

**FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ**

Studijní program: B5345 Specializace ve zdravotnictví

**Pavel Konvář**

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**Sekvenování DNA – historie, současnost,  
perspektivy**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Prof. MUDr. Radim Černý CSc.

Plzeň 2016

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
Fakulta zdravotnických studií  
Akademický rok: 2015/2016

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Pavel KONVÁŘ**  
Osobní číslo: **Z13B0193P**  
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Sekvenování DNA - historie, současnost, perspektivy**  
Zadávající katedra: **Katedra teoretických oborů**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- Zpracovat seznam odborné literatury na vybrané téma
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační normu

Rozsah grafických prací:

Rozsah kvalifikační práce:

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

Seznam odborné literatury:

- **BROWN, T.A.** Klonování genů a analýza DNA : Úvod. Výkonný redaktor prof. RNDr. Tomáš Opatrný, Dr.; RNDr. Martin Fellner, Ph.D.. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6
- **BLOW, Nathan.** DNA sequencing: generation next-next. Nature Methods [online]. 2008, vol. 5, no.3 [cit. 2008-05-25], s. 267-274. Dostupný z WWW: <www.nature.com/naturemethods>. ISSN 1548-7105
- **MARDIS, Elaine R.** The impact of next-generation sequencing technology on genetics. Trends in Genetics [online]. 2008, vol. 24, no. 3 [cit. 2008-05-24], s. 133-141. Dostupný z WWW:<www.sciencedirect.com>. ISSN 0168-9525
- **RHEE, Minsoung, BURNS, Mark A.** Nanopore sequencing technology: research trends and applications. Trends in Biotechnology [online]. 2006, vol. 24, no. 12 [cit. 2008-06-04], s. 580-586. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>. ISSN 0167-7799
- **WATSON, James D.** Tajemství DNA : Příběh jednoho z největších objevů 20. století. Jitka Zykánová; František Sládeček. 1. vyd. Brno : Academia, 1995. 150 s. ISBN 80-200-0556-0
- **RYAN, Declan, et al.** Toward nanoscale genome sequencing. TRENDS in Biotechnology [online]. 2007, vol. 25, no. 9 [cit. 2008-06-02], s. 385-389. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>. ISSN 0167-7799

Vedoucí bakalářské práce:

**Prof. MUDr. Radim Černý, CSc.**

Katedra teoretických oborů

Datum zadání bakalářské práce:

**31. ledna 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**31. března 2016**

Doc. PaedDr. Ilona Mauritzová, Ph.D.

děkanka



MUDr. Otto Kott, CSc.

vedoucí katedry

V Plzni dne 29. ledna 2016

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, s použitím odborné literatury a pramenů uvedených v seznamu, který je součástí této bakalářské práce.

V plzni dne 21.3.2016

.....  
**Pavel Konvář**

## **Poděkování**

Tímto bych rád poděkoval především vedoucímu bakalářské práce Prof. MUDr. Radimovi Černému, CSc. a MUDr. Monice Černé Ph.D., za cenné rady a připomínky při vypracovávání této práce.

## **Anotace**

Příjmení a jméno: Pavel Konvář

Katedra: Katedra teoretických oborů

Název práce: Sekvenování DNA – historie, současnost, perspektivy

Vedoucí práce: Prof. MUDr. Radim Černý, CSc.

Počet stran – číslované: 33

Počet stran – nečíslované: 22

Počet příloh: 5

Počet titulů použité literatury: 48

## **Annotation**

Name: Pavel Konvář

Department: Department of theoretical studies

Name of thesis: DNA sequencing – history, the present-day, perspective

Thesis supervisor: Prof. MUDr. Radim Černý, CSc.

Number of pages – numbered: 33

Number of pages – unnumbered: 22

Number of addition: 5

Number of applied literary titles: 48

## **Souhrn**

Předmětem této bakalářské práce bylo shrnout nejnovější poznatky o metodách současné molekulární genetiky, a sice přístrojích nové generace a jejich potenciálního využití v klinické diagnostice lidských onemocnění.

V úvodu se zabývám historií a nejdůležitějšími objevy, které stojí za dnešní podobou moderní genetiky. Ve třetí, čtvrté a páté kapitole uvádím základy molekulární biologie, izolaci DNA a princip polymerázové řetězové reakce. Tyto kapitoly jsou základem pro pochopení funkce a principů sekvenování DNA.

Následné kapitoly textu jsou věnovány popisu tradičních sekvenčních metod a popisu metod nové generace, které jsou cílem této práce. U jednotlivých platforem se zabývám principem s následným popisem zpracování vzorku DNA a současnou nabídkou sekvenátorů na trhu.

Poslední kapitola je věnovaná dědičným formám diabetu insipidu, jako příkladu využití sekvenace pro diagnostické účely.

**Klíčová slova:** DNA, sekvenování, nové metody sekvenování



## Summary

The main topic of this thesis is a summary of the newest findings connected with methods of a current molecular genetics, namely new generation devices and its potencial application in a clinical diagnostics of a humane diseases.

The introduction applies to history and the most important finding which creates modern genetics shape. In the third, the forth and the fifth chapter I present basis of molecular biology, DNA isolation and a principle of a polymerase chain reaction. These chapters are the main tenet for the knowledge of a function and of the DNA sequencing rules.

The further chapters of the text are dedicated to a traditional sequencing and new generation methods description, which are the main aim of this thesis. I apply to principles of a individual platforms with a following description of a treatment DNA specimens and a present offer of sequencer on the market.

The last chapter is applied to hereditary shapes of diabetes insipidu as a example of sequecing application for diagnostical purposes.

Key words: DNA, sequencing, new methods of sequencing

## **Seznam zkratek**

**DNA** – deoxyribonukleová kyselina

**RNA** – ribonukleová kyselina

**NGS** – sekvenování nové generace (z anglického *New Generation Sequencing*)

**PCR** – polymerázová řetězová reakce (z anglického *Polymerase Chain Reaction*)

**emPCR** – emulzní polymerázová řetězová reakce

**CCD kamera** – součástka používaná pro snímání obrazové informace

(z anglického *Charge-Coupled Device*)

**dNTP** – deoxyribonukleosidtrifosfát

**ddNTP** – dideoxyribonukleosidtrifosfát

**ADH** – antidiuretický hormon (vazopresin)

**AVPR** – vazopresinový receptor

**AQP** – aquaporin

# Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>13</b>
<b>2. HISTORIE</b> .....	<b>14</b>
<b>3. MOLEKULÁRNÍ ZÁKLADY DĚDIČNOSTI</b> .....	<b>15</b>
3.1 NUKLEOVÉ KYSELINY .....	15
3.1.1 Stavba nukleových kyselin .....	15
3.1.2 Párování dusíkatých bází .....	16
3.1.3 DNA a její struktura.....	16
3.1.4 RNA a její struktura.....	17
3.2 EXPRESE GENETICKÉ INFORMACE .....	19
3.2.1 Replikace.....	19
3.2.2 Transkripce.....	20
3.2.3 Translace.....	21
<b>4. IZOLACE DNA</b> .....	<b>22</b>
4.1. POSTUP IZOLACE DNA .....	22
4.2 SEPARAČNÍ METODY.....	22
4.3 UCHOVÁNÍ A SKLADOVÁNÍ VZORKU .....	23
<b>5. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)</b> .....	<b>24</b>
<b>6. METODY SEKVENOVÁNÍ</b> .....	<b>25</b>
6.1. KLASICKÉ METODY SEKVENOVÁNÍ.....	25
6.1.1. Sangerova metoda.....	25
6.1.2. Maxam-Gilbertova metoda .....	27
6.2. NOVÉ METODY SEKVENOVÁNÍ (NEXT GENERATION SEQUENCING, NGS).....	27
6.2.1 Pyrosekvenace (454/Roche).....	27
6.2.1.1 Postup sekvenační metody 454/Roche.....	28
6.2.2 Reversibilní terminátorová sekvenace (Illumina/Solexa).....	31
6.2.2.1 Postup sekvenační metody Illumina/Solexa .....	31
6.2.3 Sekvenace ligací (Life technologies/SOLiD).....	33
6.2.3.1 Postup sekvenační metody SOLiD.....	33
6.2.4 Life Technologies/Ion torrent.....	35
6.2.4.1 Postup sekvenační metody Ion torrent .....	35
6.2.5 Sekvenace jednotlivých molekul DNA .....	36
6.2.5.1 Helicos Biosciences HeliScope™ .....	36
6.2.5.1.1 Postup sekvenační metody HeliScope .....	37
6.2.5.2 Pacific Biosciences SMRT™.....	38
6.2.5.2.1 Postup sekvenování metodou SMRT .....	38
6.2.6 Nanopore Sequencing.....	39
<b>7. VYUŽITÍ SEKVENOVÁNÍ V DIAGNOSTICE DĚDIČNÝCH CHOROB</b> .....	<b>40</b>
7.1 DIABETES INSIPIDUS .....	40
7.1.1 Centrální diabetes insipidus.....	40
7.1.2 Nefrogenní diabetes insipidus (NDI) .....	41
7.1.2.1 Mechanismus funkce.....	41
7.1.2.2 Popis a mutace genu pro AVPR2.....	42
7.1.2.3 Popis a mutace genu pro AQP-2 .....	42

<b>9. ZÁVĚR .....</b>	<b>45</b>
<b>10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>46</b>
<b>11 . PŘÍLOHY .....</b>	<b>50</b>

## 1. Úvod

Jedním z hlavních cílů současné molekulární genetiky je snaha o porozumění molekulární podstaty vzniku mutací, které vedou ke genetickému onemocnění. Snahou je využít těchto informací ke zlepšení diagnostiky, ke zlepšení terapeutických metod a prevenci vzniku onemocnění [7].

Stanovení pořadí nukleových kyselin v biologických vzorcích – sekvenování DNA je v dnešní době nedílnou součástí lékařských, ale i vědeckých aplikací. Využitelnost sekvenčních metod spočívá nejen v diagnostice dědičných chorob a nádorových onemocnění, ale své uplatnění také nalézá při výzkumu biologických procesů, a také v souvisejících oborech, jako například forenzní medicíně. Sekvence DNA byla také použita ve světovém projektu čtení lidského genomu, který byl zveřejněn v roce 2001.

Základní metodou sekvenování je Sangerova enzymatická metoda, která od sedmdesátých let 20. století patří mezi nejčastěji používanou aplikaci sekvenční analýzy. V posledních několika letech dochází na poli genetického testování k rychlému technologickému rozvoji, který umožnil vznik sekvenátorů nové generace (z anglického New Generation Sequencing – NGS) [16].

## 2. Historie

Kořeny genetiky zasahují až do raného starověku a středověku. Pěstitelé a chovatelé zvířat pozorovali, že některé znaky se přenášejí z rodičů na potomstvo. Avšak nikdo ze starověkých a středověkých badatelů tento jev vysvětlit nedokázal [17].

V polovině 19. století brněnský opat Gregor Mendel vysvětlil a popsal zákonitosti, jimiž se řídí přenos dědičných znaků. Při pokusech s křížením hrachu definoval zákony dědičnosti. Jeho práce, kterou publikoval v roce 1866, však nebyla pochopena. O znovobjevení a potvrzení správnosti jeho poznatků se v roce 1900 zasloužili Hugo de Vries, Carl Correns a Erich von Tschermak-Sysenegg, kdy na základě svých pokusů došli ke stejným závěrům jako Mendel. Tento rok je považován za zrod genetiky [17].

Johannes Friedrich Miescher, švýcarský lékař a přírodovědec, roku 1869 z jader bílých krvinek poprvé izoloval molekulu DNA, kterou nazval nuclein. Stál tak u zrodu objevu, jehož důležitost mohl jen stěží odhadnout. Pojem genetika (z latinského *genus* – rod) zavedl roku 1906 britský badatel William Bateson. Roku 1904 americký genetik Thomas Hunt Morgan na univerzitě Columbia University se svými kolegy začal studovat a křížit *Drosophila melanogaster*, neboli octomilku obecnou, ve snaze nalézt dědičné mutace. V roce 1912 vyslovil teorii o uspořádání genů v chromozomech, stanovil, že geny na chromozomech jsou uspořádány lineárně za sebou a pravděpodobnost jejich rekombinace je přímo úměrná jejich vzdálenosti. Roku 1933 byl oceněn Nobelovou cenou.

Dalším zlomem byl návrh prostorového uspořádání molekul nukleových kyselin v podobě známé dvojité šroubovice v roce 1953, o který se zasloužili vědci James Watson a Francis Crick. Zásadní moment, který k tomuto objevu přispěl, byl rentgenový difrakční obraz DNA pořízený Rosalind Franklinovou, a jeho interpretace s pomocí dřívějších poznatků o chemické stavbě DNA. V roce 1962 byli Francis Crick, James Watson a Maurice Wilkins oceněni Nobelovou cenou za fyziologii a lékařství. Wilkins zprostředkoval informaci o difrakčním obrazu DNA, Franklinová se ocenění nedožila, ale ani nebyla na něj dříve navržena, stejně jako ti, kteří se podíleli na chemické analýze DNA (Erwin Chargaff aj.).

Klíčovým okamžikem v oblasti genetiky byl rok 1988, kdy vznikla mezinárodní organizace pro mapování a sekvenování lidského genomu HUGO (Human Genome Organisation). Byl tak odstartován projekt lidského genomu [18]. V roce 2003 byl tento projekt ukončen s výsledkem kompletního přečtení lidského genomu [30].

### 3. Molekulární základy dědičnosti

#### 3.1 Nukleové kyseliny

Chemický základ dědičnosti, tedy genetická informace a její přenos u všech organismů – jednobuněčných, mnohobuněčných, ale i virů (nebuněčná forma života), je zakódován ve struktuře dvou typů informačních nukleových makromolekul:

- deoxyribonukleové kyselině (DNA – deoxyribonucleic acid)
- ribonukleové kyselině (RNA – ribonucleic acid) [19]

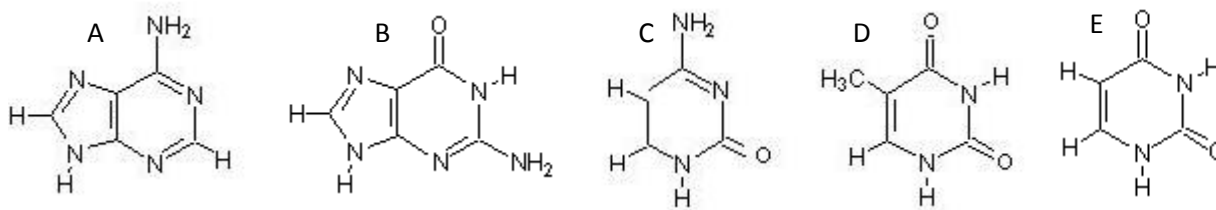
##### 3.1.1 Stavba nukleových kyselin

Polymerní nukleové kyseliny jsou složeny z monomerních jednotek zvaných nukleotidy. Nukleotidy jsou složeny ze tří chemicky i strukturně rozdílných částí: dusíkaté báze, cukerného zbytku a fosfátové skupiny. Dusíkatá báze a cukerný zbytek se označují jako nukleosid.

Kyselý charakter nukleových kyselin je způsobeno přítomností fosfátové skupiny. NK obsahuje dva cukerné zbytky: deoxyribózu (DNA) a ribózu (RNA). Dusíkaté báze jsou také dvojího typu. Jedná se buď o deriváty bicyklického purinu nebo monocyklického pyrimidinu [1]. Rozlišujeme pět hlavních heterocyklických dusíkatých bází. Bázemi purinu jsou adenin (A) a guanin (G), pyrimidinu cytosin (C), thymin (T) a uracil (U). (obr. 1)

Jednotlivé báze jsou napojeny N-glykosidovými vazbami na cukerné zbytky spojované fosfodiesterovými vazbami do polarizovaného polynukleotidového řetězce.

Hlavní úlohou nukleotidů v organismu není pouze stavba nukleových kyselin, ale také účastnit se četných fosfotransferázových reakcí (ATP). Svou roli hrají také při biosyntéze sacharidů (UDP-glukosa, UDP-galaktosa) a lipidů (CDP-diacylglycerol). V neposlední řadě jsou nukleotidy součástí koenzymů FAD, NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup> a koenzymu A [6].



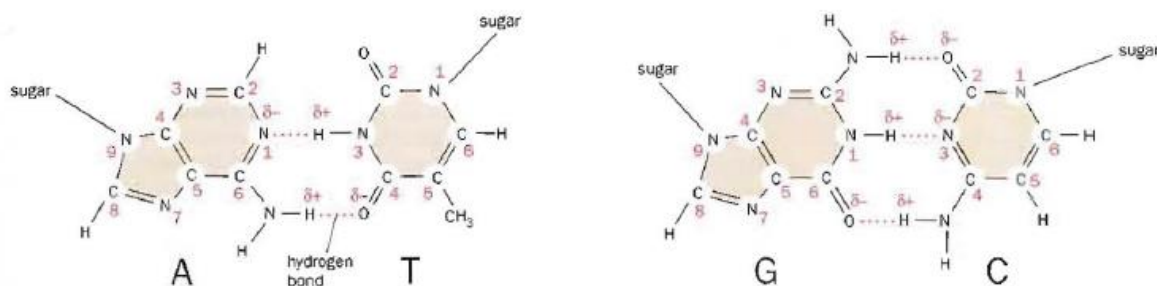
**Obr. 1 Dusíkaté báze – vzorce** A) adenin B) guanin C) cytosin D) thymin E) uracil

zdroj: [http://www.iam.fmph.uniba.sk/web/genetika/stranky/andrea/images/vzorce\\_baz.jpg](http://www.iam.fmph.uniba.sk/web/genetika/stranky/andrea/images/vzorce_baz.jpg)

### 3.1.2 Párování dusíkatých bází

Důležitou vlastností nukleových kyselin je jejich schopnost tvorby párů mezi dusíkatými bázemi. Toto párování je uskutečněno vodíkovými vazbami mezi jejich polárními skupinami a podle pravidel komplementarity. Nejčastějším uspořádáním párů mezi bázemi v organismu je vazba mezi G a C (obsahuje 3 vodíkové vazby) a mezi A a T (popř. U v RNA, obsahuje 2 vodíkové vazby). Purinová báze se tedy páruje s pyrimidinovou a naopak. Uspořádání nazýváme Watsonovy-Crickovy (W-C) páry, které jsou nositelem genetické informace. (obr. 2)

Jiné uspořádání párů bází je sice také možné a jejich párová interakce může být i výhodnější (silnější), ale hlavním důvodem proč jiné konformace nemůžou být nositelem genetické informace je jejich „neisostericita“, tj. jejich nevhodnost z hlediska začlenění do linie řetězce DNA a neschopnost tvorby dvoušroubovice. [15].



Obr. 2 Komplementarita bází

zdroj: Human Molecular Genetics, Strachan str.7

### 3.1.3 DNA a její struktura

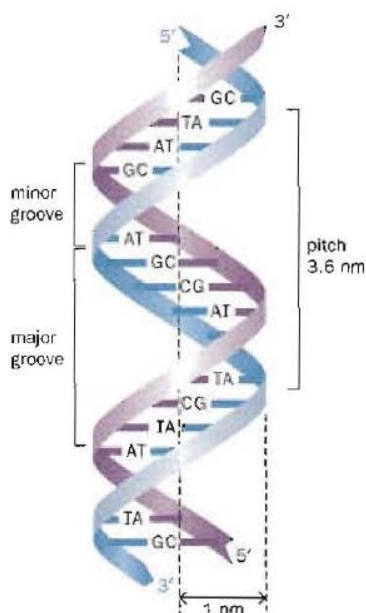
DNA neboli deoxyribonukleová kyselina je obsažena ve všech buňkách živých organismů. Výjimku tvoří některé druhy jednobuněčných živočichů (virů), u kterých je DNA nahrazena méně stabilní RNA (ribonukleovou kyselinou).

U prokaryotických organismů, které nemají jádro, se chromozomální DNA nalézá volně v cytoplasmě. Některé typy buněk obsahují přídatnou (postradatelnou) genetickou informaci. Tento typ DNA označujeme jako plazmidová. Dojde-li ke ztrátě plazmidu, může dojít ke zkrácení životnosti organismu. Pokud však buňka přijde o chromozomální DNA, zpravidla hyne [14].

V eukaryotických buňkách se DNA vyskytuje v chromozomech uvnitř jádra, dále v mitochondriích a u rostlinných buněk v chloroplastech [12].



Nejběžnější formou DNA je pravotočivá antiparalelní dvoušroubovice. Existuje v 6 formách (A-E a Z). Nejběžnější uspořádání označujeme jako B konformaci. Její průměr činí 2 nm a na jednu otáčku připadá 10 párů bází. Stoupání závitu je 3,6 nm. Vyznačuje se opačnou polaritou řetězců, kdy orientace jednoho řetězce je ve směru 5' → 3' a druhého ve směru 3' → 5' [11]. (obr. 3)



**Obr. 3 Struktura DNA**

zdroj: T.Strachan, A.Read – Human MOlecular Genetics

### 3.1.4 RNA a její struktura

Ribonukleová kyselina neboli RNA je podobná s DNA, jsou zde ale i rozdíly. RNA až na výjimky bývá jednořetězcová, tvořená tedy pouze jedním polynukleotidovým řetězcem. Namísto 2'-deoxyribosy (DNA) je cukerným zbytkem ribosa. Rozdíl nalezneme i při párování dusíkatých bází, kdy thymin je nahrazen uracilem. Ostatní purinové a pyrimidinové složky zůstávají, mění se pouze jejich poměr. Neplatí tak, že množství guaninu a cytosinu (adeninu a uracilu) se shoduje [6]. V molekule cukerné složky nukleotidu (D-ribosy) se na uhlíku C2' nachází hydroxilová skupina. Ta je schopna tvořit silné vodíkové vazby a slouží jako donor vodíkové vazby. Přispívá tak ke stabilizaci molekuly [13]. RNA se vyskytuje v několika formách:

**Messengerová RNA** (mRNA, *messenger RNA*) – její syntéza probíhá v jádře procesem zvaným transkripce. Nukleotidový řetězec je lineární. [4] Hlavní funkcí mRNA je přenos genu do procesu translace (proteosyntézy). Slouží zde jako templát, podle kterého se jednotlivé aminokyseliny řadí do polypeptidového řetězce [6].

**Transferová RNA** (tRNA, *transfer RNA*) – její hlavní funkcí je transport aminokyselin do ribozomu. Zařazuje zde aminokyseliny podle mRNA do vznikajícího polypeptidu [6]. Každá buňka obsahuje nejméně 20 druhů tRNA, každá aminokyselina potřebná pro výstavbu proteinu má tedy svoji vlastní tRNA [6]. Molekulu tvoří 74-95 nukleotidů, její sekundární struktura není lineární. Na několika místech je vlákno propojeno vodíkovými můstky a vytváří čtyři ramena – akceptorové, antikonové, D rameno a TC rameno [4]. Akceptorové rameno slouží pro vazbu aminokyseliny, antikodonové rameno obsahuje antikodon, který je tvořen tripletem nukleotidů. Triplet je komplementární k příslušné trojici nukleotidů na mRNA. [13].

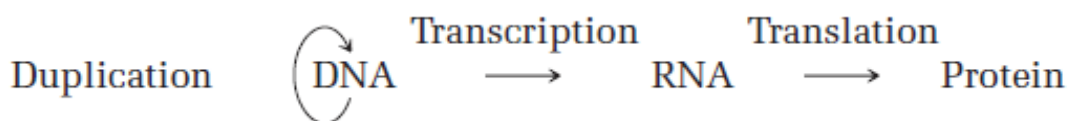
**Ribosomální RNA** (rRNA, *ribosomal RNA*) – tvoří útvary tzv. ribozomy. Jsou místem syntézy proteinu. Ribozomy se skládají ze dvou podjednotek, malé a velké. Po navázání mRNA na malou podjednotku dochází ke spojení s velkou podjednotkou. Uvnitř pak dochází ke kontaktu mRNA s tRNA a připojení aminokyseliny do polypeptidového řetězce [4].

**Mikro RNA** (miRNA) – je přirozeně se vyskytující jednořetězcová molekula nekódující RNA, její délka dosahuje řádově 21 až 25 nukleotidů. Vzniká při procesu transkripce z genů v DNA, ale nedochází k jejich translaci v protein. Částečně je komplementární k messengerové RNA (mRNA) vyskytujícím se v buňce. Její hlavní funkcí v organismu je schopnost regulovat buněčnou expresi (snižovat až ukončit) [22].

**Malá jaderná RNA** (snRNA, *small nuclear RNA*) – jedná se o typ nekódující RNA, jenž se v organismu podílí na úpravě pre-mRNA. Pomocí těchto molekul dochází k tzv. sestřihu (splicing), tj. k odstranění intronů a vzájemnému spojení exonů. [23].

### 3.2 Exprese genetické informace

Způsob, jakým je genetická informace uložena v molekule DNA a následný přenos genetické informace do struktury proteinu, byl poprvé formulován Francisem Crickem roku 1956 v teorii, kterou pojmenoval Centrální dogma. Její podstatou je schopnost transkribovat (přepisovat) molekulu DNA do RNA a translatovat (překládat) genetickou informaci do struktury polypeptidu. Nedílnou součástí teorie je i schopnost molekuly DNA zachovat genetickou informaci a předávat ji v nezměněné formě při mitotickém dělení. To je zajištěno procesem zvaným replikace (zdvojování). (Obr. 4)



**Obr. 4 Centrální dogma molekulární biologie**

Zdroj: Molecular Biology of the Gene

#### 3.2.1 Replikace

Replikace je proces, který zajišťuje přenos genetické informace při rozmnožování buněk. Probíhá v jádře buněk v S-fázi buněčného cyklu. Při replikaci vznikají z původní molekuly (mateřské) DNA dvě strukturně totožné molekuly. Nová vlákna jsou syntetizována na základě komplementarity dusíkatých bází [6].

Replikace je zahájena rozvolněním vazby vodíkových můstků mezi jednotlivými nukleotidy enzymem helikázou. Vzniká tak tzv. replikační bublina. V iniciaci replikace se uplatňuje také enzym primáza, jehož úkolem je syntéza krátkého RNA fragmentu (délka cca 10 nukleotidů), který slouží jako replikační start. Volný 3'-konec primeru je rozeznán enzymem DNA polymerázou, který na základě komplementarity připojuje k templátové DNA další nukleotidy a syntetizuje tak nové vlákno ve směru 5'-3'. RNA primer je exonukleázovou aktivitou odbourán.

Druhé (antiparalelní) vlákno je syntetizováno obdobně, ale po menších úsecích (100 – 200 nukleotidů). Důvodem je schopnost DNA polymerázy syntetizovat nové vlákno pouze ve směru 5'-3'. Vzniklé úseky označujeme jako Okazakiho fragmenty. Enzymem ligázou je zajištěno jejich spojení [17].

### 3.2.2 Transkripce

Transkripce neboli přepis, je proces, při kterém genetická informace uložená v DNA je transkribována do mediátorové RNA (mRNA, *messenger RNA*). mRNA obsahuje informaci, která slouží k výrobě konkrétní bílkoviny.

Iniciace procesu transkripce u eukaryot vyžaduje určité změny v organizaci chromatinu, včetně chemických modifikací histonů, a pokračuje enzymem RNA polymerázou, která prohledává DNA řetězce (u eukaryot za pomoci četných proteinových transkripčních faktorů) a hledá startovací sekvenci neboli promotor. Ten u eukaryot obsahuje sekvence TATAA (TATA box), GC bohatý úsek (GC box) a opakované CAAT (CAAT box). Při nalezení promotoru a navázání RNA polymeráza dochází k rozvolnění vodíkových můstků a rozpletení molekuly DNA v rozsahu molekuly RNA polymerázy, která pak syntetizuje RNA vlákno komplementární k přepisovanému vláknu DNA a tudíž identické s druhým DNA vláknem.

Elongace probíhá obdobně jako u replikace ve směru 5' - 3', a také podle stejné komplementarity bází jako u DNA, rozdílem je však náhrada thyminu za uracil. Elongace probíhá do doby, než RNA polymeráza narazí na terminátor transkripce, který u prokaryot tvoří vlásenková smyčka tvořené RNA (jako důsledek vzájemně komplementárních sekvencí terminátoru) a následující sekvence oligo-U. U eukaryot je vlastní mechanismu terminace nejasný, ale v koncové části tvořené RNA známe signál AAUAAA, známý jako polyadenylační signál. Za ním totiž specifická endonukleáza odštípne zbytek RNA a za polydenylační signál pak další enzym (terminální transferáza) připojuje nukleotidy obsahující výhradně adenin v počtu až 250 a vytváří tak 3'koncové poly-A. Přítomnost poly-A je typická pro eukaryotické mRNA a uplatňuje se jako ochrana před nukleázami a v procesu translace.

Primární transkript není plně funkční a prochází post-transkripčním úpravami. Ze sekvence jsou procesem sestřihu (*splicing*) odstraňovány nekódující sekvence genu, tzv. introny. Kódující sekvence genu tzv. exony se touto úpravou dostávají k sobě. Jejich uspořádání specificky určuje strukturu a funkci proteinu, který bude podle nich syntetizován [17].

Dalšími postranlačními úpravami jsou tvorba tzv. metylguanozinové čepičky na 5'- konci, jejíž hlavní funkcí v proteosyntéze je ochrana molekuly před účinkem nukleáz a připojení polyadeninové sekvence na 3'- konec, která napomáhá orientaci molekuly v proteosyntéze a rozpoznání molekuly ribozomem. Takto upravená molekula mRNA putuje z jádra do cytoplazmy [6].

### 3.2.3 Translace

Jedná se o překlad genetické informace z mediátorové mRNA do sekvence primární struktury polypeptidu. Místem translace je cytoplazma. Zprostředkovávají ji specifické orgány – ribozomy. O zařazení aminokyselin do polynukleotidového řetězce rozhoduje systém označovaný jako genetický kód. Jedná se o systém, kdy trojice po sobě následujících dusíkatých bází – triplet (kodon), kóduje jednu z 20 aminokyselin. Čtyři typy nukleotidů dávají možnost vzniknout 64 různým kombinacím.

Genetický kód je univerzální pro všechny organismy, význam jednotlivých tripletů ale může být rozdílný. Je také nepřekryvný, tzn. jednotlivé nukleotidy jsou čteny souvisle ve směru 5' - 3' a degenerovaný, což znamená, že některé aminokyseliny jsou kódovány více triplety. Specifickou funkci mají triplety UAA, UAG, UGA, které nekódují žádnou aminokyselinu. Jsou umístěny na konci translatované sekvence a jsou důležité pro její ukončení. Označujeme je jako terminační (stop) kodony. Svůj význam má také kodon AUG, který kóduje metionin a je iniciátorem proteosyntézy. Označujeme ho jako iniciační kodon [17].

Proces translace začíná navázáním malé podjednotky ribozómu na specifickou oblast mRNA. Součástí této oblasti je iniciační kodon AUG, ke kterému se svým antikodonovým raménkem naváže první tRNA nesoucí aminokyselinu methionin. Na vzniklý komplex nasedá velká podjednotka ribozomu. Aminokyselinová sekvence polypeptidu se prodlužuje podle komplementarity bází nasednutím antikodonu tRNA (nese další aminokyselinu) na další triplet bází. Mezi jednotlivými aminokyselinami dochází k vytvoření peptidové vazby. (Obr. 6) K terminaci celého procesu dochází po nalezení stop kodonu UGA, UAA nebo UAG. Pomocí uvolňovacích faktorů dochází k ukončení syntézy, uvolnění proteinu do cytoplazmy a rozpadu velké a malé podjednotky ribozomu.

Vzniklé polypeptidové vlákno je v Golgiho aparátu nebo endoplazmatickém retikulu upraveno na správnou strukturu. Může být také spojeno s jiným peptidem a využito [13].

## **4. Izolace DNA**

DNA izolace nebo-li extrakce DNA je možná téměř z jakéhokoliv materiálu. Nejčastějšími zdroji jsou krev, sliny, epitelové buňky, vlasy, nehty, moč, spermie atd. V současné době známe řadu metod pro izolaci DNA, které závisí na stáří, velikosti a místě odkud vzorek pochází. Cílem těchto metod je oddělit DNA přítomnou v jádře buňky od ostatních buněčných složek. Izolace DNA je potřeba nejen pro genetickou analýzu, ale využívá se také pro vědecké, lékařské či forenzní účely. Důvodem proč DNA izolujeme od ostatních buněčných složek je, že organické a anorganické sloučeniny mohou interferovat s metodami analýzy DNA a mohou také snižovat její kvalitu [24].

### **4.1. Postup izolace DNA**

Prvním krokem izolace je narušení celistvosti buněk pomocí lyzačního roztoku. Tento proces umožňuje uvolnění nukleových kyselin z jádra. Jednotlivá činidla pro lýzu buněk jsou součástí řady komerčních kitů. U bakterií a rostlinných buněk je důležité rozrušit buněčnou stěnu. K tomuto účelu nejčastěji užíváme lysozym, který polymerní sloučeniny buněk rozpouští. U živočišných buněk k uvolnění nukleových kyselin užíváme jednak iontové detergenty např. dodecylsulfát sodný (SDS), který vlivem snížení osmolality destabilizuje buněčnou membránu a dojde k popraskání buněk, ale také neionogenní (nenabité) detergenty např. Triton X100. Lýza se provádí v solném roztoku, který obsahuje řadu enzymů (nejčastěji proteinázu K) pro denaturaci proteinů a RNázu pro odstranění kontaminující RNA. Tento enzym štěpí RNA na směs oligonukleotidů, aniž by degradoval molekulu DNA. Součástí lyzačního roztoku je také chelatační činidlo ethylendiamin triacetát (EDTA). Jeho hlavní funkcí je zabránit degradaci DNA [2]; [24].

### **4.2 Separční metody**

Abychom ze vzniklého buněčného extraktu získaly co nejčistší DNA, musíme složky tohoto extraktu separovat. Tento krok nazýváme čištění DNA. V současnosti známe celou řadu metod, jak vzorek DNA přečistit. Mezi ty nejpoužívanější řadíme [24]:

**Vsolování a vysolování** – princip této metody je založen na změně rozpustnosti molekul DNA v závislosti na změně koncentrace iontů v roztoku. S rostoucí koncentrací iontů rozpustnost roste (DNA se do roztoku vsoluje) a po dosažení maxima rozpustnost molekuly klesá (DNA se vysoluje) [15].

**Fenol – chloroformová extrakce** – princip metody spočívá v polaritě DNA a v její ochotě rozpouštět se v polárním vodném roztoku. Polarita jednotlivých proteinů je dána aminokyselinami, část molekuly je více polární než jiná. Horní fázi tvoří vodný roztok obsahující DNA, spodní fáze je tvořena organickým rozpouštědlem (chloroform). Fenol obsažený v roztoku sráží proteiny. Vlivem rozdílné polaritě molekul peptidu dochází k hromadění proteinů mezi organickou a vodní fází. Opakovaným přidáváním organického rozpouštědla a odebíráním vrchní fáze dochází postupnému přečišťování roztoku [2]; [15]; [25].

**Silika kolony** – metoda využívá chaotropních solí, které v lyzačním roztoku denaturují DNA tím, že rozrušují intramolekulární vodíkové vazby. DNA v denaturované formě se pak váže na povrch silikátové membrány. Centrifugací přes membránu projdou kontaminující složky, zatímco DNA zůstává navázána na její povrch do doby užití elučního pufru, který uvolní vazbu DNA na silikát [26].

**Magnetické částice** – separační metoda využívající magnetických částic kulovitěho tvaru, které mají modifikovaný povrch, aby mohly vázat vlákna nukleových kyselin. Izolace pak probíhá tak, že do zkumavky obsahující polyethylenglykol (PEG), soli a cílové nukleové kyseliny tyto magnetické částice přidáme. Vlivem změny konformace DNA do globulární formy dojde k vazbě na magnetické částice. Celý systém přiblížíme k působení magnetu. Magnetické částice se přitáhnou ke stěně zkumavky a zbylý roztok se odstraní. Po užití pufru bez přítomnosti solí dojde k opětovnému uvolnění DNA [15] [24].

#### **4.3 Uchování a skladování vzorku**

Před analýzou se DNA uskladňuje při 4°C. Pokud DNA dlouhodobě uchováváme, vhodná teplota je -20°C. Dlouhodobým skladováním a opakovaným rozmrazováním DNA křehne a láme se na fragmenty. Je proto vhodné se opakovaného rozmrazování vyvarovat nejlépe alikvotací vzorku [4].

## 5. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce je v současnosti nejznámější a nejvyužívanější molekulárně-biologickou metodou. Hraje klíčovou roli při diagnostice mnoha geneticky podmíněných chorob. Uplatnění však také nalézá při mapování genomů, získávání templátů pro sekvenování, detekci infekčních mikroorganismů a virů v potravinách, vodě a v půdě, ale také ve forenzní medicíně a archeologii [4]; [5].

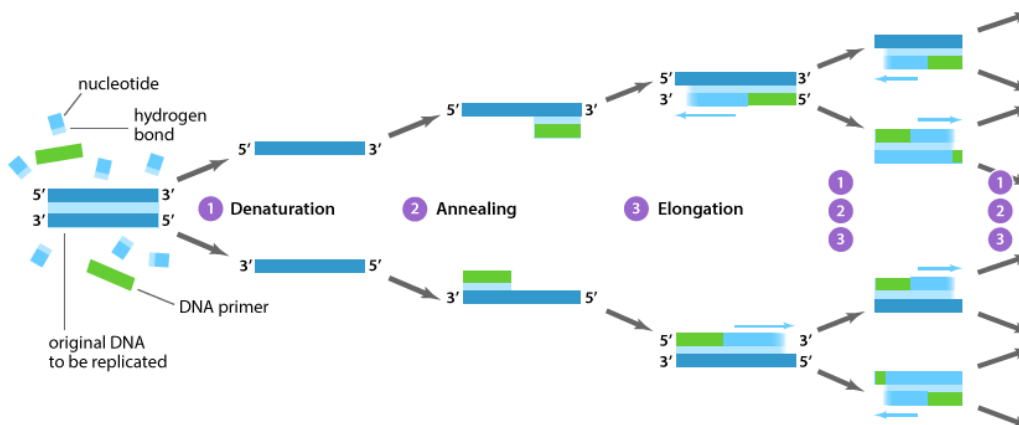
Jedná se o enzymovou metodu sloužící k amplifikaci velkého množství definovaného úseku DNA *in vitro*. Pro amplifikaci určité části DNA je potřeba dvou krátkých úseků tzv. primerů, které jsou komplementární k jednomu řetězci molekuly na jedné straně a k opačnému řetězci na straně druhé [7]. Tyto primery musí být navíc specifické pro oblast, kterou chceme amplifikovat. Pro úspěšný průběh reakce je také potřeba dostatečného množství deoxyrinokleotidtrifosfátů (dNTP) a termostabilní DNA polymeráza

(Taq-DNA-polymeráza), která zůstává aktivní i při teplotách převyšující 90°C. Tento enzym byl izolován z bakterie *Thermus aquaticus*, odtud označení „Taq“. PCR probíhá v zařízení zvaném termocykler, který je konstruován tak aby dokázal měnit teplotu reakční směsi podle předem nastaveného programu. Jeden cyklus reakce se skládá ze tří základních kroků [5]; [7]:

- **Denaturace vyšetřované DNA** – DNA se po dobu 20 – 30 sekund zahřívá na teplotu 92 – 96°C. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků a rozpletení dvoušroubovice. Výsledkem jsou dvě opačně orientované jednovláknové DNA.
- **Annealing primerů (hybridizace)** – Teplota se sníží na 40 - 65°C a dochází k navázání primerů na cílové sekvence vyšetřované DNA.
- **Enzymová syntéza** – Probíhá ve směru 5' → 3' za působení DNA polymerázy, která nasedá na navázaný primer a připojuje nové nukleotidy. Tím se řetězec prodlužuje a vzniká nový fragment vlákna, který chceme získat [4].

„Opakované cykly tepelné denaturace, annealingu a syntézy mají za následek exponenciální zmnožení kopií cílové sekvence [7].“ (obr. 5)





**Obr. 5 PCR reakce**

Zdroj [https://www.abmgood.com/marketing/knowledge\\_base/img/PCR/PCR-polymerase\\_chain\\_reaction.png](https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/img/PCR/PCR-polymerase_chain_reaction.png)

## 6. Metody sekvenování

Těmito metodami určujeme přesné pořadí (sekvenci) nukleových bází ve vyšetřované DNA. V oblasti molekulární diagnostiky patří sekvenování DNA pravděpodobně k nejvýznamnějším technikám [2].

### 6.1. Klasické metody sekvenování

Od konce 70. let 20. století je možné rychlé a účinné sekvenování díky dvěma, téměř současně vyvinutým technikám. Jedna byla vyvinuta ve Velké Británii týmem F. Sangera a A. R. Coulsona – metoda terminace řetězců (enzymová) a druhá v USA W. Gilbertem a A. Maxamem – metoda specifické chemické degradace. Jedná se o dvě zcela odlišné metody. V současné době se více z těchto technik užívá metoda F. Sangera (enzymová). Hlavními důvody jsou netoxičita reagensů, relativní jednoduchost a především možnost postupné automatizace [2].

#### 6.1.1. Sangerova metoda

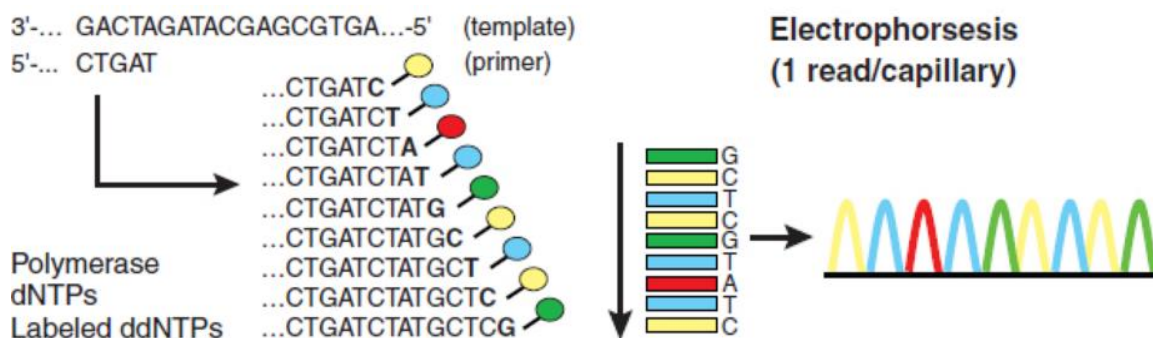
Jedná se o tzv. metodu terminace řetězců, ddNTP metodu nebo enzymovou metodu, která využívá procesu replikace DNA a tedy principu využívaného také při PCR. Templátem je jednořetězcová molekula DNA [15].

Prvním krokem experimentu je navázání radioaktivně značeného primeru, který je komplementární k začátku sekvenovaného místa a je tedy výchozím bodem pro syntézu nového vlákna. Druhá možnost je použití běžného primeru, ale aplikace jednoho

radioaktivního prekursoru, který se zabudovává do syntetizovaného vlákna. Do reakční směsi přidáme deoxyribonukleotidy dNTP a modifikovaný nukleotid (dideoxynukleotid – ddNTP). Syntézu vlákna spustíme přidáním DNA-polymerázy. ddNTP je do polynukleotidového řetězce včleněn jako nukleotid normální, ale další syntézu vlákna zastaví. Důvodem je absence hydroxylové skupiny na 3' konci, který umožňuje připojení dalšího nukleotidu. Začlenění ddNTP je náhodné a výsledkem je směs různě dlouhých vláken. Syntéza komplementárních vláken probíhá ve čtyřech paralelních reakcích, každá s odlišným typem ddNTP. Jednotlivé fragmenty se separují pomocí gelové elektroforézy a autoradiograficky vizualizují [15] [28].

Modernější modifikace této metody umožňuje sekvenaci v jedné reakci a využívá fluorescenčního značení na místo radioaktivního jako v tradiční metodice. Fluorescenční značky se připojují na 3' konce dideoxynukleotidů (ddNTP). Pro každý ddNTP můžeme použít jiný fluochrom [28]. Separace probíhá elektroforeticky v tenké gelové vrstvě mezi skly nebo nověji ve skleněné kapiláře. Fluorescenční signál reakčních produktů je detektorem detekován, přenesen do počítače a převeden do příslušné sekvence DNA [29]. (Obr. 6)

Díky značné možnosti automatizace je tato metoda součástí řady analyzátorů i dnes. Příkladem může být moderní typ přístroje od firmy Thermo Fisher Scientific – Applied Biosystems®3500 Series Genetic Analyzer [27].



**Obr. 6 Sekvenování DNA Sangerovou metodou**

Zdroj: [http://www.mdpi.com/medsci/medsci-02-00098/article\\_deploy/html/images/medsci-02-00098-g001-1024.png](http://www.mdpi.com/medsci/medsci-02-00098/article_deploy/html/images/medsci-02-00098-g001-1024.png)

### **6.1.2. Maxam-Gilbertova metoda**

„Princip této metody je založen na chemickém štěpení analyzované molekuly DNA [6].“ Stejně jako Sangerova metoda, pracuje s jednovláknovou DNA, která je na 5' konci značena radioaktivním fosforem. Reakce probíhá ve čtyřech zkumavkách, kdy každá obsahuje jiný typ činidla, který rozštěpí fragment v místě specifické báze. Vzniká tak směs různě dlouhých fragmentů. Pomocí elektroforézy fragmenty rozdělíme podle jejich délky. Kratší úseky se v gelu se pohybují rychleji, což umožňuje jejich separaci. Delší fragmenty jsou naopak zpomalovány a nalézáme je blíže ke startu [31].

Vizualizace probíhá pomocí autoradiografie, kdy jednotlivé fragmenty se jeví jako proužky [15].

## **6.2. Nové metody sekvenování (Next generation sequencing, NGS)**

V posledním desetiletí, někdy označovaném jako postgenomová éra, se objevily zcela nové technologie a možnosti sekvenování. Zatím co dříve byly potřeba k osekvenování celého lidského genomu roky a byly na to potřeba stovky přístrojů, dnes je to samé možné udělat na jediném přístroji za necelé 3 týdny. NGS využívá principu paralelizace procesu sekvenování, kdy dochází k sekvenci tisíců až milionů sekvencí současně. I když tyto nové technologie v mnoha případech předčí klasické metody sekvenování, jsou stále zatížené značnými náklady na přístrojové vybavení a provoz.

Základní rozdíl mezi klasickým (Sangerovým) sekvenováním a NGS je ve způsobu detekce narůstajících řetězců. Klasické sekvenování používá elektroforetickou separaci, což je zároveň hlavní limitující faktor přes veškeré automatizační snahy. NGS se opírá o chemické děje při vstupu nového nukleotidu do syntetizovaného řetězce, které poskytnou signál v případě, že vložený prekurzor skutečně odpovídá požadovanému nukleotidu z hlediska komplementárního templátu. Detekce odpovědí je pochopitelně maximálně automatizována [46].

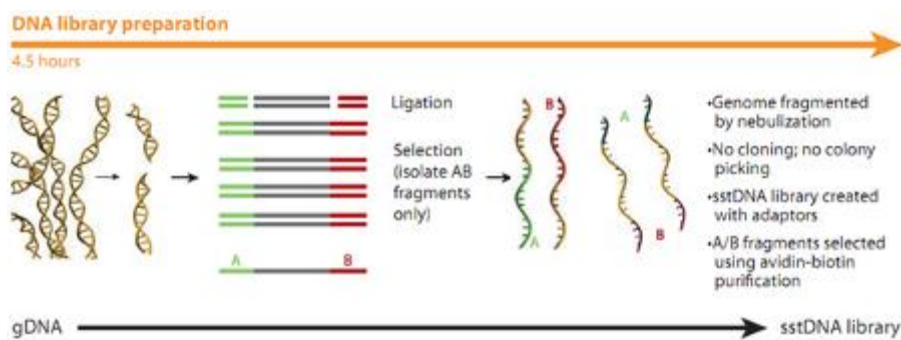
### **6.2.1 Pyrosekvenace (454/Roche)**

Pyrosekvenace je jednou z prvních sekvenačních metod nové generace. Metoda byla vyvinuta v roce 1987 ve Stockholmu profesorem Palem Nyrénem. Ve své studii popsal, jak lze monitorovat aktivitu DNA polymerázy pomocí bioluminiscence. Do praxe byla sama o sobě uvedena až o několik let později. Pyrosekvenaci lze popsat jako sled

enzymatických reakcí, během kterých se začleňují jednotlivé nukleotidy do nově vznikajícího řetězce DNA, přičemž dochází k emisi viditelného světla. Množství uvolněného světla je úměrné počtu začleněných nukleotidů v jednom stupni [15].

### 6.2.1.1 Postup sekvenační metody 454/Roche

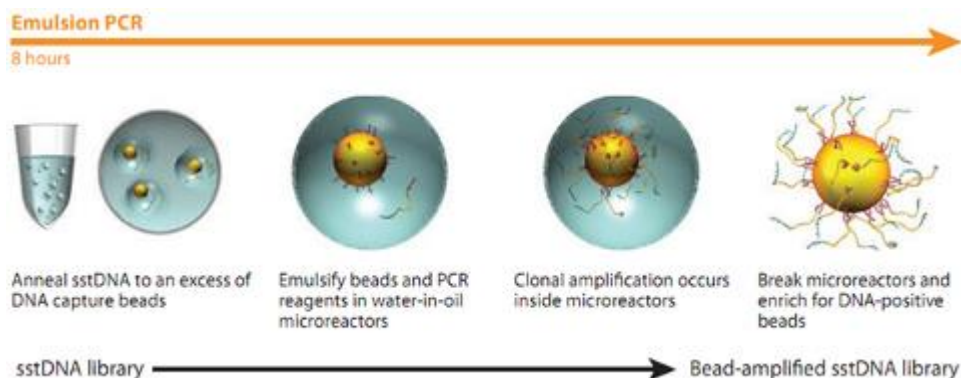
V prvním kroku je genomová DNA mechanicky rozštěpena kratší fragmenty o délce 300 – 800 bp. Na konec těchto fragmentů jsou ligovány specifické adaptory (A a B). Adaptér A je značen biotinem a slouží k imobilizaci fragmentu na magnetické kuličky potažené streptavidinem. DNA je denaturována hydroxidem sodným a vzniklé fragmenty slouží jako DNA knihovna. (obr. 7)



Obr. 7 Příprava knihovny

Zdroj: [http://www.biotechland.it/appunti\\_genomica%20funz\\_1\\_454.html](http://www.biotechland.it/appunti_genomica%20funz_1_454.html)

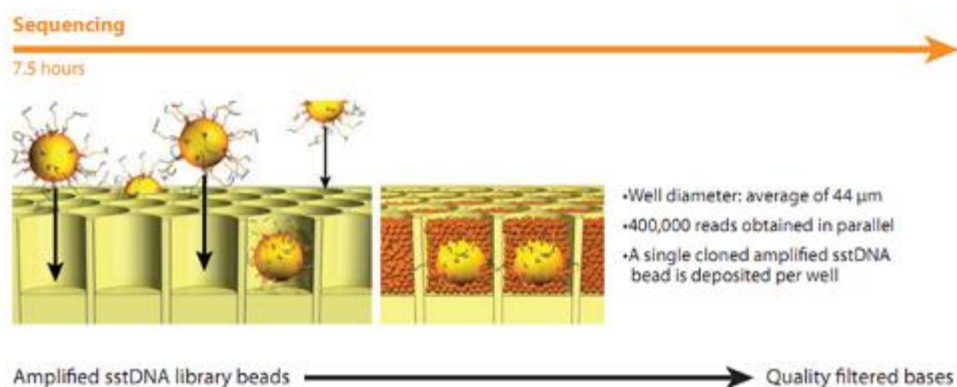
Druhým krokem je PCR reakce. Adaptory na konci řetězců slouží jako primery pro tzv. emulzní polymerázovou řetězovou reakci (emPCR), která probíhá na streptavidinových kuličkách v olejové emulzi. Ke každé kuličce je připojena pomocí oligonukleotidů jedna molekula jednořetězcové DNA, která je během emPCR namnožena. (Obr. 8)



**Obr. 8 Amplifikace pomocí emulzní PCR**

Zdroj: [http://www.biotechland.it/appunti\\_genomica%20funz\\_1\\_454.html](http://www.biotechland.it/appunti_genomica%20funz_1_454.html)

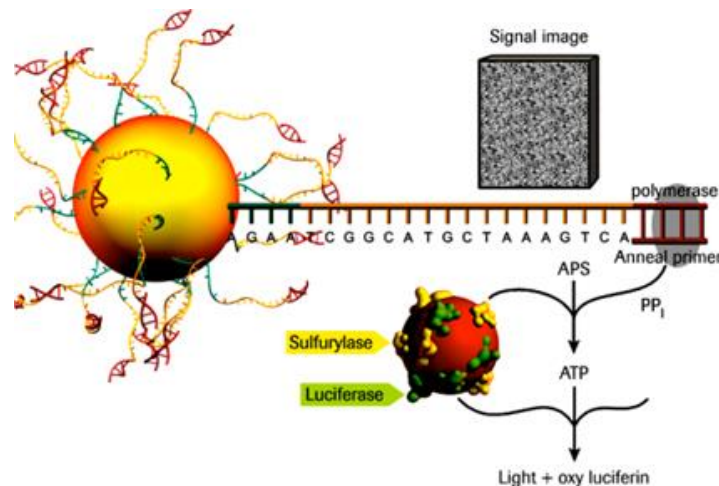
Vlastní sekvenace probíhá na povrchu pikotitrační destičky (PTP, *PicoTiterPlate*). Velikost jednotlivých jamek zajišťuje přítomnost pouze jedné DNA kuličky. Do jamky jsou vpraveny další kuličky obsahující enzymy nezbytné pro pyrosekvenační reakci (DNA-polymerázu, luciferázu, sulfurylázu) a enzymy způsobující imobilizaci kuličky. (Obr. 9)



**Obr. 9 Umístě DNA kuliček do jamek pikotitrační destičky**

Zdroj: [http://www.biotechland.it/appunti\\_genomica%20funz\\_1\\_454.html](http://www.biotechland.it/appunti_genomica%20funz_1_454.html)

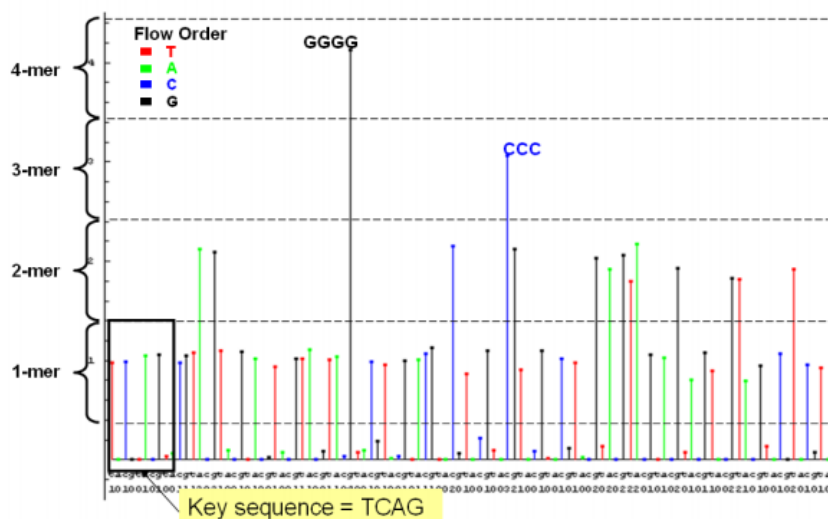
Takto připravená pikotitrační destička se umístí do přístroje, který řídí průtok nukleotidů (dNTP) v přesně daném pořadí. Vždy, když je daný nukleotid komplementární k následující bázi, je DNA polymerázou inkorporován do prodlužujícího se řetězce za současného uvolnění molekuly pyrofosfátu. Enzym ATP sulforyláza přeměňuje uvolněný pyrosulfát na ATP, který dodává energii reakci, při níž dochází k oxidaci luciferinu na oxyluciferin a světlo. Detekce se provádí pomocí CCD kamery umístěné na spodní části pikotitrační destičky, která emitované světlo detekuje. (Obr. 10)



**Obr. 10** Pyrosequenační reakce

Zdroj: [http://www.biotechland.it/appunti\\_genomica%20funz\\_1\\_454.html](http://www.biotechland.it/appunti_genomica%20funz_1_454.html)

Vyhodnocení probíhá v počítačového softwaru, kdy jako první dochází k detekci jednotlivých nukleotidů, sloužící jako standard. Emitované záblesky jsou zpracovány do tzv. Flow grafů. (Obr. 11) V případě více stejných nukleotidů řazených v sekvenci za sebou – tzv. homopolymery, dochází vlivem odštěpení více pyrofosfátu ke zvýšení intenzity detekovaného signálu. Podle intenzity emitovaného světla je poté vypočtena délka daného homopolymeru. Jelikož se intenzita nezvyšuje lineárně, dochází často k chybám při čtení těchto homopolymerů. Posledním krokem je blastování = přiřazení přečtené sekvence k již známým sekvencím v genových bankách [15]; [32].



**Obr. 11** Flowgram

Zdroj: <http://sequence.otago.ac.nz/download/ManualPartB.pdf>

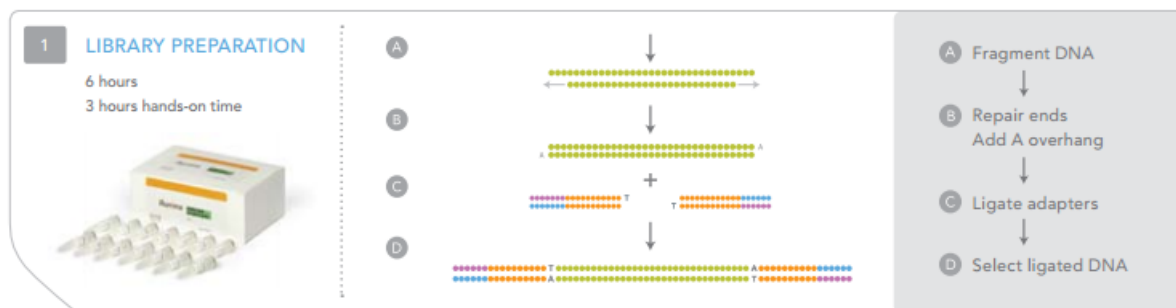
Prvním komerčně dostupným analyzátozem využívající výše zmíněnou technologii, byl analyzátor firmy 454 Life Sciences (společnost byla později koupená mezinárodním farmaceutickým gigantom Roche) a sice FLX Genome Sequencer (FLX GS), který byl na trh uveden v roce 2005. Umožňoval masivní paralelní analýzu stovek tisíců krátkých úseků DNA během jedné procedury. V roce 2011 se na trhu objevila modernější verze toho přístroje – FLX GS Titanium +, který umožnil zlepšení výkonu prodloužením čtecího rámce. Během sekvenace vytváří vysoce kvalitní uspořádání s větším pokrytím kompletního genomu. Firma Roche v současnosti (2016) také nabízí stolní verzi pyrosekvenátoru GS Junior, jehož pořizovací náklady jsou nižší, nabízí možnost sekvenování v menším objemu a při nižší spotřebě chemikálií [15].

## 6.2.2 Reversibilní terminátorová sekvenace (Illumina/Solexa)

Za vývojem reversibilní terminátorové sekvenace stojí společnost Solexa, kterou v roce 2007 odkoupila firma Illumina. Stejně jako u 454/Roche je princip metody založen na sekvenaci syntézou. Technologie Illumina je převážně využívána k resekvenaci známých genomů či sekvenaci transkribovaných úseků [15].

### 6.2.2.1 Postup sekvenační metody Illumina/Solexa

Vzorek DNA je nejprve štěpen na menší fragmenty dlouhé 800bp. Konce jednotlivých fragmentů jsou pak směsí enzymů upraveny tak, aby na ně mohly být navázány dva rozdílné adaptéry, které umožňují kovalentní vazbu na povrch pro sekvenaci. Následnou elektroforetickou separací se pro sekvenační reakci vybírají fragmenty o délce 200 až 500 bp. (Obr. 12)

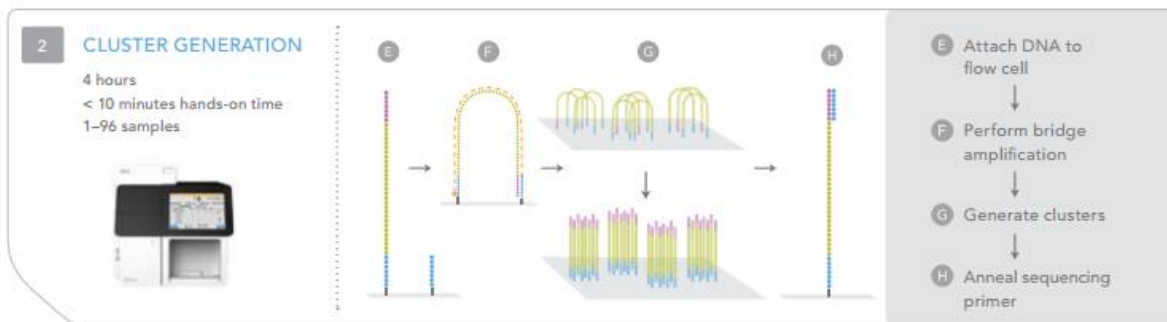


Obr. 12 Příprava Knihovny

Zdroj: [http://www.illumina.com/documents/products/brochures/brochure\\_genome\\_analyzer.pdf](http://www.illumina.com/documents/products/brochures/brochure_genome_analyzer.pdf)



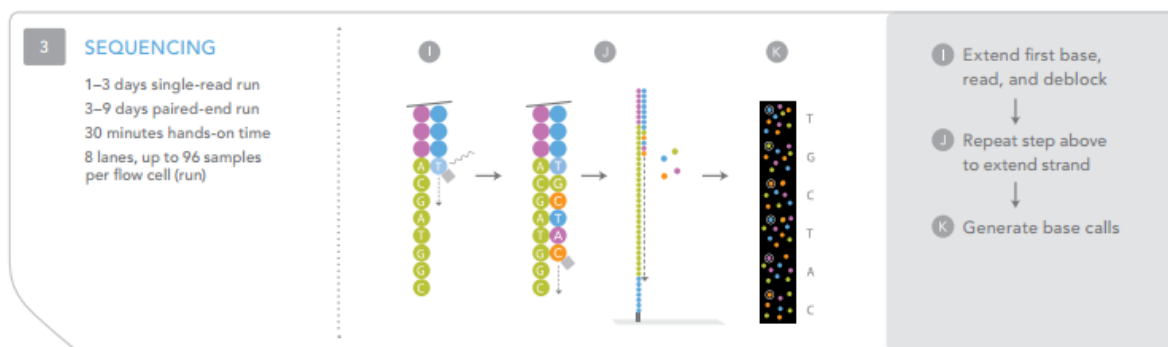
Fragmenty DNA jsou přichyceny jedním koncem na sklíčko, které obsahuje oligonukleotidy komplementární k adaptérům na fragmentech. Po přidání reagentů nezbytných pro PCR dochází k amplifikaci, ohnutí fragmentů a vytvoření tzv. „můstku“. Výsledkem amplifikace jsou dva řetězce. Následnou denaturací zajistíme narovnání jednotlivých fragmentů a opakováním cyklu dosáhneme namnožení původní sekvence na tisíce kopií. Namnožené fragmenty se shlukují a tvoří tzv. klastry. Tento způsob PCR je označován jako klastrová nebo také můstková PCR. (Obr. 13)



**Obr. 13 Můstková amplifikace**

Zdroj: [http://www.illumina.com/documents/products/brochures/brochure\\_genome\\_analyzer.pdf](http://www.illumina.com/documents/products/brochures/brochure_genome_analyzer.pdf)

Vlastní sekvenování probíhá pomocí primerů navázaných na kopie fragmentů a pomocí modifikovaných nukleotidů značených různými fluorochromy. Nukleotidy jsou na 3' konci chemicky upraveny aby nedošlo k začlenění více než jedné báze. Jejím navázáním dochází k dočasnému zastavení syntézy. Detekce signálu je prováděna přímo při syntéze vlákna a její zastavení je pouze dočasné. Po odblokování 3' konce může syntéza opět pokračovat začleněním následující komplementární báze. Proces se opakuje do doby, než je zachycen obraz celé sekvence [15]; [33]; [35]. (Obr. 14)



**Obr. 14 Sekvenace**

Zdroj: [http://www.illumina.com/documents/products/brochures/brochure\\_genome\\_analyzer.pdf](http://www.illumina.com/documents/products/brochures/brochure_genome_analyzer.pdf)



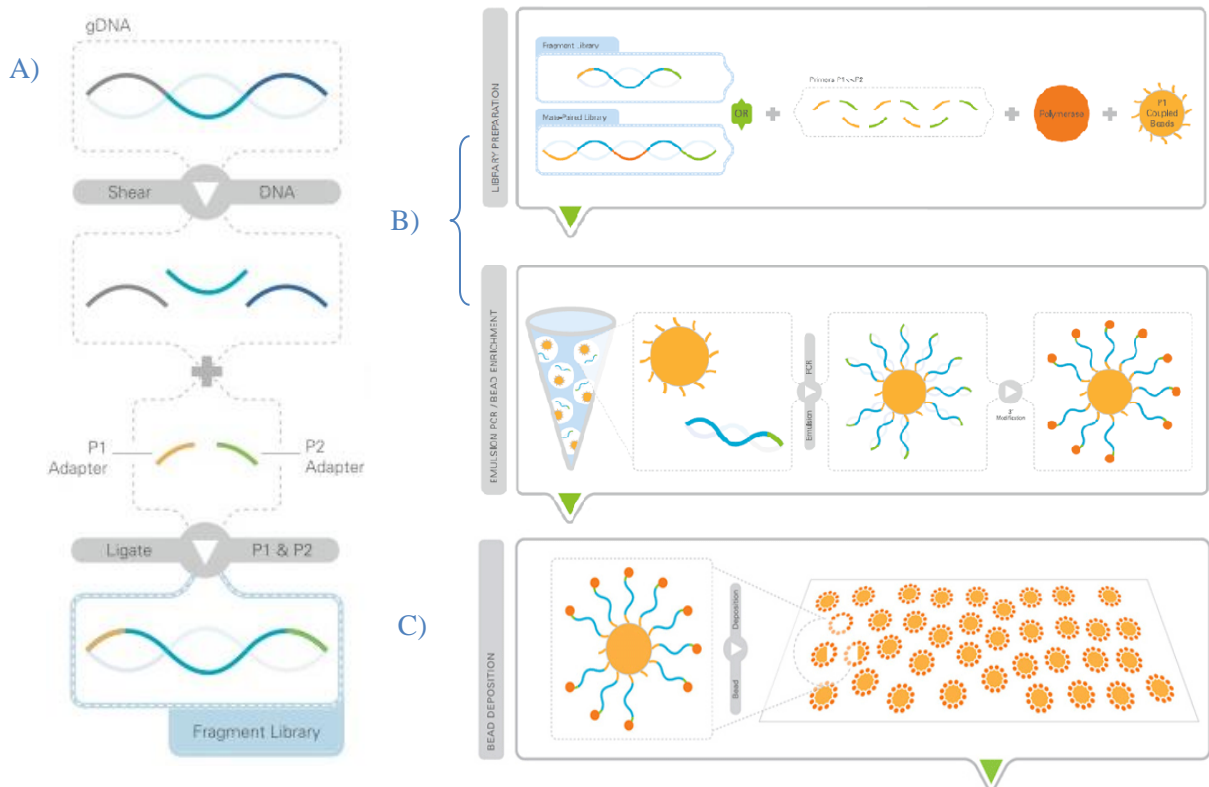
Prvním přístrojem, který tento typ platformy využíval, byl analyzátor stejnojmenné firmy s označením GA (*Genome Analyzer*), schopný přečtení sekvencí dlouhých 35 bází [15]. V současnosti je na trhu několik verzí přístrojů různé výkonnosti. MiSeq, MiSeqDx jsou sekvenátory určené do malých laboratoří pro sekvenování malých genomů a pro amplikonové sekvenování. NextGen 500 představuje první vysokokapacitní stolní sekvenátor umožňující nejširší záběr DNA i RNA sekvenčních aplikací. HiSeq X-TEN je nejvýkonnější sekvenační platforma cílená pro populační studie. Je složena z 10 ultra vysokokapacitních sekvestorů, které jsou společně schopny osekvenovat více než 18 000 genomů za rok. Jejich nevýhodou jsou relativně krátká délka sekvenčního čtení (2x125 – 2x300 bází) a relativně vyšší chybovost. Analyzátoři firmy Illumina díky své vysoké výkonnosti, kapacitě a cenové hospodárnosti provozu patří k nejvíce užívaným sekvenátorům vůbec [33].

### **6.2.3 Sekvence ligací (Life technologies/SOLiD)**

Platforma SOLiD (*Sequencing by oligonucleotide ligation and detection*) byla poprvé představena v roce 2007 tehdy ještě společností Applied Biosystems - dnes Life Technologies. Pro postupné prodlužování vlákna DNA komplementárního k jednovláknovému templátu, využívá ligaci [2].

#### **6.2.3.1 Postup sekvenační metody SOLiD**

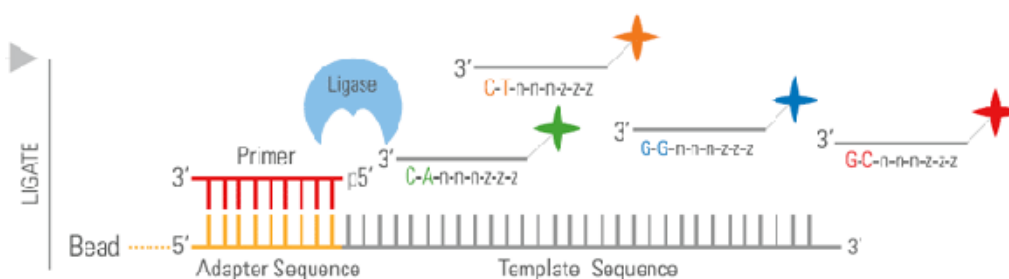
DNA knihovna se připravuje ligací adaptérů na 3' a 5' konce fragmentů, které jsou komplementární k nukleotidům imobilizovaným na povrchu paramagnetických kuliček. Po amplifikaci pomocí emPCR jsou kuličky kovalentně navázány na sklíčko se speciálně upraveným povrchem. [33] (Obr.15)



**Obr. 15 A) Příprava knihovny B) Amplifikace pomocí emPCR C) Umístění DNA knihovny na povrch sklíčka**

Zdroj: <http://seqanswers.com/forums/showthread.php?t=10>

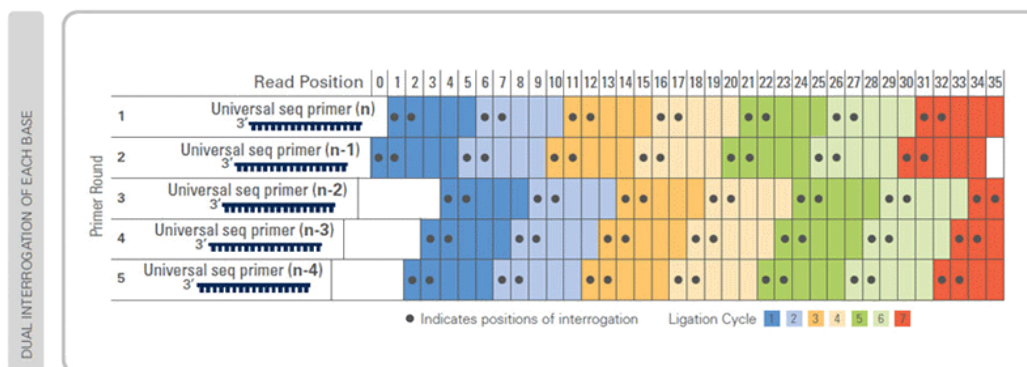
Metoda SOLiD probíhá v několika cyklech, během nichž dochází k hybridizaci čtyř fluorescenčně značených sond (syntetické oligonukleotidy o délce 8nt – oktameru), které jsou pomocí ligázy připojeny k primeru ohraničující začátek reakce [35]. Každá ze sond má známou sekvenci prvních dvou bází na 3' konci, 6 náhodných nukleotidů a na 5' konci fluorescenční značku, která kromě signalizace prvních dvou nukleotidů zabraňuje ligaci dalšího oktameru na 5' konci během jednoho cyklu sekvenace. Po přečtení signálu je sonda společně s třemi posledními nukleotidy oktameru odštěpena. Sekvenační primer tak zůstává prodloužen o 5 nukleotidů [2]. (Obr. 16)



**Obr. 16 Ligase sond**

Zdroj: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/solid-next-generation-sequencing/next-generation-systems/solid-sequencing-chemistry.html>

Následují další cykly, které stejným způsobem prodlužují 5' konec oktameru. Po dosažení 5 cyklů je proces ukončen a vzniklý legační produkt omyt. Celý proces je zopakován s primerem o jeden nukleotid kratší než původní primer [36]. (Obr. 17) Máme 16 možných kombinací dinukleotidů a pouze 4 fluorescenční značky, jedna sonda tak kóduje více párů nukleotidů. K dekódování sekvence musíme znát jednak barvu, ale i první bázi pocházející z adaptéru. Solid technologie zaručuje přečtení každého nukleotidu dvakrát, což zvyšuje přesnost, s jakou je určeno pořadí nukleotidů dané sekvence [33].



Obr. 17 Přehled sekvenčních cyklů

Zdroj: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/solid-next-generation-sequencing/next-generation-systems/solid-sequencing-chemistry.html>

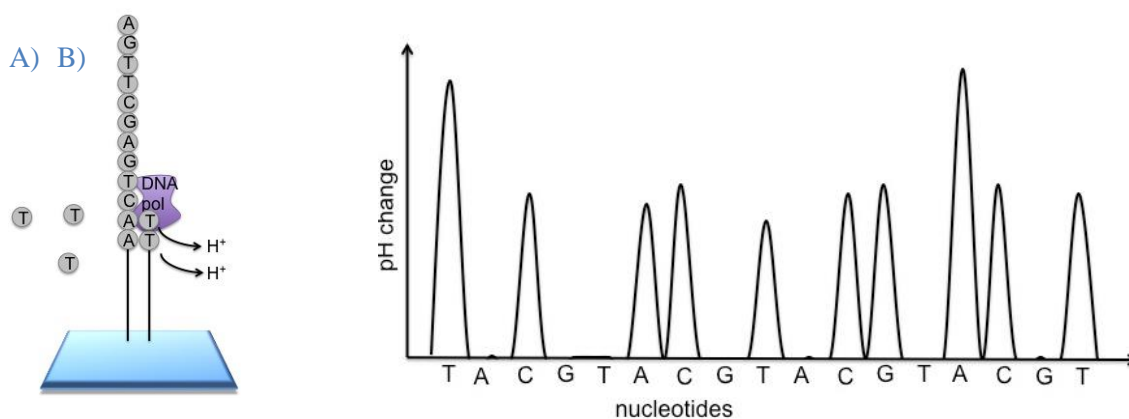
## 6.2.4 Life Technologies/Ion torrent

V roce 2010 představila firma Life Technologies přístroj Ion Personal Genome Machine (PGM), založený na nové technologii, schopné přímo převádět chemicky kódované signály do digitální podoby na polovodičovém čipu. Na rozdíl od předchozích technologií, využívající optické detekce značených nukleotidů, tato platforma využívá detekci vodíkových protonů uvolněných v průběhu syntézy nově vznikajícího řetězce. [37].

### 6.2.4.1 Postup sekvenční metody Ion torrent

Nejprve je nutné vytvoření knihovny, kdy řetězec DNA je třeba fragmentovat na kratší úseky dlouhé řádově 200 – 400 bází a na vzniklé fragmenty ligovat sekvenční adaptéry. Nutná amplifikace fragmentů probíhá na paramagnetický kuličkách potaženým komplementárními primery pomocí emPCR, jako je tomu u metody 454/Roche nebo SOLiD [38].

Vlastní sekvenování probíhá na polovodičovém čipu pokrytém mikrojamkami obsahující paramagnetické kuličky s navázanými fragmenty DNA. Jamky čipu jsou postupně zaplavovány jednotlivými druhy nukleotidů a pomocí DNA polymerázy začleněny do nově vznikajícího řetězce. Inkorporace nukleotidu do řetězce způsobuje uvolnění H<sup>+</sup> iontu (Obr. 18a) a změnu pH, která je zaznamenávána detektorem. (Obr. 18b) Jsou-li do řetězce začleněny dvě identické báze, výsledné napětí na čipu je dvojnásobné. Naopak pokud nukleotid komplementární není, detektor žádný signál nezaznamená [37].



**Obr. 18 A) Sekvenční reakce B) Změna pH převedená na napěťový signál**

Zdroj: <https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/ebi-next-generation-sequencing-practical-course/what-next-generation-dna-sequencing/ion-torre>

Výhodou technologie je, že nepoužívá žádné fluorescenční detektory, sondy ani kamery. Sekvenční proces tak trvá méně než 2 hodiny a je levnější než předchozí metody sekvenace. Objem produkovaných dat je závislý na hustotě jamek na čipu. V roce 2012 byla představena nová generace polovodičového sekvenátoru – Ion Proton s kapacitou čipu obsahující dostatečný počet jamek i pro sekvenaci lidského genomu [33].

## 6.2.5 Sekvence jednotlivých molekul DNA

### 6.2.5.1 Helicos Biosciences HeliScope™

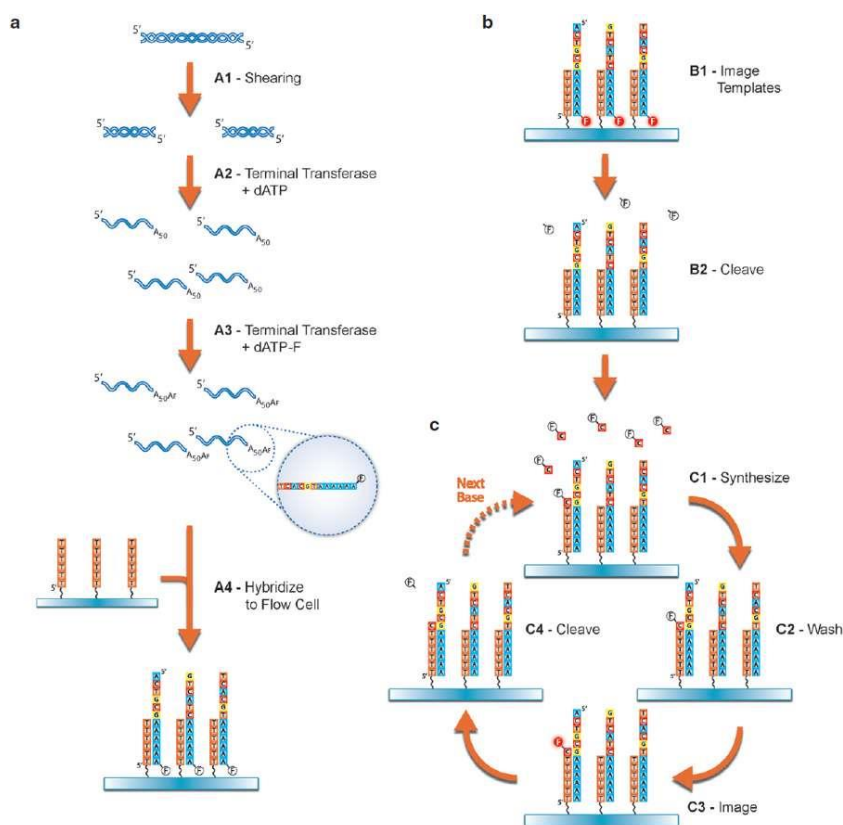
První společností, která přišla na trh s platformou umožňující přímé sekvenování jednotlivých molekul DNA nebo RNA, byla Helicos BioSciences Corporation. Výhoda technologie spočívá v absenci amplifikačního kroku, čímž je řazena do sekvenační skupiny třetí generace. Absence tohoto kroku je důvodem nižší ceny analýzy, nižší chybovosti a podstatného zrychlení celého procesu [33]. Jedná se o tzv. přesné sekvenování jednotlivých molekul DNA (z anglického *Tru Single Molecule Sequencing* - TSMS™).

Pracuje na principu fluorescenční detekce a dokáže analyzovat mnoho miliónů jednotlivých fragmentů DNA současně.

### 6.2.5.1.1 Postup sekvenční metody HeliScope

Pomocí restrikčních enzymů je DNA rozštěpána na fragmenty dlouhé 100 – 200 bází a pomocí ligace se připojí adaptéry s fluorescenční značkou. Zkrácené provazce se poté hybridizují na destičku s oligonukleotidy umístěnými na jejich povrchu. Jednotlivé značení se provádí ve 4 cyklech (pro každou nukleotidovou bázi zvlášť).

Vlastní proces sekvenace probíhá po přidání DNA polymerázy a po přidání jednoho ze čtyř fluorescenčně značených nukleotidů. Pomocí laserového paprsku jsou poté detekovány fluorescenční značky a pomocí CCD kamery určeny polohové souřadnice zachycených řetězců. Před další cyklem je fluorescenční značka odstraněna [39]. (Obr. 19)



**Obr. 19 Postup sekvenční reakce metody HeliScope** A) Příprava vzorku B) Zachycená templátová DNA a jejich fluorescenční značky jsou odstraněny C) sekvenování syntézou

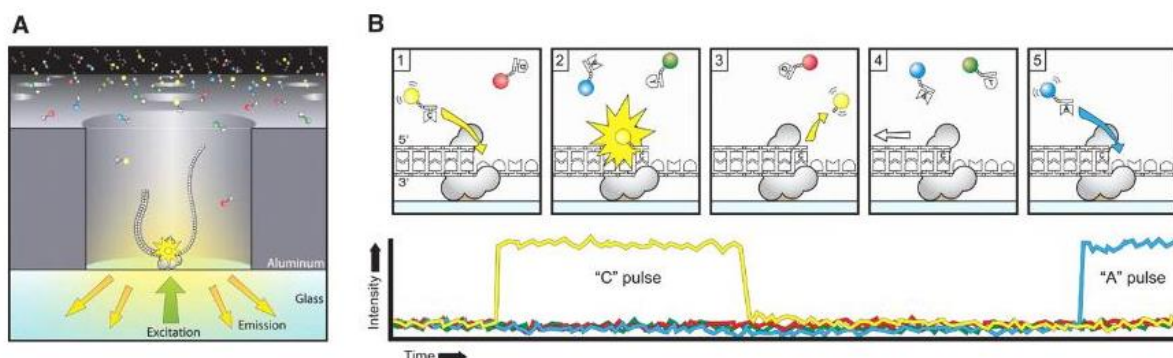
Zdroj: <http://www.americanlaboratory.com/913-Technical-Articles/780-Making-Single-Molecule-Sequencing-a-Reality/>

### 6.2.5.2 Pacific Biosciences SMRT™

Ve snaze překonat inherentní problémy v oblasti genomiky se firma Pacific Biosciences snažila vyvinout novou technologii, která by posunula hranice sekvenování. Výsledkem jejich snažení je tzv. sekvenování jednotlivých molekul v reálném čase (z anglického *Single Molecule Real Time Sequencing* – SMRT). Technologie využívá přirozeného procesu replikace DNA a umožňuje v reálném čase pozorování syntézy této molekuly. Inovací bylo použití čipu tzv. Zero Mode Waveguide (ZMWs) s deseti tisíci jamkami, které mají nanofotonickou strukturu a snižují pozadí fluorescence [40].

#### 6.2.5.2.1 Postup sekvenování metodou SMRT

Proces začínám přidáním vzorku do ZMW jamek, v nichž je na dně imobilizovaná DNA polymeráza, která spouští proces replikace. Čtyři fluorescenčně značené nukleotidy, které generují odlišné emisní záření, se inkorporují do prodlužujícího se řetězce DNA za současného vyzáření světelného signálu. Fluorescence se zaznamená detektorem a je vyhodnocena jako odpovídající nukleotid. Detekce je ukončena po rozštěpení fluoroforu, který je spojený s nukleotidovým koncovým fosfátem na polymeráze. (Obr. 20)



Obr. 20 Princip sekvenování jednotlivých molekul DNA v reálném čase A) Vnitřek ZMW nanostruktury B)

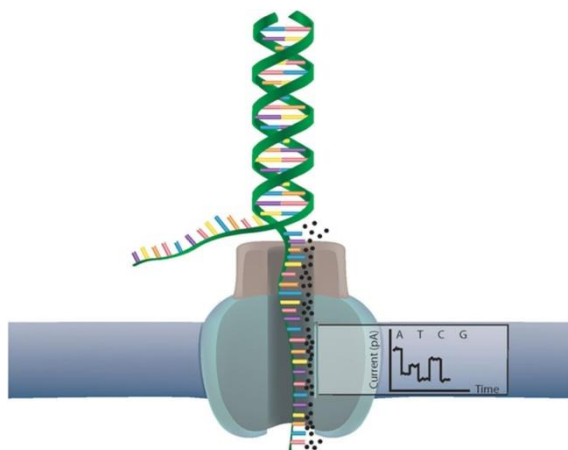
Schéma průběhu inkorporace dNTP a fluorescenční diagram

Zdroj: <http://decodingdna.yolasite.com/single-molecule-real-time-sequencing.php>

## 6.2.6 Nanopore Sequencing

Sekvenování pomocí nanopórů patří mezi nejnovější metody NGS. Výzkum technologie započal v 90. letech na univerzitních půdách Harwardu a Oxfordu ve Velké Británii, ale také na Bostonské univerzitě nebo přední Kalifornské univerzitě. Roku 2005 vznikla společnost Oxford Nanopore Technologies®, která spolupracovala s výše zmíněnými univerzitami a poznatky z univerzitních výzkumů se rozhodla převést do komerční sféry. Od počátku svého vzniku tým společnosti vyvíjí převratnou platformu pro přímou elektronickou analýzu jednotlivých molekul [41].

Technologie je založena na biologických vlastnostech nanopóru, který je začleněn do lipidové dvojvrstvy oddělující jamky naplněné elektrolytem. Procházející jednovláknová DNA zeslabuje konstantní proud, jenž je vháněn do systému. Jednotlivé nukleotidy jsou detekovány na základě specifické modulace toku iontů a délce trvání tohoto omezení. (Obr. 21) Rychlost, kterou je DNA sekvenována, reguluje DNA polymeráza [8]; [42].



**Obr. 21 Princip sekvenování nanopore technologií**

Zdroj: <http://circres.ahajournals.org/content/112/12/1613.figures-only>

V současnosti společnost představila dva přístroje. Prvním je PromethION - malý stolní systém pracující v reálném čase. Slouží pro analýzu jednotlivých molekul DNA, RNA a proteinů. Druhým je MinION – přenosná USB verze, pracující taktéž v reálném čase a sloužící pro sekvenování DNA. Aktuálně je také ve vývoji přístroj GridION – plně škálovatelný analytický systém sloužící taktéž pro analýzu jednotlivých molekul DNA, RNA a proteinů. Rozdílem oproti PromethION je, že tato verze přístroje obsahuje více stejných kazet pro sekvenování a mohou spolu sdílet informace v průběhu analýzy [43].

## 7. Využití sekvenování v diagnostice dědičných chorob

„Hlavním úkolem molekulárně genetického vyšetření je zjistit, zda vyšetřovaná osoba nebo plod při prenatalní vyšetření bude či nebude trpět dědičnou chorobou, která se v jeho rodině nebo u některého z jejího člena již vyskytuje.“ Molekulárně genetické vyšetření můžeme rozdělit do dvou skupin. Na přímou a nepřímou molekulárně genetickou diagnostiku. Sekvenování DNA se převážně využívá u přímé diagnostiky a to jak při mutačním screeningu, kdy pomocí sekvenace určíme, o jakou mutaci se jedná, tak u diagnostiky již známých mutací, kdy poskytuje nejpřímější důkaz přítomnosti mutace v DNA [44]. Konkrétním příkladem využití sekvenování může být diagnostika dědičné formy diabetu insipidu.

### 7.1 Diabetes insipidus

Diabetes insipidus je pojem označující heterogenní skupinu onemocnění, kdy porucha nastává v regulačním mechanismu homeostázy vody v organismu. „Regulace osmolality zahrnuje osmotické a neosmotické stimuly pro hypotalamus, ovlivněna může být sekrece antidiuretického hormonu (ADH /vazopresin) v hypotalamu, transport a skladování ADH v zadním laloku hypofýzy, uvolnění ADH a transport krevním řečištěm k vazopresinovým receptorům (AVPR2) v ledvinách, translokace vodních kanálů (aquaporinu-2) do membrány, reabsorpce vody do renálního intersticia (pomocí aquaporinů 3 a 4) s výsledným snížením osmolality a zvýšením objemu extracelulární vody.“

Diabetes insipidus je společné označení chorob vyznačující se tvorbou velkého množství hypotonické moči (4 - 20l/den) a trvale nižší osmolalitou (50 – 200mmol/kg). Rozlišujeme několik typů onemocnění, těmi nejzákladnějšími jsou [3]:

- centrální (*diabetes insipidus centralis*)
- nefrogenní (*diabetes insipidus renalis*)

#### 7.1.1 Centrální diabetes insipidus

Centrální diabetes insipidus je onemocnění způsobené poruchou syntézy, sekrece nebo transportu ADH do neurohypofýzy nebo uvolnění z něj. Následkem je nedostatek ADH a neschopnost ledvin koncentrovat moč. Vzniká idiopaticky (samovolně, resp. bez známých důvodů), kde tvoří necelou polovinu všech případů, ale vzniká i v důsledku



poškození CNS infekcí, ischemií, úrazem nebo tumorem. 1 – 5% případů je hereditárních. V případě geneticky podmíněného onemocnění jsou rovnoměrně postiženy obě pohlaví. Mírné formy se manifestují až v předškolním věku, ty těžké už v kojeneckém věku [3]; [45].

### **7.1.2 Nefrogenní diabetes insipidus (NDI)**

Nefrogenní diabetes insipidus je vzácné onemocnění, které vzniká při neschopnosti ledvin (distálních tubulů) koncentrovat moč (viz výše). Důvodem je porucha receptorů (AVPR2) pro vazbu vazopresinu nebo také porucha aquaporinu-2 (AQP2) – kanálu zodpovědného za udržování rovnováhy vody v těle. Projevem obou forem NDI je polyurie a polydipsie [48]. NDI je obecně charakterizováno jako vrozené onemocnění vyplývající z genetických mutací v AVPR2 (onemocnění vázané na X chromozom) nebo AQP2 (autozomálně dominantní i recesivní typ dědičnosti). NDI může vzniknout i sekundárně a to po užívání lékových forem lithia a solí magnezia nebo při akutním a chronickém selhání ledvin, ale také při narušení elektrolytové rovnováhy [45].

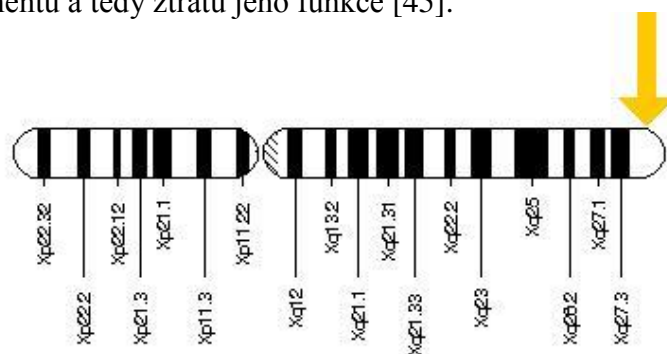
#### **7.1.2.1 Mechanismus funkce**

Mechanismus funkce vstřebávání vody je založen, na vazbě AVP na vazopresinový receptor AVPR2. Receptor je spřažený s G proteinem a lokalizován na bazolaterální straně buněk distálních tubulů. Po vazbě hormonu na receptor, dochází k aktivaci adenylátcyklázy. Následkem aktivace je zvýšená hladina cAMP (cyklický adenosin monophosphate) a ta vede ke kaskádovitému spuštění dějů uvnitř buňky. Při tomto ději mimo jiné dochází k aktivaci a pohybu transportních váčků (obsahující vodní kanál aquaporin 2) z intracelulárního prostoru na apikální povrch buňky. Voda je resorbována přes aquaporin na základě osmotického gradientu. Voda vstupuje do buňky přes AQP2, AQP3 a AQP4, které jsou umístěny na bazolaterální plazmatické membráně. Po obnovení rovnováhy vody hladina hormonu AVP klesá [45]. (Příloha 1)

### 7.1.2.2 Popis a mutace genu pro AVPR2

AVPR2 gen (Příloha 2) byl poprvé popsán v roce 1992. Je umístěn na chromozomu Xq28 (Obr.22) dle cytogenetické nomenklatury. Molekulárně genetický zápis dle NCBI (GRCh37): X:153,167,984 - 153,172,619. Je tvořen 3 exony a kóduje ho 370 aminokyselin [48]. Mutace je vázaná na X chromozom a přenášejí ho heterozygotní ženy na syny. Tvoří 90% všech diagnostikovaných případů [45]. Hlavními symptomy jsou polyurie, žízeň a polydipsie často přítomné již od narození. V případě nedostatečného zásobování vodou může dojít k vážné hypernatrémii a dehydrataci nemocného [3]. Mutace v AVPR2 vedoucí k NDI vedou ke ztrátě funkce receptoru a lze je rozdělit do pěti tříd:

- I. třída** – Mutace vedou k posunu čtecího rámce na mRNA a tím k neúplnému receptoru.
- II. třída** – K tomuto typu mutace dochází nejčastěji. Má za následek špatné seskupení receptoru (neúplné vazebné místo) pro hormon AVP.
- III. třída** – Stejně jako v předchozím případě dochází k neúplnému seskupení receptoru. Vazba s AVP je aktivní, ale receptor plně nespolupracuje s G proteinem. Následkem je nedostatečná produkce cAMP a nespouštění kaskády dějů (viz výše).
- IV. třída** – V tomto případě mutace způsobují neschopnost vazby AVP na receptor.
- V. třída** – Mutace genu způsobí nesprávné umístění receptoru do buněčného kompartmentu a tedy ztrátu jeho funkce [45].



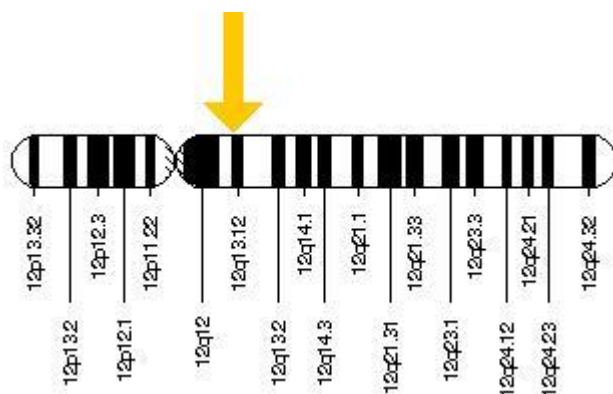
Obr. 22 Umístění genu na chromozomu

Zdroj: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/AVPR2>

### 7.1.2.3 Popis a mutace genu pro AQP-2

AQP2 gen kóduje aquaporin-2, vodní kanál umístěný v ledvinových sběrných kanálcích. (Příloha 3) Nachází se na dlouhém rameni chromozomu 12 na pozici 12q13 (Obr. 23). Molekulárně genetický zápis dle NCBI je (GRCh37): 12:50,344,523 - 50,352,663. Obsahuje 4 exony a je kódován 271 aminokyselinami [48]. Skládá se ze čtyř

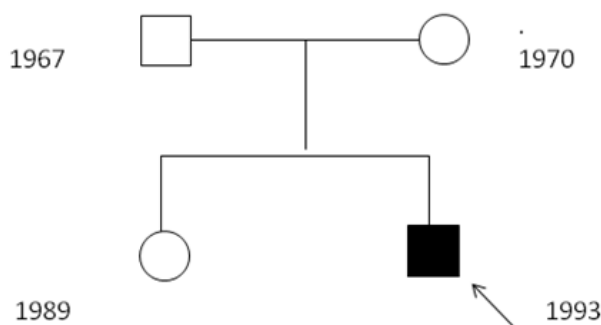
podjednotek, které tvoří stabilní tetrametr v plazmatické membráně. K mutacím v tomto genu dochází pouze vzácně a tvoří necelých 10% případů. Jedná se o autozomálně dominantní i o autozomálně recesivní typ dědičnosti. V současné době je známo okolo 51 mutací v genu pro AQP2. Obecně je lze rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří mutace, které inhibují signál vystavující receptor na povrch lipidové membrány. Druhou skupinu tvoří mutace, které mají za následek vadu ve struktuře pórů a vedou tedy k nedostatečné funkci vodního kanálu [45].



**Obr. 23 Umístění genu na chromozomu**

Zdroj: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/AQP2>

Konkrétním příkladem využití sekvenčních metod může být případ pacienta (chlapce 1993), jehož vzorek byl zaslán do laboratoře lékařské genetiky. Pacientovi byl diagnostikován nefrogenní diabetes insipidus. (Obr. 24)



**Obr. 24 Schéma rodokmenu probanda**

Zdroj: Ústav lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň

Postup vyšetření probanda vyplývá ze současných poznatků o tomto onemocnění, kdy byly popsány dva geny způsobující nefrogenní diabetes insipidus (viz výše). Z důvodu daleko větší pravděpodobnosti X-vázané formy (cca 90%) se nejprve provádí vyšetření genu AVPR2. Pokud je výsledek negativní a mutace není nalezena, vyšetřuje se druhý gen

AQP2. Při nálezu mutace je možné provést vyšetření nosičství familiární mutace u příbuzných a určení pravděpodobnosti přenosu na další generace.

Osekvenováním prvního genu AVPR2 (Příloha 4) probanda a porovnáním s referenční sekvencí nebyly na exonech nalezeny žádné odchylky. Z důvodu negativního výsledku bylo provedeno vyšetření druhého genu AQP2 (Příloha 5), kde byla nalezena translokace c.439G>A (p.Ala147Thr) a delece c.236\_244del (p.Cys79\_Val81del). Obě změny jsou patogenní a potvrzují diagnózu diabetu insipidu [48].

## 9. Závěr

Jak už bylo napsáno v úvodu tohoto textu, sekvenování je v dnešní době nedílnou součástí lékařských, ale i vědeckých aplikací.

Sangerova metoda používaná od 70. let i v současnosti má své uplatnění a řada laboratoří tuto metodu využívá. Její největší výhodou je její spolehlivost a cenová dostupnost. Hodí se také pro čtení kratších úseků DNA.

NGS metody jsou v dnešní době na vzestupu, jejich cena postupně klesá, čtecí rámce se prodlužují, dochází ke zlepšení jejich přesnosti a největší výhodou oproti klasickým metodám je jejich rychlost sekvenace. Z mého výčtu metod však nelze určit, která je lepší. Záleží pouze na laboratoři, jaké požadavky na přístroj má a jaké typy experimentů provádí.

Před nákupem sekvenátoru je však třeba zvážit několik důležitých aspektů. Asi tím nejhlavnějším je využitelnost přístroje laboratoří. V případě, že laboratoř nemá velkou kapacitu vzorků potřebných k vyšetření nebo obecně k získání sekvenačního řetězce, pořízení sekvenátoru je pro ni nevýhodné. Důvodem je vysoká cena pořízení přístroje a poměrně vysoké náklady potřebné na údržbu, pravidelný servis a reagenty. Právě cena pořízení brání masivnímu rozšíření.

Řada firem dnes poskytuje zakázkové služby spojené se sekvenováním. Vzorek je odeslán přepravní společností do laboratoře firmy a ta za cenově přijatelnější cenu provede sekvenování za Vás. Pro správnou profesionální sekvenaci je třeba dbát na správné uchování vzorku. Jednotlivé zkumavky se skladují v kapalném dusíku [47].

## 10. Seznam použité literatury

### Knižní zdroje

- [1] ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science, c2008. ISBN 978-0-8153-4105-5.
- [2] BROWN, T. *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. 1. české vyd. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2007. ISBN 978-80-244-1719-6.
- [3] JABOR, Antonín. *Vnitřní prostředí*. 1. vyd. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-1221-5.
- [4] KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007. ISBN 978-80-7013-450-4.
- [5] KRÁLOVÁ, Blanka. *Bioanalytické metody*. Vyd. 3., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 978-80-7080-449-0.
- [6] MURRAY, Robert K. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Překlad Bohuslav Matouš. Praha: Galén, c2012. ISBN 978-80-7262-907-7.
- [7] NUSSBAUM, Robert L, Roderick R MCINNES, Huntington F WILLARD, James THOMPSON a Margaret Wilson THOMPSON. *Klinická genetika: Thompson & Thompson* : 6. vyd. Vyd. 1. Překlad Petr Goetz. Praha: Triton, 2004. ISBN 80-7254-475-6
- [8] RHEE, Minsoung, BURNS, Mark A. *Nanopore sequencing technology: research trends and applications*. Trends in Biotechnology [online]. 2006, vol. 24, no. 12 [cit. 2016-12-03], s. 580-586. Dostupný z WWW: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)> . ISSN 0167-7799
- [9] RONAGHI, Mostafa. *Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing*. Genome Research [online]. 2001, vol. 11, no. 1 [cit. 2016-03-22], s. 3-11. Dostupný z WWW:<<http://genome.cshlp.org/content/11/1/3.full#Article>> . ISSN 1088-9051/01.
- [10] RYAN, Declan, et al. *Toward nanoscale genome sequencing*. TRENDS in Biotechnology [online]. 2007, vol. 25, no. 9 [cit. 2016-03-03], s. 385-389. Dostupný z WWW: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)> . ISSN 0167-7799
- [11] STRACHAN, T a Andrew P READ. *Human molecular genetics*. 1st pub. Oxford: Bios scientific publishers, 1996. ISBN 1-872748-69-4.
- [12] VONDREJS, Vladimír. *Otazníky kolem genového inženýrství*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2010. Průhledy (Academia). ISBN 978-80-200-1892-2.
- [13] WATSON, James Dewey. *Molecular biology of the gene*. 6th ed. San Francisco: Pearson, c2008. ISBN 978-0-321-50781-5.
- [14] WATSON, James Dewey. *Tajemství DNA: příběh jednoho z největších objevů 20. století*. 1. vyd. Překlad František Sládeček. Praha: Academia, 1995. Stříbrná řada ag. ISBN 80-200-0556-0.
- [15] ZVÁROVÁ, Jana a Ivan MAZURA. *Metody molekulární biologie a bioinformatiky*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2012. Biomedicínská informatika. ISBN 978-80-246-2150-0.

- [16] ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2013. ISBN 978-80-7492-062-2.
- [17] BEDNÁŘ, Jan, Jiří KUCIEL a Tomáš VYHNÁLEK. *Genetika*. Vyd. 2., nezměn. V Brně: Mendelova univerzita, 2010. ISBN 978-80-7375-448-8.
- [18] ŘEHOUT, Václav, Jindřich ČÍTEK a Lenka SÁKOVÁ. *Genetika I: (úvod do studia genetiky)*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 2000. ISBN 80-7040-405-1.
- [19] KEJNOVSKÝ, Eduard. *Tajemství genů: od vzniku života po genom člověka*. Vydání 1. Praha: Academia, 2015. Průhledy (Academia). ISBN 978-80-200-2478-7.
- [20] BLOW, Nathan. *DNA sequencing: generation next-next*. Nature Methods [online]. 2008, vol. 5, no. 3 [cit. 2016-09-03], s. 267-274. Dostupný z WWW: <[www.nature.com/nautremethods](http://www.nature.com/nautremethods)> ISSN 1548-7105
- [21] MARDIS, Elaine R. *The impact of next-generation sequencing technology on genetics*. Trends in Genetics [online]. 2008, vol. 24, no. 3 [cit. 2016-03-22], s. 133-141. Dostupný z WWW: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)> . ISSN 0168-9525

## Internetové zdroje

- [22] miRNA. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com). [online]. [cit. 2016-03-23]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/mirna/learning-center/mirna-introduction.html>
- [23] Small nuclear RNA. *Wikipedia: the free encyclopedia*. [online]. 2001- [cit. 2016-03-23]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Small\\_nuclear\\_RNA](https://en.wikipedia.org/wiki/Small_nuclear_RNA)
- [24] DNA Isolation Methods. [www.encyclopedia.com](http://www.encyclopedia.com). [online]. 2005 [cit. 2016-03-23]. Dostupné z: [http://www.encyclopedia.com/topic/DNA\\_Isolation\\_Methods.aspx](http://www.encyclopedia.com/topic/DNA_Isolation_Methods.aspx)
- [25] DNA extraction. *Wikipedia: the free encyclopedia*. [online]. 2001- [cit. 2016-03-23]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/DNA\\_extraction](https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_extraction)
- [26] Co je DNA a genetika. [www.qgen.cz](http://www.qgen.cz). [online]. [cit. 2016-03-23]. Dostupné z: <https://www.qgen.cz/en/co-je-dna-a-genetika>
- [27] Sanger DNA sequencing . [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com). [online]. [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: <http://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/applied-biosystems.html>
- [28] Sekvenování DNA. [www.wiki.matfyz.cz](http://wiki.matfyz.cz). [online]. [cit. 2016-03-06]. Dostupné z: [http://wiki.matfyz.cz/images/2/20/Metody\\_studia\\_DNA\\_a\\_genové\\_exprese\\_\(chybi\\_gen\\_i\\_nzenyrstvi\).pdf](http://wiki.matfyz.cz/images/2/20/Metody_studia_DNA_a_genové_exprese_(chybi_gen_i_nzenyrstvi).pdf)
- [29] Klasické metody sekvenování. [www.labguide.cz](http://www.labguide.cz). [online]. [cit. 2016-03-06]. Dostupné z: <http://labguide.cz/klasicke-metody-sekvenovani/>
- [30] Projekt lidského genomu. *Wikipedia: the free encyclopedia*. [online]. 2001- [cit. 2016-02-04]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Projekt\\_lidského\\_genomu](https://cs.wikipedia.org/wiki/Projekt_lidského_genomu)

- [31] Jak se čte genom. *www.rozhlas.cz*. [online]. 4.5.2007 [cit. 2016-03-02]. Dostupné z: <http://www.rozhlas.cz/leonardo/priroda/zprava/343164>)
- [32] Pyrosequencing Technology and Platform Overview. *www.qiagen.com*. [online]. [cit. 2016-03-14]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/cz/resources/technologies/pyrosequencing-resource-center/technology-overview/>
- [33] KOUBKOVÁ L, Vojtěšek B, Vyzula R. Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. *www.linkos.cz*. [online]. 2014 [cit. 2016-03-18]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/cz/resources/technologies/pyrosequencing-resource-center/technology-overview/>
- [34] *www.illumina.com*. [online]. [cit. 2016-03-14]. Dostupné z: <http://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing.html>
- [35] SHENDURE J, Hanlee Ji. Next-generation DNA sequencing. *www.nature.com*. [online]. 9.10.2008 [cit. 2016-03-20]. Dostupné z: <http://www.nature.com/nbt/journal/v26/n10/full/nbt1486.html#f3>
- [36] MATTHEW W. A., Schrijver I.. Next Generation DNA Sequencing and the Future of Genomic Medicine . *www.mdpi.com*. [online]. 2010 [cit. 2016-03-16]. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/journal/genes>
- [37] Iont Torrent Next-Generation Sequencing technology. *www.thermofisher.com*. [online]. [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-technology.html>
- [38] Iont Torrent (ThermoFisher). *www.allseq.com*. [online]. [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: <http://allseq.com/knowledge-bank/ion-torrent/>
- [39] Helicos BioSciences Corporation. *www.biotech.about.com*. [online]. 25.10.2015 [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: <http://biotech.about.com/od/casestudies/a/Helicos.htm>
- [40] Advance genomics with Single Molecule, Real-Time (SMRT) Sequencing. *www.pacb.com*. [online]. [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: <http://www.pacb.com/smrt-science/smrt-sequencing/>
- [41] Summary. *www.nanoporetech.com*. [online]. [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: <https://nanoporetech.com/about-us/summary>
- [42] DNA:nanopore sequencing. *www.nanoporetech.com*. [online]. [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: <https://nanoporetech.com/applications/dna-nanopore-sequencing>
- [43] Fields of use. *www.nanoporetech.com*. [online]. [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: <https://nanoporetech.com/applications/fields-of-use/fields-of-use>

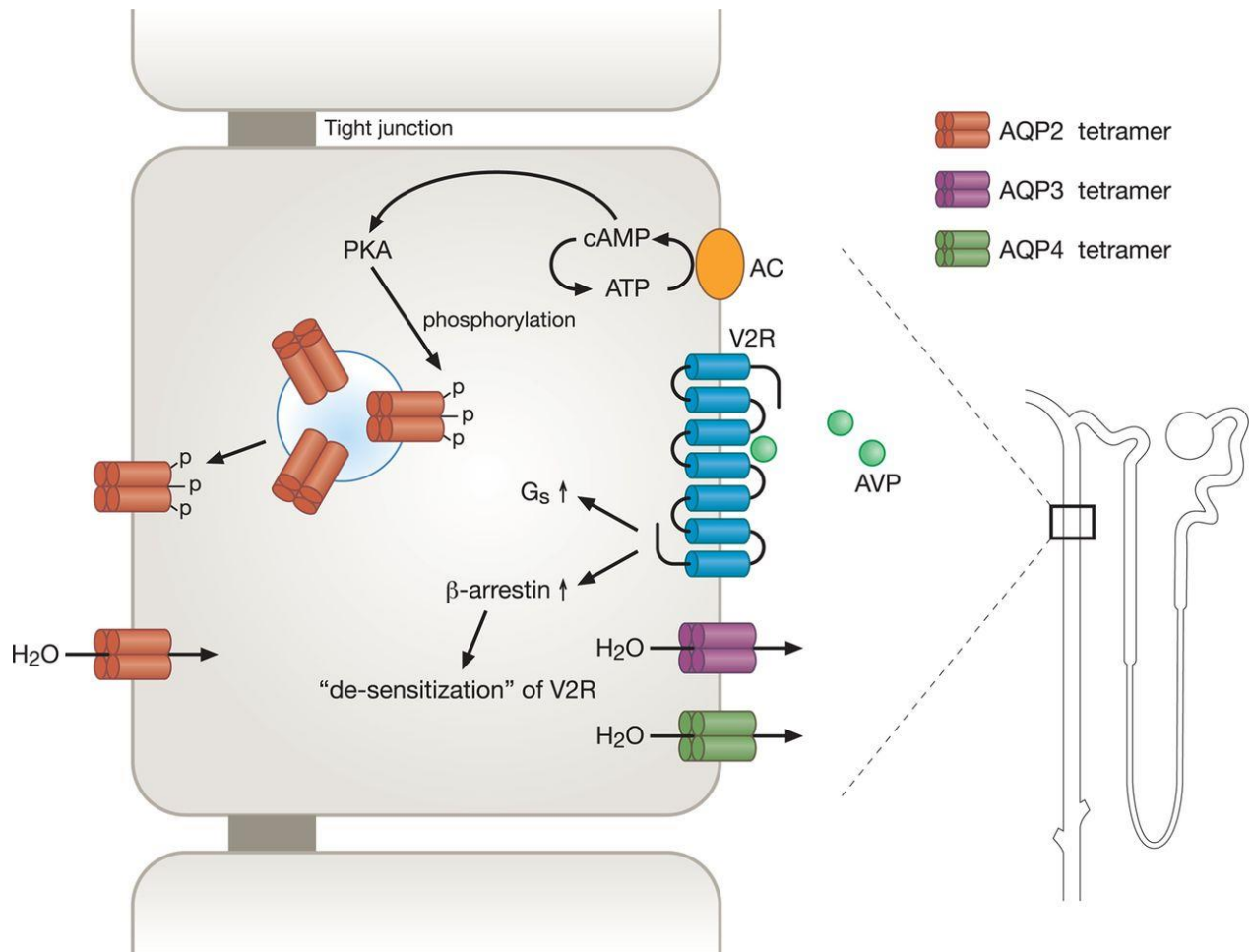


- [44] HALUZA R.. teoretický úvod do molekulární genetiky a jejich metod. *www.gyn-test.cz*. [online]. [cit. 2016-03-20]. Dostupné z: <http://www.gyn-test.cz/testy-uvod-do-molekularni-genetiky/>
- [45] HANNE B. Moeller, Søren Rittig, Robert A. Fenton. Nephrogenic Diabetes Insipidus: Essential Insights into the Molecular Background and Potential Therapies for Treatment. *www.ncbi.nlm.nih.gov*. [online]. 29.1.2013 [cit. 2016-03-19]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3610677/>
- [46] DOLEŽAL T. Základy moderní biologie, sekvenování, přečtení genetické informace, éra genomiky. *www.zmb.prf.jcu.cz*. [online]. [cit. 2016-02-09]. Dostupné z: <http://zmb.prf.jcu.cz/index.php/5-sekvenovani-genomika>
- [47] Sekvence DNA. *www.biogen.cz*. [online]. [cit. 2016-03-21]. Dostupné z: <http://www.biogen.cz/sekvence-dna>
- [48] ČERNÁ M. Hejnalová M., Komrsková P., Zavoral T., Nováková M., Šubrt I. Nefrogenní diabetes insipidus a jeho molekulárně genetické vyšetření

## 11 . Přílohy

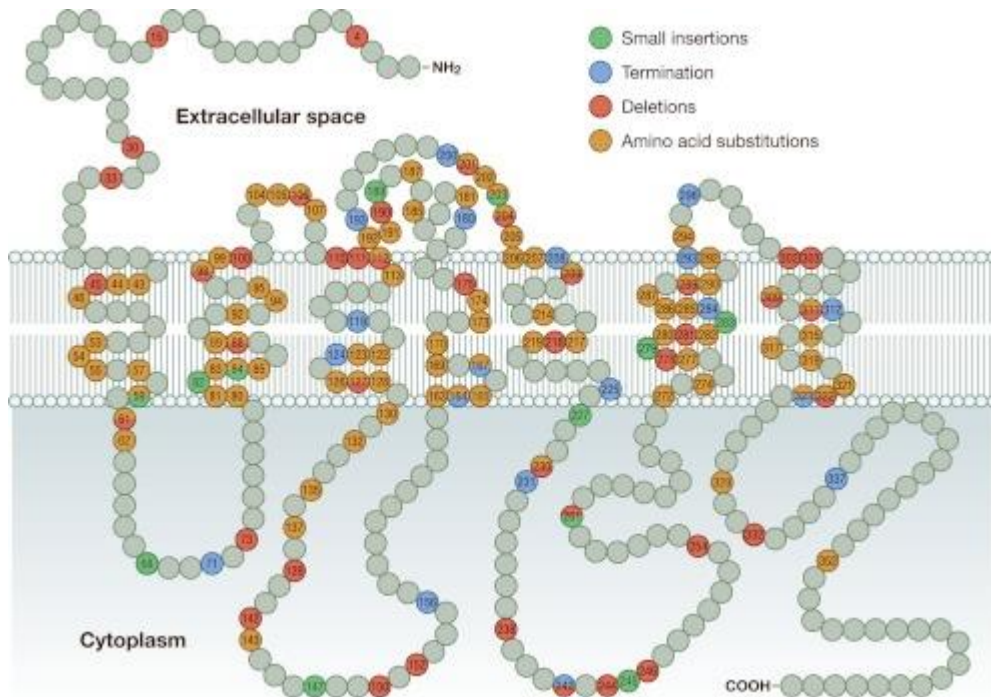
### Příloha 1 AVP dependentní regulace AQP2 ve sběrném kanálku

Zdroj: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3610677/figure/F1/>



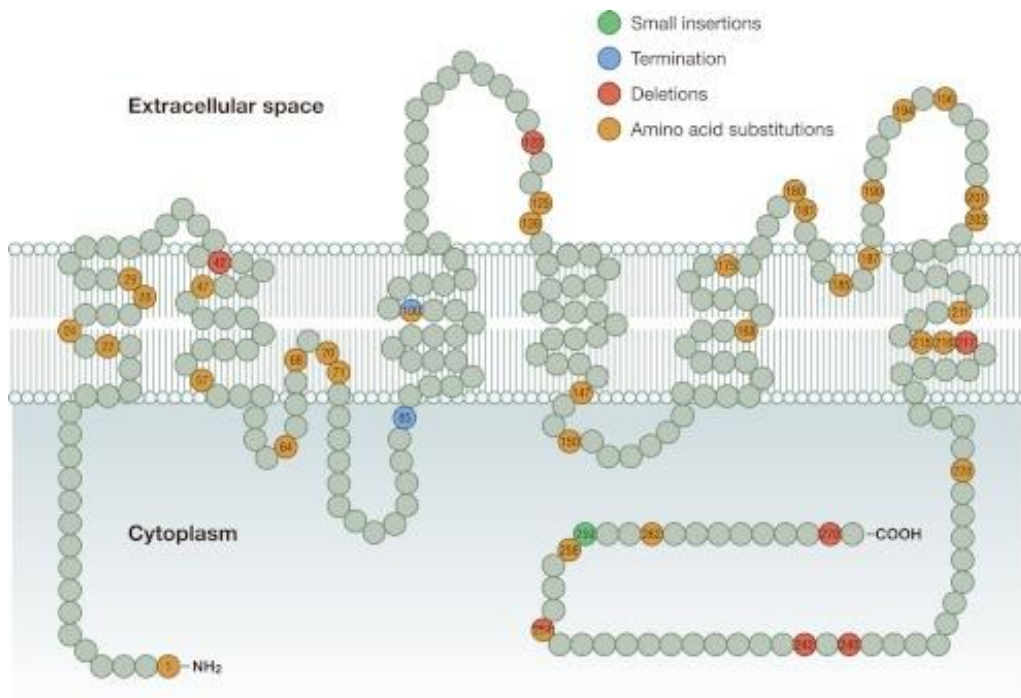
## Příloha 2 Vazopresinový receptor

Zdroj: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3610677/figure/F4/>



## Příloha 3 Aquaporin 2

Zdroj: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3610677/figure/F5/>



## Příloha 4 Sekvence genu AVPR2

Zdroj: Ústav lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň

ATCCGTCGTCTGACCATCCCTCTCAATCTTCCCTGCCAGGACTGGCCATACTGCCACCGACAGTGCACACAGCCAAAC  
AGGCATCTGCCATGCTGGCATCTCTATAAGGGCTCCAGTCCAGAGACCCTGGGCCATTGAA

CTTGCTCCTCAGGCAGAGGCTGAGTCCGCACATCACCTCCAGGCCCTCAGAACACCTGCCAGCCCCACCATGCTCATGG  
CGTCCACCACTTCCG

GTAAGGCTTGGCCCTCCATGAGTCCGGTGGGCAGAGTGGGTTTGACGATTGAGGAAGCCCTCTTTCTAAAGACCTCCTT  
CACCTCACCTCTGGGTGTGTCTCTCCAGGCTGCCAATGAGTGGGGAGGGGAGCACAGCCCCACTTCCCCGCCAGGGCTGG  
GGCTGGGGCTGGGGCTGGGGCTGCCCTTCTTCTGGACTGCATGAGCCTGGGGTGTGTATCCCTCATAACATGGCTTTCTT  
GGAGTCCCCTCTGCTAGGAGCCAGGAAGTGGGTGTCCGGATGGGGGCACGGGAGGCAGGCCTGAGTCCCCCTGCACAGCAC  
CCTCTCTAACCAGGCCCTTCCCCGACTCCTTCCAG

CTGTGCCTGGGCATCCCTCTCTGCCAGCCTGCCAGCAACAGCAGCCAGGAGAGGCCACTGGACACCCGGGACCCGCTGC  
TAGCCCGGGCGGAGCTGGCCTGCTCTCCATAGTCTTTGTGGCTGTGGCCCTGAGCAATGGCCTGGTGCTGGCGGCCCTAG  
CTCGGCGGGGCCGGCGGGGCCACTGGGCACCCATACAGTCTTTCATTGGCCACTTGTGCCTGGCCGACCTGGCCGTGGCTC  
TGTTCCAAGTGCTGCCCCAGCTGGCCTGGAAGGCCACCGACCCTTCCGTGGGCCAGATGCCCTGTGTGGGCCGTGAAGT  
ATCTGCAGATGGTGGGCATGTATGCCTCCTTACATGATCCTGGCCATGACGCTGGACCGCCACCGTGCATCTGCCGTC  
CCATGCTGGCGTACCGCCATGGAAGTGGGGCTCACTGGAACCGCCGGTGTAGTGGCTTGGGCCTTCTCGCTCCTTCTCA  
GCCTGCCCCAGCTTTCATCTTCCGCCAGCGCAACGTGGAAGGTGGCAGCGGGTCACTGACTGCTGGGCCTGCTTTGCGG  
AGCCCTGGGGCCGTGCACCTATGTCACCTGGATTGCCCTGATGGTGTTCGTGGCACCTACCTGGGTATCGCCGCCTGCC  
AGGTGCTCATCTTCCGGGAGATTCATGCCAGTCTGGTGCCAGGGCCATCAGAGAGGCCTGGGGGGCGCCGCAGGGGACGCC  
GGACAGGCAGCCCCGGTGGGGAGCCACGTGTGAGCAGCTGTGGCCAAGACTGTGAGGATGACGCTAGTGATTGTGGTGC  
TCTATGTGCTGTGCTGGGCACCTTCTTCTTCTGGTGCAGCTGTGGGCCGCTGGGACCCGGAGGCACCTCTGGAAG

GTGGGTGTAGCCGTGGCTAGGGCTGACGGGGCCACTTGGGCTTGGCCGCATGCCCTGTGCCACCCAGCCATCCTGAACC  
CAACCTAGATCCTCCACCTCCACAG

GGGCGCCCTTTGTGCTACTCATGTTGCTGGCCAGCCTCAACAGCTGCACCAACCCCTGGATCTATGCATCTTTCAGCAGCA  
GCGTGTCTCAGAGCTGCGAAGCTTGCTCTGCTGTGCCGGGGACGCACCCACCCAGCCTGGGTCCCCAAGATGAGTCCT  
GCACCACCGCCAGCTCCTCCCTGGCCAAGGACACTTCATCGTGAGGAGCTGTGGGTGTCTTGCTCTAGAGGCTTTGAGA  
AGCTCAGCTGCCT

## Příloha 5 Sekvence genu pro AQP2 s vyznačenou delecí a translokací probanda

Zdroj: Ústav lékařské genetiky

AAGACACAAACCTTTATGCCTTGAAATTTGTCACAAGCCAACCAGTTGTTTTCCATCCCTGTGAAGCAGGAATAATTGGA  
GGTCTGACAGAAGAACTTCCAGTTACCAGAAGGAGCAGCACTCATGTTCTCTCTTAGTTTTGTGTGAGGTGTGGCCCTG  
CCTTGGTCAACAGTTTGTAGTCAGAGAGATGGGGCCGGGCACAATCCCCACCAGACGTTCCCATTCACAAGACCCTGTGGG  
GGCTGGGAGACGCCCTGGGGCAGCAGCCCTGGGGTAACCAAGGGAACAAACACGGAAAACCAGGGACGTCAGTCCCTATCT  
GGAGCTCATTAATGGGGAACATTAGTCAGCTGTGAAGGCCAAGATAGGGTGATAGGCCTGTGGGTGGGCTGGGATGGGGC  
ATGGGGGCAGAGGCCGCCATGGAGGAGAAGAGGTATTGGCCTCAACGACTCCACCTCCCCGCCAGTGCCAGATCCGGGA  
TGAAGGACCCTATAAATGCCACAACCCAGCCTCCCCAGAGGCCTTGAGAAAGAGAGCGATAGAGTGCAGAG

CGAGTGGCCGGAGCATCCTGGCCCTGAGACAGCTGGGCCAGCCCCGAGGGCTCTGCAGCATGTGGGAGCTCCGCTCCATA  
GCCTTCTCCAGGGCTGTGTTTCGACAGATTCTGGCCACACTCCTCTTCGTCTCTTTGG

I A F S R A V F A E F L A T L L F V F F G M W E L R S

CCTCGGCTCTGCCCTCAACTGGCCACAGGCCCTGCCCTCTGTGCTACAGATTGCCATGGCGTTTGGCTTGGGTATTGGCAC  
CCTGGTACAGGCTCTGGGCCACATAAGCGGGGCCACATCAACCCTGCCGTGACTGTGG

L G S A L N W P Q A L P S V L Q I A M A F G L G I G T L V Q A L G H I S G A H I N P A V T V

CCTGCCTGGTGGGCT **GCCACGTCT** CCGTTCTCCGAGCCGCTTCTACGTGGCTGCCACGCTGCTGG

**DELETOVANÝ ÚSEK, KTERÝ U PROBANDA CHYBÍ!!!**

GGGCTGTGGCCGGAGCCGCTCTGCTCCATGAGATCACGCCAGCAGACATCCGCGGGGACCTGGCTGTCAATGCT

A C L V G C H V S V L R A A F Y V A A Q L L G A V A G A A L L H E I T P A D I R G D L A V N A

GTGAGTAGCCACAACCTTTGCCATCCACAAGGGGAGGTCCTGGGAATCCCTTGTAAGGATGAGATGGGAGGGATGGGCT  
CTGGGTGATGTAGGGAGAGAGATGGAGACAGAGGAGAGAGAGGCTGGAGCCAGGAACACAGCCACCATAGGAGGGTCA  
GGATGAAAGGAGCAATGATACCAGAGCAAAGCAGGATGCAGACAGACTGCTGGCTTCTTCCACCTGACCGTCTGCAGGA  
AGAGCCTCATCCAGGTTTCTGTTGGACTCAACGCCTACATTACAGTGAAGACAGGGCTATACCTCAGCAGGGGTGGTGTC  
CCGAGCAGACATGCTTTCCAAGCTGCGGGGAGCCTTGGAGTGATCATCACAGGTTCTCAAGAGAGAAGAGGGGCCAGCA  
TTTCTTCTGCTTTGAGGGTTTGCAGGTCCCGTGGCAGGTGCTCCTTACAGGCCAGGCACGGACACACCACAGCCCTGCAAG  
CAGCAATGGGCATACTACTTCTCAAACCTTGAGGAGGTCCCCGAGCCATAAGCTGGCTGCTGATTACATGATACAGG  
CGCTAACTGGGCCCCGCTGGGCCCTTTGGGAGCTGAGGGTGGTGCCACAGTCCCTTCCCCATGTCCACCCACTTCCCCTC  
TCAAGTCTGTGTGGGCCCTGTGAATCCAAGGCCATGAATGTGGAGGAATGACCTGTGCCCCAACAGATCAACACTCACT  
CTGTACCCCATCCTAAGCCAGGACAGTGAGTGCCCTTTTTGTGCTTGTTCGGTAGTTCCCGGCCTTTTCCATCCTTGA  
GCCACTGGACAAGAGTCTGATGTCTTTGATGAGTCCCGACAATCTCTGTGGGCGCCCCCTTCTCTGCACAAGTGGCCCT  
TCCTCATCTGTGGGACAGAGGTATCCCAATTAGGGAACCTCTCTGCTTTGTTTTGTTTTGTTTTGAGATGGAGTCTCACT  
CTATTGCCAGGCTGGAGTGCAATGGTACAATCTCAACTCACTGCAACCTCCACCTCAGGCCATTCTCTTGCCTCAGCCTC  
CCATGGGATTACACGCCTGTAATCCCAGCTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGACAGGACTCGCCACGTTGGTAAGGCTGGT  
TTCAAATCCTAACCTCAAGTGATCCACCCGCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGAATTACAGGCATGAGCCACCACACCCAG  
CCTCTGTCTTTAAAGAGGAAAATATGACAAGGCTGGGGGCCAGGGGCCAAGGAAAGGCTAGGTGGGCAAGCAGAGGAGTG  
GGCTCATTTCTCTGAGAACAAAATTAGTTCAGTTTGCAGCAAGAAGAGGTCCAGTTAGACTGAAAAAGGAACTTCTGAG  
AGCATGACCAGGAAGTCTTCTCTAATAGCAGGGCACTGGGAGTGAAAGGCCATGGGAAACATGCAGTCTCTCTCTCCAT  
CATTTACAACCTGACTGGGGCCCTCAGAAGAGAAAGGCTGGGAGGGCTCCTCCATGCCACTTCTCAGCATTTACCACCTT  
GAGGACCTGGGAGAACCCTGCCTGGATGGAATGGGGCAGTGGTGGGACCAACTTGCTCTGAGGCTAAGGAGAGCCAGATG  
ACCCTCAAGACAATCCCAAGTGTCTTTGAGGACACTGAGAGCCAGCCTGGCCACCAGGAAGTTAATCATTGACATGCACC  
TGCCCTGTGCCAGGCCAGCTATCATCTCATCATTGGTACAACGCTATAAGGAAATCTGTGGTTCCCCCTATGGTGAGTG  
GCAAATTGAGGCTCAACAGCAATTGATCAAAGTCACAG

AACCAATATGTCATTTCTAGTCTCCACAGTCTCCAGAATCCATTTTCTTATCCCATTTACAGAAGGAGAACTGAGG  
CCAAATTAAGTAGTCCCATGGCAAGTCAGAGGCCTCCAAAGTGTCTGCTTCCAAAGCTCTTTTACTGTCTCTAGAGACT  
CTGCATTGGACAACAATAGGAGGGATTGAGGTTAGACCCTAGAGAGACCCAAGGGTCTGACCTGATGTCTCGGACCCAGG  
GGTGGGGGTTTCAGGGCCTGGAGAAAGAGCGTGGGAGCTGAGAGCTGTCACTGTTCACCCAGTGCAGTGCCAGCCCA  
AGGCAGGGTGTAGGGTACAGGGTGACAAAACCAAGGAGAAATCCAGTGTGGGTGCGGCCAGTTATGAAATCACCTCTT  
TACTCAGCCCCGAGTTCTCTCTTACCCAAGCAGGGTCTGTGAGACCATGGCAGCCTACATGGGTGTGGAGGCATTGT  
CCAACACAGCTCCAGGGCCCTTACCCAACCTCCATAGGATGTGCAGGGAGCAAATAACAGGGCAAACCTGAGGCCTGAA  
AGGCAGTGGGAATAGACAAGGGTTAGGGAAGAGGTAGATTCCGGACTCATAGCGAAAGGGGCACACTAGGACTGTCCC  
CCAGACCAAGTCCCTAGACCCTGTCTCTGGGAGCCATTTAACCTCAGGAAGAAAGACCACAGGCCTCTCATTGCACCAAG  
GTCTGATGGTCTACAGACAGAGGAAGGTCTTCTGCTAACCGGCCCAAAGCTTCTGAGGCAGTTGAAACCTCTTCCCTTC  
TTGTTCTTTGGGAAACAGAAATTCGGATCTCAGCATTCTTTTCTCTCATACTGCAGGCTCCCAGCCTCAGGCCCAATC  
TAATGGGTACAGAGTCAGTTTGTACCTCTGGCGGGGGGACCATGGGCATCTGGGGGATCAGGGGCTGCCTTTGGGCC  
AGGGCCAGGAAGAAGGGATCAGTCGTTGCAGCTAAGGCTCTGGCAAGCCAGGTGTTCCGGCTCCAGCCAGAGGCC  
CCTGGTGCCTCGACTGCAGGTGGACAGGAAGATGGAGCCAGAGAGGAAAGTGGGCTCAGTGTCCCCTACCCGCTCTTCT  
CTGTCCCCAG

CTCAGCAACAGCACGACGGCTGGCCAGGCGGTGACTAGTGGAGCTCTTCTGACACTGC **GCC** AGCTGGTGTCTGCG  
ATCTTCTCCACCGATGAGCGCCGCGGAGAGAACCCGGGCAC

L S N S T T A G Q A V T V E L F L T L Q L V L C  
I F A S T D E R R G E N P G T

**TRANSLOKACE AMINOKYSELINY ALANINU V REFEREČNÍ SEKVENACI ZA  
THRYPTOFAN !!!!**

CCCTGCTCTCTCCATAGGCTTCTCCGTGGCCCTGGGCCACCTCCTTGGGGTAGGTCATGGCCATGGGTTCCAGCCTCCCTG  
GAGGAACAGACACACAGACCACTCCAGAGACAGACACAGAGACCCCAAGAGGGACACAT

P A L S I G F S V A L G H L L G

ACACAGAACTCTCAAGAGGAACAGACACCCAGAGGTTTGTACTCTAGATACCCAGAGGGACAGATATCACTCCAGCCCA  
TCTGTAATAAAACGTGATGTTAATTGTCCATCACGTGGGTTCCCTTTAGGCTGAGGTCAAGCACTGCAGTGGGACAAAG  
GACTTCTGCCCCTGTCTCACCTCCCTTCTCTTTGATGCCCTCCTCCACTGCAGATCCATTACACCGGCTGTCTATG  
AATCTGCCCGCTCCCTGGCTCCAGCTGTCTGCTACTG

I H Y T G C S M N P A R S L A P A V V T

GCAAATTTGATGACCACTGGGTAATGGCTGAAACCCCTGCCTCCCTTCTCTAGAAACCCATTTTAGAGGGAGAACAAG  
AGCTGGAATAGCATGGGATGGGGCTCAGCAGCGGTACCCAAACCTCCCACTCCTC

G K F D D H W

CTGGTCTGGGGAGCCTTGGGTTCCACCCCTCAGATCTGATGCCAAAGACTCAGTTTCCAGCTGTGTAATGAGGATGACA  
ACAGCTTACCTCACTGGCTTCTTGGGAACAGTAAGTGGGTTACCGGTGTAACCCAGATAATGCAGTGTCTGGCACTTAGA  
ACTCTATAAGTGGTAGTATTTAGCACTTATCTGGTGTCTAGTATGTGGTGAGCCTTGTCTGAGTGCTTTGCAAACATTAA  
CTCAGTTTTTACAACCCAGGAGGTAGACATTCTTAGAGTGAAAGGCACAGAGAGGGTAAGTAACCTGTTGAAGTGCA  
CACAGCACTTAAGTGGTGAATCAGGACACACAGGCAGTGGCTTCAAGATTCGCACCCCTTAACCCCGCACTGACAAGGC  
TTCCCCAGCAGCTGGCGTTGTCTGTAATTACATAAATAAGCATTTTACTAGATTAATGTGCGGGAGGAGAGGTGCGGCC  
GCAGAGTGTGCCGCCGGGCTGCGGGCTCCGCGTGCCGGTGCCGGCGGGGTGCCAAGCCGCCCTCTCCGCTC

GCCCCAGGTCTTCTGGATCGGACCCCTGGTGGGCGCCATCTGGGCTCCCTCCTCTACAACACTAGTGTCTGTTTCCGCCAG  
CCAAGAGCTGTGCGAGCGCTGGCAGTGTGAAGGGCTGGAGCCGGACACCGATTGG

V F W I G P L V G A I L G S L L Y N Y V L F  
P P A K S L S E R L A V L K G L E P D T D W

GAGGAGCGGAGGTGCGACGGCGGAGTCCGTTGGAGCTGCACTCGCCGAGAGCCTGCCACGGGTACCAAGGCCTGAGGG  
CCGCCAGCGCCTCTAAGGCCCCGACGGACGCTTGTGAGGCCGAGGCAGAAGGGCCCA

E E R E V R R R Q S V E L H S P Q S L P R G T K A  
□

CCCCGTCCTCTCCCGCAGGTCTGAAGTTGGCCCCCAGCGCAGAGTAGCTGCTTCCTGGACGTGCGCGCCAGGCCA  
GTGCTGTGAGCAGGCGGGGAGGAGGCTGCCGGAGGGAGCCCTGAGCCTGGCAGGTCCCCTGCCCTGAGGCTGTGAGCAGCT  
AGTGGTGGCTTCTCCAGCCTTTTTTCAGGGAACTGGGAACCTAGGGGACTGAGCTGGGGAGGGAGGCAGGTGGGTGGTAAGA  
GGGAAACTCTGGAGAGCCTGCACCCAGGTAAGTGTGAGTGGGGAGTGTACAGACCCCTGCCTTGGGGGTTCGGGAATGATGCA  
ACTGGTTTTACTAGTGTGCAAGTGTGTTTCATCCCCAAGTTCTCTTTTGTCTCACATGCAGAGTTGTGCATGCCCTGAGT  
GTGAACAGGTTTGCTACGTGGTGTGCAAGTGTGCATGGCTGGGACTTCTCACTTCCCCTTGCACCCCTTCTCCCAACC  
TGCAATAAATCCGCTTCTCCTGCAGTGGATGAGTGTGGGTGCCAGTCTCCTCAGGAGAAGGGGAAGGAGGCCACT  
TTGAGAGGGCTGAAGGGAGGCGCTTGATTTCCAGCCGCAATCTGGCTCCTCCTGGAAAATTTCCCCACCTGCAGCGCTGG  
GCCCCAAGGCTTGCCAAGACTCATTGCTGGAGGTAGAGAGGTGTCAACCAGAGAACAGCTCCCCTAGACATGGCTCTGGA  
AAAAGGAAATCTTTGGTGGCCAAAGATTTCTTTCTGTGGTGGGGAGAACCTCTCAAAGAGGAAGCAGGCATATGAGTG  
CGCACGCTTCACGTGTGTATGCTGTGTGTGCCCGGACCCCGTCTCCAGGGGTGCCCCAGACCCAGAGATTAGCCTC  
CCTTTCGCGCAGAAAACAAAAGCCCTTTGTGGGACCCGGCCCTTTGTCTTGGGTGAGGGGAGATTTGCACCTAGACACT  
TCTTGAAAGGAGACACTCAGTTTACAAGTGTGAGCCCTTGTCCCAGCACACACCTATGGCTGGCTGGGCAAGCGCTCAGG  
CATGCAACCATGGGCACCAGGCAATACCCATCCATCACCCATCTCACTTCCCCAGTCTCAGGCAGCAGCTTTTCCACCC  
CAGGAATCTCTGTTTCTTCTGTCTGCCTTCCACAGCCGTGATCCCCTGCTTCTGGCTCCTACCCTGGACAGTCATT  
GTGGATAGAGCAGCCTGTGCTCTCAGGACCAGAGAAGGGAAATGACTTCTCCAGGCAGAGGCAGATCTGAGTCTAGAACC  
CAGGCTTCTAAATTTCTAGGCCAGTACTGCTCTCAAAGAGATTAAGTGGGATTAAGTGTGATGACGCATGTAAAGAT  
GCTGTGTAAACTGTAATTTCTAATACCATTATCACGCATTACTAGAATCATTTCATTATTTCTGCTTCTGGGGAAAGGAT  
GCAGAAGGAGTCTGATGCTCAACATCCCTTACCTCCTTTCGTTGATGGCCAAAGCAAAGGAGAGTCTGGGAGCCACAAG  
ATCCAGGCAGAAGGAGATGGGTTTGGGGCTGGCCCCATCTGGCCAGCCTCTTAACCTCTTCTTACCCTGAATGTGTGCC  
CTATCTTTTCTCCCACCTCCTTCTCCTACCACCCAGCCCTATCCATTCTCCTTCCCTTCCAGCCTGCTGTATAAGTA  
ACATGTGGGTACATACCTTGAACCCCTCCGCCCATGCTCTGTGGCTCCATGCCTTCAAGACTTCTGTCTGTATCT  
ATCTCACACTGCACCAAGCACCCACTGTGCACCAGGCACTAAGTCTTAGCCTCTTCTCCTTCTGCTCCCATCCAAGAA  
AGACAGTGTATAAGGAACATCTCTGTAATTTGTGTCCCCTCATCTATGCTCTTCTCTGCTTCCCTTGACCAAAGCTCTCT  
TTGAGGTCCAAAAAGGCTGCCCTGGGCCATATGTGCTATGGAGAGGACTCTCCAAACCCCAATAGCTAGTGACAGCCA  
CTTGGCCTCACTACCAGAAGAAGGGTGGAGTCAGAAACCAAAGTGTGACTTCCAGAGCTGTCTCCTGGCACCTGAGTGTCT  
TGCTCTAGAGGTTCAAAGGCAGCAAGGCAGTGTGATGAGCCAGCATGGATGTGTCTCAGGCACCTCATCCCCACCCCA  
CCTCACCCCAACAACTCCTTAGAAGAAGCCAAGAATTTCTCTATGTCTGTTTCACTTTTGGATTGCATCCCCAA  
AAACTAAATGTGAAATCCCTACCATTCTTAGCCTCTATTGCCAGATTGGAGTCAGAGGTCAAAGGATTTCAAGTGAT  
GGAACTCCAGGGGTGGAGGAAATGGCAGTTCTGTCATCTTGTGTACCAGCTGCTGTGCTGGGTGCCCTGCATGCAC  
GGACTTATCTGATCTTCTCAAACCTCAGATAGGTTAGGGAAGGACAAAGGCCCCAGCCATGAAGGGTTTTGCTATTTCC  
AAAGCTTCCCCTTATCGTCCCCTGTGATTATCTCCAACCCCGTGACAAAGGTAGAGCAAATATGTTCTTCCCATTTTAC  
AGATTCAGAAACCAAGGCTAAGGGACTGGTCTAAAGTCTCACAGGTAGTATATGGTGGAGCCAACTTGAATCAGACCT  
TTTTACACAAAATCCCATGATTTTTTCCACTGAGACAAATCCTAGGCTCCTGGGAGGCCCTGGCAGAAGCCAGAACACATGG  
CTGGGCCTTCCAGCCCAACCCACTGTCTTGCAGTGGACGGAGAGCCTTGGCGAGGGCAGCAGGGTAGAGAGGACAAAGAA  
TGTGGGGCTGGTTTCTGCCCTTTAAGAGCACCCGGTCACTGAGAGAACAGAGATCACACACACCAAACAGACAGAGGCAG  
GGCAGCATGGAGACAGGTAGACAGACCTCCAGGTCCCTAAGCTGGGGACAGAGAAGGTTCTGAGCTGTCCATACTCCCAC  
TTTGTGCCAAATGACTTTGCACCTGCAAATGGTGTCTCAATGTGCTTTTGTATCTTTAAGCTGTGATGTTGTATATATACA  
ATGCCTCCCAGCTAGACTGTAAGCCCTTTGGGGACAAGGGCTGTCTCCAGTCTTGGATGGCGTCTCCTATCTACCTTCC  
TTCAACTGCTCTGCATATAATAAGCACTCAATAAATGCTCATTTGCCAATAAGTACTGTTTCTTCCACAACCTGGCAGTGG  
TAATAGAAATACAGCCCAAGGTACCAGAAGACAGGCGGAGCTCCCTACCCTTCTACCCAGCCCTCAACTTCTCCAGGG  
AACTCAGAAGTCCCATATCAGGAGAGGAGGGGAAGGGCTCTCCCTAAGACATTCAAATTTCCCCTGCCACAAATGGGGAG  
ACCCATCACTCAGCTCACAAAGGTCCCGGCATTCTCTGGAGCTGCCAGGCAGGGCCTGAGTGTGGGCAAGAGAAT  
TCCGAGACATAATGGGA