

UNIVERZITA KARLOVA
KATOLICKÁ TEOLOGICKÁ FAKULTA
Katedra systematické teologie a filosofie

Miroslav Auxt

**Boj za lidskou důstojnost
v éře moderní eugeniky**

**Molekulární nástroj editace genomu
CRISPR/CAS9 a jeho užití
v lidské genové terapii
z pohledu teologické etiky**

Diplomová práce

Vedoucí práce: ThLic. Petr Štica PhD.

Praha 2022

Prohlášení

1. Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracoval samostatně a použil jen uvedené prameny a literaturu.
2. Prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného titulu.
3. Souhlasím s tím, aby práce byla zpřístupněna pro studijní a výzkumné účely.

V Praze dne 8. července 2022

Miroslav Auxt

Bibliografická citace

Boj za lidskou důstojnost v éře moderní eugeniky : Molekulární nástroj editace genomu CRISPR/CAS9 a jeho užití v lidské genové terapii z pohledu teologické etiky [rukopis] : diplomová práce / Miroslav Auxt ; vedoucí práce: Petr Štica. --Praha, 2022. --112 s.

Anotace

Nedávný průlomový objev molekulárního nástroje editace genomu CRISPR/CAS9 představuje v oblasti molekulární biologie, biomedicíny a dalších přidružených oborů naprostou revoluci. Jedná se o vysoce efektivní biomolekulární nástroj, odvozený od bakteriálního imunitního systému, kterým je možné zavádět přesné změny v genomech všech organismů. Diplomová práce se omezuje na etické hodnocení použití CRISPR/CAS9 výlučně v lidské genové terapii. Díky efektivitě, jednoduchosti, přesnosti a nízkým finančním nákladům má již nyní editační nástroj CRISPR/CAS9, při dodržení etických parametrů, širokospektrální využití v terapeutických postupech na somatických neboli tělních buňkách při léčení lidských geneticky podmíněných onemocnění bez zavedení změny do budoucího potomstva daného jedince. Kromě velkého terapeutického potenciálu, aplikace CRISPR/CAS9 vyvolává mnohé etické otázky spojené s možnostmi jejího dalšího využití, příp. zneužití. Mezi eticky problematické genetické postupy se řadí: lidská dědičná editace genomu, tedy cílené pozměňování genomu pohlavních buněk, progenitorových buněk a buněk raných embryonálních vývojových stadií s terapeutickým cílem eliminace geneticky podmíněného onemocnění spojeného se zavedením této změny do budoucího potomstva daného jedince. Dále jsou to kontroverzní neterapeutické experimentální genetické manipulace, jakými jsou: volné neterapeutické experimentování, navržení lidského jedince na zakázku rodičů a cílené vylepšování lidského jedince, potažmo lidského druhu. Vědecká obec o otázkách spojených s možností zneužití metody prostřednictvím eticky problematických a kontroverzních aplikací CRISPR/CAS9 intenzivně diskutuje a promýšlí strategie regulace a nastavení bioetických hranic a limitů. Je důležité reflektovat, že tyto kontroverzní postupy v sobě ukrývají tendence selektivní eugenické mentality, která z křesťanského úhlu pohledu potírá základní etické principy lidské důstojnosti, autonomie, integrity a zranitelnosti. Do odborné diskuze se zapojuje také katolická církev, jejíž magisterium neohroženě brání lidskou důstojnost každého člověka od jeho počátku až po přirozenou smrt jasně proklamuje, že ne vše, co je technicky možné, je taky morálně akceptovatelné. Svým názorem katolická církev vytváří prostor pro poctivou a odbornou reflexi, která má chránit lidský život a jeho důstojnost při řešení aktuálních bioetických otázek, které vyvstávají v důsledku nových vědeckých objevů.

Klíčová slova

editace genomu, CRISPR / CAS9, genová terapie, eugenika, lidská důstojnost, křesťanská etika

Abstract

The recent breakthrough discovery of the molecular genome editing tool CRISPR/CAS9 represents a complete revolution in the field of molecular biology, biomedicine and other related fields. It is a highly effective biomolecular tool, derived from the bacterial immune system, with which it is possible to introduce precise changes in the genomes of all organisms. The thesis is limited to the ethical evaluation of the use of CRISPR/CAS9 exclusively in human gene therapy. Thanks to its efficiency, simplicity, accuracy and low financial costs, the CRISPR/CAS9 editing tool, in compliance with ethical parameters, already has a broad spectrum of use in therapeutic procedures on somatic or body cells in the treatment of human genetically determined diseases without introducing a change into the future offspring of the given individual. In addition to great therapeutic potential, the application of CRISPR/CAS9 raises many ethical questions related to the possibilities of its further use, possibly misuse. Ethically problematic genetic procedures include: human hereditary genome editing, i.e. the targeted alteration of the genome of sex cells, progenitor cells and cells of early embryonic development stages with the therapeutic goal of eliminating a genetically determined disease associated with the introduction of this change into the future offspring of a given individual. Furthermore, there are controversial non-therapeutic experimental genetic manipulations, such as: free non-therapeutic experimentation, design of a human individual at the request of parents and targeted improvement of the human individual, thus the human species. The scientific community is intensively discussing issues related to the possibility of misuse of the method through ethically problematic and controversial applications of CRISPR/CAS9 and thinking about regulation strategies and setting bioethical boundaries and limits. It is important to reflect that these controversial procedures hide tendencies of a selective eugenics mentality, which from a Christian point of view contradicts the basic ethical principles of human dignity, autonomy, integrity and vulnerability. The Catholic Church is also involved in the professional discussion, whose magisterium fearlessly defends the human dignity of every person from the beginning to natural death and clearly proclaims that not everything that is technically possible is also morally acceptable. With its opinion, the Catholic Church creates space for honest and professional reflection, which is supposed to protect human life and its dignity while solving current bioethical questions that arise as a result of new scientific discoveries.

Keywords

genome editing, CRISPR / CAS9, gene therapy, eugenics, human dignity, christian ethics

Počet znaků (včetně mezer): 189 393

Poděkování

Chtěl bych upřímně poděkovat svému školiteli ThLic. Petru Šticovi PhD. za prvotní impulz a návrh tematického zaměření diplomové práce. Děkuji mu za jeho trpělivost, odborné rady a konzultace. Upřímné díky patří všem mým farníkům za lidskou a duchovní podporu, blízkým přátelům a rodině, kteří mě při dokončení studia na Katolické teologické fakultě Univerzity Karlovy podporovali.

Obsah

Úvod.....	8
1. Editace lidského genomu	10
1.1. Projekt lidského genomu	10
1.2. Cílená mutageneze	12
1.3. Editace genomu a vývoj prvních molekulárních metod k její realizaci	13
1.4. Původ, molekulární mechanismus a účinnost CRISPR/CAS9.....	16
1.4.1. Prokaryotické restriční endonukléazy a proteiny <i>cas</i> genů.....	17
1.4.2. Identifikace CRISPR sekvencí u <i>Prokaryot</i> a <i>Archae</i>	18
1.4.3. Funkční součinnost molekul CRISPR a Cas9.....	21
1.4.4. Účinnost metody CRISPR/CAS9.....	24
1.5. CRISPR/CAS9 v základním a aplikovaném výzkumu	31
1.6. Mutagenní řetězová reakce – Gene-drive.....	33
1.6.1. Klasická dědičnosti podle Mendela a pohlavně vázaná dědičnost	33
1.6.2. Princip mutagenní řetězové reakce	35
1.7. Vědecký pokrok a fenomén syntetické biologie	37
2. Editace genomu lidských somatických buněk	40
2.1. Terapeutické editační strategie v léčení monogenetických onemocnění	41
2.2. Využití CRISPR/CAS9 u somatických monogenetických onemocnění	43
3. Editace genomu germinálních buněk a embryonální editace.....	48
3.1. Lidská dědičná editace	48
3.2. Motivace pro využití lidské dědičné editace	53
3.3. Charakterizace a vymezení studovaného bioetického problému	53
3.4. Vývoj vědecké bioetické diskuse k využití CRISPR/CAS9	57
3.5. Obecní principy translační cesty	62
3.6. Nejpravděpodobnější cesty budoucího využití metody HHGE	66
3.7. Technické návrhy pro co nejefektivnější provedení metody HHGE	66
4. Základní etické principy.....	68
4.1. Barcelonská deklarace a základní etické principy.....	68
4.1.1. Princip důstojnosti.....	69
4.1.2. Princip autonomie	71
4.1.3. Princip integrity.....	72
4.1.4. Princip zranitelnosti	73
4.2. Aplikace základních bioetických principů	74
4.3. Biomedicinské principy podle T. L. Beauchampa a J. F. Childresse.....	74
4.4. Reflexe etických principů v CRISPR/CAS9 genové terapii	76
5. Eticko-křesťanská reflexe využití CRISPR/CAS9 v genové terapii.....	79
5.1. Základy etické argumentace	81
5.2. Lidská důstojnost v církevních dokumentech	83
5.3. Etická reflexe somatické genové terapie	86
5.4. Etická reflexe dědičné genové terapie a neterapeutické genové terapie	91
Závěr	96
Seznam použitých zkratk.....	99
Seznam literatury	102
Přílohy.....	110

Úvod

Biomedicínský výzkum zaznamenal v posledních letech 20. a 21. století veliký pokrok. Jedním z nevýznamnějších a nejúspěšnějších projektů v molekulárních a biomedicínských oborech je nepochybně Projekt lidského genomu. Díky tomuto klíčovému projektu je možné číst sekvenci jednotlivých genů lidského genomu, a tím blíže studovat jejich funkci. V těchto posledních letech kromě mnoha jiných významných vědeckých objevů došlo k objevení molekulárního nástroje pro cílenou editaci genomu. Dlouhotrvající enormní úsilí vědců vyvinout účinnou molekulární strategii k cílené mutagenézi a k zavádění přesných změn do genomu organismů bylo korunováno velkým objevem tzv. editačních molekulárních nůžek, CRISPR/CAS9.

Cílem diplomové práce je podání uceleného pohledu na užití molekulárního nástroje CRISPR/CAS9 z vědecko-terapeutické perspektivy i z morálně-teologického hlediska, a tak vytvořit komplexnější myšlenkovou reakci na bioetické otázky spojené s užitím editačního nástroje CRISPR/CAS9 v lidské genové terapii. Kvůli tematické šíři je analýza využití CRISPR/CAS9 a jeho etického hodnocení omezena čistě na lidský druh *Homo sapiens sapiens*.

Diplomová práce má pět kapitol. První kapitola předkládá konkrétní popis molekulárního nástroje CRISPR/CAS9. Druhá a třetí kapitola jsou podrobnějším popisem konkrétní terapeutické aplikace CRISPR/CAS9 v genové terapii a nastiňují základní bioetické otázky. Čtvrtá a pátá kapitola představují vlastní etickou reflexi.

První kapitola předkládané diplomové práce pojednává o revolučním molekulárním nástroji CRISPR/CAS9 z hlediska molekulární biologie, tak, aby byl v postupných krocích objasněn jeho původ. Tou největší zajímavostí je to, že CRISPR/CAS9 byl původně identifikován jako klíčová složka bakteriálního imunitního systému, která cíleně likviduje exogenní formy DNA. Postupným a komplexním studiem bakteriální imunitní odpovědi byl tento systém blíže identifikován a následnými úpravami převeden do vysoce efektivního biomolekulárního editačního nástroje, díky kterému jsou vědci schopni zasáhnout úplně přesně jakékoli místo v genomu a cíleně toto místo změnit. Součástí kapitoly je nastínění využití CRISPR/CAS9 v základním a aplikovaném výzkumu.

Druhá kapitola blíže popisuje využití editačního nástroje CRISPR/CAS9 v somatických neboli tělních buňkách. Editace genomu somatických buněk není dědičná a terapeutická genetická úprava se týká jenom konkrétní tkáně nebo orgánu geneticky nemocného jedince, přičemž tato změna neovlivňuje jeho budoucí potomstvo. Klinických

studií na somatických buňkách je nespočet, proto se omezujeme jenom na konkrétní příklady užití editačního nástroje v genové terapii nejznámějších lidských monogenetických onemocnění.

Kapitola třetí pojednává o editaci buněk pohlavních a buněk embryonálních s naznačením etické problematičnosti vybraných terapeutických postupů. Na základě popisu pozitivního způsobu využití metody v kapitolách předešlých se ve třetí kapitole dostáváme k hlavnímu problému diplomové práce, což je reflexe eticky sporných užití CRISPR/CAS9 v genové terapii a klinické praxi. Mezi ně se řadí aplikace CRISPR/CAS9 v embryonálních buňkách raných vývojových stadií člověka, dále v prekurzorech pohlavních buněk a v samotných pohlavních buňkách. Všechny tyto aplikace souborně nazýváme dědičnou editací lidského genomu, protože takovéto genetické změny zasáhnou nejenom daného jedince, ale taky celé jeho potomstvo. K řešenému problému se pak dále přidružuje cílené navrhování výhodných vlastností potomků na genetické úrovni, což vede k vylepšování lidského druhu, které přímo v sobě ukrývá selektivní eugenickou mentalitu a eliminaci nevhodných jedinců. Do skupiny kontroverzních užití se také řadí neterapeutické volné experimentování a úpravy genů embryonálních buněk do jejich letální podoby. Pro lepší orientaci se v této kapitole snažíme přiblížit vývoj vědecké diskuze v této oblasti, což by mělo napomoci k pochopení kontextu námi řešeného problému.

Čtvrtá kapitola přináší pojednání o etických principech lidské důstojnosti, autonomie, integrity a zranitelnosti, které se formovaly v dějinném kontextu tragédií s eugenickým základem. Díky těmto principům jsme schopni lépe a pravdivěji reflektovat eticky problematickou dědičnou editaci, neterapeutického použití CRISPR/CAS9 a potenciální snahy o vylepšování lidského druhu, jako důsledku eugenického snažení.

Pátá kapitola je teologickou reflexí důstojnosti každého člověka, stvořeného podle Božího obrazu. Kristus, vtělený Boží Syn, posvěcuje lidství člověka svým božstvím, a tím je každý člověk nositelem důstojnosti, která je nesmazatelnou existenciální hodnotou. Katolická církev bude neustále chránit lidskou důstojnost od počátku lidského života, až po jeho přirozenou smrt. Kapitola mapuje názor katolické církve a jejího magisteria na nové vědecké výzvy v genové terapii a experimentální medicíně a snaží se je zasadit do kontextu širší vědecké diskuze.

1. Editace lidského genomu

První kapitola diplomové práce je detailní popis procesu postupného objevování jednotlivých sekvenčních a proteinových molekulárních komponent prokaryotických organismů, u kterých bude původ CRISPR/CAS9 jako editačního nástroje hledán.

Pro pochopení je nutné se dotknout základních paradigmat a terminologie v oblasti molekulární biologie a přiblížit důležitost Projektu sekvenace lidského genomu. Další součástí první kapitoly je naznačení velké snahy vědců vyvinout účinný nástroj pro tzv. cílenou mutagenezi, tedy zavádění mutací do přesně vytipovaných míst v molekule DNA, což umožňuje studovat konkrétní vlastnosti daného genu. Poté budou popsány jednotlivé součásti prokaryotického "imunitního" systému, které v konečném důsledku tvoří funkční jádro editačního nástroje CRISPR/CAS9. Následovat bude popis součinnosti podjednotek editačního nástroje CRISPR/CAS9 na molekulární úrovni a přiblížení jeho účinnosti. V další podkapitole budou naznačeny směry aplikace CRISPR/CAS9 v základním a aplikovaném výzkumu. Poslední část kapitoly okrajově zmíní progresivní metody využití CRISPR/CAS9, jakými jsou mutagenní řetězová reakce a možnost využití editace genomu v syntetické biologii.

1.1. Projekt lidského genomu

Genetická informace lidského organismu, je tvořena cca 2,9 biliony nukleotidů, tzv. bází (adenin, thymin, cytozin, guanin). Nukleotidy jsou stavební kameny deoxyribonukleové kyseliny, tzv. DNA. Molekula DNA tvoří z hlediska prostorové struktury dvoušroubovici. Tu je možné si představit jako lano vzniklé proplétáním dvou jednoduchých vláken. U eukaryotických buněk, tedy buněk s jasně definovaným jádrem, je molekula DNA lineární. Její délka v rozpleteném stavu je přibližně 2 m s průměrem šroubovice cca 2 nm. Aby se tak dlouhá molekula vešla do několika–mikrometrového buněčného jádra, dochází k její kompaktaci. Posledním stupněm tohoto nadmolekulárního uspořádání DNA jsou chromozomy, které jsou umístěny v buněčném jádru. U prokaryotických organismů, tedy organismů bez jasně definovaného jádra, je molekula DNA cirkulární, volně přístupná v cytoplazmě a označuje se jako nukleoid. Pokud je molekula DNA orientována svislým směrem, pak v horizontální rovině jsou nukleotidy propojeny vodíkovými můstky a vertikálně fosfodiesterovou vazbou, která vytváří jakousi kostru celé struktury. V horizontálním párování nukleotidů při svislé

orientaci dvoušroubovice DNA platí princip komplementarity – adenin se páruje s thyminem a cytozin s guaninem a naopak. Uspořádání nukleotidů v molekule DNA označujeme jako sekvenci.

Základní sekvenční strukturní jednotkou dědičnosti je gen. Geny jsou tvořeny introny, jakousi výplňovou regulační sekvencí, která je po vlastním přepisu DNA do mRNA často odstraněna, a exony, tedy vlastními oblastmi kódujícími proteiny, u kterých sekvence trojic nukleotidů odpovídá sekvenci aminokyselin ve vzniklých proteinech v procesu překladu, tzv. translace. Exony, které kódují proteiny, představují jenom 2 % z celkové délky DNA. Zbytek genetické informace je tvořený repetitivními elementy a sekvencemi nejrůznějších typů, které jsou jakýmsi evolučním otiskem v lidské genetické informaci. Konkrétní sekvence genu, po buněčně-molekulárních procesech transkripce – přepisu a translace – překladu, se majoritně transformují do proteinů, které jsou posttranslačně modifikovány a v organismu zastávají nejrůznější funkce. Chromatinová oblast, ve které dochází k aktivnímu přepisu genů, se nazývá euchromatin. Zatímco z vysoké míry inaktivní a kondenzovaná chromatinová forma se nazývá heterochromatin.

Při přesné identifikaci sekvence DNA jednotlivých genů transkripčně aktivního euchromatinu a jejich funkcí sehrál zásadní roli Projekt lidského genomu (*Human genome project*), HGP. Jedná se o sofistikovaný program sekvenace lidského genomu, tedy odkrytí pořadí nukleotidových bází kódujících oblastí DNA. Pod pojmem genom rozumíme soubor všech genů. Tento geniální projekt probíhal v letech 1990 až 2003. V říjnu 2004 byl Mezinárodním konsorciem pro sekvenaci lidského genomu pod vedením Národního ústavu pro výzkum lidského genomu a Ministerstva energetiky USA zveřejněn kompletní přehled genů s jejich klíčovou funkcí. Jeho referenční kontrolu zajišťoval projekt společnosti Celera Genomics. Na celkové sekvenaci se podílelo dvacet špičkových univerzitních a výzkumných center z USA, Velké Británie, Japonska, Francie a Německa. V projektu Lidského genomu bylo přečteno 2,85 bilionu nukleotidů, což představuje 99,8 % celkového euchromatinu, tedy transkripčně aktivní formy genomové DNA. Kromě jiného bylo identifikováno 341 segmentálních duplikací, které vyžadovaly jiné metodické přístupy pro sekvenaci. Sekvenace probíhala s neuvěřitelnou přesností metody, a to jedna chybně zařazená báze na 100 000 nukleotidů. V lidském euchromatinu bylo charakterizováno 20000 – 25000 genů.¹ Toto rozmezí je dáno tím, že 19599 genů

¹ Zdálo by se, že člověk jako nejdokonalejší organismus této země bude taky obsahovat největší počet genů. Ale není tomu tak. Jenom pro představu mezidruhové genomové diverzity je velkou zajímavostí, že třeba modelový organismus mušky Octomilky (*Drosophila melanogaster*) obsahuje přibližně 13000

odpovídá genům kódujících proteiny a dalších 2188 transkripčně aktivních oblastí DNA odpovídá pravděpodobně genům kódujících proteiny, nebo další transkripční regulátory. Díky alternativnímu sestřihu, jeden gen kóduje i několik proteinů. Rozmezí počtu proteinů v lidském organismu je mezi 80000 – 400000.

Pro souhrnnou představu HGP zastřešoval identifikaci genů, kombinatorickou představu struktury proteinů, jednotlivé odlišnosti v celkové kompozici genomu, rozptýlení a původ transpozonů a jiných mobilních genetických elementů.²

Rok 2022 je významný v tom, že se vědcům povedlo odkrýt zbytek heterochromatinové oblasti lidského genomu, který zůstal doposud utajený. V sekvenčním genetickém programu „Telomere to telomere“ (T2T), tedy od jednoho konce chromozomu ke druhému, byly odkryty 3 miliardy doposud nepřechtených bází těžko čitelné oblasti repetitivních sekvencí, centromerických satelitních polí, segmentální duplikace a krátká ramínka akrocentrických chromozomů, což odemyká tyto komplexní a doposud utajované části genomu pro variační a funkční studie. Přibližně 200 milionů nově odhalených bází heterochromatinových oblastí genomu obsahuje 1956 genových predikcí, ze kterých přibližně 99 pravděpodobně tvoří protein kódující oblasti.³

1.2. Cílená mutageneze

Díky Projektu lidského genomu je objasněna přesná sekvence nukleotidů jednotlivých genů. Každý gen kóduje alespoň jeden protein. Identifikace proteinů a jejich funkce je dalším klíčovým krokem ve studiu molekulární biologie. Pro studium funkce proteinů se používá nejrůznějších bio-molekulárních přístupů. Jednou z nejpřímějších cest, jak odhalit funkci daného genu v organismu, je jeho vyřazení. Toto vyřazení se realizuje díky molekulárnímu mechanismu cílené mutageneze výchozího genu. Cílenou mutagenezí rozumíme zavádění mutací do sekvence konkrétního genu, jehož funkci studujeme. Je známo několik druhů mutací. Nejčastěji se jedná o delecii-odstranění, inzerci-vložení a substituci-nahrazení nukleotidových bází. Každý z těchto mutačních mechanismů

genů, zatímco modelový organismus rostlin Huseniček rolních (*Arabidopsis thaliana*) obsahuje 25500 genů. Počtem genů patří dokonce mezi rostliny s nejnižším počtem genů. Převzato:

PRAY, Leslie. Eukaryotic genome complexity. *Nature education* 2008, roč.1, č. 1, s. 96.

² Srov. INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, Finishing the euchromatic sequence of the human genome, *Nature* 2004, roč. 431, č. 7011, s. 931–945.

³ Srov. NURK, Sergey – KOREN, Sergey a kol. The complete sequence of a human genome, *Science* 2022, roč. 376, č. 6588, s. 44–53.

zavádí změnu v kódující genové sekvenci. Následkem delece a inserce nukleotidu do sekvence genu je narušení čtecího rámce při translaci, tzn. konkrétní změna nukleotidu se projektuje do změněného pořadí aminokyselin ve vznikajícím proteinovém řetězci. V případě substituce dochází k záměně jedné báze za jinou a tím dochází ke změně jedné aminokyseliny za jinou ve čtecím rámci proteinu, nebo zavedení stop kodonu spojeného s ukončením translace. Výsledkem těchto zásahů je u delece a inserce nefunkční protein. U substituce pozměněná aminokyselina může narušit celkovou konformaci proteinu, nebo jeho esenciální funkční části, a tím protein buď vyřadit z funkce, anebo výrazně snížit jeho funkčnost. Absence původního, nemutovaného proteinu se pochopitelně projeví v buňce. Tyto procesy jsou velmi složité a komplexní. Realizují se prostřednictvím genetického screeningu požadovaných mutantů a poté pokračují identifikací genu, nebo genů odpovědných za pozorovaný fenotyp. Tento přístup často vyžaduje hledání homologických sekvencí a určení kdy a kde je gen exprimován – stejně jako generování mutantních organismů a charakterizace jejich fenotypů.⁴

1.3. Editace genomu a vývoj prvních molekulárních metod k její realizaci

Editace genomu je cílené pozměnění konkrétního místa v genomu, prostřednictvím vhodně navrženého molekulárního editačního nástroje. Ještě předtím, než bude detailně představen nejmodernější molekulární editační nástroj CRISPR/CAS9 (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein*), což znamená: nahromaděné pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice v součinnosti CRISPR asociovaným proteinem 9, je potřebné se ve zkratce dotknout alternativních molekulárních editačních nástrojů, které CRISPR/CAS9 předcházely.

V 80. letech 20. století byl popsán molekulární mechanismus homologické rekombinace. Homologickou rekombinací ve smyslu editace genomu rozumíme molekulární mechanismus, který využívá vysoké sekvenční identity k nahrazení poškozené formy genu formou správnou. Na procesu se podílejí nejrůznější molekulární komplexy přirozeně přítomné v buňkách. Jednou z prací, která tento proces popisuje

⁴ Srov. ALBERTS, Bruce – JOHNSON, Alexander a kol. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed., *Studying gene expression and function*. New York: Garland Science, 2002, [2022-05-10]. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26818/>>.

v eukaryotických buňkách, je práce Thomase a Capecchiho.⁵ Autoři této studie popisují, jak faktory uspořádání, chromozomální pozice integrovaného genu a množství injikovaných molekul opraveného genu do buněčného jádra, ovlivňují frekvenci homologické rekombinace. I když proces opravy je úspěšný, probíhá s velice nízkou frekvencí, tzn. že požadovanou změnou projde jenom velmi malé procento buněčné populace. Dalším aspektem je, že spontánní integrace exogenní DNA do hostitelské DNA je opravdu velmi nízká. Buňka se podobným zásahům prostě brání. Frekvence integrace závisí ve velké míře na buněčném typu a buněčném cyklu, ve kterém se buňka nachází. V neposlední řadě je tu vysoké riziko náhodné integrace exogenní formy DNA do nežádoucího místa, což by mohlo ovlivnit expresi jiných genů, a tím způsobit buňce další problémy.⁶

Velkou výzvou pro molekulární biologie bylo navržení efektivního editačního nástroje, kterým by bylo možné zavést mutaci do požadované cílové sekvence. Pro specifické zasažení genu byly třeba navrženy tzv. molekulární meganukleázy, které rozeznávají delší restrikční místo o počtu 14 - 40 nukleotidů, čímž došlo k snížení frekvence štěpní, za to však ke zvýšení specificity. Takovým příkladem je I-SceI meganukleáza.

Dalšími molekulárními nástroji, jak specificky rozeznat cílovou sekvenci DNA jsou proteiny zinkového prstu. Jedná se o proteinové motivy, které se vážou na DNA sekvencně specifickým způsobem, a to interakcí s velkým žlábkem ve struktuře DNA. Každý takto navržený motiv rozeznává 3 páry nukleotidů v DNA. K zasažení genomové sekvence o počtu 21 nukleotidových páru je potřeba 7 zinkových prstů. Syntézou několika specifických motivů podle cílové sekvence nukleotidů a připojením endonukleázové proteinové domény, třeba Fok I k jejímu konci je možné docílit štěpení cílové DNA ve specifickém místě. Takto navržený nástroj se označuje jako ZFN, nukleázy zinkového prstu. K tomu, aby došlo k zavedení dvouvláknového zlomu, Fok I musí pracovat jako homodimer. Je tedy nutné navrhnout dva separované motivy zinkových prstů s restrikční aktivitou, čímž se molekulární nástroj stává velmi náročným na přípravu s nejistou frekvencí štěpení, ale přesto s poměrně velkým terapeutickým potenciálem.⁷

⁵ Srov. THOMAS, Kirk R. – CAPECCHI, Mario R. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* 1986, roč. 44, č. 3, s. 419–428.

⁶ Srov. tamtéž, s. 420.

⁷ Srov. DUNBAR, Cynthia – HIGH, Katherine a kol. Gene therapy comes of age. *Science* 2018, roč. 359, č. 6372.

Určitou alternativou k proteinovým motivům zinkového prstu jsou TALE proteiny, které rozpoznávají jeden nukleotidový pár místo třech u zinkových prstů. Připojením nukleázové aktivity k těmto proteinům vzniká další nástroj pro specifické štěpení v hostitelské DNA, tzv. TALEN elementy.

Co se týče způsobů přenosu genetické informace, je známo několik významných strategií. Jedním ze způsobů přenosu genetické informace do buněk jsou replikačně defektní retrovirové vektory a vektory odvozené od adenovirů. Na základě velice slibných výsledků v předklinických modelech nemocí, se zahájily v devadesátých letech 20. století také klinické studie. Však v těchto brzkých testech se projevíly velmi vážné cytotoxické účinky virové genové terapie. Jako třeba velmi silné imunitní odpovědi na vektory a také maligní bujení zasaženého buněčného typu, což bylo vyvoláno insercí terapeutického vektoru do oblasti onkogenu, a tím došlo k maligní buněčné manifestaci. Při aplikaci adeno-asociovaných vektorů v klinických aplikacích do rohovky, jater a nervového systému bylo zaznamenáno zlepšení v případě vrozené slepoty, hemofie B a svalové atrofie.⁸

Lentivirové vektory jsou velice účinné při přenosu genetické informace zvláště nedělicích se buněk. Virové vektory jsou však obecně stále nebezpečné na to, aby se používaly při klinické genové terapii, protože zvláště u efektivních lentivirových vektorů hrozí nebezpečí aktivace buněčných onkogenů z důvodu vysoké integrační preference vektorů do transkripčně aktivních oblastí. Využití lentivirových vektorů však zaznamenalo taky úspěchy, jako tomu bylo v 90. letech v případě Ashanti De Silvy, která po aplikaci retrovirální genové terapie T-lymfocytů byla vyléčena z vážného X vázaného imunodeficientního syndromu. Hlavním metodickým přístupem bylo vyjmutí T-lymfocytů, které pak byly infikovány retrovirovým vektorem s funkční kopií genu. Původně měly být infikovány kmenové buňky, ty se však pomalu dělí, a proto byly vybrány T-lymfocyty. Příklad Ashanti De Silvy je však výjimečný. V devadesátých letech došlo k velkému zklamání, protože u mnoha pacientů se stejnou nemocí, jakou trpěla De Silva, se po aplikaci retrovirální terapie u pacientů objevily různé druhy leukémií. Mnozí pacienti zemřeli. I přesto, že retrovirové vektory jsou úspěšným molekulárním prostředkem pro přenos genetické informace do buněk, kvůli jejich vysoké pravděpodobnosti integrace do transkripčně aktivních oblastí buněčného genomu pacienta, zůstává jejich terapeutická aplikace zapovězena.⁹

⁸ Srov. tamtéž.

⁹ Srov. tamtéž.

Tímto přehledem bylo poukázáno na velké úsilí vyvinout bezpečný molekulární nástroj pro specifickou mutagenézi v cílové sekvenci DNA hostitele a opravě poškozených, nebo mutovaných míst způsobujících geneticky podmíněná onemocnění. U všech těchto typů editačních nástrojů se vědci potýkají s mnoha problémy. Je to hlavně složitost a určitá krkolomnost při navrhování proteinových motivů. Syntéza je velmi drahá a v konečném důsledku ne příliš efektivní. Navíc je tady vysoké riziko nesespecifických zasažení, potažmo způsobených nežádoucích mutací v hostitelském organismu, případně aktivací onkogenů, do jejichž blízkosti došlo k integraci terapeutického vektoru.

1.4. Původ, molekulární mechanismus a účinnost CRISPR/CAS9

Objevem a přesnou identifikací molekulárního editačního nástroje CRISPR/CAS9 začíná přelomová éra v molekulární biologii a v přidružených biologických a biomedicínských oborech. Tato metoda je fenoménem v cílené mutagenézi a genomovém inženýrství. Je to programovatelný molekulární nástroj k zavádění precizních změn v genetickém kódu. Hlavní podíl na pochopení a objasnění CRISPR/CAS9 mají dvě špičkové vědkyně: Emmanulle Charpentier z Berlinského Institutu Maxe Plancka a Jenifer Anna Doudna z Kalifornské Univerzity Berkeley. Ani jedna z nich při společném setkání u café v Portoriku v roce 2011 netušila, jak velký objev se črtá, když budou spolupracovat. Emmanuelle Charpentier jako průkopnice v oblasti patogenních bakterií (zvláště *Streptococcus pyogenes*) a Jenifer Doudna jako průkopnice v metabolismu RNA, spojily síly pracovních týmů a dočkaly se vytouženého objevu. Za objasnění molekulárního mechanismu a vyvinutí vysoce efektivních editačních molekulárních nůžek CRISPR/CAS9 získaly v roce 2020 Nobelovou cenu za chemii.¹⁰

Historie objasnění tohoto molekulárního nástroje je neméně zajímavá jako jeho současná identifikace přesné funkce jako editačního molekulárního nástroje. Následující historický exkurz směřující k objevu je důležitý pro pochopení a objasnění molekulárního editačního nástroje CRISPR/CAS9, jako revoluční molekulární metody.

¹⁰ Srov. The nobel prize. *Press release: The Nobel prize in chemistry 2020*. (7.10.2020) [2022-02-10]. <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/>>.

1.4.1. Prokaryotické restriční endonukléazy a proteiny *cas* genů

V sedmdesátých letech 20. století došlo v prokaryotických buňkách k objevu restričních endonukleáz štěpících cizorodou DNA. Za cizorodou DNA je považována každá nukleová kyselina nevlastní hostitelskému organismu, jež je do něj vpravena z vnějšího prostředí ve formě plazmidu nebo fágovou infekcí. Jednou z důležitých publikací, která popisuje mechanismus štěpení cizorodé DNA v bakteriálním organismu *Hemophilus influenzae*, je práce Hamiltona O. Smithe a K. H. Wilcoxe. Autoři této práce popisují izolaci proteinu s endonukleázovou (uvnitř DNA štěpící) aktivitou. Tento protein má nedetekovatelnou afinitu k DNA hostitele, zato však vykazuje vysokou endonukleázovou aktivitu k DNA bakteriofága T7. Bakteriofágovou DNA byl schopen rozštěpit 40x na fragmenty o průměrné délce 1000 nukleotidů. Endonukleáza vytváří dvouřetězcové zlomy a ke své aktivitě nepotřebuje nic zvláštního kromě iontů hořčíku. Štěpením tedy došlo k úplné likvidaci cizorodé bakteriofágové DNA.¹¹ Následným přidáním nukleotidů ke koncům štěpených molekul polynukleotidkinázovou aktivitou byli autoři schopni určit přesnou sekvenci, kterou endonukleáza R štěpí u bakterie *Hemophilus influenzae* cizorodou DNA.¹² Publikace otevřela prostor pro další studium významu prokaryotických restričních endonukleáz, které specifickým způsobem likvidují exogenní formy DNA u prokaryotických organismů. Autoři pochopitelně v tom čase ještě netušili, že jsou na stopě CAS endonukleáz (endodonukleázy asociované s Crispr). Jejich lepší identifikace přichází později, ale citovaná práce je jedním z rozhodujících důkazů existence endonukleáz, které zastávají roli jakýchsi hlídačů bakteriálního imunitního systému proti cizorodé DNA.

Kromě jiného byly v průběhu následujících let charakterizovány další příbuzné proteiny přidružené do *cas* genové rodiny. Sem patří třeba proteiny podílející se na opravách DNA. Proteiny genu *cas3* jsou charakteristické svojí helikázovou aktivitou (funkce spočívá v rozvolňování otáček DNA šroubovice). Protein CAS4 má příbuznou aktivitu k RecB exonukleáze, která je součástí RecBCD komplexu, který je důležitý při přeskupení dvojitého zlomu DNA při zahájení homologické rekombinace. Proteiny

¹¹ Srov. SMITH, Hamilton O. – WELCOX, Kent W. A Restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*: I. Purification and general properties. *Journal of molecular biology* 1970, roč. 51, č. 2, s. 379–391.

¹² Srov. tamtéž, s. 380.

CAS3 a CAS4 se tedy uplatňují při DNA metabolismu, opravě a rekombinaci DNA, transkripční regulaci a segregaci chromozomů.¹³

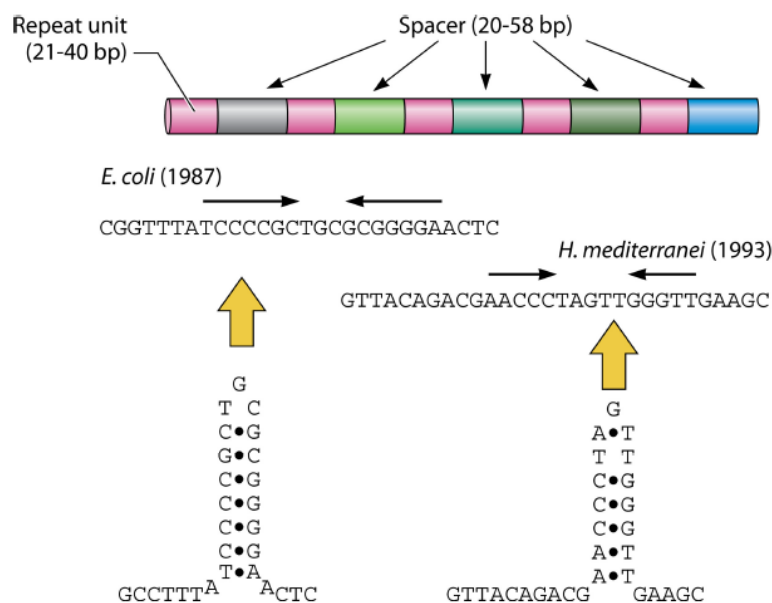
Přesná funkce proteinu CAS9, který nás zajímá nejvíce, byla objasněna až v roce 2012. Protein CAS9 je klíčovou RNA vazebnou DNA endonukleázovou komponentou CRISPR kódované interference, což znamená, že prostřednictvím malých RNA molekul crRNA + tracrRNA identifikovaných později, s kterými CAS9 protein interaguje, je CAS9 naváděn do konkrétního místa v molekule DNA a ve specifickém místě sekvenci DNA štěpí. Objev je natolik významný, že v něm autoři vidí jeho použití jako přesného editačního nástroje pro pozměňování genetické informace v požadovaných sekvenčních místech.¹⁴ Profesor Martin Jinek, jeden z hlavních autorů objevné publikace, je aktuálně jedním z nejvýznamnějších českých vědců ve světě, který se svým kolegou Chilinskim stojí u objevu průlomové metody editace genomu pomocí molekulárního nástroje CRISPR/CAS9.

1.4.2. Identifikace CRISPR sekvencí u *Prokaryot* a *Archae*

V roce 1987 byla publikována práce, která osvětlila funkci *iap* genu v modelovém organismu *Escherichia coli*. Gen zastává důležitou roli při izozymové konverzi alkalické fosfatázy. Autoři při mapování okolí genu zjistili, že za genem se nacházejí nestandardní struktury. Na 3' konci genu objevili 5 vysoce homologických sekvencí, které jsou tvořeny 29 nukleotidy, ze kterých 14 nukleotidů páruje mezi sebou a vytvářejí tak strukturu stonku a očka. Mezi těmito pravidelně se opakujícími sekvencemi neboli repeticemi se nacházejí nerepetitivní homologické mezery obsahující 32 nukleotidů. Pro lepší představivost je logika uspořádání sekvencí znázorněna na obr. 1.

¹³ Srov. JANSEN, Ruud a kol. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology* 2002, roč. 43, č. 6, s. 1565–1575.

¹⁴ Srov. JINEK, Martin – CHYLINSKI, Krzysztof a kol. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012, roč. 337, č. 6069, s. 816–821.



Obr. 1 Struktura CRISPR – opakující se sekvence konstantní délky, 21 – 40 nukleotidů, se symetrií utvářející palindromatické struktury stonku a očka. Homologické sekvence jsou přerušovány mezerami o délce 20 – 58 nukleotidů bez sekvence homologie, navzájem se tedy od sebe liší. Zde jsou uvedeny dva příklady: první CRISPR objeven u bakterií *Escherichia coli* v roce 1987 a druhý CRISPR identifikován u *Archea Haloferax mediterranei* objeven v roce 1993. Převzato Ishino Y. a kol. 2018.¹⁵

Autoři se tehdy jenom domnívali, že podobné sekvence by mohly ovlivňovat stabilitu mRNA genu, ale jejich přesnou funkci nedokázali identifikovat.¹⁶

Z důvodu nedostatku sekvenčních dat DNA zvláště mobilních genetických elementů, bylo velice těžké popsat biologickou funkci těchto zvláštních palindromických repetič. V roce 1993 došlo k objevení palindromických repetič v řiši *Archea*, konkrétně při zjišťování mechanismu adaptace halofilického druhu *Haloferax mediterranei* na prostředí s vysokou koncentrací solí. Funkce těchto sekvencí však byla stále neznámá. Autoři se domnívali, že by se mohla podílet na regulaci genové exprese při adaptaci na zvýšenou koncentraci solí, nebo třeba na konverzi DNA formy B do Z pro specifickou vazbu proteinu, nebo při opravě DNA.¹⁷ Zatímco se vědecký svět přehupl do genomické éry díky sekvenování nejrůznějších genomů, byly podobné sekvence detekovány v mnoha

¹⁵ Srov. ISHINO, Yoshizumi a kol. History of crispr-cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of bacteriology* 2018, roč. 200, č. 7, s. 2.

¹⁶ Srov. ISHINO, Yoshizumi a kol. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology* 1987, roč. 169, č. 12, s. 5429–5433.

¹⁷ Srov. MOJICA, Francisco J. M. – RODRIGUEZ-VALERA, Francisco E. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular microbiology* 1993, roč. 9, č. 3, s. 613–621.

dalších bakteriálních genomech a genomech říše *Archae*, avšak funkce byla stále neznámou.

V roce 2002 Jansen společně s dalšími autory přesně popisuje tyto opakující se krátké sekvence a označuje je CRISPR, tedy nahromaděné pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice. Tyto repetice se vyskytují výlučně v říši bakterií a *Archae*. V říši eukaryot a virů detekovány nejsou. Kolektiv autorů si navíc všímá, že CRISPR lokusy, tedy přesná umístění těchto repetitivních sekvencí v genomu bakterií a *Archae*, jsou v těsné blízkosti *cas* genů a tím předpokládají funkční závislost obou komponent. Protože nevěděli přesnou souvislost, domnívali se, že se jedná o rozšířené mobilní genetické elementy. U *cas* genů předpokládali jejich spojitost s metabolismem DNA. Dále popsali, že CRISPR lokusy se nacházejí v intergenových oblastech, obsahují mnoho přímých repetic s velmi nízkou sekvenční variabilitou, jsou rozesety, nebo proloženy nekonzervovanými sekvencemi a vedoucí sekvence o délce 300 - 500 párů bází se nachází před skupinou takhle uspořádaných repetic.¹⁸

Další předěl přinesl až rok 2005. Tehdy španělský mikrobiolog Francisco Chuan Martinez Mojica, autor publikace z roku 1993, se svým týmem objasnil, že CRISPR sekvence patří do rodiny repetic vyskytujících se v širokém spektru druhů bakterií a *Archae*. Funkci těchto repetic, žel v tom čase stále neznal, ale to, co objasnil je původ nehomologických výplňových přímých repetic nacházejících se těsně za CRISPR. Jejich původ je odvozen od již existujících exogenních DNA chromozomů nebo přenosných genetických elementů, jakými jsou bakteriofágy, profágy, nebo konjugační migrující plazmidy. Uvedené extrachromozomální formy DNA nebyly schopny infikovat hostitelský organismus, který byl již nositelem nehomologické výplňové sekvence, která byla úplně identická s částí sekvence infikujícího patogenu. Z toho se dá odvodit velice úzké propojení CRISPR se sousedními nehomologickými repeticemi a ochranou organismu proti exogenní DNA. Sekvence CRISPR jsou tedy další komponentou bakteriálního imunitního systému, kde každé formě exogenní DNA odpovídá specifická výplňová sekvence u hostitele, která vykazuje identitu k určité části cizorodé DNA.¹⁹

V roce 2007 došlo konečně k objasnění a potvrzení CRISPR/CAS komplexu u bakterie *Streptococcus thermophilus*. Vložení fágové sekvence do oblasti nehomologických

¹⁸ Srov. JANSEN, Ruud a kol. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes, s. 1565.

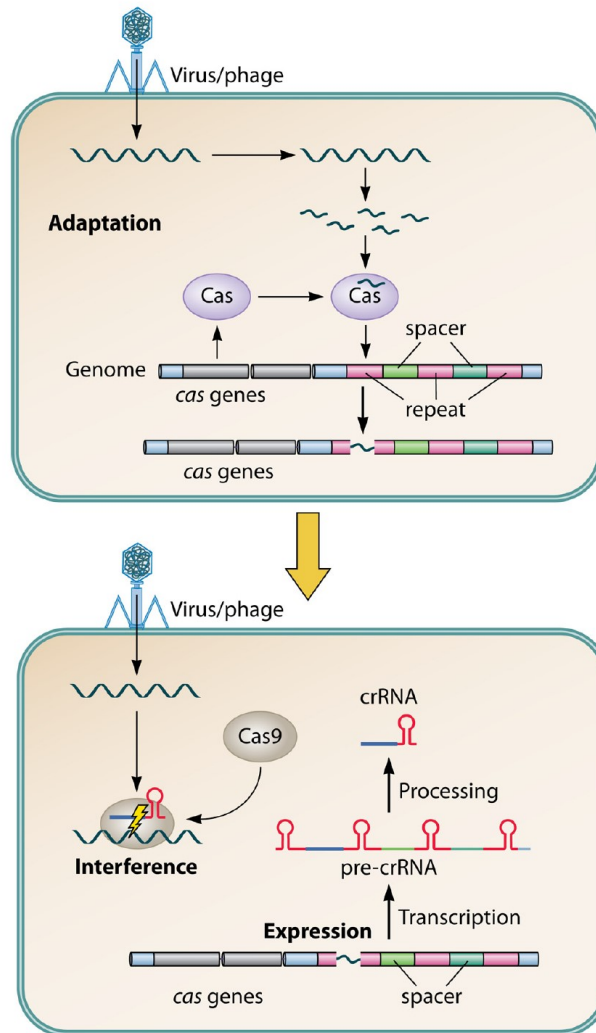
¹⁹ Srov. MOJICA, Francesco J. M. a kol. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution* 2005, roč. 60, č. 2, s. 174–182.

výplňových sekvencí s CRISPR repeticí způsobilo, že takto upravená bakterie je rezistentní vůči odpovídajícímu bakteriofágu. Jakmile došlo k vyštěpení této sekvence, bakterie rezistenci k bakteriofágu ztratila.²⁰

1.4.3. Funkční součinnost molekul CRISPR a Cas9

Protein Cas9 sehrává důležitou roli ve „vrozené“ imunitní odpovědi *Prokaryot* a *Archea*, tím, že našťepí a váže fragment cizorodé DNA a napomáhá jeho inzerci do pomyslné bakteriální patogenní knihovny, ve které se nacházejí v tematických odděleních stejné záložky, které označujeme CRISPR. Jakmile je bakterie napadena exogenní formou DNA fága nebo infekčního plazmidu, okamžitě začne v této knihovně listovat a hledat odpovídající sekvenci patogenu, podle které vniklou cizorodou DNA identifikuje a štěpením zničí. Molekulární komplex CRISPR/CAS9 je tedy prokazatelně podstatou „vrozené“ jako i získané imunity u *Prokaryot* a *Archea*. Tyto organismy se tak brání proti cizorodým patogenům, jakými jsou bakteriofágy nebo migrující patogenní plazmidy. V případě opakované infekce stejným patogenem, je hostitelský organismus schopen sáhnout do pomyslné knihovny patogenních sekvencí již přítomných v genomu a vybrat tu správnou, která na základě homologie k té exogenní navádí restriční systém CRISPR/CAS9 do přesného sekvenčního lokusu, čímž dochází k rozštěpení cizorodé DNA, a tudíž k její likvidaci a zamezení pokračování infekce (obr. 2).

²⁰ Srov. BARRANGOU, Rodolphe a kol. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007, roč. 315, č. 5819, s. 1709–1712.

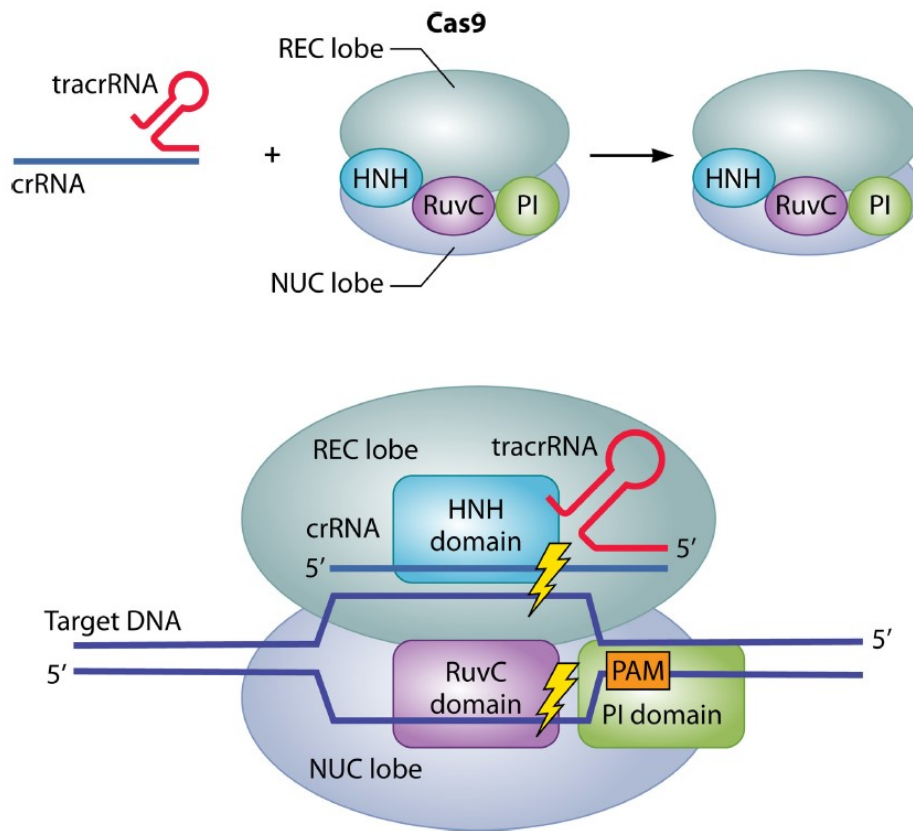


Obr. 2 Průběh získané imunity prostřednictvím CRISPR-Cas molekulárního systému. V prvním kroku infekce se aktivuje „vrožený“ bakteriální imunitní systém. Protein Cas rozeznává rozštěpenou cizorodou molekulu DNA bakteriofága nebo plasmidu. Tuto kratičkou část vkládá do jedné z přímých repetitivních CRISPR, a tak ji uchovává v hostitelském organismu. V případě reinfekce dochází transkripcí CRISPR lokusu k produkci dlouhé prekurzorové molekuly pre-crRNA, která je rozštířena na krátké CRISPR RNA – crRNA. Tato je svojí částí komplementární k cílové sekvenci bakteriofága, která má být štěpena. Tento komplex pak aktivně rozeznává sekvenci bakteriofága, dochází ke konformační změně proteinu Cas9 a tím ke specifickému dvouvláknovému štěpení cizorodé DNA. Převzato Ishino Y. a kol. 2018.²¹

Detailnější prozkoumání molekulárního mechanismu CRISPR/CAS9 přináší publikace z roku 2012, která ukazuje klíčovou roli tzv. CRISPR RNA – crRNA, která se páruje s další malou transaktivací RNA – tracrRNA. Tyto dvě molekuly vytvářejí komplex, který označujeme jako sgRNA. Molekula sgRNA nabíjí a řídí protein Cas9 k cílové sekvenci, se kterou RNA podjednotka crRNA páruje na základě principu komplementarity. Takhle naváděný protein Cas9 zavádí dvouvláknové štěpení v přesném

²¹ Srov. ISHINO, Yoshizumi a kol. History of crispr-cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology, s. 2.

místě. Délka párující se oblasti crRNA a cílové sekvence je v rozmezí mezi 20 – 28 nukleotidy. Ke štěpení dochází na třetím nukleotidu v oblasti vazby PAM proteinové domény. Tříšložkový molekulární komplex crRNA+tracrRNA+CAS9 je rozhodující pro místně specifické štěpení cílové DNA a zdůrazňuje jejich potenciál využití pro editaci genomu programovatelného pomocí RNA (obr. 3).²²



Obr. 3 Editace genomu za použití CRISPR/CAS9. Principem editce genomu je dvouvláknové štěpní DNA v konkrétním místě genomu. Komplex sgrRNA tvoří dvě molekuly RNA: crRNA obsahuje homologickou sekvenci k cílenému místu a tracrRNA váže endonukleázu Cas9 a přivádí ji k místu, kde má dojít ke specifickému štěpení. Protein Cas9 obsahuje dvě části: REC – rozpoznávající a NUC – nukleázovou. REC je důležitá při rozpoznání nukleové kyseliny. NUC část obsahuje HNH a RuvC nukleázové domény, které štěpí DNA a PAM doménu, která rozvíjí dvoušroubovici DNA v daném místě. REC část štěpí vlákno DNA v místě komplementarity cílové DNA k crRNA a NUC část vlákno druhé. Převzato Ishino Y. a kol. 2018.²³

²² Srov. JINEK, Martin – CHYLINSKI, Krzysztof a kol. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, s. 816–817.

²³ Srov. ISHINO, Yoshizumi a kol. History of crispr-cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology, s. 10.

V roce 2014 Jennifer Doudna a Emmanuelle Charpentier publikovali v časopise *Science* fenomenální práci, ve které jasně popsali mechanismus molekulárního nástroje editace genomu CRISPR/CAS9, který se stal díky své přesnosti zásahu cílové sekvence jedním z největších mílníků v molekulární biologii.²⁴

Na těchto stránkách byl popsán poměrně komplikovaný proces postupného objevování klíčových komponent bakteriálního imunitního systému až po vývoj vysoce účinného biomolekulárního nástroje pro cílené a přesné pozměňování genomu – tedy jeho editaci.

Tento nástroj je možné použít napříč organismy bakterií, rostlin, živočichů, člověka. Díky této metodě se otevřel prostor pro genetickou terapeutickou manipulaci. Metoda CRISPR/CAS9 je průlomová ve své jednoduchosti, rychlosti, přesnosti a ekonomické dostupnosti. Díky jejímu širokospektrálnímu využití se stala nedílnou součástí základního a aplikovaného výzkumu v oblasti molekulární biologie, molekulární genetiky, biomedicíny.

Následným krokem bude potřeba mnohem detailnějšího seznámení se s účinností metody, aby bylo daleko lépe možné identifikovat nejenom její velké výhody, ale také potenciální rizika zvláště v oblasti lidské genové terapie.

1.4.4. Účinnost metody CRISPR/CAS9

Na základě dosavadních poznatků je možné shrnout, že CRISPR lokusy se nacházejí v intergenových oblastech, obsahují krátké mnohopočetné přímé repeticity s velmi nízkou sekvenční odlišností a jsou rozmístěny v kombinaci s nekonzervativními výplňovými sekvencemi. CRISPR sekvence se nacházejí ve více než 40 % bakteriálních a 90 % druhů *Archae*. CRISPR repeticity se nacházejí v blízkosti *cas* lokusů. Nehomologické sekvence vložené mezi sekvence CRISPR odpovídají části genetické informace virů a jiných mobilních genetických elementů, které v konečném důsledku cílí na restriktivní štěpení infekčního agens v přesném místě. U eukaryotických buněk podobný systém sekvencí neexistuje, určitou analogií k prokaryotickému systému CRISPR/CAS je RNA interference.²⁵

²⁴ Srov. DOUDNA, Jennifer – CHARPENTIER, Emmanuelle. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014, roč. 346, č. 6213.

²⁵ Srov. MAKAROVA, Kira S. a kol. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology direct* 2006, roč. 1, č. 7.

Zjednodušeně by se dalo říct, že CRISPR/CAS9 pracuje ve třech krocích. Prvním je skenování a nalezení cílové sekvence, ve druhém kroku následuje specifické štěpení za vzniku dvouvláknového zlomu DNA a ve třetím kroku dochází k lokální modifikaci nukleotidu, zacelení a opravení DNA.

I když editační nástroj CRISPR/CAS 9 je jednoduchý pro manipulaci, účinný a cenově dostupný, je nutno podotknout, že vědci neustále pracují na jeho vylepšování. Pracuje se zvláště na zmenšení proteinové endonukleázové podjednotky CAS9, při zachování její funkce a zvýšení přesnosti štěpení a na rozšíření CAS9 variant pro cílenou mutagenezi.²⁶ Nástroj funguje velice efektivně, ale taky s prokazatelným rizikem možných nevyžádaných zásahů mimo cílovou sekvenci. Riziko nevyžádaných zásahů je charakteristické zvláště pro oblasti otevřeného a transkripčně aktivního chromatinu. Výskyt možných nežádoucích dvouvláknových štěpení je pravděpodobně daný určitou nedokonalou komplementaritou bází mezi vodící sgRNA a nežádoucí cílovou sekvencí, zvláště však, pokud se nekomplementární spojení několika nukleotidů vyskytuje v místě PAM domény CAS9.²⁷

Co vlastně ovlivňuje to, jestli komplex CRISPR/CAS9 bude štěpit specificky anebo nespecificky? Zdá se, že PAM doména v CAS9 proteinu je při specifickém štěpení nejvíc rozhodující. V místě vazby, konkrétně na pozici čtvrtého nukleotidu směrem dovnitř dochází k rozlišování konkrétního typu nukleotidu. V případě přítomnosti adeninu anebo tyminu na této pozici je komplex veden k substituční inzerci nebo v případě cytozinu k delecii. V případě, že na zmiňované čtvrté pozici se nachází guanin, komplex se stává více nepředvídatelným a dochází ve vyšší míře k nespecifickým štěpením.²⁸ Při navrhování účinného molekulárního nástroje je pochopitelně klíčové navržení sgRNA s dostatečnou délkou a strukturní stabilitou. V podstatě nejdůležitějších je 10 - 12 nukleotidů, které specificky párují s cílovým místem a sousedí s vazebným místem PAM proteinové domény. O určitých nespecifických štěpeních může rozhodovat konkrétní buněčný typ, na kterém se metodicky musí editační nástroj vyladit. Při zvyšování specifity a eliminaci nežádoucích zásahů se někdy přistupuje ke snižování množství

²⁶ Srov. ADLI, Mazhar. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature communication* 2018, roč. 9, č. 1911, s. 1–13.

²⁷ Srov. HSU, Patrik D. – SCOTT, David A. a kol. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology* 2013, roč. 31, č. 9, s. 827–832.

²⁸ Srov. CHAKRABARTI, Anob M. a kol. Target-specific precision of crispr-mediated genome editing, *Molecular cell* 2019, roč. 73, č. 4, s. 699-713.

aktivního CAS9 proteinu, čímž však také dochází ke snižování požadovaných štěpení v buněčné populaci.

Případně se využívá CAS9 nikáza, která zavádí jenom poziční jednovláknové štěpení.²⁹ Dále se využívá úprava 5' konce sgRNA, nebo třeba fúze restriktázy FokI s katalyticky inaktivním proteinem CAS9.³⁰ Zajímavým přístupem pro zvýšení specifity je strukturně řízené proteinové inženýrství, konkrétně postupná substituce aminokyseliny alaninu ve vazebném žlábků PAM domény CAS9 pro zvýšení specifity Cas9 u bakterie *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). Zde za pomoci cíleného hlubokého sekvenování

a analýzy nespecifických míst štěpení jednotlivých alaninových mutantů SpCas9 autoři demonstrují, že zvýšená specifita vybrané varianty SpCas9 (eSpCas9) snižuje účinky nespecifických zasažení a udržuje stabilní štěpení v požadovaném místě. Tak, by eSpCas9 varianta mohla být široce užitečná pro aplikaci v účinné editaci genomu, která vyžaduje vysokou úroveň specifity.³¹

V procesu je také potřeba zohlednit určité faktory, které ovlivňují terapeutickou úspěšnost v případě daného buněčného typu. Klíčová je celková kondice buněčné kultury, která má být předmětem terapeutického zásahu editačním nástrojem. Dalším kritériem je volba editační strategie a volba následné genové opravy buď NHEJ anebo HDR. Při studiu genů se využívá jeho cíleného narušení díky zavedení dvouvláknového zlomu. Dvouvláknový zlom je zaveden ve specifickém místě a může být opraven dvěma způsoby: buď NHEJ, tedy nehomologické spojení rozpojených řetězců s odstraněním anebo nespecifickou inzercí nukleotidů v místě štěpení. Druhým způsobem je homologická přímá oprava, HDR.

V případě NHEJ dochází k zavedení mutace, která narušuje čtecí kód pořadí nukleotidů. Inaktivace takto poškozeného genu dochází prostřednictvím degradace transkriptu poškozeného genu molekulárním komplexem NMD, který rozeznává nesmyslné a chybné mRNA a zabezpečuje kontrolu a translaci těch správných transkriptů. Pokud by však došlo k translaci chybné mRNA, výsledkem by byl nefunkční protein, který by byl označen a následně proteolyticky degradován. Pro tyto operace má buňka

²⁹ Srov. RAN, Ann F. a kol. Double nicking by rna-guided crispr cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 2013, roč.154, č. 6, s. 1380-1389.

³⁰ Srov. TSAI, Shengdar Q. a kol. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nature biotechnology* 2014, roč. 32, č. 6, s. 569–576.

³¹ Srov. SLAYMAKER, M. Ian a kol. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* 2016, roč. 351, č. 6268, s. 84–88.

velice dobře vyvinutý systém kontroly, kdy zkouší správnou a vhodnou proteinovou konformaci před vlastním proteinovým exportem. NHEJ způsob se v molekulární biologii nejčastěji využívá k zanesení mutací v důsledku nehomologického spojení po štěpení. Tím se gen vyřadí z funkce, a tak je možné sledovat důsledky absence tohoto poškozeného genu v buňce.³²

Druhou cestou, jak se buňka dokáže vypořádat se zavedeným dvouřetězcovým zlomem v kódující oblasti genu je, HDR. Ta probíhá za přítomnosti exogenní sekvence homologické k místům štěpení a procesem homologické rekombinace dojde k nahrazení cílové sekvence za exogenní. Tak může dojít k opravě určité genové mutace, která je tímto způsobem nahrazena exogenní správnou formou. Mezi zavedené mutace patří delece, inserce, substituce určitého nukleotidu.

NHEJ a HDR se od sebe významně odlišují svojí účinností. Tato účinnost závisí na několika faktorech: buněčný typ a fáze, ve které se buňka nachází během buněčného cyklu. NHEJ je několikrát preferovanější způsob opravy než HDR. Oprava genu a nahrazení chybné genové varianty formou správnou je proces molekulárně a pro buňku energeticky mnohem náročnější, než pouhé a rychlé, častěji buňkou preferované spojení konců s následnou inaktivací genu. NHEJ forma opravy je mnohem pravděpodobnější během celého buněčného cyklu, proto ji můžeme pozorovat jak v mitotických, tak v post-mitotických buňkách. HDR forma opravy je mnohem více buňkou preferována ve stavu S/G2 fáze buněčného cyklu. Tedy ve stavu aktivního buněčného dělení. Proto mnohé procedury výměny a opravy genů vyžadují populaci buněk v dělicím se stadiu.³³

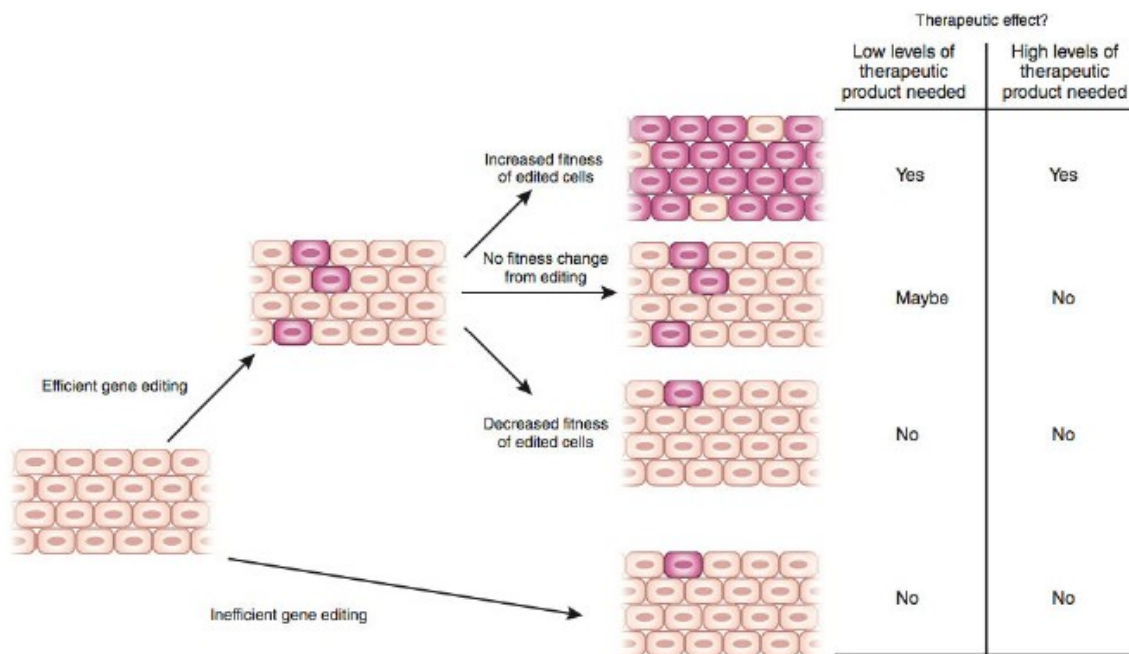
Samozřejmě velkou výzvou v mutagenních postupech je zvýšení účinnosti HDR nad NHEJ, což jsou považovány za nerovnoměrně silné kompetitivní molekulární dráhy opravy DNA. Navíc HDR je esenciální při klíčové dráze CRISPR/CAS9.

Dalším z terapeutických faktorů, ovlivňujících účinnost CRISPR/CAS9 je způsob dopravení molekul CRISPR/CAS9 do konkrétního buněčného typu. Z toho důvodu je velice důležité zvolit správnou kombinaci přístupů a terapeutickou strategii, aby bylo modifikováno dostatečné množství buněk v cílové buněčné populaci, a tím došlo ke kýženému terapeutickému projevu (obr. 4).³⁴

³² Srov. HENTZE, Matthias W. – KULOZIK, Andreas E. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 1999, roč. 96, č. 3, s. 307–310.

³³ Srov. CHAPMAN, Ross J. a kol. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular cell* 2012, roč. 47, č. 4, s. 497-510.

³⁴ Srov. COX, David B. T. – PLATT, Jeffrey R. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nature medicine* 2015, roč. 21, č. 2, s. 121–131.



Obr. 4 Buněčné faktory ovlivňující terapeutickou úspěšnost. Aby byla genomická editační terapie účinná, musí v tkáni existovat dostatek buněk nesoucích požadovanou genomovou modifikaci, aby se zvrátilo onemocnění. Pokud je editace efektivní, ošetření vytvoří populaci buněk nesoucích požadovanou genomickou modifikaci (zobrazenou růžovou barvou). V závislosti na tom, zda editační událost vytváří v cílových buňkách změnu kondice, upravené buňky se úměrně zvýší nebo sníží relativně k neupraveným buňkám (znázorněným hnědě) v průběhu času v tkáních. Poměrně vysoké úrovně buněk nesoucích terapeutické genomové modifikace v tkáni postižené onemocněním pravděpodobně povedou k terapeutickému účinku. Pokud jsou však pro zvrácení onemocnění zapotřebí nízké hladiny sekretovaného genového produktu, pak může být úspěšné editování malého počtu buněk terapeuticky účinné. Převzato Cox D. B. T. – Platt J. R., 2015.³⁵

Jak již bylo uvedeno, účinnost, s jakou se dosáhne terapeutického efektu za použití editačního nástroje CRISPR/CAS9 se také odvíjí od konečné strategie aplikace molekul do cílové tkáně. Jsou dva známé přístupy: *ex vivo* a *in vivo*, přičemž editační molekuly mohou být dopraveny do buněk buď ve formě nukleových kyselin kódujících editační nástroj anebo ve formě samotných proteinů.

Při úpravě *ex vivo* jsou buňky konkrétní tkáně vyjmuty z pacienta, upraveny v laboratorních podmínkách a poté znovu vráceny do tkáně. Aby byl tento způsob léčby úspěšný, musí být cílové buňky schopny přežít mimo tělo a po úpravě *in vitro* následně transplantovány do cílové hostitelské tkáně. V tomto případě je možné použít širokou škálu molekulárních transferních přístupů jako je elektroporace, kationtové lipidy, penetrační peptidy nebo karbonová nanovlákná. Editace *ex vivo* vykazuje mnohem vyšší účinnost než *in vivo*, a to z důvodu efektivní kontroly celkového množství terapeutických

³⁵ Srov. tamtéž, s. 128.

molekul a z důvodu možnosti kontroly stavu a kondice buněčné kultury. Regulace a kontrola těchto parametrů je důležitá při možných editačních zásazích mimo cílovou sekvenci.³⁶ Nejtěžší výzvou pro *ex vivo* terapii je zachování životaschopných lidských kmenových buněk po vyjmutí z organismu, dále během kultivace, při které může docházet ke ztrátě životaschopnosti nebo důležitých fyziologických vlastností buněk. I když je třeba terapeutický zákrok proveden úspěšně, při návratu upravených buněk je velké riziko, že je organismus nerozpozná jako vlastní. Tím dochází k jejich eliminaci.

Terapie *in vivo* zahrnuje úpravu genomu buněk *in situ*, tedy přímo v těle. Tato aplikace je zatím v případě CRISPR/CAS9 jenom hypotetickým přístupem. Pro systémovou terapii *in vivo* je charakteristická přímá aplikace editačního nástroje a všech potřebných molekulárních komponent přímo do těla pacienta za použití činidel, která jsou buď relativně nespecifická vůči buněčnému typu nebo fázi cyklu, a tak dochází k provedení editace v široké škále typů tkání anebo za užití specifických činidel, čímž dochází k editaci jenom v konkrétní specifické tkáni. *In vivo* aplikace může být potenciálně mutagenní a je více nepředvídatelná. Její velkou výhodou oproti *ex vivo* terapii však, je možné zasažení jakéhokoli buněčného typu, čímž se překonává *in vitro* fáze kultivace a riziko snížené životaschopnosti buněčné populace a také riziko eliminace upravených buněk po návratu do hostitelského organismu. Tímto přístupem je možné terapeuticky léčit onemocnění, která postihují více orgánů, protože *in vivo* terapií je možné zasáhnout širší orgánové spektrum. Významnou bariérou v případě *in vivo* strategie je odpověď imunitního systému, jak na transgen, tak na peptidy molekulárního nástroje, které se prezentují na povrchu buněk. To vše se zjišťuje na úrovni preklinických testů. Další otázkou je také vhodné množství injektáže nukleáz do organismu, aby nedocházelo k nespecifickým štěpením.³⁷

Vhodná účinnost, specifická nukleázového štěpení a eliminace rizika nespecifických štěpení nukleoproteázového komplexu CRISPR/CAS9 jsou velmi důležitými faktory, které rozhodují o bezpečnosti metody. Potenciální nespecifické mutace, které by editační nástroj mohl do buněčné populace zanést svojí sníženou specificitou, by mohly případně ovlivnit expresi onkogenů nebo snížit celkovou kondici buněčné populace. Onkogenní mutace vzniklé editací mimo cílovou sekvenci mohou vést k růstu a expanzi editovaných

³⁶ Srov. HSU, Patrik D. – SCOTT, David A. a kol. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases, s. 830.

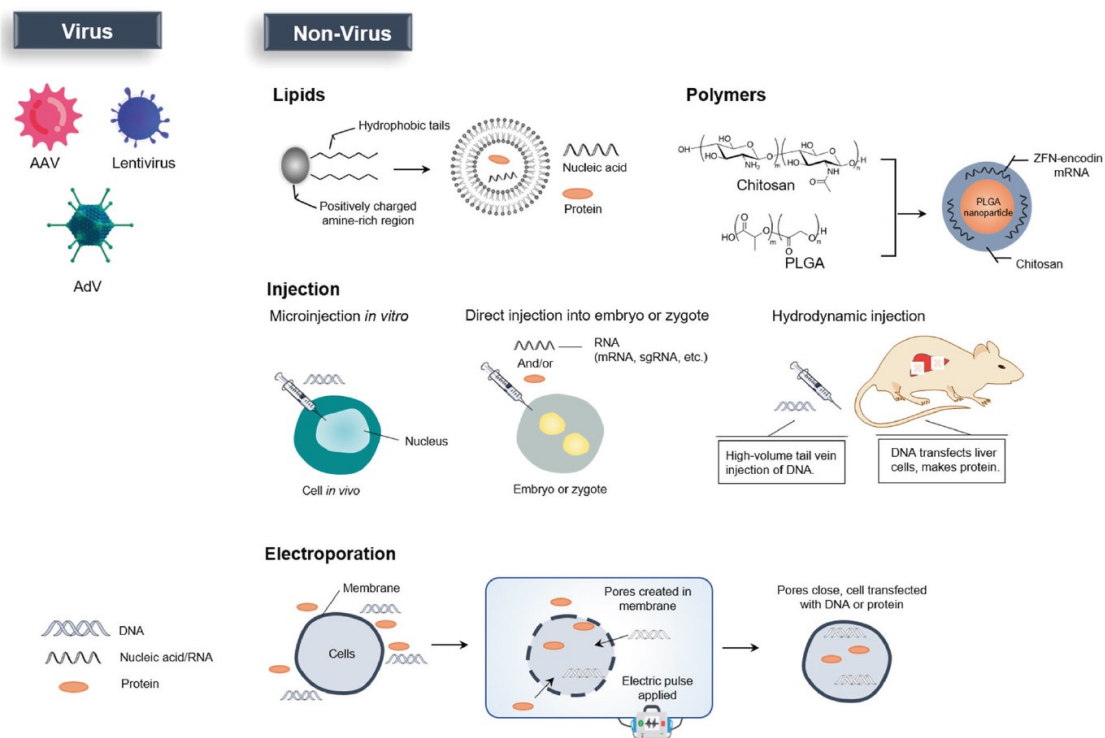
³⁷ Srov. COX, David B. T. – PLATT, Jeffrey R. Therapeutic genome editing: prospects and challenges, s. 127.

buněk, a tak i nízká míra nescificky cílené mutageneze by mohla mít velmi nebezpečné důsledky.

Dalším kritickým faktorem je způsob dopravení editačních molekulárních nástrojů ve formě nukleové kyseliny nebo proteinů do buněk. Na výběru metody se odvíjí buď krátkodobá anebo dlouhodobá exprese nástroje v cílových buňkách. Pro *ex vivo* aplikaci by jedním ze způsobů přenosu vektorů nesoucích editační systém, mRNA, nebo proteinů mohla být elektroporace. Samozřejmě lze použít integračně kompetentní lentivirové vektory, které však nesou riziko nebezpečné integrace do transkripčně aktivních oblastí. Dále může být použita metoda pronikajících peptidů anebo chemické konjugace.

Pro *in vivo* aplikaci jsou zvláště výhodné vektory odvozené od adenovirů. Jejich výhodou je vysoká účinnost přenosu do specifických tkání jako je oční tkáň, mozek, játra anebo svaly. Nevýhodou je malá přenosová kapacita a případná agresivnější imunitní odpověď proti specifickým serotypům. Možnými alternativami jsou využití nanoparticulární konjugace, případně lipidické anebo proteinové importní molekulární komplexy.³⁸ Přehled jednotlivých způsobů dopravení editačního nástroje CRISPR/CAS9 znázorňuje obr. 5.

³⁸ Srov. tamtéž, s. 129.



Obr. 5 Metody dopravení editačního molekulárního nástroje do buněk. Používají se dvě strategie, virová a nevirová cesta. U virové se využívají virové vektory jako adenovirové, přídružené adenovirové a lentivirové vektory. U nevirových strategií se využívá několika strategií: lipidové a polymerní partikule, mechanická mikroinjekce a elektroporace. Převzato Li H. a kol. 2020.³⁹

1.5. CRISPR/CAS9 v základním a aplikovaném výzkumu

Následující podkapitola přiblíží konkrétní a praktické využití editačního nástroje CRISPR/CAS9 v základním a aplikovaném výzkumu. Molekulární nástroj CRISPR/CAS9 je sofistikovaným molekulárním nástrojem pro cílenou editaci genomu, což je také jeho primární cíl. Existují však nejrůznější přístupy a využití tohoto nástroje, které označujeme jako CRISPRy nové generace. Většinu z nejdůležitějších přístupů schematicky znázorňuje obr. 6. Je však téměř nemožné obsáhnout molekulární užití metody CRISPR/CAS9 a její variací a modifikací, proto budou naznačeny jenom základní molekulární strategie.

Kromě editace lidského genomu, kde musí být zachována restriční aktivita katalytického místa CAS9 proteinu, tedy obou dvou štěpících katalytických domén HNH a RuvC, které jsou klíčové pro zavedení dvouvláknového zlomu v oblasti PAM domény Cas9 proteinu, zavedením bodové mutace buď do jedné nebo do druhé domény dochází

³⁹ LI, Hongyi a kol. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal transduction and target therapy* 2020, roč. 5, č. 1, s. 16.

k tomu, že takhle upravený protein Cas9 štěpí v daném místě jenom jedno vlákno DNA. Mluvíme o tzv. nCas9 – nikáza Cas9. Zavedením mutace v obou štěpících proteinových doménách Cas9 proteinu dochází ke katalytické inaktivaci endonukleázové aktivity obou podjednotek, čímž se využívá specifické vazby deaktivovaného CRISPR/dCAS9 komplexu k vazbě na cílovou sekvenci DNA. Tím tedy nedochází ke štěpení cílové sekvence, ale k navedení nejrůznějších modifikátorů, které jsou fúzovány s deaktivovaným proteinem dCAS9. Mezi tyto modifikátory řadíme třeba aktivátory nebo represory genové exprese, čímž je možné velice snadno sledovat zvýšenou, nebo sníženou expresi genu.⁴⁰

Dále je to epigenomická editace, jejíž podstata tkví v navádění nejrůznějších histonových modifikačních enzymů nebo enzymů modifikujících DNA do specifického místa genu nebo jeho regulační oblasti. Tyto enzymy mohou lokálně svými posttranslačními modifikacemi, jako je acetylace a metylace určitých aminokyselinových zbytků N konců histonů a v případě DNA metylace cytozinů, ovlivnit otevřenější nebo uzavřenější chromatinový stav a tím aktivovat, nebo deaktivovat genovou expresi.^{41,42,43,44} Dále se deaktivovaný molekulární nástroj CRISPR/CAS9 využívá v nejrůznějších zobrazovacích a topologických chromatinových technikách.^{45,46}

Dalším přístupem je bodová editace nukleotidů. Nikázová forma CAS9 proteinu zavádí enzym citidin deaminázu APOBEC k cílové sekvenci. Následně dochází k jednovláknovému štěpení a odstranění amino skupiny z cytozinu za vzniku tyminu, a tím k zavedení možného stop kodonu v transkriptu daného genu. Tímto krokem gen druhotně vyřadíme z funkce na úrovni translace.⁴⁷ Posledním je mapování RNA transkriptů, za pomoci proteinu CAS13.⁴⁸

⁴⁰ Srov. QI L.S. a kol. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequencespecific control of gene expression. *Cell* 2013, roč. 152, č. 5, s. 1173–1183.

⁴¹ Srov. tamtéž, 1173–1175.

⁴² Srov. STEPPER, Peter a kol. Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L methyltransferase. *Nucleic acids research* 2017, roč. 45, č. 4, s. 1703–1713.

⁴³ Srov. LIU, Shawn X. a kol. Editing DNA methylation in the mammalian genome. *Cell* 2016, roč. 167, č. 1, s. 233–247.

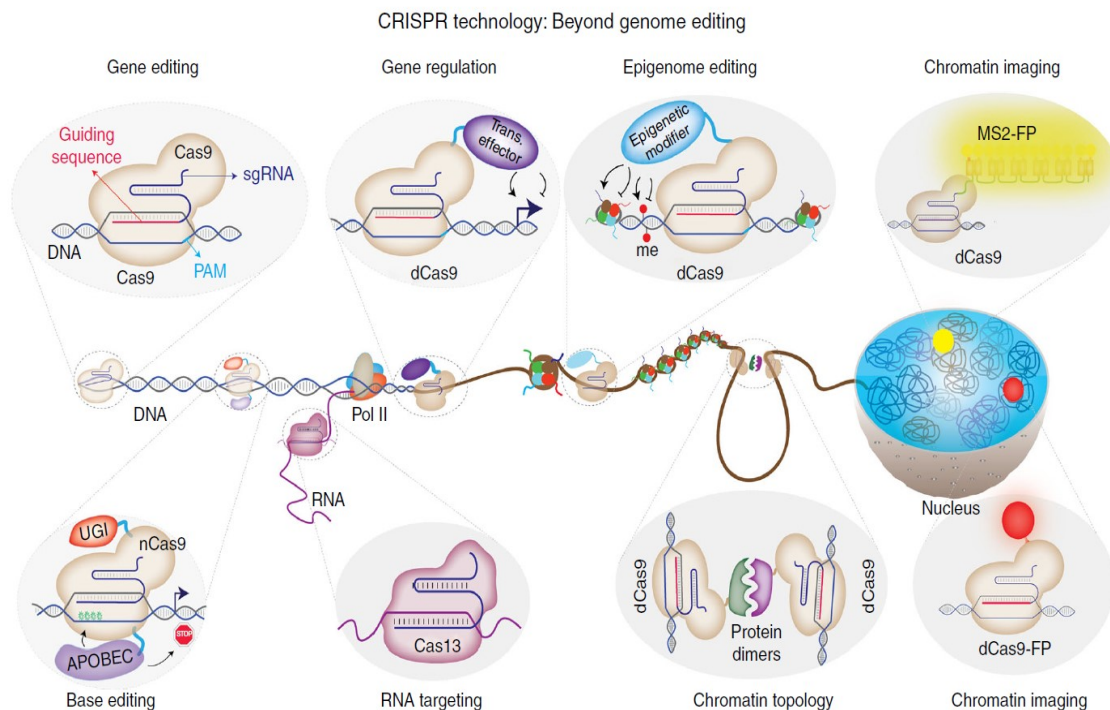
⁴⁴ Srov. KWON, Deborah Y. a kol. Locus-specific histone deacetylation using a synthetic CRISPR-Cas9-based HDAC. *Nature communication* 2017, roč. 8, č. 15315.

⁴⁵ Srov. MA, Hanhui a kol. Multicolor CRISPR labeling of *chromosomal loci* in human cells. *Proceedings of the National academy of sciences USA* 2015, roč. 112, č. 10, s. 3002–3007.

⁴⁶ Srov. DENG, Wulan. Reactivation of developmentally silenced globin genes by forced chromatin looping. *Cell* 2014, roč. 158, č. 4, s. 849–860.

⁴⁷ Srov. KOMOR, Alexis a kol. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 2016, roč. 533, č. 7603, s. 420–424.

⁴⁸ Srov. DOENCH, John. Am I ready for CRISPR? A user's guide to genetic screens. *Nature reviews genetics* 2018, roč. 19, č. 2, s. 67–80.



Obr. 6 Nejvýznamnější oblasti využití molekulárního nástroje CRISPR/CAS9. Uprostřed se nachází rozpletené chromatinové vlákno. V jednotlivých zvětšených kruzích můžeme vidět využití CRISPR/CAS9 k různým molekulárním účelům. Horní řádek: editace lidského genomu s plně funkční katalytickou aktivitou proteinu CAS9; zavedení transaktivátoru do blízkosti genu, jehož expresi se bude regulovat; epigenomický editing; chromatinové mapování. Spodní řádek: katalyticky inaktivní nikáza CAS9 vytváří základ pro nukleotidovou editaci bez zavedení dvojitých zlomů; zacílení mRNA vznikající při transkripci genu a její sledování za pomoci CAS13 proteinu; dále jsou to techniky pro chromatinovou topologii a chromatinové značení za pomoci fluorescenčních barviček. Převzato Adli M. 2018.⁴⁹

1.6. Mutagenní řetězová reakce – Gene-drive

Editační nástroj CRISPR/CAS9 se stává podkladem pro vývoj dalších a dalších mnohem sofistikovanějších biomolekulárních strategií. Jedním z těchto postupů je tzv. metoda mutagenní řetězové reakce, neboli gene-drive, která si nepochybně zaslouží detailnější vysvětlení. Jedná se o geniální molekulární strategii, díky které je možné šířit požadovanou terapeutickou mutaci genu v cílové populaci napříč generacemi, a tak uniknout principům klasické dědičnosti.

1.6.1. Klasická dědičnosti podle Mendela a pohlavně vázaná dědičnost

Nejdříve budou velice stručně představeny základy dědičnosti podle Mendela, které jsou klíčové k pochopení metody. Každý gen je v organismu zastoupen ve dvou kopiích.

⁴⁹ Srov. ADLI, Mazhar. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond, s. 5.

Jedna kopie neboli alela se nachází na chromozomu od otce a druhá se nachází na chromozomu od matky. Alela může být dvojího typu, a to buď recesivní anebo dominantní. Jak recesivní, tak dominantní alela má svůj charakteristický vnější projev neboli fenotyp. Po oplodnění tedy mohou nastat kombinace, kdy obě přítomné alely téhož genu v daném potomkovi jsou recesivní. Takový organismus označujeme jako recesivní homozygot. Pokud jsou obě alely dominantní, jedná se o dominantního homozygota. V případě, kdy potomek má kombinaci recesivní a dominantní alely v daném genu označujeme ho heterozygotem. Pokud se kříží recesivní homozygot s recesivním homozygotem, potomstvo je uniformní a ve 100 % recesivním homozygotem. Pokud se kříží dominantní homozygot s dominantním homozygotem, potomstvo je opět uniformní a ve 100 % dominantním homozygotem. Když dochází ke křížení homozygota dominantního a homozygota recesivního potomstvo je opět uniformní, a to ve 100 % tentokrát heterozygotní, protože dochází ke kombinaci alel recesivní a dominantní ve stejném poměru. Pokud bychom křížili homozygota recesivního s heterozygotem vznikne v potomstvu 50 % heterozygotů a 50 % homozygotů recesivních. V případě křížení homozygota dominantního s heterozygotem vznikne 50 % heterozygotů a 50 % homozygotů dominantních. A poslední kombinací je křížení heterozygota s heterozygotem. V tomto případě je potomstvo nejpestřejší. Vzniká 25 % potomků homozygotně dominantních, 50 % je heterozygotů a 25 % homozygotně recesivních potomků.

Mendelovskou dědičností se dědí v případě člověka 4633 monogenetických onemocnění, kdy mutace v jednom konkrétním genu vyvolává fenotyp onemocnění.⁵⁰ Za propagaci daného onemocnění je tedy odpovědná přítomnost alely s konkrétní mutací. V případě, že nositelem onemocnění, tedy určité mutace, je recesivní alela, postiženým bude vždy homozygotně recesivní jedinec. V případě heterozygota bude přenašečem recesivní alely, ale díky přítomnosti dominantní alely se fenotypově nebude lišit od zdravého jedince. V případě vzácných onemocnění vázaných na dominantní alelu dojde k manifestaci onemocnění jak u dominantního homozygota, tak u heterozygota, jediným zdravým bude recesivní homozygot.

Dalším typem dědičnosti je pohlavně vázaná dědičnost, tedy dědičnost vázaná na geny umístěné na pohlavních chromozomech. Nejtypičtějším příkladem je recesivní onemocnění vázano na X chromozom, hemofilie typu B. Hemofilie způsobuje mutaci

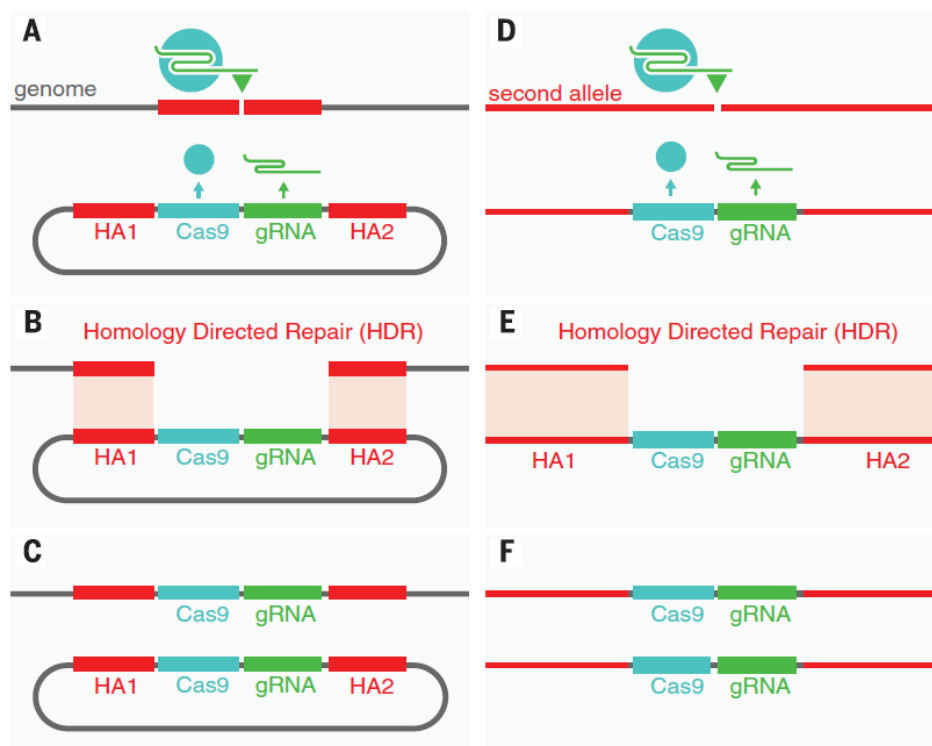
⁵⁰ Srov. Online mendelian inheritance in man. *Gene map statistics* (10.5.2022) [2022-02-20]. <<https://omim.org/statistics/geneMap>>.

v genu pro srážlivost krve, hemokoagulační faktor IX, který se nachází na X chromozomu. Ženy jsou obvykle přenašečky tohoto onemocnění. V případě že maminka je přenašečka recesivní alely, je tedy 25% pravděpodobnost, že se jí narodí jeden zdravý syn a druhý nemocný, jedna úplně zdravá dcera a jedna dcera přenašečka.

1.6.2. Princip mutagenní řetězové reakce

V roce 2015, tedy necelý rok poté, co Charpentier a Doudna publikovaly mechanismus CRISPR/CAS9, byla publikována zásadní práce Ganze a Biera. Autoři dokázali na základě principu molekulárního nástroje CRISPR/CAS9 zavést v populaci mušek octomilek *Drosophilla melanogaster* autokatalytickou, jakousi samořízenou mutagenезi, kterou se zavedená mutace v populaci neztrácí vlivem dědičnosti, nýbrž se rozšiřuje v potomstvu. Autorům se podařilo nevídané. V případě heterozygota, došlo k převodu heterozygotní mutace na homozygní mezi homologickými chromozomy ve většině somatických buněk a buněk germinální linie. Metoda fungovala s velmi vysokou – až 95 % úspěšností.⁵¹ Strategie úspěšného experimentu spočívá v navržení plazmidového konstruktů, který obsahuje *cas9* gen, dále průvodcovskou sgRNA a hraniční kazety ke Cas9-sgRNA, které jsou homologické k okrajovým cílovým sekvencím po zavedení dvouvláknového štěpení v cílovém místě (obr. 7). Tím dochází k narušení genu a na základě homologické rekombinace dojde k opravě místa štěpení prostřednictvím vložení kazety CAS9-sgRNA. Zavedením mutace je gen vyřazen z provozu. Tato kazeta tam pochopitelně setrvává, ba co víc na základě další homologické rekombinace v průběhu oplození se dostává i do sesterského chromozomu, tedy na místo druhé alely, kterou mění. Tím dochází k vyřazení principů klasické dědičnosti monogenetických znaků. Pokud je mutace zavedena v ranním embryonálním stadiu, téměř každá buňka tohoto organismu bude nositelem zavedené mutace a bude stabilní v průběhu populace.

⁵¹ Srov. GANTZ, Valentino M. – BIER, Ethan. The mutagenic chain reaction: method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science* 2015, roč. 348, č. 6233, s. 442–444.



Obr. 7 Schéma naznačující mutagení řetězovou reakci (MCR – mutagenic chain reaction). Jako výchozí produkt vidíme plazmid sestávající z kazety nesoucí Cas9 transgen, sgRNA pro zacílení na sledovanou genomickou sekvenci a lemující homologická ramena odpovídající genomické sekvenci přiléhající k cílovému štěpicímu se místu. Z plazmidu se produkuje jak CAS9, tak sgRNA, které se seskládají do aktivní formy a dochází ke dvouzlomovému štěpení v cílové sekvenci (schéma A-B). Na základě homologické přímé opravy dojde k vložení kazety Cas9-gRNA z plazmidu do požadovaného místa (schéma C). Tak se úspěšně zavede mutace do požadovaného místa. Když se následně při oplodnění potkají jedna mutovaná alela a druhá ne, dojde na základě homologické rekombinaci k vložení Cas9-sgRNA kazety i to druhé alely, čímž se z heterozygotní mutace stává homozygotní (schéma D-F). Převzato Ganz V. M. – Bier E., 2015.⁵²

Technologie mutagení řetězové reakce neboli gene drive, by měla být použitelná pro genetické manipulace nejrůznějších organismů. Urychluje genetickou manipulaci, představuje silný a velice efektivní systém pro dodávání transgenů v populacích a jejich stabilnímu šíření. Má velký potenciál v boji proti nejrůznějším chorobám a škůdcům a případně slouží jako specifický doručovací nástroj pro strategie genové terapie v boji proti nejrůznějším geneticky podmíněným onemocněním. Tímto nástrojem je možné zavádět a udržovat stabilní inserční a deleční mutace v kódující částí genů a vytvářet mutace regulační. Základním cílem metody je tedy stabilita zavedené mutace, která se rozšiřuje v populaci nezávisle na dědičnosti.

⁵² Srov. GANTZ, Valentino M. – BIER, Ethan. The mutagenic chain reaction: method for converting heterozygous to homozygous mutations, s. 443.

Asi je možné tušit, že tento nástroj přináší velmi velké nebezpečí možného zneužití. Existuje množství studií na modelových organismech. Je však obrovským rizikem, když se manipulované organismy se dostanou do přirozené populace, kde dojde k masivnímu šíření transgenů, čímž dojde ke zvýhodnění nebo potlačení určitých genů v populaci. Velice až téměř markantním příkladem je snaha o zastavení šíření malárie, kterou přenáší prvek *Plasmodium* prostřednictvím komárů rodu *Anopheles*.⁵³ Při aplikaci gene-drive by pyramidovým efektem docházelo k rozšiřování transgenů, které by byly letální pro samičky. Důsledkem tohoto postupu by bylo úplnému vybití rodu *Anopheles*. Není možné dohlédnout, co by vymizení tohoto druhu na druhé straně však znamenalo pro celkový přírodní ekosystém. A na druhé straně jsou statistiky neúprosné, na malárii umírá každé dvě minuty jeden člověk. Jak se nejenom k této otázce postavit? Je zřejmé, že postupně se otvírá prostor pro důležité otázky s ne úplně jasným řešením.

1.7. Vědecký pokrok a fenomén syntetické biologie

Molekulární editační nástroj CRISPR/CAS9 by mohl být nepochybně klíčový pro syntetickou biologii. Syntetickou biologii se rozumí progresivní vědní biotechnologický obor, který zahrnuje přepracování organismů na genetické úrovni tak, aby získaly nové vlastnosti využitelné v biotechnologické a biomedicinské praxi. Syntetická biologie se zabývá pochopením nejrůznějších funkcí různých biologických systémů v přirozeném prostředí a tyto poznatky pak využívá na záměrný cílený design nově vytvořených neboli umělých anebo pozměněných biologických systémů s konkrétními funkcemi. Syntetická biologie zahrnuje několik aspektů výzkumu. Jedná se o přípravu minimálních syntetických životaschopných biologických systémů, jako jsou buňky, organismy, nebo malé genomy – tak je tomu třeba u virů. Dále je to hloubková identifikace a použití biologických částí a vytvoření funkčního souboru biologických nástrojů. A pak je to konstrukce zcela nebo částečně umělých biologických systémů.⁵⁴ Syntetická biologie si klade za cíl vyrábět umělé biologické komponenty a systémy, a dokonce i živé organismy, které v přírodě neexistují. Dostupné definice zároveň kladou důraz na metodologii.

⁵³ Srov. HAMMOND, Andrew a kol. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature biotechnology* 2016, roč. 34, č. 1, s. 78–83.

⁵⁴ Srov. European group on ethics in science and new technologies in the European Commission. *Ethics of synthetic biology*, roč. 25, s. 13, (17.2.2010) [2022-02-25].
<<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/c9b00815-2268-4ba7-bdfe-59d96dfb1f5d/language-en/format-PDF/source-77404369>>.

Metody dříve používané v různých biotechnologiích se zdají být příliš řemeslné, pokusné a časově náročné. Specialisté na syntetickou biologii se snaží vybudovat skutečné „inženýrství“ živých organismů, strukturovaným způsobem s využitím metod vycházejících z inženýrské vědy a praxe, zejména matematického modelování a počítačové simulace. Cílem je dokončit racionální návrh a testování nových biologických systémů před pokusem o jejich vybudování pomocí genetického inženýrství, syntetické chemie nebo jiných technologií, a následně posoudit jejich zájem a jejich dopad na zdraví, životní prostředí nebo společnost.⁵⁵

Jaký je vlastně rozdíl mezi editací genomu a syntetickou biologii? V některých ohledech je syntetická biologie podobná editaci genomu, protože oba přístupy zahrnují změnu genetického kódu organismu; nicméně, někteří vědci dělají rozdíl mezi těmito dvěma přístupy založený na tom, jak se tato změna provádí. V syntetické biologii vědci obvykle spojují dlouhé úseky DNA a vkládají je do genomu organismu. Těmito syntetizovanými kousky DNA mohou být geny, které se nacházejí v jiných organismech, nebo mohou být zcela nové. Při editaci genomu vědci obvykle používají nástroje k provádění menších změn ve vlastní DNA organismu, jako třeba CRISPR/CAS9. Nástroje pro editaci genomu lze také použít k odstranění nebo přidání malých úseků DNA v genomu.

Další důležitou otázkou je, jestli jsou vědci schopni syntetizovat nový genom? Odpověď zní ano, to již bylo provedeno. V roce 2002 vědci ve Spojených státech poprvé syntetizovali virový genom. Virové genomy jsou mnohem menší ve srovnání s genomy většiny bakterií a mikroorganismů. Vědci ukázali, že je možné vytvořit virus dětské obrny od nuly, a upozornili na riziko, že by syntetická biologie mohla být použita k vývoji biologických zbraní. I když tato skupina výzkumníků neměla v úmyslu svým výzkumem ublížit, jejich práce pochopitelně vyvolala obavy, že by špatní aktéři mohli používat syntetickou biologii ke zlým účelům. Je tedy důležité se ptát, jaké jsou etické a sociální důsledky těchto a podobných tendencí? V případě, že by tento výzkum byl zneužit, představoval by významnou hrozbu pro veřejné zdraví a bezpečnost, zemědělské plodiny a jiné rostliny, zvířata, životní prostředí nebo národní bezpečnost.

Projekty, které navrhuje syntetizovat celé genomy, vyvolávají důležité etické otázky o potenciálních škodách a přínosech pro společnost. Mnoho etických otázek relevantních pro syntetickou biologii je podobných etickým diskusím souvisejícím s editací genomu.

⁵⁵ Srov. European group on ethics in science and new technologies in the European Commission, *Ethics of synthetic biology*, roč. 25, s.14–15.

Překračují lidé morální hranice přepracováním organismů pomocí technik syntetické biologie? Pokud syntetická biologie přinese nové způsoby léčby a vyléčení nemocí, kdo k nim bude mít přístup? Jaké jsou environmentální dopady zavádění modifikovaných organismů do ekosystémů? Takové etické otázky jsou předmětem výzkumu od počátku objevu lidského genomového projektu a budou dále zkoumány v souvislosti s tím, jak se technologie vyvíjí a mění. Většina vědců, etiků a politiků souhlasí s tím, že celá společnost musí diskutovat a zvažovat potenciální škody a přínosy syntetické biologie. Přední hlasy v bioetice, včetně Prezidentské komise pro studium bioetických problémů a Národní akademie věd, inženýrství a medicíny, vyjádřily důležitost zapojení veřejného dialogu do řízení vznikajících technologií syntetické biologie a úpravy genomu. Jak ukazuje syntéza viru obrny, existují také obavy týkající se biologické bezpečnosti související se syntetickou biologií. Federální program vybraných patogenních agens vlády USA reguluje držení vysoce rizikových infekčních agens, jako je obrna, pro výzkum a jiné účely. Navíc federálně financovaný výzkum, jako je výzkum podporovaný Národním institutem zdraví, který zahrnuje vysoce rizikové infekční agens, podléhá dodatečnému dohledu a řízení rizik, jak je stanoveno v zásadě „*Dual use research of concern*”⁵⁶. Obecněji řečeno, to znamená, že federální vláda má zavedenou politiku, kterou přísně koordinuje a reguluje nové biotechnologické výzkumu, aby tak dohlížela na uvádění produktů syntetické biologie na trh.⁵⁷

⁵⁶ Dual-use research of concerns je soubor pravidel popisujících výzkum, který má poskytnout jasný přínos, ale který by mohl být snadno zneužitelný k opačným a nebezpečným cílům.

⁵⁷ Srov. National human genome research institute. *Synthetic biology* [2022-02-10].
< <https://www.genome.gov/about-genomics/policy-issues/Synthetic-Biology>>.

2. Editace genomu lidských somatických buněk

Druhá kapitola pojednává o využití CRISPR/CAS9 v lidských somatických neboli tělních buňkách. Po představení hlavních terapeutických strategií využití editace genomu prostřednictvím CRISPR/CAS9, budou uvedena vybraná geneticky podmíněná onemocnění, která jsou v pokročilé fázi klinických studií. Tím bude dokázán velký potenciál genové terapie založené na editaci prostřednictvím CRISPR/CAS9.

Buňky organismu dělíme na buňky tělní neboli somatické a na buňky pohlavní neboli germinální. Somatická buňka je každá buňka organismu kromě buněk pohlavních. Dělí se mitotickým dělením, jsou jasně diferencovány a tvoří tkáň se specifickou funkcí. Tyto buňky si zachovávají dvojitou sadu chromozomů, tedy 23 párů. Somatické buňky vytvářejí v lidském organismu nejrůznější tkáně, které mají specifickou funkci, a tak dotvářejí homeostatické prostředí.

Progenitorové buňky, buněčné pohlavní prekurzory, jsou specifické tím, že jako tělní diploidní buňky se ve specifických nikách pohlavních žláz dělí meiotickým dělením za vzniku pohlavních buněk, tj. spermií a vajíček které mají jenom jednu sadu chromozomů, a proto jsou označovány jako haploidní.

Způsoby terapeutické aplikace editace na základě buněčného kritéria se tedy rozlišují na editaci somatických buněk, editaci buněk pohlavních a editaci buněk raného embryonálního vývoje.

Editace somatických buněk má několik důležitých charakteristik. Aplikace somatické editace genomu se výlučně váže na daný buněčný typ, který je předmětem genové terapie a nezasahuje buňky celého organismu. Není dědičná, tedy se dotýká jenom určitého konkrétního jedince, který tyto změny nepřenáší do dalších generací. Editace genomu somatických buněk je cílenou strategií genové terapie, která má za cíl vyléčit, nebo zmírnit projevy nějakého typu geneticky podmíněného onemocnění, které je vyvoláno určitou konkrétní mutací.⁵⁸ Monogenetická onemocnění jsou způsobena mutací jedné nebo obou kopií (alel) daného genu. Mezi nejvýznamnějšími monogenetickými onemocněními se uvádějí: hemofylie, svalová dystrofie, β -talasemie, cystická fibróza, Tay-Sachsova nemoc, myotonická dystrofie, neurofibromatóza, spinální svalová atrofie, srpková anémie, syndrom fragilního X chromozomu, fenylketonurie. K plné manifestaci

⁵⁸ Srov. NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE. *Human genome editing: Science, ethics and governance*. Washington, DC: The National academies press, 2017, s. 82

daného onemocnění přispívají různé vlivy jako prostředí nebo životní styl. Každopádně platí, že mutace musí být jasně spojena a s určitým fenotypem, tedy vnějším patologickým projevem. Pro studium těchto geneticky podmíněných onemocnění se využívají modelové organismy. V případě úspěšného vyvolání onemocnění v těchto organismech a jeho úspěšného léčení je možné, že metody a postupy takhle odpovědně prověřené genové terapie se stanou součástí klinických testů, což se samozřejmě už také děje.⁵⁹

2.1. Terapeutické editační strategie v léčení monogenetických onemocnění

Genová terapie využívající editaci genomu se neustále vylepšuje a vyvíjí. Tyto přístupy se týkají hlavně opravy, inaktivace nebezpečných mutací, zavedení ochranných mutací, vkládání terapeutických transgenů, ničení virové DNA. Specifická volba strategie použití molekulárního editačního přístupu závisí na povaze monogenetického onemocnění. Pro větší a systematictější přehled jsou uvedeny čtyři různé strategie využití editačního nástroje CRISPR/CAS9 v genové terapii monogenetických onemocnění (obr. 8).⁶⁰

Prvním případem jsou nemoci, u kterých dochází k expresi dominantního aberantního genu za vzniku patogenního proteinu. Jeho hromaděním dochází k propagaci onemocnění. Nejvýznamnějšími příklady jsou geny *htt* u Huntingtonovy nemoci a gen *fgfr3* u Achondroplazie. Cílem editace konkrétního genu je zásah ve specifické oblasti za vzniku dvouvláknového zlomu. Buněčnou opravou NHEJ dojde k náhodným delecím, případně insercím, čímž se daný gen inaktivuje. Tato inaktivace probíhá na dvou možných úrovních. Degradace mRNA s nesmyslným čtecím rámcem anebo degradace nefunkčního proteinu po případné translaci těchto nesmyslných mRNA (obr. 8a). Výsledkem editačního zásahu byly inaktivace aberantní genové alely, aktivace zdravé recesivní alely a obnovení funkcí. Druhou z možných editačních strategií je odstranění nebezpečného genu zavedením specifických dvou dvouvláknových zlomů v hraničních genových oblastech s následnou NHEJ opravou. Tato strategie by mohla být efektivní v případě Spinocelebrální ataxie, Huntingtonovy nemoci a Friedrichovy ataxie (obr. 8b). Ve všech případech se jedná o neurodegenerativní monogenetická onemocnění.

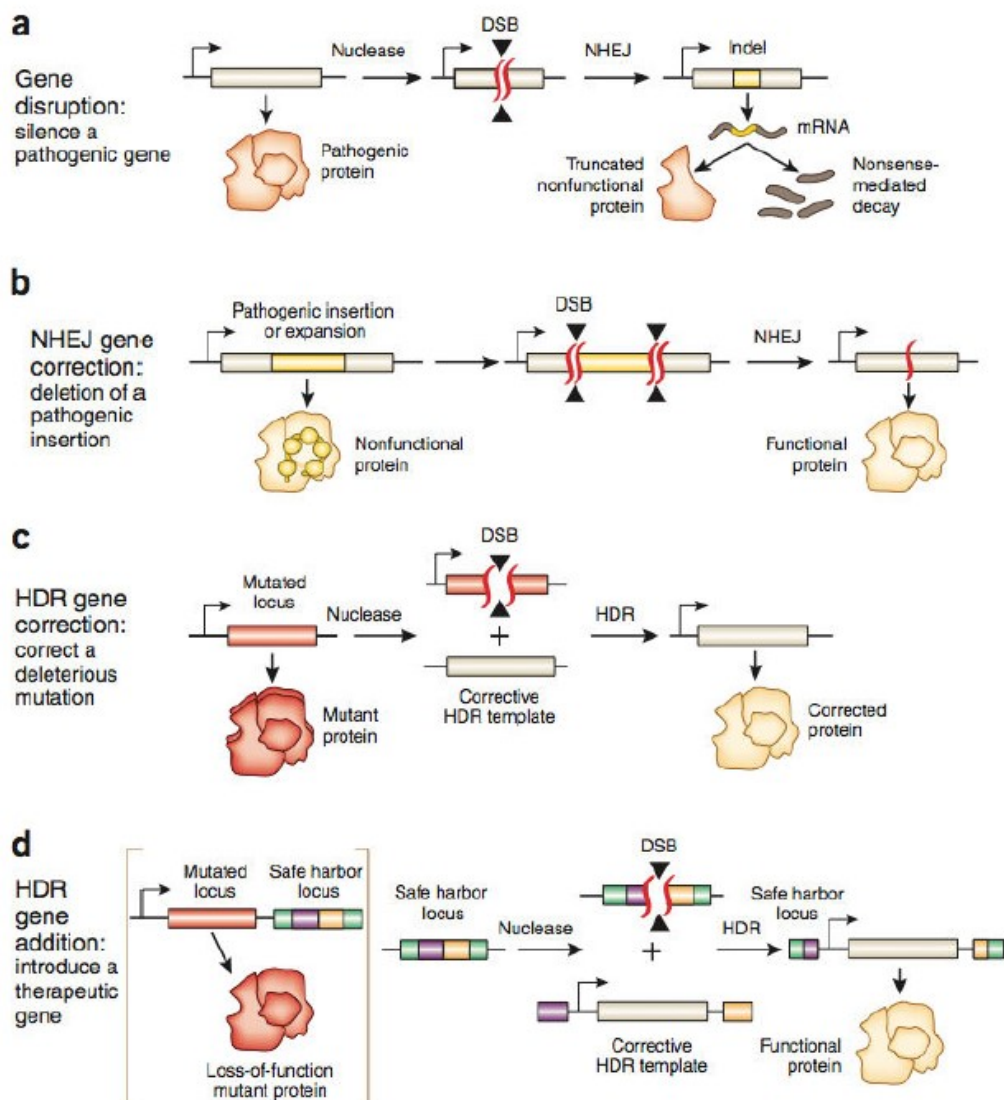
⁵⁹ Srov. tamtéž, s. 83.

⁶⁰ Srov. COX, David B. T. – PLATT, Jeffrey R. Therapeutic genome editing: prospects and challenges, s. 124.

V pořadí třetí je příklad Amyotrofické laterální sklerózy, kterou způsobuje nahromadění bodových mutací v genu *sod1*. Tím dochází k postupnému genovému znehodnocení až úplné ztrátě funkčního proteinu. Pro obnovu a zachování není možné použít strategii dvojitého zlomu a NHEJ opravy. Editace musí být navržena cestou HDR, čímž dojde k výměně poškozeného genu za zdravý, obnovení funkce genu a odstranění patogenní aktivity při zachování fyziologických hladin genové exprese (obr. 8c). Podobnou editační strategii je možné řešit Tay-Sachsovu nemoc, u které by bylo možné obnovit funkci genu při zavedení dvojitého zlomu ve specifickém místě genu a dodání homologické bezchybné génové části s následnou HDR opravou. Dalšími podobnými přístupy by bylo možné zamezit vstupu viru HIV do buněk v případě cílené editační mutagenese koreceptoru CCR5, který je klíčový jako koreceptor pro vstup viru do buňky. Anebo NHEJ inaktivace genu *pcsk9* u hypercholesterolémií, případně posílení funkce genu *app* u Alzheimerovy nemoci HDR opravou.⁶¹

Čtvrtá strategie je poněkud komplikovanější. Je velice podobná virové genové terapii. Jedná se o vložení kopie zdravého genu anebo výhodně mutovaného genu do oblasti nového bezpečného lokusu mimo cílový poškozený nebo úplně nefunkční gen, čímž by došlo k obnovení jeho funkce dálkově. Místo vložení musí být velice pečlivě vybráno, aby vložený gen neovlivňoval expresi sousedních genů a také nepodléhal obranným umlčovacím buněčným mechanismům. Modifikovaný editační nástroj CRISPR/CAS9 by se využil právě na cílené vložení zdravé formy genu. Významným příkladem je vložení genu pro chimerický antigenní receptor do T-lymfocytů, kterým by bylo možné dosáhnout zvrácení onemocnění u některých typů leukémií (obr. 8d).

⁶¹ Srov. tamtéž, s. 125.



Obr. 8 Typy terapeutických genomových editačních strategií. Převzato Cox D. B. T. – Platt J. R., 2015.⁶²

2.2. Využití CRISPR/CAS9 u somatických monogenetických onemocnění

Jedním z úspěšných editačních zásahů je terapeutické léčení vážné kombinované imunodeficiencie vázané na X chromozom (SCID-X1). Onemocnění je způsobeno mutací v genu *il2rgi*, který je klíčový pro zdravý vývoj T-lymfocytů ze svých hematopoetických buněčných prekurzorů. Postižení tímto onemocněním postrádají aktivní imunitu a musí žít v naprosto sterilním prostředí. Děti, které trpí syndromem, jsou známy také jako bublinové děti. Nejvýznamnějším případem takového dítěte je David Vetter, který žil

⁶² Srov. tamtéž, s. 128.

mezi lety 1971-1984. Prekurzory T-lymfocytů jsou schopny překonat vývojový blok a rozšiřovat se ke svým poškozeným protějškům, a tak zprostředkovat a zabezpečit terapeutickou nápravu onemocnění. U tohoto onemocnění byla díky CRISPR/CAS9 genové terapii prokázána až 20 % frekvence cílené integrace bez vedlejšího cytotoxického vlivu. Zároveň nebyly detekovány zásahy editačního nástroje mimo požadovanou sekvenci a také byla prokázána vysoká vazebná afinita CAS9 ribonukleoproteinového komplexu k cílové sekvenci. V případě modifikace CD34⁺ hematopoetických buněk je prokázána frekvence cílové integrace v medianu až 45 % a u šesti pacientů došlo k vyléčení onemocnění jak strategií *in vitro* terapie, tak *in vivo*.⁶³

Dalším z geneticky podmíněných onemocnění je hemofilie typu B. Jedná se o monogenetické onemocnění s dědičností vázanou na X chromozomu. Onemocnění je způsobeno mutací v genu, který kóduje hemokoagulační faktor IX. Ten je produkován hepatocyty a je esenciální v průběhu krevní srážlivé deštičkové reakce. K vážným projevům onemocnění dochází již při menším než jednoprocenním poklesu normální genové aktivity. Při zvrácení jednoprocenní prahové genové aktivity dochází ke zmírnění z vážného na středně vážný průběh. To znamená, že i malé procentuální zvýšení aktivity faktoru IX v buněčné populaci jaterních buněk přináší velký terapeutický úspěch. Již v roce 2011 byla provedena úspěšná studie na myším modelu, kde za pomoci ZFN strategie došlo k 3 – 7 % obnovení aktivity mutovaných alel genů, což vedlo k zvrácení onemocnění obnovením aktivity faktoru IX.⁶⁴

Zajímavou je také nedávná studie na indukovaných pluripotentních buňkách, což jsou buňky somatického původu, ve kterých je navozen jakýsi umělý embryonální stav. Indukovaná pluripotentní buňka může dát vznik dalším buňčným typům. Autoři uvedené studie navrhli plasmidy se zdravou formou druhého exonu hemokoagulačního faktoru IX s homologickými konci k poškozené části po specifickém štěpení. Následovala transfekce plasmidu a editačního nástroje CRISPR/CAS9 do indukovaných buněk. Vědci sofistikovaně nasměrovali diferenciaci takto upravených buněk do linie hepatocytárních buněk, aby se tím co nejlépe přiblížili fyziologii onemocnění. Podle výsledků došlo k úspěšné genové opravě a zvýšení aktivity faktoru srážlivosti krve IX.⁶⁵

⁶³ Srov. PAVEL-DINU, Mara a kol. Gene correction for SCID-X1 in long-term hematopoietic stem cells. *Nature communications* 2019, roč. 10, č. 1, s. 1634.

⁶⁴ Srov. LI, Hojun a kol. In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature* 2011; roč. 475, č. 7355, s. 217–221.

⁶⁵ Srov. MORISHIGE, Satoshi a kol. CRISPR/Cas9-mediated gene correction in hemophilia B patient-derived iPSCs. *International journal of hematology* 2020, roč. 111, č. 2, s. 225–233.

Další z důležitých experimentů se týká výzkumu HIV viru. Je známé, že virus HIV pro vstup do T-lymfocytů potřebuje pomocný koreceptor CCR5. Je prokázáno, že pokud dojde k mutacím v obou alelách genu *ccr5*, vzniká absolutní rezistence vůči viru HIV T-lymfocytů v humanizovaných myších modelech.⁶⁶ Tato terapie založená na editaci genomu s vyřazením funkce koreceptoru CCR5 je aplikovatelná již v první fázi klinických testů u HIV pozitivních pacientů. Lymfocyty CD4⁺ infikované virem HIV jsou odebrány, *ex vivo* editací ZFN dochází k zrušení genu CCR5 a takhle upraveny jsou vráceny zpátky do pacienta.⁶⁷ U pacientů s AIDS a připojenými hematologickými komplikacemi, kteří prošli antiretrovirovou terapií, se uvádějí klinické testy, u kterých dochází k ošetření hematopoetických kmenových buněk, tedy krevních prekursorů *ex vivo* strategií za použití editačního nástroje CRISPR/CAS9 a navrácení takto ošetřených buněk zpátky do organismu. Cílem těchto přístupů je vyřazení koreceptoru CCR5 z funkce.⁶⁸

Další prací týkající se HIV genové terapie je inaktivace provirální DNA HIV viru v hostitelské DNA. Virus HIV se ve svém infekčním cyklu integruje do hostitelské DNA, kde přebývá a čeká na buněčnou aktivaci vyvolanou imunitní reakcí. Tento tzv. latentní virus je největším problémem úspěchu různých forem antiretrovirální terapie, protože je velmi obtížné „spící“ virus v hostitelské DNA eliminovat úplně. Při buněčné aktivaci dochází k probuzení latentního viru, který se začne rychle replikovat, pučet a infikovat další CD4⁺ T-lymfocyty. Vědcům se povedlo díky editačnímu agens CRISPR/CAS9 zavést do buněk JLat10.6, které byly latentně infikovány virem HIV-1, cílenou mutací, již latentní virus deaktivovali.⁶⁹ Na základě těchto úspěchů Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) povolil CRISPR/CAS9 při léčení HIV-1 pozitivních pacientů a otevřel tím cestu k jeho klinické terapeutické aplikaci.⁷⁰

Léčba srpkovité anémie díky CRISPR/CAS9 editaci zaznamenala také svůj úspěch. Srpkovitá anémie neboli falciformní anémie, je autozomálně recesivní dědičné

⁶⁶ Srov. PEREZ, Elena E. a kol. Establishment of HIV-1 resistance in CD4⁺ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology* 2008, roč. 26, č. 7, s. 808–816.

⁶⁷ Srov. TEBAS, Pablo a kol. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *New England Journal of Medicine* 2014, roč. 370, č. 10, s. 901–910.

⁶⁸ Srov. HU, Chen. U.S. National Library of Medicine: *Safety of transplantation of CRISPR CCR5 modified CD34⁺ cells in HIV-infected subjects with hematological malignancies* (23.5.2017) [2022-01-20]. <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03164135?term=CRISPR%2FCAS9&cond=HIV+Infections&draw=2&rank=1>>.

⁶⁹ Srov. ZHU, Weijun a kol. The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology* 2015, roč. 12, č. 22.

⁷⁰ Srov. PARKINS, Kezia. *FDA approves first trial investigating CRISPR gene editing as HIV cure* (16.9.2021) [2022-01-22]. <<https://www.clinicaltrialsarena.com/news/crispr-gene-editing-hiv-cure/>>.

onemocnění, které se projevuje změnou tvaru červených krvinek z tzv. promáčknutých piškotů na protažené srpkky. Tato morfologická změna je důsledkem jediné mutace v genu pro hemoglobin, při níž je na šesté pozici ve struktuře β -hemoglobinového řetězce aminokyselina valin místo kyseliny glutamové. V důsledku této mutace hemoglobin vázaný v červených krvinkách nedostatečně váže kyslík. Kromě jiného srpkovitý tvar červených krvinek způsobuje velmi časté ucpávání cév, s čímž jsou spojeny velké bolesti až smrt. Průměrná délka života s tímto onemocněním je u mužů 43 let, u žen 48. Nemoc se vyskytuje v tropických a subtropických pásmech. Za nemoc je odpovědný protein genu *bcl11a*, který je transkripčním faktorem a potlačuje expresi γ -globinu a fetálního hemoglobinu v erytroidních buňkách. Autoři prostřednictvím elektroporace dopravili do CD34+ hematopoetických kmenových a progenitorových buněk získaných od zdravých dárců editační nástroj CRISPR/CAS9, přičemž CRISPR-Cas9 cílil na BCL11A erytroidně specifický zesilovač. Přibližně 80 % alel v tomto lokusu bylo modifikováno, bez známek editace mimo cíl. Díky této genetické úpravě došlo k obnovení tvorby správné formy hemoglobinu.⁷¹ Na základě podobných studií FDA schválil první klinický test na lidech za použití CRISPR/CAS9 při léčbě srpkovité anémie. V těchto a podobných projektech se přímo angažuje Jeniffer Doudna, která usiluje o co nejširší dostupnost této metody všude, kde se nemoc srpkovité anémie objevuje.⁷²

Zářným příkladem úspěšné terapeutické aplikace CRISPR/CAS9 je Duchennova muskulární dystrofie s *ex vivo* aplikací editačního nástroje CRISPR/CAS9. Je to nemoc, která se vyskytuje pouze u chlapců s incidencí 1/3000. Onemocnění je způsobeno mutací genu na dystrofin. Postižení již během pubertálního věku jsou na vozíku, dožívají se 20 – 30 let a umírají na srdeční selhání. Pro studium tohoto onemocnění se využívají myši *mdx/UTR^{+/-}*, které jsou modelovým organismem pro svalovou dystrofii. Myšim chybí funkční gen pro dystrofin, nemohou chodit, mají špatnou funkci srdce a později se u nich objevuje srdeční selhání. Do těchto myši byl *in vivo* vpraven editační reagens. Po určitém čase došlo k obnovení potřebné hladiny dystrofinu. Myši po určitém čase začali chodit, obnovil se srdeční sval a kosterní svalstvo.⁷³ CRISPR/CAS9 by tedy mohl sloužit jako terapeutická léčebná strategie pro pacienty s dědičnou dystrofií.

⁷¹ Srov. FRANGOUL, Haydar a kol. Crispr-cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia. *New england journal of medicine* 2021, roč. 384, č. 3, s. 252–260.

⁷² Srov. SANDERS, Robert. *FDA approves first test of CRISPR to correct genetic defect causing sickle cell disease*, (30.3.2021) [2022-01-20]. <<https://news.berkeley.edu/2021/03/30/fda-approves-first-test-of-crispr-to-correct-genetic-defect-causing-sickle-cell-disease/>>

⁷³ Srov. EL REFAEY, Mona a kol. In vivo genome editing restores dystrophin expression and cardiac function in dystrophic mice. *Circulation research* 2017, roč. 121, č. 8, s. 923–929.

Dalším příkladem je monogenetické dominantně vázané onemocnění dědičné hluchoty, které vyvolává jednonukleotidová mutace v genu *tmc1*. Důsledkem této mutace je absence kanálku na vlásenkových buňkách, čímž je znemožněn převod mechanického vzruchu na elektrický signál vedoucí do mozku. Vědci aplikovali CRISPR editační reagens do myšího modelu Bethoven metodologickou aplikací *in vivo* přímo do uší. Myším se po čase obnovil sluch.⁷⁴ Když to domyslíme do důsledků, takové vážné dědičné onemocnění by se mohlo léčit dokonce ambulantně, kdy hluchý pacient přijde a do ucha mu je vpíchnuto editační reagens. Po několika dnech by došlo k jeho vyléčení.

Mezi další kandidáty onemocnění, na které se vztahují možnosti léčení CRISPR/CAS9 editací, patří: Tyrosinémie I typu (*in vivo*)⁷⁵, infekce virem Hepatitidy B (*in vivo*)⁷⁶, β-Talasémie (*ex vivo*), syndrom vážné kombinované imunodeficiency vázané na X chromozom (*ex vivo*), cystická fibróza (*in vivo*), nádorová onemocnění imunitního charakteru, Duchennova muskulární dystrofie (*ex vivo*), Huntingtonova nemoc (*ex vivo*) a různé variace neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova nemoc, Parkinsonova nemoc.⁷⁷ Dále se jedná o nemoci kardiovaskulárního systému, dědičné onemocnění očí jako vrozený šedý a zelený zákal, retinoblastom, vrozená rohovková dystrofie.⁷⁸

Velmi slibně se rozvíjející oblastí je nádorová imunoterapie za využití nástrojů editace genomu. Podstatou této genové terapie jsou geneticky upravené T lymfocyty, které se označují jako chymerické antigenní receptorové T buňky. Po izolaci T lymfocytů z krve dochází k jejich úpravě editačním nástrojem tak, aby dokázaly cíleně reagovat díky specifickému receptoru na svém povrchu na příslušný druh nádoru. Následně se tyto buňky pomnoží a aplikují se zpětně do pacienta.⁷⁹ Přehled dalších klinických případů genové terapie prostřednictvím CRISPR/CAS9 uvádí studie: Pokroky v genové terapii založené na CRISPR/CAS9 v lidských genetických onemocněních.⁸⁰

⁷⁴ Srov. GAO, Xue a kol. Treatment of autosomal dominant hearing loss by *in vivo* delivery of genome editing agents. *Nature* 2018, roč. 553, č. 7687, s. 217–221.

⁷⁵ Srov. YIN, Hao a kol. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nature biotechnology* 2014, roč. 32, č. 6, s. 551–553.

⁷⁶ Srov. LIN, Su-Ru. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic hbv templates *in vivo*. *Molecular therapy nucleic acids* 2014, roč. 3, č. 8, s. 186.

⁷⁷ Srov. NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE. *Human genome editing: Science, ethics and governance.*, s. 92–93.

⁷⁸ Srov. CAI, Shang a kol. The research advances and applications of genome editing in hereditary eye diseases. *Zhonghua yan ke za zhi* 2017, roč. 53, č. 5, s. 386–391.

⁷⁹ Srov. REIN, Lindsay A. M. a kol. Applications of gene editing technologies to cellular therapies. *Biology blood marrow transplantation* 2018, roč. 24, č. 8, s. 1537–1545.

⁸⁰ Srov. WU, Shao-Shuai a kol. Advances in CRISPR/CAS-based gene therapy in human genetic diseases. *Theranostics* 2020, roč. 10, č. 10, s. 4374–4382.

3. Editace genomu germinálních buněk a embryonální editace

Třetí kapitola pojednává o editaci buněk germinální linie, tedy buněk pohlavních, jejich prekurzorů a buněk embryonálních. Po krátké charakteristice uvedených typů buněk, bude následovat výčet motivací vedoucích k editaci genomu právě těchto buněčných typů. V jádru třetí kapitoly bude pojmenován klíčový bioetický problém diplomové práce, který souvisí s eticky problematickou lidskou dědičnou editací a etičností jiných neterapeutických editačních postupů. Následně budou nastíněny základní bioetické otázky, které z uvedeného bioetického problému vyplývají. K hlubší analýze a lepšímu pochopení celé problematiky bude uvedena geneze odborného názoru široké vědecké obce na lidskou dědičnou editaci genomu a alternativní aplikace CRISPR/CAS9 genové terapie. Jako praktický výstup analýz je zmíněna tzv. translační cesta, která je procesem zavedení dědičné editace genomu v klinické praxi. Závěr kapitoly se dotýká nejpravděpodobnějších cest budoucího využití dědičné editace a upřesnění technického provedení její klinické aplikace.

3.1. Lidská dědičná editace

Editace buněk germinální linie představuje soubor všech genetických manipulací vedoucích ke změně genomu pohlavních buněk, jejich prekurzorů. Mezi buňky germinální linie patří: primordiální zárodečné buňky a gamety – vajíčka a spermie. Podle uvedeného výčtu je evidentní, že pokud jsou modifikace zavedeny do pohlavních buněk a jejich prekurzorů úspěšně, dochází k přenosu požadovaných mutací na potomky daného jedince.⁸¹ Metoda probíhá tak, že editační agens se injikuje do vaječníků/varlat nebo primordiální zárodečné buňky, jsou editačním agens *in vitro* ošetřeny a vráceny zpátky do jedince, čímž dochází k produkci modifikovaných pohlavních buněk.⁸²

⁸¹ Srov. NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE. *Human genome editing: Science, ethics and governance*, s. 111.

⁸¹ Srov. LI, Dali a kol. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology* 2013, roč. 31, č. 8, s. 681–683.

⁸² Srov. GREELY, Henry T. CRISPR'd babies: human germline genome editing in the 'He Jiankui affair'. *Journal of law and the biosciences* 2019, roč. 6, č. 1, s 111–183.

V případě použití editačních nástrojů u embryí mluvíme o embryonální editaci. K modifikacím v tomto případě dochází v jednotlivých fázích ranného embryonálního vývoje: jednobuněčná diploidní zygota, blastomera, embryonální kmenové buňky blastocysty (vnitřní buněčná masa). Při úspěšném zasažení genu v diploidní zygotě je vysoká pravděpodobnost, že zaváděnou změnu bude obsahovat každá buňka vyvíjejícího se embrya, a to jak tělní, tak buňka pohlavní. V případě editace ve vyšších buněčných embryonálních vývojových stádiích jsou buňky editací zasaženy s různou frekvencí. Tím vzniká populace buněk modifikovaných a nemodifikovaných. Tento fenomén označujeme jako buněčný mozajcizmus (zavedenou mutaci neobsahovala každá buňka vyvíjejícího se embrya, anebo buňky obsahovaly různé mutace v důsledku několika násobného zásahu editačního nástroje mimo cílovou sekvenci).

Ukázalo se, že embryonální editace genomu funguje u embryí mnoha druhů živočichů. To zrychluje tempo mnoha oblastí biologie a vede k rychlejšímu a levnějšímu studiu funkce genů v modelových organismech a ekonomicky důležitých druzích, jako jsou plodiny, hospodářská zvířata a energetické suroviny. Upravené nukleázy, zejména CRISPR/CAS9, lze snadno použít k úpravě genů v raných embryích savců, jako jsou myši, krysy a jiné živočišné druhy.⁸³ Známý je případ čínských vědců, kteří prostřednictvím metody CRISPR/CAS9 vytvořili super muskulárního psa pravděpodobně pro bojové účely. Psí embrya byla editována v genu pro myostatin, který zabraňuje enormnímu růstu svalové hmoty. Když vědci vypli tento gen prostřednictvím CRISPR/CAS9, došlo k vyřazení myostatinu z funkce, a tím k deregulaci růstu svalové hmoty. Takto modifikovaní psi byly 2x svalnatější než nemodifikovaní. Je důležité poznamenat, že tuto změnu obsahují všechny buňky organismu, protože změna byla provedena na embryonální úrovni. Důsledkem toho je vznik úplně nového druhu psa, který bude plodit potomky se stejnou mutací, jaká byla zavedena do rodičů prostřednictvím CRISPR/CAS9.⁸⁴

Podobnost mezi lidskými embryi a embryi jiných živočichů zvyšuje možnost, že do postupů lidské reprodukce mohou být začleněny metody úpravy genomu prostřednictvím CRISPR/CAS9. Již editace genomu myši diploidní zygoty v jednobuněčné fázi

⁸³ Srov. SINGH, Priti a kol. A mouse geneticist's practical guide to crispr applications. *Genetics* 2015, roč. 199, č. 1, s. 1–15.

⁸⁴ Srov. REGALADO, Antonio. *First gene-edited dogs reported in China* (19.10.2015) [2022-01-20]. <<https://www.technologyreview.com/2015/10/19/165740/first-gene-edited-dogs-reported-in-china/>>.

zprostředkovaná CRISPR/Cas9 je naprostou rutinou. V této souvislosti není překvapující, že by lidská embrya nemohla být podobně upravována.

Na začátku roku 2015 byla zveřejněna jedna z prvních studií prokazujících, že metoda CRISPR/CAS9 by mohla být použita k úpravě genů v raných stádiích lidských embryí. V této studii byly použity polyspermní třípronukleární zygoty, které vznikají s 2 – 5 % pravděpodobností při *in vitro* fertilizaci. Na rozdíl od normálních diploidních zygot, nejsou schopny dalšího embryonálního vývoje. Autoři publikace do těchto třípronukleárních zygot za použití CRISPR/CAS9 zavedli mutaci v oblasti genu pro β -globin, jehož narušení je odpovědné za vývoj β -thalasemie. I když se autorům povedlo gen zasáhnout a zavést dvouřetězcový zlom v genu, přesto pozorovali několik klíčových negativních postranních efektů. Jednak byla detekována nízká frekvence žádoucí HDR opravní dráhy za přítomnosti opravného templátu zdravé formy genu. Dále bylo zaznamenáno několik zásahů mimo cílovou sekvenci genu, a za třetí, embryím v pozdějším stadiu vývoje byl detekován tzv. mozajcismus.⁸⁵

Další studie je z roku 2017, kdy metoda CRISPR/CAS9 byla použita v případě lidských embryí postižených hypertrofickou kardiomyopatií, která vede k srdečnímu selhání. Nemoc se často manifestuje v pozdějším věku, takže nic netušící rodiče předávají poškozenou alelu genu svým dětem. Toto onemocnění je ve 40 % vyvoláno mutací v genu *mybpc3*. Vědci vzali zdravá vajíčka od dárkyně a spermie muže, který měl tuto mutaci. Po oplodnění, do embryí vložili editační nástroj CRISPR/CAS9, který úspěšně provedl změnu v mutaci poškozeného genu, dokonce bez postranních efektů jako mozajcismus, nebo zásahy mimo cílovou sekvenci. Tato studie byla provedena jenom pro ověření konceptu, že CRISPR/CAS9 bude fungovat i v lidských embryích. Embrya tedy nebyla vložena do dělohy matky, aby se narodili živí jedinci, kteří by byli nositeli zavedené mutace.⁸⁶

V listopadu 2018 se však vědecký svět otřásá ve svých etických základech. Čínský vědec He Jankui na druhém mezinárodním summitu k editaci lidského genomu v Hong Kongu, který organizovala americká Akademie věd, Americká národní akademie medicíny, Britská královská společnost a Akademie věd Hong-Kong, publikuje s velkým nadšením úspěšné použití metody CRISPR/CAS9 při editaci lidských embryí a narození

⁸⁵ Srov. LIANG, Puding a kol. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein cell* 2015, roč. 6, č. 5, s. 363–372.

⁸⁶ Srov. MA, Hong a kol. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 2017, roč. 548, č. 7668, s. 413–419.

takto upravených embryí. Téma naprosto ovládlo průběh celé konference.⁸⁷ Při uvedení dalších dat a studií týkajících se čínského experimentu byl následující text inspirován přednáškou doktorandky Alžběty Resslerové M.Sc z laboratoře Smart Devices, ve vědeckém pracovišti Ceitec, která uvádí další podrobné informace k případu editovaných dvojčat Nany a Lulu.⁸⁸

Základní podstatou experimentu byla silná iniciace Pekingu pomoci lidem postiženým virem HIV. He Jankui se snažil shromáždit optimální počet dobrovolníků pro svůj výzkum. Přihlásilo se mu osm párů, ve kterých byl otec HIV pozitivní a matka negativní. He Jankuimu se povedlo připravit 13 modifikovaných embryí. Modifikovaná embrya nesla editací poškozený gen *ccr5*. Vyřazení genu He Jankui docílil za pomoci CRISPR/CAS9 delecí 32 párů nukleotidů na třetím chromozomu. Protein CCR5 je koreceptorem esenciálním pro vstup viru HIV do buňky, tzn. že po zavedení kóžené mutace jsou embrya vůči viru HIV rezistentní. Dvě z pěti matek, do kterých He Jankui implantoval embrya, zůstaly těhotné. Jedné z nich se narodila nestejná dvojčata Nana a Lulu. O narození dítěte druhé matce se ví jenom tolik, že se narodilo předčasně.

He Jankuimu se však požadované mutace úplně nepovedly. Jedna dívka z dvojčat byla v mutaci heterozygotem – tzn. jedna alela nesla nepozměněný gen *ccr5*, ve druhé alele byla mutace editačním nástrojem zavedena úspěšně. To znamená, že k produkci proteinu CCR5 v T-lymfocytech docházelo, ale v nižší míře. V případě druhého dvojčete došlo k požadované delecii u obou chromozomů, tedy obě alely genu byly vyřazeny z funkce a nedocházelo k produkci koreceptoru. He Jankui publikoval, že doteď neexistují žádné podobně modifikované děti. Celý případ je provázejí mnohé nejasnosti. He Jankui byl za tento počín okamžitě odsouzen vědeckou obcí.^{89,90} Kromě pokuty byl taky odsouzen za nedovolené medicínské praktiky na tři roky vězení.⁹¹ Je otázkou, jak se mu povedlo

⁸⁷ Srov. GREELY, Henry T. CRISPR'd babies: human germline genome editing in the 'He Jiankui affair', s 111–183.

⁸⁸ Srov. RESSLEROVÁ, Alžběta. *Genová editace pomocí CRISPR, jak daleko můžeme zajít?* (23.11.2021) [2022-01-25]. <<https://www.youtube.com/watch?v=p9I-9m-Ecyg>>.

⁸⁹ Srov. CYRANOSKI, David. The CRISPR-baby scandal: what's next for human gene-editing. *Nature* 2019, roč. 566, č. 7745, s. 440–442.

⁹⁰ Srov. BELLUZ, Julia. *Is the CRISPR baby controversy the start of a terrifying new chapter in gene editing?* (22.1.2019) [2022-01-26]. <<https://www.vox.com/science-and-health/2018/11/30/18119589/crispr-gene-editing-he-jiankui>>.

⁹¹ Srov. NORMILE, Dennis. *Chinese scientist who produced genetically altered babies sentenced to 3 years in jail* (30.12.2019) [2022-01-26]. <<https://www.sciencemag.org/news/2019/12/chinese-scientist-who-produced-genetically-altered-babies-sentenced-3-years-jail>>.

vyřadit obě funkční alely genu *ccr5*. Zdá se, že imunní vůči viru HIV je jenom jedna z dvojčat.⁹²

Postupem času se začaly vynořovat studie popisující význam genu *ccr5*. Je zapotřebí poznamenat, že zabránění HIV infekci, vyřazením genu *ccr5* není jedinou funkcí toho genu. Protein CCR5 je široce spektrálním proteinem. Jedná se o chemokinový receptor, který se podílí na mnoha imunitních buněčných reakcích a signálních kaskádách. Je důležitý pro zahájení imunitní odpovědi organismu třeba na Západonilskou horečku, protože spouští migraci buněk imunitního systému do mozku. Dále chrání plíce, játra a jiné orgány proti těžkým průběhům dalších virových onemocnění.⁹³ Existují však lidé, kteří od narození gen *ccr5* postrádají. Jsou senzibilní na nejrůznější onemocnění, mohou předčasně umírat s roztroušenou sklerózou⁹⁴, nebo zemřít v mladém věku⁹⁵.

Na druhou stranu se však objevují taky studie, které vypovídají, že CRISPR/CAS9 editovaná dvojčata Nana a Lulu, mají díky zavedené mutaci „vylepšený“ mozek⁹⁶, který by mohl být schopen lepší regenerace svých motorických center v případě mozkového ataku.⁹⁷ Je možné, že díky této mutaci se dvojčata stanou mnohem inteligentnějšími a budou mít efektivnější paměť, jak je tomu v případě myši bez tohoto genu.⁹⁸

Je tedy opravdu velkou otázkou, jestli nově narozeným dvojčatům Naně a Lulu bylo pomoheno, nebo ublíženo. Nic to však nemění na tom to, že jsou na světě. Jsou to však taky ty, o jejichž narození se ví. Kolik je již CRISPR/CAS9 editovaných dětí, o kterých společnost vůbec nic neví a již jsou na světě? Jsou známí taky další protagonisté, kteří editaci dětí plánují. Mezi nimi je taky ruský vědec Denis Rebrikov, který editací genu pro dědičnou hluchotu umožní narození dětí několika rodičovským párům, které mají jasné genetické predispozice pro toto onemocnění.⁹⁹

⁹² Srov. COHEN, Jon. *Did CRISPR help or harm the first-ever gene-edited babies?* (1.8.2019) [2022-01-26]. <<https://www.science.org/content/article/did-crispr-help-or-harm-first-ever-gene-edited-babies>>.

⁹³ Srov. tamtéž.

⁹⁴ Srov. GADE-ANDAVOLU, Radhika a kol. Association of CCR5 delta32 deletion with early death in multiple sclerosis. *Genetics in medicine* 2004, roč. 6, č. 3, s. 126–131.

⁹⁵ Srov. SCHMIDT, Fabian. *CRISPR-Cas9 babies likely to die earlier, Berkeley study says*. (3.6.2019) [2022-01-26]. <<https://www.dw.com/en/crispr-cas9-babies-likely-to-die-earlier-berkeley-study-says/a-49025884>>.

⁹⁶ Srov. REGALADO, Antonio. *China's CRISPR twins might have had their brains inadvertently enhanced*. (21.2.2019) [2022-01-26]. <<https://www.technologyreview.com/2019/02/21/137309/the-crispr-twins-had-their-brains-altered/>>.

⁹⁷ Srov. JOY, Mary T. CCR5 Is a therapeutic target for recovery after stroke and traumatic brain injury. *Cell* 2019, roč. 176, č. 5, s. 1143–1157.

⁹⁸ Srov. ZHOU, Miou a kol. CCR5 is a suppressor for cortical plasticity and hippocampal learning and memory. *Elife* 2016, roč. 5. (20.12.2016) [2022-01-26]. <<https://elifesciences.org/articles/20985>>.

⁹⁹ Srov. CYRANOSKI, David. Russian biologist plans more CRISPR-edited babies. *Nature* 2019, roč. 570, č. 7760, s.145–146.

Jeniffer Doudna ve své výroční zprávě odsoudila podobné experimenty a volá po jasném legislativním ukotvení možnosti použití CRISPR/CAS9 a taky trestech za svévolné zneužití metody v případě jiných nedovolených manipulací.¹⁰⁰

3.2. Motivace pro využití lidské dědičné editace

Hlavní motivací k vylepšování a zdokonalování molekulárních nástrojů pro editaci genomu v embryonálních buňkách a buňkách pohlavních je eliminace výskytu monogenetických dědičných onemocnění v populaci spojených s určitou morbiditou a taky mortalitou. U polygenních onemocnění použití metody dědičné editace genomu zatím nepřipadá v úvahu, protože na manifestaci onemocnění se může podílet více genů. Je zde značný vliv prostředí, návyků, životosprávy, znečištění.

Soubor monogenetických onemocnění není nijak zvlášť velký, ale v případě použití editace genomu přináší rodičům, kteří buď trpí monogenetickým onemocněním, nebo mají jasné genetické predispozice k tomu, že jejich dítě bude postižené, jasný efekt, a tím je: zdraví jejich dítěte. Navíc toto dítě nejen, že bude zdravé, ale taky nebude přenašečem nezdravé genové alely daného onemocnění v příštích generacích. Je potřeba si uvědomit, že takhle navržená editační strategie se neobejde bez postupů fertilizace *in vitro* a preimplantační diagnostiky, kterou se selektují embrya s požadovanou genovou opravou, vhodná pro implantaci do dělohy matky. Embrya se špatně zavedenou mutací anebo bez zavedené mutace se likvidují, nebo se používají k dalším vědeckým účelům.

3.3. Charakterizace a vymezení studovaného bioetického problému

Na základě hlubšího pochopení souvislostí spojených s CRISPR/CAS9 editací je nyní možné vymezit hlavní bioetický problém. Řešeným problémem, kterým se dále bude diplomová práce zabývat, je zkoumání etičnosti využití biomolekulárního nástroje CRISPR/CAS9 v eticky problematické dědičné editaci, kontroverzních přístupech neterapeutického vylepšování jedince, jako i zkoumání etických parametrů v případě klinické aplikace v oblasti somatické genové terapie.

¹⁰⁰ Srov. DOUDNA, Jennifer. Crispr's unwanted anniversary. *Science* 2019, roč. 366, č. 6467, s. 777.

Zatímco genová editace pomocí molekulárního nástroje CRISPR/CAS9 v somatických buňkách bude zjevně součástí terapeutických postupů při léčení jedinců u editace embryonálních buněk, pohlavních buněčných prekurzorů, vajíček a spermií je problém mnohem kontroverznější a eticky problematický. Studovaný problém omezujeme pouze na lidský druh *Homo sapiens sapiens*.

Stanovený problém je velmi komplexní a vychází z něho několik okruhů metodologických, bioetických a sociálních otázek, které se pokusíme nastínit a rozvinout v následujícím výčtu.

Přestože se metoda CRISPR/CAS9 neustále zdokonaluje, existuje soubor rizik, která se týkají možných nespecifických zásahů po použití editačního agens v genomu. Jsou tu také rizika výskytů dalších nežádoucích účinků vyvolaných editací. Z metodického hlediska vyvstává otázka, jak co nejefektivněji eliminovat rizika a jaké jsou neoptimálnější podmínky pro použití molekulárního nástroje. Tomuto metodickému zdokonalování se věnuje velké úsilí zvláště v oblasti CRISPR/CAS9 somatické genové terapie a v modelových organismech geneticky podmíněných onemocnění.

I když by metodicky bylo vše správně provedeno a molekulární nástroj by byl co možná nejlépe optimalizován, je těžké predikovat, jaký postranní dopad by mohlo mít zavedení, byť zdravé alely genu v daném jedinci a následně v dalších generacích. To souvisí s dokonalým pochopením nejenom funkce aberantního genu, který onemocnění způsobuje, ale taky dalších širších souvislostí a vlivů na propagaci onemocnění. Jaká je tedy hranice mezi potenciálním prospěchem a rizikem užití metody?

Protože používání metody CRISPR/CAS9 je na začátku svého potenciálního terapeutického využití v lidské dědičné editaci, není vytvořen dlouhodobý dostatečně velký statistický soubor dat o těchto faktech, což činí využití editační metody přinejmenším nejasným a hůře prediktivním.¹⁰¹

Jednou z neméně důležitých metodických otázek bude monitorování, kontroly a vznik institucí, které budou odpovídat za terapeutickou aplikaci dědičné editace a kontrolovat ji.¹⁰² Bude důležité si položit otázku, jak ochránit vědecký svět od vědců, kteří nemají žádné etické zábrany a dělají si, co chtějí? Jak budou reagovat zákonodárné orgány jednotlivých států na toto riziko zneužití? Jak bude probíhat implementace těchto

¹⁰¹ Srov. NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE. *Human genome editing: Science, ethics and governance*, s. 122.

¹⁰² Srov. tamtéž, s. 119–125.

základních ochranní principů do legislativní normativy jednotlivých států? Bude ta konvence platit pro všechny státy, anebo jenom pro některé?¹⁰³

Rozhodující otázkou je, jak se vlastně bude dále vyvíjet výzkum a spektrum terapeutické/neterapeutické aplikace metody? Na metodu CRISPR/CAS9 bychom mohli aplikovat princip nakloněné roviny (*slippery slope*), kdy po překročení stanovených etických limitů terapeutického užívání CRISPR/CAS9 dojde k jejímu nekontrolovanému a taky neterapeutickému využití v klinické praxi. Nejdříve to bude základní výzkum ve formě terapeutického léčení aberantních genů v somatických buňkách jedinců, dále terapeutická aplikace v případě různých monogenetických onemocnění na úrovni lidské dědičné editace a o několik let později to už bude třeba neterapeutické genetické vylepšování.¹⁰⁴

Metoda CRISPR/CAS9 je fenomenální ve své jednoduchosti, rychlosti, přesnosti, velké efektivitě a dostupnosti. Tím se stává však taky lehce zneužitelnou. Podstata neterapeutického genetického vylepšování genofondu populace spočívá ve snaze neustále překonávat limity lidského organismu a zdokonalovat jeho schopnosti. Jedná se o možnost genetického navržení vlastního dítěte (*designed babies*). Tento koncept se ve veřejných vědeckých diskusích spojuje s motivem hry na Boha (*playing God*). Poptávka po takto navrženém dítěti může vycházet jednak od rodičů, ale taky při dostupnosti velkého počtu embryí, jako produktů IVF, může vycházet ze strany nejrůznějších vědeckých, laboratorních a farmaceutických skupin. Je potřeba si uvědomit, že selekce lidských jedinců se již děje, a to v průběhu preimplantační genové diagnostiky (rejekce vážně geneticky poškozených embryí), asistované reprodukce (selekce nejvhodnějších embryí k přenosu, selekce pohlaví jedince), případně selekce prostřednictvím potratové strategie.

Neterapeutické genetické vylepšování zahrnuje jednak kosmetické úpravy jako jsou, barva očí, vlasů, výška, muskulatura jedince. Ovlivňování genetických znaků však nesouvisí jenom s morfologickými znaky, ale souvisí také s vylepšováním inteligence, rozumových schopností a dovedností až po určité - nazvěme to sci-fi schopnosti lidského druhu (super armáda, odolnost člověka vůči extrémním podmínkám...)¹⁰⁵

¹⁰³ Srov. RESSNEROVÁ, Alžběta. *Genová editace pomocí CRISPR, jak daleko můžeme zajít?*

¹⁰⁴ Srov. NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE. *Human genome editing: Science, ethics and governance*, s. 128.

¹⁰⁵ Srov. RESSNEROVÁ, Alžběta. *Genová editace pomocí CRISPR, jak daleko můžeme zajít?*

Další možností neterapeutického využití CRISPR/CAS9 je volné experimentování a zavádění cílených škodlivých mutací do vznikajícího embrya bez implantace do dělohy matky. To může připomínat hrůzostrašné praktiky nacistického režimu během druhé světové války na lidech. Probíhající sice ve skrytosti, v prostředí laboratoří, bez lidské bolesti a utrpení, ale přesto při ztrátě lidské důstojnosti.

Ve zmiňovaných metodologických přístupech můžeme vnímat velmi nebezpečnou eugenickou selekční mentalitu. Víme, že vědecká sféra se svým pokrokem a inovativními metodami může být velmi silně ovlivněna názorem transhumanistů¹⁰⁶, kteří zastávají názor, že lidský druh by se měl dále vylepšovat, být více odolný vůči nemocem, více morální, více inteligentní, a tak směřovat k vývoji nadčlověka, jak to popisuje jeden z předních představitelů tohoto myšlenkového proudu James Hughes.¹⁰⁷ Je nutno připomenout, že transhumanismus je jedním z pilířů moderního satanismu.

Tím se zde otvírá velmi široký prostor pro další otázky filozofického charakteru týkající se různých pohledů na vznik lidského života. Kdy je zárodek lidskou osobou a požívá tak lidských práv a lidské důstojnosti?

V souvislosti s dostupností metody vyvstává soubor dalších eticko-sociálních otázek, týkajících se omezenosti rodičovské autonomie, nemožnosti využití metody vlivem kultury, národnosti, sociálního postavení, náboženství, vyspělosti té, které země. S tím také souvisí otázka terapeutické turistiky, jak je tomu třeba v případě fertilizace *in vitro* dnes. Nezpůsobí nerovnoměrnost dostupnosti metody sociální rozdělení společnosti? Mají mít vůbec lidi možnost si vybírat, jak bude jejich dítě vypadat, jaké bude mít vlastnosti a inteligenci? Pokud by si rodiče vybírali vlastnosti dětí, nebyli by si lidé potom dost podobní? Jaké efekty by měly dědičné změny genomu na společnost? Má vědecký svět za každou cenu ochránit lidstvo před genetickými chorobami? Co vše je považováno za chorobu a co už ne? Jak těžká by musela být choroba, aby byla opravena pomocí CRISPR/CAS9? Kdo bude rozhodovat o tom, co je normální/zdravé, a co už není? Jak

¹⁰⁶ Transhumanismus věří, že člověk byl stvořen Přírodou. Odmítá koncept boha v pojetí hlavních světových náboženství. Jeho podstatou je neustálé zdokonalování lidské rasy. Lidstvo je přechodem k nadčlověku. Transhumanismus je cestou, skrze níž člověk může stvořit něco co přesahuje jeho samotného. Způsobům, jak toho dosáhnout, se nekladou hranice. Transhumanismus je jedním z pilířů moderního satanismu, materialistické filosofie, jejíž původ můžeme hledat na přelomu 18. a 19. století. Převzato (3.6.2022). <<https://satanovakomunita.cz/>>

¹⁰⁷ Srov. HUGHES, James. *Citizen cyborg: Why democratic societies must respond to the redesigned human of the future*. Cambridge, MA: Westview press, 2004.

víra a náboženství mohou chránit člověka a jeho důstojnost ve spleti různých bioetických názorových přístupů?

3.4. Vývoj vědecké bioetické diskuse k využití CRISPR/CAS9

Po výčtu nejdůležitějších otázek souvisejících s řešeným bioetickým problémem bude následovat vývoj odborného názoru vědecké obce k využití CRISPR/CAS9 v klinické terapii.

Jedním z klíčových dokumentů k náhledu na bioetický problém, který diplomová práce analyzuje, je Úmluva na ochranu lidských práv a důstojnosti lidské bytosti v souvislosti s aplikací biologie a medicíny: *Úmluva o lidských právech a biomedicině*.¹⁰⁸ Tento dokument byl schválený Radou Evropy 4. dubna 1997 ve španělském Oviedu. Čtvrtá kapitola Úmluvy pojednává o zákazu diskriminace člověka na základě jeho genetické výbavy, dále o genetických testech a jejich výpovědní hodnotě, také o zásazích do lidského genomu a konečně o výběru pohlaví potomka. V článku 13 zmiňované kapitoly je deklarováno, že zásah zaměřený na úpravu lidského genomu lze provést pouze preventivně, za diagnostickým nebo terapeutickým účelem a pouze v případě, že jeho cílem není zavést žádnou změnu do genomu všech potomků.¹⁰⁹

Na základě Oviedské deklarace je možné rozlišit, že editace buněk somatického původu je přípustnou formou genové terapie za dodržení obecně platných etických principů. Editace buněk zárodečné linie a embryonální editace je nepřípustná, protože dochází k přímé projekci pozměňování genomu do potomků lidského jedince a následujících generací. To znamená, že geneticky modifikovaná embrya se nesmí implantovat do dělohy matky s následným těhotenstvím a narozením takto modifikovaných dětí.

Oviedskou deklaraci přijalo 29 zemí, šest zemí smlouvu podepsalo, ale ve svém zákonodárství neratifikovalo. Mezi zeměmi, které Oviedskou deklaraci nepodepsaly ani neratifikovaly, je Velká Británie, Irsko, Belgie, Německo a Rakousko. Česká republika Oviedskou deklaraci ratifikovala v červnu 2001 a účinnosti nabyla 1. října 2001. Je publikována pod č. 96/2001 ve Sbírce mezinárodních smluv.

¹⁰⁸ Srov. Council of Europe. *Convention for the protection of human rights and dignity of the human being with regard to the application of biology and medicine: Convention on Human Rights and Biomedicine* (4.4.1997) [2022-02-10]. <<https://rm.coe.int/168007cf98>>.

¹⁰⁹ Srov. tamtéž.

Vědecká obec byla již od počátku objevu CRISPR/CAS9 jako editačního nástroje v roce 2014 velmi opatrná a zdrženlivá při jeho používání v pohlavních buňkách a embryích. Již v lednu 2015 J. Doudna svolala do Napa Valley pracovní schůzi nejvýznamnějších odborníků v oblasti editačních inovací. Mezi nimi laureáty Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu Davida Baltimore, nebo Paula Berga. Výstupy těchto významných vědců jsou uvedeny v článku časopisu *Science* z roku 2015.¹¹⁰

Editace genomu somatických buněk představuje obrovskou naději pro lidi, kteří se již narodili s geneticky podmíněným onemocněním. Na druhé straně se však odmítá jakékoli zneužití editace CRISPR/CAS9 v lidských pohlavních a zárodečných buňkách. Autoři vyzývají k tomu, aby se mnohem intenzivněji mluvilo o sociálních a právních důsledcích modifikace genomu lidských zárodečných buněk. Dále vyjadřují snahu vynaložit, co největší úsilí na podporu transparentního výzkumu k hodnocení účinnosti a specifčnosti CRISPR/CAS9 technologie v genovém inženýrství lidských a nelidských modelových systémů. Tím by se argumentačně podložila potenciální aplikace CRISPR/CAS9 v genové terapii zárodečných linií. Členové této pracovní schůze vyzývají k vytvoření celosvětové reprezentativní skupiny vývojářů a uživatelů technologií genomového inženýrství a odborníků v genetice, právu a bioetice, stejně jako členů vědecké komunity, veřejnosti a příslušných vládních agentur a zájmových skupin, kteří by reflektovali aktuální etické výzvy a vytvářeli by experimentační rámec zásad biotechnologického využití editačního nástroje CRISPR/CAS9.¹¹¹

Záhy po této prvotní iniciativě úzké vědecké obce se ustanovila Komise pro editaci lidského genomu¹¹² pod záštitou Národní akademie věd US, a Americké společnosti pro medicínu, za podpory Britské královské společnosti a Čínské akademie věd. V prosinci 2015 se ve Washingtonu pod vedením zmíněných společností organizovala první mezinárodní konference o editaci lidského genomu od objevu editačního nástroje CRISPR/CAS9. V průběhu jednání byla vyslovena velmi silná podpora k prohloubení základního a klinického výzkumu v případě editace somatických buněk. V případě lidské dědičné editace bylo vysloveno vážné omezení, které je podobné tomu dřívějšímu. Členové komise uvádí, že by bylo nezodpovědné pokračovat v jakémkoli klinickém použití editace genomu zárodečné linie, pokud a dokud nebudou na základě vhodnosti

¹¹⁰ Srov. BALTIMORE, David. – BERG, Paul. a kol. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science* 2015, roč. 348, č. 6230, s. 36–38.

¹¹¹ Srov. tamtéž.

¹¹² Srov. National academies of sciences, engineering, and medicine. *Human genome editing initiative*. [2022-02-15]. <<https://www.nationalacademies.org/our-work/human-gene-editing-initiative>>.

vyřešeny příslušné problémy s bezpečností a účinností metody, prohloubeno porozumění a vyvážení potenciálních rizik, výhod a dokud nedojde k jasnému vymezení možností využití metody v oblasti zárodeční linie. Zdůrazňuje se nutnost existence široké společenské shody o vhodnosti aplikace lidské dědičné editace a jakékoli klinické použití by mělo probíhat pouze pod příslušným odborným a regulačním dohledem. Upozorňují, že stanovená kritéria nebyla splněna pro žádné navrhované klinické použití a otázky bezpečnosti použití metody nebyly dostatečně prozkoumány. Dále se uvádějí překážky, které brání schválení lidské dědičné editace. Jsou to například omezenost případů přesvědčivého prospěchu, rozdílnost regulační a právní legislativy týkající se zákazů úprav zárodečné linie. Je však vyjádřeno, že klinické využití zárodečné linie a její úpravy by měly být pravidelně monitorovány a diskutovány, přičemž platí, že každý národ má pravomoc regulovat činnosti spadající do jeho jurisdikce, ale musí respektovat, že lidský genom je sdílen všemi národy. Bylo vyjádřeno přání, aby Mezinárodní společenství usilovalo o stanovení norem týkajících se přijatelného použití úpravy lidské zárodečné linie, dále aby harmonizovalo předpisy s cílem odradit od nepřijatelných činností a zároveň, aby vždy postupovalo ve prospěch zdraví a dobrých životních podmínek pro všechny.¹¹³

V prosinci 2015 se na mezinárodní konferenci o editaci lidského genomu stanovily základní otázky, které souvisí s použitím metody CRISPR/CAS9 v buňkách zárodeční linie v hypotetických klinických experimentech. Jedná se o následující okruhy: Jaké je riziko a frekvence nežádoucích zásahů editačního nástroje CRISPR/CAS9 mimo cílenou sekvenci upravovaného genu? Jaké je riziko neúplné genové editace buněk embryí v jejich rané fázi vývoje? Jaký má vliv zavedená mutace v cílovém genu? Jaký je celkový význam editační strategie v daném buněčném typu? Dále se jedná o otázku, jak nejlépe predikovat intenzitu škodlivých účinků, které genetické změny vyvolají za působení široké škály okolností, s nimiž se setkává lidská populace, včetně interakcí s jinými genetickými variantami a se životním prostředím. Jakým způsobem lze predikovat závažnost důsledků editace zárodečné linie u jednotlivců a jak u budoucích generací, které genetické změny následně ponесou? Je potřeba taky brát v úvahu otázku, jak přistoupit ke skutečnosti, že po zavedení mutace do lidské populace by bylo velmi obtížné

¹¹³ Srov. National academies of sciences, engineering, and medicine. *On human gene editing: international summit statement*. (3.12.2015) [2022-02-15].
<<https://www.nationalacademies.org/news/2015/12/on-human-gene-editing-international-summit-statement>>.

odstranit nežádoucí genetické změny tak, aby nezůstaly v žádné komunitě nebo zemi. Velkým rizikem je také to, že editace zárodeční linie otevírá prostor pro tzv. vylepšování lidí. Jak by docházelo k řešení obtížných situací, kdy trvalé genetické „vylepšení“ podmnožin populace by způsobilo velké prohloubení sociální nerovnosti a vedlo by k fenoménu exkluzivity určité společenské vrstvy. Konečnou obavou je velká nejasnost ohledně morálních a etických úvah o záměrném pozměňování lidské evoluce pomocí této technologie.¹¹⁴

V únoru 2017 se konalo další zasedání Komise pro editaci lidského genomu, kterou organizovala Národní akademie věd US a Americké společnosti pro medicínu. Účastnili se jí nejvýznamnější odborníci v oboru genové terapie, etiky a práva.¹¹⁵ Tato konference přinesla velmi důležité poznatky z oblasti základního výzkumu v oblasti editace genomu, z oblasti editace somatických buněk. Pojednávala taky o dědičné editaci buněk zárodečné linie, o teoretickém vylepšování lidí a konečně poskytla náhled na veřejný zájem a další sociální poznatky. Protože její závěry byly formulovány 14. února, závěrečná zpráva konference se nazývá Valentýnská. Obsahuje deset základních kritérií, která musí být splněna, pokud by mělo dojít ke klinické aplikaci dědičné editace buněk zárodečné linie. Tato kritéria jsou následující: musí absentovat rozumné alternativy k léčení v tom kterém konkrétním případě onemocnění. Musí být splněno omezení v prevenci závažné nemoci, stavu a důsledku onemocnění. Je zapotřebí, aby bylo splněno omezení úprav genů na ty, které byly přesvědčivě prokázány, že způsobují nebo silně predisponují onemocnění nebo stav. Dále musí platit, že aberantní geny se musí převádět na verze, které převládají v populaci a je známo, že jsou spojeny s běžným zdravím s malými nebo žádnými důkazy o nepříznivých účincích. Je nutno vytvořit a zajistit dostupnost důvěryhodných preklinických a / nebo klinických údajů o rizicích a potenciálních přínosech postupů pro zdraví. Musí být zajištěn průběžný a přísný dohled nad klinickými hodnoceními účinků postupů pro zdraví a bezpečnost účastníků výzkumu. Nesmí chybět komplexní plány pro dlouhodobé, vícegenerační sledování při současném respektování osobní autonomie. Je potřeba, aby byla zajištěna maximální transparentnost studií v souladu s ochranou soukromí pacientů. V průběhu studií je nutné, aby bylo zajištěno pokračující přehodnocování zdravotních i společenských přínosů a rizik se širokou účastí a vstupy odborné veřejnosti. Dále musí být zajištěny spolehlivé kontrolní mechanismy, které

¹¹⁴ Srov. tamtéž.

¹¹⁵ NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE. *Human genome editing: Science, ethics and governance.*, s. 279–291.

zabrání rozšíření aplikace CRISPR/CAS9 na jiné použití než prevenci vážného onemocnění nebo stavu.¹¹⁶

V roce 2020 Americká národní lékařská akademie, Národní akademie věd a Britská královská společnost Spojeného království, na základě mezinárodního konsorcia o využití dědičné editace, vydává ve Washingtonu publikaci *Heritable Human Genome editing* (Dědičná editace lidského genomu, HHGE), která se problému dědičné editace lidského genomu a jejího využití v klinické praxi věnuje velmi hluboce. Této publikaci předcházela téměř roční mezinárodní vědecká diskuse na různých úrovních v průběhu měsíců srpna 2019 až ledna 2020. Do této veřejné diskuse bylo zapojeno 10 národností ze 4 kontinentů. Účastnili se jí odborníci v oblasti vědy, medicíny, genetiky, psychologie, etiky a práva.¹¹⁷

Již v úvodu této publikace se autoři velice jasně vymezují vůči nelegálnímu případu narození čínských dvojčat s editovaným genem *ccr5*. Tento případ ještě více vyvolal vlnu touhy po obnově odborné diskuse ve věci dědičné editace lidského genomu nejen na vědecké, sociální, vládní úrovni, ale také na úrovni morální a náboženské. V publikaci je jasně vyjádřeno, že je nezbytné, aby se ustanovily kontrolní režimy a mechanismy využití dědičné editace lidského genomu. V případě výskytu monogenetických onemocnění a hypotetického klinického použití metody dědičné editace lidského genomu je naprosto esenciální dokonalá bezpečnost a vysoká účinnost použité metody. Za předpokladu existence bezpečné a efektivní metodiky, dále za předpokladu rozhodnutí o povolení klinického použití HHGE, bude uděleno jednotlivým zemím, kde nebude chybět fundovaná diskuse o vědeckých, etických, morálních aspektech a konkrétních aplikacích metody, povolení zvést CRISPR/CAS9 dědičnou editaci v pohlavních buňkách nebo embryích.¹¹⁸ Všechny tyto aspekty jsou předmětem probíhajících národních a mezinárodních rozhovorů, včetně aktuální práce odborného poradního výboru pro Světovou zdravotnickou organizaci (WHO), který pracuje na vytváření standardů pro správu a dohled nad editací lidského genomu, jak na národní, tak na globální úrovni. Další klíčovou mezinárodní komisí, která byla ustanovena Americkou národní lékařskou akademií, Národní akademií věd a Královskou společností Spojeného království,

¹¹⁶ Srov. tamtéž, s. 189.

¹¹⁷ NATIONAL ACADEMY OF MEDICINE, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, AND THE ROYAL SOCIETY. *Heritable human genome editing*. Washington, DC: The National academies press, 2020.

¹¹⁸ Srov. tamtéž, s.1.

je Mezinárodní komise klinického použití editace v lidských pohlavních buňkách. Tuto společnost tvoří členové z 10 zemí. Základním úkolem této komise je: zvážení všech technických, vědeckých, lékařských a regulačních požadavků na mezinárodní úrovni, jakož i zvážení společenských, morálních a etických problémů, které jsou neoddelitelně spjaty s těmito požadavky. Důležitá je například odborná analýza nejistot souvisejících s výsledky a analýza potenciálních výhod a škod pro účastníky klinického využití HHGE. Dalším rozměrem zkoumání těchto komisí bude, jestli vůbec technologie asistované reprodukce mohou být dostatečně, bezpečně a efektivně vyvinuty pro odpovědné klinické využití HHGE.¹¹⁹

Předkládaná publikace formuluje několik důležitých závěrů, které se týkají postupného a co nejbezpečnějšího procesu translační cesty, tedy zavedení HHGE od preklinického výzkumu ke klinické aplikaci u lidí. V angličtině je označována jako „translational pathway“.¹²⁰

3.5. Obecní principy translační cesty

Translační cesta, tedy proces zavedení metody dědičné editace lidského genomu do klinické praxe je poměrně složitý a komplikovaný.¹²¹ Zodpovědná realizace translační cesty k počátečnímu klinickému využití HHGE by měla zahrnovat vytvoření platformy pro základní výzkum s cílem optimalizovat technologie úpravy genomu z metodologického hlediska tak, aby terapeutická aplikace CRISPR/CAS9 byla bezpečná. Pro úspěšné zavedení HHGE v případě konkrétního geneticky podmíněného onemocnění nesmí chybět soubor preklinických důkazů na podporu navrhovaného terapeutického použití editačního nástroje. To pochopitelně obnáší vytvoření návrhu metodiky a vhodnou kalibraci metody pro konkrétní genetické onemocnění. U toho musí probíhat komplexní doprovodní referenční výzkum obsahující testování v kultivovaných lidských buňkách a v zygotách modelových organismů konkrétních geneticky podmíněných onemocnění, dále testování činidel pro úpravu genomu v embryích modelových organismů, pak ještě hodnocení rodičovských genomů a testování editačních reagens pro úpravu genomu v kultivovaných rodičovských buňkách. Až poté následuje preklinické testování na lidských embryích spojené s charakterizací cílových míst úpravy

¹¹⁹ Srov. tamtéž, s. 2–4.

¹²⁰ Srov. tamtéž, s. 28.

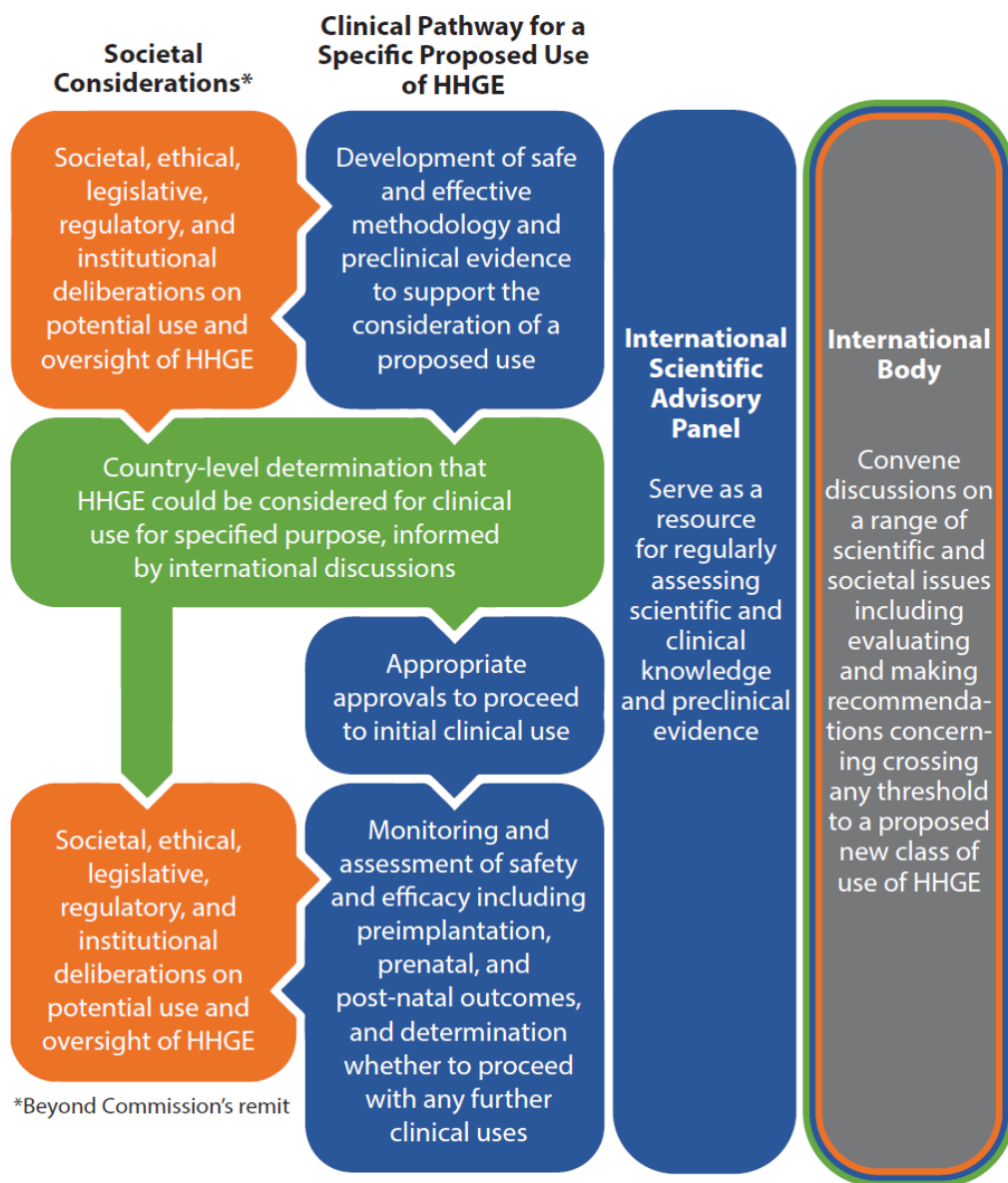
¹²¹ Srov. tamtéž, s. 28–30.

a identifikace rizika pravděpodobných zásahů mimo cílovou sekvenci v genomu. Nutně se vyhodnocuje také riziko vzniku mozajcizmu a co nejlépe se predikuje samotný vývoj geneticky upraveného embrya. Probíhá detailní klinické hodnocení navrhovaného použití s následným vytvořením a charakterizací editovaných lidských embryí s upraveným genomem. Vhodná embrya jsou přenesena do dělohy. Proces těhotenství se velmi pečlivě sleduje; je nutné provádět dlouhodobé sledování každého dítěte, které se narodí po aplikaci HHGE. Ze shromážděných dat se vytváří dostupné informační databáze, které umožní klinické hodnocení aplikace HHGE pro budoucí rozhodování o využití této aplikace v klinické praxi. Veškerý proces úspěšné translační cesty musí podléhat přísné kontrole a schválení ze strany národních regulačních systémů, které se opírají o fundovaný informovaný souhlas rodičů.¹²²

Detailnější rozpracování jednotlivých kroků translační cesty obsahuje Tab. 1, která je součástí diplomové práce jako příloha a je uvedena pod názvem: Translační cesta – základní aspekty a výstupy vědecké obce.

Na následujících stránkách je pro přehlednost znázorněno grafické schéma translační cesty jako procesu zavedení HHGE v klinické praxi (obr. 9) a schéma, které přibližuje postupné kroky translační cesty v případě konkrétního geneticky podmíněného onemocnění (obr.10).

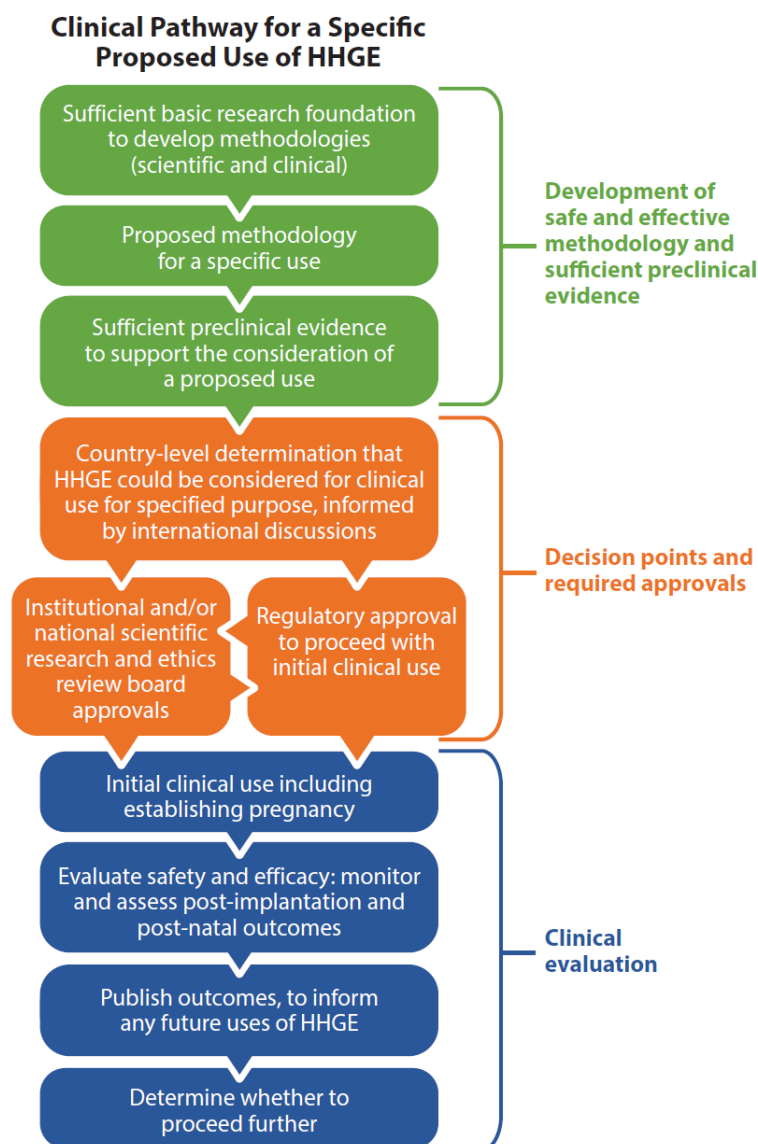
¹²² Srov. tamtéž, s. 123.



Obr. 9 Grafické schéma translační cesty jako procesu zavedení metody HHGE do klinické praxe. Oranžová plocha uvádí sociální, etické, regulační a institucionální návrhy a úvahy týkající se potenciálního zavedení a kontroly HHGE v klinické praxi. Nezbytným doplněním je modrá plocha týkající se vývoje bezpečné a účinné metody a soubor preklinických studií podporující navrhovaný způsob použití metody. Tento preklinický výzkum neprobíhá na germinálních buňkách, ale na somatických a jiných. K preklinickým experimentům se využívají zvířecí modely a lidská embrya, která nejsou směřována k dalšímu vývoji v těhotenství.¹²³ Na zelené ploše se obě platformy setkávají. V obecné diskusi na národní a mezinárodní úrovni dochází k profilaci požadavků těch kterých států na zavedení metody HHGE v klinické praxi pro konkrétní případy použití. V dalším kroku dochází k vlastnímu schválení metody a k zahájení klinického používání. Klíčovou je kontrola a průběžné vyhodnocování bezpečnosti a účinnosti v různých fázích vývoje lidského jedince – preimplantační, prenatální a postnatální, což poskytuje platformu pro další rozlišování a použití metody i v dalších hypotetických případech. V průběhu této informační výměny má docházet k precizování a zveřejňování pracovních protokolů a co nejširšího souboru informací. Na celý tento proces dohlíží kontrolní orgán jak na národní úrovni, tak na mezinárodní, ten rozhoduje o dalších klinických možnostech využití editační metody HHGE. Převzato National academy of medicine, national academy of sciences, and the royal society. *Heritable human genome editing*, 2020.¹²⁴

¹²³ Srov. tamtéž, s. 32.

¹²⁴ Srov. tamtéž, s. 162.



Obr.10 Krokový proces zavedení metody HHGE v konkrétním klinickém výzkumu. Schéma naznačuje tři klíčové části tohoto procesu. První z nich, označen zeleně, je vývoj bezpečné a efektivní metody ověřené dostatečným souborem preklinických důkazů. Tato část sestává ze třech kroků: vytvoření dostatečného souboru dat základního výzkumu pro vývoj metodologie (jak vědecký přístup, tak klinická aplikace), navržení metody pro konkrétní případ využití a posledním je dostatečný preklinický soubor důkazů pro uvažované zavedení konkrétního využití metody. Druhý proces je označen oranžově a představuje proces rozlišování, rozhodování a nutných souhlasů k aplikaci metody. Obsahem tohoto procesu je rozvažování na národní úrovni, že metoda HHGE se zavede v klinické praxi pro konkrétní účel. Toto rozhodnutí je v přímé korelaci s informacemi mezinárodních diskusí. Současně probíhá institucionální a/nebo národní vědecký výzkum a etické hodnocení komisních souhlasů. Dále se přehodnocuje regulační schválení počátečního klinického využití. Třetím procesem translační cesty zavedení metody HHGE do klinické praxe, označeném modře, je proces klinického hodnocení aplikačních kroků. Skládá se z počáteční testovací fáze a ustavení těhotenství. Dále dochází k hodnocení bezpečnosti a účinnosti, monitorování a posouzení post-implantačních a post-natalních výsledků. Tyto výsledky se dále publikují v impaktovaných časopisech pro informování široké vědecké obce o budoucích použitích metody HHGE. Rozhodování o dalších možnostech zlepšení a rozšíření možností použití metody je posledním krokem. Převzato National academy of medicine, national academy of sciences, and the royal society. *Heritable human genome editing*, 2020.¹²⁵

¹²⁵ Srov. tamtéž, s. 122–123.

3.6. Nejpravděpodobnější cesty budoucího využití metody HHGE

Pokud by HHGE vstoupila do klinické praxe, ty nejpravděpodobnější způsoby aplikace se budou týkat rodičů, kteří jsou nositeli vážného dědičného monogenního onemocnění s velkou morbiditou anebo předčasným úmrtím dítěte. Dále by šlo o případy rodičů, u kterých by byla velká pravděpodobnost, že některé z jejich dětí by zdědilo patogenní genotyp vážného monogenního onemocnění. Pak by sem patřily případy zahrnující jiné monogenní podmínky s méně závažným dopadem a některé případy polygenních onemocnění. Pravděpodobně by se jednalo také o případy zahrnující jiné aplikace HHGE, včetně změn, které by posílily nebo zavedly nové rysy nebo se pokusily odstranit některé nemoci z lidské populace.¹²⁶

3.7. Technické návrhy pro co nejefektivnější provedení metody HHGE

Jak konkrétně by aplikace editačních agens probíhala? První kategorie modifikací se týká raných stadií vývoje embrya. Jedním z prvních způsobů je zavedení editačních reagensů do aktivovaného oocytu současně s vpravením spermií. Zatím není úplně objasněno vytvoření nových epigenetických modifikačních vzorců u ustanoveného prvojádra nově formující se zygoty, což by mohlo ovlivňovat průběh editační reakce.

Druhou cestou je zavedení editačních reagensů těsně po oplodnění, tedy při formování zygotického prvojádra. Tato strategie je velmi obtížná, ale zaručuje, že všechny buňky organismu budou nositeli požadované mutace a jedinec bude tvořit pohlavní buňky, kterými se změna udrží v potomstvu. Metoda se provádí buď přímou mechanickou injektáží anebo elektroporací (rozvolnění buněčné membrány pomocí elektrického proudu a vpravení reagensů do buněčného nitra s ochlazením a zacelením membrány).

Při zavádění editačních reagensů v pozdějších embryonálních fázích přichází velmi velké riziko vzniku mozajcizmu, to znamená, že vznikne heterogenní populace embryonálních buněk s požadovanou změnou, bez požadované změny (některé buňky neprojdou editací genomu) a buněk s nežádoucími změnami. Neoptimálnější způsob zajištění, co nejúčinnější a nejbezpečnější editace je i nadále předmětem zkoumání.¹²⁷

¹²⁶ Srov. tamtéž, s. 10.

¹²⁷ Srov. tamtéž, s. 65, 88.

I nadále však nejsou úplně prozkoumány přirozené procesy prvotních fází embryonálního vývoje, zvláště epigenetická reprogramace jak samčího, tak samičího prvojádra po splnutí. Tyto procesy se týkají smazání a znovuuštění metylačních modifikací na cytozinu, dalších histonových modifikací a ustavení nových transkripčních epicenter.¹²⁸ Je tedy důležité prozkoumávat souvislosti těchto epigenetických remodelací s účinností na editačních reagens.

Zajímavou je taky hypotetická metoda získání pohlavních buněk – tzv. *in vitro* gametogeneze. Je to metodický proces, kdy z pluripotentních lidských kmenových buněk se nastavením správné diferenciační cesty vytvoří prekurzory pohlavních buněk, které by produkovaly neomezené množství jak samčích, tak samičích gamet. Pokud by se kmenové buňky geneticky nemocných rodičů *in vitro* ošetřily editačním nástrojem, znamenalo by to, že všechny pohlavní buňky vznikající ze svých editovaných prekurzorů by nesly zavedenou požadovanou mutaci a systém by se vyvaroval hrozcímu mozajcizmu a nežádoucím zásahům, jako i nadměrné eliminaci připravovaných embryí.¹²⁹

Další možnou strategií je izolace spermatogoniálních kmenových buněk, tedy buněk, ze kterých se v průběhu spermatogeneze vyvíjejí spermie a vajíčka. Je známé, že tyto buňky je možné izolovat od různých živočišných druhů. U myši byly tyto buňky editovány a vráceny do organismu. Samčí jedinec začal produkovat spermie s požadovanou genovou úpravou.¹³⁰

Dalším zvířecím modelem pro získání pohlavních buněčných prekurzorů je cesta využití reprogramace somatických buněk na indukované pluripotentní kmenové buňky a jejich nasměrování prostřednictvím specifických transkripčních faktorů do linie primordiálních zárodečných buněk produkujících gamety. Druhou cestou je jaderný přenos somatického jádra do enukleovaného oocyty a nastavení embryonálního vývoje s další diferenciací embryonálních kmenových buněk na progenitorové buňky produkující gamety, tedy se jedná o formu *in vitro* gametogeneze. Pochopitelně na lidského jedince není možné z etických důvodů tyto přístupy aplikovat, ale představují určité teoretické přístupy.¹³¹

¹²⁸ Srov. tamtéž, s. 71–72.

¹²⁹ Srov. tamtéž, s. 76–77.

¹³⁰ Srov. WU, Yuxuan a kol. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell research* 2015, roč. 25, č. 1, s. 67–79.

¹³¹ Srov. NATIONAL ACADEMY OF MEDICINE, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, AND THE ROYAL SOCIETY. *Heritable human genome editing*, s. 78–80.

4. Základní etické principy

Člověk je neustále konfrontován s celým spektrem nejrůznějších výzev. Mohou to být výzvy společenské, sociální, ekonomické, kulturní, ale taky výzvy týkající se vědeckého pokroku, který je mnohem rychlejší než etická reflexe dopadu moderních vědeckých objevů. Při reflexi o nových vědeckých pokrocích, zvláště s ohledem na editační nástroj CRISPR/CAS9 a jeho použití v lidské genové terapii, je důležité eticky promýšlet nové klinické strategie z perspektivy obecně platných základních etických principů, které člověku přináležejí z podstaty jeho vlastní existence. Soubor těchto principů byl označen jako Barcelonská deklarace. Etické principy důstojnosti, autonomie, integrity a zranitelnosti představují referenční kritéria hodnocení nejrůznějších etických otázek týkajících se člověka. Praktickou aplikací se z těchto čtyř dále mohou odvíjet principy, které jsou určeny pro konkrétní oblast řešených problémů z etického hlediska. U eticky problematické aplikace CRISPR/CAS9 v případě lidské dědičné editace a pak v neterapeutických postupech, jakými je volné neterapeutické experimentování, vylepšování lidského jedince potažmo lidského druhu, jsou v mnoha ohledech v ohrožení všechny čtyři etické principy. Je tedy důležité tyto principy definovat a přiblížit jejich smysl a význam a reflektovat.

4.1. Barcelonská deklarace a základní etické principy

Dříve než se přistoupí k hodnocení bioetického problému použití metody CRISPR/CAS9 v lidské dědičné editaci z hlediska křesťanské etiky, je potřeba přiblížit koncept základních etických principů, které jsou obecně platné při odborném hodnocení bioetických otázek. V evropském prostředí byly tyto principy definovány na základě výzkumu Evropské komise pod názvem *Základní etické principy v evropské bioetice a právu* mezi lety 1995-1998 a jejich výstupy jsou známé jako *Barcelonská deklarace* z roku 1998. Autoři Petr Kemp a Jacob Dahl Rendtorff poskytují filosofickou syntézu čtyř základních etických principů, a to důstojnosti, autonomie, integrity a zranitelnosti.¹³²

¹³² Srov. KEMP, Peter – RENDTORFF, Jacob D. The Barcelona declaration. *Synthesis philosophica* 2008, roč. 23, č. 2, s. 239–251.

4.1.1. Princip důstojnosti

Slovo důstojnost je odvozeno z latinského slova *dignitas*, což znamená znamenitost, výjimečnost, vznešenost, urozenost, hodnota. Lidská důstojnost je jakýmsi privilegiem, které přináleží každé lidské osobě pro jeho lidskou přirozenost. Je neodvolatelná. Důstojností se vyjadřuje rovnost všech lidských bytostí v jejich nejhlubší podstatě. Rozhodujícím etickým principem se stala díky křesťanské reflexi člověka stvořeného Bohem k jeho obrazu. Důstojností je každé lidské bytosti přiznán morální status a schopnost morálního jednání. Je jakousi vlastní vnitřní hodnotou lidské osoby. Člověk je podle principu důstojnosti považován za samostatnou bytost, která má jak individuální rozměr, tak rozměr interpersonální. Je připisována osobě jako takové bez ohledu na vážnost onemocnění a na psychický stav. V opačném případě by to mělo velmi vážné důsledky ve způsobu zacházení s danou osobou. Tento princip je klíčový při zákonodárství a odvíjí se z něj základní lidská práva. Nejvýznamnějším lidskoprávním dokumentem týkající se lidské důstojnosti a jejích aspektů je Všeobecná deklarace lidských práv, která byla promulgována Valným shromážděním OSN 10. prosince 1948. Všeobecná deklarace lidských práv byla původně jenom obecným a nezávazným textem. Teprve postupně se přepracovala do formy mezinárodní akceptovatelné smlouvy, kterou jednotlivé státy ratifikovala. Pro naši potřebu se dotkneme jenom prvních třech bodů samotné Deklarace.

Hned v prvním článku Všeobecné deklarace lidských práv je uvedeno, že všichni lidé se rodí svobodní a sobě rovni v důstojnosti i v právech. Jsou nadáni rozumem a svědomím a mají spolu jednat v duchu bratrství. Druhý článek mluví o rovnosti všech v právech a svobodách, stanovených deklarací bez jakéhokoli rozdílu rasy, barvy pleti, pohlaví, jazyka, náboženství, politického nebo jiného smýšlení, národnostního nebo sociálního původu, majetku, rodu nebo jiného postavení. Ve třetím článku je jasně promulgováno, že každý má právo na život, svobodu a osobní bezpečnost.¹³³

Každý člověk je osobou. To je realita, ne jenom vlastnost, která se v průběhu lidského vývoje získává. Člověk je definován lidskou přirozeností. Osoba je jednotou těla, duše a ducha a jako taková představuje oduševnělou existenci s hlubokým vnitřním duchovním dynamismem. Koncept osoby je neustále zkoušen a často vystavován nejružnějším redukcionismům. V obecné antropologické diskusi se velmi často vedou spory, kdy se

¹³³ Srov. Valné shromáždění Organizace spojených národů, New York, (10. 12. 1948), [2022-01-23]. <http://www.lidskaprava.cz/uploads/03_dokumenty/04_uvod/00_VDLP_UDHR-.pdf>.

lidská bytost stává osobou a kdy jí být přestává. Katolická církev jasně deklaruje, že každá lidská bytost je osobou od svého přirozeného početí, až po přirozenou smrt. Lidská důstojnost je respektována od začátku samotného života až po jeho přirozený konec. Pokud je však v ohrožení koncept osoby, bude ohrožena také její důstojnost.

Součástí důstojnosti jako principu je schopnost hledat a poznat pravdu. Důstojnost pramení ze svobody. I touto svobodou je člověk obrazem Boha – Stvořitele. Člověk je díky důstojnosti morální bytostí. Tento princip je kritériem ve většině etických rozhodování, jakými jsou: ochrana vznikajícího života, ukončení lidského života, je důležitým kritériem při posuzování etické kvality medicínských zásahů (oplození in vitro, genová technologie, transplantace, experimentování s člověkem).¹³⁴ Z principu důstojnosti jsou odvozeny principy služebnosti a kreativity. Služebnost člověka vysvětlujeme tak, že člověk nemá absolutní nadvládu nad přírodou. Má být jejím ochráncem a uchovávat ji neporušenou. Kreativitou se rozumí schopnost člověka vytvářet nové prostředky sloužící k zlepšení kvality života. Tyto aktivity se týkají i technických metod a umělých terapeutických zásahů při léčení nebo experimentování, pokud představuje zásah do přirozených funkcí a schopností člověka. Kreativita je jedním z dimenzí personality, a tedy přináší principu lidské důstojnosti. Oba principy mají vést k péči a k eliminaci rizik poškozování a ničení lidského jedince a druhu.¹³⁵

Důsledkem platnosti principu důstojnosti je mj. princip společného dobra. Důstojnost a hodnota osoby předpokládá společenství, v němž každý má povinnost přispívat ke společnému dobru a také se podílet na vytváření tohoto společného dobra. V podstatě se jedná o sociální spravedlnost vyžadující distribuci společných dober, přičemž kritériem není jenom zásluha, ale potřeba. Jedná se o rozdělení prostředků podle potřeby prostřednictvím solidární pomoci a podpory. Lékařská péče nesmí být jen výsadou bohatých. Podle tohoto principu je klíčovou povinností státu přispívat k zajištění lékařské péče pro všechny, aby tak zajišťoval dostatečnou péči zaměřenou na zdravotní potřeby občanů. Pod společné dobro patří výzkum nových léčebných metod, který mnohdy vyžaduje experimentování s lidskými subjekty při testování jejich účinnosti a nezávadnosti. Jde hlavně o hledání nových léků proti nemocem, zavádění nové chirurgické terapie a další.¹³⁶

¹³⁴ Srov. ONDOK, Josef P. *Bioetika, biotechnologie a biomedicina*. Praha: Triton 2005, s. 61–62.

¹³⁵ Srov. tamtéž, s. 63–64.

¹³⁶ Srov. tamtéž, s. 67.

4.1.2. Princip autonomie

Zahrnuje osobní svobodu, která je podmínkou osobní identity a sebezvoje, uznává právo svobodně rozhodovat o sobě (řec. autos – já, nomos – vláda), řídit se vlastním rozumem, respektuje samostatnou tvorbu myšlenkových plánů a cílů, a tak umožňuje vytvářet harmonické podmínky k vlastnímu vývoji.¹³⁷ Autonomie dále zahrnuje schopnost morálního posouzení a jednání podle morálních hodnot, které osoba pokládá za pravdivé. Z principu autonomie se odvozuje právo na soukromí, schopnost racionálního rozhodování, schopnost převzít zodpovědnost. Asi nejzásadnějším problémem z pohledu autonomie je nejasné stanovisko vědecké obce ke vzniku a zániku lidského života. Otázkou je autonomie embrya, plodu, člověka s kvantitativní poruchou vědomí, nebo v kómatu.

Konkrétní praktickou aplikací kombinace principů důstojnosti, autonomie a integrity je odvození z vlastního práva na sebeurčení, správného svědomí a informovaného souhlasu.¹³⁸ Dobře formované svědomí je předpokladem správného etického rozhodnutí. To vyžaduje detailní informovanost o stavu pacienta a o etických normách, které přicházejí v úvahu při rozhodování o terapeutických zákrocích. Na základě těchto informací je potřeba získat morálně jistý úsudek a převzít odpovědnost za jednání ve shodě s takto formovaným svědomím. Informovaný souhlas je druhou stranou téže mince. Při rozhodování, nestačí jenom princip správného svědomí. Požadavek informovaného souhlasu znamená, že žádný fyzický nebo psychický zásah do integrity lidské osoby v průběhu léčby nebo experimentu nemůže být podniknut bez předcházejícího svobodného (nesmí být vyvinut nátlak) a informovaného souhlasu pacienta (příp. opatrovníka, který se zavazuje jednat v zájmu a k prospěchu pacienta). Podle těchto principů se hodnotí různé terapeutické zásahy v oblasti použití genové terapie a vážných operativních zákroků.¹³⁹ Informovaný souhlas je podmíněn svobodnou, autentickou, rozumovou a morální reflexí. Informovaný souhlas sestává z následujících myšlenkových kroků: odkrytí a vysvětlení problému, porozumění problému, dobrovolné přijetí, způsobilá reflexe a konečný souhlas.¹⁴⁰

¹³⁷ Srov. RENDTORFF, Jacob D. Bioethics and medical ethics: Basic principles in bioethics and biolaw. *The Paideia archive: Twentieth world congress of philosophy* 1998, č. 4., s. 132.

¹³⁸ Srov. ONDOK, Josef P. *Bioetika, biotechnologie a biomedicína*, s. 64–66.

¹³⁹ Srov. tamtéž, s. 64–75.

¹⁴⁰ Srov. RENDTORFF, Jacob D. Bioethics and medical ethics: Basic principles in bioethics and biolaw, s. 133–134.

K informovanému souhlasu se jasně přidružuje odvozený princip profesionální komunikace, který zahrnuje povinnost lékařů a lékařského personálu naslouchat pacientovi, věřit mu a pokud je to možné, říkat pravdu. Každá osoba má právo na respektování vlastního soukromí, ze strany lékaře pacientovo sdělení se pokládá vždy za svěřené tajemství. Díky profesionální komunikaci se ustavuje mezi lékařem a pacientem vztah důvěry jak na emocionální, tak na racionální úrovni. Při sdělování úplné pravdy o stavu pacienta se musí brát do úvahy celkový stav pacienta, a to, jestli by to nevedlo k rezignaci a depresím. Tento princip nedovoluje lékařům sdělovat informace o zdravotním stavu pacienta nebo o vlastní terapii osobám, které nemají k němu příbuzenský vztah, nebo nejsou jeho opatrovníky.¹⁴¹

V informovaném lékařském rozhodovacím procesu je velmi důležitý princip dvojího účinku, kdy cíl léčebního zákroku je sám o sobě etický, ale v dané situaci, může nepřímo vést k výsledku, který sám o sobě je neetický. Vhodným příkladem může být odstranění zhoubného nádoru, spojeného s rizikem usmrcení plodu těhotné ženy. Primárním cílem je záchrana života ženy. Bioetické rozhodování při aplikaci tohoto principu podléhá několika podmínkám. Zamýšlený cíl musí být eticky správný, úmyslem jednajícího musí být dosažení dobrého účinku a vystříhání se – pokud možno – účinku škodlivému. Prospěšné účinky musí z jednání vyplývat stejně přímo jako účinky škodlivé, a jako poslední podmínka musí platit, že předvídané prospěšné účinky musí být větší než účinky škodlivé. Někdy tyto podmínky jsou ještě zpřísněny tím, aby špatný účinek byl pouze doprovodný a aby dobrého účinku nebylo možné dosáhnout žádným jiným způsobem, který by jakýkoli špatný doprovodný účinek vyloučil. Princip se aplikuje ve zvláště závažných případech a případech operací spojených s rizikem smrti.¹⁴²

4.1.3. Princip integrity

Integrita představuje lidskou nedotknutelnost. Sféra integrity zahrnuje jak dimenzi duchovní a duševní, tak rozměr tělesný. Odkazuje na soudržnost života v čase a prostoru. Je to princip ochrany před nežádoucím vnějším zásahem podle stanoviska *noli me tangere*. Integritu můžeme chápat jako celistvost, totalitu a ušlechtilost, nenarušitelnost, nedotknutelnost. Integrita chrání genetickou dědičnost budoucích generací a staví se proti manipulaci genetického dědictví a jeho genetických identit. Manipulace s lidským tělem

¹⁴¹ Srov. ONDOK, Josef P. *Bioetika, biotechnologie a biomedicina*, s. 66.

¹⁴² Srov. tamtéž, s. 68–69.

podstatně mění osobní integritu. V této souvislosti existuje intimní spojení mezi integritou a soukromou sférou lidské osoby jako subjektu individuální autonomie.¹⁴³

K principu integrity se přidružuje také princip totality. Jedná se fundamentální funkční kapacity, které ustavují osobu člověka. Musí být uchovávány pro dobro člověka a celé společnosti. Lidská přirozenost je otevřený systém s hierarchií jednotlivých funkcí. Termín integrita zahrnuje soulad všech těchto funkcí. Integrita představuje jednotu psycho-sociálně-fyzických aspektů jedinečné lidské bytosti. Principy totality a integrity se aplikují v preventivní medicíně, v chirurgické operační praxi, v řešení problému souvisejících s nejistým pohlavím a transsexualismem.¹⁴⁴

4.1.4. Princip zranitelnosti

Tento princip se odvozuje od integrity jako základního principu pro ochranu jak lidského, tak života vůbec. Každý, nejenom lidský život, je ve své nejhlubší podstatě vystaven poškození, zranění, zničení, smrti. Proto je potřebné jej chránit a pečovat o něj. Společně s dalšími principy stojí u základu morality. Základním morálním imperativem odvozeným z principu zranitelnosti je péče o druhé a etická zodpovědnost za druhé.¹⁴⁵

Princip zranitelnosti je v moderní společnosti často přehlížen, jako by veškerá lidská zranitelnost, lidské utrpení, nemoci a postižení měly být odstraněny, a tak se měl vytvořit prostor pro nerušený život dokonalých lidských bytostí. Úcta ke zranitelnosti je projevem důstojnosti k lidskému životu, který je zranitelný a konečný.¹⁴⁶ V lidských bytostech, jako osobách s vlastní autonomií, princip zranitelnosti vytváří nejenom možnost, ale nutnost správného morálního jednání. Tím správným morálním jednáním vzhledem k principu zranitelnosti je vlastní péče o zranitelné. Zranitelní jsou ti, jejichž autonomie, důstojnost nebo integrita mohou být ohroženy. Tato zásada však také konkrétně vyžaduje nejen nezasahování do autonomie, důstojnosti nebo integrity bytostí, ale také poskytují adekvátní pomoci, která umožní realizovat, nebo obnovovat jejich potenciál. Z tohoto předpokladu vyplývá, že existují pozitivní práva na integritu a autonomii, která zakládají myšlenky solidarity, nediskriminace a společenství.¹⁴⁷

¹⁴³ Srov. RENDTORFF, Jacob D. Bioethics and medical ethics: Basic principles in bioethics and biolaw, s.136–137.

¹⁴⁴ Srov. ONDOK, Josef P. *Bioetika, biotechnologie a biomedicina*, s. 62–63.

¹⁴⁵ Srov. KEMP, Peter – RENDTORFF, Jacob D. The Barcelona declaration, s. 247.

¹⁴⁶ Srov. KEMP, Peter. *Final report to the European Commission on the Project basic ethical principles in Bioethics and Biolaw 1995-1998*, Part B, s. 4-5. (9.7.1999) [2022-02-27].

<<http://cometc.unibuc.ro/reglementari/Basic-Ethical-Principles.pdf>>.

¹⁴⁷ Srov. tamtéž, s. 9.

4.2. Aplikace základních bioetických principů

Z uvedených základních bioetických principů Barcelonské deklarace vyplývají konkrétní aplikace, které jsou obsaženy v závěrečné zprávě k projektu *Základní etické principy v evropské bioetice a právu* adresované Evropské komisi.¹⁴⁸ V následujícím výčtu budou uvedeny ty aplikace, které jsou klíčové při řešení etických problémů a vytvářejí tak důležitý podklad pro etickou reflexi.

Všechny čtyři principy, princip důstojnosti, autonomie, integrity a zranitelnosti, vyjadřují úctu ke všem lidským bytostem jako osobám. Zmiňované principy by měly být v základu evropské bioetiky a biologického práva. Respektování čtyř etických principů znamená projevení nejhlubší úcty k lidskému tělu na základě lidské důstojnosti a zranitelné integrity lidské osoby. Díky těmto principům dochází k integraci lidské osoby do většího světa živé přírody, čímž se prohlubuje úcta ke všemu živému a tím se také podněcuje a prohlubuje lidská zodpovědnost ve vztahu k celému živému světu. Tyto čtyři principy by měly být prosazovány v rámci solidarity a měly by vést k odpovědnosti celou společnost. Hlavní aplikace odpovídá integraci principů do etiky péče, která je nasměřována ke všemu živému a zajišťuje seberealizaci člověka v sociálním státě. V civilizačním vývoji společnosti působí základní principy změnu interpretace, a to od nároku na smluvní práva k nároku na ochranná práva, která jsou konfrontována s technologickým vývojem v různých oblastech biomedicíny a biotechnologie. Konkrétní aplikací principů v klinické praxi je jasná identifikace vztahu lékaře a pacienta, který se musí opírat o fundovaný informovaný souhlas. Pro dodržování těchto principů ve všech evropských zemích by měly být ustanoveny konkrétní etické rady. Kontrolou dodržování těchto principů by docházelo k harmonizaci politického, sociálního, kulturního, společenského a vědeckého prostředí.¹⁴⁹

4.3. Biomedicínské principy podle T. L. Beauchampa a J. F. Childresse

Ve druhé polovině 20. století, formulovali Beauchamp a Childress tzv. čtyři principy lékařské etiky, které výstižně shrnuje Marek Vácha.¹⁵⁰ Jedná se o princip neškodění (nonmaleficence), dobřechinění (beneficence), autonomie a spravedlnosti.

¹⁴⁸ Srov. tamtéž, s. 5–6.

¹⁴⁹ Srov. tamtéž, s. 5

¹⁵⁰ VÁCHA, Marek a kol. *Základy moderní lékařské etiky*. Praha: Portál 2012, s. 55–59.

Jako první se uvádí princip neškodění, který představuje v lékařské etice povinnost neškodit druhým. Z tohoto jednoduše formulovaného principu vyvstávají další morální pravidla: nezabíjet, nezpůsobovat bolest a utrpení, neznevažovat hodnotu člověka, neurážet, nepozbavovat druhé jejich dober. Lékař neustále musí zvažovat výhody a zátěže indikované léčby a vyhýbat se těm, které jsou nevhodně zatěžující pro pacienta a zvolit nejlepší postup. Tohle je zvláště důležité v obtížných rozhodnutích udržovat pacienta vhodnou péčí, nebo léčbou udržující život ukončit.¹⁵¹

Jako druhý se uvádí princip prospěšnosti (beneficence), který zahrnuje povinnost volit vždy to, co je pro pacienta prospěšné. Tento princip podporuje a rozvíjí další morální pravidla k ochraně a obraně jiných práv, prevenci poškození a odstraňuje podmínky, které by mohly škodit. Dále pomáhá postiženým osobám a chrání osoby vystavené potenciálnímu nebezpečí.¹⁵²

Je povinností lékaře mírnit utrpení pacienta, a to i podáním utlumujících léků, včetně opiátů, kterými se potlačí předpokládané bolestné projevy, ale objeví se nezamýšlené škodlivé účinky, jako tlumení dechových center, snížení peristaltiky, určité zkrácení života a aplikace návykové látky. Zde na praktickém příkladu lékařského postupu je popsán konflikt mezi principem dobřečinnosti a neškození. Tento konflikt se snaží vyřešit princip dvojího účinku, který se v medicínské praxi objevuje velmi často. Tento princip obsahuje několik podmínek. Lékařský postup a jednání je samo o sobě dobré nebo přinejmenším indiferentní. V úmyslu jednajícího je na prvním místě dobrý efekt, nikoli efekt špatný. Musí platit podmínka, že dobrý efekt není docílen prostřednictvím špatného efektu. Existují však velmi závažné důvody k dovolení či připuštění efektu špatného.¹⁵³

Třetím je princip autonomie, který je popsán již výše. V medicínské praxi má pacient na základě tohoto principu plné právo požádat o vysazení stávající léčby či nasazení léčby nové, a to i v případě, že důsledkem bude jeho trvalé poškození či smrt. V důsledku tohoto principu dochází ke kombinaci dvou modelů vztahu lékař – pacient, a to modelu paternalistického a partnerského, v důsledku, čeho sám pacient spolutvoří vlastní léčebnou terapii, ale i nadále podléhá rozhodování lékaře, pokud přání, volby či požadavky pacienta jsou v rozporu s jeho vlastním dobrem.¹⁵⁴

¹⁵¹ Srov. tamtéž, s. 56.

¹⁵² Srov. tamtéž.

¹⁵³ Srov. tamtéž.

¹⁵⁴ Srov. tamtéž, s. 57.

Čtvrtým principem je princip spravedlnosti, jehož podstata tkví v respektu k tomu, co je právem všech, a tím je z medicínské perspektivy dostupnost adekvátní lékařská péče pro všechny. Pochopitelně tento princip je narušován vážnými okolnostmi, jakými jsou válka, živelná katastrofa, kdy se lékařská péče dostává primárně postiženým a těm, kteří mají přeci jenom alespoň optimističtější vyhlídky na přežití.¹⁵⁵

4.4. Reflexe etických principů v CRISPR/CAS9 genové terapii

Na závěr této principiální části je na místě vlastní etická reflexe, která promýšlí aplikaci základních etických principů na užití CRISPR/CAS9 genové terapie.

Podle Kempa základní etické principy musí chránit lidské osoby v biomedicínských výzkumech. Principy lidské důstojnosti, integrity, autonomie a zranitelnosti jasně omezují a limitují možnosti experimentování, vedou k minimalizaci rizik spojených s léčbou a musí být použity k ochraně lidských osob před jejich čistou instrumentalizací ve výzkumu.¹⁵⁶ Kemp dále zdůrazňuje, že po aplikaci bioetických principů v genetice by lidská osoba neměla být redukována pouze a jenom na jakousi genetickou strukturu a lidský genom by neměl být komercializován. Tím podtrhuje, že při genetickém vylepšování lidských bytostí by měla být respektována tělesná integrita, která zahrnuje i tu genetickou, a proto je tak důležité chránit genetickou integritu jak jedince, tak celé společnosti. Princip integrity zahrnuje jak osobní, sociální, tak i společenskou soudržnost hodnot, které by společnost jako taková neměla měnit.¹⁵⁷

Kemp se dále dotýká nedostatku konsensu ohledně konceptu osoby. Velmi raným embryonálním stadiím vývoje lidského jedince není přidělen status osoby. Podle Kempa je však přijatelná gradualistická koncepce, podle které je možné sledovat postupující vývoj vztahu mezi etickými principy a vývojem lidské osoby v čase. Tedy vyvíjející se lidský jedinec v raných embryonálních fázích osobou není, ale v průběhu svého vývoje se jí stává.¹⁵⁸

¹⁵⁵ Srov. tamtéž, s. 58.

¹⁵⁶ Srov. KEMP, Peter. *Final report to the European Commission on the Project basic ethical principles in Bioethics and Biolaw 1995-1998*, Part B, s. 5–6.

¹⁵⁷ Srov. tamtéž, s. 6

¹⁵⁸ Marek Vácha a kol. k tématu uvádí: „Gradualismus je kompromisním řešením mezi ontologickým personalismem a empirickým funkcionalismem. Podle této koncepce má embryo významnou, i když ne absolutní hodnotu, v průběhu nitroděložního vývoje se jeho práva zvětšují. Embryo/fétus má tedy nárok na odstupňovanou ochranu. Diploidní zygota má tedy nulová práva a jakožto jediná buňka nulovou důstojnost, novorozenec je již plnohodnotnou osobou. Gradualismus ovšem nikdy nedefinoval, co by to byla částečná důstojnost některého z prostředních stadií, a pokud důstojnost přiřazujeme ve škále zygota-novorozenec po

Podle Kempa je embryo považováno za „potenciální osobu“, za budoucího lidského jedince a člena širší společnosti a jako takové je existenciálním vyjádřením osudu lidstva, proto si zaslouží ochranu. Uvádí však, že je velmi obtížné připsat raným embryonálním stadiím vývoje lidského jedince vlastní autonomii, důstojnost a status osoby, protože to není osoba ve své konečné integritě, a připouští, že embrya velmi rané fáze vývoje se mohou stát předmětem experimentování.¹⁵⁹

Pokud lidskému jedinci v obecných medicínských podmínkách nepřínáleží status lidské osoby v jeho počátečních fázích embryonálního vývoje, lidské embryo pozbývá vlastní lidské důstojnosti a může být redukováno na pouhý shluk buněk, který se instrumentalizuje na biologický materiál, se kterým je možné dále manipulovat. Aplikace CRISPR/CAS9 genové terapie se v tomto ohledu řadí mezi mnohé další embryonální experimentální přístupy, které jsou užívány v biomedicínské praxi, jako *in vitro* fertilizace, preimplantační diagnostika, prenatální diagnostika.

Eticky problematická lidská dědičná editace prostřednictvím editačního nástroje CRISPR/CAS9 nerespektuje princip integrity, jehož součástí je i integrita genetická. Narušení principu autonomie je možné sledovat v kontextu úvahy, jestli geneticky upravený jedinec by se rozhodl pro genetickou změnu, kterou v embryonální fázi jeho vývoje rozhodli za něho jeho rodiče, byť informovaným souhlasem. Dědičná editace lidského genomu také nerespektuje princip zranitelnosti, který se vztahuje na ochranu života jako takového. V případě, že se genetická úprava nezdaří, je embryo vystaveno likvidaci nebo kategorizaci jako biologického materiálu, který může sloužit pro další experimentování, třeba i neterapeutické.

V případě dědičné editace genomu je na místě uvažovat o aplikaci bioetických principů neškodění a dobročinnosti. Pokud se rodičové, kteří mají jasnou genetickou predispozici k tomu, že jejich dítě po nich zdědí geneticky podmíněné onemocnění, je pochopitelné, že k požadovanému terapeutickému zákroku přistoupí, protože touží po zdravém dítěti, které již nebude přenášet onemocnění na své potomky (princip dobročinnosti). Na druhé straně je však nutno domyslet i to, že metoda CRISPR/CAS9 je v terapeutických aplikacích na začátku vývoje své klinické aplikace, a tím také

stupních, po kolika takových stupních cesta k osobě vede a jak jsou tyto stupně velké. Gradualismus rovněž nikdy nevysvětlil, proč by se vývoj lidské důstojnosti měl zastavit po narození a proč by status osoby neměl různě stoupat a klesat v průběhu celého lidského života.“ VÁCHA, Marek a kol. *Základy moderní lékařské etiky*. Praha: Portál 2012, 193–194.

¹⁵⁹ KEMP, Peter. *Final report to the European Commission on the Project basic ethical principles in Bioethics and Biolaw 1995-1998*, Part B, s. 6.

představuje značné riziko. Rizikem může být nedostatečné vyladění podmínek pro úspěšný cílený zásah v konkrétním případě onemocnění. Dalším rizikem je nižší specifita editačního nástroje CRISPR/CAS9, což souvisí s výskytem zásahů mimo cílovou sekvenci. Rizikem je také výskyt buněčného mozajcizmu, díky kterému efekt terapeutického zásahu bude v buněčné populaci snížený. Je možné se tedy ptát, jestli editační nástroj je navržen tak, aby byl pro klinickou terapii daného onemocnění bezpečný (princip neškodění)? Otázkou je, jak správně aplikovat princip dvojího účinku při uvedeném konfliktu principů dobřechinění a neškodění v konkrétním případě geneticky podmíněného onemocnění léčeného CRISPR/CAS9.

Dalším z bioetických principů je princip spravedlnosti. Bioetický princip spravedlnosti bude aplikován na dostupnost CRISPR/CAS9 genové terapie pro všechny, nemocné, kteří budou nositeli nebo přenašeči genetického onemocnění. Je otázkou, jakým způsobem bude CRISPR/CAS9 genová terapie spravedlivě přístupná pro všechny tyto pacienty. Jak bude ovlivňovat tuto dostupnost rozdílnost kultury, národností, sociálního postavení a finančního zázemí? Nebude tak docházet ještě více k rozdělování společnosti na ty, kteří si léčbu mohou dovolit, a kteří na to nemají?

Další strategií použití editačního nástroje CRISPR/CAS9 je neterapeutické vylepšování jedince, potažmo druhu. Neterapeutickým vylepšováním dochází k nerespektování principu důstojnosti a integrity, a to nejenom geneticky modifikovaného lidského jedince a jeho potomstva, ale také celého lidského druhu, který je tím vystaven ohrožení. Je důležité poznamenat, že každá zavedená mutace přináší určité důsledky. Jaké budou? Jaké jsou výhody a jaké jsou nevýhody a vůbec motivace vedoucí k neterapeutickému vylepšování lidského jedince?

Při CRISPR/CAS9 editaci somatických buněk je respektován princip lidské důstojnosti. Princip autonomie je stvrzen informovaným souhlasem pacienta, který se pro genetickou terapii rozhoduje při plné informovanosti výhod a rizik spojených s léčebným procesem. Dochází však k narušení integrity, které je doprovázeno jistým ohrožením pacienta po aplikaci metody, což souvisí s principem zranitelnosti. V editaci somatických buněk je nutné rozlišovat důsledky principů dobřechinění a neškodění, pečlivě je vyhodnocovat a eliminovat možné negativní účinky somatické genové terapie.

5. Eticko-křesťanská reflexe využití CRISPR/CAS9 v genové terapii

Poslední kapitola diplomové práce se bude zabývat bioetickým postojem katolické církve k aktuálnímu vývoji v oblasti biomedicíny v čase důležitých biomedicínských průlomových objevů, jakým nepochybně molekulární editační nástroj CRISPR/CAS9 je.

Katolická církev předkládá principy a morální hodnocení biomedicínského výzkumu, přičemž se řídí rozumovým parametrem v součinnosti s parametrem křesťanské víry a z ní plynoucí křesťanské nauky. Tím poskytuje jakýsi celostní pohled na život člověka, jeho hodnotu a jeho poslání.

V páté kapitole se prvně vymezí bioetické principy pro eticko-křesťanskou argumentaci, jež jsou obsaženy v novějších dokumentech katolické církve. Na základě uvedených principiálních argumentů bude následovat bioetická reflexe somatické a dědičné genové terapie, doplněná o příspěvky autorů ze sborníku bioetických reflexí Papežské akademie pro život.

Výběr dokumentů a literatury byl omezen jenom na ty, které pojednávají o etických aspektech použití genové terapie z eticko-křesťanské perspektivy. Dokumenty církevního magisteria obsahují základní principiální argumentace k řešení otázek, které spadají pod tematické zaměření určitého vatikánského dikasteria, jež dokument zpracovává a vydává. Tyto dokumenty vznikají v součinnosti s přidruženými institucemi, jejichž úkolem je vytvářet prostor pro odbornou a fundovanou diskusi k řešenému problému. V otázkách bioetiky je touto vatikánskou institucí Papežská akademie pro život (PAV).

Mezi základní řešené projekty PAV patří: umělá inteligence, robotická etika, globální bioetika, lidské vědomí v oblasti neurověd a posledním z řešených projektů je editace lidského genomu. K jednotlivým tematickým okruhům PAV organizuje nejrůznější kongresy a sympózia. Jeden z kongresů, který se týkal genové terapie a genetických manipulací, proběhl ve Vatikánu ve dnech 20. – 21. února 2009. V roce 2010 Jean Laffitte a Ignacio Carrasco de Paula vytvořili výstupní publikaci všech příspěvků, které na kongresu zazněly, pod názvem „Le nuove frontiere della genetica e il rischio dell'eugenetica“, v překladu „Nové hranice v genetice a riziko eugeniky“.¹⁶⁰

¹⁶⁰ LAFFITTE, Jean – CARRASCO DE PAULA, Ignacio. *Le nuove frontiere della genetica e il rischio dell'eugenetica*. Pontificia academia per la vita. Città del Vaticano: Libreria Editrice vaticana, 2010.

Papežská akademie pro život se i v této době snaží o reflexi moderního vědeckého pokroku a jeho aktuálních objevů. Mezinárodní asociace pro vzdělávání v etice v součinnosti s PAV organizovala od 23. do 25. června 2022 mezinárodní konferenci na Univerzitě v Padově pod názvem: „Vzdělávání v etice a nové technologie: spolupráce anebo rozpor“. Podle základních informací se konference týkala nových vědeckých objevů v oblasti informačních a komunikačních technologií, dále oblasti nových biomedicinských oborů s důrazem na biotechnologii. Součástí konference byla také analýza vědeckého pokroku v nanotechnologiích a neurovědách.¹⁶¹

Další mezinárodní konference, organizována PAV, pod názvem: „Etika programovaného života“ proběhne 26. – 27. září 2022 v Římě.¹⁶² Konference se bude týkat etiky v genetickém inženýrství a použití nových terapeutických přístupů. S nadějí je tedy možné očekávat další příspěvek do bioetické diskuse z pozice církevního magisteria.

Kromě papežských institucí existují další centra, která podporují šíření eticko-křesťanských principů ve společnosti. Jedním z nich je Národní katolické bioetické centrum (NCBC). Jeho posláním je poskytovat bioetické vzdělávání, podporovat informovanost, reflektovat biomedicinský pokrok s cílem udržení důstojnosti lidské osoby ve zdravotnictví a biomedicinském výzkumu na základě učení magisteria katolické církve.

Podle záznamu Katolické zpravodajské agentury, představenstvo NCBC deklaruje, že církev se staví na stranu nenarozených lidských bytostí.¹⁶³ Reaguje tak, na poslední studie anglické laboratoře Institutu Francise Cricka, která provedla delecí genu pomocí molekulární metody CRISPR/CAS9 na embryích. Autoři použili 25 lidských embryí, z nichž 18 editovali v genu *pou5f1*. Zbytek embryí sloužilo jako negativní kontrola. Deset embryí po zásahu vypadalo normálně, ale 8 vykazovalo nežádoucí zásahy podél celého chromozomu, který gen nese, a u čtyř z nich zaznamenali nežádoucí delece a adice DNA v blízkosti genu. V abstraktu zmíněné publikace autoři dokonce zdůrazňují, že jejich práce podtrhuje důležitost dalšího základního výzkumu pro posouzení bezpečnosti technik editace genomu u lidských embryí, což povede k debatám o potenciálním

¹⁶¹ Srov. International association for education and ethics, *Ethics education and new technologies: cooperation or conflict?* 10th International conference for education and ethics, 23. – 25. June 2022, University of Padova. [2022-03-10] <<https://www.zipinternationalcongress.com/>>.

¹⁶² Srov. Ist. International conference ethics of engineering life. (8.6.2022). <<https://iceel.info/>>.

¹⁶³ Srov. Catholic news agency. *Catholic bioethicist warns against gene-editing experiments*. (27.6.2020) [2022-03-15]. <<https://www.catholicnewsagency.com/news/44994/catholic-bioethicist-warns-against-gene-editing-experiments>>.

klinickém využití této technologie. Publikace byla zveřejněna jenom v online formě na serveru BioRxiv a doteď nebyla recenzovaná.¹⁶⁴ Studie si zasloužila odsouzení širokou vědeckou obcí.

Joseph Meaney, PhD., výkonný ředitel NCBC, uvedl v rozhovoru pro týdeník EWTN Pro-Life Weekly, že experiment, který se anglické laboratoři nepovedl, byl předvídatelný, protože pokud se objevují nové vědecké metody a používají se v nových biomedicinských oblastech, dochází ke spoustě chyb. Varoval také před argumenty některých vědců, kteří tvrdí, že takové experimenty jsou etické, protože modifikovaným embryím je zapovězeno narození. Zdůraznil, že i když může existovat přípustné použití takové technologie pro dospělé a děti v děloze, je eticky nepřipustné dítě v laboratoři počít a experimentovat s ním.

V březnu 2020 Papežská rada pro novou evangelizaci vydala aktualizovanou verzi Direktáře pro katechezi¹⁶⁵, která obsahuje také nové sekce o bioetice. Publikace poskytuje univerzální normy pro pastorační a evangelizační v současnosti a v čase aktuálních výzev. V bioetické sekci se nachází, že vědecký výzkum a jeho aplikace nejsou morálně neutrální a že morálka jednání nemůže být založena na samotné technické účinnosti, užitku nebo dominantních ideologiích. Direktář dále pojednává o genetickém experimentování a riziku, že takové jednání povede k eugenickým praktikám. Zároveň uvádí, že je důležité pečlivě rozlišovat mezi terapeutickým zásahem a manipulací, přičemž Meaney dále říká, že úprava genetických abnormalit je zákonná, pokud podporuje dobro člověka, aniž by to ovlivnilo jeho identitu a integritu.¹⁶⁶

5.1. Základy etické argumentace

Učitelství úřad církve nebrání vědě ve jejím vývoji, ale povzbuzuje tento vývoj k rozvoji obecného dobra pro lidský život a zasazuje se o zachování důstojnosti a integrity každého člověka. Kongregace pro nauky víry vydala v roce 2008 bioetický dokument, instrukce *Dignitas personae* o některých otázkách bioetiky¹⁶⁷, jenž je pro hodnocení námi

¹⁶⁴ Srov. ALANIS-LOBATO, Gregorio a kol. *Frequent loss of heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos*. Proceedings of the National academy of sciences 2021, roč. 118, č. 22.

¹⁶⁵ Srov. Vatican news. *New directory for catechesis released*. (25.6.2020) [2022-03-18].

<<https://www.vaticannews.va/en/vatican-city/news/2020-06/vatican-publishes-new-directory-for-catechesis.html>>.

¹⁶⁶ Catholic news agency. *Catholic bioethicist warns against gene-editing experiments*.

¹⁶⁷ KONGREGACE PRO NAUKU VÍRY, Instrukce *Dignitas personae* o některých otázkách bioetiky. Kostelní Vydří: Karmelitánské nakladatelství, 2009.

stanovené otázky, tedy etičnosti aplikace editačního nástroje CRISPR/CAS9 v klinické praxi jak buněk somatických, tak geminálních, z hlediska katolické církve zásadní. Instrukce *Dignitas personae* vychází z původního učení, které je obsaženo v instrukci *Donum vitae*¹⁶⁸ z roku 1987, obohaceného o aktuální bioetické stanovisko v souvislosti s rychlým vývojem výzkumu v biomedicině a molekulární biologii.

Jeden ze základních bioetických principů křesťanské etiky týkajících se ochrany lidského života a jeho důstojnosti je tento: Embryo od okamžiku svého vzniku, tedy splynutí spermie a vajíčka za vzniku diploidní zygoty, musí být posuzováno jako lidská bytost, které přináleží status osoby. Od okamžiku vzniku diploidní zygoty, této osobě přináleží bezpodmínečná úcta v její tělesné a duchovní celistvosti.¹⁶⁹ Tato principiální orientace křesťanské etiky je známá jako ontologický personalismus.¹⁷⁰ Ontologický personalismus je koncepcí, která je v přímém protikladu k empirickému funkcionalismu, ve kterém existuje rozdíl mezi lidskou bytostí a lidskou osobou. Lidská bytost se v průběhu svého vývoje osobou stává, ale může jí také v průběhu svého života přestat být.¹⁷¹ V křesťanské etice jsou obecně platné etické principy důstojnosti, autonomie, integrity a zranitelnosti, doplněny o bioetické principy dobřečinění, neškození a spravedlnosti.

Konfrontací hodnoty lidské důstojnosti a nových vědeckých objevů vyvstávají na povrch mnohé limitní situace. Hraniční limitní situace vycházejí ze špatného pochopení komplexního pohledu na osobu, který pramení buď z přírodního redukcionismu anebo redukcionismu sociálního.

Přírodní redukcionismus vychází z předpokladu, že lidský život je pouhým bodem, anebo jedním z mnoha elementů přírodního vývoje, který směřuje k novému druhu se speciálními a dokonalejšími vlastnostmi. Lidská tělesnost se svojí podstatou neodlišuje od té zvířecí, a tedy je možné, aby byla regulovatelná genetickými a biologickými zásahy do individua. Nebere se v potaz rozměr lidské bytosti jako osoby, hodnota těla je redukována pouze na materiální stránku. Z hedonistické koncepce je považována za objekt požitku, potěšení a prospěchu a v utilitaristické koncepci je hodnota lidského těla považována a redukována na objekt využití a užitečnosti. Důsledkem přírodního redukcionismu je redukce lidské bytosti a její tělesnosti na materialisticky využitelnou

¹⁶⁸ KONGREGACE PRO NAUKU VÍRY, Instrukce *Donum vitae* o respektování počínajícího lidského života a o důstojnosti plození. Brno: Občanské sdružení Hippokrates, 2007.

¹⁶⁹ Srov. DP 4, 5.

¹⁷⁰ VÁCHA, Marek a kol. *Základy moderní lékařské etiky*, s. 52–54.

¹⁷¹ Srov. tamtéž, s. 49–51.

hmotu, která se stává instrumentálním objektem novodobých vědeckých objevů a jejich aplikací.¹⁷²

Sociální redukcionismus tvrdí, že hodnota lidského života a lidské důstojnosti je v rukou společnosti. Hodnota lidského života je měřitelná podle principu užitečnosti lidského života pro společnost. Důsledky tohoto přístupu jsou jasné. Oddělením principů svobody a pravdy a tvrzením, že to, co je dobré, má být uznáno buď individuální anebo společenskou vůlí, dochází k prohloubení utilitaristického pojmání lidské existence a potírání lidské důstojnosti a hodnoty.¹⁷³

Lidská bytost se nesmí stát jenom jakýmsi pouhým žijícím organismem, který podléhá fyzikálním zákonitostem, je předmětem experimentování, a tím má sloužit dobru všech, nýbrž sama o sobě je tím nejvyšším dobrem a zaslouhuje si nejvyšší možnou míru respektu, důstojnosti a ochrany. Vědecké poznání, biomedicinské aplikace a zásahy se tedy musí stát součástí mnohem širší antropologické reflexe. Reflexe, která při morálním hodnocení biomedicinských zásahů reflektuje lidskou osobu z hlediska její totality, a ne jenom z hlediska parciálních přístupů.¹⁷⁴

5.2. Lidská důstojnost v církevních dokumentech

Člověk jako lidská osoba se z hlediska křesťanské antropologie těší nejvyšší možné míře důstojnosti, jako stvoření podle Božího obrazu. Zde se nachází pramen a počátek lidské identity a důstojnosti. Člověk se podílí svojí existencí na Božím životě, odvozuje se od něj a k němu směřuje. Podle konstituce *Gaudium et spes* je člověk ve své nejhlubší podstatě jednotou těla a duše, je obdařen intelektem, kterým se podílí na světle Boží mysli, má vědomí, skrze které člověk naslouchá svému Bohu, má svobodu jako nejvyšší existenciální princip člověka stvořeného podle Božího obrazu.¹⁷⁵

V teologicko-antropologické reflexi se tajemství člověka jako osoby, se vším, co k ní přináležejí, zcela vyjasňuje v Ježíši Kristu, vtěleném Božím Synu. Vztahem jednoty s nebeským Otcem, Kristus svým vtělením dává člověku účast na božské přirozenosti a v něm je každý člověk považován za božího syna a dceru. V Ježíši Kristu člověk chápe

¹⁷² SARMIENTO, Augusto. Genetica ed eugenetica alla luce della Teologia morale. In LAFFITTE, Jean – CARRASCO DE PAULA, Ignacio. *Le nuove frontiere della genetica e il rischio dell'eugenetica*, s. 164–165.

¹⁷³ Srov. tamtéž, s. 165.

¹⁷⁴ Srov. tamtéž, s. 166.

¹⁷⁵ Srov. GS 12–17.

plnou hloubku posvěceného lidství Kristovým božstvím. Hypostatická unie v Kristu neznamená umenšení významu lidské důstojnosti, ale vlastní naplnění a existenciální maximalismus, který se uskutečňuje a naplno realizuje v Duchu Svatém. Skrze Kristův kříž a vzkříšení je člověk spasen a vykoupen, je určen pro věčnost a povolán, aby se podílel na trinitární lásce živého Boha již zde na zemi a stal se její součástí v plné míře ve věčnosti.¹⁷⁶

Hned v úvodu Instrukce *Dignitas personae* se jasně proklamuje, že důstojnost osoby musí být přiznána každému člověku od jeho početí až po přirozenou smrt. Dále naznačuje, že v éře moderních bioetických objevů musí být tento základní křesťansko-antropologický princip v centru etických úvah o bioetickém výzkumu.¹⁷⁷ Buňky prvních stadií embryonálního vývoje nesmí být redukovány jenom na pouhý shluk buněk. Klíčovým etickým argumentem pro důstojnost lidské bytosti v těchto fázích je kontinuita vývoj jedince, tzn. že bez dřívějších jednodušších stadií embryonálního vývoje by nevznikla ta složitější a komplexnější. Instrukce *Donum vitae* tyto principy dále rozvíjí:

„Lidský plod od začátku své existence, tedy od okamžiku vzniku diploidní zygoty, vyžaduje bezpodmínečnou úctu, která morálně náleží lidské bytosti v její tělesné a duchovní celistvosti. Lidskou bytost je nutno od okamžiku početí respektovat jako osobu a jako s osobou s ní také zacházet. Od téhož okamžiku je třeba také uznat práva této lidské bytosti jako osoby, mezi, než patří především neporušitelné právo na život náležející každému nevinnému lidskému tvor.“¹⁷⁸

Lidskému embryu tedy náleží důstojnost, která přísluší osobě. Tato důstojnost náleží každému člověku, protože svou vlastní důstojnost a hodnotu má každý v sobě nesmazatelně vtištěnou.¹⁷⁹ Hodnotu lidské důstojnosti doplňuje dále ontologický princip, který se odvozuje od vnitřní spojitosti mezi ontologickým rozměrem a zvláštní hodnotou každého lidského života. Ontologický princip se rozumem rozpoznává jako pravdivý, protože se shoduje s přirozeným mravním zákonem. Na základě toho by se měl stát bioetický princip o nedotknutelnosti lidského života od jeho počátku až po jeho přirozený konec, základem všech právních úprav.¹⁸⁰ Na to upozorňuje emeritní papež Benedikt XVI. ve své promluvě ke generálnímu shromáždění OSN.

¹⁷⁶ Srov. SANNA, Ignazio. Dignità della persona umana ed eugenetica. In LAFFITTE, Jean – CARRASCO DE PAULA, Ignacio (ed.). *Le nuove frontiere della genetica e il rischio dell'eugenetica*, Pontificia Accademia per la Vita, Città del Vaticano: Libreria Editrice vaticana 2010, 119–138.

¹⁷⁷ Srov. DP 1

¹⁷⁸ DoV 1

¹⁷⁹ Srov. DP 6

¹⁸⁰ Srov. DP 5

„Právo každého člověka na život má základ v přirozeném zákoně, který je vepsán do lidského srdce a je přítomen v různých kulturách a civilizacích. Vyjmout lidská práva z tohoto kontextu by znamenalo ohraničení jejich šíře a ústupek relativistickému pojetí, pro něž se význam a interpretace tohoto práva mohou měnit a následkem toho by se mohla popírat jejich univerzalita ve jménu kulturních, politických sociálních, a dokonce náboženských představ. Velká různorodost názorů nesmí zastírat skutečnost, že univerzalitu nelze vztahovat pouze na práva, ale že se týká také nositele těchto práv, tedy lidské osoby.“¹⁸¹

Jak upozorňuje Instrukce *Donum vitae*, počátek lidského života má své autentické místo v manželství a rodině, a je zplozen úkonem, kterým se vyjadřuje vzájemná láska mezi mužem a ženou. Má-li být plazení skutečně zodpovědné vůči nenarozenému novému životu, musí být plodem manželství.¹⁸² Důstojnost každého člověka v sobě ukrývá tajemství mužské a ženské originality. Manželé vzájemným sebedarováním se v lásce, úctě a věrnosti, sexuálním stykem, který je pro ně vyhrazeným, směřují k vytvoření společenství osob, ve kterém se vzájemně zdokonalují a spolupracují s Bohem na tvoření a výchově nových živých bytostí.¹⁸³ Bůh, který je láska a život, vložil do muže a ženy povolání ke zvláštní účasti na svém tajemství společenství osob i na svém díle Stvořitele a Otce.¹⁸⁴

Každý člověk tedy musí být respektován již na základě své pouhé existence, která je výsostně Božím darem. Pokud se církve vyjadřuje k etickým aspektům souvisejících s vědeckým pokrokem, nečiní tak proto, aby se vměšovala do oblasti lékařské vědy, ale spíše vyzývá všechny lidi k etické a společenské odpovědnosti za jejich jednání.¹⁸⁵

V závěru dokument zdůrazňuje mravní učení církve, které je založeno na uznání a podpoře všech darů, které Bůh Stvořitel člověku udělil. Těmito dary jsou život, poznání, svoboda, láska, intelektuální činnost, praktické schopnosti. Tím vším je člověk povolán sloužit Bohu, aby se podílel na stvořitelské Boží moci. Při této uvědomělé lidské činnosti v jednotě s Božím záměrem se člověk podílí na ochraně a rozvoji lidské důstojnosti, jako i dobra všech lidských bytostí a lidské osoby v jejím celku. Člověk ve svých dějinách zneužil svým postojem svoji moc i schopnosti, které mu Bůh svěřil a zavinil tak různé formy nespravedlivé diskriminace a útlaku těch nejslabších a nejbezbrannějších. Lidská

¹⁸¹ BENEDIKT XVI., Promluva ke generálnímu shromáždění OSN, (18. dubna 2008): AAS 100 (2008), s. 334.

¹⁸² Srov. DoV 4

¹⁸³ Srov. HV 8

¹⁸⁴ Srov. DoV 3

¹⁸⁵ Srov. DP 10

historie však také ukazuje, že skutečný pokrok tkví v porozumění a uznání hodnoty a důstojnosti každé osoby. To je základem práva a důsledkem platnosti etických principů, na jejichž základě je lidská společnost uspořádána. Dokument zdůrazňuje, že jsou zakázány jakékoli formy chování, které by lidskou důstojnost pošlapávaly a poškozovaly. Katolická církev nebrání vědeckému pokroku, ale upozorňuje, že se nesmí stát prostředkem evidentního a nepřijatelného zneužívání k cílům, které potírají lidskou důstojnost. Oprávněnost každého zákazu je založena na potřebě chránit skutečné morální dobro jak jednotlivce, tak celé společnosti.¹⁸⁶

5.3. Etická reflexe somatické genové terapie

Jak potvrzuje Instrukce *Dignitas personae*, genovou terapii lze aplikovat na dvou úrovních, na somatických buňkách a na zárodečných a embryonálních kmenových buňkách.

„Somatická genová terapie nabízí eliminaci nebo redukci genetických vad, vyskytujících se na úrovni tělních či somatických buněk, to znamená buněk, které nejsou reprodukcí a ze kterých jsou složeny tkáně a tělesné orgány. V tomto případě jde o zákroky, jež směřují do určitých buněčných oblastí a mají účinky, které se týkají dotyčného jedince. Naproti tomu zárodečná genová terapie usiluje o korekci genetických vad přítomných v zárodečných buňkách tak, aby terapeutické účinky, dosažené na dotyčné osobě, byly předány jeho případnému potomstvu. Tyto zásahy genové terapie, ať somatické či zárodečné, mohou být uskutečněny na plodu před narozením a pak se mluví o genové terapii in utero, anebo po narození na dítěti či dospělém.“¹⁸⁷

Protože molekulární editační nástroj CRISPR/CAS9 je v aktuální biomedicíně a klinické genové terapii jedním z nejefektivnějších nástrojů genové terapie, podrobíme jeho klinické využití na základě křesťansko-antropologické reflexe základním morálním a bioetickým kritériím, která jsou naznačena v 26. článku Instrukce *Dignitas personae*, kde je uvedeno doslovně:

„Z morálního hlediska je nutno pečlivě rozlišovat: Zásahy do somatických buněk pro jednoznačně terapeutické účely jsou zásadně morálně dovoleny. Jejich cílem je totiž obnova normální genetické výbavy nemocného, nebo omezení poškození, která pocházejí z genetických anomálií nebo jiných

¹⁸⁶ Srov. DP 36–37

¹⁸⁷ DP 25

chorobných změn. Vzhledem k tomu, že genová léčba může být u nemocného spojena se závažnými zdravotními riziky, je ovšem potřeba pečlivě dbát na dodržování etického principu, podle kterého je vždy nezbytné předem zajistit, aby léčená osoba nebyla vystavena rizikům zdravotního poškození nebo tělesné integrity, které by byly nadměrné nebo nepřiměřené závažnosti poruchy, která má být léčena. Vyžaduje se také informovaný souhlas nemocného nebo jeho zákonného zástupce.¹⁸⁸

Je tedy zřejmé, že editační nástroj CRISPR/CAS9 je možné aplikovat jako klinickou terapeutickou metodu v případě somatické genové terapie, za dodržení přísných podmínek a na základě dodržení etických principů, které podobné aplikace v praxi vyžadují.

Zkoumání somatické genové terapie a její hodnocení na základě bioetických principů přímo koresponduje s bioetickými principy prospěšnosti, spravedlnosti, autonomie a informovaného souhlasu. Somatická genová terapie nesmí představovat pro daného jedince ohrožení. Omezení rizik vyplývajících z klinické aplikace somatické genové terapie musí být co největší.¹⁸⁹

Somatická genová terapie je podle principu prospěšnosti dobrem, protože jejím cílem je zmírnění lidského utrpení v důsledku propagace geneticky podmíněné nemoci. Rodičové mají morální povinnost předcházet a zmírňovat důsledky geneticky podmíněného onemocnění u svých postižených dětí. Pokud toto onemocnění je diagnostikováno včas, genetická aplikace má být aplikována co nejdříve za splnění všech platných bezpečnostních parametrů. Tedy, v případě, že aplikace somatické genové terapie má potenciál pro snížení, potažmo úplnou eliminaci propagace geneticky podmíněného onemocnění, má být aplikována.¹⁹⁰

V případě metody CRISPR/CAS9 se bude samozřejmě jednat o aplikace, které jsou odsouhlaseny a přísně kontrolovány příslušnými kontrolními zdravotnickými orgány. Je zde zabezpečena dostatečná klinická studie a samozřejmě nástroj je kalibrován do vysoce efektivního a bezpečného módu, bez rizika nežádoucích zásahů nebo jiných postranních efektů, které by průběh nemoci ještě zhoršily.

Je tedy zřejmé, že příslušná aplikace somatické genové terapie je přímo vázaná na přesvědčení dokonalého poznání dané metody a účinnosti použití této metody. V případě, že by naopak klinická zkušenost prokázala, že aplikací genové terapie nedochází

¹⁸⁸ DP 26

¹⁸⁹ Srov. SUAUDEAU, Jacques. Attuali possibilità intervento genetico. In LAFFITTE, Jean – CARRASCO DE PAULA, Ignacio. *Le nuove frontiere della genetica e il rischio dell'eugenetica*, s. 79.

¹⁹⁰ Srov. tamtéž, s. 80.

k požadovanému účinku, převažuje nutnost chránit daného jedince proti možnému ohrožení nad nutností zmírnění jeho utrpení a vyvstává morální povinnost pro pozastavení aplikace genové terapie a nalezení jiného způsobu léčení postiženého pacienta.¹⁹¹

Další otázkou etické reflexe je vztah aplikace somatické genové terapie v součinnosti s bioetickým principem autonomie. Při klinické aplikaci somatické genové terapie se musí postupovat nanejvýš opatrně a obezřetně vzhledem k autonomii daného jedince. Konečné slovo v dané aplikaci má samozřejmě pacient, který se informovaným souhlasem v plné svobodě rozhodne, že se genové terapii podrobí. V případě, že předmětem aplikace nového genetického přístupu je miminko, za které rozhodují rodiče, musí se jasně pohlížet na aktuálně stanovené standardy ustanovené národními a mezinárodními úmluvami. Takovou je např. Helsinská deklarace, která stanovuje podmínky, při kterých by se dané postižené dítě stalo součástí klinického experimentu za použití určité aplikace genové terapie. Základním principem takového přístupu je, že se bude chránit zdraví a přinese prospěch celé skupině vybraných jedinců.¹⁹²

V každém případě informovaný souhlas je jednoznačně jasným důsledkem respektování principu lidské důstojnosti a integrity. Informovanému souhlasu musí předcházet vysvětlení diagnózy, vysvětlení příslušných lékařských postupů, které nemocný bude muset podstoupit s jejími jak pozitivními, tak negativními potenciálními důsledky. V případě nových aplikací somatické genové terapie je nutno taky zmínit, že jedinci, kteří uvažují o podstoupení nových klinických aplikací genové terapie se nemusí vždy rozhodovat v plné svobodě. Daná aplikace jim může být představena ve světle určitého „terapeutického úspěchu“ čímž je jim vlita určitá naděje, ale přesto je jasné, že je minimální šance k uzdravení. Samozřejmě zde vstupují do hry další faktory, jako sdělení o absolutním pravdivém stavu pacienta lékařem, psychické nastavení pacienta, dodání psychických sil, vztah pacienta a lékaře. V případě, že se jedná o velmi komplikované a delikátní případy vážně nemocného dítěte v komunikaci s rodiči o jeho stavu, je nutno brát v potaz, že rodičové jsou připraveni podstoupit vše, jen aby své dítě zachránili, a tedy i přijmout určitá rizika spojená s novými a méně prozkoumanými genetickými aplikacemi. V těchto a podobných případech je velmi komplikované, ale

¹⁹¹ Srov. tamtéž, s. 81.

¹⁹² Srov. tamtéž.

taky klíčové naznačit, že metoda nemusí být účinná, aby tak nedocházelo k prohlubování falešných nadějí na záchranu.¹⁹³

Pokud se jedná o otázku snesitelných rizik spojených se somatickou genovou terapií, v tomto ohledu je naprosto esenciální vidět aplikaci genové terapie v celé šíři důsledků, které aplikace může přinést. Je tedy nutné se ptát, jaký je prospěch a jaká jsou rizika pro daného jedince při aplikaci konkrétní genové terapie v případě konkrétního onemocnění, aktuálního stavu vývoje a vážnosti onemocnění.¹⁹⁴ Pokud bychom měli soubor pacientů, kteří trpí pokročilým stadiem rakovinového onemocnění, rovina se překlápí samozřejmě na stranu zkusit vše, co by mohlo stav zvrátit. Zde mluvíme o tzv. soucitné aplikaci (*compassionate use*), neboli použití poslední naděje (*last hope use*), při které jsou pacienti ochotni podstoupit mnohem větší riziko, které přináší nová, ne dokonale prozkoumaná, aplikace genové terapie.¹⁹⁵

Experimentální léčebné postupy první a druhé fáze klinického testování by připadaly v úvahu v případě souboru pacientů s postupujícím rakovinovým onemocněním, kteří podstupují paliativní léčbu, protože už neexistuje jiný nevyzkoušený účinný léčebný postup. Tito pacienti již nemají úplně co ztratit, ale taky nemají úplně co získat. Pokud tito pacienti poskytnou kvalifikovaný informovaný souhlas, vědomi si, že vztah prospěchu a rizika v jejich případě je nulový, z jakési altruistické pozice mohou napomoci dobru, tedy těm, kteří onemocní v budoucnosti.¹⁹⁶

Dalším aspektem etického pohledu na somatickou genovou terapii je princip nakloněné roviny (*slippery slope*). Tím, že somatická genová terapie se stane součástí klinických postupů, jak tomu naznačuje aktuální vývoj, je velmi důležité si uvědomit, že je to taky prostor pro zneužití dobře ověřené metody v oblasti neterapeutických klinických postupů, jakými jsou lidská dědičná genová terapie, vylepšování jedince, nebo vylepšování lidského druhu. To znamená, že somatická genová terapie by se stala podkladem pro kontroverzní neterapeutické genetické přístupy.¹⁹⁷ Zde se jasně objevuje riziko eugenické selekce a jiných eugenických tendencí, které se podsouvají i do klinické aplikace metody CRISPR/CAS9. Klinickým využitím této metody je možné velice přesně

¹⁹³ Srov. tamtéž, s. 82.

¹⁹⁴ Srov. FLETCHER, John C. Ethical issues in and beyond prospective clinical trials of human gene therapy. *The journal of medicine and philosophy* 1985, roč. 10, č. 3., s. 295.

¹⁹⁵ Srov. SUAUDEAU, Jacques. Attuali possibilità di intervento genetico. In LAFFITTE, Jean – CARRASCO DE PAULA, Ignacio. *Le nuove frontiere della genetica e il rischio dell'eugenetica*, s. 84.

¹⁹⁶ Srov. NICHOLSON, Steve a kol. Ethical and regulatory issues in gene therapy. *British journal of urology* 1995, roč. 76, č. 2, s. 71–74.

¹⁹⁷ Srov. SUAUDEAU, Jacques. Attuali possibilità di intervento genetico. In LAFFITTE, Jean – CARRASCO DE PAULA, Ignacio. *Le nuove frontiere della genetica e il rischio dell'eugenetica*, s. 85.

měnit, při znalosti funkce daného genu, nejenom poškozené geny, ale taky ovlivňovat aktivitu jiných ve prospěch přání žadatelů. Změny inteligence, muskulatury, barvy vlasů, kůže, pohlaví, to jsou jasné aplikace pozitivní eugeniky. Je nutno zdůraznit, že není úplně jasný rozdíl mezi tím, co je považováno za léčebnou terapii a co za vylepšení. Oba pojmy sdílejí společný cíl, a tím je poskytnout zlepšení, i když zlepšení je běžně chápáno jako „změna, která mění to, co je normální“, ať už pro lidstvo jako celek, nebo v případě konkrétního jedince. Co je však považováno za normální, je nejednoznačné a mění se v průběhu času. Otázkou zůstává, zda odchylka od normálu představuje „nemoc“. Například v komunitě neslyšících mnoho lidí odmítá názor, že hluchota je něco, co je potřeba léčit. V důsledku toho musí vzniknout jasná identifikace, která onemocnění jsou dostatečně závažná, k tomu, aby bylo možné provést úpravu, přičemž je nutno vzít v úvahu různé názory a existující alternativní způsoby léčby.¹⁹⁸ Nejednoznačný slovník normální/nenormální, defektní/nedefektní, dokonalý/nedokonalý je velice znepokojivý a evokuje návrat eugenických tendencí pod pláštěm molekulární klinické medicíny a moderní genové terapie.¹⁹⁹

Je velice nepravděpodobné, že somatická genová terapie bude dostupná všem lidem bez rozdílu kultury, příslušnosti, rasy, sociálního postavení a ekonomického zázemí. Tím dochází k porušení etického principu spravedlnosti. Důsledkem toho nastane ještě větší společenské rozdělení, nejednota, nerovnost, a jistým způsobem také stigmatizace těch, kteří nějakou geneticky řízenou modifikaci neprodělali. Je tedy potřeba neustále koncept somatické genové terapie promýšlet, reflektovat jak z hlediska stanovených a obecně platných bioetických principů, tak z hlediska technologicky zvládnutých a dokonale prověřených klinických aplikací.

Jak je konkrétně je regulována terapeutická somatická genová terapie v případě editace genomu? Editace genomu představuje výzvu pro kontrolní a regulační medicínské instituce, protože editační přístupy se značně liší v závislosti na původu tkání a na tom, jak bude terapie využívána. Terapie využívající úpravu somatického genomu, jsou klasifikovány jako pokročilé terapeutické lékařské vzorky pro moderní terapii ATMP. Jedná se o terapeutické vzorky genů, tkání nebo buněk. Technické požadavky stanovené touto legislativou jsou na vysoké úrovni, protože typ a množství údajů nezbytných

¹⁹⁸ Srov. BRIGDEN, Tanya – HALL, Allison. *Somatic genome editing: ethics and regulation*. (11.2019) [2022-03-12]. <<https://www.phgfoundation.org/briefing/somatic-genome-editing-ethics-regulation>>.

¹⁹⁹ Srov. SUAUDEAU, Jacques. Attuali possibilità di intervento genetico. In LAFFITTE, Jean – CARRASCO DE PAULA, Ignacio. *Le nuove frontiere della genetica e il rischio dell'eugenetica*, s. 88–89.

k prokázání kvality, bezpečnosti a účinnosti různých ATMP jsou vysoce specifické a jsou hodnoceny kritérii pro jednotlivé třídy, které vypracovala Evropská agentura pro léčivé přípravky (EMA). Všechny léky musí být povoleny, než budou zpřístupněny pacientům. Zatímco většina léků je registrována na vnitrostátní úrovni, pro ATMP je povinný centralizovaný postup, na který dohlíží EMA, aby byla zajištěna dostupnost ve všech členských státech prostřednictvím jediné licence, což urychluje přístup pacientů k těmto léčebným postupům. To vyžaduje, aby žádosti byly posuzovány vědeckými výbory EMA a schváleny Evropskou komisí.²⁰⁰

5.4. Etická reflexe dědičné genové terapie a neterapeutické genové terapie

Z argumentačních principů, které uvádí instrukce *Dignitas personae* plyne, že dědičná genová terapie založená na editaci genomu prostřednictvím CRISPR/CAS9 patří mezi experimentální přístupy, jež jsou považovány z etického hlediska za nepřijatelné.

„Morální hodnocení zárodečné genové terapie vyžaduje odlišný přístup. Všechny genetické změny, které budou uskutečněny na zárodečných buňkách, by byly předány všem možným potomkům. Protože rizika spojená s jakoukoli genetickou manipulací jsou značná a dosud ne zcela kontrolovatelná, za současného stavu vědeckého poznání není morálně přípustné podstupovat riziko, že by mohlo být ohroženo potomstvo. K hypotetickému použití genové terapie u embrya je třeba ještě dodat, že ji lze uskutečnit pouze v souvislosti s oplodněním *in vitro*, a tak zde opět vyvstávají všechny etické námitky spojené s tímto postupem. Z těchto důvodů je třeba říci, že v současnosti jsou všechny formy zárodečné genetické terapie nedovolené.“²⁰¹

Instrukce dále upřesňuje, že dědičná genová terapie se nevyhne postupům *in vitro* fertilizace, preimplantační diagnostiky a selekci embryí; tudíž dědičná editace je považována jenom za jeden z experimentálních odstínů metod, které křesťanská etika nedovoluje.

V článku 27 Instrukce *Dignitas personae* nalézáme velmi důležité stanovisko Kongregace pro nauku víry v případě využití genové terapie pro jiné účely než terapeutické. Zvláště se pojednává o zásazích, které by měly vést k vylepšení a zdokonalení genetického fondu člověka. Kongregace v této části jasně zdůrazňuje, že

²⁰⁰ Srov. BRIGDEN, Tanya – HALL, Allison. *Somatic genome editing: ethics and regulation*.

²⁰¹ DP 26

podobné tendence jsou deklarovány jako nepřipustné a nastiňuje základní etické otázky, které z podobných aplikací vyvstávají.

„Ponecháme-li stranou technické obtíže a skutečná i možná rizika, takové manipulace by podporovaly eugenickou mentalitu a nepřímo vedly ke společenské stigmatizaci lidí, kterým se určitých kvalit nedostává, a k privilegovaní vlastností, které sice v určité kultuře nebo v určitém, společenském prostředí mohou být ceněny, samy o sobě však nejsou vysloveně lidské. Takový přístup by odporoval základní pravdě o rovnosti všech lidských bytostí, z něhož vychází princip spravedlnosti, jehož porušování by v dlouhodobé perspektivě ohrožovalo pokojné soužití mezi lidmi. Navíc se vynořuje otázka, kdo by měl určovat, jaké změny by byly pozitivní a jaké negativní, anebo které meze by se měly pro jednotlivá přání na vylepšení stanovit, protože by nebylo fyzicky možné splnit přání na vylepšení všech jednotlivých osob. Ať už by odpověď na položené otázky byla jakákoli, vždy by se opírala o neurčitá a sporná kritéria. To vše vede k závěru, že takové snahy by dříve či později poškodily společné dobro a vedly k neodůvodněné podpoře vůle jedněch nad svobodou druhých. Závěrem je třeba poznamenat, že pokus vytvořit nový typ člověka obsahuje ideologický prvek, podle něhož se člověk snaží stanout na místě Stvořitele.“²⁰²

Uvedené poznatky upřesňují, že přestože molekulární editační nástroj CRISPR/CAS9 je v biomedicíně a molekulární biologii díky efektivitě, jednoduchosti, nízké ceně a přesnosti průlomový, není možné jej využívat pro svévolné použití v klinické praxi. Z eticko-křesťanského úhlu pohledu jsou dědičná editace genomu a její odvozené cesty využití CRISPR/CAS9, jako neterapeutické aplikace, vylepšení jedince a zdokonalování lidského genofondu, považovány za nepřipustné.

Etická nepřipustnost uvedených postupů se odůvodňuje také opatrností a obezřetností, kvůli možným technickým problémům ohledně kalibrace metody na jednotlivé případy klinického použití, rizika nesespecifických zásahů v genomu, rizika výskytu mozajcismu. Instrukce dále uvádí obavy z možné legalizace postupů dědičné editace. Rizikem je sociální a kulturní rozdělení společnosti, kategorizace společnosti na modifikované a nemodifikované, čímž by byla vážným způsobem narušena sociologická rovnováha, která vychází z principu spravedlnosti. Je otázkou, kdo by byl arbitrem, jenž by rozhodoval, která modifikace se vykoná a která ne. Navíc – jak by byl zachován princip spravedlnosti, aby všichni lidé měli možnost podstoupit modifikaci podle svých přání, když jenom pro některé by aplikace byla cenově dostupná? Tím by docházelo k velmi vážnému prohloubení rozdílů mezi bohatou a chudou vrstvou a ke stigmatizaci

²⁰² DP 27

společnosti. Tímto přístupem je jasně deklarováno eugenické chování na lidském druhu, které potírá lidskou důstojnost.

Ve vědecké obci panuje konsenzus, že je morálně a eticky nepřijatelné při aktuálním stavu poznání metody CRISPR/CAS9, aby došlo k legalizaci dědičné genové terapie; je zdůrazňován princip lidské důstojnosti, integrity, užitečnosti, spravedlnosti a neškození.

Pro relevantní reflexi je však potřebné se ptát, jaké by mohly být potenciální výhody zavedení terapeutické dědičné genové terapie.

Terapeutická aplikace dědičné genové terapie představuje skutečné, a zřejmě i konečné řešení problému výskytu genetických onemocnění, zatímco terapeutické zásahy na somatické úrovni dospělého jedince jsou považovány za symptomatické, nebo v důsledku vážné morbidity, za paliativní.²⁰³

V případě rodičovského páru, ve kterém každý z rodičů je homozygotem v přenosu genetického onemocnění, germinální genová terapie představuje jediný možný prostředek, jak se těmto rodičům může narodit zdravé dítě. To může být vnímáno, jako požadovaná odpověď ve prospěch plnohodnotného života dítěte, které rodiče mohou přivést na tento svět. Pokud každý z rodičů je heterozygotem v přenosu genetického onemocnění, germinální genová terapie představuje velice efektivní metodu k preimplantační diagnostice a výběru zdravého embrya. Taková germinální genová terapie by mohla být realizována modifikací gamet a následnou umělou inseminací pro ujištění, že počaté dítě pochází z geneticky upravených gamet. Přenos modifikovaných gamet však rodičům nezaručuje jistotu zdraví jejich potomka, protože transfer genu do spermií má své metodologické limity a mnohé z ošetřených spermií nebudou nositelkami požadované změny. Uvedený postup jenom zvětšuje pravděpodobnost narození zdravého dítěte. Germinální genová terapie by však v tomto případě představovala eticky přístupnější řešení oproti eugenickým metodám eliminace, prenatalní diagnostiky a následných potratů anebo preimplantační diagnostiky, které jsou v případě těchto rodičů jediným možným přístupem ke zdravému dítěti. Další hypotetickou výhodou zavedení dědičné genové terapie je respektování autonomie genetickou nemocí postižených rodičů s nárokem na zdravé dítě.²⁰⁴

²⁰³ Srov. ZIMMERMAN, Burke K. Human germ-line therapy: the case for its development and use. *The journal of medicine and philosophy* 1991, roč. 16, č. 6, s. 593–612.

²⁰⁴ Srov. COOK-DEEGAN, Robert Mullan. Human gene therapy and congress. *Human Gene Therapy* 1990, roč. 1, č. 2, s. 163–170.

Proti výhodám využívat klinickým způsobem dědičnou genovou terapii se však uvádí protiargumenty, které mají nejrůznější důvody podložené jak vědeckými, tak morálně-etickými argumenty.

Germinální genová terapie s přenosem genu do embrya je eticky nepřijatelná, protože předpokládá vytvoření a ztrátu velkého počtu embryí. Nedílnou součástí celého terapeutického procesu je preimplantační diagnostika s cílem eliminovat poškozená a geneticky nevhodná embrya, což neodpovídá důstojnosti lidského života, ani důstojnosti embrya. (Je důležité však uvést, že je na zákonodárství jednotlivých států, jak definují lidskou bytost a od kdy v embryonálním vývoji mluví o lidské osobě).

Dalším důvodem je, že jenom část modifikovaných gamet bude obsahovat požadovanou změnu. To znamená, že při umělé inseminaci modifikovaných gamet existuje i nadále riziko, že se rodičům narodí dítě s genetickým onemocněním. Je vysoce nepravděpodobné, že by rodiče nemuseli absolvovat preimplantační diagnostiku, kterou by došlo k eliminaci homozygotních embryí. Umělé oplodnění a preimplantační diagnostika jsou charakterizovány negativním etickým hodnocením.²⁰⁵

Pokud by rodiče byli heterozygoti v recesivně dědičné nemoci, dědí se podle klasické mendelovské dědičnosti znaků, rodiče s 25 % pravděpodobností počnou normální dítě, s 50 % pravděpodobností počnou přenašeče onemocnění – stejného genotypu jako rodiče a s 25 % pravděpodobností se narodí nemocí postižené děti. Je tedy 75 % pravděpodobnost, že se rodičům narodí fenotypově zdravé děti. V tomto případě je téměř nesmyslné přistoupit ke germinální dědičné genové terapii z objektivních důvodů nemožnosti pozměnit soubor pohlavních buněk tak, aby všechny byly v daném znaku homozygoty. I tato cesta vede k jedinému řešení, a to k *in vitro* fertilizaci a preimplantační diagnostice.²⁰⁶

Germinální dědičná genová terapie tedy nevymýtí úplně všechny genetické předpoklady k propagaci nemoci v dané rodině. Zdá se tedy iluzí, že dědičná genová terapie by mohla eliminovat geneticky podmíněné onemocnění úplně.²⁰⁷

Navíc, rizika, která souvisí s použitím metody CRISPR/CAS9 pravděpodobně nebudou snadno odstranitelná. Pokud by při jejím použití došlo k nežádoucím zásahům, tyto zásahy se stanou součástí genetické výbavy potomstva. Je poměrně těžké si

²⁰⁵ Srov. SUAUDEAU, Jacques. Attuali possibilità di intervento genetico. In LAFFITTE, Jean – CARRASCO DE PAULA, Ignacio. *Le nuove frontiere della genetica e il rischio dell'eugenetica*, s. 92–93.

²⁰⁶ Srov. tamtéž, s. 94.

²⁰⁷ Srov. tamtéž.

představit, jaké by byly jejich následky. Funkce spousty genů jsou provázané a neví se, jaký by byl efekt, byť pozitivně směřované genetické opravy na celkovou buněčnou a celkovou homeostázi jedince.

Hraničním přístupem dědičné genové terapie je samozřejmě riziko vývoje kontroverzních terapeutických přístupů, o kterých bylo pojednáno dříve. Takové jednání překračuje všechny stanovené bioetické principy.²⁰⁸

Dědičná genová terapie je z pohledu magisteria považována za morálně nepřijatelnou. Tyto procesy zahrnují všechny dostupné biomedicínské generativní aplikace, jakými jsou *in vitro* fertilizace, preimplantační diagnostika k eliminaci geneticky poškozených nebo nezdravých embryí a selekce nejživotaschopnějších a správně editovaných embryí. V průběhu celého procesu genetické manipulace není respektována důstojnost embrya a důstojnost lidského života. Tyto procesy jsou považovány za eugenické.²⁰⁹

²⁰⁸ Srov. SUAUDEAU, Jacques. Attuali possibilità di intervento genetico. In LAFFITTE, Jean – CARRASCO DE PAULA, Ignacio. *Le nuove frontiere della genetica e il rischio dell'eugenetica*, s. 95–96.

²⁰⁹ Srov. tamtéž, s. 92.

Závěr

Editací molekularní nástroj CRISPR/CAS9 je fenomenálním biomolekulárním objevem 21. století a díky němu obory jako molekularní biologie, medicína, genová terapie prožívají takřikajíc revoluci. Jedná se o velice jednoduchý, účinný a cenově dostupný molekularní nástroj odvozený od bakteriálního imunitního systému, byl navržen pro cílenou editaci, tedy pozměňování genetické informace v přesném místě sekvence DNA. I když nástroj funguje velice efektivně, je nutno podotknout, že při jeho aplikaci existuje riziko nechtěných zásahů mimo požadovanou cílovou sekvenci. Účinnost metody ovlivňují nejrůznější faktory, jakými jsou buněčný typ, fáze buněčného cyklu, kondice buněčné kultury, editační strategie a volba následné genové opravy. Vyladění nástroje pro jeho aplikaci v léčení monogenetického onemocnění představuje poměrně složitý proces. Kromě jiného jednotlivá onemocnění vyžadují odlišný princip aplikace, jakými jsou postupy *ex vivo* a *in vivo*. Klíčovou podmínkou úspěšnosti metody je vhodně zvolená kombinace všech zmiňovaných faktorů a dalších jiných tak, aby nedocházelo k nežádoucím zásahům editačního nástroje mimo cílovou sekvenci (možné riziko spuštění onkogenů). Podmínky aplikace mají směřovat ke snížení mozajcizmu buněčné populace, aby se tak zvýšila efektivita propagace zavedené genetické změny v buněčné kultuře, a tím se efektivně obnovila funkce porušeného genu. Všechny zmiňované aspekty rozhodují o bezpečnosti samotné metody v konkrétním případě genetického onemocnění a úspěšnosti jeho léčebné terapie.

Klinické strategie aplikace CRISPR/CAS9 byly rozděleny na dvě základní. První je editace genomu somatických buněk, která se s velkou pravděpodobností stane – při eliminaci rizik, zachování etických principů a správné kalibraci metody – pro konkrétní typ geneticky podmíněného onemocnění, běžným terapeutickým postupem. Provedená genetická změna se v tomto případě v potomstvu nešíří, ale týká se výlučně jenom konkrétního jedince. Druhou aplikací je eticky problematická dědičná genová terapie, ze které se odvozují kontroverzní neterapeutické postupy, jakými jsou: vylepšování jedince, potažmo druhu, a volné neterapeutické experimentování. Při porovnání těchto dvou postupů je velmi důležité jasně identifikovat etické rozhraní mezi léčením nemoci a vylepšováním, což je předmětem mnoha etických diskuzí. Somatická genová CRISPR terapie již zaznamenala ohromný klinický úspěch, a proto je možné konstatovat, že dědičná editace genomu se nejeví jako úplně nutná. Mnohá geneticky podmíněná onemocnění se diagnostikují a vyhodnocují pomocí preimplantační diagnostiky na úrovni

cyklů *in vitro* fertilizace a výběru vhodného embrya pro implantaci, anebo při onemocnění v pokročilejším stadiu vývoje při aplikaci somatické editace jedince, která je jednou z možných terapeutických přístupů.

Od objevu editačního nástroje CRISPR/CAS9 až do současnosti se vědecký názor ohledně dědičné editace posunul, a to od absolutního zákazu až k rezervované otevřenosti terapeutické aplikace dědičné editace za velmi přísných jak vědeckých, tak právních kritérií, která budou kontrolovat příslušné vědecko-etické instituce a komise. Zavedení lidské dědičné editace v klinické praxi označujeme jako translační cestu. Ta stanovuje přísná kritéria pro terapeutickou aplikaci lidské dědičné editace v pohlavních buňkách nebo embryonálních buňkách s následnou implantací takto upraveného embrya do dělohy a narození geneticky upraveného jedince.

Zdá se, že translační cesta u vybraných geneticky podmíněných onemocnění by se tak stala právně-odbornou strategií, která má za cíl eliminovat zvyšující se riziko zneužití metody CRISPR/CAS9 nekontrolovanými a neterapeutickými postupy, které jsou vědeckou obcí zapovězeny. Translační cesta přináší velké množství bioetických, metodologických, společenských, sociálních, právních a kulturních otázek, které se musí stát předmětem veřejné vědecké diskuze.

Dědičná genová terapie a z ní odvozené aplikace vylepšování lidského jedince, tvorba dětí na zakázku, slepé experimentování na živých bytostech atp. v sobě ukrývá nebezpečnou selekční eugenickou mentalitu, která ohrožuje ve své nejhlubší podstatě lidskou důstojnost a ohrožuje tak obecné etické principy lidské integrity, autonomie a zranitelnosti, které přináležejí každé lidské bytosti.

Použití editačního nástroje CRISPR/CAS9, jako součásti postupů somatické genové terapie, je považováno z pohledu křesťanské etiky za morálně dovolené při zachování základních etických principů daného lidského jedince, jako i bioetických principů dobročinnosti, neškození, autonomie a spravedlnosti. Konečné slovo v navrhovaném léčebném postupu má samozřejmě pacient, který se na základě informovaného souhlasu svobodně rozhodne, zda podstoupí somatickou genovou terapii, nebo nikoli. Informovaný souhlas je praktickým důsledkem platnosti principu lidské důstojnosti a integrity v lékařské praxi.

Genetické manipulace buněk germinální linie a embryonálních buněk jsou oproti tomu v církevních dokumentech z etického důvodu zapovídány.

Genová terapie by měla být ve své nejhlubší podstatě slova terapie léčením konkrétního onemocnění daného organismu, přičemž má být respektováno integrální

dobro osoby s jejím tělesným, citovým, intelektuálním a spirituálním rozměrem, při dodržení všech platných bioetických parametrů a principů. Klinické zásahy, které směřují k vylepšování genomu jedince, potažmo společnosti, jsou nepřijatelné. Lidský život se nesmí stát předmětem pozitivisticko-materialistické mentality s eugenickým podkladem. Má svoji velkou hodnotu proto, že životem je. Toto přesvědčení je vepsáno do srdce lidské existence. Neporušitelnost a nedotknutelnost lidského života se vztahuje na každou lidskou bytost. Na počátku každé lidské existence je Bůh, dárce života. Jedině jemu přináležejí místo Stvořitele, přičemž člověk se jenom podílí na stvořitelství Boží moci. Z této pravdy Zjevení vyvstává klíčová morálně teologická orientace ontologického personalismu, jako bytostného principu důstojnosti každé lidské bytosti od početí až po přirozenou smrt. Tím je jasně položen základ jedinečnosti osoby a osobní identity.

Některé léčebné procesy a biomedicinské postupy byly před několika lety nepředstavitelné. Ne všechno, co moderní genetický výzkum poskytuje, je však dobré a prospěšné. Křesťanská etika ve světle nejmodernějších vědeckých objevů odmítá eugenickou mentalitu, která potírá lidskou důstojnost a neustále bude obhajovat lidský život, jako nejvyšší možné dobro od jeho počátku až po přirozenou smrt. Vědecký pokrok je jenom tehdy opravdovým a lidstvu prospěšným, když chrání a respektuje lidskou důstojnost každé lidské osoby.

Seznam použitých zkratek

AAV	– adeno associated virus – vektory odvozeny od adenoviru
APOBEC	– apolipoprotein B mRNA editing enzyme – apolipoproteinový mRNA editační enzym B citidin deaminázy modifikující cytozin na uracyl
app	– amyloid precursor protein – amyloidní proteinový prekurzor
ATMP	– Advanced therapy medical products - Pokročilé terapeutické lékařské vzorky pro moderní terapii
bcl11a	– BAF chromatin remodeling complex subunit – gen pro podjednotku chromatin remodelačního komplexu BAF
Cas	– CRISPR associated enzyme – enzym spojený s CRISPR
CAS9	– Crispr associated protein 9 – Protein 9 sdružený s CRISPR
ccr5	– chemokin receptor type 5 – gen pro chemokinový receptor typu 5
CD34 ⁺	– cluster of differentiation 34 – povrchový glykoproteinový adhézní antigen T - lymfocytů
CD4 ⁺	– cluster of differentiation 4 – povrchový glykoproteinový koreceptor přítomný na vnější straně cytoplazmatické membrány pomocných T-lymfocytů
crRNA	– CRISPR associated RNA - CRISPR asociující molekula RNA
CRISPR	– Clustered regularly interspaced short palindromic repeats – Nahromaděné pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice
dCAS9	– deactivated CAS9 protein – protein CAS9 s deaktivovanou štěpící aktivitou
DNA	– Deoxyribonucleic acid - Deoxyribonukleová kyselina
DoV	– Instrukce Donum vitae o respektování počínajícího lidského života a o důstojnosti plození.
DP	– Instrukce <i>Dignitas personae</i> o některých otázkách bioetiky
EMA	– European medicines agency - Evropská agentura pro léčivé přípravky
pou5f1	– POU class 5 homeobox 1 – POU proteinová doména, třídy 5, transkripčního faktoru 1
eSpCAS9	– enhanced <i>Streptococcus pyogenes</i> CAS9 – protein CAS9 bakterie <i>Streptococcus pyogenes</i> se zvýšenou mírou specificity

FDA	– Food and drug administration – Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv
Fok I	– Flavobacterium okeanokoites IIS nuclease – restriční endonukleáza bakterie Flavobacterium okeanokoites
frfr3	– fibroblast growth factor receptor - gen pro receptor, který váže fibroblastový rostoucí faktor
GS	– Pastorální konstituce o církvi v dnešním světě Gaudium et spes.
HDR	– homology direct repair – buněčná strategie spojující DNA konce na základě homologické rekombinace
HGP	– Human genome project – Projekt lidského genomu
HHGE	– Heritable human genome editing - Dědičná editace lidského genomu
HIV	– Human imunodeficiency virus – Virus lidské imunodeficiency
htt	– huntingtin – gen pro huntingtin
HV	– Encyklika Humanae vitae o správném předávání lidského života.
iap	– izozym alcalic phosphatase - gen odpovědný za konverzi izozymové alkalické fosfatázy
il2rgi	– interleukin 2 receptor subunit gamma – γ podjednotka receptoru pro interleukin 2
IVF	– <i>in vitro</i> fertilisation – <i>in vitro</i> fertilizace
JLat10.6	– buněčná linie s latentním virem HIV
MCR	– Mutagenic chain reaction - mutagenní řetězová reakce
<i>mdx/UTR^{+/-}</i>	– utrophin heterozygous mdx mouse – heterozygenní kombinace absence dystrofinu s postsynaptickou svalovou dysfunkcí u myšního modelu
mRNA	– mediated ribonucleic acid – mediátorová ribonukleová kyselina
mybpc3	– myosin binding protein C3 – gen pro myozin vazebný protein C3
NCBC	– National christian bioetic centrum – Národní křesťanské bioetické centrum
NHEJ	– Non homologic end joining – opravná buněčná strategie zlomů DNA založena na nehomologickém spojení DNA konců
NHN	– nuclease domain CAS9 – nukleázová štěpící podjednotka CAS9 vazebná s crRNA
NIH	– National institute of health – Národní institut pro zdraví
NMD	– non sense mediated decay – komplex rozeznávající chybné transkripty mRNA

NMD	– non-sense mediated decay – komplex degradující nesmyslné transkripty mRNA
NUC	– nuclease domain CAS9 – nukleázová doména CAS9 proteinu
PAM	– protospacer adjacent motiv – proteinová vazebná doména pro DNA cílovou sekvenci
PAV	– Pontificia academia per la vita – Akademie pro život při Svatém stolci
psk9	– proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 – proproteinová konvertáza subtilisin/kexin typu 9
REC	– recognition domain – rozpoznávající doména CAS9 proteinu
RecB	– enzym s helikázovou aktivitou
RecC	– enzym rozpoznávající překřížená místa DNA při opravě
RecD	– enzym s helikázovou aktivitou
RecBCD	– komplex enzymů bakterie <i>E. coli</i> podílejících na rekombinantní opravě DNA
RNA	– ribonucleid acid – ribonukleová kyselina
I-SceI	– <i>Saccharomices cerevisiae</i> I meganuclease – mitochondriální meganukleáza kvasinky <i>Saccharomices cerevisiae</i>
sgRNA	– single guide RNA – jednoduchá naváděcí molekula RNA pozůstávající z tracrRNA a crRNA
sod1	– superoxid dismutase gen – gen pro superoxid dismutázu
spCAS9	– <i>Streptococcus pyogenes</i> CAS9 – protein CAS9 odvozený z bakterie <i>Streptococcus pyogenes</i>
TALE	– transcription activator-like effector – efektor transkripční aktivace
TALLEN	– transcription activator-like effector nuclease – transkripčně aktivační nukleázový aktivátor
tmc1	– transmembrane channel-like protein 1 – gen pro tranmembránový kanálový protein 1
tracrRNA	– trans-activating CRISPR RNA – trans aktivační CRISPR ribonukleová kyselina
WHO	– World Health Organisation – Světová zdravotní organizace
ZFN	– zink finger nuclease – nukleáza proteinového motivu zinkového prstu

Seznam literatury

CÍRKEVNÍ DOKUMENTY

BENEDIKT XVI. Promluva ke generálnímu shromáždění OSN, (18. dubna 2008): in AAS 100 (2008), s. 334.

KONGREGACE PRO NAUKU VÍRY, Instrukce *Dignitas personae* o některých otázkách bioetiky. Kostelní Vydří: Karmelitánské nakladatelství, 2009.

KONGREGACE PRO NAUKU VÍRY, Instrukce *Donum vitae* o respektování počínajícího lidského života a o důstojnosti plazení. Brno: Občanské sdružení Hippokrates, 2007.

PAVEL VI., Encyklika *Humanae vitae* o správném předávání lidského života. Brno: Občanské sdružení Hippokrates, 2014.

II. VATIKÁNSKÝ KONCIL. *Pastorální konstituce o církvi v dnešním světě Gaudium et spes. Dokumenty II. vatikánského koncilu*. Praha: ZVON, 1994. s. 271–297.

ODBORNÁ LITERATURA

ADLI, Mazhar. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature communication* 2018, roč. 9, č. 1911, s. 1–13.

ALANIS-LOBATO, Gregorio a kol. *Frequent loss of heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos*. *Proceedings of the National academy of sciences* 2021, roč. 118, č. 22.

BALTIMORE, David. – BERG, Paul. a kol. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science* 2015, roč. 348, č. 6230, s. 36–38.

BARRANGO, Rodolphe a kol. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007, roč. 315, č. 5819, s. 1709–1712.

CAI, Shang a kol. The research advances and applications of genome editing in hereditary eye diseases. *Zhonghua yan ke za zhi* 2017, roč. 53, č. 5, s. 386–391.

COOK-DEEGAN, Robert Mullan. Human gene therapy and congress. *Human gene therapy* 1990, roč. 1, č. 2, s. 163–170.

COX, David B. T. – PLATT, Jeffrey R. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nature medicine* 2015, roč. 21, č. 2, s. 121–131.

CYRANOSKI, David. Russian biologist plans more CRISPR-edited babies. *Nature* 2019, roč. 570, č. 7760, s. 145–146.

- CYRANOSKI, David. The CRISPR-baby scandal: what's next for human gene-editing. *Nature* 2019, roč. 566, č. 7745, s. 440–442.
- DENG, Wulan. Reactivation of developmentally silenced globin genes by forced chromatin looping. *Cell* 2014, roč. 158, č. 4, s. 849–860.
- DOENCH, John. Am I ready for CRISPR? A user's guide to genetic screens. *Nature reviews genetics* 2018, roč. 19, č. 2, s. 67–80.
- DOUDNA, Jennifer. Crispr's unwanted anniversary. *Science* 2019, roč. 366, č. 6467, s. 777.
- DOUDNA, Jennifer – CHARPENTIER, Emmanuelle. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014, roč. 346, č. 6213.
- DUNBAR, Cynthia – HIGH, Katherine a kol. Gene therapy comes of age. *Science* 2018, roč. 359, č. 6372.
- EL REFAEY, Mona a kol. In vivo genome editing restores dystrophin expression and cardiac function in dystrophic mice. *Circulation research* 2017, roč. 121, č. 8, s. 923–929.
- FLETCHER, John C. Ethical issues in and beyond prospective clinical trials of human gene therapy. *The journal of medicine and philosophy* 1985, roč. 10, č. 3., 293–309.
- FRANGOUL, Haydar a kol. Crispr-cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia. *New england journal of medicine* 2021, roč. 384, č. 3, s. 252–260.
- GADE-ANDAVOLU, Radhika a kol. Association of CCR5 delta32 deletion with early death in multiple sclerosis. *Genetics in medicine* 2004, roč. 6, č. 3, s. 126–131.
- GANTZ, Valentino M. – BIER, Ethan. The mutagenic chain reaction: method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science* 2015, roč. 348, č. 6233, s. 442–444.
- GAO, Xue a kol. Treatment of autosomal dominant hearing loss by in vivo delivery of genome editing agents. *Nature* 2018, roč. 553, č. 7687, s. 217–221.
- GREELY, Henry T. CRISPR'd babies: human germline genome editing in the 'He Jiankui affair'. *Journal of law and the biosciences* 2019, roč. 6, č. 1, s. 111–183.
- HAMMOND, Andrew a kol. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature biotechnology* 2016, roč. 34, č. 1, s. 78–83.
- HENTZE, Matthias W. – KULOZIK, Andreas E. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 1999, roč. 96, č. 3, s. 307–310.
- HSU, Patrik D. – SCOTT, David A. a kol. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology* 2013, roč. 31, č. 9, s. 827–832.

HUGHES, James. *Citizen cyborg: Why democratic societies must respond to the redesigned human of the future*. Cambridge, MA: Westview press, 2004.

CHAKRABARTI, Anob M. a kol. Target-specific precision of crispr-mediated genome editing. *Molecular cell* 2019, roč. 73, č. 4, s 699-713.

CHAPMAN, Ross J. a kol. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular cell* 2012, roč. 47, č. 4, s. 497-510.

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM,
Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004, roč. 431,
č. 7011, s. 931–945.

ISHINO, Yoshizumi a kol. History of crispr-cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of bacteriology* 2018, roč. 200,
č. 7, s. 1–17.

ISHINO, Yoshizumi a kol. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology* 1987, roč. 169, č. 12, s. 5429–5433.

JANSEN, Ruud a kol. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology* 2002, roč. 43, č. 6, s. 1565–1575.

JINEK, Martin – CHYLINSKI, Krzysztof a kol. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012, roč. 337, č. 6069, s. 816–821.

JOY, Mary T. CCR5 Is a therapeutic target for recovery after stroke and traumatic brain injury. *Cell* 2019, roč. 176, č. 5, s. 1143–1157.

KEMP, Peter – RENDTORFF, Jacob D. The Barcelona declaration. *Synthesis philosophica* 2008, roč. 23, č. 2, s. 239–251.

KOMOR, Alexis a kol. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 2016, roč. 533, č. 7603, s. 420–424.

KWON, Deborah Y. a kol. Locus-specific histone deacetylation using a synthetic CRISPR-Cas9-based HDAC. *Nature communication* 2017, roč. 8, č. 15315.

LAFFITTE, Jean – CARRASCO DE PAULA, Ignacio. *Le nuove frontiere della genetica e il rischio dell'eugenetica*. Pontificia academia per la vita. Città del Vaticano: Libreria Editrice vaticana, 2010.

LI, Dali a kol. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology* 2013, roč. 31, č. 8, s. 681–683.

LI, Hongyi a kol. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal transduction and target therapy* 2020, roč. 5, č. 1, s. 1.

LI, Hojun a kol. In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature* 2011; roč. 475, č. 7355, s. 217–221.

LIANG, Puping a kol. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein cell* 2015, roč. 6, č. 5, s. 363–372.

LIN, Su-Ru. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic hbv templates in vivo. *Molecular therapy nucleic acids* 2014, roč. 3, č. 8, s. 186.

LIU, Shawn X. a kol. Editing DNA methylation in the mammalian genome. *Cell* 2016, roč. 167, č. 1, s. 233–247.

MA, Hong a kol. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 2017, roč. 548, č. 7668, s. 413–419.

MA, Hanhui a kol. Multicolor CRISPR labeling of chromosomal loci in human cells. *Proceedings of the National academy of sciences USA* 2015, roč. 112, č. 10, s. 3002–3007.

MAKAROVA, Kira S. a kol. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology direct* 2006, roč 1, č. 7.

MOJICA, Francesco J. M. a kol. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution* 2005, roč. 60, č. 2, s. 174–182.

MOJICA, Francisco J. M. – RODRIGUEZ-VALERA, Francisco E. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular microbiology* 1993, roč. 9, č.3, s. 613–621.

MORISHIGE, Satoshi a kol. CRISPR/Cas9-mediated gene correction in hemophilia B patient-derived iPSCs. *International journal of hematology* 2020, roč. 111, č. 2, s. 225–233.

NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE. *Human genome editing: Science, ethics and governance*. Washington, DC: The National academies press, 2017.

NATIONAL ACADEMY OF MEDICINE, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, AND THE ROYAL SOCIETY. *Heritable human genome editing*. Washington, DC: The National academies press, 2020.

NICHOLSON, Steve a kol. Ethical and regulatory issues in gene therapy. *British journal of urology* 1995, roč. 76, č. 2, s. 71–74.

NURK, Sergey – KOREN, Sergey a kol. The complete sequence of a human genome, *Science* 2002, roč. 376, č. 6588, s. 44–53.

ONDOK, Josef P. *Bioetika, biotechnologie a biomedicína*. Praha: Triton, 2005.

PAVEL-DINU, Mara a kol. Gene correction for SCID-X1 in long-term hematopoietic stem cells. *Nature communications* 2019, roč. 10, č. 1, s. 1634.

PEREZ, Elena E. a kol. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology* 2008, roč. 26, č. 7, s. 808–816.

PRAY, Leslie. Eukaryotic genome complexity. *Nature education* 2008, roč.1, č. 1, s. 96.

QI, Lei S. a kol. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequencespecific control of gene expression. *Cell* 2013, roč. 152, č. 5, s. 1173–1183.

RAN, Ann F. a kol. Double nicking by rna-guided crispr cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 2013, roč.154, č. 6, s. 1380-1389.

REIN, Lindsay A. M. a kol. Applications of gene editing technologies to cellular therapies. *Bioliology blood marrow transplantation* 2018, roč. 24, č. 8, s. 1537–1545.

RENDTORFF, Jacob D. Bioethics and medical ethics: Basic principles in bioethics and biolaw. *The Paideia archive: Twentieth world congress of philosophy* 1998, č. 4., s. 130–142.

SINGH, Priti a kol. A Mouse Geneticist's Practical Guide to CRISPR Applications. *Genetics* 2015, roč. 199, č. 1, s. 1–15.

SLAYMAKER, M. Ian a kol. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* 2016, roč. 351, č. 6268, s. 84–88.

SMITH, Haminton O. – WELCOX, Kent W. A Restriction enzyme from Hemophilus influenzae: I. Purification and general properties. *Journal of molecular biology* 1970, roč. 51, č. 2, s. 379–391.

STEPPER, Peter a kol. Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L methyltransferase. *Nucleic acids research* 2017, roč. 45, č. 4, s. 1703–1713.

TEBAS, Pablo a kol. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *New england journal of medicine* 2014, roč. 370, č. 10, s. 901–910.

THOMAS, Kirk R. – CAPECCHI, Mario R. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* 1986, roč. 44, č. 3, s. 419–428.

TSAI, Shengdar Q. a kol. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nature biotechnology* 2014, roč. 32, č. 6, s. 569–576.

VÁCHA, Marek a kol. *Základy moderní lékařské etiky*. Praha: Portál, 2012.

WU, Shao-Shuai a kol. Advances in CRISPR/CAS-based gene therapy in human genetic diseases. *Theranostics* 2020, roč. 10, č. 10, s. 4374–4382.

WU, Yuxuan a kol. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell research* 2015, roč. 25, č. 1, s. 67–79.

YIN, Hao a kol. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nature biotechnology* 2014, roč. 32, č. 6, s. 551–553.

ZIMMERMAN, Burke K. Human germ-line therapy: the case for its development and use. *The journal of medicine and philosophy* 1991, roč. 16, č. 6, s. 593–612.

ZHU, Weijun a kol. The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology* 2015, roč. 12, č. 22.

INTERNETOVÉ ODKAZY

ALBERTS, Bruce – JOHNSON, Alexander a kol. *Molecular Biology of the Cell, 4th ed., Studying gene expression and function*. New York: Garland Science, 2002, [2022-05-10]. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26818/>>.

BELLUZ, Julia. *Is the CRISPR baby controversy the start of a terrifying new chapter in gene editing?* (22.1.2019) [2022-01-26]. <<https://www.vox.com/science-and-health/2018/11/30/18119589/crispr-gene-editing-he-jiankui>>.

BRIGDEN, Tanya – HALL, Allison. *Somatic genome editing: ethics and regulation*. (11.2019) [2022-03-12]. <<https://www.phgfoundation.org/briefing/somatic-genome-editing-ethics-regulation>>.

Catholic news agency. *Catholic bioethicist warns against gene-editing experiments*. (27.6.2020) [2022-03-15]. <<https://www.catholicnewsagency.com/news/44994/catholic-bioethicist-warns-against-gene-editing-experiments>>.

COHEN, Jon. *Did CRISPR help or harm the first-ever gene-edited babies?* (1.8.2019) [2022-01-26]. <<https://www.science.org/content/article/did-crispr-help-or-harm-first-ever-gene-edited-babies>>.

Council of Europe. *Convention for the protection of human rights and dignity of the human being with regard to the application of biology and medicine: Convention on Human Rights and Biomedicine* (4.4.1997) [2022-02-10]. <<https://rm.coe.int/168007cf98>>.

European group on ethics in science and new technologies in the European Commission. *Ethics of synthetic biology*, roč. 25, s. 13, (17.2.2010) [2022-02-25]. <<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/c9b00815-2268-4ba7-bdfe-59d96dfb1f5d/language-en/format-PDF/source-77404369>>.

HU, Chen. U.S. National library of medicine: *Safety of transplantation of CRISPR CCR5 modified CD34+ cells in HIV-infected subjects with hematological malignances* (23.5.2017) [2022-01-20].
<<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03164135?term=CRISPR%2FCAS9&cond=HIV+Infections&draw=2&rank=1>>.

International association for education and ethics, *Ethics education and new technologies: cooperation or conflict?* 10th International conference for education and ethics, 23.-25. June 2022, University of Padova. [2022-03-10]
<<https://www.zipinternationalcongress.com/>>.

Srov. KEMP, Peter. *Final report to the European Commission on the Project basic ethical principles in Bioethics and Biolaw 1995-1998, Part B*, s. 1-13. (9.7.1999) [2022-02-27]. <<http://cometc.unibuc.ro/reglementari/Basic-Ethical-Principles.pdf>>.

National academies of sciences, engineering, and medicine. *On human gene editing: international summit statement*. (3.12.2015) [2022-02-15].
<<https://www.nationalacademies.org/news/2015/12/on-human-gene-editing-international-summit-statement>>.

National human genome research institute. *Synthetic biology* [2022-02-10].
< <https://www.genome.gov/about-genomics/policy-issues/Synthetic-Biology>>.

NORMILE, Dennis. *Chinese scientist who produced genetically altered babies sentenced to 3 years in jail* (30.12.2019) [2022-01-26].
<<https://www.sciencemag.org/news/2019/12/chinese-scientist-who-produced-genetically-altered-babies-sentenced-3-years-jail>>.

Online mendelian inheritance in man. *Gene map statistics* (10.5.2022) [2022-02-20].
<<https://omim.org/statistics/geneMap>>.

PARKINS, Kezia. *FDA approves first trial investigating CRISPR gene editing as HIV cure* (16.9.2021) [2022-01-22]. <<https://www.clinicaltrialsarena.com/news/crispr-gene-editing-hiv-cure/>>.

REGALADO, Antonio. *China's CRISPR twins might have had their brains inadvertently enhanced*. (21.2.2019) [2022-01-26].
<<https://www.technologyreview.com/2019/02/21/137309/the-crispr-twins-had-their-brains-altered/>>.

REGALADO, Antonio. *First Gene-Edited Dogs Reported in China* (19.10.2015) [2022-01-20]. <<https://www.technologyreview.com/2015/10/19/165740/first-gene-edited-dogs-reported-in-china/>>.

RESSNEROVÁ, Alžběta. *Genová editace pomocí CRISPR, jak daleko můžeme zajít?* (23.11.2021) [2022-01-25]. <<https://www.youtube.com/watch?v=p9I-9m-Ecyg>>.

Satanova komunita. (3.6.2022). <<https://satanovakomunita.cz/>>.

SANDERS, Robert. *FDA approves first test of CRISPR to correct genetic defect causing sickle cell disease*, (30.3.2021) [2022-01-20]. <<https://news.berkeley.edu/2021/03/30/fda-approves-first-test-of-crispr-to-correct-genetic-defect-causing-sickle-cell-disease/>>.

SCHMIDT, Fabian. *CRISPR-Cas9 babies likely to die earlier, Berkeley study says*. (3.6.2019) [2022-01-26]. <<https://www.dw.com/en/crispr-cas9-babies-likely-to-die-earlier-berkeley-study-says/a-49025884>>.

The nobel prize. *Press release: The Nobel prize in chemistry 2020*. (7.10.2020) [2022-02-10]. <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/>>.

Valné shromáždění Organizace spojených národů, New York, (10. 12. 1948), [2022-01-23]. <http://www.lidskaprava.cz/uploads/03_dokumenty/04_uvod/00_VDLP_UDHR-.pdf>.

Vatican news. *New directory for catechesis released*. (25.6.2020) [2022-03-18]. <<https://www.vaticannews.va/en/vatican-city/news/2020-06/vatican-publishes-new-directory-for-catechesis.html>>.

ZHOU, Miou a kol. CCR5 is a suppressor for cortical plasticity and hippocampal learning and memory. *Elife* 2016, roč. 5. (20.12.2016) [2022-01-26]. <<https://elifesciences.org/articles/20985>>.

1st. Internation conference ethics of engineering life. (8.6.2022). <<https://iceel.info/>>.

Přílohy

Tab. 1 Translační cesta – základní aspekty a výstupy vědecké obce (doslovný překlad.)

<p>„Neměl by proběhnout žádný pokus vedoucí k ustavení těhotenství s vývojem embrya, které bylo geneticky modifikováno editací genomu, dokud a pokud nebylo jasně stanoveno, že je možné účinně a zodpovědně objasnit, že zavedené genomové změny v embryu nebudou mít nežádoucí účinky a dopady. S těmito kritérii se zatím nepočítalo a je potřebné, aby je budoucí výzkum postupně objasňoval.“²¹⁰</p>
<p>„Je potřebné, aby byl veden rozsáhlý společenský dialog ještě dříve, než se jakákoli krajina rozhodne povolit klinické využití HHGE. Toto možné zavedení vyvolává mnoho dalších společenských a etických otázek mimo dosah Mezinárodní etické komise, které mají být reflektovány a hodnoceny. Na veřejné společenské diskusi mají participovat také ti, kteří jsou nositeli dědičných onemocnění, jsou to tedy ti, kterých by se aplikovaná metoda měla nejvíc týkat.“²¹¹</p>
<p>„Není možné definovat jednu obecnou odpovědnou translační cestu použitelnou napříč všemi možnými způsoby použití dědičného editování lidského genomu, protože použití, okolnosti a úvahy se velmi liší, stejně jako pokroky v základních znalostech, které by byly zapotřebí, než by byla vůbec možná aplikace různých druhů použití. Klinické použití HHGE by mělo postupovat podle principu graduality. Vždy by měly existovat jasné prahy pro povolení použití na základě toho, zda může být a byla jasně definována odpovědná translační cesta pro hodnocení bezpečnosti a účinnosti použití v konkrétním případě a zda se země rozhodla použití povolit.“²¹²</p>
<p>„Pokud by se nějaká země rozhodla dovolit HHGE v klinické praxi měla by zabezpečit, aby použití této metody se vztahovalo na vymezená kritéria jeho použití, kterými jsou:</p>
<ul style="list-style-type: none"> ○ Vážné monogenetické onemocnění, kterého etická komise určí jeho závažnost podle kritéria incidence, morbidity a frekvence předčasné smrti. Počet monogenetických onemocnění je přibližně 4000.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Použití HHGE je omezeno na změnu patogenní genetické varianty, o které je známo, že je zodpovědná za závažné monogenetické onemocnění na opravenou variantu sekvence, jež je běžná v příslušné populaci a o které je známo, že není původcem choroby.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Embrya bez genotypu, který způsobuje onemocnění, nebudou podrobena procesu úpravy genomu, jeho přenosu a ustavení těhotenství, aby bylo zajištěno, že žádní jedinci pocházející z upravených embryí nebyli vystaveni rizikům HHGE bez jakéhokoli potenciálního prospěchu.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Použití HHGE je omezeno na situace, ve kterých potenciální rodiče nemají možnost mít vlastní geneticky zdravé dítě bez monogenetického onemocnění. Přičemž platí, že ve všech embryích těchto rodičů by došlo k propagaci onemocnění bez zásahu metody HHGE, anebo mají extrémně špatné genetické predikce, protože očekávaný podíl nemocí nepostižených embryí by byl neobvykle nízký, což Komise stanovuje na 25 procent nebo méně, a pokusili se alespoň o jeden cyklus preimplantačního genetického testování, ale bez úspěchu.“²¹³
<p>„Před jakýmkoli pokusem navození stavu těhotenství s embryem, které bylo ošetřeno metodou HHGE, je nutné, aby preklinické studie prokázaly, že HHGE lze provádět s dostatečně vysokou účinností a přesností, aby byla klinicky signifikantní. Pro každé počáteční použití HHGE by preklinické důkazy o bezpečnosti a účinnosti měly být založeny na studii statisticky významného souboru upravených lidských embryí a měly by prokázat, že tento proces má schopnost generovat a s vysokou přesností vybrat vhodný počet embryí. Tato embrya by měla splňovat následující kritéria:</p>
<ul style="list-style-type: none"> ○ Vybraná embrya mají zamýšlené úpravy a žádné jiné.

²¹⁰ Srov. NATIONAL ACADEMY OF MEDICINE, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, AND THE ROYAL SOCIETY. *Heritable human genome editing*, s. 3.

²¹¹ Srov. tamtéž.

²¹² Srov. tamtéž.

²¹³ Srov. tamtéž, s. 3–4.

<ul style="list-style-type: none"> ○ V souboru embryí je nedostatek dalších pozměněných variant zavedených procesem editace mimo cílová místa; celkový počet nových genomových variant by se neměl výrazně lišit od počtu nalezeného u srovnatelných neupravených embryí.
<ul style="list-style-type: none"> ○ V populaci embryí po zavedení genomových úprav chybí důkazy o mozaismu.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Embrya mají mít vhodný klinický stupeň vývoje pro ustanovení těhotenství.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Poměry aneuploidie nesmí být vyšší, než se očekávalo na základě standardních postupů technologie asistované reprodukce.²¹⁴
<p>„Další kritérium se týká ověření kvality a vhodnosti modifikovaných embryí HHGE před vlastní implantací do dělohy matky:</p>
<ul style="list-style-type: none"> ○ Standardy by měly zůstat stejné jako při obecných postupech asistované reprodukce, která by měla sledovat vývojová stadia až do fáze blastocysty, kdy by mělo dojít k transferu embrya do dělohy.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Zavedená cílová mutace prostřednictvím HHGE v embryu by měla být ověřena pomocí biopsie buněk ve stadiu blastocysty s následným testováním přítomnosti změny ve všech buňkách blastocysty a vyloučením nežádoucích změn v místě zásahu a zároveň ověřena nepřítomnost nežádoucích mutačních zásahů.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Pokud je po přísném vyhodnocení uděleno schválení pro regulovaný přenos embryí do dělohy matky, je velmi důležité proces těhotenství neustále monitorovat a sledovat další vývoj již narozeného jedince a dospělého člověka.²¹⁵
<p>„Vědecký výzkum by měl pokračovat ve vývoji metod, díky kterým by bylo možné produkovat funkční lidské gamety z kultivovaných lidských pluripotentních kmenových buněk. Tento proces je označován jako <i>in vitro</i> gametogeneze a představuje jakousi náhradu za editaci genomu zygoty. Metoda <i>in vitro</i> gametogeneze se neustále vyvíjí a v aktuální fázi vývoje není použitelná pro klinické studie. Dalším z teoretických aplikací je izolace spermatogoniálních buněčných prekurzorů, jejich následná editace a navrácení do pohlavních žláz (metoda je teoretická, protože je spojena s mnoha etickými otázkami a z technického hlediska je spojena s velkým rizikem výskytu mozaicizmu). Prostřednictvím <i>in vitro</i> gametogeneze by se otevřela další možnost pro potenciální rodiče, jak se vyhnout dědičnosti onemocnění účinnou produkcí, testováním a výběrem embryí bez genotypu způsobujícího onemocnění. Použití takových gamet odvozených <i>in vitro</i> v reprodukčním prostředí nastoluje velmi vážné lékařské, etické a společenské problémy, které je třeba pečlivě vyhodnotit. Takto produkované gamety bez úpravy genomu by musely být prvně schváleny pro použití v technologii asistované reprodukce, až poté by mohly být zvažovány pro klinické použití dědičné úpravy lidského genomu. Rodiče, kteří jsou přímo postiženi, nebo jsou přenašeči vážných monogenetických onemocnění nemají moc šancí mít jinak zdravé dítě, které bude jejich. K jiným řešením se radí adopce nebo přijetí vajíčka nebo spermie od cizího dárce s následnými cykly <i>in vitro</i> fertilizace a preimplantační diagnostiky.²¹⁶</p>
<p>„Jakákoli země, ve které se klinicky zvažuje použití dědičné editace lidského genomu HHGE, musí zajistit mechanismy a mít příslušné regulační orgány, které zajistí splnění všech následujících podmínek:</p>
<ul style="list-style-type: none"> ○ Jednotlivci vykonávající činnosti související s HHGE v klinické sféře a orgány na ně dohlížející musí dodržovat zásady lidských práv, bioetiky a musí brát v potaz globální dohled.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Zavedení HHGE v klinické praxi musí vycházet z osvědčených postupů souvisejících technologií, jako jsou techniky mitochondriálního přenosu, preimplantačního genetického testování a úprav genomu somatických buněk prostřednictvím editace.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Rozhodování o klinickém zavedení HHGE je podloženo poznatky z nezávislých mezinárodních hodnocení pokroku ve vědeckém výzkumu, bezpečnosti a účinnosti HHGE, které naznačují, že technologie jsou natolik pokročilé, že by mohly být zvažovány pro klinické použití HHGE.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Vědecké a etické hodnocení jakékoli aplikace používání HHGE je pečlivě prováděno příslušným orgánem nebo procesem, přičemž jednotlivá rozhodnutí jsou přijímána ne obecně, ale případ od případu.

²¹⁴ Srov. tamtéž, s. 3.

²¹⁵ Srov. tamtéž, s. 4.

²¹⁶ Srov. tamtéž, s. 78–80.

<ul style="list-style-type: none"> ○ Oznámení o zvažovaných aplikacích HHGE je poskytováno příslušným orgánem, pod jehož kontrolu aplikace spadá.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Podrobnosti o schválených aplikacích (včetně genetického stavu, laboratorních postupů, laboratoře nebo kliniky, kde to bude provedeno, a národních orgánů zajišťujících dohled) jsou veřejně přístupné, zatímco rodinná identita je pochopitelně chráněna.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Podrobné postupy a výsledky budou publikovány v recenzovaných časopisech, aby bylo zajištěno šíření znalostí, které budou v oboru postupovat.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Jsou uplatňovány normy odpovědného vědeckého chování jednotlivých vyšetřovatelů a jednotlivých laboratoří.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Výzkumní pracovníci a kliničtí lékaři prokazují vedoucí postavení tím, že organizují a účastní se otevřených mezinárodních diskusí o koordinaci a sdílení výsledků relevantního vědeckého, klinického, etického a společenského vývoje, který má dopad na hodnocení bezpečnosti, účinnosti, dlouhodobého monitorování HHGE a společenské přijatelnosti.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Zprávy o vybočení od stanovených směrnic jsou přijímány, přezkoumávány a případně ukládány sankce.²¹⁷
<p>„Měla by vzniknout Mezinárodní vědecká poradní komise, která by měla zvažovat jakémkoli klinické použití dědičné editace lidského genomu (HHGE). Komise by měla být založena na principu interdisciplinarity a jejími členy by měli být nezávislí odborníci schopni vyhodnocovat vědecké důkazy o bezpečnosti a účinnosti editace genomu a souvisejících technologií asistované reprodukce. Komise by měla poskytovat pravidelné informace o pokroku v technologiích, na nichž bude zavedení HHGE záviset, jejich hodnocení a doporučovat další vývoj výzkumu, který by byl nutný k zavedení aplikace HHGE do klinické praxe. Komise by měla dále posuzovat, zda byly splněny veškeré preklinické požadavky za určitých okolností, za nichž lze HHGE zvažovat pro klinické použití. Dalším úkolem ustanovené komise bude přezkoumávat údaje o klinických výsledcích z jakéhokoli regulovaného používání HHGE a poskytovat rady ohledně vědeckých a klinických rizik a potenciálních přínosů možných dalších aplikací.“²¹⁸</p>
<p>„Aby bylo možné pokračovat v aplikacích HHGE, které by byly mimo rámec schváleného primárního účelu použití HHGE v klinické praxi, musí Mezinárodní vědecká poradní komise s odpovídajícím postavením a různorodými odbornými znalostmi a zkušenostmi vyhodnocovat a vydávat doporučení týkající se navrhovaného nového způsobu použití metody v klinické praxi. Tento mezinárodní orgán by měl: jasně definovat každý navrhovaný způsob použití metody a specifikovat její omezení. Měl by navrhnout jasný proces, jak má být nový způsob aplikace metody HHGE v praxi zaveden. Dále má umožnit a svolávat transparentní diskuse o společenských problémech spojených s novým způsobem využití metody HHGE. Dále má neustále reflektovat udělené povolení, zda bylo vhodné překročit práh prvotního omezení a nový způsob využití metody zavádět.“²¹⁹</p>
<p>„Klíčové je vytvoření mezinárodního mechanismu kontroly, který by předával jasné instrukce příslušným vnitrostátním orgánům a zveřejňoval by obavy týkající se výzkumu nebo provádění úpravy dědičného lidského genomu, která se odchyluje od stanovených pokynů nebo doporučených standardů.“²²⁰</p>

²¹⁷ Srov. tamtéž, s. 5.

²¹⁸ Srov. tamtéž, s. 5–6.

²¹⁹ Srov. tamtéž, s. 6.

²²⁰ Srov. tamtéž.