



Vanda Repiská
Helena Gbelcová
Petra Priščáková
Martina Čulenová

NOVÉ TRENDY V LEKÁRSKEJ BIOLÓGII A KLINICKEJ GENETIKE



Vanda Repiská, Helena Gbelcová, Petra Priščáková, Martina Čulenová

Nové trendy v lekárskej biológii a klinickej genetike

Vysokoškolská učebnica pre pregraduálne a postgraduálne štúdium
na lekárskech fakultách

2024

Univerzita Komenského v Bratislave

Financované EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I0X-03-V04-00253 a Ministerstvom školstva, výskumu, vývoja a mládeže Slovenskej republiky prostredníctvom grantov VEGA č. 1/0198/24 a VEGA č. 1/0405/22.

© Autori, 2024

prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD., MPH [3,05 AH]

Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky

doc. Ing. Helena Gbelcová, Ph.D. [3,14 AH]

Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky

RNDr. Petra Priščáková, PhD. [3,51 AH]

Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky

MUDr. Martina Čulenová, PhD. [3,31 AH]

Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky

Recenzenti

Prof. RNDr. Erika Halašová, PhD.

Doc. MUDr. Daniel Böhmer, PhD.

Dr.h.c. prof. Ing Dušan Bakoš, DrSc.

Ilustrácia na obálke

Juraj Hutník

Ilustrácie

Autorky (ak nie je uvedené inak)



Publikácia je šírená pod licenciou Creative Commons CC BY-NC-SA 4.0

(vyžaduje sa: povinnosť uvádzať pôvodného autora, len nekomerčné použitie, povinnosť odvodené dielo zdieľať pod rovnakou licenciou ako pôvodné dielo). Viac informácií o licencií

a použití diela: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



https://stella.uniba.sk/texty/LF_kol_lekarska_biologia_klinicka_genetika-trendy.pdf

Vydavateľ

Univerzita Komenského v Bratislave

ISBN 978-80-223-5961-0 (online)

Obsah

Predhovor.....	7
1 Sekvenovanie nukleových kyselín (<i>Petra Prišćáková, Vanda Repiská</i>).....	8
1.1 Prvá generácia sekvenovania.....	9
1.1.1 Maxam-Gilbertova chemická metóda sekvenovania	9
1.1.2 Sangerova enzymatická metóda sekvenovania	10
1.2 Prístupy k sekvenovaniu	13
1.2.1 <i>Shotgun</i> sekvenovanie.....	13
1.2.2 <i>Primer walking</i>	13
1.3 Ako vyhodnotiť elektroforetogram?	14
1.4 Masívne paralelné sekvenovanie	16
1.5 Sekvenovanie druhej generácie	17
1.5.1 Príprava knižníc	18
1.5.2 Amplifikácia templátov.....	19
1.5.3 Sekvenovanie a zobrazovanie	21
1.5.4 Sekvenačné prístupy	21
1.5.5 Pyrosekvenovanie (adícia jednotlivých nukleotidov)	22
1.5.6 Cyklická reverzibilná terminácia (CRT)	25
1.5.7 Sekvenovanie na iónových polovodičoch.....	29
1.5.8 Sekvenovanie pomocou ligácie (SBS, <i>sequencing-by-ligation</i>).....	30
1.5.9 Zarovnávanie a skladanie genómu	34
1.5.10 Záverečné porovnanie	35
1.6 Sekvenovanie tretej generácie	37
1.6.1 Jednomolekulové sekvenovanie v reálnom čase (<i>Pacific Biosciences</i>)	37
1.6.2 Sekvenovanie pomocou nanopórov	38
1.6.3 Syntetické dlhé čítania	40
1.6.4 Hybridné sekvenovanie.....	41
1.7 Sekvenovanie štvrtej generácie.....	41
Literatúra	42
2 Metódy analýzy nukleových kyselín založené na sekvenovaní (<i>Petra Prišćáková</i>)... 	44
2.1 Sekvenovanie DNA	44
2.1.1 Cílené sekvenovanie.....	44
2.1.2 SNaPshot genotypizácia.....	46

2.2	RNA sekvenovanie	47
2.3	Sekvenovanie nukleových kyselín z jednej bunky	49
2.4	Sekvenovanie fragmentov zachytených chromatínovou imunoprecipitáciou	50
2.4.1	Profilizácia histónových modifikácií	51
2.4.2	Profilizácia DNA metylácie	52
	Literatúra	55
3	Ľudský genóm (<i>Vanda Repiská</i>)	56
3.1	História projektu „Ľudský genóm“	56
3.2	Ciele projektu „Ľudský genóm“	61
3.3	Výsledky projektu „Ľudský genóm“	62
3.3.1	Vedecké výsledky vyplývajúce z projektu „Ľudský genóm“	62
3.3.2	Výsledky riešenia etických problémov vyplývajúcich z projektu „Ľudský genóm“	67
3.4	Nové genómové projekty	69
	Literatúra	74
4	Využitie kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie (<i>Petra Priščáková</i>)	75
4.1	Optimalizácia krokov kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie	80
4.1.1	Extrakcia RNA	80
4.1.2	Reverzná transkripcia	82
4.1.3	Kvantitatívna PCR	83
4.1.4	Vhodný výber referenčného génu	83
4.1.5	Ako postupovať pri výbere a validácii referenčných génov?	86
4.2	Technológie odvodené od polymerázovej reťazovej reakcie	88
4.2.1	Digitálna polymerázová reťazová reakcia	88
4.2.2	Prevedenia digitálnej PCR	90
4.2.3	Je pre môj experiment vhodnejšia qPCR alebo dPCR?	91
4.3	Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia jednej bunky (<i>Single-cell qPCR</i>)	93
4.4	Mikročipy a RNA sekvenovanie	96
4.5	Vybrané aplikácie kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie	97
4.5.1	Detekcia infekčných agensov	97
4.5.2	Predimplantačné genetické testovanie aneuploidí a genotypizácia reprodukčných strát	100
4.5.3	Využitie qPCR a dPCR na zachytenie počtu kópií DNA fragmentov	104
4.5.4	Využitie qPCR a dPCR pri tekutej biopsii	106
	Literatúra	108

5	CRISPR/Cas (<i>Helena Gbelcová</i>)	110
5.1	Charakteristika CRISPR/Cas	112
5.1.1	Štruktúra lokusu CRISPR/CAS	112
5.2	Klasifikácia CRISPR/Cas systémov	113
5.3	Molekulárny mechanizmus účinku CRISPR/Cas	119
5.3.1	Adaptácia	120
5.3.2	Biogenéza	121
5.3.3	Interferencia	122
5.4	Editácia genómu pomocou CRISPR/Cas9	122
5.5	Otázky bezpečnosti súvisiace s aplikáciou systému CRISPR/Cas	123
5.6	Možnosti využitia CRISPR/Cas v medicínskej praxi	125
5.7	CRISPR/Cas v diagnostike a liečbe monogénovo podmienených ochorení	125
5.7.1	Liečba beta-talasémie a Leberovej kongenitálnej amaurozy	126
5.7.2	Diagnostika kosáčikovej anémie a amyotrofickej laterálnej sklerózy SNP CRISPR/CAS čipmi	126
5.7.3	SHERLOCK a DETECTR	127
5.8	CRISPR/Cas a imunoterapeutická stratégia pri liečbe onkologických ochorení	127
5.9	CRISPR/Cas v boji proti patogénom človeka	131
5.9.1	Liečba bakteriálnych infekcií rezistentných na antibiotiká	132
5.9.2	Liečba protozoálnych infekcií	142
5.9.3	Antivirálna terapia	143
5.9.4	Prevenencia priónových ochorení	146
5.10	CRISPR/Cas v regeneračnej medicíne	147
5.10.1	Metódy indukcie diferenciácie kmeňových buniek na chondrocyty hyalínovej chrupavky	147
5.10.2	Potenciálne molekulárne ciele CRISPR/Cas9 pri liečbe osteoartritídy	151
5.11	CRISPR/Cas a transplantácie solídnych orgánov	153
5.11.1	Editovanie génov na bunkovej úrovni <i>in vivo</i> a <i>ex vivo</i>	153
5.11.2	Xenotransplantácie a humanizované prasacie pečene	154
5.11.3	Chimérické orgány a komplementácia blastocýst	155
5.11.4	Potenciál ďalšieho využitia CRISPR technológií v transplantáciách	156
5.12	Alternatívy nástroja CRISPR/Cas	157
5.13	Etické otázky	158
	Literatúra	160
6	Génová terapia (<i>Vanda Repiská</i>)	161

6.1	Ochorenia liečené génovou terapiou	162
6.2	Základné požiadavky na úspešnú génovú terapiu.....	165
6.3	Základné spôsoby génovej terapie	166
6.4	Výhody a limitácie génovej terapie	168
	Literatúra.....	170
7	Tkanivové inžinierstvo (<i>Martina Čulenová</i>).....	171
7.1	Skafoldy – kostra tkanivových konštruktov	174
7.2	Extracelulárny matrix.....	175
7.3	Biomateriály používané na výrobu skafoldov	178
7.3.1	Syntetické polyméry	179
7.3.2	Prírodné polyméry	181
7.3.3	Keramika.....	183
7.3.4	Hybridné materiály	185
7.3.5	Hydrogély	185
7.4	Biokompatibilita – kľúčová vlastnosť materiálov	187
7.5	Porézna štruktúra skafoldov a technológie výroby umožňujúce porézny dizajn	191
7.5.1	Porézna štruktúra skafoldu	191
7.5.2	Technológie výroby skafoldov	192
7.6	Bioreaktory	198
7.7	Bunky aplikované v tkanivovom inžinierstve	201
7.7.1	Základné zdroje buniek.....	201
7.8	Interakcie medzi skafoldom a bunkami	217
7.9	Imunoinžinierstvo – budúcnosť regeneratívnej medicíny	221
7.9.1	Odpoveď ľudského organizmu na implantáciu skafoldov	222
	Literatúra.....	226
	Zoznam skratiek.....	228

Predhovor

Práve sa Vám dostala do ruky kniha, ktorá nie je klasickou učebnicou, ale predpokladá, že už máte zvládnuté základné témy z biológie a genetiky. Učebnica je určená nielen pre študentov PhD. štúdiá na lekárskech a prírodovedeckých fakultách, ale aj pre študentov medicíny a lekárov. Je sprievodcom pre zdravotníckych profesionálov a zvedavé mysle. Umožní nám spoločne objavovať vzrušujúcu oblasť, kde sa stretáva genetika a medicína za účelom zlepšiť zdravotné výsledky a priniesť nový štandard v starostlivosti o pacientov.

Našou snahou je priblížiť čitateľom inovatívne úspechy v lekárskej biológii a klinickej genetike, pretože v súčasnosti stojíme na prahu novej éry. Vstupujeme do obdobia genetickej revolúcie, ktorá má potenciál preformovať medicínsku prax spôsobmi, o ktorých sme ešte nedávno nesnívali. Jadrom sú moderné molekulárne genetické metódy, prelomové nástroje a techniky, ktoré nám umožňujú dešifrovať a upravovať zložitý genetický kód, definujúci život na našej planéte. Celé storočia sa medicína opierala o pozorovanie, príznaky, skúsenosti a obmedzené pochopenie genetických faktorov, ktoré ovplyvňujú zdravie a choroby. Moderné molekulárne genetické metódy však prepisujú dejiny zdravotnej starostlivosti.

Dnes sa pomocou najmodernejších techník sekvenovania novej generácie, génovej terapie prostredníctvom CRISPR-Cas9 a tkanivového inžinierstva dostávame do éry personalizovaného zdravotníctva, kde sa postupy diagnostiky a liečby efektívne a veľmi presne prispôbujú jedinečnej genetickej výbave každého pacienta. Táto kniha zavedie čitateľa na pútavú cestu molekulárneho sveta, otvorí mu okno do preventívnej a personalizovanej medicíny a odhalí mu objavy, inovácie, technológie, spôsoby, výhody, limitácie, ale aj etické aspekty, ktoré vznikli v dôsledku spomínanej genetickej revolúcie. Potešujúcou správou je, že metódy spomínané v tejto knihe, sú v rôznej miere už dnes súčasťou klinickej praxe.

Vanda Repiská

1 Sekvenovanie nukleových kyselín

(Petra Priščáková, Vanda Repiská)

Nukleotidy sú základné stavebné jednotky nukleových kyselín. Nukleotid je zložený z dusíkatej bázy, cukornatej zložky (ribóza/deoxyribóza) a zvyšku po kyseline fosforečnej. Sekvenovanie DNA v princípe znamená určenie poradia dusíkatých báz. Dusíkaté bázy spolutvoriace vlákna DNA sú adenín (ďalej len A) a guanín (ďalej len G), ktoré sú purínového typu, cytozín (ďalej len C) a tymín (ďalej len T) pyrimidínového. Tymín je v ribonukleovej kyseline (RNA) nahradený uracilom (ďalej len U). Dusíkaté bázy sa párujú na základe princípov komplementarity – tvorby vodíkovej väzby medzi purínovou bázou na jednom vlákne a pyrimidínovou bázou na protiľahlom vlákne v dvojzávitnici DNA. Za normálnych podmienok sa C páruje s G, T s A. Zároveň je molekula stabilizovaná pôsobením van der Waalsových síl medzi susednými dusíkatými bázami.

Štruktúru dvojzávitnice DNA prvýkrát opísali už v roku 1953 **Francis Crick** a **James D. Watson**. Je zaujímavé, že prešlo 15 rokov medzi objavom štruktúry DNA a prvými experimentálnymi pokusmi o determináciu poradia dusíkatých báz v nukleových kyselinách. Ako prvá bola sekvenovaná transferová RNA pochádzajúca z kvasinky v roku 1965. Pre transferové RNA platí, že sú relatívne krátke a dajú sa medzi sebou odlišiť, keďže špecificky na seba viažu určitú aminokyselinu. Náročným opakovaným porovnávaním štiepných fragmentov vzniknutých účinkom ribonukleáz, sa Holleymu podarilo determinovať nukleotidovú sekvenciu tRNA pre alanín.

Prvým významným krokom k sekvenovaniu DNA bolo objavenie restričných endonukleáz typu II a ich schopnosť rozpoznávať špecifické sekvencie na nukleovej kyseline a štiepiť ju.

Prvý vyvinutý efektívnejší spôsob sekvenovania DNA, niesol pomenovanie „Plus mínus metóda“. Túto metódu v roku 1975 opísal Sanger a Coulson a pomocou nej sekvenovali prvý kompletný génom – bakteriofága ΦX174.

Táto metóda však nebola veľmi efektívna, a preto ju rýchlo nahradili nové techniky vyvinuté v nasledujúcich rokoch, konkrétne metóda podľa **Maxama-Gilberta** a neskôr **Sangera**. Súhrnne by sa dali charakterizovať spoločnými vlastnosťami:

- vytvorenie súboru fragmentov rôznych dĺžok, ktoré všetky majú rovnaký spoločný začiatok (rovnaký nukleotid), na druhom konci sú zakončené vo všetkých možných pozíciách, spoločný začiatok je 5' koniec sekvenačného primeru,

- 3' koniec sekvenačného primeru obsahuje voľnú hydroxylovú skupinu –OH, ktorá umožňuje DNA-polymeráze inkorporovať ďalšie nukleotidy,
- vzniknuté fragmenty sa separujú na základe svojej dĺžky pomocou elektroforézy v polyakrylamidovom géli.

Maxam-Gilbert metóda využíva štiepenie reťazcov DNA po opracovaní činidlami v špecifických miestach a Sangerova metóda pracuje na princípe inkorporácie terminátorov polymerizácie.

1.1 Prvá generácia sekvenovania

1.1.1 Maxam-Gilbertova chemická metóda sekvenovania

Allan Maxam a Walter Gilbert v rokoch 1976 až 1977 vypracovali nový prístup k sekvenovaniu. Hoci bol publikovaný dva roky po Sangerovej Plus mínus metóde, rýchlo sa stal populárnejším.

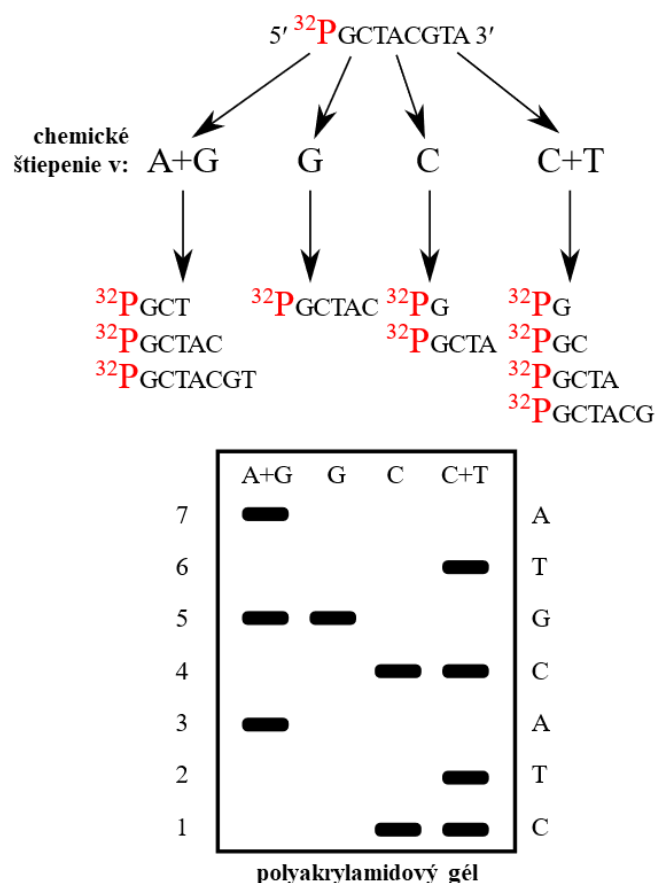
Pri tejto metóde boli sekvenované fragmenty rádioaktívne značené na 5' konci molekuly rádioaktívnym fosforom ^{32}P . Neskôr sa začalo používať fluorescenčné značenie.

Podstatou tohto prístupu je chemický atak na DNA fragmenty prebiehajúci v nasledovných krokoch:

- modifikácia báz špecifickými činidlami (napr. dimetylsulfát, hydrazín),
- odstránenie modifikovaných báz z ich cukornatých zložiek nukleotidu a rozštiepenie DNA vlákna v modifikovanom mieste pôsobením piperidínu.

Podmienky reakcie (napr. koncentrácia modifikačných činidiel) zabezpečia, že každá molekula je modifikovaná len na jednom mieste. Získané fragmenty sa delia elektroforézou v polyakrylamidových géloch v denaturačných podmienkach. Elektroforéza prebieha v štyroch dráhach, pretože pre analýzu fragmentov je nutné ich separovať oddelene, vzhľadom na použité činidlá (Obrázok 1.1).

Táto metóda pôvodne umožňovala čítanie nukleotidovej sekvencie dlhej 200 – 300 nukleotidov, v dnešnej dobe po modifikáciách postupu až 500 bp. Kvôli svojej pracnosti (nie je možná paralelizácia), časovej náročnosti, nízkej špecificite a nepostačujúcim dĺžkam čítaní, sa už v súčasnosti takmer nepoužíva. Rozdiel pri tomto postupe voči Sangerovmu je, že sa sekvenuje originálny DNA fragment, nie jeho enzymatická kópia.



Obrázok 1.1 Princíp Maxam-Gilbertovej metódy sekvenovania

1.1.2 Sangerova enzymatická metóda sekvenovania

Enzymatický prístup vypracovaný Frederickom Sangerom dominoval takmer dve dekády v oblasti sekvenovania. V porovnaní s Maxam-Gilbertovou metódou, je Sangerová metóda účinnejšia a používa menej toxické chemikálie. V roku 1987 bola firmou *Applied Biosystems* zavedená **automatizovaná Sangerová metóda**, ktorá sa považuje za sekvenačnú technológiu 1. generácie (angl. *first generation technology*) a umožnila realizáciu **projektu sekvenácie ľudského genómu** (viac o Projekte v kapitole 3).

Enzymatická metóda sekvenovania je založená na syntéze nového reťazca DNA pomocou DNA polymerázy a na inkorporácii inhibítora polymerizácie, najčastejšie **2'3' - dideoxinukleozidtrifosfátu (ddNTP)**. Takéto modifikované nukleotidy sa môžu zaradiť do novovznikajúceho vlákna DNA na základe párovania báz, ale nemajú voľnú –OH skupinu na 3'konci. DNA-polymeráza nie je schopná inkorporovať do reťazca nasledujúci nukleotid za už začleneným ddNTP, pretože nie je možné vytvoriť fosfodiesterovú väzbu.

V reakcii je udržiavaný pomer dXTP:ddXT¹ približne 100:1, takže pravdepodobnosť ukončenia vznikajúceho reťazca v danej pozícii (X) je 1/100. Vzniknuté fragmenty DNA sú denaturáciou uvoľnené z templátového vlákna, následne sa separujú elektroforézou v polyméri. Pôvodný postup vyžadoval priebeh sekvenovania v štyroch samostatných reakciách, teda v každej reakcii jeden typ ddNTP, ktoré sa nanášali samostatne do štyroch dráh/kapilár v elektroforéze. Pri tomto pôvodnom postupe je každý terminátor označený rovnako – najprv rádioaktívne (detekcia rádiografiou), neskôr sa začalo používať fluorescenčné značenie (v súčasnosti napr. BigDye terminator²). Zvýšenie citlivosti procesu bolo dosiahnuté metódou PCR sekvenovania, v ktorej sa (podobne ako pri PCR) opakujú cykly denaturácie templátovej DNA, anelácie primeru a syntézy komplementárneho DNA vlákna v prítomnosti terminátorov ddNTP.

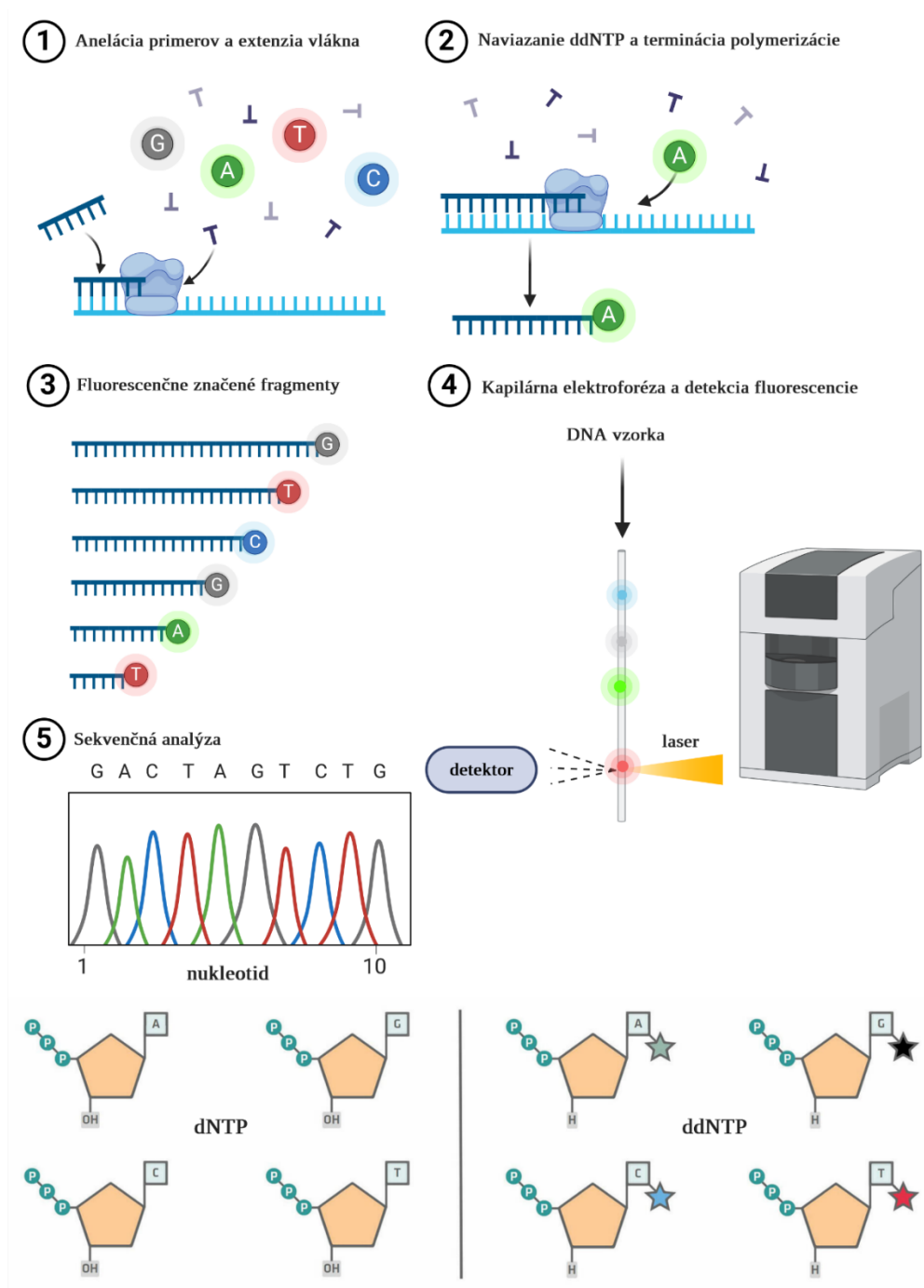
Automatické analyzátory Sangerovho sekvenovania sú založené na **princípe elektroforézy v tenkých kapilárach s akrylamidovým polymérom**³. Zároveň použitie inej **fluorescenčnej značky** pre každé ddNTP umožnilo spojiť štyri, pred tým oddelené reakcie, do jednej. Farbivá absorbujú určitú vlnovú dĺžku svetelného žiarenia, dochádza k ich excitácii (pôsobením laserov) a následne emitujú žiarenie v inej špecifickej vlnovej dĺžke. Emisné žiarenie je zachytené CCD (*charge-coupled device*) kamerou a softvérovo spracované do **elektroforetogramu** (Obrázok 1.2). Separácia fragmentov kapilárnou elektroforézou v lineárnych polyméroch umožnila dosiahnuť čítanie nukleotidovej sekvencie o dĺžke 500 – 1200 nukleotidov v rámci jedného pracovného cyklu (v porovnaní s metódou Maxam-Gilbert s kapacitou 200 – 300 nukleotidov). **Automatická verzia Sangerovho sekvenovania** dosiahla svoje technické hranice/možnosti koncom ukončenia projektu sekvenovania ľudského genómu v 2001. Použitie tejto metódy pre rutinné celogenómové sekvenovanie nie je z ekonomického a časového hľadiska efektívne. Dve najpoužívanejšie stratégie sekvenovania

¹ X predstavuje jednu zo štyroch dusíkatých báz – A/G/C/T.

² BigDye Terminator (BDT) je fluorescenčne značený terminátor vyrábaný Applied Biosystems. Tieto terminátory sú optimalizované pre väčšinu DNA sekvenačných aplikácií. BDT v1.1 je navrhnutý na sekvenovanie kratších úsekov a je vhodnejší pre správne určenie identity nukleotidov v blízkosti sekvenačného primeru. BDT v3.1 je vhodnejší pri sekvenovaní dlhších fragmentov a pri *de novo* sekvenovaní.

³ V súčasnosti sú komerčne dostupné viaceré polyméry (POP), ktorých presné zloženie závisí od aplikácie. POP - 4 je vhodný pre sekvenovanie produktov menších ako 400 bp, POP-6 často používaný v kombinácii s BigDye Terminator v1.1 pre sekvenovanie krátkych produktov a na správnu identifikáciu nukleotidov v bezprostrednej blízkosti sekvenačných primerov. POP-7 pre sekvenovanie produktov až do dĺžky 1000 bp.

dlhších DNA fragmentov a celých genómov založené na Sangerovom sekvenovaní sú *shotgun* sekvenovanie a *primer walking*.



Obrázok 1.2 Sangerová metóda sekvenovania a štruktúra dNTP a ddNTP (dNTP – deoxynukleotid, ddNTP – dideoxynukleotid) (Priščáková, vytvorené v Biorender.com)

Platformy od Applied Biosystems sa líšia v kapacitách. Varujú od štvorkapilárových (*SeqStudio Genetic Analyzer*), k 8 – 24 (*3500 Series Genetic Analyzer*), až 48 – 96 kapilárovým (*3700 Series Genetic Analyzer*). Všetky tieto genetické analyzátory generujú čítania o dĺžke 600 – 1000 bp. Takisto aj iní výrobcovia prišli na trh s analyzátormi využívajúcimi Sangerovo

sekvenovanie, ako Licor, Amersham, MilliGen, Perkin Elmer a Dupont, avšak v súčasnosti už nie sú podporované. Síce je Sangerovo sekvenovanie finančne náročné a neefektívne na celogenómovej úrovni, stále je to nosná metóda s najnižšou mierou chybovosti, validácie variantov identifikovaných metódami masívneho paralelného sekvenovania, hlavne v klinickej diagnostike.

1.2 Prístupy k sekvenovaniu

1.2.1 *Shotgun* sekvenovanie

Shotgun sekvenovanie bolo najprv používané pri sekvenovaní len malých genómov (cca. 4 – 7 kb), a to už v roku 1979. Predpokladalo sa však, že nie je vhodná pre väčšie genómy s veľkosťou niekoľko megabáz a viac. Napriek tomu bola použitá na sekvenovanie genómu baktérie *Haemophilus influenzae* (1995) či *Drosophila melanogaster* (2000), dokonca pomocou nej Craig Venter sekvenoval ľudský genóm. *Shotgun* sekvenovanie je náhodný prístup. Celý genóm je fragmentovaný náhodne na úseky dlhé asi 2 – 3 kilobáz. Možné spôsoby fragmentácie zahŕňajú napr. sonikáciu (pomocou vysokofrekvenčných vĺn) či enzymatické pôsobenie.

Každý z fragmentov je klonovaný do plazmidových vektorov, vytvorí sa DNA knižnica, kde sa môže klonovaná DNA replikovať spolu s vektorom a samostatne sekvenovať. Keďže je genóm náhodne fragmentovaný, vznikajú tzv. prečnievania medzi fragmentmi, teda na rôznych fragmentoch sa nachádzajú časti jednej sekvencie. Na základe nich sa neskôr spätne poskladá (angl. *assembly*) celý genóm. Väčšinou sa používa metóda, ktorou sa sekvenuje klonovaný fragment z obidvoch koncov (angl. *pair-end*). Pri tomto prístupe však vznikajú aj medzery, teda časti, ktoré nie sú sekvenované. Tieto medzery vznikajú v dôsledku náhodnosti tohto postupu (niektoré časti genómu sa nemusia vôbec vyskytnúť v knižnici). Mieru ich výskytu ovplyvňuje aj komplexita genómu, najmä výskyt repetitívnych sekvencií. Medzery môžu byť vyplnené pomocou iných metód, ako je napríklad *primer walking* alebo sa vytvorí ďalšia knižnica, kde sa tentokrát pripravujú väčšie inzerty o veľkosti aj 5 – 10 kb, ktoré sa vkladajú do BAC. Takto získané sekvencie slúžia ako mosty cez medzery.

1.2.2 *Primer walking*

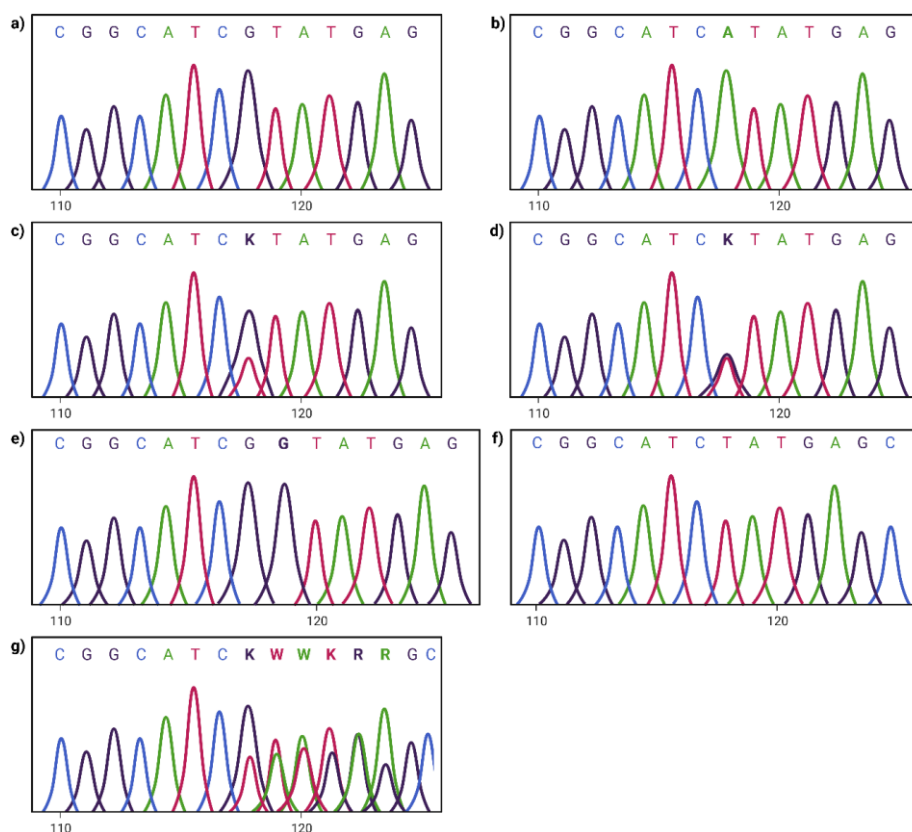
Neznámy úsek DNA, ktorého sekvencia sa zisťuje, je vkladá do vektoru. Primer je navrhnutý tak, aby bol komplementárny k vektoru a orientovaný 3' koncom smerom k inzertu. Sekvenovanie postupuje smerom k inzertu, teda v smere od 5' k 3' koncu. Takýmto spôsobom sa zistí poradie nukleotidov v časti sekvencie skúmaného fragmentu a je navrhnutý nový primer komplementárny k novosekvenovanému úseku. Opakovaním týchto krokov sa sekvenuje celý

fragment. Táto stratégia je označovaná aj ako priamy prístup a môže sa použiť na vyplnenie medzier vzniknutých *shotgun* sekvenovaním. **Primer walking** umožňuje sekvenovať dlhšie úseky DNA, než jedna sekvenčná reakcia a považuje sa za priamy sekvenačný prístup .

1.3 Ako vyhodnotiť elektroforetogram?

Elektroforetogram predstavuje fluorescenčne značené fragmenty, ktoré sú elektroforeticky separované v kapilárach. Fluorescencia je zachytená na konci kapiláry a intenzita zachyteného signálu sa vynesie na y-ovú os elektroforetogramu. Na osi x môže byť vnímaná ako časová os, teda v akom čase daný fragment prešiel koncom kapiláry. V elektroforetograme je priamo možné rozpoznať či v sekvencii došlo k substitúcii, delécii alebo inzercii (Obrázok 1.3).

Elektroforetogram je často vo formáte ab1 a v textovom súbore obsahujúcom sekvenciu. Ab1 formát okrem identity báz obsahuje aj informácie o kvalite danej sekvenčnej reakcie a s akou pravdepodobnosťou je identita bázy stanovená správne.



Obrázok 1.3 Elektroforetogramy rôznych sekvencií: a) sekvencia divokého typu, b) homozygotná substitúcia v pozícii 118, c) d) možné prejavy heterozygotnej substitúcie v pozícii 118, e) homozygotná inzercia G v pozícii 119, f) homozygotná delécia G v pozícii 118, g) heterozygotná delécia G v pozícii 118 (Priščáková, vytvorené v Biorender.com).

Spôľahlivosť určenia identity báz sa dá posúdiť na základe tzv. **hodnoty kvality** (QV – *Quality Value*), resp. skóre Phred kvality (Q – *Phred quality score*), pričom QV je logaritmicky závislé od pravdepodobnosti chyby určenia identity bázy (angl. *base-calling*). Teda ak QV = 20, pravdepodobnosť chyby je 0,01; teda 1 %⁴. Kvalitu celého čítania vieme vyhodnotiť ako priemerné hodnoty QV pre všetky píky, pričom priemerná hodnota nad 40 sa považuje za znak kvalitného čítania (tabuľka 1.1).

Tabuľka 1.1 Hodnoty skóre kvality

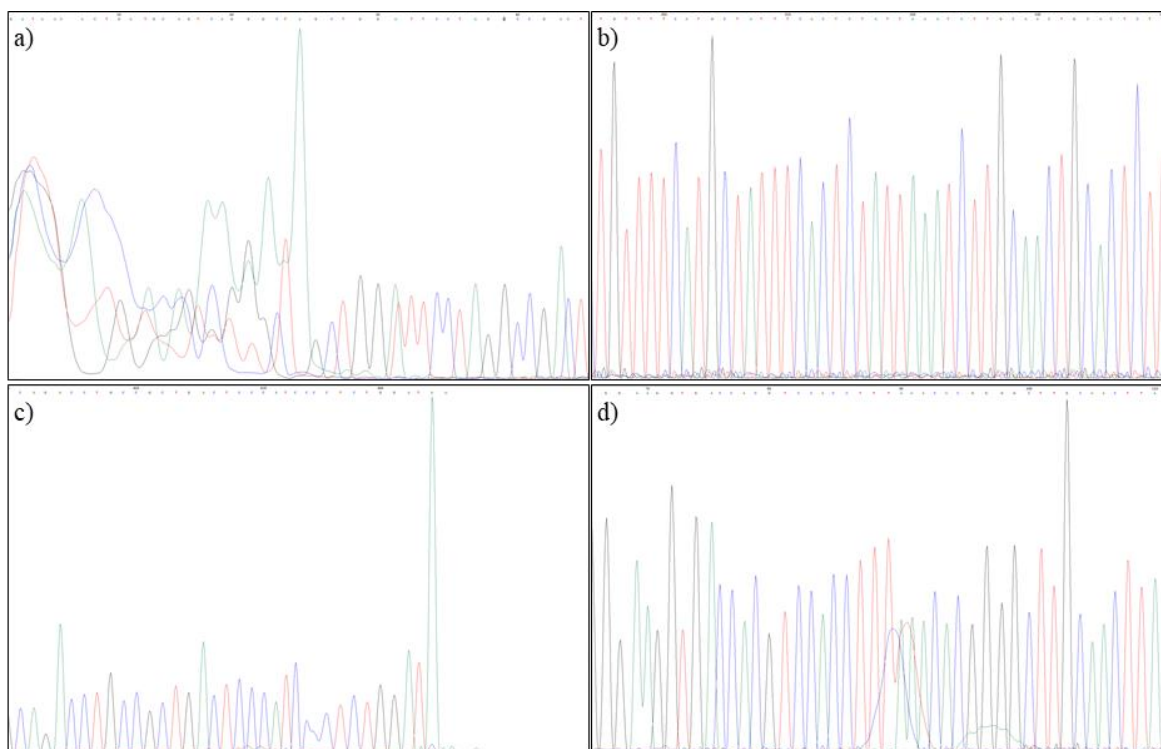
hodnota kvality	pravdepodobnosť chyby	presnosť
10	1 z 10	90 %
20	1 zo 100	99 %
30	1 z 1000	99,9 %
40	1 z 10 000	99,99 %
50	1 zo 100 000	99,999 %
60	1 z 1 000 000	99,9999 %

Identitu prvých 20 – 40 nukleotidov v elektroforetogramе nie je možné spoľahlivo určiť, nakoľko veľmi krátke sekvenčné produkty nemigrujú počas elektroforézy konštantne. Dokonca aj fragmenty líšiace sa dĺžkou môžu migrovať v polyméri rovnakou rýchlosťou (Obrázok 1.4a). Z tohto dôvodu sa odporúča navrhnúť primery vo vzdialenosti 60 – 100 bp od regiónu záujmu. Takisto si treba uvedomiť, že sekvencia primeru sa v elektroforetogramе nenachádza, keďže primery nie sú fluorescenčne značené. Väčšina sekvenčných protokolov je optimalizovaných na poskytnutie najlepšieho rozlíšenia v rozmedzí 100 až 500 báz. V tomto rozmedzí by mali byť píky jasne rozlíšiteľné a určenie identity bázy je najspoľahlivejšie (Obrázok 1.4b). *Taq* polymeráza, ktorá sa používa v sekvenčnej reakcii pridáva na koniec lineárneho templátu netemplátové A. Po tomto A dochádza k dramatickému poklesu intenzity signálu (Obrázok 1.4c).

Široké píky C a T, **dye blobs** (DB) sa objavujú okolo 80. bázy. Tieto aberancie predstavujú zhľuky neinkorporovaných terminátorov, ktoré neboli prečistením po sekvenčnej reakcii odstránené. Tieto artefakty sa vo zvýšenej miere objavujú pri neefektívnych sekvenčných reakciách prejavujúcich sa aj nízkym pomerom medzi signálom a šumom (*signal-to-noise ratio*). Pri manuálnom prejení elektroforetogramu je však možné určiť

⁴ QV = - 10 x log (pravdepodobnosť chyby), teda pravdepodobnosť chyby = 10^{-QV/10}

identitu báz prekrytých DB. Pre analýzy regiónov záujmu je odporúčané navrhnuť primer vo vzdialenosti aspoň 100 bp od týchto artefaktov (Obrázok 1.4d).



Obrázok 1.4 Príklady špecifických častí elektroforetogramu. a) Identitu prvých 20 – 40 nukleotidov v elektroforetogramе nie je možné spoľahlivo určiť. Vyplýva to z toho, že veľmi krátke sekvenačné produkty nemigrujú počas elektroforézy konštantne, a aj fragmenty líšiace sa dĺžkou môžu migrovať v polyméri rovnakou rýchlosťou. b) Jasne rozlíšiteľné píky so spoľahlivým určením identity bázy (*base-calling*). c) *Taq* polymeráza, ktorá sa používa v sekvenačnej reakcii pridáva na koniec lineárneho templátu netemplátové A. Po tomto A dochádza k dramatickému poklesu intenzity signálu. d) *Dye blobs* (DB), teda široké píky C a T sa objavujú okolo 80. bázy. Tieto aberancie predstavujú zhluky neinkorporovaných terminátorov, ktoré neboli prečistením po sekvenačnej reakcii odstránené. Pri manuálnom prejdení elektroforetogramu je však možné určiť identitu báz prekrytých DB.

1.4 Masívne paralelné sekvenovanie

Pojem metódy **masívneho paralelného sekvenovania** (angl. *next-generation sequencing* (NGS)) sa používa pri pomenovaní novších metód sekvenovania. Tieto metódy predstavujú rôzne kombinácie stratégií prípravy templátov, sekvenovania, zobrazovania, tzv. poskladania (angl. *assembly*) čítaní (angl. *reads*) do kontingov, alebo zarovnania (angl. *alignment*) čítaní podľa referenčného genómu. NGS môžeme rozdeliť na druhú, tretiu a štvrtú generáciu.

Pre tieto technológie je charakteristické, že umožňujú simultánne sekvenovať milión až stovky miliónov sekvencií, pričom nie je potrebná fyzická separácia produktov napr. elektroforézou, ako pri starších metódach spomenutých v úvode kapitoly. Produktom sú čítania, ktorých dĺžka závisí od použitej metódy. Pri druhej generácii sú čítania s dĺžkou 35 – 400 v závislosti od platformy, pri tretej generácii viac ako 1 kb až 2 Mb. Čítanie vlastne predstavuje

skutočný počet za sebou nasledujúcich sekvenovaných báz. Ich dĺžky varírujú v spomenutom rozpätí v závislosti od použitej metódy. Pri metódach druhej generácie je dĺžka čítania výrazne kratšia než pri Sangerovej metóde, čo je v podstate ich najväčšia limitácia.

Metódy sekvenovania sú založené na rôznych prístupoch. Dajú sa však rozdeliť na základe metodického prístupu určovania poradia báz na **sekvenovanie založené na syntéze** (SBS, *sequencing by synthesis*) alebo na **hybridizácii/ligácii** (SBL/H, *sequencing by ligation/hybridization*). SBS metódy sú závislé na DNA-polymeráze a patrí k nim Sangerovo sekvenovanie, ale aj pyrosekvenovanie, cyklická reverzibilná terminácia (CRT), sekvenovanie na iónových polovodičoch alebo *real-time* sekvenovanie. Všetky sekvenčné techniky, napriek svojim odlišnostiam, prebiehajú v základných krokoch: príprava templátu, sekvenovanie a zobrazovanie, zarovnávanie alebo genómové skladanie.

1.5 Sekvenovanie druhej generácie

Metódy druhej generácie nie sú schopné sekvenovať úseky dlhé tisícky báz. Z toho dôvodu pri celogenómovom sekvenovaní je podstatným krokom náhodné rozštiepenie genómu na fragmenty. Pripravené templáty sú zväčša amplifikované, pretože detekčné zariadenia väčšiny platforiem nie sú schopné zachytiť signál len z jediného templátu – zachytávajú sa signály tisícov kópií konkrétneho templátu a vytvára sa konsenzus pre každú bázu.

Kvalita zloženia fragmentov genómu je úzko spojená s pokrytím (angl. *coverage*) genómu. Hĺbka pokrytia vyjadruje priemerný počet výskytu určitej sekvencie medzi fragmentmi (Obrázok 1.5). Čím vyššie pokrytie, tým vyššia pravdepodobnosť, že sekvencie budú zastúpené rovnomerne a klesá pravdepodobnosť, že niektorá zo sekvencií nebude prítomná vôbec. S narastajúcim pokrytím súvisí aj zvyšujúca sa cena sekvenovania. Inak povedané, pokrytie je definované ako množstvo krátkych čítaní, ktoré sa navzájom medzi sebou prekrývajú v rámci špecifickej genomickej oblasti. Takže tridsaťnásobné pokrytie znamená, že každý nukleotid tejto špecifickej sekvencie/genomickej oblasti sa nachádza priemerne v tridsiatich prekrývajúcich sa fragmentoch zo všetkých, ktoré tvoria sekvenačnú knižnicu. Šírka pokrytia hovorí o tom, aká časť analyzovanej sekvencie je pokrytá. V praxi je nutné nájsť kompromis medzi dostupnými finančnými možnosťami a potrebným pokrytím.



Obrázok 1.5 Sekvenčné pokrytie

Samotné poskladanie sekvenovaných úsekov je založené na rovnakých princípoch ako pri *shotgun* metóde. Skladanie prebieha vďaka presahom sekvenovaných fragmentov. Najčastejším dôvodom vzniku medzier pri sekvenovaní sú repetitívne oblasti. Krátke čítania nie sú schopné zachytiť unikátnu sekvenciu prilahlú k repetitívnym oblastiam, čo by umožnilo správnu lokalizáciu fragmentu v genóme.

V prípade, že pri študovanom genóme je dostupný **referenčný genóm** (to znamená, že daný druh alebo blízko príbuzný organizmus už bol sekvenovaný), zarovnávanie získaných fragmentov je menej náročné. Referenčný genóm slúži ako kostra, o ktorú sa dá oprieť pri mapovaní jednotlivých fragmentov. Sekvenované DNA úseky, ktoré je možné asociovať s referenčnou DNA, a tým sekvenciu „umiestniť“ v genóme, sú vo všeobecnosti nazývané mapovateľné sekvencie.

Jednoznačne najväčšou devízou metód NGS je schopnosť relatívne lacno (oproti predchádzajúcim metódam) produkovať enormné množstvo dát. Táto možnosť vedie k sekvenovaniu celých genómov príbuzných druhov, čo umožnilo rozvoj rozľahlých komparatívnych a evolučných štúdií, ktoré pred pár rokmi boli nereálne. Najrozšírenejšia aplikácia je resekvenovanie ľudského genómu a zvyšovanie úrovne našich vedomostí o vplyve genetických odlišností na zdravie, či vznik chorôb. Produkcia enormných množstiev dát však tiež súvisí so značnou výzvou pre ukladanie týchto dát a ich analýzu. Pre tieto úlohy sú potrebné pokročilé bioinformatické nástroje.

1.5.1 Príprava knižníc

Príprava sekvenačných knižníc zahŕňa fragmentáciu DNA a adíciu špecifických sekvencií (potrebné pre zachytenie fragmentov – ich imobilizáciu na pevných povrchoch alebo pre cirkularizáciu, sekvencie komplementárne k amplifikačným primerom) (Obrázok 1.6).



Obrázok 1.6 Príprava sekvenačnej knižnice a ligácia/adícia špecifických sekvencií na analyzovaný DNA fragment. CS – sekvencia umožňujúca ukotvenie alebo zachytenie analyzovanej sekvencie (*capture sequence*) (Priščáková, vytvorené v Biorender.com).

Knižnica môže byť sekvenovaná z jedného konca (*single-ends reads*) alebo z oboch koncov (*paired-end reads*). Pri *pair-end* knižnici je fragment známej dĺžky sekvenovaný z oboch jeho koncov. Cieľom nie je sekvenovať daný fragment celý, dôležité je získať jeho koncové sekvencie. Tým pádom bude známe poradie báz dvoch úsekov a zároveň aj ich vzájomnú vzdialenosť, pretože sa pracuje s fragmentom známej dĺžky. Tieto dva údaje umožňujú efektívnejšie lokalizovať sekvencie podľa referenčného genómu. Takáto knižnica je vhodnejšia na identifikáciu štrukturálnych variant, ktoré môžu byť dlhšie ako 3 kb. Postup je výhodný pri sekvenovaní repetitívnych oblastí, s ktorými je problém pri mapovaní do referenčného genómu. Templát je zvyčajne imobilizovaný alebo pripojený k pevnému povrchu. Táto imobilizácia priestorovo separuje templáty a umožňuje priebeh tisícok až miliónov sekvenačných reakcií naraz. Ďalším parametrom je či platforma vyžaduje amplifikáciu templátu, alebo jej detektory sú schopné zachytiť aj jedinečný signál z jednej molekuly. Toho sú schopné sekvenačné metódy tzv. tretej generácie, ako napr. platformy od Pacific Biosciences a Oxford Nanopore Technologies. Pri týchto metódach sa templát neznásobuje pomocou PCR, čím sa redukuje skreslenie výsledkov prípadnými chybami pri amplifikáciách.

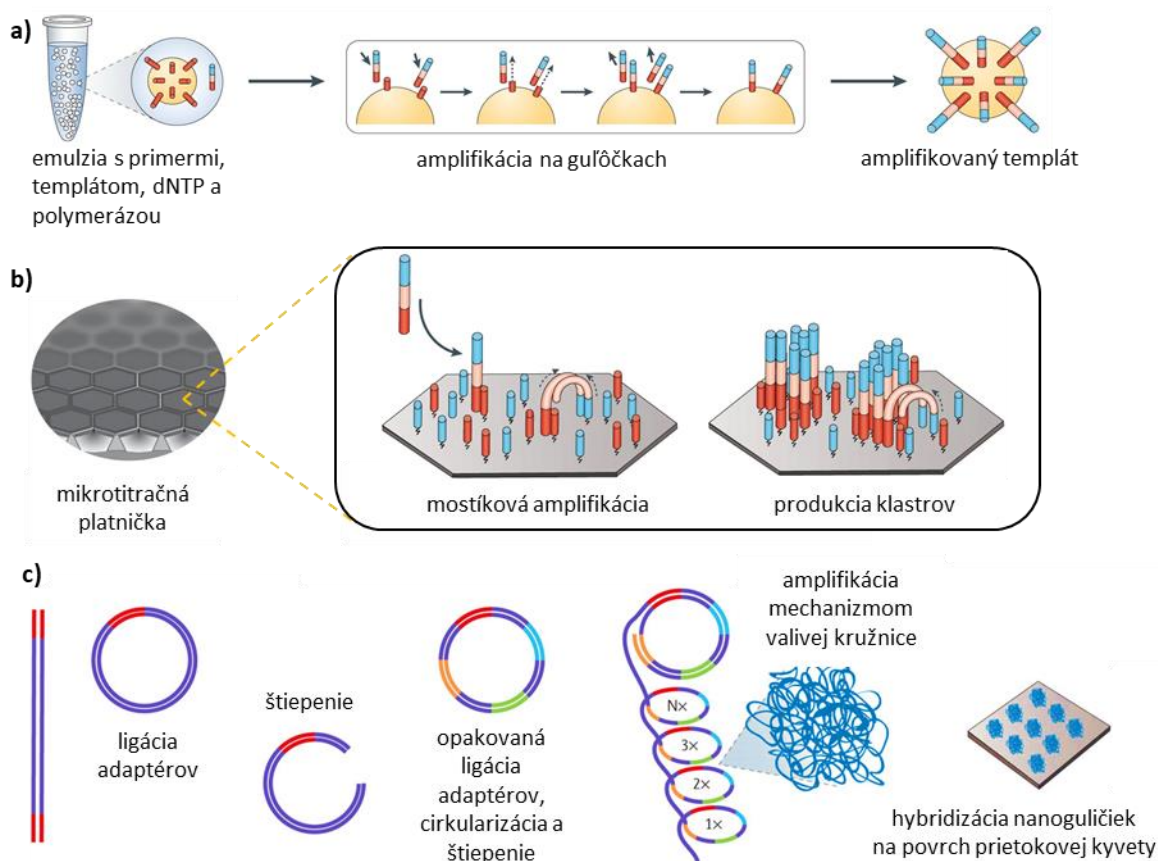
1.5.2 Amplifikácia templátov

Väčšina zobrazovacích systémov nie je schopná zachytiť len jedinú fluorescenčnú udalosť, preto je potrebná **amplifikácia templátov**. Templáty sú klonálne amplifikované na pevných povrchoch. Tisíciky kópií jedného templátu zachytené na rovnakom mieste zabezpečia, že sekvenačný signál je odlišiteľný od pozadia. Masívna paralelizácia umožňuje vytvorenie miliónov individuálnych reakčných centier, každé s vlastným klonálnym DNA templátom. Sekvenačné platformy zbierajú informácie z miliónov reakčných centier simultánne a paralelne sa sekvenujú milióny DNA molekúl.

Existuje niekoľko stratégií klonálnej amplifikácie. Prvým krokom je vždy fragmentácia templátovej DNA, následná ligácia adaptorov potrebných na amplifikáciu a sekvenovanie.

Dve najbežnejšie metódy amplifikácie sú **emulzná PCR (emPCR)** a **mostíková amplifikácia**.

Pri emulznej PCR (Obrázok 1.7a) sa ku fragmentom ligujú adaptéry. Adaptéry sú komplementárne k oligonukleotidom na **mikroguľôčkach** (*microbeads*), čo umožní naviazanie templátovej PCR. Na každú mikroguľôčku sa zachytí len jeden fragment. Následne prebehne amplifikácia, ktorej výsledkom sú milióny kópií pôvodných fragmentov na každej mikroguľôčke.



Obrázok 1.7 Spôsoby amplifikácie templátovej DNA. a) Pri emulznej PCR sú k DNA fragmentom ligované adaptéry. Fragments sú zachytené v micelách s mikroguľôčkou, ktorá je pokrytá komplementárnymi adaptérmi, deoxynukleotidmi (dNTPs), primermi a DNA polymerázou. PCR prebieha v micelle a guľôčka sa pokryje tisíckami kópií templátového fragmentu. b) Pri mostíkovej amplifikácii je fragmentovaná DNA ligovaná k adaptérom, ktoré sú komplementárne k oligonukleotidom imobilizovaným na pevnom povrchu. Voľný koniec môže interagovať s okolitými primermi a tvoriť mostíkovú štruktúru. Amplifikuje sa komplementárne vlákno, ktoré je zachytené o povrch, neprichytené vlákno sa odmyje. c) Pri nanoguličky je DNA fragmentovaná a sú k nej ligované prvé adaptory. Templát sa amplifikuje, cirkularizuje a štiepi. To sa opakuje s ďalšími tromi sadami adaptérov. Konečným produktom je cirkulárny templát so štyrmi adaptérmi separovanými templátovou DNA. Molekuly sú amplifikované mechanizmom valivej kružnice a vytvoria sa konkateméry – nanoguličky. Nanoguličky sú hybridizované na povrch kyvety (upravené podľa Goodwin a spol., 2016).

Mostíková amplifikácia produkuje klastre kópií pôvodných fragmentov priamo na sklenenom podklade. Primery sú kovalentne naviazané ku sklu v hustom "trávníku". Pomer

primerov ku templátom určuje povrchovú hustotu klastrov amplikónov. Výsledkom tejto amplifikácie môže byť 100 – 200 miliónov priestorovo oddelených templátových klastrov s voľnými koncami, ktoré sú komplementárne k univerzálnym sekvenačným primerom.

Amplifikácia templátu môže prebiehať aj v roztoku. DNA je opakovane ligovaná, cikularizovaná a štiepená, čo vedie k tvorbe cirkulárneho templátu so štyrmi odlišnými adaptorovými regiónmi. Cirkulárny templát je namnožený amplifikáciou valivej kružnice a vytvoria sa miliardy separovaných **nanoguličiek** (angl. **nanoballs**). Nanoguličky sú distribuované na povrchu sklička. Príprava knižnice môže vnieť niekoľko technických chýb, hlavne vyplývajúcich z chybovosti PCR a nedostatkov sekvenačných chemikálií (napr. inherentné chyby polymerázy a neefektívnosť amplifikácie v GC bohatých oblastiach).

1.5.3 Sekvenovanie a zobrazovanie

Výsledkom klonálnej amplifikácie je populácia identických templátov, ktoré sa všetky sekvenujú. Pozorovaný signál je potom konsenzus nukleotidov, ktoré boli pridané na rovnaké miesto v identických templátoch v určitom cykle. Termín určenie identity bázy (angl. **base-calling**) sa používa na označenie procesu odvodu identity báz na základe intenzity fluorescenčného alebo iného signálu. Software analyzuje dáta, ktoré zachytí detektor sekvenátora a predpovedá, aká báza sa nachádza na určitej pozícii v sekvencii (França, 2002).

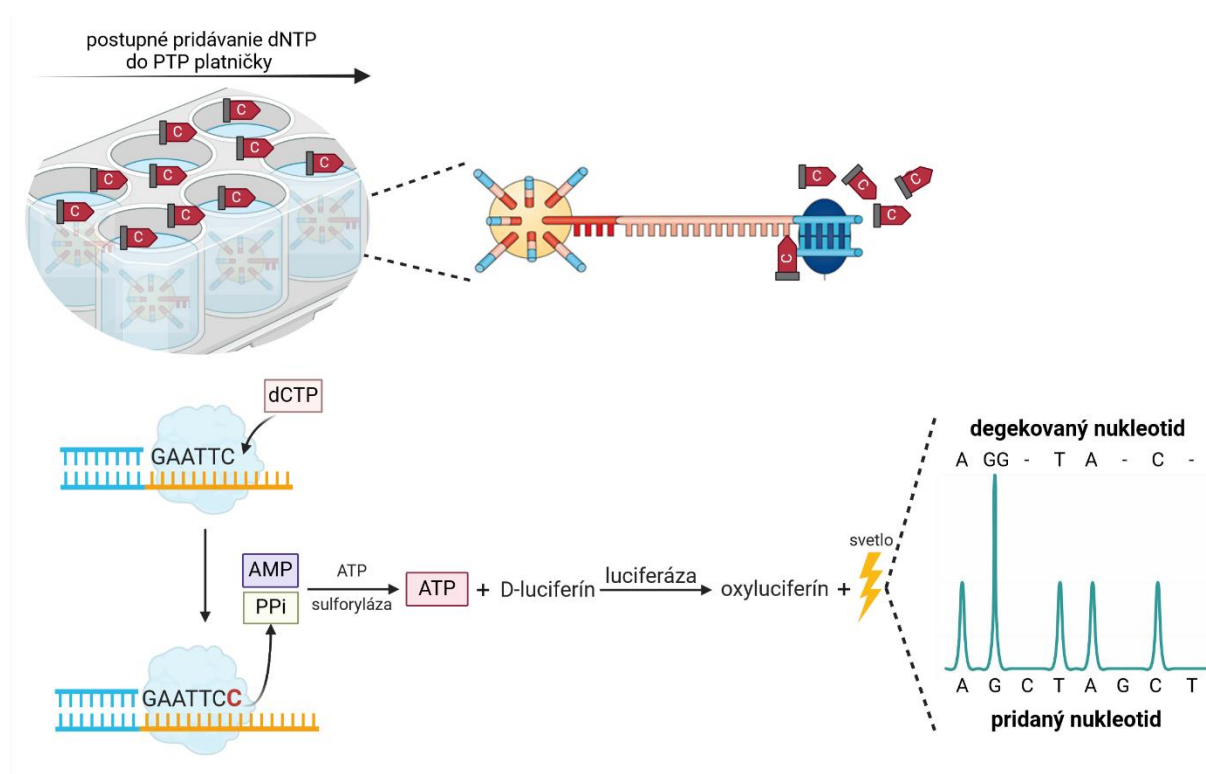
1.5.4 Sekvenačné prístupy

Sangerovo sekvenovanie má technické limitácie, preto je využitie tejto metódy primárne v sekvenovaní konkrétnych regiónov v analyzovanom gène. NGS metódy umožňujú analýzu väčších regiónov v kratšom čase, čo viedlo k vzniku viacerých prístupov. **Cielené sekvenačné prístupy** sa zameriavajú na špecifické regióny v genóme, pričom to môžu byť sekvencie v rámci jedného alebo viacerých génov (TGS, *targeted gene sequencing*). Väčšina klinických panelov je založená na analýze genetických variantov v génoch asociovaných so špecifickými fenotypmi. **Celoexómové sekvenovanie** (WES – *whole exome sequencing*) je zacielené na všetky regióny v genóme, ktoré kódujú proteíny, teda na exóny všetkých génov, čo predstavuje menej ako 2 % z genómu. Odhaduje sa, že okolo 85 % dnes známych chorôb spôsobených genetickými variantami sú v exónoch. Najrozsiahlejší prístup je **celogenómové sekvenovanie** (WGS – *whole genome sequencing*), kde sa sekvenujú kódujúce aj nekódujúce regióny. Na získané WGS dáta je možné *in silico* uplatniť WES a TGS prístupy. Rozvoj bioinformatických nástrojov umožnil analýzy aj nekódujúcich regiónov v genóme či

transkriptóme. Charakterizácia variability nekódujúcich regiónov a transkriptómov môže napomôcť objasneniu niektorých ochorení.

1.5.5 Pyrosekvenovanie (adícia jednotlivých nukleotidov)

Pyrosekvenovanie je neelektroforetická bioluminescenčná metóda. Pri inkorporácii nukleotidov sa uvoľňuje pyrofosfát. Princíp spočíva v meraní intenzity viditeľného svetla, ktoré sa vyprodukuje enzymatickou premenou pyrofosfátu. Je to teda nefluorescenčná metóda (Morozova, Marra, 2008). Do reakcie sa postupne pridáva len jeden typ nukleotidu, a to v obmedzenom množstve. Ak pridaný nukleotid nie je komplementárny k nukleotidu, ktorý má byť sekvenovaný, DNA-polymeráza ho neinkorporuje a polymerizácia sa zastaví, kým nie je dodaný komplementárny nukleotid (Obrázok 1.8).



Obrázok 1.8 Princíp pyrosekvenovania využívaný Roche 454. dNTP – deoxynukleozidtrifosfát, PPi – pyrofosfát, AMP – adenzínmonofosfát, dCTP – deoxycytozíntrifosfát, ATP – adenzíntrifosfát, (Priščáková, vytvorené v Biorender.com)

Podobnosť so Sangerovým sekvenovaním je v používaní jednovláknovej DNA ako templátu pre sekvenačné primery. Inkorporácia nukleotidov do predlžujúceho sa reťazca prebieha bez terminácie, polymerizácia sa len pozastaví.

Prvým krokom v celom postupe je **denaturácia DNA**, ktorá má byť sekvenovaná. Jednovláknová DNA je pripojená ku mikrogulôčke. Reakčná zmes obsahuje primery, DNA

polymerázu, ďalšie enzýmy (sulforyláza, luciferáza, apyráza). Táto štartovacia zmes však neobsahuje dNTP, tie sú postupne pridávané počas sekvenačnej reakcie. Po každom cykle inkorporácie sa nezaradené nukleotidy odmyývajú. V prebiehajúcej reakcii, je vždy prítomný len jeden typ nukleotidu. Tieto cykly pridávania a odmyývania dNTP sa neustále opakujú.

Inkorporácia nukleotidu je sprevádzaná uvoľnením pyrofosfátu. Uvoľnené množstvo je equimolárne k počtu zabudovaných nukleotidov. Nasleduje enzymatická kaskáda, v ktorej enzým sulforyláza v prítomnosti AMP (adenozínmonosulfát) modifikuje PPi (anorganický pyrofosfát) na ATP (adenozíntrifosfát). Následným pôsobením luciferázy sa ATP konvertuje na viditeľné svetlo a ADP (adenozíndifosfát), luciferín na oxyluciferín. Uvoľnené svetlo z enzymatickej reakcie je zaznamenané pyrosekvenátorom vo forme elektroforetogramu, ktorý korešponduje s poradím nukleotidov v sekvencii nášho záujmu.

Hlavným nedostatkom pyrosekvenovania je strata priamej úmernosti medzi množstvom emitovaných fotónov a počtom inkorporácií rovnakého nukleotidu (homopolymerické úseky). K nepriamej úmere dochádza pri sekvenciách, kde za sebou nasleduje viac ako päť rovnakých nukleotidov. Preto je problematické v homopolymerických sekvenciách určiť presný počet za sebou idúcich rovnakých nukleotidov. V týchto oblastiach takisto dochádza aj k nedostatočnej inkorporácii nukleotidov, práve kvôli ich obmedzenému množstvu, pridávaného v jednotlivých krokoch. Táto metóda je vhodnejšia skôr pri známych SNP, ako na ich *de novo* identifikáciu.

454 sekvenátor genómu

Prvá komerčne dostupná platforma bola predstavená na trhu v roku 2004 ako 454 *Genome Sequencer* od Roche a práve pomocou nej bol sekvenovaný druhý kompletný ľudský genóm, konkrétne genóm Jamesa D. Watsona v roku 2008. Technológia samotného postupu sekvenovania je derivovaná zo spojenia emulznej PCR na streptavidínových mikrogulôčkách a pyrosekvenovania (metóda *sequencing-by-synthesis*). Princíp pyrosekvenovania prvýkrát opísal Nyrén a neskôr bol postup ešte vylepšený vďaka Ronaghlimu.

DNA, ktorá bude sekvenovaná sa fragmentuje a na konci fragmentov sa ligujú adaptéry (A na jeden koniec, B na druhý koniec fragmentu). Adaptéry sú komplementárne k sekvenačným primerom. Adaptér B obsahuje na 5'konci biotínovú značku, ktorá tiež umožňuje naviazanie fragmentov na spomínané streptavidínové mikrogulôčky (Obrázok 1.7). Cieľom tohto kroku je naviazanie práve jedného fragmentu DNA na mikrogulôčku. Mikrogulôčky s naviazanými templátmi sa nachádzajú v emulzii typu voda-v-oleji spolu s PCR komponentami. Micely v emulzii vytvárajú mikroreaktory a práve v nich prebieha klonálna

amplifikácia. Po jej ukončení sa micely narušia a monoklonálne mikrogulôčky sa uvoľnia. Následne sú všetky mikrogulôčky transportované do prietokovej kyvety. Adaptéry sú tiež špecifické tým, že sa na 3' konci končia kombináciou nukleotidov TCAG, ktoré už nepatria k sekvenačnému primeru. Toto poradie báz korešponduje s postupným tokom nukleotidov pri sekvenovaní a umožňuje kalibráciu detekčného programu.

Pyrosekvenovanie prebieha v reakčnej platničke, v tomto prípade nesúcej pomenovanie *picotiter plate* (PTP). Je tvorená fúzanými kremičitými kapilármi. V PTP sa nachádzajú jamky (angl. *wells*), čo sú vlastne reakčné mikroreaktory. Steny týchto mikroreaktorov sú pokovované, čo umožňuje lepšie vedenie emitovaného signálu počas reakcie. Na každom PTP sa nachádza priemerne 1,7 milióna (pri modeli Roche GS FLX) hexagonálnych jamiek (Speers, Hyman), každá s priemerom 40 – 44 μm v najširšej časti. Tento rozmer je približne 1,5 krát väčší ako veľkosť mikrogulôčky, takže do priestoru mikroreaktora sa zmestí práve jedna. Zvyšný priestor je zaplnený tzv. sprievodnými a enzýmovými mikrogulôčkami, ktoré sú nevyhnutné pre priebeh pyrosekvenovania. PTP teda funguje ako prietoková kyveta, do ktorej priteká reakčná zmes vždy len jedným typom nukleotidu, teda buď dATP/dCTP/dGTP/dTTP. Po každom cykle prídania reakčnej zmesi nasleduje detekcia signálu a premytie kyvety, aby sa odstránili neinkorporované nukleotidy. Signál v podobe emitovaného svetla je zachytený CCD (*charged-couple device*) kamerou (Voelkerding a spol., 2009). Výstupom z kamery je *flowgram*, čo je graf série vrcholov vyjadrujúcich mieru emitovaného svetla uvoľneného počas inkorporácie nukleotidov (Obrázok 1.8).

Dĺžka čítaní produkovaná týmto prístupom je/bola okolo 400 – 700 bp, čo je najdlhšie čítanie spomedzi prístupov druhej generácie, čo poskytovalo výhodu pri celogenómovom *de novo* sekvenovaní či pri sekvenovaní repetitívnych oblastí. Presnosť správneho určenia báz sa uvádza až 99,997 % pri 15-násobnom pokrytí. Presnosť sa však rapídne znižuje pri nižšom pokrytí.

Nevýhodou tejto metódy je nielen vysoká cena reakčných činidiel, ale aj vysoká chybovosť v homopolymerických oblastiach (najčastejšie chyby sú inzercie a delécie nukleotidov v dôsledku nesprávneho určenia počtu nukleotidov v homopolymerickej oblasti). Pre tieto spomenuté charakteristiky boli sekvenátory používané na *de novo* sekvenovanie bakteriálnych a hmyzích genómov, záchyt exónov strednej veľkosti (do 3 Mb), sekvenovanie 16S génov v metagenomike, identifikáciu RNA izoforiem pomocou *RNA-seq*. Prvý kompletný genóm, ktorý spoločnosť sekvenovala, bol genóm *Mycoplasma genitalium* (582 970 bp). 454 platformy sa však prestali v 2013 vyrábať.

1.5.6 Cyklická reverzibilná terminácia (CRT)

Cyklická reverzibilná terminácia prebieha v troch základných krokoch, ktoré sa cyklicky opakujú:

- inkorporácia reverzibilného terminátora,
- zobrazenie fluorescenčných značiek,
- deprotektcia, čo značí štiepenie väzby medzi nukleotidom a ochranou skupinou

Pre techniky NGS je typická eliminácia elektroforézy, čo platí aj pri tomto postupe. Výhoda CRT voči pyrosekvenovaniu je hlavne prítomnosť všetkých štyroch typov nukleotidov v každom cykle, možnosť kontroly adície nukleotidov aj v homopolymerických oblastiach a synchronná extenzia heterogénnych sekvencií.

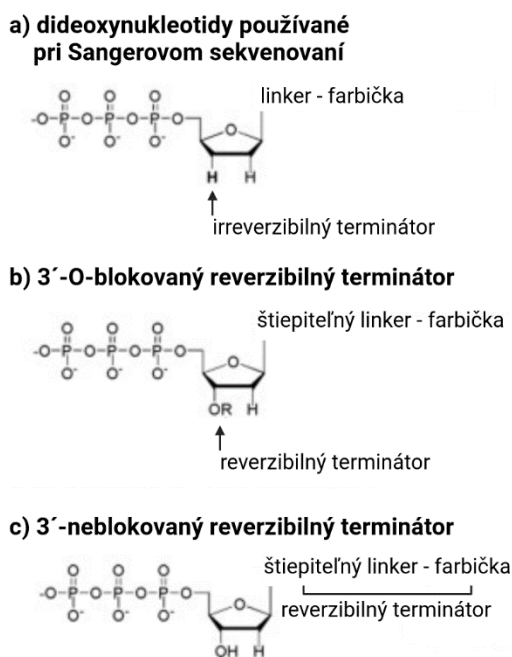
Podstatou celej sekvenačnej reakcie sú **reverzibilné terminátory** (v angl. *reversible terminator bases* = *RT-bases*), ktoré zastavujú proces polymerizácie vlákna komplementárneho k templátu (podobne ako ddNTP pri Sangerovom sekvenovaní). Terminátory sú vlastne nukleotidy, ktoré navyše obsahujú molekulu fluorofóru a terminátor polymerizácie/ochrannú skupinu, ktorý/ktorá zabráni DNA-polymeráze pokračovať v inkorporácii nukleotidov. Pre pokračovanie procesu predlžovania reťazca je potrebné tieto pridané skupiny odštiepiť. Z dôvodu modifikácie nukleotidov je potrebná mutantná DNA-polymeráza, ktorá bude takýto reverzibilný terminátor schopná inkorporovať do už existujúceho reťazca.

Pre pokračovanie polymerizácie je potrebné odštiepenie ochrannej skupiny. Ochranná skupina terminátora musí byť efektívne odštiepiteľná za miernych podmienok. Odstránenie ochrannej skupiny prebieha pôsobením silnej kyseliny alebo zásady, katalytickou alebo chemickou redukciou, dokonca kombináciou oboch postupov. Toto pôsobenie môže narušiť štruktúru nukleotidov, DNA-polymerázy, samotných templátov či pevného povrchu, na ktorom prebieha reakcia. Zo spomenutých dôvodov sa navrhli terminátory s fotoštiepiteľnou väzbou medzi ním a ochranou skupinou, ktoré však nie sú komerčne využívané.

Primer sa naviaže na templát, DNA-polymeráza k primeru inkorporuje presne jeden fluorescenčne značený nukleotid, ktorý je komplementárny k templátu. Po inkorporácii nastane terminácia polymerizácie. Neinkorporované nukleotidy sú odmyté. Prebehne detekcia a zobrazenie signálu emitovaného práve inkorporovaným nukleotidom. Nasleduje odštiepenie terminačnej skupiny a fluorescenčnej farbičky. Vzorka sa znovu premyje a nasleduje ďalší cyklus inkorporácie.

Samotné reverzibilné terminátory sú v podstate dvoch typov:

- 3'-blokované – vyžadujú štiepenie dvoch chemických väzieb na odstránenie fluorofóru a terminačnej skupiny
- 3'-neblokované – vyžadujú štiepenie len jednej chemickej väzby – fluorofór a terminačná skupina sú na seba naviazané, majú voľnú 3'-OH skupinu na vytvorenie väzby s ďalším nukleotidom (Obrázok 1.9).



Obrázok 1.9 Typy terminátorov. a) ireverzibilné terminátory b) 3'-blokované reverzibilné terminátory c) 3'-neblokované reverzibilné terminátory

Najbežnejšou chybou pri tejto metóde sú substitúcie a komplikácie pri sekvenovaní regiónov bohatých na GC. Nevýhodou pri 3'-blokovaných terminátoroch je potreba mutantných DNA-polymeráz, ktoré sú schopné ich inkorporovať do reťazca.

Genómový analyzátor Illumina

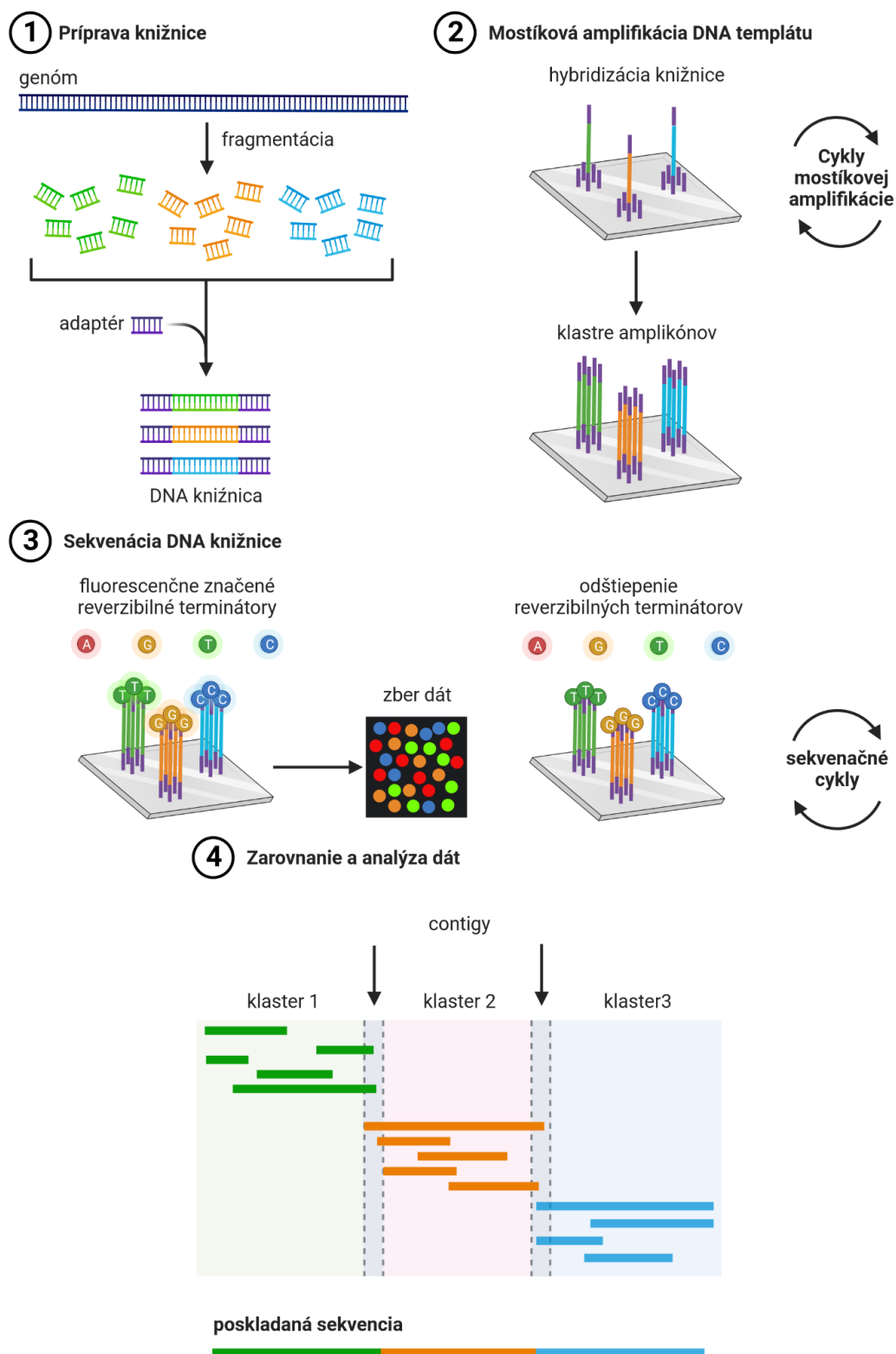
Sekvenátory od spoločnosti Illumina sa stali jedným z najrozšírenejších na trhu. Pri príprave knižníc sa využíva mostíková amplifikácia (Obrázok 1.7) v prietokových sklenených kyvetách, na povrchu ktorých sú zachytené tzv. oligonukleotidové kotvy. V tomto prípade sa teda na imobilizáciu fragmentov DNA nepoužívajú mikrogulôčky ako pri emPCR, ale pevný povrch. Pri príprave knižnice je templátová DNA fragmentovaná na dĺžku niekoľko stoviek bázových párov. Konce fragmentov sú reparované tak, aby sa vytvorili 5'-fosforylované tupé konce. Na 3'koniec sa pomocou Klenowho fragmentu pridá jeden dATP, čo umožní efektívnejšiu ligáciu fragmentu k oligonukleotidovým adaptérom. Tie zas majú prečnievajúci

3' koniec s T a sú komplementárne ku kotvám na povrchu prietokovej kyvety. Vďaka komplementárnosti kotiev a adaptérov je možné imobilizovať templáty kovalentným prichytením k pevnému povrchu a amplifikovať. Templát prichytený ku kotve sa ohýna a pritom sa hybridizuje k ďalšej priľahlej oligonukleotidovej kotve. Výsledkom PCR sú klastre klonálne amplifikovaných templátov, pričom každý klastor obsahuje priemerne 1000 kópií fragmentu DNA (Obrázok 1.7b). Na povrchu prietokovej kyvety sa môže generovať až 5×10^7 samostatných klastrov. Následným krokom je denaturácia DNA, pri čom sa získa ssDNA, ktorá je následne sekvenovaná.

Sekvenovanie prebieha metódou **cyklickej reverzibilnej terminácie**. Používa sa zmes štyroch reverzibilných terminátorov, každý je značený inou fluorescenčnou farbou. Po každej inkorporácii RT sú prebytočné činidlá odmyté a nasleduje detekcia signálu. Odštiepenie fluorofóru umožňuje ďalší cyklus inkorporácie (Obrázok 1.10). Dĺžka produkovaných čítaní 75 – 250 bp. Celkové množstvo vyprodukovaných dát na jeden beh je až 1 Gb. Presnosť určenia báz dosahovala 96,7 %. Všetky tieto charakteristiky platia pre Genome Analyzer, ktorý bol Illuminou uvedený na trh v 2006 ako ich prvý sekvenátor.

V súčasnosti existuje niekoľko modelov sekvenátorov, štyri modely sekvenátorov sú vhodné na analýzy transkriptómov, WES a baketriálnych genómov (iSeq, MiniSeq, MiSeq a NextSeq). Dve platformy (HiSeq a NovaSeq) sú vhodné na WGS. HiSeq X umožňuje sekvenovanie až 1800 ľudských genómov s 30-násobným pokrytím za rok. Pre všetky sekvenátory sa uvádza presnosť na úrovni 99,5 %.

Výhody Illumina sekvenátorov sú masívna paralelnosť (1,2 – 6000 Gb), vysoká presnosť, relatívne nízke náklady na bázu, široké spektrum aplikácií (WGS, WES, epigenetika, RNA sekvenovanie) a konfigurácii príprav knižníc. V porovnaní s 454 GS FLX sa v procese sekvenovania vyskytujú menej často inzercie či delécie. Najväčším problémom sú substitúcie, pretože sa používajú modifikované nukleotidy. Na ich inkorporáciu je aj potrebná mutantná DNA polymeráza, ktorá je ich schopná inkorporovať do rastúceho reťazca. Tieto faktory vplyvajú na kratšiu dĺžku čítaní, pretože s jeho rastúcou dĺžkou markantne rastie pravdepodobnosť zaradenia nesprávneho nukleotidu. Možné príčiny sú neefektívnosť polymeráz, problémy s odštiepením fluorofóru, úpadok intenzity signálu s každým cyklom v dôsledku ešte nedokonalého chemického postupu, atď. Problém môže nastať aj pri asynchrónnom sekvenovaní jednotlivých fragmentov v klastroch, čo môže interferovať s vytvorením konsenzus sekvencie. Problematické je aj vysoké množstvo vstupnej templátovej DNA, kde môže dôjsť k zahľteniu čipu (angl. *overclustering*).



Obrázok 1.10 Princíp sekvenovania Illumina sekvenátorov založený na cyklickej reverzibilnej terminácii (Prišćáková, vytvorené v Biorender.com)

V júni 2009 Illumina odštartovala ich vlastný *Personal Full Genome Sequencing* servis, ktorý ponúkal sekvenovanie ľudského genómu s 30-násobným pokrytím za cenu 48 000

dolárov. V máji 2011 sa, dokonca, táto cena redukovala na 4000 dolárov a v roku 2018 pod 1000 dolárov.

V 2015 Qiagen priniesol na trh sekvenátor *GeneReader*, ktorý v princípe používa rovnaký prístup ako Illumina. Hlavná aplikácia sekvenátora má byť v klinike so zameraním sa na onkologické génové panely.

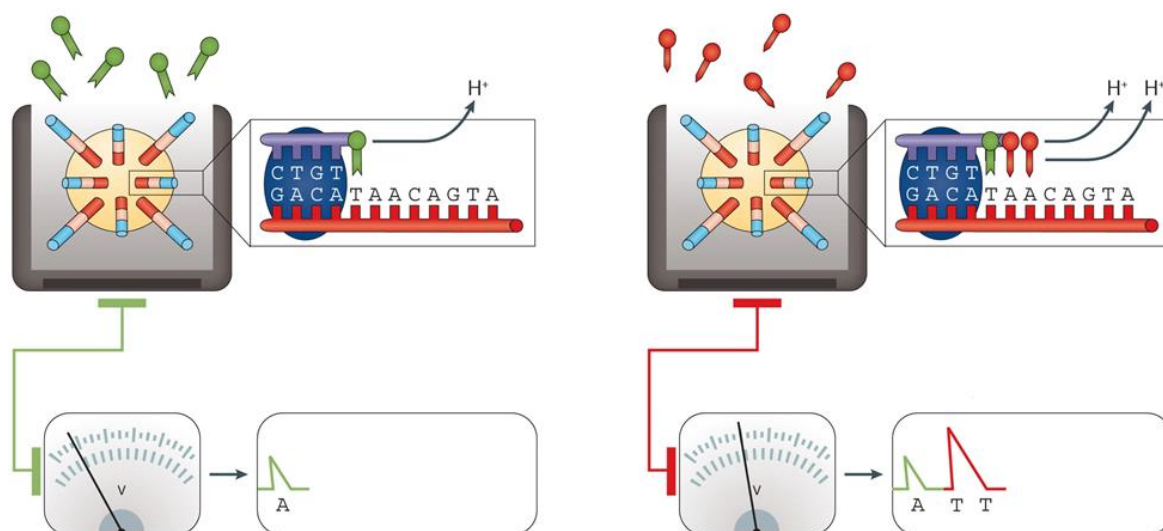
1.5.7 Sekvenovanie na iónových polovodičoch

Sekvenovanie prostredníctvom iónových polovodičov takisto využíva syntézu nukleového vlákna. Identita bázy sa určuje vďaka **zmene pH**, ktorá nastane po uvoľnení kationov vodíka pri inkorporácii nukleotidu do rastúceho reťazca. Sekvenačná reakcia prebieha v jamkách na mikročipoch a každá jamka obsahuje vysoko citlivý iónový senzor, podobný pH metru. Jednotlivé nukleotidy sú postupne pridávané do reakčnej platničky, ich inkorporácia sa prejaví elektrickou zmenou, ktorá je meraná polovodičovými senzormi (Obrázok 1.11). Ak sa nukleotid neinkorporuje, k zmene napätia nedochádza. Nukleotidy nie je potrebné fluorescenčne značiť a odpadá potreba optických senzorov.

Ion Torrent (ThermoFisher Scientific)

Platforma prepája metódu sekvenovania založenú na syntéze nukleotidového vlákna s masívne paralelným prístupom. Knižnica je pripravená a zachytená na povrchu guľôčok, na ktorých prebieha emulzná PCR. Následne sú guľôčky rozptýlené do reakčnej mikroplatničky s jamkami. Merajú sa elektrické zmeny asociované s uvoľňovaním kationov vodíka pri inkorporácii nukleotidu. Pri homopolymerických úsekoch je intenzita elektrického signálu prepočítaná na počet báz, ale konzistentné výsledky sú limitované na homopolymerický úsek nie dlhší ako šesť nukleotidov.

Ion Torrent Gene Studio S5 produkuje čítania o dĺžke 200 až 600 bp presnosťou viac ako 99 % a produkciou až 50 Gb. Hlavnými aplikáciami sú cielené resekvenovanie, sekvenovanie exómov, transkriptómov, sekvenovanie malých genómov, tekuté biopsie a veľké onkologické panely. Výhodou je relatívne nízka cena za bázu. Keďže sa na detekciu nevyužíva fluorescencia, na detekciu nie je potrebný finančne náročný optický systém. Nevýhodou je relatívne nízka produkcia a nepresnosť pri homopolymerických oblastiach.

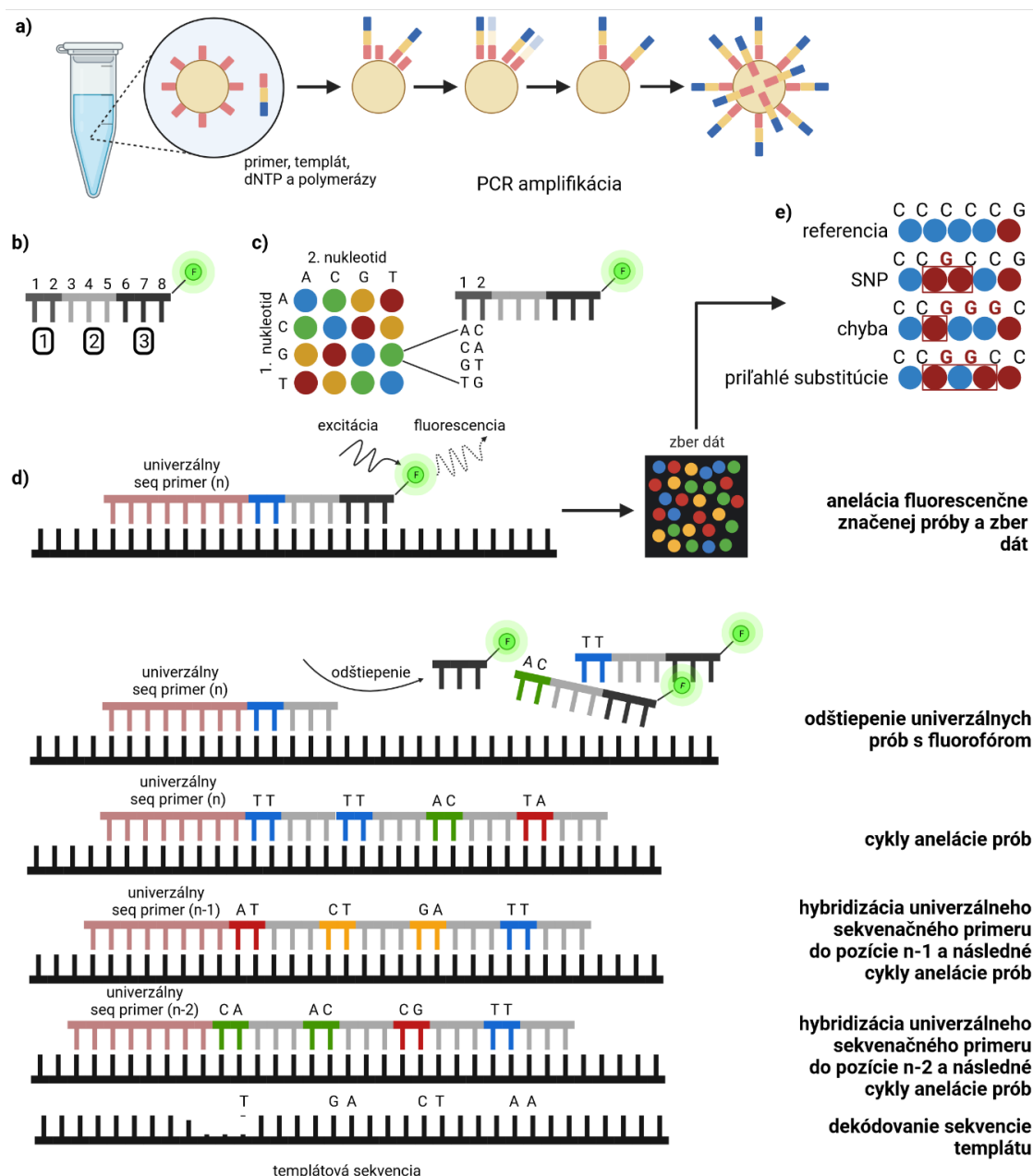


Obrázok 1.11 Sekvenovanie na iónových polovodičoch (platforma *Ion Torrent*). Templátová DNA je amplifikovaná emulznou PCR v mikrotitračnej platničke (PTP). Do PTP sa postupne pridávajú jednotlivé nukleotidy (vždy len A/C/G/T). Pri inkorporácii nukleotidu sa uvoľňuje jeden kation vodíka. Uvoľnenie kationu vodíka spôsobí zmenu pH, čo je detegované polovodičom (CMOS – *metal oxide semiconductor*) a tranzistorom (ISFET – *ion-sensitive field-effect transistor*). Po inkorporácii nukleotidov sú neinkorporované nukleotidy odmyté (prevzaté a upravené od Goodwin a spol., 2016).

1.5.8 Sekvenovanie pomocou ligácie (SBS, *sequencing-by-ligation*)

Pri sekvenovaní pomocou ligácie sa nepoužíva DNA-polymeráza, tak ako pri doteraz spomínaných metódach, ale DNA-ligáza. V procese sekvenovania dochádza k ligácii prôb (Obrázok 1.12). Próba je v tomto prípade oligonukleotidová sekvencia zložená z ôsmich nukleotidov. Prvá a druhá pozícia v próbe predstavuje „hľadané“ nukleotidy, ktorých kombinácia je v asociácii s konkrétnou fluorescenčnou farbou. Existuje teda 16 rôznych dinukleotidov, štyri budú mať vždy rovnaký fluorescenčný signál. Napríklad A na prvej pozícii korešponduje so zelenou farbou fluorescenčnej značky. V prípade dvojbázového kódovania, sekvenovanie prebieha ligáciou oligonukleotidových sekvencií, v ktorých dve vyšetřované bázy sú asociované s určitou farbou. Napríklad s červenou farbou budú asociované kombinácie báz TA, GC, CG, AT. Výhodou tohto kódovania je, že nukleotidová substitúcia sa prejaví dvoma farebnými zmenami vo výstupnej schéme v porovnaní s referenčnou sekvenciou, kým sekvenačná chyba sa prejaví zmenou len jedného farebného kódu (Obrázok 1.12e). Tretia až piata báza je degenerovaná, teda dokáže sa párovať s viac ako s jedným typom nukleotidu (napr. s oboma purínovými či pyrimidínovými bázami). Šiesta až ôsma sú tzv. univerzálne bázy – hydrofóbne analógy báz, ktoré netvoria vodíkové mostíky s prirodzenými bázami na komplementárnom reťazci. Párujú sa menej selektívne. Táto vlastnosť je nevyhnutná, pretože presná sekvencia fragmentu, na ktorý sa hybridizuje próba, nie je známa. Často sa

využívajú inozínové bázy. Medzi piatou a šiestou bázou sa nachádza fosfotiolátová väzba, ktorá je analóg ku fosfodiesterovej väzbe medzi prirodzenými nukleotidmi. Túto väzbu je možné štiepiť pomocou iónov striebra.



Obrázok 1.12 Princíp sekvenačnej metódy založenej na ligácii (SBS) využívanej sekvenátormi ABI SOLiD. a) Templátová DNA je namnožená mostíkovou amplifikáciou. b) Štruktúra sekvenačných prób – próba je zložená z ôsmich nukleotidov, pričom prvé dva sú definované (1), tretí až piaty sú degenerované (2), šiesty až ôsmy sú univerzálne s naviazaným fluorofórom (3). c) Dvojnukleotidové kódovanie – každá farba môže kódovať štyri možné kombinácie dvojíc nukleotidov. d) K templátu je hybridizovaný sekvenačný primer, následne sa hybridizuje próba, ktorej nukleotid v prvej a druhej pozícii je komplementárny k templátu, dôjde k emisii signálu, k odštiepeniu časti próby a ligácii próby k primeru. Následne dochádza k opakovaným cyklom anelácie a ligácie prób. Po prečítaní celej dĺžky templátu sa komplex templátu a prób denaturuje, a následne sa hybridizuje sekvenačný primer do pozície n-1 a opakujú sa cykly hybridizácie a ligácie fluorescenčne značených prób. e) Rozdiely v zmene signálu vyvolané SNP (jednobodový polymorfizmus), chybou a príľahlými substitúciami (Priščáková, vytvorené v Biorender.com)

Najjednoduchší postup tejto metódy začína hybridizáciou fluorescenčne značenej próby k templátu s primerom. Následne sa pridá DNA-ligáza, ktorá spojí primer s próbou. Nehybridizované próby sú odmyté. Nasleduje fluorescenčné zobrazenie, aby sa určila identita ligovanej próby. V prípade, že sa použijú štiepateľné próby, môže sa odstrániť fluorofór, aby sa obnovila fosfátová skupina na 5'konci, a tým pádom môže prebehnúť ďalší cyklus ligácie. Cykly ligácie sa opakujú, kým sa neprejde celý fragment, následne sa primer aj syntetizovaný reťazec odstráni a hybridizuje sa nový primer v pozícii n-1 voči pôvodnému.

ABI SOLiD platforma

Táto metóda patriaca k technikám NGS sa stala komerčne dostupnou v roku 2008. Pomenovanie SOLiD znamená *Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*, z čoho vyplýva, že princípom tejto metódy sekvenovania je ligácia oligonukleotidových prób.

Prvým krokom pri tejto platforme je emulzná PCR na paramagnetických mikrogulôčkách. Princíp PCR je rovnaký ako pri 454, rozdiel je v rozmeroch mikrogulôčok. Pri SOLiD majú v priemere 1 μm (454 viac ako 20 μm). Imobilizácia mikrogulôčok prebieha ich naviazaním na sklenený povrch, nie do jamiek ako pri Roche/454. Výsledkom amplifikácie sú identické jednovláknové kópie pôvodného fragmentu s naligovaným P1 adaptérom. Mikrogulôčky s amplifikovanými fragmentami sú následne kovalentne prichytené na sklenený povrch prietokovej kyvety. Táto platforma podporuje *end-pair* aj fragmentovanú knižnicu. Amplifikované fragmenty sú sekvenované pomocou metódy *sequencing-by-ligation*. V skratke, na templát je anelovaný primer a následne dochádza k hybridizácii próby, ktorá má bázy na prvej a druhej pozícii komplementárne k nukleotidom na templáte. Po excitácii fluorescenčného farbiva a zachytení signálu, dochádza k štiepeniu väzby za piatym nukleotidom, teda aj odstráneniu fluorofóru. Tento ligačný krok sa opakuje sedemkrát, potom sa vzniknutý reťazec odstráni denaturáciou. Dôležitým krokom je anelácia nového primeru, ale tentokrát do pozície n-1 oproti pôvodnému. Prebehne 5 cyklov s polohami primerov n, n-1, n-2, n-3 a n-4. Vďaka posunu sa sekvenuje aj časť adaptérov, ktoré sa ligovali ku fragmentom počas prípravy knižnice. Sekvencie adaptérov sú známe, tým pádom tieto nukleotidy slúžia ako štartovací bod, od ktorých sa môžu podľa farebného signálu určovať nukleotidy v neznámej sekvencii. Z princípu metódy vyplýva, že výstupom nie je priamo poradie nukleotidov, ale fluorescenčné signály, pričom každý reprezentuje štyri možné kombinácie dinukletidov (*colour-space*). Je potrebných niekoľko cyklov ligácie aby sa určila presná identita jednotlivých nukleotidov v sekvencii.

Postup umožňuje sekvenovať každý nukleotid dvakrát, čo zvyšuje presnosť určenia báz. Výrobca udáva presnosť až na úrovni 99,99 %. Výhodou dvojbazového kódovania je možnosť jednoducho rozlíšiť SNP od chýb pri sekvenovaní. SNP je sprevádzané farebnými zmenami na dvoch za sebou nasledujúcich pozíciách oproti referenčnej sekvencii, chyba pri sekvenovaní len jednou farebnou zmenou. Najčastejšími chybami sú substitúcie, podobne ako pri Illumina/Solexa. Ďalším spoločným problémom je tzv. podreprezentácia úsekov bohatých na AT alebo GC.

SOLiD 4 produkuje čítania až s dĺžkou 50 bp a dokáže produkovať 80 – 100 Gbp sekvencií za cyklus. Najnovší model (v apríli 2011) 5500x1 (pôvodne označený SOLiD4hq) môže generovať viac ako 2,4 miliardy čítaní za jeden beh s presnosťou surových (nezarovnaných) dát 99,94 %. Pri 15-násobnom pokrytí vzrastá presnosť až na 99,999 %. Staršie modely platformy produkujú čítania dlhé 25 – 35 bp, každý sekvenačný beh 1 – 3 Gb dát. V roku 2016 boli tieto platformy z trhu stiahnuté.

Sekvenovanie pomocou nanoguličiek

Technológia vyvinutá *Complete Genomics* (súčasť *Beijing Genomics Institute - BGI*) je založená na inovatívnom prístupe tvorby sekvenačnej knižnice. Izolovaná DNA je fragmentovaná na úseky dlhé 400 – 500 bp. K fragmentom sú ligované adaptéry (štyri) a sú cirkularizované. Fragменты sú amplifikované **replikáciou valivou kružnicou**. Replikáciou sa vytvorí reťazec kópií daného fragmentu, ktorý je zbalený do kompaktného zhluku (nanoguličky) vďaka palindromatickým sekvenciám v adaptéroch. Nanogulička je zachytená na povrchu kremičitej kvety na mikročipe (Obrázok 1.7c). Následne sú jednotlivé nanoguličky sekvenované pomocou ligácie, označovanej ako *combinatorial probe-anchor ligation* (cPAL). Kotviaca sekvencia (*anchor*) je komplementárna k jednému zo štyroch adaptérov v templáte a sonda (*probe*) hybridizuje k rôznym častiam nanoguličiek. Próby tvoria zmes rôznych oligonukleotidov, ktoré však majú v definovanej pozícii známy nukleotid a korešpondujúci fluorofor (*one-base-encoded probes*). Po zachytení signálu sa odmyje komplex kotvy a próby a nové kombinácie sú hybridizované. Nový komplex má vždy známy nukleotid v polohe n+1. Pri sekvenovaní sa používajú adaptéry rôznej dĺžky, čo umožní sekvenovanie v okolí oboch koncov adaptéra.

Sekvenátory BGI a dáta nimi produkované sú výkonnostne a kvalitatívne na úrovni Illumina HiSeq2500. Náklady na sekvenovanie sú pri BGI nižšie než pri Illumina. Nevýhody tohto prístupu sú rovnaké, ako pri všetkých sekvenačných metódach produkujúcich krátke čítania, a to nespoľahlivosť pri repetitívnych sekvenciách a štrukturálnych variantoch.

1.5.9 Zarovnávanie a skladanie genómu

Prvým krokom sekvenačnej analýzy je určenie identity bázy (angl. **base calling**), keď sa signál zachytený sekvenátorom transformuje na sekvenciu báz, teda získame surové dáta. Surové dáta zo sekvenovania sú bioinformaticky spracované. Proces zahŕňa identifikáciu jednotlivých fragmentov podľa priradených kódov počas prípravy knižnice (*demultiplexing*), kontrolu kvality a mapovanie čítaní. FASTQ je súbor, v ktorom sú surové sekvenačné dáta spolu so skóre kvality pre jednotlivé bázy. Skóre určuje pravdepodobnosť, že je daná báza správne identifikovaná.

Po vygenerovaní krátkych čítaní pomocou technológií NGS, je finálnym krokom zarovnanie čítaní v prípade, že je referenčný genóm známy. Pri **de novo sekvenovaní** prebieha poskladanie získaných sekvencií do celistvých úsekov, či už genómu, alebo študovaného regiónu. Problém pri lokalizácii sekvencie nastáva v prípade, že je **súčasťou repetitívnych alebo homologických oblastí** (napr. pseudogény), alebo sa dokonca v referenčnom genóme nenachádza. Tieto situácie môžu nastať v dôsledku medzier v referenčnom genóme alebo kvôli štrukturálnym variantom v analyzovanom genóme. Medzi štrukturálne varianty sa radia všetky sekvenčné varianty okrem SNP – inzercie, delécie, inverzie, duplikácie segmentov, rozdiely v počte kópií. V takýchto prípadoch je vhodné zvoliť *pair-end* sekvenovanie. Po mapovaní čítaní do referenčného genómu sa generuje SAM a následne BAM súbor. V ňom sa identifikujú všetky odchýlky od referenčnej sekvencie. Ak sa odchýlka vyskytuje v určitom počte čítaní rovnakého úseku, anotuje sa ako variant. Pri heterozygotnom bodovom polymorfizme by mal byť teoreticky detegovaný v 50 % čítaní a vtedy anotovaný. V skutočnosti však detekčný prah môže byť nastavený aj na len 23 % v dôsledku technických nedostatočností metód. Do úvahy pri určovaní variantov je potrebné brať aj kvalitu signálu pre jednotlivé bázy a kvalitu mapovania. Detegované varianty a ich alelická frakcia sú generované do VCF súboru (*variant call file*). Pri anotácii variantov sa odlišia reálne varianty od sekvenačných artefaktov. Dostupné sú rôzne anotačné nástroje, ako ANNOVAR, AnnTools, SVA, VARIANT, VEP, atď. Význam detegovaných variantov je následne interpretovaný pomocou dostupných databáz a variant je klasifikovaný.

Existuje viacero smerníc a odporúčaní pre interpretáciu germinatívnych variantov (ACMG – *American College of Medical Genetics and Genomics, Association of Molecular Pathologists, College of American Pathologists* (CAP), Slovenská spoločnosť lekárskej genetiky). Tieto smernice na základe viacerých kritérií a poznatkov, ako sú populačné štúdie, funkčné štúdie, predikcie efektu mutácií, dedičné faktory, atď., klasifikujú varianty ako

benígne, pravdepodobne benígne, s neznámou významnosťou, pravdepodobne patogénne a patogénne. Informácie o variantoch a ich interpretácia sú zhrnuté aj vo verejne dostupných databázach (Tabuľka 1.2). Údaje z databáz je potrebné vyhodnocovať so zreteľom aj na odbornú literatúru, resp. podľa odporúčaní pracoviska. Pri identifikácii potenciálneho genetického variantu NGS metódou sa často používa potvrdenie resekvenáciou Sangerovou metódou.

Tabuľka 1.2 Prehľad verejne dostupných databáz variantov a ich klinického významu

TYP DATABÁZY	NÁZOV DATABÁZY	INTERNETOVÝ ODKAZ
Populačné databázy	<i>Exome aggregation consortium (Exac)</i>	
	<i>gnomAD browser</i>	https://gnomad.broadinstitute.org/
	<i>1000 Genomes</i>	https://www.internationalgenome.org/
	<i>Exome server project</i>	https://evs.gs.washington.edu/EVS/
Databázy dedičných ochorení	<i>ClinVar</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
	<i>dbSNP</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/
	<i>NCBI genetic testing registry</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/
	<i>Leiden open variant database</i>	https://www.lovd.nl/
Onkologické databázy	<i>Catalogue of somatic mutations in cancer (COSMIC)</i>	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic
	<i>The cancer genome atlas (TCGA)</i>	https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga
	<i>OncoKB (annotated TCGA data)</i>	https://www.oncokb.org/
	<i>dbSNP</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/
	<i>JAX CKB</i>	https://ckb.jax.org/
	<i>My cancer genome</i>	https://www.mycancergenome.org/

Ako záber diagnostických panelov narastá, zvyšuje sa pravdepodobnosť náhodných nájdení, nesúvisiacich s vyšetrovaným ochorením/stavom, či už nerelevantných alebo relevantných pre pacienta. ACMG vydáva usmernenia aj v takých prípadoch. Jedným z najpopulárnejších a prvých softvérov na priradenie fragmentov k referenčnému genómu je MAQ (*Mapping and Assembly with Quality*), ktorý efektívne mapuje študované regióny. Ďalšie programy sú napríklad ELAND, BLAST, SOAP, SeqMap.

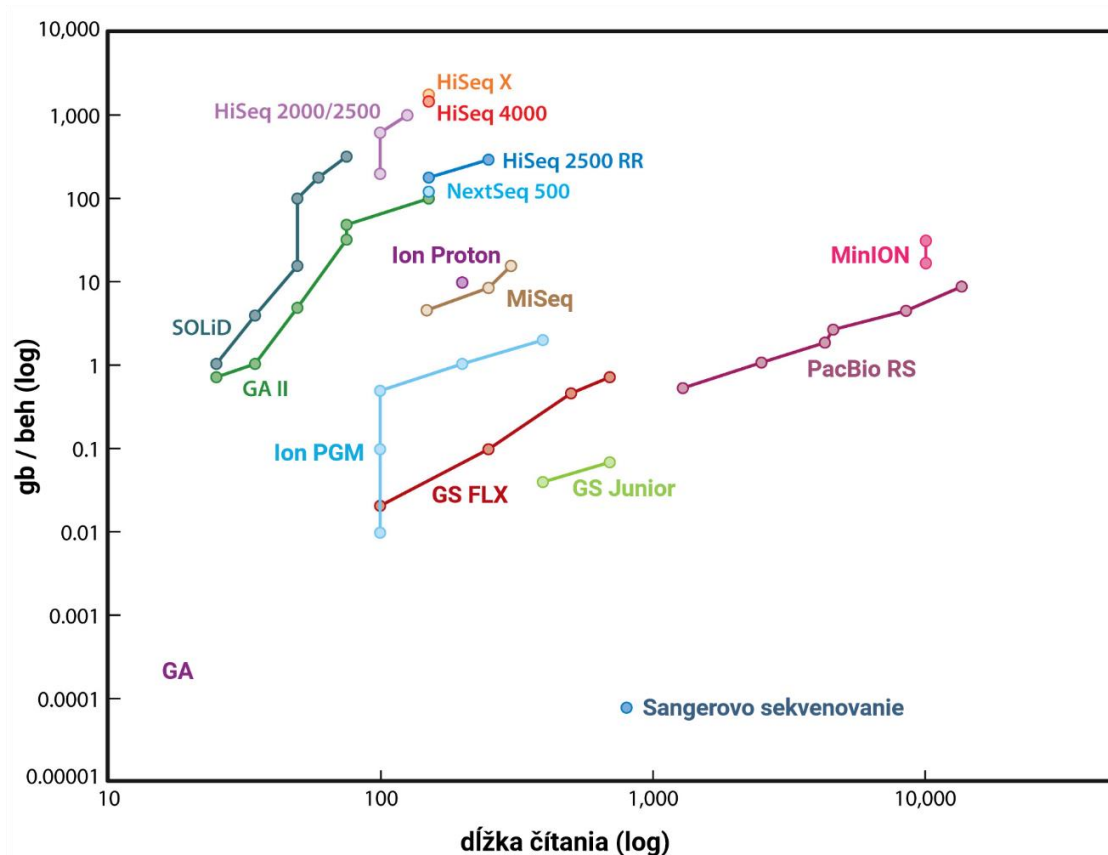
1.5.10 Záverečné porovnanie

Technické parametre jednotlivých sekvenátorov sa líšia. Rozdiely spočívajú v odlišných dĺžkach produkovaných čítaní (Obrázok 1.13), chybovosti či v samotnej metóde sekvenovania. Napriek odlišným technickým parametrom a postupom, tieto metódy patria k NGS. Z toho

vyplýva, že pre ne platia charakteristiky spomínané v predchádzajúcej kapitole, stručne zhrnuté:

- templáty sú priestorovo separované,
- templát je klonálne amplifikovaný (*in vitro*) alebo je jednomolekulový,
- sekvenovanie prebieha v reakčnej platničke (angl. *flow cell*),
- hlavným znakom je masívna paralelnosť, teda množstvo čítaní z jedného experimentu je výrazne väčšie ako pri Sangerovom sekvenovaní,
- nevýhoda je krátka dĺžka prečítaných sekvencií.

Citlivosť/detekčná schopnosť NGS metodík voči SNV (jednonukleotidové varianty) je vo všeobecnosti 5 – 10 %, čo je postačujúce pre zachytenie väčšiny dedičných ochorení. Problematické môže byť zachytenie nízkočetných variantov pri mozaicizme alebo v nádoroch, pre ktoré je typická genetická heterogenita. Systémová chybovosť NGS metodík je na úrovni 4 – 6 % a zvyšuje sa s väčším pokrytím. Systémové chyby môžu byť sekvenčne špecifické, teda sa objavujú v konkrétnych častiach čítania (napr. konce čítaní produkovaných Illumina sekvenátormi) alebo súvisia so zastúpením báz (úseky bohaté na GC).



Obrázok 1.13 Rozvoj platforiem masívneho paralelného sekvenovania. Komerčne dostupné platformy produkujú čítania rôznej dĺžky a v rôznych množstvách vrámci jedného sekvenačného behu. SOLiD je platforma od *Applied Biosystems*; Ion PGM a Ion Protein od *Ion Torrent*; GA II, HiSeq, NextSeq a MiSeq od *Illumina*, GS FLX a GS Junior od *Roche 454*. Upravené podľa Levy a Myers 2016.

1.6 Sekvenovanie tretej generácie

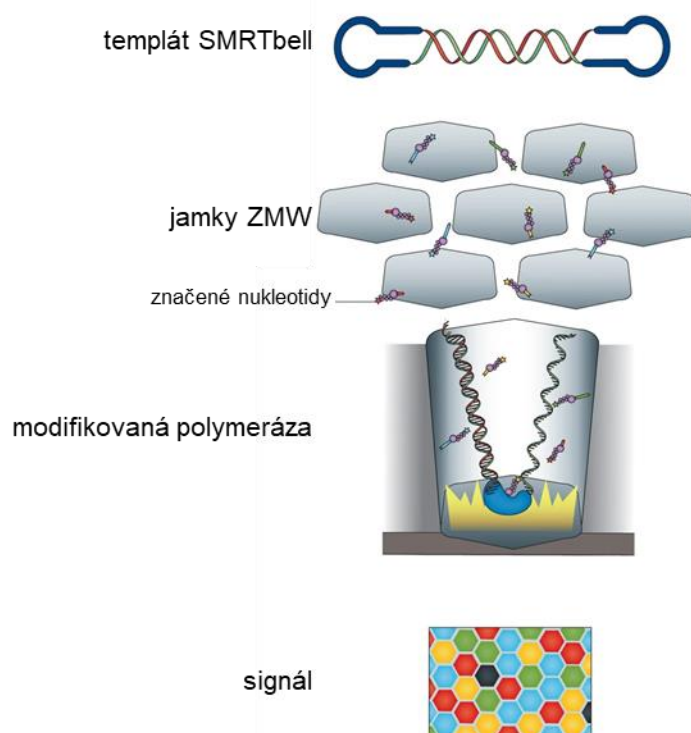
Tretia generácia sekvenovania (3G) prekonala hlavné nedostatky druhej generácie vyplývajúce z produkcie krátkych čítaní, teda nespoľahlivosť pri repetitívnych oblastiach a pri veľkých genomických prestavbách. Sekvenátory tretej generácie produkujú dlhé čítania, viac ako 1 kb až 2 Mb v reálnom čase (*real-time sequencing*).

1.6.1 Jednomolekulové sekvenovanie v reálnom čase (*Pacific Biosciences*)

Jednomolekulové sekvenovanie v reálnom čase (SMRT – *single-molecule real-time sequencing*) je založené na syntéze nukleového vlákna a čítaní dlhších úsekov ako 1 kb (30 – 50 kb). Sekvenačná knižnica sa pripravuje ligáciou adaptérov na oba konce fragmentu. Adaptéry tvoria vlásenkovú štruktúru. Ligáciou sa z dvojvláknového fragmentu vytvorí cirkulárna jednovláknová molekula (*SMRTbell* templát) (Obrázok 1.14). Adaptéry obsahujú komplementárnu sekvenciu k primerom iniciujúcim syntézu vlákna z templátu. Molekuly sú separátne umiestnené v špeciálnych jamkách (ZMW – *zero-mode waveguides*), v ktorých je na transparentnom dne uchytená jedna molekula DNA polymerázy. Na čipe (SMRT *flow cell*) môže byť 150 000 (sekvenátor PacBio RS II) až milión (sekvenátor Sequel) ZMW jamiek. Dizajn ZMW jamiek a vlnová dĺžka použitého žiarenia umožňujú, že svetelný signál je len na dne jamky. DNA polymeráza amplifikuje templát a pri amplifikácii sa inkorporujú fluorescenčne značené nukleotidy, každý typ inou fluorescenčnou značkou. Inkorporovaný nukleotid je excitovaný laserom a zachytí sa fluorescenčný signál. Po inkorporácii polymeráza odštiepi fluorofór, ktorý difunduje preč od dna jamky a senzora. Cirkulárnosť templátu umožňuje jeho opakovanú amplifikáciu, teda templát je sekvenovaný niekoľkokrát, čo zvyšuje presnosť sekvenovania. Z opakovaného sekvenovania sa generuje konsenzus sekvencia (CCS – *circular consensus sequence*). Životnosť polymerázy je najväčšia limitácia prístupu, pri ultradlhých fragmentoch je možné získať len jedno čítanie, pri kratších fragmentoch viacero čítaní.

Dlhé čítania umožňujú vyššiu presnosť pri skladaní čítaní do kontigu, teda poskytujú lepšie rozlíšenie repetitívnych regiónov a štrukturálnych variantov. Hlavné nevýhody tejto metódy sú nižšia produkcia dát, vysoká cena za bázu a vysoká chybovosť (3 – 13 %). Chybovosť je však náhodná (nesystematická, nedá sa predvídať) a dá sa prekonať hlbším pokrytím. Hlavné aplikácie sú WGS, cielečné resekvenovanie, sekvenovanie celej dĺžky mRNA, komplexné sekvenovanie populácií. SMRT dokáže identifikovať niektoré modifikácie báz, ako je metylácia, pri ktorých sa merateľne mení rýchlosť inkorporácie nukleotidu do predlžujúceho sa reťazca, čím získava uplatnenie v epigenetických štúdiách.

V roku 2018 Pacific Biosciences sekvenovalo ľudský genóm dovedy s najvyššou kvalitou a úplnosťou (96 %) s najrozsiahlejším prehľadom rozsahu štrukturálnych variantov v ľudskom genóme. V roku 2018 Illumina zakúpila Pacific Biosciences.

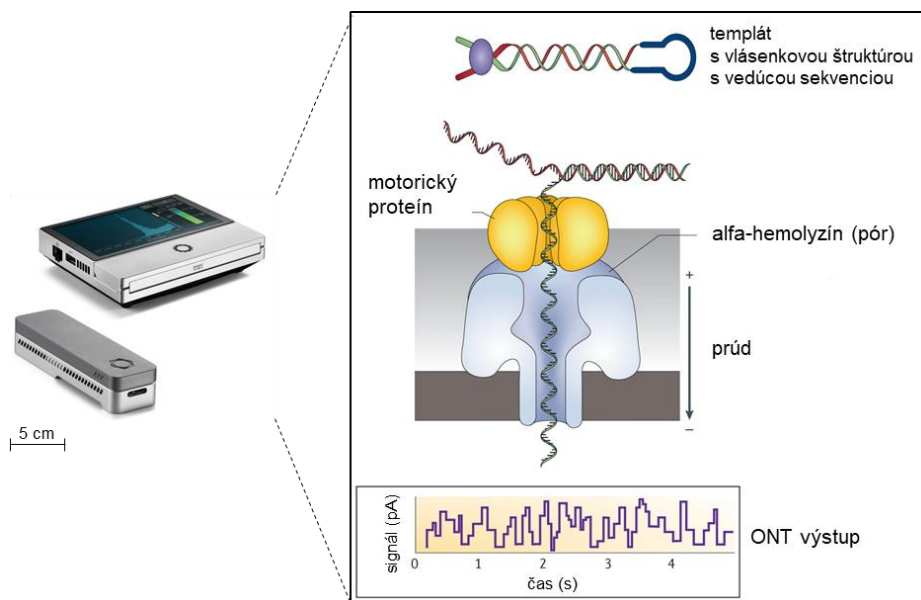


Obrázok 1.14 Jednomolekulové sekvenovanie v reálnom čase (SMRT). Fragменты templátov sú procesované a na ich oba konce sú ligované adaptéry s vlásenkovou štruktúrou, čo vedie k vytvoreniu cirkulárnej DNA (SMRTbell templát). Primery a DNA polymeráza sa zachytia na templát. Pripravené templáty sa pridávajú do jamiek (ZMW – *zero-mode waveguides*), kde prebieha sekvenovanie. Na vizualizáciu sekvenačnej reakcie sú pridané fluorescenčne značené nukleotidy. Keď je nukleotid inkorporovaný, na dne jamky sa zachytí fluorescenčný signál (upravené podľa Goodwin a spol., 2016).

1.6.2 Sekvenovanie pomocou nanopórov

V roku 2014 *Oxford Nanopore Technologies* prinieslo na trh **sekvenovanie pomocou nanopórov** pod názvom MinION. Na rozdiel od iných platforiem, sekvenátor nezachytáva inkorporáciu alebo hybridizáciu nukleotidov ako zmenu signálu (emitovanie svetla, fluorescenčného signálu alebo zmena pH), ale priamo deteguje kompozíciu natívnej jednovláknovej DNA molekuly. Sekvenátor obsahuje membránu s proteínovými pórmi. Membrána oddeľuje dva iónové roztoky umožňujúce prechod elektrického prúdu cez nanopóry. K dlhým dvojvláknovým DNA molekulám sú na jeden koniec pridané adaptéry s vlásenkovou štruktúrou. Helikáza rozvinie dvojvláknovú DNA a motorický proteín zachytený na templáte translokuje DNA cez nanopór. DNA prechádza pórmi postupne nukleotid za nukleotidom, čo spôsobuje pre každý nukleotid charakteristické zmeny v elektrickom prúde (Obrázok 1.15).

Sekvenovanie cez nanopóry má vysokú chybovosť (15 %), ale inovácia metódy je objektom viacerých výskumov. Jednou z inovácií je možnosť súčasne sekvenovať obe komplementárne vlákna templátu. Sekvenovanie oboch vlákien (*2D reads*) je umožnené naviazaním vlásenkového adaptéra na koniec dvojvláknového templátu, teda cez nanopór prejde najprv jedno vlákno, ďalej adaptér a následne aj druhé vlákno (komplementárne k prvému).



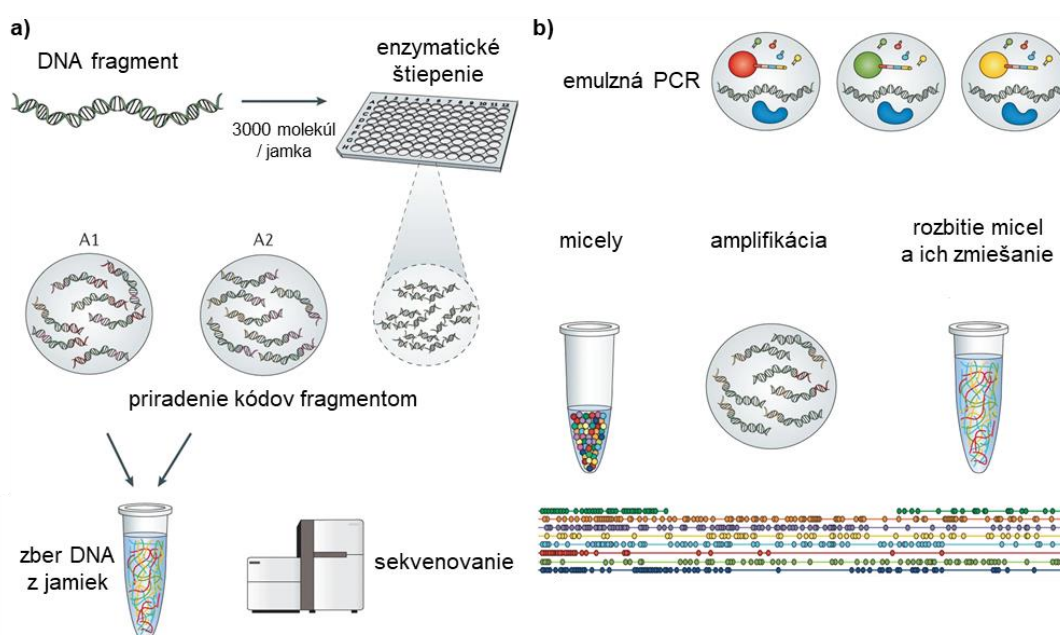
Obrázok 1.15 Sekvenovanie pomocou nanopórov. Templátová DNA je fragmentovaná na úseky dlhé 8 – 10 kb. K fragmentom sú ligované dva rôzne adaptéry, vedúca sekvencia a adaptér s vlásenkovou štruktúrou. Vedúca sekvencia zabezpečí naviazanie templátu ku sekvenačnému póru. Ako je DNA translokovaná cez pór, je možné pozorovať charakteristickú zmenu napätia, čo je interpretované ako konkrétny nukleotid (upravené podľa Goodwin a spol., 2016).

Výhodou MinION je, že je ľahko prenosný (rozmery približne 10 x 2 x 3 cm), sekvenačná knižnica je pripravená extrémne rýchlo a na spustenie sekvenátora je potrebné ho len zapojiť do príslušného notebooku. Sekvenátor sa ukázal veľmi užitočný pri sekvenovaní priamo v teréne pri prepuknutí eboly v roku 2015, kedy vedci mohli už počas epidémie monitorovať cesty prenosu a mutovanie vírusu alebo pri prvom sekvenovaní vo vesmíre. Oxford Nanopore priniesol na trh nové platformy (GridION X5 a PromethION) umožňujúce masívnejšie experimenty, pričom MinION je skôr určený na ciele resekvenovanie, analýzu kvality, sekvenovanie malých genómov a ciele diagnostické testovanie, ako genetická profilizácia patogénov, rýchla identifikácia pôvodu vzorky (ľudská alebo iný zdroj, atď...). Výhody sekvenovania cez nanopóry, v porovnaní s inými platformami, spočívajú hlavne v absencii potreby značenia, či už sekvencie alebo nukleotidov, nie je nutná amplifikácia templátov a produkcia dlhých čítaní (až 2,3 Mb). Dĺžka čítaní je najväčšia výhoda pri *de novo* celogenómovom sekvenovaní. To, že nie je potrebná amplifikácia templátu umožňuje

zachovanie epigenetických modifikácií templátu, či už na DNA alebo RNA. Nevýhodou je pomerne vysoká chybovosť, pričom sa chyby preferenčne vyskytujú na rovnakých miestach (napr. oblasti bohaté na GC), teda nie je možné znížiť chybovosť hlbším pokrytím.

1.6.3 Syntetické dlhé čítania

Sekvenačný prístup je založený na systéme priradenia čiarových kódov k asociovaným fragmentom. Templát sa fragmentuje na dlhé úseky (> 100 kb). Následne sú tieto fragmenty od seba oddelené, napr. v mikrotitračnej platničke (Illumina) alebo v emulzných kvapkách (10x Genomics). V každom oddieli je templát fragmentovaný na krátke úseky a ku každému fragmentu je priradený rovnaký čiarový kód. Následne sú krátke fragmenty sekvenované metódou NGS. Pri skladaní čítaní umožňuje čiarový kód k sebe priradiť čítania, ktoré pochádzajú z pôvodného rovnako dlhého fragmentu (Obrázok 1.16). Tento prístup umožňuje lepšie pokrytie repetitívnych alebo komplikovaných regiónov aj pomocou sekvenačných prístupov generujúcich kratšie čítania.



Obrázok 1.16 Sekvenačné metódy produkujúce syntetické dlhé čítania. a) Illumina. Genomická DNA je fragmentovaná na úseky dlhé 8 – 10 kb. Následne sú redistribuované do mikrotitračnej platničky, kde je v každej jamke približne 3000 fragmentov. Každý fragment v platničke je poštičený na úseky dlhé 350 bp a fragmentom z rovnakej jamky je ligovaný rovnaký kód. Následne môžu byť fragmenty zmiešané dokopy a pokračuje sa so štandardným sekvenovaním produkujúcim krátke čítania. b) 10x Genomics. Fragmenty DNA sú rozdelené do micel, ktoré obsahujú gélové guľôčky s adaptérmi a sekvenciami kódov. V micelách dôjde k amplifikácii kratších úsekov z pôvodného dlhšieho veľkého fragmentu. Všetkým fragmentom z jednej micely je pri amplifikácii syntetizovaná rovnaká sekvencia kódu. Po sekvenovaní sú čítania zarovnané a na základe kódu je možné určiť, ktoré fragmenty boli v jednej micelle (upravené podľa Metzker 2010; Goodwin a spol., 2016).

1.6.4 Hybridné sekvenovanie

Nevýhody druhej generácie sekvenovania ako produkcia krátkych čítaní a vysoká chybovosť, čo je nevýhoda tretej generácie sekvenovania, môžu byť eliminované použitím kombinácie oboch techník súčasne. Takýto prístup je prínosný hlavne pri sekvenovaní *de novo*. Genóm je najprv sekvenovaný metódou produkujúcou dlhé čítania, čím sa umožní poskladanie celého genómu, vrátane repetitívnych regiónov. Následne sa jednotlivé úseky resekvenujú metódou produkujúcou krátke čítania na dosiahnutie vyššej presnosti. V súčasnosti (rok 2023) je tento prístup stále nákladný, ale využil sa napr. pri projekte *Vertebrate Genomes Project* (UK Genome 10k consortium) či pri kompletnom sekvenovaní ľudského Y chromozómu.

1.7 Sekvenovanie štvrtej generácie

Štvrtá generácia (4G) prepája technológiu sekvenovania cez nanopóry so sekvenovaním jednej molekuly (*single molecule sequencing*). Označuje sa aj ako *in situ* sekvenovanie a umožňuje určiť identitu nukleotidov priamo vo fixovaných bunkách a tkanivách.

Najväčšie rozdiely 4G od predošlých metód sú možnosť sledovať priestorovú distribúciu DNA čítaní vo vzorkách, čo umožňuje charakterizovať heterogenitu tkanív (ako napr. nádorov), a zároveň môže byť súčasne analyzovaný vysoký počet buniek. Táto metodika (samostatná analýza každej bunky) je však technicky aj informaticky náročná. Cielené *in situ* sekvenovanie by mohlo byť využité na validáciu biomarkerov priamo vo vzorke a WGS (alebo WES) prístupy by sa mohli využívať na vytvorenie molekulárnych profilov pre jednotlivé tkanivá a ochorenia.

Literatúra

- Delahaye, C., & Nicolas, J. (2021). Sequencing DNA with nanopores: Troubles and biases. **PLOS One**, *16*(9), e0257521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257521>
- van Dijk, Erwin L., et al. "Genomics in the Long-Read Sequencing Era." **Trends in Genetics: TIG**, vol. 39, no. 9, 2023, pp. 649-671. doi:10.1016/j.tig.2023.04.006.
- França, L. T. C., Carrilho, E., & Kist, T. B. L. (2002). A review of DNA sequencing techniques. **Quarterly Reviews of Biophysics**, *35*(2), 169–200. <https://doi.org/10.1017/S0033583502003797>
- Flusberg, Benjamin A., et al. "Direct Detection of DNA Methylation During Single-Molecule, Real-Time Sequencing." **Nature Methods**, vol. 7, no. 6, 2010, p. 461. doi:10.1038/NMETH.1459.
- Garalde, Daniel R., et al. "Highly Parallel Direct RNA Sequencing on an Array of Nanopores." **Nature Methods**, vol. 15, no. 3, 2018, pp. 201-206. doi:10.1038/nmeth.4577.
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics**, *17*(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Green, Robert C., et al. "ACMG Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing." **Genetics in Medicine**, vol. 15, no. 7, 2013, pp. 565-574. doi:10.1038/GIM.2013.73.
- Hutchison, C. A. (2007). DNA sequencing: Bench to bedside and beyond. **Nucleic Acids Research**, *35*(19), 6227–6237. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm688>
- Ke, R., Mignardi, M., Hauling, T., & Nilsson, M. (2016). Fourth generation of next-generation sequencing technologies: Promise and consequences. **Human Mutation**, *37*(12), 1363–1377. <https://doi.org/10.1002/humu.23051>
- Koepfli, Klaus Peter, et al. "The Genome 10K Project: A Way Forward." **Annual Review of Animal Biosciences**, vol. 3, 2015, p. 57. doi:10.1146/ANNUREV-ANIMAL-090414-014900.
- Kumar, K. R., Cowley, M. J., & Davis, R. L. (2019). Next-generation sequencing and emerging technologies. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, *45*(6), 661–673. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1688446>
- Larson, Nicholas Bradley, et al. "A Clinician's Guide to Bioinformatics for Next-Generation Sequencing." **Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer**, vol. 18, no. 2, 2023, pp. 143-157. doi:10.1016/j.jtho.2022.11.006.
- Ledergerber, Christian, and Christophe Dessimoz. "Base-Calling for Next-Generation Sequencing Platforms." **Briefings in Bioinformatics**, vol. 12, no. 5, 2011, p. 489. doi:10.1093/BIB/BBQ077.
- Levy, S. E., & Myers, R. M. (2016). Advancements in next-generation sequencing. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, *17*, 95–115. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083115-022413>
- Mamanova, Lira, et al. "Target-Enrichment Strategies for Next-Generation Sequencing." **Nature Methods**, vol. 7, no. 2, 2010, pp. 111-118. doi:10.1038/nmeth.1419.
- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, *9*(1), 387–402. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164359>

- McCombie, W. R., McPherson, J. D., & Mardis, E. R. (2019). Next-generation sequencing technologies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, *9*(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036798>
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. **Nature Reviews Genetics**, *11*(1), 31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Morganti, Stefania, et al. “Next Generation Sequencing (NGS): A Revolutionary Technology in Pharmacogenomics and Personalized Medicine in Cancer.” **Advances in Experimental Medicine and Biology**, vol. 1168, 2019, pp. 9-30. doi:10.1007/978-3-030-24100-1_2/COVER.
- Pervez, M. T., Hasnain, M. J. U., Abbas, S. H., Moustafa, M. F., Aslam, N., & Shah, S. S. M. (2022). A comprehensive review of performance of next-generation sequencing platforms. **BioMed Research International**, *2022*, 3457806. <https://doi.org/10.1155/2022/3457806>
- Pugh, Jonathan. “The Current State of Nanopore Sequencing.” **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, vol. 2632, 2023, pp. 3-14. doi:10.1007/978-1-0716-2996-3_1.
- Raine, A., Liljedahl, U., & Nordlund, J. (2018). Data quality of whole genome bisulfite sequencing on Illumina platforms. **PLOS One**, *13*(4), e0195972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195972>
- Rodriguez, Raphaël, and Yamuna Krishnan. “The Chemistry of Next-Generation Sequencing.” **Nature Biotechnology**, vol. 41, no. 12, 2023, pp. 1709-1715. doi:10.1038/s41587-023-01986-3.
- Slatko, Barton E., Andrew F. Gardner, and Frederick M. Ausubel. “Overview of Next Generation Sequencing Technologies.” **Current Protocols in Molecular Biology**, vol. 122, no. 1, 2018, e59. doi:10.1002/CPMB.59.
- Smith, H. O. (1979). Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases. **Science**, *205*(4402), 455–462. <https://doi.org/10.1126/science.377492>
- Venter, C. J., Adams, M. D., Myers, E. W., et al. (2001). The sequence of the human genome. **Science**, *291*(5507), 1304–1351. <https://doi.org/10.1126/science.1058040>
- Voelkerding, K. V., Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: From basic research to diagnostics. **Clinical Chemistry**, *55*(4), 641–658. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112789>
- Warburton, Peter E., and Robert P. Sebra. “Long-Read DNA Sequencing: Recent Advances and Remaining Challenges.” **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, vol. 24, 2023, pp. 109-132. doi:10.1146/annurev-genom-101722-103045.
- Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A., & Zhang, G. (2011). The impact of next-generation sequencing on genomics. **Journal of Genetics and Genomics**, *38*(3), 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2011>

2 Metódy analýzy nukleových kyselín založené na sekvenovaní (Petra Priščáková)

Analytické metódy štúdia štruktúry a modifikácií DNA založené na sekvenovaní sa dajú rozdeliť do základných kategórií podľa predmetu ich záujmu. Patrí sem:

- sekvenovanie DNA (*DNA-seq*)
 - *de novo*
 - resekvenovanie
 - cielené sekvenovanie (angl. *targeted sequencing*)
- RNA sekvenovanie (*RNA-seq*) s cieľom skríningu mutácií, analýzy transkriptómu alebo alternatívneho splicingu
- sekvenovanie nukleovej kyseliny z jednej bunky
- ChIP sekvenovanie (*ChIP-seq*) – identifikácia:
 - metylovaných regiónov (*methyl-seq*)
 - väzobných miest pre transkripčné faktory
 - distribúcie nukleozómov
- identifikácia hypersenzitívnych miest pre DNázu I (angl. *DNase-seq*)

2.1 Sekvenovanie DNA

Cieľom sekvenovania je určiť poradie nukleotidov v sekvencii DNA. Skúmať je možné celý genóm (**celogenómové sekvenovanie**) alebo len regióny, ktoré sú relevantné pre experiment/diagnostiku (**cielené sekvenovanie**). V prípade, že organizmus nebol pred tým sekvenovaný, hovoríme o *de novo* sekvenovaní. Ak je dostupný referenčný genóm, jednotlivé úseky sa resekvenujú a porovnávajú už so známymi sekvenciami.

2.1.1 Cielené sekvenovanie

NGS prístupy sa v klinickej praxi využívajú na záchyt germinálnych (dedičných) aj somatických genetických variantov. Pri dedičných ochoreniach, a teda detekcii germinálnych mutácií, sa používajú panely génov (relevantných pre dané ochorenie), **celoexozómové** alebo **celogenómové sekvenovanie**, resp. sekvenovanie mitochondriálnej DNA pri podozrení na mitochondriálne ochorenie. Je pravda, že počiatočné náklady na sekvenovanie celého

ľudského genómu s ubiehajúcim časom neustále klesajú⁵, pre rutinné sekvenovanie je suma stále pomerne vysoká. Preto je vhodným riešením práve **cielené sekvenovanie** len relevantnej časti genómu (ako panely génov alebo WES). V prípade, že je potrebné preukázateľne identifikovať genetický variant v genóme, je dôležité zvoliť dostatočné pokrytie, ktoré umožní správne a kompletne poskladanie regiónov, napriek dostupnosti len krátkych čítaní produkovaných metódami NGS. V súčasnosti je pri celogenómovom sekvenovaní odporúčané 30 až 50-násobné, pri WES 80 až 100-násobné pokrytie. Vo všeobecnosti optimálne pokrytie závisí od použitej sekvenačnej metódy, veľkosti genómu, dĺžky čítaní a počtu čítaní a dá sa odhadnúť pomocou Landerovej – Watermanovej rovnice⁶.

Panely génov sú navrhnuté pre široké spektrum ochorení, ako sú imunodeficiencie, syndrómy zlyhania kostnej drene, slepota, hluchota, mitochondriálne ochorenia, renálne ochorenia, neurologické ochorenia, ochorenia spojivových tkanív, kardyomyopatie a onkologické ochorenia, ale aj pre gény súvisiace s odpoveďou na určité liečivo a jeho metabolizovanie. Panel génov je väčšinou v klinickej praxi prvá voľba, ak je panel neinformatívny, pristupuje sa k WES. Pri WES testovaní môže byť analyzované nielen dieťa ale aj jeho rodičia pre správnu interpretáciu detegovaných variantov.

Panely génov pre onkologické ochorenia môžu byť navrhnuté rôzne. Môžu mať široký záber a zahŕňať kandidátne gény pre solídne nádory, ale aj hematologické malignity, alebo môžu byť zamerané len na konkrétnu malignitu a jej prognózu. Gény v paneloch sa môžu sekvenovať celé alebo len vybrané regióny, tzv. **hotspot regióny**. O obsahu a zameraní panelu, jeho užitočnosti pre konkrétny prípad, je potrebné byť oboznámený pred jeho použitím.

NGS techniky sa využívajú aj v prenatálnej diagnostike na analýzu voľnej fetálnej DNA, pri genotypizácii ľudských leukocytových antigénov (HLA), analýze mikrobiómu či vo farmakogenetike. **Tekutá biopsia** sa postupne stáva klinickým nástrojom. Pri tekutej biopsii sa v krvi analyzuje DNA uvoľnená z tumoru (ctDNA, *tumor-derived cell-free DNA*). Služi na skríning alebo diagnostiku onkologického ochorenia, monitorovanie progresu alebo relapsu ochorenia, či sledovanie reakcie na terapiu. Analýza ctDNA má najväčšie uplatnenie pri pacientoch s metastatickým rozsevom, kde je nedostatok tkaniva na testovanie a opakované biopsie by boli asociované so zvýšenou morbiditou a mortalitou. Tekutá biopsia má veľký

⁵ V 2022 NHGRI (National Human Genome Research Institute) uviedol, že cena sekvenovania ľudského genómu pri 30-násobnom pokrytí je menej ako 1000 dolárov.

⁶ $C = LN/G$, C – pokrytie, G – veľkosť genómu, L – dĺžka čítaní, N – počet čítaní.

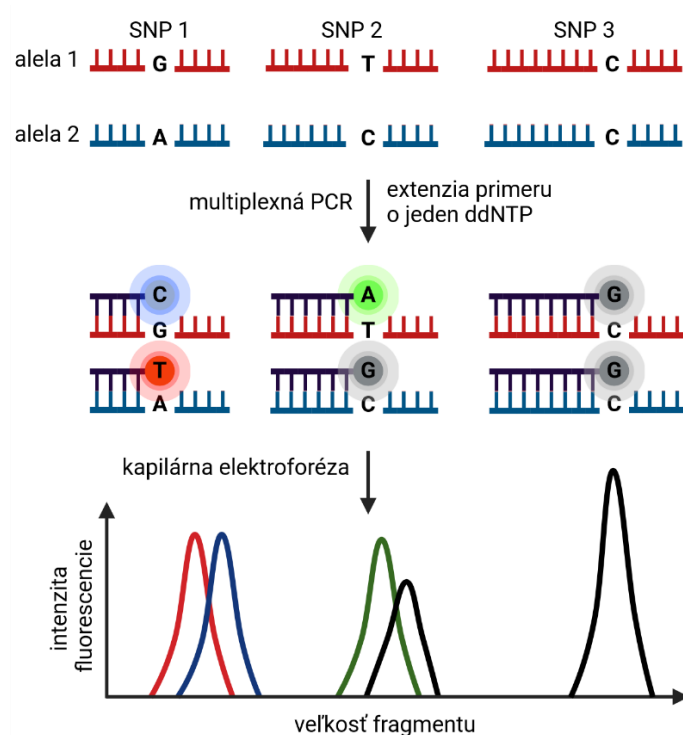
potenciál v klinickej praxi, avšak pre generalizovanú uplatniteľnosť sú potrebné ešte dodatočné štúdie.

Na záchyt relevantných oblastí z genómu, ktoré majú byť sekvenované sa používajú **techniky obohatenia** (angl. *enrichment techniques*). Najpoužívanjšie sú PCR (uniplex – záchyt jedného amplikónu, multiplex – záchyt desiatok amplikónov, kvapôčková PCR a iné modifikácie PCR umožňujúce záchyt tisícov amplikónov), použitie molekulárnych inverzných prób, zachytenie cieľových sekvencií na pevných nosičoch alebo mikrogulôčkach. PCR sú vhodné pri sekvenovaní menších regiónov, záchyt na ľubovoľnom nosiči zase pri väčších genomických regiónoch.

Slovenské pracoviská klinickej genetiky sa zaoberajú širokým spektrom genetických ochorení, či už v rámci onkogenetiky, dedičných geneticky podmienených ochorení, farmakogenetiky či prenatálnej diagnostiky. Využívajú pritom metódy prvej aj druhej generácie sekvenovania, ale aj mikročipové prístupy a cytologické metódy. Zoznam vybraných pracovísk so zameraním a odkazom na zoznam vyšetrení je v Tabuľke 2.1, ktorá je na konci kapitoly 2.

2.1.2 SNaPshot genotypizácia

SNaPshot genotypizácia umožňuje súčasné určenie genotypov viacerých definovaných SNP reakciou v jednej skúmavke.



Obrázok 2.1 Princíp SNaPshot genotypizácie. SNP – jednonukleotidový polymorfizmus, ddNTP – dideoxynukleotid (Priščáková, vytvorené v Biorender.com)

Prvým krokom je amplifikácia fragmentu, ktorý obsahuje dané SNP. Purifikované fragmenty sú použité ako templáty, sú k nim pridané *Taq* polymeráza, fluorescenčne značené ddNTP a primery nasadajúce blízko analyzovaných SNP. V jednej reakcii je možné použiť až desať rôznych primerov, a teda detegovať desať rôznych SNP. Primery sa od seba navzájom líšia dĺžkou a pre každý analyzovaný SNP vznikne fragment rozdielnej dĺžky. Primery sa predĺžia len o jedno ddNTP na 3'konci. Následne sa vzniknuté fragmenty analyzujú v genetickom analyzátoe, kde je určená identita zaradeného ddNTP (Obrázok 2.1).

2.2 RNA sekvenovanie

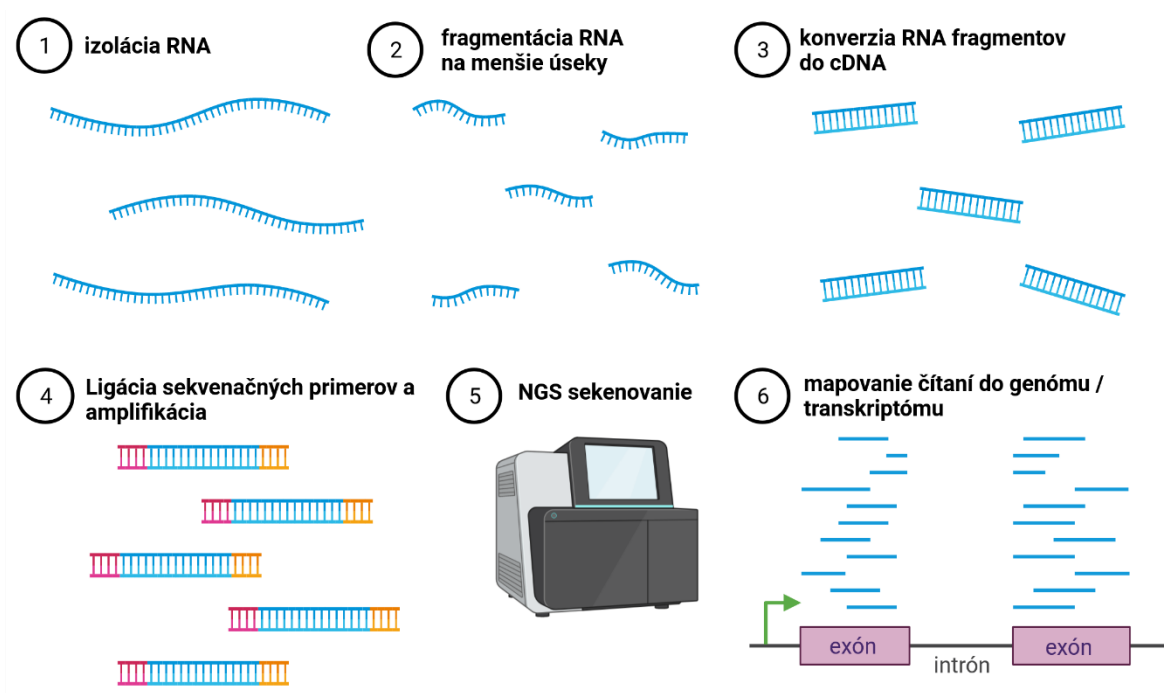
RNA sekvenovanie umožňuje profilizáciu transkriptómu pomocou masívnych sekvenačných technológií.

Pojem transkriptóm zahŕňa kompletný obsah transkriptov v bunke. Pochopenie transkriptómu je esenciálne pre interpretáciu funkčných elementov v genóme a odhalenie molekulárnych zložiek buniek, tkanív či podstaty chorôb. Hlavným cieľom analýzy je katalogizácia všetkých druhov transkriptov (mRNA, nekódujúce RNA, *small* RNA, miRNA, ...), determinovať transkripčnú štruktúru génov (z hľadiska štartu transkripcie, 5' a 3' konca, splicingu, post-transkripčných modifikácií), kvantifikovať zmeny úrovne exprese počas vývinu a vplyvom rozličných podmienok, identifikovať génové fúzie. Transkriptóm je omnoho dynamickejší ako genomická DNA, hlavne v dôsledku diferenciácie buniek, takže napr. bunky jedného organizmu z rôznych tkanív majú odlišné transkriptómy.

Vo všeobecnosti existujú dva prístupy k analýze transkriptómu – založené na hybridizácii (**mikročipy**, angl. *microarrays*) alebo na sekvenovaní (Obrázok 2.2). Viacero metód už bolo využívaných pred NGS pri určení cDNA ako napr. SAGE (*serial analysis of gene expression*), MPSS (*massively parallel signature sequencing*) a CAGE (*cap analysis gene expression*), alebo aj metódy založené na drahšom Sangerovom sekvenovaní. Výhoda sekvenačných metód spočíva v priamom určovaní sekvencií cDNA, nie prostredníctvom hybridizácie s navrhnutými próbami.

Prvým krokom je konverzia populácie RNA reverznou transkriptázou na cDNA fragmenty. Zároveň sa ligujú adaptéry k jednému alebo oboch koncom molekuly. Na každom fragmente sú následne sekvenované krátke úseky z jedného (*single-end*) alebo oboch koncov (*pair-end*). Tieto čítania môžu byť dlhé 30 – 400 bp v závislosti od použitej sekvenačnej technológie. Získané sekvencie môžu byť usporiadané podľa referenčného genómu či transkriptu, alebo poskladané *de novo*. Keďže sa pracuje s transkriptom, ktorý prešiel post-

translačnými úpravami, ako je splicing, vo fragmentoch sa nenachádzajú intrónové sekvencie. Výsledkom je vytvorenie transkripčnej mapy.



Obrázok 2.2 RNA sekvenovanie. NGS – masívne paralelné sekvenovanie (Priščáková, vytvorené v Biorender.com).

Na obrázku 2.2 je zobrazený typický experiment RNA sekvenovania. Výsledné čítania sú zarovnané a klasifikované do troch kategórií: exón-intrónové spojenia, exóny a poly(A) konce. Sekvenovanie je alternatívnou metódou k mikročipom a poskytuje voči ním aj určité výhody:

- môžeme detegovať aj regióny, ku ktorým nepoznáme korešpondujúcu genomickú sekvenciu (výhodná vlastnosť napríklad pri nemodelových organizmoch, regiónoch, ktoré sú minimálne preštudované),
- identifikácia genetických variantov (SNV, inzercie/delécie (indel), transkripčné izoformy, chimerické génové fúzie) v transkribovaných regiónoch,
- možnosť zachytenie širšieho rozpätia intenzity génovej expresie⁷.

⁷ Hoci bolo dokázané, že korelácia nie je až taká vysoká medzi množstvom mRNA a súvisiacimi proteínmi (kvôli post-transkripčným reguláciám ako je RNA interferencia), meranie množstva mRNA je stále užitočné pri určení ako je transkripcia určitých génov ovplyvnená externými signálmi, alebo ako sa bunky od seba líšia v zdravom a abnormálnom stave.

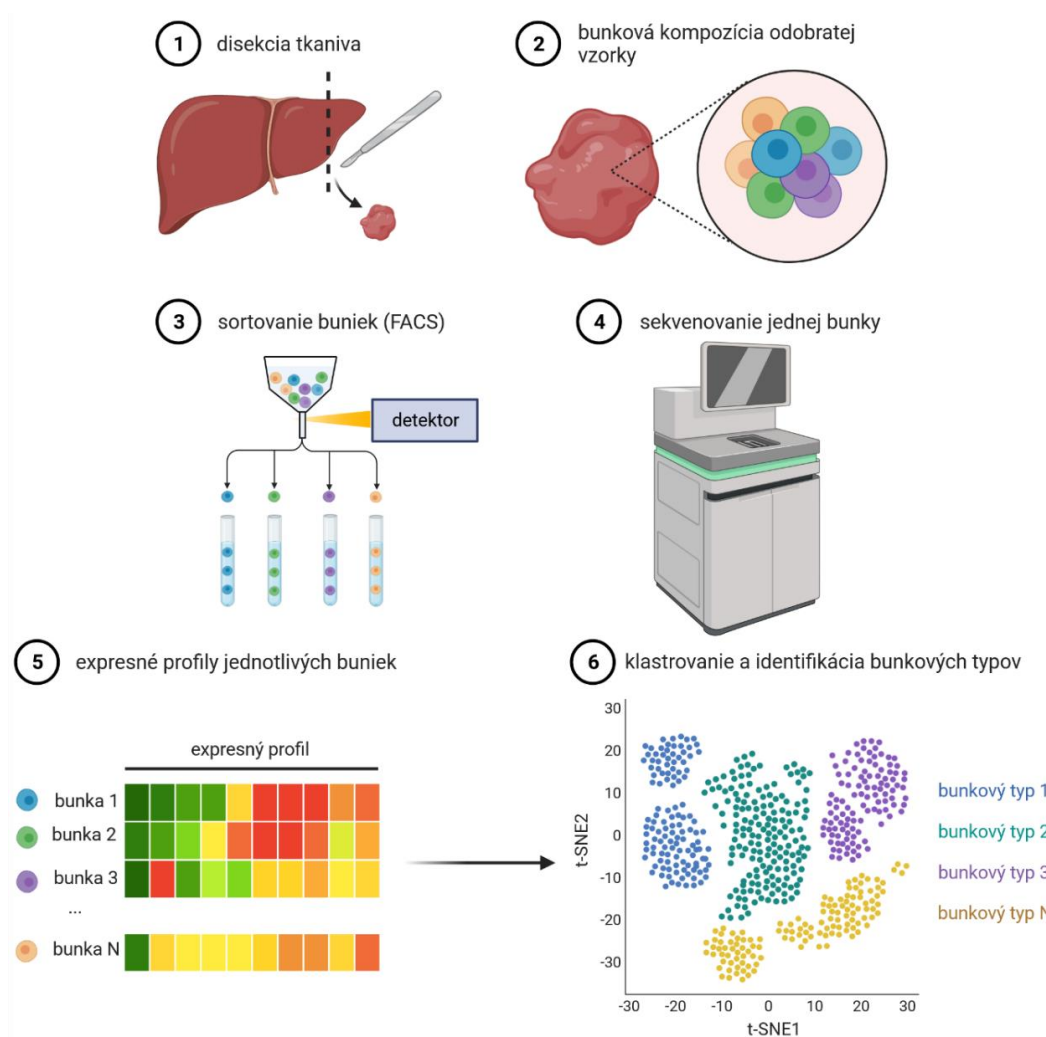
Niektoré sekvenačné prístupy (sekvenovanie cez nanopóry, SMRT) zachytia aj epigenetické modifikácie báz RNA. Uplatnenie RNA-seq je takisto v diagnostike pre detekciu infekčných ochorení spôsobených RNA vírusmi. V klinických štúdiách sa ukázal prínos kombinácie DNA a RNA analýz pri určovaní významnosti variantov a ich dopad na génovú expresiu.

Nevýhodou tejto metódy je jej cena oproti mikročipom. V prípade, že mikročip je už navrhnutý pre organizmus použitý v experimente, sekvenovanie je finančne náročnejšie. Ďalším obmedzením sú vysoko početné transkripty (napr. *house-keeping* gény), ktoré tvoria značnú časť sekvenovaných dát. V typickej vzorke je až 75 % transkriptov produktom len 5 % študovaných génov.

Tiež je dôležité si uvedomiť, že génová expresia je tkanivovo špecifická a časovo závislá (v akom ontogenetickom štádiu sa organizmus nachádza), čo treba brať do úvahy pri vyhodnocovaní získaných informácií.

2.3 Sekvenovanie nukleových kyselín z jednej bunky

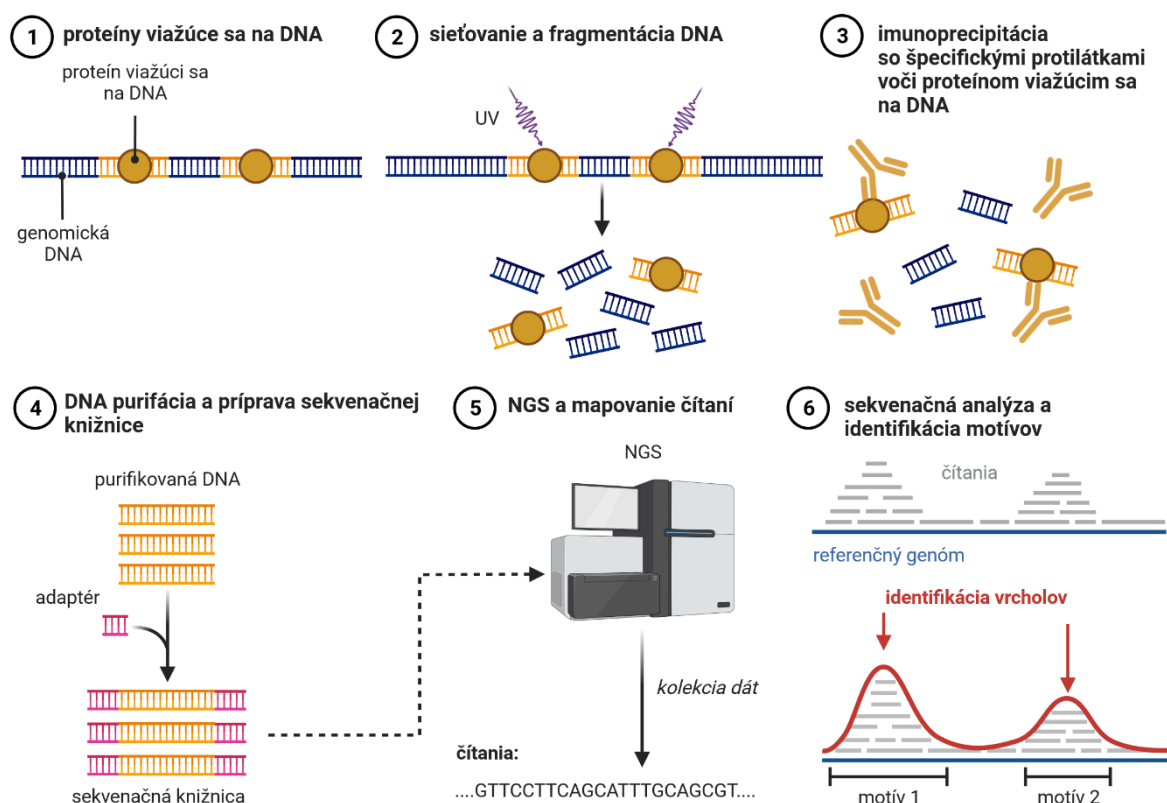
Tkanivá majú komplexnú organizáciu tvorenú rôznymi typmi buniek. Tieto bunky spolu neustále komunikujú a sú regulované širokým spektrom vnútorných aj vonkajších signálov. Zároveň každá bunka má jedinečný genóm, ktorý sa mení s časom, ale aj vplyvom vonkajšieho prostredia, životného štýlu, choroby alebo liečbou, a teda dochádza k heterogenite buniek v jednej vzorke (napr. v tkanive ale aj vo vzorke nádorového tkaniva). Aby sme dokázali lepšie porozumieť fyziologickým aj patologickým aspektom tkanív je potrebné tieto štruktúry komplexne analyzovať ako jednotlivé bunky. V prípade sekvenovania sa tento prístup nazýva **sekvenovanie nukleových kyselín z jednej bunky** (SCS, *single-cell sequencing*) (Obrázok 2.3). SCS umožňuje aj analýzu buniek, ktoré sú v organizme/orgánoch/tkanive zastúpené v nižšom množstve (ľudské oocyty, cirkulujúce nádorové bunky). Veľký potenciál má tento prístup aj v prenatálnej diagnostike ako neinvazívna metóda genetického testovania fetálnych buniek. V ostatných rokoch SCS umožnilo klasifikáciu bunkových subpopulácií, identifikovať vzácne typy buniek, definovať bunkové línie, získať nové biologické poznatky o kompozícii tkanív, sledovať dynamiku transkripcie a regulačné siete rôznych génov.



Obrázok 2.3 Princíp sekvenovania nukleových kyselín z jednotlivých buniek. FACS – metóda založená na prietokovej cytometrii (*fluorescence-activated cell sorting*) (Priščáková, vytvorené v Biorender.com).

2.4 Sekvenovanie fragmentov zachytených chromatinovou imunoprecipitáciou

V prípade analýzy interakcií proteínov s DNA je často používaná chromatinová **imunoprecipitácia**. Jej výsledkom je selekcia fragmentov DNA interagujúcich so študovaným proteínom (Obrázok 2.4). Analýza takto získanej DNA môže prebehnúť pomocou mikročipov (*ChIP-on-ChIP*) alebo novším postupom, čo je sekvenovanie NGS platformami. Cieľom je analýza genómovej organizácie, čo zahŕňa určenie distribúcie nukleozómov, väzobných miest pre transkripčné faktory, lokalizácia metylovaných miest na histónoch a DNA. Následne sa zo získaných informácií dá dedukovať ich možný vplyv na génovú expresiu a objasniť mechanizmy jej regulácie.



Obrázok 2.4 Princíp sekvenovania DNA fragmentov zachytených chromatinovou imunoprecipitáciou (Priščáková, vytvorené v Biorender.com)

2.4.1 Profilizácia histónových modifikácií

Histónové modifikácie, ktorými sa zaoberá vedný odbor epigenetika, ovplyvňujú expresiu génov. Tieto zmeny však neprebiehajú na úrovni primárnej genetickej informácie – nie sú spôsobené zmenami v poradí nukleotidov. V princípe môže dochádzať k:

- metylácii (v mieste lyzínových zvyškov),
- acetylácii,
- fosforylácii,
- ubikvitinácii histónov.

Pri identifikácii konkrétnej histónovej modifikácie v určitom regióne DNA sa používa **chromatínová imunoprecipitácia (ChIP)**. Genomická DNA je rozštiepená použitím sonikácie alebo nukleáz, použitie metódy závisí od cieľa experimentu. V oboch prípadoch je cieľom izolácia komplexov proteínu a DNA, ktoré sa stabilizujú pôsobením formaldehydu. Navrhnutím protilátky, napr. voči histónovej modifikácii, je možné tieto komplexy zachytiť. Nasleduje proteolýza histónov a purifikácia DNA, ktorá je s nimi asociovaná. Z takto získaných fragmentov sa pripraví knižnica vhodná na sekvenovanie.

Najvyužívanejšou platformou pri mapovaní histónových modifikáciách je Illumina Genome Analyzer.

2.4.2 Profilizácia DNA metylácie

DNA metylácia je reverzibilná modifikácia takmer výlučne cytozínu metyltransferázou. Patrí medzi epigenetické modifikácie u mnohobunkových organizmov.

Na rozdiel od určovania metylácie histónov, pri DNA bolo vyvinutých niekoľko prístupov využívajúcich platformy NGS. Zjednodušene by sa metódy dali rozdeliť do nasledovných kategórií:

- spoliehajúce sa na enzymatickú reštrikciu v závislosti od metylácie,
- techniky obohatenia metylovanej DNA (angl. *methyl-DNA enrichment* – *MeDIP-Seq*, *MBD-seq*),
- priama hydrogénsiričitanová konverzia.

MeDIP-Seq je sekvenovanie metylovanej DNA selektovanej pomocou imunoprecipitácie. Protilátky v tejto technike sú navrhnuté voči metylcytozínu. Prvým krokom je extrakcia a purifikácia genomickej DNA z bunky a následne jej fragmentácia pomocou sonikácie. Fragmenty sú denaturované a inkubované s monoklonálnymi protilátkami anti-5mC (5-metyl cytozín). Na vychytanie komplexov je možné použiť magnetické guľičky konjugované s proteínom, ktorý sa viaže s anti-5mC.

Podobnou metódou je aj *MBD-seq*, teda sekvenovanie metylovaných väzobných domén. Rozdiel je v použitých magnetických guľičkách, ktoré nesú proteíny MECP2 alebo MBD2. Tieto proteíny zachytávajú metylovaný cytozín. Výhoda voči *MeDIP-Seq* spočíva v použití rôznych koncentrácií solí v štádiu, keď už sú komplexy DNA-proteín zachytené. Vďaka tomuto kroku sa dajú odlíšiť slabo metylované fragmenty od mierne až husto metylovaných úsekov (ako sú napríklad CpG ostrovy), pretože sa odmyývajú pri rôznych koncentráciách solí. Možnosť selekcie intenzity metylácie poskytuje potenciálne zníženie nákladov na sekvenovanie.

Metóda založená na hydrogénsiričitanovej konverzii využíva deamináciu cytozínu na uracil pôsobením hydrogénsiričitanu, zatiaľ čo metylcytozín (mC) sa jeho pôsobením nemodifikuje. Z toho vyplýva možnosť rozoznať mC od C, pretože v nasledovnom sekvenovaní je cytozín zobrazovaný ako tymín a metylcytozín ako cytozín.

Tabuľka 2.1 Zoznam vybraných slovenských pracovísk so zameraním na klinickú genetiku

PRACOVISKO	ODBORNÉ ZAMERANIE	ODKAZ NA ZOZNAM VYŠETRENÍ
Klinika lekárskej genetiky SZU a UNB, Bratislava	klinická genetika, prenatálna genetická diagnostika, klinická onkogenetika	https://www.unb.sk/klinika-lekarskej-genetiky-szu-a-unb/
Oddelenie lekárskej genetiky, Onkologický ústav sv. Alžbety, Bratislava	klinická onkogenetika, molekulárna onkogenetika	http://www.ousa.sk/img/Documents/laboratorne_sluzby.pdf
Ambulancia a laboratórium lekárskej genetiky, Unilabs Slovensko, s. r. o.	klinická genetika, klinická onkogenetika, cytogenetika	https://www.unilabs.sk/genetika/katalog-vysetreni?sort=alph
GENEXPRESS s.r.o. Bratislava	molekulárna genetika	https://genexpress.sk/zoznam-vysetreni
MedGene s. r. o. , Bratislava	molekulárna genetika	www.medgene.eu
MEDIREX, a.s.	klinická genetika, onkogenetika, cytogenetika, molekulárna genetika	https://www.medirex.sk/lekar/odbornosti/genetika
Oddelenie lekárskej genetiky Národného onkologického ústavu, Bratislava	klinická onkogenetika, onkocytogenetika, molekulárna onkogenetika	http://www.nou.sk/oddelenie-lekarskej-genetiky
Cytopathos, s.r.o.	molekulová genetika, onkogenetika	https://www.cytopathos.sk/sk/sluzby/molekularna-genetika/diagnostika/
GHC GENETICS SK, s.r.o.	medicínska genomika, molekulárna genetika zriedkavých ochorení, klinická genetika, testy otcovstva, genografické DNA testy	https://www.ghcgenetics.sk/pre-odbornikov
Genetické laboratórium PROGENET s.r.o., Bratislava	molekulárna genetika zriedkavých a onkologických ochorení, klinická genetika	https://www.progenet.sk/sk/genetike-vysetrenia

PRACOVISKO	ODBORNÉ ZAMERANIE	ODKAZ NA ZOZNAM VYŠETRENÍ
GenVias s.r.o., Bratislava	onkologická genetika, klinická genetika, molekulová genetika	http://www.genvias.sk/testy/
Oddelenie lekárskej genetiky FNŠP Trenčín	klinická genetika, prenatálna genetická diagnostika, klinická onkogenetika	https://fntn.sk/index.php/sk/zdravotne-pracoviska/vysetrovacie-a-liecebne-zlozky/oddelenie-lekarskej-genetiky
GENET, s.r.o. Nitra	klinická genetika	https://www.poliklinikarazusova.sk/index.php?page=genet-s-r-o-2
Oddelenie lekárskej genetiky FNŠP Žilina	klinická genetika, prenatálna genetická diagnostika, cytogenetika	https://www.fnsppza.sk/lekarska-genetika/ambulancia-lekarskej-genetiky
M-Genetik, s.r.o. Martin	klinická genetika	
Oddelenie lekárskej genetiky, Univerzitná nemocnica Martin	cytogenetika, prenatálna genetická diagnostika	https://www.unm.sk/oddelenie-lekarskej-genetiky#profil-pracoviska
Oddelenie lekárskej genetiky FNŠP F.D. Roosevelta, Banská Bystrica	klinická genetika, prenatálna genetická diagnostika, cytogenetika	https://www.fnsppdr.sk/kliniky-a-oddelenia/oddelenie-lekarskej-genetiky/
Ambulancia lekárskej genetiky, Centrum prenatálnej diagnostiky, s.r.o.	klinická genetika, reprodukčná genetika, prenatálna genetika, onkogenetika	http://genetika-kosice.sk/?go=vysetrenia
Genetická ambulancia, I. klinika detí a dorastu DFN Košice	klinická genetika	https://www.dfknosice.sk/ambulancie-a-centra/ambulancie/genetika/
Oddelenie laboratórnej medicíny – Pododdelenie lekárskej genetiky, Univerzitná nemocnica L. Pasteura Košice	klinická genetika, prenatálna genetická diagnostika, cytogenetika, molekulárna diagnostika	https://unlp.sk/oddelenie/oddelenie-laboratornej-mediciny/

Literatúra

Ambrosini, G., Dreos, R., Kumar, S., & Bucher, P. (2016). The ChIP-seq tools and web server: A resource for analyzing ChIP-seq and other types of genomic data. **BMC Genomics**, **17**, 938. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3288-8>

Green, R. C., Berg, J. S., Grody, W. W., et al. (2013). ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. **Genetics in Medicine**, **15**(7), 565–574. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.73>

Morozova, O., & Marra, M. A. (2008). Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, **92**(5), 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.07.001>

Morganti, S., Tarantino, P., Ferraro, E., D'Amico, P., Duso, B. A., & Curigliano, G. (2019). Next-generation sequencing (NGS): A revolutionary technology in pharmacogenomics and personalized medicine in cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, **1168**, 9–30. https://doi.org/10.1007/978-3-030-24100-1_2

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., et al. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, **17**(5), 405–423. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

Voelkerding, K. V., Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: From basic research to diagnostics. **Clinical Chemistry**, **55**(4), 641–658. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112789>

Yohe, S., & Thyagarajan, B. (2017). Review of clinical next-generation sequencing. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, **141**(11), 1544–1557. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0501-ra>

Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A., & Zhang, G. (2011). The impact of next-generation sequencing on genomics. **Journal of Genetics and Genomics**, **38**(3), 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2011>

3 Ľudský genóm (*Vanda Repiská*)

Projekt „Ľudský genóm“ (*Human Genome Project* – HGP) bol významným vedeckým podujatím so zámerom zmapovať a sekvenovať celý ľudský genóm, čo predstavuje **kompletný súbor genetických informácií zakódovaných v našej DNA**. Projekt bol jedným z najdôležitejších vedeckých aktivít 20. storočia a sme prvou generáciou ľudstva, ktorá bola pri odhaľovaní tajomstiev ľudského genómu. Projekt začal v roku 1990 ako medzinárodná spolupráca, ktorá zahŕňala mnoho krajín a výskumných inštitúcií a trval približne 13 rokov.

Prvý náčrt ľudského genómu bol zverejnený v roku 2001, takmer konečná verzia bola publikovaná v roku 2003 a projekt bol dokončený v roku 2022. Prečítanie kompletného genómu človeka vyvolalo mimoriadny záujem vedeckých kruhov aj verejnosti. Dlhú ľudskú DNA a jej gény takmer tajomstvom. Predtým ako sa oboznámime s doteraz najväčším, najnáročnejším, najdrahším a najkontroverznejším projektom v histórii biológie, musíme si vysvetliť niektoré pojmy. Pre istotu si zopakujeme aj pojem **gén** – predstavuje kompletnú sekvenciu nukleovej kyseliny (DNA alebo RNA), ktorá nesie informáciu pre syntézu určitého produktu (funkčnej RNA alebo proteínu). Štruktúrne gény sú špecifické sekvencie DNA, ktoré kódujú proteíny, ktoré sú stavebnými blokmi života a zohrávajú kľúčové úlohy v rôznych biologických procesoch. **Genóm** je súbor všetkých génov a nekódujúcich sekvencií jedinca, ktoré predstavujú jeho kompletnú genetickú informáciu uloženú v jeho DNA. Usporiadanie génov v genóme označujeme ako **štruktúru a organizáciu genómu**. Genóm nachádzajúci sa v bunkových organelách (jadro, mitochondrie, chloroplasty) nazývame **bunkový genóm**. Vedná disciplína, ktorá stanovuje, mapuje a analyzuje genómy sa nazýva **genomika**.

3.1 História projektu „Ľudský genóm“

Robert Holley už v roku 1965 sekvenoval genóm pekárskej kvasinky. Myšlienka úplného dešifrovania ľudského genómu bola prvýkrát navrhnutá biomedicínskymi vedcami v polovici 80-tych rokov dvadsiateho storočia, teda pár rokov po tom, ako bola v roku 1975 vynájdená Sangerova metóda sekvenovania DNA. Onedlho po zverejnení sekvenačnej metódy a jej zavedení v rôznych laboratóriách vo svete bolo možné v roku 1981 publikovať kompletnú sekvenciu ľudskej mitochondriálnej DNA.

Na príprave projektu „Ľudský genóm“ sa postupne podieľalo až dvadsaťštyri krajín. Program začala koordinovať Organizácia výskumu ľudského genómu (*human genome organization* – **HUGO**) pod vedením jedného z najvýznamnejších genetikov tej doby Victora A. McKusicka, autora prvého katalógu monogénovo podmienených chorôb človeka *Mendelian*

Inheritance in Man – MIM (v súčasnosti Online MIM – OMIM <http://www.omim.org>). Po úvodných diskusiách sa dohodlo, že *Human Genome Project* sa bude realizovať postupne v Spojených štátoch a koordinátorom bude Národný inštitút zdravia (*National Institute of Health* – NIH). V marci 1988 okrem toho vzniklo Národné centrum pre výskum ľudského genómu (*National Center for Human Genome Research* – NCHGR), ktorého prvým šéfom bol spoluobjaviteľ sekundárnej štruktúry DNA a komplementarity dusíkových báz James Watson. Po ňom Michael Gottesmann a od roku 1993 Francis Collins, ktorý sa podieľal na identifikovaní génov, ktorých genetické zmeny spôsobujú cystickú fibrózu, neurofibromatózu a Huntingtonovu chorobu. Projekt mal stáť 3 miliardy dolárov a mal prečítať 3,2 miliardy báz DNA.

Samotná práca na tomto projekte bola naplánovaná na 15 rokov a rozbehla sa koncom roka 1990 súčasne v dvadsiatich vedeckých laboratóriách (USA, Kanada, Veľká Británia, Francúzsko, Nemecko, Čína a Japonsko). Pre USA bol tento projekt od začiatku vedeckou prioritou a postupne bol podporovaný čoraz väčšími finančnými prostriedkami, ktoré sa vyšplhali až k sume 200 miliónov dolárov ročne. Predpokladané náklady celého projektu boli 3 miliardy dolárov. Výsledky, teda prečítané fragmenty DNA, boli denne zverejňované na internete. Prvé roky však nepriniesli očakávané výsledky. Sekvenovanie DNA je ako skladanie puzzle. Vedci musia najprv rozdeliť DNA na menšie časti a potom ich pomocou sekvenátorov prečítať a poskladať v správnom poradí. Doterajšie nástroje dokázali naraz sekvenovať iba malé úseky DNA (metóda sekvenovania DNA je podrobnejšie rozobraná v kapitole 1) Zavedením automatického sekvenovania sa od roku 1995 začalo projektu dariť. Craig Venter spočiatku pracoval na projekte „Ľudský genóm“ v NIH, kde nebol príliš spokojný ani uznávaný. Preto v roku 1994 založil súkromnú biotechnologickú firmu TIGR, v ktorej za jediný rok prečítali kompletný genóm baktérie *Hemophilus influenzae*.

Informácie ukryté v našich génoch začali byť zaujímavé. Nielen vedci, ale aj podnikatelia si uvedomovali, že nové vedomosti majú obrovskú hodnotu. Vývoj nových liekov, diagnostických postupov a prístrojov sľuboval obrovský profit. To bol dôvod, prečo C. Venter v roku 1998 založil firmu CELERA a začal rýchlo konkurovať vedcom v NIH. Používal najrýchlejšie moderné metodiky sekvenovania (tzv. automatické sekvenovanie) a počítačové programy. Ešte v tom istom roku dokázali vedci pod jeho vedením sekvenovať celý genóm hlísty *Caenorhabditis elegans*. Hlísta síce nie je podobná človeku v žiadnom smere, avšak jej genetická informácia je nám veľmi podobná (35 % génov *C. elegans* má homológ v ľudskom genóme - homologický gén u rôznych druhov je zdedený od spoločného predka. Homologické gény môžu byť sekvenčne podobné, ale zároveň podobné sekvencie nemusia mať homologický

pôvod.). Vedci najprv rozstrihali DNA na malé fragmenty, potom v nich prečítali poradie dusíkových báz a prekryvajúce sa úseky poskladali pomocou počítačových analýz, táto metóda sa nazýva **shotgun**. Rovnaká metóda aká bola použitá na sekvenovanie DNA hlísty, bola použitá na sekvenovanie ľudského genómu.

Konkurenčný boj medzi NIH a Venterom veľmi urýchlil prácu v genetických centrách. Po zložitých diskusiách, do ktorých musel zasahovať aj vtedajší americký prezident Bill Clinton, vedci ohlásili predbežný výsledok na spoločnej tlačovej konferencii 26. júna 2000. Tento deň bol označený ako **deň G**, kedy bol nahrubo prečítaný ľudský genóm. **15. 4. 2003 bol projekt úspešne ukončený**. Dokončili ho za necelých 13 rokov a stál 3,8 miliardy dolárov. Oveľa väčšie náklady, ako boli použité na samotný projekt, slúžili na riešenie etických a právnych problémov a podporu aktivít HGP. V tej dobe sa lekári a biológovia dostali k obrovskej databáze údajov, avšak až doteraz majú problémy s interpretáciou získaných dát, ktoré vyplývajú z komplexnosti genómu. Nedajú sa totiž analyzovať len jednotlivé gény a ich bielkovinové produkty, pretože sa zistilo, že jeden gén môže mať viaceré funkcie. V roku 2003 sa prečítala všetka DNA, ktorá bola dostupná. Použitá technológia nebola dostatočne dobrá na to, aby sme dokázali prečítať úplne celý ľudský genóm.

Už bolo spomenuté, že vedci z „Projektu ľudského genómu“ sa prvýkrát zapísali do dejín v roku 2003, kedy sa im podarilo prečítať až 92 % ľudského genómu. Naša DNA sa však skladá z vysoko repetitívnych sekvencií DNA, ktoré sa ťažko analyzujú. Trvalo ďalších 20 rokov, kým technológie a algoritmy pokročili natoľko, aby sa nám podarilo prečítať, poprípade opraviť, zvyšných 8 % nášho genómu, ktorá je tvorená komplexnými a veľmi repetitívnymi oblasťami. Veľká časť DNA, ktorá doposiaľ chýbala, bola DNA centromér a telomér. Tieto úseky DNA sú organizované veľmi zvláštnym spôsobom – ide o repetície, ktoré spoločne tvoria opakujúce sa jednotky. Segmenty ľudského genómu bohaté na opakovania zvyčajne neobsahujú gény, čo je ďalším z dôvodov, prečo boli tak dlho nepreskúmané. Genetici sa vo veľkej miere zamerali na gény a logicky ich zaujímali hlavne tie, ktoré kódujú proteíny. Prekvapivým zistením bolo, že iba niečo vyše 1 % z našej DNA kóduje proteíny. Zvyšných 99 % DNA sa stále skúma, jej úloha je stále jasnejšia a genetické zmeny v týchto sekvenciách sa dávajú do súvisu so starnutím a karcinogénou. Výskumníci sa takmer dvadsať rokov snažili rozlúštiť týchto chýbajúcich 8 %. Nedávno, **31. marca 2022**, medzinárodný tím mladých vedcov potichu zverejnil **kompletný ľudský genóm**. V tento deň bola ľudská DNA úplne sekvenovaná a výskum sa stručne nazýva **T2T** (*The Telomere to Telomere Consortium*). Konzorcium vzniklo v roku 2018, keď sa bioinformatik Adam M. Phillipy z National Institutes of Health a genetička Karen Miga z UC Santa Cruz rozhodli

dokončiť „Projekt ľudský genóm“. Ako už bolo spomenuté, prečítanie zvyšku ľudského genómu trápilo vedcov dlhé roky kvôli svojej zložitosti. Prelom umožnila až kombinácia dvoch metód sekvenovania *PacBio Hifi* a *Oxford Nanopore*, z ktorých jedna dokáže s určitou mierou chybovosti prečítať až milión báz v DNA naraz, druhá síce prečíta súvisle „iba“ 20 000 báz, avšak s presnosťou 99,9 % (Presnosť 99,9 % znamená pravdepodobnosť nesprávneho určenia identity bázy 1:1000. Keďže ľudský genóm obsahuje 3 miliardy báz, v získanej sekvencii získanej celogenómovým sekvenovaním môžu byť až 3 milióny chýb). Mohli by sme jednoducho povedať, že je náročné zložiť veľké množstvo malých, často sa opakujúcich a na prvý pohľad zhodných dielikov v správnom poradí, ale keď je ale týchto dielikov málo a nevádi, že sú obrovské, ide to oveľa jednoduchšie.

Porovnanie kompletnej genetickej informácie od množstva ľudí umožňuje lepšie pochopiť vývoj a individuálne formovanie sa organizmu. Obrovský význam majú zistenia, ako sa líšime nielen od ostatných ľudí, ale aj od iných biologických druhov. Tak ako na začiatku storočia, tak aj teraz sa benefity nového objavu prejavujú predovšetkým v medicíne. V súčasnosti sa dá analyzovať aké genetické odchýlky zohrávajú úlohu pri príslušnom ochorení, a ktoré variácie sú pre vznik choroby podstatné. Vedci z T2T identifikovali 80 doteraz neobjavených génov, ktoré boli skryté medzi repetíciami. Našli sa nesmierne dôležité gény pre adaptáciu, ktoré nám pomáhajú prispôbiť sa, ďalej gény zodpovedné za imunitnú reakciu a gény, ktoré sú veľmi dôležité z hľadiska predvídania reakcie na lieky. Zároveň sa dá technológia *Oxford Nanopore* použiť aj na zmapovanie oblastí, v ktorých sa presne pripájajú komponenty deliaceho vretienka. Skúmanie týchto sekvencií by mohlo prispieť k objasneniu vzniku chromozómových aberácií.

Je mimoriadne náročné sekvenovať chromozóm Y, pretože až polovicu jeho sekvencie tvoria vysoko repetitívne oblasti a dva druhy satelitnej DNA (úsek DNA sa opakuje v extrémnom množstve kópií a neobsahuje gény). Veľká časť Y chromozómu je tvorená amplikonickými sekvenciami a obsahuje palindrómy (čítajú sa rovnako z oboch strán), ktoré sú prítomné vo viacerých kópiách. Tým, že amplikonické sekvencie majú zvláštnu a komplexnú organizáciu, často v nich dochádza k preskladaniu. Problém je, že obsahujú gény potrebné pre tvorbu spermií a mutácie v nich (predovšetkým delécie), vedú k poruchám spermiogenézy. Nie je nezvyčajné, že muži nad 70 rokov stratia v bielych krvinkách svoj Y chromozóm. Keďže je chromozóm Y veľmi variabilný, tak v rámci celého ľudského genómu najviac inverzií DNA uskutoční práve tu (Inverziou označujeme jav, kedy dochádza k tvorbe dvoch zlomov v DNA, pričom sa vyštiepený segment otočí o 180° a znovu sa spojí). Aj počas evolúcie dochádzalo k inverziám úsekov Y chromozómu a nedochádzalo k častému *crossing overu*

s X chromozómom, s výnimkou pseudoautozomálnych oblastí na X a Y chromozóme. Keďže si chromozómy X a Y nemôžu vymieňať genetickú informáciu na väčšine úseku, tak sú na Y chromozóme lokalizované gény, ktoré sú dôležité pre spermatogézu. Podobné verzie chromozómu X ako u ľudí sú aj medzi ľudoopmi. Možno ich datovať desiatky miliónov rokov dozadu. Chromozóm Y sa počas evolúcie dynamicky menil. Y chromozómy ľudoopov sú štrukturálne aj obsahom génov iné ako ľudské. Šimpanzom chýba niekoľko génov, ktoré človek a gorila majú na chromozóme Y. Sekvenovať takúto DNA je mimoriadne náročné a v minulosti neboli technológie ani algoritmy, ktorými by sa dal prečítať celý Y chromozóm. Pokrok umožnili až nové, extrémne rýchle technológie sekvenovania a algoritmy. **V auguste 2023** bol pridaný doposiaľ posledný príspevok do projektu „Ľudský genóm“. Sekvenovaním **zvyšnej polovice Y chromozómu** bolo identifikovaných viac ako 30 miliónov párov báz, pričom ešte pred pár rokmi nebolo niečo také vôbec možné. Dôvodom bola spomínaná zložitá štruktúra chromozómu Y.

Veľmi dôležitou úlohou, ktorá vyplývala z projektu ľudského genómu, bolo vytvorenie "kontrolnej" sekvencie ľudskej DNA, nazývanej referenčná sekvencia ľudského genómu. Nie je to DNA sekvencia jednej osoby. Predstavuje sekvenciu DNA získanú pôvodne od niekoľkých desiatok anonymných darcov, mužov a žien. Môžeme povedať, že referenčný genóm predstavuje konsenzus genetickej informácie viacerých osôb. Táto pôvodná sekvencia sa kontinuálne aktualizuje, je digitalizovaná a dostupná v genómových prehliadačoch, ako napríklad *Genome Data Viewer*, *Ensembl* a *UCSC Genome Browser*. V genómových prehliadačoch je možné vyhľadať a vizualizovať jednotlivé gény a celý genóm. Referenčnú sekvenciu používajú vedci ako akýsi štandard a je špecifický pre každý druh. Referenčná sekvencia obsahuje varianty, ktoré by nemali spôsobovať ochorenia, preto má význam pri porovnaní s patientskou DNA. Nedá sa však tvrdiť, že existuje bezchybná kontrolná sekvencia ľudského genómu, bez patogénnych variantov a výskum ľudského genómu stále napreduje.

Ak si niekto v budúcnosti nechá kompletne prečítať svoj genóm, vedci budú schopní identifikovať všetky varianty v jeho DNA, čo sa bude dať využiť na lepší management jeho zdravotnej starostlivosti. [*Human Pangenome Reference Consortium*](#) a ďalšie iniciatívy vychádzajú z toho, že jeden referenčný genóm nestačí. Treba prihliadať na rozdielnosť ľudí z celého sveta, aby sa vytvorila skupina referenčných genómov. Genóm daného človeka (napríklad pacienta), by sa potom porovnával s rozdielnosťou všetkých genómov v databáze. Až potom sa bude dať povedať, čo je u jedinca prirodzená genetická variabilita, a čo môže predstavovať genetickú predispozíciu napr. pre ochorenie. Problémom nie je vygenerovať

takéto dáta, ale ako interpretovať rozdiely medzi genómami. Pokiaľ existuje iba jeden referenčný genóm, je to jednoduché. Referenčná DNA sa porovná s DNA pacienta a zistí sa, či sú medzi nimi rozdiely a kde sa nachádzajú. Oveľa zaujímavejšie bude sledovať ako sa tieto repetitívne sekvencie menia pri vývine jedinca, s jeho vekom, pri karcinogenéze, aké sú rozdiely medzi rodičmi a deťmi, medzidruhovú rozdiely a podobne.

Ďalším významným medzníkom v budúcnosti bude rutinné sekvenovanie diploidných genómov, ktoré by bolo zrealizované v priebehu pár dní, samozrejme bez repetitívnych oblastí. Takáto rýchlosť a stále zlepšovanie technológií sekvenovania by mohla pomôcť v klinike/klinickej praxi a lekárom uľahčiť diagnostiku pacientov pomocou sekvenovania genómu. Konečným snom bude prečítať každý genóm, ktorý sa vedci pokúsia sekvenovať od konca po koniec (od teloméry po teloméru) a všetky páry chromozómov, čiže v prípade človeka diploidný genóm.

3.2 Ciele projektu „Ľudský genóm“

Ústredným cieľom HGP bolo určiť úplnú sekvenciu ľudského genómu. To zahŕňalo identifikáciu a mapovanie všetkých génov, nekódujúcich sekvencií a regulačných prvkov, ktoré tvoria ľudskú DNA. Cieľom projektu bolo identifikovať všetky gény v ľudskom genóme a určiť ich funkcie. Tieto informácie sú kľúčové pre pochopenie toho, ako gény prispievajú k zdraviu, chorobám a biologickým procesom. HGP sa snažil zmapovať genetické variácie, vrátane jednonukleotidových polymorfizmov (SNP, variácie v jednom bázevom páre DNA), v rôznych populáciách. Projekt položil základ pre výskum genetickej podstaty chorôb a individuálnych rozdielov v reakciách na lieky. Zároveň HGP pridelila časť svojich financií na štúdium a riešenie etických, právnych a sociálnych problémov vyplývajúcich z genomického výskumu. Sú to predovšetkým obavy o súkromie, genetickú diskrimináciu (napríklad v prijímaní do zamestnania a v poisťovníctve) a informovaný súhlas. Projekt mal niekoľko kľúčových cieľov:

Stanovenie úplnej sekvencie ľudskej DNA: Snahou HGP bolo určiť presnú sekvenciu 3 miliárd bázevých párov, ktoré tvoria ľudskú DNA. Táto sekvencia predstavuje všetky genetické informácie nevyhnutné pre ľudský vývoj a fungovanie. Hlavným cieľom HGP bolo získať základné informácie týkajúce sa humánnej DNA, čo následne viedlo k pochopeniu molekulovej biológie a genetiky človeka a jej úlohy v zdraví a pri chorobách.

Identifikácia všetkých génov ľudskej DNA: Ďalším kľúčovým aspektom projektu bolo identifikovať a lokalizovať všetky gény v ľudskom genóme a vytvorenie genetickej mapy.

Mapovanie genetických variácií: HGP si dalo za cieľ identifikovať a mapovať genetické variácie, vrátane SNP. Tieto variácie môžu mať významné dôsledky pre náchylnosť jednotlivcov k chorobám a reakcii na liečbu.

Zálohovanie získaných informácií: Dôležité bolo aj uskladnenie obrovského množstva informácií, ktoré sa získali pri riešení projektu - vytvorili sa fyzické mapy a počítačové databázy.

Etické, právne a spoločenské aspekty: Projekt uznal potrebu riešiť etické, právne, sociálne a spoločenské dôsledky výskumu genómu, vrátane ochrany osobných údajov, diskriminácie a informovaného súhlasu. Zriadili sa programy na štúdium a riešenie týchto otázok.

3.3 Výsledky projektu „Ľudský genóm“

3.3.1 Vedecké výsledky vyplývajúce z projektu „Ľudský genóm“

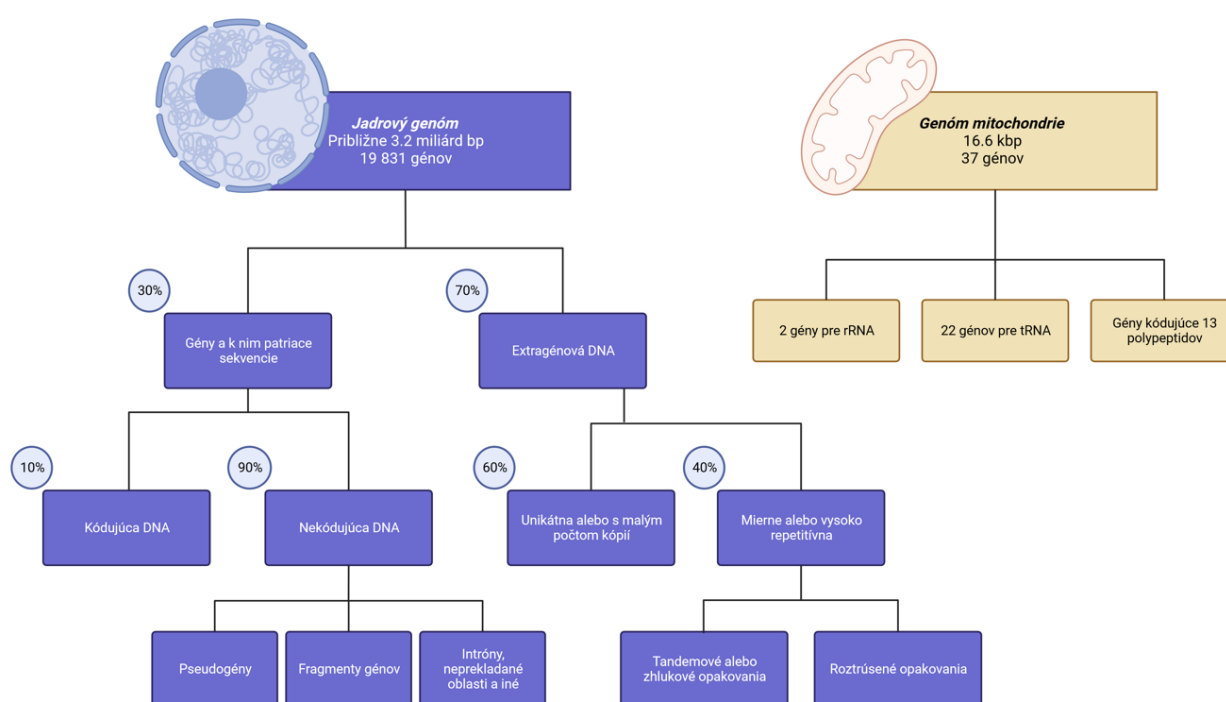
Projekt *Human Genome Project* poskytol neoceniteľné poznatky o genetike a genomike, ale zároveň zdôraznil dôležitosť riešenia etických a sociálnych problémov spojených s používaním genetických informácií, čo je nevyhnutné na to, aby sme sa zodpovedne orientovali v zložitosti genomickej vedy. Momentálne už vieme zhodnotiť obrovský prínos HGP pri vývoji metód molekulovej biológie, konštrukcii genetických a fyzických máp, tvorbe rekombinantných DNA molekúl, vytváraní DNA databáz, v bioinformatike, v diagnostike nádorových, monogénových chorôb a hľadani genetických predispozícií pre určité choroby na úrovni DNA. Nemalý význam je spojený s výrobou nových liekov (predovšetkým antibiotík) a s personalizovanou medicínou.

Výsledky projektu sú poskytnuté verejným databázam, preto môžeme hovoriť, že je to "významný dar celému ľudstvu". Najdôležitejšia elektronická databáza je **GenBank** spravovaná Národným centrom pre biotechnologické informácie (NCBI) pri Národnom ústave zdravia (NIH) v USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Po zverejnení hrubej sekvencie genómu bolo kompletne identifikovaných 11 000 génov. Ďalšie tisícky sa predpovedali na základe počítačových analýz sekvencií a pomocou analýz CpG ostrovčekov (oblasti 200 - 500 bp DNA s vysokým zastúpením cytozínu a guanínu), ktoré sa nachádzajú v promótorových oblastiach génov, a preto predpovedajú prítomnosť génu.

Najväčším objavom vyplývajúcim z projektu HGP bolo zistenie, že človek nemá dovtedy predpokladaných 80 - 100 tisíc génov, ale len asi 20 - 25 tisíc. V auguste roku 2023 sa počet kódujúcich génov človeka odhadoval na ešte nižší počet, presne na **19 831** (http://www.esembl.org/Homo_sapiens/Location/Genome).

Pre porovnanie malý, už spomínaný červ *Caenorhabditis elegans*, má 20 tisíc génov a väčšina cicavcov ich má toľko ako človek. Štruktúra a funkcia veľkej väčšiny génov zvierat je totožná s funkciou a štruktúrou analogických ľudských génov. Vysvetlenie rozdielu medzi nižšími a vyššími organizmami a medzi zvieratom a človekom spočíva práve v komplexnosti genómu. Z 3,2 miliárd bp genómovej DNA je okolo 5 % silne konzervovaných a v porovnaní s inými živočíchmi veľmi podobných, teda ostali počas evolúcie zachované a väčšinou kódujú génový produkt so zásadným významom. Obrovským prekvapením bolo, že iba približne **1,1 %** našej DNA kóduje proteíny a menej než 4 % predstavujú iné konzervované sekvencie (regulačné sekvencie, RNA gény a proteíny nekódujúcu konzervovanú DNA) (Obrázok 3.1).



Obrázok 3.1 Schéma organizácie ľudského genómu

V bunke sa niektoré gény vyskytujú iba v jednej kópii (nazývajú sa jednokópiové alebo unikátne gény). Iné sú viackópiové a vznikli zmnožením sa v genóme počas evolúcie. Niektorým mnohokópiovým genómom zostala rovnaká funkcia ako jednokópiovým a niektoré majú podobnú funkciu. Funkčne podobné gény môžu byť zoskupené na chromozóme blízko seba, ale môžu byť aj roztrúsené.

Gény podľa funkčnosti delíme na:

- **identické gény** (napr. histónové gény, ktorých je asi 86),
- **podobné gény** (napr. gény pre alfa a beta globín),
- **príbuzné gény** (napr. súčasti jednej signálovej dráhy).

Génové rodiny môžu byť:

- **klasické**, majú rovnakú sekvenciu v celom géne (napr. históny, globíny),
- **kódujúce produkty s krátkymi aminokyselinovými motívmi**, majú rovnaký len krátky DNA motív, ale v iných oblastiach génu sa líšia (napr. transkripčné faktory, na DNA sa viažúce domény),
- **superrodiny**, kódujú funkčne príbuzné produkty (napr. imunoglobulíny, HLA).

Okrem génov máme v genóme repetitívne sekvencie, ktoré môžu byť zoskupené alebo roztrúsené (viac učebnica Lekárska biológia a genetika 1, kapitola „Typy DNA v ľudskom genóme“, <https://www.fmed.uniba.sk/pracoviska/teoreticke-ustavy/ustav-lekarskej-biologie-genetiky-a-klinickej-genetiky-lf-uk-a-un-bratislava/pedagogicka-cinnost/>).

Aj v rámci HGP bolo zistené, že ľudská DNA vykazuje určité varianty. Zárodočné varianty sú prítomné vo všetkých bunkách tela vrátane zárodočných buniek a môžu sa preto preniesť na potomstvo. Somatické varianty vznikajú počas života jedinca v tkanivách iných ako zárodočné bunky, a preto sa do potomstva neprenášajú. *De novo* mutácie sú genetické zmeny, ktoré sa prvýkrát objavili u jedného člena rodiny v dôsledku variácie (alebo mutácie) v zárodočnej bunke (vajíčku alebo spermii) jedného z rodičov, alebo variácie, ktoré vznikli v samotnom oplodnenom vajíčku počas skorého embryonálneho vývoja.

DNA dvoch osôb na svete nie je identická, s výnimkou monozygotných (jednovaječných) dvojčiat. Ale spomínané metódy NGS umožňujú masívne analýzy genómov a tým sa zistilo, že monozygotické dvojčiky sa v priemere líšia v 5,2 mutáciách, ktoré vznikli počas skorého embryonálneho vývoja. Zároveň v rôznych somatických bunkách dvojčiek dochádza k akumulácii ďalších mutácií. Už sme spomínali, že DNA polymorfizmus znamená existenciu minimálne dvoch variantov v sekvencii DNA so signifikantnou frekvenciou v ľudskej populácii. DNA polymorfizmy delíme podľa veľkosti (rozsahu) na **bodové** a na tzv. **hypervariabilné** oblasti. Z hľadiska dopadu na fenotyp ich môžeme deliť na **normálne** a **patogénne**. Dohodou odbornej genetickej verejnosti bolo pôvodne ustanovené pravidlo, že sa interpersonálne rozdiely v sekvencii dusíkových báz budú nazývať podľa ich frekvencie (početnosti výskytu) v populácii. Ak sa zmenená sekvencia (alelový variant) vyskytuje u 1 % a menej jedincov v populácii – označovala sa pojmom mutácia (náhla zmena sekvencie, množstva alebo usporiadania genetickej informácie). Ak sa odchýlka vyskytovala u **viac ako 1 %** – nazývala sa polymorfizmus. To, či ovplyvnila zdravotný stav sa v tomto prípade nebralo do úvahy.

V súčasnej ére personalizovanej genomiky sa definícia týchto pojmov modifikovala. Pojmy "**mutácia**" a "**polymorfizmus**", ktoré sa však široko používajú, často vedú k zmätku

z dôvodu nesprávnych predpokladov ich patogénnych a benígnych účinkov. Preto sa obidva výrazy nahradili výrazom "**variant**". Existuje päťstupňový systém klasifikácie variantu: 1. patogénny, 2. pravdepodobne patogénny, 3. neistý, 4. pravdepodobne benígny a 5. benígny variant.

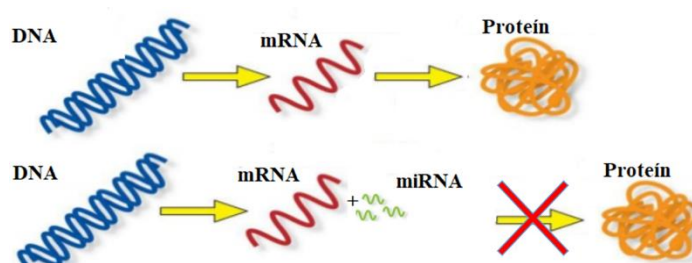
Variety sa klasifikujú na základe ich molekulovo-biologickej podstaty. Celosvetovo bolo identifikovaných obrovské množstvo variantov, ktoré sa ukladajú v databázach a analyzujú. Pri variantoch sa zisťuje ich kauzalita k príslušnému ochoreniu a sú klasifikované na základe ich potenciálneho vplyvu na funkciu génu. Pri klasifikácii sa postupuje podľa kritérií *American College of Medical Genetics and Genomics*.

Patogénne varianty preukázali jasné vedecké dôkazy, že spôsobujú monogénovo dedičné ochorenie, sú teda spojené s vysokým rizikom vzniku ochorenia. V prípade pravdepodobne patogénnych variantov je vysoká pravdepodobnosť, že spôsobujú ochorenie, ale molekulárno-biologické dôkazy nie sú až také presvedčivé ako pri patogénnych variantoch. Klinický genetik však postupuje rovnako ako pri patogénnych variantoch. Varianty neistého významu sa nedajú jednoznačne interpretovať vzhľadom na asociáciu s ochorením, nakoľko neexistujú dostatočne dôkazy či sú patogénne alebo benígne. Je vysoko pravdepodobné, že nespôsobia príslušné ochorenia, dôkazy nie sú jednoznačné ako pri benígnych variantoch. Benígne varianty sú dobre preštudované a nemajú žiadnu významnú súvislosť s ochorením, sú teda ako keby neškodné. Klasifikácia variantov sa neustále, dynamicky vyvíja a niektoré varianty bývajú preklasifikované. Do úvahy sa ďalej berie mutácia v géne, ktorá vedie k strate funkcie. Variant s nižšou frekvenciou ako 1% sa považuje za zriedkavý. Čím má variant nižšiu frekvenciu v populácii, tým je väčšia pravdepodobnosť, že by mohol byť patogénny. Dopad daných variantov na fenotyp sa overuje aj funkčnými štúdiami, ktoré zahŕňajú rôzne techniky. Cieľom funkčných štúdií môže byť objasnenie ako variant vplýva na štruktúru proteínu, jeho funkcie a interakcie s inými bunkovými komponentami.

DNA polymorfizmy slúžia ako **genetické markery**. Genetický marker musí mať vysokú heterozygotnosť v populácii, aby bol informatívny (je možné odlíšiť materskú a otcovskú alelu, potvrdiť identickosť DNA darcu a príjemcu pri transplantácii). Ako genetický marker slúži aj **minisatelitná DNA**, kde sa opakuje 9 až 65 nukleotidov dlhý DNA motív. V praxi predstavuje najužitočnejšie markery mikrosatelitná DNA s 2 – 5 nukleotidovými repetíciami, najčastejšie sa používajú dinukleotidové CA opakovania. **Mikrosatelitná DNA** je vysoko polymorfná, v populácii sa môže vyskytovať množstvo alel, zároveň sa dá ľahko analyzovať pomocou PCR, tzv. fragmentačnou analýzou. Genetické mapy boli založené na detekcii mikrosatelitných markerov. Vytvárajú sa detailné genetické väzobné (*linkage*) mapy

využívajúce DNA markery, teda lokusy na presne definovanom mieste na chromozóme, ktoré sú polymorfné v populácii. Dajú sa testovať pomocou metód molekulovej genetiky. Umožňujú od seba odlíšiť jednotlivé homologické chromozómy, detegovať alely dvoch alebo viacerých markerov segregovaných spolu v rodinných štúdiách. DNA markery je možné lokalizovať do tzv. **väzobných skupín** (*linkage groups*). Jednotlivé väzobné skupiny je možné priradiť k patričnému chromozómu pomocou fyzického mapovania. Pre sekvencie, ktoré sú orientačnými bodmi fyzických máp genómu bola vytvorená špeciálna databáza UniSTS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists>).

Veľkým prekvapením projektu Ľudského genómu sú výsledky o počte génov pre RNA, ktorých počet stále nie je definitívny a v súčasnosti sa odhaduje na asi 60 000 (Obrázok 3.2).



Obrázok 3.2 Regulácia génovej expresie pomocou miRNA

Ľudské gény kódujúce rRNA a tRNA sú organizované do veľkých génových zoskupení (klastrov). Nedávno boli identifikované nové malé nekódujúce jednovláknové RNA molekuly (21 až 23 nukleotidov dlhé) tzv. **mikroRNA** (miRNA), ktoré sa podieľajú na regulácii génovej expresie. Vznikajú transkripciou z génov uložených v DNA, ale nedochádza k ich translácii na proteín. Namiesto toho sa každý primárny transkript páruje s niektorými vlastnými komplementárnymi bázami a nakoniec sa premení na funkčnú miRNA. Tieto molekuly sú čiastočne komplementárne k určitým molekulám mRNA (obvykle k regiónu 3' UTR) a sú preto schopné regulovať proteín vznikajúci z tejto mRNA. Keď sa komplementárne spáruje miRNA a mRNA, je obvykle inhibovaná translácia a nevzniká proteín.

MikroRNA sa nachádza nielen u ľudí, ale aj u rastlín a živočíchov. Sekvencie miRNA sú, na veľké prekvapenie pre vedcov, zapísané v nekódujúcej oblasti DNA, o ktorej sme až doteraz vôbec nič nevedeli.

Je vysoko pravdepodobné, že rozlúštenie genómu človeka zasiahne v blízkej budúcnosti každú oblasť medicíny a spôsob liečby. Nebudeme hovoriť o lekárskej genetike, ale oveľa viac o genomike. Diagnostika mutovaných génov, ktoré predisponujú choroby, bude súčasťou rutinnej medicíny. Mnohé DNA testy sú k dispozícii už v súčasnosti. Možnosť identifikovať mutácie v nádoroch naštartovalo éru génovej terapie „šitej“ presne na mieru jednotlivých

pacientov. Sekvenovanie prinieslo niekoľko zaujímavých informácií. Napríklad deti majú 60 genetických variácií, ktoré nezískali ani od jedného z rodičov, a tak museli vzniknúť ako mutácie *de novo*. Takisto žiadna osoba nemá perfektnú genetickú výbavu, ale nesie si so sebou 50 až 100 recesívnych genetických variácií v heterozygtnom stave, ktoré boli v doterajších výskumoch spojené s niektorou z chorôb.

3.3.2 Výsledky riešenia etických problémov vyplývajúcich z projektu „Ľudský genóm“

Projekt ľudského genómu spôsobil, že genetické informácie sa stali zrozumiteľnejšie a dostupnejšie, a práve preto vyvolal aj rôzne etické otázky a strach o súkromie. Vynorili sa obavy jednotlivcov o súkromie a zneužitie genetických údajov. Dodnes pretrvávajú otázky o tom, ako by sa mali uchovávať, sprístupňovať a zdieľať genetické údaje pri zachovaní súkromia. Keďže použitie genetických údajov na výskumné účely si vyžaduje informovaný súhlas účastníkov, pretrvávajúcou etickou výzvou je zabezpečiť, aby pacienti plne rozumeli dôsledkom zdieľania ich genetických informácií. Ďalším predmetom etických diskusií boli otázky o tom, kto je vlastníkom, kto kontroluje genetické údaje a kto má finančný prospech z genetických objavov. Spravodlivý prístup k výhodám genetického výskumu, pokrokom v oblasti genómu a personalizovanej medicíny by mali mať všetky populácie, vrátane marginalizovaných skupín.

V priebehu jedného alebo dvoch desaťročí budeme možno mať pri sebe svoju genetickú informáciu v mobile. Súčasťou bude informácia o krvnej skupine, genetickej predispozícii k rôznym chorobám, alergiám a podobne. Bude podstatne jednoduchšie vybrať genetické znaky ľudských embryí pred umelým oplodnením. Liečba pacientov bude založená na možnosti ovplyvňovania konkrétnych génov (genetických ochorení, vývinových chýb alebo rakoviny). Budeme snáď vedieť dosť o spojení určitých génov v našom genóme s prvkami ľudskej povahy, budeme chápať ľudské myslenie a budeme vedieť regulovať starnutie. To sú výhody, ktoré nám prináša znalosť ľudského genómu. Ale realizácia tohto projektu priniesla so sebou aj veľké morálne dilemy. Na ich riešenie vznikla komisia ELSIWG (*ethical, legal and social issues joint working group*), ktorá sa venuje etickým, právnym, politickým a spoločenským aspektom súvisiacich s realizáciou HGP.

Na tieto problémy upozornili členovia Medzinárodného bioetického výboru, ktorí vydali v roku 1996 dokument s medzinárodnou platnosťou, ktorého cieľom je chrániť ľudský genóm. O projekt sa začali zaujímať nielen poisťovne ale aj katolíci, etici a právnici. Na prvý pohľad je HGP zdanlivo bezproblémová vec, avšak už od začiatku jeho realizácie vznikali mnohé etické, legálne i sociálne problémy. Jeho organizátori vyčlenili 3 % z rozpočtu len

na riešenie etických aspektov. V súčasnosti tento podiel rapídne stúpol. Výsledky riešení etických problémov sú predmetom medzinárodných dohôd (Rada Európy, Európsky parlament, UNESCO) s cieľom harmonizovať legislatívne normy jednotlivých štátov. Všetky normy uznávajú autonómiu, dôvernosť informácie a právo na súkromie, rovnosť prístupu a rešpektovanie ľudskej dôstojnosti. Výsledky genotypovania sú vysoko osobnou záležitosťou, ale svojimi dôsledkami sa dotýkajú aj iných osôb.

DNA analýza na rozdiel od iného typu vyšetrení je vo svojej podstate spojená s možnosťou diskriminácie. Napríklad v zamestnaní by vás nemuseli prijať, pokiaľ by ste mali predispozíciu k chorobe, a ani poisťovňa by vás nemusela poistiť, pokiaľ by mala takéto informácie. Genetické testovanie často prináša informácie aj o ostatných členoch rodiny a môže priniesť i rozvrat v rodine. Napríklad v roku 2019 genetické testovanie novorodencov na cystickú fibrózu vo Veľkej Británii dokázalo, že až 13 % zákonných otcov nie sú biologickými otcami. Stále častejšie sa vynára otázka, či HGP neprehĺbi sociálnu nerovnosť a diskrimináciu niektorých etnických skupín, kde určité mutované gény budú vo vyššej prevalencii.

Riešenie etických problémov je prejavom zodpovednosti súčasnej generácie ľudstva pred budúcimi generáciami. Niektorí kritici naznačujú, že pokiaľ sme schopní diagnostikovať genetické poruchy pred ich prejavom, môže to u človeka vyvolať frustráciu, najmä v prípadoch, keď nie je k dispozícii vhodná liečba. Genetici majú niekoľko presne definovaných génov, v ktorých mutácie spôsobujú konkrétnu chorobu, ale terapia doposiaľ neexistuje. Napríklad mutácia v géne pre beta-globín, ktorá vyústi do kosáčikovej anémie bola identifikovaná už v roku 1956, ale doteraz je takmer neliečiteľná. Ale aj pri absencii spôsobov liečby, mutácia detegovaná pred nástupom príznakov často účinne ovplyvní manažment poruchy.

Projekt ľudského genómu dosiahol niekoľko významných míľnikov:

Sekvenovanie genómu: HGP úspešne sekvenoval celý ľudský genóm, čo bolo obrovským vedeckým úspechom, pričom počiatočný návrh bol publikovaný v roku 2001 a konečná verzia v roku 2003.

Pokroky v technológii sekvenovania DNA: HGP zohral kľúčovú úlohu v rozvoji metód sekvenovania DNA, vďaka čomu je technológia oveľa rýchlejšia, jednoduchšia a cenovo dostupnejšia. Mohli by sme povedať, že inovácia techník sekvenovania spôsobila až revolúciu v genetickom výskume a v klinickej aplikácii pri diagnostike, prognostike a liečbe pacientov.

Identifikácia ľudských génov: Projekt identifikoval a anotoval približne 20 000 - 25 000 génov kódujúcich proteíny v ľudskom genóme a získané informácie výrazne rozšírili naše poznatky o genetike ľudstva.

Mapovanie genetických variácií: HGP vytvoril komplexný katalóg genetických variácií, vrátane SNP a štrukturálnych variantov, ktoré prispeli k výskumu genetickej diverzity, predispozície a farmakogenomiky.

Riešenie etických sociálnych a právnych problémov: Zložka ELSI HGP viedla k dôležitým odborným a verejným diskusiám. Výsledkom bolo vytvorenie právnych predpisov a zásad týkajúcich sa genetického súkromia, informovaného súhlasu, nediskriminácie v zdravotníctve, poisťovníctve a zamestnaní. Najvýznamnejší z nich je zákon platný v Spojených štátoch o nediskriminácii genetických informácií *Genetic Information Nondiscrimination Act* (GINA). Výsledky HGP by sme mohli zhrnúť do nasledujúceho prehľadu (Tabuľka 3.1).

Tabuľka 3.1 Prehľad výsledkov HGP vo vede, medicíne a technológiách:

VEDA	- evolúcia človeka a pôvod ľudských populácií - kompletná DNA sekvencia, slúži ako dôležitá informačná databáza - determinácia štruktúrnych génov - porovnanie rôznych genómov (evolučný a fylogenetický význam)
MEDICÍNA	- izolácia a charakteristika génov zodpovedných za dedičné a nádorové ochorenia - DNA diagnostika chorôb - pochopenie vývinu a myslenia človeka - štúdium biologických funkcií na molekulárnej úrovni (diferenciácia, starnutie ...) - genetická konzultácia
TECHNOLÓGIE	- génová terapia (genetických a nádorových ochorení) - cielená liečba (molekulárna farmakológia) - DNA databázy (kriminalistika, armáda)

3.4 Nové genómové projekty

Aj keď bol HGP ukončený, vedci sa aj naďalej pokúšajú zistiť, ktoré gény, prípadne ich varianty, sú pre vznik, vývin a progresiu chorôb dôležité. Projekt poznania ľudského genómu

je ešte vytrvalo realizovaný. Sú vypracovávané ďalšie plány, sekvenujú sa viaceré DNA vzorky a porovnávajú sa DNA polymorfizmy. Analýza polymorfizmov ľudského genómu mala svoj vlastný projekt „*Human Genome Diversity Project*“ (HGDP). Aj keď bol HGP monumentálnym úspechom, zameriaval sa predovšetkým na jeden referenčný genóm, ktorý prevažne reprezentoval jedincov európskeho pôvodu. HGDP vznikol, aby riešil túto obmedzenosť porovnávania s jedným referenčným genómom. Projekt bol spustený v 90. rokoch minulého storočia a tento ambiciózny projekt sa snažil preskúmať genetickú diverzitu ľudských populácií po celom svete. Projekt bol vyjadrením jednoty a zároveň rozmanitosti nášho druhu. Výskumníci sa snažili pochopiť genetické variácie, ktoré robia každého človeka jedinečným, a zároveň oceniť náš spoločný genetický pôvod. Projekt mal za cieľ zbierať vzorky DNA z populácií po celom svete, analyzovať, uchovávať a katalogizovať ich jedinečné genetické profily. DNA sa izolovala od osôb z 56 populácií a zistilo sa, že jednonukleotidové polymorfizmy typu SNP sa vyskytujú v priemere na každých 300 nukleotidov našej DNA, čo predstavuje obrovské množstvo variácií. Genetická diverzita ľudí je dôkazom našej evolučnej histórie, odráža migrácie, adaptácie a interakcie človeka s rôznymi prostrediami. HGDP si uvedomoval, že štúdium tejto diverzity je nevyhnutné na pochopenie genetických základov ochorení, zložitostí histórie a migrácie populácií a mechanizmov ľudskej evolúcie. Projekt ukázal, že aj keď sa genetická štruktúra ľudských populácií líši, zdieľame spoločný genetický pôvod. Toto poznanie je dôležité nielen pre pochopenie dejín ľudstva, ale aj pre biomedicínsky výskum a personalizovanú medicínu.

Približne 99 % genómu máme všetci rovnaký a práve v tom jednopercetnom zvyšku sú skryté rozdiely. Na projekt ľudského genómu nadväzuje aj „*1000 Genomes Project*“, ktorého cieľom bolo preskúmať genetické varianty u 2500 neidentifikovaných osôb z 20-tich populácií sveta metódou sekvenovania druhej generácie. Touto metódou môžeme rýchlo sekvenovať vybrané oblasti, zistiť genetickú výbavu mnohých ľudí a hľadať genetické odlišnosti. Výsledky by sa mali dať použiť pri pátraní po genetických príčinách rôznych chorôb. V pilotnom štádiu programu „*1000 Genomes Project*“ vedci preskúmali a porovnali genetickú výbavu osemsto ľudí. O tom, že lúštenie genetického kódu výrazne pokročilo, svedčí aj fakt, že genóm prvého jednotlivca sa sekvenoval takmer 11 rokov a vedci na to minuli tri miliardy dolárov. Projekt genóm 1000 si vystačil so 120 miliónmi dolárov.

V rokoch 2003 - 2012 realizovalo 32 vedeckých tímov projekt, ktorý mal identifikovať a kategorizovať funkčné elementy v DNA, teda kódujúce aj nekódujúce sekvencie (proteín kódujúce gény, promótory, enhancery, gény pre RNA, regulačné sekvencie, pseudogény...) s názvom ENCODE – „*Encyclopedia Of DNA Elements*“. Poslaním projektu bolo odhaliť

komplexné regulačné mechanizmy, ktoré riadia expresiu génov a ich funkciu, pričom náklady predstavovali 288 miliónov amerických dolárov. V rozsiahlej oblasti genomiky bol projekt ENCODE komplexným, ambicióznym úsilím na anotáciu a porozumenie funkčných prvkov nielen ľudského genómu, ale aj genómu mnohých iných druhov. Pred realizáciou tohto projektu bol dôraz kladený na identifikáciu génov a oblastí kódujúcich proteíny. Nekódujúce oblasti genómu, tvoriace väčšinu našej DNA, však zostávali prevažne nepreskúmaným územím. Projekt ENCODE vznikol ako reakcia na túto medzeru vo vedomostiach a ukázal, že nekódujúce oblasti zohrávajú kľúčovú úlohu pri jemnom nastavení expresie génov. Zistenia projektu majú veľký význam pre pochopenie evolúcie, fylogény a mechanizmu vzniku ochorení. Jedným z kľúčových princípov ENCODE je otvorené zdieľanie dát, poskytovanie výsledkov za účelom spolupráce a inovácie nielen vedeckej komunite ale aj verejnosti. Dáta generované ENCODE sú cenným zdrojom pre genetikov, ktorí sa snažia pochopiť funkcie konkrétnych genómových oblastí a ich relevanciu pre ľudské zdravie a choroby. ENCODE má hlboký význam najmä pre personalizovanú medicínu pri liečbe nádorov a umožňuje terapiu prispôbenú genetickému profilu jednotlivca.

Ukončenie genomického projektu otvára priestor pre ďalšie súvisiace projekty, ako je napríklad proteomický. Proteomický projekt „**Human Proteome Project**“ (HPP) je medzinárodný projekt organizovaný *Human Proteome Organization* (HUPO). Má za úlohu kompletne opísať (funkcie, lokalizáciu a asociované gény) a kvantifikovať proteínové produkty vznikajúce génovou expresiou. Jeho cieľom je zmeniť naše chápanie ľudského proteómu prostredníctvom koordinovaného úsilia mnohých výskumných laboratórií po celom svete. Je navrhnutý tak, aby systematicky mapoval celý ľudský proteóm v súčasnosti dostupnými a vznikajúcimi technikami. Má sa pokúsiť charakterizovať všetkých 19 823 predpokladaných proteín kódujúcich génov a vygenerovať mapu proteínovej molekulárnej architektúry ľudského tela. Ukončenie tohto projektu zvýši porozumenie biológie človeka na bunkovej úrovni a položí základ pre rozvoj diagnostických, prognostických, terapeutických a preventívnych medicínskych aplikácií.

Vieme, že naše telo je komplexným ekosystémom, v ktorom okrem našich vlastných buniek existuje rozsiahla a rôznorodá komunita mikroorganizmov, ktorá nás osídľuje a vytvára takzvaný ľudský mikrobióm. Tento svet baktérií, vírusov, húb a iných jednobunkových organizmov má hlboký vplyv na naše zdravie, imunitný systém, metabolizmus a duševnú pohodu. Preto vznikla revolučná iniciatíva známa ako projekt „Ľudský mikrobióm“ „**Human Microbiome Project**“ (HMP), ktorého cieľom bolo charakterizovať mikrobiálne spoločenstvá v rôznych častiach ľudského tela (urogenitálny trakt, koža, nos, ústna dutina, gastrointestinálny

trakt). Každé miesto nášho tela hostí jedinečnú mikrobiálnu komunitu, prispôsobenú svojmu konkrétnemu prostrediu a funkcii. Cieľom bolo spoznať úlohu mikrobiómu v normálnej fyziológii a pri rôznych ochoreniach. Projekt inicioval NIH už v roku 2007 a plne sa realizoval v rokoch 2008 – 2016 s rozpočtom presahujúcim 100 miliónov dolárov. Vedci skúmali štruktúru, diverzitu a funkcie mikrobiómu, pričom sa snažili odhaliť a pochopiť nekonečné spôsoby, akými mikroorganizmy ovplyvňuje ľudské zdravie a choroby. V rámci riešenia tohto projektu bolo vyšetrené obrovské množstvo vzoriek zdravých aj chorých jedincov, bolo vygenerované veľké množstvo genetických údajov a vytvorený podrobný katalóg mikrobiómu rôznych oblastí ľudského tela. Získané genetické údaje boli voľne dostupné celosvetovej vedeckej komunite a verejnosti. Tento otvorený prístup uľahčil rozsiahly výskum a urýchlil tempo objavov. Jedným z hlavných zistení HMP bol ohromujúci rozsah mikroorganizmov prítomných v ľudskom mikrobióme. Len v tráviacom trakte existujú tisíce rôznych druhov baktérií, každý so svojím jedinečným súborom funkcií. Mikroorganizmy ovplyvňujú nielen našu tráviacu činnosť, absorpciu živín ale dokonca aj produkciu esenciálnych vitamínov a hrajú kľúčovú úlohu pri vývoji a regulácii imunitného systému a ovplyvňuje aj metabolizmus liekov. Zem je domovom úchvatného množstva druhov, pričom každý prispieva k rozmanitosti prírody.

Koncom roku 2018 bol oficiálne spustený monumentálny projekt nazvaný „*Earth BioGenome*“ – EBP a nadväzoval na projekty ako *Human Genome Project* a *Barcode of Life Initiative*. Tieto predchádzajúce snahy poskytlí základné vedomosti a technológie potrebné na riešenie sekvenovania biodiverzity Zeme. Ambicióznou úlohou EBP je zmapovanie genómov všetkých 1,6 milióna známych živých rastlinných a živočíšnych druhov na Zemi. Očakáva sa, že náklady na projekt budú 4,7 miliárd dolárov. Výsledky by mali slúžiť na pochopenie fylogénzy, evolúcie, posilnenie ochrany prírody, zachovanie biodiverzity a udržanie ľudských rás. Ako prvé sú sekvenované vzácne druhy a je už známa kompletná sekvencia kanadského rysa, novozélandského papagája, vtákovyska, netopiera, či zebry. Napríklad USA plánuje sekvenovať 66-tisíc stavovcov a Čína 10-tisíc rastlinných genómov. Projekt má tri hlavné výskumné a koordinačné centrá: v New Yorku, Cambridge a Drážd'anoch. Dosiaľ bol zverejnený kompletný genóm 244 007 prokaryotických, 14 337 eukaryotických (pes, kôň, krava, sliepka, šimpanz, ryža, ľalia, kukurica, pšenica...) biologických druhov a 35 423 vírusov. V roku 2019 bolo z celkového počtu 4 000 ľudských a zvieracích múmií sekvenovaných 3 000 kusov. Tento projekt má potenciál zmeniť naše pochopenie života na Zemi. Ponúka pohľad na vzťahy medzi druhmi, evolúciu biodiverzity a mechanizmy, ktoré riadia rozmanitosť života. Projekt *Earth BioGenome* nie je iba zaznamenávanie druhov na Zemi, ale je to aj iniciatíva pre ochranu biodiverzity, identifikáciu ohrozených populácií,

vypracovanie stratégií na ochranu a obnovu ekosystémov. EBP čelí významným výzvam, od logistických problémov spojených so získavaním vzoriek z odľahlých oblastí až po etické úvahy týkajúce sa ochrany genetického súkromia. Aj napriek tomu sú potenciálne výhody vyplývajúce z tohto projektu obrovské. EBP predstavuje spoločný záväzok a tým je zabezpečiť budúcnosť pre všetkých obyvateľov našej planéty. Podobne ako iné globálne projekty v oblasti genomiky aj EBP sa zaväzuje ku spolupráci a otvorenému prístupu k dátam, ktoré generuje a vedecká komunita môže získané genetické informácie využiť na výskum, ochranu a vzdelávanie.

Literatúra

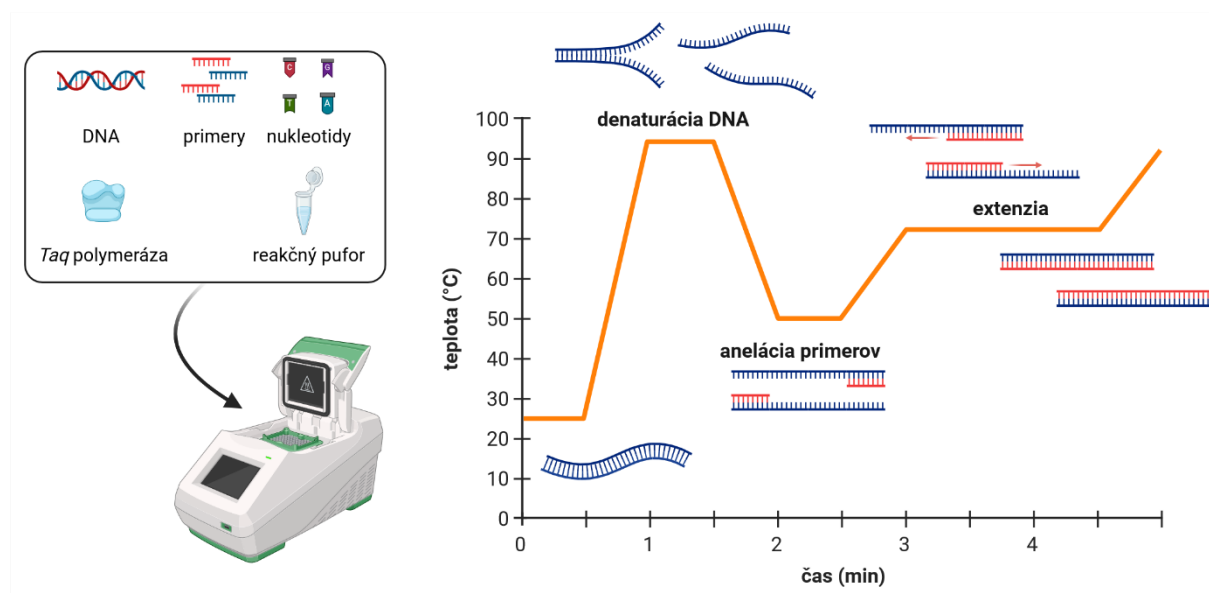
- Bentley, D. R. (2000). The human genome project—An overview. **Medicinal Research Reviews**, *20*(3), 189–196. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1128\(200005\)20:3<189::AID-MED1>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1128(200005)20:3<189::AID-MED1>3.0.CO;2-G)
- Collins, F. S., McKusick, V. A. (2001). Implications of the Human Genome Project for medical science. **JAMA**, *285*(5), 540–544. <https://doi.org/10.1001/jama.285.5.540>
- Collins, F. S., Patrinos, A., Jordan, E., Chakravarti, A., Gesteland, R., & Walters, L. (1998). New goals for the US human genome project: 1998–2003. **Science**, *282*(5389), 682–689. <https://doi.org/10.1126/science.282.5389.682>
- Fatumo, S., Emmanuel, O., Charles, T., & Lucy, E. (2022). A roadmap to increase diversity in genomic studies. **Nature Medicine**, *28*(2), 243–250. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01560-1>
- Gibbs, R. A. (2020). The human genome project changed everything. **Nature Reviews Genetics**, *21*(10), 575–576. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00295-4>
- Keller, E. F. (2022). Nature, nurture, and the human genome project. In **The ethics of biotechnology** (pp. 335–354). Routledge.
- Logsdon, G. A., Vollger, M. R., & Eichler, E. E. (2020). Long-read human genome sequencing and its applications. **Nature Reviews Genetics**, *21*(10), 597–614. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0230-9>
- Moraes, F., & Góes, A. (2016). A decade of human genome project conclusion: Scientific diffusion about our genome knowledge. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, *44*(3), 215–223. <https://doi.org/10.1002/bmb.20941>
- Nurk, S., Koren, S., Rhie, A., et al. (2022). The complete sequence of a human genome. **Science**, *376*(6588), 44–53. <https://doi.org/10.1126/science.abj6987>
- Olson, M. V. (1993). The human genome project. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, *90*(10), 4338–4344. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.10.4338>
- Rood, J. E., & Regev, A. (2021). The legacy of the human genome project. **Science**, *373*(6562), 1442–1443. <https://doi.org/10.1126/science.abj8687>
- 100,000 Genomes Project Pilot Investigators. (2021). 100,000 genomes pilot on rare-disease diagnosis in health care—Preliminary report. **New England Journal of Medicine**, *385*(20), 1868–1880. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035790>

4 Využitie kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie

(Petra Priščáková)

Úvodné kapitoly sa zaoberali genetickou informáciou primárne na úrovni genómu, akými metódami ho vieme analyzovať a aké informácie z týchto analýz sa dajú získať. Pandémia SARS-CoV-2 vniesla do povedomia širokej verejnosti metódu RT-PCR, ktorá sa pri podozrení na infekciu koronavírusom stala súčasťou rutinného testovania. Čo však znamená RT-PCR skratka a aká metodika sa za ňou skrýva? Ako nám táto metóda rozširuje možnosti skúmania genetickej informácie?

Len veľmi málo objavov v molekulárnej biológii za ostatných 100 rokov môže konkurovať dôležitosti **polymerázovej reťazovej reakcii** (PCR – *polymerase chain reaction*). V roku 1983 Kary Mullis vymyslel, že použitie dvoch špecifických oligonukleotidov, ktoré nasadnú na denaturovanú DNA (ssDNA, *single-stranded DNA*) na základe komplementarity, umožní amplifikáciu konkrétnej sekvencie DNA. Dnes sa tieto úseky nazývajú PCR primery. Reakcia sa skladá z troch cyklicky sa opakujúcich reakcií pri rôznych teplotách. Prvý krok PCR je denaturácia templátu (nukleovej kyseliny), druhý krok hybridizácia primerov na templát a tretí krok elongácia (Obrázok 4.1).



Obrázok 4.1 Princíp polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Reakčná zmes obsahuje templát (DNA), primery, nukleotidy, *Taq* polymerázu a reakčný pufor. Celia reakčná zmes je cyklicky zahrievaná na dopredu stanovený teplotný program. Pri daných teplotách je umožnená denaturácia DNA, anelácia primerov a následná extenzia vznikajúcich PCR produktov (Priščáková, vytvorené v Biorender.com)

Teoreticky je templát duplikovaný v každom cykle PCR, v prípade ak je efektivita reakcie 100 %. DNA polymeráza, pôvodne používaná v PCR, sa degradovala v každom

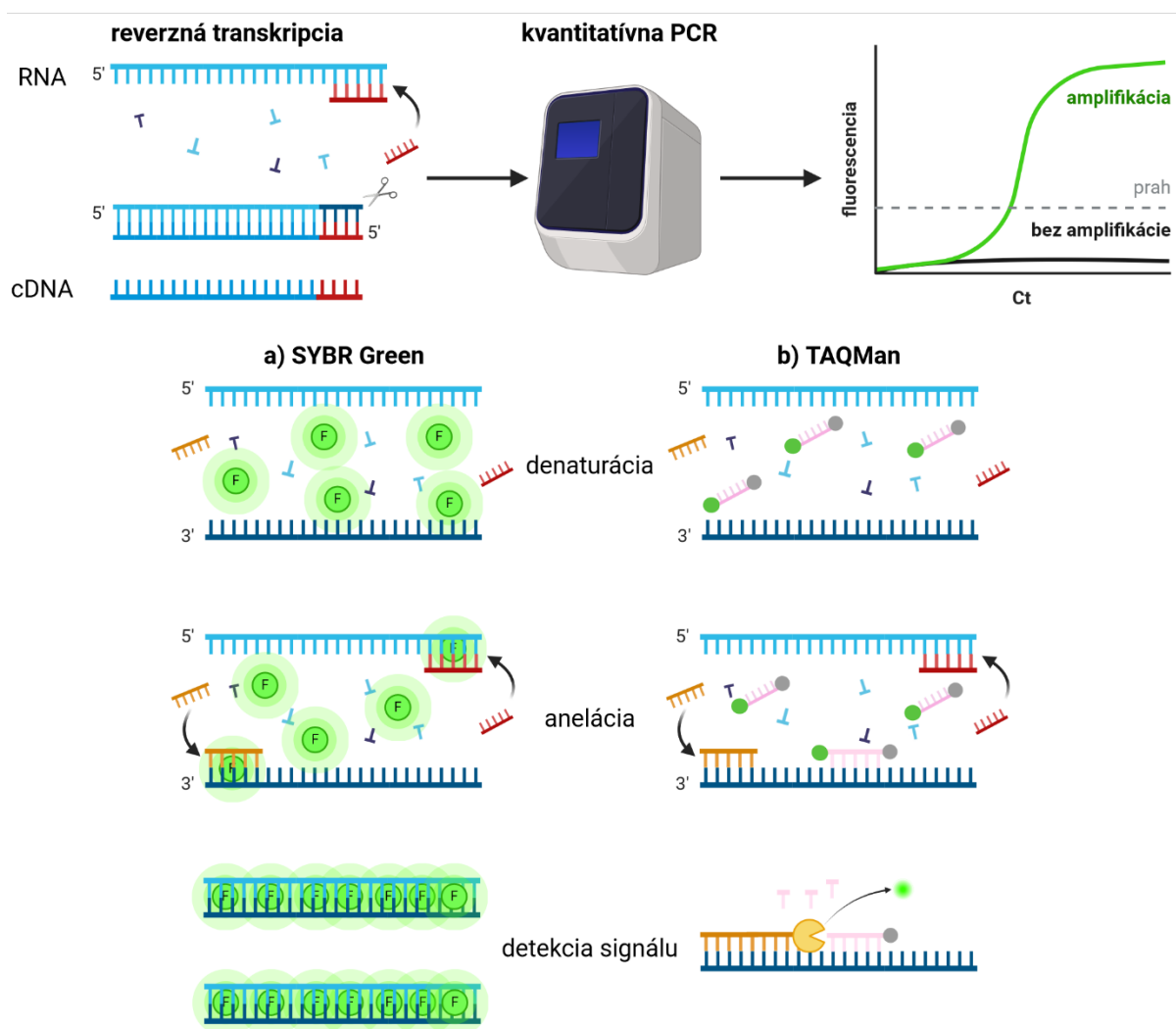
denaturačnom cykle, a preto sa musela opakovane pridávať pred každým PCR cyklom. Zjednodušenie a zrýchlenie PCR nastalo objavením termostabilnej DNA polymerázy (*Taq* polymeráza), ktorá bola izolovaná z baktérie *Thermophilus aquaticus*. *Taq* polymeráza ostáva funkčná aj pri teplote 94 °C, a teda ostáva aktívna počas všetkých cyklov PCR.

PCR metódy sa stali plne kvantitatívne po zavedení **kvantitatívnej PCR (qPCR)** a jej následným rozvinutím. qPCR sa umožnilo monitorovanie PCR kinetiky v reálnom čase, nie až na konci reakcie (*end-point* PCR). Inkorporácia **reverznej transkripcie** (RT-PCR), ako prvého kroku pred termálnym cyklovaním, umožnila aplikáciu PCR aj v RNA výskume. Tieto techniky sa rýchlo stali zlatým štandardom pre kvantitatívne analýzy nukleových kyselín. Pri **RT-qPCR** (v princípe modifikovaná PCR), je prvý krok prepis RNA reverznou transkripciou, do **komplementárnej DNA** (cDNA). Konverzia templátovej RNA do cDNA je realizovaná enzýmom reverzná transkriptáza. Následne je cDNA amplifikovaná, pričom amplifikáciu je možné sledovať v reálnom čase (qPCR) a na základe toho určiť množstvo nukleovej kyseliny, ktoré sa nachádzalo v analyzovanej vzorke. PCR sledovaná v reálnom čase (*real-time*) je niekedy označovaná ako RT-PCR, pričom dochádza k slovnej zámene s PCR s reverznou transkripciou.

RT-qPCR môže byť jednokroková alebo dvojkroková. Pri jednokrokovej RT-qPCR prebieha RT-PCR aj qPCR v jednej skúmavke a je nutné použitie sekvenčne špecifických primerov navrhnutých na sledovanú RNA. Pri dvojkrokovej RT-qPCR je cDNA syntetizovaná pomocou oligo(dT) primerov, náhodných hexamérov alebo génovo špecifických primerov. Oligo(dT) primery hybridizujú k 3'poly(A) koncom mRNA (transkripty proteín kódujúcich génov), zatiaľ čo náhodné hexaméry na základe komplementarity hybridizujú náhodne ku všetkým RNA. Jednokroková reakcia je praktickejšia pri masívnom skríningu, dvojkroková je ideálna pri súčasnej detekcii viacerých cieľov vo vzorke RNA.

Sledovanie reakcie v reálnom čase (qPCR) je možné vďaka použitiu fluorescenčných farbív v reakcii (Obrázok 4.2). **SYBR Green I** je jedno z najčastejšie používaných fluorescenčných farbív, ktoré sa viaže na dvojvláknovú DNA (dsDNA), nie však na jednovláknovú DNA (ssDNA). Je to asymetrické kyanidové farbivo, ktoré sa viaže do malého žliabku DNA, nezávisle od sekvencie DNA. Jeho nevýhodou je, že sa viaže nešpecificky, teda na všetky dsDNA. Excitácia SYBR Green je možná modrým svetlom s vlnovou dĺžkou 480 nm s emisným spektrom porovnateľným s fluoresceínom. Fluorescencia farbiva sa po naviazaní na dsDNA zvýši viac ako 1000-krát v porovnaní s nenaviazaným farbivom. Naviazanie SYBR Green I na dsDNA vedie k výraznému zvýšeniu detekovateľnej fluorescence (fluorescenčného signálu). Fluorescenčný signál narastie počas polymerizačného

kroku (SYBR Green I sa inkorporuje do každej novonasynetizovanej dsDNA) a poklesne, keď je DNA denaturovaná. Fluorescenčný signál je meraný v každom PCR cykle na konci elongácie. Použitie SYBR Green I je lacnejšie, než použitie špecifických hydrolyzačných prób, ale špecifickosť reakcie je zabezpečená len PCR primermi. Metódu je teda potrebné dôkladne optimalizovať, aby sa neamplifikovali nešpecifické úseky, ktoré by skreslili fluorescenčný signál. Z toho istého dôvodu Sybr Green I nie je možné použiť v multiplexných reakciách. Tak isto, čím je amplikón dlhší, tým viac molekúl SYBR Green I sa inkorporuje, čo môže viesť k saturácii signálu.



Obrázok 4.2 Kvantitatívna PCR s reverznou transkripciou, v ktorej je množstvo templátu určené na základe intenzity fluorescenčného signálu použitím: a) SYBR Green I, b) hydrolyzačných prób (Priščáková, vytvorené v Biorender.com)

Nukleová kyselina môže byť detegovaná aj pomocou **fluorescenčne značených oligonukleotidov** (prób), ktoré sa špecificky viažu na amplikón, čím sa dosiahne vyššia

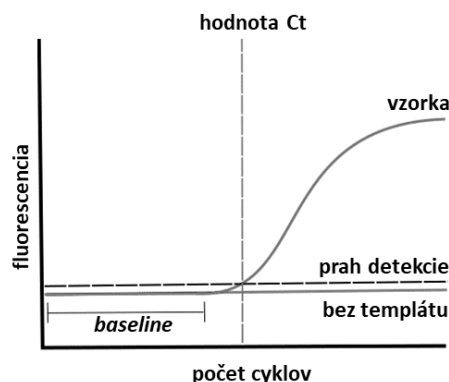
špecifickosť reakcie. Tieto próby môžu byť hydrolyzačné (**TaqMan**) alebo hybridizačné (molekulárne majáky (*molecular beacon*)).

Hydrolyzačné próby sú génovo-špecificky navrhnuté a obsahujú reportér a zhášač (*quencher*). Próba sa naviaže na cieľovú sekvenciu, ktorá sa nachádza medzi priamym a spätným primerom, vďaka ktorým sa bude amplifikovať cieľová sekvencia. Keď sú zhášač aj reportér naviazaný na próbu, zhášač absorbuje fluorescenciu emitovanú z reportéru (FRET, Försterov rezonančný prenos energie). Počas extenzie pri qPCR je próba degradovaná exonukleázovou aktivitou DNA polymerázy, reportér sa vzdiali od zhášača a emituje fluorescenčné žiarenie. Kumulatívne zvýšenie intenzity fluorescencie je úmerné množstvu prítomného transkriptu. Výhodou hydrolyzačných prôb je možnosť multiplexovania v prípade použitia rôzne žiariacich reportérov. **Hybridizačné próby** sa nehydrolyzujú počas PCR a fluorescencia je generovaná pri hybridizácii. Hybridizácia vedie k zväčšeniu vzdialenosti medzi reportérom a zhášačom, a teda emitovaniu fluorescenčného signálu. Pri použití SYBR Green I aj prôb je intenzita fluorescencie vo vzorke detegovaná v reálnom čase vo vzťahu k počtu cyklov (Obrázok 4.2). Intenzita fluorescencie je úmerná množstvu produktu.

Presná kvantifikácia fluorescencie reportéra v prôbach môže byť sťažená vplyvom vnútornej fluorescencie samotného zhášača. Tmavé zhášače (*dark quenchers*) eliminovali túto interferenciu, pretože absorbujú emitované žiarenie z reportérov, ale neemitujú žiadne žiarenie. Výhoda tmavých zhášačov je zníženie počtu potrebných svetelných vlnových dĺžok na excitáciu v reakcii a znižujú spektrálny prekryv fluorofórov. Z týchto dôvodov sú užitočné v masívne multiplexovaných reakciách.

MGB (*minor groove binders*) sú molekuly, ktoré sa viažu do malého žliabku DNA. Môžu byť konjugované k prôbam, čím sa zvyšuje ich teplota topenia. Vyššia teplota topenia zvyšuje špecifickosť nasadania prôb a umožňuje rozlišovať bodové mutácie v cieľovej sekvencii.

V prvých fázach qPCR je DNA replikácia najpomalšia, keďže množstvo templátu je relatívne malé v porovnaní s neskoršími cyklami, teda SYBR Green I alebo prôbam dlhšie trvá hybridizácia na dsDNA resp. komplementárne úseky. Ďalšia fáza je exponenciálna, a čím rýchlejšie reakcia dosiahne tento bod, tým bolo viac nukleovej kyseliny v analyzovanej vzorke. Cyklus, keď fluorescencia presiahne hodnotu fluorescencie pozadia (*baseline*), je tzv. Ct, teda prahový cyklus (*cycle threshold*) a je to začiatok logaritmickej fázy (Obrázok 4.3).



Obrázok 4.3 Závislosť fluorescence od počtu cyklov v kvantitatívnej PCR

Množstvo nukleovej kyseliny môže byť merané absolútne alebo relatívne. V prípade absolútnej metódy, počet kópií templátu je určený porovnaním so štandardnou krivkou pripravenou sériovým riedením roztoku so známou koncentráciou. Pri relatívnej kvantifikácii sa krivka používa len na vypočítanie efektivity reakcie sledovaného a **referenčného génu** (RG). V prípade, že reakcie majú rovnakú efektivitu, množstvo transkriptu sledovaného génu sa normalizuje vzhľadom k referenčnému génu. Relatívna úroveň expresie sledovaného génu sa dá vyjadriť ako ΔCt . ΔCt je rozdiel hodnôt Ct študovaného génu a Ct kontrolného (referenčného) génu. Úroveň expresie vzhľadom na štandard (vzorka so známou koncentráciou), resp. porovnanie ovplyvnených vzoriek vzhľadom na neovplyvnené, je možné vyjadriť vzorcom: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct$ je rozdiel ΔCt sledovanej vzorky a štandardu, resp. ovplyvnenej a neovplyvnenej vzorky. Ak sa RQ rovná 1, znamená to, že oba gény majú rovnakú úroveň expresie.

Efektivita PCR reakcie často nie je rovnaká pre všetky analyzované gény. Ak je efektivita reakcie 100 %, po 20 cykloch je množstvo vstupnej cDNA zvýšené milión-násobne, pri efektívite 95 %, len 600 000-násobne. Preto je vhodné použiť na výpočet iný matematický model napr. Pfafflov model:

$$RQ = \frac{(E_{\text{študovaný gén}})^{\Delta Ct_{\text{študovaný gén (kontrola - vzorka)}}}}{(E_{\text{kontrolný gén}})^{\Delta Ct_{\text{kontrolný gén (kontrola - vzorka)}}}}, \text{ kde } E \text{ je efektivita amplifikácie.}$$

Analýza génovej expresie má uplatnenie v mnohých odvetviach biologického výskumu. Porozumenie expresnému profilu sledovaných génov môže viesť k porozumeniu komplexných regulačných sietí a k identifikácii génov relevantných v biologických procesov alebo v ochoreniach. qPCR nie je len metóda používaná vo výskume, ale má aj diagnostické uplatnenie, pri kvantifikácii mikroorganizmov (detekcia SARS-CoV-2 v steroch

z hltana/nosohltana), určovaní génovej dávky, identifikácii transgénov v geneticky modifikovaných potravinách, hodnotení rizika recidívy rakoviny a forenzných aplikáciách.

Pre štúdie a experimenty v biológii a medicíne platí, že majú najnižšiu mieru reprodukovateľnosti. Dôvodom môžu byť nevhodne zvolené experimentálne modely, ktoré neilustrujú fyziologický stav alebo ochorenie. Interpretácii experimentálnych výsledkov bránia podstatné biologické a technické faktory, metodické chyby, tiež nesprávne definované a navrhnuté validačné experimenty a nevhodne zvolené štatistické analýzy.

V súčasnosti je kvantitatívna PCR jedna z najčastejšie používaných techník kvantifikácie nukleových kyselín v biologických vzorkách vďaka čomu je metodicky relatívne jednoduchá. Aby boli získané dáta reprodukovateľné a reprezentovali skutočný stav v bunke/tkanive, množstvo krokov a reagensí vyžaduje optimalizáciu a validáciu.

Kroky, ktoré najviac ovplyvňujú reprodukovateľnosť, teda aj vierohodnosť výsledkov qPCR sú: RNA extrakcia, skladovanie vzoriek a ich kvalita, proces reverznej transkripcie, návrh primerov a výber štatistických metód pri analýze dát.

4.1 Optimalizácia krokov kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie

qPCR a RT-qPCR predstavujú metodický zlatý štandard v širokom spektre aplikácií, či už experimentálneho alebo klinického charakteru. Sú rýchlo realizovateľné, cenovo dostupné a prístrojové vybavenie na ich realizáciu je štandardom väčšiny laboratórií. Ponúkajú spoľahlivé a reprodukovateľné výsledky, ale len v prípade, ak sú optimalizované jednotlivé kroky RT-qPCR. Pri plánovaní qPCR experimentu treba brať do úvahy aký biologický materiál bude použitý, a tomu prispôbiť podmienky izolácie nukleových kyselín. Na výsledky experimentu majú dopad podmienky a použité enzýmy reverznej transkripcie či reakčné zmesi pre kvantitatívnu PCR. Nakoniec, vhodne zvolená metóda kvantifikácie a samotná analýza získaných výsledkov ovplyvní, či sú dáta reprodukovateľné a reprezentatívne. Nejednotné metodické kroky a chemikálie môžu byť zodpovedné za protichodné informácie z rôznych laboratórií o rovnakej problematike.

4.1.1 Extrakcia RNA

Pri odbere materiálu treba mať na zreteli, že aj keď sa odoberie rovnaké množstvo tkaniva (rovnaká hmotnosť, veľkosť), neznamená to, že aj množstvo nukleových kyselín vo vzorkách bude rovnaké. Bunky a tkanivá sú neustále pod vplyvom interných a externých faktorov, čo bude odrážať absolútne aj relatívne množstvo nukleových kyselín. V rôznych vzorkách preto bude pozorovaná vysoká prirodzená variabilita a pre jej pokrytie je potrebné analyzovať

dostatočne veľký súbor biologických replikátov. Počet potrebných replikátov závisí od úrovne variability.

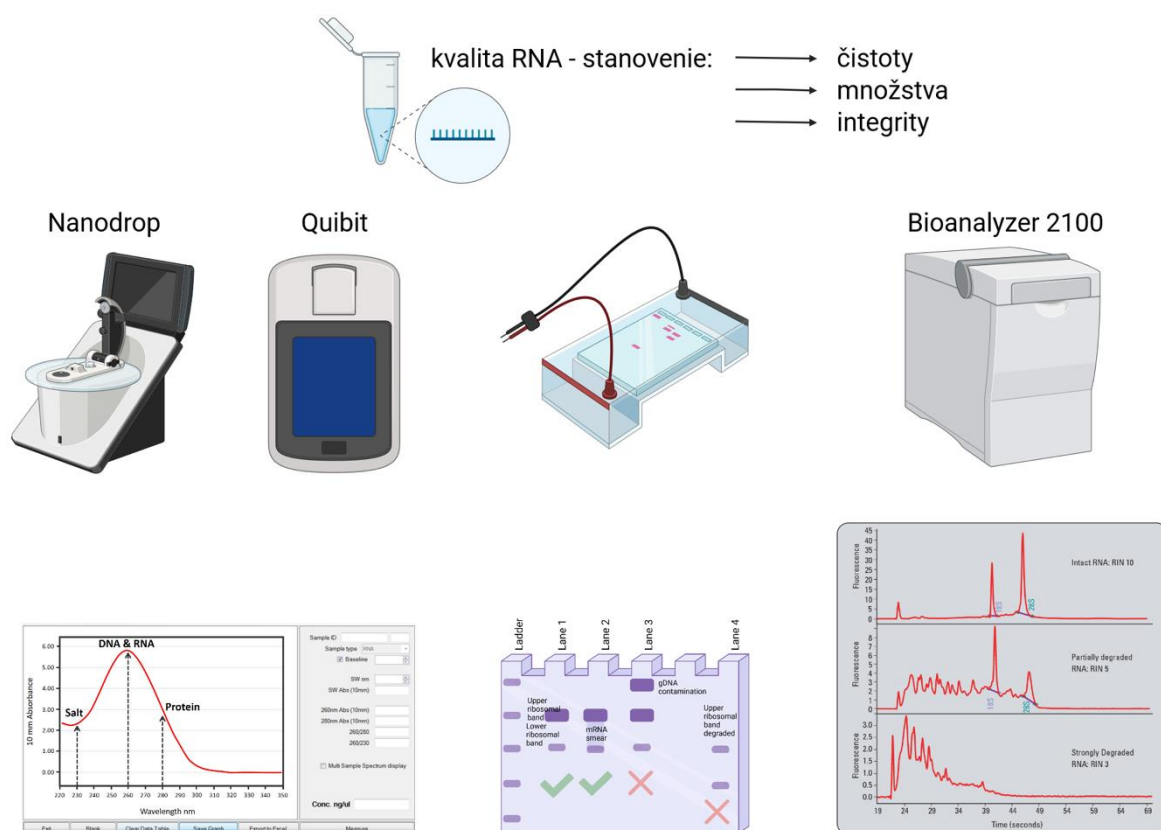
Ďalší dôležitý parameter je **kvalita nukleových kyselín**. Nemožno kvantitatívne porovnávať vzorky rôznych kvalít. Kvalitu a kvantitu RNA je možné určiť viacerými spôsobmi (Obrázok 4.4). Koncentrácia RNA, ale aj miera kontaminácie (či už DNA, proteíny, guanidínové soli, fenol, ...) môže byť stanovená spektrofotometricky, napr. pomocou Nanodrop-u. Koncentrácia a čistota RNA je vypočítaná na základe miery absorbancií pri definovaných vlnových dĺžkach. Výhody metódy sú, že je rýchla a jednoduchá – vzorka sa nemusí špeciálne pripraviť, nie sú potrebné žiadne farbičky ani štandardy. Nevýhodou je vyšší detekčný limit v porovnaní s inými metódami, a to, že táto metóda nie je selektívna (rozlíšenie RNA od DNA je len počítačovým algoritmom). Pri fluorometrickom meraní (napr. Quibit) kvantity RNA je potrebné použiť fluorogénnu farbičku, ktorá sa selektívne viaže k RNA. Koncentrácia sa stanoví na základe porovnania so štandardizovanou vzorkou a jej kalibračnou krivkou. Výhoda tejto metódy je teda špecifickosť, citlivosť a merania nie sú skreslené prítomnosťou kontaminantov. Meranie je časovo náročnejšie (v porovnaní s Nanodrop) a neposkytuje informácie o čistote vzorky. Elektroforeticky je možné určiť množstvo 28S a 18S rRNA, pri čom ich pomer v intenzite bandu by mal byť približne 2⁸. To znamená, že izolovaná RNA nie je fragmentovaná, teda je intaktná a nedegradovaná. Tento pomer platí hlavne pre cicavčie vzorky, pri iných organizmoch môže byť pomer mierne odlišný. Populárna metóda hodnotenia kvality RNA je určenie RIN/RQI, teda pomer hodnoty **integrity RNA** a **hodnoty kvality RNA** (*RNA integrity value (RIN)/RNA quality value (RQI)*). RNA vzorka je elektroforeticky separovaná v mikrokapilárach, deteguje sa fluorescenčne. Intaktnosť RNA je vyjadrená hodnotou RIN, hodnoty môžu byť 0 – 10. Intaktná RNA dobrej kvality má RIN viac ako 5, ideálnej kvality viac ako 8. Miera degradácie mRNA môže byť stanovená aj porovnávaním efektivity množenia amplicónov referenčného génu rôznej dĺžky alebo stanovenie relatívnej amplifikácie oligo-dT primermi 5' a 3' regiónov cDNA.

Pri plánovaní experimentu je potrebné vziať do úvahy aký typ RNA je cieľom záujmu. 80 % z celkovej izolovanej RNA je rRNA, 10 – 20 % je tRNA a 1 – 5 % mRNA a v niektorých prípadoch je potrebné prispôsobiť postup izolácie miere zastúpenia cieľovej RNA vo vzorke

⁸ 28S a 18S rRNA sú produkované štiepením jedného RNA transkriptu, teda ich množstvo v bunke je rovnaké. Avšak keď sa tieto rRNA analyzujú v agarózovom géli, intenzita fluorescencie bandov týchto molekúl závisí od počtu nukleotidov v molekule. U ľudí je 28S rRNA zložená z 5070 nukleotidov a 18S z 1869 nukleotidov, teda pomer intenzity 28S/18S (5070/1869) je približne 2,7.

celkovej RNA. Počas prípravy vzoriek môžu byť s RNA extrahované viaceré inhibítory. Tie vplyvajú na ďalšie kroky RT-qPCR, ale výsledky analýzy jednotlivých transkriptov nemusia ovplyvniť rovnako. Okrem čistoty, integrity a koncentrácie RNA je dôležité, aby vzorka nebola kontaminovaná DNA. Najvhodnejším riešením je ošetrovanie vzorky DNázou a následné overenie neprítomnosti DNA pomocou PCR alebo qPCR.

Vzorky s rozdielnou kvalitou (čistotou, mierou degradácie) RNA budú s vyššou pravdepodobnosťou vykazovať v analýzach rozdiely, aj keď nie sú rozdielne, resp. budú rozdiely maskované. Všetky spomínané faktory takisto ovplyvňujú aj analýzy DNA vzoriek.



Obrázok 4.4 Možnosti stanovenia kvality RNA, teda jej čistoty, množstva a integrity. Charakterizácia kvality RNA je možná viacerými prístupmi, a to spektrofotometricky (Nanodrop), fluometricky (Qubit), elektroforeticky, buď v agarózových géloch alebo v polyméroch (Bioanalyzer 2100) (Prišćáková, vytvorené v Biorender.com)

4.1.2 Reverzná transkripcia

Spôľahlivá/presná **reverzná transkripcia RNA** pred qPCR závisí od koncentrácie RNA, typu použitých primerov, a tiež od eliminácie rozsiahlych sekundárnych štruktúr vo väzobných miestach pre primery. Sekundárne štruktúry môžu ovplyvňovať rôzne reverzné transkriptázy odlišne. Pre reverznú transkripciu je možné zvoliť primery špecifické pre sledovaný gén, zmes náhodných hexamérov alebo oligo(dT) primery. Efektivita reverznej transkripcie môže byť

značne odlišná vplyvom použitých primerov alebo dokonca vplyvom rozdielov medzi jednotlivými komerčne dostupnými reakčnými zmesami. Pri návrhu RT-PCR experimentov je nevyhnutné overiť efektivitu používaných komerčných súprav na reverznú transkripciu, a takisto zvoliť vhodnú alternatívu pri výmene reakčnej zmesi v experimente, ak majú byť výsledky porovnateľné.

4.1.3 Kvantitatívna PCR

Samotná qPCR sa považuje za robustnejšiu metódu než RT-PCR. Najdôležitejší je kvalitný vstupný materiál (kvalitná cDNA), dobre navrhnuté primery alebo próby, nasadajúce len na transkript sledovaného génu. Výsledky však môže výrazne ovplyvniť použitá reakčná zmes, tzv. *master mix* pre qPCR. Použitie relatívnej kvantifikácie by malo tento problém zdanlivo odstrániť, ale zistilo sa, že rôzne reakčné zmesi nemusia amplifikovať transkripty referenčného génu a sledovaného génu v rovnakej miere.

Za hlavné nedostatky RT-qPCR sa môžu označiť neschopnosť rozlišovať malé rozdiely v úrovni expresie, slabú reprodukovateľnosť experimentov vzoriek s nízkym počtom kópií, inhibíciu PCR reverznou transkriptázou, rozdielnu mieru transkripcie RNA použitím rôznych primerov a samotný použitý protokol extrakcie RNA a aj reverznej transkripcie, ktoré sa medzi laboratóriami líšia. Z toho vyplýva vysoká pravdepodobnosť, že výsledky RT-qPCR o rovnakej problematike prezentované rôznymi laboratóriami budú pravdepodobne odlišné. V prípadoch, keď nie sú zverejnené protokoly a presné informácie o návrhu experimentu, nie je jednoduché určiť, ktoré výsledky odrážajú realitu. Toto platí pre všetky metódy, ktoré vychádzajú z reverznej transkripcie, tak ako **digitálna RT-PCR** (RT-dPCR) a sekvenovanie RNA (RNA-seq).

V dôsledku nedostatočne opísaných, nevalidovaných protokolov pre qPCR v publikovaných štúdiách a ich nízkej miere reprodukovateľnosti, sa vytvorila smernica nazývaná **MIQE** (*minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*). MIQE hovorí o minimálnych informáciách, ktoré musia byť v prípade qPCR experimentov spomenuté v publikácii so snahou podporiť produkciu spoľahlivejších a konzistentných dát.

4.1.4 Vhodný výber referenčného génu

Štúdie expresných profilov boli v minulosti často robené Northern blotom alebo v súčasnosti pomocou mikročipov, vďaka možnosti ekonomicky analyzovať viacero génov súčasne. qPCR je jedna z najspoľahlivejších metód validácie týchto výsledkov. Výhodou qPCR je jej

senzitivita, detekcia v reálnom čase, rýchlosť analýzy a precíznosť (ak sú jednotlivé kroky experimentu optimalizované). Úroveň expresie niektorých génov je taká nízka, že ju je možné stanoviť len pomocou qPCR. Ale ak má qPCR validovať výsledky iných metód, ako je sama normalizovaná, a ako sú jej výsledky validované? Najmenšie zmeny v izolačných metódach, ošetrovaní DNázou, reverznej transkripcii, v reakčnej zmesi a teplotnom programe qPCR môžu viesť k nepresným výsledkom. Ak konformita týchto krokov nemôže byť na 100 % zachovaná, čiastočne vplyv týchto faktorov zmiernuje zahrnutie normalizačného génu, ku ktorému sa vzťahuje úroveň expresie sledovaného génu/génov. Napriek tomu, že qPCR je používaná od roku 1992, dôležitosť referenčných génov bola dlhé roky v ústraní.

Referenčné gény sú endogénne kontroly reakcie, ktoré sú sekvenčne odlišné od sledovaného génu (GOI, *gene of interest*). Aby bol gén spoľahlivou referenčnou kontrolou, musí spĺňať niekoľko kritérií. Najdôležitejšie kritérium je, aby jeho úroveň expresie nebola ovplyvnená experimentálnymi faktormi. Úroveň expresie referenčného génu by mala byť stabilná a porovnateľná medzi vzorkami, s minimálnou variabilitou medzi tkanivami a fyziologickými stavmi organizmu. Zároveň by mal mať referenčný gén podobné **hodnoty prahového cyklu** (Ct, to isté ako Cq, teda kvantifikačný cyklus) ako sledovaný gén. Variabilita v úrovni expresie referenčného génu by mala byť spôsobená len nedokonalosťami používaných technológií a nepresnosťami pipetovania. V takom prípade je možné predpokladať, že chybovosť je rovnaká aj pre sledovaný gén. Zdá sa, že tieto kritéria spĺňajú gény bazálneho metabolizmu, tzv. „*house-keeping*“ **gény**⁹. Ich génové produkty sú zapojené do procesov esenciálnych pre prežívanie buniek, musia byť teda stabilne a konštantne exprimované. Z tohto dôvodu sa začali ako prvé zvažovať ako referenčné gény. S týmto sa dá súhlasiť, ale na druhej strane, veľa produktov „*house-keeping*“ génov sa podieľa nie len na bazálnych procesoch, ale aj na iných špecifickejších dejoch v organizme. „*House-keeping*“ gény sú často silne exprimované, čo nemusí byť prípad sledovaného génu, a to môže viesť k skresleniu presnosti relatívnej kvantifikácie. Keď je nejaký referenčný gén spoľahlivý pri jednom type experimentov s určitým tkanivom a podmienkami, neznamená to, že bude aplikovateľný a funkčný aj v iných experimentoch. Použitie referenčného génu, ktorý má nestabilnú úroveň expresie, vedie k skreslenému pohľadu na úroveň expresie GOI, či ju už nadhodnotí alebo podhodnotí.

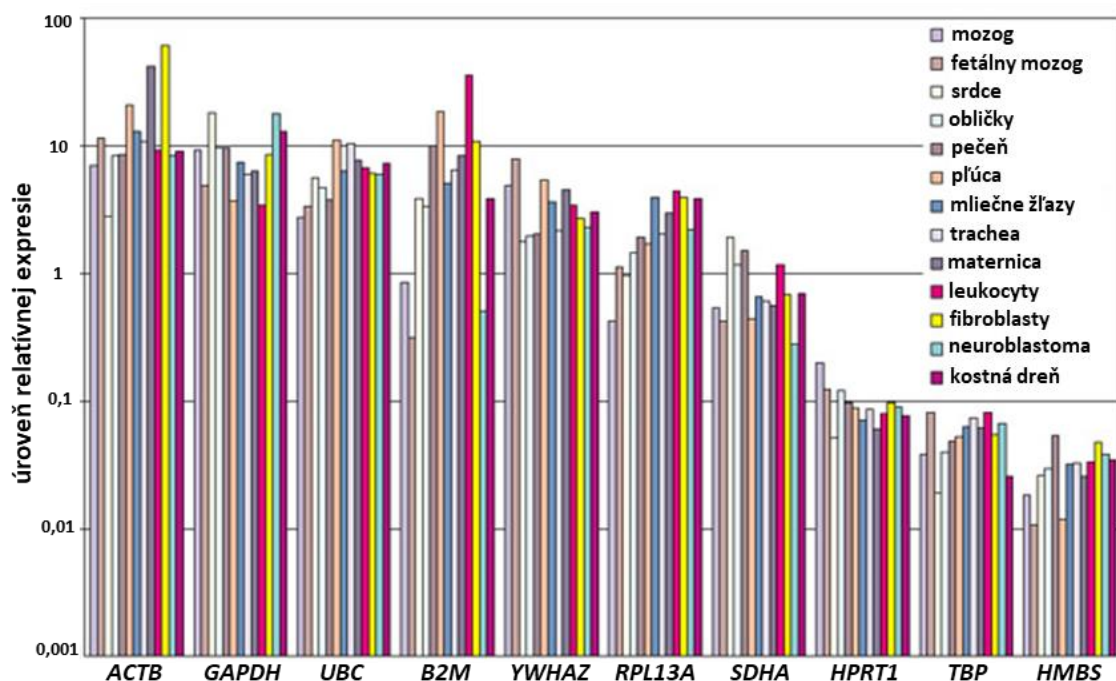
Najčastejšie používané a v publikovaných štúdiách spomínané referenčné gény sú *18S rRNA* (18S ribozomálna RNA), *28S rRNA* (28S ribozomálna RNA), *TUBA* (α -tubulín), *ACTB*

⁹ *House-keeping* gény sú exprimované vo všetkých bunkách a vo všetkých vývojových štádiách. Produkty kódované týmito génmi sú nevyhnutné pre základné funkcie buniek.

(β -aktín), $\beta 2M$ ($\beta 2$ -mikroglobulín), *ALB* (albumín), *RPL32* (ribozomálny proteín L32), *TBP* (TATA väzobný proteín), *CYCC* (cyklofilín C), *EF1A* (elongačný faktor 1 α), *GAPDH* (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza), *HPRT* (hypoxantín fosforibozyl transferáza) a *RPII* (RNA polymeráza II).

Pri výbere vhodného referenčného génu je nemožné sa spoľahnúť len na publikované štúdie, ale pri návrhu a realizácii experimentu je potrebné otestovať vhodnosť kandidátnych referenčných génov pre konkrétne tkanivo, ktoré sa analyzuje, a aj pre konkrétne podmienky, ktoré sa testujú.

Úroveň expsie bežne používaných referenčných génov sa môže meniť vplyvom externých faktorov, pričom pôsobenie týchto faktorov nemusí mať rovnaký vplyv na všetky typy tkanív či organizmov. Úroveň expsie sa dokonca môže meniť medzi rôznymi tkanivami (Obrázok 4.5), ale aj v rôznych častiach tkaniva. Toto všetko treba brať pri návrhu experimentu do úvahy a optimalizovať spôsob odberu vzoriek, aby bol súbor reprezentatívny a otestované referenčné gény v ňom mali stabilnú úroveň expsie. Takisto treba zohľadniť, že rôzne patologické stavy, ako infekcie, nádorové a iné ochorenia (*diabetes mellitus*, atď.) ovplyvňujú expsiu génov bežne používaných ako referenčné.



Obrázok 4.5 Úroveň expsie desiatich referenčných génov v 13 ľudských tkanivách normalizovaných ku geometrickému priemeru šiestich kontrolných génov (*GAPD*, *HPRT1*, *SDHA*, *TBP*, *UBC*, *YWHAZ*) (upravené podľa Vandesompele a spol., 2002)

4.1.5 Ako postupovať pri výbere a validácii referenčných génov?

Plánovanie qPCR experimentov a výber vhodného referenčného génu by sa mohli zhrnúť do nasledovných bodov:

- Výber kandidátnych referenčných génov na základe publikovaných štúdií resp. experimentálnych skúseností.
- Návrh primerov a prób. Primery a próby musia nasadať do unikátnych oblastí, aby dochádzalo k amplifikácii len cieľovej sekvencie. Nie je vhodné primery navrhovať na oblasti, ktoré obsahujú bežne sa vyskytujúce varianty, resp. sú mutačným *hot spot*-om. Pri eukaryotických genómoch netreba zabudnúť na alternatívny zostrih. Primery je vhodné navrhnuť na sekvencie, ktoré sa nachádzajú vo všetkých transkripčných variantoch, ak nás zaujíma celkové množstvo danej mRNA, resp. na špecifické časti konkrétneho transkriptu, ak nás zaujíma len produkt vznikajúci z toho zostrihového variantu. V prípade, že sledovaný gén má nefunkčné kópie alebo pseudogény, treba pri návrhu primerov aspoň jeden z primerov navrhnuť na špecifickú oblasť neprítomnú v pseudogéne.
- Výber referenčných génov, ktoré majú podobnú úroveň expzie ako testovaný gén, to však nie je vždy možné dosiahnuť. Preto sa odporúča, aby úroveň RG nebola príliš nízka ($Ct > 30$) alebo príliš vysoká ($Ct < 15$). V prípade, že je významný rozdiel v úrovni expzie, preferenčne sa môže amplifikovať mRNA, ktorej je tam vyššia koncentrácia. Preferenčná amplifikácia sa dá eliminovať *simplex* návrhom experimentu (v jednej jamke v reakčnej platni sa sleduje fluorescencia len GOI alebo referenčného génu), čo však vedie k zvýšeným materiálnym, časovým, a tým pádom aj finančným nárokom. Pri *duplex/multiplex* experimente sa sleduje úroveň expzie všetkých sledovaných génov v jednej jamke.

Základnou vlastnosťou referenčného génu je, že má stálu a takmer nemennú úroveň expzie v každej testovanej vzorke nezávisle od experimentálnych podmienok. Existuje niekoľko algoritmov, ako napr. **geNorm**, **NormFinder**, **BestKeeper**, **qBasePlus**, ktoré vypočítavajú tzv. index stability pre páry kandidátnych referenčných génov, ktoré sú testované. V prípade geNorm je miera génovej stability definovaná ako štandardná odchýlka logaritmicke transformovaných hodnôt expzie porovnávaných génov (M hodnota). NormFinder algoritmus vyberá RG na základe lineárneho modelu, ktorý opisuje geometrický priemer úrovne expzie ako komplexný súbor faktorov, ku ktorým patrí úroveň génovej expzie v skupinách, množstvo mRNA vo vzorke a náhodné variácie spôsobené biologickými a experimentálnymi faktormi.

Takto navrhnutý aditívny model je možné otestovať rôznymi štatistickými prístupmi, ako je klasická ANOVA a iné metódy pre zmiešané lineárne modely pozostávajúce z pozorovaní a nezávislých premenných. NormFinder vypočíta na základe dát intra- a inter-skupinovú variabilitu, ktorú skombinuje do hodnoty stability.

Keďže spomínané programy využívajú rôzne algoritmy, nie je prekvapujúce, že programy kandidátne RG vyhodnotia odlišne. Výhoda geNorm spočíva v schopnosti určiť potrebný počet génov pre normalizáciu. NormFinder zase vypočítava stabilitu každého génu nezávisle, čo je výhodné pri nedostatku informácií o spoločnej regulácii expresie daných génov. Mallona a spol. aplikovali geNorm, NormFinder, BestKeeper, qBasePlus a výsledky skombinovali pomocou programu RankAgregg. Zaujímavé je, že GAPDH, najčastejšie používaný referenčný gén, bol takmer všetkými algoritmami vyhodnotený ako najmenej stabilný vo všetkých testovaných líniiach petúnií.

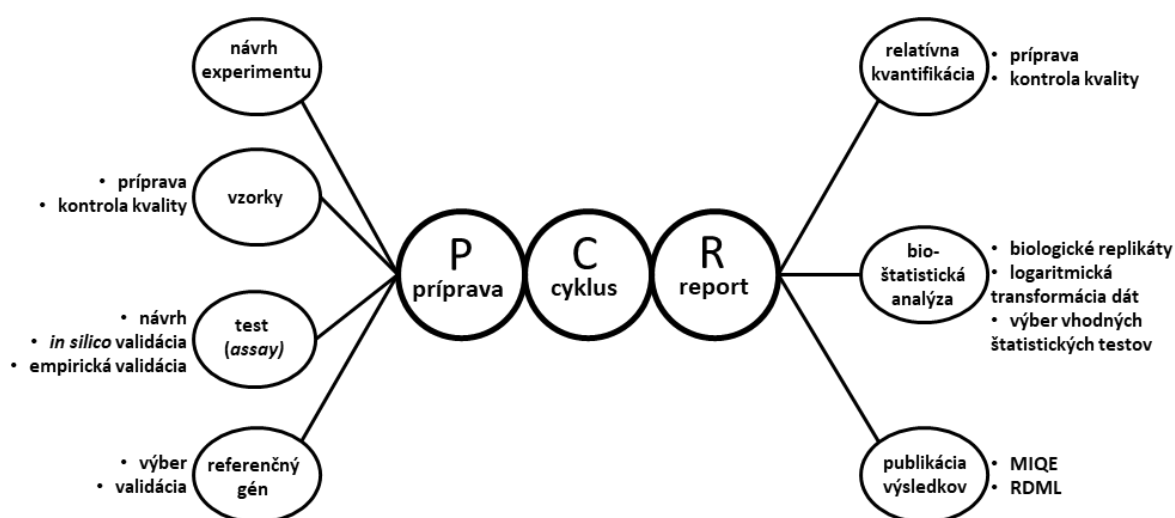
Typický pilotný experiment pre evaluáciu stability úrovne expresie referenčných génov je analýza desiatich kandidátnych RG v desiatich reprezentatívnych vzorkách z každého tkaniva alebo skupiny vzoriek. Vybrané gény by mali byť súčasťou rôznych biologických dráh, s rôznou úrovňou expresie.

V prípade, že použitím algoritmov nie je možné jednoznačne vybrať RG, resp. algoritmy ponúkajú rôzne RG, pre najspoľahlivejšie výsledky sa odporúča použiť minimálne tri RG, pričom minimálne dva z nich by mali mať nesúvisiace úlohy v organizme, aby sa znížila pravdepodobnosť, že ich expresie sú regulované spoločne. Následne je potrebné tieto tri RG otestovať na troch vzorkách (biologické replikáty), ak majú rôzne genotypy, tak triplikáty pre každý. Použitie len jedného referenčného génu je prijateľné len v prípade, ak už bol otestovaný a validovaný za podobných experimentálnych podmienok, avšak aj to môže viesť k významnému skresleniu výsledkov. Vo všeobecnosti platí, že čím je tkanivo homogénnejšie, tak bude potrebných menej RG (napr. dva). V prípade heterogénnejších tkanív bude relevantnejšie odrážať úroveň expresie v tkanive použitie štyroch až piatich referenčných génov.

S rozmachom mikročipov a charakterizáciou expresie na celogenómovej úrovni sa naskytl nový spôsob identifikácie vhodných referenčných génov. Množstvo dát z mikročipov sa pre konkrétne tkanivá alebo podmienky kompiluje dokopy a v nich sa identifikujú najstabilnejšie exprimované gény. Validačné experimenty potvrdili vhodnosť takto identifikovaných génov ako referenčných. Program, ktorý toto umožňuje je RefSeq. Výhoda tohto prístupu je, že najprv skenuje verejne dostupné dáta na úrovni celého genómu, z nich vyberie tie s najstabilnejšou úrovňou expresie. Experimentátor si môže nastaviť konkrétne

tkanivo a experimentálne podmienky, ktoré najvernejšie reprezentujú jeho navrhnutý experiment. Následne je potrebné ponúknuté kandidátne RG otestovať algoritmi GeNorm, NormFinder alebo Bestkeeper. Takisto má tento prístup svoje nepresnosti, pretože mikročipy rôznych technológií majú rôzne navrhnuté primery a próby na analyzované transkripty. Z tohto dôvodu je potrebné takto identifikované kandidátne RG otestovať aj experimentálne porovnaním s overenými RG.

Napriek neistotám a nejasnostiam ohľadom RG a normalizácie qPCR, qPCR je stále jedna z najpresnejších metód kvantifikácie nukleových kyselín pri zachovaní základných pravidiel pre qPCR metodiku (Obrázok 4.6).

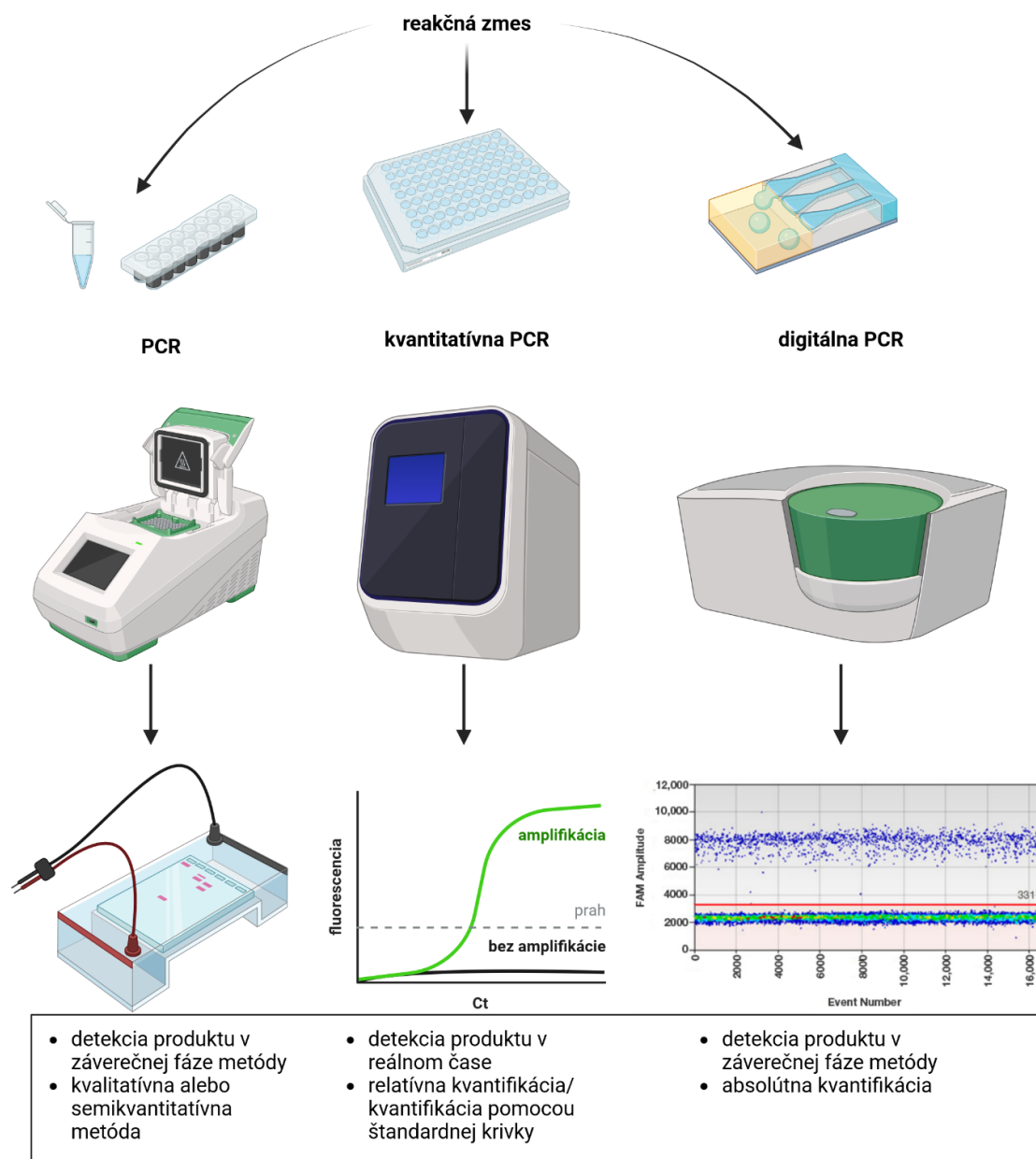


Obrázok 4.6 Postup a dôležité kroky pri návrhu a realizácii kvantitatívnej polymerázovej reakcie (upravené podľa Derveaux a spol., 2010)

4.2 Technológie odvodené od polymerázovej reťazovej reakcie

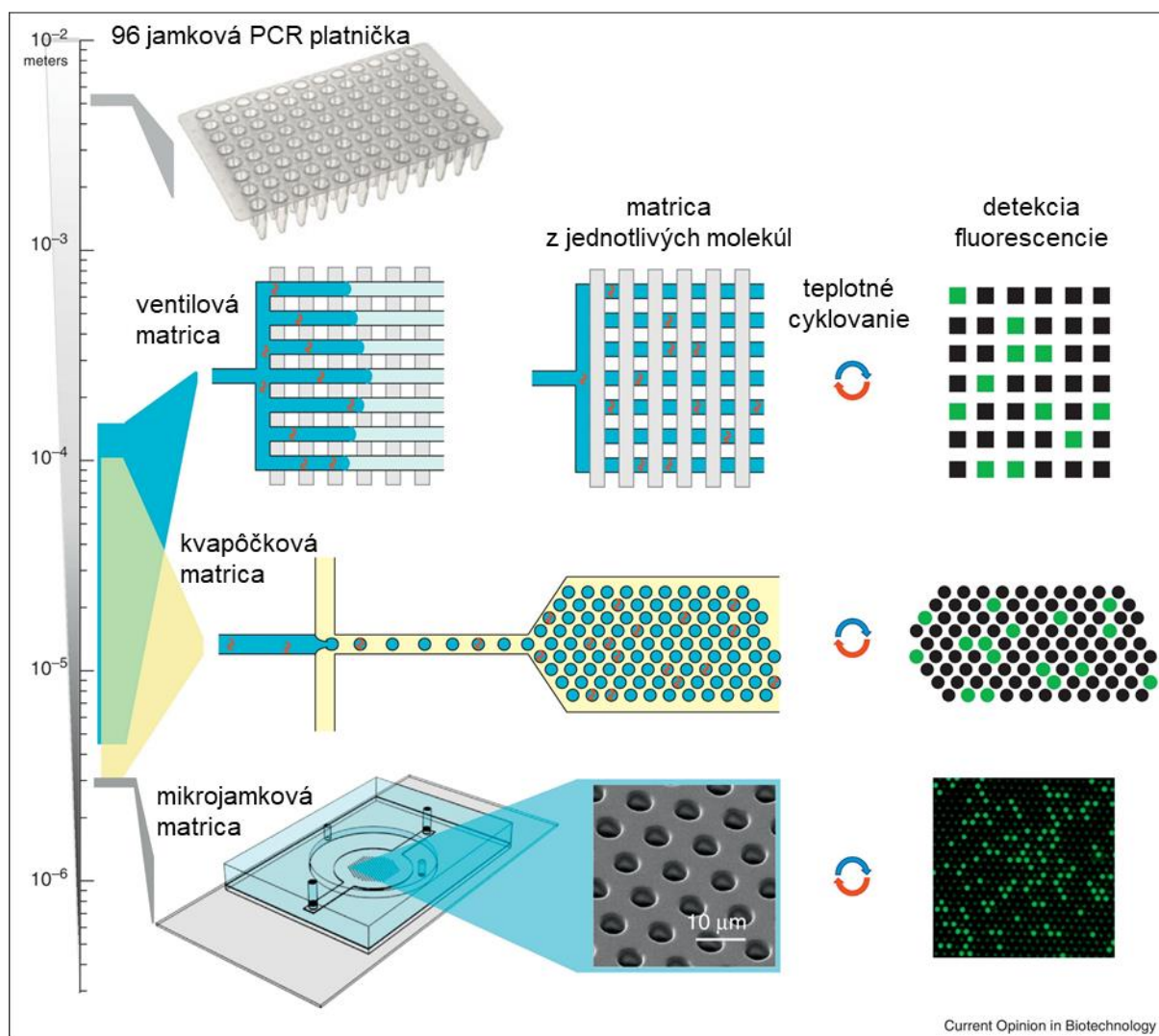
4.2.1 Digitálna polymerázová reťazová reakcia

Digitálna polymerázová reťazová reakcia (dPCR) je metóda umožňujúca kvantifikáciu nukleových kyselín. Na amplifikáciu nukleových kyselín sa využívajú rovnaké chemikálie ako pri qPCR. Úspešná amplifikácia cieľovej molekuly je detegovaná vďaka fluorescencii, či už z interkalačných činidiel alebo z hydrolyzačných prôb. Hlavný rozdiel medzi metodikami je v tom, ako je PCR pripravená, a akým spôsobom sa detegovaný signál z amplifikácie kvantifikuje (Obrázok 4.7).



Obrázok 4.7 Porovnanie PCR (polymerázová reťazová reakcia), qPCR (kvantitatívna PCR) a dPCR (digitálna PCR). GOI – gén záujmu (Priščáková, vytvorené v Biorender.com).

Pri qPCR je pripravená homogénna reakčná zmes a fluorescencia indukovaná amplifikáciou cDNA je monitorovaná po každom cykle. Množstvo templátu sa odhaduje na základe intenzity fluorescenčného signálu meraného počas logaritmickéj amplifikácie, vzhľadom na interný alebo externý kalibrátor (RG). Na rozdiel od toho, digitálna PCR je založená na rozdelení jednej reakčnej zmesi do tisícov jednotlivých mikroskopických kvapiek s cieľom fyzicky izolovať jednotlivé molekuly templátov pred amplifikáciou. Reakčná zmes môže byť rozdelená rôznymi mechanizmami, ako napr. emulgovaním mikrokvapiek oleja (digitálna PCR v kvapkách), mikrojamkami alebo mikrofluidnými ventilmi (Obrázok 4.8).



Obrázok 4.8 Možnosti separácie vzorky na jednotlivé molekuly pri digitálnej polymerázovej reťazovej reakcii (upravené podľa Streets, Huang, 2014)

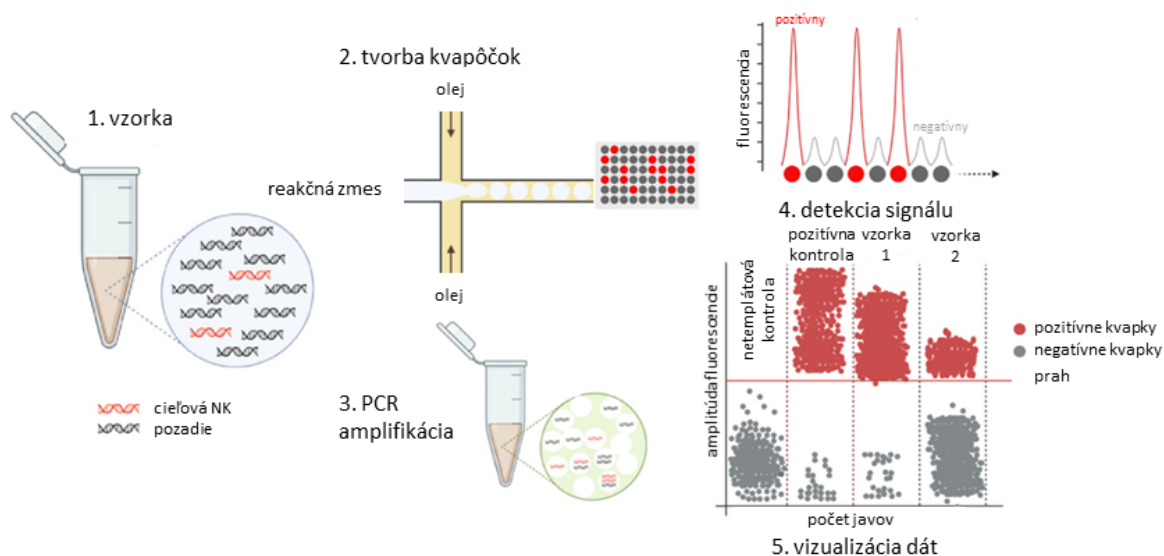
Cieľom je dosiahnuť aby v každom mikroskopickom kompartmente (mikroreakčná jednotka, kvapka alebo jamka) bola jedna alebo žiadna molekula a nie viacero cieľových molekúl. PCR reakcia prebehne nezávisle v každom kompartmente, pričom fluorescencia z každého kompartmentu je snímaná samostatne. Na základe Poissonovho rozdelenia sa určí priemerné množstvo a podiel pozitívnych jednotiek (tie, ktoré vykazovali fluorescenciu) s cieľom redukovať/eliminovať chybu generovanú jednotkami, v ktorých bolo viac kópií cieľovej sekvencie. Na základe rozdelenia je určený počiatočný počet kópií v analyzovanej vzorke.

4.2.2 Prevedenia digitálnej PCR

Princípom **digitálnej PCR v kvapkách** (ddPCR – *droplet-based digital PCR*) je rozdelenie vzorky (templátu) pred amplifikáciou. Vzorka sa rozdelí do tisícok malých uzavretých

kvapôčok olejovej emulzie s objemom niekoľko nanolitrov. V kvapôčke sa nachádza templát aj reakčná zmes. Emulzie sa umiestnia do skúmaviek, kde prebehne PCR a následne sú vzorky spracované prietokovým cytometrom. Alternatívne môžu byť kvapky umiestnené na čípe, z ktorého sa následne zachytáva fluorescenčný signál, ak v kvapke prebehla reakcia (Obrázok 4.9).

V porovnaní s qPCR, ddPCR je presnejšia, s menšou chybovosťou. Je možné multiplexovať, próby sú označené rôznymi fluorescenčnými značkami pre rôzne DNA/RNA. Takýmto spôsobom je napríklad možné vytvoriť RNA knižnice pre jednotlivé bunky.



Obrázok 4.9 Digitálna PCR v kvapkách, PCR – polymerázová reťazová reakcia (upravené podľa Kojabad a spol., 2021)

Pri digitálnej PCR na čípech (cdPCR – *chip-based digital PCR*) sú vzorky v jamkách na silikónovom čípe. V jamke prebehne PCR a čip je zosnímaný fluorescenčným mikroskopom, aby sa určilo v ktorých jamkách prebehla reakcia. Tak isto je možné multiplexovanie použitím prób s rôznymi fluorescenčnými značkami.

4.2.3 Je pre môj experiment vhodnejšia qPCR alebo dPCR?

dPCR umožňuje kvantifikáciu absolútneho množstva kópií v jednotlivých vzorkách na konci reakcie. Docieli sa to rozdelením vzorky na tisíce častí, ktoré sú analyzované oddelene. Fluorescenčný signál dPCR je binárny, buď kompartment „svieti“ (1, v jamke je templát) alebo „nesvieti“ (0, templát nie je v jamke). Pri qPCR je intenzita fluorescencie meraná kontinuálne počas celej reakcie. dPCR metóda absolútne kvantifikuje počet kópií DNA alebo RNA, čím sa eliminuje časovo aj metodicky náročnejšia relatívna kvantifikácia (pomocou štandardných kriviek, referenčných génov, ...). Eliminácia relatívnej kvantifikácie je praktická, keď pre analyt

nie je dostupný vhodný RG alebo kalibrátor. Keďže sa jednotlivé molekuly nukleových kyselín od seba oddeľujú, každá sa amplifikuje samostatne a nedochádza k prednostnej amplifikácii najpočetnejších nukleových kyselín, teda nie je potrebné brať do úvahy efektívnosť amplifikácie jednotlivých sledovaných génov.

Väčšina dPCR systémov umožňuje simultánne detegovať emitovanú fluorescenciu z dvoch až piatich fluorescenčných farbív, čo je podobný počet ako pri qPCR prístrojoch. Multiplexovanie reakcií je však flexibilnejšie pri dPCR, keďže reakcie prebiehajú samostatne v kompartmentoch, a teda emisné spektrá fluorofórov sa pri dPCR môžu, na rozdiel od qPCR, prekrývať.

Pri dPCR môže byť kompartment vyhodnotený ako falošne pozitívny alebo falošne negatívny vplyvom nešpecifickej amplifikácie alebo komplikovanej interpretácie priemernej úrovne fluorescencie z kompartmentov, čo sťažuje určenie koncentrácie analytov.

V prípade, ak je qPCR experiment dobre navrhnutý, optimalizovaný a precízne prevedený, je možné získať excelentné a presné výsledky. Avšak je citlivejší k nepresnostiam a zmenám v každom kroku experimentu. Pri izolácii RNA z rôznych zdrojov sa v izoláte často nachádzajú kontaminanty. Kontaminanty môžu interagovať s *Taq* polymerázou, a teda zistené C_t nemusí skutočne odrážať množstvo nukleovej kyseliny vo vzorke, ale aj interakciu s kontaminantami. Riedenie vzorky zriedi aj množstvo kontaminantov, ktoré interagujú s reakčnou zmesou. Riedenie je však možné, len ak je množstvo nukleovej kyseliny vo vzorke dostatočne vysoké. Keďže dPCR nie je závislá od efektivity reakcie, ktorá môže byť ovplyvnená kontaminantami, efekt kontaminantov sa minimalizuje. Amplifikácia síce nie je taká efektívna, ako bez prítomnosti kontaminantov, ale kompartment je stále vyhodnotený ako pozitívny. Preto je dPCR vhodná alternatíva pri vzorkách, pre ktoré je typická vysoká miera inhibície PCR, ako sú napr. vzorky stolice. Takisto pri multiplexovaní v dPCR nie je potrebné pre každý sledovaný gén normalizovať viacero RG.

dPCR je v porovnaní s qPCR efektívnejšia pri detegovaní zriedkavých variantov v súbore DNA vzoriek s vysokou frekvenciou *wild-type* sekvencie. dPCR je efektívna metóda aj pri detekcii cirkulujúcej voľnej DNA (cfDNA, *cell free DNA*) v rôznych vzorkách, ako krv, spútum, stolica a cerebrospinálna tekutina, ale aj vo vzorkách fixovaných vo formalíne a zaliatych do parafínu, kde často dochádza k degradácii DNA. dPCR našla uplatnenie aj v génovej terapii, kde umožňuje absolútnu kvantifikáciu virálneho vektoru pred administráciou pacientovi a stanovenie počtu kópií v cieľovom tkanive, ale aj pri detekcii rôznych vírusových aj bakteriálnych nákaz.

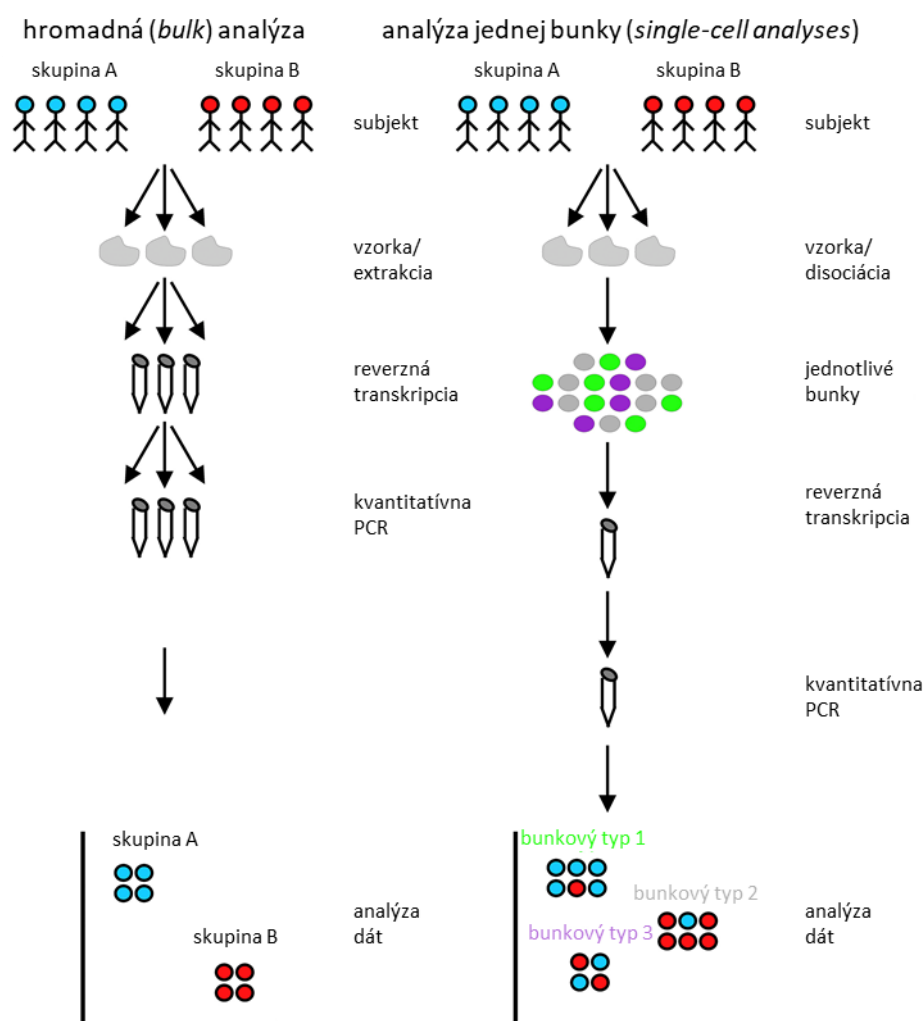
V súčasnosti sú celkové náklady na reakciu pri dPCR vyššie, než pri qPCR. V prípade, že je vzorka náchylná na inhibíciu amplifikácie resp. nie je dostupný vhodný RG alebo kalibrátor, dPCR je vhodná voľba. dPCR je aplikovateľná na široké spektrum problémov, ale otázka je či je potrebné ju aplikovať v prípadoch, keď je už qPCR optimalizovaná a poskytuje hodnoverné výsledky. V niektorých analýzach mala dPCR vyššiu špecifickosť, v niektorých rovnakú a v niektorých nižšiu než qPCR. Preto len experimentálne overenie aplikovateľnosti metódy zodpovie otázku či použiť qPCR alebo dPCR.

4.3 Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia jednej bunky (*Single-cell qPCR*)

Bunka je základná fyziologická a biologická jednotka, ktorá dokáže fungovať samostatne, ale aj ako súčasť tkanív a orgánov. Charakterizácia jednotlivých buniek na molekulárnej úrovni umožňuje pochopiť ich funkciu, ako interagujú s prostredím, alebo navzájom. qPCR je jedna z najvyužívateľnejších metód pre charakterizáciu jednotlivých buniek, či už na úrovni DNA alebo RNA. Bunky majú vysoko variabilné molekulárne profily, ktoré zodpovedajú interným a externým stimulom, čo robí každú bunku jedinečnou. Profily buniek sú dynamické, neustále sa adaptujúce na stále sa meniace mikroprostredie. Ich molekulárny profil odráža ich funkcie. Profilácia jednotlivých buniek umožňuje identifikovať alebo objaviť nové subtypy buniek, porozumieť ako presne bunky reagujú na stimuly, opísať heterogénnu kompozíciu tkanív a odhaliť bunkovo špecifické interakcie v rámci komplexných tkanív.

Využitie qPCR na analýzy jednotlivých buniek, a nie celých tkanív, je celkom priamočiare. Môžu byť použité bežné qPCR metodiky a prístroje so štandardným qPCR analyzujúcim programom. Kroky navyše sú zber jednotlivých buniek, preamplifikácia a modifikácia niektorých analýz. Obmedzenie je, že naraz môže byť analyzovaný limitovaný počet molekúl (zvyčajne maximálne 96), ak je potrebné analyzovať väčší počet, odporúča sa masívne paralelné sekvenovanie (NGS, *next generation sequencing*). Výhodou qPCR je jednoduchšia optimalizácia, čo prispieva k vyššej citlivosti a reprodukovateľnosti než pri NGS. Dáta získané z qPCR vie analyzovať bežný výskumník, nešpecialista. Vyhodnocovanie dát z NGS si už vyžaduje bioštatistika. Cena qPCR analýzy na vzorku je nižšia ako pri NGS, ak sa berú do úvahy všetky kroky prípravy. qPCR môže byť nahradená dPCR, čo však vedie k zvýšeniu ceny reakcie. Pri hromadnej analýze sa porovnávajú vzorky (napr. od pacientov, z bunkových kultúr) medzi sebou. Teda sa spriemerujú hodnoty množstva daného transkriptu v celej vzorke. Pri analýze jednotlivých buniek je možné porovnávať jednotlivé bunky

v jednom tkanive, porovnávať jednotlivé tkanivá navzájom, pričom dochádza k menšiemu skresleniu dát (Obrázok 4.10).



Obrázok 4.10 Porovnanie klasickej hromadnej analýzy a analýzy jednotlivých buniek. Pri hromadnej analýze sú porovnávané subjekty, pri analýze jednotlivých buniek sú porovnávané bunkové typy (upravené podľa Ståhlberg, Kubista, 2018).

Jednotlivé bunky môžu byť zozbierané niekoľkými technikami, najbežnejšie sú mikromanipulácia, laserová mikrodisekcia a prietoková cytometria. Pri charakterizácii molekulového profilu jednotlivej bunky je dôležitá charakterizácia v rámci jej jednotlivých častí a v rámci jej kompartmentov. Nástraha analýzy je, že sa pracuje s minimálnym množstvom cieľových molekúl, takže bunková lýza a reakcie musia byť maximálne efektívne s minimálnymi materiálovými stratami. Často je efektívnejšie cieľové bunkové populácie označiť pomocou génového konštruktu alebo protilátkou konjugovanou s fluorescenčným signálom.

Množstvo dostupných buniek je dôležitým faktorom pri výbere platformy pre analýzu jednotlivých buniek. Fluorescenčne aktivovaná prietoková cytometria (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) sa dá považovať za rýchlu a masívnu metódu z hľadiska spracovania buniek, ale požaduje na začiatok veľké množstvo buniek. Mikromanipulácia vie zachytiť všetky viabilné bunky, aj keď ich je len pár. Obe metódy zachytávajú živé bunky. Laserová mikrodisekcia zachová priestorové usporiadanie zozbieraných buniek, ale väčšinou vyžaduje fixáciu, čo je spojené so stratou analytov a degradáciou.

Molekuly sú väčšinou priamo izolované z intaktnej bunky. Enzymatické spracovanie buniek je prispôbené tomu, čo je potrebné izolovať. Miernejšie neiónové detergenty lyzujú len cytoplazmatickú membránu, čo umožňuje purifikovať RNA od obsahu jadra. Silnejšie detergenty lyzujú aj jadrovú membránu. Enzymatické spracovanie musí byť optimalizované aby došlo k purifikácii želaných molekúl a zároveň ďalšie analýzy neboli inhibované. Pri klasickej qPCR je nukleová kyselina z tkaniva alebo bunkovej kultúry purifikovaná na pevnej fáze (guličky, membrány v kolónkach). Pri analýzach jednotlivých buniek sú tieto metódy zriedka použité kvôli vysokým stratám analytov.

Analýza molekúl s nízkou koncentráciou si vyžaduje preamplifikáciu alebo detekciu viacerých cieľov naraz (*multiplexing*). Preamplifikácia väčšinou prebieha rovnako ako následná amplifikácia počas qPCR. Výsledky qPCR jednotlivých buniek môžu byť skreslené, podobne ako klasická qPCR, a to vplyvom prípravy vzoriek, reverznou transkripciou a samotnou qPCR. Preto je potrebné optimalizovať a normalizovať jednotlivé kroky. Pri klasickej qPCR sú expresné profily porovnané normalizovaním voči referenčným génom, čo však nie je aplikovateľné pri analýze jednotlivých buniek, pretože žiadna RNA alebo proteín nie je v bunke prítomný v konštantnom množstve vďaka časovým výkyvom. Preto sa výsledky normalizujú vzhľadom na bunku, či už ako relatívne množstvo konkrétneho transkriptu vzhľadom na celkové množstvo transkriptov alebo v absolútnom množstve v bunke.

qPCR analýza jednotlivých buniek, po dostatočnej optimalizácii, otvára nové možnosti výskumu a vyriešenia problémov, ktoré neboli riešiteľné štandardným prístupom. Metodika je robustná, flexibilná a môže byť implementovaná takmer v každej problematike a laboratóriu. qPCR analýza jednotlivých buniek by mohla pomôcť aj pri riešení klinických problémov, napr. prečo niektorí pacienti vôbec nereagujú na liečbu. Podľa posledných odhadov, 90 % liečiv je efektívnych len u 50 % pacientov. Jedným z dôvodov neefektivity môže byť bunková heterogenita, ktorá existuje v rámci, ale aj medzi pacientami, ktorí trpia rakovinou a inými komplexnými ochoreniami. Bunky sa môžu líšiť expresnými profilmi stoviek génov. Keď je

testovaný génový profil na úrovni populácií, intercelulárne variácie s funkčnou a klinickou relevanciou môžu byť zamaskované.

4.4 Mikročipy a RNA sekvenovanie

Za ostatné desaťročia sa vyvinuli metódy umožňujúce **celogenómovú kvantifikáciu génovej expresie**, teda charakterizáciu transkriptómu. **Mikročipová analýza** je metóda umožňujúca simultánne sledovať relatívnu koncentráciu viacerých DNA alebo RNA sekvencií. Prvé štúdie boli realizované pomocou mikročipov založených na hybridizácii. DNA čip funguje na princípe hybridizácie analyzovanej DNA k špecifickým nasyntetizovaným sekvenciám. Tieto sekvencie sú kovalentne alebo nekovalentne prichytené k povrchu čipov. Analyzovaná DNA je značená, napr. fluorescenčne. Na základe signálu z hybridizácie je meraná relatívna koncentrácia/počet sekvencií vo vzorke. Pri analýze génovej expresie musí byť RNA prepísaná do cDNA a následne sa hybridizuje k próbam na čipe. Čipy majú niekoľko nevýhod. Dopredu je potrebné poznať sekvenciu, ktorá má byť analyzovaná. Ak gén alebo jeho produkt nie sú v genóme ešte anotované, nie je možné ich pomocou mikročipov zachytiť. V prípade, že chceme analyzovať podobné sekvencie, resp. sa v genóme nachádzajú vysoko homológne sekvencie (napr. pseudogény) alebo alternatívne splicingové varianty, môže dôjsť ku krížovej hybridizácii. Zachytenie konkrétneho zostrihového variantu je možné napríklad navrhnutím prób ku spojom exónov. Problematická môže byť aj presná kvantifikácia vysoko exprimovaných a slabo exprimovaných génov. V dôsledku kinetiky hybridizácie nie je intenzita signálu stále lineárne závislá od počtu kópií hybridizujúcich na mikročip. Pri istej koncentrácii hybridizujúcich sa sekvencií dochádza k saturovaniu reakcie a intenzita fluorescenčného signálu už nerastie s rastúcim počtom kópií. Naopak pri nízkych koncentráciách sekvencií nemusí dochádzať k naviazaniu. Teda intenzita signálu je lineárna len v obmedzenom intervale koncentrácií sledovaných molekúl v roztoku.

Napriek nevýhodám mikročipov, je to stále spoľahlivá metóda pre simultánne analyzovanie tisícov transkriptov. Viedla k objasneniu širokého spektra biologických problémov, vrátane vývojových procesov, k identifikácii génov, ktoré sa exprimujú rozdielne v prípade patologických stavov či k rozvoju farmakogenomiky.

Sekvenačné techniky, na rozdiel od hybridizačných techník, priamo určujú sekvenciu transkriptu. Najprv sa na analýzu cDNA používalo Sangerove sekvenovanie. K cDNA boli pridávané podľa metodík rôzne značky (EST – *expressed sequence tag*, SAGE – *serial analysis of gene expression*, CAGE – *cap analyses gene expression*), pričom sa pripravila expresná knižnica, ktorá sa následne sekvenovala. Táto metóda umožňuje priamo určiť počet kópií

mRNA transkriptu, čo poskytuje výhodu v porovnaní s mikročipovými metódami. RNA sekvenovanie pomocou automatizovanej Sangerovej metódy vyžaduje veľké množstvo vstupnej RNA a je pomerne cenovo náročné.

Rozvoj masívneho paralelného sekvenovania spôsobil revolúciu v transkriptomike. RNA sekvenovanie použitím NGS umožňuje detailnejší pohľad na génovú expresiu, alternatívny zostrih a alelovo špecifickú expresiu. RNA-seq predstavuje metódu, ktorá by mohla nahradiť mikročipy pri celogenómových analýzach transkriptómu.

Hlavná výhoda RNA sekvenovania je schopnosť rozlíšiť transkripty líšiace sa len jedným nukleotidom. Tým je možné presne charakterizovať úroveň expresie jednotlivých alel v heterozygotných lokusoch a identifikovať **alelovo špecifickú expresiu** (ASE, *allele-specific expression*). Avšak vyhodnocovanie RNA-seq dát predstavuje algoritmickú aj logistickú výzvu. Bolo vyvinutých niekoľko počítačových metód na priradovanie čítaní (*reads*), kvantifikáciu génov a/alebo transkriptov, identifikáciu diferenciálne exprimovaných génov, ale aj medzi nimi existuje veľká variabilita vo výstupoch analýz.

4.5 Vybrané aplikácie kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie

4.5.1 Detekcia infekčných agensov

Skorá detekcia infekčného ochorenia môže byť rozhodujúca pri liečbe pacienta. Infekčné agensy môžu byť identifikované priamym vyšetrením postihnutého tkaniva, detekciou antigénov patogénnych agensov, kultiváciou a izoláciou agensov alebo stanovením sérologickej odpovede infikovaného jedinca. Tieto prístupy sú stále využívané v diagnostike a sú dôležité pri správnom liečebnom postupe. Zavedenie PCR, vrátane RT-qPCR, však zmenilo detekciu a diagnostiku infekčných agensov. Stanovenie množstva infekčného agensu je cenný prognostický nástroj či spôsob monitorovania efektivity terapie.

SARS-CoV-2 spôsobuje ťažký akútny respiračný syndróm. Najčastejšie bežné prejavy ochorenia sú: horúčka (takmer vždy), kašeľ, slabosť a únava. Najčastejšie komplikácie vedúce k vážnym prejavom ochorenia sú akútny respiračný syndróm (dýchavičnosť), zápal a zlyhávanie pľúc, septický šok, poškodenia obličiek, poškodenia srdca, sekundárne bakteriálne a plesňové infekcie a multiorgánové zlyhanie.

Kvantitatívna PCR s reverznou transkripciou je celosvetovo používaná na analýzu vzoriek od pacientov, ktorí majú symptómy ochorenia alebo boli v kontakte s infikovaným jedincom. Primery musia byť špecificky a precízne navrhnuté, aby nedochádzalo k falošne pozitívnym reakciám na základe krížovej reaktivity s príbuznými kmeňmi. Rôzne krajiny

a inštitúcie používajú rôzny počet prób k cieľovým sekvenciám. Próby sú väčšinou navrhnuté na sekvencie štrukturálnych génov (ako sú *S*, *E* a *N* gény), ktoré citlivejšie detegujú koronavírus, a tiež na sekvencie druhovo špecifických génov (gén pre RNA-závislú RNA polymerázu (RdRp), *ORF1a* a *ORF1b*), ktoré sú špecifické pre SARS-CoV-2.

Presnejším diagnostickým testom než RT-qPCR je masívne paralelné sekvenovanie, ktoré je však finančne aj časovo náročné a nemôže byť použité ako skríningový nástroj. Preto sa RT-qPCR stala zlatým štandardom pri diagnostike SARS-CoV-2, aj napriek riziku falošne pozitívnych či negatívnych výsledkov. Faktory, ktoré môžu vplývať na presnosť testu sú spôsob odberu (výtery z nosa alebo nosohltanu, bronchoalveolárna laváž, odber z výkalov, slín a sputa), ako aj miera s akou vírus mutuje. Nie je dôležitá len frekvencia mutácií, ale aj ich lokalizácia v genóme. Ak zmutuje oblasť kde nasadajú primery a próby použité v qPCR, špecifickosť a efektivita testu sa zmení. Tento problém sa dá eliminovať multiplexovaním – návrhom viacerých primerových párov a prób používaných súčasne.

Síce sa RT-qPCR používa celosvetovo na detekciu SARS-CoV-2, podmienky reakcie, používané chemikálie, protokoly a kedy je výsledok považovaný za pozitívny, je nastavený v rôznych krajinách rôzne. Citlivosť testu (*LoD*, *limit of detection*) závisí od jeho konkrétneho dizajnu a prevedenia. Ďalším faktorom je množstvo biologického materiálu, ktoré sa analyzuje. Typ a spôsob odberu vzorky, čas od infekcie, závažnosť priebehu ochorenia ovplyvňujú množstvo vírusovej RNA vo vzorkách. Vytvorenie štandardného protokolu, ktorý by sa jednotne používal celosvetovo, by prinieslo údaje priamo porovnateľné medzi jednotlivými krajinami.

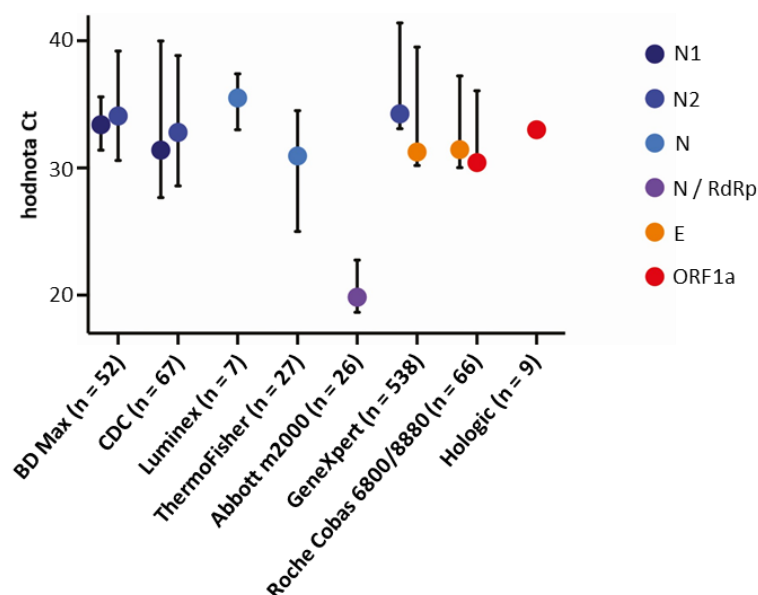
Pri tvorení takéhoto protokolu, nielen v prípade detekcie SARS-CoV-2 sú dôležité viaceré parametre. Prvým je hodnota *Ct*, teda cyklus, pri ktorom fluorescenčný signál vzorky prekročí dopredu stanovený prah. Inak povedané je to počet cyklov potrebných na amplifikáciu vírusovej RNA, aby dosiahla detegovateľné množstvo. Hodnota *Ct* závisí od počtu kópií cieľovej sekvencie (napr. počet kópií SARS-Cov-2), čím je tam viac kópií, tým je *Ct* nižšie, a naopak čím je tam menej kópií, tým je *Ct* vyššie. Za *Ct* je zvyčajne stanovený 25. – 28. cyklus. Ak je signál významný v neskorších cykloch ako v 28., predpokladá sa, že signál môže byť z nešpecifických sekvencií vďaka postupnej degradácii a inaktivácii *Taq* polymerázy. Vo všeobecnosti sa hodnoty *Ct* nad 40 považujú za negatívny výsledok, ale nie je to jednotné v každom laboratóriu.

Niektoré laboratória pri výsledku testu uvádzajú hodnotu *Ct*, niektoré len či je výsledok pozitívny alebo negatívny. Zároveň neboli výsledky porovnané medzi jednotlivými protokolmi, jednotlivými komerčnými súpravami, teplotnými cyklovačmi, atď., preto je veľmi ťažké

porovnávať tieto výsledky a uzatvárať klinicky aplikovateľné závery. CAP (*College of American Pathologists*) upozornili, že metóda odberu materiálu, zdroj biologického materiálu, spôsob uskladnenia a transportu, rozmrazenie a zamrazovanie vzoriek, čas od odberu po analýzu a čas od infikovania po odber vzoriek môžu ovplyvniť množstvo vírusovej RNA, ktorá bude detegovaná, a teda hodnota Ct bude variabilne ovplyvnené týmito faktormi. K 25. aprílu 2020 bolo komerčne dostupných 480 validovaných diagnostických testov. Neexistuje žiadny referenčný štandard, ktorý by bol celosvetovo dostupný, a na základe ktorého by sa validovali kvantitatívne eseje, a teda sa generovali dáta, ktoré sú navzájom porovnateľné. Ct hodnoty dokonca významne varíujú medzi metódami, ale aj v rámci metód. CAP poslali pripravené rovnaké vzorky do viac ako 700 laboratórií (Obrázok 4.11). Mediány hodnoty Ct boli medzi rôznymi protokolmi rozdielne, pričom rozdiel bol aj 14 cyklov. Ak sa použil rovnaký prístroj a rovnaká komerčná súprava, ale cieľová sekvencia (na ktorú časť SARS-CoV-2 genómu bola navrhnutá próba) bola rozdielna, rozdiel bol tri cykly. Rozdiely medzi laboratóriami, ktoré používali tie isté prístroje aj komerčné súpravy boli v niektorých prípadoch až 12 cyklov.

Samozrejme, vo všeobecnosti vzorky, ktoré obsahujú menej vírusovej RNA majú vyššie hodnoty Ct a naopak. Tak isto sa dá predpokladať, že ak je vírusová nálož vyššia, tak aj priebeh ochorenia môže byť závažnejší, ale pri momentálne nastavených protokoloch a postupoch nie je možné priamo aplikovať hodnoty Ct do klinickej praxe ako nástroj pre stratifikáciu závažnosti infekcie SARS-CoV-2. Metóda RT-qPCR je pravdepodobne najpraktickejšia metóda detekcie infekcie SARS-CoV-2, ale pre presné a výpovedné výsledky, ktoré môžu byť porovnané celosvetovo, je potrebná štandardizácia a validácia protokolov.

Digitálna PCR bola využitá aj na detekciu SARS-CoV-2 a dáta boli porovnané s výsledkami získanými z tých istých vzoriek, ale pomocou RT-qPCR. dPCR testovanie vykazovalo spoľahlivejšie výsledky, pričom senzitivita dPCR bola 94 % v porovnaní 40 % pre RT-qPCR. Výsledkami ilustrovali, že je možná aplikácia dPCR aj do virálnej diagnostiky, hlavne v situáciách, keď je vírusová nálož nízka a zároveň sa eliminuje miera falošne negatívnych výsledkov. Zatiaľ, čo kvantifikácia pomocou qPCR závisí od použitých primerov a prób (Obrázok 4.11), dPCR prináša stále porovnateľné výsledky nezávisle od použitých primerov, dokonca aj v ich suboptimálnom množstve bez straty citlivosti. Nevýhoda je, že kvôli cene nie je možné dPCR rutinne zaviesť do diagnostickej praxe. Riešením by však bolo kvantifikovať štandardizovanú vzorku SARS-CoV-2 RNA digitálnou PCR, a to použiť ako kalibračný štandard pri stanovaní kvantity RNA vo vzorkách pomocou qPCR.



Obrázok 4.11 Hodnoty Ct pre vybrané cieľové génové transkripty v diagnostike SARS-CoV-2. Biologický materiál pochádzal z rovnakej dávky a bol analyzovaný rôznymi komerčne dostupnými chemikáliami a platformami v rôznych laboratóriách. Medián Ct hodnôt je vyznačený farebným krúžkom, rozmedzie hodnôt je vyznačené úsečkami, n – počet respondentov realizujúcich analýzu, Ct – prahový cyklus (upravené podľa Rhoads a spol., 2021).

Využitie dPCR v klinickej mikrobiológii vo všeobecnosti spočíva v kvantifikácii dávky patogénu (aj pri nízkych dávkach, aj bez dostupnosti referenčnej vzorky), na kalibráciu referenčných štandardov pre qPCR, detekcii zriedkavých mutácií a alel a detekcii genomických editácií. Digitálna PCR už bola použitá na kvantifikáciu viacerých vírusov, vrátane HIV, cytomegalovírusu, vírusu hepatitídy B, C a E, JC polyomavírusu, ľudského papillomavírusu, ľudského T-lymfotropického vírusu, ľudského rinovírusu a ľudského parechovírusu typu 3. Z baktérií boli kvantifikované *Mycobacterium tuberculosis* a *Helicobacter pylori*, z protozoa *Plasmodium malariae*. Zoznam mikroorganizmov, ktoré boli pomocou dPCR úspešne detegované a kvantifikované sa neustále rozrastá.

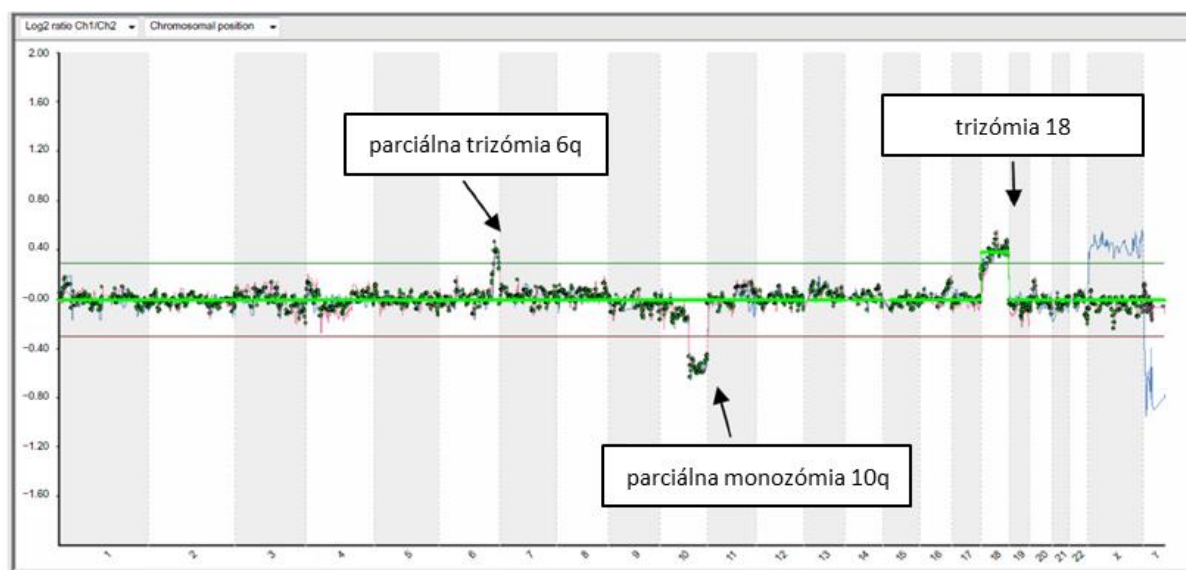
4.5.2 Predimplantačné genetické testovanie aneuploidii a genotypizácia reprodukčných strát

In vitro fertilizácia (IVF) zmenila reprodukčnú medicínu. Vyšetrenie embryí na prítomnosť **aneuploidii** (PGS, *preimplantation genetic testing for aneuploidy*) je najčastejší genetický test pred embryonálnym transferom pri IVF. Chromozomálne aneuploidie sú najčastejším dôvodom reprodukčných strát. Metodiky PGS umožňujú odobrať vzorku trofektodermu zo skorých kultivovaných embryí a určiť kompozíciu genómu embrya. PGS analyzuje bunky, z ktorých sa vyvinie placenta. Keďže s istou mierou dochádza k mitotickej disjunkcii počas embryonálneho

vývoja, výsledky PGS odobratých embryonálnych buniek sa v niektorých prípadoch môžu líšiť od skutočnej kompozície genómu plodu.

Existuje niekoľko diagnostických možností, ktorými je možné otestovať všetkých 23 chromozómových párov, či už detegovať chromozómové aberácie alebo génové mutácie. Najčastejšie sa používajú qPCR, mikročipy a NGS.

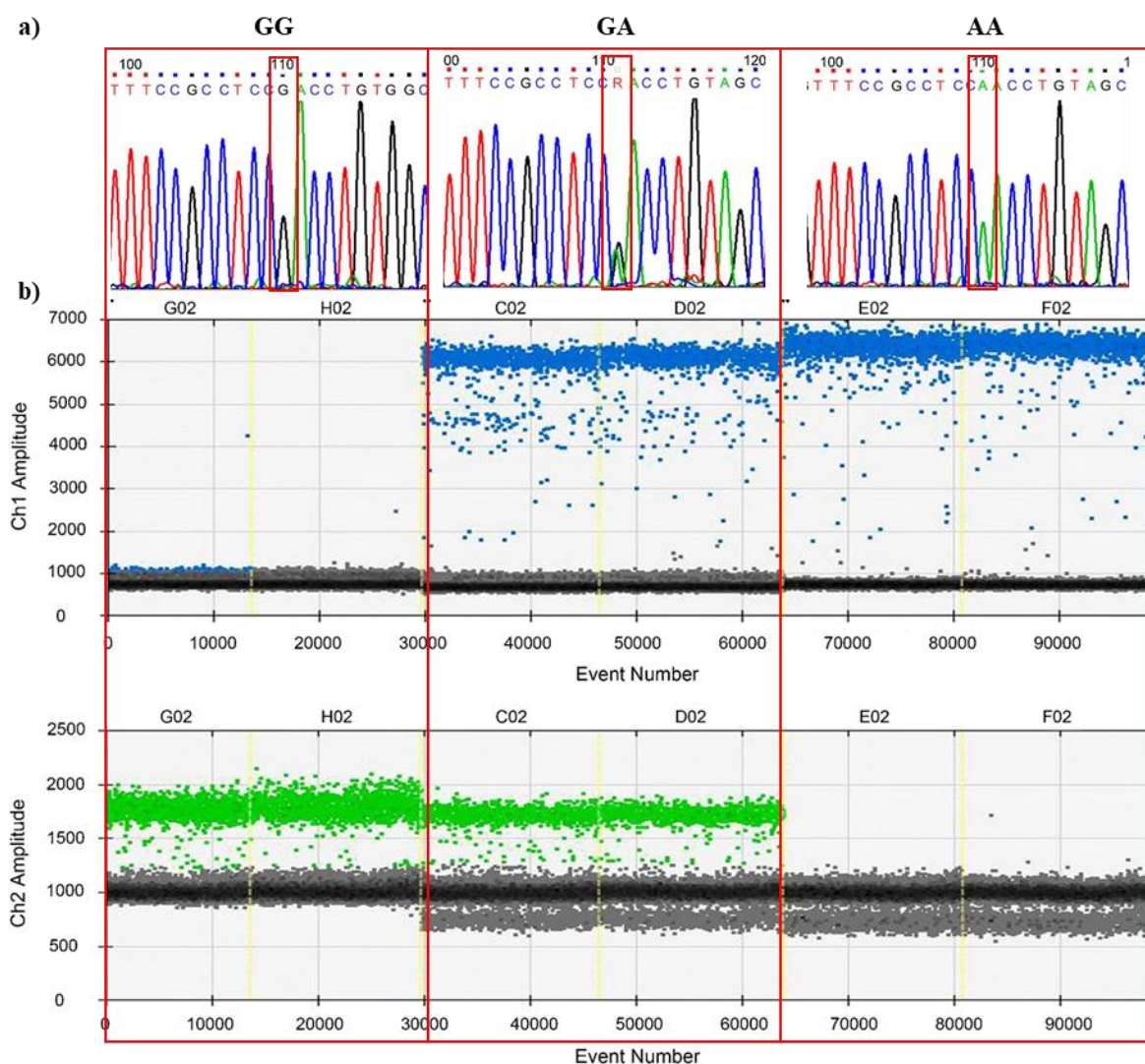
Na genetické testovanie sa používajú dva typy mikročipov – SNP (jednonukleotidové polymorfizmy, vysoko variabilné v genóme) a **komparatívna genomická hybridizácia** (CGH). SNP mikročipmi je možné identifikovať chromozómové aneuploidie, niektoré štrukturálne chromozómové aberácie a uniparentálnu dizómiu. Triploidiu nie je možné detegovať. CGH testuje približne 4000 markerov (duplikátne) rozmiestnených v celom genóme. Pri CGH sa vzorky porovnávajú so vzorkami normálnych genómov, 46,XY a 46,XX. CGH nerozlíši triploidie ani uniparentálnu dizómiu. Identifikuje len chromozómové aneuploidie, a nie štrukturálne zmeny chromozómov (napr. balansované translokácie, inverzie, atď.) (Obrázok 4.12).



Obrázok 4.12 Výsledok komparatívnej genomickej hybridizácie na čipe. Vzorka má parciálnu trizómiu dlhého ramienka 6. chromozómu, parciálnu monozómiu dlhého ramienka 10. chromozómu a je trizomická pre 18. chromozóm.

V prípade, že je podozrenie na genómové prestavby nezachytiteľné spomenutými metódami, je stále možné uplatniť **fluorescenčnú *in situ* hybridizáciu** (FISH), ktorá ako prvá vôbec umožnila predimplantačné analýzy. Kvantitatívna PCR umožňuje zachytenie chromozómovým aneuploidii detegovaním počtu kópií analyzovaných chromozómov. qPCR porovnáva tri alebo štyri amplikóny konkrétnych lokusov rozptýlených po chromozóme vzhľadom na referenčný gén na tom istom chromozóme. Pomocou qPCR je možné zachytiť

triploidiu alebo monozómiu, nie je však možné identifikovať štrukturálne chromozómové aberácie alebo uniparentálnu dizómiu. Výhodou analýzy je jej rýchlosť, 96 lokusov (4 na každom chromozóme) je zanalyzovaných za 4 hodiny (v porovnaní s 12 hodinami pri použití CGH). Potenciál dPCR v prenatalnej a postnatálnej diagnostike sa neustále verifikuje na už zavedených protokoloch pre rozmanité spektrum ochorení (Obrázok 4.13).



Obrázok 4.13 Prenatálna neinvazívna detekcia genotypu (GG/GA/AA) v géne PAH (fenylalanin hydroxyláza) vo voľne cirkulujúcej fetálnej DNA. a) stanovenie genotypu Sangerovým sekvenovaním, b) stanovenie genotypu digitálnou dropletovou PCR. Alela A je klasifikovaná ako patogénna v prípade fenylketonúrie (upravené podľa Yan a spol., 2019).

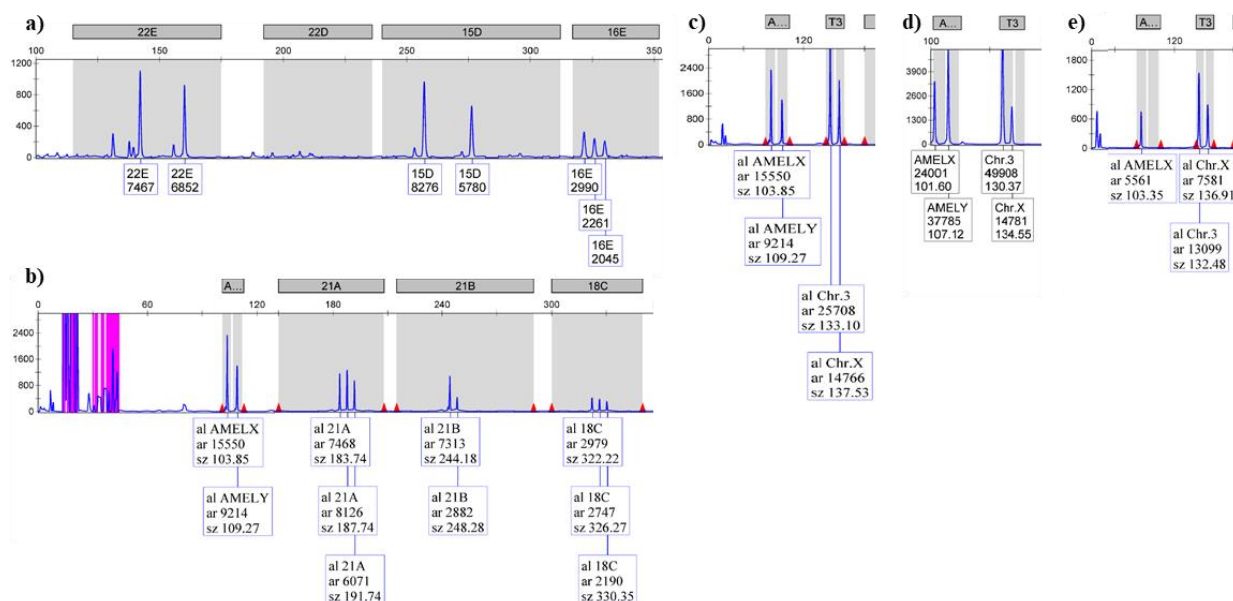
PGS je možné aj pomocou **masívneho paralelného sekvenovania**, a to konkrétne MiSeq (Illumina) a Personal Genome Machine (PGM, Thermo-Fisher Scientific). Prvé klinické štúdie ilustrujú, že použitím NGS metód je možné v porovnaní s CGH presnejšie detegovať parciálne aneuploidie, nebalansované translokácie, a aj mozaiky.

Napriek rozvoju mikročipov, NGS a iných metód je stále zlatým štandardom v prenatalnej aj postnatalnej diagnostike karyotypizácia kultivovaných amniotických buniek. Táto metóda síce umožňuje zachytiť numerické aj štrukturálne zmeny, je však časovo náročná (dĺžka analýzy dva až tri týždne).

Tabuľka 4.1 Porovnanie PGS (*preimplantation genetic testing for aneuploidy*) technológií. SNP - jednonukleotidový polymorfizmus, aCGH - komparatívna genomická hybridizácia na čipoch, qPCR - kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia, NGS - masívne paralelné sekvenovanie, PGM - *Personal Genome Machine*.

	SNP	aCGH	qPCR	MiSeq NGS	PGM NGS
chromozómové aneuploidie	✓	✓	✓	✓	✓
mozaicizmus	✓	pri cca 50 %	X	✓	✓
triploidia	závisí od DNA kvality	X	✓	✓	✓
veľké delécie alebo duplikácie (>50Mb)	✓	X	X	nenavrhnutý s tým cieľom	✓
klinicky významné delécie alebo duplikácie	závisí od veľkosti a chromozómovej lokalizácie	X	X	X	✓
uniparentálna dizómia	✓	X	X	✓	✓
počet mitochondriálnych kópií	X	X	✓	✓	✓

Alternatívna metóda je **kvantitatívna fluorescenčná PCR (QF-PCR)**. Výhodou QF-PCR je rýchlosť, nízke finančné náklady a vysoká presnosť. Analyzuje sa amniotická tekutina alebo vzorka choriových klkov, pričom kultivácia buniek nie je potrebná. Pri QF-PCR sa analyzujú **krátke tandemové opakovania** (STR, *short tandem repeats*). STR (mikrosatelity) sú repetitívne sekvencie s dĺžkou dva až šesť nukleotidov rozptýlené v genóme. Sekvencie sú v populácii vysoko polymorfné. Vďaka súčasnej analýze viacerých STR je možné presne identifikovať jedincov, čo sa využíva v testoch paternity, forenzných prípadoch či v populačných štúdiách. STR môžu byť amplifikované pomocou fluorescenčne značených primerov. Amplifikované produkty sú analyzované **v kapilárnej elektroforéze** (napr. Genetický Analyzátor ABI PRISM 3130xl), pričom je možné určiť veľkosť produktov, heterozygotnosť a počet kópií v analyzovaných lokusoch. Na základe analýzy je možné detegovať aneuploidie alebo parentálne dizómie (Obrázok 4.14). V prípade prenatalnej diagnostiky sa analyzujú STR na chromozómoch 13, 18, 21, X a Y (Devyser Complete). V prípade opakovaných reprodukčných strát je analýza rozšírená na chromozómy 13, 15, 16, 18, 21, 22, X a Y (Devyser Extend).



Obrázok 4.14 Genotypizácia krátkych tandemových opakovaní (STR) kvantitatívnou fluorescenčnou polymerázovou reakciou (QF-PCR), a) trizómia 16. chromozómu, b) triploidia, c) XXY, d)XXY, e) X0 (Turnerov syndróm)

4.5.3 Využitie qPCR a dPCR na zachytenie počtu kópií DNA fragmentov

Kvantitatívna PCR sa rutinne využíva na stanovenie počtu kópií génov v genóme. Tento prístup sa využil pri stanovení počtu kópií *SMN1* a *SMN2* pri spinálnej muskulárnej atrofii, pri kvantifikácii *CFTR* transkriptov pri cystickej fibróze, pri determinácii miery *HER-2* amplifikácie v ľudskom karcinóme prsníka a pri nespočetnom množstve iných ochorení. Na stanovenie počtu kópií je možné použiť fluorescenčné próby alebo interkalačné farbivá. Vo všeobecnosti sú nádorové bunky geneticky nestabilné s vysokou frekvenciou vzniku nových mutácií, ktoré sa však nachádzajú len v časti nádorových buniek, pričom detekcia týchto mutácií môže napomôcť k navrhnutiu personalizovanej liečby. Metóda dPCR je vhodná alternatíva zachytenia takýchto sekvencií s nízkou frekvenciou. Výborným príkladom je nemalobunkový karcinóm pľúc. Nádorové bunky s aktivačnou mutáciou v géne *EGFR* (receptor pre epidermálny rastový faktor) sú citlivé na liečbu inhibítorom tyrozín kináz. Avšak po liečbe často nastane relaps a to v dôsledku vzniku druhej mutácie v géne pre kinázu, ktorá má byť liečbou inhibovaná (*gatekeeper mutation*). Metóda dPCR umožňuje skorý záchyt tejto mutácie spôsobujúcej rezistenciu na liečbu a môže mať aj potenciál pri sledovaní progresie ochorenia a pri nastavovaní liečby.

Variabilita počtu kópií (*CNV* – *copy number variation*) je štruktúrna variabilita genómu, pričom dochádza k delícii alebo duplikácii úsekov DNA dlhších viac ako 1 kb. Teda počet kópií daného fragmentu sa môže medzi jednotlivcami líšiť. CNV prispievajú k **genetickej variabilite**

jedincov rovnakého druhu. Medzinárodný projekt **HapMap** stanovil, že 12 % ľudského genómu je tvorených CNV. Dokonca sa zistilo, že genómy dvoch jedincov obsahujú viac CNV než substitúcií jedného nukleotidu. Regióny obsiahnuté v týchto fragmentoch môžu a nemusia obsahovať gény. Väčšina CNV sa nachádza v nekódujúcich oblastiach. Zmeny v počte kópií môžu byť, ale nemusia byť asociované so zmenou fenotypu. Niektoré CNV však majú vplyv na génovú expresiu a organizáciu chromatinu.

Polymorfizmy počtu kópií (CNP – *copy number polymorphism*) sú v populácii bežné, ich frekvencia výskytu je viac ako 1 %. CNP sú väčšinou krátke (menej ako 10 kb), často zahŕňajú gény kódujúce proteíny s úlohou v detoxifikácii látok alebo v imunite. CNP asociované s génmi imunitnej odpovede sú spájané s rozvojom komplexných genetických ochorení ako psoriáza, Crohnova choroba a glomerulonefritída. Druhá skupina CNV zahŕňa varianty, ktoré sú dlhšie, od niekoľko stoviek tisíc až po milión báz. Tie sú v populácii menej časté, väčšinou majú pôvod v rodine a vznikli počas spermiogenézy alebo oogenézy. Tieto veľké CNV boli pozorované u pacientov s mentálnou retardáciou, zaostávaním vývoja, schizofréniou a autizmom.

Metódou qPCR je možné určiť počet kópií analyzovaného CNV. Pomocou qPCR sa amplifikuje testovaný lokus s neznámym počtom kópií a referenčný lokus so známym počtom kópií. Počet kópií sledovaného lokusu sa kvantifikuje relatívne. Pre presné stanovenie počtu kópií pomocou qPCR je potrebný vysoký počet replikátov, napr. pre odlišenie štyroch a piatich kópií je potrebné analyzovať až 18 replikátov. V prípade, ak nie sú hodnoty relatívnej kvantifikácie celé čísla (napr. 1,3), môže byť interpretácia výsledku zložitá. Citlivosť dPCR je vyššia, rozlíšenie počtov kópií vyžaduje menší počet replikátov, ktorý závisí od návrhu experimentu. Metódou dPCR je možná absolútna kvantifikácia počtu kópií.

V prípade, že sú duplikácie/inzercie malé (menej ako 100 bp), v repetitívnom regióne alebo nie sú v genóme unikátnymi sekvenciami, môže byť návrh primerov pre qPCR náročný. Výsledok môže byť skreslený aj bunkovým mozaicizmom. Takisto ako pri ostatných metodikách založených na PCR, kvalita vstupnej DNA môže výrazne ovplyvniť výsledky analýz. Veľmi často sú práve biopsie nádorového tkaniva fixované formalínom a zaliate do parafrínu (FFPE) pre potreby histo- a imunohistochemických analýz. Takýto spôsob spracovania biologického materiálu výrazne poškodzuje genomickú DNA a samotné chemikálie použité na fixáciu následne inhibujú PCR. Analýza FFPE tkaniva pomocou qPCR môže viesť k nepresnému určeniu počtu kópií. dPCR je však rezistentná voči inhibítorom a môže poskytnúť spoľahlivú kvantifikáciu aj pri tomto type vzoriek, napriek nízkej kvalite vzoriek. Citlivosť a špecificita dPCR je rovnaká ako pri rutinne používaných metódach

vyšetrovania nádorového tkaniva (imunohistochemia a fluorescenčná *in-situ* hybridizácia – FISH). Aplikácia dPCR si v takýchto prípadoch nevyžaduje zapojenie expertného patológa pri rutinných vyšetreniach, len diagnostika vyškoleného pre prácu s dPCR.

4.5.4 Využitie qPCR a dPCR pri tekutej biopsii

Tekutá biopsia je neinvazívna metóda diagnostiky a monitorovania priebehu ochorenia, vrátane rakoviny. Štandardne sa odoberá biopsia postihnutého tkaniva, ktorá je však invazívny zákrok a je spojená s rizikom infekcií, poškodenia ciev a nervov. V prípade tekutej biopsie sú hlavne z krvi alebo poprípade inej tekutiny zachytené cirkulujúce nádorové bunky (CTC – *circulating tumor cell*), voľná cirkulujúca DNA (cfDNA – *cell-free DNA*) alebo cirkulujúca nádorová DNA (ctDNA – *circulating tumor DNA*). cfDNA sú fragmenty DNA, ktoré sa primárne uvoľnili z apoptických a nekrotických buniek. Vo všeobecnosti je progresia tumorov znásobená cirkulujúcimi nádorovými bunkami, ktoré sa uvoľňujú z primárnych nádorov a tvoria metastázy. A práve problematickosť zacielenia liečiv priamo na nádor, ale aj na distálne metastázy je hlavným dôvodom vplývajúcim na mieru prežívania onkologických pacientov. Analýza cfDNA môže byť užitočná pri širokom spektre ochorení, vrátane rakoviny, cukrovky, infarktoch myokardu alebo pri monitorovaní úspešnosti transplantácie orgánov. V prípade rakoviny sa označuje cfDNA, ktorá pochádza z nádorových buniek a je pre ne špecifická, ako ctDNA. V krvi sú cfDNA, ctDNA a CTC v malom množstve a navyše je cirkulujúca DNA výrazne fragmentovaná. Zároveň je pre nádorové tkanivo typická genetická heterogenita. Tekutá biopsia umožňuje monitorovanie efektívnosti liečby, genetických zmien v nádoroch, skrínovať pacientov v remisii a detegovať rast nového nádorového tkaniva ešte pred objavením fyzických symptómov, či rutinne skrínovať vysokorizikových pacientov. Zavedenie dPCR umožnilo detekciu cirkulujúcej DNA s ešte vyššou senzitivitou, v kratšom čase a bez potreby vysokého počtu replikátov.

Približne 50 % melanómov má mutáciu v onkogéne B-Raf a liečba je založená na BRAF inhibítoroch. Množstvo cirkulujúcej cfDNA s mutáciou je veľmi nízke (menej ako 0,01 % z celkového množstva). dPCR je schopná zachytiť fragmenty s danou mutáciou aj pri frekvencii 0,005 %, čo umožňuje monitorovať úspešnosť liečby inhibítormi (znižujúce sa množstvá korelujú s účinnou liečbou, zvyšujúce sa množstvá s rozvojom rezistencie na liečbu), a teda identifikovať pacientov, ktorý z liečby benefitujú.

Post-operačný relaps pri rakovine prsníkov nie je výnimočný, preto sa často po operácii pokračuje s radiáciou a/alebo chemoterapiou s cieľom zničiť reziduálne nádorové bunky. Postoperačne sa ctDNA digitálnou PCR zachytila v krvi u 50 % vyšetrených žien, čo naznačuje

možnú prítomnosť mikrometastáz a využitie tejto metódy na stanovenie rizika post-operačného relapsu a zvolenie vhodného liečebného postupu.

Extravezikulárne vezikuly (EV) sú vaky derivované z cytoplazmatickej membrány o veľkosti od 50 nm do 1 μ m. EV obsahujú biologicky aktívne molekuly (kargo), ako sú proteíny a RNA, ktoré sprostredkovávajú medzibunkovú komunikáciu. Zároveň EV obsahujú na svojom povrchu rovnaké markery aké majú bunky, z ktorých pochádzajú. EV sú uvoľňované a detekovateľné v telesných tekutinách, ako plazma, moč a bronchio-alveolárnej tekutine. Kargové molekuly EV sa ukazujú ako potenciálne biomarkery v diagnostických a prognostických metódach pri rakovine a metastázach, zápalových procesoch a metabolických ochoreniach. Detekcia RNA, konkrétne miRNA v EV v telových tekutinách, pomocou RT-qPCR bola navrhnutá ako nový diagnostický nástroj pri rôznych ochoreniach.

Pri *diabetes mellitus* prvého typu (DM1) dochádza k autoimunitnej reakcii, ktorá zničí beta bunky pankreasu, čo vedie k zníženému množstvu cirkulujúceho inzulínu. Predpokladá sa, že k progresívnej deštrukcii buniek dochádza počas dlhšieho obdobia, bez zjavných prejavov, až kým väčšina beta buniek nie je zničená. U pacientov, ktorí mali vysoké riziko rozvoja DM1, a neskôr sa im aj rozvinul, bolo dPCR v krvi zachytené zvýšené množstvo nemetylovanej DNA pochádzajúcej z génu pre inzulín v porovnaní s kontrolami. Nemetylovaná cfDNA sa zrejme uvoľnila z beta buniek po ich deštrukcii, a predpokladá sa, že tento jav môže byť epizódny. Rozvoj a progresia DM1 sa zvyčajne monitoruje kvantifikáciou protilátok, ako markerov autoimunity voči beta bunkám. Štúdie však naznačujú, že digitálna PCR by mohla umožniť včasnejšiu diagnostiku ochorenia.

Po transplantácii orgánov je potrebná imunosupresívna terapia, pre zníženie rizika odmietnutia orgánu imunitným systémom pacienta. Imunosupresívna terapia môže mať závažné vedľajšie efekty (infekcie, malígne neoplazmy, renálne dysfunkcie, ...). Skorá detekcia odmietnutia a poškodenia môže výrazne zvýšiť kvalitu života a prežitie pacienta. Súčasné prístupy zahŕňajú biopsie transplantovaných orgánov a sledovanie markerov poškodenia tkaniva (napr. kreatinín kináza). Kombináciou mikročipovej analýzy, masívneho paralelného sekvenovania a dPCR sa podarilo monitorovať pacienta po transplantácii pomocou kvantifikácie množstva DNA obsahujúcej SNP charakteristické pre recipienta orgánu a DNA obsahujúcej SNP charakteristické pre donora orgánu. Zvýšenie podielu DNA so SNP donora v krvi môže znamenať zvýšenú mieru bunkovej smrti v transplantovanom orgáne.

Literatúra

- Brezina, P. R., Anchan, R., & Kearns, W. G. (2016). Preimplantation genetic testing for aneuploidy: What technology should you use and what are the differences? **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, *33*(7). <https://doi.org/10.1007/S10815-016-0740-2>
- Bumgarner, R. (2013). DNA microarrays: Types, applications, and their future. **Current Protocols in Molecular Biology**. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2201s101>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., et al. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**. <https://doi.org/10.1373/clincnem.2008.112797>
- Bustin, S. A., & Nolan, T. (2017). Talking the talk, but not walking the walk: RT-qPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular research. **European Journal of Clinical Investigation**. <https://doi.org/10.1111/eci.12801>
- Chapman, J. R., & Waldenström, J. (2015). With reference to reference genes: A systematic review of endogenous controls in gene expression studies. **PLOS One**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141853>
- Chervoneva, I., Li, Y., Schulz, S., Croker, S., Wilson, C., & Waldman, S. A. (2010). Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. **BMC Bioinformatics**. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-253>
- Derveaux, S., Vandesompele, J., & Hellemans, J. (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.11.001>
- Jalali, M., Zaborowska, J., & Jalali, M. (2017). The polymerase chain reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. **Basic Science Methods for Clinical Research**, Academic Press, pp. 1–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00001-1>
- Kahraman, S., Beyazyurek, C., Tac, H., Pirkevi, C., Cetinkaya, M., & Gulum, N. (2015). Recent advances in preimplantation genetic diagnosis. **Advances in Genomics and Genetics**. <https://doi.org/10.2147/agg.s53422>
- Kojabad, A. A., Farzanehpour, M., Galeh, H. E. G., Dorostkar, R., Jafarpour, A., Bolandian, M., & Nodooshan, M. M. (2021). Droplet digital PCR of viral DNA/RNA: Current progress, challenges, and future perspectives. **Journal of Medical Virology**, *93*, 4182–4197. <https://doi.org/10.1002/jmv.26846>
- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. **Journal of Applied Genetics**. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Quan, P. L., Sauzade, M., & Brouzes, E. (2018). dPCR: A technology review. **Sensors (Basel)**. <https://doi.org/10.3390/s18041271>
- Rhoads, D., Peaper, D. R., She, R. C., Nolte, F. S., Wojewoda, C. M., Anderson, N. W., et al. (2021). College of American Pathologists (CAP) Microbiology Committee perspective: Caution must be used in interpreting the cycle threshold (Ct) value. **Clinical Infectious Diseases**. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1199>
- Salipante, S. J., & Jerome, K. R. (2020). Digital PCR—An emerging technology with broad applications in microbiology. **Clinical Chemistry**. <https://doi.org/10.1373/clincnem.2019.304048>
- Ståhlberg, A., & Kubista, M. (2018). Technical aspects and recommendations for single-cell qPCR. **Molecular Aspects of Medicine**, *59*, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.07.004>

Streets, A. M., & Huang, Y. (2014). Microfluidics for biological measurements with single-molecule resolution. **Current Opinion in Biotechnology**, **25**, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.013>

Taylor, S. C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., & Fenrich, J. (2019). The ultimate qPCR experiment: Producing publication quality, reproducible data the first time. **Trends in Biotechnology**. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>

Tong, Y., Shen, S., Jiang, H., & Chen, Z. (2017). Application of digital PCR in detecting human diseases associated gene mutation. **Cellular Physiology and Biochemistry**. <https://doi.org/10.1159/000484035>

Vandesompele, J., Preter, K. D., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., et al. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>

Yan, Y., Wang, F., Zhang, C., Jin, X., Zhang, Q., Feng, X., Hao, S., & Ma, X. (2019). Evaluation of droplet digital PCR for non-invasive prenatal diagnosis of phenylketonuria. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, **411**, 7115–7126. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02087-4>

5 CRISPR/Cas (*Helena Gbelcová*)

Štúdie zamerané na technológie rekombinantnej DNA na začiatku 70. rokov 20. storočia položili základy moderných technológií na úpravu genómu. Vedecké úsilie počas nasledujúcich dvoch desaťročí poukázalo na potrebu tvorby zlomu dvojvláknovej DNA v blízkosti cieľového miesta na dosiahnutie presnej a efektívnej úpravy genómu. Preto boli navrhnuté umelé reštrikčné enzýmy, vďaka ktorým sa eliminovali prípady náhodnej integrácie DNA. Za účelom editácie genetického materiálu boli následne skonštruované najskôr tzv. zinkové prsty s nukleázou (ZFN, z anglického *zinc-finger nucleases*), neskôr tzv. efektorové nukleázy podobné aktivátoru transkripcie (TALEN, z anglického *transcription-activator-like effector*). Napriek ich veľkému prínosu do génového inžinierstva oba systémy vyžadujú pre každé cieľové miesto drahú a časovo náročnú *de novo* syntézu proteínov. Systém CRISPR rozpoznáva cieľovú DNA pomocou RNA a nie je od proteínov závislý.

Tabuľka 5.1 Súhrn najpoužívanějších editačných technológií

Metóda	ZNF (od 1996)	TALEN (od 2009)	CRISPR (od 2013)
Rozpoznávajúci mechanizmus	proteín – DNA	proteín – DNA	RNA – DNA
Náročnosť	vysoká	stredná	nízka
Špecifickosť	nízka	vysoká	vysoká
Cena	vysoká	vysoká	nízka
Realizovateľnosť	nízka	stredná	vysoká
Klinické štúdie (počet, oblasť)	*15 väčšina HIV	*6 krvné nádory	*33 kosáčiková anémia, krvné nádory, CAR-T, diagnostika

*údaje pre rok 2023

Príprava CRISPR/Cas systému ako editačného nástroja bola inšpirovaná prirodzene sa vyskytujúcim adaptácie schopným dvojzložkovým imunitným systémom prokaryotických organizmov zabezpečujúci ich rezistenciu voči cudzím genetickým elementom. Objavenie tohto systému prinieslo nové možnosti liečby rôznych ochorení, vrátane onkologických, infekčných a monogénovo podmienených. V kapitole je čo najjednoduchšie opísaná štruktúra

systému CRISPR/Cas, mechanizmus jeho fungovania, možnosti jeho využitia v medicínskej praxi a uvedené etické a bezpečnostné otázky, ktoré s využitím systému CRISPR/Cas súvisia.

Za objav CRISPR/Cas boli v roku 2020 po prvýkrát v histórii ocenené Nobelovou cenou za chémiu dve ženy, a to americká vedkyňa **Jennifer Doudnová**, profesorka z Kalifornskej univerzity v Berkeley a francúzska vedkyňa **Emmanuelle Charpentierová**, profesorka, genetička, mikrobiologička a riaditeľka ústavu Maxa Plancka pre infekčnú biológiu. **Cenu dostali za objavenie metódy na cielenú úpravu genetickej informácie (DNA) v rastlinných, živočíšnych ako aj v ľudských bunkách.** Hlavným zameraním výskumu oboch vedkýň bol imunitný systém baktérií a ich odpoveď na vírusovú infekciu. V dôsledku toho vznikla spolupráca, ktorej výsledkom bol objav takzvaných **“genetických nožníc” – systému CRISPR/Cas9** a jeho využitie pri úprave DNA. Prvá zmienka o tejto technológii bola publikovaná v časopise Science v roku 2012. Objavený obranný mechanizmus baktérií našiel okamžite uplatnenie vo výskume a v súčasnosti sa jeho aplikácia začína zavádzať do klinickej praxe.

Doudnová a Charpentierová so svojimi spolupracovníkmi boli prvé, ktoré predviedli postup, avšak v jednom dôležitom ohľade ich predbehla konkurencia. Svoj systém uplatnili najprv na „nahom“ úseku DNA, nie v živej bunke, ako to vyžaduje napríklad aj medicínske použitie. Prvý, kto ukázal využitie tohto systému na úpravu DNA priamo v jadre bunky bol na prelome rokov 2012 a 2013 tím z ústavov Broadových (spoločné pracovisko dvoch prestížnych inštitúcií, MIT (Massachusetts Institute of Technology) a univerziity Harvard). V ňom sú hlavnými osobnosťami George Church a jeho bývalý post-doc Feng Čang (anglická transkripcia je Feng Zhang).

Obe skupiny si nezávisle podali niekoľko žiadostí o patent, ktorý by mal proces a jeho jednotlivé kroky ochrániť. Tímy narazili na skutočný patentový poklad. Oni aj ich materské ústavy a školy – na jednej strane predovšetkým Kalifornská univerzita, na strane druhej spomínaný ústav Broadových – by mohli na licenčných poplatkoch zarobiť naozaj zaujímavé peniaze. Očakávané zisky boli rádovo v miliardách dolárov a vyššie. Zainteresované strany sa spolu nedokázali dohodnúť a vznikol spor, ktorý prerástol do patentovej vojny. Tá stála obe strany desiatky miliónov dolárov. Je ťažko uveriteľné, že kalifornská skupina (prípadne samotná univerzita) si pri svojej patentovej žiadosti nepriplatila za expresné posúdenie (pri jednom patente ide o dvetisíc dolárov). Americký patentový úrad sa tak najskôr vyjadril k žiadosti Feng Čangovej skupiny a uznal jej patenty popisujúce CRISPR v cicavčích bunkách. Rozhodnutie obstálo aj následnú žalobu zo strany Kalifornskej univerzity (a tiež univerzity vo švédskom Umeå a Viedenskej univerzity, ktoré majú na patente podiel). Skupina z ústavu

Broadsových teda vyšla z prvej fázy sporu v lepšej pozícii. Uznania niektorých patentov sa dočkala aj kalifornská konkurencia, kľúčové však bolo, že uznané patenty skupiny z ústavu Broadsových pokrývali využitie CRISPR v bunkách cicavcov, teda aj ľudí. To znamená, že pokrýva využitie v medicíne, ktoré by podľa dnešných predstáv malo byť hlavným zdrojom príjmov pre držiteľov patentov.

Spor sa však preniesol za oceán a Európsky patentový úrad rovnakú situáciu vyhodnotil inak. V roku 2017 rozhodol, že v EÚ bude držiteľom platného patentu kalifornská skupina Doudnovej, Charpentierovej a ich kolegov. Kľúčové patentové žiadosti ich protistrany označil za „zjavne založené“ na práci tímu z Kalifornie. V tej chvíli sa zdalo, že za použitia jednej technológie na každom kontinente bude nutné platiť licencie niekomu inému. Patentový úrad v USA však v ďalšom kole rozhodovania priznal ďalší zo „základných“ patentov (konkrétne WO2013176772A1) Kalifornskej univerzite. Patent nepopisuje celý proces, ale jeho dôležitú súčasť, ktorá je rovnaká pre využitie v bunkách aj mimo nich. To síce neznamená, že by predchádzajúce patenty boli všetky neplatné, ale záujemcovia o využitie CRISPR v USA sa musia vo väčšine prípadov dohodnúť na licencií s oboma znepriatelenými stranami.

5.1 Charakteristika CRISPR/Cas

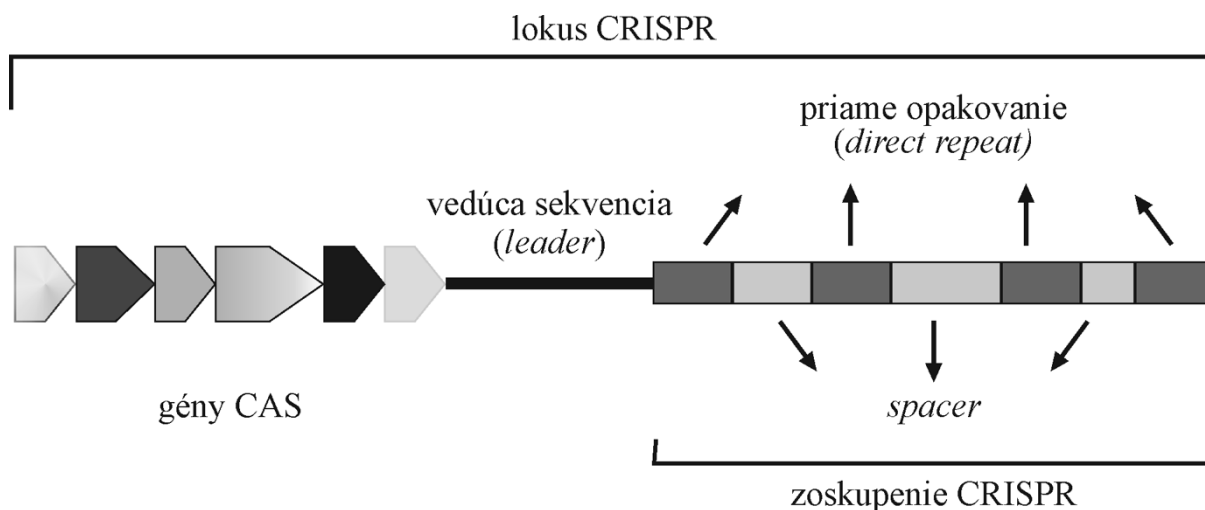
CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) a s ním asociované proteíny Cas (*CRISPR associated protein*) spolu tvoria prirodzene sa vyskytujúci adaptácie schopný dvojzložkový imunitný systém prokaryotických organizmov. Ten zabezpečuje rezistenciu prokaryotických organizmov voči cudzím genetickým elementom ako sú plazmidy a fágy. CRISPR lokus bol prvýkrát pozorovaný v baktérii *Escherichia coli* a nachádza sa približne v 84 % doteraz sekvenovaných genómov archeobaktérií a 45 % baktérií.

5.1.1 Štruktúra lokusu CRISPR/CAS

Organizácia lokusu CRISPR/CAS je na obrázku 5.1. Pozostáva zo sady génov *CAS* a zoskupenia CRISPR (z anglického *CRISPR array*). Gény *CAS*, ktorých počet a poradie v rámci CRISPR/Cas podtypov sú variabilné, kódujú reštrikčné enzýmy Cas. Práve na typoch Cas proteínov prítomných v systéme CRISPR/Cas je založená v súčasnosti najviac akceptovaná klasifikácia CRISPR/Cas systémov.

CRISPR zoskupenie predstavuje úsek prokaryotickej DNA zahŕňajúci vedúcu sekvenciu (z anglického *leader sequence*) bohatú na adenín a tymín a sériu priamych opakovaní (z anglického *direct repeats*) dlhých 21 – 45 nukleotidových párov, ktoré sú prerušované variabilnými sekvenciami, takzvanými *spacer* oblasťami dlhými 20 – 58 nukleotidových

párov. Práve *spacer* oblasti DNA predstavujú pozostatky tzv. *protospacerov* (mobilných genetických elementov), čiže nukleových kyselín vírusov, plazmidov alebo transpozónov, ktoré boli do CRISPR zoskupenia začlenené po predchádzajúcich atakoch.



Obrázok 5.1 Organizácia lokusu CRISPR/CAS

5.2 Klasifikácia CRISPR/Cas systémov

V súčasnosti najviac akceptovaná klasifikácia rozdeľuje systémy CRISPR/Cas na základe prítomných génov CAS a vlastností vznikajúceho efektorového komplexu. Základná klasifikácia delí tieto systémy do dvoch tried (1 a 2), ktoré sú ďalej delené do šiestich typov a niekoľkých podtypov. Trieda 1 obsahuje typy I, III a IV, zatiaľ čo do triedy 2 sú zaradené typy II, V a VI. Hlavným rozpoznávacím znakom triedy 1 je využitie proteínových komplexov obsahujúcich viac proteínových podjednotiek, zatiaľ čo trieda 2 využíva efektorový komplex obsahujúci iba jediný multidoménný proteín. Do triedy 1 patrí asi 90 % všetkých doteraz identifikovaných CRISPR/Cas systémov. V mikroorganizmoch najrozšírenejším a najdiverzifikovanejším typom je typ I, využívajúci nukleázu Cas3, ktorý bol nájdený napríklad u *E. coli*. Najpreštudovanejším systémom je v súčasnosti systém z baktérie *Streptococcus pyogenes* kódujúci nukleázu Cas9, ktorý je zaradený do typu II. V jednom organizme môžu existovať rôzne typy systémov CRISPR/Cas. Efektorové komplexy CRISPR/Cas systémov sa od seba líšia aj typom nukleovej kyseliny, ktorú rozpoznávajú. Typy I, II, V a pravdepodobne IV sú cielené na DNA, zatiaľ čo typ VI na RNA. Systémy typu III sú schopné štiepiť DNA aj RNA.

Systémy typu I sú definované prítomnosťou charakteristického proteínu Cas3, proteínu s doménami helikázy aj DNázy, zodpovednými za degradáciu cieľa. Využívajú proteíny

z proteínovej nadrodiny RAMP (*Repeat associated mysterious protein*), ktoré pomocou svojich RNA rozpoznávajúcich motívov (*RRM – RNA recognition motif*) rozpoznávajú a rozštiepia pre-crRNA vo vnútri repetícií na menšie úseky zrelej crRNA. Do proteínovej nadrodiny RAMP patria napríklad efektorové endonukleázy Cas6, Cas6e a Cas6f. Následne sa crRNA viaže na komplex niekoľkých proteínov Cas (Cse1, Cse2, Cas7, Cas5, Cas6e1) s názvom Cascade (*CRISPR-associated complex for antiviral defense*). Cascade sa viaže na cieľové sekvencie, kde vytvorí R-ohyb (*R-loop* – trojvláknová štruktúra DNA:RNA hybridu a komplementárneho nekódujúceho vlákna DNA) v cieľovej DNA. Potom naberie transaktivujúcu Cas3 nukleázu s helikázovou aktivitou, ktorá rozpletie a následne rozštiepi cieľovú DNA vo vytvorenom R-ohybe. Proteín Cas3 sa delí do podskupín A-F a to podľa polohy Cas3 v lokuse voči ostatným génom a ďalej podľa ďalších signatúrnych génov *CAS*, špecifických pre jednotlivé kategórie. Signatúrne gény podtypu I-A sú cas8a1 a cas8a2, z ktorých sa väčšinou vyskytuje v lokuse iba jeden. Cas3 je často rozštiepený na helikázovú doménu Cas3' a endonukleázovú doménu Cas3". Podtyp I-B sa vyznačuje signatúrnym cas8b. Podtyp I-C obsahuje signatúrny cas8c a väčšinou mu chýba gén pre Cas6 endonukleázu, ktorá je funkčne nahradená katalyticky aktívnym Cas5. Podtyp I-D má ako špecifický gén CAS10d. Pre subtyp I-E sú špecifické gény pre Cse1 a Cse2 (systematicky Cas8a a Cas11), chýba im gén pre Cas4. Podtyp I-F taktiež neobsahuje Cas4, jeho gén pre endonukleázu Cas3 je spojený s Cas2 a jeho typickými génmi sú gény kódujúce Csy1 a Csy2 (systematicky Cas8f a Cas11).

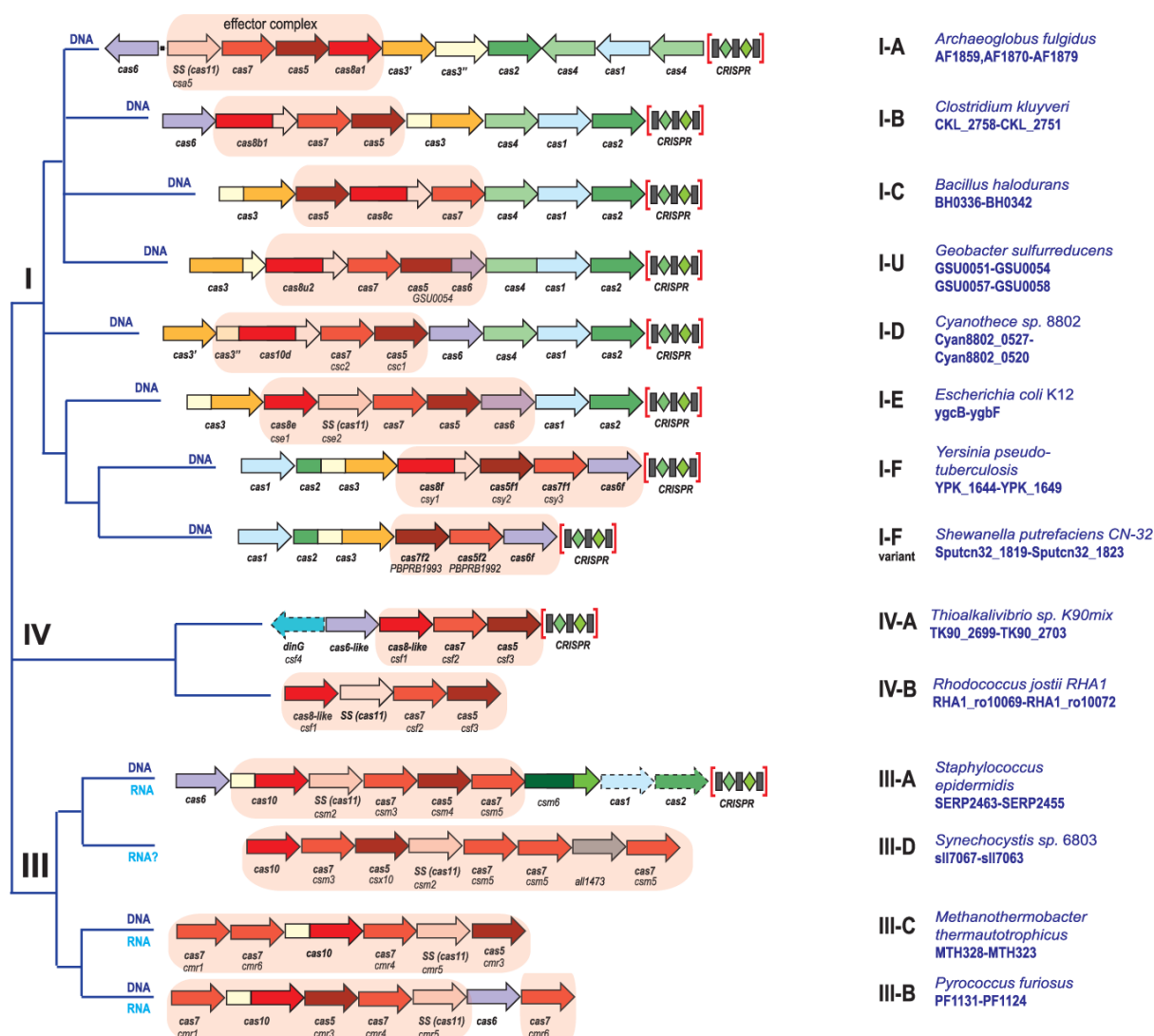
Typ III je často prítomný u archeí, vzácnejšie potom u baktérií. Je pre neho typická prítomnosť génu pre Cas10. Podobne ako typ I tvorí efektorový multipodjednotkový proteínový komplex. Najprv prebehne transkripcia pre-crRNA, ktorá je obdobne ako u typu I rozštiepená enzýmom Cas6 vo vnútri repetícií. Vytvorí sa tak prechodná crRNA, ktorá tvorí ribonukleoproteínový komplex s produktmi génov *CMR* (*RAMP module Cas* – proteín obsahujúci RAMP modul) alebo *CSM* (*Cas subtype Mtube* – podtyp proteínu Cas pôvodom z *M. tuberculosis*). Vnútri tohto komplexu prebieha definitívne zrenie crRNA formou štiepenia. Komplex s naviazanými zrelými crRNA potom nasadne na komplementárnu cieľovú DNA/RNA a Cas10 endonukleáza ju rozštiepi. Obe endonukleázové aktivity, RNázová aj DNázová sú dôležité a *in vivo* vedú ku kotranskripčnému štiepeniu cudzorodej DNA aj jej produktov. Typ III sa ďalej delí na podtypy A-D, ktoré rozlišujeme podľa proteínov efektorového komplexu. Pri podtype III-A je komplex tvorený proteínmi Csm2, 3, 4, 5 a 6 (systematicky a pre maturáciu crRNA je nutný produkt génu *CSM2*). Podtyp III-B má komplex z proteínov Cmr2, 3, 4 a 5 a Csx1 (paralóg Csm6), signatúrnym génom je *CMR5*. Podtyp III-C je špecifický inaktíváciou cyklázovej domény Cas10 spojenou s významnými rozdielmi

v sekvenciách tohto génu. III-C aj III-B využívajú rovnaké proteíny efektorového komplexu, Cmr. Rovnako obsahujú aj rovnaký signatúrny proteín Cmr5. III-D podtyp sa zhoduje v proteínoch efektorového komplexu s III-A podtypom obsahom proteínov Csm. Signatúrnym génom je *CSX10*, gén podobný *CAS5*.

Zriedkavý **typ IV** sa podobá podtypu III-B, avšak neobsahuje Cas1 ani Cas2 a často sa vyskytuje vzdialene od lokusu CRISPR. Kóduje silne zredukovaný efektorový komplex pozostávajúce z redukovanej veľkej podjednotky Csf1, dva gény *RAMP* (pre Csf2, Csf3) a niekedy aj malú podjednotku komplexu Cascade (malý, väčšinou α -helikálny proteín). *CSF1* je typickým génom typu IV. Typ IV sa delí na dva podtypy, pričom základný obsahuje navyše helikázu Cfs4 z rodiny DinG a variantný podtyp obsahuje malý α -helikálny proteín. Pravdepodobný mechanizmus funkcie zahŕňa použitie cudzorodej RNA priamo ako crRNA.

V triede 2 sa systémy CRISPR/Cas líšia stavbou efektorových modulov, ktoré obsahujú vždy jeden proteín tvorený viacerými doménami. Rozdiel medzi triedou 1 a 2 v stavbe efektorových komplexov aj ich špecifického navádzania pomocou RNA ilustrujú obrázky 5.2 a 5.3. Trieda 2 zahŕňa typy II, V a VI.

Typ II je v súčasnosti najvyužívanejší v praxi pre svoju jednoduchú stavbu. Jeho typickým génom je *CAS9*, ktorého produkt v sebe zlučuje funkcie interakcie s crRNA aj endonukleázovej aktivity. Spracovanie a maturácia crRNA je zaistená prostredníctvom tracrRNA, ktorá tvorí komplex s pre-crRNA na základe komplementarity v repetíciách pre-crRNA. Tým umožňuje štiepenie pre-crRNA pomocou RNázy III za prítomnosti Cas9. Gén kódujúci tracrRNA je súčasťou lokusu CRISPR/CAS typu II, gén kódujúci RNázu III leží mimo lokusu. Typ II sa delí na 3 podtypy A-C. Podtyp II-A obsahuje navyše k základnej štruktúre gén *CSN2*, ktorý je zároveň jeho signatúrnym génom. Ten sa zrejme podieľa na integrácii spacerov, avšak nie je nevyhnutný na ich rozpoznávanie a štiepenie. Na rozdiel od neho podtyp II-B obsahuje oproti základnej štruktúre aj *cas4*, ktorý sa typicky vyskytuje u typu I. Ďalej obsahuje gény *CAS1* a *CAS2* sekvenčne bližšie homológom typu I, než sesterskému podtypu II-A. Typ II-C obsahuje iba základnú štruktúru CRISPR/CAS lokusu, a to gény kódujúce proteíny Cas1, Cas2 a Cas9 a gén pre tracrRNA.

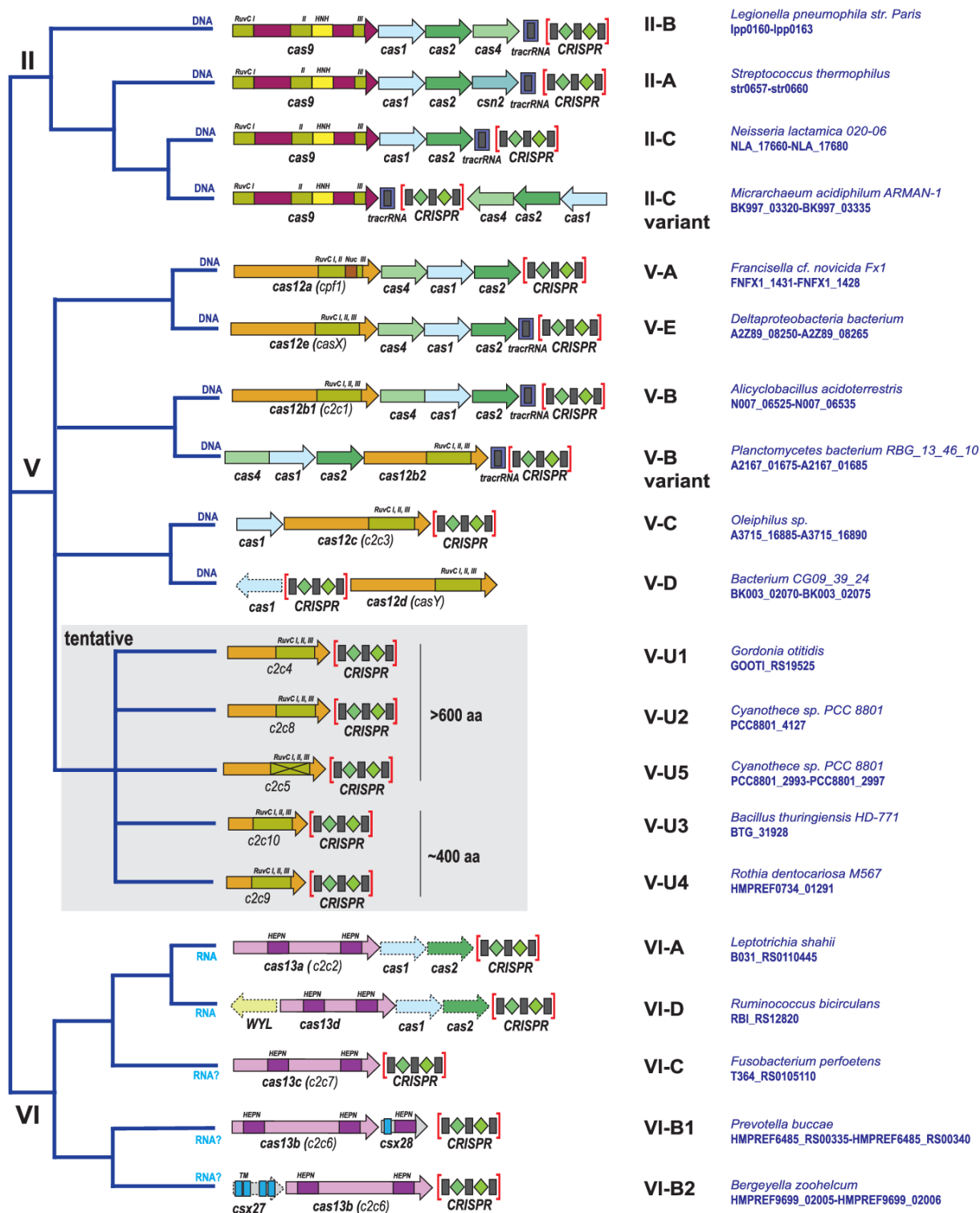


Obrázok 5.2 Trieda 1 CRISPR/Cas systémov. Pre každý podtyp je vyznačená štruktúra génového lokusu aj cieľová molekula (DNA/RNA). Ružovo je vyznačený efektorový modul. SS, malá podjednotka Cascade komplexu. Upravené podľa Koonin, Makarova, a Zhang 2017.

Typ V na rozdiel od variantu typu II obsahuje miesto *CAS9* ako typický gén *CPF1* (*CRISPR-associated endonuclease in Prevotella and Francisella 1*). Cpf1 navádzaná crRNA má endonukleázovú aktivitu a to bez potreby tracrRNA, čo ponúka využitie v génovom inžinierstve. Medzitým boli objavené ďalšie podobné systémy s efektorovými proteínmi odlišných vlastností (napr. vyžadujú navádzanie dvoma RNA) – C2c1, C2c3, CasX a CasY. Ich nomenklatúra bola zjednotená a teraz sú označované štandardne vo forme génov *CAS* ako *CAS12a*, *b*, *c*, *d*, *e2*. Typ V sa delí na 5 podtypov A-E podľa prítomného efektorového proteínu Cas12, ktorý je zároveň aj typickým proteínom podtypu. V-A, B a E sú podtypy, ktoré obsahujú Cas1, Cas2 a Cas4, teda okrem zámeny Cas9 za Cas12 prakticky zhodné s podtypom II-B. Podtyp V-A obsahuje efektorový proteín Cas12a, II-B obsahuje Cas12b a II-E Cas12e. Podtyp

V-C a V-D sa výrazne líšia, predstavujú maximálne zjednodušený systém, ako jediné neobsahujú gén *CAS2*, efektorovým proteínom je Cas12c u V-C a Cas12d pre V-D.

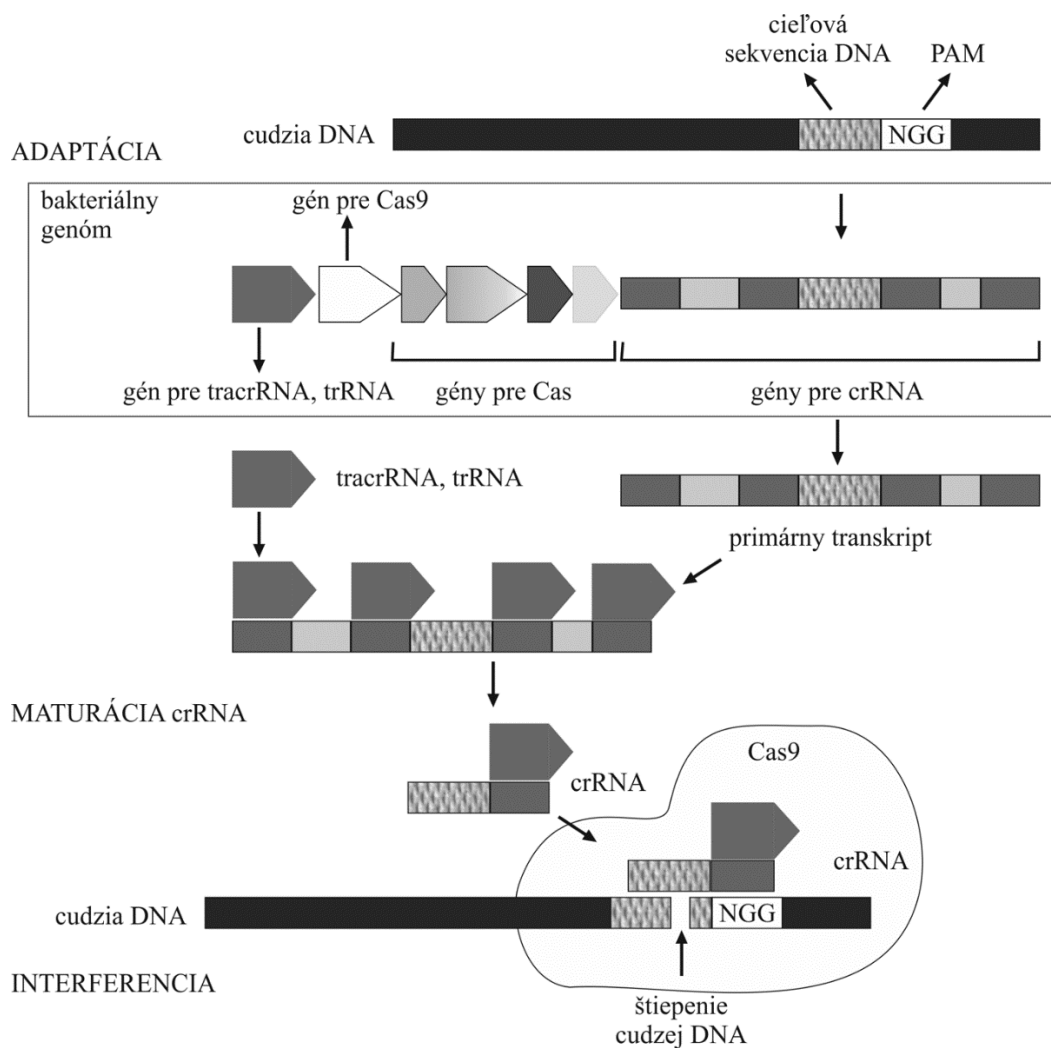
Typ VI je unikátny svojou špecifitou výhradne voči RNA. Jeho typickým génom je efektorový gén *C2C2*, systematicky *CAS13a*, ktorý je zároveň typickým génom podtypu VI-A. Typ VI je zároveň schopný štiepenia po navedení iba jednou RNA. Po väzbe na crRNA proteíny Cas13 identifikujú a rozštiepia cieľovú jednovláknovú RNA. Unikátna je tiež schopnosť Cas13 po aktivácii štiepiť aj necieľové RNA. Typ VI má redukovanú štruktúru, väčšinou obsahuje iba CRISPR, adaptorové gény *CAS1* a *CAS2* a príslušný efektor kódujúci gén *CAS13*. Delí sa na podtypy A-C podľa typov proteínov Cas13: VI-A, VI-B a VI-C prináležia v zodpovedajúcom poradí gény pre Cas13a, Cas13b a Cas13c. VI-B sa oproti ostatným podtypom odlišuje neprítomnosťou *CAS1* a 2, navyše obsahuje gény *CSX27* a *CSX28* (*CSX* je označenie pre gény CAS, ktoré doteraz neboli zaradené do žiadnej génovej rodiny), ktoré majú regulačnú funkciu pre *CAS13b*.



Obrázok 5.3 Trieda 2 CRISPR/Cas systémov. Pre každý podtyp je vyznačená štruktúra génového lokusu aj cieľová molekula (DNA/RNA). TM, predpovedaná transmembránová doména. Upravené podľa Koonin, Makarova, a Zhang 2017.

5.3 Molekulárny mechanizmus účinku CRISPR/Cas

Molekulárny mechanizmus identifikácie a likvidácie invadujúcej nukleovej kyseliny systémom CRISPR/Cas sa v detailoch v jednotlivých typoch CRISPR/Cas systémov líši a navyše ešte stále nie sú všetky jeho kroky jednoznačne opísané. Na obrázku 5.4 je zjednodušený prehľad molekulárneho mechanizmu účinku najpoužívanejšieho systému CRISPR/Cas9. Ten pozostáva z troch základných krokov, a to adaptácie, biogenézy (maturácie crRNA) a interferencie.



Obrázok 5.4 Molekulárny mechanizmus účinku CRISPR/Cas9

Expresiou *CAS* génov vznikajú enzýmy, ktorých úlohou je špecificky rozstrihať invadujúcu nukleovú kyselinu. Aby však neštípili vlákno DNA zakaždým, keď objavia cieľovú sekvenciu báz, sú k miestu štiepenia navedené. Ako navádzacie jednotky pre Cas enzýmy slúžia produkty CRISPR zoskupenia, ktoré je v procese transkripcie prepísané do podoby mRNA a následne upravené na kratšie úseky crRNA (crispr RNA). Vzniknuté crRNA sú vďaka obsahu transkribovanej *spacer* oblasti komplementárne k invadujúcej nukleovej kyseline a

s príslušnými Cas proteínmi vytvárajú nukleoproteínové komplexy schopné identifikovať a špecificky štiepiť invadujúce nukleové kyseliny. Vlastný CRISPR lokus neštiepia vďaka sekvencii PAM (z anglického *protospacer adjacent motif*; 2 – 6 nukleotidových párov dlhá špecifická sekvencia 5'-NGG-3'; N – dusíkatá zásada, G – guanín), ktorá je súčasťou *protospacer* sekvencie invadujúcej nukleovej kyseliny, v *spacer* sekvencii CRISPR zoskupenia sa však už nenachádza. PAM sekvencia je zároveň nevyhnutná pre začlenenie sekvencie nového *protospacera* do CRISPR lokusu.

5.3.1 Adaptácia

V prvej fáze je určitá sekvencia invadujúceho mobilného genetického elementu (MGE), nazývaná *protospacer*, začlenená do oblasti CRISPR zoskupenia, čím vznikne nový *spacer* úsek. Tento proces umožňuje hostiteľskému organizmu zapamätať si cudzorodý genetický materiál, a tým zabezpečuje adaptácie schopnú povahu tohto imunitného systému. Mechanizmu začleňovania *spacer* sekvencií do genómu ešte stále nie je úplne objasnený.

Proces adaptácie môže byť rozdelený do dvoch krokov. Prvým je výber *protospacer* sekvencie spolu s jeho upravením do podoby *spacer* sekvencie a druhý je jeho následné začlenenie do CRISPR zoskupenia spolu s duplikáciou opakujúcej sa sekvencie (Obrázok 5.4). V tomto procese sú potrebné aj nukleázy Cas1 a Cas2. Tie v *Escherichia coli* vytvárajú komplex, ktorý pomáha integrácii nových *spacer* sekvencií. Integrácia sekvencií pripomína spôsoby vírusových integráz a transponáz. Integráza je enzým produkovaný retrovírusmi, patriaci medzi rekombinázy. Je schopná naviazať sa na DNA hostiteľskej bunky prostredníctvom zinkových prstov a integrovať vírusovú nukleovú kyselinu do genómu bunky v podobe provírusu. Pri replikácii genetickej informácie dochádza aj k replikácii vírusovej nukleovej kyseliny a následne k tvorbe nových viriónov, ktoré sú schopné infikovať ďalšie bunky. Niektorí autori považujú transponázy za podskupinu integráz, ktoré umožňujú presun určitého úseku nukleovej kyseliny, takzvaného *transpozónu*, z pôvodného miesta na iné, buď priamo vystrihnutím tohto úseku alebo tomuto vystrihnutiu predchádza replikácia a až vytvorená kópia je následne presunutá na iné miesto. Takéto preskupenie môže ovplyvniť mieru expresie ďalších génov v rámci genómu. Funkcia Cas1 a Cas2 bola potvrdená nadexpresiou príslušných génov v type I-E v *E. coli*, pričom integrácia *spacer* úseku prebehla aj pri absencii ďalších Cas proteínov. Mutácia v oblasti aktívneho miesta Cas1 znemožnila integráciu *spacer* sekvencie do genómu *E. coli*.

Obe nukleázy vytvárajú komplex, kde jeden Cas2 dimér viaže dva Cas1 diméry. Uvedené usporiadanie komplexu je pre začlenenie *spacer* sekvencie nevyhnutné. Cas1

prednostne viaže CRISPR DNA v Cas2-závislom vzorci, ďalej podporuje a hrá úlohu v začlenení *spacer* sekvencie. Predpokladá sa, že Cas1/Cas2 komplex transportuje a zároveň zabezpečuje integráciu *spacer* sekvencie. Pri integrácii sú potrebné aj niektoré ďalšie faktory, napr. Cas9, Csn2 a tracrRNA v type II-A a v type I-B je to Cas4. Úlohy tracrRNA, Csn2 a Cas4 sú nejasné ale Cas9 pravdepodobne navádza a riadi mechanizmus integrácie. Polymerázy, ligázy a rekombinázy hostiteľskej bunky sa môžu podieľať na nešpecifických krokoch v procese adaptácie.

Výber cieľovej sekvencie, ktorá je integrovaná do CRISPR lokusu nie je náhodná. Krátka sekvencia nazývaná PAM je lokalizovaná priamo vedľa *protospacer* sekvencie a je nevyhnutná pre získanie a začlenenie do genómu. V type II-A CRISPR/Cas systéme, PAM rozpoznávajúca doména enzýmu Cas9 je zodpovedná za selekciu *protospacer* sekvencie. Po rozpoznaní *protospacer*-sekvencie Cas9 zapojí Cas1, Cas2 a prípadne Csn2 do integrácie novej *spacer* oblasti do CRISPR zoskupenia. Tento vzorec správania sa môže byť konzervovaný u všetkých typov CRISPR/Cas systému, hoci experimentálna evidencia zatiaľ chýba. Nový *spacer* úsek je zvyčajne inkorporovaný do oblasti hraničiacej s *leader* sekvenciou CRISPR zoskupenia, kým prvé opakovanie v rámci zoskupenia je duplikované.

5.3.2 Biogenéza

Po aktivácii imunity je CRISPR zoskupenie prepísané do dlhej prekursorovej molekuly pre-crRNA (mRNA) a následne do crRNA (Obrázok 5.4).

V systéme typu I a III Cas6 enzým zabezpečuje spracovanie pre-crRNA, pričom vznikajú crRNA, ktoré sú ohraničené krátkou sekvenciou na 5' konci. Jediná výnimka je v type I-C, ktorý nekóduje Cas6 proteíny. U tohto typu spracovanie pre-crRNA zabezpečuje enzým Cas5d a vytvorené crRNA majú na 5' sekvenciu 11 nukleotidov na rozdiel od osem-nukleotidovej sekvencie, ktorú generuje Cas6. Ďalšia úprava na 3' konci prekursorovej molekuly crRNA nukleázou vedie k získaniu plne funkčnej crRNA zloženej z kompletného *spacer* úseku, ktorý je na 5' konci presne definovaný a premenlivej časti na 3' konci, ktorá vo väčšine systémov typu I a III vykazuje štruktúru vlásenky.

V systéme typu II je na úpravu crRNA potrebná tracrRNA (*trans-activating crRNA*). Neopakujúce sa úseky tracrRNA umožňujú sformovať RNA do dvojzávitnice s každým opakovaním pre-crRNA, ktorá je stabilizovaná Cas9. Dvojzávitnica je následne rozpoznaná a spracovaná hostiteľskou RNázou III, čo vedie k tvorbe navádzacích crRNA. Od RNázy III je nezávislý mechanizmus, ktorý bol objavený v type II-C CRISPR/Cas systéme *Neisserie meningitidis*.

5.3.3 Interferencia

V poslednom kroku imunitnej reakcie je hlavnou úlohou crRNA interferovať s invadujúcou nukleovou kyselinou (Obrázok 5.4).

Systém typu I využíva na dosiahnutie cielenej degradácie celý komplex proteínov Cascade, zatiaľ čo v systéme typu II je za cielenú degradáciu zodpovedný jediný efektorový proteín. Vďaka PAM úsekom lokalizovaným v *protospacer* sekvencii, ktorá predstavuje invadujúcu DNA (v systéme typu I je lokalizovaný „*upstream*“ a v type II je „*downstream*“) je imunitný systém schopný rozpoznať cudziu nukleovú kyselinu od vlastnej, keďže *spacer* sekvencia už reprezentuje vlastnú, začlenenú, DNA a neobsahuje PAM úsek. V type III je rozpoznanie vlastného od nevlastného zabezpečené prostredníctvom 5' značenému úseku crRNA, ktorý nemôže byť komplementárny s cieľovým úsekom nukleovej kyseliny. Cudzorodá nukleová kyselina tento úsek, ktorý chráni prirodzené štruktúry bunky neobsahuje a bez spárovania báz, ktoré má inhibičný efekt na daný systém, dôjde k aktivácii deštruktívnych mechanizmov. V systéme typu I Cascade lokalizuje invadujúcu DNA crRNA závislým spôsobom, pričom pre cielenú degradáciu využíva aj nukleázu Cas3. Cas3 spôsobí zlom na cudzorodej DNA a následne degraduje cieľovú DNA.

V type II CRISPR/Cas systému tracrRNA:crRNA duplex navádza efektorový proteín Cas9 na cudziu DNA, v ktorej Cas9 následne spôsobuje dvojvláknové zlomy.

Systém typu III zahŕňa aj Cas10-Csm (podtyp III-A a III-D) a Cas10-Cmr (podtyp III-B a III-C) komplexy, ktoré sú schopné zacieliť DNA aj RNA. Interferencia systémov typu III-A a typu III-B závisí od transkripcie cieľovej DNA. Presnejšie, podjednotka Cas10 štiepi DNA, zatiaľ čo Csm3 a Cmr4 štiepia transkribovanú pre-crRNA.

5.4 Editácia genómu pomocou CRISPR/Cas9

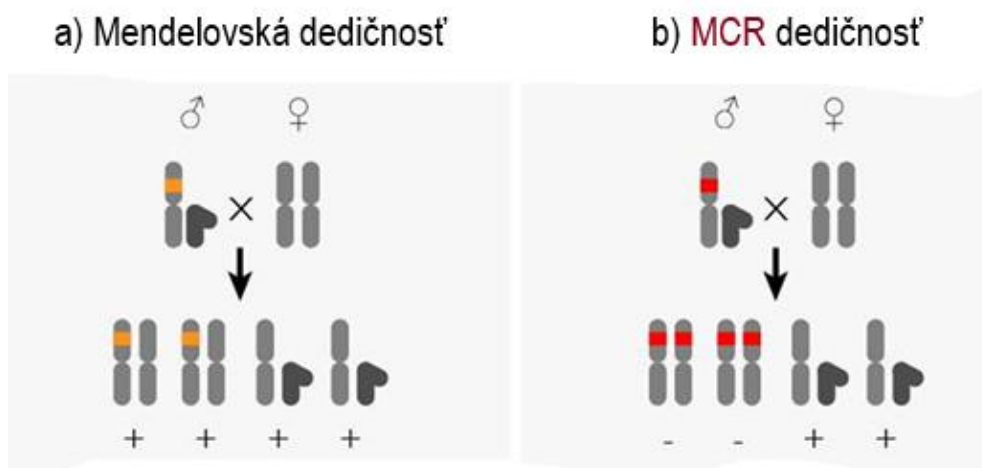
Na editovanie genómu v praxi sa najčastejšie pripravuje editačný systém vychádzajúci z typu II, konkrétne CRISPR/Cas9. Ten pozostáva z krátkej nekódujúcej navádzajúcej gRNA (z anglického *guide* RNA), ktorá má dve molekulové zložky, a to cieľovo špecifickú crRNA a pomocnú trans-aktivačnú crRNA (tracrRNA). Jednotka gRNA má za úlohu naviesť Cas9 proteín na špecifický genómový lokus pomocou párovania báz medzi sekvenciou crRNA a cieľovou sekvenciou, preto musí byť crRNA navrhnutá a optimalizovaná pre každú aplikáciu. Existuje mnoho variant proteínu Cas9, ktoré sa navzájom líšia funkciami, konkrétne môžu spôsobovať jednovláknové zlomy, dvojvláknové zlomy, alebo sa len viazať na DNA. V prípade potreby editácie genetickej informácie je súčasťou CRISPR/Cas9 systému aj templátová DNA, ktorá po vzniku zlomu a naštartovaní bunkových systémov opravy umožňuje vloženie

špecifickej sekvencie DNA. Ak je cieľom inhibícia, umlčanie niektorého z génov, používajú sa tzv. mŕtve verzie dCas9 (z anglického *dead* Cas9), ktoré eliminujú schopnosť systému štiepiť DNA pri súčasnom zachovaní schopnosti zacieliť na požadovanú sekvenciu. Výsledkom je, že cieľový gén nie je rozštiepený a zároveň nedochádza k jeho expresii. Pridaním rôznych regulačných faktorov ku dCas9 je možné zapnúť alebo vypnúť akýkoľvek gén, prípadne nastaviť úroveň jeho aktivity. CRISPR/Cas9 systém môže byť bunkám poskytnutý vektorovo riadenou expresiou génov pre Cas9 a gRNA, čo je proces používaný pri príprave geneticky modifikovaných organizmov. Dnes sa však v praxi častejšie používa dodávanie Cas9-gRNA v podobe ribonukleoproteínovej častice priamo do bunky.

5.5 Otázky bezpečnosti súvisiace s aplikáciou systému CRISPR/Cas

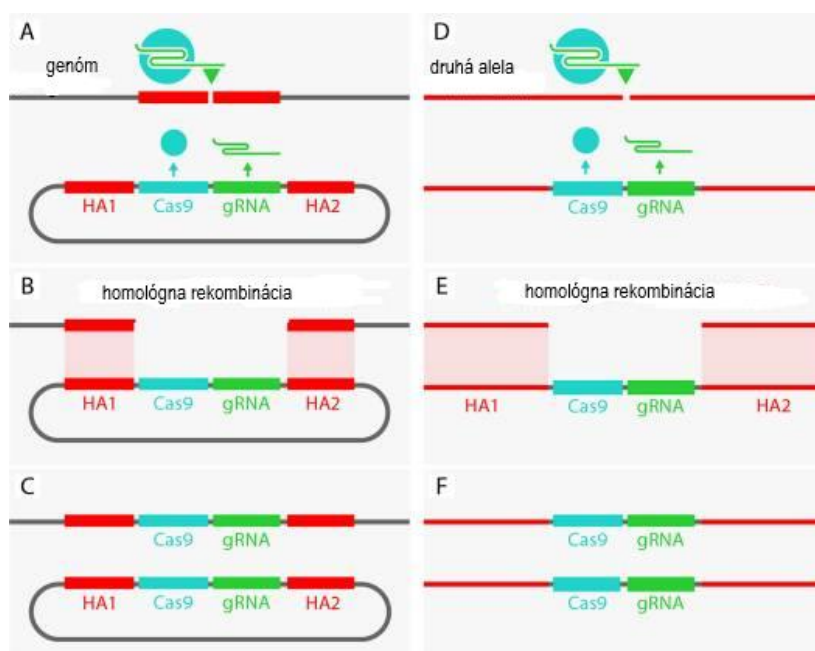
Geneticky modifikované organizmy (GMO) pripravené vektorovo riadenou expresiou génov môžu v populácii s divými typmi organizmov daného druhu prežiť iba vďaka selekčnému tlaku. Tým je zvyčajne rezistencia k antibiotikám, ktorú GMO v procese genetickej manipulácie získajú tiež. V momente ak výhoda selekčného tlaku pominie (antibiotikum sa GMO nedodá), GMO hynie a opäť sa presadí divý typ organizmu. Ukázalo sa však, že v prípade mutácií vnesených CRISPR/Cas systémom, má mutovaný organizmus schopnosť organizmu divého typu premeniť na svoj obraz. Experiment, počas ktorého vniesli do embrya vínnej mušky (*Drosophila melanogaster*) CRISPR/Cas systém s cieľom vytvoriť mutáciu istého génu, skončil vyradením daného génu nie na jednej, ale na oboch alelách, čo sa prejavilo zmenou farby tela mušky.

Ešte zaujímavejšie výsledky priniesol pokus, kedy sa vínne mušky s poškodenými génmi krížili s muškami divého typu, ktoré mali obe kópie daného génu funkčné. Na základe Mendelových princípov dedičnosti by mali potomkovia zdediť od jedného rodiča poškodený gén a od druhého gén plne funkčný. V skutočnosti však viac ako 95 % mušiek, ktoré z uvedeného kríženia vznikli, malo poškodené oba gény, pretože CRISPR/Cas lokus zdedený od jedného rodiča okamžite zabezpečil rozstrihnutie funkčného génu získaného od zdravého rodiča a do medzery vložil gény pre Cas-gRNA. Výsledkom bolo potomstvo prakticky len so zmenenou farbou tela (Obrázok 5.5).



Obrázok 5.5 Experimentálna demonštrácia mutagénnej reťazovej reakcie u *Drosophila melanogaster*. a) Mendelovská dedičnosť mužského znaku viazaného na pohlavný chromozóm X. b) Teoretická dedičnosť založená na mutagénnej reťazovej reakcii MCR vedie k tomu, že pôvodne heterozygotná alela konvertuje druhú alelu a vytvára homozygotné samčie potomstvo. MCR – mutagénna reťazová reakcia. Upravené podľa Gantz a Bier, 2015.

Vďaka schopnosti CRISPR/Cas šíriť sa procesom tzv. mutagénnej reťazovej reakcie (Obrázok 5.6), výsledkom ktorej je proces označovaný ako *gene drive*, je na mieste obava šírenia sa mutácií v prírode v prípade úniku organizmov pozmenených CRISPR/Cas technológiou.



Obrázok 5.6 Mechanizmus mutagénnej reťazovej reakcie. Plazmid nesúci Cas9 gén, gRNA zacielenú na požadovanú genómovú sekvenciu a lemujúce homologické ramená (HA1, HA2) zodpovedajúce genómovým sekvenciám komplementárnym k cieľovému štiepnemu miestu (A) vkladá Cas9/gRNA do cieľového lokusu prostredníctvom opravy DNA homolognou rekombináciou (HR). (B, C) Z vlozenej sekvencie sa exprimuje Cas9 aj gRNA, čo vedie k štiepeniu (D) a HR-sprostredkovanej inzercii vlozenej sekvencie aj do druhej alely, čím sa mutácia stáva homozygotnou (E, F). Upravené podľa Gantz a Bier, 2015.

Nápravu prípadnej havárie s *gene drive* následkom odskúšali vedci na kvasinkovom experimentálnom modeli. Nechali populáciu kvasiniek systémom CRISPR/Cas zaviesť a šíriť mutáciu. Následne do populácie vpustili kvasinky schopné prepísať mutáciu do pôvodného stavu DNA. Vymazanie mutácie sa im podarilo.

5.6 Možnosti využitia CRISPR/Cas v medicínskej praxi

Systém CRISPR/Cas nachádza okrem využitia vo výskume široké uplatnenie v medicínskej praxi. V Číne prebiehali oficiálne klinické štúdie aplikácie systému CRISPR/Cas do HIV terapie od roku 2015. V súvislosti so spustením mnohých klinických štúdií CRISPR/Cas systému v USA a Európe bol prelomový rok 2018.

Možných využití systému CRISPR/Cas je mnoho. Od liečby chorôb hospodárskych zvierat cez vyhubenie komárov, opravy DNA ľudí s dedičnými chorobami, ale napríklad aj úpravy imunitného systému tak, aby dokázal poraziť rakovinu alebo vírusové ochorenia (nie len typu AIDS), až po úplne extrémnu víziu, avšak evidentne už možnú, ktorou je genetická úprava nenarodených detí.

Konkrétne v roku 2018 sa traja čínski lekári rozhodli geneticky upraviť DNA ľudských embryí, čo vyvolalo právny a etický rozruch. Zahájili projekt na pomoc párom, kde otec je HIV pozitívny a matka HIV negatívna. DNA embryí, konkrétne gén *CCR5* kódujúci receptor na povrchu bielych krviniek, pomocou ktorého do nich vstupuje vírus HIV, upravili využitím technológie CRISPR/Cas9 s cieľom vyvolať kompletnú rezistenciu na vírus HIV. Prvé dve deti sa narodili v októbri 2018 a tretie v roku 2019. Lekár oznámil, že všetky deti sa narodili zdravé. Výskum sa však stretol s masívnou kritikou a následným suspendovaním celého výskumu. He Jiankui, vedúci lekárskeho tímu, bol zatknutý a obvinený z falšovania dokumentov a neetického správania.

5.7 CRISPR/Cas v diagnostike a liečbe monogénovo podmienených ochorení

Ideálnym cieľom pre aplikáciu CRISPR/Cas systému v génovej terapii sú ochorenia spôsobené mutáciou v jedinom géne. K takýmto ochoreniam patrí celý rad vrodených monogénovo podmienených chýb, vrátane cystickej fibrózy, hemofílie, Duchennovej svalovej dystrofie, Huntingtonovej choroby a iných.

5.7.1 Liečba beta-talasémie a Leberovej kongenitálnej amaurozy

Počiatkové klinické skúšky testovali schopnosť úpravy genómu systémom CRISPR/Cas9 na bunkách, ktoré boli odobraté z pacienta a po úprave vybraných častí DNA boli aplikované naspäť do tela pacienta. Ide o takzvanú *ex vivo* terapiu. Tak, ako sa genetická zmena šíri v populácii vinných mušiek, šíri sa aj medzi bunkami v rámci jedného organizmu.

Príkladom je liečba monogénovo podmieneného krvného ochorenia, beta-talasémie, kedy sú krvné bunky vystavené účinku CRISPR/Cas systému mimo ľudského tela a následne sú do tela vrátené.

Prvýkrát bola génová terapia s využitím CRISPR/Cas9 testovaná priamo v tele pacienta s genetickou mutáciou spôsobujúcou dedičnú poruchu zraku, Leberovu kongenitálnu amaurozu 10 (slepotu, LCA10). Je to **vzácná**, autozomálne recesívne dedičná choroba, pri ktorej sú defektné fotoreceptory v sietnici a je od narodenia prítomná závažná porucha zraku. Defektný je gén RPE65 (z anglického retinal pigment epithelium). Než bola spustená klinická štúdia sledujúca schopnosť systému CRISPR/Cas9 efektívne odstrániť mutácie spôsobujúce Leberovu kongenitálnu amaurozu 10, efektívna liečba neexistovala.

5.7.2 Diagnostika kosáčikovej anémie a amyotrofickej laterálnej sklerózy SNP CRISPR/CAS čipmi

Viac ako 50 % mutácií spôsobujúcich ochorenie u ľudí predstavujú jednonukleotidové polymorfizmy (SNP). Ovplyvňujú patogenézu ochorenia a to, ako reagujeme na patogény, chemikálie, lieky a vakcíny. Súčasný zlatý štandard pre rozsiahlu genotypizáciu SNP vyžaduje špecializované vybavenie, personál s odbornými znalosťami a zahŕňa zdĺhavé procesy, vďaka ktorým sú tieto technológie nekompatibilné v mieste starostlivosti alebo v teréne.

Aktuálne vedci vyvinuli nový biosenzor na elektronickú detekciu neamplifikovaných cieľových génov pomocou tranzistorov napojených na CRISPR (*CRISPR-powered transistors*), označovaných aj SNP-čip, ktoré dokážu identifikovať jednonukleotidové polymorfizmy do hodiny.

Ide o technológiu, ktorá kombinuje CRISPR/Cas slúžiaci na vyhľadávanie potenciálnych mutácií v genóme a ultracitlivý grafén. Biosenzor pozostáva z katalyticky deaktivovaného proteínu Cas9 (označovaný ako dCas9 alebo deadCas9), ktorý je cieleňý na príslušný gén špecifickou jednovláknovou navádzajúcou gRNA, ktorá je imobilizovaná na povrchu tranzistorov na báze grafénu. Biosenzor hľadá v genóme svoju cieľovú sekvenciu DNA a po naviazaní sa zmenené vodivé vlastnosti grafénu následne detegujú jednoduchou

ručnou čítačkou. CRISPR-čip tak rozširuje aplikácie technológie CRISPR/Cas9 na elektrickú detekciu neznačených, neamplifikovaných nukleových kyselín na čipe.

SNP-čip bol zatiaľ navrhnutý na detekciu SNP v cieľových génoch v dvoch modeloch ľudských chorôb, a to kosáčikovej anémii (SCD) spojenej s bodovou mutáciou v gène *HBB*, ktorý tvorí podjednotku hemoglobínu beta, a amyotrofickéj laterálnej skleróze (ALS). ALS je neurodegeneratívne ochorenie, ktoré je spojené s bodovou mutáciou v gène superoxiddismutázy typu 1 (SOD1). Čipy boli postupne upravené tak, aby dokázali rozlíšiť aj homozygota od heterozygota.

5.7.3 SHERLOCK a DETECTR

Ďalšie dve jednoduché platformy pre diagnostiku na báze CRISPR, poskytujúce rýchlu a špecifickú detekciu SNP sú SHERLOCK (z anglického *Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking*) a DETECTR (z anglického *DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter*).

5.8 CRISPR/Cas a imunoterapeutická stratégia pri liečbe onkologických ochorení

Keďže aj mnohé onkologické ochorenia sú spôsobené mutáciou v jednom gène, konkrétne genetickými a epigenetickými zmenami v onkogénoch a tumorsupresorových génoch, technológia našla uplatnenie aj pri liečbe nádorových ochorení. Cieľom je vniesť do organizmu CRISPR/Cas systém rozpoznávajúci sekvencie DNA typické pre nádorové bunky, a tým vyradiť gény nepostrádateľné pre rast nádoru. Reťazovou mutagénou reakciou by sa tento zásah šírila do všetkých rakovinových buniek. Experimentálne modelovanie a funkčné testovanie novo-identifikovaných mutácií v onkogénoch a tumorsupresorových génoch pomocou systému CRISPR/Cas už prebieha. Významne ovplyvňuje napredovanie a smerovanie personalizovanej medicíny. Terapeutický potenciál CRISPR/Cas9 v oblasti protinádorovej terapie bol potvrdený množstvom *in vitro*, *in vivo* a *ex vivo* experimentov.

Iným, obzvlášť úspešným a najviac používaným prístupom je aplikácia CRISPR/Cas9 technológie v imunoterapii nádorových ochorení, a to predovšetkým v adoptívnej (nezamieňať s adaptívnou) imunoterapii, ktorá je založená na izolácii pacientových T-lymfocytov, ich genetickej modifikácii *ex vivo*, kultivácii a následnom vrátení späť do organizmu, kde dôjde k navodeniu imunitnej odpovede v oblasti nádoru. Dodanie systému CRISPR pomocou vírusových a nevírusových (elektroporácia, lipozómy, nanočastice, ribonukleoproteínový komplex) metód (podrobnejšie vysvetlené v kapitole 5.9 a 5.10) do *ex vivo* izolovaných buniek

je relatívne uskutočniteľnejšie v porovnaní s in vivo zacielením na pevné tkanivo. Preto sa uskutočnili počiatočné klinické štúdie s CRISPR (33 štúdií fázy I/II) na vyliečenie rakoviny krvných buniek a chorôb liečiteľných manipuláciou T-buniek a hematopoetických kmeňových buniek (HSC) *ex vivo*.

Cieľom genetických modifikácií na T-lymfocytoch je upevniť špecifitu a zvýšiť ich afinitu k danému nádorovému antigénu, aktivovať imunitnú odpoveď a zároveň obmedziť riziko vzniku imunitnej reakcie štepu proti hostiteľovi (*graft versus host disease* – GvHD). Rozsah imunitnej reakcie je závislý na interakcii rôznych receptorov a ligandov, ktoré zosilňujú či tlmia procesy aktivácie T-lymfocytov. Dôležitú úlohu v potlačení imunitnej odpovede v nádorovom mikroprostredí hrajú tzv. kontrolné body imunitného systému. Za jeden z nich je považovaná interakcia PD-1/PD-L1, ktorá navodzuje funkčnú inaktivitu lymfocytov, a tým chráni organizmus pred vznikom autoimunitných ochorení. Táto interakcia prispieva k „vyčerpaniu“ efektorových lymfocytov, ktoré nie sú schopné špecifickej cytotoxickej odpovede a deštrukcie cieľových buniek, čo môže naopak viesť k navodeniu nádorovej tolerancie. K jej vzniku prispieva predovšetkým expresia PD-L1 na povrchu nádorových buniek. Jednou z možností imunoterapie je vyradenie kontrolného bodu PD-1, a tým navodenie vyššej aktivity imunitného systému. Je potrebné spomenúť, že v súčasnej dobe existujú monoklonálne protilátky blokujúce receptor PD-1, ale aj ligand PD-L1, ktoré boli schválené na liečbu pokročilého metastázujúceho melanómu, renálneho karcinómu a nemalobunkového karcinómu pľúc.

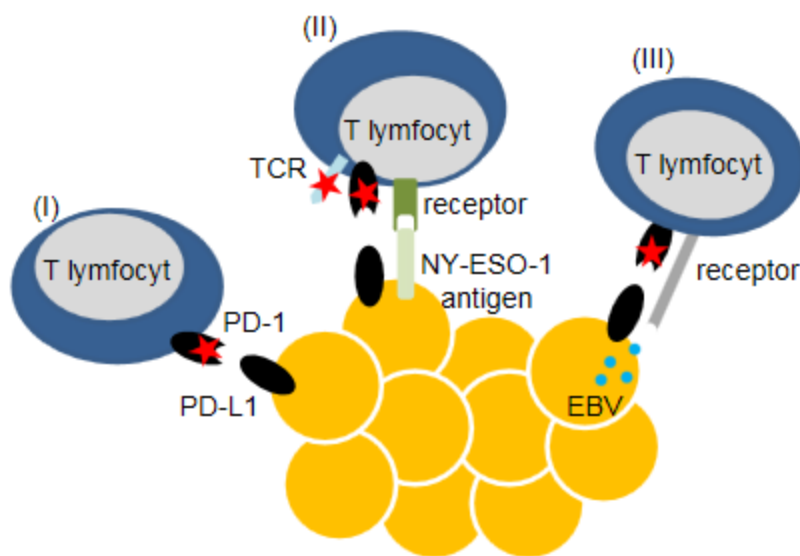
T-lymfocyty modifikované CRISPR/Cas9 s vyradeným PD-1 boli použité v klinickej štúdii (NCT02793856) (Obrázok 5.7 (I)) vykonanej u pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc, u ktorých zlyhala štandardná liečba a u ktorých bola zistená zvýšená expresia PD-L1 na nádorových bunkách. Štúdia je zameraná na zhodnotenie bezpečnosti a definovanie maximálnej tolerovanej dávky po implantácii autológnych T lymfocytov modifikovaných CRISPR/Cas9 s vyradeným PD-1 (PD-1-/- T). Štúdie sa zúčastnilo deväť pacientov, dokončilo ju osem z nich. Záverom štúdie bolo konštatované, že terapia PD-1-/- T sa zdá byť bezpečná. Z nežiaducich účinkov bola najzávažnejšia hyperhidróza (nadmerné potenie). Ďalej u pacientov dochádzalo k zvýšenej aktivite pečenej transamináz (ALT/AST), trombocytopénii, únave či horúčke, všetko hodnotené v miernej až strednej závažnosti (stupeň 1–2). Jeden pacient trpel srdcovou arytmiou stupňa 1, a to po dobu 42,4 týždňa. Sedem pacientov odpovedalo na priebeh liečby. U dvoch bolo ochorenie stabilizované po dobu 18 – 22 týždňov a zároveň bola zistená väčšia diverzita T lymfocytov ako u ďalších piatich pacientov, u ktorých došlo k progresii ochorenia.

Štyri ďalšie klinické štúdie využívajúce podobný koncept delécie PD-1 na autológnych

T lymfocytoch boli registrované pri liečbe rakoviny prostaty (NCT02867345), močového mechúra (NCT02863913), pažeráka (NCT03081715) a obličiek (NCT02867332).

V ďalšej klinickej štúdii (NCT03399448) (Obrázok 5.7 (II)) bolo testované využitie T lymfocytov nesúcich tri rôzne genetické modifikácie indukované CRISPR/Cas9 v liečbe mnohopočetného myelómu, synoviálneho sarkómu, myxoidného liposarkómu a melanómu. Okrem obmedzenia expresie PD-1 bola vyradená aj časť T-bunkového receptora (*T-cell receptor* – TCR) a vnesený modifikovaný receptor selektívne sa viažuci na antigén NY-ESO-1 exprimovaný na nádorových bunkách. Vyradenie T-bunkového receptora by malo pomôcť znížiť riziko vzniku imunitnej reakcie štepú proti hostiteľovi.

Klinická štúdia fázy I/II (NCT03044743) (Obrázok 5.7 (III)) je registrovaná na liečbu malignít asociovaných s vírusom Epstein a Barrovej, u ktorých veľmi často dochádza k zvýšenej expresii PD-L1. V štúdii sú využité T-lymfocyty modifikované CRISPR/Cas9 s vyradeným PD-1, ktoré sú špecifické k bunkám infikovaným vírusom Epstein a Barrovej. Na inhibíciu interakcie PD-1/PD-L1 sú v súčasnosti využívané monoklonálne protilátky. Napriek tomu celý zámer s „nabudením“ imunitného systému pomocou modifikovaných T-lymfocytov vyzerá veľmi sľubne a je ďalšou alternatívou protinádorovej terapie využiteľnou v klinickom prostredí.



Obrázok 5.7 Schéma adoptívnej imunoterapie nádorov využitím T lymfocytov geneticky modifikovaných CRISPR/Cas9. (I) vyradenie PD-1, (II) vyradenie PD-1 a TCR a s modifikovaných receptorom viažucím sa selektívne na antigén NY-ESO-1, (III) s vyradeným PD-1 a špecificky sa viažuce k bunkám infikovaným EBV. Upravené podľa Zatloukalová a spol., 2019.

Ďalšia imonoterapeutická stratégia je založená na využití modifikovaných T-lymfocytov upravených *ex vivo* tak, aby exprimovali chimérický antigénny receptor (CAR z anglického *chimeric antigen receptor*). Ten je tvorený intracelulárnou doménou TCR, ktorá vedie

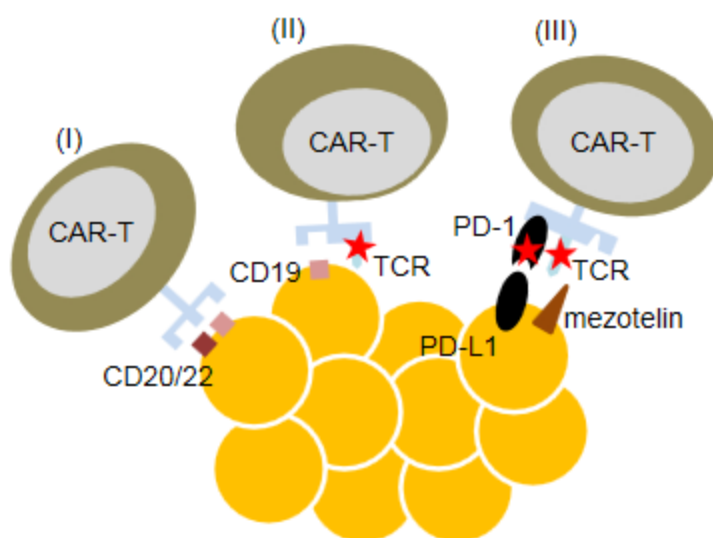
k aktivácii T-lymfocytov a spúšťa cytotoxickú odpoveď, a extracelulárnou doménou špecificky rozoznávajúcou cieľový antigén. Výhodou týchto geneticky modifikovaných T-lymfocytov je špecifita väzby na cieľový antigén bez nutnosti spracovania antigénu a jeho prezentácie na hlavnom histokompatibilnom komplexe (MHC z anglického *major histocompatibility complex*). Cieľom je zabezpečiť, aby tieto geneticky modifikované T-lymfocyty rozpoznali špecifické antigény vyskytujúce sa na povrchu malígnych buniek a eliminovali ich. Táto metodika sa vyvíja už viac ako 20 rokov. V jej priebehu vzniklo niekoľko generácií chimérických antigénnych receptorov a súčasne boli zdokonaľované metodiky ich bezpečného a účinného vloženia do autológnych T-lymfocytov. Pôvodne bola používaná transfekcia DNA, neskôr transpozónové vektory obsahujúce element pre integráciu, až po stabilnú transdukciiu T-lymfocytov pomocou lentivírusových vektorov. Úspešne bola testovaná špecifita CAR-T lymfocytov k antigénu CD19, ktorého expresia je obmedzená predovšetkým na B-lymfocytnú líniu. U mnohých pacientov veľmi často dochádza k relapsu ochorenia z dôvodu straty CD19 na nádorových bunkách. Riešenie ponúka klinická štúdia (NCT03398967), ktorej úlohou je zhodnotiť uskutočniteľnosť a bezpečnosť terapeutického použitia CRISPR/Cas9 na prípravu modifikovaných CAR-T lymfocytov špecifických k CD19 a CD20 alebo k CD10 pre B-lymfocytovú leukémiu v recidíve alebo s malígnym B-lymfómom (Obrázok 5.8 (I)). CD20 alebo CD22 sú ďalšie antigénne štruktúry exprimované na povrchu B-lymfocytov a CAR-T lymfocyty afinitné k týmto antigénom by pomohli rozpoznať nádorové bunky, u ktorých došlo k strate CD19, a to rozpoznaním znakov CD20 alebo CD22. Väčšina CAR-T lymfocytov je pripravená z T-lymfocytov jednotlivých pacientov, čím sa terapia výrazne predlžuje a finančne predražuje. Možnosťou je príprava univerzálnych CAR-T lymfocytov, u ktorých však dochádza k zvýšeniu rizika vzniku imunitnej reakcie štepu proti hostiteľovi. Riziko imunitnej reakcie štepu proti hostiteľovi bolo výrazne znížené u CAR editovaného pomocou CRISPR/Cas9 do receptorov $\alpha\beta$ TCR (tvorený polypeptidovými reťazcami α a β), ktoré rozpoznávajú výhradne antigény prezentované na povrchu MHC molekúl.

Jediná registrovaná *in vivo* štúdia (NCT03057912) využíva CRISPR/Cas9 na liečbu cervikálnych intraepiteliálnych neoplázií (CIN), ktoré môžu viesť najmä k vzniku karcinómu krčka maternice u žien. Hlavným kauzálnym faktorom je infekcia vysoko rizikovými ľudskými papilomavírusmi (HPV z anglického *human papillomavirus*), najčastejšie HPV16 a HPV18, u ktorých v priebehu karcinogenézy dochádza k zvýšenej expresii onkoproteínov E6 a E7. Cieľom štúdie je eliminovať HPV priamo vo vnútri ľudského tela. Ženám vo veku 18 – 50 rokov s ľahkou dyspláziou (CIN I) a pozitívnou HPV infekciou bol dvakrát týždenne po dobu

štyroch týždňov aplikovaný na infikovaný krček gél nesúci konštrukty CRISPR/Cas9, ktoré boli navrhnuté tak, aby obmedzili expresiu vírusových proteínov E6 a tým zabránili malígnej transformácii.

V ďalšej klinickej štúdii (NCT03166878) (Obrázok 5.8 (II)) sú testované CAR-T lymfocyty špecifické k CD19 s vyradenou doménou TCR. Cieľom je zistiť, či tieto genetické modifikácie T-lymfocytov znížia riziko vzniku imunitnej reakcie štepu proti hostiteľovi bez obmedzenia terapeutického účinku u pacientov s B-lymfocytovou leukémiou v recidíve alebo s malígnym B-lymfómom.

Klinicky testované (NCT03545815) (Obrázok 5.8 (III)) sú aj CAR-T lymfocyty s CRISPR/Cas9 vyradenou doménou TCR a PD-1 (alebo CTLA-4), ktoré sa špecificky viažu k mezotelínu, ktorý je považovaný za povrchový antigén s vysokou expresiou v rade solídnych nádorov. Vyradenie PD-1 alebo CTLA-4 (ďalší kontrolný bod imunitného systému) napomáha utlmiť inhibičné mechanizmy imunitného systému a podporiť jeho nabudenie v hostiteľskom prostredí.



Obrázok 5.8 Schéma adoptívnej imunoterapie nádorov využitím CRISPR/Cas9 modifikovaných CAR-T lymfocytov. (I) špecifických k CD19 a CD20/22, (II) špecifických k CD19 s vyradeným TCR, (III) špecifických k mezotelínu s vyradeným TCR a PD-1. Upravené podľa Zatloukalová a spol., 2019.

5.9 CRISPR/Cas v boji proti patogénom človeka

Široké uplatnenie nachádza technológia CRISPR/Cas aj v boji proti ochoreniam, ktoré sú spôsobené ľudskými patogénmi, vrátane vírusov, baktérií, prípadne protozoí. Vírusy predstavujú nebunkové mikroorganizmy, zvyšok patogénnych mikroorganizmov pozostáva z bunky, konkrétne baktérie z bunky prokaryotickej a protozoá z bunky eukaryotickej.

5.9.1 Liečba bakteriálnych infekcií rezistentných na antibiotiká

V súvislosti s liečbou bakteriálnych infekcií sa do popredia dostávajú dva problémy. Na jednej strane neschopnosť štandardných antibiotík pôsobiť selektívne bakterocídne len na patogénne baktérie a nenarušať tak eumikrobiu, a teda pozitívne pôsobenie ľudského mikrobiómu. Na druhej strane príliš rozšírené a nevhodné používanie antibiotík umožňuje rezistentným baktériám šíriť ich gény rezistencie ďalej prostredníctvom plazmidov.

Plazmidová DNA baktérií a vznik rezistencie na antibiotiká

Plazmidy sú malé kruhové DNA, ktoré môžu byť v prokaryotickej bunke voľne v cytoplazme alebo integrované, čiže zabudované do genómu bakteriálnej bunky. Integrované plazmidy sa označujú pojmom epizómy. Počet plazmidov v bunke sa pohybuje od 1 až do viac ako 100. Čím je plazmid menší, tým väčší býva počet jeho kópií v bunke. Počet kópií plazmidu je pre daný plazmid v danom hostiteľovi konštantný a označuje sa pojmom plazmidové číslo alebo *copy number*. Plazmidy predstavujú prídavnú, nie nepostrádateľnú genetickú informáciu baktérií. Obsahujú od troch do sto génov. Funkcie, ktoré kódujú, nie sú všeobecne životne nepostrádateľné, ale v špeciálnych podmienkach prostredia môžu svojho hostiteľa zvýhodňovať alebo zachrániť pred zahynutím. Okrem rezistencie na antibiotiká môže byť plazmid zodpovedný za rezistenciu na chemoterapeutiká a ťažké kovy, produkciu antibiotík a toxínov, degradáciu a oxidáciu inak biologicky inertných alebo toxických organických látok, tvorbu reštrikčných a modifikačných enzýmov a schopnosť symbiôzy. Niektoré plazmidy sú kryptické, čiže sú v bunke prítomné, ale nepoznáme ich fenotypový prejav.

Plazmid je definovaný ako replikón schopný trvalej prítomnosti v bunke v mimochromozomálnom stave. To je veľmi dôležitá definičná vlastnosť, lebo to znamená, že pre udržanie plazmidu v bunke nie je nutný trvalý špecifický selekčný tlak, napríklad prítomnosť antibiotika. Plazmid svojimi vlastnými génmi autonómne riadi a kontroluje svoju replikáciu a segregáciu do dcérskych buniek, dokonca so stálym počtom kópií. V jednej bakteriálnej bunke môže byť viac druhov plazmidov, ale len niektoré druhy plazmidov sú kompatibilné, čiže iba niektoré druhy plazmidov vedia pretrvávať a koexistovať v množiacej sa bunke vedľa seba. Segregačná stabilita plazmidu nie je absolútna a bunka môže plazmid stratiť. Strata je trvalá a bunka nie je sama schopná plazmid vytvoriť. Môže ho však získať od inej bunky.

Intercelulárny prenos plazmidu môže byť vertikálny, a to na priame potomstvo, kedy sa do dcérskych buniek prenášajú kópie plazmidu, a horizontálny medzi nepríbuznými bunkami, a to nie len medzi klonmi rovnakého druhu, ale dokonca medzi rôznymi druhmi a rodmi. Objav

tohoto spôsobu prenosu genetickej informácie je jedným z najväčších objavov bakteriálnej genetiky. Vysvetlil totiž takzvané nemendelistické dedenie bakteriálnych znakov, preukázal, že DNA je jediným nositeľom dedičnej informácie baktérií ako aj nevysvetliteľné pomnoženie a selekciu mutantov. Intercelulárny horizontálny prenos je zabezpečený procesmi konjugácie, transdukcie a transformácie.

Ciele účinku antimikrobiálnych látok a mikrobióm

Vznik mnohonásobnej liekovej rezistencie viedol k intenzívnemu záujmu o vývoj nových antibakteriálnych látok. Zatiaľ čo v minulosti boli štandardom širokospektrálne antibakteriálne látky, v súčasnosti dominuje potreba eliminovať patogény selektívne pri zachovaní prirodzenej mikroflóry. Väčšina antibiotík sa zameriava na inhibíciu tých štruktúr a dejov bakteriálnej bunky, ktoré sa v ľudských bunkách nevyskytujú. Vtedy sú špecifické s minimálnymi vedľajšími účinkami na eukaryotické bunky ľudského tela. K takýmto patria antibiotiká inhibujúce syntézu bunkovej steny, ako sú napríklad betalaktámy a glykopeptidy, antibiotiká zvyšujúce permeabilitu vonkajšej fosfolipidovej membrány bunkovej steny gramnegatívnych baktérií, ako sú polypeptidové antibiotiká alebo lipopeptidy, antibiotiká inhibujúce bakteriálnu transláciu, ako sú aminoglykozidy, tetracyklíny a makrolidy, a antibiotiká zasahujúce do replikácie alebo transkripcie alebo selektívnym spôsobom vyvolávajúce zlomy DNA baktérií, ako chinolóny, ansamycíny a nitroimidazoly. V prípade inhibície syntézy bunkovej steny alebo zvýšenia jej permeability, ide o zásah, ktorý bakteriálnu bunku zabije. Takýto účinok označujeme pojmom baktericídny. Baktericídny účinok majú aj antibiotiká, ktoré sa ireverzibilne, čiže nevratne, viažu na ribozomálne podjednotky bakteriálnych ribozómov. Ak je však väzba na ribozomálnu podjednotku reverzibilná, ako v prípade tetracyklínov, hovoríme o bakteristatickom účinku, nakoľko po uvoľnení sa tetracyklínu z ribozómu môže translácia pokračovať.

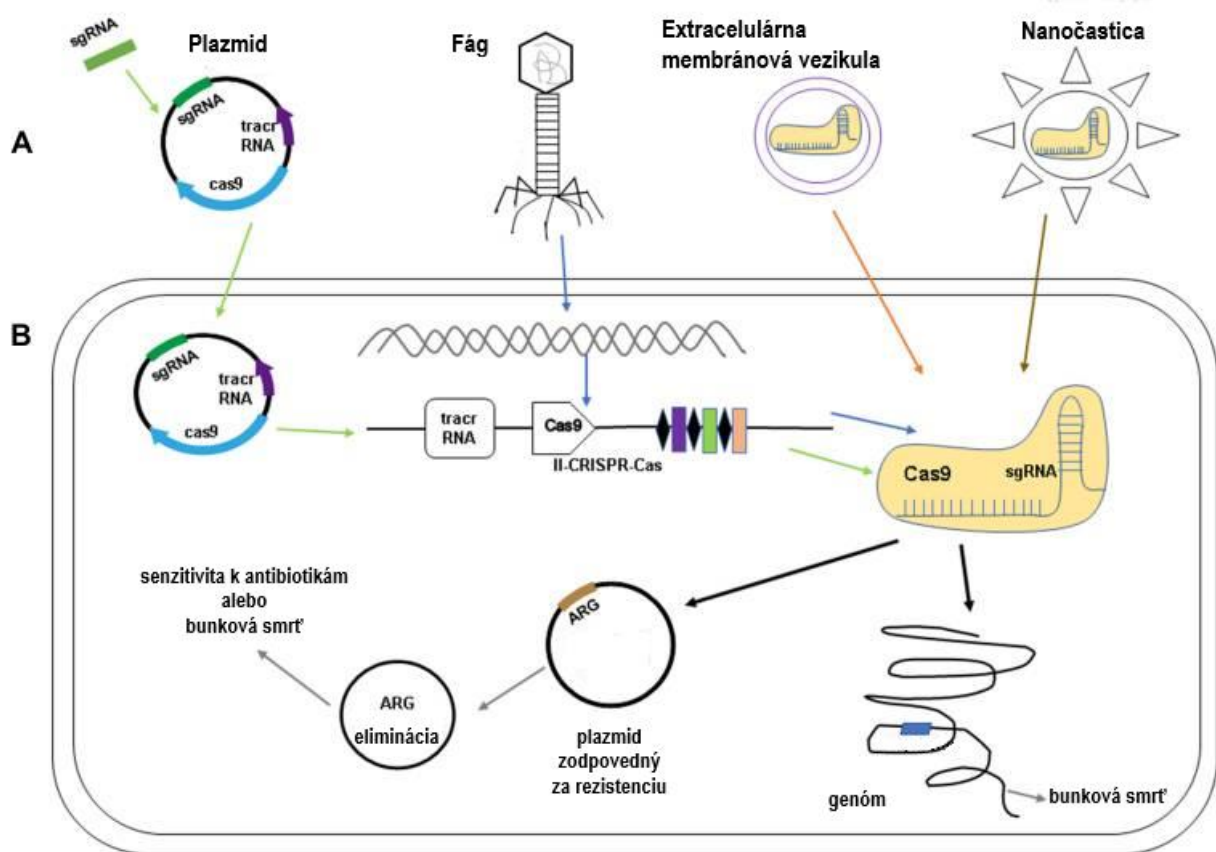
Pretože efekt antibiotík je cielený na takéto základné procesy, antibiotiká neovplyvňujú len patogénne baktérie, ale menia aj natívnu, prospešnú flóru jednotlivca a môžu spôsobiť dismikrobiu. Dnes sa ukazuje, že narušenie prirodzenej mikroflóry môže mať ďalekosiahlejšie nežiaduce účinky, ako sa v minulosti pozorovalo. Viacero štúdií poukazuje na odlišné zloženie mikrobiómu u ľudí trpiacich chronickým zápalom hrubého čreva, obezitou a autizmom. Experimentami na hlodavcoch bolo preukázané, že transplantácia stolice môže prejavy autizmu eliminovať. V prípade terapie chronických zápalov hrubého čreva sa transplantácia stolice v klinickej praxi úspešne aplikuje aj na Slovensku.

Krisprové antibiotiká

V súčasnosti nie je k dispozícii antibiotická stratégia zameraná len na patogénne baktérie alebo baktérie rezistentné k účinkom antibiotík. Špecifickosť a jednoduchý mechanizmus účinku systému CRISPR/Cas umožňuje využitie týchto obranných systémov ako základ programovateľných antimikrobiálnych látok, ktoré sú označované pojmom krisprové antibiotiká. Antimikrobiálna terapia je v súvislosti so systémom CRISPR/Cas zameraná najmä na využitie dvoch jeho mechanizmov, a to priameho účinku voči genómu baktérií a účinku voči plazmidom zodpovedným za rezistenciu baktérií. Väčšina baktérií má nedostatočne fungujúce mechanizmy opravy DNA, takže dvojvláknový zlom v genóme baktérií indukovaný CRISPR/Cas systémom je pre ne smrteľný. Ak sa dvojvláknový zlom vyskytne v plazmide, dôjde k jeho vymiznutiu z baktérie, čo v závislosti od povahy plazmidu môže tiež spôsobiť smrť baktérie. Jedinečnosť CRISPR/Cas systému spočíva v tom, že sa zameriava na špecifické sekvencie v jedinom virulentnom bakteriálnom druhu alebo dokonca na gén rezistencie voči antibiotikám a nie na spomínané základné životné bakteriálne procesy. Nepatogénne baktérie tak zostávajú nepoškodené a pomáhajú pri obnove zdravej mikrobioty, čím sa znižuje pravdepodobnosť infekcie oportúnnymi patogénnymi mikroorganizmami.

Vpravenie CRISPR/Cas systému do bakteriálnych buniek

Problémom antimikrobiálnych látok založených na CRISPR/Cas systémoch zostáva ich transport do príslušných buniek a skutočnosť, že jednoduché modely *in vivo* vykazujú výrazné zníženie účinnosti v porovnaní s experimentami *in vitro*. Nedoriešeným zostáva zatiaľ aj problém možnosti vzniku rezistencie na tento typ antibiotík. Obava vznikla na základe experimentov, počas ktorých neboli všetky cieľové baktérie usmrtené dostatočne rýchlo a niektoré dokonca liečbu krisprovými antibiotikami prežili. Do niektorých baktérií sa CRISPR/Cas vôbec nedostal, do iných síce prenikol, ale baktérie ho zase rýchlo vylúčili, alebo sa CRISPR/Cas poškodil a stratil tak účinnosť. V uvedených prípadoch bol CRISPR/Cas systém vnášaný do bakteriálnych buniek pomocou bakteriofága (vírus schopný infikovať baktérie). Predpokladá sa preto, že za odolanie účinku CRISPR/Cas môže mutácia bakteriálnej DNA, vďaka ktorej došlo k úplnej strate alebo k principiálnej zmene receptora, prostredníctvom ktorého sa bakteriofág zachytí na povrchu bakteriálnej bunky. Ak sa bakteriofág na povrchu bakteriálnej bunky neuchytí, nemôže CRISPR/Cas do bunky vniesť. Na obrázku 5.9 je znázornený postup redukcie génov rezistencie a plazmidov rezistencie pomocou systému CRISPR/Cas vneseného do bakteriálnych buniek plazmidmi, extracelulárnymi vezikulami, fágmi a nanočasticami ako nosičmi.



Obrázok 5.9 Redukcia génov a plazmidov rezistencie pomocou systému CRISPR/Cas. A) Spôsoby dodávania komponentov CRISPR/Cas: dodávanie na báze plazmidov (navrhnutá a syntetizovaná sgRNA zacielená na cieľový gén a ligovaná do plazmidového vektora obsahujúceho Cas9); dodávanie na báze fágov (systém CRISPR/Cas integrovaný do fágového génomu a dodávaný s fágom ako vektor); dodávanie pomocou extracelulárnych vezikúl (EV) a dodávanie na základe nanočastíc (proteín Cas9 a sgRNA tvoria ribonukleoproteínový komplex (RNP) a sú zabalené do EV alebo nanočastíc). B) Aplikácia systému CRISPR/Cas pri rezistencii na antibiotiká. Keď sa do bakteriálnych buniek dodajú systémy CRISPR/Cas, gény rezistencie na antibiotiká (ARG) na plazmidoch môžu byť eliminované a baktérie znova senzibilizované k antibakteriálnym látkam. CRISPR/Cas tiež vykazuje silnú baktericídnu aktivitu a spôsobuje, že bunka po rozpoznaní cieľového ARG na plazmide a cieľového miesta na génome zomrie. Upravené podľa Tao a spol., 2022.

a) Transport systému CRISPR/Cas založený na plazmidovom vektore

Niektoré, tzv. konjugatívne plazmidy, majú vďaka príslušným génom schopnosť po spojení donorovej a recipientnej bunky prostredníctvom špecifického pilusu prechádzať z bunky do bunky, pričom donorová bunka plazmid nestráca, nakoľko priamo počas transportu dochádza k jeho replikácii mechanizmom otáčavej kružnice, čiže plazmid sa v populácii baktérií, a to aj rôznych druhov či rodov, rozšíri. Takýto spôsob horizontálneho prenosu génov je pre človeka mimoriadne nebezpečný v súvislosti so šírením rezistencie na antibiotiká.

Integrácia sekvencií systému CRISPR/Cas alebo niektorých jeho komponentov do plazmidového vektora umožňuje vniesť systém CRISPR/Cas do buniek a následne cieľiť a štiepiť gény rezistentné voči liekom, čím sa znižuje odolnosť rezistentných baktérií voči

antibiotikám. Jeden zo spôsobov prenosu bakteriálnych génov, ktorý podporuje šírenie génov rezistencie, je konjugácia.

Zavedenie plazmidového vektora nesúceho systém CRISPR/Cas do rezistentných baktérií (napríklad pCasCure systém do *Enterobacteriaceae* rezistentných na antibiotikum karbapeném) odstráni gény rezistencie a tým ich resenzibilizuje. Baktérie zároveň daný plazmid obsahujúci systém CRISPR/Cas prostredníctvom konjugácie prenášajú na iné baktérie, čo značne rozširuje rozsah použitia systému CRISPR/Cas na elimináciu génov rezistencie na liečivá v populácii baktérií.

Hlavným faktorom obmedzujúcim klinickú aplikáciu systému CRISPR/Cas je účinnosť prenosu plazmidu. Perspektívu aplikácie systému CRISPR/Cas pri prevencii a kontrole prenosu génov rezistencie na lieky môže rozšíriť práve **zlepšenie účinnosti konjugácie plazmidov**.

Plazmid citlivý na feromóny (PRP z anglického *pheromone response plasmid*), ktorý je prirodzene prítomný v *Enterococcus faecalis*, má vyššiu účinnosť konjugačného prenosu ako iné plazmidy. Tento plazmid použili na prenos systému CRISPR/Cas do grampozitívnych baktérií (*Enterococcus faecalis*). Baktérie nesúce plazmid citlivý na feromóny po indukcii feromónmi vylučovanými recipientnými bunkami bez daného konjugačného plazmidu začnú produkovať proteín adhezín, ktorý podporuje agregáciu donorových a recipientných baktérií, čím sa zvyšuje účinnosť konjugácie plazmidov.

b) Transport systému CRISPR/Cas do bakteriálnych buniek pomocou fágov

Nekonjugatívne plazmidy môžu byť prenesené transdukciou. Pri pomnožení bakteriofága v infikovanej bunke a tvorbe nových fágových častíc je s určitou pravdepodobnosťou do fágovej hlavičky namiesto fágovej DNA omylom uzatvorená aj plazmidová DNA. Ak takýto fág infikuje ďalšiu bunku, plazmidovú DNA do nej prenesie.

Bakteriofágy predstavujú veľmi rozmanitú skupinu vírusov. Pozostávajú z DNA alebo RNA, ktorá je uzatvorená v hlave bakteriofága pozostávajúcej z proteínov. Štruktúra bakteriofágov môže byť rôzne komplikovaná, všeobecne obsahuje hlavu, chvostík, golier a ďalšie zložky. Genómy bakteriofágov môžu kódovať len štyri gény, ale aj stovky génov. Bakteriofágy sa replikujú v baktérii po injekcii ich genómu do cytoplazmy. V minulosti boli bakteriofágy približne 60 rokov používané v Sovietskom zväze a východnej Európe ako alternatíva k antibiotikám. Dnes predstavujú možnú liečbu proti kmeňom multirezistentných baktérií. A okrem iného nachádzajú uplatnenie aj ako vektor pre vnesenie systému CRISPR/Cas do baktérií.

V porovnaní s plazmidovými vektormi sú fágové vektory nielen schopnejšie infikovať hostiteľské baktérie, ale môžu niesť aj väčšie fragmenty DNA, ktoré možno zaviesť

do CRISPR/Cas systému. Okrem toho je nukleová kyselina uzatvorená v hlavičke fága relatívne stabilná a nie ľahko degradovateľná. To, že fágy sú prirodzené parazity baktérií, z fágov robí preferovaný nástroj pre transport systému CRISPR/Cas do bakteriálnych buniek.

c) *Transport systému CRISPR/Cas do bakteriálnych buniek pomocou extracelulárnych membránových vezikúl*

Aj voľná, v prostredí sa nachádzajúca molekula DNA, môže do tzv. kompetentnej bakteriálnej bunky preniknúť a stať sa jej súčasťou. Takýto prenos DNA do bunky sa označuje pojmom transformácia. Kompetencia je fyziologický stav len prechodne a v prírode nemá významnú úlohu. Stav kompetencie je však možné umelo navodiť. Transformácia bunky plazmidom predstavuje dôležitý metodický nástroj v génových manipuláciách. Pri vnášaní CRISPR/Cas9 do buniek sa však neosvedčil a ako účinnejšie sa ukázalo dodávanie systému do buniek pomocou rôznych nanočastíc.

Membránové vezikuly (MV z anglického *membrane vesicles*) sú nanočastice lipidovej membrány, prvýkrát opísané u gramnegatívnych baktérií. Sú známe aj ako vezikuly vonkajšej membrány (OMV z anglického *outer membrane vesicles*). Sú to vezikulárne štruktúry, ktoré gramnegatívne baktérie vylučujú do extracelulárneho kompartmentu počas ich rastu. Môžu pôsobiť ako transportné systémy pre gény rezistencie na antibiotiká, gény virulencie alebo plazmidy, ktoré sú v membránových vezikulách chránené pred DNázami, a tým sa zvyšuje úspešnosť horizontálneho prenosu génov, resp. DNA.

Membránové vezikuly testovali ako vektory na dodávanie CRISPR/Cas9 na úpravu génov a reguláciu génov. Chýba však mechanizmus na obohatenie membránových vezikúl ribonukleoproteínmi, čo obmedzuje účinnosť membránových vezikúl ako nástroja na transport CRISPR/Cas systému.

d) *Transport systému CRISPR/Cas do bakteriálnych buniek pomocou nanočastíc*

Nanočastice majú malú veľkosť a sú veľmi účinné pri prenikaní biologickými membránami. Po ukotvení systému CRISPR/Cas9 nanomateriálmi sa CRISPR/Cas9 nedá ľahko degradovať a je cielene transportovaný s vysokou účinnosťou.

Uskutočnilo sa veľa štúdií aplikujúcich nanočastice ako nosiče antibiotík, testovali sa polymérne nanočastice a nanokryštály, nanočastice zwitteriónových aminolipidov (ZAL), zmiešané nanočastice exozóm-lipozóm a nanočastice kationových lipidov.

Vzt'ah medzi CRISPR/Cas, šírením antimikrobiálnej rezistencie a tvorbou biofilmu

Obzvlášť nebezpečné je horizontálne šírenie antimikrobiálnej rezistencie, nakoľko sa šíri aj medzidruhovo. Systémy CRISPR/Cas slúžia na ochranu genómu proti invázii exogénneho genetického materiálu, takže môžu zabrániť šíreniu plazmidov a fágov obsahujúcich gény rezistencie na antibiotiká. Tým sa obmedzí horizontálny prenos génov zodpovedných za rezistencie na antibiotiká.

To znamená, že CRISPR/Cas prirodzene prítomný v prokaryotoch slúži zároveň na prevenciu a kontrolu šírenia rezistencie na antibiotiká. Patogény obsahujúce CRISPR/Cas s menšou pravdepodobnosťou nie sú gény rezistencie na antibiotiká ako tie, ktorým tento obranný systém chýba. Z nejakého dôvodu však v niektorých patogénoch, v ktorých sa prítomnosť systémov CRISPR očakáva, tieto chýbajú alebo sú inaktivované.

Baktérie často tvoria biofilmy, ktoré im pomáhajú odolávať rôznym hrozbám v rámci hostiteľa. Okrem iného sa preukázalo, že systém CRISPR/Cas posilnil integritu obalu reguláciou bakteriálnych lipoproteínov a tým bunkám umožnil odolávať poškodeniu membrány účinkom antibiotík.

Anti-CRISPR (Acr) proteíny a odolnosť voči antibiotikám

Mnohé fágy a mobilné genetické elementy vyvinuli anti-CRISPR proteíny (Acres), ktoré pôsobia proti systému CRISPR/Cas pod silným selekčným tlakom vyvíjaným CRISPR/Cas systémom. Anti-CRISPR proteíny inhibujú účinok CRISPR/Cas rôznymi mechanizmami. Môžu blokovat' väzbové miesta DNA, môžu blokovat' štiepenie DNA a dokonca enzymaticky deaktivovat' CRISPR/Cas.

CRISPR/Cas a rýchla detekcia patogénnych mikroorganizmov a ich rezistencie na antibiotiká

V súvislosti s rezistenciou na antibiotiká sa dnes okrem kultivačného dôkazu využívajú aj metódy molekulovej biológie. Na testovanie citlivosti baktérií voči antibiotikám sa používajú fenotypové a genotypové metódy.

a) Fenotypové metódy

Na fenotypové testovanie citlivosti baktérií na antibiotiká sa používajú kvalitatívne a kvantitatívne metódy. Fenotypové testovanie dáva odpoveď na aké antibiotikum je baktéria citlivá a aká je jeho minimálna inhibičná koncentrácia MIC udávaná mg/l.

Príkladom kvalitatívnej metódy je diskový **difúzny test**, ktorého podstatou je difúzia testovaného antibiotika z antibiotického disku do pevného kultivačného média a posúdenie jeho

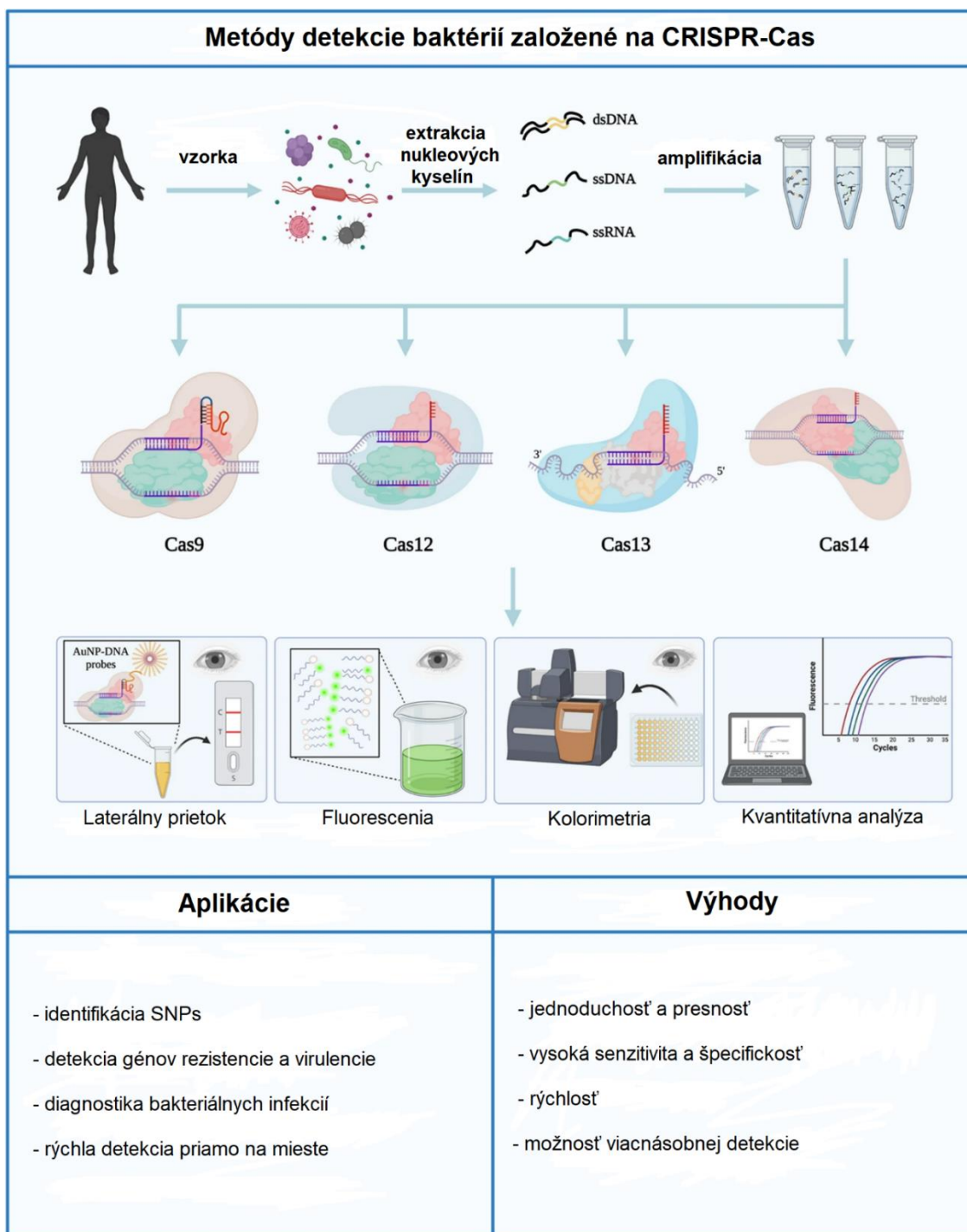
vplyvu na testovaný bakteriálny izolát, ktorý je na povrchu kultivačného média inokulovaný. Hodnotí sa prítomnosť, respektíve neprítomnosť a veľkosť zóny inhibície rastu okolo antibiotického disku, ktorá vzniká pôsobením antibiotika na testovaný bakteriálny izolát.

Antibiotické disky, ktoré sa na test používajú, sú komerčne dostupné filtračné papieriky s presne definovaným obsahom antimikrobiálnej látky. Zostavy testovaných antibiotík sú tvorené tak, aby obsahovali antibiotiká pre jednotlivé skupiny mikroorganizmov, podľa lokalizácie infekcie v organizme ako aj podľa toho, či ide o hľadanie pôvodcu infekcie pacienta v ambulantnej starostlivosti alebo o hospitalizovaného pacienta so závažnou infekciou.

b) Genotypové metódy

Genotypové metódy sú založené na detekcii špecifických génov kódujúcich mechanizmus rezistencie alebo jeho produkt. Genotypové metódy predpovedajú iba rezistenciu, nie sú kvantifikovateľné. Na detekciu génov rezistencie sa používajú molekulárno-biologické metódy a pre epidemiologické účely tiež metódy molekulárnej epidemiológie. Prítomnosť génu rezistencie sa nie vždy prejaví vo fenotype baktérie a nemusí sa rovnať *in vivo* klinickému zlyhaniu liečby infekcie. Príslušný produkt génu nemusí byť exprimovaný vôbec alebo iba na veľmi nízkej úrovni. Na druhej strane absencia génu rezistencie nevylučuje prítomnosť iného mechanizmu rezistencie voči určitej látke. V rutinnej praxi sú genotypové metódy vhodné napríklad na rýchlu detekciu niektorých génov rezistencie s ohľadom na rýchle začatie účinnej antimikrobiálnej liečby, ako v prípade meticilín rezistentného *Staphylococcus aureus* alebo vankomycín rezistentného *Enterococcus faecium* a *faecalis*. Používajú sa metódy PCR na stanovenie jednotlivých génov, multiplexová PCR, real-time PCR, DNA sekvenácia, hybridizačné metódy aj genomické biočipy. Výhodou týchto metód je ich rýchlosť a presnosť určenia známych genetických determinantov rezistencie, nevýhodou je, že nedokážu zachytiť nové, novo sa vyskytujúce, dosiaľ neznáme genetické determinanty rezistencie a nové varianty známych génov rezistencie. Zachytávajú aj gény rezistencie bez fenotypového prejavu, takže citlivosť na antibiotikum musí byť zväčša potvrdená fenotypovými metódami.

V súčasnosti je vynakladané značné úsilie na aplikovanie nástroja CRISPR ako rýchleho nástroja na presnú identifikáciu genotypov a jednonukleotidových polymorfizmov (SNP) v patogénnych baktériách, detekciu génov rezistencie (ARG z anglického *antibiotic resistance genes*) a génov virulencie v patogénnych baktériách a diagnostiku bakteriálnych infekcií (Obrázok 5.10).



Obrázok 5.10 Postupy, aplikácie a výhody metód detekcie baktérií založených na systéme CRISPR/Cas. Na diagnostiku patogénov boli vyvinuté systémy CRISPR/Cas9, Cas12, Cas13 a Cas14. Najprv sa z klinických vzoriek extrahujú a amplifikujú nukleové kyseliny patogénu. RNA vzorky sú amplifikované reverznou T7 transkripciou. Po následnej identifikácii cieľa je tento štiepený zodpovedajúcim systémom CRISPR/Cas. Citlivosť možno zvýšiť metódami využívajúcimi fluorescenciu alebo laterálny prietok. Nasleduje kvantitatívna detekcia patogénov. Okrem toho môžu byť systémy CRISPR/Cas použité na rozlíšenie genotypov patogénov od SNP, rozlíšenie génov rezistencie a génov virulencie, diagnostiku patogénnych infekcií a vykonávanie rýchlej detekcie na mieste. Diagnostika patogénov na báze CRISPR poskytuje prenosnosť, vysokú citlivosť a špecifickosť, úsporu času a viacnásobnú detekciu. Upravené podľa Wu a spol., 2021.

Pre diagnostiku bakteriálnych infekcií a antimikrobiálnych rezistencií boli vyvinuté platformy založené na CRISPR/Cas systémoch cielených na DNA.

Technika FLASH (z anglického *Finding Low Abundance Sequences by Hybridization*) využíva CRISPR/Cas9 na implementáciu multiplexnej detekcie sekvencií zodpovedných za antimikrobiálnu rezistenciu (AMR). Používa sa na testovanie meticilín-rezistentných kmeňov *S. aureus* a vankomycín-rezistentných kmeňov *E. faecalis*.

Ďalšia metóda využívajúca kombináciu fluorescenčného farbiva YOYO-1, AT-selektívnu molekulu netropsín a CRISPR/Cas9 predstavuje jednokrokový test identifikácie a optického mapovania šírenia sa génov blaCTX-M, blaNDM a blaKPC zodpovedných za antimikrobiálnu rezistenciu v nozokomiálnom ohnisku.

Stratégia nazývaná CAS-EXPAR (z anglického *CAS-exponential amplification reaction*) je založená na izotermickej exponenciálnej amplifikačnej reakcii nukleovej kyseliny sprostredkovanej CRISPR/Cas9 a „nicking“ endonukleázou (NEáza – reštrikčný enzým rozpoznávajúci krátku asymetrickú sekvenciu dvojreťazcovej DNA, avšak štiepi len jeden vopred určený reťazec). Má výhody rýchlej a miestne špecifickej detekcie nukleovej kyseliny a nevyžaduje exogénne primovanie, čím sa účinne vyhýba amplifikácii nukleovej kyseliny spôsobenej cudzími primérmí. Okrem toho môže byť použitá na detekciu metylácie DNA.

CRISPR/Cas12 vykazuje nešpecifickú lytickú aktivitu na molekule ssDNA rozpoznaním dsDNA. Využitím Cas12 bol vyvinutý nástroj DetectR, ktorý je vysoko citlivý, rýchlo deteguje DNA alebo RNA a umožňuje identifikáciu zámien jednotlivých báz. Takzvané kolaterálne štiepenie CRISPR/Cas12 sa tiež použilo na diagnostiku a identifikáciu kmeňov a poddruhov baktérie *M. tuberculosis* v klinických vzorkách.

Na princípe CRISPR/Cas12a s kolektívnym testom impedancie bez potreby značenia bolo vyvinuté prvé vysoko citlivé a špecifické prenosné biosnímacie zariadenie na rýchlu detekciu *E. coli* a *S. aureus*. Detekčný limit pre *S. aureus* je len 3 nM. CRISPR/Cas12a známy ako Cpf1 bol vyvinutý na identifikáciu cieľových sekvencií zodpovedajúcich génom rezistencie na karbapeném, ako sú blaKPC, blaNDM a blaOXA. Celkovo sa s testom impedancie bez potreby značenia čas detekcie skrátil na menej ako hodinu a výsledky sú porovnateľné s výsledkami qPCR, pokiaľ ide o presnosť a citlivosť.

CRISPR/Cas14 cielené štiepi ssDNA, pričom Cas14 je najmenší známy proteín Cas. Kombináciou CRISPR/Cas14a s magnetickým DNA nanočasticovým systémom vznikla fluorescenčná platforma na detekciu nukleových kyselín známa ako systém Cas-TSPE (*target-specific primer extension*), ktorá umožňuje vykonávať diagnostickú analýzu bez zložitých

nástrojov a purifikácie nukleových kyselín. Používa sa na detekciu patogénov ako *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pyogenes* a *E. faecalis*.

Ďalšia platforma založená na Cas14a známa pod označením CMP (z anglického *Cas14a1-mediated nucleic acid detection platform*) sa používa na rýchlu detekciu patogénov vo vzorkách mlieka a iných patogénov sledovaných v súvislosti so zdravotnou nezávadnosťou potravín. CMP poskytuje vyššiu citlivosť ako qPCR.

5.9.2 Liečba protozoálnych infekcií

Existujú vážne protozoálne infekcie, ktorých liečba nie je vždy úspešná. Z dôvodu náročnosti protozoí na životné podmienky dané často neobvyklým životným prostredím a životnými cyklami alebo odvodenosťou ich genómov komplikujúcich samotný priebeh génových manipulácií, sa protozoa vyznačujú pri výskume rôznymi komplikáciami.

K protozoálnym infekciám patrí aj malária. Každoročne postihuje až 300 miliónov ľudí, z nich približne 750-tisíc zomrie. Pôvodcom malárie sú plazmódiá prenášané samičkou komára rodu *Anopheles* počas satia krvi. Plazmódiá sa v tele infikovaného človeka krvou dostanú do pečene, kde sú dostatočne chránené pred imunitným systémom postihnutého jedinca, na ktorý sa nakoniec adaptujú. Následne sa začnú jednoduchým delením veľmi rýchlo množiť, z jedného parazita môže vzniknúť až 40-tisíc nových jedincov nazývaných merozoity. Túto fázu životného cyklu plazmódií prežíva infikovaný jedinec bez príznakov. Asi za mesiac a pol sa merozoity z buniek pečene presunú do krvi, kde začínajú patogénny proces, napádajú červené krvinky, v ktorých sa množia, následkom čoho červené krvinky praskajú. Táto fáza životného cyklu plazmódií je sprevádzaná rôznymi príznakmi postihnutého jedinca, ku ktorým patrí horúčka, neznesiteľné bolesti hlavy, zimnica, zvracanie, kŕče, niekedy strata vedomia, anémia, ischémia, prítomnosť hemoglobínu v moči. Desaťročia sa malária liečila chinínom. Neskôr boli vyvinuté a dodnes sa používajú lieky, ku ktorým patrí Artesunat, Amodiachin, Cotrifazit, Mefloquin a ďalšie. Niektoré z nich sa používajú aj k prevencii. Vakcíny proti malárii zatiaľ neexistujú.

Komplikáciou pri génových manipuláciách je v prípade plazmódií práve haploidné krvné štádium, kde inaktivácia génu často vedie k smrti alebo extrémne zníženej životaschopnosti. Tento problém je možné obísť rôznymi formami podmienenej génovej inaktivácie alebo umlčováním, ktoré zachováva nutnú bazálnu hladinu expresie daného génu, avšak metodika je komplikovaná a výsledky sú menej presné. Výrazne znížená životaschopnosť organizmu po umlčaní nevyhnutných génov zároveň vedie k extrémnemu spomaleniu rastu, čo komplikuje ich selekciu počas rastu na selekčných médiách. Mnoho

protozoí sa od ostatných organizmov výrazne odlišuje takzvaným *codon usage bias* (stav nerovnomerného využívania synonymných kodónov pre jednu aminokyselinu). Obmedzenie vplyvu *codon usage bias* je možné dosiahnuť nadexpresiou tRNA, ktoré sú u daného druhu menej zastúpené. To je možné buď zvýšením aktivity promótoru riadiaceho transkripciu prirodzene nižšie syntetizovaných tRNA, alebo inzerciou plazmidu kódujúceho konkrétnu tRNA, čím sa nahradí jej nedostatok a nastane tak syntéza proteínov s úplne odlišným kodónovým zložením.

Existujú CRISPR/Cas systémom pripravené tropické komáre *Anopheles stephensi*, ktoré neprenášajú pôvodcu malárie – plazmódie. Ich rezistencia k malárii je zabezpečená vnesením génov kódujúcich protilátky proti dvom proteínom sporozoítov plazmódií do ich genómu tak, aby sa šírili mutagénnou reťazovou reakciou. Po ich vypustení do voľnej prírody by sa táto ich vlastnosť rozšírila na všetky komáre, čím by sa problém s maláriou vyriešil. Pripravené sú aj komáre šíriace neplodnosť komáríh samičiek. Ak by sa do prírody vypustili takto pozmenení samčekovia, populácia prenášačov mnohých tropických chorôb (malária, žltý zimnica, horúčka dengue a.i.) by skolabovala. Je však zrejmé, že kolaps môže vyvolať v prírode ďalekosiahle zmeny. Komáre sú súčasťou potravinového reťazca a chýbali by tak živočíchom, ktorí sa nimi živia. Otázne je tiež, ktoré druhy hmyzu by komára v prírode nahradili, a aké následky by malo ich rozšírenie. Rovnako tak rozšírenie komárov s mutáciou zodpovednou za rezistenciou k malárii nemusí zostať bez následkov. Odvahu vypustiť takto modifikované komáre do tropického pralesa zatiaľ nikto nenašiel aj napriek tomu, že už existuje systém, ktorý riziko nekontrolovaného šírenia mutácii významne znižuje.

5.9.3 Antivirálna terapia

Je možné navrhnúť CRISPR/Cas rozpoznávajúci bunky, do ktorých zabudoval svoju genetickú informáciu vírus. Postupne by sa tak mohli bunky infikovaného človeka od vírusovej genetickej informácie očistiť. Využitie schopnosti CRISPR/Cas systému špecificky zacieliť nukleotidové sekvencie vo vírusových genómoch umožňuje elimináciu vírusov bez poškodenia ľudských buniek hostiteľa. Identifikovať takýto terapeutický cieľ v prípade vírusov je veľmi náročné, pretože vírusy, na rozdiel od baktérií, pre svoju replikáciu využívajú hostiteľský enzymatický aparát. Doteraz používané vhodné ciele pre terapiu, ktoré zároveň nepoškodzujú ľudské bunky, predstavujú vírusové proteíny, ako napr. vírusové polymerázy, voči ktorým sa vyvíjajú inhibítory alebo vírusové obalové proteíny, ktoré slúžia ako cieľ pri vývoji očkovacích vakcín. Niektoré vírusy však vstupujú do neaktívneho stavu perzistencie alebo latencie, kedy sa

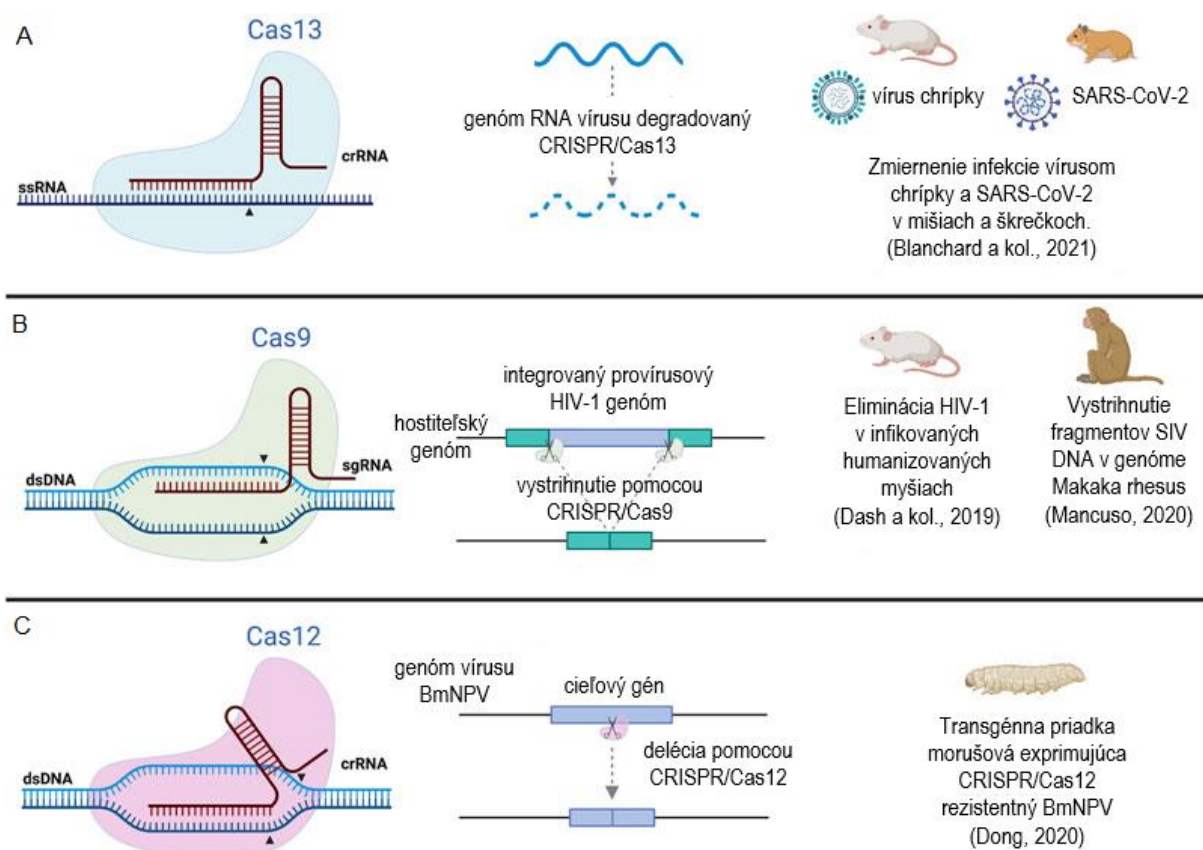
vírusové proteíny netvorí alebo len vo veľmi malom množstve. CRISPR/Cas systém preto predstavuje kľúčový prvok v boji proti vírusovým ochoreniam.

V rámci rozmanitosti prirodzených systémov CRISPR/Cas sa ako možné antivírusové terapeutiká javia najvhodnejšie endonukleázy Cas triedy II, čiže jednoproteínové efektory. Konkrétne Cas9 a Cas12, pričom obe strihajú dvojvláknovú DNA, a Cas13 strihajúca jednovláknovú ssRNA. Sú vhodné proti niektorým DNA a RNA vírusy.

Cas13 štiepi jednovláknovú RNA a môže sa použiť na degradáciu genómov vírusovej RNA. Cas9 strihá dvojvláknovú DNA, čo vedie k vzniku tupých koncov. Môže vystrihnúť integrovanú provírusovú HIV-1 DNA z hostiteľského genómu, čo si vyžaduje dve navádzajúce sgRNA. Dvojitá úprava v tej istej bunke nemusí byť vždy dostatočne účinná na vyrezanie segmentu vírusovej DNA, ale v dôsledku zásahu aspoň na jednom mieste by mohlo dôjsť k inaktivácii replikácie vírusu. Cas12 môže z DNA priamo odstrániť úsek v cieľovej oblasti vo vírusovom genóme. Ilustrované sú príklady štúdií *in vivo* na modelových zvieratách (Obrázok 5.11).

RNA vírusy sa nástupom pandémie COVID-19 stali akútnou globálnou prioritou a v tejto súvislosti sa ako potenciálne antivirotikum stal predmetom záujmu Cas13, keďže strihá ssRNA, ktorá predstavuje aj genóm SARS-CoV-2. V skutočnosti jednovláknové RNA vírusy tvoria väčšinu vírusov, ktoré môžu infikovať ľudí a tak antivírusový systém Cas13 bol vyvinutý a overený dokonca aj v bunkách cicavcov už pred COVID-19. Napríklad Cas13a a Cas13b boli testované proti trom rôznym patogénnym ssRNA vírusom, konkrétne proti vírusu lymfocytovej choriomeningitídy, vírusu chrípky A a vírusu vezikulárnej stomatitídy. CRISPR RNA (crRNA) sú cielené na vysoko konzervované oblasti vírusového genómu, čo umožňuje vyhnúť sa úniku prípadných mutantov. Navyše multiplexovanie, čiže zacielenie na viaceré lokusy súčasne pomocou združených crRNA ešte významnejšie znižuje možnosť úniku mutovaných vírusov.

Z podtypov Cas13 je Cas13d najmenší, čím je najvhodnejší z hľadiska dopravenia na miesto pôsobenia *in vivo* prostredníctvom adeno-asociovaného vírusového vektora, nakoľko práve adeno-asociovaný vírus má sérotypy vysoko špecifické pre pľúca, čo je hlavný orgán pre infekciu vírusom SARS-CoV-2. Navrhnuté bolo zbalit' do jedného vektora Cas13d s tromi rôznymi navádzajúcimi RNA zacielenými na rôzne kódujúce oblasti RNA genetického materiálu vírusu SARS-CoV-2, čím sa minimalizuje možnosť vzniku rezistencie.



Obrázok 5.11 Schéma systémov CRISPR/Cas v antivírusovej terapii. A) Cas13 strihá ssRNA a môže sa použiť na degradáciu genómov vírusovej RNA. B) Cas9 tvorí tupé konce DNA a môže vyrezať integrovanú provírusovú HIV-1 DNA z hostiteľského genómu, čo si vyžaduje dve sgRNA. Dvojitá úprava v tej istej bunke nemusí byť vždy dostatočne účinná na vyrezanie segmentu vírusovej DNA, ale prípadný vznik inzercii a delécií v mieste strihania, môžu inaktivovať replikáciu vírusu. C) Cas12 môže z DNA priamo odstrániť úsek v cieľovej oblasti vo vírusovom genóme. dsDNA - dvojvláknová DNA, ssRNA – jednovláknová RNA, sgRNA – jednoduchá vodiaca RNA, crRNA – CRISPR RNA, HIV-1 – vírus ľudskej imunodeficiencie 1, SIV – vírus opičej imunodeficiencie, BmNPV – nukleopolyhedrovírus *Bombyx mori*, SARS-CoV-2 – koronavírus ťažkého akútneho respiračného syndrómu. Upravené podľa Baddeley a Isalan, 2021.

Platforma PAC-MAN (z anglického *prophylactic antiviral CRISPR in human cells*) využíva Cas13 a CRISPR-asociovanú RNA (crRNA) na štiepenie alebo degradáciu RNA genómu vírusu SARS-CoV-2 a inhibíciu jeho intracelulárnej replikácie.

Riešením technického problému, ktorý spočíva v nájdení vysoko špecifického dodávacieho systému transportujúceho komponenty CRISPR jedinečne do infikovaných buniek, čiastočne rieši systém ABACAS (z anglického *antibody and cas fusion*), v ktorom je CRISPR nukleáza pripojená k hlavnému vírusovému štruktúrnemu proteínu, napríklad S proteínu, čím sa uľahčí spoločný vstup s Cas13 do infikovaných buniek.

Okrem priamej degradácie RNA vírusu SARS-CoV-2 technológiou CRISPR/Cas sa uvažovalo o použití tejto technológie na spresnenie špecificity a bezpečnosti CAR-T buniek, CAR-NK buniek a neutralizačných protilátok proti SARS-CoV-2 počas rôznych štádií

progresie ochorenia COVID-19 u infikovaných jedincov. Takto personalizované kokteily imunoterapeutík a CRISPR/Cas systémov proti COVID-19 ako stratégia môžu zabrániť ďalšej progresii ochorenia a zabrániť vírusu uniknúť pred imunitou.

Technológia CRISPR/Cas ako editačný nástroj v kombinácii s existujúcou technológiou amplifikácie nukleových kyselín, technológiou luminiscencie, technológiou rýchlej detekcie a iných, poskytuje obrovské technické výhody, ako je vysoká citlivosť detekcie, špecifickosť a skrátený reakčný čas. V tejto súvislosti je CRISPR/Cas technológia uplatniteľná aj ako nástroj pre diagnostiku vírusových ochorení. Napríklad molekulárna detekčná platforma SHERLOCK založená na CRISPR/Cas13a systéme cielenom na ssRNA a rekombinantnej polymerázovej amplifikácii dokáže detegovať vírus Zika a vírus Dengue s extrémne vysokou citlivosťou a to až 2 aM (2×10^{-18} mol/l). Verzia SHERLOCKv2 súčasne deteguje viaceré vírusové nukleové kyseliny do 90 minút.

5.9.4 Prevencia priónových ochorení

Prióny predstavujú nebunkové infekčné častice tvorené bielkovinami, ktoré vykazujú vo svojej štruktúre zmeny. Boli objavené v súvislosti s hľadaním pôvodcu ochorenia zvierat, známeho pod názvom ovčia klusavka resp. BSE (z anglického *Bovine Spongiform Encephalopathy*) u hovädzieho dobytku. Postihnuté zvieratá sa vyznačovali agresivitou a trpeli ťažkými poruchami telesnej koordinácie, nedokázali kontrolovať svoje končatiny, padali a po krátkom čase uhynuli. Podobný typ ochorenia postihuje aj ľudí, známa je Creutzfeld-Jacobova choroba.

Prióny, ako pôvodcov ochorení, objavil Daniel Carleton Gajdušek, americký lekár a biológ, pôvodom jediný Slovák, ktorý dostal Nobelovu cenu. Gajduškov otec pochádzal zo Smrdák na Záhorí. V roku 1957 sa dostal na exotický ostrov Papua-Nová Guinea v Tichomorí, kde jeden z primitívnych domorodých kmeňov ničila choroba zvaná kuru. Bola nevyhladiteľná, chorým sa plietli nohy, šklbalo im celým telom a šiekavo sa smiali. Keď Gajdušek prišiel na ostrov, mal pred sebou 28 chorých a 13 mŕtvych. O dva mesiace sa počet obetí zvýšil na 200, boli medzi nimi najmä ženy a deti. Skúšal všetko, čo bolo v tej dobe možné, vitamíny, steroidy, antibiotiká, ale nič nezaberalo. Podrobne skúmal, čo domorodci jedli, robili a ako žili. Postupne zistil, že za ochorenie môže spôsob, akým domorodci prejavovali úctu svojim predkom. Po smrti im odrezali hlavu a zjedli ich mozog. Gajdušek a jeho tím dokázali, že práve takto sa kuru prenáša. V podmienkach, ktoré na ostrove mali, pitvali mŕtvych ostrovanov a vzorkami z ich mozgov nakazili pokusné šimpanzy. Výsledkom bol objav vtedy nazývaných pomalých vírusov, ktoré môžu v tele chorého prežívať aj desiatky rokov bez toho,

aby si to všimol. Potom však choroba prepukne, mozog obete sa zmení na niečo ako špongiu a prichádza smrť.

Vzhľadom k tomu, že prevalencia jedného z priónových ochorení (CWD z anglického *chronic wasting disease*) v niektorých endemických oblastiach Severnej Ameriky presahuje u jeleňovitých 30 % a že nemožno vylúčiť prípadný prenos na iné druhy cicavcov, prípadne na ľudí, v Amerike začali skúmať nové stratégie kontroly šírenia priónového ochorenia nad rámec riadenia populácie prostredníctvom lovu a/alebo utratenia, a to využitím práve systému CRISPR/Cas. Uvedené priónové ochorenie je spôsobené nesprávnou posttranslačnou úpravou bunkového priónového proteínu kódovaného génom *PRNP*. Inhibícia expresie génu kódujúceho daný proteín, ktorá je všeobecne dobre tolerovaná, úplne eliminuje náchylnosť na priónové ochorenie. Elektroporáciou CRISPR/Cas9 do myších oocytov sa podarilo získať koizogénnu líniu myši neexprimujúcich gén *PRNP*. Technickou výzvou zostala úprava samčej zárodočnej línie.

5.10 CRISPR/Cas v regeneračnej medicíne

Mezenchymálne kmeňové bunky (MSC) predstavujú vďaka ich schopnosti diferencovať sa do chondrogénnej línie vhodný zdroj terapeuticky relevantných buniek na regeneráciu hyalínovej chrupavky.

Cieľom cielej diferenciacie je získať regenerát s biomechanickými vlastnosťami podobnými vlastnostiam natívnej hyalínovej chrupavky (hyperelastická, odolnosť proti opotrebeniu, odolnosť voči tlakovým, ťahovým a šmykovým silám). Okrem diferenciacie MSC na chondrocyty je potrebné zvýšenie syntézy proteínov extracelulárneho matrixu hyalínovej chrupavky vrátane fibronektínu, kolagénov, glykozaminoglykánov, proteoglykánov, cytokínov a rastových faktorov zapojených do správneho fungovania chrupavky.

Ďalším faktorom je výber vhodného nosiča, na ktorý sú MSC aplikované. Ak nosič priamo obsahuje faktory podporujúce diferenciaciu MSC, potom ide o takzvanú nepriamu metódu diferenciacie a jej úspešnosť závisí od vlastností nosiča. Druhou možnosťou je *in vitro* cielená priama diferenciacia MSC na chondrocyty, ktoré sa aplikujú na nosič už diferencované.

5.10.1 Metódy indukcie diferenciacie kmeňových buniek na chondrocyty hyalínovej chrupavky

Väčšina experimentálnych metód regenerácie hyalínovej chrupavky, ktoré už boli do klinickej praxe zavedené, využíva techniky priamej modifikácie, čiže indukciu diferenciacie MSC

pred ich aplikáciou na nosič. Indukovať diferenciáciu MSC na chondrocyty hyalínovej chrupavky možno rôznymi fyzikálnymi, chemickými a genetickými faktormi.

Hlavnými fyzikálnymi faktormi ovplyvňujúcimi proliferáciu chondrogénnych buniek sú periodické mechanické namáhanie, hypoxia, elektromagnetické žiarenie, fotobiomodulácia. Následná transformácia fyzikálneho signálu na biochemický signál je sprostredkovaná integrínmi a fokálnou adhézou. Potenciál realizovateľného hydrostatického tlaku účinne podporiť proliferáciu a chondrogénnu diferenciáciu mezenchymálnych kmeňových buniek bol preukázaný *in vitro* a efekt fotobiomodulácie bol úspešne predklinicky aj klinicky testovaný. Chondrogenézu ešte významnejšie podporuje kombinácia vhodných fyzikálnych stimulov s vhodným nosičom.

Z chemických faktorov sú neoddeliteľnou súčasťou formovania reálnych podmienok mikroprostredia a chondrogénnej diferenciácie rastové faktory. Najviac študovanými rodinami s priamym vplyvom na chondrogénnu diferenciáciu mezenchymálnych kmeňových buniek sú fibroblastové rastové faktory FGF-2, inzulínu podobný rastový faktor IGF-1, hypoxické faktory HIF cytokíny superrodiny transformujúcich rastových faktorov TGF- β a s nimi súvisiace kostné morfogenetické proteíny BMP-2,4,6,7, ako aj transkripčný faktor SOX9.

Ďalším terapeutickým prístupom je aplikácia plazmy bohatej na krvné doštičky (PRP z anglického *Platelet Rich Plasma*, autológny prípravok získaný z vlastnej krvi pacienta). Indukcia chondrogénnej diferenciácie MSC krvnými doštičkami aktivovanými trombínom, vápnikom alebo kolagénom uvoľňujúcimi rastové faktory viedla k regenerácii chrupavky u králikov. V súčasnosti prebieha prvá a druhá fáza klinického skúšania na posúdenie účinnosti PRP pri liečbe osteoartritídy kolena (ClinicalTrials.gov ID: NCT05579665, ClinicalTrials.gov ID NCT02118519).

Existujú lieky na báze tzv. malých molekúl, ako je kartogenín (KGN), kurkumín a resveratrol, ktoré sú v porovnaní s často používanými rastovými faktormi príliš malé na vyvolanie imunitnej odpovede a zároveň sú cenovo dostupnejšie. Jednou z najbežnejších malých molekúl používaných ako chondrogénny faktor je KGN. Podporuje produkciu viacerých proteínov súvisiacich s chondrogenézou MSC, vrátane kolagénu typu II a agrekanu.

Chondrogénnu diferenciáciu ako aj produkciu proteínov extracelulárneho matrixu (ECM) je možné kontrolovať genetickou modifikáciou buniek, ktorá zahŕňa transfekciu, transdukciu a priamu úpravu genómu. Všetky tri metódy už boli použité na regeneráciu chrupavky zvierat, ale zatiaľ neboli zavedené do klinickej praxe. Pre aplikáciu genetického inžinierstva ako nástroja regenerácie chrupavky je potrebné detailne poznať molekulárne mechanizmy chondrogénnej diferenciácie MSC. Signálne dráhy a proteíny podieľajúce sa

na chondrogénnej diferenciácii MSC zahŕňajú TGF- β , Hedgehog (Hh), NOTCH, WNT a FGF signálne dráhy, z transkripčných faktorov predovšetkým Sox9 a z matrixových proteínov chrupavky kolagény 1 a 2 a agrekan. Dráhy TGF- β a Hedgehog závislé od R-SMAD môžu podporovať nadmernú expresiu génu pre Sox9, zatiaľ čo dráhy NOTCH a WNT môžu inhibovať chondrogénny transkripčný faktor SOX9. FGF môže pôsobiť na R-SMAD-nezávislú TGF- β signálnu dráhu, a tak hrať úlohu v chondrogénnej diferenciácii. Existujú ďalšie molekuly, ktoré interagujú s transkripčným faktorom SOX9, ako je osteogénny transkripčný faktor RUNX2, PGC1- α (z anglického *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha*) a člen rodiny histón acetyltransferáz P300/Cbp.

Na priamu indukciu chondrogénnej diferenciácie sa používajú transgénne rastové faktory, na reguláciu diferenciácie transgénne transkripčné faktory a oligonukleotidy umožňujú riadiť diferenciáciu MSC prostredníctvom post-transkripčnej génovej regulácie.

Jedným z najjednoduchších, najbezpečnejších a experimentálne a klinicky overených prístupov vyvolania diferenciácie a zmien v bunkovej proliferácii je modifikácia MSC pomocou rekombinantných rastových faktorov. Predklinická štúdia na modeli poškodenia chrupavky kráľíka preukázala schopnosť rekombinantného proteínu Sox9 podávaného v mieste mikrofraktúry indukovať vznik tkaniva so znakmi hyalínovej chrupavky. Klinická štúdia zameraná na bezpečnosť a znášanlivosť, ako aj dávku limitovanú toxicitou a maximálnu tolerovanú dávku intraartikulárneho BMP-7 ukončená v roku 2010, podporila ďalší vývoj tohto produktu na liečbu osteoartritídy. Výsledky štúdií fázy II neboli zverejnené a neboli oznámené žiadne ďalšie štúdie.

Na rozdiel od rekombinantných proteínov a RNA, DNA musí byť vnesená do jadra. Z množstva existujúcich metód by sa mali vybrať tie, ktoré sú vhodné na modifikáciu väčšej populácie buniek. Podobne ako chemické faktory, genetické nástroje umožňujú použitie priamych a nepriamych metód diferenciácie MSC; preto je potrebné rozhodnúť, či by sa diferenciácia MSC mala uskutočniť pred inokuláciou buniek na nosič alebo by sa mal použiť nosič obsahujúci plazmidovú DNA (pDNA).

V procese transdukcie sa ako vektory na vyvolanie chondrogénnej diferenciácie MSC použili retrovírusy, vírus *herpes simplex*, adeno-asociované vírusy a lentivírusy. Prostredníctvom transdukcie sa genetický materiál (vektor a transgén) môže dostať priamo do kĺbu (postup *in vivo*) alebo do explantátov buniek odobratých z kĺbu (postup *ex vivo*), ktorých bezpečnosť sa kontroluje pred ich opätovným doručením do kĺbu. Vedecká literatúra obsahuje mnoho úspešných príkladov transdukcie MSC na zvýšenie chondrogenézy zvýšením

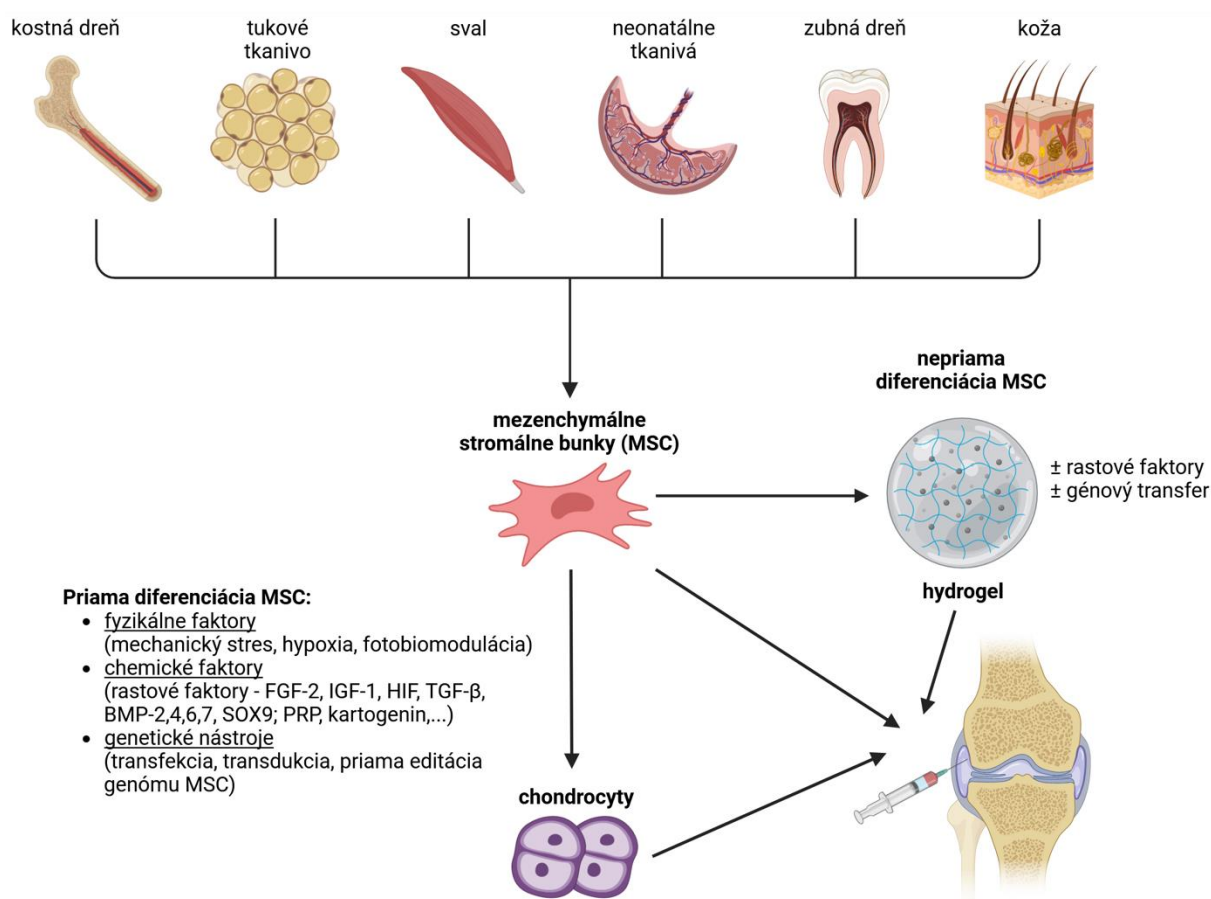
expresie génov zodpovedných za proliferáciu hyalínovej chrupavky vykonanej *in vitro* alebo *in vivo*. Hoci existuje niekoľko úspešných klinických štúdií z hľadiska využitia transdukcie na regeneráciu chrupavky, bolo opísaných aj niekoľko klinických prípadov rozvoja leukémie po transdukcii. Preto sa skúmajú ďalšie metódy génovej terapie uplatniteľných na regeneráciu chrupavky v klinickej praxi.

Primárne bunkové línie, vrátane MSC a chondrocytov, môžu byť transfekované elektroporáciou alebo nanonosičmi, vrátane lipofektamínu. Nukleové kyseliny môžu byť do buniek vnesené aj mikroinjektovaním. Mikroinjekcia nie je vhodná pre veľké populácie buniek. Naopak nanonosiče umožňujú, aby sa nukleová kyselina dodávala aj priamo do jadra, ak sa spolu zavedie sekvencia jadrovej lokalizácie. Dodávanie nukleovej kyseliny priamo do jadra sa nazýva nukleofekcia. Na elimináciu intracelulárneho zápalu a umlčania transgénu sa ukázalo ako vhodné dodávať minikruhovú DNA (mcDNA) pripravenú z plazmidovej DNA odstránením bakteriálnych sekvencií.

Výhodou plazmidov je jednoduchá príprava a chemická stabilita, nevýhodou nutnosť ich transkripcie. Transfekcia mRNA a oligonukleotidov (malá interferujúca siRNA a mikro miRNA) nevyžaduje jadrový transport a transkripciu. Podobne ako DNA a mRNA, siRNA a miRNA môžu byť dodávané prostredníctvom nanonosičov. Pre zvýšenie účinnosti transfekcie a chondrogenézy MSC sa potvrdila aj dôležitosť vhodnej tuhosti a adhézie génovo aktivovaných nosičov.

Ďalším prístupom génovej modifikácie MSC na zvýšenie chondrogenézy je *knockout* génov v kombinácii s miRNA, konkrétne miR-140, miR-21 a miR-675, ktoré ovplyvňujú expresiu ECM génov. CRISPR/Cas predstavuje najnovšiu metódu úpravy genómu pre efektívnu liečbu osteoartrózy a iných degeneratívnych ochorení kĺbov. Prostredníctvom knockoutu zaist'uje technológia CRISPR/Cas aktiváciu špecifickej génovej expresie. Tento prístup bol úspešne aplikovaný na produkciu ECM proteínov v hADSC bunkách, ako aj na aktiváciou sprostredkovanú syntézu kolagénu typu II a agrekanu v hMSC bunkách.

Použitie vírusovej transdukcie MSC na klinické použitie vyžaduje skúsenosti s prácou s vírusmi a bunkovými kultúrami a zvyšuje náklady na túto techniku. Transfekcia, hoci umožňuje obmedzenú klinickú aplikáciu, vedie k nízkej účinnosti a vysokej cytotoxicite MSC. Aplikácia génovej terapie sprostredkovanej CRISPR/Cas v klinickej praxi je okrem etických problémov limitovaná aj možnosťou zavedenia ďalších, nežiaducich mutácií do genómu. Aspekty modifikácie MSC na opravu hyalínovej chrupavky sú zhrnuté na obrázku 5.12.



Obrázok 5.12 Aspekty modifikácie MSC na opravu hyalínovej chrupavky (Priščáková, vytvorené v Biorender.com)

5.10.2 Potenciálne molekulárne ciele CRISPR/Cas9 pri liečbe osteoartritídy

Potenciálne ciele, ktoré môžu byť pri liečbe osteoartritídy (OA) predmetom úpravy systémom CRISPR/Cas9 sú zhrnuté v tabuľke 5.2. IL-1 β je prozápalový cytokín vylučovaný primárne neutrofilmi a indukuje expresiu mnohých génov súvisiacich s OA vrátane tumor nekrotizujúceho faktora alfa (TNF α). Súčasná terapia OA sú zamerané na TNF α , avšak v dôsledku mnohých ďalších funkcií TNF α sa vyskytujú nežiadúce vedľajšie účinky. Ľudská kĺbová chrupavka (hAC z anglického *Human articular cartilage*) vystavená TNF α vykazuje zvýšené hladiny expresie interleukínu IL-1 β . Utlčením IL-1 β cytokínového receptora (IL1-R1) v hAC pomocou CRISPR/Cas9 sa podarilo určiť jeho vplyv na zápal ako aj rediferenciačný potenciál hAC po expozícii interleukínu IL-1 β a TNF α .

Pridanie rekombinantného IL-1 β významne zvýšilo v kontrolnej skupine zápal na rozdiel od knockoutovaných buniek, v ktorých nedošlo k vyvolaniu merateľného zápalu. Terapeutický knockdown IL1-R1 v bunkách kĺbovej chrupavky *in vitro* pred opätovným vstreknutím do tela môže zlepšiť výsledky bunkovej terapie.

V prípade liečby osteoartritídy by zmiernenie starnutia buniek mohlo podporiť ich regeneračnú kapacitu a zlepšiť kvalitu tkaniva. V tomto kontexte by CRISPR/Cas9 mohol byť cielený na *Cbx4*, konexín 43, prípadne *Foxd1*, ktorý môže byť regulovaný pomocou *Yap*. Dôležitú úlohu v zdraví kĺbov hrajú aj degradačné enzýmy, ako sú matricové metaloproteinázy (MMP). Znížením úrovne aktivity *Mmp13* v ľudských chondrocytoch pomocou CRISPR/Cas9 boli bunky schopné akumulovať vyššie hladiny prospešného kolagénu typu II na posilnenie extracelulárneho matrixu kĺbovej chrupavky.

Tabuľka 5.2 Potenciálne ciele CRISPR/Cas9 pri liečbe osteoartritídy

Gén	Symbol	Úloha
Interleukín 1	<i>IL1-β</i>	Zápal
Receptor pre interleukín 1 beta	<i>IL1-R1</i>	Zápal
Osteokalcín	<i>BGLAP</i>	Tvorba trabekulárnej kosti
Mikro RNA 140	<i>miR-140</i>	Homeostáza chondrocytov
Hyaluronan syntáza 2	<i>Has2</i>	Hromadenie agrekanu v chondrocytoch
Receptor rozpustného nádorového nekrotického faktora 1	<i>sTnfr1α</i>	Antagonista TNF
Antagonista receptora interleukínu 1 beta	<i>IL1RA</i>	Antagonista IL-14 beta
Lubricín	<i>Prg4</i>	Lubrikácia kĺbov
Transkripčný faktor súvisiaci s Runt 2	<i>Runx2</i>	Diferenciácia osteoblastov
E3 ubikvitín ligáza podobná proteínu hrd 1	<i>Hrd1</i>	Premena a proteazomálna degradácia proteínov
Matrixový metaloproteín 13	<i>Mmp13</i>	Degradácia tkanív
Konnexín 43	<i>Cx43</i>	<i>Gap junction</i> protein
Nervový rastový faktor	<i>Ngf</i>	Citlivosť na bolesť
Chromobox 4	<i>Cbx4</i>	Homeostáza jadierka
Forkhead box D1	<i>Foxd1</i>	Transkripčný faktor
S Yes proteínom asociovaný proteín 1	<i>Yap</i>	Mechanosenzitívny transkripčný faktor

Osteoartritída nie je len ochorením chrupavky, ale skôr celého kĺbu. Niekoľko fyziologických funkcií kĺbu je ovplyvňovaných osteokalcínom, čo je malý proteínový hormón vylučovaný kostnými osteoblastmi. Aplikovaním technológie CRISPR/Cas9 na expresiu osteokalcínu zlepšili biomechaniku kostí a obnovu trabekulárnej kosti na experimentálnom modeli potkana.

Pomocou technológie CRISPR/Cas9 boli identifikované aj ďalšie potenciálne ciele liečby osteoartritídy. Napríklad CRISPR/Cas9 sprostredkovaný *knockout* génu

pre hyalurónansyntázu 2 (*Has2*) v potkaních chondrocytoch demonštroval dôležitosť hyalurónanu (glykozaminoglykán) pre retenciu agrekanu, proteoglykánu nevyhnutného pre funkčnú integritu kĺbovej chrupavky.

5.11 CRISPR/Cas a transplantácie solídnych orgánov

Transplantácia predstavuje najúspešnejšiu kuratívnu liečbu akútneho a chronického zlyhania orgánov. Medzi dostupnosťou orgánov na transplantáciu a zvyšujúcim sa počtom pacientov v národných čakacích zoznamoch však stále pretrváva nepomer. Z toho dôvodu sa intenzívne hľadá pre vysoký dopyt po orgánoch riešenie. Zatiaľ čo časť výskumníkov sa zameriava na generovanie organoidov z kmeňových buniek alebo indukovaných pluripotentných buniek, iní sa snažia modifikovať genómy buniek alebo celý orgán darcu, aby bol štep tolerantnejší k alo- a xenotransplantácii.

5.11.1 Editovanie génov na bunkovej úrovni *in vivo* a *ex vivo*

Dodanie systému CRISPR (pomocou už spomínaných vírusových a nevírusových metód) do *ex vivo* izolovaných buniek je relatívne uskutočniteľnejšie v porovnaní s *in vivo* zacielením na pevné tkanivo. Vedci zatiaľ nedokážu v laboratóriu vytvoriť orgán z kmeňových buniek na miske, dokážu však vytvoriť alogénne kmeňové bunky odstránením molekúl MHC I a II a vložením proteínu CD47 pomocou CRISPR. Vznikajú tak univerzálne kmeňové bunky, ktoré sa nazývajú „hypoimunogénne“ a vyhýbajú sa imunitnému odmietnutiu. Táto stratégia by sa mohla použiť v budúcich projektoch vývoja orgánov v laboratóriu. Pri dedičnej tyrozinémii typu 1 (HT1) má alogénna transplantácia hepatocytov potenciálne terapeutické výhody, ale dostupnosť dostatočného množstva darcovských buniek a GvHD (z anglického *graft versus host disease*) predstavujú hlavné a bežné obmedzenia pri transplantáciách na báze buniek. Na myšacom modeli tohto ochorenia *in vivo* aj *ex vivo* úprava génu v hepatocytoch sprostredkovaná nástrojom CRISPR zlepšila metabolizmus pečene a preukázala potenciál systému CRISPR ako alternatívnej terapie pre transplantáciu buniek. Ďalší potenciálny cieľ pre bunkovú terapiu sú mezenchymálne kmeňové/stromálne bunky (MSC) a to vďaka svojim protizápalovým, imunomodulačným a tkanivovým reparačným vlastnostiam, ktoré môžu hrať rozhodujúcu úlohu počas transplantácie solídnych orgánov. CRISPR manipulácia s genómom týchto buniek naznačuje potenciálne terapeutické prístupy v transplantácii v budúcnosti.

Tolerancia, špecifická absencia nežiaducej aloimunitnej odpovede na tkanivo štepu v neprítomnosti imunosupresie, predstavuje hlavný krok k úspešnému úplnému vysadeniu imunosupresívneho lieku (IS) po transplantácii solídneho orgánu. Dôležitú úlohu v imunitnej

tolerancii majú dendritické a regulačné T-bunky (Tregs). So snahou získať ďalšie poznatky o mechanizmoch ich ochrany a ich úlohe pri imunotolerancii sa stali cieľom pre úpravy ich genómu nástrojom CRISPR. Vedci dokážu skonštruovať oba typy buniek tak, aby navodili toleranciu. V súčasnosti prebieha približne 50 klinických štúdií aplikujúcich Tregs a 15 z nich je zameraných na transplantáciu solídneho orgánu, žiadna z nich však nevyužíva Tregs upravené nástrojom CRISPR.

Adoptívna bunková terapia polyklonálnych Tregs bola klinicky testovaná pri transplantácii pečene a obličky od živého darcu a preukázala účinnosť pri zastavení IS. Aloantigén-špecifické Tregs sú silnejšími inhibítormi ako polyklonálne Tregs. Produkcia týchto buniek je však veľmi náročná a môže byť uľahčená aplikáciou technológie CRISPR:

- na úpravu génu kódujúceho receptor T-buniek (TCR),
- na úpravu génov kódujúcich chimérické antigénové receptory (CAR) napríklad T-buniek,
- na dosiahnutie nadmernej expresie génu kódujúceho FoxP3 v antigén-špecifických efektorových bunkách CD4+.

5.11.2 Xenotransplantácie a humanizované prasacie pečene

Hospodárske zvieratá a primáty (okrem človeka) sa od roku 1900 považujú za alternatívne zdroje orgánov, s čím súvisia mnohé medicínske, právne a etické problémy. V počiatočných pokusoch boli použité šimpanzy a paviány, ale v modernej xenotransplantácii sa kvôli podobnej veľkosti orgánov, jednoduchosti chovu, vysokému počtu potomkov a menšiemu riziku prenosu chorôb v porovnaní s primátmi uprednostňujú ošípané. Stále však existujú tri hlavné bariéry, ktoré bránia úspešným transplantáciám orgánov ošípanej ľuďom:

- glykány na povrchu endotelových buniek ošípaných pôsobia ako xenoantigény (α -Gal, Neu5Gc, SDa) a spôsobujú hyperakútnu reakciu,
- deregulovaná koagulácia v dôsledku nezhody medzi prasacím a ľudským koagulačným systémom (THBD, TFPI, CD39),
- prasacie endogénne retrovírusy (PERV) v prasacom genóme sa môžu vertikálne preniesť do ľudských buniek.

Vďaka efektívnosti a jednoduchosti úpravy genómu pomocou CRISPR bolo možné za menej ako desať rokov otestovať približne 40 rôznych kombinácií vypnutia génu ošípaných a zapnutia ľudského génu vneseného do genómu ošípaných. V roku 2019 bolo pomocou technológie CRISPR pripravené zatiaľ najpokročilejšie transgénne prasa, v ktorom boli

úspešne odstránené tri gény ošípaných (*GGTA1*, *CMAH*, *B4GALNT2*), inaktivovaných 25 lokusov PERV a v jedinom lokuse špecificky vložených deväť ľudských transgénov (*CD46*, *CD55*, *CD59*, *B2M*, *HLA-E*, *CD47*, *THBD*, *TFBI*, *CD39*). Ďalšie zlepšenia možno v príprave transgénnych zvierat očakávať po vyhodnotení výsledkov prvých klinických skúšok vedúcich k lepšiemu pochopeniu mechanizmov xenoimunitnej odozvy. Jedným z možných spôsobov, ako zlepšiť xenotransplantáciu, je identifikovať ďalšie iné ako Gal xenoantigény a celogenómový skrining využitím CRISPR zameraný na posúdenie úlohy génov ošípaných zapojených do odmietnutia orgánov imunitným systémom človeka. K dnešnému dňu existuje iba jedna štúdia vykonaná pomocou prasacej CRISPR knižnice.

5.11.3 Chimérické orgány a komplementácia blastocýst

So súčasnými technológiami nie je možné vytvárať ľudské orgány v podmienkach *in vitro*; zviera však môže slúžiť ako biologický inkubátor na aspoň čiastočnú produkciu ľudských orgánov. Teoreticky môžu byť pre pacienta špecifické a imunitne prispôbované chimérické orgány pripravené injikovaním ľudských pluripotentných/kmeňových buniek do zvieracej blastocysty (komplementácia blastocysty - do tetraploidnej blastocysty vzniknutej elektrickou fúziou 2-bunkového embrya sú injikované diploidné iPSC bunky, pričom z tetraploidnej blastocysty sa vytvorí len extraembryonálne tkanivo, vnútorná bunková masa a následne aj celé embryo sa tvoria výlučne z iPSCs) alebo do cieľového orgánu v maternici (transplantácia maternice).

Úspešne boli vytvorené chiméry potkan/myš. Pre medzidruhovú chiméru, ako je človek/prasa alebo človek/ovca sa zatiaľ dosiahol len veľmi nízky pomer chimérizmu. Editácia génov pomocou CRISPR zvyšuje účinnosť chimérizmu človek/zviera tým, že deaktivuje vývoj konkrétneho orgánu v hostiteľskej zygotе, a ten môže byť nahradený orgánom z ľudských buniek.

V prebiehajúcich štúdiách tvorby chimérických orgánov sa vedci zameriavajú na využitie transgénnych ošípaných alebo oviec upravených nástrojom CRISPR, ako zdroj zygoty a náhradných zvierat na kultiváciu orgánov. Napríklad vedci z čínskeho Kantonského inštitútu biomedicíny a zdravia úspešne vypestovali „humanizované“ obličky v embryách prasiat. Geneticky upravili embryá tak, aby sa im nevytvorili vlastné obličky a potom im vstrekli ľudské kmeňové bunky. Embryá následne implantovali prasnici a nechali ich vyvíjať sa až 28 dní. Výsledné embryá boli zložené prevažne z prasacích buniek, hoci niektoré ľudské bunky sa našli v celom ich tele vrátane mozgu. Embryonálne obličky však boli z veľkej časti ľudské. Tento objav naznačuje, že čoskoro bude možné vytvárať ľudské orgány v čiastočne

ľudských, takzvaných chimérických zvieratách. Takéto zvieratá by sa mohli používať na lekárske výskum alebo na pestovanie orgánov na transplantáciu, čo by mohlo zachrániť mnoho ľudských životov.

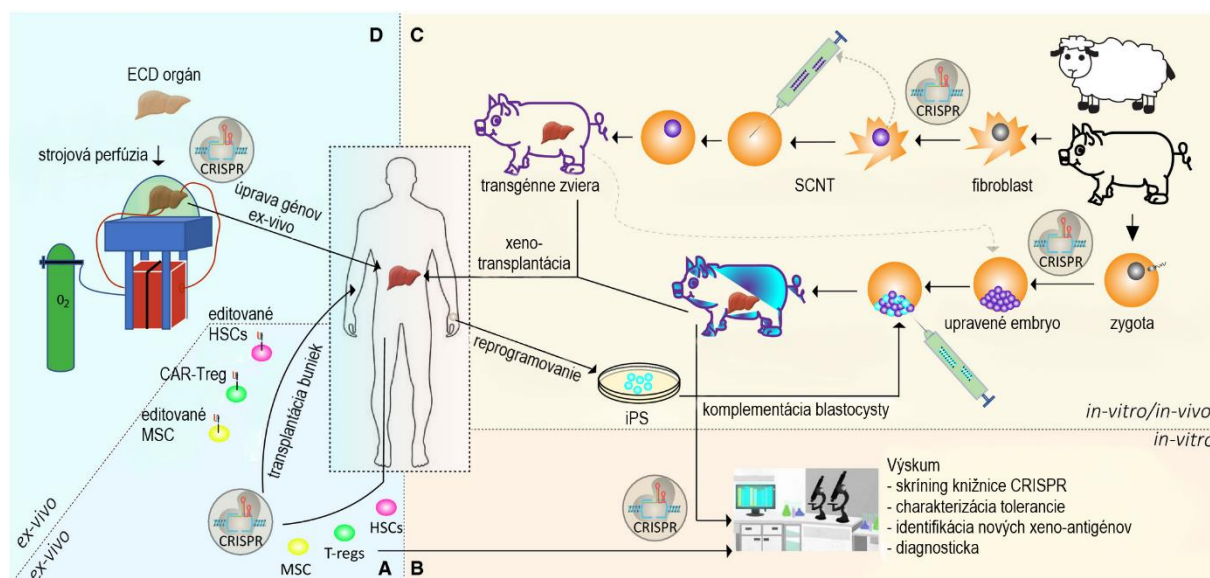
5.11.4 Potenciál ďalšieho využitia CRISPR technológií v transplantáciách

V niekoľkých klinických štúdiách bola pri odbere orgánov úspešne použitá normotermická pulzáčná strojová perfúzia až do 24 hodín. Úpravou bežnej pumpy s viacerými základnými fyziologickými jednotkami dokázali zvýšiť životaschopnosť nekvalitných pečení dokonca až na sedem dní. Kombináciou vylepšenia strojovej perfúzie a spôsobov aplikácie a doručenia CRISPR na miesto účinku, môžu byť prekonané limitácie úpravy orgánov *in vivo* prostredníctvom *ex vivo* génovej úpravy darcovských orgánov vo vnútri pumpy. Ďalšie štúdie by mohli byť zamerané na prehodnotenie *ex vivo* prístupov spojených s normotermickou perfúziou:

- vyraďených orgánov s cieľom ich úpravy do stavu vhodného na transplantáciu,
- orgánov nízkej kvality (napríklad stukovatená pečeň) s cieľom ich vyliečenia pred transplantáciou,
- všeobecne orgánov s cieľom navodenia tolerancie voči transplantácii.

Ďalším kritickým faktorom pri transplantácii orgánov je ischemicko-reperfúzne poškodenie orgánu. Pomocou CRISPR bol skríňovaný celý genóm a identifikované gény, ktorých deplécia má za následok rezistenciu proti nedostatku kyslíka v modeli *in vitro*. Rovnakým prístupom je možné identifikovať nové xenoantigény a nové molekuly spájané s imunitou, sledovať pacienta po transplantácii v súvislosti s možným odmietnutím orgánu ako aj detegovať prítomnosť vírusov v transplantovanom orgáne za krátky čas.

Už spomínané dve detekčné metódy založené na CRISPR, a to SHERLOCK a DETECTR, poskytujú rýchlu a špecifickú detekciu HPV v ľudských vzorkách s attomolárnou (1×10^{-18} mol/l) citlivosťou a môžu byť prispôbené na detekciu biomarkerov rejeckí z plazmy alebo moču pacienta. Na rovnaký účel môže byť použitý rovnako už spomínaný CRISPR-Chip, čo je biosenzor, ktorý dokáže snímať neamplifikované vzorky DNA (citlivosť do 1,7 fmol/l) na graféne do 15 minút.



Obrázok 5.13 Prebiehajúce a budúce aplikácie technológie CRISPR na transplantáciu solidných orgánov. Upravené podľa Kuscu C, a spol., 2020.

5.12 Alternatívy nástroja CRISPR/Cas

CRISPR umožňuje presné zmeny DNA v genóme organizmu, avšak jednou z hlavných obáv sú *off-target* efekty, kedy proteín Cas9 môže neúmyselne prestrihnúť DNA v miestach podobných, ale nie totožných s cieľovou sekvenciou. To môže viesť k nechceným mutáciám v genóme, ktoré môžu mať škodlivé dôsledky, vrátane vzniku nových ochorení. V niektorých prípadoch sa môže stať, že nie všetky bunky v ošetrovanom organizme alebo tkanive prejdú požadovanou úpravou génu, čo vedie k mozaicizmu, teda situácii, keď má človek v tele dve alebo viac geneticky odlišných sád buniek. Pretože niektoré bunky obsahujú požadované genetické zmeny, zatiaľ čo iné nie, môže to sťažiť použitie niektorých liečebných postupov. Môže byť tiež náročné účinne dopraviť súčasti CRISPR (Cas9 a vodiacu RNA) do cieľových buniek alebo tkanív. Zároveň existuje možnosť, že pri použití CRISPR pre génovú terapiu u ľudí by imunitný systém zamenil proteín Cas9 za niečo cudzie a spustil imunitnú reakciu, čo by mohlo obmedziť účinnosť liečby. V neposlednom rade je technológia a jej využitie chránené patentom a to nejednotne v USA a Európe, ako je vysvetlené v úvode. Preto sa hľadajú rôzne alternatívy, ktoré by niektoré z uvedených problémov dokázali vyriešiť.

Nová technológia na úpravu génov s názvom **Cas-CLOVER**, je funkčne podobná najpoužívanejšiemu systému na editáciu génov CRISPR/Cas9, ale používa iný nukleázový proteín nazývaný Clo51. Cas-CLOVER je fúzny, ktorý obsahuje nukleázou inaktivovaný proteín Cas9 fúzovaný s Clo51 endonukleázou. Cas-CLOVER dosahuje v porovnaní s CRISPR/Cas9 väčšiu špecifickosť vďaka využitiu dvoch navádzajúcich RNA a tiež tým, že pre nukleázovú aktivitu je nutná dimerizácia podjednotiek spojených s každou navádzacou

gRNA. Systém Cas-CLOVER je teda alternatívna vysoko presná technológia úpravy génov ako CRISPR/Cas9 a pri zachovaní vysokej účinnosti úprav nebola detekovateľná necieľová *off-target* aktivita. Navyše je systém Cas-CLOVER jasne zaštitená vydanými patentami.

Čínski vedci sa naopak vrátili k nástroju génového inžinierstva používanému pred objavením CRISPR/Cas a vyvinuli nástroj **CyDENT** schopný editácie génov bez strihania vlákien nukleových kyselín. CyDENT obsahuje pár programovateľných TALE proteínov fúzovaných s FokI nikázou, ssDNA cytidíndeaminázou a exonukleázou. CyDENT využíva na prenos editora k nukleovej kyseline proteínový signál, čím odpadá požiadavka na vodiacu RNA ako je to v prípade CRISPR/Cas systému, čo nie je problém pri úprave DNA v jadre bunky, ale stáva sa ním pri úprave DNA v chloroplaste rastliny alebo v ľudskej mitochondrii.

5.13 Etické otázky

Prvá správa o použití CRISPR/Cas9 na ľudských trippronukleárných zygotách bola zverejnená v roku 2015 a viedla k celosvetovému moratóriu biológov a etiky na ľudské zárodočné genetické inžinierstvo. Medzinárodný summit o editovaní genómu vo Washingtone v roku 2015 sa týkal stanovení smerníc na úpravu genetickej informácie prostredníctvom rekombinácie DNA. Bolo navrhnuté, aby sa dynamické smernice rozvíjali s postupom vedeckých poznatkov a mali by sa skôr postupne stanoviť, než by sa zaviedlo moratórium na rozvoj takejto sľubnej technológie. Súhlasilo sa s tým, že ľudské embryá alebo bunky zárodočnej línie, ktoré podliehajú úpravám génov, by sa nemali používať na oplodnenie. Vypracoval sa zoznam súčasných technických a morálnych problémov, pri ktorých bolo možné potvrdiť výhody aplikácie tohto systému na somatické a zárodočné línie a docieľiť tak odstránenie ničivého vplyvu dedičných chorôb. Avšak súčasne s tým, ako sa objavujú stále nové možnosti aplikácie systému CRISPR/Cas, prichádzajú aj stále nové morálne a bezpečnostné otázky.

Z etického hľadiska je kontroverzný napríklad spomínaný výskum vedcov z čínskeho Kantonského inštitútu biomedicíny a zdravia, ktorí úspešne vypestovali „humanizované“ obličky v embryách prasiat. Kontroverzia tohto výskumu spočíva v tom, že by sme mohli chcieť robiť s týmito tvormi veci, ktoré by sme nikdy neurobili s človekom, napríklad zabíjať ich pre časti tela. Problém je v tom, že tieto chimérické ošípané nie sú len ošípané, ale sú to čiastočne aj ľudia. Nie je zatiaľ definované, či by sme s chimérou človeka a prasťa mali zaobchádzať ako s prasťom, s človekom, alebo ako s niečím úplne iným.

Chiméry predstavujú len jednu z mnohých výziev. Vedci vytvorili „syntetické embryá“, laboratórne vypestované modely embryí, ktoré sa veľmi podobajú normálnym ľudským embryám. Napriek podobnosti však nespádali do rámca právnych definícií ľudského

embrya v Spojenom kráľovstve, kde sa štúdia uskutočnila. Podobne ako chiméry človeka a prasťa aj syntetické embryá sa pohybujú na pomedzí dvoch rôznych kategórií, a to modelu kmeňových buniek a ľudského embrya. Nie je zrejmé, ako by sa s nimi malo zaobchádzať.

Ďalšou otázkou je vývoj čoraz dokonalejších ľudských mozgových organoidov, takzvaných „*laboratórne vypestovaných minimozgov*“. Na rozdiel od syntetických embryí mozgové organoidy nenapodobňujú vývoj celého človeka. Väčšina vedcov si myslí, že súčasné „*minimozgy*“ nie sú vedomé, ale táto oblasť sa rýchlo rozvíja. Nie je nadnesené predpokladať, že mozgový organoid v budúcnosti vedomie dosiahne.

Sporné sú aj entity, ktoré kombinujú ľudské neuróny s technológiou, takzvané biologické počítačové čipy. Nie je definované, či s nimi treba zaobchádzať ako s akoukoľvek inou kultúrou ľudského tkaniva alebo ako s človekom, prípadne ako s výskumným zvieratkom. Chiméry, modely embryí a mozgy *in vitro*, ukazujú, že základné kategórie už nemajú zmysel.

S ohľadom na potrebu vyriešiť etické otázky a otázky súvisiace s bezpečnosťou aplikácie CRISPR/Cas systému je nevyhnutné, aby naďalej prebiehala rozsiahla informovaná diskusia medzi všetkými predstaviteľmi spoločnosti, nakoľko potenciál systému CRISPR/Cas v humánnej medicíne ďaleko viac prevyšuje obavy, ktoré vznikajú pri jeho skúmaní.

Literatúra

- Baddeley, H. J., & Isalan, M. (2021). The application of CRISPR/Cas systems for antiviral therapy. **Frontiers in Genome Editing**, *3**, 745559. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.745559>
- Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J. M., & Doudna, J. A. (2018). CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. **Science**, *360**(6387), 436–439. <https://doi.org/10.1126/science.aar6245>
- Gantz, V. M., & Bier, E. (2015). The mutagenic chain reaction: A method for converting heterozygous to homozygous mutations. **Science**, *348**(6233), 442–444.
- Gbelcová, H., Tuhárska, T., & Böhmer, D. (2019). CRISPR/Cas - lekár v zálohe. **Lekársky Obzor**, *68**(2), 67–72.
- Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Kellner, M. J., Joung, J., Collins, J. J., & Zhang, F. (2018). Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. **Science**, *360**(6387), 439–444. <https://doi.org/10.1126/science.aag0179>
- Hajian, R., Balderston, S., Tran, T., deBoer, T., Etienne, J., Sandhu, M., Wauford, N. A., Chung, J. Y., Nokes, J., Athaiya, M., Paredes, J., Peytavi, R., Goldsmith, B., Murthy, N., Conboy, I. M., & Aran, K. (2019). Detection of unamplified target genes via CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor. **Nature Biomedical Engineering**, *3**(6), 427–437. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0371-x>
- Hu, J., Sun, Y., Li, B., Liu, Z., Wang, Z., Gao, Q., Guo, M., Liu, G., Zhao, K. T., & Gao, C. (2024). Strand-preferred base editing of organellar and nuclear genomes using CyDENT. **Nature Biotechnology**, *42**(6), 936–945. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01910-9>
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., & Zhang, F. (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. **Current Opinion in Microbiology**, *37**, 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.008>
- Kováč, J., Priščáková, P., Gbelcová, H., Heydari, A., & Žiaran, S. (2023). Bioadhesive and injectable hydrogels and their correlation with mesenchymal stem cells differentiation for cartilage repair: A mini-review. **Polymers**, *15**(21), 4228. <https://doi.org/10.3390/polym15214228>
- Kuscu, C., Kuscu, C., Bajwa, A., Eason, J. D., Maluf, D., & Mas, V. R. (2020). Applications of CRISPR technologies in transplantation. **American Journal of Transplantation**, *20**(12), 3285–3293. <https://doi.org/10.1111/ajt.16095>
- Tao, S., Chen, H., & Li, N. (2022). The application of the CRISPR-Cas system in antibiotic resistance. **Infection and Drug Resistance**, *15**, 4155–4168.
- Wu, Y., Battalapalli, D., Hakeem, M. J., et al. (2021). Engineered CRISPR-Cas systems for the detection and control of antibiotic-resistant infections. **Journal of Nanobiotechnology**, *19**, 401. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01132-8>
- Zatloukalová, P., Krejčíř, R., Valík, D., & Vojtěšek, B. (2019). CRISPR-Cas9 jako nástroj v terapii nádorových onemocnění. **Klinická Onkologie**, *32**(Suppl 3), 3S13-3S18.

6 Génová terapia (*Vanda Repiská*)

Génová terapia už nie je len teoretický koncept, ale dynamické a rýchlo sa rozvíjajúce odvetvie modernej lekárskej praxe. Súčasné vývojové trendy v genetickej terapii prinášajú nádej a konkrétne výhody pacientom s rôznymi genetickými poruchami, rakovinou a ďalšími ochoreniami. V posledných rokoch zaznamenala génová terapia pozoruhodné pokroky. Postupne sa menila z čisto experimentálnych konceptov až na dobre etablovanú a stále viac používanú metódu v lekárskej praxi a v modernom zdravotníctve.

Vývoj genetickej terapie prebieha za prísnych regulácií a dohľadu, ktoré zabezpečujú bezpečnosť a účinnosť. Klinické štúdie sú dôkladne navrhované a zhromažďujú sa dlhodobé údaje o bezpečnosti, aby sa minimalizovali riziká pre pacientov. Génovú terapiu môžeme definovať ako liečenie geneticky podmienených chorôb postupmi, ktoré využívajú metódy génového inžinierstva s cieľom vniesť chýbajúci gén, prípadne upraviť alebo odstrániť defektný gén. Nazývame ju aj oprava génov. Je lákavé preniesť skúsenosti z vkladania génov do rastlín a živočíchov aj na ľudí.

Genetické choroby sú spôsobené kvalitatívnymi alebo kvantitatívnymi zmenami v DNA (napr. bodové substitúcie, delécie a duplikácie rôzneho rozsahu, atď.). Niektoré zmeny DNA vedú k zníženiu funkcie príslušného génu (často kódujúceho enzým), prípadne k jeho úplnej nefunkčnosti. Príčinou väčšiny genetických chorôb je zmena v DNA, ktorá vedie k zníženiu funkcie príslušného génu (často kódujúceho enzým), prípadne k jeho úplnej nefunkčnosti. Dôsledkom je chýbanie potrebného funkčného proteínu, čo vedie k vzniku choroby. Úlohou génovej terapie je napríklad pripraviť funkčný gén a zaviesť ho pomocou vhodného vektora do genetického materiálu bunky. Ide teda o reparáciu genetického vybavenia bunky. Génová terapia je však veľmi zložitá záležitosť. Je nutné zabezpečiť, aby sa správny gén dostal do správnych buniek, aby sa začal prepisovať v správnom čase, a aby vydržal čo najdlhšie (v ideálnom prípade po celý život). Aj množstvo syntetizovanej bielkoviny musí byť „akurátne“ – ani príliš malé, ani príliš veľké.

Hlavnou motiváciou génovej terapie je nájsť nové spôsoby liečenia chorôb v prípadoch, kde je tradičná terapia málo efektívna alebo neefektívna. Snahou je aspoň do niektorých buniek pacienta vniesť nepoškodený gén, ktorý nedostatkovú bielkovinu vyrobí a aspoň čiastočne nahradí jej existenciu. Často stačí, aby sa produkcia bielkoviny obnovila iba na zlomok obvyklej úrovne a dochádza k zlepšeniu stavu pacienta, prípadne sa pri onkologických ochoreniach zastaví alebo spomalí rast nádorových buniek.

Základom liečby je poznanie súvislosti medzi mutáciou v géne a fenotypovým prejavom choroby. Problémom je, že mnohé gény nemajú iba jednu funkciu, ale plnia viaceré úlohy, ktoré sú často rozdielne. Preto gén a jeho funkcie musia byť presne identifikované. Ďalším dôležitým pravidlom je, že nová forma génu musí odstrániť alebo zmierniť prejavy choroby a nesmie negatívne ovplyvniť fyziologické funkcie.

6.1 Ochorenia liečené génovou terapiou

Teoreticky sa pomocou génovej terapie dá „opraviť“ každá choroba. Zatiaľ sa však génová terapia aplikuje a klinicky testuje pri špecifických ochoreniach. Experimentálna génová terapia sa používa pri chorobách, ktoré majú veľmi ťažký, často letálny priebeh a zároveň neexistuje iná možnosť terapie. Tzv. modelové mutácie, pre ktoré sa génová terapia testuje, môžeme rozdeliť do štyroch skupín:

- **zmena v jednom géne** – (napr. jednobodové mutácie), príkladom je kosáčiková anémia;
- **multigénové poruchy** – mutácie vo viacerých génoch zároveň, často sa prejaví aj vplyv prostredia, príkladom sú srdcovo-cievne poruchy, diabetes, nádorové ochorenia;
- **mitochondriálne poruchy** – mutácie v mitochondriálnej DNA, sú často letálne a spôsobujú poruchy orgánov;
- **chromozómové aberácie** – delécia, duplikácia, translokácia.

Napriek značnému úsiliu vedcov a lekárov je génová terapia vo väčšine prípadov iba v experimentálnom štádiu alebo sa klinicky testuje. Iba niekoľko prípravkov sa aplikuje v klinickej praxi. Hlavný problém je, že často nesie so sebou mnoho vedľajších efektov. V Číne bola povolená prvá génová terapia *Gendicine* na liečbu nádorov mozgu a kože v roku 2003.

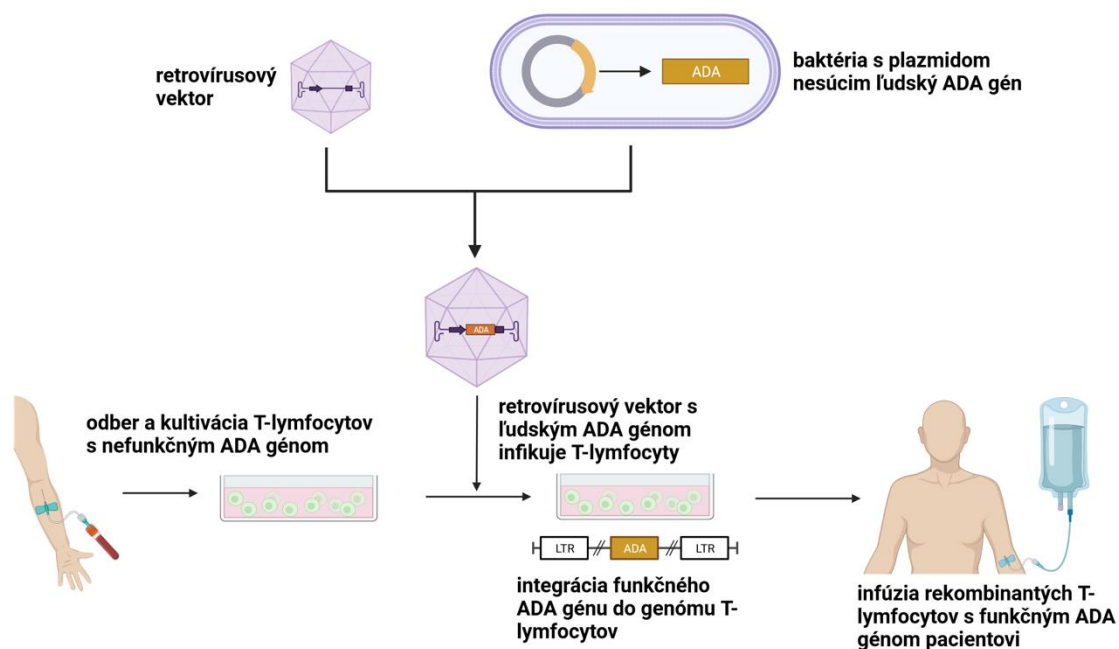
Európska komisia v roku 2012 schválila génovú terapiu s názvom *Glybera*. Základom tejto génovej terapie je vírus upravený metódami génového inžinierstva tak, aby do buniek pacienta vniesol ľudský gén pre enzým lipoproteínová lipáza (LPL). Z pôvodného vírusu ostali len 4 %. Pacienti s týmto veľmi zriedkavým ochorením (1 až 2 ľudia z milióna) trpia ťažkými zápalmi pankreasu, majú narušený metabolizmus tukov a zvýšené riziko aterosklerózy a diabetu II. typu. Doposiaľ boli odkázaní len na veľmi prísnu diétu. Táto génová terapia sa už nepoužíva, dôvodom bola vysoká cena.

V máji 2016, po 20 rokoch práce, bola oficiálne schválená prvá génová terapia *Strimvelis* od firmy GlaxoSmithKline (cena 665 000 dolárov). Je zameraná na liečbu **ťažkej kombinovanej imunodeficiencie** (SCID – *severe combined immunodeficiency*). Forma dedičnej

SCID je nesmierne zriedkavá. Pacienti nemajú funkčný **gén ADA**, ktorý kóduje adenzín deaminázu. Jej úlohou je katalyzovať deamináciu adenzínu, pričom vzniká inozín, ktorý sa premieňa na hypoxantín. Mutáciou v géne *ADA* je deaminácia zastavená, adenzín sa mení na dAMP, ten na dATP, stúpa množstvo dATP v bunkách. dATP je silným inhibítorom tvorby deoxynukleotidov, hlavne deoxytimidíntrifosfátu. To vedie k zablokovaniu syntézy DNA a tým aj zastaveniu delenia buniek. Pokiaľ je gén *ADA* nefunkčný, dochádza k imunitnej nedostatočnosti a k infekčným chorobám, pretože T lymfocyty sú citlivé na zníženie syntézy DNA. Bez adenzindeaminázy biele krvinky odumierajú ihneď v kostnej dreni. Deti s týmto ochorením majú od útleho veku jednu infekciu za druhou, od nádchy až po život ohrozujúce pneumónie. Pred dvadsiatimi rokmi mohli prežiť jedine pod ochranným plastickým krytom – bublinou. Takýto sterilný kryt chránil Dávida, slávneho "chlapca v bubline". Neskôr sa vedci pokúšali chemicky zmeniť *ADA* od kráv (liek nazvaný *Adagen*). Hoci tento liek zachránil deti, nevyliečil ich úplne, stále sa vyskytovali komplikácie. Sen o génovej terapii SCID sa vykryštalizoval, keď W. French Anderson prišiel k záveru, že defícia ADA je najlepšou chorobou na testovanie genetickej liečby. Jeho tím pracoval na osvojení techník génového transferu vyvinutých základným výskumom a na ich aplikácii v medicínskej terapii.

Rekombinantnými technikami za pomoci restričných enzýmov sa gén schopný tvoriť chýbajúci **enzým adenzín deaminázu včlenil do nukleovej sekvencie retrovírusu** (RNA-vírusu). **RNA-vírusy obsahujú reverznú transkriptázu**, enzým zodpovedný za to, že pri replikácii týchto vírusov dochádza k reverznej transkripcii RNA genómu do komplementárneho vlákna DNA, ktoré je vzápätí dosyntetizované na dvojvláknovú DNA. Takáto DNA sa potom integruje do hostiteľskej chromozómovej DNA. Dlhो žijúce kmeňové bunky sú vyplavené z kostnej drene do krvného obehu. Geneticky zmenené vírusy a kmeňové bunky izolované z odobratej krvi sa zmiešajú. Vírusy nesúce nový gén vstúpia do kmeňových buniek (Obrázok 6.1). Touto technikou genetického transferu kmeňové bunky získajú schopnosť syntetizovať chýbajúci enzým. Zmenené kmeňové bunky sa injikujú do pacienta a trvale podporujú jeho imunitný systém.

Príkladom schválenej génovej terapie pri liečbe rakoviny sú: *Kymriah* – akútna lymfoblastová leukémia, *Yescarta* – niektoré lymfómy, *Imlygic* – lokálna liečba malígneho melanómu, *Provenge* – karcinóm prostaty, *Zalmoxis* – hematologické malignity.



Obrázok 6.1 Postup pri liečbe ťažkej kombinovanej imunodeficiencie génovou terapiou

Príkladom schválenej génovej terapie genetických ochorení sú: *Luxturna*, ktorej cieľom je opraviť mutáciu v gène *RPE65*, ktorý fyziologicky produkuje proteín, vďaka ktorému očné receptory vnímajú svetlo. Pacienti s mutáciou v tomto gène postupne slepnú. Liečba je založená na vpíchnutí injekcie s modifikovaným vírusom priamo do oka pacienta. V máji 2019 schválil americký Úrad pre kontrolu potravín a liečiv (FDA) liek **Zolgensma**. Je to nová génová terapia pre deti do dvoch rokov so spinálnou muskulárnou atrofiou (SMA) a je dostupná zatiaľ iba v Amerike. SMA je autozomálne recesívne ochorenie. Mutovaný je gén *SMN1* (*survival motoric neuron*), ktorý kóduje syntézu proteínu SMN zodpovednú za fungovanie motorických neurónov. Prvé príznaky SMA sa objavujú už pri narodení, prípadne do pol roka veku dieťaťa. Choroba sa veľmi rýchlo rozvíja, dieťa nie je schopné zdvihnúť hlavu a vykonávať bežné pohybové zručnosti očakávané v prvých mesiacoch života. Nikdy sa nenaučí sedieť a postupne mu ochabujú všetky svaly. Až 95 % detí zomrie do 2. roku života na respiračné zlyhanie.

V tom istom čase bol v EU schválený *Zynteglo* na liečbu beta talasémie, ktorá znižuje schopnosť pacienta vytvárať hemoglobín. Génová terapia využíva vírus na zavedenie zdravých kópií génu na výrobu hemoglobínu do kmeňových buniek odobratých pacientovi. Bunky sa potom znovu zavedú do krvného obehu a transportujú sa do kostnej drene, kde začnú produkovať zdravé červené krvinky, ktoré môžu produkovať hemoglobín. Príklady cien niektorých génových terapií sú zhrnuté v Tabuľke 6.1.

Tabuľka 6.1 Ceny génovej terapie

Liek	Indikácia	Cena (\$)
Luxturna	vrodené ochorenie šošoviek	850 000
Kymriah	akútna lymfoidná leukémia	475 000
Yescarta	veľkobunkový B-lymfóm	373 000
Zolgensma	spinálna muskulárna atrofia	2 125 000
Tecartus	lymfóm z plášťových buniek	373 000
Breyanzi	veľkobunkový B-lymfóm	410 300
Abecma	Mnohopočetný myelóm	419 500

6.2 Základné požiadavky na úspešnú génovú terapiu

Ak má byť génová terapia úspešná, musia byť splnené niektoré základné požiadavky. Najdôležitejšia je **poznať presnú príčinu choroby** až na molekulovej úrovni, zodpovedný gén, jeho presnú DNA sekvenciu a lokalizáciu, génový produkt a mechanizmus jeho normálneho a patologického účinku. Sekvenovanie ľudského genómu a zavedenie techník masívneho paralelného sekvenovania výrazne napomohlo v odhaľovaní príčin chorôb. Robia sa tzv. celogenómové asociačné štúdie. Pomocou bioštatistických metód sa porovnávajú tisíce vzoriek pacientov a zdravých jedincov. Odhaduje sa význam v ich rozdieloch (napr. DNA polymorfizmach a mutáciách) pri vzniku a vývine choroby. Analyzuje sa, ktoré gény sú zodpovedné za vznik chorôb a dá sa vypočítať riziko pre konkrétneho pacienta (personalizovaná medicína). Odhaľujú sa nové asociácie medzi génom a chorobou. Stáva sa, že identifikované gény neboli predtým vo vzťahu k chorobe skúmané. Následne sa v laboratóriu vytvorí terapeutická genetická informácia, **transgén**, pomocou rekombinačných techník.

Druhou požiadavkou sú **vhodné cieľové bunky** génovej terapie. Ideálne sú bunky kmeňové, ktoré sa dajú ľahko získať od pacienta, je možné ich namnožiť v *in vitro* podmienkach a jednoducho sa s nimi manipuluje. Dôležité je, aby po vnesení do pacienta ostali funkčné a následne sa opravený gén prenášal do dcérskych buniek. V poslednom období sa používa na vystrihnutie a zacielenie vybraného úseku CRISPR-Cas9 systém, ktorý umožňuje výmenu defektného génu za zdravý.

Tretia súčasť stratégie je **voľba vhodného vektora** (nosiča). Vývoj bezpečných a účinných vírusových vektorov je v súčasnej lekárskej praxi veľmi dôležitý. Používajú sa vírusové, nevírusové a bakteriálne vektory. Z vírusových sú to najčastejšie retro-, adeno-,

adeno-asociované-, lenti-, herpes a alfa vírusové vektory. Lentivírusové a vektorové systémy adeno-asociovaných vírusov (AAV) sú často používané a preukázali svoju schopnosť efektívne prenášať terapeutické gény do cielených buniek s minimálnymi vedľajšími účinkami. Z nevírusových sa najčastejšie používa nahá DNA a bakteriálne sa získavajú z baktérií rodu *Listeria*, *Escherichia* a *Salmonella*.

Zároveň musí existovať vhodný **systém prenosu genetickej informácie** do cieľových buniek. Možností je mnoho – napr. mechanické metódy (mikroihly, mikromanipulátory a biobalistika), chemické či fyzikálne metódy (elektroporácia – umožní prienik genetickej informácie cez cytoplazmatickú membránu), samotná DNA či DNA v komplexoch s rôznymi molekulami (DNA prenos pomocou lipozómov (lipoplexov), modifikovaných lipozómov (polyplexov), komplexných mnohovrstvových lipozómov (piedmontov), mnohovrstvových lipidových nanočastíc (kochleátov).

Štvrtou požiadavkou je **zaručenie bezpečnosti prenosu** a zabránenie rekombinácii retrovírusového vektora s endogénnym retrovírusom, čo by malo za následok nekontrolované množenie. Zároveň vnesená DNA nesmie pôsobiť ako mutagén a inaktivovať niektorý tumor-supresorový gén, poprípade aktivovať protoonkogén. Vzhľadom na určitú kontroverznosť tejto terapie je možné ju použiť na pacientovi iba ak je úspešne otestovaná a schválená. K podstúpeniu experimentálnej terapie je nutné získať informovaný súhlas pacienta.

Pre aplikáciu génovej terapie sa vytvárajú prísne zákony a normy. Experimentálna génová terapia (tesne pred schválením) sa používa na liečbu hemofílie, cystickej fibrózy, hemoglobínopatie, deficitu alfa1-antitrypsínu, Parkinsonovej a Alzheimerovej choroby, arterosklerózy, AIDS, hepatitídy, diabetu, Duchenneovej svalovej dystrofie, cirhózy pečene a z malignít napr. multiformného glioblastómu. Po génovej terapii je potrebné starostlivo monitorovať zdravotný stav pacienta.

6.3 Základné spôsoby génovej terapie

Podľa typu ovplyvnených buniek môžeme definovať génovú terapiu ako **somatickú** a **zárodočnú**. Pri zárodočnej terapii je u človeka a vyšších stavovcov celosvetové moratórium. V tomto type je zmenený genóm priamo vo vajíčku alebo spermii a zmena sa prenáša do ďalších generácií. Niektorí pacienti majú mutáciu v určitom gène (napr. deléciu, substitúciu) a pozmenený produkt pôsobí patologicky. V týchto prípadoch sa robí pomocou rekombinácie tzv. **oprava génu** (náhrada, transplantácia génu). Mutovaný gén sa vymení za zdravý. Pri strate funkčnosti génu, ak je patologický nedostatok génového produktu, sa dodávajú extra kópie tohto génu do genómu príslušných buniek, čím sa zvýši množstvo potrebného génového

produktu. Gény sa pridávajú napríklad do kmeňových buniek s cieľom zabezpečiť ochranu pred toxickým účinkom chemoterapeutík (gény rezistencie na chemoterapeutiká).

Revolučný systém genetickej úpravy CRISPR-Cas9 stále dominuje v genetickej terapii. Táto technológia umožňuje presnú, cielenú modifikáciu génov a momentálne sa používa na liečbu širokej škály genetických porúch. Jej aplikácie sa rozširujú od opravy mutácií jediného génu po úpravu imunitných buniek pre liečbu rakoviny.

Najviac používanou metódou v terapii nádorov je **cielené usmrtenie** určitých buniek vložením tzv. „killer“ génu, ktorý následne produkuje letálny toxín, a tým zabije vybrané bunky (nádorové). Alebo sa použije „killer“ gén, ktorý je citlivý na smrtiaci účinok liečiva, ktoré sa dá pacientovi až po vložení takéhoto smrtiaceho génu do bunky, čo sa nazýva aj **samovražedná génová terapia**. Imunoterapia, najmä terapia CAR-T bunkami, je rýchlo sa rozvíjajúcim odvetvím genetickej terapie. V terapii CAR-T sa pacientovi vlastné T bunky geneticky upravujú tak, aby sa nacieli na rakovinové bunky. Tento prístup priniesol pozoruhodné výsledky a viedol k schváleniu terapií CAR-T na liečbu viacerých typov rakoviny, čím sa zároveň zlepšila bezpečnosť a účinnosť génovej terapie.

V niektorých prípadoch sa gén len ako keby „vypne“ (cielená inhibícia expresie chybného génu), čo sa nazýva **ablácia génu**. Ablácia génu sa vykonáva podľa potreby na úrovni DNA, RNA prípadne sa zablokuje už vzniknutý proteín. V určitých nádoroch je naopak možné spustiť expresiu terapeutických génov prostredníctvom špecifických sekvencií v promótoroch, ktoré sa zapínajú len v nádoroch a zdravé tkanivo zostane nepoškodené.

Génová terapia sa môže robiť **in vivo**, kedy sú cieľové bunky pre vnesenie génu lokalizované priamo v tele pacienta (cieľové bunky sú po celú dobu súčasťou organizmu) a **in vitro = ex vivo**, kedy sa gén vnesie do cieľových buniek v laboratóriu, čiže mimo tela pacienta (cieľové bunky sú najprv odobrané z organizmu a po uskutočnení génovej terapie sú vrátené na svoje miesto v organizme). Pri *in vivo* terapii ide o viac-menej náhodný proces, s malými možnosťami kontroly a riadenia. Používa sa v prípadoch, ak ide o bunky (tkanivá), ktoré nemožno kultivovať v *in vitro* podmienkach alebo ak nemožno kultivované bunky preniesť späť do tela pacienta. Pri *ex vivo* je genetický materiál najprv prenesený do buniek kultivovaných *in vitro*, čo je kontrolovaný proces, počas ktorého sú transfekované bunky selektované a množené. Výhodou je, že bunky sú zvyčajne autológne a možno ich vrátiť späť do tela pacienta. Génová terapia sa teda môže podávať dvoma hlavnými spôsobmi: *in vivo* a *ex vivo*. V terapiách *in vivo* sa terapeutické gény podávajú priamo do tela pacienta. Terapie *ex vivo* naopak zahŕňajú odstránenie buniek z tela pacienta, ich genetickú úpravu mimo tela a následné

opätovné podanie napríklad infúziou. Oba prístupy sa aktívne používajú v klinickej praxi a voľba závisí od konkrétneho stavu a cieľov liečby.

6.4 Výhody a limitácie génovej terapie

Výhody génovej terapie sú nesporné, rovnako ako aj jej limitácie. Preto je snaha nedostatky génovej terapie zmierniť, ideálne úplne eliminovať. Medzi najdôležitejšie limity génovej terapie patrí **krátkodobá účinnosť** génovej terapie, pretože bez integrácie do genómu je veľmi ťažké dosiahnuť dlhodobý účinok transgénu. Imunitná odpoveď redukuje efektívnosť terapie a zabraňuje opakovanej aplikácii. Aj keď vírusové vektory sú najpoužívanejšie v génovej terapii, existuje obava, že vírusový vektor môže vyvolať iné ochorenie. Problematická je ich toxicita, **imunitná a zápalová odpoveď**. Pri použití vírusových vektorov je genetická informácia do genómu vložená viac menej náhodne. Vnesený gén tak môže narušiť sekvenciu iného génu (narušenie protoonkogénu alebo tumor-supresorového génu môže spustiť malígnu transformáciu bunky). V neposlednom rade, väčšina chorôb nie je spôsobená mutáciou v jedinom gène, ale sú vyvolané kombinovaným účinkom rôznych génov (ide o tzv. multigénové choroby, napr. ochorenia kardiovaskulárneho systému, Alzheimerovu chorobu, artritídu a diabetes). Opraviť viacero génov súčasne je v zatiaľ nereálne. Nevýhodou je vysoká **finančná, technická a technologická náročnosť** týchto metód. Génová terapia je aj **eticky** problematická. Existuje veľmi tenká hranica medzi tým, či je alebo nie je vhodné génovú terapiu z hľadiska etiky použiť.

K etickým témam ohľadom génovej terapie je dôležitá celosvetová a celospoločenská diskusia. Nie je to práca iba pre genetikov, molekulárnych biológov, informatikov či lekárov, ale aj pre sociológov, psychiatrov a psychológov. Pri veľmi vážnych genetických ochoreniach, pri ktorých pacienti a s nimi aj ich príbuzní, trpia po celý život je voľba génovej terapie takmer jednoznačná. Okrem toho existuje tzv. sivá zóna pacientov, kedy modifikácie genómu nemajú podstatný prejav, mnohí ich môžu považovať za neopodstatnené, ale práve v takýchto prípadoch personalizovanej medicíny by sa malo nechať rozhodnutie na samotného pacienta. Práve tieto prípady sú najväčšie etické dilemy. V prípade, že technológia manipulácie s génmi ešte pokročí a modifikácie DNA sa budú robiť s obrovskou presnosťou, v princípe bude možné urobiť akékoľvek zmeny. Technologicky sme na to v podstate pripravení, problém je, že musíme pochopiť ako gény a ich varianty fungujú, pretože jeden gén môže vykonávať viaceré funkcie. Teda náročnejšie, ako vykonať zmeny, bude pochopiť, čo znamenajú a aké sú ich dôsledky. V tejto oblasti je stále výskum viac-menej na začiatku, pretože väčšina ľudských ochorení nie

je monogénovo podmienená, ale veľmi komplexná, ide o súhru mnohých génov a regulačných oblastí v DNA.

Medzi výhody génovej terapie patrí možnosť tzv. precíznej medicíny a personalizovanej genetickej terapie. **Precízna medicína** eliminuje neefektívnosť pokusov a omylov pri liečbe. DNA diagnostika umožňuje presnejšie predpovedať, aký spôsob liečby je najefektívnejší a najbezpečnejší, prípadne ako zabrániť možnému ochoreniu. Získané informácie majú cenu zlata pre pacienta a ošetrojúceho lekára. Uznatie, že genetická zložka každého pacienta je jedinečná, viedlo k rozvoju personalizovanej genetickej terapie. Maximálna personalizácia je prístup v diagnostike ušitej pacientovi na mieru. Vychádza sa z analýzy pacientovej vzorky DNA a využíva sa najmodernejšia medicínska technológia, bioštatistika a vedecké poznatky. Tento revolučný prístup sa nazýva **personalizovaná medicína**. Terapie sú navrhnuté tak, aby zasiahli konkrétne genetické mutácie a variácie, prispôsobujúc liečbu genetickému profilu jednotlivca.

Ďalšou veľkou výhodou je, že sa zavádzajú **terapie pre zriedkavé ochorenia**. V oblasti genetickej terapie pre zriedkavé ochorenia dochádza k obrovskej expanzii. Tieto stavy, často spôsobené mutáciami v jednom gène, boli predtým ťažko liečiteľné. Aktuálne techniky genetickej terapie sa okrem mutácií v jednom gène sústreďujú vo veľkej miere aj na onkologické prípady, multigénové a mitochondriálne poruchy a chromozómové aberácie.

Záverom môžeme skonštatovať, že hoci génová terapia dosiahla významný pokrok, nie je bez výziev. K najzávažnejším patrí znížiť náklady na liečbu a cenu liečiv, rovnaký prístup ku každému pacientovi, monitorovanie dlhodobej bezpečnosti a potreba zlepšiť doručovanie genetického materiálu do cieľových buniek. Výskumníci aktívne pracujú na riešení týchto problémov a na rozšírení možnosti použitia terapie na širšie spektrum ochorení. S pokračujúcim výskumom sa očakáva, že genetická terapia bude zohrávať stále dôležitejšiu úlohu v liečbe a dokonca aj prevencii mnohých ochorení.

Literatúra

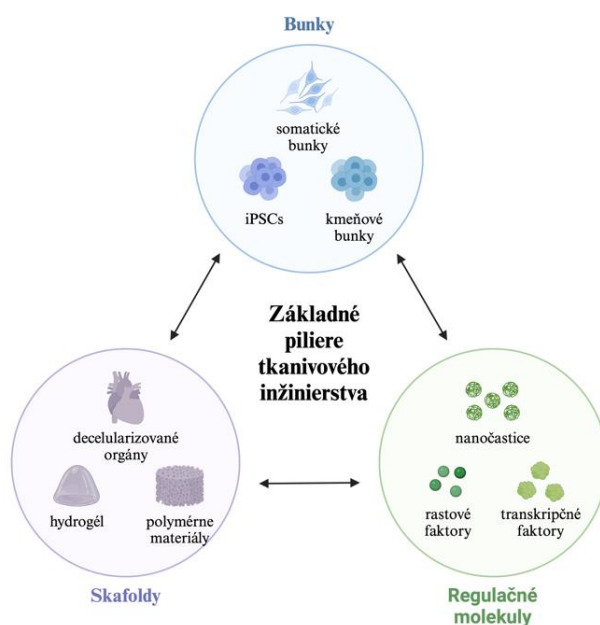
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2005). *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky* (2nd ed.). Espero Publishing.
- Amer, M. H. (2014). Gene therapy for cancer: Present status and future perspective. *Molecular and Cellular Therapies*, *2*(1), 1–19.
- Collins, M., & Thrasher, A. (2015). Gene therapy: Progress and predictions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1821), 20143003. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.3003>
- Cotrim, A. P., & Baum, B. J. (2008). Gene therapy: Some history, applications, problems, and prospects. *Toxicologic Pathology*, *36*(1), 97–103. <https://doi.org/10.1177/0192623307310870>
- Dunbar, C. E., Kohn, D. B., Schiffman, J. D., & Janson, C. G. (2018). Gene therapy comes of age. *Science*, *359*(6372), eaan4672. <https://doi.org/10.1126/science.aan4672>
- Gbelcová, H., Repiská, V., & Shawkatová, I. (2017). *Nukleové kyseliny a proteíny: Analytické metody a postupy* (1st ed.). Univerzita Komenského.
- Gonçalves, G. A. R., & Paiva, R. M. A. (2017). Gene therapy: Advances, challenges, and perspectives. *Einstein (São Paulo)*, *15*(3), 369–375. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082017RB4005>
- Halčák, L., & Repiská, V. (2007). *Tvorba biomakromolekul a ich úloha v prenose genetickej informácie* (1st ed.). Asklepios.
- Kohn, D. B., & Candotti, F. (2009). Gene therapy fulfilling its promise. *New England Journal of Medicine*, *360*(5), 518–519. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr0808994>
- Ma, C.-C., Wang, Z.-L., Xu, T., He, Z.-Y., & Wei, Y.-Q. (2020). The approved gene therapy drugs worldwide: From 1998 to 2019. *Biotechnology Advances*, *40*, 107502. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107502>
- Pfeifer, A., & Verma, I. M. (2001). Gene therapy: Promises and problems. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *2*(1), 177–211. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.2.1.177>
- Rosypal, S. (2003). *Úvod do molekulární biologie: Díl II* (3rd ed.). Stanislav Rosypal.
- Rosypal, S. (2006). *Úvod do molekulární biologie: Díl I* (4th ed.). Stanislav Rosypal.
- Verma, I. M., & Weitzman, M. D. (2005). Gene therapy: Twenty-first century medicine. *Annual Review of Biochemistry*, *74*, 711–738. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.050304.091637>
- Wirth, T., Parker, N., & Ylä-Herttuala, S. (2013). History of gene therapy. *Gene*, *525*(2), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137>

7 Tkanivové inžinierstvo (*Martina Čulenová*)

Tkanivové inžinierstvo predstavuje nový interdisciplinárny, biotechnologický odbor integrujúci prírodné vedy a materiálové inžinierstvo za účelom vytvorenia špecifických **tkanivových konštruktov** v laboratórnych podmienkach (*in vitro*). Hlavným cieľom je výskum a vývoj tkanivových náhrad, ktoré po implantácii do živého organizmu podporujú regeneráciu a rekonštrukciu poškodených tkanív spolu so zachovaním, prípadne zlepšením ich fyziologických funkcií. Z medicínskeho hľadiska predstavuje tento odbor veľký potenciál najmä pre pacientov čakajúcich na transplantáciu orgánov.

Z aplikačného hľadiska sa môžu tkanivové konštrukty využiť na náhradu, opravu či regeneráciu konkrétnych poškodených tkanív. Druhý smer predstavuje možnosť vyhotovenia nových tkanív vo veľkom množstve a s konkrétnymi vlastnosťami, akými sú napr. tvar a hrúbka. Využívajú sa na prekryvanie tkanivových defektov, na účely štúdií patofyziologických procesov rôznych orgánových ochorení a vo farmakológii pri výskume, vývoji a testovaní liečiv či vakcín.

Základné piliere tkanivového inžinierstva predstavujú **bunky** a **biokompatibilné materiály** spolu so špecifickými biochemickými (**rastové faktory**) a fyzikálnymi faktormi (**dynamické prostredie**), ktoré pozitívne ovplyvňujú biologické vlastnosti novovznikajúcich tkanivových konštruktov (Obrázok 7.1).



Obrázok 7.1 Základné piliere tkanivového inžinierstva

Tkanivové inžinierstvo bolo ako samostatný odbor prvý krát zadefinované v roku 1993 Langerom a Vacantom v ich spoločnej publikácii, ktorá spustila enormnú vlnu záujmu o túto

disciplínu v rámci vedecko-výskumnej obce. Do povedomia širokej verejnosti sa dostalo vďaka dokumentárnemu programu BBC v roku 1997. Doktor Vacanti predstavil svoj experiment. Podarilo sa mu vypestovať konštrukt podobný ľudskému uchu na chrbte laboratórnej myši. O popularizáciu tkanivového inžinierstva sa taktiež postaral Dr. Atala. Počas prednášania na TED konferencii predviedol, ako dokáže 3D tlačiareň vytlačiť za krátku dobu ľudskú obličku. Navyše, v rámci medicínskej praxe úspešne implantoval arteficiálny močový mechúr pacientovi s vrodenou dysfunkciou urogenitálneho traktu. Spomínané experimenty sú len ukážkou toho, aký veľký potenciál má tento odbor. Ďalšími príkladmi praktického využitia tkanivového inžinierstva v klinickej medicíne predstavujú aj biosyntetické transplantáty kože a chrupky. Dá sa konštatovať, že tkaninové inžinierstvo je aplikovateľné v každom medicínskom odbore či pri konkrétnych diagnózach akými sú: *diabetes mellitus*, kongestívne srdcové zlyhávanie, osteoporóza, striktúra uretry, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, popáleniny, poranenia miechy, vrodené vývojové chyby u detí a i. Na druhej strane, implantácia tkanivových konštruktov do ľudského tela naďalej ostáva veľkou výzvou. Ich zavedenie do klinickej praxe predstavuje z časového, ekonomického ako aj etického hľadiska komplikovaný proces. Avšak na laboratórnej úrovni a animálnych modeloch nachádzame veľa zaujímavých výsledkov.

Regeneratívna medicína je často spájaná s pojmom tkanivového inžinierstva a predstavuje jeho neoddeliteľnú súčasť. Táto disciplína zahŕňa široký medicínsky odbor, ktorý v zmysle regenerácie poškodených tkanív využíva princípy tkanivového inžinierstva spolu s ďalšími stratégiami, akými sú **terapia bunkami**, **génová terapia** či **imunomodulácia** v zmysle potenciovania a indukcie endogénnych reparačných dráh. Niektorí odborníci spájajú tieto disciplíny do jedného termínu, tzv. **TERM** (*Tissue Engineering and Regenerative Medicine*), nakoľko sa do veľkej miery prelínajú a obe majú rovnaký cieľ: **nahradiť**, **zrekonštruovať** a **zregenerovať** poškodené tkanivá.

Hlavným cieľom TERM je reparácia poškodených tkanív, ku ktorým dochádza veľmi často. Medzi najčastejšie príčiny poškodenia patria:

- akútna trauma,
- iatrogénne poškodenie,
- chronické ochorenia,
- vrodené anomálie.

TERM ponúka viaceré prístupy na opravu tkanivových defektov. Radíme k nim:

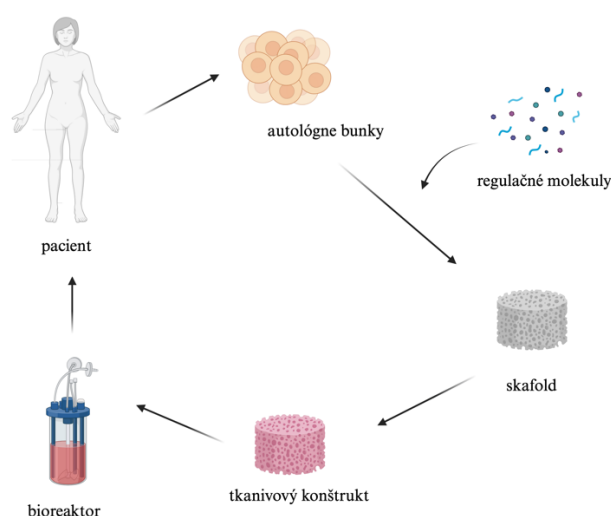
- výlučnú aplikáciu buniek,

- výlučnú aplikáciu biokompatibilných materiálov,
- súčasnú aplikáciu buniek a materiálov v podobe tkanivových konštruktov.

Najnovšie výskumy sa zameriavajú aj na aplikáciu špecifických extracelulárnych častíc, tzv. exozómov. Tieto nanočastice disponujú vysokým regeneračným potenciálom s nižším rizikom rozvoja nežiadúcej reakcie po *in vivo* aplikácii.

Vyhotovenie tkanivového konštrukt v skratke zahŕňa nasledovné procesy:

- **odoberanie vzorky** na izoláciu buniek (biopsia tkaniva, aspirácia kostnej drene, výplach močového mechúra a i.),
- **izolácia buniek**,
- **založenie tkanivovej kultúry**,
- **výsev buniek** na biokompatibilný materiál,
- **maturácia tkanivového konštruktu** v statických alebo dynamických podmienkach (Obrázok 7.2).



Obrázok 7.2 Schematické znázornenie vyhotovenia tkanivového konštruktu. Proces zahŕňa odber vzorky patientskeho tkaniva s následným založením bunkovej kultúry. V prípade potreby diferenciácie izolovaných buniek sa aplikujú regulačné molekuly, napr. rastové faktory. Ďalší krok predstavuje fázu kolonizácie scaffoldu bunkami. Vyhotovený tkanivový konštrukt dozrieva v bioreaktore, v ktorom naň pôsobia fyzikálne stimuly a po maturácii v dynamickom prostredí sa implantuje pacientovi.

Viacere štúdie poukazujú na fakt, že na efektívnu reparáciu väčších (> 1cm) orgánových defektov je potrebné zvoliť stratégiu aplikácie buniek spolu s vhodným biomateriálom. Ten má podobu konkrétnej 3D štruktúry, ktorú nazývame **scaffold**. Pri výseve scaffoldov je kľúčové, aby prebehla správna interakcia medzi bunkami a materiálom. Tá sa prejaví prostredníctvom **prichytenia, proliferácie, diferenciácie a migrácie** použitých buniek. Tieto javy výrazne

ovplyvňujú endogénne a exogénne regulačné molekuly. Modulujú biologické vlastnosti bunkových kolónií v laboratórnych podmienkach, interakciu buniek so skafoldami a v *in vivo* prostredí potencujú adaptáciu tkanivového konštrukt v mieste implantácie.

Môžeme vo všeobecnosti konštatovať, že vhodná kombinácia buniek, materiálu, rastových faktorov a nastavenie laboratórnych podmienok predurčujú úspešnosť vyhotovenia funkčného biosyntetického tkaniva.

7.1 Skafoldy – kostra tkanivových konštruktov

Skafoldy v tkanivovom inžinierstve predstavujú **špecifické matrice** s konkrétnym dizajnom vyrobené z rôznych **biokompatibilných materiálov**. Poskytujú lešenie pre bunky, ktoré sa po výseve vedľa efektívne prichytiť a aktivovať sa v zmysle proliferácie, migrácie ako aj bunkovej diferenciácie. Tieto matrice vytvárajú taktiež 3D priestor. Bunky by ho mali prerásť a začať v ňom komunikovať. Pre potreby TERM musí spĺňať skafold základné **požiadavky**:

- **biokompatibilita**,
- **biodegradabilita**,
- adekvátne **mechanické vlastnosti**,
- adekvátny **dizajn** (povrchová a vnútorná štruktúra skafoldu).

Skafoldy napodobňujú **mikroprostredie** živých organizmov, v ktorom vzájomná interakcia a biologické správanie buniek závisí od mechanických a biochemických podnetov z ich okolitého prostredia. Pre naplnenie biologických požiadaviek skafoldov je adekvátna architektúra kľúčová. Preferuje sa **porézna 3D** štruktúra. V rámci nej sú jednotlivé póry navzájom poprepájané a umožňujú prísun kyslíka, nutrientov a regulačných molekúl. Zároveň umožňujú kontinuálne odstraňovanie metabolických odpadových látok z mikroprostredia.

Štruktúra skafoldu je v prvom rade podmienená výberom výrobného materiálu. Využívajú sa **polyméry** (prírodné, syntetické), **keramika** ako aj **kompozitné biomateriály**. Kompozitné materiály sú zložené z dvoch, prípadne viacerých biomateriálov. Ich kombináciou vieme získať lepšie vlastnosti potrebné pre rekonštrukciu konkrétneho tkaniva. Metódy spracovania polymérov do formy skafoldu zohrávajú taktiež kľúčovú rolu. Výber konkrétnej metódy závisí najmä od aplikačného zámeru. V súčasnosti sa zameriava na tzv. **počítačom podporované technológie** (*computer-aided technologies*), akými je **3D printing**, ktorý vie zabezpečiť precízny dizajn s presne zadefinovanou vonkajšou ako aj vnútornou štruktúrou skafoldu. Jedná sa hlavne o spomínanú poréznosť, veľkosť pórov, štruktúru povrchu skafoldu, elasticitu, rigiditu a i. Všetky spomínané charakteristiky sú dôležité pre správnu biologickú aktivitu vysiatých buniek, najmä ich prežívanie, proliferáciu a diferenciáciu.

Základné vlastnosti scaffoldov môžeme zhrnúť do nasledovných bodov:

- poskytnutie mechanickej podpory a 3D šablóny na rast tkanivového konštruktu,
- podpora efektívneho prichytenia sa buniek na povrch s následným prerastením do vnútorných štruktúr,
- umožniť vaskularizáciu a vrastanie okolitého tkaniva po *in vivo* implantácii,
- umožniť transport živín,
- schopnosť biodegradácie, ktorá je zosúladená s rekonštrukciou tkaniva,
- pozitívne ovplyvňovať biologické správanie naviazaných buniek,
- pozitívne ovplyvňovať expresiu génov zodpovedných za bunkovú proliferáciu a diferenciáciu,
- biomimetika, t. j. scaffold má vlastnosti podobné tkanivu, ktoré má rekonštruovať,
- biokompatibilita, t. j. nevyvolá neadekvátnu imunitnú reakciu ústiacu do masívnej zápalovej odpovede po *in vivo* implantácii,
- dobre sterilizovateľný pre bezpečnú *in vivo* aplikáciu,
- prijateľné náklady na výrobu a samotný proces výroby scaffoldu.

Nasledujúca kapitola sa bude najskôr zaoberať opisom extracelulárneho matrixu na lepšie porozumenie kľúčových vlastností scaffoldov. Nasleduje popis materiálov a výrobných procesov ako aj súčasných trendov v rámci materiálového výskumu v tkanivovom inžinierstve.

7.2 Extracelulárny matrix

Extracelulárny matrix (ECM) alebo medzibunková hmota, predstavuje **heterogénny** materiál v **medzibunkových priestoroch**. Je produkovaný bunkami a organizovaný do **3D siete** s poréznou štruktúrou, ktorá spája bunky v daných tkanivách. Zároveň zabezpečuje **štrukturálnu podporu** tkanivovým bunkám a výrazne podmieňuje celkovú integritu tkaniva. ECM vytvára komplexné mikrostredie s tkanivovo špecifickými štrukturálnymi, biochemickými a biomechanickými vlastnosťami. Tie priamo ovplyvňujú biologické správanie tamojších rezidentských buniek. Početné výskumy potvrdili, že ich priama interakcia s ECM moduluje ich proliferáciu, migráciu, diferenciáciu či apoptózu. Veľké množstvo ECM produkujú napríklad bunky väziva – fibroblasty. Z evolučného hľadiska predstavuje vznik ECM zásadný míľnik, nakoľko sa podieľa na procesoch akými sú **zachytávanie** a **organizácia** buniek do komplexnejších štruktúr, **medzibunková komunikácia** či **vývoji embrya**.

Funkcie ECM môžu byť zhrnuté do nasledovných bodov:

- vytvára podpornú kostru tkanivám,

- poskytuje bariéru medzi jednotlivými tkanivami,
- vplýva na rast tkanív, hojenie rán a fibrotické procesy,
- vplýva na mechanizmy prerastania tumorov a metastatické procesy,
- zásobáreň rastových faktorov,
- reguluje medzibunkovú komunikáciu a komunikáciu buniek s okolitým prostredím,
- vplýva na diferenciáciu kmeňových buniek,
- ovplyvňuje ukotvenie, proliferáciu, migráciu, diferenciáciu a génovú expresiu buniek.

V súčasnosti evidujeme vysoký záujem o štúdium a výskum biologických vlastností ECM, nakoľko priamo súvisia s mnohými fyziologickými, ale aj patologickými procesmi prebiehajúcimi v ľudskom tele. Ako príklady môžeme uviesť schopnosť auto-regenerácie poškodených tkanív či vplyv ECM pri kancerogénnych a metastatických procesoch.

Oblasti záujmu daných výskumov môžeme rozdeliť do nasledovných smerov:

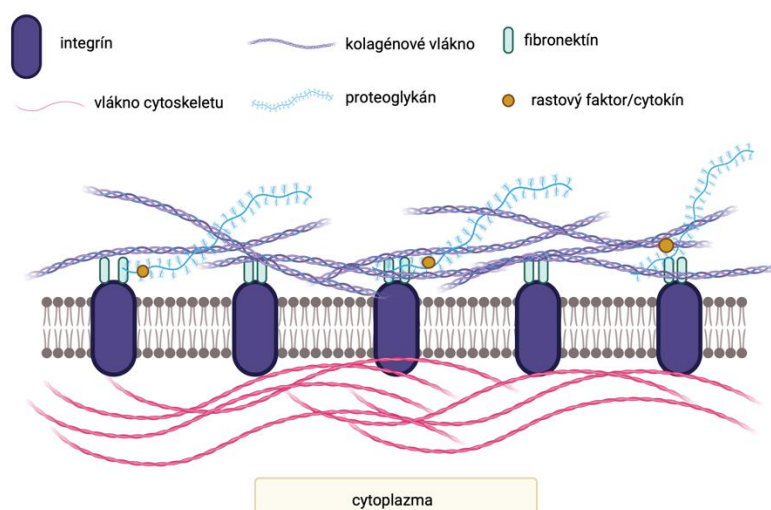
- vplyv tuhosti a elasticity ECM na diferenciáciu buniek
- objasnenie úlohy ECM pri ukotvení buniek, rola integrínov
- úloha ECM pri hojení rán, rozdielnosť mechanizmu hojenia v závislosti od veku jedinca.

Vyššie 300 molekúl so špecifickými biochemickými ako aj biologickými vlastnosťami, bolo identifikovaných v rámci komplexného výskumu zložiek tejto hmoty. Hlavné komponenty sú **proteíny**, **glykozaminoglykány** a **glykoproteíny**. Jednotlivé zložky a ich pomer vytvárajú kostru danému tkanivu, ale taktiež poskytujú orgánu pevnosť v ťahu a zabraňujú prílišnému rozpínaniu sa. Tým, že medzibunková hmota zadržiava vodu, poskytuje tkanivu aj potrebnú hydratáciu. Ďalšou úlohou ECM je participácia pri vytváraní **selektívnej bariéry** voči vonkajšiemu prostrediu. Jednotlivé komponenty ECM sú kolagén, elastín, fibronektín, proteoglykány, integríny, signálne molekuly (rastové faktory, cytokíny a chemokíny, bunkové zložky, metaloproteinázy, ióny a voda (Obrázok 7.3).

Rôzne typy **kolagénov** vytvárajú základný skelet ECM. Avšak detailná analýza usporiadania medzibunkovej hmoty poukázala na fakt, že jej celkovú organizáciu podmieňuje **fibronektín**. Na kostru ECM sú taktiež naviazané tzv. neštrukturálne proteíny – **ligandy**.

Ligandy vytvárajú väzby so špecifickými adhéznymi membránovými receptormi v bunkách, tzv. **integrínmi**. Po naviazaní dochádza k tvorbe tzv. **fokálneho adhézneho plaku**. Jedná sa o veľké makromolekulárne zhluky, prostredníctvom ktorých sa mechanické a regulačné signály prenášajú medzi ECM a komunikujúcou bunkou. Tieto subcelulárne štruktúry slúžia ako mechanické spojky medzi bunkami a ECM. Taktiež plnia úlohu biochemickej signalizačnej

centrály, ktorá zhromažďuje a smeruje početné signály. Spomínanými mechanizmami ovplyvňujú fokálne adhézne plaky génovú expresiu a proteosyntézu v komunikujúcej bunke. Celulárnu odpoveď predstavuje miera produkcie ECM, diferenciačná kapacita bunky, zmena štruktúry cytoskeletu alebo zmena signálov, ktoré bunky vysielajú. Ďalší typ zhlukov predstavujú tzv. **dynamické adhézne plaky**. Sú prítomné pri migrácii buniek. Po jej ukončení sa rozložia a bunky začnú formovať stabilnejšie fokálne adhérie.



Obrázok 7.3 Zjednodušená schéma štruktúry extracelulárneho matrixu (ECM). Medzibunková hmota je v priamom spojení s okolitými bunkami. Základnými spojkami sú špecifické proteíny – integríny, ktoré sú ukotvené v plazmatickej membráne buniek. Proteíny ECM, ako napríklad molekuly fibronektínu, predstavujú „mosty“ medzi integrínmi a ostatnými proteínmi ECM, najmä kolagénom. Integríny sa z vnútornej strany membrány napájajú na cytoskelet. Funkcia integrínov spočíva v ukotvení buniek k ECM. Navyše, dokážu detegovať chemické, ako aj mechanické podnety prichádzajúce z ECM a spätne reagovať aktiváciou signálnych dráh.

Zaujímavý jav predstavuje tzv. **durotaxia**. Jedná sa o formu bunkovej migrácie, pri ktorej sa bunky pohybujú na základe rozdielnej tuhosti (rigidity) ECM. Tento fenomén je determinovaný rozdielmi v štruktúre medzibunkovej hmoty. Viaceré štúdie poukázali na fakt, že bunky migrujú na miesta s väčšou tuhosťou. Pravdepodobne preto, lebo rigidné miesta ponúkajú lepšiu mechanickú oporu. Tieto poznatky upriamili pozornosť vedcov na detailnejšiu analýzu **biomechanických** vlastností ECM. Výsledky experimentov preukázali, že bunky menia svoje biologické správanie v závislosti od miery elasticity ECM. Jedná sa hlavne o proces diferenciácie. Je taktiež známe, že bunky sú citlivé na rôzne mechanické podnety, ktoré vedú spracovať a následne na nich aj odpovedať. Túto vlastnosť nazývame **mechanotransdukcia**. Jednou z celulárnych odpovedí na biomechanické stimuly je aj miera diferenciácie buniek. Početné výskumy poukázali na skutočnosť, že tento proces je v značnej

miere ovplyvnený organizáciou proteínových vlákien a pórov, ktoré predstavujú medzery v sieťovitej štruktúre medzibunkovej hmoty. Aby sa bunky diferencovali a následne organizovali do funkčných tkanív, je potrebné, aby obdržali adekvátne biochemické a biomechanické signály zo svojho mikroprostredia. A práve preto je prítomnosť regulačných molekúl (rastové faktory, chemokíny, cytokíny) spolu s fyzikálnymi podnetmi v rámci štruktúry ECM nevyhnutná.

Produkcia ECM bunkami musí byť v sústavnej rovnováhe s jej degradáciou a remodeláciou. Tieto procesy zabezpečujú **degradačné enzýmy** (najmä matrixové metaloproteinázy) spolu s ich **tkanivovými inhibítormi**. Zásadnú úlohu tu zohrávajú aj rastové faktory. Remodelácia ECM je spojená s procesom uvoľňovania týchto bioaktívnych molekúl. Rastové faktory priamo ovplyvňujú prítomné bunky, ktoré začnú produkovať novú medzibunkovú hmotu. Táto vzájomná komunikácia je kľúčová pre zachovanie homeostázy a fyziologických vlastností tkanív. Ak je rovnováha medzi degradáciou a remodeláciou narušená, prejavuje sa systémovo v podobe rôznych patológií (napr. poruchy spojivového tkaniva, muskulárne dystrofie, rakovina a i.). Každé tkanivo v ľudskom tele má svoju vlastnú ECM, ktorá sa líši zložením ako aj usporiadaním jej jednotlivých zložiek.

V kontexte TERM je správna interakcia buniek so skafoldami kľúčová. Nakoľko matrice zastávajú v *in vitro* podmienkach prítomnosť ECM, mali by bunkám aspoň čiastočne poskytnúť také podmienky, aké dostávajú v živom organizme prostredníctvom medzibunkovej hmoty. Navyše, pre čo najefektívnejšiu rekonštrukciu tkanív je nevyhnutná prítomnosť signálnych biomolekúl. Moderné technológie výroby umožňujú ich inkorporáciu do štruktúry skafoldov, a tým vedia regulovať požadované správanie vysadených buniek. A práve táto modifikácia patrí v súčasnosti k veľmi atraktívnej oblasti materiálového výskumu.

7.3 Biomateriály používané na výrobu skafoldov

Tkanivové inžinierstvo sa zaoberá rekonštrukciou mäkkých, ako aj tvrdých tkanív. Jednotlivé orgány ľudského tela sa navzájom odlišujú, a preto výber materiálu a konkrétneho dizajnu skafoldu musia korelovať s ich aplikačným zámerom. **Biomateriály** sú v súčasnosti definované ako materiály určené na interakciu so živým organizmom (biologickým systémom) za účelom liečby, augmentácie a nahradenia určitého tkaniva alebo orgánu. Delíme ich na tri základné skupiny:

- **keramika**,
- **polyméry** (prírodné, syntetické),
- **hybridné materiály**.

V rámci tkanivového inžinierstva mnoho štúdií aplikovalo aj skafoldy na báze kovu . Tie našli uplatnenie najmä pri rekonštrukcii kostného tkaniva.

Na základe schopnosti rozkladania sa v živých systémoch môžeme materiály kategorizovať ako **degradovateľné** a **nedegradovateľné**. Každá skupina biomateriálov disponuje špecifickými pozitívnymi aj negatívnymi vlastnosťami. Avšak spoločne musia spĺňať určité kritériá na to, aby mohli byť aplikovateľné vo forme skafoldu v rámci TERM. K najzásadnejším požiadavkám patria:

- biokompatibilita a biostabilita,
- bioaktivita,
- biodegradabilita,
- stabilita pri sterilizácii,
- dobrá chirurgická manipulácia,
- odolnosť voči únave materiálu,
- adekvátne interakcie s imunitným systémom prijímateľa.

7.3.1 Syntetické polyméry

Syntetické polyméry predstavujú heterogénnu skupinu materiálov, ktoré sú **arteficiálne** vyrábané v laboratórnych alebo industriálnych podmienkach. Získavajú sa pomocou špecifických chemických reakcií z fosílnych materiálov. V medicíne nachádzame ich širokú škálu využitia napríklad v podobe hemotransfúzných vakov, chirurgického šijacieho materiálu, stentov, katétrov a i. Ich najvýraznejšími črtami, dôležitými z hľadiska aplikácie v tkanivovom inžinierstve, sú:

- výborná spracovateľnosť umožňujúca vytvorenie precízneho dizajnu skafoldu,
- dobrá kontrola degradácie,
- výborné mechanické vlastnosti,
- termorezistencia,
- možnosť opakovanej výroby vo vysokej kvalite a čistote,
- ľahká chemická modifikovateľnosť,
- nízke náklady na výrobu.

Syntetické polyméry sa preukázali v početných štúdiách ako výborní adepti na vyhotovenie skafoldov s architektúrou „šitú na mieru“ konkrétnemu pacientovi s následnou kolonizáciou bunkami. V porovnaní s matricami na báze prírodných polymérov, syntetické skafoldy vykazujú **lepšie mechanické vlastnosti** s presne zadefinovanou chemickou

štruktúrou, ktorá sa podľa potreby dokáže ľahko modifikovať. Navyše, aj ostatné dôležité črty akými sú topografia, porozita či veľkosti jednotlivých pórov, vedia byť pri procesovaní týchto polymérov ľahko adaptabilné v závislosti od ich biologickej aplikácie. Biodegradácia týchto matric neprebíha tak rýchlo ako pri prírodných skafoldoch. Degradujú prostredníctvom **hydrolýzy** a rýchlosť tohto procesu sa vie regulovať prostredníctvom pozmenenia molekulárnej hmotnosti či koncových skupín daného polyméru. Nevýhodou je, že niektoré degradačné produkty môžu vykazovať známky toxicity, prípadne znižovať pH prostredia, a tým navodzovať zápal v mieste aplikácie. Po aplikácii môžu vyvolať neprimeranú reakciu imunitného systému pre svoj potenciálne imunogénny charakter. Preto je **testovanie cytotoxicity** a **biokompatibility** kľúčové. Taktiež je známe, že syntetické polyméry (kvôli svojmu arteficiálnemu pôvodu) ťažšie interagujú s biologickými systémami. Kvôli tomu sa mnoho výskumov zameriava na stratégie ich modifikácie v zmysle **bioaktívacie**, aby sa podporila ich interakcia so živým systémom na úrovni buniek alebo tkanív. Princíp funkcionalizácie týchto skafoldov spočíva v zakomponovaní biologicky aktívnych zložiek do inertných syntetických polymérov, aby zabezpečili nasledovné podmienky:

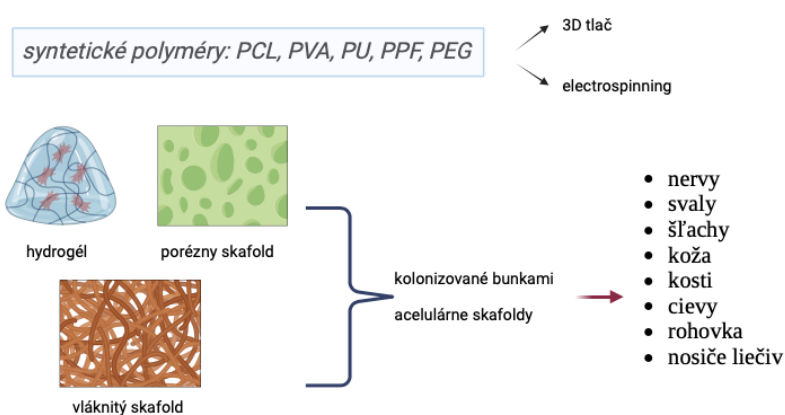
- napodobňovali prostredie, ktoré v živých organizmoch poskytuje ECM,
- potenciovali adhéziu buniek,
- podporovali pozitívnu biologickú bunkovú odpoveď v zmysle proliferácie, migrácie, diferenciácie,
- regulovali remodeláciu a regeneráciu poškodeného tkaniva.

Ako sme už viac krát spomínali, interakcia medzi bunkou a ECM spúšťa komplexnú kaskádu biochemických procesov. Ústia do prichytenia a aktivácie vysiatych buniek. Bunky rozpoznávajú špecifické väzbové domény ECM pomocou **membránových integrínových receptorov**. Po vytvorení väzby s ECM sa bunky vedia prichytiť, deliť a interagovať s mikroprostredím. V kontexte tkanivového inžinierstva je kľúčové, aby tieto deje ostali zachované, nakoľko vedú k vytváraniu nového tkaniva. Navyše, od tohto mechanizmu sú odvodené základné prístupy **funkcionalizácie povrchov** syntetických skafoldov. Jedná sa napríklad o modifikáciu povrchu matrice prostredníctvom tripeptidu **arginín-glycín-aspartát**. Tento motív rozpoznáva integrínový receptor, čím potencie bunkovú adhéziu.

Povrchová **absorpcia proteínov ECM** (napr. kolagénu, fibronektínu, laminínu) predstavuje ďalšiu efektívnu stratégiu navodenia bunkového prichytenia na skafold. Mnohé štúdie sa venujú modifikáciám či už povrchu, alebo celkovému dizajnu syntetických matric prostredníctvom rôznych **biologicky aktívnych činiteľov** (rastové faktory, bioaktívne peptidy,

biofyzikálna stimulácia). Veľmi zaujímavú oblasť predstavuje aj **antimikrobiálna modifikácia** povrchu matric. Spomínaná stratégia je špeciálne dôležitá pre aplikáciu skafoldu bez bunkového výsevu, napríklad pri bedrových či kolenných implantátoch, alebo v podobe povrchového krytia rôznych rán. Pri týchto stavoch je kľúčové, aby počas regenerácie tkaniva nedošlo k nežiadúcej kolonizácii patologickými mikróbmami. Antimikrobiálnu modifikáciu vieme dosiahnuť impregnáciou povrchu alebo celkovej štruktúry syntetického skafoldu **biocídnymi činiteľmi**. Tieto látky by ale nemali negatívne interagovať s okolitými bunkami (v zmysle cytotoxicity) či vyvolať systémovú nežiadúcu reakciu v organizme.

Syntetické polyméry môžeme klasifikovať na základe ich hydrofilnosti, hydrofóbnosti a degradovateľnosti. Medzi **základných predstaviteľov** využívaných v TERM patria (Obrázok 7.4) polykaprolaktón (PCL), polyvinylalkohol (PVA), polyuretán (PU), polpropylén-fumarát (PPF), polyetylénglykol (PEG). Boli využité v početných štúdiách na regeneráciu nervového, svalového, tráviaceho, endokrinného a kardiovaskulárneho systému. Aplikčný potenciál bol potvrdený aj pri tkanivovom inžinierstve kože či urogenitálneho traktu. V rámci praktickej medicíny sú vo veľkom používané vo forme chirurgického šitia, stentov, katétrov a i.



Obrázok 7.4 Syntetické skafoldy a ich využitie v TERM. Syntetické polyméry sa v súčasnosti často spracovávajú technológiou elektrospiningu, 3D tlače, ako aj bioprintingu. Umožňujú vyhotovenie precízne definovaných matric a hydrogéllov. Početné štúdie potvrdili, že výsev skafoldov bunkami (najmä kmeňovými) predstavuje efektívnejší prístup v zmysle schopnosti regenerácie početných tkanív v porovnaní s aplikáciou nevysiatych matric.

7.3.2 Prírodné polyméry

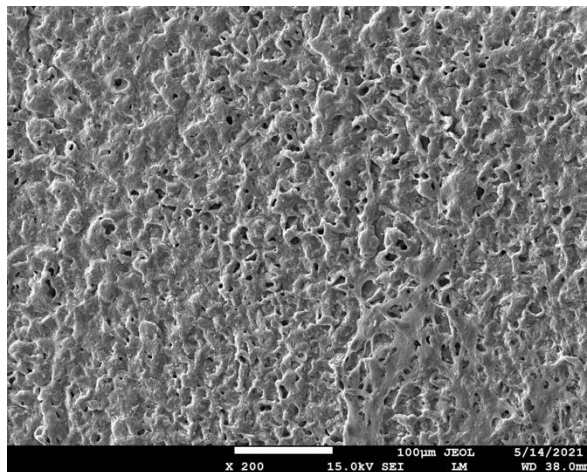
Prírodné polyméry zaraďujú viacerí autori spolu s decelularizovanými naturálnymi matricami k tzv. **biologickému skafoldu**. Tieto polyméry nachádzame v prírode a môžu mať rastlinný či živočíšny pôvod. Vo všeobecnosti nevykazujú známky imunogenicity, sú biodegradovateľné

a biokompatibilné. Vďaka svojmu pôvodu vedia ľahko napodobňovať biochemické zloženie natívnych tkanív, nakoľko zdieľajú podobnosť s komponentami z ECM. Túto vlastnosť vykazujú najmä **decelularizované skafoldy**. Bunková odpoveď na tieto materiály je veľmi rýchla a prejavuje sa dobrým prichytávaním sa buniek na povrch s následnou proliferáciou, migráciou a diferenciáciou. Ich **prirodzená bioaktívnosť** uľahčuje adaptáciu v živých organizmoch po *in vivo* implantácii. Na druhej strane, veľkou nevýhodou prírodných polymérov je ich obmedzená dostupnosť, limitovaná reprodukovateľnosť a nevyhovujúce mechanické vlastnosti. V porovnaní so syntetickými materiálmi vykazujú **lepšiu biokompatibilitu**, aj keď riziko potenciálnej imunogenicity pretrváva (Tabuľka 7.1).

Tabuľka 7.1 Porovnanie základných charakteristík syntetických a prírodných skafoldov

Materiál	Výhody	Nevýhody
SYNTETICKÉ SKAFOLDY	presne definovaná čistota materiálu	zhoršená biokompatibilita
	ľahká reprodukcia chemických a mechanických vlastností	potenciálne toxický účinok degradačných produktov
	dobré mechanické vlastnosti	komplikovanejšia aplikácia v rámci 3D tlače
	nízka imunogenicitá	nízka adhézia buniek
	nízka cena nákladov	pomalá degradácia <i>in vivo</i> – riziko chronickej zápalovej odpovede
	schopnosť produkcie uniformných matríc vo väčších množstvách	
	možnosť upravovať parametre skafoldu počas výrobného procesu	
PRÍRODNÉ SKAFOLDY	biologický pôvod polyméru	horšie mechanické vlastnosti
	výborná biokompatibilita	možný prenos kontaminácie
	výborná interakcia s bunkami	potenciálna imunogénnosť
	rýchla biodegradácia	nízka stabilita
	bioaktivita	náročné spracovanie
	bioresorbabilita	vysoká cena nákladov na spracovanie

Medzi **najvýznamnejších predstaviteľov** prírodných polymérov patria kolagén, kyselina hyalurónová, chitosan, fibrín, polysacharidy (chitín, glykogén, škrob), kyselina polymliečna (PLA) a polyhydroxyalkanoáty (polyhydroxybutyrát – PHB) a i. (Obrázok 7.5).



Obrázok 7.5 Planárny (2D) skafold na báze prírodných polymérov PLA/PHB. Mikroskopická analýza povrchu matrice.

Decelularizované matrice predstavujú **acelulárne** skafoldy na báze **kolagénu** získaných z konkrétnych tkanív, akými sú napr. koža, močový mechúr, šľachy, submukóza tenkého čreva, aorta a i. Jedná sa zväčša o alotransplantáty alebo xenotransplantáty. Odstránením bunkovej zložky sa získa ECM. Slúži ako kostra pre ďalší výsev bunkami. Tento prístup vyhotovuje skafoldy s **najlepšie** zachovanými **biochemickými** a **biomechanickými** vlastnosťami pre reparáciu konkrétneho tkaniva, z ktorého sú derivované.

Výzvou pri vytváraní decelularizovaných matric predstavuje samotný proces decelularizácie. Musí byť veľmi precízny, aby po implantácii nedošlo k neželanej imunitnej reakcii, ale zároveň šetrný, aby si skafold uchoval pôvodné chemické a mechanické vlastnosti. Vhodne zvolená technika decelularizácie umožňuje zachovať aj **pôvodnú orientáciu** kolagénových vlákien. Rozsiahle štúdie týkajúce sa tkanivového inžinierstva **mäkkých tkanív** aplikovali do svojich experimentov prírodné polyméry a decelularizované tkanivá vo forme skafoldov. Ich využitie pre regeneráciu tvrdých tkanív je taktiež možná, ale najmä kvôli zlým mechanickým vlastnostiam je potrebné ich kombinovať so syntetickými materiálmi alebo keramikou vo forme **hybridných skafoldov**.

7.3.3 Keramika

Keramika predstavuje **anorganické materiály** derivované z **ílovitých** surovín, ktoré vznikajú procesom vypaľovania. Pozostáva z kovových a nekovových zložiek. Tie sú chemicky viazané

pomocou iónových, alebo prevažne iónových väzieb s rôznym stupňom kovalentného charakteru. Keramické materiály sa vyznačujú nasledovnými črtami:

- vysoká tuhosť,
- vysoká pevnosť,
- vysoká tvrdosť,
- odolnosť voči vysokým teplotám,
- dlhá životnosť, odolnosť voči opotrebovaniu,
- odolnosť voči chemickej degradácii.

Významné **biologické vlastnosti** keramických materiálov sú:

- **osteoinduktivita** - schopnosť indukovať osteogénzu,
- **osteoinkonduktivita** – schopnosť poskytnúť kostnému tkanivu predlohu, na ktorej môže rásť.

Hlavnou **nevýhodnou** vlastnosťou keramiky je vysoká miera **krehkosti**.

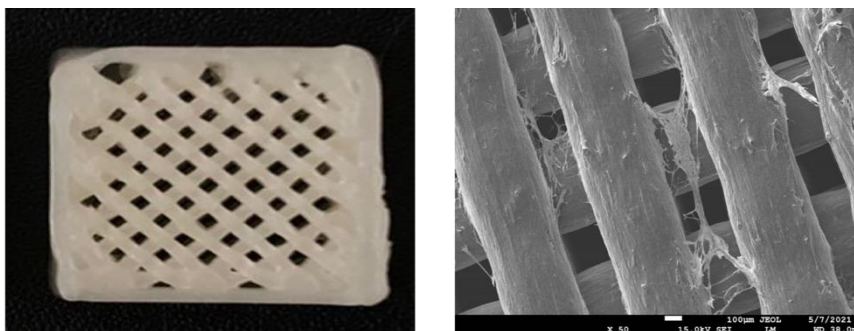
Na základe ich schopnosti **interakcie** v živom organizme ich môžeme deliť na:

- inertné,
- bioaktívne,
- vstrebateľné (bioresorbovateľné).

Inertná keramika po implantácii **neinteraguje** s okolitým tkanivom, nakoľko sa v jej bezprostrednom okolí vytvára sieť vláknitého spojivového tkaniva. Toto tkanivo vytvára bariéru medzi implantátom a okolitými štruktúrami a zároveň zabezpečuje zotrvanie v mieste aplikácie. Tieto materiály dokážu dlho odolávať prostrediu s nízkym pH a dlhodobo si zachovávajú svoje chemické a mechanické vlastnosti. Vďaka tomu sú vhodnými kandidátmi na trvalé implantáty. Predstaviteľom tejto skupiny je napr. **oxid hlinitý**.

Bioaktívna keramika sa dokáže viazať na špecifické proteíny a taktiež uvoľňovať ióny. Tieto mechanizmy napomáhajú integrácii implantátov do tkanív a mali by tiež potenciovateľ špecifickú biologickú odpoveď vedúcu k regenerácii daného tkaniva. Zaráďujeme sem **bioaktívne sklo**.

Bioresorbovateľná keramika sa po implantácii postupne vstrebáva a zároveň je nahradzovaná novovznikajúcim tkanivom. Patrí sem napr. **trikalciumfosfát** (Obrázok 7.6). Keramika má bohatý aplikačný potenciál najmä v tkanivovom inžinierstve **tvrdých tkanív**, predovšetkým kosti a zubného tkaniva.



Obrázok 7.6 3D skafold na báze trikalciumfosfátu a hydroxyapatitu. Obrázok vpravo zobrazuje 3D vytlačený skafold vo forme kvádra na potenciálnu regeneráciu kostného tkaniva. Elektronogram zobrazuje daný skafold po výseve kmeňovými bunkami z tukového tkaniva.

7.3.4 Hybridné materiály

Hybridné materiály sa získavajú **zlúčením** dvoch alebo viacerých zložiek s **rozličnými chemickými a fyzikálnymi** vlastnosťami. Touto kombináciou vzniká nový materiál s **vylepšenou charakteristikou**. Konečné vlastnosti takto vzniknutej zmesi sú podmienené miešateľnosťou jednotlivých zložiek. Medzi **základných predstaviteľov** zaradujeme:

- hybridné materiály na báze PLA – PLA/PHB, PLA/PEG,
- hybridné materiály na báze PCL – PCL/PLA, PCL/PEG, PCL/škrob,
- zmesi polyméru a biokeramiky – rôzne syntetické ako aj prírodné polyméry s bioaktívnym sklom, trikalciumfosfátom či hydroxyapatitom.

Tieto kompozitné skafoldy sú predmetom výskumu a vývoju v rámci tkanivového inžinierstva **mäkkých** ako aj **tvrdých** tkanív. Ich výhodou je, že umožňujú vyhotovenie skafoldu „ušíťého na mieru“ na základe aplikačného zámeru.

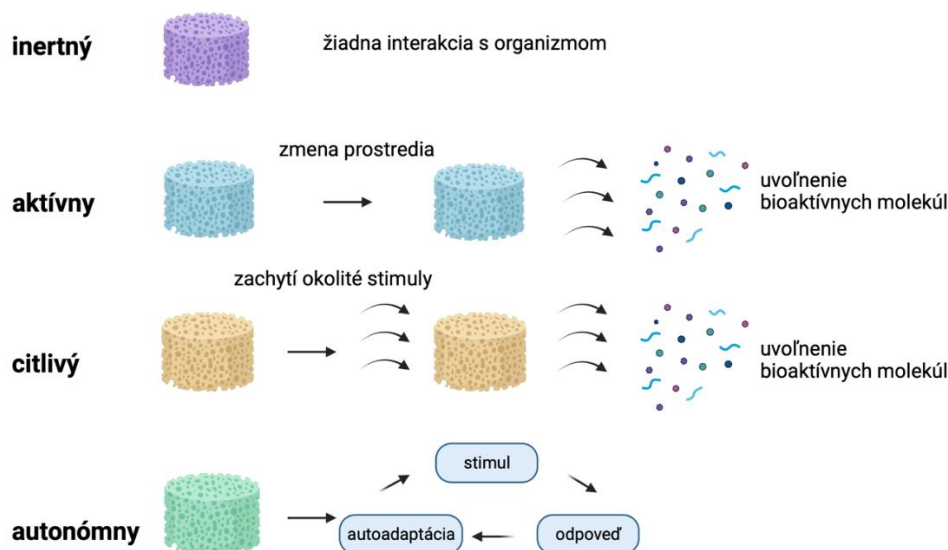
7.3.5 Hydrogély

Hydrogély predstavujú ďalšiu skupinu materiálov využívaných na vyhotovenie skafoldov v rámci TERM. Zaradujeme sem vo **vode nerozpustné gély**, v ktorých priečne zosieťované polymérové reťazce vytvárajú 3D štruktúru vyznačujúcu sa silnou schopnosťou **viazat' vodu**. Vďaka zabudovaným hydrofilným zložkám zväčšujú objem vo vode, bez narušenia materiálovej súdržnosti. Hydrogély nachádzame aj prirodzene v **ľudskom tele** (ECM, chrupavky, menisky, šľachy a i.). V kontexte tkanivového inžinierstva, vysoký obsah vody v hydrogélach poskytuje ideálne prostredie pre prežívanie buniek. Práve preto slúžia tieto systémy ako podporná matrica pre **imobilizáciu buniek** a ako **nosiče** regulačných molekúl či liečiv. Inkorporované bunky v hydrogélach po implantácii plnia v mieste poškodenia svoje biologické funkcie, pričom hydrogél postupne degraduje. Okrem vysokého obsahu vody sa vyznačujú aj **poréznu štruktúrou**. Je veľmi výhodná, nakoľko umožňuje prísun živín a odsun

bunkového odpadu. Disponujú aj významným stupňom **flexibility** a **elasticity**, ktoré sú podobné vlastnostiam ECM. Bývajú označované ako tzv. **inteligentné materiály** (*smart materials*), pretože reagujú na externé stimuly (teplota, pH, svetlo, magnetické a elektrické pole, enzýmy a i.). Na základe **stimulov** ich môžeme deliť na hydrogély reagujúce na:

- fyzikálne stimuly (teplota, svetlo, elektrické a magnetické pole),
- chemické stimuly (pH, hladina glukózy, biologické stimuly).

Hydrogély predstavujú veľmi atraktívne materiály pre výskum a vývoj, nakoľko skafoldy na báze hydrogélů predstavujú tzv. inteligentné skafoldy s výnimočnými biologickými vlastnosťami (Obrázok 7.7). Tematike inteligentných skafoldov sa budeme venovať v samostatnej kapitole.



Obrázok 7.7 Schéma znázorňujúca vývoj matric v kontexte „smart materials“. Spočiatku sa považovalo za kľúčové, aby implantovaný materiál neinteragoval so živým organizmom. Mal byť „biologicky neviditeľný“ – inertný. Štúdie však poukázali na skutočnosť, že skafold by mal viesť aktívne modulovať biologické ako aj biochemické deje v jeho blízkosti prostredníctvom vylučovania bioaktívnych molekúl. Táto sekrécia bola spočiatku neregulovaná, avšak pokrok v technologickej príprave umožnil vyhotoviť matrice s ich riadeným uvoľňovaním. Pokročilejšie skafoldy sú citlivé na stimuly z okolia, na ktoré vedia adekvátne reagovať prostredníctvom uvoľnenia bioaktívnych činiteľov. Najinteligentnejšie matrice zaznamenávajú stimul (fyzikálny alebo chemický), odpovedajú naň a prispôbia svoje vlastnosti na základe zmeny prostredia, v ktorom sa nachádzajú.

Aplikačný potenciál našli v štyroch významných odboroch:

- nosiče liečiv a bioaktívnych molekúl,
- biomedicínske aplikácie (implantáty s tvarovou pamäťou),
- biosenzory (glukózové senzory),
- TERM (vstrekovateľné systémy na transport buniek a rastových faktorov, povrchy kontrolujúce bunkovú adhéziu, hydrogély podporujúce infiltráciu buniek).

7.4 Biokompatibilita – kľúčová vlastnosť materiálov

Biokompatibilitu môžeme definovať ako schopnosť implantovaného materiálu fungovať v *in vivo* prostredí bez vyvolania **nežiadúcej lokálnej** či **systémovej** reakcie. Tým pádom nepredstavuje riziko pre organizmus prijímateľa. Táto vlastnosť je absolútne kľúčová pre všetky druhy implantátov a zdravotníckych pomôcok používaných v praktickej medicíne alebo v rámci výskumu s aplikačným potenciálom *in vivo*.

Pozitívna interakcia cudzieho materiálu so živým organizmom predstavuje prvý krok k zaradeniu skafoldov do experimentov. Zásadná je taktiež pre následnú transláciu do praktickej medicíny.

Je dôležité, aby každý materiál prešiel dôkladným testovaním. V kontexte matric na báze polymérnych materiálov je nevyhnutné, aby konkrétne polyméry využívané na vyhotovenie skafoldov spĺňali tzv. **medical grade kritérium**. Táto kategorizácia ich odlišuje od polymérov určených pre priemyselné a spotrebiteľské segmenty.

Medzinárodná organizácia pre normalizáciu (**ISO**) prezentuje usmernenia týkajúce sa biokompatibility zdravotníckych pomôcok v rámci normy ISO 10993. Kritéria sa vzťahujú aj na tkanivové konštrukty, nakoľko sú určené na implantáciu do živého organizmu. Táto norma neustále podlieha aktualizácii a obsahuje 20 častí. V skratke môžeme zhrnúť niektoré kategórie testov do nasledovných skupín:

- testovanie celkovej bezpečnosti – testovanie na pyrogény a bakteriálne endotoxíny, testovanie systémovej toxicity,
- cytotoxicita materiálu – extrakčné testy, priame a nepriame kontaktné testy,
- hemokompatibilita,
- mutagenicita,
- mukózne iritačné testy,
- testy senzibilizácie.

V rámci tkanivového inžinierstva zohráva nesmierne dôležitú úlohu testovanie toxického potenciálu materiálu v *in vitro* podmienkach na úrovni bunkových kultúr. Toto testovanie nazývame aj ako testovanie **cytotoxicity**. Zameriava sa hlavne na to, ako a či daný materiál ovplyvňuje rast, proliferáciu a morfológiu buniek. Ich nepriaznivý vplyv sa na bunkovej úrovni prejavuje poškodením bunkovej membrány, zastavením proteosyntézy, ireverzibilným naviazaním na receptory až bunkovou smrťou. *In vitro* **cytotoxické testy** sú v rámci štúdia materiálov veľmi obľúbené, pretože sú cenovo dostupné, rýchle a nevyžadujú testovanie na animálnych modeloch. Vieme nimi otestovať veľké množstvo vzoriek, čo je

taktiež dôležité zo štatistického hľadiska. Testy sú založené na rôznych bunkových vlastnostiach, akými sú permeabilita bunkovej steny, enzymatická aktivita buniek, bunková adherencia, produkcia ATP a i.

Cytotoxické testy môžeme rozdeliť na:

- **kvalitatívne,**
- **kvantitatívne.**

Ku **kvalitatívnym testom** radíme:

- extrakčné testy,
- nepriame kontaktné testy (agarový difúzny test),
- priame kontaktné testy.

Pri týchto testoch sa toxicita vyhodnocuje po určitom časovom úseku, počas ktorého boli bunky exponované danej látke alebo jej **eluátu** (výluhu). Zväčša sa jedná o interval 24 – 48 hodín.

Extrakčné testy využívajú na testovanie cytotoxicity eluát. Získa sa 24 hodinovým výluhom daného materiálu v základnom kultivačnom médiu (MEM – *Minimal Essential Medium*). Následne sa z bunkovej kultúry odsaje pôvodné médium a pridá sa výluh. Po inkubácii sa mikroskopicky sledujú **morfologické zmeny, degenerácia a lýza** buniek.

Tenká vrstva nutrične obohateného agaru sa využíva pri nepriamom kontakte teste (**agarový difúzny test**). Agarom sa pokrýva bunková kultúra a na povrch sa umiestni testovaný materiál. Nasleduje 24 hodinová inkubácia. Agar predstavuje membránu umožňujúcu prechod potenciálnych toxických látok k bunkám. Materiál vykazuje cytotoxicitu ak sa v miestach pod ním vyskytne zóna s malformovanými, zdegradovanými či lyzovanými bunkami. Ak sa pri testovaní nepoužije agarová membrána, vykoná sa priamy kontaktný test materiálu s bunkami.

Spomínané kvalitatívne testy sa často dopĺňajú kvantitatívnymi metódami testovania cytotoxicity.

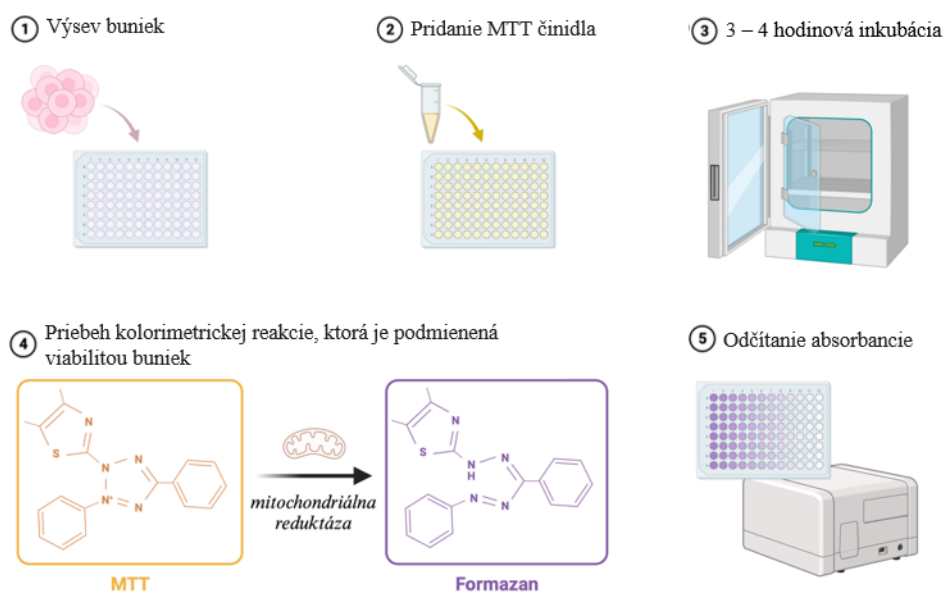
Medzi **kvantitatívne testy** patria:

- testy založené na vylučovaní farbiva (*dye exclusion tests*),
- kolorimetrické testy,
- fluorometrické testy,
- luminometrické testy.

Prvá kategória testov (*dye exclusion tests*) je založená na fakte, že živé bunky vedú vylúčiť špecifické farbivo, neživé to však nedokážu. To ústi do zafarbenia mŕtvych buniek. Tieto deje sú podmienené **integritou** bunkovej membrány. Využíva sa napr. **tryptánová modrá**

alebo **tetrazoliové soli**. Odporúčajú sa aplikovať najmä na testovanie viability buniek vo forme suspenzií.

Kolorimetrické testy fungujú na princípe merania určitého **biochemického markera** slúžiaceho na vyhodnotenie metabolickej aktivity buniek. Činidlá využívané pri týchto testoch menia farbu v závislosti od životaschopnosti buniek a táto zmena umožňuje kolorimetrické meranie prostredníctvom **spektrofotometra**. Dajú sa aplikovať pri testovaní adherentných buniek ako aj bunkových suspenzií. Patrí sem napríklad MTT test, MTS test, LDH (laktátdehydrogenázový) test, WST-1 a WST-8 testy. **MTT** (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) test patrí k najčastejšie používaným metódam na vyhodnotenie cytotoxického potenciálu rôznych materiálov. Sleduje viabilitu buniek na základe **aktivity mitochondriálnych enzýmov**. Ak je bunka nepoškodená, enzýmy dokážu redukovať MTT farbivo na fialový **formazán**. Tento produkt vieme kvantifikovať na základe absorbie pri špecifickej vlnovej dĺžke spektrofotometrom (Obrázok 7.8).



Obrázok 7.8 Schematické znázornenie MTT testu. Prvý krok predstavuje inkubáciu buniek s daným testovaným materiálom. Následne sa materiál so starým kultivačným médiom odoberie a bunkovým kultúram sa v špecifickom pomere pridá reagens a čerstvé médium (zafarbenie kultivačných jamiek nažltlo). Po cca 4 hodinovej inkubácii sa výsledky vyhodnocujú spektrofotometricky. MTT test odráža viabilitu a proliferáciu buniek prostredníctvom zachovanej funkcie mitochondrií. Ak sú bunky živé, dochádza k redukcii MTT činidla a vytvára sa fialový formazán.

Fluorometrické testy vyhodnocujú viabilitu buniek a cytotoxicitu prostredníctvom fluorescenčného mikroskopu, fluorometru, fluorescenčnej čítačky mikroplatin či prietokového cytometra. Sú oveľa **citlivejšie** ako kolorimetrické metódy. Dajú sa využiť pri testovaní adherentných kultúr aj bunkových suspenzií. Zaraďujeme sem napr. test redukcie resazurínu

(*AlamarBlue assay*), GF-AFC test (test markerov životaschopnosti proteázy), CFDA-AM test, a i. **AlamarBlue test** sa používa v početných štúdiách skúmajúcich cytotoxický potenciál novo vyvíjajúcich sa scaffoldov. Pri tomto teste dochádza ku konverzii modrej, nefluorescenčnej farbičky resazurínu na ružový, fluorescenčný rezofurín. Podmienkou tejto zmeny je zachovalá aktivita mitochondriálnych enzýmov v bunke. Miera viability buniek je následne kvantifikovaná pomocou fluorescenčných prístrojov. Pri vyhodnocovaní prostredníctvom fluorescenčnej čítačky je potrebné vybavenie so sadou špecifických filtrov (560 nm excitácia 590 nm emisia). Tento test umožňuje aj meranie zmien absorbancií, ale neodporúča sa, nakoľko nie je tak výpovedná ako meranie fluorescence.

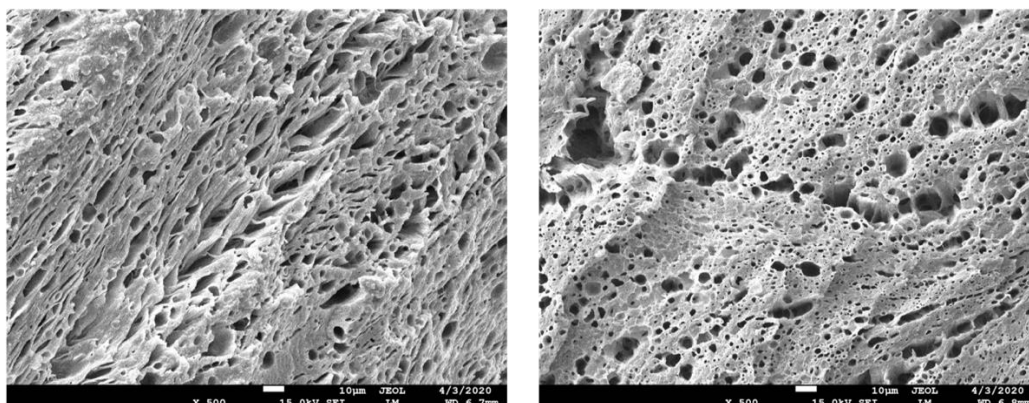
Luminometrické testy merajú **luminiscenčný signál** podmienený biochemickými reakciami v bunkách. Veľkou výhodou je, že tento signál (signál typu žiary) pretrváva a je stabilný po pridaní daného činidla. Tento jav možno využiť na získanie hodnôt vitality aj cytotoxicity z tej istej jamky. K týmto testom radíme **ATP test** a tzv. *real-time viability assay* (testovanie viability v reálnom čase). ATP (adenozíntrifosfát) predstavuje najdôležitejší zásobník chemickej energie v bunkách. Je nevyhnutný pre procesy syntézy, signalizácie, transportu a migrácie. Práve preto je bunkový ATP veľmi citlivý marker pre vyhodnocovanie viability. Pri letálnom poškodení bunky strácajú membrány integritu a taktiež schopnosť syntetizovať ATP, ktorého hladina dramaticky klesá. ATP test je založený na premene luciferínu na oxyluciferín. Táto reakcia je katalyzovaná enzýmom **luciferáza** za prítomnosti Mg^{2+} iónov, pričom ATP poskytuje luminiscenčný signál. Existuje **lineárny vzťah** medzi intenzitou luminiscenčného signálu a koncentráciou ATP alebo počtom buniek. Tento test predstavuje veľmi rýchlu a citlivú metódu na detekciu životaschopnosti buniek. Navyše je menej náchylný na artefakty než iné testy cytotoxicity. Luminiscenčný signál dosahuje stabilné hodnoty a pretrváva počas 10 minút od pridaní činidla.

Real-time viability assay využíva luciferázu derivovanú z morských kreviet spolu s malou molekulou pro-substrátu. Obe sa pridávajú priamo k bunkovým kultúram ako činidlá. Živé bunky redukujú pro-substrát na substrát, ktorý luciferáza využije na generovanie luminiscenčného signálu. Táto metóda umožňuje **kontinuálne monitorovanie** bunkovej viability či cytotoxicity v **reálnom čase**. Pri dizajne experimentu s potenciálnou aplikáciou *in vivo* je vždy kľúčové zvoliť a nakombinovať čo najvhodnejšie testy cytotoxicity. Mylný výsledok signifikantne ovplyvní priebeh celého výskumu a preto testovanie cytotoxicity patrí medzi prvé experimenty vykonávané v rámci materiálových štúdií.

7.5 Porézna štruktúra skafoldov a technológie výroby umožňujúce porézny dizajn

7.5.1 Porézna štruktúra skafoldu

Dizajn skafoldu predstavuje jednu zo zásadných vlastností determinujúcich mieru funkčnosti celého tkanivového konštruktu. Rozsiahle výskumy potvrdili, že matrice by mali mať **poréznu** štruktúru s navzájom poprepájanými pórmí (Obrázok 7.9). Táto štruktúra umožňuje **penetráciu buniek** aj do vnútra skafoldu a priamo ovplyvňuje ich proliferáciu a diferenciáciu. Zároveň uľahčuje **difúziu nutrientov a kyslíka** k vysiatym bunkám a taktiež k ECM, ktorú bunky produkujú.



Obrázok 7.9 Elektrónogramy z rastrovacieho elektrónového mikroskopu znázorňujúce príklady rôznej poréznej štruktúry skafoldov na báze prírodných polymérov, priečny rez. Porozita bola dosiahnutá aplikáciou technológie vymývania častíc.

Porézny dizajn umožňuje odvádzanie **odpadových** produktov. Tie majú bunkový pôvod alebo predstavujú degradačné produkty daného materiálu. Zásadný dej predstavuje aj prenikanie **ciev** cez póry. Vaskularizácia podmieňuje úspešnú integráciu tkanivového konštruktu do daného orgánu. Tento fenomén je veľmi dobre známy, avšak v praxi predstavuje veľkú výzvu pre vedcov. Vytvoriť 3D štruktúru umožňujúcu preniknutie buniek, živín a ciev aj do najhlbších častí matrice, je veľmi náročné. Ak sa však takýto dizajn nedodrží, často dochádza k odumretiu tkanivového implantátu v živom organizme. Podmieňuje to nedostatok adekvátneho vyživovania a odvádzania odpadových metabolitov.

Porézna štruktúra uľahčuje umiestnenie a **stabilizáciu** implantátu po jeho aplikácii *in vivo*. Umožňuje dobrú **komunikáciu** s mikroprostredím prostredníctvom efektívneho uvoľňovania biofaktorov do okolia vysiataho skafoldu.

Je dôležité, aby mali póry primeranú **veľkosť**, ktorá umožní efektívne prichytenie buniek s následnou migráciou do vnútorných štruktúr. Veľkosť pórov je determinovaná typom vysievaných buniek a taktiež od druhu rekonštruovaného tkaniva. Avšak treba mať na pamäti, že príliš vysoká porozita negatívne ovplyvňuje mechanické vlastnosti skafoldu. Preto je dôležité dbať na to, aby poréznosť bola dostatočná, ale na druhej strane nenarúšala mechanickú stabilitu matrice. V súčasnosti viaceré experimentálne štúdie poukazujú na fakt, že ideálna 3D štruktúra skafoldu obsahuje väčšie i menšie póry (makro-póry, mikro-póry). Vychádza to z poznatku, že viaceré tkanivá v ľudskom tele disponujú štruktúrou, ktorá nemá uniformnú veľkosť pórov (tzv. ***gradient porosity structure*** – GPS). Porézna architektúra je nevyhnutná aj pre regeneráciu tkaniva, nakoľko umožňuje **migráciu** okolitých buniek do tkanivového implantátu.

Na dosiahnutie poréznej štruktúry je dôležité vybrať vhodný materiál a najmä technologický spôsob jeho spracovania do formy skafoldu.

7.5.2 Technológie výroby skafoldov

Translácia skafoldu alebo tkanivového konštruktu z laboratórnych podmienok do praktickej medicíny predstavuje zložitý ekonomický a legislatívny proces. Pre komerčné použitie je dôležité, aby náklady na výrobu matríc boli prijateľné a zároveň by mala byť umožnená aj ich sériová výroba. Splnenie základných kritérií, ktoré princípy tkanivového inžinierstva kladú na vyvíjajúci sa materiál, sú taktiež samozrejmosťou. V danom kontexte sa javí výber vhodnej technológie výroby na konkrétnu aplikáciu ako kľúčový. Doposiaľ bolo opísaných viacero **metód** umožňujúcich syntézu poréznych matríc. Ako príklady uvedieme:

- elektro-spinning,
- odlievanie z roztoku a vymývanie častíc,
- spenenie plynom,
- emulzifikácia a vymrazovanie,
- termicky indukovaná separácia fáz.

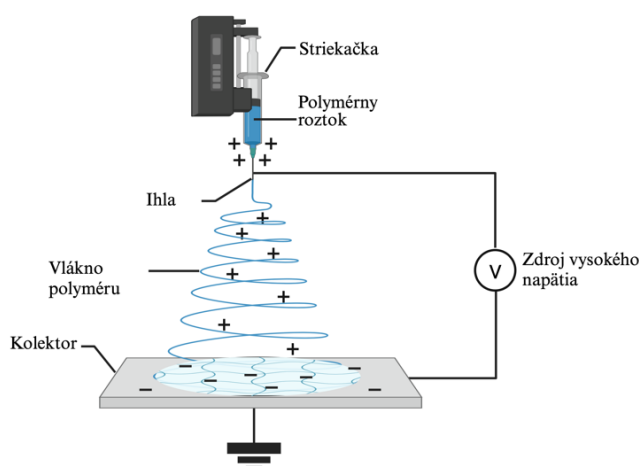
V súčasnosti máme k dispozícii aj najmodernejšie technológie, ktoré predstavujú tzv. **pokročilé výrobné techniky** (*advanced fabrication techniques*). Radíme k nim:

- 3D tlač,
- 3D biotlač,
- selektívne laserové spekanie,
- stereolitografia,
- rýchle prototypovanie a i.

Pokročilé technológie umožňujú vyhotovenie **3D** skafoldov s extrémne precíznym dizajnom a výhodnými vlastnosťami. V kontexte výroby inteligentných skafoldov predstavujú pokročilé technológie metódu voľby. V nasledujúcom texte bude viac priblížená metóda elektro-spiningu, 3D tlače a 3D biotlače. Tieto metódy umožňujú pripraviť inteligentné skafoldy, ktoré dokážu byť dobre modifikovateľné v zmysle architektúry alebo funkčnosti. Ponúkajú vyhotovenie skafoldov s rôznou architektúrou a topografiou pórov, čím umožňujú vyhotoviť maticu podľa jej cieľenej aplikácie. Takéto inteligentné matrice majú potenciál na efektívnu adaptáciu v živom organizme a úspešnú reparáciu poškodeného tkaniva. Pokročilé výrobné techniky umožňujú syntézu skafoldov pre tkanivové inžinierstvo komplexných, **hierarchicky** usporiadaných tkanív.

Elektro-spining alebo tzv. elektrostatické zvlákňovanie predstavuje jednu z metód umožňujúcich produkciu **nanovláknien**. Pre svoju nízku energetickú náročnosť a schopnosť priemyselnej výroby nanovláknových materiálov sa stal intenzívne študovanou technológiou v rámci TERM. Zariadenie sa skladá z nasledovných častí (Obrázok 7.10):

- striekačka napojená na pumpu,
- ihla/kapilára predstavujúca jednu z elektród,
- stabilná časť trysky,
- kolektor (predstavujúci druhú elektródu),
- uzemnenie,
- zdroj vysokého napätia.



Obrázok 7.10 Schematické znázornenie technológie elektrostatického zvlákňovania.

Pri tomto procese dochádza k tvorbe nanovláknien prostredníctvom vplyvu silného **elektrického poľa** na roztok alebo taveninu polyméru. Tvorba samotných vlákien, ktoré môžu

mat' veľkosť desiatok či stoviek nanometrov, prebieha medzi dvoma opačne nabitými elektródami. Zdroj vysokého napätia predáva svoj kladný náboj ihle a záporný náboj sa odovzdáva kolektoru na uzemnenie. Prostredníctvom pumpy pripojenej k striekačke sa polymérny roztok vo forme kvapôčky vytláča z ihly, nabíja sa pod vysokým tlakom a následne sa ťahuje do vlákien. Tie sa v podobe siete zachytávajú na kolektore.

Parametre s bezprostredným vplyvom na tvorbu nanovláken sú:

- tvar ihly,
- vlastnosti roztoku – koncentrácia, vodivosť, viskozita, molekulová hmotnosť polyméru,
- premenné samotného procesu – vzdialenosť elektród, sila elektrostatického poľa,
- vlastnosti okolia – teplota, vlhkosť, prúdenie vzduchu.

Jednotlivé parametre sa dajú ľahko upravovať tak, aby vznikla štruktúra skafoldu podľa konkrétnych požiadaviek. Najmä sa jedná o porozitu, ktorou sa myslia „**medzery**“ vytvorené medzi jednotlivo usporiadanými vláknami. Výhodou týchto matric je ich veľký povrch uľahčujúci adhéziu buniek. Parametre nanovláken sa pohybujú v podobnom rozmedzí, aké nachádzame v rámci štruktúry ECM. **Vláknitá štruktúra** umožňuje inkorporovať rôzne **bioaktívne** molekuly do skafoldu, ktoré po aplikácii *in vivo* priaznivo ovplyvňujú biologické správanie buniek. Nakoľko táto technológia dovoľuje kombináciu viacerých materiálov, vieme tým nadizajnovávať maticu s vylepšenými biologickými a mechanickými vlastnosťami. Technológia elektrostatického zvlákňovania podlieha neustálemu výskumu a vývoju. V rámci najnovších výskumov bola namiesto polymérneho roztoku aplikovaná vysoko viskózna polymérna tavenina. Touto metódou, **elektrostatickým zvlákňovaním taveniny**, sa docielilo cielenejšie nanášanie materiálu, čo umožnilo vyhotovenie **3D** matrice na báze tzv. aditívnej výroby.

Skafoldy na báze elektro-spiningu nachádzajú aplikačný potenciál v mnohých odboroch regeneratívnej medicíny. Koherentné a **orientované** nanovláka vytvárajúce vnútornú štruktúru skafoldov majú dôležitý vplyv na prichytenie a proliferáciu buniek. To otvára bránu pre inžinierstvo takých tkanivových konštruktov, ktorých pôvodné tkanivo obsahuje vysoko usporiadanú orientovanú štruktúru ECM, ako napr. **šľachy** či **chrupavky**.

Niektoré štúdie dokonca priamo aplikovali **bunky** do samotného procesu elektro-spiningu, čím ešte viac zefektívnili ich inkorporáciu do celkovej štruktúry skafoldu. Navyše, bunky tento proces prežili a pod vplyvom dynamických kultivačných podmienok boli schopné vykonávať biologické funkcie.

3D tlač a **3D biotlač** patria k širokej škále nových procesných technológií známych aj ako tzv. **aditívna výroba** (Additive Manufacturing, AM). Technológia AM vytvára produkty pokladaním materiálu na čistú podložku po jednotlivých vrstvách (**vrstvením**). Tým sa výrazne znižuje materiálový odpad, pričom sa generuje produkt so špecifickou geometriou. Na vyhotovenie 3D geometrie sa využíva špecifický **program**, tzv. *computer-aided design software* (CAD), ktorého výstup predstavuje digitálny **CAD súbor** s daným **3D modelom**. Ten je v súbore rozdelený na základné stavebné 2D vrstvy. Na základe týchto vrstiev vie 3D tlačiareň tlačiť požadovaný produkt. Vo všeobecnosti môžeme konštatovať, že AM technológie ponúkajú vyhotovenie skafoldov početných tvarov a veľkostí s presne nadizajnovanou mikro- a makro-štruktúrou. 3D tlač sa stala nesmierne cenným technologickým nástrojom v rámci biomedicíny. Poskytuje najpresnejší návrh a kontrolu štruktúry pri výrobe skafoldov. Ako sme už viackrát spomínali, čo najprecíznejšia štruktúra matríc je pre úspešné uchytenie sa tkanivového konštruktu v živom organizme kľúčová. Enormný záujem o túto technológiu v rámci tkanivového inžinierstva je podmienený mnohopočetnými vedeckými publikáciami, ktoré sa ňou zaoberali. 3D tlač umožňuje aplikáciu rôznych materiálov, vrátane hybridných. Princíp 3D tlače spočíva v **nanášaní** danej vrstvy materiálu v osi **X** a **Y** a následne sa vrstvenie posunie **vertikálne** v osi **Z**. Potom nasleduje opätovné nanášanie osi **X** a **Y**. Tento proces sa opakuje, až kým sa nedosiahne vytvorenie požadovaného 3D modelu.

K častým metódam tlače patrí napríklad „**ink-jet**“ metóda, pri ktorej sa matrica tlačí z polymérneho prášku. 3D „ink-jet“ (atramentová) tlačiareň distribuuje vrstvu polymérneho prášku na pohyblivú platformu. Následne sa na túto vrstvu vytrysknú kvapôčky tekutého spojiva (binder), aby sa jednotlivé častice spojili a predmet bol tuhý. Takýmto spôsobom sa na seba ukladajú jednotlivé vrstvy materiálu. Keď je tlač ukončená, nespojené polymérne prášky sú odstránené a získa sa výsledný 3D produkt.

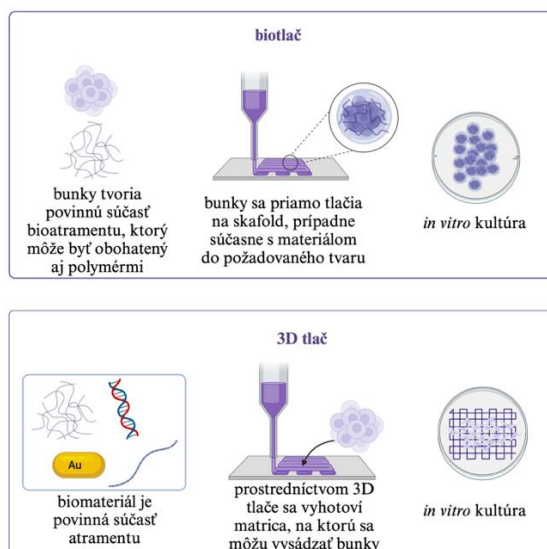
Ďalší prístup predstavuje tzv. **Fused Deposition Modeling** metóda, pri ktorej sa nanáša polymérna tavenina (termoplastický filament) do požadovaného 3D modelu.

3D tlač našla svoje uplatnenie v mnohých medicínskych odboroch na edukačné účely, vytvorenie implantátov či pri plánovaní náročných operačných zákrokov. Konkrétne odbory predstavujú:

- stomatológia,
- kardiológia,
- neurochirurgia,
- ortopédia,

- oftalmológia,
- maxilofaciálna chirurgia,
- traumatológia.

Ďalšia pokročilá technológia založená na princípe 3D tlače, ktorá umožňuje priamo tlačiť tkanivá či orgány sa nazýva **bioprinting** (biotlač). Tento proces tlače využíva biokompatibilný atrament (**bioatrament**) s polymérnym materiálom a živými bunkami (Obrázok 7.11). Materiál napodobňuje prostredie ECM. Tým vytvára vhodné podmienky pre zachovanie nevyhnutných biologických funkcií buniek (adhézia, proliferácia, diferenciácia) po ukončení tlače.



Obrázok 7.11 Atramenty využívané v biotlači a 3D tlači

V porovnaní s materiálmi bežne používanými na 3D tlač je potrebné, aby sa bioatramenty tlačili pri teplotách, ktoré korelujú s fyziologickou teplotou živého organizmu.

Biotlač využíva **štyri** základné prístupy:

- ink-jet (atramentová) biotlač,
- extrúzna biotlač,
- laserová biotlač,
- biotlač založená na stereolitografii.

Atramentová biotlač vo veľkej miere pripomína klasické tlačiarne na pracoviskách či v domácnostiach. **Tekutý bioatrament** sa nachádza v tlačiarňi v nádobe a je tlačovou hlavou vystrekovaný cez dýzu (trysku). Bioatrament z dýzy vychádza vo forme jednotlivých kvapôčok, ktoré sa ukladajú vedľa seba v X,Y a Z osi. Pohybom tlačovej hlavy vieme veľmi presne kontrolovať ukladanie kvapiek. Táto metóda ponúka využitie viacerých dýz a tým vieme

súčasne tlačiť nielen bunky, ale aj rôzne bunkové biomateriály. Vďaka tomu vieme vyhotoviť veľmi komplexné a hierarchicky usporiadané štruktúry.

Extrúzne biotlačiarne využívajú na tlač objektov hustý **gélovitý bioatrament** (biogél). Ten sa v celku ako gél vytláča na podložku vo forme tenkého prúžku a následne sa vrství. Vytlačanie prebieha mechanicky pod tlakom, keď sa biogél stlačením piestu alebo rotáciou skrutky dostáva cez dýzu von. Táto technológia ponúka veľkú rýchlosť tlače.

Laserová biotlač využíva laser ako zdroj energie na nanášanie biomateriálu na substrát. Táto technika sa obvykle skladá z častí ako pulzný laserový zdroj, ďalej z pásky umiestnenej na kovovom filme, ktorá je potiahnutá tekutým biologickým materiálom a prijímacieho substrátu. Laser ožiarí pásku a spustí proces odparovania sa biologického materiálu, ktorý sa takto dostane vo forme kvapiek k prijímaciemu substrátu. Ten obsahuje biopolymér alebo vhodné kultivačné médium a zabezpečuje adhéziu a prežitie buniek počas tlače.

Tekuté svetlocitlivé bioatramenty sa využívajú pri **stereolitografickej biotlači**. Táto metóda využíva mikro-zrkadlá, ktorými kontroluje intenzitu svetla dopadajúceho na konkrétne miesto, na ktorom dochádza k polymerizácii bioatramentu. Aplikuje UV žiarenie, a preto hrozí riziko poškodenia buniek. Na druhej strane, stereolitografická biotlač umožňuje precíznu syntézu štruktúr veľmi malých rozmerov.

V rámci TERM sa biotlač aplikovala najmä na vyhotovenie ciev, srdca, kosti, chrupky, obličiek, kože, nervov. Táto technológia umožňuje aj **inkorporáciu** bioaktívnych molekúl, napríklad proteínov či nukleových kyselín, do štruktúry výsledného 3D konštruktu. Ponúka aj možnosť tlače tzv. **organoidov**, ktoré predstavujú *in vitro* vyhotovené miniatúrne a zjednodušené verzie orgánu. Ich dôležitá vlastnosť však je, že by mali napodobňovať základné funkčné, štrukturálne a biologické charakteristiky daného orgánu. Pomocou organoidov vieme študovať rôzne patofyziologické mechanizmy, farmakodynamiku liečiv či mechanizmus toxicity liekov. Pri použití autológnych patientskych buniek slúžia na vyhotovenie **terapie šitej na mieru** pri konkrétnom ochorení.

Z uvedených technológií využívaných v TERM vyplýva, že je možné vyrobiť skafoldy s rozličnými štruktúrami, napríklad **vláknité** či **hydrogélové** matrice. Špecifickú kategóriu tvoria tzv. **microsphere-based scaffolds** (skafoldy na báze mikrosfér/mikrogulôčok). Jedná sa o mikročastice schopné enkapsulovať bioaktívne molekuly a riadene ich uvoľňovať v mieste potreby alebo poškodenia. V týchto 3D matriciach slúžia mikrosféry ako základné stavebné častice. Pri výrobe sa môžu kombinovať aj s biomateriálmi ako chitosan, kolagén, alginát a i.

7.6 Bioreaktory

Pokročilé technológie spolu s neustálym výskumom umožňujú vyhotovovať skafoldy šité na mieru pre konkrétneho pacienta. Nakoľko ľudské telo predstavuje **dynamický systém**, mali by byť aj tkanivové konštrukty vystavené dynamickým podmienkam, aby sa čo najlepšie adaptovali po *in vivo* implantácii. Takéto prostredie v laboratórnych podmienkach vieme navodiť použitím **bioreaktorov**. Sú to špecifické zariadenia, ktoré vytvárajú potrebné **biomechanické**, ako aj **biochemické** podmienky na vyhotovenie funkčného, 3D tkanivového konštruktu. Dokážu udržať špecifické mikroprostredie pre vysiate bunky tým, že v nich prebieha rovnomerná a kontrolovaná distribúcia kyslíka a nutrientov. V tomto prostredí sa dobre kontroluje odvádzanie nepotrebného metabolického odpadu z danej kultúry. Navyše štúdie potvrdili, že výsev skafoldov pod dynamickými podmienkami dokáže lepšie rozdistribúovať bunky na povrchu ako aj vo vnútorných častiach matríc. V porovnaní so statickými kultivačnými podmienkami, kultivácia a maturácia tkanivového konštruktu v bioreaktore ponúka nasledovné **výhody**:

- uniformné rozloženie buniek počas výsevu,
- neustále monitorovanie kultivačného prostredia – teplota, pH, koncentrácia kyslíka, metabolitov, tlak
- distribúcia nutrientov spolu so súčasným odvádzaním odpadových látok,
- monitorovanie bunkovej viability, proliferácie,
- aplikácia mechanických stimulov,
- ovplyvňovanie danej kultúry fyzikálnymi stimulmi.

Pre každý tkanivový konštrukt je potrebné v závislosti od *in vivo* aplikácie, vybrať vhodný typ bioreaktora a precízne nastaviť požadované parametre.

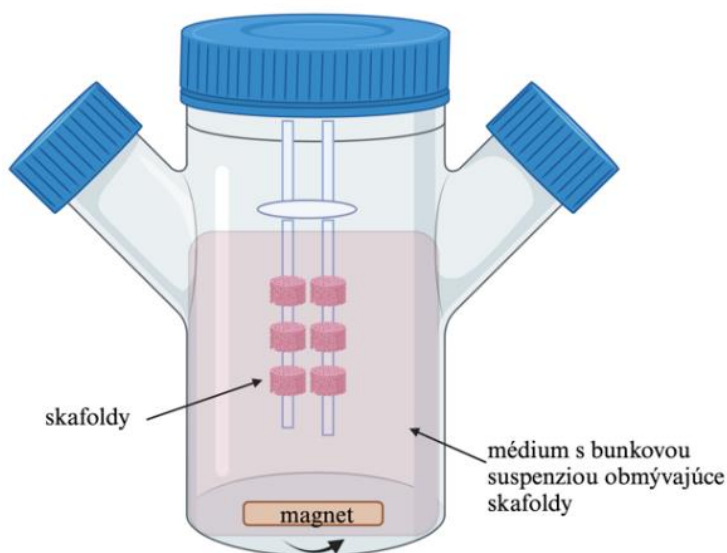
Základné typy bioreaktorov sú:

- spinner flasks (rotačné fľaše),
- bioreaktor s rotujúcou stenou (*rotating wall bioreactor*),
- kompresný bioreaktor,
- bioreaktor aplikujúci ťah,
- bioreaktor aplikujúci hydrostatický tlak,
- perfúzny bioreaktor.

Okrem mechanických stimulov vieme v bioreaktoroch docieľiť aj ovplyvňovanie tkanivového konštruktu alebo len samotnej bunkovej kultúry aj **fyzikálnymi stimulmi**. Jedná sa napríklad o elektrickú stimuláciu. Spomínané druhy stimulov (mechanické, fyzikálne) sa

dajú spájať a výsledky početných štúdií indikujú, že tento prístup sa javí ako efektívny pri vytváraní funkčných tkanív v *in vitro* prostredí.

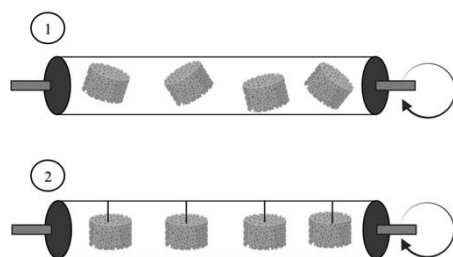
Spinner flasks, alebo tzv. **rotačné fľaše**, patria k základným a zároveň k najjednoduchším typom bioreaktorov (Obrázok 7.12). Rotáciou zabezpečujú homogénne miešanie kyslíka a živín v médiu.



Obrázok 7.12 Bioreaktor typu rotačnej fľaše. Scaffolds pripojené na ihly bioreaktora môžu byť acelulárne, ale aj v podobe kolonizovaných matric. Pohyb magnetu zabezpečuje prúdenie kultivačného média, ktoré ovplyvňuje povrch scaffoldov šmykovým napätím. Zároveň sú zabezpečené dynamické kultivačné podmienky podporujúce uchytenie sa buniek na povrch scaffoldu. Zároveň zabezpečujú dobrý prísun živín a O_2 .

V tomto druhu bioreaktora sú scaffolds umiestené na koncových častiach ihl, ktoré tvoria súčasť nádoby s kultivačným médiom. Magnetické miešadlo mieša okolo pevne fixovaných matric kultivačné médium. Prúd obmývajúcí povrch scaffoldov vytvára víry, ktoré uľahčujú transport média so živinami aj do vnútornejších štruktúr. Na druhej strane sa javí, že tento typ bioreaktora neumožňuje dostatočne efektívnu distribúciu buniek na povrchu scaffoldu. Bolo pozorované, že bunky sa zachytávajú najmä na periférii a stred ostáva nekolonizovaný.

Na vývoji tzv. **rotating wall bioreaktorov** sa primárne podieľala NASA za účelom simulácie mikrogravitačných podmienok. Zariadenia rotujú pozdĺž **horizontálnej** osi a vzniká v nich laminárne prúdenie média s nízkou intenzitou šmykového napätia. Tieto javy podporujú homogénnu distribúciu živín a odvádzanie metabolitov. Bioreaktor pozostáva z cylindrickej komory, v ktorej vnútorná a vonkajšia stena dokážu rotovať. Tým sa umožňuje voľný pohyb scaffoldov v médiu ako aj rovnomerná distribúcia buniek na povrchu matrice (Obrázok 7.13). *Rotating wall* bioreaktory boli aplikované na vyhotovenie tkaniva **chrupavky** o hrúbke 5 mm počas siedmich mesiacov kultivácie

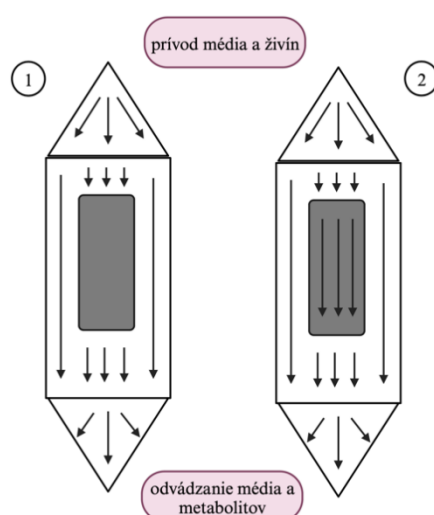


Obrázok 7.13 Bioreaktor s rotačnými stenami. 1) kultivácia tkanivových konštruktov na podklade voľného pádu. Konštrukty sa voľne pohybujú v médiu. 2) modifikácia maturácie vysiatych skafoldov v rotačných bioreaktoroch. V tomto prípade sú tkanivové konštrukty pripevnené k rotujúcej stene.

Kompresný bioreaktor našiel široké využitie v rámci tkanivového inžinierstva **chrupavky**, nakoľko dokáže pôsobiť na vyvíjajúce sa tkanivo statickou a dynamickou záťažou.

Bioreaktory aplikujúce **tlač** sa študujú v kontexte vývoja funkčných tkanivových konštruktov **šliach, väzov, kostí, ciev** a taktiež **chrupaviek**. Viaceré štúdie potvrdili, že táto stimulácia kolonizovaného skafoldu s mezenchymálnymi kmeňovými bunkami výrazne zlepšila ich diferenciáciu na požadovanú bunkovú líniu.

Perfúzne bioreaktory dokážu poskytnúť najlepšie podmienky pre transport média ako aj najlepšiu distribúciu buniek na matrici. Ich významná rola bola zvýraznená najmä pri maturácii **tubulárnych** tkanivových konštruktov v dynamickom kultivačnom systéme. Médium cirkuluje okolo, alebo cez tubulárne konštrukty, na ktoré zároveň pôsobí pulzné, jednosmerné mechanické naťahovanie s kontrolovanou frekvenciou (Obrázok 7.14). Tieto systémy boli aplikované v rámci tkanivového inžinierstva **ciev** či **močovej trubice**.



Obrázok 7.14 Perfúzny bioreaktor. 1) schéma znázorňujúca nepriamu perfúziu, nakoľko médium obteká najmä okolo a len minimálne cez skafold. 2) priama perfúzia, pri ktorej je médium hnané cez štruktúru skafoldu a šmykové napätie priamo ovplyvňuje bunky v matrici.

7.7 Bunky aplikované v tkanivovom inžinierstve

Počas posledných dekád monitorujeme výrazný vzostup odborov tkanivového inžinierstva a regeneratívnej medicíny. Zaslúžil sa o to intenzívny vedecký výskum najmä v oblastiach **biomateriálov** a **buniek**. Poskytol nám objasnenie biológie a regulačných mechanizmov kmeňových buniek či objav ďalších bunkových aj nebunkových častíc, ktoré sa veľkou mierou môžu podieľať na regenerácii poškodených tkanív. Aplikácia buniek v tkanivovom inžinierstve predstavuje atraktívnu oblasť výskumu. Ide najmä o štúdium mechanizmov proliferácie, migrácie a diferenciácie buniek. Analýza genómu má takisto veľké opodstatnenie. Biologické správanie podmieňuje ich prijatie v živom organizme. Zároveň je podstatné, aby aplikované bunky nevyvolali nežiadúcu systémovú reakciu zo strany prijímateľa.

7.7.1 Základné zdroje buniek

Jeden z najdôležitejších elementov, ktorý podmieňuje úspech vyhotovenia tkanivového konštruktu, je schopnosť generovať **dostatočné množstvo** buniek v laboratórnych podmienkach. Je nevyhnutné aby si bunky zachovávali svoj fenotyp a biologickú funkčnosť po implantovaní do živého organizmu. Po *in vivo* aplikácii by mali byť schopné produkovať správne organizovanú **ECM** a reagovať na **biochemické** a **fyzikálne** stimuly. Celulárna odpoveď na spomínané deje sa prejavuje prostredníctvom vylučovania **cytokínov** a **signálnych molekúl** pre správnu interakciu s okolitými bunkami a tkanivami. Pre zachovanie týchto funkcií je dôležité, aby mali bunky adekvátne podmienky na rast a prípadnú diferenciáciu v *in vitro* podmienkach.

V kontexte reparácie konkrétneho tkaniva je kľúčové, aby bol zvolený zdroj buniek, ktorý vie čo najlepšie napodobňovať vlastnosti pôvodných buniek daného tkaniva. Práve pre tieto skutočnosti sa vo viacerých štúdiách utilizovali diferencované **somatické bunky** (fibroblasty z bukálnej sliznice, fibroblasty z predkožky, femorálne osteoblasty a i.). Výhodou týchto zdrojov je ich imunitná kompatibilita, predovšetkým ak sa jedná o autológnu implantáciu. Na druhej strane, ich získanie vyžaduje **intervenčný** zásah do živého organizmu a výťažnosť zo získaného bioptického materiálu je pomerne malá. Navyše, počas *ex vivo* kultivácie často vykazujú nízky proliferačný potenciál a môžu mať tendenciu dediferencovať na nevhodný fenotyp. Tým degradujú potenciálny regeneračný potenciál. Spomínané limitácie prinútili vedcov nájsť alternatívny bunkový zdroj. V súčasnosti sa obrovský záujem vedeckej obce orientuje na výskum **kmeňových buniek**, ktoré disponujú unikátnymi vlastnosťami a regeneračným potenciálom.

Kmeňové bunky

Kmeňové bunky predstavujú populáciu **nediferencovaných** buniek. Sú prítomné počas embryonálneho, fetálneho, ale aj dospelého štádia v živote jedinca. Práve z nich vznikajú diferencované bunky, ktoré tvoria základ tkanív a orgánov. Kmeňové bunky nachádzame aj v samotných diferencovaných orgánoch. Plnia v nich **reparačné** a **regeneračné** funkcie. Výrazne sa podieľajú na udržiavaní homeostázy živých organizmov. Existuje veľa vlastností kmeňových buniek, pričom ich dva základné atribúty sú:

- vysoká kapacita **sebaobnovy** (*self-renewal*), t. j. schopnosť extenzívnej proliferácie pričom si stále zachovávajú nediferencovaný stav,
- **potencia** (*potency*) – kapacita diferencovať sa do špecifických bunkových línii.

Vlastnosť sebaobnovy zabezpečuje stále **udržiavanie** populácie kmeňových buniek v živých organizmoch. Zároveň sa tento dej podieľa na **zachovávaní** ich **veľkosti**, t. j. nezmenšujú sa. Mechanizmy podmieňujúce vlastnosť sebaobnovy sú:

- **symetrická proliferácia** – jedna kmeňová bunka sa rozdelí na dve dcérske, ktoré sa buď diferencujú alebo ostanú v nediferencovanom stave (identické s materskou bunkou),
- **asymetrická proliferácia** – kmeňová bunka sa delí na jednu nediferencovanú bunku (identickú s pôvodnou) a na ďalšiu dcérsku, ktorá podlieha diferenciácii.

Delenie kmeňových buniek podlieha prísnej kontrole prostredníctvom **vnútorných** a **vonkajších** faktorov. Analýza genómu týchto buniek ukázala, že gény *Oct-4*, *Sox-2* a *Rex-1* spolu transkripčnými faktormi LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), EGF (*Epidermal Growth Factor*), PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) a FGF (*Fibroblast Growth Factor*) sú esenciálne na udržanie **nediferencovaného** stavu. Stimul pre diferenciáciu často predstavuje pôsobenie **konkrétneho rastového faktora**, napríklad TGF- β (*Transforming Growth Factor β*), BMP (*Bone Morphogenic Protein*), IGF (*Insulin-like Growth Factor*).

K ďalším charakteristikám kmeňových buniek patrí aj fakt, že po implantácii dokážu opätovne osídliť tkanivo svojho pôvodu a prispievajú k tvorbe vysoko diferencovaných bunkových populácii aj mimo potreby reparácie či regenerácie tkaniva.

Kmeňové bunky môžeme deliť na základe **diferenciačného potenciálu** na:

- **totipotentné** – predstavujú najmenej diferencované bunky, ktoré sa dokážu diferencovať do embryonálnych ako aj extraembryonálnych bunkových línii. Tieto bunky vedia vytvoriť komplexného živého jedinca. Vznikajú fúziou vajíčka a spermie.

Bunky vznikajúce pri prvých dvoch deleniach oplodneného vajíčka sú taktiež totipotentné,

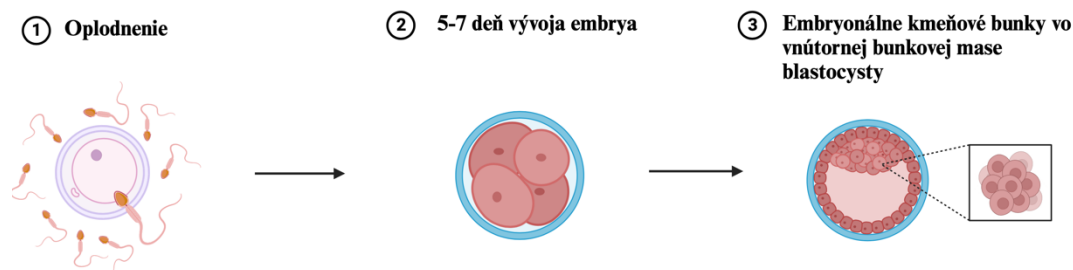
- **pluripotentné** – bunky schopné diferencovať sa na bunky všetkých troch zárodočných listov (endoderm, mezoderm, ektoderm), t. j. do akejkoľvek bunky ľudského tela, ale už nie na bunky totipotentné. Radíme sem napr. **embryonálne kmeňové bunky** spolu s **indukovanými pluripotentnými bunkami**,
- **multipotentné** – nachádzajú sa vo väčšine tkanív a diferencujú sa na bunky derivované z jednej zárodočnej vrstvy. Radíme k nim napríklad **mezenchymálne kmeňové bunky** a **hematopoetické kmeňové bunky**.
- **oligopotentné/bipotentné** – dokážu sa diferencovať len do pár bunkových línií. Zástupcami sú **lymfoidné** a **myeloidné kmeňové bunky**,
- **unipotentné** (progenitorové) – produkujú iba jeden typ buniek, ich vlastný. Avšak zachovávajú si vlastnosť sebaobnovy, ktorá ich odlišuje od somatických (diferencovaných) buniek.

Na základe **pôvodu** delíme kmeňové bunky na:

- **embryonálne**,
- **dospelé** (*adult stem cells*),
- **indukované pluripotentné**.

Embryonálne kmeňové bunky

Embryonálne kmeňové bunky nachádzame vo vnútornej bunkovej mase **blastocysty**, ktorá predstavuje veľmi skoré štádium ontogenézy človeka (Obrázok 7.15). Blastocysta vzniká z moruly približne 5 – 7 dní po oplodnení. Počas fyziologickej embryogenézy zanikajú po siedmych dňoch od oplodnenia, nakoľko sa začínajú tvoriť tri základné zárodočné listy: endoderm, mezoderm a ektoderm. Z hľadiska schopnosti diferenciácie sú tieto bunky **pluripotentné**, t. j. dokážu sa diferencovať na akýkoľvek bunkový typ nachádzajúci sa v ľudskom tele, okrem extraembryonálnych štruktúr. Taktiež vedia ostať v nediferencovanom stave po dlhú dobu v rámci *in vitro* kultivácie. Najvýznamnejšie **identifikačné markery** embryonálnych kmeňových buniek sú **transkripčné faktory** OCT4, NANOG, SOX2, KLF4. Avšak utilizácia pre vedecké účely je v mnohých štátoch zakázaná, nakoľko dochádza k ničeniu embryí počas ich získavania.



Obrázok 7.15 Pôvod embryonálnych kmeňových buniek

Dospelé kmeňové bunky

Dospelé, somatické kmeňové bunky, radíme z hľadiska diferenciácie schopnosti k **multipotentným** bunkám. Nachádzame ich v diferencovaných tkanivách a orgánoch. Slúžia na reparáciu poškodenia a celkovú údržbu daných štruktúr. Najvýznamnejšími zástupcami sú **mezenchymálne kmeňové bunky (MSCs)** a **hematopoetické kmeňové bunky**.

Tabuľka 7.2 Dospelé kmeňové bunky derivované z rôznych tkanív a ich fenotypizácia

Zdroj	Povrchové antigény	
	+	-
Kostná dreň	CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, CD271	CD14, CD31, CD34, CD45
Periférna krv	CD90, CD105, CD133	CD14, CD34, CD45
Pupočníková krv	CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD95, CD105, CD133, CD166	CD14, CD34, CD45
Placenta	CD9, CD13, CD44, CD63, CD73, CD90, CD105, CD349	CD31, CD34, CD45
Endometrium	CD44, CD73, CD90, CD105, CD140b	CD34, CD45
Tukové tkanivo	CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166	CD14, CD31, CD45
Kostrový sval	CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106	CD14, CD34, CD45
Koža	CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD166	CD14, CD31, CD34, CD45, CD133
Pankreas	CD29, CD44, CD51, CD58, CD81, CD90	CD7, CD34, CD45
Zubná dreň	CD29, CD44, CD106	CD14, CD34, CD45
Periosteum	CD9, CD44, CD90, CD105, CD166	CD14, CD34, CD45

MSCs boli aplikované v početných výskumoch (animálne modely), v ktorých preukázali signifikantný **protizápalový** potenciál a významne potenciovali reparáciu poškodených tkanív. Ich diferenciačná kapacita je však limitovaná. Jednou z veľkých výhod aplikácie somatických kmeňových buniek predstavuje možnosť implantovať autológne bunky do daného organizmu. Extrahovať sa dajú zo všetkých tkanív pochádzajúcich z troch zárodočných vrstiev, placenty, aj pupočníkovej krvi. Identifikácia prebieha na základe fenotypizácie prostredníctvom povrchových CD antigénov (Tabuľka 7.2).

V orgánoch sídlia v špecifickom mikroprostredí, tzv. **niche** (*stem cell niche*). Tu sa nachádzajú v pokojovom režime, pokiaľ nie sú aktivované signálmi prichádzajúcimi z okolitého prostredia (najmä v dôsledku poškodenia tkaniva). V niche dochádza k výžive a ku kontrole sebaobnovy a diferenciácie kmeňových buniek. Taktiež je tu zamedzená prílišná aktivácia delenia buniek, ktorá by mohla vyústiť do nádorového bujnenia.

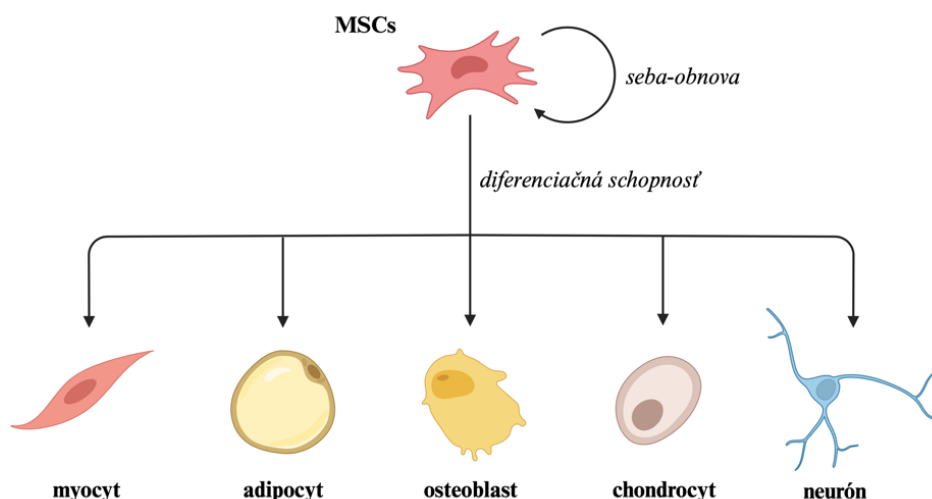
Mikroprostredie spomínaného niche pozostáva z rôznych **signálov**, ktoré generuje ECM a **solubilných mediátorov** regulujúcich bunkovú signalizáciu a génovú expresiu. Tým sa usmerňuje proliferácia, migrácia, diferenciácia či apoptóza. Stále nie je objasnené, čo sú hlavné spúšťače zodpovedné za preklopenie zo štádia, v ktorom sa kmeňové bunky sebaobnovujú do procesu diferenciácie.

Nakoľko sa MSCs masívne používajú v rámci tkanivového inžinierstva, venujeme danej tematike nasledovnú podkapitolu.

Mezenchymálne kmeňové bunky (MSCs)

Terminológia MSCs je rôznorodá a pre tento druh buniek sa môžeme v odbornej literatúre stretnúť aj s názvami ako mezenchymálne stromálne bunky či medicínálne signalizačné bunky. Predstavujú populáciu **multipotentných** stromálnych buniek s kapacitou diferencovať sa na rôzne línie, napr. adipocyty, osteoblasty, chondrocyty, myocyty či neuróny (Obrázok 7.16).

V *in vitro* podmienkach výborne proliferujú, čím vznikajú početné bunkové populácie. Disponujú **protizápalovými**, **imunosupresívnymi** a **imunomodulačnými** účinkami. Štúdie naznačujú, že po *in vivo* aplikácii nespúšťajú okamžitú imunitnú odpoveď. MSCs boli izolované a popísané približne pred 30 rokmi. V súčasnosti existuje vyše 55 000 vedeckých publikácií, ktoré ich skúmali a aplikovali do rôznych experimentov. Boli úspešne izolované z viacerých živočíšnych druhoch vrátane myši, potkana, zajaca, psa, ovce, ošípanej a človeka. Aplikovali sa do vyše 950 klinických štúdií. Výskum MSCs nám ponúka lepšie porozumieť biológii buniek a lepšie predikovať efekt pri ich aplikácii v rámci bunkovej terapie.



Obrázok 7.16 Diferenciačná kapacita mezenchymálnych kmeňových buniek

Najčastejšími zdrojmi pre extrakciu MSCs sú **kostná dreň** a **tukové tkanivo**. Izolovať sa dajú aj zo šľachy, periférnej a pupočníkovej krvi, placenty, dentálneho tkaniva, urogenitálneho traktu. Nevýhodou je, že získanie týchto buniek často vyžaduje invazívny zákrok, ktorý predstavuje potenciálne riziko pre pacienta. Výtťažnosť MSCs zo spomínaných tkanív varíruje, avšak výskumy poukazujú na fakt, že so stúpajúcim vekom donora vidíme klesajúci trend úspešnosti extrakcie.

Pre vedecké účely v rámci TERM je potrebné zabezpečiť dostatočné množstvo buniek. Kultivácia v *in vitro* prostredí a v médiách so špecifickým zložením umožňuje expandovať MSCs až na miliónové počty. Avšak opakované pasážovania môžu znižovať komplexnosť daných bunkových kultúr.

MSCs produkujú široké spektrum **biologicky aktívnych molekúl**, napr. rastových faktorov, cytokínov, mikro RNA. Prostredníctvom nich komunikujú s jednotlivými bunkami a okolitými tkanivami.

Základné kritéria, ktoré musí bunka spĺňať aby mohla byť považovaná za MSCs, navrhla Medzinárodná spoločnosť pre bunkovú terapiu (*International Society for Cell Therapy*) a sú nasledovné:

- **adherencia** na plastové povrchy kultivačných nádob,
- kapacita diferencovať sa na **osteogénnu**, **chondrogénnu** a **adipogénnu** bunkovú líniu v *in vitro* podmienkach, čím sa potvrdzuje ich multipotentnosť,
- prítomnosť špecifických povrchových CD antigénov v bunkovej membráne, a to konkrétne **CD105**, **CD73**, **CD90** a zároveň musí chýbať expresia CD45, CD34, CD14 alebo CD11b a CD79a, alebo CD19 a HLA-DR povrchových molekúl.

K ďalším **základným charakteristikám** patrí:

- symetrická alebo asymetrická proliferácia,
- motilita,
- schopnosť organizovania sa do multifunkčných zhlukov.

MSCs majú tvar podobný ako fibroblasty, ktorý značne varíruje od toho, s akým povrchom bunka interaguje (mäkký/tvrdý, hladký/drsný).

Aby vedeli kmeňové bunky naplniť svoj regeneračno-reparačný účel, je nevyhnutné, aby sa nachádzali vo vhodnom mikrostredí s patričnou stimuláciou. Preto sa aj viaceré štúdie zamerali na podrobnejší výskum ich **niche**, nakoľko reprogramovanie fenotypu MSCs je vo veľkej miere závislé od tohto špecifického vnútorného prostredia.

Niche by sa malo vnímať ako špecifická oblasť kde **humorálne, neurálne, parakrinné, fyzikálne a metabolické** podnety interagujú navzájom medzi sebou a bunkami. Nie ako konkrétne miesto, kde tieto bunky prežívajú.

Je náročné presne zadefinovať jednotlivé komponenty, ktoré sa podieľajú na tvorbe niche, nakoľko sa líšia medzi jednotlivými tkanivami. Ale môžeme konštatovať, že ultimátny **základ** tvoria:

- podporné bunky strómy, vrátane medzibunkových adhézných molekúl a solubilných faktorov, ktoré sa nachádzajú v bezprostrednej blízkosti kmeňových buniek,
- proteíny ECM slúžiace na ukotvenie kmeňových buniek a zároveň poskytujú mechanickú oporu na prenos signálov,
- cievy poskytujúce prísun živín a neustálych signálov z ostatných orgánov,
- neurálne impulzy podporujúce mobilizáciu kmeňových buniek z niche. Taktiež integrujú signály z rozličných orgánov. Táto zložka sa javí obzvlášť dôležitá pri aktivizácii hematopoetických kmeňových buniek.

Niche kmeňových buniek predstavuje veľmi **dynamické** mikrostredie, ktoré podľa viacerých štúdií podlieha starnutiu, v patologických prípadoch aj malígnej transformácii. Bolo identifikovaných **päť** lokalizácií niche u cicavcov, a to hematopoetický systém, črevo, mozog, svaly a koža. Počas experimentov s MSCs sa pozorovalo, že ich populácie nie sú homogénne, ale bunky v nich sa správajú skôr ako jednotlivci. To znamená, že nie všetky bunky majú rovnaké biologické správanie (napr. v rámci jednej populácie určité bunky diferencujú, iné podľahnú apoptóze, pričom pochádzajú z toho istého klonu). Tento jav je stále predmetom mnohých výskumov, ktoré by mohli poskytnúť vysvetlenie tohto deja.

Pri kultivácii MSCs v kultivačných nádobách sa bunky prichytávajú na plastový povrch prostredníctvom **integrínových** receptorov, ktoré sa zhlukujú do **fokálnych plakov**. Pri ich formácii sa zapájajú taktiež molekuly ECM (fibronektín, laminín, kolagén). Tie sú súčasťou **séra** pridávaného do kultivačných médií. Kultivačné nádoby zvyčajne disponujú negatívne nabitým povrchom, aby sa uľahčilo prichytávanie ECM proteínov a samotných buniek. Avšak, pre multipotentné bunky takýto **rigidný** povrch nemusí byť vždy vyhovujúci, nakoľko štúdie preukázali, že práve tvrdé povrchy potenciujú MSCs diferenciáciu do osteogénnej línie. Diferenciácia na adipogénnu, myogénnu či neurogénnu líniu prebehla v rámci experimentov lepšie na **mäkkších** povrchoch (napríklad pri použití gélových skafoldov).

Tkanivá v ľudskom tele preukazujú rôznu škálu svojej pružnosti v ťahu, ktorá sa kvantifikuje Youngovým modulom a dáva nám obraz o ich tvrdosti/mäkkosti:

- mozog a kostná dreň cca 0,3 kPa,
- tukové tkanivo cca 3 kPa,
- svalové tkanivo cca 10 kPa,
- kostné tkanivo cca 100 kPa,
- kultivačné nádoby vyše 1000 kPa.

Tieto fakty treba brať do úvahy pri vysievaní skafoldov, pretože nevhodne zvolená **tvrdosť materiálu** môže negatívne vplývať na diferenciačnú kapacitu MSCs.

Štandardné *in vitro* kultivačné podmienky nedokážu dobre pripraviť MSCs na *in vivo* pôsobenie. Taktiež je náročné relevantne vyhodnotiť ich biologickú aktivitu po implantácii do živého organizmu. Štúdie poukazujú na skutočnosť, že vhodne nadizajnovaná matrica, vie zlepšiť ich *in vivo* pôsobenie. Preto sa v súčasnosti pri reparácii poškodených tkanív preferuje aplikácia tkanivových konštruktov pozostávajúcich z MSCs (alebo buniek vo všeobecnosti) vysiatych na skafold.

Rutinná kultivácia MSCs prebieha zväčša v inkubačných boxoch s nastavenou koncentráciou kyslíka na 20 %. Avšak bunky sa v *in vivo* prostredí musia prispôbiť oveľa nižším koncentráciám O₂, ktoré sú prítomné v daných tkanivách. Veľa štúdií zdôrazňuje proces „predprípravy“ MSCs na *in vivo* aplikáciu. Jeden z prístupov opisuje kultiváciu buniek v *in vitro* podmienkach pri nízkych hladinách O₂, t.j. 1-5 % O₂. Predpríprava buniek na **hypoxiu** môže viesť k lepšej adaptácii a viabilite v živom organizme.

Imunomodulačné účinky MSCs

Prvé hypotézy týkajúce sa **imunomodulačných** schopností MSCs boli podmienené štúdiami, v ktorých ich *in vivo* aplikácia nevyvolala reakciu štepu voči hostiteľovi. Tieto pozorovania

následne podnietili bližšie štúdium mechanizmu týchto buniek počas ich interakcie s imunitným systémom hostiteľa.

MSCs ovplyvňujú bunky **vrodenej** a **získanej** (špecifickej) imunity. Je to dané faktom, že produkujú širokú škálu **imunomodulačných molekúl** vrátane:

- prostaglandínu E2 (PGE2),
- oxidu dusnatého,
- indolamin 2,3-dioxygenázy (IDO),
- interleukínu 6 (IL-6), interleukínu 8 (IL-8),
- povrchových markerov FasL, PD-L1, PD-L2.

V kontexte **modulácie vrodenej imunity** pôsobia MSCs na makrofágy, neutrofile, NK-bunky, mastocyty a dendritické bunky. Sú schopné migrovať na miesto poškodenia, kde prostredníctvom produkcie PGE2 **polarizujú makrofágy** na fenotyp **M2**, ktorý disponuje protizápalovými vlastnosťami. Navyše, PGE2 taktiež inhibuje degranuláciu mastocytov a produkciu prozápalových TNF- α a IL-12. Cytotoxická aktivita NK-buniek je inhibovaná prostredníctvom PGE2 a IDO. Výskumy taktiež preukázali schopnosť MSCs buniek redukovať expresiu NK bunkových receptorov.

Imunomodulačný vplyv na dendritické bunky sa prejavuje poklesom prozápalových zrelých DC1 buniek, spolu so zníženou expresiou TNF- α .

Výskumy preukázali, že imunosupresívne účinky MSCs sú závislé aj od hladiny IL-10. Avšak nie je isté či je tento cytokín produkovaný samotnými MSCs, alebo len stimulujú iné bunky k jeho produkcii.

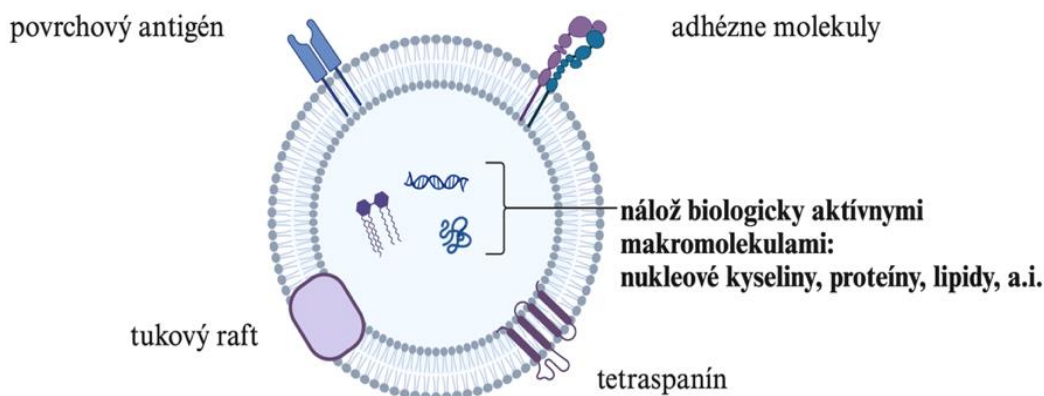
Pri interakcii s **T-lymfocytmí** redukujú MSCs zápalové Th1 bunky a zvyšujú hladiny **regulačných T-lymfocytov** (Treg). Zároveň dochádza k vzostupu populácie protizápalových **Th2 buniek** s konkomitantným poklesom hladín IFN- γ . Spomínané imunosupresívne a protizápalové mechanizmy, ktorými MSCs modulujú imunitnú odpoveď, predikujú ich potenciálnu aplikáciu v rámci **bunkovej terapie** rôznych autoimunitných chorôb a veľmi ťažko liečiteľných zápalových ochorení.

Exozómy derivované z MSCs

Tkanivové inžinierstvo ponúka možnosť vyhotovenia tkanivového konštruktu „**šitého na mieru**“ pacientovi. Možnosť kolonizácie skafoldov autológnyimi bunkami predstavuje pre pacientov veľkú výhodu z hľadiska neželaných imunitne-podmienенých reakcií. Avšak boli spozorované prípady, pri ktorých aj autológne tkanivové konštrukty boli odmietnuté. Každá takáto reakcia predstavuje záťaž a riziko pre pacienta. Pri snahe eliminovať takéto reakcie sa

vedci snažili modulovať skafoldy iba **bioaktívnymi molekulami** s regeneračnými vlastnosťami. Zároveň by nahradili potrebu použitia celých buniek. Početné štúdie naznačujú, že vyššie spomínané vlastnosti dokážu spĺňať špecifické membránové extracelulárne vezikuly, tzv. **exozómy**. Dosahujú veľkosť v rozpätí **30 – 200 nm** a produkuje ich väčšina buniek vrátane imunitných, neurálnych, epiteliálnych, endoteliálnych, embryonálnych, rakovinových buniek a takisto MSCs (Obrázok 7.17).

Termín **extracelulárne vezikuly** vo všeobecnosti zastrešuje niekoľko typov vezikúl, akými sú napr. **mikrovezikuly**, **exozómy** a **apoptické telieska**. Slovo „exozóm“ však špecificky označuje vezikuly, ktoré sa tvoria vo vnútri **multivezikulárnych teliesok (MVB)** v bunkách.



Obrázok 7.17 Základná stavba exozómu. Exozómy predstavujú v ľudskom tele medzibunkový tranzitný systém s pleiotrofnými účinkami. Ich štruktúra priamo závisí od typu pôvodnej bunky, z ktorej sú generované. Povrch prezentuje fosfolipidová dvojvrstva so špecifickými antigénmi, tetraspanínmi, adhéznymi molekulami, lipidmi a karbohydrátmi. Vnútri obsahujú bioaktívne makromolekuly, akými sú proteíny, lipidy či nukleové kyseliny.

Exozómy sú **nosičmi** dôležitých informácií a makromolekúl zo svojho pôvodného zdroja. Zastávajú dôležitú úlohu v rámci **medzibunkovej komunikácie**.

Makromolekuly nachádzame na vnútornej aj na vonkajšej strane exozómu a k **hlavným predstaviteľom** patria enzýmy, transkripčné faktory, lipidy, proteíny ECM, receptory a nukleové kyseliny.

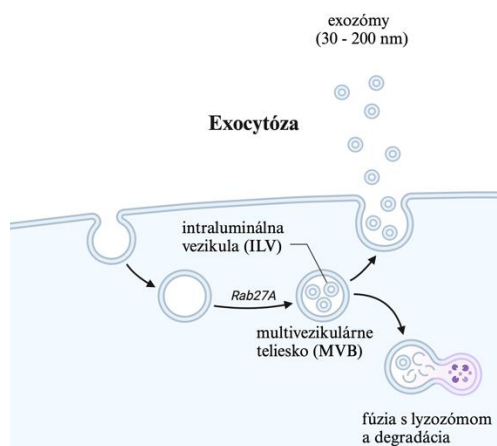
Exozómy boli po prvý krát objavené pri výskume mechanizmov dozrievania ovčích retikulocytov na červené krvinky. Vedci Pan a Johnstone v roku **1983** zdetegovali špecifický typ vezikuly, ktorá bola uvoľnená z retikulocytov a obsahovala lipidy, proteíny a enzýmy retikulocytárneho pôvodu. Tieto útvary neskôr pomenovali ako exozómy. Spočiatku boli považované za bunkovú debris signalizujúcu bunkovú smrť. Avšak masívny výskum potvrdil,

že sa jedná o unikátne útvary, ktoré bunka uvoľňuje do extracelulárneho priestoru a disponujú výrazným **bioaktívnym** potenciálom.

Doposiaľ boli exozómy detegované takmer vo všetkých **telesných tekutinách** v rámci **fyziológického** ale aj **patologického** stavu ľudského organizmu. Nachádzajú sa v moči, krvi, sére, materskom mlieku, plodovej vode, likvore, malígnych výpotkoch, slinách, žlči a lymfe. Podieľajú sa na **medzibunkovej komunikácii** či **výmene genetického materiálu a proteínov** medzi pôvodnými a okolitými bunkami. V rámci TERM vzbudzujú záujem tým, že dokážu potenciovať a modulovať **reparačné mechanizmy** v poškodených tkanivách. Početné protokoly umožňujú ich efektívnu izoláciu s následným inkorporovaním do rôznych skafoldov a aplikáciou *in vivo* v mieste poškodenia. Okrem toho nám umožňujú študovať v *in vitro* podmienkach patofyziologické mechanizmy podmieňujúce systémové ochorenia.

Biogenéza exozómov prebieha prostredníctvom **exocytózy** (Obrázok 7.18). Sú generované z **multivezikulárnych teliesok** (MVB), ktoré obsahujú **intraluminálne vezikuly**. MVB sú zväčša vystavené **lyzozomálnej degradácii** hydrolázami. Ak tomuto mechanizmu uniknú, priamo sa spájajú s bunkovou plazmatickou membránou. Následne dochádza k vylúčeniu exozómov do **extracelulárneho prostredia**. Tam nadobúdajú **pleiotropné** funkcie.

Štruktúra a zloženie exozómov závisia od pôvodu bunky a mikroprostredia, v ktorom sa nachádzajú. Ako **biologické transportéry** môžu prenášať proteíny, peptidy, nukleové kyseliny a lipidy. Štúdie skúmajúce proteínové zloženie exozómov ukázali, že zatiaľ čo niektoré proteíny špecificky pochádzajú z rodičovského tkaniva, niektoré sú jedinečné len pre dané exozómy.



Obrázok 7.18 Schéma znázorňujúca biogenézu exozómov. Exozómy sú generované počas procesu zahŕňajúceho dvojité invaginácie plazmatickej membrány a formovanie intracelulárnych multivezikulárnych teliesok (MVB). Tie obsahujú intraluminálne vezikuly. Pri fúzii MVB s plazmatickou membránou dochádza k uvoľneniu exozómov do mikroprostredia.

Transportujú taktiež **nukleové kyseliny** vrátane rôznych typov RNA, napr. microRNA, messenger RNA a nekódujúcu RNA. Je zaujímavé, že zloženie proteínov, peptidov a nukleových kyselín v exozómoch je **nezávislé** od typov pôvodných buniek hoc zloženie **lipidov** od týchto buniek **závisí**. Vychádza to z faktu, že exozómy obsahujú lipidy **plazmatickej membrány** akými sú sfingomyelín, desaturovaný fosfatidyletanolamín, fosfatidylserín, desaturovaný fosfatidylcholín, cholesterol a gangliozyd.

Vo **voľnej forme** preukazujú exozómy **zhoršenú** biologickú dostupnosť, a tým sa znižuje efektivita ich reparačných účinkov v mieste poškodenia. Tento problém bol do značnej miery napravený **kombináciou** exozómov so skafoldami, najmä **hydrogélmi**. Takáto forma zlepšuje nielen ich biologickú dostupnosť, ale aj biokompatibilitu. Zároveň je umožnená regulácia pomeru nálože a uvoľňovania exozómov zo skafoldov. Tým sa prispieva k **regulovanej regenerácii** tkaniva.

V rámci štúdií dosiahli exozómami modifikované skafoldy uspokojujúce výsledky pri reparácii **mäkkých** aj **tvrdých** tkanív.

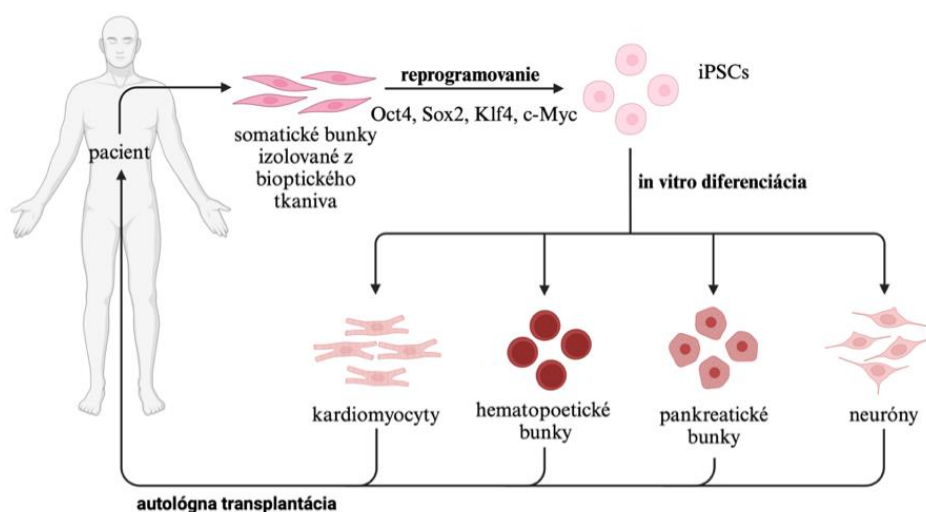
Terapie kmeňovými bunkami sú čoraz populárnejšie. Veľká časť nedávnych výskumov bola zameraná na potenciálny význam aplikácie exozómov derivovaných z **MSCs**. Pre pripomenutie, MSCs sú **nehematopoetické multipotentné** dospelé kmeňové bunky, ktoré možno izolovať z mnohých biologických zdrojov. Majú schopnosť diferencovať sa na adipocyty, chondrocyty a osteocyty ako aj na endodermálne (hepatocyty) a ektodermálne línie (neurocyty).

Hoci výsledky štúdií *in vitro* potvrdili silný regeneračný potenciál týchto buniek, výstupy z *in vivo* štúdií neboli až také uspokojujúce. Ukázalo sa, že MSCs slabo prežívali a ťažko sa inkorporovali do poškodených oblastí tkaniva. Na druhej strane, pokračujúce výskumy poukázali na fakt, že priaznivé reparačné účinky pri aplikácii MSCs možno pripísať **parakrinnej signalizácii**, ktorá zahŕňa aj vylučovanie exozómov do daného mikroprostredia. Práve preto sa predpokladá, že exozómy derivované z MSCs by mohli efektívne nahradiť terapie kmeňovými bunkami pri rôznych patologických stavoch. Experimentálne štúdie vykonané na animálnych modeloch ukázali, že tieto vezikuly **indukovali reparáciu** obličiek, kostí, chrupavky, kože, pečene či myokardu po infarkte. Dokážu taktiež **transportovať** liečivá a biomolekuly.

V porovnaní so syntetickými nanočasticami, lipozómami či bunkami, majú exozómy mnoho **terapeutických výhod**. Vyplýva to z ich vlastností, ako napríklad menšia veľkosť, neprítomnosť jadra (prevencia neoplastickej transformácie), vyššia stabilita a relatívne jednoduchá izolácia v *in vitro* podmienkach.

Indukované pluripotentné kmeňové bunky

Indukované pluripotentné kmeňové bunky (iPSCs) predstavujú ďalší typ buniek podliehajúci extenzívnemu výskumu v rámci odborov TERM. Jedná sa o **dospelé somatické** bunky, ktorých genóm je *in vitro* **preprogramovaný** na **pluripotentný** stav podobný embryu. Táto zmena sa dosiahne **nútenou expresiou génov** kódujúcich **transkripčné faktory**, ktoré sa považujú za kľúčové pre udržanie pluripotencie embryonálnych kmeňových buniek (Obrázok 7.19).



Obrázok 7.19 Schéma znázorňujúca proces izolácie, reprogramovania a aplikácie iPSCs v rámci bunkovej terapie

Prvé iPSCs pochádzali z buniek **myši** a boli vytvorené v laboratóriu Yamanaka na Kjótskej univerzite v roku **2006**. V tom istom laboratóriu sa taktiež podarilo vygenerovať prvé **ľudské iPSCs**. Jednalo sa o proces **transdukcie** dospelých ľudských dermálnych fibroblastov **vírusovými vektormi**, ktoré niesli kľúčové **gény pluripotencie**, a to: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* a *c-Myc*. Existuje aj iná kombinácia. Konkrétne sa jedná o gény kódujúce transkripčné faktory **Oct4**, **Sox2**, **Nanog** a **Lin28**. Spomínané faktory preprogramovali genóm diferencovaných fibroblastov do pluripotentného stavu, ktorý je ekvivalentný, ale nie identický s ľudskými embryonálnymi kmeňovými bunkami.

Porovnanie ľudských iPSCs a embryonálnych kmeňových buniek preukázalo viaceré **podobnosti**, najmä morfológické charakteristiky, výskyt povrchových antigénov, profil génovej expresie, epigenetický stav a diferenciačný potenciál. iPSCs sa podarilo vygenerovať z mnohých typov somatických buniek vrátane dermálnych fibroblastových buniek, pankreatických beta buniek, nervových kmeňových buniek, zrelých B-lymfocytov, hepatocytov, keratinocytov či z buniek pupečníkovej krvi.

Doposiaľ sa neustanovila jednotná metóda, ktorá by zaručovala najlepšiu účinnosť konverzie somatických buniek na líniu iPSCs. Na druhej strane, určité štandardy na identifikáciu a charakterizáciu iPSCs sú relatívne akceptované a taktiež dodržiavané.

Plne preprogramované ľudské iPSCs zdieľajú **morfologické** charakteristiky s ľudskými embryonálnymi kmeňovými bunkami. Radíme k nim:

- vysoký pomer jadra k cytoplazme,
- veľké jadierka,
- tvorbu plochých kompaktných kolónií s odlišnými bunkovými hranicami a dobre definovanými okrajmi kolónií,
- kontrola expresie **markerov pluripotencie**, ku ktorým radíme špecifické embryonálne antigény SSEA-3 a SSEA-4, Tra-1-60 a Tra-1-81 ako aj **transkripčné faktory** Oct4, Sox2 a Nanog. Miera expresie daných markerov by mala byť porovnateľná s ich výskytom u embryonálnych kmeňových buniek.

Ľudské iPSCs majú tendenciu vykazovať vysokú **telomerázovú aktivitu** a pozitívne sa farbia na aktivitu alkalickéj fosfatázy. Tieto parametre sa môžu kontrolovať buď genetickými metódami (kvantitatívna RT PCR, mikročipová analýza) alebo imunocytochemickými metódami (farbenie alkalickéj fosfatázy, SSEA-3/4, Okt4). **Epigenetický** stav iPSCs sa porovnáva s embryonálnymi kmeňovými bunkami pomocou bisulfitového genomického sekvenovania, aby sa skontroloval stav metylácie promótorov génov zodpovedných za udržiavanie pluripotencie a diferenciácie.

Ďalšia charakterizácia ľudských iPSCs buniek zahŕňa **dve** úrovne. Prvú predstavuje schopnosť iPSCs formovať v *in vitro* podmienkach 3D agregáty pluripotentných buniek, tzv. **embryoid bodies**. Tie sa potom testujú na prítomnosť markerov charakteristických pre všetky tri zárodočné vrstvy. Druhú úroveň predstavuje tvorba **teratómu**, pri ktorej sa iPSCs vstrekujú do imunodeficientných myší, kde by mali vytvoriť nádor pozostávajúci z diferencovaných buniek endodermu, mezodermu a ektodermu. Tieto štandardy však nie sú pevne stanovené a stále sa o nich diskutuje.

Veľa inovatívnych **metód** bolo aplikovaných na generovanie iPSCs. Prvú a veľmi efektívnu metódu predstavovala **retrovírusová transdukcia** na zavedenie transkripčných faktorov do somatických buniek. Avšak problémom tejto metódy bola nechcená genomová **inercia** vírusových **transgénov** s ich reaktiváciou a následnou tvorbou nádorov u chimérických zvierat. Tým pádom sa metóda zapísala ako vysoko **nespolahlivá** pre **terapeutické účely**. **Lentivírusy** boli takisto použité na indukciu iPSCs, buď ako viaceré

vektory obsahujúce jednotlivé faktory alebo ako multifaktorová kazeta v jednej lentivírusovej častici. Riziko **inzerčnej mutagenézy** v dôsledku genómovej integrácie však zostalo. Ďalšia technika aplikuje ako vírusový faktor **adenovírus**. iPSCs boli generované bez nevýhod integrácie transgénu, ale bola preukázaná nižšia účinnosť reprogramovania. Tým pádom sa vyžadovala **opakovaná transdukcia** na udržanie expresie transgénu. Novšia vírusová technika využíva tzv. **Sendai vírus** (RNA vírus). Tento systém umožnil **efektívnu** produkciu iPSCs **bez akýchkoľvek zmien v genóme** a po vytvorení iPSCs bol vírus odstránený pomocou negatívnej selekcie sprostredkovanej protilátkou.

Nevírusové metódy reprogramovania boli tiež úspešne aplikované. Patrí k nim aj opakovaná **nukleofekcia nevírusového polycistronického konštrukt**, ktorý obsahuje génové sekvencie reprogramovacia. Potrebná je následná excízia faktorov pomocou systému Cre/LoxP. Opakované cykly **transfekcie polycistronických plazmidov** exprimujúcich faktory reprogramovania tiež poskytli iPSCs bez akéhokoľvek dôkazu genómovej integrácie. Na druhej strane, takto generované iPSCs dosiahli nižšie úrovne expresie transgénu a podstatne **nižšiu efektívnosť** v porovnaní s retrovírusovým reprogramovaním.

Jeden z **najúčinnejších** systémov dodávania **nevírusových** génov pre generovanie iPSCs využíva tzv. **piggyback (PB) transpozón**. Vie byť vyrezaný zo svojho integračného miesta bez zmeny pôvodnej sekvencie DNA. Transfekovaný transpozón PB nesie jediný konštrukt obsahujúci kódujúce sekvencie *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* a *Sox2* (tiež označovaný ako kazeta MKOS), ktorý po indukateľnej expresii úspešne reprogramuje somatické bunky na iPSCs.

Všetky vyššie uvedené metódy reprogramovania zahŕňajú **použitie genetického materiálu**, čo ich robí **veľmi rizikovými** z pohľadu použitia na terapeutické účely. Jeden z prvých **negenetických systémov** na indukciu iPSCs zahŕňal priame dodávanie proteínov reprogramovania pripojených k bunkovým **penetračným peptidom** (tzv. *cell penetrating peptides*, CPPs), ktoré obsahujú vysoký podiel bázických aminokyselín a umožňujú proteínom prechádzať cez plazmatickú membránu. Táto metóda poskytuje technicky jednoduchšiu a ekonomicky výhodnejšiu alternatívu bez akéhokoľvek rizika genómovej integrácie a inzerčnej mutagenézy. Miera účinnosti reprogramovania je signifikantne nižšia a vyžaduje **opakované aplikácie** daných **proteínov**.

Indukcia iPSCs prostredníctvom **synteticky modifikovanej mRNA** predstavuje ďalší trend tejto oblasti. Takto vytvorené iPSCs sa nazývajú **RiPSCs** (RNA indukované pluripotentné bunky). Táto nová technológia je **nemutagénna**, má doteraz **najvyššiu účinnosť** a kinetiku. Dokonca viac ako retrovírusová metóda a bola upravená tak, aby obchádzala vrodené

antivírusové imunitné reakcie proti jednovláknovým molekulám RNA. Navyše je vysoko kontrolovateľná.

Kľúčové body, ktoré **sumarizujú** základné aspekty týkajúce sa generovania iPSCs sú nasledovné:

- priame reprogramovanie (zo somatickej priamo na pluripotentnú bunku) umožňuje generovanie pluripotentných kmeňových bunkových línii z takmer akéhokoľvek somatického tkaniva a cicavčích druhov, čím sa ich využitie na vedecké účely vyhýba etickým problémom spojeným s používaním ľudských embryonálnych kmeňových buniek,
- priame reprogramovanie predstavuje koncepčne a technicky jednoduchý prístup, avšak ide o extrémne pomalý a neefektívny proces. Je ovplyvnený niekoľkými premennými, ktoré ovplyvňujú jeho účinnosť, reprodukovateľnosť a kvalitu výsledných iPSCs,
- rôzne faktory sú schopné podporovať reprogramovanie. Radíme k nim gény, ktoré sú normálne exprimované v ranom vývoji či faktory priamo alebo nepriamo ovplyvňujúce bunkovú proliferáciu,
- účinnosť a kinetika reprogramovania závisí primárne od biologického stavu somatickej bunky, ktorá tento proces podstupuje,
- metódy reprogramovania možno rozdeliť do dvoch tried, metódy zahŕňajúce integráciu exogénneho genetického materiálu a metódy nezahŕňajúce žiadnu genetickú modifikáciu darcovských buniek. Spomedzi týchto metodológií je stále najpoužívanejšia retrovírusová transdukcia génov *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* a *MYC* do fibroblastov,
- spomedzi systémov aplikujúcich neintegračné reprogramovanie sa prístup na báze RNA javí ako veľmi sľubný. Na druhej strane, predstavuje určité onkogénne riziko,
- rozhodujúcou výzvou v oblasti výskumu iPSCs je vyhodnotiť, ako rôzne metodológie reprogramovania ovplyvňujú ich biologickú kvalitu a tumorigénny potenciál.

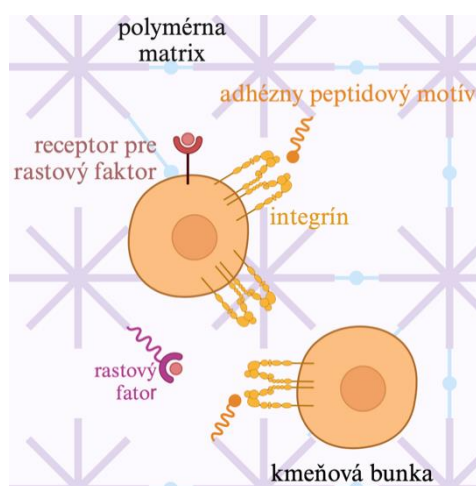
Sekvenovanie celého genómu bude mať v budúcnosti dôležitú úlohu pri hodnotení genetickej integrity iPSCs a zároveň nám pomôže lepšie porozumieť mechanizmu, ku ktorému dochádza v rámci preprogramovania konkrétného typu bunky. iPSCs predstavujú výbornú alternatívu k embryonálnym kmeňovým bunkám. Ich ďalšiu výhodu prezentuje možnosť produkovania autológnych, špecifických pluripotentných kmeňových buniek pre konkrétnoho pacienta. Avšak pre ich klinickú aplikáciu je potrebné prekonať viacero reštrikcií, napríklad použitie vírusových vektorov či možná aktivácia protoonkogénov. Práve preto je dôležité

skúmať nové metódy reprogramovania, aby bola zaručená najväčšia bezpečnosť pri ich aplikácii pacientovi. V súčasnosti predstavujú tieto bunky spolu s inteligentnými skafoldami najatraktívnejšie zložky **personalizovanej regeneratívnej medicíny**.

7.8 Interakcie medzi skafoldom a bunkami

Správna interakcia buniek so skafoldom predstavuje kritický proces podmieňujúci úspešnú regeneráciu tkaniva prostredníctvom tkanivového konštruktu. Skafoldy by mali vysiatym bunkám vytvárať také **makro- a mikroprostredie**, v ktorom vedia produkovať ECM, a majú k dispozícii biochemické ako aj biofyzikálne stimuly. Nezávisle od pôvodu materiálu, z ktorého je skafold generovaný, je známe, že samotný **dizajn a vlastnosti** matrice významne ovplyvňujú **celulárnu odpoveď**. Tá následne podmieňuje efektívnu rekonštrukciu tkaniva či celého orgánu (Obrázok 7.20).

Mechanotransdukcia predstavuje proces **snímania a reakcie** buniek na **mechanické stimuly**, ktoré bunka dostáva z prostredia ECM, ale aj po adhézii na skafold. Mechanické stimuly sa premieňajú na biochemické signály. Tie priamo ovplyvňujú fenotyp a biologické správanie bunky. Pri **kolonizácii skafoldov** sa tento jav začína pripojením **integrínových** receptorov v bunkovej membráne k zložkám **ECM**, ktoré sa nachádzajú na povrchu matrice. Skafoldy môžu byť vopred modifikované alebo sa zložky ECM absorbujú na povrch z kultivačného média.

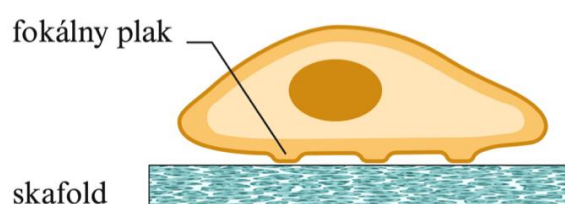


Obrázok 7.20 Interakcia kmeňových buniek s polymérnym skafoldom. Bunky adherujú na skafold prostredníctvom integrínových receptorov, ktoré rozoznávajú špecifické adhézne motívy na povrchu matric. Aby vedeli vykonávať biologické funkcie, regulovaná stimulácia buniek rastovými faktormi je nevyhnutná. Rastové faktory môžu tvoriť súčasť štruktúry skafoldu, alebo sú dodávané k bunkám externe v kultivačnom médiu.

Integríny predstavujú „super“ rodinu receptorov zodpovedných za bunkovú **adhéziu**. Tieto heteromérmé molekuly pozostávajú z α - a β -podjednotiek, ktoré sa nekovalentne viažu s rôznymi zložkami ECM. **Extracelulárna** doména integrínového receptora sa viaže na molekuly **ECM**, zatiaľ čo **intracelulárna** doména interaguje s **cytoskeletálnym aktínom** v cytoplazme bunky. Integríny viažuce sa na konkrétne proteínové sekvencie ECM majú tendenciu zhlukovať sa na bunkovej membráne. Vytvárajú tak špecifické spojenia, ktoré nazývame **fokálne plaky** (fokálne adhérie) (Obrázok 7.21). V kontexte tkanivového inžinierstva tento mechanizmus zabezpečuje dobrú **adherenciu** buniek na povrch skafoldu. Fokálne plaky umožňujú aj **komunikáciu** medzi extracelulárnym a intracelulárnym prostredím.

V rámci ich komplexnej štruktúry v nich rozoznávame dve triedy **mechanotransdukčných proteínov**:

- proteíny slúžiace ako **mechanosenzory**, ktoré v rámci reakcie na mechanické stimuly menia svoju konformáciu,
- proteíny pôsobiace ako **mechanoefektory**.



Obrázok 7.21 Schematické znázornenie fokálnych plakov. Fokálne plaky predstavujú klastre integrínových receptorov. Tieto zoskupenia zabezpečujú pevné priľnutie bunky k skafoldu a zároveň priamo ovplyvňujú morfológiu a biologickú aktivitu buniek.

Väzba integrínov s komponentami ECM podmieňuje aj **tvar a vnútornú architektúru** bunky. Vnútorná doména integrínového receptora sa viaže na **kontraktilný aktinomyozínový komplex**. Táto väzba je kľúčová pre **mechanosenzoriku**.

Vychádzajúc z molekulárnych interakcií sa identifikovala aj najčastejšie sa vyskytujúca peptidová sekvencia, zodpovedná za adhéziu buniek k ECM. Jedná sa o **RGD tripeptid**, predstavujúci sekvenciu arginín-glycín-aspartát. Po jeho zakomponovaní do štruktúry skafoldu vieme vo veľkej miere zefektívniť adhéziu buniek na povrch a do vnútorných častí matrice.

Vďaka početným štúdiám sa podarilo opísať podstatu **interakcie** bunky s materiálom aj na **molekulárnej** úrovni. Podmieňuje ho najmä **YAP/TAZ komplex**. YAP (*yes-associated protein*) a TAZ (*transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*) patria k transkripčným ko-aktivátorom, členom tzv. **Hippo signálnej dráhy**. Tento komplex podlieha procesu

fosforylácie v bunkovej cytoplazme. V jadre je defosforylovaný a preferenčne sa viaže na TEAD doménu. Aktivovaný YAP/TAZ komplex zohráva **klúčovú úlohu** v rámci regulácie bunkového delenia, rastu orgánov počas embryonálneho vývoja, regenerácie tkanív (amplifikujú tkanivovo špecifické progenitorové bunky počas reparácie poškodeného tkaniva). Vo veľkej miere sa podieľajú aj na reprogramovaní rakovinových buniek na rakovinové kmeňové bunky a podnecujú rast a metastázovanie tumoru.

Rastové faktory zohrávajú taktiež dôležitú úlohu pri procesoch kolonizácie skafoldov bunkami. Predstavujú polypeptidy, ktoré sa bežne vyskytujú v živých organizmoch a modulujú správanie buniek prostredníctvom prísne regulovaných dráh. Ich aktivita sa navodzuje navedením sa na špecifický receptor danej bunky. Syntetizujú sa vo forme **prekurzorov** (neaktívne alebo parciálne aktívne) a proces **proteolýzy** ich aktivuje. **Odpoveď bunky** vyplývajúca z pôsobenia rastového faktoru závisí od:

- typu rastového faktora,
- typu bunky,
- typu receptora,
- druhu aktivovanej intracelulárnej signálnej dráhy.

Platí, že molekula rastového faktora, ktorá sa viaže na konkrétny receptor, dokáže indukovať rozličnú bunkovú odpoveď u rozličných druhov buniek.

Vo všeobecnosti môžeme zhrnúť ich **regulačné účinky** na tieto bunkové vlastnosti:

- bunkové prežívanie,
- migrácia,
- proliferácia,
- diferenciácia do konkrétnej bunkovej línie.

Štúdie taktiež potvrdili, že vzájomná komunikácia medzi integrínmi a rastovými faktormi zohráva klúčovú rolu pre nastavenie a udržanie vhodného prostredia pre správny vývoj tkanív. Stimuláciou **endogénnych reparačných mechanizmov** akcelerujú procesy hojenia. Sú zakomponované aj do patologických procesov (zápal, kancerogenéza) v tkanivách či orgánoch. Priamo interagujú s imunitným systémom.

Viaceré rastové faktory sa v rámci tkanivového inžinierstva skúmajú v súvislosti s ich **inkorporáciou** do materiálov za účelom vyhotovenia inteligentného skafoldu. Výskumy sa zameriavajú najmä na aplikáciu:

- EGF – epidermálny rastový faktor,
- FGF – fibroblastový rastový faktor,

- PDFG – rastový faktor odvodený od krvných doštičiek,
- IGF – inzulínu podobný rastový faktor,
- BMP – kostný morfogenetický proteín,
- VEGF – vaskulárny endoteliálny rastový faktor.

Voľba použitia rastového faktora závisí od konkrétneho aplikačného zámeru, pričom sa v rámci jedného experimentu často používajú **kombinácie**. Ich koncentrácia a distribúcia musia byť prísne kontrolované, inak hrozí tvorba disfunkčného či **ektopického** tkaniva. Viaceré **techniky** umožňujú inkorporovanie rastových faktorov do matric. Jednotlivé prístupy prezentujú:

- **priame** zakomponovanie v rámci procesu výroby skafoldu,
- inkorporácia vo forme **mikro** a **nano** častíc, **imobilizáciou** na povrch skafoldu.

Ako už bolo spomenuté, dôležité je ich **kontrolované uvoľňovanie** z matrice. Početné štúdie preukázali, že regulovaná distribúcia rastových faktorov zo štruktúry skafoldu signifikantne ovplyvnila rast, migráciu a diferenciáciu vysiatych buniek. Týmto mechanizmom sa dokáže **modulovať** aj **zápalová reakcia**. Nastupuje bezprostredne po implantácii tkanivového konštruktu *in vivo*. Spomínaný prístup vie obmedziť neželané fibrotické procesy, ktoré majú potenciál zastaviť regeneračné procesy. Navyše, tieto regulačné molekuly pozitívne ovplyvňujú aj **neovaskularizáciu** implantovaných konštruktov.

Okrem mechanických vlastností skafoldu, ktoré priamo ovplyvňujú adhéziu a bunkovú odpoveď, ďalšie kľúčové charakteristiky regulujúce vzájomné interakcie sú:

- **vlastnosti povrchu** – hydrofóbnosť, adsorpcia proteínov, náboj, topografia, tvrdosť,
- celková **architektúra** – tvar, veľkosť pórov, porozita, spleť pórov.

Mnohé štúdie potvrdili, že hydrofóbnosť povrchu matrice priamo ovplyvňuje biologické pochody po naviazaní buniek. Túto vlastnosť vieme sledovať prostredníctvom merania **kontaktného uhla** na základe šírenia kvapky vody na povrchu. Čím je kontaktný uhol menší, tým je povrch viac hydrofóbny. Výsledky štúdií poukazujú na fakt, že bunky takýto povrch preferujú. Taktiež sa zistilo, že na hydrofóbne povrchy sa lepšie absorbujú aj proteíny, ktoré vo veľkej miere potenciujú adhéziu buniek.

Drsný povrch skafoldu, nakoľko nerovnosti zväčšujú celkový povrch matrice, sa javí ako efektívnejší z hľadiska prichytenia buniek. Navyše, bunky na ňom lepšie proliferujú či dokonca diferencujú v porovnaní s hladkým povrchom.

Počas procesu adhézie bunky sondujú aj mieru **tvrdosti** matrice, čím sa priamo ovplyvňuje mechanizmus mechanotransdukcie. **Tvrдый povrch** podmieňuje generovanie veľkej

sily, ktorá vedie k vytvoreniu **zrelých fokálnych plakov**. To sa odráža aj v morfológií buniek. Na takýchto povrchoch majú oploštený tvar. Na druhej strane, bunky vysiate na **mäkkých** povrchoch vytvárajú menej fokálnych plakov a ich tvar je zväčša **sférický**.

Porozita skafoldu predstavuje ďalšiu charakteristiku, ktorá ovplyvňuje vzťah medzi materiálom a bunkami. Štruktúra pórov v 3D matici sa typicky skladá z nepravidelne tvarovaných dutín a spojovacích kanálov. Priľahlé dutiny môžu navzájom splývať a vytvárajú fenestrácie (otvory). **Tortuozita**, alebo spletnosť pórov, predstavuje parameter, ktorý sa v rámci architektúry skafoldu sleduje a modifikuje. Ovplyvňuje rýchlosť dodávania nutrientov k bunkám, rýchlosť difúzie kyslíka či schopnosť migrácie buniek v rámci vnútornej štruktúry matrice.

Celkový dizajn matrice na makroskopickú úroveň by mal byť taktiež prijateľný z hľadiska dobrej integrácie v rámci miesta implantácie, t. j. má sa dobre napojiť na okolité tkanivo. Pri výrobe skafoldu sa sleduje veľa dôležitých parametrov, ktoré priamo ovplyvňujú biologickú aktivitu výsledného tkanivového konštruktu. Aj keď experimenty v laboratórnych podmienkach vykážu sľubné výsledky, **rozhodujúcim** vždy ostane správanie sa tkanivového konštruktu v *in vivo* podmienkach, kde na neho od začiatku pôsobí veľká sila v podobe reakcie **imunitného systému** daného jedinca.

7.9 Imunoinžinierstvo – budúcnosť regeneratívnej medicíny

Jeden z najdôležitejších cieľov, ktorý taktiež predstavuje najväčšiu výzvu tkanivového inžinierstva, je úspešné preklopenie laboratórnych experimentov do **medicínskej praxe**. Bez ohľadu na to, že tento krok predstavuje náročný legislatívny ako aj ekonomický proces, mnohé štúdie s excelentnými *in vitro* výsledkami zlyhali po aplikácii tkanivových konštruktov do živých organizmov.

Vo všeobecnosti vieme konštatovať, že väčšina štúdií využíva animálne modely. Výsledky experimentov, v ktorých boli konštrukty implantované do ľudského organizmu, sú dostupné len minimálne. Aby sa tento trend zmenil, treba zabezpečiť najväčšiu **bezpečnosť** pacientom a zároveň eliminovať čo najviac komplikácií súvisiacich s implantáciou tkanivového konštruktu do ľudského tela.

Imunoinžinierstvo je nový vedecký odbor, ktorý má potenciál posunúť TERM smerom do klinickej praxe. Zameriava sa na štúdium mechanizmov a reakcií **imunitného systému** prijímateľa, nakoľko adekvátna reakcia medzi tkanivovým konštruktom a imunitným systémom je absolútne kľúčová pre prijatie a funkčnosť daného arteficiálneho tkaniva.

7.9.1 Odpoveď ľudského organizmu na implantáciu skafoldov

Ľudské telo je neustále ovplyvňované rôznymi patogénmi a cudzími molekulami. Práve imunitný systém zabezpečuje jeho správne fungovanie v podobe udržiavania **homeostázy**.

Z **morfologického hľadiska** sa jedná o difúznú sieť pozostávajúcu z:

- lymfatických orgánov,
- lymfatických buniek,
- humorálnych faktorov,
- cytokínov.

Jeho základnú úlohu môžeme zhrnúť ako **ochrana** živého organizmu pred infekčnými ako aj neinfekčnými činiteľmi, ktoré narúšajú jeho integritu.

Zlyhanie imunity vedie k závažným, až život ohrozujúcim stavom. Radíme k nim napríklad:

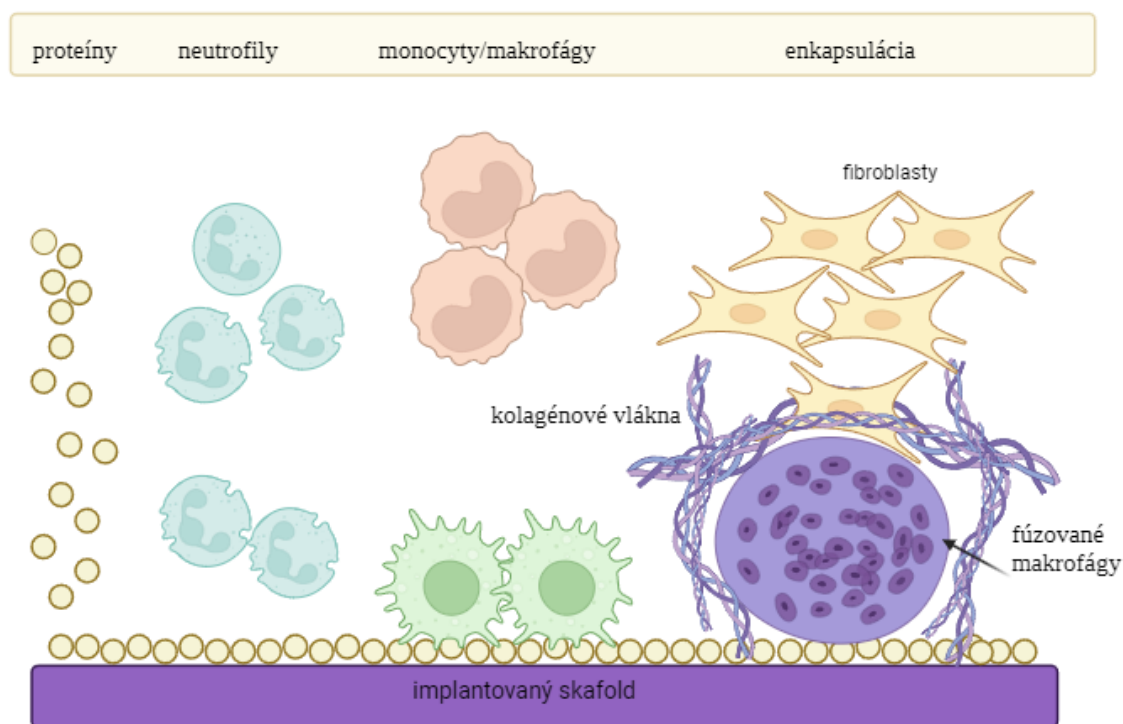
- ťažké infekcie,
- alergie,
- onkologické ochorenia,
- autoimunitné ochorenia.

Aplikácia tkanivového konštruktu do ľudského tela sa realizuje prostredníctvom **intervenčného zásahu**, ktorý okamžite aktivuje reakciu zo strany imunitného systému. Je preto potrebné, aby kombinácia základných zložiek tkanivového inžinierstva, t. j. materiálov, buniek a regulačných molekúl, viedli v mieste aplikácie k potenciovaniu fyziologických mechanizmov imunity a v konečnom dôsledku viedli k efektívnej regenerácii tkaniva.

Po implantácii skafoldov *in vivo* dochádza v danom mieste k uvoľneniu **pro- a protizápalových regulačných molekúl**. Ich pomer bude určovať či sa tkanivo začne regenerovať, alebo sa vyvinie chronická zápalová reakcia ústiaca do masívnej **fibrotizácie** v okolí implantátu. V odbornej literatúre sa tento fenomén nazýva ako **reakcia na cudzie teleso** (Foreign Body Reaction, FBR) (Obrázok 7.22). Nakoľko tkanivový konštrukt predstavuje cudzie teleso, podrobné štúdium tohto javu pomohlo objasniť, prečo mnohé konštrukty s excelentnými *in vitro* výsledkami nenaplnili očakávania po aplikácii *in vivo*.

FBR predstavuje štádium **chronického zápalu**, pri ktorom v rámci histologického nálezu nachádzame typické „*foreign body giant cells*“ (obrovské bunky cudzieho telesa). Tieto bunky vznikajú z makrofágov, ktoré sa snažia **degradovať** implantát. Dochádza k ich **fúzii**, v dôsledku čoho nadobúdajú veľké rozmery. Jednotlivé fázy a rolu imunitného systému v rámci FBR opisuje nasledujúci text.

Zavedenie tkanivového konštruktu do živého organizmu spúšťa **akútnu zápalovú odpoveď**. Priľahlé kapiláry dilatujú, čím sa z poškodených buniek a ECM uvoľnia do daného miesta cytokíny spolu s tzv. „**DAMPs**“ (*damage-associated molecular patterns*). DAMPS iniciujú a udržiavajú neinfekčnú zápalovú odpoveď. Zároveň sa na povrch skafoldu adsorbujú **bielkoviny krvnej plazmy** a spúšťajú koagulačnú dráhu. Výsledkom je vytvorenie **dočasného matrixu** nachádzajúceho sa v okolí a na povrchu skafoldu. Z imunitných buniek nachádzame v akútnej fáze aktivované **neutrofile** a **mastocyty**. Týmto bunkami dochádza k sekrécii početných **cytokínov** a **regulačných** molekúl, ktoré priťahujú k miestu poškodenia ďalšie imunitné bunky, napr. makrofágy, B-lymfocyty, T-lymfocyty, NK-bunky. Štádium akútneho zápalu trvá približne 3 – 7 dní a bunky prirodzenej ako aj špecifickej imunity sa snažia o degradáciu cudzieho materiálu.



Obrázok 7.22 Fázy reakcie na cudzie teleso po implantácii skafoldu do živého organizmu. Bezprostredne po implantácii dochádza k interakcii povrchu matrice so sérovými proteínmi, ktoré sa adsorbujú. Následne sa aktivujú bunky nešpecifickej imunity – neutrofile. Produkujú regulačné molekuly a do činnosti sa dostávajú aj makrofágy. Nakoľko cudzí materiál pretrváva v organizme dlhší čas, nastúpia aj mechanizmy chronického zápalu. V rámci tohto procesu je charakteristická tvorba fúzovaných makrofágov (tzv. *foreign body giant cells*), ktoré sa snažia danú matricu odbúrať. Ak prevažujú pro-zápalové mechanizmy nad regeneračnými, okolo implantátu sa vytvorí fibrózna kapsula.

Avšak nakoľko sa za daný čas matrica nezdegraduje a pretrváva v organizme, nastupuje ďalšia fáza v podobe **chronickej zápalovej odpovede**. Typickými predstaviteľmi sú **makrofágy** a **fúzované makrofágy** (*foreign body giant cells*), ktoré hrajú kľúčovú úlohu vo formácii **fibrotickej kapsule** v okolí skafoldu. Celkový rozsah fibrotizácie je výrazne

ovplyvnený aktuálnym biochemickým statusom postihnutého miesta. Ten takisto potencuje schopnosť makrofágov polarizovať sa na bunky podporujúce regeneráciu tkanív (tzv. **M2 fenotyp**) alebo naopak na fenotyp provokujúci ďalšie zápalové procesy (tzv. **M1 fenotyp**). Pre úspešnú implantáciu je preto nevyhnutné, aby v rámci interakcie s hostiteľským imunitným systémom prevažovali **pro-regeneračné** mechanizmy.

Súčasným materiálovým výskumom sa vo veľkom zameriavajú na tzv. **imunomodulačné** vlastnosti vyhotovených matric. Práve tie by mali podporovať spúšťanie pro-regeneračných dráh a uľahčiť tak obnovenie poškodených tkanív. V tomto kontexte je dôležité vedieť modulovať už spomínané základné vlastnosti skafoldov, akými sú napr. tvar, topografia, mikroarchitektúra (porozita a veľkosť pórov), tvrdosť, hydrofóbnosť, degradačná kinetika a i. Viaceré štúdie taktiež potvrdili, že veľkosť a **orientácia polymérnych vlákien** v rámci dizajnu skafoldu ovplyvňujú **polarizáciu makrofágov** a mieru zápalovej reakcie v postihnutom mieste. Výsledky naznačujú, že organizované vlákna s väčším priemerom podporujú polarizáciu makrofágov k pro-regeneračnému M2 fenotypu. Tento fenomén sa spozoroval aj pri skafoldoch s veľkými pórmami.

Taktiež sa spozorovalo, že matrice na báze prírodných polymérov nespôsobujú prílišnú tvorbu fibrotickej kapsule v okolí implantátu. Na druhej strane, nevýhoda týchto matric spočíva v náročnej kontrole ich degradácie. Kombinácia so syntetickými materiálmi môže pomôcť vyriešiť daný problém. Tým pádom sa **hybridné skafoldy** javia ako sľubný prístup za účelom vývoja imunomodulačných matric. Navyše, výsev skafoldov kmeňovými bunkami taktiež potencuje lepšiu pro-regeneračnú odpoveď. Na zabezpečenie čo najlepšej interakcie s imunitným systémom je ideálne, aby bunky pochádzali z **autológneho** zdroja. Avšak aj tento prístup stále predstavuje riziko navodenia reakcie štetu proti hostiteľovi, ktorá spadá pod veľmi vážne nežiadúce účinky. Najnovšie štúdie sa preto zameriavajú na výsev skafoldov pomocou špecifických **nanočastíc** derivovaných z kmeňových buniek (exozómy), ktorými by sa mohlo tejto komplikácii predísť.

Aplikácia tkanivových konštruktov so schopnosťou modulácie imunitnej odpovede predstavuje veľký potenciál najmä pre regeneráciu komplikovaných a **rozsiahlych** poškodení. Na skafoldy bol dlhé roky kladený nárok, aby ostali po implantácii inertné, respektíve biologicky neviditeľné a neinteragovali s imunitným systémom. Nakoľko v súčasnosti vieme, že každý jeden zásah do živého organizmu vyvolá imunitnú odpoveď, javí sa tento prístup ako neopodstatnený. Súčasným výskumom sa intenzívne zaoberajú **zápalom navodenej regenerácii tkanív**. V tomto kontexte by skafoldy mohli modulovať a spolupracovať s imunitným

systémom tak, aby všetky biochemické procesy, ktoré sa odohrávajú v mieste postihnutia, viedli k regenerácii. A práve preto pozornosť púta **imunoinžinierstvo**.

Tento odbor skúma a prispôsobuje princípy tkanivového inžinierstva s ohľadom na intervenciu s imunitným systémom daného jednotlivca. Vyvíja biokompatibilné, resorbovateľné matrice s imunomodulačnými účinkami, ktoré by potenciovali vytváranie endogénneho pro-regeneračného prostredia v mieste poškodenia tkaniva a zohľadňuje rozdielnosť aktivity imunitného systému medzi jednotlivcami (v závislosti od veku, pohlavia, pridružených chorôb). Imunoinžinierstvo taktiež ponúka **personalizovaný** prístup pre každého pacienta. Odborníci sa domnievajú, že práve implementácia tohto odboru do TERM výrazne posunie transláciu tkanivových konštruktov z experimentálnych podmienok do rutínnej medicínskej praxe.

Literatúra

- Berthiaume, F., Maguire, T. J., & Yarmush, M. L. (2011). Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, *2*, 403–430. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>
- Chandorkar, Y., K., R., & Basu, B. (2019). The foreign body response demystified. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, *5*(1), 19–44. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01085>
- Chang, H.-I., & Wang, Y. (2011). Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds. In *Regenerative medicine and tissue engineering - Cells and biomaterials* (InTech). <https://doi.org/10.5772/21983>
- de Lucas, B., Pérez, L. M., & Gálvez, B. G. (2018). Importance and regulation of adult stem cell migration. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *22*(2), 746–754. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13397>
- González, F., Boué, S., & Belmonte, J. C. I. (2011). Methods for making induced pluripotent stem cells: Reprogramming à la carte. *Nature Reviews Genetics*, *12*, 231–242. <https://doi.org/10.1038/nrg2937>
- Green, J. J. (2021). Immunoengineering has arrived. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *109*(3), 397–403. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37088>
- Huang, Y., Wu, Q., & Tam, P. K. H. (2022). Immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cells and their potential clinical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(17), 10023. <https://doi.org/10.3390/ijms231710023>
- Jantová, S., & Bakoš, D. (2009). *Bunkové kultúry a tkanivové inžinierstvo*. Slovenská technická univerzita.
- Khan, F., & Tanaka, M. (2017). Designing smart biomaterials for tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(1), 17. <https://doi.org/10.3390/ijms19010017>
- Khazaei, F., Rezakhani, L., Alizadeh, M., Mahdavian, E., & Khazaei, M. (2023). Exosomes and exosome-loaded scaffolds: Characterization and application in modern regenerative medicine. *Tissue and Cell*, *80*, 102007. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2023.102007>
- Kim, T. G., Shin, H., & Lim, D. W. (2012). Biomimetic scaffolds for tissue engineering. *Advanced Functional Materials*, *22*(12), 2446–2468. <https://doi.org/10.1002/adfm.201103083>
- Kular, J. K., Basu, S., & Sharma, R. I. (2014). The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering*, *5*, 204173141455711. <https://doi.org/10.1177/2041731414557116>
- Kwon, S. G., Kwon, Y. W., Lee, T. W., Park, G. T., & Kim, J. H. (2018). Recent advances in stem cell therapeutics and tissue engineering strategies. *Biomaterials Research*, *22*(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0142-x>
- Licata, J. P., Schwab, K. H., Har-el, Y., Gerstenhaber, J. A., & Lelkes, P. I. (2023). Bioreactor technologies for enhanced organoid culture. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(19), 11427. <https://doi.org/10.3390/ijms241911427>
- Li, J., Chen, M., Fan, X., & Zhou, H. (2016). Recent advances in bioprinting techniques: Approaches, applications and future prospects. *Journal of Translational Medicine*, *14*, 271. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1028-0>
- Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, *19*(6), 485–502. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437>

Mantha, S., Pillai, S., Khayambashi, P., Upadhyay, A., Zhang, Y., & Tao, O. (2019). Smart hydrogels in tissue engineering and regenerative medicine. **Materials**, **12**(20), 3323. <https://doi.org/10.3390/ma12203323>

O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, **14**(3), 88–95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)

Pina, S., Ribeiro, V. P., Marques, C. F., Maia, F. R., Silva, T. H., & Reis, R. L. (2019). Scaffolding strategies for tissue engineering and regenerative medicine applications. **Materials**, **12**(11), 1824. <https://doi.org/10.3390/ma12111824>

Polak, J. M., & Bishop, A. E. (2006). Stem cells and tissue engineering: Past, present, and future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **1068**(1), 352–366. <https://doi.org/10.1196/annals.1346.039>

Zoznam skratiek

(a)CGH	komparatívna genomická hybridizácia na čipoch
3G	tretia generácia sekvenovania
4G	štvrtá generácia sekvenovania
ADP	adenozíndifosfát
AEM	anembryomola
AI	neúplný potrat (<i>abortus incompletes</i>)
AMP	adenozínmonofosfát
AMR	antimikrobiálna rezistencia
anti-5mC	protilátka voči 5-metylcytozínu
APS	adenozín-5'-fosfosulfát
ARG	gény rezistencie na antibiotiká (<i>antibiotic resistance genes</i>)
ASE	alelovo špecifická expresia (<i>allele-specific expression</i>)
ATP	adenozíntрифосфат
BAC	umelý bakteriálny chromozóm
BMP	kostné morfogenetické proteíny
CAP	<i>College of American Pathologists</i>
CAR	chimérický antigénny receptor (<i>chimeric antigen receptor</i>)
Cas	<i>CRISPR associated protein</i>
Cascade	<i>CRISPR-associated complex for antiviral defense</i>
CCS	cirkulárna konsenzus sekvencia
cDNA	komplementárna DNA
cdPCR	digitálna PCR na čipoch (<i>chip-based digital PCR</i>)
cfDNA	voľne cirkulujúca (extracelulárna) DNA (<i>cell free DNA</i>)
CI	interval spoľahlivosti
CPF	<i>CRISPR-associated endonuclease in Prevotella and Francisella</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNA	<i>crispr</i> RNA
CRT	cyklická reverzibilná terminácia
Ct	prahový cyklus
ctDNA	cirkulujúca nádorová DNA
dATP/dCTP/dGTP/dTTP	deoxy-adenozín/cytozín/guanín/tymín-trifosfát
dCas9/deadCas9	katalyticky deaktivovaný proteín Cas9
ddNTP	dideoxynukleotidtrifosfát
ddPCR	digitálna PCR v kvapkách (<i>droplet-based digital PCR</i>)

DETECTR	<i>DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter</i>
DNáza	deoxyribonukleáza
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
dsDNA	dvojvláknová DNA
dsRNA(DNA)	dvojvláknová RNA (DNA)
dT	deoxytymidín
emPCR	emulzná polymerázová reťazová reakcia
EST	značka exprimovaných sekvencií (<i>expressed sequence tag</i>)
EV	extravezikulárne vezikuly
FACS	fluorescenčne aktivovaná prietoková cytometria (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FGF-2	fibroblastový rastový faktor 2
FISH	fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia
FN	fyziológické placenty
FRET	Försterov rezonančný prenos energie
GMO	geneticky modifikované organizmy
GOI	gén záujmu (<i>gene of interest</i>)
gRNA	krátka nekódujúca navádzajúca RNA (<i>guide RNA</i>)
GTD	gestačná trofoblastová choroba (<i>gestational trophoblastic disease</i>)
GvHD	<i>graft verus host disease</i>
HA	hydropický potrat
hAC	ľudská kĺbová chrupavka (<i>Human articular cartilage</i>)
Has2	hyalurónansyntáza 2
HD	placenty z preeklamptických tehotností
HIF	hypoxiou inducibilné faktory
HLA	ľudský leukocytový antigén
HPV	ľudský papilomavírus (<i>human papillomavirus</i>)
ChIP	chromatínová imunoprecipitácia
IGF-1	inzulínu podobný rastový faktor
IVD	<i>in vitro</i> fertilizácia
Kb	kilobáza
KGN	kartogenín
LoD	detekčný limit (<i>limit of detection</i>)
MA	zamĺknutý potrat (<i>missed abortion</i>)
Mb	megabáza
MBD	metylovaná DNA-väzobná doména

mC	metylovaný cytozín
mcDNA	minikruhová DNA
MECP	proteín viažúci sa na metylovaný CpG
MGE	mobilný genetický element
MHC	hlavný histokompatibilný komplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MIC	minimálna inhibičná koncentrácia
MIQE	minimálne informácie potrebné pre publikovanie experimentov využívajúcich RT-qPCR (<i>minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments</i>)
miRNA	mikro RNA
MMP	matricové metaloproteinázy
mRNA	mediátorová (<i>messenger</i>) RNA
MSC	mezenchýmové kmeňové bunky (<i>mesenchymal stem cells</i>)
NGS/NextGen	masívne paralelné sekvenovania (<i>next-generation sequencing</i>)
ORF	otvorený čítací rámec
PAGE	polyakrylamidový gél
PAM	2 – 6 nukleotidových párov dlhá špecifická sekvencia 5'-NGG-3'; N – dusíkatá zásada, G – guanín (<i>protospacer adjacent motif</i>)
PCR	polymerázová reťazová reakcia
pDNA	plazmidová DNA
PERV	prasacie endogénne retrovírasy
PGS	predimplantačné vyšetrenie embryí na prítomnosť aneuploidii (<i>preimplantation genetic testing for aneuploidy</i>)
PMG	parciálna mola hydatidóza (<i>partial hydatidiform mole</i>)
PPi	anorganický pyrofosfát
PRP	plazma bohatá na krvné doštičky, autológny prípravok získaný z vlastnej krvi pacienta (<i>platelet rich plasma</i>)
PTP	pikotitračná platnička
QF-PCR	kvantitatívna fluorescenčná PCR
qPCR	kvantitatívna PCR
RAMP	<i>repeat associated mysterious protein</i>
RG	referenčný gén
RIN	hodnota integrity RNA (<i>RNA integrity value</i>)
RNA-seq	RNA sekvenovanie
RQ	relatívna kvantifikácia expresie
RQI	hodnota kvality RNA (<i>RNA quality value</i>)
RRM	RNA rozpoznávajúci motív (<i>RNA recognition motif</i>)

rRNA	ribozomálna RNA
RT	reverzný terminátor
RT-dPCR	digitálna RT-PCR
RT-PCR	PCR s reverznou transkripciou
SARS-CoV-2	koronavírus 2 spôsobujúci ťažký akútne respiračný syndróm (<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>)
SBS	sekvenovanie pomocou ligácie
SCS	sekvenovanie jednej bunky (<i>single-cell sequencings</i>)
SHERLOCK	<i>specific high sensitivity enzymatic reporter unlocking</i>
SINE	krátke rozptýlené jadrové elementy (<i>short interspersed nuclear element</i>)
SMRT	sekvenovanie jednej molekuly v reálnom čase (<i>single-molecule real-time sequencing</i>)
SNP	jednonukleotidové polymorfizmy
SNV	jednonukleotidové varianty
SOLiD	metóda sekvenovania (<i>sequencing by oligonucleotide ligation and detection</i>)
SOX9	transkripčný faktor
ssDNA	jednovláknová DNA
ssRNA	jednovláknová RNA
STR	krátke tandemové opakovania (<i>short tandem repeats</i>)
TALEN	efektorové nukleázy podobné aktivátoru transkripcie (<i>transcription-activator-like effector</i>)
TCR	T-bunkový receptor (<i>T-cell receptor</i>)
TGF- β	transformujúcich rastových faktorov
tracrRNA	<i>trans-activating crRNA</i>
tRNA	transférová RNA
TS	cielené sekvenovanie (<i>targeted sequencing</i>)
UTR	neprekladaný región
WES	celoexómové sekvenovanie (<i>whole exome sequencing</i>)
WGS	celogenómové sekvenovanie (<i>whole genome sequencing</i>)
ZFN	zinkové prsty s nukleázou (<i>zinc-finger nucleases</i>)

Vanda Repiská, Helena Gbelcová, Petra Priščáková, Martina Čulenová

Nové trendy v lekárskej biológii a klinickej genetike

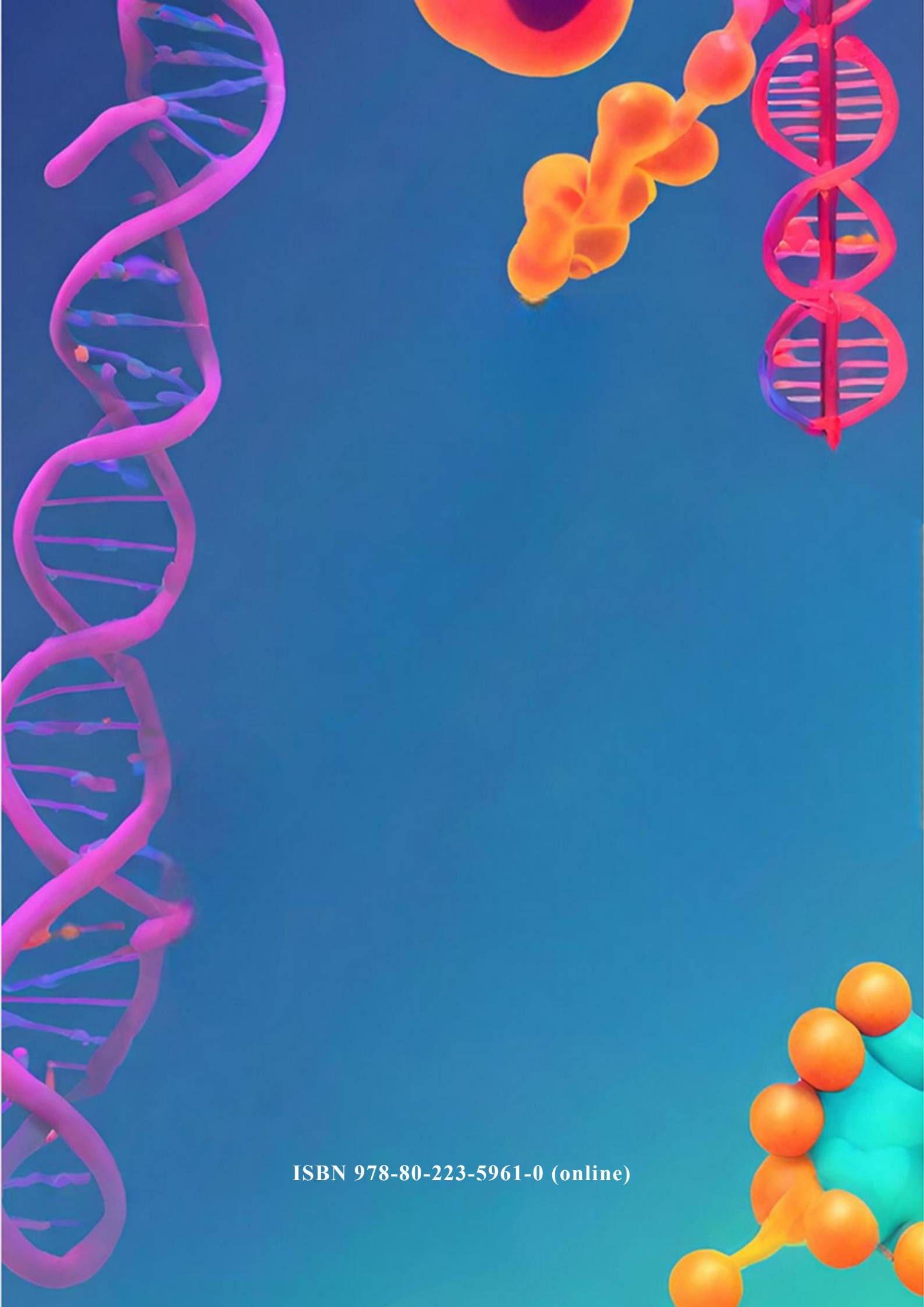
Vydala Univerzita Komenského v Bratislave, 2024

Redakcia: Autorky

Technická redakcia, návrh obálky: Juraj Hutník

Rozsah 232 strán, 13,01 AH, prvé vydanie,
vyšlo ako elektronická publikácia

ISBN 978-80-223-5961-0 (online)



ISBN 978-80-223-5961-0 (online)