

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

STUDIUM POŠKOZENÍ DNA POMOCÍ PCR

Bc. ADÉLA JANSOVÁ

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2022

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Dne 15. 5. 2022 v Hradci Králové

Bc. Adéla Jansová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat mé školitelce PharmDr. Anně Jirkovské, Ph.D. za její čas a veškeré rady a připomínky během tvorby mé diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat všem kolegům z Katerdy biochemických věd, hlavně Mgr. Veronice Skalické za její rady a podporu. Nakonec bych z celého srdce chtěla poděkovat své rodině, příteli a kamarádům za nekonečnou podporu a trpělivost po dobu celého mého studia, za kterou jsem opravdu velice vděčná.

Abstakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Biochemických věd

Kandidátka: Bc. Adéla Jansová

Školitel: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium poškození DNA pomocí PCR

Klíčová slova: funkce DNA, DNA poškození, PCR, SINE elementy

Předávání genetické informace budoucím generacím je možné díky replikaci DNA za pomoci enzymů, hlavně DNA polymerasy. Nejdůležitější funkcí DNA je biosyntéza proteinů, které vykonávají specifické funkce v celé buňce. Kódující DNA sekvence jsou zdrojem pro syntézu proteinů. Ty vznikají transkripcí dané sekvence za pomoci RNA polymerasy a následně jsou translací přeloženy na aminokyseliny. Nekódující sekvence mají hlavně regulační funkce, jsou to funkční molekuly DNA (rRNA, tRNA, snRNA) a regulační oblasti (promotory, zesilovače a tlumiče), dále také transpozony (SINE, LINE) a pseudogeny.

Poškození DNA způsobuje UV záření, ionizační záření, chemické látky (léky na bázi cisplatin, alkylační látky, apod.), reaktivní formy kyslíku a také dochází k poškození DNA deaminací bází. Při poškození se aktivují opravné procesy, které odstraňují chybné párování, addukty a zlomy. Pokud se nepodaří poškození odstranit opravnými procesy, dochází k tvorbě mutací, senescenci nebo buněčné smrti.

Stanovit poškození DNA je možné několika metodami podle typu poškození. Poškození lze stanovit i kvantifikovat pomocí PCR (polymerázová řetězcová reakce), která je jednou z nejpoužívanějších metod. Spolu s PCR se často využívá gelová elektroforesa, kometový test, chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií a vysoce specifické metody jako je LAMP či NGS.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical

Sciences Candidate: Bc. Adéla Jansová

Supervisor: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Title of thesis: Using PCR to study the DNA damage

Key words: functions of DNA, DNA damage, PCR, SINE elements

The transmission of genetic information to future generations is possible thanks to DNA replication using enzymes, mainly DNA polymerase. The most important function of DNA is the biosynthesis of proteins that perform specific functions throughout the cell. The coding DNA sequences are the source for protein synthesis. These are produced by transcription of a DNA sequence using RNA polymerase and then translated into amino acids by translation. Non-coding sequences have mainly regulatory functions, they are functional DNA molecules (rRNA, tRNA, snRNA) and regulatory regions (promoters, enhancers and silencers) as well as transposons (SINE, LINE) and pseudogenes.

DNA damage is caused by UV radiation, ionizing radiation, chemicals (cisplatin-based drugs, alkylating agents, etc.), reactive oxygen species, and DNA damage by base deamination. When damage occurs, repair processes are activated to remove mismatches, adducts and breaks. If the damage is not repaired by repair processes, the damage leads to mutation formation, senescence or cell death.

To determine DNA damage can be used several methods, depending on the type of damage. Damage can also be determined and quantified by PCR (polymerase chain reaction), which is one of the most commonly used methods. Along with PCR is often used gel electrophoresis, comet assay, chromatography in tandem with mass spectrometry and highly specific methods such as LAMP or NGS.

OBSAH

CÍL PRÁCE	8
1. ÚVOD.....	9
2. DNA	10
2.1 Primární struktura	10
2.1.1 Epigenetické modifikace	12
2.2 Sekundární struktura.....	12
2.3 Alternativní konformace DNA	14
2.3.1 B konformace DNA.....	14
2.3.2 A konformace DNA.....	15
2.3.3 Z konformace DNA	15
2.3.4 Nekanonické párování bází	16
2.4 Vyšší úrovně uspořádání	17
2.4.1 Nadšroubovicové vinutí	17
2.4.2 Chromatin.....	18
2.5 Funkce DNA.....	19
2.5.1 Kódující DNA.....	20
2.5.2 Nekódující DNA	23
2.5.2.1 Transponovatelné elementy	24
3. Poškození DNA	30
3.1 Deaminace bází.....	30
3.2 Addukty	33
3.3 Oxidační poškození DNA	34
3.4 Zlomy řetězce	35
3.5 Fotoprodukty.....	37
4. Buněčné důsledky poškození DNA.....	39
4.1 Mutace genové a chromozomové	39
4.2 Kontrolní body buněčného cyklu a opravné procesy.....	40
4.3 Buněčná smrt	43
4.4 Senescence.....	43
5. Metody stanovení poškození DNA.....	45
5.1 Gelová elektroforesa	45
5.2 Kometový test	48

5.3	Chromatografie	48
5.4	Alkalická eluce	49
5.5	Průtoková cytometrie	50
5.6	PCR	50
5.6.1	Reakční směs PCR.....	51
5.6.2	Tvorba primerů	52
5.6.3	Průběh PCR reakce	54
5.6.4	Modifikace PCR	55
6.	Diskuze	59
7.	Závěr.....	67
8.	Seznam použitých zkratk.....	68
9.	Seznam obrázků	71
10.	Zdroje	72

CÍL PRÁCE

- Popis struktur DNA
- Popis funkcí DNA
- Rozdělení typů poškození DNA
- Charakteristika hlavních metod stanovení poškození DNA
- Příklady studií stanovující poškození DNA s využitím PCR a jiných vysoce účinných metod

1. ÚVOD

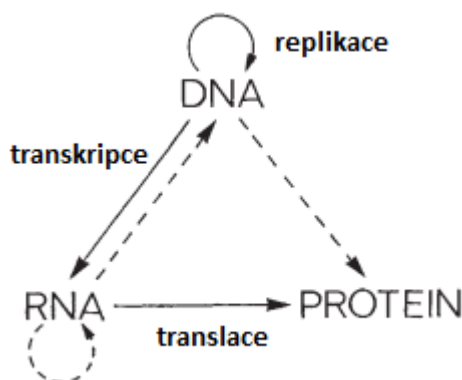
Tato diplomová práce popisuje typy poškození DNA a charakterizuje možnosti identifikace a kvantifikace daných poškození. Nejdříve byla popsána struktura DNA a její základní konformace – A-DNA, B-DNA, Z-DNA a také nekanonické struktury. DNA zaujímá vyšší struktury uspořádání, mezi které patří stočení DNA do méně náchylné struktury pomocí nadšroubovicového vinutí a také svinutí DNA do kompaktnější struktury - chromatinu. Přenos DNA informace do dceřiné DNA, v rámci zachování dědičnosti, zajišťuje proces replikace za pomoci několika enzymů, z nichž nejdůležitějším je DNA polymerasa. Kódující DNA sekvence obsahují genetické informace pro syntézu proteinů, které zastávají specifické funkce v životně důležitých procesech. Vznik proteinů začíná transkripcí DNA za pomoci RNA polymerasy. Výsledkem je přepsaná lineární pre-mRNA uvolněná z jádra do cytoplazmy. Následuje proces translace, kde je mRNA přeložena na aminokyseliny za účasti ribosomů a další translačních jednotek. Mezi nekódující DNA, dříve „junk DNA“, patří funkční molekuly DNA (rRNA, tRNA, miRNA a snRNA) a regulační oblasti (promotory, zesilovače a tlumiče), dále také transpozony (SINE, LINE, Alu elementy) a pseudogeny.

Poškození DNA je indukováno fyzikálními, chemickými či biologickými činiteli, ale také k němu dochází samovolně (hlavně deaminace bází). Působením škodlivého záření, ROS (reaktivní formy kyslíku), chemických látek, včetně protinádorových léků, způsobuje vznik DNA adduktů a jednovláknových a dvouvláknových zlomů. Pokud se buňce nepodaří eliminovat poškození opravnými procesy (přímou opravou, DNA mismatch repair, BER a NER či homologní rekombinací a nehomologním spojováním konců), dochází ke vzniku mutací, senescenci nebo buněčné smrti.

Poškození DNA lze stanovit a kvantifikovat pomocí několika metod. Jednou z nejvíce využívaných metod je PCR (polymerázová řetězcová reakce), která díky mnoha modifikacím má větší možnosti využití. Další metodou pro stanovení poškození je gelová elektroforesa (primárně separace produktů z PCR), kometový test (stanovení řetězcových zlomů), chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií (stanovení adduktů) atd. V diskuzi jsou zmíněny další modifikace PCR využívané pro kvantifikace poškození a metody pro stanovení poškození DNA, jako je LAMP nebo NGS.

2. DNA

Deoxyribonukleovou kyselinu (DNA, *deoxyribonucleic acid*) popsali v roce 1953 James Watson a Francis Crick. Hlavní funkcí DNA je uchování genetické informace a její přenos pro následující generace. Kromě uchování genetického kódu je potřebná pro biosyntézu proteinů. DNA je pravotočivá dvojitá šroubovice DNA, která je složena ze dvou komplementárních polynukleotidových řetězců (Alberts et al., 1998), (Kooman a Rohm, 2012). Základní funkci DNA popisuje tzv. centrální dogma molekulární biologie, publikované Watsonem Crickem v roce 1970 (Cobb, 2017). Dogma říká, že každá genetická informace zapsaná v úseku DNA se přepisuje do mRNA (messenger RNA). Každá mRNA tak obsahuje postup pro syntézu určitého proteinu, který zastává specifickou funkci (ncbi.nlm.nih.gov, online). Crick popsal 4 hlavní cesty přenosu informace viz Obr. 1 (přímá cesta DNA → protein nebyla prokázána), (Cobb, 2017).

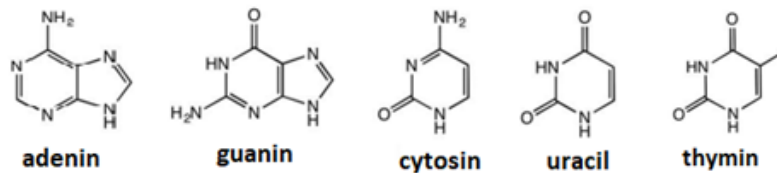


Obr. 1 Centrální dogma molekulární biologie (převzato, upraveno; Crick, 1970)

2.1 Primární struktura

Nukleové kyseliny (NK) jsou makromolekulární sloučeniny vyskytující se v živých organismech. Nukleotidy jsou tvořené z nukleotidové báze, pentosy a zbytku kyseliny fosforečné. Báze se dělí na pyrimidinové a purinové. Pyrimidinové báze jsou cytosin (C), thymin (T) a uracil (U) a purinové jsou guanin (G) a adenin (A). V DNA se vyskytují báze A, G, C a T. V ribonukleové kyselině (RNA, *ribonucleic acid*) je thymin nahrazen uracilem (Beránek, 2016). Spojením báze a pentosy 2'-deoxy- β -D-ribosy pro DNA (β -D-ribosy pro RNA), vzniká nukleosid a následným spojením se zbytkem kyseliny fosforečné vznikají nukleotidy (Priestle a Paris, 1996). Nukleotidové báze se vážou na cukernou část molekuly díky N-glykosidické vazbě. Zbytky kyseliny fosforečné se spolu

s pentosou váží pomocí fosfodiesterové vazby (Beránek, 2016). NK tvoří nukleotidy základní a modifikované. Kromě základních nukleotidů (AMP - adenosinmonofosfát, CMP - cytidinmonofosfát, GMP - guanosinmonofosfát, TMP - thymidinmonofosfát) existují i modifikované nukleotidy, např. 5-hydroxymethylcytosin, dihydrouracil, xanthin, 7-methylguanin ad. (Chawla et al., 2015), (Nguyen et al., 1992).



Obr. 2 Základní báze nukleových kyselin (převzato, upraveno; Chatterjee a Walker, 2017)

Počet a pořadí připojených nukleotidů tvoří primární strukturu nukleových kyselin a postupným připojováním dalších nukleotidů, pomocí polymeras, nukleotidový řetězec roste. Nukleotidy se vážou od 5'-konce s fosfátovou skupinou k 3'-konci s hydroxylovou skupinou dalšího nukleotidu. Fosfátové a pentosové zbytky tvoří tzv. páteř DNA (Passarge, 2013). Polynukleotidový řetězec tvořený cukry a fosfáty je velmi polární. Každý fosfátový diester má záporný náboj (negativně nabitá fosfátová skupina) a DNA tak získává celkově záporný náboj (Kooman a Rohm, 2012). Spojením dvou polynukleotidových řetězců k sobě, vzniká dvoušroubovice DNA (Snustad et al., 2009).

Nukleotidy jsou v buňkách využívány také k jiným účelům, než je tvorba DNA. Takzvaným „univerzálním nukleotidem“ je adenosin 5'-trifosfát (ATP), který zásobuje energií mnoho buněčných reakcí a zároveň slouží jako zásobárna energie pro buňku. ATP je energetickou měnou buněk a působí jako důležitý efektor při regulaci buněčného metabolismu (Roy et al., 2016). Podobně jsou v některých reakcích využívány i GTP (guanosintrifosfát), UTP (uridintrifosfát) nebo CTP (cytidintrifosfát). Specifickou úlohu tzv. „druhých poslů“ zastávají také některé cyklické mononukleotidy (cMNP), mající ve své sloučenině jeden fosfát. Za velice významné cMNP se považují cAMP (cyklický adenosin-5'-monofosfát) a cGMP (cyklický guanosin-5'-monofosfát), (Roy et al., 2016).

2.1.1 Epigenetické modifikace

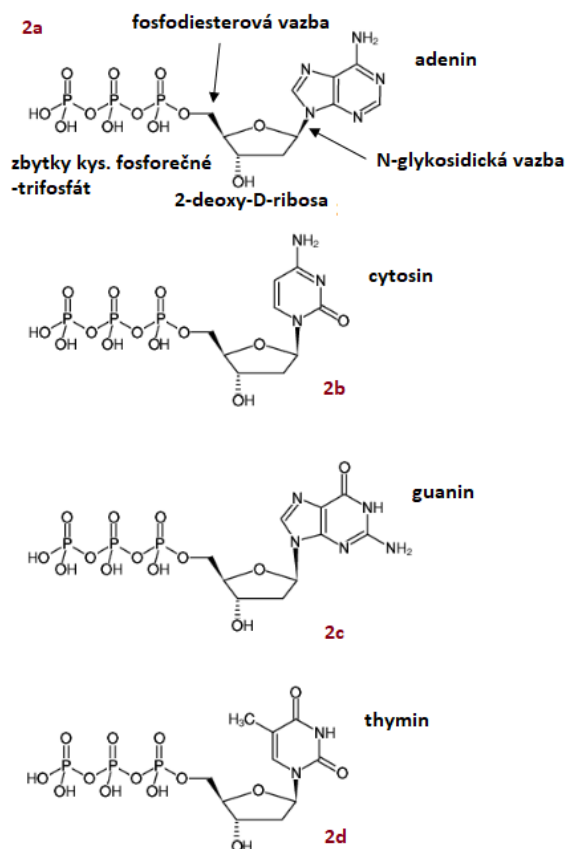
K ovlivnění genetické exprese dochází z epigenetického hlediska řízením aktivity genů, tedy jejich vypínáním a zapínáním (cdc.gov; medlineplus.gov, online). Jde o modifikace DNA, které nemění sekvenci DNA, ale regulují expresi genů (=epigenom) a ta ovlivňuje tvorbu proteinů (medlineplus.gov).

Nejčastější epigenetickou modifikací je **methylace DNA**, acetylace histonů a mechanismy řízené malými nekódujícími RNA (miRNA), (Udali et al., 2013), (cdc.gov, online). Nejčastěji dochází k methylaci v CpG dinukleotidech a v CpG ostrůvcích (Roubroeks et al., 2017). Jde o oblasti s vysokým výskytem CG bází, které se nacházejí hlavně v promotorových oblastech. Methylace vede k inhibici transkripčních faktorů. V lidském genomu je přibližně 29 milionů CpG dinukleotidů a 60–80 % z nich je methylováno. Methylace může být prováděna 3 mechanismy – *de novo* methylací, udržováním methylace a demethylací. Při extrémních změnách v methylaci může dojít až k buněčné smrti (Watson a Goodman, 2002). Nemodifikovaná DNA je methylována pomocí methyltransferas (DNMT). Methyl vázající proteiny jsou exprimovány v embryonálních kmenových buňkách a v nervových prekurzorech. Z této skupiny proteinů je v CNS nejvíce prozkoumán MeCP2, jehož změna vede k rozvoji Rettova syndromu, což je nejčastější forma mentální retardace u žen (Moore et al., 2013). DNMT1 přenáší methylovou skupinu z S-adenosylmethioninu na cytosin do pozice 5 a slouží jako „udržovací“ methyltransferasa (Roubroeks et al., 2017). DNMT3a, b jsou enzymy, které preferují nemethylované CpG dinukleotidy a provádějí *de novo* methylaci (Jin et al., 2011). Dříve se domnívalo, že methylace DNA je spojena pouze s transkripční expresí, bylo ale zjištěno, že hraje důležitou roli i při genovém imprintingu nebo inaktivaci chromozomu X či „umlčování“ transponovatelných elementů. Aktivní demethylací přechází methylovaný cytosin do nemodifikovaného stavu pomocí TET enzymů (ten-eleven translocation), (Roubroeks et al., 2017).

2.2 Sekundární struktura

Vzájemným obtočením polynukleotidových řetězců vzniká sekundární struktura DNA. Jednotlivé báze (A, C, G, T) se mezi sebou komplementárně vážou vodíkovými vazbami. Cytosin se váže s guaninem třemi vodíkovými vazbami (C≡G) a adenin

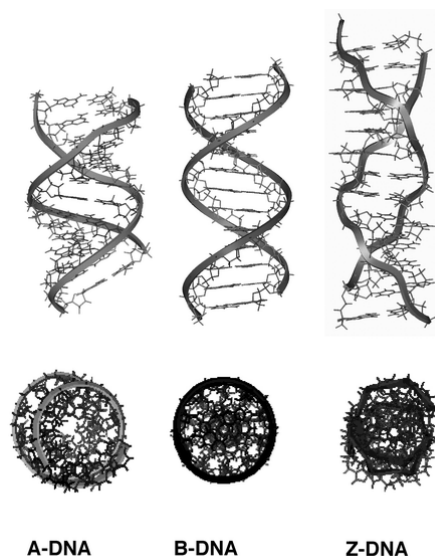
s thyminem dvěma vodíkovými vazbami (A=T), (Alberts et al., 1998). Pravidla párování objevili v roce 1953 vědci James Watson a Francis Crick – Watson-Crickovo párování bází, ke kterému přispěly poznatky o poměru purinů a pyrimidinů, tzv. Chargaffovo pravidlo, které potvrzuje, že poměr mezi purinovými a pyrimidovými bázemi v DNA si je roven (Dahm, 2008). Zásadní informace o struktuře molekul přinesly rentgenové difrakční obrazce, které poskytli Maurice Wilkins a Rosalind Franklinová a další kolegové. Jejich data prokázaly, že DNA je dvouvláknová struktura s opakujícími strukturními podjednotkami v pravidelných vzdálenostech 0,34 nm podél osy molekuly DNA. Na základě Chargaffových údajů a rentgenových difrakčních dat od Wilkinse a Franklinové, došli Watson a Crick k závěru, že se jedná o pravotočivou dvoušroubovici DNA (Snustad et al., 2009).



Obr. 3 Struktura NK (převzato a upraveno; jenabioscience.com, online)

Popis: (2a) dATP - deoxyadenosin trifosfát (2b) dCTP - deoxycytidin trifosfát (2c) dGTP - deoxyguanosin trifosfát (2d) dTTP - deoxythymidin trifosfát

2.3 Alternativní konformace DNA



Obr. 4 Alternativní konformace DNA (převzato, Belmont et al., online)

2.3.1 B konformace DNA

„Klasická“ konformace DNA je B a přišli na ni Watson a Crick. Následně strukturu upřesnili Arnott a Hukins, kteří poskytli soubor atomových souřadnic (Zimmerman, 1982). B-DNA se označuje jako kanonická pravotočivá dvojité šroubovice DNA, která je tvořená dvěma antiparalelními vlákny. Na jeden závit B-DNA připadá asi 10,5 páru bází (bp) na osu šroubovice, ke které jsou téměř kolmo. Tento typ DNA má průměr 20 Å (Ångstrom) nebo také 2 nm a vzdálenost mezi bázemi je 3,4 Å. Ve studii o oligonukleotidových duplexech bylo poukázáno na značnou variabilitu v parametrech u jednotlivých konformací DNA, např. u ohnuté DNA se parametry B-DNA sčítají na délce několika bp a vytvářejí trvale zakřivenou šroubovici (Potaman a Sinden, 2013).

Podle určitých sekvenčních prvků může docházet ke strukturním přechodům do jiných forem DNA. Ostatní struktury (kromě B-DNA) jsou funkčně důležité hlavně pro interakce s proteiny, které se podílejí na replikaci, genové expresi a rekombinaci. Další struktury DNA mohou obsahovat oblasti nepárových vláken nebo mohou být složeny ze tří až čtyř vláken (Potaman a Sinden, 2013). Ústřední roli hrají pentosové kruhy, které jsou spojením mezi bází a fosfátovou páteří. Mohou mít několik různých konformací a ty mohou změnit relativní orientaci fosfátové páteře, báze a 2'-OH ribonukleotidu (Huang et al., 2014).

Jednotlivé změny mají za důsledek „pukliny“ v cukerném kruhu, označované termínem puckering, a to vede k celkovým změnám struktury a funkce NK (Huang et al., 2014). Planární forma pentosového kruhu není energeticky výhodná a kvůli tomu dochází k výchytkám polohy některých atomů z roviny. Atomy C2' a C3' jsou buď nad rovinou, nebo pod. Pokud je atom ve stejné rovině, nazývá se konformace endo a pokud je pod rovinou, jde o konformaci exo (Zgarbová et al., 2018).

2.3.2 A konformace DNA

Významnou alternativní strukturou DNA je pravotočivá A-DNA. Má 11 párů bází na jeden závit šroubovice, ke které jsou báze nakloněny asi o 20°. Vzdálenost mezi bázemi činí 2,55 Å. A-DNA je kratší a širší a má hluboké žlábků jako B-DNA při stejném počtu bází. Oproti stabilní B-DNA dochází u A-DNA k odlišnému vázání kationtů molekul vody. A-DNA byla pozorována za podmínek sníženého obsahu vody (při 75 % relativní vlhkosti) a v roztocích, které obsahují organická rozpouštědla nebo soli o vysoké koncentraci. K přeměně B-DNA na A-formu dochází za snížení obsahu vody (dehydratací) a to v určitých sekvencích. Snadněji se mění při sekvenci obsahující 5'-CC-3' a 5'-ACT-3' a obtížněji se mění v sekvenci 5'-AA-3' (Potaman a Sinden, 2013).

Experimenty s oligonukleotidovými duplexy v krystalech ukázaly, že u B- a A-DNA při mírné změně podmínek může vzniknout řada přechodných struktur. Také byla popsána stabilita A-DNA pomocí skupiny sporulujících bakterií *Bacillus subtilis*. Nukleobáze v A-DNA jsou řádově více odolné na UV záření (ultrafialové, *ultraviolet*) než B-DNA (Potaman a Sinden, 2013).

2.3.3 Z konformace DNA

Další struktura byla nalezena ve střídajících se purin-pyrimidinových sekvencích (CG)_n a (TG)_n (Potaman a Sinden, 2013). Typická struktura pro Z-DNA je střídavý polymer (dC) a (dG), (Dickerson, 1992). Jde o levotočivou strukturu Z-DNA, která má 12 párů bází a vzdálenost mezi párem bází je 3,7 Å. Z-DNA je tenčí než B-DNA a má pouze jeden hluboký, úzký žlábků, který je podobný minoritnímu žlábků v B-DNA. V Z-DNA se na rozdíl od B-DNA opakují místo jednoho páru bází 2 bp. Oproti B-DNA jsou páry bází v Z-DNA nakloněny k ose šroubovice o 180°. Kromě vazby deoxyguanosinu s cukernou

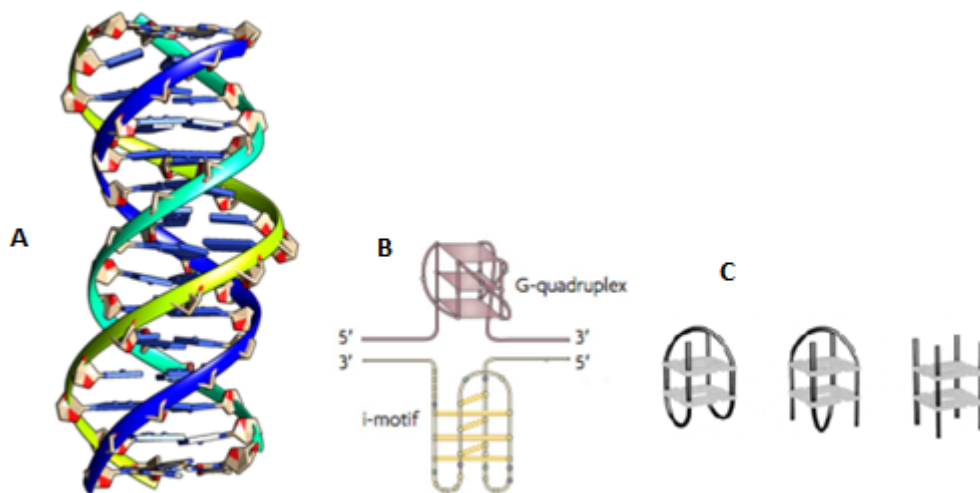
složkou, která zaujímá konformaci syn-, všechny ostatní nukleosidy kolem glykosidické vazby zaujímají v Z-DNA konformaci anti- (Potaman a Sinden, 2013). V dokonalé šroubovici by byla pouze konformace syn-. Avšak u cytosinu nemůže být syn-konformace kvůli stérickému střetu mezi cukrem a cytosinovým kruhem, a proto musí cytosin rotovat zpět do antikonformace a vytváří se tak klikatá páteřní dráha (Dickerson, 1992). Jde o první příklad zbytku přirozeného nukleotidu, který zaujímá polohu syn v oligomerním systému (Zimmerman, 1982). V této molekule má každá druhá báze opačnou konformaci. Střídá se syn- a anti- podél celého řetězce a působí to jako „zigzag“ uspořádání, od kterého také dostala tato molekula pojmenování Z-DNA (Rich a Zhang, 2003).

Elektrostatické interakce hrají klíčovou roli při tvorbě Z-DNA. Některé fosfátové skupiny jsou kvůli zkroucené dráze páteře blíž u sebe a dochází mezi nimi k elektrostatickému odpuzování. Z tohoto důvodu je Z-DNA stabilizována vysokými koncentracemi solí nebo polyvalentními kationty, které jako štít minimalizují interfosfátové odpuzování a Z-DNA je poté stabilní. V článku Riche a Zhanga bylo potvrzeno, že stabilitu Z-DNA lze nastolit i chemickou modifikací, např. methylací cytosinu (Rich a Zhang, 2003). Ke stabilitě Z-DNA dále přispívá negativní nadšroubovicové vinutí DNA (Potaman a Sinden, 2013).

2.3.4 Nekanonické párování bází

Nekanonickou strukturu DNA, nazývanou jako triplex či H-DNA, je trojitá šroubovice DNA, která je tvořena sekvencemi delších úseků purinových nebo pyrimidinových bází, a ty jsou hlavní složkou jednoho řetězce dvojšroubovice DNA. Triplex vzniká z dvoušroubovice DNA, ke které se váže třetí vlákno díky Hoogsteenovu (nekanonickému) párování bází. Intramolekulární triplexy se vytvářejí *in vitro* za nadšroubovicových podmínek v homopurin-homopyrimidinových repeticích a jsou tvořeny v rámci jednoho vlákna. Intermolekulární triplexy vznikají mezi triplex-forming oligonucleotides (TFO) a cílovými sekvencemi dvojité DNA (Frank-Kamenetskii a Mirkin, 1995). Nedávné biofyzikální studie naznačily, že triplexové struktury mohou ovlivňovat expresi různých genů a projázaly schopnost mnoha proteinů se vázat na triplexní DNA (Hu et al., 2017). Kromě trojité šroubovice se Hoogsteenovo párování bází vyskytuje i v G-kvadruplexech (guaninový kvartet), (Travers a Muskhelishvili, 2015). G-kvadruplexy

jsou tvořeny z vláknů bohatého na G, které jsou postavené kolem tetrad guaninů spojených vodíkovými vazbami (Burge et al., 2006). Jde o specifické sekvence, které představují hlavní strukturní motiv na jednovláknových koncích telomer u eukaryot (Travers a Muskhelishvili, 2015). Ve dvouřetězcové formě se vyskytují v i netelomerní genomové DNA především v promotorových oblastech citlivých na nukleasu (Burge et al., 2006). Další struktura, i-motif, je tvořena řetězcem bohatým na C (Travers a Muskhelishvili, 2015).



Obr. 5 (A) Trojitá šroubovice (převzato, Shri Mall et al. 2018, online; (B) G-kvadruplex a i-motif v dvouvláknové DNA (převzato; Travers a Muskhelishvili, 2015) ; (C) Různé stechiometrie vláken G-kvadruplexu (převzato; Simonsson, 2001)

Pozn. (A) - DNA:DNA:DNA triplex – tmavě modré a tyrkysové vlákno = původní dvoušroubovice DNA, Watson-Crickovo párování bází; světle zelené vlákno = TFO – Hoogsteenovo párování bází

2.4 Vyšší úrovně uspořádání

2.4.1 Nadšroubovicové vinutí

DNA slouží i jako zásobárna energie pro usnadnění přenosu RNA polymeras a DNA. Enzymatická a chemická manipulace s DNA ovlivňuje torzní stav DNA a dochází k přechodu do stočené konformace. Jde o nadšroubovicové vinutí (Travers a Muskhelishvili, 2015). Nadšroubovicové vinutí je základní vlastností DNA, které

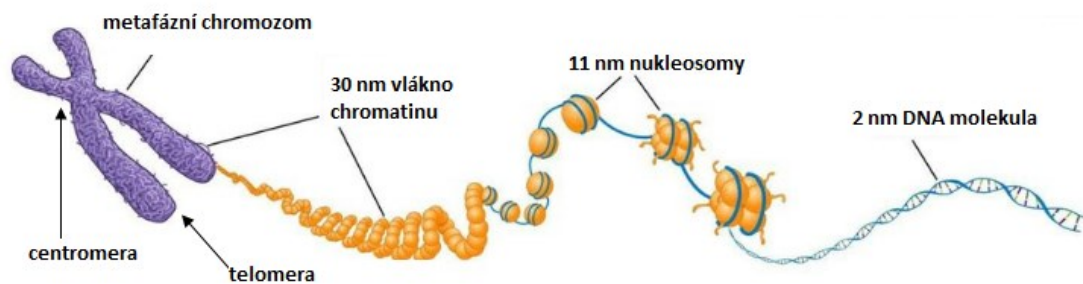
pomáhají korigovat topoisomerasy a polymerasy. Kromě stability může nadšroubovicové vinutí ovlivňovat i strukturu DNA. Pozitivní nadšroubovicové vinutí spočívá v přijímání pravotočivé šroubovicové konformace (struktury) a tím dochází ke zvýšení volné energie v molekule DNA. Jde tedy o navíjení ve stejném směru jako je šroubovice DNA (např. B-DNA), pokud dojde k přijetí pravotočivé struktury Z-DNA, která je levotočivá, jde o negativní nadšroubovicové vinutí. Při navíjení v opačném směru se vytváří záporné superzávity, které jsou produktem svinování nebo ohýbání DNA. Každých 10 bp dochází k tvorbě superzávitů a zvýšení energie. Úloha topoisomeras je klíčová, uvolňuje torzní napětí a tím udržuje DNA v transkripčně kompetentním stavu (Vosberg et al., 1985), (Gilbert a Allan, 2014).

Enzymatické ovlivnění DNA může mít dvě formy. Buď se enzym přímo naváže na jedno místo a mění svinování, nebo může být vinutí změněno pohybem proteinového komplexu, např. RNA polymerasou. Enzym DNA gyrasa, bakteriální topoisomerasa, zavádí negativní nadšroubovicové vinutí do DNA, čímž ulehčuje separaci vláken v důležitých sekvencích a nárůst energie v DNA (Travers a Muskhelishvili, 2015).

2.4.2 Chromatin

U eukaryot je DNA v jádru rozdělena mezi sadu chromozomů, která se skládá z lineární molekuly DNA, na které jsou navázány proteiny se schopností svinout vlákno DNA do kompaktnější struktury – chromatinu (Alberts et al., 1998). Proteiny navázané na DNA jsou buď bazické – histony, nebo kyselé – nehistonové chromozomové proteiny. Čtyři typy bazických histonů (H2A, H2B, H3 a H4) tvoří základní strukturní podjednotky kondenzace chromatinu – nukleosomy (Snustad et al., 2009). Histony jsou tvořeny lysinem a argininem (kladné AMK), a proto jsou schopny navázat negativně nabitou DNA. Jádro nukleosomu je tvořeno oktamerem histonů, kolem kterého je obtočená DNA. DNA spojující nukleosomy mezi sebou má 8–114 nukleotidových párů. DNA obalující nukleosom má 146 nukleotidových párů. Vzniká interfázní chromatinové vlákno o průměru 11 nm (Snustad et al., 2009). V živých buňkách převažuje kompaktnější struktura chromatinu – 30 nm chromatinové vlákno s poskládanými nukleosomy, než forma „korálků“ na vláknu DNA. Další úrovní kondenzace je tvorba smyček, které jsou připojené k centrální ose (Alberts et al., 1998). Nejkondenzovanější

formou eukaryotických chromozomů jsou metafázní chromozomy, které vznikají kondenzací 30 nm vlákna pomocí nehistonových chromozomových proteinů. Funkcí metafázních chromozomů je organizace a sbalování velkých molekul DNA do struktur, které se lépe segregují do dceřiných jader (Snustad et al., 2009).



Obr. 6 Úrovně kondenzace DNA v chromozomech (převzato, upraveno; Snustad et al., 2009)

Pozn. Centromera = zaškrcená oblast chromozomu, ve které se vyskytují tandemové repetitivní sekvence; telomera = konce chromozomů, které jsou tvořeny repeticemi o 6 nukleotidů (obratlovci – 5'-TTAGGG-3')

2.5 Funkce DNA

Hlavní funkcí DNA je uchování genetické informace a její přenos pro následující generace. Kromě uchování genetického kódu je potřebná pro biosyntézu proteinů. Genetický materiál musí v zásadě plnit tři základní funkce – genotypovou (replikace), fenotypovou (genová exprese) a evoluční (mutace), (Snustad et al., 2009). Funkce fenotypová je dána asi třemi miliardami párů bází v každé lidské buňce, které kódují syntézu asi 100 000 proteinů (Kooman a Rohm, 2012).

Lidská DNA se skládá z kódujících (exony) a nekódujících sekvencí (introny). U vyšších eukaryot je jen malá část z celého genomu, která je určena pro syntézu proteinů. Kódující sekvence jsou uloženy v exonech a ty mají průměrnou délku kolem 200 nukleotidů (Jurica a Roybal, 2013).

Dvoušroubovice DNA má jedno vlákno kódující proteiny a druhé nekódující. Kódující vlákno, paměťové či pozitivní, slouží jako matrice. Má stejnou sekvenci jako výsledná mRNA (messenger RNA) a nedochází u něj k transkripci (Shabalina a

Spiridonov, online). Antikódující vlákno, templátové či negativní, transkripcí tvoří pre-mRNA (prekurzorová mRNA) nebo hnRNA (heterogenní jaderná RNA – vznik v jádře), jinak také primární transkript (Hoy, 2019).

2.5.1 Kódující DNA

Replikace DNA

U replikace obě dvě vlákna slouží jako templátové pro syntézu nových (dceřiných) řetězců. Tento děj se skládá ze tří částí – iniciace, elongace a terminace. Iniciace replikace DNA začíná na replikačním startovacím místě ori (origin – počátek), který má specifickou sekvenci (Snustad et al., 2009). Lidský genom má přibližně 10 000 počátků (Parker et al., 2017).

Díky enzymu DNA gyrasa (typ topoisomerasy II) dojde k narušení dvoušroubovicové struktury (Reece a Maxwell, 2008). Za využití energie z hydrolýzy ATP uvolňují nadšroubovicovou DNA a tvoří negativní nadšroubovicové vinutí (Snustad et al., 2009). Poté je DNA helikasa schopna rozvinout DNA narušením vodíkových vazeb u komplementárně spárovaných nukleotidů. V replikačních počátcích se typicky vyskytují A-T páry, které jsou snadněji rozpojitelné oproti G-C párům. DNA helikasa se posouvá po vláknu a rozvolňuje ho, aby mohl začít fungovat hlavní enzym replikace - DNA polymerasa. Po rozvolnění vlákna může začít DNA polymerasa syntetizovat nové vlákno podle původní předlohy (Alberts et al. 1998). V *E. coli* existují alespoň čtyři DNA polymerasy s různými vlastnostmi a nejvýznamnější je DNA-polymerasa III, protože má polymerasovou aktivitu 5'→3', exonukleasovou aktivitu 3'→5' a exonukleasovou aktivitu 5'→3' (pro jednořetězcovou DNA). U eukaryot je přibližně 13 DNA polymeras, které se označují řeckými písmeny α , β , γ , δ apod. V replikaci má největší uplatnění DNA polymerasa α a δ (Snustad et al., 2009). V replikační vidličce jsou dvě DNA polymerasy, jedna na vedoucím řetězci a jedna na váznoucím (opožďujícím), (Alberts et al. 1998). Pokud DNA polymerasa narazí na chybné párování 3'-konce primeru, chyby opraví díky exonukleasové aktivitě 3'→5' (pokud je neopravila v průběhu) a vyjmuté báze dosyntetizuje ve směru 5'→3'.

Polymerasa není schopna sama začít replikaci, a proto je potřeba primasy, která syntetizuje krátký RNA primer (u eukaryot asi 10 nukleotidů). Na 3'-OH konec primeru

se připojí DNA polymerasa (δ) a nastane fáze elongace (Burgers, 1998). Dvoušroubovice DNA má opačnou chemickou polaritu, takže jedno vlákno se prodlužuje ve směru 5'→3' (vedoucí) a druhé ve směru 3'→5' (opoždující). Syntéza opoždujícího vlákna probíhá přerušovaně, takže vznikají krátké fragmenty, které byly pojmenovány po objevitelích – Okazakiho fragmenty. U eukaryot mají Okazakiho fragmenty délku 100–200 nukleotidů (prokaryota 1000–2000). Ty jsou spojovány pomocí DNA ligasy, která katalyzuje kovalentní vazby a dojde k zacelení mezer mezi fragmenty a vzniku celistvého řetězce (Snustad et al., 2009). Na vlákně je DNA polymerasa přidržována pomocí svíracího proteinu (sliding clamp), který jí umožňuje se posouvat po vláknu. Další důležité proteiny, které jsou součástí replikačního aparátu jsou SSB proteiny (single-strand binding proteins). SSB proteiny chrání jednořetězcovou DNA před znovuspárováním (Alberts et al. 1998).

Konec replikace (terminace) nastává, když se replikační vidlička setká s jinou vidličkou nebo pokud polymerasa dojde na konec molekuly (Snustad et al., 2009).

Transkripce DNA

Proces transkripce byl poprvé pozorován pomocí elektronových mikrofotografií v roce 1970 (Shabalina a Spiridonov, online). Při transkripci vzniká z dvouřetězcové DNA jednořetězcová molekula mRNA (Clancy, 2008). U vyšších organismů má schopnost kódovat proteiny méně než 3 % genetických transkriptů (Li a Liu, 2019).

Nejprve dojde k rozvolnění dvoušroubovice pomocí DNA dependetní RNA polymerasy, která se postupně pohybuje podél DNA (Schier a Taatjes, 2020). RNA polymerasa katalyzuje tvorbu diesterových vazeb, které spojují nukleotidy dohromady a vzniká lineární řetězec pre-mRNA (Reines et al., 1996). U eukaryot jsou tři typy RNA polymerasy - I, II a III (Schier a Taatjes, 2020). Syntéza mRNA je zprostředkována díky RNA polymerase II, (enzymu o 12 podjednotkách), (Reines et al., 1996) promotoru a transkripčním faktorům řídící iniciaci - TFIID (transkripční faktor II D) nebo TFIIF (transkripční faktor II F) a řídící elongaci DSIF (DRB sensitivity inducing factor) ad., (Schier a Taatjes, 2020). Transkripce se dělí do třech stádií: iniciace, elongace a terminace s následným uvolněním vzniklé pre-mRNA (Snustad et al., 2009). Pomocí sigma faktoru rozezná RNA polymerasa promotor v DNA a po určitém počtu vytvořených ribonukleotidů se uvolní a řetězec se dostává do fáze elongace (Snustad et

al., 2009). Promotor se nachází před transkripčním začátkem a je to například TATA-box (sekvence TATAAAA), kde se v sekvenci opakují báze A a T. TATA-box spolu s TATA box binding proteinem jsou nejúčinnějším transkripčním mechanismem (Liu et al., 2013), (Parra-Marin et al., 2020). Dalším konzervativním elementem je CAAT-box, CG-box a oktamerový box. Kromě transkripčních faktorů ovlivňují iniciaci také regulační sekvence tzv. tlumiče a zesilovače (Snustad et al., 2009). Enzym se u eukaryot pohybuje rychlostí přibližně 20 nukleotidů za sekundu a za hodinu může být vytvořeno až 1000 transkriptů (Reines et al., 1996).

Po ukončení iniciační fáze nastává fáze elongační. Vznikající vlákno se postupně transkribuje podle templátové DNA. Dochází k modifikaci 5'-začátku pre-mRNA, kam se přidá 7-methylguanosenová čepička, která má 5'-5'-trifosfátovou vazbu a dvě a více methylových skupin. Slouží především jako ochrana vznikajícího řetězce před napadením nukleasami. RNA polymerasy I a III reagují na terminační signály, podobně jako tomu je u prokaryot, takže pokud na ně transkripční komplex narazí, rozpadne se a uvolní pre-mRNA. V okamžiku, kdy se RNA polymerasa II dostane 11 až 30 nukleotidů od sekvence AAUAAA, dojde k rozštěpení pomocí endonukleas. Po odštěpení se na 3'-konec přidá polymerasou úsek poly(A) - až 200 zbytků AMP. Tento děj se nazývá polyadenylace. Koordinací těchto reakcí a díky stimulačnímu faktoru, který váže sekvenci bohatou na GU blízko transkripční jednotky, dochází ke stabilitě nově vzniklé pre-mRNA. Polyadenylace hraje zásadní roli při transportu mRNA z jádra do cytoplazmy (Snustad et al., 2009). Mediátorové RNA, pre-mRNA (hnRNA) je sestřiháváno dvoustupňovými reakcemi, které jsou prováděny spliceosomy (ribonukleotidový komplex), (Alberts et al., 1998).

Translace

Translace se odehrává v cytoplazmě a je druhou fází genové exprese, v níž vzniklá mRNA je připravená na okamžitý překlad na aminokyseliny. Genetický kód je složen z tripletů sousedících ribonukleotidů (Hoy, 2019). Proteosyntézy se účastní ribosomy, tRNA a soubor enzymů, hlavně aminoacyl-tRNA-syntetasa, která katalyzuje připojení jednotlivých AMK ke správné molekule tRNA a iniciační, elongační a terminační faktory (Hoy, 2019). Každá AMK je určována kodonem, který se skládá ze tří ribonukleotidů. Z 64 tripletů ribonukleotidů jsou dva triplety považovány za iniciační,

tři za terminační a 61 tripletů kóduje AMK. Iniciační kodon má triplet AUG a kóduje methionin. Triplet GUG je alternativní iniciační kodon a kóduje valin (Snustad et al., 2009). Terminační kodony jsou UAA, UAG a UGA a není jim přiřazena žádná aminokyselina. Jakmile na ně translační podjednotky narazí, uvolní se nově vytvořený protein (Hoy, 2019).

Ribosomy se skládají ze dvou podjednotek, z větší a menší, a jsou složeny z rRNA (ribosomální RNA) a proteinů. Jejich velikost se udává v jednotce Svedberg (rychlost sedimentace při centrifugaci). Větší jednotky se u eukaryot pohybují mezi 80–60 S a menší 30–40 S (Snustad et al., 2009). Větší jednotka se skládá ze tří rRNA o velikostech 5 S, 5.8 S, 25 S a dalších 46 proteinů a menší podjednotka se skládá pouze z jedné rRNA a 33 proteinů (Hoy, 2019), (Ben-Shem et al., 2011).

Antikodon tRNA se páruje s kodonem mRNA pomocí vodíkových vazeb. tRNA pozná začátek translace podle 5'-čepičky mRNA, naváže se a začne hledat iniciační kodon. Methionyl-tRNA-syntetasa interaguje s počátečním kodonem AUG z mRNA za pomoci iniciačních proteinů (Hoy, 2019). Ribosom má tři vazebná místa pro tRNA a jedno pro mRNA. V Prvním kroku se na A vazebné místo naváže aminoacyl-tRNA, ve druhém kroku vznikne v P-místě peptidická vazba. Malá podjednotka ribosomu se posune o 3 ribonukleotidy dál a uvolní tRNA. Z A-místa se přesune tRNA na P-místo a z P-místa na E-místo. Poté nastává fáze elongace a pomalu roste polypeptidový řetězec od N-konce (amino konce) do C-konce (karboxylového konce). Translační podjednotky narazí na terminační kodony, stop kodony, a začne konečná fáze proteosyntézy. Nakonec se do cytoplazmy uvolní nově vytvořený protein (Alberts et al., 1998). Aby byl celý proces rychlejší, nasedá na mRNA několik ribosomů současně. Jde o tzv. polyribosomy, které jsou od sebe vzdáleny asi 80 nukleotidů (Alberts et al., 1998).

2.5.2 Nekódující DNA

Přibližně 97 % DNA bylo dříve označováno za odpadní DNA neboli „junk DNA“, protože u nich nebyla zjištěna žádná funkce. Dnes je ale jasné, že i když takové sekvence nekódují proteiny, mají důležité biologické funkce, především regulační (Wong, online). Řadí se sem sekvence, které se přepisují na funkční molekuly RNA (např. rRNA, tRNA – transferové RNA, snRNA - malé jaderné RNA), dále regulační oblasti, které řídí expresi genů (např. promotory, zesilovače a tlumiče – enhancery a

silencery), nebo počátky replikace a také repetice, které určují strukturu na chromozomální úrovni (např. telomery a centromery) a nakonec transpozony a pseudogeny (Palazzo et al., 2014).

Podle Gencode v17 (katalog intronových oblastí lidského genomu) tvoří přibližně 40 % genomu právě intronové oblasti (Derrien et al., 2012). Lidské geny obsahují introny, které mají průměrně přes 11 000 nukleotidů o různých délkách (Jurica a Roybal, 2013). Introny se z primárního transkriptu vystřihávají (splicing DNA). I přesto, že sestřih je velmi přesným mechanismem, právě zde dochází k největším chybám, které způsobují mutace a následnou nefunkčnost proteinu a snižují integritu genomu (Snustad et al., 2009).

Funkční molekuly rRNA, tRNA mají hlavní roli při translaci proteinů. Molekula **tRNA** má asi 80 nukleotidů a strukturou připomíná jetelový list. Trojlístek se dál balí do konečné struktury ve tvaru písmene L. Nachází se zde antikodon, což jsou 3 nukleotidy komplementární ke kodonu mRNA a na 3'-konci je připojena AMK specifická pro určitou tRNA. Pro některé AMK existuje více tRNA a některé tRNA vážou více kodonů (Alberts et al., 1998). Syntéza **rRNA** probíhá v jadérku a je katalyzována RNA polymerasou I (Snustad et al., 2009). Molekula rRNA spolu s proteiny tvoří velké a malé translační podjednotky ribosomů (Alberts et al., 1998). Další typ molekuly RNA je krátká jednovláknová **miRNA** (mikro RNA) o velikosti 10–22 nukleotidů. Jejich funkcí je odštěpovat malé prekurzorů ve tvaru vlásenek a blokovat expresi mRNA zajištěním jejich degradace nebo represe jejich translace. Posledním typem je **snRNA**, které jsou strukturální složkou spliceosomů, které vyštěpují introny (Snustad et al., 2009).

2.5.2.1 Transponovatelné elementy

Transponovatelné elementy (TE) jsou repetitivní sekvence rozptýlené po genomu, které mají zásadní vliv na strukturu a funkci savčích genomů. Dříve byly označovány za „skákaající“ geny (jumping genes) a řadily se do „junk DNA“, protože se nachází v intronech (Richardson et al., 2015). Kopie TE jsou přítomny ve více kopiích a po celém genomu. TE tvoří nejméně 46 % lidské DNA a 37 % myši (Munoz-Lopez a Garcia-Perez, 2010). TE elementy se dělí podle toho, jestli se mobilizují prostřednictvím DNA (DNA transpozony) nebo RNA (retrotranspozony). Mohou se dělit podle schopnosti kódovat proteiny, které zprostředkovávají jejich vlastní mobilitu (autonomní elementy), nebo

pokud pro svou mobilitu musí spoléhat na proteiny kódované jinými elementy (neautonomní elementy), (Beck et al., 2011).

DNA transpozony

DNA transpozony se přesouvají z místa na místo mechanismem „cut and paste“ (vystříhnout a vložit) nebo replikací transpozonu. Tvoří 3 % lidského genomu (Callinan a Batzer, 2006). Nejčastěji využívaný enzym transponasa, vyštěpí konce transpozonu z původního vlákna. Konce mají na sobě navázané invertní repetice (TIR, terminal inverted repeats), které obklopují otevřený čtecí rámec pro kódování transponasy. Sekvence se přeloží na mRNA a v cytoplazmě prochází translací, které vede ke vzniku proteinu transponasy. Příkladem transpozičního proteinu je eukaryotický DNA transpozon Sleeping Beauty. Transponasa se naváže na TIR (3'-OH), vystříhne a přenesse repetitivní sekvenci na nové specifické místo v genomu, které transponasa rozštěpila (Munoz-Lopez a Garcia-Perez, 2010). Po spojení transpozonu s novou částí DNA přijde na řadu DNA polymerasa, která dosyntetizuje mezery (Serrato-Capuchina a Matute, 2018). V lidském genomu jsou označovány za „fosílie“ - neaktivní molekulární řetězce (Richardson et al., 2015).

Retrotranspozony

Retrotranspozony převládají v savčím genomu a tvoří asi 40 % sekvence DNA. Mobilizují se prostřednictvím meziprojektu RNA, který je reverzně přepsán enzymem RNA polymerasou a poté reverzní transkriptasou do cDNA (complementary DNA), procesem retrotranspozice (Callinan a Batzer, 2006), (Richardson et al., 2015). Tento mechanismus se označuje jako Target Primed Reverse Transcription (TPRT) a jeho cílem je šířit retrotranspozony do nových míst v chromozomu (genomu).

Retrotranspozony se dělí na základě jejich mobilizace na LTR (*long terminal repeats*) a non-LTR retrotranspozony (Callinan a Batzer, 2006) a také podle jejich velikosti na SINE (short interspersed element) a LINE (long interspersed element) elementy (Richardson et al., 2015).

LTR elementy

Dlouhé terminální repetice retrotranspozonů se často označují za endogenní retroviry (ERV - endogenous retroviruses). HERV (human endogenous retroviruses –

lidské) a jejich neautonomními deriváty jsou přítomny ve více než 450 000 kopiích lidského genomu, což tvoří asi 8 % všech kopií v lidské DNA (Richardson et al., 2015). LTR má dva konce o délce 250–600 bp a mezi nimi je dlouhá vnitřní doména o velikosti 5–7 kbp (kilobází), která kóduje bílkoviny (Zhang et al., 2014). Transponují se mechanismem „copy and paste“ (Richardson et al., 2015), ale jelikož obsahují nefunkční gen pro virový obal (*env*), nebo ho vůbec nemají, nemohou opustit hostitelskou buňku (Loon Ooi a Boeke, 2004). V lidském genomu jsou LTR elementy považovány za fosílie a nemohou podléhat autonomní retrotranskripci (Richardson et al., 2015). I přesto mohou ovlivňovat genom savců a to hlavně v rámci transkripce nebo sestřihu mRNA (Beck et al., 2011).

Non-LTR elementy

Lidský genom je plný non-LTR retrotranspozonů (Grandi a An, 2014). Tyto elementy jsou jediné aktivní autonomní retrotranspozony, které zajišťují intra- a interindividuální genetickou rozmanitost (Richardson et al., 2015). Non-LTR elementy se dělí na SINE a LINE elementy. Oba typy se mobilizují mechanismem „copy and paste“ pomocí meziprojektu RNA (Grandi a An, 2014).

LINE elementy

Hlavní skupinou, které tvoří přibližně 1/6 lidského genomu, jsou LINE-1 elementy (Beck et al., 2011), které zabírají asi 17 % lidského genomu, což je asi 500 000 kopií L1 (Richardson et al., 2015). LINE jsou dlouhé autonomní retrotranspozony, které kódují enzymatický mechanismus potřebný pro jejich šíření (Callinan a Batzer, 2006). L1 jsou hlavním zdrojem reverzní transkriptasy, na které jsou závislé další retrotransponovatelné elementy (Callinan a Batzer, 2006).

Aktivní L1 elementy mají délku přibližně 6 kbp (Callinan a Batzer, 2006). L1 jsou ohraničeny nepřekládanou oblastí (UTR – untranslated region), které chrání L1 na obou koncích. 3' konec se vyznačuje poly(A) sekvencí nebo 3' tandemovými repeticemi a jsou transkribovány z promotoru v prvních nukleotidech elementu (v UTR). Aktivní LINE mnohdy vedou ke vzniku 5' zkrácených kopií, které vznikly inverzí nebo bodovými mutacemi (Beck et al., 2011), (Jiang et al., 2014). Jelikož je většina LINE inaktivována z důvodu neúčinnosti zpětné transkripce, tak ORF (otevřený čtecí rámec, *open reading frame*) kódující transpoziční mechanismus je mutacemi vyřazen z činnosti. LINE se

skládá ze dvou čtecích rámců – ORF1 a ORF2 (Jiang et al., 2014). ORF1 kóduje protein ORF1p (40 kDa), který je nezbytný pro retrotranspozici a má chaperonovou aktivitu. ORF2 kóduje protein ORF2p (150 kDa), který má endonukleasovou aktivitu a aktivitu reverzní transkriptasy (Beck et al., 2011).

L1 elementy jsou přímo i nepřímo zodpovědné za většinu onemocnění způsobené retrotransponovatelnými elementy. Nadměrné šíření těchto elementů má za následek onemocnění, která způsobují v genech *de novo* inserce a ty poté narušují RNA splicing atd. (Callinan a Batzer, 2006).

Pseudogeny

Buněčné mRNA mohou příležitostně využívat L1 proteiny k mobilizaci na nová místa v genomu nebo je využít pro tvorbu zpracovaných pseudogenů (processed pseudogenes). V lidském genomu existuje asi 8000–15000 zpracovaných kopií pseudogenů a podstatná část z nich pochází z vysoce exprimovaných genů zárodečné linie, jako jsou třeba housekeepingové geny nebo geny ribosomálních proteinů. Většina zpracovaných pseudogenů je ale nefunkční už od samého vzniku, protože jim chybí funkční promotor. Mohou sloužit jako molekulární hodiny k odhadování míry mutací určitých druhů nebo mohou sloužit jako zdroj malých interferujících RNA (siRNA) s regulačními funkcemi (Beck et al., 2011). Podílejí se na vzniku interindividuální genomové rozmanitosti a mohou si získat buněčnou funkci. Příkladem jsou nezávislé retrotranspozice zprostředkované L1 (cyklofilin), které vedou k produkci fúzního proteinu (TRIM5/cyklofilin), který dokáže omezit mobilitu HIV viru u opic (Richardson et al., 2015).

SINE elementy

SINE elementy jsou krátké a neautonomní retrotranspozony. U lidí jsou hlavními SINE elementy - Alu elementy a SVA (SINE/VNTR/Alu) elementy. U myší to jsou B1 a B2 elementy (Richardson et al., 2015). Kromě myší a lidí se tyto elementy vyskytují i u hub, hmyzu, ptáků a rostlin. V genomu se šíří mechanismem TPRT za pomoci LINE aparátu (Jiang et al., 2014). Typický SINE element se skládá ze tří typů krátkých transkriptů – tRNA, 5S rRNA nebo 7SL RNA. ORF1p nebo ORF2p mají schopnost mobilizovat neautonomní retrotranspozony a přesunout mRNA na nová místa v genomu. SINE elementy jsou typicky zakončeny poly(A)sekvencí, nebo jsou

obklopeny duplikáty cílového místa (TSD – target site duplications), (Jiang et al., 2014) a nebo interagují s L1 endonukleasou (Richardson et al., 2015). Vnitřní doména SINE je jedinečná a nemá kódovací schopnosti. Zatím byly popsány pouze 4 takové domény – CORE (obratlovci), V (ryby), Deu (druhouští), Ceph (hlavonožci), (Jiang et al., 2014).

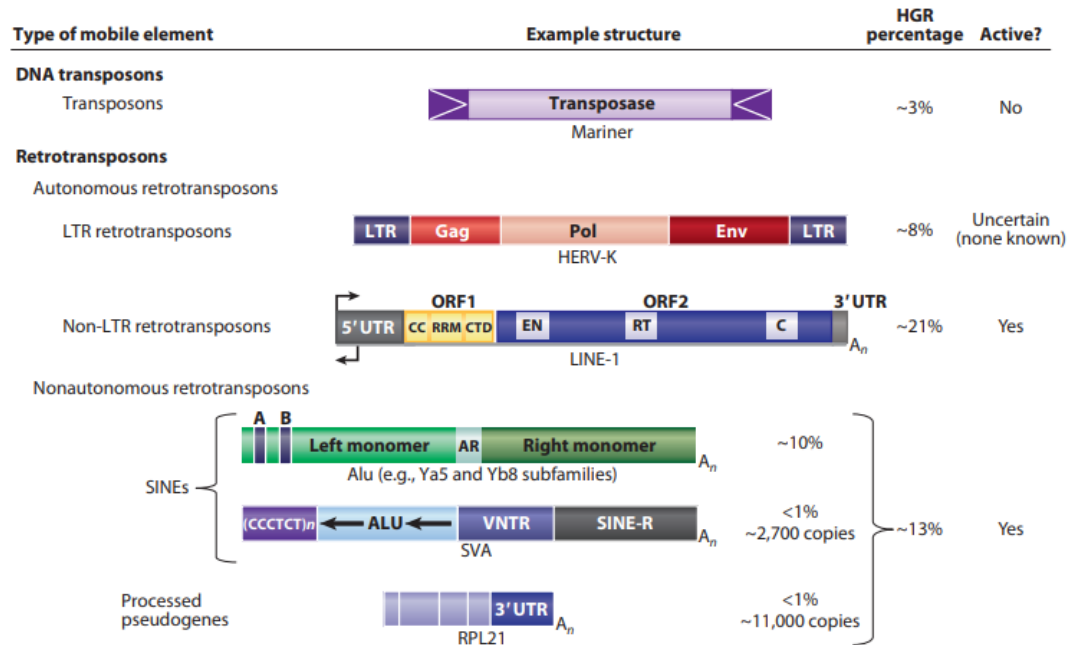
SVA elementy

Původně se tyto elementy označovaly SINE-R a dnes se označují zkratkou podle hlavních složek – SINE, VNTR (variable number of tandem repeats), Alu (Jiang et al., 2014). V lidském genomu jich je přibližně 1750–3500 (Callinan a Batzer, 2006). SVA elementy jsou přibližně 1,5 kbp (až 2 kbp – Richardson et al., 2015) dlouhé a skládají se z několika opakujících se elementů. Opakujícími elementy může být repetice (CCCTCT)_n, anti-sense Alu a jiné variabilní počty tandemových repetic, které jsou na 5' koncích. SVA elementy mají na svých 3' koncích sekvence bohaté na adenosin a ty jsou obklopeny krátkými repeticemi (Jiang et al., 2014), (Callinan a Batzer, 2006). SVA elementy jsou transkribovány RNA polymerasou II (Richardson et al., 2015). Vnitřní doména se skládá ze sekvencí podobné Alu, jde o VNTR oblasti a SINE oblasti o délce asi 490 bp. Berou se za neautonomní retrotranspozony, a proto pro svou mobilizaci potřebují proteiny kódující L1 (trans), (Jiang et al., 2014). Nedávné studie také prokázaly, že SVA elementy mohou měnit expresi sousedních genů (Richardson et al., 2015).

Alu elementy

Alu elementy tvoří asi 11 % savčích genomů a jsou přítomny ve více než 1 milionu kopií (Richardson et al., 2015). Aktivní Alu elementy mají asi 250 bp (Beck et al., 2011), (300 bp – Richardson et al., 2015). Jsou tvořeny 2 monomerními 7SL RNA částicemi, které jsou odvozené od částic přijímající signály (SRP – signal recognition particle). Studie prokázaly, že pro účinnost retrotranskripce je nezbytná interakce Alu elementů s protein rozpoznávajícím signálem SRP9 a SRP14 (Richardson et al., 2015). Alu element je tvořen dimerní strukturou a pravý a levý monomer jsou od sebe odděleny sekvencí bohatou na adenosin. Levý monomer obsahuje interní promotor RNA polymerasu III, který má sekvence v A a B boxu. Pravý monomer je zakončen poly(A)sekvencí (Beck et al., 2011). Alu elementy vykazují vysokou míru polymorfismu.

V lidské linii se odhaduje 7000–9000 Alu inzercí, je tedy naprosto předvídatelné, že způsobují mnohá lidská onemocnění (Callinan a Batzer, 2006).



Obr. 7 Třídy transponovatelných elementů v lidském genomu (převzato; Beck et al., 2011)

Pozn.: HGR – humangenome reference sequence = referenční sekvence lidského genomu

3. POŠKOZENÍ DNA

Poškození DNA vyúsťuje ke vzniku epimutací a mutací, při nichž dochází ke změnám v sekvencích DNA. Změny jsou způsobené záměnami normálních párů bází nebo jejich odstraněním či přidáním (Bernstein et al., 2013).

Podle původu můžeme dělit poškození do dvou hlavních skupin, na endogenní a exogenní (Chatterjee a Walker, 2017). Podstatná většina endogenních poškození DNA vzniká z meziproductů při redukci kyslíku, které napadají báze a deoxyribosyl v DNA. Kyslíkaté radikály se spojují s bázemi za vzniku DNA adduktů. Pokus o replikaci DNA adduktů vede k mutaci nebo apoptose (Marnett, 2000). Kromě oxidačního poškození je DNA destruováno spontánní nebo indukovanou deaminací (Chatterjee a Walker, 2017). Mezi typy endogenního poškození patří mimo jiné addukty některých intermediátů, např. propanolu, malondialdehydu nebo estrogenu, alkylované báze a addukty vytvořené aktivními karbonylovými formami (Bernstein et al., 2013).

K exogennímu poškození DNA dochází působením fyzikálních, chemických, environmentálních či biologických činitelů. Mezi ně patří UV záření (ultrafialové záření), ionizující záření, alkylační činidla nebo síťovací činidla (Chatterjee a Walker, 2017). V přírodě se za nejvíce rozšířené činidlo považuje UV záření. Zbytky záření vyvolávají až 100 000 lézí na exponovanou buňku za hodinu (Jackson a Bartek, 2009). Mezi agresivně působící látky na DNA se dále řadí polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a aromatické aminy (Chatterjee a Walker, 2017). I přesto, že v buňce minimalizují chyby opravné dráhy, tak i při jejich činnosti dochází k tvorbě mnohých mutací, zlomů a fatálních chyb, které DNA nenávratně poškozují (Bernstein et al., 2013).

3.1 Deaminace bází

Deaminace bází je hlavním zdrojem spontánních mutací v lidských buňkách. Cytosin, adenin, guanin i 5-methylcytosin (5-mC) ztrácejí svůj exocyklický amin a mění se v uracil, hypoxanthin, xanthin a thymin (Chatterjee a Walker, 2017). Rychlost deaminace bází závisí především na teplotě, pH ale také na složení pufru (Lindahl a Nyberg, 2002).

Při vysokých teplotách dochází v roztoku DNA k pomalé akumulaci změn v kovalentní struktuře. Primárně jsou zasaženy citlivá místa, N-glykosidické vazby

(Lindahl a Nyberg, 2002), deaminace aminové skupiny N8 vede k hydrolýze (Labet et al., 2008). Z jednovláknové i dvouvláknové DNA se uvolní puriny a pyrimidiny. Deoxyribosa již není „uzamčena“ ve formě furanosy a může být přítomna i jako volná reaktivní aldehydová forma, a to je podnětem pro vznik různých typů sekundárních lézí, příčných vazeb a zlomů v řetězci DNA (Lindahl a Nyberg, 2002).

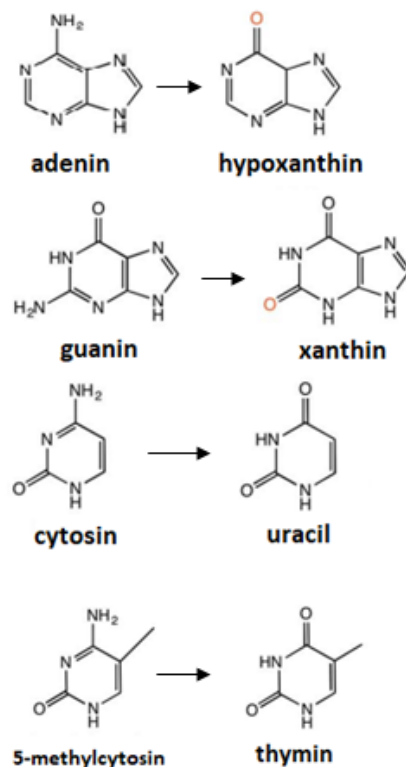
Nejvíce termolabilní bází je **cytosin** kvůli své zvýšené citlivosti na hydrolýzu v kyselém, bazickém i neutrálním roztoku. Proto je mnohem více spojován se vznikem mutací než guanosin a adenosin, u kterých je deaminace při stejných podmínkách nedetekovatelná (Lindahl a Nyberg, 2002). Zvýšená citlivost cytosinu na teplotu (a pH) je důvodem, proč velmi ochotně podléhá deaminačním reakcím (Lewis et al., 2016). Další údaje potvrdily, že rychlost deaminace cytosinu závisí na struktuře DNA (v ssDNA probíhá deaminace cytosinu asi 140x rychleji než v dsDNA) a na stupni protonizace cytosinu (Frederico et al., 1990). Cytosin se nativně páruje s guaninem (C-G) a následně se pár bází mění na uracil a adenin (U-A). V dalším kole replikace dojde ke vzniku páru C-G a poté k T-A mutaci. Promutagenní pár G-U je příčinou přechodu páru G-C na mutagenní T-A, pokud nedojde k opravě, před následující replikací (Yonekura et al., 2009).

Enzymy, které modifikují DNA (např. DNA methyltransferasy), se zaměřují na cytosinové pozice C4 a C6 pro jejich náchylnost k nukleofilní substituci. Pozice C5 je přístupná pro alkylaci či oxidaci. V dvoušroubovici DNA pozice C5 a C6 leží v hlavním žlábků a není zatížena Watson-Crickovými interakcemi. Pozice C6 má elektrofilní charakter, který z ní dělá klíčový cíl modifikujících enzymů (Nabel et al., 2012). Deaminace cytosinu se řadí do „heat mutagenesis“, z čehož vyplývá, že u této reakce je důležité, při jaké teplotě probíhá. Podle Lewis et al. (2016) při vyšších teplotách vzniká mnohem vyšší procento mutací. Je tedy otázkou, jak hodně ovlivní zvyšující se teplota Země, v rámci globálního oteplování, tvorbu mutací způsobující vážná lidská onemocnění (Lewis et al., 2016).

Methylace zbytků cytosinu v poloze 5 je nejznámější modifikací báze v DNA všech obratlovců (Ehrlich et al., 1990). Zbytky **5-methylcytosinu** (5-mC) jsou deaminovány na thymin a ten nelze pomocí reparačních systémů opravit nebo vyjmout, a proto jsou velkými adepty na spontánní mutace. 5-mC zbytky jsou často označovány za tzv. hotspots neboli „horká místa“ (Šponer et al., 2004). Domněnka o hotspots pro tvorbu

mutací byla prokázána v genu *lacI* u *Escherichia coli* (Duncan a Miller, 1980) a následně také u lidských zárodečných a somatických buněk (Shen et al., 1994). Většina 5-mC bází se nachází právě v dinukleotidové sekvenci CpG (Pfeifer et al., 2006). Methylované CpG sekvence jsou také označovány za preferované cíle pro spontánní bodové mutace (Šponer et al., 2004). Jde například o mutaci v genu pro faktor IX u hemofilie. Přibližně 3–4 % všech cytosinů v savčí DNA se po replikaci DNA přemění na 5-mC pomocí enzymu DNA methyltransferasy (Pfeifer et al., 2006).

Substituce thyminu uracilem je hlavním zdrojem pro endogenní abasická místa, která mohou iniciovat cytotoxicitu uracilu v DNA (Yonekura et al., 2009). Adenin se deaminuje na hypoxanthin za 10 týdnů při pokojové teplotě. Kdežto cytosin by se za pokojové teploty nedeaminoval ani po 3 letech. V článku dle Wanga a Hu (2016) bylo prokázáno, že volná báze adeninu deaminuje 20–40krát rychleji než cytosin (Wang a Hu, 2016).



Obr. 8 Deaminace bází (převzato, upraveno; Chatterjee a Walker, 2017)

3.2 Addukty

Addukty jsou tvořeny působením chemických látek, které se kovalentně navážou na DNA molekulu. Vznikají hlavně nukleofilní nebo radikálovou substitucí. Jde o modifikované báze, které mají za důsledek bodové mutace, chybné párování bází a následné vnesení mutace do genomu. DNA addukty jsou častými indikátory karcinogeneze. Hlavní místa ataku jsou v guaninu polohy 7, O⁶ a N², v adeninu 1, 3, N⁶ a 7, v thyminu 3 a v cytosinu 3 a N⁴. Působením cytotoxických látek dochází k otevření a zpětnému uzavření pyrimidinových a imidazolových kruhů a ke štěpení náchylné glykosidické vazby atd. (Linhart a Novák, 2002). Existuje přes 500 typů adduktů (Hemminki, 1993), z nichž byl jako první pozorován 7-methylguanin, který je produktem dimethylnitrosaminu (Guliaev a Singer, 2004).

Protinádorová léčiva představují velkou skupinu látek, které většinou nevratně poškozují DNA. Alkylační látky, např. cyklofosamid, přidávají k vazebným proteinům alkylovou skupinu, aby nedošlo ke spojení vláken při tvorbě dvojité šroubovice DNA. Cisplatina a další látky na bázi platiny vytvářejí intra- a intermolekulární příčné vazby v DNA a v proteinech, a tím je omezena možnost opravy DNA. Etoposid tvoří ternární komplex s enzymem topoisomerasou II a štěpenou DNA. Tím pádem nemůže dojít ke zpětnému spojení vláken a to vede ke generování trvalých zlomů, nejčastěji DSB (dvouvláknový zlom, *double strand break*), (Baldwin a Osheroff, 2005).

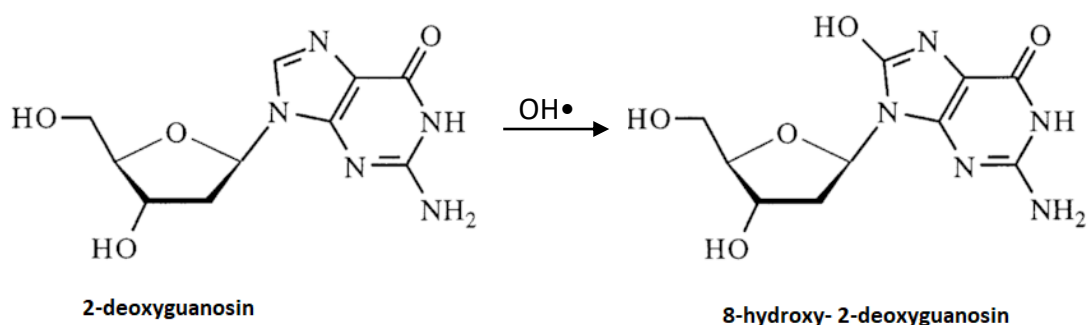
Nejvýznamější addukt způsobený oxidačním poškozením je 8-hydroxyl-2-deoxyguanosin, jeho koncentrace se využívá pro stanovení oxidačního stresu (Marnett, 2000). Další látky způsobující DNA addukty jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, kde je nevýznamnějším zástupcem benzo[*a*]pyren. Příkladem metabolitu působení této látky je *trans*-7,8-dihydrobenzo[*a*]pyren-7,8,-diol-oxid, který způsobuje mimo jiné rakovinu kůže (Linhart a Novák, 2002). Nejvýznamější biologickou látkou jsou aflatoxiny, toxiny přirozeně se vyskytující v *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. Aflatoxin B1 je nejúčinnějším karcinogenem jater. Pasivní difúzí se dostane do buněk a poté je metabolizován komplexem P-450 na aktivní formu – aflatoxin B1-8,9-epoxid. Ten se naváže na N7 guanin a vzniká kladně nabitý produkt, který oslabuje glykosidickou vazbu (Chatterjee a Walker, 2017).

3.3 Oxidační poškození DNA

Typickými vedlejšími produkty dýchacího řetězce v aerobních organismech jsou reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species, ROS), (Chatterjee a Walker, 2017). Mohou vznikat při katabolických oxidázách, anabolických procesech a peroxisomálním metabolismu. ROS se uvolňují z fagocytujících buněk prostřednictvím oxidačního vzplanutí (Cooke et al., 2003). Pokud jsou zastoupeny v nízkých hladinách, plní důležitou buněčnou funkci, jakožto buněční poslové v signálních reakcích a ovlivňují obranné reakce při napadení patogeny. Jsou-li ROS v nadbytku, mohou způsobovat až 100 různých oxidačních lézí a 2-deoxyribosové modifikace. Proto je nadbytek ROS spojován s rozvojem mnohých onemocnění, jako je rakovina, Alzheimerova choroba či cukrovka nebo srdeční selhání (Chatterjee a Walker, 2017). Když je organismus zdravý, škodlivé důsledky ROS jsou v buňce regulovány omezením mitochondriálního dýchání, které samo o sobě vytváří reaktivní formy kyslíku (Chatterjee a Walker, 2017), (Cadet a Davies, 2017).

ROS léze

Za nejvíce významnou lézi se považuje 8-hydroxy-2-deoxyguanosin (8-oxo-2-deoxyguanosin; 8-oxodeoxyguanosin; 8-oxo-dG), (Cooke et al., 2003). Mezi další mutagenní léze se řadí 8-oxoadenin, thymin-glykol, 5-hydroxyuracil a uracil-glykol (Marnett, 2000). ROS jsou důvodem vzniku různých modifikací bází, křížových vazeb nebo vzniku abasických míst či zlomů v řetězci DNA (Wu a Anderson, 1997).



Obr. 9 Vznik 8-hydroxy-2-deoxyguanosinu z 2-deoxyguanosinu po působení ROS, (upraveno, online)

8-oxo-dG je biomarker oxidačního poškození DNA a vzniká reakcí s ROS. Za fyziologického stavu je opraven nebo odstraněn většinou mechanismem opravy DNA (bázové excisní opravy). Potencionální spárování s deoxyadeninem vede k transverzním mutacím G-T, které tvoří jednonukleotidové polymorfismy (SNP) a jsou hojně zastoupeny v mutovaných onkogenech a nádorových supresorových genech (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, online), (Marnett, 2000).

Významné oxidační radikály jsou superoxid ($O_2^{\bullet-}$), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál (OH^{\bullet}), oxid dusnatý (NO) a peroxytril ($ONOO^-$), (Bertram a Hass, 2008). Extrémně reaktivním ROS radikálem je radikál hydroxylový, který vzniká jako vedlejší produkt Fentonovy reakce (Chatterjee a Walker, 2017). Superoxidový radikál vzniká jednoelektronovou redukcí molekulového kyslíku (Cadenas a Davies, 2000). Oxid dusnatý inhibuje několik enzymů, které opravují DNA, včetně glykosylasy, která odstraňuje 8-oxo-dG (Marnett, 2000).

Exogenní příčiny ROS lézí

ROS mohou být generovány ultrafialovým nebo ionizujícím zářením (Cooke et al., 2003). Působením ionizujícího záření vznikají poměrně specifické zlomy. Místo 3'-OH konce mají 3'-fosfoglykolátové nebo 3'-fosfátové konce (Chatterjee a Walker, 2017). Také mohou být generovány farmakologicky, příkladem jsou antracykliny. ROS interagují kromě DNA s mnoha dalšími buněčnými složkami - lipidy, proteiny ad. Způsobují poškození jaderné a mitochondriální DNA, peroxidace lipidů a oxidační poškození proteinů. Dále jsou ROS také spojovány s předčasným stárnutím a apoptosou (Bertram a Hass, 2008).

3.4 Zlomy řetězce

K **jednovláknovým zlomům** (SSB, single strand break) může docházet v buňce přímo, rozpadem poškozeného cukru, nebo nepřímo, prostřednictvím enzymatického štěpení fosfodiesterového řetězce, nebo po iniciaci excisní opravy bází. Přímé SSB vznikají převážně po útoku volných radikálů (primárně ROS). Nepřímé jednovláknové zlomy mohou vznikat během abortivní činnosti topoisomerasy I (Caldecott, 2004). Jednou z hlavních příčin tvorby zlomů je bezpochyby ionizační záření (Eastman a Barry, 2009). Každý den dochází k tvorbě až tisícům spontánních jednovláknových zlomů.

Konce SSB mají zablokované, protože postrádají obvyklé 5'-fosfátové a 3'-hydroxylové skupiny, které jsou nezbytné pro polymerázovou aktivitu řetězce (Horton et al., 2008). Většina zlomů vzniká kvůli metabolické účasti buňky, nikoliv jako přímý důsledek působení léku. Zpočátku se léze berou za opravitelné, protože protilehlé vlákno drží oba konce blízko sebe, a lze je rychle opravit. Je možné je spojit přímo, pokud jde o jednoduché diskontinuity ve fosfodiesterové páteři DNA, kde je 5'-fosfát a 3'-hydroxyl (Eastman a Barry, 2009). Některé zlomy můžou obsahovat 3'-fosfát, který je nutné před replikaci defosforylovat. Často se stává, že konce mají různé struktury, které poškozují deoxyribosu, nebo se kovalentně vážou k proteinu. Tato poškození konců vyžadují úpravy nebo odstranění před nástupem polymeras nebo ligas k dokončení oprav v DNA (Eastman a Barry, 2009), (Freifelder a Trumbo, 1969). Četnost zlomů lze snížit pomocí antioxidantů, superoxiddismutasy nebo glutathionu (Eastman a Barry, 2009).

Ke vzniku SSB může dojít několika způsoby, například ozařováním, alkylačními činidly, působením ROS, enzymy apod. (Freifelder a Trumbo, 1969). Existuje jen velmi málo látek, které přímo vytvoří zlomy v DNA. Jedná se především o protinádorové léky, například bleomycin. Ten se spolu s železem a kyslíkem váže na DNA a tvoří radikály, které následně „lámou“ DNA (Eastman a Barry, 2009). Protinádorové léky na bázi cisplatiny se kovalentně váží na DNA a tvoří DNA addukty. Reagují především s nukleofilními místy N7 purinových bází.

Důsledkem aktivity reparačních procesů, které odstraňují DNA léze, dochází k nepřímé tvorbě DSBs (**dvouvláknových zlomů**), (Rocha et al., 2018). Když se v molekule DNA nahromadí velký počet zlomů, které jsou v určité vzdálenosti, vznikne DSB (Freifelder a Trumbo, 1969). Ke vzniku dvouvláknového zlomu může dojít po setkání replikačního aparátu s jednovláknovým zlomem nebo jinou lézí (Jackson a Bartek, 2009), (Caldecott, 2004). Zlomy se nemusí vyskytovat přesně naproti sobě, aby došlo ke vzniku DSB, ale musí být v těsné blízkosti (Freifelder a Trumbo, 1969). DSB se často označují za letální „smrtné“, protože je velmi nepravděpodobné, že by se oba správné konce spojily. Významnou příčinou tvorby DSB jsou restriční endonukleasy. Právě restriční endonukleasy štěpí fosfodiesterovou vazbu v obou řetězcích DNA za vzniku 5'-fosfátu (DNasa I), ale ostatní endonukleasy (DNasa II) můžou štěpit vazbu za vzniku 3'-fosfátu (Eastman a Barry, 2009). Další příčinou, která způsobuje DNA zlomy je

enzym topoisomerasa I a II (TOP I, TOP II). Vyvolávají přechodné zlomy ve šroubovici DNA. TOP I katalyzuje štěpení a opětovné uzavření v jednom vlákně DNA, kdežto TOP II štěpí a uzavírá obě vlákna. TOP I vytváří přechodnou kovalentní vazbu přes tyrosinový zbytek s 3'-fosfát zbytkem za vzniku SSB. TOP II tvoří s 5'-fosfátem přechodnou vazbu a vzniká DSB (Eastman a Barry, 2009). Ovlivnění topoisomerasy chemoterapeutickým lékem, například etoposidem, zabraňuje enzymu znovu navázat přerušené řetězce DNA (Baldwin a Osheroff, 2005).

Kromě tvorby zlomů dochází k rekombinacím, které ovlivňují životnost buňky, a může dojít k úplné výměně na jinou molekulu DNA. Tomuto procesu se říká výměna sesterských chromatid nebo chromozomální translokace. Ty vedou k chybné expresi rekombinovaných genů, které mohou aktivovat protoonkogeny (Eastman a Barry, 2009).

3.5 Fotoprodukty

Ultrafialové záření (UV záření) vyvolává intra- a intermolekulární (řetězcové) příčné vazby v DNA (Yadav et al., 2019). Tvorba pyrimidinových dimerů je pravděpodobněji nejčastějším poškozením DNA způsobené exogenně (Husain et al., 1988). Kromě výše uvedených poškození způsobuje UV záření cyklobutan pyrimidinové dimery (CPD) a 6-4 fotoprodukty (6-4 PP), (Yadav et al., 2019). Jelikož jde o tvorbu dimerů pyrimidinových, může vzniknout také thymin-cytosinový dimer (Sinha et al., 2002). Oba typy lézí, CPD i 6-4 PP, narušují strukturu DNA a tvoří ohyby a zlomy a ty brání buňce v transkripci a replikaci. CPDs a 6-4 PPs vyvolávají ohyb 7–9° až 44°. Nejvíce ohroženým úsekem po UV záření je mutovaný onkogen p53 (Chatterjee a Walker, 2017), (Sabapathy et al., 2019). Relativní četnost dvou hlavních fotoproduktů závisí na vlnové délce a dávce světla. Vznikají také minoritní fotoprodukty, například glykol thymin, addukty dipurinu nebo hydrát pyrimidinu ad. (Chatterjee a Walker, 2017).

Poškození DNA může být vyvoláno třemi typy UV záření, které se dělí podle rozsahu vlnových délek. UV-B záření má rozsah 280–315 nm a je zdrojem většiny poškození způsobené UV. UV-A záření kvůli svým vlnovým délkám (315–400 nm) indukuje DNA poškození nejméně, protože k absorpci záření nativní DNA téměř

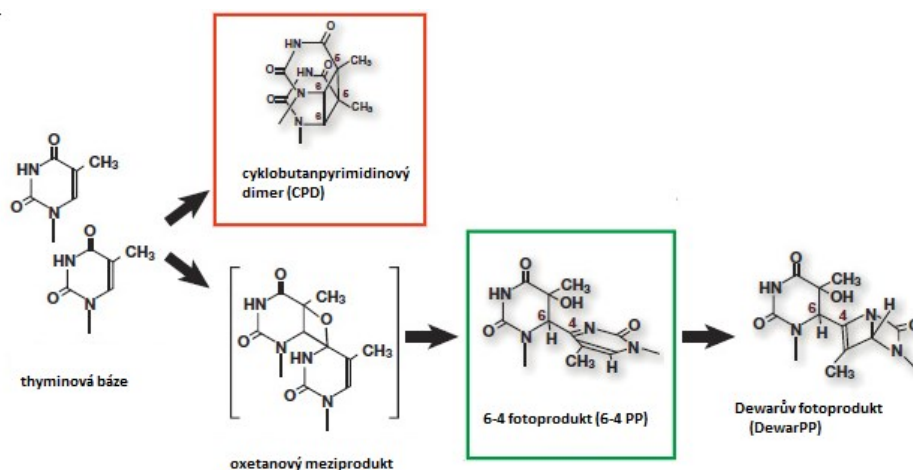
nedochází. UV-C záření má na DNA největší vliv díky rozsahu vlnových délek pod 280 nm. Ale díky tomu, že je z velké části odfiltrováno ozónovou vrstvou, představuje pro DNA menší hrozbu než UV-B. Pokud by tomu tak nebylo, UV-C záření by se stalo hlavní příčinou poškození DNA. Dnes se UV-C záření dostává mnohem více pozornosti v souvislosti s postupným úbytkem ozónové vrstvy, která propouští větší množství škodlivého záření než dříve (Sinha et al., 2002).

Cyklobutan pyrimidinové dimery

Cyklobutan pyrimidinový dimer vzniká spojením dvou pyrimidinů pomocí kovalentní vazby za vzniku cyklobutanového kruhu (Chatterjee a Walker, 2017). CPD se tvoří v jednořetězcové DNA a na ohebných koncích poly (dA)-(dT) řetězcích. CPD inhibují vývoj DNA polymeras. TATA box binding protein (TBP), transkripční faktor, indukuje tvorbu CPD na okrajích DNA, která není ohnutá (Sinha et al., 2002).

6-4 fotoprodukty

6-4 PP má cyklobutanový kruh a ke spojení dvou pyrimidinů dochází pomocí kovalentní vazby z pozice C6 jednoho pyrimidinu s druhým pyrimidinem v pozici C4 (Chatterjee a Walker, 2017). Fotoizomerací 6-4 PP vznikají Dewarovy fotoprodukty, které blokují pohyb DNA polymeras. TATA-box binding protein indukuje tvorbu 6-4 PP v místě, kde je DNA ohnuta (Sinha et al., 2002).



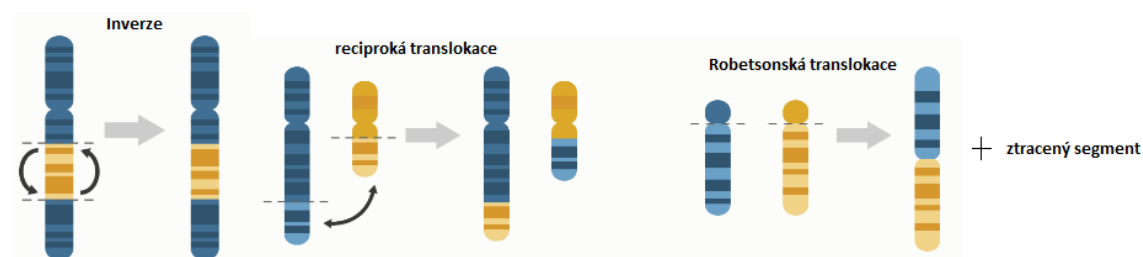
Obr. 10 Struktury lézí způsobené UV zářením, upraveno (dbaitalia,online)

4. BUNĚČNÉ DŮSLEDKY POŠKOZENÍ DNA

4.1 Mutace genové a chromozomové

Mutace jsou hlavním zdrojem dědičné variability. Jejich vznik ale nemusí znamenat funkční změny ve fenotypu. Díky mutacím se organismy dokážou adaptovat na měnící se životní prostředí. Pro člověka jsou mutace životně důležitým procesem, který je nezbytný pro evoluci. Mutace se dělí podle několika kritérií. Podle vzniku se dělí na spontánní a indukované mutace. Podle úrovně ovlivnění genetické informace se dělí na genomové, chromozomové a genové. Mutace, které se vyskytují ve vývojovém stádiu u zárodečné linie, se nazývají gametické a všechny mutace nezárodečných linií jsou somatické (Snustad et al., 2009). Genomové mutace se týkají celého genomu, celých chromozomů. Jde o numerické aberace chromozomů – polyploidie, aneuploidie či trizomie (Snustad et al., 2009).

Chromozomové mutace se odehrávají uvnitř chromozomu, kde dochází ke změnám struktury jednotlivých chromozomů (Grade et al., 2015). Typickými strukturními změnami jsou inverze a translokace. V rámci inverze dojde ke dvěma zlomům na chromozomu, ze kterého se vyštěpí určitý úsek. Vzniklý odštěpený úsek se převrátí o 180° a poté se znovu vrátí do původního chromozomu. Existují dva typy inverzí – paracentrický (inverze je mimo centromeru) a pericentrický (inverze zahrnuje centromeru). Translokace je děj, při kterém dojde k přemístění nebo výměně chromozomového segmentu mezi různými chromozomy. Dokonalá výměna translokovaných segmentů na nehomologních chromozomech se označuje jako translokace reciproká. Chromozomovou abnormalitou je Robertsonová translokace, kde dojde k fúzi dvou akrocentrických chromozomů a vznikne metacentrický chromozom. Oba chromozomy ztrácejí svá krátká raménka (Snustad et al., 2009).



Obr. 11 Vznik chromozomových mutací (převzato, upraveno; yourgenome.org, online)

Genové mutace

Nejmenší patologické změny, které zahrnují změnu i jediného nukleotidu v sekvenci DNA jsou genové mutace (Jankovic et al., 2021). Podle mechanismu a molekulární podstaty se genové mutace dělí na inserce, delece a substituce. U inserce je jeden nebo více párů bází přidáno a u delece naopak odebráno. Záměnou purinového nukleotidu za jiný purinový nukleotid nebo pyrimidinový nukleotid za jiný pyrimidinový dochází k tranzici. Záměna purinových nukleotidů s pyrimidinovými a naopak se nazývá transverze (Snustad et al., 2009). Mutace způsobené delecemi a insercemi mění čtecí rámec, ať už jde o ztrátu nebo přidání jednoho či více nukleotidů. Takové mutace se nazývají posunové mutace (frameshift mutation). Dojde k posunu čtecího rámce tripletů v genu a následné syntéze jiného polypeptidu nebo k předčasnému ukončení proteosyntézy (Snustad et al., 2009).

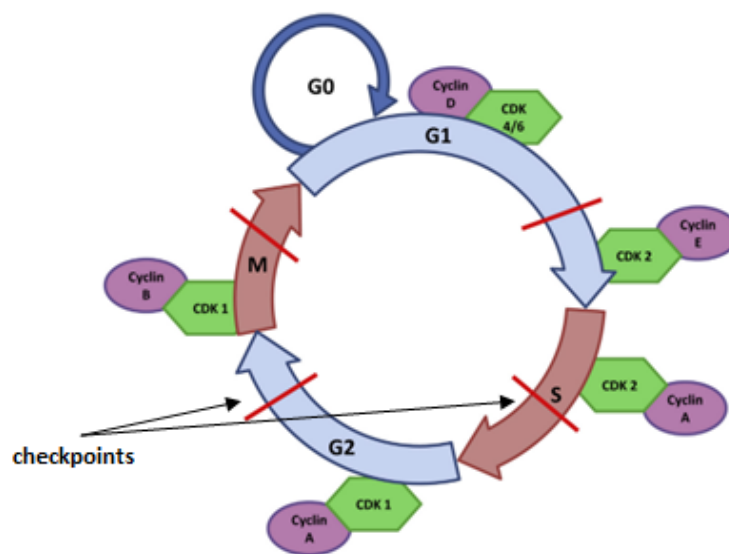
V proteinu se genové mutací projeví změnou na jinou aminokyselinu, tzv. missense mutace (měnící smysl), nebo změnou v terminační kodon, nonsense mutace (nesmyslná). Mutace měnící smysl ovlivní protein několika způsoby. Může dojít ke změně chemických vlastností, ale hlavně záleží na tom, jestli ke změně dojde v oblasti s funkčním významem. Nesmyslná mutace způsobují předčasné zkrácení proteinu, což má za následek vznik nefunkčního proteinu. Nebo se vytvoří nová sekvence, která působí jako tichá mutace (silent mutace), protože nemění funkci proteinu ani vznik výchozí AMK. Může dojít ke vzniku jiné aminokyseliny, nicméně zastupuje stejnou funkci v proteinu jako původní AMK. Tichá mutace může změnit například regulační vlastnosti genu, jako je sestřih RNA, transkripci a tím změnit expresi genu (Jankovic et al., 2021).

Genové mutace jsou příčinou mnoha závažných onemocnění, jako je srpkovitá anémie, hemofilie, Alzheimerova choroba, Tay-Sachsova choroba a mnoho dalších (Snustad et al., 2009).

4.2 Kontrolní body buněčného cyklu a opravné procesy

Buněčný cyklus je soubor určitých fází, ve kterém dochází k duplikaci buněčných složek a ty jsou poté rozdělovány do dceřiných buněk (Barnum et al., 2014). V eukaryotické buňce se buněčný cyklus odehrává v pořadí fází: $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$.

Nejdůležitějším bodem pro kontrolu cyklu je mezi fázemi G₁ (gap) a S (fáze syntézy). Mezi jednotlivými fázemi cyklu dochází ke kontrole genetického materiálu pomocí kontrolních bodů, označované jako **checkpoints** (Snustad et al., 2009). Kontrolní body jsou schopny zastavit buněčný cyklus, dokud se neopraví poškozená DNA, nebo pokud není syntéza dokončena. Tyto body jsou regulovány cykliny a cyklin-dependentními kinasami (CDK). Cykliny spolu s CDK tvoří komplex, který aktivuje nebo deaktivuje buněčný cyklus (Snustad et al., 2009). Samotná aktivita cyklin/CDK komplexu je regulována syntézou a degradací cyklinů v buňce (Gomez a Hergovich, 2016).



Obr. 12 Regulace buněčného cyklu savců pomocí cyklin/CDK komplexů (převzato, Gomez a Hergovich, 2016; online)

Buněčná odpověď na většinu typů poškození DNA zahrnuje signalizační transdukční dráhu – DDC (DNA damage checkpoint), (Waterman et al., 2020), (Kastan a Bartek, 2004). Signalizace poškození DNA je u savců iniciována fosfoinositid-3-kinasami – ATM (ataxia telangiectasia mutated) a ATR (ATM and rad3-related), (Waterman et al., 2020). ATR i ATM patří mezi DDR (DNA damage response) proteiny, které slouží k detekci a opravě DNA (Giglia-Mari et al., 2011). ATM reaguje na DSB a je přítomna ve všech fázích buněčného cyklu (Barnum et al., 2014). Kontrolní body DNA mají velký význam zejména u nádorových onemocnění, která vznikají hlavně v S-fázi. Nádorový

supresor p53 je nejznámějších kontrolním bodem, který podléhá mutacím (Nyberg et al., 2002).

Opravné procesy

Pro zachování stability genomu existují opravné procesy, které odstraňují a opravují poškozenou DNA. U člověka existuje nejméně 5 mechanismů (DNA damage response), které odpovídají na poškození DNA (Jackson a Bartek, 2009).

Přímá oprava DNA se u člověka nevyužívá tolik jako ostatní mechanismy DDR. Působením alkyltransferasy lze opravit lézy O⁶-alkylguanin, která je způsobena alkylačními látkami (O-alkylové poškození), (Pegg a Byers, 1992). Dioxygenasy mají schopnost opravit N-alkylované poškození. Schopnost fotolyasy opravit pyrimidinové dimery vyvolané UV zářením se také řadí do přímé opravy DNA (Yi a He, 2013)

DNA mismatch repair je zodpovědný za odstraňování chybných delecí, inzercí, které jsou primárně tvořeny DNA polymerasami. Dále za odstraňování spontánních deaminací, oxidací a methylocí během replikace DNA a také odstraňuje chemicky indukované neshody. Hlavním cílem jsou neshody bází G-T, G-G, A-C a C-C (Christmann et al., 2003). Dědičnost defektních genů vede k nádorovým predispozičním syndromům, např. Lynchův syndrom. Chyby v mismatch repair mají za následek zvýšenou míru mutací, které zvyšují pravděpodobnost mutace protoonkogenu nebo tumor supresorového genu, které vedou ke vzniku rakoviny (Graham et al., 2018).

Bázová excizní oprava (BER – *base excision repair*) opravuje poškození způsobené deaminací, oxidací a alkylací. BER je zahájena enzymem DNA glykosylasou, která rozpozná poškozenou bázi, odstraní ji a zůstane po ní abasické místo (to je dále opraveno jinými proteiny BER), (Krokan a Bjoras, 2013). Tímto mechanismem lze odstranit například N-alkylované puriny nebo i 8-oxo-dG (Christmann et al., 2003).

Nukleotidová excizní oprava (NER – *nucleotide excision repair*) je hlavním mechanismem, kterým se savci zbavují objemných lézí DNA způsobených UV zářením a některými protinádorovými léky a alkylačními látkami (Scharer, 2013).

K opravě DNA zlomů slouží dva mechanismy – **homologní rekombinace a nehomologní spojování konců**. Nehomologní spojování konců je primární oprava pro DSB v průběhu buněčného cyklu (Chang et al., 2017). Homologní rekombinace

zahrnuje několik cest, které fungují při opravě DSB a mezivláčkových křížových vazeb a také pomáhá při zastavení replikačních vidlic během replikace DNA (Li a Heyer, 2008).

4.3 Buněčná smrt

Proces buněčné smrti je přirozeným dějem organismu pro zbavení už nepotřebných nebo poškozených buněk. Typů buněčné smrti je několik druhů, ale nevýznamnějším je nekrosa a apoptosa. **Nekrosa** se považuje za patologický děj, při kterém dojde k úplnému vyčerpání ATP. Dojde k narušení integrity cytoplazmatické membrány a rovnováhy vnitřního prostředí. Charakteristický otok membrán je doprovázený kondenzací chromatinu a nepravidelnou degradací DNA. Otok se zvětšuje a způsobuje rozpad plazmatické membrány, až se vnitřní obsah buňky uvolní do vnějšího prostředí spolu se zánětlivými enzymy z nekrotické buňky, které způsobují zánětlivou reakci (Escobar et al., 2015). **Apoptosa** je přirozený fyziologický děj programované buněčné smrti, který se podílí na správném vývoji organismu. Pokud buňka dojde do bodu, kdy není schopna vykonávat svou funkci, automaticky spustí programovanou smrt (Alberts et al., 1998). Dochází i k nechtěným apoptosám, které jsou faktorem pro mnoho onemocnění, včetně autoimunitních chorob nebo rakoviny (Elmore, 2007). V rámci apoptosy dochází ke zmenšení buňky, zhutnění chromatinu, cytoskelet je odbourán, jaderný obal se rozkládá a jaderné DNA se fragmentuje (Alberts et al., 1998). Tento proces je závislý na energii, která se využívá především na aktivaci cysteinových proteas – kaspas (Elmore, 2007). Buňka se rozpadá na apoptická tělíčka a ty jsou poté zfagocytovány (Alberts et al., 1998). Apoptosa se dělí na 2 hlavní apoptické dráhy – vnější („dráha smrti“) a vnitřní (mitochondriální dráha), (Elmore, 2007). Hlavním rozdílem mezi oběma typy buněčné smrti je rozpad plazmatické membrány a vyvolání zánětu v postižené oblasti způsobené uvolněním intracelulárních látek z buňky (Escobar et al., 2015).

4.4 Senescence

Senescence neboli stárnutí buněk je přirozeným procesem všech buněk, při kterém dochází k úbytku telomer kvůli neaktivitě enzymu telomerasy (Mchugh a Gil, 2018). V buňce se zpomaluje buněčný cyklus, až se nakonec zastaví a buňka se

přestane dělit. Staré buňky se kumulují v tkáních a můžou uvolňovat škodlivé látky, které se podílejí na poškození zdravých buněk (cancer.gov, online). Předčasná senescence je aktivním cytostatickým dějem, který spouští expresi silných onkogenů, ztrácí tumor supresorové geny a tím vystavuje DNA většímu ohrožení (Mchugh a Gil, 2018). López-Otín et al. (2013) uvádí 9 charakteristických znaků zodpovědných za stárnutí - genomická nestabilita, úbytek telomer, epigenetické změny, ztráta proteostasy, deregulované vnímání živin, mitochondriální dysfunkce, buněčné senescence, vyčerpání kmenových buněk a změněná mezibuněčná komunikace (López-Otín et al., 2013).

5. METODY STANOVENÍ POŠKOZENÍ DNA

Existuje několik metod, technik a testů pro specifické stanovení poškození DNA. Klasickými metodami jsou gelová elektroforesa, PCR, chromatografie, sedimentace DNA, kometový test a mnoho imunologických metod (FISH – fluorescenční hybridizace *in situ*, *fluorescence in situ hybridization*; ELISA – enzymová imunoanalýza, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* apod.). Pro zajištění komplexních výsledků se často využívá několik metod současně. Využívají se také metody v tandemu s hmotnostní spektrometrií, např. HPLC-MS (vysokoúčinná kapalinová chromatografie tandemově spojená s hmotnostní spektrometrií, *High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*), GC-MS (plynová chromatografie tandemově spojená s hmotnostní spektrometrií, *Gas Chromatography -Mass Spectrometry*), ad. (Kumari et al., 2008).

5.1 Gelová elektroforesa

Gelová elektroforesa je jednou z nejčastěji používaných separačních technik v molekulární biologii. Před přijetím elektroforesy na agarosovém gelu byla DNA primárně separována pomocí centrifugace v hustotním gradientu sacharózy (Lee et al., 2012). ELFO (elektroforesa) na agarosovém gelu je neúčinnějším způsobem pro separaci fragmentů DNA o různé velikosti v rozmezí od 100 bp do 25 kbp (Stellwagen, 2009) Hanada (2020) uvádí rozmezí 100 bp až 25 kbp (Hanada, 2020). Pro detekci poškození DNA se používají gely agarosové nebo polyakrylamidové (PAG). Každý je vhodný pro určité typy a velikosti analytu (Stellwagen, 2009). Polyakrylamidové gely jsou vhodné pro proteiny a malé fragmenty DNA do 500 bp. Gelovou elektroforesou s pulzním polem lze dosáhnout rozlišení až 10 Mbp (megabází). Gelová ELFO se využívá pro analýzu reakcí *in vitro*, purifikaci fragmentů DNA nebo analýzu reakcí PCR atd. Lze detekovat i zlomy DNA, které se hromadí v buňkách, například pomocí kometového testu (Hanada, 2020).

Gelová elektroforesa má dva druhy aparatury pro provedení – horizontální a vertikální. Kromě vzorku se na gel pipetuje velikostní marker, který je vyráběn komerčně. Marker obsahuje DNA, která je fragmentována pomocí restričních endonukleas. Bez nanesení velikostního markeru je nemožné hodnotit délky fragmentů ve vzorcích (Beránek, 2016). DNA spolu s nanášecím puforem se napipetuje do předem

odlitých jamek v gelu a aplikuje se proud. Fosfátová páteř molekuly DNA (RNA) je záporně nabitá, proto při spuštění proudu migrují fragmenty DNA směrem ke kladně nabitě anodě. DNA má jednotný poměr hmotnost/náboj, tak se rychlost migrace molekul DNA určuje podle velikosti molekuly DNA nebo fragmentů DNA, koncentrace látky, která tvoří gel (agarosa nebo akrylamid) a konformace DNA. Záleží také na použitém napětí a složení elektroforetického pufru (Lee et al., 2012). Kratší fragmenty se pohybují rychleji, protože lépe prostupují póry gelu a dostanou se tak dál než delší fragmenty (Stellwagen, 2009). Po dokončené separaci elektroforesou se gely barví intekalačními barvivy. Mezi nejvíce využívaná barviva patří ethidiumbromid a fluorescenční barvivo SYBR Green (Hanada, 2020). SYBR Green se také používá pro stanovení telomerasové aktivity, při fluorescenčních zobrazovacích technikách, real-time PCR, kvantifikaci DNA, aplikaci biočipů či průtokové cytometrii (Zipper, 2004).

Využívají se dva typy pufrovacího systému – kontinuální a diskontinuální. Kontinuální pufrovací systém má konstantní pH, používá se stejný pufr v gelu, vzorku i v elektroforetickém pufru. Vznikají rozmazané a nerozlišené pruhy proteinů. Pro analýzu NK se využívá spíše systém kontinuální. Diskontinuální systém používá dva gely o různém pH. Horní gel slouží je stohovací a má velké póry, dolní gel je separační s malými póry. Každá vrstva gelu je tvořena různými pufr, které se liší v pH, iontové síle a pohyblivosti iontů. Tento systém zajišťuje lepší rozlišení, díky kvalitnější separaci (Fritsch, 2013).

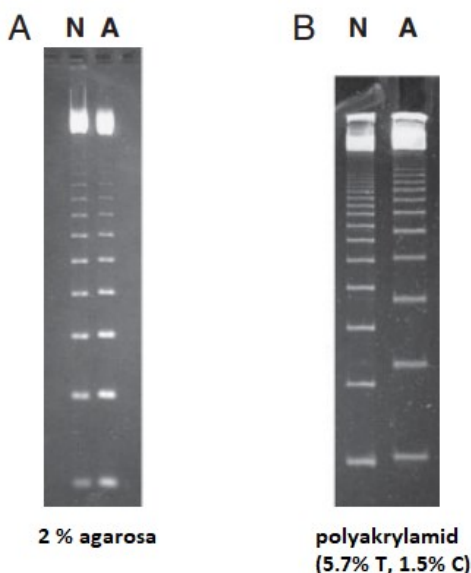
Agarosový gel

Agarosa je vysoce přečištěný polysacharid získaný z červených mořských řas (Fritsch, 2013). Základní monomery jsou D-galaktosa a 3,6-anhydro-L-galaktosa. Prášková agarosa se smíchá spolu s pufr, ve kterém se rozvaří a po úplném rozpuštění se vylíje do formy. Pro tento typ gelu se využívá pufr, který obsahuje TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethan) a EDTA (kyselina ethylendiaminotetraoctová) a navíc látku specifickou pro určitý pufr (TBE pufr - kyselina boritá, TAE pufr - kyselina octová, TPE pufr - kyselina fosforečná). Koncentrace agarosových gelů se odvíjí od délky fragmentů, které se separují v daném gelu. Pro delší fragmenty se používají gely méně koncentrované a pro kratší gely (délka fragmentů 100–5000 bp) se využívají 1–3% gely (Beránek, 2016). Agarosové gely jsou oproti polyakrylamidovým tuhé a mají

horší rozlišovací účinnost (Fritsch, 2013). Jejich výroba je levná a poměrně jednoduchá s vysokou výtěžností vzorku (Masoodi et al., 2021).

Polyakrylamidový gel

Polymerací akrylamidu a bisakrylamidu v přítomnosti persulfátu amonného a tetramethylethylendiaminu vzniká polyakrylamidový gel. Většinou se provádí pomocí vertikální aparatury. Podle způsobu využití se odvíjí koncentrace gelu, která se pohybuje od 3–20 %. Sekvenační gely jsou schopny rozlišit fragmenty DNA, které se od sebe liší i v jednom nukleotidu, pokud jde o fragmenty o velikosti do 500 nukleotidů. Denaturační gel určený pro separaci jednovláknové DNA obsahuje denaturační činidlo - močovinu nebo formamid. Pro zjištění bodových mutací je vhodnější použít PAG s rostoucím gradientem (Beránek, 2016). Velikost pórů si lze upravovat pomocí koncentrace akrylamidu a relativního podílu zesíťování BIS k akrylamidu (Fritsch, 2013). Gely jsou biologicky inertní a koncentrace jednotlivých složek nemění jejich biochemické vlastnosti (Funaki a Janmey, 2017). Získaná DNA z PAG je extrémně čistá, ale manipulace s gelem je oproti agarosovému mnohem náročnější (Green a Sambrook, 2020).



Obr. 13 Elektroforéza normálních a anormálních DNA fragmentů (převzato; Stellwagen, 2009)

Pozn. N=normální, A=anormální

5.2 Kometový test

Kometový test (comet assay), jinak jako jednobuněčná gelová elektroforéza (SCGE), je citlivá, rychlá a poměrně jednoduchá metoda pro detekci zlomů řetězců DNA (Kuchařová, et al., 2021). Pro provedení SCGE stačí pouze malé množství počtu buněk, alespoň tisíc (Olive a Banáth, 2006). Je využívána pro širokou škálu aplikací, ale především je používána pro zkoumání DNA poškození a jeho opravy. Pokud je DNA inkubována s enzymem, např. RNasa či proteinasa K, specifita a senzitivita testu se mnohonásobně zesílí (Kuchařová, et al., 2021), (Kumari et al., 2008). Nejdůležitější aplikací kometového testu je detekce oxidačního poškození DNA, ale i detekce jednovláknových a dvouvláknových zlomů, jednovláknové poškození vzniklé kvůli neúplné excisní opravě DNA způsobené UV zářením či ultrazvukem (Kumari et al., 2008). Kometový test je jednou z metod *in vivo* pro zkoušení genotoxicity na hlodavcích (Hanada, 2020). Oproti chromatografickým metodám má kometový test menší přesnost, nicméně díky němu lze s velkou přesností odhadnout poškození na nízké úrovni (Kuchařová, et al., 2021).

Dnes se používá kometová analýza ve dvou základních modifikacích – alkalická a neutrální SCGE. Alkalická SCGE je využívána spíše pro jednovláknové zlomy a neutrální slouží k detekci dvouvláknových zlomů. Alkalická zkouška se odehrává při vysoce alkalických podmínkách, $\text{pH} > 13$ (Hanada, 2020). Vzorek s buňkami je vložen na agarosový gel, lyzován a poté podroben elektroforéze při vysokém pH. DNA migruje ven z buňky a smyčky obsahující zlom ztrácí své nadšroubovicové vinutí a jsou přitahovány směrem k anodě. Tvar, který DNA obsahující zlomy tvoří po vizualizaci fluorescenční mikroskopií, připomíná kometu (Kuchařová, et al., 2021). Hlavička komety obsahuje vysokomolekulární DNA a chvost komety obsahuje přední konce migrujících fragmentů, které jsou měřené v reálném čase pomocí speciálního systému. Za běžně využívané fluorochromy se považuje ethidumbromid a 4',6-diamidino-2-fenylindol (Olive a Banáth, 2006).

5.3 Chromatografie

Chromatografické metody se pro detekci poškození DNA neustále zlepšují. Kapalinová chromatografie v tandemu s hmotnostním spektrometrem a plynová

chromatografie jsou nejvíce využívané druhy pro stanovení poškození, ať už způsobené vnějšími nebo vnitřními podněty (Kumari et al., 2008).

Díky tandemu hmotnostní spektrometrie a kapalné chromatografie (HPLC-MS) je možné v jediném vzorku DNA kvantifikovat nukleosidové formy až 7 lézí DNA, které odrážejí rozsah chemických látek spojených se zánětem (2-deoxyinosin, 2-deoxyuridin, 2-deoxyxanthosin atd.), (Taghizadeh et al., 2008). Metodika založená na kapalinové chromatografii s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/HPLC-MS) prokázala výhody pro detekci poškození DNA, na základě její přesnosti, selektivity, citlivosti a reprodukovatelnosti analýzy (Yin et al., 2019). Jednou z ionizačních technik HPLC-MS je ionizace elektrosprejem. Ta umožňuje hodnotit addukty DNA způsobené chemikáliemi či UV zářením, např. pyrimidinové dimery a jejich cis- a syn- konformaci (Kumari et al., 2008).

Plynová chromatografie (gas chromatography – GC) se používá k analýze především oxidačního poškození bází. Nejčastěji jde o zlomy v řetězcích, modifikované báze nebo křížové vazby (Kumari et al., 2008). GC umožňuje identifikaci produktů oxidace, ale vyžaduje derivatizační postupy, které mohou způsobovat „umělou“ oxidaci nepoškozených bází, což vede k falešnému navýšení oxidačních produktů, jako je 8-hydroxyguanin. Pokud se derivatizační teplota sníží na 23 °C, zabrání se tím vzniku uměle oxidovaných bází (Jenner et al., 1998). Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) se běžně používá pro své schopnosti detekovat širokou škálu základních produktů DNA. Kromě 8-hydroxyguaninu při GC-MS dochází ke zvýšení hladiny i 8-hydroxyadeninu a 5-hydroxycytosinu. Dále se používá pro stanovení derivátů formamidpyrimidinů (Kumari et al., 2008).

5.4 Alkalická eluce

Tato technika byla vyvinutá Kohnem a jeho kolegy v 80. letech 20. století (Nicolini et al., 1982). Jde o poměrně citlivé měření, které poskytuje informace o velikosti jednoho vlákna DNA v savčích buňkách. Využívá se pro stanovení poškození DNA, zejména jednovláknových zlomů (Kohn et al., 1976). Jde o relativně jednoduchou a nenákladnou metodu pro detekci jednovláknových zlomů (Nicolini et al., 1982). Součástí eluce je filtr a alkalický roztok, který pomalu unáší vzorek skrz filtr. Kinetika

eluce probíhá ve dvou fázích: počáteční fáze, ve které je délka řetězce určujícím faktorem pro rychlost eluce a druhá fáze, kde je eluce urychlená kvůli akumulaci jednovláknových zlomů (Kohn et al., 1976). I přesto, že se z metody odstranily nedostatky, které spočívaly v nadměrném proplachování, oplachování vzorku a v rychlosti elučního roztoku, se dnes tato metoda už tolik nevyužívá (Koch a Giandomenico, 1994).

5.5 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je standardní technika užívaná k třídění buněk podle obsahu DNA. Ke generování dat o jednotlivých buňkách se využívají principy rozptylu světla, excitace světla a emise molekul fluorochromu. Buňky jsou fixované a permeabilizované, takže DNA může být obarvena fluorescenčním barvivem (Resnick-Silverman a Manfredi, 2011). Využívá se pro detekci apoptosy a představuje velkou výhodu v analýze velkého počtu buněk. Dále se tato metoda využívá k detekci chemických adduktů DNA, chromozomálních aberací a k detekci DNA zlomů (Kumari a kol., 2008).

5.6 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR, polymerase chain reaction) vynalezl v roce 1983 vědec Mullis a o dva roky později si ji nechal patentovat (Kadri et al., 2020). PCR je amplifikační metoda vybraného úseku DNA, který chceme namnožit (amplifikovat). Každá matrice (templát) slouží jako předloha pro vytvoření kopií určitého fragmentu (Lorenz, 2012). V buňce výstavbu DNA zajišťují polymerasy v místě, kde na templát nasedá primer a dojde tak k prodlužování řetězce ve směru 5'-3'. Sense primer (forward, přímý, F primer) je komplementární s nekódujícím řetězcem a antisense primer (reverse, R primer) s kódujícím řetězcem. PCR reakce se skládá ze tří částí – denaturace, annealing (hybridizace primerů s DNA) a elongace (prodlužování), (Beránek, 2016). Amplifikace má exponenciální charakter (Snustad et al., 2009). Po 30 cyklech se teoreticky vytvoří více než miliarda specifického produktu (kopií sekvence DNA), ve skutečnosti to je ale méně, kvůli postupnému čerpání složek při amplifikaci (Snustad et al., 2009), (Beránek, 2016). Celý proces PCR se odehrává v termocykleru,

který je schopen rychle a přesně měnit teploty podle určitých fází a pojme velké množství vzorků (Snustad et al., 2009), (Kadri et al., 2020). Pomocí PCR jsem schopni sekvenovat určitou sekvenci DNA i přesto, že se v extraktu nachází ve velmi malém množství. Tato technika se využívá hlavně za účelem purifikace a klonování NK. PCR je jednou z nejspolehlivějších metod pro detekci poškození DNA, protože dojde k zastavení amplifikace přesně v místě poškození. Využívá se především v molekulární diagnostice nebo i ve forenzní genetice a je důležitou součástí mnoha dalších oborů (Kumari a kol., 2008).

5.6.1 Reakční směs PCR

DNA templát by měl být obsažen v množství od 10–100 ng na 100 μ l reakční směsi, ale pracuje se i s nižšími koncentracemi než 1 ng/ μ l a nebo naopak vyššími než 100 ng (i 500 ng), (Wang et al., 2018), (Warsen et al., 2004), (Kramer a Coen, 2000). Čistota DNA by se měla pohybovat v rozmezí $A_{260}/A_{280} \sim 1,8\text{--}2,0$ a $A_{260}/A_{230} \sim 2,0\text{--}2,2$. Pokud je poměr výrazně nižší ve vzorku jsou přítomny bílkoviny, fenol či jiné kontaminanty absorbující při 280 a 230 nm nebo často využívaná látka při extrakci NK – guanidin (Matlock, online).

Deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTPs) jsou většinou dodávány v komerční směsi, ve které jsou zastoupeny všechny 4 typy: dATP, dTTP, dCTP, dGTP. Slouží jako stavební kameny pro syntézu nových vláken (Beránek, 2016). Finální koncentrace každého deoxynukleotidu je v rozmezí 20–200 μ M (μ mol/l). Nízké koncentrace dNTP můžou zvýšit účinnost a specifickou reakce. Vysoké koncentrace naopak PCR spíše inhibují (Lorenz, 2012).

Termostabilní polymerasa je enzym umožňující replikaci molekuly DNA. Nejvíce používanou **DNA polymerasou** je rekombinantní *Taq* polymerasa, která se získává z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, protože je schopna odolávat teplotám nad 100 °C (Kadri et al., 2020). *Taq* polymerasa (94 kDa) má teplotní optimum při 72 °C. *Taq* polymerasa postrádá 3'→5' exonukleasovou aktivitu a díky tomu došlo ke zvýšení rychlosti polymerace. Počet nukleotidů připojených pomocí *Taq* polymerasy je 60–150 nukleotidů za sekundu (Beránek, 2016). Existuje mnoho dalších termostabilních polymeras, které splňují specifické potřeby reakce (Lorenz, 2012). Termostabilní polymerasou schopnou přesně amplifikovat je *Pfu* polymerasa (vysoká přesnost díky

3'→5' korekci), *Pwo* polymerasa, *Tfl* polymerasa (pro dlouhé fragmenty) atd. (Beránek, 2016).

Hořečnaté kationty (hlavně chlorid hořečnatý - $MgCl_2$, případně síran hořečnatý – $MgSO_4$) spolu s dNTPs tvoří komplexy, které katalyzují DNA polymerasu a stabilizují primery (Beránek, 2016). Nízká koncentrace Mg^{2+} má za následek nízký výtěžek reakce (nízká specifita) a naopak vysoká koncentrace vede ke vzniku nespecifických produktů. Změna koncentrace hořčíku je lépe manipulovatelná oproti ostatním složkám v reakci. Nejčastěji se Mg^{2+} dodává v komerčním roztoku spolu s DNA polymerasou a **reakčním pufr** 10x koncentrovaným (pH 8–9). Pufr obsahuje chlorid draselný (KCl) o koncentraci 500 mM a Tris-HCl s koncentrací 100 mM. Koncentrace $MgCl_2$ se pohybuje kolem 15 mM (Lorenz, 2012) nebo 25 mM (Beránek, 2016).

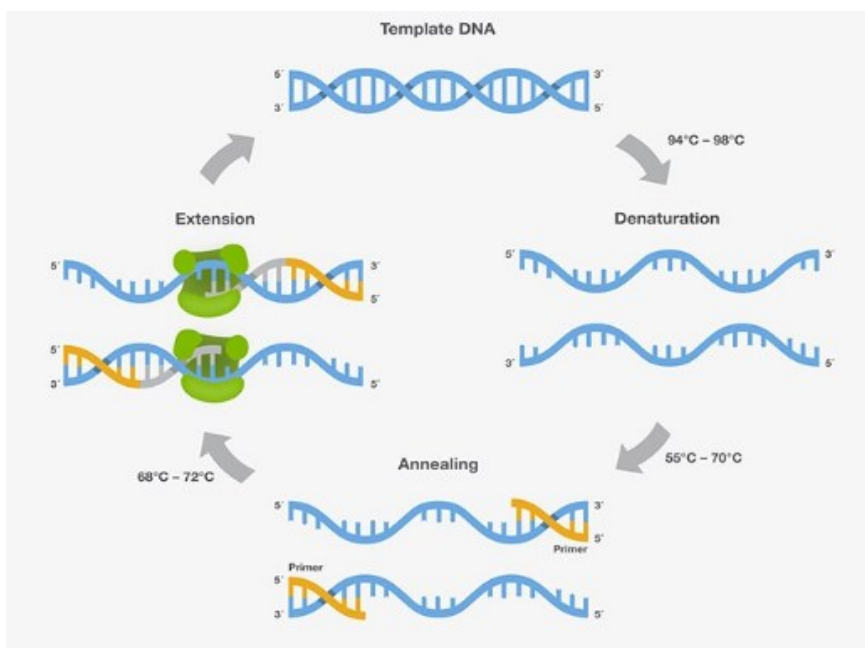
Pro zvýšení stability a zvýšení efektivity se do PCR reakční směsi přidávají různá **aditiva**. Jde hlavně o látky snižující adsorpci nukleových kyselin, jako je bovinní sérový albumin o 400 ng/μl, detergenty Triton X-100 a Tween 20, želatina nebo spermidin. Pro usnadnění rozvolnění sekundární struktury DNA se přidává 1–10% DMSO, 1–5% formamid, 5–10% glycerol nebo propandiol (Lorenz, 2012), (Beránek, 2016). Součástí reakční směsi je demineralizovaná voda nejčastěji nuclease-free water. Kromě ředění vzorku templátu na chtěnou koncentraci se využívá pro **pozitivní a negativní kontroly** reakce. Pozitivní amplifikační kontrola (reakční směs nahrazena vodou) slouží k ověření kvality a množství použitých reagentů a musí vyjít pozitivně. Negativní amplifikační kontrola (NTC – no template control) slouží k měření kontaminace v reakční směsi, pokud se tedy molekula DNA nevytvoří, tak nedošlo k žádné kontaminaci (vzorek je nahrazen vodou), (Beránek, 2016).

5.6.2 Tvorba primerů

Primery jsou sekvence oligonukleotidů, která slouží jako primer pro replikaci (Kadri et al., 2020). Obvykle mají délku kolem 18–24 nukleotidů (Beránek, 2016). Délka primerů je však ve většině literatur uváděna různá, např. Kadri et al. (2020) uvádí rozmezí 10–30 nukleotidů a Lorenz (2012) uvádí rozmezí 15–30 nukleotidů. Primery musí být specifické a co nejvíce komplementární s oběma konci sekvence, které budou amplifikovány. Jeden primer je navržen, aby rozpoznal komplementární sekvenci na

paměťovém vlákně (směr 5'→3') a druhý, aby poznal komplementární sekvenci na templátovém vlákně (směr 3'→5'), (Lorenz, 2012), (Kadri et al., 2020). Pokud je nějaká část primeru komplementární k primeru druhému, dochází k tvorbě primerových dimerů – vlásenek. Vlášeny mohou být také vytvořeny opakováním dinukleotidů GC nebo AT, nebo opakováním jedné báze. Jestliže je použití sekvence vlásenky nevyhnutelné, je možné pracovat se sekvencí o 4 bp. Oba primery by měly mít podobnou teplotu tání (T_m) v rozmezí 45–65 °C a u obou primerů by se neměla lišit o více než 5 °C (Lorenz, 2012). U annealingu by měla být teplota asi o 5–10 °C nižší, než je T_m primerů (Beránek, 2016). Optimální obsah GC nukleotidů by neměl překročit hranici 40–60 %. Čím více je v primeru obsaženo GC párů, tím se zvyšuje T_m kvůli třem vodíkovým můstkům (Lorenz, 2012). Pro tvorbu jsou využívány speciální softwary, kde jsou vneseny všechny potřebné vzorce a omezení. Nejvíce se pro tvorbu primerů využívá Primer3, Primer-blast a mnoho dalších. (Dostupné na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

5.6.3 Průběh PCR reakce



Obr. 14 Průběh PCR reakce (převzato, thermofisher.com; online)

Prvním krokem PCR reakce je počáteční **denaturace** vzorku DNA při teplotě 94 °C až 98 °C. Dvouvláknová DNA se tepelně rozpadne na jednovláknovou DNA, protože vodíkové můstky mezi jednotlivými bázemi jsou vysokou teplotou rozvolněny. Typická denaturační fáze trvá přibližně 1–3 minuty, poté dochází k degradaci (Lorenz, 2012).

Fáze **annealingu** se v češtině popisuje jako fáze dosednutí primerů nebo také hybridizace. Po denaturaci následuje ochlazení vzorku, při kterém nasedají primery na komplementární úseky DNA. Teplota annealingu se pohybuje kolem 50–60 °C (Beránek, 2016). V publikaci Karima et al. (2020) se teplota udává mezi 40–70 °C (Kadri et al., 2020). Doba annealingu je přibližně 30–60 sekund (Beránek, 2016). Snížením teploty se vodíkové vazby obnovují a komplementární vlákna mohou hybridizovat. Při nižších teplotách můžou primery nasedat i na sekvence, které nejsou plně komplementární a dochází tak k tvorbě nespecifických produktů. Naopak při vysoké teplotě budou primery málo nasedat na určité sekvence a nebude tak vytvořeno dostatečné množství produktu (Kadri et al., 2020).

Poslední fází PCR je **elongace** jinak také extenze (Beránek, 2016). Od 3'- konce primeru začne DNA polymerasa replikovat úsek DNA komplementární k oligonukleotidovým primerům (Snustad et al., 2009). Přesná teplota elongace závisí na zvolené DNA polymerase. Například Taq polymerasa elonguje při 70–80 °C a za 1 minutu zvládne prodloužit první 2 kbp, další minutu zvládne už jen 1 kbp (Beránek, 2016).

5.6.4 Modifikace PCR

Za dobu používání si PCR prošla zásadními modifikacemi, které ulehčily způsob detekce amplikonů a zajistily jednoznačnější závěry analýz PCR. Došlo také k výrazné automatizaci PCR analýz, které představují velké zjednodušení pro jejich operátory. Existuje mnoho modifikací, jenž plní specifické požadavky podle určitých cílů analýz. Níže jsou uvedené některé modifikace PCR, které se využívají pro mapování genomu a stanovení poškození DNA.

Kvantitativní real-time PCR také kvantitativní PCR (qPCR) je metoda pro kvantifikace DNA na základě fluorescence (Maddocks a Jenkins, 2017). Síla techniky real-time qPCR spočívá ve schopnosti současně detekovat, kvantifikovat a analyzovat amplikony během reakce (Kovac et al., 2022). Tato metoda umožňuje stanovit množství produktu PCR po každém cyklu. Data posbírané v exponenciální fázi poskytují informace o původním množství amplifikačního cíle v rozsahu 5 až 6 řádů. Změna fluorescence se měří v průběhu reakce (PCR probíhá v termocykleru vybaveném zdrojem záření – laser, LED dioda) a zaznamenává se vhodným typem detektoru - fotonásobičem. Vykreslením fluorescence v závislosti na počtu cyklů vzniká amplifikační graf (thermofisher.com, online). Ve směsi jsou obsaženy interkalační látky (ethidiumbromid, SYBR Green, SYBR Gold) nebo fluorescenční sondy (hydrolyzační a hybridizační), které hybridizují k vzniklým amplikonům (Beránek, 2016). Real-time qPCR založené na interkalačních barvivech jsou méně specifické a náchylnější na vznik nespecifických amplikonů, nicméně jsou levnější variantou než sondy (Kovac et al., 2022).

Hydrolyzační sondou je třeba TaqMan sonda (Beránek, 2016). Sonda obsahuje nukleovou kyselinu komplementární k vnitřnímu cílovému úseku (Hoy, 2013). Přenos

energie mezi zářičem a zhášecem umožňují dipólové momenty obou látek, označuje se jako FRET přenos (fluorescence resonance energy transfer). Působí na velmi krátké vzdálenosti a energie se přenáší formou nezářivé interakce. Pokud se sonda naváže na cílovou sekvenci spolu s primery, dochází k polymeraci řetězce (Hoy, 2013). **Hybridizační sondy** jsou v PCR směsi vždycky dvě a musí nasedat vedle sebe na stejné vlákno. Když sondy hybridizují k DNA, tak zdroj záření vyvolá excitaci elektronů na donoru a tato energie je zachycena na akceptoru, který excituje elektrony a dochází k emisi specifické vlnové délky, kterou už detektor zaznamenává (Beránek, 2016).

Metoda **hot start PCR** byla vyvinuta za účelem omezení vzniku nespecifických produktů, tedy omezení amplifikace mimo cílovou sekvenci. Při nižších teplotách na počátku denaturační fáze mohou vznikat dimery primerů, které tvoří chybné produkty. Lze použít vosk, který vytvoří voskovou bariéru, co rozdělí složky reakce (Beránek, 2016). Při tání vosku (voskové pelety, např. AmpliWax) dochází ke smíchání složek a uvolňování hořčnatých kationtů následně katalyzuje polymerasu a nedochází k odpařování vzorku (Eun, 1996), (Hoy, 2013). Dnes se nejvíce využívá speciálně upravená polymerasa, tzv. hot-start polymerasa, která pro svou aktivaci vyžaduje inkubaci při 95 °C. Hot start polymerasy jsou většinou dodávané komerčně, příkladem je FastStart, AmpliTaq Gold či HotMaster Taq, TopoTaq (Beránek, 2016), (Paul et al., 2010). Termostabilní polymerasy (*Taq* polymerasa) obsahují termolabilní protilátky, které reverzibilně blokují polymerasu. Jakmile se zvýší teplota celé PCR směsi, protilátka se denaturuje a tím se uvolní *Taq* polymerasa a může začít prodlužovat úsek DNA (Eun, 1996). Kromě protilátky mohou blokovat polymerasu i aminokyselinové zbytky peptidového řetězce, které se opět degradují při zvýšené teplotě (Beránek, 2016).

PCR long-range by se mohla přeložit jako PCR s dlouhým dosahem. Používá se k přípravě specifických vysokomolekulárních molekul DNA, které mají mnohá využití včetně klonování, sekvenování a mapování genomu (Hogrefe et al., 2011). V roce 1992 Barnes zavedl nové podmínky PCR, které umožňovaly amplifikovat DNA až do 5 kbp. Díky modifikacím polymeras zvýšila PCR long-range velikost ampliconů až na 30 kbp. Příkladem DNA polymeras s dlouhým dosahem jsou QIAGEN LongRange PCR Polymerase, KAPA Long Range HotStart, TaKaRa PrimeSTAR GXL ad. Long-range PCR je rychlá, flexibilní a efektivní volba pro sekvenování genomických oblastí v malém počtu

vzorků (Jia et al., 2015). Jia et al. (2015) ve své studii dokázaly, že pouze některé long range polymerasy jsou schopny amplifikovat genomovou DNA v rozmezí od 5,8 bp do 12,9 bp. Za nejlepší polymerasu pro amplifikaci kratších i delších amplikonů označili AccuPrime a LA Tag (Jia et al., 2015).

Alelově specifická PCR využívá amplifikačně refrakterní mutační systém. Jde o amplifikační strategii, kde je primer navržen tak, aby dokázal rozlišovat mezi templáty, které se od sebe liší i o jediný nukleotidový zbytek, nebo pouze o jednu alelu. Primery jsou zkonstruovány tak, že jejich 3' nukleotid překrývá polymorfni zbytek (Lo, 1998). Jeden z primerů obsahuje na 3' konci mutační alelu (alely), která je komplementární k hledané mutaci (Newton et al., 1989). Slouží pro detekci jakékoliv změny bází a malých delecí, inzercí a polymorfismů (Bottema a Sommer, 1993). K amplifikaci a vzniku produktu dojde, pokud se ve vzorku DNA nachází cílová alela (zmutovaná alela). Modifikací amplifikačně refrakterního mutačního systému je její fluorescenční multiplexní metoda, která zahrnuje koamplifikaci normálních a mutantních alel. Byla použita na identifikaci běžných mutací fenylketonurie spolu s analýzou polymorfniho místa s krátkými tandemovými repeticemi na lokusu fenylalaninhydroxylas (Zschocke a Graham, 1995). Amplifikačně refrakterní mutační systém je jednoduchý a spolehlivý systém, který se využívá pro detekci jednobodových mutačních změn a polymorfismů (Beránek, 2016), (Newton et al., 1989).

Pro mapování genomu se využívá **inverzní PCR**. Inverzní PCR se používá, pokud je známá sekvenční informace pouze na jedné straně cílové oblasti. Nejdříve restriční enzym nařízne známý úsek DNA. Délka rozpoznání sekvence by měla být 6 a více bp, aby se vytvořili přiměřeně dlouhé úseky pro amplifikaci. Cílová DNA je restričním enzymem přestřihnuta a tím se získá úsek DNA, který má kompatibilní lepivé konce, jeden před známou sekvencí a druhý za ní. Následně se konce spojí do kruhu a specifické primery se navážou na známé koncové sekvence. Každý primer se váže na jedno vlákno a oba směřují směrem ven do neznámé DNA. PCR amplifikuje neznámou DNA, čímž vzniknou na koncích lineární molekuly s krátkými úseky známé DNA (Clark a Pazdernik, 2016). Využívá se pro identifikace neznámých sekvencí, jako jsou například sekvence Alu elementů (Beránek, 2016).

RT-PCR (zpětná, reverzní PCR) se primárně používá k měření množství konkrétní RNA. Jde o dvou krokový proces, o spojení techniky reverzní transkripce mRNA do DNA

(za vzniku cDNA) a amplifikace specifických cílů DNA pomocí PCR. Je zde využíván termolabilní enzym reverzní transkriptasy z retrovirů. V prvním kroku se přidá nesespecifický primer na 3'-poly(A)konec a ve druhém kroku se přidá primer specifický na 5'-konec mRNA spolu s DNA polymerasou. Samotný přepis RNA do cDNA není obtížný, ale RNA rychle degraduje působením ribonukleas (RNas), které jsou kontaminanty téměř všeho. Navíc jsou RNasy termostabilní, takže je třeba je ošetřit roztoky s inhibitory RNas (Beránek, 2016).

6. DISKUZE

Působením mnoha činitelů má za důsledek poškození DNA. Existuje několik metod, pro identifikaci a kvantifikaci daných typů poškození. Jednou z nejpoužívanějších metod je PCR. Konkrétně qPCR je často využíváno nejen pro kvantifikaci a detekci, ale i pro potvrzení zdali předešlá PCR proběhla, tedy jestli specifické primery (např. z SINE, LINE, Alu oblasti) nasedly na správné úseky v DNA. Dalším typem PCR vhodným pro detekci poškození DNA je dnes hojně využívaná LM-PCR, TD-PCR a klasická endpoint PCR. Ve spojení se specifickými primery se citlivost a selektivita metody jen zvyšuje. Poslední roky se dostává do popředí metoda LAMP nebo i velice slibná metoda NGS.

Několik studií se věnovalo stanovení poškození DNA způsobené kouřem (cigaretovým či kouřem ze spalování dřevěných hoblin apod.). Studie se shodují svými výsledky v tom, že dlouhodobá inhalace kouře způsobuje poškození DNA a velmi často jde o poškození ireversibilní. Dochází ke vzniku specifických adduktů, podle kterých lze identifikovat, o jaké poškození se jedná. Pro zjištění oxidativního poškození se využívá biomarker 8-oxo-dG.

Chen et al. (2007) ve své studii měřili pomocí real-time PCR poškození DNA na potkanech. Měřili addukt malondialdehyd, který byl izolován pomocí Qiagen kitu a následně byla kvalita izolace ověřena na agarosovém gelu pomocí barvení ethidiumbromid. Jelikož je ethidiumbromid silný mutagen, mohlo by být vhodnějším řešením barvivo SYBR Green. Pro PCR reakci byly zvoleny dva páry primerů. Jeden byl z oblasti genu MutY (gen podílející se na opravě poškozené DNA u potkanů) a druhý pár byl z lidské DNA z β globinu a sloužil jako vnitřní kontrola pro amplifikaci DNA. Stanovení relativní četnosti určitého typu DNA adduktů byla upravena amplifikací PCR pomocí DNA modifikujícího enzymu *Escherichia coli* formamidopyrimidin-[fapy]-DNA glykosylasou, zkráceně Fpg (lze použít také endonukleasu III a V), (Chen et al., 2007).

Enzym Fpg využili i ve studii Lee et al. (2011), kde porovnávali působení kouře na myší mozek (wild type) a Ngb-tg (neuroglobulin – využívaný ve výzkumu pro své neuroprotektivní hypoxické schopnosti). Pro analýzu integrity DNA využili kometový test i jeho modifikovanou zkoušku, kde použili pro ošetření jader Fpg, jako restriční enzym, který vylučuje oxidované báze guaninu z DNA a díky lyasové aktivitě dojde k přeměně abasických míst na řetězcové zlomy. Tyto zlomy jsou dobře stanovitelné

pomocí PCR, protože dojde k zastavení amplifikace přesně v bodu zlomu. Z obou studií vyplývá, že po vystavení subjektu kouři, dochází po několika hodinách ke štěpení oxidačních adduktů a k opravám řetězcových zlomů pomocí opravných mechanismů např. BER (Lee et al., 2011). Důsledkem vdechování kouře se zabývala také studie Danielsena et al. (2010), kde stanovovali na plicích a jaterních buňkách hladiny adduktů DNA a opravu DNA po 24 hodinách. Věnovali se stanovení 8-oxo-dG a také dalším oxidačním adduktům, např. 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosin a 1,N²-etheno-2'-deoxyguanosin. Izolovaná a přečištěná RNA byla pomocí RT-PCR převedena cDNA a následně byla provedena real-time qPCR s komerčním TaqManGene Expression Assays, což je bráno za zlatý standard pro real-time PCR. Primery byly navrženy tak, aby pokrývaly hranice exonů specifické pro cDNA a jako referenční gen byl použit 18S RNA. Finální stanovení poškození DNA bylo provedeno metodou HPLC (Danielsen et al., 2010). Chen et al. (2015) se zabývali stanovením hladiny ROS (8-oxo-dG), kapacitou antioxidantního systému a expresí DNA reparačních enzymů, zejména 8-oxoguanin-DNA-glykosylasou, což je jeden z hlavních reparačních enzymů u báze excisní opravy. Kromě potvrzení, že dlouhodobé působení kouře má vliv na poškození DNA, studie potvrdila, že při dlouhodobé expozici jsou sníženy hladiny 8-oxoguanin-DNA-glykosylasy, což způsobuje sníženou funkčnost opravy DNA. Oproti studii Danielsena et al. (2010), kde detekovali poškození DNA pomocí real-time PCR, zde se po amplifikaci pomocí RT-PCR využilo pro finální hodnocení nanesení na gel spolu s barvivem GelRed, což přineslo odlišný úhel pohledu na výsledné hodnocení poškození DNA (Chen et al., 2015). Z uvedených studií vyplývá, že pro stanovení 8-oxo-dG se více využívá metoda qPCR kvůli své vyšší citlivosti, než je tomu u endpoint PCR.

Zhang et al. (2013) ve své studii využíval pro měření oxidačního markeru metodu kapilární elektroforesy s detekcí laserem indukované fluorescence. Ukázalo se, že tato metoda nabízí velké výhody, kterými jsou vysoká účinnost separace, nízký limit detekce a dobrá selektivita (Zhang et al., 2013). Kromě stanovení oxidačního poškození může být 8-oxo-dG marker využit pro stanovení klinické patogeneze a toxicity léčiv. Pro takové stanovení využívá Zhang et al. (2014) ve své studii kapilární elektroforesu s UV detekcí, nicméně tato metoda i přes svou univerzálnost není vhodná kvůli své nízké citlivosti. Vhodnější metodou pro stanovení 8-oxo-dG v moči je micelární

elektrokinetická kapilární chromatografie ve spojení s extrakcí na pevné fáze a díky spojení několika technik dostaneme mnohem vyšší citlivost (Zhang et al., 2014).

Endpoint a qPCR jsou nejuniverzálnější technikou pro stanovení poškození PCR díky své dostatečné citlivosti a selektivitě. Pro zvýšení účinnosti a selektivity metody se využívají specifické primery, například z oblasti transponovatelných sekvencí (SINE, LINE).

Hodnocení poškození a oprav DNA zejména v transkribovaných oblastech je důležité, protože odráží integritu kódujících sekvencí. U savců jsou často přepisované oblasti repetitivní sekvence, které se nacházejí v intronech a dalších doprovodných oblastech genů. V roce 1999 Wang et al. vydali 2 studie, ve kterých využívali stejné SINE primery z B1 elementů. V první studii šlo o působení protinádorového léku na bázi cisplatinu (Platinol-AQ), který byl podáván in vivo i in vitro, což způsobilo vznik adduktů, které blokovaly termostabilní polymerasy. Pro detekci použili Long Template PCR spolu se SINE elementy, které byly komplementární k B1 elementům, konkrétně k nukleotidům 17–36, a díky tomu annealují na většinu cílů v genomu. Velkou výhodou použití SINE primerů je také schopnost amplifikovat současně několik náhodných fragmentů DNA a dlouhých úseků DNA. Výsledkem byla velice citlivá metoda pro detekci poškození za velmi nízké dávky cisplatinu (1–8 mg/kg), (Wang et al., 1999). Druhá studie, využívající stejné SINE primery, se zabývala detekcí poškození DNA při působení UV-B záření, které vyvolalo vznik fotoproduktů. SINE primery byly využity pro lineární a exponenciální PCR, které se od sebe lišily hlavně v počáteční denaturaci, která u exponenciální PCR nebyla prováděna. Pomocí qPCR došlo také k porovnání měření poškození se SINE primery a s primery z DNA polymerasy β kvůli podobné délce produktů. I tento protokol prokázal, že je dostatečně citlivý na stanovení poškození a i pro následnou detekci odstraněných fotoproduktů (v závislosti na dávce), jako v předchozí studii (Wang et al., 1999).

Englander a Howard (1997) uvedli nový postup pro sledování poškození způsobené UV zářením a pro sledování oprav v lidském genomu. Bylo vyvinuto několik amplifikačních protokolů pro sledování aspektů poškození DNA za použití primeru komplementárního k Alu sekvenci. Šlo o sledování indukce UV fotoproduktů na předpokládaných místech v sekvenci Alu, o modifikaci profilů syntézy prodloužení a o kvantitativní inhibici amplifikace řízené Alu primery v závislosti na dávce UV záření.

Podle tohoto protokolu lze určit místa Alu sekvence předpokládané blokády *Taq* polymerasy, snížení průměrné délky prodloužených produktů a měřitelné snížení množství prodloužených produktů v Alu sekvenci, které je nepřímo úměrné dávce UV záření (Englander a Howard, 1997).

Kromě využití SINE elementů (B1 a Alu) se hojně využívají i elementy LINE (konkrétně L1). Studie Tanak et al. (2012) se zabývala účinky ionizujícího rentgenového záření a ionizujícího uhlíkového záření na L1 elementy. Po ozáření buněk byla extrahována RNA, která byla následně reverzně přepsána na cDNA. Pomocí PCR s AmliTaq Gold polymerasou (hot start) a primery specifickými pro fragment L1 elementu gliomové buněčné linie prokázali, že záření zvyšuje tvorbu de novo inzercí L1 elementů a že velikost inzercí je podstatně delší u ozáření ionty uhlíku než u rentgenového záření. Studie naznačuje, že retrotranspozice L1 způsobené zářením přispívají ke genomové nestabilitě (Tanak et al., 2012).

Jintaridh a Mutirangura (2010) se ve své studii věnovali hypomethylaci v repetitivních sekvencích, která je častým epigenetickým poškozením nejen pro senescentní buňky, ale i pro buňky nádorové. Porovnávali ztrátu methylace u L1, SINE, Alu elementů a u HERV v periferních krevních mononukleárech. Většina methylací se odehrává právě v těchto sekvencích a potlačuje jejich funkci. Ukázalo se, že s vyšším věkem dochází ke zvýšené ztrátě methylace u Alu elementů, ale u L1 a HERV věk není podstatný. Tato studie svými výsledky přispěla k pochopení celogenomové hypomethylace v závislosti na procesu stárnutí (Jintaridh a Mutirangura, 2010).

Pro amplifikaci konkrétních úseků DNA se využívají specifické primery o známé sekvenci. Jak bylo zmíněno výše, jde především o SINE, LINE a Alu elementy, ze kterých se specificky tvoří primery pro konkrétní stanovení cílové DNA. Kromě specifických primerů se využívá i analýza náhodně amplifikovaných polymerních DNA (RAPD, random amplified polymorphic DNA). Jsou to náhodné sekvence většinou v rozsahu 8–15 nukleotidů. Takovéto primery annealují na různé oblasti genomu a vytvářejí komplexní PCR produkty. RAPD se vyznačuje velmi špatnou reprodukovatelností mezi laboratořemi, jelikož je potřeba dodržet konzistentní podmínky amplifikace PCR (Butler, 2012). Amplifikované fragmenty migrují na agarosovém gelu a pozoruje se rozdíl ve struktuře pásů. Další nevýhodou je interpretace RAPD produktů, jejich skórování v rámci elektroforesy je velice komplikované a identifikace směsí

představuje opět velký problém, který vyžaduje hodně zkušeností (Butler, 2012). RAPD byla úspěšně použita na identifikaci *E. Coli* rezistentní vůči antibiotikům a pro studium *S. Aureus* a *Yersinia sp.* (Chatterjee a Raval, 2019). Analýza RAPD se široce využívá pro genetické mapování, taxonomické a fylogenetické studie mnoha organismů. Dále se uplatňuje při detekci změn v DNA po působení genotoxických látek, například UV záření způsobující pyrimidinové dimery cyklobutanového typu a fotoprodukty (Danylchenko a Sorochinsky, 2005). RAPD detekuje poškození DNA a mutace způsobené genotoxiny, které se vyznačují změnami v pásech, nárůstem nebo ztrátou pásů. Atienzar et al. (2002) ve své studii hodnotili vliv řady změn DNA na profil RAPD. Štěpení DNA bylo zajištěno restrikčními enzymy, ultrazvukem, benzo[*a*]pyrendiolepoxidem. Po proběhnutí RAPD lze vyčíst, že sonikace DNA způsobila větší změny na pásech gelu a způsobila vymizení vysokomolárních amplikonů v závislosti na dávce oproti restrikčním enzymům. U vzorku na něj působil benzo[*a*]pyrendiolepoxid došlo k podobným změnám (Atienzar et al., 2002).

Existují i mnohem specifičtější modifikace PCR, díky kterým je detekce poškození mnohem přesnější, příkladem je ligací zprostředkovaná PCR (LM-PCR, ligation-mediated PCR). Technika LM-PCR se využívá hlavně pro stanovení primárních nukleotidových sekvencí DNA, vzorců methylace cytosinu, tvorby a opravy lézí DNA (Dai et al., 2000). LM-PCR zahrnuje tři hlavní kroky – štěpení genomové DNA restrikčními enzymy a ligaci specifických adaptérů, amplifikaci restrikčních fragmentů pomocí specifických primerů a nakonec analýzu amplifikovaných fragmentů pomocí gelové elektroforesy a sekvenování. Právě kvůli využití specifických primerů je jednou z preferovaných metod PCR k identifikaci doprovodných sekvencí vyznačující se vysokou specificitou a citlivostí (Yu et al. 2020). LM-PCR je jednou z nejcitlivějších a nejrozšířenějších metod pro kvantifikaci DNA lézí a interakcí DNA s proteiny v savčích buňkách s rozlišením jednoho nukleotidu (Chen et al., 2001). Nevýhodou této metody je snížená flexibilita způsobená cirkularizací nebo multimerizací restrikčních fragmentů, která snižuje účinnost metody (Yu et al. 2020). LM-PCR je jednou z mála metod, která umožňuje přesné mapování sekvence poškození DNA. Ve studii Besaratinia a Pfeifera (2012) využili této metody pro mapování fotoproduktů DNA vyvolaných UV zářením. Schopnost detekovat addukty DNA závisí na specifické přeměně adduktů na řetězcové

zlomy na 5'-konci. 6-4 PP lze mapovat pomocí speciálních enzymů jako je třeba T4 endonukleasa V. Úpravou LM-PCR protokolu byla vyvinuta metoda pro DNA lesion footprinting, která se dnes rutinně využívá (Besaratina a Pfeifer, 2012). Studie Akopiants et al. (2014) potvrdila, že díky LM-PCR je možné sledovat poškození DSB in vivo (vyvolané nebilkovinným chromoforem neokarzinostatinem) v Alu sekvenci a poté ho pomocí real-time qPCR i kvantifikovat (Akopiants et al., 2014). V další studii využili LM-PCR pro stanovení pyrimidinových dimerů způsobených UV zářením. Konečná kvantifikace byla umožněna díky přítomnosti jednovláknových zlomů s fosfátovými skupinami na 5'-koncích (Chen et al., 2001).

Pro kvantifikaci poškození DNA se využívají techniky velmi zdlouhavé a často detekují pouze globální poškození DNA, nikoliv konkrétní. Lehle et al. (2014) vytvořili protokol LORD-Q (long-run realtime PCR technique for DNA damage – quantification) pro přesnou sekvenční kvantifikaci poškození DNA pomocí sond o velikosti více než 3 kb pro libovolné jaderné či mitochondriální DNA. Svůj protokol porovnali s qPCR a kometovým testem a prokázali, že LORD-Q je mnohem výkonnější a citlivější metodou. Studie sledovala indukci poškození DNA a opravu DNA v lidských indukovaných pluripotentních kmenových buňkách a isogenních fibroblastech. Prokázali, že LORD-Q poskytuje sekvenčně specifickou a kvantitativní metodu, kterou lze hodnotit poškození a opravu DNA a další procesy v oblasti přírodních věd (Lehle et al., 2014).

Další modifikací PCR pro detekci změn v DNA je PCR závislá na terminální transferase (TD-PCR, terminal transferase-dependent PCR). Jde o všestrannou a citlivou metodu využívanou pro detekci změn v DNA, které vznikají v důsledku působení footprinting činidel při detekci interakcí protein DNA in vivo (Chen et al., 2001). Tuto metodu je možné využít i pro sekvenování genomu a pro studium adduktů DNA (Komura a Riggs, 1998). Oproti LM-PCR má TD-PCR výhodu, že není potřeba žádných speciálních enzymů kromě terminální deoxynukleotidtransferasy, T4 DNA ligasy a termostabilní DNA polymerasy. Chen et al. (2001) vytvořili modifikovaný protokol TD-PCR pro stanovení změn v transkripčních faktorech. Pro zvýšení detekční citlivosti použili magnetické kuličky se streptavidinem a neradioaktivním značením pomocí fluorochromů v blízkosti infračervené oblasti (Chen et al., 2001).

Vysoce selektivní metodou, kterou lze využít pro detekci poškození DNA je LAMP (isotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou, *loop-mediated isothermal*

amplification), která umožňuje isotermickou amplifikaci cílového genu. V reakci probíhá amplifikace genu opakováním 2 typů elongačních reakcí prostřednictvím smyčkových oblastí. Jde o samovolné prodlužování templátu ze struktury kmenové smyčky. Jelikož jde o isotermickou amplifikaci, odpadá zde nutnost využití termálních cyklierů. LAMP je mnohem rychlejší metodou než je PCR a je ještě více specifická (Girish a Karabasanavar, 2020). Oproti PCR tato metoda vyžaduje 4–6 párů primerů, které rozpoznávají 6–8 odlišných cílových oblastí DNA. Syntézu zahajuje DNA polymerasa, která s pomocí primerů vytváří smyčky (international.neb.com, online). Vnitřní primer obsahuje sekvenční kódujícího a antikódujícího vlákna a iniciuje LAMP. Následující syntéza posunutého DNA je primována vnějším primerem a výsledkem je uvolněná jednoláknová DNA. Ta je templátem pro syntézu DNA druhým vnitřním a vnějším primerem, které hybridizují s druhým koncem cílového řetězce, a tím vzniká kmenová smyčka DNA. Při dalším cyklu jeden vnitřní primer hybridizuje ke smyčce na produktu a iniciuje syntézu vytěsněné DNA. Vznikne původní DNA s kmenovou smyčkou a nová DNA se smyčkou s dvakrát delším kmenem (Notomi et al., 2000). Produkty DNA jsou velmi dlouhé a jsou tvořeny velkým počtem opakujících se sekvencí, které jsou spojeny jednořetězcovými smyčkami v dlouhé konkatamery. Cyklickou reakcí se za hodinu naakumuluje až 10^9 kopií cílového úseku. LAMP je kompatibilní s detekcí pomocí interkalátorů, fluorescencí, sond a s detekcí v agarosovém gelu a lze produkty kvantifikovat také pomocí qPCR (international.neb.com, online). Jediným zásadním omezením LAMP je specifické navržení 4 primerů pro každý cíl, pokud není primer dostatečně specifický a citlivý, účinnost metody se snižuje (Jain et al., 2018).

Rychlý pokrok v sekvenačních technologiích usnadnil vznik nových metod pro detekci poškození DNA způsobených vnějšími vlivy a pro jejich opravu na úrovni genomu. Metoda sekvenování nové generace (NGS, next generation sequencing) je jednou z novějších metod zároveň velmi spolehlivou a účinnou metodou, díky které je možné sekvenovat celý genom během jediného dne (Behjati a Tarpey, 2013). Vznik této metody způsobil revoluci v oblasti oprav DNA, protože díky NGS je možné přesně určit lokalizaci DNA poškození. S rozvojem třetí generace sekvenčních technologií, jako je Pacific Biosciences Single Molecule Real-Time a Oxford Nanopore sekvenování, se třetí generace sekvenování rozšířila o sekvenování v reálném čase. Další velice slibnou metodou je RADAR-seq (RAre DAmage and Repair sequencing), které slouží

k odhalování inkorporace ribonukleotidů a poškození DNA vyvolané UV zářením (Li a Sancar, 2020).

7. ZÁVĚR

Molekula DNA obsahuje veškeré informace pro přežití buňky a celého organismu. DNA má klíčovou roli při syntéze proteinů, které vykonávají specifické funkce. V DNA se kromě sekvencí kódujících proteiny vyskytují nekódující sekvence, které zastávají hlavně regulační funkci. Pokud dojde k poškození v molekule DNA, dochází u proteinů ke ztrátě jejich funkce, ke změně funkce ale také existují mutace, které nijak funkci proteinů neovlivňují. Spolu se vznikem poškození se v buňce aktivují i opravné procesy, které se snaží daná poškození eliminovat. Pro detekci poškození DNA se využívají molekulární techniky, z nichž nejpoužívanější je PCR. Při použití SINE primerů představuje PCR velice schopnou a kvalitní metodu pro stanovení nejen poškození DNA, ale i pro mapování genomů. Kromě PCR a jejích modifikací jsou vhodné metody pro stanovení poškození DNA gelová elektroforesa, průtoková cytometrie či chromatografie a také velice selektivní metoda LAMP nebo NGS.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMP	adenosinmonofosfát
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATP	adenosintrifosfát
ATR	ATM and rad3-related
BER	bázová excisní oprava, <i>base excision repair</i>
bp	počet bází, <i>base pair</i>
cAMP	cyklický adenosin-5'-monofosfát
CDK	cyklin-dependentní kinasy
cDNA	komplementární DNA, <i>complementary DNA</i>
cGMP	cyklický guanosin-5'-monofosfát
cMNP	cyklický mononukleotid
CMP	cytidinmonofosfát
CPD	cyklobutan pyrimidinové dimery
CTP	cytidintrifosfát
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytidintrifosfát
DDC	<i>DNA damage checkpoint</i>
DDR	<i>DNA damage response</i>
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNMT	DNA methyltransferasa
dNTPs	deoxyribonukleotidtrifosfáty
dsDNA	dvouvláknová DNA, <i>double-strand DNA</i>
DSB	dvouvláknový zlom, <i>double strand break</i>
DSIF	DRB sensitivity inducing factor
dTTP	deoxythymidintrifosfát
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELFO	elektoforesa
ELISA	enzymová imunoanalýza, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ERV	endogenní retroviry
FISH	fluorescenční hybridizace in situ, <i>fluorescence in situ hybridization</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GC	plynová chromatografie, <i>gas chromatography</i>
GC-MS	plynová chromatografie tandemově spojená s hmotnostní spektrometrií, <i>Gas Chromatography -Mass Spectrometry</i>
GMP	guanosinmonofosfát
GTP	guanosintrifosfát
HERV	lidské endogenní retroviry, <i>human endogenous retroviruses</i>
hnRNA	heterogenní jaderná RNA
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie tandemově spojená s hmotnostní spektrometrií, <i>High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry</i>
kbp	kilobáze, <i>kilobase pair</i>
LAMP	isotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou, <i>loop-mediated isothermal amplification</i>

LINE	<i>long interspersed element</i>
LM-PCR	zprostředkovaná ligací PCR, <i>ligation-mediated PCR</i>
LORD-Q	<i>long-run realtime PCR technique for DNA damage – quantification</i>
LTR	<i>long terminal repeats</i>
Mbp	megabáze, <i>megabase pair</i>
miRNA	mikro RNA
mRNA	messenger RNA
mtDNA	mitochondriální DNA
NER	nukleotidová excisní oprava, <i>nucleotide excision repair</i>
NGS	sekvenování nové generace, <i>next generation sequencing</i>
NK	nukleová kyselina
non-LTR	<i>non-long terminal repeats</i>
NTC	<i>no template control</i>
ORF	otevřený čtecí rámeček, <i>open reading frame</i>
PAG	polyakrylamidový gel
PCR	polymerázová řetězcová reakce, <i>polymerase chain reaction</i>
pre-mRNA	prekurzorová mRNA
qPCR	kvantitativní PCR, <i>quantitative PCR</i>
RADAR-seq	<i>rare damage and repair sequencing</i>
RAPD	náhodně amplifikované polymerní DNA, <i>random amplified polymorphic DNA</i>
RNA	ribonukleová kyselina, <i>ribonucleic acid</i>
ROS	reaktivní formy kyslíku, <i>reactive oxygen species</i>
rRNA	ribosomální RNA
SCGE	jednobuněčná gelová elektroforéza, <i>single cell gel electrophoresis</i>
SINE	<i>short interspersed element</i>
siRNA	krátká interferující RNA, <i>small interfering RNA</i>
snRNA	malé jaderné RNA
SRP	částice přijímací signály, <i>signal recognition particle</i>
SSB	jednovláknový zlom (<i>single strand break</i>)
SSB proteiny	single-strand binding proteins
ssDNA	jednovláknová DNA, <i>single-strand DNA</i>
SVA	SINE/VNTR/Alu
TAE	pufř se složkami TRIS, kyselina octová a EDTA
TATA-BOX	sekvence TATAAAA
Taq	<i>Thermus aquaticus Y1</i>
TBE	pufř se složkami TRIS, kyselina boritá a EDTA
TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TD-PCR	PCR závislá na terminální transferase, <i>terminal deoxynucleotidyl transferase-dependent PCR</i>
TE	transponovatelné elementy
TFIID	transkripční faktor II D
TFIIH	transkripční faktor II H
TFIIX	transkripční faktor II X
TFO	<i>triplex-forming oligonucleotides</i>
TMP	thymidinmonofosfát
TOP I	topoisomerasa I

TOP II	topoisomerasa II
TPE	pufr se složkami TRIS, kyselina kyselina fosforečná a EDTA
TPRT	<i>Target Primed Reverse Transcription</i>
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transferová RNA
TSD	<i>target site duplications</i>
UTP	uridintrifosfát
UTR	nepřekládaná oblast, <i>untranslated region</i>
VNTR	variabilní počty tandemových repetice, <i>variable number of tandem repeats</i>

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Centrální dogma molekulární biologie (převzato, upraveno; Crick, 1970)	10
Obr. 2 Základní báze nukleových kyselin (převzato, upraveno; Chatterjee a Walker, 2017)	11
Obr. 3 Struktura NK (převzato a upraveno; jenabioscience.com, online)	13
Obr. 4 Alternativní konformace DNA (převzato, Belmont et al., online)	14
Obr. 5 (A) Trojitá šroubovice (převzato, Shri Mall et al. 2018, online; (B) G-kvadruplex a i-motif v dvouvláknové DNA (převzato; Travers a Muskhelishvili, 2015) ; (C) Různé stechiometrie vláken G-kvadruplexu (převzato; Simonsson, 2001).....	17
Obr. 6 Úrovně kondenzace DNA v chromozomech (převzato, upraveno; Snustad et al., 2009)	19
Obr. 7 Třídy transponovatelných elementů v lidském genomu (převzato; Beck et al., 2011) ...	29
Obr. 8 Deaminace bází (převzato, upraveno; Chatterjee a Walker, 2017)	32
Obr. 9 Vznik 8-hydroxy-2-deoxyguanosinu z 2-deoxyguanosinu po působení ROS, (upraveno, online)	34
Obr. 10 Struktury lézí způsobené UV zářením, upraveno (dbaitalia,online)	38
Obr. 11 Vznik chromozomových mutací (převzato, upraveno; yourgenome.org, online)	39
Obr. 12 Regulace buněčného cyklu savců pomocí cyklín/CDK komplexů (převzato, Gomez a Hergovich, 2016; online)	41
Obr. 13 Elektroforéza normálních a anormálních DNA fragmentů (převzato; Stellwagen, 2009)	47
Obr. 14 Průběh PCR reakce (převzato, thermofisher.com; online)	54

10. ZDROJE

- AKOPIANTS, Konstantin, Susovan MOHAPATRA, Vijay MENON, Tong ZHOU, Kristoffer VALERIE a Lawrence F. POVIRK. Tracking the processing of damaged DNA double-strand break ends by ligation-mediated PCR: increased persistence of 3'-phosphoglycolate termini in SCAN1 cells. *Nucleic Acids Research* [online]. 2014, **42**(5), 3125-3137 [cit. 2022-05-12]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkt1347
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. *From DNA to RNA*. [cit.:2022-03-14], Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26887/>
- ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Přeložil Arnošt KOTYK, přeložil Bohumil BOUZEK, přeložil Pavel HOZÁK. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902906-2-0.
- ATIENZAR, Franck A, Paola VENIER, Awadhesh N JHA a Michael H DEPLEDGE. Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* [online]. 2002, **521**(1-2), 151-163 [cit. 2022-05-13]. ISSN 13835718. Dostupné z: doi:10.1016/S1383-5718(02)00216-4
- BALDWIN, E. a N. OSHEROFF. Etoposide, Topoisomerase II and Cancer. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* [online]. 2005, **5**(4), 363-372 [cit. 2022-03-31]. ISSN 15680118. Dostupné z: doi:10.2174/1568011054222364
- BARNUM, Kevin J. a Matthew J. O'CONNELL. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. NOGUCHI, Eishi a Mariana C. GADALETA, ed. *Cell Cycle Control* [online]. New York, NY: Springer New York, 2014, 2014-5-14, s. 29-40 [cit. 2022-03-28]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-0887-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-0888-2_2
- BECK, Christine R., José Luis GARCIA-PEREZ, Richard M. BADGE a John V. MORAN. LINE-1 Elements in Structural Variation and Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* [online]. 2011, **12**(1), 187-215 [cit. 2022-04-07]. ISSN 1527-8204. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-genom-082509-141802
- BEHJATI, Sam a Patrick S TARPEY. What is next generation sequencing?. *Archives of disease in childhood - Education & practice edition* [online]. 2013, **98**(6), 236-238 [cit. 2022-05-13]. ISSN 1743-0585. Dostupné z: doi:10.1136/archdischild-2013-304340
- BELMONT, Philippe, Jean François CONSTANT a Martine DEMEUNYNCK. Nucleic acid conformation diversity: from structure to function and regulation. *Chemical Society Reviews* [online]. 30(1), 70-81 [cit. 2022-03-10]. ISSN 03060012. Dostupné z: doi:10.1039/a904630e
- BEN-SHEM, Adam, Nicolas GARREAU DE LOUBRESSE, Sergey MELNIKOV, Lasse JENNER, Gulnara YUSUPOVA a Marat YUSUPOV. The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution. *Science* [online]. 2011, **334**(6062), 1524-1529 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1212642

BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7. (online : pdf), [cit.: 17.12.2021]

BERNSTEIN, Carol, Anil R., Valentine NFONSAM a Harris BERNSTEI. DNA Damage, DNA Repair and Cancer. CHEN, Clark, ed. *New Research Directions in DNA Repair* [online]. InTech, 2013, 2013-05-22 [cit. 2021-11-30]. ISBN 978-953-51-1114-6. Dostupné z: doi:10.5772/53919

BERTRAM, Catharina a Ralf HASS. Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. *Biological Chemistry* [online]. 2008, 389(3), 211-220 [cit. 2022-02-03]. ISSN 14374315. Dostupné z: doi:10.1515/BC.2008.031

BESARATINIA, Ahmad a Gerd P. PFEIFER. Measuring the Formation and Repair of UV Damage at the DNA Sequence Level by Ligation-Mediated PCR. BJERGBÆK, Lotte, ed. *DNA Repair Protocols* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2012, 2012-7-23, s. 189-202 [cit. 2022-05-12]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-61779-997-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-998-3_14

BOTTEMA, Cynthia D.K. a Steve S. SOMMER. PCR amplification of specific alleles: Rapid detection of known mutations and polymorphisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [online]. 1993, 288(1), 93-102 [cit. 2022-04-06]. ISSN 00275107. Dostupné z: doi:10.1016/0027-5107(93)90211-W

BURGE, Sarah, Gary N. PARKINSON, Pascale HAZEL, Alan K. TODD a Stephen NEIDLE. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Research* [online]. 2006, 34(19), 5402-5415 [cit. 2022-04-24]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkl655

BURGERS, Peter M. J. Eukaryotic DNA polymerases in DNA replication and DNA repair. *Chromosoma* [online]. 1998, 107(4), 218-227 [cit. 2022-03-18]. ISSN 0009-5915. Dostupné z: doi:10.1007/s004120050300

BUTLER, John M. Non-human DNA. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing* [online]. Elsevier, 2012, 2012, s. 473-495 [cit. 2022-05-13]. ISBN 9780123745132. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374513-2.00016-6

CADENAS, Enrique a Kelvin J.A. DAVIES. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. This article is dedicated to the memory of our dear friend, colleague, and mentor Lars Ernster (1920–1998), in gratitude for all he gave to us. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2000, 29(3-4), 222-230 [cit. 2022-04-26]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/S0891-5849(00)00317-8

CADET, Jean a Kelvin J.A. DAVIES. Oxidative DNA damage & repair: An introduction. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2017, 107, 2-12 [cit. 2022-02-03]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.030

CALDECOTT, Keith W. DNA single-strand breaks and neurodegeneration. *DNA Repair* [online]. 2004, 3(8-9), 875-882 [cit. 2022-02-04]. ISSN 15687864. Dostupné z: doi:10.1016/j.dnarep.2004.04.011

CALLINAN, P.A. a M.A. BATZER. Retrotransposable Elements and Human Disease. VOLFF, J.-N., ed. *Genome and Disease* [online]. Basel: KARGER, 2006, 2006, s. 104-115 [cit. 2022-04-06]. Genome Dynamics. ISBN 3-8055-8029-0. Dostupné z: doi:10.1159/000092503

- CLANCY, Suzanne. *DNA Transcription* [online], Nature Education, 2008, 1 (1): 41, [cit.: 2022-03-12], Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-transcription-426/>
- CLARK, David P. a Nanette J. PAZDERNIK. DNA Synthesis In Vivo and In Vitro. *Biotechnology* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 97-130 [cit. 2022-05-13]. ISBN 9780123850157. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-385015-7.00004-1
- COOKE, Marcus S., Mark D. EVANS, Miral DIZDAROGLU a Joseph LUNEC. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal* [online]. 2003, 17(10), 1195-1214 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.02-0752rev
- CHRISTMANN, Markus, Maja T. TOMICIC, Wynand P. ROOS a Bernd KAINA. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* [online]. 2003, 193(1-2), 3-34 [cit. 2022-04-26]. ISSN 0300483X. Dostupné z: doi:10.1016/S0300-483X(03)00287-7
- COBB, Matthew. 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology. *PLOS Biology* [online]. 2017, 15(9) [cit. 2022-04-27]. ISSN 1545-7885. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.2003243
- DAI, Shu-Mei, Hsiu-Hua CHEN, Cheng CHANG, Arthur D. RIGGS a Steven D. FLANAGAN. Ligation-mediated PCR for quantitative in vivo footprinting. *Nature Biotechnology* [online]. 2000, 18(10), 1108-1111 [cit. 2022-05-12]. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/80323
- DAHM, Ralf. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human Genetics* [online]. 2008, 122(6), 565-581 [cit. 2022-03-08]. ISSN 0340-6717. Dostupné z: doi:10.1007/s00439-007-0433-0
- DANIELSEN, Pernille Høgh, Steffen LOFT, Nicklas Raun JACOBSEN, Keld Alstrup JENSEN, Herman AUTRUP, Jean-Luc RAVANAT, Håkan WALLIN a Peter MØLLER. Oxidative Stress, Inflammation, and DNA Damage in Rats after Intratracheal Instillation or Oral Exposure to Ambient Air and Wood Smoke Particulate Matter. *Toxicological Sciences* [online]. 2010, 118(2), 574-585 [cit. 2022-05-11]. ISSN 1096-6080. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kfq290
- DANYLCHENKO, Oksana a Boris SOROCHINSKY. Use of RAPD assay for the detection of mutation changes in plant DNA induced by UV-B and γ -rays. *BMC Plant Biology* [online]. 2005, 5(S1) [cit. 2022-05-13]. ISSN 1471-2229. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2229-5-S1-S9
- DERRIEN, Thomas, Rory JOHNSON, Giovanni BUSSOTTI, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Research* [online]. 2012, 22(9), 1775-1789 [cit. 2022-04-03]. ISSN 1088-9051. Dostupné z: doi:10.1101/gr.132159.111
- DICKERSON, Richard E. [5] DNA structure from A to Z. *DNA Structures Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA* [online]. Elsevier, 1992, 1992, s. 67-111 [cit. 2022-03-10]. Methods in Enzymology. ISBN 9780121821128. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(92)11007-6
- DUNCAN, Bruce K. a Jeffrey H. MILLER. Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature* [online]. 287(5782), 560-561 [cit. 2022-01-30]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/287560a0

- EASTMAN, Alan a Michael A. BARRY. The Origins of DNA Breaks: A Consequence of DNA Damage, DNA Repair, or Apoptosis?. *Cancer Investigation* [online]. 2009, 10(3), 229-240 [cit. 2022-02-05]. ISSN 0735-7907. Dostupné z: doi:10.3109/07357909209032765
- ELMORE, Susan. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* [online]. 2007, 35(4), 495-516 [cit. 2022-04-26]. ISSN 0192-6233. Dostupné z: doi:10.1080/01926230701320337
- ENGLANDER, Ella W a Bruce H HOWARD. Alu-mediated detection of DNA damage in the human genome. *Mutation Research/DNA Repair* [online]. 1997, 385(1), 31-39 [cit. 2022-04-30]. ISSN 09218777. Dostupné z: doi:10.1016/S0921-8777(97)00036-0
- ESCOBAR, Ma. Luisa, Olga M. ECHEVERRÍA a Gerardo H. VÁZQUEZ-NIN. Necrosis as Programmed Cell Death. NTULI, Tobias M., ed. *Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis* [online]. InTech, 2015, 2015-12-16 [cit. 2022-04-26]. ISBN 978-953-51-2236-4. Dostupné z: doi:10.5772/61483
- EUN, Hylene-Myong. DNA Polymerases. *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology* [online]. Elsevier, 1996, 1996, s. 345-489 [cit. 2022-04-05]. ISBN 9780122437403. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012243740-3/50009-0
- FARKAS, Daniel H. a Carol A. HOLLAND. Overview of Molecular Diagnostic Techniques and Instrumentation. *Cell and Tissue Based Molecular Pathology* [online]. Elsevier, 2009, 2009, s. 19-32 [cit. 2022-04-03]. ISBN 9780443069017. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044306901-7.50008-0
- FOSTER, Patricia L. Methods for Determining Spontaneous Mutation Rates. *DNA Repair, Part B* [online]. Elsevier, 2006, 2006, s. 195-213 [cit. 2022-03-21]. Methods in Enzymology. ISBN 9780121828141. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(05)09012-9
- CRICK, FRANCIS. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* [online]. 1970, 227(5258), 561-563 [cit. 2022-04-27]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/227561a0
- FRANK-KAMENETSKII, Maxim D. a Sergei M. MIRKIN. TRIPLEX DNA STRUCTURES. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 1995, 64(1), 65-95 [cit. 2022-03-11]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000433
- FREDERICO, Lisa A., Thomas A. KUNKEL a Barbara Ramsay SHAW. A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry* [online]. 1990, 29(10), 2532-2537 [cit. 2022-04-24]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi00462a015
- FREIFELDER, David a Bruce TRUMBO. Matching of single-strand breaks to form double-strand breaks in DNA. *Biopolymers* [online]. 1969, 7(5), 681-693 [cit. 2022-02-04]. ISSN 0006-3525. Dostupné z: doi:10.1002/bip.1969.360070506
- FRITSCH, R.J. a I. KRAUSE. ELECTROPHORESIS. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* [online]. Elsevier, 2003, 2003, s. 2055-2062 [cit. 2022-03-25]. ISBN 9780122270550. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-227055-X/01409-7
- FUNAKI, Makoto a Paul A. JANMEY. Technologies to Engineer Cell Substrate Mechanics in Hydrogels. *Biology and Engineering of Stem Cell Niches* [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 363-

373 [cit. 2022-03-26]. ISBN 9780128027349. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802734-9.00023-8

GIGLIA-MARI, G., A. ZOTTER a W. VERMEULEN. DNA Damage Response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2011, 3(1), a000745-a000745 [cit. 2022-03-29]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a000745

GILBERT, Nick a James ALLAN. Supercoiling in DNA and chromatin. *Current Opinion in Genetics & Development* [online]. 2014, 25, 15-21 [cit. 2022-03-10]. ISSN 0959437X. Dostupné z: doi:10.1016/j.gde.2013.10.013

GIRISH, P.S. a Nagappa S. KARABASANAVAR. Molecular techniques for speciation of meat. *Meat Quality Analysis* [online]. Elsevier, 2020, 2020, s. 133-151 [cit. 2022-05-13]. ISBN 9780128192337. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819233-7.00009-4

GOMEZ, V. a A. HERGOVICH. Cell-Cycle Control and DNA-Damage Signaling in Mammals. *Genome Stability* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 227-242 [cit. 2022-03-29]. ISBN 9780128033098. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803309-8.00014-8

GRADE, Marian, Michael J. DIFILIPPANTONIO a Jordi CAMPS. Patterns of Chromosomal Aberrations in Solid Tumors. GHADIMI, B. Michael a Thomas RIED, ed. *Chromosomal Instability in Cancer Cells* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2015, 2015-9-17, s. 115-142 [cit. 2022-03-21]. Recent Results in Cancer Research. ISBN 978-3-319-20290-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-20291-4_6

GRANDI, Fiorella C. a Wenfeng AN. Non-LTR retrotransposons and microsatellites. *Mobile Genetic Elements* [online]. 2014, 3(4) [cit. 2022-04-06]. ISSN 2159-256X. Dostupné z: doi:10.4161/mge.25674

GREEN, Michael R. a Joseph SAMBROOK. Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2017, 2017(4) [cit. 2022-02-14]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot093450

GULIAEV, Anton B. a B. SINGER. DNA Damage: Alkylation. *Encyclopedia of Biological Chemistry* [online]. Elsevier, 2004, 2004, s. 609-613 [cit. 2022-04-26]. ISBN 9780124437104. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-443710-9/00154-X

HANADA, Katsuhiko, ed. *DNA Electrophoresis* [online]. New York, NY: Springer US, 2020 [cit. 2022-03-25]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-0716-0322-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-0716-0323-9

HATTERJEE, Shruti a Ishan H. RAVAL. Pathogenic Microbial Genetic Diversity with Reference to Health. *Microbial Diversity in the Genomic Era* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 559-577 [cit. 2022-05-13]. ISBN 9780128148495. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814849-5.00032-0

HEMMINKI, Kari. DNA adducts, mutations and cancer. *Carcinogenesis* [online]. 1993, 14(10), 2007-2012 [cit. 2022-04-26]. ISSN 0143-3334. Dostupné z: doi:10.1093/carcin/14.10.2007

HICKMAN, Alison Burgess, Michael CHANDLER a Fred DYDA. Integrating prokaryotes and eukaryotes: DNA transposases in light of structure. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2010, 45(1), 50-69 [cit. 2022-04-06]. ISSN 1040-9238. Dostupné z: doi:10.3109/10409230903505596

HOGREFE, Holly H. a Michael C. BORNES. Long-Range PCR with a DNA Polymerase Fusion. PARK, Daniel J., ed. *PCR Protocols* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, 2011-9-29, s. 17-23 [cit. 2022-04-11]. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-60761-943-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-944-4_2

HORTON, Julie K, Mary WATSON, Donna F STEFANICK, Daniel T SHAUGHNESSY, Jack A TAYLOR a Samuel H WILSON. XRCC1 and DNA polymerase β in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks. *Cell Research* [online]. 2008, 18(1), 48-63 [cit. 2022-02-04]. ISSN 1001-0602. Dostupné z: doi:10.1038/cr.2008.7

HOY, Marjorie A. DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction. *Insect Molecular Genetics* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 307-372 [cit. 2022-04-05]. ISBN 9780124158740. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-415874-0.00008-1

HOY, Marjorie A. Transcription, Translation, and Regulation of Eukaryotic DNA. *Insect Molecular Genetics* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 37-71 [cit. 2022-03-13]. ISBN 9780128152300. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-815230-0.00002-9

HU, Yuwei, Alessandro CECCONELLO, Andrea IDILI, Francesco RICCI a Itamar WILLNER. Triplex DNA Nanostructures: From Basic Properties to Applications. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2017, 56(48), 15210-15233 [cit. 2022-03-11]. ISSN 14337851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201701868

HUANG, Ming, Timothy J. GIESE, Tai-Sung LEE a Darrin M. YORK. Improvement of DNA and RNA Sugar Pucker Profiles from Semiempirical Quantum Methods. *Journal of Chemical Theory and Computation* [online]. 2014, 10(4), 1538-1545 [cit. 2022-03-09]. ISSN 1549-9618. Dostupné z: doi:10.1021/ct401013s

HUSAIN, I., J. GRIFFITH a A. SANCAR. Thymine dimers bend DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1988, 85(8), 2558-2562 [cit. 2022-02-07]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.85.8.2558

CHANG, Howard H. Y., Nicholas R. PANNUNZIO, Noritaka ADACHI a Michael R. LIEBER. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2017, 18(8), 495-506 [cit. 2022-04-08]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm.2017.48

CHATTERJEE, Nimrat a Graham C. WALKER. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* [online]. 2017, 58(5), 235-263 [cit. 2021-11-30]. ISSN 08936692. Dostupné z: doi:10.1002/em.22087

CHAWLA, Mohit, Romina OLIVA, Janusz M. BUJNICKI a Luigi CAVALLO. An atlas of RNA base pairs involving modified nucleobases with optimal geometries and accurate energies. *Nucleic Acids Research* [online]. 2015, 43(14), 6714-6729 [cit. 2022-04-03]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkv606

CHEN, Hsiu-Hua, Joanna KONTARAKI, Constanze BONIFER a Arthur D. RIGGS. Terminal Transferase-Dependent PCR (TDPCR) for In Vivo UV Photofootprinting of Vertebrate Cells. *Science's STKE* [online]. 2001, 2001(77) [cit. 2022-05-13]. ISSN 1525-8882. Dostupné z: doi:10.1126/stke.2001.77.pl1

CHEN, Liuji, Heung M. LEE, George H. GREELEY a Ella W. ENGLANDER. Accumulation of oxidatively generated DNA damage in the brain: A mechanism of neurotoxicity. *Free Radical*

Biology and Medicine [online]. 2007, **42**(3), 385-393 [cit. 2022-05-11]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.11.009

CHEN, Zhihai, Dapeng WANG, Xing LIU, et al. Oxidative DNA damage is involved in cigarette smoke-induced lung injury in rats. *Environmental Health and Preventive Medicine* [online]. 2015, **20**(5), 318-324 [cit. 2022-05-11]. ISSN 1342-078X. Dostupné z: doi:10.1007/s12199-015-0469-z

GRAHAM V, William J., Christopher D. PUTNAM a Richard D. KOLODNER. DNA Mismatch Repair: Mechanisms and Cancer Genetics. *Reference Module in Biomedical Sciences* [online]. Elsevier, 2018, 2018 [cit. 2022-04-26]. ISBN 9780128012383. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.96130-0

JACKSON, Stephen P. a Jiri BARTEK. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* [online]. 2009, 461(7267), 1071-1078 [cit. 2021-11-30]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature08467

JAIN, Sapna, Mukesh K. YADAV a Ajay KUMAR. Techniques for Production and Quality Assessment of Genetically Modified Foods. *Genetically Engineered Foods* [online]. Elsevier, 2018, 2018, s. 177-202 [cit. 2022-05-13]. ISBN 9780128115190. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-811519-0.00007-8

JANKOVIC, Joseph, John MAZZIOTTA, Scott POMEROY a Nancy NEWMAN., *Polymorphisms and Point Mutations. Clinical Neurogenetics: Bradley and Daroff's Neurology in Clinical Practice* [online]. 8th Edition. Elsevier, March 23, 2021, s. 681-708 [cit. 2022-03-21]. ISBN 780323642613. Dostupné z: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323642613000486>

JENNER, Andrew, Timothy G. ENGLAND, Okezie I. ARUOMA a Barry HALLIWELL. Measurement of oxidative DNA damage by gas chromatography–mass spectrometry: ethanethiol prevents artifactual generation of oxidized DNA bases. *Biochemical Journal* [online]. 1998, 331(2), 365-369 [cit. 2021-12-21]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj3310365

JIA, Haiying, Yunfei GUO, Weiwei ZHAO a Kai WANG. Long-range PCR in next-generation sequencing: comparison of six enzymes and evaluation on the MiSeq sequencer. *Scientific Reports* [online]. 2015, 4(1) [cit. 2022-04-05]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep05737

JIA, Haiying, Yunfei GUO, Weiwei ZHAO a Kai WANG. Long-range PCR in next-generation sequencing: comparison of six enzymes and evaluation on the MiSeq sequencer. *Scientific Reports* [online]. 2015, 4(1) [cit. 2022-04-11]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep05737

JIANG, Jingchen, Liuya ZHAO, Lan YAN, et al. Structural features and mechanism of translocation of non-LTR retrotransposons in *Candida albicans*. *Virulence* [online]. 2014, 5(2), 245-252 [cit. 2022-04-07]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.4161/viru.27278

JIN, B., Y. LI a K. D. ROBERTSON. DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy?. *Genes & Cancer* [online]. 2011, 2(6), 607-617 [cit. 2022-03-27]. ISSN 1947-6019. Dostupné z: doi:10.1177/1947601910393957

JINTARIDTH, Pornnratsami a Apiwat MUTIRANGURA. Distinctive patterns of age-dependent hypomethylation in interspersed repetitive sequences. *Physiological Genomics* [online].

2010, **41**(2), 194-200 [cit. 2022-04-28]. ISSN 1094-8341. Dostupné z: doi:10.1152/physiolgenomics.00146.2009

JURICA, M.S. a G.A. ROYBAL. RNA Splicing. *Encyclopedia of Biological Chemistry* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 185-190 [cit. 2022-03-16]. ISBN 9780123786319. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-378630-2.00674-5

KADRI, Karim. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. L. NAGPAL, Madan, Oana-Maria BOLDURA, Cornel BALTĂ a Shymaa ENANY, ed. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science* [online]. IntechOpen, 2020, 2020-2-12 [cit. 2022-03-31]. ISBN 978-1-78984-089-6. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.86491

KASTAN, Michael B. a Jiri BARTEK. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* [online]. 2004, **432**(7015), 316-323 [cit. 2022-03-29]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature03097

KIM, Yun-Ji, Jungnam LEE a Kyudong HAN. Transposable Elements: No More 'Junk DNA'. *Genomics & Informatics* [online]. 2012, **10**(4) [cit. 2022-04-07]. ISSN 1598-866X. Dostupné z: doi:10.5808/GI.2012.10.4.226

KOCH, C.J. a A.R. GIANDOMENICO. The Alkaline Elution Technique for Measuring DNA Single Strand Breaks: Increased Reliability and Sensitivity. *Analytical Biochemistry* [online]. 1994, **220**(1), 58-65 [cit. 2021-12-21]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.1994.1299

KOHN, Kurt W., Leonard C. ERICKSON, Regina A. G. EWIG a Charles A. FRIEDMAN. Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry* [online]. 1976, **15**(21), 4629-4637 [cit. 2021-12-21]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi00666a013

KOMURA, J.-i. a A. D. RIGGS. Terminal transferase-dependent PCR: A versatile and sensitive method for in vivo footprinting and detection of DNA adducts. *Nucleic Acids Research* [online]. 1998, **26**(7), 1807-1811 [cit. 2022-05-13]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/26.7.1807

KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.

KOVAC, Jasna, Maria L. ROLON, Marianna NAUM a Keith A. LAMPEL. DNA-Based Assays. *Encyclopedia of Dairy Sciences* [online]. Elsevier, 2022, 2022, s. 356-362 [cit. 2022-04-05]. ISBN 9780128187678. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818766-1.00157-4

KRAMER, Martha F. a Donald M. COEN. Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. *Current Protocols in Toxicology* [online]. 2000, **3**(1) [cit. 2022-04-02]. ISSN 1934-9254. Dostupné z: doi:10.1002/0471140856.txa03cs03

KROKAN, H. E. a M. BJORAS. Base Excision Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2013, **5**(4), a012583-a012583 [cit. 2022-04-26]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a012583

KUCHAŘOVÁ, M., M. HRONEK, K. RYBÁKOVÁ, Z. ZADÁK, R. ŠTĚTINA, V. JOSKOVÁ a A. PATKOVÁ. Comet assay and its use for evaluating oxidative DNA damage in some pathological states. *Physiological Research* [online]. 1-15 [cit. 2022-03-29]. ISSN 1802-9973. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.933901

KUMARI Sunita, RASTOGI Rajesh P., SINGH Kanchan L., SINGH Shailendra P. and SINHA Rajeshwar P., *DNA Damage: Detection strategies*, EXCLI Journal 2008;7:44-62 – ISSN 1611-2156, publikováno 04/2008 [cit.:16. 12. 2021] Dostupné z: <https://www.excli.de/vol7/Sinha02-08/Kumari04-03proof.pdf>

LABET, V., A. GRAND, C. MORELL, J. CADET a L. A. ERIKSSON. Proton catalyzed hydrolytic deamination of cytosine: a computational study. *Theoretical Chemistry Accounts* [online]. 2008, 120(4-6), 429-435 [cit. 2022-02-01]. ISSN 1432-881X. Dostupné z: doi:10.1007/s00214-008-0418-7

LEE, Pei Yun, John COSTUMBRADO, Chih-Yuan HSU a Yong Hoon KIM. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, (62) [cit. 2022-03-25]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/3923

LEE, Heung Man, George H. GREELEY a Ella W. ENGLANDER. Transgenic overexpression of neuroglobin attenuates formation of smoke-inhalation-induced oxidative DNA damage, in vivo, in the mouse brain. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2011, 51(12), 2281-2287 [cit. 2022-05-11]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.026

LEHLE, Simon, Dominic G. HILDEBRAND, Britta MERZ, et al. LORD-Q: a long-run real-time PCR-based DNA-damage quantification method for nuclear and mitochondrial genome analysis. *Nucleic Acids Research* [online]. 2014, 42(6), e41-e41 [cit. 2022-05-13]. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkt1349

LEWIS, Charles A., Jesse CRAYLE, Shuntai ZHOU, Ronald SWANSTROM a Richard WOLFENDEN. Cytosine deamination and the precipitous decline of spontaneous mutation during Earth's history. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2016, 113(29), 8194-8199 [cit. 2022-04-24]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1607580113

LEWIS, Charles A., Jesse CRAYLE, Shuntai ZHOU, Ronald SWANSTROM a Richard WOLFENDEN. Cytosine deamination and the precipitous decline of spontaneous mutation during Earth's history. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2016, 113(29), 8194-8199 [cit. 2022-01-31]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1607580113

LI, Jing a Changning LIU. Coding or Noncoding, the Converging Concepts of RNAs. *Frontiers in Genetics* [online]. 2019, 10 [cit. 2022-03-12]. ISSN 1664-8021. Dostupné z: doi:10.3389/fgene.2019.00496

LI, Wentao a Aziz SANCAR. Methodologies for detecting environmentally induced DNA damage and repair. *Environmental and Molecular Mutagenesis* [online]. 2020, 61(7), 664-679 [cit. 2022-05-13]. ISSN 0893-6692. Dostupné z: doi:10.1002/em.22365

LI, Xuan a Wolf-Dietrich HEYER. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research* [online]. 2008, 18(1), 99-113 [cit. 2022-04-26]. ISSN 1001-0602. Dostupné z: doi:10.1038/cr.2008.1

LINDAHL, Tomas a Barbro NYBERG. Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* [online]. 2002, 13(16), 3405-3410 [cit. 2022-02-01]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi00713a035

LINHART, Igor a Jan NOVÁK. DERIVÁTY PURINOVÝCH BÁZÍ JAKO INDIKÁTORY POŠKOZENÍ DNA. *Chem. listy* [online]. 2002, (96), 276-281 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2002_05_02.pdf

LIU, Xin, David A. BUSHNELL a Roger D. KORNBERG. RNA polymerase II transcription: Structure and mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* [online]. 2013, 1829(1), 2-8 [cit. 2022-03-14]. ISSN 18749399. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagr.2012.09.003

LO, Y. M. Dennis. The Amplification Refractory Mutation System. LO, Y. M. Dennis. *Clinical Applications of PCR* [online]. New Jersey: Humana Press, 1998, s. 61-70 [cit. 2022-04-06]. ISBN 0-89603-499-2. Dostupné z: doi:10.1385/0-89603-499-2:61

LOON OOI, Siew a Jef D. BOEKE. Nonhomologous Recombination: Retrotransposons. *Encyclopedia of Biological Chemistry* [online]. Elsevier, 2004, 2004, s. 80-86 [cit. 2022-04-06]. ISBN 9780124437104. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-443710-9/00436-1

LÓPEZ-OTÍN, Carlos, Maria A. BLASCO, Linda PARTRIDGE, Manuel SERRANO a Guido KROEMER. The Hallmarks of Aging. *Cell* [online]. 2013, **153**(6), 1194-1217 [cit. 2022-04-26]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2013.05.039

LORENZ, Todd C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, (63) [cit. 2022-03-31]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/3998

MADDOCKS, Sarah a Rowena JENKINS. Quantitative PCR. *Understanding PCR* [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 45-52 [cit. 2022-04-04]. ISBN 9780128026830. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802683-0.00004-6

MARNETT, Lawrence J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis, Volume 21, Issue 3, 2000* [online]. 21(3), 361-370 [cit. 2022-01-29]. ISSN 1460-2180. Dostupné z: doi:10.1093/carcin/21.3.361

MASOODI, Khalid Z., Sameena Maqbool LONE a Rovidha Saba RASOOL. Agarose gel electrophoresis. *Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology* [online]. Elsevier, 2021, 2021, s. 7-12 [cit. 2022-03-26]. ISBN 9780128244494. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-824449-4.00002-5

MATLOCK, Brian. *Assessment of Nucleic Acid Purity: Technical Note 52646* [online]. In: . Wilmington, MA, USA: Thermo Fisher Scientific [cit. 2022-04-02]. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>

MCHUGH, Domhnall a Jesús GIL. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *Journal of Cell Biology* [online]. 2018, **217**(1), 65-77 [cit. 2022-04-26]. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.201708092

Melanie EHRlich; Xian-Yang ZHANG; Nilufar M. INAMDAR (1990). *Spontaneous deamination of cytosine and 5-methylcytosine residues in DNA and replacement of 5-methylcytosine residues with cytosine residues.* , 238(3), 277–286. Dostupné z: doi:10.1016/0165-1110(90)90019-8

- MOORE, Lisa D, Thuc LE a Guoping FAN. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology* [online]. 2013, 38(1), 23-38 [cit. 2022-03-27]. ISSN 0893-133X. Dostupné z: doi:10.1038/npp.2012.112
- MUNOZ-LOPEZ, Martin a Jose GARCIA-PEREZ. DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Current Genomics* [online]. 2010, 11(2), 115-128 [cit. 2022-04-06]. ISSN 13892029. Dostupné z: doi:10.2174/138920210790886871
- NABEL, Christopher S., Sara A. MANNING a Rahul M. KOHLI. The Curious Chemical Biology of Cytosine: Deamination, Methylation, and Oxidation as Modulators of Genomic Potential. *ACS Chemical Biology* [online]. 2012, 7(1), 20-30 [cit. 2022-04-24]. ISSN 1554-8929. Dostupné z: doi:10.1021/cb2002895
- NEWTON, C.R., A. GRAHAM, L.E. HEPTINSTALL, S.J. POWELL, C SUMMERS, N. KALSHEKER, J.C. SMITH a A.F. MARKHAM. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research* [online]. 1989, 17(7), 2503-2516 [cit. 2022-04-06]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/17.7.2503
- NGUYEN, T, D BRUNSON, C L CRESPI, B W PENMAN, J S WISHNOK a S R TANNENBAUM. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1992, 89(7), 3030-3034 [cit. 2022-04-03]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.89.7.3030
- NICOLINI, Claudio, Marco CAVANNA, Annalisa MAURA, et al. DNA Alkaline Elution: Physical Basis of the Elution Process and Validation of this Method as a Screening Procedure to Identify Chemical Carcinogens. NICOLINI, Claudio, ed. *Chemical Carcinogenesis* [online]. Boston, MA: Springer US, 1982, 1982, s. 93-119 [cit. 2021-12-21]. ISBN 978-1-4684-4336-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4684-4334-9_6
- NOTOMI, Tsugunori, Hiroto OKAYAMA, Harumi MASABUCHI, Toshihiro YONEKAWA, Keiko WATANABE, Nobuyuki AMINO a Tetsu HASE. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* [online]. 2000, (28(12)), e63 [cit. 2022-05-13]. Dostupné z: doi:10.1093/nar/28.12.e63
- NYBERG, Kara A., Rhett J. MICHELSON, Charles W. PUTNAM a Ted A. WEINERT. Toward Maintaining the Genome: DNA Damage and Replication Checkpoints. *Annual Review of Genetics* [online]. 2002, 36(1), 617-656 [cit. 2022-03-28]. ISSN 0066-4197. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.genet.36.060402.113540
- OHLE, L D a E A ROSE. Optimization of long-distance PCR using a transposon-based model system. *Genome Research* [online]. 1992, 2(1), 51-59 [cit. 2022-04-03]. ISSN 1088-9051. Dostupné z: doi:10.1101/gr.2.1.51
- OLIVE, Peggy L a Judit P BANÁTH. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* [online]. 2006, 1(1), 23-29 [cit. 2022-03-29]. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2006.5
- PALAZZO, Alexander F., T. Ryan GREGORY a Joshua M. AKEY. The Case for Junk DNA. *PLoS Genetics* [online]. 2014, 10(5) [cit. 2022-03-13]. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1004351
- PARKER, Matthew W., Michael R. BOTCHAN a James M. BERGER. Mechanisms and regulation of DNA replication initiation in eukaryotes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular*

Biology [online]. 2017, 52(2), 107-144 [cit. 2022-03-18]. ISSN 1040-9238. Dostupné z: doi:10.1080/10409238.2016.1274717

PARRA-MARÍN, Olivia, Karla LÓPEZ-PACHECO, Roberto HERNÁNDEZ a Imelda LÓPEZ-VILLASEÑOR. The highly diverse TATA box-binding proteins among protists: A review. *Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. 2020, 239 [cit. 2022-03-14]. ISSN 01666851. Dostupné z: doi:10.1016/j.molbiopara.2020.111312

PASSARGE, Eberhard. *Color atlas of genetics*. Fourth edition, revised and updated. Stuttgart: Thieme, [2013], 475 s. Thieme flexibook. ISBN 978-3-13- 100364-5 , Dostupné online, [cit.:2022-03-09]

PAUL, Natasha, Jonathan SHUM a Tony LE. Hot Start PCR. KING, Nicola, ed. *RT-PCR Protocols* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2010, 2010-2-10, s. 301-318 [cit. 2022-04-04]. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-60761-628-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-629-0_19

PEGG, Anthony E. a Timothy L. BYERS. Repair of DNA containing O⁶-alkylguanine. *The FASEB Journal* [online]. 1992, 6(6), 2302-2310 [cit. 2022-04-26]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fasebj.6.6.1544541

PFEIFER, G. P. Mutagenesis at Methylated CpG Sequences. DOERFLER, Walter a Petra BÖHM, ed. *DNA Methylation: Basic Mechanisms* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006, s. 259-281 [cit. 2022-02-02]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. ISBN 3-540-29114-8. Dostupné z: doi:10.1007/3-540-31390-7_10

POTAMAN VN, Sinden RR. DNA: *Alternative Conformations and Biology*. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience;2000-2013. Dostupné z : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6545/> ; cit.: [2022-03-09]

PRIESTLE, JOHN P. a C. GREGORY PARIS. Experimental Techniques and Data Banks. *Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design* [online]. Elsevier, 1996, 1996, s. 139-217 [cit. 2022-04-03]. ISBN 9780121782450. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012178245-0/50006-8

RASTOGI, Rajesh P., RICHA, Ashok KUMAR, Madhu B. TYAGI a Rajeshwar P. SINHA. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *Journal of Nucleic Acids* [online]. 2010, 2010, 1-32 [cit. 2022-04-30]. ISSN 2090-021X. Dostupné z: doi:10.4061/2010/592980

Real-time PCR handbook (online) - Life technologies.com – Thermo Fisher Scientific [cit.: 19.12.2021] Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>

REECE, Richard J. a Anthony MAXWELL. DNA Gyrase: Structure and Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2008, 26(3-4), 335-375 [cit. 2022-03-18]. ISSN 1040-9238. Dostupné z: doi:10.3109/10409239109114072

REINES D, CONAWAY JW, CONAWAY RC. *The RNA polymerase II general elongation factors*. *Trends Biochem Sci*. 1996;21(9):351-355. [cit.:2022-03-14], Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3374595/>

RESNICK-SILVERMAN, Lois, MANFREDI, James, Analyzing p53 regulated DNA damage checkpoints by flow cytometry, [online], *Methods Mol Biol.* 2011;782:193-203. [cit.:2022-03-30], doi: 10.1007/978-1-61779-273-1_14;

RICH, Alexander a Shuguang ZHANG. Z-DNA: the long road to biological function. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2003, 4(7), 566-572 [cit. 2022-03-10]. ISSN 1471-0056. Dostupné z: doi:10.1038/nrg1115

RICHARDSON, Sandra R., Aurélien J. DOUCET, Huiru C. KOPERA, John B. MOLDOVAN, José Luis GARCIA-PEREZ, John V. MORAN, Alan LAMBOWITZ a Nancy CRAIG. The Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes. *Microbiology Spectrum* [online]. 2015, 3(2) [cit. 2022-04-06]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0061-2014

ROCHA, CR., SILVA MM, QUINET A, CABRAL-NETO JB, MENCK CF., *DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship*, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, BR. II Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, BR. Rocha CR, Silva MM, Quinet A, Cabral-Neto JB, Menck CF. DNA repair pathways; *Clinics*. 2018;73(suppl 1):e478s [cit.:05.11.2021] (online) Dostupné z: <https://www.scielo.br/j/clin/a/rMRrntdVGjXtpCdWGYQssy/?lang=en>

ROUBROEKS, Janou A. Y., Rebecca G. SMITH, Daniel L. A. VAN DEN HOVE a Katie LUNNON. Epigenetics and DNA methylomic profiling in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Journal of Neurochemistry* [online]. 2017, 143(2), 158-170 [cit. 2022-03-27]. ISSN 00223042. Dostupné z: doi:10.1111/jnc.14148

ROY, Béatrice, Anaïs DEPAIX, Christian PÉRIGAUD a Suzanne PEYROTTE. Recent Trends in Nucleotide Synthesis. *Chemical Reviews* [online]. 2016, 116(14), 7854-7897 [cit. 2022-03-08]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.6b00174

RUDIN, Charles M. a Craig B. THOMPSON. Transcriptional Activation of Short Interspersed Elements by DNA-Damaging Agents. *GENES, CHROMOSOMES & CANCER* [online]. 2001, (30), 64–71 [cit. 2022-04-29]. Dostupné z: doi:10.1002/1098-2264(2000)9999:9999<:aid-gcc1066>3.0.co;2-f

SERRATO-CAPUCHINA, Antonio a Daniel MATUTE. The Role of Transposable Elements in Speciation. *Genes* [online]. 2018, 9(5) [cit. 2022-04-06]. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes9050254

SHABALINA, Svetlana A a Nikolay A SPIRIDONOV. *Genome Biology* [online]. 5(4) [cit. 2022-03-12]. ISSN 14656906. Dostupné z: doi:10.1186/gb-2004-5-4-105

SHEN, Jiang-Cheng, William M. RIDEOUT a Peter A. JONES. The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA. *Nucleic Acids Research* [online]. 1994, 22(6), 972-976 [cit. 2022-02-01]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/22.6.972

SHRI MALL, Vijaya, Rajendra PRASAD OJHA a Rakesh KUMAR TIWARI. Recombinant Triplex formed by PNA-TFO: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Oriental Journal of Chemistry* [online]. 2018, 34(5), 2440-2446 [cit. 2022-03-11]. ISSN 0970020X. Dostupné z: doi:10.13005/ojc/340528

SCHARER, O. D. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2013, 5(10), a012609-a012609 [cit. 2022-04-26]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a012609

SCHIER, Allison C. a Dylan J. TAATJES. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Genes & Development* [online]. 2020, 34(7-8), 465-488 [cit. 2022-03-13]. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.335679.119

SIMONSSON, Tomas. G-Quadruplex DNA Structures Variations on a Theme. *Biological Chemistry* [online]. 2001, 382(4) [cit. 2022-04-24]. ISSN 1431-6730. Dostupné z: doi:10.1515/BC.2001.073

SINHA, Rajeshwar P. a Donat-P. HÄDER. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical & Photobiological Sciences* [online]. 1(4), 225-236 [cit. 2021-12-02]. ISSN 1474905X. Dostupné z: doi:10.1039/b201230h

SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS, RELICHOVÁ, Jiřina, ed. *Genetika*. Přeložil Anna MATALOVÁ. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-4852-2.

STELLWAGEN, Nancy C. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2009, 30(S1), S188-S195 [cit. 2022-03-25]. ISSN 01730835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.200900052

ŠPONER, Judit E., Pablo J. SANZ MIGUEL, Luis RODRÍGUEZ-SANTIAGO, Andrea ERXLEBEN, Michael KRUMM, Mariona SODUPE, Jirí ŠPONER a Bernhard LIPPERT. Metal-Mediated Deamination of Cytosine: Experiment and DFT Calculations. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2004, 43(40), 5396-5399 [cit. 2022-02-01]. ISSN 1433-7851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200460107

TAGHIZADEH, Koli, Jose L MCFALINE, Bo PANG, Matthew SULLIVAN, Min DONG, Elaine PLUMMER a Peter C DEDON. Quantification of DNA damage products resulting from deamination, oxidation and reaction with products of lipid peroxidation by liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry. *Nature Protocols* [online]. 2008, 3(8), 1287-1298 [cit. 2021-12-21]. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2008.119

TANAKA, Atsushi, Youko NAKATANI, Nobuyuki HAMADA, et al. Ionising irradiation alters the dynamics of human long interspersed nuclear elements 1 (LINE1) retrotransposon. *Mutagenesis* [online]. 2012, 27(5), 599-607 [cit. 2022-04-30]. ISSN 1464-3804. Dostupné z: doi:10.1093/mutage/ges025

TRAVERS, Andrew a Georgi MUSKHELISHVILI. DNA structure and function. *FEBS Journal* [online]. 2015, 282(12), 2279-2295 [cit. 2022-03-10]. ISSN 1742464X. Dostupné z: doi:10.1111/febs.13307

UDALI, Silvia, Patrizia GUARINI, Sara MORUZZI, Sang-Woon CHOI a Simonetta FRISO. Cardiovascular epigenetics: From DNA methylation to microRNAs. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2013, 34(4), 883-901 [cit. 2022-03-27]. ISSN 00982997. Dostupné z: doi:10.1016/j.mam.2012.08.001

VOSBERG, H.-P. DNA Topoisomerases: Enzymes That Control DNA Conformation. COOPER, M., H. EISEN, W. GOEBEL, et al., ed. *Current Topics in Microbiology and Immunology* [online].

Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1985, 1985, s. 19-102 [cit. 2022-03-10]. Current Topics in Microbiology and Immunology. ISBN 978-3-642-70229-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-70227-3_2

WANG, Guichun, Lance M HALLBERG, Elisa SAPHIER a Ella W ENGLANDER. Short Interspersed DNA Element-mediated detection of UVB-induced DNA damage and repair in the mouse genome, in vitro, and in vivo in skin. *Mutation Research/DNA Repair* [online]. 1999, 433(3), 147-157 [cit. 2022-04-10]. ISSN 09218777. Dostupné z: doi:10.1016/S0921-8777(99)00007-5

WANG, Guichun, Lance M HALLBERG a Ella W ENGLANDER. Rapid SINE-mediated detection of cisplatin: DNA adduct formation in vitro and in vivo in blood. *Mutation Research/DNA Repair* [online]. 1999, 434(2), 67-74 [cit. 2022-04-27]. ISSN 09218777. Dostupné z: doi:10.1016/S0921-8777(99)00021-X

WANG, Meng, Junjie YANG, Zhongtao GAI, et al. Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of Salmonella typhimurium in milk. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2018, 266, 251-256 [cit. 2022-04-01]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.011

WANG, Shiliang a Anguang HU. Comparative study of spontaneous deamination of adenine and cytosine in unbuffered aqueous solution at room temperature. *Chemical Physics Letters* [online]. 2016, 653, 207-211 [cit. 2022-01-31]. ISSN 00092614. Dostupné z: doi:10.1016/j.cplett.2016.05.001

WARSEN, Adelaide E., Melissa J. KRUG, Stacey LAFRENTZ, Danielle R. STANEK, Frank J. LOGE a Douglas R. CALL. Simultaneous Discrimination between 15 Fish Pathogens by Using 16S Ribosomal DNA PCR and DNA Microarrays. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2004, 70(7), 4216-4221 [cit. 2022-04-02]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.70.7.4216-4221.2004

WATERMAN, David P., James E. HABER a Marcus B. SMOLKA. Checkpoint Responses to DNA Double-Strand Breaks. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2020, 89(1), 103-133 [cit. 2022-03-28]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biochem-011520-104722

WATSON, J. D. a F. H. C. CRICK. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* [online]. 1953, 171(4356), 737-738 [cit. 2022-03-08]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/171737a0

WATSON, R. E. a J. I. GOODMAN. Epigenetics and DNA Methylation Come of Age in Toxicology. *Toxicological Sciences* [online]. 2002, 67(1), 11-16 [cit. 2022-03-27]. ISSN 1096-6080. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/67.1.11

WONG, G. K.-S. Is "Junk" DNA Mostly Intron DNA?. *Genome Research* [online]. 10(11), 1672-1678 [cit. 2022-03-13]. ISSN 10889051. Dostupné z: doi:10.1101/gr.148900

YADAV, Vipin Kumar, Poorwa AWASTHI a Amit KUMAR. Detection of UV-Induced Thymine Dimers. DHAWAN, Alok a Mahima BAJPAYEE, ed. *Genotoxicity Assessment* [online]. New York, NY: Springer New York, 2019, 2019-09-01, s. 313-322 [cit. 2022-02-07]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-9645-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-9646-9_17

YI, C. a C. HE. DNA Repair by Reversal of DNA Damage. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2013, 5(1), a012575-a012575 [cit. 2022-04-26]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a012575

YIN, Junfa, Ning ZHANG a Hailin WANG. Liquid chromatography- mass spectrometry for analysis of DNA damages induced by environmental exposure. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2019, 120 [cit. 2021-12-16]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2019.115645

YONEKURA, Shin-Ichiro, Nobuya NAKAMURA, Shuji YONEI a Qiu-Mei ZHANG-AKIYAMA. Generation, Biological Consequences and Repair Mechanisms of Cytosine Deamination in DNA. *Journal of Radiation Research* [online]. 2009, 50(1), 19-26 [cit. 2022-01-31]. ISSN 0449-3060. Dostupné z: doi:10.1269/jrr.08080

YU, Dong, Tianshun ZHOU, Xuewu SUN, et al. Cyclic Digestion and Ligation-Mediated PCR Used for Flanking Sequence Walking. *Scientific Reports* [online]. 2020, 10(1) [cit. 2022-05-12]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-60411-w

YU, Tian-Wei a Diana ANDERSON. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: A chemical investigation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [online]. 1997, 379(2), 201-210 [cit. 2022-02-03]. ISSN 00275107. Dostupné z: doi:10.1016/S0027-5107(97)00141-3

ZGARBOVÁ, Marie, Petr JUREČKA, Jiří ŠPONER a Michal OTYEPKA. A- to B-DNA Transition in AMBER Force Fields and Its Coupling to Sugar Pucker. *Journal of Chemical Theory and Computation* [online]. 2018, 14(1), 319-328 [cit. 2022-03-10]. ISSN 1549-9618. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jctc.7b00926

ZHANG, Cheng, Gergana NESTOROVA, Robert A. RISSMAN a June FENG. Detection and quantification of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in Alzheimer's transgenic mouse urine using capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2013, 34(15), 2268-2274 [cit. 2022-05-11]. ISSN 01730835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201300036

ZHANG, Lulu, Lan YAN, Jingchen JIANG, Yan WANG, Yuanying JIANG, Tianhua YAN a Yongbing CAO. The structure and retrotransposition mechanism of LTR-retrotransposons in the asexual yeast *Candida albicans*. *Virulence* [online]. 2014, 5(6), 655-664 [cit. 2022-04-06]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.4161/viru.32180

ZHOU, Bin-Bing S. a Jiri BARTEK. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2004, 4(3), 216-225 [cit. 2022-03-30]. ISSN 1474-175X. Dostupné z: doi:10.1038/nrc1296

ZIMMERMAN, S. B. The Three-Dimensional Structure of DNA. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 1982, 51(1), 395-427 [cit. 2022-03-08]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.bi.51.070182.002143

ZIPPER, H. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* [online]. 2004, 32(12), e103-e103 [cit. 2022-03-25]. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gnh101

ZSCHOCKE, Johannes a Colin A. GRAHAM. A fluorescent multiplex ARMS method for rapid mutation analysis. *Molecular and Cellular Probes* [online]. 1995, 9(6), 447-451 [cit. 2022-04-06]. ISSN 08908508. Dostupné z: doi:10.1006/mcpr.1995.0068

INTERNETOVÉ ZDROJE

<https://www.yourgenome.org/facts/what-is-a-chromosome-disorder>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
<http://chemistry.gravitywaves.com/CHEMXL153/DNAMutationRepair.htm>
<https://www.dbitalia.it/SchedaNews.aspx?id=280>
<https://biotechkhan.wordpress.com/tag/deamination/>
https://www.researchgate.net/figure/The-chemical-structures-of-2-deoxyguanosine-dG-and-8-hydroxy-2-deoxyguanosine_fig1_13779220
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8-Oxo-dG>
<https://www.jenabioscience.com/nucleotides-nucleosides/nucleotides-by-structure/unmodified-natural-nucleotides/dntps/bundles/nu-1005-dntp-bundle>
<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>
<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/senescence>
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Modules/MolBioReview/central_dogma.html
<https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/isothermal-amplification/loop-mediated-isothermal-amplification-lamp>