

Od genomu za miliony **k milionům genomů**

Možnost číst v DNA přiblížila vědce mílovými kroky k pochopení principů života, jeho fungování a vzniku. Je také příležitostí pro lékaře bojující s chorobami založenými na genetice. Jak však takové čtení skutečně probíhá? **Filip Pardy**

Není tomu tak dávno, co jste mohli sledovat zprávy o velkém průlomu v biologii, totiž zprávy o přečtení lidského genomu. Od té chvíle uteklo sotva patnáct let, a přesto tato událost jako by pouze symbolicky nastartovala něco mnohem většího, strhla doslova lavinu projektů, jejichž cílem je zmapovat rozdíly a podobnosti v genomech lidí. Pouhé ambice vědců a výzkumníků by však nestačily, pokud by jim v provedení zásadně nepomohl technologický pokrok, zlepšení výpočetních kapacit počítačů a s ním ruku

v ruce i rostoucí výkon sekvenačních technologií.

Čtení DNA

V druhé polovině 70. let byly téměř současně publikovány dvě metody, které umožňovaly sekvenovat molekulu DNA – tedy stanovit pořadí nukleotidů, čtyř písmen genetické abecedy, která tvoří náš genom. Původně populárnější, Maxam-Gilbertova metoda, využívala radioaktivně značený fosfor, který přidávala k náhodně rozštěpaným kouskům studované DNA. Pokud byly

tyto fragmenty seřazeny podle délky v elektroforetickém gelu, bylo pak možné odečítat sekvenci DNA.

Druhou metodou bylo Sangerovo sekvenování a na rozdíl od Maxam-Gilbertova postupu je v automatizovaných přístrojích používána dodnes. Její princip se liší v tom, že studovaná molekula DNA není fragmentována, ale naopak prepisována speciálním enzymem DNA polymerázou. Do reakční směsi jsou kromě čtyř běžných nukleotidů adeninu, thyminu, cytosinu a guaninu přidány jejich analogy (označené fluo-

roforem, tedy svítící molekulou), které ukončí vznikající řetězec. Nakonec jsou tyto fragmenty opět rozděleny na gelu, takže se dá postupně přečíst sekvence podle čtyřbarevného diagramu.

Drahý koníček

Metody první generace byly sice revoluční na svou dobu, jejich společným nedostatkem ovšem byla časová náročnost a možnost sekvenovat pouze jednu konkrétní sekvenci v jedné reakci. Představte si lidský genom, který

Roku 2003 byl ukončen projekt čtení lidského genomu, velkolepé dílo financované americkým Národním zdravotnickým institutem. Jeho dokončení trvalo bezmála deset let a k jeho uskutečnění bylo potřeba doslova naplnit tovární haly Sangerovými kapilárními sekvenátory. Výsledkem tohoto úsilí bylo publikování tří miliard bází lidského genomu a identifikace 22 tisíc genů, které se na něm nacházejí. Celkové náklady tohoto projektu jsou odhadovány na 3 miliardy USD.



☑ Díky vysoké citlivosti mohou metody NGS pomáhat i budoucím maminkám. V nedávných letech bylo vyvinuto neinvazivní prenatální testování, které umožňuje vyšetřit plod v ranných fázích těhotenství – zpravidla ještě do 10. týdne

Ve chvíli, kdy velká sekvenační centra přešla na technologii NGS, začala cena přečtení genomu klesat

obsahuje celkem 3 miliardy nukleových bází. Sekvenačními metodami první generace jste schopni přečíst přibližně tisíc bází během jedné reakce, stále byste tedy potřebovali 3 miliony reakcí, jen abyste přečetli celý genom. Na to, aby bylo možné jednotlivé úseky skládat dohromady, je však zároveň potřeba, aby se částečně překrývaly.

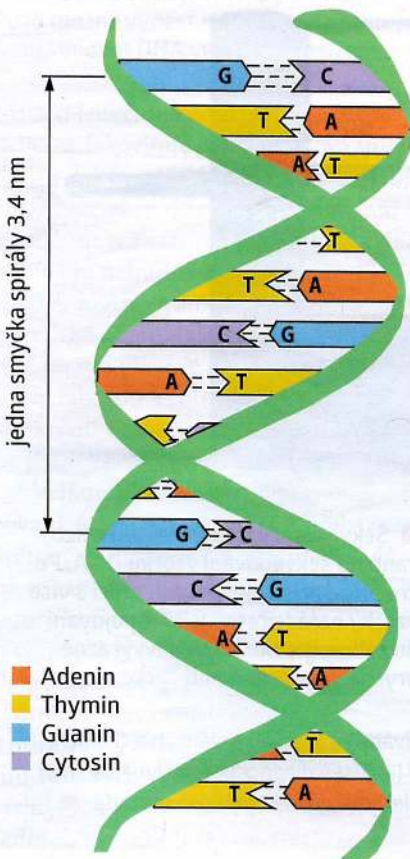
Nově, rychle, efektivně

Zatím co se tento obří projekt blížil svému dokončení, v zákulisí se chystala technologická revoluce, která výzkum DNA od základů změnila. Přístroje nové generace, označované jako NGS (*Next Generation Sequencing*, sekvenování nové generace), začaly využívat digitální zpracování obrazu a naplno se opířely o rostoucí výkon výpočetní techniky. Nejdůležitější součástí této novinky je ale masivní paralelizace sekvenačních reakcí.

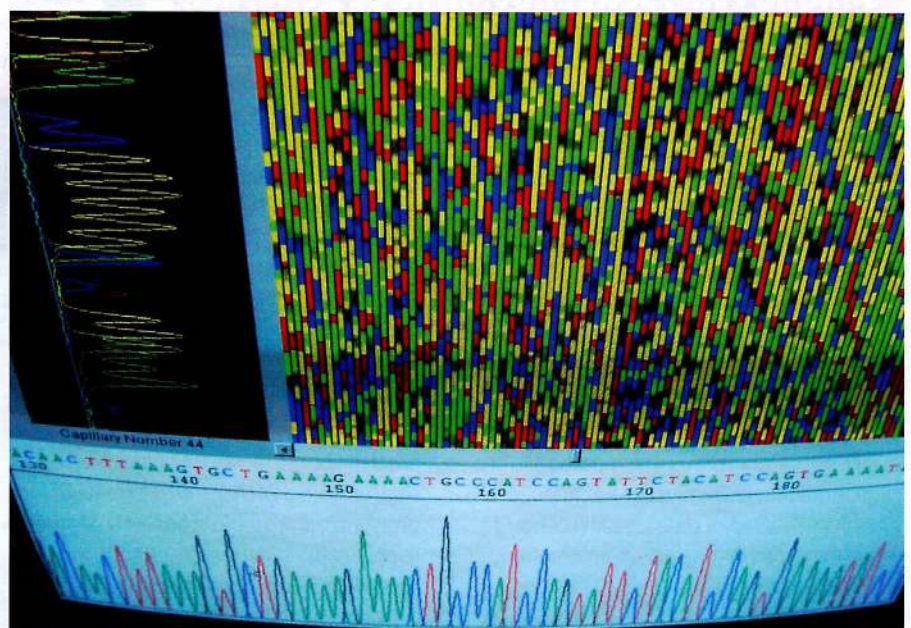
Pomocí metod první generace šlo analyzovat vždy jen jeden přesně defi-

novaný fragment DNA v každé reakci. Pokud byste se jich pokoušeli číst víc naráz, dostávali byste pro každou pozici ve vlákně spojenou informaci o dvou nukleotidech, bez jakékoliv možnosti rozlišit, ze kterého vlákna pochází. Lze si to představit asi tak, jako byste poslouchali dvě písničky najednou a snažili se přitom odlišit, který tón je z které skladby.

dvoušroubovice DNA



☑ Sekvenování umožňuje vědci stanovit pořadí nukleotidů ve fragmentu DNA, který zkoumá; vzniklá sekvence představuje informace zakódované v genomu



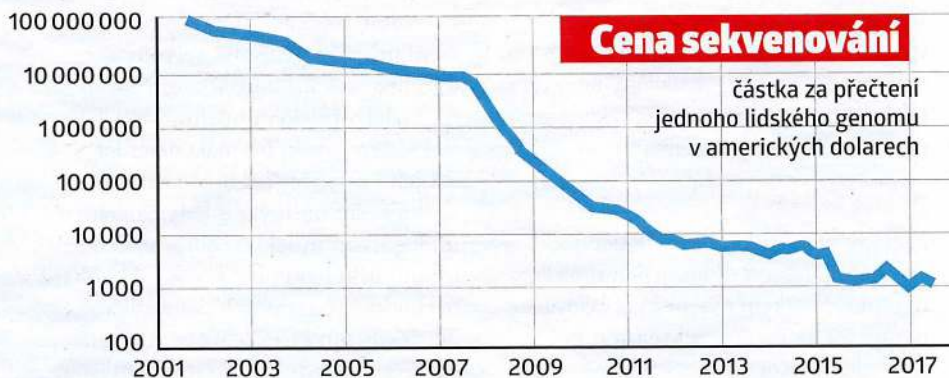
Skok vpřed

Kdyby bylo možné jednotlivé molekuly v reakci přimět k tomu, aby zaujaly přesně dané místo a seřadily se jako vojáci na cvičišti, pak by je šlo pozorovat mikroskopem a sekvenovat pěkně všechny vedle sebe. Přesně takové uvažování vědce dovedlo k tomu, že se podařilo ukotvit a sekvenovat najednou miliony rozdílných sekvencí při jednom spuštění přístroje.

Přechod na novou technologii způsobil skutečný převrat ve chvíli, kdy cena za sekvenování začala dramaticky klesat. Od dokončení projektu čtení lidského genomu klesla cena za genom stotisíc-

Roku 2003 byl ukončen projekt čtení lidského genomu, jenž od základů změnil výzkum DNA

krát. Hranice jednoho lidského genomu přečteného za 1 000 dolarů byla pokořena v roce 2015 sestavou sekvenátorů HiSeq X Ten od firmy Illumina. Tato společnost dnes také zaujímá zcela dominantní postavení na sekvenačním trhu.



Nové obzory

Z dříve poněkud náročné a drahé metody se dnes stává jeden z hlavních tahounů genetického výzkumu. NGS umožňuje skvěle poznávat a popisovat živý svět kolem nás – japonská encyklopedie genomů KEGG uvádí k dnešnímu dni téměř 5 000 kompletně popsaných genomů bakterií a 442 genomů vyšších organismů, včetně savců a hospodářsky významných rostlin. Na významu také dramaticky nabývá obor personalizované medicíny.

Personalizovaná medicína popisuje přístup, kdy se lékaři snaží přizpůsobit léčbu na míru pacientovi, jeho genetické výbavě a konkrétní podobě jeho onemocnění. Již dříve byla známa dědičná onemocnění, za která zpravidla mohla nějaká porucha v dědičné výbavě našich buněk. Příkladem může být například hemofilie či

Částka, kterou stojí přečtení jednoho lidského genomu, od roku 2003 strmě klesla. Spolu s pokrokem v technologiích sekvenování tak umožňuje širší využití poznání DNA, ať už na poli vědy nebo medicíny

cystická fibróza. Postupně ale vědci zjišťují, že změna genetické výbavy nemusí vždy přímo způsobit onemocnění, pouze značně navýšit riziko, že k němu dojde.

Součást prevence i léčby

Z tohoto důvodu se dnes zavádí například vyšetření genů BRCA1/2, jehož poškození značně zvyšuje riziko rakoviny prsu a vaječníků. Ještě složitější je i-

Mnoho tváří sekvenování nové generace

Cílené resekvenování – jeden gen či soubor genů, které spojujeme se vznikem či průběhem určitého onemocnění, lze sekvenovat s vysokou citlivostí a relativně levně. Pomocí takového screeningu je možné zmapovat genetické pozadí konkrétního pacienta či stanovit riziko vzniku onemocnění.

Celogenomové sekvenování – touto metodou se vědci snaží přečíst a poskládat celé tři miliardy nukleotidů, které tvoří genetickou informaci člověka. V současnosti je tato metoda vhodná pro vytváření referenčních databází, pro diagnostiku jednotlivce je většinou ještě příliš nákladná. S dále klesající cenou za sekvenování se nejspíš stane dominantní metodou.

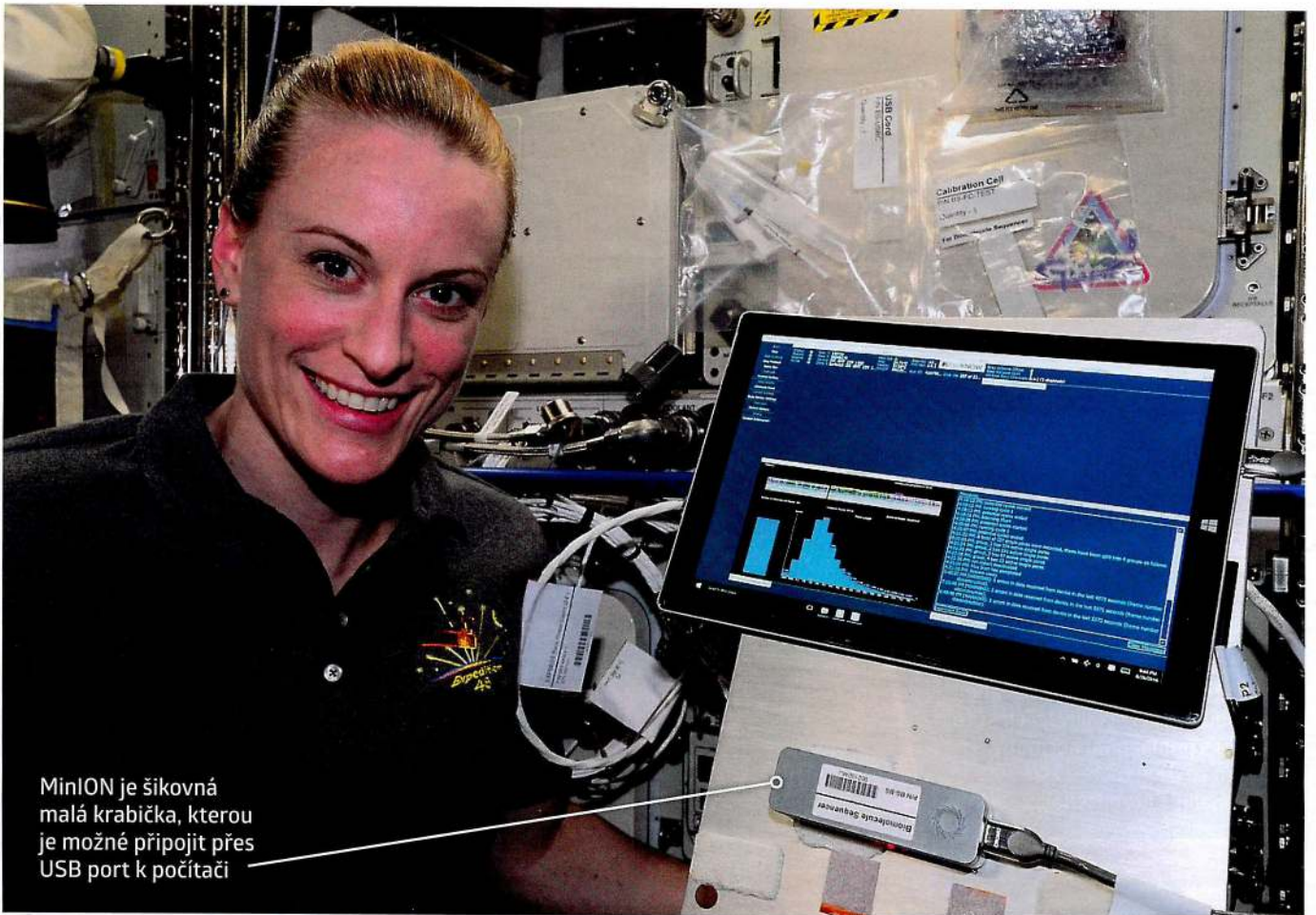
Likvidní biopsie – neinvazivní vyšetření, při kterém se v krevním odběru lékaři snaží identifikovat úlomky DNA pocházející buď z plodu u těhotné matky, případně DNA nádorových buněk, pokud se jedná o onkologického pacienta. Výhoda je především v šetrnosti tohoto postupu a vysoké citlivosti.

RNA sekvenování – Touto metodou lze přečíst ribonukleovou kyselinu, která se přepisuje z DNA a slouží jako návod pro syntézu proteinů a enzymů. Metoda je používána hlavně ve výzkumu, kde umožňuje zjistit, které geny jsou vyu-



Sekvencátory slouží k automatizovanému sekvenování vzorku DNA. Pokročilejší přístroje zvládají práci s více vzorky naráz včetně jejich spojování do celkového obrazu a tím výrazně urychlují čtení genomu

živány ve kterých orgánech a tkáních. V lékařské diagnostice se využívá spíše okrajově, jako doplňková metoda. ♥



MinION je šikovná malá krabička, kterou je možné připojit přes USB port k počítači

▲ Sekvenátor MinION firmy Oxford Nanopore je tak malý, že jej bylo roku 2016 možné vynést na oběžnou dráhu a sekvenovat DNA ve stavu beztlakosti

tuace u leukemických onemocnění, kdy dělí se rakovinné buňky doslova sbírají další a další změny DNA. Onemocnění je potom velice různorodé a léčba může zasáhnout jen část vadných buněk a jiná část na ni nemusí vůbec reagovat. Mají-li však možnost důkladně prostudovat genetické pozadí takového onemocnění, mohou onkologové spolehlivěji vybrat právě takovou léčbu, která je cílená na konkrétní variantu nemoci, a tím nejlépe pomoci v léčbě.

Velkou pomocí jsou v personalizované medicíně vznikající databáze světových i národních genomů. Tady už se samozřejmě nejedná o sekvenci pouhého jednoho genomu, ale naopak o co největší počet. Existuje proto databáze *1000 genomes*, mapující varianty z celého světa, či vznikající *100K UK genomes*, tedy sto tisíc genomů britských. V takovýchto databázích jsou zahrnutí nejenom zdraví jedinci, ale také lidé trpící některou

formou rakoviny či nějakým vzácným dědičným onemocněním. Při srovnávání s takovouto databází se může klinický genetik snažit dobrot správné diagnózy či přizpůsobit odpovídajícím způsobem léčbu.

K čemu je to dobré?

Využití metod NGS samozřejmě není omezeno jen na diagnostiku onemocnění, své služby nabízí také v těhotenském screeningu, kde umožňuje velice

Velice populární jsou také genealogické studie, prováděné taktéž na objednávku komerčně. Výzkumníci se v jejich rámci podívají na zoubek vašemu rodokmenu a pomocí variant DNA vystopují váš původ na Zemi.

Možnosti současné technologie NGS ještě zdaleka nejsou vyčerpány, ale na dveře už klepou nové technologické platformy, které jsou povětšinou založeny na elektrické detekci DNA při jejím průchodu polovodičovou membránou.

” Pomocí metod první generace šlo analyzovat **vždy jen jeden přesně definovaný fragment DNA**

přesně vyšetřit plod prostřednictvím odběru krve matce (jedná se tedy o vyšetření, jež nezasáhne plod). Další směr výzkumu se dnes zabývá takzvaným mikrobiomem, tedy studuje, jaké miliony přátelských bakterií obývají lidské útroby. Takováto vyšetření by mohla jednou pomáhat upravovat zažívání či řešit problémy s obezitou.

Takovéto přístroje mají výhodu, že mohou vynechat celou složitou optiku, jsou tedy malé a přenosné, s dalším velkým potenciálem pro růst výkonu a snižování ceny. Je tedy nasnadě, že se na poli sekvenování DNA v budoucnosti lidstvo dočká dalšího bouřlivého vývoje a s ním i příchodu nových, nejen lékařských využití. ♥