

MOLEKULÁRNÍ GENETIKA PRO BIOANALYTIKY

Martin Beránek



Molekulární genetiky pro bioanalytiku

Martin Beránek

Recenzovali:

prof. MUDr. Radim Brdička, DrSc.

doc. Ing. Karel Kotaška, Ph.D.

Vydala Univerzita Karlova v Praze

Nakladatelství Karolinum

jako učební text pro posluchače Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové

Praha 2016

Sazba Nakladatelství Karolinum

První vydání

© Univerzita Karlova v Praze, 2016

© Martin Beránek, 2016

ISBN 978-80-246-3224-7

ISBN 978-80-246-3246-9 (online : pdf)



Univerzita Karlova v Praze
Nakladatelství Karolinum 2016

www.karolinum.cz
ebooks@karolinum.cz

Obsah

Předmluva	9
1. Historické mezníky v rozvoji molekulární biologie a genetiky	10
2. Lékařská genetika a dědičně podmíněné choroby	14
2.1 Monogenně podmíněné choroby	14
2.1.1 Autosomálně dominantní choroby	14
2.1.2 Autosomálně recesivní choroby	15
2.1.3 Gonosomálně recesivní choroby	16
2.1.4 Gonosomálně dominantní choroby	17
2.2 Chromosomové aberace	18
2.3 Choroby s multifaktoriálním typem dědičnosti	18
2.4 Mitochondriální genetické choroby	19
3. Struktura a funkce nukleových kyselin	20
3.1 Základní informace o struktuře nukleových kyselin	20
3.2 Genofory jako nosiče genetické informace	21
3.3 Funkce molekul RNA v buňce	22
3.3.1 Kódující molekuly RNA	22
3.3.2 Malé nekódující molekuly RNA	23
3.3.3 Velké nekódující molekuly RNA	24
3.4 Gen jako základní jednotka genetické informace	24
3.5 Genové repetice	26
3.6 Genetický kód	26
4. Variabilita lidského genomu	28
4.1 Charakteristika genomu člověka	28
4.1.1 Jedinečné genomové sekvence	28
4.1.2 Repetitivní genomové sekvence	29
4.1.2.1 Tandemové repetice	29
4.1.2.2 Rozptýlené repetice	30
4.2 Faktory podmiňující variabilitu genomu	30
4.3 Koncepce pojmů mutace a genetický polymorfismus	31
4.4 Hardy-Weinbergova rovnováha a vazebná nerovnováha	32
4.4.1 Hardy-Weinbergův zákon	32
4.4.2 Faktory narušující Hardy-Weinbergovu rovnováhu	33
4.5 Typy genetického polymorfismu	33
4.6 Příčinné mutace	35
4.7 Názvosloví příčinných mutací	36
4.8 Vyšetření mutací a genetických polymorfismů	37
4.9 Epigenetické změny v lidském genomu	39

4.9.1	Methylace DNA	39
4.9.2	Methylace DNA a genetické choroby	40
5.	Izolace nukleových kyselin	41
5.1	Principy izolačních metod	41
5.1.1	Fenol-chloroformová extrakce	42
5.1.2	Vysolovací extrakční metoda	42
5.1.3	Guanidinová extrakční metoda	42
5.1.4	Extrakce pomocí separačních kolonek	42
5.1.4.1	Adsorpční extrakční mikrokolonky	42
5.1.4.2	Iontoměničové extrakční mikrokolonky	43
5.1.4.3	Mikroafinitní extrakční mikrokolonky	43
5.1.4.4	Extrakční kolonky na bázi ultrafiltrace a gelové filtrace	44
5.1.5	Extrakce NK pomocí separačních špiček	44
5.2	Specifické faktory ovlivňující účinnost extrakce molekul RNA	44
5.3	Purifikace molekul DNA a RNA	45
5.4	Charakteristika izolovaných a purifikovaných molekul NK	45
5.5	Archivace extraktů NK	47
5.6	Etické zásady při práci s nukleovými kyselinami	47
5.7	Nejčastější chyby při práci s NK a možnosti jejich prevence	48
6.	Reverzní transkripce	50
7.	Elektroforéza nukleových kyselin	52
7.1	Používaná separační média	52
7.1.1	Agarosové gely	52
7.1.2	Akrylamidové gely	53
7.2	Přístrojové vybavení pro elektroforézu NK	54
7.3	Vizualizace NK v elektroforetickém gelu	54
7.4	Aplikace vzorků NK do elektroforetických gelů	55
7.5	Kapilární elektroforéza v analýze nukleových kyselin	55
7.6	Klinické použití elektroforézy NK	56
8.	Význam klonování pro molekulárně genetické laboratoře	58
8.1	Přehled klonovacích technik	58
8.2	Inserty a vektory používané v molekulární genetice	59
8.3	Příprava rekombinantních molekul DNA	59
8.4	Techniky genového transferu	60
8.5	Testování úspěšnosti molekulárního klonování	60
8.6	Klinický význam molekulárního klonování	61
9.	Hybridizační metody v molekulární genetice	63
9.1	Klasifikace hybridizačních technik	64
9.2	Hybridizace na pevném podkladu	64
9.2.1	Southernův přenos	65
9.2.2	Alelově specifická hybridizace	66
9.2.3	Reverzní blotting	66
9.3	<i>In situ</i> hybridizace	68
9.3.1	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	69
9.3.2	Klinické aplikace FISH technologie	69
9.4	Výroba hybridizačních sond	70
10.	Čipové technologie v molekulární genetice	72
10.1	Dotykový tisk hotových sond (<i>ink jet printing</i>)	73
10.2	Fotolitografická výroba sond na čipu	73
10.3	Bezdotykový tisk sond (<i>ink jetting</i>)	74
10.4	Třídění čipů podle typu vyšetřované NK	74
10.4.1	Expresní čipy	74
10.4.2	Čipy pro vyšetření bodových mutací	74
10.4.3	Čipy pro komparativní genomovou hybridizaci	74

10.5 Trendy v oblasti čipové technologie	75
11. Polymerasová řetězová reakce	76
11.1 Polymerasy a polymerasová řetězová reakce	76
11.1.1 Termolabilní polymerasy	76
11.1.2 Polymerasová řetězová reakce	77
11.1.3 Termostabilní polymerasy	78
11.1.4 Katalytické vlastnosti DNA polymeras	79
11.2 Reakční směs k provedení standardní PCR	81
11.3 Reakční prostředí pro PCR	82
11.4 Termocykléry	82
12. Modifikace PCR pro molekulární genetiku	84
13. Real-time PCR	89
13.1 Přístroje pro real-time PCR	90
13.2 Analýza pomocí hydrolyzačních sond	90
13.2.1 Hydrolyzační sondy (TaqMan sondy) a real-time PCR	90
13.2.2 Systém Universal ProbeLibrary	92
13.3 Analýza pomocí hybridizačních sond	93
13.3.1 Hybridizační FRET sondy	93
13.3.2 Hybridizační sondy Molecular Beacons	94
13.3.3 Analýza pomocí sond SimpleProbes	94
13.3.4 Analýza pomocí sond Scorpions	94
13.4 Kvantitativní analýza pomocí real-time PCR	95
13.5 COLD real-time PCR	98
14. Digitální PCR	100
15. Amplifikační techniky založené na jiných enzymových reakcích	103
15.1 Metoda LCR	103
15.2 Metoda MLPA	104
15.3 Metody NASBA a TMA	105
15.4 Metody SDA	106
15.5 Metoda <i>Q-beta</i> replikasové amplifikace	107
15.6 Metoda bDNA	108
15.7 Metoda molekulární inverzní sondy	108
15.8 Metoda LAMP	109
15.9 Metoda MDA	111
15.10 Metoda NEAR	111
16. Analýza restrikčních fragmentů	113
16.1 Restrikční enzymy	113
16.2 Konstrukce restrikčních map	114
16.3 Restrikční analýza v molekulární genetice	115
16.4 Příprava restrikční směsi	117
17. Kontrola kvality v molekulární genetice	118
17.1 Kontrolní vzorky pro vnitřní kontrolu kvality	118
17.1.1 Negativní amplifikační kontrola	118
17.1.2 Pozitivní amplifikační kontrola	119
17.1.3 Inhibiční amplifikační kontrola	119
17.1.4 Vnitřní standardy v molekulární genetice	120
17.1.4.1 Vnitřní standard jako přídavek exogenní NK	120
17.1.4.2 Vnitřní standard realizovaný bez přídavku NK	120
17.2 Referenční kontrolní vzorky pro EHK	121
18. Screeningové metody v molekulární genetice	123
18.1 Analýza heteroduplexů na nedenačních elektroforetických gelech	124
18.2 Vyšetření heteroduplexů pomocí gradientové elektroforézy	124

18.3	Metoda jednořetězcového konformačního polymorfismu	126
18.4	Screeningová metoda založená na štěpení RNAsou A	126
18.5	HRM analýza	127
18.6	Přínos screeningových metod pro molekulární genetiku	127
19.	Sekvenování DNA – přehled tradičních sekvenačních metod	129
19.1	První pokusy o sekvenování fragmentů NK	130
19.2	Gilbertovo degradační sekvenování	131
19.3	Sangerovo syntetické sekvenování s dideoxynukleotidy	133
19.4	Automatizace Sangerova sekvenování	134
19.4.1	Sekvenační poloautomatické systémy	134
19.4.2	Automatické sekvenační systémy založené na kapilární elektroforéze	135
19.5	Metoda prodlužování primeru	137
19.6	Pyrosekvenování	137
19.7	Strategie sekvenování při analýze dlouhých úseků DNA	140
20.	Technologie sekvenování druhé generace	142
20.1	Příprava knihovny DNA	143
20.1.1	Fragmentace DNA	144
20.1.2	Oprava nezarovnaných konců fragmentů DNA	145
20.1.3	Připojení koncových adaptérů	146
20.1.3.1	Připojení adaptérů pomocí ligasy	146
20.1.3.2	Připojení adaptérů pomocí modifikovaných amplifikačních primerů	150
20.2	Klonální amplifikace sekvenovaných fragmentů	152
20.2.1	Klonální amplifikace pomocí <i>emulzní PCR</i>	153
20.2.2	Klonální amplifikace pomocí <i>bridge PCR</i>	155
20.3	Principy sekvenování druhé generace	157
20.3.1	Technologie <i>454</i>	157
20.3.1.1	Stručná historie technologie <i>454</i>	157
20.3.1.2	Proces sekvenování pomocí technologie <i>454</i>	157
20.3.1.3	Primární zpracování záznamu sekvenování <i>454</i>	158
20.3.1.4	Technologické možnosti sekvenování <i>454</i>	158
20.3.2	Technologie firmy Illumina	159
20.3.2.1	Stručná historie technologie Illumina	159
20.3.2.2	Průběh sekvenování pomocí technologie firmy Illumina	159
20.3.2.3	Primární zpracování záznamu sekvenování technologie Illumina	160
20.3.2.4	Technologické možnosti sekvenování systémů Illumina	160
20.3.3	Technologie <i>Two Base Encoding</i>	161
20.3.3.1	Stručná historie technologie <i>Two Base Encoding</i>	161
20.3.3.2	Průběh sekvenování pomocí technologie <i>Two Base Encoding</i>	161
20.3.3.3	Primární zpracování záznamu sekvenování <i>Two Base Encoding</i>	164
20.3.3.4	Technologické možnosti sekvenování <i>Two Base Encoding</i>	164
20.3.4	Technologie <i>Ion Torrent</i>	164
20.3.4.1	Stručná historie technologie <i>Ion Torrent</i>	164
20.3.4.2	Průběh sekvenování pomocí technologie <i>Ion Torrent</i>	165
20.3.4.3	Technologické možnosti sekvenování <i>Ion Torrent</i>	165
20.3.5	Technologie fluorogenního pyrosekvenování	166
20.4	Analýza sekvenačních dat u zařízení NGS	166
20.4.1	Hodnocení dat a strategie celogenomového sekvenování	167
20.4.2	Hodnocení dat a strategie sekvenování obohacených fragmentů	169
20.4.2.1	Obohacení fragmentů pomocí <i>long-range PCR</i>	169
20.4.2.2	Obohacení fragmentů pomocí <i>microdroplet PCR</i>	170
20.4.2.3	Obohacení fragmentů pomocí hybridizačních sond	170
20.4.3	Hodnocení dat a strategie při sekvenování RNA transkriptů	170
20.4.4	Strategie a význam ampliconového sekvenování	170
20.4.5	Strategie a význam NGS v epigenomice	172
20.5	Nevýhody technologie sekvenování druhé generace	173
21.	Technologie sekvenování třetí a vyšší generace	174
21.1	Obecná charakteristika sekvenačních systémů třetí a vyšší generace	174

21.2	Sekvenační zařízení typu <i>True Single Molecule Sequencing</i> -	174
21.3	Sekvenační zařízení typu <i>Single Molecule Real Time Sequencing</i> -	176
21.4	Sekvenační zařízení založená na technologii nanopórů -	178
21.5	Sekvenační zařízení na bázi <i>TIRF</i> mikroskopie -	178
21.6	Sekvenační zařízení na bázi elektronové mikroskopie-	180
22.	Základy genomiky -	181
22.1	Mapování lidského genomu -	181
22.2	LOD skóre -	183
22.3	Genetická mapa člověka -	184
22.4	Vazebná rovnováha a vazebná nerovnováha -	185
22.5	Vazebná nerovnováha a asociační populační studie -	185
22.6	Projekt <i>Lidský genom</i> a jeho význam pro molekulární genetiku -	186
22.7	Další významné projekty týkající se lidského genomu -	187
22.8	Haplotypová analýza-	187
23.	Vybrané fyzikální a biologické proměnné používané v molekulární genetice -	188
	Seznam použitých zkratk -	191

Předmluva

Učební text je určen pro studenty navazujícího magisterského studia bioanalytiky na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové. Věřím, že najde své čtenáře i na jiných vysokých školách a bude užitečný i pro přípravu k atestaci v rámci společného kmene. Učebnici, přestože se svým objemem zdá rozsáhlá, je nutno považovat za základní studijní materiál pro absolvování předepsané zkoušky.

V oblasti molekulární genetiky lze od nástupu nového milénia pozorovat velké pokroky ve vyšetřovacích metodách. Stěžejními momenty tohoto rozvoje byly: dokončení projektu Lidský genom, aplikace čipové technologie a sekvenování nové generace. Úloha bioanalytika při genetickém testování spočívá zejména v provedení spolehlivého laboratorního vyšetření a ve správném hodnocení získaných dat. Z těchto důvodů je v textu kladen důraz na principy používaných analýz. U čtenáře se předpokládají znalosti obecné a molekulární biologie týkající se procesů probíhajících v živých buňkách: replikace, transkripce, proteosyntézy a mechanismů jejich regulace.

Věřím, že následující kapitoly přivedou zájemce o molekulární genetiku k dalšímu prohlubování jejich znalostí a laboratorních dovedností.

Hradec Králové, srpen 2015
Martin Beránek

1. Historické mezníky v rozvoji molekulární biologie a genetiky

*Jsem si vědom, že psaní knížek je určitou formou parazitismu,
u romanopisců většinou na životech jiných,
u odborných pracovníků na jejich práci.*

Radim Brdička

Obory molekulární biologie a molekulární genetiky vycházejí ze znalostí buněčné biologie, genetiky, metabolických procesů (biochemie) a pokroků v oblasti laboratorní technologie. Jejich vznik a rozvoj lze rozdělit do několika historických etap.

I. etapa – počátky genetiky

Vznik molekulárních metod předznamenaly *mikroskopické* objevy buněčného jádra (R. Brown, 1831), chromosomů (K. von Nageli, 1842), poznání mechanismu meiózy (O. Hertwig, 1876), mitózy (W. Flemming, 1878) a procesu oplodnění (A. Weissmann, 1886). Křížení rostlin za vzniku tzv. *hybridů* prováděné M. Sageretem na počátku 19. století vedlo o padesát let později k definování prvních zákonů genetiky (G. Mendel, 1866). Základ dědičnosti byl spatřován v blíže nespecifikovaných *faktorech* (E. Haeckel, 1866; G. Mendel, 1866), později přejmenovaných na **geny** (W. Johannsen, 1911). Významná úloha v dědičnosti byla již v té době připisována **chromosomům** (E. von Tschermak, K. Correns, H. de Vries, 1900). Postupné poznávání principů dědičnosti a biologických funkcí chromosomů daly vznik novému oboru, **genetice** (W. Bateson, 1905).

Na počátku 20. století však před biology stálo mnoho nezodpovězených otázek. Ta nejpalčivější byla otázka podstaty a fungování genů. Experimenty s octomilkou ukázaly, že geny jsou na chromosomech řazeny lineárně. Pokud se dva geny vyskytují na témže chromosomu v těsné blízkosti, procházejí jejich alely buněčným dělením ve **vazbě** (tedy společně), bez rizika rekombinace (T. Morgan a T. Boveri, 1910). Porovnáním pravděpodobnosti rekombinace mezi geny pro různé biologické znaky octomilky (barva a tvar očí, délka křídel, barva těla, ochlupení) vznikla první **genetická mapa** chromosomu a byly poprvé definovány **genetické vzdálenosti** mezi geny (B. Sturtevant a T. Morgan, 1915). Pro haploidní sadu chromosomů daného organismu se začal užívat termín **genom**, jako složenina slov *gen* a *chromosom* (H. Winkler, 1920).

II. etapa – odhalení struktury nukleových kyselin

V období přibližně před sto lety nebyly kromě mikroskopie a „zkumavkových“ chemických reakcí k dispozici žádné laboratorní techniky vhodné pro analýzu nukleových kyselin a studium struktury genů. K identifikaci nukleových kyselin výrazně přispěl objev **nukleinu**, látky, která se v alkalickém prostředí

uvolňuje z buněčného jádra (F. Miesher, 1869). Nuklein byl později nalezen v chromosomech (E. Zacharias, 1881) a byla prokázána jeho úloha v dědičnosti (W. Hertwig, 1884). Pojem **nukleová kyselina** (NK) byl poprvé použit až o pět let později (R. Altmann, 1889).

Další experimenty ukázaly, že NK jsou součástí chromosomů a jsou také přítomny v buněčné cytoplazmě (J. Brachet, 1933). Na základě chemického rozboru byly v NK identifikovány **nukleotidy** tvořené zbytky kyseliny fosforečné, nukleotidovými bázemi a ribosou (P. Levene, 1909) nebo deoxyribosou (P. Levene, 1929). Jejich polymerní charakter popsali v roce 1934 T. Caspersson a E. Hammertsen.

Rentgenová analýza potvrdila pravidelnou prostorovou strukturu DNA (W. Astbury, 1937). Také se prokázalo, že působení rentgenových paprsků způsobuje v DNA genetické změny, **mutace** (M. Delbruck, 1935). Pro veškeré chemické a fyzikální metody objasňující otázky života na molekulové úrovni byl navržen pojem **molekulární biologie** (W. Weaver, 1938). Jejím cílem bylo zejména pochopení struktury genu.

Pro uchování genetické informace a zprostředkování jejího přenosu připadaly do úvahy dva typy makromolekul – NK a proteiny. Důkaz, že dědičnost je vázána na NK, přinesl úspěšný přenos virulence bakterie *Streptococcus pneumoniae* pomocí extraktu DNA (O. Avery, 1944). Podobným výsledkem skončil také experiment s bakteriofágem T2 vloženým do bakterie *E. coli* pěstované v živném médiu s radioaktivním fosforem. Radioaktivita naměřená v dceřiných buňkách potvrdila, že **genetickým materiálem** musí být DNA, nikoliv proteiny, které většinou fosfor ve své struktuře neobsahují (A. Hershey a M. Chase, 1952).

Prostorové uspořádání DNA bylo objasněno počátkem 50. let. Nejprve bylo zjištěno, že počet purinových a pyrimidinových bází v molekulách DNA je shodný (E. Chargaff, 1950). Následovalo pochopení tvorby fosfodiesterové vazby mezi nukleotidy (A. Todd, 1952), navržení párovacích pravidel mezi řetězcí DNA (J. Griffith, 1952), a nakonec sestavení modelu **dvoušroubovice DNA** s antiparalelním uspořádáním obou vláken (J. Watson a F. Crick, 1953). Současně bylo popsáno a experimentálně ověřeno, že semikonzervativní způsob replikace DNA umožňuje přenos genetické informace do dceřiných buněk (J. Watson a F. Crick, 1953; M. Meselson a F. Stahl, 1958), a že dvouřetězce DNA lze od sebe oddělit tepelnou denaturací (J. Marmur, 1959).

K objasnění struktury RNA přispěla úspěšná syntéza „umělých“ molekul RNA pomocí polynukleotidové fosforylasy (M. Grunberg-Manago, 1955). Následně byla RNA vytvořena i transkripcí z bakteriální DNA v podmínkách *in vitro* (S. Weiss, 1959).

III. etapa – molekulární biologie vysvětluje funkce nukleových kyselin

Do popředí zájmu molekulárních biologů se v padesátých letech dostává problematika **centrálního dogma molekulární biologie**, jednoho ze základních biologických postulátů, který tvrdí, že dědičnost je založena na molekulách DNA, podle nichž dochází k tvorbě bílkovin, a nikoliv naopak (F. Crick, 1957). Možnost reverzního přepisu virové RNA do komplementární DNA (**cdNA**) byla objevena až o několik let později (H. Temin, 1964). První chorobou, u níž bylo doloženo, že klinické projevy jsou podmíněny genetickými změnami, byla srpkovitá anémie (V. Ingram, 1956).

Přestože u nás v té době byla genetika zakázanou „buržoazní vědou“, v západní Evropě se v té době úspěšně studovaly vztahy mezi strukturou a funkcemi RNA. Po objevu ribosomu (R. Roberts, 1958) byl popsán transport aminokyselin pomocí molekul transferové RNA (**tRNA**) (P. Zamecnik a M. Hoagland, 1959) a o dva roky později proces **proteosyntézy** (F. Jacob a J. Monod, 1961). Vznikla též **operonová teorie** vysvětlující regulaci exprese prokaryontních genů (F. Jacob a J. Monod, 1961).

Záhadou však nadále zůstával **genetický kód**, tedy „šifra“, podle níž sekvence nukleotidů určují pořadí aminokyselin v peptidovém řetězci. Tajemství genetického kódu pomohla rozluštit výroba syntetických molekul mediátorové RNA (*messenger RNA*, **mRNA**). Vložení uměle vyrobené mRNA skládající se výhradně z nukleotidů s uracilem vedlo v hostitelské buňce k tvorbě peptidového vlákna obsahujícího pouze fenylalanin (M. Nirenberg a J. Matthaei, 1961). Poté se záměnami nukleotidů a indukci posunových mutací (inserce, delece) v syntetických molekulách mRNA podařilo najít způsob, jak vytvářet

různé typy peptidů a postupně odkryt genetický kód (F. Crick a S. Brenner, 1961). K jeho kompletnímu rozluštění došlo v roce 1966, a to včetně tří tripletů terminačních (S. Ochoa, H. Khorana, M. Nirenberg, M. Bretscher, S. Brenner, F. Crick).

Poznání podstaty genetického kódu výrazně zasáhlo do práce molekulárních biologů zabývajících se procesem proteosyntézy. V ribosomu bylo definováno místo vazby molekul tRNA (J. Warner a A. Rich, 1964) a navržena jejich „čtyřlístková“ sekundární struktura (R. Holley, 1965).

IV. etapa – rozvoj molekulárně genetických vyšetřovacích metod

70. léta přinesla molekulární biologii a genetice několik velmi důležitých objevů. Díky bakteriální **DNA polymerase** se podařilo laboratorně vytvořit nukleovou kyselinu viru *phiX 174* (A. Kornberg a M. Goulian, 1967) a pomocí **restrikčního enzymu** *HindII* extrahovaného z *Haemophilus influenzae* tuto DNA nevratně degradovat (H. Smith, 1970). Desítky izolovaných a purifikovaných restrikčních endonukleas umožňujících štěpit řetězce DNA za vzniku lepicích nebo tupých konců přispěly k rozvoji rekombinantních technik (S. Cohen a H. Boyer, 1973). Tím se otevřela cesta k molekulárnímu klonování a k výrobě monoklonálních protilátek (G. Kohler a C. Milstein, 1975), syntetických hormonů – insulínu (J. Lederberg, 1978) a somatotropního hormonu (Ch. Li, 1981). Významného pokroku v identifikaci fragmentů DNA bylo dosaženo přípravou jednořetězcových **hybridizačních sond** značených nejprve radioaktivně (E. Southern, 1975) a později enzymaticky (A. Murasugi a R. Wallace, 1984), fluorescenčně (J. Bauman a P. Van Duijn, 1981) a chemiluminiscenčně (M. Musiani, 1991).

V tomtéž období došlo k významným objevům v oblasti **sekvenování**, tedy určování primární struktury NK. Od krátkých úseků čítajících desítky nukleotidů kvasinkové tRNA (R. Holley, 1964) dosáhly délky sekvenovaných úseků brzy stovek nukleotidů. Prvním kompletně osekvenovaným genem byl gen plášťového proteinu fága *MS2* (W. Fiers, 1972). Celá sekvence tohoto viru byla zveřejněna o čtyři roky později (W. Fiers, 1976). Účinnost sekvenačních technik a délky čtení výrazně vzrostly u Gilbertova degradačního sekvenování (A. Maxam a W. Gilbert, 1977) a Sangerova dideoxynukleotidového sekvenování, díky němuž byla získána kompletní sekvence genomu fága *phiX 174* (F. Sanger, 1977).

Amplifikaci krátkých úseků DNA v podmínkách *in vitro* umožnila technologie polymerasové řetězové reakce, **PCR** (K. Mullis, 1983). Pro účely ukládání a vyhledávání sekvencí DNA se v roce 1982 otevřela první biologická databáze GenBank. V roce 1986 T. Roderick poprvé použil pojem **genomika**.

Sekvenování NK se začalo postupně automatizovat. V roce 1987 se na trhu objevil první sekvenační poloautomat ABI 373, který pro vizualizaci fragmentů DNA v akrylamidovém gelu používal čtyři různé fluorofory. V roce 1996 se stal komerčně dostupným automatický sekvenační analyzátor ABI 310 založený na principu **kapilární elektroforézy**. V tomtéž roce se poprvé představuje i technologie **pyrosekvenování** (M. Ronaghi, 1996).

V. etapa – od analýzy genu k analýze genomu

Další rozvoj molekulárně genetických metod vedl k objevu složených genů u eukaryont (M. Green, 1986), mechanismu alternativního sestřihu (R. Breitbart, 1987), editace RNA (L. Simpson, 1989), posttranskripčních úprav RNA (E. Wahle a W. Keller, 1992), struktury a funkce telomeras (C. Autexier, 2006), nálezů malých nekódujících typů RNA molekul (R. Carthew, 2009; R. Bonasio, 2010) a k mnoha dalším významným biologickým objevům.

Automatizace sekvenačních technik a zrychlení celého sekvenačního procesu postupně odkrylo tajemství genomů různých organismů. V roce 1995 byl přečten genom viru *H. influenzae*, o rok později první eukaryontní genom kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) a v roce 1998 genom hlísty *Caenorhabditis elegans*. Kompletní sekvence lidského genomu byla zveřejněna v roce 2003, kdy bylo známo 99,99 % naší DNA.

Veškeré genomové projekty do té doby používaly multikapilárové sekvenátory. Nové typy sekvenátorů, tzv. zařízení **next generation sequencing** (NGS), byly vyvinuty začátkem 21. století. Firma Life Science v roce 2005 uvolňuje na trh zařízení pracující na principu *454*. O rok později ji následuje sekve-

nační zařízení firmy Solexa a v roce 2007 analyzátor *SOLiD* firmy Applied Technologies. Tyto techniky souhrnně označované jako sekvenátory *druhé generace* jsou od svého vzniku stále zdokonalovány k vyššímu výkonu a ke snížení podílu manuální práce při přípravě vzorků. Cílem je vytvořit systém schopný sekvenovat fragmenty DNA bez nutnosti jejich amplifikace a identifikovat genom jedince z jediné buňky jeho organismu. *Heliscope*, první sekvenátor *třetí generace* splňující některá z těchto kritérií, představila v roce 2010 firma Helicos BioSciences.

Další pokrok v oblasti sekvenování je pro dnešního molekulárního genetika stěží předvídatelný. Do hry vstupují významné technologické subjekty schopné konstruovat sekvenátory na bázi tranzistorů. Sekvenování bude patrně probíhat na pevných površích v jamkách o objemu několika nanolitřů až pikolitřů. Snahou biotechnologů je snížit cenu *celogenomového sekvenování* pod tisíc amerických dolarů, aby se stalo běžně dostupné pro medicínské účely. Cílem molekulárního genetika však nadále zůstane pečlivá a spolehlivá analýza struktury a funkcí nukleových kyselin.

Doporučená literatura

- Gribbin, J.: Pátrání po dvojité šroubovici. 1. vydání. Praha, Columbus 2007.
Brownová, J.: Darwinův Původ druhů. 1. vydání. Praha, Nakladatelství Pavel Dobrovský – BETA 2007.
Ridley, M.: Francis Crick. 1. vydání. New York, Harper Collins 2006.
Orel, V.: Gregor Mendel a počátky genetiky. 1. vydání. Praha, Academia 2003.
Watson, J. D.: Tajemství DNA. 1. vydání. Praha, Academia 1995.
Watson, J. D.: Geny, ženy a Gamow. 1. vydání. Praha, Mladá fronta 2004.
Mullis, K.: Dancing naked in the mind field. 1. vydání. New York, Vintage 2000.

2. Lékařská genetika a dědičně podmíněné choroby

Dědičnost nemá paměť a může být nespravedlivá.

Eva Seeemanová

Lékařská genetika je přes třicet let samostatným lékařským oborem, v němž spolupracují lékaři, cytogenetici a molekulární genetici. Jeho posláním je diagnostikovat a léčit pacienty s dědičně podmíněnými nemocemi, a vyhledávat rizikové jedince v jejich rodinách.

Genetická pracoviště historicky vznikala v nemocnicích vyššího typu jako malé ambulance spadající pod dětské kliniky. Po roce 1989 se osamostatnila jak fyzicky (jako oddělení lékařské genetiky), tak personálně. Pro lékaře vznikl specializační obor Lékařská genetika a pro nelékařské pracovníky obor Vyšetřovací metody v lékařské genetice. Dnes již lékařská genetika není oborem, který se zabývá jen poradenskou činností. Pracoviště úzce spolupracují se specialisty z oblasti pediatrie, onkologie, interní medicíny, gynekologie a patologie.

Předmětem zájmu klinických genetiků jsou genetická onemocnění, která se tradičně (a ne zcela jednoznačně) dělí na monogenně podmíněné choroby, chromosomové vady, multifaktoriální genetické nemoci, mitochondriální nemoci a patologické stavy související se somatickými mutacemi.

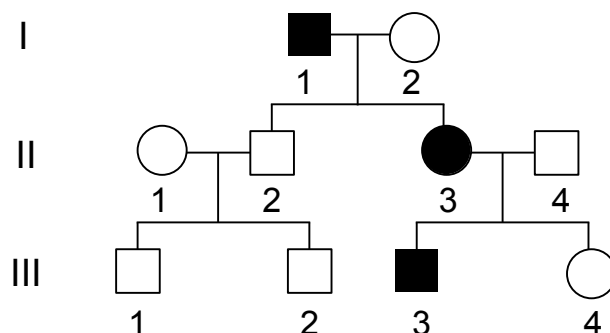
2.1 Monogenně podmíněné choroby

Monogenní choroby jsou vyvolány genetickými změnami v definovaném genu a pro jejich dědičnost zpravidla platí Mendelova pravidla dědičnosti. Přenos nemocí tohoto typu může být autosomálně dominantní, autosomálně recesivní, gonosomálně dominantní nebo gonosomálně recesivní. Jejich počet v databázi OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) se dnes pohybuje okolo 22 tisíc. Devadesát procent těchto chorob se manifestuje v dětském věku se souhrnnou incidencí 0,36 %. Jejich prevalence v populaci je okolo 2 %.

2.1.1 Autosomálně dominantní choroby

Autosomálně dominantních (AD) chorob je známo asi 6 tisíc. Fenotyp je zde vyjádřen *dominantně*. Klinické projevy se objevují u homozygotů i heterozygotů pro danou mutaci. Riziko přenosu do další generace (nezávisle na pohlaví potomků) je 50 %, pokud je jeden z rodičů heterozygot; v případě heterozygosity obou rodičů riziko vzrůstá na 75 %.

U této skupiny nemocí se často objevují znaky **variabilní expresivity** mutovaných genů, z níž vyplývají různě vyjádřené příznaky, jak z hlediska jejich intenzity, tak pokud jde o časnost jejich nástupu. Dalším nápadným rysem AD je **neúplná penetrance**, což znamená, že u postižených jedinců se některé příznaky nemoci nemusí projevovat, což může komplikovat určení správné diagnózy. Častým rysem AD bývá také **nekompletní dominance**, kdy heterozygot pro mutaci má mírnější projevy choroby v porovnání s postiženým homozygotem. Některé AD choroby mohou vznikat na podkladě mutace vzniklé **de novo**; u rodičů či prarodičů postižené osoby se daná mutace nevyskytuje. Rodokmen typický pro přenos onemocnění s AD ukazuje obr. 2.1; nejčastější onemocnění jsou uvedena v tabulce 2.1.



Obr. 2.1 Rodokmen rodiny s AD chorobou

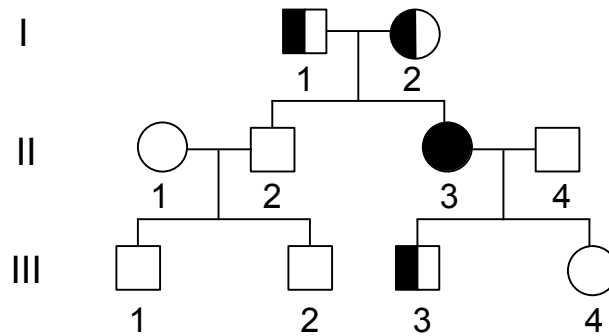
Tabulka 2.1 Příklady AD chorob

Choroba	Výskyt	Gen	Chromosomová lokalizace
Familiární hypercholesterolémie	1 : 500	<i>LDL-R</i>	19p13.2
Hereditární karcinom prsu	1 : 500	<i>BRCA 1,2</i>	17q21, 13q12.3
AD polycystóza ledvin	1 : 1000	<i>PKD1,2</i>	16p13.3, 4q22.1
Neurofibromatóza typ I	1 : 3000	<i>NF1</i>	17q11.2
Myotonická dystrofie	1 : 7000	<i>DMPK</i>	19q13.32
Familiární adenomatózní polypóza	1 : 10000	<i>APC</i>	5q22.2
Marfanův syndrom	1 : 10000	<i>FBN1</i>	15q21.1
Huntingtonova chorea	1 : 20000	<i>HTT</i>	4p16.3
Achondroplázie	1 : 40000	<i>FGFR3</i>	4p16.3

Mezi choroby s AD přenosem patří také některá onemocnění vznikající multifaktoriálně. Příkladem může být typ diabetu mellitu označovaný zkratkou MODY (*maturity-onset diabetes of the young*). AD přenos je zde vázán na geny *HNF-4A*, *TCF1* a *GCK*.

2.1.2 Autosomálně recesivní choroby

Autosomálně recesivní (AR) choroby zahrnují většinu dědičných metabolických poruch, tj. poruchy metabolismu cukrů, aminokyselin, lipidů, organických kyselin, močovinového cyklu, tvorby energie, transportu kovů a mnoho dalších. Klinické manifestace AR chorob se projevují u postižených homozygotů a složených heterozygotů, kteří mají v genotypu dvě různé mutace v pozici *trans* (tedy od každého rodiče jednu) umístěné v somatických buňkách na obou homologních nepohlavních chromosomech. Jsou-li oba rodiče heterozygotní přenašeči mutované alely, jejich potomci mají 25% pravděpodobnost postižení a 50% šanci, že také oni budou heterozygoti. Rodokmen rodiny, u níž se projevila choroba s AR přenosem, ukazuje obr. 2.2; příklady jsou uvedeny v tabulce 2.2.



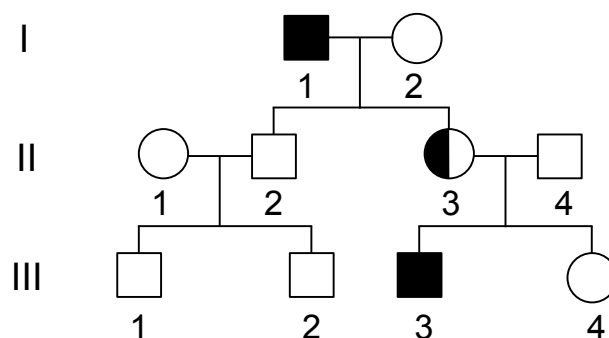
Obr. 2.2 Rodokmen rodiny s AR chorobou

Tabulka 2.2 Příklady AR chorob

Choroba	Výskyt	Gen	Chromosomová lokalizace
Hemochromatóza	1 : 300	<i>HFE</i>	6p21.3
Deficit alfa1-antitrypsinu	1 : 2000	<i>AIAT</i>	14q32.1
Cystická fibróza	1 : 2500	<i>CFTR</i>	7q31
Deficit 21-hydroxylasy	1 : 10000	<i>CYP21A2</i>	6p21.3
Fenylketonurie	1 : 10000	<i>PAH</i>	12q22-q24.2
Alkaptonurie	1 : 19000	<i>HGD</i>	3q13.33
AR polycystóza ledvin	1 : 30000	<i>PKHD1</i>	6p12
Wilsonova choroba	1 : 50000	<i>ATP7B</i>	13q14.3

2.1.3 Gonosomálně recesivní choroby

Choroby s gonosomálně recesivním přenosem (GR) jsou zpravidla vázány na postižení chromosomu X. Jelikož ženy mají ve své genetické výbavě dva tyto chromosomy, z nichž jeden pochází od otce a druhý od matky, jsou v naprosté většině rodin bezpříznakovými přenašečkami. Dcery matek-přenašeček a zdravých otců mají 50% šanci, že budou také přenašečkami. Synové přenašeček (tzv. *hemizygoti* pro X chromosom), pokud zdědí od matky chromosom X s mutací, budou danou chorobou postiženi. Přenos z otce na syna možný není, přenašečkami často bývají sestry postižených otců. Postižení žen GR chorobou je méně časté než u mužů, nelze je však zcela vyloučit. Rodokmen s GR chorobou ukazuje obr. 2.3; příklady v tabulce 2.3.



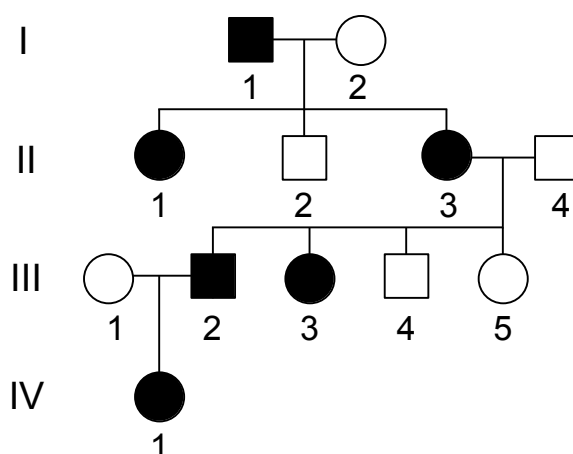
Obr. 2.3 Rodokmen rodiny s GR chorobou

Tabulka 2.3 Příklady GR chorob vázaných na chromosom X

Choroba	Výskyt	Gen	Chromosomová lokalizace
Duchennova svalová dystrofie	1 : 3500	<i>DMD</i>	Xp21.2
Beckerova svalová dystrofie	1 : 20000	<i>DMD</i>	Xp21.2
Hemofilie A	1 : 5000	<i>FVIII</i>	Xq28
Hemofilie B	1 : 20000	<i>FIX</i>	Xq27.1-q27.2
Syndrom testikulární feminizace	1 : 30000	<i>AR</i>	Xq12
Fabryho choroba	1 : 50000	<i>GLA</i>	Xq22
Menkesův syndrom	1 : 100000	<i>ATP7A</i>	Xq21.1
Lesch-Nyhanův syndrom	1 : 400000	<i>HPRT1</i>	Xq26.1

2.1.4 Gonosomálně dominantní choroby

Onemocnění s gonosomálně dominantní dědičností (GD) vázané na chromosom X patří mezi vzácná onemocnění postihující hemizygotní muže a heterozygotní ženy. Z postižených mužů je choroba přenášena vždy na všechny dcery, které jsou rovněž postiženy. U postižených žen (heterozygotek) jsou danou chorobou postiženi všichni jejich potomci, kteří ve svém genotypu obsahují chromosom X s mutací, souhrnně tedy 50 % synů a dcer (obr. 2.4); příklady jsou uvedeny v tabulce 2.4. Velmi vzácné choroby vázané na chromosom Y podléhají *holandrické* dědičnosti postihující výhradně muže; kromě mužské neplodnosti nebyla dosud takto vázaná choroba prokázána.



Obr. 2.4 Rodokmen rodiny s GD chorobou

Tabulka 2.4 Příklady GD chorob vázaných na chromosom X

Choroba	Výskyt	Gen	Chromosomová lokalizace
Amelogenesis imperfecta	1 : 14000	<i>AMELX</i>	Xp22.31-p22.1
Aarskog-Scottův syndrom	1 : 25000	<i>FGD1</i>	Xp11.21
Deficit ornithintranskarbamylyasy	1 : 80000	<i>OTC</i>	Xp21.1
Incontinentia pigmenti	1 : 140000	<i>IKBKG</i>	Xq28

2.2 Chromosomové aberace

Druhou oblastí analýz prováděných v genetických laboratořích jsou vyšetření chromosomových aberací. Mezi chromosomové aberace patří jak numerické, tak strukturní změny chromosomů. Velikostí změn, měřeno délkou postižených úseků, jsou aberace mnohonásobně rozsáhlejší než genetické změny u monogenně podmíněných chorob. Mohou zahrnovat i změny celých chromosomových sad. Incidence chromosomových aberací se u živě narozených dětí odhaduje na 0,7 %.

Numerické změny chromosomů zahrnují veškeré změny vedoucí k počtu chromosomů jinému než 46 (u somatických buněk).

Řadíme sem:

- a) *polyploidie* – změny kompletních sad chromosomů somatických buněk (nejčastěji jde o triploidie a tetraploidie);
- b) *aneuploidie* – chromosom určitého typu (tedy nikoliv celá sada jako v předešlém bodě) se v buňce nachází v atypickém počtu: monosomie chromosomu X (Turnerův syndrom), trisomie chromosomů 21 (Downův syndrom), 13 (Patauův syndrom), 18 (Edwardsův syndrom) a trisomie pohlavních chromosomů XXY (Klinefelterův syndrom);
- c) *mixoploidie* – vzniká, pokud v jednom těle (organismu) lze prokázat buněčné linie s diploidním a aneuploidním počtem chromosomů, vzniká tzv. *chromosomová mozaika*.

Strukturní aberace jsou změny struktury postihující konkrétní chromosom. Mikroskopicky lze zjistit atypický tvar chromosomu nebo změnu jeho velikosti. Nejběžnějšími typy strukturních změn jsou **delece**. Ztracená část chromosomu může postihovat jeho konce (terminální delece) nebo části mezi oběma konci (intersticiální delece). Příkladem klinicky významné delece je Wolfův syndrom (delece na krátkém raménku chromosomu 4) nebo DiGeorgeův syndrom (na dlouhém raménku chromosomu 22). Opačný mechanismus vede ke strukturním změnám označovaným jako **inserce**. Zdvojení části chromosomů se označuje jako **duplikace** (např. duplikace na krátkém raménku chromosomu 17 podmiňuje chorobu Charcot-Marie-Tooth typ 1A). Otočení určitého segmentu chromosomu o 180 stupňů je popisováno jako **inverze**. V případě paracentrických inverzí je segment otočen v rámci jednoho raménka, u pericentrických inverzí otočení zahrnuje i oblast centromery. Současnou ztrátou obou konců téhož chromosomu a spojení jejich „torza“ vznikají **prstencové chromosomy** cirkulárního tvaru. Termínem **marker chromosom** se označuje každý nadpočetný, většinou velmi malý chromosomový útvar v buněčném jádře vznikající delecí velké části obou ramen chromosomu.

Závažné jsou též výměny celých ramen nebo částí chromosomů (**reciproké translokace**). Spojení akrocentrických chromosomů v oblasti krátkých ramen se označují jako Robertsonské translokace. Při buněčném dělení mohou vzniknout i útvary zahrnující dvě totožná ramena připojená z opačných stran k centromere (**izochromosomy**), a konečně fúzí dvou chromosomových fragmentů, z nichž každý obsahuje centromeru, vznikají **dicentrické chromosomy**.

2.3 Choroby s multifaktoriálním typem dědičnosti

Tato onemocnění jsou podmíněna desítkami genetických změn a mnoha faktory vnějšího prostředí. Příslušné genetické změny se označují jako změny malého dosahu a postižené geny jako **geny malého dosahu**. Výsledný fenotyp choroby (z hlediska nástupu choroby, příznaků a závažnosti pro konkrétního jedince) je nutno hodnotit kumulativně. Tedy, čím více faktory je choroba podmíněna, tím vážnější budou pro daného jedince její projevy, a tím komplikovanější bude také její léčba.

Do této skupiny chorob patří různé kongenitální malformace a velké množství tzv. **komplexních onemocnění**, která podle odhadů odborníků postihují až 60 % dospělé populace. Řadíme sem diabetes

mellitus, aterosklerózu, arteriální hypertenzi, bronchiální astma, osteoporózu, bipolární chorobu, schizofrenii, migrénu a mnoho dalších nemocí. Diagnostika a léčba komplexních onemocnění vyžaduje spolupráci lékařů různých specializací. Pro molekulární genetiku jsou komplexní choroby velkou výzvou do dalších let.

Specifickou skupinou komplexních onemocnění jsou **nádorová onemocnění**. Monogenně podmíněné choroby tvoří méně než 10 % známých malignit. V patogenezi nádorových nemocí hrají závažnou úlohu somatické mutace, které se objevují v průběhu dělení somatických buněk, a nejsou tedy dědičné. Předpokládá se, že během života člověka dochází přibližně k 10^{15} buněčným dělením. Pravděpodobnost neodhalené a neopravené somatické mutace přepočtená na jedno buněčné dělení je odhadována na 10^{-10} . Znamená to, že v průběhu života se v našem organismu objeví asi 100000 buněk s některou ze somatických mutací. Z hlediska důsledků somatických mutací jsou nejrizikovější ty, ke kterým dochází v časných fázích rozvoje organismu, postihují progenitorové buňky a urychlují proliferaci buněk až k jejich maligní transformaci.

Zmíněné genetické změny zahrnují jak velké delece a translokace, tak jednonukleotidové změny v protoonkogenech, tumor supresorových genech a v genech souvisejících s opravnými procesy (reparované geny *MLH1*, *MSH2*, *PMS2* a *MSH6*).

2.4 Mitochondriální genetické choroby

Charakteristickým prvkem mitochondriálních chorob je maternální dědičnost vyplývající z původu mitochondrií při reprodukčním dělení eukaryontních buněk. Za přenašeče choroby je označována nemocná matka. Tyto choroby často souvisejí s mutacemi mitochondriálních molekul tRNA. Jedná se o nemoci vzácné, většinou s velmi vážnou prognózou. Patří sem například syndrom chronické progresivní externí oftalmoplegie, syndrom Kearnsův-Sayrehův, Leighova choroba, pigmentová retinopatie s neurodegenerací, Leberova hereditární neuropatie optického nervu, myoklonická epilepsie, mitochondriální kardiomyopatie a encefalomyopatie, syndrom MELAS s příznaky mitochondriální encefalopatie, laktátové acidózy a s poruchami cévního zásobení mozku.

Doporučená literatura

- Sršeň, Š., Sršňová, K.: Základy klinické genetiky a její molekulární podstata. 3. přepracované vydání. Martin, Osveta 2000.
- Lebl, J., Macek, M.: Kazuistiky z molekulární genetiky. 1. vydání. Praha, Galén 2006.
- Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., Willard, H. F. Klinická genetika. 1. vydání. Praha, Triton 2004.
- Strachan, T., Read, A.: Human molecular genetics. 4. vydání. New York, Garland Science 2011.

3. Struktura a funkce nukleových kyselin

Neuniklo naší pozornosti, že ze specifického párování, jež tu navrhujeme, vyplývá bezprostředně i mechanismus, jakým se může genetický materiál kopírovat.
James Watson a Francis Crick

3.1 Základní informace o struktuře nukleových kyselin

O struktuře NK jste se učili v předmětu molekulární biologie. Zmíním zde proto v krátkosti jen nejdůležitější informace, které jsou nezbytné k pochopení principů používaných vyšetřovacích metod.

Nukleové kyseliny patří mezi makromolekulární sloučeniny. Jejich vznik je v živých organismech katalyzován mnoha různými enzymy. Svou strukturou jsou NK **lineární nebo cirkulární heteropolymery**. Obsahují různé typy **nukleotidů**, ať základní či modifikované (kupříkladu bakteriofág *T4* obsahuje v nukleotidech namísto cytosinu hydroxymethylcytosin). Spojení nukleotidů do řetězců pomocí fosfodiesterových vazeb katalyzují polymerasy.

Každý nukleotid obsažený ve struktuře NK je tvořen nukleotidovou bází, pentosou a zbytkem kyseliny fosforečné. Podle cukerné složky se NK dělí na deoxyribonukleové kyseliny a ribonukleové kyseliny. Molekula RNA obsahuje **ribosu**, která má na druhém uhlíku pentosového kruhu (označovaném C2) hydroxylovou skupinu, na rozdíl od **deoxyribosy**, u níž tato hydroxylová skupina chybí. **Nukleotidové báze** přítomné v RNA obsahují adenin, cytosin, guanin a uracil. DNA má v nukleotidech namísto uracilu thymin. Obě báze, tedy uracil a thymin, mají pyrimidinovou strukturu a liší se přítomností methylové skupiny na pátém uhlíku (u uracilu není přítomna). Nukleotidové báze jsou v rámci každého nukleotidu vázány na cukernou část molekuly **N-glykosidickou vazbou**.

Ze střední školy si jistě pamatujete, že volné nukleotidy, stavební kameny NK, obsahují tři zbytky **kyseliny fosforečné** spojené dvěma makroergními vazbami. Makroergní vazby zajišťují energii nezbytnou pro tvorbu NK. Během její syntézy vzniká mezi hydroxylovou skupinou na třetím uhlíku pentosy (C3) posledního nukleotidu v řetězci a zbytkem kyseliny fosforečné na pátém uhlíku (C5) právě připojovaného nukleotidu zmíněná **fosfodiesterová vazba**; vedlejším produktem je molekula **difosfátu (pyrofosfátu)**.

Postupným připojováním dalších nukleotidů polymerní řetězec NK roste od svého 5'- konce molekuly k 3'- konci. Počet připojených nukleotidů a jejich pořadí určuje **primární strukturu** molekuly NK. O **oligonukleotidech** hovoříme, pokud se počet nukleotidů v jejich řetězci pohybuje v rámci desítek; **polynukleotid** obsahuje minimálně sto nukleotidů. Primární struktura se vyšetřuje sekvenováním jejich řetězců (kapitoly 19 a 20). Získané sekvence jsou součástí řady veřejných i neveřejných databází.