

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Ivana Kuryviálová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Reverzní transkriptáza

Bakalářská práce

2023

Ivana Kuryviálová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Ivana Kuryviálová**
Osobní číslo: **C19253**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Reverzní transkriptáza**
Téma práce anglicky: **Reverse Transcriptase**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma reverzní transkriptáza.
2. V práci se zaměřte na popis nukleových kyselin, definujte reverzní transkriptázu a její funkci u virů a v poslední části práce popište využití reverzní transkriptázy v molekulární biologii.
3. Pro vytvoření kompilačního textu využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus* apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Lucie Michalcová**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Bakalářskou práci s názvem Reverzní transkriptáza jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 22. 6. 2023

Ivana Kuryviálová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce Ing. Lucii Michalcové, za cenné rady a připomínky, odbornou kontrolu a trpělivost, které mi pomohly tuto bakalářskou práci vypracovat. Dále bych ráda poděkovala své rodině a kamarádům, za jejich nesmírnou podporu během celého mého studia.

ANOTACE

Bakalářská práce je zaměřena na reverzní transkriptázu. Na úvodu jsou popsány nukleové kyseliny. Následně se práce zabývá centrálním dogmatem a reverzní transkripcí. Nejvíce se práce věnuje využití reverzní transkriptázy v molekulární biologii, konkrétně v diagnostice, výskytu u virů a inhibice enzymu, jejíž princip je používán k výrobě léčiv.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nukleové kyseliny, reverzní transkripce, RT-PCR, viry, inhibitory

TITLE

Reverse transcriptase

ANNOTATION

The bachelor thesis is focused on reverse transcriptase. At the beginning are described nucleic acids. Subsequently, the thesis deals with the central dogma and reverse transcription. Most of the thesis focuses on the use of reverse transcriptase in molecular biology, specifically in diagnostics, occurrence in viruses, and inhibition of the enzyme, the principle of which is used to produce drugs.

KEYWORDS

Nucleic acids, reverse transcription, RT-PCR, viruses, inhibitors

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ	10
SEZNAM ZKRATEK.....	11
Úvod	14
1. Nukleové kyseliny	15
1.1. Historie.....	16
1.2. Struktura nukleových kyselin.....	16
1.2.1. Primární struktura	16
1.2.2. Sekundární struktura	17
1.2.3. Kyselina trihydrogenfosforečná (H ₃ PO ₄)	18
1.2.4. Dusíkaté báze	18
1.2.5. Monosacharidy.....	19
1.2.6. Funkce nukleotidů.....	19
1.3. Ribonukleová kyselina	19
1.3.1. Mediátorová RNA.....	20
1.3.2. Transferová RNA.....	21
1.3.3. Ribozomální RNA	21
1.4. Deoxyribonukleová kyselina.....	21
1.4.1. Tvar molekuly DNA	22
2. Genová exprese.....	23
2.1. Replikace.....	24
2.2. Transkripce.....	24
2.3. Translace	25
2.4. Reverzní transkripce.....	25
2.4.1. Průběh reverzní transkripce	26
3. Reverzní transkriptáza	27

3.1. Čeleď <i>Retroviridae</i>	28
3.1.1. Rod <i>Lentivirus</i>	29
3.2. Virus hepatitidy B	30
3.3. RT-PCR.....	31
3.3.1. Průběh RT-PCR.....	32
3.3.2. Použití RT-PCR.....	32
3.3.3. RT-qPCR	33
3.4. Inhibitory reverzní transkriptázy	34
3.4.1. Zidovudin.....	35
3.4.2. Tenofovir disoproxil fumarát.....	36
3.4.3. Tenofovir alafenamid.....	36
4. Závěr	38
SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ	39

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 Nukleové kyseliny	15
Obrázek 2 Párování dusíkatých bází pomocí vodíkových můstků	18
Obrázek 3 Struktura a párování bází v RNA	20
Obrázek 4 Chemická struktura a párování bází v DNA	22
Obrázek 5 Centrální dogma molekulární biologie.....	23
Obrázek 6 Schéma reverzní transkripce	27
Obrázek 7 Struktura retrovirů	28
Obrázek 8 Průběh RT-qPCR.....	34
Obrázek 9 Strukturní vzorec azidothyminu	36

SEZNAM ZKRATEK

A – adenin

AMK – aminokyseliny

ART – antiretroviróv terapeutika

ATP – adenosin trifosfát

AZT – zidovudin (azidothymine)

C – cytosine

cDNA – komplementární deoxyribonukleov kyselina

CNS – centrn nervov soustava

Cq – kvantifikační cyklus

DNA – deoxyribonukleov kyselina

DNA polymeráza – deoxyribonukleov polymeráza

dNTP – 2'-deoxynukleosid-5'-trifosfát

dsDNA – dvouvlknov deoxyribonukleov kyselina

G – guanine

gp41 – glykoprotein 41

gp120 – glykoprotein 120

HCC – hepatocelulární karcinom

HDL – high density lipoprotein – vysokodenzitní lipoprotein

HIV – Human Immunodeficiency Virus

hnRNA – heterogenní jadern ribonukleov kyselina

LDL – low density lipoprotein – nízkodenzitní lipoprotein

mtDNA – mitochondriální deoxyribonukleov kyselina

mRNA – meditorov ribonukleov kyselina

ncRNA – nekódující ribonukleová kyselina

NK – nukleové kyseliny

NNRTI – nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy

NRTI – nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy

PBS – primer binding site

pDNA – provirová deoxyribonukleová kyselina

PCR – polymerázová řetězová reakce

pgRNA – pregenomová ribonukleová kyselina

PolyA – polyadenylační signál

PPT – polypurinový trakt

RNA – ribonukleová kyselina

RNáza H – ribonukleáza

RNA polymeráza – ribonukleová polymeráza

rRNA – ribozomální ribonukleová kyselina

RT – reverzní transkripce

RT-PCR – polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí

RT-PCR/ESI-MS – polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí/hmotnostní spektrofotometrie s ionizací elektrospřejem

RT-qPCR – polymerázová řetězová reakce v reálném čase s reverzní transkripcí

SSB-protein – single-stranded DNA-binding protein

ssDNA – jednovláknová deoxyribonukleová kyselina

ssRNA – jednovláknová ribonukleová kyselina

T – thymin

TAF – tenofovir alafenamid

TDF – tenofovir disproxil fumarát

TP – terminální protein

tRNA – transferová ribonukleová kyselina

U – uracil

vDNA – virová deoxyribonukleová kyselina

VHB – virus hepatitidy B

vRNA – virová ribonukleová kyselina

Úvod

Jako téma mé bakalářské práce jsem si zvolila enzym reverzní transkriptázu. Toto téma jsem si zvolila, protože mě zajímalo, jak se tento hlavně tedy virový enzym dá využít v praxi.

Reverzní transkriptáza je jedním z důležitých enzymů katalyzující děje nukleových kyselin a případným účastníkem genové exprese. Běžně probíhající exprese genu je složena ze tří kroků (replikace, transkripce, translace) a je stěžejním dějem při předávání genetické informace. Reverzní transkriptáza je schopna se vložit do centrálního dogma molekulární biologie a zapříčinit tak vznik nové molekuly deoxyribonukleové kyseliny z ribonukleové kyseliny, místo vzniku proteinu, jak by běžně exprese pokračovala. Tento děj je běžně využíván u virů, zvláště retrovirů a hepadnovirů, které se díky tomuto účinku v infikované buňce množí. Lidské buňky nemají reverzní transkriptázu, tudíž nemohou využívat tento děj.

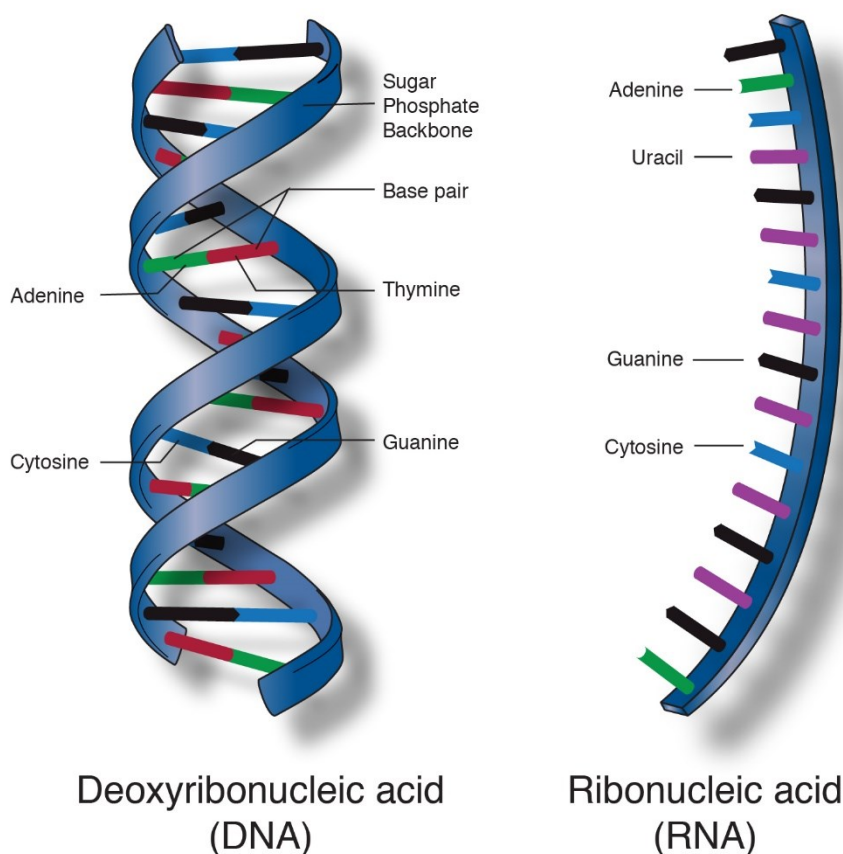
Díky pokročilé vědecké schopnosti je děj reverzní transkripce hojně využíván při diagnostice v molekulární biologii, zvláště u polymerázové řetězové reakce. Vzhledem ke své vysoké spolehlivosti a malému množství použití biologického materiálu, jsou tyto metody často využívané v mnoha odvětvích, např. v posledních letech sloužily ke stanovení koronaviru.

Inhibice reverzní transkriptázy se využívá při léčbě některých virových onemocnění, její inhibitory jsou obsaženy v lécích, např. antiretrovirotika. Ovšem léky inhibující tento enzym jsou po delší době užívání pro lidský organismus toxické a u některých pacientů pak dochází k jejich vysazení.

Tato bakalářská práce se věnuje popisu děje reverzní transkripce při genové expresi. Taky zahrnuje popis enzymu reverzní transkriptáza a její využití v molekulární biologii či popis jejího fungování ve virových genomech, zároveň taky způsob, jak je možné tento enzym inhibovat. Práce vychází z vědeckých poznatků a zkoumá využití reverzní transkriptázy v dnešní době.

1. Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny jsou makromolekulární látky tvořené polynukleotidovým řetězcem. Mezi nukleové kyseliny (NK) řadíme jednovláknovou ribonukleovou kyselinu (RNA) a dvouvláknovou deoxyribonukleovou kyselinu (DNA); viz Obrázek 1. DNA v sobě přechovává všechny genetické informace organismu společně se specifickými enzymy. Tyto enzymy jsou pak schopné na základě replikace genetickou informaci dále předávat do RNA. Ribonukleová kyselina je důležitým prvkem syntézy proteinů. Genetická informace se zabudovává do struktury bílkovin, dochází ke genové expresi (1).



Obrázek 1 Nukleové kyseliny. Převzato, upraveno z (2). Deoxyribonucleic acid (DNA) = deoxyribonukleová kyselina, sugar = cukr, phosphate backbone = fosfátová páteř, base pair = párování bází, adenine = adenin, thymine = thymin, cytosine = cytosin, guanine = guanin, ribonucleic acid (RNA) = ribonukleová kyselina, uracile = uracil.

1.1. Historie

NK byly objeveny již v 19. století, avšak jejich složení a funkce byly vědci popsány až ve 20. století. K rozpoznání nukleových kyselin pomohl roku 1869 J. F. Meishera objevem nukleinu v jádrech bílých krvinek, což je látka alkalické povahy uvolňující se z buněčného jádra. Nuklein objevil roku 1881 E. Zacharias i v chromozomech a W. Hertwig v roce 1884 prokázal jeho úlohu v dědičnosti. Jelikož byl nuklein objeven v jádře a má vlastnosti kyseliny, dostal jméno nukleová kyselina. Časem se ukázalo, že nukleové kyseliny jsou přítomny kromě jádra i v cytoplazmě buněk, díky tomu je lze rozdělit na DNA vyskytující se v jádře a RNA, která se vyskytuje jak v jádře tak i v cytoplazmě. Objev DNA nejprve nevyvolal pozornost, protože se myslelo, že se jedná jen o stavební látku. V roce 1953 došlo díky tehdejším vědcům k objevení dvoušroubovicové struktury DNA, tím se zároveň prokázalo jednoduché vysvětlení evoluce. Za svůj objev James Watson a Francis Crick získali Nobelovu cenu (3, 4).

1.2. Struktura nukleových kyselin

Nukleové kyseliny jsou strukturně lineární nebo cirkulární heteropolymery. Základní stavební jednotkou NK jsou nukleotidy. Každý nukleotid je tvořen dusíkatými heterocyklickými bázemi (purinové a pyrimidinové deriváty), monosacharidem (β -D-ribózou nebo β -D-2-deoxyribózou) a kyselinou fosforečnou. Vznik nukleosidu z dusíkaté báze a sacharidu spojením díky N-glykosidické vazbě, se mohou nukleosidy vyskytovat ve dvou konformacích. Reakcí nukleosidu s kyselinou fosforečnou vzniká kompletní nukleotid. V řetězci jsou jednotlivé nukleotidy za katalýzy polymeráz propojeny fosfodiesterovými vazbami. Na monosacharid se v pozici C5' váže N-glykosidickou vazbou fosfát v poloze 1. Na C3' je pentóza spojena přes fosfát k sousedící pentóze. Díky tomuto propojení dochází ke vzniku polynukleotidů (1, 3, 7).

1.2.1. Primární struktura

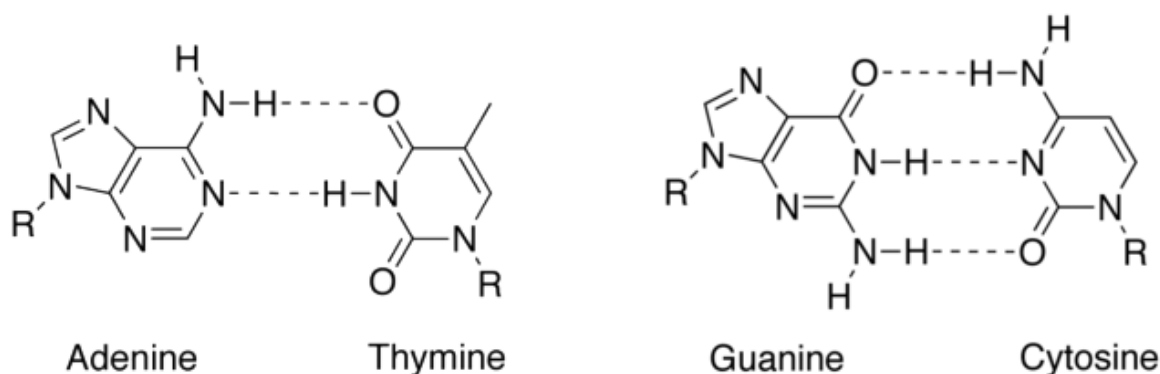
Primární struktura DNA se dá vyobrazit jako 2 lineární polynukleotidová vlákna. Uspořádání nukleotidů v lineárním dvouvlákně udává primární strukturu i genetickou informaci. Každé vlákno je snadno odlišitelné, obsahuje na konci C5' hydroxylovou skupinu -OH a na C3' konci obsahuje taktéž hydroxylovou skupinu -OH. Polarita obou vláken molekuly je v opačném směru. Směr vláken je určován pomocí orientace cukru deoxyribózy, a to buď C3' → C5' nebo opačný směr C5' → C3'. Polaritu vlákna ve směru C5' → C3' se označuje jako kladná, kladná polarita odpovídá uspořádání nukleotidů v mediátorové RNA. Opačná polarita

je označována jako komplementární, jelikož zapadá do kladného řetězce. Posloupnost nukleových kyselin, které vznikly při replikaci DNA či transkripci RNA je vystavena konformačním změnám v buňkách. Záměrem těchto reakcí je zajištění co nejmenšího tvaru molekul a nejnižší vnitřní energie NK. Díky tomu dosáhnou nukleové kyseliny vyšší stability a sníží se pravděpodobnost výskytu jejich poruch (3, 4, 5).

1.2.2. Sekundární struktura

Sekundární struktura nukleových kyselin se podobá struktuře proteinů. Dva polynukleotidové řetězce tvoří nejčastěji pravotočivou dvoušroubovici, kdy vlákna se řadí antiparalelně. Antiparalelní řazení nám říká, že páteře tvořeny ze sacharidu a fosfátu jsou orientovány v obrácených směrech. Tímto řazením je ovlivněna rozdílná polarita konců C3 a C5. Mezi bázemi na protilehlých vláknech se vyskytují vazby slabé interakce, zejména vodíkové můstky. Vazby pomocí vodíkových můstků jsou slabší než vazby kovalentní. Purinová báze připojená k sacharidu na jedné straně je pomocí vodíkové vazby připoutána k pyrimidinové bázi. V molekule RNA se adenin páruje vždy s thyminem a guanin s cytosinem; viz Obrázek 2. K párování cytosinu a guaninu jsou zapotřebí tři vodíkové můstky, zatímco u párování adeninu s thyminem se vyskytují dvě vodíkové vazby. DNA molekula má párování bází podobné, liší se pouze v párování adeninu, který se zde váže s uracilem. Při splnění těchto podmínek vznikne stabilní dvojitá šroubovicová struktura. Odlišná kombinace bází by značně deformovala tvar dvoušroubovice, a proto se v živých organismech nevyskytuje.

Vyjma vodíkových můstků je stabilita nukleových kyselin podporována také dalšími typy interakcí, stohování (stacking). Páry bází interagují vzájemně ve vertikálním směru díky π -elektronech na aromatických cyklech bází. Dalšími stabilizujícími mechanismy jsou kationty a jejich působení. Kationty redukují elektrostatickou sílu fosfátových skupin, které jsou záporně nabitý v penta-fosfátových kostrách. O pevnost dvoušroubovice se stará také hydrofobní prostředí uvnitř, to je tvořeno nepolárními bázemi. Do okolí hydrofilního prostředí jsou exponovány nabité fosfáty (4, 5, 6, 7).



Obrázek 2 Párování dusíkatých bází pomocí vodíkových můstků. Převzato, upraveno z (8).
Adenine = adenin, thymine = thymin; guanine = guanin, cytosine = cytosin.

1.2.3. Kyselina trihydrogenfosforečná (H_3PO_4)

Kyselina trihydrogenfosforečná se řadí mezi trojsytné kyseliny. Její struktura obsahuje tři hydroxylové skupiny, které jsou schopny odštěpit proton. Fosfáty jsou přítomny ve velké části známých biomolekul a jsou nezbytnou součástí biochemického přenosu energie. Fosfátová skupina (PO_4^{3-}) dává DNA a RNA vlastnost kyseliny, tj. látka, která uvolňuje v rámci fyziologického pH proton. Spojovací vazby vznikající z fosfátů jsou estery, které mají navíc vlastnost stability, zároveň snadno podléhají enzymatické hydrolýze. Po vytvoření fosfodiesterové vazby je jeden atom kyslíku fosfátové skupiny záporně ionizován (9, 10).

1.2.4. Dusíkaté báze

Dusíkaté báze jsou molekuly obsahující minimálně dva atomy dusíku, který má vlastnost báze. Chemické analýzy buněčného genetického materiálu ukázaly, že existují čtyři typy nukleotidů, které se liší pouze připojenou dusíkatou bází. Mezi nejběžnější dusíkaté báze patří adenin (A), guanin (G), cytosin (C) a uracil (U) u RNA. U DNA je U nahrazen thyminem (T). Adenin a guanin jsou báze, které mají dvojitou strukturu kruhu uhlíku a dusíku, označujeme je jako puriny. Další 3 báze mají jednokruhovou strukturu; nazývají se pyrimidiny, ty se mohou objevovat ve dvou tautomerních podobách (laktimová a laktamová forma). Vyjma těchto uvedených bází obsahují nukleové kyseliny minoritní báze, zvláště transferová RNA. Minoritní báze vznikají chemickou modifikací hlavních dusíkatých bází nukleových kyselin.

Chemická analýza DNA genetického materiálu již dříve ukázala, že molární poměr guanin/cytosin a adenin/thymin se blíží jedné. Tato informace byla důležitá pro určení dvoušroubovicové struktury DNA. Watson a Crick rozpoznali, že tyto dva páry bází se mohou vázat pomocí vodíkových můstků a vytvářet tak antiparalelní dvoušroubovici. Dusíkaté báze

mohou vytvářet páry prostřednictvím vodíkových můstků mezi svými polárními skupinami. Existuje mnoho možných uspořádání párů dusíkatých bází s vodíkovými můstky, avšak Watson-Crickovy páry bází jsou zásadní. Watson-Crickovy dvojice mezi G a C a mezi A a T (případně U) jsou nositelé genetické informace (1, 11, 12).

1.2.5. Monosacharidy

Monosacharidy jsou nejjednodušší cukry a zároveň jsou základní stavební složkou pro složitější sacharidy. Podle počtu uhlíků se dělí do několika skupin. Pro nukleové kyseliny jsou nejvýznamnější pentózy, ty jsou složeny z pěti uhlíků. Nukleotidové jednotky RNA obsahují pentózový (pětiuhlíkatý) cukr zvaný ribóza, zatímco nukleotidy DNA obsahují cukr β -D-2-deoxyribózu. Tyto cukry se navzájem od sebe liší pouze přítomností či nepřítomností „deoxy“ kyslíku na C2 v kruhu. Ačkoli je to jediný rozdíl mezi RNA a DNA, významně ovlivňuje jejich funkci. Aby bylo možné udržet všechny uhlíky v rovině, je pět atomů uhlíku v každém pentózovém cukru přiřazeno číslo 1 až 5. Při číslování v kruhu se používají prvočísla, aby se odlišily od poloh kruhu v bázích. Oba cukry mají kyslík jako část pětičlenného kruhu; C5' uhlík je vně kruhu (11, 14).

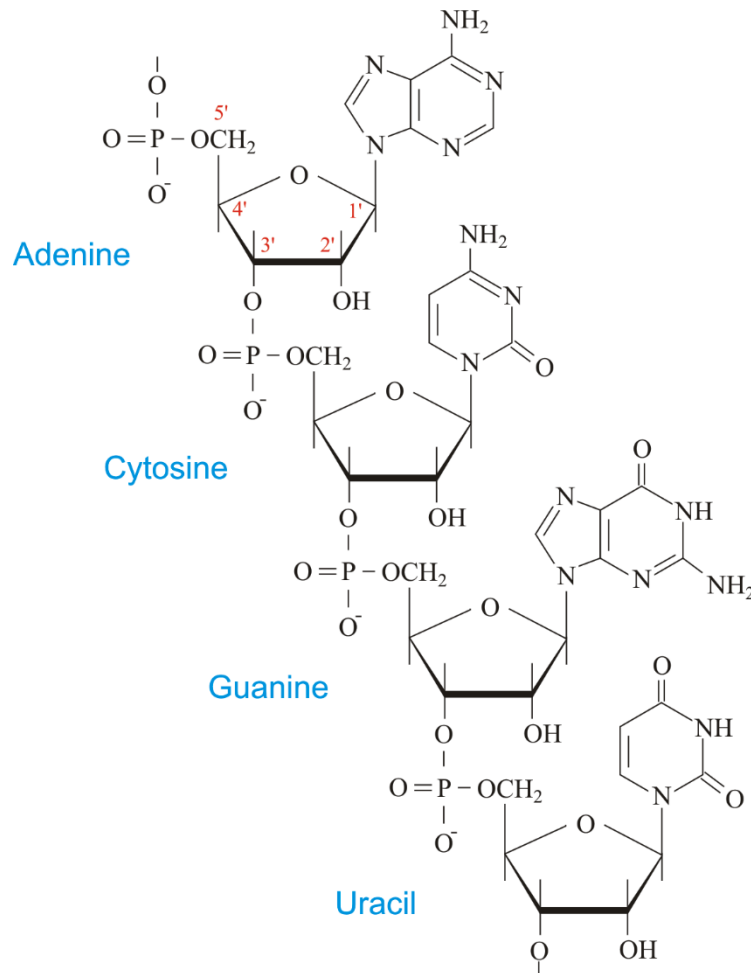
1.2.6. Funkce nukleotidů

Nukleotidy jsou fosforečné estery pentóz. V molekule se vážou na dusíkaté báze, jak na šestičlenné pyrimidinové (uracil, thymin, cytosin) tak i na pětičlenné purinové (adenin, guanin). Nukleotid, který se neváže s fosfátem, nazýváme nukleosid, jedná se tedy o komplex monosacharidu a dusíkaté báze. Nukleosidy vážou na sebe kyselinu trihydrogenfosforečnou a vznikají mono-, di- a trifosfáty. Tyto sloučeniny jsou součástí metabolicky aktivních látek, jednou z nejvýznamnějších sloučenin je adenosintrifosfát (ATP). ATP je poskytovatelem energie pro většinu biochemických reakcí (14).

1.3. Ribonukleová kyselina

Převážně jednovláknová kyselina (s výjimkou některých virových RNA). Chemicky je RNA podobná DNA, liší se pouze v párování bází, kdy se u RNA guanin páruje s uracilem; viz Obrázek 3. RNA se snadno rozkládá všude přítomnými RNázami. Díky lokálním interakcím vodíkových můstků mezi organickými sloučeninami, může mít RNA komplikovanou strukturu – většina molekul RNA nevytváří stabilní sekundární struktury. Studie ukázaly, že nekódující ribonukleová kyselina (ncRNA) má důležitou roli v buněčných procesech, včetně regulace transkripce, replikace chromozomů a interakcí při zpracování RNA

a proteinů. RNA dělíme na několik typů: hnRNA (heterogenní jaderná RNA), mRNA (mediátorová RNA), tRNA (transferová RNA) a rRNA (ribosomální RNA). Všechny typy RNA vznikají procesem transkripce (14, 16).



Obrázek 3 Struktura a párování bází v RNA. Převzato, upraveno z (15). Adenine = adenin, cytosine = cytosin, guanine = guanin.

1.3.1. Mediátorová RNA

Hlavním úkolem mediátorové ribonukleové kyseliny (mRNA) je přenos genetické informace z DNA do primární struktury proteinu, tzn. udává pořadí aminokyselin v peptidovém řetězci. Mediátorová RNA vzniká prepisem z DNA a následným sestřihem. Z jádra je transportována do cytoplazmy, kde se ve spojení s ribozomy účastní syntézy bílkovin (translace). Množství mRNA v cytoplazmě buněk je důležité pro průběh a rychlost translace určitého proteinu. Rychlost tvorby, modifikace a degradace mRNA slouží jako přesný regulační mechanismus pro množství proteinu v buňce. Na regulaci se podílejí i malé molekuly RNA.

Jejím zpětným přepisem (reverzní transkripcí) do DNA vzniká cDNA (komplementární DNA), díky účasti enzymu reverzní transkriptázy. U prokaryotických buněk je tvorba mRNA transkripcí několika genů. U eukaryot vzniká mRNA transkripcí jednoho genu (4, 17, 18).

1.3.2. Transferová RNA

Transferová RNA (tRNA) zajišťuje přenos aminokyselin (AMK) z cytoplazmy na proteosyntetický aparát buňky (ribozomy) při translaci. Transferová RNA se skládá z 80 nukleotidů, z nichž 17 % dusíkatých bází je posttranskripčně modifikováno. tRNA vzniká pomocí polymerázy III, transkripcí genů roztroušených na různých místech genomu. Na konci C3' je esterovou vazbou navázána přenášená AMK. Primární strukturu tRNA tvoří sekvenci nukleotidů, sekundární struktura je tvořena interakcemi mezi jednotlivými částmi molekuly tRNA. Sekundární struktura transferové RNA je charakteristická svým tvarem trojlistu s několika rameny (akceptorové rameno, antikodonové rameno, dihydrouridinové a pseudouridinové rameno) a variabilní smyčky. Akceptorové rameno váže příslušnou AMK. Antikodonové rameno nese antikodon, který je komplementární k danému kodonu na mRNA. Trojrozměrné uspořádání tRNA udává terciární strukturu (18, 19).

1.3.3. Ribozomální RNA

Ribozom je ribonukleoproteinový komplex, který je zodpovědný za katalýzu syntézy bílkovin ve všech živých buňkách. Ribozomální ribonukleová kyselina (rRNA) tvoří většinu hmotnosti ribozomu a je zodpovědná za katalýzu tvorby peptidových vazeb. Molekula rRNA tvoří stavební složku ribozomálních podjednotek. Malá podjednotka se skládá z 20 proteinů a jedné rRNA. Velká podjednotka je složena z 50 proteinů a dvou molekul rRNA. Malá podjednotka slouží k vychytávání mRNA pro translaci a v průběhu translace dohlíží na komplementaritu kodonu mRNA a antikodonu tRNA, aby zabránila posunu čtecího rámce. Velká podjednotka má za úkol vázat elongační a terminační faktory a zaručit správný kontakt AMK navázané na tRNA v peptidyltransferázovém centru. Až 80 % rRNA se vyskytuje v organismu a tím patří mezi nejhojnější typy RNA (11, 17, 20).

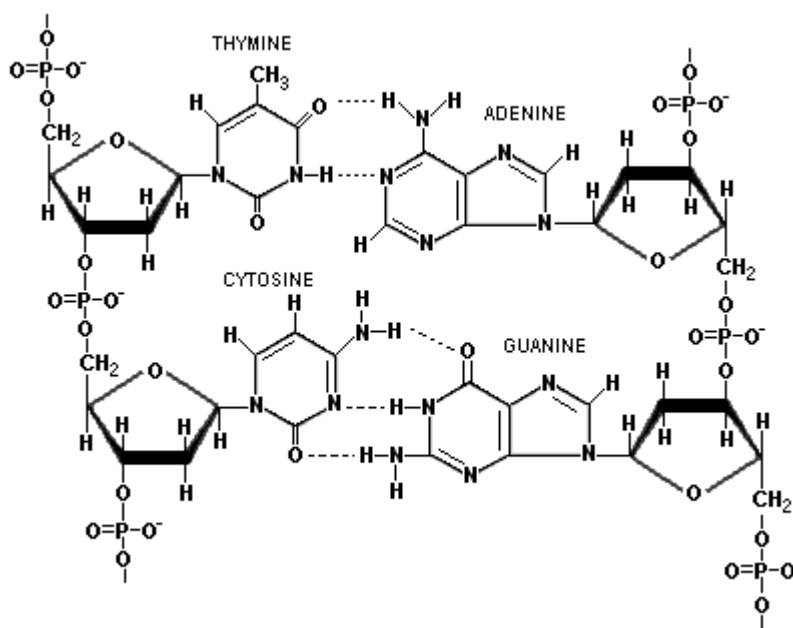
1.4. Deoxyribonukleová kyselina

Všechny živé organismy uchovávají svou genetickou informaci v DNA, která se skládá ze dvou polymerních vláken stočených do šroubovice propojených pomocí vodíkových můstků mezi dusíkatými bázemi; viz Obrázek 4. Párování jednotlivých bází je založeno

na elektrostatické interakci protonu vodíku se slabě záporně nabitým atomem dusíku v purinové nebo pyrimidinové bázi.

Samostatný polymer DNA se skládá ze sekvence dusíkatých bází, která je bílkoviny kopírována do RNA. Molekula DNA se nachází převážně v jádře (jaderná DNA), mimojaderná DNA se vyskytuje v mitochondriích buněk. Mitochondrie jsou semiautonomní buněčné orgány obsahující dvouvláknovou DNA v kruhové podobě. Každá buňka obsahuje 100 až 10 000 kopií mtDNA. Klíčovou funkcí mitochondriálního genomu je regulace buněčných reakcí, které jsou zásadní pro tvorbu buněčné energie – oxidativní fosforylace. Mitochondriální DNA je v podobě nukleoidů, tedy komplexů jedné molekuly mtDNA s řadou proteinů, propojena přes vnitřní mitochondriální membránu. Proteinový aparát, který se nachází v nukleoidu, umožňuje replikaci, transkripci, opravy a balení DNA.

Při změně pH, vyšších teplotách nebo díky vlivu organických rozpouštědel či tenzidů molekula DNA podléhá denaturaci. To je proces oddělení dvou komplementárních vláken a tvoření neuspořádané struktury. Renaturace je opačným dějem denaturace, kdy dochází znovu k obnovení dvoušroubovice (1, 3, 22, 23).



Obrázek 4 Chemická struktura a párování bází v DNA. Převzato, upraveno z (21). Thymine = thymin, adenine = adenin, cytosine = cytosin, guanine = guanin.

1.4.1. Tvar molekuly DNA

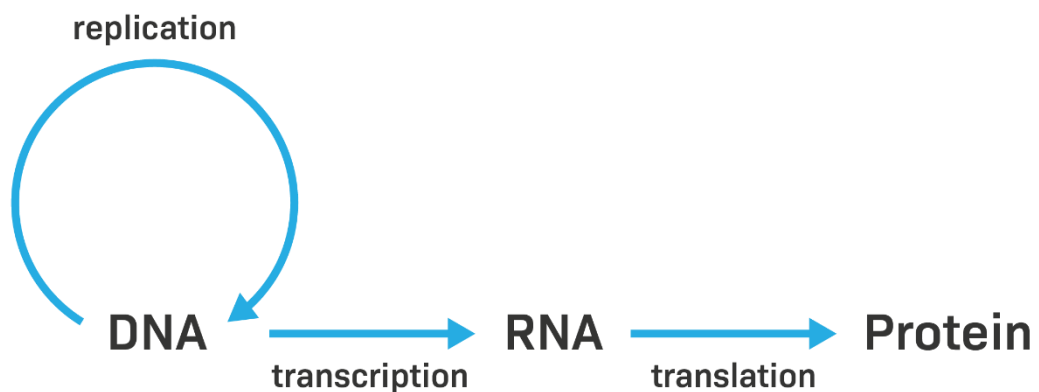
DNA je dynamická molekula s trojrozměrným tvarem. Základním tvarem molekuly deoxyribonukleové kyseliny je lineární dvojitá šroubovice. Menší molekuly mají často tvar

cirkulární, vyskytují se zejména u virů, bakterií. Mitochondriální DNA (mtDNA) se u člověka nachází také v cirkulární podobě. Na základě složení nukleotidů v mtDNA rozlišujeme 2 typy řetězců, těžký H řetězec a lehký L řetězec. H řetězec je hojný na guanin, zatímco L řetězec je bohatý na cytosin. Mitochondriální DNA obsahuje až 93 % kódující oblasti. Jedinou částí nekódující oblasti je vytěšňovací smyčka (D-smyčka), která je v trojvláknovém rozměru. V D-smyčce se vyskytuje začátek syntézy těžkého H řetězce a oba transkripční promotory těžkého H řetězce.

Nejčastější formou DNA je tzv. B-forma. B-forma DNA je pravotočivá, obsahuje zhruba 10 bází na závit. Dusíkaté báze vytváří pár vždy v jedné rovině, na povrchu dvoušroubovice se vyskytují dva typy žlábků (malý a velký). Dalším typem molekuly DNA je A-forma, jenž je také pravotočivá a na závit má 11 párů dusíkatých bází. Třetím a posledním biologicky důležitým typem je Z-forma. Molekula DNA v Z-formě je však levotočivá a tvoří se pouze, pokud se ve šroubovici objevuje pravidelné opakování dusíkatých bází adeninu a thyminu. Přechody mezi jednotlivými typy závisí na iontové síle prostředí, ale i na její vlhkosti (1, 6, 7, 22, 23).

2. Genová exprese

Jedná se o složitý a regulovaný proces, kdy je genetická informace uložená v genu (DNA) přepsána do struktury proteinu. Celý proces shrnuje tzv. centrální dogma molekulární biologie; viz Obrázek 5. Prvním krokem je replikace, následuje transkripce a po ní translace (1, 25, 26).



Obrázek 5 Centrální dogma molekulární biologie. Převzato, upraveno z (27). Replication = replikace, transcription = transkripce, translation = translace.

2.1. Replikace

Při každém dělení buňky je třeba syntetizovat dvě kopie každého chromozomu (v nich je schovaná genetická informace), který se v buňce nachází. U člověka se před dělením musí replikovat 23 párů chromozomů, aby vzniklo 46 párů a po dělení měla každá dceřiná buňka plný počet chromozomů. Každé vlákno DNA může sloužit jako šablona pro syntézu komplementárního vlákna, tzn. že replikační mechanismus by rozložil dvoušroubovici a četl by podél dvou existujících "rodičovských" vláken, přičemž by syntetizoval nové komplementární "dceřiné" vlákno s A (adenin) naproti T (thymin), C (cytosin) naproti G (guanin).

Za replikaci DNA je zodpovědná DNA polymeráza (deoxyribonukleová polymeráza). DNA polymeráza je enzym řízený podle šablony. Jako šablona slouží rodičovské vlákno DNA. Syntéza DNA nemůže probíhat, pokud není přítomen templát.

Místo, kde probíhá samostatná replikace označujeme jako replikační počátky. Působením α -helikázy na vodíkové můstky se DNA šroubovice rozbalí. Jedno řetězcová DNA slouží jako templát pro syntézu nových vláken. Na rozpletené vlákno DNA nasedají SSB-proteiny (single-stranded DNA-binding protein) zabráňující opětovnému párování bází. Po rozpletení následuje elongace (prodloužení) replikačních vidlic kopiemi chromozomů. Za tenhle krok zodpovídá DNA ligáza. Elongace probíhá ve směru $5' \rightarrow 3'$. Poslední částí replikace je terminace. SSB-proteiny se odpojí, dochází ke spojení replikačních vidlic a opětovnému vzniku dvoušroubovice (14, 26).

2.2. Transkripce

Transkripce je děj probíhající v buněčném jádře, při kterém dochází k přepisu genetické informace z nukleotidové sekvence DNA do nukleotidové sekvence molekuly hnRNA (heterogenní jaderná RNA). Za transkripci je zodpovědný enzym RNA polymeráza (ribonukleová polymeráza).

DNA-dependentní RNA polymerázy jsou zodpovědné za přepis DNA do mRNA. Podobně jako DNA polymeráza vyžaduje RNA polymeráza templát DNA. Během transkripce se do RNA přepisuje pouze jedno vlákno DNA.

V této fázi dochází k rozpletení molekuly DNA a navázání enzymu RNA polymerázy na ssDNA (jednovláknová DNA) v místě promotoru (počátek transkripce). Následuje elongace, u které dochází k prodloužení transkriptu a k přepisu thyminu (T) na uracil (U). Tím vzniká

primární transkript. Tento děj probíhá ve směru $C5' \rightarrow C3'$. Jakmile RNA polymeráza gen přepíše, transkripce se ukončí a RNA polymeráza se odpojí a uvolní se nově vzniklá RNA. Vzniklý transkript musí být upraven, aby vznikla funkční mRNA, která bude následně vypuštěna do cytoplazmy a použita k translaci (14, 26).

2.3. Translace

Důležitou složkou při syntéze bílkovin je ribozom, tj. složitá struktura složená z RNA a proteinů. Ribozom poskytuje svou část, pro správné umístění mRNA a tRNA, což umožňuje dešifrování genetického kódu. Ribozom je složený ze dvou podjednotek (malé a velké). Malá podjednotka je rRNA, tj. molekula RNA s katalytickými vlastnostmi podobnými vlastnostem enzymů. Ribozomální RNA může vytvářet peptidovou vazbu mezi dvěma aminokyselinami. Další NK, kterou potřebujeme pro syntézu bílkovin, je transferová RNA. Molekula tRNA je jednovláknová a skládá se do charakteristické struktury párováním bází. Fungují jako adaptorové molekuly, každá má antikodon pro určitý kodon mRNA a každá nese AMK určenou tímto kodonem. Antikodon má komplementární sekvenci ke kodonu na mRNA.

Translace je zahájena pomocí iniciační transferové RNA s navázaným methioninem (specifická molekula tRNA). Proteosyntéza začíná na iniciačním kodonu (AUG). Iniciační tRNA se váže na ribozomu do P-místa, díky tomu může prodlužování řetězce začít ihned po navázání druhé tRNA do A-místa. Samotné prodlužování (elongace) se skládá opakováním tří kroků. Při prvním z nich se tRNA s AMK napojí na příslušný antikodon mRNA. V dalším kroku dochází ke vzniku peptidové vazby mezi 2 sousedícími AMK. Posledním krokem je malá podjednotka ribozomu posunuta vpřed a tRNA bez AMK se uvolňuje z E-místa, A-místa a P-místa. Polypeptidový řetězec roste od N-konce k C-konci. Samotná mRNA je předávána ve směru $C5' \rightarrow C3'$. Translace je ukončena navázáním terminačních faktorů na stop kodon. Ribozomy se rozpojí a vzniklé proteiny se uvolní. Ribozomy jsou vázány na endoplazmatické retikulum, kde dochází ještě k posttranslačním úpravám nově vzniklých proteinů (14, 28).

2.4. Reverzní transkripce

Reverzní transkripce (RT) je zásadní proces v molekulární biologii, jenž zahrnuje přepis genetické informace z RNA do DNA. Reakce je katalyzována reverzní transkriptázou, tj. enzym DNA polymeráza, která je schopna dle molekuly RNA syntetizovat molekulu DNA. Reverzní transkripce se skládá z několika po sobě jdoucích kroků. Tento děj se přirozeně vyskytuje u virů čeledi *Retroviridae*, kde byl také prvně popsán, a virů čeledi *Hepadnaviridae*.

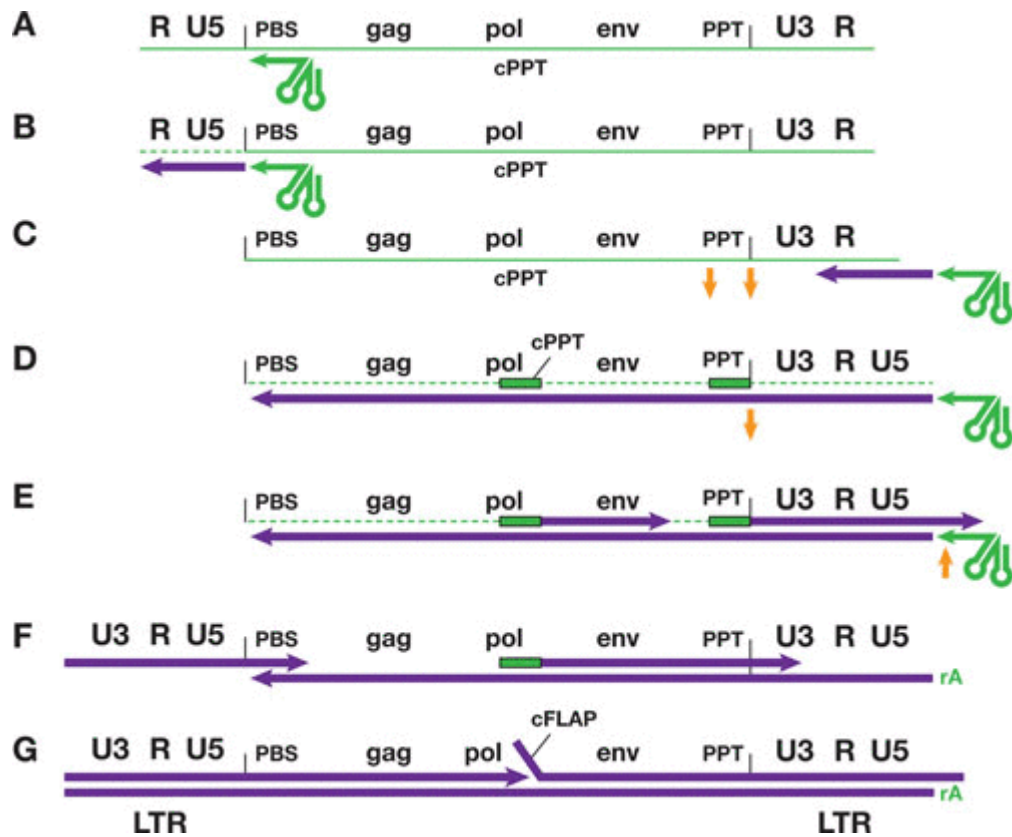
Princip RT je popisován podle jejího průběhu u retrovirů. V RT jsou přítomny 2 enzymatické aktivity, které jsou nezbytné a potřebné k jejímu průběhu. Jedná se o DNA polymerázu a RNázu H (ribonukleáza H). Existují dva typy primerů reverzní transkripce vedoucí k amplifikaci komplementárního řetězce DNA. Prvním příkladem je univerzální primer oligo (dT), kdy reverzní transkripce používá poly-T oligonukleotidový primer k zahájení syntézy cDNA. Druhým typem je reverzní transkripce s náhodnou aktivací, ta využívá k aktivaci syntézy cDNA náhodné hexamery.

Zpětným přepisem templátu RNA vzniká cDNA. Tento děj využívá RT-PCR (polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí). Oproti klasické molekule DNA, cDNA neobsahuje introny ani regulační a jiné kontrolní sekvence. Díky tomu může být cDNA použita k identifikaci a izolaci genů z genomické DNA (29, 30, 37).

2.4.1. Průběh reverzní transkripce

Reverzní transkripce se podílí na přeměně ssRNA (jednovláknová ribonukleová kyselina) genomu virionu na dsDNA. Stejně jako mnoho jiných DNA polymeráz, i tento proces potřebuje primer a templát, jenž poskytne volný hydroxylový C3' konec, na který se přidávají nukleotidy. Vlákno RNA genomu je pozitivně nabitě a může tak fungovat jako mRNA, která udává celý proces tvorby proteinu. Průběh reverzní transkripce začíná vazbou hostitelské tRNA, jejíž molekula má negativní náboj, na virovou RNA (vRNA), která je k tRNA komplementární a podléhá hybridizaci. Tato část vRNA, kam se váže primer, pojmenováváme jako PBS (primer binding site). Syntéza DNA vytváří hybrid (-) DNA a vRNA, jež byla vzorem pro vznik (-) DNA. Tento hybrid je substrátem pro RNázu H, která štěpí ribonukleovou kyselinu. Z hybridní molekuly se uvolní (-) DNA úsek, označený jako R, jenž se shoduje v úseku C5' i C3' vRNA. Volný C5'(-) úsek DNA vlákna se váže na komplementární C3' vRNA. Reverzní transkripce vRNA do (-) DNA probíhá, dokud přepisovaná molekula DNA se setkává s dvouvláknovou RNA, jenž je tvořena tRNA a PBS. Dalším krokem RNázy H je odštěpení vRNA, kromě malého úseku PPT (polypurinový trakt). PPT slouží jako primer pro syntézu (+) DNA vlákna, které opisuje (-) DNA vlákno znovu až do oblasti tRNA a PBS, kterou rozruší a opisuje PBS virové RNA. Tento úsek může kopírovat i (-) DNA vlákno, protože oblast tRNA-PBS byla rozrušena. V oblasti PBS se (+) DNA vlákno zachytí na komplementární část (-) DNA a opíše jeho dlouhé sekvence LTR (long terminal repeats) označené jako U3 R U5. Syntézou templátu (+) DNA vlákna je doplněn chybějící druhý LTR

(-) DNA vlákna; viz Obrázek 6. Dokončením syntézy obou vláken vznikne dvouvláknová kopie RNA genomu v plné délce (29, 31, 33).



Obrázek 6 Schéma reverzní transkripce. Převzato, upraveno z (34).

3. Reverzní transkriptáza

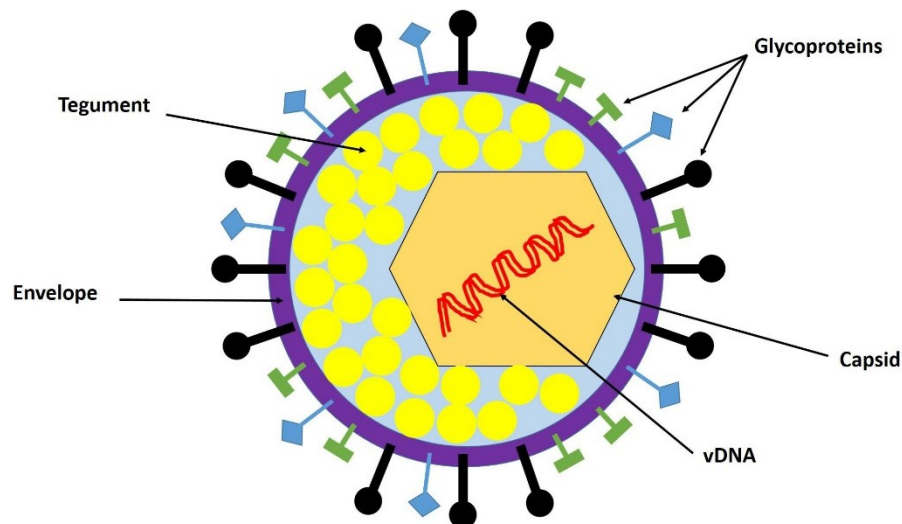
Jedná se o restriktivní enzym, který katalyzuje zpětný přepis genetické informace. Reverzní transkriptáza byla poprvé objevena H. Teminem v retrovirech, kde jejím důsledkem ve virovém genomu je schopna RNA přeměnit v cDNA. Takhle vznikající DNA je pak zabudována do genomu hostitelské buňky a díky tomu dochází k množení viru.

Reverzní transkriptáza je velmi užitečná pro výzkum a diagnostiku. Tento enzym je hojně využíván v modifikovaných PCR a to RT-PCR a RT-qPCR. Reverzní transkriptáza formuje řetězec cDNA na základě sekvence RNA. Enzym umožňuje amplifikovat RNA templáty stejným způsobem jako DNA. Podobně jako ostatní DNA polymerázy, nedokáže reverzní transkriptáza syntetizovat DNA bez primeru. Primer poskytuje počáteční bod, od kterého reverzní transkriptáza začíná syntézu kopie DNA (37).

3.1. Čeleď *Retroviridae*

Viry z čeledi *Retroviridae* se vyskytují v široké škále hostitelů z řad obratlovců. Čeleď *Retroviridae* se řadí do skupiny RNA virů. Viriony jsou kulovité obalené s průměrem 80-100 nanometrů.

Obal viru je tvořen lipoproteinovou membránou, na jejíž povrchu se vyskytuje 72 glykoproteinových výběžků složených z vnějšího trimetrického glykoproteinu (gp120) a transmembránového glykoproteinu (gp41). V lipoproteinovém obalu se můžou vyskytovat některé proteiny z hostitelské buňky. Z vnitřní strany obalu je zabudována proteinová matrix; viz Obrázek 7. Genom viru tvoří několik tisíc nukleotidů, které formují geny. Tyto geny jsou zodpovědné za konstrukci viru. V nukleokapsidě viru se nachází replikační enzymy. Tvar nukleokapsidy je pro každý rod z čeledi *Retroviridae* odlišný. Rod *Lentivirus* má nukleokapsidu s tyčinkovitým tvarem, zatímco u rodu β -retrovirus je tvar excentrický a u příslušníků rodu α -retrovirus, γ -retrovirus a δ -retrovirus je nukleokapsida koncentrického tvaru.



Obrázek 7 Struktura retrovirů. Převzato, upraveno z (36). Glycoproteins = glykoproteiny, capsid = kapsida, vDNA = virová deoxyribonukleová kyselina, envelope = obal, tegument = matrix.

Replikace zahrnuje reverzní transkripci a integraci do DNA hostitelské buňky. Reverzní transkripcí genomu RNA vzniká dsDNA s dlouhými terminálními repeticemi. Dvouvláknová DNA je integrována do genomu hostitelské buňky za vzniku proviru, který slouží jako šablona pro syntézu virového genomu a mRNA pomocí RNA polymerázy. Nově vzniklá mRNA je z jádra transportována do endoplazmatického retikula, kde dojde k translaci na polypeptidy. Retrovirová replikace má sklon k chybám, což má za následek vysoký výskyt náhodných mutací. Při jednom replikačním cyklu reverzní transkripce se může v průměru vyskytnou

1-10 chyb v jednotlivých genomech. Díky těmto několika po sobě jdoucích kroků dokážou retroviry vyvolat přetrvávající chronickou infekci.

Retroviry mohou tvořit endogenní formy při vniku do zárodečných hostitelských buněk. Tyto útvary se vertikálně přenášejí, a tudíž je lze považovat za genetické fosilie starých virů. Všechny rody retrovirů, vyjma δ -retrovirů, jsou zastoupeny v hostitelském genomu jako virové fosilie. Popisujeme zde endogenní δ -retrovirus, identifikovaný v linii zárodku. Jediná, silně deletovaná kopie tohoto retroviru byla nalezena v genomu miniopteridů, tj. netopýrů dlouhouchých. K endogenizaci tedy došlo v časovém intervalu před 20 až 45 miliony let. Tento objev ukončuje poslední velkou mezeru ve fosilním záznamu retrovirů a poskytuje důležité poznatky o historii δ -retrovirů.

Mnoho retrovirů se řadí mezi významné lidské i veterinární patogeny, které jsou spojeny se spoustou onemocnění, včetně autoimunitních onemocnění, onkologických onemocnění, onemocnění motorického neuronu i několik akutních onemocnění s poškozením tkání. V tělních tekutinách se virus nachází v krvi, spermatu, poševním sekretu a mateřském mléce, v zanedbatelném objemu byl dále zjištěn v potu, slzách a slinách. Přenos viru můžeme rozdělit na 3 způsoby: přenos krví, sexuální přenos a přenos z matky na dítě. Infikovaná krev patří mezi nejvyšší rizika přenosu HIV (Human Immunodeficiency Virus). Vehikulem při tomto způsobu přenosu jsou několikrát použité infikované jednorázové jehly u narkomanů nebo v zemích, kde není rozvinuté zdravotnictví a nepoužívají se zde jednorázové jehly. Podobným rizikem mohou být infikované krevní transfuze nebo orgánové transplantace. Sexuální přenos patří k nejčastějšímu způsobu přenosu viru. Šíření viru značně napomáhá nechráněný styk. Při použití kondomu anebo femidomu se riziko přenosu výrazně snižuje. Přenos HIV z matky na dítě může nastat v průběhu těhotenství přímou infekcí vyvíjejícího se embrya, při porodu nebo taky při kojení novorozence. Vysoká virová nálož může být velkým rizikem přenosu (37, 38, 39, 40, 41).

3.1.1. Rod *Lentivirus*

Lentiviry patří do čeledi *Retroviridae*. Nejvýznamnějším zástupcem tohoto rodu je virus lidské imunodeficiency neboli HIV. Virus nejspíš vznikl díky mutaci opičích imunodeficientních virů. K objevení HIV došlo v 80. letech 20. století ve 2 různých státech téměř současně, jmenovitě v USA a ve Francii. Za svůj počín získali francouzští vědci L. Montagnierem a F. Barré-Sinoussi v roce 2008 Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. Po infekci virem je i přes progresivní vývoj vědy eliminace z hostitele prakticky nemožná.

Klinický obraz infekce je různorodý a dlouhé roky může probíhat nákaza bez příznaků. Infikovaný člověk je již od samostatného bez příznakového počátku přenašečem HIV. Lentiviry charakterizuje dlouhá doba latence, trvající replikace viru, zasažení centrální nervové soustavy (CNS) a přechod do chronicity. Průběh infekce HIV se dělí 3 fáze: primoinfekce, asymptomatická fáze, symptomatická fáze.

Rozlišujeme 2 typy HIV a to HIV-1 a HIV-2. Jejich morfologie v elektronovém mikroskopu je téměř totožná. Drobnou rozdílnost můžeme nalézt v sekvenci RNA kódující virové proteiny. Po průniku do lidského organismu se HIV-1 a HIV-2 navážou díky ligandu na receptor CD4+, vyskytující se na membráně cílové buňky. V hostitelské buňce pak probíhají další fáze replikačního cyklu. Nukleokapsida uniká do cytoplazmy, kde dojde k uvolnění virové RNA s navázanou reverzní transkriptázou. Reverzní transkriptáza zahájí uvnitř CD4+ buněk transkripci virové RNA na provirovou DNA (pDNA). Inhibice RT působením nukleosidových inhibitorů byla prvním léčebným zásahem, tento princip působení je využíván dodnes.

Nákaza typem HIV-1 má většinou rychlejší průběh než u typu HIV-2. Typ HIV-1 velmi lehce podléhá mutacím, především ve struktuře glykoproteinů (42, 43, 44).

3.2. Virus hepatitidy B

Virus hepatitidy typu B (VHB) se řadí do skupiny DNA obalených virů a zároveň také patří do čeledi *Hepadnaviridae*. Objevení VHB proběhlo v roce 1967 B. Blumbergem, který objevil jeden z antigenů VHB a za svůj objev roku 1976 získal Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. Infekce VHB je nakažlivější než HIV. VHB patří mezi hlavní příčiny akutního či chronického onemocnění jater. Zároveň ho můžeme také zařadit do skupiny hlavních prekurzorů karcinogenního onemocnění jater. Viriony útočí zvláště na buňky jater, tzv. hepatocyty. Přenos VHB je obdobný jako u retrovirů, tzn. přenos krví, sexuální přenos a přenos z matky na dítě. Nejvyšším rizikem přenosu jsou rozvojové země, ve kterých není rozvinuté zdravotnictví na vyšší úrovni. Přechod akutní formy onemocnění do chronicity má za následek cirhózu jater nebo hepatocelulární karcinom (HCC), který patří na šesté místo nejčastějších typů nádorů na světě a na druhé místo příčiny úmrtí. Pro onkologicky nemocné pacienty s imunosupresivní léčbou představuje VHB vysoké riziko. VHB je v zevním prostředí poměrně odolný, v zaschlé krvi je schopen vydržet až týden.

V genomu viru se nachází enzym reverzní transkriptáza, který je řízen pomocí proteinů. DNA polymeráza viru hepatitidy B katalyzující reverzní transkripci, má dvě domény, a to terminální proteinovou (TP) a spacerovou. TP doména obsahuje AMK, které jsou základem

pro syntézu DNA viru. Reverzní transkripce je započata vazbou DNA polymerázy na virovou pregenomovou RNA (pgRNA). Aktivita RT zahájí syntézu DNA a dojde ke kovalentnímu spojení DNA polymerázy s virovým vláknem DNA. RNáza H poté degraduje pgRNA, co byla přepsána do DNA. Při reverzní transkripci se využívá přenosu tří vláken za vzniku zralé částečně dvouvláknové vDNA. DNA polymeráza jako monomer zůstává navázána kovalentní vazbou na vDNA. Životní cyklus viru vede v průběhu aktivní replikace ke tvorbě velké virové nálože, aniž by došlo k přímému usmrcení hostitelské buňky. Replikační účinnost viru je založena na závislosti kombinace faktorů viru a faktorů infikované buňky, které zabraňují VHB replikaci uvnitř buňky.

K léčbě hepatitidy jsou využívány léky fungující na principu inhibice reverzní transkriptázy. Proti virové hepatitidě existuje prevence v podobě vakcíny, v současné době v tzv. hexavakcíně. Očkování je řazeno jako jeden z nejlepších způsobů prevence HCC způsobeným VHB (42, 43, 44, 45).

3.3. RT-PCR

Tato molekulární metoda vychází z polymerázové řetězové reakce (PCR) a využívá účinku enzymu reverzní transkriptázy. Klasická PCR je docela jednoduchá a velmi často používaná diagnostická metoda v molekulární biologii. Technika RT-PCR je vysoce citlivým nástrojem při studiu genové exprese na úrovni RNA. PCR s reverzní transkripcí využívá RNA jako templát. Enzym reverzní transkriptáza hraje klíčovou roli v RT-PCR. Reverzní transkriptáza je schopna syntetizovat komplementární řetězec DNA z templátu RNA. Pro úspěšný výsledek RT-PCR je zásadní čistota a kvalita templátu RNA. Výsledná cDNA pak může být amplifikována pomocí PCR. Reakce RT-PCR je započata syntézou hybridu RNA-DNA. Reverzní transkriptáza, stejně jako RNáza H, degraduje část RNA hybridu. Jednovláknová molekula DNA je následně dovršena pomocí RNA dependentní DNA polymerázovou aktivitou reverzní transkriptázy na komplementární DNA. Účinnost reakce prvního řetězce může ovlivnit průběh amplifikace. Poté následuje PCR amplifikace cDNA. Amplifikovaná cDNA je analyzována pomocí různých technik, jako je gelová elektroforéza nebo sekvenování. Převod RNA na cDNA díky RT-PCR má mnoho výhod. Samostatná jednořetězcová RNA je velmi nestabilní, což s ní ztěžuje práci. Reverzní transkriptáza, která je u RT-PCR využívána, snáší vyšší teplotní optimum, jelikož vyšší teplota ruší vlákna tvořící se na mRNA.

RT-PCR lze provést v jednom nebo dvou krocích. Jednokroková RT-PCR kombinuje reverzní transkripci a PCR reakce ve stejné zkumavce. Ve dvoukrokové RT-PCR se kroky provádějí odděleně ve dvou zkumavkách a nově syntetizovaná cDNA se přenesse do druhé zkumavky pro PCR reakci. Obě metody mají výhody i nevýhody, jednokroková RT-PCR má snadnější průběh, nízké riziko kontaminace a je ideální pro vysoce výkonný screening. Zatímco dvoukroková RT-PCR je vhodná pro detekci více parametrů z jednoho vzorku, tento proces umožňuje aplikovat jednu molekulu cDNA k vícero reakcím (5, 46, 47, 48).

3.3.1. Průběh RT-PCR

Metoda je založena na 3 krocích: denaturace DNA, nasednutí primerů, syntéza DNA. Nejprve se extrahuje celková RNA. Z vyextrahované celkové RNA se izoluje mRNA pomocí afinitní chromatografie s použitím oligo dT, jelikož messengerová RNA se vyznačuje sekvencí C3' poly A. Poté templát mRNA podléhá reverzní transkriptáze, která vytvoří kopii DNA (cDNA) každé mRNA. Tato molekula slouží jako templát pro PCR amplifikaci. Po reverzní transkripci se mRNA hydrolyzuje. Další kroky jsou provedeny v uzavřeném prostoru termálního cyklu. Syntéza nové DNA probíhá od jednoho primeru ve směru hodinových ručiček kolem kruhu a poté pokračuje v protisměru hodinových ručiček. Vytváří se fragment, který obsahuje úsek DNA napravo a úsek DNA nalevo od původní známé oblasti. V daném fenotypu buňky je u člověka a většiny savců exprimováno odhadem 10-15 000 genů (5, 46, 47).

3.3.2. Použití RT-PCR

V klinické diagnostice zahrnuje oblast použití RT-PCR hodnocení virové nálože u RNA virů a analýzu produktů genové transkripce. RT-PCR je taky užitečná pro sekvenci velkých genů. Vývoj v této oblasti vedl k rozšíření aplikací RT-PCR v klinické diagnostice. Reakce je však choulostivá kvůli své nedostatečné reprodukovatelnosti a kvůli labilitě RNA a časté kontaminaci DNA. Další obtíže mohou být způsobeny potřebou získat specifickou amplifikaci v přítomnosti homologních sekvencí, které mohou být přítomny ve větším množství než stanovovaná sekvence. Tyto rizika se musí vzít v úvahu při navrhování stanovování pomocí RT-PCR a při výběru primerů. RT-PCR ve spojení s hmotnostní spektrofotometrií s ionizací elektrosprejem (ESI-MS) je vysoce výkonná technologie založená na NK, která se opírá o přesné měření molekulové hmotnosti PCR amplikonů, z níž lze odvodit počet bází DNA. Jednou z hlavních výhod RT-PCR/ESI-MS (polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí/hmotnostní spektrofotometrie s ionizací elektrosprejem) je její univerzálnost a přizpůsobivost pro charakterizaci patogenů (50, 51).

3.3.3. RT-qPCR

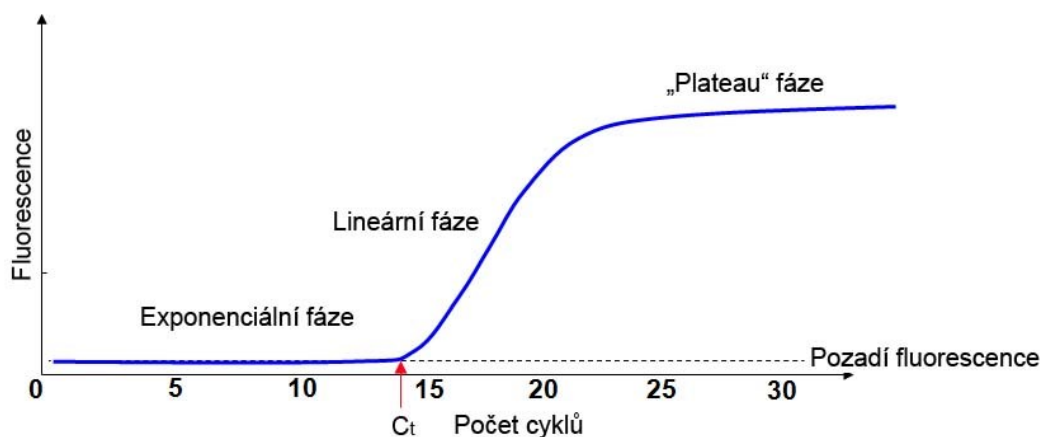
Kvantitativní PCR v reálném čase s reverzní transkripcí (RT-qPCR) se stala díky své vysoké citlivosti ze vzorků s velmi nízkou koncentrací RNA, hlavní metodou pro kvantifikaci rozdílů v hladinách genové exprese mezi vzorky. Pro zajištění přesných a reprodukovatelných kvantitativních dat je však třeba dodržovat přísné standardní operační postupy. Díky své specifčnosti, citlivosti, jednoduchosti, nákladům a vysoké výkonnosti nabízí RT-qPCR širokou škálu výhod oproti standardním metodám. Proto se stala nejrozšířenějším nástrojem pro absolutní a relativní kvantifikaci hladin transkripce mRNA. RT-qPCR je metoda, která využívá dobře zavedenou chemii a analýzu dat, a je proto lepší než techniky, jako je Southern blot nebo sekvenování DNA. Kromě toho použití různých metod detekce qPCR, jako jsou systémy založené na barvivech nebo sondách, rozšiřuje spektrum možných aplikací.

Jednou z cenných výhod RT-qPCR je snadnost, s jakou lze kvantifikovat RNA obecně a virovou nálož konkrétně, pokud jsou stanoveny odpovídající parametry testu, včetně zahrnutí vhodné kontroly. Základem přesné a reprodukovatelné kvantifikace pomocí RT-qPCR je kvantifikační cyklus (C_q), který se skládá ze 3 fází: exponenciální fáze, lineární fáze, plató fáze (viz Obrázek 8). V exponenciální fázi je množství syntetizované DNA na úrovni přesahu fluorescence za pozadí a dochází k záznamu v detektoru. Pro lineární fázi je charakteristický prudký nárůst intenzity fluorescence a ve vysoké míře je i hojnost templátu. V plató fázi se díky velkému množství výskytu DNA rychlost reakce zpomaluje a některé části reakční směsi jsou vyčerpány. V této fázi intenzita fluorescence neodpovídá přesné koncentraci templátové DNA.

Hodnoty fluorescence se zaznamenávají během každého cyklu a představují množství produktu amplifikovaného do daného bodu amplifikační reakce. Čím více templátu je přítomno na začátku reakce, tím méně cyklů je třeba k dosažení bodu, kdy je fluorescenční signál poprvé zaznamenán jako statisticky významný nad pozadím. Tento bod je definován jako C_q a nastane vždy během exponenciální fáze amplifikace. Kvantifikace tedy není ovlivněna tím, že se některá ze složek reakce stane omezenou ve fázi plató. Při vykazování výsledků je však důležité nespolehat se pouze na C_q, protože hodnoty C_q podléhají přirozeným odchylkám mezi jednotlivými cykly a neměly by se používat bez vhodných kalibračních standardů. Jedním ze zřejmých způsobů, jak dosáhnout spolehlivé kvantifikace, je zahrnout molekulu RNA se známým počtem kopií jako spike s RNA po extrakci. To by umožnilo jak kontrolu kvality, protože jakákoli odchylka od očekávaného C_q by naznačovala určitou inhibici reakce,

tak i stanovení počtu virových kopií vzhledem k této špičce. Díky tomu je možné uvádět nejen kvalitativní odpověď infikovaný/neinfikovaný, ale snažit se například zahrnout hodnocení virové nálože pro měření progresu onemocnění.

Spolehlivost výsledků RT-qPCR je závislá na standardizaci měření, zejména pokud se používá jako diagnostický nástroj. Je zřejmé, že vzhledem k potřebě mít možnost porovnávat výsledky z široké škály testů, přístrojů, různých laboratoří a různých zemí je nezbytné vyvinout referenční materiály, které by byly nakonec certifikovány, aby bylo možné údaje harmonizovat (50, 51, 52, 53).



Obrázek 8 Průběh RT-qPCR. Převzato, upraveno z (54).

3.4. Inhibitory reverzní transkriptázy

Inhibitory reverzní transkriptázy jsou základní skupinou antiretrovirových terapeutik (ART), dále se ale používají i pro léčbu VHB. Virový enzym reverzní transkriptáza je cílem terapeutického účinku. Kopírování genomu o 10 000 RNA bází je potřeba 20 000 přesně a správně provedených jednotlivých kroků. Jestliže dojde k přerušení jednoho z těchto kroků, cyklus se zastaví. Problémem ART je toxicita a rychlý vznik virové rezistence, proto je nutná kombinace léčiv, které se opět chovají jako nukleosidové báze.

Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NRTI) tvoří rozsáhlou třídu inhibitorů a jsou základem kombinovaných režimů pro terapii HIV. Princip účinku inhibitorů spočívá v tom, že místo přirozeně se vyskytujících nukleosidů jsou reverzní transkriptáze poskytnuty falešné nukleosidové báze. Tyto báze jsou chemické sloučeniny blokuující vznik nové molekuly DNA. NRTI podléhají účinku intracelulární fosforylací a aktivní trifosfátová forma poté blokuje virovou replikaci prostřednictvím konkurence s přirozeně se vyskytujícími puriny a pyrimidiny, čímž zabraňuje přidávání dalších nukleotidů RT. Důsledkem tohoto děje

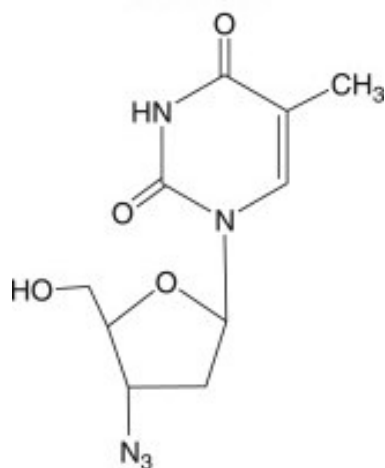
je ukončení replikace virové DNA. Spektrum NRTI zahrnuje léčbu HIV-1 i HIV-2. Do skupiny NRTI patří řada sloučenin. Hlavními zástupci NRTI jsou tenofovir disproxil fumarát (TDF) a tenofovir alafenamid (TAF). Všechny NRTI mají vedlejší účinky, které jsou specifické pro danou třídu a lék. U všech NRTI tříd může dojít k selekci rezistentních mutací, a to dvěma způsoby. První způsob zahrnuje mutovaný enzym virové RT, kdy mutace proběhne v N-terminální polymerázové doméně enzymu. RT se selektivně vyhýbá včlenění nukleotidových analogů do DNA. Druhý mechanismus zahrnuje mutaci thymidinu, kdy mutovaná RT v podstatě provádí fosforolytickou excizi NRTI.

NNRTI (nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy) se naváží do tzv. alosterického centra, tj. místo oddělené od aktivního místa, na které se zaměřují NRTI. Vazba nenukleosidového inhibitoru způsobí změnu v proteinu, která sníží schopnost přirozeně se vyskytujících nukleosidů se vázat do kapsy v aktivním místě, a tím blokuje elongaci virové cDNA. NNRTI jsou účinné proti HIV-1, avšak nemají postačující účinnost proti HIV-2. Do první generace NNRTI se řadí efavirenz a nevirapin. Druhá generace NNRTI je tvořena rilpivirinem a etravirinem. Látky první generace jsou málo rezistentní a snadno podléhají mutacím. NNRTI mají dlouhý plazmatický poločas. Efavirenz způsobuje lékové interakce, takže vyžaduje pečlivou revizi současně podávaných léků. Jeho hlavním nežádoucím účinkem je neuropsychiatrická toxicita.

Společná indikace preparátů umožnila snížit dávky a výskyt nežádoucích účinků. Díky odlišným principům fungování NRTI a NNRTI je při terapii možná jejich kombinace, při které může dojít ke snížení pravděpodobnosti vzniku rezistence (37, 40, 55).

3.4.1. Zidovudin

Zidovudin (AZT) byl prvním klinicky schváleným antiretrovirovým léčivem z třídy NRTI. Chemicky je to azidothymin (viz Obrázek 9) a jeho složení připomíná jednu ze složek NK. V laboratoři byl připraven již v roce 1964 jako potenciální léčivo k nádorové léčbě. Účinkem zidovudinu je inhibice DNA polymerázy a likvidace rychle se dělících nádorových buněk. V průběhu času může vést léčba AZT k selekci mutaci RT a tím snížit její účinnost. Mechanismus rezistence HIV vůči zidovudinu je zapříčiněn excizí inkorporovaného monofosfátu AZT za přítomnosti ATP. V dnešní době se ale k léčbě rakovin nepoužívá a ani se nedoporučuje jako lék první volby pro terapii HIV. Jeho toxicita se projevuje supresí kostní dřeně, navíc je AZT spojen s velkým množstvím nežádoucích účinků jako je např. bolest hlavy, malátnost, nauzea, úbytek tuku v končetinách atd. (37, 55).



Obrázek 9 *Strukturní vzorec azidothyminu. Převzato, upraveno z (57).*

3.4.2. Tenofovir disoproxil fumarát

Tenofovir disoproxil fumarát (TDF) je používán jako acyklonukleosid proti HIV. Patří mezi hlavní zástupce skupiny nukleosidových inhibitorů reverzní transkriptázy. Na počátku 21. století byl schválen nejprve k léčbě HIV, později i k léčbě infekce VHB. Kvůli přítomnosti vysoko polární kyseliny fosfanové je toto léčivo omezeno v oblasti orálního užívání. V organismu se vyskytuje hlavně v plazmě, v buňkách je zanedbatelné množství. Samostatné podávání TDF je pro lidský organismus toxické, doporučuje se proto tedy ho kombinovat ještě s jiným inhibitorem RT. Při použití TDF se vyskytují tři hlavní nežádoucí účinky: 1) jaterní toxicita projevující se laktátovou acidózou a hepatomegalií se steatózou; 2) ledvinná toxicita – poškození proximálního tubulu; a 3) snížená hustota kostních minerálů v oblasti páteře a kyčlí. TDF se může projevit i s menšími nežádoucími účinky jako je bolest hlavy, nauzea, bolesti svalů nebo deprese (56).

3.4.3. Tenofovir alafenamid

Tenofovir alafenamid (TAF) byl objeven roku 2001 a funguje jako „vylepšené“ proléčivo TDF. Určité části TDF byly nahrazeny fenolem a alanin-isopropylesterem. TAF vykazuje vyšší perorální biologickou dostupnost a příznivou selektivní tkáňovou distribuci, protože TDF je přednostně vychytáván hepatocyty a lymfatickou tkání. Vědecké poznatky ukázaly, že TAF má lepší účinnost a bezpečnost oproti TDF, a to i v případě použití nižší dávky. Od roku 2015 je TAF používán k léčbě HIV-1 a o rok později byl schválen i k léčbě infekce VHB. Na základě odlišného metabolismu od TDF a jeho nízké koncentraci v plazmě, není TAF toxický pro játra, ledviny nebo kosti. Užívání TAF je spojeno s vyššími hladinami LDL (low density lipoprotein – nízkodenzitní lipoprotein), HDL (high density lipoprotein – vysokodenzitní lipoprotein)

cholesterolu a triacylglyceridů. TAF a TDF mají společný profil rezistence, avšak TAF může mít vyšší bariéru pro mutanty rezistentní k TDF z důvodu své vyšší intracelulární koncentrace (56).

4. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši o enzymu reverzní transkriptáza a její potencionální i praktické využití. Reverzní transkriptáza je enzym nalezený v retrovirech, který je schopný vstoupit do klasického průběhu genové exprese. Enzym se podílí na reverzní transkripci, kde katalyzuje přeměnu ribonukleové kyseliny zpět na deoxyribonukleovou kyselinu a tím i přepis genetické informace. Reverzní transkripcí vzniká dvouvláknová DNA, která slouží jako šablona pro syntézu genomu. Tuto schopnost enzymu využívají viry hepatitidy B a viry lidské imunodeficience, které mají reverzní transkriptázu uloženou v nukleokapsidě společně s ostatními replikačními enzymy. Virům slouží reverzní transkriptáza ke množení v hostitelských buňkách, případně u HIV i k napadání okolních buněk hostitele. Klinický obraz infekce je různý a u každého pacienta probíhá jinak, dlouhé roky může nákaza probíhat bezpříznakově. Infikovaný pacient je přenašečem od samostatného počátku infekce, i když u něho probíhá bezpříznakové období. Onemocnění HIV může přecházet do chronicity. Virus hepatitidy B je nakažlivějším virem než HIV. Oproti onemocnění HIV, je u VHB prevence ve formě očkování. Viriony nelze v infikovaném organismu zcela eliminovat, terapie tedy probíhá podáváním antiretrovirotik, které inhibují fungování reverzní transkriptázy. Inhibice reverzní transkriptázy je využíváno v léčbě HIV a VHB, jako antiretrovirotika. ART inhibující reverzní transkriptázu dělíme do dvou skupin na nukleosidové inhibitory a nenukleosidové inhibitory. Jedná se o chemické sloučeniny, které jsou při delším podáváním pro organismus toxické a časem na používání jednoho typu může vzniknout rezistence.

Díky popisu chování reverzní transkriptázy, se enzym začal hojně využívat v diagnostických metodách molekulární biologie. Propojením reverzní transkriptázy s polymerázovou řetězovou reakcí, která je v molekulárně biologickém odvětví značně využívána v diagnostice, vzniká účinnější metoda ke kvantifikaci nukleových kyselin, kde výchozím materiálem je mRNA. RT-PCR je rychlá jednoduchá metoda, často kombinována s jinou diagnostickou metodou.

SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ

1. MATOUŠ, Bohuslav. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén, c2010. ISBN 978-80-7262-702-8.
2. Nucleic Acid. *National Human Genome Research Institute* [online]. [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Nucleic-Acid>
3. CLEAVES, Henderson James, Christopher BUTCH, Pieter Buys BURGER, Jay GOODWIN a Markus MERINGER. One Among Millions: The Chemical Space of Nucleic Acid-Like Molecules. *Journal of Chemical Information and Modeling* [online]. 2019, **59**(10), 4266-4277 [cit. 2023-06-13]. ISSN 1549-9596. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jcim.9b00632
4. BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, 2016. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-80-246-3224-7.
5. RAPLEY, Ralph a David WHITEHOUSE, ed. *Molecular biology and biotechnology*. 6th edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2015. ISBN 978-1-84973-795-1.
6. ROSYPAL, Stanislav. Úvod do molekulární biologie. Díl 1. 1. vyd. Brno: Stanislav Rozsypal, 2006, 289, ISBN 80-902562-5-2.
7. BANSAL, Manju. DNA structure: Revisiting the Watson-Crick double helix. *Current science*. 2003, **35**(11), 1556-1563. ISSN 0011-3891.
8. TIMMER, John. Bacteria engineered to copy DNA with synthetic base pairs. *Arstechnica* [online]. California: Nature, 2014, [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: <https://arstechnica.com/science/2014/05/bacteria-engineered-to-copy-dna-with-synthetic-base-pairs/>
9. ALLISON, Lizabeth A. *Fundamental molecular biology*. 2nd ed. Hoboken: John Wiley, 2012. ISBN 978-1-118-05981-4.
10. GOLDFORD, Joshua E., Hyman HARTMAN, Temple F. SMITH a Daniel SEGRÈ. Remnants of an Ancient Metabolism without Phosphate. *Cell* [online]. 2017, **168**(6), 1126-1134.e9 [cit. 2023-06-13]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2017.02.00
11. ŠPONER, J. a F. LANKAŠ, ed. *Computational Studies of RNA and DNA* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006 [cit. 2023-06-13]. ISBN 978-1-4020-4794-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4020-4851-3

12. USAMI, K. a A. OKAMOTO. Hydroxyapatite: catalyst for a one-pot pentose formation. *Organic & Biomolecular Chemistry* [online]. 2017, **15**(42), 8888-8893 [cit. 2023-06-13]. ISSN 1477-0520. Dostupné z: doi:10.1039/C7OB02051A
13. ŠÍMA, Petr. Význam nukleotidů jako složky výživy pro růst, regeneraci a imunitu. *Interní medicína pro praxi*. Sektor imunologie a gnotobiologie, Mikrobiologický ústav v.v.i. AV ČR, Praha, 2008.
14. MINCHIN, Steve a Julia LODGE. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays in Biochemistry* [online]. 2019, **63**(4), 433-456 [cit. 2023-06-13]. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20180038
15. Generalic, Eni. "Ribonucleic acid." *Croatian-English Chemistry Dictionary & Glossary*. 20 Oct. 2018. KTF-Split. 26 May. 2022. Dostupné z: <<https://glossary.periodni.com>>
16. CHEN, Chun-Chi a Yi-Ming CHAN. REDfold: accurate RNA secondary structure prediction using residual encoder-decoder network. *BMC Bioinformatics* [online]. 2023, **24**(1) [cit. 2023-06-14]. ISSN 1471-2105. Dostupné z: doi:10.1186/s12859-023-05238-8
17. BICKNELL, Alicia A. a Emiliano P. RICCI. When mRNA translation meets decay. *Biochemical Society Transactions* [online]. 2017, **45**(2), 339-351 [cit. 2023-06-13]. ISSN 0300-5127. Dostupné z: doi:10.1042/BST20160243
18. LODISH, Harvey F. *Molecular cell biology*. 5th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2003. ISBN 978-0-7167-4366-8.
19. HAYNE, Cassandra K, Casey A SCHMIDT, Maira I HAQUE, A Gregory MATERA a Robin E STANLEY. Reconstitution of the human tRNA splicing endonuclease complex: insight into the regulation of pre-tRNA cleavage. *Nucleic Acids Research* [online]. 2020, **48**(14), 7609-7622 [cit. 2023-06-13]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkaa438
20. SCULL, Catherine E. a David A. SCHNEIDER. Coordinated Control of rRNA Processing by RNA Polymerase I. *Trends in Genetics* [online]. 2019, **35**(10), 724-733 [cit. 2023-06-13]. ISSN 01689525. Dostupné z: doi:10.1016/j.tig.2019.07.002
21. DEWAR, James M. a Johannes C. WALTER. Mechanisms of DNA replication termination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2017, **18**(8), 507-516 [cit. 2023-06-13]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm.2017.42

22. MARCO, Crimi. The mitochondrial genome, a growing interest inside an organelle. *International Journal of Nanomedicine* [online]. [cit. 2023-06-14]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S2482
23. CHINNERY, P. F. a G. HUDSON. Mitochondrial genetics. *British Medical Bulletin* [online]. 2013, **106**(1), 135-159 [cit. 2023-06-14]. ISSN 0007-1420. Dostupné z: doi:10.1093/bmb/ldt017
24. KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět. 2. přepracované vydání*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2018. ISBN 978-80-7592-013-3.
25. Chemical structure of DNA. In: *ResearchGate* [online]. 2009 [cit. 2022-05-26]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-DNA_fig1_230851750
26. SHANDILYA, Jayasha a Stefan G.E. ROBERTS. The transcription cycle in eukaryotes: From productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* [online]. 2012, **1819**(5), 391-400 [cit. 2023-06-13]. ISSN 18749399. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagr.2012.01.010
27. Central Dogma and Gene Editing. *LabXchange* [online]. Harvard, 2019 [cit. 2022-04-02]. Dostupné z: <https://www.labxchange.org/library/pathway/lx-pathway:f3d8a145-a863-4e74-9899-314bf8fa6a4f/items/lx-pb:f3d8a145-a863-4e74-9899-314bf8fa6a4f.html:379e35f6>
28. DEVER, Thomas E., Jonathan D. DINMAN a Rachel GREEN. Translation Elongation and Recoding in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2018, **10**(8) [cit. 2023-06-13]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a032649
29. SVOBODA, Jan. Sága reverzní transkripce. *Živa. Academia*, 2017, (3), 67-68.
30. BUSTIN, S A, V BENES, T NOLAN a M W PFAFFL. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* [online]. 2005, **34**(3), 597-601 [cit. 2023-06-13]. ISSN 0952-5041. Dostupné z: doi:10.1677/jme.1.01755
31. COFFIN, John M. a Hung FAN. The Discovery of Reverse Transcriptase. *Annual Review of Virology* [online]. 2016, **3**(1), 29-51 [cit. 2023-06-13]. ISSN 2327-056X. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-virology-110615-035556
32. HU, W.-S. a S. H. HUGHES. HIV-1 Reverse Transcription. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2012, **2**(10), a006882-a006882 [cit. 2023-06-13]. ISSN 2157-1422. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a006882

33. HUGHES, Stephen H., Susan SANDMEYER a Nancy CRAIG. Reverse Transcription of Retroviruses and LTR Retrotransposons. *Microbiology Spectrum* [online]. 2015, **3**(2) [cit. 2023-06-13]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0027-2014
34. Reverse transcription of the genome of HIV-1. In: *ASM Journals* [online]. [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0027-2014>
35. CLARK, David P., Nanette J. PAZDERNIK a Michelle R. MCGEHEE. Polymerase Chain Reaction. In: *Molecular Biology* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 168-198 [cit. 2023-06-13]. ISBN 9780128132883. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813288-3.00006-9
36. ALANDIJANY, Thamir. HSV-1 virion structure. In: *Frontiers* [online]. 2019 [cit. 2022-10-17]. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02611/full#F1>
37. KONVALINKA, Jan a Ladislav MACHALA. *Viry pro 21. století*. Praha: Academia, 2011. Průhledy, sv. 8. ISBN 978-80-200-2021-5.
38. REICHEL, Martin, Ján MATIS, Jela MISTRÍKOVÁ a Jozef LEŠŠO. The analysis of polypeptides in the nuclei and cytoplasm of cells infected with murine herpesvirus 72. *The Journal of General Virology*. 1994, **75**(6), 1259-1265.
39. JILICH, David a Veronika KULÍŘOVÁ. *Infekce HIV*. Praha: Maxdorf, [2021]. Jessenius. ISBN 978-80-7345-688-7.
40. HÁLA, Rudolf. HIV pozitivní. *PharmaNews*. Dostupné také z: <https://www.pharmanews.cz/clanek/hiv-pozitivni-2/>
41. FARKAŠOVÁ, Helena, Tomáš HRON, Jan PAČES, Pavel HULVA, Petr BENDA, Robert James GIFFORD a Daniel ELLEDER. Discovery of an endogenous Deltaretrovirus in the genome of long-fingered bats (Chiroptera: Miniopteridae). *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2017, **114**(12), 3145-3150 [cit. 2023-06-13]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1621224114
42. SULKOWSKI, Mark S., Kosh AGARWAL, Xiaoli MA, et al. Safety and efficacy of vebicorvir administered with entecavir in treatment-naïve patients with chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* [online]. 2022, **77**(5), 1265-1275 [cit. 2023-06-13]. ISSN 01688278. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhep.2022.05.027

43. TAJWAR, Razia, Daniel P. BRADLEY, Nathan L. PONZAR a John E. TAVIS. Predicted structure of the hepatitis B virus polymerase reveals an ancient conserved protein fold. *Protein Science* [online]. 2022, **31**(10) [cit. 2023-06-13]. ISSN 0961-8368. Dostupné z: doi:10.1002/pro.4421
44. ZHANG, Jianing, Yanrong TONG, Yang LIU, Minmin LIN, Yao XIAO a Chao LIU. Mechanical loading attenuated negative effects of nucleotide analogue reverse-transcriptase inhibitor TDF on bone repair via Wnt/ β -catenin pathway. *Bone* [online]. 2022, **161** [cit. 2023-06-13]. ISSN 87563282. Dostupné z: doi:10.1016/j.bone.2022.116449
45. MACOUNOVÁ, Petra a Rastislav MAĎAR. Hepatitis B and vaccination in relation to cancer. *Onkologie* [online]. 2021, **15**(2), 73-76 [cit. 2023-06-13]. ISSN 18024475. Dostupné z: doi:10.36290/xon.2021.014
46. CARTER, Matt a Jennifer SHIEH. Molecular Cloning and Recombinant DNA Technology. In: *Guide to Research Techniques in Neuroscience* [online]. Elsevier, 2015, 219-237 [cit. 2023-06-13]. ISBN 9780128005118. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800511-8.00010-1
47. VONDREJS, Vladimír. *Genové inženýrství II*. Karolinum, 2001. ISBN 8024602628, 9788024602622.
48. ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, Rubén. Explanatory Chapter. In: *Laboratory Methods in Enzymology: DNA* [online]. Elsevier, 2013, 1-21 [cit. 2023-06-13]. Methods in Enzymology. ISBN 9780124186873. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-418687-3.00001-X
49. KADRI, Karim. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In: L. NAGPAL, Madan, Oana-Maria BOLDURA, Cornel BALŤĂ a Shymaa ENANY, ed. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science* [online]. IntechOpen, 2020, [cit. 2023-06-21]. ISBN 978-1-78984-089-6. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.86491
50. DEYDE, Varough M, Rangarajan SAMPATH a Larisa V GUBAREVA. RT-PCR/electrospray ionization mass spectrometry approach in detection and characterization of influenza viruses. *Expert Review of Molecular Diagnostics* [online]. 2014, **11**(1), 41-52 [cit. 2023-06-13]. ISSN 1473-7159. Dostupné z: doi:10.1586/erm.10.107
51. TAYLOR, Sean, Michael WAKEM, Greg DIJKMAN, Marwan ALSARRAJ a Marie NGUYEN. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform

- to the MIQE guidelines. *Methods* [online]. 2010, **50**(4), 1-5 [cit. 2023-06-13]. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.005
52. BUSTIN, Stephen A. a Tania NOLAN. RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2: A Primer. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(8) [cit. 2023-06-13]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21083004
53. JACOB, Francis, Rea GUERTLER, Stephanie NAIM, Sheri NIXDORF, André FEDIER, Neville F. HACKER, Viola HEINZELMANN-SCHWARZ a Sui HUANG. Careful Selection of Reference Genes Is Required for Reliable Performance of RT-qPCR in Human Normal and Cancer Cell Lines. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(3) [cit. 2023-06-13]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0059180
54. Real-time PCR. In: *Lab Guide* [online]. [cit. 2022-05-13]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>
55. AMBLARD, Franck, Dharmeshkumar PATEL, Eleftherios MICHAELIDIS, et al. HIV nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2022, **240** [cit. 2023-06-13]. ISSN 02235234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2022.114554
56. RAI, Mohammad A., Sam PANNEK a Carl J. FICHTENBAUM. Emerging reverse transcriptase inhibitors for HIV-1 infection. *Expert Opinion on Emerging Drugs* [online]. 2018, **23**(2), 149-157 [cit. 2023-06-13]. ISSN 1472-8214. Dostupné z: doi:10.1080/14728214.2018.1474202
57. Zidovudine. In: *Science direct* [online]. [cit. 2023-05-06]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/zidovudine>