

Základy metod forenzní genetiky

Hana Šumberová, DiS

Bakalářská práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta humanitních studií

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta humanitních studií

Ústav ošetrovatelství

akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Hana ŠUMBEROVÁ, DiS.**

Osobní číslo: **H080333**

Studijní program: **B 5341 Ošetrovatelství**

Studijní obor: **Všeobecná sestra**

Téma práce: **Základy metod forenzní genetiky**

Zásady pro vypracování:

V teoretické části seznámit se základy genetiky všeobecně a se základy některých metod používaných ve forenzní genetice.

V praktické části porovnat využití těchto metod v praxi a představit pracoviště zabývající se touto problematikou v České republice.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

HATINA, Jiří; SYKES, Bryan. Lékařská genetika : Problémy a přístupy. 1. vydání. Praha 2 : Nakladatelství Akademie věd České republiky, 1999. 296 s. ISBN 80-200-0700-8.

ROSYPAL, Stanislav. Úvod do molekulární biologie : První díl. Druhé rozšířené vydání. Brno : [s.n.], 1997. 270 s. Nemá ISBN.

ROSYPAL, Stanislav. Úvod do molekulární biologie : Druhý díl. Druhé rozšířené vydání. Brno : [s.n.], 1997. 270 s. Nemá ISBN.

ROSYPAL, Stanislav. Úvod do molekulární biologie : Třetí díl. Druhé rozšířené vydání. Brno : [s.n.], 1997. 270 s. Nemá ISBN.

ŠMARDA, Jan, et al. Metody molekulární biologie. 1. vydání. Masarykova univerzita : [s.n.], 2008. 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání bakalářské práce:

10. února 2011

Termín odevzdání bakalářské práce:

3. června 2011

Ve Zlíně dne 10. února 2011



prof. PhDr. Vlastimil Švec, CSc.
děkan



Mgr. Anna Krátká, Ph.D.
ředitelka ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – bakalářskou práci – nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům.

Prohlašuji, že

- elektronická a tištěná verze bakalářské práce jsou totožné;
- na bakalářské práci jsem pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.

Ve Zlíně

.....

1) zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47b Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

2) zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

3) zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tématem mé bakalářské práce jsou „Základy metod forenzní genetiky“. Teoretická část se zabývá genetikou všeobecně. Představuje tento vědní obor a seznamuje s jeho základy. Rychlý rozvoj tohoto oboru vedl k rozdělení genetiky do mnoha specializovaných oblastí. Jednou z nich je právě forenzní genetiky.

Praktická část se zabývá popisem vybraných metod, jejich využitím ve světě i u nás. Porovnává výhody i nevýhody jednotlivých metod a podává stručný přehled o tom, ve kterých vědních oborech lze tyto metody využít.

Klíčová slova: genetiky, dědičnost, metody, forenzní genetiky

ABSTRACT

My bachelor thesis deals with „The basics of Forensic Genetics“. The theoretical part is concerned with genetics in general. It introduces this field of science and acquaints with its basic principles. Genetics is the science of heredity and variation in living organisms. A rapid development of this field has led to dividing the genetics into many specialized branches. One of them is a forensic genetics.

The practical part involves the description of some selective methods, their utilization in the world and of course in the Czech Republic. It compares the advantages and disadvantages of particular methods and gives us brief account of fields of science, in which we can use these methods.

Keywords: genetics, heredity, methods, forensic genetics

Poděkování

Děkuji Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D. za pomoc, odborné vedení, cenné rady a podněty při vedení mé bakalářské práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 ZÁKLADY GENETIKY	12
1.1 HISTORIE GENETIKY	12
1.2 BUŇKA	13
1.2.1 Prokaryota	14
1.2.2 Eukaryota.....	14
1.3 NUKLEOVÉ KYSELINY	15
1.3.1 Deoxyribonukleová kyselina	16
1.4 GENETICKÝ KÓD.....	18
1.5 EUKARYOTICKÝ CHROMOZOM.....	20
2 GENOM	21
2.1.1 Genotyp a fenotyp	23
2.2 GEN.....	23
2.2.1 Strukturní gen.....	24
2.2.2 Gen pro funkční RNA	25
2.2.3 Geny pro kvalitativní a kvantitativní znaky	25
2.3 ALELA	25
2.4 DNA POLYMERÁZY	27
2.5 TRANSKRIPCE.....	28
2.6 TRANSLACE.....	30
3 POLYMORFISMUS DNA	31
3.1 MUTACE A JEJICH VÝZNAM.....	33
3.1.1 Klasifikace mutací.....	36
3.1.1.1 Genové mutace:	36
3.1.1.2. Chromozomové mutace:	36
3.1.1.3. Genomové mutace:	37
3.1.1.4. Typy mutací:	37
II PRAKTICKÁ ČÁST	39
4 MATERIÁL A METODIKA	40
4.1 STUDOVANÉ METODY	40
4.2 SBĚR A VYHODNOCENÍ INFORMACÍ.....	40
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	43
5.1 METODY AMPLIFIKACE DNA	43
5.2 METODY ANALÝZY POLYMORFISMU DNA.....	44

5.2.1	Fluorescenční in situ hybridizace (FISH).....	45
5.2.1.1	Popis metody FISH:	45
5.2.1.2	Nevýhody metody FISH:	45
5.2.1.3	Výhody metody FISH:	45
5.2.1.4	Analýza využívání metody FISH:	45
5.2.2	Polymorfismus délky restričních fragmentů	47
5.2.2.1	Popis metody RFLP:	47
5.2.2.2	Výhody metody RFLP:	48
5.2.2.3	Nevýhody metody RFLP:.....	48
5.2.2.4	Analýza využívání metody RFLP:	48
5.2.3	Sekvenování DNA.....	50
5.2.3.1	Popis metody sekvenování DNA:.....	50
5.2.3.2	Nevýhody metody sekvenování DNA:	51
5.2.3.3	Výhody metody sekvenování DNA:	51
5.2.3.4	Chemická metoda sekvenování DNA:.....	51
5.2.3.5	Nevýhody chemické metody sekvenování:.....	51
5.2.3.6	Výhody chemické metody sekvenování:.....	52
5.2.3.7	Enzymová metoda sekvenování:.....	52
5.2.3.8	Výhody enzymové metody sekvenování:.....	52
5.2.3.9	Analýza využívání metody sekvenování DNA:	53
5.2.4	Polymerázová řetězová reakce	54
5.2.4.1	Popis metody PCR:	54
5.2.4.2	Výhody metody PCR:	57
5.2.4.3	Nevýhody metody PCR:	57
5.2.4.4	Diagnostické využití metody PCR:.....	58
5.2.4.5	Analýza využívání metody PCR:	59
5.2.5	Real-time PCR	61
5.2.5.1	Popis metody Real-time PCR:	61
5.2.5.2	Výhody metody Real-time PCR:	62
5.2.5.3	Nevýhody metody Real-time PCR:.....	62
5.2.5.4	Analýza využívání metody Real-time PCR:	62
5.2.6	Alu-PCR.....	64
5.2.6.1	Popis metody Alu-PCR:.....	64
5.2.6.2	Nevýhody metody Alu-PCR:	64
5.2.6.3	Analýza využívání metody Alu-PCR:.....	64
5.2.7	Primed <i>in situ</i> hybridization	65
5.2.7.1	Popis metody PRINS:	65
5.2.7.2	Výhody metody PRINS:.....	66
5.2.7.3	Analýza využívání metody PRINS:	66
5.2.8	Stanovení polymorfismu délky restričních fragmentů u produktů PCR	67
5.2.8.1	Popis metody PCR-RFLP:	67
5.2.8.2	Výhody metody PCR-RFLP:	67
5.2.8.3	Analýza využívání metody PCR-RFLP:	68
5.2.9	Mnohonásobná (“Multiplex”) PCR.....	69
5.2.9.1	Popis metody Multiplex PCR:	69
5.2.9.2	Výhody metody “Multiplex” PCR:.....	69
5.2.9.3	Nevýhody metody “Multiplex” PCR:	69
5.2.9.4	Analýza využívání metody Multiplex PCR:	70

5.2.10	Nested PCR	71
5.2.10.1	Popis metody Nested PCR:	71
5.2.10.2	Nevýhody metody Nested PCR:	71
5.2.10.3	Analýza využívání metody Nested PCR:	72
5.2.11	Polymorfismus délky jednoduchých repetitivních sekvencí	73
5.2.11.1	Popis metody SSLP-PCR:	73
5.2.11.2	Nevýhody metody SSLP-PCR:	73
5.2.11.3	Výhody metody SSLP-PCR:	74
5.2.11.4	Analýza využívání metody SSLP-PCR:	74
5.2.12	DNA Microarrays	75
5.2.12.1	Popis metody DNA Microarrays:	75
5.2.12.2	Výhody metody DNA Microarrays:	76
5.2.12.3	Nevýhody metody DNA Microarrays:	76
5.2.12.4	Analýza využívání metody DNA Microarrays:	76
6	ZÁVĚR	78
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	79
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	88
	SEZNAM OBRÁZKŮ	90
	SEZNAM TABULEK	91
	SEZNAM PŘÍLOH	93

ÚVOD

Téma mé bakalářské práce, „Základy metod forenzní genetiky“, jsem si vybrala záměrně, protože je velmi aktuální. Naskytla se mi možnost nahlédnout hlouběji do vědního oboru, který se velmi rychle rozvíjí, ale na druhou stranu je mu, podle mého názoru, věnována jen malá pozornost.

Lidé zabývající se genetikou se nespokojili jen s tím, že rozluštili genetický kód. To jim totiž umožnilo odhalit příčiny některých dědičných onemocnění. Dalším studiem genů ovlivňujících procesy v lidském těle odhalili např. příčiny vzniku některých druhů nádorů, které jsou úzce spjaty s mutacemi specifických genů. Genetika má také velký vliv na léčbu některých infekčních onemocnění. Studium bakteriálního genomu pomohla odhalit příčinu rezistence některých bakterií vůči antibiotikům. To má samozřejmě velký vliv v klinické medicíně.

Zvláštní postavení mezi genetickými podobory má jistě forenzní genetika. Vyplývá z poznatků genetiky, ze znalostí genetického kódu, mutací a chromozomálních odchylek. Nezabývá se ale příčinami vzniku nemocí ani možnostmi jejich léčby. Forenzní genetika slouží pouze pro právní účely. Vychází z poznatků, že každý člověk má svůj specifický genetický kód. Je téměř vyloučeno, aby dvě osoby měly tento kód naprosto totožný. Forenzní genetika je využívána v případech hromadných neštěstí, kdy je potřeba identifikovat oběti. Kriminalisté ji využívají jak k identifikaci oběti, tak samozřejmě také k určení možného pachatele zločinu. V neposlední řadě je forenzní genetika využívána také v soudních sporech, ve kterých se prokazují příbuzenské vztahy, např. při určování otcovství.

Protože forenzní genetika je relativně mladý obor, chtěla jsem některé metody, které používá, stručně popsat ve své práci a poskytnout tak malý přehled pro případné zájemce o genetiku.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ZÁKLADY GENETIKY

Genetika (genetics) je věda o dědičnosti a proměnlivosti. Název genetika pochází od latinského genus (rod). K výraznému pokroku v rozvoji genetiky došlo ve druhé polovině 20. století, kdy byla popsána struktura nukleových kyselin a objeven jejich klíčový význam pro přenos genetické informace. Genetika popisuje a vysvětluje pravidla, jimiž se řídí přenos dědičných znaků z rodičovské generace na potomstvo (Kočárek, 2004, s. 10). V této souvislosti je třeba definovat dva pojmy, dědičnost a proměnlivost. *Dědičnost* je schopnost organismů uchovávat soubor dědičných informací (genů) o vytváření nejrůznějších morfologických znaků a fyziologických vlastností a schopnost předávat tento soubor víceméně nezměněný svým potomkům. Pro všechny organismy je však stejně charakteristická i opačná tendence – tendence k *proměnlivosti neboli variabilitě*. Je to schopnost organismů reagovat na různé podmínky prostředí různým způsobem (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 129). Proměnlivost organismů může být podmíněna jednak působením faktorů vnějšího prostředí (např. fyzikálních, chemických a geografických vlivů, výchovou, sociálním zázemím a vzděláním), jednak genetickými vlivy, u nichž záleží na tom, které vlohy potomci od svých rodičů zdědí a jak se jejich výsledná kombinace projeví při tvorbě konkrétního znaku. Genetika je tedy věda o dědičnosti a proměnlivosti. Faktory vnějšího prostředí a genetické vlivy se při tvorbě variability často doplňují (Kočárek, 2004, s. 11). Dědičnost a proměnlivost patří mezi základní vlastnosti živé hmoty. Projevy dědičnosti a proměnlivosti organismů mají své zákonitosti a jsou podmíněny uspořádáním genetické informace organismů. Genetické zákonitosti lze sledovat nejenom u jednotlivých organismů, ale i na úrovni populací (Rosypal, 2003, s. 605).

1.1 Historie genetiky

Většina předmendelovských teorií dědičnosti nebyla v podstatě ničím jiným než rozvíjením představy, že znaky rodičů se nějakým způsobem mísí v dětech (Hatina, Sykes, 1999, s. 13). Jean Baptiste Lamarck (1744–1829) zformuloval roku 1809 „evoluční“ teorii, podle níž jedinci získávají působením prostředí určité výhodné vlastnosti, které pak dále přenášejí na potomstvo. Tato dědičnost získaných vlastností je podle Lamarcka základní podstatou vývoje všech organismů. Lamarckově teorii výrazně odporoval fakt, že křížením rodičovských jedinců vzniká značně různorodé potomstvo. Proto Charles Darwin (1809–

1882) zformuloval roku 1859 teorii přírodního výběru, která předpokládá, že variabilita potomstva je nezbytnou podmínkou k selekci jedinců s vhodnými vlastnostmi. Jeho dílo značně ovlivnilo pozdější vývoj genetiky. Také J. G. Mendel měl Darwinovu práci „O původu druhů“ ve své knihovně (Kočárek, 2004, s. 48).

Základy genetiky však položil až v roce 1865 J. G. Mendel na základě svých pokusů s křížením hrachu, když popsal a vysvětlil základní zákonitosti, jimiž se řídí přenos dědičných znaků. (Kočárek, 2004, s. 10). Mendel jako první dospěl k představě, že se nedědí znaky jako takové, ale jejich základy (elementy). Tyto jednotky dědičnosti byly poprvé Johannsenem v roce 1909 nazvány *geny* (genes). Mendel prezentoval svoji práci „Pokusy s rostlinnými kříženci“ (Versuche über Pflanzenhybriden) v roce 1866 na půdě Brněnské přírodovědecké společnosti a ta ji v témže roce publikovala ve svém sborníku (Hatina, Sykes, 1999, s. 15). Již v poslední čtvrtině 19. století byla zavedena celá řada důležitých genetických termínů – včetně „genetiky“ samotné. Fyzický popis znaků daného individuálního organismu se stal jeho fenotypem (fenotype). „Ona věc“, ať už to bylo cokoliv, která určovala výšku, vzhled nebo barvu pokožky, se stala genem (gene) pro tento znak. „Onen pár jednotek“, který segregoval v Mendelových kříženích, se stal *alelami* (allele) daného genu. Již ve 20. letech bylo zjištěno, že lze experimentálně vyvolat dědičné změny genetické informace, *mutace* (mutation). Po druhé světové válce došlo k velkému rozmachu molekulární genetiky (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 128). Strukturu DNA objasnili roku 1954 americký biolog James Dewey Watson a britský fyzik Francis Harry Compton Crick, kteří společně pracovali v Cambridgi. Dospěli k závěru, že molekula DNA je tvořena dvěma polynukleotidovými řetězci, které jsou navzájem propojeny vodíkovými můstky mezi dusíkatými bázemi (Kočárek, 2004, s. 122).

1.2 Buňka

Buňka (cell) je základní stavební a funkční jednotkou všech buněčných organismů, je jejich organizačním základem (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 59). Má všechny podstatné složky potřebné k samostatnému životu: (1) Metabolický aparát, tj. soubor několika set tisíců enzymů, které přeměňují živiny, a tak z nich dílem uvolňují energii nutnou k životním projevům buňky, dílem z nich vytvářejí stavební složky pro růst buňky. (2) Od okolí je buňka oddělena plazmatickou membránou, která umožňuje uchovávat vnitřní pro-

středí buňky a přijímat z vnějšího prostředí živiny. (3) Další podstatnou složkou buňky je DNA a na ni napojený enzymový aparát zajišťující přenos genetické informace pro syntézu proteinů potřebných pro růst buňky a dělení buňky na dvě zcela identické buňky dceřiné (Rosypal, 2003, s. 27).

Buňku chápeme jako otevřený systém s autoreprodukcí, schopný výměny látek, energie a informací se svým okolím. Vůči svému okolí je buňka poměrně stálou soustavou a je schopna existence, i když se její okolí v určitém rozmezí podmínek mění. Je soustavou velmi dynamickou, neustále v ní probíhají chemické přeměny a přeměny energie a informací, které vedou k udržení ustáleného optimálního stavu. Tyto vlastnosti mají všechny buňky, tedy jak buňky prokaryotické, tak eukaryotické (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 59). Existuje mnoho odlišných buněčných typů (např. epiteliální, jaterní, nervové atd.). Odlišné druhy metabolismu charakteristické pro každý buněčný typ jsou zajišťovány různými druhy organel a velkým množstvím cytoplazmatických enzymů konkrétních buněk (Pritchard, Korf, 2007, s. 14). Buňky jsou primárně odpovědné za veškerou aktivitu organismu. Většina životních dějů probíhá v buňkách. Ve srovnání s tisíci enzymovými ději v buňce jen poměrně málo enzymových reakcí probíhá mimo buňky. Zúčastněné enzymy jsou ovšem opět produkovány buňkami pod kontrolou organismu (Rosypal, 2003, s. 27).

1.2.1 Prokaryota

Do této skupiny patří jednobuněčné organismy (bakterie, sinice a mykoplazmata). Jádro prokaryotických buněk je tvořeno jediným chromozomem, který nazýváme *nukleoid* (nucleoid). Kromě něj obsahují mnohé bakterie i malé dvouřoubovicové molekuly DNA, zvané plazmidy (plasmid), které nesou např. geny rezistence vůči antibiotikům. Prokaryotické buňky se rozmnožují nepohlavně, většinou příčným dělením. Podle toho, zda prokaryotické buňky vyžadují ve svém prostředí kyslík, nebo žijí v jeho nepřítomnosti, je dělíme na aerobní, anaerobní a fakultativně anaerobní (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 61–62).

1.2.2 Eukaryota

Rostliny, živočichové a houby jsou jednobuněčné i mnohobuněčné. Ve srovnání s bakteriální buňkou je eukaryotická buňka mnohem větší a složitější a evolučně mnohem mladší. Je charakteristická diferencovaným jádrem, jadernými chromozomy a velkým

množstvím membránových organel (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 63). Dělení jádra je mitotické a zajišťuje se jím rozdělení chromozomů do dceřiných buněk. Všechny eukaryotické buňky obsahují mitochondrie. Rostlinné buňky kromě mitochondrií obsahují plastidy a z nich především chloroplasty. Mitochondrie a plastidy jsou membránou odděleny od ostatního kompartmentu buňky (Rosypal, 2003, s. 8).

1.3 Nukleové kyseliny

Genetická informace je uložena v nukleových kyselinách. Velký průlom ve studiu nukleových kyselin nastal v roce 1953, když James Watson a Francis Crick odvodili, jak jsou nukleotidy uspořádány uvnitř DNA. Watson a Crick věděli, že nukleotidy jsou spojené mezi sebou v řetězci. Tato spojení jsou tvořena chemickými interakcemi mezi fosfátem jednoho nukleotidu a cukrem dalšího nukleotidu. Dusíkaté báze se těchto interakcí neúčastní. Od jednoho konce řetězce ke druhému tvoří báze lineární posloupnost (sekvenci), která je pro tento konkrétní řetězec charakteristická. Je to právě tato sekvence bází, co odlišuje jeden gen od druhého. Watson a Crick dospěli k závěru, že se molekula DNA skládá ze dvou řetězců nukleotidů (Snustad, Simmons, 2009, s. 3).

Nukleové kyseliny tvoří sice relativně malé procento hmotnosti buňky, ale svým významem v uchování, přenosu a vyjádření (expresi) genetické informace jsou velmi důležité a nenahraditelné. Monomery nukleových kyselin jsou *nukleotidy* (nukleotide). Každý nukleotid je tvořen spojením organické *dusíkaté báze* (deriváty purinu nebo pyrimidinu), *pentózy* (pentose) a *kyseliny fosforečné* (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 53). Pentózy mohou být ribóza (ribose) v kyselině ribonukleové (RNA) a deoxyribóza v kyselině deoxyribonukleové (DNA) (Rosypal, 2003, s. 39). Nukleotidy se spojují prostřednictvím diesterových vazeb a tvoří polynukleotidový řetězec (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 53). Délku řetězců vyjadřujeme počtem nukleotidů, tzv. páru bází (bp). Základní a snad tou nejpodstatnější vlastností nukleotidových řetězců je schopnost tvořit vodíkové vazby a vzájemným spojením mezi bázemi vytvářet molekuly sestávající ze dvou řetězců (Brdička, 2001). Kyselina fosforečná se váže na hydroxyl na uhlíkovém atomu 3' a na hydroxyl atomu 5' diesterovou vazbou. Molekuly nukleových kyselin mají tedy 3'-konec a 5'-konec.

Dusíkaté báze jsou vždy čtyři:

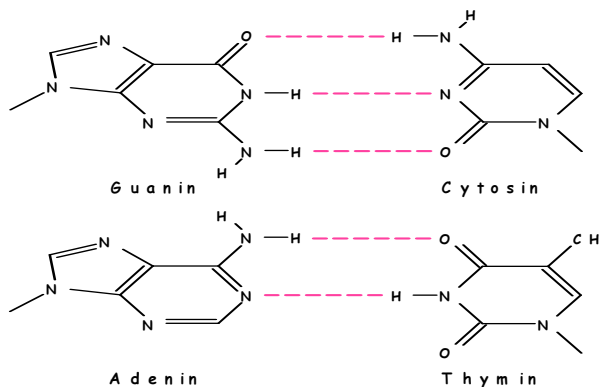
- Dvě purinové, tj. adenin (A; Adenine) a guanin (G; Guanine).
- Dvě pyrimidinové, tj. cytosin (C; Cytosine) a thymin (T; Thymine) v DNA. V RNA je pak místo tyminu uracil (U; Uracil).

1.3.1 Deoxyribonukleová kyselina

Molekula DNA může být jednořetězcová až čtyřřetězcová. U virů se setkáváme s DNA jednořetězcovou a dvouřetězcovou, zatímco eukaryotické buňky mají jen dvouřetězcovou (dvoušroubovice (double helix)) DNA (Rosypal, 1997). Makromolekula DNA v eukaryotických buňkách je tvořena dvěma protiběžnými polynukleotidovými řetězci, které jsou šroubovitě stočeny a jsou mezi bázemi navzájem spojeny vodíkovými můstky. Vodíkovými můstky se spojují vždy jedna purinová a jedna pyrimidinová báze (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 55). Každá purinová nebo pyrimidinová báze spolu s navázanou sacharidovou molekulou a fosfátovou skupinou vytvářejí *nukleotid*. Úsek dvouřetězcové DNA tudíž v podstatě tvoří dva spojené stočené řetězce nukleotidů. V úplném závitě dvoušroubovice DNA je deset párů nukleotidů (Pritchard, Korf, 2007, s. 20). Mezi adeninem a thyminem se vytvářejí dva vodíkové můstky a mezi guaninem a cytosinem tři vodíkové můstky. V jednom řetězci DNA se jednotlivé nukleotidy opakují v určitém sledu a ve druhém, párovém řetězci, je vždy proti adeninu thymin, proti guaninu cytosin, proti tyminu adenin a proti cytosinu guanin. Pořadí jednotlivých nukleotidů v jednom řetězci tak přímo určuje primární strukturu druhého řetězce, je jeho matricí. Tato skutečnost je příčinou vzájemné komplementarity bází v párových řetězcích a je podstatou genetického kódování (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 55). Pravidlo o párování bází, podle kterého se adenin páruje s thyminem nebo s uracilem a guanin s cytosinem, se obvykle nazývá Watsonovo-Crickovo (Rosypal, 1997, s. 104–106).

Dvoušroubovice má následující charakteristické rysy: (1) Sestává ze dvou polydeoxyribonukleotidových řetězců šroubovicovitě ovíjejících společnou osu neboli osu dvoušroubovice. (2) Oba řetězce jsou navzájem komplementární, tj. jejich nukleotidové sekvence jsou ve vztahu, který vyhovuje pravidlu o párování bází (base-pairing). (3) Na jeden závit dvoušroubovice připadá 10,5 párů bází, což odpovídá úseku o délce 3,4 nm. Vzdálenost mezi dvěma páry je 0,34 nm. Páry bází se vytvářejí uvnitř dvoušroubovice. Báze jsou tedy

orientovány směrem dovnitř dvoušroubovice, kdežto její vnější část tvoří opornou strukturu dvoušroubovicové DNA a představuje páteř DNA. (4) Největší vzdálenost páteře DNA od osy dvoušroubovice je 1 nm. (5) Oba komplementární řetězce jsou antiparalelní, tj. liší se směrem fosfodiesterové vazby. Pojmeme antiparalelizmus se rozumí orientace komplementárních polynukleotidových řetězců ve dvouřetězcových molekulách nukleových kyselin, která je charakteristická směrem fosfodiesterových vazeb $3' \rightarrow 5'$ na jednom řetězci a $5' \rightarrow 3'$ na řetězci druhém. (6) Platí pro ni Chargaffovo pravidlo, podle kterého se stechiometrické množství adeninu v dvouřetězcové molekule DNA rovná množství thyminu, množství guaninu se rovná množství cytosinu a tedy poměr purinů a pyrimidinů se rovná 1. (7) V každém ze čtyř možných párů AT, TA, GC, CG se váže purinová báze (purine bases) s pyrimidinovou (pyrimidine bases). (8) Báze jsou aromatické sloučeniny a mají proto rovinný charakter. Během otáčení kolem osy dvoušroubovice nabývají však uvnitř jednotlivých párů různých poloh, které jsou určeny v soustavě souřadnic x, y, z. Např. celý pár bází neleží vždy v jedné rovině. Roviny proložené páry bází jsou navzájem poněkud pootočený, takže připomínají listy vrtule. Tato poloha bází uvnitř daného páru se označuje jako vrtulový zkrot (propeller twist). (9) Jelikož páry bází jsou od osy šroubovice posunuty, není vnější vzhled dvojité šroubovice hladký, ale vyznačuje se dvěma žlábků různé šíře a hloubky. Větší žlábek (major groove) je široký 1,2 nm, menší 0,6 nm. Větší žlábek je hlubší než menší žlábek (minor groove). Oba žlábků se vyznačují přítomností atomů schopných vytvářet vodíkové vazby s proteiny, větší žlábek ve větší míře než žlábek menší. To má značný význam pro interakci DNA s proteiny v regulačních oblastech. (10) Již bylo naznačeno, že poloha, kterou báze vlivem rotace zaujímají, je určena soustavou souřadnic x, y, z. Vzájemnou rotací rovin dvou párů bází kolem osy y nabývají tyto páry též polohy tzv. rovinného zkrutu (twist). Roviny párů bází se mohou také posouvat podél osy x nebo z. (11) Vinutím řetězců v dvoušroubovici se rozumí několikanásobné vzájemné otáčení (twisting) jednoho DNA-řetězce kolem druhého; může být pravotočivé nebo levotočivé (Rosypal, 1997, s. 59–65).



Obr.1: Vodíkové vazby

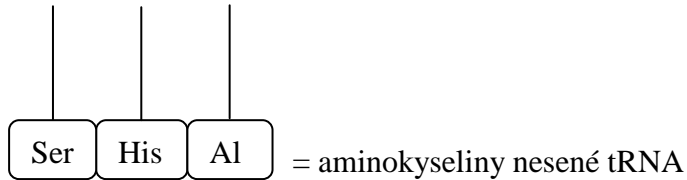
1.4 Genetický kód

Genetická informace je uchovávána v DNA prostřednictvím genetického kódu (genetic code). Principem je, že sekvence sousedních nukleotidových bází určuje sekvenci aminokyselin v příslušné bílkovině. Klíčovým prvkem pro správné fungování translace (přepis informace z mRNA do pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci) je kód, který přiřazuje jednotlivé aminokyseliny ke kombinacím tří přilehlých nukleotidových bází v mRNA. Tato informace je předávána pomocí sady tří nukleotidových bází vytvářejících kodón. Každý kodón je specifický pro danou aminokyselinu (Nussbaum, 2004). *Kodon* (codon) tj. pořadí tří nukleotidů (triplet) kódující v polypeptidu určitou aminokyselinu nebo signalizující začátek, případně konec jeho syntézy na ribozomu, je základní jednotkou genetického kódu. Genetický kód je pak systém pravidel, podle kterých jednotlivé kodony určují zařazení standardních aminokyselin do polypeptidu (Rosypal, 1997, s. 103). Konkrétně je pro tři protilehlé nukleotidové báze možný počet 64 tripletových kombinací. Vzhledem k tomu, že existuje pouze 20 aminokyselin a 64 možných kodónů, většina aminokyselin je kódována více než jedním kodónem. Tento fenomén se nazývá *degenerace genetického kódu* (Nussbaum, 2004). Jednotlivé aminokyseliny jsou kódovány většinou dvěma až šesti různými tripletami. Naopak žádný triplet nemůže kódovat více než jednu aminokyselinu (Kočárek, 2004, s. 124). Významnou vlastností genetického kódu je jeho univerzalita. Znamená to, že přiřazení aminokyselin k jednotlivým tripletům je u všech organismů bez ohledu na fylogenetické zařazení stejné. Výrazné shody v genetickém kódu u všech organismů podporují předpoklad, že genetický kód se v průběhu evoluce vyvinul pouze jednou. Vytvořil se zřejmě hned na počátku vzniku života před rozrůzněním organismů do jednotlivých domén, říší a kmenů (Kočárek, 2004, s. 143).

Čtení genetického kódu probíhá na ribozomech. Je to proces, který je součástí translace a spočívá v jednosměrném rozeznávání kodonů v mRNA *antikodony* na tRNA. Antikodonem (antikodon) se rozumí specifický triplet, jehož prostřednictvím se tRNA přechodně váže ke komplementárnímu kodonu na mRNA (Rosypal, 1997, s. 103). Párování komplementárních bází mezi kodónem a antikodonem na jedné straně molekuly tRNA a kovalentní vazba tRNA a příslušné aminokyseliny na druhé straně jsou tedy podstatou čtení genetického kódu. Specifita tohoto čtení je určena výhradně párováním kodón-antikodón (Hatina, Sykes, 1999, s. 105).

UCG CAU GCC = kodony na mRNA

AGC GUA CGG = antikodony tRNA



Obr. 2: Čtení genetického kódu

Přitom se genetický kód čte postupně po tripletech. Jedna ze tří možností způsobu čtení tripletů v nukleotidové sekvenci založená na pevně stanoveném počátku tohoto čtení se označuje jako čtecí rámec. Rozlišují se dva typy čtecích rámců: (1) Otevřený čtecí rámec (open fading frame), tj. čtecí rámec vymezený iniciačním a terminačním kodonem tak, že může kódovat souvislý a dostatečně dlouhý polypeptidový řetězec. (2) Uzavřený čtecí rámec (closed fading frame), tj. čtecí rámec přerušovaný terminačními kodony tak, že nemůže kódovat souvislý a dostatečně dlouhý polypeptidový řetězec (Rosypal, 1997, s. 103).

Základní vlastnosti genetického kódu lze shrnout do těchto bodů: (1) Genetický kód je tripletový (třípísmenný), tj. každá aminokyselina je kódována trojicí nukleotidů v nukleové kyselině neboli tripletem (triplet). (2) Je sestaven ze 64 kodonů. (3) Je degenerovaný. Degenerací genetického kódu se rozumí kódování jednotlivých aminokyselin několika různými kodony. (4) Z celkového počtu kodonů kóduje aminokyseliny pouze 61 kodonů. Schopnost kodonu kódovat určitou aminokyselinu se označuje jako smysl kodonu (sense of the codon). (5) Většina kodonů je synonymních. Jako synonymní se označují odlišné kodony stejného smyslu. (6) Většina kodonů, které mají smysl, je rozdělena do kodonových rodin a dvoukodonových sad. Kodonová rodina (codon family) je skupina čtyř synonymních kodonů, které se liší jen nukleotidem ve třetí pozici a kódují stejnou aminokyselinu. Dvoukodonová sada (two-codon set) jsou dva synonymní kodony končící ve třetí pozici jeden na A a druhý na G nebo jeden na U a druhý na C. (7) Některé kodony jsou nesmyslné. To znamená, že nekódují žádnou aminokyselinu. Jsou to: UAA nazývaný ochre, UAG nazývaný amber. (8) Funkce těchto kodonů spočívá v tom, že signalizují zakončení syntézy polypeptidu na ribozomu. Proto se též označují jako terminační (termination codon, stop codon). (9) Kodon UGA nazývaný též opal je bifunkční. Jedna jeho funkce spočívá v tom, že může

vystupovat jako nesmyslný (terminační) a druhá v tom, že může kódovat aminokyselinu selenocystein, která má svou vlastní tRNA. Ve většině případů působí jako kodon pro selenocystein. Tato aminokyselina se na ribozomu zařazuje do polypeptidového řetězce. (10) Kodon AUG je také bifunkční. Může kódovat aminokyselinu metionin nebo signalizovat začátek syntézy polypeptidového řetězce na ribozomu, tedy působit jako kodon iniciační (initiation codon). (11) Naprostá většina kodonů je univerzální (universal codons), což znamená, že má u všech živých soustav smysl stejný. Tato vlastnost genetického kódu se označuje jako univerzalita genetického kódu (universality of the genetic code).

1.5 Eukaryotický chromozom

Eukaryotický chromozom je většinou rozdělen *centromerou* (centromere) na dvě raménka. Centromera má význam při jaderném dělení. Konce ramének se nazývají *telomery* (telomeres). Vlákno tvořící chromozom, tj. jeho dlouhé i krátké raménko, nazýváme *chromatida*. Chromozom může být složen z jedné nebo ze dvou chromatid. Obě chromatidy ve dvouchromatidovém chromozomu obsahují zcela shodnou genetickou informaci a jsou spolu spojeny jen v oblasti centromery. Každý chromozom obsahuje dvě důležité složky – vlákno DNA a specifické proteiny, zejména histony. DNA a histony vytvářejí základní stavební jednotku chromozomu – nukleohistonové vlákno (Kočárek, 2004, s. 18).

Počet a utváření chromozomů jsou pro každý biologický druh zcela specifické (Kočárek, 2004, s. 18). Po proběhlém buněčném dělení obsahuje každá z dceřiných buněk kompletní *diploidní* sadu chromozomů. Každý chromozom je rozdělen na řadu replikačních jednotek. Každý lidský chromozom zahrnuje snad 100 nebo i více replikačních jednotek. Jednotlivé replikační jednotky jsou aktivovány v určitém, pevně daném pořadí. Výsledkem jsou dvě nová vlákna – chromatidy, z nichž každé obsahuje jeden původní a jeden nově syntetizovaný řetězec DNA (Hatina, Sykes, 1999, s. 22).

Genetická informace eukaryotické buňky je převážně soustředěna v jejím jádře na chromozomech. Počet a tvar chromozomů je typický pro každý biologický druh. V tabulce jsou uvedeny diploidní počty chromozomů (2n) u některých organismů (Chalupová-Karlovska, 2004, s. 136).

Tab. 1 Diploidní počty chromozomů některých živočišných a rostlinných druhů.

Druh	2n
Člověk	46
Šimpanz	48
Myš	40
Kapr	104
Škrkavka	2
Drosophila Melanogaster	8
Moucha	12
Komár	6
Hrách	14
Pšenice	42
Rajče	24
Lípa	82

2 GENOM

Roku 1990 byl ve Spojených státech zahájen jeden z nejrozsáhlejších vědeckých projektů v historii. V angličtině získal označení „Human Genome Project“. Hlavním úkolem projektu bylo zmapování lidského genomu, objasnění funkce všech jeho genů a studium genomů některých dalších modelových organismů. Z nich jmenujme bakterii *Escherichia coli*, octomilku a myš (Kočárek, 2004, s. 157). V roce 2001 projekt vyústil v úplnou analýzu lidské DNA. Počítačová analýza této DNA naznačovala, že lidský genom obsahuje 30000–40000 genů. Novější analýzy opravily počet lidských genů na 20000–25000 (Snustad, Simmons, 2009, s. 4, Hatina, Sykes, 1999, s. 90). Více informací o projektu lidského genomu lze získat např. na adrese: http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml. Co to tedy je genom? Genom je soubor všech genů daného organismu (genome). Genom eukaryotických orga-

nismů je tvořen *jaderným genomem* (souborem genů přítomných v jaderné DNA) a *mimo-jaderným genomem* (souborem genů přítomných v mitochondriové, popř. chloroplastové DNA) (Kočárek, 2004, s. 28). Můžeme pak rozlišovat jadernou, mitochondriovou nebo chloroplastovou složku buněčného genomu. Některé geny jsou lokalizovány na chromozomech v jádře buňky, jiné v mitochondriích, chloroplastech a u prokaryot na plazmidech. Uspořádání genů v genomu označujeme jako strukturu a organizaci genomu (Rosypal, 1997, s. 123). Lidský jaderný genom si můžeme představit jako jedinou molekulu DNA o délce dvou metrů, obsahující kolem $3 \cdot 10^9$ párů bází nukleotidů (pb). Lidský genom je rozdělen do 23 částí – chromozomů.

Předpokládáme-li, že většina genů se v haploidním genomu vyskytuje jen v jedné kopii, pak se délka celkové kódující sekvence lidského genomu pohybuje mezi $1,5-3 \cdot 10^8$ pb z celkové délky $3 \cdot 10^9$ pb. Jinými slovy, kódující význam má pouze 5 – 10% celkové jaderné DNA, v závislosti na odhadu počtu různých proteinů, a tedy genů. Většina DNA tedy proteiny nekóduje. Některé sekvence DNA mají co dělat s funkcí chromozomů – sekvence centromer a telomer a počátky replikace. S kódujícími sekvencemi genů těsně souvisí jiné sekvence, které sice samy o sobě nemají přímo kódující smysl, ale které jsou nezbytné pro správnou funkci genu – sem patří zvláště promotory a enhancery. Obvykle se nalézají v oblastech přiléhajících ke genu, mohou však být rovněž lokalizovány v nekódujících vymezených sekvencích (intronech), které přerušují souvislou kódující sekvenci genu, čili exony. To všechno dohromady – promotory, enhancery a introny – ovšem nedává víc než přinejlepším několik procent z celkové velikosti genomu. Podstatná část zbytku je tvořena opakujícími se bloky identických nebo téměř identických sekvencí. Často jsou označovány podle jména restriktivního enzymu, který štěpí po stranách nebo uvnitř příslušné repetice (Hatina, Sykes, 1999, s. 91). Mnohé úseky s repetitivními sekvencemi vykazují výraznou variabilitu, neboli *polymorfismus*. Znamená to, že počet repetitivních sekvencí je pro každého jedince zcela specifický a mezi jednotlivými osobami existují v délce těchto úseků velmi výrazné rozdíly. To je podstatou molekulárně-biologické metody zvané DNA-fingerprinting, která se využívá především ve forenzní genetice (Kočárek, 2004, s. 159).

2.1.1 Genotyp a fenotyp

Od genomu je třeba odlišovat *genotyp*. Tento pojem se vztahuje na jedince daného druhu. Dva jedinci téhož druhu mají stejný genom, který je charakteristický pro tento druh, ale liší se sestavou či konstitucí alel. Genetická konstituce alel v organismu se označuje jako jeho genotyp. Soubor znaků a vlastností, kterými se v daném prostředí genotyp organismu projevuje, se označuje jako jeho *fenotyp*. Utváření fenotypu závisí též na podmínkách prostředí, ve kterém organismus žije. Může být tímto prostředím tlumeno, zastaveno, stimulováno nebo různým způsobem modifikováno. Těmito vlivy prostředí se však nemění genotyp, ale fenotyp, neboť genetická informace obsažená v genotypu zůstává zachována a fenotyp se podle ní utváří v závislosti na vlivech vnějšího prostředí organismu (Rosypal, 1997, s. 125).

2.2 Gen

Gen se chápe jako jednotka genetické informace nebo jako základní funkční genetická jednotka. Jako jednotka informační a funkční se jeví v tom, že obsahuje genetickou informaci o primární struktuře buď funkční molekuly translačního produktu (polypeptidu, proteinu), nebo funkční molekuly produktu transkripce (tRNA, rRNA aj.), který nepodléhá translaci (Rosypal, 1997, s. 113). Gen představuje úsek DNA nesoucí informaci pro jednu „biologickou funkci“ – tj. definovanou nukleotidovou sekvenci biologicky aktivní RNA nebo aminokyselinovou sekvenci polypeptidu. Odhad celkového počtu genů u člověka se pohybuje okolo 100 000. Jen tato část genomu tedy nese přímou biologickou informaci (Hatina, Sykes, 1999, s. 94). Délku genu zpravidla vyjadřujeme v počtu nukleotidových párů tvořících jeho sekvenci v DNA. Tyto jednotky označujeme jako páry bází (base pairs), zkratkou pb. Většina genů dosahuje délky několika tisíc až milionů párů bází (Kočárek, 2004, s. 149). Struktura většiny eukaryotických genů je diskontinuální, tzn., že geny jsou složeny z oblastí kódujících – *exonů* (exon), nesoucích informaci o primární struktuře kódovaného peptidu, přerušovaných úseky nekódujícími – *introny* (intron). Celý gen, tj. jak exony, tak introny, je v závislosti na dané kombinaci transkripčních faktorů působících na gen podroben transkripci; výsledkem je primární transkript (Hatina, Sykes, 1999, s. 97).

Důležitou stavební i funkční složkou buněčných struktur jsou proteiny a ribonukleové kyseliny. Geny, které je kódují, dělíme do dvou základních skupin: (1) Strukturní geny, které obsahují informace o primární struktuře proteinů, popř. polypeptidů. Patří k nim zejména geny kódující proteiny se stavební funkcí (tj. základní složky cytoskeletu a mezi-buněčné hmoty; např. kolagen, elastin, aktin, myosin atd.) a geny kódující proteiny, popř. peptidy s biochemickou nebo fyziologickou funkcí (zejména enzymy, buněčné receptory, regulační proteiny, protilátky a některé hormony). (2) Geny pro funkční RNA, jejichž transkripční produkty nepodléhají translaci. Patří k nim především geny kódující tRNA a rRNA (Kočárek, 2004, s. 146).

2.2.1 Strukturní gen

Strukturním genem je úsek DNA, který obsahuje informaci o primární struktuře polypeptidu (proteinu) jako translačního produktu. Translační produkt je vždy molekula polypeptidu (proteinu) vytvořená na ribozomu translací mRNA-sekvence vymezené iniciačním a terminačním kodonem (Rosypal, 2003, s. 88). Existují dva druhy strukturních genů:

- Složené strukturní geny neboli geny s introny. Charakteristickou vlastností složeného genu je to, že se skládá z exonů a intronů, a že jeho primární transkript (transcript) podléhá posttranskripční úpravě sestřihem. Celý složený gen, všechny jeho introny a exony se přepíše do jedné molekuly primárního transkriptu, ze kterého se pak vyštěpí přepisy intronů a přepisy exonů se spojí. Výsledkem takového štěpení je mRNA, která se překládá na ribozomu. Vyštěpení přepisů intronů z primárního transkriptu a spojení přepisů exonů se označuje jako sestřih (splicing). Introny pak nazýváme takové DNA-sekvence složeného genu, jejichž přepisy se při posttranskripční úpravě sestřihem z primárního transkriptu vyštěpují a nepřecházejí tedy do výsledné mRNA. Naproti tomu exony se při této úpravě nevyštěpují, ale spojují a přecházejí do výsledné mRNA.
- Jednoduché strukturní geny neboli geny bez intronů. Jednoduchý gen není složen ze sekvencí, které by měly charakter intronů a exonů. Přepíše se celý do primárního transkriptu, který nepodléhá posttranskripční úpravě sestřihem (Rosypal, 2003, s. 88).

2.2.2 Gen pro funkční RNA

Genem pro funkční RNA se rozumí úsek DNA-řetězce přepisovaný do primární struktury tRNA nebo rRNA, případně dalších druhů RNA, které nejsou určeny k translaci. Obvykle je několik genů pro tRNA a rRNA přepisováno společně do jedné molekuly primárního transkriptu, který se posttranskripčně štěpí na jednotlivé funkční typy RNA. Gen jako regulační oblast je úsek na DNA nebo RNA plnící regulační funkci, neboť obsahuje informaci o vazbě ke specifickému proteinu, který po realizaci této vazby signalizuje určitý proces, např. zahájení nebo zastavení transkripce. Zatímco strukturální geny a geny pro RNA mají produkt (polypeptid nebo RNA určenou k translaci), regulační oblasti ho nemají (Rosypal, 2003, s. 89).

2.2.3 Geny pro kvalitativní a kvantitativní znaky

Geny můžeme rozdělit i podle jejich účinku na vzniku znaků. Kvalitativní znaky jsou v genotypu podmíněny malým počtem genů, nejčastěji genem jediným (monogenní znaky). Takovéto geny mají tedy velký fenotypový účinek, říkáme jim geny velkého účinku (majorgeny). Na kvalitativní znaky podmíněné geny velkého účinku obvykle příliš nepůsobí vlivy vnějšího prostředí. Kvantitativní znaky jsou podmíněny spolupůsobením většího množství genů, z nichž každý má na daný znak jen velmi malý účinek. Jsou to tzv. geny malého účinku (polygeny, kvantitativní geny). Jeden kvantitativní znak může být podmíněn desítkami genů malého účinku a jeho fenotypový projev bývá velkou měrou ovlivňován vlivy vnějšího prostředí (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 131).

2.3 Alela

Jako alely (allele) se nazývají různé varianty téhož genu lišící se navzájem více nebo méně v nukleotidové sekvenci, která rozhoduje o míře funkčnosti (aktivity) genu. (Rosypal, 2003, s. 610) Geny kódující určitý polypeptidový řetězec nebo přepisované do určitého typu RNA nemusí mít nutně ve všech případech stejnou nukleotidovou sekvenci, ačkoliv je v nich obsažena informace o stejném funkčním produktu. Proto se rozeznávají různé varianty téhož genu. Alely, které se navzájem liší ve stejném místě jedním nebo více nukleotidy, se označují jako *homoalely* (homoalleles). Alely, které se navzájem liší jedním nebo

více nukleotidy ve více místech, se označují jako *heteroalely* (heteroalleles) (Rosypal, 1997, s. 122).

Každý gen může existovat ve formě nejméně dvou rozdílných alel, a to: (1) Ve formě alely plně funkční (aktivní), jejíž primární strukturou je kódován funkční protein (u strukturních genů), funkční RNA (u genů přepisovaných do tRNA, rRNA) nebo se na tuto primární strukturu vážou regulační proteiny. (2) Ve formě alely zcela nefunkční (neaktivní), jejíž primární struktura je do té míry změněna, že kóduje nefunkční protein (u strukturních genů), nefunkční RNA (u genů přepisovaných do tRNA, rRNA) nebo ztratila schopnost vázat regulační protein.

Mezi těmito krajními případy existuje škála rozsáhlých řad různě funkčních, různě aktivních alel téhož genu. Avšak u konkrétního diploidního jedince se mohou vyskytovat pouze dvě z nich (Rosypal, 2003, s. 610). I když genotyp určitého jedince z hlediska sledovaného genu zapisujeme vždy dvojicí alel, nemusí to v některých případech znamenat, že tento gen může být vyjádřen jen dvěma způsoby, dvěma alelami. U některých genů existuje tzv. mnohotný alelismus – gen může být u různých jedinců v populaci vyjádřen celým souborem různých alel. Mnohotný alelismus byl popsán například u genu krevní skupiny systému ABO u člověka (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 146). Pojem gen je proto třeba chápat jako obecné označení, zatímco pojem alela je konkrétním označením funkčního stavu, v jakém se daný gen nachází (alela zajišťující určitý konkrétní fenotypový projev daného znaku) (Rosypal, 2003, s. 610).

Kódují-li v chromozomovém páru diploidního organismu obě párové alely nefunkční polypeptidový řetězec, říkáme, že jsou recesivní. Jestliže jedna párová alela kóduje funkční polypeptidový řetězec, může funkčně nahradit alelu s nefunkčním polypeptidovým řetězcem. Taková alela je dominantní, většinou se kryje s alelou standardní, tj. s alelou převládající v přírodní populaci. Dominance však může být různého stupně, což závisí na tom, jaká je nukleotidová sekvence alel (Rosypal, 1997, s. 123). U jednoduchých biochemických vlastností se mezi různě funkčními alelami téhož genu často uplatňuje vztah kodominance. Při něm žádná z rozdílných alel svým fenotypovým projevem ani nepřevládá, ani není potlačována, a ve fenotypu heterozygota se objevují projevy těchto rozdílných alel společně vedle sebe (Rosypal, 2003, s. 612). Rozdíly v nukleotidových sekvencích u alel stejného genu se v různém stupni promítají do biologické funkce proteinu kódovaného tímto genem.

Není totiž jedno, ve kterém místě genu se alely navzájem liší a jakého rozsahu tyto odlišnosti jsou. Některé změny v nukleotidových sekvencích alel způsobují, že jimi kódovaný protein je biologicky nefunkční, neaktivní. Na druhé straně existují alely stejného genu, u nichž změny v nukleotidových sekvencích neovlivnily buď vůbec, nebo alespoň ne výrazně funkci polypeptidu, který kódují (Rosypal, 1997, s. 123).

2.4 DNA polymerázy

Replikace DNA se účastní několik enzymů, z nichž nejdůležitější jsou DNA-polymerázy (DNA polymerase). Tyto enzymy katalyzují vznik nových vláken DNA (Kočárek, 2004, s. 130). Replikace je katalyzována čtyřmi DNA-polymerázami. Jsou to:

- DNA-polymeráza α , která katalyzuje syntézu Okazakiho fragmentů (Okazaki fragment) při replikaci jaderné DNA (Rosypal, 1997, s. 303). Tyto fragmenty jsou mezi produkty při replikaci DNA (Kočárek, 2004, s. 132).
- DNA-polymeráza β , která se uplatňuje v syntéze krátkých řetězců při reparaci DNA.
- DNA-polymeráza γ , která katalyzuje syntézu mitochondriové DNA.
- DNA-polymeráza δ , která katalyzuje syntézu vedoucího řetězce a dokončuje syntézu opoždujícího se řetězce (Rosypal, 1997, s. 303).

Syntéza DNA probíhá jen v jednom směru. DNA-polymerázy připojují nový nukleotid vždy jen ke 3'-OH skupině deoxyribózy, nikdy však k OH-skupině na 5'-konci. Proto syntéza nového řetězce probíhá pouze ve směru 5' \longrightarrow 3' a nikoli opačně. Vzhledem k tomu, že jsou vlákna DNA antiparalelní, je průběh replikace na každém z nich poněkud odlišný. Na vlákně mateřské DNA orientovaném ve směru 3' \longrightarrow 5' probíhá syntéza komplementárního polynukleotidového řetězce kontinuálně, neboť nukleotidy nového vlákna se zařazují ve směru 5' \longrightarrow 3'. Na opačném mateřském vlákně je však syntéza daleko pomalejší, neboť komplementární řetězec se vytváří diskontinuálně po drobných, zpočátku oddělených úsecích zvaných Okazakiho fragmenty (Kočárek, 2004, s. 131). Vlákno s kontinuální syntézou se označuje jako vedoucí řetězec (leading strand), opačné vlákno s diskontinuální syntézou pak jako opoždující se řetězec (lagging strand) (Hatina, Sykes, 1999, s. 92). Jednotlivé fragmenty jsou postupně spojovány působením enzymu zvaného DNA-ligáza (Ko-

čárek, 2004, s. 131). Je to enzym katalyzující spojování polydeoxyribonukleotidů, tj. vytvoření fosfodiesterové vazby mezi 5'-koncem a 3'-koncem DNA řetězců nebo jejich fragmentů. Ligáza se uplatňuje při replikaci DNA během spojování Okazakiho fragmentů do souvislého polydeoxyribonukleotidového řetězce (Rosypal, 2003, s. 93). Proto replikace DNA probíhá semidiskontinuálně (na mateřském řetězci 3' → 5' kontinuálně, na opačném řetězci diskontinuálně) (Kočárek, 2004, s. 132).

2.5 Transkripce

Transkripce (transcription) znamená přepisování genetické informace z DNA do RNA. Opačný pochod, tj. přepisování genetické informace z RNA do DNA, se označuje jako zpětná transkripce (reverse transcription). Transkripcí se genetická informace převádí z formy zápisu v nukleotidové sekvenci určitého typu do formy zápisu v nukleotidové sekvenci jiného typu, tj. z DNA-sekvence do RNA-sekvence. Obě sekvence jsou navzájem komplementární. Transkripcí vzniklá sekvence se označuje jako transkript (transcript) (Rosypal, 1997, s. 101). Transkripcí jaderných genů se tvoří tyto primární transkripty:

- Heterogenní jaderná RNA (hnRNA) – je to prekurzorová mRNA (pre-mRNA), která vzniká v jádře transkripcí transkripčních jednotek obsahujících strukturní geny.
- Prekurzorová ribozomová RNA (pre-rRNA), která vzniká transkripcí transkripčních jednotek, které obsahují geny pro rRNA. Posttranskripční úpravou se štěpí na funkční druhy rRNA.
- Prekurzorová transferová RNA (pre-tRNA) vznikající transkripcí transkripčních jednotek obsahujících geny pro tRNA. Posttranskripčně se upravuje na jednotlivé tRNA.
- 5S-rRNA je rRNA, která se tvoří transkripcí genů pro 5S-rRNA.
- Malé RNA, tak se označují nízkomolekulární stabilní druhy RNA, jejichž délka je 80–300 nukleotidů a vyskytují se v eukaryotických buňkách. Malé RNA mají důležitý význam v životních procesech buňky (Rosypal, 2003, s. 100).

Rozlišuje se RNA-transkript, který je komplementární matricové DNA-sekvenci, a DNA-transkript, který je komplementární RNA-sekvenci při zpětné transkripci. RNA-transkript může po svém vzniku podléhat různým chemickým modifikacím. Chemické

modifikace primárních RNA-transkriptů se označují jako posttranskripční úpravy (post-transcription processing). Jedna z nejdůležitějších úprav primárního RNA-transkriptu je jeho štěpení, kterým vznikají molekuly rRNA, tRNA a u eukaryot také mRNA (Rosypal, 1997, s. 101). Proces proteosyntézy začíná transkripcí. V této fázi se sekvence nukleotidů v daném genu přepisuje (transkribuje) do sekvence tzv. mediátorové RNA neboli mRNA. Molekula mRNA je lineární. Její syntéza probíhá v buněčném jádře a katalyzuje ji enzym zvaný RNA-polymeráza. Matricí pro tvorbu mRNA je jeden z řetězců DNA. V místě, kde začíná daný gen, nasedá RNA-polymeráza na templátové vlákno DNA a k jednotlivým jeho deoxyribonukleotidům přiřazuje komplementární ribonukleotidy. Z nich se vytváří nový řetězec mRNA. Jako zdroje ribonukleotidů slouží molekuly nukleotidtrifosfátů (NTP). Podobně jako při syntéze DNA se řetězec RNA prodlužuje ve směru 5' → 3'. Když částice RNA-polymerázy dospěje až na konec přepisovaného genu, vlákno mRNA se odpojí (Kočárek, 2004, s. 140).

Genová transkripce je procesem dvojnásobně selektivním – jednak se týká jen té minoritní části genomu, kterou představují geny, a jednak je podstatný rozdíl mezi spektrem přepisovaných genů v jednotlivých buněčných typech. U eukaryot představuje každý gen oddělenou transkripční jednotku. Enzymy katalyzující transkripci – RNA-polymerázy – jsou velké makromolekulární komplexy složené v průměru z deseti různých polypeptidů (Hatina, Sykes, 1999, s. 95). Existují tři druhy těchto RNA-polymeráz:

- RNA-polymeráza I, která katalyzuje syntézu pre-rRNA; vyskytuje se jen v jádérku.
- RNA-polymeráza II, která katalyzuje syntézu hnRNA a některých malých rRNA; vyskytuje se v nukleoplasmě.
- RNA-polymeráza III, která katalyzuje syntézu pre-tRNA, 5S-rRNA a některých malých RNA; vyskytuje se v nukleoplasmě (Rosypal, 2003, s. 101).

RNA-polymerázy nejsou ovšem samy schopny rozeznat začátek genu a zahájit transkripci. Pro přesnou iniciaci transkripce jsou nutné dva prvky: předně přesná specifická sekvence nukleotidů (tzv. bazální promotor) těsně předcházející vlastnímu genu a definující tak vlastní počátek transkripce a dále sada pomocných proteinů, tzv. obecných transkripčních faktorů, které umožní RNA-polymeráze rozeznat promotor (Hatina, Sykes, 1999, s. 96). Obecné transkripční faktory se vyskytují ve všech nebo většině eukaryotic-

kých buněk a buněčných typech mnohobuněčného organismu. Speciální transkripční faktory se vyskytují v buňkách určitých tkání a v určité době. Uplatňují se při diferenciaci buněk. Transkripce genů daného buněčného typu je výsledkem kombinace účinků obecných a speciálních transkripčních faktorů (Rosypal, 1997, s. 315). Bazální promotor je dostatečný pro přivedení RNA-polymerázy na příslušný gen, nezajišťuje ovšem onu nezbytnou selektivitu transkripce. K tomu je nutná další, regulační informace, kterou představují krátké sekvence DNA obvykle dále před bazálním promotorem, sloužící jako vazebné sekvence specializovaných regulačních proteinů – transkripčních faktorů (Hatina, Sykes, 1999, s. 97). Konec transkripce je signalizován sekvencí označovanou jako polyadenylační signál. Je to signál k tomu, že 10 až 30 nukleotidů za ním se hnRNA bude štěpit (Rosypal, 2003, s. 102).

2.6 Translace

Druhým stupněm exprese strukturních genů je translace (translation) mRNA. Výchozími látkami pro translaci je 20 standardních aminokyselin + selenocystein. Na ribozomech se z nich podle informace obsažené v mRNA tvoří za účasti tRNA polypeptidové řetězce. K translaci musí být však aminokyseliny chemicky aktivovány. To se děje procesem, který se označuje jako aktivace aminokyselin (Rosypal, 2003, s. 102). V cytoplasmě se k molekule mRNA připojují ribozomy. Tyto útvary jsou tvořeny molekulami ribozomové RNA (rRNA) a specifickými proteiny (Kočárek, 2004, s. 140). Cytoplasmatické ribozomy buňky se skládají ze dvou podjednotek, které obsahují čtyři molekuly rRNA a 70 proteinů (Rosypal, 1997, s. 376). Každý ribozom nasedá na 5'-konec řetězce mRNA, jenž odpovídá počátku příslušného genu v DNA. Od tohoto místa pak probíhá syntéza proteinové molekuly podle matrice mRNA. Tento děj se nazývá translace. Znamená to, že genetická informace přepsaná z DNA do mRNA udává pořadí aminokyselin v proteinovém řetězci. Jednotlivé aminokyseliny jsou do ribozomu transportovány prostřednictvím transferové RNA neboli tRNA (Kočárek, 2004, s. 140). Translace je tedy překládání genetické informace z RNA do primární struktury proteinu. Nukleotidová sekvence, která obsahuje informaci o primární struktuře proteinu, se nazývá kódující nukleotidová sekvence (nukleotide coding sequence) (Rosypal, 1997, s. 101).

Translací končí přenos genetické informace ze strukturního genu tím, že se vytvoří primární struktura proteinu (polypeptidového řetězce). Veškeré další procesy, které se budou odehrávat na polypeptidovém řetězci, budou záviset na jeho primární struktuře, která v závislosti na okolních chemických a fyzikálních podmínkách rozhoduje o tom: (1) Jaké budou jeho konečné chemické vlastnosti. (2) Jaká bude jeho sekundární a terciární struktura. (3) Do jaké kvartérní struktury a nadmolekulárních sestav (tedy i buněčných organel) bude vcházet (Rosypal, 2003, s. 108).

3 POLYMORFISMUS DNA

Bylo zjištěno, že přibližně jeden pár z každých 100–200 nukleotidových párů v DNA je polymorfní. Polymorfismus je mutace, v mnoha případech neutrální, daná změnou sekvence nukleotidů, která se v populaci nachází v minimální frekvenci 1%. (Kopecká, 2001, s. 20).

Jiná definice praví, že za polymorfismus (polymorfism) označujeme v populaci současnou existenci dvou nebo více mutantních alel genu umístěného v příslušném lokusu na chromozomu. Lokusy, v nichž se takový gen nachází, se označují jako polymorfní (Rosypal, 2003, s. 723). Je-li určitý druh polymorfní se dvěma formami v daném okamžiku, potom mohou být buď obě formy v rovnováze, v tom případě říkáme, že je polymorfismus vyvážený (balancovaný), anebo se jedna z forem nachází v procesu vytlačení a náhrady druhé a polymorfismus se označuje jako přechodný. Skryté (kryptické) polymorfismy zahrnují chromozomální přestavby, krevní skupiny, rozdíly v elektroforetické mobilitě proteinů a konečně rozdíly v nukleotidové sekvenci DNA (Hatina, Sykes, 1999, s. 84). Polymorfismy jsou pro veškerý výzkum v lidské genetice klíčovým prvkem. Schopnost rozlišit jednotlivé zděděné formy genu nebo různých úseků genomu poskytuje nástroje nezbytné pro široké pole aplikací (Nussbaum, 2004). Význam DNA-polymorfismu spočívá ve vytvoření systému genetických markerů, které nám umožňují mapovat relativní pozice genů podél chromozomu (Hatina, Sykes, 1999, s. 115).

Chromozomální polymorfismus, definujeme-li tento pojem jako diskrétní rozdíly ve struktuře chromozomů, je u člověka dosti omezený. Krevní skupiny představují speciální případ. Aby bylo možno krevní skupinu detekovat sérologickými křížovými reakcemi, musí existovat antigenní rozdíl. Krevní skupiny jsou tudíž polymorfní přímo definičně, proto-

že kdyby neexistovala žádná variabilita a tudíž žádné antigenní rozdíly, neexistovala by ani kategorie krevních skupin jako taková (Hatina, Sykes, 1999, s. 87). Krevní skupiny nám neposkytují žádnou informaci, pokud jde o celkový rozsah variability. Elektroforetická mobilita proteinů se v tomto směru liší, poněvadž nám umožňuje odhadnout podíl lokusů, které jsou polymorfní. Obecnou příčinou jsou nukleotidové substituce, které mění kódovanou aminokyselinu. Dochází-li současně ke změně náboje, můžeme takovou změnu detekovat elektroforeticky. 23% lidských lokusů testovaných tímto způsobem se ukázalo jako polymorfní (Hatina, Sykes, 1999, s. 89). Polymorfismus můžeme chápat jako formu přetržitě proměnlivosti organismů, které se nalézají ve stejné fázi individuálního vývoje v rámci určité populace. A pokud zdůrazníme, že tato proměnlivost je geneticky determinována, na rozdíl od proměnlivosti, která vzniká na stejném genetickém základě, ale vlivem podmínek vnějšího prostředí získáme podklady k základnímu rozdělení polymorfismů na geneticky determinované a prostředím modulované (Brdička, 1981). Polymorfismy krevních skupin, enzymových systémů a ostatních bílkovin spadají jednoznačně do první skupiny. Do druhé bychom zařadili rozdíly v chování nebo ve fyziologických hodnotách.

Při analýze genomu lze s výhodou využít rozdílů v restričních mapách jedinců téhož druhu. Tyto rozdíly, podmíněné různou délkou a počtem restričních fragmentů vytvořených štěpením genomové DNA, se označují jako polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism). Jejich podstatou jsou buď mutace, které vedou k vytvoření nebo ztrátě rozpoznávacích míst pro restriční enzymy, nebo vznikají jako důsledek přítomnosti různého počtu repetitivních sekvencí ve specifických oblastech chromozomů. Rozdíly ve velikosti fragmentů u různých jedinců lze využít jako signální znaky při mapování (Rosypal, 1997, s. 776). Soubor restričních fragmentů genomové DNA je označován jako otisk DNA (fingerprint). Jelikož je otisk DNA každého genomu zcela jedinečný, lze jej použít ke genetické identifikaci jedinců a jejich vzájemnému odlišení, podobně jako je např. využíváno otisků prstů k identifikaci osob (Rosypal, 1997, s. 776).

Podstatou některých RFLP jsou inserce nebo delece různého množství DNA, nikoliv vznik nebo zánik rozpoznávacího místa. Například jedna zvláštní třída polymorfismů je způsobena tandemovou insercí několika kopií sekvence DNA o délce 10 až 100 párů bází, známé jako *minisatellity* (minisatellite), do DNA mezi dvěma restričními místy. Tato třída

RFLP známá jako *variabilní počet tandemových repetitiv* (VNTR; Variable Number of Tandem Repeats) je charakterizována větším počtem alel. Nejinformativnější markery mívají desítky či více alel, takže není pravděpodobné, že dvě nepříbuzné osoby budou mít shodné alely. Pouze identická dvojčata mají totožný vzor. Pro účely analýzy genetické vazby byly VNTR markery převážně nahrazeny mikrosatelitovými markery, ale stále se široce užívají pro osobní identifikaci, jako například pro porovnání DNA podezřelého a pachatele, identifikace ostatků obětí zločinu či vojenského personálu a při testech paternity (Nussbaum, 2004, s. 97).

Ještě častější a polymorfnější než minisatelitové lokusy VNTR jsou lokusy mikrosatelitové (Nussbaum, 2004, s. 98). Mikrosatelity (microsatellite) se ukázaly jako mimořádně cenné při konstrukci map eukaryotických chromozomů o vysoké hustotě. U lidí jsou zvláště užitečné mikrosatelitní sekvence složené z polymorfních tandemových repetitiv dinukleotidové sekvence AC/TG (AC v jednom řetězci, TG v komplementárním řetězci). Skupina francouzských a kanadských vědců publikovala v roce 1996 souhrnnou mapu 5264 AC/TG mikrosatelitů v lidském genomu (Snustad, Simmons, 2009, s. 468). Mikrosatelity jsou úseky DNA tvořené opakováním jednotky o délce dvou, tří nebo čtyř nukleotidů (Nussbaum, 2004, s. 98). Počet repetitiv je extrémně variabilní a pohybuje se v rozpětí od několika až po několik desítek opakování (Sykes, 1999, s. 135). V lidském genomu již byly popsány desetitisíce mikrosatelitových polymorfních lokusů, takže již jen minimum oblastí genomu nemůže být mapováno metodami genetické vazby s použitím těchto markerů (Nussbaum, 2004, s. 98).

3.1 Mutace a jejich význam

Replikace DNA je neobyčejně přesný proces, ale není perfektní. S nízkou, avšak měřitelnou frekvencí jsou nukleotidy začleňovány do rostoucích řetězců DNA nesprávně. Takové záměny mohou vést k záměně nebo porušení informace kódované v genech. Úseky nukleotidů uvnitř celkové struktury molekuly DNA mohou být odstraněny (deletovány), zdvojeny (duplikovány), nebo mohou být přeuspořádány. Tyto typy změn nazýváme mutacemi. Geny, které jsou změněny mutacemi, se nazývají *mutantní geny*. Mutantní geny často způsobují u organismů odlišné znaky. Termínem mutace se označuje jak změna genetického materiálu, tak i proces, během kterého tato změna vzniká (Snustad, Simmons, 2009, s.

8). Mutace se může vyskytnout v jakékoliv buňce v jakémkoliv stadiu vývoje mnohobuněčného organismu. Bezprostřední účinky mutace a její schopnost způsobovat změny fenotypu jsou určeny její dominancí, typem buněk, ve kterých vznikne, a době, ve které se uskuteční v průběhu životního cyklu organismu. *Gametické mutace* jsou takové mutace, které se vyskytují pouze u buněk zárodečné linie, zatímco mutace somatické se vyskytují u buněk somatických. Pokud tedy mutace vznikne v somatické buňce, bude výsledný mutantní genotyp přítomný pouze u následníků této buňky, mutace se nebude přenášet gametami do potomstva. Gametické mutace mohou vznikat v jakémkoliv stadiu reprodukčního cyklu organismu (Snustad, Simmons, 2009, s. 348).

Ke vzniku mutací dochází s velmi nízkou pravděpodobností samovolně, např. v důsledku náhodných chyb při replikaci DNA, takovýto proces označujeme za *spontánní mutace* (spontaneous mutation) (Rosypal, 2003, s. 628). Mohou být skutečně spontánní, tj. vznikat v důsledku malého množství metabolických poruch v organismu, nebo mohou být vyvolány neznámou látkou přítomnou ve vnějším prostředí (Snustad, Simmons, 2009, s. 349). Četnost spontánních mutací v přírodě je nízká, jsou to jevy poměrně vzácné (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 166). Pravděpodobnost vzniku mutací se však prudce zvyšuje působením některých fyzikálních nebo chemických činitelů, které vyvolávají změny v primární struktuře při vyšší četnosti. Takové mutace se pak označují jako *indukované* (induced mutation). Fyzikální a chemické faktory, které je vyvolávají, se nazývají *mutageny* (mutagens). Velmi účinným mutagenem je třeba záření (ionizující – paprsky X, záření gama a kosmické záření a neionizující – ultrafialové světlo), jehož následkem dochází ke vzniku neobvyklých chemických vazeb uvnitř molekuly DNA, k odbourávání purinů a pyrimidinů z nukleotidů a přerušení řetězovité stavby DNA. Významnými chemickými mutageny (chemical mutagen) jsou např. alkylační látky nebo silná oxidační činidla (Rosypal, 2003, s. 628). Většina mutací má na organismy škodlivý efekt, některé vzniklé mutace se zase vůbec nemusí ve fenotypu projevit (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 166). Účinky mutací na genotyp sahají od nepatrných změn detekovatelných pouze speciálními genetickými nebo biochemickými metodami přes výrazné změny v morfologii až po letalitu. Geny obsahující mutace bez fenotypového projevu nebo s minimálními účinky, které mohou být detekovány pouze pomocí speciálních technik, se nazývají *izoalely*. Jiné mutace vytvářejí *nulové alely*, což znamená, že produkty mutovaných genů nejsou funkční, popřípadě se vůbec netvoří. Pokud se mutace tohoto typu vyskytnou v genech potřebných pro růst a vý-

voj organismu, pak jedinci homozygotní pro tuto mutaci nepřežijí. Takové mutace se pak označují jako *recesivně letální*. Díky tomu, že genetický kód je degenerovaný, mnoho mutací na fenotyp organismu nemá vliv. Takové mutace se označují jako *mutace neutrální* (Snustad, Simmons, 2009, s. 353). Nepatrná část mutací je však v daných podmínkách pro své nositele dokonce výhodná. V evoluci takovéto mutace mohly díky selekční výhodě umožnit organismům přežít a dát vznik novým druhům. Mutace jsou tedy stálým vnitřním zdrojem genetické proměnlivosti organismů, která tvoří předpoklad pro působení přírodního výběru v průběhu evoluce (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 166). Ze všech mutací – od izoalel až k letálním mutacím – jsou z hlediska genetických studií nejužitečnější podmíněně letální mutace. Tyto mutace jsou letální v tzv. restriktivním prostředí, ale jsou slučitelné se životem v tzv. permisivním prostředí. Podmíněně letální mutace byly a jsou využívány k analýzám širokého spektra biologických procesů od embryonálního vývoje až po fotosyntézu (Snustad, Simmons, 2009, s. 357).

Organismy jsou do jisté míry schopny mutační poškození DNA opravit. Jejich buňky jsou k tomu účelu vybaveny enzymovými komplexy odpovídajícími za biochemické reakce, jichž je k takovým opravám třeba (Rosypal, 2003, s. 630). Opravy, vedoucí k původnímu pořadí nukleotidů v molekulách DNA, se označují jako *reparace*. Existence reparačních enzymatických systémů podstatně snižuje pravděpodobnost fenotypového vyjádření mutací (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 171). Reparační buněčné enzymatické komplexy mají omezenou kapacitu. Mohou proto podmiňovat opravy DNA poškozené mutacemi jen do určité míry. Naroste-li četnost současně vznikajících mutací v buňce nad tuto únosnou míru, buňka ztrácí schopnost je dále opravovat. V zásadě existují čtyři obecné typy reparačních mechanismů. Jsou to: (1) Fotoreaktivace (photoreactivation) – ta se uplatňuje pouze a výhradně při opravách poškození, které v DNA způsobuje ultrafialové záření. Specifický enzym, jehož funkce je aktivována denním světlem, podmiňuje návrat k původnímu stavu molekuly DNA (Rosypal, 2003, s. 630). (2) Excizní oprava (excision repair) – spočívá ve vystřížení poškozeného úseku molekuly DNA. Je založena na funkci komplexu enzymů, které jsou schopny rozeznat poškození ve struktuře DNA, „vystříhnout“ postiženou oblast její molekuly a nahradit ji nově vytvořenou oblastí s původním nukleotidovým uspořádáním. Při excizní reparaci se uplatňují především enzymy typu endo-a exonukleáz, polymeráz a ligáz (Rosypal, 2003, s. 630). Rozeznáváme dva hlavní typy excizní opravy: básová excizní oprava odstraňuje abnormální nebo chemicky modifikova-

né báze z DNA, zatímco nukleotidová excizní oprava odstraňuje rozsáhlejší defekty v DNA (Snustad, Simmons, 2009, s. 369). (3) Rekombinační oprava - podstatou je rekombinační výměna poškozených oblastí mezi dvěma molekulami DNA postiženými mutací tak, že v důsledku vzniká jedna molekula DNA zcela bez poškozených oblastí (tedy plně funkční) a druhá, nefunkční molekula DNA, s kumulovanými poškozenými oblastmi (Rosypal, 2003, s. 630). (4) Oprava chybného párování bází řízená metylací (mismatch repair) – opravuje chybně zařazené nukleotidy, které zůstaly v DNA po replikaci. Opravný systém rozpozná chybné párování bází na základě identifikace matricového řetězce, který obsahuje původní nukleotidovou sekvenci, a nově syntetizovaného řetězce, který obsahuje chybně vloženou bázi (Snustad, Simmons, 2009, s. 371).

3.1.1 Klasifikace mutací

3.1.1.1 *Genové mutace:*

Jako genové mutace se označují změny v genetické informaci, které proběhly v jednom genu a nenarušily celistvost stavby chromozomu (Rosypal, 2003, s. 628). Tyto změny mají minimální rozsah, jde často o změny jednotlivých bází – proto některým z nich říkáme také bodové mutace (site mutation) (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 167). Lze je postihnout jen podle změny příslušné fenotypové vlastnosti. Význam genových mutací je však značný, mj. i tím, že mohou postihnout i geny s regulační funkcí. Právě mutace genů, regulujících dělení a diferenciaci buněk, bývají jednou z nejčastějších příčin nádorových onemocnění (Rosypal, 2003, s. 628).

3.1.1.2 *Chromozomové mutace:*

Podstatně větší rozsah současně vznikajících fenotypových změn je podmiňován chromozomovými mutacemi. To jsou takové mutační změny, které vedou ke zlomům a k přestavbám struktury chromozomů. Obvykle při nich dochází ke ztrátám nebo k přemístění větších „bloků“ genetických informací, odpovídajících větším skupinám genů. Protože jsou spojeny se změnami ve vnější stavbě chromozomů, lze je pozorovat mikroskopem (Rosypal, 2003, s. 629). Na rozdíl od genových mutací jsou chromozomové mutace často překážkou normálního průběhu buněčného dělení. Chromozomové mutace vznikají poměrně často. Například u člověka se, dle odhadu, vyskytuje asi 5% zygot, vzniklých

oplozením gamet nesoucích chromozomové mutace. Tyto defektní zygoty však většinou odumírají hned na začátku embryonálního vývoje (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 170).

3.1.1.3. Genomové mutace:

Jako genomové mutace se označují mutační změny v počtu chromozomů, nazývané jako numerické aberace chromozomů (numerical aberrations of chromosomes) (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 170). Ztráta nebo naopak nadbytečná přítomnost některých jednotlivých chromozomů v chromozomovém souboru buněčného jádra se nazývá aneuploidie. Nejčastější takovou změnou je ztráta jednoho chromozomu z některého z chromozomových párů – monozomie, nebo naopak přítomnost tří homologických chromozomů namísto normálního párového uspořádání – trizomie. U člověka se poměrně velmi často objevuje trizomie chromozomu 21, jejímž negativním fenotypovým důsledkem je tzv. Downova choroba (Rosypal, 2003, s. 629). Životnost organismů s různými typy genomových mutací je zvláště u živočichů silně snížena, protože je u nich porušena genová rovnováha. Například zygoty s euploidními mutacemi u člověka zanikají záhy po svém vzniku v rané embryogenezi. Aneuploidní mutace u člověka vedou k vážným vývojovým poruchám (Chalupová-Karlovská, 2004, s. 171). Rozsáhlejší ztráty většího počtu chromozomů obvykle nejsou slučitelné se životem organismu (Rosypal, 2003, s. 629).

3.1.1.4. Typy mutací:

Mutace posunová je způsobena delecemi nebo insercemi, které mění („posunují“) čtenou sekvenci nukleotidů v genu. Delece je ztráta jednoho nebo více nukleotidů z nukleotidové sekvence a inserce je naopak vložení jednoho nebo více nukleotidů do nukleotidové sekvence (Rosypal, 2003, s. 630). Jako bodové mutace (site mutation) označujeme mutace spočívající v substituci jednoho nukleotidu (jednořetězcové nukleové kyseliny), nebo jednoho nukleotidového páru (u dvouřetězcových nukleových kyselin). Mutantní alely, které se ve fenotypu neprojevují, jsou výsledkem tzv. tiché mutace (silent mutation), tj. mutace spočívající ve změně kodonu, která se neprojevuje ve funkci polyptidového řetězce. Mutace, kterou se inaktivuje funkce genového produktu, případně se zastavuje nebo snižuje jeho syntéza, je mutace škodlivá (deleterious mutation). Většina mutací je tohoto typu. Co do směru účinku mutací je nutno rozeznávat jednak původní mutaci (forward mutation), tj. mutaci, kterou se standardní alela mění v kurantní a jednak zpětnou

mutaci (back mutation), tj. mutaci, kterou se mutantní alela mění částečně nebo úplně ve standardní (Rosypal, 1997, s. 569).

Se všemi typy mutací se můžeme setkat také u člověka. Zde navíc existuje další typ mutací, který je úzce spojen s lidskými chorobami. Opakující se sekvence o velikosti jednoho až šesti párů bází jsou známy jako jednoduché tandemové repetice. Takové repetice jsou rozptýleny po celém lidském genomu. Repetice o velikosti tří nukleotidových párů, trinukleotidové repetice, mohou zvyšovat počet opakování (tzn. dochází k jejich expanzi) a způsobovat závažné dědičné choroby u člověka. Celkově bylo nalezeno několik trinukleotidů, u kterých může dojít ke zvýšení počtu kopií. Závažnost choroby koreluje s počtem opakování trinukleotidových repeticí – čím větší je počet kopií, tím závažnější jsou symptomy nemoci. Expandované trinukleotidy jsou navíc nestabilní v somatických buňkách i mezi generacemi. Tato nestabilita způsobuje jev označovaný jako anticipace – jak se počet opakování trinukleotidů zvyšuje, nemoc se vyvíjí v následujících generacích ve stále mladším věku a má závažnější následky (Snustad, Simmons, 2009, s. 367).

V lidském genomu lze pozorovat velkou genetickou variabilitu. Nejčastějšími změnami v lidském genomu jsou substituce jednotlivých nukleotidových párů, například substituce A:T za G:C nebo G:C za A:T. Substituce jednoho páru nukleotidů tohoto typu jsou příčinou velkého počtu jednonukleotidových polymorfismů (SNP; Single-Nucleotide Polymorphism) v lidských genomech. Většina těchto SNP se nenachází v kódujících oblastech genů a není příčinou mutantních fenotypů. Při srovnání nukleotidových sekvencí stejných chromozomů dvou jedinců nalezneme v průměru jeden SNP na 1200 párů nukleotidů. SNP mohou být nalezeny v lidských genomech pomocí hybridizace s využitím technologie „genových čipů“. Většina SNP známých u lidských populací vznikla u jednoho jedince jedinou mutací, která se následně rozšířila v celé populaci. SNP na určitém chromozomu nebo na segmentu určitého chromozomu, které mají tendenci dědit se společně, tvoří genetickou jednotku zvanou haplotyp. Vzhledem ke svému četnostem v lidském genomu se SNP osvědčily jako cenné genetické markery. Studium haplotypů tvořených SNP poskytuje důležité informace o vztazích mezi různými etnickými skupinami a o lidské evoluci. Studium SNP a haplotypů také pomáhá identifikovat geny hrající úlohu ve vnímavosti k nemocem, jako jsou rakovina prsu, glaukom a revmatoidní artritida (Snustad, Simmons, 2009, s. 479).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Studované metody

Praktická část je zaměřená na některé vybrané metody, kterými je možno zkoumat biologický materiál. V dnešní době je požíváno již takové množství metod, že jsem zvolila jen ty nejpoužívanější, případně jejich modifikace. Vybrala jsem si tyto metody zkoumání DNA: Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP), sekvenování DNA, polymerázová řetězová reakce (PCR), real-time PCR, Alu-PCR, PCR *in situ* (PRINS), stanovení polymorfismu délky restričních fragmentů u produktů PCR (PCR-RFLP), mnohonásobná PCR, nested PCR, polymorfismus délky jednoduchých repetitivních sekvencí (SSLP-PCR), DNA microarrays. Cílem praktické části je tedy stručný popis vybraných metod, zhodnocení jejich kladů a záporů a především četnost využívání jednotlivých metod ve vědě a výzkumu.

4.2 Sběr a vyhodnocení informací

Druhým krokem praktické části byla práce s údaji získanými z Web of Science (WOS). Web of Science je internetová databáze určená vědcům i školám. Její obsah je multidisciplinární. Nabízí články, sborníky z konferencí, seminářů a symposií, review i porovnání výsledků z příbuzných oborů. Je složena ze tří hlavních oblastí. Jedna část je určena přírodním a technickým vědám, např. chemie, fyzika, biologie (Science Citation Index Expanded), další část je zaměřena na společenské vědy, jako je psychologie a lingvistika (Social Science Citation Index) a třetí část je orientována na humanitní a společenské vědy (Arts & Humanities Citation Index). Web of Science umožňuje sledovat vývoj vědy v průběhu času, nabízí totiž i články starší, některé dokonce z roku 1945. Jedná se o kvalitní databázi článků i s informacemi o jejich autorech. Každý časopis, který je zde citován, musí splnit velmi přísné normy. Vždy jednou týdně jsou prováděny aktualizace článků. Na Web of Science je možno vyhledávat články podle jména autora, tématu nebo klíčového slova. Je zde uveden i počet citací daného článku v dalších časopisech.

Web of Science jsem využila při zpracování praktické části své bakalářské práce v několika směrech. Každou metodu, kterou jsem zde popsala, jsem poté vyhledala na této stránce a zjišťovala jsem různé údaje, které lze z této stránky vyčíst. Zaměřila jsem se na počet článků (article) s využitím dané metody, které byly uveřejněny v časopisech, dále počet příspěvků, které byly o tomto tématu předneseny na různých konferencích a sympoziích (proceedings paper a meeting abstract) a review. Hledání jsem omezila na roky 2000 až 2010, protože všechny zmiňované metody jsou moderní a starší články by již nebyly relevantní. Navíc některé z těchto metod se začaly více používat až po roce 2000. Studovala jsem také, kolik článků a příspěvků o dané metodě pocházelo z určitých zemí, především evropských, ale také např. z USA nebo z Asie. I když u naprosté většiny metod převládaly příspěvky z USA, evropské příspěvky, včetně českých, tvoří také nezanedbatelné množství.

U každé z těchto metod jsem také vytvořila seznam vědeckých oborů, ve kterých byla daná metoda v těchto letech použita. Jedná se o různé obory klinické medicíny, farmakologie, veřejné zdravotnictví, mikrobiologii, ale i o vědu a výzkum. U většiny metod jsem uvedla příklady užití ve forenzní genetice i v některém z uvedených vědeckých odvětví (většinou z geriatricke nebo veřejného zdravotnictví). Některé metody nemají širší využití ve forenzní genetice, jedna nebyla dokonce využita pro tyto účely vůbec. Poslední část u každé metody tvoří tabulka, ve které je uvedeno, jak často byla tato metoda v jednotlivých letech použita. Z uvedené tabulky je patrné, jestli je daná metoda na ústupu, nebo jestli se využívá více než před několika lety. Cílem této části mé práce bylo seznámit čtenáře s údaji, jak jednotlivé státy využívají různé metody, zda jsou některé starší metody již nahrazeny novějšími, a uvést příklady, jak mohou být jednotlivé metody použity ve zdravotnické praxi.

Forenzní genetika je obor poměrně mladý. Nicméně rozvoj genetiky a modernizace jejích metod umožňuje pokrok i ve forenzní genetice. Vědci i soudní znalci vycházejí ze znalostí lidského genomu. Charakterizace individuálního genomu (profilování DNA) je založena na analýze DNA, která zahrnuje DNA-fingerprinting neboli „genetickou daktyloskopii“ či „genetické otisky“, užití jednobokusových sond a mikrosatelitních, Y-chromozomálních, mitochondriálních a etnických polymorfismů. Je nesmírně cenný k identifikaci biologického otce při paternitních sporech, k potvrzení odlišné příslušnosti při kontrole přistěhovalců a k identifikaci pachatelů a obětí zločinů ze stop biologického

materiálu. Naše genomy obsahují velké množství vysoce repetitivní DNA, zvané „mikrosatelitní DNA“, jsou-li opakující se sekvence krátké (1–4 bp), a „minisatelitní DNA“, obsahují-li opakující se sekvence o délce 5–64 bp. Mikrosatelitní DNA je rozptýlena ve všech chromozomech a poskytuje užitečné markery pro geny odpovědné za chorobu. Minisatelitní DNA je zvláště cenná k charakterizaci individuálního genomu, ale v tomto ohledu se používají obě (Pritchard, Korf, 2007, s. 153).

ISI Web of KnowledgeSM

Web of Science | Additional Resources

Search | Cited Reference Search | Structure Search | Advanced Search | Search History | Marked List (0)

Web of Science® – with Conference Proceedings

Search for:

Example: oil spill* mediterranean

AND | Example: O'Brian C* OR OBrian C* | Need help finding papers by an author? Use Author Finder.

AND | Example: Cancer* OR Journal of Cancer Research and Clinical Oncology

Search | Clear | Searches must be in English

Current Limits: [Hide Limits and Settings] (To save these permanently, sign in or register.)

Timespan:

All Years (updated 2011-04-30)

From 1900-1914 to 2011 (default is all years)

Citation Databases:

- Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED) –1900-present
- Social Sciences Citation Index (SSCI) –1900-present
- Arts & Humanities Citation Index (A&HCI) –1977-present
- NEW! Conference Proceedings Citation Index- Science (CPCI-S) –1990-present
- NEW! Conference Proceedings Citation Index- Social Science & Humanities (CPCI-SSH) –1990-present

Chemical Databases:

- Current Chemical Reactions (CCR-EXPANDED)–1986-present (includes Institut National de la Propriete Industrielle structure data back to 1840)
- Index Chemicus (IC)–1993-present

View in | 简体中文 | English | 日本語

Support, Tools, Tips

Training & Support

- Download quick Recorded Training
- Access additional Training Resources
- More questions? Consult the Help files.

Featured Tips

- Visualize citation connections at a glance with Citation Mapping (view demo).
- Identify citation trends graphically with Citation Report (view demo).
- Make sure your funding efforts pay off. Search grant activity and funding acknowledgements.

Customize Your Experience

Sign In | Register

- Save and manage your references online with EndNote Web – freely available and fully integrated.
- Save and run searches
- Create alerts and RSS feeds
- Choose your start page
- Want to know more?

My ResearcherID

- What is ResearcherID?
- ResearcherID numbers are now searchable from within Web of Science!
- Sign in to ISI Web of Knowledge to get your ResearcherID.

Further Information

Obr. 3: Úvodní strana Web of science

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Metody amplifikace DNA

Mnoho z toho, co víme o struktuře genů, bylo získáno díky vývoji technologií rekombinantní DNA a jejich použití pro molekulární studium genů. Většina technik používaných k analýze genů a dalších sekvencí DNA vyžaduje jejich dostupnost v dostatečném množství a v čisté nebo téměř čisté formě. Vývoj technologií rekombinantní DNA a klonování genů vybavil molekulární genetiky metodami, kterými se dají geny izolovat, replikovat a studovat pomocí sekvenování nukleových kyselin, elektronové mikroskopie a dalších analytických metod. Přístupy založené na rekombinantní DNA začínají klonováním specifických genů. Při přístupu *in vivo* vyžaduje klonování genu jeho izolaci, vložení do malého samostatně se replikujícího genetického elementu, jako je virový chromozom, a jeho zmnožení (amplifikaci) během replikace virového chromozomu v příslušné hostitelské buňce (obvykle *E. coli*). Po naklonování může být gen podroben celé řadě manipulací, které umožňují zkoumání vztahu struktury a funkce genu. Obvykle je klonovaný gen sekvenován, tzn. je určena sekvence (pořadí) nukleotidových párů genu. Někdy může být funkce genu odvozena podle jeho podobnosti s jinými geny, jejichž funkce je již známa – komparativní mapování. Na základě znalosti nukleotidové sekvence a genetického kódu může být odvozena sekvence aminokyselin polypeptidu, který je kódován tímto genem. Databáze sekvencí nukleových kyselin a proteinů se staly důležitým zdrojem informací pro výzkum v molekulární genetice. Při přístupu *in vitro* jsou nejprve syntetizovány krátké řetězce DNA, které jsou komplementární k sekvencím na obou stranách zvoleného genu nebo sekvence DNA. Tyto krátké řetězce jsou následně použity k zahájení amplifikace *in vitro* pomocí speciální (teplotně stabilní) DNA-polymerázy. Tato metoda, nazývaná polymerázová řetězová reakce (PCR), je nesmírně výkonným nástrojem pro amplifikaci genů a stála u zrodu moderní genetiky. Amplifikované produkty se mohou následně analyzovat a sekvenovat. Amplifikace sekvencí DNA pomocí PCR často eliminuje potřebu klonovat sekvence replikací *in vivo*. Proto postupy amplifikace sekvencí DNA pomocí PCR běžně nahradily dřívější amplifikace *in vivo*. PCR však může být použita pouze tehdy, když je známa nukleotidová sekvence, primer, ohraničující analyzovaný gen nebo sekvenci DNA (Snustad, 2009, s. 424). Základem většiny prací s nukleovými kyselinami je hybridizace.

Ta je založena na vztazích mezi dusíkatými bázemi a je vlastně základním kamenem, o který se používané metody, včetně PCR, opírají. Hybridizace je vysoce specifická a v mnoha aplikacích je sama schopna prokázat odchylnost porovnávaných sekvencí na úrovni jedné báze (Brdička, 2001, s. 228).

5.2 Metody analýzy polymorfismu DNA

Pokud existuje více možných nukleotidových sekvencí v konkrétním genu, je známo více variant, označujeme každou takovou konkrétní variantu jako polymorfismus. Znamená to, že i každá alela je polymorfismem daného genu (Kočárek, 2008, s. 35). Metody molekulární diagnostiky se zaměřují na vyhledání rozdílů v sekvencích DNA a identifikaci polymorfismů (z řeckého výrazu „mající mnoho forem“) v celkové genomové, chromozomové, mitochondriové, chloroplastové nebo plazmidové DNA a nebo polymorfismů specifických genů, případně jejich částí. Záměrem použití jednotlivých metod je zpravidla identifikace nebo typizace studovaných vzorků, které mohou poskytnout informace důležité pro rozlišení jedinců, léčbu choroby, vyhledání zdroje patogenních organismů, provedení preventivních opatření anebo fylogenetické studie. Genotypové diagnostické metody jsou rychlé a často nevyžadují předchozí kultivaci buněk (Šmarda, 2008, s. 54).

Pro studium sekvenčního polymorfismu DNA mohou být použity přímé metody, při nichž se přímo stanovuje sekvence variabilní oblasti DNA. Tyto metody jsou však časově náročné a často nevhodné pro rutinní provádění. Častěji se proto používají nepřímé metody, kterými lze zobrazit profil DNA konkrétního organismu ve formě otisku DNA (fingerprint) (Šmarda, 2008, s. 54). Nepřímé metody se rozdělují na techniky založené na amplifikaci DNA a na techniky, u kterých se amplifikace neprovádí; mezi ně řadíme restriční endonukleázovou analýzu (REA) a selektivní hybridizaci restričních fragmentů (SRFH) ke specifickým sondám (Šmarda, 2008, s. 55).

5.2.1 Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

5.2.1.1 Popis metody FISH:

FISH umožňuje specifickou lokalizaci genů a přímou vizualizaci aberací na molekulární úrovni. Tato metoda se využívá například v prenatalní diagnostice. Pomocí sond specifických pro jednotlivé chromozomy provádíme rychlou diagnózu nebo vyloučení trizomie v buňkách amniové tekutiny. Při standardní aplikaci denaturujeme značenou sondu ohřevem na vysokou teplotu, pak ji aplikujeme na chromozomový preparát na podložním skle a necháme přes noc inkubovat v termostatu. Následně aplikujeme roztok fluorescenčního barviva (tzv. podbarvení neboli „counterstaining“) k vizualizaci chromozomů a interfázních jader. Místo, kde se studovaný gen nachází, lze pak lokalizovat na základě fluorescence při ozáření UV světlem. V současnosti se při běžném vyšetření používají sondy, které jsou přímo značeny fluorescenčním barvivem, takže odpadá časově náročná detekce, popř. amplifikace fluorescenčního signálu (Pritchard, Korf, 2007, s. 129).

5.2.1.2 Nevýhody metody FISH:

- Časová náročnost.
- Nutnost ozařování UV světlem.

5.2.1.3 Výhody metody FISH:

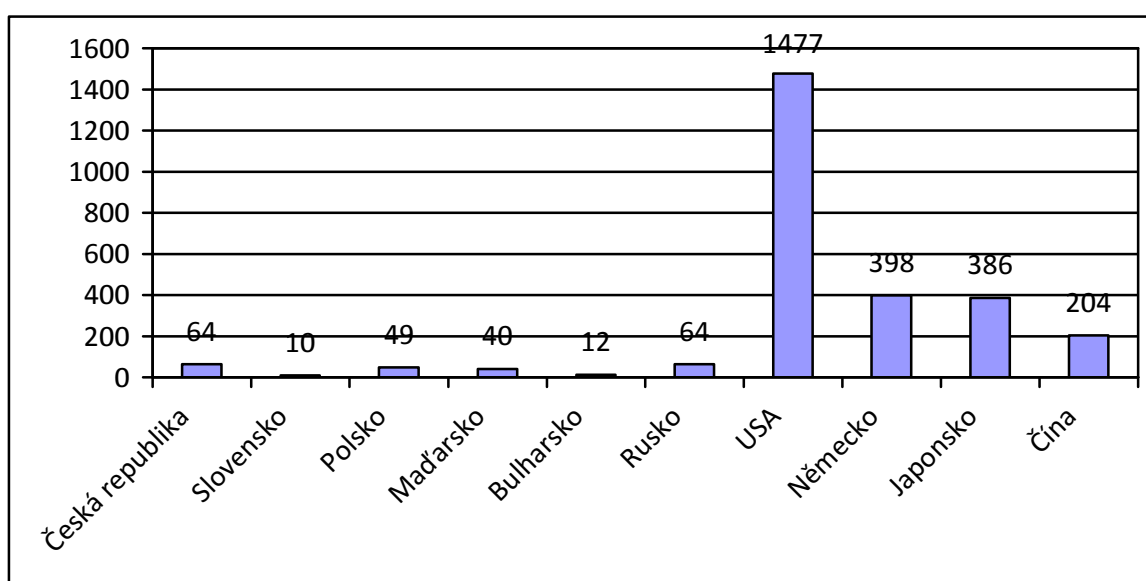
- Umožňuje přímou vizualizaci aberací.
- Na jednom chromozomu lze současně identifikovat polohy několika genů.
- Metoda je velmi citlivá.

5.2.1.4 Analýza využívání metody FISH:

Dle WOS byla metoda FISH použita ve 4361 případech. Metodu využily mimo jiné tyto vědní obory: Genetika, mikrobiologie, onkologie, patologie, hematologie, gynekologie a porodnictví, věda a výzkum v medicíně, imunologie, chirurgie, klinická neurologie, gastroenterologie, pediatrie, interní medicína, endokrinologie, virologie, urologie, nukleární medicína, farmakologie, parazitologie, kardiologie, veřejné zdravotnictví, psychiatrie, ortopedie.

Tab. 2 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu FISH v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010.

Typ příspěvku	Celkový počet	Procentuální počet
Článek	3684	85,22
Příspěvek z konference	429	9,92
Review	210	4,86
Σ	4323	100



Graf 1 Počet příspěvků jednotlivých států o metodě FISH ve sledovaných letech 2000–2010.

Tab. 3 Celkový počet příspěvků o metodě FISH ve sledovaných letech.

Rok	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Počet příspěvků	348	380	315	360	359	405	391	439	448	465	409

Z tabulky 3 vyplývá, že během posledních deseti let byl počet použití metody konstantní. Nebyl patrný ani prudký pokles, ani prudký nárůst užití. Domnívám se, že je to způsobeno tím, že nesporné výhody této metody jsou zastíněny časovou náročností. Ve forenzní genetice byla tato metoda použita pouze třikrát, a to v těchto případech: (1) Izolace jedné buňky a amplifikace celého genomu z jedné buňky pro získání templátu pro analýzu CGH

(Komparativní genová hybridizace) (Geigl, et al., 2007), (2) Fluorescenční značení buněk obou pohlaví pro laserové mikrodisekce a DNA profily (Anslinger, et al., 2007), (3) Užití Y chromozomu jako pomůcky pro forenzní důkazy sexuálního napadení (Dziegelewski, et al., 2002). V gynekologii a porodnictví byla tato metoda použita např. v těchto případech: (1) vyšetření chromozomálních abnormalit v prenatální diagnostice (Cretu, et al., 2010), (2) preimplantační genetická diagnostika (Harper, et al., 2002), (3) predispozice vzniku rakoviny způsobené mikrodelecí (Vanneste, et al., 2009), (4) vliv genetických faktorů na opakující se potraty (Ward, 2000).

5.2.2 Polymorfismus délky restričních fragmentů

5.2.2.1 Popis metody RFLP:

Při analýze genomu lze využít rozdílů v restričních mapách jedinců téhož druhu. Tyto rozdílů, podmíněné různou délkou a počtem restričních fragmentů vytvořených štěpením genomové DNA (nebo její části) určitou restriční endonukleázou, se označují jako polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism). Jejich podstatou jsou buď mutace, které vedou k vytvoření nebo ztrátě rozpoznávacích míst pro restriční endonukleázy, nebo vznikají jako důsledek přítomnosti různého počtu repetitivních sekvencí, delecí, inzercí nebo přestaveb ve specifických oblastech chromozomů (Šmarda, 2008, s. 55). Mnohé endonukleázy štěpí molekuly DNA náhodně, ale restriční endonukleázy jsou místně specifické. Dodnes bylo charakterizováno a purifikováno již okolo 400 restričních enzymů, tzn. jsou k dispozici restriční endonukleázy, které štěpí molekuly DNA v mnoha různých místech (Snustad, 2009, s. 425). Taková štěpná místa se vyskytují po celém genomu a úseky DNA, které vznikají enzymovým štěpením, se nazývají restriční fragmenty (Pritchard, Korf, 2007, s. 147). Restriční endonukleázy objevili v roce 1970 Hamilton Smith a Daniel Nathans. Biologickou funkcí restričních endonukleáz je chránit genetický materiál bakterií před „invazí“ cizích DNA, jako jsou molekuly DNA z jiných druhů nebo virové DNA. V důsledku toho jsou restriční endonukleázy někdy označovány jako imunitní systém prokaryot. Všechna štěpná místa v DNA organismu musí být chráněna před štěpením svými vlastními restričními endonukleázami, v opačném případě by si mohl organismus přivodit smrt degradací své vlastní DNA. Každá restriční endonukleáza bude štěpit molekulu cizorodé DNA na určitý stálý počet fragmen-

tů, který závisí na množství restrikčních míst v konkrétní molekule DNA (Snustad, 2009, s. 425). Rozdíly ve velikosti restrikčních fragmentů u různých jedinců lze snadno detekovat gelovou elektroforézou (Šmarda, 2008, s. 55). Selektivní hybridizace umožní snazší interpretaci výsledků analýzy RFLP snížením počtu srovnávaných fragmentů, které lze využít i jako signální znaky při mapování genomu (Šmarda, 2008, s. 55).

5.2.2.2 Výhody metody RFLP:

- Lze identifikovat postižené osoby v rodině, aniž bychom znali přesnou lokalizaci a charakter příslušné mutace.
- Metoda slouží jako nástroj při konstrukci podrobných genetických map pro účely pozičního klonování (Snustad, Simmons, 2009, s. 468).
- Snadná detekce i interpretace výsledků (Šmarda, 2005, s. 55).

5.2.2.3 Nevýhody metody RFLP:

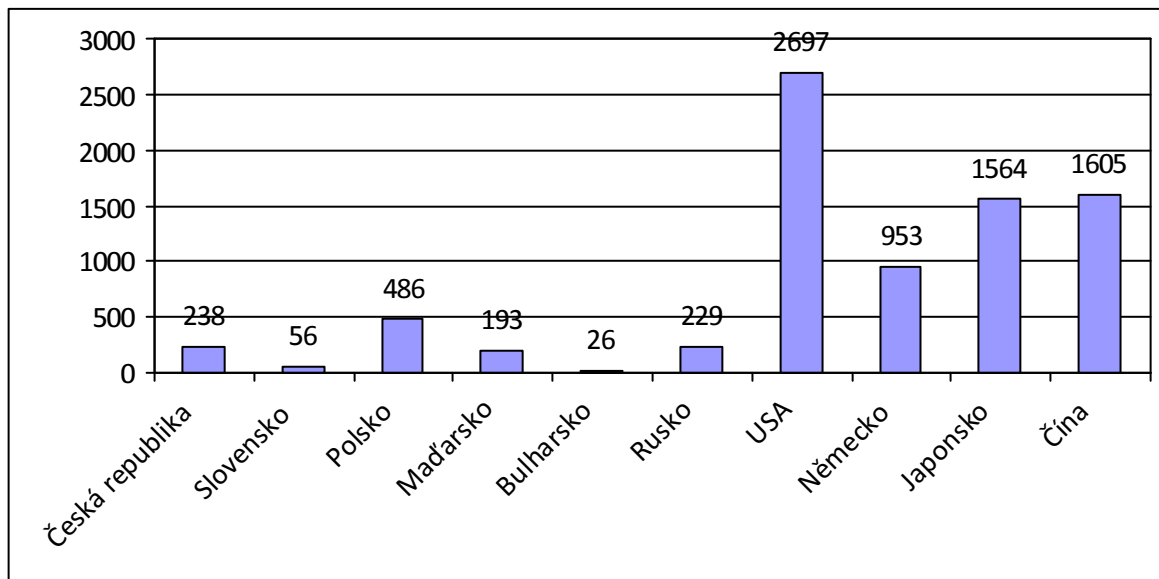
- Některé enzymy se sice váží na specifickou rozpoznávací oblast, ale štěpí mimo tuto sekvenci (Vlášková, Trešlová, 2008, s. 19).

5.2.2.4 Analýza využívání metody RFLP:

Dle WOS byla metoda RFLP použita v 15099 případech. Tato metoda našla využití v široké škále vědních oborů, např.: Genetika, mikrobiologie, onkologie, patologie, hematologie, gynekologie a porodnictví, věda a výzkum v medicíně, imunologie, chirurgie, klinická neurologie, gastroenterologie, pediatrie, interní medicína, endokrinologie, virologie, urologie, nukleární medicína, farmakologie, parazitologie, kardiologie, veřejné zdravotnictví, psychiatrie, ortopedie, geriatrie a gerontologie.

Tab. 4 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu RFLP v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010.

Typ příspěvku	Celkový počet	Procentuální počet
Článek	13797	91,85
Příspěvek z konference	1017	6,77
Review	208	1,38
Σ	15022	100



Graf 2 Počet příspěvků jednotlivých států o metodě RFLP ve sledovaných letech 2000–2010.

Tab. 5 Celkový počet příspěvků o metodě RFLP ve sledovaných letech.

Rok	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Počet příspěvků	1179	1184	1201	1272	1274	1326	1402	1454	1564	1623	1441

Z tabulky 5 vyplývá, že použití této metody během sledovaných deseti let se mírně zvyšovalo. Zřejmě je to způsobeno převahou výhod této metody nad jejími nevýhodami.

Z forenzní genetiky jsem našla celkem 72 příspěvků, např.: (1) Vyšetřování DNA z krve lidské a zvířecí (El-Sayed, et al., 2010), (2) zkoumání obměn lidské DNA z hlediska dědičných nemocí (Nakamura, 2009), (3) vyšetřování krevních skupin kvůli nesouladu mezi genetickým a serologickým stanovením (Shintani-Ishida, et al., 2008), (4) určení otcovství v soudních sporech (Liron, et al., 2004). Metoda RFLP je využívána též např. v geriatrii. Byla použita např. v těchto případech: (1) Souvislost genetického polymorfismu ADA (adenosin – deaminázy) s lidskou dlouhověkostí (Napolioni, et al., 2010), (2) souvislost genetického polymorfismu s Alzheimerovou demencí (Fu, et al., 2009), (3) souvislost polymorfismu receptoru vitamínu D a kostní denzity u žen v menopauze (Mitra, et al., 2006), (4) souvislost polymorfismu miochondriální DNA s dlouhověkostí (Ross, et al., 2001).

5.2.3 Sekvenování DNA

5.2.3.1 *Popis metody sekvenování DNA:*

Sekvenování DNA (DNA Sequencing) se může použít při diagnostickém testování, je-li jeho záměrem identifikace specifické patogenní mutace. Přináší to tu výhodu, že specifická mutace nemusí být předem známa, a metoda může v podstatě detekovat širokou paletu typů mutací (Pritchard, Korf, 2007, s. 144). Přímé sekvenování není běžně alternativní metodou pro většinu diagnostických laboratoří, jejichž náplní je identifikace přítomnosti omezeného souboru mutací. Užívá se však při identifikaci mutací genů BRCA1 a BRCA2 u nádorového onemocnění prsu. Zde jsou místa mutací odlišná a široce rozptýlená a vyžadují vyšetření sekvencí v plném rozsahu (Pritchard, Korf, 2007, s. 145).

Kompletní popis většiny mutací vyžaduje znalost sekvence bází DNA v místě chyby. Nyní se většina sekvenování DNA provádí enzymovou metodou podle Langer a spolupracovníků. (Pritchard, Korf, 2007, s. 144). Cílem sekvenování DNA je stanovení primární struktury neboli pořadí nukleotidů v molekulách DNA. Znalost sekvencí DNA také značně urychlila rozvoj dalších molekulárních metod, mezi které patří např. polymerázová řetězová reakce (PCR; Polymerase Chain Reaction), jejíž provedení je na znalosti sekvencí DNA často závislé (Šmarda, 2008, s. 59). V současné době se k sekvenování DNA používají dvě metody: metoda enzymová a chemická. Jejich společným rysem je příprava a elektroforetická separace fragmentů DNA lišících se navzájem v délce o jediný nukleotid (Rosypal, 1997, s. 765). První metoda využívá specifickou inhibici enzymové syntézy řetězců DNA. Druhá je založena na specifické degradaci řetězců nukleových kyselin pomocí chemických sloučenin (Šmarda, 2008, s. 59). Poslední fáze sekvenování spočívá ve vyhodnocení získaných sekvencí. To se již neobejde bez využití počítačů a speciálních programů, pomocí nichž lze provést komplexní analýzu stanovené sekvence (Rosypal, 1997, s. 769). Při této analýze se provádí rovněž srovnání stanovené sekvence nukleotidů nebo z ní odvozené sekvence aminokyselin se sekvencemi uloženými v databankách, v nichž se shromažďují údaje získané v laboratořích celého světa (Šmarda, 2008, s. 59).

5.2.3.2 *Nevýhody metody sekvenování DNA:*

- Občas dochází k nesprávnému strojovému odečtení, je tedy nutné okometrické pro-
veření získaných křivek (Brdička, 2001, s. 228).

5.2.3.3 *Výhody metody sekvenování DNA:*

- Sekvenování poskytuje základní údaje o genetické variabilitě.
- Může být analyzována jakákoliv sekvence (ne/kódující, ne/genová) (Snustad, Sim-
mons, 2009, s. 742).

5.2.3.4 *Chemická metoda sekvenování DNA:*

Podstatou chemické metody sekvenování je specifické štěpení molekuly DNA chemic-
kými činidly v místech určitého typu báze. Výchozím materiálem je soubor identitických
fragmentů jednořetězcové DNA označených na jednom konci radioaktivně (Rosypal, 1997,
s. 765). Mezi chemikálie používané pro navození modifikací bází patří dimethylsulfát, hyd-
roxid sodný, kyselina mravenčí a hydrazin (Šmarda, 2008, s. 60). Fragmenty DNA se roz-
dělí elektroforézou na denaturujícím polyakrylamidovém gelu, jehož rozlišovací schopnost
umožňuje navzájem oddělit řetězce DNA lišící se svou velikostí o jedinou bázi. Délka sek-
vence, kterou lze odečíst, závisí na délce použitého gelu a dosahuje několik stovek bází
(Rosypal, 1997, s. 765). Data produkovaná chemickým sekvenováním bývají častěji nejed-
noznačná než u enzymového sekvenování, protože reaktivita chemických činidel je ovliv-
něna různými nečistotami. Dalším důvodem je nutnost používat radioaktivní značení konců
přinášející vysokou úroveň radioaktivity. V porovnání s enzymovým sekvenováním posky-
tuje chemické relativně kratší sekvence a postup pro jejich získání je laboratorně náročnější
(Šmarda, 2008, s. 60).

5.2.3.5 *Nevýhody chemické metody sekvenování:*

- Reaktivita chemických činidel je ovlivněna různými nečistotami.
- Nutnost používat radioaktivní značení konců.
- Poskytuje relativně kratší sekvence.
- Postup je laboratorně náročnější.

5.2.3.6 *Výhody chemické metody sekvenování:*

- Velká rozlišovací schopnost.

5.2.3.7 *Enzymová metoda sekvenování:*

Enzymová metoda sekvenování je v současné době nejběžnější metodou sekvenování DNA (Šmarda, 2008, s. 61). Při enzymatickém sekvenování je DNA, jejíž sekvence má být stanovena, použita jako matrice pro syntézu komplementárních řetězců různé délky pomocí DNA-polymerázy (Rosypal, 1997, s. 776). Metoda využívá několika vlastností DNA-polymerázy: schopnosti vytvářet přesné kopie molekuly DNA a schopnosti specifické syntézy řetězce DNA (Šmarda, 2008, s. 61). Po proběhnutí polymerizační reakce se vytvořené produkty zdenaturují a rozdělí na polyakrylamidovém denaturujícím gelu podobně jako při chemické metodě. Rovněž odečet sekvence z autoradiogramu je obdobný (Rosypal, 1997, s. 768). Migrující proužky odpovídající různým fragmentům DNA se poté detekují pomocí své fluorescence, když procházejí prostorem ozářeným úzkým ultrafialovým paprskem. Barevný světelný signál se elektronicky monitoruje a zobrazuje jako řada vrcholů v grafu (Pritchard, Korf, 2007, s. 144). Při manuálním provádění enzymového sekvenování je možné stanovit sekvenci dlouhou přibližně 300–400 bází (Šmarda, 2008, s. 62).

Moderní variantou enzymové metody je automatické sekvenování DNA (automated DNA sequencing), při němž se sekvence odečítá a vyhodnocuje z gelu automaticky (Rosypal, 1997, s. 768). Je proto využíván zejména při sekvenování DNA z genomových knihoven, obsahujících tisíce klonů (Šmarda, 2008, s. 63). Délka stanovené sekvence je typicky mezi 500–1000 bázemi. Detekce produktů sekvenčních reakcí probíhá v průběhu elektroforesy automaticky pomocí laserového detektoru napojeného na počítač, který z pořadí signálů v příslušných drahách přímo vyhodnocuje sekvenci DNA (Šmarda, 2008, s. 64).

5.2.3.8 *Výhody enzymové metody sekvenování:*

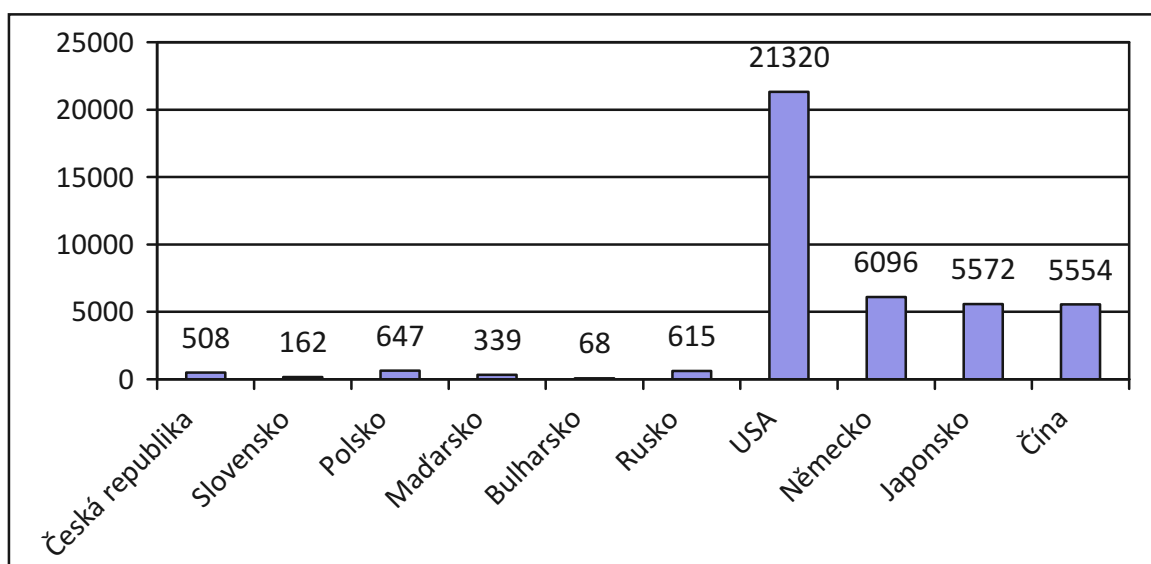
- Rychlé zpracování sekvence DNA.

5.2.3.9 Analýza využívání metody sekvenování DNA:

Dle WOS byla metoda sekvenování DNA použita v 65436 případech. Metoda sekvenování našla využití v řadě vědních oborů, např.: Genetika, mikrobiologie, onkologie, patologie, hematologie, gynekologie a porodnictví, věda a výzkum v medicíně, imunologie, chirurgie, klinická neurologie, gastroenterologie, pediatrie, interní medicína, endokrinologie, virologie, urologie, nukleární medicína, farmakologie, parazitologie, kardiologie, veřejné zdravotnictví, psychiatrie, ortopedie.

Tab. 6 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu sekvenování DNA v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010.

Typ příspěvku	Celkový počet	Procentuální počet
Článek	54825	85,09
Příspěvek z konference	6391	9,92
Review	3216	4,99
Σ	64432	100



Graf 3 Počet příspěvků jednotlivých států o metodě sekvenování DNA ve sledovaných letech 2000–2010.

Tab. 7 Celkový počet příspěvků o metodě sekvenování DNA ve sledovaných letech.

Rok	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Počet příspěvků	4588	4554	4736	4940	5351	5684	5996	6478	6930	7710	7984

Z tabulky 7 vyplývá, že oblíbenost metody sekvenování DNA výrazně stoupá. Podle mého názoru je to způsobeno tím, že může být sekvenována jakákoliv sekvence.

Ve forenzní genetice byla tato metoda použita 326krát, např.: (1) Identifikace druhů podle velikosti odchylky v mitochondriální DNA (Nakamura, et al., 2009), (2) určování otcovství (Turci, et al., 2004), (3) odhalení pachatele trestného činu (Pitra, et al., 1999). Metoda se také úspěšně využívá v interní medicíně, např.: (1) Genetická predispozice pro vznik esenciální hypertenze (Passalacqua, et al., 2010), (2) vzájemný vztah autismu a nedostatku oxytocinových receptorů (Gregory, et al., 2009), (3) mitochondriální abnormality u psychiatrických onemocnění (Shao, et al., 2008), (4) nestabilita mikrosatelitů mezi pacienty s kolorektálním karcinomem (Montenegro, et al., 2006), (5) rozvoj cílené terapie v onkologii (Schultze, 2006).

5.2.4 Polymerázová řetězová reakce

5.2.4.1 Popis metody PCR:

Polymerázová řetězová reakce (PCR; Polymerase Chain Reaction) byla zavedena v roce 1985 Kary Banks Mullisem (v roce 1993 oceněn Nobelovou cenou za chemii) (Šmarda, 2008, s. 74). Metoda způsobila naprosto zásadní převrat v diagnostice a molekulární analýze genetických chorob. Technologie založené na PCR umožňují získat konečná data o struktuře genů a sekvencí DNA, i když vycházíme z velmi malého množství DNA (Snustad, 2009, s. 434). Analýza touto metodou se může provádět z tak malého množství vzorku, jako je jedno jediné buněčné jádro získané z preimplantačního embrya, výplachu úst, vlasového kořínku nebo jiného zdroje (Pritchard, Korf, 2007, s. 150). Často jsou jako zdroj DNA používány různé biologické materiály, např. hrubé extrakty z krve, tělní tekutiny, kultury mikroorganismů, buňky z tkáňových kultur, atd. V důsledku vysoké citlivosti PCR je vhodné provést hrubou extrakci vzorků za použití kombinace zahřátí a různých detergentů nebo enzymatického štěpení. U těchto materiálů by měla být věnována pozor-

nost možným nečistotám. Mezi ně patří komponenty červených krvinek, některé detergenty, EDTA, vysoké koncentrace solí a negativně působí také vysoká koncentrace DNA. Pro PCR je třeba pouze malé množství DNA, proto mohou být tyto nečistoty ve většině případů odstraněny dostatečným naředěním vzorku (Šmarda, 2008, s. 75).

PCR se provádí během několika hodin a je levnější než kterákoliv jiná metoda. Proto se stala nejvíce užívanou metodou genetické analýzy (Pritchard, Korf, 2007, s. 150). Má význam v řadě lékařských oborů, ve výzkumu, a má i praktické aplikace. Metoda umožňuje získat během asi 90 minut z jediného úseku molekuly DNA až milion identických kopií (Kopecká, 2001, s. 18). Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin, která je základním molekulárním procesem všech živých organismů. K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy odolávající teplotám, při nichž DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů. PCR je proces, při němž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu (Šmarda, 2008, s. 73):

- Denaturace dvouřetězcových molekul DNA – genomová DNA obsahující sekvence, které mají být amplifikovány, je denaturována zahřátím na 92 – 95°C po dobu asi 30 sekund (Snustad, 2009, s. 434).
- Připojení primerů k odděleným řetězcům DNA – denaturovaná DNA je hybridizována s nadbytkem syntetických oligonukleotidových primerů tak, že se inkubují společně při 50 – 60°C po dobu 30 sekund (Snustad, 2009, s. 434).
- Syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy – k polymeraci obvykle dochází při 70 – 72°C po dobu 1,5 minuty (Snustad, 2009, s. 434).

Reakce se provádějí v zařízení nazývaném termocykler (thermocycler), v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Postupným opakováním tohoto procesu se exponenciálně (2^n ; n = počet cyklů) vytváří až miliarda kopií vybraného úseku cílové molekuly. Jelikož výsledkem PCR je mnohonásobné zmnožení vybraného úseku DNA, lze ji označit za způsob klonování DNA. Optimální počet cyklů se zpravidla pohybuje v rozmezí od 25 do 35 cyklů (Šmarda, 2008, s. 75).

Jednou z nevýhod PCR je, že se v nízké, ale významné četnosti, zanášejí do amplifikovaných kopií DNA chyby. Když je začleněn nesprávný nukleotid během jednoho z prvních cyklů PCR, bude amplifikován zrovna tak jako jakýkoliv jiný nukleotid v sekvenci DNA. Pokud je požadována vysoká přesnost, provádí se PCR s použitím teplotně stabilních polymeráz (Snustad, 2009, s. 434). DNA-polymeráza katalyzuje prodlužování primeru při laboratorní teplotě, což může být příčinou chyb a vzniku nespecifických produktů, protože není schopna opravit chybně vloženou nukleotidovou bázi (Dale, von Schantz, 2002, s. 143) Vysoká citlivost a specifita PCR způsobuje, že kontaminace i jedinou molekulou exogenní nebo neznámé DNA postačuje pro získání falešného signálu (Šmarda, 2008, s. 76). Pod pojmem kontaminace rozumíme vstup neautorizované cílové sekvence do PCR (Bílek, 2008, s. 28). Pro minimalizaci falešných pozitivních výsledků byly doporučeny určité standardní postupy zahrnující používání autoklávových roztoků, fyzikální separaci používaných PCR-reagencií od templátové DNA a produktů PCR, používání UV-světla k odstranění exogenních nukleových kyselin na pracovní ploše, používání jednorázových rukavic, přidávání DNA do reakce jako poslední složky a pečlivou volbu pozitivních, negativních a vnitřních kontrol (Šmarda, 2008, s. 76).

PCR je významným nástrojem pro detekci odchylek v sekvencích nukleových kyselin. Znalost povahy mutací je důležitá především pro správnou diagnostiku a terapii. PCR je neocenitelným nástrojem pro celou řadu analýz prováděných v základním nebo aplikovaném výzkumu a v praxi. (Šmarda, 2008, s. 82). Polymerázová řetězová reakce je používána v široké škále variant, které jsou upraveny podle toho, zda je potřeba detekovat sekvenční polymorfismy, provádět molekulární identifikaci nebo typizaci organismů nebo modifikovat sekvence nukleových kyselin (Šmarda, 2008, s. 85). Hlavní výhodou PCR je její rychlost a možnost mnohonásobně amplifikovat (zmnožit) DNA jen z jediné molekuly (Kopecká, 2001, s. 19).

Tab. 8 Využití PCR a jejích modifikací ve výzkumu a praxi.

Základní výzkum	<ul style="list-style-type: none"> ▪ izolace genů nebo jejich částí ▪ sekvenování DNA ▪ mutageneza in vitro, modifikace konců DNA ▪ analýza klonů z genových knihoven ▪ příprava značených sond
Aplikovaný genetický výzkum	<ul style="list-style-type: none"> ▪ prenatální diagnostika dědičných chorob ▪ detekce mutací v genech ▪ studium polymorfismu genů ▪ populační genetika
Klinické disciplíny	<ul style="list-style-type: none"> ▪ detekce patogenních bakterií, virů, prvoků a hub ▪ typizace patogenních mikroorganismů ▪ identifikace onkogenů ▪ typizace nádorů ▪ stanovení pohlaví
Ostatní	<ul style="list-style-type: none"> ▪ archeologie ▪ soudnictví ▪ kriminalistika

5.2.4.2 Výhody metody PCR:

- Metoda PCR je velmi citlivá, je použitelná k amplifikaci tak malého množství DNA, jaké se nachází v jediném genomu.
- Postup je velmi rychlý (3–48 hodin).
- Metoda je bezpečná, protože nepoužívá radioaktivitu.
- Produkt je vhodný k další analýze zavedenými molekulárními postupy.
- Metoda má velkou rozlišovací schopnost, postup lze použít i u silně degradované DNA.

5.2.4.3 Nevýhody metody PCR:

- Nemohou se amplifikovat dlouhé sekvence.
- Je třeba znát sekvence úseků ohraničujících amplifikované sekvence.
- Metoda je velmi citlivá, proto je nezbytná absolutní čistota vzorku.

- Může dojít k nepřesnostem v replikaci, protože neexistuje korektura (proof-reading), proto mutace, které případně vznikají během reakce, jsou dále rozšiřovány.

5.2.4.4 Diagnostické využití metody PCR:

- Diagnostika poruch tripletových repetitiv (např. Huntingtonova choroba).
- Přímé sekvenování genů.
- Analýza restrikčními endonukleázami při vyšetřování konkrétní mutace.
- Analýza založená na polymorfismu konformace jednořetězců (SSCP; Single Strand Conformation Polymorphism) – v této modifikaci PCR se amplifikovaná DNA denaturuje a elektroforeticky analyzuje bez denaturace, kdy se mutované řetězce detekují pomocí svých abnormálních rychlostí migrace.
- Vyšetření vazby alelově-specifických oligonukleotidů (ASO; Allele Specific Oligonucleotide) – tato metoda se užívá obecně tam, kde je třeba detekovat bodovou mutaci nebo omezený počet běžných alel asociovaných s chorobou. Tento přístup nabízí levnou a rychlou diagnostickou metodu, má však omezení, neboť předem musíme znát mutované sekvence.
- Analýza systému mutací vzdorujících (refrakterních) amplifikací (ARMS; Amplification Refractory Mutation System) – závisí na specifičnosti vazby PCR-primerů na templátovou DNA.
- Kvantitativní PCR – používá se rutinně ke kvantitativní detekci delecí v dystrofinovém genu odpovědném za Duchenneovu muskulární dystrofii. Kvantifikace produktu PCR je možná, ale vyžaduje speciální vybavení a značnou analytickou pečlivost. Praktičtější je užití metody FISH.
- Charakterizace individuálního genomu (Pritchard, Korf, 2007, s. 150–151).

Významné využití nachází tato metoda při diagnóze dědičných onemocnění u lidí, zvláště v případech prenatální diagnostiky, kde je k dispozici pouze limitované množství DNA plodu (Snustad, 2009, s. 434). Příkladem je použití PCR ke stanovení pohlaví u prenatálních buněk. Pro choroby vázané na X-chromozom, které postihují pouze samčí jedince, je prvním krokem stanovení pohlaví (Šmarda, 2008, s. 84). Druhou významnou aplikací je řešení forenzních případů vyžadujících identifikaci jedince použitím DNA izolované z velmi malých vzorků tkání. Máloco může poskytnout pádnější důkaz identity než sek-

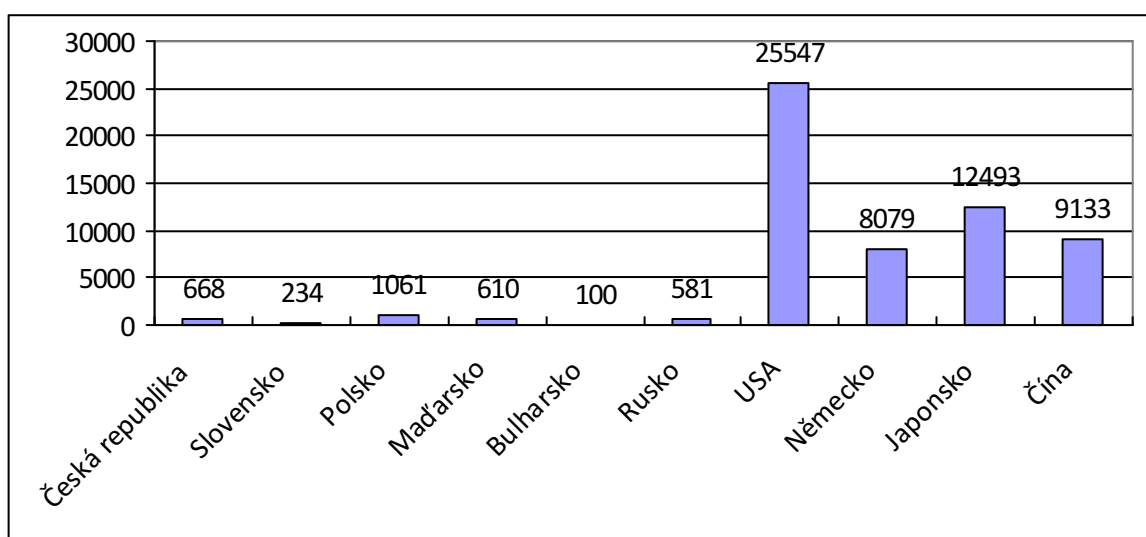
vence DNA (Snustad, 2009, s. 517). Profil DNA byl v kriminalistice poprvé požit jako důkaz v roce 1988 (Snustad, 2009, s. 518). Při použití PCR-amplifikace lze získat sekven-
cence DNA z nepatrného množství DNA izolované z několika kapek krve, spermatu nebo do-
konce jednotlivých lidských vlasů (Snustad, 2009, s. 434). Poslední nálezy prokázaly, že
lidský genom obsahuje velké množství rodin polymorfismů DNA různých typů – polymor-
fismů, které mohou poskytnout spolehlivý důkaz v případech nejasné identity. Tyto poly-
morfismy lze využít k vytvoření profilu DNA (DNA fingerprints) (Snustad, 2009, s. 517).
PCR se také úspěšně používá k detekci bakteriálních a virových infekcí. Spolehlivá a citli-
vá diagnostika je zvláště důležitá při detekci virů, např. viru HIV (Šmarda, 2008, s. 83).
Konvenční diagnostické metody jsou založeny na schopnosti kultivovat patogenní orga-
nismy v kultuře nebo detekovat jejich přítomnost u pacienta prostřednictvím protilátek.
Jejich nevýhodou však je, že jsou často náročné a vyžadují až několik týdnů, a navíc někte-
ré imunologické metody bývají málo citlivé. Další významnou oblastí využití metody PCR
je monitorování terapie rakoviny. Možnost detekce genetických změn v rakovinných buň-
kách je cenným prostředkem ke sledování přítomnosti maligních buněk u pacientů
s nádorovým onemocněním (Šmarda, 2008, s. 82). PCR má i mnohostranné využití ve vý-
zkumu, v genovém inženýrství atd (Kopecká, 2001).

5.2.4.5 Analýza využívání metody PCR:

Dle WOS byla metoda PCR použita více než 100000krát. Své využití našla v těchto
oborech medicíny: Genetika, mikrobiologie, onkologie, patologie, hematologie, gynekolo-
gie a porodnictví, věda a výzkum v medicíně, imunologie, chirurgie, klinická neurologie,
gastroenterologie, pediatrie, interní medicína, endokrinologie, virologie, urologie, nukleár-
ní medicína, farmakologie, parazitologie, kardiologie, veřejné zdravotnictví, psychiatrie,
ortopedie, geriatric a gerontologie.

Tab. 9 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu PCR v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010.

Typ příspěvku	Celkový počet	Procentuální počet
Článek	88363	89,43
Příspěvek z konference	6054	6,13
Review	4394	4,44
Σ	98811	100



Graf 4 Počet příspěvků jednotlivých států o metodě PCR ve sledovaných letech 2000 – 2010.

Tab. 10 Celkový počet příspěvků o metodě PCR ve sledovaných letech.

Rok	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Počet příspěvků	2760	9098	8937	9501	9054	9427	9901	10195	10420	10584	9992

Z tabulky 10 vyplývá, že od roku 2001, kdy oblíbenost a využití této metody výrazně stoupla na několiknásobek, se její využití drží na zhruba stejné úrovni. Zřejmě je to způsobeno nespornými výhodami této metody. Ve forenzní genetice byla tato metoda využita v 646 případech, např.: (1) Forenzní diagnostika těhotenství (Gauvin, et al., 2010), (2) rychlé určení krevních skupin v systému ABO (Lee, et al., 2009), (3) extrakce lidské DNA

(Sutlovic, et al., 2007), (4) identifikace těl při hromadných neštěstích (Leclair, et al., 2007), (5) testování lidské identity (Hohoff, Brinkmann, 1999), (6) určování otcovství (Reshef, et al., 1999), (7) zubní kartáček jako zdroj důkazní DNA (Tahala, et al., 2000), (8) výskyt infekcí lidským papilomavirem u zneužívaných dívek (Stevens-Simon, et al., 2000), (9) identifikace pohřešovaných osob (Lorente, et al., 2001). V geriatrii byla tato metoda také často používána, např.: (1) Reaktivace herpesviru vázaná na věk (Stowe, et al., 2007), (2) průkaz *Helicobacter pylori* u starších hospitalizovaných pacientů (Salles, et al., 2006), (3) změny genu u Alzheimerovy demence a demence s Lewyho tělísky (Akatsu, et al., 2006), (4) výskyt závažných rinovirových onemocnění dýchacích cest v domech s pečovatelskou službou (Nicka, et al., 2006), (5) patogeny způsobující Alzheimerovu demenci (Itzhaki, et al., 2004), (6) klinické projevy chřipky u starších hospitalizovaných (Walsh, et al., 2002).

5.2.5 Real-time PCR

5.2.5.1 Popis metody Real-time PCR:

V současné době se používá varianta PCR umožňující přímou kvantifikaci PCR-produktu v průběhu reakce (Real-time PCR). Kvantifikace množství molekul nukleových kyselin je důležitá při detailním studiu genové exprese nebo diagnostice některých patogenů (Šmarda, 2008, s. 79). Tato metoda se od klasické metody PCR liší přesným určením množství produktu měřením nárůstu fluorescence během vlastní PCR reakce. Vzrůstající množství DNA ve vzorku je přímo úměrné narůstající fluorescenci. Výsledek reakce tak známe často dřív, než proběhnou všechny cykly. PCR v reálném čase se používá při detekci jednobodových záměn v genetické diagnostice (Vlášková, Trešlová, 2008, s. 15). Metoda Real-time PCR je vysoce citlivá a přesná a právě proto je i velice náchylná k detekci různých nespecifických reakcí (Bílek, 2008, s. 29). Pro provedení PCR v reálném čase je nutné mít způsob, jak zjistit přítomnost produktu reakce v okamžiku jeho vzniku, a nikoliv až po zastavení reakce a provedení gelové elektroforézy. Nejjednodušším způsobem je přidání takového barviva do směsi PCR, které fluoreskuje po navázání na dvouřetězcovou DNA. Tento přístup však má své slabiny spočívající v tvorbě falešných signálů, jakmile se barvivo naváže na chybný produkt reakce. Pokud se PCR provádí ve speciálním přístroji, který nejen umožňuje provádět cyklické změny teplot, ale také detekci fluorescence, lze monitorovat postup PCR v reálném čase – vznik produktu v průběhu PCR. PCR v reálném

čase je důležitá metoda pro kvantitativní detekci určitých sekvencí DNA a pro identifikaci specifických změn v sekvenci DNA včetně takových, které mají diagnostický význam v medicíně (Šmarda, 2008, s. 125).

5.2.5.2 Výhody metody Real-time PCR:

- Rychlé zaznamenání produktů bezprostředně po jejich vzniku.
- Přesné určení množství produktu měřením nárůstu fluorescence.

5.2.5.3 Nevýhody metody Real-time PCR:

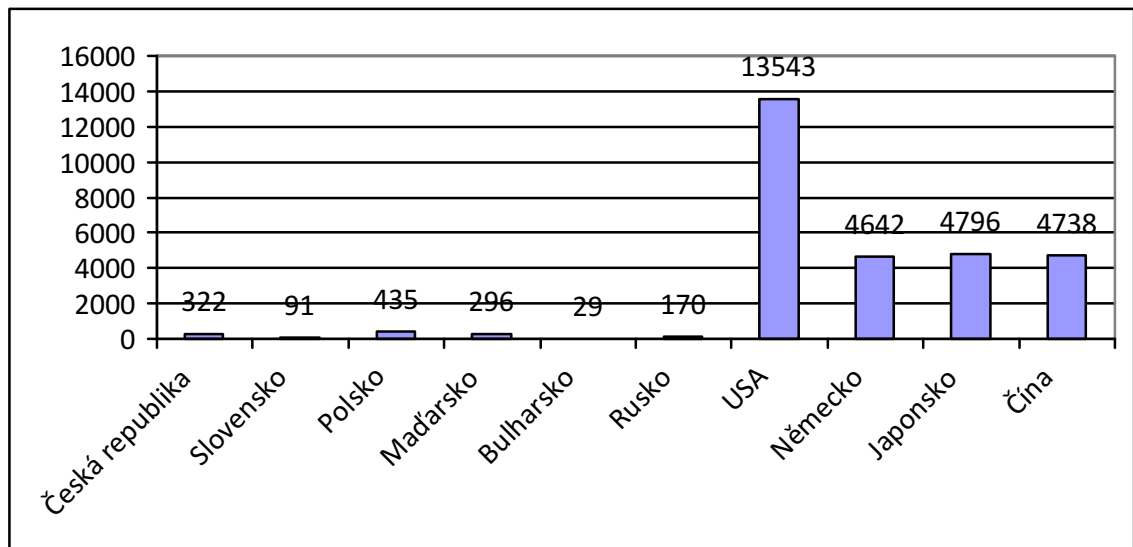
- Náchylnost k detekci různých nespecifických reakcí, tvorba falešných signálů.
- Vysoké nároky na vlastnosti primerů.

5.2.5.4 Analýza využívání metody Real-time PCR:

Dle WOS byla metoda Real-time PCR použita ve 44770 případech. Odvětví, ve kterých byla tato metoda použita: Genetika, mikrobiologie, onkologie, patologie, hematologie, gynekologie a porodnictví, věda a výzkum v medicíně, imunologie, chirurgie, klinická neurologie, gastroenterologie, pediatrie, interní medicína, endokrinologie, virologie, urologie, nukleární medicína, farmakologie, parazitologie, kardiologie, veřejné zdravotnictví, psychiatrie, ortopedie, geriatrické a gerontologie.

Tab. 11 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu Real-time PCR v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010.

Typ příspěvku	Celkový počet	Procentuální počet
Článek	39585	89,30
Příspěvek z konference	3651	8,24
Review	1090	2,46
Σ	44326	100



Graf 5 Počet příspěvků jednotlivých států o metodě Real-time PCR ve sledovaných letech 2000–2010.

Tab. 12 Celkový počet příspěvků o metodě Real-time PCR ve sledovaných letech.

Rok	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Počet příspěvků	403	799	1464	2378	3305	4274	5170	5935	6529	7223	7196

Z tabulky 12 vyplývá, že metoda Real-time PCR nabývá stále více na popularitě. Její použití stoupl během deseti let na několikrát. Myslím si, že hlavní příčinou je to, že metoda je velmi rychlá a přesná. Ve forenzní genetice byla metoda použita 115krát, např.: (1) Při vyšetřování násilných úmrtí (Maeda, et al., 2010), (2) extrakce DNA ze starých kosterních pozůstatků (Lee, et al., 2010), (3) určování krevních skupin v systému ABO (Ruan, et al., 2010), (4) použití real-time PCR přímo na místě činu (Liu, et al., 2008), (5) vyhodnocení jaderné DNA z lidských vlasů (Opel, et al., 2008), (6) určování stáří skvrn od krve (Anderson, et al., 2005), (7) určování pohlaví z biologického materiálu (Andreasson, Allen, 2003). V geriatrii byla metoda použita např.: (1) Při zkoumání procesu stárnutí buněk lidské kůže (Lener, et al., 2006), (2) zjištění faktorů podílejících se na metabolismu tuků souvisejících s věkem (Misso, et al., 2005), (3) zkoumání věkově vázaných změn na receptoru adenosinu (Jenner, et al., 2004).

5.2.6 Alu-PCR

5.2.6.1 Popis metody Alu-PCR:

Alu-PCR patří do skupiny tzv. interrepetitivních PCR, které využívají přítomnosti repetitivních elementů v lidském genomu. Alu-sekvence je velmi variabilní a obsahuje sekven-
ci, která je specifická pro člověka. Tato technika je často používána pro odlišení lidské DNA od ostatních a k získání specifického fingerprintu pruhů neznámé lidské DNA (Vlášková, Trešlová, 2008, s. 16).

5.2.6.2 Nevýhody metody Alu-PCR:

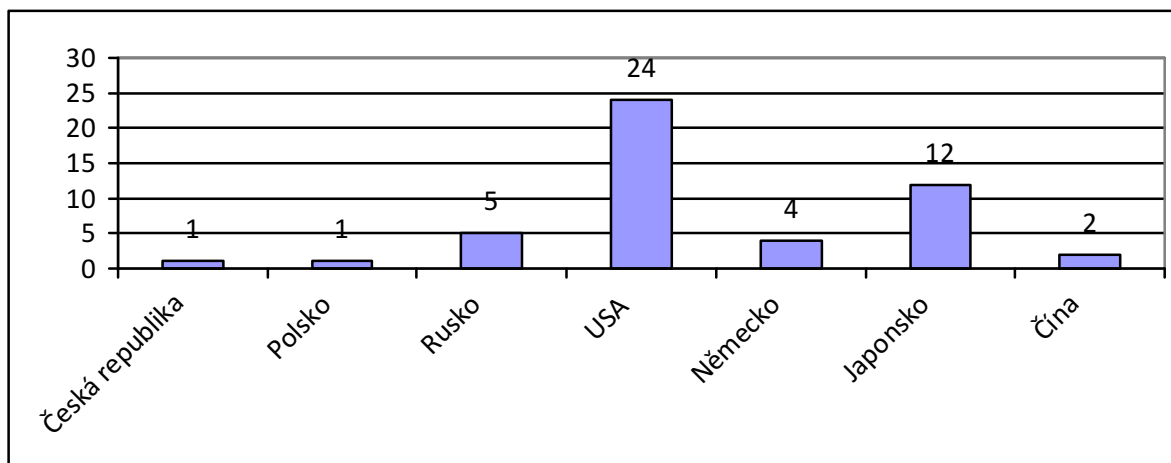
- Velmi specifické užití metody.

5.2.6.3 Analýza využívání metody Alu-PCR:

Dle WOS byla metoda Alu-PCR použita v 67 případech. Tato metoda byla použita jen v malém množství vědních oborů, např: Genetika, onkologie, mikrobiologie, gastroenterologie, farmakologie, hematologie, geriatric, patologie, veřejné zdravotnictví.

Tab. 13 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu Alu-PCR v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010.

Typ příspěvku	Celkový počet	Procentuální počet
Článek	58	87,88
Příspěvek z konference	8	12,12
Σ	66	100



Graf 6 Počet příspěvků jednotlivých států o metodě Alu-PCR ve sledovaných letech 2000–2010.

Tab. 14 Celkový počet příspěvků o metodě Alu-PCR ve sledovaných letech.

Rok	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Počet příspěvků	6	16	10	6	6	2	5	2	4	3	5

Tato metoda byla použita jen v několika málo případech vzhledem ke svému omezenému použití. Ve forenzní genetice byla použita dvakrát, a to k určování lidské DNA. (Nicklas, Buel, 2002) (Walker, et al., 2003). Ve veřejném zdravotnictví byla tato metoda použita např. ke kvantifikaci lidské DNA ve stolici při screeningu kolorektálního karcinomu. (Zou, et al., 2006).

5.2.7 Primed *in situ* hybridization

5.2.7.1 Popis metody PRINS:

PRINS (Primed *in situ* Hybridization) – základem metody je reakce PCR probíhající *in situ*, tj. přímo na chromozomech. (Alternativní název metody je „PCR *in situ*“). Přidáním primerů vymezujeme na cílové DNA specifický genový lokus, jehož přítomnost vyšetřujeme. Pokud je při následné polymerázové reakci přítomen v reakční směsi fluorescenčně značený analog některé z bází, dochází k jeho inkorporaci, takže hledanou sekvenci lze vizualizovat během jediného cyklu PCR (Pritchard, Korf, 2007, s. 130).

5.2.7.2 Výhody metody PRINS:

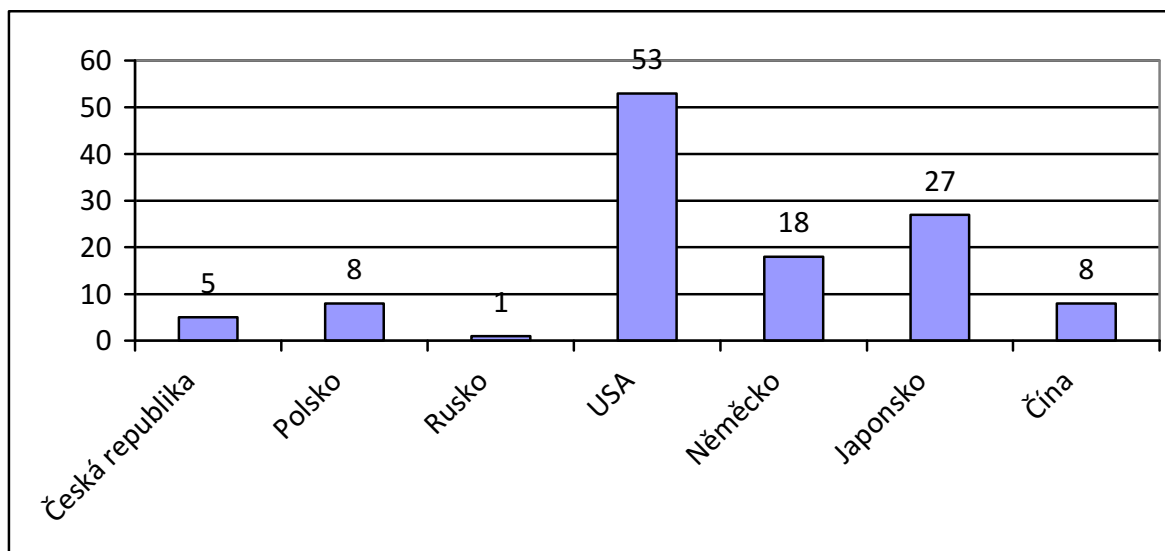
- Rychlé zpracování výsledků (stačí jeden cyklus).

5.2.7.3 Analýza využívání metody PRINS:

Dle WOS byla metoda PRINS použita ve 184 případech. Metoda byla užita v těchto odvětvích medicíny: Genetika, onkologie, endokrinologie, patologie, gynekologie a porodnictví, imunologie, mikrobiologie, hematologie, interna, urologie, farmakologie, gastroenterologie, veřejné zdravotnictví.

Tab. 15 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu PRINS v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010.

Typ příspěvku	Celkový počet	Procentuální počet
Článek	164	89,62
Review	12	6,56
Příspěvek z konference	7	3,82
Σ	183	100



Graf 7 Počet příspěvků jednotlivých států o metodě PRINS ve sledovaných letech 2000–2010.

Tab. 16 Celkový počet příspěvků o metodě PRINS ve sledovaných letech.

Rok	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Počet příspěvků	30	31	22	23	17	11	13	13	8	8	5

Tabulka 16 ukazuje, že použití této metody od roku 2000 prudce kleslo. Domnívám se, že je to omezeným použitím. Ve forenzní genetice nebyla tato metoda vůbec použita. V gynekologii a porodnictví byla metoda PRINS použita např.: (1) Pro vyšetření trizomie 21 (Krabchi, et al., 2006), (2) pro analýzu lidských oocytů (Pellestor, et al., 2005).

5.2.8 Stanovení polymorfismu délky restričních fragmentů u produktů PCR

5.2.8.1 Popis metody PCR-RFLP:

Stanovení polymorfismu délky restričních fragmentů u produktů PCR (PCR-RFLP) je modifikací standardní PCR používanou pro typizaci cílové sekvence, obvykle určitého genu, obsahujícího sekvenční polymorfismus (Šmarda, 2008, s. 85). Výsledkem jsou fragmenty různé velikosti, které jsou separovány na agarózovém gelu. Pro svoji nenáročnost a relativní možnost určení místa mutace je tato metoda velmi oblíbená. Je vhodná především pro geny s větším polymorfismem nebo nekódující sekvence (Gazdová, 2007, s. 23). Jako příklad využití PCR-RFLP může být uvedena prenatální diagnostika hemofilie A u rodiny, která nese určitý typ mutace. Heterozygotní matka – přenašečka má jednu kopii normálního genu a jednu kopii mutantního genu. Jelikož se jedná o X-chromozomovou recesivně dědičnou chorobu, postižení potom bývají synové, kteří zdědí X-chromozom s mutantním genem (Šmarda, 2008, s. 85).

5.2.8.2 Výhody metody PCR-RFLP:

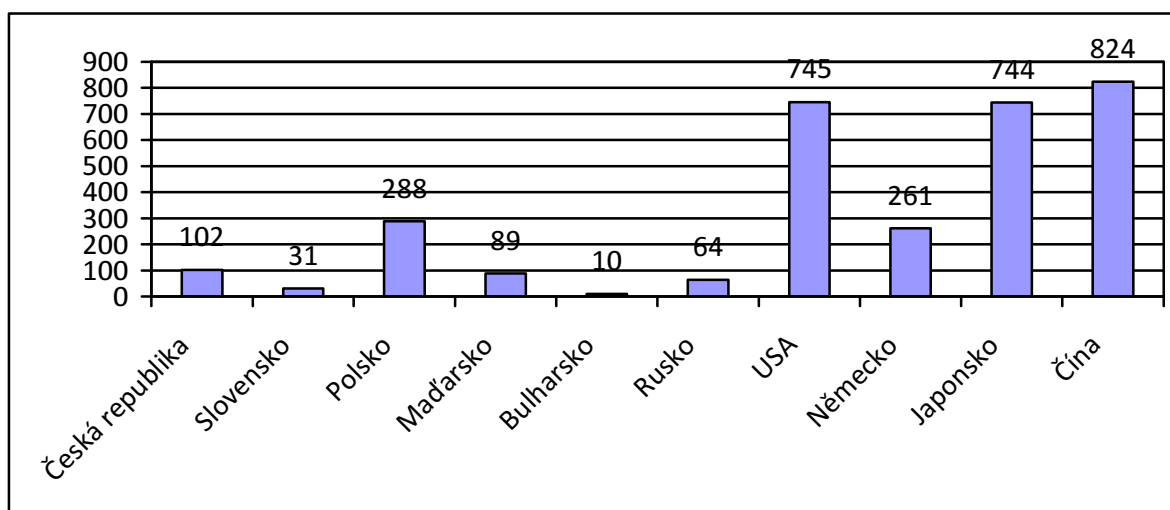
- Nenáročná metoda.
- Vhodná pro geny s větším polymorfismem.

5.2.8.3 Analýza využívání metody PCR-RFLP:

Dle WOS byla metoda PCR-RFLP použita v 6398 případech. Své využití našla tato metoda v těchto odvětvích: Genetika, mikrobiologie, onkologie, patologie, hematologie, gynekologie a porodnictví, věda a výzkum v medicíně, imunologie, chirurgie, klinická neurologie, gastroenterologie, pediatrie, interní medicína, endokrinologie, virologie, urologie, nukleární medicína, farmakologie, parazitologie, kardiologie, veřejné zdravotnictví, psychiatrie, ortopedie, geriatrické a gerontologie.

Tab. 17 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu PCR-RFLP v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010.

Typ příspěvku	Celkový počet	Procentuální počet
Článek	5910	92,82
Příspěvek z konference	391	6,14
Review	66	1,04
Σ	6367	100



Graf 8 Počet příspěvků jednotlivých států o metodě PCR-RFLP ve sledovaných letech 2000–2010.

Tab. 18 Celkový počet příspěvků o metodě PCR-RFLP ve sledovaných letech.

Rok	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Počet příspěvků	318	369	402	442	488	544	610	705	828	880	773

Tabulka 18 ukazuje, že obliba této metody vzrůstá. Zřejmě je to způsobeno tím, že metoda je nenáročná a našla své využití např. v prenatální diagnostice. Ve forenzní genetice byla metoda použita ve 27 případech, např.: (1) Pro určení doby smrti pomocí PCR-RFLP (Schroeder, et al., 2003), (2) pro rozlišování DNA lidské a zvířecí (El-Sayed, et al., 2010). V geriatrii byla tato metoda použita např.: (1) Při zkoumání délky života (Ross, et al., 2001), (2) genetický vliv na hustotu kostní hmoty (Mitra, et al., 2006).

5.2.9 Mnohonásobná (“Multiplex”) PCR

5.2.9.1 Popis metody *Multiplex PCR*:

Mnohonásobná PCR je taková varianta PCR, kdy je do reakční směsi přidáno několik párů primerů rozpoznávajících několik rozdílných cílových sekvencí, což umožňuje detekci několika genů současně v jedné reakční směsi. Reakční podmínky pro současnou amplifikaci všech produktů je nutno empiricky, krok za krokem optimalizovat. Hlavní výhodou této varianty jsou nižší cenové náklady než při samostatných amplifikacích a proto se používá pro vyhledávání změn na dlouhých úsecích DNA nebo testování vzájemně nesouvisejících oblastí DNA. Příkladem využití mnohonásobné PCR je diagnóza Duchennovy muskulární dystrofie (Šmarda, 2008, s. 85).

5.2.9.2 Výhody metody “*Multiplex*” PCR:

- Detekce několika genů současně.
- Nižší cenové náklady.

5.2.9.3 Nevýhody metody “*Multiplex*” PCR:

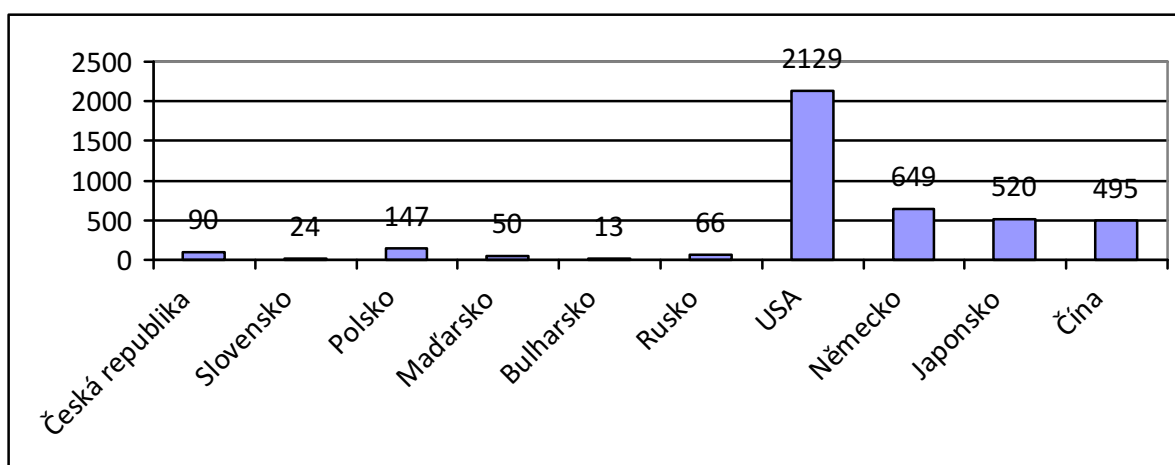
- Reakční podmínky je nutno sjednotit.

5.2.9.4 Analýza využívání metody Multiplex PCR:

Dle WOS byla metoda Multiplex-PCR použita v 8398 případech. Tato metoda byla použita např. v těchto odvětvích: Genetika, mikrobiologie, virologie, onkologie, imunologie, patologie, hematologie, farmakologie, veřejné zdravotnictví, gynekologie a porodnictví, interna, pediatrie, endokrinologie, gastroenterologie, urologie, radiologie, ortopedie.

Tab. 19 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu Multiplex PCR v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010.

Typ příspěvku	Celkový počet	Procentuální počet
Článek	7328	88,55
Příspěvek z konference	741	8,95
Review	207	2,50
Σ	8276	100



Graf 9 Počet příspěvků jednotlivých států o metodě Multiplex PCR ve sledovaných letech 2000–2010.

Tab. 20 Celkový počet příspěvků o metodě Multiplex PCR ve sledovaných letech.

Rok	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Počet článků	369	417	464	603	669	748	749	1010	996	1146	1171

Obliba této metody vzrůstá. Podle mého názoru je to zapříčiněno hlavně tím, že jsou nižší cenové náklady a zároveň je možno detekovat několik genů současně. Ve forenzní genetice byla tato metoda použita v 331 případech, např.: (1) Pro identifikaci DNA z tělních tekutin (Juusola, Ballantyne, 2005), (2) rychlé určení krevní skupiny v systému ABO (Lee, et al., 2009), (3) prenatální vyšetřování plodu na dědičná onemocnění (Dongling, et al., 2009), (4) identifikace novorozenců (Alvarez, Ballantyne, 2006), (5) aplikace metody v identifikaci lidí (Walker, et al., 2005). Ve veřejném zdravotnictví byla tato metoda použita např.: (1) Pro stanovení adenoviru ve vzorcích vod (Jiang, et al., 2009), (2) podíl infekce *E. coli* u akutních průjmů (Anvikar, et al., 2008), (3) rychlá detekce parazitů způsobujících malárii (Padley, et al., 2003).

5.2.10 Nested PCR

5.2.10.1 Popis metody Nested PCR:

Nested PCR (odstupňovaná PCR) je vysoce citlivá metoda PCR využívající vnějších a vnitřních primerů, která umožňuje detekovat i jedinou molekulu templátové DNA. Provádí se ve dvou krocích: (1) amplifikace templátové DNA zahrnující 15–30 cyklů s jedním párem tzv. vnějších primerů, (2) amplifikace produktu z prvního kroku pomocí páru tzv. vnitřních primerů. Tento krok zahrnuje dalších 15–30 cyklů a po jeho dokončení se produkt detekuje pomocí elektroforézy (Vlášková, Trešlová, 2008, s. 17).

5.2.10.2 Nevýhody metody Nested PCR:

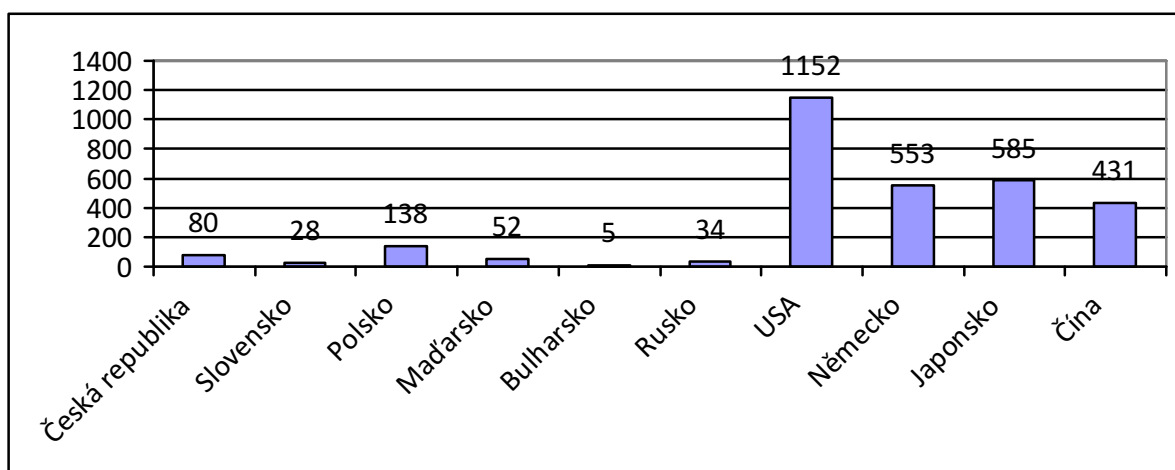
- Druhý krok vyžaduje přísné podmínky.
- Riziko kontaminace při přenosu z jedné reakce do druhé.

5.2.10.3 Analýza využívání metody Nested PCR:

Dle WOS byla metoda Nested PCR použita v 6304 případech. Odvětví, v nichž byla metoda použita: Genetika, mikrobiologie, virologie, onkologie, imunologie, veřejné zdravotnictví, patologie, hematologie, gastroenterologie, vnitřní lékařství, gynekologie a porodnictví, farmakologie, pediatrie, endokrinologie, urologie, toxikologie, psychiatrie, radiologie.

Tab. 21 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu Nested PCR v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010.

Typ příspěvku	Celkový počet	Procentuální počet
Článek	5733	91,61
Příspěvek z konference	462	7,38
Review	63	1,01
Σ	6258	100



Graf 10 Počet příspěvků jednotlivých států o metodě Nested PCR ve sledovaných letech 2000–2010.

Tab. 22 Celkový počet příspěvků o metodě Nested PCR ve sledovaných letech.

Rok	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Počet článků	484	528	508	568	553	573	530	605	676	640	593

Použití této metody se drží na relativně stejné úrovni. Domnívám se, že je to způsobeno především nevýhodami této metody. Ve forenzní genetice byla metoda Nested PCR použita ve 13 případech, např.: (1) Pro průkaz mikroorganismů v aortálních chlopních (Nilsson, et al., 2005), (2) pro detekci ženské složky ve smíšené krvi (Robino, et al., 2004), (3) hodnocení DNA u určité, místně omezené části populace (Dimo-Simonin, et al., 2000). Ve veřejném zdravotnictví byla metoda použita např.: (1) Pro detekci *H. pylori* z bioptických tkání (Ottiwet, et al., 2010), (2) stanovení resistance vůči antimalaritické terapii (Zhang, et al., 2009), (3) využití metody v detekci mimoplicní formy TBC (Garcia-Elorriaga, et al., 2009), (4) stanovení podtypů viru HIV (Yirrell, et al., 2008), (5) detekce *Salmonelly* z krve, moči a stolice (Hatta, Smits, 2007), (6) vyšetření těhotných žen na *Toxoplasmozu* (Nimri, et al., 2004).

5.2.11 Polymorfismus délky jednoduchých repetitivních sekvencí

5.2.11.1 Popis metody SSLP-PCR:

Další vybranou metodou je polymorfismus délky jednoduchých repetitivních sekvencí (SSLP-PCR). Jednoduché repetitivní sekvence jsou tandemové repetice (např. mikrosatelity) přítomné v eukaryotických genomech s četností až 80 kopií. V důsledku mutací nebo rekombinací se počet těchto repeticí může zvýšit nebo snížit. Jelikož je mezi jedinci počet repeticí značně variabilní, výsledkem amplifikace je vznik různě dlouhých PCR produktů. Rozdílů v délce fragmentů genomové DNA podmíněné přítomností jednoduchých repetitivních sekvencí se používá k odlišení blízce příbuzných jedinců a k detekci vztahů mezi nimi zejména v genetice populací (Šmarda, 2008, s. 99).

5.2.11.2 Nevýhody metody SSLP-PCR:

- Je nutno navrhovat vždy novou sadu primerů.

5.2.11.3 Výhody metody SSLP-PCR:

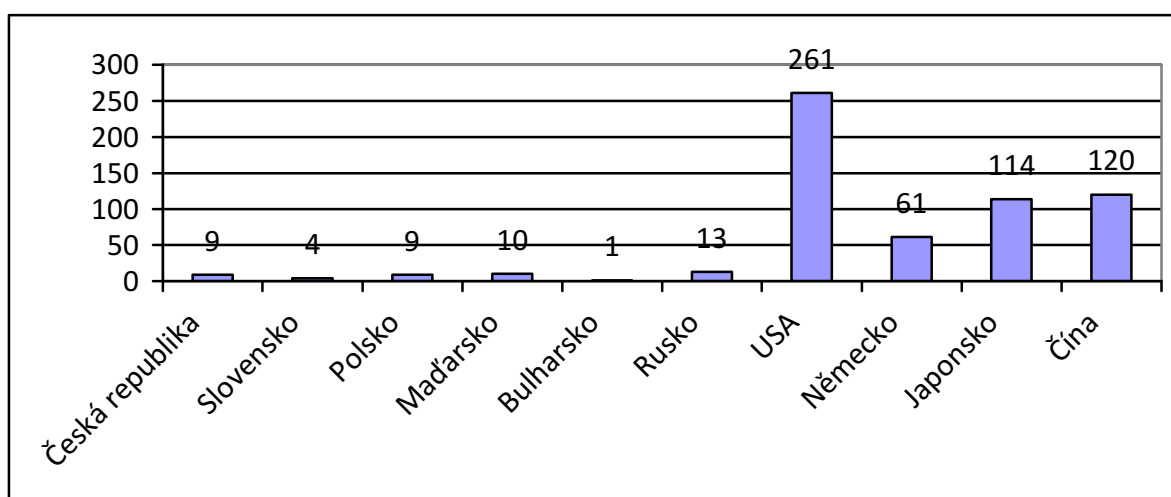
- Využití v genetice poulací.

5.2.11.4 Analýza využívání metody SSLP-PCR:

Dle WOS byla metoda SSLP-PCR použita v 876 případech. Mezi odvětví, v nichž byla metoda použita, patří: Genetika, mikrobiologie, parazitologie, imunologie, onkologie, farmakologie, veřejné zdravotnictví, endokrinologie, patologie, hematologie, toxikologie, geriatric, interna, urologie.

Tab. 23 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu SSLP-PCR v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010.

Typ příspěvku	Celkový počet	Procentuální počet
Článek	818	93,81
Příspěvek z konference	34	3,90
Review	20	2,29
Σ	872	100



Graf 11 Počet příspěvků jednotlivých států o metodě SSLP-PCR ve sledovaných letech 2000–2010.

Tab. 24 Celkový počet příspěvků o metodě SSLP-PCR ve sledovaných letech.

Rok	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Počet článků	71	58	66	83	76	84	87	97	88	89	69

Z tabulky 24 vyplývá, že použití této metody se drží na konstantní úrovni. Domnívám se, že je to způsobeno hlavní nevýhodou metody, tedy nutností navrhovat vždy novou sadu primerů. Ve forenzní genetice byla tato metoda použita jen ve třech případech. Jako příklad uvádím druhovou determinaci z fosilních kosterních pozůstatků (Vural, et al., 2010) Ve veřejném zdravotnictví byla metoda použita např. pro určení vztahu mezi hladinami IGF (Insulin-like Growth Factor) a rizikem rakoviny prsu (Fletcher, et al., 2005).

5.2.12 DNA Microarrays

5.2.12.1 Popis metody DNA Microarrays:

Jedná se o metodu založenou na technologii DNA čipů („DNA Microarrays“). Využívá nepřímé metody sekvenování pomocí hybridizace (SBH). Jedná se o perspektivní a účinnou metodu varianty hybridizace prováděné prostřednictvím technologie DNA-čipů. Tato technologie byla optimalizována zejména pro stanovení jednonukleotidových polymorfismů v genomech, pro srovnávací sekvenování krátkých fragmentů DNA a pro analýzu exprese genů (Šmarda, 2008, s. 69). Znalost úplné sekvence genomu daného organismu umožňuje vytvořit čipy z malých fragmentů DNA, kterými lze identifikovat všechny možné otevřené čtecí rámce. Čipy pro úplný genom jsou v současné době k dispozici pro některé bakteriální kmeny a prvoky (Šmarda, 2008, s. 131). Technologie čipů je velmi nákladná. Nejen, že vyžaduje pořízení nákladné přístrojové techniky, ale také syntéza velkého počtu primerů i vlastní provedení PCR, jsou drahé. Jakmile je však příprava čipu ukončena, jsou další kroky podstatně levnější. Je výhodné, že lze snadno připravit mnoho kopií téhož čipu (Šmarda, 2008, s. 132).

5.2.12.2 Výhody metody DNA Microarrays:

- Tuto techniku lze použít pro testování přítomnosti mnoha specifických molekul DNA v buňkách rostoucích za různých podmínek (Šmarda, 2008, s. 131).
- Umožňuje zkoumat expresi všech genů jednoho organismu současně (Snustad, Simmons, 2009, s. 462).

5.2.12.3 Nevýhody metody DNA Microarrays:

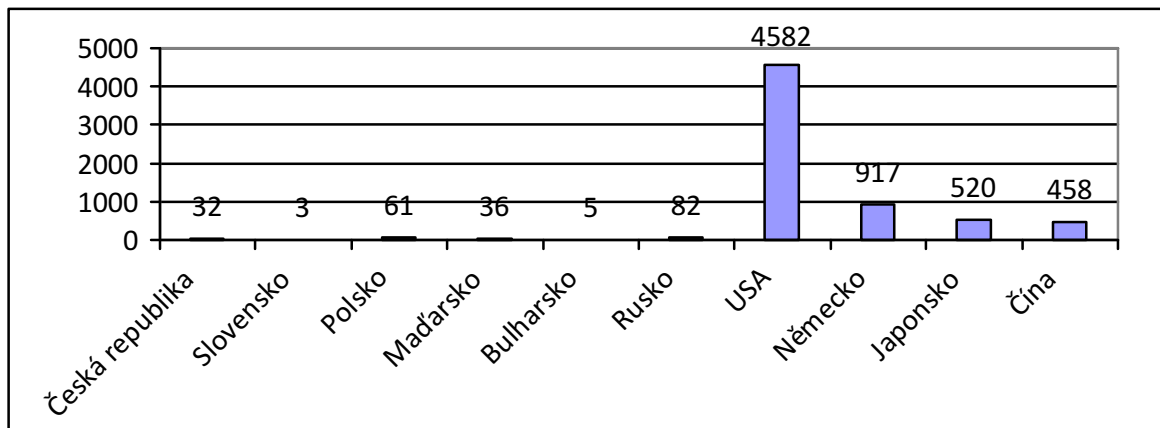
- Velmi nákladná metoda.

5.2.12.4 Analýza využívání metody DNA Microarrays:

Dle WOS byla metoda DNA Microarrays použita v 9309 případech. Zde uvádím některá odvětví, v nichž byla tato metoda použita: Genetika, onkologie, mikrobiologie, farmakologie, patologie, imunologie, toxikologie, hematologie, endokrinologie, gastroenterologie, urologie, gynekologie a porodnictví, interna, parazitologie, veřejné zdravotnictví, radiologie, psychiatrie, pediatrie, geriatric, anatomie.

Tab. 25 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu DNA Microarrays v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010.

Typ příspěvku	Celkový počet	Procentuální počet
Článek	6965	68,49
Review	1133	11,14
Příspěvek z konference	2071	20,37
Σ	10169	100



Graf 12 Počet příspěvků jednotlivých států o metodě DNA Microarrays ve sledovaných letech 2000–2010.

Tab. 26 Celkový počet příspěvků o metodě DNA Microarrays ve sledovaných letech.

Rok	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Počet článků	193	458	678	875	1066	1092	1153	1089	990	924	774

Z tabulky 26 vyplývá, že do roku 2007 docházelo k nárůstu použití této metody, po tomto roce došlo k mírnému poklesu. Metoda je výhodná pro její nesporná klady, k poklesu však podle mého názoru došlo proto, že se jedná o nákladnou metodu.

Ve forenzní genetice byla tato metoda použita ve 26 případech, např.: (1) Pro analýzu nukleových kyselin jako diagnostického a prognostického ukazatele (O'Driscoll, 2007), (2) pro vyšetření červených krvinek, bílých krvinek a destiček ve forenzní genetice (Wu, Csako, 2006). Ve veřejném zdravotnictví byla metoda užita např.: (1) Pro zjištění vlivu genetiky při studiu bakteriální resistance (Garza-Ramos, et al., 2009), (2) protektivní vliv těhotenství na rakovinu prsu (Russo, et al., 2008), (3) vyšetření genotoxicity v raném vývoji novorozence (Kisby, et al., 2006), (4) vliv alkoholu na vývoj plodu (Lee, et al., 2004), (5) aplikace metody ve výzkumu vlivu zaměstnání na zdraví (Koizumi, 2004).

6 ZÁVĚR

Téma své bakalářské práce „Základy metod forenzní genetiky“ jsem si vybrala proto, že mě osobně zajímalo a myslela jsem si, že by mohlo mít i další zájemce. V současné době existuje velké množství metod, které se využívají v genetice, proto jsem vytvořila jen stručný přehled některých vybraných metod a jejich modifikací. Mým záměrem bylo každou vybranou metodu stručně popsat, nastínit její principy, využití, výhody i nevýhody. Každou metodu jsem si vyhledala na stránkách Web of Science a snažila se podat přehled o četnosti jejího využití ve světě i u nás. Dále jsem u každé metody sledovala četnost využití v jednotlivých letech, a to od roku 2000 do roku 2010. Posledním sledovaným parametrem bylo publikování metody v odborných časopisech. Zajímalo mě, zda se jednalo o článek, nebo o příspěvek z odborné konference či o review.

Doufám, že se mi podařilo vytvořit srozumitelný přehled o metodách používaných v genetice a že případní zájemci o toto téma zde najdou určitý základ, ze kterého se dozví něco víc o tomto, dle mého názoru, opomíjeném oboru. Snad by se mohli tímto přehledem i inspirovat a pokračovat ve studiu dalších metod, případně rozšířit informace o metodách, zde uvedených.

Do přílohy jsem navíc přidala seznam pracovišť v České republice, která se zabývají právě vyšetřovacími metodami, které se využívají ve forenzní genetice. Seznam je to velmi stručný, ale pro ty, kteří by se chtěli dozvědět více konkrétních informací, nabízí alespoň přehled pracovišť, na která se mohou obrátit.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AKATSU, H., YAMAGATA, H. D., KAWAMATA, J., KAMINO, K., TAKEDA, M., YAMAMOTO, T., MIKI, T., TOOYAMA, I., SHIMOHAMA, S., KOSAKA, K. *Variations in the BDNF gene in autopsy-confirmed Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies in Japan*. Dementia and Geriatric cognitive disorders. 2006. 22. 3. 216–222.

ALVAREZ, M., BALLANTYNE, J. *The identification of newborns using messenger RNA profiling analysis*. Analytical Biochemistry. 2006. 357. 1. 21–34.

ANDERSON, S., HOWARD, B., HOBBS, G. R., BISHOP, C. P. *A method for determining the age of a bloodstain*. Forensic Science International. 2005. 148. 1. 37–45.

ANDREASSON, H.; ALLEN, M. *Rapid quantification and sex determination of forensic evidence materials*. Journal of Forensic Science. 2003. 48. 6. 1280–1287.

ANSLINGER, K., BAYER, B., MACK, B., EISENMENGER, W. *Sex-specific fluorescent labelling of cells for laser microdissection and DNA profiling*. International Journal of Legal Medicine. 2007. 121. 1. 54–56.

ANVIKAR, A. R., DOLLA, C., DUTTA, S., RAO, V. G., GADGE, V. S., SHUKLA, G. P., RAO, S., KARFORMA, C. *Role of Escherichia coli in acute diarrhoea in tribal preschool children of central India*. Paediatric and Perinatal Epidemiology. 2008. 22. 1. 40–46.

BÍLEK, K. *Analýza diferenciálně exprimovaných genů a validace referenčních genů u prasat*. Brno, 2008. 97 s. Dizertační práce na Mendelově zemědělské a lesnické univerzitě v Brně. Vedoucí disertační práce prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

BRDIČKA, R. *Lidský genom na rozhraní tisíciletí*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, spol. s r. o., 2001. 256 s. ISBN 80–2470–118–9.

CRETU, R., NEAGOS, D., BOHILTEA, R., STRUGARU, C., MUSTATA, A., BOHILTEA, L. C. *Chromosome Abnormalities in Prenatal Diagnosis*. Gineco RO. 2010. 6. 2. 94–100.

DALE, J. W.; VON SCHANTZ, M. *From Genes to Genomes*. England: John Wiley & Sons Ltd., 2002. 353 s. ISBN 0–471497827.

DIMO-SIMONIN, N., GRANGE, F., TARONI, F., BRANDT-CASADEVALL, C., MANGIN, P. *Forensic evaluation of mtDNA in a population from south west Switzerland*. International Journal of Legal Medicine. 2000. 113. 2. 89–97.

DONG-LING, T., YAN, L., XIN, Z., XIA, L., FANG, Z. *Multiplex fluorescent PCR for noninvasive prenatal detection of fetal-derived paternally inherited diseases using circula-*

tory fetal DNA in maternal plasma. Europia Journal of Obstetrics & Gynaecology and Reproductive Biology. 2009. 114. 1. 35–39.

DZIEGELEWSKI, M., SIMICH, J. P., RITTENHOUSE-OLSON, K. *Use of a Y chromosome probe as an aid in the forensic proof of sexual assault.* Journal of Forensic Science. 2002. 47. 5. 1187.

EL-SAYED, Y. S., MOHAMED, O. I., ASHRY, K. M., EL-RAHMAN, S. M. A. *Using species-specific repeat and PCR-RFLP in typing of DNA derived from blood of human and animal species.* Forensic Science Medicine and Patology. 2010. 6. 3. 158–164.

FLEMING, R. I.; HARBISON, S. *The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids.* Forensic Science International – Genetics. 2010. 4. 4. 244–256.

FLETCHER, O., GIBSON, L., JOHNSON, N., ALTMANN, D. R., HOLLY, J. M. P., ASHWORTH, A., PETO, J., SILVA, I. D. *Polymorphisms and circulating levels in the insulin-like growth factor system and risk of breast cancer: A systematic review.* Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2005. 14. 1. 2–19.

FU, Y., LI, A. F., SHI, J. J., TANG, M. N., GUO, Y. B., ZHAO, Z. H. *Lack of association of neprilysin gene polymorphisms with Alzheimer's disease in a southern Chinese community.* International Psychogeriatrics. 2009. 21. 2. 354–358.

GARCIA-ELORRIAGA , G., GRACIDA-OSORNO, C., CARRILLO-MONTES, G., GONZALES-BONILLA, C. *Clinical usefulness of the nested polymerase chain reaction in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis.* Salud Publica de Mexico. 2009. 51. 3. 240–245.

GARZA-RAMOS, U., SILVA-SANCHEZ, J., MARTINEZ-ROMERO, E. *Genetics and Genomics for the study of bacterial resistance.* Salud Publica de Mexico. 2009. 51. S439-S446.

GAUVIN, J., ZUBAKOV, D., van RHEE-BINKHORST, J., KLOOSTERMAN, A., STEEGERS, E., KAYSER, M. *Forensic pregnancy diagnostics with placental mRNA markers.* International Journal of Legal Medicine. 2010. 124. 1. 13–17.

GAZDOVÁ, V. *Identifikace SNPs asociovaných s produkcí masa u skotu.* Brno, 2007. 83 s. Dizertační práce na Mendelově zemědělské a lesnické univerzitě v Brně. Vedoucí disertační práce prof. Ing. Josef Dvořák, CSc.

GEHRIG, C., TEYSSIER, A. *Forensic DNA analysis.* Chimia. 2002. 56. 3. 71–73.

GEIGL, J. B., SPEICHER, M. R. *Single-cell isolation from cell suspensions and whole genome amplification from single cells to provide templates for CGH analysis.* Nature Protocols. 2007. 2. 12. 3173–3184.

GREGORY, S. G., CONNELLY, J. J., TOWERS, A. J., JOHNSON, J., BISCOCHO, D., MARKUNAS, C. A., LINTAS, C., ABRAMSON, R. K., WRIGHT, H. H., ELLIS, P., LANGFORD, C. F., WORLEY, G., DELONG, G. R., MURPHY, S. K., CUCCARO, M. L., PERSICO, A., PERICAK-VANCE, M. A. *Genomic and epigenetic evidence for oxytocin receptor deficiency in autism*. BMC Medicine. 2009. 7. 62.

HARPER, J. C.; BUI, T. H. *Pre-implantation genetic diagnosis*. Best Practice & Research in Clinical Obstetrics & Gynaecology. 2002. 16. 5. 659–670.

HATINA, J., SYKES, B. *Lékařská genetika: Problémy a přístupy*. 1. vydání. Praha 2 : Nakladatelství Akademie věd České republiky, 1999. 296 s. ISBN 80–200-0700–8.

HATTA, M., SMITS, H. L. *Detection of Salmonella typhi by nested polymerase chain reaction in blood, urine, and stool samples*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2007. 77. 2. 403.

HICKS, L. A., SHEPARD, C. W., BRITZ, P. H., ERDMAN, D. D., FISCHER, M., FLANNERY, B. L., PECK, A. J., LU, X. Y., THACKER, W. L., BENSON, R. F., TONDELLA, M. L., MOLL, M. E., WHITNEY, C. G., ANDERSON, L. J., FEIKIN, D. R. *Two outbreaks of severe respiratory disease in nursing homes associated with rhinovirus*. Journal of the American Geriatrics Society. 2006. 54. 2. 284–289.

HOHOFF, C., BRINKMANN, B. *Human identity testing with PCR-based systems*. Molecular Biotechnology. 1999. 13. 2. 123–136.

CHALUPOVÁ-KARLOVSKÁ, V. *Obecná biologie: Evoluce, biologie buňky, genetika*. 1. vydání. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, s r.o., 2004. 206 s. ISBN 80–7182-174–8.

ITZHAKI, R. E., WOZNIAK, M. A., APPELT, D. M., BALIN, B. *Infiltration of the brain by pathogens causes Alzheimer's disease*. Neurobiology of Aging. 2004. 25. 5. 619–627.

JENNER, T. L., MELLICK, A.S., HARRISON, G. J., GRIFFITHS, L. R., ROSE MEYER, R. B. *Age-related changes in cardiac adenosine receptor expression*. Mechanism of Aging and Development. 2004. 125. 3. 211–217.

JIANG, Sunny C., HAN, J. J., HE, J. W., CHU, W. P. *Evaluation of four cell lines for assay of infectious adenoviruses in water samples*. Journal of Water and Health. 2009. 7. 4. 650–656.

JUUSOLA, J., BALLANTYNE, J. *Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids*. Forensic Science International. 2005. 152. 1. 1–12.

KISBY, G. E., OLIVAS, A., STANDLEY, M., LU, X. F., PATTEE, P., O'MALLEY, J., LI, X. R., MUNIZ, J., NAGALLA, S. R. *Genotoxicants target distinct molecular networks in neonatal neurons*. Environmental Health Perspectives. 2006. 114. 11. 1703–1712.

KOČÁREK, E. *Genetika: Obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 1. vydání. Praha 6 : Scientia, spol. s r.o., 2004. 211 s. ISBN 80–7183-326–6.

KOČÁREK, E. Genetický kód. In ŠŤASTNÁ, Sylvie. *Vybrané aspekty lékařské genetiky*. Praha: [s. n.], 2008. s. 97. CZ.04.3.07/3.2.01.2/2048.

KOČÁREK, E. Molekulární podstata a identifikace polymorfismů DNA. In ŠŤASTNÁ, Sylvie. *Vybrané aspekty lékařské genetiky*. Praha: [s. n.], 2008. s. 97. CZ.04.3.07/3.2.01.2/2048.

KOIZUMI, S. *Application of DNA microarrays in occupational health research*. Journal of Occupational Health. 2004. 46. 1. 20–25.

KOPECKÁ, M., et al. *Lékařská biologie: Část druhá – genetika*. 2. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2001. 64 s. ISBN 80–210-2670–7.

KRABCHI, K., GADJI, M., SAMASSEKOU, O., GREGOIRE, M. C., FOREST, J. C., DROUIN, R. *Quantification of fetal nucleated cells in maternal blood of pregnant women with a male trisomy 21 fetus using molecular cytogenetic techniques*. Prenatal Diagnosis. 2006. 26. 1. 28–34.

KWACK, S. J., LEE, R. D., KIM, S. S., RHEE, G. S., SEOK, J. H., CHAE, S. Y., KANG, J. S., JU, H. Y., LEE, S. H., CHO, D. H. *Differential gene profiles in developing embryo and fetus after in utero exposure to ethanol*. Toxicology Letters. 2005. 158. S126-S127.

LECLAIR, Benoit, SHALER, R., CARMODY, G. R., ELIASON, K., HENDRICKSON, B. C., JUDKINS, T., NORTON, M. J., SEARS, C., SCHOLL, T. *Bioinformatics and human identification in mass fatality incidents: The world trade center disaster*. Journal of Forensic Sciences. 2007. 52. 4. 806–819.

LEE, H. Y., PARK, M. J., KIM, N. Y., SIM, J. E., YANG, W. I., SHIN, K. J. *Simple and highly effective DNA extraction methods from old skeletal remains using silica columns*. Forensic Science International-Genetics. 2010. 4. 5. 275–280.

LEE, S. H., PARK, G., YANG, Y. G., LEE, S. G., KIM, S. W. *Rapid ABO Genotyping Using Whole Blood without DNA Purification*. Korean Journal of Laboratory Medicine. 2009. 29. 3. 231–237.

LENER, T., MOLL, P. R., RINNERHALER, M., BAUER, J., ABERGER, F., RICHTER, K. *Expression profiling of aging in the human skin*. Experimental Gerontology. 2006. 41. 4. 387–397.

LIRON, J. P., RIPOLI, M. V., GARCIA, P. P., GIOVAMBATTISTA, G. *Assignment of paternity in a judicial dispute between two neighbor Holstein dairy farmers*. Journal of Forensic Science. 2004. 49. 1. 96–98.

LIU, P., YEUNG, S. H. I., CRENSHAW, K. A., CROUSE, C. A., SCHERER, J. R., MATHIES, R. A. *Real-time forensic DNA analysis at a crime scene using a portable microchip analyzer*. Forensic Science International – Genetics. 2008. 2. 4. 301–309.

LORENTE, J. A., ENTRALA, C., ALVAREZ, J. C., ARCE, B., HEINRICHS, B., LORENTE, M., CARRASCO, F., BUDOWLE, B., VILLANUEVA, E. *Identification of missing persons: The Spanish "Phoenix" Program*. Croatian Medical Journal. 2001. 42. 3. 267–270.

MAEDA, H., ZHU, B. L., ISHIKAWA, T., MICHIE, T. *Forensic molecular pathology of violent deaths*. Forensic Science International. 2010. 203. 1–3. 83–92.

MATAR, G. M., ABDO, D., KHNEISSER, I., YOUSSEF, M., ZOUHEIRY, H., ABDELNOUR, G., HARAKEH, H. S. *The multiplex-PCR-based detection and genotyping of diarrhoeagenic Escherichia coli in diarrhoeal stools*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 2002. 96. 3. 317–324.

MISSO, M. L., JANG, C., ADAMS, J., TRAN, J., MURATA, Y., BELL, R., BOON, W. C., SIMPSON, E. R., DAVIS, S. R. *Differential expression of factors involved in fat metabolism with age and the menopause transition*. Maturitas. 2005. 51. 3. 299–306.

MITRA, S., DESAI, M., KHATKHATAY, M. I. *Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in postmenopausal Indian women*. Maturitas. 2006. 55. 1. 27–35.

MONTENEGRO, Y., RAMIREZ-CASTRO, J. L., ISAZA, L. F., BEDOYA, G., MUNETON-PENA, C. M. *Microsatellite instability among patients with colorectal cancer*. Revista Medica de Chile. 2006. 134. 10. 1221–1229.

NAKAMURA, H., MURO, T., IMAMURA, S., YUASA, I. *Forensic species identification based on size variation of mitochondrial DNA hypervariable regions*. International Journal of Legal Medicine. 2009. 123. 2. 177–184.

NAKAMURA, Y. *DNA variations in human and medical genetics: 25 years of my experience*. Journal of Human Genetics. 2009. 54. 1. 1–8.

NAPOLIONI, V., LUCARINI, N. *Gender-specific association of ADA genetic polymorphism with human longevity*. Biogerontology. 2010. 11. 4. 457–462.

NICKLAS, J. A., BUEL, E. *Development of Alu PCR and Alu real-time PCR methods for quantitation of human DNA in forensic samples*. American Journal of Human Genetics. 2002. 71. 4. 384.

NILSSON, K., LIU, A., PAHLSON, C., LINDQUIST, O. *Demonstration of intracellular microorganisms (Rickettsia spp., Chlamydia pneumoniae, Bartonella spp.) in pathological human aortic valves by PCR*. Journal of Infection. 2005. 50. 1. 46–52.

NIMRI, L.; PELLOUX, H.; ELKHATIB, L. *Detection of Toxoplasma gondii DNA and specific antibodies in high-risk pregnant women*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2004. 71. 6. 831–835.

NOVOTNÁ, D., CHUDOBA, D. In situ hybridizace, FISH. In ŠŤASTNÁ, Sylvie. *Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice*. Praha: [s. n.], 2008. s. 50. CZ.04.3.07/3.2.01.2/2048.

NUSSBAUM, R. L. MCINNES, R. R., WILLARD, H. F. *Klinická genetika*. 1. vydání. Praha 10 : Nakladatelství Triton, 2004. 426 s. ISBN 80–7254–475–6.

O'DRISCOLL, L. *Extracellular nucleic acids and their potential as diagnostic, prognostic and predictive biomarkers*. Anticancer Research. 2007. 27. 3A. 1257–1265.

OPEL, K. L., FLEISHAKER, E. L., NICLAS, J. A., BUEL, E., MCCORD, B. R. *Evaluation and quantification of nuclear DNA from human telogen hairs*. Journal of Forensic Science. 2008. 53. 6. 1501.

OTTIWET, O., CHOMVARIN, C., CHAICUMPAR, K., NAMWAT, W., MAIRIANG, P. *Nested polymerase chain reaction for detection of Helicobacter Pylori in gastric biopsy specimens*. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 2010. 41. 6. 1423–1431.

PADLEY, D., MOODY, A. H., CHIODINI, P. L., SALDANHA, J. *Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 2003. 97. 2. 131–137.

PASSALACQUA, C., CASTILLO TAUCHER, S. *Genetic markers in essential hypertension*. Revista Medica de Chile. 2010. 138. 6. 767–772.

PELLESTOR, F., ANAHORY, T., HAMAMAH, S. *The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures*. Human Reproduction Update. 2005. 11. 1. 15–32.

PITRA, C., LIECKFELDT, D. *Molecular-forensic contribution to the conviction of an alleged poacher: A case report*. Zeitschrift für Jagdwissenschaft. 1999. 45. 4. 270–275.

PRITCHARD, D. J., KORF, B. R. *Základy lékařské genetiky*. 1. vydání. Praha 5 : Galén, 2007. 182 s. ISBN 978–80-7262–449-2.

RESHEF, A., BRAUNER, P., SHPITZEN, M., GALLILI, N., MARBACH, A., MOTRO, U., SHMUELI, E., MEINER, V. *Chorionic villus sampling prior to pregnancy termination, a tool for forensic paternity testing*. Journal of Forensic Sciences. 1999. 44. 5. 1065–1068.

ROBINO, C., GINO, S., TORRE, C. *Human X-chromosome inactivation assay for the detection of female minor component in male/female mixed bloodstains*. *Progress in Forensic Genetics* 10. 2004. 1261. 293–295.

ROSS, O. A., MCCORMACK, R., CURRAN, M. D., DUGIUD, R. A., BARNETT, Y. A., REA, I. M., MIDDLETON, D. *Mitochondrial DNA polymorphism: its role in longevity of the Irish population*. *Experimental Gerontology*. 2001. 36. 7. 1161–1178.

ROSYPAL, S., et al. *Nový přehled biologie*. 1. vydání. Praha 6 : Scientia, spol. s r.o., 2003. 797 s. ISBN 80–7183-268–5.

ROSYPAL, S.. *Úvod do molekulární biologie: První díl*. Druhé rozšířené vydání. Brno: [s. n.], 1997. 270 s. ISBN nemá.

ROSYPAL, S. *Úvod do molekulární biologie: Druhý díl*. Druhé rozšířené vydání. Brno: [s. n.], 1997. 270 s. ISBN nemá.

ROSYPAL, S.. *Úvod do molekulární biologie: Třetí díl*. Druhé rozšířené vydání. Brno: [s. n.], 1997. 270 s. ISBN nemá.

RUAN , L., ZHAO , H. A., LI, Q. C. *Multicolor Real-Time PCR Genotyping of ABO System Using Displacing Probes*. *Journal of Forensic Science*. 2010. 55. 1. 19–24.

RUSSO , J., BALOGH, G. A., RUSSO, I. H. *Full-term pregnancy induces a specific genomic signature in the human breast*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2008. 17. 1. 51–66.

SALLES , N., MENARD, A., GEORGES, A., SALZMANN, M., DE LEDINGHEN, V., DE MASCAREL, A., EMERIAU, J. P., LAMOULIATTE, H., MEGRAUD, F. *Effects of Helicobacter pylori infection on gut appetite peptide (leptin, ghrelin) expression in elderly inpatients*. *Journal of Gerontology Series A – Biological Sciences and Medical Sciences*. 2006. 61. 11. 1144–1150.

SHAO , L., MARTIN, M. V., WATSON, S. J., SCHATZBERG, A., AKIL, H., MYERS, R. M., JONES, E. G., BUNNEY, W. E., VAWTER, M. P. *Mitochondrial involvement in psychiatric disorders*. *Annals of Medicine*. 2008. 40. 4. 281–295.

SHINTANI-ISHIDA, K., ZHU, B. L., MAEDA, H., UEMURA, K., YOSHIDA, K. I. *A new method for ABO genotyping to avoid discrepancy between genetic and serological determinations*. *International Journal of Legal Medicine*. 2008. 122. 1. 7–9.

SCHROEDER, H., KLOTZBACH, H., ELIAS, S., AUGUSTIN, C., PUESCHEL, K. *Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses*. *Forensic Science International*. 2003. 132. 1. 76–81.

SCHULTZE, J. L. *Requirements for the development of molecularly defined targeted therapy in oncology*. Medizinische Klinik. 2006. 101. 8. 617–623.

SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M. J. *Genetika*. 1. vydání. Masarykova univerzita: [s. n.], 2009. 871 s. ISBN 978–80-210–4852-2.

STEVENS-SIMON, C., NELLIGAN, D., BREESE, P., JENNY, C., DOUGLAS, J. M. *The prevalence of genital human papillomavirus infections in abused and nonabused preadolescent girls*. Pediatrics. 2000. 106. 4. 645–649.

STOWE, R. P., KOZLOVA, E. V., YETMAN, D. L., WALLING, D. M., GOODWIN, J. S., GLASER, R. *Chronic herpesvirus reactivation occurs in aging*. Experimental Gerontology. 2007. 42. 6. 563–570.

SUTLOVIC, D., GOJANOVIC, M. D., ANDELINOVIC, S. *Rapid extraction of human DNA containing humic acid*. Croatia Chemica Acta. 2007. 80. 1. 117–120.

ŠMARDA, J., et al. *Metody molekulární biologie*. 1. vydání. Masarykova univerzita: [s. n.], 2008. 188 s. ISBN 978–80-210–3841-7.

TANAKA, M., YOSHIMOTO, T., NOZAWA, H., OHTAKI, H., KATO, Y., SATO, K., YAMAMOTO, T., TAMAKI, K., KATSUMATA, Y. *Usefulness of a toothbrush as a source of evidential DNA for Typing*. Journal of Forensic Sciences. 2000. 45. 3. 674–676.

TURCHI, C., PESARESI, M., ALESSANDRINI, F., ONOFRI, V., ARSENI, A., TAGLIABRACCI, A. *Unusual association of three rare alleles and a mismatch in a case of paternity testing*. Journal of Forensic Sciences. 2004. 49. 2. 260–262.

VANNESTE, E., MELOTTE, C., DEBROCK, S., D'HOOGHE, T., BREMS, H., FRYNS, J. P., LEGIUS, E., VERMEESCH, J. R. *Preimplantation genetic diagnosis using fluorescent in situ hybridization for cancer predisposition syndromes caused by microdeletions*. Human Reproduction. 2009. 24. 6. 1522–1528.

VLÁŠKOVÁ, H., TREŠLOVÁ, H. PCR. In ŠŤASTNÁ, Sylvie. *Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice*. Praha: [s. n.], 2008. s. 50. CZ.04.3.07/3.2.01.2/2048.

VLÁŠKOVÁ, H., TREŠLOVÁ, H. Varianty PCR. In ŠŤASTNÁ, Sylvie. *Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice*. Praha: [s. n.], 2008. s. 50. CZ.04.3.07/3.2.01.2/2048.

VLÁŠKOVÁ, H., TREŠLOVÁ, H. Restrikční analýzy. In ŠŤASTNÁ, Sylvie. *Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice*. Praha: [s. n.], 2008. s. 50. CZ.04.3.07/3.2.01.2/2048.

VURAL, H. C. *Quantification and presence of human ancient DNA in burial place remains of Turkey using real time polymerase chain reaction*. African Journal of Biotechnology. 2009. 8. 20. 5163–5168.

VURAL, H. C., TIRPAN, A. A. *Species determination of ancient bone DNA from fossil skeletal remains of Turkey using molecular techniques*. Scientific Research and Essays. 2010. 5. 16. 2250–2256.

WALKER, J. A., KILROY, G. E., XING, J., SHEWALE, J., SINHA, S. K., BATZER, M. A. *Human DNA quantitation using Alu element-based polymerase chain reaction*. Analytical Biochemistry. 2003. 315. 1. 122–128.

WALKER, J. A., HEDGES, D. J., PERODEAU, B. P., LANDRY, K. E., STOILOVA, N., LABORDE, M. E., SHEWALE, J., SINHA, S. K., BATZER, M. A. *Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous quantitation of human nuclear, mitochondrial, and male Y-chromosome DNA: application in human identification*. Analytical Biochemistry. 2005. 337. 1. 89–97.

WALSH, E. E., COX, C., FALSEY, A. R. *Clinical features of influenza A virus infection in older hospitalized persons*. Journal of the American Geriatrics Society. 2002. 50. 9. 1498–1503.

WARD, K. J. *Genetic factors in recurrent pregnancy loss*. Seminars in Reproductive Medicine. 2000. 18. 4. 425–432.

WU, Y. Y., CSAKO, G. *Rapid and/or high-throughput genotyping for human red blood cell, platelet and leukocyte antigens, and forensic applications*. Clinica Chimica Acta. 2006. 363. 1–2. 165–176.

YIRRELL, D. L., SHAW, L., CAMPBELL, E., BURNS, S. M., CAMERON, S. O., GOLDBERG, D. *HIV subtypes in Scotland, 2000–2006*. Epidemiology and Infection. 2008. 136. 8. 1069–1075.

ZHANG, G. Q., GUAN, Y. Y., ZHENG, B., WU, S., TANG, L. H. *Molecular assessment of Plasmodium falciparum resistance to antimalarial drugs in China*. Tropical Medicine & International Health. 2009. 14. 10. 1266–1271.

ZOU, H. Z., HARRINGTON, J. J., KLATT, K. K., AHLQUIST, D. A. *A sensitive method to quantify human long DNA in stool: Relevance to colorectal cancer screening*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2006. 15. 6. 1115–1119.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	adenin
ABO	system krevních skupin
ADA	adenosin - deamináza
Al	Alanin
ARMS	mutacím vzdorující (refrakterní) amplifikace
ASO	alelově specifický oligonukleotid
ATP	adenosintrifosfát
BRCA	breast cancer (rakovina prsu)
C	cytosin
CGH	komparativní genová hybridizace
COOH	aminokyselinový karboxyl
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E. coli	Escherichia coli
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
G	guanin
H. pylori	Helicobacter pylori
HIV	virus lidského imunodeficitu
His	Histidin
hnRNA	heterogenní jaderná RNA
IGF	Insulin - like Growth Factor
mRNA	mediátorová RNA
nm	nanometr
NTP	nukleotidtrifosfát
OH	hydroxylová skupina
pb	pár bází
PCR	polymerázová řetězová reakce
PCR - RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů u produktů PCR
pH	kyselost (potential of hydrogen)

pre - mRNA	prekurzorová mediátorová RNA
pre - rRNA	prekurzorová ribozomová RNA
pre - tRNA	prekurzorová transferová RNA
PRINS	primed in situ hybridization
REA	restrikční endonukleázová analýza
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomová RNA
RT - PCR	reverzní transkripce polymerázové řetězové reakce
SBH	sekvencování pomocí hybridizace
Ser	Serin
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
SRFH	selektivní hybridizace restrikčních fragmentů
SSCP	polymorfismus konformace jednořetězců
SSLP - PCR	polymorfismus délky jednoduchých repetitivních sekvencí
STR	short tandem repeats
T	tymin
TBC	tuberkulóza
tRNA	transferová RNA
U	uracil
UV záření	ultrafialové záření
VNTR	tandemové repetice o variabilním počtu
WOS	Web of Science

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr.1: Vodíkové vazby

Obr. 2: Čtení genetického kódu

Obr. 3: Úvodní strana Web of science

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Diploidní počty chromozomů některých živočišných a rostlinných druhů

Tab. 2 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu FISH v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010

Tab. 3 Celkový počet příspěvků o metodě FISH ve sledovaných letech

Tab. 4 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu RFLP v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010

Tab. 5 Celkový počet příspěvků o metodě RFLP ve sledovaných letech

Tab. 6 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu sekvenování DNA v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010

Tab. 7 Celkový počet příspěvků o metodě sekvenování DNA ve sledovaných letech

Tab. 8 Využití PCR a jejích modifikací ve výzkumu a praxi

Tab. 9 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu PCR v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010

Tab. 10 Celkový počet příspěvků o metodě PCR ve sledovaných letech

Tab. 11 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu Real-time PCR v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010

Tab. 12 Celkový počet příspěvků o metodě Real-time PCR ve sledovaných letech

Tab. 13 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu Alu-PCR v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010

Tab. 14 Celkový počet příspěvků o metodě Alu-PCR ve sledovaných letech

Tab. 15 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu PRINS v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010

Tab. 16 Celkový počet příspěvků o metodě PRINS ve sledovaných letech

Tab. 17 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu PCR-RFLP v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010

Tab. 18 Celkový počet příspěvků o metodě PCR-RFLP ve sledovaných letech

Tab. 19 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu multiplex PCR v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010

Tab. 20 Celkový počet příspěvků o metodě multiplex PCR ve sledovaných letech

Tab. 21 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu Nested-PCR v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010

Tab. 22 Celkový počet příspěvků o metodě Nested-PCR ve sledovaných letech

Tab. 23 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu SSLP-PCR v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010

Tab. 24 Celkový počet příspěvků o metodě SSLP-PCR ve sledovaných letech

Tab. 25 Počet publikovaných příspěvků využívajících metodu DNA microarrays v impaktovaných časopisech dle WOS za roky 2000–2010

Tab. 26 Celkový počet příspěvků o metodě DNA microarrays ve sledovaných letech

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Seznam laboratoří zabývajících se forenzní genetikou v České republice

PŘÍLOHA P I: SEZNAM LABORATOŘÍ ZABÝVAJÍCÍ SE FORENZNÍ GENETIKOU V ČESKÉ REPUBLICE

Pracoviště	Fakultní nemocnice Ostrava
Oddělení	DNA laboratoř, Krevní centrum
Nemoc	Identifikace osob, paternitní expertízy
Lokus	VNTR, STR, DNA-fingerprinting
Pracoviště	Genetika Plzeň, s.r.o. (AKR ČIA 8034)
Oddělení	Molekulárně-genetická laboratoř
Nemoc	Identifikace osob, paternitní expertízy
Lokus	VNTR, STR, DNA-fingerprinting
Pracoviště	Genexpress s.r.o., (CERT dle normy ISO 9001:2001)
Oddělení	Laboratoř molekulární genetiky
Nemoc	Identifikace osob, paternitní expertízy
Lokus	VNTR, STR, DNA-fingerprinting
Pracoviště	GENNET s.r.o., (AKR.ČIA 8068)
Oddělení	Laboratoř molekulární genetiky
Nemoc	Identifikace osob, paternitní expertízy
Lokus	VNTR, STR, DNA-fingerprinting
Pracoviště	Genomac International, s.r.o.
Oddělení	Laboratoř molekulární genetiky a onkologie
Nemoc	Identifikace osob, paternitní expertízy
Lokus	VNTR, STR, DNA-fingerprinting

Pracoviště	GENvia, s.r.o. (AKR ČIA 8006)
Oddělení	Laboratoř lékařské genetiky
Nemoc	Identifikace osob, paternitní expertízy
Lokus	VNTR, STR, DNA-fingerprinting
Pracoviště	GHC Genetics Ltd., CERT TÜV SÜD Czech č. 3053, (CERT dle normy ISO 9001:2001, ISO/IEC 27001:2006)
Oddělení	
Nemoc	Identifikace osob, paternitní expertízy
Lokus	VNTR, STR, DNA-fingerprinting
Pracoviště	Laboratoř forenzní genetiky, spol. s r.o. (CERT 1835/2008, dle normy ISO 9001:2001)
Oddělení	Laboratoř forenzní genetiky
Nemoc	Identifikace osob, paternitní expertízy
Lokus	VNTR, STR, DNA-fingerprinting
Pracoviště	Masarykova nemocnice Ústí nad Labem, o.z. (CERT ISO9001:2008 – URS)
Oddělení	Transfuzní oddělení
Nemoc	Identifikace osob, paternitní expertízy
Lokus	VNTR, STR, DNA-fingerprinting
Pracoviště	Nemocnice České Budějovice, a.s.
Oddělení	Laboratoř molekulární biologie a genetiky
Nemoc	Identifikace osob, paternitní expertízy
Lokus	VNTR, STR, DNA-fingerprinting
Pracoviště	P&R LAB a.s. (AKR ČIA 8003)
Oddělení	Laboratoř molekulární biologie
Nemoc	Identifikace osob, paternitní expertízy
Lokus	VNTR, STR, DNA-fingerprinting

Pracoviště	Šiklův patologicko-anatomický ústav, FN Plzeň
Oddělení	Laboratoř molekulární biologie
Nemoc	Identifikace osob, paternitní expertízy
Lokus	VNTR, STR, DNA-fingerprinting

Pracoviště	Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN
Oddělení	Oddělení lékařské genetiky
Nemoc	Identifikace osob, paternitní expertízy
Lokus	VNTR, STR, DNA-fingerprinting

Pracoviště	Ústav imunologie, FN Olomouc, (CERT EFI 05-CZ-002.998)
Oddělení	HLA laboratoř
Nemoc	Identifikace osob, paternitní expertízy
Lokus	VNTR, STR, DNA-fingerprinting

Pracoviště	Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny, Olomouc (CERT 04/2008/AQ/PRG dle normy ISO 9001)
Oddělení	DNA laboratoř
Nemoc	Identifikace osob, paternitní expertízy
Lokus	VNTR, STR, DNA-fingerprinting

Pracoviště	Ústav soudního lékařství, detašované pracoviště FN u sv. Anny v Brně, (CERT ISO 9001:2001....1835/2008)
Oddělení	Laboratoř forenzní genetiky
Nemoc	Identifikace osob, paternitní expertízy
Lokus	VNTR, STR, DNA-fingerprinting