

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Lidská mitochondriální DNA a její využití v diagnostické a forenzní oblasti
Bakalářská práce

2022

Kristýna Dibonová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kristýna Dibonová**
Osobní číslo: **C18211**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Lidská mitochondriální DNA a její využití v diagnostické a forenzní oblasti**
Téma práce anglicky: **Human Mitochondrial DNA and its Applications in the Diagnostic and Forensic Analysis**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na dané téma.
2. Definujte téma z hlediska genetického a diagnostického. Zaměřte se na praktické využití mitochondriální DNA při diagnostice v lékařství a ve forenzní analýze.
3. Pro vytvoření kompilačního textu využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Lucie Stříbrná, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem „Lidská mitochondriální DNA a její využití v diagnostické a forenzní oblasti“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 5. 2022

Kristýna Dibonová v. r.

Poděkování:

Ráda bych zde poděkovala své vedoucí bakalářské práce Mgr. Lucii Stříbrné, Ph.D. za přátelský přístup, trpělivost a poskytnutí cenných rad v průběhu psaní této bakalářské práce. Zároveň bych chtěla poděkovat své rodině, která mi byla oporou během celého mého studia.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá lidskou mitochondriální DNA. Nejprve jsou obecně charakterizovány mitochondrie a lidská mitochondriální DNA. Později se práce zaměřuje na využití mitochondriální DNA ke studiu evoluce lidstva a ve forenzní analýze. Další část tvoří mutace mitochondriální DNA a jimi podmíněná onemocnění. Součástí práce je i diagnostika a terapie mitochondriálních onemocnění včetně genetického poradenství a reprodukčních možností.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mitochondrie, mitochondriální DNA, studium evoluce lidstva, forenzní analýza, mutace mtDNA, mitochondriální onemocnění, diagnostika mitochondriálních onemocnění, terapie mitochondriálních onemocnění

TITLE

Human Mitochondrial DNA and its Applications in the Diagnostic and Forensic Analysis

ANNOTATION

The bachelor thesis deals with human mitochondrial DNA. First, mitochondria and human mitochondrial DNA are generally characterized. Later the work focuses on the use of mitochondrial DNA to study human evolution and in forensic analysis. The next part consists of mutations of mitochondrial DNA and diseases, which are caused by these mutations. The work also describes diagnostics and therapy of mitochondrial diseases, including genetic counseling and reproductive options.

KEYWORDS

Mitochondria, mitochondrial DNA, study of human evolution, forensic analysis, mutations of mitochondrial DNA, mitochondrial diseases, diagnostics of mitochondrial diseases, therapy of mitochondrial diseases

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ	9
SEZNAM PŘÍLOH.....	10
SEZNAM ZKRATEK	11
TERMINOLOGIE.....	17
ÚVOD.....	21
1 MITOCHONDRIE	22
1.1 Struktura mitochondrií	22
1.2 Funkce mitochondrií	23
1.3 Původ mitochondrií.....	26
2 MITOCHONDRIÁLNÍ DNA	29
2.1 Struktura mitochondriální DNA.....	29
2.2 Replikace, transkripce a translace mitochondriální DNA	30
2.3 Mutace mitochondriální DNA.....	32
2.4 Mateřská dědičnost mitochondriální DNA	33
2.5 Onemocnění spojovaná s mitochondriální DNA	34
2.6 Využití mitochondriální DNA.....	34
3 MITOCHONDRIÁLNÍ DNA JAKO NÁSTROJ PRO STUDIUM EVOLUCE LIDSTVA A FORENZNÍ ANALÝZU	35
3.1 Mitochondriální DNA a studium evoluce lidstva	35
3.2 Mitochondriální DNA ve forenzí analýze.....	35
3.3 Starodávná mitochondriální DNA.....	36
3.4 Analýza mitochondriální DNA	36
3.4.1 Hypervariabilní oblasti a haploskupiny	36
3.4.2 Heteroplazmie a údajná možnost rekombinace	38
3.4.3 Sekvenování mitochondriální DNA.....	38
3.4.4 Metody sekvenování	39
3.5 Vybrané případy využití mitochondriální DNA	41
3.5.1 Vybrané případy využití mitochondriální DNA ke studiu lidské historie	41
3.5.2 Vybrané případy využití mitochondriální DNA pro forezní identifikaci	41
4 MUTACE MITOCHONDRIÁLNÍ DNA	43
4.1 Vznik a původ mutací	43
4.2 Typy patogenních mutací	43

4.2.1	Bodové mutace	44
4.2.2	Delece	44
4.3	Onemocnění podmíněná mutacemi	44
4.3.1	Onemocnění podmíněná bodovými mutacemi	45
4.3.2	Onemocnění podmíněná delecemi	47
4.3.3	Mitochondriální onemocnění podmíněná mutacemi v jaderně kódovaných genech... ..	48
4.3.4	Mitochondriální dysfunkce jako následek mutací a její podíl na některých onemocněních	48
5	DIAGNOSTIKA A TERAPIE MITOCHONDRIÁLNÍCH ONEMOCNĚNÍ.....	50
5.1	Diagnostika mitochondriálních onemocnění.....	50
5.1.1	Technologie sekvenování nové generace v diagnostice	51
5.1.2	Technologie OMICS	52
5.1.3	Další funkční validační testy.....	53
5.1.4	Biochemický screening.....	53
5.2	Terapie mitochondriálních onemocnění.....	54
5.3	Genetické poradenství a reprodukční možnosti	55
	ZÁVĚR	57
	POUŽITÁ LITERATURA.....	59
	ZDROJE OBRÁZKŮ	65
	ZDROJE PŘÍLOH	67
	PŘÍLOHY.....	68

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 – Struktura mitochondrie	23
Obrázek 2 – Cyklus trikarboxylové kyseliny	24
Obrázek 3 – Elektronový transportní řetězec	25
Obrázek 4 – Endosymbióza	27
Obrázek 5 – mtDNA	29
Obrázek 6 – Lidská mtDNA a faktory umožňující její replikaci a transkripci	31
Obrázek 7 – Oploďněním navozená autofagie	33
Obrázek 8 – Migrace lidské mtDNA ve světě	37
Obrázek 9 – Sekvenování technologií Illumina	40
Obrázek 10 – Vztah mezi genotypem a fenotypem u lidských mitochondriálních onemocnění	45
Obrázek 11 – Reprodukční možnosti pro ženy s patogenními mutacemi mtDNA	56

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – Zjednodušený fylogenetický strom lidské mitochondriální DNA obsahující hlavní haploskupiny včetně znázornění jejich výskytu dle světadílů	68
Příloha 2 – Příklad rodokmenu s výskytem Leberovy dědičné neuropatie zřakového nervu... ..	69
Příloha 3 – Diagnostický postup při podezření na mitochondriální onemocnění.....	70
Příloha 4 – Graf znázorňující vývoj metod k objevu chorobných genů mezi lety 1988–2020.	71

SEZNAM ZKRATEK

Ade (A)	adenine	adenin
A	aminoacyl binding-tRNA site	akceptorové místo mitoribozomu
ADP	adenosine diphosphate	adenosindifosfát
ASD	Autism Spectrum Disorder	porucha autistického spektra
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
BN-PAGE	Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis	modrá nativní elektroforéza
bp	base pair	pár bází
C	cytosine	cytosin
CNS	central nervous system	centrální nervová soustava
CoA	coenzyme A	koenzym A
CoQ10	coenzyme Q10	koenzym Q10
CPEO	Chronic Progressive External Ophthalmoplegia	chronická progresivní externí oftalmoplegie
rCRS	the revised Cambridge Reference Sequence	revidovaná cambridgeská referenční sekvence
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
DNAJC30	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C30	protein teplotního šoku DnaJ (Hsp40), člen C30
DRP1	Dynamin-Related Protein 1	protein 1 spřízněný s dynaminem
E	exit site	výstupní místo mitoribozomu
EGT	endosymbiotic gene transfers	endosymbiotické genové přenosy
FAD	flavin adenine dinucleotide	flavinadenindinukleotid (oxidovaná forma)
FADH₂	flavin adenine dinucleotide	flavinadenindinukleotid (redukováná forma)

FGF 21	Fibroblast Growth Factor 21	fibroblastový růstový faktor 21
Gua (G)	guanine	guanin
GDF 15	Growth/Differentiation Factor 15	růstový/diferenciační faktor 15
GTP	guanosine triphosphate	guanosintrifosfát
HGT	horizontal gene transfers	horizontální genové přenosy
HSP1	the heavy-strand promoter 1	promotor těžkého řetězce 1
HSP2	the heavy-strand promoter 2	promotor těžkého řetězce 2
HVR (1-3)	Hypervariable Region (1-3)	hypervariabilní oblast (1-3)
kb	kilobase	kilobáze
LHON	Leber Hereditary Optic Neuropathy	Leberova dědičná neuropatie zrakového nervu
arLHON	Leber Hereditary Optic Neuropathy, autosomal recessive	Leberova dědičná neuropatie zrakového nervu, autozomálně recesivní forma
LRS	long-read sequencing	sekvenování s dlouhým čtením
MELAS	Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes	mitochondriální encefalomyopatie, laktátová acidóza a příhody podobné mrtvici
MERRF	Myoclonus epilepsy and ragged-red fibers	myoklonická epilepsie s roztrhanými červenými vlákny
MILS	Maternally Inherited Leigh Syndrome	maternálně dědičný Leighův syndrom
MNGIE	Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy	mitochondriální neurogastrointestinální encefalomyopatie
mtDNA	mitochondrial DNA	mitochondriální DNA
nDNA	nuclear DNA	jaderná DNA

mtEFG1	Mitochondrial Translation Elongation Factor G1	mitochondriální elongační faktor G1
mtEFG2	Mitochondrial Translation Elongation Factor G2	mitochondriální elongační faktor G2 (mitochondriální ribozomální recyklační faktor)
mtEFTs	Mitochondrial Elongation Factor Ts	mitochondriální elongační faktor Ts
mtEFTu	Mitochondrial Elongation Factor Tu	mitochondriální elongační faktor Tu
mTERF1	Mitochondrial Transcription Termination Factor 1	mitochondriální transkripční terminační faktor 1
mtIF2	Mitochondrial Translation Initiation Factor 2	mitochondriální translační iniciační faktor 2
mtIF3	Mitochondrial Translation Initiation Factor 3	mitochondriální translační iniciační faktor 3
mtRF1a	Mitochondrial Translation Release Factor 1a	mitochondriální uvolňovací faktor 1a
mtRRF	Mitochondrial Ribosome Recycling Factor	mitochondriální ribozomální recyklační faktor
mtSSB	Mitochondrial Single-Stranded DNA Binding Protein	mitochondriální jednovláknový vazebný protein
MOs	membrane organelles	membránové organely
MTATP6	Mitochondrially Encoded ATP Synthase Membrane Subunit 6	mitochondriálně kódovaná membránová podjednotka ATP syntázy 6
MTATP8	Mitochondrially Encoded ATP Synthase Membrane Subunit 8	mitochondriálně kódovaná membránová podjednotka ATP syntázy 8
MT-CYB	Mitochondrially Encoded Cytochrome B	mitochondriálně kódovaný cytochrom B

MT-ND1	Mitochondrially Encoded NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 1	mitochondriálně kódovaná NADH-ubichinon oxidoreduktázová podjednotka 1
MT-ND3	Mitochondrially Encoded NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 3	mitochondriálně kódovaná NADH-ubichinon oxidoreduktázová podjednotka 3
MT-ND4	Mitochondrially Encoded NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 4	mitochondriálně kódovaná NADH-ubichinon oxidoreduktázová podjednotka 4
MT-ND4L	Mitochondrially Encoded NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 4L	mitochondriálně kódovaná NADH-ubichinon oxidoreduktázová podjednotka 4L
MT-ND5	Mitochondrially Encoded NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 5	mitochondriálně kódovaná NADH-ubichinon oxidoreduktázová podjednotka 5
MT-ND6	Mitochondrially Encoded NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 6	mitochondriálně kódovaná NADH-ubichinon oxidoreduktázová podjednotka 6
MT-TF	Mitochondrially Encoded tRNA-Phe	mitochondriálně kódovaný tRNA fenylalanin
MT-TH	Mitochondrially Encoded tRNA-His	mitochondriálně kódovaný tRNA histidin
MT-TK	Mitochondrially Encoded tRNA-Lys	mitochondriálně kódovaný tRNA lysin
MT-TL1	Mitochondrially Encoded tRNA-Leu 1	mitochondriálně kódovaný tRNA leucin 1
MT-TL2	Mitochondrially Encoded TRNA-Leu 2	mitochondriálně kódovaný tRNA leucin 2

MT-TP	Mitochondrially Encoded tRNA-Pro	mitochondriálně kódovaný tRNA prolin
MT-TS2	Mitochondrially Encoded tRNA-Ser 2	mitochondriálně kódovaný tRNA serin 2
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide	nikotinamidadenindinukleotid
NAD⁺	nicotinamide adenine dinucleotide	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide	nikotinamidadenindinukleotid (redukována forma)
NARP	Neuropathy, Ataxia and Retinitis Pigmentosa	neurogení svalová ochablost s ataxií a <i>retinitis pigmentosa</i>
NGS	Next-Generation Sequencing	sekvenování nové generace
OGG1	8-Oxoguanine DNA Glycosylase 1	8-oxoguanin DNA glykosyláza 1
OXPHOS	oxidative phosphorylation	oxidativní fosforylace
P	peptidyl binding site	peptidylové místu mitoribozomu
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PGD	Preimplantation genetic diagnosis	preimplantační genetická diagnostika
PINK1	PTEN Induced Kinase 1	PTEN indukovaná kináza 1
POLG	DNA Polymerase Gamma	DNA polymeráza gama, katalytická podjednotka
POLG2	DNA Polymerase Gamma 2	DNA polymeráza gama 2, doplňková podjednotka
POLRMT	RNA Polymerase, Mitochondrial	mitochondriální RNA polymeráza
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
rRNA	ribosomal RNA	ribosomální RNA
tRNA	transfer RNA	transferová RNA

ROS	Reactive Oxygen Species	reaktivní formy kyslíku
S		jednotka Svedberg
SMRT	Single-molecule real-time sequencing	jednomolekulární sekvenování v reálném čase
SNHL	Sensorineural hearing loss	senzorieurální (percepční) ztráta sluchu
STR	Short Tandem Repeat	krátká tandemová repetice
Y-STR	Y-chromosome Short Tandem Repeat	krátká tandemová repetice na Y-chromozomu
T	thymine	thymín
TEFM	Transcription Elongation Factor, Mitochondrial	mitochondriální transkripční elongační faktor
TFAM	Transcription Factor A, Mitochondrial	mitochondriální transkripční faktor A
TFB1M	Transcription Factor B1, Mitochondrial	mitochondriální transkripční faktor B1, dimethyladenosin transferáza 1
TFB2M	Transcription Factor B2, Mitochondrial	mitochondriální transkripční faktor B2, dimethyladenosin transferáza 2
Ura	uracil	uracil
Ub	ubiquitin	ubikvitin
VUS	Variant of uncertain significance	varianta nejistého významu
WES	Whole Exome Sequencing	sekvenování celého exomu
WGS	Whole Genome Sequencing	sekvenování celého genomu

TERMINOLOGIE

Alogenní transplantace: transplantace, při které je transplantována tkáň od dárce, tedy jedince stejného druhu s jinou genetickou výbavou oproti příjemci

Amniocentéza: metoda odběru plodové vody za účelem prenatalní diagnostiky; dojde k nabornutí amniového obalu zárodku přes břišní stěnu matky; kontrola zákroku je umožněna pomocí ultrazvuku; plodová voda obsahuje buňky plodu, které následně poslouží např. k biochemickému či cytogenetickému vyšetření

Amplifikace DNA: zmnožení sekvence DNA

Apoptóza: zánik buňky; programovaná buněčná smrt

Ataxie: porucha hybnosti, jejíž příčinou je onemocnění nervového systému

Autofagie: proces, při kterém dochází k rozkladu vnitrobuněčných struktur nebo celých organel pomocí lysozómu

Autofagozóm: váček, obsahující pohlcený materiál, který má být rozložen během procesu autofagie

Biogeneze: vznik organismu z organismů jemu podobných (zde vznik mitochondrií z již existujících mitochondrií)

Biomarker: indikátor stavu nebo události v biologickém systému (vzorku); poskytuje míru účinku, expozice nebo citlivosti; jedná se o měřitelnou chemickou, biochemickou, fyziologickou, behaviorální či jinou změnu v organismu

Biparentální mitochondriální dědičnost: zdědění mitochondriální genetické informace od obou rodičů

Bradykineze: celkové zpomalení pohybů

Delece: chromozomová mutace; chybění části chromozomu včetně na ní uložených genů

Deplece mtDNA: úbytek mtDNA

Diferenciace buněk: proces vyžívání a rozlišování, během něhož jednotlivé buňky získávají specializované vlastnosti a funkce

Dysartrie: porucha řeči (výslovnosti), jejíž příčinou je onemocnění nervového systému

Dystonie: abnormální svalové stahy, které způsobují abnormální polohu takto postižených částí těla

Embryogeneze: vývoj zárodku embrya od stadia embryoblastu po skončení organogeneze

Encefalopatie: nezánetlivé onemocnění mozku

Endosymbióza: druh symbiózy, při které jeden organismus žije uvnitř organismu druhého

Exom: část genomu skládající se pouze z exonů a podílející se na kódování polypeptidových produktů

Expresí genu: proces, kdy se genetická informace, obsažená v genu, projeví jako fenotyp

Fagocytóza: proces, kdy buňka pohlcuje pevné částice z okolního prostředí

Fenotyp: soubor pozorovatelných znaků jedince, který je výsledkem jeho genotypu a působení prostředí

Fylogenetický strom: grafické znázornění evolučních vztahů skupiny organizmů

Genetický drift: stálá nebo náhodná změna ve frekvenci genů populace za jednotku času

Genom: veškerá genetická informace uložená v DNA

Genový klastr: skupina genů se stejnými vlastnostmi nebo stejným původem, která se nachází na chromozomu v těsné blízkosti

Haploskupina: soubor haplotypů, který se dědí od společného předka

Haplotyp: kombinace alel, jež odkazuje na různá místa sekvence DNA

Helikáza: enzym, který při replikaci DNA rozvíjí dvoušroubovici DNA

Heteroplazmie: smíšená populace mutantních a normálních molekul mtDNA v jedné buňce

Hirsutismus: nadměrné ochlupení mužského typu u žen

Homeostáza: stálost (rovnováha) vnitřního prostředí organismu, která je regulována pomocí zpětných vazeb

Homologní sekvence: dvě nebo více nukleotidových nebo proteinových sekvencí, které mají společného předka a jsou tedy evolučně příbuzné

Homoplazmie: stejná populace všech molekul mtDNA v jedné buňce

Hydrogenozóm: organela, vyskytující se v buňkách některých anaerobních prvoků a hub; produkuje vodík a ATP, čímž je podobná mitochondrii; nemá vlastní genom

Hypervariabilní oblast: úsek kontrolní oblasti mtDNA, kde se opakují páry bází nukleotidů

Chaperonový protein: protein, který pomáhá správně sbalovat polypeptidový řetězec do vyšších struktur a skládat podjednotky do nadmolekulárních celků; vazbou na určité oblasti vznikajícího polypeptidu brání vzniku nežádoucí vzájemné interakce této oblasti s jinými úseky téhož polypeptidu, nesprávnému uspořádání či předčasné degradaci

Choreoatetóza: nervová porucha, jež je kombinací chorey a atetózy; jedná se o mimovolní „červovité“ pomalejší pohyby, postihující různé části těla, např. obličej, jazyk, ruce, ramena

Choriové klky: prstovité výběžky vysílané placentou směrem do děložní sliznice; struktura klků se postupně vyvíjí; tvoří součást mateřského oddílu placenty

Imunizace: umělé vytvoření imunity za účelem zisku odolnosti proti určitým infekcím; imunizace je možná podáním částí cizorodých látek (antigenů oslabené bakterie, upravených toxinů atp.); vývoj odolnosti trvá zpravidla několik týdnů

Iniciační kodon: trojice nukleotidů v mRNA, která zahajuje translaci

Intron: část genu, která neobsahuje vlastní dědičnou informaci potřebnou pro tvorbu bílkoviny; krátce po transkripci do mRNA je „vystřížena“

Kodon: trojice nukleotidů v mRNA, která kóduje v genetickém kódu jednu určitou aminokyselinu

Konjugace: spojení, při kterém dochází k přenosu DNA z jedné bakteriální buňky do druhé

Missense varianta (mutace): substituční bodová mutace; v kodonu je nahrazena nukleotidová báze, která způsobí kódování jiné aminokyseliny takto změněným kodonem

Mitofagie: proces odstranění poškozené mitochondrie z buňky

Mitozóm: organela podobná hydrogenozómu; neprodukuje vodík ani ATP; nemá vlastní genom

Neuropatie: nezánettivé onemocnění nervu

Nukleoid: komplex jedné molekuly DNA s proteiny

Oftalmoplegie: ochrnutí očních svalů

Pinocytóza: proces, kdy buňka pohlcuje malé kapénky tekutiny

Pleiotropie: jev, kdy má jeden gen vliv na dva a více fenotypových znaků

Pluripotence buněk: proces, kdy se kmenová buňka vyvíjí v buňky všech tří zárodečných vrstev (ektodermu, mezodermu a endodermu)

Polygenní onemocnění: onemocnění, které je způsobeno interakcí více genů

Polymeráza: enzym, který při replikaci DNA syntetizuje komplementární DNA řetězec podle řetězce DNA

Polymorfismus: výskyt minimálně dvou nespojitých genetických variant ve stejné populaci s frekvencí výskytu těchto variant u více než 1 % populace

Prahový efekt: úroveň, do které je buňkou tolerována defektní molekula mtDNA; při překročení této úrovně dojde k metabolické dysfunkci a projevu klinických symptomů

Primáza: enzym syntetizující RNA-primer, potřebný k zahájení syntézy DNA při replikaci

Proband: první vyšetřovaný jedinec postižený dědičnou nemocí

Promotor: část DNA v blízkosti genu RNA sekvence bází, mající specifické vazební body pro RNA-polymerázu, která se podílí na regulaci jeho exprese

Pseudogen: sekvence v DNA, která patří k funkčnímu genu, ale nemůže být transkribována; nejčastěji to bývá způsobeno mutacemi

Rekombinace: přeskupení genů za účelem tvorby nového genotypu, který se liší od genotypů rodičů

Replikace: proces zdvojení DNA

Replikativní segregace: možná procentuální změna složení DNA v dalších buněčných liniích oproti liniím předchozím

Retinopatie: nezánettivé onemocnění sítnice vedoucí k závažné poruše zraku až slepotě

Rigidita: ztuhlost

Semiautonómni organela: organela s vlastní genetickou informací

Snížená penetrance: pravděpodobnost projevu varianty genu ve fenotypu nižší než 1

Stop kodon: trojice nukleotidů v mRNA, která ukončuje translaci

Topoizomeráza: enzym, který umožňuje měnit terciární strukturu DNA (změny ve vinutí DNA)

Transdukce: přenos DNA z jedné bakterie do druhé prostřednictvím bakteriofága

Transformace: volný přenos DNA do bakteriální buňky

Transkripce: přepis dědičné informace z DNA na RNA

Transkriptom: celý soubor mRNA, který je transkribován z genomu buňky

Translace: „překlad“ dědičné informace uložené v mRNA do sekvence aminokyselin

Ubikvitin: protein, který se naváže na nadbytečné nebo poškozené proteiny, které jsou určeny k intracelulárnímu odbourání

Ubikvitinace: označení proteinů, určených k intracelulárnímu odbourání, ubikvitinem

Variabilní exprese: rozdíl v síle promítnutí stejného genotypu do fenotypu u různých jedinců, kteří žijí v různých prostředích [14, 15, 26, 41, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67].

ÚVOD

Lidská mitochondriální DNA se přibližně od 90. let 20. století začala stávat více a více atraktivnějším nástrojem, který lze využít napříč různými obory. Své uplatnění našla v lékařské a forenzní genetice, evoluční biologii, kriminalistice, archeologii či antropologii. Tato bakalářská práce se zaměřuje především na využití lidské mitochondriální DNA ve forenzní oblasti a v diagnostice mitochondriálních chorob. Cílem práce bylo sjednotit dostupné informace týkající se nejprve mitochondrií a lidské mitochondriální DNA, konkrétně jejich struktury, vlastností a funkce, a dále podrobněji představit forenzní a diagnostickou oblast, kde mitochondriální DNA slouží jako základní odrazový můstek analýzy. Práce je také obohacena o konkrétní případy využití mitochondriální DNA při identifikaci nalezených lidských ostatků a rovněž nabízí pohled na nejčastěji využívané diagnostické postupy, které jsou nezbytné ke správnému určení diagnózy mitochondriálního onemocnění.

Posun v technologiích sekvenování mitochondriálního genomu otevřel dveře novým možnostem, a umožnil tak zrychlit výzkum mitochondriálních chorob. Vzhledem k tomu, že se tato oblast výzkumu stále zdokonaluje, je možné, že se zanedlouho dočkáme i objevení účinné terapie mitochondriálních onemocnění, která zatím (až na výjimku) stále zůstává velice problematická.

1 MITOCHONDRIE

Mitochondrie jsou vysoce dynamické semiautonómni organely, které společně s dalšími organelami nacházíme v eukaryotických buňkách. Buňka je definována jako základní stavební a funkční jednotka organismu. Rozlišujeme eukaryotickou buňku živočišnou, rostlinnou a buňku hub. Živočišná buňka se skládá z jádra a cytoplazmy, kterou obklopuje plazmatická membrána, oddělující cytoplazmu od extracelulárního prostoru. Cytoplazma obsahuje funkční podjednotky buněk, zvané organely. Organely lze rozlišit podle přítomnosti membrány na membranózní a nemembránové. K těm nemembránovým řadíme cytoskelet, ribozomy, proteazomy a centrioly. Mezi membranózní organely patří endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, transportní vezikuly, endozomy, lysozomy, peroxizomy a již zmíněné mitochondrie. Součástí jádra eukaryotické buňky je i jadérko. U většiny živočišných buněk nacházíme také řasinky, které se z důvodu jejich modifikované struktury nepohybují. Řasinky jsou podle nejnovějších poznatků zodpovědné za koordinaci klíčových procesů během vývoje a homeostázy tkáně [1, 2].

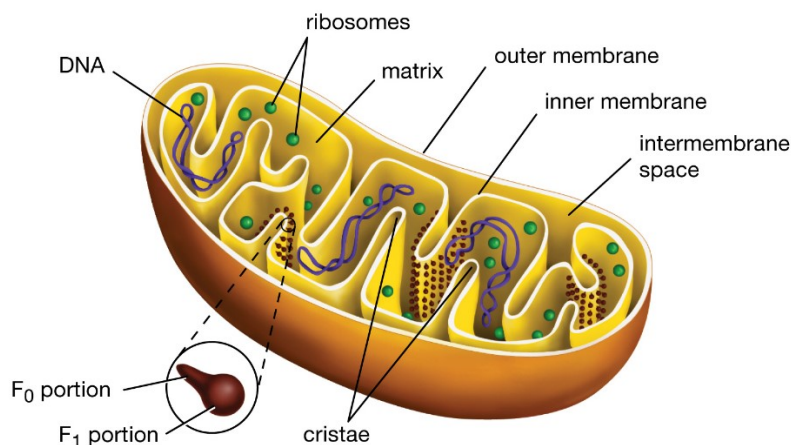
Rostlinná buňka se liší od buňky živočišné přítomností buněčné stěny obsahující celulózu a další polysacharidy. Dále se liší chyběním lysozomů, které byly nahrazeny velkou membránově vázanou vakuolou. Typickým znakem rostlinné buňky jsou také plasmodesmy a chloroplasty.

Buňka hub je obklopena buněčnou stěnou na bázi chitinu. Výztuž buněčné stěny tvoří různé glukany a proteiny. Plazmatická membrána buňky hub obsahuje místo cholesterolu ergosterol [2].

1.1 Struktura mitochondrií

Jedná se o organely protáhlého tvaru se zaoblenými konci. Průměr mitochondrie se pohybuje přibližně kolem 1 μm a délka může dosahovat až 10 μm . Mitochondrie se vyznačují dvojitou membránou. Vnější membrána je relativně propustná z důvodu přítomnosti velkých pórů. Vnitřní membrána vytváří několik záhybů, které se nazývají kristy. Tyto záhyby vybíhají do vnitřního prostoru organely, čímž se zvyšuje její vnitřní povrch. Vnitřní membrána obsahuje i proteinové komplexy $F_1 - F_0$, kde dochází k syntéze adenosintrifosfátu (ATP). Na rozdíl od vnější membrány je vnitřní membrána nepropustná. Mezimembránový prostor o šířce 10–20 nm obsahuje tekutinu o podobném složení jako má cytosol, což je dáno vysokou propustností vnější membrány. Matrix, vnitřní prostor mitochondrie, obsahuje kruhovou mtDNA, mechanismus k syntéze proteinů a enzymy, potřebné například pro cyklus kyseliny citrónové [1]. Struktura mitochondrie je patrná na Obrázku 1, který představuje její přibližnou podobu.

Růst a dělení stávajících mitochondrií vede ke vzniku mitochondrií nových. Počet, velikost a umístění mitochondrií se liší mezi jednotlivými buňkami. Tyto parametry se mohou měnit i v průběhu 24 hodin, neboť se mitochondrie účastní štěpných a fúzních událostí nezávislých na celkovém dělení buněk [1, 2].



© Encyclopædia Britannica, Inc.

Obrázek 1 – Struktura mitochondrie; DNA, ribozomy (ribosomes), matrix, vnější membrána (outer membrane), vnitřní membrána (inner membrane), mezimembránový prostor (intermembrane space), kristy (cristae), proteinový komplex $F_1 - F_0$ (F_0 portion, F_1 portion); převzato z: Zdroje obrázků [1]

1.2 Funkce mitochondrií

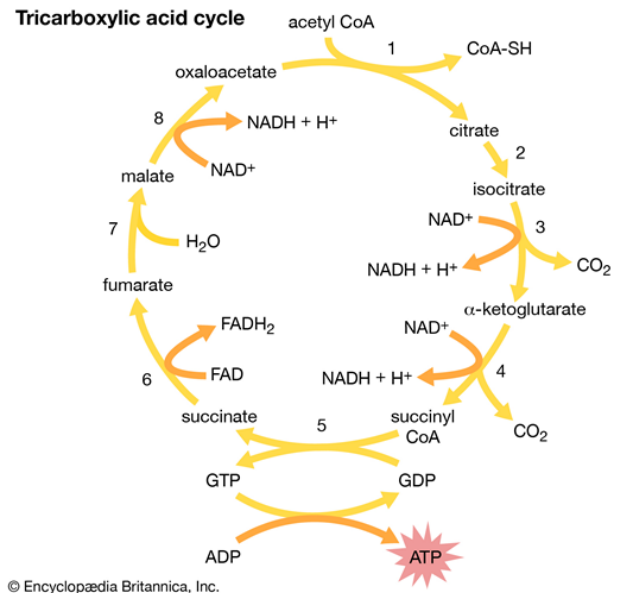
Mitochondrie zodpovídají za energetický metabolismus buněk neboli buněčné dýchání a jsou tak hlavními producenty adenosintrifosfátu (ATP). Schopností molekuly ATP je přenos vysoké energie. Buňky s vysokou metabolickou aktivitou obsahují více mitochondrií, z čehož vyplývá, že počet přítomných mitochondrií závisí na metabolické úrovni buňky. Většina ATP v heterotrofních buňkách je získávána extrakcí chemické energie z glukózy. Kromě glukózy existují pro buněčné dýchání i další zdroje substrátu. Tyto zdroje jsou generovány metabolismem proteinů, lipidů a nukleových kyselin. Mitochondriální energetický metabolismus sestává ze čtyř klíčových fází – glykolýza, oxidace pyruvátu, cyklus trikarboxylové kyseliny (známý také jako cyklus kyseliny citrónové nebo Krebsův cyklus) a transport elektronů [2, 3].

V aerobním buněčném dýchání dominují redoxní reakce, z nichž každá je katalyzována enzymem. Nejdůležitější složkou celého procesu je nikotinamidadeninukleotid (NAD). Jedná se o nukleovou kyselinu působící jako koenzym, jejíž primární úlohou je přenos elektronů během redoxních reakcí. Ziskem energie z různých meziproduktů dochází k redukci NAD^+ za vzniku NADH, tedy molekuly s vysokou energií, dvěma elektrony a jedním vodíkovým

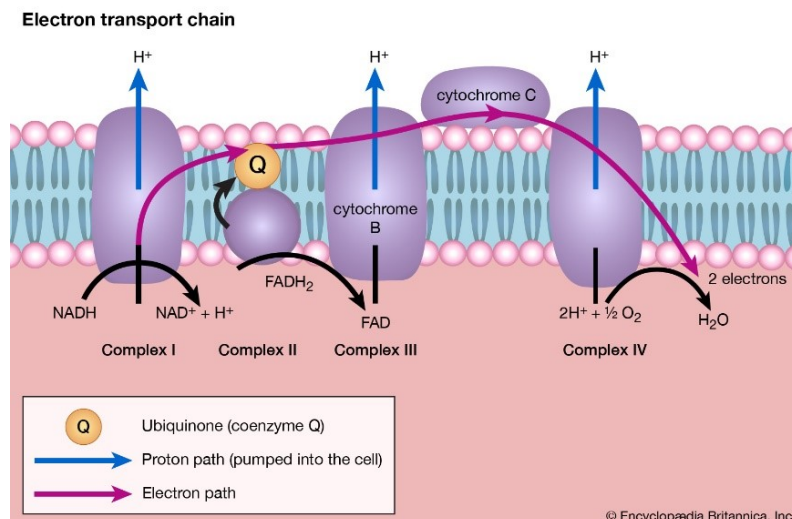
ionem. Redukovaná forma molekuly, NADH, slouží k přesunu energie mezi různými fázemi aerobního dýchání. V posledním kroku se tato molekula oxiduje, což nakonec vede k syntéze ATP.

Jedna molekula glukózy dokáže teoreticky vyprodukovat 29 molekul ATP, což je založeno na kumulativní produkci z glykolýzy, cyklu trikarboxylové kyseliny a nedávného zjištění, že eukaryotická buňka transportuje dostatek protonů k produkci přibližně tří molekul ATP pro každý NADH a dvou molekul ATP pro každý FADH₂.

Nejdůležitější úlohou cyklu trikarboxylové kyseliny, zobrazeném na Obrázku 2, je produkce vysokoenergetických nosičů elektronů, NADH a FADH₂. Tyto redukované molekuly obsahují pár elektronů s vysokým přenosovým potenciálem, a tedy i energii s vysokým potenciálem. Přenos těchto elektronů z donorů na akceptory je známý jako oxidativní fosforylace. Jedná se o primární způsob syntézy ATP v eukaryotických buňkách. Oxidativní fosforylace je dokončena řadou proteinových komplexů, které se označují jako komplexy I–IV, z nichž každý má sadu charakteristických kofaktorů a funkčních skupin pro usnadnění redoxních reakcí. Přesun elektronů mezi komplexy usnadňují mobilní transportní molekuly, ubiquinon a cytochrom c [2]. Tento tzv. elektronový transportní řetězec je zobrazen na Obrázku 3.



Obrázek 2 – Cyklus trikarboxylové kyseliny; převzato z: Zdroje obrázků [2]



Obrázek 3 – Elektronový transportní řetězec; komplexy I–IV včetně transportních molekul ubichinonu (Q) a cytochromu c; modrá šipka představuje cestu protonů a fialová šipka cestu elektronů; převzato z: Zdroje obrázků [3]

V případě nedostatku kyslíku se buňky musí spoléhat na alternativní formu dýchání, aby udržely dostatečné hladiny ATP. Běžně používaná metoda anaerobního dýchání je známá jako fermentace (kvašení). Fermentaci předchází glykolýza, která využívá v mnoha případech jako klíčový reaktant pyruvát. Existují dva obecné mechanismy fermentace: alkoholová fermentace a fermentace kyseliny mléčné. Při alkoholové fermentaci se pyruvát přeměňuje na meziprodukt acetaldehyd, který se poté redukuje pomocí NADH a vzniká etanol. Oxidace NADH za vzniku NAD^+ umožňuje další glykolýzu. Fermentace kyselinou mléčnou nemá žádný meziprodukt, a tudíž je samotný pyruvát redukován NADH za vzniku laktátu. Velké množství laktátu v savčích buňkách může dramaticky změnit pH tkáně a způsobit tak vážné následky. Anaerobní dýchání poskytuje buňkám nízký, ale konstantní proud ATP k využití v dalších buněčných metabolických reakcích. Tento způsob získu energie je tedy méně účinný než biosyntéza aerobní energie [2].

Energii ve formě ATP je možné získat také pomocí beta-oxidace mastných kyselin. Štěpením beta-oxidací vzniká jako konečný produkt, kromě redukovaných molekul NADH a FADH_2 , i acetyl-CoA, který vstupuje, stejně jako v případě štěpení sacharidů, do cyklu trikarboxylové kyseliny. Vedlejším produktem beta-oxidace mastných kyselin jsou ketolátky, jejichž tvorba probíhá v játrech a ledvinách. Jedná se o vysokoenergetické sloučeniny, které mohou být transportovány krví do jiných tkání, kde dochází k jejich zpracování a také vstupu do cyklu trikarboxylové kyseliny. V případě zhoršené oxidace glukózy se tak ketolátky stávají alternativním zdrojem energie [4].

Dále jsou mitochondrie spojovány s uhlíkovým cyklem, syntézou steroidních hormonů a homeostázou vápníku. Na homeostáze vápníku se podílejí tím, že v sobě ukládají vápenaté ionty, které jsou v případě potřeby uvolňovány zpět do cytosolu. Zvýšená hladina mitochondriálního vápníku také stimuluje syntézu ATP. Při mitochondriální oxidativní fosforylaci dochází k produkci velkého množství reaktivních forem kyslíku (ROS) jako vedlejšího produktu, tudíž se mitochondrie stávají i hlavním zdrojem intracelulární produkce ROS. Důležitou úlohou mitochondrií je také regulace různých základních buněčných fyziologických procesů, ke kterým patří diferenciace a pluripotence buněk nebo buněčná smrt. V důsledku toho byly dysfunkční mitochondrie pozorovány u mnoha patologických stavů, včetně rakoviny, kardiovaskulárních poruch a metabolických onemocnění. Dle nedávného zjištění jsou mitochondrie také možným účinným cílem k regulaci a podpoře funkcí mezenchymálních kmenových buněk. Pro zachování strukturální a funkční integrity buňky je nezbytné, aby byly mitochondrie podrobeny jemné regulaci. Pokud se mitochondrie poškodí, podstoupí proces mitofagie, programované mitochondriální smrti, čímž se nemohou na produkci energie dále podílet [1, 2, 3, 4, 5].

1.3 Původ mitochondrií

V evoluci eukaryotického života hrála jednu z nejdůležitějších rolí endosymbióza, pomocí níž došlo s největší pravděpodobností k vývoji jednobuněčných eukaryotických buněk.

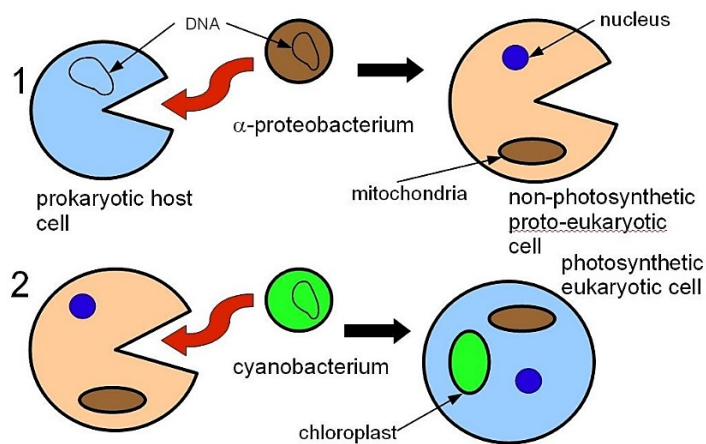
Endosymbióza je fenomén, ve kterém daná buňka, působící jako hostitel, přijímá menší buňku nebo endosymbiont nejčastěji prostřednictvím fagocytózy nebo pinocytózy. Alternativně může endosymbiont pro vstup do hostitelské cytoplazmy využít i specializované mechanismy. Po účinné integraci endosymbionta do hostitelské cytoplazmy dojde k jeho transformaci a vzniká organela s unikátními vlastnostmi. Endosymbiont získává ochranu před potenciálními predátory a přístup k intracytoplazmatickému prostředí poměrně bohatému na živiny. Hostitelská buňka zase tímto spojením získává biologickou výhodu v podobě další nutriční cesty.

Obecně se předpokládá, že se právě tímto způsobem vyvinula jednobuněčná eukaryota, a to z prokaryotických buněk, starověkých archea nebo primitivního eukaryotického předka s fagotrofním způsobem výživy. Endosymbióza se poté uplatnila i v případě eukaryot mnohobuněčných.

Organely, které jsou pro většinu eukaryot společné, mají podle této endosymbiotické teorie původ v bakteriích. K těmto organelám můžeme zařadit právě mitochondrie, dále endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát nebo chloroplasty [6].

Literatura nabízí několik důkazů o endosymbióze. Prvním z nich je strukturální a funkční podobnost bakteriální DNA, ribozomů a enzymů s mitochondriálními a chloroplastovými organelami. Další důkaz se opírá o podobnost bakteriálního biochemického aparátu, který má schopnost generovat ATP oxidativní fosforylací nebo fotosyntézou. Hypotézu endosymbiózy podporuje i citlivost prokaryotických, chloroplastových a mitochondriálních ribozomů na podobná antibakteriální činidla. Nejvýznamnějším důkazem o bakteriálním původu chloroplastů a mitochondrií je, že tyto organely nejsou schopné vznikat *de novo*. Místo toho se duplikují procesem připomínajícím binární štěpení. Navíc, pokud by byly tyto organely z buňky odstraněny, ztratily by schopnost udržet se v další generaci.

Předpokládá se, že k endosymbióze mitochondriálního předka došlo pouze jednou, zatímco endosymbióza, která vedla ke generování moderních chloroplastů, se mohla uskutečnit několikrát. Vícenásobná evoluce chloroplastů vedla k různým úrovním endosymbiózy, což způsobilo specializaci různých prvoků, řas a rostlin. Naproti tomu mitochondriální anatomie se zdá být u různých druhů podobná. Výjimku podobnosti mitochondriální anatomie tvoří přítomnost mitozómů a hydrogenozómů u některých prvoků a jiných organismů. Rozdíly ve velikosti, anatomii a biochemii chloroplastů mohou také naznačovat vícenásobné požití různých rodových druhů sinic. K samotnému pohlcení mělo dojít před 2–3 miliardami let. Chloroplasty jsou považovány za endosymbioticky vyvinuté formy rodových sinic, kdežto mitochondrie za rodovou linii proteobakterií (viz Obrázek 4) [6].



Obrázek 4 – Endosymbióza. 1) Pohlcení proteobakterie prokaryotickou hostitelskou buňkou za vzniku nefotosyntetizující eukaryotické buňky s mitochondrií a jádrem. 2) Pohlcení cyanobakterie nefotosyntetizující eukaryotickou buňkou za vzniku fotosyntetizující eukaryotické buňky s mitochondrií, jádrem a chloroplastem; upraveno; převzato z: Zdroje obrázků [4]

V průběhu intracytoplazmatického symbiotického vztahu nakonec dojde k poměrně dramatickým změnám, které závisí na stavu a fázi endosymbiózy. Dochází k tomu, že hostitelská buňka začne integrovat genom endosymbionta. V případě některých starověkých

endosymbiontů, jako jsou mitochondrie nebo chloroplasty, nastává přenos více než 90 % genových klastrů do jaderného genomu hostitelské buňky za normálního fungování endosymbionta. Konkrétně se to týká klastrů, zodpovědných za proteomickou a jinou biomolekulární syntézu. Endosymbiotické genové přenosy (EGT) jsou charakterizované tokem a trvalou integrací genetických materiálů z endosymbionta do jádra hostitelské buňky. Jedná se o typ horizontálních genových přenosů (HGT), které zahrnují laterální, spontánní a nereprodukční pohyb genů z jedné buňky do druhé prostřednictvím biologických procesů, jako je transformace, transdukce a konjugace. Nezbytností EGT je navození dominance hostitele, zahájení jaderně-cytoplazmatických spojení a umožnění vhodné kontroly nad biosyntetickým potenciálem endosymbiontů. EGT mohou také hrát roli ve strukturálních a fyziologických změnách endosymbiontů, což bylo vypořádáno ze strukturálních odlišností dlouhodobých endosymbiontů a jejich přirozených volně žijících protějšků. Příkladem mohou být právě mitochondrie. Přestože jsou mitochondrie bakteriálního původu, sdílí s moderními volně žijícími protějšky pouze několik anatomických detailů. Z tohoto důvodu se vedly o postavení mitochondrie jako endosymbionta vážné diskuze. I přes některé pochybnosti byla mitochondrie za endosymbionta nakonec uznána.

Kromě teorie endosymbiózy existuje i několik dalších teorií. K těm nejznámějším patří vodíková hypotéza, která uvádí, že rodová specializovaná archeobakteriální buňka s primitivním cytoskeletem pohltila rodový metanogen, což potenciálně vyústilo v původ všech moderních „mitochondriových“ eukaryot. Podle této hypotézy došlo nejen k vytvoření kompartmentalizované organelární složitosti, ale také ke zrychlení evoluce prokaryot na eukaryota. Další hypotéza, která nesahá daleko do historie, např. naznačuje, že při spojení anaerobního hostitelského prokaryota s alfa-proteobakteriálním symbiontem, za zřejmě částečně aerobních podmínek v hlubinných hydrotermálních prostředích, dochází k eukaryogenezi [6].

Otázkou původu mitochondrií a plastidů se zabývala již na konci 19. a začátku 20. století řada významných osobností z oblasti biologie, botaniky a histologie. Od konce 19. století do poloviny 20. století bylo na toto téma vydáno několik stěžejních publikací, se kterými jsou spojeny čtyři významná jména, a to Schimper, Altmann, Mereschkowski a Wallin. Obrovský přínos měla i pozdější publikace Margulisové a Sagana [7].

Žádná z hypotéz o původu mitochondrií ale nebyla dosud uznána za tu jedinou správnou. Vzhledem k tomu, že se stále objevují nová fylogenetická data, pracuje se na variantách původních teorií nebo dokonce vznikají i teorie nové [8].

mtDNA, na rozdíl od nDNA, postrádá introny. U některých genů jako je např. MTATP6 a MTATP8 se vyskytují překrývající se oblasti. Z 93 % obsahuje mtDNA kódující oblasti. Jedinou nekódující oblastí je tzv. vytěšňovací smyčka (D-smyčka, D-Loop), která je na rozdíl od celé mtDNA trojvláknová. V D-smyčce se nachází počátek syntézy těžkého řetězce a oba transkripční promotory těžkého řetězce – HSP1 a HSP2.

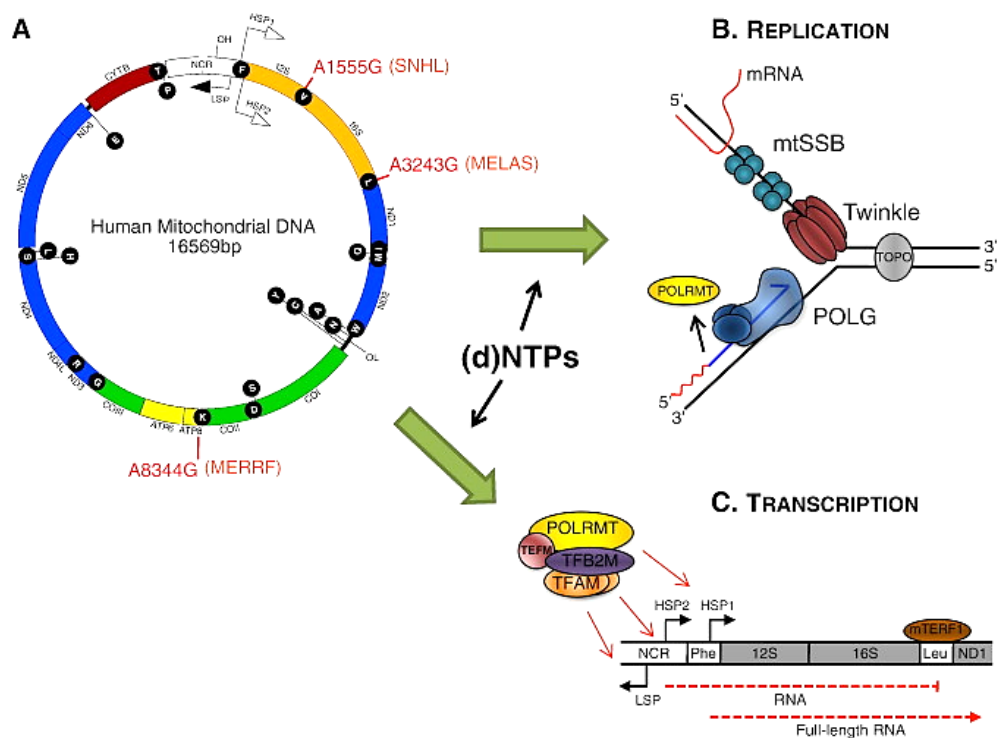
mtDNA je ve formě nukleoidů, tedy komplexů jedné molekuly mtDNA s řadou proteinů, spojena s vnitřní mitochondriální membránou. Proteinový aparát, umístěný v nukleoidech, umožňuje replikaci, transkripci, opravy a balení DNA. Nukleoidy také obsahují mtDNA polymerázu, dále helikázu mtDNA a vazebné proteiny twinkle a mtSSB. Stabilita mtDNA je udržována pomocí chaperonových proteinů HSP90- β a HSP70, které jsou rovněž součástí nukleoidu [10].

2.2 Replikace, transkripce a translace mitochondriální DNA

Na replikaci mtDNA nemá vliv buněčný cyklus, ale samotná nDNA, která zajišťuje i její integritu. K replikaci mtDNA dochází nepřetržitě, a to i v buňkách, které nemají schopnost dělení (např. centrální neurony nebo vlákna kosterního svalstva). Replikace mtDNA probíhá v replizomu, což je komplex DNA a proteinů, tvořící replikační aparát. Proteinový komplex obsahuje polymerázu gama, jejíž katalytická podjednotka o velikosti 140 kDa je kódována genem POLG a další dvě doplňkové podjednotky o velikosti 55 kDa kódovány genem POLG2. Tento komplex slouží jako DNA polymeráza, dále vykonává 3'-5' exonukleázovou (korekturní) aktivitu a 5'dRP lyázovou aktivitu, která je nezbytná pro enzymatickou opravu DNA. Aktivitu polymerázy gama lze zvýšit stabilizací jednovláknových oblastí mtDNA na replikačních vidlicích. Na stabilizaci se podílí mitochondriální jednovláknový vazebný protein (mtSSB), který je rovněž součástí replizomu. 5'-3' DNA helikázu mtDNA představuje protein twinkle. Tento protein rozplétá dvouvláknovou mtDNA, usnadňuje syntézu mtDNA a slouží také jako primáza mtDNA, jejímž úkolem je aktivace syntézy nukleotidů. Jako topoizomeráza se v případě mtDNA uplatňuje mitochondriální topoizomeráza I, kódovaná genem TOP1mt, a topoizomeráza III α , kódovaná genem TOP3a [10, 11].

Transkripce mtDNA je zprostředkována proteinovým komplexem obsahujícím mitochondriální RNA polymerázu (POLRMT) a transkripční faktor TFB2M. TFB1M, který byl původně chybně uváděn taktéž jako transkripční faktor, působí jako dimethyltransferáza, která stabilizuje malou podjednotku mitochondriálního ribozomu. Mitochondriální transkripční faktor A (TFAM) aktivuje transkripci, váže DNA a sbaluje ji do nukleoidu. Dále slouží jako chaperon mtDNA, čímž ji chrání před oxidačním poškozením.

Jednotlivé řetězce mtDNA se transkribují do molekuly mRNA, která vždy obsahuje všechny geny. Lehké vlákno je transkribováno z promotoru lehkého vlákna a těžké vlákno ze dvou promotorů těžkého vlákna – HSP1 a HSP2. K prodlužování transkriptu dochází pomocí mitochondriální RNA polymerázy (POLRMT), kterou zesiluje mitochondriální transkripční elongační faktor (TEFM). Dle původní hypotézy je transkripce ukončena pomocí mitochondriálního terminačního faktoru 1 (mTERF1). Novější poznatky ale této hypotéze odporují a přesné ukončení transkripce tak zůstává nejasné [10, 12]. Replikace a transkripce je zobrazena na Obrázku 6.



Obrázek 6 – Lidská mtDNA a faktory umožňující její replikaci a transkripci. A) Schématický diagram lidské mtDNA včetně tří nejčastějších mutací mtDNA s jejich asociovanými klinickými fenotypy (SNHL, MELAS, MERRF). B) Replikace mtDNA. C) Transkripce mtDNA; upraveno; převzato z: Zdroje obrázků [6]

Translaci je možné rozdělit na čtyři po sobě jdoucí kroky – iniciaci, elongaci, terminaci a recyklaci ribozomů. Mitochondriální translace začíná dvěma mitochondriálními iniciačními faktory – mtIF2 a mtIF3. MtIF3 disociuje mitochondriální ribozom (mitoribozom) na dvě podjednotky a s tou menší podjednotkou vytvoří iniciační komplex. Mitoribozomy jsou částečně kódovány mtDNA pomocí genů MTRNR1 a MTRNR2, ale vyžadují i dalších 81 proteinů nDNA. Po sestavení iniciačního komplexu následuje navázání mRNA na malou podjednotku ribozomu v komplexu, čímž dojde k zarovnání iniciačního kodonu (AdeUraGua nebo AdeUraAde) k peptidylovému místu (P) mitoribozomu. Aminoacylovaný iniciátor

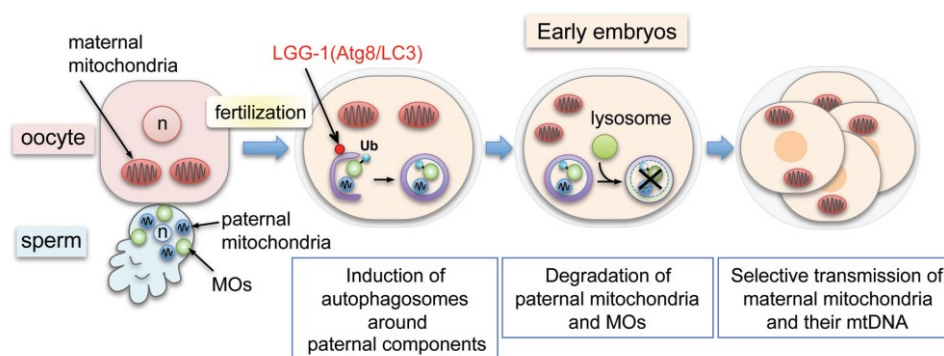
mt-tRNAMet podstoupí formylaci methioninu (fMet), čímž se zvýší jeho afinita k mtIF2. mtIF2 spojí fMet-tRNAMet s mRNA a sestaví mitochondriální monozom. Samotné prodlužování peptidů (elongace) je řízeno pomocí jaderně kódovaných genů, mezi které patří i mitochondriální elongační faktor Tu (mtEFTu), mitochondriální elongační faktor Ts (mtEFTs) a mitochondriální elongační faktor G1 (mtEFG1). Úlohou mtEFTu je vazba tRNA na mitoribozom, kdy mtEFTu vytvoří komplex s GTP a aminoacyl tRNA a poté vyše tRNA na akceptorové místo (A), kde dojde ke spárování báze tRNA s mRNA. Hydrolyza GTP způsobí vznik peptidové vazby, mtEFTu je uvolněn a komplex GTP-mtEFTu vzniká nově pomocí mtEFTs. MtEFG1 přesouvá nově přidané aminokyseliny o jednu pozici a umožňuje jejich začlenění. Konkrétně dochází k uvolnění deacetylované tRNA z místa P, translokaci peptidyl-tRNA z místa A do místa P a výstupního (E) místa. mRNA se tak posune o jeden kodon. Terminace translace je navozena mitochondriálním uvolňovacím faktorem 1a (mtRF1a), který rozpoznává stop kodony, UraAdeAde a UraAdeGua, v místě A a spouští hydrolyzu vazby mezi terminální tRNA a vznikajícím peptidem. Nakonec se uplatní mitochondriální ribozomální recyklační faktory, mtRRF a mtEFG2, které katalyzují uvolňování mRNA, deacetylovaných tRNA a ribozomálních podjednotek [10, 12, 13].

2.3 Mutace mitochondriální DNA

Mitochondriální genom má zhruba desetkrát větší pravděpodobnost mutace než genom jaderný. Poškození mtDNA, způsobené ROS nebo radiací, bývá v porovnání s nDNA mnohem závažnější a trvalejší, a to z důvodu omezené schopnosti opravy genomu. V případě poškození mtDNA často dochází k prohlubování mitochondriální dysfunkce doprovázené zvýšenou produkcí ROS. Každá tkáň je na typy a úrovně mutací mtDNA jinak citlivá a mutační zátěž se může s časem měnit. Pokud vzniknou v mitochondriích genetické či metabolické změny, dochází často k řadě onemocnění. Tato onemocnění vykazují charakteristické vzory dědičnosti – replikativní segregaci, homoplazmii/heteroplazmii a mateřskou dědičnost. V případě vzniku mutace v buněčné mtDNA, dojde k vytvoření smíšené intracelulární populace mutantních a normálních molekul – heteroplazmii. Při dělení buňky se mutantní mtDNA rozdělí náhodně do jedné nebo druhé dceřiné buňky. V dalších buněčných liniích se může, vzhledem k této náhodě, procento mutantní mtDNA zvýšit nebo naopak snížit, či dokonce vrátit do normálu (homoplazmie). Tento proces je známý jako replikativní segregace. Výsledný fenotyp onemocnění závisí na relativním poměru normální a mutantní mtDNA v buňkách konkrétní tkáně. Mitochondriální poruchy se tak vyznačují sníženou penetrancí, variabilní expresí a pleiotropií [14, 15].

2.4 Mateřská dědičnost mitochondriální DNA

mtDNA je přenášena pouze po mateřské linii. Lidská mtDNA je z 99,99 % zděděna po matce, což je dáno zředěním mtDNA otce. Spermie nese kolem části bičíku pouze asi 100 mitochondrií, kdežto oocyt jich obsahuje 100 000. Mitochondrie spermií jsou také označeny molekulami ubikvitinu, což společně s procesem autofagie vede k jejich zničení. U eukaryot obecně je selektivní odstranění spermatických mitochondrií během embryogeneze do značné míry neznámé, i když se u savců předpokládá uplatnění právě ubikvitin-proteazomové dráhy. Po oplodnění pohltí vytvořené autofagozomy otcovské mitochondrie včetně jejich mtDNA a následně dochází k jejich degradaci v lysozomech. Na Obrázku 7 je zobrazena autofagie otcovských mitochondrií a od spermií odvozených membránových organel embrya Hád'átka obecného (*Caenorhabditis elegans*) [15, 16].



Obrázek 7 – Oplodněním navozená autofagie. Embryo Hád'átka obecného (*Caenorhabditis elegans*). Po oplodnění vstupují spermatické mitochondrie a membránové organely (MOs) do cytoplazmy oocytů, kde jsou rozpoznány jejich ubikvitinové signály (Ub (modře)), dochází k jejich pohlcení autofagozomy a degradaci v lysozomech. (V případě *C. elegans* není ubikvitinem označena mitochondrie, ale spermatická membránová organela, z čehož vyplývá, že otcovské mitochondrie jsou rozpoznány nezávisle na ubikvitinaci). Pomocí LGG-1 (Atg8/LC3) (červeně) byly při tomto výzkumu označeny autofagozomy; převzato z: Zdroje obrázků [7]

Z důvodu autofagické degradace otcovských mitochondrií je tedy dosaženo pouze mateřské dědičnosti mtDNA. Hlavní důvod, proč musí být otcovské mitochondrie odstraněny, není zcela znám. Hypotézou je zabránění šíření silně poškozených otcovských mitochondrií a/nebo mtDNA vlivem ROS na další generace [16].

Je nutno ale poznamenat, že se objevil i případ přenosu po linii otcovské. Jednalo se o 28letého muže, kterému byla ve svalové tkáni objevena jak mateřská, tak otcovská mtDNA. Jeho ostatní tkáně se touto anomálií již nevyznačovaly. Existují i další důkazy pro lidskou biparentální mitochondriální dědičnost, kdy byla u tří nepříbuzných rodin identifikována heteroplazmie mtDNA, kterou nebylo možné vysvětlit mateřskou dědičností. U těchto tří případů ale nebylo mitochondriální onemocnění potvrzeno. K učinění závěrů o otcovské nebo

biparentální dědičnosti by byly zapotřebí další studie a identifikace dalších případů potenciální otcovské dědičnosti mtDNA, proto zůstává otcovská dědičnost stále výjimkou [14, 17, 18].

2.5 Onemocnění spojená s mitochondriální DNA

První onemocnění způsobené mutací mtDNA bylo rozpoznáno v roce 1988. Jednalo se o Leberovu dědičnou neuropatii zřetelného nervu. Dosud bylo objeveno více než 200 mutací mtDNA. Tyto mutace jsou původci řady onemocnění. Nejčastěji se setkáváme s familiárními symptomy, jež zahrnují postižení zraku, sluchu, demenci, migrénu, kardiomyopatii, mrtvici, poruchy pohybu, renální dysfunkci, cukrovku, různé formy rakoviny a další [14, 18].

2.6 Využití mitochondriální DNA

Vzhledem k vysoké frekvenci mutací a pouze mateřské dědičnosti se stala mtDNA užitečným nástrojem pro studium evoluce lidstva, studium předků a uplatnila se i ve forenzní identifikaci. Díky její malé velikosti a kruhové formě se hojně využívá v archeologii, neboť je oproti nDNA odolnější vůči degradaci. Analýza mtDNA našla také uplatnění v antropologii, studiích lidské migrace nebo biogeografických výzkumech, čímž bylo umožněno zkoumání příbuznosti či mapování geografických stop jednotlivých skupin populace [14, 18, 19].

3 MITOCHONDRIÁLNÍ DNA JAKO NÁSTROJ PRO STUDIUM EVOLUCE LIDSTVA A FORENZNÍ ANALÝZU

3.1 Mitochondriální DNA a studium evoluce lidstva

Již zmíněné vlastnosti mtDNA, tedy mateřská dědičnost, nedostatek rekombinace, homoplazmie a vysoká četnost mutací v kontrolní oblasti, umožnily využít tuto molekulu v populační a evoluční genetice. Analýzou mtDNA napříč lidskou populací bylo možné nejen objasnit lidskou evoluční historii či migraci, ale i získat molekulárně genetické portréty světových populací [20].

mtDNA poskytla důkaz o africkém původu lidského druhu, jehož vznik byl datován do doby před 150 000 lety. Před asi 60 000 až 70 000 lety došlo k migraci do Asie a před 40 000 až 50 000 lety do Evropy. Následně naši předkové migrují z Asie, případně Evropy, do Ameriky, což se uskutečňuje před 20 000 až 30 000 lety. K těmto faktům bylo možné dojít na základě analýzy variací mtDNA, která posloužila k rekonstrukci dávných migrací ženských linií.

Současné podoby sekvencí mtDNA se liší od původní sekvence mutacemi, které se nahromadily během výše zmíněných migrací. Dnes jsou tyto mutace označovány jako vysokofrekvenční polymorfismy sekvencí mtDNA, jež jsou pro každý kontinent specifické. Každý polymorfismus byl spojen se specifickým haplotypem a haploskupinou. Variace mtDNA, specifická pro daný kontinent, je dána ustálením mutací pomocí genetického driftu. Dnes je možné populačně specifické polymorfismy využít pro srovnání při identifikaci potenciálně patogenních mutací mtDNA [21].

3.2 Mitochondriální DNA ve forenzí analýze

Lidská mtDNA našla uplatnění i při forezních vyšetřováních, kdy je možné právě pomocí typizace mtDNA identifikovat pohřešované osoby, válečné oběti a osoby zapojené do kriminálních případů či hromadných katastrof [22].

Analýza mtDNA se pro tyto účely využívá v případech, kdy pro analýzu není k dispozici dostatečné množství jaderné DNA (nDNA) nebo kdy je nDNA silně degradována. Příkladem mohou být vlasové stvoly bez kořínků nebo velmi staré vzorky.

Kromě nDNA a mtDNA se ve forenzí analýze pracuje i s chromozomem Y. Analýza chromozomu Y se provádí v případech sexuálního napadení bez ejakulace, sexuálního napadení mužem po vasektomii, při nálezu mužské DNA pod nehty oběti a mužské „dotykové“ DNA na kůži, oblečení nebo osobní věci ženské oběti. Jedná se tedy o případy, kdy je přítomen

přebytek DNA od ženské oběti a malý podíl DNA od mužského pachatele. Společně spadají chromozom Y, mtDNA a nDNA do kategorie rodově informativních genetických markerů, pomocí nichž je možné spojit jedince s rodinou nebo genetickým fondem předků [23].

3.3 Starodávná mitochondriální DNA

Poprvé byla starodávná mtDNA extrahována roku 1984 z vysušených svalů 140 let staré kvagy, vyhynulého druhu zebry (*Equus quagga quagga*), a o rok později z mumie egyptského dítěte. Později byl prokázán i zisk mtDNA z kosterních pozůstatků. Dnes je možné starodávnou DNA extrahovat i ze zubů, vlasů, tkání fixovaných v parafínu, dále z půdy, rostlin nebo semen.

Extrakce a amplifikace DNA ze starodávných pozůstatků je spojena s řadou obtíží. Brzy po smrti totiž dochází k modifikaci genetického materiálu, což vede k jeho fragmentaci a degradaci. Možná je i přítomnost enzymatických inhibitorů, které jsou schopny reagovat s DNA a vést k falešně negativním výsledkům. Zachování starodávné DNA může být také ovlivněno chemickým, fyzikálním nebo biologickým stresem. Problémem při extrakcích či samotných analýzách bývá i kontaminace cizím genetickým materiálem. Je proto vždy nutné vzít v úvahu možnost kontaminace starodávné DNA moderní DNA. K uchování starodávné DNA jsou naopak vhodné anaerobní podmínky, nízká teplota, nízká kyselost a prostředí bez vlhkosti [24].

Aby se zabránilo kontaminaci, je potřeba dodržovat určitá doporučení, která zahrnují použití specializovaných metod k extrakci starodávné DNA, zisk reprodukcí výsledků z několika extrakcí stejného vzorku nebo zisk reprodukcí výsledků ze sekundární laboratoře. Dále je možné ověřit přežití starodávné DNA biochemickým testem na makromolekulární uchování ve vzorku, tepelnou analýzou stáří nebo získáním DNA z dalších vzorků, které se podařilo vykopat ze stejného archeologického naleziště [25].

3.4 Analýza mitochondriální DNA

3.4.1 Hypervariabilní oblasti a haploskupiny

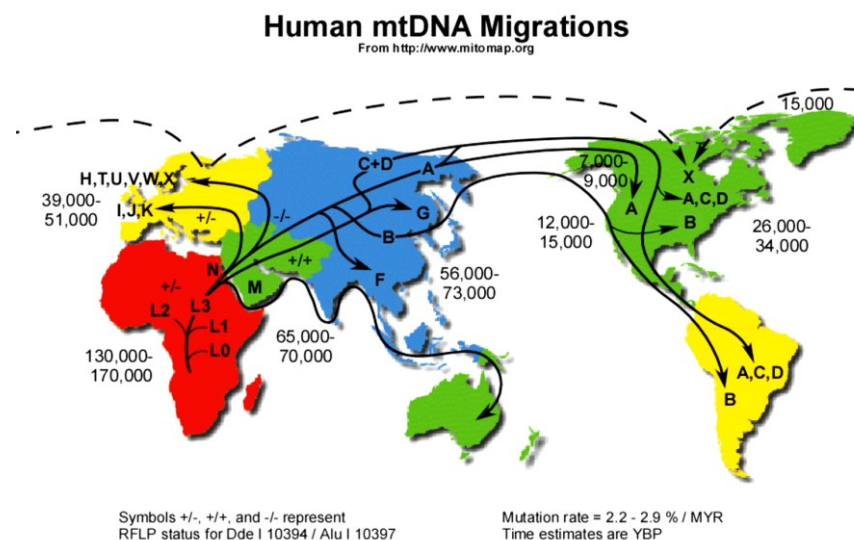
Ať už je potřeba využít mtDNA pro studium evoluce nebo pro forenzní testování, vždy budí zájem dva specifické segmenty kontrolní oblasti. Konkrétně se jedná o hypervariabilní oblast 1 (HVR1, pozice 16 024 až 16 365) a hypervariabilní oblast 2 (HVR2, pozice 73 až 340). V případě nerozlišitelných vzorků HVR1/HVR2 se analyzuje i hypervariabilní oblast 3 (HVR3, pozice 438 až 574) s dalšími polymorfními polohami.

Každá sekvence mtDNA představuje individuální haplotyp. Ten je určen na základě porovnání párů bází v této sekvenci oproti revidované cambridgeské referenční sekvenci

mtDNA (rCRS). Soubor podobných haplotypů, zděděných od společného předka, definuje haploskupinu. Ta je výsledkem sekvenční akumulace mutací po mateřské linii.

Určování haploskupin je založeno na fylogenetice, která pracuje s vědecky podloženým faktem, že všechny linie mtDNA pocházejí ze společného mateřského předka. Celosvětové variace lidské mtDNA jsou sestaveny do referenčního fylogenetického stromu, který je dostupný na webové stránce PhyloTree (<http://www.phylotree.org>). U tohoto fylogenetického stromu dochází k průběžné aktualizaci a doplňování o nově identifikované haploskupiny. Zjednodušený fylogenetický strom lidské mtDNA představuje Příloha 1. Existují i databáze haplotypů mtDNA, jako např. populační databáze mtDNA EMPOP (<https://empop.online>) nebo databáze Mitomap (<https://www.mitomap.org>) [26].

Haploskupinám je nadřazena jedna makrohaploskupina L, pod níž spadají haploskupiny L0, L1, L2, L3, L4, L5 a L6. Na pozadí haploskupiny L3 vznikly podhaploskupiny M a N, které obsahují ještě další podhaploskupiny. Každá haploskupina představuje určitou geografickou oblast. Makrohaploskupina L má původ v Africe. Podhaploskupiny M a N, vzniklé z haploskupiny L3 ve východní Africe, byly rozšířeny do Eurasie a na Nový Zéland. U lidí evropského původu je možné najít haploskupiny H, I, J, N1b, T, U, V a W. V Asii a Americe se vyskytují haploskupiny A, B, C a D, na Sibiři převážně G, Y, a Z. Haploskupina X je v nízkých frekvencích výskytu typická pro severní Afriku a západní Asii, dále pak pro Evropu a střední Asii či Ameriku. Její výskyt na Sibiři nebo ve východní Asii není znám [26, 27]. Migraci lidské mtDNA ve světě nastiňuje Obrázek 8.



Obrázek 8 – Migrace lidské mtDNA ve světě. Časové odhady jsou uvedeny v letech před současností; upraveno; převzato z: Zdroje obrázků [8]

3.4.2 Heteroplazmie a údajná možnost rekombinace

Analýza mtDNA pro účely populační a evoluční genetiky původně počítá s homoplazmií a nedostatkem rekombinace. Začaly se ale objevovat případy, kdy byla heteroplazmie prokázána. Heteroplazmatický jedinec je jedinec, který nese více než jeden detekovatelný typ mtDNA. Pokud se heteroplazmie prokáže, obvykle se liší pouze na jediné bázi v HVR1 nebo HVR2. Existují různé projevy heteroplazmie – více typů mtDNA v rámci jedné tkáně, heteroplazmie v jednom vzorku tkáně a homoplazmie v druhém, nebo jeden typ mtDNA v jedné tkáni a druhý typ mtDNA v druhé tkáni. Přítomnost heteroplazmie může způsobit problémy ve forenzním vyšetřování, což nejčastěji spočívá v nesprávné interpretaci vyloučení důkazů. S heteroplazmií jsou hlavně spojeny vzorky vlasů, proto bývá, v případě pozitivního výsledku na jednu ze dvou heteroplazmatických linií z referenčního vzorku, vyžadováno opakování analýzy mtDNA z dalších vlasů dané osoby [26].

Nedostatek rekombinace mtDNA byl považován za prokázaný fakt, ale v letech 1999–2000 bylo toto tvrzení zpochybněno. Objevily se čtyři práce, které předkládaly důkazy o rekombinaci v lidské mtDNA. Jedna z nich dokonce poskytovala přímý důkaz o rekombinaci v Melanésii. Ostatní práce byly postaveny na principu fylogenetických a statistických analýz sekvencí mtDNA. Po přezkoumání ale byla možnost rekombinace mtDNA zamítnuta, neboť se ukázalo, že práce, poskytující údajný přímý důkaz o rekombinaci, byla postavena na chybě zarovnání a ostatní práce rovněž využívaly chybná data a/nebo sporné statistické metody.

Nicméně již zmíněný případ přenosu otcovské mtDNA u mladého muže možnost obecné rekombinace zcela nevylučuje. Únik otcovské mtDNA ale stále zůstává velmi vzácným jevem [27].

3.4.3 Sekvenování mitochondriální DNA

V současné době je heteroplazmie v celém mitochondriálním genomu považována za běžný nález i u zdravých jedinců. Savčí buňka obsahuje zhruba 100 mitochondrií, přičemž každá mitochondrie nese 2–10 kopií mtDNA. Z této skutečnosti tedy vyplývá, že často se vyskytující heteroplazmatické mutace mtDNA v rámci jedné buňky nejsou žádným překvapením. Dnes existují vyspělé, vysoce výkonné sekvenační technologie, které dokáží úroveň heteroplazmie mtDNA analyzovat na celém mitochondriálním genomu. Mezi přednosti dnešních technologií se řadí spolehlivost, možnost analýzy velkého množství vzorků a nízké náklady.

Informace o mitochondriálním genomu jsou získávány pomocí přímých nebo nepřímých metod sekvenování mtDNA. Přímé metody sekvenují mtDNA, která je obohacena z celkové

buněčné DNA. Obohacení je možné provést pomocí PCR nebo mikročipové hybridizace. Nepřímé metody jsou založeny na extrakci sekvence mtDNA z dat o sekvenování exomu a celého genomu. Data z nepřímého sekvenování se začala využívat k detekci somatických mutací mtDNA. Bylo ale zjištěno, že tato detekce může poskytovat falešně pozitivní výsledky, jež jsou způsobeny pseudogeny nebo homologními sekvencemi. V tomto případě je potřeba využít potvrzovací metodu, která pečlivě izoluje mtDNA z nDNA [28].

3.4.4 Metody sekvenování

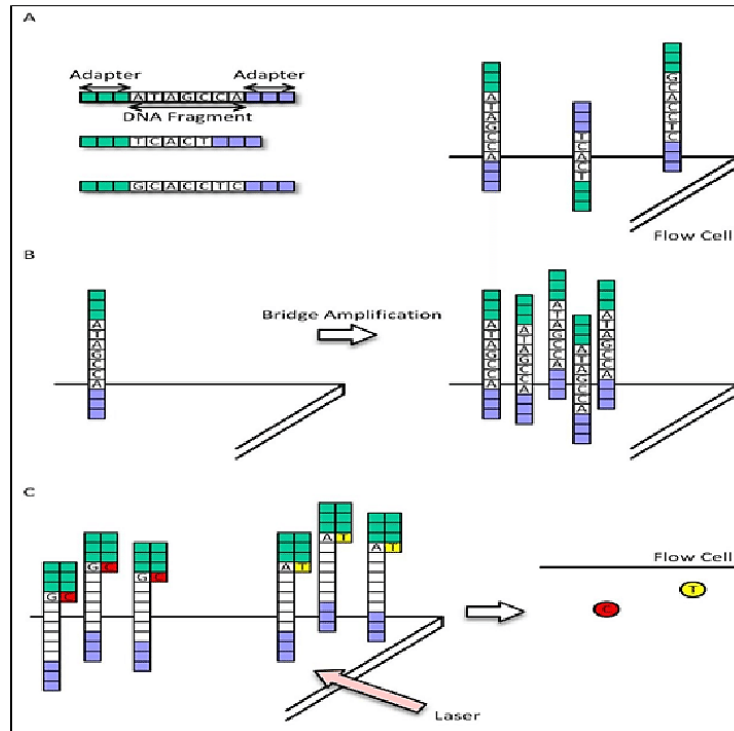
3.4.4.1 Technologie sekvenování první generace

První metody, využívané k sekvenování DNA, byly představeny roku 1977. Jednalo se o dvě metody – Sangerovo sekvenování a Maxam-Gilbertovo sekvenování. Sangerova metoda sekvenování je také známá pod názvem metoda terminace řetězce, metoda dideoxynukleotidů nebo sekvenování metodou syntézy. Maxam-Gilbertovo sekvenování se dostalo do povědomí jako metoda chemické degradace. Tyto metody ale byly nesmírně zdoluhavé a nákladné. Obě vyžadovaly pro detekci výstupu sekvenování použití elektroforézy. Sangerovo sekvenování bylo později společností Applied Biosystems (dnes Thermo Fisher Scientific) komercializováno a automatizováno pod názvem „Sangerova sekvenační technologie“, která se stala, díky své vysoké účinnosti a nízké radioaktivitě, nejpoužívanější technikou sekvenování na tři desítky let. Tato metoda nahradila i Maxam-Gilbertovo sekvenování, od jehož používání se upustilo z důvodu manipulace s toxickými chemikáliemi a radioizotopy. Největší úspěch Sangerova sekvenační technologie slavila v roce 2004, kdy se s její pomocí podařilo dokončit sekvenování prvního lidského genomu. Od roku 2005 se začaly vyvíjet novější technologie, obecně známé jako technologie sekvenování nové generace (NGS), které původní Sangerovu sekvenační technologii z převážné většiny nahradily. I forenzní výzkum, který ještě řadu let spoléhal na tuto metodu, začal přecházet na technologie NGS.

3.4.4.2 Technologie sekvenování nové generace

Vznikající technologie sekvenování nové generace napravily nedostatky z předchozí generace a vylepšily své metody o paralelní sekvenování a detekci výstupu bez potřeby elektroforézy za kratší čas a nižší náklady. V roce 2005 byla uvedena technologie Roche/454, v roce 2006 Illumina/Solexa (viz Obrázek 9) a o rok později ABI/SOLiD. Pro tyto technologie je nezbytné, ještě před zahájením sekvenování, připravit amplifikované sekvenační knihovny. V roce 2010 se objevila polovodičová technologie přístroje Personal Genome Machine (PGM)

od společnosti Ion Torrent (dnes spadá pod Thermo Fisher Scientific). Všechny tyto technologie se řadí mezi technologie druhé generace.



Obrázek 9 – Sekvenování technologií Illumina. A) Dochází k náhodné fragmentaci vzorku DNA do sekvencí a následné ligaci adaptérů na každý z konců všech sekvencí. Následuje samovolné připojení adaptérů k doplňkovým adaptérům a zaháknutí s komplementárními adaptéry na pevné desce. B) Proběhne můstková amplifikace každé sekvence pomocí PCR. C) Stanoví se každý nukleotid v sekvenci pomocí sekvenování syntézou. Laser excituje shluky, což emituje, pro každý nukleotid specifický, světelný signál. Následuje detekce signálu a jeho převedení do nukleotidové sekvence pomocí počítačových programů; upraveno; převzato z: Zdroje obrázků [9]

Dále byl představen systém detekce jedné molekuly od společnosti Helicos BioSciences (dnes již společnost neexistuje). Tento systém již nevyužívá amplifikaci pomocí PCR jako předchozí technologie, a proto představuje mezistupeň technologií druhé a třetí generace. Právě využívání amplifikace pomocí PCR, jejíž nevýhodou jsou stále poměrně vysoké náklady a dlouhý čas sekvenování, vedlo k potřebě vyvinout technologie novější.

Základ technologie třetí generace tvoří jednomolekulární sekvenování v reálném čase (SMRT) laboratoře Quake. Tuto metodu využila společnost Oxford Nanopore Technologies, se svým sekvenátorem MinION, a společnost Pacific Biosciences [29, 30].

S produkcí velkého množství dat z NGS technologií se objevují poměrně komplikované otázky ohledně jejich ukládání a zpracování. Možné porušení důvěrnosti těchto citlivých informací by pak vedlo k vážným etickým problémům, které je potřeba neodkladně řešit [30].

3.5 Vybrané případy využití mitochondriální DNA

3.5.1 Vybrané případy využití mitochondriální DNA ke studiu lidské historie

Nález lidských ostatků, starých několik stovek až tisíc let, budí vždy velký zájem. K prvním studiím, které využily DNA ke zkoumání historie lidské populace, lze zařadit 23 egyptských mumií, jejichž sekvence měla 77% homologii se sekvencí vyskytující se u moderních populací. Tato studie se ale setkala s kritikou z důvodu obav o přežití DNA ve vysokých teplotách Afriky.

Poměrně známým případem byl v 90. letech nález Ledového muže (Ötziho), jehož silně degradovanou nDNA nebylo možné využít, a tudíž musela být analyzována oblast HVRI mtDNA, pomocí níž se zjistila jeho příbuznost se současnou populací střední a východní Evropy. V roce 2008 se podařilo kompletně osekvenovat jeho mtDNA a zjistit podhaploskupinu K1 západoeurasijské haploskupiny U. Později došlo, za pomoci moderní technologie, k osekvenování jeho celého genomu, kdy se prokázala blízká příbuznost s moderními obyvateli oblasti Tyrhénského moře.

Pro lidskou evoluci byla dlouhodobou záhadou otázka, zda došlo ke křížení mezi neandertálci a anatomicky moderními lidmi. Výzkum mitochondriálního genomu neandertálců neprokázal shodu s variací současných lidí. Nicméně po analýze celého neandertálského genomu se prokázala shoda v 1–4 % genomů současných lidí v Eurasii [31].

V roce 2017 byla publikována studie linií mtDNA původních obyvatel Austrálie (Aboridžinců). K analýze byly použity vzorky od 594 Aboridžinců z celého kontinentu. Haploskupiny 78 % vzorků měly původ v Austrálii. Nejčastěji se vyskytovaly haploskupiny P, S a M42a. Stáří haploskupin, od 39 000 do 55 000 let, odpovídalo archeologickým důkazům o době kolonizace Austrálie. Aby bylo možné více prohloubit poznatky z historie mtDNA původních obyvatel Austrálie, bylo by nutné dourčit podhaploskupiny ještě nevyřešených jedinců této studie kompletním osekvenováním mitochondriálního genomu [32].

3.5.2 Vybrané případy využití mitochondriální DNA pro forenzní identifikaci

Prvním publikovaným případem, kdy se k forenzní identifikaci využila mtDNA, byl nález kosterních pozůstatků lidského dítěte v roce 1986. Dva roky před tím, tři míle od tohoto místa, zmizel z domu svých rodičů tříletý chlapec. Vzorek matky pohřešovaného chlapce a vzorek z kosterních pozůstatků lidského dítěte vykazoval stejný typ mtDNA. Bylo tedy prokázáno, že se jedná právě o tohoto pohřešovaného chlapce.

V roce 2004 se v jižním Thajsku vytvořila vlna tsunami, která za sebou zanechala okolo 5400 obětí. Pomocí mtDNA se podařilo ze vzorků zubů úspěšně identifikovat 258 z 507 obětí.

Dále bylo možné v roce 2010 identifikovat lidské kosterní pozůstatky nejmladší oběti, která byla exhumována z hromadného hrobu pocházejícího ze španělské občanské války. Identifikace byla provedena na základě porovnání mtDNA oběti se sestrou oběti, o níž se vědělo, že je v hrobě pohřbena. V tomto roce se také povedla identifikace pozůstatků známého slavného italského vojáka zabitého v první světové válce. Potomci tohoto slavného vojáka ale měli jinou mtDNA než nalezené ostatky, tudíž se zjistilo, že ostatky domnělému hrdinovi nepatřily.

Porovnáním mtDNA žijících příbuzných krále Richarda III. a mtDNA kostry, která byla vykopána roku 2012 na místě dříve stojícího kláštera Gray Friars v Leicesteru, se prokázalo, že nalezená kostra skutečně patřila králi Richardu III.

V roce 2016 se podařilo identifikovat 50 obětí z jednoho hromadného hrobu nalezeného na hřbitově ve Varšavě. Hrob pochází z komunistického období v Polsku v letech 1944–1956.

Analýza mtDNA byla také využita k identifikaci obětí teroristického činu v newyorském obchodním centru z 11. září 2001 [33].

Jedním z nejznámějších případů se stal v roce 1991 na Uralu v Rusku poblíž Jekatěrinburgu nález hrobu s lidskými ostatky, o kterých se předpokládalo, že by mohly patřit sedmičlenné ruské carské rodině Romanovců, která byla společně se svými třemi sluhy a rodinným lékařem zavražděna během ruské občanské války v roce 1918. Hrob obsahoval pouze devět těl z předpokládaných jedenácti. Forezním vyšetřováním bylo potvrzeno, že se skutečně jednalo o Romanovce. Dvě děti ale chyběly. Identifikaci ostatků bylo možné provést na základě porovnání jejich mtDNA s mtDNA žijících potomků Romanovců. Komplikaci ale představovala heteroplazmie císaře Mikuláše II., která v době vyšetřování nebyla ještě dostatečně prozkoumána. V roce 2007 byl nalezen druhý hrob, který ukrýval úlomky kostí dvou spálených koster. Pro potvrzení biologického příbuzenského spojení byla kromě mtDNA také využita analýza STR a Y-STR, která potvrdila, že se jedná o rodinné příslušníky. Nakonec se prokázalo, že ostatky, nalezené v prvním hrobě, skutečně patřily ruskému caru Mikuláši II. Romanovu, jeho manželce carevně Alexandře a jejich třem dcerám (velkokněžně Olze, Taťáně a Marii). Jejich nejmladším dětem (velkokněžně Anastázii a careviči Alexeji) patřily ostatky z hrobu druhého [34].

4 MUTACE MITOCHONDRIÁLNÍ DNA

4.1 Vznik a původ mutací

Výskyt mutací je spojen s řadou událostí či faktorů, které zvyšují pravděpodobnost jejich tvorby. Na jejich vzniku může mít podíl spontánní rozklad struktury nukleové kyseliny mtDNA nebo oxidační stres způsobený reaktivními formami kyslíku (ROS) nebo jejich chemicky aktivními metabolity. Náchylnost mtDNA k mutacím je také zvýšena její kontinuální replikativní povahou a jejím umístěním blízko vnitřní membrány mitochondrie, kde dochází k produkci ROS. Další nevýhodu představuje zaostávající vlákno mtDNA, které je během replikace jednovláknové, čímž snadněji podléhá spontánním mutacím. Na poškození mtDNA mají vliv mimo jiné i metabolické poruchy, které zvyšují rychlost mutací, narušují replikaci mtDNA a mitofagii, dále mění mitochondriální bioenergetiku a vedou k akumulaci somatických mutací mtDNA.

Detekce a oprava mitochondriálního genomu je omezena z důvodu přirozené neschopnosti mtDNA kódovat proteiny zodpovědné za opravu mtDNA. Jediný opravný systém mtDNA, tedy základní excizní opravný systém, zahrnuje 8-oxoguanin DNA glykosylázu-1 (OGG1), DNA polymerázu gama (POLG) a DNA ligázu [35].

Většina změn v mtDNA je považována za neutrální polymorfismy, které se využívají ke sledování lidských migrací, jak již bylo představeno v předchozí kapitole. Ostatní změny jsou patogenní a přispívají ke vzniku různých onemocnění. Mitochondriální onemocnění se vyvíjí v důsledku mutací genů v mtDNA nebo genů v nDNA, které kódují mitochondriální komponenty [36, 37].

4.2 Typy patogenních mutací

K nejčastěji se vyskytujícím typům mutací se řadí bodové mutace a přeuspořádání mtDNA (většinou delece), které postihují 1 z 4300 jedinců. Mutace jsou variabilní z hlediska klinického fenotypu, věku a závažnosti projevu, postižení orgánů a heterogenity symptomů pacientů. Obvykle ale dochází k postižení tkání s vysokou energetickou náročností a závislostí na oxidační fosforylaci, jako je centrální nervová soustava a nervosvalové systémy. Výsledné klinické projevy mitochondriálního onemocnění se také u každého pacienta liší z důvodu rozdílné mutační zátěže, prahového efektu dle úrovně heteroplazmie a remodelace metabolismu a buněčných signálních drah [37].

4.2.1 Bodové mutace

Výskyt bodových mutací je charakteristický jak pro geny proteinů, tak pro tRNA nebo rRNA. tRNA však obsahuje tyto mutace nejčastěji. Nachází-li se bodové mutace v proteinu, dochází k ovlivnění funkce respiračního řetězce. Pokud se však vyskytují v tRNA, mohou negativně ovlivnit celkovou mitochondriální translaci, a to z důvodu nízké dostupnosti funkční tRNA. Mezi typické znaky bodových mutací patří heteroplazmie, klinická heterogenita a vysoká recesivita. Jejich výskyt je zdůvodňován mateřskou dědičností.

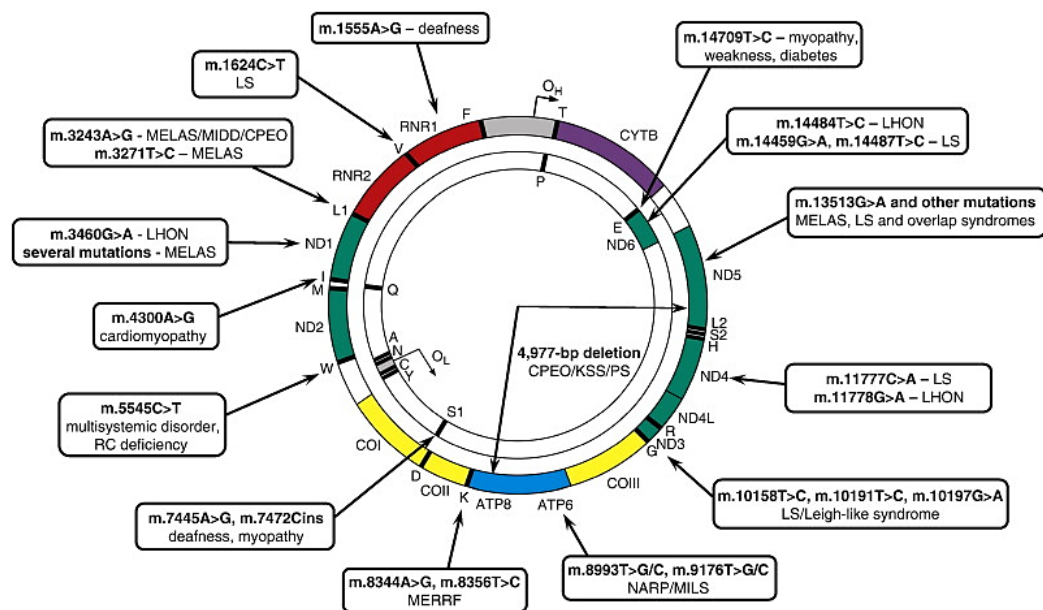
4.2.2 Delece

Delece se obvykle nacházejí mezi počátky replikace těžkého a lehkého vlákna mtDNA. Jsou doprovázeny krátkými přímými repeticemi. Mohou se vyskytovat jak jednotlivě, tak čteně s velikostí obvykle od 1,3 do 8 kb. Výskyt jednotlivých delecí je typický pro raný vývoj, ale děje se tak pouze sporadicky. Tuto delecí obsahují všechny buňky postižené tkáně. Mnohočetné delece se mohou projevit v důsledku zděděných mutací v jaderných genech, které ovlivňují replikaci mtDNA a metabolismus mitochondriálních nukleotidů. Nejdůležitějšími faktory pro posouzení klinických projevů nemoci v souvislosti s delecemi je jejich množství a rozšíření do tkání [36].

4.3 Onemocnění podmíněná mutacemi

Vzhledem k tomu, že mtDNA kóduje především proteiny systému oxidační fosforylace, její případné mutace změní aktivitu tohoto systému. Sníží se produkce ATP a zvýší tvorba ROS. Dále nastanou změny v homeostáze vápníku či v organizaci mitochondriální sítě. Tyto změny pak mohou přispět k rozvoji mitochondriálního onemocnění.

Jak již bylo zmíněno dříve, mutace v mtDNA jsou nejčastěji spojovány s neurologickými poruchami z důvodu postižení centrálního nervového systému, a dále poruchami ve tkáních, které rovněž vyžadují vysoký přísun energie. Jedná se především o srdeční a kosterní svalstvo, sítnici a endokrinní systém. Mutace mohou vést také k mitochondriální dysfunkci, jež se může projevit jako neurodegenerativní onemocnění, kardiomyopatie, slepota, diabetes či rakovina [38]. Nejčastější mutace spojované s mitochondriálními onemocněními, včetně jejich klinických projevů, jsou zobrazeny na Obrázku 10.



Obrázek 10 – Vztah mezi genotypem a fenotypem u lidských mitochondriálních onemocnění. Mitochondriální genom se zvýrazněnými místy výskytu běžných mutací mtDNA a jejich klinickými projevy; upraveno; převzato z: Zdroje obrázků [10]

4.3.1 Onemocnění podmíněná bodovými mutacemi

4.3.1.1 Syndrom MELAS

Bodová mutace m.3243A>G v genu MT-TL1 se dle úrovně heteroplazmie projevuje řadou fenotypů. Nejlépe byl však charakterizován fenotyp (syndrom) MELAS (mitochondriální encefalopatie, laktátová acidóza a příhody podobné mrtvici). S tímto onemocněním bylo spojeno přes 30 mutací. Mezi ně lze zařadit mutaci m.3271T>C v genu MT-TL1, méně často pak bodové mutace v tRNA, mRNA a rRNA. Jedná se o multisystémovou poruchu, kterou doprovází příhody podobné mrtvici (dostaví se před 40. rokem života), encefalopatie s demencí a/nebo záchvaty. Důležitým potvrzujícím znakem je i myopatie s laktátovou acidózou a/nebo roztřepená červená vlákna. Pacienti, mající typicky malou postavu, špatně snášejí zátěž, ztrácejí sluch a slábnou jim končetiny. Kromě těchto projevů se může dostavit i pigmentová retinopatie, atrofie zřakového nervu, oftalmoplegie, kardiomyopatie a další srdeční poruchy, nefropatie, epizodické kóma, myoklonus, ataxie, migrény, nehybnost střev, hluchota, hirsutismus či *diabetes mellitus*.

4.3.1.2 Syndrom MERRF

Mutace m.8344A>G v genu MT-TK je bodovou mutací vyskytující se v tRNA^{Lys}, jež v 80 % případů představuje původce onemocnění MERRF (myoklonická epilepsie s roztrhanými červenými vlákny). MERRF může být také spojeno s mutací m.8356T>C, m.8363G>A a m.8361G>A v genu MT-TK nebo vzácně s mutací v genech MT-TF, MT-TL1,

MT-TH a MT-TP. Jedná se o onemocnění projevující se především svalovými záškuby (myoklonií), záchvaty, neuropatií a ataxií. Dále se často objevuje epilepsie, méně často pak srdeční abnormality, postižení sluchu, respirační dysfunkce, mnohočetná lipomatóza, ptóza očních víček či různé psychiatrické poruchy [39, 40, 41].

4.3.1.3 Leighův syndrom

Leighův syndrom je spojován nejčastěji s bodovými mutacemi v genu MT-ATP6, konkrétně s mutací m.8993T>G, méně závažnou m.8993T>C nebo m.9185T>C. Leighův syndrom také podmiňuje mutace m.10158T>C v genu MT-ND3 či mutace m.12706 T>C v genu MT-ND5. Rovněž byly mutace nalezeny v genech MT-ND1, MT-ND4 a MT-ND6. Jedná se o těžký neurodegenerativní stav s nástupem v dětství. Charakteristická je pro něj psychomotorická regrese a mentální postižení, přičemž míra projevu obou příznaků závisí na mutační zátěži. Může se projevit multisystémovou poruchou, kdy dojde k postižení srdce, jater, ledvin a gastrointestinálního traktu [40, 42].

4.3.1.4 Syndrom NARP

Syndrom NARP (neurogenní svalová ochablost s ataxií a *retinitis pigmentosa*) podmiňují stejné mutace jako Leighův syndrom, tedy mutace m.8993T>G a m.8993T>C v genu MT-ATP6. Rozdíl v syndromech spočívá v mutační zátěži tkání, přičemž úroveň heteroplazmie větší než 90 % vede k projevu Leighova syndromu a nižší mutační zátěž k syndromu NARP. Onemocnění je charakterizováno proximální neurogenní svalovou slabostí, senzomotorickou neuropatií, ataxií a pigmentovou retinopatií. Již v raném dětství se objevují potíže s učením, opožděný vývoj a ataxie. U starších jedinců se může projevit demence. Kromě zmíněných příznaků lze pozorovat i malý vzrůst, sensorineurální ztrátu sluchu, srdeční poruchy, progresivní zevní oftalmoplegii či mírnou úzkostnou poruchu [41].

4.3.1.5 Syndrom LHON

Mutace m.11778G>A v genu MT-ND4 se stala první bodovou mutací vůbec, jež byla označena jako původce mitochondriálního onemocnění, a to konkrétně onemocnění LHON (Leberova dědičná neuropatie zřetivého nervu). Později byly s LHON spojeny i mutace m.3460G>A v genu MT-ND1 a m.14484T>C v genu MT-ND6. Tyto tři mutace jsou uváděny jako mutace primární. Existují však i vzácné primární mutace, jejichž výskyt je spjat pouze s některými populacemi. Především se jedná o populaci čínskou, kde byla zaznamenána mutace m.3635G>A v genu MT-ND1 a mutace m.10680G>A v genu MT-ND4L. Záznamy o mutaci m.3635G>A v genu MT-ND1 lze nalézt i v Rusku nebo Polsku. V souvislosti s onemocněním

LHON byly objeveny i sekundární mutace, jejichž patogenní účinek by mohl mít potenciální vliv na klinické projevy LHON. Diskuze se vedly o mutacích m.8779C>T a m.13138G>A. Jejich vliv ale nebyl dostatečně objasněn. Příkladem dalších sekundárních mutací může být mutace m.12811T>C nebo m.593T>C, které jsou běžnými variantami. Možná je i synergie sekundárních mutací s mutacemi primárními. Tato skutečnost však platí pouze v některých populacích, neboť ne všechny sekundární mutace byly spojeny s onemocněním LHON ve všech populacích. Při onemocnění LHON dochází k postižení zřetelného nervu, které se projevuje ztrátou centrálního vidění. Ztráta je obvykle akutní nebo subakutní a bezbolestná. Nejprve je zasaženo jedno oko a později, během týdnů až měsíců, i oko druhé. Onemocnění se objevuje od adolescence do pozdní dospělosti. Častěji postihuje muže, a to mezi 20. a 40. rokem života. Těhotné ženy, přenašečky, jsou před ztrátou zraku v období těhotenství chráněny z důvodu aktivace mitochondriální biogeneze a snížení produkce ROS a apoptózy pomocí estrogenů. Vzhledem k tomu, že je exprese ovlivněna genetickým a environmentálním faktorem, nemusí být ztráta zraku u všech pacientů pravidlem. Kromě ztráty zraku se mohou objevit pohybové poruchy, dystonie, migréna a roztroušená skleróza [39, 41, 43, 44].

Kromě klasického syndromu LHON byla představena i jeho autozomálně recesivní forma (arLHON). Tu podmiňují varianty v jaderně kódovaném genu DNAJC30 [45].

4.3.2 Onemocnění podmíněná delecemi

4.3.2.1 Kearns-Sayreův syndrom (KSS)

Kearns-Sayreův syndrom, nejčastější onemocnění spojené s delecemi v mtDNA, obvykle zahrnuje mutace v genech MT-ND4, MT-TH, MT-TS2, MT-TL2 a MT-ND5. Představuje delecii o délce 1,1–10 kb. Nastupuje v dětství a projevuje se před 20. rokem života chronickou progresivní externí oftalmoplegií a pigmentovou retinopatií. Doprovázet je mohou srdeční abnormality, endokrinopatie, cerebelární ataxie nebo ztráta sluchu. K úmrtí většinou dochází v rané dospělosti [40, 41].

4.3.2.2 Další onemocnění podmíněná delecemi

Delece m.8517_15421del a m.7974_15496del je spojována s onemocněními MELAS a KSS. U MELAS byla identifikována i delece m.14787_14790del v genu MT-CYB. V souvislosti s Wolframovým syndromem byla nalezena delece m.6465_14135del, dále, u pacientů se záchvaty, pak delece m.10090_15402del a m.12366_15203del. Pacient s deficitem cytochromu C vykazoval mutaci m.10961_15846del. U poruch autistického spektra (ASD) byly pozorovány delece v genech MT-ND4 a MT-CYB [40].

4.3.3 Mitochondriální onemocnění podmíněná mutacemi v jaderně kódovaných genech

Mitochondriální onemocnění může být způsobeno i mutacemi v jaderně kódovaných genech, jež jsou zodpovědné za expresi a udržování mtDNA. Typická je mutace v mitochondriální polymeráze gama (POLG), která vede k delecím a deplecím mtDNA. Tímto způsobem tedy dochází k sekundárnímu poškození mtDNA. Obecně se rozvíjí těžká encefalopatie se selektivním postižením CNS a jater, dochází k poruchám vědomí, těžké epilepsii a rozvoji akutních mozkových lézí, které ve větší míře postihují zadní mozek. Mutace v POLG1 se projevují širokou škálou klinických příznaků. Mohou se projevit jako autozomálně recesivní sensorická ataxie a neuropatie s dysartrií a oftalmoplegií, autozomálně dominantní a autozomálně recesivní familiární externí oftalmoplegie, Alpersův hepatocerebrální syndrom, parkinsonismus nebo mitochondriální spinocerebelární ataxie a epilepsie s nástupem v dospělosti [46].

4.3.4 Mitochondriální dysfunkce jako následek mutací a její podíl na některých onemocněních

Mitochondriální dysfunkce vzniká často následkem genetických mutací. Ovlivňují ji dědičné metabolické poruchy nebo faktory prostředí, jako např. léky či virové infekce. Doprovází mitochondriální poruchy s mutací v jednom genu a podílí se na patogenezi polygenních onemocnění. Typickým příkladem může být Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, kardiovaskulární onemocnění, epilepsie, rakovina, obezita či *diabetes mellitus*. Spojena bývá i s poruchami autistického spektra a dětskou mozkovou obrnou. Rovněž ovlivňuje lidské stárnutí, a to sníženou expresí mitochondriálních genů [47].

4.3.4.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerovu chorobu charakterizuje progresivní senilní nebo presenilní demence se selektivní ztrátou neuronů. Dochází ke ztrátě konektivity mezi neurony vlivem synaptických změn, neurofibrilární degeneraci a extracelulárnímu depozitu $\alpha\beta$ plaků. Mitochondriální dysfunkce se zde projevuje změnami v homeostáze vápníku a metabolismu lipidů, sníženým energetickým metabolismem a zvýšeným oxidačním poškozením. Patrný je rovněž abnormální tvar a dynamika mitochondrií. Posttranslační modifikace DRP1, tedy s-nitrosylace oxidem dusnatým produkovaným v důsledku akumulace β amyloidního proteinu, vede k mitochondriálnímu štěpení, synaptické ztrátě a poškození neuronů.

4.3.4.2 Parkinsonova choroba

Parkinsonovu chorobu charakterizuje klidový třes, rigidita a bradykineze. Příčinou je smrt dopaminergních neuronů v *substantia nigra*. Onemocnění způsobují autozomálně recesivní mutace v genech PINK1 a Parkin, jejichž úkolem je regulace kontroly kvality mitochondrií prostřednictvím mitofagie. Dysfunkce těchto dvou genů vede ke zvýšení hladiny DRP1, čímž se zvýší mitochondriální štěpení, které přispívá ke smrti neuronů.

4.3.4.3 Huntingtonova choroba

Huntingtonovu chorobu charakterizuje choreoatetóza s demencí a předčasným úmrtím. Způsobuje ji mutace v genu huntingtin, jehož nadměrná exprese vede k mitochondriální fragmentaci [48].

5 DIAGNOSTIKA A TERAPIE MITOCHONDRIÁLNÍCH ONEMOCNĚNÍ

5.1 Diagnostika mitochondriálních onemocnění

Správná a rychlá diagnostika mitochondriálních onemocnění zůstává stále poměrně velkou výzvou i přes řadu dostupných diagnostických nástrojů. Největší problém představuje rozmanitost klinických fenotypů onemocnění, zvláště u dětských pacientů. Právě u dětí je potřeba detailně sledovat klinické projevy možného onemocnění, a to již od narození, ověřovat správný vývoj dítěte a sestavit rodinnou anamnézu, aby se urychlilo případné potvrzení mitochondriálního onemocnění. Příklad rodokmenu s výskytem Leberovy dědičné neuropatie zrakového nervu uvádí Příloha 2. Dále může na tato onemocnění upozornit biochemická abnormalita. Kromě již zmíněných postupů při diagnostice je potřeba provést důkladné fyzikální a neurologické vyšetření a pátrat po příčinách objevujících se poruch, kterými mohou být periferní neuropatie, dystonie, hypotonie, svalová slabost, poruchy vidění, kardiomyopatie a další. Na tato vyšetření pak navazují metabolická vyšetření, neurovizuální metody (nejčastěji magnetická rezonance), genetické testování nebo svalová biopsie [49].

Obecně pro diagnostiku mitochondriálních onemocnění neexistuje žádný zlatý standard. I když byla biopsie tkáně tradiční testovací metodou, v současnosti se od ní upouští, a to především z důvodu preference neinvazivního přístupu ze strany pacientů. Dalším důvodem je možné riziko zdravotních komplikací, zejména u dětí, vlivem celkové anestezie, kterou tento zákrok vyžaduje.

K neinvazivním způsobům diagnostiky lze zařadit testování pomocí biochemických profilů krve a moči, elektroforézu mitochondriálních proteinů, testování aktivity mitochondriálního elektronového transportního řetězce, dále tkáňovou histochemii nebo elektronovou mikroskopii. Vývoj metod sekvenování nové generace (NGS) zasáhl i diagnostickou oblast a umožnil tak snadnější stanovování diagnózy pomocí paralelního sekvenování jaderných a mitochondriálních genů [50].

Pro správné určení diagnózy je zapotřebí tyto metody kombinovat. Biochemické testování vzorku DNA z krve nebo moči může být nejsnadnějším způsobem, jak začít diagnostiku mitochondriálních onemocnění. Avšak negativní výsledek nemusí mutaci mtDNA vyloučit. NGS, jež zahrnuje cílené sekvenování mtDNA, panelové sekvenování, sekvenování celého exomu (WES) a sekvenování celého genomu (WGS), dokáže změřit úroveň heteroplazmie mtDNA a najít geny, které se podílejí na mitochondriálním onemocnění nebo na kritických mitochondriálních funkcích. Přesto zůstává detekce některých variant mtDNA pomocí těchto

metod obtížná. V tomto případě neprůkaznost genetického vyšetření vede k odebrání vzorku tkáně. Může se jednat o močové epitelální buňky, buňky kosterního svalstva nebo tkáň s vysokou energetickou náročností, z níž se projeví klinický fenotyp. Svalová biopsie je stěžejní při podezření na progresivní externí oftalmoplegii nebo Kearns-Sayreův syndrom, kdy delece mtDNA, spojené s těmito onemocněními, nelze v krvi detekovat [51]. Příloha 3 představuje schéma diagnostického postupu při podezření na mitochondriální onemocnění.

WES a WGS se stávají stále častějšími vyšetřeními používanými v molekulární diagnostice, jež umožňují ověření variant a objevy nových genů onemocnění. Využívají se rovněž pro tzv. trio sekvenování, tedy současnou analýzu probanda a rodičů za účelem identifikace *de novo* variant, které jsou často hlavní příčinou závažných genetických poruch charakterizovaných jejich časným nástupem. Problém při těchto sekvenováních představují varianty nejistého významu (VUS), tedy varianty mtDNA s nízkou úrovní heteroplazmie, jež také mohou vyvolat onemocnění. K jejich interpretaci je zapotřebí validace pomocí funkčních testů.

Nedostatky technologií sekvenování druhé generace (krátkého čtení) by měly napravit technologie sekvenování třetí generace (dlouhého čtení a jednobuněčného sekvenování). Dále se v současnosti objevují doplňkové nástroje k analýze DNA, tzv. technologie OMICS, k nimž lze zařadit transkriptomiku, proteomiku či metabolomiku. Tyto technologie lze využít jako funkční testy při validaci VUS [51, 52].

5.1.1 Technologie sekvenování nové generace v diagnostice

Nástup NGS umožnil detekovat přibližně třikrát větší množství genů onemocnění ročně, než tomu bylo do příchodu těchto technologií. V diagnostice mitochondriálních onemocnění se před érou NGS využívalo sekvenování kandidátního genu se sekvenováním mtDNA. Tento přístup lze zvolit v případě jasných klinických syndromů, jež bývají podmíněny pouze několika málo mutacemi. Typickým příkladem může být onemocnění LHON.

Cílené sekvenování mtDNA umožňuje prohledat celou sekvenci mtDNA za účelem měření úrovně heteroplazmie. Dalším typem je panelové sekvenování, které je zaměřeno na panel genů, jenž se podílí na onemocnění. Problém ale představují variace cílových genů, které pomocí této metody nelze rozpoznat, a tudíž nemusí dojít ke správnému zachytu diagnózy. Vzhledem k objevování nových genů onemocnění se stává nevýhodou také omezená skladovatelnost panelu. Dále se využívá již zmíněné WES a WGS sekvenování, a to především pro objev nových patogenních variant [51]. Vývoj metod k objevu chorobných genů mezi lety 1988–2020 znázorňuje graf v Příloze 4.

Technologie sekvenování dlouhého čtení (LRS) pracují na principu jednomolekulárního sekvenování v reálném čase (SMRT). Zvýšená hloubka čtení umožňuje překonat chyby sekvenování, jejichž rozložení je poměrně náhodné. Polymerázy, umístěné na dně jímky speciálních průtokových buněk a obsahující značené báze, navážou jednotlivé molekuly DNA. Poté dochází na značených bázích ke kamerové detekci fluorescenčního signálu v reálném čase. Existují i další LRS, tzv. nanopórové sekvenátory, které detekují molekulu DNA pomocí kolísání iontového proudu membrány, v níž je umístěn nanopór, kterým molekula prochází. Problémem těchto sekvenátorů je jejich vyšší chybovost. LRS obecně však stále nepatří k rutinním diagnostickým metodám.

Další technologií je jednobuněčné sekvenování. Tato technologie umožňuje sekvenovat genom nebo transkriptom jednotlivých buněk. Nejprve se izolují jednotlivé buňky, poté extrahuje a amplifikuje DNA a následně připraví knihovna. Nakonec dochází k sekvenování dle protokolů NGS. Nejvíce využívanou technologií jednobuněčného sekvenování se stalo jednobuněčné sekvenování RNA [52].

5.1.2 Technologie OMICS

Technologie OMICS lze využít nejen jako funkční testy k validaci VUS, ale také k objevu variant, jež nebylo možné vyřešit pomocí WES a WGS. Pro zařazení těchto technologií jako komplementárního diagnostického nástroje k WES a WGS je však zapotřebí provést další studie [51, 52].

5.1.2.1 Transkriptomika

Transkriptomika představuje technologii využívající sekvenování RNA za účelem odhalení účinku varianty na transkript. Touto analýzou však nelze prokázat missense varianty. Sekvenováním RNA lze získat informace o variantách v oblastech, které nejsou dostatečně pokryty WES. Transkriptomika by se tak mohla stát, vedle sekvenování DNA, dalším vhodným nástrojem pro diagnostiku onemocnění.

5.1.2.2 Proteomika

Proteomika je technologií umožňující systematickou analýzu buněčného proteomu. Jedná se o hmotnostní spektrometrickou analýzu proteinových lyzátů, jejíž výsledkem je kvantifikace všech přítomných proteinů. To představuje výhodu oproti analýze Western blot, která vyžaduje analýzu každého proteinu zvlášť. Tato technologie má však jisté omezení, které se týká tkáňové specifity a nedostatečného pokrytí buněčných proteinů.

5.1.2.3 Metabolomika

Metabolomika, technologie pracující rovněž na principu hmotnostní spektrometrie, dokáže detekovat a kvantifikovat tisíce malých molekul metabolitů v rámci jednoho testu. Pomocí metabolomiky lze také studovat narušené metabolické dráhy, objevovat biomarkery nebo interpretovat varianty patogenity. Omezení této technologie spočívá ve vlivu genetického pozadí a environmentálních faktorů na naměřené hladiny metabolitů a v neúplných znalostech o metabolických drahách, které ztěžují interpretaci naměřených dat. Rovněž nebylo oficiálně představeno přímé použití této technologie pro diagnostiku mitochondriálních poruch [52].

5.1.3 Další funkční validační testy

Kromě technologií OMICS lze k funkčním validačním testům zařadit i některé experimentální nástroje, které dokáží zachytit vliv významných podskupin genů mitochondriálních chorob. Jedná se např. o modrou nativní elektroforézu (BN-PAGE), pomocí níž lze studovat integritu komplexů OXPHOS. Dále lze využít enzymové testy OXPHOS za účelem změření zbytkové enzymatické aktivity komplexů v požadované tkáni nebo buněčné linii. Nedostatek enzymu OXPHOS dokazuje patogenitu pro VUS v genech, které kódují podjednotku OXPHOS [51].

5.1.4 Biochemický screening

Při podezření na primární mitochondriální onemocnění se provádí řada screeningových vyšetření z krve a moči za účelem odhalení případné mitochondriální dysfunkce. Tato vyšetření je možné rovněž provést i v případě vrozených chyb metabolismu nebo při výskytu sekundárních problémů, které souvisejí s mitochondriálním onemocněním. Vyšetření se týká kompletního krevního obrazu s diferencíálem a komplexního chemického panelu, dále krevního laktátu a pyruvátu, glykovaného hemoglobinu, kreatinkinázy a amoniaku. V plazmě se měří profil karnitinu, acylkarnitinu a lipoproteinů. Dále se provádějí screeningové hormonální studie a celková analýza moči, včetně analýzy organických kyselin a aminokyselin. Biochemický screening krve a moči však pro potvrzení či vyloučení primárního mitochondriálního onemocnění nestačí. Je proto potřeba provést další diagnostické testy.

Možností je testování mitochondriálních enzymů a funkcí z buněčné linie fibroblastů získaných kožní biopsií. Obvykle se jedná o spektrofotometrickou analýzu aktivit enzymů komplexu elektronového transportního řetězce, analýzu oxidace mastných kyselin či polarografickou analýzu k měření kapacity integrované mitochondriální OXPHOS [53].

Pro diagnostiku se rovněž využívají biomarkery. Kromě klasických sérových biomarkerů, kreatinkinázy a laktátu, byly identifikovány dva další biomarkery mitochondriální dysfunkce,

kteře se vyznačují lepší senzitivitou a specificitou pro mitochondriální onemocnění u dospělých pacientů. Jedná se o fibroblastový růstový faktor 21 (FGF21) a růstový/diferenciační faktor 15 (GDF15). Dále byly představeny nové tekutinové biomarkery, ke kterým patří cirkulující bezbuněčná mtDNA. Ta je zvýšená u mitochondriálního onemocnění, jež souvisí s mutací m.3243A>G. Tento tekutinový biomarker by tak mohl monitorovat závažnost daného onemocnění [54].

5.2 Terapie mitochondriálních onemocnění

Léčba mitochondriálních onemocnění je v současnosti stále velmi obtížná. Obvykle dochází k léčbě klinických projevů onemocnění a nikoli jejich příčin. Z tohoto důvodu je u pacientů nezbytné zajistit rutinní lékařskou péči, jejíž součástí je kromě vyšetřování symptomů a sledování případných nových neurologických poruch i doporučená imunizace a minimalizace horečnatých stavů. Lékař pacienta seznámí se správnou hydratací a výživou, včetně vyhnutí se hladovění, a poučí jej o dobré spánkové hygieně. V případě zákroku s nutností použití anestezie se doporučuje přidat glukózu do perioperačních tekutin, aby se předešlo katabolismu, a pomalu titrovat anestetika, aby bylo zabráněno velkým hemodynamickým změnám.

Osvědčenou terapií pro pacienty s mitochondriálním onemocněním se stalo cvičení. To je důležité zejména pro zvýšení aktivity enzymů a počtu mitochondriálních kopií, maximalizaci mitochondriálního příjmu kyslíku a zlepšení svalové síly. Pravidelné cvičení, ideálně pod vedením profesionálního terapeuta nebo cvičebního fyziologa, tedy může zkvalitnit pacientův život.

Dále se k terapii začaly využívat doplňky stravy. Obvykle se podávají kombinovaně. Nejčastěji jsou to antioxidanty, konkrétně ubiquinol, kyselina α -lipoová a vitamín C a E, dále metabolity, které zvyšují zásoby volného koenzymu Q10, konkrétně karnitin, dále enzymové kofaktory, konkrétně vitamíny skupiny B, a různé metabolitové terapie, konkrétně arginin, kreatin či kyselina folinová [53].

Prvním licencovaným lékem v Evropě, který slouží k léčbě zrakového postižení u pacientů s LHON, se stal idebenon. Po 24 měsících užívání tohoto léku je možné pozorovat zlepšení předchozích zdravotních komplikací. Lék by se však měl užívat do té doby, než pacient na léčbu přestane reagovat, neboť k zotavení může vzácně dojít i po delší době.

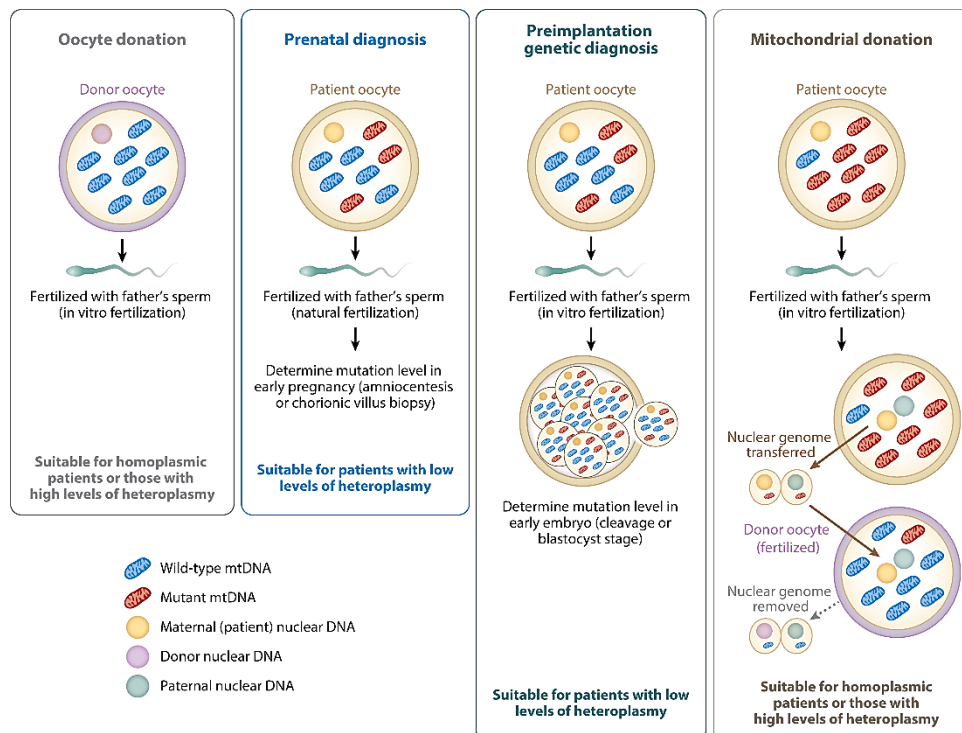
V případě všech příhod podobných mrtvici se využívá urgentní podání intravenózních antiepileptik. Příkladem může být lék valproát. Ten by se ale neměl podávat pacientům s onemocněním, jež souvisí s POLG, neboť by mohlo dojít k selhání jater [54].

Největších pokroků v experimentální léčbě bylo dosaženo u mitochondriální neurogastrointestinální encefalomyopatie (MNGIE), vzácného mitochondriálního onemocnění způsobeného deficitem enzymu thymidinfosforylázy. Byla představena enzymová substituční terapie, kdy je thymidinfosforyláza zapouzdřena v erytrocytech, což udržuje aktivitu tohoto enzymu po celou dobu života erytrocytů. Další možností je poměrně úspěšná transplantace jater, která slouží jako dobrý zdroj thymidinfosforylázy. Možná je i alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk. Tato možnost je však v případě MNGIE bohužel spojena s vysokou morbiditou a mortalitou, a to z důvodu špatného zdravotního stavu pacienta, obtížného získávání vhodných dárců, rizika selhání štěpu či reakce štěpu proti hostiteli. Vzhledem k tomu, že MNGIE patří do podskupiny syndromů deplece mtDNA, poznatky z léčby tohoto onemocnění by mohly být vodítkem k vývoji léčby dalších onemocnění, jež mají podobnou podstatu jako MNGIE. Dále se v souvislosti s mitochondriálním onemocněním experimentuje se zvětšením mitochondriální biogeneze, zvýšením mitofagie, obnovou buněčného poměru NAD^+ k NADH, metabolickým přeprogramováním nebo manipulací s oxidativním stresem. Pravděpodobné jsou i techniky genetické manipulace mitochondriálního genomu [54, 55].

5.3 Genetické poradenství a reprodukční možnosti

Z důvodu neexistence léků k léčbě mitochondriálních onemocnění (vyjma idebenonu) je poskytováno rizikovým párům genetické poradenství, na základě kterého lze vypočítat riziko recidivy onemocnění. To v případě jaderných mitochondriálních poruch závisí na vzoru dědičnosti. Poradenství u žen s mutacemi v mtDNA je náročné a často bývá komplikováno heteroplazmií, která se u potomků mírně postižených žen nemusí projevit žádnými symptomy nebo naopak může vyvolat velmi závažné onemocnění. V současné době existuje několik možností reprodukce, jež umožňují snížit riziko závažných onemocnění u potomků. Prvním z nich je využití dárcovských oocytů, kdy je riziko onemocnění danou mutací eliminováno. Ne všechny páry ale na tuto možnost přistoupí, neboť touží po geneticky příbuzném dítěti. Další možnost představuje prenatální diagnostika a preimplantační genetická diagnostika. Prenatální diagnostika umožňuje testovat mutace odběrem choriových klků v 10.–12. týdnu těhotenství nebo amniocentézou v 16.–20. týdnu těhotenství. Preimplantační genetickou diagnostikou (PGD) lze testovat 3. nebo 5. den jednu nebo dvě buňky z embrya v prostředí *in vitro* fertilizace na specifickou genovou mutaci, která způsobuje onemocnění v rodině rizikového páru. PGD ovšem není ve všech zemích povolena. Významného pokroku v prevenci mitochondriálního onemocnění dosáhla technika mitochondriálního dárcovství, která je založena na oplodnění

in vitro. Technika spočívá v nahrazení mitochondrií s mutantní mtDNA v oocytech nebo zygotách matky zdravými mitochondriemi dárkyně. Snahou je vytvořit embryo, které bude geneticky shodné s nastávajícími rodiči, ale bude obsahovat mitochondrie z nepříbuzného oocytu dárkyně. Podmínkou pro využití dárcovských mitochondrií je úroveň heteroplazmie mtDNA. Ta musí být v těchto mitochondriích nižší než 2 % oproti heteroplazmii patogenní mutace mtDNA v rodině páru [53, 54, 56]. Schémata jednotlivých reprodukčních možností jsou zobrazena na Obrázku 11.



Obrázek 11 – Reprodukční možnosti pro ženy s patogenními mutacemi mtDNA. Obrázek naznačuje schémata čtyř reprodukčních možností: darování oocytů, prenatální diagnostiku, preimplantační genetickou diagnostiku a mitochondriální dárcovství. Fialově je označen oocyt dárkyně včetně její jaderné DNA, žlutě oocyt pacientky včetně její jaderné DNA, červeně mitochondrie s obsahem mutantní mtDNA, modře mitochondrie s obsahem mtDNA divokého typu a zeleně spermie otce včetně jeho jaderné DNA; upraveno; převzato z: Zdroje obrázků [11]

ZÁVĚR

Bakalářská práce shrnuje v pěti kapitolách dostupné informace o lidské mitochondriální DNA, která je charakterizována jak z obecného hlediska, tak i z oblasti forenzní genetiky a diagnostiky.

První kapitola představuje semiautonomní organely – mitochondrie. Zaměřuje se především na podrobný popis jejich struktury a funkcí, včetně fungování energetického metabolismu (buněčného dýchání). Součástí kapitoly tvoří i otázka skutečného původu mitochondrií, která ovšem dosud nebyla jistě zodpovězena. Nejpravděpodobnější možností však zůstává teorie endosymbiózy.

Druhá kapitola obsahuje informace o samotné mitochondriální DNA. Konkrétně popisuje její strukturu a představuje replikaci, transkripci a translaci této kruhové dvouvláknové molekuly. Kromě vysvětlení způsobu mateřské dědičnosti mitochondriální DNA kapitola rovněž nastiňuje témata, kterým se podrobněji věnují následující kapitoly.

Třetí kapitola je věnována studiu evoluce lidstva a forenzní identifikaci za pomoci analýzy mitochondriální DNA. Specifické vlastnosti této molekuly ji učinily vhodným nástrojem, pomocí něhož je možné mapovat lidskou evoluční historii a migraci nebo datovat archeologické nálezy. Forenzní analýza ji využívá při identifikaci pohřešovaných osob, obětí hromadných katastrof či válek, a dále osob zapojených do kriminálních činů v případě, že k analýze není k dispozici jaderná DNA. V souvislosti s forenzní identifikací je zmiňována i analýza chromozomu Y. Kapitola rovněž vysvětluje způsob analýzy mitochondriální DNA, představuje hypervariabilní oblasti a haploskupiny, věnuje se problematice heteroplasmie a zpochybnění tvrzení o nedostatku rekombinace, které bylo nakonec vyvráceno z důvodu použití chybných dat a sporných statistických metod. Dále představuje sekvenování mitochondriální DNA včetně vývoje metod sekvenování od roku 1977. Od technologií sekvenování první generace, kam se řadí Sangerovo a Maxam-Gilbertovo sekvenování, přes Sangerovu sekvenační technologii, se vývoj posunul k technologiím sekvenování nové generace, jež zahrnují i systém detekce jedné molekuly či jednomolekulární sekvenování v reálném čase (SMRT). Do kapitoly jsou také začleněny vybrané případy využití mitochondriální DNA jak ke studiu lidské historie, tak pro forenzní identifikaci.

Čtvrtá kapitola je zaměřena na mutace mitochondriální DNA. Kromě popisu vzniku a původu mutací představuje i nejčastěji se vyskytující patogenní mutace, ke kterým lze zařadit bodové mutace a delece. Největší část kapitoly se věnuje onemocněním, jež jsou těmito

mutacemi podmíněna. Rovněž se zmiňuje i o onemocněních podmíněných mutacemi v jaderně kódovaných genech nebo onemocněních, které vznikají následkem mitochondriální dysfunkce.

Poslední kapitola představuje především dnešní diagnostické možnosti, pomocí kterých lze docílit správného určení diagnózy mitochondriálního onemocnění. Kapitola nás seznamuje s neinvazivními způsoby diagnostiky, genetickým testováním i svalovou biopsií. Vzhledem k tomu, že pro diagnostiku mitochondriálních onemocnění neexistuje žádný zlatý standard, tyto metody se obvykle kombinují. Vývoj sekvenování nové generace umožnil obrovský posun i v rámci diagnostiky. Nejčastěji se dnes využívá cílené sekvenování mitochondriální DNA včetně sekvenování celého exomu a genomu. Nevýhodou tohoto sekvenování je přítomnost variant nejistého významu (VUS), které je nutné validovat pomocí funkčních testů. Velký potenciál mají tzv. technologie OMICS, jež by se mohly, po vykonání dalších studií, zařadit mezi vhodné diagnostické nástroje. Další část kapitoly zaujímá i možnost terapie mitochondriálních onemocnění. Ta zůstává stále velmi problematická a spočívá často pouze v léčbě klinických projevů nemoci a nikoli jejích příčin. Obvykle se všeobecně doporučuje pravidelné cvičení a užívání doplňků stravy. Prozatím jediným licencovaným lékem v Evropě se stal idebenon, který slouží pacientům se zrakovým postižením u onemocnění LHON. Nadějí zůstává experimentální léčba mitochondriální gastrointestinální encefalomyopatie (MNGIE), která by mohla pomoci s vývojem léčby dalších onemocnění. Kapitola nabízí i informace o genetickém poradenství a reprodukčních možnostech pro rizikové páry. Konkrétně představuje možnost využití dárcovských oocytů, prenatální diagnostiku, preimplantační genetickou diagnostiku a mitochondriální dárcovství.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] REHFELD, Anders, Malin NYLANDER a Kirstine KARNOV. *Compendium of Histology*. Cham: Springer International Publishing, 2017, 27-47. ISBN 978-3-319-41871-1.
- [2] ROGERS, Ryan. *Cell and Molecular Biology for Environmental Engineers*. Momentum Press, 2018, 17-46. ISSN 2375-3625.
- [3] YAN, Wanhao, Shu DIAO a Zhipeng FAN. The role and mechanism of mitochondrial functions and energy metabolism in the function regulation of the mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2021, **12**(1), 1-2. ISSN 1757-6512.
- [4] MCINNES, Joseph. Mitochondrial-associated metabolic disorders: foundations, pathologies and recent progress. *Nutrition & Metabolism*. 2013, **10**(63), 1-6. ISSN 1743-7075.
- [5] ZHOU, Qiyin, Yawen ZHENG a Yi SUN. Neddylation regulation of mitochondrial structure and functions. *Cell & Bioscience*. 2021, **11**(1), 1. ISSN 2045-3701.
- [6] PURI, Kartik Mayank, Vito BUTARDO a Huseyin SUMER. Evaluation of natural endosymbiosis for progress towards artificial endosymbiosis. *Symbiosis*. 2021, **84**(1), 1-2. ISSN 0334-5114.
- [7] KUTSCHERA, U. Endosymbiosis, cell evolution, and speciation. *Theory in Biosciences*. 2005, **124**(1), 4-5. ISSN 14317613.
- [8] ZACHAR, István a Eörs SZATHMÁRY. Breath-giving cooperation: critical review of origin of mitochondria hypotheses. *Biology Direct*. 2017, **12**(19), 9-10. ISSN 1745-6150.
- [9] MARCO, Crimi a Roberta RIGOLIO. The mitochondrial genome, a growing interest inside an organelle. *International Journal of Nanomedicine*. 2008, **3**(1), 51. ISSN 1178-2013.
- [10] CHINNERY, P. F. a G. HUDSON. Mitochondrial genetics. *British Medical Bulletin*. 2013, **106**(1), 135-140. ISSN 0007-1420.
- [11] SMITS, Paulien, Jan SMEITINK a Lambert VAN DEN HEUVEL. Mitochondrial Translation and Beyond: Processes Implicated in Combined Oxidative Phosphorylation Deficiencies. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010, **2010**, 2. ISSN 1110-7243.
- [12] GARONE, Caterina, Michal MINCZUK, Aaron R. D'SOUZA a Michal MINCZUK. Mitochondrial transcription and translation: overview. *Essays in Biochemistry*. 2018, **62**(3), 310-314. ISSN 0071-1365.
- [13] PEARCE, Sarah, Catherine Laura NEZICH a Antonella SPINAZZOLA. Mitochondrial diseases: Translation matters. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2013, **55**, 1-4. ISSN 1044-7431.

- [14] ZHANG, Xian-ning a Ming QI. Mitochondrion and its related disorders: Making a comeback. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 2008, **9**(2), 90-92. ISSN 1673-1581.
- [15] VERMA, Mukesh a Deepak KUMAR. Mitochondrial DNA. SCHWAB, Manfred, ed. *Encyclopedia of Cancer*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017, 2867-2868. ISBN 978-3-662-46874-6.
- [16] SATO, Miyuki a Ken SATO. Maternal inheritance of mitochondrial DNA. *Autophagy*. 2012, **8**(3), 424-425. ISSN 1554-8627.
- [17] LADOUKAKIS, E. D. a A. EYRE-WALKER. Evolutionary genetics: Direct evidence of recombination in human mitochondrial DNA. *Heredity*. 2004, **93**(4), 321. ISSN 0018-067X.
- [18] MCWILLIAMS, Thomas G. a Anu SUOMALAINEN. Mitochondrial DNA can be inherited from fathers, not just mothers. *Nature*. 2019, **565**, 296-297. ISSN 0028-0836.
- [19] VISSING, John. Paternal comeback in mitochondrial DNA inheritance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019, **116**(5), 1475-1476. ISSN 0027-8424.
- [20] BERMISHEVA, M. A., T. V. VIKTOROVA a E. K. KHUSNUTDINOVA. Polymorphism of Human Mitochondrial DNA. *Russian Journal of Genetics*. 2003, **39**(8), 849-850. ISSN 1022-7954.
- [21] WALLACE, Douglas C., Michael D. BROWN a Marie T. LOTT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene*. 1999, **238**(1), 211-214. ISSN 0378-1119.
- [22] BUTLER, John M. a Barbara C. LEVIN. Forensic applications of mitochondrial DNA. *Trends in Biotechnology*. 1998, **16**(4), 158. ISSN 0167-7799.
- [23] ROEWER, Lutz. DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. *Investigative Genetics*. 2013, **4**(22), 4-7. ISSN 2041-2223.
- [24] ANASTASIOU, Evilena a Piers D. MITCHELL. Evolutionary anthropology and genes: Investigating the genetics of human evolution from excavated skeletal remains. *Gene*. 2013, **528**(1), 27-29. ISSN 0378-1119.
- [25] YAO, Yonggang a Yaping ZHANG. Pitfalls in the analysis of ancient human mtDNA. *Chinese Science Bulletin*. 2003, **48**(8), 826. ISSN 1001-6538.
- [26] AMORIM, António, Teresa FERNANDES a Nuno TAVEIRA. Mitochondrial DNA in human identification: a review. *PeerJ*. 2019, **7**(e7314), 3-9. ISSN 2167-8359.
- [27] PAKENDORF, Brigitte a Mark STONEKING. Mitochondrial DNA and Human Evolution. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2005, **6**(1), 168-171. ISSN 1527-8204.

- [28] YE, Fei, David C. SAMUELS, Travis CLARK a Yan GUO. High-throughput sequencing in mitochondrial DNA research. *Mitochondrion*. 2014, **17**, 157-158. ISSN 1567-7249.
- [29] KCHOUK, Mehdi, Jean Francois GIBRAT a Mourad ELLOUMI. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biology and Medicine*. 2017, **9**(3), 1-6. ISSN 0974-8369.
- [30] VAN DIJK, Erwin L., Hélène AUGER, Yan JASZCZYSZYN a Claude THERMES. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*. 2014, **30**(9), 418-424. ISSN 0168-9525.
- [31] ANASTASIOU, Evilena a Piers D. MITCHELL. Evolutionary anthropology and genes: Investigating the genetics of human evolution from excavated skeletal remains. *Gene*. 2013, **528**(1), 29-30. ISSN 0378-1119.
- [32] NAGLE, Nano, Kaye N. BALLANTYNE, Mannis VAN OVEN, et al. Mitochondrial DNA diversity of present-day Aboriginal Australians and implications for human evolution in Oceania. *Journal of Human Genetics*. 2017, **62**, 343-352. ISSN 1434-5161.
- [33] AMORIM, António, Teresa FERNANDES a Nuno TAVEIRA. Mitochondrial DNA in human identification: a review. *PeerJ*. 2019, **7**(e7314), 11-15. ISSN 2167-8359.
- [34] ROGAEV, E. I., A. P. GRIGORENKO, Y. K. MOLIAKA, et al. Genomic identification in the historical case of the Nicholas II royal family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, **106**(13), 5258-5261. ISSN 1091-6490.
- [35] LEE, Sung Ryul a Jin HAN. Mitochondrial Mutations in Cardiac Disorders. SANTULLI, Gaetano, ed. *Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Medicine*. Cham: Springer International Publishing, 2017, s. 91-93. Advances in Experimental Medicine and Biology 982. ISBN 978-3-319-55329-0.
- [36] TUPPEN, Helen A.L., Emma L. BLAKELY, Douglass M. TURNBULL a Robert W. TAYLOR. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2010, **1797**(2), 115-116. ISSN 0005-2728.
- [37] CHUNG, Chih-Yao, Gabriel E. VALDEBENITO, Anitta R. CHACKO a Michael R. DUCHEN. Rewiring cell signalling pathways in pathogenic mtDNA mutations. *Trends in Cell Biology*. 2021, 2-5. ISSN 0962-8924.
- [38] SZCZEPANOWSKA, Joanna, Dominika MALINSKA, Mariusz R. WIECKOWSKI a Jerzy DUSZYNSKI. Effect of mtDNA point mutations on cellular bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2012, **1817**(10), 1740-1741. ISSN 0005-2728.
- [39] LAX, N. Z., D. M. TURNBULL a A. K. REEVE. Mitochondrial Mutations: Newly Discovered Players in Neuronal Degeneration. *The Neuroscientist*. 2011, **17**(6), 647-648. ISSN 1073-8584.

- [40] CRUZ, Ana Carolina P., Adriano FERRASA, Alysson R. MUOTRI a Roberto H. HERAI. Frequency and association of mitochondrial genetic variants with neurological disorders. *Mitochondrion*. 2019, **46**, 354-357. ISSN 1567-7249.
- [41] MONTANO, V., F. GRUOSSO, C. SIMONCINI, G. SICILIANO a M. MANCUSO. Clinical features of mtDNA-related syndromes in adulthood. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2021, **697**, 1-5. ISSN 0003-9861.
- [42] MESHRKEY, Fibi, Ana CABRERA AYUSO, Raj R. RAO a Shilpa IYER. Quantitative analysis of mitochondrial morphologies in human induced pluripotent stem cells for Leigh syndrome. *Stem Cell Research*. 2021, **57**, 2. ISSN 1873-5061.
- [43] JANCIC, Jasna, Branislav ROVCANIN, Vesna DJURIC, Ana PEPIC, Janko SAMARDZIC, Blazo NIKOLIC, Ivana NOVAKOVIC a Vladimir S. KOSTIC. Analysis of secondary mtDNA mutations in families with Leber's hereditary optic neuropathy: Four novel variants and their association with clinical presentation. *Mitochondrion*. 2020, **50**, 132-137. ISSN 1567-7249.
- [44] BI, Rui, Ian LOGAN a Yong-Gang YAO. Leber Hereditary Optic Neuropathy: A Mitochondrial Disease Unique in Many Ways. SINGH, Harpreet a Shey-Shing SHEU, ed. *Pharmacology of Mitochondria*. Cham: Springer International Publishing, 2017, s. 314-317. Handbook of Experimental Pharmacology. ISBN 978-3-319-57311-3.
- [45] KIENINGER, Sinja, Ting XIAO, Nicole WEISSCHUH, et al. DNAJC30 disease-causing gene variants in a large Central European cohort of patients with suspected Leber's hereditary optic neuropathy and optic atrophy. *Journal of Medical Genetics*. 2022, 1. ISSN 0022-2593.
- [46] LAX, N. Z., D. M. TURNBULL a A. K. REEVE. Mitochondrial Mutations: Newly Discovered Players in Neuronal Degeneration. *The Neuroscientist*. 2011, **17**(6), 649. ISSN 1073-8584.
- [47] GLICK, Bernard R., T. L. DELOVITCH a Cheryl L. PATTEN. *Medical Biotechnology: 3.4.1 Disorders*. Washington, DC: American Society of Microbiology, 2014, 193-201. ISBN 978-1-55581-705-3.
- [48] SERASINGHE, Madhavika N. a Jerry E. CHIPUK. Mitochondrial Fission in Human Diseases. SINGH, Harpreet a Shey-Shing SHEU, ed. *Pharmacology of Mitochondria*. Cham: Springer International Publishing, 2017, 172-178. Handbook of Experimental Pharmacology. ISBN 978-3-319-57311-3.
- [49] RAHMAN, S. Mitochondrial disease in children. *Journal of Internal Medicine*. 2020, **287**(6), 609-626. ISSN 0954-6820.
- [50] KERR, Marina, Stacey HUME, Fadya OMAR, et al. MITO-FIND: A study in 390 patients to determine a diagnostic strategy for mitochondrial disease. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2020, **131**(1-2), 66-67. ISSN 1096-7192.

- [51] STENTON, Sarah L. a Holger PROKISCH. Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. *EBioMedicine*. 2020, **56**, 1-7. ISSN 2352-3964.
- [52] GUSIC, Mirjana a Holger PROKISCH. Genetic basis of mitochondrial diseases. *FEBS Letters*. 2021, **595**(8), 1132-1142. ISSN 0014-5793.
- [53] MURARESKU, Colleen C., Elizabeth M. MCCORMICK a Marni J. FALK. Mitochondrial Disease: Advances in Clinical Diagnosis, Management, Therapeutic Development, and Preventative Strategies. *Current Genetic Medicine Reports*. 2018, **6**, 64-69. ISSN 2167-4876.
- [54] NG, Yi Shiao, Laurence A BINDOFF, Gráinne S GORMAN, et al. Mitochondrial disease in adults: recent advances and future promise. *The Lancet Neurology*. 2021, **20**(7), 573-581. ISSN 1474-4422.
- [55] SCARPELLI, Mauro, Alice TODESCHINI, Irene VOLONGHI, Alessandro PADOVANI a Massimiliano FILOSTO. Mitochondrial diseases: advances and issues. *The Application of Clinical Genetics*. 2017, **10**, 21-24. ISSN 1178-704X.
- [56] CRAVEN, Lyndsey, Charlotte L. ALSTON, Robert W. TAYLOR a Doug M. TURNBULL. Recent Advances in Mitochondrial Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2017, **18**, 264-265. ISSN 1527-8204.
- [57] *Velký lékařský slovník* [online]. Praha: Maxdorf, 1998-2022 [cit. 2022-05-11]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/>.
- [58] Biotech slovník. *Gate2Biotech: Biotechnologický portál - Vše o biotechnologiích na jednom místě*. [online]. České Budějovice: Jihočeská agentura pro podporu inovačního podnikání, 2006-2021 [cit.2021-11-02]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/dictionary.php/>.
- [59] VRTIŠKA, Ondřej. Dějiny buněčných elektráren. *Vesmír*. 2016, **95**(146), 354-357. ISSN 1214-4029.
- [60] Mitochondriální fyziologie. In: *Fyziologický ústav AV ČR* [online]. 2021 [cit. 2021-11-03]. Dostupné z: <https://www.fgu.cas.cz/departments/mitochondrialni-fyziologie>.
- [61] YI, G., S.-H. SZE a M. R. THON. Identifying clusters of functionally related genes in genomes. *Bioinformatics*. 2007, **23**(9), 1054. ISSN 1367-4803.
- [62] VODIČKOVÁ KEPKOVÁ, Kateřina, Petr VODIČKA a Jan MOTLÍK. Buňky s velkým potenciálem: 1. Historie indukované pluripotence a metody přípravy iPS buněk. In: *Živa: Rozhled v oboru veškeré přírody*. 2016, **2016**(4), 150. ISSN 0044-4812.
- [63] Autofagie. In: *Wikipedie: Otevřená encyklopedie* [online]. 2021 [cit. 2022-01-17]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Autofagie&oldid=20287963>.
- [64] Penetrance. In: *Wikipedie: Otevřená encyklopedie* [online]. 2021 [cit. 2022-01-17]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Penetrance&oldid=20358769>.

- [65] CAMMACK, R., T. K. ATTWOOD, P. N. CAMPBELL, J. H. PARISH, A. D. SMITH, J. L. STIRLING a F. VELLA, ed. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2006. ISBN 978-0-19-852917-0.
- [66] Haplotyp. In: *Wikipedie: Otevřená encyklopedie* [online]. 2021 [cit. 2022-02-28]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Haplotyp&oldid=19363678>.
- [67] Hypervariabilní oblast. In: *Wikipedie: Otevřená encyklopedie* [online]. 2021 [cit. 2022-02-28] Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Hypervariabiln%C3%AD_oblast&oldid=20313094.

ZDROJE OBRÁZKŮ

- [1] Mitochondrion. Encyclopædia Britannica. In: *Encyclopædia Britannica* [online]. [cit. 2021-12-06]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/cell-biology/Actin-filaments#/media/1/101396/107019>.
- [2] Tricarboxylic acid cycle. Encyclopædia Britannica. In: *Encyclopædia Britannica* [online]. [cit. 2021-12-06]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/tricarboxylic-acid-cycle#/media/1/604852/18022>.
- [3] Electron transport chain. Encyclopædia Britannica. In: *Encyclopædia Britannica* [online]. [cit. 2021-12-06]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/cellular-respiration#/media/1/101613/242566>.
- [4] Margaret. Schematic representation of how a eukaryotic cell evolves by way of the endosymbiosis of proteobacteria and cyanobacteria. Macquarie University, Australia. 2012. In: *Gesundheitsindustrie BW: Endosymbiosis and horizontal gene transfer* [online]. BIOPRO Baden-Württemberg. 2021 [cit. 2021-12-07]. Dostupné z: <https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/en/article/news/endosymbiosis-and-horizontal-gene-transfer>.
- [5] Mitochondrial DNA. In: CHINNERY, P. F. a G. HUDSON. Mitochondrial genetics. *British Medical Bulletin*. 2013, **106**(1), 136. ISSN 0007-1420.
- [6] The human mitochondrial genome and factors involved in mtDNA replication and transcription. In: PEARCE, Sarah, Catherine Laura NEZICH a Antonella SPINAZZOLA. Mitochondrial diseases: Translation matters. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2013, **55**, 2. ISSN 1044-7431.
- [7] Fertilization-triggered autophagy degrades sperm-derived mitochondria and membranous organelles (MOs). In: SATO, Miyuki a Ken SATO. Maternal inheritance of mitochondrial DNA. *Autophagy*. 2012, **8**(3), 424-425. ISSN 1554-8627.
- [8] World migrations: Human mtDNA Migrations. In: *MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database* [online]. 2019 [cit. 2022-02-25]. Dostupné z: <https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMAP/MitomapFigures>.
- [9] Illumina sequencing technology. In: KCHOUK, Mehdi, Jean Francois GIBRAT a Mourad ELLOUMI. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biology and Medicine*. 2017, **9**(3), 5. ISSN 0974-8369.
- [10] Genotype:phenotype correlations in human mitochondrial disease. In: TUPPEN, Helen A.L., Emma L. BLAKELY, Douglass M. TURNBULL a Robert W. TAYLOR. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2010, **1797**(2), 116. ISSN 0005-2728.

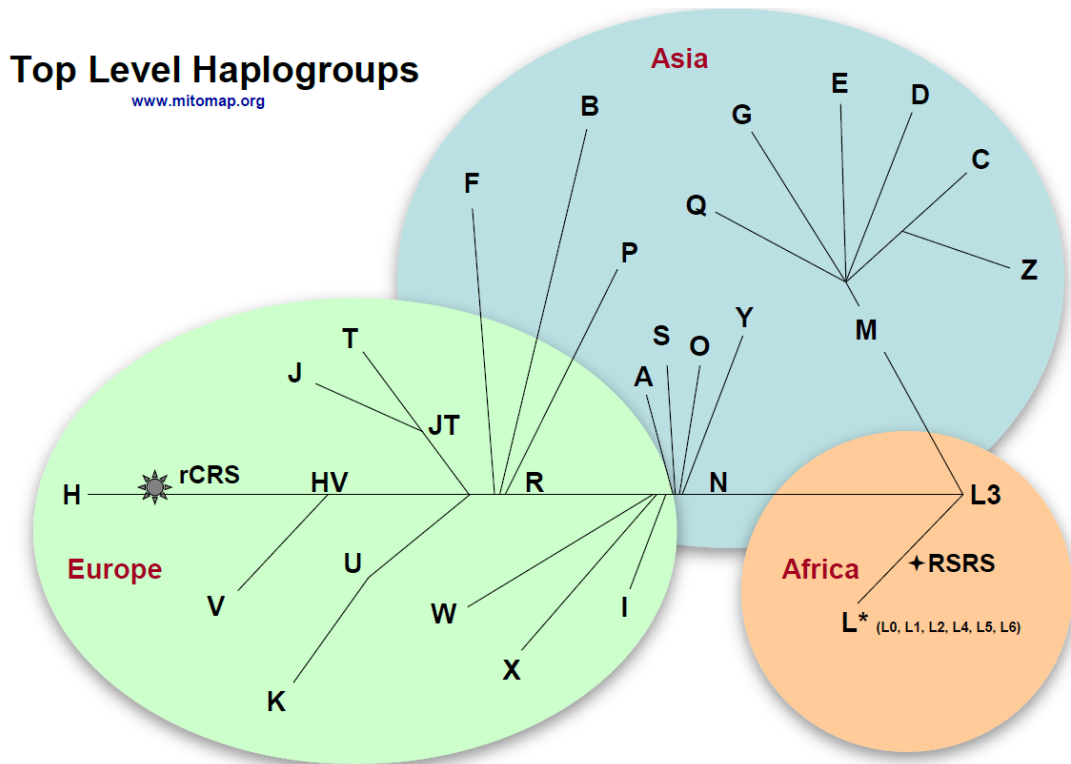
- [11] Reproductive options for women with pathogenic mitochondrial DNA mutations. In: CRAVEN, Lyndsey, Charlotte L. ALSTON, Robert W. TAYLOR a Doug M. TURNBULL. Recent Advances in Mitochondrial Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2017, **18**, 265. ISSN 1527-8204.

ZDROJE PŘÍLOH

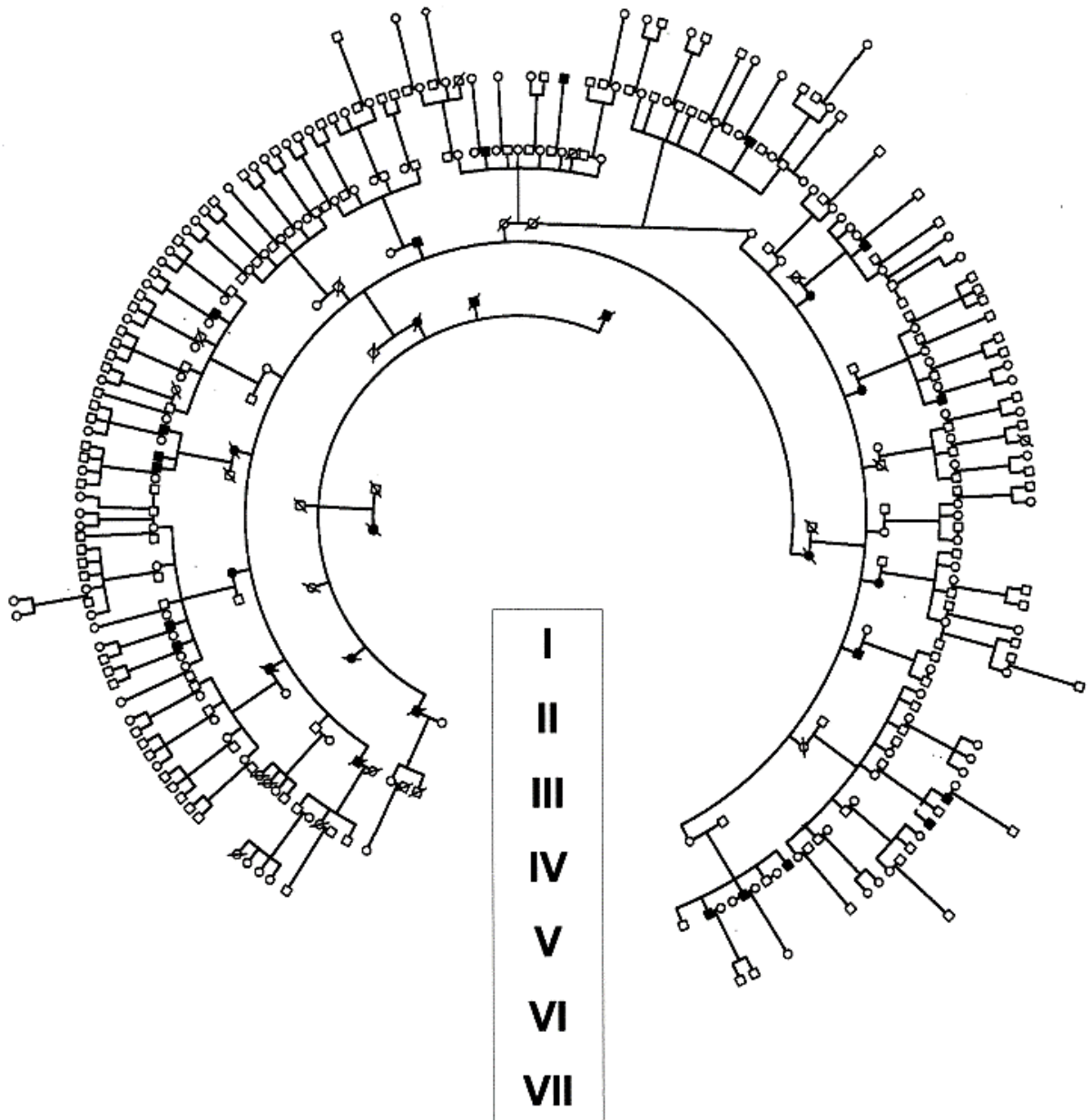
- [1] Simple mtDNA Tree: Top Level Haplogroups. In: *MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database* [online]. 2019 [cit. 2022-05-08]. Dostupné z: <https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMAP/MitomapFigures>.
- [2] Seven-generation 11778 (homoplasmic) Leber hereditary optic neuropathy pedigree. In: SADUN, Alfredo A, Valerio CARELLI, Solange R SALOMAO, et al. Extensive investigation of a large Brazilian pedigree of 11778/haplogroup J Leber hereditary optic neuropathy. *American Journal of Ophthalmology*. 2003, **136**(2), 234. ISSN 0002-9394.
- [3] Diagnostic algorithm for suspected mitochondrial disease. In: MURARESKU, Colleen C., Elizabeth M. MCCORMICK a Marni J. FALK. Mitochondrial Disease: Advances in Clinical Diagnosis, Management, Therapeutic Development, and Preventative Strategies. *Current Genetic Medicine Reports*. 2018, **6**, 65. ISSN 2167-4876.
- [4] Methods of disease gene discovery. In: STENTON, Sarah L. a Holger PROKISCH. Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. *EBioMedicine*. 2020, **56**, 4. ISSN 2352-3964.

PŘÍLOHY

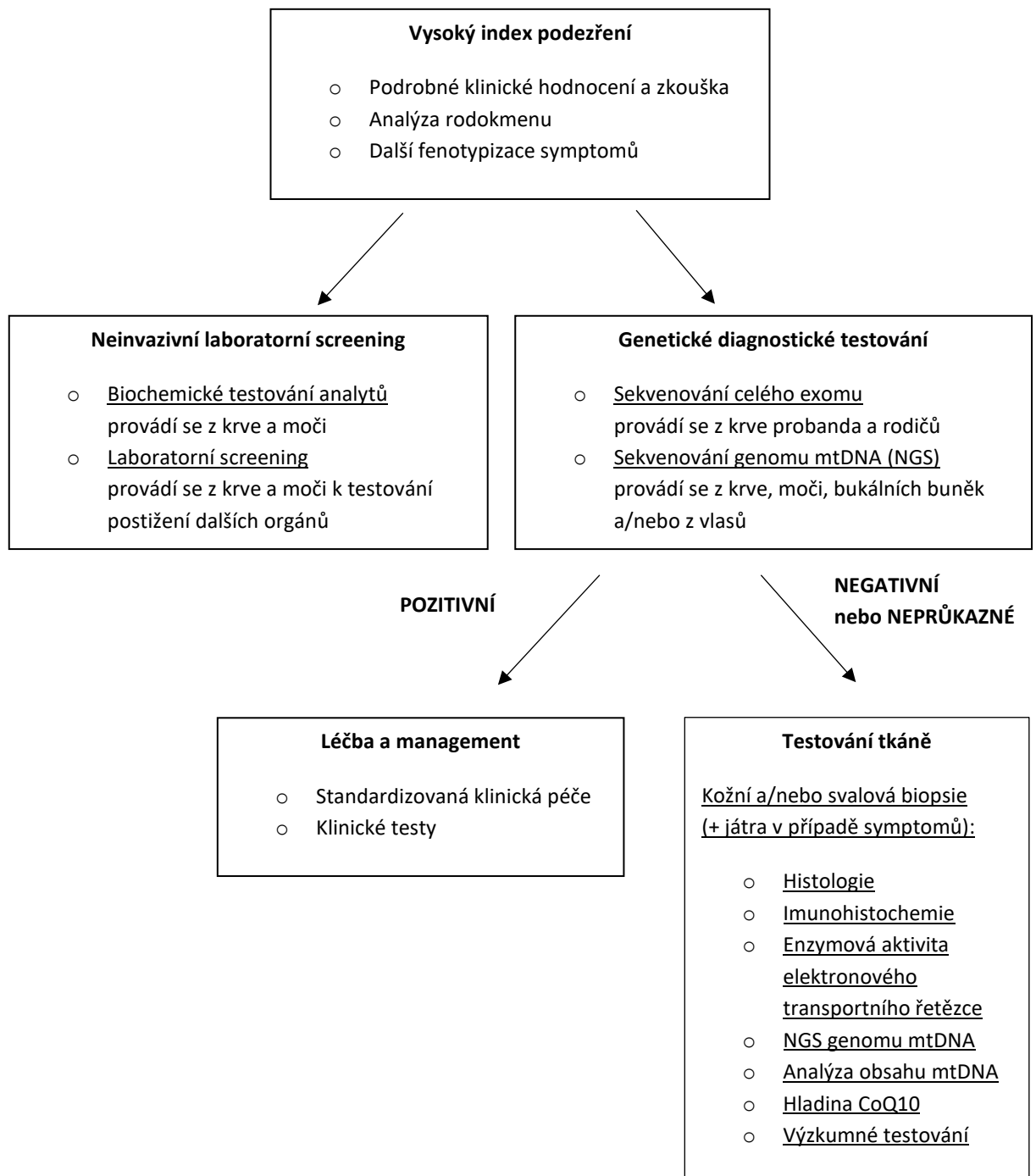
Příloha 1 – Zjednodušený fylogenetický strom lidské mitochondriální DNA obsahující hlavní haplogrupy včetně znázornění jejich výskytu dle světadílů; upraveno; převzato z: Zdroje příloh [1]



Příloha 2 – Příklad rodokmenu s výskytem Leberovy dědičné neuropatie zrakového nervu. Zde se konkrétně jedná o sedmigenerační rodokmen brazilské rodiny s homoplazmií m.11778 a haploskupinou J. První výskyt nemoci byl patrný u předka s rokem narození 1861 (v centru rodokmenu). Další generace potomků následuje vždy odstředivě od té předchozí; upraveno; převzato z: Zdroje příloh [2]



Příloha 3 – Diagnostický postup při podezření na mitochondriální onemocnění; vytvořeno dle:
Zdroje příloh [3]



Příloha 4 – Graf znázorňující vývoj metod k objevu chorobných genů mezi lety 1988–2020. Vývoj těchto metod také přinesl zrychlení v objevu genů onemocnění. Je zde patrný posun od sekvenování mtDNA (tmavě zelená) a kandidátních genů (oranžová) k metodám sekvenování nové generace (NGS; označeno čárkovanou čarou v roce 2010). Modrá označuje cílené NGS, růžová metodu WES a světle zelená metodu WGS; upraveno; převzato z: Zdroje příloh [4]

