

# Dobrodružství současné genetiky očima jednoho z jejích zakladatelů

*Genetika v posledních desetiletích dosáhla neuvěřitelných úspěchů. Od základů o monogenně podmíněné dědičnosti položených G. J. Mendelem (60. léta 19. století) tato věda v třetím tisíciletí přinesla průlomové poznatky i techniky, například byl přečten lidský genom a genová terapie není snem, ale realitou. Jak vidí genetické pokroky jeden z odborníků, kteří se významně zasloužili o rozvoj genetiky v Česku? Pro čtenáře Medicíny po promoci exkluzivně odpovídá docent MUDr. Milan Macek, CSc., který stál u zrodu Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol v roce 1961 (tenkrát pod názvem Ústav výzkumu vývoje dítěte). Tento vynikající vědec, organizátor a učitel oslavil v červenci 2023 úctyhodné 91. narozeniny.*

**Pane docente, v šedesátých letech minulého století jste se věnoval problematice viru Epstein–Barrové (EBV) a jeho vlivu na stabilitu lidského genomu a s tím spojeného rizika vzniku nádorů. V posledních letech se EBV zase vztahuje k autoimunitním onemocněním, konkrétně k roztroušené skleróze.**

Mé výsledky byly potvrzeny publikacemi dalších studií, které prokázaly asociaci EBV se vznikem lymfomů, karcinomu nosohltanu, Kaposiho sarkomu. Nádorová reaktivace EBV byla vyvolána mutací MTHFR genu s následnou poruchou syntézy kyseliny listové, s deficiencí methioninu pro metylaci DNA k regulaci genové exprese nebo stravou s nedostatečným množstvím kyseliny listové, vitaminů B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, D, E, cesia a zinku. Na reaktivaci EBV se však podílí i chronický pracovní či psychický stres, nezdravý životní styl, tak

jako jiné genotoxické epigenetické faktory zevního prostředí, které vyvolávají hypoxii buněk, ROS syndrom, a tím instabilitu DNA, chromozomů. To je pak příčinou závažných poruch prenatálního a postnatálního vývoje a zvýšeného rizika vzniku nádorů. EBV, tak jako jiné viry, může proto vyvolat epigenetickým účinkem chronický zánět buněk CNS s následnou autoimunitní odpovědí u lidí s genetickou dispozicí roztroušenou sklerózu. Virové infekce patří proto k důležitým epigenetickým faktorům.

**Souhlasíte s tvrzením, že na zdraví lidské populace se podílejí genom člověka a epigenetické vlivy zevního prostředí, utváření imunitního systému a genom střevních mikrobiálních kmenů?**

Z nejnovějších poznatků potvrzených výsledky molekulárně genetických studií jednoznačně vyplývá, že tento

závěr je správný. Imunologická ochrana je rovněž klíčovou součástí našeho genomu. Tyto poznatky odstranily dřívější rozpory mezi mendelismem, který neuznával dědičnost získaných znaků, a neolamarckismem, který zastával lisenkismus popírající obecnou platnost Mendelem objevených zákonů dědičnosti. Pokrok molekulárně genetické diagnostiky prokázal možnost dědičnosti získaných znaků a epigenetického negativního/pozitivního ovlivnění genové aktivity. Uvedené výsledky výzkumu proto umožnily rozvíjet také diagnostiku, prevenci a léčbu následků škodlivých epigenetických faktorů, které významně ohrožují normální prenatální a postnatální vývoj, a rovněž tak chránit a posilovat stabilitu genomu, snižovat tak rizika vzniku nádorů a předčasného stárnutí bez rizika a velkých finančních nákladů.

**Co pro lékařství znamená sekvenace celého genomu?**

### ***Budeme kdy umět aplikovat toto poznání v praxi?***

Cesta k dosažení tohoto cíle využitím celogenomového sekvenování je možná, ale v dohledné době není reálné jeho klinické využití, protože je zatím nákladné a velmi náročné na interpretaci pro obrovskou variabilitu a počet genů a jejich variant.

### ***Fascinuje mne, že známých 20 000 genů kóduje statisíce transkriptomů, miliony proteomů a nevyčísitelné množství metabolomů.***

Pokusím se odhadnout perspektivy, které tento pokrok přinese dalšímu rozvoji a klinickému využití lékařské genetiky. Nastupující celogenomové sekvenování genů (WGS) zvýší diagnostickou úspěšnost současného sekvenování exomu (WES; zahrnující zhruba 20 000 patogeneticky významných genů kódujících proteiny) o ne více než o 5 %. Celková diagnostická úspěšnost se v současné době pohybuje kolem 40–50 % podle dané diagnostické skupiny genetických onemocnění.

Známe rodinu, kde jeden sourozenec čeká na transplantaci srdce pro dilatační kardiomyopatii na podkladě patogeneticky významné mutace, zatímco jeho bratr s touto mutací žije bez problémů i v 60 letech.

To ukazuje, že naši genetickou zátěž lze plně odhalit až s diagnostikou a vyšetřením transkriptomu, proteomu a metabolomu, k čemuž nás přiblíží celogenomová sekvenace, která rozšíří spektrum patogeneticky významných genů, jejichž mutace jsou příčinou těžkého poškození prenatálního a postnatálního vývoje, včetně nádorů. Stále je co zkoumat, protože principy exprese genů nejsou zcela objasněny.

Celogenomové sekvenování pomůže určit geny zvyšující riziko dispozic k závažným poruchám vývoje člověka za určitých epigeneticky rizikových podmínek zevního prostředí. Může také identifikovat geneticky podmíněné kognitivní schopnosti, například matematické nadání či kreativitu v různých oborech, což umožní tyto pozitivní vlastnosti rozvíjet. Bude možno určit význam genových variant, jejichž biologický význam je prozatím neznámý, a odlišit je od genů, jejichž genová aktivita je trvale reprimována (potlačena), jak se předpokládá



Fotografie laskavě poskytl Martin Pírkas (UK Praha)

*Docent MUDr. Milan Macek, CSc., se synem a současným přednostou Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol prof. MUDr. Milanem Mackem, DrSc., MHA*

u transpozonů, které určovaly vývoj života od jeho začátku na naší planetě.

Nezapomenu na přednášku proslavenou na jednom genetickém kongresu, kde byl prezentován případ dítěte, jehož tvář byla plochá – bez nosu, jako u žaby. Molekulárně genetické vyšetření prokázalo, že mutace rušila inaktivaci genu, který u žab zajišťuje tento obličejový fenotyp.

### **Transpozony se někdy označují jako genetické haraburdí.**

Toto hodnocení už neplatí. DNA transpozonů se považuje za neaktivní

variant je v genu *CFTR*, zodpovědném za rozvoj cystické fibrózy, známo více než 2 000.

Nové studie proto potvrzují význam retrotranspozonů pro zdokonalení molekulárně genetické diagnostiky chorob, vad a nádorů v důsledku epigenetické alterace jejich genetické aktivity.

### **Vraťme se k praktickému významu celogenomové sekvenace.**

Celogenomová sekvenace by mohla urychlit také poznání zákonitostí a jejich

produktu, a tak je možno předejít vývoji monogenně podmíněných vad, chorob, dědičných poruch metabolismu, imunity či nádorů ve všech buněčných systémech, tkáních a orgánech.

### **Můžete uvést příklady klinického využití?**

V tomto roce byly tyto možnosti potvrzeny úspěšným využitím nejnovější verze metody genové editace u hypertrofické kardiomyopatie, choroby s rizikem fatálního konce pro akutní srdeční selhání. Může pomoci nejen postiženým pacientům, ale i v preklinické fázi jejího vývoje v geneticky rizikových rodinách, kde je prokázána její asociace se specifickou mutací. Metody genové editace jsou v současné době rovněž úspěšně využívány ve vazbě na onkologickou imunoterapii nádorů rezistentních na současnou onkologickou terapii.

Transfer editovaného genu do buněk je spolehlivě zajištěn adenoasociovanými viry, které neškodí buňkám příjemce, neintegrují se do jejich genomu a jsou minimálně imunogenní.

### **Genetika již dosáhla další významné mety – genové terapie v klinické praxi.**

Ano, v posledních letech byla vyvinuta úspěšná *in vivo* genová terapie, kdy s využitím adenoasociovaného virového vektoru normálního genu podání infuzí je dosaženo trvalého léčebného úspěchu. Dokumentují to zkušenosti při léčbě spinální muskulární atrofie u dětí, kterou úspěšně zavedla docentka MUDr. Jana Habarová, Ph.D., na Dětské neurologické klinice 2. LF UK a FN Motol použitím přípravku Zolgensma.

K perspektivním metodám této genové terapie je řazena kombinace s buněčnou terapií založenou na izolaci somatických buněk pacienta *in vitro*, které se dediferencují specifickou indukci do stadia pluripotentních kmenových buněk, do nichž je pomocí adenoasociovaných virů přenesen editovaný gen. Po jejich namnožení se infuzí vrátí pacientovi k úspěšné genové léčbě.

### **To už jsme na hranicích zázraku, možná až za nimi.**

Úspěšně se léčí hereditární hemoglobinopatie alogenní transplantací

## **Pro lékařskou genetiku je průlomovým objevem genová editace metodou CRISPR-Cas9, která je základem nejúspěšnější metody genové terapie.**

část genomu, avšak retrotranspozony (z kategorie transpozonů) mají genovou aktivitu stále zachovanou. Podle současných poznatků citlivě reagují na epigenetické vlivy a pomáhají udržovat funkční stabilitu našich genů současně s negativní selekcí genů, jejichž aktivita ztratila biologický význam nebo je funkčně škodlivá. Retrotranspozony aktivují polymorfismy genů, které mohou mít funkční význam při změně epigenetických vlivů, což zaručuje plasticitu našeho genomu a jeho vývojovou adaptaci na měnící se životní prostředí a jeho epigenetické vlivy.

Retrotranspozony také zaručují kontrolu genové aktivity určitých genů, aby začala/skončila v pravý čas a na správném místě k zajištění geneticky určeného normálního vývoje od narození až do konce života. Tak je chráněno naše genetické zdraví proti předčasnému stárnutí.

Zajištění klíčových funkcí organismu, jako je úspěšná reprodukce, je pod kontrolou několika tisíců genů. Díky tomu je v našem genomu obrovské množství vzniklých genových variant s prozatím neurčenou funkcí. Například patogeneticky významných

poruch u syntézy proteinů (proteomu) a jejich konečného využití v metabolismu celého organismu (metabolomu). Zatím využíváme pouze molekulárně genetické vyšetření známého genomu a transkripcie (transkriptomu).

### **Který objev v genetice považujete za podobně průlomový? Zjištění kvarterní struktury bílkovin, metodu CRISPR, genovou terapii (například cystické fibrózy), o níž jsme ve dvacátém století jenom snili a dvacátému století za nedosažitelnou?**

Pro lékařskou genetiku je průlomovým objevem genová editace metodou CRISPR-Cas9, která je základem nejúspěšnější metody genové terapie pro klinické využití podle hesla „vystříhni a přilep“, což vystihuje přesně její princip. Je založena na molekulární charakteristice genové mutace, určení přesné hranice mutovaného genu nebo segmentu s mutací, který je enzymaticky vystřížen. Do vystřížené části je vložen celý nemutovaný specifický gen nebo jeho segment. Tím je zajištěno kódování normálního genového

pupečníkových kmenových buněk postižených novorozenců (po nutné imunosupresi u nemocného). Variantou této metody pro rodiny s hereditární těžkou, neléčitelnou chorobou je využití preimplantační diagnostiky. Po vyšetření genotypu postiženého dítěte, jeho rodičů – nosičů patologické mutace a HLA systému se vybere k transferu do dělohy embryu se stejným HLA haplotypem bez mutací. Po porodu zdravého novorozence pak transfuze kmenových buněk z pupečníkové krve zachrání život postiženému sourozenci – bez imunosupresivní terapie.

Cílená přímá genová terapie vnáší gen přímo do poškozené tkáně, například do sítnice u dědičných degenerativních poruch sítnice, do mozku u Huntingtonovy choroby nebo do míchy u syndromu těžké neuropatické bolesti. Její klinické využití je u nás připravováno na zvířecím modelu miniprasátek na pracovišti profesora MVDr. Jana Motlika, DrSc., (Ústav živočišné fyziologie a genetiky AVČR).

### ***A co genová terapie cystické fibrózy?***

Nejnovější variantou genové strategie je korekční terapie funkce genového produktu, jak je využita právě v léčbě cystické fibrózy podmíněné nejčastějšími variantami mutací *CFTR* genu s nejčastější mutací delta F 508. Používá se trojkombinace funkčně korigovaných genových produktů *CFTR* genu (elexacaftor, trexacaftor, ivacaftor), která prokazatelně zlepšuje plicní funkce, kvalitu života, snižuje riziko exacerbace choroby a koncentrace chloridů v potu postižených dětí, což potvrdily výsledky dosažené profesorem MUDr. Pavlem Dřevínkem, Ph.D., (2. LF UK a FNM Praha) ve spolupráci se zahraničními pracovišti.

Širokému klinickému využití genové terapie brání její mimořádně vysoká cena a nutnost dalšího ověřování ke snížení variability výsledků a interakcí mezi používanými léčebnými přípravky. Dosažené výsledky však jednoznačně prokázaly, že genová terapie umožňuje kauzální léčbu jinak

nevyléčitelných těžkých dědičných poruch prenatálního a postnatálního vývoje a monogenních chorob včetně zhoubných nádorů na úrovni somatických buněk.

### ***Co byste predikoval oboru lékařské genetiky v jejím dalším rozvoji a využití?***

Vývoj tohoto nového oboru od roku 1961, kdy jsem byl pověřen vybudováním prvního oficiálního oddělení lékařské genetiky u nás, do současné doby prokázal, že lékařská genetika se stala součástí léčebně preventivní péče našeho zdravotnictví a jedním ze základních lékařských oborů. Dosažená úroveň státních i soukromých genetických pracovišť odpovídá mezinárodní úrovni v zajištění prekoncepční prevence screenem nejčastějších mutací monogenních chorob, v jejich časné prevenci a léčbě, v prevenci dysfertility, v preimplantační diagnostice monogenních chorob a v chromozomálním vyšetření embryí. Interdisciplinární spolupráce s našimi a zahraničními



*Docent MUDr. Milan Macek, CSc., se významně zasloužil o rozvoj genetiky posledních desetiletí*

pracovišti, včetně grantové podpory s aplikovaným klinicko-genetickým výzkumem zajišťuje další zdokonalování péče o genetické zdraví na vynikající úrovni.

Podle současných poznatků, potřeb a perspektivního využití v péči o genetické zdraví bude důležité rozvíjet v oblasti lékařské genetiky nové směry důležité k dalšímu zdokonalení genetické léčebně preventivní péče, uvedené v následujícím přehledu:

#### **Zdokonalení prevence a léčby epigeneticky indukované instability DNA ke snížení rizik léčby poruch prenatálního a postnatálního vývoje, včetně nádorů a poruch imunity**

- Stabilizace DNA rostlinnými produkty;
- Rozvoj nutrigenomiky a nutrigenetiky;
- Vyšetření a ochrana genomu mikrobů střevního systému;
- Rozvoj farmakogenomiky a farmakogenetiky ke snížení rizik, zvýšení úspěšnosti a individualizaci farmakoterapie podle specifity genových variant pacienta.

#### **Zdokonalení molekulárně genetické diagnostiky**

- Zdokonalení stávajících metod ke zvýšení jejich spolehlivosti, snížení časové a ekonomické náročnosti celogenomového sekvenování na úrovni genomu, transkriptomu, včetně transpozonů, k objasnění patogeneze vzácných chorob, nádorů, k cílené prevenci a kauzální terapii;
- Detekce variant zvyšujících dispozici k poruchám vývoje, ale i ke specifickému nadání a vynikající kvalitě kognitivních funkcí.

#### **Příprava, zavádění a využití hmotové spektroskopie k vyšetření proteomu**

- Odhalení dalších genů a faktorů ovlivňujících aktivitu genů normálních a patogeneticky významných;
- Upřesnění prognózy, diagnostiky a prevence monogenně a polygenně podmíněných chorob a konečného fenotypu.

#### **Zdokonalování metod genové terapie a buněčné terapie**

- Zvyšování úspěšnosti, snižování časové, ekonomické náročnosti a jejich rizik;

### **Etika a lékařská genetika**

Právně a eticky je zakázáno využití genové manipulace na gametách a embryích; je povolen pouze základní výzkum na zvířatech, neboť není možno prozatím vyloučit zdravotní rizika pro těhotnou ženu a prenatální/postnatální vývoj plodu a dítěte.

K těmto rizikům patří i arteficiální zvyšování prevalence určitých genů některých variant genové editace s nárůstem počtu homozygotů v dalších generacích, což by porušovalo rovnováhu mezi homozygoty a heterozygoty v lidském genomu, která je udržována zákony dědičnosti.

Netušený pokrok molekulární genetiky však přináší netušená vysoká rizika jeho zneužití v neprospěch člověka, k čemuž došlo v nacistickém Německu v minulém století.

Z těchto důvodů byl několik let vězněn čínský vědec, kterému se podařilo úspěšně editovat u dvou embryí, která se prozatím vyvíjejí normálně, gen, který chrání před HIV.

### **Zajištění genetické léčebně preventivní péče pro geneticky rizikové rodiny**

Dodržování etických pravidel a právních norem z nich odvozených je základním předpokladem úspěšného využití i nejnovějších metod molekulární genetiky. Chrání zájmy geneticky rizikových rodin a pracovníků genetických poraden oddělení lékařské genetiky, kteří zajišťují klinicko-genetickou diagnostiku integrací získaných výsledků, konečnou diagnózu s určením optimální strategie genetické léčebně preventivní péče interdisciplinární spoluprací se všemi lékařskými obory.

Konečný úspěch je možný pouze tehdy, když rodina či pacient pocítí snahu vyřešit své problémy s využitím všech dostupných metod, pokud nám podají přesné informace o klinickém průběhu dědičného postižení ve třech generacích k průkazu, že zjištěná varianta DNA je patogeneticky významná ke spolehlivé preimplantační/prenatální diagnostice, genové terapii, prevenci a eliminaci dědičného přenosu těžké choroby do dalších generací.

K dosažení tohoto cíle je potřeba trpělivě a s empatií naslouchat jejich názorům a otázkám, radit a doporučovat, srozumitelně uvádět i možná rizika, s nimiž je nutno počítat. Je nutné je ujistit o možnosti opakované konzultace, aby si byli jisti, že rozhodnutí, které přijmou, je to nejlepší, co si přejí a co mohou využít k individualizované genetické léčebně preventivní péči o pacienta a jeho rodinu.

Naše doporučení proto nesmí být nikdy vnucováno, pokud není pacientem/rodinou přijato. Jejich konečné rozhodnutí je vždy nutno respektovat.

Pokud v dané době ještě není optimální řešení technicky možné, je nutno informovat rodinu o možnosti perspektivního úspěchu novými diagnostickými metodami a zajištit stávající léčebné metody spolu s pomocí k sociálnímu zabezpečení postižených členů geneticky rizikové rodiny.

Tyto rodiny trpí rovněž chronickým stresem, neboť jde většinou o závažné choroby a vady s různě vysokým rizikem nejenom pro jejich další děti, ale i děti další generace.

Je proto rovněž důležité připomenout, že molekulárně genetická diagnostika prokázala, že u chronického stresu je i dobré slovo lékem, který pomáhá chránit stabilitu lidské DNA a genomu rodičů a tím i genetické zdraví jejich dětí.

- Kombinace s metodami buněčné terapie transplantací kmenových pluripotentních buněk bez mutace.

#### **Zdokonalování obecného a specializovaného genetického poradenství**

- Zavádění umělé inteligence k integraci a vyhodnocení klinicko-genetických

nálezů s výsledky biochemické genetiky, imunogenetiky, celogenomového sekvenování genomu, transkriptomu a proteomu k určení optimální individualizované genetické prevence, diagnostiky a léčby.

MUDr. Marta Šimůnková