



Změnou genů do doby Frankensteinů

Úpravou lidské DNA se některá onemocnění určitě léčit budou. Kdy to bude, ale nikdo neví. Rozhodně to nebude zítra

Nikdo nezná **opravdový potenciál metody CRISPR**. Její použití ve výzkumu je revoluční, v medicíně však velkou neznámou. Pozměnit pár genů v Petriho misce je jako vylézt na Říp. Vyléčit člověka s cystickou fibrózou je let na Mars. Každý lék je třeba dopravit na místo určení a minimalizovat jeho vedlejší účinky. Na tom, aby se to povedlo, pracují tisíce laboratoří, a to ani nevíme, co se děje mimo obrazovky.

LUKÁŠ ČERMÁK
molekulární biolog



B ylo-li první vejce, či slepice, už nebudí ze snu nikoho, kdo dával v muzeu pozor. Víme totiž, že vrabci v hrsti i holubi na střeše jsou opeření dinosaurů, kteří kladli vejce do svých hnízd miliony let před prvním zakdákáním. Otázkou je, kdo první zakdáká.

Poznání posloupnosti dějů umožňuje vytvořit mapu, dle níž se můžeme toulat historií života jako po Boubínském pralesi. Díky drobnému vlákně DNA, v němž se hromadí a cizeluje informace, dokážeme sledovat jednotlivé linie evoluce, která vytvořila cirkus života na Zemi. Od každého živého soupevníka, který s námi tento svět sdílí, se linie vine k jednomu ze tří praorganismů, předchůdců dnešních – archebakterií, bakterií či eukaryotů.

Archebakterie, pradávni mikrobi, kteří se dnes vznášejí kolem podmořských sopek či toulají po slaných pláních Starého a Nového světa. Bakterie, všudypřítomná a esenciální forma života, jež přinesla tuberkulózu i kyslík, a nakonec my eukaryoty, kteří jsme naoko souboj vyhráli – nebo si to aspoň myslíme. Všechny tyto formy si zkřížily cesty, vyměnily geny, v některých případech byl i zajat jeden organismus druhým, ale jejich originalita je nesporná a původnost neoddiskutovatelná.

Jako stavebnice Lego

Každý z těchto životů je definován svým ohraničením vůči okolí, schopností jíst a zvracet a spojuje DNA jako cíl k ukládání informací a jejich přenášení do dalších generací. Ne vždy tomu tak muselo být. Existuje teorie, jež staví na počátek její příbuznou – RNA – a má mnoho stoupenců. Jedním je Kanaďan Jack Szostak, který se narodil v Londýně v roce 1952.

Szostak si vybíral okrajová témata, u nichž vycítil důležitost a zásadnost. V roce 2009 byl společně s Elizabeth H. Blackburnovou a Carol W. Greiderovou oceněn Nobelovou cenou za objev enzymu telomerázy, který se stará o konce naší DNA. Ať telomerázu čistili, jak to šlo, vždy v ní zůstala komponenta, bez níž tato mašinka nefungovala – malá molekula RNA, ribonukleová kyselina.

Když se vědci poprvé podívali do nejkomplikovanější mašinky na světě, jež dle kódu v DNA vyrábí bílkoviny, zjistili, že uvnitř je zase RNA a že jsou to malé odchylky v ní mezi námi a bakteriemi, jež jsou cílem některých antibiotik. RNA totiž stojí v triangu životů uprostřed. Představíte-li si buňku jako stavebnici Lega, je DNA návod. Vaše dítě je ribozom schopný z malých základních kamenů-kostiček vytvořit Star Wars raketu. RNA jste vy.

Sedíte u návodu a snažíte se jeho komplikovanou strukturu převést do dětské řeči: tohle dej sem, tady to spoj, teď to za-

cvakni. RNA je messengerem, který přenáší informaci mezi zákonem (DNA) a exekutivou (bílkoviny). Některé RNA ale mají mnohem aktivnější roli, jako je tomu například u telomerázy, a zdá se, že právě ony mohou být pojítkem mezi námi a momentem zrodu života.

Zmíněný Szostak dokonce ve své laboratoři připravil RNA, jež se sama reprodukuje. Tak nějak si lze představit začátek života. Lego, jakmile ho dostavíte, začne stavět další samo sebe. O zbytek se postará evoluce a každá chyba bude souzena podle výhody, již přinese. RNA možná stojí na počátku všech našich tráblí a radostí. A také v centru jednoho z největších objevů, který biologie přinesla a jenž možná časem umožní vypořádat se s nepřízní osudu a měnit to, s čím jsme přišli na tento svět – naši DNA. Návod na použití a přežití, který dostáváme od svých rodičů.

Francisco Mojica

Historie CRISPR začíná na španělském středozemním pobřeží Costa Blanca, kde se nacházejí superslaná jezera, jež mají ty-

Kyselina ribonukleová, RNA, stojí v centru jednoho z největších objevů, který biologie přinesla, a možná časem umožní vypořádat se s osudem a měnit to, s čím jsme přišli na tento svět – naši DNA



pickou růžovou barvu – produkt prastarých mikroorganismů patřících do říše archebakterií. Jejich schopnost vyrovnat se s tímto extrémním prostředím upoutala pozornost mladého adepta biologie Franciska Mojiky. Ten vyrůstal u zmíněných slanisek a v roce 1989 se přihlásil na doktorand-



ILUSTRACE RICHARD CORTÉS

Takové komplexní sekvence sice mohou vzniknout náhodou, ale aby se jich vytvořilo několik za sebou, je i na náhodu příliš. Magie života někdy vytváří neuvěřitelné ornamenty, jež postrádají smysl nebo naplňují definici samoúčelnosti. Vlastnosti, které vznikají a jež svým nositelům dobře slouží, jsou ale předávány dál a konzervují se v manuálu života – DNA.

Bylo proto třeba zjistit, zda se podobné repetice nacházejí i v jiných organismech, což se potvrdilo. Mojica dokázal objev potvrdit v *Haloferax volcanii*, blízké příbuzné archebakterii z Mrtvého moře, a v relativně vzdáleném slanomilovi *Haloarcula hispanica*. Repetice nazval TREP (tandemové repetice).

V době juvenilního internetu bylo těžké zjistit, zda někdo pozoroval něco podobného. Titěrným procházením tisíců studií španělská skupina zjistila, že podobné repetice byly identifikovány ve dvou vzdálených bakteriích – v *Escherichii coli*, jíž máme plná střeva, a v *Mycobacterii tuberculosis*, potvoře, jež zabila Franze Kafku dřív, než to stihli v Osvětimi.

Obě skupiny pozorování zveřejnily jako vedlejší produkt. Mojica navíc zjistil, že repetice nejsou tichošlápkem, ale aktivní. To se projevilo tím, že stejné jako jiné geny byly překládány do RNA. Tim bylo stvrzeno, že TREP jsou prastaré kusy DNA, jsou aktivní a pravděpodobně budou hrát podstatnou roli v životě mikrobů. Mojica zveřejnil v roce 1995 svůj objev a odjel do Oxfordu. Tam příliš dlouho nevydržel a vrátil se na Univerzitu v Alicante, aby pokračoval, kde skončil.

Sekvence a repetice

Devadesátá léta byla odrazovým můstkem dalšího odvětví, které nadobro změnilo vnímání mikrosvěta. Obrovský technologický skok umožnil masivní sekvenování DNA, které vyvrcholilo na počátku nového tisíciletí přečtením lidského kódu. Funkce tajemných repetit, které Mojica v té době nazýval SRSR (short regularly spaced repeats, krátké pravidelně oddělené repetice), ale zůstávala tajemstvím. Důvodů, proč se nedařilo rozpoznat pravou funkci těchto sekvencí, bylo několik a ukazují nástrahy, jimž čelí mladý vědec na okraji vědeckého okraje.

Práce na archebakteriích žádnou grantovou komisi neoslbnila a ani Univerzita v Alicante nepovažovala investici do Mojikovy experimentální činnosti za neodkladnou. Bez financí a s minimální institucionální podporou bylo složité takové otázky řešit. Mojikova skupina se proto vydala levnější cestou zjišťování, kde všude se podobné sekvence nacházejí. Veřejně dostupné sekvence bakteriálních genomů byly ideálním prostorem a Mojica a jeho spolupracovníci se specializovali na prohledávání těchto Rosettských desk. Postupně byli schopni identifikovat podobné repetice u více než 20 bakterií a archebakterií.

Nebyli sami, i další skupiny se věnovaly prohledávání těchto dat. Jedna z nich se soustředila na tyto (jak je nazývala) přímé repetice a používala je k identifikaci mykobakterií. Zatímco repetice byly stále stejné, to mezi nimi se výrazně lišilo. Toho se dalo využít v diagnostice. Skupina si všimla podobnosti těchto a Mojikových repetit a kontaktovala ho ohledně názvu. Dohodli se na CRISPR (clustered regularly interspaced palindromic repeats, klastrované pravidelně opakované palindromické repetice).

Mojica později uvedl, že kdyby si tento název patentoval, mohl být miliardářem. Stejná skupina, jež ho kontaktovala, objevila blízko těchto repetit aktivní gen, který se zdál s repeticemi funkčně provázaný. Nazvala jej Cas (CRISPR-asociovaný). Kostky byly vrženy, hráči byli na hřišti, jen stále nebylo jasné, jaká hra se hraje.

Pokračování na straně 14

Změnou genů do doby Frankensteinů

Dokončení ze strany 13

Bakteriální paměť

Mojica, jehož laboratoř byla stále podfinancovaná, v roce 2003 otáčí list a místo repetice se soustřeďuje na to mezi nimi – krátké sekvence bez zřejmé podobnosti s čímkoli jiným. To se však mění s rostoucí databází genomů virů a bakterií. Nové prohlédávání těchto sekvencí otvírá nové dveře a navždy mění optiku genetiky. Krátká sekvence ze zmíněné bakterie E.coli byla totiž navlas podobná sekvenci z prapodivného parazita bakterií, takzvaného bakteriofága P1.

Tento bakteriální virus je jako vystříženy z matrixu. Vypadá jako geometricky dokonalá robotická chobotnička. Fág, jak se zkráceně tento virus nazývá, se pomocí chapadel připeňuje k bakterií a injekcí mezi nimi vstříkne do bakterie svou DNA. Ta ji namnoží ve svém nitru a podle této parazitické DNA vytvoří tisíce nových kopií těchto fágů. To vede k jejímu zániku, prasknutí a nakonec k vylití vytvořených fágů do okolí.

Mojiku fascinovalo, že daná bakterie byla z nějakého důvodu vůči tomuto fágu imunní. Prošel tedy tisíce podobných sekvencí a identifikoval desítky dalších, které pocházely z bakteriálních parazitů. Heuréka moment jako ze slabikáře. Okamžitě rozeznal, že se geny CRISPR musejí nějakým způsobem podílet na obraně bakterií vůči parazitům, respektive být součástí bakteriální paměti, která umožňuje být na pozoru před něčím, co už jednou udělalo trouble. Systém víceméně identicky očkování.

Jasná premisa

Legenda praví, že ráno po oslavě spojené s konzumací koňaku Mojica napsal článek a odeslal jej do první třídy – do časopisu Nature. Co by to ale bylo za objev, kdyby to šlo snadno. V Nature článek kvůli neobjevnosti odmítl. Dokonce jej ani neposlali posoudit jiným vědcům a editor sám se rozhodl pro tento krok.

Toto editorské harakiri se opakovalo v PNAS, Molecular Microbiology a Nucleic Acid Research. Všechno kvalitní časopisy, které si své idiotské rozhodnutí dávno nějak omluvily. Koneckonců i Kiplingovi vyčetli, že neumí anglicky, a celá historie se týká jen boje s ignoranty.

Frustrovaný Mojica poslal článek do okrajového časopisu Journal of Molecular Evolution, kde jej po intenzivním ročním skrutině vydali. O měsíc později zveřejnila podobné sdělení skupina z Francie, jež se soustředila na bakterie, jež způsobily morovou ránu v 60. letech ve Vietnamu. Další podobnou práci zveřejnil ruský emigrant Bolotin působící také ve Francii.

Všechny tři práce se shodovaly v jednom – sekvence CRISPR jsou „paměť“ bakterií na dávné genetické agrese. Základní ingredience CRISPR byly tedy objeveny. Mechanismus byl stále nejasný, ale premisa jasná byla – bakterie mají mechanismus, jak měnit svůj genom, a pokud něco takového umějí bakterie...

Do další části příběhu jako by zasáhlo alsaské vepřo knedlo zelo. Francouzský genetik Philippe Horvath, který se také významně zapsal do historie objevování CRISPR, se totiž věnoval bakteriím, jež se účastní fermentačního procesu při přípravě kysaného zelí. Po studiu začal pracovat ve firmě, která připravovala bakteriální kultury do jogurtů a podobných produktů (později se stala součástí korporace DuPont), a zabýval se kulturami bakterie Streptococcus thermophilus.

Horvath používal repetice CRISPR k rozpoznávání kmenů tohoto jogurtového koka a zanedlouho si podobně jako Mojica všiml, že mezery mezi repetice-mi odpovídají tomu, zda bakterie byly, nebo nebyly imunní vůči fágům. Společně s několika kolegy navrhl experiment a vyzkoušel tuto hypotézu.

Nalili fágy na kmen bakterie, který tím téměř celý pozabíjeli. Horvath pak u převážích přečetl sekvence CRISPR a zjistil, že obsahují sekvence totožnou s fágy, jejichž útok přežily. To byl přímý důkaz, jak CRISPR funguje. Bakterie si vzala kousíček fágové DNA a zakomponovala jej do své DNA. To jí pak sloužilo k tomu, aby se fága efektivně zbavila.

Začátek precizního hrani

Jedna věc je šelmu znát, druhá ji zkrotit. Milión let lidstvu trvalo, než vlka podrobilo, a teď je z něho „pekiňák“. Systém se nezdál složitý. Do hry vstupují velcí hráči a velká očekávání. Litevský biochemik Virginijus Šikšnys se o CRISPR za-

čal zajímat v roce 2007 v návaznosti na Horvathovy objevy a jeho jogurtové bakterie. Šikšnysovi se podařilo přenést systém ze streptokoka do E.coli, do prostoru, kde jsou molekulární biologové doma a kde funguje všechno jejich nádobíčko.

Spolu se systémem se E.coli stala imunní vůči některým virům, což Šikšnysovi umožnilo studovat jednu komponentu po druhé a identifikovat hlavní DNA, nůžky systému – enzym Cas9. Objev byl na světě, článek napsán a poslán do časopisu PNAS v květnu 2012. Za měsíc posílají podobný článek do Science dvě vedlé dámy mikrobiologie – Jennifer Doudnová a Emmanuelle Charpentierová.

Časopis Science vycítil velkou věc a zrychlil proces natolik, že článek byl na světě v červenci. Díky triku, který vymyslel hlavní autor článku český strukturální biolog Martin Jínek, se systém výrazně zjednodušil a jeho aplikační možnosti rozšířily. Tým Doudnové totiž objevil, že v centru štěpící mašinky je takzvaná průvodcovská RNA, která se jako lepidlo váže na repetici CRISPR. To, co následuje za repetici CRISPR, pak mašinku navede k cílové DNA, která je rozštížena.

Jínek měl geniální nápad obě tyto RNA (průvodcovskou a CRISPR) spojit, a tím systém zjednodušit a zefektivnit. Šikšnysův článek, kterému se nedostalo podobného pochopení, vyšel až koncem roku – s křížkem po funusu. Jak Jínek, tak Šikšnysův článek se však soustřeďují na bakteriální prostředí.

Vyvrcholení přichází o několik měsíců později, kdy záračné dítě molekulární biologie Feng Zhang z Broadova institutu při Massachusettském technologickém institutu a génius z Harvardu George Church publikují články, podle nichž lze celý systém přenést do lidských buněk a začít si s naší DNA precizně hrát. Revoluce mohla začít.

Díky CRISPR metodě lze geny podle libosti měnit, mutovat či napodobovat jejich formy, jež způsobují nemoci. Konečným cílem je změna DNA v dospělých organismech nebo alespoň v embryích.



Nežádoucí vedlejší účinky

Nikdo nezná potenciál metody CRISPR. Její použití ve výzkumu je však revoluční. Příprava myši, jež postrádají určitý gen, se z několika let smrškla na několik měsíců. Geny se nemusejí jen vypínat, ale podle libosti měnit, mutovat či napodobovat jejich formy, jež způsobují nemoci. Konečným cílem je změna DNA v dospělých organismech, nebo alespoň v embryích – vstup do doby Frankensteinů. Hlavní problémy na této cestě jsou v podstatě dva – preciznost a zacílenost.

Vzít buňky a dát do nich CRISPR je jako vylézt na Říp. Vyléčit člověka s cystickou fibrózou je let na Mars. V tuto chvíli je asi největší potenciál CRISPR v laboratořích, ale nevíme, co se děje mimo obrazovku. Doudnovou překvapilo, když jejího doktoranda oslovila podnikatelka, která se ho snažila zlákat do firmy vyrábějící miminka CRISPR na míru.

To je zatím nesmysl, a to jak technologicky, tak v legálním smyslu. Nikdo neví, jak metodu použít, aby na sto procent nepřenesla nežádoucí vedlejší účinky.

Na začátku letošního června vyšel článek, který celkem důvěryhodně ukázal, že použití metody CRISPR může vést k aktivaci protirakovinné bílkoviny p53. Závěr, možná trochu přehnaný, zní, že metoda CRISPR může vést k nechtěné selekci buněk, které p53 nemají, a tím zvyšovat riziko rakoviny.

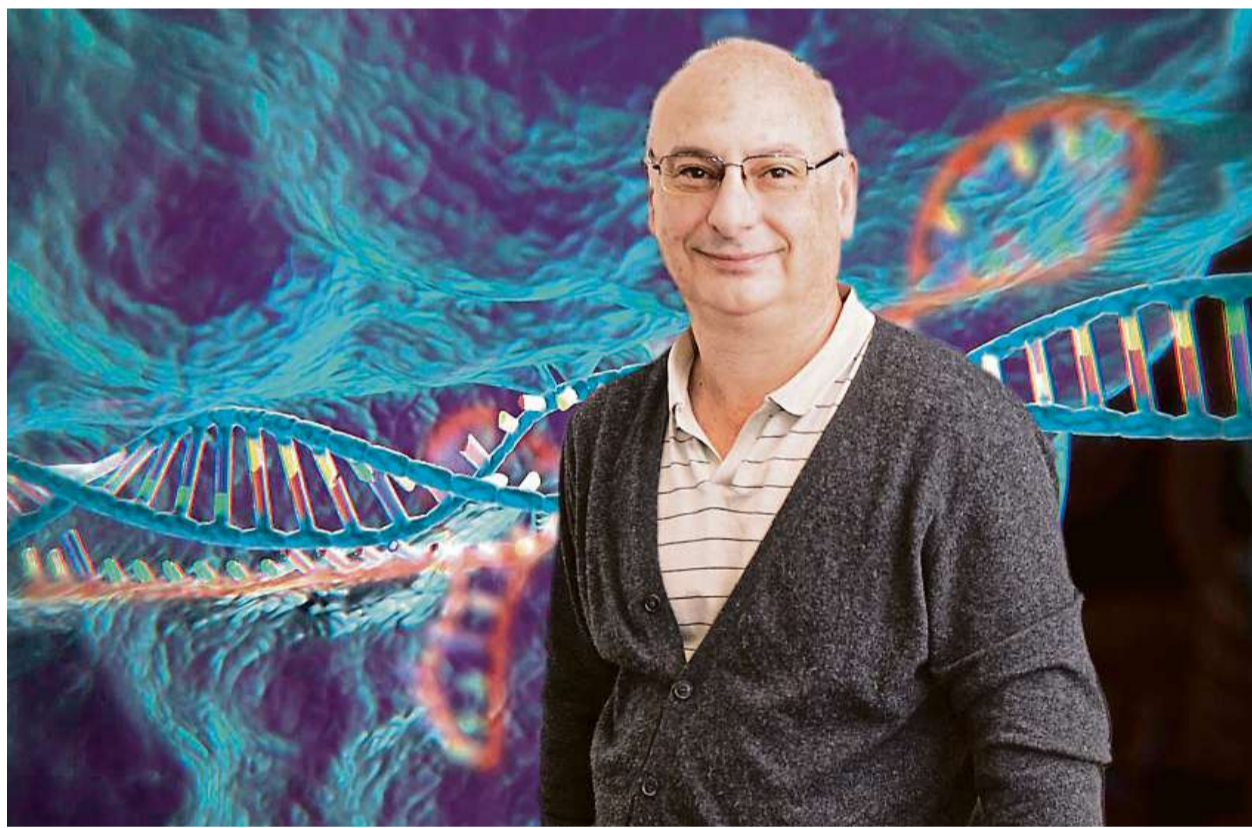
Je to trochu hyperbolické, ale opatrnosti není nikdy dost. Reakce trhu na tuto zprávu naznačila, jak opatrné je očekávání. Akcie švýcarské firmy CRISPR Therapeutics, která se připravovala zahájit klinické studie, se totiž okamžitě propadly. Je třeba říct, že podobný článek, který vyšel minulý rok, byl stažen, a že se akcie po počátečním propadu ustálily.

Experimenty

CRISPR se také nehodí na všechny typy genetických onemocnění. V současnosti probíhají experimenty na opicích, kterým se snaží pomocí CRISPR aktivovat určité geny. Cílem je navodit přirozenou anomálii, která pomáhá lidem se srpkovitou anémií nebo beta-talasémií. Obě tyto vrozené poruchy se týkají červených krvinek a tvorby hemoglobinu.

Představa je, že se izolují kmenové buňky těchto krvinek a pomocí CRISPR se v nich vypne určitý gen (BCL11A). To povede k aktivaci speciálního dětského hemoglobinu, který by nahradil zděděný defekt. Takové buňky by se vrátily do pacienta. Kromě toho jsou rozběhlé i další programy a některé mají ambiciózní cíle.

Například firma Editas Medicine cílí na vrozenou slepotu. Léčbou aplikovanou přímo do oka byl tým Charlese Albrighta schopný opravit mutaci v deseti procentech buněk síťnice pokusných opic. To by nestačilo, aby člověk s takovou chorobou začal normálně vidět, ale viděl by „přiměřeně dobře“ a možná by mohl žít nezávisleji.



Objevitel. CRISPR – štípačky na DNA – byl objeven i bez španělského mikrobiologa Franciska Mojiky, ale to se nestalo.

FOTO REUTERS



Další možnosti. Tým americké biochemičky Jennifer Doudnové zjistil, že v centru štěpící mašinky je průvodcovská RNA.

FOTO REUTERS

Jistý optimismus přinesl článek pensylvánské skupiny, již se podařilo „dopravit“ CRISPR neškodným virem do velkého počtu jaterních buněk makaka. CRISPR byl naprogramován, aby odstranil gen odpovědný za hladinu cholesterolu. Výsledky byly víc než skvělé. CRISPR sice občas stříhl vedle, ale makakům se výrazně snížil cholesterol, což je skvělá zpráva pro boj s ischemickými chorobami, jako je mozková mrtvice či infarkt.

Americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA), který všechny podobné experimenty na lidech musí schválit, však stále o metodě pochybuje a vyhlásil dočasné moratorium. To vedlo k dalšímu pádu akcií a další jejich stabilizaci.

Všechny firmy soustřeďující se na CRISPR zakládají svůj výzkum (a investice) na základním principu – do buněk musíte vložit dvě komponenty, enzym Cas9 a „průvodcovskou“ RNA, která Cas9 navede, kam je třeba. A zde je zakončen pes. Celý postup byl pravděpodobně „vymyšlen“ před miliardami lety, ale otázka zní, kdo jej vymyslel znovu. Doudnová, která ukázala, jak systém funguje, i když jen v bakteriích, nebo Feng Zhang, jenž systém předvedl v celé kráse v lidských buňkách?

Feng Zhang versus Doudnová

V současnosti vlastní patent Feng Zhang, ačkoli Doudnová byla první. Feng Zhang, za kterým stojí Broadův institut, říká, že k výsledku dospěl nezávisle. To se nelíbí zaměstnavateli Doudnové – Kalifornské univerzitě v Berkeley (UCB). Problém začal v roce 2017, kdy soud přiznal Zhangovi patent z roku 2014.

Soud argumentoval, že Zhanguv patent se „nepral“ s patentem Doudnové, jelikož se na rozdíl od ní soustředil na využití CRISPR v buňkách a nikoli ve zku-mavce (nebo bakteriích). A prohlásil, že Zhangova práce z roku 2012 se neodvíjela od výzkumu týmu UCB, a tudíž Zhang neměl „reasonable expectations of success“ (opodstatněná očekávání úspěchu). Hlavní linií obrany UCB je zmíněná věta a v ní slovo „expectations“ – očekávání. Mělo tam ale být spíše být slovo „obvious“ – samozřejmé.

Bitva o možné miliardové zisky se tedy týká především slov. UCB podráždí nohy původní prohlášení Doudnové, že převzít CRISPR do lidských buněk bude nesmírně obtížné. Brání se ale, že součástí vědeckého vyjadřování je skepse. UCB si vybrala právnícké eso Donalda Verrilliho a musí u soudu prokázat, že během původního líčení byla určitá fakta přehlédnuta v její neprospěch.

Obě instituce již založily firmy, do kterých investovaly miliony dolarů – Broadův institut Editas Medicine, UCB pak CRISPR Therapeutics a Intellia Therapeutics. Všechny jsou na burze a jejich akciemi hýbe trh a zejména výsledky patentních soudů. UCB vlastní patenty v Evropě a v posledním klání ji soud přiřkl dva dílčí patenty i v USA.

První se týká použití CRISPR na štěpení RNA, tudíž na dočasné změny v buňkách, druhý se soustřeďuje na vznik terapeutik a ochranu potravin. To sice nejsou patenty v centru sporu, ale jde o pozitivní posun. Každopádně Broadův institut zůstává v klidu, jelikož jeho hlavním cílem je genová terapie lidských onemocnění. Jak však soud skončí, není jasné.

Pozor na politiky

Metodu CRISPR určitě budeme používat k léčbě. Kdy to bude, ale nikdo neví. Rozhodně ne zítra. A určitě budeme, pokud se to již někde neděje, pěstovat pomocí CRISPR svalnatá prasata a kuřata. Jedno je jisté – výzkum získal obrovského pomocníka, proto budme Francisku Mojikovi vděční za plí a houževnatost. CRISPR bychom objevili i bez něho, ale to se nestalo, objevil jej on. Dal si teď od vědy oddech, „aby znovu našel důvod, proč to dělá“. To je poctivé vyjádření, jež by měli mnozí také zvážít.

Ještě jedno je však třeba zdůraznit. Mojica netušil, že jeho hrátky ve slavných loužích otevrou cestu k miliardovému byznosu. Snažil se poctivě přijít na kloub anomálii. Budiž to ponaučením, až politici zase začnou mluvit o tom, že věda by měla být více otevřená aplikacím a potřebám průmyslu. To je jen lež a snaha přesunout finanční prostředky na vědu a výzkum do temných vod sponzorů hnutí a stran. Tak pozor!

Autor působí v ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky