

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA ANTROPOLOGIE A GENETIKY ČLOVĚKA**



MITOCHONDRIÁLNÍ GENOM V ONTOGENEZI
diplomová práce

Petra Töröková

Praha 2010

Vedoucí práce: Prof. MUDr. Radim Brdička, DrSc.

Vedoucí diplomové práce: Prof. MUDr. Radim Brdička, DrSc.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, s použitím uvedené literatury.

V Praze 23. 8. 2010

Petra Töröková

Poděkování:

Za podnětné rady a odborné vedení během této práce děkuji prof. MUDr. Radimu Brdičkovi, DrSc. Děkuji RNDr. Janě Schmuczerové, PhD a RNDr. Pavlíně Čejkové, PhD za sdílení zkušeností a mnohá cenná poučení. Zaměstnancům Oddělení molekulární genetiky Ústavu hematologie a krevní transfuze, kterým vděčím za pomoc a možnost využít vybavení k praktické části diplomové práce. Za podporu děkuji svému manželovi Danu Törökovi a svým rodičům.

ABSTRAKT

Hlavním cílem této práce bylo porovnání sekvence HVRII oblasti mitochondriálního genomu ve vzorcích pupečnickové krve a buněk dutiny ústní stejných jedinců odebrané v průměru 10 let od narození. Je známo, že během ontogeneze probíhají v lidském genomu změny. O to více v mitochondriálním genomu, který vykazuje vyšší mutační rychlost a navíc o něj nepečují opravné mechanismy. Ve starších jedincích byla nalezena celá řada mitochondriálních odchylek nahromaděných v různých tkáních v průběhu ontogeneze. Tato práce se však zaměřuje na detekci těchto změn již u mladších jedinců. Tkáňově specifická variabilita vznikající během ontogeneze může mít nepříznivý dopad na nejrůznější studie, které se opírají o mtDNA.

Vzhledem k tomu, že vzorky souboru byly odebrány ve dvou z hlediska životního prostředí odlišných regionech (Teplice / Prachatice), byly vzorky s nalezenými změnami porovnány z hlediska regionu, ze kterého pocházely, ve snaze prokázat vliv životního prostředí na mutagenezi mitochondriální DNA. Vzorky byly také srovnány z hlediska pohlaví.

Dále byla zhodnocena variabilita souboru české populace a vypočten odhad genetické diverzity.

Klíčová slova: mitochondriální DNA, HVRII oblast, ontogeneze, polymorfismus

ABSTRACT

The main goal of this study is the comparison of sequences of the HVRII region of the mitochondrial genome in the cord blood sample and the saliva sample of the same individual, taken at average ten years from his/her birth. It is known that during ontogenesis the human genome changes. All the more the mitochondrial genome which shows a higher mutation rate, and moreover it is not taken care of it by repair mechanisms. In older individuals, there was found a distinctive amount of mitochondrial variations cumulated in different tissues in the process of the ontogenesis. This study is focused on the detection of these changes already in younger individuals. The tissue-specific variability which is created during ontogenesis might have an adverse influence on all sorts of the mtDNA based studies.

The samples were taken in two regions (Teplice / Prachaticice) that differ in the pollution of environment. With regard to that, the samples with discovered changes were compared from the standpoint of the region, which they had come from, with the aim to prove the influence of environment on the mutagenesis of the mitochondrial DNA. Samples were also compared from the point of view of sex.

Furthermore the variability of the collection of Czech population was evaluated and the estimation of the genetic diversity was computed.

Key words: mitochondrial DNA, HVRII region, ontogenesis, polymorphism

OBSAH

1. ÚVOD	8
1.1. Mitochondriální genom	9
1.1.1. Struktura mtDNA.....	9
1.1.2. D-loop.....	11
1.1.2.1. Hypervariabilní region I.....	12
1.1.2.2. Hypervariabilní region II.....	13
1.2. MtDNA v časně ontogenezi	15
1.2.1. Maternální původ mtDNA.....	15
1.2.2. Mitochondriální efekt hrdla láhve.....	16
1.2.3. Segregace během časného vývoje.....	18
1.2.4. Heteroplasmie.....	19
1.3. Mitochondriální genom během stárnutí	21
1.3.1. Elektronový transportní řetězec v mitochondriích.....	22
1.3.2. Úloha ROS v procesu stárnutí.....	22
1.3.3. Produkce ROS a oxidační poškození.....	23
1.3.4. Akumulace mutací v mtDNA během stárnutí.....	24
2. CÍLE PRÁCE	27
2.1. Hypotézy	28
3. MATERIÁL	30
3.1. Vzorky	30
3.2. Materiál	30
3.2.1. Chemikálie.....	30
3.2.2. Připravované roztoky.....	31
3.2.3. Komerčně dodávané roztoky.....	31
3.2.4. Enzymy.....	32
3.2.5. Komerční sady.....	32
3.2.6. Další materiál.....	32
3.2.7. Nástroje.....	32
3.2.8. Použité přístroje.....	32
3.2.9. Software.....	33
4. METODY	34
4.1. Izolace DNA ze slin	34
4.2. Izolace DNA z pupečnickové krve	35
4.3. Měření čistoty a koncentrace DNA	36
4.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	36
4.4.1. Komponenty PCR reakce.....	37
4.4.2. Princip reakce.....	38
4.4.3. Amplifikace HVRII oblasti mtDNA.....	39
4.5. Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu	40
4.6. Purifikace PCR produktů	41

4.7. Sekvenování	42
4.7.1. Sekvenační reakce.....	42
4.7.2. Precipitace produktů.....	43
4.8. Fragmentační analýza	44
4.8.1. Princip reakce.....	44
4.9. Statistické zpracování dat	47
5. VÝSLEDKY	48
5.1. Stanovení rozdílů v sekvenci HVRII mtDNA ve vzorcích pupečnickové krve a buněk dutiny ústní stejných jedinců	48
5.2. Vliv životního prostředí na mutagenezi mtDNA	50
5.3. Charakteristika studovaného souboru	53
6. DISKUZE	61
6.1. Stanovení rozdílů v sekvenci HVRII mtDNA ve vzorcích pupečnickové krve a buněk dutiny ústní stejných jedinců	61
6.2. Vliv životního prostředí na mutagenezi mtDNA	65
6.3. Charakteristika variability HVRII oblastí souboru	66
7. ZÁVĚR	69
8. SEZNAM ZKRATEK	71
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	73
10. PŘÍLOHY – tabulky	83
11. PŘÍLOHY – obrázky	95

1. ÚVOD

Je známo, že mitochondriální genom se během ontogeneze vyvíjí. Během života totiž dochází ke kumulaci různých mutací. Vzhledem k vysokému počtu molekul mtDNA v lidském těle se však takto vzniklé mutace nebudou vyskytovat ve všech buňkách těla a ani v jediné buňce nemusí být výbava mtDNA identická. Tento jev, zvaný heteroplasmie, se též mění během ontogeneze - dochází ke změnám v hladině heteroplasmie. Překročí-li tato hladina určitý kritický práh, může dojít k defektům mitochondriálního dýchacího řetězce. Byla uveřejněna řada prací nacházejících souvislost mezi různými negativními vlivy, které působí na buňky, na stav procesů probíhajících v mitochondriích a samozřejmě i na stav mitochondrií samotných (Wei & Lee, 2002). Jedním z nejvíce diskutovaných faktorů je oxidativní stres. V případě mtDNA změny s věkem postupně přibývají, protože nejsou dostatečně odstraňovány, a výkonnost energetického zdroje buňky klesá, tento prakticky nezvratný proces je proto často spojován se stárnutím. To podpírají nálezy určitých změn v mtDNA, které jsou detekovány u starších osob mnohem častěji než u mladších (Michikawa et al., 1999).

Jedním z dalších faktorů, které by mohly ovlivňovat mutagenézi mtDNA, je životní prostředí. Protože lidský organizmus vznikl, vyvíjel se a existuje v určitém prostředí, které určuje jeho existenci, má k němu určitý vztah. Třeba tím, že ho spotřebovává, reaguje na něj nebo ho dokonce i ovlivňuje. Mitochondrie na vlivy vnějšího prostředí reagují většinou nepřímo, na základě signálů, které do ní pronikají z ostatních částí buňky. Není ale příliš pravděpodobné, aby mitochondrie byly na prostředí, ve kterém se organizmus nachází, zcela nezávislé.

V rámci této práce bylo pátráno po změnách v mitochondriální DNA, ke kterým mohlo dojít u dětí, narozených ve dvou z hlediska životního prostředí odlišných regionech (Teplíce / Prachatice) v době od narození průměrně do 10 let života. Jelikož nebylo umožněno srovnání sekvence pocházející ze stejných tkání, poskytlo nám to příležitost sledovat variabilitu mezi odlišnými tkáněmi.

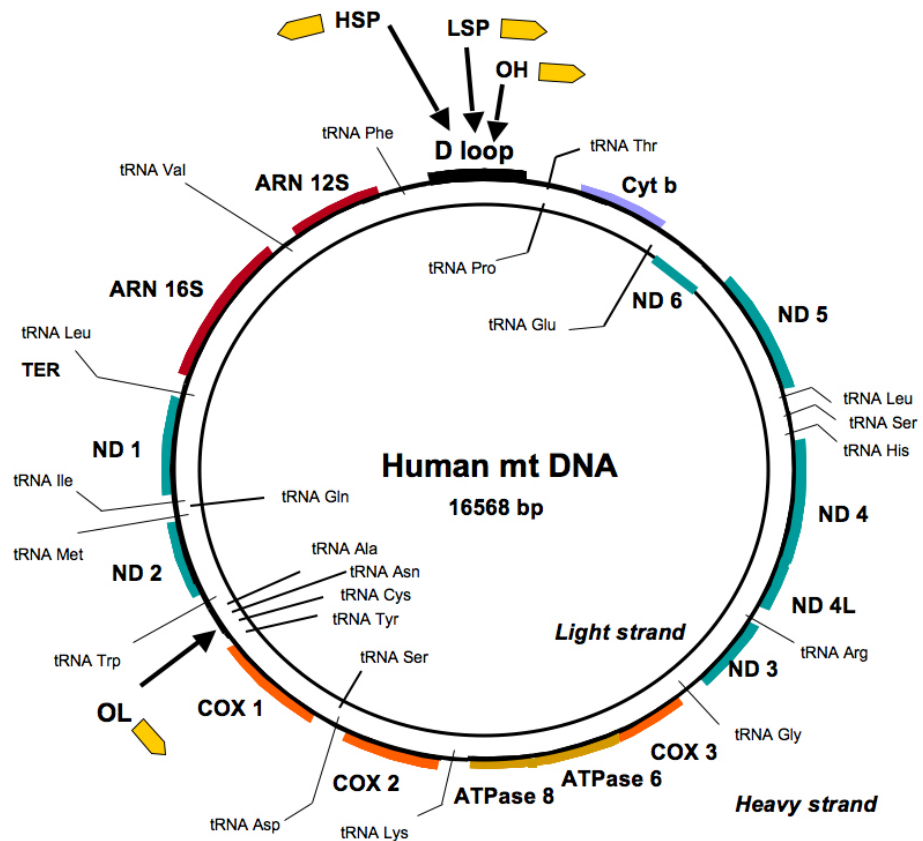
1.1. Mitochondriální genom

Mitochondrie jsou organely vyskytující se v cytoplazmě eukaryotních buněk. Jejich hlavním úkolem je produkovat energii ve formě ATP, k čemuž jim slouží proces oxidační fosforylace. Pro buňku se tak stávají nepostradatelnými, protože tvoří její základní energetický zdroj. V buňkách se mitochondrie nachází velice hojně, jejich počet se v jednotlivých tkáních liší, záleží na energetických požadavcích dané tkáně či orgánu. Nejvíce mitochondrií se nachází ve svalových buňkách, v neuronech a v jaterní tkáni (Alberts et al., 1998; Scheffler, 2000).

Převážná většina (asi 99 %) genetického materiálu organismu se nachází v jádře buňky ve formě jaderné DNA. První doklad o možnosti, že mitochondrie mají svou vlastní DNA pochází z roku 1949. Brzy poté se jí podařilo již úspěšně izolovat. Mitochondrie jsou jedinou organelou v savčích buňkách, která obsahuje vlastní DNA mimo jádro (mtDNA). Přestože většina proteinů účastníci se dějů v mitochondriích je kódována jadernou DNA, translatována v cytoplazmě a poté transportována do mitochondrií, 13 proteinů je kódováno v mitochondriální DNA a syntetizováno vlastním aparátem na speciálních mitochondriálních ribozomech. Mitochondrie jsou tedy řízeny jak samy sebou, tak jádrem, podléhají duální genetické kontrole, a proto jsou nazývány semiautonomními organelami (Anderson et al., 1981; Taanman, 1999).

1.1.1. Struktura mtDNA

Mitochondriální DNA je kruhová, dvouřetězcová molekula o délce 16 569 bp. Lze u ní rozlišit těžký řetězec (H) a lehký řetězec (L), které se mezi sebou liší v zastoupení G a T bází. V mitochondriální DNA je kódováno 13 polypeptidů, které jsou zapojeny v OXPHOS, 2 rRNA (16S a 12S) a 22 tRNA, což je dostatečný počet nezbytný pro translaci proteinů kódovaných v mtDNA. V dýchacím řetězci kóduje mtDNA sedm podjednotek komplexu I (NADH oxidoreduktáza), tři podjednotky komplexu IV (cytochrom c oxidáza), dvě podjednotky komplexu V (ATP syntáza) a podjednotku cytochromu b (Alberts et al., 1998). Struktura mtDNA je názorně uvedena na obrázku 1.1.



Obr. 1.1. Struktura mitochondriálního genomu. MtDNA kóduje 22 tRNA, 12S a 16S rRNA a 13 polypeptidů (ND 1-6: podjednotky NADH dehydrogenázy; COX 1-3: podjednotky cytochrom c oxidázy; ATP 6, ATP 8: podjednotky ATP syntázy; Cyt b: cytochrom b). D-loop obsahuje HSP (promotor pro transkripci těžkého řetězce), LSP (promotor pro transkripci lehkého řetězce) a OH (počátek replikace těžkého řetězce). OL (počátek replikace lehkého řetězce) neleží v kontrolním regionu (převzato z Bellance at al., 2009).

Anderson et al. v roce 1981 publikovali kompletní sekvenci lidské mitochondriální DNA, dnes známou jako „Cambridge reference sequence“ (CRS), a přestože byla později v několika málo pozicích zrevidována, zůstává objevení sekvence a organizovanosti lidské mitochondriální DNA jedním z nejdůležitějších zlomů ve studiu lidského genomu (Andrews et al., 1999). Anderson et al. nejen popsali sekvenci mtDNA, ale také poukázali na odlišnost mitochondriálního genetického kódu od univerzálního genetického kódu. Tyto odlišnosti jsou uvedeny v tabulce 1.1.

Tab. 1.1. Odlišnosti mitochondriálního genetického kódu od univerzálního

Kodon	Mitochondriální genetický kód	Univerzální genetický kód
UGA	Trp	Stop
AUA	Met	Ile
AGA	Stop	Arg
AGG	Stop	Arg
AUU	Met	Ile

Převážná část molekuly mitochondriálního genomu je tvořena kódující oblastí, mtDNA tedy neobsahuje žádné introny. Přibližně 7 % molekuly pokrývá tzv. d-loop, což je nejrozsáhlejší souvislý nekódující úsek molekuly. D-loop vykazuje zvláštní trojvláknovou strukturu molekuly, kdy těžký řetězec je vytlačen úsekem komplementárním k lehkému řetězci, který formuje kličku (Anderson et al., 1981; Taanman, 1999).

1.1.2. D-loop

V roce 1981 primární sekvenování mitochondriálního genomu odhalilo nejen kódující část molekuly, ale přes vysokou úspornost a velmi těsné přiléhání genů i úsek, jemuž nebylo možno přiřadit žádnou kódující funkci (Anderson et al., 1981). Tento úsek se nazývá d-loop dle struktury pozorovatelné elektronovým mikroskopem. Tato nekódující část molekuly, rozhodně však není zbytečná, jak by se možná na první pohled mohlo zdát. Obsahuje totiž promotory pro transkripci obou řetězců (HSP, LSP) a počátek replikace těžkého řetězce. Představuje tak regulační neboli kontrolní oblast mitochondriálního genomu (obr. 1.1.) (Anderson et al., 1981; Taanman, 1999).

Regulační úsek mtDNA je asi 1125 bp dlouhý a je lokalizován mezi geny, které kódují tRNA pro prolin a phenylalanin (tRNA^{pro} a tRNA^{phe}). Tento úsek genomu obsahuje hypervariabilní oblast 1 (HVRI) a hypervariabilní oblast 2 (HVRII). Někteří rozlišují i nejkratší hypervariabilní oblast 3 (HVRIII) (Lutz et al., 2000). Vzhledem k tomu, že mezi HVRI a HVRII dle referenční sekvence (CRS) leží počátek číslování bází genomu, který zároveň odpovídá prvnímu nukleotidu replikačního počátku těžkého řetězce, leží d-loop

mezi nukleotidy 16 024 a 16 569 a dále pokračuje z pozice 1 do pozice 576, která leží v těsné blízkosti genu pro tRNA^{phe} (Anderson et al., 1981).

Kontrolní region vykazuje mnohem vyšší variabilitu než zbytek molekuly mtDNA. Již zmíněné úseky HVRI a HVRII jsou považovány za tzv. mutační hot-spots, mutace v nich totiž vznikají s daleko vyšší frekvencí (Stoneking, 2000). Bendall et al. (1996) pozorovali lišící se stupeň heteroplasmie dokonce i v jednotlivých vlasových kořínkách téhož jedince. Výskyt určitého haplotypu se pohybovala od 9 % do 99 %.

1.1.2.1. Hypervariabilní region I

HVRI je lokalizován mezi nukleotidy 16 024 a 16 383. Celá sekvence je uvedena v tabulce 1.2. Na lehkém řetězci mezi nukleotidy 16 184 a 16 193 obsahuje homopolymerní trakt cytosinů, který je dle CRS v pozici 16 189 přerušen jedinou bází a to thyminem (ACCCCCTCCCCAT) (Anderson et al., 1981). V populaci se občas vyskytne varianta nesoucí transici T16189C, díky níž dojde k nahrazení thyminu za další cytosin a vzniká tak nepřerušovaný homopolymerní C-trakt. Přímé sekvenování jedinců nesoucích tuto variantu produkuje za C-traktem charakteristicky rozmazané sekvence. Chceme-li přečíst sekvenci za tímto místem, musíme použít reverzní sekvenování. Tento jev je nejspíš způsoben vysokým stupněm délkové heteroplasmie v homopolymerním C-traktu. Vznik této varianty je připisán sklouznutí DNA polymerázy při replikaci (Bendall & Sykes, 1995) a počet cytosinů v ní se v populaci pohybuje v rozmezí 8-14 (Marchington et al., 1996).

Tab. 1.2. Sekvence hypervariabilní oblasti I mtDNA (vyznačena tučně), žlutou barvou je označen homopolymerní C-trakt

Pozice	Sekvence hypervariabilní oblasti I (16024-16383)				
16001	ATTCTAATT	AAAAC TATTCT	CTGTTCTTTC	ATGGGGAAGC	AGATTTGGGT
16051	ACCACCCAAG	TATTGACTCA	CCCATCAACA	ACCGCTATGT	ATTCGTACA
16101	TTACTGCCAG	CCACCATGAA	TATTGTACGG	TACCATAAAT	ACTTGACCAC
16151	CTGTAGTACA	TAAAAACCCA	ATCCACATCA	AAA CCCCCTC	CCC ATGCTTA
16201	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCCTCAACTA	TCACACATCA	ACTGCAACTC
16251	CAAAGCCACC	CCTCACCCAC	TAGGATACCA	ACAAACCTAC	CCACCCTTAA
16301	CAGTACATAG	TACATAAAGC	CATTTACCGT	ACATAGCACA	TTACAGTCAA
16351	ATCCCTTCTC	GTCCCCATGG	ATGACCCCCC	TCAGATAGGG	GTCCCTTGAC

1.1.2.2. Hypervariabilní region II

HVR II leží mezi nukleotidy 57 a 372 (tab. 1.3.). I v hypervariabilním úseku II kontrolního regionu je homopolymerní trakt cytosinů. Nachází se mezi pozicí 303 a 315 a k jeho přerušení thyminem dochází dle CRS v pozici 310 (CCCCCCTCCCC) (Anderson et al., 1981). Také zde dochází k transici T→C v nukleotidu 310, zapříčiňující tak nepřerušovaný homopolymerní C-tract. Počet cytosinů se pohybuje v rozmezí od 12 do 18. V populaci jsou rozšířené i varianty, kdy T zůstane, ale počet C před ním nebo po něm se oproti referenční sekvenci liší. Inzerce či delece jsou v tomto místě časté (Marchington et al., 1996).

Tab. 1.3. Sekvence hypervariabilní oblasti II mtDNA (vyznačena tučně), žlutou barvou je označen homopolymerní C-tract

Pozice	Sekvence hypervariabilní oblasti II (57-372)				
51	TTGGTATTTT	CGTCTGGGGG	GTATGCACGC	GATAGCATTG	CGAGACGCTG
101	GAGCCGGAGC	ACCCTATGTC	GCAGTATCTG	TCTTTGATTG	CTGCCTCATC
151	CTATTATTTA	TCGCACCTAC	GTTCAATATT	ACAGGCGAAC	ATACTACTA
201	AAGTGTGTTA	ATTAATTAAT	GCTGTAGGA	CATAATAATA	ACAATGAAT
251	GTCTGCACAG	CCACTTTCCA	CACAGACATC	ATAACAAAAA	ATTCCACCA
301	AA CCCCCCT	CCCCG GCTTC	TGGCCACAGC	ACTTAAACAC	ATCTCTGCCA
351	AACCCCAAAA	ACAAAGAACC	CTAACACCAG		

Analýza sekvenční variability d-loop je hojně využívána k nejrůznějším studiím např. pro populační a fylogenetické zkoumání lidské minulosti. Výzkum se zaměřuje nejen na současné, ale i na minulé populace pomocí analýzy mtDNA z ostatků (Sigurqardóttir et al., 2000). Dále se tento úsek využívá ve forenzním vyšetřování biologických stop. MtDNA totiž oproti jaderné poskytuje vyšetřování dvě velké výhody. V buňkách se vyskytuje ve značném počtu kopií, a tak její analýza může poskytnout výsledky i ve chvíli, kdy analýza jaderné DNA selže. To umožňuje analýzu vlasů bez kořínků, nepatrných částí epitelu a zubů (Wilson et al., 1995). Další výhodou je striktně maternální dědičnost. Dovolí nám přímé srovnání DNA sekvence stopy s DNA sekvencí příbuzných ze stejného rodokmenu, samozřejmě z mateřské linie (Giles et al., 1980). Neutrální záměny, které se

projevují jako bodový polymorfismus (oproti CRS), se nijak fenotypově neprojevují, zato mají výpovědní hodnotu při studiu příbuznosti.

V rámci této práce bylo též využito sekvenování jednoho z hypervariabilních lokusů v kontrolní oblasti, a to konkrétně HVRII, ke stanovení případných rozdílů mezi sekvencí pupečnickové krve matek a sekvencí ze slin jejich potomků po uplynutí průměrně 10 let od narození.

1.2. MtDNA v časně ontogenezi

Každý zralý oocyt v sobě skrývá více než 100 000 mitochondrií a každá mitochondrie několik molekul mtDNA (Lightowers et al., 1997). Buňky jsou během oogeneze metabolicky neaktivní a to společně s efektem hrdla láhve vede k homoplasmii jedince (Cummins, 2001). Ve spermii je počet mitochondrií mnohem nižší než ve vajíčku. Udává se, že spermie během fertilizace nese 50 až 100 mitochondrií, které se nachází ve střední části bičíku, tzv. krčku (Sutovsky et al., 2000). Na rozdíl od mitochondrií ve vajíčku jsou metabolicky aktivní a výsledná energie je pak zužitkována pro pohyb spermie (Alberts et al., 1998). Chybná koncepce zastávající fakt, že paternální mitochondrie do oocytu nevstupují, byla vyvrácena, když byly detekovány molekuly paternální mtDNA u časných embryí ještě před implantací (St. John et al., 2000). Dnes je již známo, že spermie obohacuje oocyt nejen jadernou, ale i mitochondriální genetickou informací. Tyto otcovské mitochondrie ve vajíčku přežívají pouze pár hodin, záhy po fertilizaci jsou ubiquitinací označeny a následně proteolyticky eliminovány (Ankel-Simons & Cummins, 1996). Tento destruktivní mechanismus je druhově specifický. U mezidruhového křížení by se tedy mohly i paternální mtDNA podílet na složení genetické informace potomstva (Sutovsky et al., 2000).

1.2.1. Maternální původ mtDNA

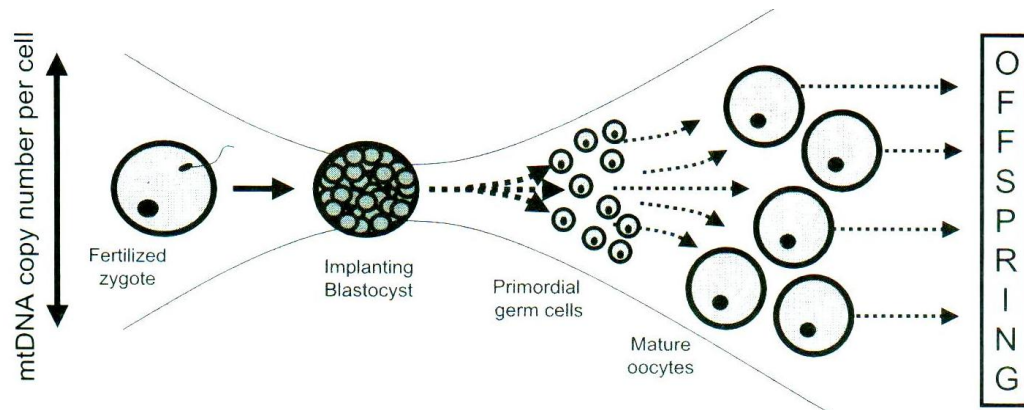
S tradičním pohledem, že mtDNA je děděna výhradně po mateřské linii, který potvrdili Giles et al. (1980) na základě polymorfismu délky restričních fragmentů, kdy potomstvo vždy vykazovalo shodný vzor s maternálním, zatřásla v roce 2002 publikace s případem pacienta trpícího svalovou dystrofií, jehož kosterní svalstvo vykazovalo 90 % mitochondrií paternálního původu (Schwartz & Vissing, 2002). Tato relativně nedávno publikovaná studie potvrzuje, že může docházet k pronikání paternálních mitochondriálních DNA. Otcovské mitochondrie mohou uniknout destruktivnímu mechanismu v oocyту a podílet se na složení mtDNA potomstva. Nicméně po mnoho let bylo studováno velké množství rodin po celém světě s defekty v mtDNA a žádný další obdobný případ paternálního přenosu popsán nebyl, zatím se tedy zdá, že prezentovaný případ bude spíše vzácným jevem. S objevením pacienta obsahujícího v kosterním svalstvu paternální mtDNA vyvstala otázka, zda by mohlo docházet k rekombinaci mezi různými

mitochondriálními DNA. Kravtsov et al. (2003) přišli s důkazy, které podporují předpoklad, že maternální a paternální mtDNA si jsou schopny mezi sebou vyměňovat lokusy. Údajně našli 33 hybridních molekul mtDNA, které se skládaly ze střídajících se paternálních a maternálních segmentů, ale jimi použité metody jsou náchylné k produkci artefaktů, a mohou tedy poskytovat falešné výsledky (Bandelt et al., 2005). Pronikání paternální mtDNA je považováno za mimořádně vzácný jev, a dokonce i v případě, že nastane, je velmi nepravděpodobné, že by signifikantně docházelo k rekombinaci mezi mitochondriálními DNA mateřského a otcovského původu. Není tedy důvod pochybovat o ryze maternálním původu mtDNA. Kdyby ovšem další studie ukázaly, že se nejedná o tak vzácný jev, a že paternální dědičnost nastává ve více než 1 %, otázka rekombinace by musela být znovu otevřena a antropologické studie evoluce a populací založené právě na analýze mtDNA by musely být přehodnoceny (Schwartz & Vissing, 2003).

1.2.2. Mitochondriální efekt hrdla láhve

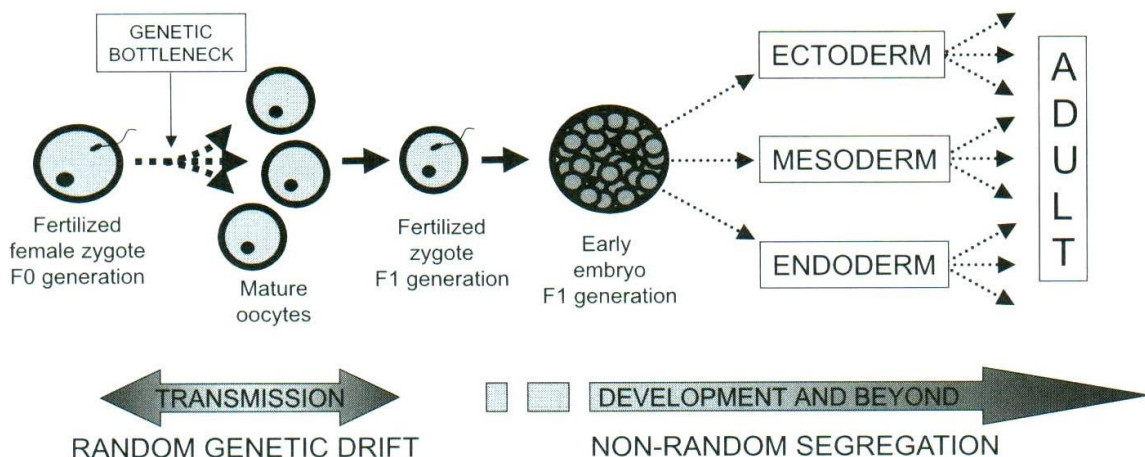
Mezigenerační změny v mitochondriálním genotypu byly nejprve pozorovány na přenosu polymorfismů mtDNA u Holsteinské krávy (Hauswirth & Laipis, 1982). Podobné výsledky byly postupně odhalovány u dalších savčích druhů. U člověka byl pozorován přenos patogenní mtDNA. Tato pozorování vedla k návrhu, že pouze malý počet molekul mtDNA bývá přenesen z mateřského organismu na potomka, za což je zodpovědný mitochondriální efekt hrdla láhve (Hauswirth & Laipis, 1982). Pro pochopení tohoto procesu bylo provedeno mnoho studií, zabývajících se přenosem neutrálních heteroplasmických mtDNA polymorfismů u myši. Měření procenta heteroplasmie v potomstvu a porovnání tohoto výsledku s vyvíjejícím se oocytem ukázalo, že změna v heteroplasmii mezi matkou a potomky byla determinována náhodným genetickým driftem během časného stádia oogeneze ještě před utvářením primárního oocytu (Jenuth et al., 1996). Snížení množství mitochondriálních genomů na efektivní počet nastává tedy během časně embryogeneze ve vyvíjející se mateřské zárodeční linii a generuje variabilitu, kterou můžeme sledovat mezi matkou a potomstvem (obr. 1.2.). Tato variabilita je tedy přítomná v primárním oocytu, který se stane mateřskou buňkou další generace. Různí autoři se pokoušeli určit mechanismy stojící v pozadí efektu hrdla láhve. Někteří použili adaptovanou populaci, jiní svůj model založili na pravděpodobnostní dedukci z pozorování mezigeneračních rozdílů (Bendall et al., 1996). Zatímco tyto modely umožňují

předpovědět chování efektu ve specifických rodokmenech, nemohou odrážet základní biologické procesy. Navíc není známo, zda je tento děj výsledkem fyzické redukce počtu mitochondriálních genomů uvnitř vyvíjejících se zárodečných buněk, redukce efektivní velikosti populace, nebo upřednostňování amplifikace specifických genotypů (Bandelt et al., 2006).



Obr. 1.2. Mitochondriální genetický efekt hrdla láhve. Redukce počtu mitochondriálních genomů na efektivní počet nastává během časné embryogeneze ve vývoji mateřské zárodečné linie. Tento proces generuje variabilitu sledovanou mezi potomstvem a matkou (převzato z Bandelt et al., 2006).

Efekt hrdla láhve během časné oogeneze vede k náhodnému genetickému driftu, nenáhodná segregace nastává až po fertilizaci a je ovlivněna řadou faktorů. Náhodným genetickým driftem dojde ke ztrátě většiny nových a dále značně škodlivých mutací. Naopak mutace, které jsou jen slabě patogenní, výhodné nebo neutrální, se budou podílet na mtDNA následujících generací.



Obr. 1.3. Faktory ovlivňující stupeň heteroplasmie, který se může měnit během ontogeneze. Přenos mtDNA je ovlivněn efektem zúženého hrdla láhve, který vede k náhodnému genetickému driftu. Nenáhodná segregace nastává po fertilizaci a je ovlivněna řadou faktorů (převzato z Bandelt et al., 2006).

1.2.3. Segregace během časného vývoje

Ačkoli maternální přenos mtDNA se zdá být řízen náhodným genetickým driftem, tkáňová segregace mutantní mtDNA již náhodná není (obr. 1.3.). Tato tkáňová segregace nastává po fertilizaci a může být ovlivněna řadou faktorů: vlivem mutace na fenotyp, odlišností replikačních rychlostí mtDNA mezi různými genotypy, odlišností v degradační rychlosti mtDNA různých genotypů, jadernými geny ovlivňujícími mtDNA. Detailní vyšetřování ukázalo, že tkáňově specifická segregace není způsobena defekty dýchacího řetězce ani různou rychlostí buněčného dělení nebo replikace mtDNA. Zdá se, že stupeň heteroplasmie je nějakým způsobem regulován na úrovni jednotlivých molekul mtDNA. Je dokonce možné, že jej mohou ovlivňovat jaderné genetické faktory, které mohou hrát důležitou roli v klinické manifestaci mitochondriálních nemocí. Mohly by tak mít vliv na přenos defektů způsobených heteroplasmickou mtDNA (Bandelt et al., 2006).

1.2.4. Heteroplasmie

Vznikne-li v mtDNA mutace, je zřejmé, že se nebude hned vyskytovat ve všech buňkách organismu, dokonce ani ve všech mitochondriích jedné buňky. Pokud se jí podaří rozšířit, jedinci obsahující tuto mutovanou mtDNA (převážně delece a bodové mutace) obvykle nesou uvnitř buňky směs mutované a normální mtDNA, tento stav se nazývá heteroplasmie. Heteroplasmie se může vyskytovat na úrovni jedné mitochondrie, buňky, tkáně či celého jedince. Pokud je jedinec heteroplasmický ve všech zkoumaných tkáních, patrně se jedná o heteroplasmii zděděnou. Naopak pokud je zasažena jen část buněk, zřejmě půjde o heteroplasmii způsobenou somatickou mutací (Calloway et al., 2000).

Zpočátku byla heteroplasmie spojována převážně s nemocemi způsobenými defekty v mtDNA, nejčastěji s chronickým degenerativním onemocněním (Jazin et al., 1996). S přibývajícemi studii se však zdá, že heteroplasmie není tak vzácná, jak se předpokládalo, a je naopak obsažena i ve zdravých jedincích (Comas et al., 2008; Lightowlers et al., 1997). Častěji je detekována v hypervariabilních regionech HVRI, HVRII a HVRIII uvnitř regulační oblasti mitochondriálního genomu (Bendall & Sykes, 1995; Bendall et al., 1996; Marchington et al., 1996; Lutz et al., 2000).

In vitro studie ukazují, že k defektům mitochondriálního dýchacího řetězce dochází tehdy, překročí-li hladina heteroplasmie (= poměr mezi mutovanými a nemutovanými kopiemi mtDNA) určitou kritickou prahovou hodnotu (Attardi et al., 1995). Tato hladina heteroplasmie se může lišit mezi různými orgány a dokonce i mezi blízce sousedícími buňkami. Tyto rozdíly jsou částečně způsobeny odlišným přerozdělováním mitochondriálních genomů mezi dceřinými buňkami během buněčného dělení. Tento děj (vegetativní segregace) může tedy vést ke změně heteroplasmie v proliferující tkáni (Lightowlers et al., 1997).

Nicméně hladina heteroplasmie se během života může měnit i v nedělicí se (postmitotické) tkáni, jako jsou neurony a svaly (Bierley et al., 1998). Tento jev může vysvětlovat pozdní nástup a pozvolný průběh některých mitochondriálních onemocnění (Wallace et al., 1995).

Každý savčí mitochondrion obsahuje 2-10 kopií mitochondriálního genomu. Vzhledem k tomu, že tyto orgány jsou v buňce zastoupeny velice hojně, se výsledný počet kopií mtDNA na jednu buňku pohybuje v rozmezí 10^3 - 10^4 (Holland & Parsons, 1999; Legros et al., 2004). Množství mtDNA na jednu buňku se liší v jednotlivých typech

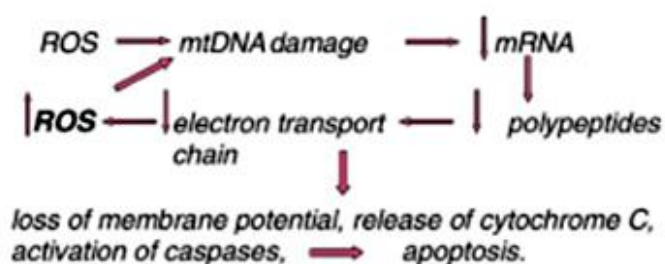
tkáně, závisí hlavně na energetických požadavcích daného orgánu. Navzdory vysokému počtu kopií genomu, je rekombinace mezi molekulami mtDNA velmi vzácná a každá molekula je replikována samostatně. Na rozdíl od jaderného genomu, který je replikován vždy pouze jednou během každého buněčného cyklu, je mitochondriální DNA degradována a replikována neustále, dokonce i v nedělicích se tkáních. Tedy i přesto, že jednotlivé molekuly mtDNA se replikují náhodně, je uvnitř buňky neustále udržován relativně stejný počet molekul genomu.

Vyskytují-li se v buňce dva nebo více typů mtDNA, může se stát, že jeden typ se bude replikovat častěji než typ druhý, což bude vést ke změně hladiny heteroplasmie uvnitř buňky. Tento děj se nazývá náhodný vnitrobuněčný genetický drift. Patrně hlavně tento mechanismus bývá odpovědný za změny v heteroplasmii v postmitotické tkáni, jako jsou neurony a svaly (Chinnery & Samuels, 1999; Brierley et al., 1998). Díky němu je možné předejít nahromadění škodlivých somatických mutací, které se během náhodného vnitrobuněčného driftu ztratí. Nicméně stejně tak může vést ke zvýšení hladiny somatických mutací uvnitř jednotlivých buněk (Elson et al., 2001). Nahromadění těchto mutací během ontogeneze a získaná deficeience mitochondriálního dýchacího řetězce může přispívat k stárnutí lidského organismu (Bierley et al., 1998).

1.3. Mitochondriální genom během stárnutí

Mitochondrie jsou hlavními dodavateli buněčné energie. Generují ATP během procesu oxidativní fosforylace (OXPHOS). Mitochondriální dýchací řetězec je také hlavním zdrojem kyslíkových radikálů (ROS), které vznikají jako vedlejší produkt OXPHOS. Bylo navrženo, že zvyšující se produkce ROS a snížená funkce mitochondrií jsou kauzálními faktory v procesu stárnutí (Murdock et al., 2000).

Mezi četnými teoriemi snažícími se objasnit proces stárnutí, získala mitochondriální teorie velkou pozornost. Stárnutí může být definováno jako multifaktoriální jev časově závislého poklesu fyziologických funkcí, asociovaného s nahromaděním defektů v metabolických drahách (Alexeyev et al., 2004). Mitochondriální teorie stárnutí navrhuje, že postupné nahromadění somatických mutací v mtDNA během lidského života vede k poklesu bioenergetických funkcí mitochondrií. Za normálních fyziologických podmínek je ROS produkován během dýchacího řetězce ve velmi malé míře. Oxidativní poškození mtDNA pomocí ROS může vést k přerušení řetězce DNA a k somatické mutaci. Kumulace těchto mutací může vyústit v dysfunkci dýchacího řetězce, která vede k zvýšení produkce ROS a následnému nahromadění většího počtu mutací v mitochondriálním genomu. Tento tzv. „začarovaný kruh“ (Obr. 1.4.) byl navržen k objasnění zvyšujícího se oxidativního poškození během života, vedoucího k poklesu buněčných a tkáňových funkcí a ke zvýšení náchylnosti k apoptóze (Wei, 1992).



Obr. 1.4. Cyklus poškození mtDNA. Jelikož mtDNA kóduje polypeptidy zapojené v elektronovém transportu nebo v ATP produkci, poškození mitochondriální DNA vede k sníženému množství mRNA a k poklesu syntézy mitochondriálních proteinů. Ztráta těchto proteinů vede k inhibici elektronového transportu, produkci ROS a k vyššímu poškození mtDNA (převzato z Mandavilli et al., 2002).

1.3.1. Elektronový transportní řetězec v mitochondriích

Mitochondriální elektronový transportní řetězec (ETC) hraje důležitou roli v produkci energie v aerobním organismu (obr. 11.1.). Elektrony z nikotinamid-adenin-dinukleotidu (NADH) a flavin-adenin-dinukleotidu (FADH₂), produkované během citrátového cyklu, jsou přenášeny po sérii akceptorů uspořádaných v dýchacím řetězci, kde vzniká protonový gradient, který je dále využit k produkci ATP. Konečným akceptorem elektronů je elementární kyslík. Spolu s protonem vodíku dávají vznik molekule vody ($4 \text{ H}^+ + \text{O}_2 + 4 \text{ e}^- \rightarrow 2 \text{ H}_2\text{O}$).

Elektronový transportní řetězec je lokalizován na vnitřní membráně mitochondrií a je tvořen pěti enzymatickými komplexy zakotvenými v této membráně. Tvoří je NADH oxidoreduktáza (komplex I), sukcinát oxidoreduktáza (komplex II), cytochrom c reduktáza (komplex III), cytochrom c oxidáza (komplex IV) a ATP syntáza (komplex V), jak je znázorněno na obrázku 11.1. (viz Přílohy). Komplexy I, III a IV čerpají protony skrz vnitřní membránu do cytoplazmy, kde vytváří protonový gradient, který využívá ATP syntáza k produkci ATP. ETC spotřebuje více než 90 % kyslíku, který se do buňky dostane. Přibližně 1-5 % kyslíku v mitochondriích je během normálního fyziologického stavu převedeno na kyslíkové radikály (zahrnující peroxidové anionty, peroxid vodíku a hydroxylové radikály). Bazální rychlost produkce těchto radikálů se může změnit v patologický stav vedoucí k zvýšení oxidačního stresu (Mandavilli et al., 2002).

Zdá se, že aktivita elektronového transportu dýchacích enzymů i u zdravých jedinců s přibývajícím věkem pozvolna klesá. Bylo objeveno, že věkově závislý pokles membránového potenciálu mitochondrie, hlavní síly pro OXPHOS, a zvýšení unikání protonů dýchacího řetězce úzce souvisí se sníženou syntézou ATP v tkáních starších jedinců, což vede k vyšší produkci ROS (Lesnefsky & Hoppel, 2006).

1.3.2. Úloha ROS v procesu stárnutí

Během evolučního procesu se v buňce vyvinula celá řada antioxidačních enzymů, které si za fyziologických podmínek snadno poradí s kyslíkovými radikály produkovanými aerobním metabolismem. Tyto enzymy zahrnují mangan-superoxid dismutázu (MnSOD), měď/zinek-superoxid dismutázu (Cu/ZnSOD), katalázy (CAT), glutathionperoxidázu (GPx) a glutathionreduktázu (GR).

MnSOD a Cu/ZnSOD přeměňují superoxidové anionty na peroxid vodíku, který je dále pomocí GPx nebo CAT transformován na vodu. Glutathion (GSH) chrání sulfhydroxylové skupiny proteinů. Oxidovaný glutathion vzniká činností GPx a je redukován na GSH pomocí GR. Tyto antioxidační enzymy a proteiny mohou disponovat kyslíkovými radikály. Nicméně nadměrná produkce ROS může přemoci antioxidační obranný systém a způsobit oxidační poškození. Kromě toho, nárůst produkce ROS s přibývajícím věkem a oxidační stres mohou být vyvolány sníženou kapacitou vnitrobuněčných antioxidantů během stárnutí (Beckman & Ames, 1998).

Důkazy podporující důležitou roli ROS na mitochondriální funkce a stárnutí předložily studie octomilky a jiných živočichů, kteří vždy nesli defekt v některém antioxidačním enzymu. U octomilky, která nesla homozygotní mutaci v genech buď pro Cu/ZnSOD nebo pro CAT, se ukázala zvýšená citlivost k oxidačnímu stresu, snížená životaschopnost organismu a kratší délka života. Jelikož primární příčinou oxidačního stresu v buňkách je mitochondriální produkce peroxidových aniontů, MnSOD (jediný známý likvidátor peroxidových aniontů) hraje klíčovou roli v matrix v první linii obrany mitochondrie a tedy i mtDNA (We & Lee, 2002).

Myši nesoucí defekt v MnSOD vykazovaly neonatální letalitu asociovanou s kardiomyopatií a nahromaděním značného množství tuku v játrech, také nesly několik mitochondriálních dysfunkcí (Melov et al., 1999). Tyto a další výsledky podporují volně radikálovou teorii stárnutí a posilují představy, že mitochondriální produkce kyslíkových radikálů a nahromadění oxidačního poškození mohou být důležitými limitujícími faktory ve vymezení životaschopnosti organismu.

1.3.3. Produkce ROS a oxidační poškození

Přibližně 1-5 % kyslíku spotřebovaného mitochondrií je v lidských buňkách převedeno na ROS. Většina vnitrobuněčného ROS je vytvořena jako vedlejší produkt oxidačně-redukčních reakcí v dýchacím řetězci.

Za normálních fyziologických podmínek jsou ROS a organické volné radikály produkovány a udržovány v relativně vysoce ustáleném stavu. Enzymy komplexu I (NADH dehydrogenáza) a komplexu III (cytochrom c reductáza) jsou hlavními místy v mitochondriálním dýchacím řetězci, kde je ROS generován (Murphy, 2009).

Tím, že jsou mitochondrie hlavním zdrojem vnitrobuněčného ROS, jsou přímo vystaveny působení ROS. Zvyšující se produkce kyslíkových radikálů může způsobit oxidační poškození buněčných struktur, včetně nukleových kyselin, lipidů a proteinů. Oxidační poškození DNA způsobuje hlavně modifikace purinových a pyrimidinových bází, jedno nebo dvouřetězcové zlomy a vazby s jinými molekulami. Mnoho z těchto modifikací v jaderné a mitochondriální DNA přibývá s věkem jedince. MtDNA je obzvláště vnímavá na oxidační poškození. Hlavně kvůli bezprostřední blízkosti k místům vzniku ROS, absenci ochrany pomocí histonů a limitované schopnosti opravovat DNA poškození (Wallace, 1994). Tento fakt byl potvrzen nalezením vyššího počtu oxidačních modifikací v mitochondriálním genomu než v jaderném. Oxidační poškození je tedy hlavní příčinou nestability a vzniku mitochondriálních mutací plynoucí v dysfunkce dýchacího řetězce (Linnane et al., 1989; Beckman & Ames, 1998).

1.3.4. Akumulace mutací v mtDNA během stárnutí

Většina somatických mutací se začínají objevovat až po středním věku jedince a hromadí se s přibývajícím věkem v postmitotické tkáni organismu. Existuje řada typů mutací korelujících s věkem jedince, patří mezi ně bodové mutace (Michikawa et al., 1999), rozsáhlé delece, ale i tandemové duplikace (Wei et al., 1996). V tomto případě byly tandemové duplikace detekovány v d-loop mitochondriální DNA z tkáně pocházející z kosterního svalstva, kůže a varlete starších jedinců. Také vysoký stupeň bodových mutací byl nalezen s přibývajícím věkem v témže lokusu (Michikawa et al., 1999). Nahromadění poškození v mitochondriální DNA během ontogeneze je často spojováno s nejrůznějšími onemocněními v lidském organismu. Mezi často diskutovatelná patří neurodegenerativní onemocnění (Coskun, 2004) a rakovina (Alfonso et al., 2007). Několik lidských nemocí, jako například Leberova hereditární optická neuropatie (LHON), u které byla vůbec poprvé pozorována heteroplasmie, Chronická progresivní externí oftalmoplegie (CPEO), Kearns-Sayerův syndrom (KSS), je dokonce způsobeno bodovými mutacemi, přeskupeními a delecemi v mitochondriální DNA.

Mutace v mtDNA by neměly způsobit mitochondriální dysfunkce, dokud jejich množství nepřekročí kritický práh (nebo-li hladina heteroplasmie nedosáhne určité hranice). Nicméně většina studií ukazuje, že celkový podíl mutovaných mtDNA je nízký (Wei & Lee, 2002). Je však otázkou, zda pozorované a detekované mutace nejsou pouze

špičkou ledovce věkově asociovaných mutací mtDNA. Důvodem by mohlo být zaměření většiny autorů na celé tkáně spíše než na jednotlivé buňky. Mutované molekuly mtDNA tak mohou být nerovnoměrně rozprostřeny a klonálně nahromaděné v určitých buňkách, což může vést k mozaikovému charakteru deficiencie dýchacího řetězce v tkáních během stárnutí (Lee & Wei, 2007).

Ve starších jedincích byla nalezena celá řada mitochondriálních odchylek nahromaděných v průběhu ontogeneze. Michikawa et al. (1999) detekovali relativně vysoký počet bodových mutací ve specifických místech kontrolního regionu pro replikaci mtDNA. Transverze T414G byla nalezena ve vysoké míře (více než 50 %) u jedinců nad 65 let, ale chyběla u mladších. Tato transverze nastává uprostřed promotoru pro syntézu replikačního primeru pro H-řetězec a transkripci L-řetězce. Navíc s touto pozicí blízké sousedí segment s vysokou afinitou k transkripčnímu faktoru mtTFA. Dalších sedm mutací ležících v rozhodujících místech pro replikaci mtDNA bylo pozorováno u starších jedinců zejména v sekvenci, kde leží počátek replikace těžkého řetězce (O_H). Tyto mutace mohou vyvolat konformační změny, které mohou být daleko citlivější k oxidativnímu stresu.

Ačkoli výsledky různých studií soustředících se na detekci specifických mutací u starších jedinců jsou statisticky signifikantní, nebývá mezi jednotlivými pracemi vždy shoda. Chinnery et al. (2001) se též zabývali kumulací mutací v mitochondriální DNA během života. Testovali mozkovou tkáň postarších zdravých jedinců, jedinců s Alzheimerovou chorobou a pacientů trpících demencí s Lewyho tělisky. Nenalezli však žádný důkaz pro hromadění somatických mutací mtDNA v mozku zdravých jedinců, ani v nervové tkáni postižené neurodegenerativním onemocněním.

Jiná práce soustředící se pouze na nervovou tkáň pacientů s Alzheimerovou chorobou ovšem prezentovala opačné výsledky. Defekty v mitochondriální oxidační fosforylaci byly častěji asociované s tímto onemocněním a byly způsobeny zděděnými i somatickými mutacemi. Defekty mohou inhibovat ATP produkci a vést ke zvýšení produkce ROS, která může aktivovat mitochondriální PTP (protein tyroxin fosfatázy) kanál a tím buňku zničit zahájením apoptózy. Tento proces může také vést ke ztrátě synaptických propojení mezi jednotlivými neurony. Ve výše uvedené studii se v 65 % vzorcích tkáně pocházejících z mozku jedinců s Alzheimerovou chorobou vyskytovala již zmíněná transverze T414G. Ve zdravé tkáni se však nevyskytovala vůbec. Tato práce dále potvrdila závislost akumulace mutací v mitochondriální DNA na čase. Všechny mtDNA

původem z mozku pacienta trpícího Alzheimerovou chorobou vykazovaly průměrně 63 % zvýšení heteroplasmických mutací v kontrolním regionu a u pacientů starších osmdesáti let bylo toto zvýšení daleko vyšší. Dopad těchto četných heteroplasmických mutací v mozku jedinců s Alzheimerovou nemocí nalezených v důležitých místech, která regulují replikaci těžkého a transkripci lehkého řetězce, byl potvrzen nálezem: mozková tkáň trpící Alzheimerovou chorobou obsahovala zřetelnou redukci v počtu ND6 mRNA (gen lokalizovaný na L-řetězci) a v počtu kopií mtDNA v buňce. Tedy nahromadění somatických mutací v mitochondriální DNA během ontogeneze podporuje vysvětlení neurologické ztráty vedoucí k demenci asociované s pozdním nástupem Alzheimerovy choroby. Samozřejmě faktorů podílejících se na vzniku tohoto onemocnění je celá řada, je však zřejmé, že somatické mutace v mitochondriální DNA nahromaděné během života hrají důležitou roli v projevu tohoto onemocnění (Coskun et al., 2004).

2. CÍLE PRÁCE

- Stanovení rozdílů v sekvenci HVRII oblasti mitochondriálního genomu ve vzorcích pupečnickové krve a buněk dutiny ústní stejných jedinců:
 - S odstupem v průměru 10 let od narození
 - Pocházející z hlediska životního prostředí z odlišných regionů (Teplice, Prachatice)
- Prokázat vliv životního prostředí na mutagenezi mtDNA
- Popsat variabilitu HVRII oblasti v daném souboru české populace, případně mutace, které dosud nebyly popsány

2.1. Hypotézy

- **V průběhu ontogeneze dochází ke vzniku tkáňově specifické variability.**

Je známo, že během stárnutí probíhají v organizmu změny, o nichž není vždy jednoduché rozhodnout, zda jsou důsledkem nebo příčinou. Stárnutí se projevuje i na úrovni DNA. V případě jaderného genomu, o který pečují opravné procesy, je množství změn ovlivněno na jedné straně strukturou genomu samotného, na druhé straně vlivy, které na něj působí, a na třetí schopností tyto změny vracet do výchozího stavu. Z hlediska zkoumání má mitochondriální genom dvě výhody: je dobře dostupný díky jeho relativně vysokému množství a vzniklé změny se téměř neopravují. Lze proto předpokládat, že v sobě mtDNA, pokud nedojde k její ztrátě, bude uchovávat změny, které v ní během života organismu proběhly. Těchto změn bude tím více, čím bude organismus starší (Michikawa et al., 1999).

Ke vzniku těchto odchylek v sekvenci mtDNA dochází během replikace mtDNA, množení a diferenciaci buněk. Díky obrovskému počtu molekul mtDNA v lidském těle se nebude nově vzniklá odchylka hned vyskytovat ve všech buňkách těla. Pokud se jí podaří rozšířit, stane se tak nejprve v rámci dané mitochondrie, poté v rámci buňky, tkáně apod.

Ve starších jedincích již byla nalezena řada mitochondriálních odchylek nahromaděných v průběhu ontogeneze (Coskun et al., 2004; Chinnery et al., 1999; Michikawa et al., 1999; Murdock et al., 2000). Otázkou je, zda je tato tkáňově specifická variabilita detekovatelná již u mladších jedinců.

- **Celoživotní vystavení některým toxinům životního prostředí může mít vliv na akumulaci poškození v mtDNA.**

Vliv znečištěného ovzduší na zdraví člověka je velice komplexní a je nutné vliv prostředí chápat jen jako jeden z mnoha faktorů ovlivňujících zdravotní stav jedince.

Pánevní oblasti severních Čech byly koncem osmdesátých let považovány za jednu z nejvíce znečištěných oblastí Evropy. Za první signály poškození byly

označovány zvýšený výskyt alergií, imunodeficience a onemocnění dýchacích cest u dětí.

Analýzou vzorků z Teplic a Prachatic získaných v rámci rozsáhlé studie byla zjištěna zvýšená mutagenní aktivita PM10 (částice o aerodynamickém průměru 10 μm) v ovzduší. Bylo ale prokázáno, že biologicky nejaktivnější skupinou látek vázanou v ovzduší na prachové částice jsou karcinogenní polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) (Binková et al., 1999). Mezi tyto aromatické uhlovodíky patří benzo(a)antracen, benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, benzo(g,h,i)perylen, benzo(a)pyren, chrysen, dibenzo(a,h)antracen a indeno(1,2,3-cd)pyren. Bylo potvrzeno, že zvýšená koncentrace těchto látek v ovzduší přispěla k nepříznivému ovlivnění zdravotního stavu obyvatelstva (Beneš et al., 2007).

Ve výše uvedené studii bylo též prokázáno, že znečištěné ovzduší významně ovlivňuje genetický materiál. Je tedy na místě domnívat se, že expozice škodlivých látek může mít vliv na změny ve struktuře mtDNA a ovlivňovat tedy i její mutagenezi. Zvláště když je známo, že mitochondrie nevlastní tak efektivní opravný mechanismus, jaký využívá jaderná DNA. Její DNA navíc není chráněná histony, jako je tomu u nDNA. Lze tedy očekávat, že případný vliv prostředí na mutagenezi DNA se projeví u mitochondriální DNA dříve a ve větší míře.

3. MATERIÁL

Praktická část této diplomové práce byla z větší části provedena na Oddělení molekulární genetiky Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze a částečně i v laboratoři Molekulární antropologie katedry Antropologie a genetiky člověka na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Soubor vzorků byl získán v letech 1994-2007 za podpory Ministerstva životního prostředí (VaV-SL/160/05) a Ústavu experimentální medicíny AV ČR v.v.i. (AV0Z50390512).

3.1. Vzorky

Zdrojem genetického materiálu byla DNA vyizolovaná z pupečnickové krve matek a ze slin dětí. Vzorky byly získány vyšetřením 269 matek a 269 jejich dětí na základě informovaného souhlasu matek. 48 děvčat a 44 chlapců pocházelo z Prachatic a 99 děvčat a 78 chlapců z Teplic. Odběry pupečnickové krve určené k analýze mtDNA se uskutečnily v období let 1994-1998. Sliny, získané od dětí ve věku mezi 8-12 lety pomocí výplachů dutiny ústní (Rogers et al., 2007), byly odebrány v roce 2006. K ověření nálezů získaných vyšetřením mtDNA z pupečnickové krve a buněk dutiny ústní byly použity odběry periferní krve matek a periferní krve dětí odebírané paralelně s výplachy dutiny ústní (tj. roku 2006). Tyto kontrolní krevní odběry byly provedeny výběrově, tzn. jen u 20 matek a dětí (Schmuczerova et al., 2009).

3.2. Materiál

3.2.1. Chemikálie

- Etanol (P-Lab)
- EDTA (Roth)
- Ethidiumbromid (Sigma)
- NaOH (Lachema)
- NH₄Cl (Lach-Ner s.r.o.)
- NaHCO₃ (Serva)
- Tris-HCl (Roth)

- NaCl (Lachema)
- Octan sodný (Sigma)
- proteináza K (Sigma-Aldrich)
- SDS (Amresco)
- Formamid (Serva)

3.2.2. Přípravované roztoky

- 0,5M EDTA (186,1 g / 1000 ml, pomocí NaOH pH upravené na 8,0)
- Lyzační roztok č. 1
NH₄Cl (3,85 g); 1M NaHCO₃ (0,5 ml); doplněné injekční H₂O na 500ml
- Lyzační roztok č. 2
1M Tris-HCl (1 ml, pH 8,2); 4M NaCl (10 ml); 0,5M EDTA (0,4 ml, pH 8,0);
doplněné injekční H₂O na 100 ml
- 6M NaCl (35,06 g / 100 ml)
- Proteináza K (20 mg / 1 ml)
- 10 % SDS (10 g / 100 ml)
- TE roztok
10mM Tris-HCl (pH 7,5); 1mM EDTA (pH 8,0)
- 5x TBE (pH 8,0)
45mM Tris; 45mM kys. boritá; 0,5M EDTA (pH 8,0)
- Ethidiumbromid (10mg / 1 ml)
- 3M octan sodný
408,24 g CH₃COONa . 3 H₂O / 11 H₂O; ph upravené na 5,2

3.2.3. Komerčně dodávané roztoky

- PCR pufr 10x koncentrovaný s obsahem (NH₄)₂SO₄ (Fermentas)
- dNTP mix (Fermentas)
10mM dATP, 10mM dGTP, 10mM dTTP, 10mM DTP
- 25 mM MgCl₂ (Fermentas)
- Bromfenolová modř (Promega)

3.2.4. Enzymy

- Taq polymeráza LC (Fermentas)
- Gold polymeráza (Fermentas)

3.2.5. Komerční sady

- Oragene DNA purification kit (DNA genotek)
- QIAquick PCR purification kit (Qiagene)
- ABI PRISM BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

3.2.6. Další materiál

- 100 bp Ladder (Fermentas)
- Primery (Biogen)
- agaróza (Promega)

3.2.7. Nástroje

- Mikropipety P 20, P 200, P 1000 (Gilson)
- Eppendorfký o objemech 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 15 ml, 50 ml (CLP)
- Polypropylenové špičky (CLP)
- Polypropylenové špičky s filtry (CLP)

3.2.8. Použité přístroje

- horizontální elektroforetické zařízení (Sigma-Aldrich)
- mikrocentrifuga (Biosan)
- mikrovlnná trouba (Daewoo)
- PCR thermocycler (Biogen)
- pH metr (Omega)
- rotátor (Labnet)
- sekvenační přístroj ABI PRISM Analyzer 3130 (Applied Biosystems)
- stolní centrifuga (Denville Scientific inc.)
- termostat (BioTech)

- UV lampa + PC (Appligene oncor)
- Analytické váhy (Scaltec)
- Zdroj stejnosměrného proudu (BioTech)
- Vortex (Velp Scientifica)
- Laminární box (BioAir Instruments)
- Mikroobjemový spektrofotometr NANODROP (Thermo Scientific)
- Míchačka s ohřevem (Ika)
- Sterilizátor (Shoeller Instruments)
- Destilační přístroj (Millipore)

3.2.9. Software

- GeneScan 3.7 (Applied Biosystems)
- BioEdit 5.0.9
- NCSS 2007
- Statistica ver.9
- Epi Info™ ver. 3.5.1
- Nanodrop 2000 ver. 1.3.1

4. METODY

Postup práce probíhal v následujícím schématu:

1. Izolace DNA ze slin
2. Izolace DNA z pupečnickové krve
3. Polymerázová řetězová reakce HVRII oblasti
4. Analýza amplifikovaného fragmentu DNA pomocí gelové elektroforézy
5. Purifikace PCR produktů
6. Sekvenační PCR
7. Precipitace produktů sekvenační reakce
8. Analýza DNA fragmentů na kapilární elektroforéze
9. Porovnání sekvencí v BioEditu
10. Identifikační analýza STR lokusů (PowerPlex 16)
11. Opakování sekvenační reakce
12. Vyhodnocení výsledků a statistické zpracování dat

4.1. Izolace DNA ze slin

Odběr slin dětí proběhl v ordinaci za stálého dohledu pediatrů. V den odběru bylo dětem striktně zakázáno pít čaje, jelikož bylo zjištěno, že čaj obsahuje látky inhibující polymerázovou řetězovou reakci. Dále přibližně 30 minut před odběrem děti nesměly nic jíst, pít ani žvýkat žvýkačku. Odběr byl proveden do plastové nádobky Oragene obsahující 2 ml stabilizačního roztoku.

DNA ze slin byla izolovaná dle komerčně dodávaného kitu Oragene DNA purification kit (DNA Genotek). Vzorek slin v roztoku Oragene byl přes noc nejprve inkubován při 50°C v termostatu. Poté byl roztok rozdělen do čtyř 1,5 ml mikrozkušavek tak, že každá obsahovala asi 1 ml vzorku. Do každé bylo přidáno 40 µl Oragene pufru (dodávané s kitem). Převrácením zkumavek byla směs jemně promíchána. Postupně došlo k vysrážení nečistot, což bylo zjevné „zakalením“ roztoku. Dále byly vzorky 10 minut inkubovány na ledu a poté 3 minuty centrifugovány při 15 000x g (13 000 rpm) za pokojové teploty. Pomocí centrifugace došlo k usazení nežádoucích látek na dno. Čistý supernatant byl ze všech čtyř mikrozkušavek pečlivě odpipetován do jedné 15 ml

zkumavky. Dále byly přidány 4ml 95 % etanolu, jemně promícháno a vzorky se nechaly odstát 10 minut při pokojové teplotě, dokud se všechna DNA nevysrážela. Poté byl vzorek 10 minut centrifugován při 1 100x g (3 500 rpm) za pokojové teploty. Pečlivě se odstranil veškerý etanol a peleta usazená na dně byla rozpuštěna v 500 µl TE pufru, vortexována a uskladněna v -20 °C pro další použití.

4.2. Izolace DNA z pupečnickové krve

Pupečnicková krev jedinců byla odebrána do roztoku EDTA, aby se zabránilo sražení krve. Celková DNA byla získána vysolovací metodou, která již byla dříve popsána (Miller at al., 1988). Odebraná krev (5-10 ml) byla přemístěna do 50 ml zkumavky, doplněna do objemu 35 ml čerstvě připraveným lyzačním roztokem č. 1 a nechala se 20 minut při pokojové teplotě lyzovat. Poté byla centrifugována 15 minut při 4°C 3 300x g. Supernatant nad sedimentem bílých krvinek byl odlit a opět se přidal lyzační roztok č. 1, směs byla protřepána a nechala se lyzovat. Poté byl roztok opět centrifugován při stejných podmínkách jako v předchozí lyzaci. Tento krok se opakuje tehdy, chceme-li čistší peletu buněk. Supernatant byl odlit a k peletě byly přidány 3 ml lyzačního roztoku č. 2, 25 µl proteinázy K a 200 µl 10 % SDS, krátce se vzorky protřepaly a nechaly přes noc inkubovat při 37°C. Po inkubaci byl k suspenzi přidán 1,5 ml 6M NaCl. Takto vzniklá suspenze byla přenesena do 2 ml mikrozkuvek a dána 15 minut centrifugovat při 4 °C 8 000x g. Pokud supernatant nebyl čirý, centrifugace se zopakovala. Čirý supernatant byl přepipetován do 15 ml zkumavek a přidal se 2,5 násobek ledového 96 % etanolu. DNA byla pouhým okem viditelná jako bílé vlákno. Tato DNA byla opatrně přenesena do sterilní 1,5 ml mikrozkuvky, propláchnuta v 75 % etanolu a nechala se oschnout v termostatu při 37 °C. Po usušení byla vyizolovaná DNA rozpuštěna v 250 µl TE roztoku a ponechána v termostatu do druhého dne, poté byla uskladněna při -18 °C pro další použití.

4.3. Měření čistoty a koncentrace DNA

Čistota a koncentrace izolované DNA všech vzorků byly stanoveny na spektrofotometru. Tento způsob využívá vlastnosti látek obsahujících konjugované dvojné vazby, v našem případě aromatické struktury dusíkatých bází, které specificky absorbují UV záření různých vlnových délek. Intenzitu absorpce látek, rozpuštěných v roztoku, lze měřit pomocí spektrofotometru. Jestliže se v roztoku vyskytují nukleové kyseliny, pak míra specifické absorpce odpovídá koncentraci nukleových kyselin v roztoku. Vzorek se nejprve naředí destilovanou vodou a měří při vlnových délkách 260 a 280 nm, protože nukleové kyseliny absorbují UV záření při 260 nm a bílkoviny při 280 nm. To umožní hodnotit čistotu vzorků. Pro čistou DNA se optimální hodnota poměru A₂₆₀/280 pohybuje mezi 1,8 – 2,0. Pokud je hodnota nižší než 1,8, je vzorek kontaminován proteiny. Je-li hodnota vyšší než 2,0, ve vzorku se nachází také RNA.

4.4. Polymerázová řetězová reakce PCR

PCR je základní metodou molekulární genetiky. V dnešní době je široce využívaná např. v diagnostice při analýze genetických chorob, infekčních onemocnění nebo v kriminalistice při identifikaci osob. Tato metoda napodobuje děj, který se odehrává v každé živé buňce. Jeho realizování a stanovení vhodných parametrů fungující *in vitro* bylo oceněno Nobelovou cenou.

Pomocí polymerázové řetězové reakce může být i z velmi malého množství DNA templátu (teoreticky ho může představovat i jediná molekula) selektivně vybrána konkrétní nukleotidová sekvence a v průběhu reakce, která je složena ze tří teplotních cyklů, exponenciálně amplifikována. Počáteční množství DNA o n kopiích vložené do reakce se po 30 cyklech exponenciálně namnoží na výsledný počet: $n \times 2^{30}$ kopií (Mullis et al., 1986).

4.4.1. Komponenty PCR reakce

- **DNA templát:** vyizolovaná DNA z pupečnickové krve a ze slin.
- **Primery:** krátké oligonukleotidové sekvence, které ohraničují námi vybraný úsek k amplifikaci. Z místa, kde nasedají, začíná polymeráza syntézu nového řetězce. Jelikož polymeráza nemůže začít iniciovat polymeraci sama od sebe, ale potřebuje několik navázaných nukleotidů, jsou pro ni primery nezbytné.

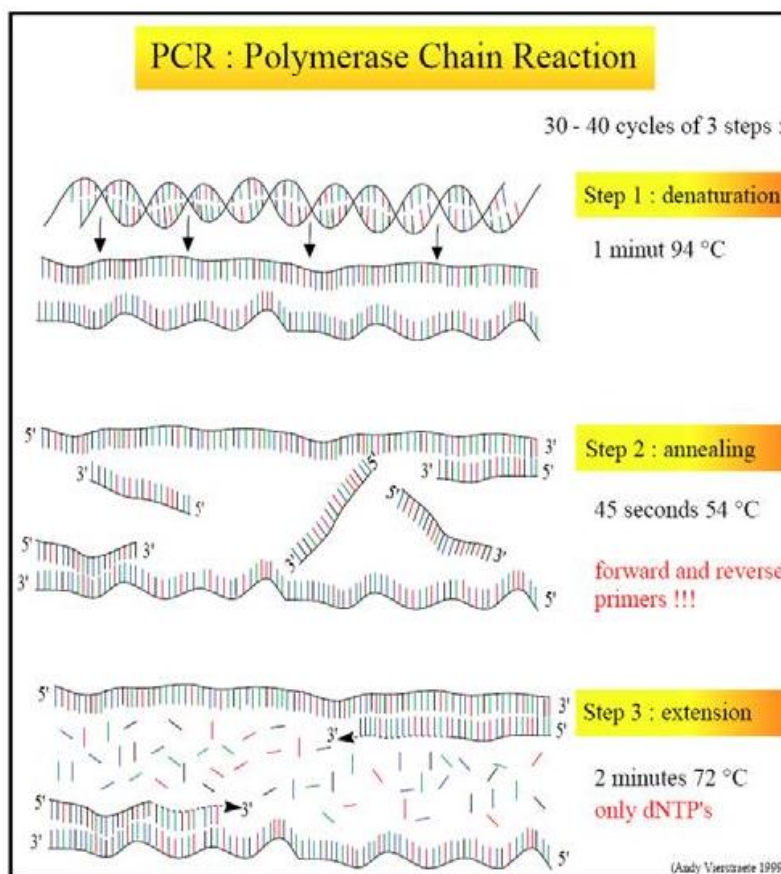
Vlastnosti primerů:

- Délka by se měla pohybovat v rozmezí 18-26 bází
- Oba primery by se v délce neměly lišit o více než 3 báze
- Nesmí být navzájem komplementární, aby nedocházelo k jejich slepování a tvorbě nežádoucích produktů
- Jejich teplota tání by se měla co nejvíce shodovat
$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$
- Obsah CG by se měl pohybovat okolo 40-60 %
- Sekvence by měla být jedinečná, aby se nevázala nespecificky

- **Deoxynukleotidtrifosfáty (dNTP):** deoxyadenozintrifosfát (dATP), deoxyguanozintrifosfát (dGTP), deoxycytozintrifosfát (dCTP) a deoxytyminozintrifosfát (dTTP). Jednotlivé nukleotidy slouží jako stavební kameny, pomocí nichž je sestaven nový řetězec. Do nového fragmentu jsou polymerázou nukleotidy řazeny dle pravidel párování (cytosin s guaninem a adenin s thyminem).
- **Pufr:** zajišťuje optimální prostředí pro Taq polymerázu
- **Mg²⁺:** hořčnaté ionty se do reakce přidávají kvůli stabilizaci dvoušroubovice DNA
- **Taq polymeráza:** replikační enzym vyizolovaný z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. V PCR se používá hlavně pro svou odolnost a aktivitu i při vysokých teplotách. Katalyzuje syntézu řetězce ve směru 3'→5'. Její hlavní nevýhodou je, že na rozdíl od jiných polymeráz nemá „proofreading“ aktivitu. Není tak schopna opravit případné chyby, které při syntéze řetězce vytvoří.

4.4.2. Princip reakce

Zahřátím dvouřetězcové DNA (dsDNA) dojde k její denaturaci, zpravidla při teplotě 92–95°C. Po snížení teploty na 45-60°C k řetězcům při hybridizují primery, které jsou v dostatečném množství přítomny v roztoku. Vzhledem k tomu, že primery jsou krátké a v nadbytku, přisednou na jednořetězcové vlákno DNA rychleji než komplementární vlákno. Teplota tohoto kroku (annealing) se liší v závislosti na délce a složení primerů. Poslední fázi cyklu je extenze, při níž dochází při teplotě 72°C, což je optimální teplota Taq polymerázy, k syntetizování nového řetězce. Dochází k začleňování volných nukleotidů do vznikajícího řetězce. Přehledné schéma principu PCR reakce je vidět na obrázku 4.1.



Obr. 4.1. Schéma průběhu PCR (<http://fme1.ifas.ufl.edu/buzz/csPCR.shtml>)

4.4.3. Amplifikace HVRII oblasti mtDNA

V rámci této diplomové práce byl pomocí PCR amplifikován HVRII region nacházející se v regulační oblasti mitochondriálního genomu v tzv. d-loop, v rozmezí 90-325 bp dle číslování referenční sekvence (Anderson et al., 1981; Andrews et al., 1999). Pro amplifikaci této oblasti byly použity primery, které tento úsek v dostatečné vzdálenosti ohraničovaly.

Sekvence primerů:

5'-GGT CTA TCA CCC TAT TAA CCA C-3' $T_m = 64^\circ\text{C}$

5'-CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC A-3' $T_m = 64^\circ\text{C}$

Množství jednotlivých složek v jedné reakční směsi pro PCR reakci:

1. dH ₂ O	12,8 μl
2. PCR pufr	2 μl
3. MgCl ₂	1,7 μl
4. dNTP	0,5 μl
5. primer přímý	0,5 μl
6. primer zpětný	0,5 μl
7. Taq polymeráza	1 μl
8. DNA templát	1 μl

Příprava:

Do 0,5 ml mikrozkušavky bylo nejprve napipetováno (dle počtu reakcí) příslušné množství dH₂O, pufru, MgCl₂, primerů, dNTP a na závěr Taq polymerázy, která byla přidávána na ledu. Takto připravený master mix byl promíchán pomocí vortexu nebo několika násobným nasátím přes pipetu. Dále byl master mix rozpipetován do jednotlivých 0,2 ml mikrozkušavek a postupně byl do každé zkumavky přidán 1 μl DNA templátu. Takto připravené mikrozkušavky byly vloženy do termocycleru, přístroje, který dokáže přesně střídat jednotlivé teplotní kroky reakce. Reakce probíhala za specifického teplotního režimu.

Teplotní režim:

1.	Iniciační denaturace	95°C	2 min
2.	Denaturace	95°C	1 min
3.	Annealing	55°C	1 min
4.	Elongace	72°C	1 min
5.	Terminační elongace	72°C	10 min
6.	Zchlazení	4°C	∞

Opakování kroků 2-4: 30x

Veškeré PCR reakce byly striktně připravovány v pre-PCR prostoru, v laminárním boxu, ve sterilních rukavicích a na ledu. DNA templát a roztok primeru byl přidáván sterilními špičkami s filtrem, aby nedošlo ke kontaminaci. S výslednými produkty bylo manipulováno pouze v prostoru post-PCR.

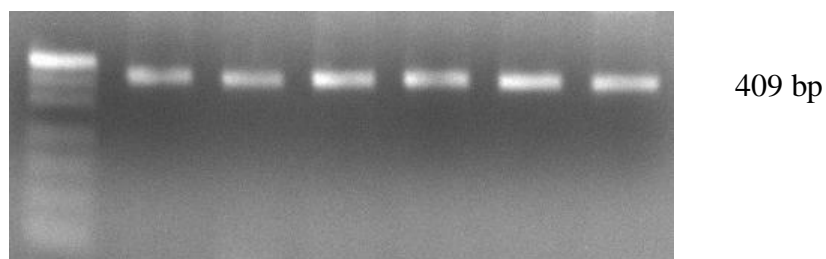
4.5. Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu

Elektroforéza je metoda, která využívá negativního náboje DNA. Tato vlastnost se zřetelně projevuje v elektrickém poli, kde molekula DNA putuje vždy k anodě. Pohyb elektronegativních molekul DNA ke kladné elektrodě vede k jejich separaci dle molekulové hmotnosti. Delší fragment DNA prochází agarózovým gelem pomaleji, naopak kratší fragment DNA postupuje snadněji. Po určitém časovém úseku jsou rozdíly v pohyblivosti různě dlouhých fragmentů patrné. V agarózovém gelu lze separovat fragmenty o velikosti 50 bp – 20 kbp. Dle velikosti separovaného fragmentu se volí koncentrace agarózového gelu (0,8 – 5,0 %).

Produktem PCR reakce prováděné v experimentální části této práce byl fragment o velikosti 409 bp, a proto byl pro jeho vizualizaci použit 2 % agarózový gel. Elektroforetickou analýzou bylo ověřeno nejen množství amplifikovaného fragmentu DNA, ale i specifita a úspěšné provedení reakce.

Gel byl připraven rozvařením agarózy v roztoku 5x TBE v požadované koncentraci (2 %). Přidáno bylo příslušné množství ethidiumbromidu (5 µg na 1 ml roztoku 5x TBE). Takto připravený roztok byl nalit do vaničky s hřebenem a ponechán asi 30 minut ve vodorovné poloze. Ztuhlý gel byl vložen do elektroforetické vany a přelit pufrům 5x TBE tak, aby hladina pufru byla několik milimetrů nad gelem. Do jamek gelu byly nanášeny

vzorky spolu s bromfenolovou modří, která pomáhá DNA lépe klesnout na dno jamky. Při každé elektroforéze byla nanесena negativní kontrola (PCR reakce bez DNA templátu) a velikostní marker (100 bp ladder) (obr. 4.2.).



Obr. 4.2. Vizualizace amplifikovaných produktů (409 bp) na 2 % agarózovém gelu; dráha 1: marker; dráhy 2-7: jednotlivé vzorky

4.6. Purifikace PCR produktů

K přečištění PCR produktů od nežádoucích primerů, nukleotidů, polymerázy a solí byl použit komerčně dodávaný kit (QIAquick PCR Purification Kit) a mikrocetrifuga (podmínky centrifugace: 13 000 rpm při pokojové teplotě). Nejprve byl produkt PCR reakce smíchán s PB pufrem, dodaném v kitu, v poměru 1: 5. Takto vzniklý roztok byl přenesen na kolonu, která se umístila do 2ml mikrozkuřavky. Následně probíhala 1 minutu centrifugace, aby došlo k navázání DNA na kolonu. Obsah mikrozkuřavky byl vylit do odpadu, kolona do ní navracena a přidalo se 750 μ l PE pufru. Opět následovala centrifugace po dobu 1 minuty. Objem prošlý kolonou byl odlit a mikrozkuřavka s kolonou opět centrifugována, aby došlo k odstranění zbylého etanolu, který byl přidán k PE pufru před začátkem manipulace s kitem. Kolona byla přenesena do čisté 1,5 ml mikrozkuřavky. K uvolnění DNA navázané na koloně bylo použito 50 μ l EB pufru a centrifugace po dobu 1 minuty.

Purifikovaná DNA byla analyzována na 2 % agarózovém gelu.

4.7. Sekvenování

Pro zjištění pořadí nukleotidů DNA existují dvě základní sekvenovací metody, Sangerova a Maxam-Gilbertova (Sanger et al., 1977; Maxam & Gilbert 1977). V rámci této práce byla pro sekvenování HVRII regionu, který jsme amplifikovali, použita Sangerova enzymatická metoda (chain termination method; dideoxy method), která je založená na terminaci syntézy nového řetězce pomocí dideoxynukleozidtrifosfátu (ddNTP). Dideoxynukleozidtrifosfáty jsou analogy klasických deoxynukleozidtrifosfátů (dNTP), kterým na 3'uhlíku deoxyribozy chybí OH skupina a proto k nim DNA polymeráza nemůže navázat další nukleotid. Když dojde k začlenění dideoxynukleotidu, syntéza řetězce se zastaví. Díky náhodnému začleňování těchto modifikovaných nukleotidů vznikne směs různě dlouhých fragmentů, které jsou dále vyhodnocovány.

Většina sekvenátorů je založena právě na modifikaci Sangerovy metody. Syntéza řetězce se prakticky shoduje s asymetrickou PCR s jedním primerem. K detekci produktů jsou používány fluorescenčně značené ddNTP. Různé fluorescenční barvy pro jednotlivé dideoxynukleotidy nám umožňují provést reakci v jedné zkumavce pro všechny nukleotidy a následnou detekci fragmentů v elektroforetickém gelu v jediné dráze. Detekce produktů probíhá na kapilární elektroforéze pomocí laserového detektoru. Výstupem je chromatogram, na kterém je každý nukleotid označen jinou barvou (Zima et al., 2004).

4.7.1. Sekvenační reakce

Pro sekvenční reakci byl použit komerčně dodávaný kit BigDye® Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit od firmy Applied Biosystems, který již obsahuje různými fluorescenčními barvami označené dideoxynukleotidy.

Před sekvenční reakcí byla změřena koncentrace DNA ve vzorcích pomocí spektrofotometru NanoDrop. Výpočet koncentrace udává počítačový program k spektrofotometru NanoDrop.

Do 0,5 ml mikrozkuvky bylo nejprve napipetováno (dle počtu reakcí) příslušné množství dH₂O, sekvenčního pufru, BigDye kitu a primeru. Takto připravený master mix (MM) byl rozpipetován do jednotlivých 0,2 ml mikrozkuvek a k MM přidán již purifikovaný produkt PCR reakce. Takto připravené zkuvky byly vloženy do termocycleru. Výsledkem sekvenační PCR je směs různě dlouhých fragmentů zakončených specifickým terminátorem.

Množství jednotlivých složek v jedné reakční směsi pro sekvenční reakci:

1.	dH ₂ O	10 µl
2.	BigDye kit	4 µl
3.	pufr	2 µl
4.	primer (20x ředěný)	1 µl
5.	Purifikovaná DNA	3 µl

Teplotní režim:

1.	Iniciační denaturace	95°C	5 min
2.	Denaturace	95°C	30 s
3.	Annealing	53°C	5 s
4.	Elongace	60°C	4 min
5.	Zchlazení	15°C	30 min

Opakování kroků 2-3: 28x

4.7.2. Precipitace produktů

Po sekvenační reakci je potřeba ze směsi odstranit nevyužité primery a fluorescenčně značené volné dideoxynukleotidy, které by rušily detekci výsledné sekvence. K purifikaci produktů sekvenční reakce existují různé způsoby, v rámci experimentální části této práce byla použita etanolová precipitace. Do čistých 0,5 ml mikrozkušavek byl přenesen celý objem sekvenační reakce a přidaly se 3 µl 3M octanu sodného (pH= 4,2), 50 µl 96 % etanolu a směs byla důkladně protřepána. Takto připravené vzorky byly uloženy na 30 minut do tmy a poté 30 minut centrifugovány při 14 000 rpm. Poté bylo přidáno 300 µl 70 % etanolu a opět probíhala centrifugace 30 minut při 14 000 rpm. Po centrifugaci byl supernatant odsán, zkumavky se nechaly volně uschnout a poté bylo přidáno 20 µl formamidu. Takto připravené vzorky se nechaly 3 minuty v termocycleru denaturovat při 96°C. Z cycleru byly vzorky okamžitě přemístěny do ledového stojánku, aby proběhl teplotní šok. Vzorky byly napipetovány do sekvenační destičky a sekvenovány na 4-kapilárním sekvenátoru (ABI PRISM Analyzer 3130). Pomocí programu GeneScan 3.7 byly výsledky převedeny do podoby barevných křivek (chromatogram), který je znázorněn na obrázku 11.2. (viz Přílohy).

Sekvence pocházející z pupečnickové krve a ze slin stejného jedince byly porovnány pomocí programu BioEdit. Byly srovnány vůči sobě navzájem a zároveň i vůči referenční sekvenci (Anderson et al., 1981; Andrews et al., 1999), (<http://www.mitomap.org/cgi-bin/tbl6gen.pl>).

4.8. Fragmentační analýza

Všechny vzorky, které se lišily v sekvenci mtDNA z pupečnickové krve a ze slin, byly podrobeny forenzní analýze STR lokusů, která se používá např. k identifikaci osob nebo k určení paternity. Důvodem této analýzy bylo potvrzení, zda tyto vzorky opravdu pochází z jediné osoby a zda nedošlo k záměně vzorků při jejich odběru.

Tato analýza je založená na amplifikaci STR (short tandem repeats) lokusů. Jedná se o krátká opakování základního motivu o délce do 10 bp, která jsou lokalizována těsně za sebou neboli v tandemu. Počet opakování může být různý, v populaci se vyskytuje mnoho alel. Tyto alely se dědí dle základních genetických principů. Každý jedinec má tedy jednu alelu původem od matky a druhou od otce. Testováním několika lokusů s tandemovými repeticemi vzniká tzv. genetický profil jedince. Čím více lokusů do analýzy zahrneme, tím se profil stává jedinečnějším.

Pro tuto analýzu jsme použili komerčně dodávaný kit Power Plex 16 od firmy Promega (power of exclusion 0,9999998), který již obsahuje vše potřebné pro vyšetření 16 polymorfismů včetně amelogeninového systému určujícího pohlaví osob, od kterých tkáň byla odebrána. Pravděpodobnost náhodné shody profilů dvou různých jedinců činí $1,83 \times 10^{-17}$. U identifikačních analýz je kladen důraz na to, aby tato hodnota byla maximálně převrácenou hodnotou počtu obyvatelstva a menší (tj. 10^{-10} a méně).

4.8.1. Princip reakce

Fragmenty DNA byly připraveny provedením PCR reakce s 16 páry primerů, které byly komplementární se sekvencemi obklopujícími dané STR lokusy a u kterých byl vždy jeden primer z každého páru fluorescenčně označen. Díky rozdílné délce jednotlivých fragmentů a použití různých fluorescenčních barev bylo možné provést analýzu všech 16 lokusů v jedné reakci. Po PCR reakci byla provedena kontrolní elektroforéza na agarozovém gelu, aby byla ověřena úspěšnost provedení reakce. Po pozitivním výsledku na gelu byl PCR produkt spolu s interním délkovým standardem (ROX) 5 minut

denaturován ve formamidu. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí kapilární elektroforézy. I k tomuto účelu byl využit sekvenátor ABI PRISM Analyzer 3130.

Složení master mixu pro Power Plex 16 (pro jednu reakci):

- | | | |
|----|-------------------|---------|
| 1. | dH ₂ O | 16,7 μl |
| 2. | Gold STR 10x pufr | 2,5 μl |
| 3. | Primery | 2,5 μl |
| 4. | Gold polymeráza | 0,8 μl |

Množství jednotlivých složek v jedné reakční směsi pro Power Plex 16:

- | | | |
|----|-------------------|---------|
| 1. | Master mix | 22,5 μl |
| 2. | DNA | 1 μl |
| 3. | dH ₂ O | 1,5 μl |

Teplotní režim PCR reakce:

- | | | | |
|----|----------------------|------|---------|
| 1. | Iniciační denaturace | 95°C | 11 min |
| | | 96°C | 1 min |
| 2. | Denaturace | 94°C | 1 min |
| 3. | Annealing | 60°C | 1 min |
| 4. | Elongace | 70°C | 1,5 min |

Opakování kroků 2-4: 10x

- | | | | |
|----|------------|------|---------|
| 5. | Denaturace | 90°C | 1 min |
| 6. | Annealing | 60°C | 1 min |
| 7. | Elongace | 70°C | 1,5 min |

Opakování kroků 5-7: 22x

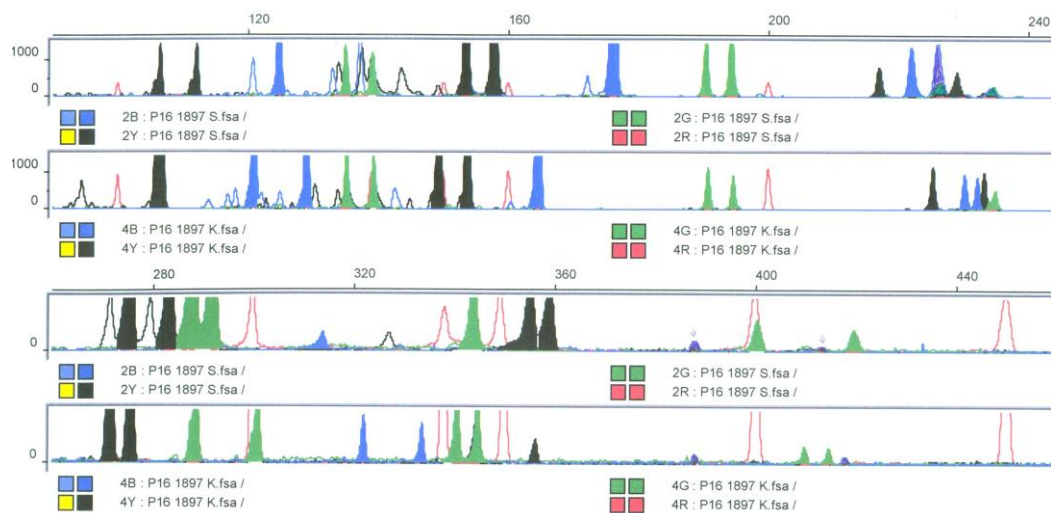
- | | | | |
|----|---------------------|------|--------|
| 8. | Terminační elongace | 60°C | 30 min |
|----|---------------------|------|--------|

Množství jednotlivých složek pro fragmentační analýzu:

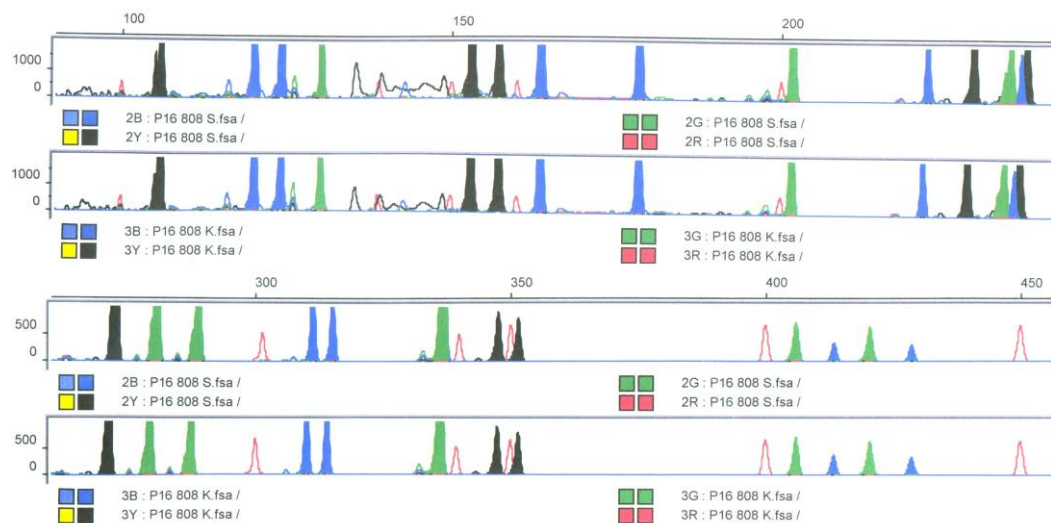
- | | | |
|----|-------------|----------------------------|
| 1. | Formamid | 12 μl |
| 2. | ROX | 1 μl |
| 3. | PCR produkt | 2-6 μl (dle výsledku gelu) |

Vzorky, u kterých se shoda identity nepotvrdila a bylo zřejmé, že pocházejí z různých jedinců, byly z databáze pro stanovení rozdílů mezi sekvencí z pupečnickové krve a ze slin vyřazeny. Tato neshoda byla v mnoha případech zjistitelná pouze z jediného lokusu a to z amelogeninového, pomocí něhož můžeme určit pohlaví. V případě chlapce byl tento lokus v heterozygotním stavu, jednalo-li se naopak o děvče, byl tento lokus homozygotní. Je tedy jasné (obr. 4.3.), že se nemohlo jednat o tkáň pocházející z téhož jedince.

U vzorků, u nichž se shoda identity potvrdila (obr. 4.4.), byla sekvence pro dvojí potvrzení pozitivního výsledku zopakována.



Obr. 4.3. Power Plex 16, neshoda vzorků



Obr. 4.4. Power Plex 16, shoda vzorků

4.9. Statistické zpracování dat

Pro statistické zpracování dat byly použity programy NCSS 2007, Statistica verze 9 a Epi Info™ Version 3.5.1.

Pro studovaný soubor byly vypočteny základní statistické charakteristiky. Pro vyjádření střední hodnoty byl použit: aritmetický průměr (\bar{x}), medián (M). Pro stanovení míry variability souboru bylo využito následujících charakteristik: směrodatná odchylka (SD), maximum (x_{\max}), minimum (x_{\min}), variační koeficient (V).

Pro studovaný soubor byla vypočtena hodnota genetické diverzity a pravděpodobnost shody haplotypů dvou náhodně vybraných vzorků.

- **Genetická diverzita (h):** byla stanovena dle vzorce: $h = (1 - \sum x^2) n / (n-1)$
 - dle Stoneking et al., 1991
 - kde **n** je počet vzorků a **x** frekvence jednotlivých haplotypů mtDNA v souboru (Tajima, 1989)
- **Pravděpodobnost shody haplotypů:** byla vypočtena dle Tajima, 1989
 - podle vzorce: $p = \sum x^2$

Výsledky rozdílů mezi studovanými regiony byly statisticky vyhodnoceny pomocí kontingenčních tabulek s použitím Fisherova exaktního testu s hladinou významnosti 0,05.

5. VÝSLEDKY

Do studovaného souboru bylo zařazeno 269 vzorků DNA pocházející z pupečnickové krve matek a 269 vzorků DNA získaných po uplynutí v průměru 10 let ze slin jejich potomků. Vyšetřovaní jedinci byli původem ze dvou odlišných regionů, z Teplic a Prachatic.

Postup při zpracování vzorků byl následující. Po úspěšné amplifikaci HVRII oblasti mitochondriální DNA vzorků z krve i ze slin byly všechny fragmenty osekvenovány oběma směry. Sekvence vzorků jednoho páru byly porovnány mezi sebou a zároveň vzhledem k referenční sekvenci pomocí softwaru Bioedit, který umožňuje srovnání jednotlivých nukleotidů studovaného fragmentu.

U všech vzorků, u nichž byly nalezeny rozdíly mezi sekvencí z pupečnickové krve a ze slin byla provedena analýza STR lokusů, aby byl potvrzen či naopak vyvrácen jednotný původ DNA z obou tkání. Vzorky, u kterých se identita nepotvrdila, byly z databáze pro určení rozdílů mezi slinami a krví vyřazeny a celkový počet vzorků, u kterých bylo možné porovnání sekvencí z obou tkání, se snížil na 245 párů. U vzorků, u nichž se shoda potvrdila, bylo sekvenování HVRII oblasti DNA ze slin zopakováno pro dvojí kontrolu pozitivního výsledku. Pokud se sekvence z druhého sekvenování neshodovala s výsledkem prvního, ale byla totožná se sekvencí z pupečnickové krve, vzorky byly považovány za shodné.

5.1. Stanovení rozdílů v sekvenci HVRII oblasti mtDNA ve vzorcích pupečnickové krve a buněk dutiny ústní stejných jedinců (s odstupem v průměru 10 let od narození)

U 5 (cca 2,04 %) párů vzorků (pupečnicková krev / sliny) byly nalezeny rozdíly v sekvenci v rámci testované oblasti HVRII (57-372), které se v převážné většině týkaly jediného nukleotidu (4/5). V jednom páru vzorků byla nalezena odlišnost ve dvou nukleotidech. Tyto výsledky jsou uvedeny v tab. 5.1.

Z hlediska typu mutace se jednalo o transiční záměny a rozdíly v počtu cytosinu vyskytující se v C-traktu (303-315) druhého hypervariabilního segmentu mezi jednotlivými sekvencemi.

Tab. 5.1. Nalezené rozdíly mezi sekvencí z pupeč. krve a ze slin

Vzorek	Pupeč. krev	Sliny
910	73A*	73G
972	73A*	73G
1025	242C*/T	242T
	309C*	309.1C
1779	309.2C	309.1C
1920	309.2C	309.1C

* referenční sekvence (CRS)

K ověření, zda je tento nález statisticky významný či nikoliv, byly použity kontingenční tabulky s využitím Fisherova exaktního testu s hladinou významnosti 0,05. Nalezené rozdíly byly porovnány s nulovou hypotézou, předpokládající, že se v souboru mezi sekvencemi mtDNA původem ze slin a z pupečnickové krve stejných jedinců nebudou vyskytovat rozdíly. Po statistickém zhodnocení je patrné, že rozdíly mezi sledovanými tkáněmi nalezené v sekvenci HVRII oblasti jsou statisticky významné ($P = 0,0306$).

V tabulce 5.1. můžeme vidět, jakých pozic se záměny týkaly a jaké nukleotidy byly zaměněny.

Ve dvou případech byla nalezena změna v pozici 73, kde došlo k záměně A za G. Vzhledem k tomu, že tato pozice je obsažena v různých haplotypech v rámci různých haploskupin, nelze vyloučit, že by u sekvence z pupečnickové krve byla určena jiná haploskupina než u sekvence ze slin pocházející ze stejného jedince.

Další transiční změna se objevila v pozici 242, kde došlo k nahrazení C za T. Jednalo se o mutaci heteroplasmickou. Buňky pupečnickové krve obsahovaly směs dvou různých

sekvencí mtDNA, kde jedna obsahovala v pozici 242 cytosin a druhá thymin. V buňkách dutiny ústní již došlo k převládnutí jedné linie a to té, která nesla ve zmiňované pozici pouze thymin.

Polovina nalezených změn mezi sekvencí z pupečnickové krve a ze slin se týkala C-traktu (303-315) hypervariabilní oblasti, který se dle referenční sekvence skládá ze 7 cytosinů, poté 1 thyminu a za ním následuje 5 cytosinů. Ve všech případech došlo ke změnám v první části cytosinů, tedy ještě před přerušením thyminem. Ve dvou vzorcích se v pupečnickové krvi v tomto místě nacházelo cytosinů ne 7, ale 9. V sekvenci pocházející ze slin jich bylo pouze 8. Došlo tedy k delecí jednoho cytosinu. V jednom vzorku došlo k opačnému jevu. V sekvenci ze slin jeden cytosin oproti sekvenci z pupečnickové krve přibyl.

5.2. Vliv životního prostředí na mutagenizi mtDNA

Dalším cílem této práce bylo porovnat vzorky s nalezenými odchylkami mezi sekvencemi původem z pupečnickové krve a ze slin s ohledem na to, z kterého regionu (Teplice / Prachatic) pocházely. Výsledek tohoto porovnání je popsán v tabulce 5.2. U 4 vzorků původem z Teplíc byly nalezeny odlišnosti (5x) mezi zkoumanými sekvencemi, což zaujímá 2,52 % ze všech vzorků z Teplíc. Pouze u 1,16 % vzorků z Prachatic byla nalezena odlišnost (1x) mezi danými sekvencemi.

Výsledky nalezených rozdílů mezi studovanými tkáněmi v různých regionech byly statisticky vyhodnoceny pomocí kontingenčních tabulek s použitím Fisherova exaktního testu s hladinou významnosti 0,05. Byly vypočteny hodnoty OR (= odds ratio) a RR (= risk ratio), které nám udávají riziko neboli pravděpodobnost výskytu daného jevu oproti druhému. Z vypočtených hodnot vyplývá (OR = 2,19), že pravděpodobnost výskytu lišících se sekvencí HVRII oblasti mtDNA mezi sledovanými tkáněmi je o něco vyšší u jedinců pocházejících z Teplíc. Nejedná se však o statisticky významný rozdíl ($P > 0,05$).

Tab. 5.2 Porovnání obou regionů (Teplice a Prachatic)

	Počet mutací	Četnost odlišných vzorků	Četnost shodných vzorků	N
Teplice	5	4 (2,52 %)	155	159
Prachatic	1	1 (1,16 %)	85	86
Σ	6	5 (2,04%)	240	245

OR = 2,19 CI (0,23-52,37*)

RR = 2,16 CI (0,79-1,94)

Pvalue (Fisherův exaktní test.) = NS

Vzorky byly dále porovnány v závislosti na regionu, z kterého pocházely, a zároveň na pohlaví (Tab. 5.3., Graf. 5.1.). Více než polovina nalezených rozdílů mezi sekvencí z pupečnickové krve a ze slin se týkala chlapců původem z Teplíc. V rámci této skupiny se změny mezi sekvencemi týkaly 4,41 % jedinců. Žádná odlišnost nebyla nalezena u děvčat pocházejících z Prachatic.

Ve většině případů (80 %) se nalezené změny mezi sekvencí pocházející ze slin a z pupečnickové krve týkaly chlapců. Mezi změněnými vzorky byl pouze jeden původem ženského pohlaví.

I tyto výsledky (tab. 5.3) byly statisticky zhodnoceny pomocí kontingenčních tabulek s použitím Fisherova exaktního testu s hladinou významnosti 0,05. Z vypočtených hodnot (OR = 4,81) vyplývá, že riziko výskytu rozdílných sekvencí HVRII oblasti mtDNA mezi sledovanými tkáněmi je více než 4x vyšší u chlapců oproti výskytu u děvčat. I přesto, že je riziko vyšší u chlapců, není statisticky významné ($P > 0,05$), což může být způsobeno slabou silou testu nebo malým počtem sledovaných jedinců.

Tab. 5.3 Porovnání rozdílů mezi oba regiony v závislosti na pohlaví

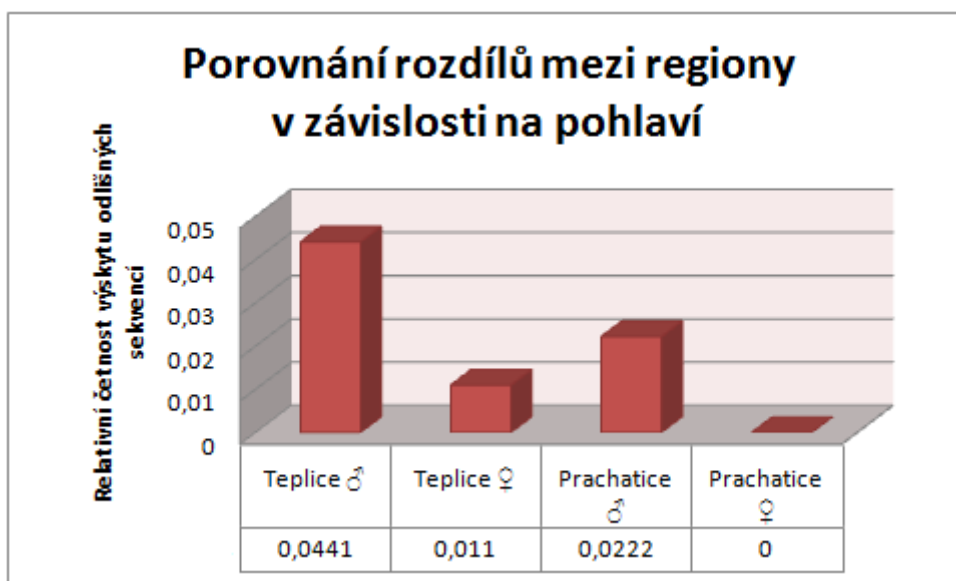
	Četnost odlišných vzorků	Četnost identických vzorků	Relativní četnost odlišných vzorků	N
Teplice ♂	3	65	4,41	68
Teplice ♀	1	90	1,10	91
Prachatice ♂	1	44	2,22	45
Prachatice ♀	0	41	0	41
Σ	5	240	2,04	245

OR = 4,81 CI (0,5-114,63*)

RR = 4,67 CI (1,11-2,79)

Pvalue (Fisherův exaktní test) = NS

Graf. 5.1 Porovnání rozdílů mezi regiony v závislosti na pohlaví



5.3. Charakteristika studovaného souboru

V tabulce 10.1. (viz. Příloha) je přehledně vidět, jaké odchylky byly nalezené od referenční sekvence (CRS), u jakých vzorků a kolik se jich v jednotlivých vzorcích nacházelo. V tabulce 10.2. (viz. Příloha) je zaznamenán charakter (transice/transverze) a výskyt identifikovaných záměn ve studovaném souboru ve vyšetřované oblasti HVRII.

Odchylky od CRS nalezené v souboru měly převážně charakter nukleotidových substitucí (= záměna nukleotidu za jiný nukleotid). Záměny v oblasti C-traktu byly hodnoceny zvlášť.

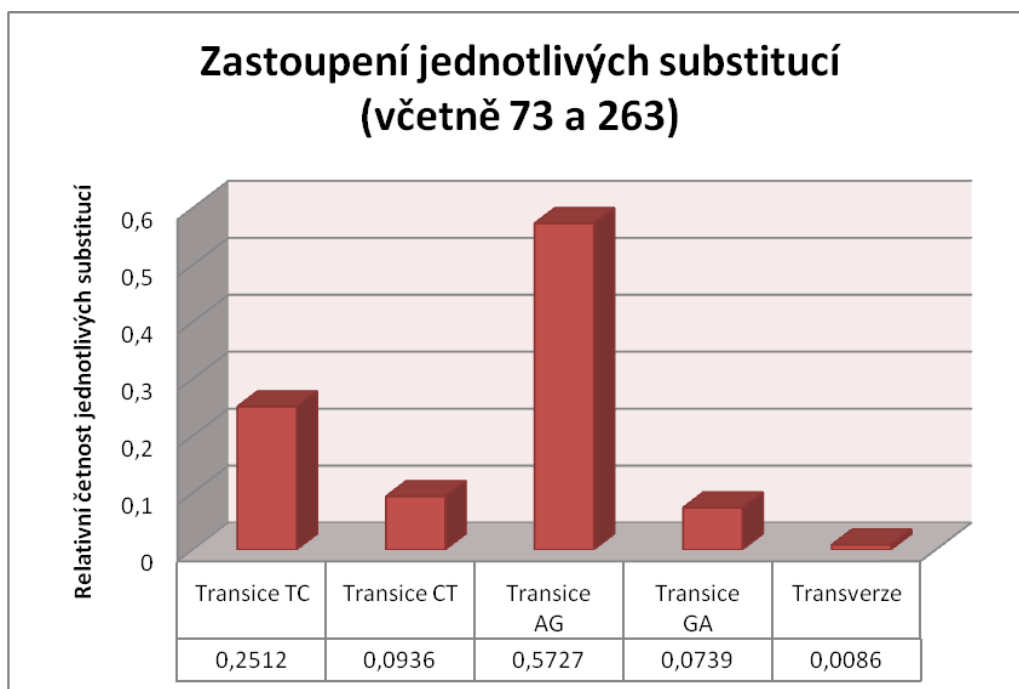
Více než polovina všech substitucí se týkala transice A→G a to v pozici 73 (20,07 %) a v pozici 263 (32,27 %). Změna v nukleotidu 263 se vyskytovala u 97,4 % vzorků a substituce v pozici 73 u 60,6 % sekvencí. Tyto výsledky se shodují s výsledky Vanecka et al. (2003), kteří detekovali změnu v pozici 263 u 92,4 % jedinců a stejnou substituci v pozici 73 v 59,1 % vzorků. To jen potvrzuje skutečnost, že tyto změny proti referenční sekvenci jsou pro českou populaci typické.

Odečteme-li z celkového počtu substitucí tyto dvě nejfrekventnější zastoupené záměny (v pozici 73 a 263), nacházely se v našem souboru častěji transice: T→C a C→T v 72,35 %. Nejvíce byla touto záměnou zasažena pozice 195, kde byl T nahrazen C v 24,9 % všech vzorků. Tento výsledek je opět shodný s prací Vanecek et al. (2003), která našla tuto záměnu ve 21,3 % svého souboru. Tyto výsledky se shodují i s pracemi jiných autorů, které popisují, že mnohem častěji podléhají substituci báze T a C než A a G. Celkový počet záměn typu transice byl v souboru v 98,2 %, což také odpovídá výsledkům těchto autorů (Cann et al., 1987; Lee et al., 1997).

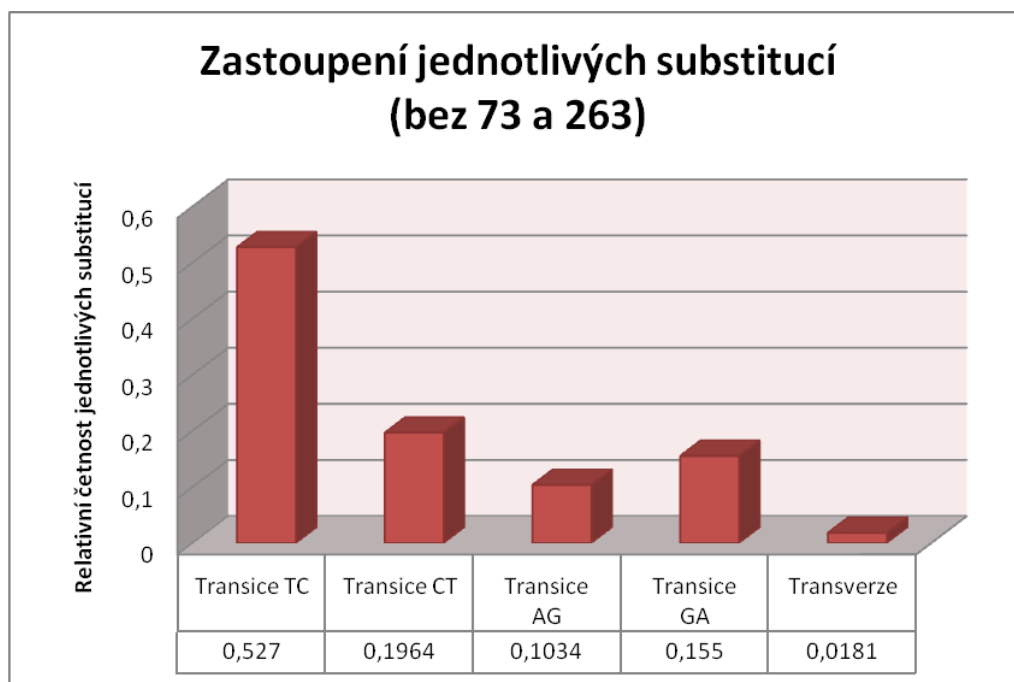
V souboru se nacházelo 7 záměn typu transverze (T→G, G→T, A→T, C→A, A→C), což je 1,81 %. Transverze se průměrně vyskytují asi v 5 % (Wakeley, 1993).

Procentuální zastoupení jednotlivých substitucí v souboru zahrnující transice v pozici 73 a 263 je znázorněno v grafu 5.2. a bez těchto záměn v grafu 5.3.

Graf. 5.2. Zastoupení jednotlivých substitucí (včetně 73 a 263)



Graf. 5.3. Zastoupení jednotlivých substitucí (bez 73 a 263)



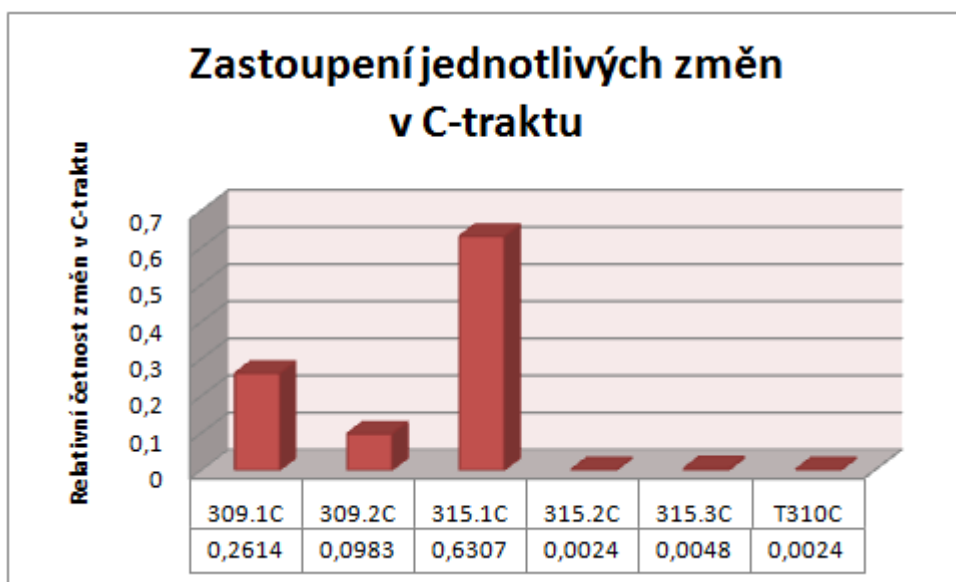
Hlavní oblastí HVRII, kde se častěji objevují inserce a delece, je tzv. C-trakt. I v tomto místě byly v souboru detekovány změny oproti CRS a to hlavně v počtu cytosinu. Tyto změny se týkaly obou částí homopolymerního cytosinového úseku, nejen před tyminem, ale i za ním. Častěji se však vyskytovaly v oblasti ležící za T.

V 89 % těchto početních změn oproti referenční sekvenci přibyl vždy jen jeden cytosin, v 10 % přibyly dva a pouze v 0,5 % šlo o zvýšení o tři cytosiny. Inserce 315.1C byla nalezena v 97,8 % všech vzorků a inserce 309.1C ve 40,5 % vzorků. Tyto výsledky se opět shodují s prací Vanecek et al. (2003) a dalších autorů (Parson et al., 1999; Pfeiffer et al., 1999).

Často je v tomto úseku HVRII pozorován další zajímavý fenomén. Dochází k němu transicí tyminu za cytosin, čímž vzniká nepřerušovaný homopolymerní C-trakt a může zároveň dojít k prodloužení C-traktu, což je připisováno sklouznutí DNA polymerázy. Jednotlivé haplotypy se pak mezi sebou liší v počtu cytosinů, který se pohybuje od 12-18. V našem souboru se vyskytoval pouze jediný případ tohoto jevu. Šlo v něm nejspíše pouze o transici T→C v nukleotidu 310 (T310C), nikoliv o inserci dalších cytosinů, jelikož celkový počet C v takto vzniklém homopolymerním C-traktu byl 14.

Procentuální zastoupení jednotlivých změn nalezených v C-traktu je znázorněno v grafu 5.4.

Graf 5.4. Zastoupení jednotlivých změn v C-traktu

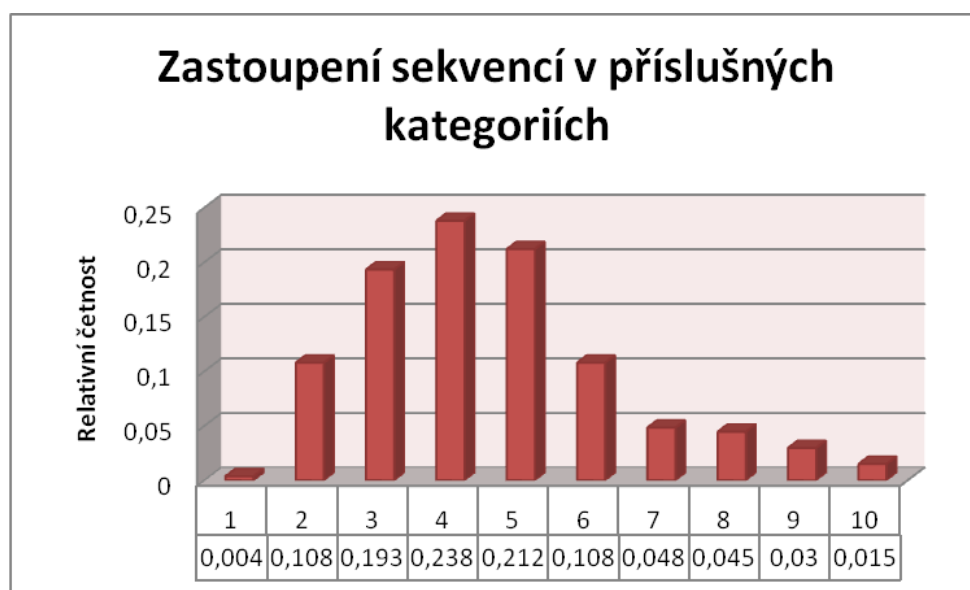


V následující tabulce 5.4. a grafu 5.5. je prezentováno početní a procentuální zastoupení všech nalezených odchylek od referenční sekvence v souboru. Tyto sekvence byly dále rozděleny dle počtu záměn oproti CRS, které se v dané sekvenci nacházely. Dle množství odchylek nalezených v jednotlivých sekvencích byly sekvence zařazeny do příslušných kategorií.

Tab. 5.4. Početní zastoupení sekvencí v jednotlivých kategoriích

Počet záměn bází na jednu sekvenci	N	Relativní četnost
1 záměna	1	0,037
2 záměny	29	0,1078
3 záměny	52	0,1933
4 záměny	64	0,2379
5 záměn	57	0,2119
6 záměn	29	0,1078
7 záměn	13	0,0483
8 záměn	12	0,0446
9 záměn	8	0,0297
10 záměn	4	0,0149

Graf. 5.5. Zastoupení sekvencí v příslušných kategoriích (počet záměn)



Z tabulky 5.4. a grafu 5.5. vyplývá, že nejvyšší počet sekvencí spadá do kategorie 4 záměny (64, tj. 23,79 %). Nejméně sekvencí se nachází v kategoriích 1 záměna (1, tj. 0,37 %) a 10 záměn (4, tj. 1,49 %). Z grafu je patrné, že rozložení sekvencí v jednotlivých kategoriích kopíruje Gaussovu křivku, jde tedy o normální rozložení znaku.

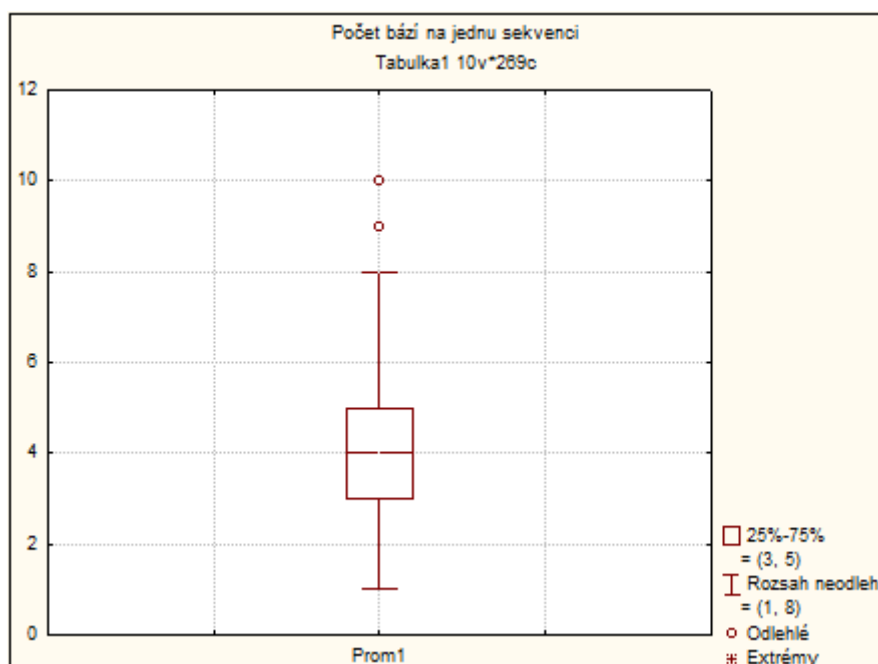
Dále byly pro zjištěná data souboru vypočteny základní parametry deskriptivní statistiky (tab. 5.5., graf. 5.6.). Zpracován byl následující znak – počet záměn bází v jednotlivých vzorcích souboru vzhledem k CRS.

Tab. 5.5. Základní parametry deskriptivní statistiky

Znak	N	Průměr	SD	SE	V %
Počet záměn bází	269	4,57	1,849	0,1127	40,46
	Min	Max	Median	Q1	Q3
	1	10	4	3	5

Z tabulky 5.5. je vidět, že průměrný počet změn oproti CRS na jednu sekvenci byl 4,57. Minimální počet záměn byl roven 1 a maximální množství změn na jeden vzorek byl 10.

Graf. 5.6. Počet bází na jednu sekvenci



Graf 5.6. znázorňuje rozložení hodnot znaku. Na grafu je zachycen medián, jehož hodnota se rovná 4. Hodnota dolního kvartilu je 3 a horní kvartil odpovídá hodnotě 5. Interkvartilové rozpětí je rovno 2, z čehož vyplývá, že mezi hodnotami 3 a 5 se nachází 50 % souboru.

Pro možnost porovnání výsledků různých autorů mezi sebou se ve studovaných populacích určují tzv. haplotypy mitochondriální DNA, které se stanovují dle charakteristických záměn oproti CRS. Haplotypy se odvozují pro oblasti HVRI i HVRII mtDNA.

Pro studovaný soubor byly též odvozeny haplotypy pro testovanou oblast HVRII mitochondriální DNA. V souboru bylo nalezeno 120 různých haplotypů a jejich jednotlivé zastoupení je znázorněno v tabulce 5.6.

Tab. 5.6. Zastoupení jednotlivých haplotypů v rámci HVRII

Počet haplotypů	Zastoupení jednotlivých haplotypů v souboru	Σ	Relativní četnost
76	1	76	0,2825
23	2	46	0,1710
5	3	15	0,0558
4	4	16	0,0595
3	5	15	0,0558
3	6	18	0,0669
1	9	9	0,0335
1	10	10	0,0371
1	11	11	0,0409
1	13	13	0,0483
1	17	17	0,0632
1	23	23	0,0855
120		269	1

V tabulce 5.6. a 10.3. (viz Přílohy) můžeme vidět v jaké frekvenci se jednotlivé haplotypy v souboru vyskytovaly a jakými změnami oproti CRS byly charakterizované.

V souboru se nejčastěji (8,55 %) vyskytoval profil charakterizovaný dvěma změnami oproti CRS a to 263 a 315.1C. Druhý nejfrekventovanější haplotyp (6,32 %) byl odlišný od referenční sekvence ve třech pozicích (263, 309.1C, 315.1C). O jaký typ mutace se v jednotlivých pozicích jednalo, můžeme vidět v tabulce 10.3. (viz Přílohy).

Celkem 28,25 % souboru tvořily jedinečné haplotypy (76 sekvencí).

Dále byla zhodnocena variabilita v rámci studovaného souboru. Z výše uvedených haplotypů HVRII oblasti souboru byl vypočten odhad genetické diverzity tohoto lokusu.

Ze získaných výsledků byl také vypočten průměrný počet bazí mezi dvěma náhodně vybranými vzorky souboru porovnáním jednotlivých haplotypů mezi sebou. Dále byla vypočtena frekvence výskytu shodných haplotypů, která udává, jak často se při náhodném výběru dvou vzorků ze studované populace vyskytne stejný haplotyp. Jednotlivé hodnoty jsou uvedené v tabulce 5.7.

Tab. 5.7. Vypočtené výsledky variability v oblasti HVRII studovaného souboru

Populace	ČR
N	269
Průměrný počet odlišných nukleotidů	3,78
Počet shod / počet porovnání	38 / 1499
Rozsah	0-11
Frekvence nejběžnějšího halotypu (%)	8,55
Genetická diverzita ¹	0,98
Pravděpodobnost shody uvnitř populace (%) ²	2,42

¹ dle Stoneking et al., 1991

² dle Tajima, 1989

Genetická diverzita souboru odpovídá hodnotě 0,98. Tyto výsledky jen potvrzují vysokou variabilitu HVRII oblasti a tedy i vhodnost použití tohoto regionu ke studiu populačních a fylogenetických vztahů, individuální identifikaci a dalším podobným analýzám.

Dva náhodně vybrané vzorky se od sebe liší v průměru ve 3,78 nukleotidech a maximální hodnota variability jednotlivých haplotypů mezi sebou odpovídá 11 nukleotidům. Při náhodném výběru dvou vzorků se stejný haplotyp bude vyskytovat v průměru ve 2,42 % jedinců.

6. DISKUZE

Hypervariabilní oblast mtDNA byla vybrána jako předmět zkoumání hlavně pro její proměnlivost, neboť na rozdíl od jaderné DNA, se změn, které v ní proběhnou nedokáže zbavit. Počet molekul mtDNA je vyšší než množství mitochondrií v buňce, a proto je zřejmé, že na jednu mitochondrii připadá těchto molekul několik, pravděpodobně desítky. Jelikož se předpokládá, že ke změnám dochází vždy nejdříve v molekule mitochondriálního genomu, měl by tento typ nejprve převládnout v rámci jedné mitochondrie, posléze tato mitochondrie v rámci všech mitochondrií v buňce a nakonec musí vzniknout klon těchto buněk se změněnou mtDNA. Těžko si lze představit, že by mohlo jít o proces připomínající infekci, kdy by změněné mitochondrie mohly přecházet z jedné buňky do druhé. Tento proces probíhá v různých tkáních různě rychle a prováděné analýzy představují vždy jen jakýsi průřez momentální situací. V některých tkáních postupuje tento proces velice pomalu, jedná se o buňky, které se prakticky vůbec nedělí (př. neurony). V jiných tkáních probíhá naopak velice rychle (př. buňky zažívací trubice a kůže). Rozdíly ve složení mtDNA mezi orgány, jejichž buňky se v dospělosti prakticky již nedělí, mohou mít nepochybně svůj původ v embryonálním období.

Tedy i výsledek sekvenace může podstatnou mírou ovlivnit použitý zdroj, neboť, a týká se to především patologických odchylek, mohou být změny v mtDNA nahromaděny v různých tkáních v různé míře. Proto je lepší tam, kde je potřeba porovnávat mtDNA různých jedinců, nebo stejných jedinců v různém časovém období, používat stejné tkáně.

6.1. Stanovení rozdílů v sekvenci HVRII mtDNA ve vzorcích pupečnickové krve a buněk dutiny ústní stejných jedinců

Výsledky stanovení rozdílů v sekvenci HVRII úseku lidské mitochondriální DNA ve vzorcích pupečnickové krve a buněk dutiny ústní stejných jedinců v průměru 10 let od narození identifikovaly odlišnosti u 2,04 % vyšetřených, jejichž rozsah se pohyboval mezi 1 a 2 nukleotidy (rozsah HVRII sekvence je většinou udáván mezi nukleotidy 57-372). Jedá se o statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) (tab. 5.1.).

Z hlediska typu mutace šlo o bodové substituce (transice) a délkový polymorfismus v C-traktu.

Dvě transiční záměny byly identifikovány v pozici 73. Vzhledem k tomu, že tato pozice je obsažena v různých haplotypech v rámci jednotlivých haploskupin, byly sekvence zařazeny do příslušných haploskupin. Toto zařazení je pochopitelně pouze orientační, pro přesné zařazení by byly potřebné další sekvence mtDNA daného vzorku (př. HVRI). Vzhledem k porovnávání pouze HVRII se předpokládalo, že může dojít k zařazení sekvence do více haploskupin. Sekvence z pupečnickové krve vzorku 972, jejíž odlišnosti oproti CRS byly v pozicích 152, 263, 309.2C a 315.1C, byla zařazena do haploskupiny H. U sekvence pocházející ze slin téhož vzorku, která se oproti CRS lišila v nukleotidech 73, 152, 263, 309.2C a 315.1C, byla určena haploskupina T (Malyarchuk et al., 2006, Malyarchuk et al., 2007). Tyto výsledky naznačují, že stupeň variability v rámci odlišných tkání uvnitř jednoho organismu by mohly překročit různé haploskupiny, což by mohlo mít důsledky pro různé fylogenetické a populační studie opírající se o mtDNA, jelikož by mohlo dojít k zařazení jedince do různých haploskupin dle tkáně, která by byla pro analýzu použita.

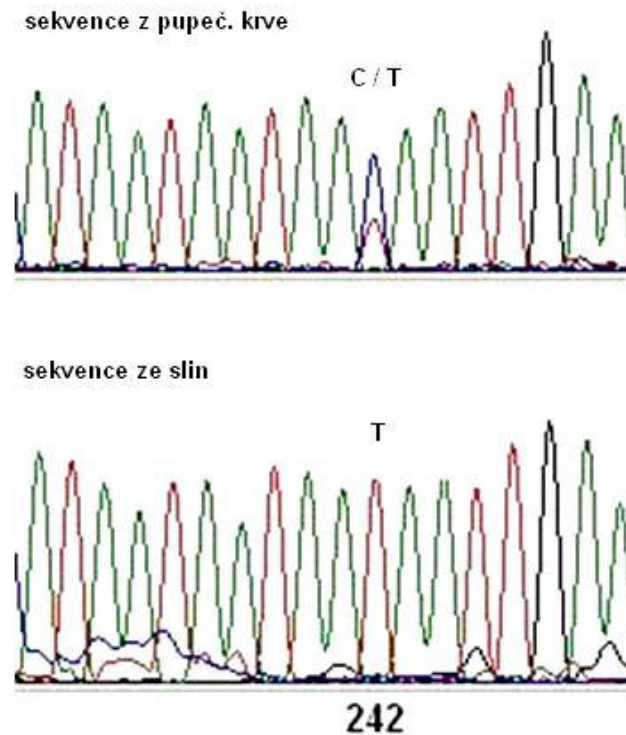
Další transiční změna se týkala pozice 242. Buňky pocházející z pupečnickové krve obsahovaly směs dvou různých mtDNA. Jedna nesla v této pozici C a druhá T. Jednalo se tedy o heteroplasmii, jak je vidět na obrázku 6.1. V buňkách dutiny ústní došlo během ontogeneze k převládnutí sekvence, která nesla ve zmiňované pozici tymin.

Obdobné mutace našli Hühne et al. (1998), jejichž studie sledovala rozdíly v sekvenci HVRI a HVRII původem od matky a jejího dítěte. Nové mutace ve formě homoplasmické substituce mezi maternálním vzorkem a vzorkem dítěte neobjevili žádné. Zato našli sedm odlišností mezi sekvencemi ve formě heteroplasmie. Většinou se jednalo o pyrimidinové transice. Za nalezené odlišnosti mezi sekvencemi původem od matky a jejího potomka je nespíše zodpovědný mitochondriální efekt hrdla láhve, a nebo se může jednat o somatickou mutaci.

Jiná studie, dlouhodobě monitorující stupeň heteroplasmie v kontrolním regionu mtDNA, prezentovala odlišný výsledek. Kvantitativní analýza ukázala, že stupeň heteroplasmie se během dvaceti let ve studované tkáni jedince nezměnil, dokonce se nelišil ani v různých tkáních. Z tohoto výsledku usoudili, že heteroplasmie je zděděná a není

výsledkem somatických mutací vznikající v průběhu ontogeneze (Lagerstrom-Fermer et al., 2001).

Dříve byla heteroplasmie spojována zejména s mitochondriálními onemocněními (Jazin et al., 1999). Později se však ukázalo, že heteroplasmie v normální populaci není tak vzácná a byl potvrzen její výskyt i u zdravých jedinců (Comas et al., 2008).



Obr. 6.1. Nalezená heteroplasmie ve vzorku 1025 v pozici 242 v buňkách pupečnickové krve

Budeme-li předpokládat, že v době narození byly sekvence identické, pak mutační rychlost pro lidskou mitochondriální DNA, obvykle udávaná jako $\sim 3 \times 10^{-6}$ nebo $2,7 \times 10^{-5}$, je v případě druhého hypervariabilního úseku mtDNA buněk izolovaných z dutiny ústní jistě vyšší. Všeobecně je HVRII považována za nejproměnlivější úsek mtDNA (Schneider & Excoffier, 1999). Je však možné, že k rozrůžňování dochází již v embryonálním období. Mohlo by začínat již na úrovni jednotlivých tkáňových kmenových buněk (Fellous et al., 2009).

Je dokázáno, že během množení a diferenciacie buněk dochází v lidském těle k hromadění odchylek v sekvenci mtDNA, které jsou v různé míře vyjádřeny v různých orgánech, tkáních, ale i v buňkách v rámci stejné tkáně – např. v jednotlivých vlasových koříncích stejného jedince (Shanske et al., 2004). Z tohoto hlediska není tento nález překvapujícím, nicméně může mít zásadní dopad na použití mtDNA k forezním účelům a populačním studiím, pokud nejsou jako zdroj materiálu systematicky používány stejné tkáně, pocházející navíc z přibližně stejně starých osob. Přestože ve vyšších věkových kategoriích se změny objevují u všech typů buněk (Kraytsberg et al., 2003), je, i dle nálezů v rámci této práce, náchylnost ke změnám zřejmě vyšší u epitelových buněk (Nekhaeva et al., 2002). Vzhledem k možnosti, že mitochondriální výbava jednotlivých blastomer nemusí být identická, je dokonce zpochybňována preimplantační diagnostika mitochondriálních poruch (Bredenoord et al., 2009).

6.2. Vliv životního prostředí na mutagenezi mtDNA

Po porovnání nalezených rozdílů mezi sekvencí z pupečnickové krve a ze slin obou regionů, které se značně lišily ve znečištění ovzduší, se nepodařilo nalézt statisticky významný rozdíl mezi vzorky pocházejícími z Teplíc a Prachatic ($P > 0,05$).

I když počet nalezených rozdílů ve vzorcích pocházejících z Teplíc byl vyšší než u tkáně původem z Prachatic, neposkytla analýza při tak nízkém počtu nalezených změn signifikantní rozdíl. Pravděpodobnost výskytu těchto rozdílů mezi tkáněmi tedy vyšla vyšší v Teplících ($OR = 2,19$) než v Prachaticích, ale ne natolik, aby se dal prokázat vliv životního prostředí a celoživotního vystavení některým toxinům na akumulaci poškození mitochondriální DNA.

Zajímavý, ačkoli statisticky nevýznamný ($P > 0,05$), výsledek poskytlo srovnání vzorků s nalezenými rozdíly mezi sekvencemi v závislosti na pohlaví. Riziko výskytu rozdílných sekvencí HVRII oblasti mtDNA mezi zkoumanými tkáněmi bylo více než 4x vyšší u chlapců než u děvčat. Ačkoli stanovené riziko u chlapců bylo vyšší než u děvčat, nebylo statisticky signifikantní.

Pokud se pokusíme získaný výsledek i přes absenci signifikance nějak hodnotit výsledky by pak mohly naznačovat obecně známý fakt, že mužské plody jsou zranitelnější a náchylnější k vlivům vnějšího prostředí (Wells, 2000). Větší zranitelnost chlapeckých plodů na prenatální poškození environmentálním stresem může vyústit až v jejich aborty nebo vést k vyšší incidenci novorozenců mužského pohlaví s vývojovou malformací, případně pouze ke změně genetického materiálu. Snížení podílu novorozenců bylo pozorováno po dlouhodobé expozici chemických faktorů prostředí (Nicolich et al., 2000). Podobně tomu bylo i u rodičů, kteří kouřili více než 20 cigaret denně (Fukuda et al., 2002). V genetickém materiálu chlapců častěji nalezené tkáňově specifické přestavby mitochondrií, studované v rámci této práce, tak jsou v souladu s dávno známým faktem vyšší zranitelnosti mužských plodů.

6.3. Charakteristika variability HVRII oblasti souboru

Sekundárním cílem této práce bylo srovnání sekvenčních odlišností vzorků souboru v oblasti HVRII mitochondriální DNA oproti referenční sekvenci a popis této variability celého souboru. Pro toto porovnání, uvedené v tabulce 10.1. (viz. Přílohy), byly použity sekvence pouze z pupečnickové krve všech vzorků souboru (269). Charakter a četnost jednotlivých nalezených mutací ve studovaném souboru jsou popsány v tabulce 10.2. (viz. Přílohy).

Na základě opakujících se polymorfismů v rámci mtDNA byla vytvořena databáze všech nalezených odlišností od referenční sekvence, které publikovali různí autoři (<http://mitomap.org/MITOMAP/PolymorphismsControl>). Srovnáním výsledků této práce s výše uvedenou databází bylo zjištěno, že většina nalezených odlišností byla již dříve publikována. Ve čtyřech případech však objevené mutace dosud publikovány nebyly. Jde o pozice: 243, 291, 296 a 299, charakter mutace a četnost jsou uvedeny v tabulce 6.1. Z pohledu typu mutace se z valné většiny jednalo o transverze. Vzhledem k jejich obecně nižší frekvenci výskytu (kolem 5 %) oproti transicím, není překvapujícím zjištěním, že právě nalezené transverze nebyly dosud popsány.

Tab. 6.1. Dosud nepublikované polymorfismy v HVRII

Pozice	CRS	Změna	N	Mutace
243	A	G	1	Transice
291	A	T	1	Transverze
296	C	A	1	Transverze
299	C	A	1	Transverze

Dalším cílem této práce bylo vyhodnocení variability v oblasti HVRII mitochondriální DNA v rámci studovaného souboru a její srovnání s výsledky obdobných studií.

Vypočtené výsledky uvedené v tabulce 5.7. v předcházející kapitole byly porovnány s výsledky studií, které se zabývaly variabilitou HVRII oblasti v různých evropských populacích.

Tab. 6.2. Porovnání odhadu genetické diverzity a pravděpodobnosti shody dvou náhodně vybraných vzorků uvnitř české populace s evropskými populacemi

Populace	FIN ¹	BOS ¹	GBR ²	CZE ³	CZE ⁴
Genet. diverzita	0,93	0,93	0,93	0,97	0,98
Pst shody dvou vzorků (%)	8,0	8,3	8,3	3,6	2,42

1 Comas et al., 1999

2 Piercy et al., 1993

3 Vanecek et al., 2004

4 Výsledky souboru hodnoceného v rámci této práce

FIN.....finská populace

BOS.....bosenská populace

GBR.....populace Velké Británie

CZE.....česká populace

Genetická diverzita souboru hodnoceného v rámci této práce byla odhadnuta na 0,98. Tato hodnota spadá do rozsahu, který je typický pro evropskou populaci (0,93-0,98) a shoduje se s výsledky, které již byly pro českou populaci zveřejněny (Vanecek et al., 2004) (Tab. 6.2.).

Tato vysoká hodnota genetické diverzity, typická pro mtDNA, je mnohem vyšší než heterozygotita (srovnatelná s diverzitou) detekovaná ve vysoce polymorfních lokusech jaderné DNA, takových jako je HLA DQ α lokus (Helmuth et al., 1990) nebo VNTR lokusy (Nakamura et al., 1987). Tyto údaje jen potvrzují skutečnost, že mitochondriální DNA se vyvíjí skutečně rychle a hypervariabilní úsek II kontrolního regionu vykazuje extrémně vysoký stupeň polymorfismů.

Právě díky vysoké variabilitě mtDNA a speciálně kontrolního regionu je mitochondriální DNA cílem intenzivního zájmu nejrůznějších populačních, fylogenetických a forezních studií. Sekvenování hypervariabilních regionů a sledování neutrálních mutací pomáhá určit příbuznost mezi jedinci a stanovit, kdy přibližně mohlo dojít k oddělení linií během evolučního vývoje (Sigurqardottir et al., 2000). I pro forezní vyšetřování je mtDNA a její variabilita hojně využívána. Mitochondriální DNA nastupuje na scénu hlavně tehdy, selže-li analýza jaderné DNA, je-li degradována nebo se ve stopě nenachází vůbec. MtDNA tak umožní analýzu vlasů bez kořínku, zubů nebo jen nepatrných kousků epitelu (Wilson et al., 1995).

Pravděpodobnost, že dva nepříbuzní jedinci ve vyšetřovaném souboru budou mít v HVRII oblasti mitochondriální DNA identický profil je asi 2,4 %. Tedy je mnohem vyšší pravděpodobnost (přibližně 97,6 %) jedinečného haplotypu. Ve skutečnosti se ale tato pravděpodobnost shody dvou náhodných profilů bude pohybovat již od frekvence nejběžnějšího haplotypu v dané populaci (v tomto souboru frekvence nejčastějšího haplotypu = 8,55 %). Pravděpodobnost vyloučení shody bude tudíž o něco nižší (91,45 %).

Tab. 6.3 Porovnání průměrných hodnot počtu odlišných nukleotidů v oblasti HVRII mezi dvěma náhodně vybranými vzorky

Populace	RUS¹	CZE²	CZE³
Prům. počet odlišných nukleotidů	4,27	2,97	3,78

RUS.... ruská populace
CZE.....česká populace

1 Orekhov et al., 1999

2 Vanecek et al., 2004

3 Výsledky souboru hodnoceného v rámci této práce

Dalším přístupem v sledování rozdílnosti mezi sekvencemi může být měření průměrného počtu nukleotidů mezi dvěma náhodně vybranými vzorky souboru. Ve studovaném souboru tato vlastnost vyšla průměrně 3,78 odlišných nukleotidů. Tento výsledek se shoduje s dříve publikovanou prací Vanecek et al. (2004), v jejichž souboru vyšel ve studované oblasti HVRII průměrný počet rozdílných nukleotidů mezi dvěma náhodně vybranými vzorky 2,97. Pro celý kontrolní region se tato hodnota pohybuje cca od 7 do 11 (Piercy et al., 1993; Poetsch et al., 2003; Poetsch et al., 2004; Calafell et al., 1996).

7. ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo stanovit rozdíly v sekvenci HVRII oblasti mitochondriálního genomu ve vzorcích pupečnickové krve a buněk dutiny ústní stejných jedinců odebrané s odstupem v průměru 10 let od narození. Tato práce byla výjimečná v tom, že doposud nebyly srovnávány sekvence mtDNA stejných jedinců po uplynutí určité doby. Byly pouze porovnávány různé věkové kategorie různých jedinců. Jde tedy o unikátní příležitost sledovat proměnlivost mtDNA během individuálního vývoje.

Po srovnání sekvencí byly nalezeny statisticky významné odlišnosti u 5 párů vzorků (2,04 %; $P < 0,05$). Z hlediska charakteru mutace se jednalo o transice a rozdíly v počtu cytosinů v C-traktu. Nalezené rozdíly mohou mít několik příčin, především časovou vzdálenost odběrů a různost buněčného složení odebíraných vzorků.

Z těchto výsledků plyne doporučení pro veškeré analýzy opírající se o mitochondriální DNA. Jejich metodika by měla být vždy založená na porovnávání mtDNA ze stejných tkání a nejlépe i podobně starých jedinců. Jiný postup by mohl vést k nepřesným výsledkům. Například k zařazení jedince do jiné haploskupiny, jak bylo naznačeno v předcházející kapitole, kde byla určena u sekvence z pupečnickové krve jiná haploskupina než u sekvence pocházející ze slin téhož jedince.

Jelikož vzorky souboru pocházely z hlediska životního prostředí z odlišných regionů (Teplice / Prachatic), byly vzorky s nalezenými odchylkami mezi sekvencemi porovnány s ohledem na jejich původ. Tyto výsledky byly statisticky hodnoceny pomocí kontingenčních tabulek s použitím Fisherova exaktního testu s hladinou významnosti 0,05, avšak neposkytly statisticky signifikantní rozdíl mezi vzorky pocházejícími z Teplic a Prachatic. Vliv životního prostředí na mutagenезi mitochondriální DNA se tedy nepodařilo prokázat. Stejně byly zhodnoceny data i z hlediska pohlaví jedinců. I přestože riziko výskytu rozdílných sekvencí mezi tkáněmi bylo asi 4x vyšší u chlapců než u děvčat, výsledek byl opět statisticky neprůkazný.

Dále byla hodnocena variabilita souboru v HVRII oblasti. Zjištěné odchylky oproti CRS odrážejí přirozenou variabilitu mtDNA. Nalezené odlišnosti v sekvenci měly převážně charakter nukleotidových substitucí. Nejčastěji se vyskytovaly v pozici 73 a 263, které jsou pro českou populaci typické. Pro daný soubor byl vypočten odhad genetické diverzity (0,98), průměrný počet odlišných nukleotidů mezi dvěma náhodně vybranými

vzorky (3,78) a pravděpodobnost shody profilů mezi dvěma náhodně vybranými vzorky (2,42 %). Výsledky se shodovaly s publikací, která se též zabývala variabilitou HVRII mitochondriální DNA české populace (Vanecek et al., 2004). Tyto hodnoty potvrzují vysokou variabilitu HVRII oblasti, a tedy i vhodnost jejího použití pro studium populačních vztahů, individuální identifikaci a k dalším analýzám. Je však nutné počítat s tkáňově specifickou variabilitou.

8. SEZNAM ZKRATEK

A	báze adenin
Arg	arginin
ATP	adenosintrifosfát
bp	páry bází
C	báze cytosin
CAT	kataláza
CPEO	Chronická progresivní externí oftalmoplegie
CRS	<u>C</u> ambridge <u>r</u> eference <u>s</u> emence
C-trakt	homopolymerní trakt cytosinů
Cu/znSOD	měď/zinek-superoxid dismutáza
dATP	deoxyadenozintrifosfát
dCTP	deoxycytozintrifosfát
ddNTP	dideoxyribonukleotidtrifosfát
dGTP	deoxyguanozintrifosfát
dH ₂ O	deionizovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
dsDNA	dvouřetězcová DNA
dTTP	deoxytyminozintrifosfát
ETC	<u>e</u> lektron <u>t</u> ransport <u>c</u> hain: řetězec elektronového transportu
FADH ₂	flavin-adenin-dinukleotid
G	báze guanin
GPx	glutathionperoxidáza
GR	glutathionreduktáza
GSH	glutathion
H-řetězec	těžký řetězec
HSP	promotor pro transkripci těžkého řetězce
HVRI	hypervariabilní úsek I
HVRII	hypervariabilní úsek II
HVRIII	hypervariabilní úsek III
Ile	izoleucin

kbp	kilo bází
KSS	Kearns-Sayerův syndrom
L-řetězec	lehký řetězec
LHON	Leberova hereditární optická neuropatie
LSP	promotor pro transkripci lehkého řetězce
Met	metionin
MM	master mix
MnSOD	mangan-superoxid dismutáza
mtDNA	mitochondriální DNA
NADH	redukovaný nikotinamid-adenin-dinukleotid
nDNA	jaderná DNA (nukleární)
O _H	počátek replikace těžkého řetězce
OXPHOS	proces oxidativní fosforylace
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
Pst	pravděpodobnost
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
rpm	otáčky za minutu
rRNA	ribozomová RNA
STR	krátké tandemové repetice (short tandem repeats)
T	báze thymin
T _m	teplota tání
tRNA	transferová RNA
tRNA ^{phe}	transferová RNA pro fenylalanin
tRNA ^{pro}	transferová RNA pro prolin
Trp	tryptofan
UV	ultrafialové záření

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

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 290:457-465.

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*. Nat Genet 23:147.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (1998) *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero, ISBN 80-902906-2-0.

Alexeyev M. F., LeDoux S. P., Wilson G. L. (2004) *Mitochondrial DNA and aging*. Clinical Science 107:355-364.

Ankel-Simons F. & Cummins J. M. (1996) *Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: Implications for theories on human evolution*. PNAS 93:13859-13863.

Attardi G., Yoneda M., Chomyn A. (1995) *Complementation and segregation behavior of disease causing mitochondrial DNA mutations in cellular model systems*. Biochim Biophys Acta 1271:241-248.

Bandelt H.-J., Kong Q. P., Parson W., Salas A. (2005) *More evidence for non-maternal inheritance of mitochondrial DNA?* J Med Genet 42:957-960.

Bandelt H.-J., Macaulay V., Richards M. (2006) *Human mitochondrial DNA and the evolution of Homo sapiens*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, ISBN 978-3-540-31788-3.

- Beckman K. B. & Ames B. N. (1998) *The free radical theory of aging matures*. *Physiol Rev* 78:547-581.
- Beneš I., Skorkovský J., Novák J., Šrám R. J. (2007) *Vývoj znečištění ovzduší v Teplicích, Prachaticích a Praze v posledních třinácti letech*. *Ochrana Ovzduší* 6:9-10.
- Bendall K. E., Macaulay V. A., Baker J. R., Sykes B. C. (1996) *Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region*. *Am J Hum Genet* 59:1276-1287.
- Bendall K. E., Sykes B. C. (1995) *Length heteroplasmy in the first hypervariable segment of the human mtDNA control region*. *Am J Hum Genet* 57:248-256.
- Binková B., Veselý D., Veselá D., Jelínek R., Šrám R. J. (1999) *Genotoxicity and embryotoxicity of urban air particulate matter collected during winter and summer period in two different districts of the Czech Republic*. *Mutat Res* 440:45-58.
- Bredenoord A., Dondorp W., Pennings G., de Die-Smulders., Smeet B., de Wert G. (2009) *Preimplantation genetic diagnosis for mitochondrial DNA disorders: ethical guidance for clinical practice*. *Eur J Hum Genet* 17:1550-1559.
- Brierley E. J., Johnson M. A., Lightowers R. N., James O. F., Turnbull D. M. (1998) *Role of mitochondrial DNA mutations in human aging: Implications for the central nervous system and muscle*. *Ann Neurol* 43:217-223.
- Calafell F., Underhill P., Tolun A., Angelichava D., Kalaydjieva L. (1996) *From Asia to Europe: mitochondrial DNA sequence variability in Bulgarians and Turks*. *Ann Hum Genet* 60:35-49.
- Calloway D. C., Reynolds R. L., Herrin G. L., Anderson W. W. (2000) *The frequency of heteroplasmy in the HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age*. *Am J Hum Genet* 66:1384-1397.

Cann R. L., Stoneking M., Wilson A. C (1987) *Mitochondrial DNA and human evolution*. Nature 325:31-36.

Comas D., Paabo S., Bertranpetit J. (2008) *Heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA*. Genome Res 5:89-90.

Comas D., Reynolds R., Sajantila A. (1999) *Analysis of mtDNA HVRII in several human populations using an immobilised SSO probe hybridisation assay*. Eur J Hum Genet 7:459-468.

Coskun P. E., Beal M. F., Wallace D. C. (2004) *Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication*. PNAS 101:10726-10731.

Cummins J. M. (2001) *Cytoplasmic inheritance and its implications for animal biotechnology*. Theriogenology 55:1381-1399.

Elson J. L., Samuels D. C., Turnbull D. M., Chinnery P. F. (2001) *Random intracellular drift explains the clonal expansion of mitochondrial DNA mutations with age*. Am J Hum Genet 68:802-806.

Fellous T. G., McDonald S. A. C., Burkert J., Humphries A., Islam S., De-Alwis N. M. W., Guitierrez-Gonzales L., Tadrous P. J., Elia G., Kocher H. M., Bhattacharya S., Mears L., El-Bahrawy M., Turnbull D. M., Tailor R. W., Greaves L. C., Chinnery P. F., Day C. P., Wriht N. A., Alison M. R. (2009) *A methodological approach to tracing cell lineage in human epithelial tissues*. Stem cells 27:1410-1420.

Fukuda M., Fukuda K., Shimizu T., Andersen C. Y., Byskov A. G. (2002) *Parental periconceptional smoking and male: female ratio of newborn infants*. Lancet 359:15-29.

Giles R. E., Blanc H., Cann H. M., Wallace D. G. (1980) *Maternal inheritance of human mitochondrial DNA*. PNAS 77:6715-6719.

Hauswirth W. M. & Laipis P. J. (1982) *Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows*. PNAS 79:4686-4690.

Helmuth R., Fildes N., Blake E., Lece M. C., Chimera J., Madej R., Gorodezky C., Stoneking M., Schmill N., Klitz W., Higuchi R., Erich H. A. (1990) *HLA-DQ α allele and genotype frequencies in various human populations determined by using enzymatic amplification and oligonucleotide probes*. Am J Hum Genet 47:515-523.

Holland M. M. & Parsons T. J. (1999) *Mitochondrial DNA sequence analysis - validation and use for forensic casework*. Forensic Sci Rev 11:21-48.

Hühne J., Pfeiffer H., Brinkmann (1998) *Heteroplasmic substitutions in the mitochondrial DNA control region in mother and child samples*. Int J Legal Med 112:27-30.

Chinnery P. F. & Samuels D. C. (1999) *Relaxed replication of mtDNA: A model with implications for the expression of disease*. Am J Hum Genet 64:1158-1165.

Jazin E. E., Cavalier L., Eriksson I., Orelund L., Gyllenstein U. (1996) *Human brain contains high levels of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA*. PNAS 93:12382-12387.

Jenuth J., Peterson A. C., Fu K., Shoubridge E. A. (1996) *Random genetic drift in the female germ line explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA*. Nat Genet 14:146-151.

Kraytsberg Y., Nekhaeva E., Bodyak N. B., Khrapko K. (2003) *Mutation and intracellular clonal expansion of mitochondrial genomes: Two synergistic components of the aging process?* Mech Ageing Dev 124:49-53.

Lee H. C. & Wei Y. H. (2007) *Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging*. Exp Biol Med 232:592-606.

Lee S. D., Ho Shin Ch., Kim K. B., Lee Y. S., Lee J. B. (1997) *Sequence variation in mitochondrial DNA control region in Koreans*. Forensic Sci Int 87:99-116.

Legros F., Malka F., Frachon P., Lombes A., Rojo M. (2004) *Organization and dynamics of human mitochondrial DNA*. J Cell Sci 117:2653-2662.

Lesnefsky E. J. & Hoppel C. L. (2006) *Oxidative phosphorylation and ageing*. Ageing Res Rev 5:402-433.

Lightowers R. N., Chinnery P. F., Turnbull D. M., Howell N. (1997) *Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease*. Trends Genet 13:450-455.

Linnane A. W., Marzuki S., Ozawa T., Tanaka M. (1989) *Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative disease*. Lancet 1:642-645.

Lutz S., Wittig H.- J., Heizmann J., Junge A., Dimo-Simonin N., Parson W., Edelman J., Anslinger K., Jung S., Augustin C. (2000) *It is possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions?* Forensic Sci Int 113:97-101.

Macmillan C., Lach B., Shoubridge E. A. (1993) *Variable distribution of mutant mitochondrial DNAs (tRNA(Leu[3243])) in tissues of symptomatic relatives with MELAS: the role of mitotic segregation*. Neurology 43:1586-1590.

Malyarchuk B. A., Vanecek T., Perkova M. A., Perenko M. V., Sip M. (2006) *Mitochondrial DNA variability in the Czech population, with application to the ethnic history of Slavs*. Hum Biol 6:681-696.

Malyarchuk B. A., Perkova M. A., Derenko M. V., Vanecek T., Lazur J., Gomolak P. (2007) *Mitochondrial DNA variability in Slovaks, with application to the roma origin*. Ann Hum Genet 72:228-240.

- Mandavilli B. S., Santos J. H., Van Houten B. (2002) *Mitochondrial DNA repair and aging*. *Mutat Res* 509:127-151.
- Marchington D. R., Hartshorne G. M., Barlow D., Poulton J. (1996) *Homopolymeric tract heteroplasmy in mtDNA from tissues and single oocytes: Support for a genetic bottleneck*. *Am J Hum Genet* 60:408-416.
- Maxam F. & Gilbert W. (1977) *A new method for sequencing DNA*. *PNAS* 74:560-564.
- Melov S., Coskun P., Patel M., Tuinstra R., Cottrell B., Jun A. S., Zastawny T. H., Dizdaroglu M., Goodman S. I., Juany T. T., Mizioroko H., Epstein C. J., Wallace D. C. (1999) *Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice*. *PNAS* 96:846-851.
- Michikawa Y., Mazzucchelli F., Bresolin N., Scarlato G., Attardi G. (1999) *Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control-region for replication*. *Science* 286:774-779.
- Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F. (1988) *A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986) *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. *Cold Spring Harb Quant Biol* 1:263-273.
- Murdock D. G., Christacos N. C., Wallace D. C. (2000) *The age-related accumulation of a mitochondrial DNA control region mutation in muscle, but not brain, detected by a sensitive PNA-directed PCR camping based method*. *Nucleid Acids Res* 28:4350-4355.
- Murphy M. P. (2009) *How mitochondria produce reactive oxygen species*. *Biochem J* 417:1-13.

Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Kumlin E., White R. (1987) *Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping*. Science 235:1616-1622.

Nekhaeva E., Bodyak N. D., Kraytsberg Y., McGrath S. B., Van Orsouw N. J., Pluzhnikov A., Wei J. Y., Vijg J., Khrapko K. (2002) *Clonally expanded mtDNA point mutations are abundant in individual cells of human tissues*. PNAS 99:5521-5526.

Nicolich M. J., Huebner W. W., Schnatter A. R. (2000) *Influence of parental and biological factors on the male birth fraction in the United States: an analysis of birth certificate data from 1964 through 1988*. Fertil Steril 73:487-492.

Orekhov V., Poltoraus A., Zhivotovsky A., Spitsyn V., Ivanov P., Janovsky N. (1999) *Mitochondrial DNA sequence diversity in Russians*. FEBS Letters 445:197-201.

Parson W., Parsons T. J., Scheithauer R., Holland M. M. (1999) *Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences: application of mtDNA sequence analysis to a forensic case*. Int J Legal Med 111:124-132.

Pfeiffer H., Brinkmann B., Huhne J., Rolf B., Morris A. A., Steighner R., Holland M. M., Forster P. (1999) *Expanding the forensic German mitochondrial DNA control region database: genetic diversity as a function of sample size and microgeography*. Int J Legal Med 112:291-298.

Piercy R., Sullivan K. M., Benson N., Gill P. (1993) *The application of the mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian genetic identification*. Int J Legal Med 106:85-90.

Poetsch M., Holger W., Krause D., Lignitz E. (2003) *Mitochondrial diversity of northeast German population sample*. Forensic Sci Int 137:125-132.

Poetsch M., Holger W., Krause D., Lignitz E (2004) *Corrigendum to „Mitochondrial diversity of northeast German population sample*. *Forensic Sci Int* 145:73-77.

Rogers N. L., Cole S. A., Lan H., Crossa A., Demerath E. W. (2007) *New saliva DNA collection method compared to buccal cell collection techniques for epidemiological studies*. *Am J Hum Biol* 19:319-326.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977) *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *PNAS* 74:5463-5467.

Scheffler I. E. (2000) *A century of mitochondrial research: achievements and perspectives*. *Mitochondrion* 1:3-31.

Shanske S., Pancrudo J., Kaufmann P., Engelstad K., Jhung S., Lu J., Naini A., DiMauro S., De Vivo D. C. (2004) *Varying loads of the mitochondrial DNA A3243G mutation in different tissues: Implications for diagnosis*. *Am J Med Genet* 130:134-137.

Schmuczerova J., Brdicka R., Dostal M., Sram R. J., Topinka J. (2009) *Genetic variability of HVRII mtDNA in cord blood and respiratory morbidity in children*. *Mutat Res* 666:1-7.

Schneider S. & Excoffier L. (1999) *Estimation of past demographic parameters from the distribution pairwise differences, when the mutation rates vary among site: application to human mitochondrial DNA*. *Genetics* 152:1079-1089.

Schwartz M. & Vissing J. (2002) *Paternal inheritance of mitochondrial DNA*. *N Engl J Med* 347:576-580.

Schwartz M. & Vissing J. (2003) *New patterns of inheritance in mitochondrial disease*. *Biochem Biophys Res Commun* 310:247-251.

Sigurqardottir S., Helgason A., Gulcher J. R., Stefansson K., Donnelly P. (2000) *The mutation rate in the human mtDNA control region*. *Am J Hum Genet* 66:1599-1609.

- St John J., Sakkas D., Dimitriadi K., Barnes A., Maclin V., Ramey J., Barrat C., De Jonge C. (2000) *Failure of elimination of paternal mitochondrial in abnormal embryos*. *Lancet* 355:371-372.
- Stoneking M. (2000) *Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots*. *Am J Hum Genet* 67:1029-1032.
- Stoneking M., Hedgecock D., Higuchi R. G., Vigilant L., Erich H. (1991) *Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes*. *Am J Hum Genet* 48:370-382.
- 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*. *Biol Reprod* 63:582-590.
- Taanman J.-W. (1999) *The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication*. *Biochim Biophys* 1410:103-123.
- Tajima F. (1989) *Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism*. *Genetics* 123:585-595.
- Vanecek T., Vorel F., Sip M. (2003) *Mitochondrial DNA D-loop hypervariable regions: Czech population data*. *Int J Legal Med* 118:14-18.
- Wakeley J. (1993) *Substitution rate variation among sites in hypervariable region I of human mitochondrial DNA*. *J Mol Evol* 37:613-623.
- Wallace D. C., Shoffner J. M., Trounce I., Brown M. D., Ballinger S. W., Corral-Debrinski M., Horton T., Jun A. S., Lott M. T. (1995) *Mitochondrial DNA mutations in human degenerative diseases and aging*. *Biochim Biophys Acta* 1271:141-151.
- Wei Y. H. (1992) *Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events*. *Mutat Res* 275:145-155.

Wei Y. H. & Lee H. C. (2002) *Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging*. Exp Biol Med 227:671-682.

Wei Y. H., Pang C. Y., You B. J., Lee H. C. (1996) *Tandem duplications and largescale deletions of mitochondrial DNA are early molecular events of human aging process*. Ann NY Acad Sci 786:82-101.

Wells J. C. K. (2000) *Natural selection and sex differences in morbidity and mortality in early life*. J theor Biol 202:65-76.

Wilson M. R., DiZinno J., Polanskey D., Replogle J., Budowle B. (1995) *Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis*. Int J Legal Med 108:68-74.

Zima J., Macholan M., Munclinger P., Pialek J. (2004) *Genetické metody v zoologii*. Praha: Karolinum, ISBN 80-246-0795.

Obrázky převzaty z:

Obr. 1.1.

Bellance N., Lestienne P., Rossignol R. (2009) *Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis*. Frontiers in Bioscience 14:4015-4034.

Obr. 1.2; 1.3.

Bandelt H.-J., Macaulay V., Richards M. (2006) *Human mitochondrial DNA and the evolution of Homo sapiens*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; ISBN 978-3-540-31788-3.

Obr. 1.4.; 11.1.

Mandavilli B. S., Santos J. H., Van Houten B. (2002) *Mitochondrial DNA repair and aging*. Mutat Res 509:127-151.

Obr. 4.1.

<http://fme1.ifas.ufl.edu/buzz/csPCR.shtml>

10. PŘÍLOHY- tabulky

Tab. 10.1 Charakteristika studovaného souboru

Vzorek	HVRII	N
43	73, 263, 295, 309.1C, 315.1C	5
76	263, 315.1C	2
115	73, 150, 263, 315.1C	4
119	73, 263, 315.1C	3
120	73, 152, 195, 263, 309.1C, 315.1C	6
133	73, 152, 263, 295, 315.1C	5
143	263, 315.1C	2
144	228, 263, 309.1C, 315.1C	4
187	263, 315.1C	2
202	152, 263, 315.1C	3
256	195, 263, 309.2C, 315.1C	4
260	263, 309.1C, 315.1C	3
292	73, 185, 263, 295, 315.1C	5
293	72, 93, 263, 309.1C, 315.1C	5
296	263, 315.1C	2
318	263, 315.1C	2
320	73, 263, 309.1C, 315.1C	4
335	73, 150, 263, 315.1C	4
337	152, 263, 309.1C, 315.1C	4
340	73, 199, 203, 204, 250, 263, 315.1C	7
344	73, 263, 309.1C, 315.1C	4
363	73, 146, 152, 263, 309.1C, 315.1C	6
369	152, 263, 315.1C	3
374	263, 309.2C, 315.1C	3
381	73, 152, 195, 225, 227, 263, 315.1C	7
391	73, 199, 203, 204, 250, 263, 309.2C, 315.1C	8
393	73, 195, 263, 315.2C	4
395	73, 195, 263, 315.1C	4
402	73, 152, 217, 263, 309.2C, 315.1C	6
412	73, 263, 315.1C	3
421	73, 195, 247, 263, 315.1C	5
422	73, 204, 263, 315.1C	4
436	152, 315.1C	2
442	73, 153, 195, 225, 226, 263, 309.1C, 315.1C	8
447	73, 146, 152, 195, 263, 309.2C, 315.1C	7
492	73, 150, 263, 315.1C	4
573	73, 263, 295, 309.1C, 315.1C	5

613	73, 152, 263, 315.1C	4
615	146, 263, 309.1C, 315.1C	4
629	73, 263, 309.1C, 315.1C	4
635	73, 152, 217, 263, 315.1C	5
636	73, 146, 195, 198, 247, 263, 309.1C, 315.1C	8
644	150, 195, 263, 315.1C	4
650	239, 263, 288, 309.1C, 315.1C	5
653	263, 315.1C	2
660	263, 309.2C, 315.1C	3
664	263, 309.2C, 315.1C	3
680	73, 263, 309.1C, 315.1C	4
696	263, 315.1C	2
703	146, 195, 263, 309.1C, 315.3C	5
704	309.2C, 315.1C	2
709	263, 309.2C, 315.1C	3
711	146, 195, 263, 315.1C	4
731	195, 215, 263, 309.1C, 315.1C	5
738	93, 239, 263, 309.2C, 315.1C	5
746	72, 263, 309.1C, 315.1C	4
749	263, 315.1C	2
763	73, 195, 247, 263, 309.1C, 315.1C	6
777	73, 263, 309.1C, 315.1C	4
783	73, 195, 263, 309.1C, 315.1C	5
784	73, 150, 152, 263, 295, 315.1C	6
785	73, 146, 152, 195, 263, 309.2C, 315.1C	7
786	73, 195, 247, 263, 315.1C	5
798	73, 152, 263, 291, 294, 296, 297, 299, 302, 315.1C	10
802	263, 309.2C, 315.1C	3
807	73, 150, 263, 315.1C	4
808	309.1C, 315.1C	2
809	73, 153, 263, 309.1C, 315.1C	5
819	73, 150, 263, 309.1C, 315.1C	5
825	73, 263, 309.2C, 315.1C	4
826	200, 263, 309.2C, 315.1C	4
830	73, 146, 152, 263, 315.1C	5
840	73, 189, 195, 204, 207, 263, 315.1C	7
856	73, 207, 263, 309.1C, 315.1C	5
860	73, 152, 263, 295, 315.1C	5
862	152, 263, 309.2C, 315.1C	4
886	73, 146, 152, 263, 309.1C, 315.1C	6
893	73, 150, 185, 228, 263, 295, 309.1C, 315.1C	8
896	263, 309.1C, 315.1C	3
904	73, 150, 195, 263, 315.1C	5
908	263, 309.1C, 315.1C	3

910	199, 203, 204, 250, 263, 315.1C	6
913	73, 263, 315.1C	3
930	73, 242, 263, 295, 315.1C	5
938	263, 315.1C	2
953	263, 315.1C	2
967	73, 146, 153, 189, 195, 225, 227, 263, 309.1C, 315.1C	10
972	152, 263, 309.2C, 315.1C	4
975	73, 146, 152, 263, 315.1C	5
985	263, 315.1C	2
986	73, 263, 315.1C	3
989	73, 146, 263, 309.1C, 315.1C	5
999	263, 315.1C	2
1006	73, 152, 195, 263, 315.1C	5
1007	73, 189, 194, 195, 204, 207, 263, 309.1C, 315.1C	9
1012	73, 185, 228, 263, 295, 315.1C	6
1013	73, 150, 152, 195, 215, 263, 295, 309.1C, 315.1C	9
1015	263, 309.1C, 315.1C	3
1025	73, 195, 263, 315.1C	4
1034	73, 146, 152, 263, 315.1C	5
1037	239, 263, 309.2C, 315.1C	4
1048	72, 89, 93, 195, 263, 309.2C, 315.1C	7
1061	263, 309.1C	2
1065	73, 263, 315.1C	3
1067	263, 315.1C	2
1071	73, 185, 195, 228, 263, 295, 309.1C, 315.1C	8
1081	73, 263, 315.1C	3
1097	73, 263, 295, 309.1C, 315.1C	5
1098	73, 263, 309.1C, 315.1C	4
1107	73, 185, 228, 242, 263, 295, 315.1C	7
1116	114, 146, 152, 195, 263, 309.1C, 315.1C	7
1120	195, 263, 315.1C	3
1135	93, 263, 315.1C	3
1139	239, 263, 309.2C, 315.1C	4
1151	73, 185, 263, 295, 309.1C, 315.1C	6
1153	150, 263, 309.2C, 315.1C	4
1154	263, 309.1C, 315.1C	3
1155	73, 263, 315.1C	3
1157	73, 189, 194, 195, 204, 207, 263, 309.1C, 315.1C	9
1160	263, 309.1C, 315.1C	3
1169	263, 309.1C, 315.1C	3
1193	73, 195, 263, 315.1C	4
1204	195, 263, 309.2C, 315.1C	4
1205	73, 152, 263, 315.1C	4
1206	73, 185, 204, 263, 309.1C, 315.1C	6

1207	263, 309.1C, 315.1C	3
1230	73, 195, 263, 309.1C, 315.1C	5
1231	73, 263, 309.1C, 315.1C	4
1239	73, 263, 309.2C, 315.1C	4
1242	73, 315.1C	2
1244	73, 153, 195, 225, 226, 263, 315.1C	7
1245	236, 263, 315.1C	3
1247	146, 263, 315.1C	3
1250	152, 263, 315.1C	3
1255	73, 263, 309.1C, 315.1C	4
1264	263, 309.1C, 315.1C	3
1272	73, 146, 263, 309.1C, 315.1C	5
1279	73, 195, 263, 309.1C, 315.1C	5
1289	263, 309.1C, 315.1C	3
1290	263, 315.1C	2
1299	73, 228, 263, 309.1C, 315.1C	5
1302	239, 263, 309.1C, 315.1C	4
1306	73, 152, 240, 263, 315.1C	5
1334	152, 263, 309.1C, 315.1C	4
1340	73, 195, 263, 309.1C, 315.1C	5
1345	73, 195, 263, 309.2C, 315.1C	5
1362	73, 152, 217, 263, 309.2C, 315.1C	6
1365	73, 257, 263, 315.1C	4
1369	73, 263, 315.1C	3
1379	263, 309.2.C, 315.1C	3
1380	73, 195, 263, 309.2C, 315.1C	5
1386	263, 315.1C	2
1390	263, 309.2C, 315.1C	3
1391	73, 195, 263, 309.1C, 315.1C	5
1393	263, 309.1C, 315.1C	3
1396	73, 199, 263, 315.1C	4
1408	73, 185, 263, 295, 315.1C	5
1419	73, 152, 195, 263, 315.1C	5
1429	73, 146, 152, 263, 315.1C	5
1435	73, 152, 217, 263, 309.1C, 315.1C	6
1437	73, 263, 309.1C, 315.1C	4
1441	73, 185, 295, 315.1C	4
1455	73, 189, 194, 195, 204, 207, 263, 315.1C	8
1459	239, 263, 288, 309.1C, 315.1C	5
1460	263, 309.1C, 315.1C	3
1466	73, 195, 263, 315.1C	4
1478	73, 152, 195, 263, 309.1C, 315.1C	6
1488	73, 146, 263, 315.1C	4
1493	73, 150, 152, 195, 215, 263, 295, 309.1C, 315.1C	9

1494	263, 309.1C, 315.1C	3
1503	263, 315.1C	2
1505	73, 150, 185, 263, 309.2C, 315.1C	6
1510	152, 263, 309.1C, 315.1C	4
1524	263, 315.1C	2
1532	73, 185, 263, 295, 309.1C, 315.1C	6
1536	73, 150, 195, 263, 315.1C	5
1546	73, 195, 263, 309.1C, 315.1C	5
1550	73, 263, 309.1C, 315.1C	4
1552	195, 263, 309.1C, 315.1C	4
1553	73, 263, 315.1C	3
1555	73, 150, 152, 263, 309.1C, 315.1C	6
1562	73, 153, 195, 225, 226, 263, 309.2C, 315.1C	8
1574	204, 239, 263, 309.1C, 315.1C	5
1581	73, 189, 250, 263, 315.1C	5
1584	195, 263, 315.1C	3
1589	73, 185, 228, 263, 295, 315.1C	6
1590	263, 315.1C	2
1595	194, 263, 309.1C, 315.1C	4
1605	73, 199, 204, 250, 263, 315.1C	6
1608	73, 263, 309.2C, 315.1C	4
1609	73, 199, 203, 204, 250, 263, 315.1C	7
1613	73, 152, 195, 263, 315.1C	5
1615	73, 150, 152, 263, 315.1C	5
1619	152, 263, 315.1C	3
1620	73, 152, 195, 263, 315.1C	5
1621	73, 150, 152, 195, 215, 228, 263, 295, 309.1C, 315.1C	10
1637	73, 263, 309.1C, 315.1C	4
1638	73, 195, 263, 309.1C, 315.1C	5
1641	73, 204, 207, 239, 263, 309.1C, 315.1C	7
1645	200, 263, 309.2C, 315.1C	4
1646	73, 150, 152, 195, 215, 263, 294, 295, 309.1C, 315.1C	10
1647	73, 125, 189, 194, 195, 204, 207, 263, 315.1C	9
1655	239, 263, 309.1C, 315.1C	4
1668	73, 152, 153, 189, 195, 225, 226, 309.2C, 315.1C	9
1691	73, 150, 152, 263, 315.1C	5
1693	263, 315.3C	2
1694	73, 263, 315.1C	3
1700	263, 315.1C	2
1729	73, 146, 152, 189, 263, 271, 280, 309.1C, 315.1C	9
1733	73, 185, 263, 295, 309.1C, 315.1C	6
1736	152, 263, 309.1C, 315.1C	4
1741	152, 263, 315.1C	3
1742	73, 185, 228, 263, 295, 315.1C	6

1743	309.1C	1
1748	73, 185, 188, 195, 228, 263, 309.2C, 315.1C	8
1764	73, 185, 228, 263, 295, 315.1C	6
1765	73, 150, 195, 263, 315.1C	5
1770	73, 195, 263, 309.1C, 315.1C	5
1772	73, 263, 295, 309.1C, 315.1C	5
1777	73, 263, 309.2C, 315.1C	4
1779	73, 263, 295, 309.2C, 315.1C	5
1781	73, 150, 263, 309.1C, 315.1C	5
1796	73, 185, 228, 263, 295, 315.1C	6
1802	73, 185, 228, 263, 295, 315.1C	6
1803	263, 315.1C	2
1811	73, 185, 204, 263, 309.1C, 315.1C	6
1814	263, 309.2C, 315.1C	3
1816	263, 315.1C	2
1821	73, 150, 195, 200, 263, 295, 315.1C	7
1830	73, 150, 263, 315.1C	4
1833	73, 119, 189, 195, 204, 207, 263, 315.1C	8
1837	73, 242, 263, 295, 309.1C, 315.1C	6
1850	263, 309.2C, 315.1C	3
1851	73, 195, 263, 309.1C, 315.1C	5
1853	263, 309.1C, 315.1C	3
1855	73, 263, 309.2C, 315.1C	4
1863	73, 152, 263, 315.1C	4
1865	150, 263, 309.2C, 315.1C	4
1868	73, 263, 315.1C	3
1873	73, 152, 212, 263, 309.1C, 315.1C	6
1874	73, 263, 315.1C	3
1875	73, 263, 315.1C	3
1876	152, 263, 309.1C, 315.1C	4
1878	263, 315.1C	2
1879	263, 315.1C	2
1881	195, 263, 315.1C	3
1883	263, 309.1C, 315.1C	3
1884	73, 152, 263, 315.1C	4
1887	73, 263, 295, 309.1C, 315.1C	5
1888	263, 309.1C, 315.1C	3
1891	73, 150, 263, 315.1C	4
1892	72, 263, 309.1C, 315.1C	4
1899	73, 185, 188, 228, 263, 295, 309.1C, 315.1C	8
1911	73, 195, 263, 309.1C, 315.1C	5
1912	73, 150, 263, 309.1C, 315.1C	5
1915	73, 119, 189, 195, 204, 207, 215, 263, 315.1C	9
1917	152, 263, 315.1C	3

1920	73, 150, 243, 263, 309.2C, 315.1C	6
1922	73, 185, 204, 263, 309.1C, 315.1C	6
1923	73, 228, 263, 295, 309.1C, 315.1C	6
1938	263, 295, 309.1C, 315.1C	4
1943	73, 150, 152, 189, 263, 295, 309.1C, 315.1C	8
1945	228, 263, 309.1C, 315.1C	4
1947	73, 199, 203, 204, 250, 263, 309.1C, 315.1C	8
1963	73, 152, 195, 263, 303.14C	5
1967	263, 309.1C, 315.1C	3
1979	73, 152, 195, 198, 263, 309.2C, 315.1C	7
1982	146, 263, 309.1C, 315.1C	4
1991	263, 309.2C, 315.1C	3
		1229

Tab. 10.2 Charakter a výskyt nalezených změn v HVR_{II} oproti CRS

Pozice	CRS	Změna	N	Mutace
72	T	C	4	Transice
73	A	G	163	Transice
89	T	C	1	Transice
93	A	G	4	Transice
114	C	T	1	Transice
119	T	C	2	Transice
125	T	G	1	Transverze
146	T	C	20	Transice
150	C	T	28	Transice
152	T	C	56	Transice
153	A	G	6	Transice
185	G	A	21	Transice
188	A	G	2	Transice
189	A	G	12	Transice
194	C	T	5	Transice
195	T	C	67	Transice
198	C	T	2	Transice
199	T	C	7	Transice
200	A	G	3	Transice
203	G	A	5	Transice
204	T	C	19	Transice
207	G	A	9	Transice
212	T	C	1	Transice
215	A	G	6	Transice
217	T	C	4	Transice
225	G	A	6	Transice
226	T	C	4	Transice
227	A	G	2	Transice
228	G	A	15	Transice
	G	T	1	Transverze
236	T	C	1	Transice
239	T	C	9	Transice
240	A	G	1	Transice
242	C	T	3	Transice
243	A	G	1	Transice
247	G	A	4	Transice
250	T	C	7	Transice
257	A	G	1	Transice
263	A	G	262	Transice
271	C	T	1	Transice
280	C	T	1	Transice
288	A	G	2	Transice
291	A	T	1	Transverze
294	T	C	2	Transice

295	C	T	35	Transice
296	C	A	1	Transverze
297	A	C	1	Transverze
299	C	A	1	Transverze
302	A	C	1	Transverze
309.1C			109	
309.2C			41	
315.1C			263	
315.2C			1	
315.3C			2	
303.14C			1	
			1229	

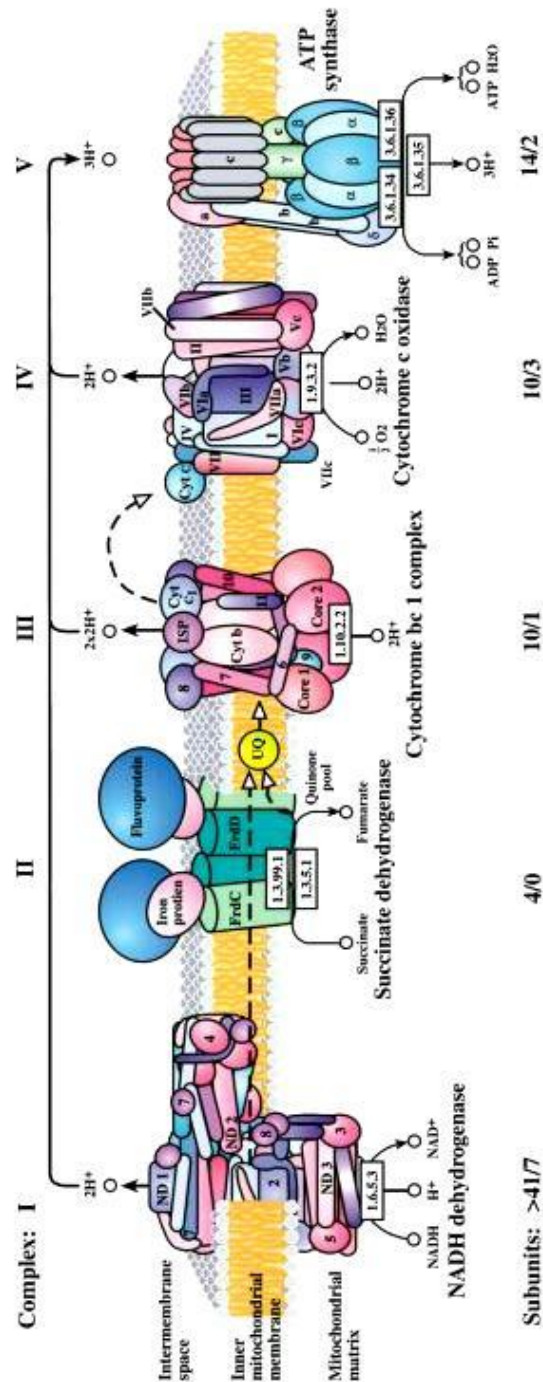
Tab 10.3 Zastoupení jednotlivých haplotypů v souboru

HVRII	N
309.1C	1
263, 315.1C	23
152, 315.1C	1
309.2C, 315.1C	1
309.1C, 315.1C	1
263, 309.1C	1
73, 315.1C	1
263, 315.3	1
263, 309.1C, 315.1C	17
73, 263, 315.1C	13
263, 309.2C, 315.1C	10
152, 263, 315.1C	6
195, 263, 315.1C	3
93, 263, 315.1C	1
236, 263, 315.1C	1
146, 263, 315.1C	1
73, 150, 263, 315.1C	11
226, 263, 309.1C, 315.1C	6
195, 263, 309.2C, 315.1C	5
73, 263, 309.1C, 315.1C	5
152, 263, 309.1C, 315.1C	4
73, 195, 263, 315.2C	4
73, 195, 263, 315.1C	2
73, 204, 263, 315.1C	2
73, 152, 263, 315.1C	2
146, 263, 309.1C, 315.1C	2
150, 195, 263, 315.1C	2
146, 195, 263, 315.1C	2
72, 263, 309.1C, 315.1C	2
73, 263, 309.2C, 315.1C	2
200, 263, 309.2C, 315.1C	2
152, 263, 309.2C, 315.1C	1
239, 263, 309.2C, 315.1C	1
150, 263, 309.2C, 315.1C	1
239, 263, 309.1C, 315.1C	1
73, 257, 263, 315.1C	1
73, 199, 263, 315.1C	1
73, 185, 295, 315.1C	1
73, 146, 263, 315.1C	1
195, 263, 309.1C, 315.1C	1
194, 263, 309.1C, 315.1C	1

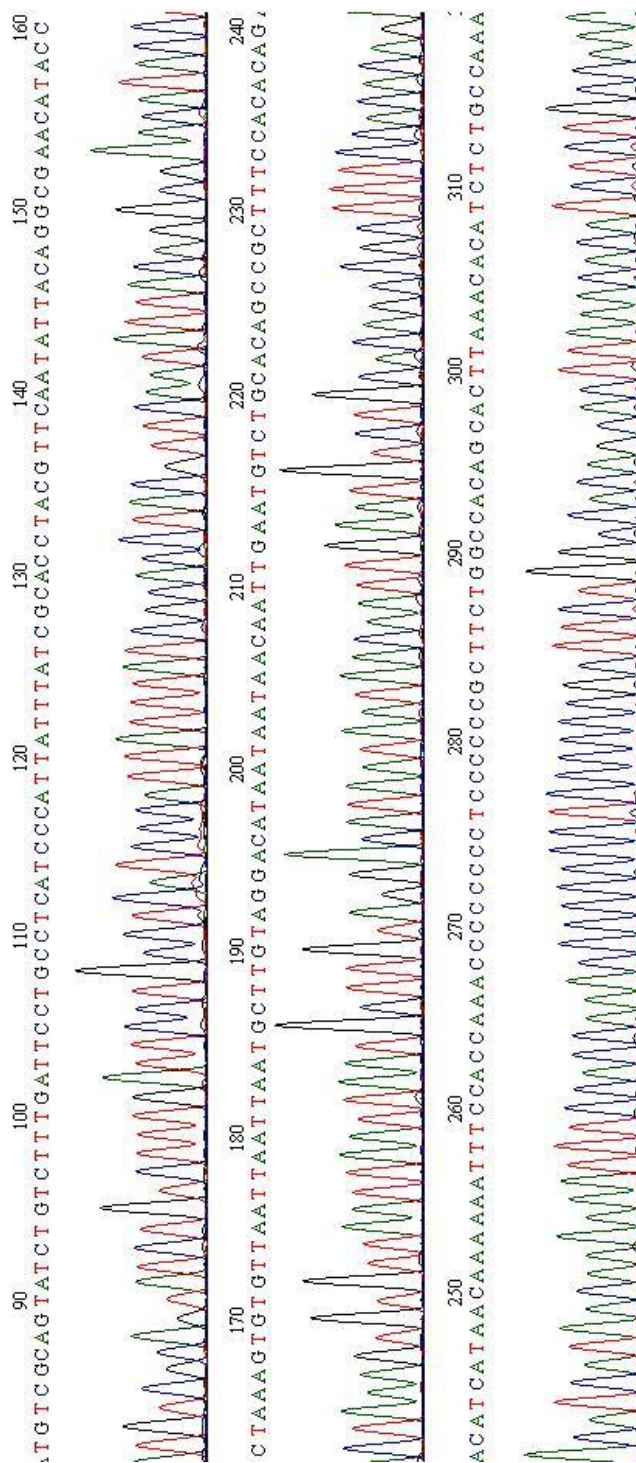
263, 295, 309.1C, 315.1C	1
73, 263, 295, 309.1C, 315.1C	9
73, 152, 263, 295, 315.1C	5
73, 185, 263, 295, 315.1C	4
72, 93, 263, 309.1C, 315.1C	4
73, 195, 247, 263, 315.1C	3
73, 152, 217, 263, 315.1C	3
239, 263, 288, 309.1C, 315.1C	2
146, 195, 263, 309.1C, 315.3C	2
195, 215, 263, 309.1C, 315.1C	2
93, 239, 263, 309.2C, 315.1C	2
73, 195, 263, 309.1C, 315.1C	2
73, 153, 263, 309.1C, 315.1C	2
73, 150, 263, 309.1C, 315.1C	2
73, 146, 152, 263, 315.1C	1
73, 207, 263, 309.1C, 315.1C	1
73, 150, 195, 263, 315.1C	1
73, 242, 263, 295, 315.1C	1
73, 146, 263, 309.1C, 315.1C	1
73, 152, 195, 263, 315.1C	1
73, 228, 263, 309.1C, 315.1C	1
73, 152, 240, 263, 315.1C	1
73, 195, 263, 309.2C, 315.1C	1
73, 263, 195, 309.1C, 315.1C	1
204, 239, 263, 309.1C, 315.1C	1
73, 189, 250, 263, 315.1C	1
73, 150, 152, 263, 315.1C	1
73, 263, 295, 309.2C, 315.1C	1
73, 152, 195, 263, 303.14C	1
73, 152, 195, 263, 309.1C, 315.1C	6
73, 146, 152, 263, 309.1C, 315.1C	3
73, 152, 217, 263, 309.2C, 315.1C	3
73, 195, 247, 263, 309.1C, 315.1C	2
73, 150, 152, 263, 295, 315.1C	2
199, 203, 204, 250, 263, 315.1C	2
73, 185, 228, 263, 295, 315.1C	1
73, 185, 263, 295, 309.1C, 315.1C	1
73, 185, 204, 263, 309.1C, 315.1C	1
73, 152, 217, 263, 309.1C, 315.1C	1
73, 150, 185, 263, 309.2C, 315.1C	1
73, 150, 152, 263, 309.1C, 315.1C	1
73, 199, 204, 250, 263, 315.1C	1
73, 242, 263, 295, 309.1C, 315.1C	1
73, 152, 212, 263, 309.1C, 315.1C	1
73, 150, 243, 263, 309.2C, 315.1C	1

73, 228, 263, 295, 309.1C, 315.1C	1
73, 199, 203, 204, 250, 263, 315.1C	2
73, 152, 195, 225, 227, 263, 315.1C	2
73, 146, 152, 195, 263, 309.2C, 315.1C	1
73, 189, 195, 204, 207, 263, 315.1C	1
72, 89, 93, 195, 263, 309.2C, 315.1C	1
73, 185, 228, 242, 263, 295, 315.1C	1
114, 146, 152, 195, 263, 309.1C, 315.1C	1
73, 153, 195, 225, 246, 263, 315.1C	1
73, 204, 207, 237, 263, 309.1C, 315.1C	1
73, 150, 195, 200, 263, 295, 315.1C	1
73, 152, 195, 198, 263, 309.2C, 315.1C	1
73, 199, 203, 204, 250, 263, 309.1C, 315.1C	1
73, 150, 152, 189, 263, 295, 309.1C, 315.1C	1
73, 199, 203, 204, 250, 263, 309.2C, 315.1C	1
73, 153, 195, 225, 226, 263, 309.1C, 315.1C	1
73, 146, 195, 198, 247, 263, 309.1C, 315.1C	1
73, 150, 185, 228, 263, 295, 309.1C, 315.1C	1
73, 185, 195, 228, 263, 295, 309.1C, 315.1C	1
73, 189, 194, 195, 204, 207, 263, 315.1C	1
73, 153, 195, 225, 226, 263, 309.2C, 315.1C	1
73, 185, 188, 195, 228, 263, 309.2C, 315.1C	1
73, 119, 189, 195, 204, 207, 263, 315.1C	1
73, 185, 188, 228, 263, 295, 309.1C, 315.1C	1
73, 189, 194, 195, 204, 207, 263, 309.1C, 315.1C	2
73, 150, 152, 195, 215, 263, 295, 309.1C, 315.1C	2
73, 125, 189, 194, 195, 204, 207, 263, 315.1C	1
73, 152, 153, 189, 195, 225, 226, 309.2C, 315.1C	1
73, 146, 152, 189, 263, 271, 280, 309.1C, 315.1C	1
73, 119, 189, 195, 204, 207, 215, 263, 315.1C	1
73, 152, 263, 291, 294, 296, 297, 299, 302, 315.1C	1
73, 146, 153, 189, 195, 225, 227, 263, 309.1C, 315.1C	1
73, 150, 152, 195, 215, 228, 263, 295, 309.1C, 315.1C	1
73, 150, 152, 195, 215, 263, 294, 295, 309.1C, 315.1C	1
	269

11. PŘÍLOHY- obrázky



Obr. 11.1. Elektronový transportní řetězec mitochondrií. Tento řetězec reprezentují enzymatické komplexy I-V (I: NADH dehydrogenáza; II: sukcinát dehydrogenáza; III: cytochrom c reduktáza; IV: cytochrom c oxidáza; V: ATP syntáza). Elektrony putují z NADH nebo sukcinátu přes jednotlivé komplexy až k finálnímu akceptoru, kterým je elementární kyslík (převzato z Mandavilli et al., 2002).



Obr. 11.2. Chromatogram – výstup sekvenátoru. Jednotlivé báze jsou na chromatogramu prezentovány odlišnými barvami: G – černá; T – červená; A – zelená; C – modrá.