

Editace genomů

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

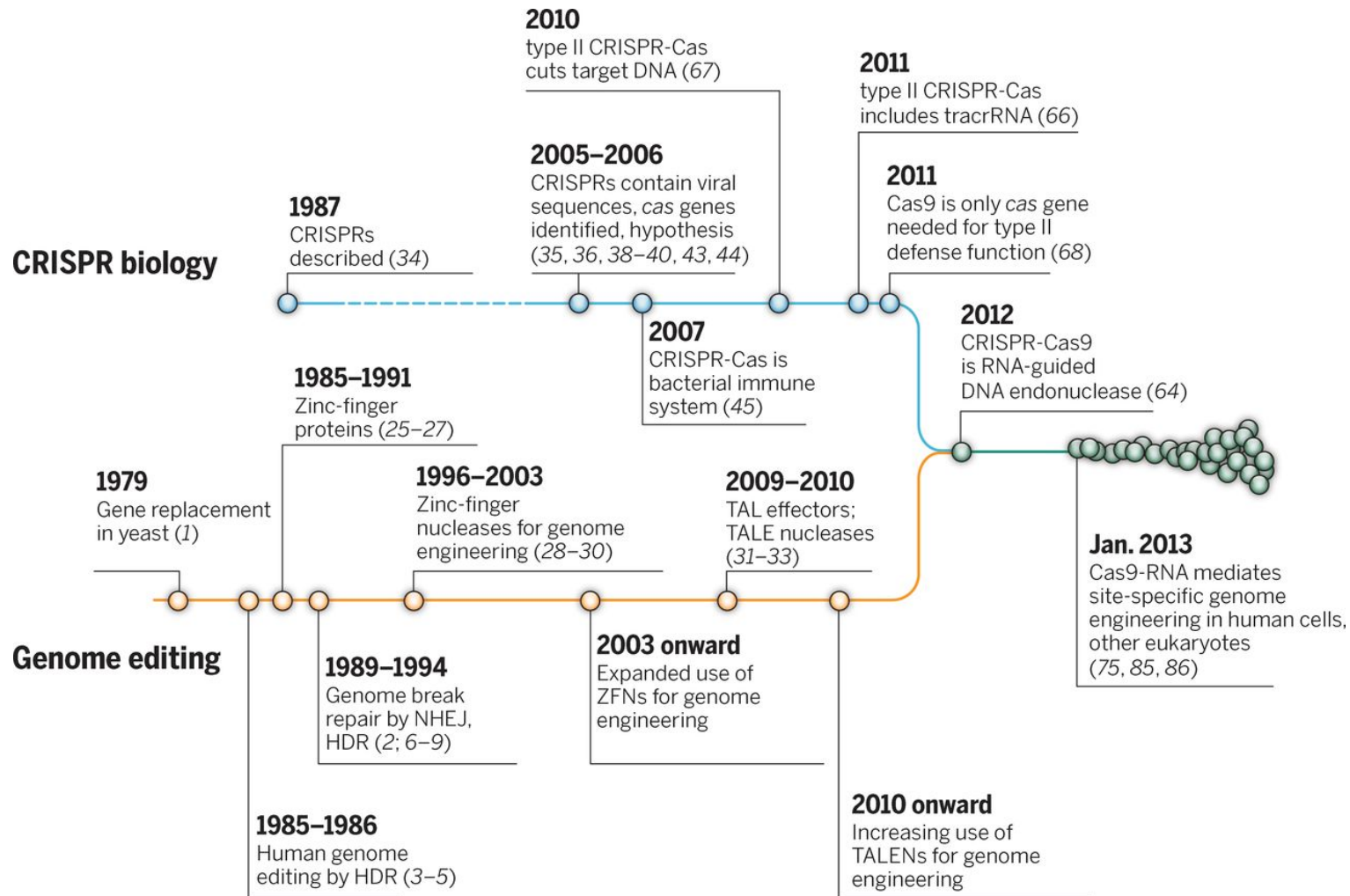
Postupy genového inženýrství, při nichž se do vybraného místa v cílové DNA pomocí uměle připravených nukleáz (tzv. molekulárních nůžek) vnáší inserce, delece a nebo se stávající sekvence nahrazuje za jiné (náhrada alel).

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



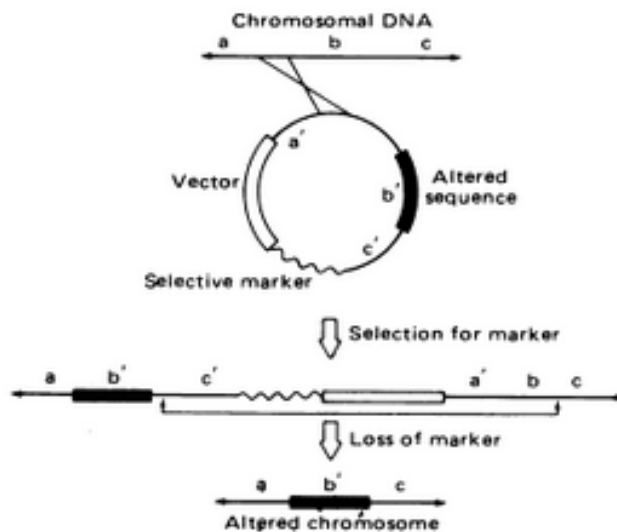
Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro*

(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

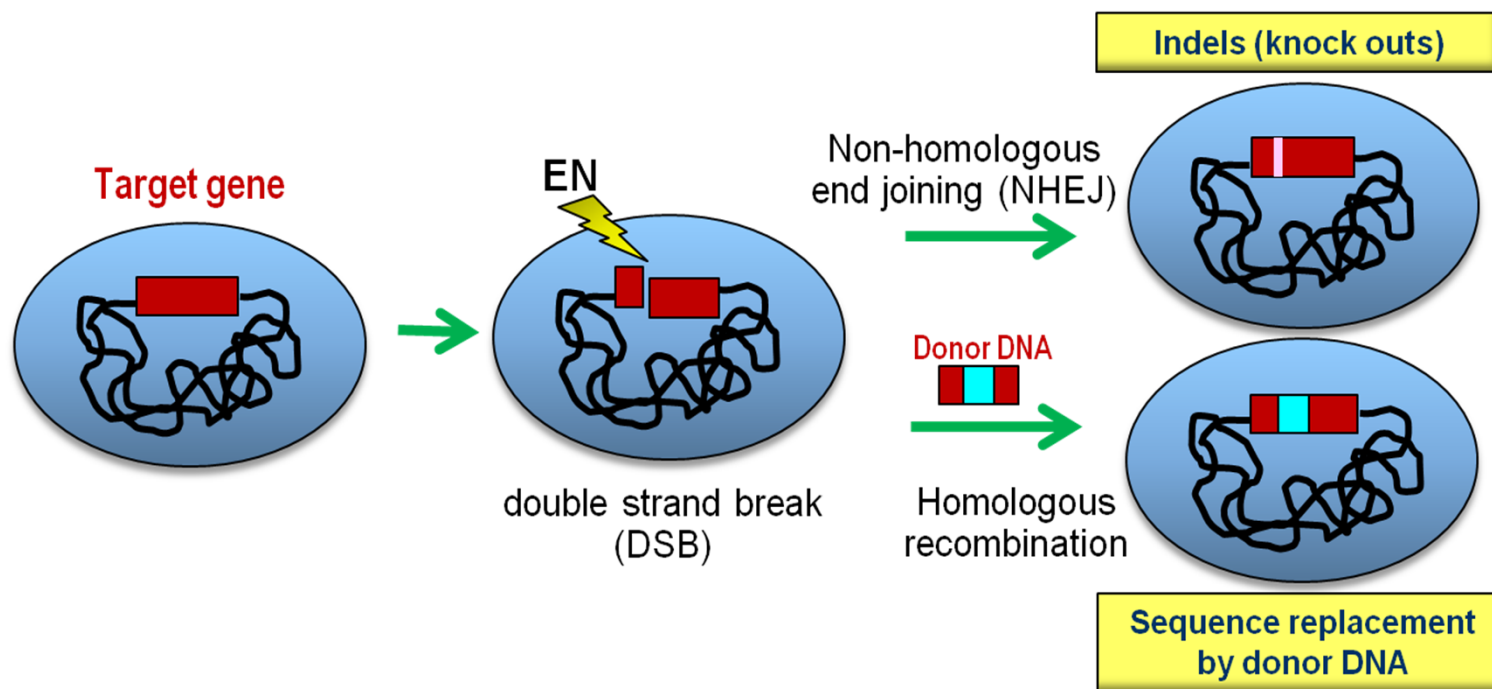
TALEN = Transcription-Activator Like Effector Nuclease

ZFN = Zinc-Finger Nuclease

(RGENs) = RNA-guided engineered nucleases

- programované nukleázy (jejich cíl je řízen molekulou RNA)

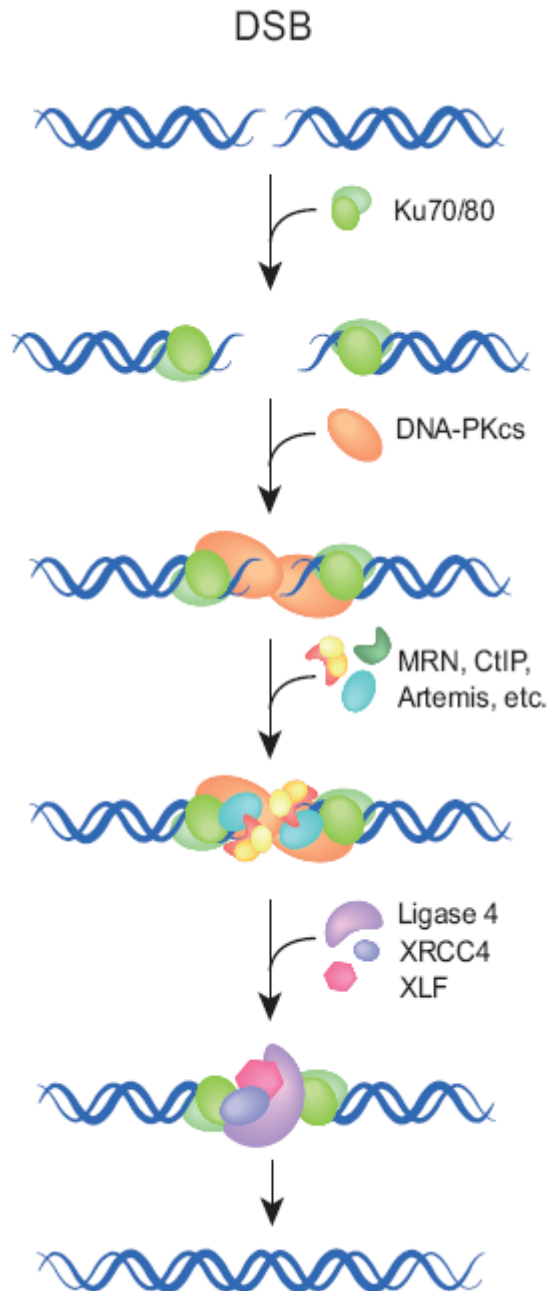
Procesy probíhající po vytvoření DSB umělými nukleázami



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

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

- sekvence delší než 20 bp



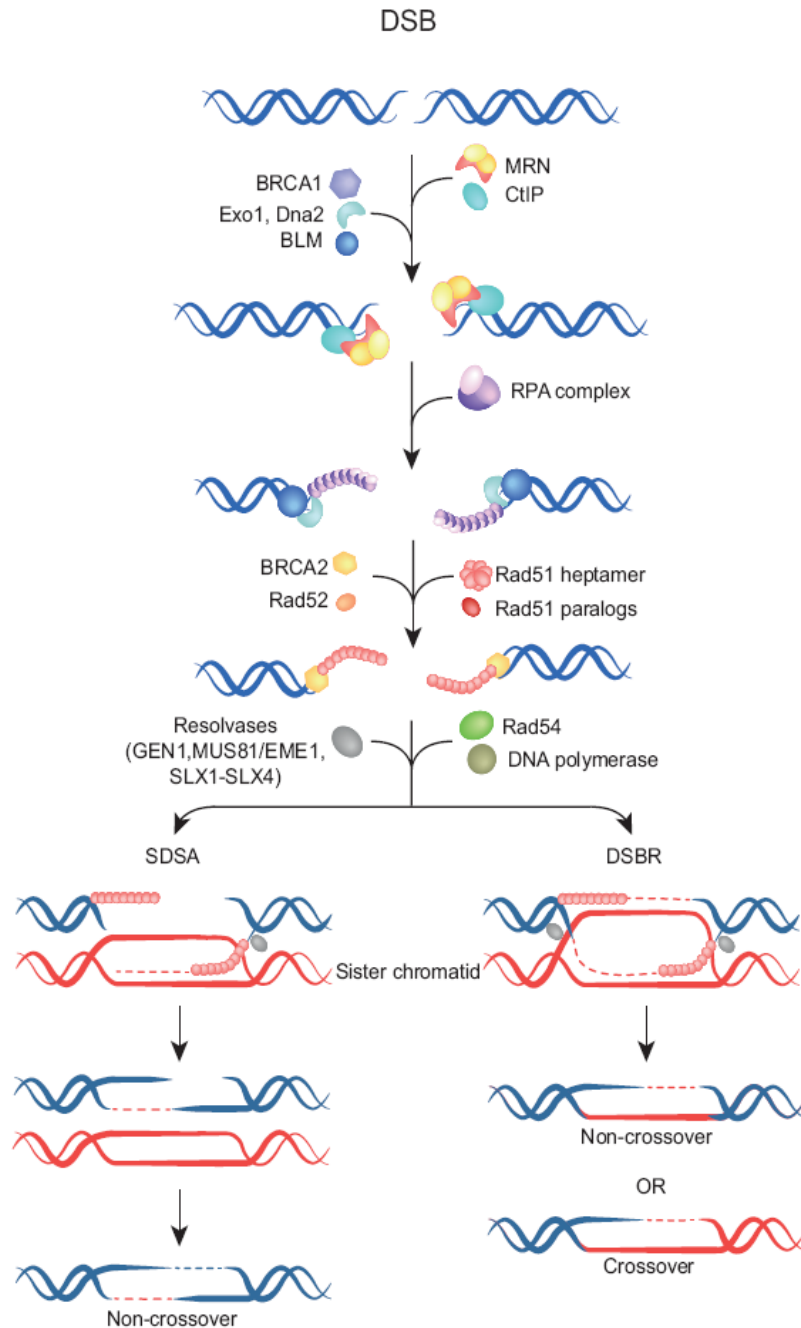
klasická NHEJ

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

- existují i **alternativní NHEJ**

př. microhomology-mediated end joining (MMEJ)

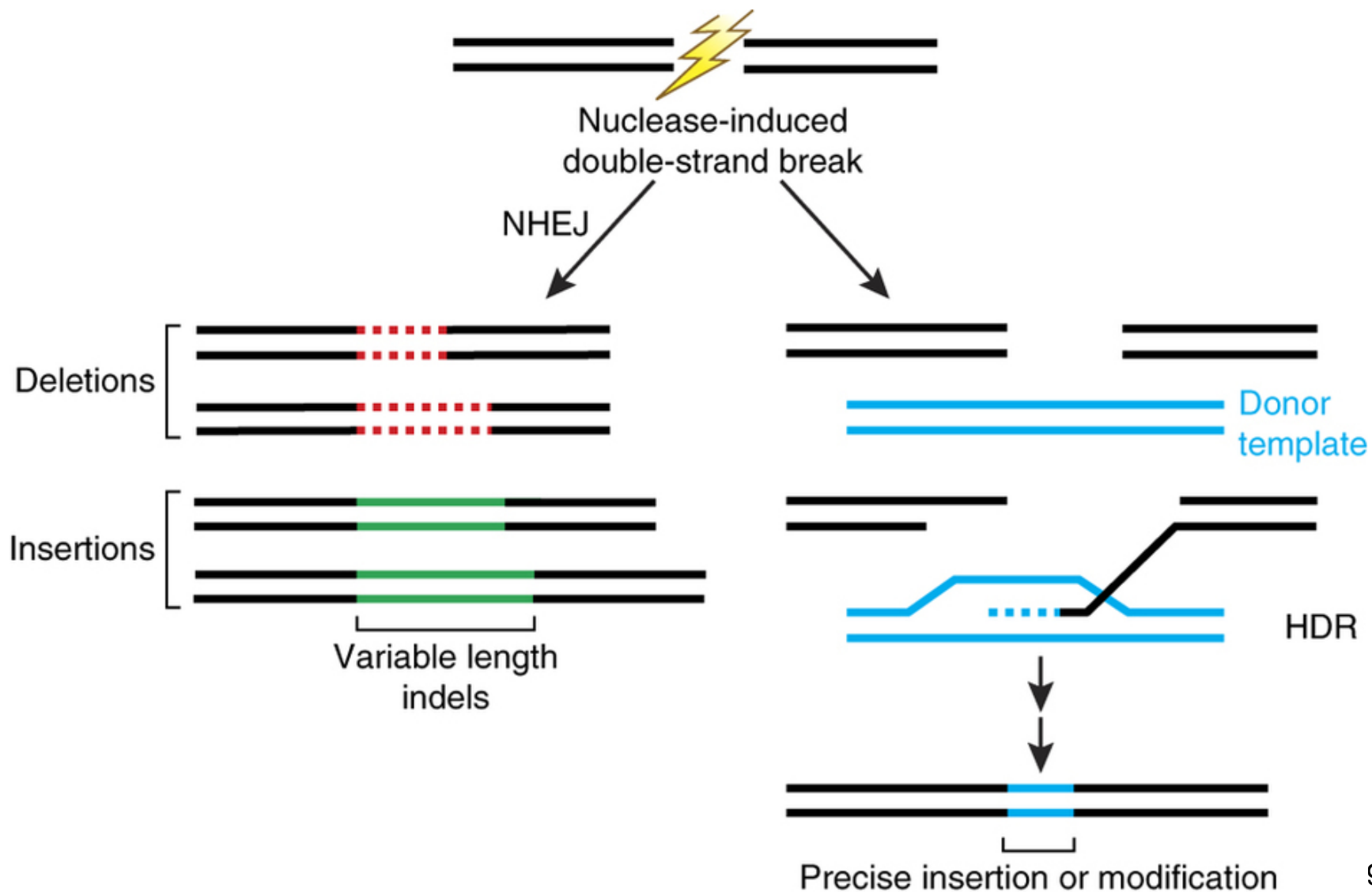
- rozsáhlé inserce, delece, fúze, ...

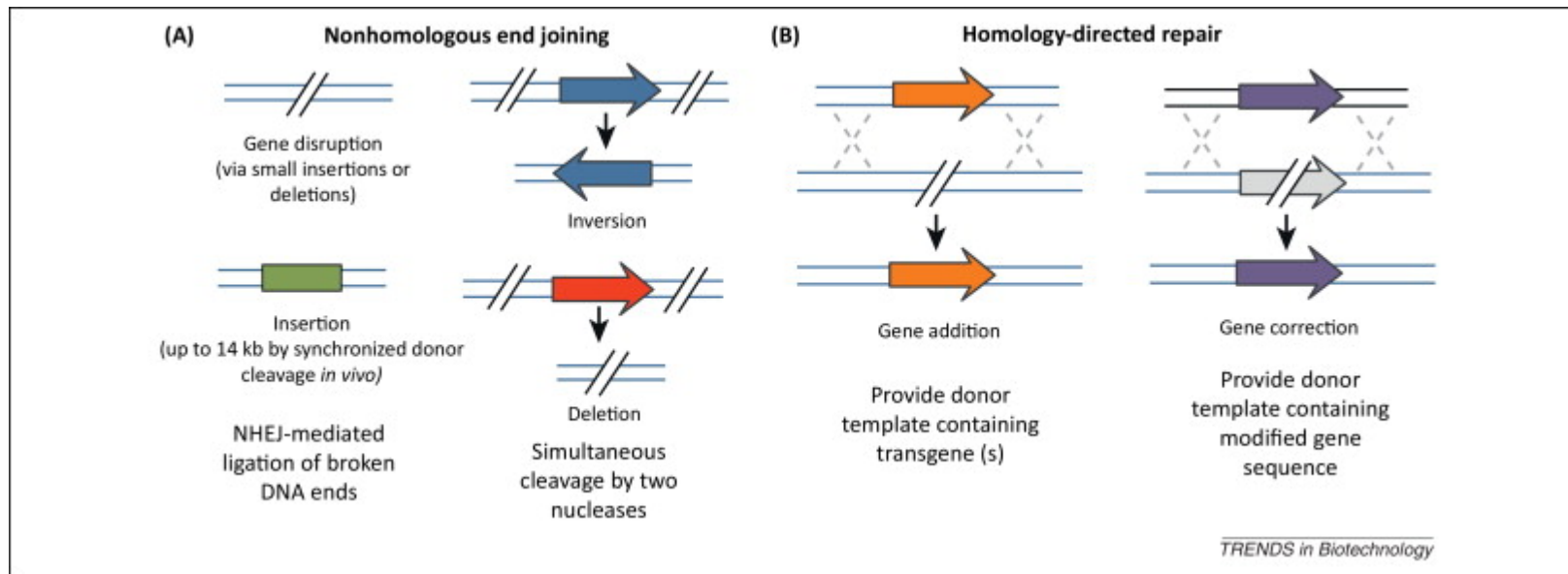


HDR

- 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.

Mutagenezí 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 specifity 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 archaea: *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**

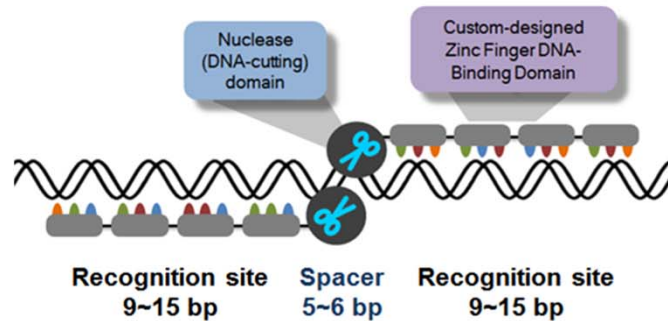
NUKLEÁZA FokI

Enzym **FokI** přirozeně se vyskytující u *Flavobacterium okeanokoites* 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:

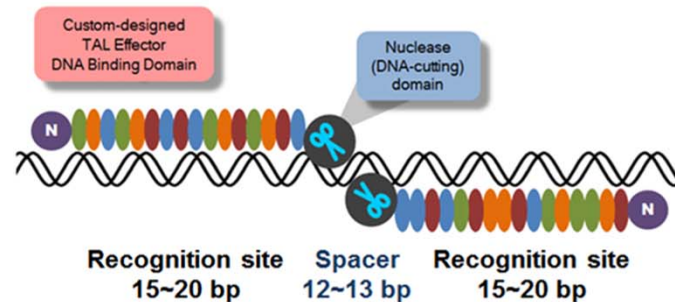
- Rozpoznávaná sekvence je oddělena od sekvence, která je štěpena – to **umožňuje izolovat doménu enzymu, která štěpí sekvenčně nespecificky**. Tato doména pak může být spojena s doménou zodpovědnou za rozpoznání cílové sekvence.
- **FokI vyžaduje pro svou nukleázovou činnost dimerizaci – zvýší se tím 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



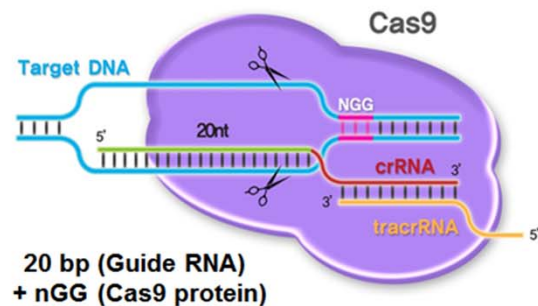
Zinc Finger Nucleases (ZFNs)

- 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

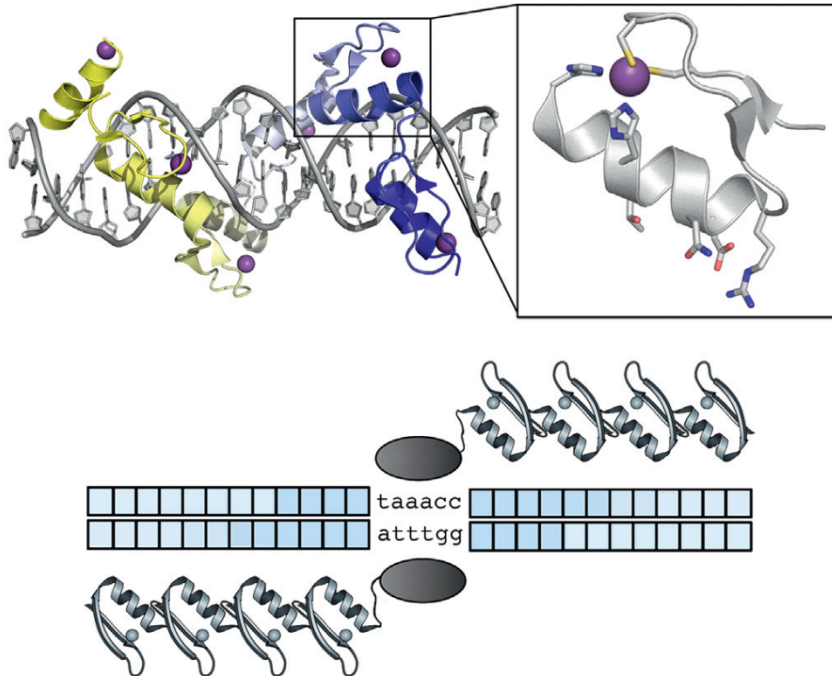


RNA-Guided Endonucleases (RGENs)

- 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.

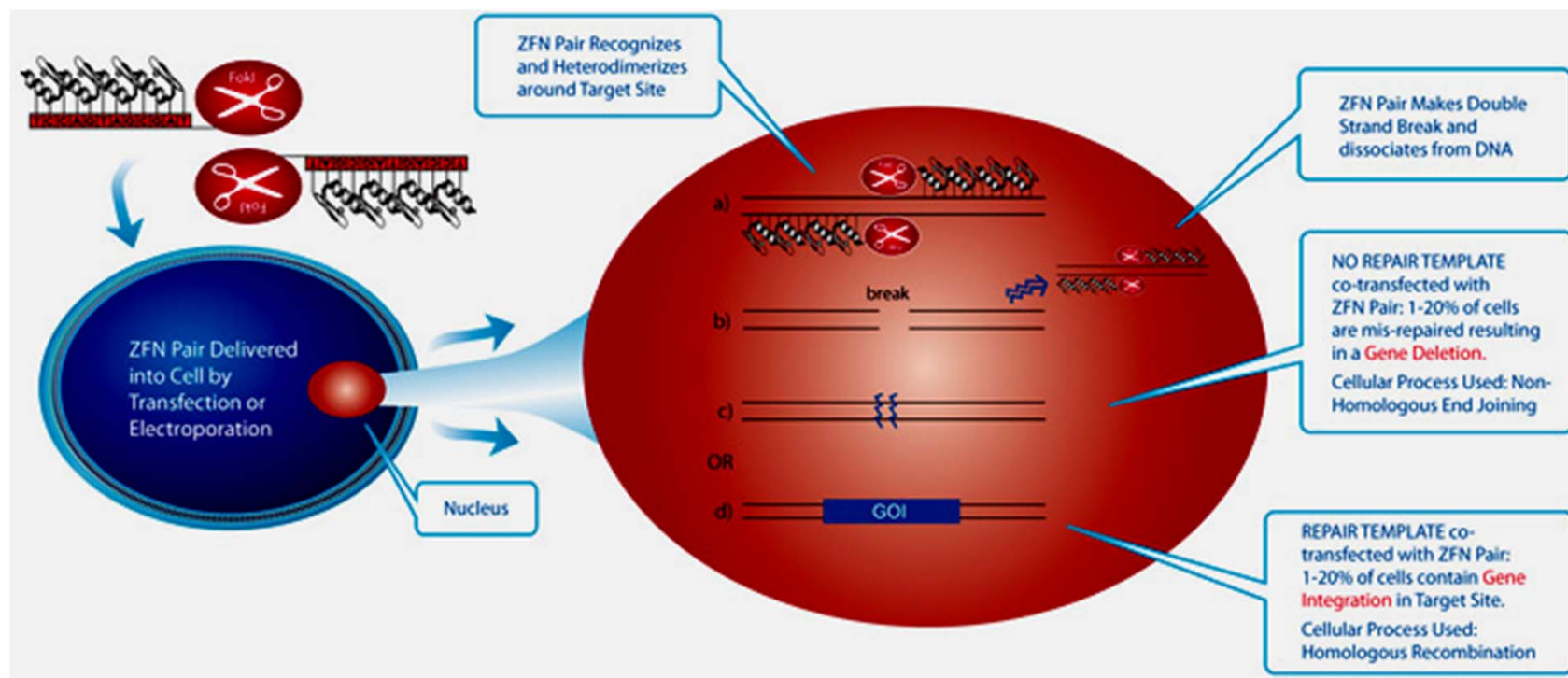


Dimer Zinc-finger nukleázy (ZFN) navázaný na DNA. Cílová místa pro vazbu ZFN sestávají ze dvou vazebných míst pro zinkové prsty, která jsou oddělena 5-7 bp dlouhou sekvencí, která je štěpena štěpící doménou FokI.

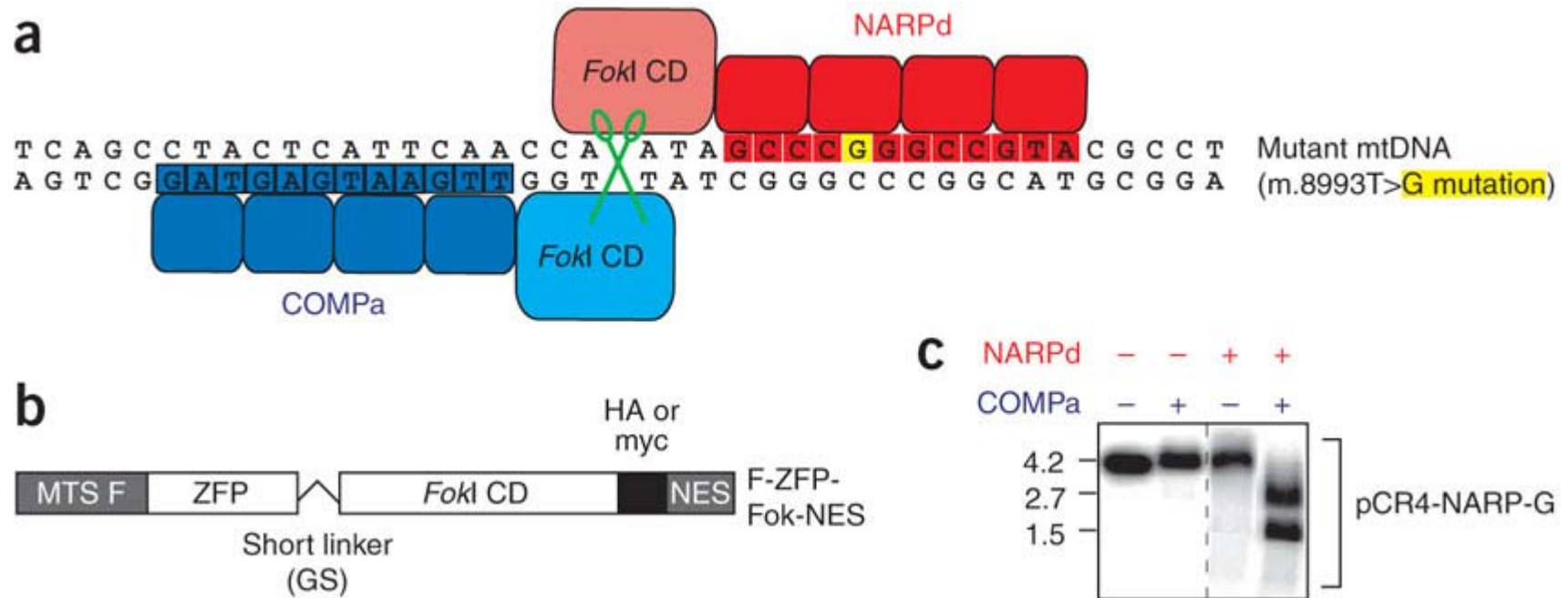
Editace genomů pomocí ZFN

- produkovány již otestované firmami:

Sigma-Aldrich
Sangamo BioSciences



- transfekovány obvykle v podobě RNA (či DNA na vektoru)



(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 effector (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, ...)

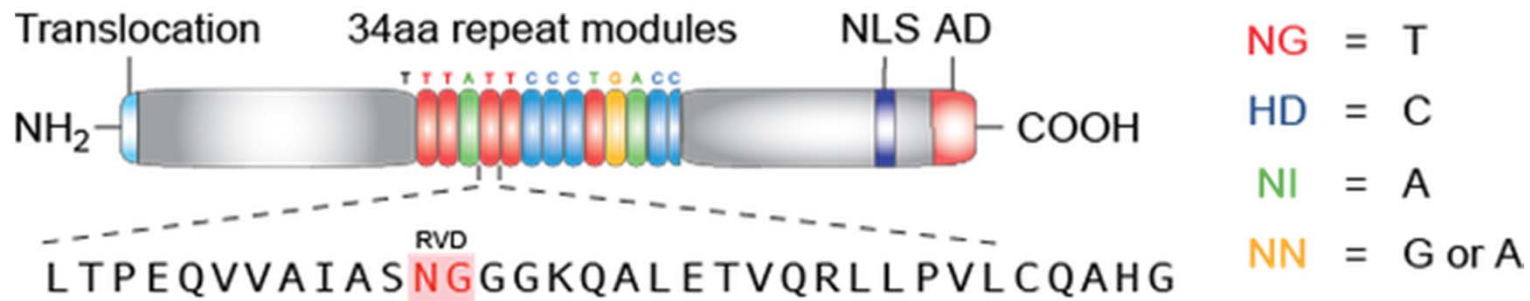
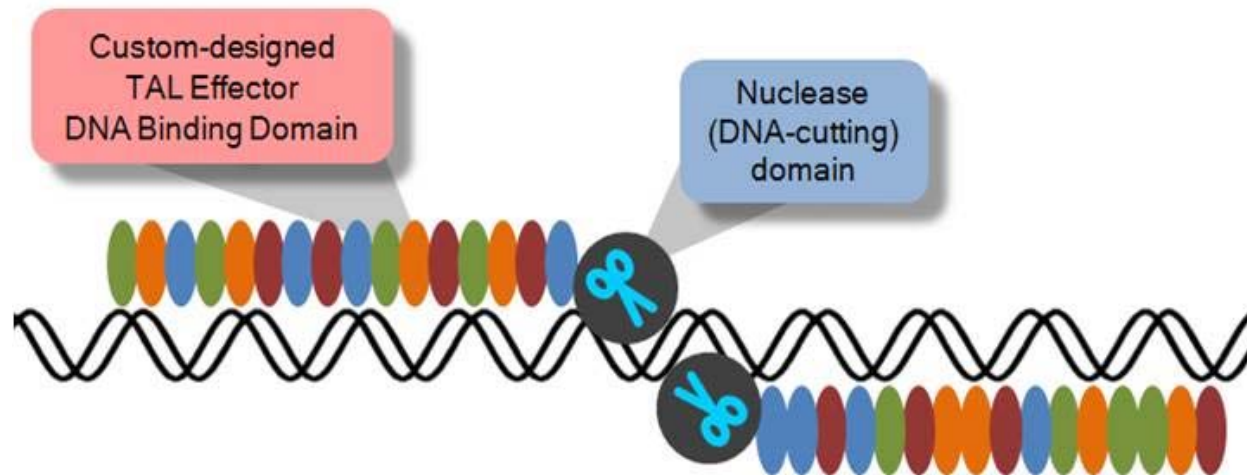
TAL obsahují v centrální části opakující se sekvence aminokyselin, které jsou dlouhé obvykle 34 AA.

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.

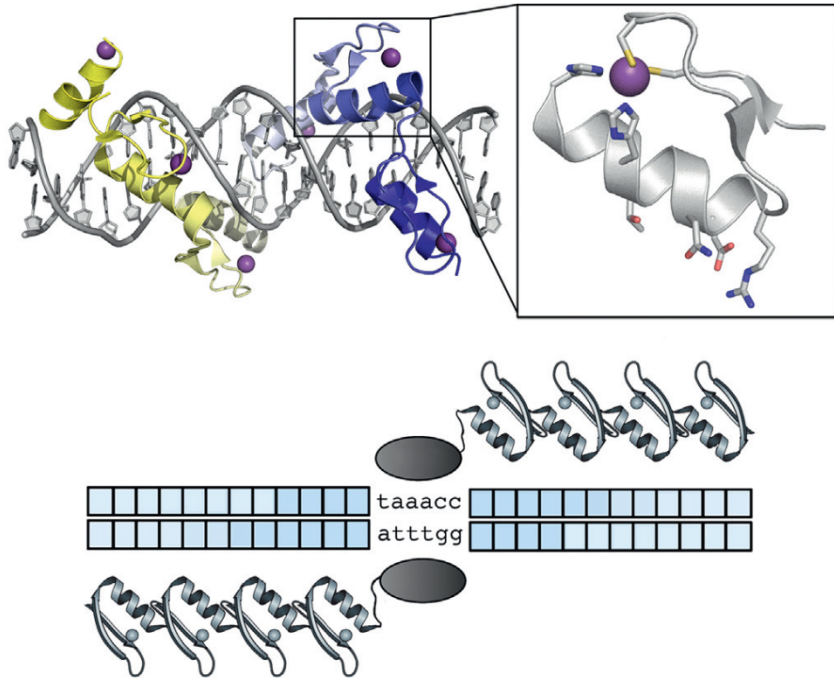
Engineered TAL effectors lze fúzovat se štěpicími doménami nukleáz (FokI) a vytvářet tak TAL Effector Nucleases (**TALENs**).

Struktura TALEN



Struktura proteinu obsahujícího zinkové prsty (zinc finger)

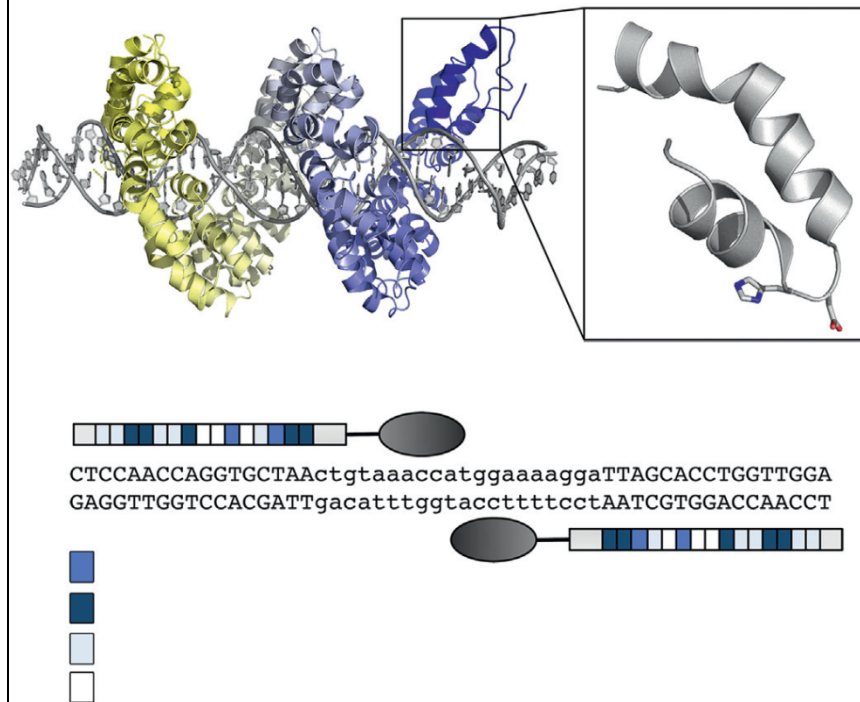
Každý zinkový prst sestává asi ze 30 AA v konformaci $\beta\beta\alpha$. Každý prst kontaktuje 3 nebo 4 bp ve velkém žlábkku DNA.



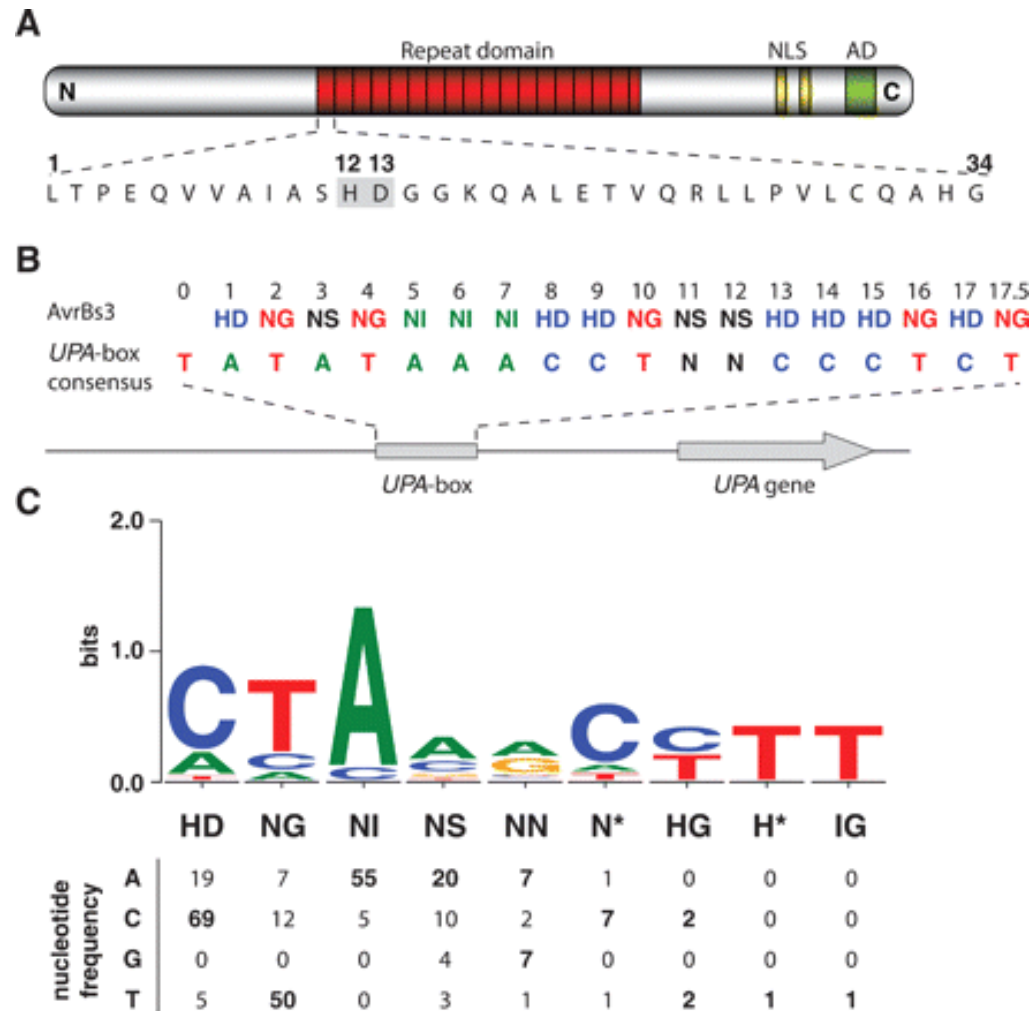
Dimer Zinc-finger nukleázy (ZNF) navázaný na DNA. Cílová místa pro vazbu ZNF sestávají ze dvou vazebných míst pro zinkové prsty, která jsou oddělena 5-7 bp dlouhou sekvencí, která je rozpoznávána štěpící doménou FokI.

Protein TALE v komplexu s cílovou DNA.

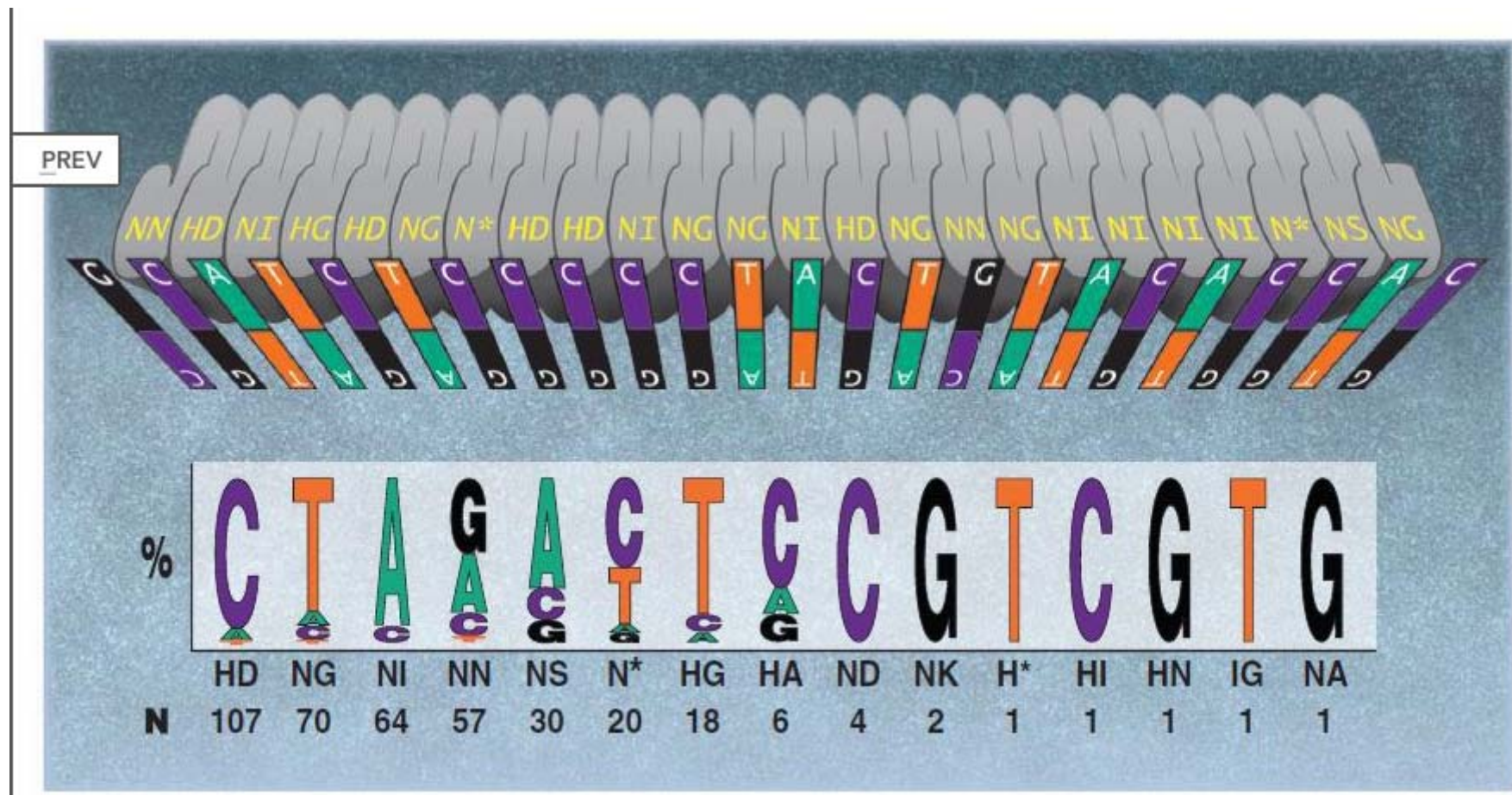
Jednotlivé repetice proteinu TALE obsahují 33-35 AA, které rozpoznávají jednotlivé páry bází prostřednictvím dvou hypervariabilních zbytků aa (repeat-variable diresidues – RVDs)



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.

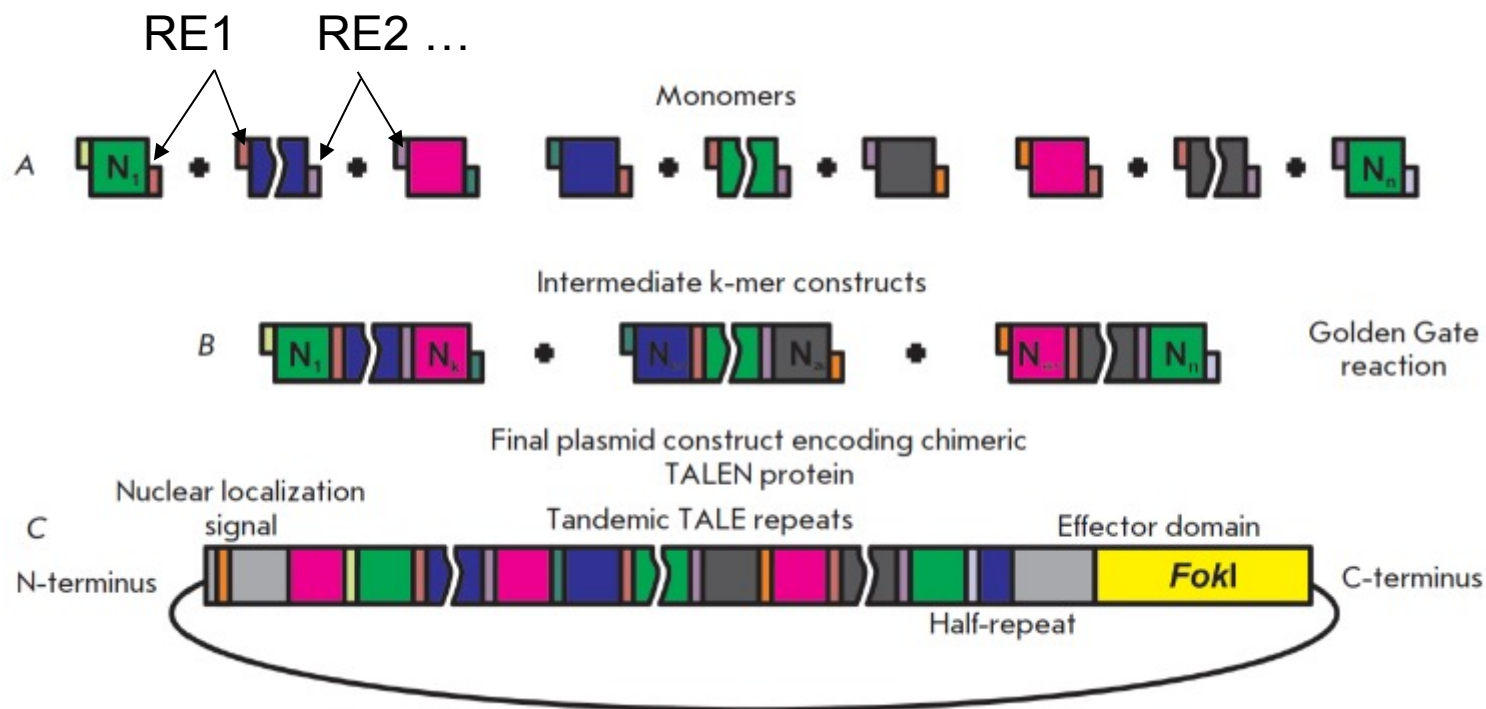


Model for DNA-target specificity of TAL effectors. **(A)** TAL effectors contain central tandem repeats, NLSs, and an AD. Shown is the amino acid sequence of the first repeat of AvrBs3. Hypervariable amino acids 12 and 13 are shaded in gray. **(B)** Hypervariable amino acids at position 12 and 13 of 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/>)

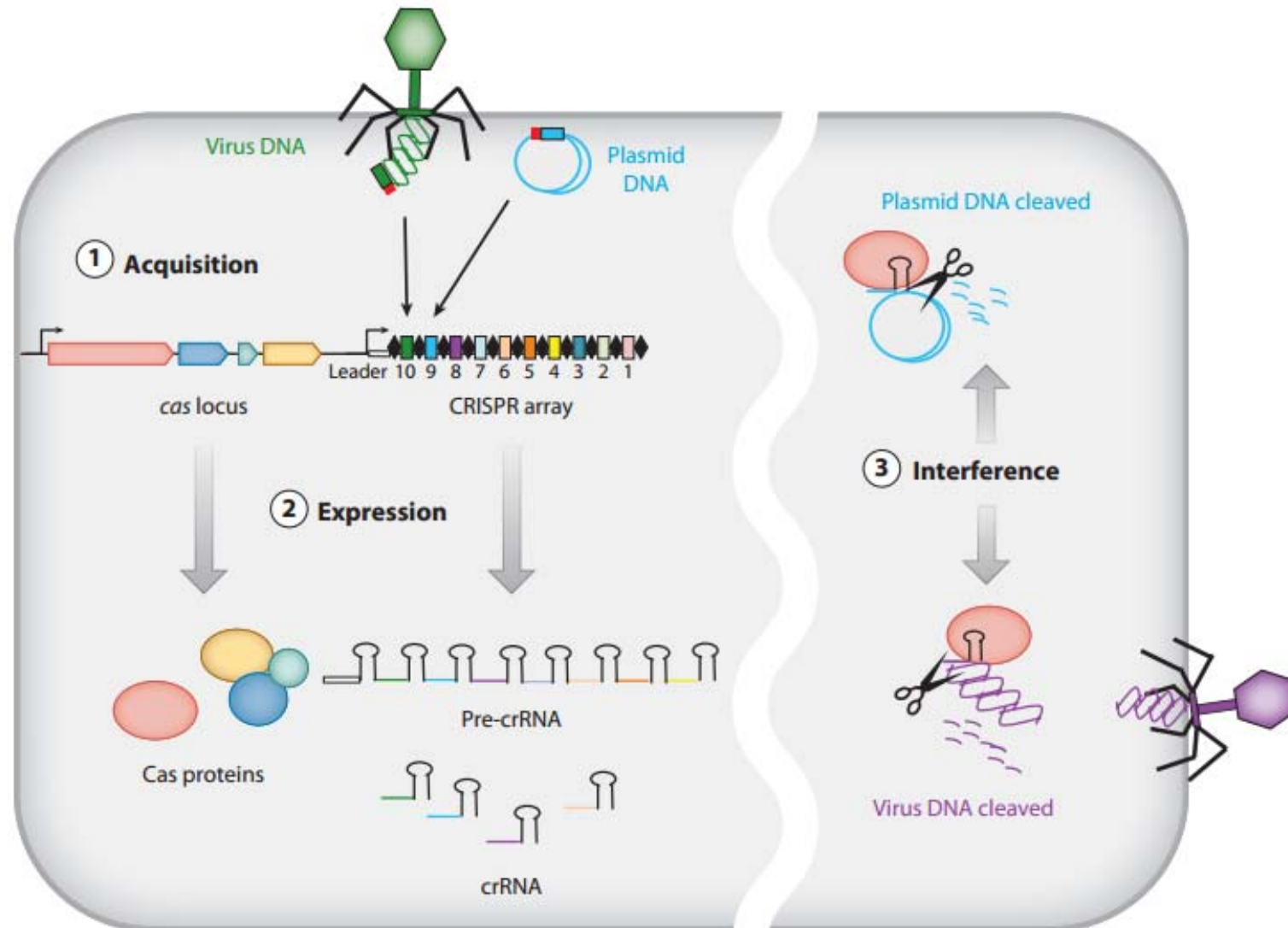
K dispozici jsou knihovny monomerů, dimerů, trimerů a tetramerů

Umělé nukleázy

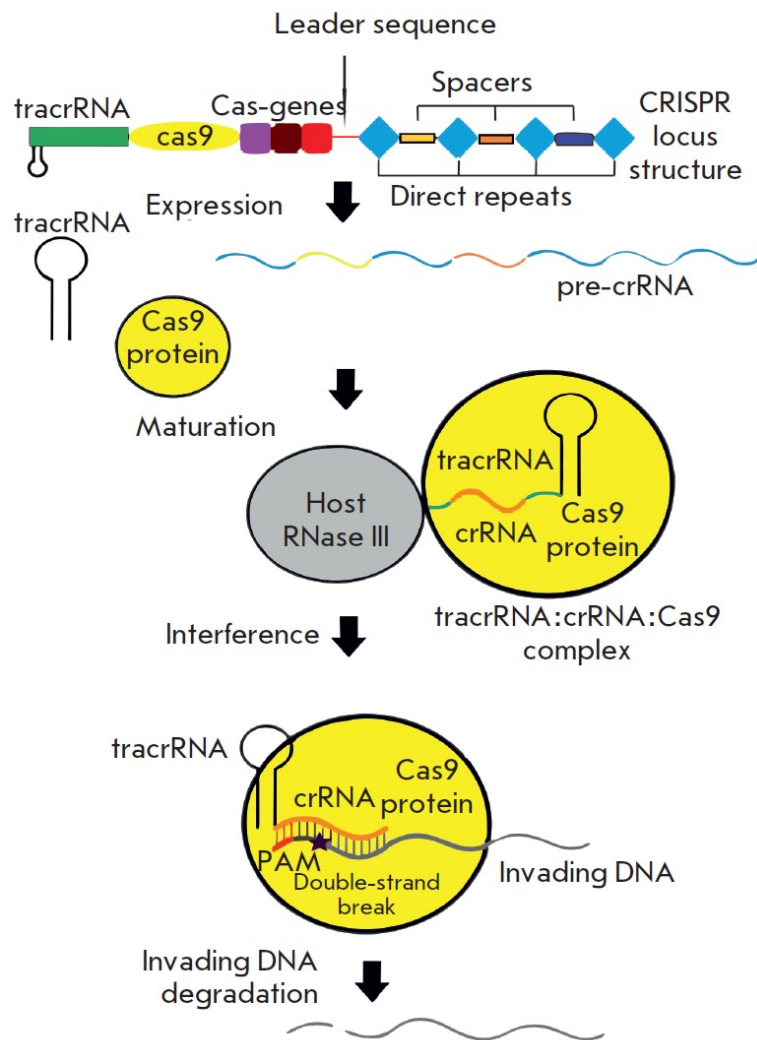
- odvozené od aktivátoru transkripce + nukleáz
 - vazba na specifické místo v genomu
 - do buněk se obvykle dopravují na expresních vektorech
 - lze je využít pro tvorbu – bodových mutací ...
 - delecí
 - inzercí
 - inverzí
 - duplikací
 - translokací
- ... ale také pro značení mRNA
- podstatou je tvorba 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



systém pravidelně uspořádaných mezerníků mezi repeticemi CRISPR lokusu

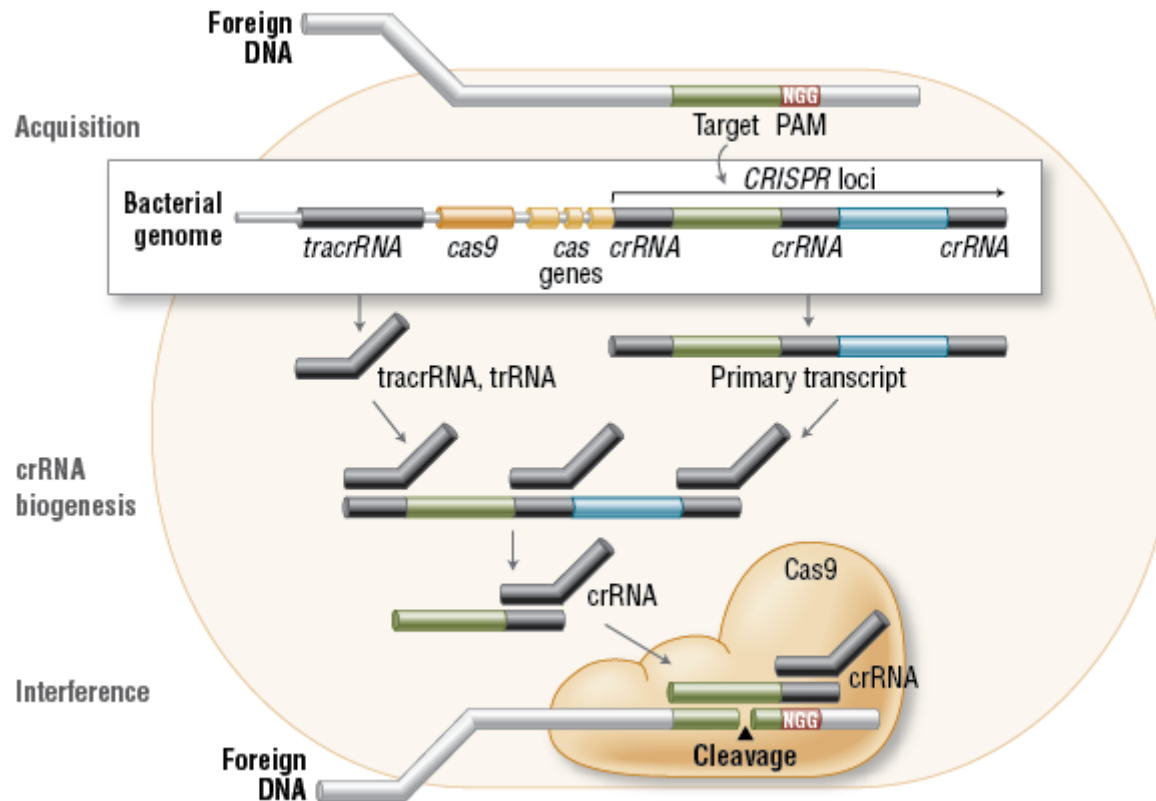
cizorodé DNA rozpoznány proteiny Cas (CRISPR associated proteins) a začleněny do CRISPR lokusu

lokus má až několik stovek mezerníků, nový mezerník, který je převzat z infikující molekuly, je začleněn jako první (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 transaktivační (transaktivující) tracrRNA a následně s některým z CAS proteinů

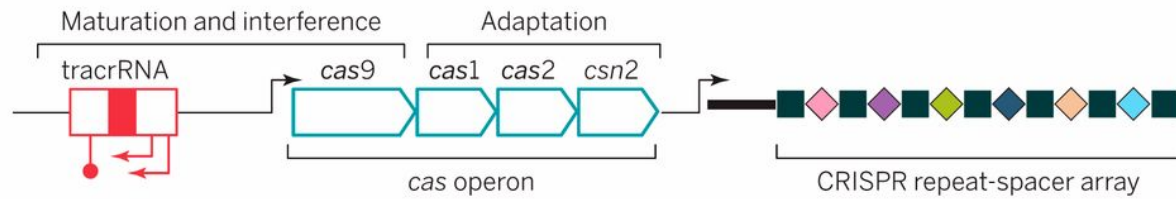
tento komplex rozpozná a štěpí cizorodou DNA



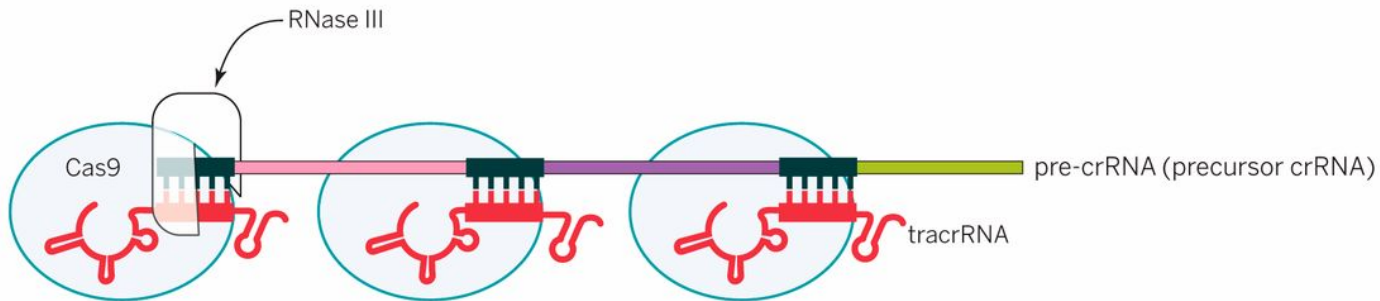
3 hlavní složky systému – crRNA, tracrRNA, Cas proteiny (1-2)

- 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.

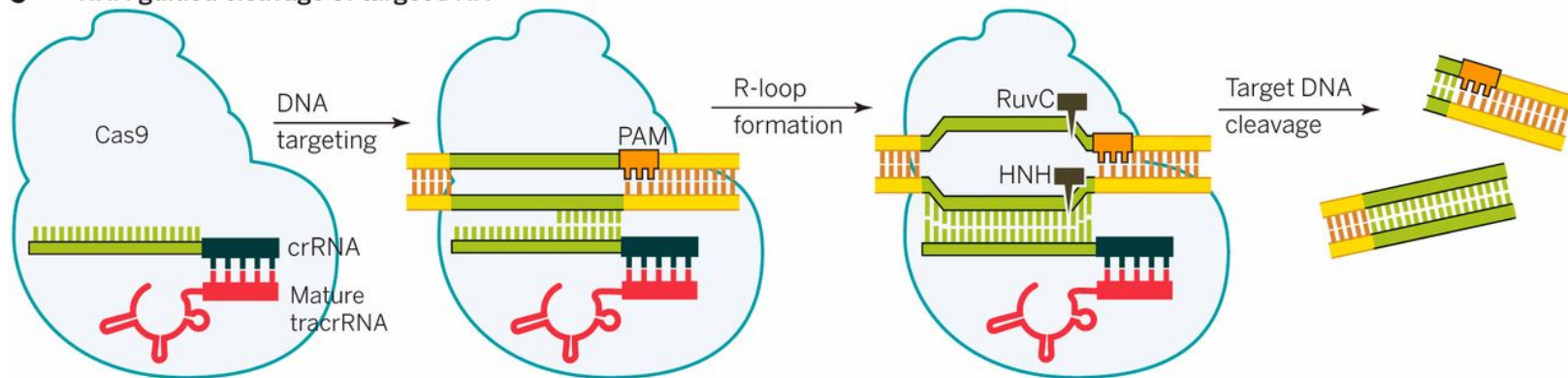
A Genomic CRISPR locus



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

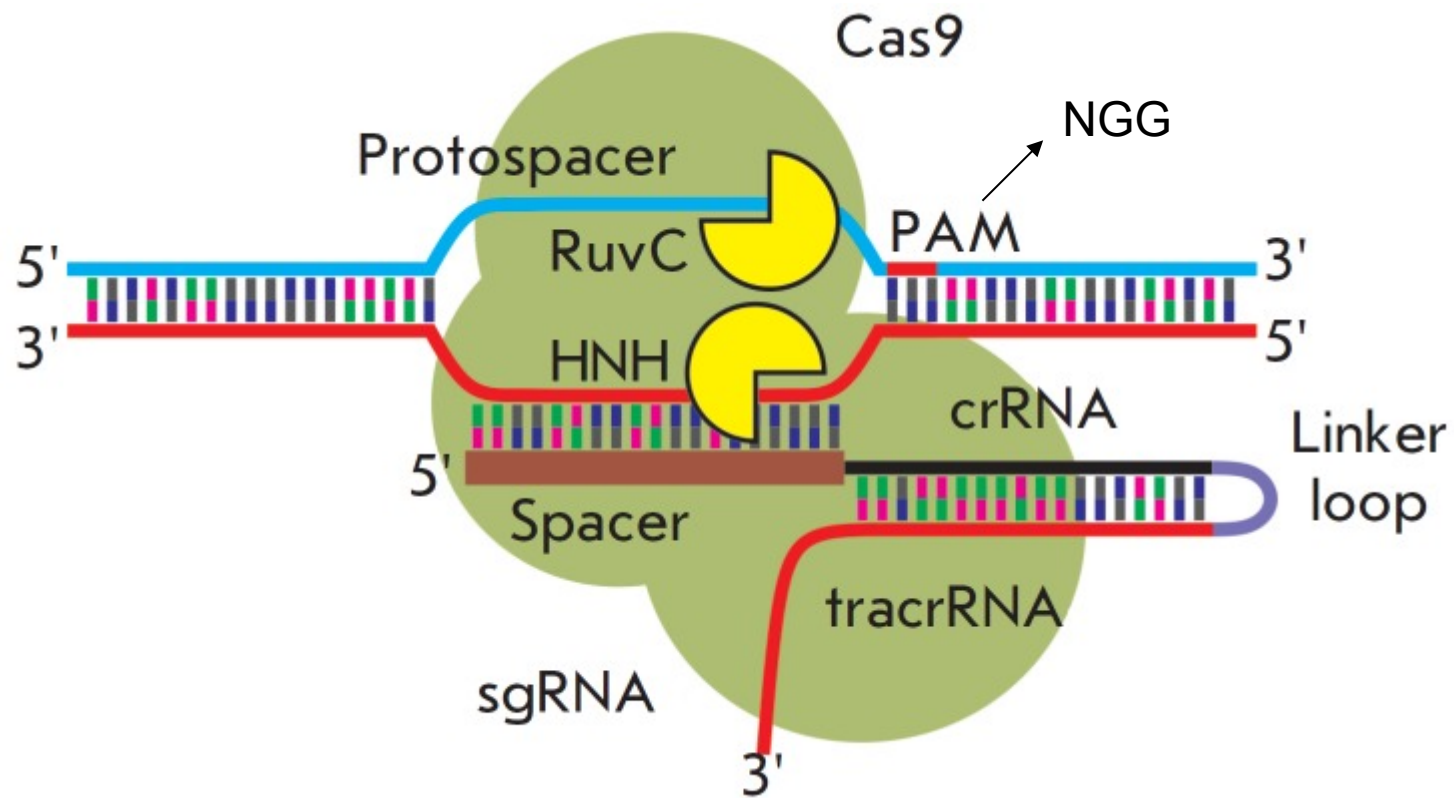


C RNA-guided cleavage of target DNA



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

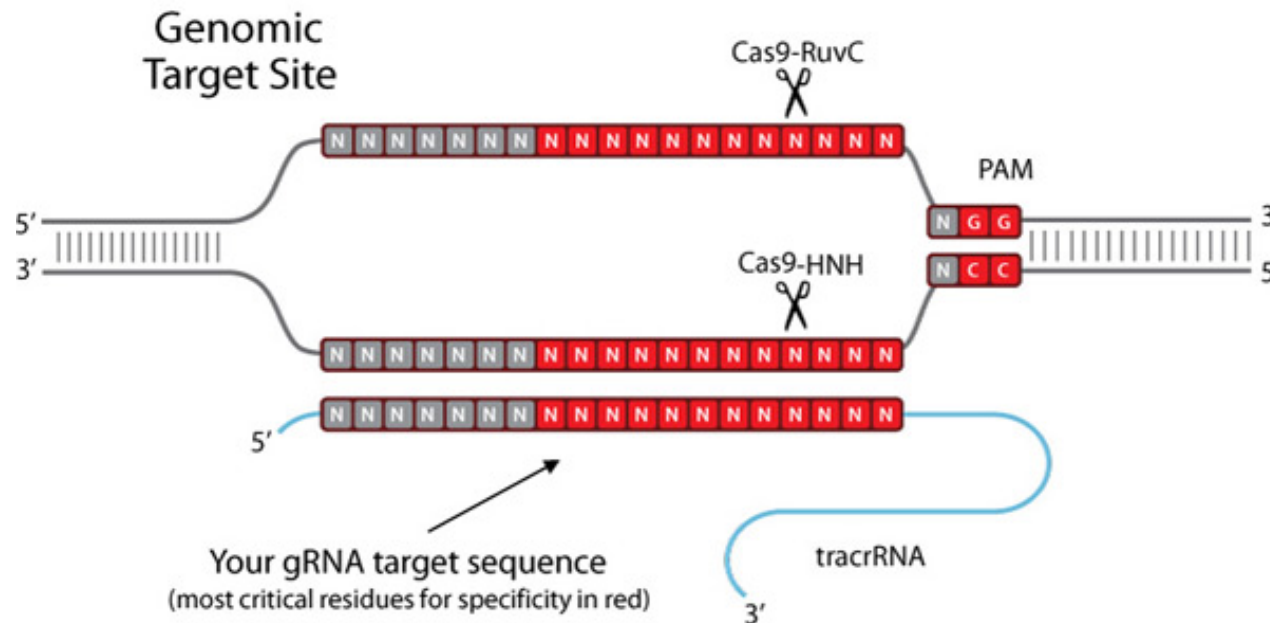
sgRNA je vytvořena spojením crRNA a tracrRNA.



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



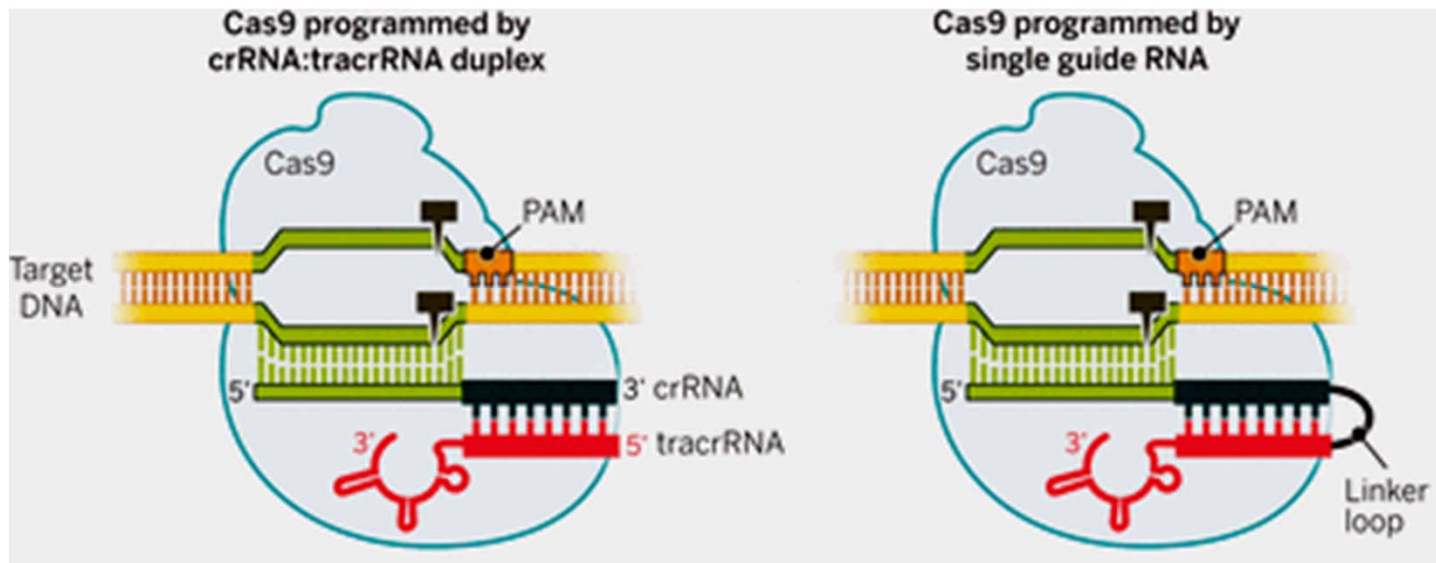
- systémy jiných bakterií nebo upravené systémy – NAG, YG, TTTN, YTN, ...

Bacterial species	PAM sequence	References
Streptococcus pyogenes (Sp)	NGG	(Jinek et al., 2012)
S. solfataricus I-A1	CCN	(Manica et al., 2011)
S. solfataricus I-A2	TCN	(Gudbergdottir et al., 2011; Lillestøl et al., 2009)
Neisseria meningitidis (Nm)	NNNGATT	(Hou et al., 2013)
Streptococcus thermophiles (St) Type II	NGGNG NNAGAAW	(Deveau et al., 2008; Horvath and Barrangou, 2010)
Streptococcus mutan (Sm)	NGG or NAAR	(van der Ploeg, 2009)

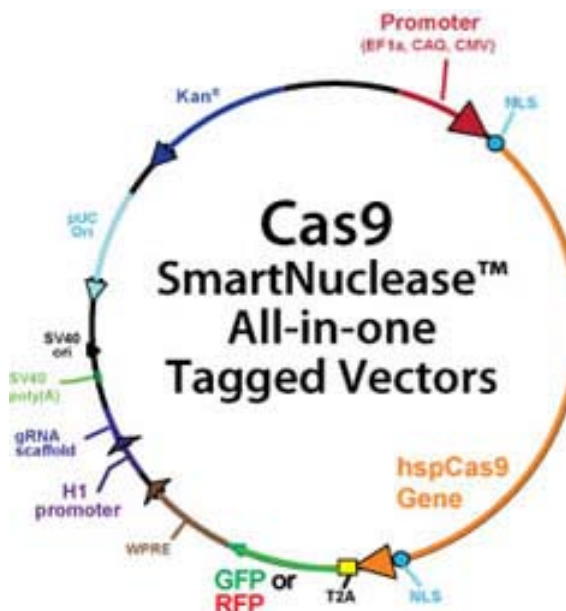
SpCas9 variant	Mutations (relative to SpCas9)	PAM sequence
D1135E variant	D1135E	NGG
VQR variant	D1135V, R1335Q and T1337R	NGAN or NGNG
EQR variant	D1135E, R1335Q and T1337R	NGAG
VRER variant	D1135V, G1218R, R1335E and T1337R	NGCG

Cas9 species	PAM sequence (5' to 3')
<i>Streptococcus pyogenes (Sp)</i>	NGG
<i>Staphylococcus aureus (Sa)</i>	NGRRT or NGRRN
<i>Neisseria meningitidis (Nm or Nme)</i>	NNNNGATT
<i>Campylobacter jejuni (Cj)</i>	NNNNRYAC
<i>Streptococcus thermophilus (St)</i>	NNAGAAW
<i>Treponema denticola (Td)</i>	NAAAAC
~20 additional Cas9 species	PAM sequence may not be characterized

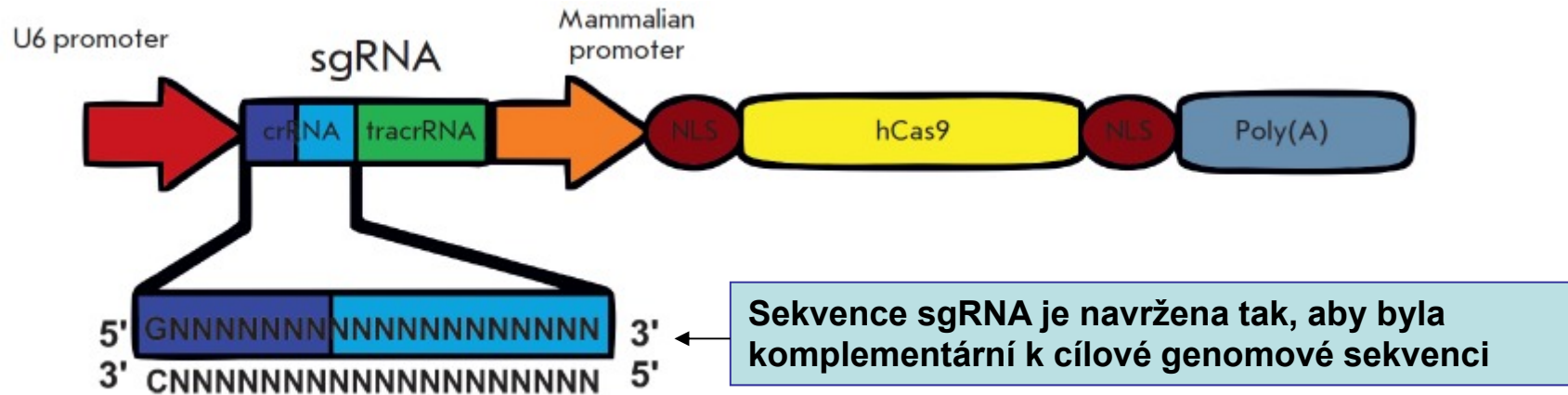
Srovnání struktury crRNA:tracrRNA a sgRNA



- 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.

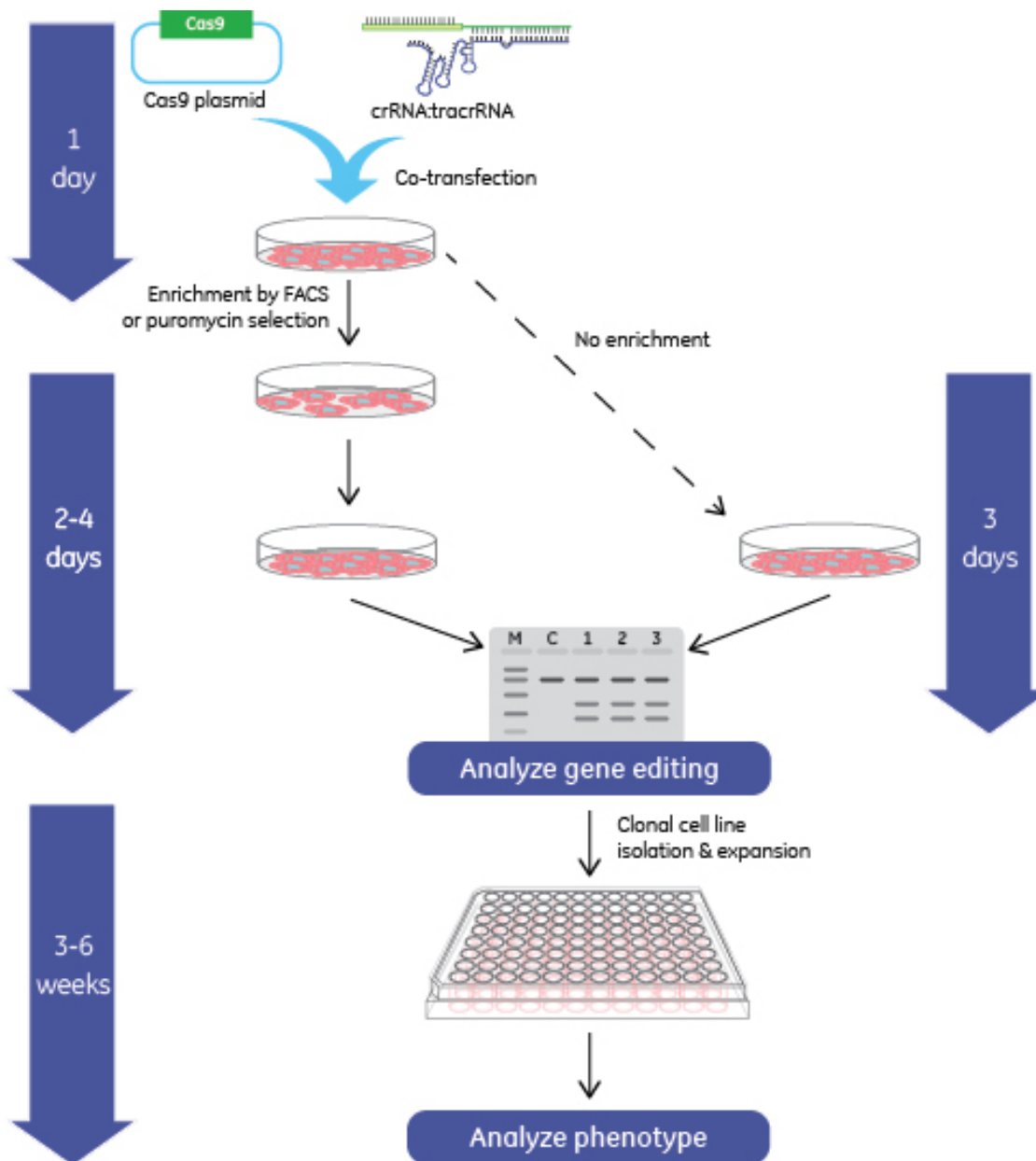
PAM není součástí klonované sekvence

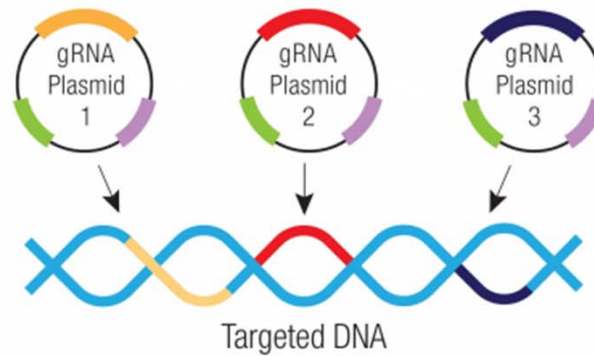
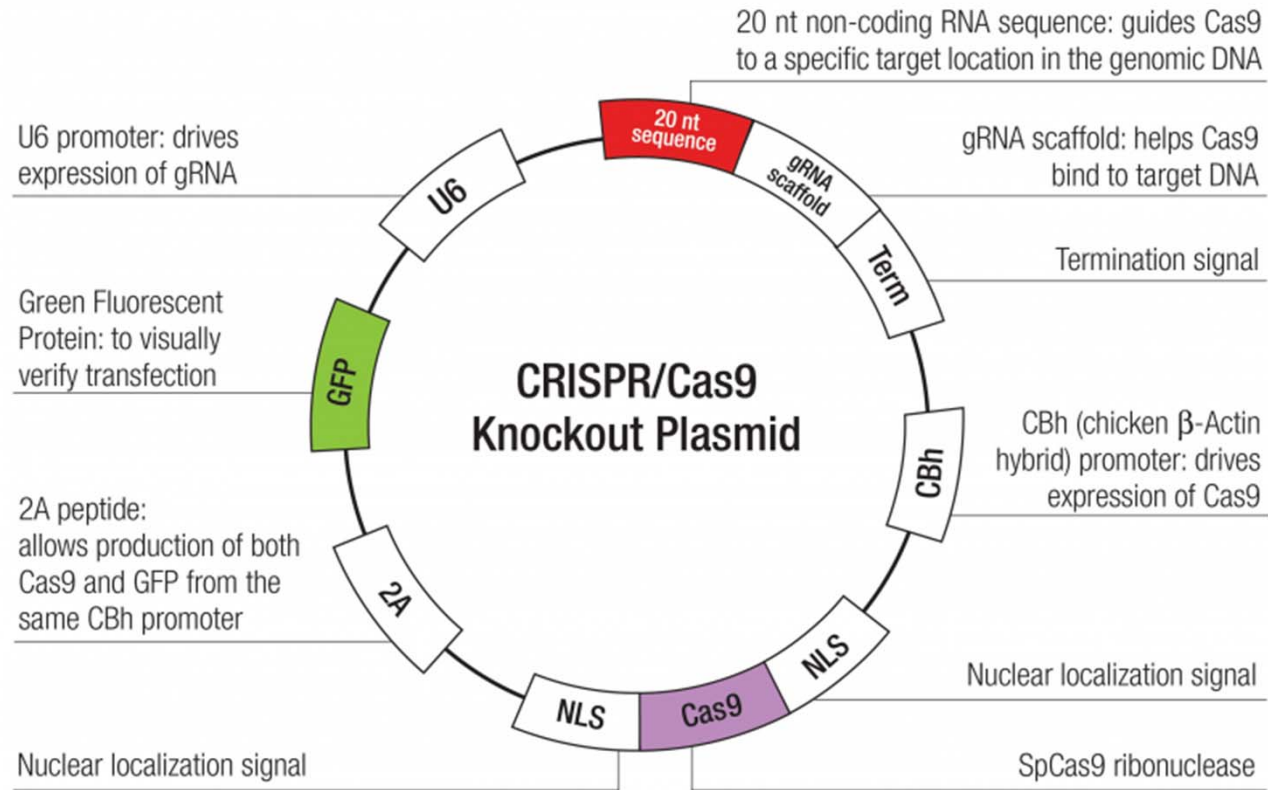
- pro design lze využít dostupný software

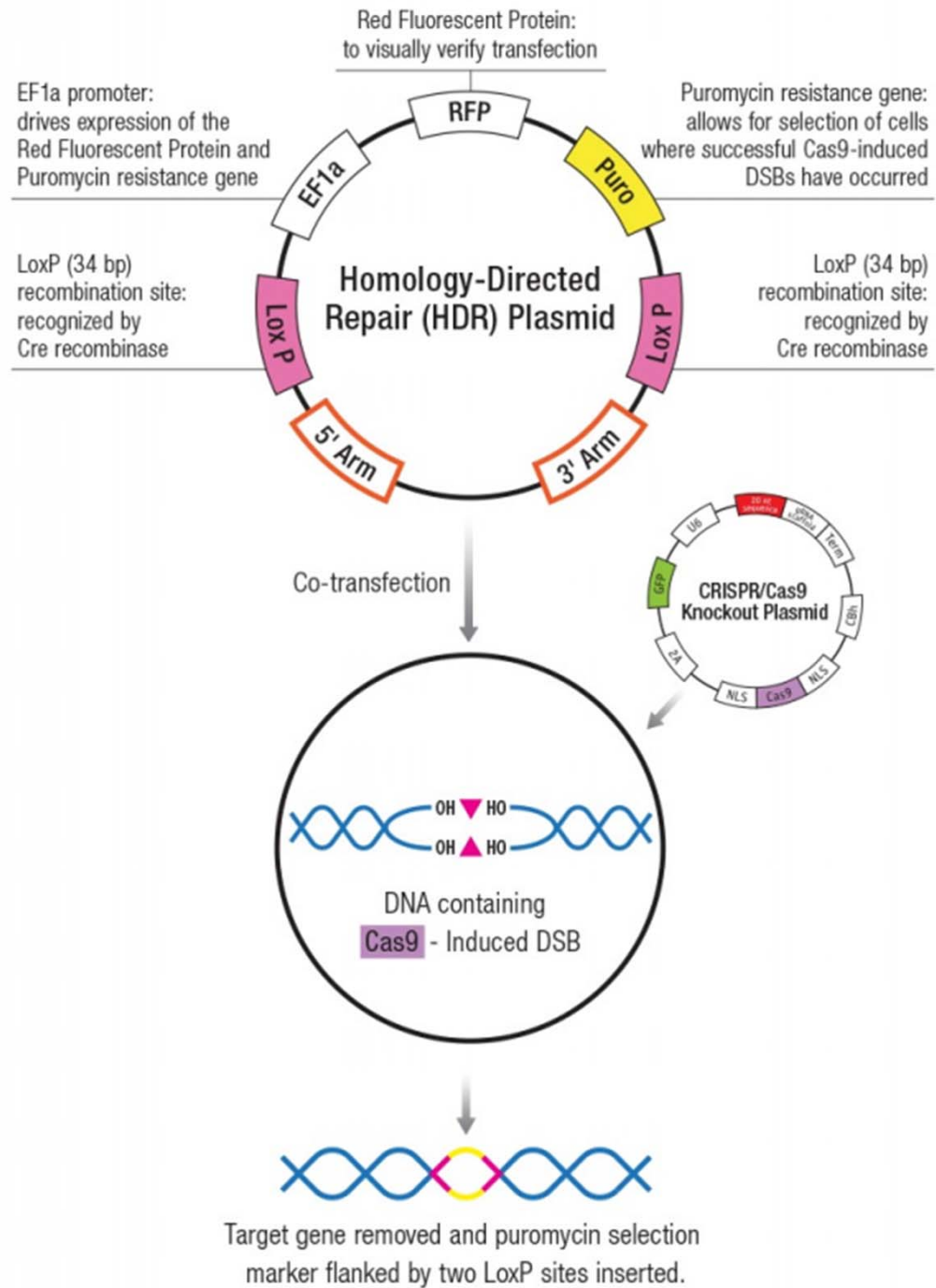
- <http://crispor.tefor.net/>

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

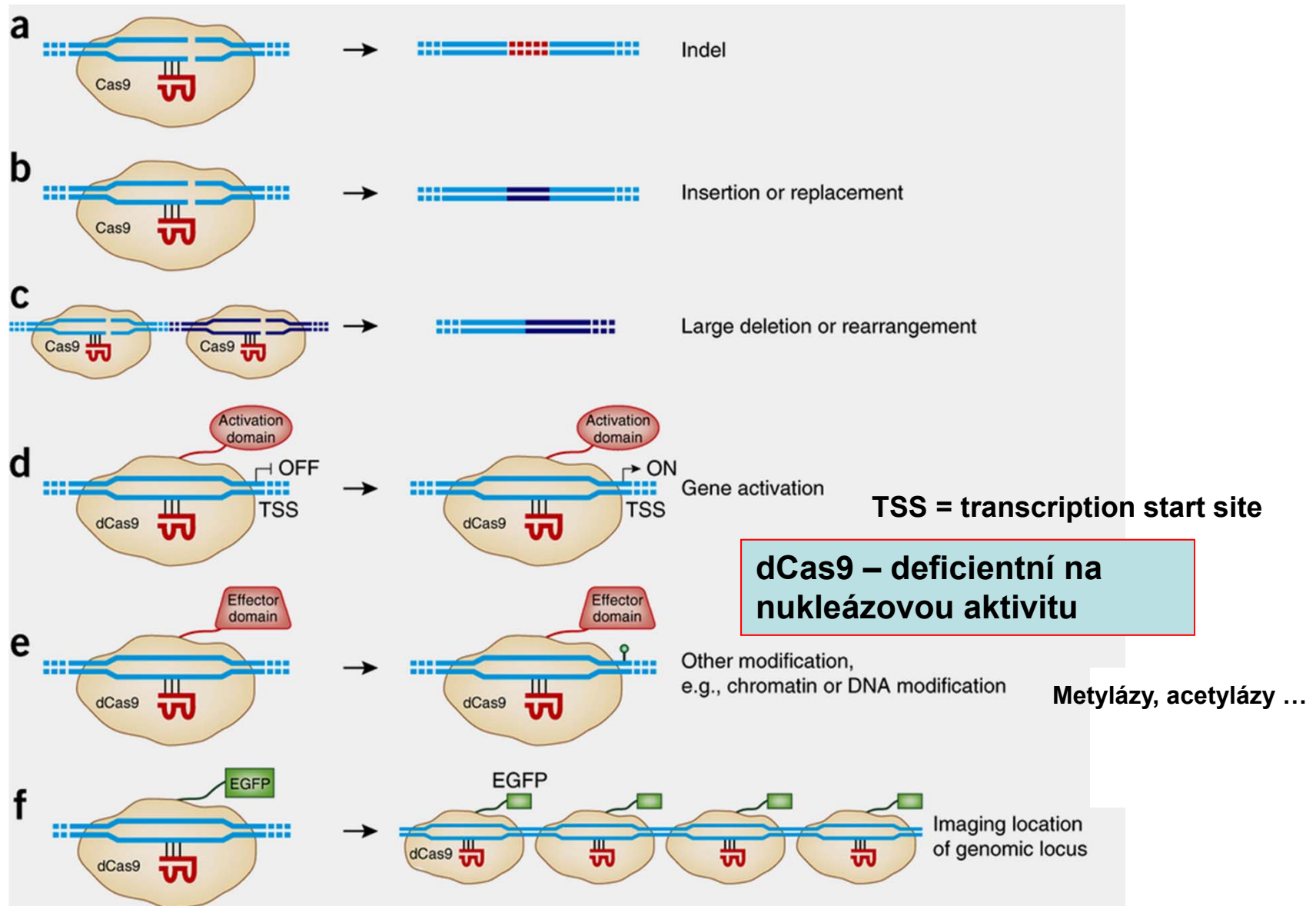
<https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>







Možnosti editace genomů pomocí systému CRISPR/Cas9

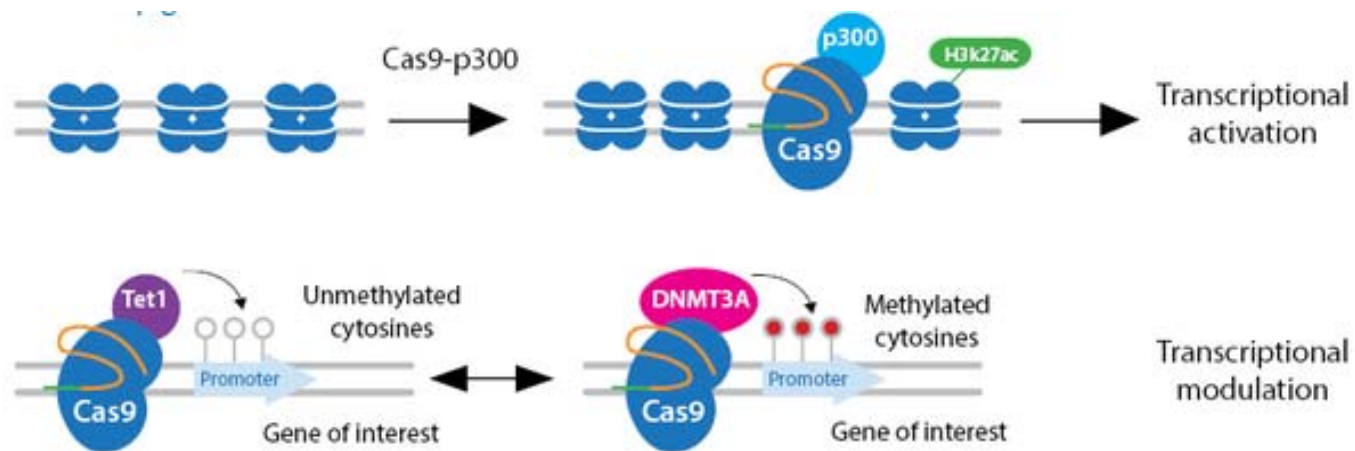


dCas9 + aktivační/represorová doména – regulace transkripce

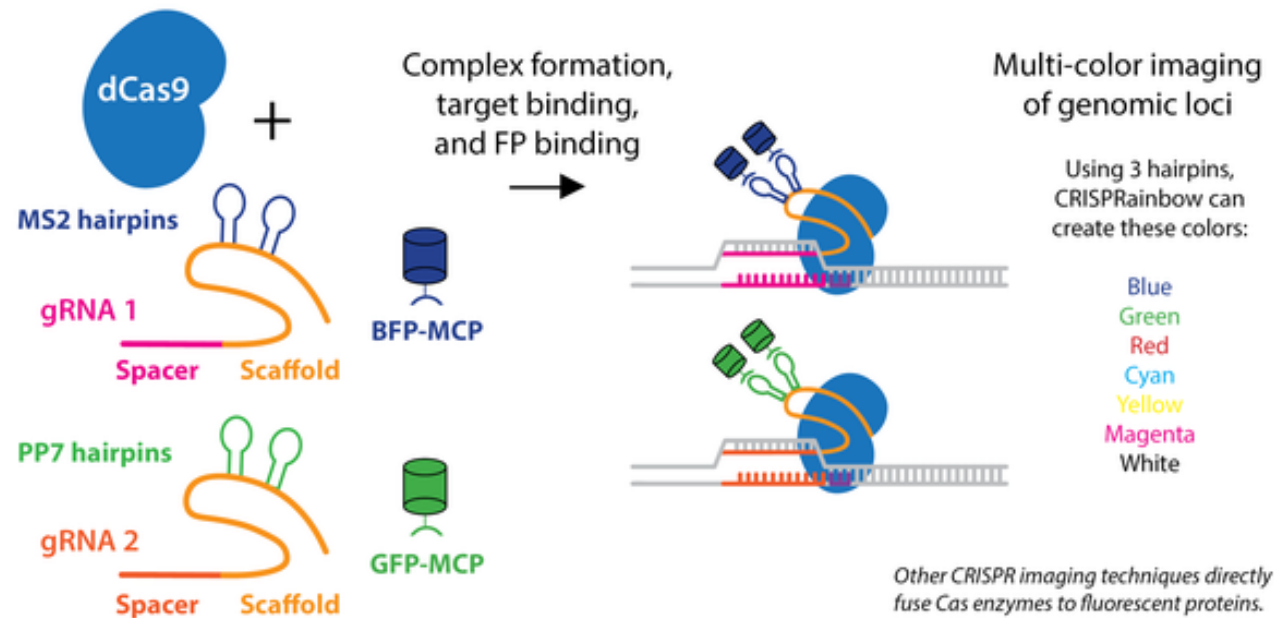
- vazba dCas9 na DNA je reverzibilní – tedy i ta regulace je reverzibilní (dočasná)

dCas9 + epigenetický regulátor – regulace transkripce

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

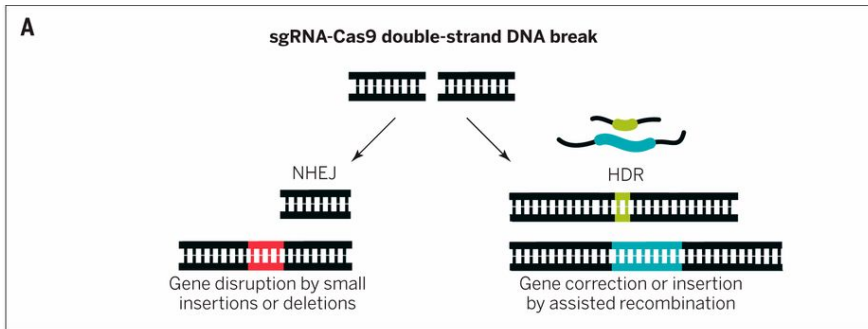


dCas9 + fluorescenční značka



- i multicolor formát – více okusů najednou, chromosome painting ...
- CRISPRainbow

Působení modifikovaného systému CRISPR/Cas9

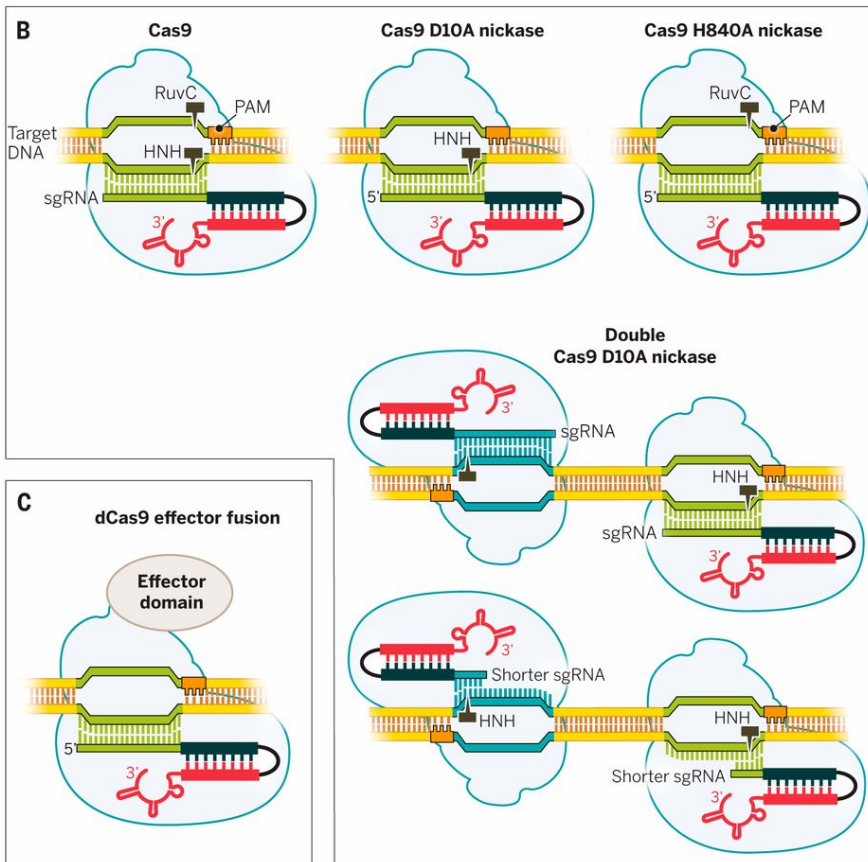


Specifita – dána pouze 20 nt sgRNA

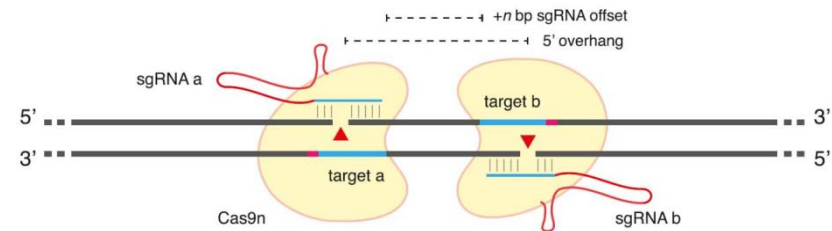
- úplná podobnost na 3' konci (seed) a částečná na 5' konci (distal)

Target site: 5'- GTGTAACGGATAATGGACANGG

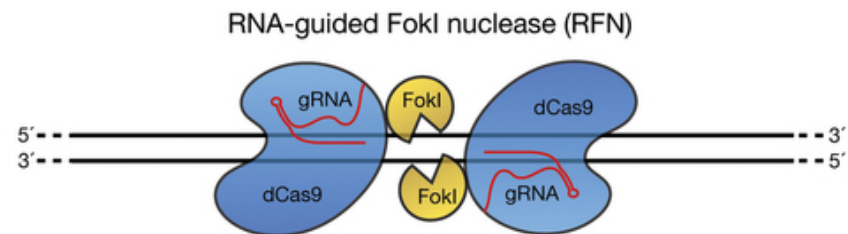
Distal Seed PAM



riziko vzniku **off-target štěpení**

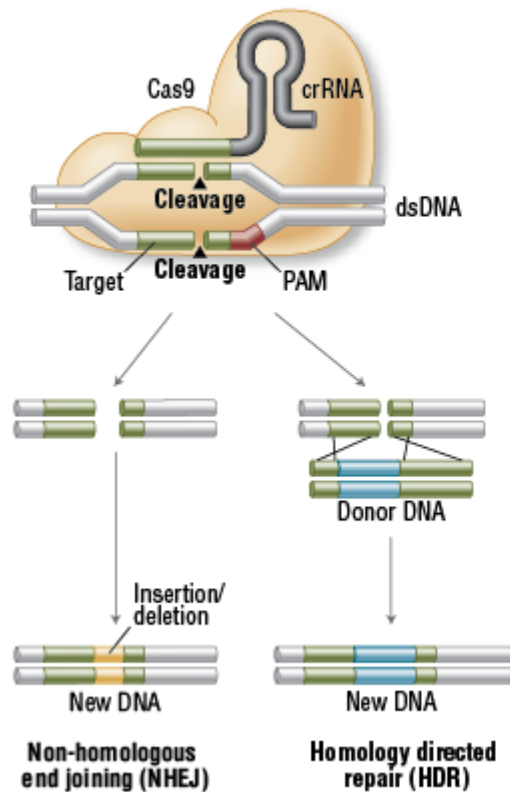


50 - 1500x vyšší specifita (n do 20 bp)

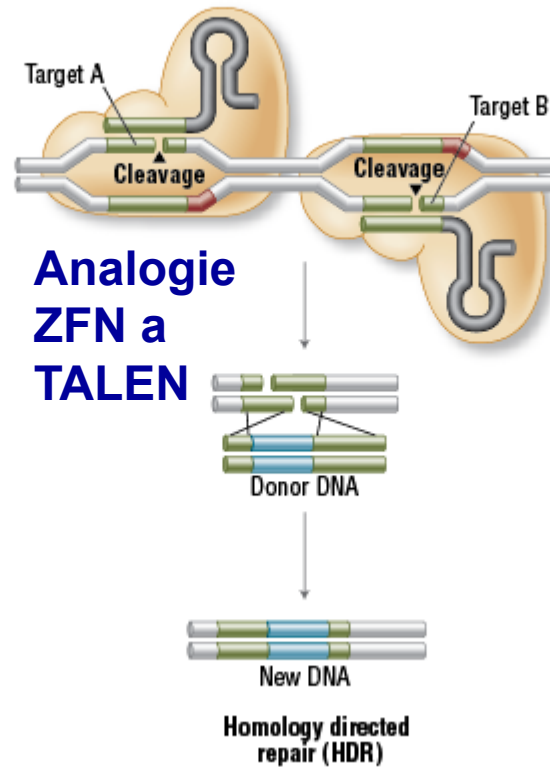


ještě vyšší specifita

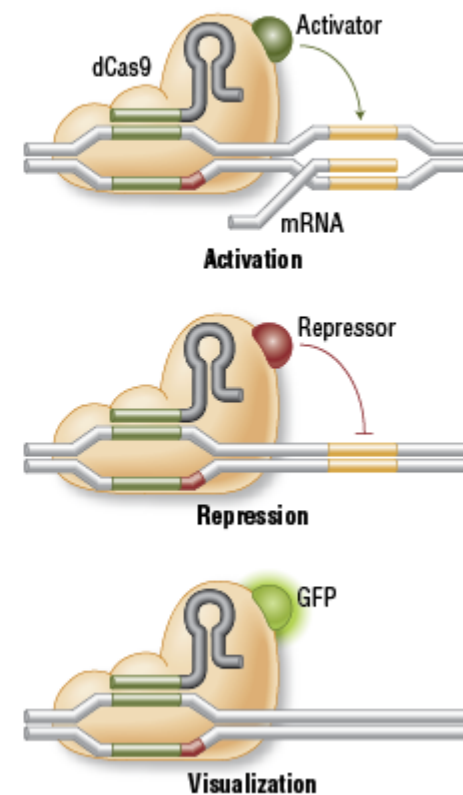
A. Genome Engineering With Cas9 Nuclease



B. Genome Engineering By Double Nicking With Paired Cas9 Nickases



C. Localization With Defective Cas9 Nuclease

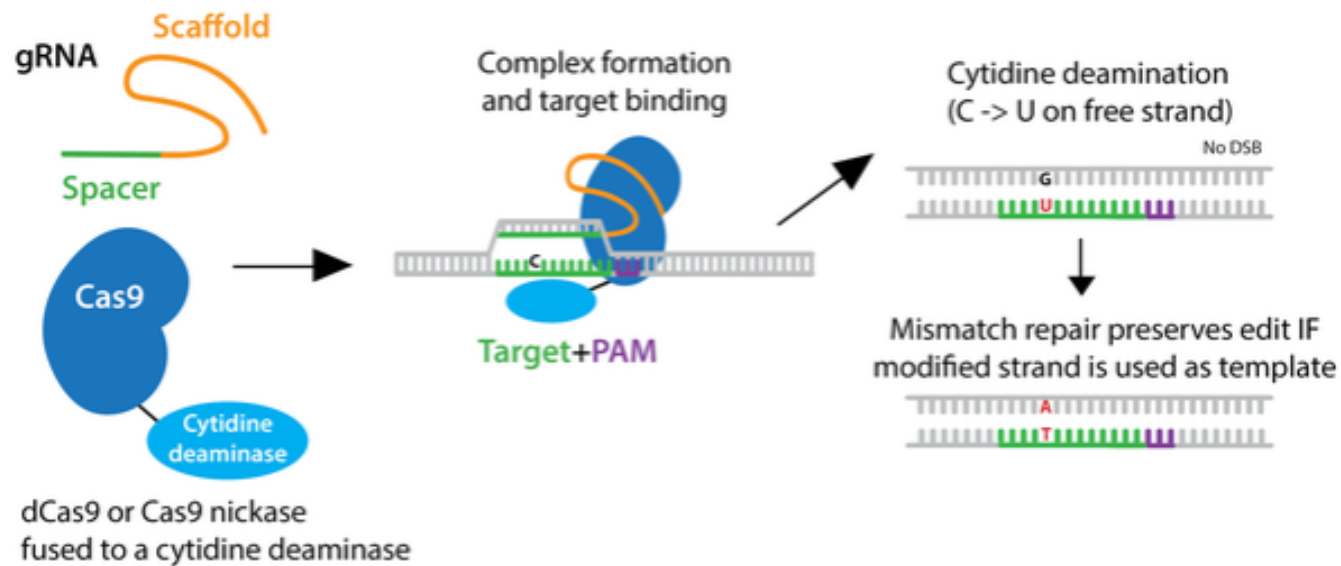


- A. Wt Cas9 nukleáza štěpí specificky dsDNA, vytváří DSB a tím navozuje reparaci. Za nepřítomnosti homologní sekvenec může dojít k nehomolognímu spojování konců (NHEJ) a vzniku ins/del mutací, přerušujících zasažený gen. Za přítomnosti homologní sekvenec může dojít k reparaci s využitím této sekvenec a jejich vložením do místa zlomu.
- B. Mutantní Cas9 nukleáza vytváří místně specifické jednořetězcové zlomy. Dvojice takových sgRNA může vést k tvorbě dsDNA zlomů, které mohou být reparovány s využitím homologní rekombinace či NHEJ (jednořetězcové zlomy zvyšují účinnost HDR). Tento systém zvyšuje specifitu tvorby dsDNA zlomů.
- C. Mutantní Cas9 nukleáza může být připojena k různým efektorovým doménám, které umísťuje na 44 specifické sekvenec. Mohou to být TF, represory, fluorescenční značky aj.

CRISPR DNA base editing

Fúze nikázy s cytidin deaminázou – konverze C na U blízko PAM

- následná konverze U na T díky BER

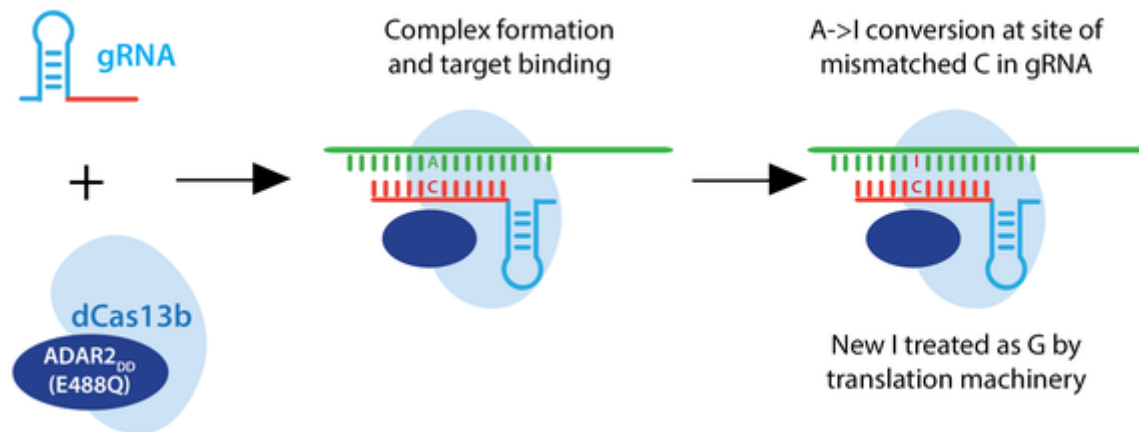


- tvorba substitučních mutací

CRISPR RNA base editing

CRISPR systémy Cas13a/C2c2 and Cas13b – substrátem je RNA

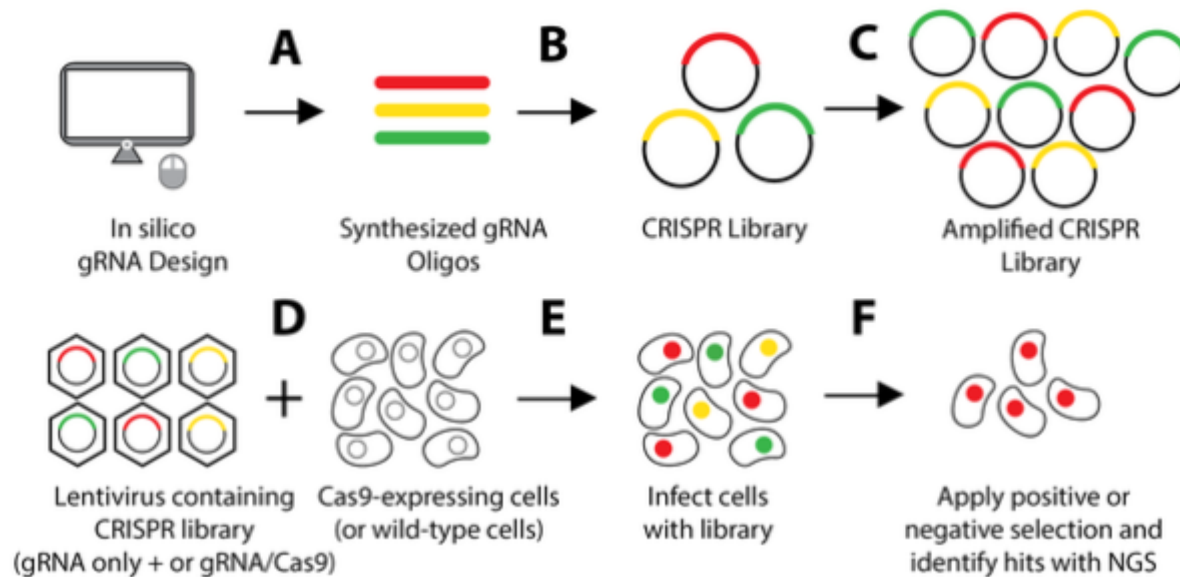
- fúze nukleázy defektního systému s adenosin deaminázou
- vzniká inosin (funkčně odpovídá G) – tedy z AT vzniká GC



- tvorba substitučních mutací na úrovni RNA

Genome wide screen

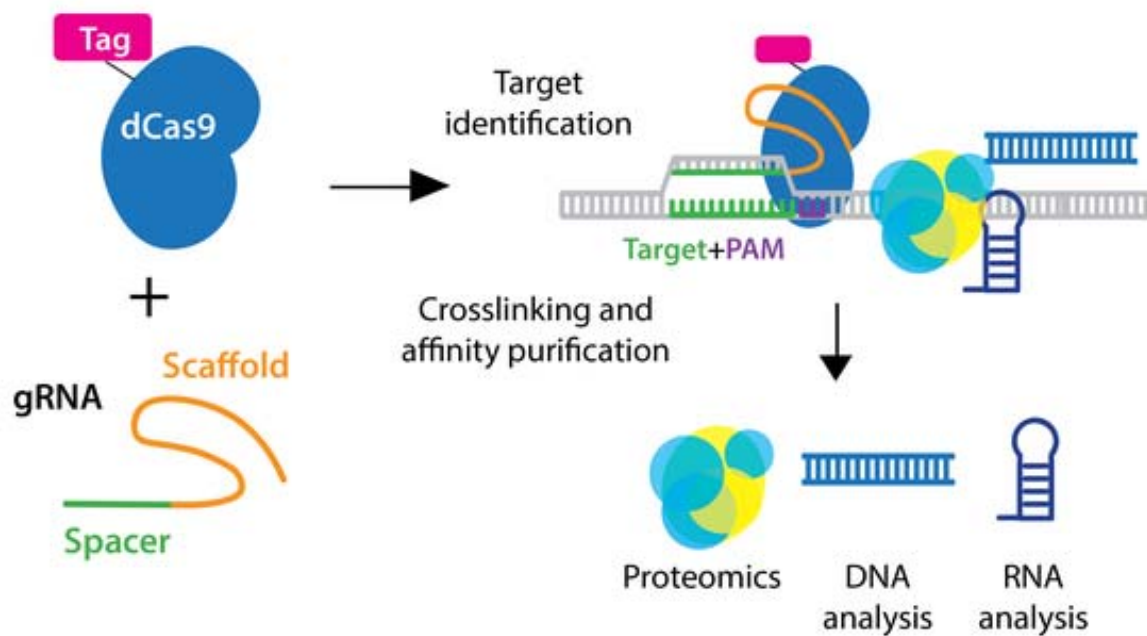
- tvorba rozsáhlé populace cílených mutací (3-6 gRNA na 1 gen)
- následně analýza fenotypu



- identifikace genů zodpovědných za určitý fenotyp

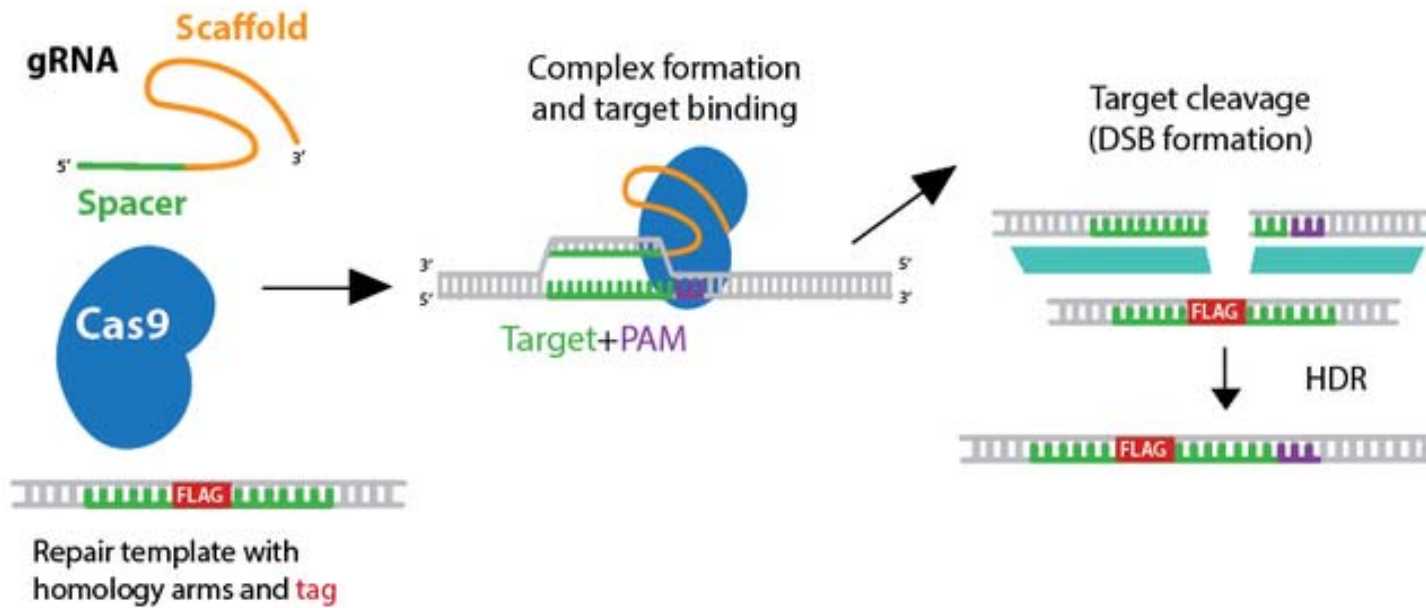
Izolace úseků genomu pomocí dCas9

enChIP (engineered DNA-binding molecule-mediated ChIP)



- Hmotnostní spektrometrie, NGS, ...

Značení endogenních genů



- přidání značky (tag) pomocí HDR

Genome Engineering



Cut

Wild-type Cas enzymes that generate double strand breaks (DSBs).



Base Edit

Base editors precisely edit DNA without promoting DSB formation.



Nick

Mutated Cas nickase enzymes generates single-strand DNA breaks.



dCas9-FokI

dCas9 fused to FokI nuclease generates a DSB when expressed with two gRNAs.

Transcriptional Regulation



Activate

dCas9 fused to an activator peptide activates gene expression.



Interfere

dCas9 alone, or fused to a repressor peptide, inhibits transcription.



Epigenetics

dCas9 fused to an epigenetic modifier alters chromatin structure/gene expression.



Screen

CRISPR libraries are a powerful tool for genome-wide screening.

Screen

RNA Targeting



RNA Targeting

Type VI CRISPR systems can target RNA, not DNA, across multiple systems.



RNA Editing

Cas13 enzymes fused to deaminases can edit bases in RNA.

Other Applications



Purify

dCas9 fused to an epitope tag can be used to isolate a given genomic locus.



Tag

Various CRISPR methods are available to endogenously tag your gene of interest.



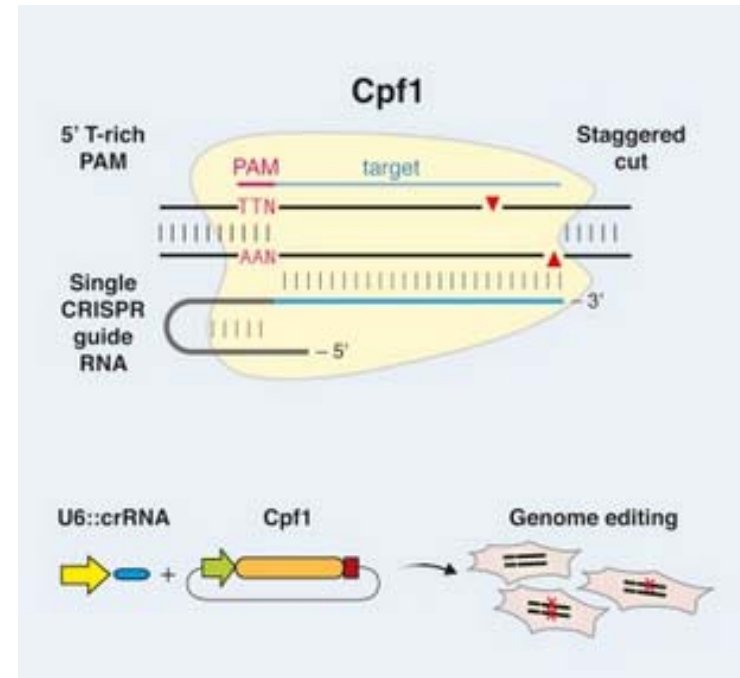
Visualize

CRISPR fluorescence methods can be used to visualize genomic loci.

Další CRISPR systémy

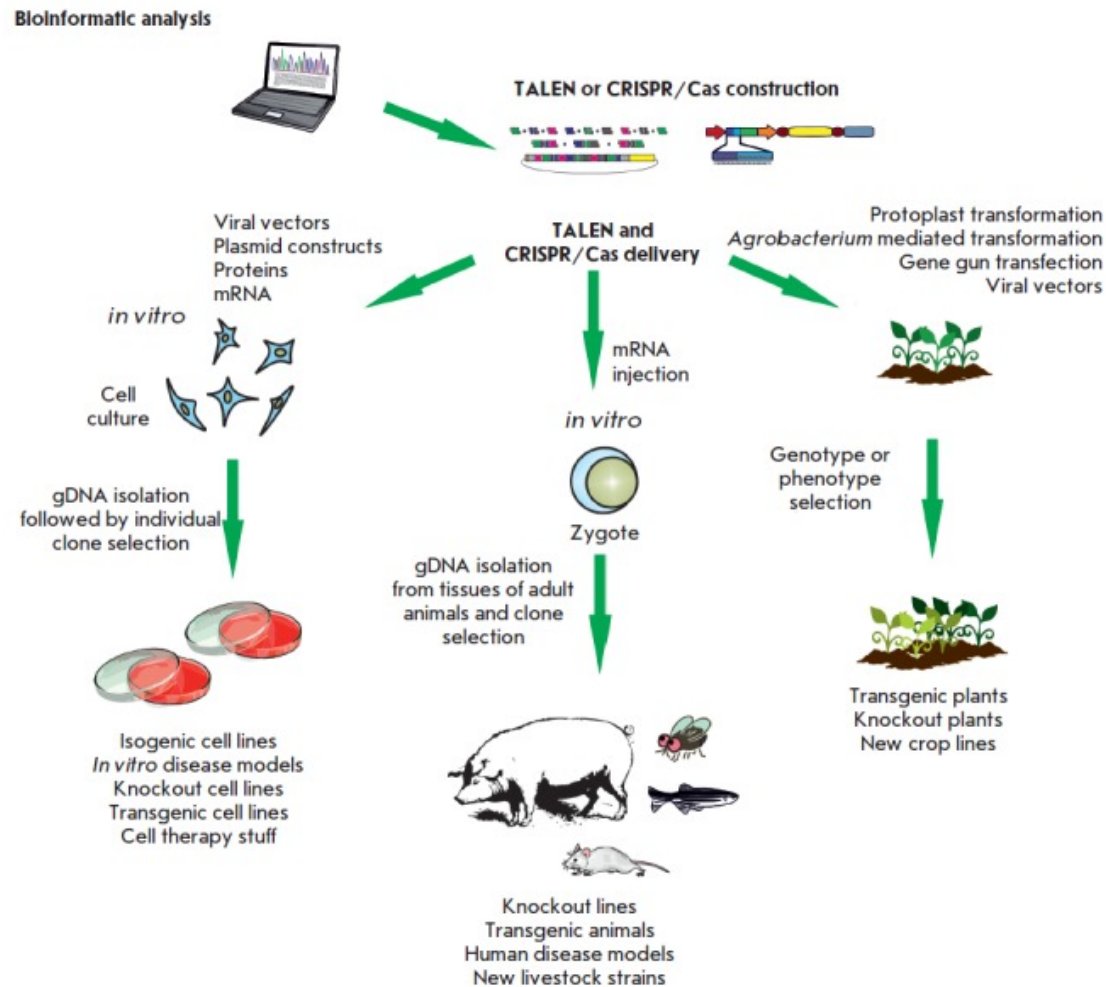
Cpf1

- má RuvC a nikoli HNH
- jediná RNA (vs. crRNA + tracrRNA)
- lepivé konce (vs. tupé konce)
- PAM (TTN) – AT bohaté oblasti (vs. NGG)
- low off-targeting frequency



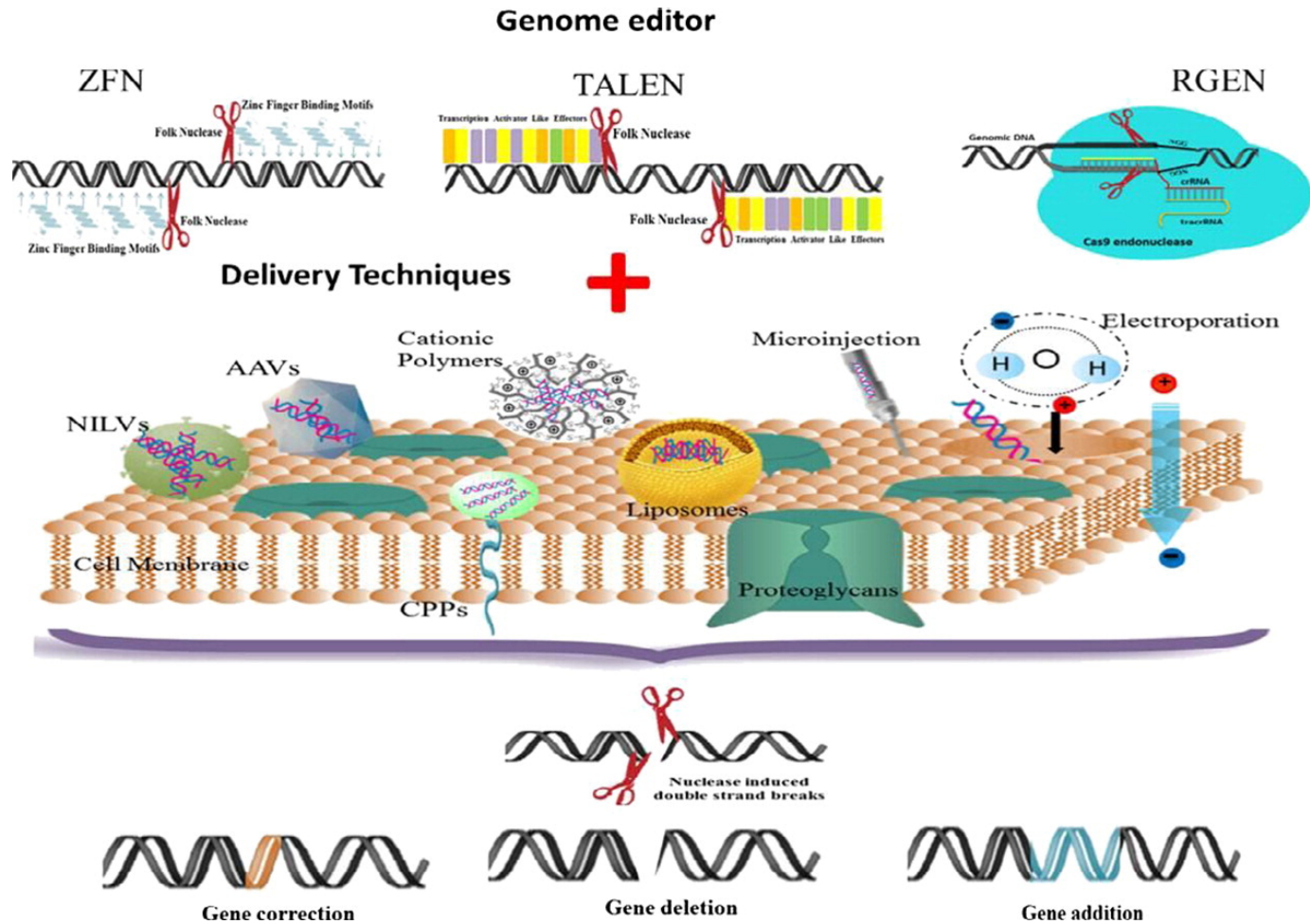
Lepivé konce – možné využití pro přímý přenos genů (obdoba RE klonování)

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, hpvt, il2rg, jak2, kras, linc00116, maoa, map2k4, mdm2, met, mlh1, msh2, mutyh, myc, mycl1, mycn, nbn, ncor1, ncor2, nlrp5, ntf3, pdgfra, pdgfrb, phf8, plin1, pms2, ppp1r12c (aavs1), ptch1, pten, 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, fancb, 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, crhrd1, ponzr1, bmil, cdh5, dip2a, elmo1, epas1b, fh, golden, gria3, hey2, hif1ab, ikzf1, jak3, moesina, myod, phf6, ppp1cab, ryr1a, ryr3, scl6a3, tbc6, 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, qhhrhr, 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, cxx2, coi1, hta1, rht, sbp, smc6, spl</i>	Knockout	[154]
	Rice (<i>Oryza sativa</i>)	<i>avrxa7, pthxo3, badh2, cxx2, dep1, sd1</i>	Knockout	[154, 155]
CRISPR/Cas	Yeast (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	<i>CAN1, ADE2</i>	Knockout, insertion	[200]
	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, apoea, 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, ensdarg00000070653, ensdarg00000076787, psmf1, dre-mir-126a, dre-mir-17a-2, dre-mir-92a-2, tardbp, tardbp1, 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, hpvt, egfp, th, rheb, uhrf2</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

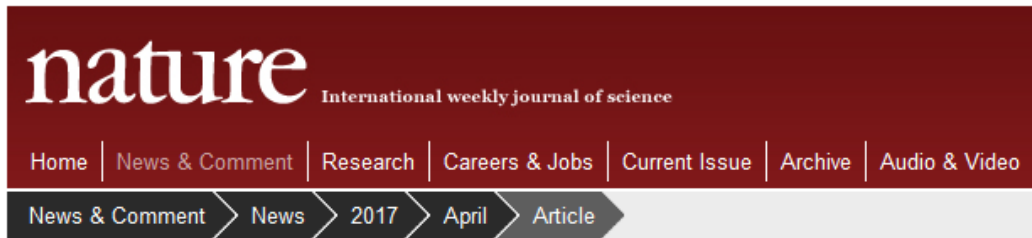
Examples of crops modified with CRISPR technology

CROPS	DESCRIPTION	REFERENCES
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 <i>Crygc</i> gene that causes cataracts	Wu <i>et al.</i> , 2013
Cystic fibrosis	Correction of the <i>CFTR</i> 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 (<i>HBB</i>) 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 <i>Fah</i> mutation in hepatocytes of a mouse model of hereditary tyrosinemia	Yin <i>et al.</i> , 2014
HIV	Generation of homozygous <i>CCR5</i> 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

Showing: 1-14 of 14 studies studies per page

Row	Saved	Status	Study Title	Conditions	Interventions
1	<input type="checkbox"/>	Not yet recruiting	A Safety and Efficacy Study of TALEN and CRISPR/Cas9 in the Treatment of HPV-related Cervical Intraepithelial Neoplasia I	<ul style="list-style-type: none"> Human Papillomavirus-Related Malignant Neoplasm 	<ul style="list-style-type: none"> Biological: TALEN Biological: CRISPR/Cas9
2	<input type="checkbox"/>	Recruiting	Safety of Transplantation of CRISPR CCR5 Modified CD34+ Cells in HIV-infected Subjects With Hematological Malignances	<ul style="list-style-type: none"> HIV-1-infection 	<ul style="list-style-type: none"> Genetic: CCR5 gene modification
3	<input type="checkbox"/>	Recruiting	Examining the Knowledge, Attitudes, and Beliefs of Sickle Cell Disease Patients, Parents of Patients With Sickle Cell Disease, and Providers Towards the Integration of CRISPR in Clinical Care	<ul style="list-style-type: none"> Sickle Cell Disease 	
4	<input type="checkbox"/>	Recruiting	NY-ESO-1-redirected CRISPR (TCRendo and PD1) Edited T Cells (NYCE T Cells)	<ul style="list-style-type: none"> Multiple Myeloma Melanoma Synovial Sarcoma Myxoid/Round Cell Liposarcoma 	<ul style="list-style-type: none"> Biological: NY-ESO-1 redirected autologous T cells with CRISPR edited endogenous TCR and PD-1 Drug: Cyclophosphamide Drug: Fludarabine Device: NY-ESO-1 expression testing
5	<input type="checkbox"/>	Recruiting	Identification of Host Factors of Norovirus Infections in Mini-Gut Model	<ul style="list-style-type: none"> Gastrointestinal Infection 	<ul style="list-style-type: none"> Procedure: Duodenal biopsy Procedure: Saliva
6	<input type="checkbox"/>	Recruiting	A Study Evaluating UCART019 in Patients With Relapsed or Refractory CD19+ Leukemia and Lymphoma	<ul style="list-style-type: none"> B Cell Leukemia B Cell Lymphoma 	<ul style="list-style-type: none"> Biological: UCART019
7	<input type="checkbox"/>	Recruiting	A Feasibility and Safety Study of Universal Dual Specificity CD19 and CD20 or CD22 CAR-T Cell Immunotherapy for Relapsed or Refractory Leukemia and Lymphoma	<ul style="list-style-type: none"> B Cell Leukemia B Cell Lymphoma 	<ul style="list-style-type: none"> Biological: Universal Dual Specificity CD19 and CD20 or CD22 CAR-T Cells
8	<input type="checkbox"/>	Recruiting	PD-1 Knockout Engineered T Cells for Advanced Esophageal Cancer	<ul style="list-style-type: none"> Esophageal Cancer 	<ul style="list-style-type: none"> Other: PD-1 Knockout T Cells
9	<input type="checkbox"/>	Recruiting	Stem Cells in NF1 Patients With Tumors of the Central Nervous System	<ul style="list-style-type: none"> Neurofibromatosis Type 1 Tumors of the Central Nervous System 	<ul style="list-style-type: none"> Diagnostic Test: Collection of Stem Cells
10	<input type="checkbox"/>	Not yet recruiting	PD-1 Knockout Engineered T Cells for Muscle-invasive Bladder Cancer	<ul style="list-style-type: none"> Invasive Bladder Cancer Stage IV 	<ul style="list-style-type: none"> Biological: PD-1 Knockout T Cells Drug: Cyclophosphamide Drug: IL-2



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

Correspondence

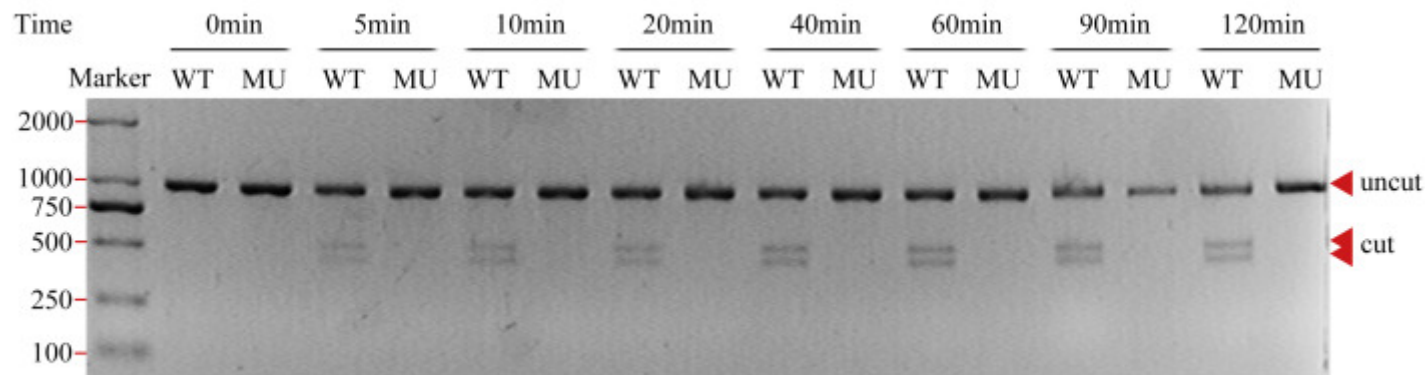
Response to “Unexpected mutations after CRISPR–Cas9 editing *in vivo*”

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.

Další možné využití CRISPR technologie

Detekce mutací – zlom v místě mutace indukovaný CRISPR technologií
- detekce mutací o nízké frekvenci (problém sekvenování)



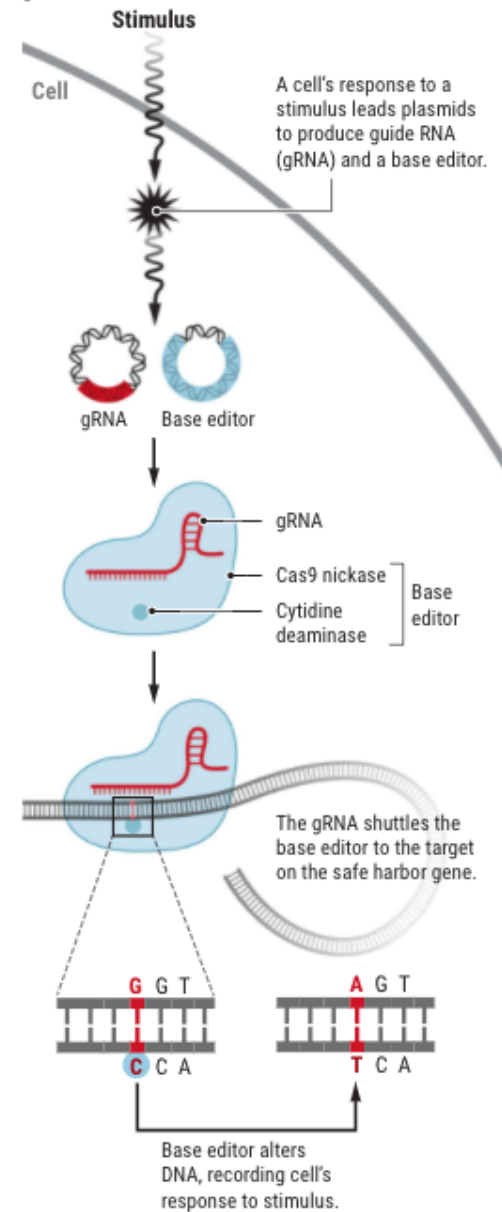
CAMERA

CRISPR-mediated analog multievent recording apparatus

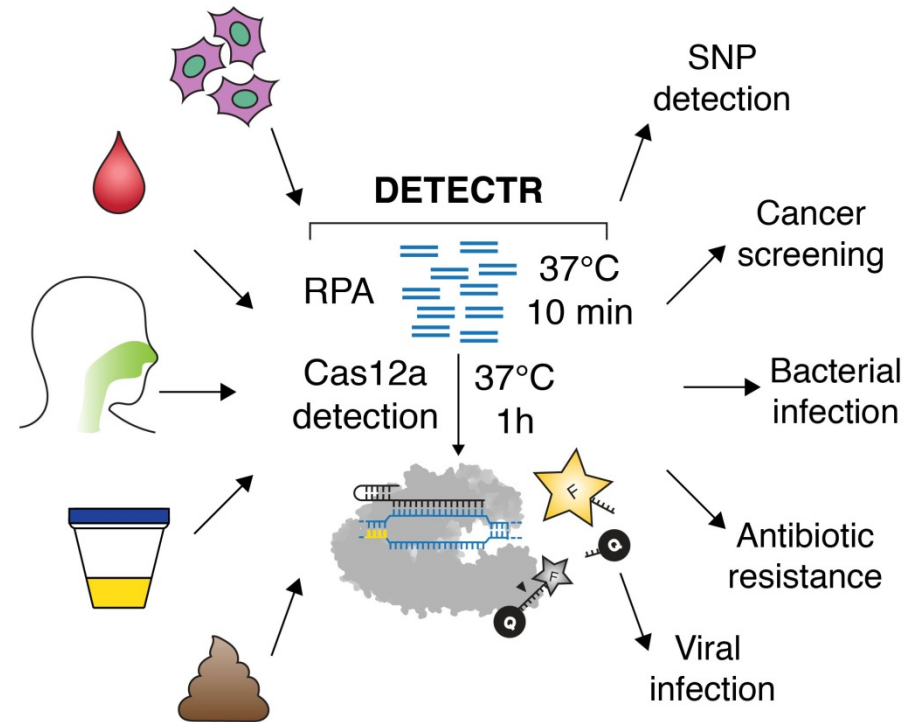
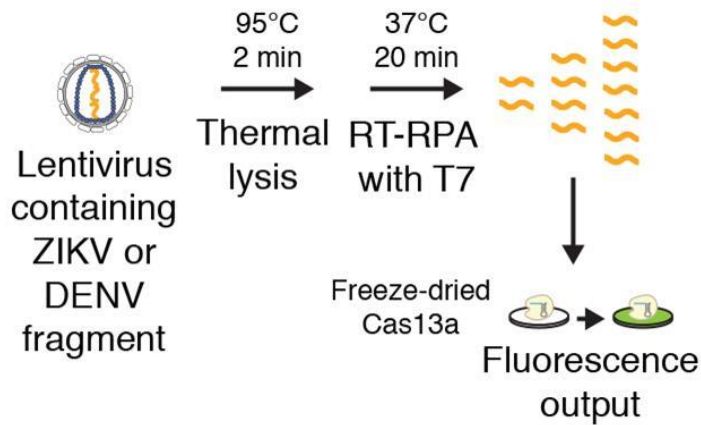
- single cell resolution
- „záznam“ reakce buňky na stimul
- některé buňky ve směsi reagují/jiné nikoli
- lze kombinovat různé signály, jejich pořadí

A new lens on cells

One form of a research tool called CAMERA engineers cells to record signals triggered by various stimuli using the DNA of a "safe harbor" gene.



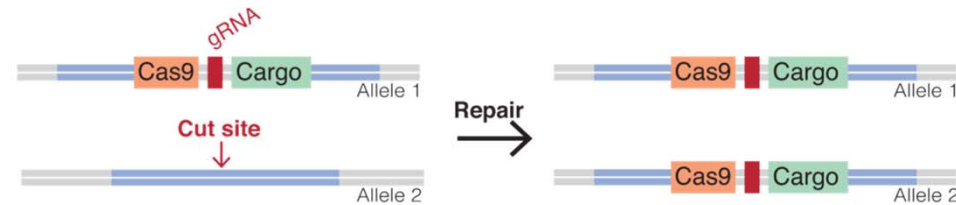
DETECTR/SHERLOCK



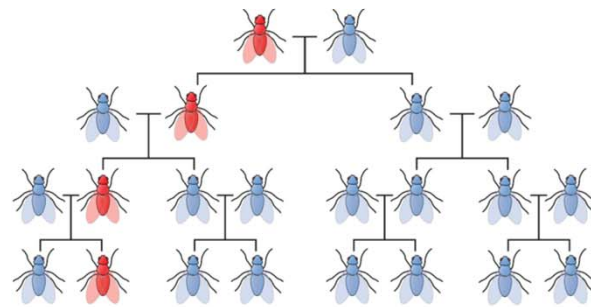
- detekce specifické DNA
- využití Cas12/Cas13 (zůstává aktivní i po tvorbě ds zlomu – štěpí ss RNA/DNA)
- testováno na detekci různých kmenů HPV – některé spojeny s rizikem karcinomů děložního čípku – rozlišení infekce těmito kmeny (DETECTR)
- využití reportérových molekul – po štěpení vzniká fluorescence
- detekce infekce virem ZIKA (SHERLOCK)

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

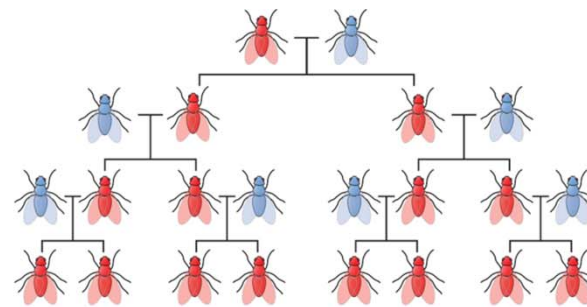


Normal inheritance



Altered gene does not spread

Gene drive inheritance

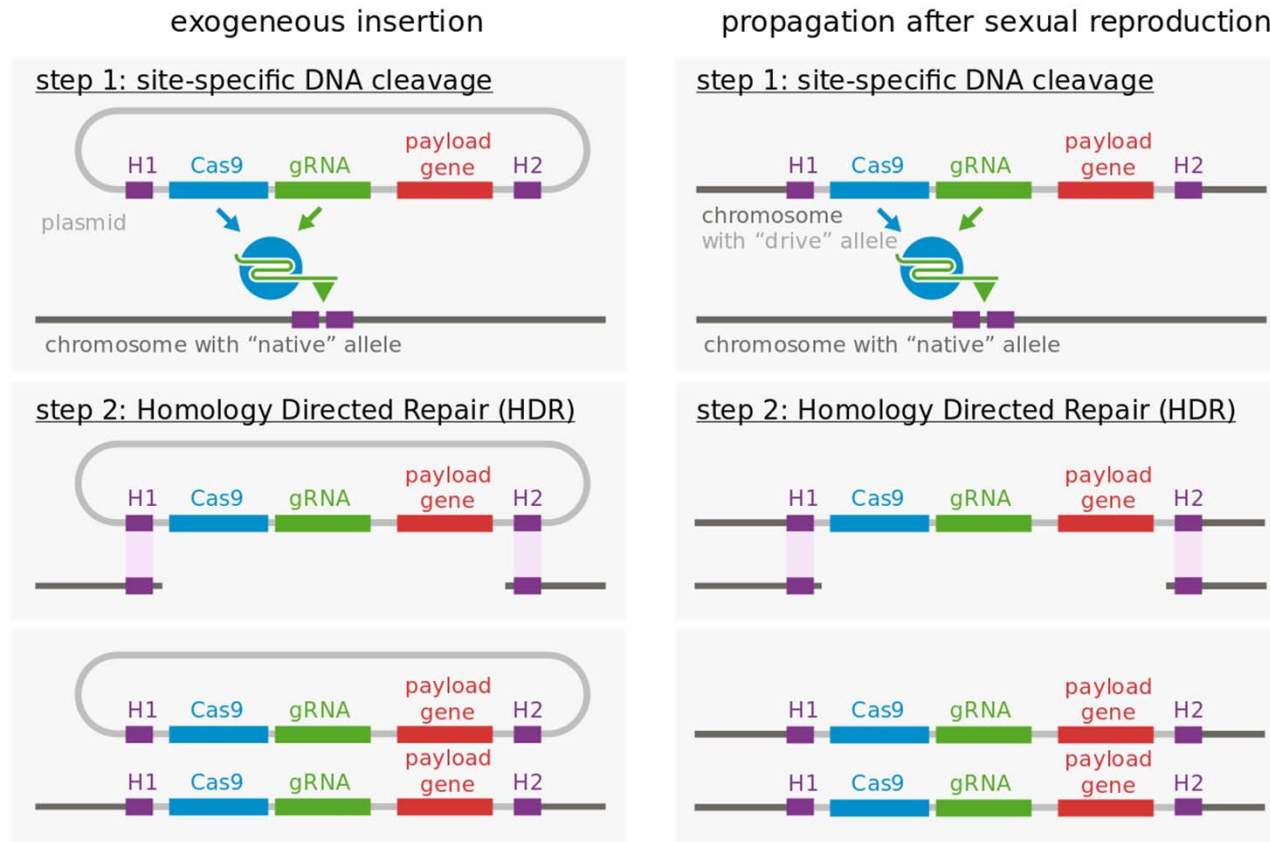


Altered gene is always inherited

- pouze u jedinců s pohlavním rozmnožováním

Gene drive

- i přirozené mechanismy – popsány alely genů, jež se nacházejí častěji v gametách
 - selekce na úrovni gamet (i u lidí)



- laboratorně ověřeno

Využití – vyhubení škůdců, patogenů, predátorů ...

(Predator Free 2050 Nový Zéland) ... x etika, bezpečnost