

Současné možnosti editace genomů



Editace genomů

= postupy genového inženýrství, při nichž se

do vybraného místa v cílové DNA přímo

v živém organismu vnáší

inzerce

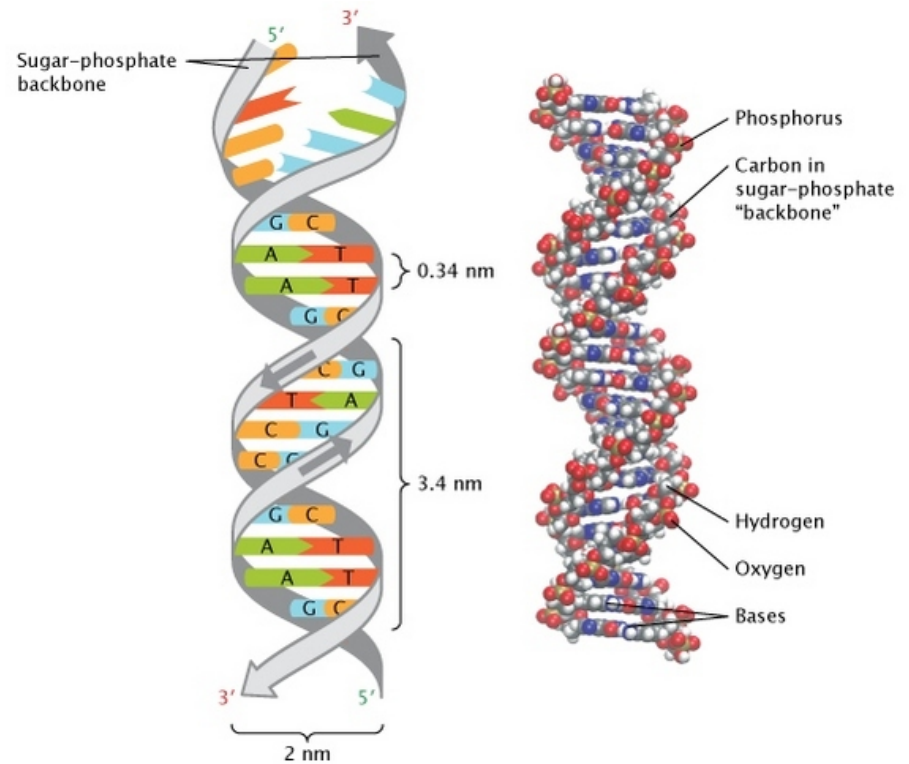
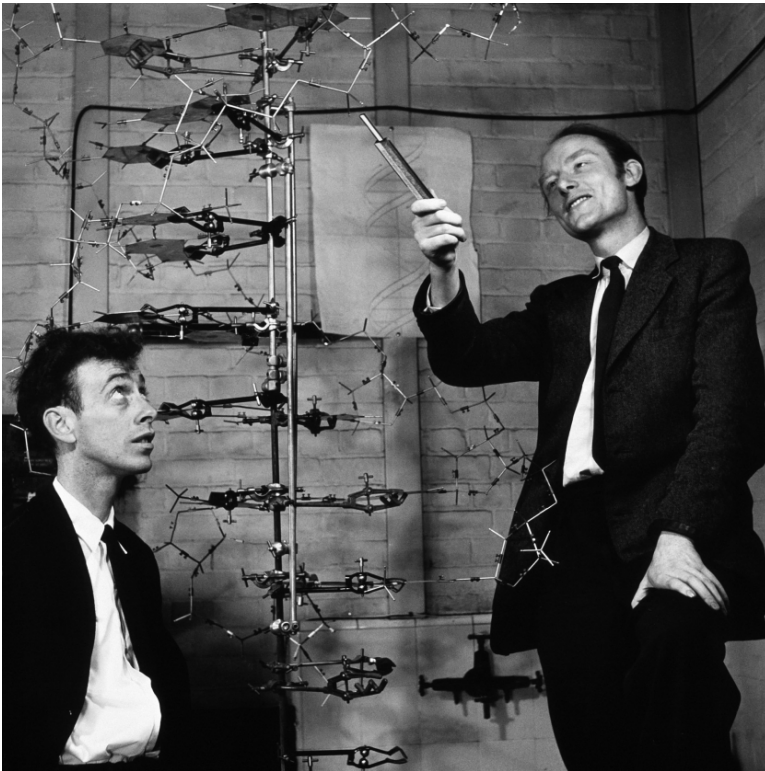
delece

nebo se stávající sekvence nahrazuje za jiné

náhrada alel

... do vybraného místa

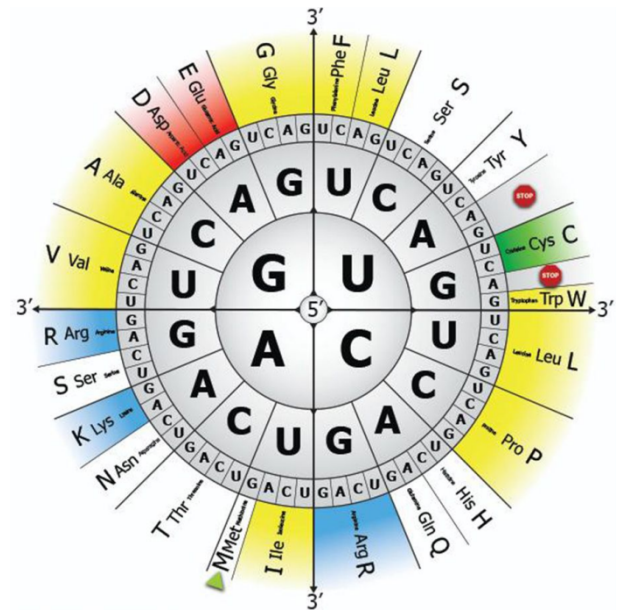
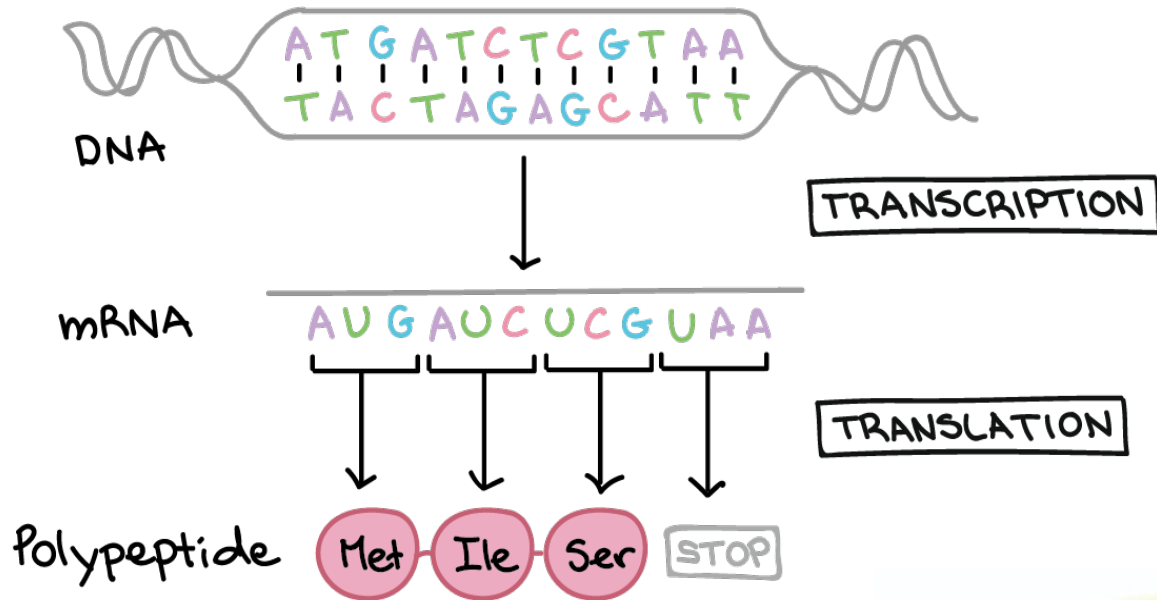
1953



James Watson, Francis Crick, Maurice Wilkins, Rosalind Franklin

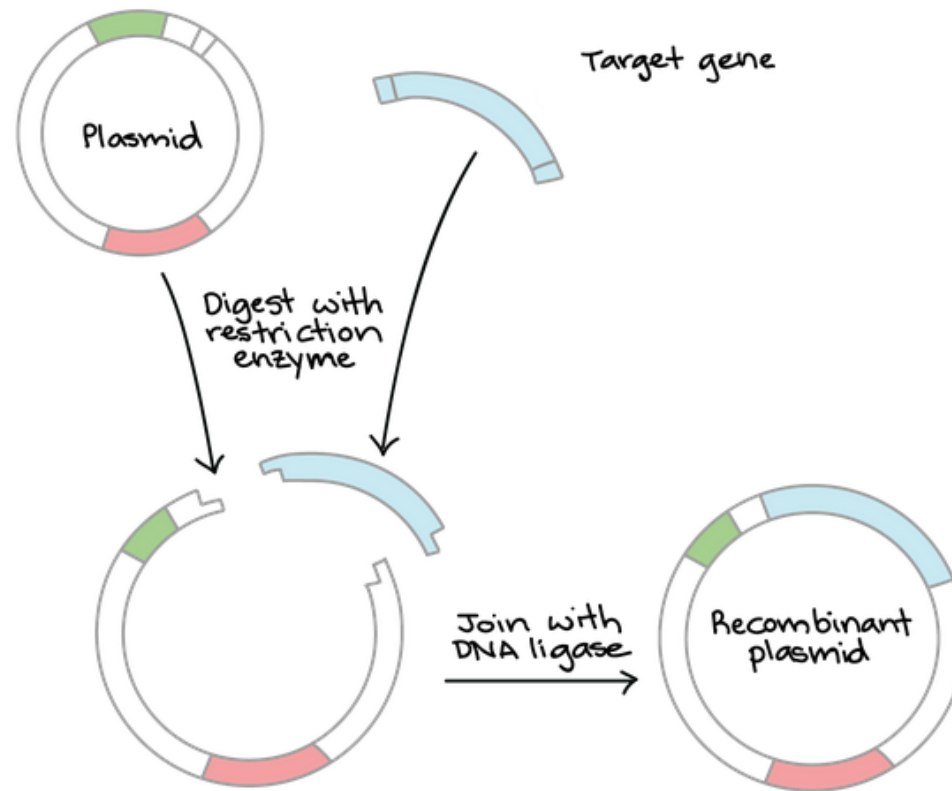
1962 – Nobelova cena

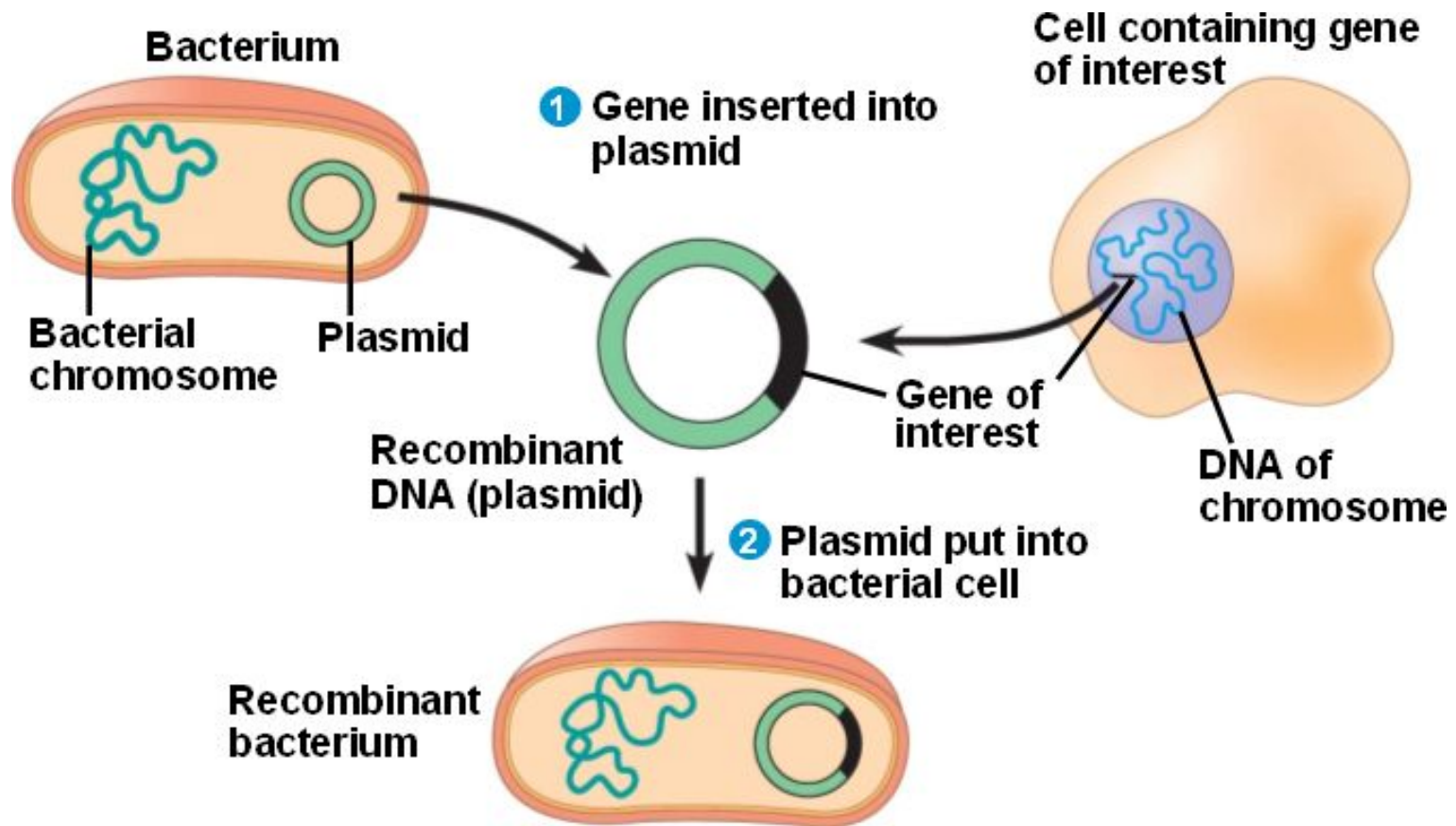
THE CENTRAL DOGMA



Cílená mutageneze/oprava DNA in vitro

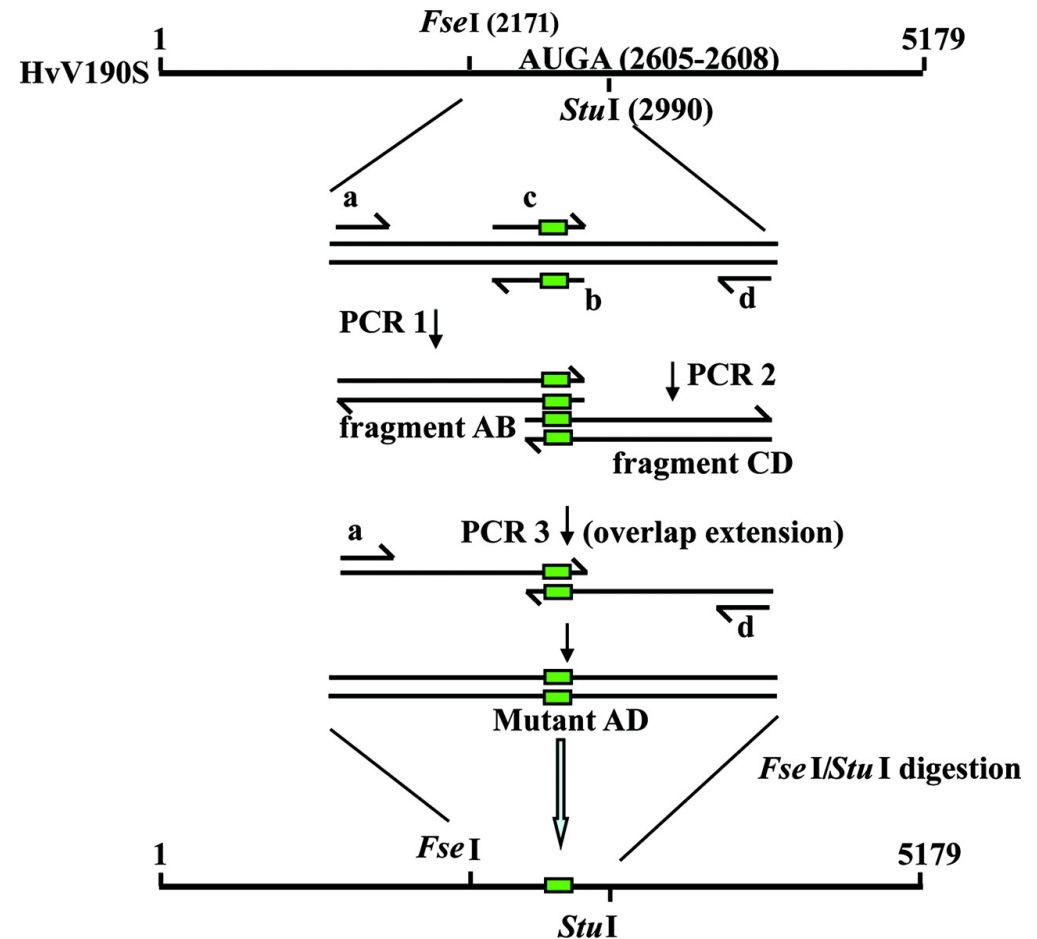
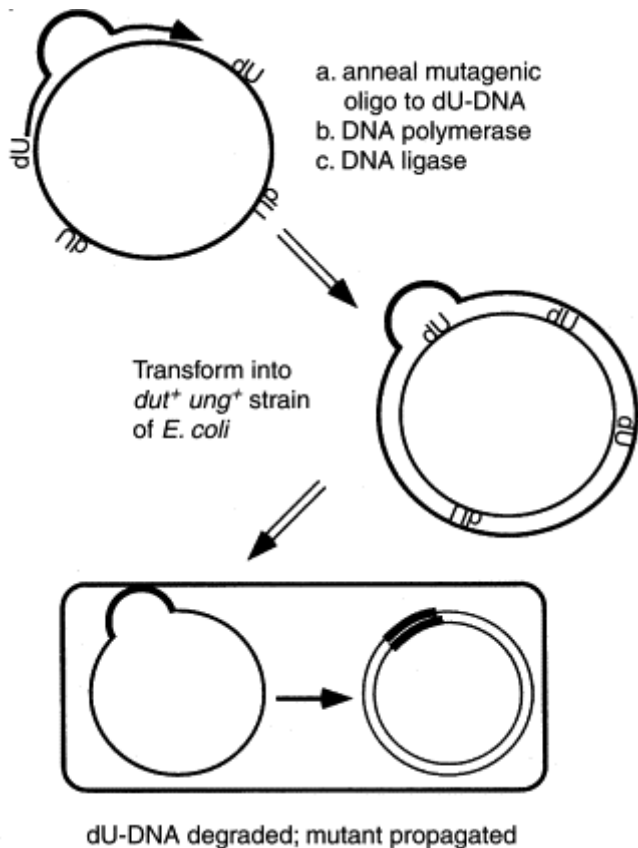
- velké množství různých technik





Cílená mutageneze/oprava DNA in vitro

- od nejjednodušších technik – přímá syntéza DNA cílového genu

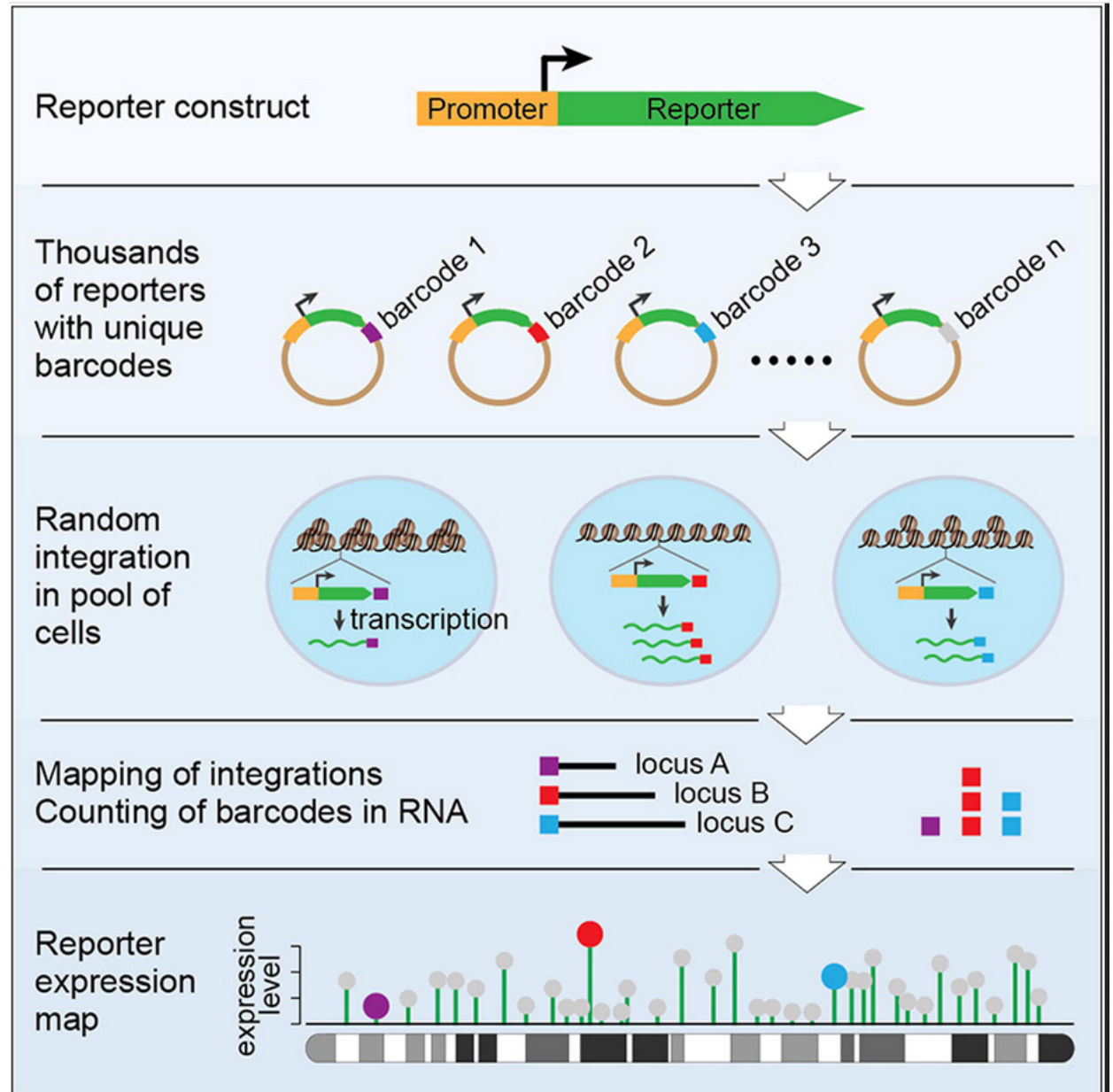


... jak ale takto připravenou
mutaci/opravu
přenést cíleně do genomu
živé buňky/organismu?

Bakterie
Rostlinné buňky
Živočišné buňky

Náhodné začlenění
transgenů do
genomu

Mutagenese
Aktivace/potlačení
expresy sousedních
genů



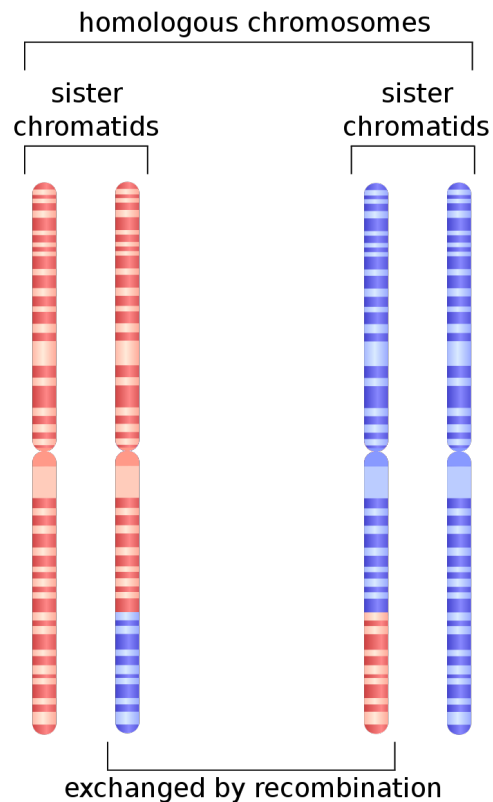
Pro cílené začlenění:

HOMOLOGNÍ REKOMBINACE

Homologní rekombinace

Joshua Ledeborg - homologní rekombinace popsána u bakterií
- Nobelova cena (1958)

= typ genetické rekombinace, při které dochází k výměně velmi podobné/identické
sekvence mezi dvěma molekulami DNA



Klasicky rekombinace mezi sesterskými
chromatidami v meioze – zdroj nových
kombinací genů předávaných na potomky

Homologní rekombinace

- již desítky let využívána při přípravě GMO (bakterií, kvasinek, rostlin, živočichů)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 76, No. 10, pp. 4951-4955, October 1979
Biochemistry

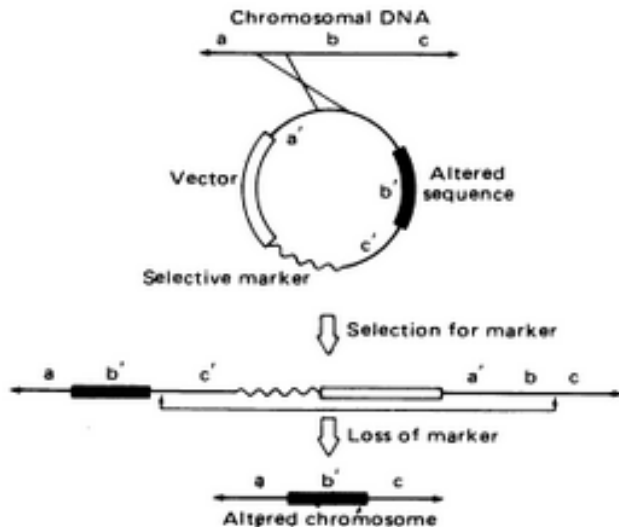
Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro*

(recombination/transformation/deletion mutants/*Saccharomyces cerevisiae*)

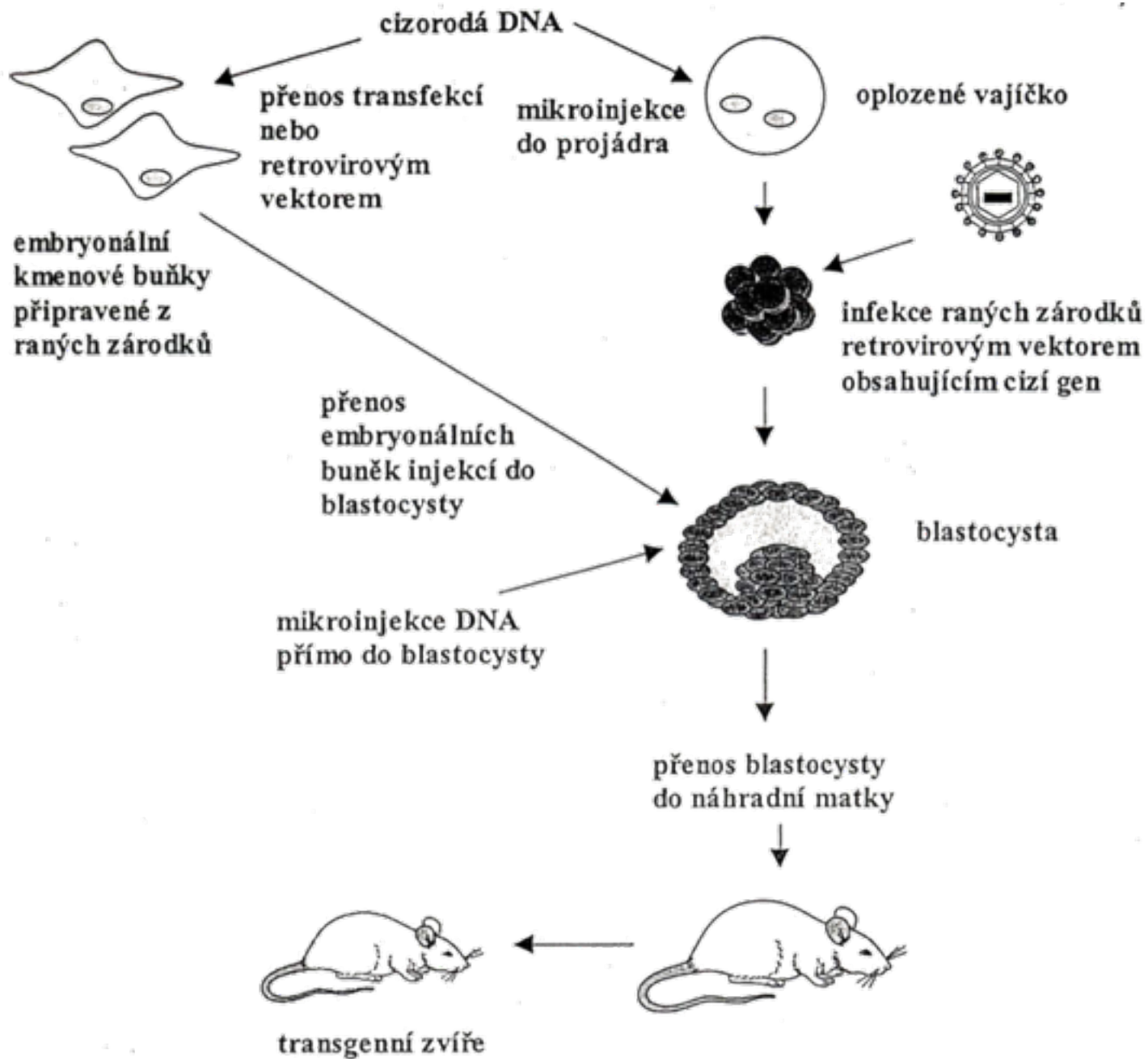
STEWART SCHERER AND RONALD W. DAVIS

Department of Biochemistry, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305

4952 Biochemistry: Scherer and Davis

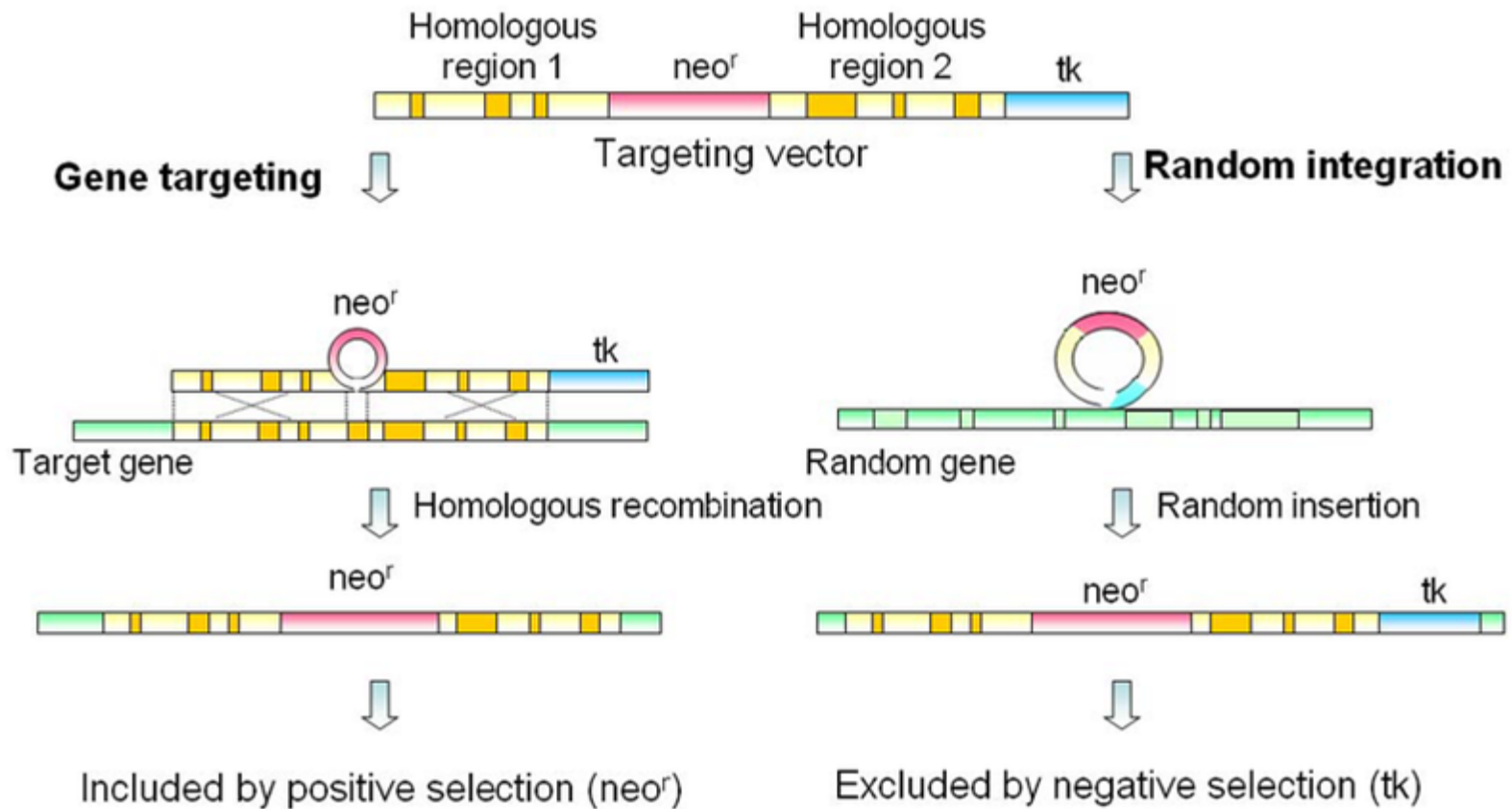


- poměrně vysoká frekvence HDR u kvasinek
- přenos His3 genu (do His3⁻ kmene)
 - pozitivní selekce na His
- využití neg. selekčního markeru (Ura)
 - vně homologní sekvence
- vytvořeny buňky His3⁺ a URA⁻

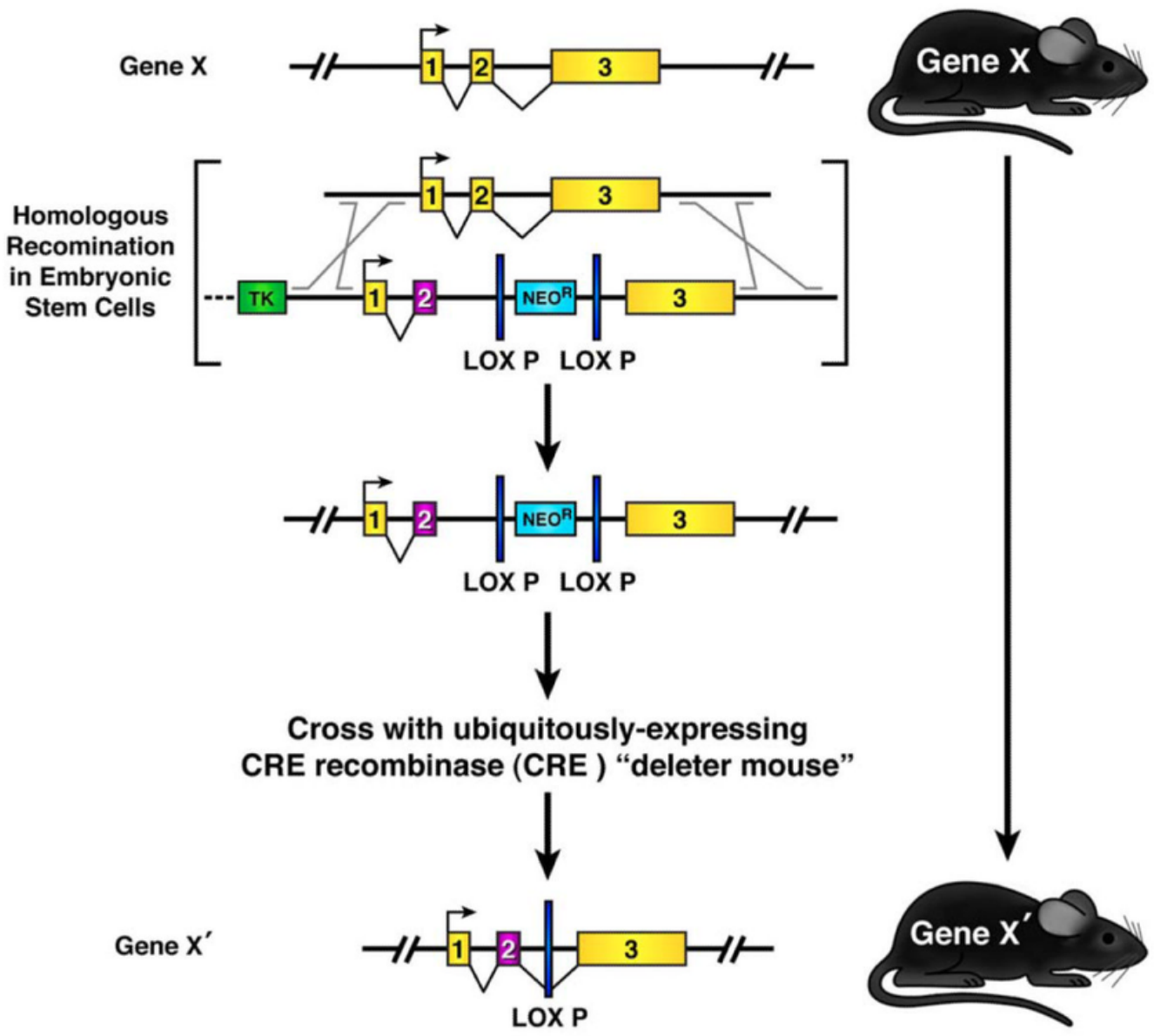


Homologní rekombinace

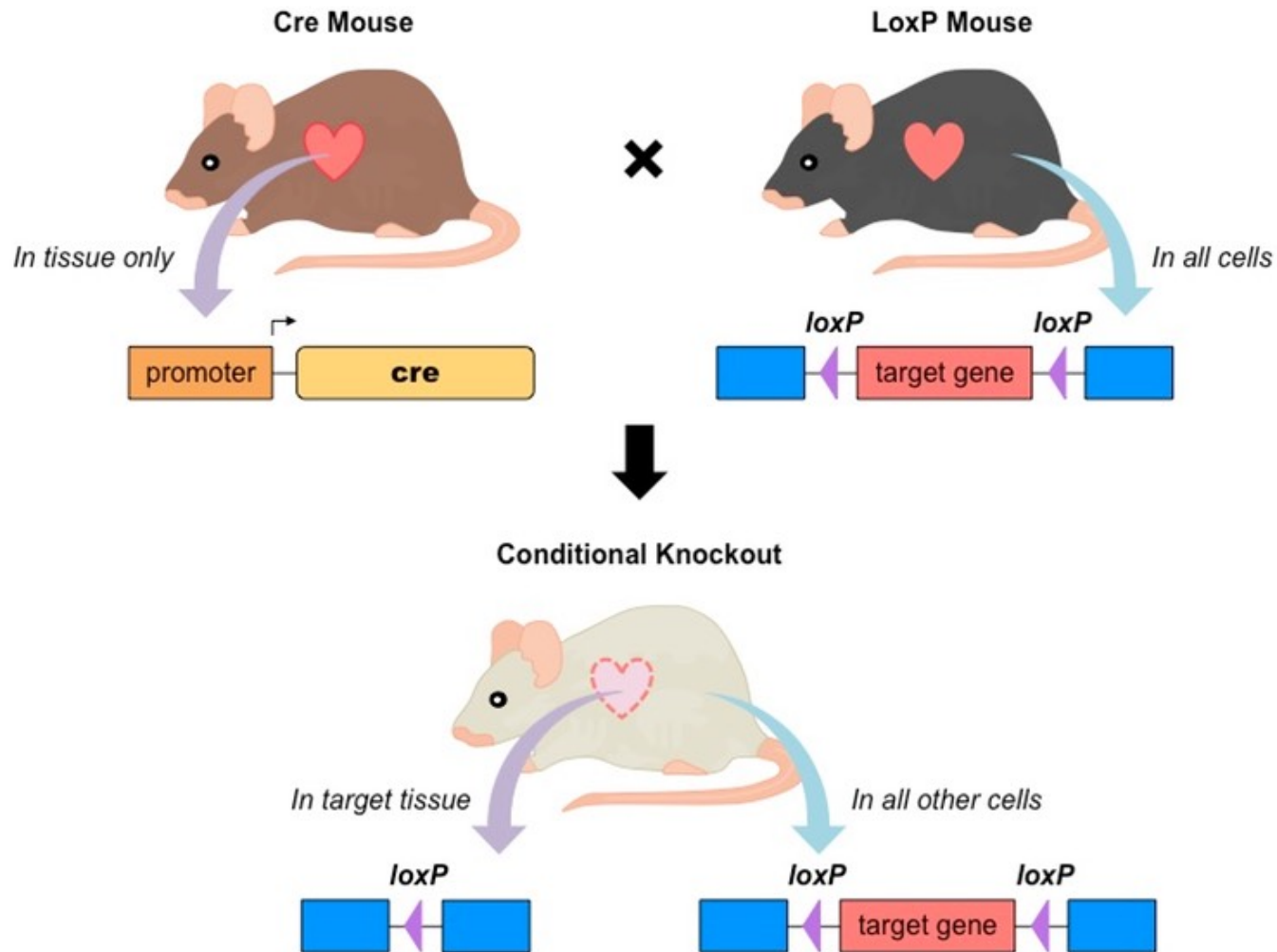
u savců méně častá – ale vyvinuty selekční systémy pro zjednodušení nalezení správných buněk



Knock-out

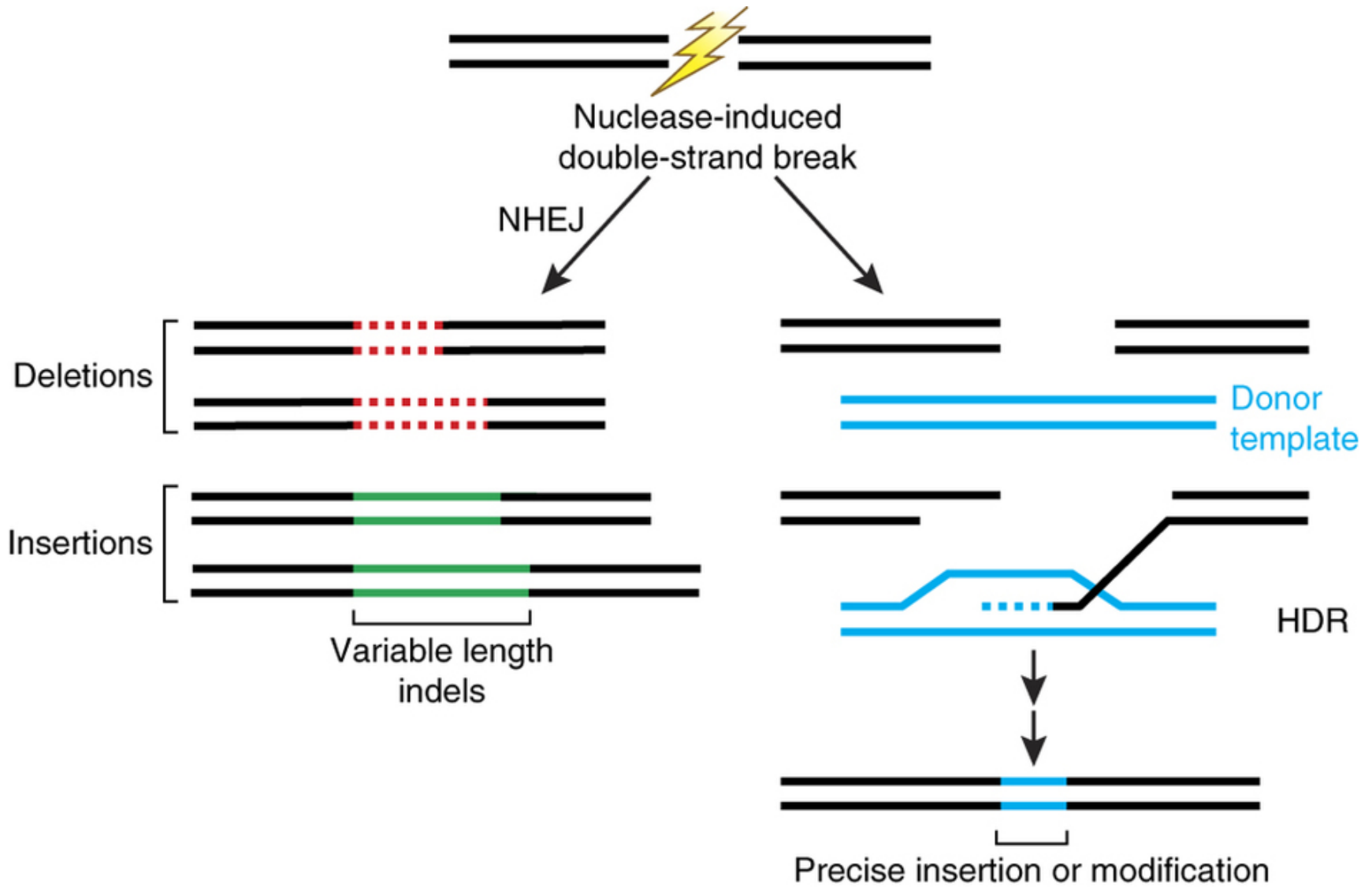


Knock-in

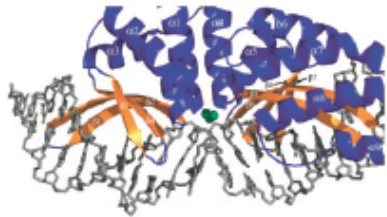


- pracné, vyžaduje selekci, křížení, nízká účinnost homologní rekombinace ...

Frekvence homologní
rekombinace je výrazně
zvýšena v místě, kde
vznikl dsDNA zlom



Nukleázy upravené genovým inženýrstvím

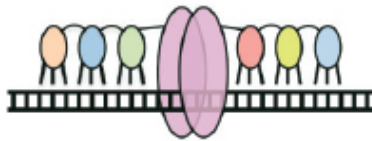


Nuclease Type

Recognition rules

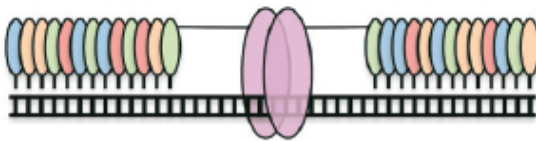
Meganuclease

Complex



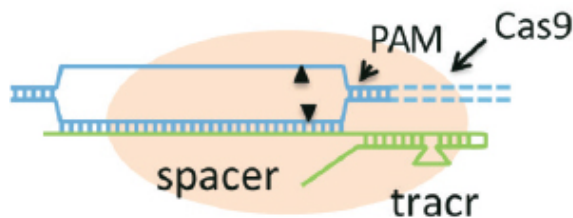
ZFN

1 module per 3 bp



TALENs

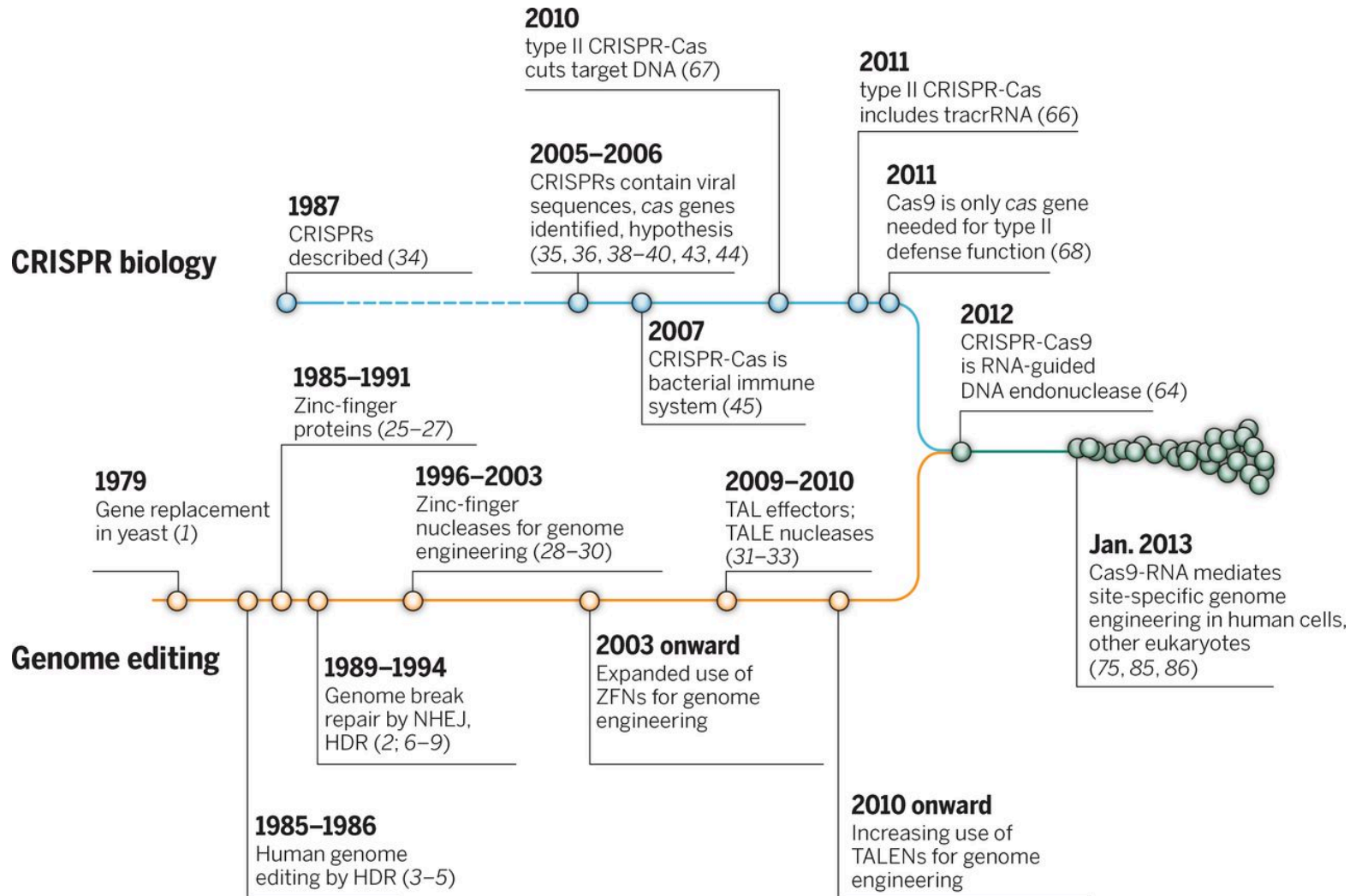
1 module per 1 bp



CRISPR/Cas

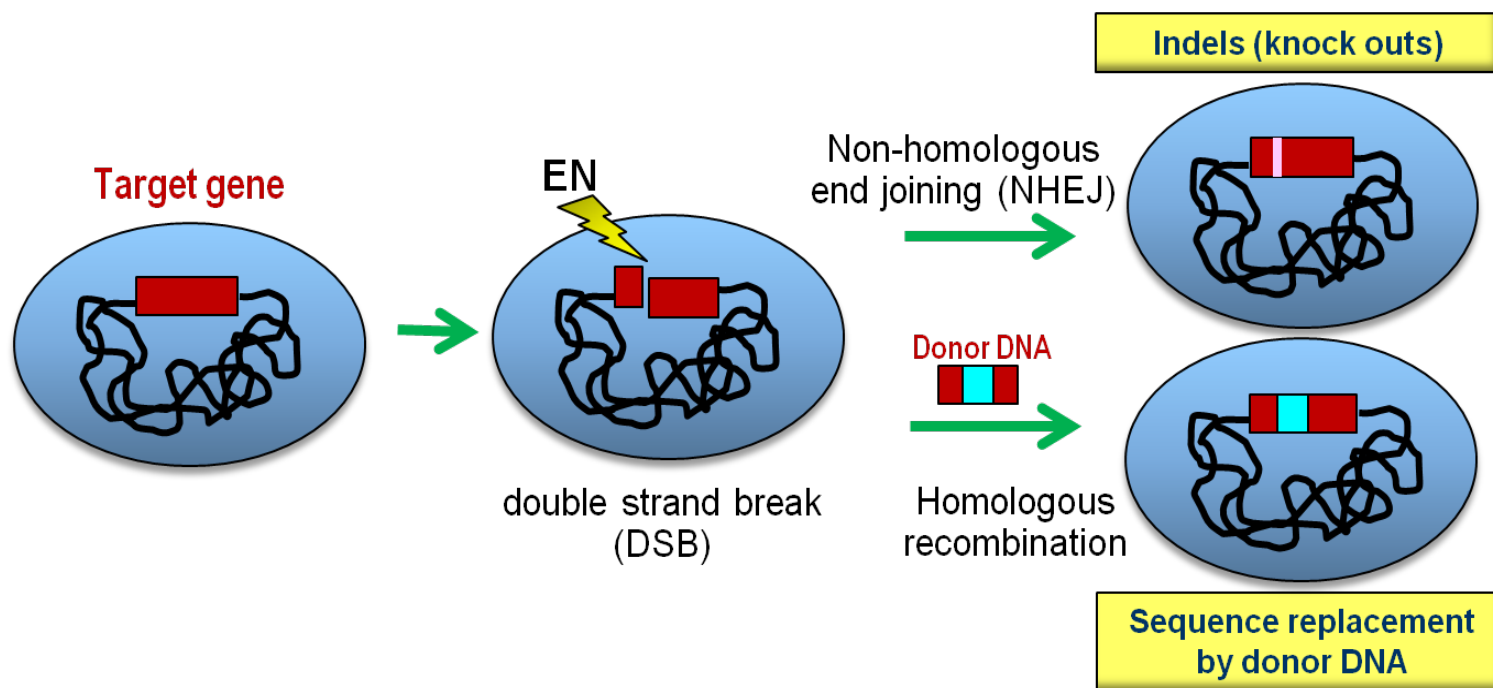
1 base per 1 bp

Historické etapy v CRISPR biologii a editování genomů



- editace probíhá s přesností až **1 nt**
- používají se **uměle připravené nukleázy** – modifikace přirozeně se vyskytujících
- **podstatou je tvorba zlomu** v řetězci DNA (1 ale i 2 zlomy)
- v místě štěpení - vznik mutace
 - vyštěpení celého úseku DNA (genu)
 - náhrada úseku DNA
- lze připravit **mutace jakéhokoli typu** (včetně náhrady alel – „gene replacement“)
- důležitá je funkce **reparačních systémů buněk** – endogenní procesy
 - „nezávisle“ na vnesené DNA/RNA

Procesy probíhající po vytvoření DSB umělými nukleázami



- snaha o vývoj systému pro **sekvenčně specifickou tvorbu dsDNA zlomů**

Lidský genom – 3,2 Gbp - cílem musí být jedinečné sekvence (**specificita**)

- sekvence delší než 20 bp

MEGANUKLEÁZY

- původ v mikroorganismech
- analogie restričních endonukleáz
(velmi dlouhé rozpoznávací sekvence (>14bp vs. RE 4-6 bp))
- je jich známo relativně málo, a tudíž počet cílových sekvencí je omezen
- proteinové inženýrství – nové varianty varianty meganukleáz
- navrhování a příprava je však časově náročná

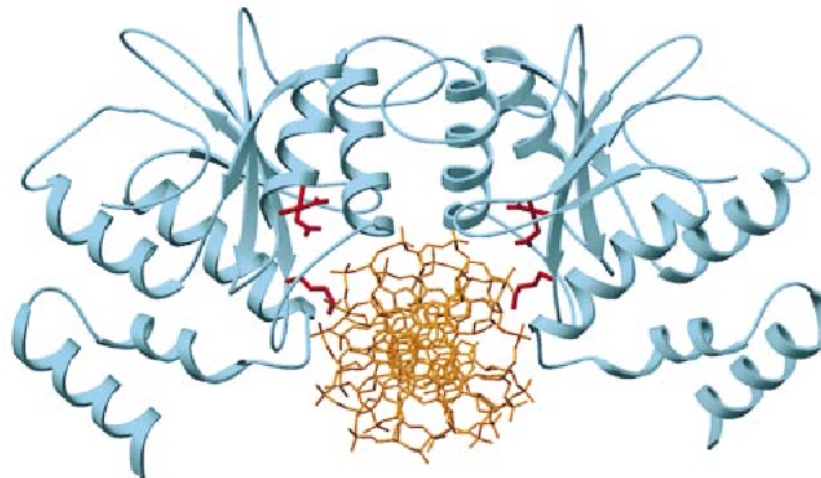
HEG	Organisms	Targeted gene/ genetic element	Application	Reference
I-CreI ^m	<i>Homo sapiens</i>	RAG1	Gene therapy	Grizot et al. 2009
I-CreI ^m	<i>H. sapiens</i>	XPC	Gene therapy	Arnould et al. 2006
I-OnuI ^m	<i>H. sapiens</i>	MAO-B	Gene therapy	Takeuchi et al. 2011
I-SceI ^{wth}	<i>Mus musculus</i>	Neomycin	Gene targeting	Rouet et al. 1994; Smih et al. 1995
I-CreI ^m	<i>Zea mays</i>	LIGULELESS1 (LG1)	Targeted mutagenesis	Gao et al. 2010
I-SceI ^{wt}	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	URA3	Targeted mutagenesis	Storici et al. 2003
I-CreI ^{wt}	<i>Drosophila melanogaster</i>	White (eye colour)	Targeted mutagenesis	Rong et al. 2002
I-PpoI ^{wt}	<i>Anopheles gambiae</i>	X-chromosome (SSU rRNA)	Pest control	Windbichler et al. 2007
I-AniI ^{wt}	<i>Aedes aegypti</i>	Reporter construct	Pest control	Traver et al. 2009
I-CreI ^{wt}				
I-PpoI ^{wt}				
I-SceI ^{wt}				
I-SceI ^{wt}	<i>Trypanosoma brucei</i>	Reporter construct	Studying DSB repair mechanisms	Glover et al. 2008
I-AniI ^{wt}	<i>H. sapiens</i>	Lentivirus based reporter construct	Antiviral therapy	Aubert et al. 2011

^m, modified HE.

^{wth}, wild-type HE.

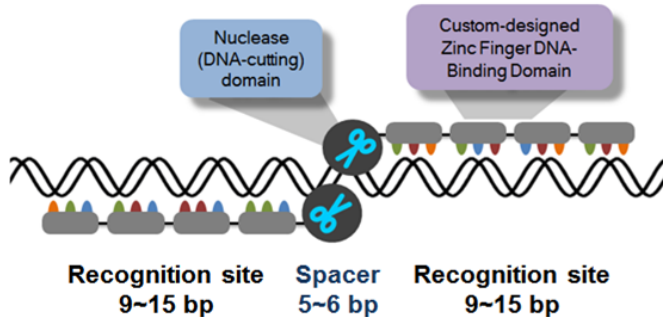
Restrikční endonukleáza *FokI*

- *Flavobacterium okeanoikoites*
- restrikční endonukleáza typu IIS (štěpí blízko rozpoznávací sekvence)
- Rozpoznávaná sekvence je oddělena od sekvence, která je štěpena – to umožňuje izolovat doménu enzymu, která štěpí sekvenci nespecificky. Tato doména pak může být spojena s doménou zodpovědnou za rozpoznání cílové sekvence.
- FokI vyžaduje pro svou nukleázovou činnost dimerizaci
 - zvýší se tím specifita rozpoznání cílového místa



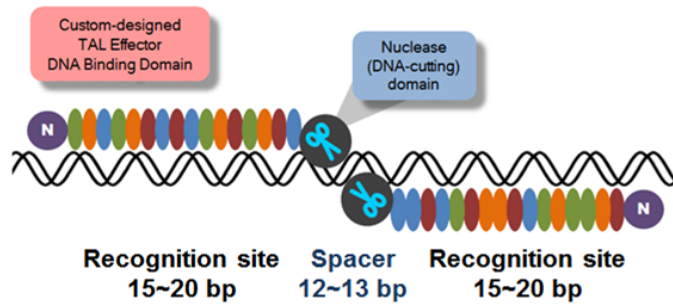
FokI Cleavage Model

Typy nukleáz používané pro editaci genomů



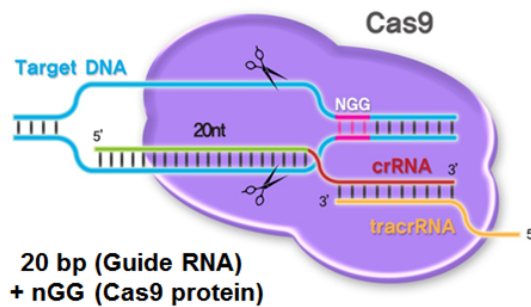
Zinc Finger Nucleases (ZFNs)

- Represent the first generation of engineered nucleases
- DNA binding module: Zinc fingers
(each module recognizes 3 bp of target sequence)
- DNA cleavage domain: Fok I restriction enzyme nuclease domain
(requires dimerization for cleavage)
- Widely proven in many cells and organisms
- Relatively lower resolution of target sequence programmability
- Relatively lower specificity



TAL Effector Nucleases (TALENs)

- DNA binding module: TAL effector unit
(each module recognizes 1 bp of target sequence)
- DNA cleavage domain: Fok I restriction enzyme nuclease domain
(requires dimerization for cleavage)
- High resolution of target sequence programmability
- High specificity and low toxicity



RNA-Guided ENdonucleases (RGENs)

- DNA binding module: Guide RNA that hybridizes to the target DNA (1:1 nucleotide base pairing)
- DNA cleavage module: Cas9 protein (contains two nuclease domains)
- High resolution of target sequence programmability
- High specificity and low toxicity

Nukleázy s motivem zinkových prstů

Zinkové prsty

- malá proteinová doména (cca 30 AK)
- součást transkripčních faktorů a DNA-vážících proteinů (mimo jiné)
- schopnost rozpoznat sekvenční motiv v DNA

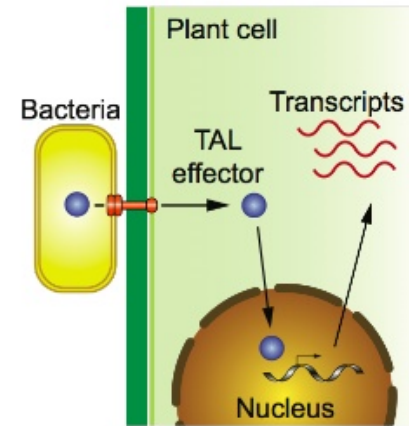


- metodami proteinového inženýrství lze upravovat specifitu zinkových prstů
- přenos do buněk ve formě RNA či DNA

TALEs

Transcription Activator-like effectors (TALE nukleázy, TALEN)

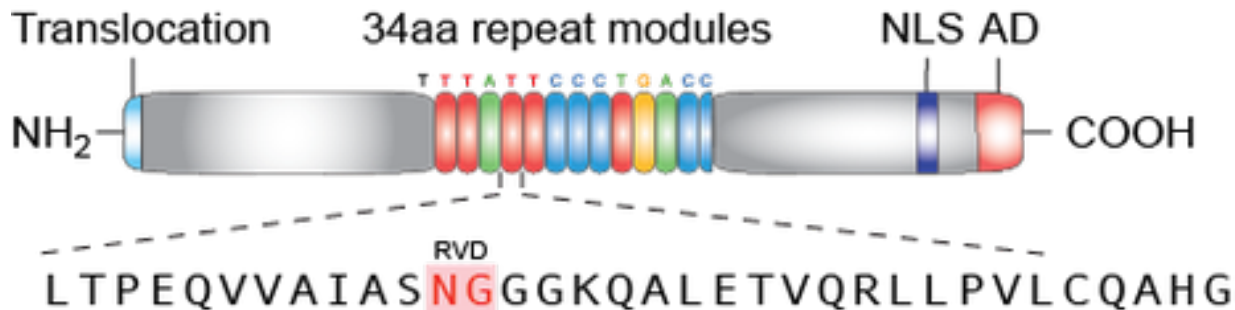
- TALE produkovány bakteriemi *Xanthomonas* při infekce rostlin
- transkripční faktory (aktivace genů – zvýšení hladiny glukózy, ...)
- složené z repetitivních sekvencí AK dlouhých cca 34 AK



Typická repetice: LTPEQVVAIAS**HD**GGKQALETVQRLLPVLCQAHG

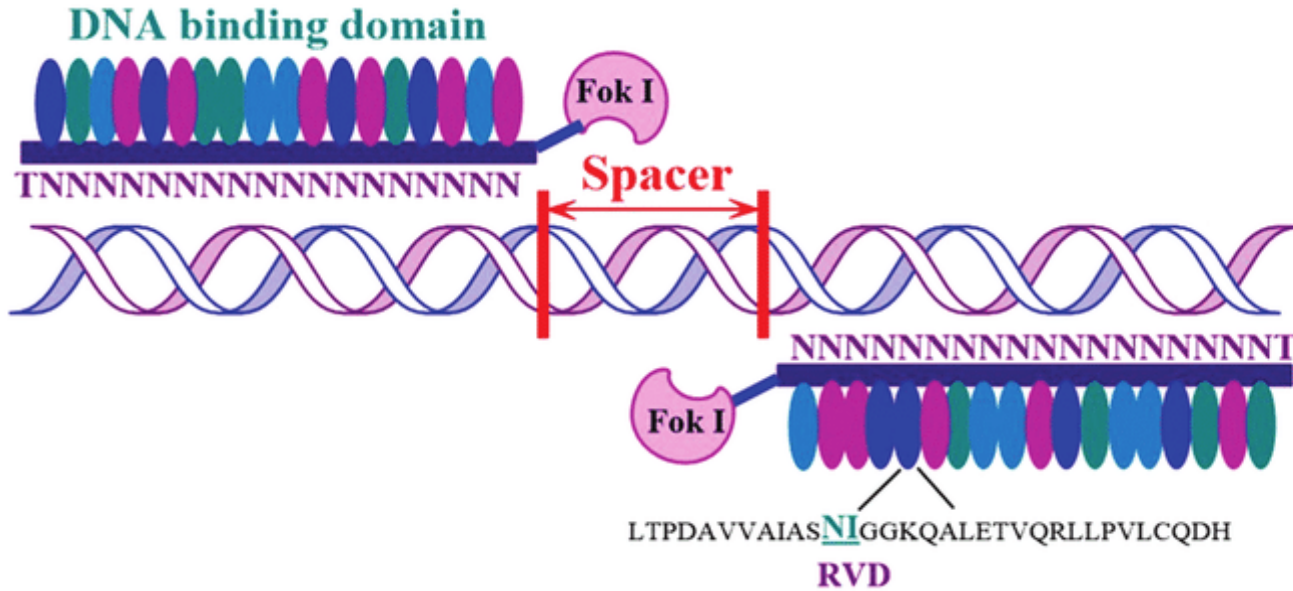
v pozicích 12 a 13 se vyskytují různé aminokyseliny (**repeat variable diresidue RVD**)

klíčové pro specifitu vazby na sekvenci DNA



NG = T
HD = C
NI = A
NN = G or A

TALENs



TALE code	
NI	= A
NG	= T
HD	= C
NK	= G
NN	= G/A
NS	= A/G/T/C

DNA binding code for TALENs

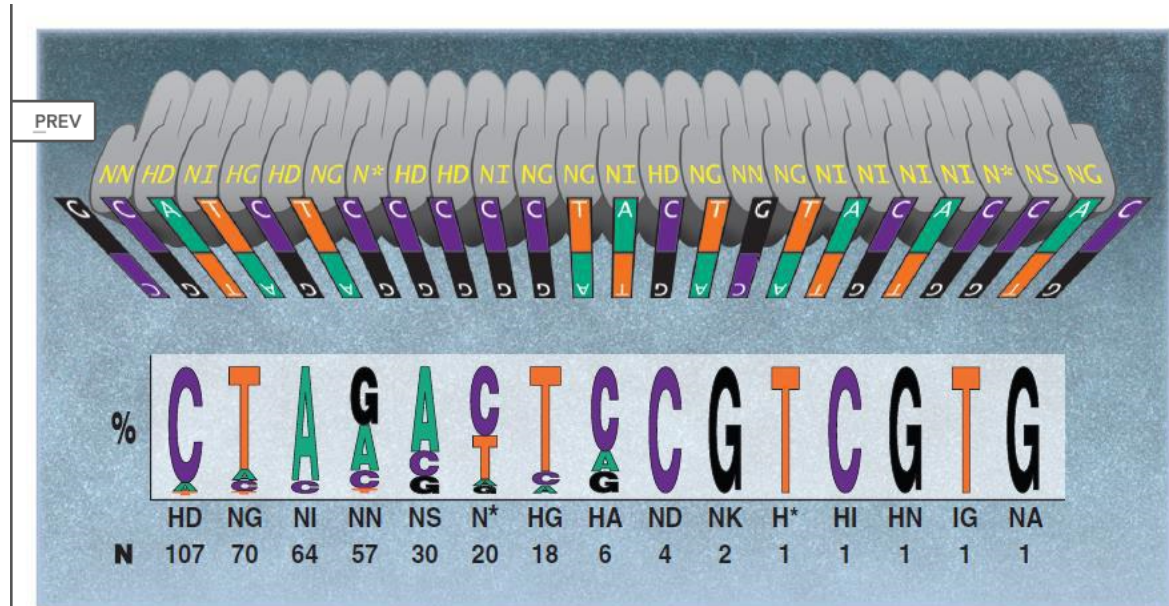
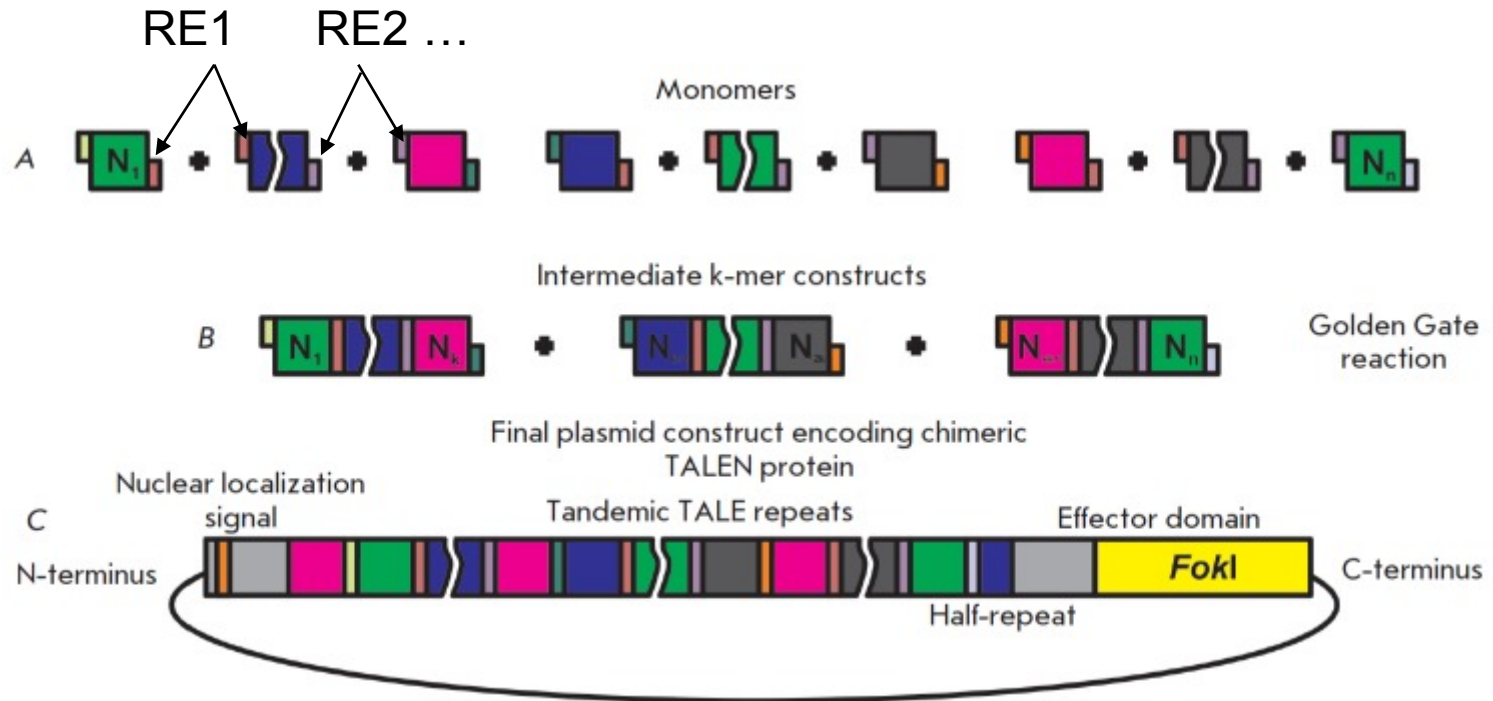


Schéma strategie pro přípravu genetických konstruktů exprimujících chimerické proteiny TALEN – postupná ligace klonovaných monomerů



výsledkem je „skládačka“ cílená proti libovolné sekvenci DNA
 k dispozici jsou knihovny monomerů, dimerů, trimerů a tetramerů
 přenos do buněk/organismů opět ve formě DNA/RNA

..... až dosud. Rozpoznávání
cílové sekvence na základě
interakce protein-DNA ...

CRISPR

1987 – Yoshizumi Ishino – nahromadění repetitivních sekvencí v genomu *E. coli*

1993 – Francisco Mojica – popsal obdobné repetice u archeí

- do roku 2000 u dalších cca 20 bakterií/archeí

- jedná o DNA odvozenou od fágů a plazmidů (**cizorodá DNA**)

2002 - **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats

2007 – Horvath, Barrangou – CRISPR je „imunitní systém bakterií“

2012 – Charpentier, Doudna, (Martin Jínek) – **upravili CRISPR systém pro**

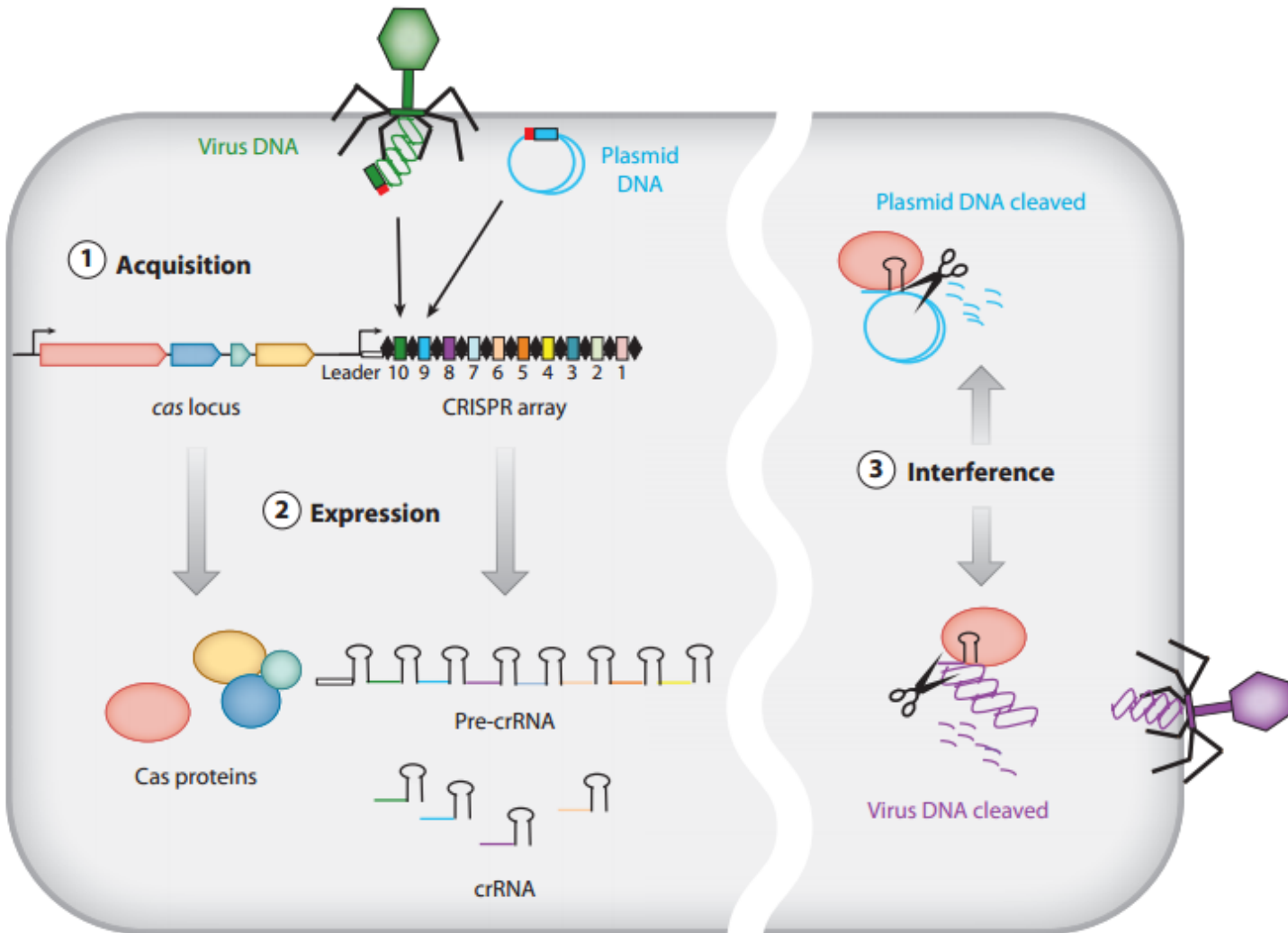
jednoduché použití pro editaci genomu

2013 – Zhang – editace genomů rostlin a savců (**včetně lidských buněk**)

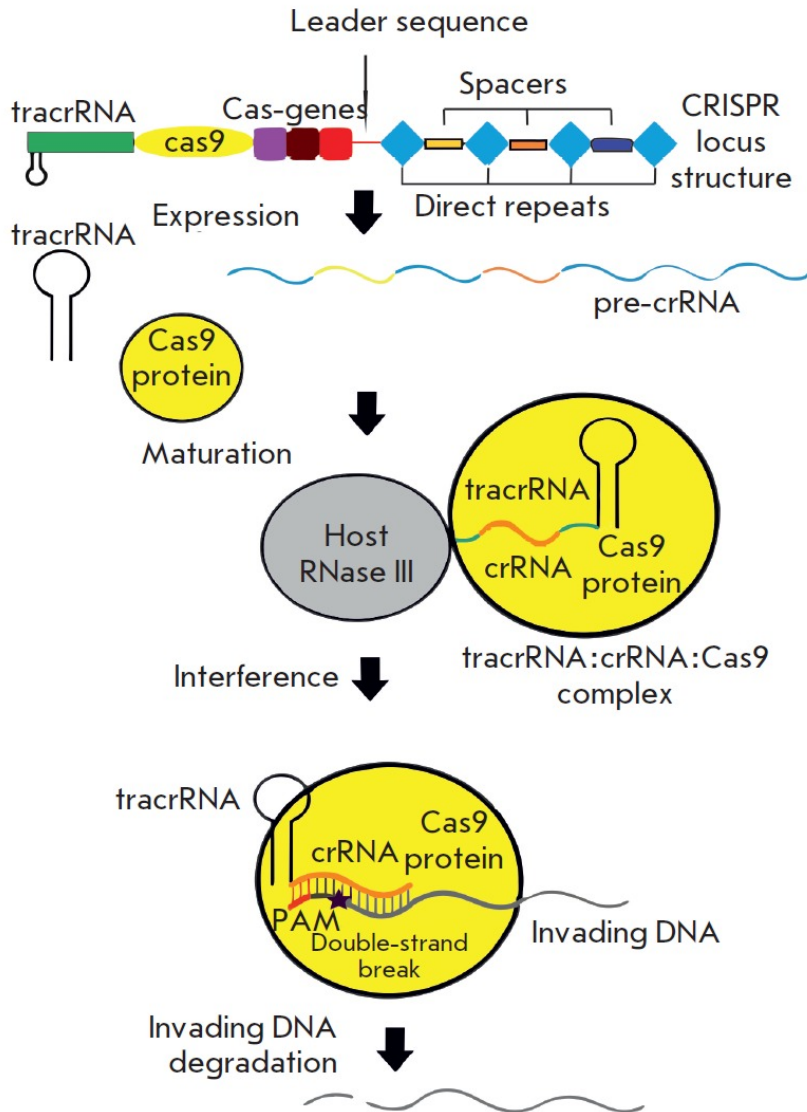
„patentový spor“

System CRISPR/Cas

- přirozený obranný systém bakterií a archeí proti **cizorodé DNA**



Mechanismus fungování CRISPR/Cas9 komplexu



cizorodé DNA rozpoznány proteiny Cas (CRISPR associated proteins) a začleněny do CRISPR lokusu

lokus má až několik stovek mezerníků, nový mezerník, který je převzat z infikující molekuly, je začleněn jako první

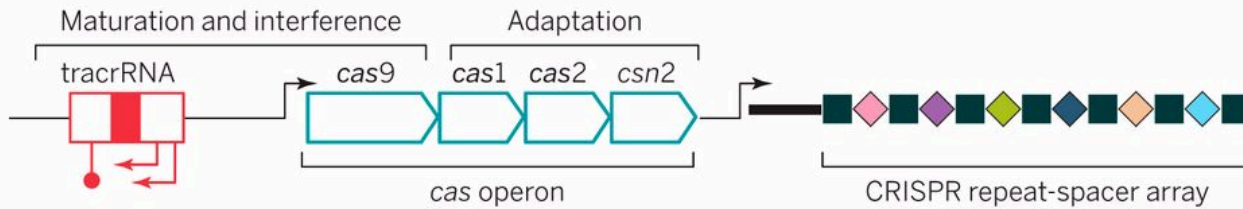
následně je lokus přepisován za vzniku preCRISPRové RNA (pre-crRNA), ta je dále upravována do krátkých molekul CRISPRové RNA (crRNA)

interakce crRNA s transaktivující (tracrRNA) a následně s některou z Cas nukleáz (př. Cas9)

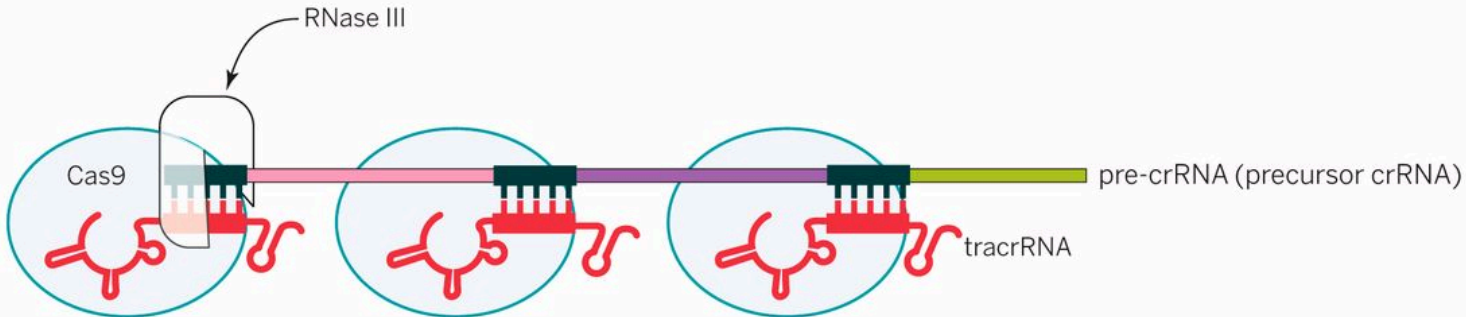
tento komplex následně rozpozná a štěpí cizorodou DNA

3 hlavní složky systému – crRNA, tracrRNA, Cas nukleázy

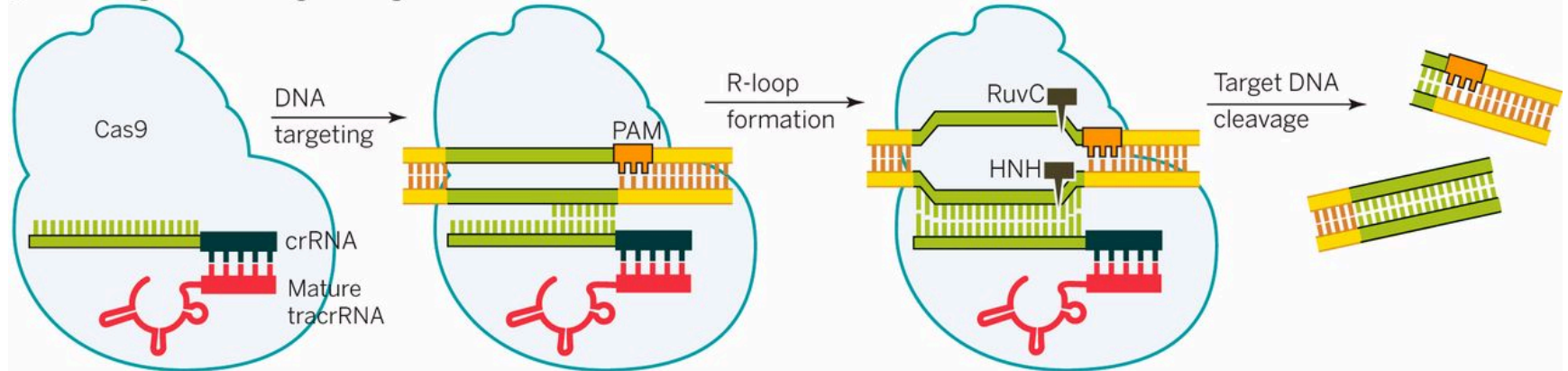
A Genomic CRISPR locus



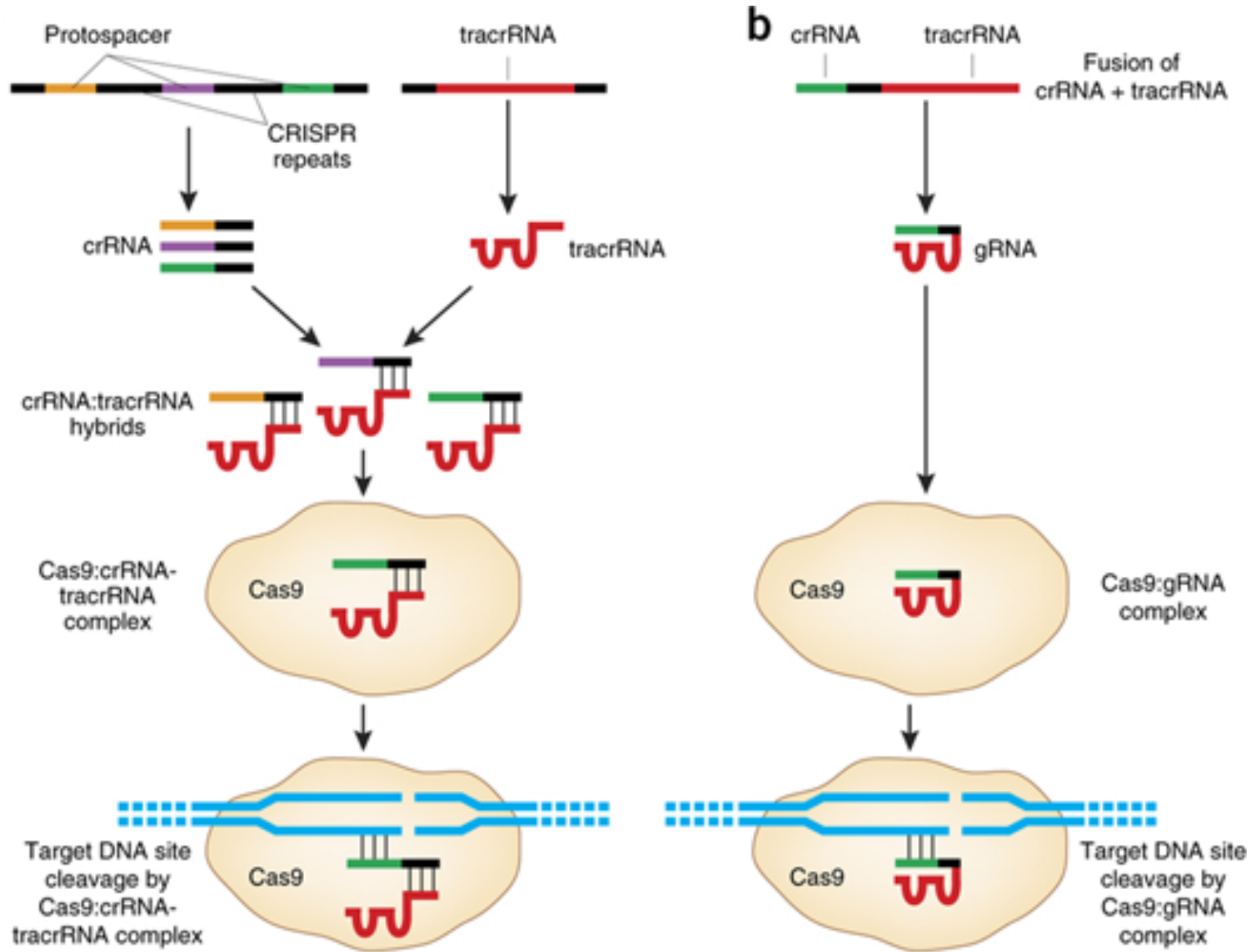
B tracrRNA:crRNA co-maturation and Cas9 co-complex formation



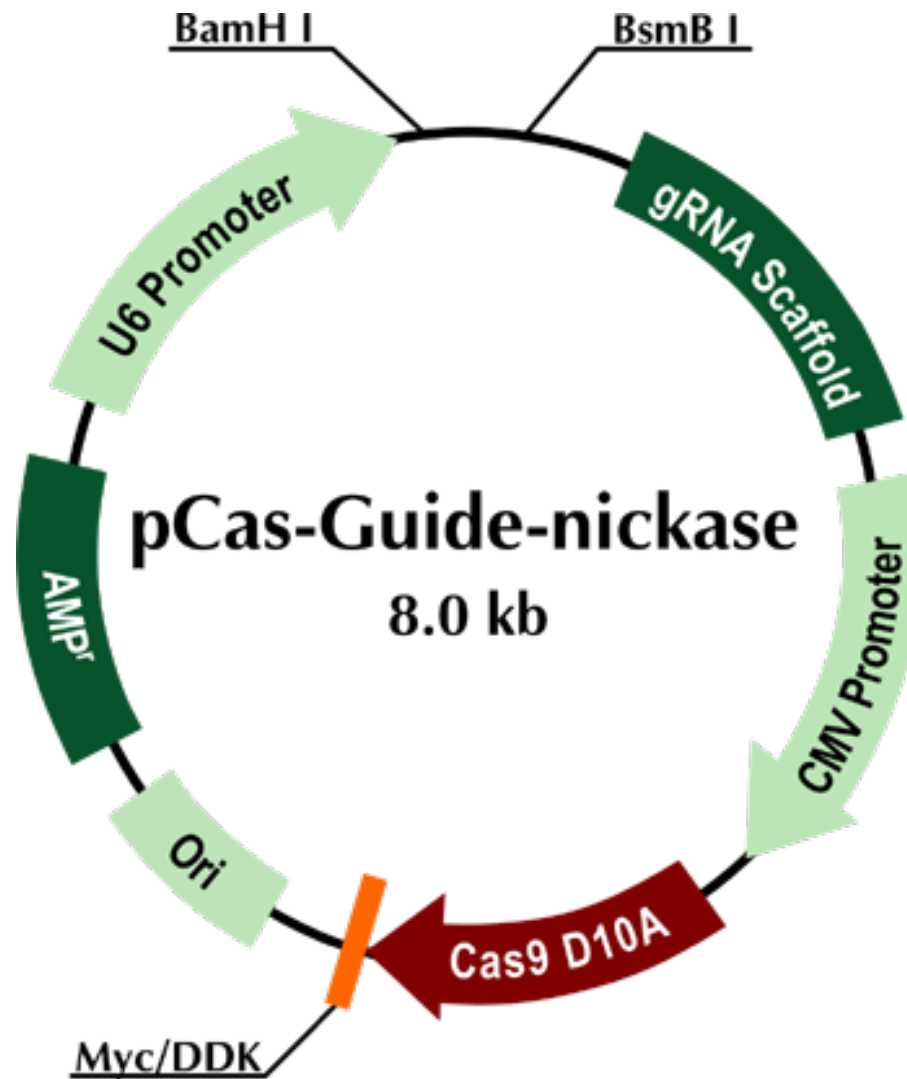
C RNA-guided cleavage of target DNA

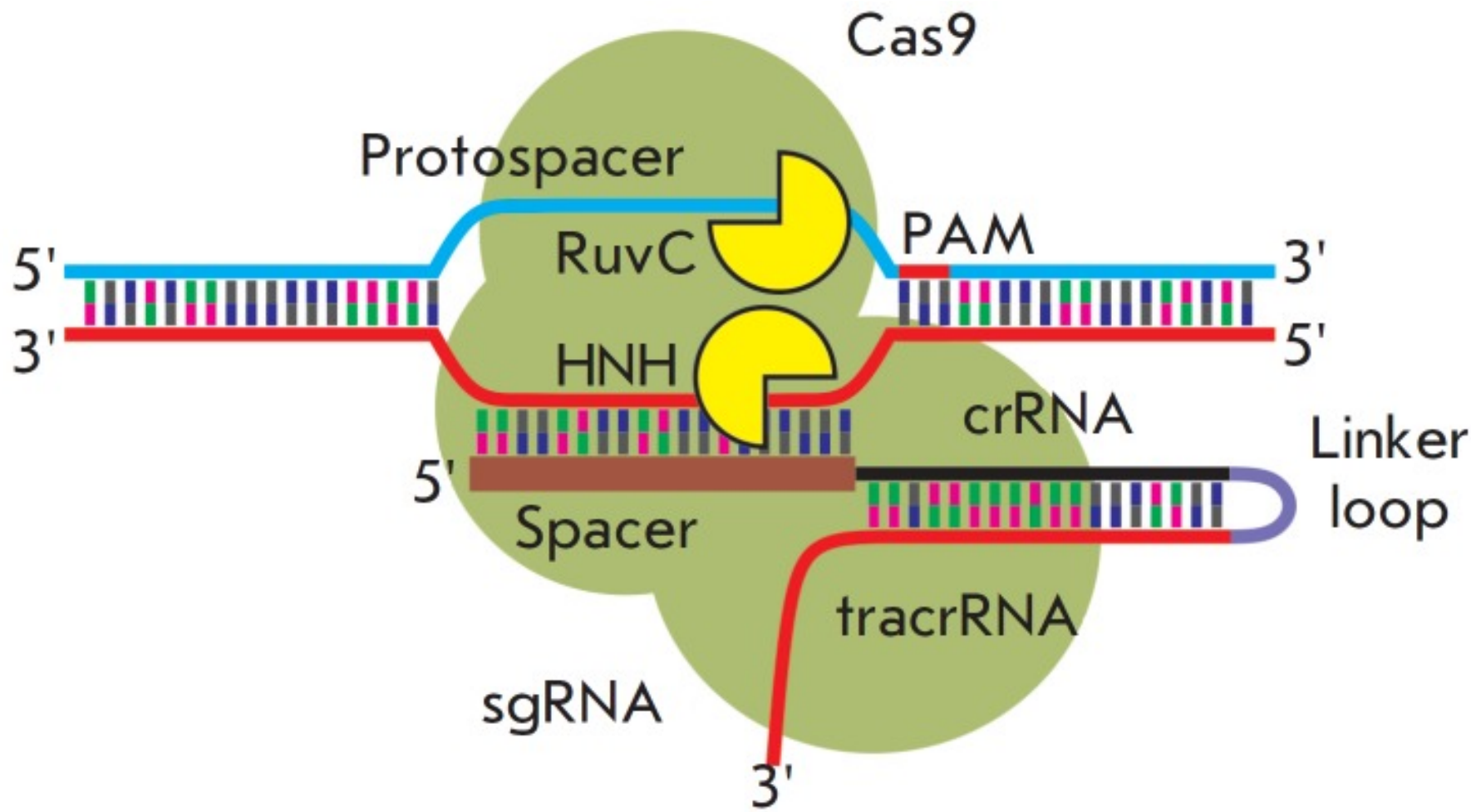


sgRNA (gRNA) vytvořená fúzí crRNA a tracrRNA



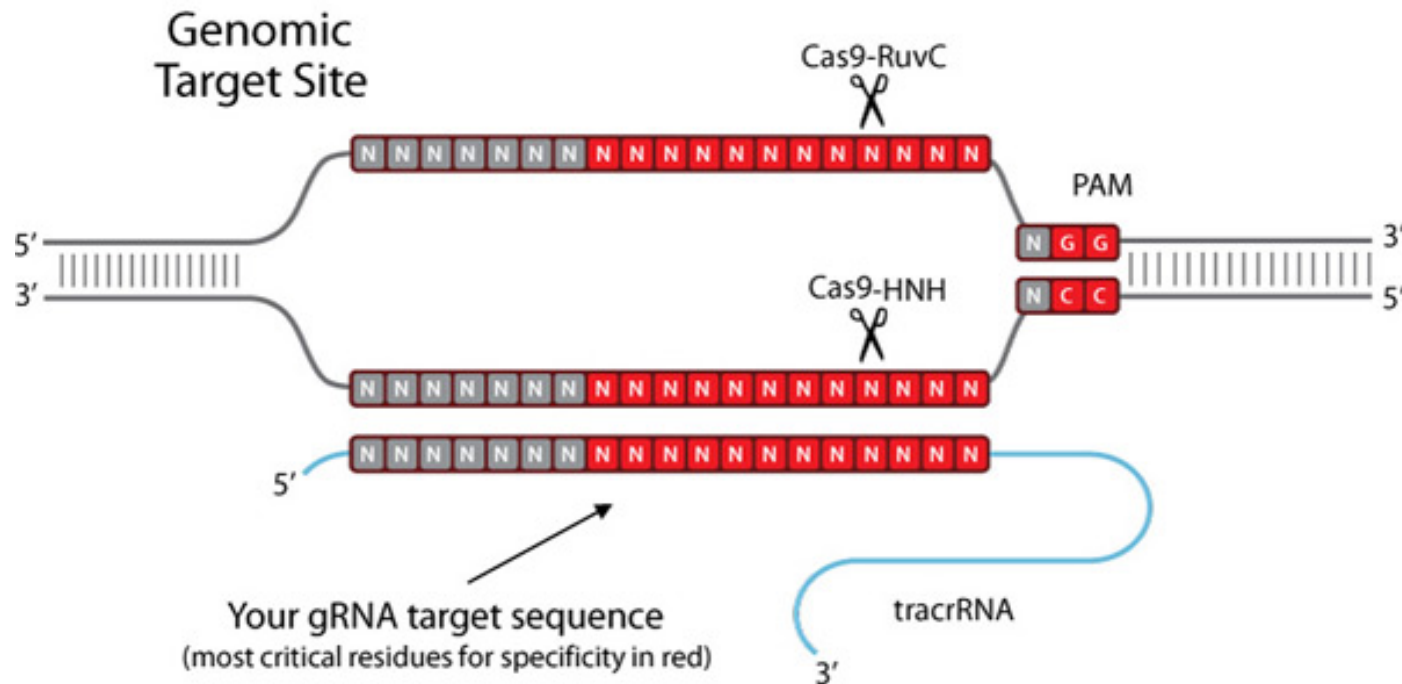
... celý systém lze produkovať z jediného vektoru





PAM sekvence – protospacer adjacent motif

- sekvence v těsném sousedství s cílovou DNA sekvencí
 - nutná pro účinné štěpení Cas9 nukleázou
-
- původní systém „NGG“ (rozpoznán Cas9 ze *Streptococcus pyogenes*)
 - dle systému cílová sekvence musí být ve formátu N₂₀-NGG



- systémy jiných bakterií nebo upravené systémy – NAG, YG, TTTN, YTN, ...

Celá řada online nástrojů pro návrh sgRNA

<http://crispor.tefor.net/>

<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>

<https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>

<http://chopchop.cbu.uib.no/>

<https://crispr.lifeandsoft.com/crispr/login/?next=/crispr/>

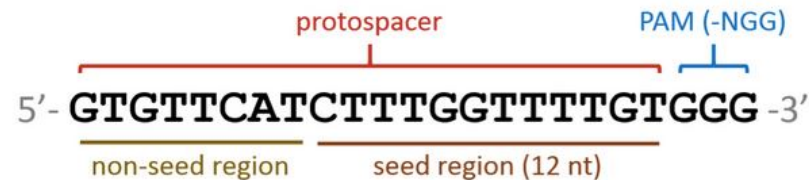
<https://www.benchling.com/crispr/>

<https://design.synthego.com/>

<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/>

Celá řada online nástrojů pro návrh sgRNA

Off-targets



Efficiency – „pravděpodobnost štěpení v cílovém místě“

Out-of-frame score – „pravděpodobnost vzniku posunové mutace“

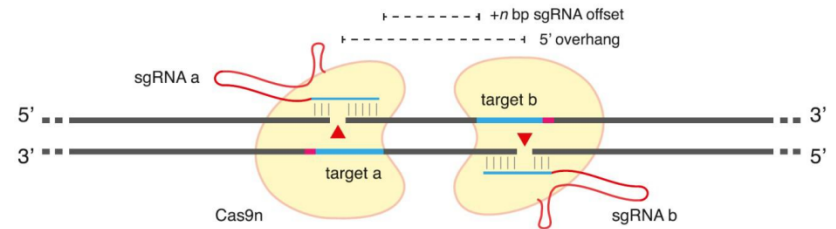
Specifita CRISPR/Cas9

Specifita – dána pouze 20 nt sgRNA

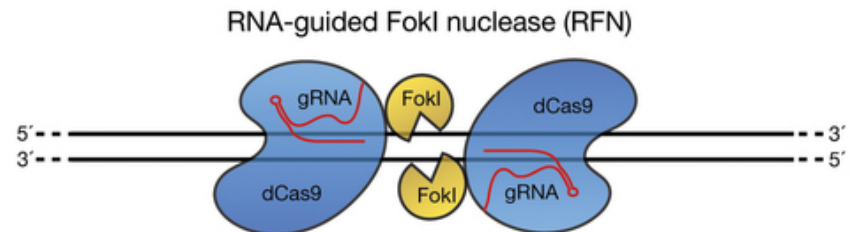
- úplná podobnost na 3'konci (seed) a částečná na 5'konci (distal)

Target site: 5'- GTGTAAACGGATAATGGAC **ANGG**
Distal Seed PAM

riziko vzniku **off-target štěpení**



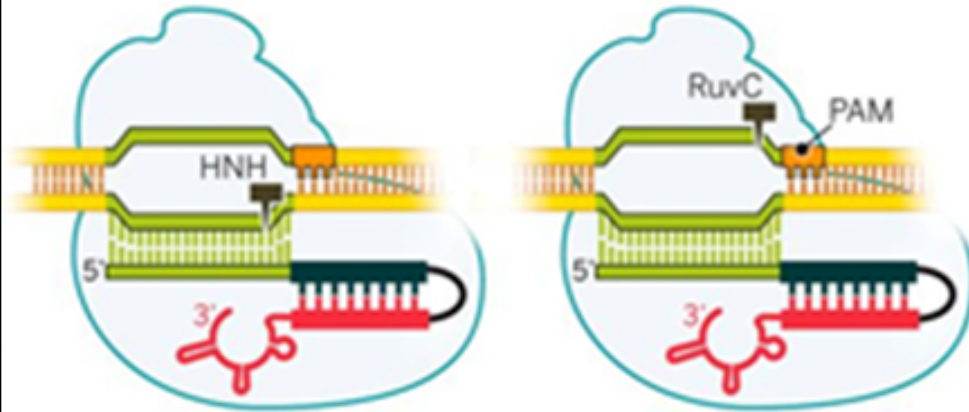
50 - 1500x vyšší specifita (n do 20 bp)



ještě vyšší specifita

Cas9 D10A nickase

Cas9 H840A nickase



gRNA 1

gRNA 2

Cas9n

Complex formation and target binding

Target 2+PAM 2

Target 1+PAM 1

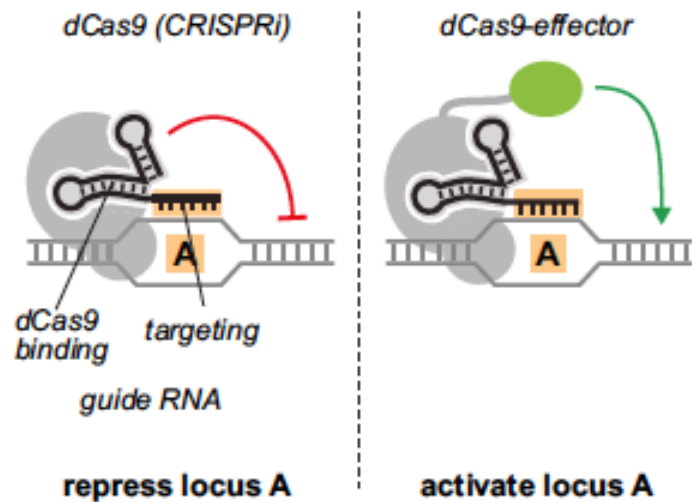
Target cleavage (DSB formation)



Další možnosti využití CRISPR/Cas systému

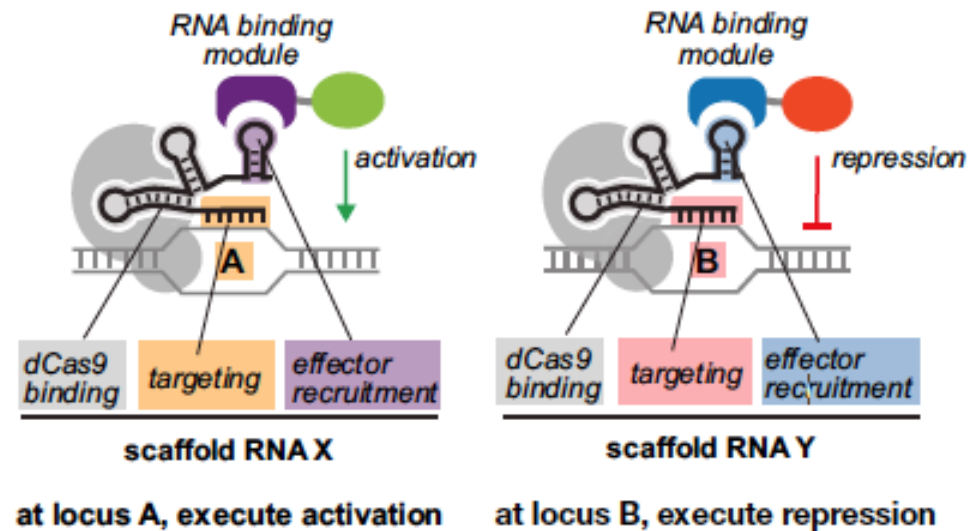
Regulace genové exprese

B dCas9 directed regulation



guide RNA encodes locus only

dCas9 and scaffold RNA directed regulation

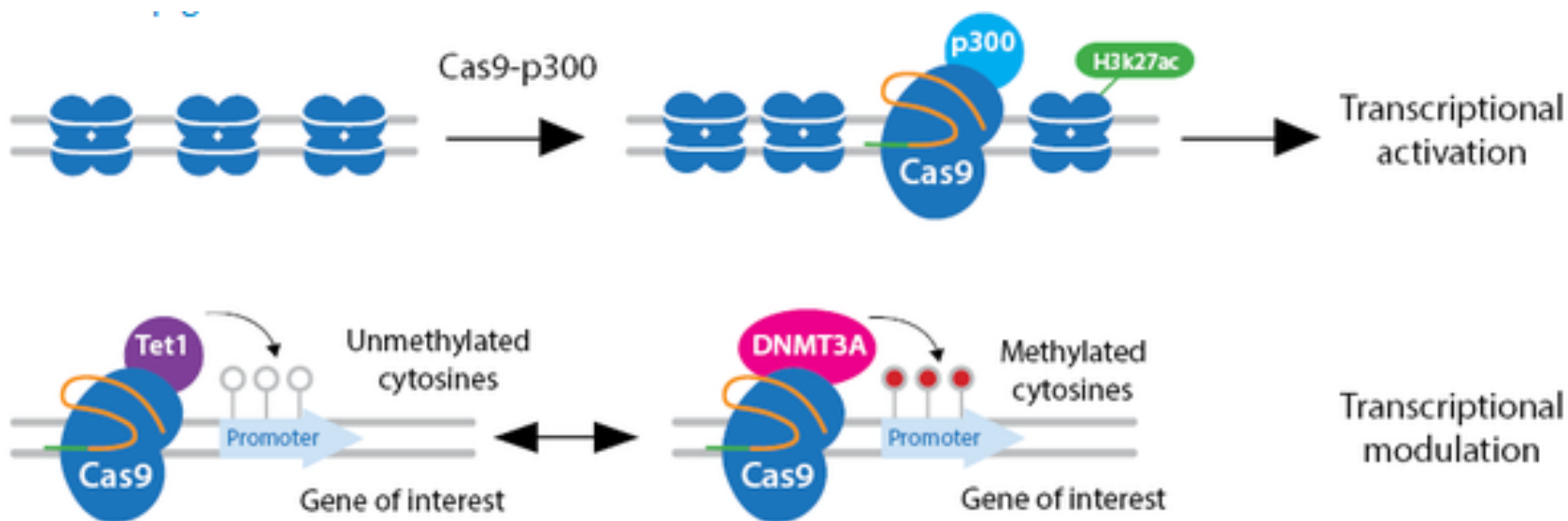


scaffold RNA encodes locus and action

- vazba dCas9 na DNA je reverzibilní – tedy i ta regulace je reverzibilní (dočasná)

Další možnosti využití CRISPR/Cas systému

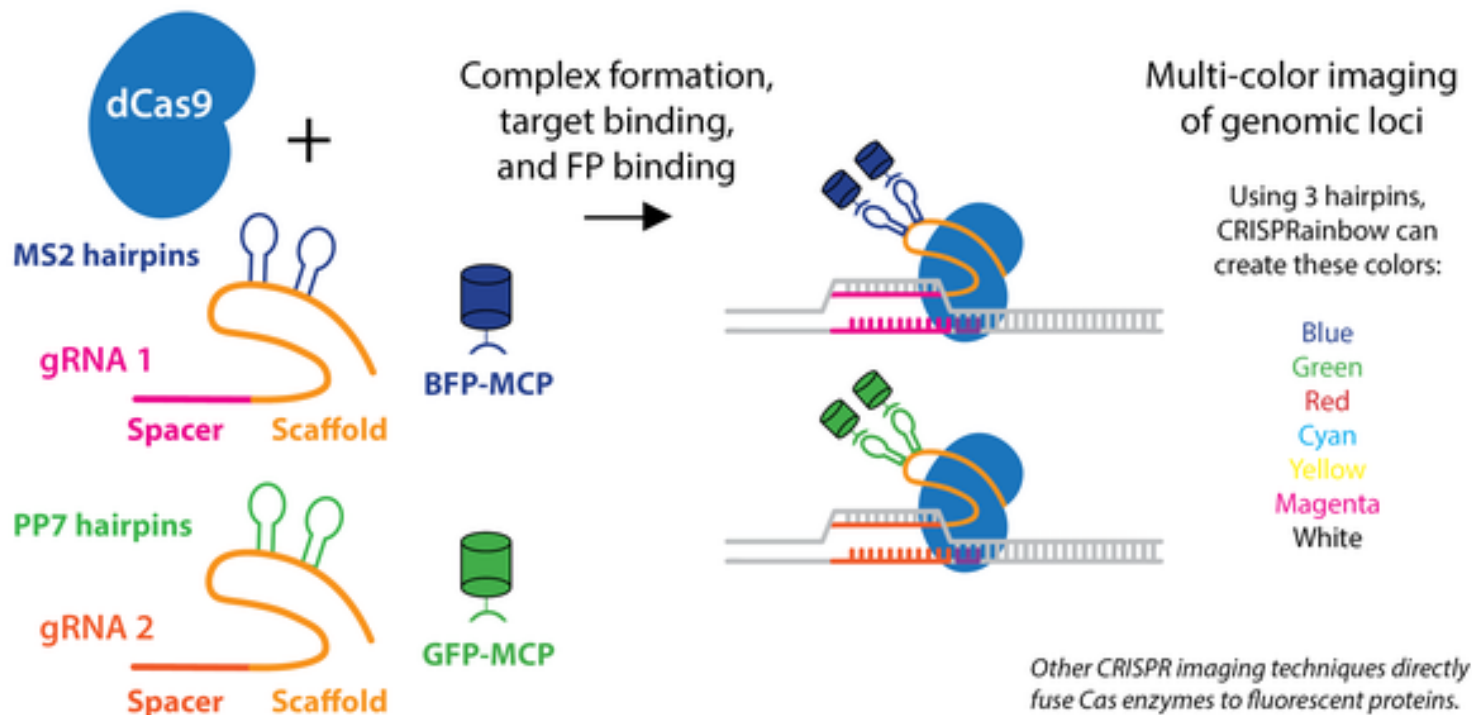
Epigenetické modifikace DNA



- vazba reverzibilní – epigenetické modifikace se mohou přenášet do dceřiných buněk

Další možnosti využití CRISPR/Cas systému

Studium struktury DNA, lokalizace genů ...



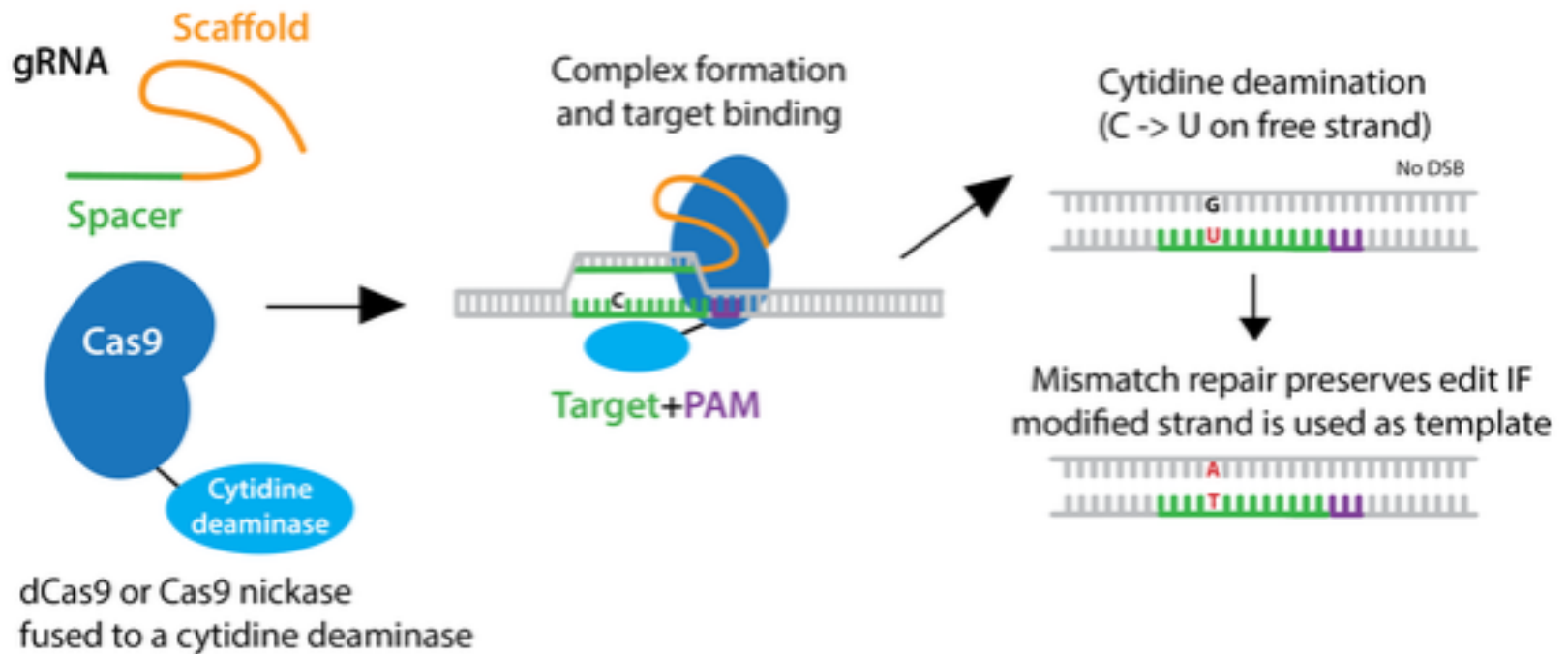
- i multicolor formát – více lokusů najednou, chromosome painting ...

Další možnosti využití CRISPR/Cas systému

Editace konkrétních bazí – tvorba substitučních mutací

Fúze dCas9 s cytidin deaminázou - konverze C na U blízko PAM

- následná konverze U na T díky BER

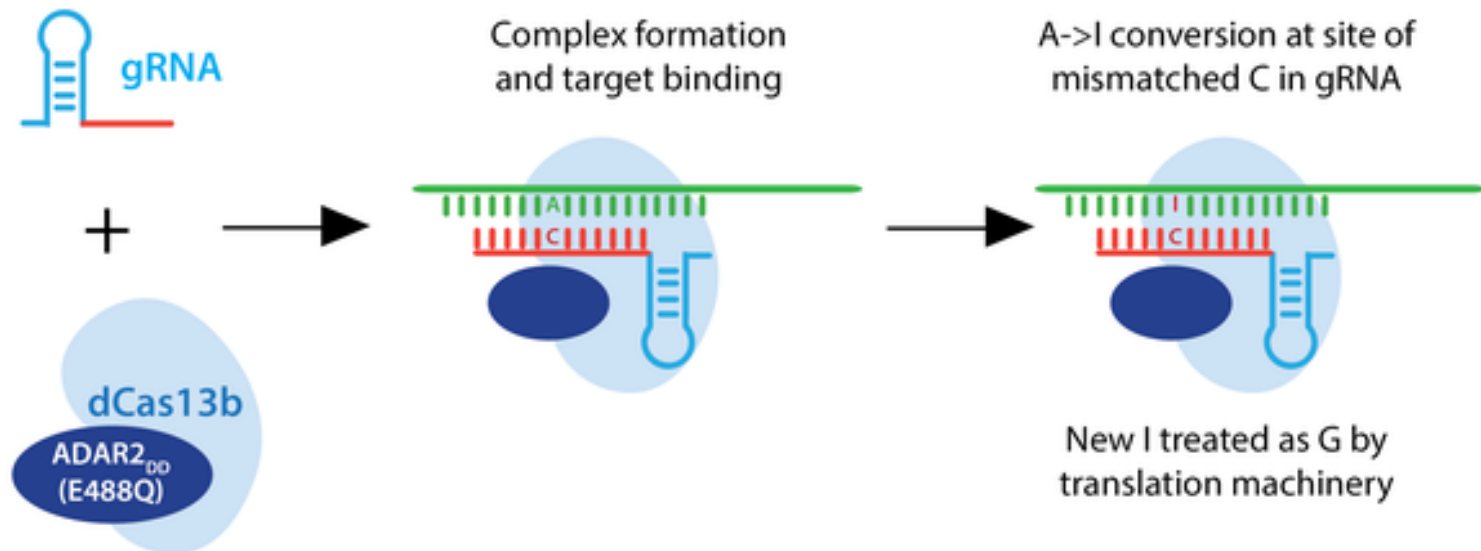


Další možnosti využití CRISPR/Cas systému

Editace konkrétních bazí na úrovni RNA

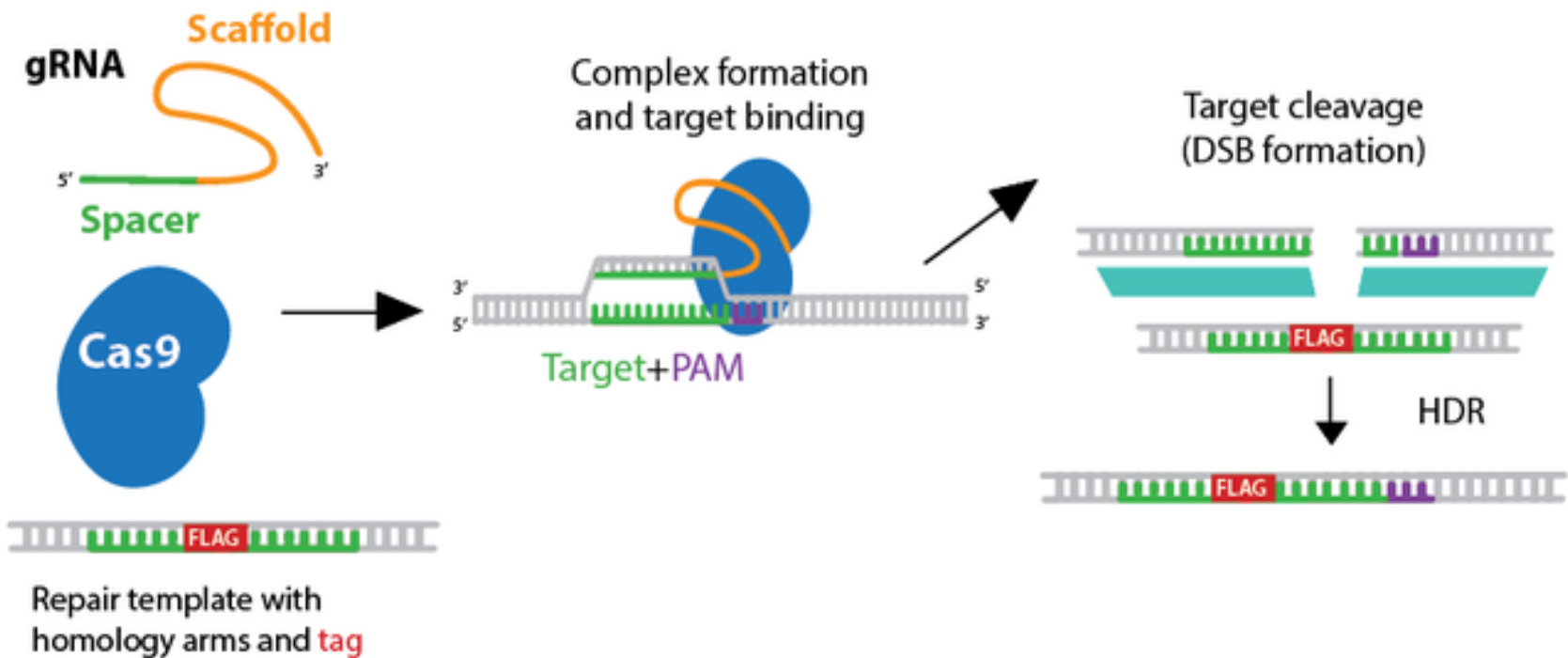
CRISPR systémy Cas13a/C2c2 and Cas13b – substrátem je RNA

- fúze nukleázy defektního systému s adenosin deaminázou
- vzniká inosin (funkčně odpovídá G) – tedy z AT vzniká GC



Další možnosti využití CRISPR/Cas systému

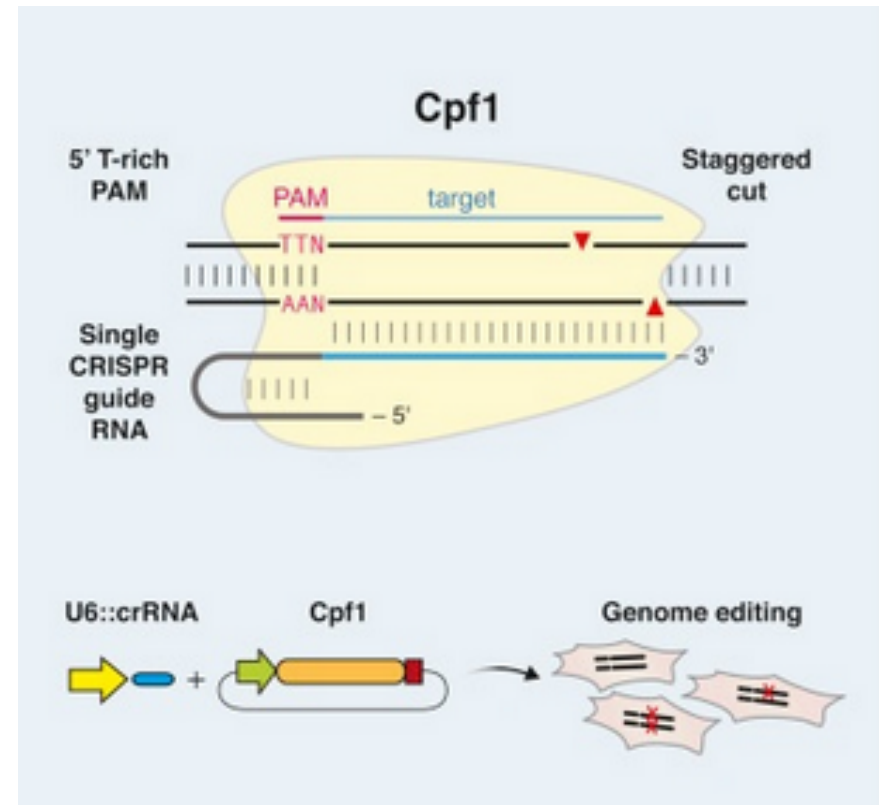
Značení genů



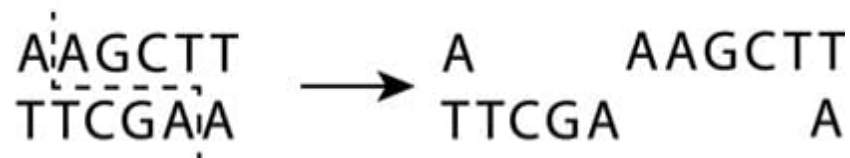
Další CRISPR systémy

Cpf1

- jediná RNA (vs. crRNA + tracrRNA)
- lepivé konce (vs. tupé konce)
- PAM (TTN) – AT bohaté oblasti (vs. NGG)
- vysoká specifita



Lepivé konce – možné využití pro přímý přenos genů (obdoba RE klonování)



(možné) využití CRISPR/Cas systému

- studium funkce, struktury, lokalizace, interakce genů/proteinů ...
- zjednodušení přípravy geneticky modifikovaných organismů
- detekce infekcí
- léčba infekcí (viry, bakterie) – CRISPRová antibiotika
 - léčba infekce HIV
- léčba nádorů
- léčba dědičných onemocnění
- hubení populací přenašečů chorob/škůdců
- úprava genomu lidí

Leden 2019 – Makak s editovaným genomem

Vedlejší účinky

- nespecifita štěpení
- aktivace nežádoucích procesů

Etické otázky

- úprava genomu člověka

Rovnováha v populacích



Unexpected mutations after CRISPR–Cas9 editing *in vivo*

Kellie A Schaefer, Wen-Hsuan Wu, Diana F Colgan, Stephen H Tsang, Alexander G Bassuk & Vinit B Mahajan

[Affiliations](#) | [Corresponding authors](#)

Nature Methods **14**, 547–548 (2017) | doi:10.1038/nmeth.4293

Published online 30 May 2017 | Updated online **14 June 2017** | Corrected online **25 July 2017**

| Retracted online **30 March 2018**

stovky off-target mutací u myší po editaci genomu metodou CRISPR/Cas9

VS

předchozí studie u linií a myší






Altmetric: 20

[More detail >>](#)

Correspondence

Response to “Unexpected mutations after CRISPR–Cas9 editing *in vivo*”

Caleb A Lareau, Kendell Clement, Jonathan Y Hsu, Vikram Pattanayak, J Keith Joung , Martin J Aryee  & Luca Pinello 

However, we here demonstrate that the simplest interpretation of data in Schaefer *et al.*¹ is that the two CRISPR–Cas9-treated mice are genetically more closely related to each other than to the control mouse.



First CRISPR clinical trial gets green light from US panel

The technique's first test in people could begin as early as the end of the year.

[Sara Reardon](#)

22 June 2016



CRISPR gene-editing tested in a person for the first time

The move by Chinese scientists could spark a biomedical duel between China and the United States.

[David Cyranoski](#)

15 November 2016

Izolace T lymfocytů z pacientů s různými typy nádorových onemocnění

Editace genomu těchto T lymfocytů – editace 3 genů

Otestování terapeutického potenciálu takto editovaných buněk

Pacient s agresivním nádorem plic

Editace genu PD-1 T lymfocytů

Otestování terapeutického potenciálu takto editovaných buněk

.. k 23.8. 2019

NIH U.S. National Library of Medicine

ClinicalTrials.gov

.. 24 klinických studií

19x nádorová onemocnění

2x thalasémie terapie CRISPR/Cas upravenými HSC

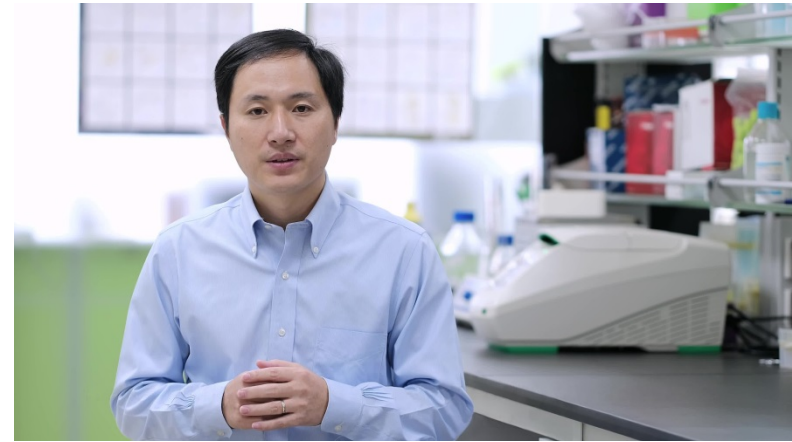
1x srpkovitá anémie terapie CRISPR/Cas upravenými HSC

1x dědičná slepota ... subretinální injekce CRISPR/Cas ... oprava mutace

1x HIV infekce terapie CRISPR/Cas upravenými HSC (cílí na CCR5 gen)

Děti, kterým nehrozí virus HIV

Listopad 2018 – čínský vědec Che Ťien-kchuej ohlásil, že geneticky pomocí systému CRISPR/Cas upravil několik lidských embryí, ze kterých se narodila dvojčata



Geneticky upravený gen pro receptor CCR5 (vstupní brána pro virus HIV na povrchu lymfocytů)

„ aby lidé s infekcí HIV mohli mít zdravé děti“

nature
medicine

Brief Communication | Published: 03 June 2019

CCR5- Δ 32 is deleterious in the homozygous state in humans

Xinzhu Wei & Rasmus Nielsen

analýza 400.000 lidí z UK

O pětinu vyšší riziko že se homozygoti s mutacemi v CCR5 nedožijí více než 78 let

Leberova kongenitální amauroza

- dědičné onemocnění – mutace 18 různých genů
- progresivní ztráta zraku (naprostá slepota do 40 let)
- nejčastější dědičná choroba vedoucí ke ztrátě zraku (2-3/100.000)
- již dříve nadějně pokusy s infekcí buněk sítnice virem nesoucím gen RPE65 (přeměna vitamínu A na rhodopsin)

100+1

ZAHRANIČNÍ ZAJÍMAVOST

ATLAS SVĚTA

HISTORIE

PŘÍRODA

REVUE

VESMÍR

VÁLKA

VĚDA

ZAJÍMAVOSTI

PŘEDPLATNÉ

f t G+

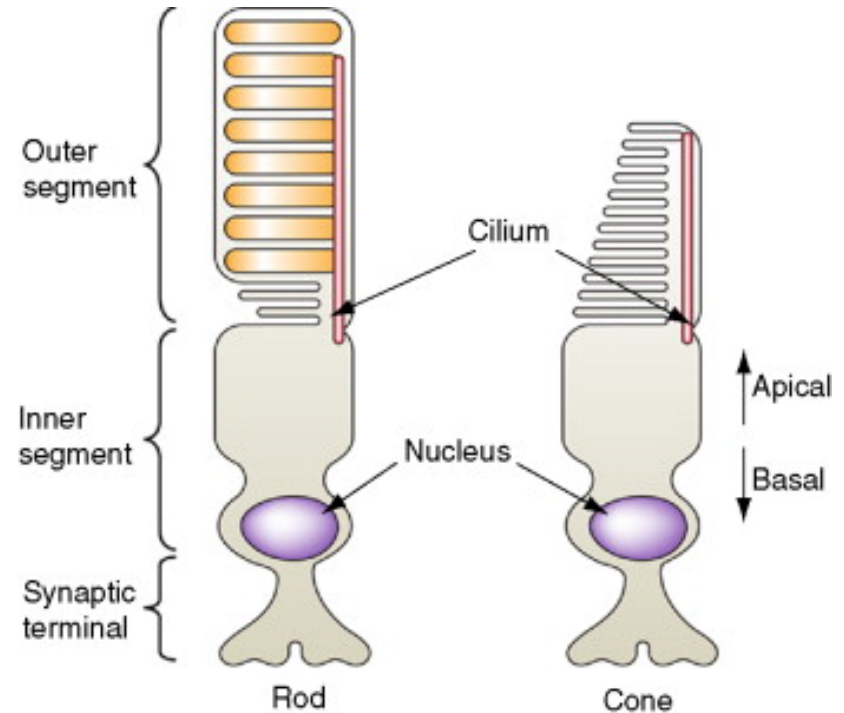


Nadějná zbraň proti slepotě: Genová posila vrací zrak

■ 24.10.2013 - Jaroslav Petr

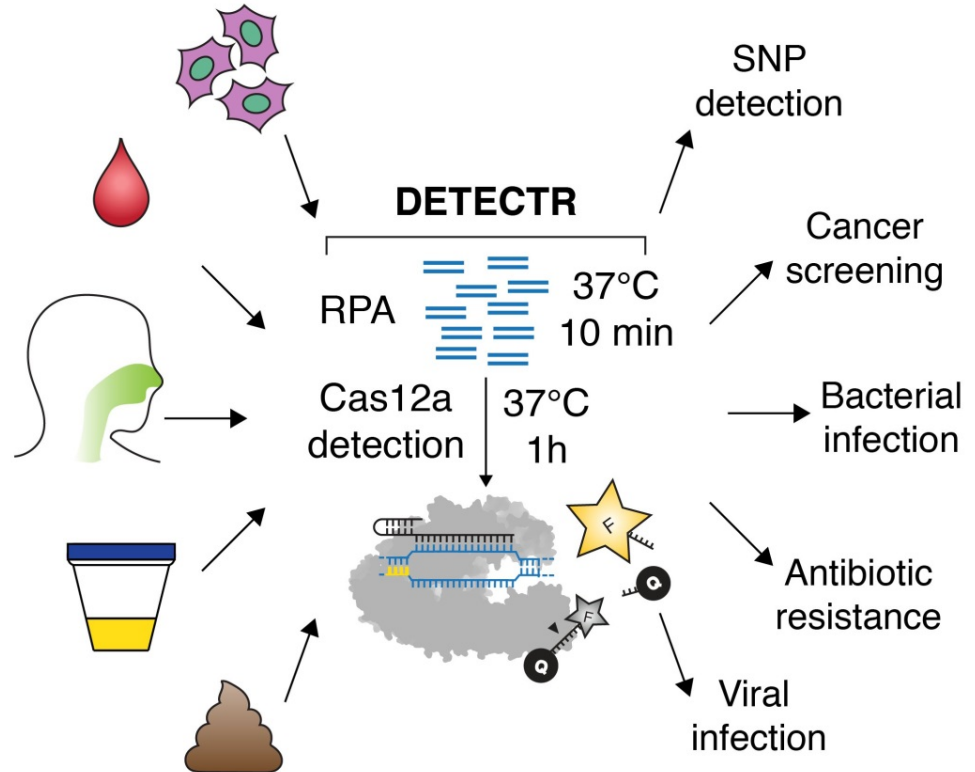
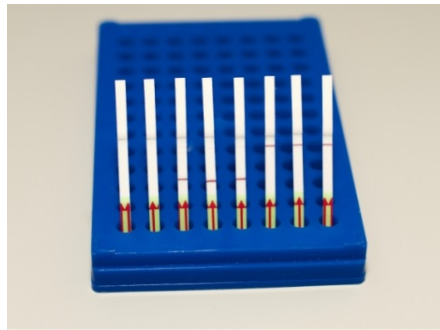
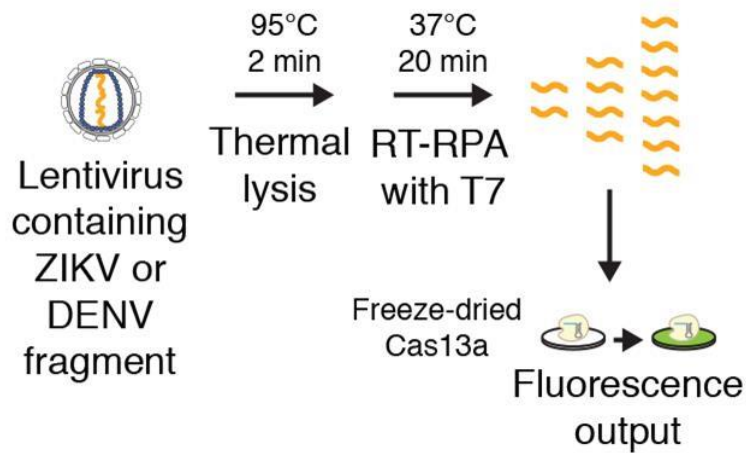
Leberova kongenitální amauroza

- gen CEP290 – tvorba cilií
- CRISPR cílí na nejčastější mutaci
- gen 8 kbp – příliš velký pro přenos adenoviry
- vektor dopraven subretinální injekcí
- Cas9 pod kontrolou promotoru pro rhodopsinovou kinázu (tkáňová specifita)



Detekce infekcí

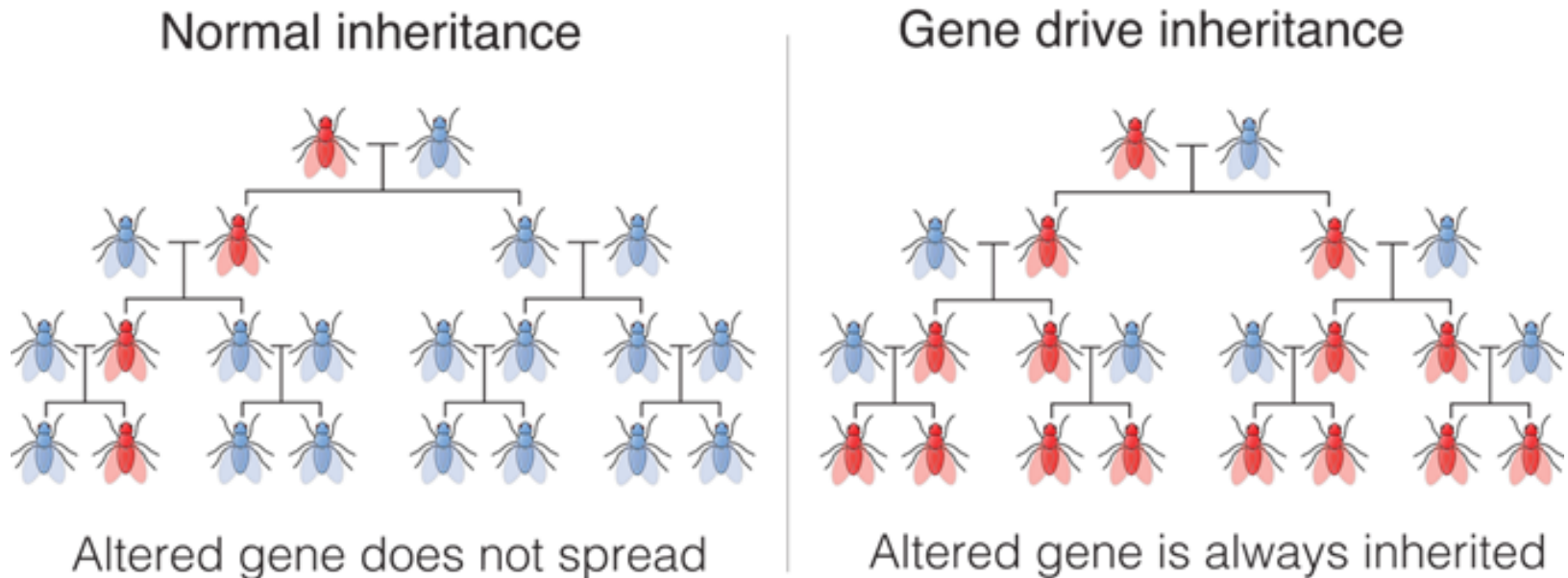
SHERLOCK



- detekce specifické (virové) DNA/RNA
- využití Cas12/Cas13 (zůstává aktivní i po štěpení specifické sekvence – štěpí následně nespecificky ss RNA/DNA)
- využití reportérových molekul – po štěpení vzniká fluorescence
- SHERLOCK (Zhang lab) vs DETECTR (Doudna lab)

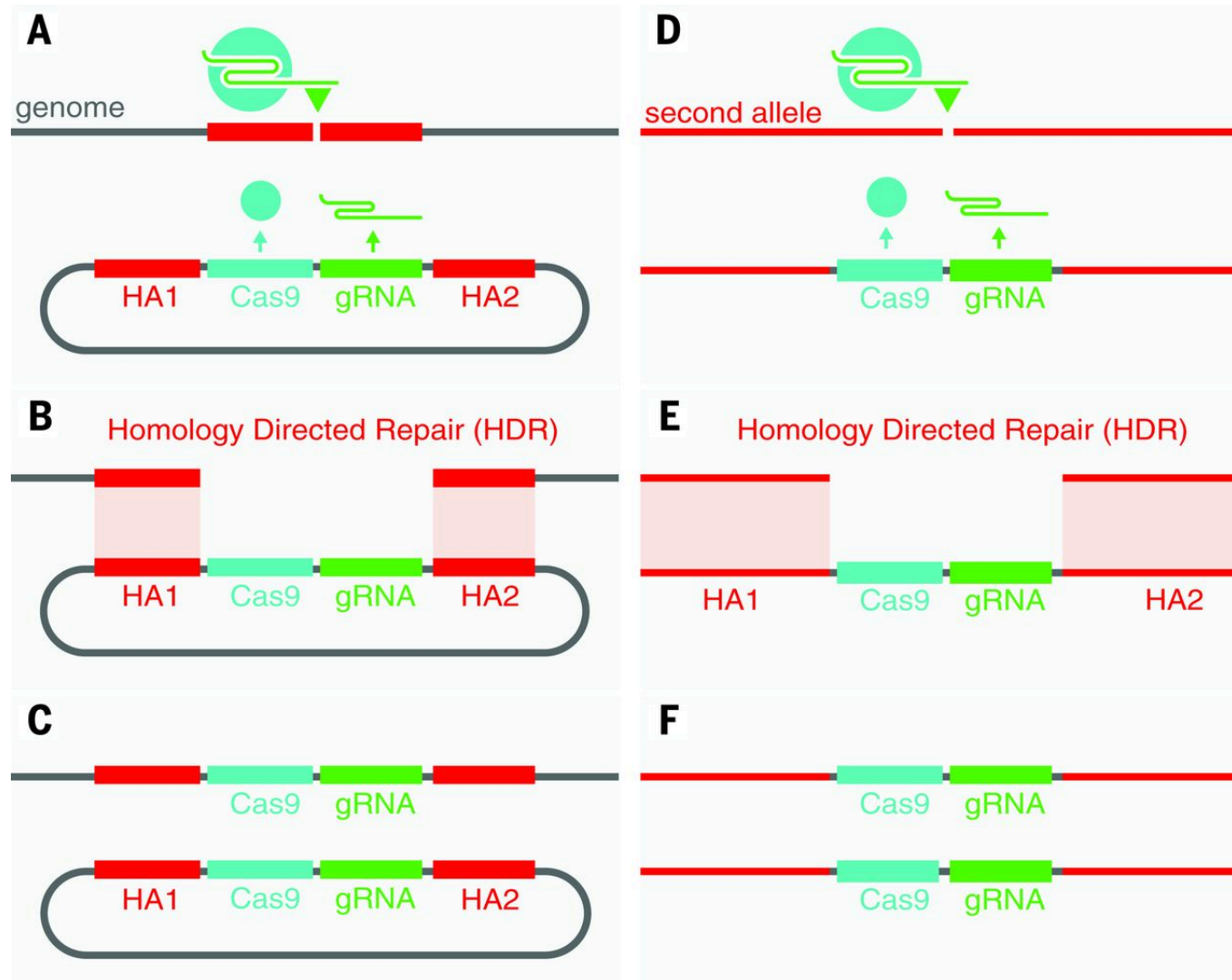
Gene drive

technologie genového inženýrství, která umožňuje rozšíření dané varianty genu (ů) v populaci prostřednictvím zvýšení pravděpodobnosti přenosu na potomky nad přirozenou hodnotu 50 procent

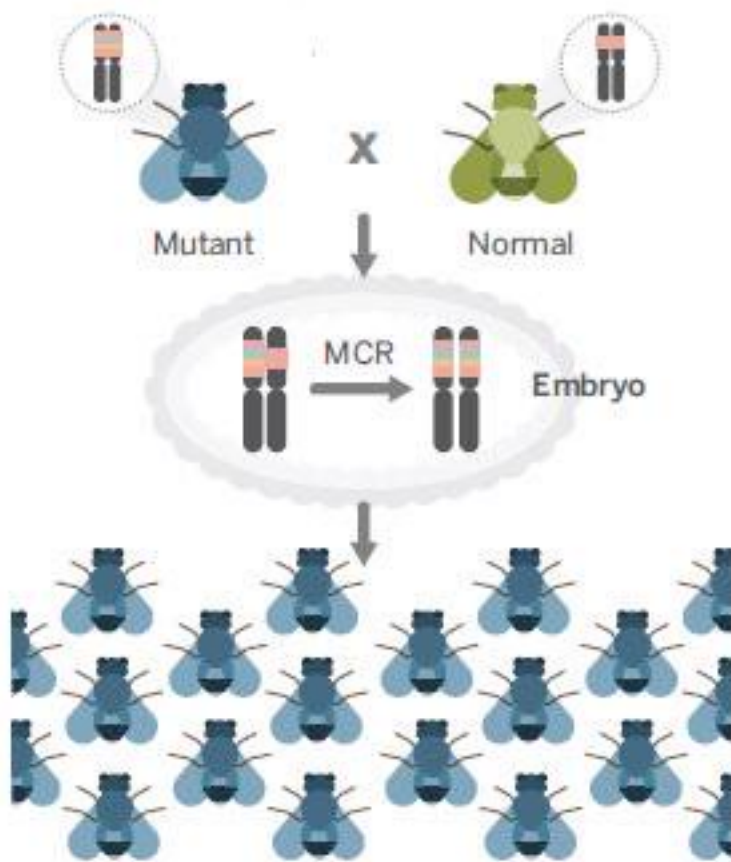


u jedinců s pohlavním rozmnožováním

Mutagenní řetězová reakce (MCR)



Gene drive



CRISPR cílen na gen, jež způsobí sterilitu samic
... vyhubení škůdců, přenašečů chorob ...

laboratorně ověřeno

u rychle se množícího hmyzu stačí 1% mutantů v
populaci a během 10 generací vyhyne

2016 vládní program - 2050 Predator Free
Nový Zéland

projekt Target Malaria

riziko rozšíření nových nepůvodních genů, přenos mezi populacemi, nevratnost
změn, narušení rovnováhy v populaci zneužití jako biologická zbraň

**'Panda Babies:
Mission Critical'**

August 28 at 8/7c
on the Nat Geo
WILD channel

AUGUST 2016

NATIONAL GEOGRAPHIC

The **DNA** REVOLUTION

With new
gene-editing
techniques, we
can transform
life—but
should we?