

# Bakteriální editační systém ve službách biologie

S rozvojem molekulární biologie a genetiky se naše chápání biologie v mnohém proměnilo. Jedním ze zásadních zvrátů v moderních dějinách oboru je naše schopnost rychle a efektivně sekvenovat genomy libovolných organismů, včetně člověka. Díky sekvenačním a bioinformatickým metodám se podařilo odhalit podstatu mnohých onemocnění spjatých s nějakou formou mutace genů. V některých případech je však frustrující nemožnost takové onemocnění vyléčit. Jde o dědičné choroby se špatnou prognózou, jako je cystická fibróza, svalová dystrofie nebo těžká kombinovaná imunodeficiencie vázaná na chromozom X. U těchto onemocnění dokážeme určit diagnózu již v raném věku pacientů, neumíme je však vyléčit. „Jednoduchou“ cestou by přitom bylo „opravit“ poškozený, mutovaný gen, kde může být chyba jen v jedné bázi, jediném „písmenu“ DNA. Na první pohled jednoduchý úkol, ve skutečnosti ale spíše trnitá cesta lemovaná střídavě úspěchy a vážnými komplikacemi. Rýsuje se v dohledné době řešení? Možná že ano – a pochází z bakterií. CRISPR-Cas9 je enzymatický bakteriální systém, schopný vyhledávat úseky v DNA na základě jejich sekvenční podobnosti se specifickou RNA, která s tímto úsekem asociuje. Tyto sekvence DNA jsou pak štěpeny mechanismem RNA interference. Vědci již CRISPR-Cas9 dokázali upravit tak, aby bylo možno degradovanou DNA nahradit novým úsekem s pozměněnou sekvencí. Tyto poznatky otevírají cesty mnoha potenciálním terapeutickým využitím (blíže na str. 70–72).

## Retroviróvé zklamání

Jedním z nejnádějnějších způsobů úpravy lidského genomu se dlouho jevíly retroviry. Ovládají totiž mechanismus, jak začlenit své geny do genomu hostitelských buněk. Díky unikátním promotorům (oblastem rozhodujícím o způsobu transkripce) navíc dokáže vložená DNA přinutit buňku k přepisu genů, které obsahuje. Pokud jde o strukturní geny, hostitelská buňka z nich nakonec vyrábí příslušné bílkoviny. Retroviry jsou tedy schopny přinutit buňku, aby se stala továrnou na virové bílkoviny, a to i na velmi dlouhou dobu (např. Živa 2015, 3: 101–104; 2006, 6: 242–244 a 1: 6–8). Kdybychom ale vyměnili virové geny za geny podle našeho výběru – např. „léčebné“ v případě geneticky podmíněných onemocnění, retrovirus by mohl pracovat pro nás.

Přesně o to se pokusil francouzský tým vedený Marinou Cavazzana-Calvo (2000). Pacientům s kombinovanou imunodeficiencí odebrali krvinky, které infikovali upraveným retrovirem, a poté, co se ujistili, že produkují žádanou bílkovinu s léčivým účinkem, krvinky vrátili. Zažili fenomenální úspěch. Terapie fungovala. Bohužel po 30 měsících se u některých pacientů projevila leukémie, která byla zřejmě vedlejším produktem léčby (Fischer a kol. 2003). Klinická studie byla zastavena.

## RNA interference – vypínání genů

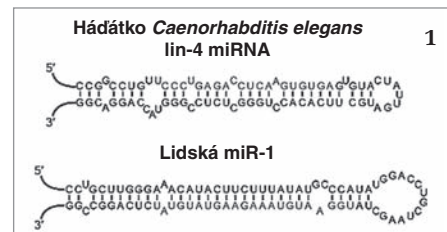
V r. 2006 se Nobelova cena za fyziologii a medicínu rozdělila mezi dva americké vědce, Andrewa Z. Firea a Craiga C. Mella.

Jejich objev vypadal původně jako něco velmi bizarního, ale ukázal se být jedním ze zásadních mechanismů ovlivňujících expresi genů u nejrůznějších organismů. Vše začalo, když pozorovali háďátka *Caenorhabditis elegans*, do něhož předtím vpravili dvojřetězec RNA (double stranded, dsRNA) sekvenčně odpovídající genu pro svalové proteiny. Háďátka, která mají tento gen poškozený, vykazují škubavé pohyby. Stejně se chovala i pokusná háďátka, do nichž byla aplikována dsRNA. Jejich geny byly ale prokazatelně v pořádku. Kde se stala chyba?

Další pokusy ukázaly, že k žádnému nedošlo. Naopak. Oba vědci objevili další způsob, jak buňky regulují vznik bílkovin.

## • Jak funguje?

Předlohu pro bílkoviny v buňkách představují jednotlivé geny, tedy konkrétní úseky DNA. Ty jsou kopírovány do mediátorové RNA (mRNA), která je překládána (translatována) do bílkovin s pomocí ribozomového aparátu. Tento proces může být (a je) regulován na všech svých úrovních, a to mnoha způsoby. Mezi ně patří právě jev popsany Firem a Mellem – RNA interference (obr. 2). Dochází k ní na úrovni translace mRNA a zakládá se na rozeznání dsRNA. Z hlediska buněk jde o poněkud zvláštní molekulu. Všechny buněčné RNA fungují v jednořetězcové podobě, i když někdy tento jeden řetězec může být tak trochu zamotaný sám do sebe (např. u transferové RNA, tRNA). Dva řetězce RNA



1 MicroRNA je typ jednovláknové RNA, jež díky své sekvenci vytváří útvary nazývané vlásenky (anglicky hairspin).

jsou ale pro buňku nezvyklé, resp. fungují v podstatě jako signál nebezpečí, jelikož výskyt dsRNA může znamenat napadení virem. Viry jsou totiž jediné známé biologické entity, které mohou mít dědičnou informaci uloženou právě v RNA. Jakmile se v cytoplazmě buňky vyskytne dsRNA, buňka ji ihned rozezná díky bílkovině Dicer. Jde o enzym, který dsRNA rozštěpí na kratší dvouřetězcové úseky a ty jsou následně použity bílkovinným komplexem RISC (RNA-Induced Silencing Complex). RISC, tvořený komplexem několika bílkovin a molekuly RNA, s jejich pomocí vyhledá a „uloží“ všechny RNA obsahující stejnou sekvenci nukleotidů. Takto identifikované RNA jsou pak buď rozštěpeny, nebo je alespoň zastavena veškerá jejich translace. Tímto elegantním způsobem dokáže buňka zastavit přepis virového genomu do bílkovin a zabránit množení viru.

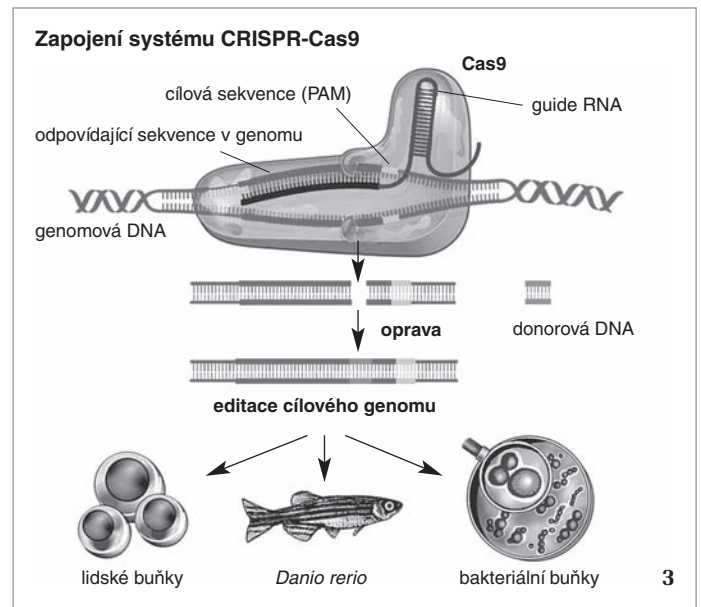
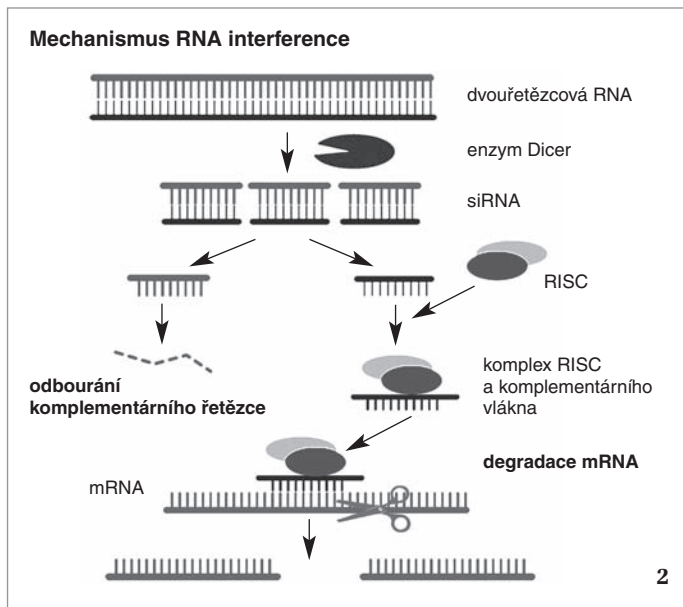
Ale tím úloha RNA interference v buněčném světě zdaleka nekončí. Jde zřejmě o evolučně velmi starý mechanismus a jak buňky, tak viry, proti nimž byl původně namířen, měly spoustu času ho dále využít.

## • Jak si pohrát s expresí?

Poměrně brzy se ukázalo, že buňky umějí pomocí RNA interference ovládat nejen virovou, ale také vlastní mRNA. V buněčném genomu jsou kódovány malé RNA (microRNA, miRNA), z nichž nejsou vyráběny bílkoviny a vyznačují se zvláštní vlásenkovou strukturou (obr. 1). Díky ní mohou „předstírat“, že jsou dvouřetězcovou RNA. Na základě struktury je rozeznává enzym Dicer a následuje stejný postup jako u virových RNA. Výsledkem je zmaření překladu mRNA o určité sekvenci. Proč potřebuje buňka likvidovat vlastní RNA?

Zapojení tohoto mechanismu nacházíme např. u vícebuněčných živočichů, kdy je nutné reagovat na vývojové signály a přesně regulovat tvorbu bílkovin ve vyvíjejících se buněčných typech. Na druhou stranu ne u všech eukaryot funguje RNA interference stejně. Zatímco u rostlin jde o perfektně sehraný mechanismus, u živočichů je mnohem variabilnější a jeho aktivity spíše než ke štěpení mRNA vede k jejímu umlčení. Navíc existují organismy jako někteří prvoci (*Leishmania* nebo *Trypanozoma*) či houby (např. kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*), které RNA interference nevyužívají vůbec a ani nemají potřebný enzymový aparát. Co je příčinou, zatím nevíme.

Buňky ale nejsou jediné, které všestranně využívají RNA interference. V r. 2004 se objevila první zpráva o miRNA kódované virem (Pfeffer a kol. 2004). Jakmile se vědci



na tento fenomén zaměřili, virové miRNA se začaly „rojit“ jako houby po dešti. Virům tento mechanismus slouží dvojím způsobem. Jednak v boji proti hostitelským buňkám, kterým pomocí RNAi „vypínají“ výrobu bílkovin zodpovědných za protivirovou obranu, mimo to regulují výrobu vlastních bílkovin. I viry se někdy chtějí nenápadně schovat a předstírat, že v buňce vůbec nejsou. Např. herpes viry způsobují opar. Mezi jednotlivými akutními výskyty (tedy v období, které vnímáme jako onemocnění) se skrývají v nervových buňkách a nevytvářejí žádné nové virové bílkoviny. Některé z nich k tomu používají právě miRNA.

### ● Jak toho využít?

Popsaný mechanismus umlčování genů, resp. jejich produktů, je pro nás samozřejmě zajímavý. A to jak z hlediska vědeckého experimentování, tak případného uplatnění v medicíně.

Příkladem terapeutického využití může být např. léčba degenerativní slepoty, kterou způsobuje degenerace sítnice v důsledku nadměrného růstu krevních kapilár. Za růst kapilár odpovídá bílkovinný vaskulární endoteliální růstový faktor (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF). Právě proti této bílkovině, resp. její mRNA, je namířena léčebná miRNA, která by se pacientům vpravovala přímo do oka. Tento inovativní způsob léčby v současnosti prochází klinickými zkouškami. Pokud by uspěly, otevírá se možnost léčit nejen problémy se zrakem, ale snad i některá nádorová onemocnění. Nádorové novotvary totiž silně závisí na přísunu živin, které jsou do nich pumpovány krví. Potřebují tedy také množství nových cév, jež nádor prorostou a zásobí. Za vznik nádorových krevních řečišť je přítom odpovědný i růstový faktor VEGF.

Podobně by se dalo mechanismu RNA interference využít třeba při boji s HIV a dalšími viry.

### CRISPR-Cas: lekce od bakterií

Další přelomový objev přineslo zkoumání imunity bakterií. Na rozdíl od člověka, kterého evoluce vybavila komplexním imunitním systémem, je imunitní systém

bakterií jednodušší, ale elegantní a funkční. Na jeho objevu se podílely Jennifer Doudna z Howard Hughes Medical Institute (Maryland, USA) a Emmanuelle Charpentierová, v současnosti ředitelka Max Planckova institutu pro infekční biologii v Berlíně (Jinek a kol. 2012). Mimo jiné jde o příklad vzorné vědecké spolupráce. Na tématu původně pracovaly každá zvlášť, ale když zjistily, že se zabývají stejným problémem, spojily se a výsledky publikovaly společně. Jejich objev byl tak převratný, že jsou nyní – také společně – pokládány za kandidátky na Nobelovu cenu.

Jak bylo řečeno výše, systém CRISPR-Cas představuje imunitní systém bakterií, který tyto prokaryotní organismy vyvinuly na obranu zejména proti virům bakterií, bakteriofágům (obr. 4). Systém se v průběhu života bakterie mění podle toho, jakými viry je infikována. Můžeme tedy mluvit o systému získané (adaptivní) imunity – a to u organismů, u nichž bychom donedávna žádnou imunitu nehledali.

### ● Jak funguje?

CRISPR je zkratka anglického Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (palindrom je sekvence, která má při čtení z obou stran stejný smysl, pořadí nukleotidů), v překladu úseky s nahromaděnými pravidelně rozmístěnými krátkými repetitivy. Repetitivní se myslí opakování sekvencí nukleotidů, podobně jako se v textu opakuje vícekrát za sebou jedno slovo nebo věta, i když v případě DNA složené jen kombinováním čtyř písmen. Opakující se sekvence jsou přerušovány krátkými úseky (spacer DNA), jež mají naopak originální a neopakující se pořadí nukleotidů. Když se na repetitivní úseky podíváme blíže, zjistíme, že se jejich sekvence nápadně podobá sekvencím genomů konkrétních bakteriofágů. Odtud už je pouze krůček k poznání, že jde o úseky DNA virů, s nimiž se bakterie během života setkala. Pokud k setkání dojde znovu, díky unikátní spacerové (tj. původně virové) DNA rozpoznat a zneškodnit výše popsáním mechanismem RNA interference, za který zodpovídají nukleázy Cas. Tyto nukleázy přítom využívají dvou typů RNA, vznikajících

2 Schematické znázornění mechanismu RNA interference. Dvouřetězcová RNA je rozpoznána enzymem Dicer, který ji našťepí na menší fragmenty (small interfering RNA, siRNA), následně zpracované komplexem RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Tento komplex porovnává sekvenci siRNA a sekvence různých mediátorových RNA (mRNA) v buňce. Pokud najde shodu, odpovídající mRNA je degradována. Blíže v textu

3 Editace genomu – způsob, jakým lze upravovat genomy obratlovců pomocí CRISPR-Cas9 systému. Příslušná sekvence DNA je rozeznána enzymem Cas9, kterému je „podstrčena“ uměle vytvořená RNA (guide RNA) o zvolené sekvenci. Na základě sekvencí podobnosti guide RNA a genomové RNA potom Cas9 rozezná a vystříhne konkrétní vybranou část genu. Tato část (určitá sekvence) může být následně opravena za použití přidané donorové DNA.

kajících přepisem genomových sekvencí uložených přímo v genech pro CRISPR. Můžeme si to představit jako databázi s popisem virů (CRISPR, spacerová DNA). Když se virus znovu objeví, díky databázi je okamžitě nalezen a zneškodněn (Cas a RNA interference).

Tento obranný systém bakterií však lze poměrně snadno manipulovat pro naše potřeby. Pokud si pohrajeme s CRISPR sekvencemi, můžeme za cíl určit jakýkoli vybraný gen. Systém tak nebude napadat bakteriofágy, ale např. mutovaný, nefunkční gen *CFTR* odpovědný za vznik cystické fibrózy. O něco komplikovanější se zprvu zdálo zaměření (a upravení) cílového genu. Původně objevený systém totiž ke své funkci vyžaduje přítomnost několika enzymů. Brzy ale byly v bakteriích objeveny jednoduché verze CRISPR-Cas systému, kde vše zajišťuje jediný enzym Cas9. Stejně tak dvě RNA požadované pro funkci Cas se vědcům podařilo spojit do jediné funkční molekuly. Díky tomu jsme získali jednoduchý systém na vyhledávání a úpravu konkrétních genomových sekvencí, čímž se zároveň otevřela možnost úprav genomu. Cas9 udělá na námi vybraném místě



zlom v genomové DNA. Pro případ zlomu v DNA má však buňka připraveny opravné mechanismy, které pracují na principu rekombinace – jsou schopné na poškozené místo zařadit sekvenčně podobnou DNA. Pokud tedy Cas9 vybavíme RNA, která pomůže najít a označit náš gen (třeba *CFTR*), a zároveň podsuneme buňce „správnou“ DNA pro daný úsek, můžeme dosáhnout přepsání genetické informace ve vybraném úseku (Charpentierová a Doudna 2013; viz obr. 3). Přesně takový systém potřebujeme pro genomovou terapii.

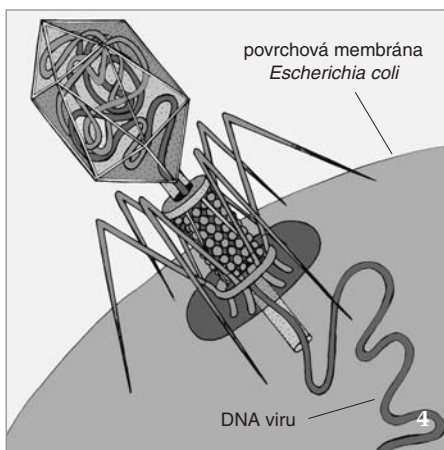
### Léčba pomocí editace genomů

První pokusy na tomto poli pak na sebe nenechaly dlouho čekat. Ke zřejmějším úspěchům s editováním savčích genomů patřila práce amerických vědců (Nelson a kol. 2016), kteří se pokusili vyléčit pomocí CRISPR-Cas technologie myši se závažně poškozeným genem způsobujícím Duchenneovu muskulární (svalovou) dystrofii (DMD). Jde o dědičnou lidskou onemocnění, spjaté s chromozomem X (postihuje pouze chlapce) s četností jednoho pacienta na 5 000 živě narozených chlapců. Příčinou je mutace DMD genu pro specifickou strukturální bílkovinu sarkolemý dystrofin. Nemocným postupně atrofuje svalová tkáň, svalová vlákna jsou nahrazena tukovými buňkami a vazivem, většinou se dožívají zhruba 30 let. Právě technologie genové terapie – úpravy genů v organismu – by mohly být pro ně spásou. Pokusy provedené na myších vynikají celkem nadějně. Vědci vložili patřičně upravený CRISPR-Cas do myši pomocí pozměněného adenovirového viru (vektor odvozený od viru, které jsou schopny se v organismu množit jen tehdy, pokud je jedinec infikován dalším virem – adenovirem), z něhož odstranili původní virové sekvence a nahradili je geny systému CRISPR-Cas. Jak dospělá, tak novorozená myši léčené tímto upraveným virem vykazovaly nárůst svalové hmoty a svalové síly.

Duchenneova muskulární dystrofie není jedinou vrozenou chorobou, která by mohla jít tímto způsobem napravit. Známý genetický základ mají i další nemoci, jako cystická fibróza, kombinovaná imunodeficiencie vázaná na chromozom X nebo náchylnost k některým typům nádorového bujení (např. rakovina prsu) atd.

Jaká je naděje, že to, co fungovalo u myši, bude fungovat také u člověka? Zatím nevíme. Odpověď je možná blízko. První pokusy na lidských embryích již začaly, zatím existují dvě studie, obě z Asie.

Historicky první zpráva o použití genomového editoru CRISPR-Cas9 na lidských embryích je dokonce ještě starší než výše zmínovaná studie myši se svalovou dystrofií. Tento experiment uskutečnila skupina kolem Jinjiu Huanga ze Sunjatsenovy univerzity v čínském Kantonu (Liang a kol. 2015). Pro editaci si vybrali neživotaschopná embrya, vajíčka oplodněná dvěma spermii, která obsahovala tři sady chromozomů. Pomocí CRISPR-Cas9 v nich pak editovali gen pro bílkovinnou podjednotku hemoglobinu beta, jejíž mutace způsobují beta-talasemii. Výsledky byly úspěchem jen zčásti. Jakkoli se některá embrya podařilo upravit, úspěšnost zdaleka nebyla stoprocentní. Navíc v některých pří-



4 Virus – bakteriofág po nasednutí na povrch bakterie *Escherichia coli* do ní injikuje svou DNA. Jde o jeden z mnoha bakteriálních virů, tento patří mezi tzv. T sude bakteriofágy, jejichž DNA často nacházíme v sekvencích CRISPR. Všechny obr. podle různých zdrojů kreslila M. Chumchalová

padech vznikly i jiné nežádoucí mutace, které vědci vysvětlují nechtěnou účastí dalších genů pro hemoglobin v editačním procesu. Svou roli mohla sehrát i skutečnost, že embrya byla triploidní. Pokus tedy ukázal, že editace je možná, ale musíme být opatrní a než začneme léčit první pacienty, čeká nás ještě dlouhá cesta.

Dalším experimentem byl pokus využít CRISPR-Cas9 v léčbě rakoviny. Klinická studie zaměřená na pacienty s rakovinou plic probíhá v Západočínské nemocnici (Su a kol. 2016). Navrhovaná léčba spočívá v odebrání bílých krvinek (konkrétně T lymfocytů) pacientům s nádorem. Tyto buňky poté ve zkumavce upravují pomocí CRISPR-Cas9 tak, že jim „vypnou“ gen pro PD-1, což je regulátor imunitního systému, který u zdravých jedinců zabraňuje nežádoucí imunitní reakci. U pacientů s rakovinou ale brání imunitnímu systému v boji s nádorovými buňkami. „Vypnutím“ tohoto genu by tak mohly vzniknout „super“ T buňky, které si s nádorem poradí. Prvořadou otázkou nebyl ani tak úspěch léčby, jako především bezpečnost nasazení těchto „super“ buněk. První výsledky zatím vypadají slibně.

### Genom na objednávku?

Široké použití genové editace má ale své etické úskalí. Díky znalosti sekvence lidského genomu a postupující identifikaci mnoha genů už známe některé geny odpovědné za různé lidské vlastnosti. Mezi identifikované geny patří nejen ty odpovědné za onemocnění, ale i geny řídící vzhled, inteligenci, nadání a na druhé straně sklony k přejídání, agresivitě nebo alkoholismu. Zasáhnout jednoduchou úpravou do těchto genů by bylo pro mnohé jistě lákavé. Kontrola využití systému CRISPR-Cas ale nemusí být tak snadná jako v případě geneticky modifikovaných (GMO) rostlin nebo práce s kmenovými buňkami. Ostatně i v těchto oblastech se legislativa mezi jednotlivými státy světa liší a z čistě vědeckého hlediska mají země s mírnější regulací větší možnosti výzkumu a jeho aplikací. Jestliže se najde úspěšný způ-

sob, jak léčit smrtelná genetická onemocnění, těžko můžeme pacientům takovou léčbu upírat (nebo jim zabránit za léčbou cestovat). Pokud se tedy první výsledky potvrdí, čeká nás pravděpodobně genomová revoluce.

### Boj o patent

Ať už bude šíře uplatnění systému CRISPR-Cas v humánní medicíně jakákoli, komerční využití této technologie bude určitě obrovské. Nobelova cena, kterou zřejmě mohou očekávat dámy J. Doudna a E. Charpentierová, je nejvyšším vědeckým uznáním a nikdo nepochybuje, že si ho obě plně zaslouží. Spory ale vznikají kolem vlastnictví patentu. Není divu – zatímco totiž držitel Nobelovy ceny získá především prestiž, majitel patentových práv inkasuje peníze s nimi spojené. A to bude v tomto případě skutečné jmění.

Žaloba ohledně vlastnictví patentu na sebe také nenechala dlouho čekat. Pře nevznikla přímo mezi vědci, ale mezi institucemi, které je zaměstnávají. Oba věhlasné ústavy, kde badatelky pracují, se dostaly do sporu s Broad Institute, pracovištěm napojeným na Massachusetts Institute of Technology (MIT). Publikace obou vědkyň, v níž popsaly funkci systému CRISPR, vyšla v časopise Science v červnu 2012 (Jinek a kol.). Svou studii vypracovaly na organismech, z nichž CRISPR pochází, tedy na bakteriích. V květnu téhož roku podaly žádosti o udělení patentu, o několik měsíců později, v prosinci 2012, podal podobnou žádost Feng Zhang z Broad Institute. Na rozdíl od objevitelek systému CRISPR však F. Zhang dělal své testy na eukaryotech, tedy složitějších organismech, pro které není CRISPR ani přirozený. Navíc právě eukaryota budou pravděpodobným cílem většiny technologií spojených s CRISPR. Spor nyní rozhoduje soud v Alexandrii v americkém státě Virginie. Nechme tedy právníky obou stran uhořvat.

Ovlivnění exprese, ať už na úrovni DNA, nebo RNA, je bezpochyby jedním z nejdůležitějších nástrojů, který se nám díky molekulární biologii dostal do rukou. Možnost ovlivnit genomy živých organismů nás posouvá z role pozorovatelů přírody do role spolutvárců evoluce. Tato role je pro nás zcela nová a budeme se muset naučit s ní zacházet – nejen ve smyslu technickém, ale i etickém. Jisté je, že možnosti měnit organismy tímto způsobem, začneme během relativně krátké doby používat. Jestliže předcházející doba byla industriální a postindustriální nebo snad počítačová, nadchází jednoznačně éra biotechnologická. Máme-li na ni být připraveni, mělo by se povědomí o molekulárně-biologickém fungování buňky rozšířit ke všem uživatelům. Proto považují za nutné, aby podobná témata byla zařazována do výuky biologie, minimálně na gymnáziích, ale s určitým zjednodušením i na základních školách. Lze je zařadit k tématům jako Dědičnost, DNA, Proteiny či Vyjádření genetické informace.

Citovanou literaturu a odkaz na videa popisující funkci CRISPR-Cas najdete na webové stránce Živý.