

# Kam kráčíš, genetiko?

*Poznání sekvence lidského genomu byl jen začátek*

*Mezi vědami o životě není mnoho těch, které v posledních desetiletích potkal podobný rozkvět jako genetiku. Ta svými panožkami proniká do všech možných oborů; nejspíš si na prvním místě všimneme disciplín věnujících se nám lidem. Teprve v době druhé světové války se nukleové kyseliny staly uznávanými nositelkami dědičných informací – historie, která nezasahuje dále, než je průměrný lidský věk. Proto mnozí z nás osobně sledovali zrychlující se rozkvět této vědy.*

## Především diagnostika

V oblasti medicíny, na rozdíl od jiných přírodních věd, se genetika uplatňuje zatím převážně v diagnostice. Upřesňuje diagnostiku klinickou a snaží se identifikovat příčiny onemocnění na úrovni genomu. Ačkoli od genové terapie jsme si slibovali mnoho, při léčbě je její význam zatím poměrně omezený. Zásahování do genomu se nám ještě příliš nedaří a navíc před námi leží mnoho zábran. I když jsme dosáhli značného pokroku, stále zbývá několik tisíc zjevně geneticky podložených onemocnění, u kterých však dosud nejsme schopni příčinu na úrovni genomu najít. O něco větší množství (asi 3700) dědičných chorob zná již svého odpovědného činitele na genové úrovni. Jde o mutace nejrůznějšího typu, kterých je popsáno víc než 100 000 (v některých genech jsme našli jednu nebo jen několik patogenních mutací, v jiných jich bylo identifikováno více než tisíc). Pro „genový standard“ se u bakterií, drozofil a třeba myši vžil označení *wild* (divoký) typ. Pro lidskou genetiku se takový název příliš nehodí a rozhodně je lepší použít slova *normální* nebo *standardní*. Ani jedno však není přesné a neříká nic víc, než že máme na mysli „obvyklý“ typ bez patogenního účinku.

Genom, jak ho známe dnes, není tvořen jen geny, jejichž konečným produktem jsou bílkoviny, ale obsahuje celou řadu informací, které se realizují jinak. Kromě další skupiny „genů“, jež kódují molekuly RNA různé velikosti, složitosti a funkčního zařazení, obsahuje genom značné množství DNA, o níž toho stále ještě mnoho nevíme (známe jen její složení, sekvenci nukleotidů, víme, že se opakují určité různé dlouhé úseky). Kódující část genomu se svými proteinotvornými geny tvoří jen asi 1 % z celé DNA. Protože se nám zdálo, že převážná část genomu je pro jeho funkci zbytečná a svými nároky (např. replikací) jen zatěžuje buňku, byla označena jako „smetí“ (junk).

## Doba postgenomická?

Díky projektu uskutečněnému organizací HUGO, který skončil na začátku minulého desetiletí, se podařilo sestavit téměř kompletní nukleotidovou sekvenci lidského genomu. V genetice, stejně jako v mnoha dalších vědách, se často přehání (zvláště při medializaci), a tak se období následující po tomto úspěšném gigantickém úsilí začalo označovat jako *postgenomická fáze vývoje genetiky*. Připadá mi to však poněkud zavádějící, protože analýza genomu jako celku zajišťujícího vznik a celoživotní existenci každého z nás v podobě pevně sestavených a evolucí vyzkoušených a upevněných programů zdaleka ještě neskončila. Vlastní vývoj genomu člověka i z hlediska lidstva, byť třeba nenápadně, stále pokračuje. Stejně tak se mění podmínky jeho existence. Bohužel se ukazuje, že se tyto podmínky mění podstatně rychleji, než stačí lidský genom sledovat. Zbývá doufat a snažit se vyrovnat se se zákony evoluce natolik, abychom zabránili negativním dopadům, jež takový nesoulad může mít (a nejspíš již má).

Jednou z cest je působení na genom. Nějaké zkušenosti jsme s tím již získali – dokážeme úspěšně přenášet a měnit geny rostlin a živočichů. U člověka jsou s tím zatím hlavně ideologické problémy. O něco shovívavější jsme v případě genové terapie, kdy připouštíme potřebu léčby genetických nemocí, ale zásadně odmítáme „vylepšování“ lidského genomu, které pro nás představuje do jisté míry neprávem zavrhanou tvář genetiky – eugeniku. Otázkou je, zda jednou nebudeme muset vylepšování chápat jako léčbu.

Druhou cestou, neméně obtížnou – i když spíše ideologickými zábranami než způsobem realizace – je zpomalit nebo alespoň utlumit negativní změny, kterými na nás působí vnější vlivy (často prostřednictvím našich vlastních produktů).

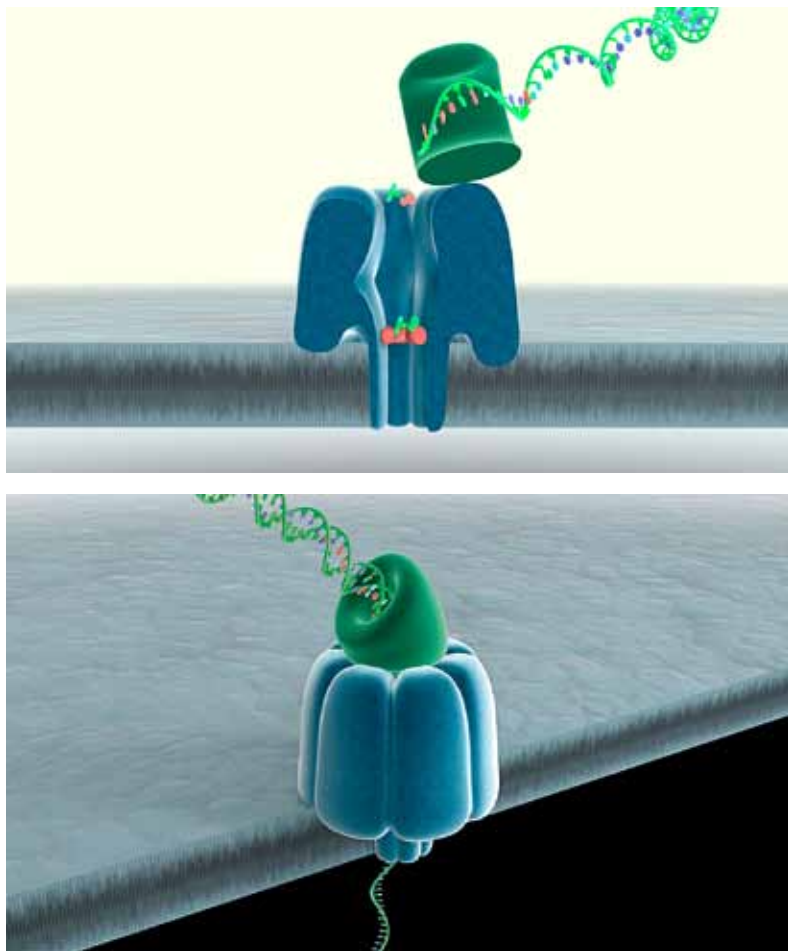
## Nové poznatky, nové otázky

Opustíme úvahy o budoucnosti lidského genomu a všimněme si některých zajímavostí, které jsme objevili a také způsobů, jimiž jsme k novým poznatkům došli.

Můžeme se zmínit o další regulační úrovni v podobě *mikroRNA* (*miRNA*). Vedle k ní cesta přes *siRNA*, což jsou velice krátké molekuly RNA namířené proti informačním

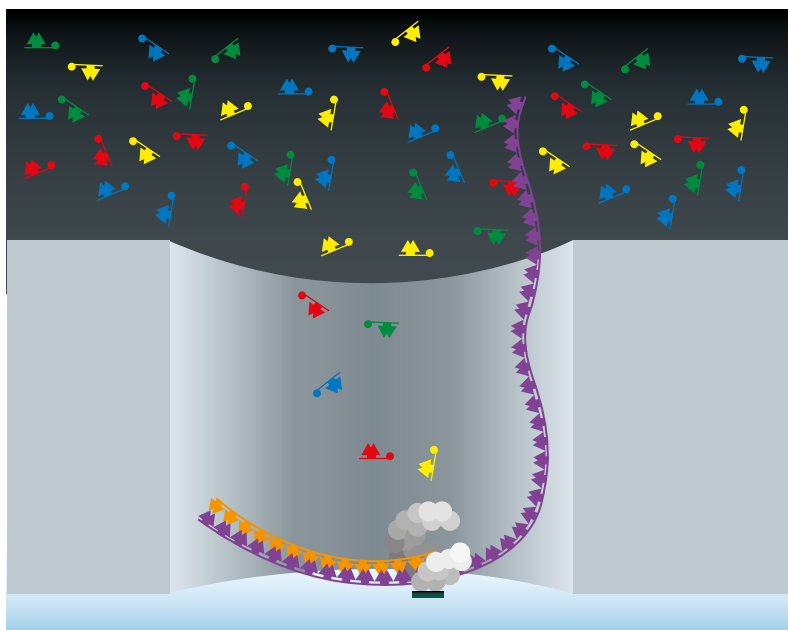
**RADIM BRDIČKA**

Prof. MUDr. Radim Brdička, DrSc., (\*1933) vystudoval Fakultu všeobecného lékařství Univerzity Karlovy v Praze a po dvouletém období, kdy se věnoval praktické medicíně, pracoval 29 let v Ústavu lékařské biologie a genetiky 1. Lékařské fakulty v Praze. Vedle učitelských povinností se věnoval studiu laboratorních potkanů a posléze se začal zabývat i lidskou molekulární genetikou. V roce 1989 přešel do Ústavu hematologie a krevní transfuze a Ústavu experimentální medicíny AV ČR, v. v. i., odkud odešel v minulém roce do důchodu. Nyní je na tzv. volné noze. Vedle krátkých pracovních pobytů v zahraničí pracoval dva roky v Římě v Istituto Superiore di Sanità. Svou pozornost zaměřuje na proměnlivost lidského genomu.



1. Nahoře: Exonukleázová sekvenace. Kanálkem vytvořeným v membráně  $\alpha$ -hemolyzinem procházejí jednotlivé nukleotidy odštěpované z řetězce DNA exonukleázou a jejich průchod je zaznamenáván. Aby tento způsob sekvenace byl účinný, je třeba, aby každý z nukleotidů (A, G, C, T) dával jiný signál.
2. Uprostřed: Jednořetězcová sekvenace. Tento způsob sekvenace je založen na syntéze řetězce, který je protahován kanálkem, v němž je umístěn senzor různé reagující na procházející nukleotidy. Senzor může reagovat na změny impedance, na vodíkové ionty uvolňované při začlenění nukleotidu do řetězce (Ion Torrent) nebo na fluorescenci vyvolanou při zařazování značených nukleotidtrifosfátů (SMART technologie) – viz obr. 3.

Obrázky principu sekvenčních strojů třetí generace jsou použity se souhlasem firem, zabývajících se jejich vývojem – Oxford Nanopore a Pacific Biosciences.



molekulám RNA, jejichž rozpad vyvolávají. Ovládají tak genovou aktivitu – vedle již známé regulace transkripce a editace molekul informačních RNA – dalším procesem.

Jisté zklamání nad poměrně malým počtem lidských genů při srovnání s mnohem jednoduššími organizmy jsme si vynahradili poznatkem, že proces realizace genetických informací (genů), který používá náš genom, umožňuje, aby se tyto informace realizovaly ve více podobách. Většina proteinotvorných genů je totiž schopna různou kombinací svých částí vytvářet více než jeden typ bílkovinné molekuly. To je ovšem jen jeden z mnoha možných zásahů do procesu realizace genetických informací. Může nás napadnout poměrně logická a zatím neuspokojivá odpověď na otázku, proč buňky investují tolik energie do transkripce, když k realizaci dospěje jen její část, prvotní produkt se neustále zmenšuje, popřípadě je konečná podoba informační RNA třeba i zavržena. Dává se tím přednost regulačním mechanismům před procesy syntetickými? Vedla evoluční zkušenost k poznatku, že napřed musí dobře fungovat adaptabilita v rámci individuálního vývoje, aby se vůbec mohla uskutečňovat adaptabilita evoluční?

### Složitá proměnlivost

Dobře známým fenoménem je variabilita genomu, umožňující lepší adaptaci na vlivy prostředí. RFLP (polymorfismus délky restričních fragmentů) a jejich moderní podoba SNP (jednonukleotidový polymorfismus) byly dlouho považovány za nejrozšířenější podstavu variability genomu mezi jedinci. Přes polymorfismy repetice (opakování) nejružnější délky včetně homopolymerních úseků a VNTR (proměnlivost počtu tandemových repetice) jsme dospěli k CNV (variabilitě počtu opakování). Evoluční genetiky se tímto fenoménem intenzivně zabývala a pokládala ho za cestu vedoucí ke vzniku nových genů – struktury obou kopií se od sebe vzdalovaly, přičemž si jedna zachovala původní funkci a tak umožnila druhé kopii získat funkci novou. Porovnáním nukleotidové sekvence obou kopií můžeme usuzovat, kdy v minulosti k zdvojení došlo. Zdá se, že CNV je v genomu dokonce častější než SNP. Ukazuje se, že variabilita primární struktury genomu je mnohem větší, než jsme se původně domnívali. Přitom jde o variabilitu lidské individuality danou spojením gamet našich biologických rodičů a vznikem našeho zárodečného (a svým způsobem definitivního) genomu, který je za našeho života velice stabilní a je ve své výchozí podobě udržován mnoha mechanismy.

3. Dole: Podle Pacific Biosciences. DNA polymeráza pevně ukotvená na dně kanálku syntetizuje nový řetězec z připravených fluorescenčně značených nukleotidtrifosfátů, ale jen ty, které jsou právě zařazovány, jsou zasaženy laserem, jehož světlo proniká dnem kanálku jen na krátkou vzdálenost. Vyvolaná fluorescence je detekována.

Zachování integrity a neměnnosti našeho zárodečného genomu je věnována velká péče. Přesto však v něm dochází v jednotlivých buňkách k odchylkám, které mohou být bezvýznamné, nebo také pro život postižené buňky podstatné. V posledních letech si začínáme více všimnout nejen změn genomu, které si můžeme přinést od našich rodičů, ale i těch, jež vznikají během našeho života – chovají se tedy jako dědičné, ale i jako získané. Nemění pořadí nukleotidů, ale jejich vlastnosti; např. metylaci přeměňují cytosin na metylcytosin. Nejsou omezeny jen na DNA, ale působí i na bílkovinnou nosnou strukturu – chromatin, jehož modifikace jsou mnohem pestřejší. Příčinu a výběr umístění těchto epigenetických změn zatím dost dobře neznáme. Epigenetickým změnám je vzhledem k jejich působení na genovou funkci věnována v poslední době zvýšená pozornost. Výsledkem je mimo jiné zjištění, jak velký – ve srovnání s tím, co o nich víme – význam mají. V jistém smyslu jsou projevy epigenetických změn obdobou mutací a svou dynamičností také spojují konzervativnost našeho genomu s environmentálními vlivy. Po metodické stránce máme k dispozici pro identifikaci metylovaných nukleotidů vlastně jen dva přístupy – enzymatický a chemický. Jiné postupy např. využívají preferenční vazbu některých bílkovin (protilátek) na metylovanou DNA, nejsou však dosud běžné.

### Sekvenační stroje, generace druhá a třetí

Dnes, kdy začínáme mít k dispozici nové technologie usnadňující a především urychlující analýzu primární struktury genomu (a pohybuje se v „postgenomické fázi“), se můžeme připravit na vstup do etapy, v níž se budeme věnovat nejen vztahům uvnitř genomu, ale zvláště jeho vztahům k prostředí.

Pokud termínem „postgenomická fáze“ chceme naznačit, že jsme dokončili projekt stanovení sekvence lidského genomu, pak máme zčásti pravdu, zdaleka to však neznamená, že o našem genomu víme vše. Musíme být mnohem skromnější, zvláště ti z nás, kteří pamatují kdysi vážně brané tvrzení, že obsahuje asi 100 000 genů. Dnes se spokojíme s asi 25 000 geny a víme, že snížený počet genů víc než dostatečně nahrazuje jejich plasticita – schopnost realizovat se ve více než v jednom produktu. Klasické dogma „gen → protein“ jsme museli vyměnit za „gen → proteiny“ (máme přitom na mysli spíše polypeptidy). Nezměnila se velikost našeho genomu, ať už ji vyjadřujeme jakýmkoliv způsobem. V době, kdy jsme se dopracovali již ke třetí úrovni sekvenačních analýz (někdo dokonce začíná mluvit o čtvrté), ji obvykle udáváme v celkovém počtu nukleotidů, což je asi  $3 \times 10^9$ . Téměř kompletní analýza genomu založená na Sangerově způsobu sekvenace trvala v rámci původního projektu 10 let.

Díky projektu organizace HUGO vznikly v řadě míst sekvenační manufaktury vybavené přístroji založenými na detekci úseků DNA, vytvořených touto metodou, pomo-

cí kapilární elektroforézy. Dnes se zmiňovaná metoda používá v omezeném měřítku, spíše k ověření nálezů získaných modernějšími technologiemi druhé a třetí generace (v anglickém jazyce jsou obvykle označovány zkratkou NGS, což odpovídá „new“ nebo „next“ generation sequencing).

Výrobou strojů druhé generace se ve světě zabývalo a zabývá několik firem, které si navzájem konkurují a v důsledku patentové ochrany zvolily navzájem poněkud odlišná řešení. Většina z nich vychází z poměrně krátkých fragmentů, které získá různými způsoby rozbíjení přirozených molekul DNA, z nichž vytvoří tzv. knihovny. Po stanovení sekvence jednotlivých fragmentů, které se navzájem částečně přesahují, je právě díky těmto přesahům seřadí tak, že vznikne plynulá sekvence odpovídající původní DNA. K jejímu sestavení je nezbytný počítač s odpovídajícím výkonem a kapacitou. Stroje druhé generace vycházejí z molekul (úseků) DNA, které jsou klasickým způsobem namnoženy tak, aby byl získán dostatečný signál pro detekci, který může vycházet z fluorescenčně značených nukleotidtrifosfátů (pro každou bázi je zvolena jiná barva). Nezbytným a stále se opakujícím cyklem je zaplavení reakčního prostoru roztokem se všemi čtyřmi typy nukleotidů a jejich následné odplavení.<sup>1</sup>

V zahraničí vzniká řada často komerčních institucí, které jsou vybaveny větším počtem strojů druhé generace různého druhu, a nabízejí celogenomové sekvenace jako službu. Je to jistě ekonomicky výhodné, protože využití strojů (včetně spotřebního materiálu) a pracovníků je optimální, nehledě na dostatek zkušeností. To se samozřejmě týká i používaných počítačových programů a informačních databází. Naším grantovým systémům je bohužel úvaha o hospodárnosti dosud velice vzdálená, přestože by mohla značně zkrátit dobu řešení řady projektů. Nehledě na skutečnost že stroje díky prudkému rozvoji nových technologií rychle zastarávají a je třeba je maximálně využít.

### Generace čtvrtá?

Postupně se objevují přístroje, které v desítky let vzdálené minulosti předpověděl švýcarský vědec Wilhelm Ansorge. Nejsou založeny na nezbytném namnožení sekvenovaných úseků, ale mohou sekvenovat jednotlivé řeťežky, aniž by používaly jakoukoliv z výše jmenovaných sekvenačních reakcí. Můžeme je považovat za stroje třetí generace založené

1. Nedokonalé odstranění zbytků původního roztoku mohou dávat nepravý signál. Sekvenované úseky musí být pevně uchyceny, aby se jejich množství podstupující další cykly nesnižovalo. Jsou obvykle připraveny na plochém podkladu nebo na mikrokuličkách, přičemž se musí zajistit, aby záznam reakce byl dobře oddělitelný od svazků úseků namožených na ploše nebo na jednotlivých kuličkách. Pro použití je podstatná velikost sekvenovaných úseků. Výrobci vycházejí z úseků krátkých (o délce 50–150 nukleotidů), nebo delších (kolem 400 a více nukleotidů). Krátké úseky se hůře seřazují, a proto jsou tyto postupy vhodné především tam, kde si můžeme pomoci již známou sekvencí, například u lidského genomu. Naopak když sekvenujeme neznámý genom, přínášejí jistou výhodu delší fragmenty. Výhod a nevýhod nabízených postupů použitých různými výrobci je celá řada, záleží pochopitelně na základní sekvenační reakci, kdy se ukazuje, že nedostatek pyrosekvenace je nepřesný odečet homopolymerních úseků – čím jsou delší, tím je určení počtu nukleotidů se stejnou bází problematictější. Výhody i nevýhody se týkají i počítačového zpracování, některé stroje produkují výsledky snadno porovnatelné s jinými, jiné jen obtížně. Ostatně produkce základních údajů – sekvence jednotlivých úseků – vyžaduje k získání konečného výsledku značnou a dosud časově náročnou práci počítače. I tak často zbyvají místa, která je nezbytné ověřit sekvencí na jiném druhu přístroje, nebo dokonce klasickou Sangerovou technikou.

na principu protahování řetězce DNA senzorem vybaveným průchodem, který je schopen jednotlivé nukleotidy (báze) od sebe odlišit. Tato představa dospěla k reálné podobě ve strojích, které od minulého roku nabízí několik firem (obr. 1–3).

Zřetelnou výhodou tohoto řešení je použití neznačených nukleotidtrifosfátů a zjednodušení detekčního systému, který je například omezen jen na senzor reagující na ionty vodíku uvolňované při postupném zařazování nukleotidů při syntéze komplementárního řetězce. Jistým rizikem jsou však opět homopolymerní sekvence. Jiným příkladem může být systém založený na uvolňování a detekci koncového nukleotidu. Podobných řešení je celá řada a rozběhlý boom výroby nových typů sekvenátorů, z nichž některé jsou označovány (ne úplně správně) jako čtvrtá generace, tomu nasvědčuje.

Pokrok v oblasti výroby a nabídky stále dokonalejších a na obsluhu méně náročných přístrojů se značně zrychlil a proroctví o poklesu nákladů a časové náročnosti na vyšetření jednoho lidského genomu nabývá stále reálnější podobu. Tomu, že náklady v roce 2013 klesnou pod 1000 USD, začínáme věřit jako víceméně jisté vyhlídce. Již pro stro-

je nabízené dnes se uvádějí provozní náklady pro stanovení celé sekvence lidského genomu na asi 5000 USD. Ostatně pro rutinní analýzu postačující pro lékařské využití nebude nejspíš potřeba analyzovat celý lidský genom (už nyní se často omezuje na transkribovanou část (exom), která představuje přibližně jen jedno procento velikosti genomu). Dokonce se budeme moci omezit na vybrané oblasti, důležité pro stanovení určitých diagnóz, popřípadě náchylností, tedy sekvenovat jen vybrané amplikony.<sup>2</sup>

### Záplava dat a zákon o DNA

Tyto technologie produkují ohromná množství primárních dat, je proto třeba vyřešit problémy s jejich produkcí, s jejich zpracováváním, uchováváním, popřípadě přenášením, především však s jejich interpretací. Založili jsme velké množství nejrůznějších databází, s jejichž pomocí se tímto směrem můžeme ubírat, zatím však je právě tato část využití výsledků sekvenace nových generací tou nejobtížnější a nejnáročnější.

Jestliže skutečně dospějeme k rutinnímu používání celogenomové, exomové nebo jinak cílené sekvenace, bude nezbytné najít i použitelnou archivaci těchto nálezů, která podle potřeby umožní uložená data vyhledat a manipulovat s nimi. Snad do doby, než se tento výhled stane reálným, budeme mít i patřičně progresivní zákon o DNA, protože půjde o data nejen velice citlivá, ale hlavně cenná z nejrůznějších hledisek – zdravotních, sociálních, obchodních, ale i vojenských. Rutinní používání pro medicínské účely ovšem předpokládá, že se ještě mnohem lépe vyznáme v mezigenomových vztazích a jejich ovládání fenotypu. I zde budeme stále více závislí na počítačích, které nám budou nabízet v úvahu připadající závěry seřazené podle pravděpodobnostního měřítka. Sama přesná a správná znalost našeho genomu nebude k rozhodování stačit, dokud nám bude chybět povědomí o všech vnějších vlivech, které se na jeho formování podílely, podílejí a budou podílet. Budoucí vlivy lze sice jen odhadovat, ale v mnoha směrech se můžeme pokusit o jistou předpověď – známe-li minulost, máme-li dostatek zkušeností a především odpovědnosti. Ukazuje se, že i sám genom nám jistou míru předpovědi nabízí. Měli bychom však být ukázněni a této skutečnosti nezneužívat, nýbrž úzkostlivě dbát na etiku lékařského povolání. Bohužel poněkud zaostáváme i z hlediska zvyšování povědomí o významu a možnostech genetiky u laické veřejnosti, ačkoliv téměř v každé detektivce se o vyšetření lidské DNA mluví.

Oповázíme-li se shrnout metodické a technologické pokroky v oblasti molekulárně-genetických analýz, pak můžeme vyzdvihnout dva zcela jednoduché principy – opakování téže reakce do „nekonečna“, tedy vynálež řetězové polymerázové reakce (Vesmír 77, 444, 1998/8) a souběžné provádění značného počtu reakcí, což jsou čipové technologie (Vesmír 77, 447, 1998/8).

2. To ostatně můžeme již dnes. Metoda RainDance Droplet Technology (RDT), zacílená na nejrůznější místa genomu, je schopna namnožit vybrané úseky pomocí až 20 000 párů priorit. Pomocí takto obohacené templátové DNA dokáže stanovit sekvence až 100 000 vybraných úseků v celkovém rozsahu do 24 Mb.

## Výherci vánočního losování

**DIGITÁLNÍ FOTOAPARÁT OLYMPUS VR-310** získali: MUDr. Michal Malina (Praha 5), MUDr. Eva Šrámková (Náchod), Zuzana Kosová (Jihlava).

**KNIHU Z NAKLADATELSTVÍ PASEKA, NEBO NAKLADATELSTVÍ JOTA** obdrželi: Tereza Příbylová (Teplice), MUDr. Vladimír Doležal (Praha 10), Adéla Novotná (Předměřice nad Jizerou), Norbert Herrman (Praha 5), Biskupství Brněnské (Brno), Ing. Jaroslav Trmal (Sušice), PhDr. Ladislav Hejdánek (Písek), Kazi Svobodová (Praha), Milan Krsek (Luby u Chebu), Ing. Ladislav Jezdinský (Přelouč), Ivo Prokop (Borovany), Milena Boháčková (Libčice nad Vltavou), Vratislav Svoboda (Mníšek pod Brdy), Tereza Holešovská (Hostivice), PaedDr. Melanie Rojková (Havířov – Suchá), Veronika Rotová (Praha 2), Gymnázium, Botičská 1 (Praha 2), Zelený kruh (Praha 2), Ing. arch. Pavel Příhoda (Praha 2), Prof. Jaroslav Kulda (Praha 2), Petr Svoboda (Praha 4), Ing. Václav Srb (Středokluky), Tomáš Mikolášek (Vrané nad Vltavou), Městská knihovna Náchod, o.p.s. (Náchod), Gymnázium (České Budějovice), Ing. Josef Klíma (Brno – Líšeň), MUDr. Martin Náčovský (Varnsdorf), Aleš Maroušek (Nový Bor), Petr Rolenc (Tanvald), Cyrilometodějské gymnázium a MŠ v Prostějově (Prostějov), Eva Šanderová (Praha 8), Ing. Tomáš Prokop (Pardubice), Dr. Detlef Schroder (Neratovice), RNDr. Karol Berta (Lučeneč), Doc. Josef Rovenský (Piešťany), Branislav Matoušek (Trnava).

*Všem výhercům gratulujeme.*