

Pan Mendel by měl jistě radost  
aneb co dokáže moderní genetika  
v medicíně při péči o pacienta

Iveta Valášková



# Brno – město genetiky

Opat v augustiniánském klášteře na Starém Brně dospěl před půldruhým stoletím křížením rostlin k zásadním objevům, z nichž vyvodil principy dědičnosti, které se staly základem genetiky.



## Augustiniánské opatství sv. Tomáše na Starém Brně

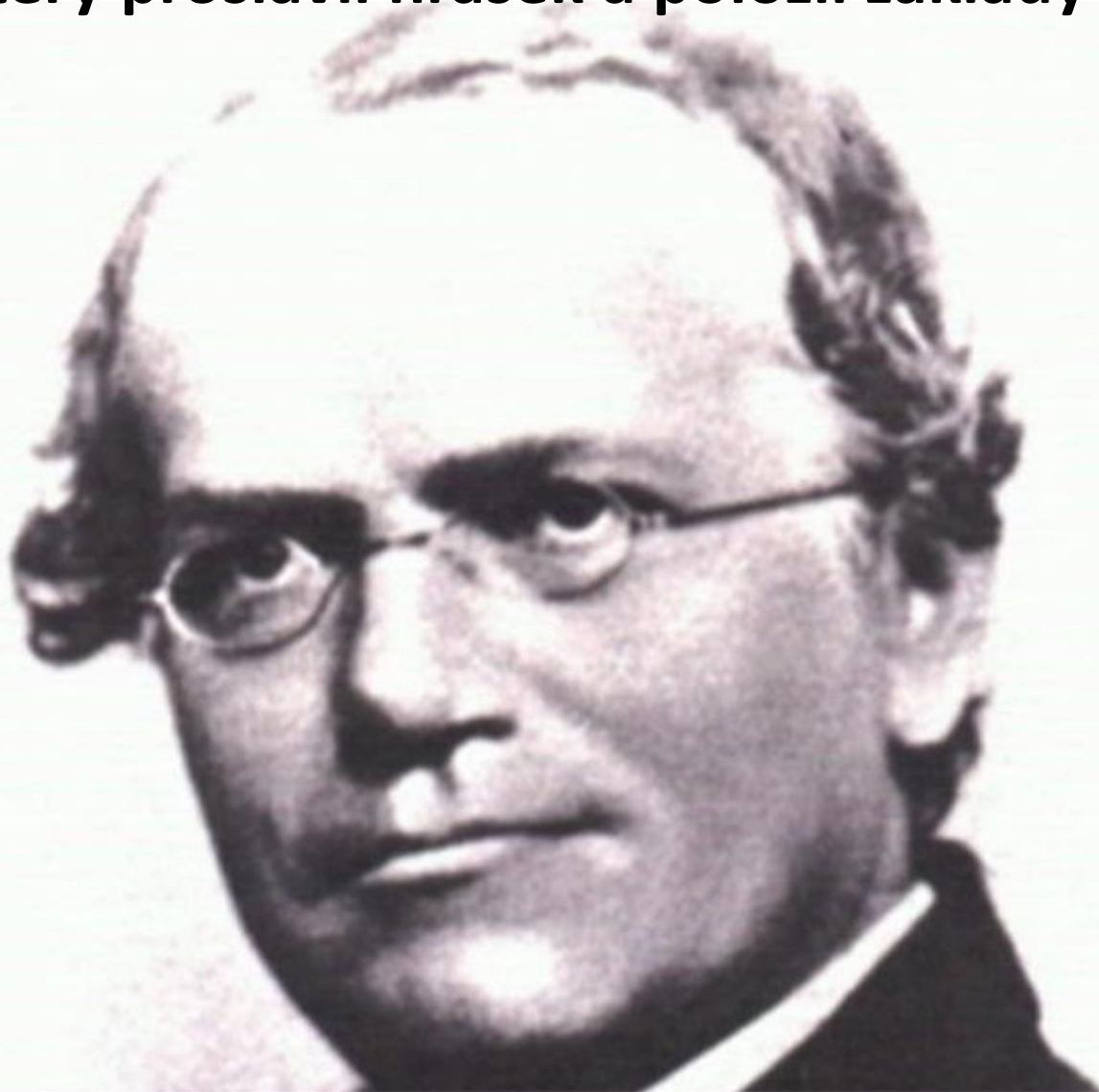


Augustiniáni ve své době hráli řečeno dnešní terminologií roli vědeckého inkubátoru.  
Zdržovala se u nich vědecká elita.  
Ti, kdo vstoupili do řádu na Starém Brně, tak buď učili na tehdejších školách,  
nebo se zabývali vědou.

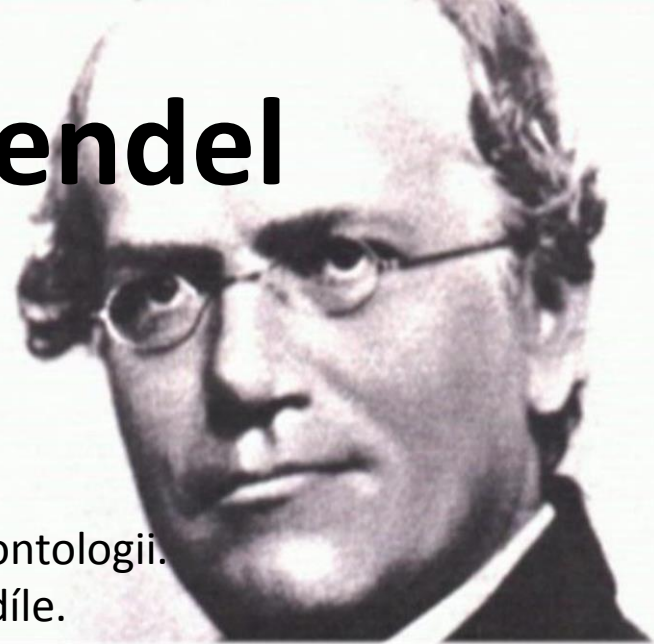


# Gregor Johann Mendel:

**Muž, který proslavil hrášek a položil základy genetiky**



# Gregor Johann Mendel



**přírodovědec, zakladatel genetiky  
a objevitel základních zákonů dědičnosti.**

Působil jako mnich a později **opat augustiniánského kláštera** sv. Tomáše na Starém Brně, kam přišel v roce 1843 a přijal řeholní jméno Gregor.

Studoval matematiku, fyziku, chemii, botaniku, zoologii a paleontologii. Své široké znalosti později uplatnil při svém nejvýznamnějším díle.

**Mezi lety 1856–1863 se Mendel věnoval křížení hrachu a sledování změn dceřiných rostlin.**

Na základě svých pokusů formuloval **tři pravidla**, která později vešla ve známost jako **Mendelovy zákony dědičnosti**.

Později byla jeho experimentální data mnohokrát prověřována, protože se mnoha kritikům zdála až příliš přesná.

**Mendelova práce byla jedna z prvních, která aplikovala matematické metody na biologický výzkum.**

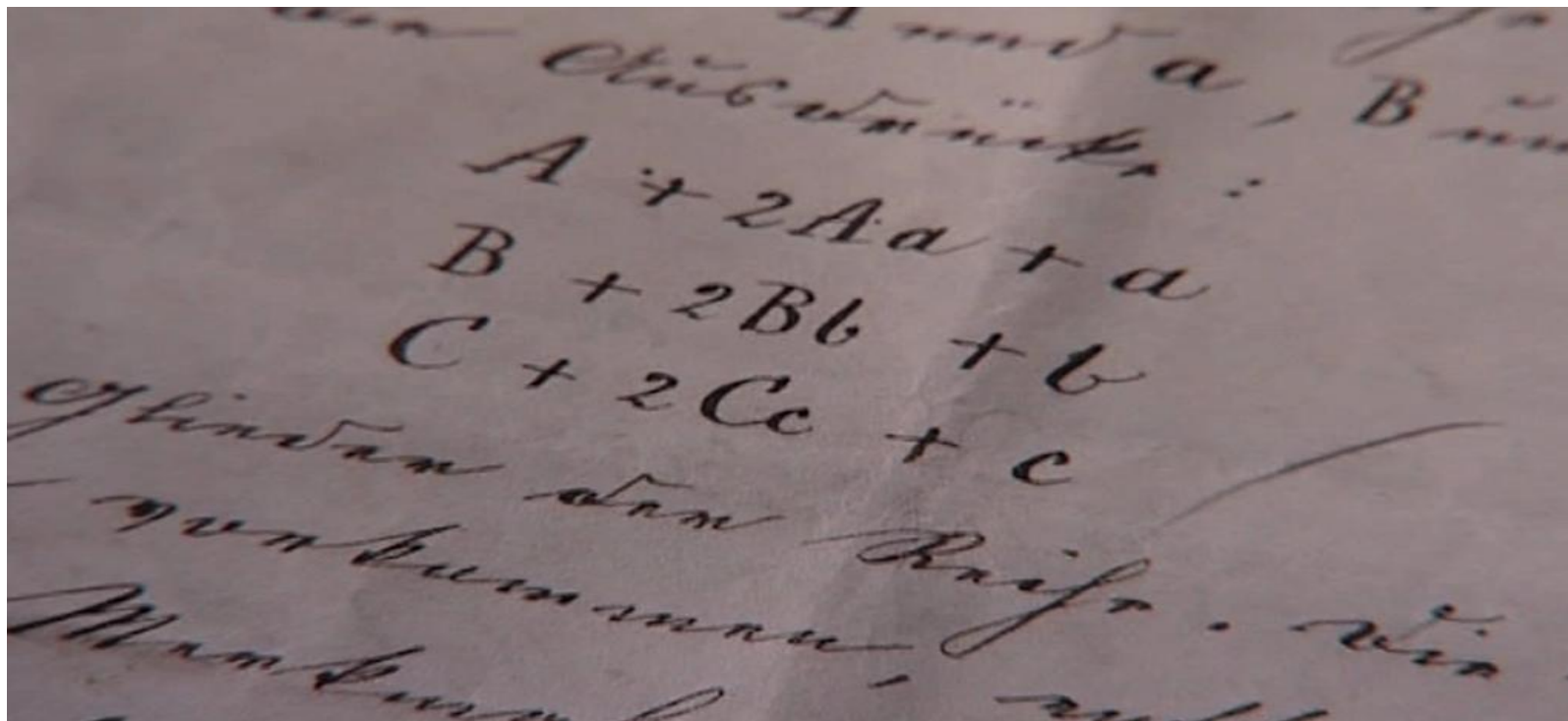
**Od roku 1862 prováděl Mendel také každodenní meteorologická pozorování pro Meteorologický ústav ve Vídni.**

V seznamu třinácti Mendelových publikací se devět týká meteorologie. Mendelovo jméno čestně nese i první česká vědecká stanice na Antarktidě.

V roce 1883 Mendel vážně onemocněl a **6. ledna 1884 zemřel v klášteře a byl pochován na Ústředním hřbitově v Brně** do hrobky augustiniánů.

Rekviem v kostele dirigoval Leoš Janáček.

Mendel předběhl svou dobu a sepsal o principech křížení v roce 1866 světoznámou publikaci „Pokusy s rostlinnými hybridy“ („Versuche über Pflanzen-Hybriden“). Tento spis pak položil základy moderní genetiky.



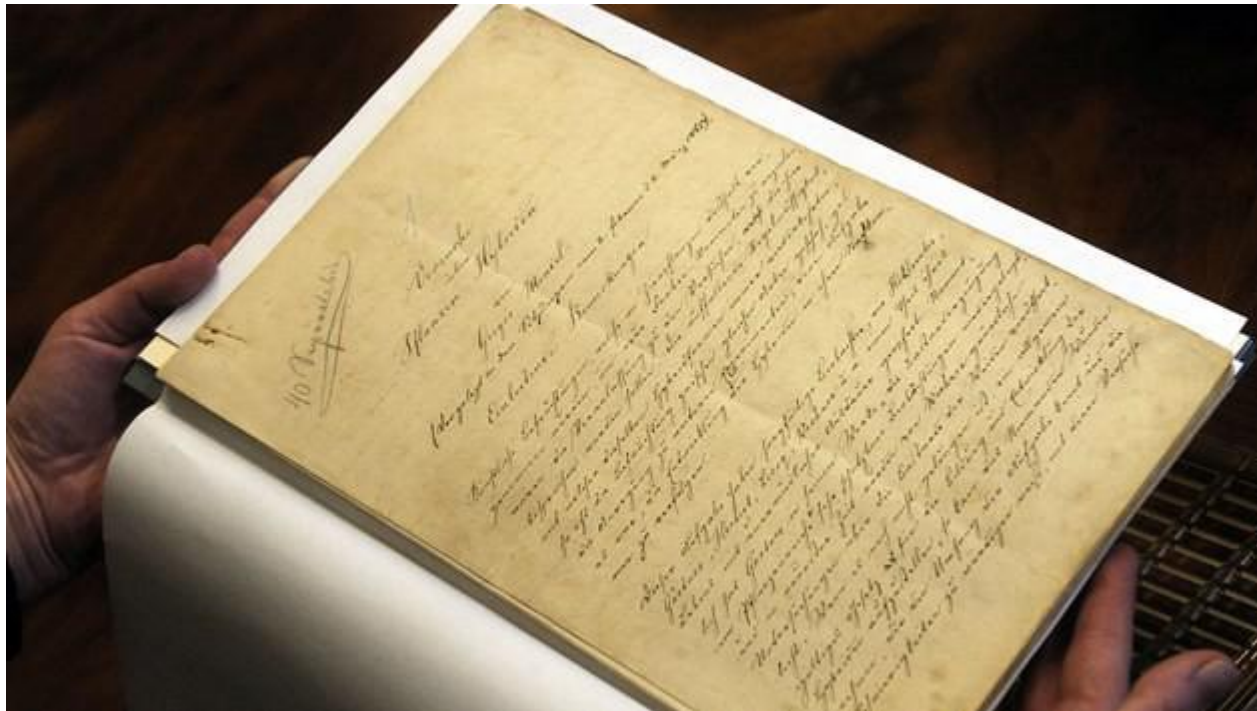
Německy psaný dokument „Versuche über Pflanzenhybriden“ byl po léta uložen v Německu, do Brna se vrátil v lednu 2012.



„Je to vlastně základní rovnice genetiky, která vyrůstá na tomto objevu a je dnes známá po celém světě. Máme před sebou dílo, jež objevil člověk, který žil v tomto domě, v tomto klášteře. A na to můžeme být patřičně hrdí.“  
*Opat augustiniánského opatství na Starém Brně Lukáš Evžen Martinec*

Podle muzejníků má cenu desítek, možná i stovek milionů korun.  
„Já si myslím, že cena rukopisu se může odhadnout, ale je to stále jenom odhad.

Můžete vypočítat, jakou cenu má člověk?  
A toto je dokument, který opravdu nemá na světě obdoby.“  
*opat Lukáš Evžen Martinec*



Rukopis obsahuje informace o tom, jak si Mendel představoval fungování dědičnosti, která byla pro tehdejší dobu věcí naprosto nepochopitelná.

Mendel ve spisu na tuctu dvoustránek popsal všechno, co pozoroval při svých pokusech s hrachem v letech 1854 až 1864.



## Vítězství mysli i trpělivosti

Zatímco dnes jsou na zdi Mendelova muzea v Brně podepsáni i špičkoví držitelé Nobelovy ceny, kteří kvůli tomu speciálně v minulých letech do Brna cestovali, před 150 lety význam Mendelovy práce nedošel prakticky nikomu. Svět sice právě prožíval ohromení nad Darwinovou evoluční teorií, ale naprosto mu uniklo, že Mendel právě poodhalil mechanismus, jakým se darwinovský vývoj druhů realizuje.

Můžeme jen žasnout nad odvahou spatřovat v dosud zcela neznámém a stále ještě dost tabuizovaném procesu plození jednotlivé tahy elementů dědičnosti (ano, Mendel objevil geny, jen to jméno jim dal později někdo jiný) a zacházet s nimi jako se stavebními kostkami.

Mendel je roven Maxu Planckovi, Albertu Einsteinovi a Nielsi Bohrovi dohromady, protože právě jeho objev základních zákonů genetiky je největším přírodovědeckým výsledkem zrozeným v českých zemích.

Mendel byl znovuobjeven až kolem roku 1900

**Hugem de Vriesem,  
Carlem Corrensem,  
Erichem von Tschermakem**

Vůbec největšího ocenění se mu dostalo v letech 1905 a 1906,  
kdy si jeho práce všiml **William Bateson**

- nechal přeložit Mendelovu objevnou práci Pokusy s rostlinnými hybridy z němčiny do angličtiny
  - poprvé použil termín genetika

- Zjistil, že Mendel byl ten, kdo stál u jejího zrodu a který formuloval základní principy dědičnosti.





I když zájem ve světě o Mendela roste, v Čechách zaostává.  
Projevuje se to i tím, že Češi přicházejí do Mendelova muzea na rozdíl od cizinců zřídka.

Je to ještě důsledek toho, že v 50. a 60. letech byl Mendel komunistickým režimem zakázán, protože genetiky byla považována za reakční pavědu. Vadilo také, že byl německé národnosti.

# Pronásledovaná genetika

**Buržoazní pavěda** (*Буржуазная лженаука, buržuaznaja lženauka*)

je pojem zavedený v Sovětské Svazu pro některé vědecké obory, které se z ideologického hlediska jevily jako nepřijatelné.

V různých obdobích byly jako buržoazní pavěda označeny genetika, kybernetika, sociologie, sémiotika, srovnávací lingvistika.

Toto pojetí převažovalo v období vlády Stalina.

Ačkoli se jeví jako zdánlivě neškodné sousloví, označení přispělo k řadě osobních tragédií (Nikolaj Vavilov)

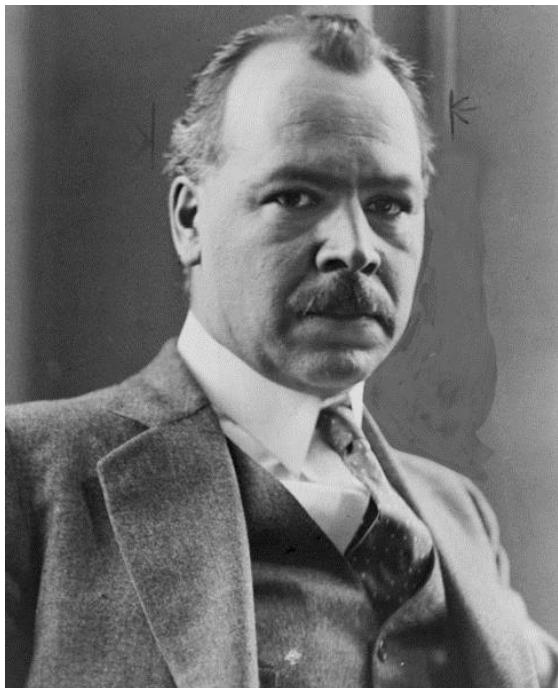
a na dlouhou dobu potlačilo povědomí o významných osobnostech vědy (Gregor Johann Mendel, Thomas Morgan),

napomohlo vzestupu obskurních osobností (Lysenko, Lepešinská), upřednostnilo Mičurina a Pavlova

a na dlouhou dobu omezilo svobodu vědeckého bádání nejen v Sovětském svazu.



# Pronásledovaná genetika



## **Nikolaj Ivanovič Vavilov**

(25. 11. 1887 Moskva – 26. 1. 1943 Saratov)

byl sovětský biolog, botanik, cestovatel, geograf,  
vysokoškolský pedagog, vědec

a **propagátor genetiky v SSSR.**

Procestoval celý svět, aby sbíral rostliny, které chtěl  
pěstovat v Sovětském svazu a nasytit tak milióny  
pracujících lidí.

## **Soud a smrt**

"Vědec" Trofim Lysenko vedl boj proti genetice a tvrdil, že se jedná o podvrh.

Rozhodující byla podle jeho názoru intenzita podnětů, která vede k požadovanému výsledku.

Například krávy mohou dojít fialové mléko, pokud by je k tomu někdo vhodně stimuloval.

Měl úzký vztah s Josifem V. Stalinem, na jehož základě byl v roce 1940 Vavilov zatčen.

Následovalo obvinění, že genetickými experimenty zavinil hladomor ve třicátých letech 20 století.

Soudní proces trval pět minut.

Byl odsouzen k nuceným pracím v gulagu na Sibiři, kde roku 1943 zemřel.

# Pronásledovaná genetika

## Oběti antimendelismu (1934-1958)

### ***Věznění a zastřelení vězni***

N. M. Tulaikov

N. K. Belyaev

I. I. Agol

V. N. Slepko

R. I. David

G. A. Nadson

S. G. Levit

G. K. Meister

A. I. Muralov

### ***Ve vězení zahynuli***

N. I. Vavilov

G. D. Karpenchenko

L. L. Govorov

A. B. Alexandrov

G. A. Levitsky

### ***Sebevraždu spáchali***

D. A. Sabinin

### ***Perzekuovaní vědci***

S. S. Chetverikov

A. A. Sapegin

V. N. Gorbunov

A. I. Geister

V. P. Efrogimson

D. D. Romashov

N. V. Timofeev-Ressovsky

J. Kříženecký

B. Sekla

D. Kostov

A mnoho dalších

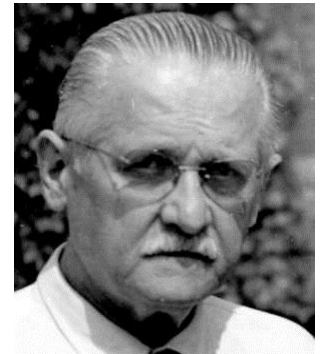
# Pronásledovaná genetika

Genetika se totiž stala v pounorovém **Československu** zcela podrobeném sovětskému vlivu jedním z nejpostiženějších vědeckých oborů, přestala se vyučovat a dokonce byli její zastánci perzekuováni.

**Jaroslav Kříženecký** (2. 3. 1896 Praha - 26. 12. 1964 Brno)

docent Vysoké školy zemědělské v Brně

zakladatel Mendeliana a genetického oddělení Moravského muzea



Protože jako jeden z mála zůstal věrný vědecké mendelovské genetice, byl v roce 1949 propuštěn ze Zootechnického ústav Vysoké školy zemědělské, který vedl. Dostal zákaz vstupu na Přírodovědeckou fakultu Masarykovy univerzity v Brně. Když v roce 1957 vystoupil slovem i tiskem s kritikou Lysenka a obranou Mendela, byl ve vykonstruovaném procesu odsouzen na jeden a půl roku do vězení.

V procesu mu jistě nepřilepšila ani filozofická úvaha v Peroutkově týdeníku

*Přítomnost* z roku 1925 „Proč nejsem komunistou“.

V ní zdůvodňuje, proč nevěří ve správnost teorie ani ideálů a praxe komunistické strany

– budoucnost dala za pravdu jemu i dalším českým osobnostem,

jako byli bratři Čapkové, Jan Herben, František Langer, Josef Kopta, Fráňa Šrámek, Ladislav P. Procházka nebo Jaroslav Kallab.

# Revoluce zvaná genetika

## 1865 - Opat augustiniánského kláštera v Brně Johann Gregor Mendel svými objevy založil nauku o dědičnosti

**1869-1871** - Objev nukleových kyselin. Zjištěno, že buňka obsahuje deoxyribonukleovou kyselinu (DNA).

**1900** - Nizozemec Hugo Maria de Vries, Němec Karl Erich Correns a Rakušan Erich von Tschermak potvrdili Mendelovy zákony o dědičnosti a vytvořili klasickou genetiku.

**1909** - Wilhelm Ludvig Johannsen položil základy moderní terminologie (gen, genotyp, fenotyp)

**1919** - Phoebus Levene určil složení DNA

**1938** - Vzniká termín „molekulární biologie“.

**1944** - Američan Oswald Avery s kolegy objevil, že DNA je nositelkou dědičné informace.

**1951** - V Londýně poprvé získány ostré rentgenové difrakční snímky DNA.

**1953** - Angličané Francis Crick a Maurice Wilkins a Američan James Watson objevili strukturu DNA.

**1956** - DNA vytvořena poprvé uměle.

**1957** - Francis Crick, George Gamov - formulace centrálního dogmatu

**1958** - Rozluštěn genetický kód, princip mechanismu,. Francis Crick předložil sérii pravidel, které popisují vztahy mezi DNA, RNA a proteiny.

**1961** - Matthew Meselson a Franklin Stahl dokázali replikační mechanismus DNA,

**1966** - DNA objevena jak v chromosomech, tak v mitochondrii.

**1969** - Poprvé oddělen jednotlivý gen.

**1970** - První syntéza umělého genu.

**1973** - Kalifornští vědci vyvinuli postup výroby rekombinantních molekul DNA tím, že lidský gen připojili do molekul bakteriální DNA. Belgičtí vědci poté určili pořadí molekul v genech.

**1976** - První funkční syntéza umělého genu v bakterii.

**1977** - Vědci se začali zabývat mapováním DNA; poprvé izolovány lidské geny.

**1981** - Objevena první lidská mitochondriální DNA. - Vědci z Ohio University vyprodukovali první transgenní zvíře transferem genů z jiných druhů zvířat do myši.

**1982** - V USA přišel poprvé na trh medikament vyrobený genovou technikou (inzulin); následoval lék proti rakovině interferon.

**1983** - Poprvé syntetizován umělý chromosom, Kary Banks Mullis popsal metodu polymerázové řetězové reakce

**1984** - Poprvé uplatněna molekulární biologie v kriminalistice. Založen genetický otisk prstu (DNA fingerprint).

**1988** - Organizace na výzkum lidského genomu (Human Genome Organisation) oznámila úkol zmapovat kompletní skladbu DNA.

**1990** - Na čtyřleté holčičce poprvé vyzkoušena léčba lidského organismu pomocí genových experimentů.

**1991** - Začátek projektu zkoumání lidského genomu mezinárodním veřejným konsorciem Human Genome Project (HGP).

**1995** - Rozluštění prvního genomu (bakterie Haemophilus influenzae).

**1996** - Po šestiletých výzkumech rozluštěn první eukaryotní genom pivovarských kvasinek (Saccharomyces cerevisiae).

**1998** - Poprvé rozluštěn genom mnohobuněčného organismu - parazita hlístice (Caenorhabditis elegans).

**Prosinec 1999** - Mezinárodní tým genetiků poprvé v historii lidstva popsal genetický kód lidského chromozómu 22, jednoho z 23 párů lidských chromozómů.

**Březen 2000** - Vědci z Kalifornské univerzity v Berkeley rozšifrovali genetickou výbavu mušky octomilky.

**26. června 2000** - HGP oznámilo sestavení prvního hrubého náčrtu celého lidského genomu.

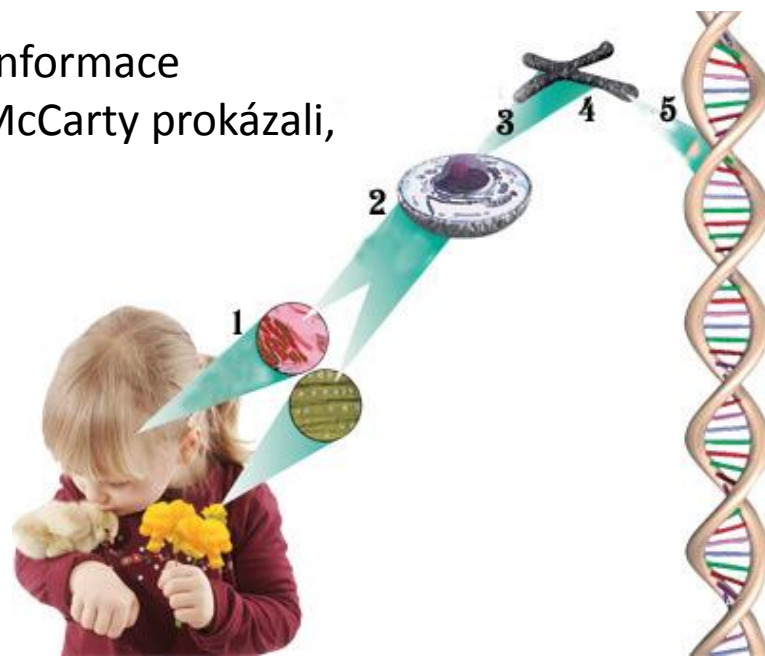
**11. února 2001** - HGP a jeho hlavní konkurent Celera Genomics oznámily rozluštění 95 procent lidského genomu.

**4. srpna 2002** - Vědcům se podařilo sestavit nejucelenější genetickou mapu myši. V prosinci americký časopis Nature zveřejnil, že lidé a myši mají asi z 99 procent totožný genom.

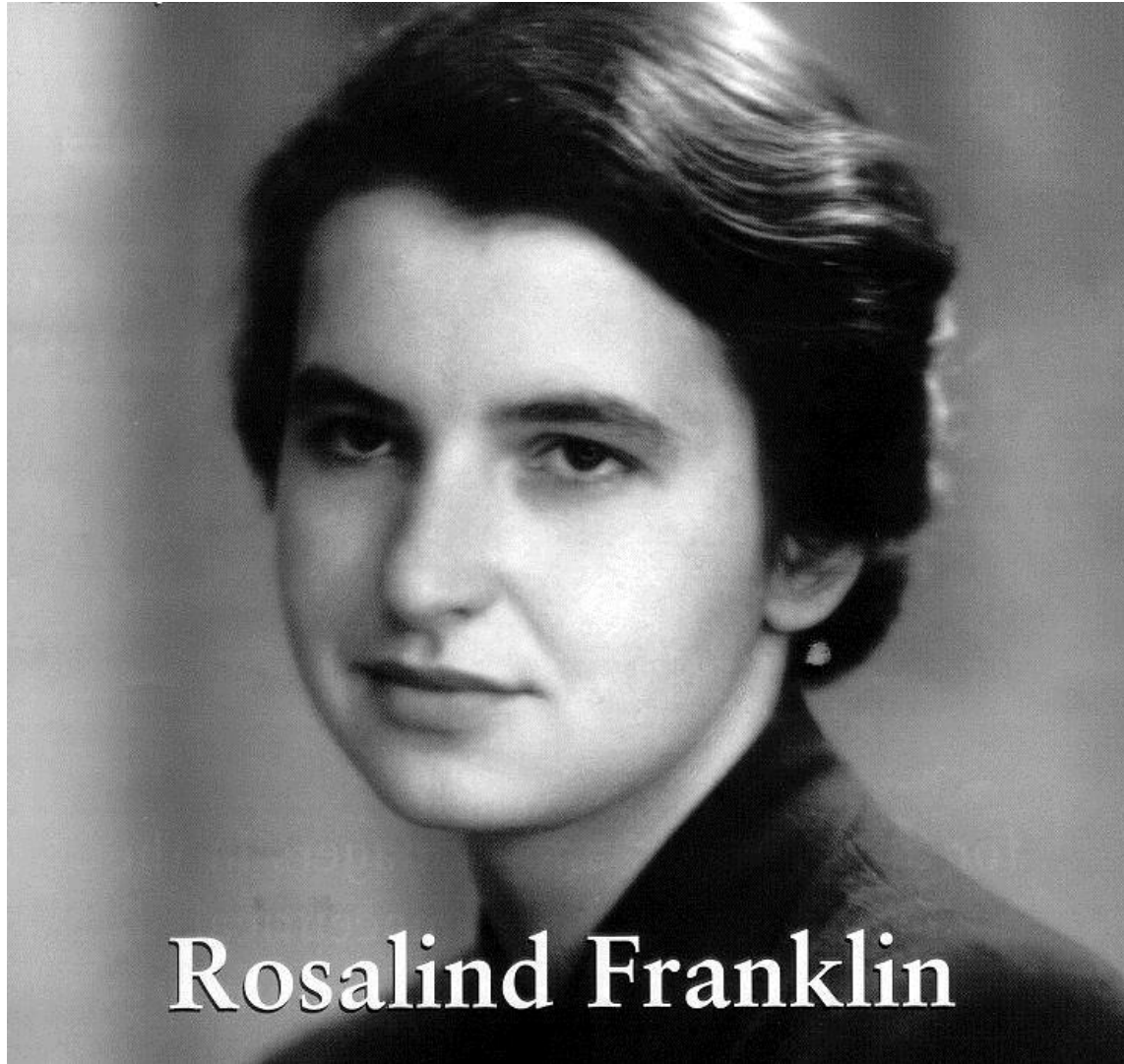
**14. dubna 2003** - Mezinárodní tým vědců oznámil dokončení plné identifikace lidského genomu.



- 1875** Charles Darwin přišel s myšlenkou „gemulí“, hypotetických částic určených k přenosu rysů z rodičů na potomky
- 1869** V buňkách byla zjištěna chemická látka deoxyribonukleová kyselina (DNA)
- 1909** Wilhelm Ludvig Johannsen položil základy moderní terminologie (gen, genotyp, fenotyp)
- 1919** Phoebus Levene určil složení DNA
- 1938** Vzniká termín „molekulární biologie“.
- 1944** DNA byla určena nositelkou genetické informace  
Oswald Avery, Colin MacLeod, Maclyn McCarty prokázali, že látkovým substrátem genů je DNA



**1951** Byl získán první jasný rentgenový snímek DNA.



# Revoluce zvaná genetika

**1865** - Opat augustiniánského kláštera v Brně Johann Gregor Mendel svými objevy založil nauku o dědičnosti

**1869-1871** - Objev nukleových kyselin. Zjištěno, že buňka obsahuje deoxyribonukleovou kyselinu (DNA).

**1900** - Nizozemec Hugo Maria de Vries, Němec Karl Erich Correns a Rakušan Erich von Tschermak potvrdili Mendelovy zákony o dědičnosti a vytvořili klasickou genetiku.

**1909** - Wilhelm Ludvig Johannsen položil základy moderní terminologie (gen, genotyp, fenotyp)

**1919** - Phoebus Levene určil složení DNA

**1938** - Vzniká termín „molekulární biologie“.

**1944** - Američan Oswald Avery s kolegy objevil, že DNA je nositelkou dědičné informace.

**1951** - V Londýně poprvé získány ostré rentgenové difrakční snímky DNA.

**1953 - Angličané Francis Crick a Maurice Wilkins a Američan James Watson objevili strukturu DNA.**

**1956** - DNA vytvořena poprvé uměle.

**1957** - Francis Crick, George Gamov - formulace centrálního dogmatu

**1958** - Rozluštěn genetický kód, princip mechanismu. Francis Crick předložil sérii pravidel, které popisují vztahy mezi DNA, RNA a proteiny.

**1961** - Matthew Meselson a Franklin Stahl dokázali replikační mechanismus DNA,

**1966** - DNA objevena jak v chromosomech, tak v mitochondrii.

**1969** - Poprvé oddělen jednotlivý gen.

**1970** - První syntéza umělého genu.

**1973** - Kalifornští vědci vyvinuli postup výroby rekombinantních molekul DNA tím, že lidský gen připojili do molekul bakteriální DNA. Belgičtí vědci poté určili pořadí molekul v genech.

**1976** - První funkční syntéza umělého genu v bakterii.

**1977** - Vědci se začali zabývat mapováním DNA; poprvé izolovány lidské geny.

**1981** - Objevena první lidská mitochondriální DNA. - Vědci z Ohio University vyprodukovali první transgenní zvíře transferem genů z jiných druhů zvířat do myši.

**1982** - V USA přišel poprvé na trh medikament vyrobený genovou technikou (inzulin); následoval lék proti rakovině interferon.

**1983** - Poprvé syntetizován umělý chromosom, Kary Banks Mullis popsal metodu polymerázové řetězové reakce

**1984** - Poprvé uplatněna molekulární biologie v kriminalistice. Založen genetický otisk prstu (DNA fingerprint).

**1988** - Organizace na výzkum lidského genomu (Human Genome Organisation) oznámila úkol zmapovat kompletní skladbu DNA.

**1990** - Na čtyřleté holčičce poprvé vyzkoušena léčba lidského organismu pomocí genových experimentů.

**1991** - Začátek projektu zkoumání lidského genomu mezinárodním veřejným konsorciem Human Genome Project (HGP).

**1995** - Rozluštění prvního genomu (bakterie Haemophilus influenzae).

**1996** - Po šestiletých výzkumech rozluštěn první eukaryotní genom pivovarských kvasinek (Saccharomyces cerevisiae).

**1998** - Poprvé rozluštěn genom mnohobuněčného organismu - parazita hlístice (Caenorhabditis elegans).

**Prosinec 1999** - Mezinárodní tým genetiků poprvé v historii lidstva popsal genetický kód lidského chromozómu 22, jednoho z 23 párů lidských chromozómů.

**Březen 2000** - Vědci z Kalifornské univerzity v Berkeley rozšifrovali genetickou výbavu mušky octomilky.

**26. června 2000** - HGP oznámilo sestavení prvního hrubého náčrtu celého lidského genomu.

**11. února 2001** - HGP a jeho hlavní konkurent Celera Genomics oznámily rozluštění 95 procent lidského genomu.

**4. srpna 2002** - Vědcům se podařilo sestavit nejucelenější genetickou mapu myši. V prosinci americký časopis Nature zveřejnil, že lidé a myši mají asi z 99 procent totožný genom.

**14. dubna 2003** - Mezinárodní tým vědců oznámil dokončení plné identifikace lidského genomu.

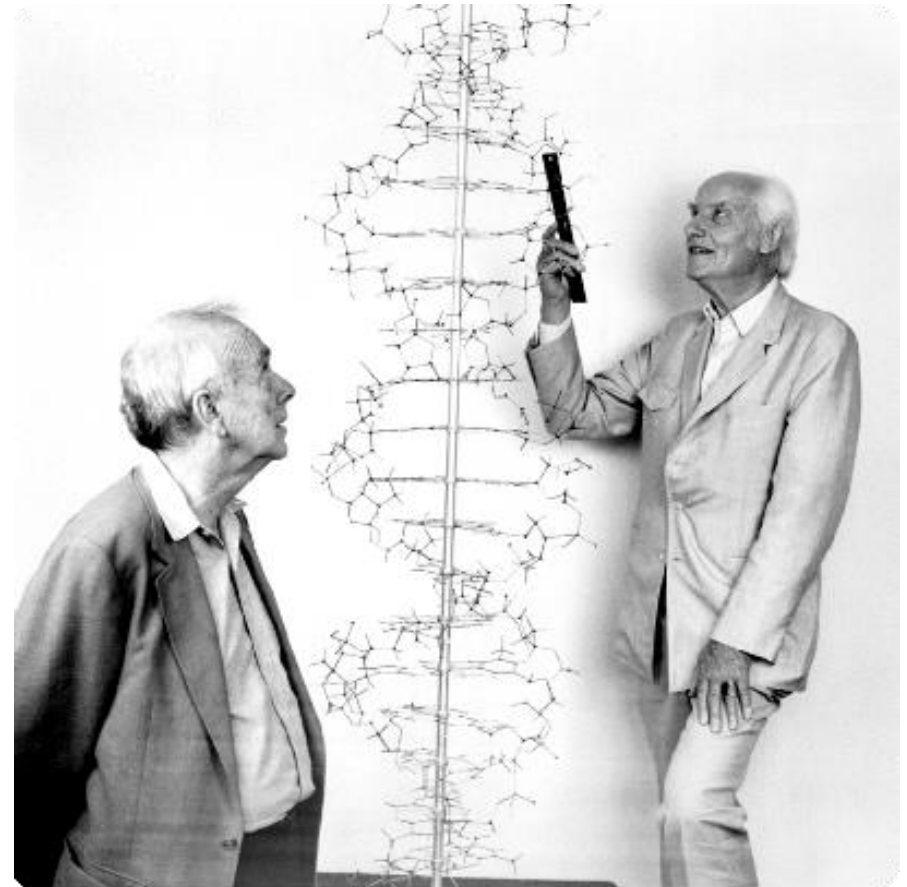
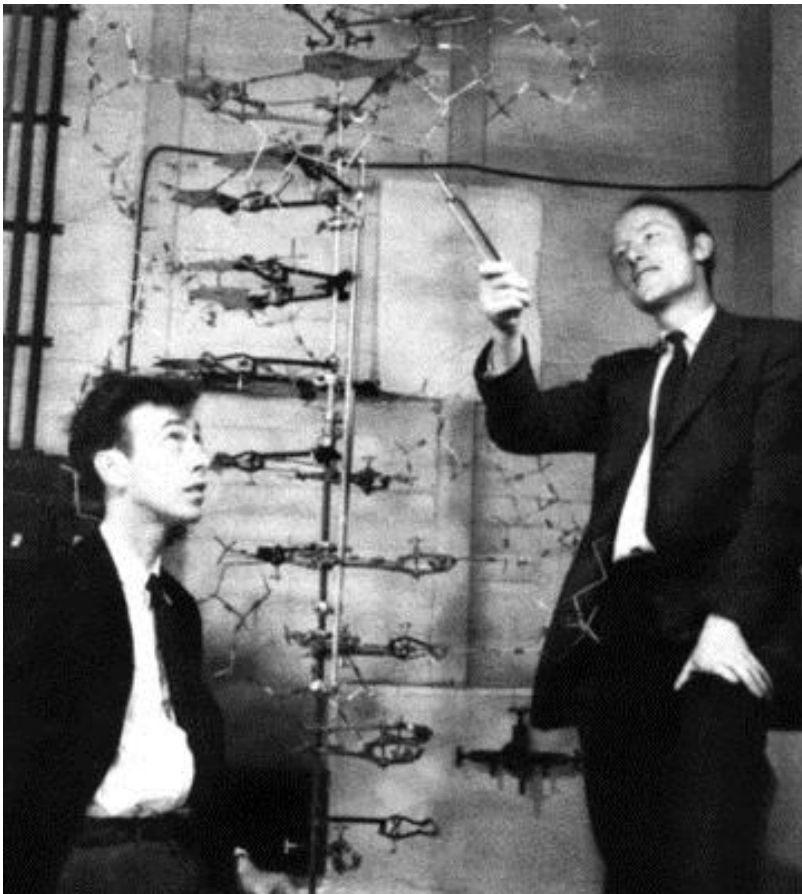
# James D. Watson, Francis H. Crick

# 1953

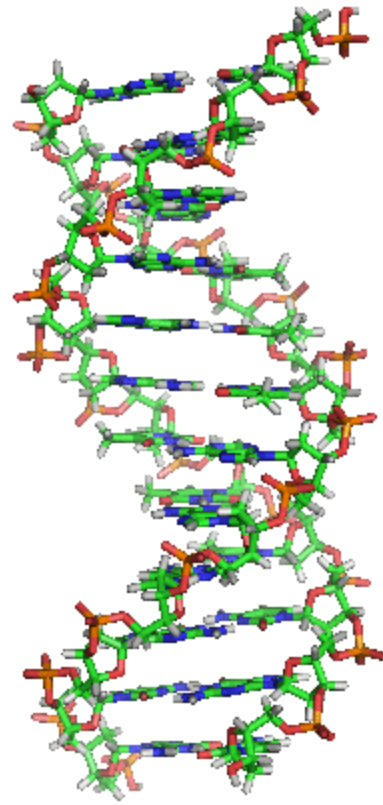
Popsali molekulární strukturu DNA

Položili tím základ ještě hlubší úrovně genetického výzkumu

– molekulární genetiky







# Revoluce zvaná genetik

**1865** - Opat augustiniánského kláštera v Brně Johann Gregor Mendel svými objevy založil nauku o dědičnosti

**1869-1871** - Objev nukleových kyselin. Zjištěno, že buňka obsahuje deoxyribonukleovou kyselinu (DNA).

**1900** - Nizozemec Hugo Maria de Vries, Němec Karl Erich Correns a Rakušan Erich von Tschermak potvrdili Mendelovy zákony o dědičnosti a vytvořili klasickou genetiku.

**1909** - Wilhelm Ludvig Johannsen položil základy moderní terminologie (gen, genotyp, fenotyp)

**1919** - Phoebus Levene určil složení DNA

**1938** - Vzniká termín „molekulární biologie“.

**1944** - Američan Oswald Avery s kolegy objevil, že DNA je nositelkou dědičné informace.

**1951** - V Londýně poprvé získány ostré rentgenové difrakční snímky DNA.

**1953** - Angličané Francis Crick a Maurice Wilkins a Američan James Watson objevili strukturu DNA.

**1956** - DNA vytvořena poprvé uměle.

**1957** - **Francis Crick, George Gamov - formulace centrálního dogmatu**

**1958** - **Rozluštěn genetický kód, princip mechanismu, - Francis Crick předložil sérii pravidel, které popisují vztahy mezi DNA, RNA a proteiny.**

**1961** - Matthew Meselson a Franklin Stahl dokázali replikační mechanismus DNA,

**1966** - DNA objevena jak v chromosomech, tak v mitochondrii.

**1969** - Poprvé oddělen jednotlivý gen.

**1970** - První syntéza umělého genu.

**1973** - Kalifornští vědci vyvinuli postup výroby rekombinantních molekul DNA tím, že lidský gen připojili do molekul bakteriální DNA. Belgičtí vědci poté určili pořadí molekul v genech.

**1976** - První funkční syntéza umělého genu v bakterii.

**1977** - Vědci se začali zabývat mapováním DNA; poprvé izolovány lidské geny.

**1981** - Objevena první lidská mitochondriální DNA. - Vědci z Ohio University vyprodukovali první transgenní zvíře transferem genů z jiných druhů zvířat do myši.

**1982** - V USA přišel poprvé na trh medikament vyrobený genovou technikou (inzulin); následoval lék proti rakovině interferon.

**1983** - Poprvé syntetizován umělý chromosom, Kary Banks Mullis popsal metodu polymerázové řetězové reakce

**1984** - Poprvé uplatněna molekulární biologie v kriminalistice. Založen genetický otisk prstu (DNA fingerprint).

**1988** - Organizace na výzkum lidského genomu (Human Genome Organisation) oznámila úkol zmapovat kompletní skladbu DNA.

**1990** - Na čtyřleté holčičce poprvé vyzkoušena léčba lidského organismu pomocí genových experimentů.

**1991** - Začátek projektu zkoumání lidského genomu mezinárodním veřejným konsorciem Human Genome Project (HGP).

**1995** - Rozluštění prvního genomu (bakterie Haemophilus influenzae).

**1996** - Po šestiletých výzkumech rozluštěn první eukaryotní genom pivovarských kvasinek (Saccharomyces cerevisiae).

**1998** - Poprvé rozluštěn genom mnohobuněčného organismu - parazita hlístice (Caenorhabditis elegans).

**Prosinec 1999** - Mezinárodní tým genetiků poprvé v historii lidstva popsal genetický kód lidského chromozómu 22, jednoho z 23 párů lidských chromozómů.

**Březen 2000** - Vědci z Kalifornské univerzity v Berkeley rozšifrovali genetickou výbavu mušky octomilky.

**26. června 2000** - HGP oznámilo sestavení prvního hrubého náčrtu celého lidského genomu.

**11. února 2001** - HGP a jeho hlavní konkurent Celera Genomics oznámily rozluštění 95 procent lidského genomu.

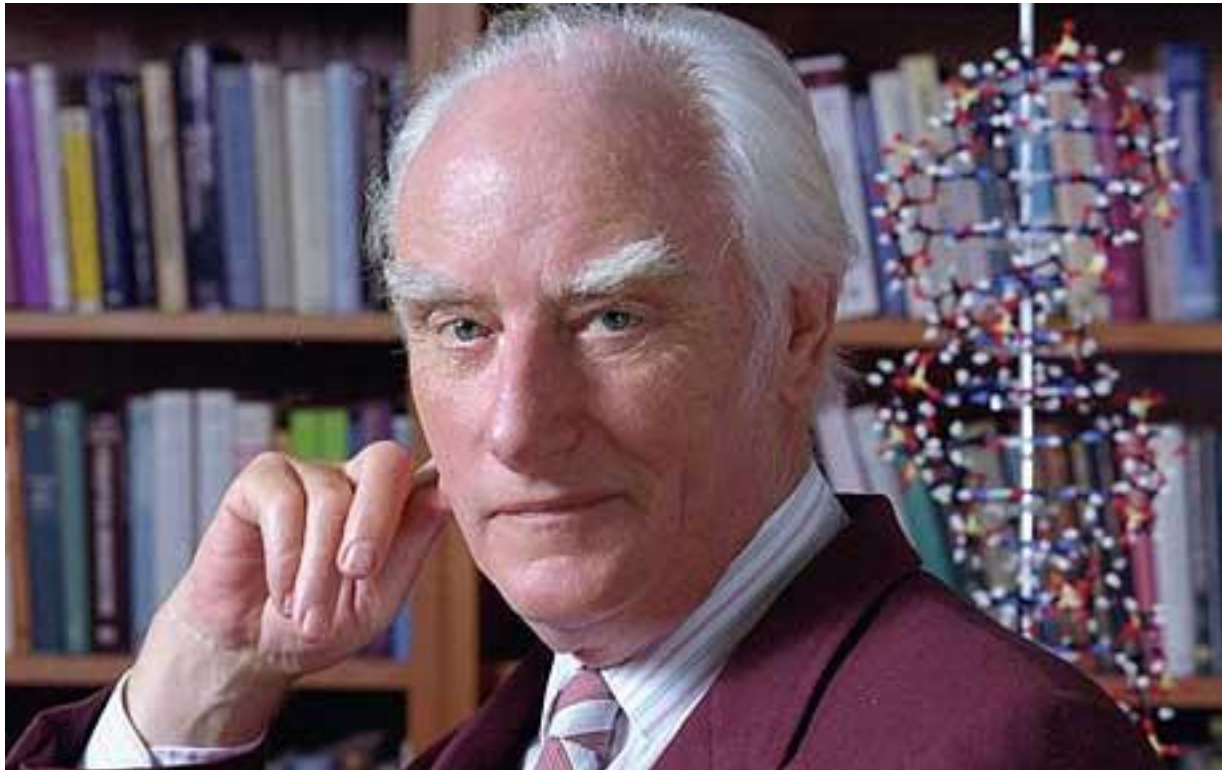
**4. srpna 2002** - Vědcům se podařilo sestavit nejucelnější genetickou mapu myši. V prosinci americký časopis Nature zveřejnil, že lidé a myši mají asi z 99 procent totožný genom.

**14. dubna 2003** - Mezinárodní tým vědců oznámil dokončení plné identifikace lidského genomu.

# Francis H. Crick byl jedním z nejvýznamnějších vědců 20. století

Hrál klíčovou roli ve výzkumu týkajícího se odhalení genetického kódu (1966)

Použil termín "centrální dogma" - jednosměrný tok genetické informace v buňce z DNA na RNA do proteinu

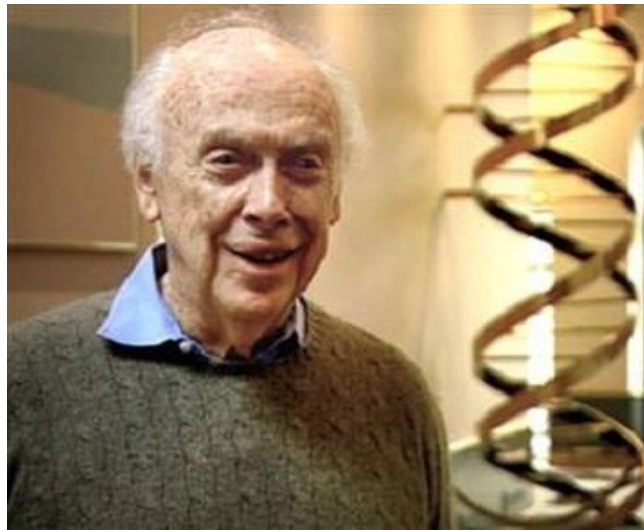


# James D. Watson

1988 – 1992 byl jedním z ředitelů Human Genome Project v National Institutes of Health, kde dohlížel na mapování genů v lidských chromozomů

Jeho genom byl sekvenován v roce 2007 jako druhé osoby, u které to bylo provedeno

V roce 2007 byla jeho pověst poskvrněná spornými výroky, které učinil ohledně inteligence Afričanů a intelektuálních rozdílů mezi geograficky oddělenými národy.



## The “Caligula of Biology” vyvolává další výzvu

Watson, J. (2013). Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers *Open Biology*, 3 (1), 120144-120144

Crickovi kolegové v laboratoři ho shledávali jako  
přímého, netaktního, arogantního a hlučného muže.

"Nikdy jsem neviděl Francise Cricka ve mírné náladě.  
Mluvil hlasitěji a rychleji, než kdokoli jiný,  
a když se zasmál, jeho umístění v laboratoři bylo jasné."

*James Watson, The Double Helix*

„Jim a já jsme si okamžitě rozuměli,  
protože mladá arogance, bezohlednost a netrpělivost s pomalým myšlením  
byly přirozené pro nás oba.

*Francise Crick*

Sdíleli úžasnou aroganci lidí, kteří se nikdy nesečkali s někým jim duševně rovným.

Ale všiml jsem si jejich kontrastních stylů.

Crick byl vysoký, upravený, světácky oblečený a hlasitý.

Watson chodil oblečený jako tulák, bylo patrné, že si nikdy nečistil boty.

Mluvil tichým monotónním nosním hlasem,  
který mizel před koncem každé věty, pak následovalo odfrknutí.

*Max Perutz*

**Francis Harry Compton Crick**  
**James Dewey Watson**  
**Maurice Hugh Frederick Wilkins**

roku [1962](#) udělena

[Nobelova cena za fyziologii a medicínu,](#)

podle komise za „jejich objevy týkající se molekulární struktury nukleových kyselin a jejich významu pro přenos informací v živých systémech“.





# Revoluce zvaná genetik

- 1865** - Opat augustiniánského kláštera v Brně Johann Gregor Mendel svými objevy založil nauku o dědičnosti
- 1869-1871** - Objev nukleových kyselin. Zjištěno, že buňka obsahuje deoxyribonukleovou kyselinu (DNA).
- 1900** - Nizozemec Hugo Maria de Vries, Němec Karl Erich Correns a Rakušan Erich von Tschermak potvrdili Mendelovy zákony o dědičnosti a vytvořili klasickou genetiku.
- 1909** - Wilhelm Ludvig Johannsen položil základy moderní terminologie (gen, genotyp, fenotyp)
- 1919** - Phoebus Levene určil složení DNA
- 1938** - Vzniká termín „molekulární biologie“.
- 1944** - Američan Oswald Avery s kolegy objevil, že DNA je nositelkou dědičné informace.
- 1951** - V Londýně poprvé získány ostré rentgenové difrakční snímky DNA.
- 1953** - Angličané Francis Crick a Maurice Wilkins a Američan James Watson objevili strukturu DNA.
- 1956** - DNA vytvořena poprvé uměle.
- 1957** - Francis Crick, George Gamov - formulace centrálního dogmatu
- 1958** - Rozluštěn genetický kód, princip mechanismu,. Francis Crick předložil sérii pravidel, které popisují vztahy mezi DNA, RNA a proteiny.
- 1961** - Matthew Meselson a Franklin Stahl dokázali replikační mechanismus DNA,
- 1966** - DNA objevena jak v chromosomech, tak v mitochondrii.
- 1969** - Poprvé oddělen jednotlivý gen.
- 1970** - První syntéza umělého genu.
- 1973** - Kalifornští vědci vyvinuli postup výroby rekombinantních molekul DNA tím, že lidský gen připojili do molekul bakteriální DNA. Belgičtí vědci poté určili pořadí molekul v genech.
- 1976** - První funkční syntéza umělého genu v bakterii.
- 1977** - Vědci se začali zabývat mapováním DNA; poprvé izolovány lidské geny.
- 1981** - Objevena první lidská mitochondriální DNA. - Vědci z Ohio University vyprodukovali první transgenní zvíře transferem genů z jiných druhů zvířat do myši.
- 1982** - V USA přišel poprvé na trh medikament vyrobený genovou technikou (inzulin); následoval lék proti rakovině interferon.
- 1983** - Poprvé syntetizován umělý chromosom.
- 1983 - Kary Banks Mullis popsal metodu polymerázové řetězové reakce**
- 1984** - Poprvé uplatněna molekulární biologie v kriminalistice. Založen genetický otisk prstu (DNA fingerprint).
- 1988** - Organizace na výzkum lidského genomu (Human Genome Organisation) oznámila úkol zmapovat kompletní skladbu DNA.
- 1990** - Na čtyřleté holčičce poprvé vyzkoušena léčba lidského organismu pomocí genových experimentů.
- 1991** - Začátek projektu zkoumání lidského genomu mezinárodním veřejným konsorciem Human Genome Project (HGP).
- 1995** - Rozluštění prvního genomu (bakterie Haemophilus influenzae).
- 1996** - Po šestiletých výzkumech rozluštěn první eukaryotní genom pivovarských kvasinek (Saccharomyces cerevisiae).
- 1998** - Poprvé rozluštěn genom mnohobuněčného organismu - parazita hlístice (Caenorhabditis elegans).
- Prosinec 1999** - Mezinárodní tým genetiků poprvé v historii lidstva popsal genetický kód lidského chromozómu 22, jednoho z 23 párů lidských chromozómů.
- Březen 2000** - Vědci z Kalifornské univerzity v Berkeley rozšířovali genetickou výbavu mušky octomilky.
- 26. června 2000** - HGP oznámilo sestavení prvního hrubého náčrtu celého lidského genomu.
- 11. února 2001** - HGP a jeho hlavní konkurent Celera Genomics oznámily rozluštění 95 procent lidského genomu.
- 4. srpna 2002** - Vědcům se podařilo sestavit nejujedenější genetickou mapu myši. V prosinci americký časopis Nature zveřejnil, že lidé a myši mají asi z 99 procent totožný genom.
- 14. dubna 2003** - Mezinárodní tým vědců oznámil dokončení plné identifikace lidského genomu.

# 1983

## Kary Banks Mullis

PCR (polymerázová řetězová reakce)

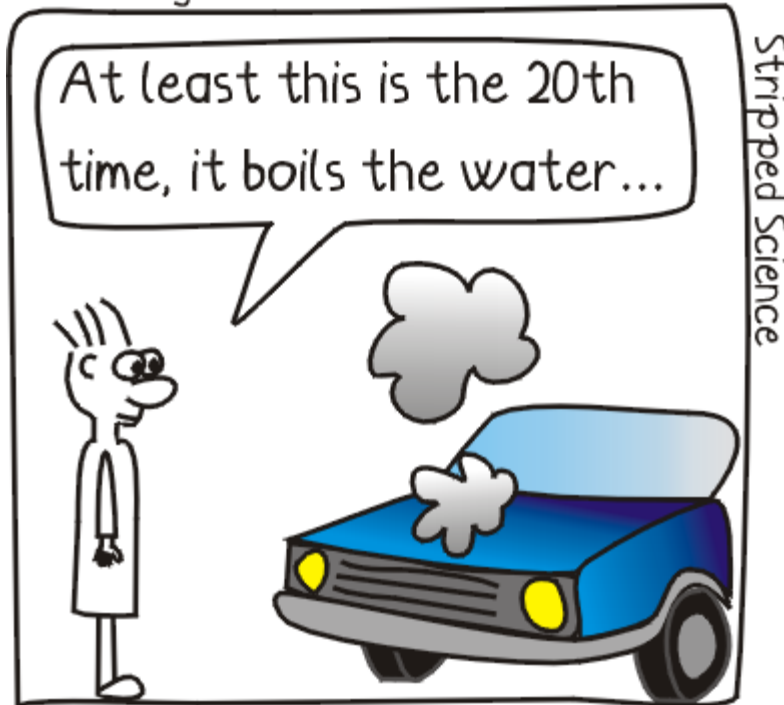


Tato metoda byla ve své době doslova převratná a nejen že měla obrovský dopad na vědeckou komunitu, ale ovlivnila i mnoho aspektů našeho každodenního života.

# Kary Banks Mullis

Událost popisuje tak, že během cesty po dálnici 128 ze San Franciska do Mendocina v jeho Hondě Civic ho náhle polymerázová řetězová reakce napadla tak jasně, jako by jí měl v hlavě nakreslenou na tabuli.

Inventing the PCR



by Viktor S. Poór





Mullis za vynález PCR obdržel Nobelovu cenu v roce 1993, deset let po své cestě ze San Francisca do Mendocina.



# Kary Banks Mullis

v Mendelově muzeu v Brně



# Kary Banks Mullis



If you want to know about genetic engineering  
you must be willing to spend years learning chemistry and biology.  
Nothing of value comes without effort.

Pokud chcete znát genetický engineering  
musíte být ochotni strávit roky učení chemie a biologie.  
Žádná hodnota nepřijde bez námahy.



# Revoluce zvaná genetik

- 1865** - Opat augustiniánského kláštera v Brně Johann Gregor Mendel svými objevy založil nauku o dědičnosti
- 1869-1871** - Objev nukleových kyselin. Zjištěno, že buňka obsahuje deoxyribonukleovou kyselinu (DNA).
- 1900** - Nizozemec Hugo Maria de Vries, Němec Karl Erich Correns a Rakušan Erich von Tschermak potvrdili Mendelovy zákony o dědičnosti a vytvořili klasickou genetiku.
- 1909** - Wilhelm Ludvig Johannsen položil základy moderní terminologie (gen, genotyp, fenotyp)
- 1919** - Phoebus Levene určil složení DNA
- 1938** - Vzniká termín „molekulární biologie“.
- 1944** - Američan Oswald Avery s kolegy objevil, že DNA je nositelkou dědičné informace.
- 1951** - V Londýně poprvé získány ostré rentgenové difrakční snímky DNA.
- 1953** - Angličané Francis Crick a Maurice Wilkins a Američan James Watson objevili strukturu DNA.
- 1956** - DNA vytvořena poprvé uměle.
- 1957** - Francis Crick, George Gamov - formulace centrálního dogmatu
- 1958** - Rozluštěn genetický kód, princip mechanismu,. Francis Crick předložil sérii pravidel, které popisují vztahy mezi DNA, RNA a proteiny.
- 1961** - Matthew Meselson a Franklin Stahl dokázali replikační mechanismus DNA,
- 1966** - DNA objevena jak v chromosomech, tak v mitochondrii.
- 1969** - Poprvé oddělen jednotlivý gen.
- 1970** - První syntéza umělého genu.
- 1973** - Kalifornští vědci vyvinuli postup výroby rekombinantních molekul DNA tím, že lidský gen připojili do molekul bakteriální DNA. Belgičtí vědci poté určili pořadí molekul v genech.
- 1976** - První funkční syntéza umělého genu v bakterii.
- 1977** - Vědci se začali zabývat mapováním DNA; poprvé izolovány lidské geny.
- 1981** - Objevena první lidská mitochondriální DNA. - Vědci z Ohio University vyprodukovali první transgenní zvíře transferem genů z jiných druhů zvířat do myši.
- 1982** - V USA přišel poprvé na trh medikament vyrobený genovou technikou (inzulin); následoval lék proti rakovině interferon.
- 1983** - Poprvé syntetizován umělý chromosom, Kary Banks Mullis popsál metodu polymerázové řetězové reakce
- 1984 - Poprvé uplatněna molekulární biologie v kriminalistice. Založen genetický otisk prstu (DNA fingerprint).**
- 1988** - Organizace na výzkum lidského genomu (Human Genome Organisation) oznámila úkol zmapovat kompletní skladbu DNA.
- 1990** - Na čtyřleté holčičce poprvé vyzkoušena léčba lidského organismu pomocí genových experimentů.
- 1991** - Začátek projektu zkoumání lidského genomu mezinárodním veřejným konsorciem Human Genome Project (HGP).
- 1995** - Rozluštění prvního genomu (bakterie Haemophilus influenzae).
- 1996** - Po šestiletých výzkumech rozluštěn první eukaryotní genom pivovarských kvasinek (Saccharomyces cerevisiae).
- 1998** - Poprvé rozluštěn genom mnohobuněčného organismu - parazita hlístice (Caenorhabditis elegans).
- Prosinec 1999** - Mezinárodní tým genetiků poprvé v historii lidstva popsal genetický kód lidského chromozómu 22, jednoho z 23 párů lidských chromozómů.
- Březen 2000** - Vědci z Kalifornské univerzity v Berkeley rozšifrovali genetickou výbavu mušky octomilky.
- 26. června 2000** - HGP oznámilo sestavení prvního hrubého náčrtu celého lidského genomu.
- 11. února 2001** - HGP a jeho hlavní konkurent Celera Genomics oznámily rozluštění 95 procent lidského genomu.
- 4. srpna 2002** - Vědcům se podařilo sestavit nejucelenější genetickou mapu myši. V prosinci americký časopis Nature zveřejnil, že lidé a myši mají asi z 99 procent totožný genom.
- 14. dubna 2003** - Mezinárodní tým vědců oznámil dokončení plné identifikace lidského genomu.

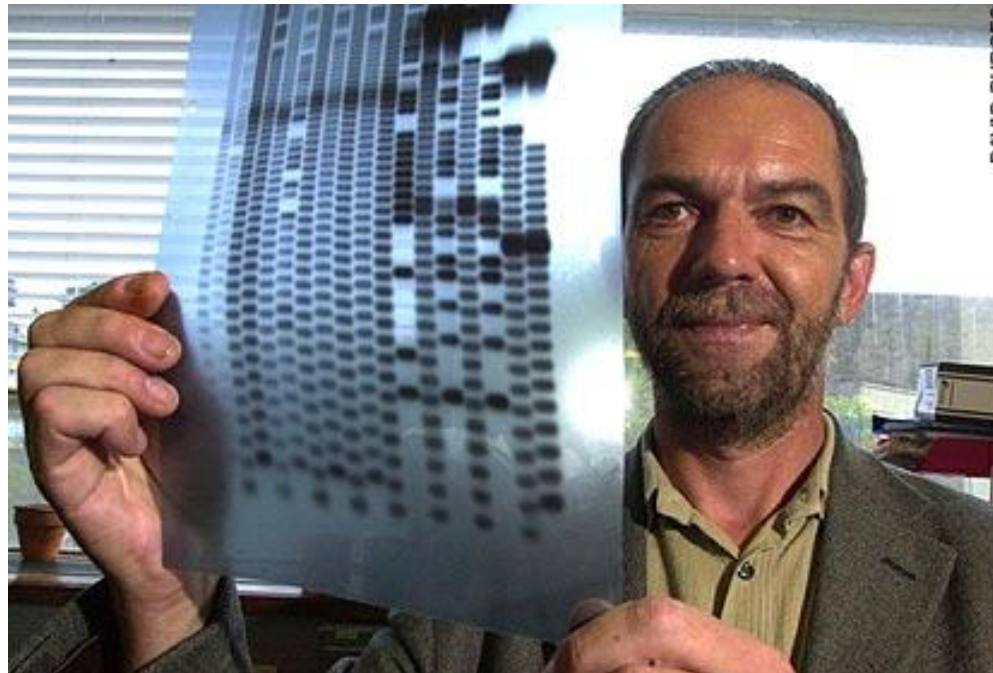
# 1984

# Alec Jeffreys

DNA fingerprinting (genetický otisk)

**1984** Zavedena technika DNA fingerprintingu k identifikování jedinců.

**1985** Technika DNA fingerprintingu začala být používána jako důkazní materiál u soudu.

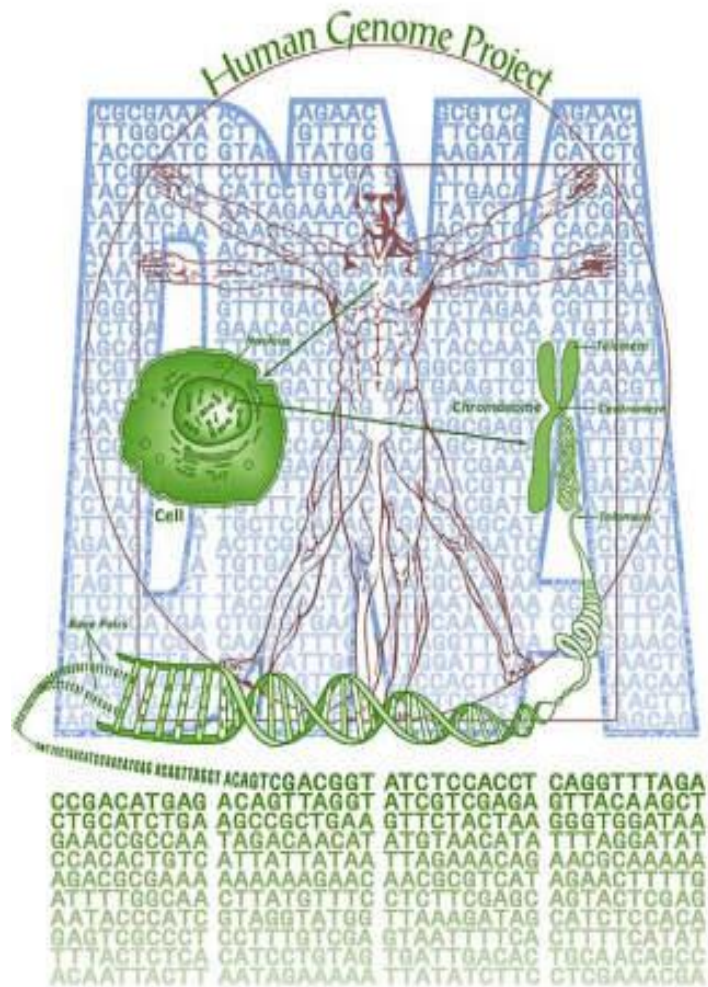


# Revoluce zvaná genetik

- 1865 - Opat augustiniánského kláštera v Brně Johann Gregor Mendel svými objevy založil nauku o dědičnosti
- 1869-1871 - Objev nukleových kyselin. Zjištěno, že buňka obsahuje deoxyribonukleovou kyselinu (DNA).
- 1900 - Nizozemec Hugo Maria de Vries, Němec Karl Erich Correns a Rakušan Erich von Tschermak potvrdili Mendelovy zákony o dědičnosti a vytvořili klasickou genetiku.
- 1909 - Wilhelm Ludvig Johannsen položil základy moderní terminologie (gen, genotyp, fenotyp)
- 1919 - Phoebus Levene určil složení DNA
- 1938 - Vzniká termín „molekulární biologie“.
- 1944 - Američan Oswald Avery s kolegy objevil, že DNA je nositelkou dědičné informace.
- 1951 - V Londýně poprvé získány ostré rentgenové difrakční snímky DNA.
- 1953 - Angličané Francis Crick a Maurice Wilkins a Američan James Watson objevili strukturu DNA.
- 1956 - DNA vytvořena poprvé uměle.
- 1957 - Francis Crick, George Gamov - formulace centrálního dogmatu
- 1958 - Rozluštěn genetický kód, princip mechanismu,. Francis Crick předložil sérii pravidel, které popisují vztahy mezi DNA, RNA a proteiny.
- 1961 - Matthew Meselson a Franklin Stahl dokázali replikační mechanismus DNA,
- 1966 - DNA objevena jak v chromosomech, tak v mitochondrii.
- 1969 - Poprvé oddělen jednotlivý gen.
- 1970 - První syntéza umělého genu.
- 1973 - Kalifornští vědci vyvinuli postup výroby rekombinantních molekul DNA tím, že lidský gen připojili do molekul bakteriální DNA. Belgičtí vědci poté určili pořadí molekul v genech.
- 1976 - První funkční syntéza umělého genu v bakterii.
- 1977 - Vědci se začali zabývat mapováním DNA; poprvé izolovány lidské geny.
- 1981 - Objevena první lidská mitochondriální DNA. - Vědci z Ohio University vyprodukovali první transgenní zvíře transferem genů z jiných druhů zvířat do myši.
- 1982 - V USA přišel poprvé na trh medikament vyrobený genovou technikou (inzulin); následoval lék proti rakovině interferon.
- 1983 - Poprvé syntetizován umělý chromosom, Kary Banks Mullis popsal metodu polymerázové řetězové reakce
- 1984 - Poprvé uplatněna molekulární biologie v kriminalistice. Založen genetický otisk prstu (DNA fingerprint).
- 1988 - Organizace na výzkum lidského genomu (Human Genome Organisation) oznámila úkol zmapovat kompletní skladbu DNA.**
- 1990 - Na čtyřleté holčičce poprvé vyzkoušena léčba lidského organismu pomocí genových experimentů.
- 1991 - Začátek projektu zkoumání lidského genomu mezinárodním veřejným konsorciem Human Genome Project (HGP).
- 1995 - Rozluštění prvního genomu (bakterie Haemophilus influenzae).
- 1996 - Po šestiletých výzkumech rozluštěn první eukaryotní genom pivovarských kvasinek (Saccharomyces cerevisiae).
- 1998 - Poprvé rozluštěn genom mnohobuněčného organismu - parazita hlístice (Caenorhabditis elegans).
- Prosinec 1999 - Mezinárodní tým genetiků poprvé v historii lidstva popsal genetický kód lidského chromozómu 22, jednoho z 23 párů lidských chromozómů.
- Březen 2000 - Vědci z Kalifornské univerzity v Berkeley rozšifrovali genetickou výbavu mušky octomilky.
26. června 2000 - HGP oznámilo sestavení prvního hrubého náčrtu celého lidského genomu.
11. února 2001 - HGP a jeho hlavní konkurent Celera Genomics oznámily rozluštění 95 procent lidského genomu.
4. srpna 2002 - Vědcům se podařilo sestavit nejucelenější genetickou mapu myši. V prosinci americký časopis Nature zveřejnil, že lidé a myši mají asi z 99 procent totožný genom.
14. dubna 2003 - Mezinárodní tým vědců oznámil dokončení plné identifikace lidského genomu.

# Human Genome Project

## Projekt lidský genom



# Human Genome Project

## Projekt lidský genom

□ 1986: Santa Fe

James Watson:

„vstoupit na cestu od dvojišroubovice k 3 miliardám schodů lidského genomu“

□ 1988: Kongres USA schválil 15 letý projekt a dotaci 3 mld USD



**\$ 3 Billions**

□ 1990: začátek projektu

□ 2005: předpokladané ukončení

- Walter Gilbert: „až budeme mít v ruce úplnou sekvenci lidského genomu, budeme vědět, co dělá člověka člověkem.“...



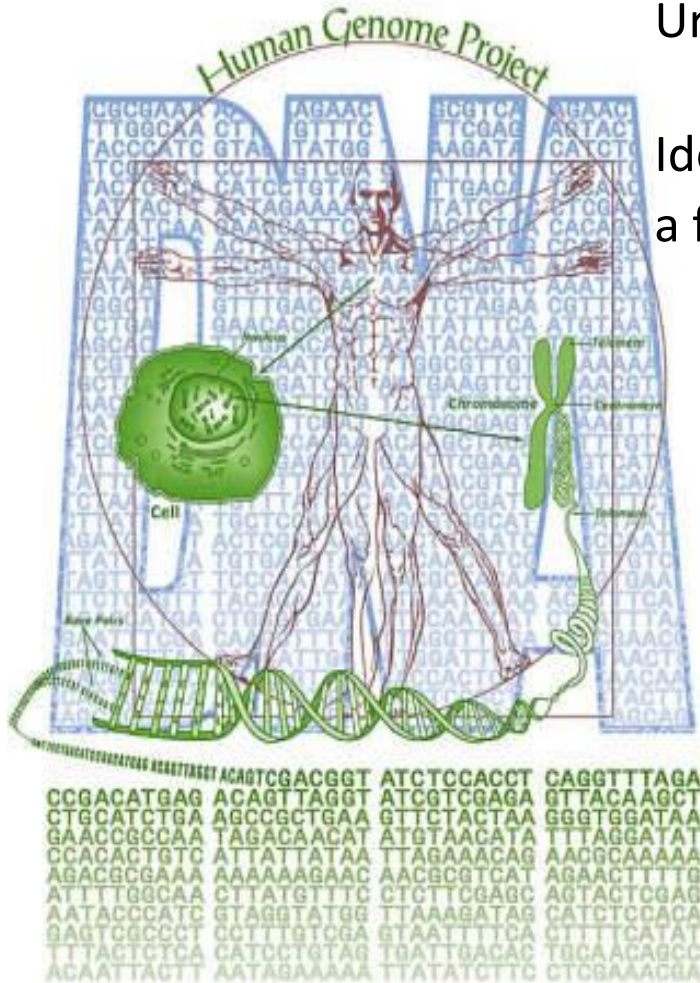


# Human Genome Project

## Projekt lidský genom

Určit úplnou sekvenci genomu (3,2 Gb)

Identifikovat a mapovat geny, určit jejich strukturu a funkci v zdraví i v patologii



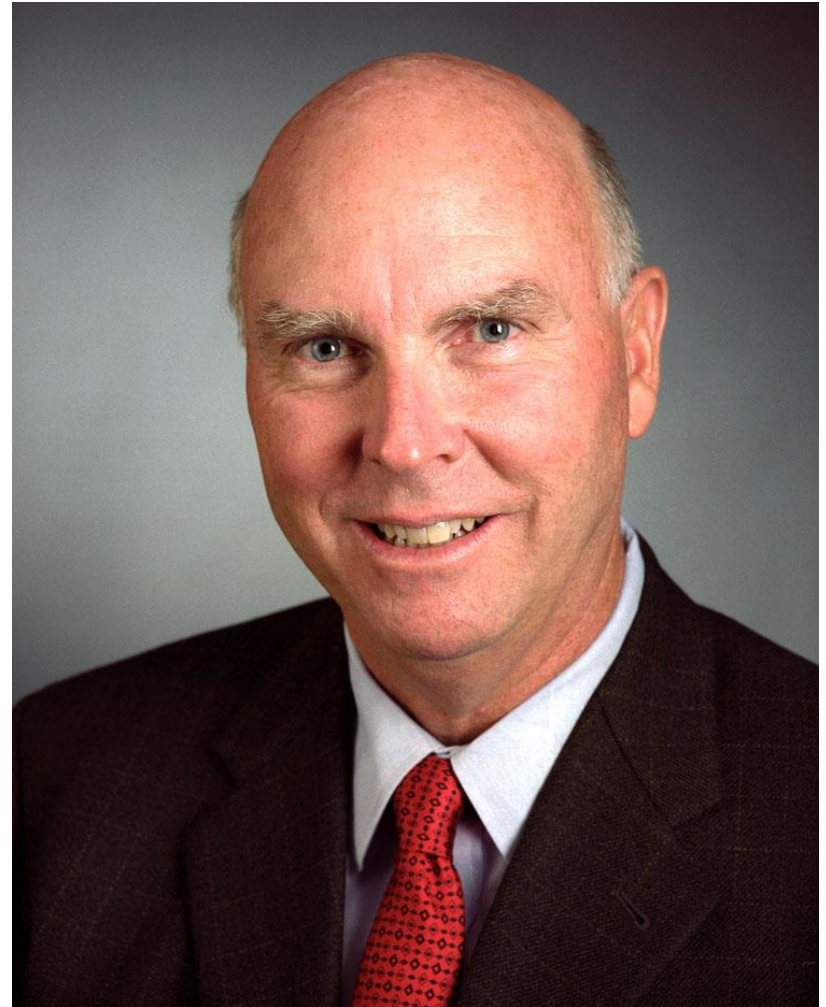
### Pomocné projekty

- vytvoření nových technologií
- ✓ zlepšení technik umožňující fyzikální a genetické mapování
- ✓ zlepšení technik sekvenování DNA
- ✓ konstrukce databází
  
- sekvenování genomu pěti modelových organismů  
E.coli, Saccharomyces cerevisiae, Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster a Mus musculus
  
- ELSI: Etické, Legální, Sociální Implikace

Veřejné Consortium  
Francis Collins



Celera Genomics  
Craig Venter





15 February 2001

# nature

£5.45 €6.25 FR54 DM18 Lin1800

www.nature.com

## the human genome

### **Nuclear fission**

Five-dimensional  
energy landscapes

### **Seafloor spreading**

The view from under  
the Arctic ice

### **Career prospects**

Sequence creates new  
opportunities

**naturejobs**  
genomics special

The Genome International Sequencing Consortium:  
Initial sequencing and analysis of the human genome.  
Nature 409,860-621,2001

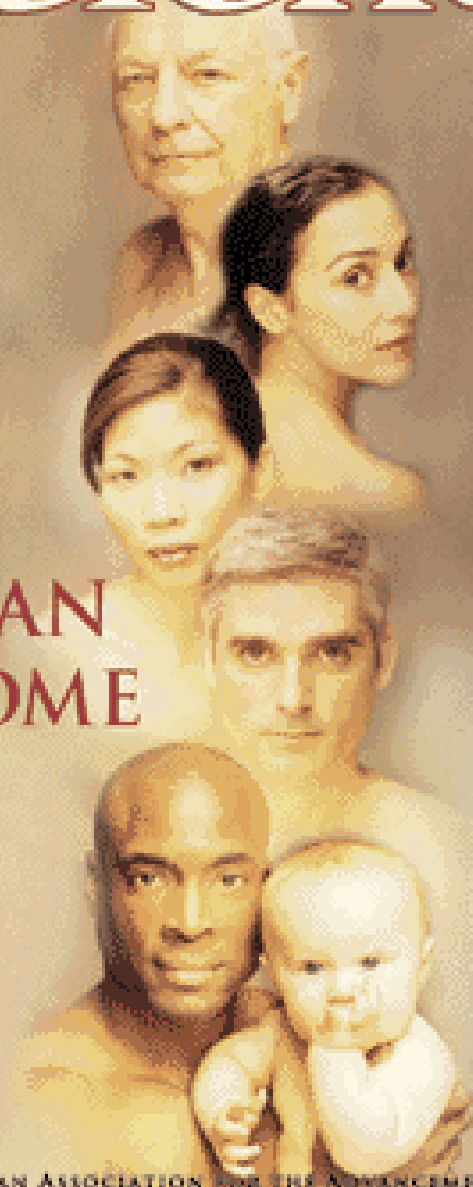
V davu jsou fotografie  
Gregora Mendela,  
James Watsona  
a Francise Cricka.

# Science

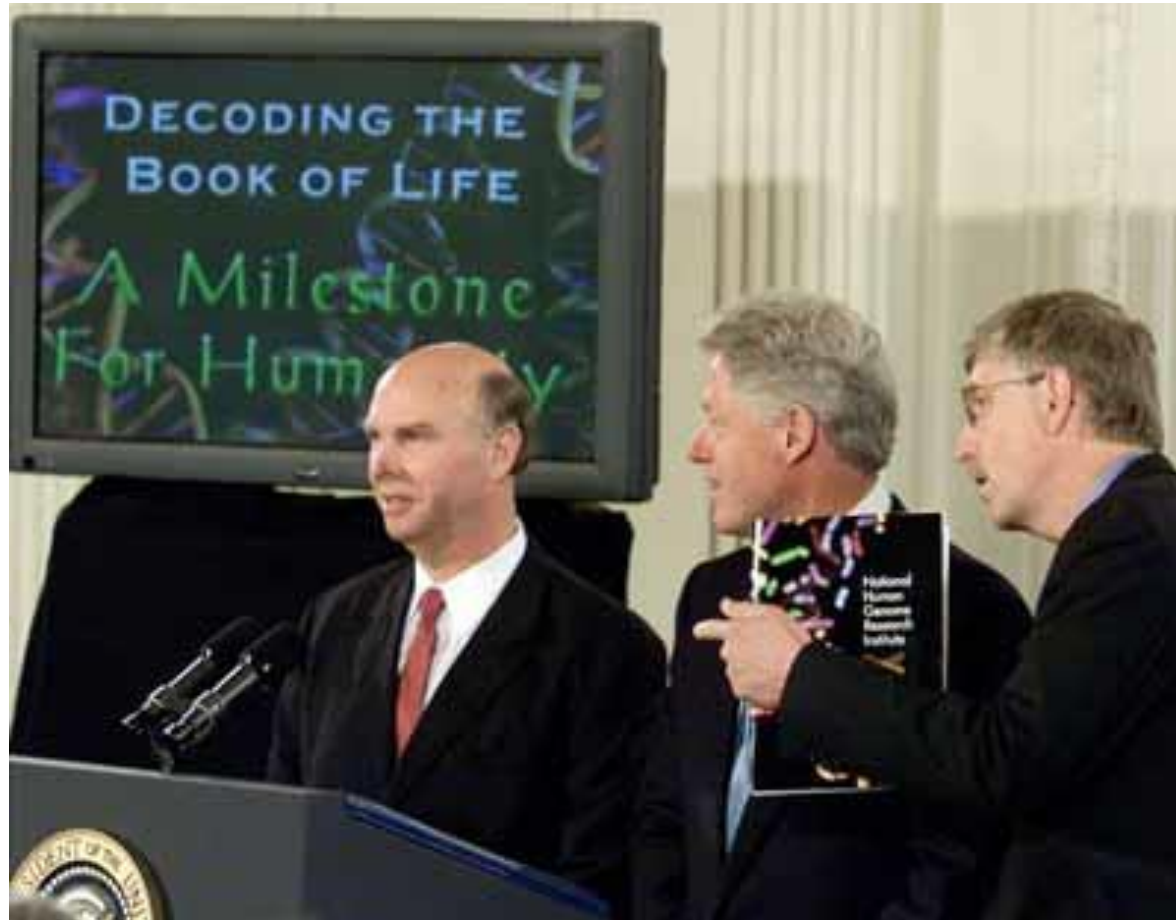
16 February 2001

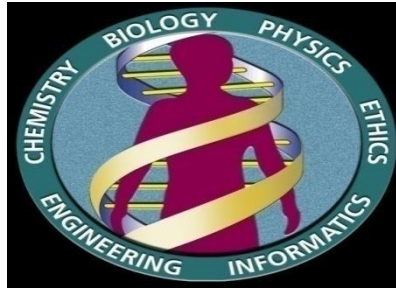
Vol. 291 No. 5507  
Pages 1145-1434 \$9

## THE HUMAN GENOME



Venter, J.C. et al.:  
The sequence of the human  
genome. *Science* 291:1304-1351, 2001





V roce 2003 vědci popsali  
DNA sekvenci 3 miliard párů bází  
tvořících lidský genom

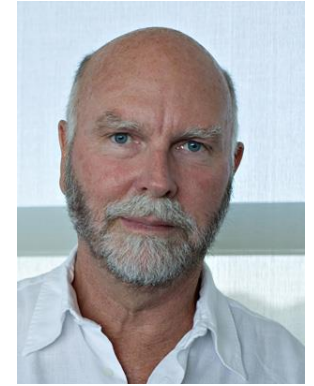


# Patentování genů



John

- „Z domova jsem si odnesl myšlenku, že se věci nedělají kvůli penězům. Zač by stál lidský život, kdybychom se v něm nepokusili objevit něco nového?“
- sekvenování genomů pro komerční zisk je "totally immoral and disgusting".



Craig Venter

- "Speed matters - discovery can't wait!"
- Věda je forma podnikání
- Informace je třeba proměnit na peníze
- snaha o patentování genů člověka za účelem zisku peněz z patentů

# Frank Collins



„Molekulární genetici jsou povinni  
využít poznatky o lidských  
genech v boji s chorobami.“

# Craig Venter



**Člověk, který dal ke zkoumání svoji DNA**

**„Myslím, že největší překvapení je, že se jeden od druhého lišíme více, než jsme čekali.“**

Zkompletování lidského genomu je důležitý krok na dlouhé cestě, avšak konečný prospěch pro zdravotnictví může být fenomenální.



*profesor Allan Bradley, ředitel Wellcome Trust Sanger Institute.*

# Lidský genom

má přibližnou velikost 3,2 Gb

z nichž je 2,95 Gb tvořeno euchromatinem.

28% sekvencí je transkribováno do RNA a z těchto 28% je pouhých 5% přepisováno do proteinů; což je 1,1%-1,4% absolutní velikosti celého genomu člověka.

toto v roce 2012 již není pravda, přepisuje se do RNA snad až 90% genomu  
v roce 2013 se předpokládá, že někdy a nějak se přepíše do RNA 100% genomu

Přes 50% genomu je tvořeno repetitivními sekvencemi: 45% genomu je tvořeno jedním ze čtyř typů parazitických DNA elementů, 3% genomu tvoří repetece jen několika bází a 5% genomu je tvořeno recentními duplikacemi velkých segmentů DNA.

Většina parazitické DNA je tvořena reverzními transkripty z RNA.

Lidský genom tak z určitého úhlu pohledu připomíná moře repetitivních sekvencí s malou příměsí genů.

# Lidský genom

- 22 287 genů kódujících proteiny

méně genů než se očekávalo: předpovídalo se 150,000 (před sekvenací), 30-40,000 (2001)

- Průměrně 9 genů na 1Mb
- Celkem 232 000 exonů (průměrně 10,4 exonu / gen)
- Identifikovaných asi 20 000 pseudogenů



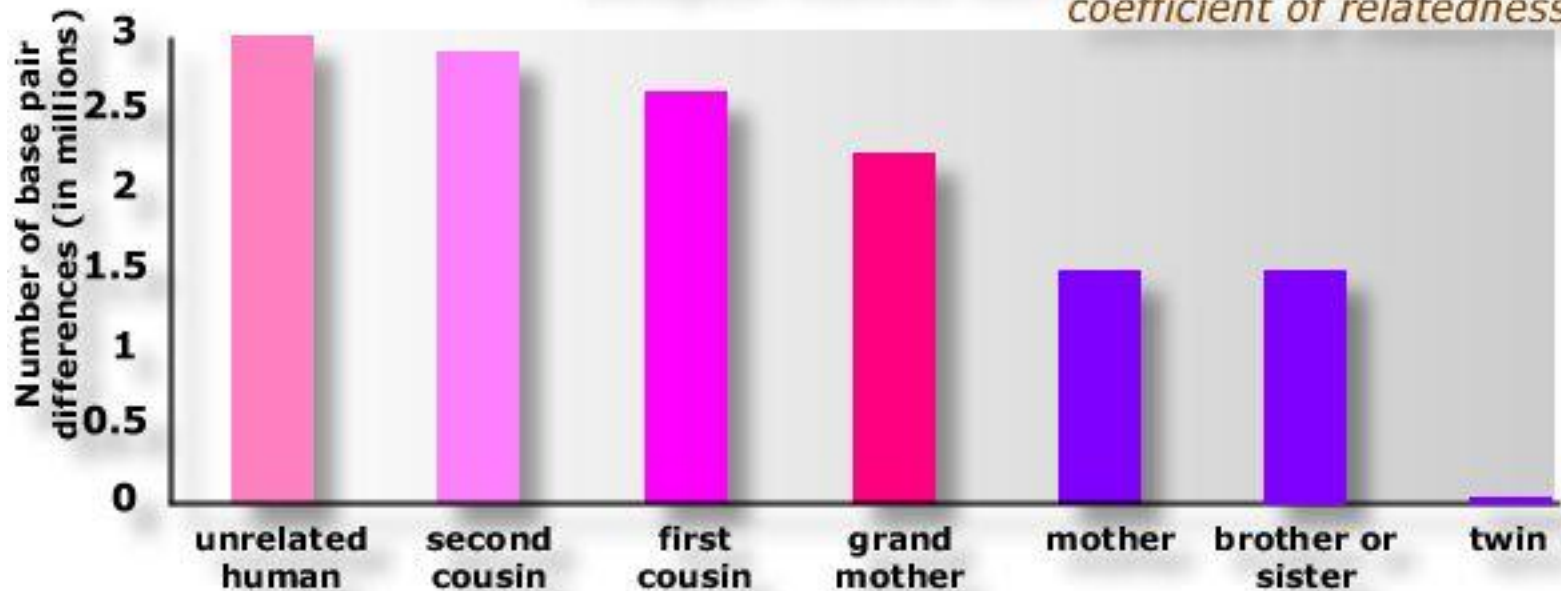
Organismus	Velikost (bp)	počet genů	Sloupec1
bakteriofág MS2	3 569		první osekvenovaný genom ssRNA viru 1976
bakteriofág MS2	5386		první osekvenovaný genom ssDNA viru 1977
bakterie Haemophilus influenzae	$1,83 \cdot 10^6$	1740	první osekvenovaný genom prokaryotického organismu 1995
bakterie Escherichia coli	$4,6 \cdot 10^6$	4 377	
kvasinka Saccharomyces cerevisiae	$12,1 \cdot 10^6$	5 770	první osekvenovaný genom eukaryotického organismu 1997
hlístice Caenorhabditis elegans	$98 \cdot 10^6$	1900	první osekvenovaný genom vícebuněčného organismu 1999
huseníček Arabidopsis thaliana	$157 \cdot 10^6$	25 498	první osekvenovaný genom rostliny 2000
rýže Oryza sativa	$430 \cdot 10^6$	60 000	2002
kukuřice Zea mays	$2,5 \cdot 10^9$	2 500	
pšenice Triticum aestivum	$15 \cdot 10^9$	40 - 60 000	
octomilka Drosophila melanogaster	$137 \cdot 10^6$	13 472	2000
laboratorní myš Mus musculus	$2,6 \cdot 10^9$	25 000	
člověk Homo sapiens sapiens	$3,2 \cdot 10^9$	22 000	první osekvenovaný genom savce 2003
lidská mitochondriální DNA	$1,6 \cdot 10^4$	37	

Odlišnosti uvnitř druhu *Homo sapiens* v rámci  
celého sekvence DNA 0.1 – 0,5%  
(většina je v nekódujících sekvencích)

- 1,5 milionu pb - rozdíl mezi matkou a dítětem
- 2,25 milionů pb - rozdíl mezi babičkou a vnučkou
- 3 miliony pb - rozdíl mezi dvěma náhodnými lidmi na Zemi

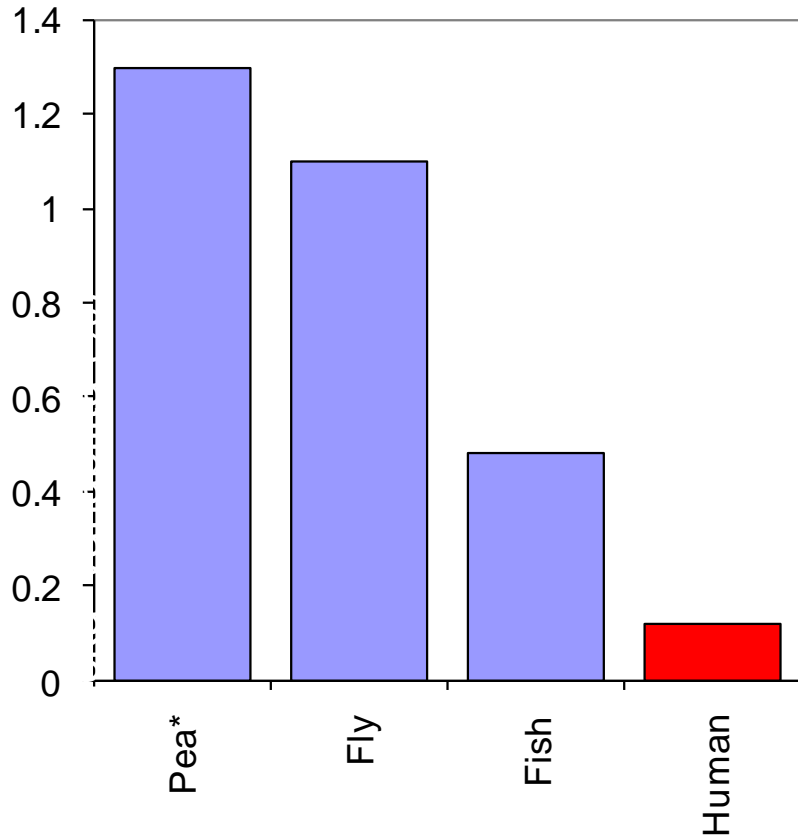
# Všichni lidé si jsou nápadně podobní

*The number of base pair differences between biological relatives decreases as a function of their coefficient of relatedness.*

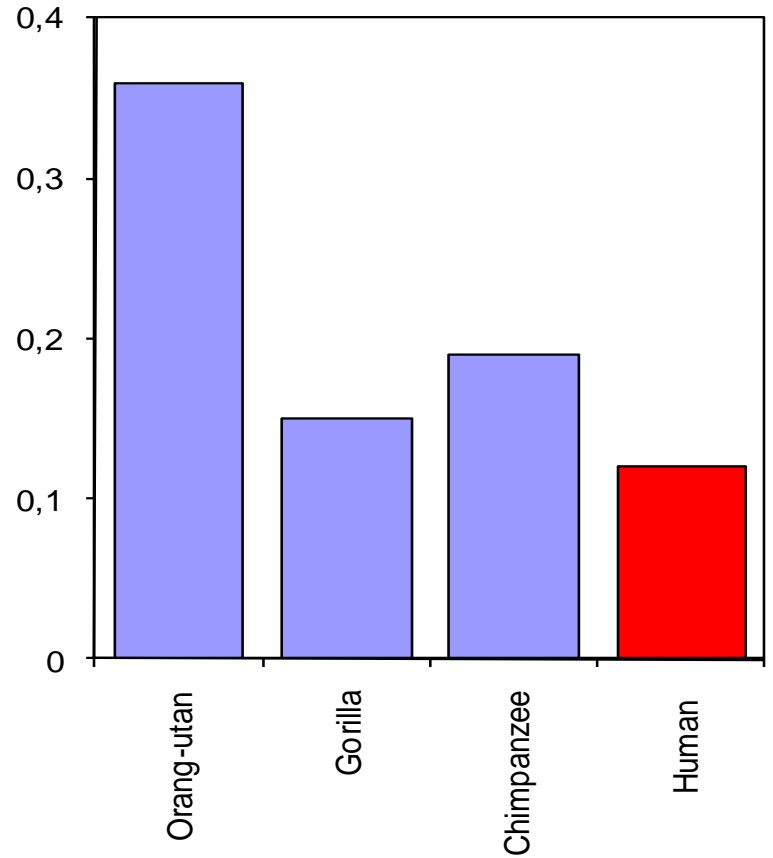


Ve srovnání s ostatními druhy vykazují lidé  
velmi malou genetickou variaci

$\pi$

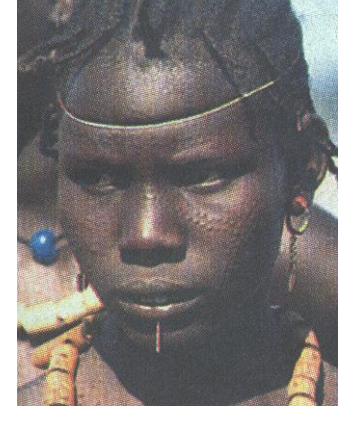
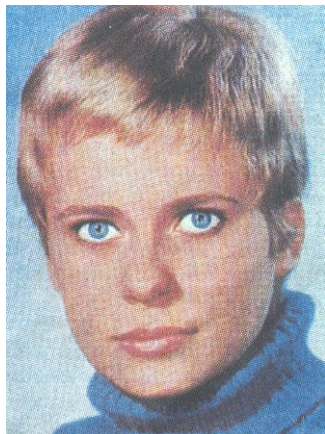
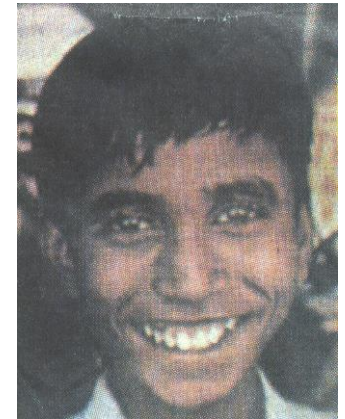
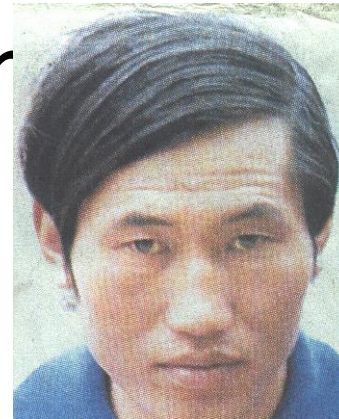
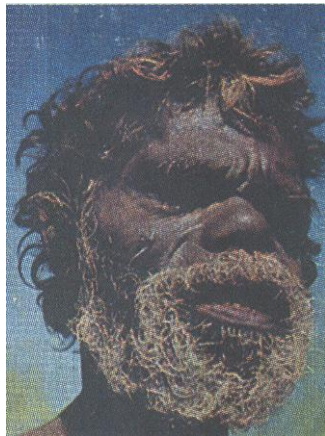
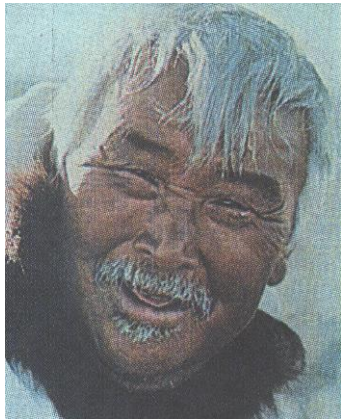


$\pi$



Moderní populační genetika učinila koncept „rasy“ biologicky beze smyslu,  
i když je stále sociálně explozivní.

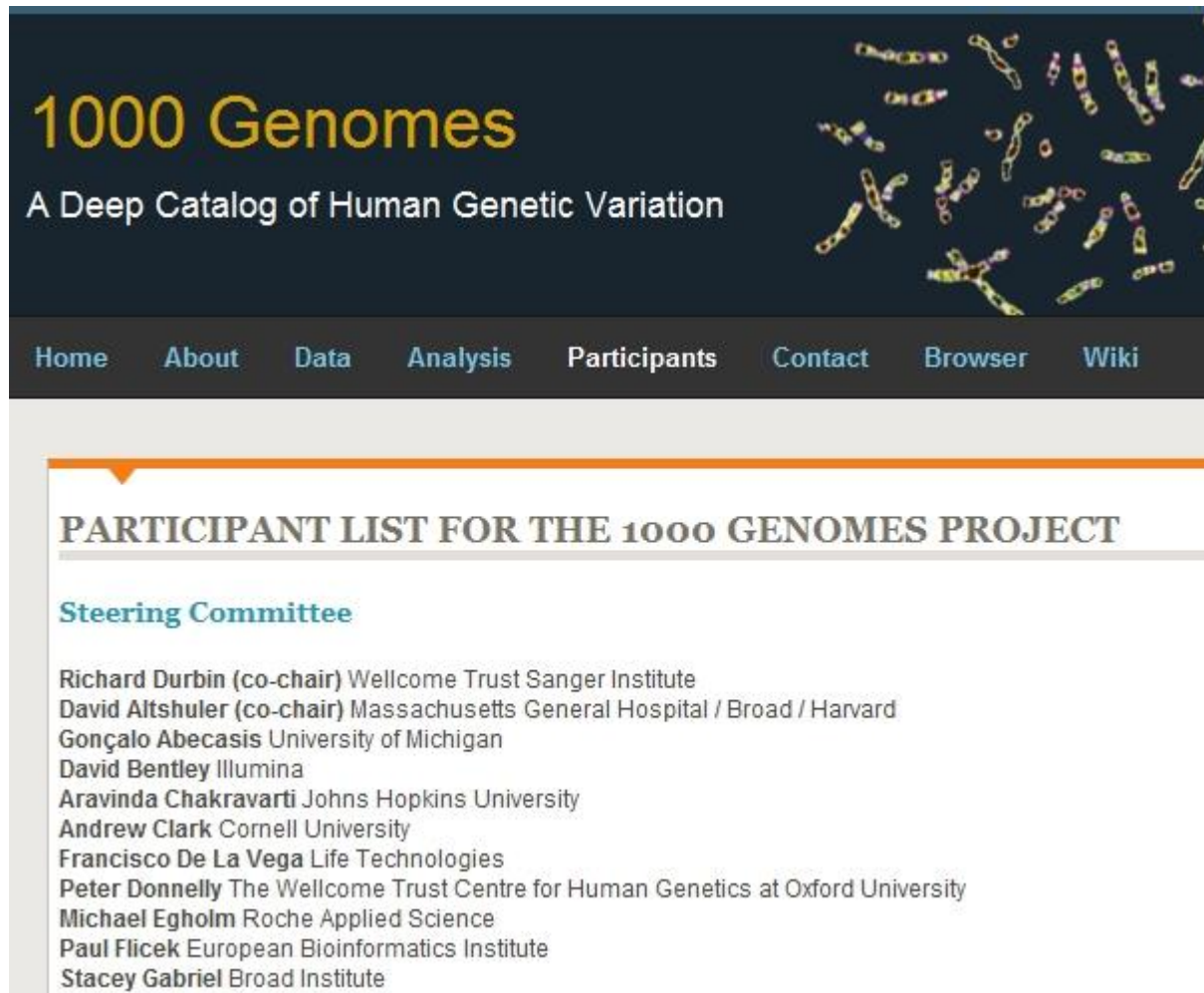
*Marek Orko Vácha*





# The 1000 Genomes Project

78 různých výzkumných institucí



The image shows a screenshot of the 1000 Genomes Project website. The top section features the title "1000 Genomes" in large yellow font, with the subtitle "A Deep Catalog of Human Genetic Variation" below it. To the right is a graphic of human chromosomes. A navigation bar contains links for Home, About, Data, Analysis, Participants, Contact, Browser, and Wiki. Below this is a section titled "PARTICIPANT LIST FOR THE 1000 GENOMES PROJECT" with a sub-section for the "Steering Committee".

**1000 Genomes**  
A Deep Catalog of Human Genetic Variation

[Home](#) [About](#) [Data](#) [Analysis](#) [Participants](#) [Contact](#) [Browser](#) [Wiki](#)

---

## PARTICIPANT LIST FOR THE 1000 GENOMES PROJECT

### Steering Committee

Richard Durbin (co-chair) Wellcome Trust Sanger Institute  
David Altshuler (co-chair) Massachusetts General Hospital / Broad / Harvard  
Gonçalo Abecasis University of Michigan  
David Bentley Illumina  
Aravinda Chakravarti Johns Hopkins University  
Andrew Clark Cornell University  
Francisco De La Vega Life Technologies  
Peter Donnelly The Wellcome Trust Centre for Human Genetics at Oxford University  
Michael Egholm Roche Applied Science  
Paul Flicek European Bioinformatics Institute  
Stacey Gabriel Broad Institute

# The 1000 Genomes Project

Vědci z konsorcia nejprve přečetli kompletní genomy cca 1000 lidí.

Vybrali si k tomu reprezentanty čtyř různých etnik - obyvatele západní Afriky, Evropany, Číňany z jižní Asie a Japonce jako reprezentanty obyvatel východní Asie.

Aby si udělali detailní představu o tom, kolik změn vzniká v dědičné informaci nově v každé další generaci, přečetli velmi důkladně genomy dvou rodičovských párů a jejich dětí.

Počet odhalených variant lidské DNA se díky tomuto počínu zvýšil dvacetinásobně. U genů dnes známe asi 15 milionů variant.

Polovina z nich se podařilo odhalit díky konsorciu The 1000 Genomes Project.

Z tohoto výzkumu také vyplynulo, že každý z nás má zásadními změnami v DNA vyřazeno z činnosti v průměru 200 až 300 genů.

# The 1000 Genomes Project

Plná polovina variant lidské dědičné informace se vyskytuje s četností nižší než 5 %.

Některé vzácnější varianty DNA jsou typické jen pro určitá etnika.

V konsorciem zkoumaných populacích Afričanů, Evropanů, Číňanů a Japonců měli příslušníci jediného etnika „monopol“ na třetinu všech variant vyskytujících se s frekvencí nejvýše 0,5 %.

Význam jednotlivých variant DNA se může lišit mezi různými etniky.

Varianta lidské DNA, která u svých nositelů zvyšuje riziko vzniku glaukomu čili zeleného očního zákalu u Islandců a Číňanů.

V čínské populaci je však tento případ genetické dispozice podstatně vzácnější. Pravděpodobnost onemocnění je u čínských nositelů této vlohy mnohem vyšší než u Islandců.

# ELSI HGP

- je identifikováno čím dál tím víc lidských genů
- pokud budou objeveny geny, které indikují náchylnost ke kriminalitě, inteligenci nebo homosexualitě, jak by na to měla společnost reagovat?
- genetika versus kriminalita: když u zločinců manipulujeme prostředí vězení, nemohli bychom též manipulovat jejich genomem?

# ELSI HGP

- Kdo bude mít přístup k osobním informacím o složení genomu jedince a jak budou tyto informace využívány?
- Kdo je majitelem informace o genomu jedince?
- Jak ovlivní informace o složení genomu jedince sebechápání daného člověka a jak tato informace ovlivní přijetí tohoto jedince společností?
- Jak informace o genomech jedinců ovlivní přijetí minoritních skupin společností?
- Jak připravíme lékaře na nástup „nové genetiky“ a jak připravíme na nástup nové genetiky veřejnost?
- Jak připravíme veřejnost, aby byla schopna uvážlivě a kvalifikovaně provést informovanou volbu?



# ELSI HGP

- Jak společnost vyváží nutná vědecká omezení a sociální risk s dlouhodobým prospěchem?
- Mělo by se provádět genetické testování, pokud neexistuje terapie?
- Měli by mít rodiče právo nechat testovat děti na nemoc, která propukne až v dospělosti?
- Jsou genetické testy spolehlivé a interpretovatelné lékařskou komunitou?
- Způsobují geny, že se lidé chovají určitým způsobem?
- Mohou lidé vždy kontrolovat své chování?
- Kde se nachází linie mezi léčbou a vylepšením?
- Kdo vlastní geny a další sekvence lidské DNA?
- Bude patentování sekvencí DNA omezující pro jejich nedostupnost a zbrzdí se tím vývoj užitečných produktů?

# ELSI HGP

- 1. Vzrůstající informovanost a genetické konstituci jedince a celých populací vede k otázce, kdo by měl kontrolovat získávání těchto informací a kde by tyto informace měly být přístupné. Do této otázky spadají otázky týkající se presymptomatického testování, screening přenašečů, genetický screening prováděný zaměstnavatelem za účelem zjištění vhodnosti uchazeče k dané práci atd.
- 2. V nedaleké budoucnosti budu zcela jistě možné manipulovat genom embryí za účelem změny genotypu i fenotypu
- 3. Vzrůstající informovanost obhledně genetického základu behaviorálních projevů zřejmě změní naše sebeepochopení a ovlivní sociální instituce.
- Murray, T.H., (1991) Ethical issues in human genome research *FASEB Journal* 5,55-60

# Úmluva na ochranu lidských práv a důstojnosti lidské bytosti v souvislosti s aplikací biologie a medicíny . Úmluva o lidských právech a biomedicině.

Členské státy Rady Evropy, další státy a Evropské společenství, signatáři této Úmluvy,

## KAPITOLA IV

### Lidský genom

#### Článek 11

##### Zákaz diskriminace

Jakákoliv forma diskriminace osoby z důvodu jejího genetického dědictví je zakázána.

#### Článek 12

##### Prediktivní genetická vyšetření

Vyšetření, která předpovídají geneticky podmíněné nemoci nebo která slouží k určení nositele genu způsobujícího nemoc nebo k odhalení genetické predispozice nebo náchylnosti k nemoci, lze provést pouze pro zdravotní účely nebo pro vědecký výzkum spojený se zdravotními účely a v návaznosti na odpovídající genetické poradenství.

#### Článek 13

##### Zásahy do lidského genomu

Zásah směřující ke změně lidského genomu lze provádět pouze pro preventivní, diagnostické nebo léčebné účely, a to pouze tehdy, pokud není jeho cílem jakákoliv změna genomu některého z potomků.

#### Článek 14

##### Zákaz volby pohlaví

Použití postupů lékařsky asistované reprodukce nebude dovoleno za účelem volby budoucího pohlaví dítěte, ledaže tak lze předejít vážné dědičné nemoci vázané na pohlaví.

## **Zákon 373/2011Sb. o specifických zdravotních službách a 372/2011 Sb. o zdravotních službách**

Genetickým laboratorním vyšetřením se rozumí laboratorní analýza lidského zárodečného genomu nebo jeho částí.

Osoba, které je nabízeno genetické laboratorní vyšetření, má právo

- na svobodné a informované rozhodnutí týkající se vyšetření, dalšího nakládání s genetickým materiálem a informacemi získanými během vyšetření.
- na podání informace o jeho účelu, povaze a dopadu na zdraví, včetně zdraví budoucích generací, a o rizicích neočekávaných nálezů pro pacienta a geneticky příbuzné osoby

Výsledky genetických vyšetření nesmějí být bez písemného souhlasu pacienta poskytnuty třetím osobám. Prodej nebo darování výsledků genetických vyšetření třetím osobám bez písemného souhlasu pacienta, včetně písemného souhlasu dotčené geneticky příbuzné osoby, je zakázán.

Výsledky genetického vyšetření nesmějí být použity k jakékoli diskriminaci pacienta a geneticky příbuzných osob.

*Společnost lékařské genetiky ČLS JEP vydala v souvislosti s přijetím zákonů 373/2011Sb. o specifických zdravotních službách a 372/2011 Sb. o zdravotních službách doporučení týkající se informovaného souhlasu pro genetická laboratorní vyšetření.*

# Jak ovlivňuje genetika klinickou medicínu?



Mnoho lékařů si z dob svých studií pamatuje,  
že lékařská genetika se zabývá relativně vzácnými monogenními onemocněními  
či chromozomálními poruchami.

S výjimkou pediatrů a gynekologů-porodníků se většina lékařů v primární péči s  
těmito chorobami setkávalo velmi vzácně,  
**a lékařskou genetiku proto považovali za okrajový obor medicíny.**

Současný rychlý vývoj molekulárně genetických metod,  
překotné odkrývání lidského genomu  
a systematický popis polymorfismů jednotlivých nukleotidů (SNPs)  
**lékařskou genetiku posouvají z periferie akademické medicíny do centra každodenní praxe.**



# Molekulární genetik



Využívá poznatky o lidských genech v boji s chorobami

Jedním z hlavních úkolů molekulární genetiky je vyřešit dosud nezdolaná úskalí medicíny.

Pochopení molekulárně genetické podstaty chorob umožňuje jejich přesnou diagnostiku a v mnoha případech i cílenou léčbu

# Molekulárně genetické testy

stanoví nebo upřesní diagnózu

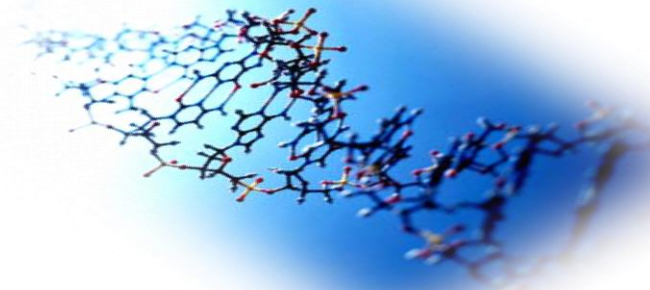
umožňují prediktivní diagnózu, tzn. identifikaci dědičných onemocnění před jejich manifestací

umožňují identifikaci přenašečů genetických onemocnění

umožňují prenatální a preimplantační diagnostiku

odhalují závažné genetické onemocnění před narozením dítěte  
umožňují výběr nejvhodnější léčby farmaky

či preventivní kroky s minimalizovanými vedlejšími účinky.

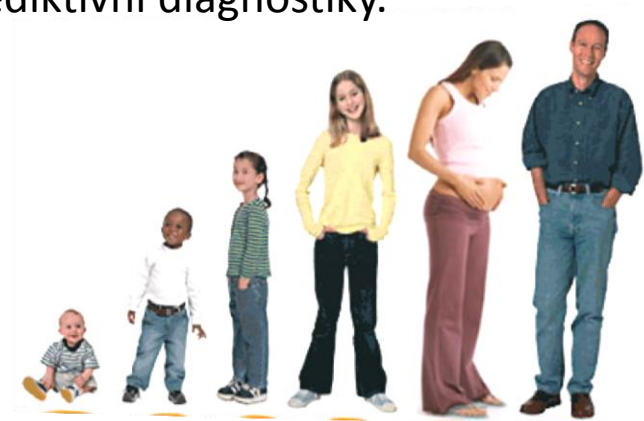


Velký význam má genetika zejména  
v odhalování dědičného základu mnoha běžných onemocnění,  
což má zásadní klinické důsledky.

Genetické příčiny jsou dnes odhalovány u stále většího počtu běžných onemocnění,  
V okamžiku, kdy jsou genetické faktory podílející se na vzniku onemocnění poznány,  
je již jen krok k **prediktivní diagnostice**.

Před zavedením diagnostických testů do běžné klinické praxe však musí být potvrzena  
jejich klinická validita a ověřen jejich užitek.

Předčasné zavádění těchto testů by mohlo mít nepříznivý dopad  
a na dlouhou dobu by poškodilo pověst prediktivní diagnostiky.



# Genetické testování zvyšuje pravděpodobnost farmakoterapeutického úspěchu

Pomocí genetických testů je možné **dopředu určit, kteří jedinci budou mít největší prospěch z užívání konkrétního léku a u kterých pacientů bude naopak podávání léku spojeno se špatnou odpovědí a častými a závažnými nežádoucími účinky.**

Stále totiž přibývá důkazů o tom, že nežádoucí účinky léků jsou často důsledkem genetických variant enzymů, které se podílejí na metabolismu těchto léků.

Je proto velmi pravděpodobné, že v příštích letech bude lékař v některých případech **před vyplněním receptu požadovat genetické vyšetření, aby zjistil, který lék je pro pacienta nejvhodnější.**



# Přínosem genetiky je poznání molekulární patogeneze onemocnění

Stále ještě existuje mnoho onemocnění, o jejichž vzniku dnes víme velmi málo a jsou léčena převážně empiricky a s nevelkým účinkem.

Identifikace genů zodpovědných za náchylnost k onemocnění **umožňuje rozvoj cílené terapie.**



# Molekulárně genetické metody

V poslední době došlo díky významným objevům v oblasti molekulární biologie k prudkému rozvoji celé řady nových moderních technik, které podstatně zvýšily citlivost a přesnost molekulárně genetických testů.





# Izolace a purifikace nukleových kyselin

Proces izolace (extrakce) nukleových kyselin je získávání DNA či RNA z daného vzorku za použití kombinace chemického a fyzikálního přístupu.

**Izolací nukleových kyselin** se rozumí především:

- izolace genomové DNA,
- izolace totální (celkové) RNA či mRNA,
- izolace plasmidové DNA z bakterií.

**Purifikace (přečištění) nukleových kyselin** je odstranění veškerých nežádoucích kontaminant z daného vzorku nukleové kyseliny. Jedná se o:

- součást procesu izolace nukleové kyseliny z testovaného organismu
- přečištění stávajícího vzorku nukleové kyseliny (vzorek DNA není dostatečně čistý a je třeba jej přečistit od daných příměsí)
- přečišťování reakčních produktů (např. produktu PCR reakce)
- přečišťování DNA po separaci v elektroforetickém gelu.

# Izolace nukleových kyselin

Při izolaci nukleových kyselin obvykle postupujeme v tomto sledu:

- Rozrušení tkáně/buněk daného vzorku pomocí lyzačních roztoků
- Separace nukleových kyselin od proteinů a dalších příměsí
- Extrakce nukleových kyselin
  - **kroky využívající různou rozpustnost**
  - **adsorpce na pevný podklad**
- Kontrola celistvosti a velikosti získané nukleové kyseliny elektroforetickou separací
- Zjištění koncentrace nukleové kyseliny v získaném roztoku a čistota roztoku

# Izolace nukleových kyselin

## ➤ kroky využívající různou rozpustnost

### IZOLACE POMOCÍ FENOL-CHLOROFORMU

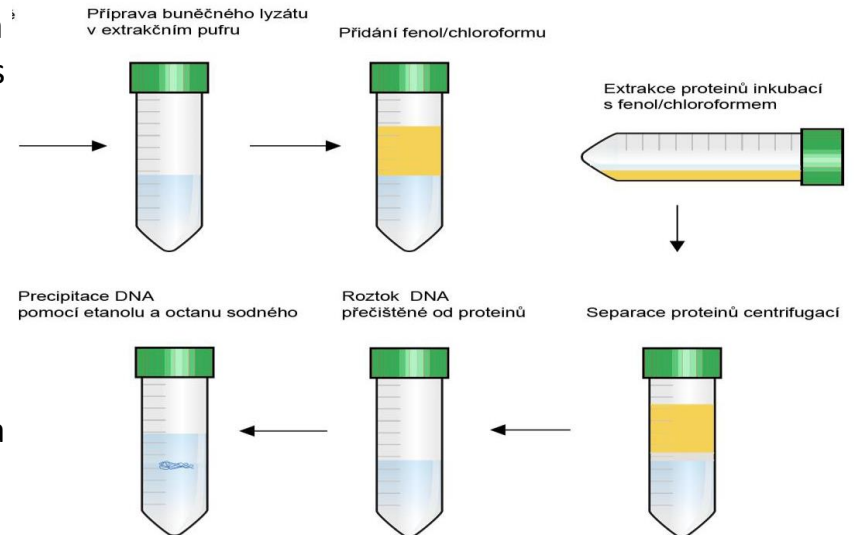
je klasickým způsobem izolace DNA. Tato izolace je poměrně pracná a zdlouhavá, ale poskytuje velké množství velmi čisté DNA.

K lyzátu, který se ponejprv získá rozrušením tkání a buněk, a také působením proteázy, se postupně přidává fenol či směs fenolu a chloroformu, které z lyzátu vyváží proteiny.

Přidáním těchto látek k vodnému roztoku dojde k separaci roztoku do dvou fází. Horní fáze je vodný roztok obsahující DNA, spodní je pak organická fáze fenolu či chloroformu.

Mezi vodnou a organickou fází se hromadí proteiny.

Princip této metody tkví v tom, že DNA se díky své polaritě ochotně rozpouští v polárním vodném roztoku. Naproti tomu je fenol v porovnání s vodou mnohem méně polární, a proto se v něm DNA rozpouští mnohem hůře. Co se týče ale proteinů, jejich polarita je dána jednotlivými aminokyselinami, a tudíž část řetězce je více polární a část méně polární. Část řetězce daného proteinu by se ráda rozpustila ve vodě a část ve fenolu. Z toho důvodu se proteiny hromadí na rozhraní mezi vodným roztokem a organickou fází. Opakovaným přidáváním fenol/chloroformu k roztoku DNA a odebíráním vrchní fáze, dochází k postupnému pročišťování roztoku od proteinů.



# Izolace nukleových kyselin

## ➤ adsorpce na pevný podklad

- Oligo-dT pro vazbu polyadenylovaných konců mRNA
- Centrifugační kolonky
- Magnetické nosiče

# Izolace nukleových kyselin

## ➤ adsorpce na pevný podklad

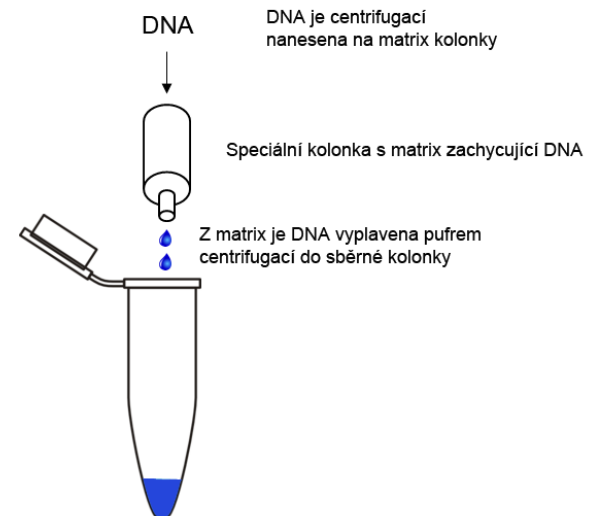
### IZOLACE DNA POMOCÍ GRAVITAČNÍCH KOLONEK

Využívaná je technologie vazby na silika membránu

Izolace pomocí komerčně dostupných gravitačních kolonek je v současné době nejčastějším způsobem izolace genomové DNA.

Jedná se o rychlou a účinnou metodu poskytující DNA o dostatečné čistotě pro většinu aplikací.

- Lyzát, který se ponejprv získá rozrušením tkání a buněk, a také působením proteázy, se nanese do speciální kolonky.
- V kolonce je přítomna matrix, na kterou se dodaná DNA naváže.
- Centrifugací kolonky se roztok (bez DNA) odplaví pryč do sběrné zkumavky.
- Matrix s navázanou DNA se promyje promývacím roztokem.  
Promývací roztok je odplaven z kolonky následnou centrifugací.
- Po promytí se DNA z matrix vyváže centrifugací s vodou či elučním puforem.
- DNA je takto odplavena z matrix do připravené zkumavky.
- 



# Izolace nukleových kyselin

➤ adsorpce na pevný podklad

## IZOLACE DNA POMOCÍ GRAVITAČNÍCH KOLONEK

### / LYZE VZORKU

vzorek je lyzován v přítomnosti chaotropních iontů a proteinázy K



### / NAVÁZÁNÍ NUKLEOVÉ KYSELINY

uvolněná DNA/RNA je navázána na silica membránu v kolonce



### / PROMYTÍ SILICA MEMBRÁNY

navázaná DNA/RNA je očištěna od buněčných zbytků



### / ELUCE NUKLEOVÉ KYSELINY

čistá DNA/RNA je uvolněna ze silica membrány do elučního pufru a připravena pro další aplikace





# Izolace nukleových kyselin

➤ adsorpce na pevný podklad

## IZOLACE DNA POMOCÍ MAGNETICKÝCH PARTIKULÍ

### / LYZE VZORKU

Vzorek je lyzován v přítomnosti lyzačního pufru a proteinázy K



### / NAVÁZÁNÍ NUKLEOVÉ KYSELINY

Uvolněná DNA/RNA je navázána na magnetické partikule



### / PROMÝVÁNÍ MAGNETICKÝCH PARTIKULÍ

Magnetický separátor umožňuje imobilizovat a uvolňovat magnetické partikule při výměně roztoků v průběhu lyze, purifikace a eluce nukleových kyselin. Během promývání je navázaná DNA/RNA očištěna od buněčných zbytků.



### / ELUCE

Nukleová kyselina je uvolněna z magnetických partikulí do elučního pufru. Tato vysoce čistá nukleová kyselina je pak vhodná pro následné molekulární biologické aplikace.



# Izolace nukleových kyselin

➤ adsorpce na pevný podklad

## IZOLACE DNA POMOCÍ MAGNETICKÝCH PARTIKULÍ

Magnetické nosiče (MPs) umožňují separaci látek z reakční směsi bez použití filtrace nebo centrifugace, což velice usnadňuje a urychluje samotnou separaci látek.

MPs jsou částice o velikosti 5 nm–100 μm (20–450 nm nukleové kyseliny) tvořené z kovového jádra, tím bývá nejčastěji gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (maghemit) nebo Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetit), ale i například Au. Jádro obaluje vrstva, která má připravený specifický povrch.

Magnetické nosiče, kompatibilní s cílovou sloučeninou, se smíchají se vzorkem.

V průběhu inkubace dochází k navázání DNA na magnetické nosiče.

Poté se magnetický nosič s navázanou DNA vloží do magnetického separátoru a díky superparamagnetickým vlastnostem jádra dochází k oddělení nosiče s navázanou cílovou sloučeninou od reakční směsi.

Po vymytí kontaminantů, může být DNA eluována.

# Izolace nukleových kyselin

➤ adsorpce na pevný podklad

## IZOLACE DNA POMOCÍ MAGNETICKÝCH PARTIKULÍ

### / LYZE VZORKU

Vzorek je lyzován v přítomnosti lyzačního pufru a proteinázy K



### / NAVÁZÁNÍ NUKLEOVÉ KYSELINY

Uvolněná DNA/RNA je navázána na magnetické partikule



### / PROMÝVÁNÍ MAGNETICKÝCH PARTIKULÍ

Magnetický separátor umožňuje imobilizovat a uvolňovat magnetické partikule při výměně roztoků v průběhu lyze, purifikace a eluce nukleových kyselin. Během promývání je navázaná DNA/RNA očištěna od buněčných zbytků.



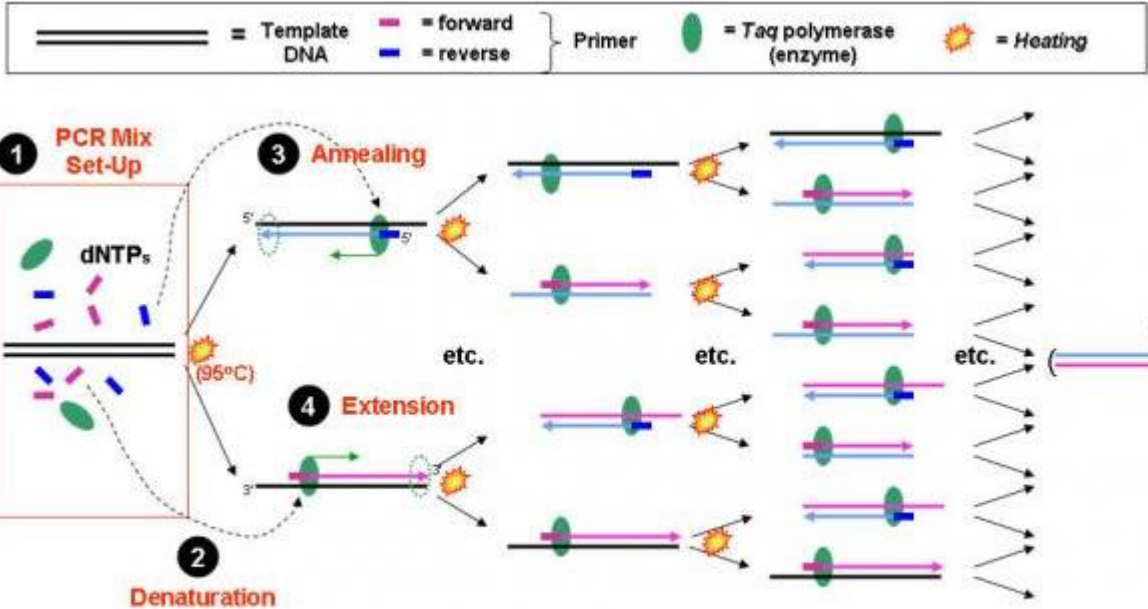
### / ELUCE

Nukleová kyselina je uvolněna z magnetických partikulí do elučního pufru. Tato vysoce čistá nukleová kyselina je pak vhodná pro následné molekulární biologické aplikace.



# PCR (polymerázová řetězová reakce)

1983 Kary Banks Mullis



Start	1	2	3	n	Cycle No.
1	2	4 (= 2 <sup>2</sup> )	8 (= 2 <sup>3</sup> )	2 <sup>n</sup>	DNA No.





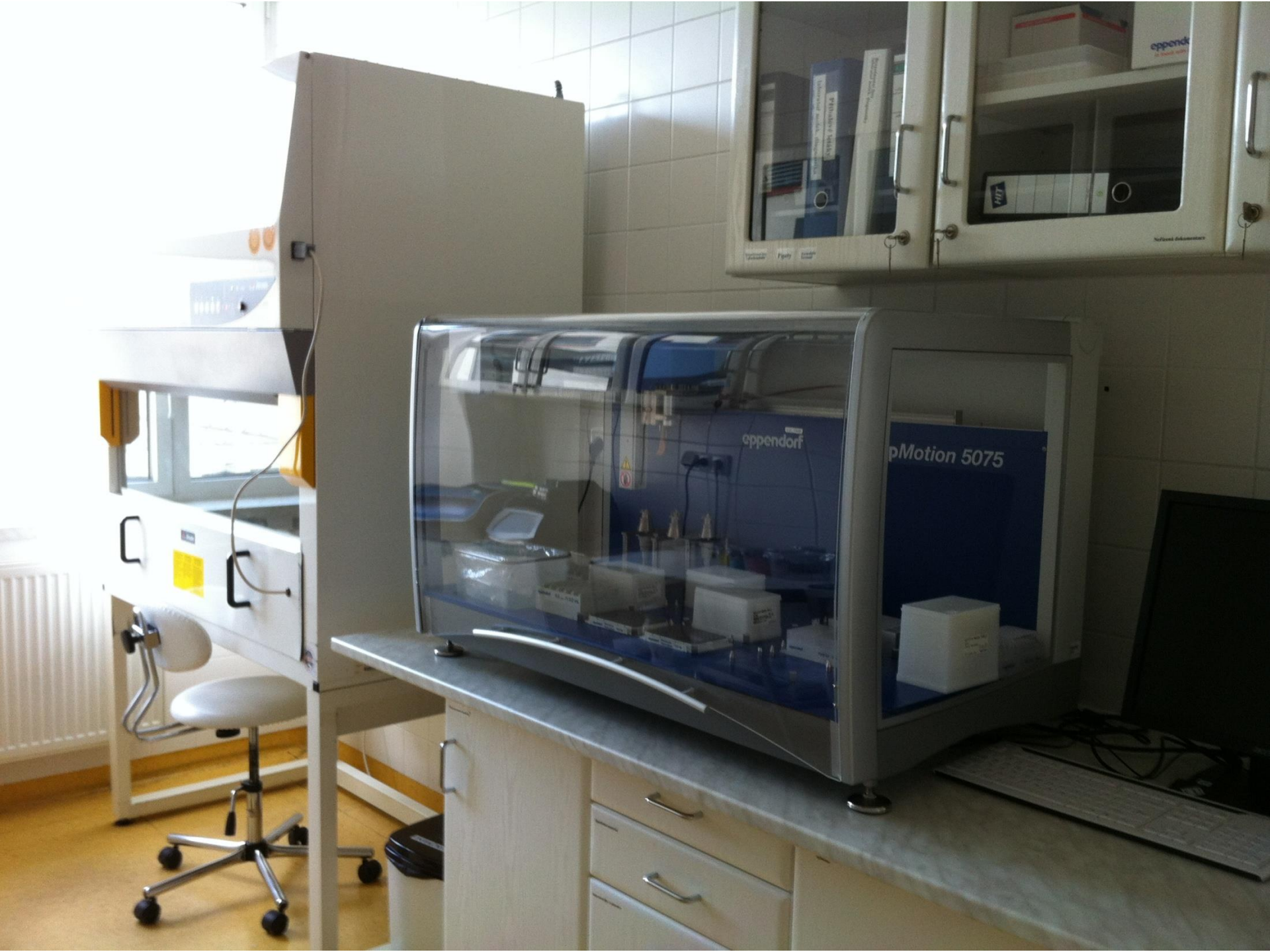
termocyklery





# Pipetování





appendorf

pMotion 5075

appendorf  
in GERMANY

Hygiene Dokumentation

# Elektroforetická separace nukleových kyselin

- Fragmenty nukleových kyselin lze dle jejich velikosti rozdělit elektroforézou. Elektroforéza využívá rozdílné pohyblivosti jednotlivých fragmentů danou právě jejich rozdílnou velikostí. Nukleová kyselina nese díky záporně nabitým fosfátům záporný náboj, a proto se v elektrickém poli pohybuje od záporného pólu (katody) ke kladnému (anodě).
- Při elektroforéze se separují molekuly nukleových kyselin na základě své délky a konformace.
  - Obvykle platí, že delší fragmenty migrují pomaleji než kratší.
  - Separace molekul nukleových kyselin je významně ovlivněna jejich konformací. Platí, že méně spiralizovaná DNA migruje v gelu pomaleji než superspiralizovaná DNA, která je díky spiralizaci kompaktnější a póry v gelu tak snadněji procházející.
- Je využívána gelová elektroforéza, kdy se molekuly nukleových kyselin separují buď v **agarosovém** či **polyakrylamidovém gelu**.

# Elektroforetická separace nukleových kyselin

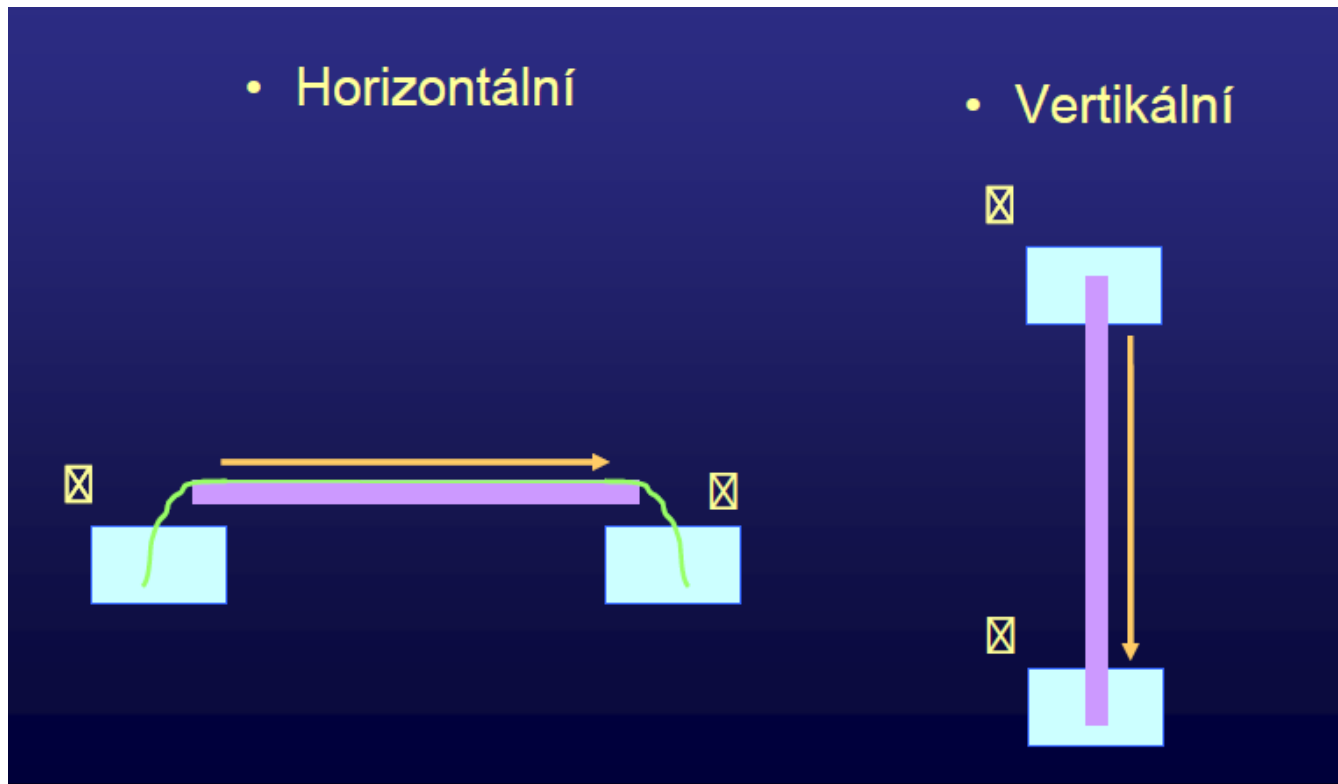
- Agarosová ELFO versus polyakrylamidová ELFO (PAGE)

Využití polyakrylamidové versus agarosové elektroforézy se především odvíjí od velikosti fragmentů, které chceme separovat. Polyakrylamidová elektroforéza nastupuje v případech, kdy separujeme krátké krátké fragmenty DNA (cca < 200bp).

- **Polyakrylamid (poly(2-propenamid))** je polymer tvořený z akrylamidových podjednotek zesíťovaných N,N'-methylenbisakrylamidem. Směs akrylamidu a bisakrylamidu polymerizuje při pokojové teplotě pomocí volných radikálů, které dodává persulfát amonný (APS) způsobující homolytické štěpení vazeb O-O. K urychlení polymerizace se používá volná zásada TEMED (tetrametylendiamin), který katalyzuje tvorbu volných radikálů persulfátu amonného. Při práci s akrylamidem je třeba obezřetnosti, protože působí jako neurotoxin. Výběrem vhodné koncentrace akrylamidu a bisakrylamidu lze ovlivňovat velikost pórů gelu a tím délku separovaných molekul. Se zvyšující se koncentrací těchto látek se póry gelu stávají menšími a gel se hodí pro separaci menších molekul, viz. tabulka. Pro PAGE je jako elektroforetický pufr využíván TBE. PAGE je buď ve formě denaturační s přídavkem denaturační látky, jako např. močoviny nebo ve formě nedenaturační, tzv. nativní.
- **Agaróza.** Standardní agarosová elektroforéza se používá pro separaci fragmentů od 100 bp do 50 kb. Agaróza je lineární sacharidový polymer D-galaktosidázy a 3,6-anhydro-L-galaktopyranozy. Vyrábí se z agaru izolovaného z mořské řasy odstraněním agaropektinu. Ačkoliv by agaróza měla být teoreticky zcela nenabitá, v praxi může obsahovat příměsi nabitých sulfátových či pyruvátových skupin. Tyto skupiny zpomalují pohyb DNA – tento jev se nazývá elektroendoosmóza (EEO). Pro elektroforézu nukleových kyselin jsou preferovány agarózy s nízkou elektroendoosmózou (low EEO). Naopak agarózy s vyšší EEO se používají pro imunoprecipitaci. Na trhu je dostupné široké spektrum agaróz vhodných k jednotlivým typům použití, např. agarózy zajišťující vysoké rozlišení při separaci velmi krátkých fragmentů, agarózy pro separaci pulzní elektroforesou, tzn. velmi dlouhé fragmenty či chromosomální fragmenty či tzv. „low melting“ agarózy, tedy agarózy s bodem tání nižším než je bod tání většiny nukleových kyselin (okolo 65°C), které jsou vhodné pro extrakci nukleové kyseliny z gelu.

# Elektroforetická separace nukleových kyselin

- Uspořádání elektroforézy



# Elektroforetická separace nukleových kyselin

- Velikost separovaných fragmentů a koncentrace gelu

Koncentrace gelu je důležitým faktorem pro mobilitu molekul. Čím koncentrovanější je gel, tím je separace pomalejší, z čehož vyplývá, že vyšší koncentrace zajistí lepší separaci krátkých fragmentů. Koncentrace gelu závisí na typu fragmentů DNA, které chceme separovat. Koncentrace gelu udává velikost pórů v gelu, kterými molekuly DNA procházejí. Koncentrací gelu lze proto ovlivňovat separaci a tedy i rozlišení velikosti fragmentů.

- Vyšší koncentrace gelu zajistí lepší separaci krátkých fragmentů.
- Nižší koncentrace gelu zajistí lepší separaci dlouhých fragmentů.

Standardně je pro většinu aplikací využívána koncentrace 1%. Nicméně, např. pro kvalitní separaci 5-10 kb DNA fragmentů je využívána 0,7% agarosa, gelem s 2% zajistíme jemnější rozlišení krátkých fragmentů o 0,2-1 kb. Pro krátké fragmenty můžeme při použití speciální agarózy o nízkém bodu tání připravit až 4% gel, který umožní rozlišení fragmentů o velikosti okolo 200bp, lišící se 15 páry bází. Pokud vyžadujeme ještě jemnější rozlišení krátkých fragmentů, musíme použít polyakrylamidový gel a vertikální elektroforézu. Stejně tak i pro kvalitní separaci velmi dlouhých fragmentů je nutné využít speciální elektroforézu, tzv. pulsní elektroforézu (pulse field gel electrophoresis (PFGE)).

# Elektroforetická separace nukleových kyselin

- Velikost separovaných fragmentů a koncentrace gelu

Koncentrace gelu je důležitým faktorem pro mobilitu molekul. Čím koncentrovanější je gel, tím je separace pomalejší, z čehož vyplývá, že vyšší koncentrace zajistí lepší separaci krátkých fragmentů. Koncentrace gelu závisí na typu fragmentů DNA, které chceme separovat. Koncentrace gelu udává velikost pórů v gelu, kterými molekuly DNA procházejí. Koncentrací gelu lze proto ovlivňovat separaci a tedy i rozlišení velikosti fragmentů.

- Vyšší koncentrace gelu zajistí lepší separaci krátkých fragmentů.
- Nižší koncentrace gelu zajistí lepší separaci dlouhých fragmentů.
- Standardně je pro většinu aplikací využívána koncentrace 1%.
- Pro kvalitní separaci 5-10 kb DNA fragmentů ➡ 0,7% agarosa,
- jemnější rozlišení krátkých fragmentů o 0,2-1 kb ➡ 2% agarosa.
- rozlišení fragmentů o velikosti okolo 200bp, lišící se 15 páry bází ➡ při použití speciální 4% gel agarózy o nízkém bodu tání
- Pokud vyžadujeme ještě jemnější rozlišení krátkých fragmentů, musíme použít polyakrylamidový gel a vertikální elektroforézu.
- Pro kvalitní separaci velmi dlouhých fragmentů je nutné využít speciální elektroforézu, tzv. pulsní elektroforézu (pulse field gel electrophoresis (PFGE)).



# Elektroforetická separace nukleových kyselin

## Elektroforetické pufry

- Mobilita při elektroforéze je ovlivněna složením elektroforetického pufru, a to především obsahem solí. Bez přítomnosti solí je elektrická vodivost minimální a DNA se pohybuje jen velmi těžce. Obsah solí v elektroforetickém pufru musí být optimální. Pokud je příliš vysoký, elektrická vodivost je vysoká a při elektroforéze dochází k uvolňování velkého množství tepla, což vede k deformaci gelu. Pro agarosovou separaci se standardně používá pufr TAE (Tris-Acetate-EDTA) nebo pufr TBE (Tris-Borate-EDTA).
  - Pufr TAE poskytuje rychlejší elektroforetickou separaci lineárních molekul a lepší rozlišení superspiralizované nukleové kyseliny.
  - Naproti tomu pufr TBE má silnější pufrovací kapacitu při déle trvajících elektroforézách či elektroforézách běžících při vysokém napětí. Při separaci v polyakrylamidovém gelu se používá TBE.
- **Disociační pufry:** disociační pufry se používají pro rozrušení sekundárních struktur, tj. denuraci dvouřetězcových molekul, které jsou formovány v případě jednořetězcové nukleové kyseliny. Jako disociační agens se využívá nejčastěji močovina nebo formamid.

## Nanášecí pufry

- Nanášecí pufry slouží ke snadnějšímu nanesení vzorku do jamek elektroforetického gelu a také kontrole rychlosti průběhu elektroforézy. Nanášecí pufr obsahuje:
  - bromfenolovou modř nebo barvivo xylen cyanol. Barvivo obarví testovaný roztok s DNA, což umožní lepší nanášení vzorku na gel a sledování vzorku při separaci. V průběhu elektroforetické separace barvivo migruje gelem. Rychlost migrace barviva v závislosti na koncentraci agarózy je uvedena v tabulce.
  - Nanášecí pufr také obsahuje glycerol, který způsobí usazení vzorku na dno jamky gelu.

# Elektroforetická separace nukleových kyselin

## Velikostní marker

Velikostní marker (hmotnostní standard, “ ladder” ) slouží pro odhad velikosti separovaných fragmentů nukleových kyselin. Jedná se o soubor velikostně definovaných fragmentů.

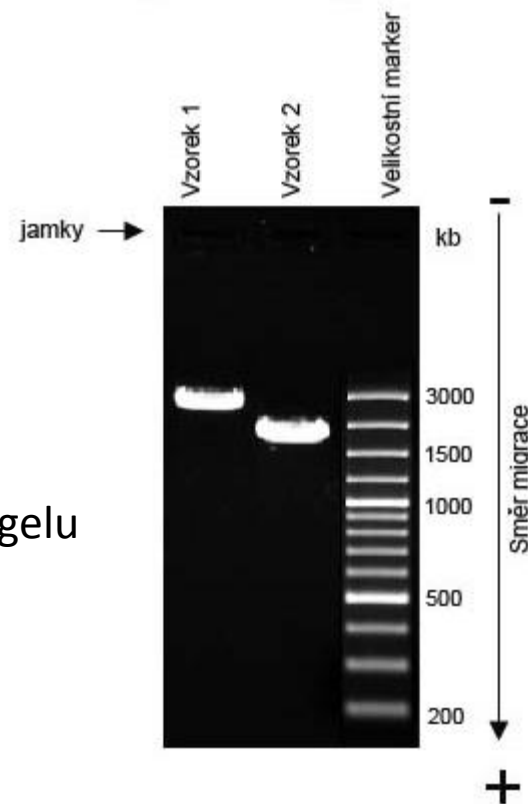
Nanáší se do jedné jamky v gelu paralelně k testovaným vzorkům.

Jedná se většinou o plazmidovou DNA štěpenou několika restrikcími enzymy.

Např. pro fragmenty s očekávanou velikostí 100 – 1000 bp používáme 100 bp ladder,

pro fragmenty od 1 kb do 10 kb používáme 1 kb laddery.

ELFO v agarózovém gelu



# Elektroforetická separace nukleových kyselin

Způsoby vizualizace nukleových kyselin po elektroforetické separaci

Nejběžnějším způsobem vizualizace molekul nukleových kyselin po elektroforetické separaci je jejich obarvení fluorescenčními barvivy.

- etidium bromid (EtBr)
- GelRed
- SYBR Green.

navazují na nukleové kyseliny.

Z toho plyne, že všechny tyto látky jsou potenciální mutageny a práce s nimi vyžaduje obezřetnost a striktní dodržování bezpečnosti práce.

Fluorescenční barvivo se přidává buď přímo do gelu při přípravě gelu, nebo se nukleové kyseliny barví až po ukončení elektroforézy,

Nukleové kyseliny jsou po obarvení fluorescenčními barvivy vizualizovány pod fluorescenční lampou.

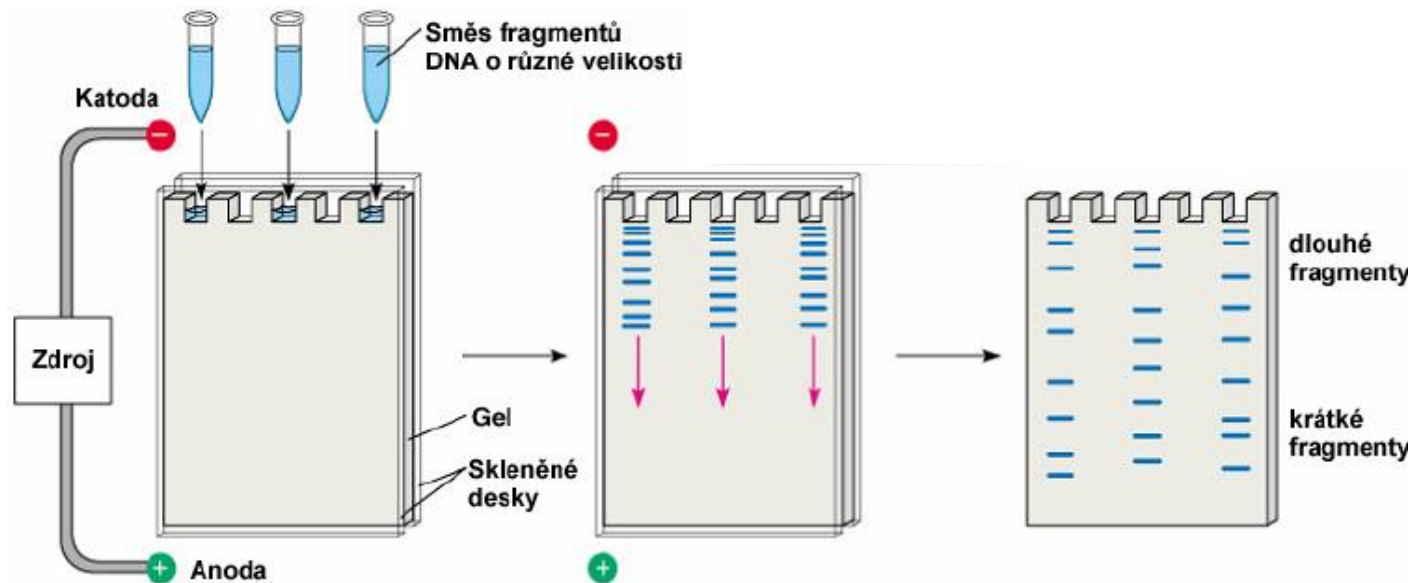
Jinou možností vizualizace separovaných molekul je barvení stříbrem konkrétně působením roztoku nitrátu stříbra či komplexem stříbro-amonium.

Vizualizace může být rovněž docílena hybridizací separovaných molekul se specifickými sondami metodou Southernovy hybridizace.

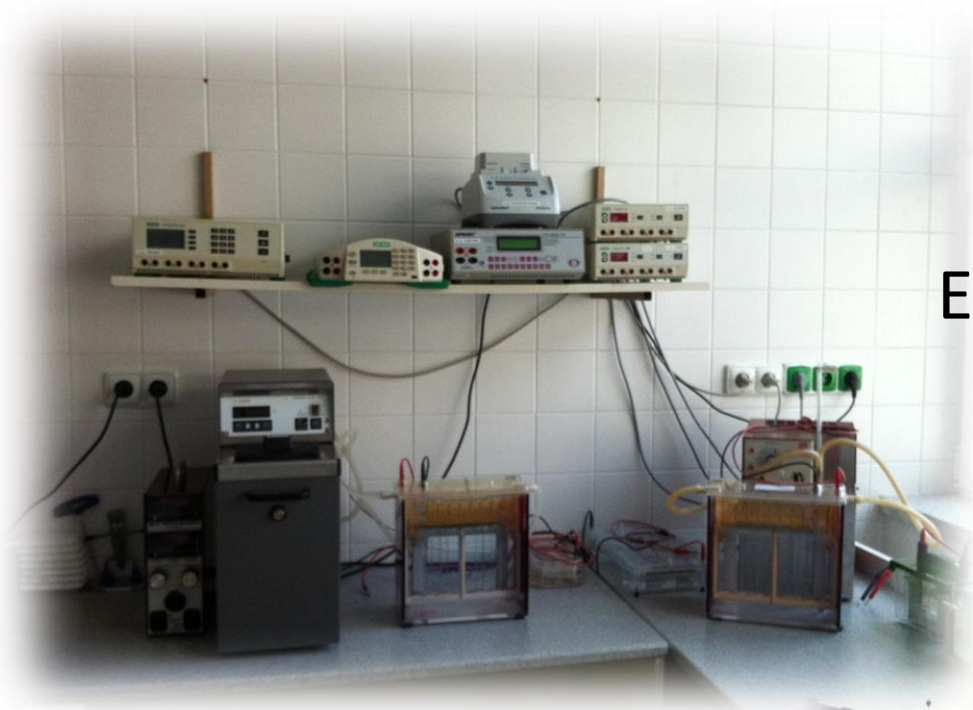
# Elektroforetická separace nukleových kyselin

## Základní kroky při ELFO

1. Příprava agarosového nebo polyakrylamidového gelu.  
Koncentrace gelu se odvíjí od velikosti separovaných molekul.
2. Vzorky se nanesou do jamek v gelu, které byly vytvořeny pomocí tzv. hřebínku.
3. Samotná elektroforetická separace.
4. Migrace v gelu je při elektroforéze kontrolována pomocí barviva přítomného v nanášecím pufru, se kterým je roztok DNA či RNA před nanášením na gel smíchán.
5. Ukončení elektroforetické separace.
6. Vizualizace separované DNA či RNA  
(obarvení fluorescenčním barvivem - vizualizace pod UV lampou).



# Elektroforetické aparatury











# Real-time PCR



# Real-time PCR

- Real-time PCR je technika umožňující rychlou detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA nebo RNA resp. cDNA.
- Metoda je založena na klasické PCR, ovšem s využitím speciálního cycleru, který v průběhu PCR kontinuálně zaznamenává množství DNA, a to v průběhu každého cyklu.
- Detekce množství DNA je umožněna přítomností fluorescenčního substrátu, který se váže na přítomnou DNA.
- Hladina fluorescence substrátu navázaného na DNA je detekovaná detektorem a odráží množství přítomné DNA, tj. i množství výchozího templátu.
- Real-time PCR se obvykle provádí v 96-ti jamkových destičkách. Úroveň fluorescence je zaznamenávána v jednotlivých jamkách.
- Pro detekci cílové DNA je Real-time PCR je vysoce citlivou metodou a pokud jsou využity specifické fluorescenční substráty, tak je to i metoda vysoce specifická.

KVALITATIVNÍ ANALÝZA

detekce snp

KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

detekce množství amplikonu

# Real-time PCR

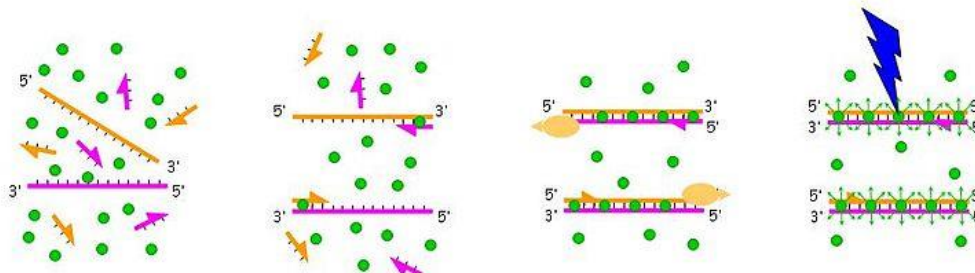
## Metody detekce

- Pro detekci produktu v průběhu PCR existují následující metody:
  - Na DNA se vázající interkalační barviva
    - **SYBR green I**
  - Na menší žlábek dsDNA se vázající barviva
    - BEBO
  - Technologie využívající fluorescenční výměny
    - dvakrát fluorescenčně značené sondy vázající se na střední část amplifikovaného produktu
      - **TaqMan**
      - **Molekulární majáky**
      - **QZyme**
    - jedenkrát fluorescenčně značené sondy nebo primery
      - **FRET**
      - **LUX**
      - **PNA**
    - dvakrát fluorescenčně značené primery
      - **AmpliFluor**
      - **Scorpions**

# Real-time PCR

## Metody detekce

- Interkalační barviva



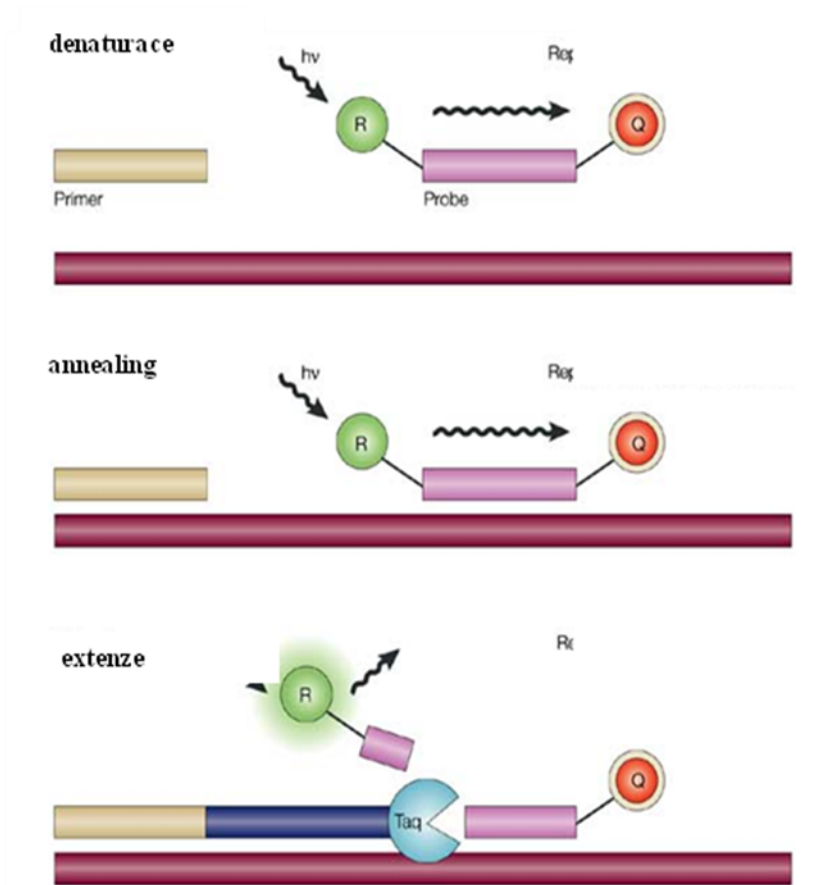
**Fluorescenční barvivo SYBR® Green** se používá pro kvantifikaci ampliconů. Fluoreskuje po vazbě na dsDNA a fluorescenční signál se zvyšuje se vzrůstajícím množstvím PCR produktu

# Real-time PCR

## Metody detekce

### Sondy

V současnosti je asi nejvíce rozšířená metoda využívající 5-exonukleázové aktivity DNA polymerázy. Klíčovým je zde použití oligonukleotidu – próby (**TaqMan sonda**), která se specificky váže na sekvenci mezi oběma primery. Sonda je na jednom svém konci označena fluorescenční látkou a na druhém konci zhášecem fluorochromu. Při syntéze komplementárních vláken hydrolyzuje DNA polymeráza TaqMan sondu, dojde k uvolnění fluorescenční látky a k nárůstu fluorescence, která je detekována a zaznamenána v reálném čase.

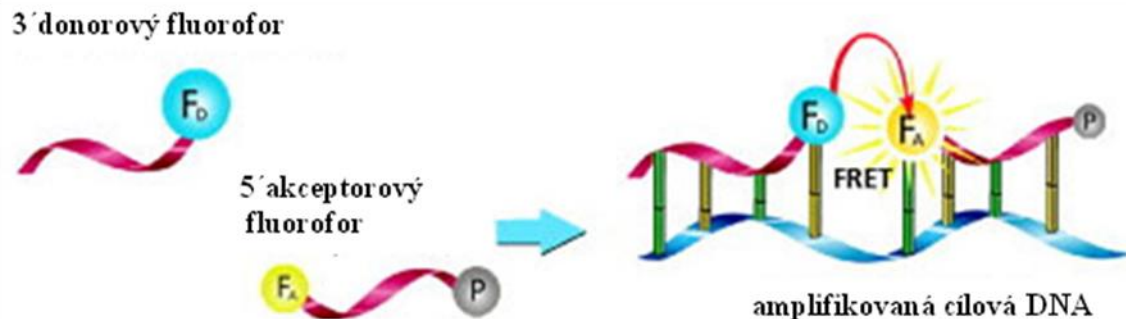


# Real-time PCR

## Metody detekce

### Sondy

Pro svoji vysokou citlivost je také hojně využívána technologie sond s **přenosem energie fluorescenční rezonancí (FRET, Fluorescent Resonance Energy Transfer)**, což je excitovaný stav interakce dvou fluoroforů závislý na vzdálenosti, ve kterém je emise energie z donorového fluoroforu na 3'-konci první sondy spojená s excitací akceptorového fluoroforu na 5'-konci druhé sondy vázající se na sousedící sekvenci. Obě sondy jsou komplementární k určitému úseku cílové DNA a jsou navrženy tak, aby v reasociační fázi přisedaly k cílové sekvenci v těsné blízkosti s maximálním oddálením 1-5 nukleotidů a mohly tak plnit funkci donora a akceptora a mohlo dojít k přenosu energie



# Real-time PCR

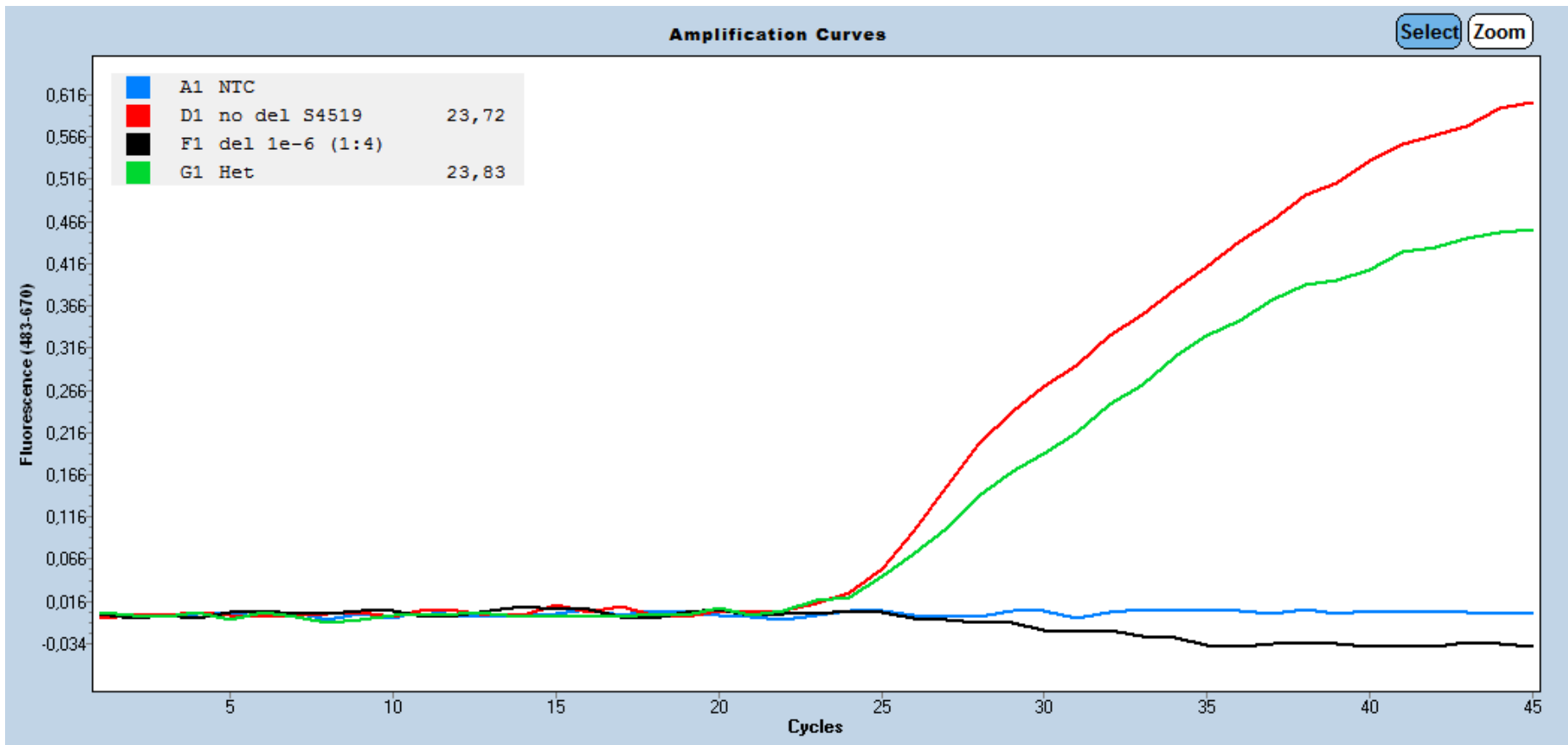
## KVANTITATIVNÍ ANALÝZA *Absolutní kvantifikace*

Pomocí absolutní kvantifikace lze přímo stanovit výchozí počet kopií templátových molekul. Fluorescence barviva DNA nebo sondy je monitorována během každého cyklu PCR. Vynesením hodnot naměřené fluorescence oproti počtu příslušných cyklů vznikají amplifikační křivky. V jistém bodu během cyklování se produkt hromadí natolik, že zvyšuje fluorescenci nad pozadím (,background' fáze, exponenciální fáze, plató fáze). Bod, kde fluorescence stoupá nad šumem pozadí, koreluje s množstvím počátečních kopií uvnitř PCR reakce. Čím dřív amplifikační křivka překročí fluorescenční práh v exponenciální fázi (označovaný hodnotou  $C_p$ ), tím víc molekul templátu bylo ve vzorku na počátku reakce. Mezi logaritmem počátečního množství kopií a  $C_p$  příslušné amplifikační křivky je lineární vztah. Amplifikací ředící řady standardů o známé koncentraci získáme kalibrační přímku. Pokud amplifikujeme s těmito standardy i vzorek o neznámé koncentraci, lze výsledně z kalibrační přímky odečíst výchozí koncentraci tohoto vzorku. Bylo prokázáno pomocí ředící řady standardů o známé koncentraci, že snížení počtu cyklů o 3,3 jednotky znamená zvýšení koncentrace o jeden řád.



# Real-time PCR

## KVANTITATIVNÍ ANALÝZA *Absolutní kvantifikace*



# Real-time PCR

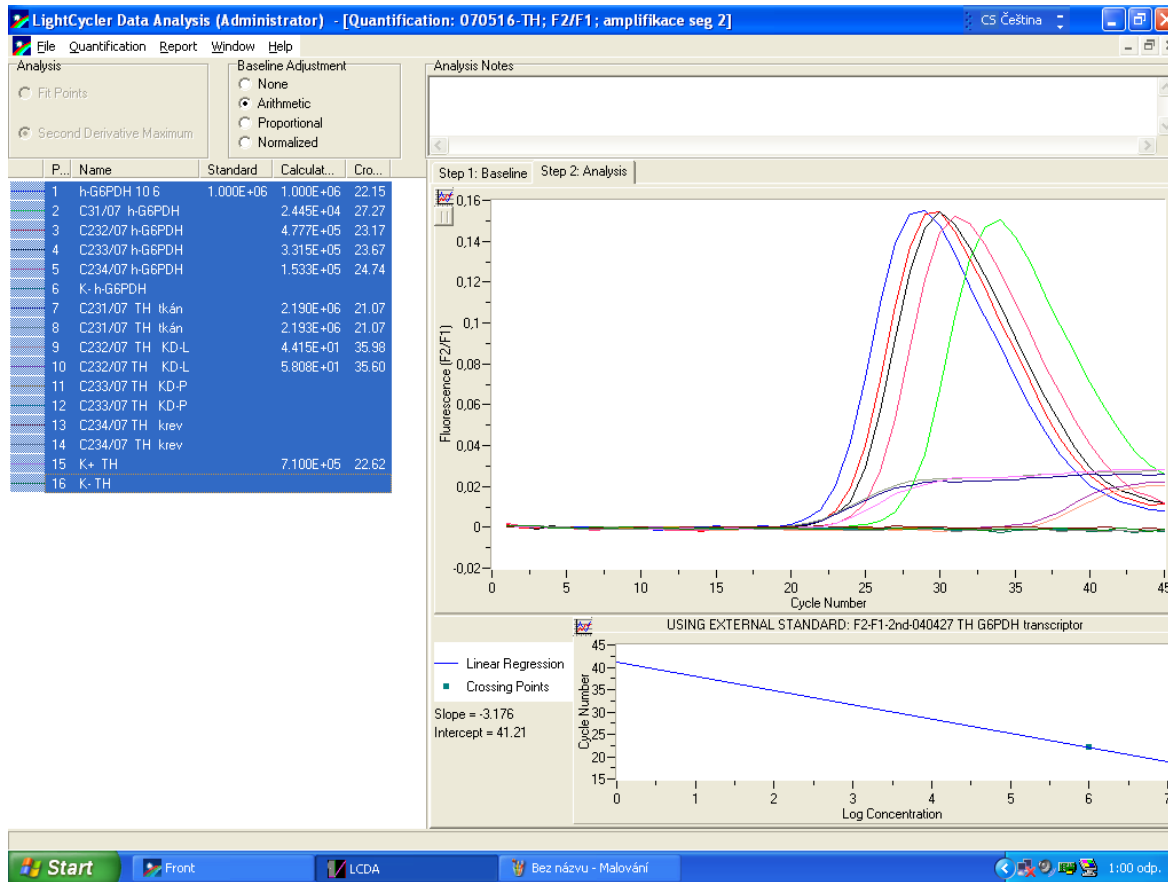
## KVANTITATIVNÍ ANALÝZA *Relativní kvantifikace*

U tohoto typu kvantifikace zpravidla není potřeba tvorba kalibrační přímky. Porovnává se relativní změna genové dávky u DNA či při hodnocení genové exprese u mRNA (respektive cDNA) v testovaném vzorku oproti vzorku kontrolnímu.

Relativní kvantifikace je založena na principu poměru počtu kopií cílové DNA nebo při hodnocení genové exprese mRNA resp. cDNA k počtu kopií DNA/cDNA referenčního genu. Výsledky testovaného genu jsou normalizovány na referenční gen. Kalibrační křivka je vytvořena vynesáním hodnoty  $C_p$  proti známému počtu kopií u jednotlivých roztoků standardů, které jsou amplifikovány paralelně s neznámými vzorky. Po odečtení absolutního množství (počtu kopií) cílové molekuly a referenčního "housekeeping" genu u jednotlivých vzorků ze standardní křivky, je absolutní hodnota množství cílové cDNA dělena absolutní hodnotou pro "housekeeping" gen. Výsledný poměr udává relativní množství cílové molekuly vzhledem k hladině endogenního referenčního genu.

# Real-time PCR

## KVANTITATIVNÍ ANALÝZA *Relativní kvantifikace*



# Real-time PCR

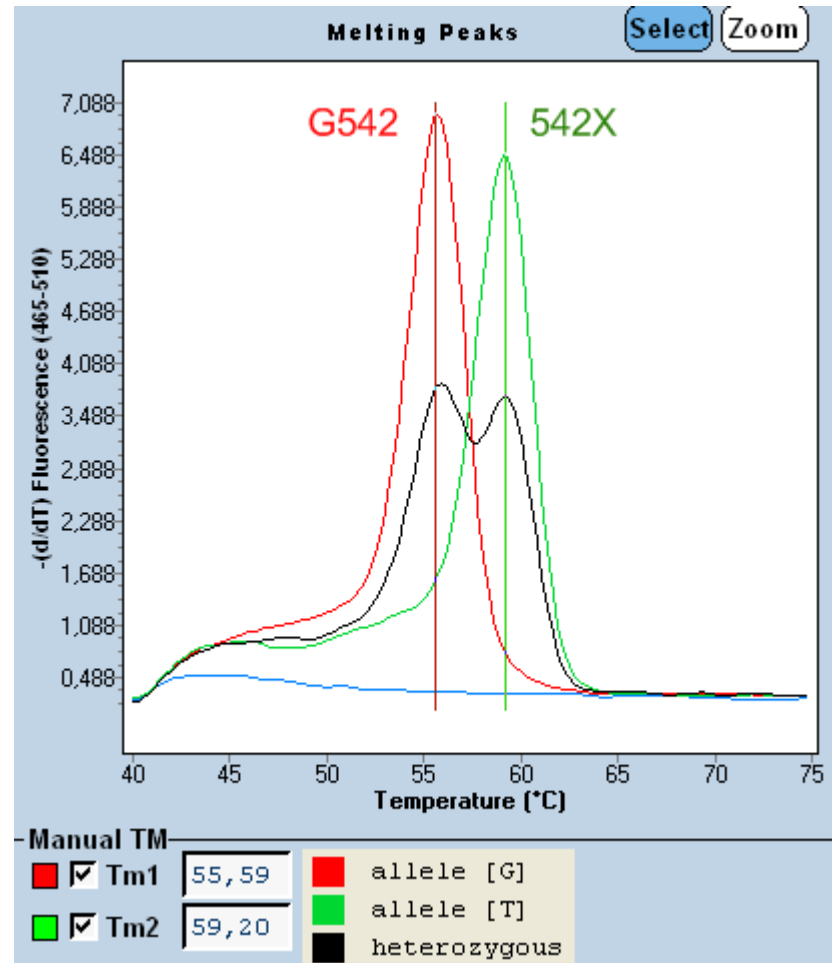
## KVANLITATIVNÍ ANALÝZA

**Analýza teploty tání na Real-Time**, tedy kvalitativní analýza, se využívá k detekci sekvenčních změn analyzovaných amplikonů na základě určení charakteristické teploty tání cílové DNA. Lze tak odlišit různé produkty nebo genotypy podle odlišnosti teploty tání.

Při tání DNA se komplementární řetězce dsDNA rozestupují na základě zvyšování teploty. Separace probíhá nejrychleji v rozsahu teplot blížících se teplotě tání  $T_m$ . Intenzita fluorescence vynesena oproti příslušné, zvyšující se teplotě strmě klesá v okolí  $T_m$ . Teplota v inflexním bodě křivky je rovna  $T_m$ . Křivka tání tedy strmě klesá v okolí  $T_m$ . Analýza křivky tání se použije pro identifikaci charakteristických profilů tání DNA jednotlivých PCR produktů. Při použití hybridizačních sond se využívá analýzy křivek teplot tání mezi cílovou DNA a specifickými sondami, které pokrývají místo předpokládané mutace, pro genotypizaci. Sekvenční změny lze detekovat i při značení výrazně levnějšími interkalačními barvivy, nicméně citlivost takové analýzy se pak snižuje.

# Real-time PCR

## KVANLITATIVNÍ ANALÝZA







11

Standard Operating Procedure Summary

Procedure Name: GLE

Procedure No: 1000000000

Version: 1.0

Effective Date: 10/01/2000

Revised: 10/01/2000

Step	Operator	Frequency	Initials	Date
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				



# Real-time PCR - HRM





# Sekvenování



# Sekvenování

## SANGEROVA METODA

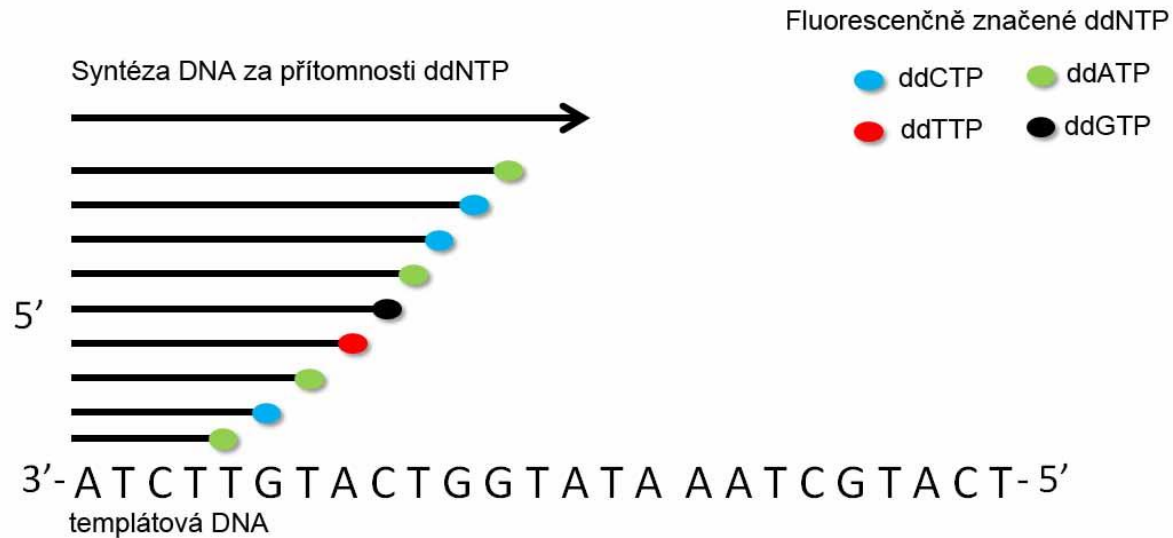
Sangerova metoda využívá proces replikace DNA a tedy princip využívaný také při PCR.

Provedení metody je prováděno tak, že:

- k jednořetězcové DNA přisedá 15-25 bp dlouhý primer (značený fluorescenčně), který je komplementární k začátku sekvenovaného místa,
- od navázaného primeru probíhá syntéza DNA za přítomnosti dNTP (dATP, dCTP, dGTP a dTTP) a jednoho z dideoxynukleotidů (ddATP, ddCTP, ddGTP nebo ddTTP) značených fluorescenčně (každý ddNTP nese svou barevnou značku), což umožňuje provedení reakce v jedné zkumavce. . Jednotlivé dideoxynukleotidy jsou v porovnání s jednotlivými nukleotidy v reakci zastoupeny jen v relativně malém množství,
- dideoxynukleotidy se náhodně začlení do syntetizovaného řetězce místo příslušného dNTP (např. místo dATP dosedne ddATP). A protože ddNTP nemají OH skupinu, po jejich dodání do syntetizovaného řetězce se syntéza zastaví. Vzhledem k tomu, že v každé reakci je obrovské množství molekul DNA a že začleňování ddNTP se děje náhodně, a to díky jejich nízké koncentraci jen s nízkou pravděpodobností (část molekul je v příslušném místě obsazena dNTP a část ddNTP), vzniká v každé reakci směs různě dlouhých fragmentů. Délka každého z fragmentů udává pozici příslušného ddNTP,
- délka fragmentů je analyzovaná pomocí kapilární elektroforézy a je získán výsledný sekvenogram.

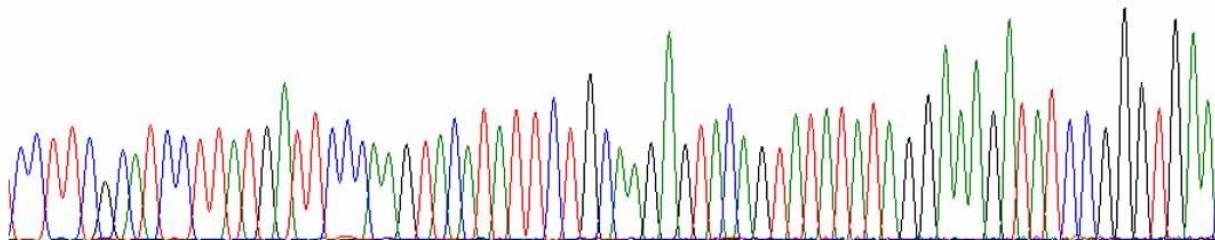
# Sekvenování

SANGEROVA METODA SEKVENOVÁNÍ (KAPILÁRNÍ PROVEDENÍ)



Výsledný sekvenogram

30 40 50 60 70 80 90 100  
CCTTCGCATCCTTATGATTCCCAAGTACATATCTGCAAGAGTACAGTATATATAGGAAAATATCCGGGTGAAC



# Kapilární sekvenování

Příprava DNA fragmentů. Fragmenty DNA se připravují jednotlivě (PCR amplifikace či klonování).

- Sekvence jednotlivých DNA fragmentů. Možnost paralelní sekvenace max. 96 sekvencí v jednom běhu (96 kapilárové sekvenátory)
- Délka získané sekvence cca 650 bp.
- Max. sekvenační výtěžek jednoho běhu cca 60 kb

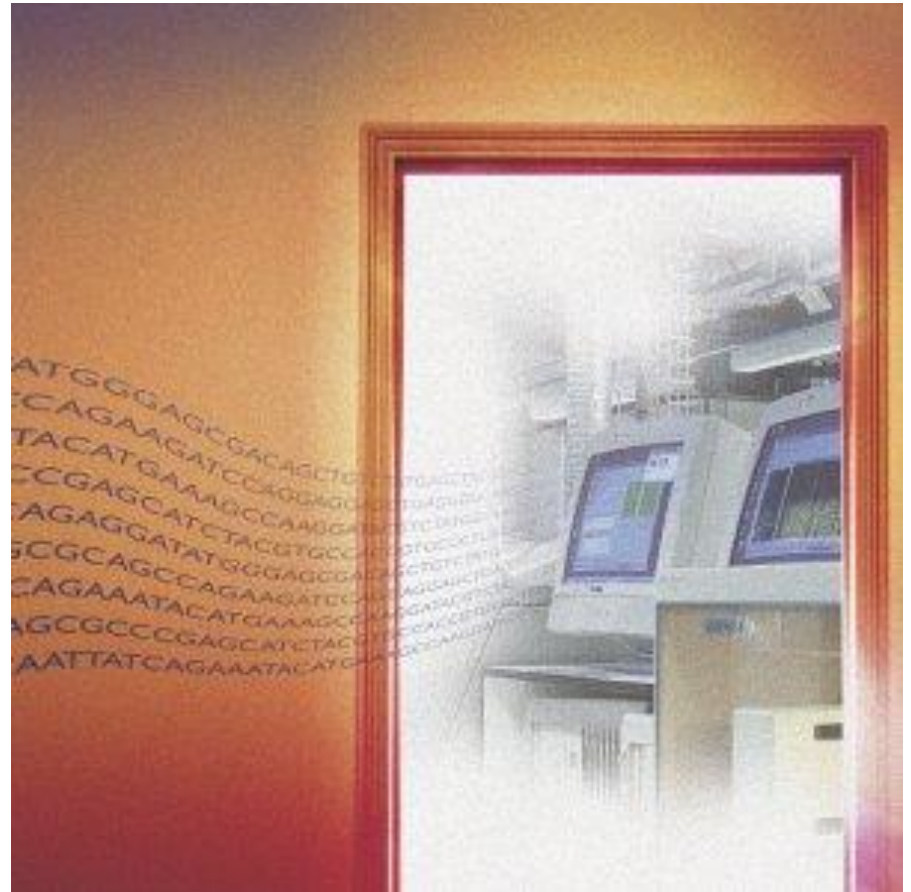


Celý obor ženou v posledních letech neskutečně rychle dopředu technologie.

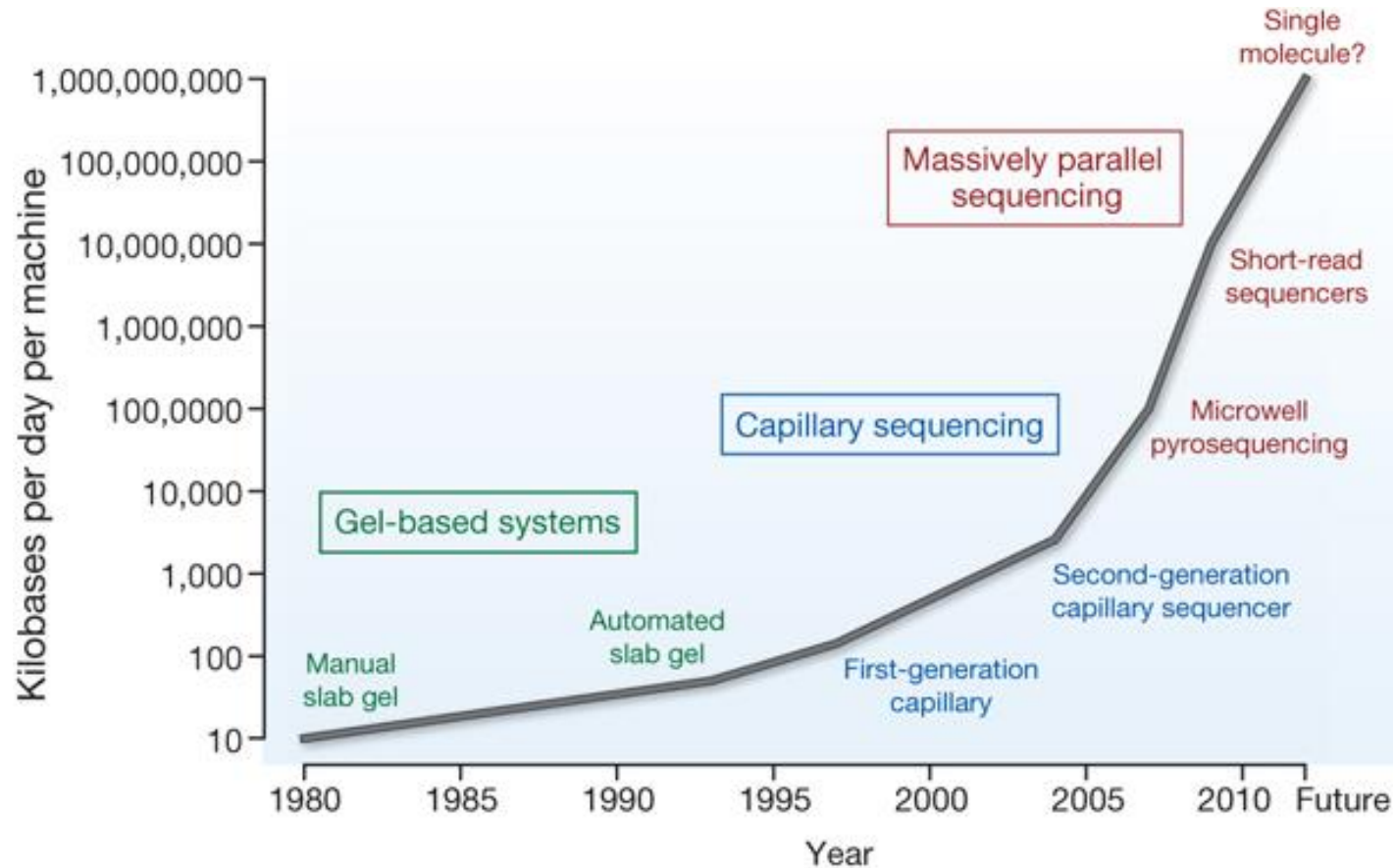


Cílem molekulární diagnostiky  
je přinést v krátké době  
správné a přesné výsledky,  
které lékař použije  
k cílené léčbě.

Sekvenování  
je v tomto oboru  
nepostradatelné



# Vývoj sekvenačních metod za posledních 30 let



Stratton et al. 2009 Nature 458:719-724



# Sekvenování nové generace („next-generation sequencing“, NGS)



Revoluční technologie.

Poskytuje levné, správné a přesné informace  
o genomické sekvenci.

Tato technologie od svého uvedení postupně téměř  
ovládla oblast základního či aplikovaného výzkumu  
zabývajícího se analýzou DNA.

# Masivně paralelní sekvenování („next-generation sequencing“, NGS)

## (massively parallel sequencing)

využívá principu paralelizace procesu sekvenování,  
kdy dochází k sekvenování tisíců až milionů sekvencí současně.

Výsledkem je obrovská produkce výstupních dat s následnou potřebou data utřídit a analyzovat.

- V prvním kroku je při těchto technikách templátová DNA fragmentovaná na úseky několika set bází dlouhé.
- Konce získaných fragmentů jsou enzymatickou reakcí zatupeny a napojeny k oligonukleotidům určité sekvence (tzv. adaptéry).
- Jednotlivé fragmenty jsou odděleně amplifikovány PCR reakcí (u některých technologií tento krok chybí)
- Pak v jednom kroku paralelně sekvenovány - při tomto paralelním sekvenování se sekvenují milióny sekvencí najednou.
- Délka získaných sekvencí je cca 20-700 bp.
- Sekvenační výtěžek jednoho běhu několik až několik tisíc Gb (o 4 až 6 řádů vyšší než u kapilárního sekvenování).
- Cena sekvenace za bázi o řád až dva nižší než u kapilárního sekvenování.

# Sekvenování nové generace („next-generation sequencing“, NGS)

**člověk**



## Humánní genom

Celogenomové - de novo

- resekvenování

Exomové

Transkriptonové

Cílené sekvenování – ampliconové sekvenování – ultra-široké

- ultra-hluboké

- Hybridization based capture

## Non-humánní genom

Metagenomické – studium microbiálního složení v různých typech prostředí – střevní mikroflóra, zubní plak.....

# Nyní NGS vstupuje i do klinické diagnostiky.

Jedná se zejména o aplikace, kde se vyžaduje velké množství sekvenačních informací případně vysoká citlivost.

Pro diagnostické účely zatím není požadováno celogenomové nebo exomové sekvenování, které se v medicíně používá především pro výzkumné účely.

V současné době sekvenování v klinické diagnostice znamená sekvenování v malém rozsahu zaměřené na analýzu jednotlivých genů nebo vybraných skupin genů asociovaných s konkrétním onemocněním.

Pro splnění těchto požadavků jsou vhodné tyto postupy:

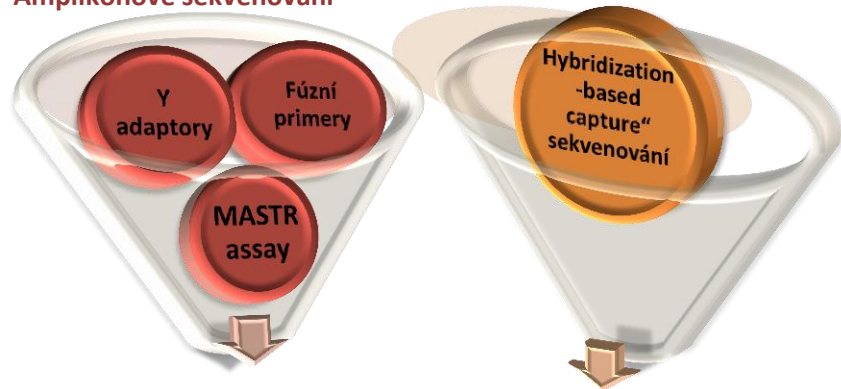
- **amplikonové sekvenování**
- **sekvenování vybraných úseků DNA získaných na základě hybridizace sond komplementárních k cílové sekvenci (hybridization-based capture sequencing, Hyb-Seq)**

**Liší se tvorbou knihovny cílové DNA**



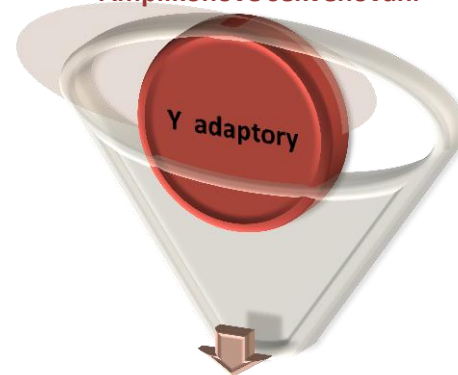
# NGS

Amplikonové sekvenování



ultra-široké sekvenování

Amplikonové sekvenování



ultra-hluboké sekvenování

Celý obor ženou v posledních letech neskutečně rychle dopředu technologie.



©2011, Illumina Inc. All rights reserved.

Illumina MiSeq  
4 millions reads/run  
150bp/read



Illumina GAII-X  
300 millions reads/run  
150bp/read



Illumina HiSeq  
1500-3000 millions reads/run  
100bp/read

Celý obor ženou v posledních letech neskutečně rychle dopředu technologie.



Solid 5500xl  
1500 millions reads/run  
75bp/read



# Technologie single-molecule sekvenování třetí generace sekvenování

## Pacific

- Single molecule real-time sequencing
- Není třeba PCR
- Sekvence čtena přímo při procesu replikace DNA pomocí DNA polymerázy používající fluorescenčně značené nukleotidy
- Dlouhé sekvence (860-1500bp)

## Oxford Nanopore

- Single molecule sequencing
- Báze DNA jsou určeny na základě elektrické vodivosti při průchodu nanopórem

# Miliónkrát lacinější během posledních deseti let

1980: jedna laboratoř 1000 pb za den.

2000: jedna laboratoř 1000 pb za vteřinu, 24 hodin denně, sedm dní v týdnu.

první lidský genom: 13 let, cena 3 miliardy dolarů

Genom Jamese Watsona: čtyři měsíce (2007), cena 1 milión dolarů

2010: 3 lidé, cena každého z genomů 4 400 dolarů

2011: sekvenování trvá jeden den, cena 1000 dolarů, celkem 1 000 lidí

2018: 19 hodin, celkem 100 000 lidí

Vyspělé technologie umožňují molekulárním genetikům získat stále více informací o genetické výbavě analyzovaného člověka.

Otázka je:

Víme, jak s nimi naložit?

Víme, jak je použít ve prospěch člověka?

Měl by pan Mendel radost?

