

Čeká nás nástup genové terapie aneb *Homo sapiens* GMO?

CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) je jedním z převratných objevů buněčné biologie s obrovským přesahem do mnoha biologických (a medicínských) oborů. Systém samotný známe poměrně dlouho, ale teprve práce, které publikovaly týmy Jennifer Doudna a Emmanuelle Charpentierové v letech 2012 a 2013, ukázaly jejich funkci a možnosti na poli biotechnologií. Původně bakteriální obranný systém bylo ale nutné pro použití v molekulární biologii mírně upravit. O objevu, principech fungování a uplatnění systému CRISPR-Cas a RNA interference, další metody ovlivnění genové exprese představené v následujícím textu, podrobněji pojednává článek na str. XLVII–XLIX kuléru tohoto čísla Živy.

Editační zařízení

Pro biotechnologické účely se ukázal jako nejvhodnější systém odvozený od bakterie *Streptococcus pyogenes*, využívající jeden Cas protein (Cas9) a dvě nekódující RNA. Tyto RNA se označují jako crRNA (crRNA) a tracrRNA (tracrRNA). Zatímco molekula crRNA sekvenčně odpovídá cílové sekvenci DNA, tracrRNA je jejím komplementárním obrazem a napomáhá plnému dozrání crRNA do funkčního stavu. Potřeba dvou různých molekul RNA se záhy ukázala jako nepraktická, a tak genoví inženýři sloučili obě molekuly RNA do jedné chimerické single guide RNA (sgRNA, obr. 1).

Takto upravené editační zařízení je široce použitelné pro různé úpravy genomů, zahrnující přípravu mutantů, přerušení metabolických drah nebo např. léčbu infekcí rezistentních vůči dosavadním způsobům léčby.

Přerušená DNA může být dále upravena několika způsoby, mezi nejčastější patří homologní (Homology Directed Repair, HDR) a nehomologní rekombinace (Non-Homologous End Joining, NHEJ). Jde o evolučně konzervovaný mechanismus, kterým savčí buňky opravují zlomy v dvouřetězcové DNA. Homologní rekombinace vyžaduje

je přítomnost druhého homologního vlákna DNA, a proto ji lze uplatnit jen u buněk v určitém stadiu buněčného cyklu. Oproti tomu NHEJ funguje dokonale, pokud jsou u opravované DNA přítomny byt pouze mikrohomologické úseky na koncích volných vláken (v řádu jednotek nukleotidů), které jsou navzájem kompatibilní. Ale při narušení této kompatibility může docházet ke ztrátám jednotlivých nukleotidů a změně výsledné sekvence. Pro biotechnologické aplikace tedy musíme zajistit přítomnost mikrohomologních úseků tak, aby byly chyby maximálně omezeny.

Další vylepšení v tomto směru na sebe nenechala dlouho čekat. Čerstvě publikovaná studie Lin Linové z Univerzity Aarhus v Dánsku a spolupracovníků (2017) představuje protein Cas9 upravený fúzí s bakteriálním proteinem RecA, který je součástí „mašinerie“ opravující DNA. Autoři ukazují, že přesnost oprav při uplatnění takto pozměněného Cas9 se zvyšuje až o jednu třetinu a jeho použití by tedy mohlo být bezpečnější než u dosavadních systémů.

Doručení do buněk

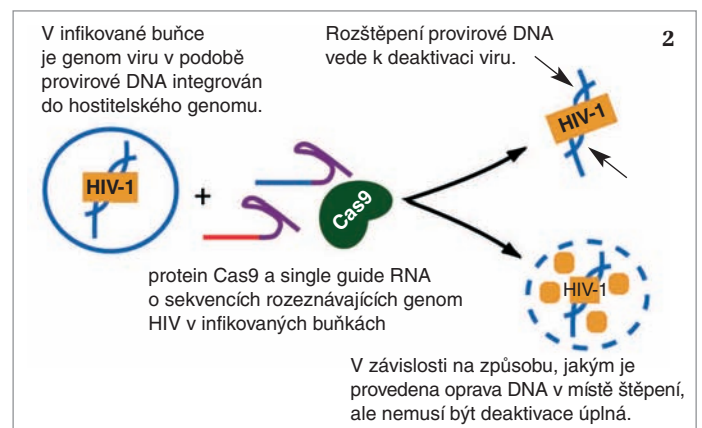
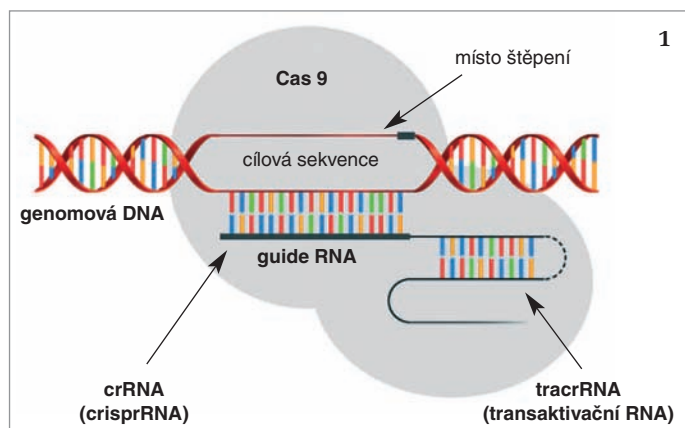
První výzvou, jež stojí před vědci testujícími aplikace CRISPR-Cas9 v humánní medicíně, je ustavení efektivního způsobu

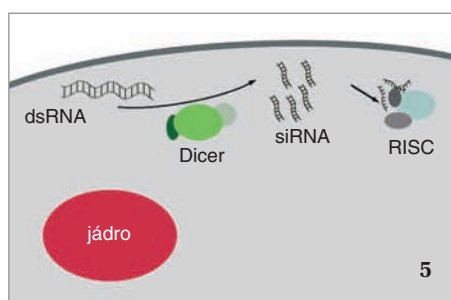
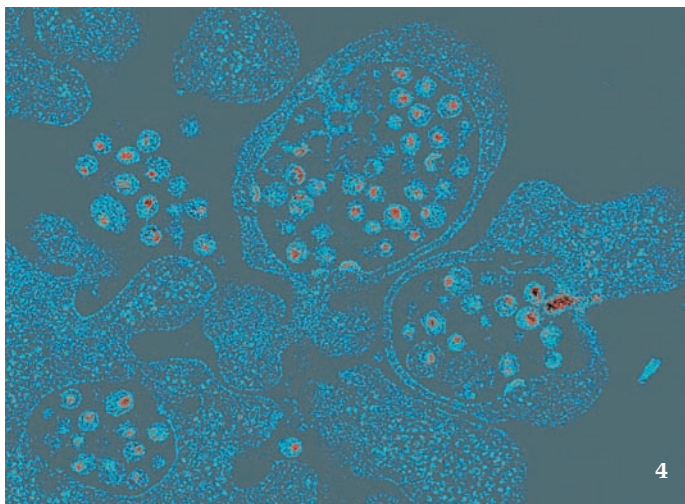
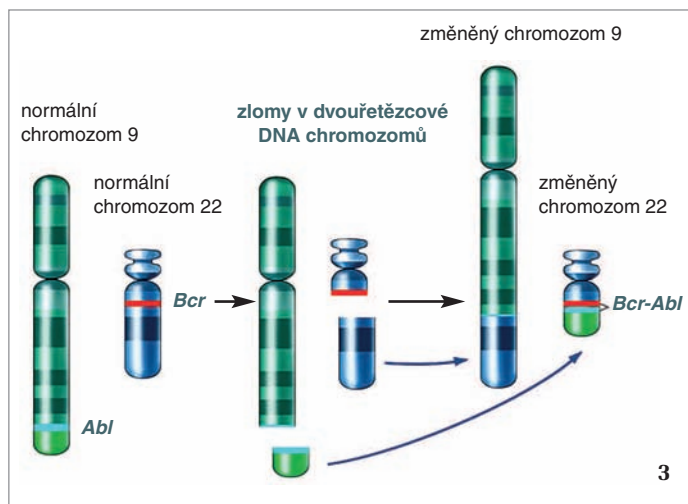
doručení editovacích enzymů do buněk. V současné době máme k dispozici tři transportní systémy založené na virových vektorech. Všechny tři lze použít, ale ani jeden není zcela bez chyb (Chen a Gonçalves 2016). První z nich, založený na adenovirech, je v experimentech schopen doručit CRISPR-Cas9 do buněk s vysokou účinností. Značnou nevýhodou ovšem představuje vysoká imunogenita adenovirů (vyvolává silnou imunitní reakci hostitele). Mnoho lidí má navíc proti adenovirům dobře vyvinuté protilátky, což efektivitu adenovirových vektorů snižuje. Jako varianta těchto vektorů existují doručovací systémy odvozené od virů asociovaných s adenoviry. Mají podstatně menší imunogenitu a nejsou pro člověka patogenní. Naneštěstí jsou ale poměrně malé a nedokážou pojmout celý systém CRISPR-Cas9 najednou. Při jejich použití musíme proto editační systém rozdělit do několika různých vektorů, což podstatně snižuje účinnost doručení. Jednu z posledních testovaných variant tvoří lentivirové vektory. Lentiviry jsou retroviry příbuzné HIV (Human Immunodeficiency Virus). Lentivirové vektory se ale samozřejmě upravují tak, aby nebyly patogenní. Jejich výhoda spočívá ve schopnosti začlenit nesenou genetickou informaci do genomu hostitele (což je obecná vlastnost retrovirů). To zaručuje stabilitu exprese vneseného genu poměrně dlouhou dobu. Dlouhodobá exprese se ale zároveň paradoxně stává nevýhodou celého systému. Jestliže CRISPR-Cas9 zůstává přítomen příliš dlouho a vyčerpá všechny specifické cíle, existuje riziko méně specifických zásahů, které jsou nežádoucí. Toto riziko ale můžeme obejít použitím speciálně upravených lentivirových vektorů s poruchami v replikaci či integraci do genomu.

Jakmile však překonáme obtíže s dopravou editačního systému do cíle, existuje téměř nepřeborné množství aplikací, kde lze editační systém CRISPR-Cas9 využít.

Nová naděje pro pacienty s chronickou myeloidní leukémií?

Jednou z aplikací je přerušení genů spojených se vznikem novotvarů. Jako typický příklad uveďme fúzní gen *Bcr-Abl*. Jde o dva původně nezávislé geny, exprimující užitečné proteiny Bcr (receptor B buněk, vlastně membránově vázanou protilátku) a Abl (tyrozin kinázu), které byly chybně spojeny dohromady. Protein Abl se v normální buňce účastní procesů buněčné diferenciace a dělení a jeho aktivita je přísně regulována. Po spojení s genem *Bcr* ale do-





chází k jeho nadprodukcí a narušení regulace, jejímž výsledkem je nádorové bujení. Tato mutace se vyskytuje často u pacientů s chronickou myeloidní leukémií, která celosvětově tvoří asi 20 % všech případů leukémie u dospělých (obr. 3). Jakkoli léčba tohoto onemocnění zaznamenala obrovský pokrok v důsledku používání specifických inhibitorů Abl kinázy (lék Glivec – imatinib a jeho deriváty), nelze tímto způsobem pacienty zcela vyléčit a u většiny z nich se v průběhu léčby objevují rezistentní nádorové buňky. Takové buňky však současně představovaly cíl pro úpravy genomů. Nádorový fenotyp je totiž spjat s výskytem *Bcr-Abl* genu, při jeho zničení by měla zmizet i „nádorovost“. Přesně o tento přístup se pokusili španělská vědci, když nádorové buňky nejprve editovali *in vitro* a pak vpravili do myši, aby testovali jejich schopnost dát vzniknout nádoru (García-Tuñón a kol. 2017). A skutečně – v pokusech se podařilo nádorové vlastnosti buněk částečně zablokovat. Zároveň ale vyvstala jedna ze slabín použití editačního systému. Ze všech editovaných buněk pouze část měla kompletně zablokovaný žádaný gen, u zbylých zůstaly jeho funkce částečně zachovány, případně došlo k dalším nežádoucím změnám v okolí cílového genu.

Nová léčba AIDS na dosah?

Léčba HIV pozitivních pacientů může být další aplikací systému CRISPR-Cas9. Jakkoli dnešní antivirotika umožňují dlouhodobé přežívání nemocných s HIV (obr. 4) a významně snižují rozvoj AIDS, tedy syndromu získaného selhání imunity, přece jen ani s jejich pomocí nelze HIV pozitivního jedince zcela vyléčit a tedy zbavit viru. Navíc samotná léčba má řadu vedlejších účinků způsobujících různé zdravotní komplikace. Ačkoli můžeme léčbou udržet infekci v chronickém neakutním

1 Schéma editace genomu metodou CRISPR-Cas9. Vybraný úsek genomu je rozeznáván pomocí sekvenční kompatibility s guide RNA vázanou na protein Cas9, který následně cílovou DNA štěpí. Blíže v textu a na str. XLVII–XLIX kuléru

2 Štěpení provirové HIV DNA pomocí CRISPR-Cas9. Tímto systémem lze specificky štěpit libovolné sekvence v genomu, jako např. provirové sekvence HIV.

3 Chromozomové změny vedoucí k chronické myeloidní leukémii. Díky chromozomové přestavbě se do vzájemně blízkosti dostávají geny, které se původně nacházely na různých chromozomech. Nové spojení vede ke změně produkce obou proteinů a jejich umístění v buňce. Výsledkem je v tomto případě nádorový fenotyp postižených buněk.

4 T lymphocyty infikované HIV (snímek z prozařovacího elektronového mikroskopu, počítačově obarveno). Foto F. Weyda (z článku M. Brůčkové v Živě 2003, 5: 194–196)

5 Mechanismus RNA interference. Nejprve enzymový komplex Dicer naštěpí dvouřetězcovou RNA (double stranded, dsRNA) na kratší úseky (oligonukleotidy), které jsou následně zpracovány komplexem RISC (RNA-Induced Silencing Complex), tvořeným několika bílkovinami a molekulou RNA. RISC nakonec naštěpí všechny RNA v buňce, které mají stejnou sekvenci jako ta v něm obsažená. Tak je buňka schopna zastavit přepis např. virového genomu do bílkovin, čímž zabrání množení viru.

stadiu, rezervoár viru se nachází v infikovaných lymfocytech rozestých především v krvi, centrální nervové soustavě, kostní dřeni a lymfoidní tkáni trávicího traktu. Tyto buňky dokážou přežít celá desetiletí, jsou rezistentní k antiretroviróvé terapii a při jejím přerušení se stávají zdrojem pro opětovný rozvoj infekce (viz také v Živě 2015, 3: 101–104).

Jeden ze způsobů, jak tyto rezervoárové buňky zahubit, spočívá právě v editaci virových genů (provirů) obsažených v jejich genomech. Metoda CRISPR-Cas9 má přitom výhodu, že je schopná jak degradovat provirovou DNA, tak přerušit buněčné geny potřebné pro virovou infekci. Pilotní pokusy ukázaly, že CRISPR-Cas9 skutečně dokáže vystříhnout (excize) HIV provirus z genomů různých typů buněk, včetně infi-

kovaných lymfocytů (obr. 2). Excizní systém lze přitom zaměřit na sekvence ohraničující provirus v buněčném genomu (LTR U3 oblasti) a jejich přerušením tak odstranit celý virový genom (Liao a kol. 2015).

Při soustavné produkci konkrétního systému CRISPR-Cas9 mohou být dokonce buňky před další infekcí aktivně chráněny. Tento přístup by nicméně vyžadoval dlouhodobou expresi genů systému CRISPR-Cas9, což je samo o sobě problematické. Nevíme ani, jak by na produkci takových cizorodých bílkovin reagoval náš imunitní systém. Navíc se ukazuje, že virus HIV dokáže překonat i tuto nástrahu. Zároveň s léčebným efektem CRISPR-Cas9 máme již popisovány únikové varianty viru rezistentní vůči štěpení tímto enzymem (Wang a kol. 2016).

Editace lidských embryí

Pokusy editovat lidská embrya už také probíhají. Nikoli však v Evropě, ani v Americe (i když zdejší kontrolní orgány de facto tyto pokusy za určitých podmínek posvětily), ale v Asii. Není se co divit, tamní legislativa je v mnoha směrech benevolentnější než naše a řada průlomových pokusů používajících kmenové buňky nebo úpravy lidských genomů se odehrává právě tam. Vůbec první pokusy s úpravou lidských genomů se uskutečnily již v r. 2015 na univerzitě v čínském Kantonu. V tomto případě vědci zkoušeli editovat vadná triploidní embrya (3PN, tedy vznikající z triploidní zygoty – zárodky, který mají více než dvě sady genů). Editace se povedla, její účinnost byla ale velmi malá (asi 10 %) a zároveň vznikla v embryích spousta poškození, jež se však nedala jednoznačně připsat úpravám pomocí CRISPR-Cas. Samotný triploidní genom těchto embryí totiž mohl být zdrojem některých poruch (Liang a kol. 2015). Autoři nicméně prokázali, že takový zákrok na lidských embryích je možný. Zřejmě i díky tomu dostali příležitost otestovat genomové úpravy na normálních diploidních embryích, vytvořených z vajíček a spermii získávaných za účelem *in vitro* oplodnění (jejichž dárce s takovým použitím souhlasili). Výsledky jejich práce nedávno přinesl časopis Molekulární genetika a genomika (Tang a kol. 2017). Vědcům se v ní podařilo injektčně vpravit CRISPR-Cas9 do jednobuněčných lidských zygot a jejich pomocí upravit bodové mutace dvou genů. Účinnost

zásahů se v této studii posunula pro jeden z upravovaných genů (pro hemoglobino-ovou beta podjednotku) až na 50 %, jakkoli toto číslo asi nemůžeme brát jako statisticky relevantní – do studie bylo totiž zařazeno pouze 10 zygot, z nichž navíc jen polovina nesla mutaci, kterou bylo třeba opravit. Druhý modifikovaný gen (pro glukóza-6-fosfát dehydrogenázu) patřil k souboru genů vázaných na chromozom X. U něj se úspěšnost editace posunula dokonce na neuvěřitelných 100 %, finálně však byla do pokusu zahrnuta jen dvě embrya. Podobně jako v případě 3PN embryí i tady jedno skončilo jako mozaika – v dalším vývoji obsahovalo směs editovaných a needitovaných buněk. To je jistě hodně nepřijemné, protože v tomto stadiu nemůžeme předvídat další osud jednotlivých buněk a jedinec vzniklý z takového embrya by představoval směs buněk opravených a neopravených, přičemž některé orgány by se mohly skládat jen z buněk neopravených a naopak. Nakolik by to ohrozilo funkčnost a soudržnost celého organismu, je otázka, a výsledek by se zřejmě lišil mezi jedinci v závislosti na míře mozaikovitosti a konkrétním buněčném složení jednotlivých orgánů. Z tohoto důvodu zatím autoři studie použití popsané metody v reprodukční medicíně důrazně nedoporučují a apelují na nutnost dalších výzkumů s větším množstvím materiálu, aby bylo možné metodu řádně statisticky vyhodnotit. Pokusy podobného charakteru v sobě skrývají navíc i řadu etických otázek, včetně diskuze zda a jak vůbec tyto výsledky publikovat (Hohmann 2017), což názorně dokládá potřeba editora výše zmíněného časopisu se k publikování článku obsáhle vyjádřit.

Mezidruhové chiméry jako transplantační banky

Jedním z posledních článků, které vzbudily senzaci nejen ve vědeckém světě, je práce laboratoře Juana C. I. Belmonta v Salk Institute for Biological Studies v Kalifornii, v níž autoři popsali chimérické organismy vytvořené právě pomocí CRISPR-Cas9 (Wu a kol. 2017). V tomto případě vědci vplnili v embryích geny potřebné pro vývoj některých orgánů (a to u různých druhů savců, konkrétně myši a prasat). Následně do embryí vpravili kmenové buňky jiného savce, které uprázdňené místo obsadily. Vznikla tak chimérická zvířata, u nichž část orgánů pocházela z jiného živočišného druhu. U myši s potkaními orgány byly výsledky celkem přesvědčivé. Horší to bylo s prasaty, která měla nosit lidské orgány. Nakonec se lidských buněk totiž nacházelo v prasatech velmi málo, o celých orgánech se nedá vůbec mluvit. I tak ale výzkum ukazuje možnou cestu k získání většího množství orgánů pro lidské transplantace, kterých se v současnosti žalostně nedostává.

Další způsob jak umravnit geny – iRNA

Objev CRISPR-Cas9 a raketový nástup jeho využití v molekulární biologii poslední dobou mírně zastínil další možnost jak ovlivnit genovou expresi – RNA interferenci (RNAi, viz obr. 5 a zmíněný článek na str. XLVII kulové přílohy nebo např. Živa 2004, 3: 98–101 a 2008, 6: 243–246). Princip obou metod je v zásadě podobný. Zatímco

ale CRISPR-Cas9 funguje na genové úrovni, RNAi se uplatňuje spíše na úrovni trans-lace – překladu RNA do bílkovin. V tomto případě buňka reaguje na přítomnost dvouřetězcové RNA v cytoplazmě. To spustí řadu reakcí, jejichž důsledkem je likvidace nebo alespoň omezení funkce mediátorové RNA (mRNA) o stejné sekvenci. Pomocí RNAi lze účinně umlčovat genovou expresi v buňkách. Samotné úpravy genomu, na rozdíl od CRISPR-Cas9, ale tak snadno možné nejsou. Nicméně i tato technologie skýtá zajímavé aplikace. Oproti předchozímu editačnímu systému je také poněkud jednodušší doručit tento systém do buněk, do nichž v zásadě stačí vpravit dvouřetězcovou RNA. To lze udělat pomocí různých nosičů – mezi nejčastější patří malé lipofilní částice (lipozomy) různého složení. Protože metoda RNAi je známa déle než metoda CRISPR-Cas9, máme k dispozici větší množství dat z klinických studií.

Zástava růstu nádorů

Takovou klinickou studií je např. testování terapeutických účinků interferujících RNA podávaných právě ve formě lipozomů pacientům s pokročilými ohraničenými nádory. V tomto konkrétním případě má RNAi zabránit rozvoji cévního zásobování tumoru (obr. 6), interferující molekula je namířena přímo proti proteinkináze vystylající cévy; Schultheis a kol. 2014). Zatím z publikovaných výsledků vyplývá, že pacienti přijímali léčbu dobře, bez vedlejších příznaků a zhruba u poloviny z nich vedla (alespoň dočasně) k zastavení postupu nádoru. Právě bezpečnost léků je aspekt, který hraje v prvních fázích klinických studií nejdůležitější roli a bude zásadní i pro jejich další postup. Proto se na ni zaměřuje většina publikovaných studií. Rozhodující je přitom konkrétní způsob dopravy terapeutika do buněk. Dopravní systém totiž musí být dostatečně spolehlivý, aby donesl svůj náklad, a zároveň musí procházet tělem pokud možno nepovšimnut imunitním systémem. Imunitní reakce proti nosiči by znamenala, že nebude moci být opětovně použit, a navíc by mohla značně zkomplikovat léčbu.

Biologická zbraň proti komárům

Jednou z dalších zajímavých možností pro uplatnění řízeného umlčování genů je aktivní boj proti hmyzím přenašečům onemocnění. V současné době se testují nej-

různější způsoby, jak vyřadit důležité geny, které se podílejí na přenosu onemocnění či přímo na rozmnožování přenašeče. Nejčastějším cílem těchto snah se stali komáři, odpovědní za přenos mnoha nepříjemných virů, v neposlední řadě mediálně známého viru Zika. Aplikace interferující RNA je přitom velmi jednoduchá. Stačí patřičné množství RNA vyrobit v bakteriích a potom přidat do vody, v níž se vyvíjejí komáři larvy. Účinnost uvedeného postupu pro zástavu vývoje larev dosahovala v různých studiích až 95 %. Variantou je vytvořit hmyzí virus, který v sobě ponese potřebné interferenční sekvence. V obou případech můžeme zároveň modifikovat metodu podání tak, aby doba působení interferujících látek byla časově omezená, čímž bychom se měli vyhnout dlouhodobým zásahům do ekosystému. Kromě toho představuje účinnější a šetrnější způsob regulace než plošné postřiky insekticidy.

Budoucnost v RNA barvách

Od objevu obou zmíněných metod úpravy genů a jejich exprese uplynula zatím relativně krátká doba. Nobelova cena za RNA interferenci byla udělena v r. 2006, objevitelky CRISPR-Cas9 a jeho využití pravděpodobně tuto cenu také obdrží. Význam obou technologií v základním i aplikovaném výzkumu ale švédské akademiky udělující toto ocenění předbývá a ukazuje zásadní přínos obou objevů pro molekulární biologii. Jen počet článků s tematikou CRISPR-Cas9 evidovaných v americké vědní databázi PubMed vzrostl mezi lety 2013–16 desítkrát. Oba objevy tak jednoznačně otevřely dveře biotechnologickým postupům, které dosud byly možné jen s obtížemi a na laboratorní úrovni. Jak dokážeme tyto možnosti uchopit a využít, už zůstává na nás.

Seznam použité literatury najdete na webové stránce Živa.

6 Vznik nových cév zásobujících rostoucí nádor. Aby mohl nádor růst, jeho buňky potřebují množství živin a kyslíku. Toto zásobení mu zajišťuje nově vzniklé cévní řečiště, které se uvnitř nádoru a v jeho okolí vytváří pod vlivem hormonálního působení nádorových buněk. Podle různých zdrojů kreslila M. Chumchalová (obr. 1–3 a 5–6)

