

Cesty mutagenese

Dlouhodobé přežití živočišných druhů je podmíněno jejich schopností měnit vlastní genetickou informaci a pod vlivem přirozeného výběru se tak následně lépe přizpůsobovat měnícím se životním podmínkám. Spontánní změny – mutace – mohou sice být pro svého nositele přínosem, ale ve většině případů ho spíše znevýhodní nebo jsou z pohledu nositele neutrální. Navíc mohou být mutace v některých případech výhodné a jindy nevýhodné. A právě na základě celkového efektu mutací na své nositele vybírá nakonec přírodní selekce v danou chvíli prospěšnější genové varianty, kterým umožní šířit se v populaci. Přirozená biologická evoluce je proto ze své podstaty úzce propojená s přírodním výběrem a zcela závisí na přírodních mutantech. Naopak cílené vytváření mutantních forem organismů člověkem představuje jeden ze základních pilířů genetického výzkumu. Rozmach metod využívaných k úpravě genetického kódu se podepsal na celkovém směřování biologických disciplín. Mutagenese od fyzikálních, přes chemické až po nejaktuálnější biologické užíváme ve snaze o pochopení molekulární podstaty různých jevů. Máme naději, že toto pochopení přinese lepší budoucnost v podobě efektivní léčby geneticky podmíněných onemocnění. V následujících řádcích se pokusím přiblížit základní principy mutagenese a původní i novější mechanismy, které je možné nyní využít.

Žijeme v (post)genomické éře, kdy máme k dispozici obrovské množství neustále se rozšiřujících dat a informací o celých genomech (tedy veškeré genetické informace uložené v DNA příslušného organismu) stále většího počtu organismů. Přechtení veškeré lidské DNA (lidského genomu) bylo dokončeno v r. 2003 (blíže viz Živa 2016, 5: 203–206) a od té doby se podařilo přechtít již tisíce dalších eukaryotních genomů. Nejzajímavější a také nejdůležitější součástí genomu jsou pochopitelně geny, přestože tvoří jen menšinu genetické informace. U drtivé většiny genů a z nich odvozených proteinů ale nemáme ani zdání o jejich funkci. Právě snaha získat tyto informace způsobila rozvoj nového odvětví genetiky – vznikla funkční genomika, jejímž hlavním cílem je hledání genů a určování jejich funkce. Pracuje na několika úrovních. Na základě podobnosti genetické sekvence, spolu s identifikací známých motivů (tzv. domén) a možností předpovědět finální strukturu proteinu dokážeme pomocí počítačové simulace vytipovat pravděpodob-

né funkce genu. Takový přístup se nazývá *in silico*, což značí „spočteno počítačem nebo zjištěno počítačovou simulací“. Z uvedených metod vzešla komparativní (srovnávací) genomika porovnávající genomy (a geny) různých organismů. Operuje opět na několika úrovních. Dokáže např. porovnávat samotné genomové sekvence nebo krátké úseky genů prepisované do RNA (tzv. transkripty; Expressed Sequence Tag, EST databáze). Bohužel v mnoha případech tyto počítačové simulace nebo metody založené na srovnání s již známými geny selhávají, protože podobnost neznámého genu s již popsanými je tak malá, že ani počítačová simulace nepřinese výsledky. Proto nezbyvá nic jiného, než studovat organismy, které mají námi vybrané geny manuálně pozmeněné – mutované.

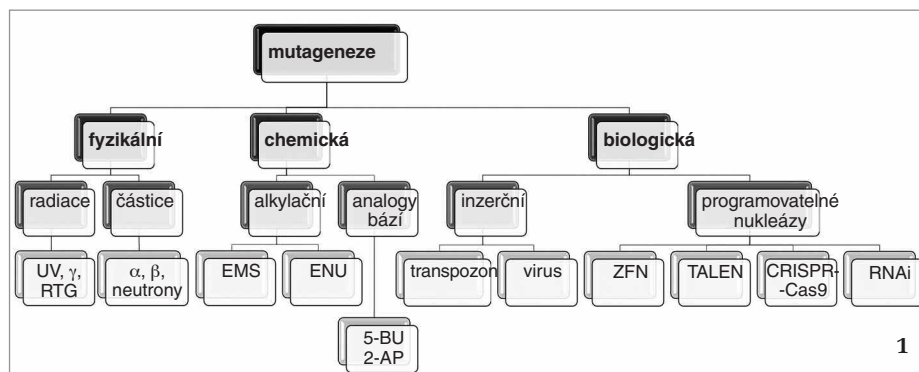
V tomto případě můžeme funkci genů u vícebuněčných organismů studovat *in vitro*, tedy např. prostřednictvím buněčných linií nesoucích mutaci ve svém genomu a jejichž projevy sledujeme. Nebo nás zajímá struktura a složení samotného pro-

teinu, který si v různých modifikacích (mutacích) můžeme připravit v živých buňkách a následně ho extrahovat a použít na další experimenty. Další možností funkční genomiky je studie *in vivo*, tedy práce s živým organismem (obratlovci, hmyz, rostliny, jednobuněčné organismy atd.), u něhož došlo ke změně v genu, který nás zajímá. Aktuálně dokážeme tyto geny pozmenit hned několika způsoby – úplně je vypnout, ale také pozmenit jen velmi krátké úseky, abychom zjistili, jak moc důležité jsou pro celý protein.

Existují dva základní přístupy studia funkce proteinů *in vivo*. První, tzv. přímá genetika využívá přirozených nebo uměle vytvořených mutantů, kteří jsou rozeznáváni na základě vnějšího projevu – fenotypu (barva srsti, délka ocasu, tvar lebky apod.). Následně se pokouší odpovědět na otázky typu, jak se dědí daná vloha, zda vznikl fenotyp následkem jedné nebo více mutací a jaký by byl fenotypový projev potomků dvou různých mutantů. Tento přístup patří k zastaralým, v době před rozvojem molekulárních metod bylo nejdůležitější získat u studovaného organismu dobře „viditelný“ projev – určitý fenotyp – a ten pak studovat, spíše než zjišťovat geny, které jsou za něj odpovědné. Metoda byla založena na vytvoření náhodné mutace, která se může odehrát kdekoli v celém genomu buňky a není proto nijak cílená.

V dnešní době jsou známy (přečteny) všechny geny modelových organismů, nyní je snahou vědců popsat funkce každého jednotlivého genu. Proto vznikl i opačný přístup, který postupuje od genu k jeho projevu (fenotypu). Právě s vývojem nových metod genetického výzkumu, schopných analyzovat funkci genů na základě jeho cílených změn (mutací), se objevil i nový přístup – reverzní genetika, kdy biologickou funkci genu zjišťujeme jeho vyřazením nebo naopak přidáním do organismu a podle potřeby jeho cílenou aktivací/deaktivací. V reverzní genetice tedy startovní bod tvoří gen. Hlavní snahou je modifikovat tento gen nebo jeho expresi (cestu k přepsání do proteinových molekul) a následně detailně popsat fenotypové důsledky modifikace. Klíčovým parametrem musí být snaha nenarušit rozmnožovací schopnost modelového organismu, protože pak by šance na získání homozygotního potomka, tedy jedince s mutací jak v otcovské, tak v matčině alele genu, byla téměř nulová. Cel genomové sekvencování odhalilo velké množství genů, jejichž funkci neznáme a ani ji nejsme schopni jednoduše předpovědět. Právě proto se staly vysoce výkonné postupy reverzní genetiky klíčovými v postgenomické éře.

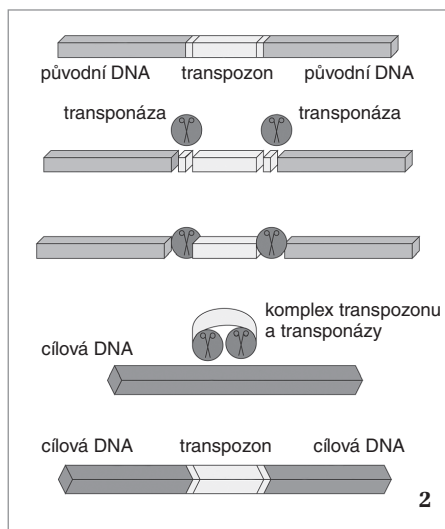
Při snaze o zjištění funkcí genů se uplatňují obě zmíněné strategie, tedy na základě studia fenotypu i genů. Přímý genetický přístup však dokáže definovat roli genů, i když nemáme žádnou představu o možné funkci a zkoumáme ji tedy bez „předsudků a předpokladů“. Mnohé postupy funkční genomiky využívají tvorbu nulových mutantů, kteří mají úplně vyřazenou produkci funkčního proteinu. Metody reverzní genetiky můžeme rozdělit do dvou skupin. První zahrnuje přímou mutagenesi pomocí chemikálií či vložení fragmentů DNA (transpozonů) do genu. Zatímco



1 Typy mutagenese s příklady jednotlivých mutagenů, tedy látek, které mutaci na úrovni DNA způsobují. Prvotní členění spočívá v typu mutagenu. Následně se zde rozlišuje princip vyvolání mutací – v případě fyzikální mutagenese se uplatňuje přímá radiace, nejčastěji záření gama nebo ultrafialové, či samotné ozařování částicemi, jako jsou neutrony nebo alfa, resp. beta. Chemické mutageny využívají několik způsobů tvoření mutací – klíčové je zavedení změny v párování bází, buď pomocí přenosu alkylových skupin na DNA, nebo prostřednictvím analogů původních nukleotidů. Biologické mutageny manipulují DNA pro ně vlastním způsobem. Začleňují různé sekvence nukleových kyselin do genomu pomocí inserce, nebo programují a regulují expresi proteinů na všech úrovních (jak DNA, tak RNA). EMS – etylmetansulfonát, ENU – etylnitrozomochovina, 5-BU – 5-bromouracil, 2-AP – 2-aminopurin, ZNF – nukleázy se zinkovými prsty (Zinc Finger Nucleases), TALEN – TALE nukleázy (Transcription Activator-Like Effector Nucleases), CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), RNAi – RNA interference. Blíže v textu

2 Princip fungování transpozonu a jeho vložení do hostitelské DNA. Samotný transpozon kóduje sekvenci genu transponázy, tedy klíčového enzymu odpovědného za vyštěpení a vložení transpozonu do cílové sekvence. Transponáza detekuje vazebná místa na okrajích sekvence transpozonu, které následně nastříhne a pak se „připojí“ na transpozon. Tento komplex se přesouvá na cílové místo, kde transponáza rozstříhne sekvenci a vloží do ní DNA transpozonu.

3 Chiméra (výřez) od italského renesančního malíře Jacopa Ligozzi (1547–1627). Převzato z Wikimedia Commons, v souladu s podmínkami použití



za tento fenotypový projev odpovědné. V reverzní genetice má však svá omezení. Existují úseky genomu náchylnější k mutacím, ale pokud cílový gen leží v oblasti s nízkým výskytem mutací, nemusí se podařit ho pomocí chemické mutagenese změnit. Obecně je při takové mutagenese nutná vysoká dávka mutagenu, která vždy vede k mnohonásobným mutacím i mimo cílové geny, takže následně musíme nežádoucí mutace odstranit opakovaným křížením s původními nezmutovanými jedinci (tzv. outcross, Hardy a kol. 2010). Nedávno byla např. vytvořena velká sbírka mutantů modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), čítající až 3 712 linií, přičemž bylo zjištěno, že se jedna mutace vyskytuje na úseku dlouhém v průměru 89 tisíc nukleotidů. To bohužel znamená, že každá mutantní linie huseníčku obsahuje několik stovek mutací. V praxi je zcela nemožné takový počet selektovat postupným křížením s nezmutovaným jedincem tak, aby měla daná linie jedinou mutaci, kterou by šlo následně studovat a analyzovat (Martin a kol. 2009).

Inzerční mutagenese

Myšlenka této metody je založena na principu náhodného včlenění (inserce) cizorodého úseku DNA, jakým je např. transpozon



nebo retrovirus, do genomu (obr. 2; viz též článek na str. XLVII a dále v textu). Taková inserce do oblasti DNA, která kóduje určitý gen, může pak vést k mutagennímu efektu a pozměnění funkce genu. Bohužel při použití této metody se vystavujeme riziku, že ztráta funkce příslušného genu bude jen částečná, což může být způsobeno vložením buď do promotorové oblasti genu (tedy části DNA nutné ke spuštění jeho transkripce), nebo do takových oblastí DNA, v nichž po inserci a následném přepisu genu vzniká zkrácený protein, který je stále alespoň částečně schopen vykonávat svou původní funkci. Pokud zvolíme inzerční mutagenese, může dojít také ke vzniku nespecifických mutací (jako v případě chemické mutagenese), celkový počet změn v DNA je ale nesrovnatelně nižší (Hardy a kol. 2010).

Transpozonům se také někdy říká „skákáčící geny“, za což vděčí své schopnosti pohybovat se v genomu. V případě mutagenese těmito elementy lze obnovit původní stav genu za použití správné transponázy – enzymu odpovědného za přemístění transpozonu, resp. jeho vyjmutí z cílového genu a vložení do nového místa v genomu.

Transpozony se hojně využívaly pro vytvoření rozsáhlých sbírek mutantů různých modelových organismů. Množství mutantních linií hádátka *Caenorhabditis elegans* bylo získáno pomocí transpozonu Tc1, který se nachází v mnoha kopiích ve všech kmenech hádátka. Později se přelo na transpozon Mos1, který má pouze jednu kopii. U ryby dánia pruhovaného (*Danio rerio*) se uplatňují oba postupy inzerční mutagenese – transpozony i retroviry. Také výzkum prováděný na octomilce *Drosophila melanogaster* se neobešel bez inzerční mutagenese. Pomocí mobilních transpozonů, tzv. P elementů, specifických právě pro octomilku, bylo získáno více než 6 tisíc genových mutací. Množství dalších linií vzešlo z použití piggyBac transpozonu, který má mimořádnou schopnost přesouvat požadovanou sekvenci z vektoru do chromozomu, a nejenom v rámci chromozomu jako u většiny ostatních transpozonů. Největší sbírka inzerčních mutantů existuje pro myš domácí (*Mus musculus*), zahrnuje 100 tisíc nezávisle zmutovaných embryonálních kmenových buněk. Tyto totipotentní buňky, tedy schopné diferencovat se v jakýkoli typ buňky, se vloží do hostitelského embrya v průběhu jeho vývoje (blíže např. Živa 2016, 4: 150–154 a 1: 7–9). V následující etapě se zmutované buňky mohou zapojit do tvorby kteréhokoli orgánu. Výsledkem bude tzv. chiméra – organismus tvořený buňkami původními i mutantními (obr. 3).

Programovatelné nukleázy

Programovatelné endonukleázy jsou enzymy schopné rozpoznat specifické sekvence v genomu a následně v daném místě přerušit obě vlákna DNA (obr. 4). Zlomky v DNA zvyšují efektivitu homologní rekombinace (HDR – Homology Directed Repair) a spouštějí nehomologní spojování konců (Non-Homologous End Joining, NHEJ; viz také str. 70 této Živy), které má za následek mutagenese. Při homologní rekombinaci je pro opravu nutná přítomnost homologního (tj. sekvencně identického)

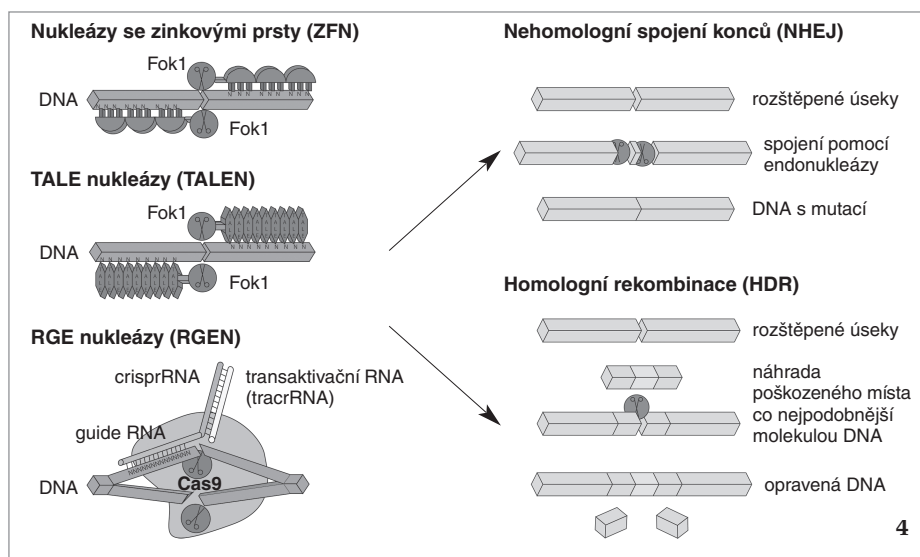
vlákna DNA bez zlomu, takže pokud buňce poskytneme námi upravenou homologní DNA, použije ji poté na opravu. Jestliže buňka nedokáže danou homologní sekvenci detekovat, spustí náhradní plán – NHEJ. Nehomologní spojování nepotřebuje žádný homologní templát a často vytváří INDEL mutace (spočívající v inzerci nebo delecii několika párů bází na okrajích zlomu). Zjednodušeně řečeno, dvouvláknový zlom na DNA se zahradí a opětovně spojí, ale s jistou chybou (mutací). Homologní rekombinace probíhá převážně v S nebo G2 fázi interfáze buněčného cyklu, kdy se buňka nedělí (v S fázi se syntetizuje DNA, v G2 fázi se buňka připravuje na rozdělení). NHEJ může nastat během celého cyklu. Technologie využívající tento princip prodělávají poměrně bouřlivý vývoj. V minulosti se používaly pouze nukleázy s tzv. zinkovými prsty (Zinc Finger Nucleases, ZFN), pak se objevily další typy programovatelných endonukleáz. V r. 2011 vstoupily na scénu výzkumu TALE nukleázy (Transcription Activator-Like Effector Nucleases, TALENs) a jako poslední se k nim přidaly RGEN (RNA-Guided Engineered Nucleases).

Všechny výše zmíněné nukleázy fungují stejným mechanismem – štěpí chromozomovou DNA ve specifických místech, čímž spouštějí systém pro opravu rozštěpené DNA a způsobují tak genovou modifikaci.

ZFN mají dvě domény, jedna se váže na DNA právě pomocí zinkových prstů a druhá obsahuje nukleázovou doménu odvozenou z Fok1 restriktivního (štěpícího) enzymu. Pro plnou funkci jsou zapotřebí dvě molekuly této nukleázy, které jsou pak schopné společně štěpit DNA. Nevýhoda ZFN spočívá v limitované délce vkládané sekvence, která při kondicionálních knockout konstruktech může být i tisíce bází (viz dále v textu).

TALEN mají podobnou strukturu jako ZFN. Na jednom konci nesou Fok1 nukleázovou doménu, pro navázání DNA ale využívají odlišnou doménu – Transcription Activator-Like Effector (TALE). Každá TALE doména rozeznává jednu bázi ve velkém žlábků DNA. Tyto nukleázy jsou tak schopni použít na jakoukoli cílovou sekvenci (Hyongbum a Jin-Soo 2014).

Další možností je využít pro mutagenézi RNA. Jednovláknová ribonukleová kyselina (single stranded RNA, ssRNA) vzniká přepisem jednoho ze dvou vláken dvoušroubovice DNA (double stranded, dsDNA) a následně slouží jako templát (mediátorová RNA, mRNA) pro tvorbu proteinu. První metodu zacílenou na tento mezikrok proteosyntézy představuje RNA interferenční (RNAi). Základním principem je zamezení přepisu mRNA do podoby proteinu. Metoda je založena na vpravení specifické sekvence dvouvláknové RNA (dsRNA), jež odpovídá svou sekvencí cílové ssRNA genu, který chceme vypnout, do cytoplazmy buňky. Po vpravení dsRNA se totiž v buňkách spustí přirozené obranné mechanismy, protože dvouvláknová RNA se normálně v buňce vyskytovat nesmí. Proto tyto mechanismy rozštěpí cizorodou dsRNA molekulu na menší úseky jednovláknové RNA, která pak ale vyhledá kompatibilní přirozenou ssRNA. Tak vznikne nepřirozená dsRNA, opět následně eliminovaná obranným mechanismem. Tímto procesem se



postupně vyřadí veškerá ssRNA pro daný gen a nedochází k tvorbě příslušné bílkoviny. Velkou komplikací spojenou s RNAi je samotný proces vnesení cizorodé molekuly RNA do buněk (více v následujícím článku A. Morávkové na str. XLVII).

Využití RNAi v umlčování vybraných genů však otevřelo dveře také dalším technikám. Mezi nejaktuálnější a mimořádně úspěšné patří metoda nazývaná zkráceně CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Tato metoda využívá RNA, aby dokázala efektivně pozměnit samotnou DNA buněk. Pomocí guide RNA (gRNA) najde specifický úsek na dvoušroubovici DNA. Aktivuje se komplex Cas9 – způsobí rozstřížení původní DNA, čímž spustí opravné mechanismy, které buď homologní rekombinací, nebo nehomologním spojením konců vyústí v mutaci na úrovni DNA (Dominguez a kol. 2016). Protože jde o prokaryotický „imunitní“ systém, musíme vždy dodat nejen samotnou gRNA s „lokalizátorem“, ale i původně bakteriální plasmidy (kružnicové DNA) se sekvencí pro enzym Cas9.

Díky vysoké efektivitě a úspěšnosti systémů CRISPR se začalo pracovat i s ovladitelnými prvky mutagenéze, a tak se podařilo včlenit do genomu sekvenci fungující jako vypínač, který umožňuje regulovat, kdy bude cílový gen vypnut. Tyto mutanty označujeme jako kondicionální a často se využívají ke studiu genů klíčových pro embryonální vývoj. Pokud by byly tyto geny poškozeny již v gametách nebo zygotě, vedly by k úmrtosti embrya a mutanti by se tedy vůbec nenarodili.

Závěrem

Studium funkcí neznámých genů je výzvou pro celou vědeckou obec. Vhodný postup by měl být zvolen s ohledem na daný organismus a na řešenou otázku. V rámci reverzní genetiky se obecně snažíme vytvořit životaschopné mutanty, kteří se následně rozmnožují a lze je dále zkoumat. Klíčová je snaha o minimalizaci tzv. offtargetů, tedy mutací v jiných genech než plánovaných. Při postupech přímé genetiky občas dochází k tomu, že mutace je embryonálně letální, a tedy všichni homozygotní mutanti umírají ještě v průběhu nitroděložního vývoje. V takových případech je třeba výzkum částečně omezit na práci s kmeny -

4 Programovatelné nukleázy a porovnaní jejich mechanismu fungování. Každá nukleáza má vlastní způsob hledání cílové sekvence v DNA řetězci, pak ale všechny nastříhnou dvoušroubovici a spustí opravné procesy. Nehomologní spojení konců (Non-Homologous End Joining, NHEJ) probíhá jednoduše, po identifikaci rozštěpených úseků se jejich konce zarovnají a opětovně se spojí, čímž vzniká mutace. Pokud nastane homologní rekombinace (Homology Directed Repair, HDR), opravné mechanismy vyhledají co nejpodobnější molekulu DNA, kterou následně zamění za původní, poškozenou molekulu. Proto vkládáme co nejpodobnější DNA s uměle upravenou sekvencí, aby právě ona byla vybrána jako nejvhodnější kandidát na opravu DNA. Všechny obr. podle různých zdrojů kreslila V. Grešáková

vými buňkami, embryem nebo na použití reverzních postupů při tvorbě indukovatelných mutací. Také lze pracovat s RNA interferencí a sledovat, zda bude ten samý gen stejně důležitý i po narození a v již vyvinutém organismu. Navíc fenotyp může být často projevem většího počtu mutací v různých genech. Proto je velice důležité ověřovat účinnost mutagenéze na celogenomové úrovni.

Moderní metody přímé a reverzní genetiky otevírají nové možnosti pro zkoumání funkcí genů, o nichž nemáme dosud téměř žádné informace. Neustálý vývoj nových a výkonných technik umožňuje komplexně a mnohem detailněji testovat každý vzorek jak na celkové úrovni (CHIP, Microarray, RNAseq), tak na úrovni stavebního prvku DNA, nukleotidu (metylace, varianty sestřihu, mutace). Doufejme, že je pouze otázkou času, kdy budeme znát funkce všech genů, což nám poskytne podrobný náhled na fungování molekulární podstaty organismu, a budeme schopni efektivněji léčit nebo zmírňovat projev různých geneticky podmíněných onemocnění (blíže např. v článku na str. 70 tohoto čísla Živy).

Citovaná literatura je uvedena na webové stránce Živy, kde najdete také obrázky použité v tomto textu v jejich původní barevné verzi.