

Mitochondrialny DNA – charakterystyka oraz możliwości praktycznego zastosowania w hodowli owiec

Anna Koseniuk, Tadeusz Rychlik

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej Zwierząt,
32-083 Balice k. Krakowa*

Komórki ludzkie i zwierzęce, obok jądrowego DNA, posiadają także materiał genetyczny zawarty w mitochondriach (mtDNA). Organella te są uznawane za centra energetyczne komórek. W ich obrębie zachodzi ostatni cykl reakcji oddychania komórkowego – fosforylacja oksydacyjna, w wyniku której wytwarza się energia, magazynowana w postaci wysokoenergetycznych wiązań ATP. Mitochondrialny DNA jest ponadto jednym z aktywatorów procesów apoptycznych i regulatorów zmian związanych ze starzeniem się komórek (Michikawa i in., 1999; Allen, 1996; Wallace, 2005).

Pochodzenie mitochondrialnego DNA

W oparciu o analizę skamieniałości przypuszcza się, że powstanie komórek eukariotycznych mogło nastąpić 2 mld lat temu (Margulis i Fester, 1991; Lang i in., 1997). Rekonstrukcja przebiegu tak odległych czasowo procesów jest problematyczna i obciążona dużym błędem. Cennym źródłem wiedzy jest analiza budowy komórek i genomów współcześnie żyjących organizmów. W tym kontekście mitochondria i chloroplasty, które poziomem złożoności przypominają proste organizmy prokariotyczne, wyróżniają się wśród pozostałych elementów składowych komórki. Najbardziej interesujące było odkrycie, że posiadają one niezależny od jądrowego materiał genetyczny, dzięki czemu mogą w dużej mierze zachować autonomiczność

względem jądra komórkowego.

Istnieje wiele hipotez, przy pomocy których próbuje się wyjaśnić pojawienie się dodatkowego materiału genetycznego w komórce eukariotycznej. Najbardziej rozpowszechniona teoria endosymbiozy zakłada, że komórki eukariotyczne powstały przez fuzję komórki *Archaea* (dała początek genomowi jądrowemu) z pierwotnymi formami α -proteobakterii (współczesne mitochondria), co przypuszczalnie nastąpiło około 5–6 milionów lat temu (Lang i in., 1997). Na przestrzeni lat obydwie formy komórkowe ewoluowały, uzależniając się od siebie na poziomie metabolicznym. Wbrew powszechnie przyjętej opinii, najistotniejszą wówczas rolę symbionta nie było umożliwienie pierwotnej beztlenowej komórce utleniania metabolitów (wydajniejszy energetycznie proces), a ich zdolność do syntezy centrów żelazowo-siarczkowych (Fe-S), będących kofaktorami wielu enzymów (Lill i in., 2005). Ścisła symbioza doprowadziła do stopniowej redukcji genomu symbionta i transferu większości jego genów do jądra komórkowego gospodarza. Przypuszczalnie miało to uchronić większość istotnych dla gospodarza genów przed panującymi w mitochondriach warunkami, sprzyjającymi mutacjom (Berg i Kurland, 2000).

Charakterystyka mtDNA

U ssaków, genom mitochondrialny jest

złożoną z 16–17 tys. par zasad dwuniciową, kulistą cząsteczką, wyglądem zbliżoną do plazmidowego DNA komórek bakteryjnych (Villalta i in., 1992; Boore, 1999). Jedna z nici mtDNA została nazwana ciężką (H) ze względu na dużą zawartość zasad purynowych, a druga lekką (L) z powodu dużej ilości zasad pirymidynowych (Holland i Parsons, 1999).

Mitochondrialny DNA występuje w pojedynczym mitochondrium w liczbie od 2 do 10 kopii, co jest zależne od częstości podziałów mitochondriów. Te z kolei są indukowane przez zapotrzebowanie energetyczne tkanki oraz funkcje życiowe komórek. Spośród tkanek organizmów ssaków najwięcej mitochondriów i tym samym zawartego w nich materiału genetycznego znajduje się w mięśniu sercowym, wątrobie, nerkach i mózgu. Najmniej, kilkaset kopii mtDNA, zawierają spermatoocyty, a najwięcej – między 200 000 a 800 000 – oocyty. Znaczna przewaga zawartości mtDNA w oocytach oraz fakt, że w trakcie zapłodnienia dostaje się do niego główka plemnika bez witki bogatej w mitochondria, powoduje, że rozwijająca się zygota posiada mtDNA odziedziczone tylko po matce (Abelardo Solano i in., 2000).

MtDNA zawiera sekwencje genów 13 białek, które biorą udział w reakcjach łańcucha oddechowego oraz niezbędne do ich powstania 22 cząsteczki tRNA i 2 rRNA (Abelardo Solano i in., 2000).

W mitochondrialnym genomie ssaków brak jest intronów, a geny są mocno obok siebie upakowane. Są one zazwyczaj rozdzielone kilkudziesięcionukleotydowymi sekwencjami transportującego RNA (tRNA). Jedynym niekodującym odcinkiem mtDNA jest region kontrolny (control region, CR), zwany także pętlą D (D-loop) ze względu na konformację „spinki”, jaką przyjmuje podczas replikacji (Holland i Parsons, 1999). Liczba mutacji, która zachodzi w tym odcinku, stanowi około 10% całkowitej liczby zmian nukleotydowych w obrębie mtDNA (Bruford i in., 2003).

Mutacja w obrębie mtDNA, której skutkiem jest brak produktu białkowego lub jego nieprawidłowa konformacja sprawia, że zostaje przerwana reakcja łańcucha oddechowego. Dprowadza to do deficytu energetycznego komórki i w rezultacie do jej śmierci (Abelardo Solano i in., 2000). U człowieka wykryto do tej pory

szereg chorób, u których podstaw leżą mutacje w mitochondrialnym genomie, a dotyczą one przede wszystkim tkanki mózgowej i mięśniowej (Abelardo Solano i in., 2000; Elpeleg i in., 2005). Wykazano również, że niektóre mutacje są dodatnio skorelowane z pogorszonymi parametrami nasienia i bezpłodnością u mężczyzn (Holyoake i in., 2001; Gemmell i in., 2004).

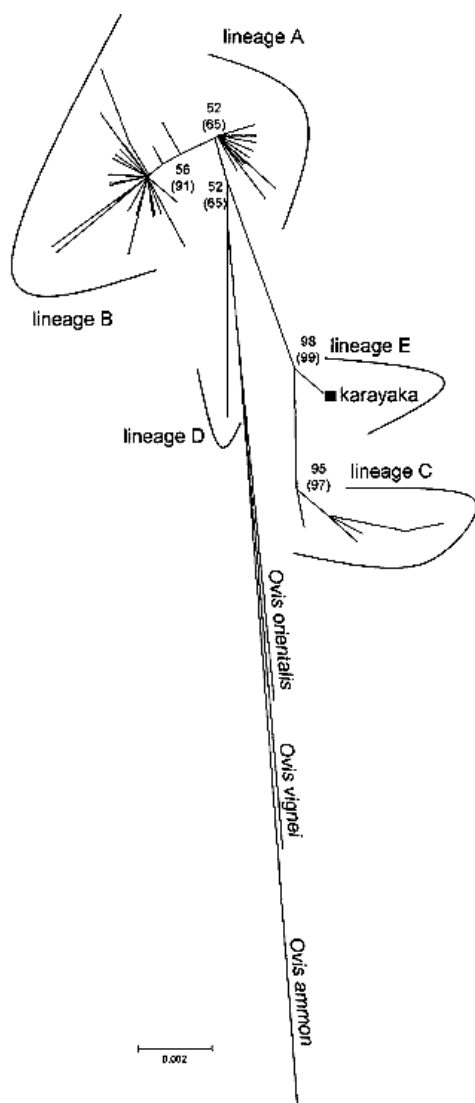
Możliwości praktycznego wykorzystania analizy mtDNA

Duży polimorfizm regionu kontrolnego, brak rekombinacji, bardzo dobra efektywność izolacji nawet z niewielkich ilości tkanki biologicznej oraz odporność mtDNA na procesy degradacyjne czyni go materiałem przydatnym w wielu dziedzinach nauki.

DNA mitochondriów jest często wykorzystywany do identyfikacji osobniczej w żeńskich liniach rodowodowych (Ivanov i in., 1996). W identyfikacji osobniczej zazwyczaj stosuje się analizę dwóch hiperzmiennych regionów. Pierwszy z nich, zwany HV1, znajduje się bliżej końca tRNA dla proliny (tRNA^{Pro}), drugi – HV2 w pobliżu tRNA^{Phe} (Holland i Parsons, 1999).

W przemyśle paszowym nierzetelne informacje producentów, dotyczące składu mieszanek dla zwierząt, są coraz powszechniej weryfikowane przy użyciu analizy mtDNA, która pozwala na identyfikację gatunków. Zagadnienie to wiąże się ze zdrowotnością zwierząt oraz prewencją chorób prionowych. Analizę specyficznych gatunkowo i homologicznych wśród kręgowców sekwencji mitochondrialnych genów cytochromu b (cyt b), oksydazy cytochromowej I (COI), 12S rRNA lub podjednostki 6 i 8 syntazy ATP cechuje wysoka powtarzalność wyników i czułość reakcji (Tartaglia i Saule, 1998; Lahiff i in., 2001; Natonek-Wiśniewska i Rychlik, 2008). Umożliwia ona wykrycie śladów zidentyfikowanego gatunku o 0,125% zawartości w analizowanej mieszance (Natonek-Wiśniewska i Rychlik, 2008). Wybrane odcinki mtDNA charakteryzują się bardzo dużą specyficznością i pozwalają na rozróżnienie nawet blisko spokrewnionych gatunków.

Mitochondrialny DNA jest skutecznym markerem molekularnym w analizach filogenetycznych. Konserwatywne sekwencje genów ko-



Ryc. 1. Drzewo filogenetyczne, utworzone metodą najbliższego sąsiada (neighbor-joining, NJ), obrazujące zależności filogenetyczne między haplogrupami (lineages A, B, C, D, E), zidentyfikowanymi u współcześnie hodowanych owiec oraz sekwencjami trzech dzikich gatunków owiec (*Ovis ammon*, *Ovis vignei*, *Ovis orientalis*); wielkość węzłów jest proporcjonalna do częstości wystąpienia poszczególnych haplotypów, a długości gałęzi do liczby różnic nukleotydowych między haplogrupami (Meadows i in., 2007)

Fig. 1. Phylogenetic tree constructed by neighbour-joining (NJ) method, showing the phylogenetic relationships between haplogroups (lineages A, B, C, D, E), identified in sheep raised today, and between sequences of three wild sheep species (*Ovis ammon*, *Ovis vignei*, *Ovis orientalis*); the size of nodes is proportional to the frequency of individual haplotypes, and the length of branches to the number of nucleotide differences between haplogroups (Meadows et al., 2007)

dujących białka są wykorzystywane w badaniach nad zróżnicowaniem międzygatunkowym (Bruford i in., 2003), natomiast region kontrolny stanowi wiarygodne źródło wiedzy na temat zmienności wewnątrzgatunkowej (Holland i Parsons, 1999; Bruford i in., 2003).

Zastosowanie mtDNA w hodowli owiec

Owce, spośród różnych zwierząt hodowlanych, są gatunkiem, którego udomowienie nastąpiło najwcześniej, przypuszczalnie około 12 000 lat temu (Ryder, 1984). Jednoznaczne ustalenie przodka współczesnej owcy domowej (*O. aries*) jest zagadnieniem problematycznym. Przyczynia się do tego skomplikowana systematyka dziko żyjących gatunków z rodzaju *Ovis* oraz duży i zróżnicowany środowiskowo obszar ich występowania, tj. od półpustynnych terenów subkontynentu indyjskiego, poprzez środkową Azję, aż do Syberii. Wśród dzikich owiec największe bogactwo form znajduje się na obszarze współczesnego Iranu, Turcji i Izraela. Na podstawie analizy materiału, pochodzącego z wykopaliisk prowadzonych na tych terenach, za przodków owcy domowej uznawano trzy gatunki: muflona europejskiego/orientalnego (*Ovis musimon/orientalis*), arka/urial (*Ovis vignei*) oraz argal (*Ovis ammon ammon*) (Ryder, 1984).

Badania filogenetyczne owiec w oparciu o wybrane odcinki mtDNA prowadzone są od połowy lat 90. XX w. Rozwój technik sekwencjonowania DNA pozwala obecnie na bezpośrednie porównywanie sekwencji mtDNA.

Dotychczas przeprowadzono reakcje sekwencjonowania odcinków regionu kontrolnego dzikich gatunków owiec z rodzaju: muflon (*O. musimon*, *O. orientalis*), azjatycka owca stepowa (*O. vignei*), argal (*O. ammon*), owca kanadyjska (*O. canadensis*) oraz owca domowa (*O. aries*), hodowanych na terenie Azji, Europy i Nowej Zelandii (Wood i Phua, 1996; Hiendleder, 1998; Hiendleder i in., 1998, 2002; Guo i in., 2005; Pedrosa i in., 2005; Tapio i in., 2006). Wyniki tych badań wykazały udział muflona w kształtowaniu się *O. aries* hodowanych na terenie Europy, Azji i Ameryki Północnej. Jednocześnie, poddano w wątpliwość założenia dotyczące roli *O. vignei* i *O. ammon* w tworzeniu współcześnie hodowanych ras owcy domo-

wej (Hiendleder, 1998; Hiendleder i in., 1998).

W oparciu o analizę sekwencji regionu kontrolnego owiec Eurazji wyróżniono początkowo azjatycką linię rodowodową – haplogrupę A (HA) i europejską linię – haplogrupę B (HB) (Hiendleder i in., 1998). W późniejszych badaniach nad regionem kontrolnym i genem cyt b, przeprowadzonych na rasach owiec z terenów Turcji i półwyspu Iberyjskiego, wykazano istnienie trzeciego typu organizacji mtDNA – haplogrupy C (HC) (Pedrosa i in., 2005). HC, podobnie jak HA i HB, nie wykazuje wspólnej linii filogenetycznej z *O. vignei* i *O. ammon*. Wkrótce po tych badaniach zidentyfikowano kolejne linie

rodowodowe *O. aries*. Tapio i in. (2006), analizując genotypy mitochondrialne owiec z terenów Europy i centralnej Azji, wykryli unikatowy typ sekwencji mtDNA, który zaliczyli do haplogrupy D (HD). Stwierdzili oni, że typ D wywodzi się od *O. vignei*, *O. ammon* i *O. orientalis*. Ponadto, w badaniach tych wykazano istnienie piątej linii pochodzeniowej, haplogrupy E (HE), która stanowi połączenie między haplogrupami C i A.

Na rycinie 1 zaprezentowano zależności filogenetyczne między pięcioma haplogrupami, zidentyfikowanymi w populacji współczesnych owiec oraz sekwencjami trzech dzikich gatunków owiec, na podstawie sekwencji cyt b i CR.

Literatura

- Abelardo Solano Q.F.B., Playan A., Lopez-Perez M.J., Motoya J., Boore J.L. (2000). Genetic diseases of human mitochondrial DNA. *Salud Publica Mex.*, 43: 151–161.
- Allen F. (1996). Separate sexes and the mitochondrial theory of ageing. *J. Theor. Biol.*, 180: 135–140.
- Berg O.G., Kurland C.G. (2000). Why mitochondrial genes are most often found in nuclei. *Mol. Biol. Evol.*, 17: 951–961.
- Boore J.L. (1999). Survey and summary: animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 27: 1767.
- Bruford M.W., Bradley D.G., Luikart G. (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Rev.*, 4: 900–910.
- Elpeleg O., Miller C., Hershkovitz E., Bitner-Glindzicz M., Bondi-Rubinstein G., Rahman S., Pagnamenta A., Eshhar S., Saada A. (2005). Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *Am. J. Hum. Genet.*, 76: 1081–1086.
- Gemmell N.J., Metcalf V.J., Allendorf F.W. (2004). Mother's curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability. *T. Ecol. Evol.*, 19 (5): 238–244.
- Guo J., Du L.X., Ma Y.H., Guan W.J., Li H.B., Zhao Q.J., Rao X., Li S.Q. (2005). A novel maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*). *Anim. Genet.*, 36: 331–336.
- Hiendleder S. (1998). A low rate of replacement substitutions in two major *Ovis aries* mitochondrial genomes. *Anim. Genet.*, 29: 116–122.
- Hiendleder S., Lewalski H., Wassmuth R., Janke A. (1998). The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *J. Mol. Evol.*, 47: 441–448.
- Hiendleder S., Kaupe B., Wassmuth R., Janke A. (2002). Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 269: 893–904.
- Holland M.M., Parsons T.J. (1999). Mitochondrial DNA sequence analysis – validation and use for forensic casework. *Forensic Sci. Rev.*, 11: 21–50.
- Holyoake A.J., Mchugh P., Wu M., O'carroll S., Benny P., Sin I.L., Sin F.Y.T. (2001). High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in men. *Int. J. Androl.*, 24: 175–182.
- Ivanov P.L., Wadhams M.J., Roby R.K., Holland M.M., Weedn V.W., Parsons T.J. (1996). Mitochondrial sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat. Genet.*, 12: 417–420.
- Lahiff S., Glennon M., O'Brien L., Lyng J., Smith T., Maher M., Shilton N. (2001). Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). *Mol. Cell. Probes.*, 15: 27–35.

- Lang B.F., Burger G., O'Kelly C.J., Cedergren R., Golding G.B., Lemieux C., Sankoff D., Turmel M., Gray M.W. (1997). An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature*, 387: 493–497.
- Lill R., Fekete Z., Sipos K., Rotte C. (2005). Is there an answer? Why are mitochondria essential for life? *IUBMB Life*, 57: 701–703.
- Margulis L., Fester R. (1991). Symbiosis as a source of evolutionary innovation. MIT Press, Cambridge, MA.
- Meadows J.R.S., Cemal I., Karaca O., Gootwine E., Kijas J.W. (2007). Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the Near East. *Genetics*, 175: 1371–1379.
- Michikawa Y., Mazzucchelli F., Bresolin N., Scarlato G., Attardi G. (1999). Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science*, 286: 774–779.
- Natonek-Wiśniewska M., Rychlik T. (2008). Polimorfizm wybranych sekwencji mikrosatelitarnych DNA u owiec rasy merynos polski oraz ocena ich przydatności w kontroli rodowodów. *Ann. Anim. Sci.*, 8 (1): 23–27.
- Pedrosa S., Uzun M., Arranz J-J., Gutierrez-Gil B., San Primitivo F., Bayon Y. (2005). Evidence of three maternal lineages in Near Eastern sheep supporting multiple domestication events. *Proc. R. Soc. B.*, 272: 2211–2217.
- Ryder M.L. (1984). Sheep. Evolution of domesticated animals. S. L. Mason (ed.), pp. 63–85. Longman, London and New York.
- Tapio M., Marzanov N., Ozerov M., Cinkulov M., Gonzarenko G., Kiselyova T., Murawski M., Viinalass H., Kantanen J. (2006). Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asian areas. *Mol. Biol. Evol.*, 23: 1776–1783.
- Tartaglia M., Saulle E. (1998). Nucleotide sequence of porcine and ovine tRNA^{lys} and ATPase mitochondrial genes. *J. Anim. Sci.*, 76: 1–2.
- Villalta M., Fernandez-Silva P., Beltran B., Enguita L., Lopes-Perez M.J. (1992). Molecular characterisation and cloning of sheep mitochondrial DNA. *Curr. Genet.*, 21: 235–240.
- Wallace D.C. (2005). The mitochondrial genome in human adaptive radiation and disease: on the road to therapeutics and performance enhancement. *Gene*, 18 (354): 169–180.
- Wood N.J., Phua S.H. (1996). Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. *Anim. Genet.*, 27: 25–33.

MITOCHONDRIAL DNA – CHARACTERISTICS AND POTENTIAL PRACTICAL APPLICATIONS IN SHEEP BREEDING

Summary

In addition to nuclear DNA, human and animal cells contain genetic material in the mitochondria (mtDNA). Due to a lack of recombination, high efficiency of isolation from even small amounts of biological tissue, high polymorphism and resistance to degradation processes, mtDNA is a useful material in many fields of science. Mitochondrial DNA is often used in humans for individual identification in female pedigree lines. What is more, mtDNA analysis allows for species identification, which found practical application in the feed industry for verifying the information provided by the manufacturers concerning the composition of animal feed mixtures. Mitochondrial DNA is an effective molecular marker in phylogenetic analyses. Phylogenetic studies of sheep based on selected segments of mtDNA showed that the mouflon (*O. musimon*, *O. orientalis*), ural (*O. vignei*) and argali (*O. ammon*) have contributed to the sheep currently raised in Europe, Asia and North America. Based on analysis of the control region sequences of Eurasian sheep, five pedigree lines (haplogroups) were identified that dominate in sheep from Asia – A (HA), C (HC), D (HD) and E (HE), and in sheep from Europe – B (HB).

Fot.: archiwum

