

Editace genomů

Genome editing, or genome editing with engineered nucleases (GEEN)

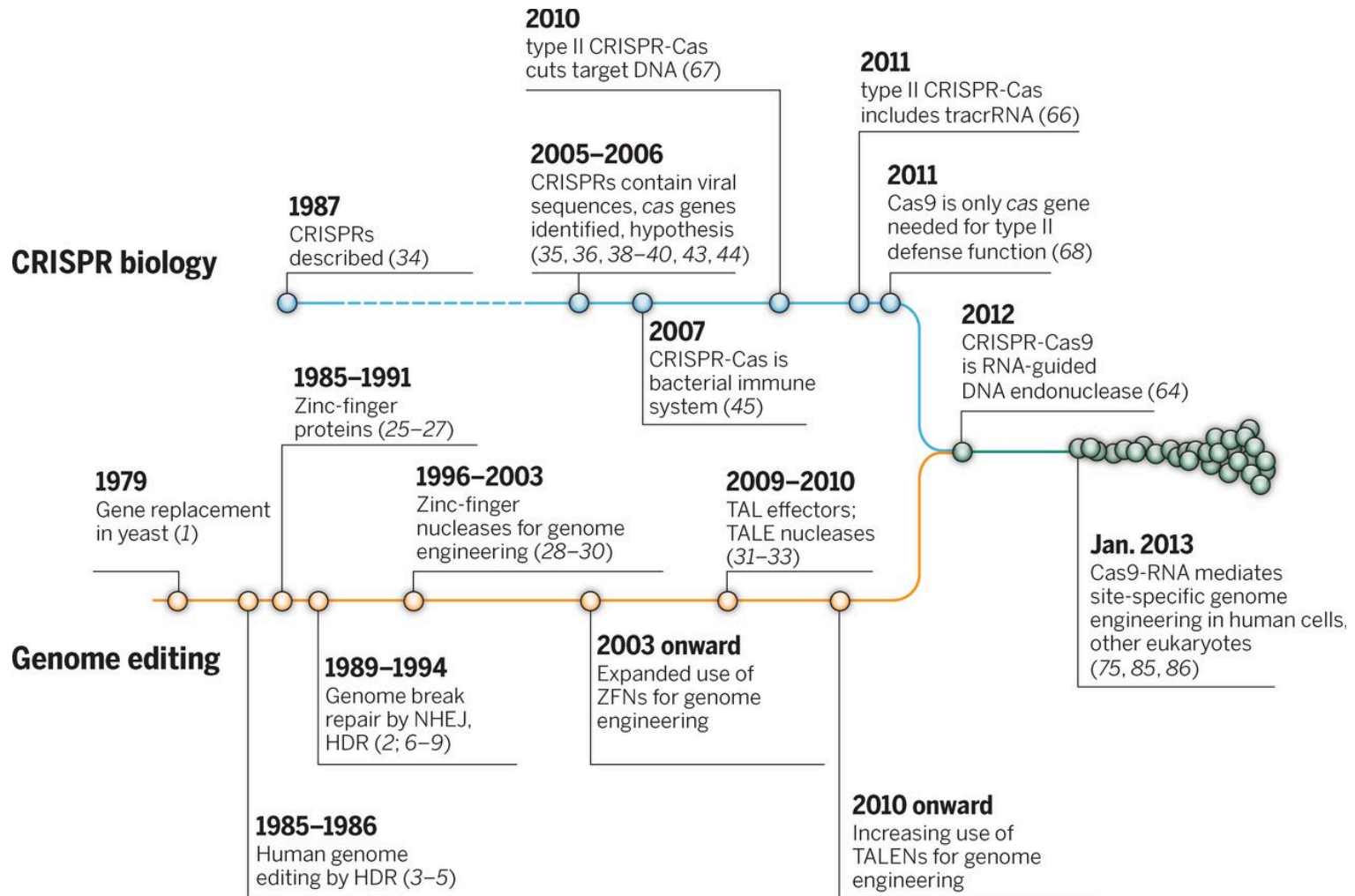
Postupy genového inženýrství, při nichž se do vybraného místa v cílové DNA pomocí uměle připravených nukleáz (tzv. molekulárních nůžek) vnáší inserce, delece a nebo se stávající sekvence nahrazuje za jiné (náhrada alel).

Tyto nukleázy vytvářejí na určených místech genomu dvouřetězcové zlomy (DSBs: double-stranded breaks), čímž vyvolávají přirozené endogenní buněčné procesy vedoucí k reparaci zlomů:

- a) Homologní rekombinací (HR) HDR = homology directed recombination
(rekombinace řízená homologií)
- b) Nehomologní spojování volných konců (NHEJ: nonhomologous end-joining)

- 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

Historické etapy v CRISPR biologii a editování genomů



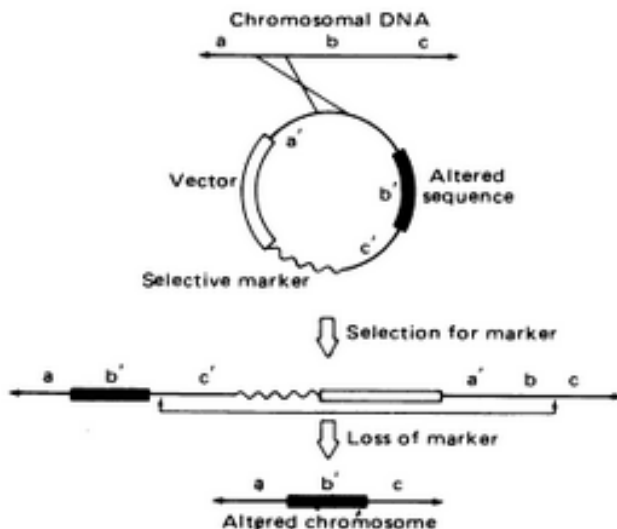
Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro*

(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 sekvence
- vytvořeny buňky His3⁺ a URA⁻

Genome Editing Glossary

Cas = CRISPR-associated genes

Cas9, Csn1 = a CRISPR-associated protein containing two nuclease domains, that is programmed by small RNAs to cleave DNA

crRNA = CRISPR RNA

dCAS9 = nuclease-deficient Cas9

DSB = Double-Stranded Break

gRNA = guide RNA

HDR = Homology-Directed Repair

HNH = an endonuclease domain named for characteristic histidine and asparagine residues

Indel = insertion and/or deletion

NHEJ = Non-Homologous End Joining

PAM = Protospacer-Adjacent Motif

RuvC = an endonuclease domain named for an *E. coli* protein involved in DNA repair

sgRNA = single guide RNA

tracrRNA, trRNA = trans-activating crRNA

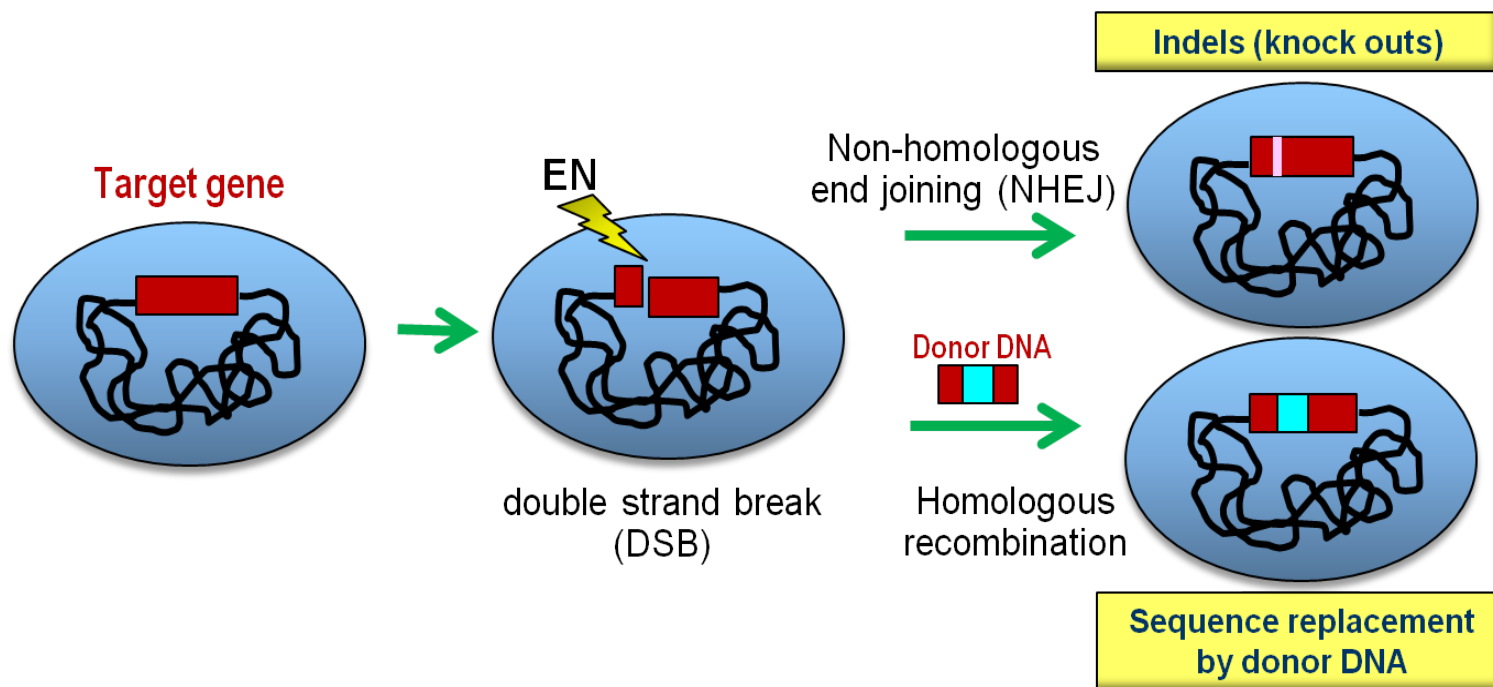
TALEN = Transcription-Activator Like Effector Nuclease

ZFN = Zinc-Finger Nuclease

(RGENs) = RNA-guided engineered nucleases

- programované nukleázy (jejich cíl je řízen molekulou RNA)

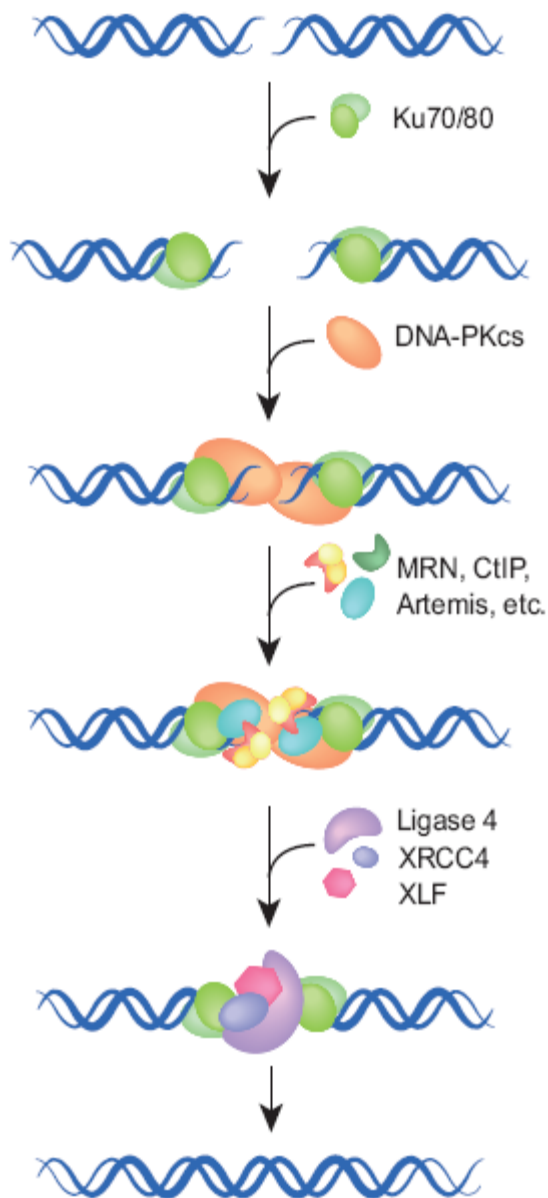
Procesy probíhající po vytvoření DSB umělými nukleázami



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

Lidský genom – 3,2 Gbp – cílem musí být jedinečné sekvence (**specifická**)
- sekvence delší než 20 bp

DSB



klasická NHEJ

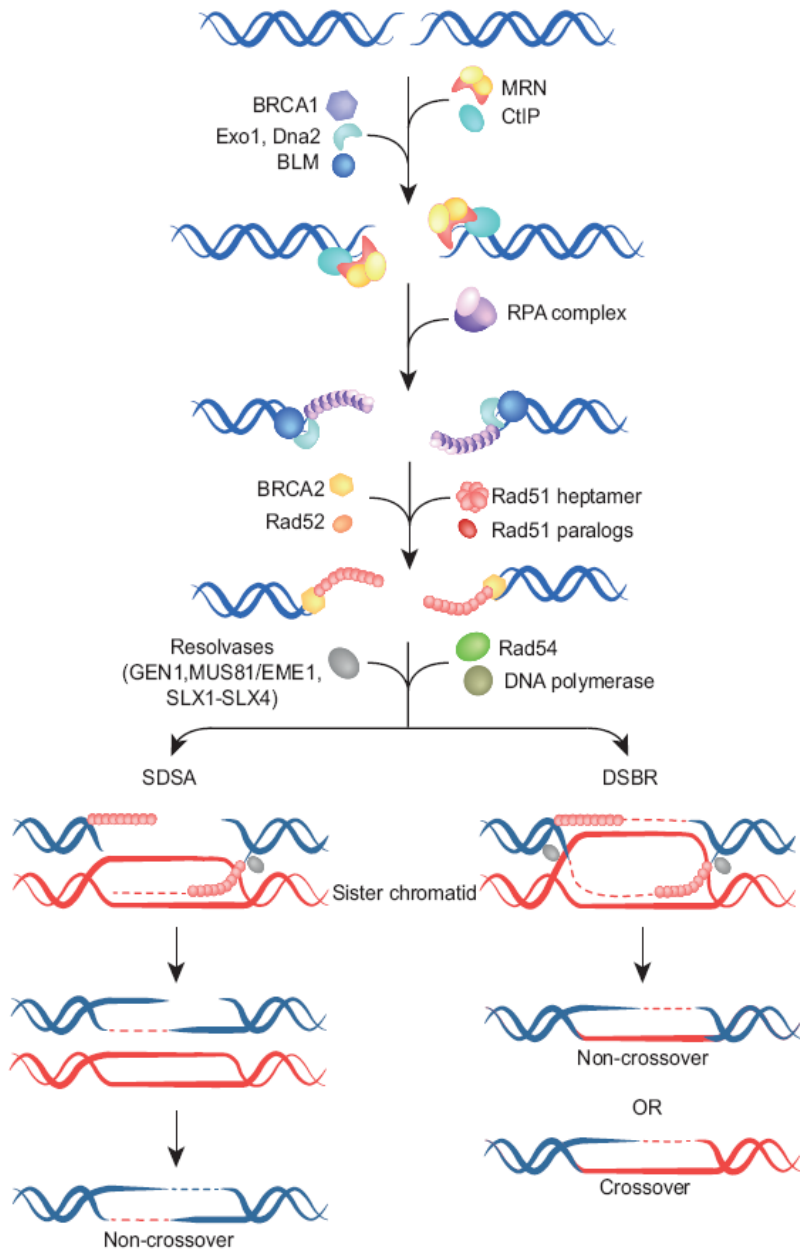
- rychlý proces (10-30 minut)
- výsledkem jsou malé inserce/delece

- existují i **alternativní NHEJ**

př. microhomology-mediated end joining (MMEJ)

- rozsáhlé inserce, delece, fúze, ...

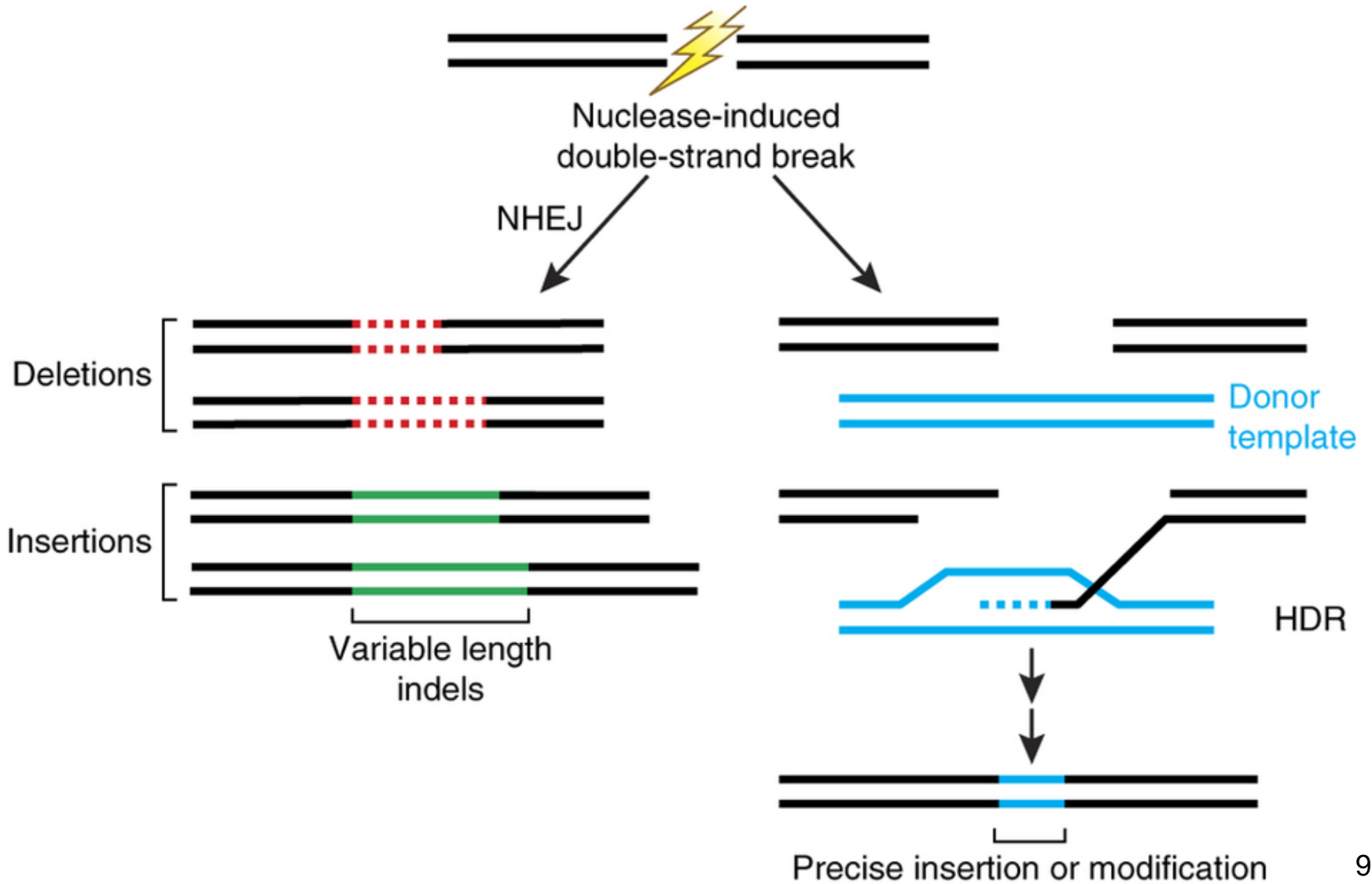
DSB

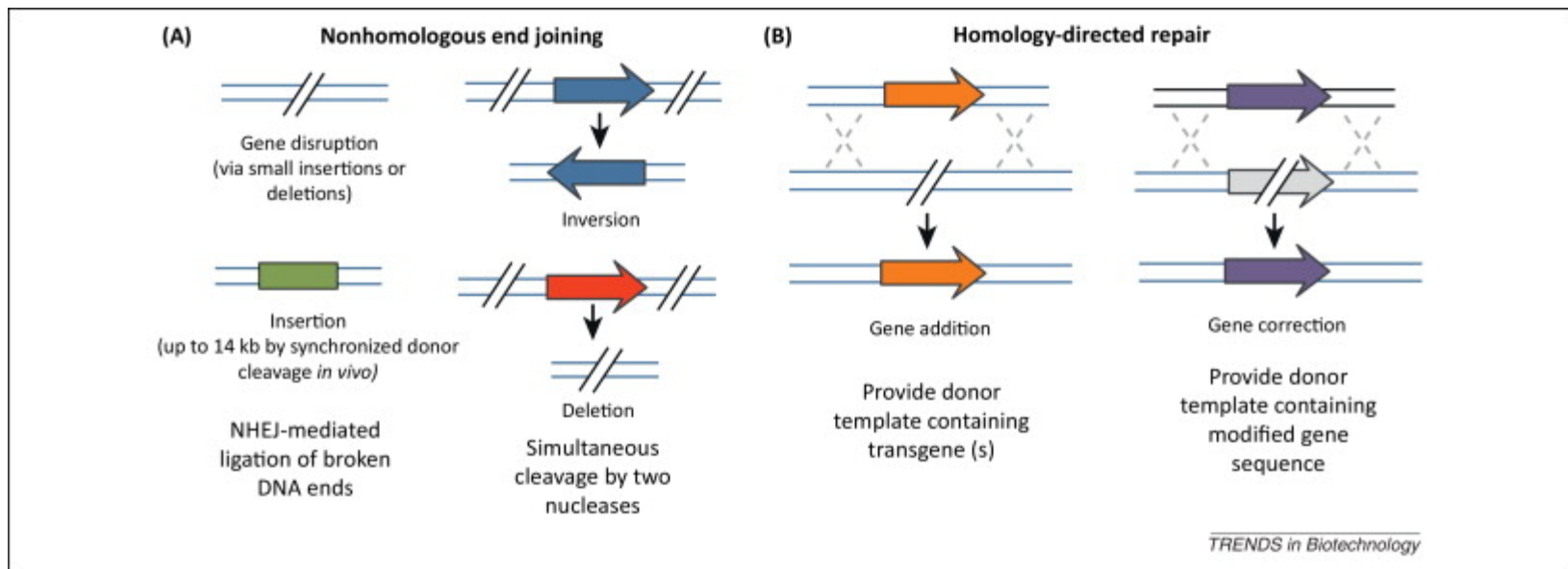


HDR

- složitější (pomalejší) proces
- zapojeno více proteinů
- nutná přítomnost homologní sekvence
- výsledkem přesně opravená DNA

Procesy probíhající po vytvoření DSB umělými nukleázami





Overview of possible genome editing outcomes using site-specific nucleases. Nuclease-induced DNA double-strand breaks (DSBs) can be repaired by homology-directed repair (HDR) or error-prone nonhomologous end joining (NHEJ). **(A)** In the presence of donor plasmid with extended homology arms, HDR can lead to the introduction of single or multiple transgenes to correct or replace existing genes. **(B)** In the absence of donor plasmid, NHEJ-mediated repair yields small insertion or deletion mutations at the target that cause gene disruption. In the presence of double-stranded oligonucleotides or *in vivo* linearized donor plasmid, DNA fragments up to 14 kb have been inserted via NHEJ-mediated ligation. Simultaneous induction of two DSBs can lead to deletions, inversions and translocations of the intervening segment.

Typy nukleáz používané pro editaci genomů

Hybrid Meganuclease



Rozpoznání sekvence
Interakce protein x DNA

ZFN



Zinc finger domains

Rozpoznání sekvence
Interakce protein x DNA

TALEN



TALE subunits



active FokI catalytic subunit heterodimer

Rozpoznání sekvence
Interakce protein x DNA

MEGANUKLEÁZY

Meganukleázy se vyskytují u různých druhů mikroorganismů, mají velmi dlouhé rozpoznávací sekvence (>14bp vs. RE 4-6 bp) a jsou tak přirozeně sekvenčně velmi specifické.

Nevýhodou je, že je jich známo relativně málo, a tudíž počet cílových sekvencí je omezen.

Mutagenézí byly uměle připraveny varianty meganukleáz, které rozpoznávají další jedinečné sekvence. Byly připraveny rovněž hybridní varianty meganukleáz fúzí dvou domén s odlišnými cílovými místy.

Byl použit též postup záměn aminokyselin v doménách interagujících s DNA a docíleno vysoké specifiky rozpoznání (*method named rationally designed meganuclease (US Patent 8,021,867 B2)*).

Meganukleázy jsou méně toxické pro buňky než ZNF díky tomu, že mají vyšší specifitu/stringenci rozpoznání cílových sekvencí DNA.

Jejich navrhování je však časově náročné.

i meganukleázy nebakteriálního původu - LAGLIDADG family of homing endonucleases (kódovány introny nebo inteiny), často v mitochondriích a chloroplastech

I-SceI 18-bp z mitochondrií *Saccharomyces cerevisiae*

I-CreI chloroplasty *Chlamydomonas reinhardtii*

I-DmI archea: *Desulfurococcus mobilis*.

oproti RE:

- **delší rozpoznávací sekvence (nemusí být palindrom, často asymetrické)**
- **vyšší tolerance k malým substitucím v rozpoznávací sekvenci**
- **obvykle vyžadují součinnost dalších proteinů**

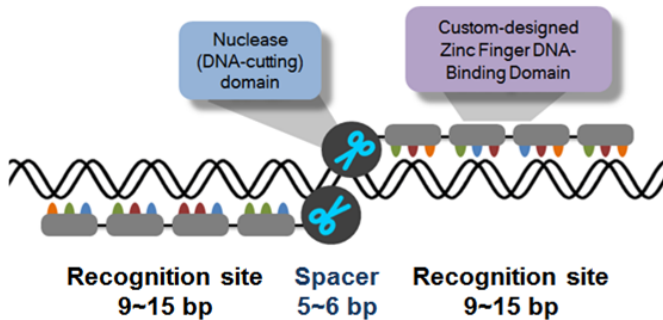
NUKLEÁZA FokI

Enzym **FokI** přirozeně se vyskytující u *Flavobacterium okeanoikoites* je restriční endonukleáza typu IIS (štěpí blízko rozpoznávací sekvence). Je tvořena N-terminální vazebnou doménou a nespecificky štěpící doménou na C-konci.

Výhody FokI pro její využití v GI:

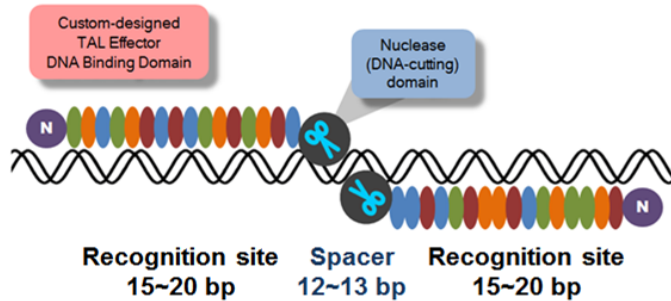
- Rozpoznávaná sekvence je oddělena od sekvence, která je štěpena – to **umožňuje izolovat doménu enzymu, která štěpí sekvenčně nespecificky**. Tato doména pak může být spojena s doménou zodpovědnou za rozpoznání cílové sekvence.
- **FokI vyžaduje pro svou nukleázovou činnost dimerizaci – zvýší se tím specifita rozpoznání cílového místa.**
- Byly připraveny modifikované FokI, které fungují jen jako heterodimery, což zvyšuje specifitu rozpoznání cílových sekvencí a eliminuje možnost vytváření nespecifického štěpení v případě homodimerů.
- využívá se pro konstrukci ZFN a TALEN nukleáz

Typy nukleáz používané pro editaci genomů



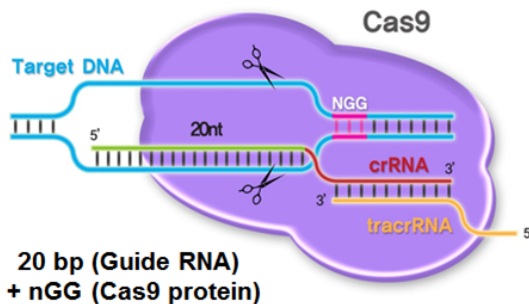
Zinc Finger Nucleases (ZFNs)

- 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

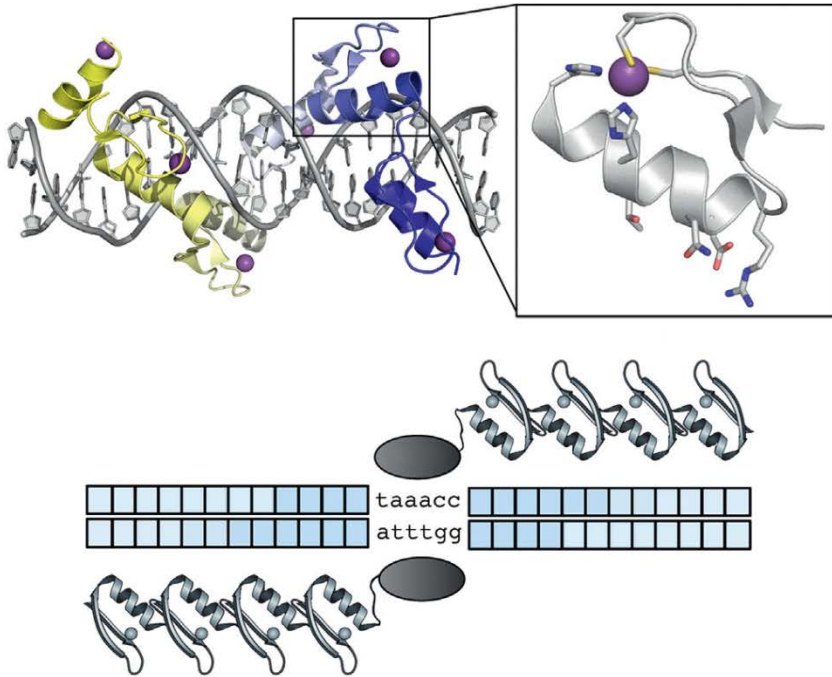


RNA-Guided Endonucleases (RGENs)

- 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

Struktura proteinu obsahujícího zinkové prsty (zinc finger)

Každý zinkový prst sestává asi ze 30 AA v konformaci $\beta\beta\alpha$. Každý prst kontaktuje 3 nebo 4 bp ve velkém žlábků DNA.

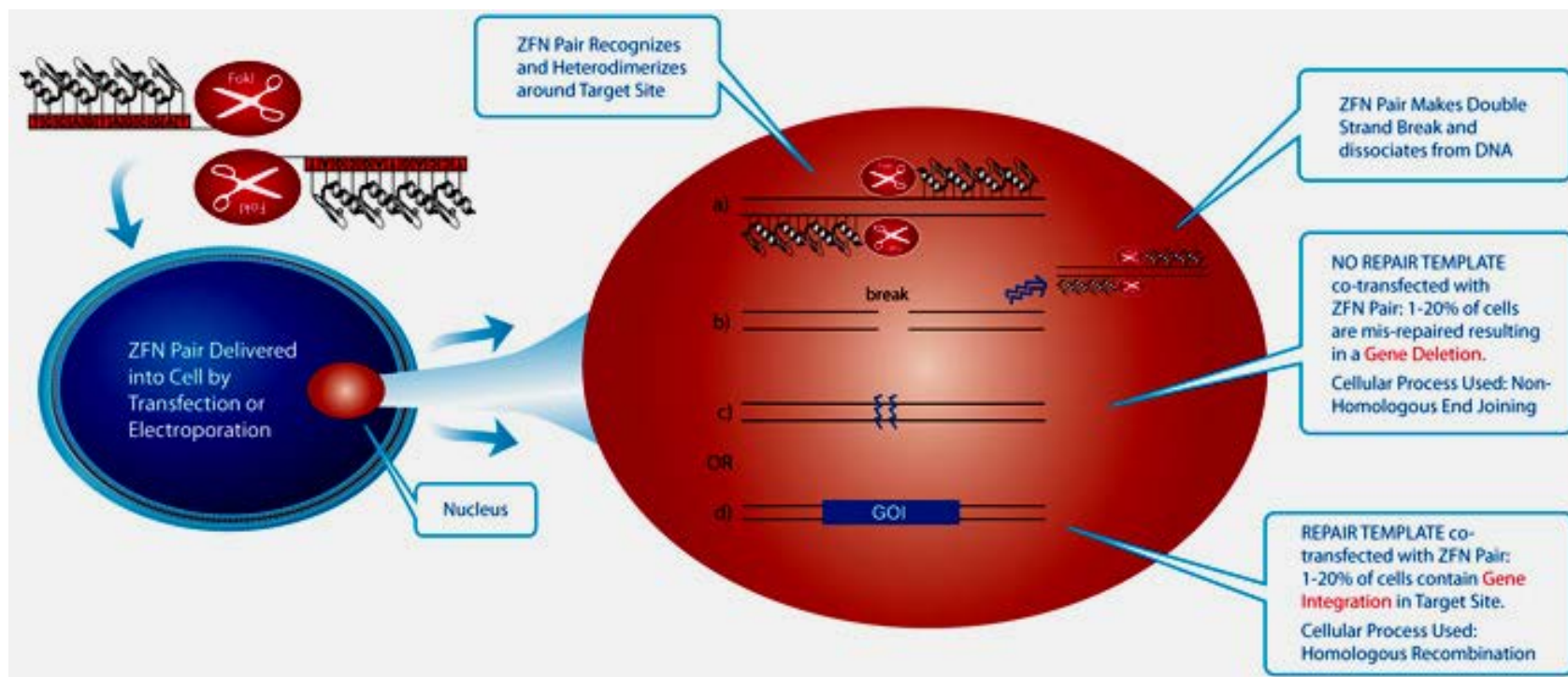


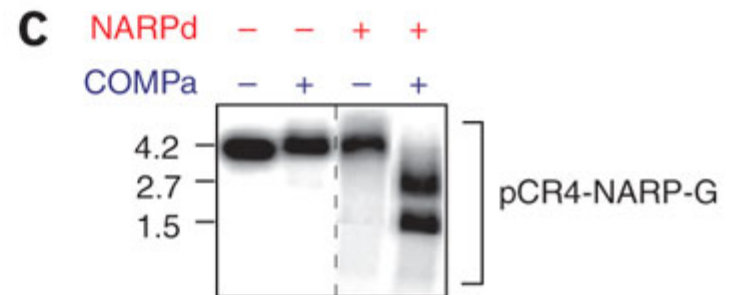
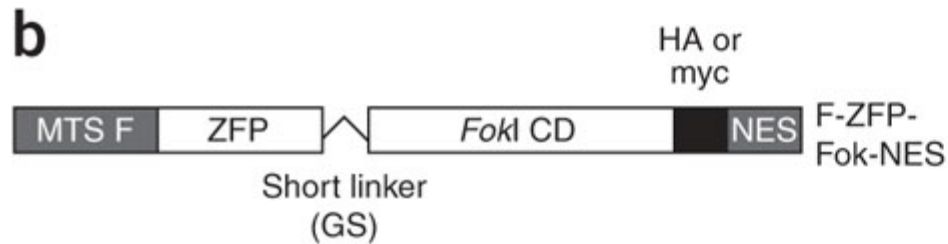
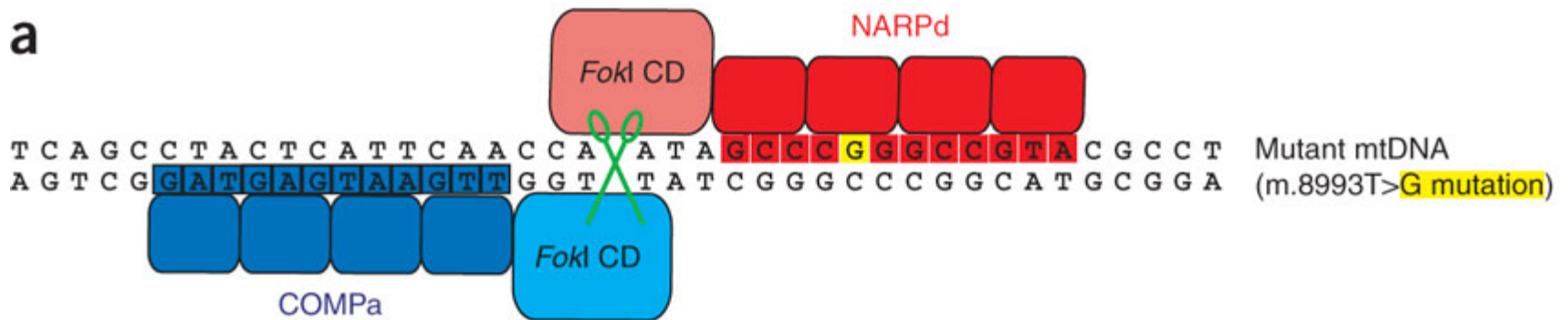
Dimer Zinc-finger nukleázy (ZFN) navázaný na DNA. Cílová místa pro vazbu ZFN sestávají ze dvou vazebných míst pro zinkové prsty, která jsou oddělena 5-7 bp dlouhou sekvencí, která je štěpena štěpicí doménou FokI.

Editace genomů pomocí ZFN

- produkovány již otestované firmami:

Sigma-Aldrich
Sangamo BioSciences





(a) Schematic diagram of a ZFN heterodimer bound to the mutated mtDNA target. Each of the monomeric ZFN consists of the *FokI* nuclease domain (*FokI* CD) linked to a zinc-finger peptide. One of the ZFNs (NARPd, red) was designed to bind to the mutated mtDNA site, whereas its companion ZFN binds a native sequence on the opposite DNA strand (COMPa, blue)¹⁹. (b) Schematic structure of mtZFN used in the cleavage assay in c. 'mitochondrial targeting sequence (MTS) F' denotes the mitochondrial targeting sequence of F1 β -subunit of the human mitochondrial ATP synthase (see ANTICIPATED RESULTS for details). (c) *In vitro* assay testing the specificity of the F–NARPd–Fok–NES and F–COMPa–Fok–NES constructs (see ANTICIPATED RESULTS for details).

TAL effectory (Transcription Activator-like effectors)

Gram negativní bakterie r. *Xanthomonas* infikují řadu rostlinných druhů, u nichž mohou způsobovat onemocnění. Injikují svými sekrečními systémy do rostlinných buněk řadu efektorových proteinů včetně TAL efektorů. TAL effectors (Transcription Activator-like effectors) mají několik motivů včetně NLS, proto mohou vstupovat do jádra, kde se vážou na promotorové sekvence a aktivují transkripci rostlinných genů, které napomáhají bakteriální infekci (snížení hladiny Cu, zvýšení hladiny glukózy, ...)

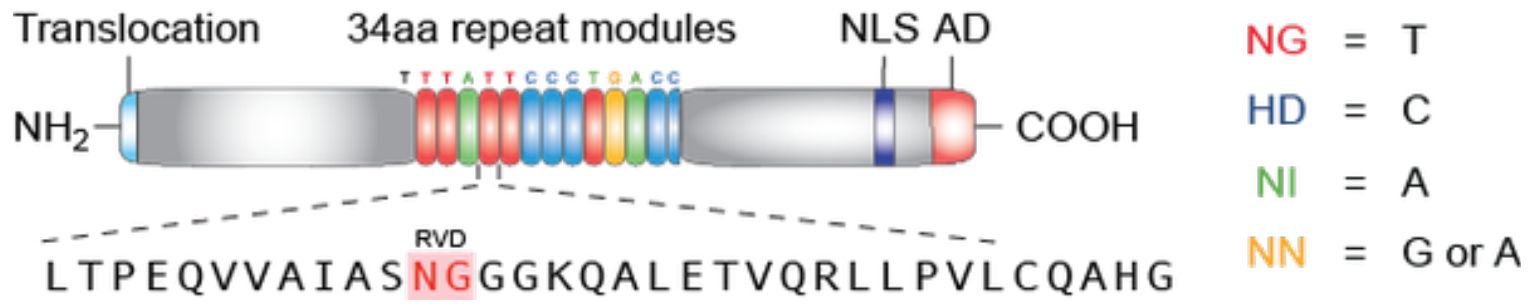
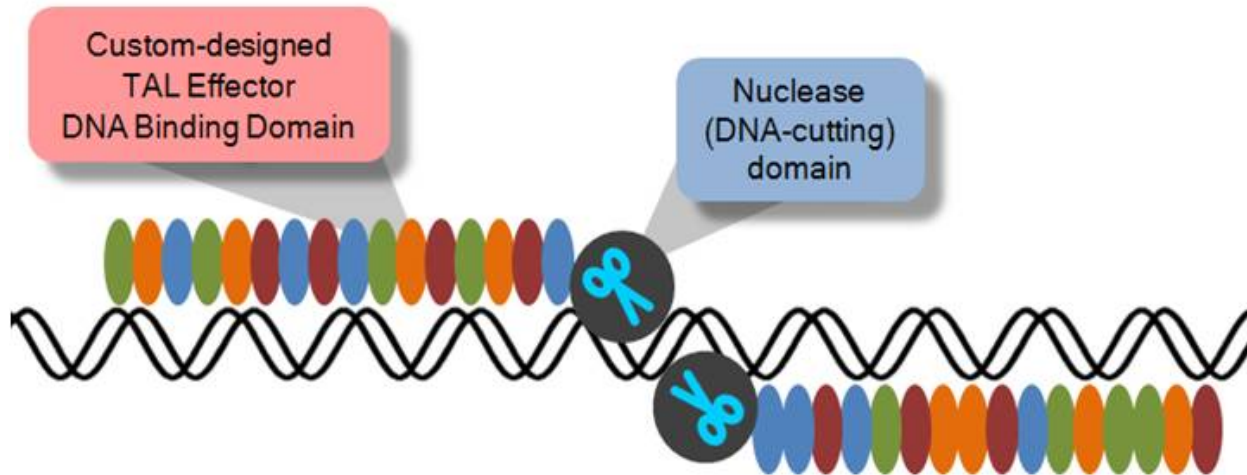
TAL obsahují v centrální části opakující se sekvence aminokyselin v počtu až 33, které jsou dlouhé obvykle 34 AA.

Typická repetice: LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG, avšak v pozicích 12 a 13 se vyskytují různé aminokyseliny (místo označované jako *repeat variable diresidue n. RVD*) – tyto klíčové pro specifitu vazby na sekvenci DNA

Byly navrženy TALE (Engineered TAL effectors) schopné se vázat na jakékoliv sekvence DNA díky záměnám aminokyselin. Takové umělé TALE lze využít pro aktivaci nebo represi endogenů u rostlin i živočichů.

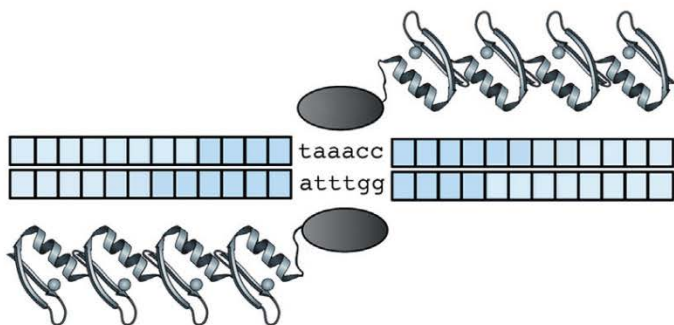
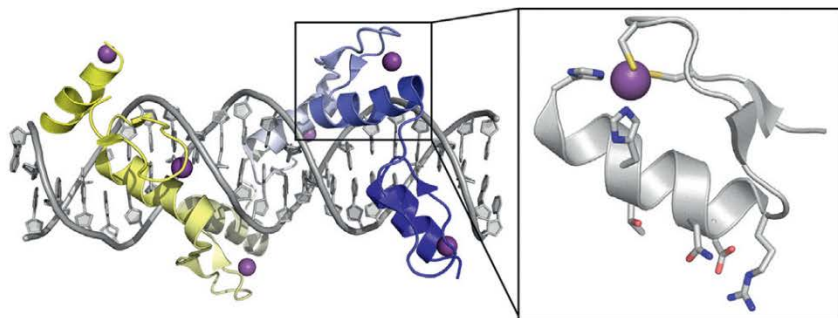
Engineered TAL effectors lze fúzovat se štěpicími doménami nukleáz (FokI) a vytvářet tak TAL Effector Nucleases (**TALENs**).

Struktura TALEN



Struktura proteinu obsahujícího zinkové prsty (zinc finger)

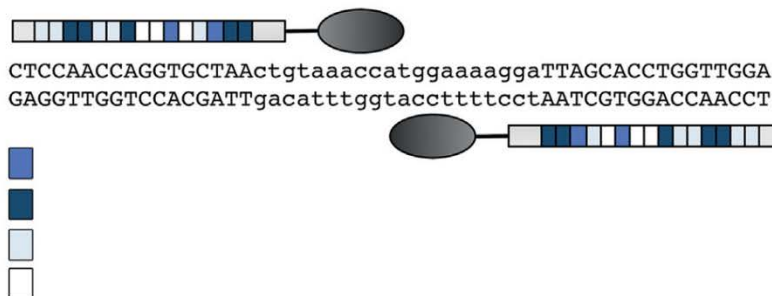
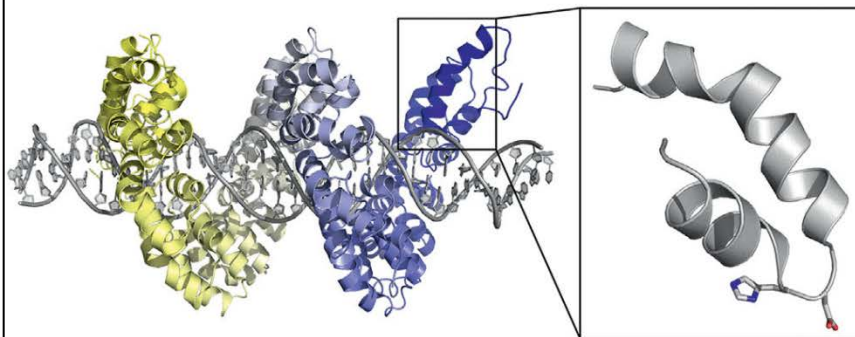
Každý zinkový prst sestává asi ze 30 AA v konformaci $\beta\beta\alpha$. Každý prst kontaktuje 3 nebo 4 bp ve velkém žlábků DNA.



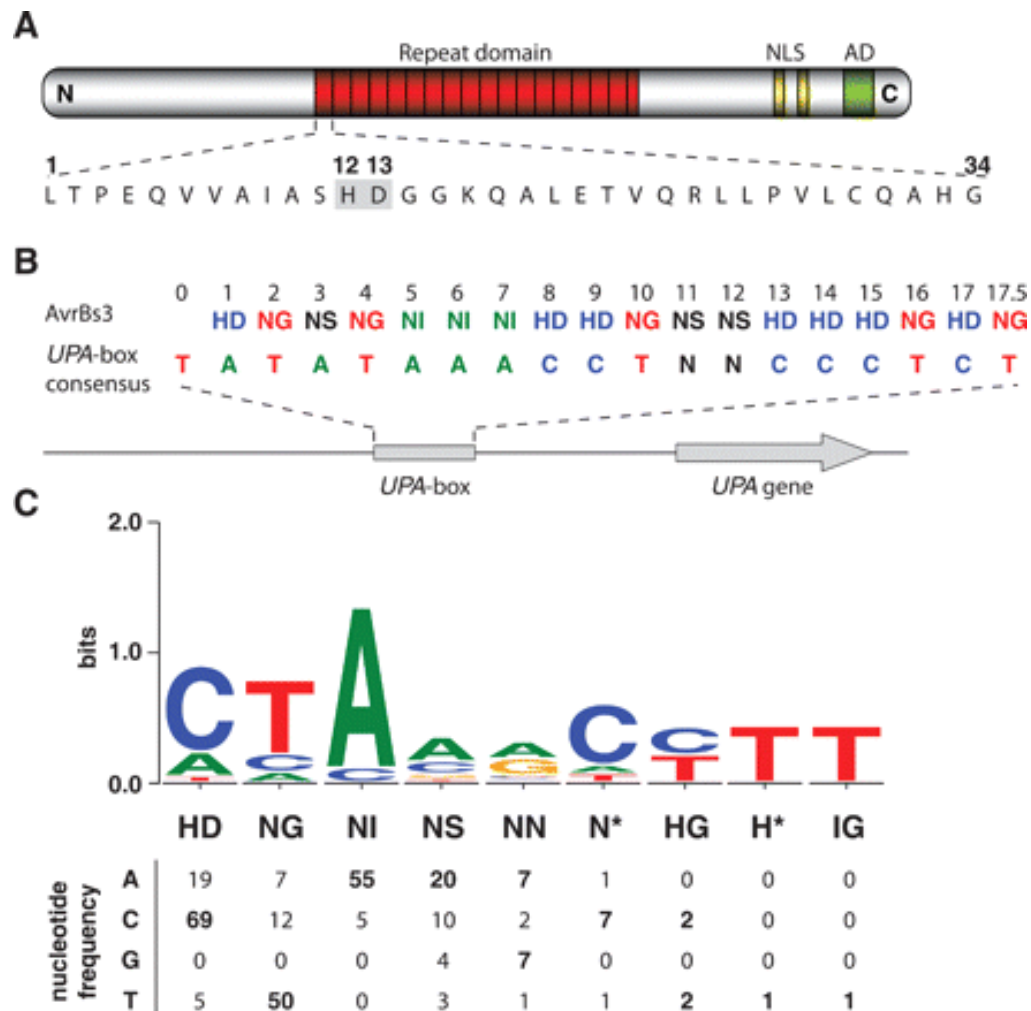
Dimer Zinc-finger nukleázy (ZNF) navázaný na DNA. Cílová místa pro vazbu ZNF sestávají ze dvou vazebných míst pro zinkové prsty, která jsou oddělena 5-7 bp dlouhou sekvencí, která je rozpoznávána štěpící doménou FokI.

Protein TALE v komplexu s cílovou DNA.

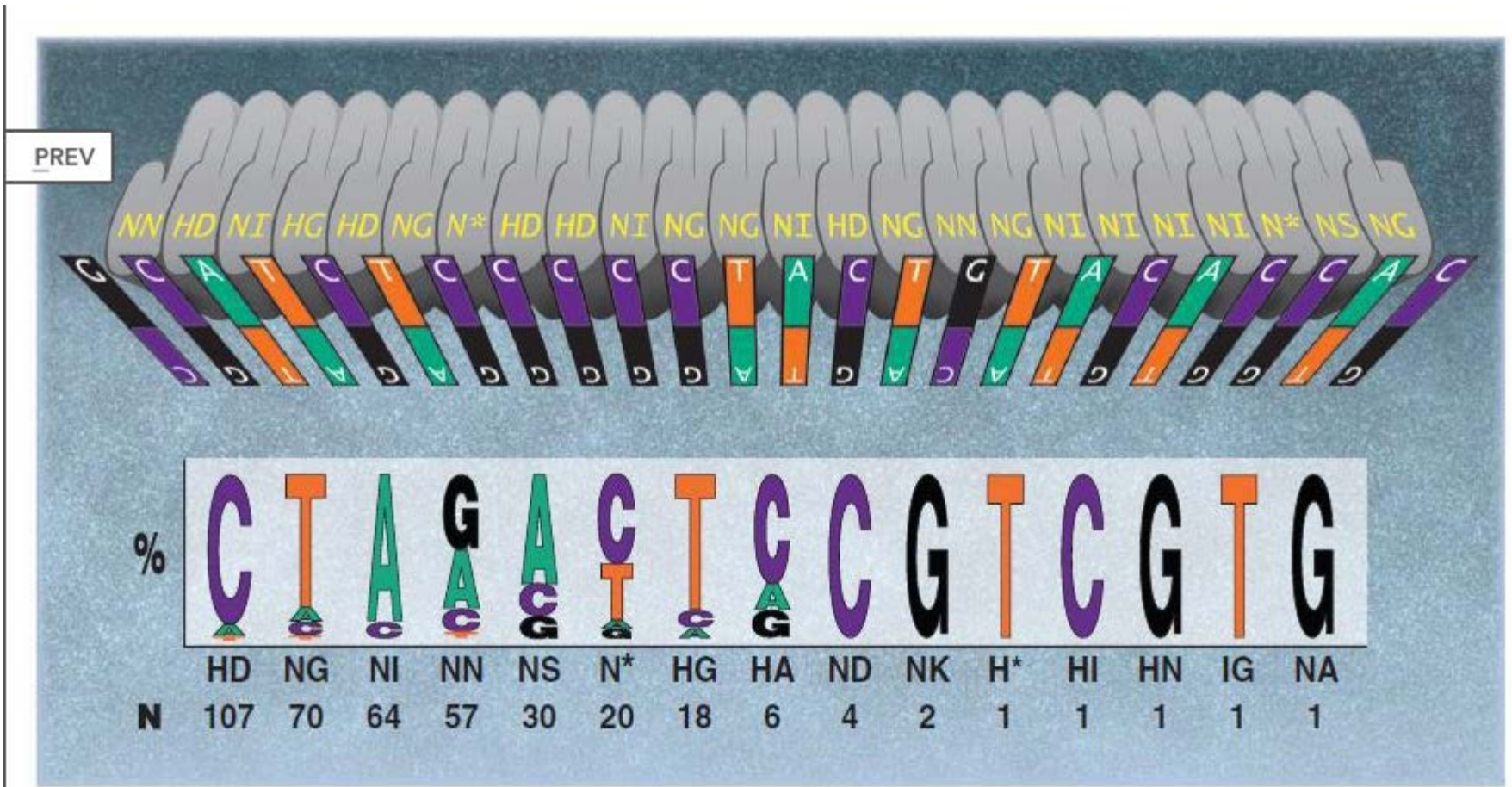
Jednotlivé repetice proteinu TALE obsahují 33-35 AA, které rozpoznávají jednotlivé páry bází prostřednictvím dvou hypervariabilních zbytků aa (repeat-variable diresidues – RVDs)



Dimer TALEN navázaný na DNA. Cílová místa pro TALEN jsou tvořena dvěma vazebnými oblastmi pro TALE oddělenými mezeríkovou sekvencí různé délky (12-20 bp). TALE lze upravit tak, aby rozpoznával jedinečné sekvence vlevo a vpravo.

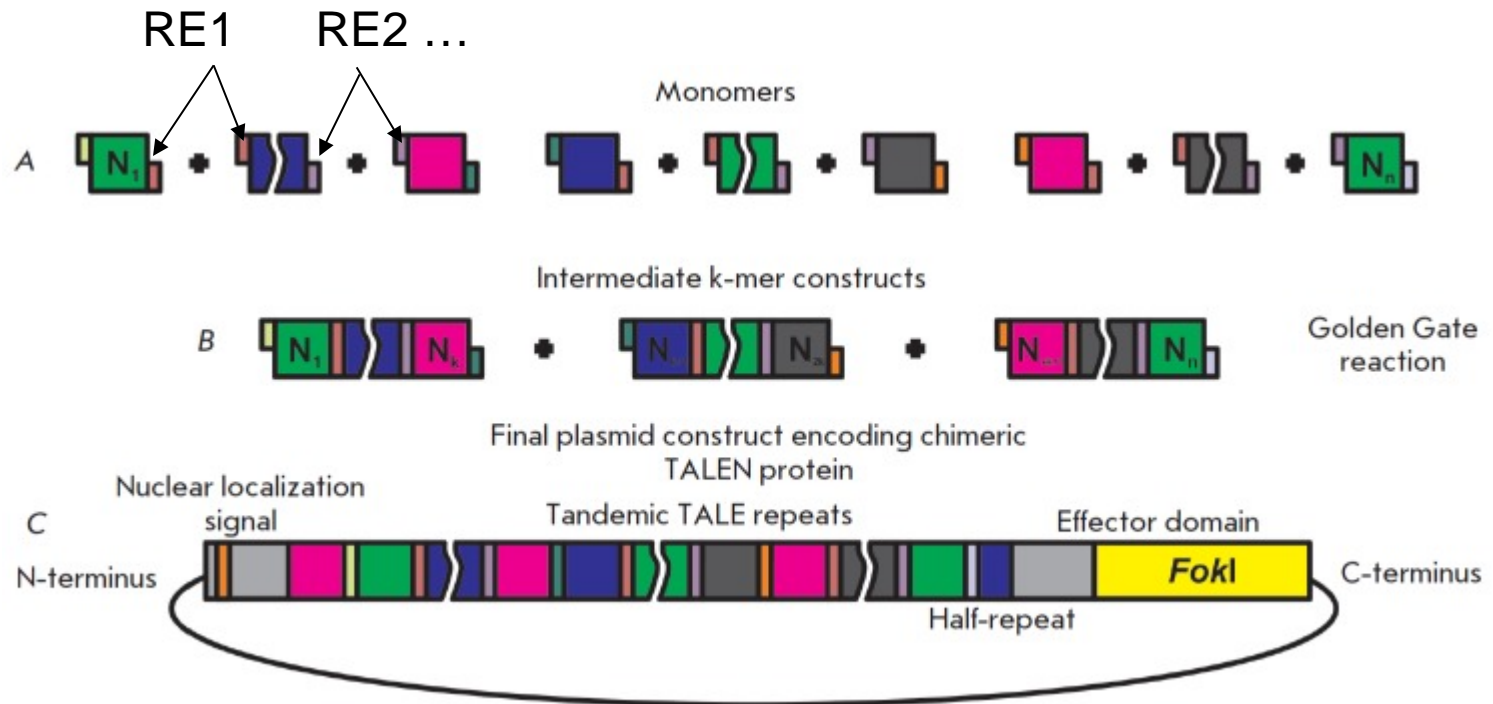


Model for DNA-target specificity of TAL effectors. (A) TAL effectors contain central tandem repeats, NLSs, and an AD. Shown is the amino acid sequence of the first repeat of AvrBs3. Hypervariable amino acids 12 and 13 are shaded in gray. (B) Hypervariable amino acids at position 12 and 13 of the 17.5 AvrBs3 repeats are aligned to the UPA box consensus (14). (C) Repeats of TAL effectors and predicted target sequences in promoters of induced genes were aligned manually. Nucleotides in the upper DNA strand that correspond to the hypervariable amino acids in each repeat were counted on the basis of the following combinations of eight effectors and



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

- každý si může sám vytvořit (<http://www.addgene.org/TALEN/>)

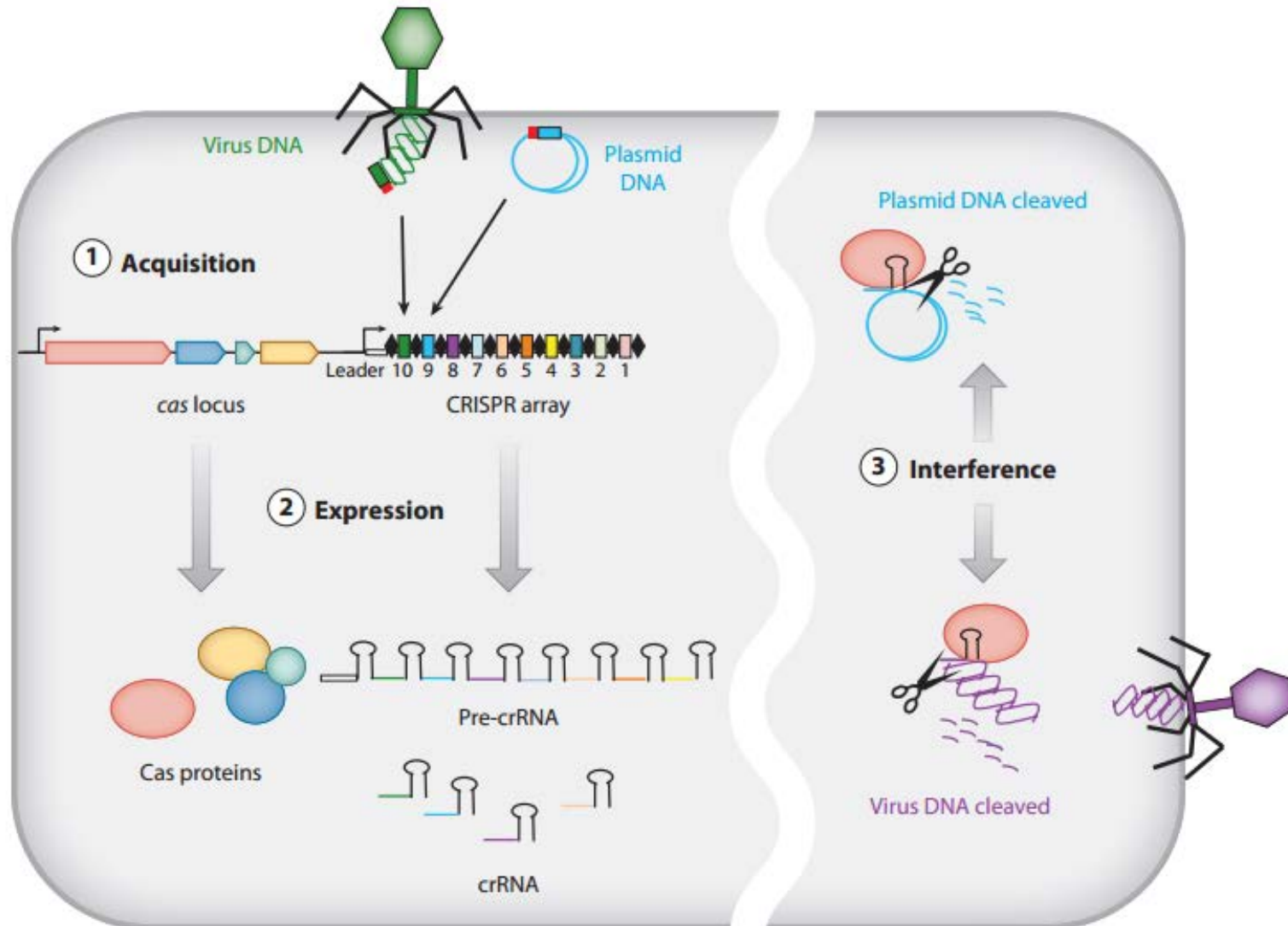
K dispozici jsou knihovny monomerů, dimerů, trimerů a tetramerů

Umělé nukleázy

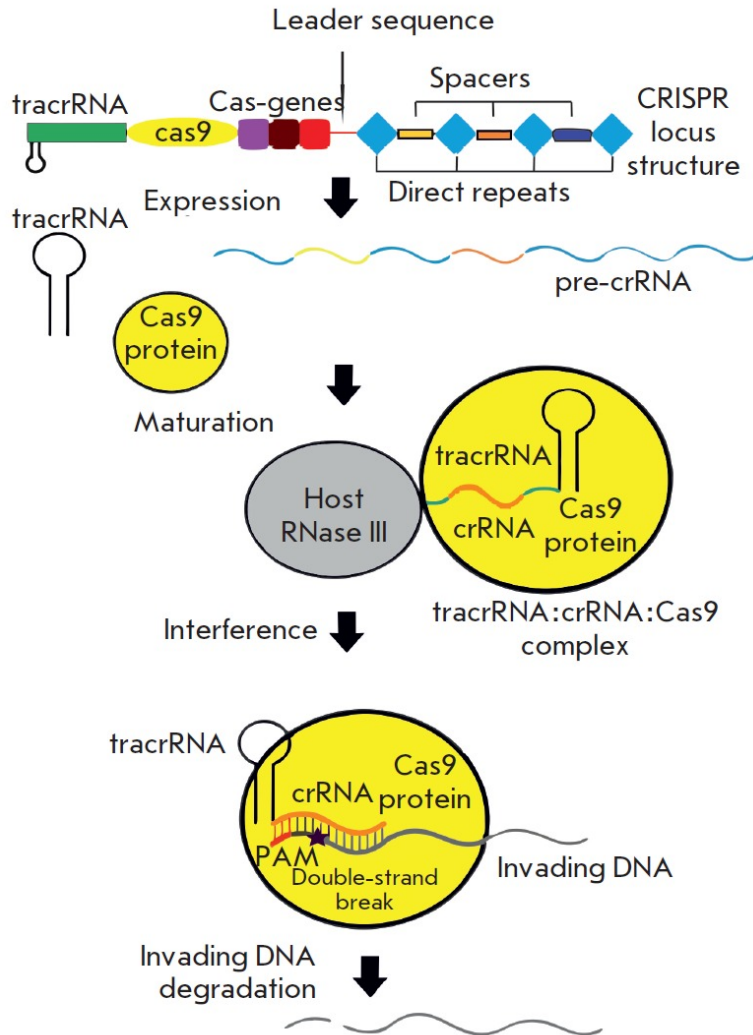
- odvozené od aktivátoru transkripce + nukleáz
 - vazba na specifické místo v genomu
 - do buněk se obvykle dopravují na expresních vektorech
 - lze je využít pro tvorbu – bodových mutací ...
 - delecí
 - inzercí
 - inverzí
 - duplikací
 - translokací
- ... ale také pro značení mRNA
- podstatou je tvorba dsDNA zlomu a jeho oprava
 - sekvenční specifita je dána **DNA-protein interakcí**

System CRISPR/Cas

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



Fungování CRISPR-Cas9 komplexu



system pravidelně uspořádaných mezerů mezi repetitivy CRISPR lokusu

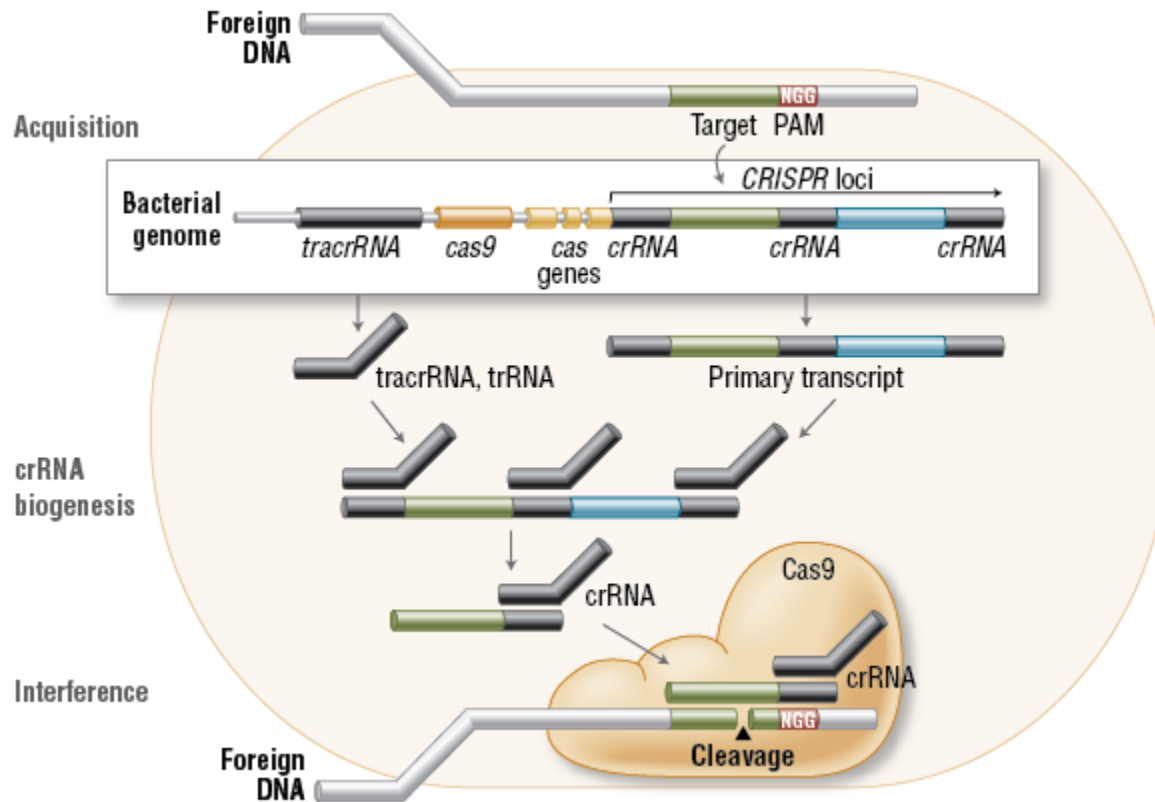
cizorodé DNA rozpoznány proteiny Cas (CRISPR associated proteins) a začleněny do CRISPR lokusu

lokus má až několik stovek mezerů, nový mezer, který je převzat z infikující molekuly, je začleněn jako první (fáze akvizice/adaptace)

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

Asociace crRNA s transkripční (transaktivující) tracrRNA a následně s některým z CAS proteinů

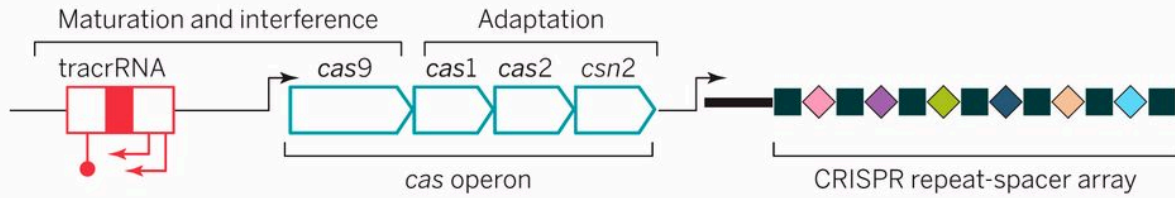
tento komplex rozpozná a štěpí cizorodou DNA



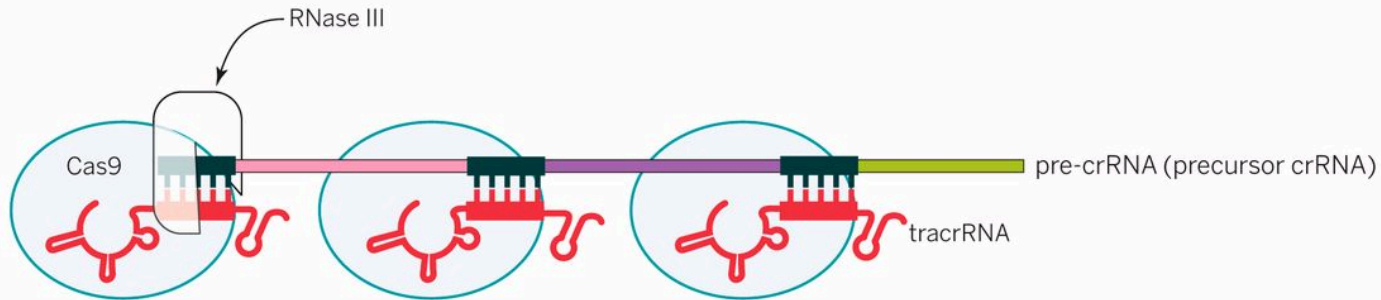
3 hlavní složky systému – *crRNA*, *tracrRNA*, Cas proteiny (1-2)

- Úseky cizorodé DNA jsou začleněny do bakteriálního genomu do lokusů CRISPR
- Lokusy CRISPR jsou přepsány a upraveny do *crRNA* (*crRNA* biogenesis)
- Během interference vytváří endonukleáza Cas9 komplex s *crRNA* a *tracrRNA*, který pak štěpí cizorodou DNA obsahující sekvenci 20-ti nukleotidů komplementárních k *crRNA* poblíž sekvence PAM.

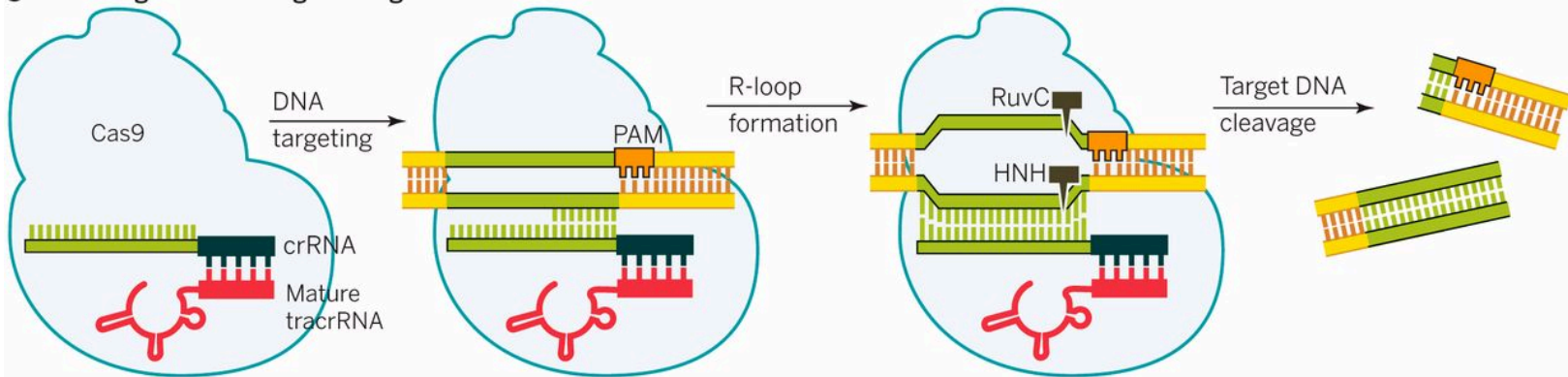
A Genomic CRISPR locus



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

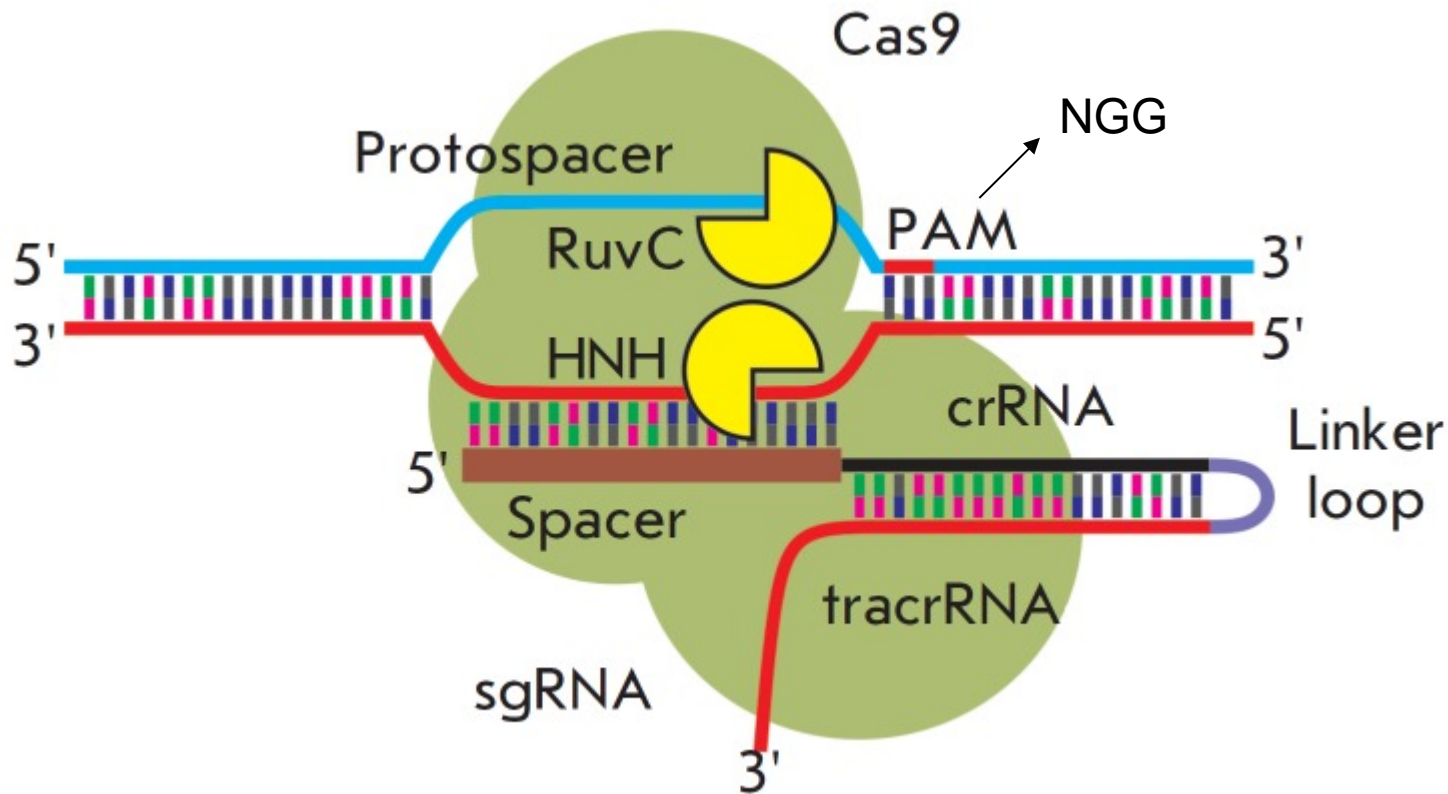


C RNA-guided cleavage of target DNA



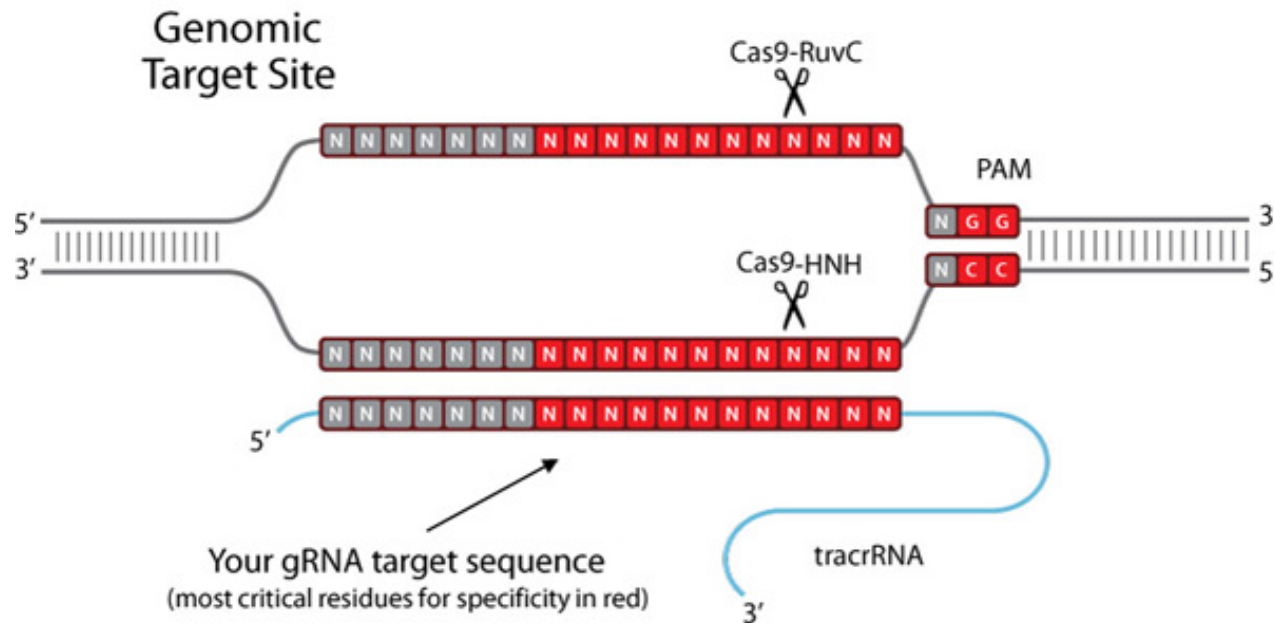
Struktura chimerické sgRNA a komplexu sgRNA s Cas9 pro vytváření DSB v cílových místech.

sgRNA je vytvořena spojením crRNA a tracrRNA.



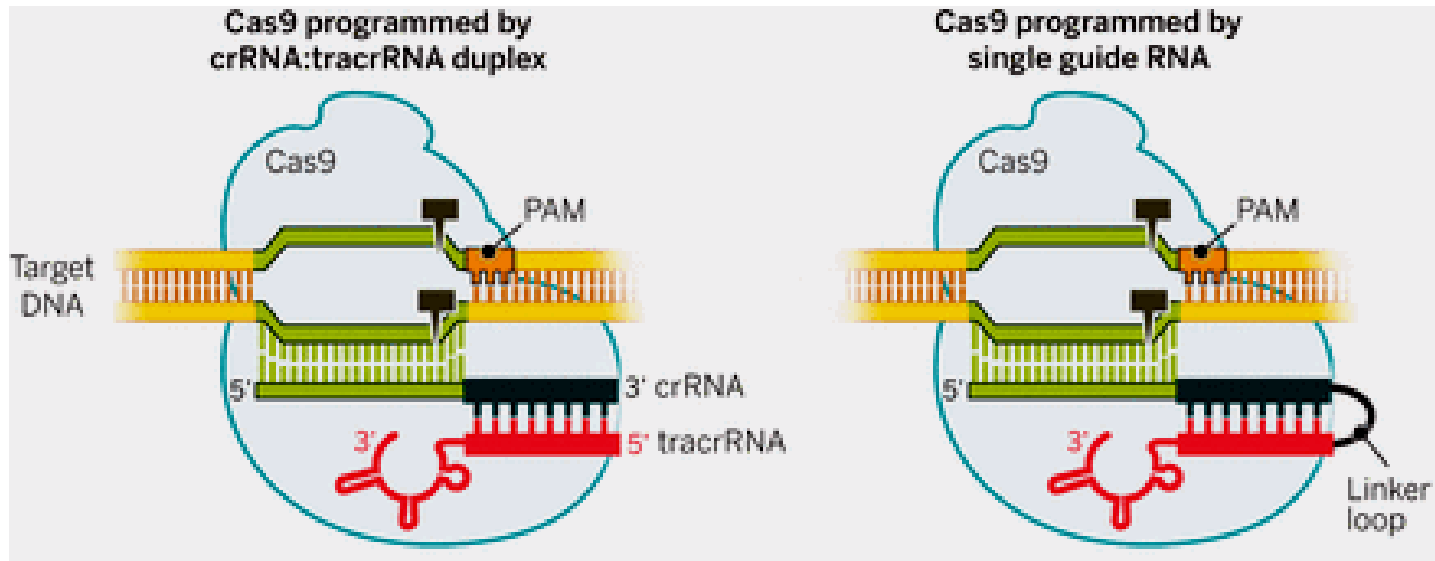
PAM sekvence – protospacer adjacent motif

- 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-GG

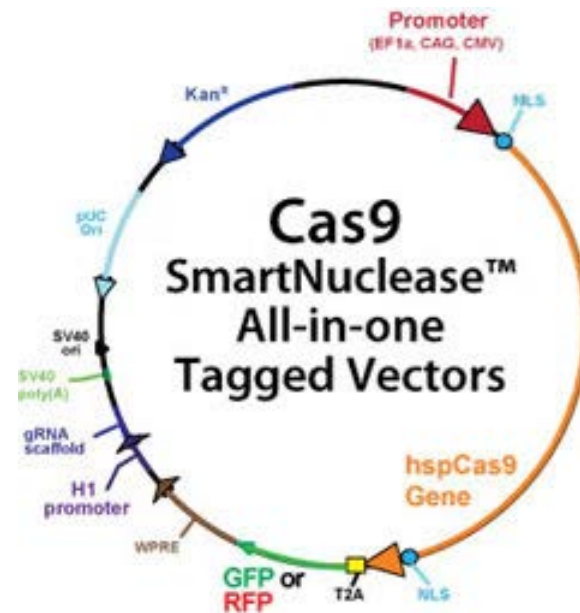


- systémy jiných bakterií nebo upravené systémy – NAG, YG, TTTN, YTN, ...

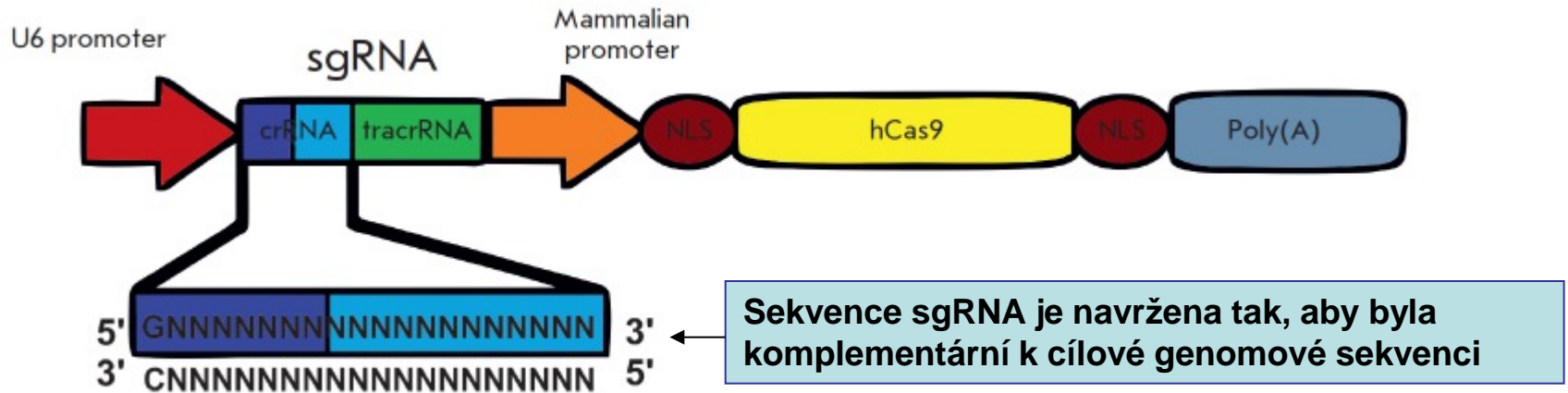
Srovnání struktury crRNA:tracrRNA a sgRNA



- systém lze exprimovat z jediného vektoru



Příprava konstruktů exprimujících CRISPR/Cas element



hCas9 = sekvence proteinu Cas9 optimalizovaná pro expresi v eukaryotických buňkách.

sgRNA = chimerická RNA obsahující úseky crRNA a tracrRNA, která je nezbytná pro dosažení aktivity.

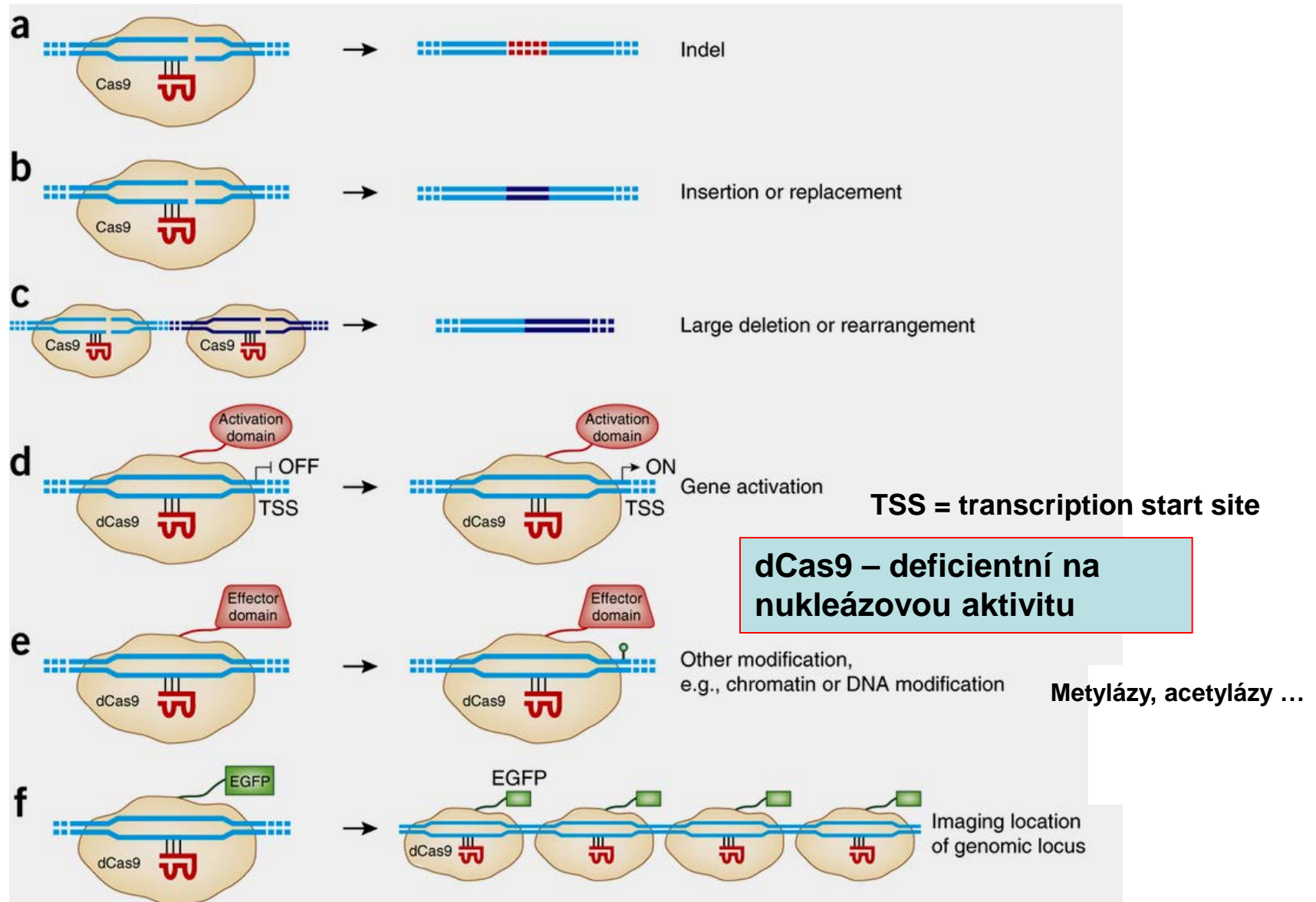
PAM není součástí klonované sekvence

- pro design lze využít dostupný software

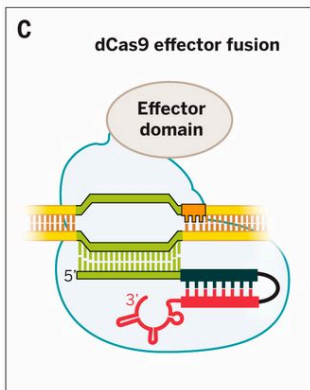
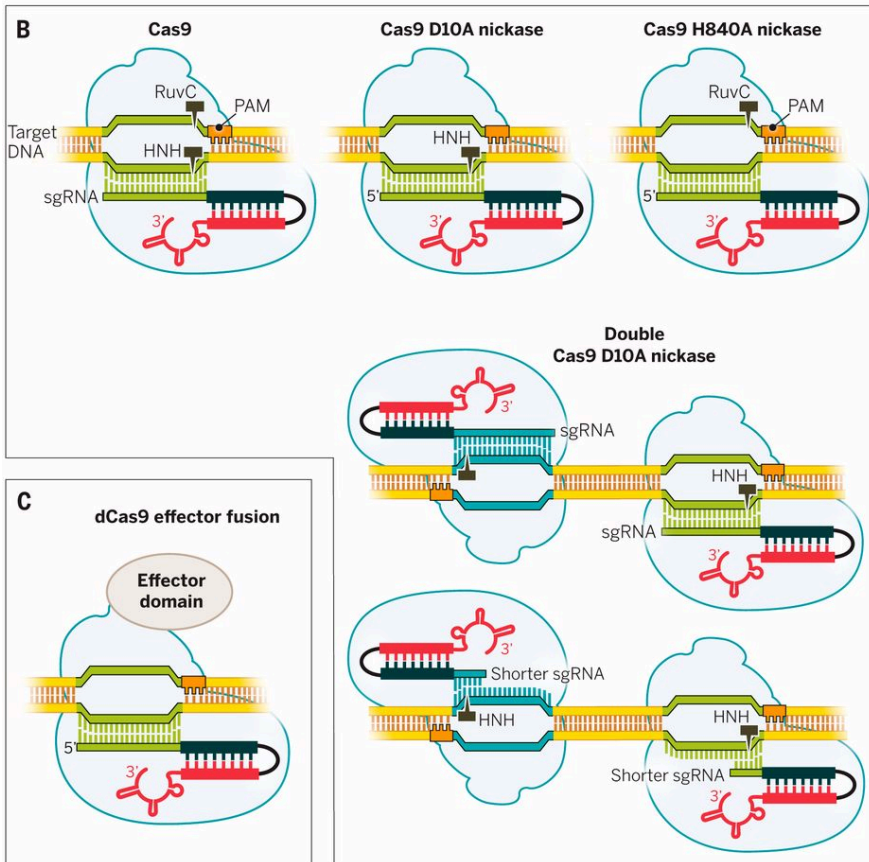
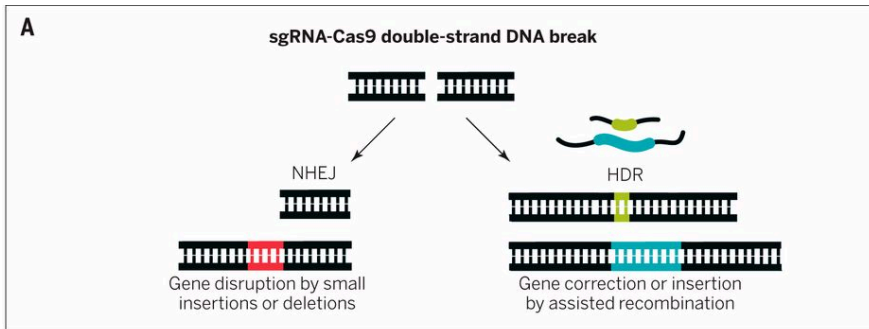
- <http://zifit.partners.org/>

- <http://crispr.mit.edu/>

Možnosti editace genomů pomocí systému CRISPR/Cas9



Působení modifikovaného systému CRISPR/Cas9



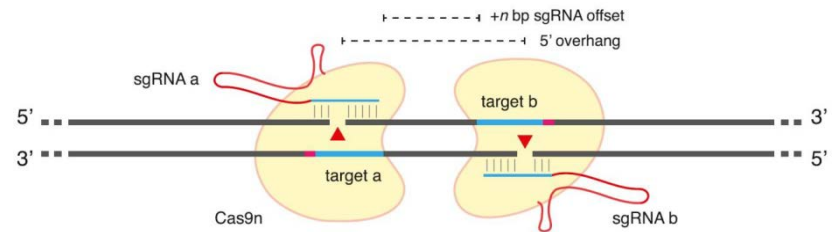
Specificita – dána pouze 20 nt sgRNA

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

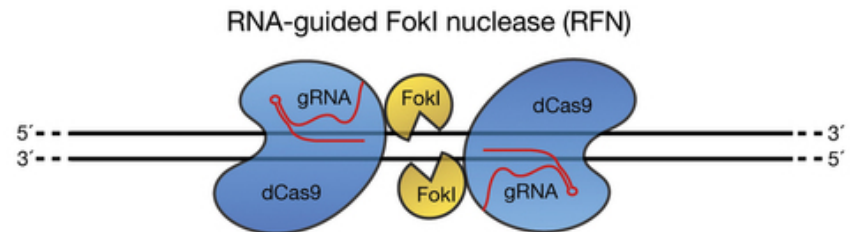
Target site: 5'- GTGTAACGGATAATGGACANGG

Distal Seed PAM

riziko vzniku **off-target štěpení**

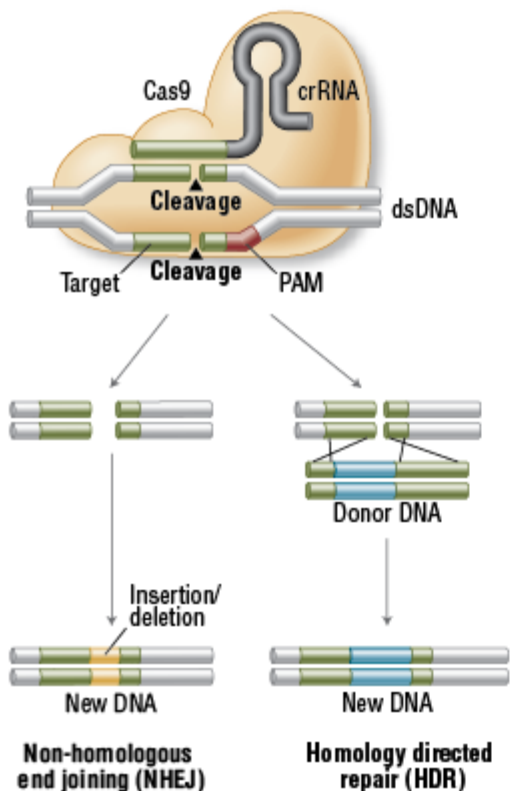


50 - 1500x vyšší specifita (n do 20 bp)

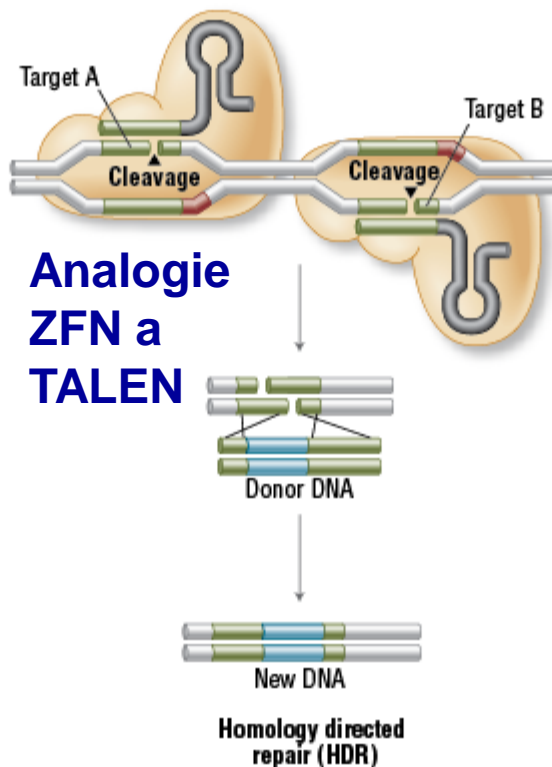


ještě vyšší specifita

A. Genome Engineering With Cas9 Nuclease

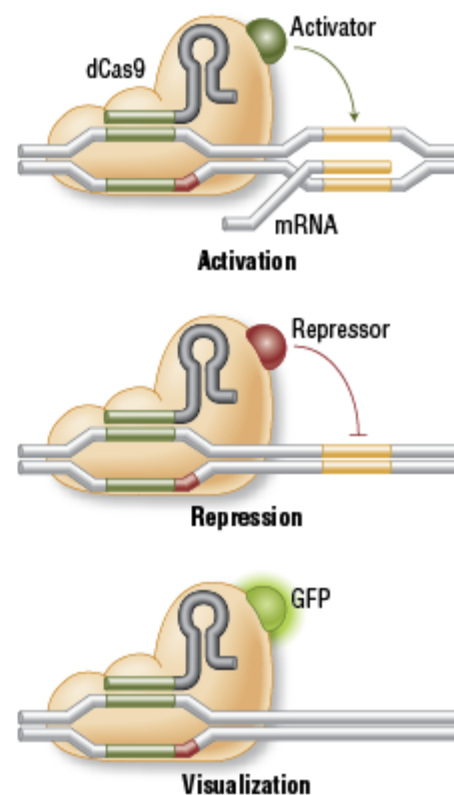


B. Genome Engineering By Double Nicking With Paired Cas9 Nickases



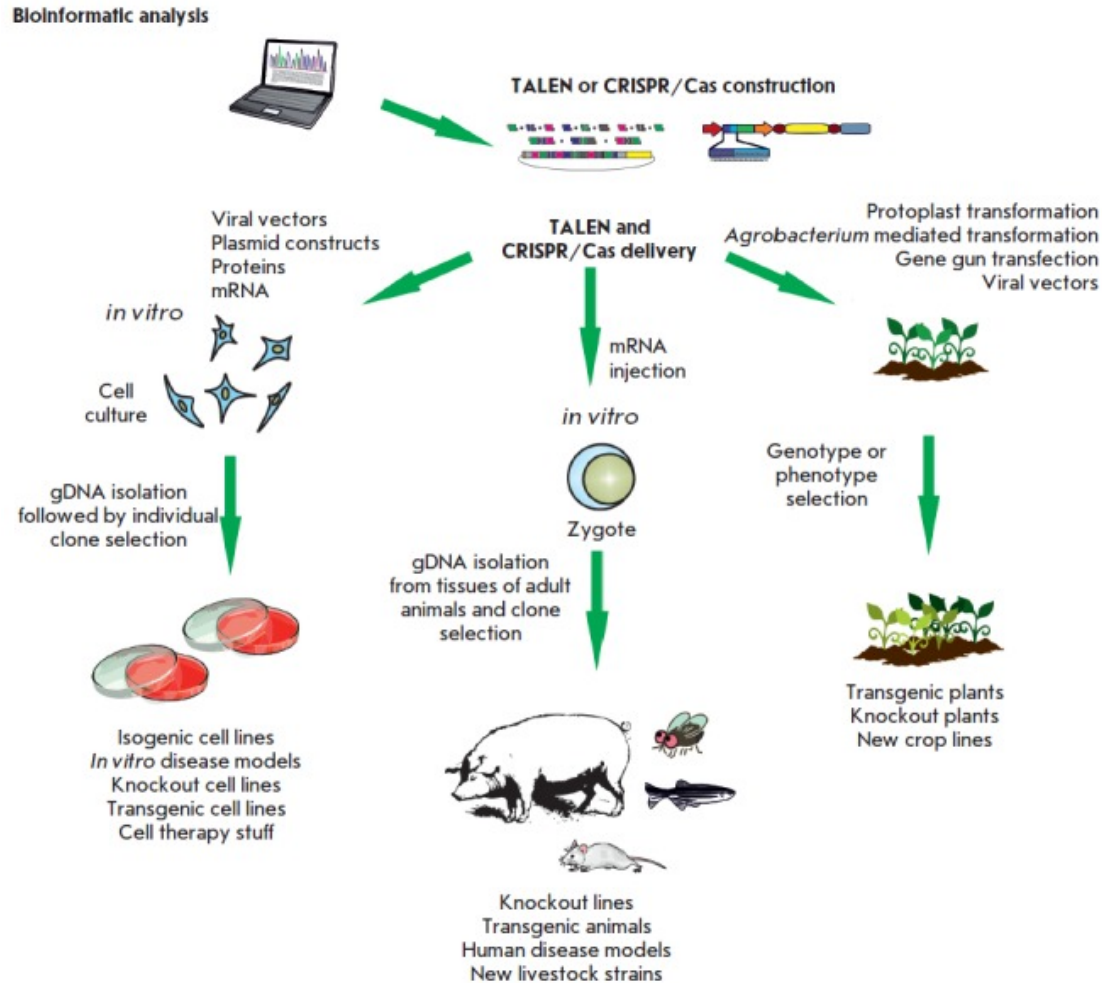
Analogie ZFN a TALEN

C. Localization With Defective Cas9 Nuclease



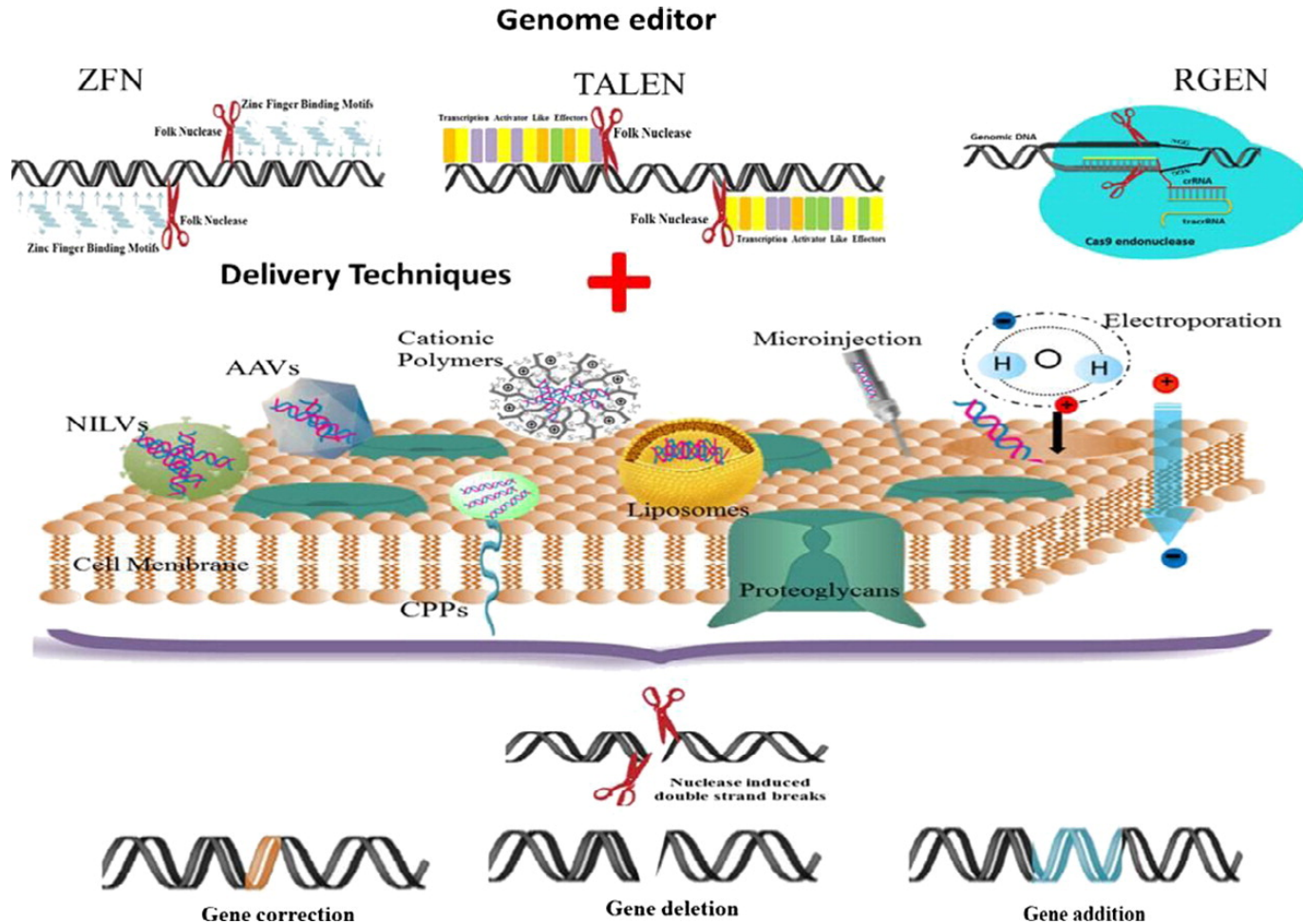
- A. Wt Cas9 nukleáza štěpí specificky dsDNA, vytváří DSB a tím navozuje reparaci. Za nepřítomnosti homologní sekvenční může dojít k nehomolognímu spojování konců (NHEJ) a vzniku ins/del mutací, přerušujících zasažený gen. Za přítomnosti homologní sekvenční může dojít k reparaci s využitím této sekvenční a jejími vložením do místa zlomu.
- B. Mutantní Cas9 nukleáza vytváří místně specifické jednořetězcové zlomy. Dvojice takových sgRNA může vést k tvorbě ds DNA zlomů, které mohou být reparovány s využitím homologní rekombinace či NHEJ (jednořetězcové zlomy zvyšují účinnost HDR). Tento systém zvyšuje specifitu tvorby ds zlomů.
- C. Mutantní Cas 9 nukleáza může být připojena k různým efektorovým doménám, které umísťuje na 37 specifické sekvenční. Mohou to být TF, represory, fluorescenční značky aj.

Obecná strategie genomového inženýrování



1. Selection of a target nucleotide sequence in the genome;
2. Generation of a nuclease construct directed at the selected target;
3. Delivery of this construct to the cell nucleus; and
4. Analysis of produced mutations.

Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN



Type of Modification	Organism	Gene(s)	Nuclease
Gene disruption	Human	CCR5	ZFN, TALEN, CRISPR/Cas
	Human	TCR	ZFN
	Zebrafish	gol, ntl, kra	ZFN
	Pig	GGTA1	ZFN
		LDLR	TALEN
	Bovine	ACAN12, p65	TALEN
	Human	EMX1, PVALB	CRISPR/Cas
	Rat	IgM, Rab38	ZFN
	<i>Arabidopsis</i>	ADH1, TT4	ZFN
	<i>C. elegans</i>	ben-1, rex-1, sds-2	ZFN, TALEN
	Hamster	DHFR	ZFN
	<i>Drosophila</i>	yellow	ZFN
Rice	OsSWEET14	TALEN	
Gene addition	Human	OCT4, PITX3	ZFN, TALEN
	Human	CCR5	ZFN
	Human	F9	ZFN
	Mouse	Rosa26	ZFN
	Human	AAVS1	ZFN, TALEN, CRISPR/Cas
	Human	VEGF-A	ZFN
	Zebrafish	th, fam46c, smad5	TALEN
	Maize	IPK1	ZFN
Gene correction	Human	IL2RG, A1AT, HBB, SNCA	ZFN
	Tobacco	SuRA, SurRB	ZFN
	<i>Drosophila</i>	yellow	ZFN

Genomic engineering using TALEN and CRISPR/Cas

Nuclease	Object	Gene	Objective	Reference
TALEN	Human cells (<i>Homo sapiens</i>)	<i>ccr5, akt2, e17k, angptl3, apob, atgl, c6orf106, celsr2, cftr, ciita, foxo1, foxo3, gli1, glut4, hbb, hdac1, hdac2, hdac6, hmga2, hoxa13, hoxa9, hoxc13, hprt, il2rg, jak2, kras, linc00116, maoa, map2k4, mdm2, met, mlh1, msh2, mutyh, myc, mycl1, mycn, nbn, ncor1, ncor2, nlr5, ntf3, pdgfra, pdgfrb, phf8, plin1, pms2, ppp1r12c (aavs1), ptch1, plen, rara, rbbp5, recql4, ret, runx1, sdhb, sdhc, sdhd, setdb1, sirt6, smad2, sort1, sox2, klf4ss18, suz12, tfe3, tp53, trib1, tsc2, ttn, vhl, xpa, xpc, abl1, alk, apc, atm, axin2, bax, bcl6, bmpr1a, brca1, brca2, cbx3, cbx8, ccnd1, cdc73, cdk4, cdh4, chd7, cttnb1, cyld, ddb2, ercc2, ewsr1, ext1, ext2, ezh2, fanca, fancc, fancf, fancg, fes, fgfr1, fh, flcn, flt4, mstn, aavs2, oct4, pitx3</i>	Knockout, insertion	[67, 68, 70-72, 74, 92, 176-179, 180]
	Yeast (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	<i>URA3, ADE2, LYS3</i>	Knockout, insertion	[181]
	Nematode (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	<i>ben-1, tex-1, sdc-2</i>	Knockout	[182]
	Drosophila (<i>Drosophila melanogaster</i>)	<i>yellow, crhr1, ponzr1, bmil, cdh5, dip2a, elmo1, epas1b, fh, golden, gria3, hey2, hif1ab, ikzf1, jak3, moesina, myod, phf6, ppp1cab, ryr1a, ryr3, scl6a3, tbx6, tnikb, th, fam46c, smad5</i>	Knockout, insertion	[94, 183-187]
	Silkworm (<i>Bombyx mori</i>)	<i>blos2</i>	Knockout	[188]
	Cricket (<i>Gryllus bimaculatus</i>)	<i>lac2</i>	Knockout	[189]
	Western clawed frog (<i>Xenopus tropicalis</i>)	<i>ets1, foxd3, grp78/bip, hhex, noggin, ptf1a/p48, sox9, vpp1</i>	Knockout	[190]
	Mouse (<i>Mus musculus</i>)	<i>c9orf72, fus, lepr, pak1ip1, gpr55, rprm, fbxo6, smurf1, tmem74, wdr20a, dcaf13, fam73a, mlkl, mstn, pibf1, sepw1, rab38, zic2</i>	Knockout, insertion	[179, 191-196]
	Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	<i>bmpr2, IgM</i>	Knockout	[197, 198]
	Pig (<i>Sus scrofa</i>)	<i>amelu, dmd, qdf8, ggta, qhhrdr, il2rg, ldlr, raq2, rela (p65), sry</i>	Knockout	[199]
	Cattle (<i>Bos taurus</i>)	<i>acan, qdf8, ggta, mstn, prnp</i>	Knockout	[179, 199]
	Arabidopsis (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>adh1</i>	Knockout	[70]
	Tobacco (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	<i>surA, surB, hax3</i>	Knockout, insertion	[156, 157]
	False brome grass (<i>Brachypodium distachyon</i>)	<i>aba1, csk2, coi1, hta1, rht, sbp, smc6, spl</i>	Knockout	[154]
	Rice (<i>Oryza sativa</i>)	<i>avrxa7, pthxo3, badh2, cka2, dep1, sd1</i>	Knockout	[154, 155]
	CRISPR/Cas	Yeast (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	<i>CAN1, ADE2</i>	Knockout, insertion
Human cells (<i>Homo sapiens</i>)		<i>dnmt3b-tdTomato, pou5f1(oct4), emx1, dyrk1a, grin2b, egfp, ccr5, c4bpb, pvalb, aavs, akt2, celsr2, ciita, glut4, linc00116, sort1, ldlr</i>	Knockout, insertion	[46, 51, 78, 80, 201, 202]
Nematode (<i>Caenorhabditis elegans</i>)		<i>dpy-11, unc-4, ben-1, unc-36, daf-2, klp-12, lab-1, egfp, dpy-11, lin-5, rol-1, dpy-3, unc-1, dpy-13, unc-119, klp-12</i>	Knockout, insertion	[119-124, 126]
Drosophila (<i>Drosophila melanogaster</i>)		<i>yellow, white, rosy, cg14251 (k81), cg3708cg17629 (kl-3), light</i>	Knockout, insertion	[130-133]
Danio rerio (<i>Danio rerio</i>)		<i>etsrp, gata5, etsrp, gsk3b, apoae, fh, fh1, th1, rgs4, tia1, tph1a, drd3, egfp, tyr, gol, mitfa, ddx19, sema3fb, dre-mir-126a, dre-mir-126b, dre-mir-17a-1-dre-mir-92a-1, dre-mir-17a-2-dre-mir-92a-2, fgd5, ensdarg0000070653, ensdarg0000076787, psmf1, dre-mir-126a, dre-mir-17a-2, dre-mir-92a-2, tardbp, tardbpl, c13h9orf72</i>	Knockout, insertion, chromosomal rearrangements	[81, 82, 203-206]
Frog (<i>Xenopus tropicalis</i>)		<i>tyr, six3</i>	Knockout	[207]
Pig (<i>Sus scrofa</i>)		<i>gdf8, p65</i>	Knockout, insertion	[208]
Mouse (<i>Mus musculus</i>)		<i>tet1, tet2, tet3, sry, uty, rosa26, hprt, egfp, th, rheb, uhvf2</i>	Knockout, insertion	[83, 144, 209, 210]
Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)		<i>dnmt1, dnmt3a, dnmt3b, tet1, tet2, tet3, mc3r, mc4r</i>	Knockout, insertion	[144, 145, 211]
Arabidopsis (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		<i>pds33, fls2, bri1, jaz1, gaj, chl, chl2, 5g13930</i>	Knockout, insertion	[87, 88, 149]
Tabacco (<i>Nicotiana benthamiana</i>)		<i>Pds</i>	Knockout, insertion	[88, 89]
Rice (<i>Oryza sativa</i>)		<i>ods, badh2, mrk2, 02g23823, roc5, spp, ysa, myb1, cao1, lazy1, sweet11, sweet14</i>	Knockout, insertion	[86, 150, 152]
Wheat (<i>Triticum aestivum</i>)		<i>Mlo</i>	Knockout	[86]

Příklady typů buněk a organismů, které byly geneticky modifikovány pomocí Cas9

Biology

Cell lines

HEK293
U2OS
K562

Model organisms

Mice
Rats
Fruit flies
Nematodes
Arabidopsis
Salamanders
Frogs
Monkeys

Biotechnology

Crop plants

Rice
Wheat
Sorghum
Tobacco

Fungi

Kluyveromyces
Chlamydomonas

Biomedicine

Organoids
hESCs
iPSCs

Examples of crops modified with CRISPR technology

CROPS	DESCRIPTION	REFERNCES
Corn	Targeted mutagenesis	Liang <i>et al.</i> 2014
Rice	Targeted mutagenesis	Belhaj <i>et al.</i> 2013
Sorghum	Targeted gene modification	Jiang <i>et al.</i> 2013b
Sweet orange	Targeted genome editing	Jia and Wang 2014
Tobacco	Targeted mutagenesis	Belhaj <i>et al.</i> 2013
Wheat	Targeted mutagenesis	Upadhyay <i>et al.</i> 2013, Yanpeng <i>et al.</i> 2014
Potato	Targeted mutagenesis	Shaohui <i>et al.</i> , 2015
Soybean	Gene editing	Yupeng <i>et al.</i> , 2015

EDITING OUT DISEASES: CRISPR Therapy

Publications demonstrating use of CRISPR-Cas9 for targeting diseases

Disease	Summary	Reference
Cataracts	Rescue of a dominant mutation in the Cryge gene that causes cataracts	Wu <i>et al.</i> , 2013
Cystic fibrosis	Correction of the CFTR locus by HDR in cultured intestinal stem cells from patients with cystic fibrosis	Schwank <i>et al.</i> , 2013
β -thalassemia	Correction of the human hemoglobin beta (HBB) gene in induced pluripotent stem cells from thalassemia patients using CRISPR technology	Xie <i>et al.</i> , 2014
HPV-associated cervical cancer	Targeting of promoters of human papillomavirus oncogenes; inhibited tumorigenesis	Zhen <i>et al.</i> , 2014
Hereditary tyrosinemia type I	Correction of the Fah mutation in hepatocytes of a mouse model of hereditary tyrosinemia	Yin <i>et al.</i> , 2014
HIV	Generation of homozygous CCR5 deletion mutations in iPSCs; proposed approach toward a functional cure of HIV-1 infection. Targeting of LTR sequences in the HIV-1 genome; inactivated viral gene expression and replication in latently infected cells and prevented new HIV-1 infection	Yi <i>et al.</i> , 2014
Malaria	High (50–100%) gene disruption of the <i>Plasmodium falciparum</i> genome. Potential to generate transgenic parasites to prevent malaria	Hu <i>et al.</i> , 2014



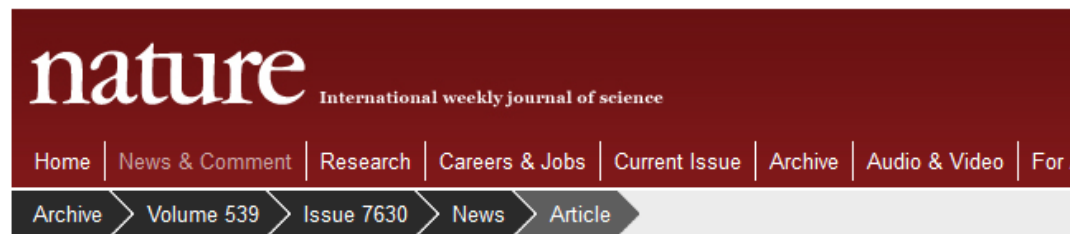
NATURE | NEWS

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



NATURE | NEWS

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