

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Struktura a využití mitochondriálního genomu psů pro
genetické studie**

Bakalářská práce

Autor práce: Iva Vaněčková

Vedoucí práce: Ing. Jakub Vašek, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Struktura a využití mitochondriálního genomu psů pro genetické studie" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22.4.2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu Ing. Jakubovi Vaškovi, Ph.D. za odborné vedení, čas, ochotu a zejména cenné rady, které mi během zpracování bakalářské práce věnoval.

Struktura a využití mitochondriálního genomu psů pro genetické studie

Souhrn

Mitochondrie, vnitrobuněčná organela, kterou lze nalézt ve většině eukaryotických buněk, je pro náš život naprosto nepostradatelná. Její nezastupitelnou funkcí je získávání a uvolňování energie ve formě ATP, nukleotidu důležitého pro činnost každé buňky. Tomuto účelu je podřízena její struktura a morfologie. Vznik mitochondrií vysvětluje endosymbiotická teorie, která tvrdí, že mitochondrie mají evoluční původ v prokaryontech. Ta vychází mimo jiné z toho, že mitochondrie obsahují svou vlastní genetickou informaci. Mitochondriální DNA (mtDNA) je mimochromozomální kruhová molekula DNA, jejíž uspořádání je podobné genomu prokaryotických buněk. Délka mtDNA psa domácího (*Canis lupus familiaris*) je 16 728 párů bází. U psů, stejně jako u člověka a většiny živočichů, kóduje mtDNA celkem 37 genů (2 pro rRNA, 13 pro proteiny a 22 pro tRNA), přičemž více než polovina se podílí na proteosyntetickém aparátu mitochondrií a zbytek na jejich enzymatické výbavě. Standardní model dědičnosti mtDNA savců je takový, že mitochondrie jsou přenášeny striktně maternálně. To znamená, že donorem cytoplazmy, a tudíž i mitochondrií pro potomstvo, je matka. V několika výjimečných případech však byl zaznamenán i paternální přenos, a také rekombinace mtDNA. V mtDNA dochází k mutacím mnohem častěji, než je tomu u jaderné DNA. Stav, kdy se v buňkách nachází směs mutovaných a nemutovaných molekul mtDNA, označujeme jako heteroplazmii. Mutace v mtDNA mohou být příčinou některých dědičných a neurodegenerativních onemocnění. Rozdíly (mutace), kterými se mtDNA jedince liší od referenční sekvence, udávají jeho haplotyp. Haplotyp je tedy specifická kombinace mutací pozorovaná ve vzorku populace, a na základě společného původu náleží jednotlivé haplotypy k určitým haploskupinám. mtDNA má široké uplatnění v aplikované genetice. Údaje získané z mtDNA umožňují populačním genetikům zkoumat strukturu populací, například geografickou distribuci haploskupin a haplotypů. Využívá se rovněž k datování a objasnění evolučních událostí, jako je domestikace zvířat. mtDNA je vhodná i pro forenzní uplatnění, například k identifikaci válečných obětí, pozůstatků nezvěstných osob, rozlišení různých biologických druhů či vyloučení podezřelých z trestných činů.

Klíčová slova: *Canis lupus familiaris*, mtDNA, původ mitochondrií, haploskupina

Structure and application of mtDNA of dogs for genetic studies

Summary

Mitochondria, the intracellular organelle that can be found in most eukaryotic cells, is indispensable for our life. Its irreplaceable function is the generation and release of energy in the form of ATP, a nucleotide important to each cell's activity. This purpose is subject to its structure and morphology. The origin of mitochondria explains endosymbiotic theory, which states that mitochondria have evolutionary origin in prokaryotes. It stems, among other things, from the fact that the mitochondria contain their own genetic information. Mitochondrial DNA (mtDNA) is an extrachromosomal circular DNA molecule that resembles a genome of prokaryotic cells. The length of mtDNA of a domestic dog (*Canis lupus familiaris*) is 16,728 base pairs. In dogs, as well as in humans and most animals, mtDNA encodes a total of 37 genes (2 for rRNA, 13 for proteins and 22 for tRNA), more than half contributing to the protheosynthetic apparatus of the mitochondria and the rest for their enzymatic equipment. The standard model of inheritance of mammalian mtDNA is such that mitochondria are transmitted strictly maternally. This means that the cytoplasmic donor, and hence the mitochondria for the offspring, is the mother. In some rare cases, however, paternal transmission and either recombination of mtDNA were reported. In mtDNA, mutations occur much more frequently than in nuclear DNA. The condition where a mixture of mutated and unmutated mtDNA molecules is present in cells is called heteroplasmy. Mutations in mtDNA may be the cause of some hereditary and neurodegenerative diseases. The differences (mutations) that the individual mtDNA differs from the reference sequence indicate its haplotype. Thus, the haplotype is a specific combination of mutations observed in a population sample, and based on a common origin, individual haplotypes belong to specific haplogroups. mtDNA has a broad application in applied genetics. Data obtained from mtDNA allows population geneticists to examine the structure of populations, such as the geographical distribution of haplogroups and haplotypes. It is also used to date and explain evolutionary events such as domestication of animals. mtDNA is also suitable for forensic applications, such as the identification of war victims, the remains of missing persons, the distinction of different biological species, or the exclusion of suspects from crimes.

Keywords: *Canis lupus familiaris*, mtDNA, origin of mitochondria, haplogroup

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce.....	2
3 Literární řešerše.....	3
3.1 Struktura a obecný popis mitochondrií	3
3.1.1 Historie výzkumu mitochondrií	3
3.1.2 Struktura a morfologie mitochondrií	4
3.1.3 Funkce mitochondrií	7
3.2 Mitochondriální genom	9
3.2.1 Rostlinný mitochondriální genom	10
3.2.2 Mitochondriální genom hub.....	11
3.2.3 Mitochondriální genom živočichů	12
3.2.3.1 Lidský mitochondriální genom	13
3.2.3.2 Mitochondriální genom psů	17
3.3 Původ a evoluce mitochondrií.....	18
3.3.1 Endosymbiotická teorie	19
3.3.2 Vznik eukaryot.....	20
3.3.2.1 Vodíková hypotéza.....	21
3.3.2.2 Syntrofická hypotéza.....	22
3.3.3 Organely příbuzné mitochondriím.....	23
3.4 Problematika dědičnosti mitochondriální DNA.....	24
3.4.1 Paternální přenos a rekombinace mtDNA	25
3.4.2 Heteroplazmie	26
3.4.3 Mitochondriální teorie stárnutí	28
3.4.4 Dědičnost mitochondriálních onemocnění	29
3.5 Využití v aplikované genetice.....	31
3.5.1 Populační studie.....	33
3.5.2 Evoluční studie	35
3.5.3 Forenzní studie.....	38
4 Závěr	40
5 Seznam použité literatury	43
6 Seznam použitých zkratk	52

1 Úvod

Mitochondrie jsou pozoruhodné organely, které slouží především jako energetické centrum buňky. energii získávají prostřednictvím několika reakcí, které na sebe navzájem navazují. Jedná se o Krebsův cyklus, oxidaci vodíku v dýchacím řetězci a oxidativní fosforylaci. Probíhá zde také beta-oxidace mastných kyselin. Mitochondrie můžeme pozorovat ve všech eukaryotických buňkách. Výjimkou jsou některé jednobuněčné eukaryotní organismy žijící v prostředí s nedostatkem kyslíku, u nichž se mohou nacházet pouze organely příbuzné mitochondriím, hydrogenozomy či mitozomy.

Objev DNA v jiné organelce, než v eukaryotickém jádře byl přelomový, neboť mimo jiné podpořil endosymbiotickou teorii o původu semiautonómních organel, tedy mitochondrií a plastidů. Původ mitochondrií zřejmě souvisí i se samotným vznikem eukaryot.

Zatímco dědičnost jaderné DNA podléhá pravidlům mendelistické dědičnosti, v případě mitochondriálního genomu je tomu jinak. Pro mitochondriální DNA (mtDNA) je charakteristická dědičnost v mateřské linii. Zároveň má mtDNA vysokou mutační rychlost, u lidí prakticky nepodléhá rekombinaci a je přítomna v buňce mnoha kopiích. Proto jí lze využít pro různé genetické analýzy.

Předkládaná práce se bude zabývat mitochondriální DNA (mtDNA) v širším kontextu, neboť mitochondrie a jejich genetická výbava jsou velice zajímavé a můžeme se u nich setkat s celou řadou specifických a výjimečných vlastností. Nejprve bude uveden přehled týkající se samotných mitochondrií, jejich stavby a procesů, které zde probíhají, a rovněž popsán mitochondriální genom a jeho organizace, zejména u člověka a psa domácího (*Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758). V následující části bude vysvětleno jak, kdy a z čeho se mitochondrie vyvinuly, a s tím související nejuznávanější teorie o vzniku eukaryot. Další kapitola se bude týkat dědičnosti, mimo jiné heteroplazmie, kde budou uvedeny studie týkající se psů. Poslední kapitola bude zaměřena na aplikované využití mtDNA. U populačních studií se budu zabývat rozšířením haploskupin mtDNA člověka jak ve světě, tak v České republice a rovněž haploskupinami psů. Poté se budu věnovat evolučním studiím, podrobně se zaměřím na možné scénáře domestikace psa a problematiku molekulárního datování. Poslední část se bude týkat forenzního využití mtDNA.

2 Cíl práce

Tato práce si klade za cíl sepsat strukturovaný text o problematice týkající se struktury a využití mitochondriální DNA v aplikované molekulární genetice se zaměřením na psovité šelmy. Jednotlivé cíle práce odrážejí náplň příslušných kapitol zaměřených na strukturu a obecný popis mitochondrií, organizaci mitochondriálního genomu, původu a evoluce mitochondrií u různých organismů, problematiku dědičnosti mtDNA a využití mtDNA v aplikované genetice.

3 Literární rešerše

3.1 Struktura a obecný popis mitochondrií

3.1.1 Historie výzkumu mitochondrií

Spolu s rozvojem mikroskopie byly přibližně od 19. století pozorovány různé intracelulární granulární, tyčinkovité či vláknité struktury, až později se zjistilo, že se jedná o stejné pleomorfní organely – mitochondrie. Tehdy však nesly mnoho rozličných označení. Podle Schefflera (2007) se nazývaly například chondriozomy, chromidia, chondriokonta, chondriosféry, histomery, mikrozoomy, sarkozomy, plastozomy, plastochondria, polioplazmata, mitogel, parabazální tělíska, a ještě mnoho dalších. Nicméně dodnes přetrvál pojem mitochondrie, který zavedl německý biolog Carl Benda kolem roku 1897/8. Odvodil ho z řeckých slov „mitos“, což znamená vlákno, a „chondros“, v překladu zrno.

Ze shrnutí Schefflera (2007) vyplývá, že důležitost mitochondrií si uvědomoval již Richard Altmann, jenž je v roce 1886 pojmenoval bioblasty. Ve své knize *Die Elementarorganismen (Základní organismy)* z roku 1894 je označil za autonomní, základní částice života, vytvářející „bakteriální“ kolonie v hostitelské buňce. Jeho postřehy však ve své době nedosáhly uznání. První jasnou izolaci a popis mitochondrií z létacího svalů hmyzu provedl roku 1888 švýcarský anatom a fyziolog Albert von Kölliker. Nabobtnáním mitochondrií ve vodě rovněž prokázal přítomnost membránového obalu. Benjamin Kingsbury navrhl v roce 1912, že mitochondrie jsou centrem buněčného dýchání a o rok později německý vědec Otto Warburg předložil hypotézu, že enzym uvnitř buněk umožňuje zpracování kyslíku. Warburgovi byla v roce 1931 udělena Nobelova cena za fyziologii za jeho objev podstaty a způsobu účinku dýchacího enzymu. Nobelova cena mu byla nabídnuta rovněž v roce 1944, v té době ji však už nemohl převzít. Jednak kvůli postoji Německa, které odmítalo povolit svým státní příslušníkům přijímat mezinárodní ceny, a zřejmě i vzhledem k jeho částečnému židovskému původu, mu nebylo umožněno opustit zemi a cenu převzít (Weisz, 2015). Další významnou osobností je David Keilin, jenž ve 20. letech znovuobjevil a popsal barviva cytochromy. Následovala izolace ATP (adenosintrifosfátu) Karlem Lohmannem v roce 1929 a o osm let později objev citrátového cyklu Hansem Krebsem, za což byl v roce 1953 oceněn Nobelovou cenou. Kingsburyho hypotéza byla potvrzena až roku 1949, kdy Eugene Kennedy a Albert Lehninger prokázali, že mitochondrie jsou dějištěm oxidativní fosforylace.

Důležitým milníkem bylo formulování chemiosmotické teorie Peterem Mitchellem, za což obdržel v roce 1978 Nobelovu cenu za chemii. Dalším přelomovým zjištěním byl objev mtDNA v mitochondrii embrya kuřete (Nassová a Nass, 1963). V 80. letech byly poprvé identifikovány molekulární příčiny některých mitochondriálních onemocnění a osekvenován mitochondriální genom člověka (Anderson et al., 1981). V 90. letech byly publikovány první kompletní sekvence mtDNA rostlin. Mitochondriální genom psa domácího (*Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758) byl osekvenován v roce 1997 (Kim et al., 1998) a jaderný genom psa až roku 2005 (Lindblad-Toh et al., 2005).

3.1.2 Struktura a morfologie mitochondrií

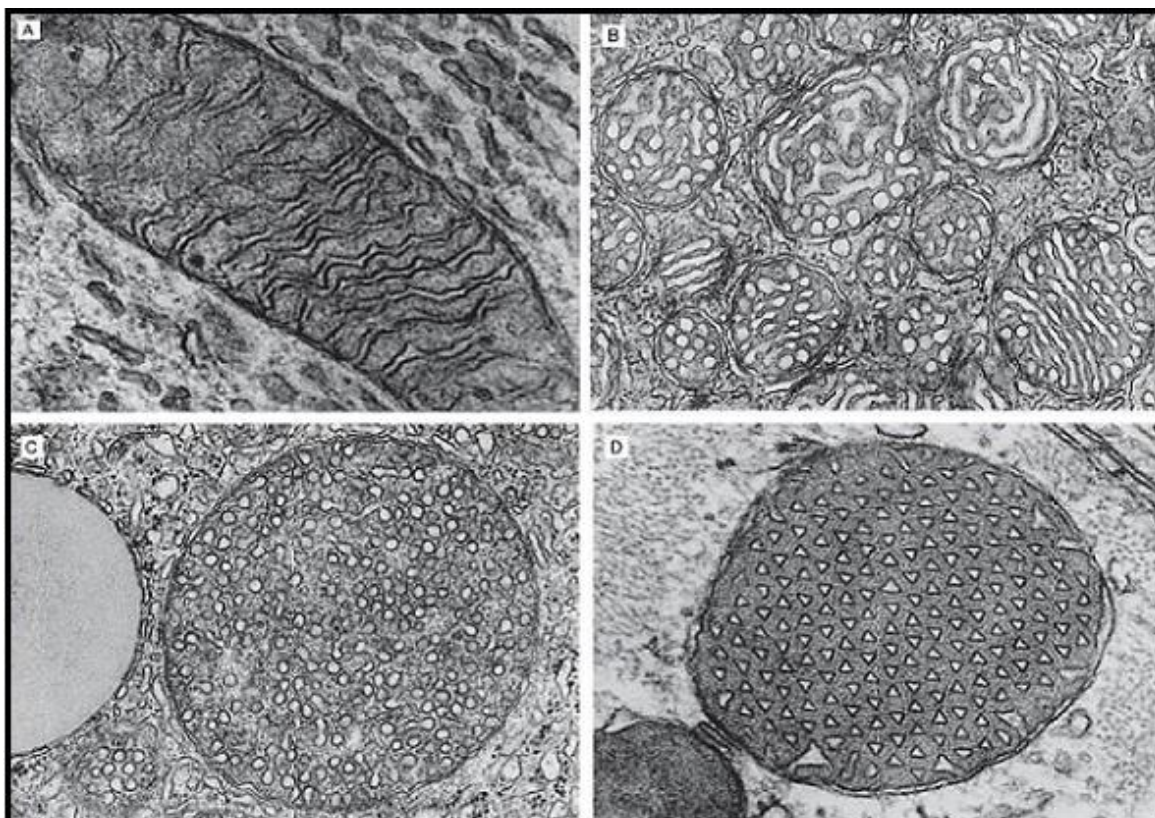
Mitochondrie jsou membránou oddělené buněčné organely nacházející se ve většině eukaryotických buněk. Výjimkou jsou například zralé lidské erythrocyty a zrohovatělé buňky. Jejich tvar, velikost a počet je velmi variabilní a závisí jak na typu buňky, tak na její metabolické aktivitě. Můžeme je pozorovat jako zrnité, tyčinkovité či vláknité struktury. Jejich velikost přibližně odpovídá bakteriálním rozměrům; délka se podle Schefflera (2007) pohybuje v průměru od 0,5 do 4 μm a šířka do 0,5 μm . Počet mitochondrií většinou závisí na energetických požadavcích buňky. Obecně obsahují nejvíce mitochondrií metabolicky aktivní buňky: v játrech, ledvinách, příčně pruhované svalovině, myokardu či mozku, kde mohou zaplňovat až 40 % cytoplazmy. Hepatocyty obsahují zhruba 800 mitochondrií, lidský oocyt až 100 000, améba *Chaos* spp. dokonce 500 000. Oproti tomu v krvinkách, tukových a kožních buňkách se jich nachází jen několik. *Trypanosoma* sp. obsahuje jedinou mitochondrii tvořící kinetoplast, spermie obvykle méně než 100 mitochondrií. Soubor mitochondrií v buňce nazýváme chondriom (Logan, 2006).

Mitochondrie jsou tvořeny čtyřmi základními kompartmenty: dvěma fosfolipidovými membránami, vnitřní (1) a vnější (2), mezi nimiž se nachází intermembránový prostor (3), a matrixem (4). Tloušťka obou membrán je 5-7 nm. Vnější membrána odděluje organelu od okolního cytosolu. Její povrch je hladký a velmi permeabilní. Obsahuje množství integrálních membránových proteinů, mitochondriálních porinů, které umožňují neselektivní transport látek. Poriny je možné najít také na membránách plastidů a gramnegativních bakterií. Vnější membrána obsahuje větší množství cholesterolu. Pro přenos makromolekul a proteinů z cytoplazmy do intermembránového prostoru slouží enzymatický tzv. TOM (translocase of the outer membrane) komplex (Logan, 2006; Scheffler, 2001).

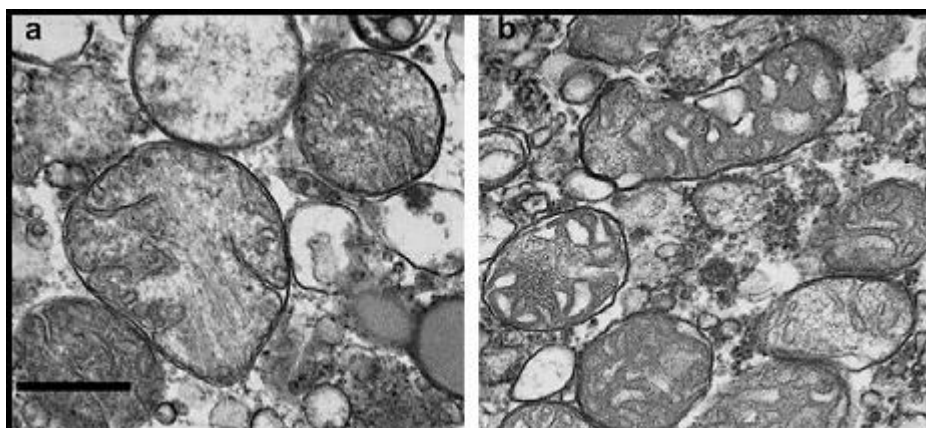
Vnitřní membrána je zvrásněná a vytváří nepravidelné výběžky, mitochondriální krusty, což umožňuje mnohonásobně zvětšit povrch organely. Podle struktury krist rozlišují Scheffler (2007) a Griparic a van der Blied (2001) několik typů mitochondrií. Mitochondrie s kristami (Obr. 1A) jsou nejrozšířenější a nacházejí se ve většině buněk savců. Krusty jsou obvykle uspořádány kolmo na dlouhou stranu organely. Mitochondrie tubulárního typu (Obr. 1B) mají rourkovité krusty, jež se navzájem proplétají. Často se vyskytují u prvoků, bezobratlých a obojživelníků. U savců se s nimi setkáváme v buňkách produkujících steroidní hormony. V buňkách kůry nadledvin se vyskytují mitochondrie sakulárního typu (Obr. 1C). Krusty tvoří drobné měchýřky, které jsou s vnitřní membránou spojeny prostřednictvím krátkých stopek. Prizmatický typ (Obr. 1D) s trojúhelníkovým průřezem je poměrně vzácný, u některých živočichů se nachází v gliových buňkách nervového systému.

Metabolická aktivita buněk (množství produkovaného ATP) má také vliv na morfologii mitochondrií. V případě metabolicky málo aktivních buněk nastává tzv. ortodoxní stav (Obr. 2a), kdy je krist velmi málo a prostor matrix je zvětšený. V kondenzovaném stavu (Obr. 2b), u metabolicky aktivnějších buněk, je naopak povrch krist zvětšený na úkor matrixu (Logan, 2006).

Vnitřní membrána propouští molekuly velice selektivně. Nízká propustnost pro ionty je zřejmě způsobena vyšším obsahem fosfolipidu kardiolipinu. Na vnitřní membráně mitochondrií jsou umístěny enzymy dýchacího řetězce a aerobní fosforylace, ATP-syntázy, přenašeče iontů, ATP, ADP, aminokyselin a mastných kyselin. Podobně jako na vnější membráně se i zde nachází komplex, který umožňuje přenos bílkovin – tzv. TIM (translocase of the inner membrane) komplex (Logan, 2006; Scheffler, 2001).



Obr. 1. Typy mitochondrií podle struktury krist. (A) Mitochondrie s kristami ve svalu srdeční komory. (B) Kristy tubulárního typu u améby. (C) Mitochondrie sakulárního typu v buňkách kůry nadledvin. (D) Prismatický typ krist v astrocytu. Převzato z: Scheffler, 2007.



Obr. 2. Vnitřní struktura mitochondrií získaných z klíčících embryí kukuřice. (a) Ortodoxní stav. (b) Kondenzovaný stav. Měřítko = 500 nm. Převzato z: Logan, 2006.

Matrix, jinými slovy mitochondriální cytoplazma, je gelovitá amorfni hmota vyplňující prostor pod vnitřní membránou. Je bohatá na proteiny, jejichž koncentrace dosahuje až 56 g na 100 g; obsah vody je naopak nízký. Matrix mimo jiné obsahuje enzymy

cyklu kyseliny citronové, metabolismu pyruvátu, β -oxidace mastných kyselin, proteosyntézy či syntézy močoviny a zásoby metabolitů (Scheffler, 2007; Logan, 2006). Dále se zde nachází molekula mitochondriální DNA, RNA a mitochondriální ribozomy prokaryotického typu.

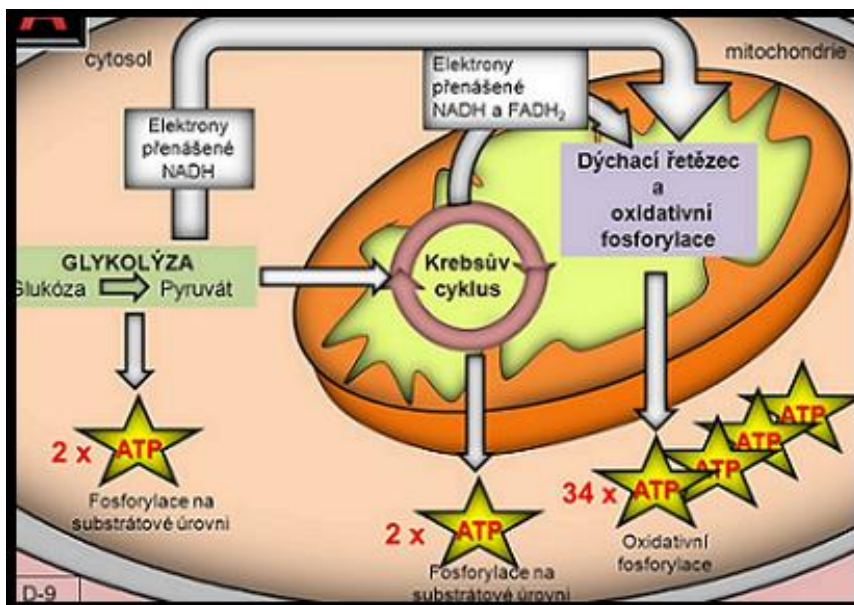
Po zdokonalení zobrazovacích metod se zjistilo, že mitochondrie tvoří v některých buňkách vysoce dynamickou rozvětvenou a ohebnou síť, tzv. retikulum van der Bliek et al., 2013), přičemž dochází k neustálému rozpojování (fission) a spojování (fusion) jednotlivých mitochondrií. V posledních letech byla popsána lidská onemocnění, která jsou zapříčiněna mutacemi během spojování a rozpojování mitochondriální sítě. Navíc bylo objeveno mnoho spojení s programovanou buněčnou smrtí, apoptózou, a odstraňováním přebytečných a poškozených mitochondrií, mitofágií.

Mitochondrie v cytoplazmě neplují bezcílně, nýbrž jsou neustále v kontaktu s dalšími buněčnými kompartmenty – mohou asociovat s jadernou membránou, endoplazmatickým retikulem (syntéza fosfolipidů) nebo cytoskeletem, po jehož mikrotubulech a intermediálních filamentách se mohou pohybovat pomocí motorových proteinů (jedná se o aktiny, myosiny, dynaminy, dyneiny či kinesiny). Ty jsou dále transportovány do mitochondriálních membrán (Scheffler, 2007; van der Bliek et al., 2013).

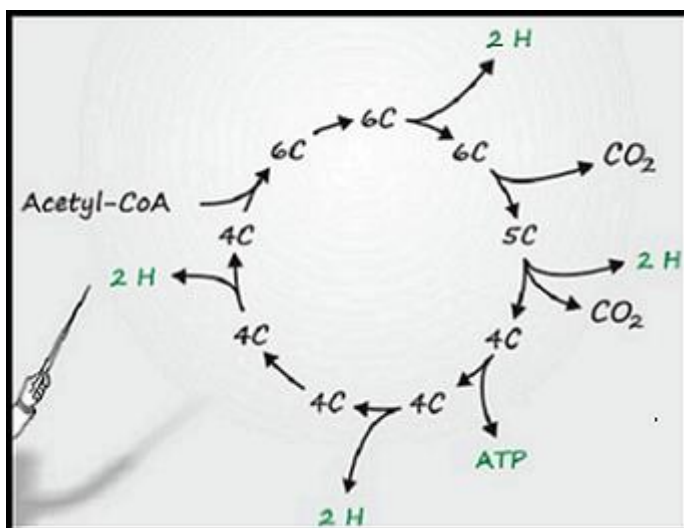
3.1.3 Funkce mitochondrií

Hlavní funkcí mitochondrií je produkce a uvolňování energie ve formě ATP (adenosintrifosfátu), důležitého pro činnost a potřeby buňky. Energií získává mitochondrie prostřednictvím tří reakcí, které na sebe navazují. Jedná se o tyto pochody: Krebsův cyklus, oxidaci vodíku v dýchacím řetězci a oxidativní fosforylaci (Obr. 3). Dále se mitochondrie uplatňují například při β -oxidaci mastných kyselin. Procesy probíhají za aerobních podmínek. Z jedné molekuly glukózy získá buňka 38 molekul ATP oproti anaerobnímu rozkladu (kvašení), jehož výtěžek je 2 molekuly ATP na jednu molekulu glukózy.

Uvnitř mitochondrií probíhá pochod zvaný Krebsův či citrátový cyklus nebo také cyklus kyseliny citronové či cyklus trikarboxylových kyselin (Obr. 4). Enzymy zodpovědné za Krebsův cyklus byly nalezeny v mitochondriální matrix, přičemž některé z nich můžeme nalézt i na mitochondriální membráně (Scheffler, 2007). Produktem katabolismu živin je acetyl-CoA (acetylkoenzym A, acetylový zbytek navázaný na Koenzym A). Postupnou dekarboxylací a oxidací jsou vytvářeny redukční ekvivalenty, které jsou následně využity při oxidativní fosforylaci a k syntéze ATP. Jako odpadní produkt se uvolňuje oxid uhličitý a protony jsou použity v dýchacím řetězci.



Obr. 3. Schéma buněčného dýchání. Převzato z: <http://slideplayer.cz/slide/2508305/>

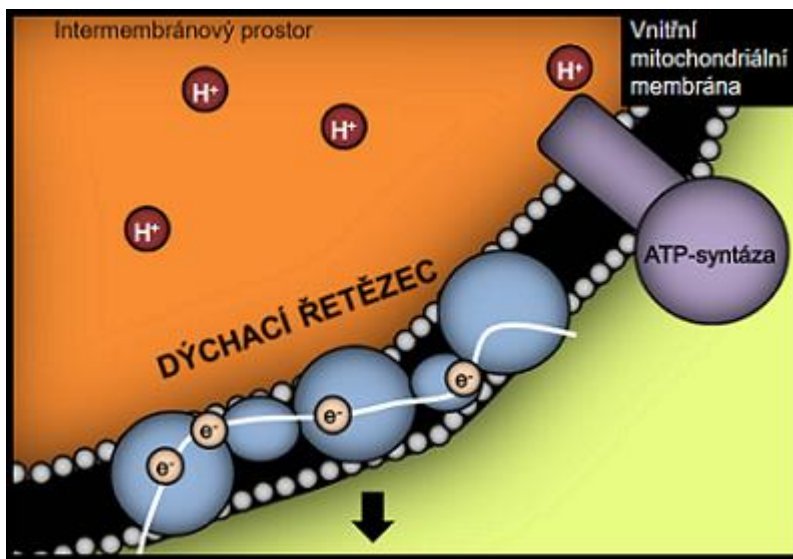


Obr. 4. Zjednodušené schéma Krebsova cyklu. Převzato z:

<http://galenus.cz/clanky/biochemie/biochemie-metabolismus-citratovy-cyklus>

Dýchací řetězec neboli elektronový transportní řetězec (Obr. 5), jak uvádí Berg et al. (2002), je terminální fází buněčného dýchání. Je to soubor čtyř (I-IV) multiproteinových komplexů lokalizovaných na vnitřní membráně mitochondrií (musí totiž být zajištěna dodávka redukováných koenzymů z beta-oxidace a citrátového cyklu). Přes tyto komplexy proudí protony a elektrony. Vnitřní mitochondriální membrána propouští molekuly velice selektivně, což umožňuje vytvářet koncentrační gradient. Jako komplex V se někdy označuje ATP-syntáza (Obr. 5). Probíhá zde oxidativní fosforylace, která je hlavním zdrojem energie

aerobních organismů. Vodíkové ionty z mezimembránového prostoru mají snahu vyrovnat protonový gradient, což je možné pouze průchodem přes ATP-syntázu do matrix mitochondrie. Rozpohybováním ATP-syntázy – podobně jako voda pohání mlýnské kolo – je získána energie, která je využita k fosforylaci ADP (adenosindifosfátu) na ATP, navázání zbytku kyseliny fosforečné na ADP. Při průchodu tří atomů vodíku skrze molekulu ATP-syntázy vzniká jedna molekula ATP. Odevzdáním energie se ATP znovu přemění na ADP, který vstupuje do oxidativní fosforylace, přičemž vzniká opět ATP. Jedná se tedy o sled reakcí, které mají za úkol výrobu ATP, jako odpadní produkty vznikají teplo a voda.



Obr. 5. Transportní řetězec na vnitřní mitochondriální membráně. Převzato z: <http://slideplayer.cz/slide/2508305/>

Neméně důležitým procesem je beta-oxidace mastných kyselin. Jedná se o sled reakcí, kdy dochází k postupné oxidaci mastných kyselin, jejichž produktem je acetyl-CoA a redukované koenzymy, které jsou dále využity v dýchacím řetězci. Acetyl-CoA je následně využit v Krebsově cyklu. Enzymy β -oxidace se nacházejí v mitochondriální matrix (Scheffler, 2007).

3.2 Mitochondriální genom

Objev DNA v jiné organelle, než v eukaryotickém jádře (Nassová a Nass, 1963), byl objevem s dalekosáhlými důsledky a možnostmi. Vrhla totiž nové světlo na teorie, jež se zabývaly původem těchto organel, a podpořila endosymbiotickou hypotézu (Saganová, 1967).

Také nastínil nový pohled na studium biogeneze mitochondrií. Zároveň se potvrdilo, že tyto subcelulární struktury pravděpodobně obsahují genetickou informaci potřebnou pro vlastní kompletaci.

Během posledních třiceti let byly osekvenovány stovky mitochondriálních genomů živočichů, rostlin či hub. Ze souboru poznatků v článku Burgera et al. (2003) je patrné, že napříč eukaryotickými organismy je funkce mitochondriální DNA (mtDNA) relativně omezená: kóduje pouze malý počet genů, jejichž mRNA je překládána prostřednictvím charakteristického mitochondriálního systému pro syntézu proteinů. Některé z jeho součástí jsou vždy (ribosomální RNA, rRNA), obvykle (transferová RNA, tRNA) nebo příležitostně (ribosomální proteiny) specifikovány mitochondriálním genomem. mtDNA je velice rozmanitá ve struktuře a mechanismech genové exprese. Její uspořádání se neshoduje s jaderným genomem eukaryotické buňky, ale je spíše podobné genomu prokaryot. mtDNA obvykle sestává z jediného cirkulárního (kruhového) chromozomu. Příklad mitochondriálního genomu obsahujícího několik cirkulárních molekul (Obr. 6) byl zaznamenán například u chytridiomycety (*Spizellomyces punctatus* (Barr, 1980)). Nejneobvyklejší uspořádání mitochondriálního genomu bylo zjištěno u protisty (*Amoebidium parasiticum* Cienk., 1861), jejíž mtDNA obsahuje komplexní soubor několika stovek lineárních molekul.



Obr. 6. Příklady uspořádání mitochondriálního genomu. Převzato z: Burger et al., 2003.

Burger et al. (2003) také uvádějí, že velikost mitochondriálního genomu nemá vliv na počet genů. Záleží na odchylkách v délce a uspořádání nekódujících intergenových oblastí.

3.2.1 Rostlinný mitochondriální genom

Mitochondriální genom vyšších rostlin má mnoho vlastností, díky kterým je pro molekulární biology jedním z nejzajímavějších. Vzhledem ke své velikosti má mtDNA rostlin

potenciál pro kódování velkého množství genů. Mitochondriální genom rostlin je totiž mnohem větší než u živočichů. Větší velikost se odvíjí zřejmě od toho, že mtDNA rostlin obsahuje introny a obrovské množství nekódujících sekvencí. Scheffler (2007) uvádí, že mtDNA rostlin dosahuje velikosti v předpokládaném rozmezí od 200 do 2 400 kbp (tedy 200 000 – 2 400 000 párů bází). Je třeba si uvědomit, že velikost 2 400 kbp (tykvovitě rostliny) je úměrná velikosti některých prokaryotických genomů. Co se týče uspořádání genů, liší se v takto rozsáhlých genomech i mezi blízkými příbuznými rody. Je rovněž zajímavé, že rostlinné mitochondrie mají zvýšenou rekombinační aktivitu, které se budu podrobněji věnovat ve čtvrté kapitole.

Jako modelový organismus v molekulární genetice rostlin se často využívá huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* L.). Vzhledem k velikosti 366 kbp patří mitochondriální genom *A. thaliana* mezi genomy se střední velikostí (Unsel et al, 1997). Bylo zde nalezeno pouhých 57 genů (pokrývají jen zhruba 10 % genomu), včetně tří rRNA genů, 22 tRNA genů a obvyklá sada genů pro komplex dýchacího řetězce. Rostlinné mtDNA obsahují geny pro ribozomální proteiny zároveň s 5S rRNA genem. Mitochondriální genomy rostlin kódují tři geny komplexu V (ATP1, ATP6 a ATP9) v porovnání s lidskou mtDNA, která kóduje geny dva (ATP6 a ATP8).

3.2.2 Mitochondriální genom hub

Velikost mitochondriálních genomů hub je typicky mezi 40 a 60 kbp, s možnými extrémy, jako je tomu například u kvasinky poltivé (*Schizosaccharomyces pombe* Lindner), jejíž mtDNA má velikost 20 kbp a u pečárky opásané (*Agaricus bitorquis* (Sacc.)), jejíž mtDNA má velikost 170kbp (Scheffler, 2007). Velikost těchto mitochondriálních genomů je v průměru třikrát až čtyřikrát větší než u živočichů, ale podstatně menší než u rostlin.

Mezi geny, které jsou v mtDNA hub přítomné, patří geny pro malé i velké ribozomální podjednotky, 24 tRNA, geny cytochromu b v komplexu III a geny pro tři podjednotky komplexu V (ATP6, ATP8 a ATP9). Mezi geny, které očividně chybí, patří ty pro komplex I. Zdá se, že mitochondrie kvasinky pивní (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen), jednoho z nejznámějších modelových organismů z říše hub, nemají ani typický komplex I, který se nachází u většiny jiných organismů (Foury et al., 1998). Je ale nutné podotknout, že nepřítomnost genů komplexu I není typická pro všechny houby.

3.2.3 Mitochondriální genom živočichů

Rozsah velikosti mtDNA, která se nachází u mnohobuněčných živočichů, je relativně úzký: průměrná velikost je okolo 16,5 kbp, ale jsou zde i výjimky. Například velikost mtDNA hlístice *Nematoda* sp. se pohybuje okolo 14 kbp a velikost mtDNA u hřebenatkovitých (*Pectinidae* sp.) je 42 kbp, přičemž se jedná vždy o kruhovou DNA. Velkou výjimku tvoří mitochondriální genom žahavce nezmara štíhlého (*Hydra attenuata* Pallas, 1766), který sestává ze dvou unikátních lineárních DNA molekul o velikosti 8 kbp (Scheffler, 2007).

Kompletní sekvence mitochondriálního genomu jsou nyní k dispozici od mnoha druhů savců. Je pozoruhodné, že odchylka v průměrné délce sekvence je obvykle menší než 1 kbp. Až na pár výjimek kóduje mtDNA živočichů 37 genů (2 pro rRNA, 13 pro proteiny a 22 pro tRNA).

Se zmenšením velikosti mitochondriálního genomu souvisejí některé principy, které redukují hromadění mitochondriálních mutací. Změna velikosti živočišné mtDNA úzce souvisí s rozsáhlým horizontálním genovým transferem z mitochondriálního genomu do jaderného genomu během evoluce, přičemž u většiny taxonů se jedná asi o 90 % genů (Hoekstra, 2000). Kromě toho je mitochondriální genom zefektivněn v několika ohledech. Mitochondrie savců neobsahují introny a mají pouze tři místa pro počátek transkripce (Taanman, 1999). Malé genomy nesou méně mutací než větší genomy a výhoda mála iniciačních míst (kromě úspory prostoru potřebného pro samostatný přepis každého genu) je taková, že mutace v těchto místech poškodí namísto jednoho genu celý mitochondriální genom (Hoekstra, 2000). V tomto ohledu má taková mutace závažnější škodlivý účinek a je snadněji vyloučena selekcí. Adams a Palmer (2003) uvádějí důvody, proč buňka může tolerovat ztrátu dříve funkčních genů z mitochondriálního genomu. Za prvé, daný gen již nemusí být potřeba, a tak je z buňky úplně ztracen. Druhým důvodem je genová substituce, kdy je gen z buňky také zcela odstraněn, avšak jeho funkce je i nadále potřebná a je nahrazena nějakým již existujícím genem, jehož produkt může hrát v mitochondrii stejnou roli. A za třetí může být gen z mitochondrie odstraněn, protože byl funkčně přenesen do jádra.

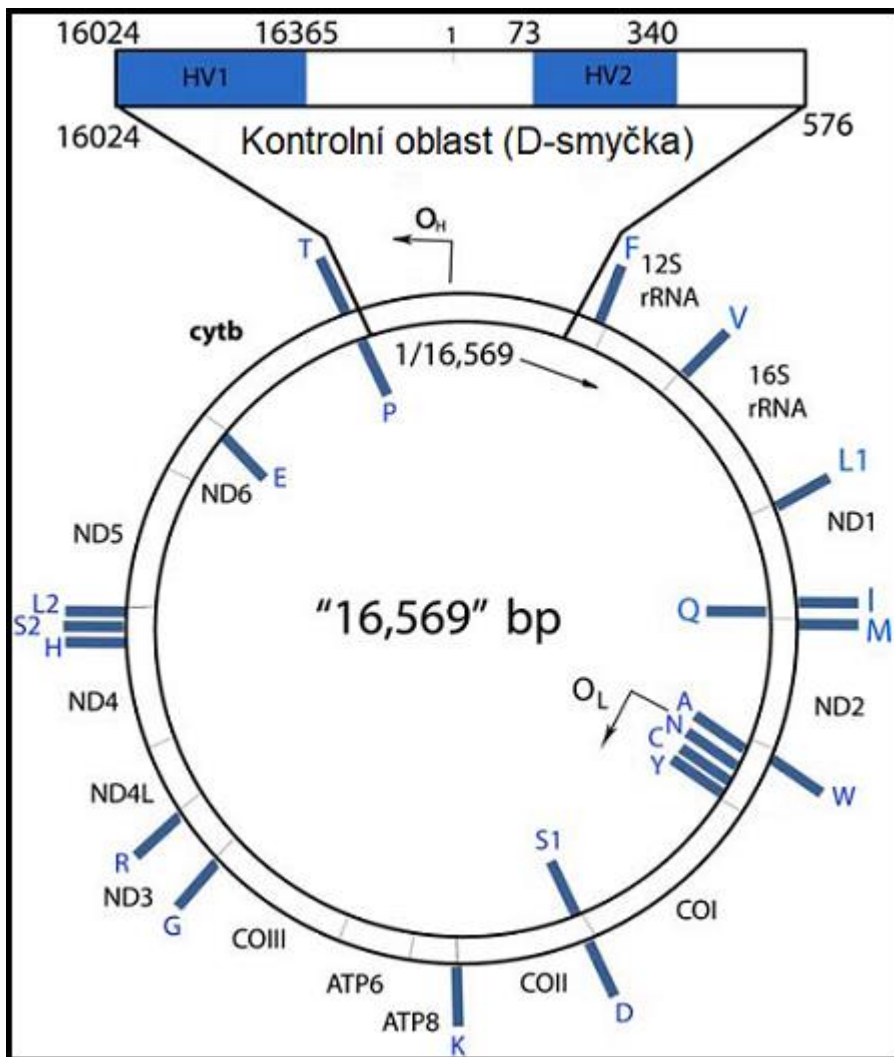
Rychlost nukleotidové substituce v mitochondriálních genomech je desetkrát vyšší než v jaderných genomech (Kim et al., 1998). Je to pravděpodobně způsobeno jednak nepřítomností ochranných histonů, dále tím, že značnou dobu během replikace se nachází ve formě samostatných řetězců mtDNA, omezeným mechanismem oprav mtDNA a také vysokými hladinami kyslíkových radikálů v průběhu elektronového transportu (Hoekstra, 2000). Relativně vysoká rychlost evoluce mitochondriálních genomů činí srovnávání sekvencí

mtDNA zvláště užitečné jak pro odhadování doby poměrně nedávných evolučních událostí, tak evoluce vzdáleně příbuzných taxonů.

3.2.3.1 Lidský mitochondriální genom

Délka lidské mtDNA je 16 569 párů bází, které tvoří vnitřní lehký (light, L) řetězec a vnější těžký (heavy, H) řetězec (Anderson et al., 1981). Nukleotidy jsou totiž zastoupeny asymetricky. H-řetězec obsahuje větší množství purinových bází (adeninu a guaninu), zatímco L-řetězec spíše báze pyrimidinové (cytosin a thymin). Stejně jako u ostatních živočichů kóduje mtDNA člověka celkem 37 genů. Jedná se o 2 rRNA (12S a 16S), 22 tRNA a 13 proteinů kódujících strukturální podjednotky mitochondriálního dýchacího řetězce: ND1-ND6, ND4L (komplex I – NADH dehydrogenázy), CYB (komplex III – cytochrom b), CO1-CO3 (komplex IV – cytochrom c oxidázy), ATP6 a ATP8 (komplex V – ATP syntázy). Hlavním kódujícím řetězcem je H-řetězec, který kóduje 28 genů, zatímco L-řetězec jen 9 genů (Obr. 7).

Lidský mitochondriální genom obsahuje velmi málo nekódujících oblastí a mezi sousedícími geny se nachází obvykle jen několik bází. Výjimkou je D-smyčka (displacement loop, D-loop) neboli kontrolní oblast, ve které nebyla zjištěna žádná kódovací funkce. Je dlouhá 1121 bp a nachází se na pozici 16024-576 a je tvořena trojšroubovicí. Třetí řetězec D-smyčky (7S DNA) je dlouhý ~650 bp a vyskytuje se v pozici ~16111-191 (He et al., 2007). Dochází zde k navázání komplementárního řetězce k L-řetězci, H-řetězec je uvolněný a tato struktura má tvar písmene D. V kontrolní oblasti se také nacházejí dva specifické segmenty mtDNA, které obsahují nejvíce polymorfismů, hypervariabilní region 1 (HV1) a hypervariabilní region 2 (HV2). Obě jsou dlouhé ~300 bp (Obr. 7), přičemž HV1 zahrnuje úsek 16024-16365 a HV2 úsek v rozmezí 73-340 (Panday et al., 2014).



Obr. 7. Lidská mitochondriální DNA. Převzato z: Panday, 2014.

První kompletní sekvenci a analýzu lidské mtDNA publikovali Anderson et al. (1981). Je známá jako Cambridgeská referenční sekvence (Cambridge reference sequence, CRS) a pojmenovaná podle univerzity, ve které sekvenování probíhalo. Jelikož v ní byly postupem času nalezeny nesrovnalosti, byl Andrewsem et al. (1999) znovu osekvenován originální materiál CRS a publikována revidovaná Cambridgeská referenční sekvence (revised Cambridge reference sequence, rCRS). Bylo identifikováno 7 nukleotidů, které jsou považovány za vzácné polymorfismy a 11 pozic, ve kterých originální sekvence obsahuje nesprávný nukleotid. Některé z těchto nesprávných nukleotidů pocházely z mtDNA skotu či buněčné linie HeLa. Podstatné ale je, že v kontrolním regionu, který je ve studiích hojně využíván, žádné chyby odhaleny nebyly. Kompletní referenční sekvenci lidské mtDNA je možné najít na webových stránkách GenBank pod přístupovým číslem NC_012920.1

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_012920) či na stránkách MITOMAP (<https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMAP/HumanMitoSeq>).

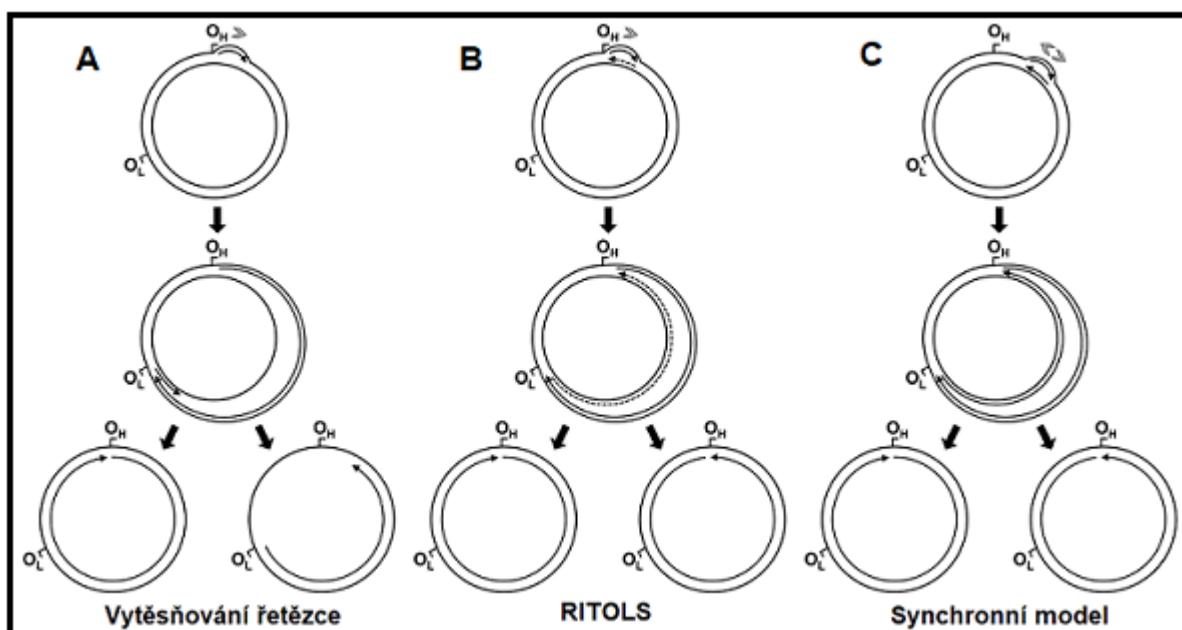
Rozdíly (mutace), kterými se mtDNA člověka liší od CRS, resp. rCRS, udávají jeho haplotyp. Haplotyp je tedy specifická kombinace mutací pozorovaná ve vzorku populace a na základě společného původu náleží jednotlivé haplotypy ke konkrétním haploskupinám. Základní haploskupiny se značí velkým písmenem, jejich podskupiny velkým písmenem a arabskou číslicí a u dalších podskupin se potom střídají malá písmena a arabské číslice (takže např. rCRS náleží k haploskupině H2a2a1 podle databáze PhyloTree_{mt}: <http://www.phylotree.org/tree/R.htm>).

Jak Anderson et al. (1981) dále zjistili, genetický kód mtDNA se v několika případech neshoduje s kódováním jaderné DNA (nuclear DNA, nDNA). Triplet UGA kóduje triptofan a nepůsobí jako stop kodon, jak je tomu v nDNA. Namísto isoleucinu kóduje triplet AUA methionin. AGA a AGG nekódují arginin, ale jsou to stop kodony. AUA, AUG a zřejmě i AUU jsou iniciační kodony.

Transkripce mtDNA začíná vždy v kontrolní oblasti. Lidská mtDNA má 3 transkripční promotory a tvoří tedy tři polycistronické transkripty (Taanman, 1999): (1) Promotor 1 H-řetězce (H-strand promoter 1, HSP1), který se nachází na pozici nukleotidu 561. Umožňuje transkripci dvou ribozomálních RNA, 12S rRNA a 16S rRNA, a dvou transferových RNA. (2) Promotor 2 H-řetězce (HSP2) podporuje transkripci zbytku těžkého řetězce a nachází se na pozici 638. Iniciační místo HSP2 je pro transkripci H-řetězce využíváno méně často než HSP1. (3) Promotor L-řetězce na pozici 407 (L-strand promoter, LSP) řídí transkripci lehkého řetězce. Z L-řetězce se tvoří buď jeden dlouhý přepis, nebo několik malých transkriptů, které mohou být užity jako primery při replikaci mtDNA. Primery vznikají působením mitochondriální RNázy. Transkripci mtDNA iniciuje několik proteinů, včetně mitochondriální RNA polymerázy a mitochondriální transkripčních faktorů A, B1 a B2 (Asin-Cayuela a Gustafsson, 2007). Terminaci transkripce zajišťuje protein mTERF (nebo mtTERM, mitochondriální transkripční terminační faktor), který také způsobuje ohýbání DNA helixu (Taanman, 1999).

Oproti jaderným genomům se mitochondriální genomy se mohou replikovat více než jednou za buněčný cyklus. Tento proces je řízen jadernými geny. Počátek replikace H-řetězce (O_H) se nachází v kontrolní oblasti mtDNA. Replikační počátek pro L-řetězec (O_L) je umístěn přibližně 2/3 délky mtDNA ve směru replikace H-řetězce (Obr. 7). O_L je lokalizován ve druhé malé nekódující oblasti, která je dlouhá jen ~30 bp (Taanman, 1999). Soubor proteinů účastnících se replikace mtDNA, tzv. multiproteinový replizom, zahrnuje katalytické a

přídavné podjednotky DNA polymerázy γ , mtDNA helikázu Twinkle, mitochondriální jednovláknový DNA-vazebný protein (mtSSB), mitochondriální RNA polymerázu, topoizomerázu I a ligázu. Mitochondriální RNA polymeráza funguje jako DNA primáza. Jak je popsáno v přehledu, který zpracovali McKinneyová a Oliveira (2013), hlavní modely replikace mtDNA jsou tři: vytěšňování řetězce (strand-displacement model, SDM), synchronní model (strand-coupled model, SCM) a model začlenění RNA do celého opožďujícího se řetězce (RNA incorporated throughout the lagging strand, RITOLS). Asynchronní replikace mtDNA v modelu SDM (Robberson et al., 1972) začíná v O_H , přičemž třetí řetězec D-smyčky funguje jako primer pro začátek replikace. H-řetězec je vytěšňován nově vznikajícím H-řetězcem a L-řetězec je tedy matricový. Když replikace prvního vlákna dojde až do O_L , začne na matricovém H-řetězci replikace L-řetězce. Ta ovšem probíhá v opačném směru a pokračuje, dokud se nezkopíruje celá molekula (Obr. 8A). V modelu synchronní replikace vedoucího a opožďujícího se vlákna (Holt et al., 2000) se počátek replikace nachází v (nebo blízko) O_H . Ta pokračuje jednosměrně kolem celé molekuly (Obr. 8C). Model RITOLS (Yasukawa et al., 2006), (Obr. 8B), je nejnovější a probíhá prakticky stejně jako SDM, jen s tím rozdílem, že na opožďujícím se vlákně jsou přítomny RNA namísto mtSSB. RNA stabilizuje vytěšněný řetězec a chrání ho před poškozením během replikace. Avšak v tomto modelu trvá replikace mnohem déle, než je tomu v případě SDM a SCM. Je pravděpodobné, že rozmanitost a složitost současných modelů replikace mtDNA může odrážet různé režimy, které fungují v různých typech tkání či buněk. Představují adaptivní procesy pro zajištění odpovídajícího počtu kopií mtDNA a exprese mitochondriálního genomu (McKinneyová a Oliveira, 2013).



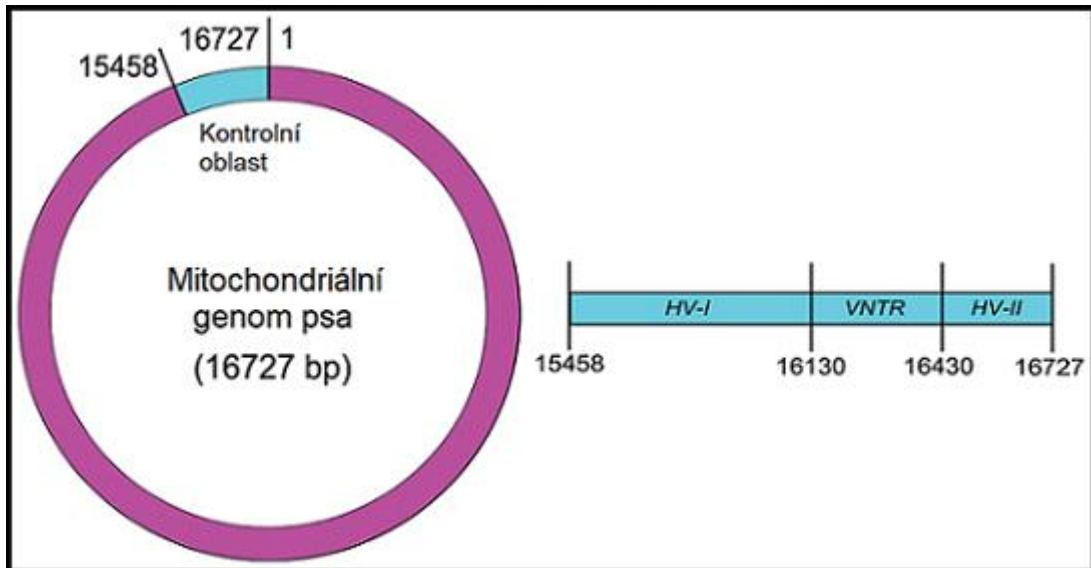
Obr. 8. Současné modely replikace mtDNA savců. (A) Model vytěšňování řetězce. (B) Model začlenění RNA do celého opožďujícího se řetězce (RITOLS). (C) Synchronní model. Převzato z: McKinneyová a Oliveira, 2013.

3.2.3.2 Mitochondriální genom psů

Mitochondriální genom psa domácího (*Canis lupus familiaris*) byl osekvenován v roce 1997 a o rok později byl i publikován (Kim et al., 1998). mtDNA použitá pro studii byla izolována z jater psa korejského plemene sapsaree. Tato sekvence slouží jako referenční, jak uvádí Pereirová et al. (2004) a na webových stránkách GenBank je dostupná pod číslem NC_002008 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_002008).

Organizace genomu, obsah genů a využití kodonů mtDNA psa domácího (*Canis lupus familiaris*) odpovídá mitochondriálnímu genomu jiných savců. Je nepatrně delší než lidská mtDNA, konkrétně 16 728 bp, nicméně tato délka není absolutní z důvodu variace (heteroplazmie) zapříčiněné různým počtem repetitivní sekvence (5'-GTACACGT(A/G)C-3') v kontrolní oblasti. Kontrolní oblast se dle Kima et al. (1998) se vyskytuje na pozici 15459-16728. Jak uvádí Verscheureová et al. (2013), kontrolní oblast se dělí na dva hypervariabilní regiony (Obr. 9), HV1 zahrnuje úsek 15458-16130 a HV2 úsek 16430-16727. Ty jsou odděleny oblastí s různým počtem tandemových repetitivních sekvencí (variable number of tandem repeats, VNTR). Zajímavostí je případ duplikace 'CTAGA', který následuje po translačním stop kodonu genu CO2. Přestože jeho funkce je neznámá, nebyl pozorován u mitochondriálních genomů ostatních savců.

Kontrolní oblasti psí mtDNA, stejně jako kontrolní oblasti lidské mtDNA, jsou předmětem řady studií zkoumajících rozdíly mezi jednotlivci. Gundry et al. (2007) uvádí, že předchozí studie ukázaly více než 100 jednonukleotidových polymorfismů (single nucleotide polymorphism, SNP) v kontrolní oblasti mtDNA psa domácího (*Canis lupus familiaris*).



Obr. 9. Pozice kontrolní oblasti, HV1 a HV2 v psím mitochondriálním genomu. Převzato z: Verscheureová et al., 2013.

Oproti lidskému jadernému genomu (~3 Gbp – 3 miliardy bází) čítá jaderný genom psa domácího (*Canis lupus familiaris*) ~2,4 Gbp (Lindblad-Toh et al., 2005). Dalším zřejmým rozdílem je počet chromozomů: zatímco karyotyp psů sestává z 78 chromozomů (38 párů autozomů a 1 pár gonozomů), u lidí je to 46 chromozomů (22 párů autozomů a 1 pár gonozomů).

3.3 Původ a evoluce mitochondrií

Co se původu mitochondrií týče, existuje jen jedna široce uznávaná teorie o jejich vzniku. Je jí endosymbiotická teorie, která tvrdí, že mitochondrie mají evoluční původ v prokaryontech.

3.3.1 Endosymbiotická teorie

O endosymbiotickém původu plastidů uvažoval již na začátku 20. století botanik Konstantin Merežkovskij. Na jeho práci navázala Lynn Saganová – později Margulisová (1967), která se stala její velkou popularizátorkou. Teorii vzniku mitochondrií a plastidů nadále rozvinula do teorie sériové endosymbiózy, kdy předpokládala endosymbiotický původ u všech buněk, které měly vzniknout splynutím několika bakterií, a například i u bičíků a řasinek, které podle ní vznikly ze spirochet. Většina vědců ovšem tuto její rozvinutou teorii neuznává.

Jak uvádí Andersson a Kurland (1999), koncem 80. let 20. století bylo objeveno, že mitochondrie jsou redukovanými pozůstatky α -proteobakteriálních předchůdců. Stalo se tak pomocí fylogenetické analýzy genů pro rRNA. Analýza kompletní sekvence α -proteobakterie (*Rickettsia prowazekii* da Rocha-Lima, 1916) poskytla další podporu názoru, že mitochondrie jsou odvozeny z volně žijících proteobakterií, které vytvořily endocelulární systém u primitivního předka postupně až k moderním eukaryotickým buňkám. Časem byl tento bakteriální symbiont redukován v intracelulární organelu (prostřednictvím rozsáhlé ztráty genů, případně transferem genů do eukaryotního jádra). Tato reduktivní tendence je genomickým znakem mitochondrií, intracelulárních parazitů a symbiontů. Genomy α -proteobakterií se liší velikostí, která je od 1,1 Mbp (*R. prowazekii*) až do 9 Mbp (*Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982)). Téměř všichni členové této skupiny žijí v úzkém spojení s eukaryotickými buňkami, a to ať už jako symbionti (*Rhizobium* sp.) nebo jako parazité rostlin a živočichů. Endosymbiotickou teorii podporují i další fakta, například, že velikost mitochondrií je podobná a nezávislá na velikosti či druhovém určení buněk. Nevznikají de novo, ale množí se dělením. Podobná je i stavba mitochondriální membrány: vnitřní membrána odpovídá plazmatické membráně endosymbiotna, vnější membrána pak plazmatické membráně hostitele.

Výsledky sekvenování genomu *R. prowazekii*, které provedli Andersson et al. (1998) ukazují, že tento genom obsahuje neobvykle malý podíl repetitivních sekvencí (o 10 % méně, než bylo pozorováno u volně žijících bakterií) a vysoký podíl (24 %) nekódující DNA (u osekvenovaných mikrobiálních genomů je to průměrně 9 %). Nekódující sekvence mohou být zbytky genů, které byly znehodnoceny mutací a dosud nebyly z genomu odstraněny. U *Rickettsia* sp. ani u mitochondrií nebyly nalezeny žádné geny pro anaerobní glykolýzu. U *R. prowazekii* se nachází kompletní sada genů kódujících součásti Krebsova cyklu a dýchacího řetězce. Ve výsledku je produkce ATP stejná jako u mitochondrií. Fylogenetické analýzy

genů cytochromu b a cytochrom c oxidázy naznačují, že dýchací systémy *Rickettsia* sp. a mitochondrií se oddělily před ~1,5-2 miliony let, brzy poté co v atmosféře začalo vzrůstat množství kyslíku.

R. prowazekii, stejně jako mitochondrie, má výrazně snížený repertoár genů podílejících se na biosyntéze aminokyselin, což je podobné jako u fylogeneticky vzdálených obligatorních intracelulárních parazitů *Chlamydia* sp.. Ještě markantnější příklad reduktivní evoluce představují mitochondriální genomy, které kódují méně než 10 % mitochondriálních proteinů. Mitochondriální genomy některých prvoků si zachovaly uspořádání genomu připomínající jejich domnělé bakteriální předky. Kupříkladu mitochondriální genom prvoka čerstvých vod (*Reclinomonas americana* Flavin & Nerad, 1993) si zachoval rodové uspořádání ribozomálních proteinových genů nalezených u bakterií. Téměř polovina z přibližně 70 mitochondriálních genů *Re. americana* kóduje geny pro translaci, zatímco druhá polovina kóduje enzymy zapojené do bioenergetických procesů. Fylogenetické rekonstrukce založené na těchto mitochondriálních proteinech (například ribozomální proteiny, NADH dehydrogenázy, cytochrom oxidázy) odhalují blízký vztah mezi mitochondriemi *Re. americana* a proteobakteriemi. To znamená, že přítomnost téměř identických systémů pro výrobu energie u *R. prowazekii* a v mitochondriích odráží společný původ, a ne pouze reduktivní, konvergentní evoluci. Avšak vzhledem k tomu, že mitochondriální genom *Re. americana* má nejkompaktnější kódovací kapacity známých mitochondrií, je to zřejmě nejlepší kandidát na chybějící spojovací článek mezi domnělým bakteriálním předkem a linií mitochondrií (Andersson a Kurland, 1999).

Podle názoru Lanea a Martina (2010) právě přítomnost mitochondrií umožnila pozměnit základní bioenergetickou stavbu buněk a množství proteinů, které si hostitelský cytosol mohl dovolit syntetizovat. Přeměna alfa-proteobakteriálního symbionta s heterogenním genomem v ATP generující kompartment navíc souvisí s kompletní ztrátou schopnosti syntetizovat ATP na hostitelské plazmatické membráně. Hostitelem byl prokaryot a znaky charakteristické pro eukaryota jako je buněčný cyklus, fagocytóza, jádro, endomembránový přenos a mnohobuněčnost se objevily až po mitochondriální endosymbióze. Mitochondrie jsou tedy předpokladem eukaryotické složitosti.

3.3.2 Vznik eukaryot

Ohledně vzniku eukaryotických buněk bylo publikováno mnoho různých hypotéz. Třicet let po endosymbiotické teorii Margulisové (Sagan, 1967) byly v roce 1998 uveřejněny

dvě na sobě nezávislé nové teorie symbiomy eukaryot: vodíková hypotéza (Martin a Müller, 1998) a syntrofická hypotéza (Moreira a López-García, 1998), které jsou široce uznávány. Jako další teorie původu eukaryot byla předložena například syntrofická hypotéza založená na síře (Margulisová et al., 2000) a fagotrofická hypotéza Cavalier-Smithe (2002), která předpokládá existenci bakteriálního předka archeí a eukaryot, jenž získal mitochondrie symbioticky až později. Podle hypotézy tří virů a tří domén (Forterre, 2005) se DNA objevila u virů, přičemž genetickým materiálem posledního univerzálního společného předka všech organismů byla RNA; různé DNA viry infikovaly tři linie RNA organismů a vznikly tři domény (nadříše) života, jak je známe dnes: archea, bakterie a eukaryota. Další alternativní teorie se odvolávají na detoxifikaci jako primární krok na pozadí endosymbiomy (Andersson a Kurland, 1999). Geochemické studie poukazují na vzestup atmosférické hladiny kyslíku, k němuž došlo před 2,2 - 2,0 miliardami let. Výhodou bylo, že aerobní α -proteobakterie přispěla ke spotřebování kyslíku, který by byl toxický pro anaerobního hostitele.

3.3.2.1 Vodíková hypotéza

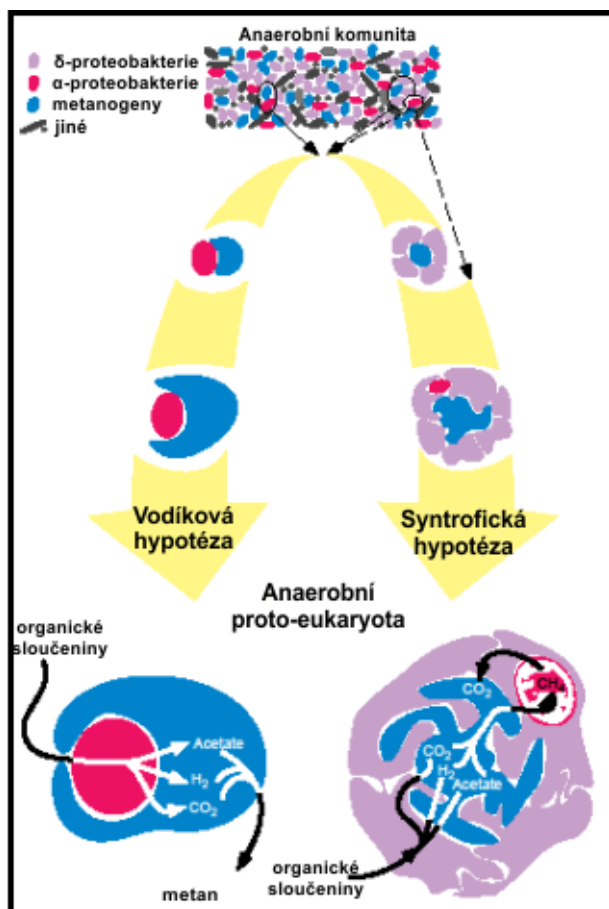
Vodíková hypotéza Martina a Müllera (1998) vychází z myšlenky, že ke vzniku eukaryot došlo v anaerobním prostředí, přičemž první eukaryot byl fakultativní anaerob. Vodík podporoval endosymbiotické propojení mezi α -proteobakteriemi a hypotetickou hostitelskou archeobakterií, metanogenem. Tato hypotéza naznačuje, že se oba organismy poprvé setkaly v prostředí, které bylo bohaté jak na vodík, tak na oxid uhličitý, který byl zřejmě vulkanického původu. Postupně se zvětšovala plocha jejich kontaktu, aby archeobakterie minimalizovala ztráty vodíku a tím se stávala více závislou na svém symbiontu, až ho nakonec zcela pohltila (Obr. 10). Teorie dále tvrdí, že společný předek nesl všechny enzymy, které byly nalezeny současně jak u mitochondrií, tak u hydrogenozomů. Předpokládá se, že počáteční symbiotický vztah vedoucí ke vzniku mitochondrií byl podpořen přenosem vodíku od striktně aerobní, vodík produkující bakterie k anaerobnímu, na vodíku závislému hostiteli. Dále byly z bakterie do archeona přesunuty geny kódující membránové přenašeče a některé metabolické dráhy. Pokud pokračovala symbiomy v anaerobním prostředí, vznikla eukaryotní buňka obsahující hydrogenozom. Naopak v prostředí bohatém na kyslík se endosymbiont přeměnil v mitochondrii a začal produkovat ATP namísto vodíku.

3.3.2.2 Syntrofická hypotéza

Syntrofická hypotéza, kterou navrhli Moreira a López-García (1998), je rovněž založena na výměně vodíku, přičemž organismy jsou různé a jedná se tedy o mezidruhovou výměnu. Vodíková a syntrofická hypotéza se liší, pokud jde o počet endosymbiotických událostí: vodíková hypotéza (Martin a Müller, 1998) navrhuje jedinou endosymbiotickou událost, zatímco syntrofická hypotéza předpokládá dvě oddělené, případně souběžné akce.

V tomto modelu je syntrofické spojení skládající se z archebakterie, vodík produkující a sulfát redukující δ -proteobakterie a α -proteobakterie (anaerobního, na vodíku závislého metanotrofa). Symbiont, který se nakonec stane mitochondrií, je zpočátku anaerobním metanotrofem, který je závislý na metanu produkovaném syntrofickým společníkem.

Plazmatická membrána archebakterie se přeměnila na jadernou membránu nové eukaryotické buňky a z plazmatické membrány δ -proteobakterií vznikla buněčná membrána (Obr. 10). Následně proběhl endosymbiotický horizontální genový transfer.



Obr. 10. Evoluční dráhy původu eukaryot navržené podle vodíkové a syntrofické hypotézy.

Převzato z: Moreira a López-García, 1998.

3.3.3 Organely příbuzné mitochondriím

Některé jednobuněčné eukaryotní organismy, žijící v podmínkách s nedostatkem kyslíku nebo jako vnitrobuněční parazité, obsahují organely příbuzné mitochondriím produkující molekulární vodík – hydrogenozomy. Hydrogenozomy můžeme najít u anaerobních nálevníků, bičíkovců či chytridiomycet. U různých skupin prvoků se ovšem hydrogenozomy navzájem metabolicky a strukturně liší (Boxma et al., 2005). Jejich velikost se pohybuje kolem 1 μm , mají dvojitou membránu, která může vytvářet krysty a při jejich energetickém metabolismu je produkován ATP, ačkoliv méně, než je tomu u mitochondrií. Hydrogenozomy nejsou schopné oxidativní fosforylace.

Jak vyplývá z přehledu poznatků molekulární fylogenetické analýzy a studií biogeneze hydrogenozomů, které poukazují na společný původ mitochondrií a hydrogenozomů, zdá se být pravděpodobné, že v různých eukaryotických liniích jsou hydrogenozomy polyfyletického původu (Dyallová a Johnsonová, 2000).

Někteří eukaryoté postrádají hydrogenozomy či mitochondrie a namísto toho obsahují vysoce redukované dvoumembránové organely zvané mitozomy. Mitozomy na rozdíl od mitochondrií a hydrogenozomů ATP neprodukují. Některé studie poukazují na přítomnost bílkovin mitochondriálního typu v těchto organelách. Jejich přítomnost, spolu s podobnostmi v biogenezi hydrogenozomů a mitochondrií, podporují hypotézu, že se tyto organely vyvinuly z jednoho α -proteobakteriálního endosymbionta. Proteomickou analýzou hydrogenozomu bičenky poševní (*Trichomonas vaginalis* Donné, 1836) bylo zjištěno, že proteom purifikovaných hydrogenozomů sestává z 569 proteinů (Schneider et al., 2011). Oproti tomu mitochondriální proteomy živočichů a hub zahrnují proteinů více. Ve srovnání s mitozomy je ovšem počet proteinů u hydrogenozomů mnohonásobně vyšší.

Objev proteinů tepelného šoku u *T. vaginalis* poskytl podporu pro teorii o společném původu hydrogenozomů a mitochondrií. Dyallová a Johnsonová (2000) uvádějí, že výskyt těchto proteinů u amitochondriálních eukaryot (jmenovaní prvoci mají pouze mitozomy) lamblie střevní (*Giardia intestinalis* (Alexeiev, 1914)), měňavky úplavičné (*Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903) a některých mikrosporidií byl nedávno interpretován jako důkaz sekundární ztráty mitochondrií.

Hydrogenozomy na rozdíl od mitochondrií zpravidla neobsahují genetickou informaci. Výjimkou je hydrogenozom nálevníka *Nyctotherus ovalis* Leidy, 1894 žijícího ve střevě švába amerického (*Periplaneta americana* Linnaeus, 1758) a *Blaberus* spp. (Akhmanova et al., 1998). Vnitřní membrána vytváří krysty. Matrix obsahuje částice podobné ribozomům

stejně velikosti jako četné 70S ribozomy endosymbiotických metanogenních archebakterií. Elektronová mikroskopie a imunocytochemie ukazují, že v hydrogenozomech *N. ovalis* jsou přítomny jak komponenty hydrogenozomálního metabolismu (komplex I a komplex II dýchacího řetězce), tak DNA a ribozomy. Na vnitřní membráně je přítomen lipid kardiolipin, což je charakteristické pro mitochondrie. Hydrogenozom *N. ovalis* je zřejmě chybějícím článkem v evoluci mitochondrií a hydrogenozomů (Boxma et al., 2005).

Dlouho se zdálo, že eukaryotní buňka bez mitochondrií nebo jejich modifikací, hydrogenozomů či mitozomů, nemůže fungovat. To však vyvrátil přelomový objev učiněný na půdě Univerzity Karlovy. Je jím prokazatelná absence mitochondrií a odvozených organel u oxymonády *Monocercomonoides* sp., žijící ve střevech různých druhů hmyzu a obratlovců (Karnkowska et al., 2016). Konkrétně se jedná o *Monocercomonoides* sp. kmene PA 203, komenzála nacházejícího se v zažívací soustavě činčil. Výběr nebyl náhodný, již delší dobu se zdálo, že tyto organismy mitochondrie nemají (nemají dokonce ani peroxizomy a Golgiho aparát). Po osekvenování jejich genomu (~75 Mbp) nebyly nalezeny žádné mitochondriální geny nacházející se u jiných eukaryot, ani žádné jaderné geny funkčně související s mitochondriemi. To, že v případě *Monocercomonoides* sp. jde o značně redukováného prvoka, jehož nejbližší příbuzní mitochondrie (hydrogenozomy) mají, naznačuje, že k jejich ztrátě došlo sekundárně, zřejmě díky jeho komenzálnímu způsobu života.

3.4 Problematika dědičnosti mitochondriální DNA

Zatímco dědičnost nDNA podléhá pravidlům mendelistické dědičnosti, v případě mitochondriálního genomu to neplatí. Standardní model dědičnosti mtDNA u savců je takový, že mitochondrie jsou přenášeny striktně maternálně, tedy v mateřské linii (matrilinéárně). Je to vývojový paradox, protože prostřednictvím fertilizující spermie proniká při oplodnění do cytoplazmy oocyty až několik desítek funkčních mitochondrií. Ty se nacházejí v oblasti krčku a bičíku a generují energii potřebnou pro aktivní pohyb spermií. Mužský mitochondriální genom je zničen, inaktivován či zředěn během oplodnění nebo v časně embryogenezi. K tomu dochází prostřednictvím tzv. ubikvitinace proteinem ubikvitinem (Sutovsky et al., 2000). Polypeptid ubikvitin je přítomný v cytoplazmě všech eukaryotických buněk a reguluje proteolýzu a recyklaci bílkovin. Je možné, že se jedná o druhově specifický mechanismus a u mezidruhového křížení by eliminace mitochondriálního genomu spermií probíhat nemusela (Sutovsky et al., 2000). Jak se zdá, odbourání spermií je evoluční a vývojovou výhodou, protože mužské mitochondrie a jejich DNA mohou být ohroženy působením kyslíkových

radikálů. S těmi se spermie setkává jak v průběhu spermatogeneze, tak v průběhu oplodnění. Dalším možným vysvětlením zabránění přenosu mužské mtDNA je prevence „sobeckého chování“ konkurenčních mtDNA (White et al., 2008).

3.4.1 Paternální přenos a rekombinace mtDNA

Pokroky v sekvenování DNA a v technologii detekování polymorfismů dokumentují rostoucí seznam výjimek z hlavních principů mitochondriální dědičnosti. Byl zaznamenán nejen paternální (otcovský) přenos, ale i rekombinace mtDNA. Rozsah těchto jevů se může značně lišit mezi taxony.

Pokud jde o rostliny a houby, White et al. (2008) zmiňují otcovský přenos mtDNA u řepky (*Brassica napus* L.) a sekvoje vždyzelené (*Sequoia sempervirens* D.), u nichž je mitochondriální genom přenášen skrze samčí gametu. Dědičnost mtDNA u hub je složitější. Způsoby sexuální reprodukce a vyloučení otcovských mitochondrií jsou zde proměnlivé a je běžná jak uniparentální, tak biparentální dědičnost. U živočichů je rovněž známo několik příkladů otcovské dědičnosti mtDNA, nepředstavují však normu. Ladoukakis a Zouros (2001) uvádějí, že unikátní systém přenosu rodičovské mtDNA mají například někteří mlži, u nichž existují dvě linie mtDNA, jedna s maternální a jedna s paternální dědičností. Tento vzácný jev je známý jako dvojitá uniparentální dědičnost (doubly uniparental inheritance, DUI). Jak zmiňují Taylor a Turnbull (2005), nízké úrovně paternálního přenosu byly pozorovány u myši po několika generacích mezidruhového zpětného křížení. Později se však oproti předpokladu Sutovského et al., (2000) ukázalo, že žádná paternální mtDNA kříženců do následující generace přenesena nebyla. Dokonce i u člověka byl otcovský přenos mtDNA zaznamenán. Schwartzová a Vissing (2002) popsali případ 28letého muže s mitochondriální myopatií způsobenou delecí v genu ND2, který kóduje podjednotku enzymu komplexu I dýchacího řetězce. mtDNA nesoucí mutaci byla otcovského původu a v jeho svalech představovala 90 % mtDNA. Pacientova krev, vlasy a fibroblasty nesly pouze mtDNA matky. Je ale nutno podotknout, že se jedná o velice výjimečný případ – žádný podobný zatím zdokumentován nebyl.

Rekombinace je důležitým evolučním mechanismem k odstranění škodlivých mutací z populací, stejně jako pro vytváření nových výhodných kombinací alel. Až do 90. let minulého století se věřilo, že v mtDNA k rekombinaci nedochází. Protože rekombinace je považována za nezbytnou součást oprav a replikace DNA, byla zvýšená míra mutační rychlosti mtDNA (ve srovnání s četností mutací v nDNA) pokládána za možné vysvětlení

nepřítomnosti rekombinace v mitochondriálním genomu. Ačkoliv u mitochondrií je enzymatická výbava umožňující případnou rekombinaci přítomná, zůstává otázkou, v jaké míře je u člověka tento mechanismus funkční a zda nejde pouze o evoluční pozůstatek. Podle Barrové et al. (2005) dnes většina vědců souhlasí, že v rostlinných mitochondriálních genomech k rekombinaci dochází, a že v mitochondriálních genomech hub se s ní můžeme setkat vcelku běžně, zejména u kvasinek. Rekombinace byla pozorována i u živočichů, konkrétně u slávky středomořské (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) vzhledem k DUI, která se u ní vyskytuje (Ladoukakis a Zouros, 2001). White et al. (2008) uvádí, že v roce 1999 byly publikovány dvě nezávislé studie, které odhalily údajnou rekombinaci v lidské mtDNA, ale metodika a kvalita sekvenčních dat v nich použitých byly přezkoumány a výsledky studií potvrzeny nebyly. Jediným potvrzeným případem rekombinace mtDNA u člověka tak zůstává pacient s mitochondriální myopatií zmíněný v předchozím odstavci. Při dalším zkoumání jeho svalových buněk se totiž ukázalo, že 7 % mateřských molekul mtDNA bylo rekombinantních (Kraytsbergová et al., 2004).

Paternální přenos a rekombinace v mtDNA člověka jsou i nadále považovány za velice vzácné úkazy spojované s patologickými dopady. Důležité je získání spolehlivých odhadů četnosti obou jevů, aby případně mohly být zohledněny v modelech evoluce mtDNA, a především ve studiích provedených molekulárními genetiky.

3.4.2 Heteroplazmie

V mtDNA dochází k mutacím mnohem častěji, než je tomu u nDNA. Pokud se mutace objevuje ve všech molekulách mtDNA, označujeme ji jako homoplazmickou. O heteroplazmii se tedy jedná v případě, kdy je mutovaná pouze část molekul mtDNA. Heteroplazmii mohou vytvářet tři různé mechanismy: rodičovský přenos, rekombinace a mutace. Substituce jsou nejčastějším typem mutací, inserce a delece jsou méně běžné. Heteroplazmie je důležitým faktorem v posuzování závažnosti mitochondriálních onemocnění. Vzhledem k tomu, že většina eukaryotických buněk obsahuje stovky mitochondrií se stovkami kopií mtDNA, je běžné, že se mutace vztahuje pouze na určitou část mitochondriálního genomu, přičemž většina zůstává nepoškozena.

Ze shrnutí Klütschové et al. (2011) je zřejmé, že rodičovský přenos a rekombinace se zdají být vzácnými případy, které obvykle nevedou k heteroplazmii. Nejdůležitější příčinou jsou mutace v haploidním mitochondriálním genomu. Heteroplazmické bodové mutace představují výzvu pro správnou individuální identifikaci a pro identifikaci haplotypů

v populaci při genetických či fylogenetických studiích. Jako důsledek mutace představuje heteroplazmie mezistupeň k fixaci buď divokého typu nebo mutovaného typu a je tedy podstatným krokem v genetické rozmanitosti mtDNA. U člověka byl čas fixace neutrální mitochondriální heteroplazmatické varianty odhadnut na 200 generací. Byly ale objeveny i případy extrémně rychlé fixace heteroplazmatických bodových mutací během několika generací (zaznamenáno u velryby černé (*Eubalaena glacialis* Müller, 1776) – McLeod a White, 2010 a skotu – Ashley et al., 1989) a v krajním případě v jedné generaci (skot – Koehler et al., 1991). Předpokládá se, že to je důsledkem efektu hrdla lahve během oogeneze či embryogeneze, což snižuje počet molekul mtDNA a vede k náhodnému genetickému driftu. Proto se přítomnost heteroplazmických genotypů může lišit mezi sourozenci nebo u matky a potomků (např. jeden sourozenec může mít zdánlivě fixovaný homoplazmický genotyp, zatímco jiní vykazují rozsáhlou variaci poměrů).

Jak uvádí Gibbonsová (1998) ve svém článku, některé studie naznačují, že heteroplazmie může být ve skutečnosti velmi častá a že nízká úroveň heteroplazmie je ve většině tkání běžně přítomna. Vědci zjistili, že se vyskytuje u nejméně 10 %, a pravděpodobně až 20 % lidí. A protože heteroplazmie je způsobena zejména mutací, tento nečekaně vysoký výskyt naznačuje, že mtDNA by mohla mutovat mnohem častěji, než se původně odhadovalo.

Kontrolní oblast mtDNA podléhá dvěma typům heteroplazmie, jednak založené na délce a jednak na sekvenci, jak popisují Spicer et al. (2014). U psů se heteroplazmie založená na délce (délková heteroplazmie) týká proměnlivého množství desetinukleotidových tandemových repetitiv a začíná na pozici 16130. VNTR se tedy vzhledem k heteroplazmii pro forenzní studie zpravidla nevyužívá. Heteroplazmii založenou na sekvenci (sekvenční heteroplazmii) je možné zjistit podle přítomnosti dvou odlišných nukleotidů na jedné pozici řetězce mtDNA. Přítomnost dvou různých míst se sekvenční heteroplazmií u stejného jedince je výjimečný případ, známý jako triplazmie.

První rozsáhlá komplexní studie týkající se sekvenční heteroplazmie u psa domácího (*Canis lupus familiaris*) proběhla na 180 jedincích z 58 rodokmenů (Klütšchová et al., 2011). Vzorky pocházely z krve a buňky epitelové sliznice psů. K sekvenování byl vybrán úsek 582 bp kontrolní oblasti mtDNA. Heteroplazmické bodové mutace byly zaznamenány u tří z nich (5,17 %). Z těchto tří nezávislých rodokmenů bylo dále analyzováno 131 vzorků a zjištěny značné rozdíly v úrovni heteroplazmie jak mezi generacemi, tak mezi sourozenci. Často (10 % případů) se poměr jedné báze mezi generacemi změnil z 0-10 % na 80-90 % a podobně se lišil mezi sourozenci.

Spicer et al. (2014) se také zaměřili na heteroplazmii ve psích chlupech. Sekvenovali fragment HV1 dlouhý 612 párů bází. Zkoumali 576 chlupů od 6 různých psů soukromých majitelů vybraných tak, aby zastupovali různou škálu plemen, věku, pohlaví a barvy srsti. Všichni jedinci pocházeli z domácností s jedním psem, aby se snížila šance kontaminace vzorku jiným jedincem. Každému psu navíc odebrali pro kontrolu i krevní a buňkový vzorek. Zaznamenali tři případy heteroplazmie u dvou chlupů různých jedinců (0,34 %), což je podstatně méně, než bylo pozorováno v lidských chlupech. Přestože pes domácí (*Canis lupus familiaris*) má mnohem kratší generační interval než člověk a dalo by se předpokládat, že jeho mtDNA bude více geneticky variabilní, člověk měl přibližně desetkrát delší čas vyvinout se jako druh. Tento větší časový rozsah může pomoci vysvětlit zdánlivý nesoulad mezi frekvencí heteroplazmie u lidských a psích chlupů. Oba chlupy, které vykazovaly heteroplazmii, byly velice málo pigmentované, zatímco u chlupů s tmavší pigmentací heteroplazmie pozorována nebyla. Toto zjištění se shoduje s předchozím zkoumáním lidských vzorků vztahujícím se k vyššímu výskytu heteroplazmie u lidí se světlejší barvou vlasů/chlupů.

3.4.3 Mitochondriální teorie stárnutí

Shokolenko et al. (2014) uvádí, že proces stárnutí je často definován jako změny, většinou škodlivé, které nasávají během života organismu. Univerzálnost tohoto procesu naznačuje existenci rovněž univerzálního mechanismu, který ho řídí. Nejpopulárnější teorií je, že stárnutí je důsledkem hromadění mutací vyvolaných prostřednictvím volných kyslíkových radikálů (reactive oxygen species, ROS). Tato teorie byla navržena již v roce 1956 a poté dále zdokonalována (určení mitochondrií jako zdroje ROS unikajících z dýchacího řetězce a určení mtDNA jako cíle ROS). MtDNA hromadí v lidských somatických buňkách bodové mutace a dlouhé delece především v mozku a srdeční svalovině u jedinců starších 40 let (Burger et al., 2003). Tyto mutace vedou k narušení funkce dýchacího řetězce, což vede ke zvýšené produkci ROS a následné akumulaci více a více mutací. To vyvolává exponenciální nárůst poškození během stárnutí, což má za následek postupné snížení buněčných a tkáňových funkcí. Dochází k energetické nedostatečnosti, signalizačním defektům a apoptóze (Taylor a Turnbull, 2005).

Tanaka et al. (2000) zkoumali mtDNA stoletých Japonců a identifikovali mitochondriální genotyp spojený s dlouhověkostí, Mt5178A. Bylo prokázáno, že tento genotyp potlačuje výskyt mutací mtDNA v oocytech a také se zdá, že zpomaluje hromadění mutované mtDNA v somatických buňkách se vzrůstajícím věkem. Je pravděpodobné, že díky

tomuto genotypu dochází k rezistenci k onemocněním propukajícím v dospělosti (potlačením obezity a aterosklerózy). Již dříve bylo poukázáno, že Mt5178A je ve světové populaci poměrně vzácný. Častý výskyt Mt5178A v japonské populaci (45 %) může být významný kvůli tomu, že průměrná délka života Japonců je jedna z nejvyšších na světě. Vzhledem k tomu, že mtDNA se dědí v mateřské linii, sourozenci stoletých se také dožívají vyššího věku, než je obvyklé.

Mitochondriální teorie stárnutí prochází v současnosti rozsáhlou revizí. Podle názoru Shokolenka et al. (2014) a přehledu uvedeného v jejich článku, vyvstávají pochybnosti, zda v procesu stárnutí skutečně hraje ústřední roli mtDNA. Pokrok, jenž byl dosažen v pochopení procesů údržby mtDNA, oprav, poškození a degradace v reakci na poškození, vyvrací názor, že je mtDNA mimořádně náchylná k ROS zprostředkované mutagenezi kvůli nepřítomnosti ochranných histonů. Mitochondrie zřejmě produkují mnohem méně ROS, než se dříve předpokládalo. Zdá se, že jak experimentálně vyvolaný oxidativní stres, tak radioterapie vedou pouze k velmi malému počtu mtDNA mutací, a také vyvrací existenci bludného cyklu poškození mtDNA a produkce ROS. Nebylo odhaleno žádné spojení mezi dlouhověkostí a zvýšenou antioxidační obranou. Zvýšená produkce ROS a oxidativní poškození buněčných makromolekul, včetně mtDNA, mohou být spojeny s prodlužující se délkou dožití. Ukazuje se, že zvýšená produkce ROS při stárnutí může být výsledkem adaptivní signalizace spíše než škodlivým vedlejším produktem buněčného dýchání.

3.4.4 Dědičnost mitochondriálních onemocnění

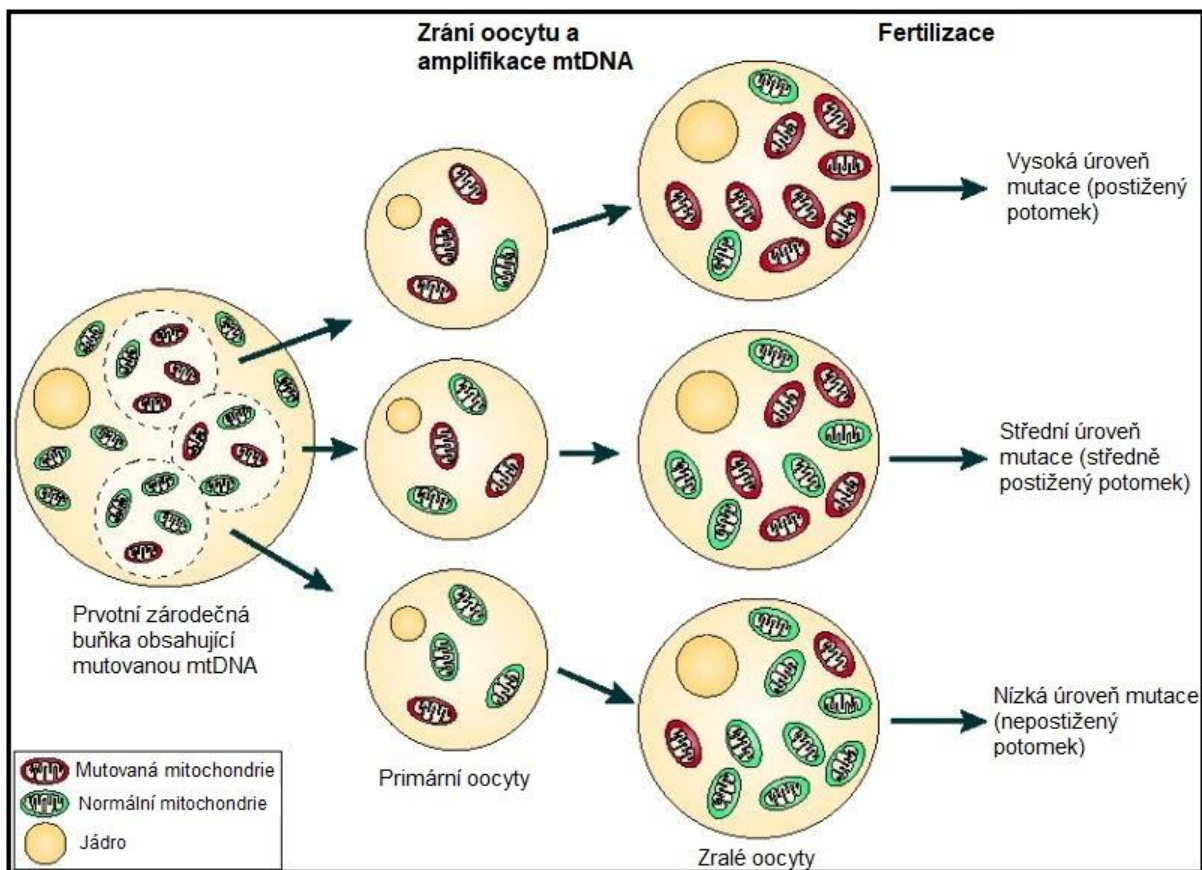
Mutace mtDNA jsou důležitou příčinou dědičných onemocnění. Vzhledem k tomu, že jsou mitochondrie pod dvojí genetickou kontrolou, a to jak mitochondriálního, tak nukleárního genomu, může mitochondriální onemocnění vzniknout i kvůli poruchám jaderných genů. Většina genů zapojených do metabolismu mitochondrií a všechny geny, které se podílejí na údržbě mtDNA, jsou jaderně kódovány. Mutace v rámci jedné molekuly mtDNA může vést k nedostatečnosti dýchacího řetězce. Během posledních dekad se ukázalo, že mitochondrie a mitochondriální poruchy přispívají mimo jiné k rozvoji řady neuromuskulárních a neurodegenerativních onemocnění, jako například Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba či Friedrichova ataxie (Scheffler, 2007).

Genetika mtDNA poskytuje nový pohled na etiologii komplexních chorob. Po matce zděděná mtDNA kódující geny nezbytné pro energii je přítomna v jedné buňce v tisíci kopiích a má velmi vysokou mutační rychlost. Mechanismy, prostřednictvím kterých tyto

heteroplazmické mutace převládají v zárodečných a somatických tkáních jsou podstatné pro vysvětlení klinické variability řady nemocí. Patogenní mutace v mtDNA se dělí do dvou skupin; jedná se o přestavby (delece) a bodové mutace (změny v rozsahu jednoho nukleotidu) (Wallace a Chalkia, 2013).

V jakém rozsahu, a zda vůbec, dojde k přenosu mutovaných mitochondrií a jejich DNA, a tedy jak se případné onemocnění projeví, je podmíněno několika faktory. Jedním z nich je mitochondriální efekt hrdla lahve (bottleneck effect), ke kterému dochází v průběhu oogeneze. Během tvorby primárních oocytů je totiž do každého z nich přenesen pouze omezený počet molekul mtDNA. Jako důsledek značné redukce počtu kopií mtDNA v primárních oocytech dochází v průběhu zrání oocytů k rychlé replikaci jejich mtDNA (Taylor a Turnbull, 2005; White et al., 2008). Jelikož rozdělení mitochondrií s mutovanou a nemutovanou mtDNA v buňce není rovnoměrné, zralá vajíčka od jedné matky budou mít různý poměr mutované a nemutované mtDNA (Obr. 11). Mishra a Chan (2014) popisují druhý mitochondriální bottleneck, který nastává mezi stádiem zygoty a blastocysty. Tehdy k replikaci mtDNA nedochází, avšak buňky se rychle dělí, což vede k redukci počtu kopií mtDNA v nově vzniklých buňkách oproti buňkám původním. V pozdějším vývoji opět hraje významnou roli rychlost replikace mtDNA. Ta závisí na typu tkáně a vzdálenosti mitochondrií od jádra, jelikož pro mitochondrie blíže jádru jsou faktory nezbytné pro replikaci snadněji dostupné (Barrová et al., 2005). Z těchto důvodů dochází k odlišným projevům mitochondriálních onemocnění i uvnitř jedné rodiny.

Mitochondriální bottleneck také zesiluje genetický drift v heteroplazmických buněčných liniích. Pokud se v každé generaci počet mitochondriálních genomů v zárodečné linii v určitém okamžiku výrazně sníží pouze na několik v buňce, genetický posun může být maximální a přirozený výběr by mohl být velmi efektivní při eliminaci „podřadných“ mitochondriálních genotypů (Hoekstra, 2000).



Obr. 11. Segregace mitochondrií v průběhu oogeneze. Převzato z: Taylor a Turnbull, 2005.

Wallace a Chalkia (2013) uvádí, že „heteroplazmické alely se mohou přesunovat“, jak během mitotického, tak během meiotického dělení buněk, což vede k potenciální kontinuální řadě bioenergetických defektů. Tento proces je známý jako replikativní segregace. Jak se procento mutovaných mtDNA zvyšuje, výsledný bioenergetický defekt se stává závažnějším. Různé tkáně mají různé bioenergetické prahové hodnoty. S tím, jak pacientova bioenergetická kapacita klesá, nakonec klesne pod minimální hranici pro tuto tkáň a z toho vyplývají symptomy. Vzhledem k tomu jsou tkáně a orgány s nejvyššími bioenergetickými požadavky také těmi, které jsou primárně postiženy ve společných metabolických a degenerativních onemocněních (nejcitlivější je tedy mozek, srdce, ledviny a endokrinní orgány). Proto mohou nepatrné systémové mitochondriální deficiencie vést k orgánově specifickým příznakům. Mitochondriální dysfunkce může být hlavním přispěvatelem ke komplexním onemocněním.

3.5 Využití v aplikované genetice

Jak uvádí Klütschová et al. (2011), mitochondriální DNA je často využívána ve forenzních analýzách, populační genetice a fylogenetických průzkumech. Vysoký počet kopií

mtDNA v buňkách umožňuje provádět analýzy i z malého množství buněčného materiálu, což je výhodou, pokud vzorky obsahují pouze malé množství či značně znehodnocenou nDNA. mtDNA obsahují jak staré kosti a zuby, tak vlasy a chlupy. Vzhledem k vysoké mutační rychlosti ve srovnání s nDNA jsou analýzy poměrně krátké nekódující oblasti mtDNA často vhodné k forenzní identifikaci či podrobným fylogeografickým studiím. U psa domácího (*Canis lupus familiaris*) byla kontrolní oblast mtDNA využita ke studování geografického původu a stáří psů, migračních tras, jakož i pro identifikaci psů ve forenzních analýzách. Budowle et al. (2003) uvádí, že v HV1 a HV2 u člověka je mutační rychlost mtDNA 5 – 10krát vyšší než u nDNA. Uniparentální (maternální) dědičnost, stejně jako nízká úroveň rekombinace v mtDNA, zjednodušují rekonstrukci rodokmenových analýz a populační historie. Kromě mutací je sekvence mtDNA sourozenců a všech příbuzných v mateřské linii identická. Proto může být mtDNA použita k vystopování linie předků z matčiny strany bez komplikujících účinků míchání genů od obou rodičů. Na druhou stranu, protože mitochondriální genom potomků neobsahuje mtDNA otce, nemůže být mtDNA využito k testům otcovství.

Nomenklatura sekvencí mtDNA používaná v genetických studiích vychází z CRS, resp. rCRS. Protože vypsání výsledků všech bází HV1 a HV2, které se pro studie nejvíce využívají, by bylo nepřehledné a nepraktické, zaznamenávají se pouze ty pozice, ve kterých byl detekován rozdíl oproti referenční sekvenci. Zde je například pozice číslo 16311 uvedená jako T – thymin. U některých jedinců může dojít k substituci na C – cytosin. Tento polymorfismus je zapsán jako 16311 C a všechny ostatní sekvenované pozice jsou chápány jako shodné s rCRS. Inzerce jsou značeny umístěním tečky za poslední shodnou bázi s referenční sekvencí a zapsáním vloženého nukleotidu. Inzerce cytosinu je značena například 16192.1 C. Dojde-li k inzerci dvou cytosinů, jsou uvedeny jako 16192.1 C, 16192.2 C. Delece jsou zaznamenány jako číslo báze nebo bází chybějících vzhledem k rCRS (například 249 D, někdy také 249-). Báze, které nemohou být jednoznačně určeny, jsou zapsány např. jako A/G = R, G/C = S, A/C/T = H, A/C/G/T = N atd. (Budowle et al., 2003; SWGDAM, 2013).

Verscheureová et al. (2013) porovnali velké množství publikovaných studií mtDNA psů a zdůraznili, že pro využití v aplikované genetice, a to zejména pokud jde o forenzní využití, je třeba zlepšit a sjednotit sběr vzorků mtDNA z populací psů. Doporučili: zahrnout do populačního vzorku alespoň několik stovek psů a vyhnout se začlenění příbuzných v mateřské linii; poskytnout dostatečně podrobné informace o zkoumané populaci; zohlednit složení vzorku z hlediska plemenné příslušnosti, geografického původu plemen, čistokrevných jedinců a kříženců; používat ověřené analytické metody; provádět kontrolu

kvality při laboratorní práci a sběru dat; zadávat výsledky do veřejně dostupných databází; a zejména užívat jednotnou nomenklaturu podle Pereirové et al. (2004) vycházející z referenční sekvence (Kim et al., 1998). Rovněž by podle Verscheureové et al. (2013) bylo ideální zaměřit se na celý mitochondriální genom psa domácího (*Canis lupus familiaris*), a ne pouze na určité oblasti, jejichž délka se navíc v jednotlivých studiích může značně lišit, což může vést například k chybnému zařazení haplotypu. Podle Klütschové et al. (2011) se totiž u psů většina haplotypů založených na kontrolní oblasti liší od ostatních haplotypů pouze jedinou mutací.

3.5.1 Populační studie

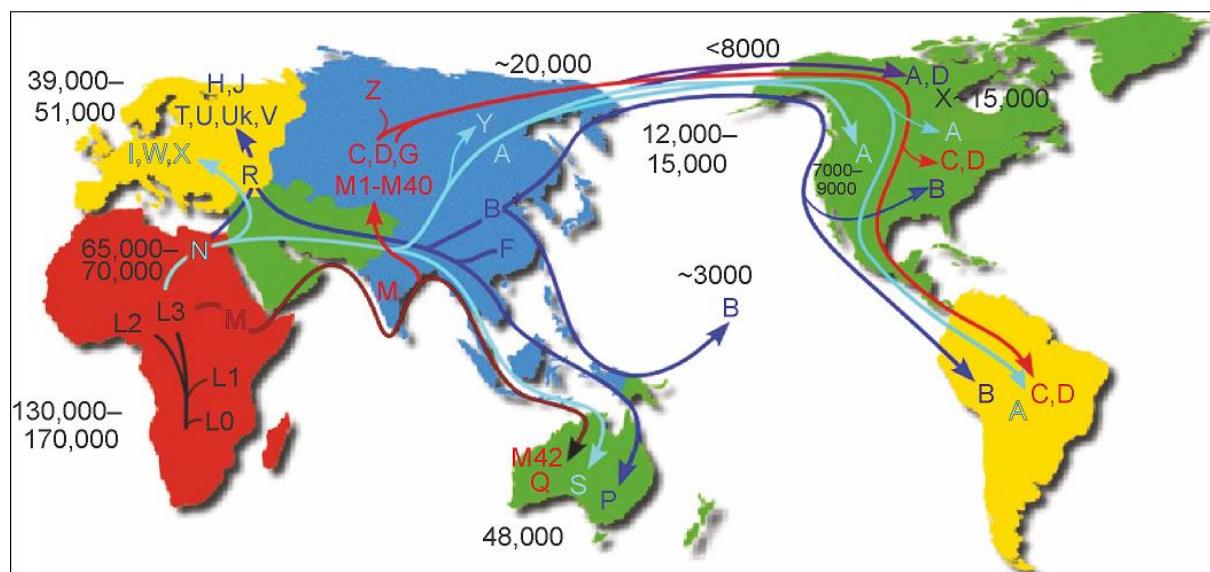
Protože ne každé výzkumné pracoviště má dostatečné zdroje pro provádění rozsáhlých populačních studií, byly vytvořeny různé populační databáze, které shromažďují publikovaná data. Je důležité, aby tyto databáze byly skutečně obsáhlé, především pokud jde o mtDNA, vzhledem k její nízké rekombinaci v porovnání s nDNA. Na základě shody vzorku s databází lze vypočítat frekvenci s jakou se sekvence vyskytuje v konkrétní populaci, výsledek se ovšem odvíjí od počtu vzorků v databázi. Také záleží, zda je předmětem zkoumání haplotyp nebo haploskupina – v databázi haploskupin se pochopitelně nachází vzorků více (Budowle et al., 2003). Významnou mitochondriální databází je EMPOP (EDNAP mtDNA Population Database), která se zaměřuje na sběr, kontrolu kvality a prezentaci haplotypů z celého světa a poskytuje i automatizované odhady haploskupin (<https://empop.online>). Rozsáhlou databází je MITOMAP, která aktuálně (duben 2018) obsahuje 42 616 kompletních sekvencí lidské mtDNA a přehled polymorfismů a mutací (<http://www.mitomap.org>). Další známou databází je PhyloTree_{mt} s 24 275 kompletními sekvencemi, která zobrazuje i komplexní fylogenetický strom s definujícími mutacemi jednotlivých haploskupin (<http://www.phylotree.org>).

Údaje získané z mtDNA umožňují populačním genetikům zkoumat strukturu populací a rovněž rozlišit jednotlivé haploskupiny. S využitím těchto poznatků se podařilo doložit migrační historii člověka na základě mateřské linie, upřesnit dobu kdy došlo k opuštění afrického kontinentu a vysledovat trasy, kudy se naši předkové rozšířili po celém světě.

Z výzkumů lidské mtDNA vyplývá, že většina haploskupin je vázána k určitému kontinentu či oblasti. Nejstarší je makrohaploskupina L, do které náleží Afričané. Ta se rozvětvila na haploskupiny L0 – L6. Jedna z nich, L3, se rozdělila na dvě významné makrohaploskupiny, M a N, které Afriku opustily (Obr. 12). Haploskupina M postupovala

směrem do Asie a haploskupina N na sever do Evropy. Čtvrtou velkou haploskupinou je skupina R, která se vyčlenila z haploskupiny N. Patří do ní většina Evropanů a je rozšířena i na Blízkém Východě (Wallace a Chalkia, 2013). Přibližně 99 % známých variací mtDNA evropských a amerických bělochů je možné rozdělit do deseti hlavních haploskupin: H, I, J, K, M, T, U, V, W, a X. Z nich je nejčastější haploskupina H vyskytující se s frekvencí 45,7 %. Dalšími nejčastěji se vyskytujícími haploskupinami jsou U (15,6 %), T (10,5 %), J (10,0 %) a K (8,9 %) (Budowle et al., 2003). Asiáté mají nejčastěji haploskupiny A, B, C, D, F, G a M a haploskupinami původních Američanů jsou A, B, C, D a X. Mezi původními obyvateli Austrálie se vyskytují haploskupiny M, P, Q a S. Jako poslední byla kolonizována Oceánie, kde převládá haploskupina B (Wallace a Chalkia, 2013).

Variabilitou mtDNA v české populaci se zabývali například Malyarchuk et al. (2006). Analýza vzorků pocházejících od 179 jedinců ze západních Čech ukázala, že většina z nich patří k obvyklým západním eurasijským haploskupinám. Hlavní mitochondriální haploskupinou v České republice je H, která byla nalezena u 44,13 % vzorků. Je charakteristická tím, že je rozvětvená do mnoha podskupin. Vysokou frekvenci v české populaci mají rovněž haploskupiny U (14,52 %) a J (11,7 %). 2,8 % haplotypů mtDNA Čechů zahrnuje východní eurasijské linie A, N9a, D4 a M*. Malyarchuk et al. (2006) porovnali získaná data s publikovanými údaji o sousedních populacích a populacích Slovanů a došli k závěru, že přítomnost východních eurasijských haplotypů je většinou výsledkem mísení se středoasijskými kočovnými kmeny, které migrovaly do střední a východní Evropy v raném středověku.



Obr. 12. Rozšíření haploskupin ve světě a schéma migrační historie člověka s uvedením před jakou dobou k přesunům zhruba došlo. Převzato z: Wallace a Chalkia, 2013.

Pro haplotypy mtDNA psa domácího (*Canis lupus familiaris*) bylo Pereirovou et al. (2004) navrženo užívat stejnou nomenklaturu jako u haplotypů člověka, přestože výzkumníci zpočátku používali k označení zejména římské číslice. Haplotypy psů se dělí do třinácti haploskupin: A1, A2, A3, A4, A5, A6, B1, B2, C1, C2, D, E a F (Fregelová et al., 2015). Většinu moderních psů je možné přiřadit do haploskupin A, B, a C (Vilá et al., 1997; Thalmann, 2013). Studie zahrnující širší vzorek jedinců uvádějí další dvě vzácné východoasijské haploskupiny E a F (Pang et al., 2009; Savolainen et al., 2002). Většinu sekvencí mtDNA psů, 64 %, zahrnuje haploskupina A. Druhá nejčastější je haploskupina B (22 %) a další je haploskupina C, která zahrnuje 12 % psů (Thalmann, 2013).

Pokud jde o geografickou distribuci haploskupin psů, A, B a C se nacházejí univerzálně rozložené v celé Eurasii a zřejmě jsou výsledkem jediné domestikační události (Pang et al., 2009). Zbývající haploskupiny D, E a F se vyskytují pouze regionálně a je velice pravděpodobné, že vzhledem k jejich nízké frekvenci v populacích psů u nich docházelo k post domestikačnímu křížení psů s vlky. To podle Ardalana et al. (2011) přichází v úvahu i pro haplotypy A2, A3, A4, A5 a A6. Podle studie Klütschové et al. (2010) byl haplotyp D1 nalezen u více než 30 % skandinávských plemen a zřejmě vznikl v tomto regionu nanejvýš před 480 – 3 000 lety. Je zajímavé, že je jediný, který se nachází výlučně mimo východní Asii. Vzácný haplotyp D2 našli Ardalan et al. (2011) u 2,6 % psů z jihozápadní Asie a vyskytuje se také ve Středomoří. Haploskupina E je vzácně přítomna v jihovýchodní Asii, Japonsku a Koreji, a haploskupina F v Japonsku (Pang et al., 2009). Jihovýchodní Asie je jedinou oblastí s téměř úplným rozsahem genetických variant (s výjimkou již zmíněného haplotypu D1), což naznačuje, že je prvotním a pravděpodobně jediným centrem domestikace psa. Původ psů v jihozápadní Asii mohl být dříve přehlédnut kvůli nedostatečnému zahrnutí vzorků z této oblasti.

3.5.2 Evoluční studie

Vědci zabývající se evolucí používají rychlost mutací hromadících se v mitochondriálním genomu jako jakési hodiny k datování klíčových evolučních událostí. Jak uvádí Ho a Larson (2006), odhady mutační rychlosti mtDNA vycházejí většinou z doby, která uplynula od divergence linií člověka a šimpanze (*Pan spp.*), tj. od doby kdy sdíleli posledního společného předka, což bylo přibližně před šesti miliony let. V posledních letech však byly pozorovány značné rozdíly mezi molekulárními a archeologickými nebo paleontologickými

daty, stejně jako nápadně vysoká míra mutací vyvozená z rodokmenových studií. Nejvýznamnější nesrovnalosti byly patrné ve studiích evoluce člověka. Kritika divergenční metodiky se zaměřila na chybné kalibrační body a míru heterogenity mezi liniemi. Výsledky studií také nejsou zcela srovnatelné, protože byly vygenerovány z různých sad sekvencí či zaměřené na různé geny a oblasti mitochondriálního genomu. Příčina těchto nesrovnalostí ale může být ještě jiná. Evoluční biologové předpokládali, že mitochondriální molekulární hodiny jsou konstantní a četnost mutace je každých 6 000 – 12 000 let, což je jedna mutace na každých 300 až 600 generací (za předpokladu, že generace je 20 let) (Gibbonsová, 1998). Ho a Larson (2006) jsou toho názoru, že rychlost molekulárních hodin v průběhu času konstantní není. Rozlišují mutační rychlost (což je okamžitá rychlost, s jakou v mitochondriálním genomu dochází ke změnám nukleotidů) a rychlost substituce. Ta je dána tím, jak rychle jsou mutace fixovány v populaci. Většina mutací je odstraněna přirozeným výběrem nebo genetickým driftem, takže za jednotku času bude pozorováno méně změn. Proto je substituční rychlost vždy pomalejší než mutační rychlost. Odhady substituční rychlosti by měly vycházet z fylogenetických studií, kdy se porovnávají sekvence mtDNA pocházející od různých druhů, a odhady mutační rychlosti ze znalosti genealogie jedinců (rodokmenů) pomocí výpočtu změn v nukleotidech. Substituční rychlost v mitochondriálním genomu psů/vlků (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) odhadli Pang et al. (2009) na jednu substituci za 3 200 – 9 600 let za předpokladu, že linie psů/vlků a kojotů (*Canis latrans* Say, 1823) se oddělily před ~1,5 – 4,5 miliony let.

Ho a Larson (2006) rovněž upozornili, že u mnoha domestikovaných zvířat, včetně psa domácího (*Canis lupus familiaris*), existuje značný nesoulad mezi odhady, kdy vlastně k domestikaci došlo. Podle porovnání archeologických nálezů a morfologických rozdílů způsobených domestikačním procesem vědci usuzují, že to u psů bylo před ~12 000 – 14 000 lety. Molekulární datování založené na údajích získaných z mtDNA však naznačovalo, že se tak mohlo stát mnohem dříve. Např. Vilá et al. (1997) došli k překvapivému závěru, že počátek domestikace psů může sahát až do doby před 135 000 lety. Podle jiného názoru proběhla domestikace před ~15 000 – 40 000 lety ve východní Asii (Savolainen et al., 2002), což je stále v rozporu s datováním podle archeologických nálezů. Pang et al. (2009) podrobili jejich závěry kritice. Zaměřili se jak na vzorky kontrolní oblasti (582 bp) pocházející od 1 576 psů z celého světa a 40 vlků, tak na téměř celý mitochondriální genom (16 195 bp), kde vzorky pocházely od 8 vlků a 169 psů. Předchozí studie pracovaly pouze s kontrolní oblastí, která se nezdá být pro takové výpočty vhodná, jak Pang et al. (2009) objasnili ve své studii. Podle jejich analýzy mitochondriálního genomu byli psi domestikováni před ~5 400 – 16 300

lety v jihovýchodní Asii a pocházejí minimálně z 51 vlčic. S přihlédnutím k archeologickým důkazům z této oblasti byl odhad upřesněn na období před ~11 500 – 16 300 lety. Domestikace psa tedy může souviset se vznikem zemědělství, neboť místo i čas se shodují s počátky pěstování rýže.

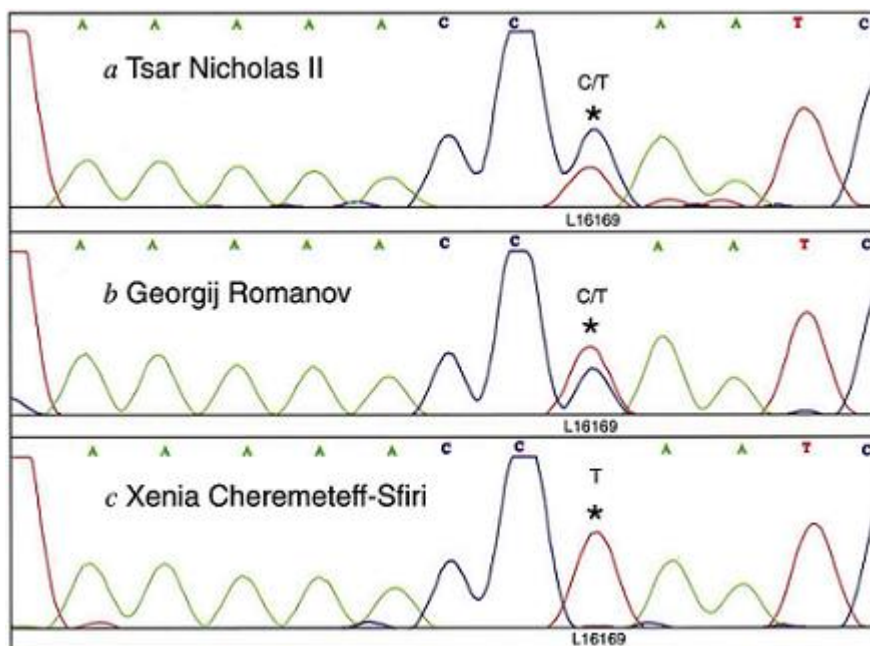
Datování některých kosterních nálezů z Evropy a ze Sibíře je ovšem s výsledky Panga et al. (2009) v rozporu. Nejstarší fosilie se znaky psa jsou zřejmě staré více než 30 000 let. Proto Thalmann et al. (2013) analyzovali mtDNA 18 pravěkých psovitých (*Canidae*) nalezených v Evropě, Rusku a Americe a porovnali ji s kompletními mitochondriálními genomy moderních psů a vlků z celého světa. Po přiřazení vzorků k haploskupinám (A, B, C a D) zjistili, že všichni moderní psi jsou nejbližší příbuzní pravěkým a moderním psovitým pocházejícím z Evropy. Dále zjistili, že tři haploskupiny moderních psů jsou příbuznější spíše pravěkým evropským vlkům než vlkům současným. Jejich studie také ukázala na oddělení linií psa a vlka před více než 15 000 lety. Počátek domestikace v Evropě odhadli na období před ~18 800 – 32 100 lety. To podpořilo hypotézu, že domestikace psů předcházela vzniku zemědělství a začala okolo posledního glaciálního maxima, kdy lidé lovíli megafaunu. Proto psi se mohli živit zbytky zdechlin, které lovci nechali na místě, pomáhat jim chytat kořist nebo je chránit před konkurenčními predátory. Jak rovněž analýza mtDNA ukázala, pozůstatky z jeskyně Goyet staré ~36 000 let a z jeskyně Razboinichya staré ~33 500 let, oboje se znaky psa, nejsou přímým předkem dnešních psů, ale spíše výsledkem zaniklé domestikací události.

Nyní se zdá, že skutečnost by mohla být ještě jiná. Frantz et al. (2016) se kromě mitochondriálního genomu zaměřili i na genom jaderný. Vygenerovali 59 sekvencí z mtDNA fosilií evropských psů starých ~14 000 – 3 000 let a jaderný genom s vysokým pokrytím (28krát), který pocházel od neolitického psa z Irsko starého ~4 800 let. nDNA porovnali s 80 veřejně dostupnými kompletními sekvencemi a 650 moderními psy – převážně vesnickými psy spolu se 48 plemeny. Fylogenetická analýza založená na SNPs ukázala dvě oddělené linie, západoeurasijskou a východoasijskou, a ukázala i hlubokou propast mezi moderními psy a Saarloosovým vlčákem. Tu však vysvětluje jeho původ, plemeno vzniklo křížením německých ovčáků a vlků chovaných v zajetí. Neolitický pes na fylogenetickém stromu těsně sousedí s moderními západoeurasijskými psy. Poté se Frantz et al. (2016) zaměřili na 59 fragmentů hypervariabilních oblastí historické mtDNA spolu se 167 sekvencemi mtDNA moderních psů a určili jejich haploskupiny. U moderních psů převládá haploskupina A, zatím co u pravěkých psů haploskupina C. Vzali také v úvahu archeologické nálezy, a sice, že pozůstatky psů objevené v západní Eurasii jsou staré až 15 000 let, ve východní Eurasii

12 500 let a ve střední Eurasii nebyly objeveny fosilie starší než 8 000 let. Na základě této analýzy navrhli scénář, že východoasijská a západoeurasijská linie vlků se oddělily před ~20 000 – 60 000 lety a byly domestikovány nezávisle na sobě před ~14 000 – 6 400 lety. Evropská populace psů pak byla postupně nahrazena východoasijskými psy, kteří sem začali pronikat spolu s lidmi nejpozději před 6 400 lety. Moderní psi jsou tedy nejspíše kříženci obou linií.

3.5.3 Forenzní studie

Maternální dědičnost je výhodná rovněž ve forenzních případech, jako je například analýza pozůstatků nezvěstné osoby, kdy příbuzní v mateřské linii mohou poskytnout referenční vzorky pro přímé porovnání s danou mtDNA. Sekvenování mtDNA je primárním analytickým nástrojem, který slouží k identifikaci válečných obětí a bylo ho využito i k určení ostatků obětí útoku na Světové obchodní centrum z 11. září 2001 (Budowle et al., 2003). Jedna z nejznámějších rodokmenových studií vedla k ověření pravosti ostatků posledního ruského cara Mikuláše II. Sekvence mtDNA získané z jeho kostí se shodovaly se sekvencemi dvou žijících příbuzných v mateřské linii, s výjimkou jediné pozice 16169, kde měl vzorek směs odpovídajících (T) a neodpovídajících (C) bází. Další experimenty ukázaly, že důvodem byla zřejmě heteroplazmie, nicméně polemika ohledně pravosti těchto ostatků přetrvávala. Zdánlivá heteroplazmie mohla být způsobena například kontaminací. Proto bylo pomocí mtDNA získané z exhumovaných kosterních pozůstatků jeho bratra Georgije Romanova a také z krevního vzorku od žijící příbuzné v mateřské linii, hraběnky Xenie Cheremeteff-Sfiri, provedeno další srovnání s mtDNA extrahovanou z kostí domnělého cara. Sekvence mtDNA Georgije Romanova se shodovala se sekvencí předpokládaného cara, protože byla heteroplazmická ve stejné pozici. Poměry C a T byly u obou mužů konzistentní, ale lišily se mezi jednotlivci. Georgij Romanov měl v průměru 62 % T a 38 % C (Obr. 13b), zatímco údajný car 28 % T a 72 % C (Obr. 13a). Hraběčina sekvence s výjimkou heteroplazmické pozice oběma mužům taktéž odpovídala (Obr. 13c). Rychlý mezigenerační posun od heteroplazmie k homoplazmii a různé heteroplazmické poměry u bratrů jsou v souladu s principem mitochondriálního bottlenecku (Ivanov et al., 1996).



Obr. 13. Srovnání sekvence mtDNA na pozici 16 169. (a) Car Mikuláš II. (b) Georgij Romanov. (c) Xenie Cheremeteff-Sfiri. Převzato z: Ivanov et al., 1996.

mtDNA je rovněž možné využít k identifikaci různých biologických druhů, neboť vzorky mtDNA nemusí nutně patřit člověku. V konkrétních případech může být určení druhové příslušnosti vzorku důležité, zejména pokud je cílem vyšetřování, jako je obchodování s ohroženými druhy, pytláctví či dopravní nehody se zvířaty. Nakamura et al. (2009) navrhli systém pro identifikaci druhů založený na variaci velikosti hypervariabilních oblastí mtDNA. Vzorky mtDNA obratlovců lze rovněž identifikovat podle nukleotidové sekvence genu pro cytochrom b (CYB), která je druhově specifická, jak prokázali Parson et al. (2000). Panday et al. (2014) dále uvádí možné využití sekvence genů 12S a 16S rRNA či genu cytochrom c oxidázy 1 (CO1).

Popularita psů domácích (*Canis lupus familiaris*) spolu s velkou podobností jejich a lidské mtDNA vedou k častému využití biologických důkazů pocházejících od psů (zejména srsti) z míst zločinů. Většina vzorků objevených na místech činů nejsou chlupy vytržené, ale vypadnuté a nemají růstovou cibulku či připojené měkké tkáně potřebné pro profilování nDNA. Oproti tomu vysoký počet kopií mtDNA nacházejících se v každém chlupu umožňuje vyhodnocení výsledků i z jediného psího chlupu. Forenzní důkazy založené na mtDNA ze psích chlupů byly použity k zahrnutí nebo vyloučení podezřelých v případech jako jsou vraždy, krádeže či podezření na pytláctví vlků (Spicer et al., 2014).

Shoda mezi mtDNA psích chlupů nalezených na místě činu a vzorku od podezřelého jedince může být podle Verscheureové et al. (2013) zapříčiněna jednou ze tří možností: (1)

chlupy z místa činu patří podezřelému jedinci, (2) chlupy z místa činu pochází od jedince ze stejné mateřské linie jako podezřelý jedinec, a (3) mtDNA z místa činu se náhodou shoduje s mtDNA podezřelého jedince. K posouzení důkazní závažnosti podle posledního scénáře je nutné vypočítat pravděpodobnost náhodné shody haplotypu – pravděpodobnost, že v dané populaci budou náhodně vybraní psi sdílet stejný haplotyp. Pravděpodobnost náhodné shody je dána výpočtem frekvence haplotypu v rámci vybrané populace. Čím častější je haplotyp, tím pravděpodobnější je, že dva psi sdílejí tento haplotyp náhodně a snižuje se pak důkazní hodnota stopy s tímto typem mtDNA. Proto je důležité přesné určení frekvencí haplotypů v populaci, která je relevantní pro konkrétní případ.

Jak již bylo uvedeno, vyhodnocování forenzních analýz může ztížit heteroplazmie (Klütschová et al., 2011). Ve forenzních případech může vést k chybnému vyloučení vzorku. Různé úrovně heteroplazmie se mohou dokonce objevit i mezi tkáněmi jednotlivce (mosaicismus) a vést k vyloučení jedince jako důkazního materiálu z důvodu nesprávného zařazení haplotypu. V opačném případě může být výskyt jedné heteroplazmatické bodové mutace v jinak identických sekvencích využít ke srovnání a zvýšit tak sílu shody, jako tomu bylo například u výše zmíněné identifikace ostatků cara Mikuláše II. (Ivanov et al., 1996). Příručky pro forenzní analýzu lidských vzorků připouštějí jeden sekvenční rozdíl mezi jedinci, přičemž výsledek je v takovém případě považován za neprůkazný.

Pro použití ve forenzních případech byla v Portugalsku vyvinuta databáze FidoSearchTM. Jedná se o databázi mtDNA psů s vyhledávacím softwarem, která však není veřejně přístupná a vstupní data byla převzata z databáze GenBank. Je třeba si uvědomit, že kontrola kvality záznamu vkládaného do GenBank závisí na samotném vědci, proto není překvapující, že spolehlivost těchto údajů byla zpochybněna. Již se vyskytl případ, kdy byla ve studii použita data pocházející od stejných psů, protože sekvence jejich mtDNA byly v GenBank nahrány dvakrát. Proto by bylo vhodné vytvořit jinou kvalitní, spolehlivou a veřejně dostupnou databázi mtDNA psů (Verscheureová et al., 2013).

4 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo vyhledat dostupné informace a vypracovat systematickou literární rešerši týkající se problematiky struktury a využití mitochondriálního genomu v aplikované genetice se zaměřením na psa domácího (*Canis lupus familiaris*). Dílčí cíle práce byly zaměřeny na náplň jednotlivých kapitol.

Mitochondrie jsou orgány eukaryotických buněk. Jejich tvar, velikost a počet se odvíjí od typu buňky a jejich energetických požadavků, přičemž metabolicky aktivní buňky jich více. Mitochondrie jsou tvořeny vnitřní a vnější fosfolipidovou membránou, intermembránovým prostorem a matrixem. Vnitřní membrána je zvrásněná a vytváří nepravidelné výběžky, mitochondriální krysty, které zvětšují povrch orgány. Rozeznáváme mitochondrie tubulárního, sakulárního či prizmatického typu a mitochondrie s krystami. Hlavní funkcí mitochondrií je produkce a uvolňování energie ve formě ATP. Energií získává mitochondrie prostřednictvím tří reakcí, které na sebe navazují. Jedná se o tyto pochody: Krebsův cyklus, oxidaci vodíku v dýchacím řetězci a oxidativní fosforylaci.

mtDNA obvykle sestává z jediného cirkulárního (kruhového) chromozomu. Největší mitochondriální genom se nachází u rostlin, obsahuje introny a velké množství nekódujících sekvencí. Nejmenší mitochondriální genom mají živočichové. Délka lidské mtDNA je 16 569 párů bází, které tvoří L-řetězec a H-řetězec. Stejně jako u ostatních živočichů kóduje mtDNA člověka celkem 37 genů. Jedná se o 2 rRNA (12S a 16S), 22 tRNA a 13 proteinů kódujících strukturální podjednotky mitochondriálního dýchacího řetězce. V mtDNA se nachází D-smyčka, kontrolní oblast, která nemá žádnou kódovací funkci a je tvořena třemi řetězci. Nachází se zde hypervariabilní region 1 a hypervariabilní region 2. V těchto oblastech je u člověka mutační rychlost mtDNA 5 – 10krát vyšší než u nDNA. mtDNA psa domácího (*Canis lupus familiaris*) je tvořena 16 728 páry bází, délka není však absolutní kvůli přítomnosti různého počtu repetitivní sekvence v kontrolní oblasti. HV1 zahrnuje úsek 15458-16130 a HV2 úsek 16430-16727.

Původ mitochondrií vysvětluje endosymbiotická teorie. Mitochondrie byly dříve prokaryotické organismy, které byly pohlceny a staly se součástí buňky. Většina jejich genů byla odstraněna, substituována nebo přenesena do jádra hostitelské buňky. Mitochondrie jsou redukovánými zbytky α -proteobakterií, nejspíše z rodu *Rickettsia*. Fylogenetické analýzy naznačují, že dýchací systémy *Rickettsia* sp. a mitochondrií se oddělily před ~1,5-2 miliony let v souvislosti se vzrůstajícím množstvím kyslíku v atmosféře. Znaky charakteristické pro eukaryota jako je buněčný cyklus, fagocytóza, jádro, endomembránový přenos a mnohobuněčnost se objevily až po mitochondriální endosymbióze. Ohledně vzniku eukaryot existuje mnoho hypotéz, nejpravděpodobnější je vodíková hypotéza. Předpokládá se, že počáteční symbiotický vztah vedoucí ke vzniku mitochondrií byl podpořen přenosem vodíku od striktně aerobní, vodík produkující bakterie k anaerobnímu, na vodíku závislému hostiteli. Pokud pokračovala symbióza v prostředí bohatém na kyslík, endosymbiont se přeměnil v

mitochondrii a začal produkovat ATP namísto vodíku. Organelami odvozenými od mitochondrií jsou hydrogenozomy a mitozomy.

Standardní model dědičnosti mtDNA u savců je takový, že mitochondrie jsou přenášeny striktně maternálně, tedy v mateřské linii (matrilinéárně). Nízké úrovně paternálního přenosu byly pozorovány u myši po několika generacích mezidruhového zpětného křížení. Jeden případ přítomnosti otcovských mitochondrií, a také rekombinace, byl zaznamenán i u člověka. mtDNA mutuje daleko častěji než nDNA. O heteroplasmii se jedná v případech, kdy je mutovaná pouze část molekul mtDNA nacházejících se v buňce. Vyskytuje u nejméně 10 %, a pravděpodobně až 20 % lidí. Kontrolní oblast mtDNA podléhá dvěma typům heteroplasmie, jednak založené na délce a jednak na sekvenci.

mtDNA je často využívána ve forenzních analýzách, populační genetice a evolučních studiích. Vysoký počet kopií mtDNA v buňkách umožňuje provádět analýzy i z malého množství buněčného materiálu, což je výhodou, pokud vzorky obsahují pouze malé množství či značně znehodnocenou nDNA. U psů rozeznáváme haploskupiny A, B a C, které se vyskytují po celém světě a D, E a F, které se vyskytují pouze regionálně. Evoluční biologové využívají rychlost mutací hromadících se v mitochondriálním genomu k datování různých evolučních událostí. Vychází se z doby, která uplynula od divergence příslušných druhů. Rozlišuje se mutační rychlost (což je okamžitá rychlost, s jakou v mitochondriálním genomu dochází ke změnám nukleotidů) a rychlost substituce. Ta je dána tím, jak rychle jsou mutace fixovány v populaci. Substituční rychlost v mitochondriálním genomu psů/vlků byla odhadnuta na jednu substituci za ~3 200 – 9 600 let. Ohledně domestikace psů existuje značný nesoulad mezi odhady, kdy vlastně k domestikaci došlo. Údaje získané z mtDNA psů naznačují, že v průběhu času došlo k několika domestikačním vlnám. První zřejmě proběhla v Evropě v období před ~18 800 – 32 100 lety, tyto linie psů ale zanikly. Podle nejnovější studie se východoasijská a západoeurasijská linie vlků oddělily před ~20 000 – 60 000 lety a byly domestikovány nezávisle na sobě před ~14 000 – 6 400 lety. Evropská populace psů pak byla postupně nahrazena východoasijskými psy, kteří sem začali pronikat spolu s lidmi nejspíše před 6 400 lety. Moderní psi jsou tedy nejspíše kříženci obou linií. Ve forenzní genetice můžeme mtDNA využít například k identifikaci různých biologických druhů. K té se využívá sekvence genu pro cytochrom b, genů 12S a 16S rRNA či genu cytochrom c oxidázy 1, které jsou druhově specifické. Rovněž se uplatňuje při identifikaci ostatků, jako tomu bylo například při identifikaci pozůstatků ruského cara Mikuláše II. Forenzní důkazy založené na mtDNA ze psích chlupů byly použity k zahrnutí nebo vyloučení podezřelých v případech jako jsou vraždy, krádeže či podezření na pytláctví vlků.

5 Seznam použité literatury

- Adams, K. L., Palmer, J. D. 2003. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29 (3). 380-395.
- Akhmanova, A. Voncken, F. van Alen, T. van Hoek, A. Boxma, B. Vogels, G. Veenhuis, M. Hackstein, J. H. P. 1998. A hydrogenosome with a genome. *Nature*. 396. 527-528.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., Young, I. G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 290 (9). 457-465.
- Andersson, S. G. E., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U. C. M., Podowski, R. M., Näslund, A. K., Eriksson, A.-S., Winkler, H. H., Kurland, Ch. G. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*. 396. 133-143.
- Andersson, S. G. E., Kurland, Ch. G. 1999. Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Current Opinion in Microbiology*. 2 (5). 535-541.
- Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowers, R. N., Turnbull, D. M., Howell, N. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*. 23. 147.
- Ardalan, A., Kluetsch, C. F. C., Zhang, A., Erdogan, M., Uhlén, M., Houshmand, M., Tepeli, C., Ashtiani, S. R. M., Savolainen, P. 2011. Comprehensive study of mtDNA among Southwest Asian dogs contradicts independent domestication of wolf, but implies dog–wolf hybridization. *Ecology and Evolution*. 1 (3). 373-385.
- Ashley, M. V., Laipis, P. J., Hauswirth, W. W. 1989. Rapid segregation of heteroplasmic bovine mitochondria. *Nucleic Acid Research*. 17 (18). 7325-7331.

- Asin-Cayuela, J., Gustafsson, C. M. 2007. Mitochondrial transcription and its regulation in mammalian cells. *Trends in Biochemical Sciences*. 32 (3). 111-117.
- Barr, C. M., Neiman, M., Taylor, D. R. 2005. Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *New Phytologist*. 168 (1). 39-50.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. 2002. *Biochemistry*. W. H. Freeman. New York. p. 974. ISBN-10: 0-7167-3051-0.
- Boxma, B., de Graaf, R. M., van der Staay, G. W. M., van Alen, T. A., Ricard, G., Gabaldón, T., van Hoek, A. H. A. M., Moon-van der Staay, S. Y., Koopman, van Hellemond, J. J., Tielens, A. G. M., Friedrich, T., Veenhuls, M., Huynen, M. A., Hackstein, J. H. P. 2005. An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature*. 434. 74-79.
- Budowle, B., Allard, M. W., Wilson, M. R., Chakraborty, R. 2003. Forensics and Mitochondrial DNA: Applications, Debates, and Foundations*. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 4. 119-141.
- Burger, G., Gray, M. W., Lang, B. F. 2003. Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends in Genetics*. 19 (12). 709-716.
- Cavalier-Smith, T. 2002. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52 (2). 297-354.
- Dyall, S. D., Johnson, P. J. 2000. Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. *Current opinion in microbiology*. 3 (4). 404-411.
- Forterre, P. 2005. The two ages of the RNA world, and the transition to the DNA world: a story of viruses and cells. *Biochimie*. 87 (9-10). 793-803.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., Purnelle, B. 1998. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 440 (3). 328-331.

Frantz, L. A., Mullin, V. E., Pionnier-Capitan, M., Lebrasseur, O., Ollivier, M., Perri, A., Linderholm, A., Mattiangeli, V., Teasdale, M. D., Dimopoulos, E. A., Tresset, A., Duffraisse, M., McCormick, F., Bartosiewicz, L., Gál, E., Nyerges, É. A., Sablin, M. V., Bréhard, S., Mashkour, M., Bălăşescu, A., Gillet, B., Hughes, S., Chassaing, O., Hitte, C., Vigne, J.-D., Dobney, K., Hänni, C., Bradley, D. G., Larson, G. 2016. Genomic and archaeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs. *Science*. 352 (6290), 1228-1231.

Fregel, R., Suárez, N. M., Betancor, E., González, A. M., Cabrera, V. M., Pestano, J. 2015. Mitochondrial DNA haplogroup phylogeny of the dog: Proposal for a cladistic nomenclature. *Mitochondrion*. 22. 75-84.

Gibbons, A. 1998. Calibrating the Mitochondrial Clock. *Science*. 279 (5347). 28-29.

Griparic, L., van der Bliek, A. M. 2001. The Many Shapes of Mitochondrial Membranes. *Traffic*. 2 (4). 235-244.

Gundry, R. L., Allard, M. W., Moretti, T. R., Honeycutt, R. L., Wilson, M. R., Monson, K. L., Foran, D. R. 2007. Mitochondrial DNA Analysis of the Domestic Dog: Control Region Variation Within and Among Breeds. *52* (3). 562-572.

He, J. Mao, Ch.-Ch., Reyes, A., Sembongi, H., Re, M. D., Granycome, C., Clippingdale, A. B., Fearnley, I. M., Harbour, M., Robinson, A. J., Reichelt, S., Spelbrink, J. N., Walker, J. E., Holt, I. J. 2007. The AAA+ protein ATAD3 has displacement loop binding properties and is involved in mitochondrial nucleoid organization. *The Journal of Cell Biology*. 176 (2). 141-146.

Ho, S. Y. W., Larson, G. 2006. Molecular clocks: when times are a-changin'. *Trends in Genetics*. 22 (2). 79-83.

Hoekstra, R. F. 2000. Evolutionary origin and consequences of uniparental mitochondrial inheritance. *Human Reproduction*. 15 (2). 102-111.

Holt, I. J., Lorimer, H. E., Jacobs, H. T. 2000. Coupled Leading- and Lagging-Strand Synthesis of Mammalian Mitochondrial DNA. *Cell*. 100 (5). 515-524.

- Ivanov, P. L., Wadhams, M. J., Roby, R. K., Holland, M. M., Weedn, V. W., Parsons, T. J. 1996. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nature Genetics*. 12 (4). 417-420.
- Karnkowska, A., Vacek, V., Zubáčová, Z., Treitli, S. C., Petrželková, R., Eme, L., Novák, L., Žárský, L., Barlow, L. D., Herman, E. K., Soukal, P., Hroudová, M., Doležal, P., Stairs, C. W., Roger, A. J., Eliáš, M., Dacks, J. B., Vlček, Č., Hampl, V. 2016. A Eukaryote without a Mitochondrial Organelle. *Current Biology*. 26 (10). 1-11.
- Kim, K. S., Lee, S. E., Jeong, H. W., Ha, J. H. 1998. The Complete Nucleotide Sequence of the Domestic Dog (*Canis familiaris*) Mitochondrial Genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 10 (2). 210-220.
- Klütsch, C. F. C., Seppälä, E. H., Fall, T., Uhlén, M., Hedhammar, A., Lohi, H., Savolainen, P. 2010. Regional occurrence, high frequency but low diversity of mitochondrial DNA haplogroup d1 suggests a recent dog-wolf hybridization in Scandinavia. *Animal Genetics*. 42 (1). 100-103.
- Klütsch, C. F. C., Seppälä, E. H., Uhlén, M., Lohi, H., Savolainen, P. 2011. Segregation of point mutation heteroplasmy in the control region of dog mtDNA studied systematically in deep generation pedigrees. *International Journal of Legal Medicine*. 125 (4). 527-535.
- Koehler, C. M., Lindberg, G. L., Brown, D. R., Beitz, D. C., Freeman, A. E., Mayfield, J. E., Myers, A. M. 1991. Replacement of Bovine Mitochondrial DNA by a Sequence Variant Within One Generation. *Genetics Society of America*. 129 (1). 247-255.
- Kraytsberg, Y., Schwartz, M., Brown, T. A., Ebraldise, K., Kunz, W. S., Clayton, D. A. 2004. Recombination of Human Mitochondrial DNA. *Science*. 304 (5673). 981.
- Ladoukakis, E. D., Zouros, E. 2001. Direct Evidence for Homologous Recombination in Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) Mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*. 18 (7). 1168-1175.

- Lane, N., Martin, W. 2010. The Energetics of Genome Complexity. *Nature*. 467. 929-934.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J. L., Kulbokas III, E. J., Zody, M. C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R. K., Ostrander, E. A., Ponting, Ch. P., Galibert, F., Smith, D. R., deJong, P. J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, Ch.-W., Cook, A., Cuff, J., Daly, M. J., DeCaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, Ch., Kim, L., Koepfli, K.-P., Parker, H. G., Pollinger, J. P., Searle, S. M. J., Sutter, N. B., Thomas, R., Webber, C., Lander, E. S. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 438 (8). 803-819.
- Logan, D. C. 2006. The mitochondrial compartment. *Journal of Experimental Botany*. 57 (6). 1225-1243.
- Malyarchuk, B. A., Vanecek, T., Perkova, M. A., Derenko, M. V., Sip, M. 2006. Mitochondrial DNA Variability in the Czech Population, with Application to the Ethnic History of Slavs. *Human Biology*. 78 (6). 681-696.
- Margulis, L., Dolan, M. F., Guerrero, R. 2000. The chimeric eukaryote: Origin of the nucleus from the karyomastigont in amitochondriate protists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97 (13). 6954-6959.
- Martin, W., Müller, M. 1998. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*. 392. 37-41.
- McKinney, E. A., Oliveira, M. T. 2013. Replicating animal mitochondrial DNA. *Genetics and Molecular Biology*. 36 (3). 308-315.
- McLeod, B. A., White, B. N. 2010. Tracking mtDNA Heteroplasmy through Multiple Generations in the North Atlantic Right Whale (*Eubalaena glacialis*). *Journal of Heredity*. 101 (2). 235-239.

- Mishra, P., Chan, D. C. 2014. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 15. 634-646.
- Moreira, D., López-García, P. 1998. Symbiosis Between Methanogenic Archaea and α -Proteobacteria as the Origin of Eukaryotes: The Syntrophic Hypothesis. *Journal of Molecular Evolution*. 47 (5). 517-530.
- Nakamura, H., Muro, T., Imamura, S., Yuasa, I. 2009. Forensic species identification based on size variation of mitochondrial DNA hypervariable regions. *International Journal of Legal Medicine*. 123 (2). 177-184.
- Nass, M. M. K., Nass, S. 1963. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *Journal of Cell Biology*. 19 (3). 593-629.
- Pang, J.-F., Kluetsch, C., Zou, X.-J., Zhang, A., Luo, L.-Y., Angleby, H., Ardalan, A., Ekström, C., Sköllermo, A., Lundeberg, J., Matsumura, S., Leitner, T., Zhang, Y.-P., Savolainen, P. 2009. mtDNA Data Indicate a Single Origin for Dogs South of Yangtze River, Less Than 16,300 Years Ago, from Numerous Wolves. *Molecular Biology and Evolution*. 26 (12). 2849-2864.
- Panday, R., Jha, D. K., Thapa, N., Pokharel, B. R., Aryal, N. K. 2014. Forensic Wildlife Parts and their Product Identification and Individualization Using DNA Barcoding. *The Open Forensics Science Journal*. 7. 6-13.
- Parson, W., Pegoraro, K., Niederstätter, H., Föger, M., Steinlechner, M. 2000. Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine*. 114 (1-2). 23-28.
- Pereira, L., Van Asch, B., Amorim, A. 2004. Standardisation of nomenclature for dog mtDNA D-loop: a prerequisite for launching a *Canis familiaris* database. *Forensic Science International*. 141 (2-3). 99-108.

- Robberson, D. L., Kasamatsu, H., Vinograd, J. 1972. Replication of Mitochondrial DNA. Circular Replicative Intermediates in Mouse L Cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 69 (3). 737-741.
- Sagan, L. 1967. On the Origin of Mitosing Cells. Journal of Theoretical Biology. 14 (3). 225-274.
- Savolainen, P., Zhang, Y., Luo, J., Lundeberg, J., Leitner, T. 2002. Genetic Evidence for an East Asian Origin of Domestic Dogs. Science. 298 (5598), 1610-1613.
- Shokolenko, I. N., Wilson, G., Alexeyev, M. F. 2014. Aging: A mitochondrial DNA perspective, critical analysis and an update. World Journal of Experimental Medicine. 4 (4). 46-57.
- Scheffler, I. E. 2001. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. Mitochondrion. 1 (1). 3-31.
- Scheffler, I. E. 2007. Mitochondria. Wiley. New Jersey. p. 484. ISBN: 9780470040737.
- Schneider, R. E., Brown, M. T., Shiflett, A. M., Dyall, S. D., Hayes, R. D., Xie, Y., Loo, J. A., Johnson, P. J. 2011. The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. International Journal for Parasitology. 41 (13-14). 1421-1434.
- Schwartz, M., Vissing, J. 2002. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. The New England Journal of Medicine. 347 (8). 576-580.
- Spicer, A. M., Kun, T. J., Sacks, B. N., Wictum, E. J. 2014. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy levels in domestic dog hair. Forensic Science International: Genetics. 11. 7-12.
- Sutovsky, P., Moreno, R. D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., Schatten, G. 2000. Ubiquitinated Sperm Mitochondria, Selective Proteolysis, and the Regulation of Mitochondrial Inheritance in Mammalian Embryos. Biology of Reproduction. 63 (2). 582-590.

Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM). Interpretation Guidelines for Mitochondrial DNA Analysis by Forensic DNA Testing Laboratories [online]. 18 July 2013 [cit. 15.4.2018]. Dostupné z

< http://media.wix.com/ugd/4344b0_c5e20877c02f403c9ba16770e8d41937.pdf >

Taanman, J.-W. 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1410 (2). 103-123.

Tanaka, M., Gong, J.-S., Zhang, J., Yamada, Y., Borgeld, H.-J., Yagi, K. 2000. Mitochondrial genotype associated with longevity and its inhibitory effect on mutagenesis. *Mechanisms of Ageing and Development*. 116 (2-3). 65-76.

Taylor, R. W., Turnbull, D. M. 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics*. 6. 389-402.

Thalmann, O., Shapiro, B., Cui, P., Schuenemann, V. J., Sawyer, S. K., Greenfield, D. L., Germonpré, M. B., Sablin, M. V., López-Giráldez, F., Domingo-Roura, X., Napierala, H., Uerpmann, H.-P., Loponte, D. M., Acosta, A. A., Giemsch, L., Schmitz, R. W., Worthington, B., Buikstra, J. E., Druzhkova, A., Graphodatsky, A. S., Ovodov, N. D., Wahlberg, N., Freedman, A. H., Schweizer, R. M., Koepfli, K.-P., Leonard, J. A., Meyer, M., Krause, J., Pääbo, S., Green, R. E., Wayne, R. K. 2013. Complete Mitochondrial Genomes of Ancient Canids Suggest a European Origin of Domestic Dogs. *Science*. 342 (6160). 871-874.

Unsold, M., Marienfeld, J. R., Brandt, P., Brennicke, A. 1997. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature Genetics*. 15. 57-61.

van der Blik, A. M., Shen, Q., Kawajiri, S. 2013. Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 5 (6). 1-16.

Verscheure, S., Backeljau, T., Desmyter, S. 2013. Reviewing population studies for forensic purposes: Dog mitochondrial DNA. *ZooKeys*. 365. 381-411.

Vilá, C., Savolainen, P., Maldonado, J. E., Amorim, I. R., Rice, J. E., Honeycutt, R. L., Crandall, K. A., Lundeberg, J., Wayne, R. K. 1997. Multiple and Ancient Origins of the Domestic Dog. *Science*. 276 (5319). 1687-1689.

Wallace, D. C., Chalkia, D. 2013. Mitochondrial DNA Genetics and the Heteroplasmy Conundrum in Evolution and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 5. 1-47.

Weisz, G. M. 2015. Dr. Otto Heinrich Warburg-Survivor of Ethical Storms. *Rambam Maimonides Medical Journal*. 6 (1). 1-5.

White, D. J., Wolff, J. N., Pierson, M., Gemmell, N. J. 2008. Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Molecular Ecology*. 17 (4). 4925-4942.

Yasukawa, T., Reyes, A., Cluett, T. J., Yang, M.-Y., Bowmaker, M., Jacobs, H. T., Holt, I. J. 2006. Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *The EMBO Journal*. 25 (22). 5358-5371.

Internetové zdroje

[1] Metablismus A. Navigace B. Terminologie E. Sacharidy I. Enzymy [online]. [cit. 16.3.2017]. Dostupné z < <http://slideplayer.cz/slide/2508305/> >

[2] Citrátový cyklus. Institut Galenus [online]. [cit. 16.3.2017]. Dostupné z < <http://galenus.cz/clanky/biochemie/biochemie-metabolismus-citratovy-cyklus> >

[3] *Homo sapiens* mitochondrion, complete genome. The National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 18.4.2018]. Dostupné z < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_012920 >

[4] Revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) of the Human Mitochondrial DNA. MITOMAP [online]. [cit. 18.4.2018]. Dostupné z < <https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMAP/HumanMitoSeq> >

[5] mtDNA tree Build 17 (18 Feb 2016): subtree R. PhyloTree [online]. [cit. 16.4.2018]. Dostupné z < <http://www.phylotree.org/tree/R.htm> >

[6] *Canis lupus familiaris* mitochondrial genome. The National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 18.4.2018]. Dostupné z < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_002008 >

[7] MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database [online]. [cit. 18.4.2018]. Dostupné z < <http://www.mitomap.org> >

[8] PhyloTree_{mt} [cit. 18.4.2018]. Dostupné z < <http://www.phylotree.org> >

[8] EMPOP mtDNA database [cit. 18.4.2018]. Dostupné z < <https://empop.online> >

6 Seznam použitých zkratk

ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
bp	páry nukleových bází (base pairs)
CRS	Cambridgeská referenční sekvence (Cambridge reference sequence)
D-loop	D-smyčka (displacement loop)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DUI	dvojitá uniparentální dědičnost (doubly uniparental inheritance)
H-řetězec	těžký řetězec (heavy strand)
HSP1	promotor 1 H-řetězce (H-strand promoter 1)
HSP2	promotor 2 H-řetězce (H-strand promoter 2)
HV1	hypervariabilní region 1
HV2	hypervariabilní region 2
L-řetězec	lehký řetězec (light strand)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
mtDNA	mitochondriální DNA
mtSSB	mitochondriální jednovláknový DNA-vazebný protein (mitochondrial single-stranded DNA-binding protein)

mTERF	mitochondriální transkripční terminační faktor
nDNA	jaderná DNA (nuclear DNA)
O _H	replikační počátek pro H-řetězec
O _L	replikační počátek pro L-řetězec
rCRS	revidovaná Cambridgeská referenční sekvence (revised Cambridge reference sequence)
RITOLS	model začlenění RNA do celého opožďujícího se řetězce (RNA incorporated throughout the lagging strand)
ROS	volné kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
SCM	synchronní model (strand-coupled model)
SDM	model vytěsňování řetězce (strand-displacement model)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
VNTR	různý počet tandemových repetitiv (variable number of tandem repeats)