

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Identifikace osob pomocí analýzy mikrosatelitů

Pavčina Strnadová

Bakalářská práce 2021

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Identification of persons using microsattellites analysis

Bachelor's thesis 2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Pavína Strnadová**
Osobní číslo: **C18279**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Identifikace osob pomocí analýzy mikrosatelitů**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte teoretickou rešerši zabývající repetitivními úseky DNA označovanými jako tzv. mikrosatelity. V úvodní části zmiňte jednotlivé typy DNA repetice a mechanismus jejich vzniku.
2. Dále popište význam mikrosatelitů pro určování identity osob a možnosti jejich využití v praxi (např. určování paternity, kriminalistika).
3. Nakonec vypracujte přehled molekulárně genetických metod umožňujících analýzu polymorfismu mikrosatelitů. Uveďte vždy stručný princip každé metody.
4. Informace přehledně zpracujte, použijte obrázky, schémata a grafy a ze získaných literárních údajů vyvoďte závěry o současném stavu studované problematiky.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

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

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Tuto práci na téma Identifikace osob pomocí analýzy mikrosatelitů 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., autorský zákon, 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 15.7.2021

Pavλίna Strnadová

PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří Mgr. Barboře Jankovičové PhD., za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

ANOTACE

Mikrosatelity jsou opakující se nukleotidové sekvence, které jsou využívány v mnoha odvětvích molekulární biologie a genetiky jako nástroj pro identifikaci osob či zvířat. Zároveň se ovšem může jednat o možné příčiny některých neurodegenerativních onemocnění. Tato práce popisuje původ mikrosatelitů, jejich význam, možné použití a metody jejich analýzy.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikrosatelity, identifikace osob, paternita, PCR

TITLE

Identification of persons using microsatellites analysis

ANNOTATION

Microsatellites are repeating nucleotide sequences, that are used in many different branches of molecular biology and genetics as a tool for identification of persons and animals. They are also possible cause of some neurodegenerative diseases. This work describes the origin of microsatellites, their significance and possible uses, while also describing methods of their analysis.

KEYWORDS

Microsatellites, person identification, paternity, PCR

OBSAH

ÚVOD	13
1 DNA	14
1.1 Základní informace	14
1.2 Repetitivní úseky DNA	15
1.2.1 Rozptýlené repetice DNA	15
1.2.1.1 Transpozony „cut and paste“	16
1.2.1.2 Replikativní transpozony	16
1.2.1.3 Retrotranspozony	16
1.2.2 Tandemové repetice DNA	17
2 MIKROSATELITY	19
2.1 Charakteristika a klasifikace mikrosatelitů	19
2.2 Mechanismy vzniku a funkce mikrosatelitů	20
2.3 Mutace mikrosatelitů	20
2.3.1 Mutační rychlost	21
2.3.2 Mutační mechanismy	21
2.3.3 Teoretické mutační modely	23
2.3.3.1 IA model	23
2.3.3.2 SM model	24
2.3.3.3 TP model	24
2.3.3.4 KA model	25
2.3.4 Nulové alely	25
3 VYUŽITÍ MIKROSATELITŮ	26
3.1 Určování paternity	27
3.2 Analýza příbuzenských vztahů	28
3.3 Kriminalistika a forezní genetika	31
3.3.1 DNA fingerprinting	31
3.3.2 DNA profiling	34
3.3.3 Y-STR	37
4 ANALÝZA MIKROSATELITŮ	39
4.1 PCR	39
4.2 Kapilární elektroforéza (CE)	42
4.3 Gelová elektroforéza	43
4.4 Hmotnostní spektrometrie	43
4.5 Hybridizační čipy	44

ZÁVĚR.....	45
SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	46

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Způsob vzniku transpozonů a retrotranspozonů	16
Obrázek 2: Satelity – primární a sekundární jednotka	17
Obrázek 3: Tvorba kličky [vlevo] a smyčky (vpravo) při sklouznutí DNA polymerázy	23
Obrázek 4: Hybridizace DNA sondy v rámci DNA fingerprintingu	26
Obrázek 5: Analýza příbuzenských vztahů na základě elektroforetogramů	28
Obrázek 6: Schéma metody RFLP	32
Obrázek 7: Srovnání DNA fingerprintu získaného z místa činu, s DNA fingerprinty podezřelých	33
Obrázek 8: Jednotlivé fáze analýzy mikrosatelitů od extrakce až po vizualizaci.	35
Obrázek 9: Tři fáze teplotního cyklu PCR	41

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Srovnání frekvence mutací mikrosatelitů u savců	21
Tabulka 2: Porovnání mikrosatelitových lokusů ze vzorku oběti a ze vzorku krve pachatele	36
Tabulka 3: Srovnání DNA separačních technik	39

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	adenin
bp	páry bazí (z angl. base pairs)
C	cytosin
CAE	kapilární řadová elektroforéza (z angl. capillary arrays electrophoresis)
CE	kapilární elektroforéza (z angl. capillary electrophoresis)
cpSSRs	chloroplastové jednoduché repetitivní sekvence (z angl. chloroplast simple sequence repeats)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
dsDNA	dvojvláknová DNA (z angl. double strand DNA)
G	guanin
KA model	K-alelový model (z angl. K-alleles model)
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (z angl. matrix assisted laser desorption/ionization)
MSRs	makrosatelitové repetice (z angl. macrosatellite repeats)
mtSSRs	mitochondriální jednoduché repetitivní sekvence z angl. mitochondrial simple sequence repeats)
nuSSRs	jaderné jednoduché repetitivní sekvence (z angl. nucleic simple sequence repeats)
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza (z angl. polyacrylamide gel electrophoresis)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
RFLP	polymorfismus délky restrikčních enzymů (z angl. restriction fragment length polymorphism)
RM	rychle mutující (z angl. rapidly mutating)
SM model	model postupné mutace (z angl. stepwise mutation model)
ssDNA	jednovláknová DNA (z angl. single strand DNA)
SSRs	jednoduché repetitivní sekvence (z angl. simple sequence repeats)

SSTRs	jednoduché tandemově se opakující sekvence (z angl. simple sequence tandem repeats)
STRs	krátké tandemové repetice (z angl. short tandem repeats)
T	thymin
TEs	mobilní elementy (z angl. transposable elements)
TP model	dvoufázový model (z angl. two phase model)
VNTR	variabilní počet tandemových repetice (z angl. variable number tandem repeats)
Y-STR	krátké tandemové repetice umístěné na Y chromosomu (z angl. Y-short tandem repeats)

ÚVOD

Mikrosatelity jsou současnými nástupci minisatelitů využívaných na poli kriminalistiky a identifikace osob. Jsou to tandemové repetice, které vynikají svou variabilitou a kodominantním chováním. Kromě jejich využití coby genetických markerů jsou ale také předpokládány příčinami některých neurodegenerativních onemocnění. Tato domněnka je v současnosti předmětem studií.

Jedná se o nástroj, který je v dnešní době využíván jako důkazní materiál v rámci soudních sporů a vyšetřování. Zároveň jde o nenahraditelný ukazatel pro zkoumání a studium příbuznosti živočišných druhů a jejich chování.

Cílem práce je shrnutí současných poznatků o mikrosatelitech, jejich přínos pro kriminalistiku, populační genetiku a studium živočichů. Dále jsou v práci popsány metody pro vyhledání a analýzu mikrosatelitových sekvencí.

1 DNA

1.1 Základní informace

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je nositelkou genetické informace pro buněčné a většinu nebuněčných organismů. Je velmi důležitá, protože určuje další vývoj a vlastnosti daného organismu. Jsou jí kódována jak prokaryota, jejichž DNA se nachází volně v cytoplazmě, tak i eukaryota, která mají deoxyribonukleovou kyselinu uloženou hlavně ve svém buněčném jádře jako součást chromatinu [1].

Samotná molekula DNA byla postupně objevována v průběhu několika desetiletí. Na samotném počátku v roce 1869 německý chemik Johann Friedrich Miescher izoloval látku z buněčného jádra leukocytů, které dal jméno „nuklein“ [2]. V roce 1928 na jeho práci nepřímo navázal anglický mikrobiolog Fred Griffith, který se zabýval patogenitou opouzdřených bakterií *Streptococcus pneumoniae*. Sérií pokusů zjistil, že kultury musí obsahovat neznámou látku, která způsobuje změnu neškodných neopouzdřených buněk na často smrtící buňky opouzdřené. Právě na základě jeho experimentů v roce 1944 Oswald Theodor Avery se svými spolupracovníky izoloval onu neznámou látku ze suspenze usmrcených bakterií. Ve vědeckém světě se tak poprvé objevily nukleové kyseliny ve své roli nositelek genetické informace [3].

Až v roce 1951 bylo objasněno, že se molekula DNA skládá z polynukleotidového řetězce, jehož základem jsou nukleotidy. Každý nukleotid je tvořen třemi složkami - a to molekulou cukru deoxyribózy, dusíkatou bází a slabě kyselou molekulou fosfátu. Dusíkaté báze se dělí na pyrimidinové a purinové. Mezi purinové se řadí adenin a guanin, zatímco mezi pyrimidinové patří thymín, cytosin a uracil. Uracil se vyskytuje pouze v RNA.

Vlastní struktura DNA byla objevena v roce 1953 americkým biologem Jamesem Deweyem Watsonem a britským fyzikem Francisem Harrym Comptonem Crickem. Jejich závěrem bylo, že se molekula DNA skládá ze dvou polynukleotidových řetězců, které jsou navzájem spojeny vodíkovými můstky. Ty se z prostorových důvodů tvoří pouze mezi určitými bázemi dle pravidel komplementarity, vždy mezi adeninem s thyminem a guaninem s cytosinem. Vytvářejí tak společně typický tvar dvoušroubovice [4].

Nukleotidy jsou uspořádány v polynukleotidovém řetězci ve specifickém pořadí, nebo-li sekvenci. Úsek takového řetězce je nazýván gen. Lidská DNA se skládá ze 3 miliard nukleotidů, které dohromady vytvářejí přibližně 20 000 až 25 000 genů kódujících bílkoviny.

Jako genom pak označujeme veškerou genetickou informaci včetně genů a nekódujících sekvencí [5].

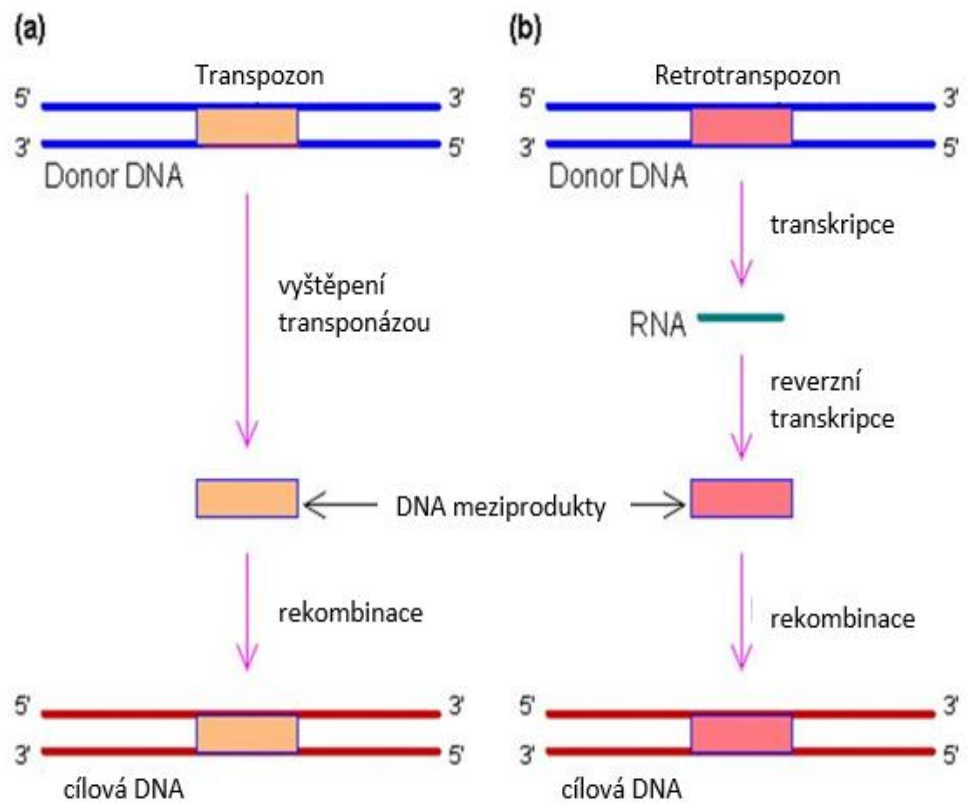
1.2 Repetitivní úseky DNA

V eukaryotické DNA můžeme nalézt jedinečné a opakující se, tzv. repetitivní sekvence. Mezi jedinečné řadíme strukturní geny nebo například pseudogeny. Jedinečnými je nazýváme proto, že se v genomu vyskytují pouze v jedné nebo velmi malém počtu kopií. Naopak repetitivní sekvence mohou zaujímat v případě některých eukaryotních organismů až 90 % celého genomu [6]. Jejich řazení může být blokové nebo mohou být zcela náhodně rozptýleny po celém genomu, rozlišujeme tak repetitivní sekvence rozptýlené a tandemové [7].

1.2.1 Rozptýlené repetice DNA

Rozptýlené repetice DNA jsou v literatuře označovány jako TEs (transposable elements). Jsou to segmenty DNA, které získaly své jméno na základě svého vzniku. Tyto genetické elementy jsou semiparazitické a velmi mobilní, schopné pohybovat se po genomu a kopírovat se procesem transpozice [8]. Jsou součástí tzv. „junk DNA“, která tvoří přibližně 45 % lidského genomu [9]. Rozptýlené repetice se dělí podle své délky na krátké a dlouhé. V případě, že je repetice kratší než-li 500 párů bází, jedná se o repetici krátkou. Pokud je repetice delší než 500 párů bází, tak se jedná o rozptýlenou repetici dlouhou [10].

Segmenty lze dále rozlišit podle vzniku na DNA transpozony, které mohou být dále děleny, a retrotranspozony (viz. Obrázek 1) [11]. Transponibilní sekvence (transpozony) vznikají většinou procesem transpozice, tedy „skákání“ segmentu DNA z jedné pozice v genomu na pozici jinou. Tyto segmenty vedou k určité variabilitě genomu. To ale také znamená, že mohou způsobovat genetické poruchy [12]. Zde hovoříme například o akutní myeloidní leukémii, akutní lymfoblastické leukémii, chronických leukémiích nebo Edwingově sarkomu. Kromě rakoviny mohou pohyby transpozonů v rámci genomu způsobovat i Anderson-Fabryho či Sandhoffovu chorobu [13].



Obrázek 1: Způsob vzniku transpozonů a retrotranspozonů, upraveno [14].

1.2.1.1 *Transpozony „cut and paste“*

U této první skupiny transpozonů můžeme pozorovat typický pohyb v rámci genomu. Nejdříve dojde k jejich vyštěpení a posléze k jejich opětovnému zařazení, ovšem do jiné části genomu. Celý mechanismus je kódován enzymem transponázou. Tento druh transpozonů byl pozorován kupříkladu v kukuřici nebo u octomilky či bakterií [11].

1.2.1.2 *Replikativní transpozony*

Tato druhá skupina transpozonů je většinou přítomna u bakterií. Segmenty jsou přenášeny za pomoci plasmidů. Nedochozí pouze k prosté transpozici, ale zároveň k cílenému kopírování určitých segmentů, díky čemuž je sekvence po transpozici přítomna v obou zúčastněných plasmidech [11,15].

1.2.1.3 *Retrotranspozony*

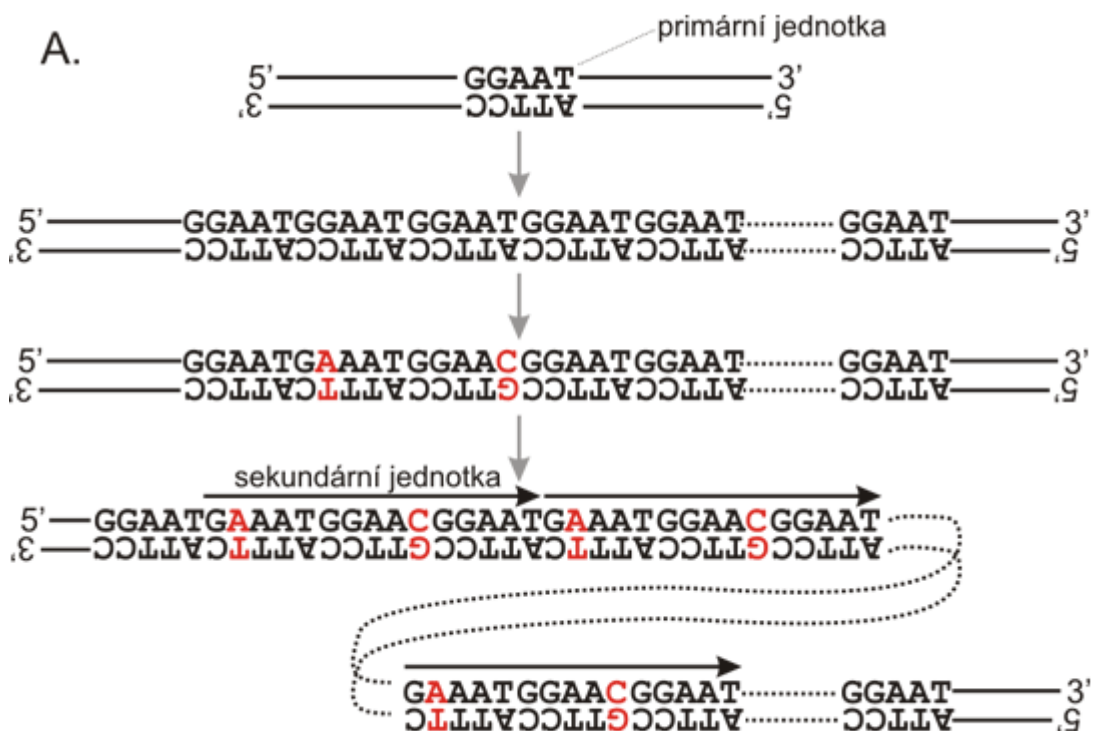
Retrotranspozony vznikají transpozicí, ovšem za účasti reverzní transkriptázy při procesu reverzní transkripce. Za pomoci enzymu integrázy jsou zreplikované sekvence

vloženy do jiné části genomu, zatímco původní sekvence zůstává na svém místě. Mechanismus retrotranspozonů je často přirovnáván k části replikačního cyklu retrovirů [11,16].

1.2.2 Tandemové repetice DNA

Tandemové repetice DNA jsou složeny z jediné sekvence, která se několikrát opakuje v řadě za sebou [17]. Repetice tohoto typu mohou být dlouhé od několika nukleotidů až po celé skupiny genových úseků. Vznikají chybami, ke kterým dochází při rekombinaci. Právě tandemové repetice DNA mohou být díky své vysoké variabilitě využity jako markery pro některé genetické poruchy [7]. Repetice se nacházejí jak v kódující části genomu, tak i v části nekódující. Tvoří přibližně třetinu proteinových sekvencí v lidském genomu, u jiných organismů to může být i více.

Nejdelším repetitivním tohoto typu říkáme satelity. Skládají se z primárních a sekundárních jednotek. Primární jednotka je sekvence, která tvoří základ každé repetice. Má ovšem sklon postupem času mutovat a dává tak vzniku nedokonalým (degradovaným) repetitivním. Právě tyto delší repetice, složené z několika degradovaných, nazýváme sekundární. Ty se dále multiplikuji a díky nim tak vznikají další nové dokonalé repetice (viz. Obr. 2). Satelitní DNA je hojná v oblasti centromer a konstitutivního chromatinu [18].



Obrázek 2: Satelity – primární a sekundární jednotka [18].

Satelity můžeme dále rozlišit podle délky jejich opakující se základní sekvence na mikrosatelity, minisatelity a makrosatelity.

Nejdelším typem tandemové repetice jsou makrosatelity, které mohou mít od 100 párů bazí až po několik kilobazí. Makrosatelitům, neboli MSRs, nebyla velmi dlouho věnována příliš velká pozornost ve srovnání s minisatelity a mikrosatelity. Tyto repetice ovšem tvoří podstatnou část genomu. Na základě nedávných výzkumů se ukázalo, že tyto repetice hrají významnou strukturální a regulační roli v organizaci jaderného chromatinu. Bohužel, makrosatelity jsou zároveň spojovány s rakovinou a jinými genetickými poruchami [19].

Minisatelity představují poněkud delší tandemové repetice, které mají délku od 10 bp až do 100 bp. Najdeme je obvykle v telomerách a subtelomerických oblastech chromozomů. Motivy se opakují obvykle 20x až 50x, což vede k vytvoření tandemů dlouhých 1000-5000 párů bazí. Ve srovnání s makrosatelity se jedná pouze o krátké úseky. Vysoká variabilita poměrně krátkých minisatelitů (VNTR – variable number tandem repeats) vede k tomu, že lze v souvislosti s nimi mluvit o tzv. DNA fingerprintingu, neboť minisatelity mohou procházet změnami v době meiózy [20]. Jsou natolik jedinečné, že byly po dlouhou dobu využívány jako genetické markery. Postupem času ovšem byly nahrazeny mikrosatelity, jejichž krátká délka umožňuje snadnou amplifikaci PCR. Díky této skutečnosti se již minisatelity při analýzách téměř nepoužívají, pouze k doplnění [21].

Na základě některých vědeckých studií, je možné předpokládat, že VNTR také ovlivňují některé pochody v lidském těle. Mezi zmiňované patří například produkce inzulinu, která má přímou návaznost na diabetes mellitus [22].

2 MIKROSATELITY

2.1 Charakteristika a klasifikace mikrosatelitů

V odborné literatuře jsou mikrosatelity označovány několika způsoby. Mezi nejčastější patří STRs = single tandem repeats, SSRs = simple sequence repeats nebo SSTRs = simple sequence tandem repeats. Jak již z první a poslední zkratky vyplývá, mikrosatelity patří mezi tandemové repetice. Obvykle se SSTRs nacházejí v nekódující části DNA, které se někdy říká „temná hmota“ molekulární biologie a genetiky, hlavně proto, že si odborná společnost velmi dlouho myslela, že je tato část DNA odpadní pozůstatek, který nemá žádný vliv ani účel pro daný organismus či buňku [23]. Jedná se hlavně o telomery, subtelomery a heterochromatin u centromer. Mezi mikrosatelity ovšem existují i výjimky, převážně z řad trinukleotidů, které expandují do kódující části genomu. Tyto repetice mají často za následek vážná neurodegenerativní onemocnění či jiné geneticky podmíněné vady [24].

Repetice se skládají z 1 až 6 párů bazí, které se obvykle v rámci genomu opakují 5-50x. Samotné repetice jsou ohraničené přilehlými oblastmi (flanking regions), které jsou obvykle unikátní pro daný genom. Tyto oblasti jsou dlouhé 30-50 párů bazí. Právě díky jejich přítomnosti a vlastnostem je možné mikrosatelity velmi snadno cíleně amplifikovat při PCR [25].

Mikrosatelity můžeme klasifikovat na základě počtu opakujících se bazí na di- (např. TGTGTGTG), tri- (např. TGCTGCTGCTGC), tetra- (např. TGCATGCATGCA), penta- (např. TGCAATGCAATGCAA) a hexanukleotidy (např. TGCAATTGCAAT). V genomu se nejvíce vyskytují mononukleotidy. Převážně je v nich zastoupen A/T. U dinukleotidů najdeme převahu GT/CA a AT/TA motivů, kterých je také v genomu mnohem více než v případě trinukleotidů vyskytujících se ze všech mikrosatelitů nejméně. Tetranukleotidy jsou obvykle složené z motivů bohatých na variace A/T [26].

Dále je možné mikrosatelity rozdělit podle způsobu jejich opakování v genomu na dokonalé, v nichž se neustále opakuje stejná sekvence nukleotidů (...GTGTGTGT...), nedokonalé, ve kterých je opakující se motiv přerušen jinou bazí (...GTGTGGGTGT...) a složené repetice, které jsou poskládané z více odlišných tandemových repetití (...TGTGTGCACACA...).

Mikrosatelity rozlišujeme i podle jejich umístění v rámci genomu, kdy se může jednat o nuSSRs, které se nacházejí v jádře, cpSSRs, jež pocházejí z chloroplastů a mtSSRs, které najdeme v mitochondriích. Největší zastoupení mají mikrosatelity nuSSRs [27].

2.2 Mechanismy vzniku a funkce mikrosatelitů

Přesný mechanismus vzniku mikrosatelitů není doposud znám, navzdory mnoha pracem, které se touto problematikou zabývají [28]. Existují dohady, že se mikrosatelitové repetice vyvinuly z rozptýlených repetitivních sekvencí, pravděpodobně z retrotranspozonů, nebo se zformovaly *de novo* z jedinečných sekvencí [29]. Jsou především charakterizovány vysokou schopností mutovat, z čehož posléze vyplývá jejich vysoký polymorfismus.

Mikrosatelity mohou a nemusí ovlivňovat funkce organismu. U některých druhů rostlin a zvířat bylo prokázáno, že mikrosatelity ve skutečnosti hrají velkou roli. Jsou součástí regulace či vlastního fungování genů. Často jsou také spojovány s patogenitou a genomovou variabilitou mikroorganismů [25].

2.3 Mutace mikrosatelitů

Vysoká variabilita mikrosatelitů je zapříčiněna mutacemi v rámci jednotlivých lokusů. Četnost mutací mikrosatelitů se pohybuje okolo 10^{-2} - 10^{-6} na lokus v jedné dané generaci (viz. Tabulka 1). Jedná se o mnohem vyšší frekvenci, než s jakou probíhají bodové mutace v kódujících částech genomu [30].

Mutace mikrosatelitů je velmi těžké zachytit a zaznamenat neboť se jedná o relativně vzácné události. Mnoho nalezených mutací je ve skutečnosti pouhá záměna vzorku nebo se jedná o nepřesnost, či chybu ve zkoumaných rodokmenech, které slouží jako materiál pro „stopování“ mutací. Dochází tak k získávání zavádějících konečných výsledků. Měření četnosti mutací je tímto významně ztíženo [31].

Tabulka 1: Srovnání frekvence mutací mikrosatelitů u savců, upraveno [31].

Člověk	2.2×10^{-4}	Petrukhin et al. 1993
Člověk	1.0×10^{-3a}	Weissenbach et al. 1992
Člověk (dinukleotidy)	5.6×10^{-4}	Weber and Wong 1993
Člověk (tetranukleotidy)	2.1×10^{-3}	Weber and Wong 1993
Myš (Ckmm/105) ^b	1.2×10^{-4}	Dallas 1992
Myš (Gfap/150) ^b	4.7×10^{-4}	Dallas 1992
Prase	7.0×10^{-5}	Ellegren 1995
Ovce	1.3×10^{-4}	This study

^aDochází zde pravděpodobně k nadhodnocení. Příčinou jsou mutace v lidských lymfoblastických buněčných liniích, které byly použity pro tento konkrétní výzkum DNA (Bachs et al. 1994).

^bOdhadovaná četnost pro myši byla hodnocena pro jednotlivé konkrétní mikrosatelitové lokusy

2.3.1 Mutační rychlost

Mutace neprobíhají na různých mikrosatelitových lokusech stejnou rychlostí. Existují faktory, které ovlivňují pravděpodobnost vzniku mutace. Mezi nejvíce zřejmé řadíme délku jednotlivých lokusů. Dlouhé a nepřerušované mikrosatelitové sekvence mutují mnohem více a jsou tedy i mnohem více polymorfni než mikrosatelitové lokusy kratší.

Naopak v případě délky jednotky repetice dochází k většímu počtu mutací, jedná-li se o kratší jednotku. Čím více nukleotidových párů tvoří jednotku repetice, tím nižší je její mutační rychlost, tudíž kupříkladu tetranukleotidy nemutují zdaleka tolik jako dinukleotidy.

Zároveň bylo v rámci studie zárodečných buněk zjištěno, že se mnohem více mutací objevuje u jedinců mužského pohlaví, než-li u jedinců ženského pohlaví. Kupříkladu poměr získaný pro zástupce lidského druhu byl 4:15, kdy 4 mutace představují ženské zárodečné buňky a 15 mutací zárodečné buňky mužské (pozn. studie Weber a Wong 1993). U většiny těchto zaznamenaných mutací se jednalo o změny, ke kterým došlo v rámci mitózy. K podobnému závěru se dospělo i v případě výzkumu prováděného na ovcích (pozn. studie Crawford a Cuthbertson 1996). Právě na základě těchto dvou nezávislých studií lze předpokládat, že mutace mikrosatelitů převážně vznikají u mužského pohlaví, protože jejich zárodečné buňky procházejí větším množstvím mitotických změn. To nadále potvrzuje myšlenku, že k mutacím mikrosatelitů převážně dochází při mitóze [31].

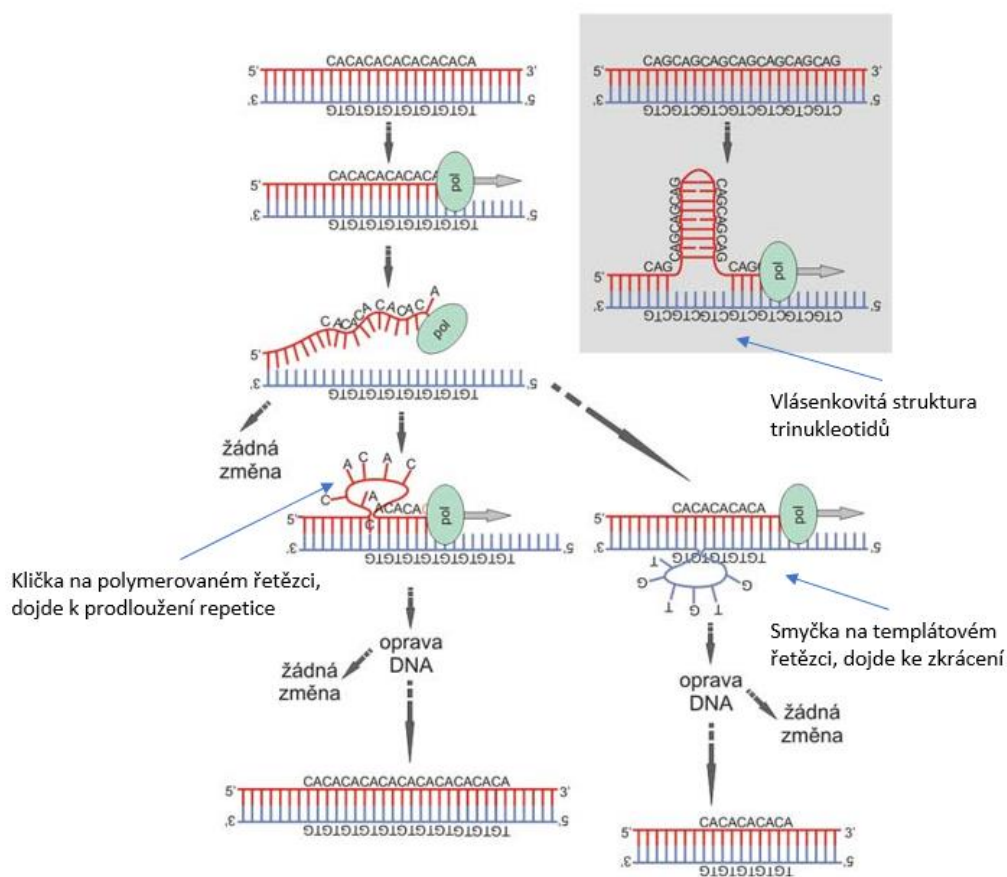
2.3.2 Mutační mechanismy

Ve většině odborných prací a výzkumů jsou v současné době brány jako hlavní příčiny mutací chyby při rekombinaci, nerovnoměrný crossing-over a sklouznutí DNA polymerázy, tzv. DNA slippage [32].

Výzkum, který byl proveden na kulturách *Escherichia coli* odhalil, že kmeny s funkčním, ale i nefunkčním rekombinačním systémem mají přibližně stejnou mutační frekvenci. Což vede k závěru, že právě mechanismus rekombinace nepatří mezi nejvíce obvyklé příčiny mikrosatelitové variability [33].

V průběhu replikace nebo opravy DNA může dojít k tzv. sklouznutí DNA polymerázy neboli DNA slippage. Tento jev může posléze probíhat dvěma různými způsoby (viz. Obr. 5). Pokud dojde k tvorbě kličky na polymerovaném řetězci, pak se celé vlákno tímto způsobem uměle prodlouží. Opačným procesem je tvorba smyčky na templátovém řetězci, díky které dojde k přeskoku části sekvence a vlákno je tak uměle zkráceno. Zvláštním případem jsou trinukleotidové repetice, které mají tendenci stabilizovat přechodový stav kličky tvorbou vláskovitě struktury a tím pádem podporují vznik této chyby. CAG/CTG trinukleotidovým repeticím můžeme právě díky tomuto jevu přisoudit některá onemocnění [18].

Sklouznutí DNA polymerázy vede k destabilizaci mikrosatelitů. A to proto, že buď není přítomen žádný efektivní způsob opravy DNA kliček a smyček nebo proto, že dochází ke změnám DNA polymerázy a jejích kofaktorů, vedoucích ke zvýšené frekvenci samotného sklouznutí. Významný vliv mutací, které jsou způsobené právě prvním z těchto dvou důvodů, byly zaznamenány v rámci několika studií. Ovlivněny jsou jimi jak kmeny *Escherichia coli* [34], tak i mikrosatelity přítomné v kvasinkách [32, 35] a buňkách savců [36]. Mutace způsobené alteracemi DNA polymerázy nebo jejích kofaktorů nemají natolik závažný vliv [24].



Obrázek 3: Tvorba kličky [vlevo] a smyčky (vpravo) při sklouznutí DNA polymerázy, upraveno [18].

2.3.3 Teoretické mutační modely

Existují čtyři teoretické mutační modely. Všechny jsou využívány k nastavení určitých parametrů pro správné posouzení údajů získaných z genetických dat. Modely jsou použity k získání předpokládaného počtu alel ze zkoumané heterozygotní populace.

2.3.3.1 IA model

IA model neboli „infinite alleles“, je model, ve kterém každá mutace náhodně vytvoří novou alelu. To v praxi znamená, že každý mikrosatelitový lokus po mutaci změní počet jednotek repetic. Např. alela s 10 repetičemi je stejně blízká alele s patnácti jako alele s šestnácti repetičemi. Jinak řečeno nezávisí na tom, jak blízké si jsou alely v počtu repetic [39].

V současné odborné literatuře nalezneme tento model pod názvem „infinite many alleles model“. Stále se ovšem jedná o původní model, který byl poprvé zmíněn v roce 1964

(Motoo Kimura a James Crow). Model připouštěl existenci mnohatisícové sekvence nukleotidů a naznačoval, že v jakémkoli lokusu může existovat nepřeborné množství alel. Právě na tomto základě získal model své jméno [37].

2.3.3.2 SM model

Zkratka SM znamená „stepwise mutations“ model. V případě, že mikrosatelitový lokus mutuje, tak ztratí, anebo získá novou repetici. To vlastně znamená, že alely, které se liší jedním motivem jsou si bližší svým původem než alely, které se liší ve vícero motivech. Model předpokládá, že v populaci dochází k náhodnému křížení a alely jsou, více, či méně selektivně ekvivalentní pro každý vybraný mikrosatelitový lokus [38].

Právě tento model je v současnosti preferován v případě, že je potřeba určit příbuznost zkoumaných alel. Nelze jej uplatnit pouze ve výjimečných případech mezi které řadíme například homoplazii. Homoplazie je výraz používaný k označení dvou alel, které sice vypadají stejně, ale liší se svým původem. Kupříkladu hypoteticky alela A i alela B mají 8 repetic. Zatímco předek alely A měl 7 repetic a posléze došlo k prodloužení o jednu repetici, alela B mohla pocházet z předka jenž měl repetic 9 a posléze došlo ke zkrácení o jednu repetici. Na základě délky repetice v daných lokusech lze určovat vzájemnou fylogenetickou příbuznost skupin organismů. Popřípadě evoluční zařazení daného rostlinného či zvířecího druhu [39].

Model prošel v minulosti několika úpravami. Nyní se při hodnocení počítá s horním limitem pro délku mikrosatelitů, s vyšší pravděpodobností mutací u delších motivů a působením bodových mutací, které narušují jinak nekonečný růst mikrosatelitových repetic [40].

2.3.3.3 TP model

„Two phase“ model byl představen v roce 1994 jako rozšíření „stepwise“ modelu pro mikrosatelity. Rozšiřuje již zmíněnou teorii o pravidlo, že nejvíce probíhající mutací způsobí získání nebo ztrátu repetice. A v některých výjimečných případech dochází ke ztrátě nebo zisku většího souboru repetic [41].

2.3.3.4 KA model

Jedná se o tzv. „K-alleles“ model, který byl navržen v roce 1970. Crow a Kimura, jimž tento model patří, předpokládají, že pokud je v mikrosatelitovém lokusu přesně k alel, pak je pravděpodobnost, že alela zmutuje na jinou $\mu/k-1$, kdy μ označuje mutační frekvenci [25].

2.3.4 Nulové alely

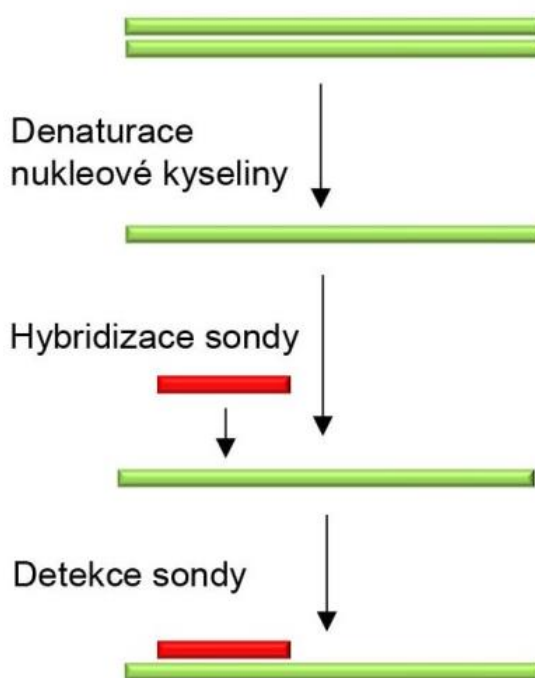
Nulové alely jsou velmi specifickým jevem, který může mít významný vliv v rámci určování paternity a příbuzenských vztahů. Nejedná se přímo o mutaci mikrosatelitů, ale stejně jako již zmíněná homoplasie, může i nulová alela velmi negativně ovlivnit výsledky analýzy mikrosatelitové DNA. Jedná se o mutaci na templátovém vlákně DNA, přímo v místě, ke kterému je komplementární primer nasedající při PCR. Mutací je nasednutí primeru narušeno a neproběhne amplifikace vybraného mikrosatelitového úseku.

Na základě tohoto principu je možné udělat chybu při určování paternity nebo při zkoumání chování jednotlivých druhů živočichů. Pokud má jeden z vyšetřovaných rodičů neamplifikující se alelu a jeví se tedy jako homozygot, mláďata, která nulovou alelu zdědí poté mohou být chybně označena jako produkt mimopárové paternity (v případě, že se jedná o otce) nebo vnitrodruhového hnízdního parazitismu (v případě, že se jedná o matku) [42].

3 VYUŽITÍ MIKROSATELITŮ

Přestože jsou mikrosatelity vysoce variabilní, jsou ovšem zároveň somaticky stabilní, což umožňuje jejich využití coby molekulárních markerů. Jejich výhodou oproti minisatelitům, které byly využívány pro tyto účely dříve, je skutečnost, že se mikrosatelity objevují v rámci genomu mnohem častěji.

První studie zabývající se mikrosatelity se objevily ke konci 20. století. Polymorfní lokusy (tj. pozice genu na chromozomu) byly hledány na základě tzv. DNA fingerprintingu, za použití DNA sondy (radioaktivně či jinak značené), která byla složena z několika opakování di-, a tetra nukleotidových repetit (viz. Obr. 4) [43].



Obrázek 4: Hybridizace DNA sondy v rámci DNA fingerprintingu [44].

Tato sonda se hybridizuje na své klony, které jsou poté osekvenovány a obklopeny jedinečnými sekvencemi nukleotidů, které dávají vznik DNA primerům. V takovém případě je poté možné s použitím připravených primerů provést amplifikaci za pomoci PCR. Pokud získáme uspokojivé výsledky v rámci PCR, pak mohou být tyto primery využity pro PCR screening v rámci populace daného druhu [45].

Mikrosatelity jsou využívány jako genetické markery z několika důvodů. Mezi jejich nesporné výhody patří jak jejich variabilita, která je činí velmi specifickými, tak i možnost

jejich poměrně snadné amplifikace za pomoci PCR. Narozdíl od minisatelitových markerů, mikrosatelity jsou lokus specifické. To znamená, že se nenacházejí na vícero místech chromosomu. Jejich další a neposlední výhodou je jejich kodominantní chování, které umožňuje částečný fylogenetický projev všech přítomných alel. Díky těmto vlastnostem jsou mikrosatelitové markery využívány ve forenzní genetice, při určování příbuznosti mezi jedinci nebo např. i pro demografické rozložení, či sledování migrace určitých specifických druhů živočichů [46].

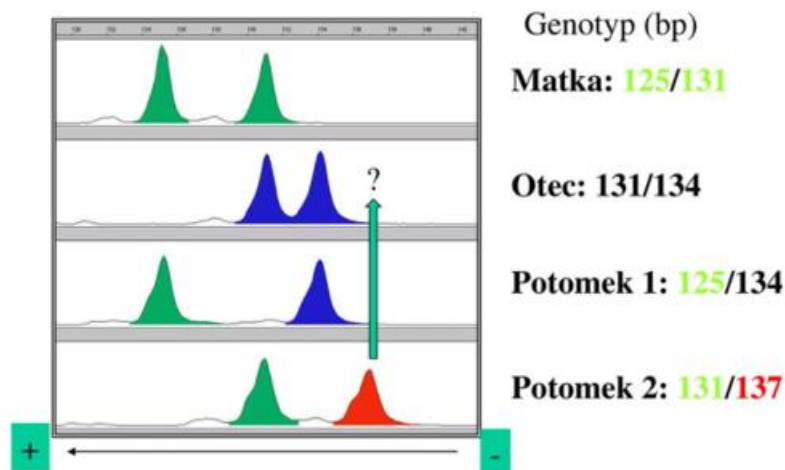
3.1 Určování paternity

Paternita neboli otcovství, v užším slova smyslu genetický vklad otce, je zjišťována na základě porovnání vybraných mikrosatelitových lokusů mezi zkoumanými jedinci, tzn. potomky a potenciálními rodiči. Pro své vlastnosti jsou mikrosatelity více než vhodným nástrojem. Disponují vysokou variabilitou a přirozenou alelovou kodominancí. Vychází se z předpokladu, že polymorfismy v počtu tandemových repetitiv (VNTR) se dědí podle mendelovské dědičnosti a potomci by tudíž měli mít jednu z možných kombinací alel svých rodičů, aby byl potvrzen jejich biologický původ.

Testy otcovství (paternity) u lidí byly v minulosti převážně založeny na porovnávání krevních skupin. Problém byl v tom, že se nejednalo o metodu, na jejímž základě by šlo otcovství potvrdit. ABO systém byl používán pouze k vyvrácení otcovství. Na rozdíl od systému krevních skupin je metoda porovnávání mikrosatelitů přesnější a více informativní [47].

V případě, že alely potomků odpovídají rodičům, jedná se s vysokou pravděpodobností o biologické rodiče zkoumaných potomků. Naopak v případě, že se u některého z potomků objeví alela, kterou nevlastní ani jeden z potenciálních rodičů, tak se dá téměř s jistotou říci, že daný jedinec je cizí (viz. Obrázek 5). Tento princip zanedbává možnost vzácně se vyskytujících mutací zrovna zkoumaného místa. Testy paternity neprobíhají na základě analýzy jediného lokusu, obvykle je k určení příbuzenských vztahů využito mezi 3-6 mikrosatelitovými lokusy, které jsou poté vzájemně porovnávány. Ke

stoprocentní shodě nedochází, ale čím více lokusů se shoduje, tím vyšší je pravděpodobnost, že se jedná o rodiče potomka [43, 48].



Sledovaný otec mohl zplodit potomka 1, ale zcela jistě není otcem potomka 2

Obrázek 5: Analýza příbuzenských vztahů na základě elektroforetogramů 4 heterozygotů [48].

3.2 Analýza příbuzenských vztahů

Mnoho vědeckých výzkumů se snaží v dnešní době mapovat a hledat podobnosti mezi mikrosatelity různých druhů a tím prokazovat jejich podobnost. Data, která jsou získávána na základě analýzy mikrosatelitových sekvencí jsou velmi důležitá pro zjišťování příbuzenských vztahů např. mezi různými druhy ptáků. Právě na jejich základě byly potvrzeny fenomény, jako jsou mimopárová mláďata nebo vnitrodruhový hnízdní parazitismus. Mikrosatelity byly v tomto případě využity jako důkaz pro reprodukční chování jednotlivých živočišných druhů a jejich abnormalit [43].

Zachovalé mikrosatelity nalezené u ploskonosých opic například prokazují podobnost mezi opicemi a člověkem. Konkrétně repetice AP74 je svou délkou velmi podobná repetici v lidském genomu [49].

Analýza příbuzenských vztahů je významným nástrojem pro studium obvyklého chování a migračních návyků živočichů. Před mikrosatelity byla využívána metoda DNA fingerprinting (metoda „otisku prstu“) [50], která však byla posléze nahrazena metodou STR analýzy [51].

Analýzu příbuzenských vztahů můžeme rozdělit do několika typů. Již v roce 2003 byla analýza rozdělena do čtyř konkrétních kategorií. A to exkluze (vyloučení) (z angl. exclusion), kategorické přidělení (z angl. categorical allocation), částečné přidělení (z angl. fractional allocation) a rodičovské přidělení (z angl. parental allocation). V posledních šesti letech se objevily nové techniky, které významně ovlivnily dosavadní kategorie. Vylepšení stávajících metod zapříčinilo dokonce vznik dvou zcela nových kategorií. První z nich byla pojmenována analýza úplné rodičovské pravděpodobnosti (z angl. full probability parentage analysis) [52] a druhá sourozenecká rekonstrukce (z angl. sibship reconstruction“) [53].

Exkluze (vyloučení) je kategorie, která je založena na poněkud jednoduchých pravidlech. Řídí se zákony Mendelovské dědičnosti, kde vychází z pravidla, že každý rodič a jeho potomek musí mít alespoň jednu stejnou alelu v lokusu [54]. V případě, že domnělý rodič žádnou alelu se svým potomkem nesdílí, nejedná se o pravého rodiče. Princip metody se možná zdá být jednoduchý, ale má také své problémy, které mohou být způsobeny nulovými alelami a vysokou mutační aktivitou mikrosatelitů, která způsobuje rozdíly mezi lokusy pravého rodiče a jeho potomka [55].

Právě z důvodu těchto možných problémů se obvykle analyzuje větší množství lokusů, aby mohlo být bezpečně vyloučeno nebo potvrzeno rodičovství. V současné době se pro vyloučení otcovství musí lišit alespoň dvě zkoumané alely. I přes všechna svá úskalí je tato metoda standardním postupem pro většinu analýz rodičovství [56].

Kategorické přidělení je metodou, která vystupuje na světlo světa v případě, že je potřeba zhodnotit větší množství potenciálních rodičů a jejich potomků, což předchozí metoda neumožňuje. Jedná se o nejrozšířeněji používanou metodu určování příbuzenských vztahů vůbec. Na rozdíl od exkluze je princip této metody založen na přenosu celých rodičovských genotypů, které mají různou šanci, že je potomek zdědí [57].

Pracuje se zde s principem pravděpodobnosti, ve kterém platí, že je mnohem častější přenos konkrétního genotypu od homozygotního rodiče, než-li od rodiče heterozygotního. Metoda tedy úplně nevylučuje ani nepotvrzuje pravého rodiče, ale místo toho vybírá toho nejvíce pravděpodobného. Proto je využívána převážně v případech, kdy je rodič úplně neznámý [58, 59].

Částečné přidělení je kategorie, pod kterou patří technika založená na metodě předchozí. Ačkoliv by se zdálo, že obě metody pokrývají většinu potřeb analýz příbuznosti, každá studie má trochu jiné cíle. A právě tato technika je pro některé z nich vhodnější. Na

rozdíl od metody kategorického přidělení, která nakonec vybere nejpravděpodobnějšího otce, tato metoda vybere celou skupinu pravděpodobných otců. A stejně tak někteří potenciální rodiče mohou mít necelé číslo pravděpodobných potomků. Ačkoliv by se mohlo zdát, že metoda nemůže nikdy dojít ke správným výsledkům, neboť již z principu věci není možné, aby rodič neměl celé číslo potomků, údaje získané touto technikou jsou užitečné pro statistické a hypotetické účely [59,60].

Analýza úplné rodičovské pravděpodobnosti je jednou z novějších metod. Na rozdíl od předchozích technik pracuje tato metoda v rámci vlastního modelového rámce, do kterého zahrnuje všechny faktory ovlivňující správnou analýzu příbuzenských vztahů. Patří k ní i data a údaje o dané populaci [59].

Může se jednat kupříkladu o teritoriální návyky zvířat nebo vzdálenost samice od samce. To činí metodu v případě zvířat flexibilnější, neboť do ní můžeme zahrnout i rozdíly v pravděpodobnosti, které sebou přinášejí rozdílné hierarchie samců v rámci zkoumané skupiny. Šance, že mlád'ata patří dominantnímu samci jsou mnohem větší, než-li šance, že potomci patří samci submisivnímu [61].

Rodičovská rekonstrukce je metoda, která pracuje s mlád'aty, o jejichž rodině máme určité předchozí informace. Jedná se kupříkladu o vejce z hnízda, které bylo chráněno specifickým samcem [62] nebo mlád'ata, která se společně vyvíjela ve stejném lůně [63].

Genotyp rodiče lze za těchto podmínek dodatečně sestavit, pokud máme k dispozici dostatečné množství potomků [64, 65]. V případě, že je jeden z rodičů znám, lze taktéž jeho genotyp oddělit od genotypů potomků a získat tak dostatek informací k sestavení genotypu chybějícího rodiče [59].

Další výhodou zpětného hledání genotypu je fakt, že je v rámci genotypů potomstva možné sledovat vztahy mezi alelami. To nám napomáhá při sestavování genotypů v případě, že se jedná o více různých otců [59, 65].

Metoda je velmi užitečná, má ovšem i svoje nevýhody. Vyžaduje vysoce polymorfní lokusy a nefunguje v případě, že není k dispozici dostatečné množství potomků, ze kterých by se dal rekonstruovat genotyp. Obvykle je proto používána pouze v případě zvířat, která mají velká množství (více než 6) potomků. To automaticky vyřazuje většinu savců a ptáky [59].

Sourozenecká rekonstrukce je poslední využívaný typ analýzy příbuzenských vztahů. Metoda zpočátku nebyla příliš využívána. Dnes k ní byly vytvořeny určité směrnice, podle kterých je možné se řídit. Metoda slouží, stejně jako metoda předchozí, k rekonstrukci genotypu. Od již zmíněné se liší tím, že máme k dispozici skupinu mláďat, o které nemáme žádné předchozí informace. Principem metody je rozdělení skupiny na úplné sourozence a neúplné sourozence (poloviční). Rozdělení může probíhat jak na základě pravděpodobnosti dědění znaků [66], tak i kombinací různých metod využívajících mendelistických zákonů dědičnosti [59].

3.3 Kriminální genetika

Mikrosatelity jsou díky své vysoké specifitě velmi oblíbeným nástrojem v mnoha různých oborech včetně forenzní genetiky, která využívá mikrosatelity jako součást důkazního materiálu u soudních řízeních, ať už se jedná o lidskou nebo zvířecí DNA. Pravděpodobnost, že nedojde ke shodě mezi podezřelým a vzorky získanými z místa činu je ve většině případů více než jedna ku milionu [67].

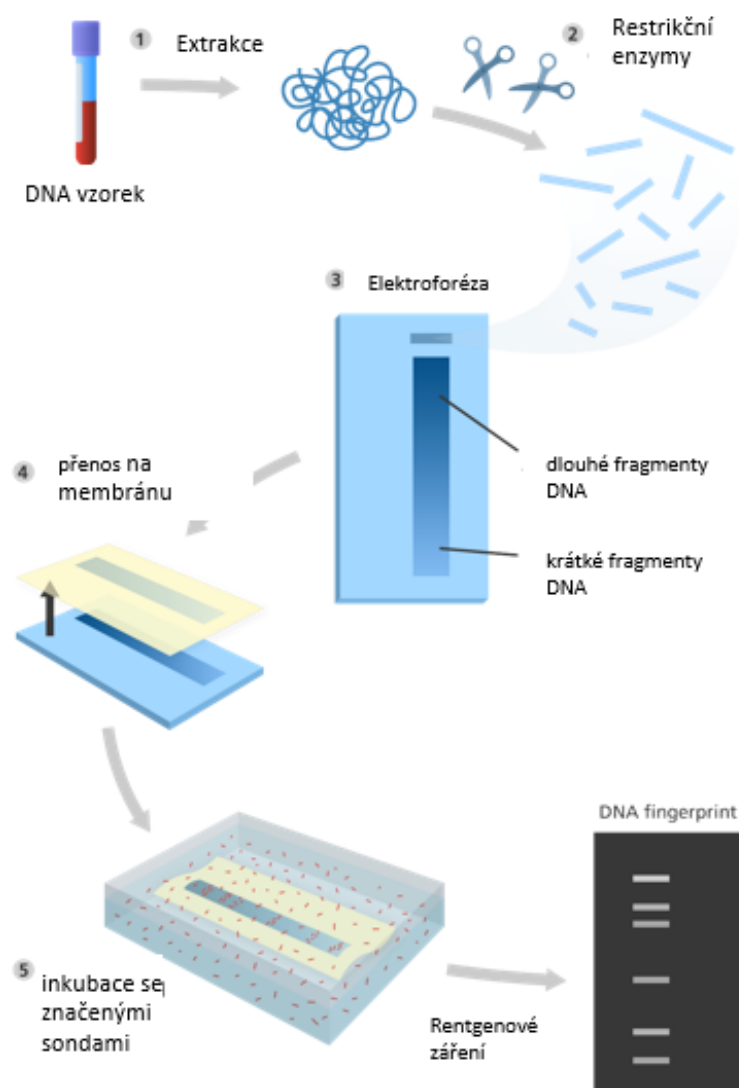
V dnešní době je nejenom možné u lidí otcovství potvrdit, ale také vyvrátit na základě shody mezi zkoumanými mikrosatelitovými lokusy. Této skutečnosti je využíváno v případech znásilnění. Shody mezi získanými vzorky lze totiž využít k odhalení a usvědčení pachatele [68]. Používají se různé analytické postupy, které budou popsány v následujících kapitolách.

3.3.1 DNA fingerprinting

Předchůdcem STR analýzy byl DNA fingerprinting (genetický „otisk prstu“). Jedná se o metodu, která ve stejnou chvíli detekuje velké množství přítomných minisatelitů ve vzorku a vytváří tak unikátní genetický „otisk prstu“. Pravděpodobnost, že by dva lidé, kteří nejsou jednovaječná dvojčata, měli stejný „otisk“ je velmi malá. Každý člověk má svůj vlastní unikátní „otisk prstu“, se kterým se narodí [49, 69].

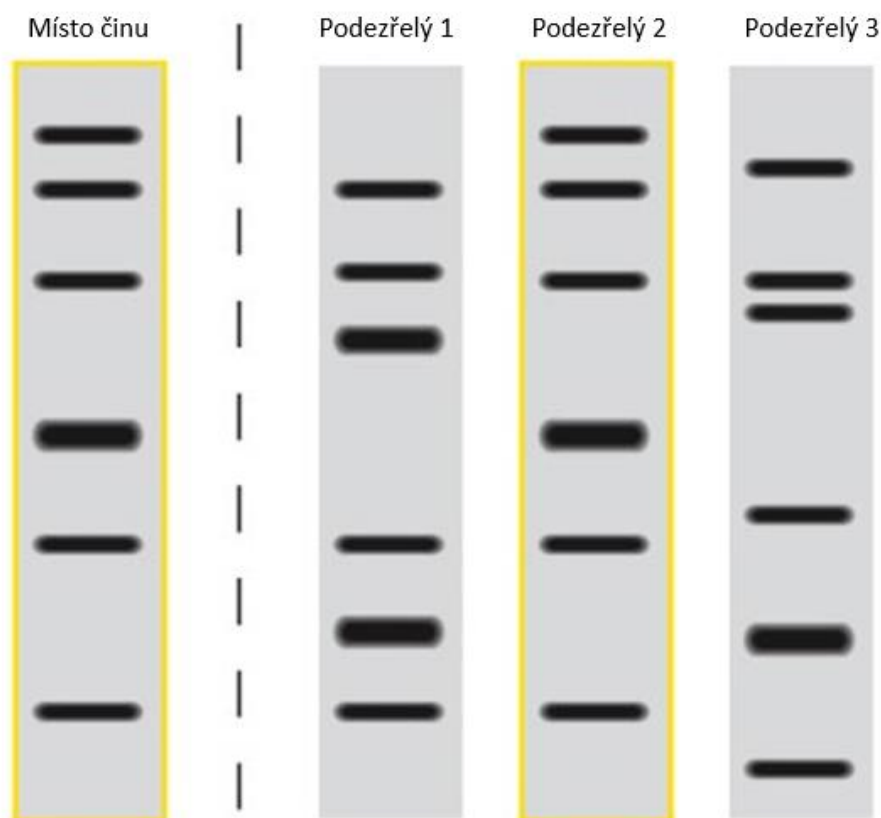
Původní DNA fingerprinting byl založen na metodě polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP) (viz. Obr. 6). Metoda využívá restrikčních enzymů, které štěpí vlákno izolované DNA na fragmenty. Ty jsou posléze vloženy na agarózový gel, kde jsou separovány podle velikosti elektroforézou. Poté jsou přeneseny na nitrocelulózovou membránu, kde se na ně naváží značené komplementární sekvence - sondy. Membrána je

přenesena na rentgenový film. Ten nám po vyvolání ukazuje umístění označených sekvencí v podobě proužků [70].



Obrázek 6: Schéma metody RFLP, upraveno [70].

Výsledek analýzy nazýváme DNA fingerprint. Na základě porovnání jednotlivých fingerprintů lze podezřelého usvědčit nebo zprostit viny (viz. Obr. 7) [70].



Obrázek 7: Srovnání DNA fingerprintu získaného z místa činu, s DNA fingerprinty podezřelých, upraveno [70].

Historicky poprvé v rámci policejního vyšetřování byla DNA analýza použita v roce 1986, kdy došlo k brutálnímu znásilnění a vraždě patnáctileté dívky. O rok později bylo nalezeno tělo čtrnáctileté dívky, která byla znásilněna a zavražděna stejným způsobem. Podezřelý byl sedmnáctiletý chlapec z místní hospody, který věděl, kde se našlo tělo druhé zavražděné dříve než policie. Dokonce se pod nátlakem k vraždě i přiznal, ale odmítal, že by zavraždil první dívku a v jeho výpovědi a přiznání se objevovaly zvláštní mezery a nepřesné detaily. K potvrzení nebo vyvrácení jeho viny byl přizván doktor Alec J. Jeffreys z University of Leicester [59, 60], který byl již v té době známý, neboť se mu podařilo dva roky zpátky vyřešit případ tamní rodiny imigrantů z Ghany. K matce, která zde žila se svými dvěma dětmi, se měl připojit její poslední potomek. U něj ovšem byly nalezeny falešné cestovní doklady, a tak mu hrozilo, že bude vykázán ze země, pokud se neprokáže, že k rodině doopravdy patří. Právní zástupce rodiny se dočetl o DNA fingerprintingu doktora Jeffreysa a přizval jej k případu. Na základě DNA analýzy, provedené na chlapci a domnělé rodině, bylo prokázáno, že chlapec je opravdu její součástí. Jednalo se o úplně první známý případ využití DNA analýzy ve věci právního sporu [69].

V případě obou brutálních znásilnění mladých dívek byly k dispozici vzorky ejakulátu a domnělému pachateli byl odebrán vzorek krve. Na základě testů, které doktor Jeffreys udělal, bylo vyloučeno, že by zadržený muž zločin spáchal, ačkoliv se k němu přiznal [71].

Na základě domněnky, že sériový vrah musí žít někde v okolí, se inspektor rozhodl k naprosto zásadnímu a poněkud odvážnému kroku. Události se dnes říká hon na DNA (z angl. DNA-based manhunt). V okruhu 8 kilometrů byly všem mužům mezi 18 a 34 lety odebrány vzorky krve. Jednalo se přibližně o 5 000 vzorků. Cena za testy pro takové množství lidí nebyla malá. Na celý nápad bylo přistoupeno pouze na základě mediální sledovanosti celého případu a výslovného souhlasu tehdejší premiérky, Margaret Thatcherové.

Testování nepřinášelo kýžené ovoce. Nakonec se ovšem na vyšetřovatele usmálo štěstí a získali informaci, že jeden mladý muž poslal místo své krve cizí vzorek. Po přezkoumání pravého vzorku krve se objevila naprosto přesná shoda a pachatel tak byl usvědčen z obou vražd a odsouzen. Tento případ významně přispěl ke slávě metody i jejího tvůrce [69, 71].

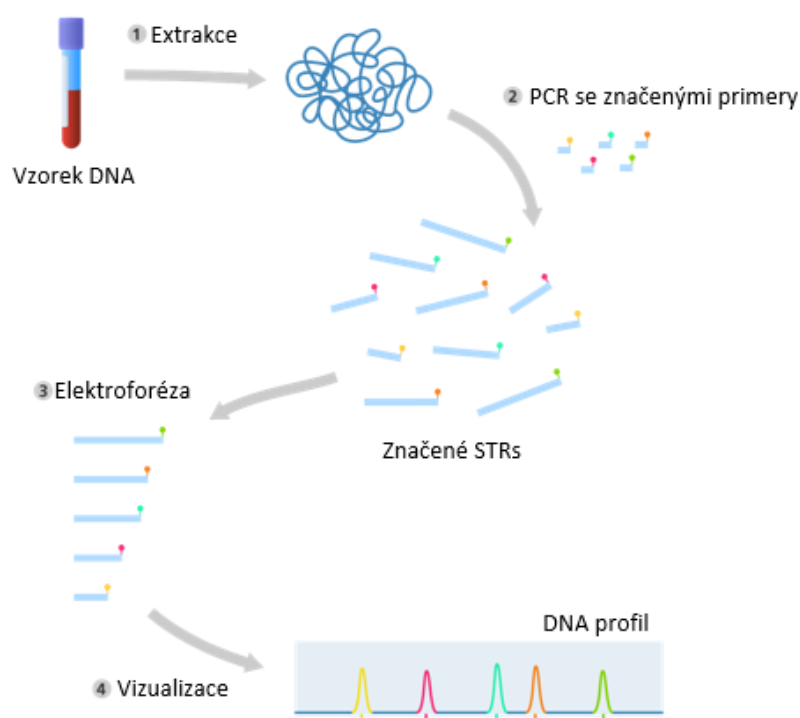
3.3.2 DNA profiling

Nástupcem DNA fingerprintingu se stalo DNA profilování (z angl. DNA profiling), kterému se dnes také říká STR analýza (z angl. STR analysis). Není zde využíváno minisatelitů, ale jejich kratších příbuzných, tedy mikrosatelitů [72].

V prvním kroku je DNA extrahována ze vzorku biologického materiálu. STR analýza je metoda natolik citlivá, že je potřeba pouze velmi malé množství genetického materiálu, aby se dala aplikovat. Jedná se o vlastnost metody, která je v kriminalistice velice významná. Díky tomuto pokroku je totiž možné získat dostatečné množství DNA i třeba z vlasů.

Na rozdíl od DNA fingerprintingu metoda STR nevyužívá restriční enzymy k nastříhání úseků DNA ale místo toho se využívá amplifikace (namnožení) za pomoci PCR

(viz. Obr. 8). V rámci tohoto procesu vzniká veliké množství kopií STR sekvencí, které jsou pak dále zpracovávány [73].



Obrázek 8: Jednotlivé fáze analýzy mikrosatelitů od extrakce až po vizualizaci, upraveno [66].

Na základě STRs lze velmi dobře identifikovat osoby, včetně jejich ostatků, a to i v případě, že se jedná o masové hroby [74]. Slavným případem takové analýzy se stala identifikace dvou chybějících členů poslední carské rodiny Romanovců, kteří byli pohřbeni ve společném masovém hrobě. Na základě provedených testů bylo prokázáno, že chybějící dva členové rodiny jsou pohřbeni v nedalekém odděleném hrobě. Byly tak vyvráceny legendy, podle kterých někteří členové rodiny přežili [73, 75].

FBI určila četnost mutací pro 13 klíčových STRs, které se přirozeně vyskytují v lidském genomu různých etnických skupin. K tomuto dni FBI analyzovalo genetické údaje stovek Kavkazanů, Afroameričanů, Hispánců a Asiatů. Statistika provedená na základě získaných údajů ukazuje, že genetická shoda je u nepříbuzných jedinců stejné etnické skupiny se šancí přibližně jedna ku 575 trilionům [76].

DNA profilování je hojně využíváno ve světě jako nástroj pro řešení zločinu a potlačování kriminality. Ve Velké Británii měli na rozdíl od americké FBI 11 klíčových STR lokusů, které jsou testovány, společně s lokusem určujícím pohlaví. Nedávno byl tento

postup rozšířen o dalších pět možných mikrosatelitových lokusů v rámci snahy přizpůsobit se zbytku Evropy [77].

DNA profily jsou skladovány v Národních DNA databázích, které má většina zemí. Nacházejí se zde profily lidí, kteří se dopustili závažných trestných činů. První taková databáze vznikla v roce 1995 ve Velké Británii [78].

Výsledky STR analýzy nejsou u soudu brány na lehkou váhu a mohou sloužit jako rozhodující důkaz.

Jako příklad můžeme uvést znásilnění dívky ve věku třiaadvaceti let, které se stalo v Indii. Za pachatele byl označen šestadvacetiletý muž. Dívka podala trestní oznámení na policii a muž byl zadržen. Do laboratoře byly poslány vzorky ejakulátu ze sukně napadené dívky a vzorek krve od domnělého pachatele. Získané elektroforeogramy posléze byly porovnávány mezi sebou a byla hledána shoda. Sledovalo se 10 mikrosatelitových lokusů s použitím tří různých fluorescenčních barviv (modré, zelené a žluté) a byla prokázána naprostá shoda (Tab. 2). Podezřelý tak byl označen za pachatele trestného činu [79].

Tabulka 2: Porovnání mikrosatelitových lokusů ze vzorku oběti a ze vzorku krve pachatele, všude panuje naprostá shoda, upraveno [79].

Barva	Lokus		Vzorek oběti	Vzorek krve pachatele	Shoda
Modrá	D3S1358	1	15	15	Shoda
		2	17	17	
	VWA	1	15	15	
		2	18	18	
	F GA	1	18	18	
		2	20	20	
Zelená	AMEL	1	X	X	Shoda
		2	Y	Y	
	D8S1179	1	10	10	
		2	14	14	
	D21S11	1	32.2	32.2	
		2	32.2	32.2	
	D18S51	1	11	11	
		2	19	19	
Žlutá	D5S818	1	12	11	Shoda
		2	13	13	
	D13S317	1	8	8	
		2	12	12	
	D7S820	1	9	9	
		2	9	9	

3.3.3 Y-STR

Analýza STR na mužském pohlavním chromozomu je široce využívána v oblasti forenzní DNA analýzy, převážně v případech, kdy autozomální DNA profilování není dostatečné. Analýza Y-STRs použitá při vyšetřování má moc zcela vyloučit osoby mužského pohlaví z účasti na spáchání trestného činu. Zároveň je na jejím základě možné určit původ pachatele a paternální pokrevní příbuzné, a to i velmi vzdálené [80].

V současné době je používán pouze jeden, pohlaví určující lokus, a to amelogenin. Používání pouze jediného lokusu k určování pohlaví je kritizováno vědeckou komunitou, neboť na chromozomu Y může dojít ke vzácným delecím přímo ve zmíněném lokusu. Provedené DNA analýzy poté vykazují nesprávné pohlaví [81].

Y-STR analýza je v mnoha ohledech nadřazena obyčejné STR analýze, která může být použita pouze za určitých okolností. Y-STR analýza je velmi jedinečná, neboť nám umožňuje analyzovat i vzorky, ve kterých je smíšený genetický materiál mnoha různých dárců nebo ženy a muže v případech znásilnění. To je možné i u klasického profilování, ale jenom za předpokladu, že je dopředu známo, že ve vzorku je přítomno mnohonásobně větší množství genetického materiálu jednoho z dárců [82].

Na druhou stranu Y-STR analýza nemůže být aplikována na přímou identifikaci osob, neboť její DNA profil je v naprosté většině případů sdílen příbuznými mužského pohlaví. Této vlastnosti je naopak využíváno při určování otcovství nebo rekonstrukci rodokmenů a příbuzenských vztahů [80].

V roce 2010 byly popsány RM Y-STR, což jsou rychle mutující (z angl. rapidly mutating) Y-STR lokusy. Mutace na nich zaznamenané mohou sloužit při odlišení jedinců stejné paternální linie, což je významné pro účely kriminalistiky a forenzní genetiky [83].

Následující kazuistika rozebírá případ využití Y-STR analýzy v policejním vyšetřování, ve kterém nebylo obyčejné DNA profilování dostačující. Potvrzuje tak důležitost a výjimečnost metody.

V roce 1999 byla v Nizozemí zavražděna a znásilněna dívka, když jela na oslavu v nedaleké vesnici. Na základě stop spermatu, které byly nalezeny, bylo provedeno klasické DNA profilování a výsledky byly porovnány s dostupnou DNA databází. Nebyla nalezena žádná shoda.

Vyšetřovatelé postupně zatkli a vyslechli několik podezřelých, u kterých byl taktéž vyhotoven autosomální DNA profil. I zde byli neúspěšní. Situaci nijak neprospívalo, že dívka byla zavražděna velmi blízko centra pro politické žadatele o azyl. Na tomto základě byl zatčen a DNA analyzován muž z Iráku ve spolupráci s INTERPOLEM a taktéž muž z Afghánistánu. U žádného z nich nebyla nalezena shoda. V okolí azylového centra se zvyšovalo napětí mezi místními a uprchlíky, neboť zde panovalo přesvědčení, že vraždu spáchal některý z cizinců. Ve chvíli, kdy se začalo stupňovat násilí, byla na popud vedení vyšetřování zahájena Y-STR analýza vzorků spermatu.

Porovnáním výsledků s přístupnými Y-STR referenčními profily se dospělo k závěru, že předkové vraha, a tudíž velmi pravděpodobně i sám vrah jsou ze severo-západní Evropy. Ačkoliv místní výsledkům analýzy příliš nevěřili, potyčky ustaly. Případ samotný nebyl vyřešen a byl odložen na celých čtrnáct let.

V Nizozemí došlo ve zmíněných čtrnácti letech ke změnám v legislativě ohledně Y-STR, neboť do té doby mohlo být při vyšetřování a soudních sporech legálně použito pouze autosomální DNA profilování.

Případ byl po těchto změnách znovu oživen. Na základě schopnosti Y-STR analýz stopovat paternální pokrevní linie bylo zahájeno v místě vraždy dobrovolné odebrání vzorků. Vyšetřovatelé předpokládali, že se jim podaří najít vzdálené příbuzné pachatele. Velmi zvláštní je, že shoda byla nalezena skoro okamžitě. Na obou mužích byla provedena dodatečná autosomální STR analýza, která vyloučila, že by se jednalo přímo o hledaného vraha. Tento objev v každém případě potvrdil domněnku, že vrah má příbuzné někde v okolí.

Genealogický výzkum ukázal, že oba muži jsou velmi vzdáleně příbuzní, ačkoliv mají jiná příjmení. Jejich pokrevní příbuznost sahala až do dob napoleonské okupace.

U obou mužů se začalo s testováním příbuzných a začalo se využívat vícero zkoumaných Y-STR lokusů. Tím se mělo postupně zúžit pole podezřelých až k blízkým příbuzným vraha, které by šlo odhalit na základě autosomálního DNA profilování.

K překvapení všech přítomných byla zjištěna naprostá shoda pro autosomální STR analýzu u jednoho z dobrovolníků, který se později k činu i přiznal. Dobrovolně se nechal odebrat, protože věděl, že by byl dříve či později dopaden přes své vzdálené příbuzné, a tak doufal, že vyšetřování bude zahrnovat tolik vzorků jeho příbuzných, že dojde k chybě a za vraha bude označen někdo jiný [84].

4 ANALÝZA MIKROSATELITŮ

Analýza mikrosatelitů je v současnosti proces, který se neobejde bez využití PCR (viz Obr. 9). Samotná analýza je nedílnou součástí DNA profilování, které je velmi důležitým nástrojem kriminalistiky a forenzní genetiky. STR analýza je natolik citlivá, že není potřeba příliš mnoho DNA k tomu, aby se dosáhlo optimálních výsledků. I malé množství DNA je amplifikováno metodou PCR za pomoci primerů [66]. Jedná se o syntetické primery, oligonukleotidy o velikosti 18 – 24 nukleotidů, které fungují jako speciální sekvence, od kterých DNA polymeráza zahajuje syntézu [85]. Každý pár primerů označuje začátek a konec sekvence („flanking regions“), kterou chceme amplifikovat.

Po PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů, jsou získané DNA fragmenty separovány a analyzovány různými technikami, jako je gelová elektroforéza, kapilární elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, či hybridizační čipy. Jednotlivé techniky budou v následujících kapitolách blíže popsány a jejich srovnání je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 3: Srovnání DNA separačních technik, upraveno [86].

Technika	Rychlost/Vzorek	Náklady
PAGE/stříbření	hodiny	+
Automatizované sekvenátory	hodiny	+++
CE	minuty	++
MALDI-TOF-MS	vteřiny	++++

4.1 PCR

PCR metoda neboli polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction) je velmi důležitou součástí diagnostiky, forenzní genetiky a molekulární biologie. Je totiž schopna namnožit genetický materiál potřebný k provedení dalších analýz. V dnešní době je například nepostradatelnou součástí SARS-CoV-2 diagnostiky.

Za posledních sto let se objevilo velmi málo metod, které se dokáží PCR vyrovnat. Objevení této metody znamenalo revoluci na poli biologického a genetického výzkumu. První kroky směrem k objevu PCR učinil americký biochemik Kary Mullis v roce 1983.

Všiml si, že pokud provede denaturaci DNA a rozdělí tím dvojitou DNA (dsDNA) na dvě jednovláknové (ssDNA) a přidá reverzní primery (pro určení celkové délky vybrané sekvence), tak získá silnější signál, než jaký poskytovalo do té doby používané Sangerovo sekvenování. Analýza vzorku tak přestala být limitována malou koncentrací DNA [87].

Jeho postup byl ovšem poněkud složitější, než je tomu dnes. DNA polymeráza byla vždy v rámci denaturačního procesu zničena a tím pádem byl způsob časově náročný, neboť polymeráza musela být znovu přidána v každém PCR cyklu. Tento problém byl později vyřešen za pomoci automatizovaného systému zvaného „Baby Blue“. Využita byla polymeráza z bakterie *Thermus aquaticus*, která je schopna přežít i teploty okolo 94°C. Tím došlo k eliminaci nutnosti přidávání čerstvé polymerázy do každého PCR cyklu [87, 88].

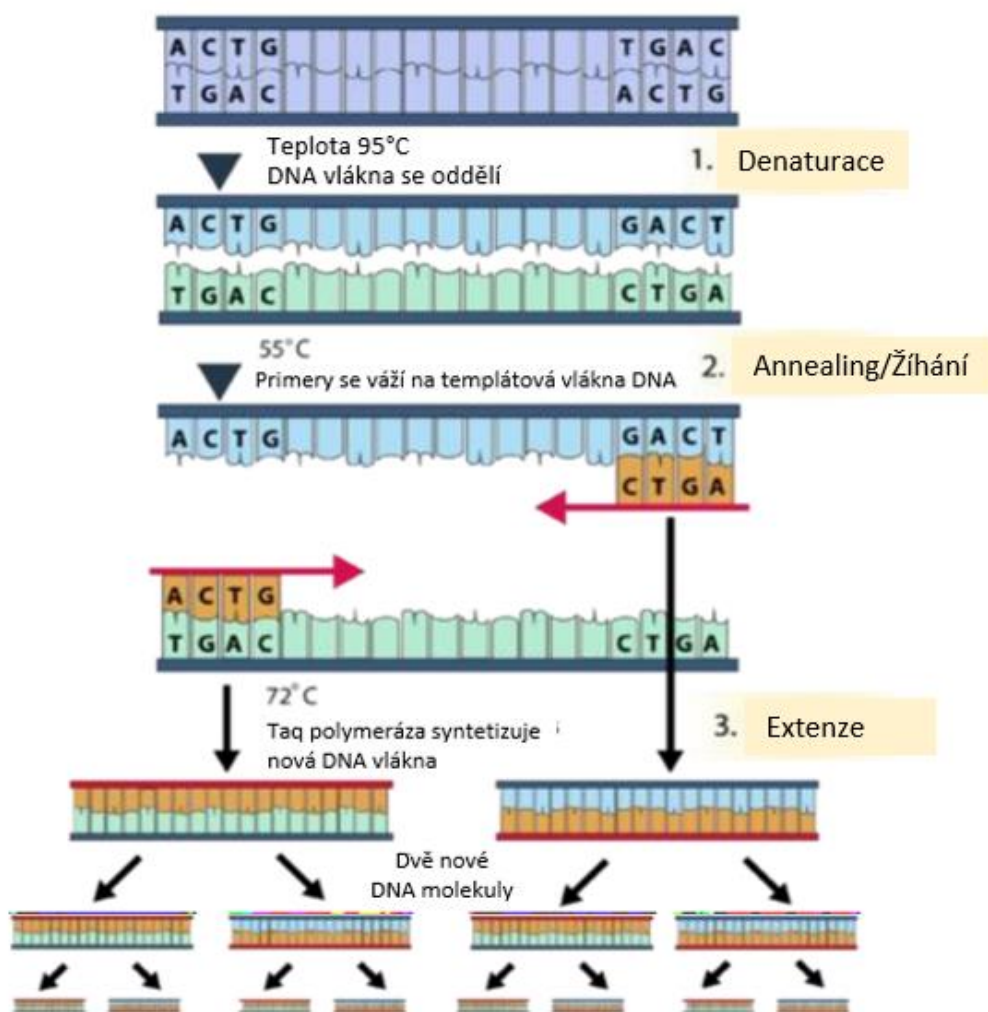
Pro úspěšné provedení PCR metody vždy potřebujeme pět základních reakčních komponent. Patří mezi ně templátová DNA, která byla izolována ze zkoumaného vzorku, synteticky připravené primery, které jsou komplementární k unikátním sekvencím („flanking regions“) obklopujícím vybraný mikrosatelitový lokus, směs nukleotidů dNTP, která slouží jako stavební materiál pro nové vlákno a DNA polymeráza (např. taq polymeráza z *Thermus aquaticus*) [87].

Součástí každé PCR amplifikace jsou teplotní cykly, z nichž každý má tři fáze, při kterých je používána jiná teplota. Jedná se o denaturaci, annealing (žihání) a extenzi (viz. Obr. 9). Cyklus je v rámci PCR opakován přibližně 25-35x [42, 89].

Na počátku je PCR zahájena denurací, která způsobuje rozvolnění řetězců DNA. Teplota je okolo 94°C. Proces je následován fází annealing, při kterém je záměrně snížena teplota, neboť je potřeba, aby na separovaná vlákna DNA nasedly primery, (přední „forward“ primer a zadní „reverse“ primer). Teplota je snížena přibližně na 50-60°C. Na základě podobnosti mikrosatelitů u příbuzných organismů mohou být pro analýzu využity již známé primery pocházející od úzce příbuzných druhů [90].

Celý cyklus zakončuje fáze extenze, při které dochází k syntéze komplementárního řetězce DNA, za účasti DNA polymerázy, která nasedne na přítomné primery a připojí volné

nukleotidy na templátové vlákno na základě pravidel komplementarity bazí. Poslední fáze probíhá při teplotě 72°C [42, 87].



Obrázek 9: Tři fáze teplotního cyklu PCR, upraveno [89].

Amplikony které jsou touto cestou získány, jsou posléze dále analyzovány např. přeneseny na polyakrylamidový nebo agarózový gel a je provedena elektroforéza.

PCR debutovalo ve forenzní genetice poté, co se vědcům podařilo amplifikovat šest vysoce polymorfních minisatelitových lokusů v jediné PCR mikrozkušavce. Hlavním úspěchem celé demonstrace byl fakt, že se amplifikace mohla zopakovat a využít i pro velmi malá množství lidské DNA. Výzkum v tomto poli vedl k představení multiplexové PCR, která je schopna amplifikovat vícero různých DNA sekvencí ve stejném časovém úseku. Amplikony na polyakrylamidovém gelu byly barvené stříbrem a srovnávány s alelovými markery. Rozšiřování a vylepšování těchto postupů vedlo k využívání fluorescenčně

značených amplikonů v rámci kapilární elektroforézy. Právě díky tomuto vývoji je nyní možné pracovat i s velmi malým množstvím někdy i degradovaného DNA materiálu [88].

Většina mikrosatelitů ceněná ve forenzní genetice patří mezi tetranukleotidy [79].

4.2 Kapilární elektroforéza (CE)

Po úspěšné PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů, mohou být získané DNA fragmenty separovány a rozděleny podle velikosti, za pomoci kapilární elektroforézy. Jeden z dvojice primerů je v tomto případě označen fluorescenčním barvivem [66].

Každý fragment, který je označen fluorescenčním barvivem je pak ozářen laserem a emituje barevné záření, které je zachyceno detektorem a přeneseno do počítače, kde můžeme zaznamenané signály vidět v podobě různě barevných a vysokých píků [66]. Čím více STR sekvencí je testováno, tím přesnější a účinnější metoda je.

Fragmenty jsou umístěny do kapiláry, která je naplněna nosným médiem. Může se jednat například o vodný elektrolyt nebo specifický gel. Elektricky nabitě částice jsou posouvány v kapiláře vlivem přítomného elektrického pole. Částice se pohybují po nosném médiu a jsou separovány podle velikosti na základě svého negativního náboje [91].

Amplifikované produkty mohou být značeny různými způsoby. Jako příklad můžeme uvést značení fluorescenčním barvivem nebo barvení stříbrem.

Právě fluorescenční vícebarevná metoda nám dovoluje analýzu většího počtu mikrosatelitových lokusů ve stejnou dobu, a to ve stejné kapiláře. A to i v případě, že jsou mezi zkoumanými alelami takové, které pocházejí ze vzájemně se překrývajících lokusů. K jejich viditelnému rozlišení nám slouží primery, které jsou odlišené různými fluorescenčními barvivy. Detektor posléze zachytí a zpracuje určité množství signálů, na základě počtu použitých barviv [79].

Budoucností kapilární elektroforézy je CAE, volně přeloženo jako kapilární řadová elektroforéza (z angl. capillary arrays electrophoresis). Jedná se stále o kapilární elektroforézu, která je ovšem schopna paralelně využívat více kapilár. Lze tak analyzovat více vzorků současně. Metoda byla poprvé popsána v roce 1992 [92].

Zde je nutno také zmínit mikročipovou CE, což je vlastně kapilární elektroforéza, kterou se podařilo vměstnat na mikročip [93]. Jedná se o velký pokrok, který by mohl jednoho dne pomoci s analýzou DNA v terénu, kde není k dispozici laboratoř. Na mikročip

se v roce 1999 podařilo dostat i 96 kapilárovou CAE, která je schopna analyzovat vzorky i ve dvou vteřinách [94].

4.3 Gelová elektroforéza

Tato metoda je založena na pohybu negativně nabitých částic v elektrickém poli. Molekuly se pohybují směrem k anodě různou rychlostí, která je nepřímo úměrná jejich velikosti. Čím menší částice, tím déle je schopna putovat. Gelová elektroforéza je prováděna obvykle na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu (PAGE). Na nich jsou přítomny póry různé velikosti, které tvoří síto pro zachycení cílových molekul.

Fyzikální vlastnosti polyakrylamidového gelu a velikost jeho pórů jsou závislé na koncentraci polyakrylamidu a stupni jeho zesíťování. K sekvenování DNA a hlavně také STR fragmentů používáme obvykle denaturované polyakrylamidové gely, které mají schopnost vysokého rozlišení a to až na jednu bázi [95].

V roce 1997 bylo prokázáno, že i gely agarósové mohou být použity pro STRs. Tímto způsobem byly zatím detekovány některé specifické tetranukleotidy a dinukleotidy [96].

4.4 Hmotnostní spektrometrie

Jedná se o metodu, která je založena na rozdělení nabitých částic podle jejich molekulové hmotnosti, a to v elektrickém nebo magnetickém poli. Po dlouhou dobu bylo možné tímto způsobem dělit pouze částice do určité velikosti. V případě, že zde byl pokus ionizovat částici s větší molekulovou hmotností, docházelo k nesprávnému štěpení. Proto se začala používat matrice, což je látka, která zachycuje ionizační energii laseru a rozprostírá ji na molekuly vzorku bez toho, že by je štěpila. Této metodě se říká MALDI, v překladu matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (z angl. matrix assisted laser desorption/ionization).

Pro částice vysoké molekulové hmotnosti se používá technika MALDI-TOF, což je MALDI, ke kterému je přidán detektor doby letu TOF (z angl. time-of-flight). Ten nám umožňuje zachytit a změřit dobu průletu, ze které je poté možné vypočítat rychlost prolétající částice. Výhodou metody je její rychlost a citlivost. Dále také neštěpí částice, takže je možné měřit i směsi. MALDI lze kombinovat s ostatními separačními technikami jako je gelová elektroforéza nebo kapalinová chromatografie [97].

V roce 1998 byla nahlášena detekce mikrosatelitů do velikosti 150bp [98], která byla poté následována v roce 1999 výzkumem GeneTrace, při kterém bylo dokázáno, že lze hmotnostní spektrometrií spolehlivě zaznamenat STRs ve vzorku za méně než 5 sekund [99].

4.5 Hybridizační čipy

Technologie hybridizačních čipů je v literatuře také nazývána genetickými čipy nebo mikročipy. Na jejím základě se provádí analýza celého genomu, která umožňuje vyšetřovatelům zkoumat změny exprese u velkého množství genů současně. Princip spočívá v nanesení a imobilizaci značených sond na pevnou matici, na kterou je poté přidáván zkoumaný biologický vzorek. V případě matrice se obvykle jedná o keramické či křemíkové čipy, sklo nebo nylonovou membránu. Metoda funguje na jediném principu, a to, že čím větší je exprese daného genu, tím větší je množství značeného cíle a tím pádem o to silnější je i výstupní signál [100].

ZÁVĚR

Tématem této práce je identifikace osob pomocí analýzy mikrosatelitů. V úvodu je popsána charakteristika mikrosatelitů a jejich zařazení v rámci DNA. V další části práce jsou popsány mutace, které jsou nedílnou součástí mikrosatelitů. Je zde popsán jejich vznik a význam pro identifikaci jedinců. Dále se práce věnuje využití mikrosatelitů v rámci určování paternity a příbuzenských vztahů. Významná část kapitoly je věnována kriminalistice a forenzní genetice. Zde je uvedena i patřičná kazuistika. Poslední část práce se zabývá popisem jednotlivých metod užívaných pro analýzu mikrosatelitů.

STR analýza je významným nástrojem pro identifikaci jedinců a sestavování DNA profilů. Je to metoda, která pomohla vyřešit velké množství případů a je na denním pořádku soudních sporů a policejních vyšetřování.

Ačkoliv se výzkum nezastavuje a ve světě se objevují pokusy o novější a přesnější metody, STR analýza se za posledních více než dvacet let zasloužila o to, aby se stala nezapomenutelnou součástí historie kriminalistických a forenzních metod.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Deoxyribonukleová kyselina. Nzip [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví České republiky, 2010 [cit. 2021-01-05]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/1068>.
- [2] Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev Biol.* 2005 Feb 15;278(2):274-88. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.11.028. PMID: 15680349.
- [3] Avery O, MacLeod C, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med.* 1944, roč. 79, čís. 2, s. 137–158.
- [4] Genetická informace: Objev DNA a její struktura. Educenet [online]. Ostrava, 2010 [cit. 2021-01-05]. Dostupné z: https://ostrava.educenet.cz/www/biologie/index7fe77fe7.html?option=com_content&view=article&id=58&Itemid=58.
- [5] Department of Forensic Genetics, Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Charité - Univer. DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. *Investig genet* [online]. 2013 [cit. 2021-01-05].
- [6] Mehrotra S, Goyal V. Repetitive sequences in plant nuclear DNA: types, distribution, evolution and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2014 Aug;12(4):164-71. doi: 10.1016/j.gpb.2014.07.003. Epub 2014 Aug 15. PMID: 25132181; PMCID: PMC4411372.
- [7] Otová B, Mihalová R. (2012) *Základy biologie a genetiky člověka.* Karolinum Press, Praha.
- [8] Brookfield J. (2001) Molecular drive. In: Brenner, S., Miller, J. (eds.): *Encyclopedia of genetics.* Academic Press, Barkeley, Los Angeles, 1233–1234.
- [9] Sargurupremraj M, Wjst M. Transposable elements and their potential role in complex lung disorder. *Respir Res.* 2013 Oct 5;14(1):99. doi: 10.1186/1465-9921-14-99. PMID: 24093510; PMCID: PMC3851442.
- [10] Carter RE. (2000) DNA fingerprinting using minisatellite probes. In: Baker A.J. (ed.): *Molecular Methods in Ecology.* Blackwell Science, Toronto, 113–135.
- [11] Snustad DP, Simmons MJ. (2009) *Genetika.* 1. vydání. Brno: Nakladatelství Masarykovy univerzity, 894 s.

- [12] Trent RJ. (2012) Molecular medicine Genomics to personalized healthcare. (Fourth edition). Academic Press, London, Waltham, San Diego.
- [13] Chenais B. Transposable elements in cancer and other human diseases. *Curr Cancer Drug Targets*. 2015;15(3):227-42. doi: 10.2174/1568009615666150317122506. PMID: 25808076.
- [14] Montgomery D. Genomes & their evolution Ch 21.4,5 [online]. *NATURE*, 2016 [cit. 2021-7-1]. Dostupné z: <https://slideplayer.com/slide/8067016/>
- [15] Choi KH, Kim KJ. (2009) Applications of transposon-based gene delivery system in bacteria. *J Microbiol Biotechnol*.19(3):217-28.
- [16] Shakes LA, Wolf HM, Norford DC et al. (2014) Harnessing mobile genetic elements to explore gene regulation. *Mob Genet Elements*. 4:e29759.
- [17] Campbell NA, Reece JB. (2006) *Biologie*. Computer Press, Brno.
- [18] Genetické haraburdí-repetitivní DNA: Tandemové repetice. Aktuální genetika – multimediální učebnice lékařské biologie, genetiky a genomiky [online]. Univerzita Karlova: Ústav biologie a lékařské genetiky 1.LF UK a VFN, 2005-2006 [cit. 2021-01-05]. Dostupné z: https://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/repetitivni_dna.htm#tandem
- [19] Dumbovic G, Forcales SV, Perucho M. Emerging roles of macrosatellite repeats in genome organization and disease development. *Epigenetics*. 2017 Jul 3;12(7):515-526. doi: 10.1080/15592294.2017.1318235. Epub 2017 Apr 20. PMID: 28426282; PMCID: PMC5687341.
- [20] Jarman AP, Wells RA. Hypervariable minisatellites: recombinators or innocent bystanders? *Trends Genet*. 1989 Nov;5(11):367-71. doi: 10.1016/0168-9525(89)90171-6. PMID: 2692244.
- [21] Richard GF, Pâques F. Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO Rep*. 2000 Aug;1(2):122-6. doi: 10.1093/embo-reports/kvd031. PMID: 11265750; PMCID: PMC1084263.
- [22] Kennedy G, German M, Rutter W. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. *Nat Genet* 9, 293–298 (1995). <https://doi.org/10.1038/ng0395-293>

- [23] Ahmad SF, Singchat W, Jehangir M, Suntronpong A, Panthum T, Malaivijitnond S, Srikulnath K. Dark Matter of Primate Genomes: Satellite DNA Repeats and Their Evolutionary Dynamics. *Cells*. 2020 Dec 18;9(12):2714. doi: 10.3390/cells9122714. PMID: 33352976; PMCID: PMC7767330.
- [24] Brouwer JR, Willemsen R, Oostra BA. Microsatellite repeat instability and neurological disease. *Bioessays*. 2009 Jan;31(1):71-83. doi: 10.1002/bies.080122. PMID: 19154005; PMCID: PMC4321794.
- [25] Oliveira EJ et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* [online]. 2006, v. 29, n. 2 [Accessed 1 July 2021] , pp. 294-307. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000200018>>. Epub 12 June 2006. ISSN 1678-4685. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000200018>.
- [26] Eckert KA, Hile SE. (2009). Every microsatellite is different: Intrinsic DNA features dictate mutagenesis of common microsatellites present in the human genome. *Molecular carcinogenesis*, 48(4), 379–388. <https://doi.org/10.1002/mc.20499>
- [27] Kalia R, Manoj R, Sanjay K, Rohtas S, Ashok D. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 2011, 177, 309–334 (PDF) Development and Use of Single Sequence Repeats (SSRs) Markers for Sugarcane Breeding and Genetic Studies. Available from: https://www.researchgate.net/publication/328882881_Development_and_Use_of_Single_Sequence_Repeats_SSRs_Markers_for_Sugarcane_Breeding_and_Genetic_Studies [accessed May 31 2021].
- [28] Schlötterer C. (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109:365-371.
- [29] Buschiazzi E, Gemmell NJ. (2006): The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays* 28: 1040-1050.
- [30] Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol*. 2002 Dec;11(12):2453-65. doi: 10.1046/j.1365-294x.2002.01643.x. PMID: 12453231.
- [31] Crawford AM, Cuthbertson RP. Mutations in sheep microsatellites. *Genome Res*. 1996 Sep;6(9):876-9. doi: 10.1101/gr.6.9.876. PMID: 8889555.

- [32] 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* 365:274-276.
- [33] Levinson G, Gutman GA. (1987): Slipped-Strand Mispairing: A Major Mechanism for DNA Sequence Evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4: 203-221.
- [34] Bichara M, Pinet I, Schumacher S and Fuchs R. (2000) Mechanisms of dinucleotide repeat instability in *Escherichia coli* *Genetics* 154:533-542.
- [35] Sia EA, Kokoska RJ, Dominska M, Greenwell P and Petes TD. (1997) Microsatellite instability in yeast: Dependence on repeat unit size and DNA mismatch repair genes. *Molecular and Cellular Biology* 17:2851-2858.
- [36] Kolodner RD and Marsischky GT. (1999) Eukaryotic DNA mismatch repair. *Current Opinion Genetics* 9:89-96.
- [37] Ewens WJ. Motoo Kimura and James Crow on the Infinitely Many Alleles Model. *Genetics*. 2016 Apr;202(4):1243-5. doi: 10.1534/genetics.116.188433. PMID: 27053120; PMCID: PMC4905530.
- [38] Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics*. 1993 Mar;133(3):737-49. PMID: 8454213; PMCID: PMC1205356.
- [39] Chen X, Cho Y, McCouch S. (2002) Sequence divergence of rice microsatellites in *Oryza* and other plant species. *Molecular Genetics and Genomics*, 268(3), 331-343.
- [40] Ellegren H. (2004) Microsatellites: Simple Sequences with Complex Evolution. *Nature Reviews Genetics*. 5: 435-445.
- [41] Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M and Freimer NB (1994) Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. *Proceeding of National Academy of Sciences* 91:3166-3170.
- [42] Dakin E, and Avise JC. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93:504–509.
- [43] Navrátil M. Analýza polymorfismu mikrosatelitových lokusů DNA [online]. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci: Katedra buněčné biologie a

genetiky, 2018 [cit. 2021-7-1]. Dostupné z: https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/kbb/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/EMBSB_E4.pdf

[44] Hybridizační metody. Lab Guide [online]. Praha, 2019 [cit. 2021-6-29]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/hybridizacni-metody/>

[45] You I, Kim EB. Genome-based species-specific primers for rapid identification of six species of *Lactobacillus acidophilus* group using multiplex PCR. *PLoS One*. 2020 Mar 20;15(3):e0230550. doi: 10.1371/journal.pone.0230550. PMID: 32196527; PMCID: PMC7083307.

[46] Selkoe KA, and RJ Toonen. (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Letters* 9: 615-629.

[47] Boyd WC. Chances of excluding paternity by the Rh blood group. *Am J Hum Genet.*, 1955. 7(3): 229–235.

[48] 周代 牽. QPCR PCR Sekvenování. SlidePlayer [online]. 2021 [cit. 2021-6-29]. Dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/11287638/>

[49] Buschiazzo E, Gemmell NJ. Conservation of human microsatellites across 450 million years of evolution. *Genome Biol Evol*. 2010 Feb 8;2:153-65. doi: 10.1093/gbe/evq007. PMID: 20333231; PMCID: PMC2839350.

[50] Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*. 1985 Jul 4-10;316(6023):76-9. doi: 10.1038/316076a0. PMID: 2989708.

[51] Tautz D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17, 6463-6471

[52] Hadfield JD, Richardson DS, Burke T. (2006) Towards unbiased parentage assignment: combining genetic, behavioural and spatial data in a Bayesian framework. *Molecular Ecology*, 15, 3715–3730.

[53] Thomas SC, Hill WG. (2002) Sibship reconstruction in hierarchical population structures using Markov chain Monte Carlo techniques. *Genetical Research*, 79, 227–234

[54] Chakraborty R, Shaw M, Schull MJ. (1974) Exclusion of paternity: the current state of the art. *American Journal of Human Genetics*, 26, 477–488.

- [55] Dakin EE, Avise JC. (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93, 504–509.
- [56] Jones AG, Ardren WR. (2003) Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology*, 12, 2511–2523.
- [57] Meagher TR. (1986) Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. 1. Identification of most-likely male parents. *The American Naturalist*, 128, 199–215.
- [58] Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7, 639–655.
- [59] Jones AG, Small CM, Paczolt KA. (2009) A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology*, 10, 6–30.
- [60] Devlin B, Roeder K, Ellstrand NC. (1988) Fractional paternity assignment – theoretical development and comparison to other methods. *Theoretical and Applied Genetics*, 76, 369–380.
- [61] Hadfield JD, Richardson DS, Burke T. (2006) Towards unbiased parentage assignment: combining genetic, behavioural and spatial data in a Bayesian framework. *Molecular Ecology*, 15, 3715–3730.
- [62] Neff BD. (2001) Genetic paternity analysis and breeding success in bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Journal of Heredity*, 92, 111–119.
- [63] Tatarenkov A, Healy CIM, Grether GF, Avise JC. (2008) Pronounced reproductive skew in a natural population of green swordtails, *Xiphophorus helleri*. *Molecular Ecology*, 20, 4522–4534.
- [64] Jones AG, Avise JC. (1997b) Polygynandry in the dusky pipefish *Syngnathus floridae* revealed by microsatellite DNA markers. *Evolution*, 51, 1611–1622.
- [65] Emery AM, Wilson IJ, Craig S, Boyle PR, Noble LR. (2001) Assignment of paternity groups without access to parental genotypes: multiple mating and developmental plasticity in squid. *Molecular Ecology*, 10, 1265–1278.
- [66] yourgenome, (2016-06-02). What is a DNA fingerprint?. [online] Available at: <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-a-dna-fingerprint> [Accessed 3 Jul. 2021].

- [67] Evett IW, and BS Weir. 1998. *Interpreting DNA Evidence: Statistical Genetics for Forensic Scientists*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- [68] Csete K, Beer Z, Varga T. Prenatal and newborn paternity testing with DNA analysis. *Forensic Sci. Int.* 2005. 147: Suppl:S57-60.
- [69] Jeffreys A. (2005). Genetic fingerprinting. *Nature medicine.* 11. 1035-9. 10.1038/nm1005-1035.
- [70] Sagar A. DNA Fingerprinting – Principle, Methods, Applications. MicrobeNotes [online]. 2018 [cit. 2021-7-15]. Dostupné z: <https://microbenotes.com/dna-fingerprinting-principle-methods-applications/#references>
- [71] Panneerchelvam S, Norazmi MN. Forensic DNA profiling and database. *Malays J Med Sci.* 2003 Jul;10(2):20-6. PMID: 23386793; PMCID: PMC3561883.
- [72] Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet.* 1991 Oct;49(4):746-56. PMID: 1897522; PMCID: PMC1683171.
- [73] Roewer L. DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. *Investig Genet.* 2013 Nov 18;4(1):22. doi: 10.1186/2041-2223-4-22. PMID: 24245688; PMCID: PMC3831584.
- [74] Calacal GC, Delfin FC, Tan MM, Roewer L, Magtanong DL, Lara MC, Fortun Rd, De Ungria MC. Identification of exhumed remains of fire tragedy victims using conventional methods and autosomal/Y-chromosomal short tandem repeat DNA profiling. *Am J Forensic Med Pathol.* 2005 Sep;26(3):285-91. doi: 10.1097/01.paf.0000177338.21951.82. PMID: 16121088.
- [75] Coble MD, Loreille OM, Wadhams MJ, Edson SM, Maynard K, Meyer CE, Niederstätter H, Berger C, Berger B, Falsetti AB, Gill P, Parson W, Finelli LN. Mystery solved: the identification of the two missing Romanov children using DNA analysis. *PLoS One.* 2009;4(3):e4838. doi: 10.1371/journal.pone.0004838. Epub 2009 Mar 11. PMID: 19277206; PMCID: PMC2652717.
- [76] Reilly P. Legal and public policy issues in DNA forensics. *Nature Reviews Genetics* 2, 313–317 (2001) doi:10.1038/35066091

- [77] Gill P, Fereday L, Morling N, Schneider PM. The evolution of DNA databases--recommendations for new European STR loci. *Forensic Sci Int*. 2006 Jan 27;156(2-3):242-4. doi: 10.1016/j.forsciint.2005.05.036. Epub 2005 Jul 5. PMID: 16002250.
- [78] Martin PD, Schmitter H, Schneider PM. A brief history of the formation of DNA databases in forensic science within Europe. *Forensic Sci Int*. 2001 Jun 15;119(2):225-31. doi: 10.1016/s0379-0738(00)00436-9. PMID: 11376988.
- [79] Bobbarala V. (2009) A case study of sexual assault by DNA finger printing technology using PCR based STR analysis. *Journal of Pharmacy Research*.
- [80] Roewer L. Y chromosome STR typing in crime casework. *Forensic Sci Med Pathol*. 2009;5(2):77-84. doi: 10.1007/s12024-009-9089-5. Epub 2009 May 20. PMID: 19455440.
- [81] Brinkmann B. Is the amelogenin sex test valid? *Int J Legal Med*. 2002 Apr;116(2):63. doi: 10.1007/s00414-001-0263-x. PMID: 12056521.
- [82] Purps J, Geppert M, Nagy M, Roewer L. Validation of a combined autosomal/Y-chromosomal STR approach for analyzing typical biological stains in sexual-assault cases. *Forensic Sci Int Genet*. 2015 Nov;19:238-242. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.08.002. Epub 2015 Aug 10. PMID: 26280567.
- [83] Ballantyne KN, Keerl V, Wollstein A, Choi Y, Zuniga SB, Ralf A, Vermeulen M, de Knijff P, Kayser M. A new future of forensic Y-chromosome analysis: rapidly mutating Y-STRs for differentiating male relatives and paternal lineages. *Forensic Sci Int Genet*. 2012 Mar;6(2):208-18. doi: 10.1016/j.fsigen.2011.04.017. Epub 2011 May 25. PMID: 21612995.
- [84] Kayser M. Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview. *Hum Genet*. 2017 May;136(5):621-635. doi: 10.1007/s00439-017-1776-9. Epub 2017 Mar 17. PMID: 28315050; PMCID: PMC5418305.
- [85] Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl*. 1993 Dec;3(3):S30-7. doi: 10.1101/gr.3.3.s30. PMID: 8118394.
- [86] STRBase (SRD-130). National Institute of Standards and Technology [online]. U.S. Department of Commerce [cit. 2021-7-15]. Dostupné z: <https://strbase.nist.gov/tech.htm#Polyacrylamide>

- [87] Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*. 2012 May 22;(63):e3998. doi: 10.3791/3998. PMID: 22664923; PMCID: PMC4846334.
- [88] Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. PCR past, present and future. *Biotechniques*. 2020 Oct;69(4):317-325. doi: 10.2144/btn-2020-0057. Epub 2020 Aug 20. PMID: 32815744; PMCID: PMC7439763.
- [89] PCR-Polymerázová řetězová reakce. *Nanoed tul* [online]. Technická univerzita v Liberci, 2019 [cit. 2021-7-3]. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/5707/mod_resource/content/1/CV1B_PCR%20reakce.pdf
- [90] Altukhov YuP, Salmenkova EA. (2002): DNA Polymorphism in Population Genetics. *The Russian Journal of Genetics* 38: 1173–1195.
- [91] Karkar S, Alfonse LE, Grgicak CM, Lun DS. Statistical modeling of STR capillary electrophoresis signal. *BMC Bioinformatics*. 2019 Dec 2;20(Suppl 16):584. doi: 10.1186/s12859-019-3074-0. PMID: 31787097; PMCID: PMC6886162.
- [92] Huang XC, Quesada MA, Mathies RA. (1992) DNA sequencing using capillary array electrophoresis. *Anal. Chem.* 64: 2149-2154
- [93] Woolley AT, Hadley D, Landre P, deMello AJ, Mathies RA, Northrup MA. (1996) Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. *Anal. Chem.* 68: 4081-4086.
- [94] Shi Y, Simpson PC, Scherer JR, Wexler D, Skibola C, Smith MT, Mathies RA. (1999) Radial capillary array electrophoresis microplate and scanner for high-performance nucleic acid analysis. *Anal. Chem.* 71: 5354-5361.
- [95] Summer H, Grämer R, Dröge P. Denaturing urea polyacrylamide gel electrophoresis (Urea PAGE). *J Vis Exp*. 2009 Oct 29;(32):1485. doi: 10.3791/1485. PMID: 19865070; PMCID: PMC3329804.
- [96] White HW, Kusakawa N. Agarose-based system for separation of short tandem repeat loci. *Biotechniques*. 1997 May;22(5):976-80. doi: 10.2144/97225pf01. PMID: 9149885.
- [97] Havliš J. Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF. *Vesmír* [online]. 1999, (78), 448 [cit. 2021-7-15]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1999/cislo-8/hmotnostni-spektrometrie-maldi-tof.html>

[98] Taranenko NI, Golovlev VV, Allman SL, Taranenko NV, Chen CH, Hong J, and Chang LY. (1998) Matrix-assisted laser desorption/ionization for short tandem repeat loci. *Rapid Commun.Mass Spectrom.* 12: 413-418.

[99] Butler JM, Becker CH. (1999) Improved analysis of DNA short tandem repeats with time-of-flight mass spectrometry. Final Report on NIJ Grant 97-LB-VX-0003. National Institute of Justice, August 1999.

[100] Freeman WM, Robertson DJ, Vrana KE. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques.* 2000 Nov;29(5):1042-6, 1048-55. doi: 10.2144/00295rv01. PMID: 11084867.