

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program Biologie  
Studijní obor Biologie



**Ela Cerovská**

Význam repetitivních sekvencí v lékařské a forenzní genetice  
Significance of repetitive sequences in clinical and forensic genetics

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Pavlína Čejková, Ph.D.

Praha, 2014

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14.5.2014

.....

Ela Cerovská

Děkuji RNDr. Pavlíně Čejkové, Ph.D. za cenné připomínky a rady při vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu.

# Obsah

<b>Obsah</b> .....	<b>i</b>
<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>ii</b>
<b>Abstrakt</b> .....	<b>v</b>
<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Organizace lidského genomu</b> .....	<b>2</b>
2.1. Jaderný genom .....	2
2.2. Mitochondriální genom.....	2
<b>3. Repetitivní sekvence</b> .....	<b>3</b>
3.1. Obecná charakteristika repetitivních sekvencí .....	3
3.2. Klasifikace repetitivních sekvencí .....	3
3.2.1. Tandemové repetice .....	3
3.2.2. Rozptýlené repetice.....	4
3.3. Detekce repetitivních sekvencí v genomu .....	6
<b>4. Význam repetitivních sekvencí</b> .....	<b>7</b>
4.1. Důsledky a využití repetitivních sekvencí v lékařské genetice .....	7
4.1.1. Nestabilita mikrosatelitových repetic (MSI) a tzv. mismatch opravný systém (MMR).....	8
4.1.1.1. Klasifikace MSI.....	9
4.1.2. Ztráta heterozygotnosti (LOH) .....	12
4.1.3. Příklady tumorů s MSI.....	13
4.1.3.1. Kolorektální zhoubné nádory a Lynchův syndrom .....	13
4.1.3.2. Rakovina plic.....	14
4.1.3.3. Rakovina slinivky břišní.....	15
4.1.4. Diagnostika a prognózy MSI tumorů.....	15
4.2. Repetitivní sekvence ve forenzní genetice.....	19
4.2.1. DNA fingerprinting.....	19
4.2.1.1. Aplikace DNA fingerprintingu a DNA typizace ve forenzní genetice .....	20
4.2.2. Příklady využití autosomálních mikrosatelitů při forenzním vyšetřování.....	21
4.2.3. Polymorfismus chromosomu Y a jeho využití ve forenzní genetice .....	24
4.2.4. Forenzní analýza a problém chimér a mozaik .....	25
4.2.4.1. Chiméry .....	26
4.2.4.2. Mozaiky.....	26
4.2.4.3. Detekce chimérismu/mozaicismu.....	27
<b>5. Závěr</b> .....	<b>28</b>
<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>29</b>

# Seznam použitých zkratek

<b>A</b>	adenine	adenin
<b>ACTC</b>	microsatellite marker on chromosome 15	mikrosatelitový marker na chromosomu 15
<b>BAT25</b>	microsatellite marker on chromosome 4	mikrosatelitový marker na chromosomu 4
<b>BAT26</b>	microsatellite marker on chromosome 2	mikrosatelitový marker na chromosomu 2
<b>BAX</b>	gene for BCL2 associated X protein	gen pro BCL2 asociovaný protein X
<b>bp</b>	base pairs	páry bazí
<b>BRCA1</b>	breast cancer gene 1	gen pro karcinom prsu 1
<b>C</b>	cytosine	cytosin
<b>C<sub>0</sub>t analýza</b>	a technique based on the principles of DNA reassociation kinetics that measures how much repetitive DNA is in a sample	technika pro určení množství repetitivní DNA ve vzorku založená na principech denaturace/renaturace DNA
<b>CCND2</b>	gene for cyclin D2	gen pro cyklin D2
<b>CDKN2A</b>	gene for cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	gen pro inhibitor cyklin dependentní kinázy 2A
<b>C-KIT</b>	gene for tyrosine-protein kinase	gen pro tyrozin protein kinázu
<b>COMBO-FISH</b>	combinatorial oligonucleotide FISH	kombinatoriální oligonukleotidová FISH
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
<b>DVI</b>	disaster victim identification	identifikace obětí katastrof
<b>ESS</b>	European Standard Set	evropská standardní sada genetických markerů
<b>FAM</b>	fluorescent marker	fluorescenční marker
<b>FGA</b>	microsatellite marker on chromosome 4, fibrinogen alpha chain	mikrosatelitový marker na chromosomu 4, alfa řetězec fibrinogenu
<b>FISH</b>	fluorescence <i>in situ</i> hybridization	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
<b>G</b>	guanine	guanin
<b>GATA49D12</b>	microsatellite marker on chromosome 12	mikrosatelitový marker na chromosomu 12
<b>GSN</b>	microsatellite marker on chromosome 9	mikrosatelitový marker na chromosomu 9
<b>HEX</b>	fluorescent marker	fluorescenční marker

<b>HNPCC</b>	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer	dědičný nepolypózní kolorektální karcinom
<b>HUMTH01</b>	microsatellite marker on chromosome 11	mikrosatelitový marker na chromosomu 11
<b>IGFRII</b>	gene for insuline-like growth factor receptor II	gen kódující receptor II pro inzulínový růstový faktor
<b>InDel</b>	insertion/deletion	inzerce/delece
<b>INTERPOL</b>	International Criminal Police Organization	Mezinárodní organizace kriminální policie
<b>ISPRA</b>	Italian National Institute for Environmental Protection and Research	Italský národní institut pro ochranu a výzkum životního prostředí
<b>kb</b>	kilobase	kilobáze
<b>LINE</b>	long interspersed nuclear element	dlouhé rozptýlené jaderné repetice
<b>LOH</b>	loss of heterozygosity	ztráta heterozygotnosti
<b>LTR</b>	long terminal repeat	dlouhá terminální repetice
<b>MLH1, 3</b>	Mut-L protein homolog 1, 3	homolog 1 a 3 proteinu Mut-L
<b>MLP</b>	multilocus probe	multilokusová sonda
<b>MMR</b>	mismatch repair	oprava nevhodných spojení
<b>MPIII-V</b>	multiplex III-V	multiplex III-V
<b>MSH2-6</b>	Mut-S protein homolog 2-6	homolog 2-6 proteinu Mut-S
<b>MSI-H</b>	high microsatellite instability	vysoká nestabilita mikrosatelitů
<b>MSI-L</b>	low microsatellite instability	nízká nestabilita mikrosatelitů
<b>MSS</b>	microsatellite stable	stabilní mikrosatelity
<b>MYC</b>	avian myelocytomatosis viral oncogene	ptačí myelocytomatózní onkogen virového původu
<b>mtDNA</b>	mitochondrial DNA	mitochondriální DNA
<b>NCI</b>	National cancer institute	Mezinárodní institut pro výzkum rakoviny
<b>NED</b>	fluorescent marker	fluorescenční marker
<b>NEFL</b>	microsatellite marker on chromosome 8	mikrosatelitový marker na chromosomu 8
<b>NR-21</b>	microsatellite marker in <i>SLC7A8</i> gene	mikrosatelitový marker v genu <i>SLC7A8</i>
<b>NR-22</b>	microsatellite marker in transmembrane precursor protein B5 gene	mikrosatelitový marker v genu pro transmembránový prekurzorový protein B5
<b>NR-24</b>	microsatellite marker in <i>ZNF2</i> gene	mikrosatelitový marker v genu <i>ZNF2</i>

<b>NSCLC</b>	non-small cell lung cancer	nemalobuněčný plicní karcinom
<b>p53</b>	tumor suppressor protein	tumor supresorový protein
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
<b>PMS1, 2</b>	postmeiotic segregation protein 1, 2	postmeiotický segregáční protein 1, 2
<b>pre-mRNA</b>	precursor messenger ribonucleic acid	prekurzorová mediátorová ribonukleová kyselina
<b>PTEN</b>	phosphatase and tensin homolog gene	gen pro fosfatázový a tenzinový homolog
<b>RAR<math>\beta</math></b>	gene for retinoic acid receptor $\beta$	gen kódující receptor $\beta$ pro retinovou kyselinu
<b>RB1</b>	gene for retinoblastoma protein 1	gen pro retinoblastomový protein 1
<b>RER</b>	replication error	replikační chyba
<b>RNA</b>	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
<b>rRNA</b>	ribosomal RNA	ribosomální RNA
<b>SCLC</b>	small cell lung cancer	malobuněčný plicní karcinom
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate	dodecylsíran sodný
<b>SINE</b>	short interspersed nuclear element	krátké rozptýlené jaderné repetice
<b>SLC7A8</b>	gene for large neutral amino acids transporter small subunit 2	gen pro malou podjednotku velkého transportéru pro neutrální aminokyseliny 2
<b>SLP</b>	single locus probe	jednolokusová sonda
<b>STR</b>	short terminal repeat	krátká terminální repetice
<b>T</b>	thymine	thymin
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transforming growth factor- $\beta$	transformující růstový faktor- $\beta$
<b>TGF-<math>\beta</math>RII</b>	gene for transforming growth factor- $\beta$ receptor II	gen kódující receptor II pro transformující růstový faktor- $\beta$
<b>TH01</b>	microsatellite marker in the tyrosine hydroxylase gene	mikrosatelitový marker v genu pro tyrosin hydroxylázu
<b>TIG1</b>	tazarotene-induced gene 1	tazarotenem indukovaný gen 1
<b>tRNA</b>	transfer RNA	transferová RNA
<b>UT762</b>	microsatellite marker on chromosome 21	mikrosatelitový marker na chromosomu 21
<b>vWA</b>	microsatellite marker on chromosome 12, von Willebrand Factor	mikrosatelitový marker na chromosomu 12, von Willebrandův faktor
<b>ZNF2</b>	gene for zinc finger protein 2	gen pro „zinc finger“ protein 2

## Abstrakt

Repetitivní sekvence jsou důležité pro genom i pro celý organismus. Tyto nekódující sekvence tvoří velkou část genomu a říká se jim „odpadní DNA“. V mnoha odvětvích vědy však mají velký význam, především kvůli svému polymorfnímu charakteru, který se projevuje jak inter-, tak intraindividuálně. Předkládaná práce se zabývá významem mikrosatelitových repetitiv v lékařské a forenzní genetice. Některé nádory vykazují mikrosatelitovou nestabilitu (MSI) v porovnání s repetitivami zdravé tkáně. To lze použít při diagnostice rakoviny. MSI se v buňkách někdy objeví ještě před propuknutím onemocnění, což by umožnilo ranou diagnostiku. MSI je také spojena s lepší prognózou. Ve forenzní genetice se uplatňuje polymorfismus mikrosatelitů mezi jedinci. DNA profilování se využívá nejen při identifikaci osob v kriminalistice, ale i k určování otcovství nebo ochraně divokých zvířat.

**Klíčová slova:** repetitivní sekvence, mikrosatelitová nestabilita, rakovina, DNA profilování, forenzní genetika

## Abstract

Repetitive sequences are important compartments of the genome and they are important for the whole organism as well. These non-coding sequences take a lot of space in the genome and they are called „junk DNA“. However, they are valuable in many science sectors, especially because of their polymorphic character among individuals and also among tissues of one individual. This work pursues the significance of microsatellite repeats in clinical and forensic genetics. Some tumors have microsatellite instability (MSI) when compared to the repeats in the healthy tissue. This can be used to diagnose cancer. MSI sometimes appears before the disease fully breaks out, which could lead into an early diagnosis of cancer. MSI is associated with better prognosis. Forensic genetics takes advantage of microsatellite polymorphism among individuals. DNA profiling is used to identify persons in criminal investigations but also in parental testing or protection of wild animals.

**Key words:** repetitive sequences, microsatellite instability, cancer, DNA profiling, forensic genetics



# 1. Úvod

Repetitivní sekvence jsou speciální oblasti DNA, které se po jednotkách opakují a rozdělují se na tandemové a roptýlené. Tyto sekvence se vyskytují u prokaryot i eukaryot, v jaderné i mimojaderné DNA a tvoří asi 50 % lidského genomu. Dlouhou dobu byly tyto sekvence považovány za „odpadní DNA“, dnes už je ale známo, že mají určitý význam. V současnosti se mnoho vědeckých pracovišť snaží přesně definovat význam různých typů repetitivních sekvencí, jelikož jsou důležitou strukturní i funkční jednotkou genomu a hrají roli při mnoha buněčných procesech, například při replikaci DNA, mutagenezi a transpozici, nádorové transformaci atd. Význam studia těchto sekvencí však nespočívá pouze v důležitosti jejich biologické funkce, repetitivní oblasti poskytují navíc informace o organizaci, dynamice a evoluci genomu. Repetitivní sekvence se mohou využívat v různých vědeckých odvětvích a používají se stále více. A právě významu těchto oblastí v lékařské a forenzní genetice je věnována tato práce.

## 2. Organizace lidského genomu

Lidská genetická informace je zakódována ve dvou genomech, v jaderném a mitochondriálním.

### 2.1. Jaderný genom

V jaderném genomu je asi  $3,2 \times 10^9$  párů bazí, které jsou uspořádány do 23 párů chromosomů lišících se velikostí. Nejmenší je chromosom 21, který má  $4,8 \times 10^7$  bp (párů bazí), největší chromosom 1 je skoro pětikrát větší, má  $24,9 \times 10^7$  bp (URL1). Počet protein kódujících genů v jaderném genomu se podle různých zdrojů trochu liší. V současnosti se jejich množství odhaduje přibližně na 22 300 (Pertea and Salzberg 2010), což je výrazně méně, než se původně očekávalo (Liang et al. 2000). Toto číslo není o moc větší než počet genů u jednodušších organismů, přesto má člověk více proteinů díky alternativnímu sestřihu pre-mRNA. Jednotlivé geny se mohou překrývat, nebo dokonce ležet uvnitř intronů jiných genů.

Ačkoliv je jaderný genom velmi rozsáhlý, pouze jeho malá část (1 – 3 %) kóduje proteiny. Devadesát sedm procent genomu je tedy nekódující DNA. Dříve se těmito nekódujícím sekvencím říkalo „odpadní DNA“, dnes už je ale jasné, že alespoň některé mají důležité funkce. Velkou část této „odpadní DNA“ tvoří introny, dále unikátní nebo „lehce repetitivní“ DNA, pseudogeny a kolem 50 % zaujímají repetitivní sekvence (Wong et al. 2000).

### 2.2. Mitochondriální genom

Eukaryotní buňky obsahují mnoho kopií mitochondrií, lidské buňky až tisíce. Mitochondrie mají svůj vlastní genom a mají pozměněný genetický kód. Lidská mitochondriální DNA (mtDNA) je dvouřetězcová kruhová molekula o 16,6 kb a obsahuje 37 genů (2 pro rRNA, 22 pro tRNA a 13 pro polypeptidy). Mitochondrie nejsou nezávislé entity a potřebují ke své existenci proteiny kódované jaderným genomem (Anderson et al. 1981, citováno podle Bandelt et al. 2006).

## 3. Repetitivní sekvence

### 3.1. Obecná charakteristika repetitivních sekvencí

Sekvence DNA, které se v rámci genomu vyskytují ve větším množství identických nebo podobných kopií se nazývají repetitivní sekvence. Každá kopie sekvenčního motivu se nazývá jednotka repetice. Velikost jednotek repetice se může pohybovat od jednoho nukleotidu až po stovky, někdy i tisíce párů bazí (LTR retrotranspozony). Rozlišujeme repetice, které jsou označovány jako „head to tail“ („hlava k ocasu“) a repetice „head to head“ („hlava k hlavě“). „Head to tail“ repetice jsou na vlákně nukleotidové kyseliny organizovány ve stejném směru, „head to head“ jsou na řetězci uspořádané ve směru opačném. Existují také takzvané palindromatické repetice, které mají stejné pořadí nukleotidů čtené ve stejném směru (např.: 5'→3') na obou vláknech DNA.

### 3.2. Klasifikace repetitivních sekvencí

Repetice lze rozdělovat podle různých kritérií, například podle počtu kopií, lokalizace v rámci genomu nebo chromosomu, ale většinou se třídí podle toho, jak jsou v genomu uspořádané. Pokud jsou kopie sekvenčního motivu seřazené v řadě za sebou (tzv. v tandemu), nazývají se takové repetice tandemové. Dále rozlišujeme rozptýlené repetice, u kterých se sekvenční motivy vyskytují na různých místech genomu a neseskupují se do řady.

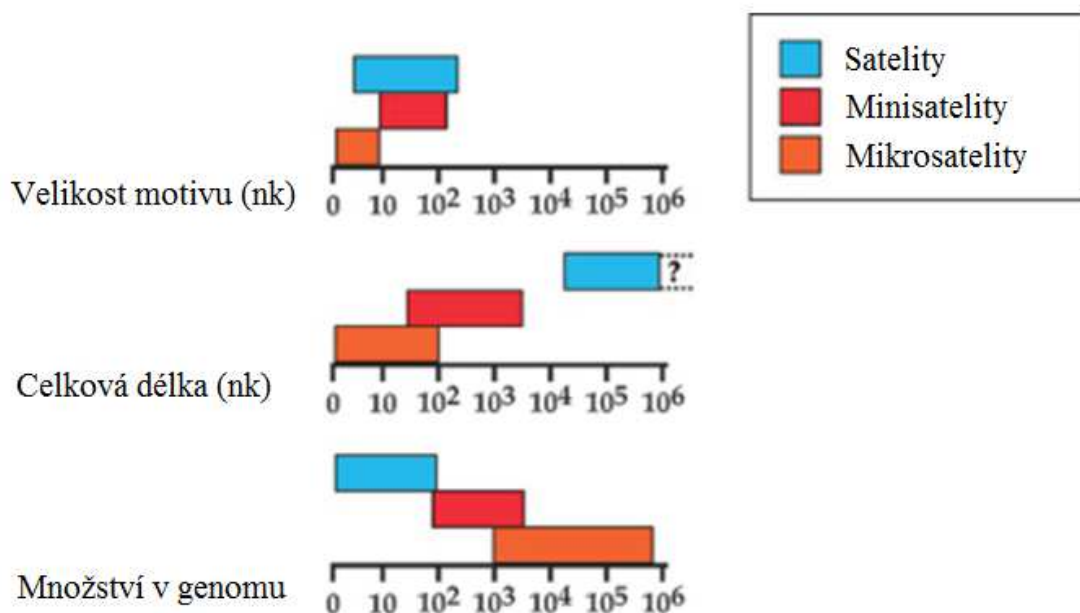
#### 3.2.1. Tandemové repetice

Tandemové repetice se vyskytují v různých místech genomu a velmi se liší velikostí jednotek repetice i počtem kopií jednotlivých repetičních motivů. Poprvé byly pozorovány pomocí centrifugace v hustotním gradientu chloridu cesného, kde tandemové repetice vytvářely „satelitní“ proužky. Odtud pochází název „satelitní DNA“. V různých publikacích je možné nalézt odlišnou klasifikaci tandemových repetice. Nejčastěji se tandemové repetice dělí na satelity, minisatelity a mikrosatelity (Tautz 1993), mohou se mezi ně řadit i vedle sebe seřazené kopie genů.

**Satelity** jsou nejdelší tandemové repetice, velikost repetiční jednotky se pohybuje od 5 bp (viz Obrázek 1) až po 171 bp u alfa satelitů (Waye and Willard 1985), a velikost celé reptice může být až několik megabazí. Tyto sekvence se hojně vyskytují v oblasti centromer a konstitutivního heterochromatinu, takže mají důležitou strukturní funkci (Waye and Willard 1985).

**Minisatelity** jsou repetice s repetičním motivem dlouhým až desítky párů bazí a celkovou délkou až několik kilobází. Jsou obvykle vysoce polymorfni co do počtu opakování jednotky repetice, a proto jsou využívány jako genetické markery v lékařské diagnostice, k identifikaci osob nebo pro genetické mapování. Minisatelity se vyskytují hojně v subtelomerických oblastech a v telomerách (Royle et al. 1988).

**Mikrosatelity** jsou zpravidla tvořeny opakováním 1 – 9 bp a celková délka většinou nepřekračuje 100 bp. Jsou nejčastějším typem tandemových repetic v genomu (viz Obrázek 1). Mikrosatelity jsou vysoce polymorfni, díky čemuž se používají jako genetické markery. Jsou známé také pod názvem krátké tandemové repetice (STR).



**Obrázek 1:** Velikosti motivů, délky a množství satelitních sekvencí v eukaryotních organismech. Pro každou kategorii (satelity, minisatelity a mikrosatelity) je uvedena distribuce velikosti motivů repetic, celková délka repetic a množství každé kategorie na eukaryotní genom. Satelitní DNA může mít velikost až několik megabází, ale maximální délka je neznámá kvůli nedostatku informací o sekvenci (upraveno podle Richard et al. 2008).

### 3.2.2. Rozptýlené repetice

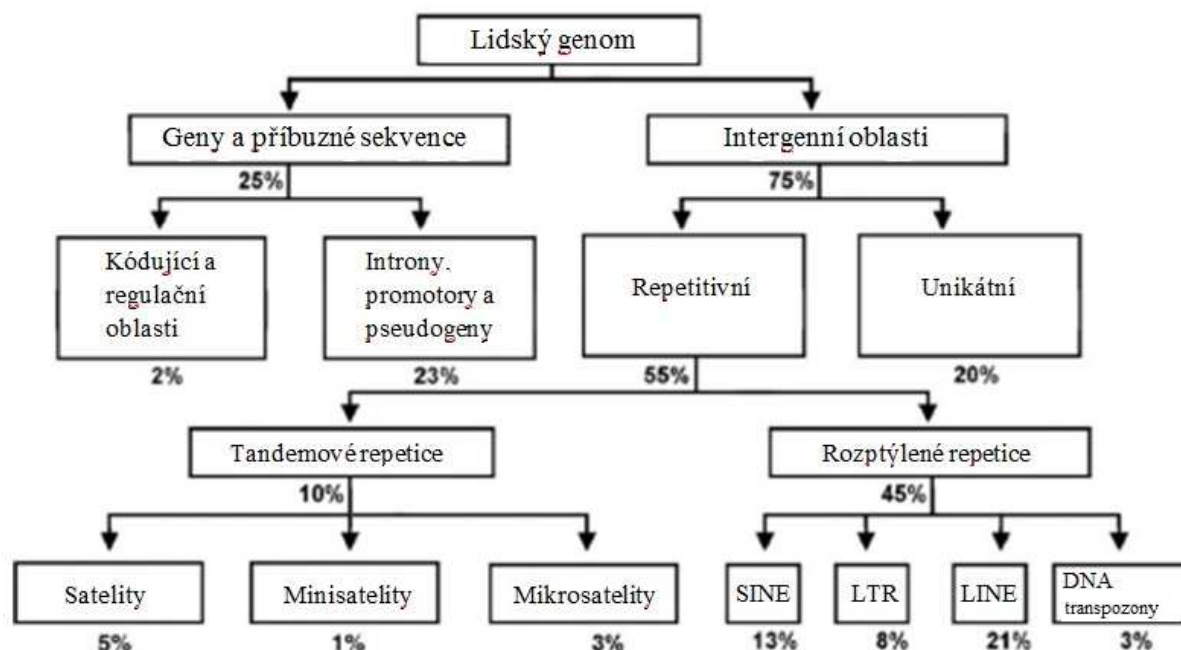
Rozptýlené repetice se vyskytují v různých místech genomu jako jednotlivé kopie. Tyto repetice mají schopnost transpozice a dělí se na dvě základní skupiny – DNA transpozony a retrotranspozony. Retrotranspozony se dále rozdělují na LTR (long terminal repeats = dlouhé terminální repetice), LINE (long interspersed nuclear elements = dlouhé

rozptýlené jaderné elementy) a SINE (short interspersed nuclear elements = krátké rozptýlené jaderné elementy).

**DNA transpozony** se v genomu nevyskytují tak často, přemisťují se mechanismem „cut and paste“ („vyjmout a vložit“) a jejich počet zůstává stabilní. Jádrem transpozonu je sekvence kódující enzym transponázu, který umožňuje vyštípnutí a opětné vložení transpozonu do jiného místa v genomu. Na krajích těchto elementů jsou invertované repetice. Všechny DNA transpozony jsou v lidském genomu inaktivní (Lander et al. 2001).

**Retrotranspozony** jsou v genomu mnohem hojnější, šíří se mechanismem „copy and paste“ („kopírovat a vložit“). Potřebují RNA polymerázy, které je přepíší do RNA, a poté reverzní transkriptázy, které je přepíší opět na DNA. LTR retrotranspozony mají dlouhé terminální repetice (100 bp až 5 kb) a obsahují několik genů. V lidském genomu jsou pravděpodobně inaktivované (Lander et al. 2001). LINE a SINE nemají dlouhé terminální repetice a vzájemně se liší velikostí a autonomitou – SINE nepřekračují velikost 500 bp a nemají kódující potenciál, LINE jsou autonomní a delší (Lander et al. 2001). Nejhojnější SINE skupinou u člověka jsou takzvané Alu elementy, které se v lidském genomu vyskytují v počtu kopií více než 1 milion a tvoří více než 10 % genomu. Jsou místem štěpení restriční endonukleázou AluI. Nejčastějším LINE retrotranspozonem v lidském genomu je L1, který tvoří asi 17 % genomu. Je dlouhý 6 – 8 kb a obsahuje dva otevřené čtecí rámce, které se kotranskribují ze stejného promotoru, ale může z nich vzniknout více odlišných mRNA. Celkově je v lidském genomu asi 850 000 LINE, které zaujímají přibližně 21 % genomu (Lander et al. 2001).

Transpozony jsou důležité pro plasticitu genomu, jsou schopné vyřadit gen z funkce, způsobit onemocnění nebo měnit genovou expresi (Doherty et al. 2013).



**Obrázek 2:** Složení lidského genomu (upraveno podle Jasinska and Krzyzosiak 2004).

### 3.3. Detekce repetitivních sekvencí v genomu

Repetitivní sekvence lze v genomu detekovat různými metodami. Ze začátku se používala centrifugace v hustotním gradientu, která separuje fragmenty DNA podle jejich hustoty. Díky tomu je možné odhadnout poměr CG/AT párů bazí. Při těchto experimentech na modelu myši byly pozorovány fragmenty o odlišné hustotě (nazvané satelitní DNA), než byla hustota ostatních DNA frakcí (Waring and Britten 1966). Poté se pomocí  $C_{0t}$  analýzy frakcí zjistilo, že tato odlišná DNA byla tvořena opakováním stejné sekvence, měla jiný poměr CG/AT párů bazí, což vedlo k odlišné hustotě (Waring and Britten 1966). Analýza  $C_{0t}$  je založena na denuraci a následné rychlosti renaturace vlákna DNA. Rychlost párování homologních sekvencí závisí na množství kopií sekvenčního motivu. Čím více je kopií, tím pravděpodobněji se homologní části setkají, a renaturace je tudíž rychlejší než u repetice s menším množstvím kopií nebo u unikátní DNA.

Později se začaly používat novější metody, například hybridizace FISH (Fluorescenční *In Situ* Hybridizace), COMBO-FISH (Combinatorial Oligonucleotide FISH) atd. nebo metody využívající PCR. V roce 1977 byla poprvé v odborném periodiku zveřejněna metoda sekvenování DNA (Maxam and Gilbert 1977), což způsobilo revoluci v metodách molekulární biologie.

## 4. Význam repetitivních sekvencí

V dnešní době se znalosti o repetitivních sekvencích aplikují do různých vědeckých odvětví, například demografie, molekulární biologie, lékařské genetiky a diagnostiky, forenzní genetiky a do mnoha dalších. Tato práce se bude zabývat jejich významem v lékařské a forenzní genetice.

### 4.1. Důsledky a využití repetitivních sekvencí v lékařské genetice

Lékařská genetika je věda, která se zabývá lidským genomem a snaží se najít souvislosti mezi strukturálními a funkčními aspekty genomu a patofyziologií lidských onemocnění. Odlišné typy repetitivních sekvencí hrají roli při různých onemocněních.

Mobilita transpozonů může způsobit mutace, pokud se transpozon inzertuje do genu, nebo do regulačních sekvencí genu. To by mohlo vést ke vzniku onemocnění, například k tumorigenezi. V roce 1988 byla v buňce lidského karcinomu prsu nalezena inserce L1 elementu do proto-onkogenu *MYC*. Po porovnání se zdravou prsní tkání stejného pacienta bylo zjištěno, že tato inserce způsobila mutaci vedoucí k rozvoji rakoviny prsu (Morse et al. 1988).

Metylace DNA je důležitá pro stabilitu genomu a správnou genovou expresi. DNA je metylována na cytosinu v 5. pozici 5'-CpG-3' dinukleotidů, které se ve velkém množství nacházejí v promotorech genů (CpG ostrůvky) (Gruenbaum et al. 1981). Metylace snižuje transkripci a je katalyzovaná pomocí metyltransferáz. Hypo- i hypermetylace genů/genomu může být pro buňku nebo i celý organismus fatální. Hypometylace onkogenů (zvyšuje jejich transkripci) a hypermetylace tumor-supresorových genů (umlčuje jejich transkripci) se vyskytuje v různých tumorech a pravděpodobně je to jeden z důležitých mechanismů pro vznik nádorové buňky. Toto se často zkoumá na kolorektálních nádorech (Toyota et al. 2000). Při porovnávání genů pocházejících z buněk tumoru a z buněk zdravé tkáně byla nalezena hypometylace genů pocházejících z nádorových buněk, někde se dokonce zjistila progresivita hypometylace ve vzniklých metastázích (Feinberg and Vogelstein 1983). Dokázalo se, že tato hypometylace způsobuje chromosomální nestabilitu a vede k tumorigenezi, nikoliv že je jejím důsledkem (Gaudet et al. 2003). Změny v metylaci DNA repetitivních sekvencí nehrají roli pouze při vzniku nádorů, souvisejí i s jinými onemocněními, například s Alzheimerovou chorobou (Bollati et al. 2011). Míra metylace tedy může pomoci při diagnostice onemocnění a stanovení prognózy pro pacienta.

Významné jsou také trinukleotidové repetice a onemocnění s nimi spojená. Velmi známé jsou neuromuskulární nemoci, vyvolané expanzí trinukleotidových repetit, například Huntingtonova chorea, syndrom fragilního X, myotonická dystrofie a další. Některé trinukleotidové repetice souvisejí s nádory, například delší poly(CAG) repetice v genu pro androgenový receptor koreluje s vyšším rizikem vzniku rakoviny endometria (Yaron et al. 2001).

Repetitivní sekvence mají v lékařské genetice velmi širokou škálu využití, ale bohužel není prostor pro to, aby byly všechny zmíněny. Tato práce se bude podrobněji věnovat pouze nestabilitě mikrosatelitových repetit, jejich spojitostí se vznikem nádorových onemocnění, možnostmi diagnostiky a stanovením prognózy pomocí těchto repetit.

#### **4.1.1. Nestabilita mikrosatelitových repetit (MSI) a tzv. mismatch opravný systém (MMR)**

Mikrosatelity mohou sloužit jako velmi informativní genetické markery, jelikož jsou mezi jedinci stejného druhu polymorfni v délce (Weber and May 1989) a zároveň mohou v některých případech vykazovat polymorfismus i v rámci jednoho druhu tkáně v jednom organismu, tento jev je označován jako nestabilita mikrosatelitů (MSI) (Thibodeau et al. 1993). Kvůli replikačnímu motivu jsou mikrosatelity velmi náchylné k takzvanému „sklouznutí“ DNA polymerázy, která nemusí nasyntetizovat přesný počet repetit. I navzdory těmto replikačním chybám (RER, replication error), probíhajícím ve všech buňkách, jsou mikrosatelity vcelku stabilní ve své délce, a to díky tzv. mismatch opravnému systému (MMR), který zodpovídá za integritu genomu, rozpoznává a opravuje špatné inserce, delece a misinkorporace bazí, ke kterým může během replikace nebo rekombinace dojít (Wildenberg and Meselson 1975; Dohet et al. 1986). Problém nastává, když se objeví mutace v některém z genů opravného systému, pokud je gen hypermetylován nebo pokud je alela genu ztracena.

Jestliže MMR nefunguje, začnou se hromadit mutace, mezi které patří i posuny čtecího rámce repetitivních sekvencí, takže může dojít ke změně délky celkové repetice a nestabilitě mikrosatelitů. Nestabilní počet mikrosatelitových repetit se vyskytuje v mnoha lidských tumorech, které mají tedy fenotyp RER<sup>+</sup>. MSI tumor je charakterizován tak, že v jeho buňkách došlo ke změně délky repetice, která nastala kvůli inserci nebo deleci v rámci mikrosatelitu v porovnání s buňkami zdravé tkáně (Boland et al. 1998).

Jelikož se tyto repetice jen zřídka vyskytují v rámci kódujících oblastí genomu, nestabilita těchto sekvencí se většinou nemůže přímo podílet na karcinogenezi (jiná situace nastane, když jsou mikrosatelity uvnitř genů souvisejících se vznikem tumoru). Z výzkumů



genomů buněk kolorektálního nádoru (Bhattacharyya et al. 1994) a rakoviny tlustého střeva (Eshleman et al. 1996), které měly fenotyp RER<sup>+</sup>, vyplynulo, že tyto buňky mají zvýšený výskyt spontánních mutací, takzvaný mutační fenotyp (mutator phenotype). Mezi tyto mutace nepatří pouze posuny čtecího rámce a mikrosatelitová nestabilita, ale zahrnují také množství substitucí bazí. Na genomu buněk rakoviny tlustého střeva bylo pozorováno, že mikrosatelitová nestabilita destabilizuje DNA sekvence i mimo repetitivní elementy (Eshleman et al. 1996). Mutační fenotyp v buňkách s poruchou opravného systému by zrychlil proces karcinogeneze, který je na mutacích závislý (Bhattacharyya et al. 1994).

Opravné proteiny MMR systému byly nalezeny u různých skupin organismů. U savců existuje několik těchto proteinů: MSH2 – MSH6, MLH1, MLH3, PMS1 a PMS2. MSH2, MSH3 a MSH6 jsou důležité pro mitotickou genetickou stabilitu, zajišťují opravy záměn bazí, MSH2 se také účastní meiotické genové konverze (Johnson et al. 1996; New et al. 1993; Reenan and Kolodner 1992). MSH4 a MSH5 hrají roli při crossing-overu během meiózy (Hollingsworth et al. 1995; Rossmacdonald and Roeder 1994). MLH1 a PMS2 jsou nejvíce prostudované, zabraňují mutagenézi v somatických buňkách (Kramer et al. 1989; Strand et al. 1993) a účastní se meiotické rekombinace (Baker et al. 1996; Lichten et al. 1990). MLH3 má roli při opravě inzercí a delecí (Lipkin et al. 2000).

Eukaryotické MMR proteiny fungují jako heterodimery, což umožňuje rozeznání a zpracování různých typů poškození DNA. V lidských buňkách se MSH2 nachází v komplexu s MSH6 nebo s MSH3 (Acharya et al. 1996). Více MSH2 je v komplexu s MSH6 (Drummond et al. 1997), tento heterodimer má totiž rozsáhlejší opravnou aktivitu než heterodimer MSH2·MSH3. MSH2·MSH6 zajišťuje opravu všech osmi misinkorporací bazí a také inzercí nebo delecí (ID) až do 8 nukleotidů, MSH2·MSH3 podporuje opravu ID obsahujících 2 – 8 nukleotidů (Genschel et al. 1998). Buňky s deficientním MSH6 jsou tudíž nestabilní v mononukleotidových repeticích (Verma et al. 1999). U člověka existují také komplexy MLH1·PMS1, MLH1·PMS2 a MLH1·MLH3 (Leung et al. 2000; Li and Modrich 1995; Lipkin et al. 2000).

#### **4.1.1.1. Klasifikace MSI**

Jelikož je pro vzájemné porovnávání výsledků důležité, aby vědci při zkoumání nádorů s MSI používali stejná pravidla pro diagnostiku MSI, bylo v roce 1998 na konferenci zaměřenou na problematiku nestability mikrosatelitových repetitív organizovanou NCI (National Cancer Institute) vytipováno pět mikrosatelitů (dva mononukleotidové a tři dinukleotidové, viz Tabulka 1), podle kterých by se měla mezinárodně určovat míra mikrosatelitové

nestability v kolorektálních tumorech. Při porovnávání DNA tumoru a normální DNA může být nádor klasifikován jako MSI-H (vysoká mikrosatelitová nestabilita), je-li nestabilní alespoň ve dvou z pěti markerů, označení MSI-L (nízká nestabilita mikrosatelitů) lze použít, pokud je nestabilní v jednom markeru. Když není zjištěna nestabilita v žádném z lokusů, je nádor klasifikován jako MSI-L nebo MSS (stabilní mikrosatelit). Pokud je analyzováno více než 5 markerů, klasifikace MSI se vyhodnocuje podle procentuálního množství markerů vykazujících polymorfismus ve své délce. Pokud je nestabilních 30 – 40 % vybraných lokusů, tumor se vyhodnotí jako MSI-H. Jestliže vykazuje MSI méně než 30 – 40 %, nádor je MSI-L, a pokud jsou všechny markery stabilní, tumor je MSI-L/MSS. Aditivní lokusy pro analýzu a interpretace MSI jsou uvedeny v Tabulce 1 (Boland et al. 1998).

**Tab. 1 Mezinárodní směrnice pro vyhodnocení MSI v kolorektálních tumorech**

Referenční panel			
Marker	Jednotka repetice	Přístupové číslo v GenBank	
<i>BAT25</i>	Mononukleotidová	9834508	
<i>BAT26</i>	Mononukleotidová	9834505	
<i>D5S346</i>	Dinukleotidová	181171	
<i>D2S123</i>	Dinukleotidová	187953	
<i>D17S250</i>	Dinukleotidová	177030	
Kritérium pro interpretaci			
Množství markerů vykazujících nestabilitu ve své délce	5 analyzovaných lokusů	> 5 analyzovaných l.	Interpretace
	≥2	≥30–40%	
	1	<30–40%	MSI-L
	0	0	MSS or MSI-L
Alternativní lokusy <sup>a</sup>			
<i>BAT40</i>	<i>D18S55</i>	<i>D3S1029</i>	<i>D5S107</i>
<i>BAT34C4</i>	<i>D18S58</i>	<i>D10S197</i>	<i>D8S87</i>
<i>TGF-β-RII</i>	<i>D18S61</i>	<i>D13S175</i>	<i>D18S69</i>
<i>ACTC (635/636)</i>	<i>D18S64</i>	<i>D17S588</i>	<i>D13S153</i>
			<i>D17S787</i>
			<i>D7S519</i>
			<i>D20S100</i>

<sup>a</sup>Na informacích o markerech se podíleli J. Ruschoff, R. Fishel, S. Hamilton, R. Fodde, J. Gilbert, R. Hamelin, I. Kirsch, S. Markowitz, B. Bapat, and S. N. Thibodeau. (upraveno podle Boland et al. 1998 )

V roce 2002 byla navržena další doporučení k diagnostice MSI. Dinukleotidové markery doporučené NCI v roce 1998 nejsou tolik citlivé pro určování MSI, vykazují nestabilitu pouze u 70 – 80 % MSI-H tumorů (Sutter et al. 1999). Jsou také hodně polymorfní, to tedy vyžaduje porovnávání s DNA zdravé tkáně, na což je zapotřebí více času, peněz a také hrozí riziko záměny vzorků DNA tumoru a zdravé tkáně. Ne ve všech případech je také možné získat vzorek k porovnání (Boland et al. 1998). V některých nádorech s nefunkčním MMR způsobeným mutací v MSH6 dinukleotidové repetice dokonce nevykazují žádné změny ve své délce (Akiyama et al. 1997). U většiny tumorů je analýza BAT-25 a BAT-26 dostatečná ke stanovení MSI-H bez porovnávání se zdravou tkání, jelikož jsou tyto markery celkem monomorfní ve většině bělošských populací (Hoang et al. 1997; Zhou et al. 1998). Avšak u afroamerických populací se polymorfismus v těchto markerech vyskytuje a byl identifikován i v malém procentu bělošských jedinců (Suraweera et al. 2002). Pouze BAT-25 a BAT-26 nejsou tudíž vhodné pro stanovení MSI-H, je třeba použít ještě nějaké navíc a dinukleotidové markery nejsou moc vhodné. Proto byl navržen nový seznam markerů pro lepší diagnostiku MSI. Jedná se o pět mononukleotidových repetic (viz Tabulka 2), které vykazují nízkou frekvenci polymorfismu u bělošských i afroamerických populací. Tyto markery je zapotřebí analyzovat všechny a poté již není třeba porovnání s DNA zdravé tkáně. Tumor je klasifikován jako MSI-H, pokud je nestabilní alepoň ve třech zmíněných markerech, ve většině případů je však nestabilní ve všech pěti (Suraweera et al. 2002).

Tab. 2 Pět mononukleotidových kvazimonomorfních markerů používaných v multiplexové PCR při determinaci MSI statusu

Název	Gen	Číslo v GenBank	Délka a umístění repetice	Fluorescenční marker	Sekvence primeru 5'-3'	Průměrná délka PCR produktu (bp)
BAT-26	hMSH2	U41210	26 (A) intron 5	FAM	tgactacttttgacttcagcc aaccattcaacattttaacc <sup>a</sup>	120
BAT-25	c-kit	L04143	25 (T) intron 16	NED	tcgcctccaagaatgtaagt <sup>a</sup> tctgcatttaactatggctc	124
NR-21	SLC7A8	XM_033393	21 (T) 5' UTR	HEX	taaagtatgtctcccctgg attcctactcgcattcaca <sup>a</sup>	103
NR-22	Transmembránový prekurzorový protein B5	L38961	22 (T) 3' UTR	FAM	gaggctgtcaaggacataa aattcggatgccatccagtt <sup>a</sup>	142
NR-24	(ZNF-2)	X60152	24 (T) 3' UTR	HEX	ccattgctgaatttaacctc attgtgccattgcattccaa <sup>a</sup>	132

<sup>a</sup>Fluorescenční primer.  
(upraveno podle Suraweera et al. 2002 )

Markery používané pro detekci MSI u kolorektálních tumorů se ale nemohou aplikovat i na jiné tumory. Tkáň z tumoru slinivky břišní se testovala na MSI pomocí markerů používaných u kolorektálních nádorů a výsledky byly negativní, MSI-H se pomocí těchto markerů nedetekovala, přestože se u rakoviny slinivky běžně vyskytuje (Ahn et al. 2000; Han et al. 1993).

#### **4.1.2. Ztráta heterozygotnosti (LOH)**

Ztráta heterozygotnosti nastává, pokud došlo ke ztrátě či mutaci jedné alely genu v buňce a následně je deletována nebo mutací vyřazena z činnosti i druhá alela téhož genu. V roce 1971 publikoval Alfred Knudson svou teorii takzvaného dvojího zásahu. Svou hypotézu potvrdil studiem retinoblastomů, pro jejichž vznik je zapotřebí dvou zásahů (dvou mutací). Pokud se jedná o dědičný retinoblastom, první zásah nastává již v raném stádiu vývoje (nebo je mutace zděděná po rodiči), dojde tedy ke ztrátě jedné alely (v tomto případě některého tumor-supresorového genu) ve všech somatických buňkách. To neznámá, že se u takového jedince musí retinoblastom objevit, protože má stále funkční druhou alelu tohoto genu. K tomu, aby vznikl retinoblastom, je zapotřebí ještě druhého zásahu, somatické mutace ve druhé alele daného genu, čímž dojde ke ztrátě heterozygotnosti. Pravděpodobnost druhého zásahu je samozřejmě vyšší u jedinců s germinální mutací. U nedědičných forem retinoblastomů musí dojít k oběma zásahům v somatických buňkách (Knudson 1971; Knudson 1978).

Při studiu rakoviny prsu byla extracelulární nádorová DNA izolovaná z plazmy pacientů testována na přítomnost LOH v různých oblastech genomu, kde se vyskytují tumor-supresorové geny. Byly použity mikrosatelitové markery pro několik oblastí. Zjistilo se, že vyšší frekvence LOH v daných oblastech (geny *CCND2*, *TIG1*, *BRCA1*, *PTEN* a *RBI*) odpovídá pokročilejšímu stádiu rakoviny prsu, nádoru větších rozměrů a možnému výskytu metastáz. Důležitý pro pacienty je především marker pro cyklin D2 (*CCND2* gen), vyšší frekvence LOH tohoto genu asociuje s nižším přežíváním pacientů. LOH cyklinu D2 je tedy důležitým prognostickým markerem (Schwarzenbach et al. 2012).

Vyšší frekvence LOH v tumorech koreluje také s větší citlivostí k neoadjuvantní chemoterapii, což bylo prokázáno například u rakoviny žaludku. LOH sice podporuje vznik tumoru, ale když dosáhne kritické hodnoty, životaschopnost buňky se může snižovat. Při studiu rakoviny žaludku bylo zjištěno, že necelých 60 % tumorů, které byly citlivé k chemoterapii, vykazovalo LOH na chromosomu 17p13, kde je lokalizován

tumor-supresorový gen pro p53. U tumorů, které na chemoterapii nereagovaly, byla LOH v této oblasti zjištěna jen u 15 % nádorů (Grundeis et al. 2000).

### **4.1.3. Příklady tumorů s MSI**

#### **4.1.3.1. Kolorektální zhoubné nádory a Lynchův syndrom**

Jedny z prvních typů nádorů identifikovaných jako polymorfní v délce mikrosatelitů byly dědičný nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC neboli Lynchův syndrom) a sporadický kolorektální karcinom (Aaltonen et al. 1993). Kromě rakoviny střev a rekta mají pacienti s Lynchovým syndromem větší riziko výskytu rakoviny žaludku, jater, močových cest, kůže, mozku a u žen také vaječníků nebo endometria. Nestabilita je připisována defektním genům, které kódují proteiny pro mismatch repair systém. HNPCC je autosomálně dominantní onemocnění, pacienti s HNPCC mají zděděnou mutaci v jednom z genů MMR, většinou v genu pro MLH1 nebo MSH2 (Bronner et al. 1994; Fishel et al. 1993; Salahshor et al. 2001). Pokud dojde k defektu i ve druhé alele genu se zděděnou mutací, tedy k LOH, buňka se stane defektní v opravách replikačních chyb v kódujících sekvencích i v mikrosatelitech. Ve většině sporadických MSI tumorů je hypermethylován promotor genu pro MLH1, čímž je exprese tohoto genu snížena (Kane et al. 1997).

Byly objeveny geny, ve kterých se často v buňkách tumorů s mikrosatelitovou nestabilitou vyskytují mutace. Tyto geny obsahují ve svých kódujících sekvencích krátké mononukleotidové repetice, tudíž jsou náchylné k mutacím způsobujícím posun čtecího rámce, nefunguje-li MMR. Produkty těchto genů jsou pak nefunkční proteiny. Mezi tyto geny patří například *TGF-βRII*, který má v kódující oblasti poly(A) sekvenci o délce 10 bp. Produktem genu *TGF-βRII* je membránový receptor, který reaguje na inhibitor růstu TGF-β. Pokud je receptor nefunkční, buňka na inhibitory růstu nereaguje. Mutace v poly(A) sekvenci tohoto genu se vyskytují v 90 % kolorektálních nádorů (Parsons et al. 1995). Dalšími, z důvodu MSI často inaktivovanými tumor-supresorovými geny, jsou *IGFR2* (Souza et al. 1996) nebo gen pro apoptózu *BAX* (Rampino et al. 1997).

Přibližně 12 % kolorektálních karcinomů má delece v poly(AT) sekvencích a dalších jednoduchých repeticích. Buňky těchto tumorů mohou obsahovat více než 100 000 takovýchto mutací (Ionov et al. 1993). Pouze nádory s defekty v poly(AT) sekvencích mají mutace v dalších mikrosatelitech, například v dinukleotidech CT a CA, nebo v trinukleotidech GGC (Ionov et al. 1993).

Ve studii zaměřené na proximální část tlustého střeva z roku 1993 se zjistilo, že 28 % studovaných tumorů vykazovalo polymorfismus poly(CA) sekvencí oproti DNA zdravé tkáně. V lidském genomu jsou poly(CA) nejpočetnější dinukleotidové repetice, jsou jich desetitisíce až statisíce a jsou v genomu vysoce konzervované (Hamada et al. 1982). Byla nalezena souvislost mezi mikrosatelitovou nestabilitou a Aster-Collerovýmmi stádii kolorektální rakoviny s vyšším přežíváním. Ve většině tumorů s mikrosatelitovou nestabilitou se zjistil polymorfismus poly(CA) repetice v různých, spolu nesouvisejících mikrosatelitech, což naznačuje společný mechanismus vzniku (Thibodeau et al. 1993).

MSI je pozorována u 92 % dědičných nepolypózních kolorektálních tumorů a u 15 % sporadických kolorektálních tumorů (Aaltonen et al. 1993; Liu et al. 1996).

#### **4.1.3.2. Rakovina plic**

Rakovina plic se dělí na čtyři histologicky odlišné formy: adenokarcinomy, karcinomy skvamózních buněk a velkobuněčné karcinomy, které všechny patří pod tzv. nemalobuněčné karcinomy (NSCLC), a dále na malobuněčné karcinomy (SCLC).

V případě SCLC byla zjištěna MSI u 45 % tumorů. Jedná se o amplifikace a delece DNA v rámci poly(CA) repetice. MSI se často vyskytuje v oblastech s LOH (Merlo et al. 1994). Nejvyšší frekvence MSI (21 – 49 %) u NSCLC se nachází na chromosomu 3p, opět se týká poly(CA) repetice (Miozzo et al. 1996; Ryberg et al. 1995).

Při testování RER<sup>+</sup> na chromosomu 3p a 2p pomocí 8 polymorfních markerů byla frekvence RER<sup>+</sup> tumorů 69 %. Při tomto testu se také zjistila souvislost mezi MSI a mutací genu pro p53. Tumory s MSI neměly mutace v p53 tak časté jako tumory bez MSI (Rosell et al. 1997).

Frekvence LOH/MSI u NSCLC se pohybuje mezi 24 – 50 %, záleží ale na použitých markerech. Nejvyšší frekvence LOH/MSI u NSCLC se vyskytuje v oblasti 3p24.2 (D3S1583 marker = DNA, chromosom 3, Single sequence repeat, pořadí lokusu na chromosomu 1583), kde se nachází *RARβ* gen, a v oblasti 3p22.2 (D3S1611 marker), kde se nachází gen pro MLH1 protein MMR systému. LOH genu pro MLH1 je asociována s pokročilejším stádiem tumoru. LOH/MSI se v těchto regionech objevuje více u starších pacientů (nad 60 let) a také se nachází s větší frekvencí u kuřáků. Kouření tedy způsobuje molekulární změny, které vedou ke vzniku tumoru. Čím více pacient vykouří cigaret, tím větší frekvence LOH/MSI se u něj objeví (viz Tabulka 3) (Antczak et al. 2013).

Tab.3 Frekvence LOH/MSI u pacientů s NSCLC vztahující se k jejich kuřáckým návykům

Marker	D3S1234	D3S1300	D3S3615	D3S1611	D3S1583	D3S1317	D3S3611
Frekvence LOH/MSI (%) <sup>a</sup>							
Doba kouření (roky)							
<40	35	16	18	28	31	24	27
≥40	41	55	30	56	42	40	31
Křabičky ročně (PYs)							
<40 PYs	33	8	19	21	21	26	22
≥40 PYs	41	54	25	52	45	37	34

<sup>a</sup> Analyzováno pouze u kuřáků  
(upraveno podle Antczak et al. 2013)

#### 4.1.3.3. Rakovina slinivky břišní

U rakoviny slinivky břišní se MSI vyskytuje přibližně u 70 % tumorů a především u těch méně diferencovaných. MSI se týká především dinukleotidových repetit (Han et al. 1993).

Vznik MSI je většinou spojen se ztrátou exprese některého genu MMR systému (to je často vyvolané hypermetylací daného genu), nejčastěji *MLH1* a *MSH2*. Při studii tkáně tumoru pankreatu však v 95 % nebyla nalezena hypermetylace těchto genů, ani jejich snížená exprese. To naznačuje alternativní mechanismus vzniku MSI u karcinomu slinivky břišní, než jak je tomu u jiných sporadických tumorů (Kondo et al. 2000).

MSI se nenachází pouze v tkáni tumoru, ale také v pankreatické šťávě (Brentnall et al. 1995).

#### 4.1.4. Diagnostika a prognózy MSI tumorů

Jelikož se MSI vyskytuje u velkého množství různých zhoubných nádorů, mohla by se tato nestabilita v určitých případech používat jako genetický marker pro časnou detekci některých tumorů.

U pacientů s rakovinou plic byla MSI nalezena téměř u poloviny tumorů, ale detekovala se také u bronchiálních sliznic s normálním fenotypem. Vzorky bronchiálních sliznic se odebíraly z oblastí vzdálenějších tumoru, aby bylo jisté, že tkáň nebyla infiltrována nádorovými buňkami. Přesto byla v této tkáni detekovaná MSI. Jedná se tedy o ranou změnu DNA, která se rozšiřuje ještě ve zdravých buňkách dříve, než vznikne tumor. Tyto změny zahrnují delece nebo amplifikace dinukleotidových poly(CA) repetit, trinukleotidových poly(GAG) a poly(CAA) repetit a také tetranukleotidových poly(AGAT). Analýza MSI

v buňkách bronchiální sliznice může tudíž pomoci detekovat rané změny DNA a predikovat vznik tumoru, což umožní časné nasazení léčby (Miozzo et al. 1996).

U pacientů s SCLC vykazujících MSI byla provedena analýza vykašlávaného hlenu. V hlenu byly nalezeny identické genetické změny, které se vyskytovaly v tumoru. Analýza vykašlávaného hlenu tedy může také umožnit brzkou detekci tumoru plic (Mao et al. 1994). Pro analýzu vykašlaného hlenu se stanovilo sedm markerů zahrnujících LOH v D9S286, D9S942, GATA49D12, D13S170, MSI v D9S942 a metylaci *CDKN2A* a *RARβ*. Tyto markery dokážou s velkou přesností odlišit zdravé jedince od těch s rakovinou plic (Wang et al. 2006). MSI se dá detekovat také z vydechovaného kondenzátu pacienta. Při analýze kondenzátu a vzorku DNA z tumoru se naprosto shodovala MSI v oblasti 3p (Carpagnano et al. 2008).

MSI se používá také k rané detekci rakoviny močového měchýře (vybrané mikrosatelitové markery používané k diagnostice tumoru močového měchýře jsou uvedeny v Tabulce 4), většinou se k tomuto účelu využívají poly(CA) repetice. Identické genetické změny v mikrosatelitových repeticích a LOH (především na chromosomu 9p21 (Cairns et al. 1994)), které doprovázejí vznik tumoru, mohou být detekovány z moči pacienta pomocí PCR. Tyto změny byly zjištěny i u pacientů, kteří měli v močovém měchýři atypické podezřelé buňky, avšak tumor u nich nebyl prokázán, nebo vznikl až za několik měsíců. MSI se objevuje u 95 % pacientů s rakovinou močového měchýře. Výhoda diagnózy tumorů z moči pomocí MSI spočívá v nižších nákladech, větší přesnosti a neinvazivitě. Cytologická diagnostika z moči, která se také používá, je asi o 20 % méně přesná než diagnostika pomocí MSI (Mao et al. 1996; Seripa et al. 2001).



Tab. 4 Seznam některých vybraných mikrosatelitových markerů pro detekci rakoviny močového měchýře

Marker	Chromosom	Motiv repeticce
D2S123	2	(CA) <sub>13</sub> TA
D4S243	4	TCTA
D4S174	4	CA
NEFL	8	GT
D8S136	8	CA
D8S256	8	CA
D9S162	9	CA
D9S258	9	CA
D9S283	9	CA
D9S1118	9	TATC, ATCT×AG
GSN	9	CA
D9S63	9	CA
D11S554	11	AAAG
D14S288	14	CA
D14S75	14	CA
D14S292	14	CA
D14S267	14	CA
D14S258	14	CA
D18S51	18	GAAA
D18S58	18	(GC) <sub>3</sub> GA (CA) <sub>17</sub>
D18S1851	18	CA
UT762	21	GAAA

(upraveno podle Wadhwa et al. 2013 )

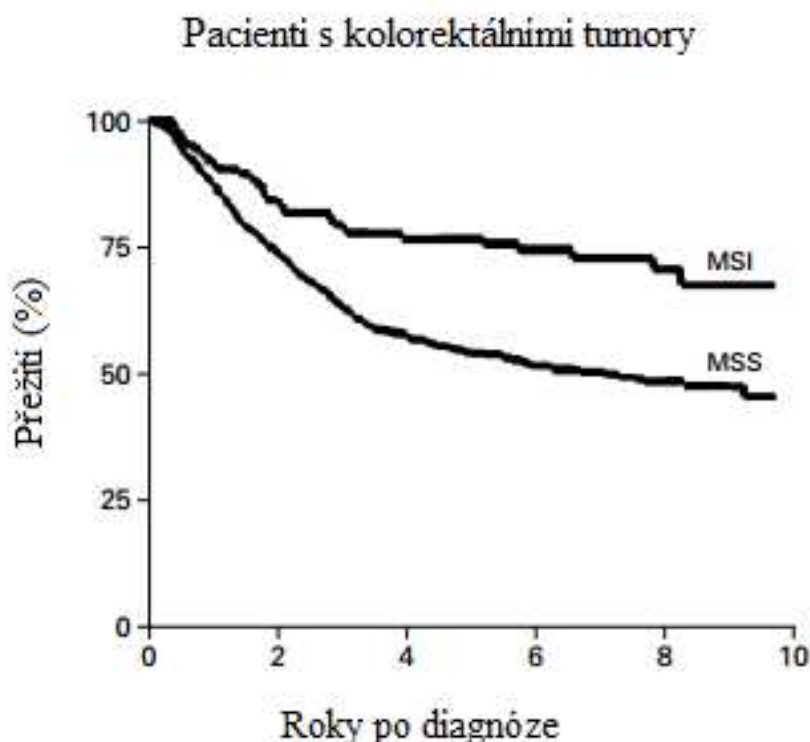
V tumorech močového měchýře se vyskytuje LOH na chromosomu 17p v oblasti, kde se nachází gen pro p53. Tato delece se objevuje ale pouze u pokročilejších stádií nádorů, LOH na chromosomu 17p tedy není vhodný marker pro časnou detekci rakoviny močového měchýře, může však sloužit pro odlišení raných a pozdních stádií tohoto onemocnění (Olumi et al. 1990).

Byly provedeny studie na pacientech, kteří měli více různých primárních zhoubných nádorů. Tumory těchto pacientů se testovaly na RER<sup>+</sup> fenotyp. Zjistilo se, že 89 % pacientů s vyšším výskytem primárních nádorů v těle vykazovalo RER<sup>+</sup> fenotyp alespoň v jednom z tumorů. DNA postižené tkáně jednoho pacienta většinou projevovala stejné RER fenotypy, příčinou by proto mohl být defekt v některém z genů MMR systému. Naopak u pacientů s jedním primárním tumorem byl RER<sup>+</sup> fenotyp rozpoznán pouze u 11 % nádorů. Při poruše genu MMR systému se zvyšuje pravděpodobnost vzniku rakoviny s RER<sup>+</sup> fenotypem

a zvyšuje se také pravděpodobnost vzniku dalšího primárního tumoru. Proto by bylo vhodné testovat pacienty s výskytem jednoho primárního nádoru na RER fenotyp, aby se zjistilo, zda je u nich zvýšené riziko vzniku dalších tumorů. Nebyla prokázána souvislost mezi typem RER (delece, amplifikace) a počtem nádorů v těle (Horii et al. 1994).

Kromě detekce zhoubných nádorů v raných stádiích se MSI může v některých případech používat jako marker pro určování prognóz pro pacienty.

Pacienti se zhoubnými kolorektálními tumory s fenotypem MSI-H mají větší šanci na přežití než pacienti s MSS (viz Graf 1), také je u nich menší pravděpodobnost recidivy (Halling et al. 1999). Pacienti s karcinomy vyšších stádií s MSI-H mají dokonce lepší prognózy než pacienti s nižšími stádii kolorektální rakoviny, která má fenotyp MSS. MSI-H nádory nevytváří metastáze tak často jako ty s fenotypem MSS (Gryfe et al. 2000). MSI-L tumory nepředstavují výhodu oproti těm s MSS, nemají totiž lepší prognózy. MSI-H nádory nevykazují alelickou nestabilitu, která naopak snižuje pravděpodobnost přežití a zvyšuje riziko recidivy (především nestabilita 8p raménka) (Halling et al. 1999).



Graf 1: Graf znázorňující procenta přežití pacientů (osa y) s MSI a MSS tumory v čase (osa x) (upraveno podle Gryfe et al. 2000).

Také u tumorů močového měchýře je výskyt MSI (tudíž nižší exprese MMR proteinů) asociován s nižší malignancí, recidivou a nižší progresí. Pacienti s MSI nádory močového měchýře mají větší šanci na uzdravení (Mylona et al. 2008; Yamamoto et al. 2006). Naopak LOH na chromosomu 13q, kde se nachází gen *RBI*, naznačuje horší prognózu, pokročilejší stádium rakoviny a nižší šanci na přežití (Cote et al. 1998). Lepší prognózu mají také tumory slinivky břišní vykazující MSI v porovnání s těmi bez MSI (Nakata et al. 2002).

## **4.2. Repetitivní sekvence ve forenzní genetice**

Jelikož jsou mikrosatelitové repetice velmi polymorfní ve své délce mezi jednotlivými jedinci (Weber and May 1989), nemají uplatnění pouze v individuální diagnostice nádorových onemocnění a určování prognóz, ale využívají se také pro identifikaci osob, například ve forenzní genetice. Forenzní genetika je vědní disciplína zabývající se analýzou DNA, která se vztahuje k nějakému kriminálnímu činu. Jedná se především o metody umožňující identifikaci osob, které napomáhají k nalezení pachatele trestného činu nebo ke zjištění totožnosti oběti. Pomocí metod forenzní genetiky se také určuje příbuznost mezi osobami.

### **4.2.1. DNA fingerprinting**

DNA fingerprinting je soubor metod, které poprvé u člověka navrhl v roce 1984 anglický genetik Alec Jeffreys. Lidská DNA je z většiny u všech jedinců stejná, DNA fingerprinting však využívá oblasti, které se mezi jednotlivci liší (mikrosatelity, minisatelity). Alec Jeffreys svou metodu testoval pomocí minisatelitu nalézajícího se v nekódující oblasti genu pro myoglobin. Pomocí restriční endonukleázy pro dané místo a elektroforézy mohl porovnávat délky vzniklých fragmentů a pozorovat jejich polymorfismus. Další polymorfní oblasti vyhledával pomocí Southern blot hybridizace. Používal takzvané multilokusové sondy (MLP), které se váží na 10 – 15 bp dlouhý „základ“ mikrosatelitů/minisatelitů bohatý na poly(CG) repetice, a které rozeznávají více takovýchto oblastí. Pomocí MLP zjistil, že každý člověk má své genetické „otisky“ (fingerprints), které se nedají zaměnit s „otisky“ jiného člověka. Používal také tzv. jednolokusové sondy (SLP), které rozeznávají pouze jednu oblast. Metodám používající SLP se říká DNA typizování. Tento významný objev má v dnešní době své nenahraditelné uplatnění při identifikaci osob (Jeffreys et al. 1985a; Jeffreys et al. 1985b; Jeffreys et al. 1989).

#### 4.2.1.1. Aplikace DNA fingerprintingu a DNA typizace ve forenzní genetice

Dříve, než se začaly používat metody DNA fingerprintingu, se ve forenzní analýze používal ABO systém, Rh systém a polymorfismus různých proteinů. Tato analýza však nemůže být provedena po několika týdnech a není moc přesná (ABO i Rh systém umožňují pouze negativní vyloučení podezřelých) (Denault et al. 1980; Sensabaugh 1982). Mezi nejčastější stopy na místě trestného činu nebo na oběti patří skvrny od krve, spermatu, vaginální stěry a vlasové kořínky. Tyto stopy mohou být týdny i roky staré, proto je zapotřebí používat metody, pomocí kterých je i po delší době možné izolovat DNA. Aby se daly získat „otisky“ DNA, musí vyizolovaná DNA mít vysokou relativní molekulovou hmotnost. V roce 1985 se podařilo oddělit jádra spermií od ženských buněk a vaginálního sekretu, které se vyskytovaly ve stěru vaginální sliznice. Nejprve byly zlyzovány ženské buňky inkubací v SDS/proteinkináze K. Jádra spermií jsou vůči tomuto odolné, lze je poté jednoduše oddělit centrifugací. To představovalo revoluci ve forenzní genetice, především v identifikaci podezřelých ze znásilnění (Gill et al. 1985).

Jeffreys k identifikaci osob začal používat dvě sondy označené 33.15 a 33.6. Při použití jedné sondy (33.15) je pravděpodobnost shody mezi dvěma nepříbuznými osobami menší než  $3 \times 10^{-11}$ , při použití obou sond, které detekují různé skupiny minisatelitů, se pravděpodobnost shody snižuje na méně než  $5 \times 10^{-19}$ . Tyto hodnoty jsou tak nízké, že jedinou shodu v DNA „otiscích“ mají monozygotní dvojčata (Jeffreys et al. 1985b).

MLP se mohou úspěšně používat pro testování otcovství (Jeffreys et al. 1991). Pro DNA fingerprinting pomocí MLP je však zapotřebí několika mikrogramů DNA dobré kvality a forenzní vzorky jsou často staré nebo obsahují malé množství DNA, která může být poškozená (Gill et al. 1985). MLP proto nejsou vhodné pro analýzu forenzních vzorků, i když byly v minulosti několikrát úspěšně použity k řešení trestných činů (Gill and Werrett 1987).

SLP jsou sondy rozeznávající jediný minisatelit, takže ve výsledku je DNA profil jednodušší, vytváří pouze dvouproužkový motiv, stále je však polymorfní, jelikož se využívají hypervariabilní minisatelity. V porovnání s MLP mají SLP několik výhod pro analýzu forenzních vzorků. Analýza využívající SLP je mnohem citlivější, na vytvoření proužků stačí 10 ng DNA. Takto se mohou testovat i vzorky se smíšenou DNA (vaginální stěr). Na porovnávání profilů DNA není zapotřebí srovnávací elektroforézy, protože velikosti alel se mohou odhadnout a zaznamenat (Jeffreys et al. 1989).

Pro usnadnění práce vznikly forenzní DNA databáze zahrnující data o mikrosatelitech používaných ve forenzních analýzách. Bez těchto databází by vyšetřování využívající DNA

profil mělo cenu pouze v případě, kdyby byly k dispozici stopy a nesměl by chybět podezřelý, s jehož DNA by se vzorky porovnávaly. Díky těmto databázím se dají vyřešit i ty nejsložitější případy, během nichž nebyl identifikován žádný podezřelý z trestného činu. První databáze byla založena ve Velké Británii v roce 1995. V Evropské unii se v dnešní době využívají stejné technologie a markery, aby se záznamy v databázích daly dobře porovnávat. Členské státy jsou povinny při analýze používat minimálně předepsané markery a na požádání musí poskytnout i výsledky analýz případných aditivních mikrosatelitů. Markery jsou uvedeny v ESS (European Standard Set), první sada obsahovala markery D3S1358, VWA, D8S1179, D21S11, D18S51, HUMTH01 a FGA (URL2). V roce 2009 bylo k těmto sedmi mikrosatelitům přidáno dalších pět, které zvyšují přesnost analýzy: D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391 a D22S1045. Čím více osob bude uvedeno v databázi, tím se zvyšuje riziko určení falešné pozitivivity při analýze. Proto jsou dále navrhovány nové markery, které by v budoucnu mohly být zařazeny mezi markery ESS (Welch et al. 2012). Státy v rámci Evropské unie nejsou oprávněné vyměňovat si navzájem informace obsahující dědičné charakteristiky osob, jejichž DNA záznam se bude v databázi vyskytovat. Markery uvedené v ESS pocházejí z nekódujících oblastí chromosomů a není známo, že by obsahovaly informace o dědičných charakteristikách. Pokud by bylo prokázáno, že takové informace obsahují, tento marker by se měl přestat používat. Členské státy musí být připraveny vymazat jakýkoliv DNA záznam, pokud se prokáže, že obsahuje informace o dědičných charakteristikách (URL3).

Není výjimkou, že při forenzním vyšetřování jsou k dispozici pouze vzorky s malým množstvím DNA, která je často vysoce degradovaná. Proto byly navrženy nové primery a změněny podmínky PCR amplifikace, díky čemuž vznikají produkty kratší než 220 bp, tzv. miniSTR, jež jsou vhodné i pro analýzu degradované DNA. Bylo navrženo osm mikrosatelitových markerů na chromosomu X v oblastech Xq12 (DXS7132, DXS10079, DXS10074, DXS10075) a Xq21 (DXS6801, DXS6809, DXS6789, DXS6799). Tento test je velmi citlivý i při malém množství DNA, pro přesnou analýzu je zapotřebí pouze 20 pg DNA (Castaneda et al. 2013).

#### **4.2.2. Příklady využití autosomálních mikrosatelitů při forenzním vyšetřování**

Ačkoli se DNA profily využívají především k identifikaci osob souvisejících s trestným činem, mohou se používat i ve forenzní botanice nebo palynologii (studium pylů). Polymorfismus mikrosatelitů se totiž vykytuje i u rostlin a zvyšující se dostupnost markerů pro široké spektrum jednotlivých druhů může poskytnout důležitý nástroj pro forenzní

genetiku a kriminalistické vyšetřování. Rostlinné DNA profily byly využity v případě vraždy, která se stala na Floridě. Vyšetřovatelé provedli analýzu DNA listů stromů (*Quercus geminata*, *Q. virginiana*) rostoucích v okolí místa činu a porovnali genetický profil se suchými listy nalezenými v autě podezřelé osoby. Byly použité mikrosatelitové markery pro *Q. macrocarpa* a *Q. petraea*, pomocí kterých se daly amplifikovat i alely *Q. geminata* a *Q. virginiana*. Nejprve se provedl test, jestli suché a zelené listy pocházející z jednoho stromu měly shodu v DNA profilu. Izolace DNA ze suchých listů byla komplikovanější, DNA byla pravděpodobně částečně degradovaná nebo obsahovala více inhibitorů PCR než zelené listy. Vzorky pocházející z jednoho stromu se po provedení testu shodovaly, mohly se tedy porovnat DNA profily listů nalezených v autě podezřelého s listy stromů na místě činu. Pravděpodobnost, že by se dva stromy shodovaly ve svých DNA profilech, je asi  $2,06 \times 10^{-6}$ . Byla nalezena shoda v některých mikrosatelitových oblastech, ale ani v jednom případě nebyla shoda ve všech čtyřech použitých markerech. Dokázalo se, že listy z auta podezřelého pocházely z různých stromů, ale ne z těch, které rostly na místě činu. Podezřelého se tedy usvědčit nepodařilo. Forenzní botanika se nevyužívá k řešení kriminálních činů příliš často, tento případ však dokazuje, že by tomu tak být v budoucnu mohlo (Craft et al. 2007).

DNA profilování se využívá i při identifikaci zvířat. V květnu roku 2010 byl v jižním Bulharsku povolen odstřel medvěda, který zabil tamního obyvatele. Porovnáním DNA profilů chlupů nalezených na místě napadení muže a vzorků získaných ze zastřeleného medvěda bylo zjištěno, že se jednalo o dva nepříbuzné jedince. Vytváření databází DNA profilů pro velké savce by nepřispělo pouze jejich monitorování a ochraně, ale mohlo by pomoci identifikovat případné agresivní jedince a zabránit tak dalším neštěstím (Frosch et al. 2011).

DNA profilování zvířat může sloužit k jejich ochraně. V Itálii se vede databáze DNA profilů velkých predátorů (medvědů, vlků, rysů atd.), vzorky se získávají nenásilnými metodami (například z trusu) a odebírají se také z mrtvých jedinců. Na severu Itálie jsou velmi častá pytláctví vlků (*Canis lupus*). V roce 2008 byl z nelegálního lovu usvědčen muž díky DNA analýze. Vytvořil se genetický profil objevených mršín a materiálu nalezeného u podezřelého (vlčí zuby). DNA profil jednoho zubu odpovídal DNA vzorkům odebraných z nalezené mršiny. Výsledky analýzy chrupu byly porovnány s údaji v ISPRA databázi a byly nalezeny dvě shody. Potvrdila se shoda mezi genotypem mršiny a jednoho zubu, další shoda byla mezi genotypem zubu a genotypem samice vlka, které byly neinvazivně odebrány vzorky v roce 2007 (Caniglia et al. 2010).

DNA profilování je velmi důležité při identifikaci obětí hromadných katastrof. Ne vždy je možná identifikace pomocí vzhledu, otisků prstů nebo osobních věcí. Vždy záleží na

stavu ostatků, který se odvíjí od typu katastrofy, jak dlouho jsou oběti po smrti a jakým fyzikálním podmínkám byly vystaveny. DNA analýza je nezbytná při vyšším stádiu rozkladu nebo při zohavení ostatků. Je to také nejspolehlivější metoda identifikace. INTERPOL (International Criminal Police Organisation) poskytuje rady, pomoc a návody jak postupovat při hromadné katastrofě a identifikaci obětí (DVI, Disaster Victim Identification) (URL4). Po izolaci a analýze DNA oběti je třeba ji porovnat s DNA pozůstalých, případně s DNA na osobních věcech oběti, aby se dala určit totožnost. Porovnání profilů je nejlepší provádět s přímými příbuznými, pokud je to možné tak s více než s jedním. Doporučený postup pro testování příbuzných je následovný. Pokud existuje, je nejvhodnější vytvořit pro srovnání DNA profil monozygotního dvojčete oběti. Jestliže jednovaječné dvojče neexistuje, testuje se biologická matka a otec, výhodou je sourozenec. Když nelze odebrat DNA rodičů, vytváří se profil biologických dětí oběti a jejich druhého rodiče. Až poté přichází na řadu sourozenci. Odběr DNA příbuzných se provádí stěry z dutiny ústní nebo odebráním kapky krve. Příbuzní mohou poskytnout osobní věci oběti, ze kterých se také dá izolovat DNA a vytvořit genetický profil (URL4). V Tabulce 5 jsou uvedeny různé zdroje DNA podle kvality a dostupnosti. DNA profily byly použity k identifikaci obětí například při potopení lodi Trenggalek, kdy byly ostatky lidí v pokročilém stádiu rozkladu (Dhanardhono et al. 2013).

Tab. 5 Zdroje DNA oběti

Kvalita DNA	Obvykle k dispozici	Může být k dispozici
Dobré zdroje DNA	Zubní kartáčky Elektrické a manuální britvy Hřebeny	Vzorky kostní dřevě, národní biobanky, kriminální databáze, vzorky ze sperma banky, vzorky krve a plasmy, usušený pupečník
Stužné zdroje DNA	Hřebinky Rtěnky, hlavice deodorantů Povlaky na polštář Použité hrnky, sklenice Nošené spodní prádlo	Odstřížky nehtů, nedopalky cigaret, pišťalky, chrániče úst, helmy, podprsenky, ponožky, sluchátka, špunty do uší, brýle, okousaná pera, pohledy a dopisy
Slabé zdroje DNA	Šperky Hodinky Oblečení Ručníky Boty Klapky na uši	Dětské vlasy, zubní protézy, natačky, zastríhovače vlasů, pilníky na nehty

(upraveno podle Prinz et al. 2007 )

#### 4.2.3. Polymorfismus chromosomu Y a jeho využití ve forenzní genetice

Většina násilných činnů je spáchána muži, chromosom Y tudíž může poskytnout důležité informace o pachateli. Dále se chromosom Y využívá při určování otcovství synů, jelikož je haploidní a neúčastní se crossing-overu, přenáší se z otce na syna v nezměněné podobě, pouze s případnými mutacemi. Muži v jedné rodinné linii mají tedy stejné alely na chromosomu Y, nelze je analýzou tohoto chromosomu rozlišit. To může představovat problém při kriminálním vyšetřování, jelikož více mužů sdílí stejný Y chromosom. Analýza chromosomu Y se používá často v případech znásilnění. Velká výhoda spočívá v tom, že není třeba oddělovat mužskou a ženskou DNA z vaginálních stěrů, protože žena nemá Y chromosom a nedojde tedy k amplifikaci její DNA při použití markerů k mužskému chromosomu. To umožňuje rychlejší analýzu bez časově náročnější diferenciální lyze pro oddělení mužské a ženské DNA a následnému autosomálnímu testování (Prinz and Sansone 2001).

Na chromosomu Y se našlo množství STR, ale většina z nich ještě nebyla dostatečně charakterizována pro své použití ve forenzní genetice. Navrhovaly se různé Y-chromosomální STR markery pro forenzní analýzu (Kayser et al. 1997). Později se k těmto



markerům přidávaly další. Bylo doporučeno 43 Y markerů rozdělených do tří multiplexů (MPIII, MPIV, MPV). V MPIII je zahrnuto 8 mikrosatelitových markerů a 1 InDel (polymorfismus inserce-delece), v multiplexu MPIV je 21 Y-STR markerů a MPV obsahuje 13 Y-STR markerů (kompletní přehled viz (Hanson et al. 2006)). STR markery vybrané pro tyto multiplexy jsou lokalizovány v nerekombinující oblasti chromosomu Y, dědí se tedy v nezměněné podobě s minimálním množstvím spontánních mutací. Pomocí těchto markerů je možné vytvořit DNA profil i ze vzorků, které byly vystaveny různým nepříznivým podmínkám. Mužský DNA vzorek (suchá skvrna od krve) se vystavil vysokým teplotám, světlu, vlhkosti a dešti po různou dobu (maximum 18 měsíců). Vzorek, který nebyl vystaven vnějším fyzikálním podmínkám, poskytl Y DNA profil i po osmnácti měsících, naopak ze vzorků vystavených těmito podmínkám bylo možné získat úplný DNA profil pomocí používaných Y-chromosomálních markerů maximálně po měsíci vystavení vysokým teplotám, světlu, vlhkosti a dešti. Pro analýzu těmito třemi multiplexy stačí velmi malé množství templátové DNA. Pro multiplex III a IV stačí 25 pg, pro MPV 50 pg. Analýza je tedy velmi citlivá. Tyto markery se také testovaly při malém množství mužské DNA smíchané s podstatně větším množstvím ženské DNA (až 1:1000). Úspěšně docházelo pouze k amplifikaci mužské DNA, touto metodou lze tedy testovat mix DNA muže a ženy, čehož se využívá právě v případech znásilnění. V případech, kdy je ve vzorku DNA od více mužů, analýza pomocí chromosomu Y umožňuje snadné určení počtu pachatelů, autozomální analýza by v tomto případě byla složitější (Hanson et al. 2006).

#### **4.2.4. Forenzní analýza a problém chimér a mozaik**

Jedincům, kteří mají ve svém těle více buněčných populací lišících se genetickou informací v nich obsaženou, se říká chiméry nebo mozaiky. U chimér jsou buněčné linie odvozeny od dvou a více zygót (jedinců), u mozaiky jsou derivované z jedné zygoty. Chimérimus může nastat, pokud dojde ke splynutí dvou embrií v děloze. Vzniklý jedinec bude mít dvě populace geneticky odlišných buněk. Dalším zdrojem cizích buněk může být transplantace nebo krevní transfúze. Naproti tomu mozaiky vznikají nondisjunkcí chromosomů při mitotickém dělení a mají často odlišný pouze jeden lokus (Rolf et al. 2002). Při nádorovém onemocnění se však počet alternací v mikrosatelitech zvyšuje (Poetsch et al. 2004). Tyto genetické zvláštnosti mohou komplikovat forenzní vyšetřování, protože nenastane shoda DNA profilu pachatele nebo oběti s DNA na místě činu, i když patří jedné osobě, nebo dojde k falešnému vyloučení rodičovství.

#### 4.2.4.1. Chiméry

Chimérismus se odhalil u dospělých pacientů, kteří podstoupili transplantaci hematopoetické tkáně od nepříbuzných dárců. Byla jim odebrána krev, vzorky vlasů a stěry dutiny ústní v období 17 dní až 9 let od zákroku. Z izolované DNA se vytvořily STR profily. V odebrané krvi byl nalezen pouze STR profil dárce, v kořínkách vlasů jen genotyp příjemce. Sedmdesát čtyři procent bukových stěrů obsahovalo dva genotypy, 22 % nevykazovalo žádný chimérismus a 4 % úplný dárcovský chimérismus (vzorky obsahovaly pouze profil dárce) (Berger et al. 2013). Celkově ve 20 % stěrů převažoval profil dárce. Nebyla nalezena souvislost mezi hladinou chimérismu (poměr množství genetického materiálu dárce a příjemce) a věkem pacienta při transplantaci, ani s dobou, která od zákroku uplynula. Avšak u pacientů, kterým se DNA z úst odebírala vícekrát, se v některých případech hladina chimérismu po čase měnila, někdy klesala, jindy stoupala (Berger et al. 2013). U několika jedinců se chimérismus lišil při odběru z různých částí úst. Tato studie dokazuje, že vznik chimérismu po transplantaci hematopoetické tkáně není výjimkou, ale spíše pravidlem (Berger et al. 2013). Biologická příčina přítomnosti DNA odvozené od dárcovských krvetvorných buněk v ústních epitelálních buňkách příjemce ale stále není zcela jasná (Waterhouse et al. 2011).

Chimérismus se vyskytuje také u jedinců narozených z vícečetného těhotenství. Vzniká transfúzí krevních buněk mezi dizygotními sourozenci, u nichž se poté může vyvinout chimérismus krevních skupin. U dvojčat je četnost tohoto jevu asi 8 %, u trojčat až 21 % (van Dijk et al. 1996). Pokud v děloze dojde ke splynutí dvou zygót, vzniká tzv. tetragametický chimérismus. Rozdílné buněčné linie se poté nachází ve většině tkání. Rodiče s krevními skupinami 0 a AB tak mohou mít dítě s fenotypem AB, které má krevní buňky s genotypy A0 a B0. V tomto případě mohlo dojít k falešnému vyloučení rodičovství (Yu et al. 2011).

#### 4.2.4.2. Mozaiky

Ve forenzní genetice se někdy ke srovnání DNA profilů používají vzorky tkání uložené v klinických zařízeních. Většinou se využívají, pokud není dostupný jiný materiál pro analýzu, například při identifikaci neznámých těl nebo při určování otcovství, když potenciální otec již zemřel. Problém nastává, jestliže je k dispozici pouze nádorová tkáň, protože se často geneticky odlišuje od té zdravé (viz kapitola 4.1.) a vzniká mozaika. Analýzou různých tumorů se určovala přesnost vytváření DNA profilů z klinického materiálu

(Poetsch et al. 2004). Vytvoření odlišného profilu by nastalo, pokud by došlo k úplné ztrátě alely nebo výskytu nové alely namísto původní formy ve zdravé tkáni. To bylo pozorováno u 5,6 % testovaných nádorů. Vzorky tumorů by se tedy měly používat opravdu jen v případech, kdy není k dispozici jiný materiál pro testování, především pokud se jedná o typ s vysokou mikrosatelitovou nestabilitou (Poetsch et al. 2004).

Při vytváření DNA profilů z bukálních stěrů pacientů s rakovinou dutiny ústní bylo zjištěno, že 5 % vykazuje LOH a 17 % alelické změny (expanse, redukce atd.). Bukální vzorky jedinců s rakovinou úst by tedy vůbec neměly být používané pro forenzní analýzu (Pai et al. 2002).

Přestože v dnešní době existují kvalitní baterie testovaných STR markerů, genetické anomálie mohou analýzy zpřesnit. Aby se minimalizovaly chyby spojené s chimérismem nebo mozaicismem, mělo by se před odebráním genetického materiálu ověřit, zda jedinec nepodstoupil transplantaci, neměl rakovinu nebo nějakou genetickou anomálii. Pokud existuje podezření, že je testovaná osoba chiméra/mozaika, bylo by vhodné vytvořit STR profily různých tkání a porovnávat mezi sebou vždy stejný typ (Castella et al. 2009).

#### **4.2.4.3. Detekce chimérismu/mozaicismu**

Obvykle se detekce chimérismu provádí pomocí komerčních baterií STR markerů určených pro forenzní analýzu metodou PCR. Tyto baterie však většinou obsahují zbytečně mnoho markerů, které nejsou pro analýzu chimér moc informativní (schopné rozlišit komponenty donora a recipienta po transplantaci). Detekce a určení hladiny chimérismu po zákroku jsou velmi důležité pro případnou ranou diagnózu recidivy a úpravu léčby tak, aby se podpořila funkce transplantované tkáně (de Weger et al. 2000). Ne vždy je k dispozici DNA profil dárce a recipienta před zákrokem, proto byl navržen panel STR markerů pro přímou efektivní analýzu. Nejprve bylo testováno 15 nejčastěji používaných markerů a poté se vybralo 8 nejinformativnějších: D2S1338, D21S11, D18S51, FGA, VWA, D19S433, TH01 a D3S1358. Pomocí těchto STR se dá spolehlivě odhalit chimérismus a je to levnější než testování většího počtu málo informativních markerů (Odriozola et al. 2011).

## 5. Závěr

Tato práce shrnuje poznatky o mikrosatelitech a jejich využití v lékařské a forenzní genetice. Ukazuje jejich značný potenciál pro diagnostiku, prognózy rakovinných onemocnění i pro identifikaci osob v kriminalistice.

V lékařské genetice se využívá polymorfismus mikrosatelitů v rámci tkání jedince, díky čemuž je možné detekovat rakovinné onemocnění v raném stádiu, jelikož se mikrosatelitová nestabilita objevuje velmi brzy, někdy i před samotných propuknutím onemocnění. Výhoda takové diagnostiky je v mnoha případech její neinvazivita. Tumory s MSI mají obecně lepší prognózy než tumory, jejichž mikrosatelity jsou stabilní.

Do budoucna je zapotřebí vybrat vhodné markery pro identifikaci MSI u různých tumorů. U nádorů kde MSI předchází rozvoji onemocnění by se poté mohlo zavést celoplošné testování na MSI, především u rizikových skupin (pacienti ohroženi recidivou, u hereditárních nádorů blízcí příbuzní).

Ve forenzní genetice se využívá polymorfismus mikrosatelitů mezi jedinci. Pomocí vybraných markerů se vytváří genetický profil osob, unikátní pro každého člověka (kromě monozygotních dvojčat). DNA profilování se tedy hojně využívá při řešení kriminálních případů. Byly vybrány speciální markery pro chromosom Y, které se uplatňují především u případů znásilnění. Při vytváření profilů je třeba brát v úvahu existenci osob s chimérismem a mozaicismem.

Používané MSI markery jsou dostatečně spolehlivé pro vytvoření individuálního DNA profilu, ale zajisté se bude jejich seznam stále obměňovat a vylepšovat. Bylo by výhodné vytvořit jednu mezinárodní databázi, velmi by to zjednodušilo vyhledávání a přiřazování DNA profilů k osobám. To by vyžadovalo sjednocení zákonu, ve kterém jsou uvedena pravidla pro vytváření DNA databází a zacházení s daty v nich uvedenými.

## Seznam použité literatury

- Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen GM, Kinzler KW, Vogelstein B, and Delachapelle A. 1993. Clues to the pathogenesis of familial colorectal-cancer. *Science* 260(5109):812-816.
- Acharya S, Wilson T, Gradia S, Kane MF, Guerrette S, Marsischky GT, Kolodner R, and Fishel R. 1996. hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(24):13629-13634.
- Ahn MS, Doctolero RT, Pham TTT, Behling CA, Binmoeller K, and Carethers JM. 2000. Infrequent microsatellite instability - High (MSI-H) in pancreatitis and pancreatic cancer specimens. *Gastroenterology* 118(4):A1378-A1378.
- Akiyama Y, Sato H, Yamada T, Nagasaki H, Tsuchiya A, Abe R, and Yuasa Y. 1997. Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Research* 57(18):3920-3923.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, Debruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, and Young IG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290(5806):457-465.
- Antczak A, Migdalska-Sek M, Pastuszek-Lewandoska D, Czarnecka K, Nawrot E, Domanska D, Kordiak J, Gorski P, and Brzezianska E. 2013. Significant frequency of allelic imbalance in 3p region covering RAR beta and MLH1 loci seems to be essential in molecular non-small cell lung cancer diagnosis. *Medical Oncology* 30(2).
- Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, Christie DM, Monell C, Arnheim N, Bradley A, Ashley T, and Liskay RM. 1996. Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nature Genetics* 13(3):336-342.
- Bandelt HJ, Macaulay V, and Richards M. 2006. *Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Berger B, Parson R, Clausen J, Berger C, Nachbaur D, and Parson W. 2013. Chimerism in DNA of buccal swabs from recipients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantations: implications for forensic DNA testing. *International Journal of Legal Medicine* 127(1):49-54.
- Bhattacharyya NP, Skandalis A, Ganesh A, Groden J, and Meuth M. 1994. Mutator phenotypes in human colorectal-carcinoma cell-lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(14):6319-6323.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, and Srivastava S. 1998. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Cancer Research* 58(22):5248-5257.
- Bollati V, Galimberti D, Pergoli L, Dalla Valle E, Barretta F, Cortini F, Scarpini E, Bertazzi PA, and Baccarelli A. 2011. DNA methylation in repetitive elements and Alzheimer disease. *Brain Behavior and Immunity* 25(6):1078-1083.
- Brentnall TA, Chen R, Kimmey MB, Hecker L, Kowdley KV, Bronner MB, and Byrd DR. 1995. Ras-mutations and microsatellite instability detected in ercp-derived pancreatic-juice from patients with pancreatic-cancer. *Gastroenterology* 108(4):A452-A452.
- Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, Tannergard P, Bollag RJ, Godwin AR, Ward DC,

- Nordenskjold M, Fishel R, Kolodner R, and Liskay RM. 1994. Mutation in the DNA mismatch repair gene homolog HMLH1 is associated with hereditary nonpolyposis colon-cancer. *Nature* 368(6468):258-261.
- Cairns P, Tokino K, Eby Y, and Sidransky D. 1994. Homozygous deletions of 9p21 in primary human bladder-tumors detected by comparative multiplex polymerase chain-reaction. *Cancer Research* 54(6):1422-1424.
- Caniglia R, Fabbri E, Greco C, Galaverni M, and Randi E. 2010. Forensic DNA against wildlife poaching: Identification of a serial wolf killing in Italy. *Forensic Science International-Genetics* 4(5):334-338.
- Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP, Spanevello A, Resta O, Carpagnano F, Mule G, Pinto R, Tornmasi S, and Paradiso A. 2008. 3p microsatellite signature in exhaled breath condensate and tumor tissue of patients with lung cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177(3):337-341.
- Castaneda M, Odriozola A, Gomez J, and Zarrabeitia MT. 2013. Development and validation of a multiplex reaction analyzing eight miniSTRs of the X chromosome for identity and kinship testing with degraded DNA. *International Journal of Legal Medicine* 127(4):735-739.
- Castella V, Lesta MD, and Mangin P. 2009. One person with two DNA profiles: a(nother) case of mosaicism or chimerism. *International Journal of Legal Medicine* 123(5):427-430.
- Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, Stein JP, Shi SR, Tran QC, Hu SX, Xu HJ, Groshen S, Taylor CR, Skinner DG, and Benedict WF. 1998. Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. *Cancer Research* 58(6):1090-1094.
- Craft KJ, Owens JD, and Ashley MV. 2007. Application of plant DNA markers in forensic botany: Genetic comparison of *Quercus* evidence leaves to crime scene trees using microsatellites. *Forensic Science International* 165(1):64-70.
- de Weger RA, Tilanus MGJ, Scheidel KC, van den Tweel JG, and Verdonck LF. 2000. Monitoring of residual disease and guided donor leucocyte infusion after allogeneic bone marrow transplantation by chimaerism analysis with short tandem repeats. *British Journal of Haematology* 110(3):647-653.
- Denault GC, Takimoto HH, Kwan QY, and Pallos A. 1980. Detectability of selected genetic-markers in dried blood on aging. *Journal of Forensic Sciences* 25(3):479-498.
- Dhanardhono T, Wulandari N, Bhima SKL, Ahmad HJ, and Widodo PT. 2013. DNA profiling of disaster victim identification in Trenggalek shipwreck case. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 4(1):e5-e6.
- Doherty JE, Woodard LE, Bear AS, Foster AE, and Wilson MH. 2013. An adaptable system for improving transposon-based gene expression in vivo via transient transgene repression. *Faseb Journal* 27(9):3753-3762.
- Dohet C, Wagner R, and Radman M. 1986. Methyl-directed repair of frameshift mutations in heteroduplex DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(10):3395-3397.
- Drummond JT, Genschel J, Wolf E, and Modrich P. 1997. DHFR/MSH3 amplification in methotrexate-resistant cells alters the hMutS alpha/hMutS beta ratio and reduces the efficiency of base-base mismatch repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(19):10144-10149.
- Eshleman JR, Markowitz SD, Donover PS, Lang EZ, Lutterbaugh JD, Li GM, Longley M, Modrich P, Veigl ML, and Sedwick WD. 1996. Diverse hypermutability of multiple expressed sequence motifs present in a cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 12(7):1425-1432.

- Feinberg AP, and Vogelstein B. 1983. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301(5895):89-92.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, and Kolodner R. 1993. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon-cancer. *Cell* 75(5):1027-1038.
- Frosch C, Dutsov A, Georgiev G, and Nowak C. 2011. Case report of a fatal bear attack documented by forensic wildlife genetics. *Forensic Science International-Genetics* 5(4):342-344.
- Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, and Jaenisch R. 2003. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 300(5618):489-492.
- Genschel J, Littman SJ, Drummond JT, and Modrich P. 1998. Isolation of MutS beta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutS beta and MutS alpha. *Journal of Biological Chemistry* 273(31):19895-19901.
- Gill P, Jeffreys AJ, and Werrett DJ. 1985. Forensic application of DNA fingerprints. *Nature* 318(6046):577-579.
- Gill P, and Werrett DJ. 1987. Exclusion of a man charged with murder by DNA fingerprinting. *Forensic Science International* 35(2-3):145-148.
- Gruenbaum Y, Stein R, Cedar H, and Razin A. 1981. Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *Febs Letters* 124(1):67-71.
- Grundeit T, Vogelsang H, Ott K, Mueller J, Scholz M, Becker K, Fink U, Siewert JR, Hofler H, and Keller G. 2000. Loss of heterozygosity and microsatellite instability as predictive markers for neoadjuvant treatment in gastric carcinoma. *Clinical Cancer Research* 6(12):4782-4788.
- Gryfe R, Kim H, Hsieh ETK, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, and Gallinger S. 2000. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *New England Journal of Medicine* 342(2):69-77.
- Halling KC, French AJ, McDonnell SK, Burgart LJ, Schaid DJ, Peterson BJ, Moon-Tasson L, Mahoney MR, Sargent DJ, O'Connell MJ, Witzig TE, Farr GH, Goldberg RM, and Thibodeau SN. 1999. Microsatellite instability and 8p allelic imbalance in stage B2 and C colorectal cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 91(15):1295-1303.
- Hamada H, Petrino MG, and Kakunaga T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 79(21):6465-6469.
- Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y, Park JG, and Nakamura Y. 1993. Genetic instability in pancreatic-cancer and poorly differentiated type of gastric-cancer. *Cancer Research* 53(21):5087-5089.
- Hanson EK, Berdos PN, and Ballantyne J. 2006. Testing and evaluation of 43 "noncore" Y chromosome markers for forensic casework applications. *Journal of Forensic Sciences* 51(6):1298-1314.
- Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, and Hamelin R. 1997. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Research* 57(2):300-303.
- Hollingsworth NM, Ponte L, and Halsey C. 1995. MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces-cerevisiae* but not mismatch repair. *Genes & Development* 9(14):1728-1739.
- Horii A, Han HJ, Shimada M, Yanagisawa A, Kato Y, Ohta H, Yasui W, Tahara E, and Nakamura Y. 1994. Frequent replication errors at microsatellite loci in tumors of patients with multiple primary cancers. *Cancer Research* 54(13):3373-3375.

- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, and Perucho M. 1993. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363(6429):558-561.
- Jasinska A, and Krzyzosiak WJ. 2004. Repetitive sequences that shape the human transcriptome. *Febs Letters* 567(1):136-141.
- Jeffreys AJ, Turner M, and Debenham P. 1991. The efficiency of multilocus DNA fingerprint probes for individualization and establishment of family relationships, determined from extensive casework. *American Journal of Human Genetics* 48(5):824-840.
- Jeffreys AJ, Wilson V, and Thein SL. 1985a. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314(6006):67-73.
- Jeffreys AJ, Wilson V, and Thein SL. 1985b. Individual-specific fingerprints of human DNA. *Nature* 316(6023):76-79.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Wong Z, Patel I, Royle N, Neumann R, Armour JAL, Kelley R, Collick A, Gray I, Gibbs M, and Fed Bur I. 1989. Multilocus and single locus minisatellite DNA probes in forensic medicine. 77-86 p.
- Johnson RE, Kovvali GK, Prakash L, and Prakash S. 1996. Requirement of the yeast MSH3 and MSH6 genes for MSH2-dependent genomic stability. *Journal of Biological Chemistry* 271(13):7285-7288.
- Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, and Kolodner R. 1997. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Research* 57(5):808-811.
- Kayser M, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, Heidorn F, Herrmann S, Herzog B, Hidding M, Honda K, Jobling M, Krawczak M, Leim K, Meuser S, Meyer E, Oesterreich W, Pandya A, Parson W, Penacino G, PerezLezaun A, Piccinini A, Prinz M, Schmitt C, Schneider PM, Szibor R, TeifelGreding J, Weichold G, deKnijff P, and Roewer L. 1997. Evaluation of Y-chromosomal STRs: A multicenter study. *International Journal of Legal Medicine* 110(3):125-+.
- Knudson AG. 1971. Mutation and cancer - statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68(4):820-&.
- Knudson AG. 1978. Retinoblastoma – prototypic hereditary neoplasm. *Seminars in Oncology* 5(1):57-60.
- Kondo E, Furukawa T, Yoshinaga K, Kijima H, Semba S, Yatsuoka T, Yokoyama T, Fukushima S, and Horii A. 2000. Not hMSH2 but hMLH1 is frequently silenced by hypermethylation in endometrial cancer but rarely silenced in pancreatic cancer with microsatellite instability. *International Journal of Oncology* 17(3):535-541.
- Kramer B, Kramer W, Williamson MS, and Fogel S. 1989. Heteroduplex DNA correction in *Saccharomyces-cerevisiae* is mismatch specific and requires functional PMS genes. *Molecular and Cellular Biology* 9(10):4432-4440.
- Lander ES, Int Human Genome Sequencing C, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe



- SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang HM, Yu J, Wang J, Huang GY, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin SZ, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan HQ, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsieck G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JGR, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang WH, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz JR, Slater G, Smit AFA, Stupka E, Szustakowki J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, and Int Human Genome Sequencing C. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822):860-921.
- Leung WK, Kim JJ, Wu L, Sepulveda JL, and Sepulveda AR. 2000. Identification of a second MutL DNA mismatch repair complex (hPMS1 and hMLH1) in human epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 275(21):15728-15732.
- Li GM, and Modrich P. 1995. Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor-cells by a heterodimer of human MutL homologs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(6):1950-1954.
- Liang F, Holt I, Pertea G, Karamycheva S, Salzberg SL, and Quackenbush J. 2000. Gene Index analysis of the human genome estimates approximately 120,000 genes. *Nature Genetics* 25(2):239-240.
- Lichten M, Goyon C, Schultes NP, Treco D, Szostak JW, Haber JE, and Nicolas A. 1990. Detection of heteroduplex DNA-molecules among the products of *Saccharomyces-cerevisiae* meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(19):7653-7657.
- Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, Banerjee-Basu S, Baxevanis AD, Lynch HT, Elliott RM, and Collins FS. 2000. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nature Genetics* 24(1):27-35.
- Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomaki P, delaChapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, and Kinzler KW. 1996. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nature Medicine* 2(2):169-174.
- Mao L, Lee DJ, Tockman MS, Erozan YS, Askin F, and Sidransky D. 1994. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(21):9871-9875.

- Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, Erozan YS, Merlo A, Schwab D, and Sidransky D. 1996. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* 271(5249):659-662.
- Maxam AM, and Gilbert W. 1977. New method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(2):560-564.
- Merlo A, Mabry M, Gabrielson E, Vollmer R, Baylin SB, and Sidransky D. 1994. Frequent microsatellite instability in primary small-cell lung-cancer. *Cancer Research* 54(8):2098-2101.
- Miozzo M, Sozzi G, Musso K, Pilotti S, Incarbone M, Pastorino U, and Pierotti MA. 1996. Microsatellite alterations in bronchial and sputum specimens of lung cancer patients. *Cancer Research* 56(10):2285-2288.
- Morse B, Rotherg PG, South VJ, Spandorfer JM, and Astrin SM. 1988. Insertional mutagenesis of the MYC locus by a LINE-1 sequence in a human-breast carcinoma. *Nature* 333(6168):87-90.
- Mylona E, Zarogiannos A, Nomikos A, Giannopoulou I, Nikolaou I, Zervas A, and Nakopoulou L. 2008. Prognostic value of microsatellite instability determined by immunohistochemical staining of hMSH2 and hMSH6 in urothelial carcinoma of the bladder. *Apmis* 116(1):59-65.
- Nakata B, Wang YQ, Yashiro M, Nishioka N, Tanaka H, Ohira M, Ishikawa T, Nishino H, and Hirakawa K. 2002. Prognostic value of microsatellite instability in resectable pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research* 8(8):2536-2540.
- New L, Liu K, and Crouse GF. 1993. The yeast gene MSH3 defines a new class of eukaryotic MutS homologs. *Molecular & General Genetics* 239(1-2):97-108.
- Odriozola A, Riancho JA, Mijares V, Nu, ntilde, ez-Céspedes J, and Zarrabeitia MT. 2011. Chimerism detection by short tandem repeat analysis when donor and recipient genotypes are not known.
- Olumi AF, Tsai YC, Nichols PW, Skinner DG, Cain DR, Bender LI, and Jones PA. 1990. Allelic loss of chromosome-17p distinguishes high-grade from low-grade transitional cell carcinomas of the bladder. *Cancer Research* 50(21):7081-7083.
- Pai CY, Hsieh LL, Tsai CW, Chiou FS, Yang CH, and Hsu BD. 2002. Allelic alterations at the STR markers in the buccal tissue cells of oral cancer patients and the oral epithelial cells of healthy betel quid-chewers: an evaluation of forensic applicability. *Forensic Science International* 129(3):158-167.
- Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JKV, Markowitz SD, Kinzler KW, and Vogelstein B. 1995. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth-factor-beta type-II receptor gene in colorectal-cancer. *Cancer Research* 55(23):5548-5550.
- Pertea M, and Salzberg SL. 2010. Between a chicken and a grape: estimating the number of human genes. *Genome Biology* 11(5).
- Poetsch M, Petersmann A, Woenckhaus C, Protzel C, Dittberner T, Lignitz E, and Kleist B. 2004. Evaluation of allelic alterations in short tandem repeats in different kinds of solid tumors - possible pitfalls in forensic casework. *Forensic Science International* 145(1):1-6.
- Prinz M, Carracedo A, Mayr WR, Morling N, Parsons TJ, Sajantila A, Scheithauer R, Schmitter H, and Schneider PM. 2007. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). *Forensic Science International-Genetics* 1(1):3-12.
- Prinz M, and Sansone M. 2001. Y chromosome-specific short tandem repeats in forensic casework. *Croatian Medical Journal* 42(3):288-291.

- Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, and Perucho M. 1997. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275(5302):967-969.
- Reenan RAG, and Kolodner RD. 1992. Isolation and characterization of 2 *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding homologs of the bacterial hexa and MutS mismatch repair proteins. *Genetics* 132(4):963-973.
- Richard GF, Kerrest A, and Dujon B. 2008. Comparative Genomics and Molecular Dynamics of DNA Repeats in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72(4):686-+.
- Rolf B, Wiegand P, and Brinkmann B. 2002. Somatic mutations at STR loci - a reason for three-allele pattern and mosaicism. *Forensic Science International* 126(3):200-202.
- Rosell R, Pifarre A, Monzo M, Astudillo J, LopezCabrerizo MP, Calvo R, Moreno I, SanchezCespedes M, Font A, and NavasPalacios JJ. 1997. Reduced survival in patients with stage-I non-small-cell lung cancer associated with DNA-replication errors. *International Journal of Cancer* 74(3):330-334.
- Rossmacdonald P, and Roeder GS. 1994. Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing-over but not mismatch correction. *Cell* 79(6):1069-1080.
- Royle NJ, Clarkson RE, Wong Z, and Jeffreys AJ. 1988. Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of human autosomes. *Genomics* 3(4):352-360.
- Ryberg D, Lindstedt BA, Zienolddiny S, and Haugen A. 1995. A hereditary genetic-marker closely associated with microsatellite instability in lung-cancer. *Cancer Research* 55(18):3996-3999.
- Salahshor S, Koelble K, Rubio C, and Lindblom A. 2001. Microsatellite instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in familial and sporadic colorectal cancer. *Laboratory Investigation* 81(4):535-541.
- Schwarzenbach H, Eicheler C, Kropidowski J, Janni W, Rack B, and Pantel K. 2012. Loss of Heterozygosity at Tumor Suppressor Genes Detectable on Fractionated Circulating Cell-Free Tumor DNA as Indicator of Breast Cancer Progression. *Clinical Cancer Research* 18(20):5719-5730.
- Sensabaugh GF. 1982. Isozymes in forensic-science. *Isozymes-Current Topics in Biological and Medical Research* 6:247-282.
- Seripa D, Parrella P, Gallucci M, Gravina C, Papa S, Fortunato P, Alcini A, Flammia G, Lazzari M, and Fazio VM. 2001. Sensitive detection of transitional cell carcinoma of the bladder by microsatellite analysis of cells exfoliated in urine. *International Journal of Cancer* 95(6):364-369.
- Souza RF, Appel R, Yin J, Wang SN, Smolinski KN, Abraham JM, Zou TT, Shi YQ, Lei JY, Cottrell J, Cymes K, Biden K, Simms L, Leggett B, Lynch PM, Frazier M, Powell SM, Harpaz N, Sugimura H, Young J, and Meltzer SJ. 1996. Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nature Genetics* 14(3):255-257.
- Strand M, Prolla TA, Liskay RM, and Petes TD. 1993. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365(6443):274-276.
- Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, Seruca R, Iacopetta B, and Hamelin R. 2002. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasi monomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 123(6):1804-1811.
- Sutter C, Gebert J, Bischoff P, Herfarth C, and Doeberitz MV. 1999. Molecular screening of potential HNPCC patients using a multiplex microsatellite PCR system. *Molecular and Cellular Probes* 13(2):157-165.

- Tautz D. 1993. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA-sequences. 21-28 p.
- Thibodeau SN, Bren G, and Schaid D. 1993. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260(5109):816-819.
- Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, and Issa JJP. 2000. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(2):710-715.
- van Dijk BA, Boomsma DI, and de Man AJM. 1996. Blood group chimerism in human multiple births is not rare. *American Journal of Medical Genetics* 61(3):264-268.
- Verma L, Kane MF, Brassett C, Schmeits J, Evans DGR, Kolodner RD, and Maher ER. 1999. Mononucleotide microsatellite instability and germline MSH6 mutation analysis in early onset colorectal cancer. *Journal of Medical Genetics* 36(9):678-682.
- Wadhwa N, Mathew BB, Jatawa SK, and Tiwari A. 2013. Genetic instability in urinary bladder cancer: An evolving hallmark. *Journal of Postgraduate Medicine* 59(4):284-288.
- Wang YC, Hsu HS, Chen TP, and Chen JT. 2006. Molecular diagnostic markers for lung cancer in sputum and plasma. In: Swaminathan R, Butt A, and Gahan P, editors. *Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum* IV. p 179-184.
- Waring M, and Britten RJ. 1966. Nucleotide sequence repetition – a rapidly reassociating fraction of mouse DNA. *Science* 154(3750):791-&.
- Waterhouse M, Themeli M, Bertz H, Zoumbos N, Finke J, and Spyridonidis A. 2011. Horizontal DNA Transfer from Donor to Host Cells as an Alternative Mechanism of Epithelial Chimerism after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 17(3):319-329.
- Waye JS, and Willard HF. 1985. Chromosome-specific alpha-satellite DNA – nucleotide-sequence analysis of the 2.0 kilobasepair repeat from the human X-chromosome. *Nucleic Acids Research* 13(8):2731-2743.
- Weber JL, and May PE. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain-reaction. *American Journal of Human Genetics* 44(3):388-396.
- Welch LA, Gill P, Phillips C, Ansell R, Morling N, Parson W, Palo JU, and Bastisch I. 2012. European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI): Evaluation of new commercial STR multiplexes that include the European Standard Set (ESS) of markers. *Forensic Science International-Genetics* 6(6):819-826.
- Wildenberg J, and Meselson M. 1975. Mismatch repair in heteroduplex DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(6):2202-2206.
- Wong GKS, Passey DA, Huang YZ, Yang ZY, and Yu J. 2000. Is "junk" DNA mostly intron DNA? *Genome Research* 10(11):1672-1678.
- Yamamoto Y, Matsuyama H, Kawauchi S, Furuya T, Liu XP, Ikemoto K, Oga A, Naito K, and Sasaki K. 2006. Biological characteristics in bladder cancer depend on the type of genetic instability. *Clinical Cancer Research* 12(9):2752-2758.
- Yaron M, Levy T, Chetrit A, Levavi H, Sabah G, Schneider D, Halperin R, Ben-Rafael Z, and Friedman E. 2001. The polymorphic CAG repeat in the androgen receptor gene in Jewish Israeli women with endometrial carcinoma. *Cancer* 92(5):1190-1194.
- Yu Q, Li Q, Gao SQ, Su YQ, and Deng ZH. 2011. Congenital Tetragametic Blood Chimerism Explains a Case of Questionable Paternity. *Journal of Forensic Sciences* 56(5):1346-1348.
- Zhou XP, Hoang JM, Li YJ, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M, Lothe RA, Gleeson CM, Russell SEH, Muzeau F, Flejou JF, Hoang-Xuan K, Lidereau R, Thomas G, and Hamelin R. 1998. Determination of the replication error phenotype in human tumors

without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites. *Genes Chromosomes & Cancer* 21(2):101-107.

### **Internetové zdroje:**

URL1 <<http://www.ensembl.org/index.html>> zobrazeno 8.5.2014

URL2 <[http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32001G0703\(01\)](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32001G0703(01))>  
zobrazeno 8.5.2014

URL3 <[http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32009G1205\(01\)](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32009G1205(01))>  
zobrazeno 8.5.2014

URL4 <<http://www.interpol.int/INTERPOL-expertise/Forensics/DVI-Pages/DVI-guide>>  
zobrazeno 8.5.2014