

CRISPR: Nová kapitola do učebnic biologie pro střední školy

JAROSLAV PAVELKA

B

Abstrakt: Článek doporučuje vyučujícím středních škol, aby zařadili do výuky některé informace o aktuálních výzkumech, které se v budoucnu mohou týkat podstatné části lidské populace. V molekulární genetice dochází k významnému technologickému posunu a vyučující i studenti by měli pracovat se současnými trendy. Popsány jsou důvěryhodné, převážně české internetové zdroje, které populární formou přibližují nové výzkumy, ze kterých mohou vyučující i studenti srozumitelně čerpat. Důraz je kladen na metodu CRISPR a její aplikace v boji proti rakovinným buňkám, pro možnou výrobu nového typu antibiotik, jako způsob vyvolání tzv. mutagenní řetězové reakce a jako způsob ovládnutí stávajících genů, či jako začínající výzkum, který by měl v budoucnu umožnit v laboratorních zvířatech pěstovat náhradní lidské orgány. Upozorněno je rovněž na etickou stránku současných výzkumů, například při zmínce o editaci lidských embryí či v jiných případech.

Klíčová slova: aktuální výzkum, popularizace, střední školy, metodika CRISPR, rakovina, HIV viry, regulace genů.

PAVELKA, J. 2018. CRISPR: Nová kapitola do učebnic biologie pro střední školy. *Arnica* 8, 2, 76–84. Západočeská univerzita v Plzni, ISSN 1804–8366.

Rukopis došel 6. 5. 2018, přijat po recenzi 30. 11. 2018.

Jaroslav Pavelka, Centrum biologie, geověd a envigigiky, Fakulta pedagogická, Západočeská univerzita v Plzni, Klatovská tř. 51, Plzeň, 306 19; email: japedos@cbg.zcu.cz

Úvod

Rozvoj molekulární genetiky probíhá mnohem rychleji a dynamičtěji, než je tomu u řady jiných oborů. Mnohé výsledky výzkumu nedávných let se již uplatňují v praxi. Studenti středních škol se však při výuce dozvídají mnohdy až desítky let stará fakta a žádná nová. Přitom zejména výzkumy molekulární genetiky v lékařské sféře zasahují značnou část obyvatel přímo, a to v diagnózách i léčebných postupech. Při dotazech na současnou revoluci v molekulární biologii a její pravděpodobný dopad na lékařství, studenti středních škol při rozhovoru s autorem článku nevykazovali prakticky žádné znalosti. Tato práce se snaží ukázat vyučujícím biologie na středních školách, jak si nenáročnou formou osvojit nejnovější poznatky, které by měli vhodným způsobem zařadit do výuky. Na příkladu výzkumu CRISPRů se pokusíme navrhnout způsob doplňování vlastního vzdělávání. CRISPR jsou segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetit (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), což je pro nezasvěcené málo říkající název, ale lze je využít ke změně smyslu a významu sekvence DNA v živých buňkách a pravděpodobně představují nadcházející novou éru molekulární genetiky. Samozřejmě až čas ukáže, jak se současný výzkum uplatní v praxi, ale první výsledky jsou velmi nadějné a veřejnost a zvláště studenti středních škol, by měli mít aktuální informace, které jim usnadní rozhodování o dalším studiu a zaměření.

Navržený postup získávání informací

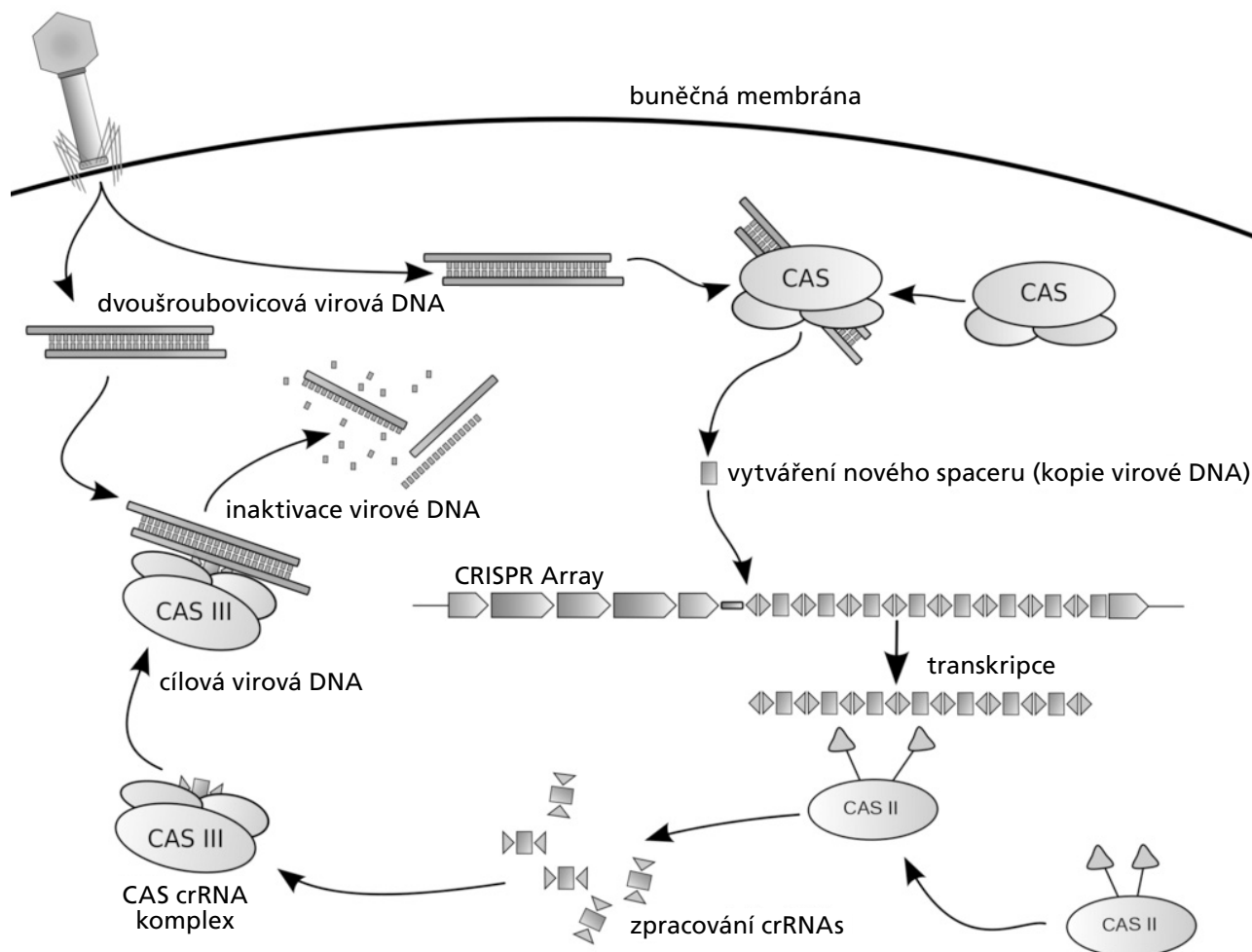
Existuje řada důvěryhodných serverů, kde je možno získat kvalitní a aktuální informace. Výhodné je, pokud vyučující ovládá dobře angličtinu. Na serveru *Science Daily* [1], nebo *Science News* [2] jsou populární formou prezentovány

zajímavé články z kvalitních vědeckých časopisů, z řady oborů. Pod ikonou „Topic“ je možno navolit konkrétnější oblast zájmu. Pokud by se vyučující zaměřil např. na metodiku, která zřejmě představuje zlom v molekulární genetice, tedy na CRISPR, (nebo CRISPR-Cas) je asi vhodnější hledat podle klíčových slov a začít s nejstaršími články. Samozřejmě existují podobné české servery, i když mají omezenější rozsah. Je to zejména *Osel* [3], nebo český *Science World* [4], kde jsou však informace o CRISPR nedohledatelné, a také časopis *Vesmír*, ať již on line [5] nebo v tištěné formě, kde je možné se při pohledu na nejstarší články k danému tématu dozvědět základní informace. Například článek *CRISPR: přesná střelba na genetické cíle* (Petr 2015a) od současného předního popularizátora prof. ing. Jaroslava Petra, DrSc., obsahuje dobře zpracované a snadno zapamatovatelné základní informace v českém jazyce. Článek shrnuje předchozí stav a problémy, kdy např. opravu poškozeného genu bylo možno provádět jen včleněním nového funkčního genu do náhodného místa, při zachování původního poškozeného genu a tato situace je vysvětlována na příkladu z autoservisu (Petr 2015a). Dále pak prof. Petr stručně popisuje princip metody CRISPR a její aplikace, na prvním místě použití proti rakovinným buňkám. Nebo jak pomocí této metodiky vytvořit nový typ antibiotik. Udivující je, jak je možno vyvolat tzv. mutagenní řetězové reakce. Novou perspektivou je i způsob ovládnutí stávajících genů. Samotnému vysvětlení principu fungování metodiky je věnováno poměrně málo prostoru, protože ho autor objasňuje v jiném článku, ale pouze pro předplatitele (Petr 2015b). Pokud není vyučující předplatitel, musí se jako nový zájemce o problematiku pokusit dohledat podrobnosti a narazit na řadu článků, třeba na zmiňovaném serveru *Osel*, kde je

řada příspěvků s novými objevy a možnostmi CRISPR, ale princip technologie je nutno dohledat z více zdrojů. První se nabízí Wikipedie, ale tyto informace je vždy nutno ověřit i jinde. Existuje řada poměrně důvěryhodných zdrojů jako stránky některých biotechnologických firem např. BIOGEN [6], nebo spolehlivý laboratorní průvodce [7], či si lze udělat představu z některých článků, které se vrací k základním podrobnostem (Pazdera 2016). Pochopitelně dobrá znalost angličtiny vše zjednoduší, podobný postup lze úspěšněji aplikovat na *Science Daily* a *Science News*, ale i na základě stručných, ale výstižných informací např. ze serveru *BIOGEN*, se vyučující dozví, základní informace, zejména že CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) – jsou clustery (shluky) pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetic. Jedná se o úseky na prokaryotické DNA, které obsahují krátké repetice nukleotidů. Každou z repetic následují krátké segmenty tzv. spacer DNA, získanými při předchozích setkáních s příslušnými bakteriálními viry nebo plastidy (*BIOGEN* [6]). Tyto informace se do značné míry shodují s textem na *Wikipedii* [8], proto je lze s větší důvěrou využít.

CRISPR metodika

České vědecky popularizační servery mají pro začátečníka v problematice i tu „výhodu“, že informací je méně a čtenář nezabředne do přemíry detailů. A tak lze snadno dohledat i dobře didakticky vysvětlený princip celé CRISPR techniky. Pazdera (2016) na *Oslu* objasňuje funkci klíčového proteinu (nukleázy) Cas9 i funkci CRISPR: *Cas9 je něco jako očkovací průkaz. Bakterie si do něj zapisuje, s jakým virem se již setkala. Nepřítele si totiž s pomocí CRISPR rozstříhá a pak jeho části vloží do svého genomu, jako do deníčku. Informaci pro strýčka příhodu případného dalšího setkání, kdy už by bakterie na infekci zareagovala pohotověji. Takže CRISPR toho znamená poměrně dost, podle toho z jakého úhlu se na jeho funkci ptáme. Je to opakující se sekvence nukleotidů (původně vyplňující virální DNA). CRISPR je také lokus, tedy místo na chromozomu bakterie. Z pohledu funkce to je rozpoznávací systém virové DNA, který nepřítele umí rozstříhat a začlenit do svého genomu v místech zvaných CRISPR lokus. Cas9 je úsek DNA, který kóduje proteiny, spolupracuje s CRISPRem a vzniklé proteiny (helikázy a nukleázy) jsou instrumenty, které dokážou rozplétat a „stříhat“ DNA. Popsané*

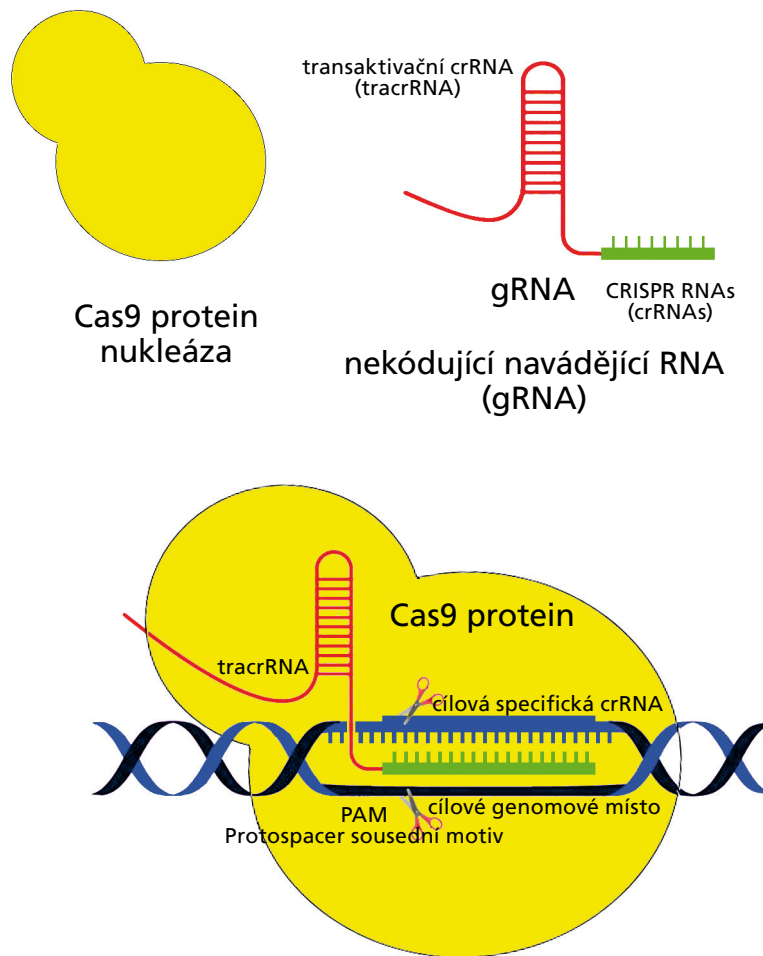


Obr. 1. Princip systému CRISPR/Cas v prokaryotní buňce [9].

bakteriální nářadí se dá využít jako technika k cílené manipulaci s genomem. Jako první na to upozornily dvě vědkyně a to nezávisle na sobě - Jennifer Doudna z University of California v Berkeley a Emmanuelle Charpentier, původem Francouzka. Podle nich je to prý jednoduché. Stačí vzít enzym, kterému se říká nůžky na střihání DNA, doplnit jej o kousky, které pouhým přiložením poznají, kdy jsou na tom správném místě a kde se má stříhat a to je vše. Tím geniálním naváděcím systémem je krátký řetězec ribonukleové kyseliny. On rozhodne o místu, kde enzym nukleáza provede svůj stříh. Protože lidský genom už máme přečtený celý, není problém narušit v něm kterékoliv místo, které si zámáme (Pazdera 2016). Domnívám se, že tento text je psán velmi populárně a přístupně vzhledem k středoškolskému studentovi a je ho možné využít při výuce prakticky doslova, samozřejmě s vysvětlujícím obrázkem, kterých je však na internetu značné množství. Hodnověrný text je i na Wikipedii, kde je schéma původního systému v prokaryotických buňkách (Obr. 1.). Schématicky zobrazená editace genu je také v mnoha různých variantách, (Obr. 2.). Podobně i text prof. Petra je možno využít jako doplňující v autentické podobě: *Technika CRISPR-Cas pro cílené zásahy do dědičné informace, která měla premiéru v roce 2012, se rychle stala „šlágre“ molekulárně genetických laboratoří. Pomocí krátkého řetězce „naváděcí“ ribonukleové kyseliny přesně vyhledá určené místo v dědičné informaci a „molekulárními nůžkami“ enzymu nukleázy Cas pak „střihne“ do dvojité šroubovice DNA. Lze tak nejen s vysokou účinností narušit zvolené místo v dědičné informaci, nebo naopak na určené místo v genomu vnést úsek cizí DNA, ale také „brzdit“ nebo „akcelarovat“ jednotlivé geny. CRISPR-Cas se tak nabízí k využití pro mnoho praktickým účelů* (Petr 2015a).

Samozřejmě pokud chce vyučující do problematiky proniknout hlouběji, existuje česká kvalifikační práce z Masarykovy university, kde je téma zpracováno odborněji (Svobodová 2016). V dostupných populárních článcích jsem např. nenašel vysvětlení funkce sgRNA, která je obsažená v proteinu Cas9 a má v systému klíčovou roli. Pazdera (2016) tuto RNA popisuje jako „očkovací průkaz“, ale sgRNA přímo nejmenuje. V kvalifikační práci je její funkce popsána odbornějším jazykem a je uvedeno, že se jedná o chimérickou sgRNA (single guide RNA) složenou jen z jediného vlákna (Svobodová 2016).

Po vysvětlení principu je potřeba následně ukázat na značně široké a zásadní spektrum využití a zde se otevírá řada možností, buď vyučující jen opět dohledá starší články,



CRISPR – Cas9 systém

Obr. 2. Aplikace CRISPR-Cas9 systému na cílenou editaci vybraného úseku DNA.

kde je určité shrnutí, nebo zkusí téma doplnit i o současné výzkumy z aktuálního roku, které jsou v češtině nejen v časopise *Vesmír*, ale velmi často na serveru *Osel*. V již citovaném starším článku Petra (2015) jsou uvedeny příklady použití, které by s velkou pravděpodobností mohly studenty zaujmout. Jedná se zejména o způsob léčení rakoviny. Systém CRISPR-Cas je možno zacílit na „nádorovou verzi“ genu, zatímco geny ve zdravých buňkách nijak atakovat nebude. Ničila by se jen dědičná informace rakovinných buněk, které by pak hynuly (Petr 2015a). Tato idea už byla vyzkoušena v praxi. Podařilo se v laboratorních podmínkách ničit buňky Burkittova lymfomu pomocí CRISPR-Cas systému poškozením genu MCL-1 (Aubrey *et al.* 2015, Petr 2016b.).

Někdy je vhodné se podívat i do rzye odborné literatury, ze které vyplývá, že od roku 2017 je k dispozici obsáhlá databáze genů specifických pro nádory a pro vývoj cílených terapií (<http://pickles.hart-lab.org>) (Lenoir *et al.* 2017). Tato databáze bude v budoucnu nezbytná pro individuální léčbu pacientů s konkrétním typem nádoru.

Dalším tématem jdou virózy, konkrétně infekce virem HIV, čehož využívá jako upoutávky i Petr (2015a). Autor

komentuje publikaci, ve které autoři demonstrovali jak lze pomocí CRISPR-Cas ničit virovou dědičnou informaci přímo uvnitř buněk (Liao *et al.* 2015, Petr 2015a). Oproti současnému stavu léčby je to obrovský pokrok, protože dnešní léky jsou schopné potlačovat volné virové částice, ale s těmi začleněnými v buňkách si neporadí a z toho důvodu musí pacienti brát léky do konce života. CRISPR-Cas úspěšně virovou informaci zničil v 70 % všech ošetřených buněk. Navíc pokud se CRISPR-Cas systém dostal do buněk dříve než HIV virus, zničil virovou dědičnou informaci ještě před jejím začleněním do lidské DNA (Petr 2015a, Liao *et al.* 2015).

Uvažovaným způsobem využití jsou také „krisprová antibiotika“, která by cílila jen na konkrétní bakterie. Byla již vyzkoušena např. na kmen směsné populace bakterií *Escherichia coli* (Citorik *et al.* 2014), nebo na methicilin-rezistentní populaci *Staphylococcus aureus* (MRSA). Rovněž v tomto případě dokázalo „krisprové antibiotikum“ výrazně snížit podíl MRSA ve směsné populaci a to z 50 % na 0,4 % (Bikard *et al.* 2014, Petr 2015a). Autoři originálních prací vyzdvihují oproti nyní používaným antibiotikům specifickou CRISPRu, který lze připravit tak, aby cílil na jeden vybraný gen jednoho organismu, zatímco současná antibiotika ničí celé spektrum bakterií, včetně těch pro člověka prospěšných. Ovšem ani autoři originálních prací, ani jejich popularizátoři neuvádí, že už dávno existuje srovnatelný systém. CRISPR-Cas systém musí být do bakteriálních buněk zaváděn přes bakteriofágy. Což se nejeví jako ideální způsob, protože je znám pravděpodobně stejně účinný, ne-li účinnější způsob likvidace vybraných bakterií, pomocí klasických lyzujících bakteriofágů, případně jejich enzymů. Na tomto místě by se vyučující mohl zastavit a nastítnit způsob léčení pomocí bakteriofágů, který byl objeven ve dvacátých letech dvacátého století a zase ve čtyřicátých letech dvacátého století opuštěn, v rámci dobového nadšení z antibiotik. Pokračování výzkumu v této oblasti se pak věnoval pouze jediný výzkumný ústav v Tbilisi (Gruzie) a teprve v posledních letech dochází znovu k oživení zájmu o tuto metodu i v dalších pracovištích, zejména v Polsku (Weber-Dabrowska *et al.* 2002, Miedzybrodzki *et al.* 2007). Zde by bylo vhodné uvést, že pokud nebude vyvinut lepší způsob jak CRISPR-Cas systém dostat do bakteriálních buněk, bude asi vhodnější kombinace specifických bakteriofágů a antibiotik, jak se podařilo dokumentovat tureckým výzkumníkům (Yilmaz *et al.* 2013). Jejich práce bohužel neměla takový ohlas, jaký by si zasloužila.

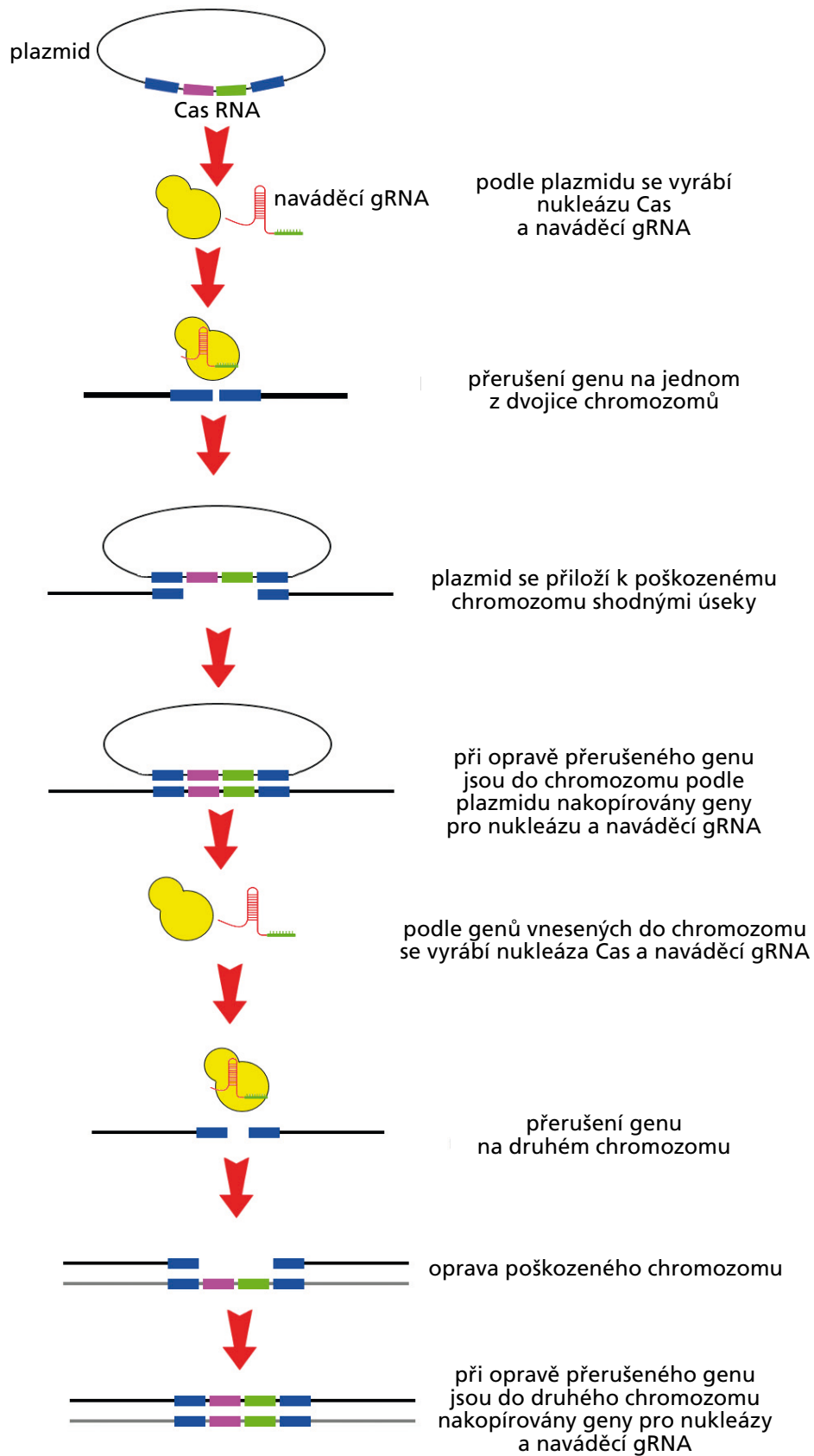
Ovšem technika CRISPR-Cas navozuje další obrovské použití. Obvykle jsou instrukce pro tvorbu příslušného komplexu „vyhledávací“ RNA s „molekulárními nůžkami“ nukleázy Cas vnášeny do organismu tak, aby se nástroj vytvořil na krátkou dobu, odvedl svou práci a pak zase zmizel (Petr 2015a). Avšak byl vytvořen systém, který

funguje v každé buňce a přenáší se do dceřiných buněk při dělení a tento systém byl inkorporován do embrya octomilky. V pokusu šlo o vyřazení genu pro zbarvení těla. Gen byl vyřazen ve všech buňkách, na obou chromozómech a moucha měla odlišnou barvu (Gantz & Bier 2015, Petr 2015a). To se nezdá zase tak zvláštní, i když je to velký úspěch, ale při křížení s normálními octomilkami došlo k tomu, že systém v nově vzniklém jedinci vyřadil gen na chromozómu i od normálního druhého rodiče a tak v potomstvu bylo více než 95 % jedinců s vyřazenými oběma geny (Gantz & Bier 2015, Petr 2015a). Dědičnost modifikovaného genu pak nebyla v souladu s Mendlovými zákony, které při použití této techniky přestávají platit. Pochopitelně jen pro geny modifikované tímto systémem. Fenomén nazvali autoři mutagenní řetězová reakce (mutagenic chain reaction – MCR) (Obr. 3 a 4). Takto by bylo možné ve velmi krátké době změnit celé hmyzí populace; například u nich způsobit vypnutí genů, které umožňují v jejich organismu množení malárie, či jiných přenosných onemocnění (Petr 2015a). Samozřejmě se dá tato metodika využít i v lékařství na vypnutí genu jen v jednom jedinci a jeho konkrétním orgánu a podobně. Zde by se měl vyučující zastavit a rozebrat etické problémy a možnosti zneužití. Záleží na něm, které aspekty zdůrazní, zda je dobré vyhubit malárii, která vlastně chrání některé oblasti v Africe před zničením a přeměnou na zemědělskou půdu, nebo zdůrazní pomoc místnímu obyvatelstvu možnostmi moderní medicíny a potřebou vzrůstající kvality života, což by mimo jiné mohlo pomoci omezit populační růst. Nebo lze probrat případné vojenské, či teroristické zneužití. Scénářů se dá vymyslet celá řada.

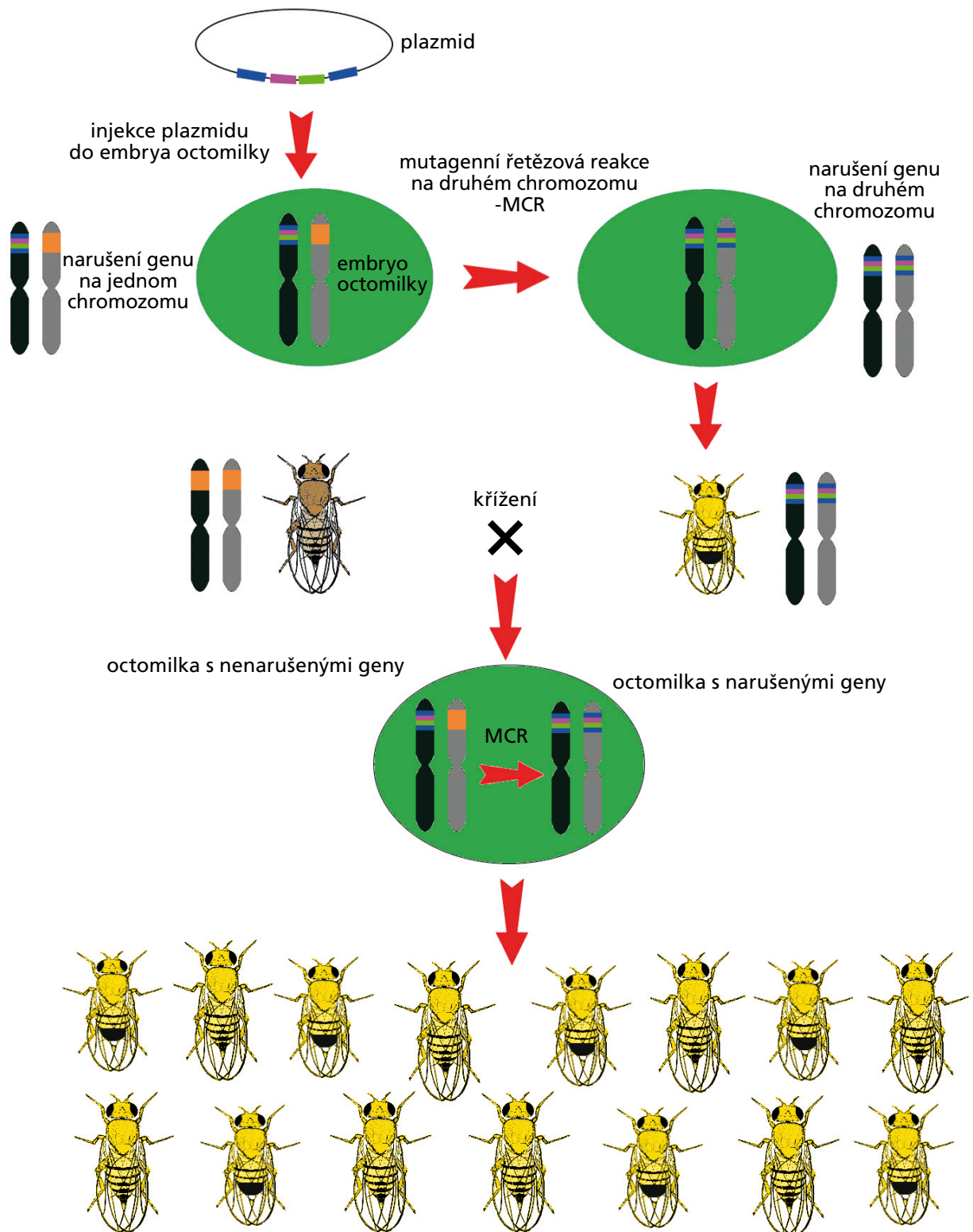
Technologie CRISPR však otevírá i možnosti, které se donedávna zdály vzdálenou budoucností. Jedná se o přímou regulaci exprese genů. CRISPR komplex se připojí na cílové místo, avšak molekula Cas je pozměněna, aby už nemohla rozpojit DNA řetězec. Tým vedený Wendellem Limem z University of California v San Francisku k systému navíc připojil další bílkoviny, které regulují přepis z DNA na RNA. Je možno přidat bílkoviny, které přepisu brání, ale také molekuly, které naopak přepis urychlují. V zásadě je tedy možné připravit systém na cílovou DNA a pak je přepis omezit, nebo naopak urychlit (Zalatan *et al.* 2015, Petr 2015a). Tento postup byl vyzkoušen na kvasinkách i buněčných kulturách lidských buněk. I když výsledek nebyl vždy jednoznačný, v řadě případů se povedl podle očekávání (Petr 2015a). Je však pochopitelné, že zatím nelze vždy snadno měnit poměrně složité systémy exprese genů.

V této souvislosti je vhodné vysvětlit studentům obrovské možnosti metodiky, pokud se bude úspěšně rozvíjet a bylo by vhodné se zmínit krátce o složitosti regulace exprese genů v organismu. Zejména, že regulace aktivity transkripčních faktorů vede přes signální dráhy. Na tomto

mutagenní řetězová reakce



Obr.3. Mutagenní řetězová reakce (mutagenic chain reaction – MCR) (upraveno dle Petr 2015a).



Obr. 4. Šíření cílené mutace na další chromozóm a do další generace (upraveno dle Petr 2015a).

místě by bylo vhodné uvést, co jsou signální dráhy v organismu a jejich důležitost. Předpokládám, že studenti již znají transkripci, proto lze zmínit funkci transkripčních faktorů, které jsou na konci signálních drah, a podle jejich pokynů přecházejí z aktivního stavu do inaktivního, případně obráceně. Lze zdůraznit, že bez transkripčních

faktorů samotná transkripce nezačne, případně je ukončena. Aktivita transkripčních faktorů je většinou spuštěna fosforylací katalyzovanou proteinkinázami.

Regulaci genových expresí je však možno provádět i dalším způsobem. Jedná se o to, jak je DNA uvolněná či „namotaná“ na bílkoviny chromozómu, zejména se jedná

o tzv. histony, které Petr (2015a) vysvětluje jako „cívky“ na které je DNA „namotána“, což je poměrně dobrá analogie, pod kterou si čtenáři Vesmíru, v našem případě studenti, mohou udělat snadnou představu. A právě rozmotání, či nerozmotání DNA je klíčové. Je asi pochopitelné, že namotaná DNA nemůže být přepisována do RNA. Opět pomocí CRISPR techniky s neštípající molekulou Cas je možno na specifické místo navázat systém, ve kterém je tentokrát přítomna bílkovina, která mění způsob namotání. Vědci pod vedením Charlese Gersbacha z Duke University zacílili na DNA oblasti, kde jsou zesilovače, či promotory, tedy místa, kde začíná přepis do RNA (Hilton *et al.* 2015, Petr 2015a). Právě zde je zatím mnoho neobjeveného a tato technika otevírá jedinečnou možnost, jak funkce a významy jednotlivých zesilovačů prozkoumat. Tento tým samozřejmě dále pokračuje v práci a pokouší se nalézt v buňkách známé a dosud neidentifikované regulační prvky (Klann *et al.* 2017).

■ Provázanost témat

Po získání informací ze starších článků by se mohl vyučující podívat i na aktuálnější, třeba na *Oslu*, kde doktor Mihulka (2016) výrazně hovorovým jazykem popularizuje některé novinky. Například popisuje, jak byly s pomocí CRISPRů vytvořeny chiméry mezi člověkem a prasetem, což je výzkum, který by měl v budoucnu umožnit v prasetech pěstovat náhradní lidské orgány. Zatím je vše teprve na začátku a náhradní orgány nejsou v dohledu. Pomocí CRISPRů byly v zárodečných buňkách vypnuty geny odpovědné za tvorbu vybraných orgánů, a k nim byly přidány pluripotentní kmenové buňky, tedy takové, z nichž může vzniknout téměř každá tělní buňka. Embrya si musela orgány vytvořit z těchto cizích buněk. Dobře to fungovalo u blízkých druhů, jako jsou myši a potkani, ale hůře mezi člověkem a prasetem. V takovém případě byla jedna lidská na sto tisíc buněk prasečích, a to není mnoho (Mihulka 2017, Wu 2017). Zde je asi cíl jasný a stačí studentům zdůraznit, že cesta k úspěchu bude asi delší a rozhodně není úspěch zaručen.

Etické téma, které by mohlo studenty zaujmout, je zásah do lidského embrya. Nejrůznější etici, i biologičtí, proti něčemu podobnému léta brojili. Znovu se tak potvrdilo, že co není možné v Evropě, provede se v Číně. Stojí za to se zamyslet nad tím, co je etika, jaké jsou její hranice a zda naše etika není jen kontraproduktivní, protože k čemu je dobrá, když kvůli ní nás jen předběhnou jiní. Co je etické a co již není je úzce provázáno s kulturní tradicí. V současnosti začal podobný výzkum editace lidského embrya i ve Velké Británii. První data již byla publikována v *Nature* (Fogarty *et al.* 2017). O přípravě těchto pokusů již referuje Mihulka (2016) v *Oslvi*, kde popisuje, že v projektu nejde o nic hrůzostrašného, ale jedná se o studium genů,

kteří řídí jednotlivé kroky nejranějšího vývoje lidských embryí. V dnešní době se při oplození ve zkumavce vyvíjí jen polovina oplodněných embryí natolik, aby mohla být úspěšně vložena do žen, a z nich zase jen polovinu ženy donosí až k porodu (Mihulka 2016). Výzkum na tomto poli byl dříve prováděn u myši a přece jen u člověka jsou asi určité rozdíly.

Vyučující by měl zdůraznit, že výzkum v této oblasti je v pohybu. V roce 2017 vyšel článek, o kterém referuje i Petr (2017). Zmiňuje článek, který vážně narušuje vše, co se metodě CRISPR zatím zjistilo. Píše o Stephenu Tsangovi, který zkoumá na Columbijské univerzitě možnosti oprav mutací způsobujících těžká poškození oka. Tsang a jeho spolupracovníci přečetli dědičnou informaci dvou myši, která byla vystavena účinkům CRISPR-Cas9 při léčbě dědičného onemocnění oka, a také dědičnou informaci myši, na jejíž DNA tento nástroj nepůsobil. Při porovnání tří genomů napočítali tisíce rozdílů mezi myši léčenými pomocí CRISPR-Cas9 a myši, která neměla upravovanou DNA. Většinu takto vzniklých odchylek přičetli tomu, že se CRISPR-Cas9 nestrefil do cílového místa a přestříhl DNA tam, kde neměl (Petr 2017, Schaefer *et al.* 2017). Pak by použití metodiky bylo velmi sporné a obrovské naděje by se začaly rozplývat. Ovšem článek byl podroben zdrcující kritice a byly v něm nalezeny vážná opomenutí. Na stránkách časopisu *Nature Methods* jeho redaktoři uveřejňují aktuální vyjádření, že začíná podrobné vyšetřování. Vyučující by měl vysvětlit studentům princip vědy a vědeckých metod a fungování vědeckých časopisů jako hodnověrných pramenů, kde se však mohou objevit i omyly. Ty jsou však dříve či později podrobeny revizi. Na rozdíl od neseriózních informací, kterým mnohdy neinformovaní lidé dávají větší váhu.

■ Přehled současných možností použití systému CRISPR

Stručný přehled dosavadních technologií uvedl časopis *Nature* na konci roku 2017 (viz Tycko *et al.* 2017). Uvádíme stručný výtah. Za povšimnutí stojí, že „krisprová antibiotika“ se v přehledu neuvádí.

■ 1. Transkripční regulace

Lze přesně a robustně modulovat expresi genu. Nabízí použití pro zjišťování genových funkcí konkrétních genů v rámci celého genomu.

■ 2. Genový knockout

Vypnutí genů bylo jednou z prvních a nejrozšířenějších aplikací systému CRISPR-Cas9. Zavádějí se indely, („indel“ je termín pro vložení nebo vymazání bází v genomu – inzerce či delece), které mohou produkovat posuny čtecích rámců a stop kodony, což vede k funkčnímu vyřazení genu.

3. Epigenetická editace

Enzym nukleáza dCas9 může být fúzován s určitými speciálními oblastmi na DNA, kde se vážou proteiny aktivující, nebo potlačující aktivitu genů. Ty, které nás zajímají, se nazývají epigenetické efektorové domény a mohou být využity k cílené změně funkce genů, tedy k cílené epigenetické editaci. Těmito změnami je možno vytvářet, nebo mazat histonové modifikace či měnit DNA metylace. Což jsou klíčové věci, pokud jde o modulování aktivity genů.

4. Základní úpravy

V současné době může být nukleáza dCas9, nebo Cas9 nickáza (nCas9), připojována k enzymům cytidin deaminázám a je schopná vyvolat substituce, nebo některé úpravy bez nutnosti vytvořit dvouřetězcové zlomy, čímž se minimalizují problémy s nechtěnými inzercemi a delecemi. Zvláště precizní úpravy (editování) genů je možno provádět s enzymy deaminázami kombinovanými s inhibitory Cas9 nickázami a uracilovými DNA glykosylázami, ale existují i další alternativy (více Tycko *et al.* 2017).

5. Zobrazení CRISPRů

dCas9 je možno spojit s jednou nebo více fluorescenčními molekulami a tak lze sledovat specifická místa na DNA přímo živých buňkách.

Shrnutí

Práce zdůrazňuje doplňování výuky využíváním českých dostupných internetových zdrojů se zřetelem na jejich důvěryhodnost. Na konkrétním příkladě CRISPRů je poukázána nutnost doplňování vzdělání výukových témat vyučujících biologie pro střední školy, vzhledem k aktuálně probíhajícím objevům. Zařazení aktuálních poznatků, přispěje jak zvýšení prestiže biologie na středních školách, tak konkrétního vyučujícího u jeho studentů.

Poděkování

Děkuji Petře Vágnerové za revizi textu a připomínky.

Literatura

AUBREY, B. J., KELLY, G. L., KUEH, A. J., BRENNAN, M. S., O'CONNOR, L., MILLA, L., WILCOX, S., TAI L., STRASSER, A. & HEROLD, M. J. 2015. An inducible lentiviral guide RNA platform enables the identification of tumor-essential genes and tumor-promoting mutations in vivo. *Cell Reports* 10 (8): 1422–1432.

BIKARD, D., EULER, C. W., JIANG, W., NUSSENZWEIG, P. M., GOLDBERG, G. W., DUPORTET, X., FISCHETTI, V. A. & MARRAFFINI, L. A. 2014. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nature Biotechnology* 32 (11): 1146–1150.

CITORIK, R. J., MIMEE, M. & LU, T. K. 2014. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nature Biotechnology* 32 (11): 1141–1145.

FOGARTY, N. M. E., MCCARTHY, A., SNIJDERS, K. E., POWELL, B. E., KUBIKOVA, N., BLAKELEY, P., LEA, R., ELDER, K., WAMAITHA, S. E., KIM, D., MACIULYTE, V., KLEINJUNG, J., KIM, J. S., WELLS, D., VALLIER, L., BERTERO, A., TURNER, J. M. A. & NIAKAN, K. K. 2017. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature* 550: 67–73.

GANTZ, V. M. & BIER, E. 2015. Genome editing. The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science* 24 (348): 442–444.

HILTON, I. B., D'IPPOLITO, A. M., VOCKLEY, C. M., THAKORE, P. I., CRAWFORD, G. E., REDDY, T. E. & GERSBACH, C. A. 2015. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology* 33: 510–517.

KLANN, T. S., BLACK, J. B., CHELLAPPAN M., SAFI, A., SONG, L., HILTON, I. B., CRAWFORD, G. E., REDDY, T. E. & GERSBACH, C. A. 2017. CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nature Biotechnology* 35(6): 561–568. DOI 10.1038/nbt.3853.

LENOIR, W. F., LIM, T. L. & HART, T. 2017. PICKLES: the database of pooled in-vitro CRISPR knockout library essentiality screens. *Nucleic Acids Research* 25.

LIAO, HK., GU, Y., DIAZ, A., MARLETT, J., TAKAHASHI, Y. LI, M., SUZUKI, K., XU, R., HISHIDA, T., CHANG, CJ., ESTEBAN, CR., YOUNG, J. & IZPISUA BELMONTE, JC. 2015. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nature Communications* 10, 6.

MIEDZYBRODZKI, R., FORTUNA, W., WEBER-DABROWSKA, B. & GÓRSKI, A. 2007. Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment. *Postepy Hig Med Dosw* 3, 61: 461–465.

MIHULKA, S. 2016. Britští genetici budou editovat genom lidských embryí. *Osel*, <http://www.osel.cz/8645-britstigenetici-budou-editovat-genom-lidskych-embryi.html>

MIHULKA, S. 2017. Vítejte v hybridní ZOO: Vědci vytvořili první chiméry mezi lidmi a prasaty. *Osel*, <http://www.osel.cz/9216-vitejte-v-hybridni-zoo-vedci-vytvorili-prvni-chimery-mezilidmi-a-prasaty.html>

PETR, J. 2015a. CRISPR: přesná strelba na genetické cíle, *Vesmír*, <https://vesmir.cz/cz/on-line-clanky/2015/05/crispr-presna-strelba-geneticke-cile.html#pozn2>

PETR, J. 2015b CRISPR-Cas9 – průlom v přírodních vědách. *Vesmír* 94: 288.

PETR, J. 2017. Když CRISPR přejde chuť. *Vesmír* 96, 550.

PAZDERA, J. 2016. CRISPR prakticky již získal federální souhlas k použití na lidech. *Osel*, <http://www.osel.cz/8902-crispr-ziskal-federalni-souhlas-k-pouziti-na-lidech.html>

SCHAEFER, K. A., WU, W. H., COLGAN, D. F, TSANG, SH., BASSUK, A. G. & MAHAJAN, V. B. 2017. Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo. *Nature Methods* 30 (14): 547–548.

SVOBODOVÁ, E. 2016. *Metoda CRISPR/Cas9 a její využití pro genetické modifikace kmenových buněk*. Bakalářská práce MU univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/423801/prif_b/Bakalarska_prace_Eliska_Svobodova.pdf

TYCKO, J., HESS, G. T., JENG, E. E., DUBREUIL, M. & BASSIK, M. C. 2017. The expanding CRISPR toolbox. *Nature*. <https://www.nature.com/collections/txhdfslxzh/posters>

WEBER-DABROWSKA, B., ZIMECKI, M., MULCZYK, M. & GÓRSKI, A. 2002. Effect of phage therapy on the turnover and function of peripheral neutrophils. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 11 (34): 135–138.

WU, J., PLATERO-LUENGO, A., SAKURAI, M., SUGAWARA, A., GIL, MA, YAMAUCHI, T., SUZUKI, K., BOGLIOTTI, Y. S., CUELLO, C., MORALES VALENCIA, M., OKUMURA, D., LUO, J., VILARIÑO, M., PARRILLA, I., SOTO, D. A., MARTINEZ, C. A., HISHIDA, T., SÁNCHEZ-BAUTISTA, S., MARTINEZ-MARTINEZ, M. L., WANG, H., NOHALEZ, A., AIZAWA, E., MARTINEZ-REDONDO, P., OCAMPO, A., REDDY, P., ROCA, J., MAGA, E. A., ESTEBAN, C. R., BERGGREN, W. T., NUÑEZ DELICADO, E., LAJARA, J., GUILLEN, I., GUILLEN, P., CAMPISTOL, J. M., MARTINEZ, E. A., ROSS, P. J., IZPISUA BELMONTE, J. C. 2017. Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells. *Cell* 26 (168): 473–486.

YILMAZ, C., COLAK, M., YILMAZ, B. C., ERSOZ, G., KUTATELADZE, M. & GOZLUGOL, M. 2013. Bacteriophage therapy in implant-related infections: an experimental study. *Journal of Bone and Joint Surgery* 95, 117–125.

ZALATAN, J. G., LEE, M. E., ALMEIDA, R., GILBERT, L. A., WHITEHEAD, E. H., LA RUSSA, M., TSAI, J.C., WEISSMAN, J. S., DUEBER, J. E., QI, L. S. & LIM, W. A. 2015. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell* 15 (160): 1–2.

[1] <https://www.sciencedaily.com/>

[2] <https://www.sciencenews.org/>

[3] <http://www.osel.cz/>

[4] www.scienceworld.cz

[5] <https://vesmir.cz/cz/>

[6] <https://biogen.cz/crispr-technologie>

[7] http://www.labo.cz/clanky/clanky.php?id_clanek=830

[8] <https://cs.wikipedia.org/wiki/CRISPR>

[9] James Atmos – Vlastní dílo, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=7821536>

E English summary

CRISPR: New chapter for the secondary-school biology text-books

The article appeals to secondary school lecturers to include some information about current surveys that are likely to affect most of the population. Molecular genetics seems to have revolutionized, and a students and lecturers should work with current trends. We describe trusted predominantly Czech Internet resources, which in popular form describe new researches from which the teacher can draw effortlessly. We are pointing to the CRISPR method and its application against cancer cells, for the possible production of a new type of antibiotic, as a way of inducing a so-called mutagenic chain reaction, and as a way of controlling existing genes, or by starting a research that should allow human organs to grow in pigs for transplantation. We also try to draw on the ethical side of current research, for example we mentioning the human embryo editing, but also in other cases.

Key words: Current research, popularization, secondary schools, CRISPR methodology, cancer, HIV viruses, gene regulation.