Následující pracovní materiál může být použit vcelku nebo, v závislosti na našich potřebách, věku a znalostech žáků jej lze modifikovat přidáváním/ubíráním podpůrných informací (zeleně) či autorských návodů k řešení (modře).

Představte si, že jste lékařem genetikem zodpovědným za včasný záchyt geneticky podmíněných onemocnění u novorozenců. Dnes máte za úkol vyšetřit pacientku s dědičným zatížením (onemocnění má známý genetický základ a v rodině se vyskytuje v několika generacích) hemofilií v rodině.

Víme, že hemofilie A je dědičné onemocnění vázané na chromozom X. Onemocnění se u žen projeví pouze tehdy, když člověk nemá **ani jednu** zdravou alelu příslušného genu. Muži jsou buď nemocní, tzn. s chybným genem na jejich jednom chromozomu X, nebo jsou zdraví. Nemohou být skrytými přenašeči.

Pacientka sama je zdravá, uvádí ale výskyt onemocnění hemofilií u otce z matčiny strany a u svého bratra. Je ona sama nositelkou vadného genu (tzv. přenašečkou)? Bude její dítě nositelem vadného genu? Jaká je pravděpodobnost, že dítě bude nemocné?

Pojďme si situaci nejprve zakreslit. K tomu můžeme použít zjednodušený genealogický diagram, kde čtverečky představují muže a kolečka ženy. Vybarvíme symboly značící jedince s klinickým projevem onemocnění.

?

?

Vyskytuje se "špatný" gen v rodokmenu i u klinicky zdravých jedinců? Pacientčin dědeček trpěl hemofilií - měl tedy pouze "špatnou" alelu příslušného genu. Tuto alelu po něm musela zdědit jeho dcera (žádnou jinou alelu, kterou by jí mohl předat, neměl). Tento předpoklad potvrzuje skutečnost, že syn této dcery, bratr naší pacientky, hemofilií trpí také (a zdědil tedy od své matky tento dědečkův gen). Matka pacientky je tedy přenašečkou, její symbol vybarvíme šrafováním.

Je naše pacientka také přenašečkou? Ne nutně. Mohla od své matky zdědit jak vadný gen (po dědečkovi) nebo zdravý gen (po babičce). Jak víme, že babička měla obě alely v pořádku? Nevíme, ale můžeme to odhadnout z toho, že měla mimo jedné dcery i čtyři zdravé syny. Pokud by byla přenašečkou, s největší pravděpodobností by alespoň jeden syn onemocněním trpěl (pravděpodobnost, že přenašečka bude mít nemocného syna je 1:1, tzn. 50%). Naše pacientka je tedy přenašečkou s pravděpodobností 50 %.

Co teď s tím? Nedá se nic dělat, budeme muset zjistit, zda naše pacientka má vadný gen. Naštěstí můžeme její DNA sekvenovat (tj. přečíst pořadí nukleotidových bází). K tomu budeme potřebovat vzorek její DNA. Kde ho získat?

Koagulační faktory jsou sice vytvářeny v játrech, kus jater ale naštěstí potřebovat nebudeme. Buňky našeho těla sice vypadají různě a mají různé funkce, ale genetickou informaci mají všechny stejnou. Vystačíme tedy s odběrem krve.

Už máme výsledky z laboratoře. Vadný gen byl nalezen.  
To je ale smůla! Pacientka je přenašečkou! Co teď?

Teď nás hlavně bude zajímat, jestli je její nenarozené dítě syn nebo dcera. Pokud je to dcera, můžeme zůstat celkem v klidu. Sice je tu 50% šance, že i ona bude přenašečkou, ale pokud její otec není hemofylik (což není), z hlediska genetiky je nulová šance že onemocní. Pokud to bude syn, je to horší, na 50 % bude trpět hemofilií.

A zrovna je to chlapeček! To je komplikace – bude dítě nemocné, nebo ne? Budeme muset vyšetřit i genom nenarozeného dítěte. K tomu slouží odběr plodové vody.

Máme výsledky. UFFFF, chlapeček je zdravý, sláva.

Pojďme se teď podívat na novorozenecké oddělení. To je miminek! Ale proč mají skoro všechna modřinku na patě? Aha, odebírali jim krev. Z krve budou zjišťovat, jestli miminka nemají "špatný" gen a netrpí některou z geneticky podmíněných chorob, která zůstala během matčina těhotenství neodhalena.

A tady už máme výsledky testů. A jé, jedno z miminek má fenylketonurii. Jedná se o poruchu metabolismu aminokyseliny fenylalaninu. Při této nemoci není fenylalanin správně metabolizován a produkty jeho špatného metabolismu vedou k zatížení centrální nervové soustavy a vývoji mentální retardace. Dítě musí okamžitě začít držet dietu s nízkým obsahem fenylalaninu, která ho odteď bude provázet celý život. Jen tak je možné zajistit jeho správný vývoj.

**Jak taková dieta vypadá? Vyhledejte na internetu.**

**Potraviny s vysokým obsahem fenylalaninu, které ze stravy vylučujeme**

* Maso,drůbež a ryby: Vepřové, hovězí, telecí a skopové maso, králík, zvěřina, kuře, krůta, husa, kachna, ryby, vnitřnosti.
* Uzeniny a masné výrobky: Měkké i trvanlivé salámy, klobásy, párky, šunka, tlačenka, paštika, masové konzervy.
* Vejce: Celá vejce, bílek, žloutek, sušená vejce.
* Mléko a mléčné výrobky: Sýry, tvaroh, jogurty, smetana, šlehačka, sušená mléka, zmrzliny.
* Chléb a pečivo: Rohlíky, chléb, sladké pečivo - koblihy, koláče, bábovky, buchty, zákusky, strouhanka, trvanlivé pečivo (sušenky, oplatky, piškoty, křehké chleby, křupky, slané pečivo).
* Cukrovinky: Čokoláda a čokoládové bonbóny, želatinové bonbóny.
* Ořechy a mák: Vlašské a lískové ořechy, arašídy, kešu, para, mák.
* Sušené ovoce: Meruňky, švestky, rozinky, banán, ananas, kokos.
* Obiloviny: Ovesné vločky.
* Mouky, těstoviny a výrobky z nich: Mouka (pšeničná, ovesná, rýžová, sójová, žitná), krupice, vaječné těstoviny, špagety, corn flakes, knedlíky z prášku (houskové i bramborové).
* Luštěniny: Čočka, fazole, hrách, sója a sójové maso.
* Nápoje a potraviny slazené umělým sladidlem aspartam: Někdy označené jako light.

**Potraviny s vyšším obsahem fenylalaninu s částečným omezením**

* Brambory a bramborové výrobky: Povoleny zařazovat dle individuální tolerance.
* Rýže: Povoleny zařazovat dle individuální tolerance.
* Ovoce: Banány, pomeranče, mandarinky.
* Zelenina: Špenát, kapusta, zelí, růžičková kapusta, květák, steril. hrášek, kukuřice, zelené steril. fazolky.
* Ostatní: Kečup, hořčice, majonéza.

**Potraviny povolené bez omezení**

* Nízkobílkovinné chleby a pečivo: Tmavý i světlý chléb PKU, housky PKU, sladké PKU keksy, medovníky PKU.
* Nízkobílkovinné mouky a těstoviny: Všechny druhy i tvary (polévkové nudle, hvězdičky, mušle, kolínka, fleky), mouky Damin, Finax, Apromix, Vitaprotam.
* Nízkobílkovinné mléko a výrobky z něho: Milupa LP Drink, Loprofin, pudinky.
* Med, džemy a marmelády: Všechny druhy.
* Zavařeniny a kompoty:
* Zeleninový bujón:
* Cukr a cukrovinky: Ovocné želé, fondán, tvrdé kyselé bonbóny, ovocné lipo.
* Tuky rostlinné i živočišné: Máslo, sádlo, Perla, Rama, Flora, Hera, rostlinné oleje.

No tedy to je pořádně přísná dieta.... Nedalo by se to řešit nějak jinak?

Možná dalo. Fenylketonurie je v 97 % způsobená vadou genu pro enzym fenylalaninhydroxylázy. Z vadného genu nelze vyrobit funkční enzym a to způsobuje poruchu metabolismu fenylalaninu. Kdyby ale šlo vyměnit gen...

Vida, teď uvažujeme jako výzkumníci! :-)

Pojďme tedy do výzkumné laboratoře a zkusme připravit "zdravý gen". Jak vyrobit DNA? Co k tomu budeme potřebovat?



Struktura DNA

DNA je polymer skládající se z monomerů, a to čtyř různých nukleotidů – deoxyadenozintrifosfátu (A), deoxyguanozintrifosfátu (G), deoxythymidintrifosfátu (T) a deoxycytosintrifosfátu (C). Ty lze zakoupit komerčně (třeba tady http://eshop.biogen.cz/10mm-dntp-mix?gclid=CPSUm4qI6NMCFYI4GwodsZMFZw).

Nové řetězce DNA jsou vytvářeny v buňkách pomocí enzymu, DNA polymerázy. Protože budeme potřebovat později během experimentu měnit teplotu, musíme koupit tepelně stabilní enzym. Také budeme potřebovat "vzorovou" DNA. Tedy "správnou" DNA genu pro fenylalaninhydroxylázu. Tu má naštěstí kolega v laboratoři, který jí používá k jiným experimentům :-).

Úplně nakonec budeme potřebovat "očka"– krátké úseky DNA, které navedou DNA plymerázu správně na začátek úseku DNA, který má za úkol syntetizovat. Ty si také můžeme objednat (třeba tady http://www.krd.cz/ – syntéza oligonukleotidů; a vida mají tu i ceník...no není to levná záležitost, ale kdyby se to povedlo, stojí to za to).

Teď máme všechny ingredience, z kterých umíme "umíchat" gen. Samotná reakce bude probíhat v přístroji, kterému říkáme Thermocycler. Není to nic extra složitého, jednoduše je to přístroj, který umí naše vzorky zahřívat a ochlazovat na námi předem zvolenou teplotu.

Vzorky musíme nejprve na 30 sekund zahřát na 94 °C, díky tomu se oba řetězce "vzorové" DNA od sebe oddělí a budou přístupné pro replikaci. Nyní je potřeba teplotu snížit na 50–60 °C po dobu 20–40 sekund, aby na denaturované řetězce mohla nesednou krátká DNA očka, která ohraničí gen, který chceme množit. Nyní přichází čas pro naší termostabilní DNA polymerázu. Ta bude pracovat při 72 °C, kolem jedné minuty, čím delší gen má nasystetizovat, tím více bude potřebovat času. Po skončení syntézy nových řetězců se zase vracíme k prvnímu kroku – rozvolnění dvojřetězců DNA, aby byly přístupny pro další kolo replikace. V každém kroku se tak množství DNA zdvojnásobí, obvykle jsme schopni v průběhu jedné reakce udělat asi třicet opakujících se kroků, takže získáme 230 (1 073 741 824) kopií našeho genu. To by mohlo stačit, ne?

Gen máme, ale jak ho dostat do buněk pacienta? Navíc, v buňkách pacienta ještě pořád máme starý "špatný" gen. Co teď?

Tady by nám mohl pomoci nově objevený systém CRISPR-Cas9. Je to enzymový systém získaný z baktérií, který umí vyštěpit z genomové DNA konkrétní gen. Místo něj pak buňce nabídneme náš správný.

Jak enzymy CRISPR-Cas9 spolu s naším "správným" genem dostaneme do buněk?

Co takhle viry – nefungují náhodou tak trochu jako přenašeče nukleových kyselin? Ano, fungují, viry jsou neživé biologické entity, které umí přenášet v nich uloženou RNA nebo DNA do hostitelských buněk. Napadené buňky potom donutí, tuto nukleovou kyselinu přijmout za svou a přepisovat geny, které jsou v ní uloženy.

Super. Vezmu tedy virus, seberu mu jeho vlastní nukleovou kyselinu a místo toho tam dám geny pro enzymy CRISPR-Cas9 plus náš "správný" gen. Upraveným virem můžu infikovat naše nemocné miminko... STOP! To tedy ne. Nejdřív to celé musím vyzkoušet na buňkách *in vitro* a na myších. Teprve když to bude fungovat a budu mít maximální jistotu, že procedura nemá žádné špatné vedlejší účinky, můžu požádat o povolení pro klinické studie. V té, za přísného dozoru státních kontrolních orgánů, budu sledovat vliv léčby na pacienty. Teprve když všechny výsledky ukážou, že léčba není škodlivá, ale je přínosná, může být její použití uvolněno pro klinickou praxi.

Bohužel, nově narození pacienti s fenylketonurii se zatím budou muset životem probíjet s pomocí vlákniny. Současna věda jim ještě chvíli (a doufejme, že opravdu jen chvíli) pomoci prostřednictvím genových manipulací umět nebude.