacija su mikroinfarkti koji su mnogostruki, asimetrične raspodjele i ne prate vaskularnu distribuciju. U ganglijima se znaju pronaći i kalcifikati, te znakovi propadanja Purkinjeovih stanica[19] [7].

[18] slabost mišića jedne strane tijela
[19] stanice koje oblikuju projekcijske neurone malog mozga

4.4. Kronična progresivna vanjska oftalmoplegija, CPEO

Kronična progresivna vanjska oftalmoplegija pripada najčešćim mitohondrijskim bolestima.[20] Obično se pojavljuje u dobi između 18 i 40 godina, a stanje se s vremenom pogoršava. Prvi znak bolesti je ptoza,[21] a dodatni simptomi uključuju gubitak sluha uzrokovan oštećenjem u unutarnjem uhu, slabost i gubitak osjeta u udovima zbog oštećenja živaca, ataksiju i depresiju [23].

CPEO uzrokuju velike delecije mtDNA ili rjeđe točkaste mutacije. Do mutacija dolazi u genima za tRNA i genima koji kodiraju proteine kao što su *MT-TL1*, *MT-TI* i *MT-ND4*. Sekundarne mutacije su delecije u genima *POLG* (protein polimeraza gama), *RRM2B* (protein ribonukleotid reduktaza), *TWNK* (eng. *Twinkle and Twinky proteins*) koji su smješteni u nDNA. Mutacije u tim genima dovode do delecije velikih sekvenci mtDNA pri čemu deletirane regije obuhvaćaju od 2000 do 10000 nukleotida. Manjak citokrom oksidaze c i velika količina abnormalnih mitohondrija glavne su patološke značajke ove bolesti [13,23].

4.5. Neurogena mišićna atrofija i retinitis pigmentosa, NARP

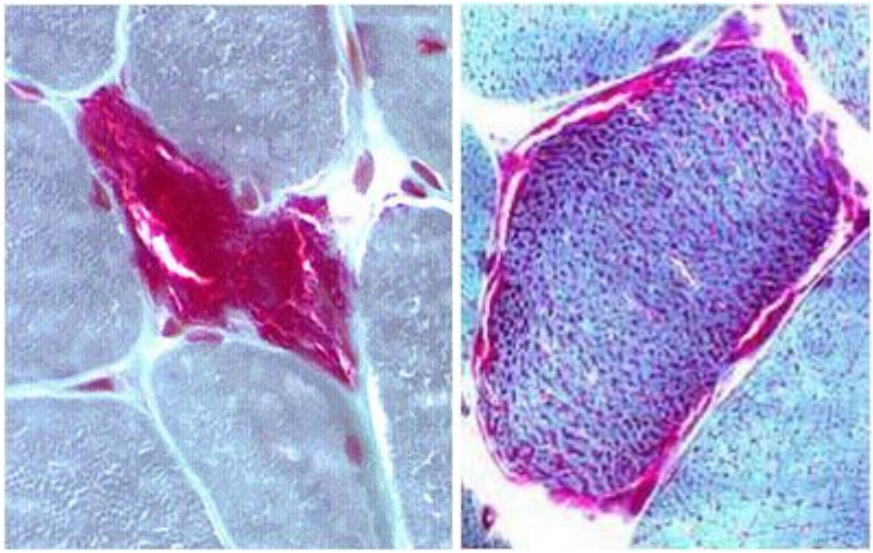
NARP je bolest koja uzrokuje niz simptoma i znakova koji upućuju na oštećenje živčanog sustava. Pojavljuje se u djetinjstvu i ranoj odrasloj dobi, a većina ljudi osjeti bol, trnce ili obamrlost ruku i nogu, slabost u mišićima i problem s koordinacijom i ravnotežom. Kod mnogih pojedinaca dolazi i do gubitka vida zbog promjena u tkivu osjetljivom na svjetlo. Djeca oboljela od NARP-a obično zaostaju u razvoju i imaju problema s učenjem, a kod odraslih se javlja demencija. Ostali simptomi su gubitak sluha, napadaji i abnormalnosti električnih signala koji kontroliraju otkucaje srca [24].

NARP uzrokuju mutacije u *MT-ATP6* genu. On daje upute za sintezu proteina koji su potrebni za normalnu mitohondrijsku funkciju. MT-ATP6 protein čini jedan dio enzima ATP sintaze koji je ključan za posljednji korak sinteze ATP-a. Mutacija u tom genu mijenja strukturu ili funkciju ATP sintaze, dovodeći do smanjene proizvodnje ATP-a. Međutim, ostaje nerazjašnjeno kako to utječe na slabost mišića, gubitak vida i druge značajke NARP-a [13,24].

[20] oduzetost očnog mišića
[21] spušten očni kapak

4.6. Mioklona epilepsija s nepravilnim crvenim vlaknima, MERRF

MERRF je poremećaj koji pogađa mnoge dijelove tijela, posebno mišiće i živčani sustav. Simptomi se obično pojavljuju tijekom djetinjstva ili u adolescenciji, a razlikuju se među pojedincima pa i članovima obitelji. Poremećaj je karakteriziran trzajima mišića, mišićnom slabošću (miopatija) i spastičnošću.[22] Proučavanjem mišićnih stanica oboljelih, uočava se abnormalnost u obliku crvenih mišićnih vlakana (eng. *ragged-red fibers*) (Slika 9.). Ostali znakovi bolesti su epileptički napadaji, ataksija, gubitak osjeta u ekstremitetima i smanjenje intelektualnih funkcija. Kod osoba oboljelih od MERRF-a može doći do gubitka sluha ili optičke atrofije[23] [25].



Slika 9. Prikaz mišićne stanice bolesnika s MERRF sindromom [26].

MERRF uzrokuju točkaste mutacije u mtDNA. U genu *MT-TK* koji kodira tRNA za aminokiselinu lizin dolazi do supstitucije A>G u 80% slučajeva. Mutacije u genima *MT-TL1*, *MT-TH* i *MT-TS1* rjeđe dovode do nastanka bolesti. Ove mutacije pogađaju organe koji su ovisni o velikim količinama energije kao što su mišići i mozak [7,25].

[22] poseban oblik povišenog mišićnog tonusa
[23] degeneracija živčanih stanica koje nose vizualne informacije iz oka do mozga

4.7. Alpers-Huttenlocherov sindrom

Alpers-Huttenlocherov sindrom je jedan od najtežih poremećaja koji pripadaju skupini poremećaja uzrokovanih mutacijama gena koji kodiraju DNA polimerazu gama (tzv. POLG-poremećaji). Simptomi ove skupine bolesti vezani su za moždane, mišićne i živčane funkcije. Sindrom se obično pojavljuje između 2. i 4. godine života, a karakteriziraju ga epileptički napadaji, gubitak mentalnih i motoričkih sposobnosti, te bolest jetre. Oboljeli obično imaju dodatne simptome kao što su ataksija, neuropatija, hipotonija, a u gorim slučajevima bolesnici gube sposobnost samostalnog hodanja, sjedenja i hranjenja. Značajke vezane uz kretanje su nehotični trzaji mišića, nekontrolirano kretanje udova, te abnormalni pokreti poznati kao parkinsonizam. Mentalne deformacije dovode do pospanosti, dekoncentracije, demencije ili nemogućnosti govora. Ljudi koji boluju od Alpers-Huttenlocherovog sindroma mogu preživjeti nekoliko mjeseci do 10 godina nakon pojave prvih simptoma bolesti [27].

Sindrom je uzrokovan mutacijama u genu *POLG*. Gen daje upute za izgradnju alfa podjedinice proteina polimeraze gama (Pol γ). Uloga Pol γ je pretvorba energije iz hrane u oblik koji stanica može koristiti, te „čitanje" sekvence mtDNA kao predloška za sintezu nove kopije mtDNA replikacijom. Mutacije *POLG* mijenjaju aminokiseline u alfa podjedinici polimeraze što smanjuje mogućnost replikacije DNA. Dolazi do smanjenja broja kopija mtDNA, posebno u stanicama mozga, jetre i mišića. mtDNA deplecija uzrokuje smanjenje stanične energije što objašnjava simptome Alpers-Huttenlocherova sindroma [27].

5. ZAKLJUČAK

Mitohondrij je stanični organel čija je glavna uloga stvaranje stanične energije. Čine ga četiri odjeljka: vanjska membrana, intermembranski prostor, unutarnja membrana, te matriks u kojem se nalazi mtDNA. Radi se o dodatnom genetskom materijalu koji se prenosi isključivo s majke na potomstvo i razlikuje od nDNA. mtDNA ima oko 15 puta veću stopu mutacija od nDNA. Do sada je otkriveno oko 250 različitih mutacija. Nagomilavanje mutacija unutar mtDNA dovodi do nastanka mitohondrijskih bolesti, a utječe i na proces starenja. Najčešće se javljaju neurodegenerativne i neuromuskularne bolesti. Mitohondrijske bolesti karakterizira pojava u bilo kojem razdoblju života, heterogenost i velik broj različitih simptoma. U djetinjstvu su najčešći Leighov sindrom i Alpers-Huttenlocherov sindrom, a u odraslijoj dobi MELAS sindrom, NARP, CPEO, LHON. Bolesti najčešće nastaju kao posljedice nedostataka u oksidacijskoj fosforilaciji, tj. negativnog utjecaja mutacija na pet proteinskih kompleksa koji sudjeluju u proizvodnji ATP-a. Najučestalije su točkaste mutacije pronađene unutar mt-tRNA gena koje dovode do zamjena baza (bazne supstitucije) ili velike delecije mtDNA koje obuhvaćaju do nekoliko tisuća nukleotida u nekoliko desetaka gena.

6. LITERATURA

[1] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.

[2] G.M. Cooper, R.E. Hausman, *Stanica: Molekularni pristup*, Medicinska naklada, Zagreb, 2010.

[3] https://ghr.nlm.nih.gov/primer/mutationsanddisorders/genemutation (11.4.2018.)

[4] G.S. Gorman, P.F. Chinnery, S. DiMauro, M. Hirano, Y. Koga, R. McFarland, A. Suomalainen, D.R. Thorburn, M. Zeviani, D.M. Turnbull, *Nature Reviews Disease Primers*, **2** (2016), 1-22.

[5] H.A.L. Tuppen, E.L. Blakely, D.M. Turnbull, R.W. Taylor, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1797** (2010), 113-128.

[6] I.N. Shokolenko, M.F. Alexeyev, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1852** (2015), 1805-1809.

[7] N. Pećina-Šlaus, A. Kafka, N. Njirić, *Medicinar*, **58** (2016), 47-50.

[8] https://www.instrukcije-poduka.com/instrukcije-iz-biologije-mitohondriji.html (12.4.2018.)

[9] http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl18.html (16.4.2018.)

[10] H. Chial, J. Craig, *Nature Education*, **1** (2008), 217.

[11] M.A. Jobling, M.E. Hurles, C. Tyler-Smith, *Human evolutionary genetics: origins, peoples and disease*, Garland publishing, New York, 2003.

[12] http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-5-evolution-and-biodi/54-cladistics/mitochondrial-dna.html (26.5.2018.)

[13] R.W. Taylor, D.M. Turnbull, *Nature reviews Genetics*, **6** (2005), 389-402.

[14] M. Srinivas, V.K. Verselis, T.W. White, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1860** (2017), 192-201.

[15] http://neuron.mefst.hr/docs/katedre/imunologija/2016-17/Biologija%20s%20genetikom%20-%20Farmacija/F_2015_Mutacije_Genetiu%CC%88ka%20A%CC%81ifra.pdf (23.5.2018.)

[16] https://ghr.nlm.nih.gov/primer/mutationsanddisorders/possiblemutations (23.5.2018.)

[17] A.J.F. Griffiths, W.M. Gelbart, J.H. Miller, et al., *Modern Genetic Analysis*, W.H. Freeman and Company, New York, 1999.

[18] J. Maynard Smith, *Evolutionary genetics*, Oxford, 1998. slika preuzeta s http://www.wikiwand.com/simple/Mutation (25.5.2018.)

[19] https://www.google.hr/search?q=depurination+mutation&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiwseSsrdHbAhVUh6YKHZnRBTMQ_AUICigB&biw=1366&bih=662#imgrc=Y1TYafisfIs-GM (13.6.2018.)

[20] S. Pramanik, J.A. Nerad, Chronic Progressive External Ophthalmoplegia (CPEO) - Kearns-Sayre Syndrome: 12-year-old boy with painless, progressive ptosis OU over 3 years. EyeRounds.org. (2005); dostupno na: http://www.EyeRounds.org/cases/case24.htm (27.6.2018.)

[21] J.A. Maceluch, M. Niedziela, *Pediatric Endocrinology Reviews*, **4** (2006), 117-137.

[22] R.W. Taylor, P.F. Chinnery, F. Haldane, A.A. Morris, L.A. Bindoff, J. Wilson, D.M. Turnbull, *Annals of Neurology*, **40** (1996), 459-462.

[23] https://ghr.nlm.nih.gov/condition/progressive-external-ophthalmoplegia#genes (27.6.2018.)

[24] I.J. Holt, A.E. Harding, R.K. Petty, J.A. Morgan-Hughes, *American Journal of Human Genetics*, **46** (1990), 428-433.

[25] G. Silvestri, E. Ciafaloni, F.M. Santorelli, S. Shanske, S. Servidei, W.D. Graf, M. Sumi, S. DiMauro, *Neurology*, **43** (1993), 1200-1206.

[26] http://www.lhsc.on.ca/Patients_Families_Visitors/Genetics/Inherited_Metabolic/Mitochondria/DiagnosisofMitochondrialDiseases.htm (29.6.2018.)

[27] R.P. Saneto, B.H. Cohen, W.C. Copeland, R.K. Naviaux, *Pediatric Neurology*, **48** (2013), 167-178.