

## Editace genomů (komentáře)

### Stránka 4

První úspěšná změna genomu u organismu pomocí homologní rekombinace, Kvasinky jsou z tohoto pohledu velmi vhodný organismus neb frekvence homologní rekombinace je u nich poměrně vysoká, využito pozitivně/negativní selekce

### Stránka 5

Vysvětlení zkratk, jež budou dále v přednášce používány, studenti by se v nich měli orientovat

### Stránka 6

Buňka má obvykle několik možností jak opravit dvouřetězcový zlom v DNA. Pomalejší, ale přesnější je homologní rekombinace. NHEJ je rychlá možnost opravy, při které ale často vznikají chyby (nejčastěji drobné inserce či delece). Zatímco prvního způsobu se využívá při náhradě alel, druhý se využívá hojně při knock-outu cílového genu, neb při něm často dochází k posunu čtecího rámce a vzniku předčasného stop kodonu.

### Stránka 16

3-4 zinkové prsty na každém ze dvou řetězců tak zajišťují specifitu rozpoznání cílové sekvence – u člověka je vzhledem k velikosti genomu považováno za zajištění specifity vazby na jediné místo v genomu sekvence o délce 20 nukleotidů. Při návrhu je však zapotřebí brát v potaz že některé sekvence se v lidském opakují, nebo jsou si velmi podobné (např. příbuzné funkční domény proteinů). Vzhledem ke znalosti lidského genomu je proto při návrhu cílových míst používán algoritmus, který zajišťuje návrh pokud možno jedinečné sekvence a tím vysokou specifitu štěpení pouze v cílovém místě.

### Stránka 17

K návrhu ZFN je třeba mít rozsáhlé znalosti proteinového inženýrství, tak aby bylo možno upravovat ZF tak, aby rozpoznávaly specificky pouze cílovou sekvenci. Obvykle se tedy využívá služeb specializovaných laboratoří, jež se na návrh ZFN specializují. Celý proces od návrhu a testování cílové sekvence po její finální doručení je tak poměrně dlouhý.

## Stránka 20

TALENs jsou tedy v podstatě skládačkou tvořenou opakovanými úseky 34 aminokyselinové repetice, kde pouze záměna aminokyselin v pozici 12 a 13 zajišťuje specifitu vazby k určitému nukleotidu v sekvenci DNA. Štěpení DNA zajišťuje opět dimer FokI. NLS je zkratka pro jaderný lokalizační signál.

## Stránky 22 a 23

DNA binding kód pro TALENs – ukazuje sekvenci aa v pozici 12-13 a vazbu cílového nukleotidu. V některých případech je tato vazba vysoce specifická, v jiných je více promiskuitní.

## Stránka 24

Dá trošku práce poskládat za sebe jednotlivé repetice TALENs ve správném pořadí. Proto jsou využívány databáze již předskládaných dimerů trimerů, tetramerů, které celý proces zrychlí a zjednoduší.

## Stránky 33 a 34

Různé možnosti PAM sekvencí – přirozené nebo mutované Cas proteiny

## Stránka 37

Schéma typického experimentu pro vytvoření knock-outu určitého genu. Transfekce CRISPR konstruktů do buněk. Cas9 nukleáza může být fluorescenčně značená, což umožňuje sortování buněk po transfekci s vysokou expresí Cas9. Jako alternativa lze použít selekci na rezistenci k antibiotiku nesenou vektorem s Cas9. Po sortování/selekce buňky rozklonujeme pro získání single cell kolonií. Tyto kolonie poté testujeme na expresi cílového proteinu. V případě ztráty exprese sekvenujeme cílové místo v genomové DNA pro potvrzení vzniku mutace.

## Stránky 38-39

Různé komerční CRISPR/Cas9 systémy (pouze výběr) – systém na straně 39 je zajímavý v tom, že obsahuje 5' a 3' homologické oblasti k sekvenci cílového místa v genomu. Po tvorbě ds DNA zlomu, tak může dojít k homologní rekombinaci, díky níž je do místa začleněn gen pro rezistenci k antibiotiku (zde puromycin). Po selekci buněk a otestování exprese je třeba pomocí PCR opět ověřit začlenění kazety do správného místa v genomu (kazeta se může začlenit do genomu i náhodně na jiné místo, tvorba ds DNA zlomu v cílovém genu však zvyšuje pravděpodobnost začlenění do cílového genu).

## Stránka 43

Klíčovou nutností i všech gene editovacích systémů je zajištění specifity. V případě jednoduché sgRNA s 20 nt cílovou sekvencí se v genomu nacházejí podobná cílová místa a je třeba zamezit štěpení mimo cílové místo. Záměna jednoho nukleotidu v seed regionu sgRNA obvykle není tolerována a ke štěpení nedochází. Při malé odlišnosti sekvencí distálně od seed regionu však specifita nemusí být úplná. Proto jsou vyvíjeny systémy zajišťující větší specifitu. Někdy jsou Cas9 proteiny s mutovanou jednou ze dvou nukleázových domén. Lze je tedy navrhnout jako pár na dvě přilehlá místa. Výsledkem jsou dva jednořetězcové zlomy na protilehlých řetězcích genomové DNA blízko u sebe. Takovéto poškození buňka opravuje jako dvouřetězcový zlom. Specifita je zde dána 2x20 nukleotidy (každá nukleáza má svou sgRNA sekvenci). Dalším přístupem zvyšujícím specifitu je využití 2 nukleáza-deficientních forem Cas9 s navazaným monomerním FokI. Specifita je opět zajištěna 2x20 nukleotidy. Štěpení DNA zajišťuje sestavený dimer FokI.

## Stránka 45

BER – excizní reparace bází

## Stránka 47

Schéma „high-throughput“ experimentu vyhledávání cílových genů či jejich mutací zodpovědných za určitý fenotyp. Knihovna CRISPR vektorů, každý nese svou jedinečnou značku, je přenesena do buněk – do různých buněk přeneseny jen některé vektory z knihovny. Následuje selekce na vybraný fenotyp. Poté je určena jedinečná značka v těchto buňkách (PCR a sekvenace značky) a od ní odvozena cílová sekvence, jež byla obsažena v původní knihovně. Takto je identifikován gen, který se pravděpodobně podílí na vzniku selektovaného fenotypu.

## Stránka 59

Na webové stránce [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) je možno po zadání klíčového slova CRISPR nalézt běžící a ukončené klinické studie využívající v současné době CRISPR technologii

## Stránka 60-61

Specifita CRISPR metody byla nedávno zpochybněna. Po hlubší analýze publikovaných dat se však ukázalo, že byly špatně zvoleny kontroly (kontrolní myši používané v experimentech nebyly totožné s myšmi pokusnými a jejich genom se proto odlišoval od genomu pokusných myší přirozeně a nikoli díky nespecifickému účinku CRISPR).

Stránka 64

Řada metod využívající systém CRISPR pro detekci mikroorganismů – každý organismus má své jedinečné sekvence. Využívány CRISPR systémy, jež se aktivují štěpením cílové sekvence ke štěpení dalších sekvencí. Tyto další sekvence jsou nějak označeny, abychom jejich štěpení mohli monitorovat.

Stránka 66

Do genomu organismu rozmnožujícího se pohlavně je vložen konstrukt syntetizující sgRNA a Cas9 nukleázu. sgRNA je zaměřena proti genu, jehož mutace způsobuje sterilitu samic. Po oplození dochází ke tvorbě dvouřetězcového zlomu v tomto genu a následné opravě. Je-li oprava bezchybná, gen je opět rozštěpen tímto konstruktem. Dojde-li ke vzniku mutace, systém již toto místo nerozpozná, ale gen je obvykle nefunkční (posunová mutace) a samička proto neplodná. Samečci tento konstrukt přenášejí v populaci. Výsledkem může být až vyhubení celé populace.