



# Editace genomu

---

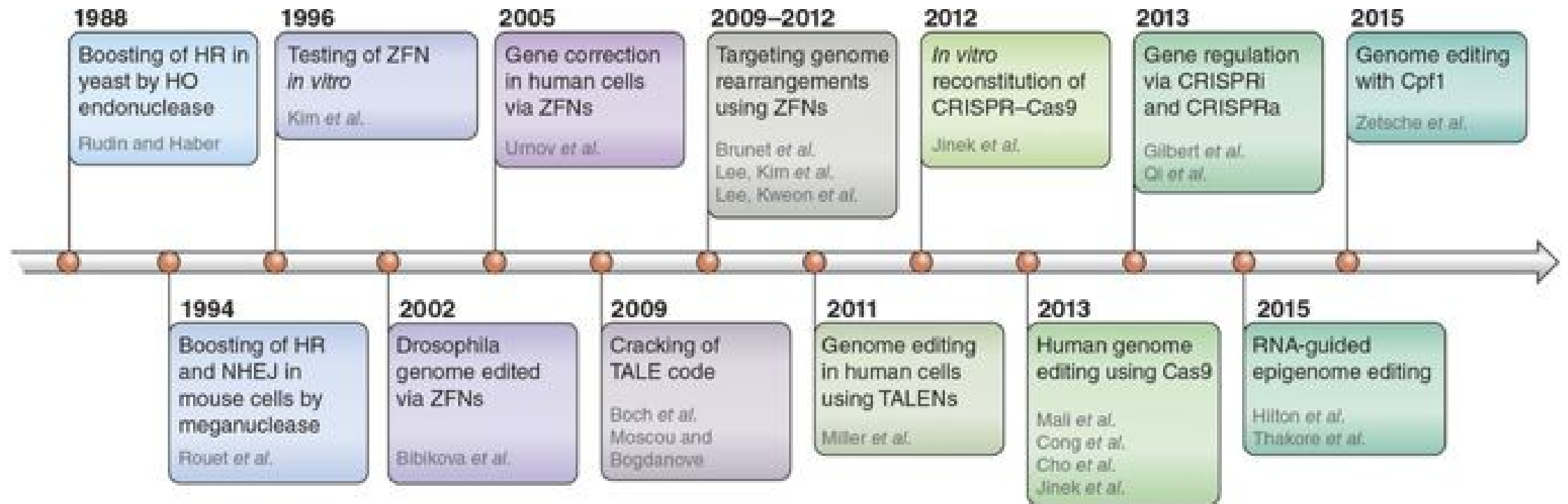
KRISTÝNA KAMARÝTOVÁ, JOZEF KOVÁČ, JANA  
PODIVÍNSKÁ, NORA MOHLEROVÁ, MARTINA RAJNÍKOVÁ

Editace genomu je způsob, jak provádět specifické změny v DNA buňky nebo organismu. Enzym štěpí DNA na konkrétní sekvenci, a pokud je buňkou opravena, dojde ke změně nebo „úpravě“ sekvence.

- 
- Zahrnuje to štěpení na specifických sekvencích DNA enzymy zvanými „engineered nucleases“.
  - Vnáší se inserce, delece nebo se stávající sekvence nahrazuje za jiné
  - Úpravou genomu lze změnit vlastnosti buňky nebo organismu.



# Historie



# Využití editace genomu

---

- Výzkum

Může být použita ke změně DNA v buňkách nebo organismech k pochopení jejich biologie a k tomu, jak fungují.

- Léčba nemocí

Používá se k úpravě lidských krevních buněk, které se pak vrací zpět do těla k léčbě stavů, včetně leukémie a AIDS. Může být také použita k léčbě jiných infekcí (jako je MRSA) a genetických stavů (jako je svalová dystrofie a hemofilie).

- Biotechnologie

Úpravy genomu se v zemědělství používají k genetické úpravě plodin ke zlepšení jejich výnosů a odolnosti vůči chorobám a suchu nebo ke genetické úpravě skotu, který nemá rohy.

## VÝHODY

- Řešení a poražení nemocí
  - Terapeutika na rakovinu
  - Výzkum léčiv
  - Vrozené nemoci
- Možnost delšího a kvalitnějšího života
- Růst produkce potravin a její kvalita

## NEVÝHODY

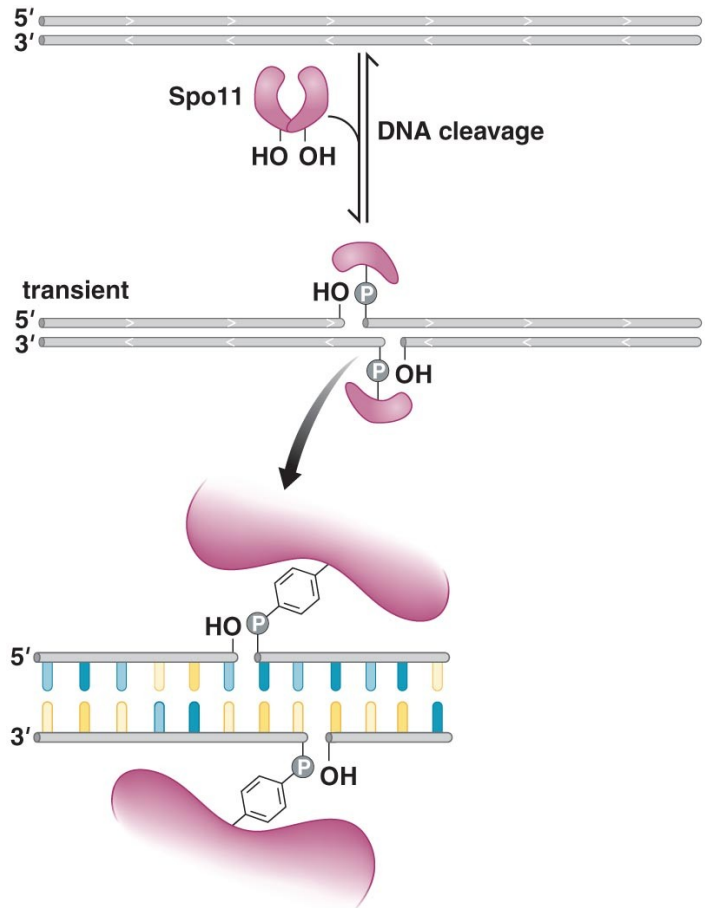
- Etické dilema
- Bezpečnost
- Ztráta diverzity populace
- Pouze pro bohaté?

# První děti narozené s editovaným genomem

---

- 1. summit o editaci lidského genomu konaném koncem roku 2015 ve Washingtonu - výzkum cílených zásahů do dědičné informace lidských embryí bude pokračovat a zároveň se všichni účastníci zavázali, že se nebudou pokoušet přivést na svět děti z embryí s cíleně upraveným genomem.
- Konec roku 2018 - cíleným poškozením genu CCR5 se snažili dodat novou vlastnost – odolnost k viru HIV.

# Site-specific recombination



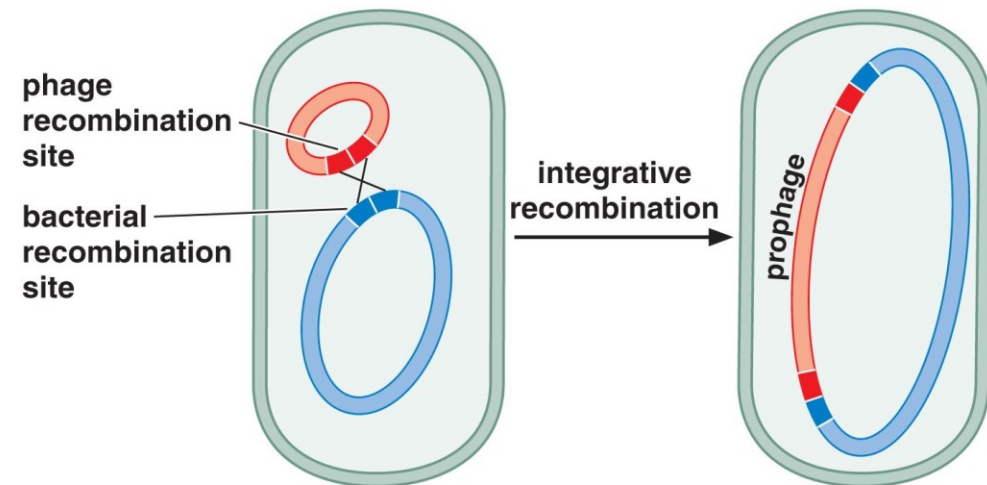
Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

Serin/tyrosin – špecifická proteinkináza

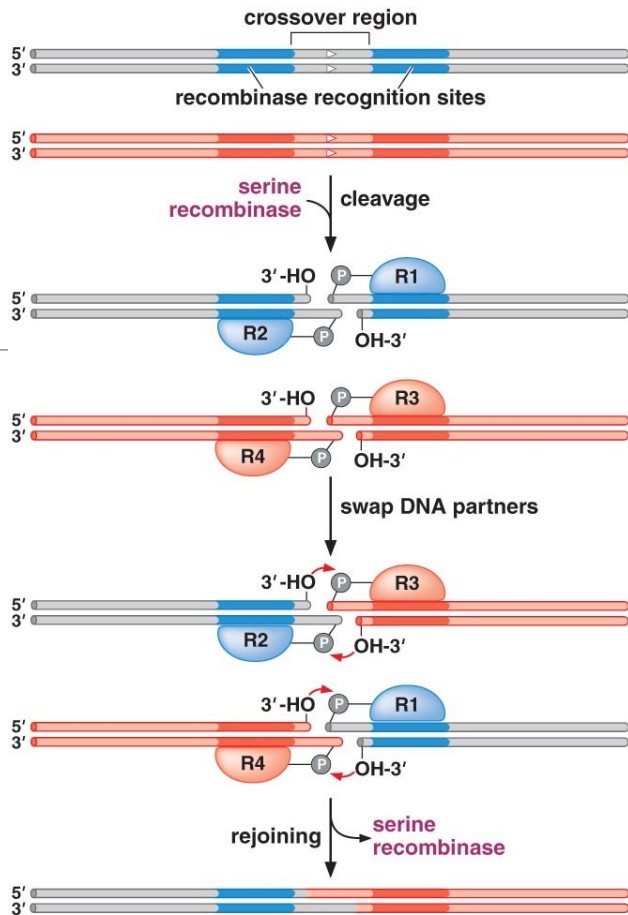
Enzymy z fágov so špecifitou na DNA

-OH skupina ako nukleofil

Rekombinačne rozpoznávacie miesto



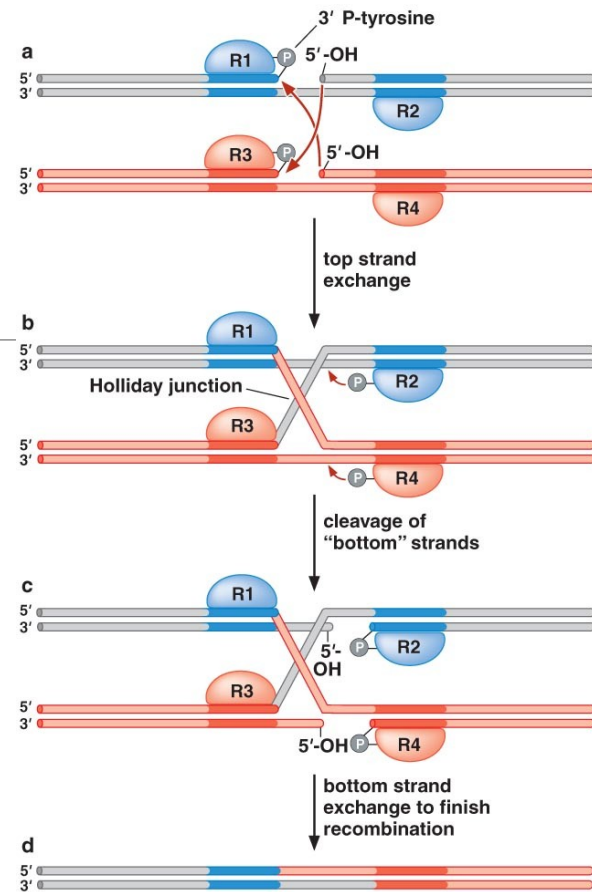
Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.



Ser

Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

špecifita



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

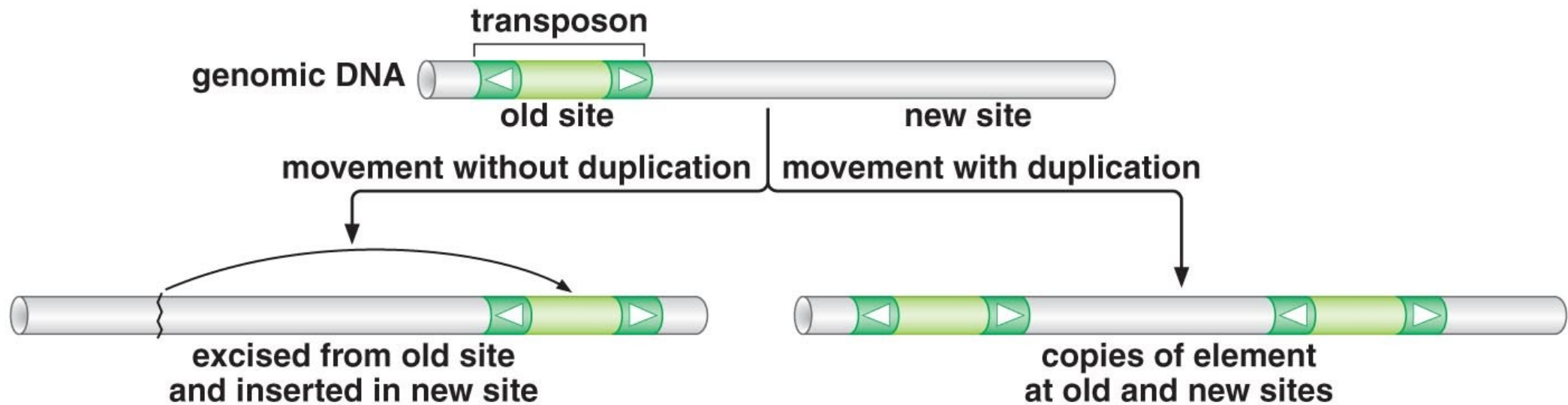
tyrosinová




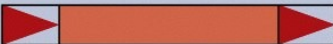
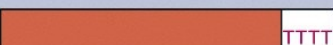
# Transpozícia

Transposons

Jumping genes



**Table 5–3 Three Major Classes of Transposable Elements**

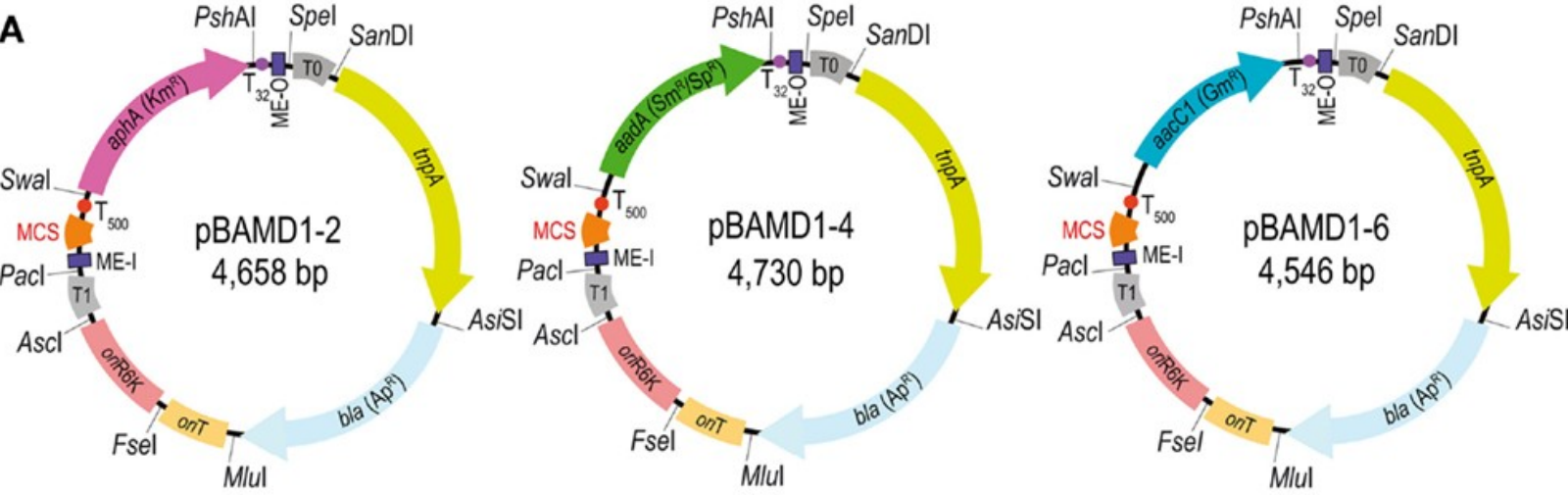
CLASS DESCRIPTION AND STRUCTURE	SPECIALIZED ENZYMES REQUIRED FOR MOVEMENT	MODE OF MOVEMENT	EXAMPLES
<b>DNA-only transposons</b>			
 short inverted repeats at each end	transposase	moves as DNA, either by cut-and-paste or replicative pathways	P element ( <i>Drosophila</i> ) Ac-Ds (maize) Tn3 and Tn10 ( <i>E. coli</i> ) Tam3 (snapdragon)
<b>Retroviral-like retrotransposons</b>			
 directly repeated long terminal repeats (LTRs) at each end	reverse transcriptase and integrase	moves via an RNA intermediate produced by a promoter in the LTR	Copia ( <i>Drosophila</i> ) Ty1 (yeast) THE1 (human) Bs1 (maize)
<b>Nonretroviral retrotransposons</b>			
 Poly A at 3' end of RNA transcript; 5' end is often truncated	reverse transcriptase and endonuclease	moves via an RNA intermediate that is often produced from a neighboring promoter	F element ( <i>Drosophila</i> ) L1 (human) Cin4 (maize)

These elements range in length from 1000 to about 12,000 nucleotide pairs. Each family contains many members, only a few of which are listed here. In addition to transposable elements, some viruses can move in and out of host cell chromosomes by transpositional mechanisms. These viruses are related to the first two classes of transposons.

Table 5-3 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

# Rozdelenie transpozičných elementov

# pBAMD

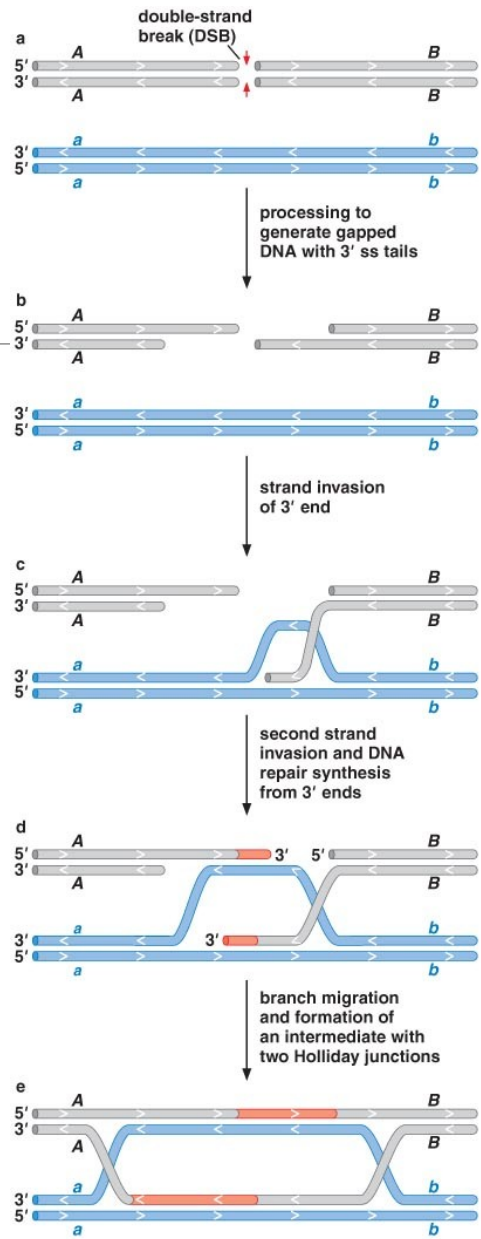


TRPA  
ME-I/ME-O  
FENOTYP

# Delécia pomocou homolognej rekombinacie

FENOTYP

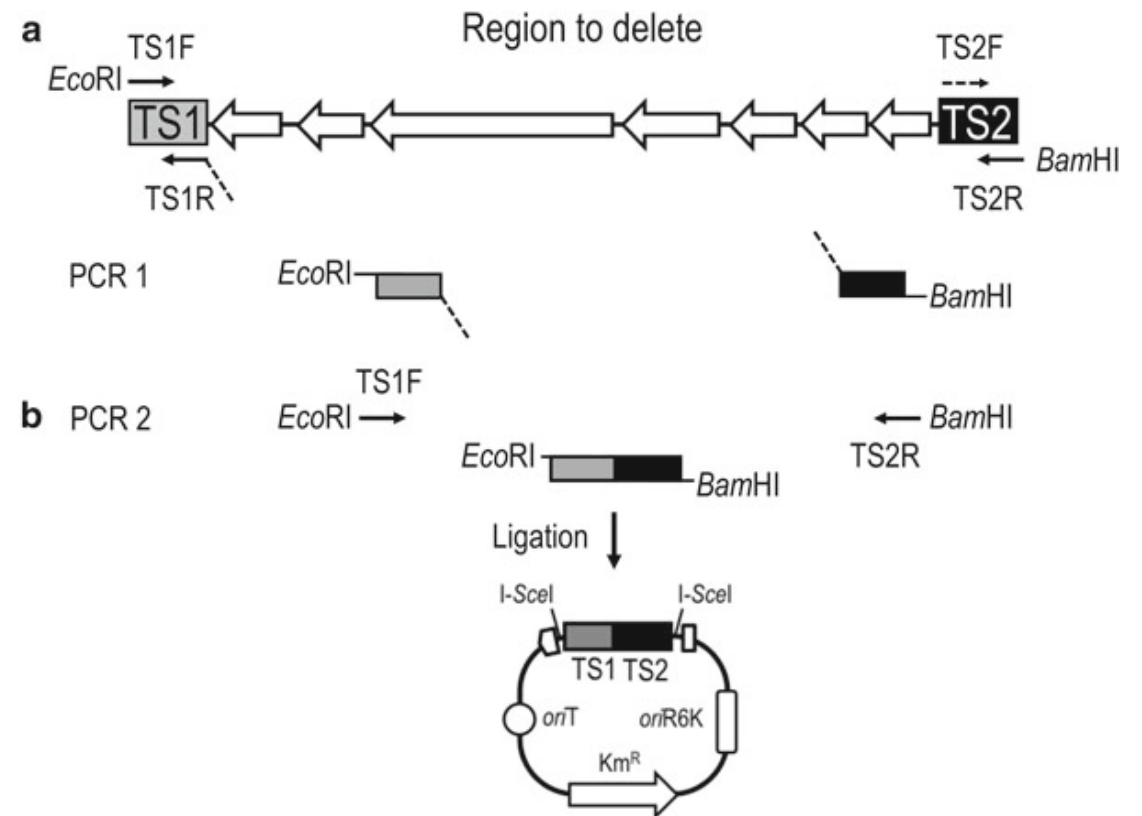
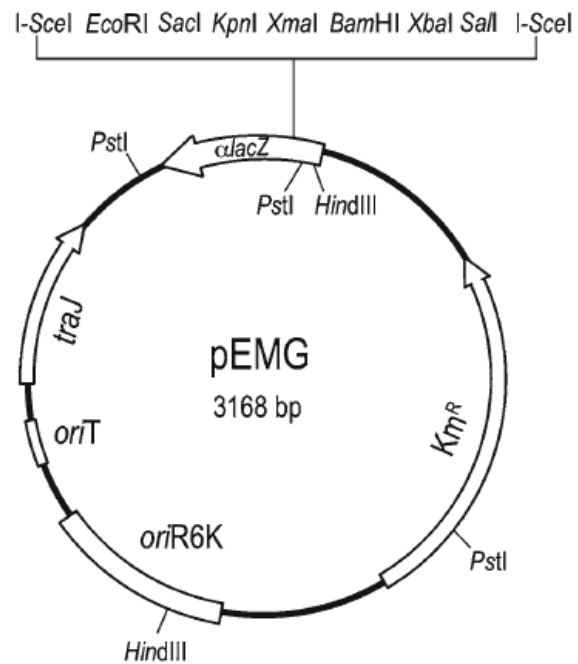
OPAKOVANÉ POUŽITIE



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

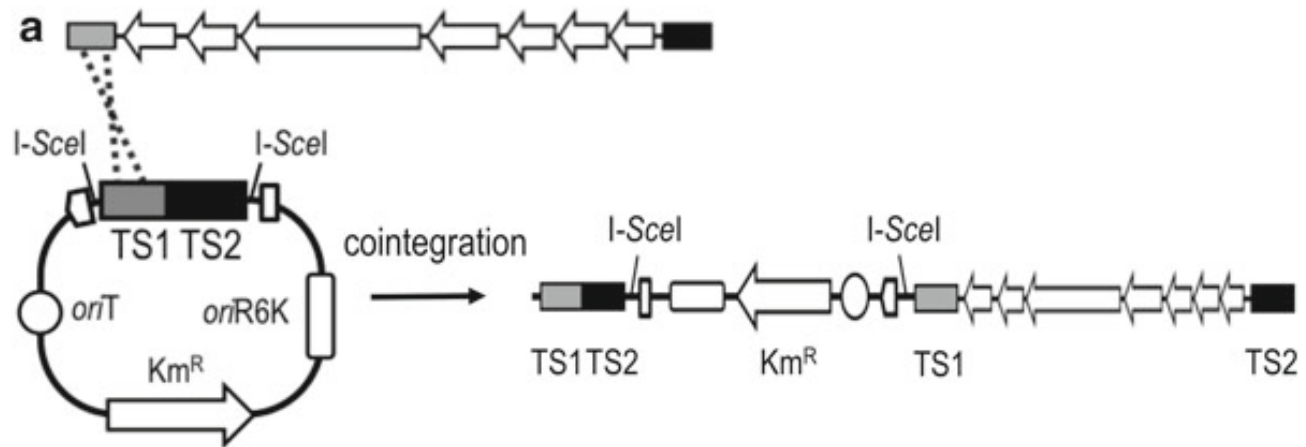
# Delécia genov kódujuce bičiek

Klonovanie 500 bp pred a za oblasťou na deléciu do samovražedného plazmidu pEMG



# Delécia genov kódujuce bičiek

Vloženie plazmidu do hostiteľskej buňky a vznik ko-integrácie

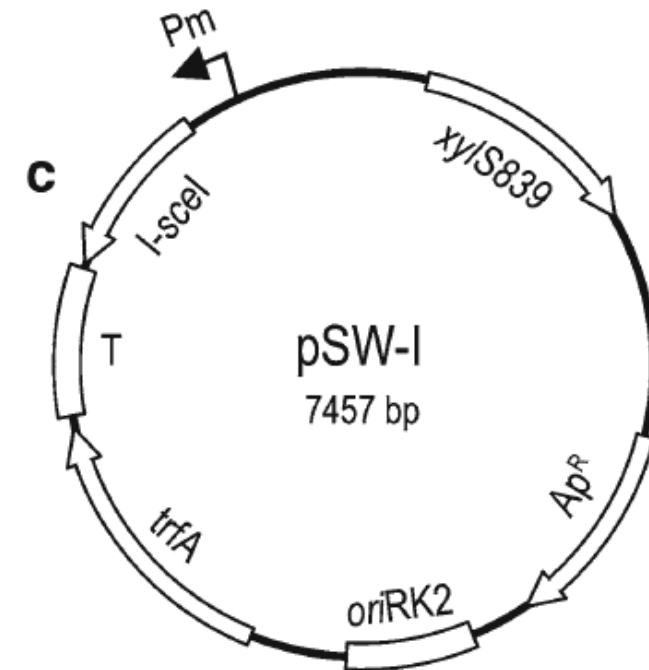
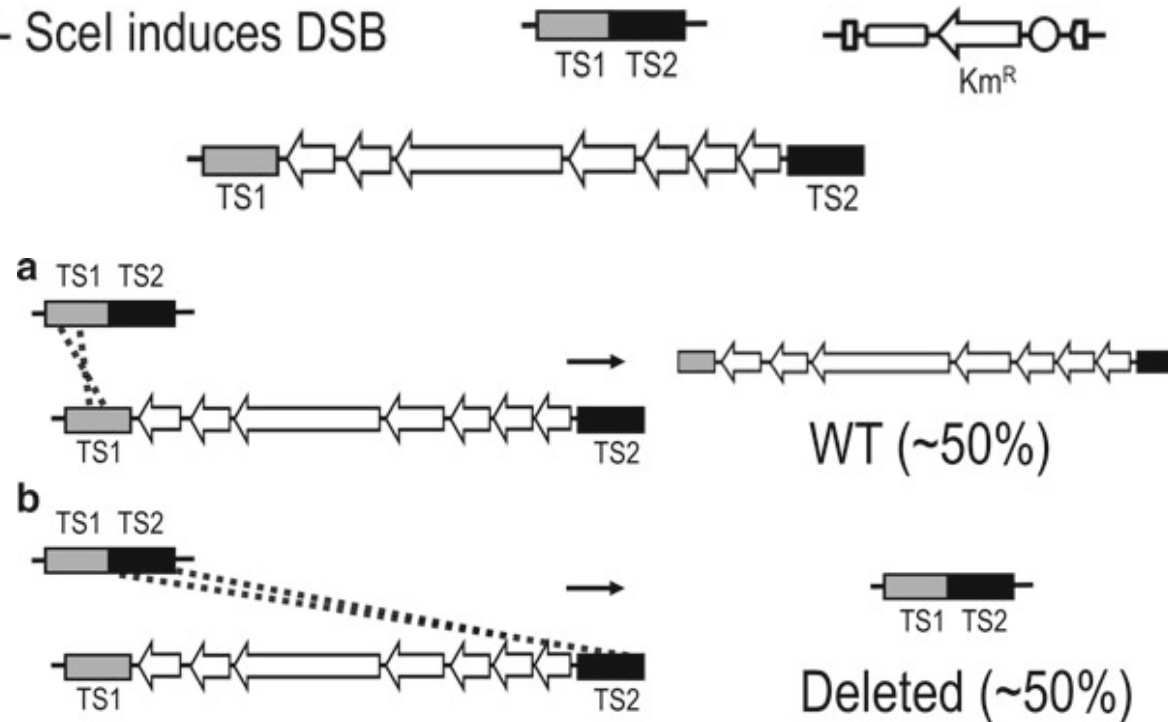


# Delécia genov kódujuce bičiek

Vloženie pSW-I a indukcia expresie genu *I-sceI*

Vznik DSB (double strand break)

*I*-SceI induces DSB



# Výhody a nevýhody

---

+ flexibilný protokol pre rôzne aplikácie

+ umožňuje mnoho modifikácií v jednom klone

- časová náročnosť

- niektoré delécie sú ťažko dosiahnuteľné alebo až nemožné

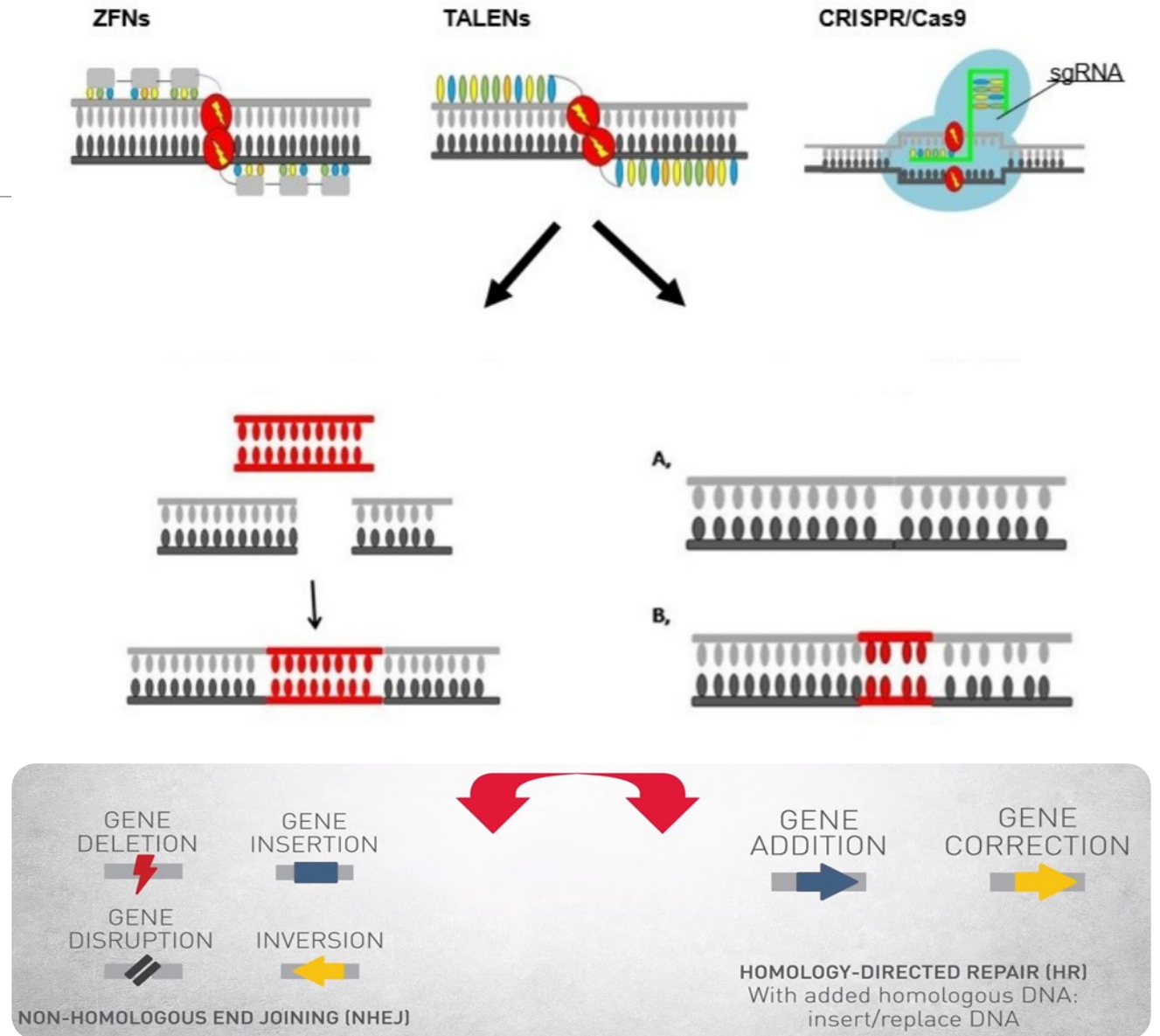


# ZFNs (zinc-finger nucleases)

---

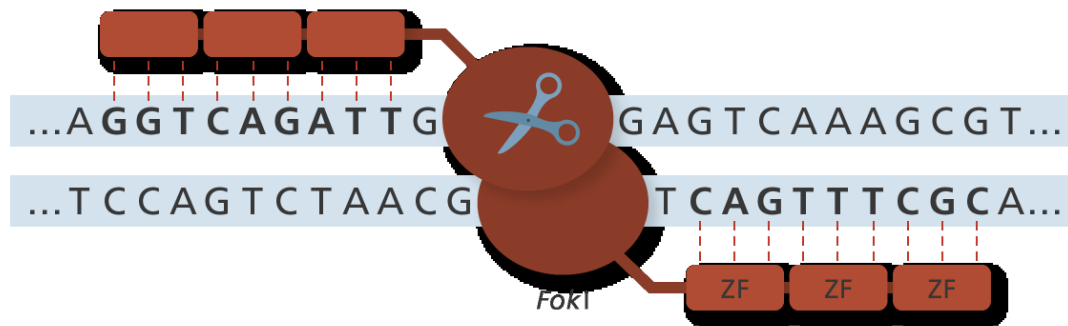
- První generace uměle vytvořených nukleáz, předchůdce CRISPR/Cas9 systému
- ZFNs = nesespecifické nukleázy spojené se zinkovými prsty, syntetickými proteiny, jejichž DNA-vazebné domény umožňují rozeznávat specifické sekvence v DNA
- Dvouřetězcové zlomy v DNA na předem vybraných místech (- > místně specifická mutageneze)

Opravy  
dvouřetězcového  
zlomu (DSBs)  
způsobené  
specifickými  
endonukleázami



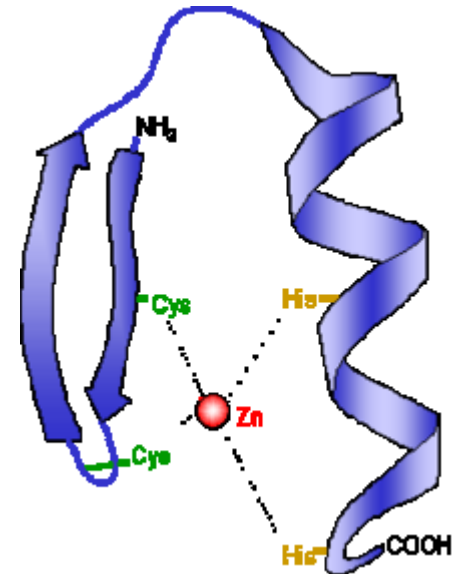
# Princip

Zinc-finger nucleases (ZFNs)



ZFNs jsou složeny ze 2 částí:

- 1) DNA vázající: zinc-finger (3 bp DNA)
- 2) DNA štěpící: *Fok I* nukleáza



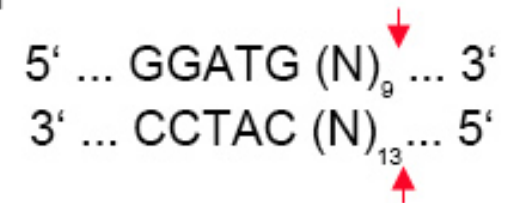
# Fok I

---

*Flavobacterium okeanoikoites*

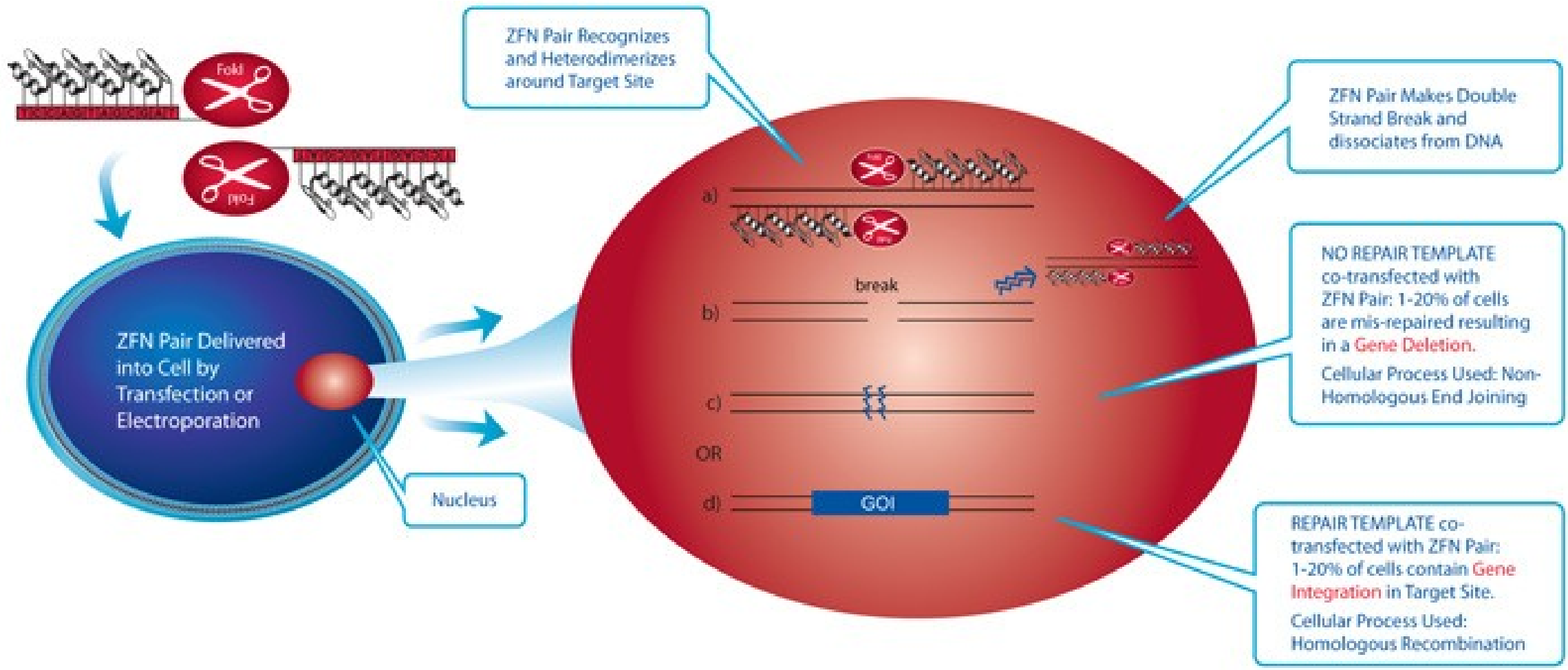
Restrikční endonukleáza typu IIS, tvořena N-terminální vazebnou doménou a nespecificky štěpící doménou na C-konci

Fok I



Výhody FokI pro její využití v GI:

- vyžaduje dimerizaci – zvýší se tím specifita rozpoznání cílového místa
- heterodimery - zvýšení specifity rozpoznání cílových sekvencí a eliminace možnosti vytváření nespecifického štěpení v případě homodimerů



# Výhody a nevýhody

---

- + Rychlé narušení nebo integrace do všech genomických lokusů
- + Vytvořené mutace jsou trvalé a dědičné
- + Funguje v celé řadě savčích typů somatických buněk
- + Úpravy vyvolané jediným transfekčním experimentem
  
- Navržení a syntéza proteinů, které dokáží rozeznat cílovou sekvenci na bázi interakce protein-DNA je finančně i časově náročné (obtížné předvídat bez testování)
- Nízká specifita a rozlišení cílené sekvence (nelze pokrýt všechny možné kombinace tripletů, avšak s vyšším počtem zinkových prstů se zvyšuje specifita)

# Cílové aplikace pro ZFN

---

- Funkční genomika / ověření cíle
- Tvorba knockoutů genu ve více buněčných liniích
- Kompletní knockout geny, které nejsou přístupné RNAi
- Screening založený na buňkách
- Vytvoření knock-in buněčných linií s promotory, fúzními značkami nebo reportéry integrovanými do endogenních genů
- Optimalizace buněčné linie
- Vytvoření buněčných linií, které produkují vyšší výtěžky proteinů nebo protilátek

# Editace genomu pomocí TALENs

---



# TALEs

---

Tzv. transkripční aktivující efekторы (Transcription Activator-like Effectors)

Proteiny objeveny u gram negativních bakterií r. *Xanthomonas*, při infekci rostlin

Vazebná doména DNA obsahuje opakující se 33-34 AA sekvenci, 12. a 13. pozice určuje specifčnost navázání

TALEs mohou vstupovat do jádra buněk, kde se váží na promotorové sekvence a aktivují transkripční rostlinných genů, napomáhají tak bakteriální infekci

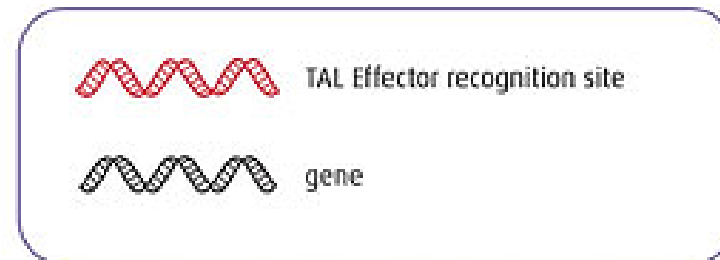
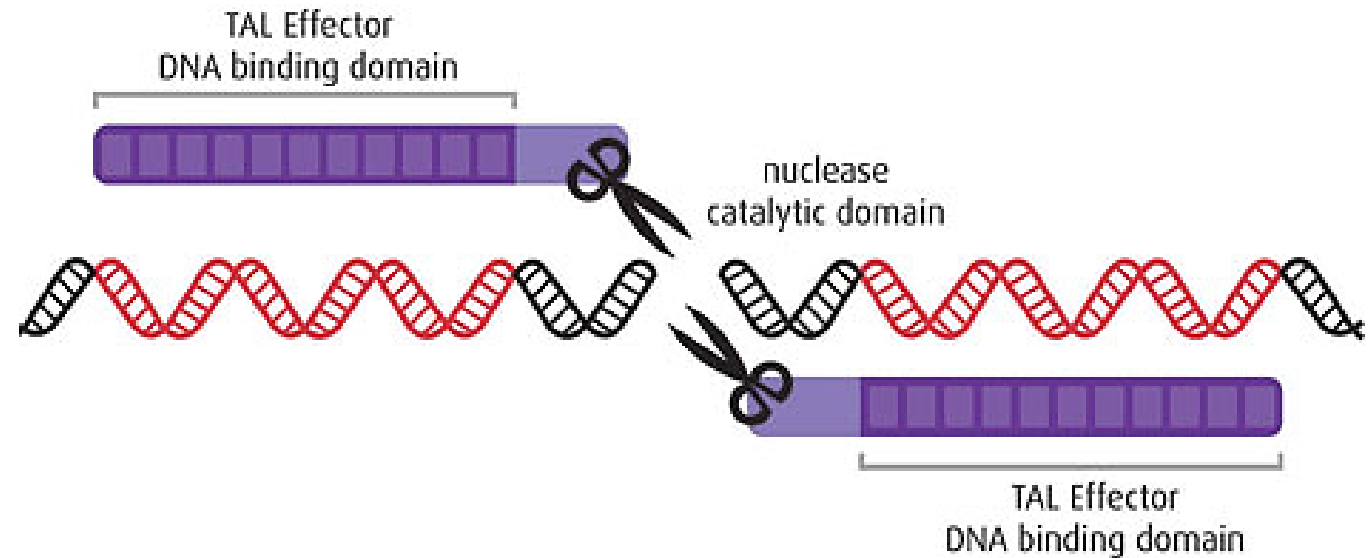
Připojením endonukleázy *Fok I* vzniká **TALENs**

TALEs mohou být konstruovány tak, aby se vážaly na jakoukoli DNA sekvenci -> v kombinaci s nukleázou může být DNA štěpena na specifických místech

# Princip

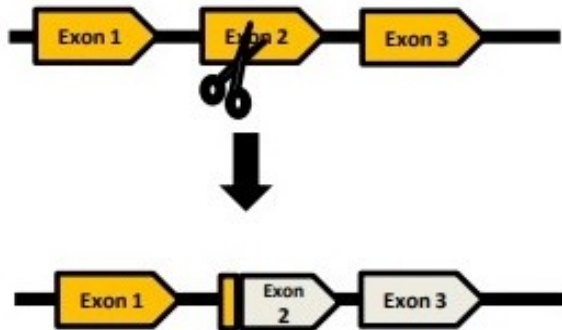
Fúze **proteinu**, obsahující vysoce specificky rozpoznávací sekvenci vázající DNA, s **endonuklázou** (*Fok I*)

*Fok I* endonukleáza vyžaduje dimerizaci → nutná vazba dvou různých TALENs na opačných vlákních v těsné blízkosti cílové DNA

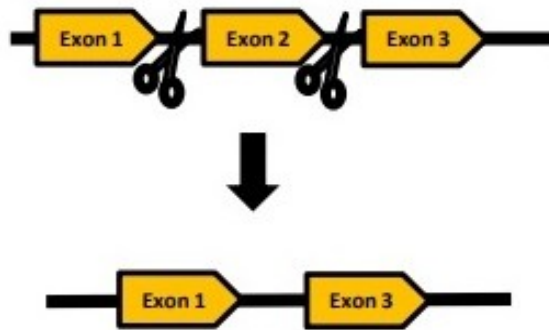


# Základní použití programovatelných nukleáz

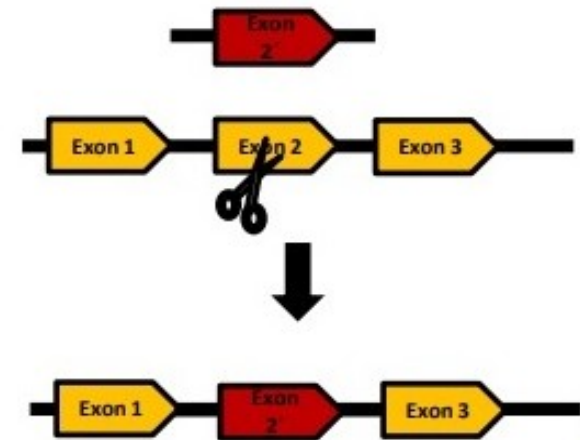
Tvorba tzv. indel mutací



Excize/vyřiznutí specifické DNA



Místně-specifická integrace  
Homologní rekombinace



# Aplikace TALENS

---

Úprava rostlinných genomů (pšenice, rýže) – zvýšení odolnosti a vlastností plodiny

Umožňuje indukci cílených změn v různých modelových organismech (škrkavka, žába, prase, krysa)

Tvorba knockout kmenů a studium buněčných mutací u různých organismů (kvasinky, bakterie, krysí embryonální kmenové buňky)

In vitro využíván k nápravě genetických defektů, které způsobují onemocnění (srpkovitá anémie, xeroderma pigmentosum)

# Výhody a nevýhody

---

Jednodušší design oproti ZFNs

Design a konstrukce TALENs za krátký čas a ve velkém množství

Délka rozpoznávaného cílového řetězce DNA může být delší (30-40 bp)

Udává se, že oproti ZFNs produkují méně off-target mutací

**NEVÝHODY:** - velká velikost, hůře se vnášejí a exprimují do buněk a jsou tudíž terapeuticky méně atraktivní, musí být dodávány ve virových vektorech nebo jako molekuly RNA

# CRISPR-CAS 9

---

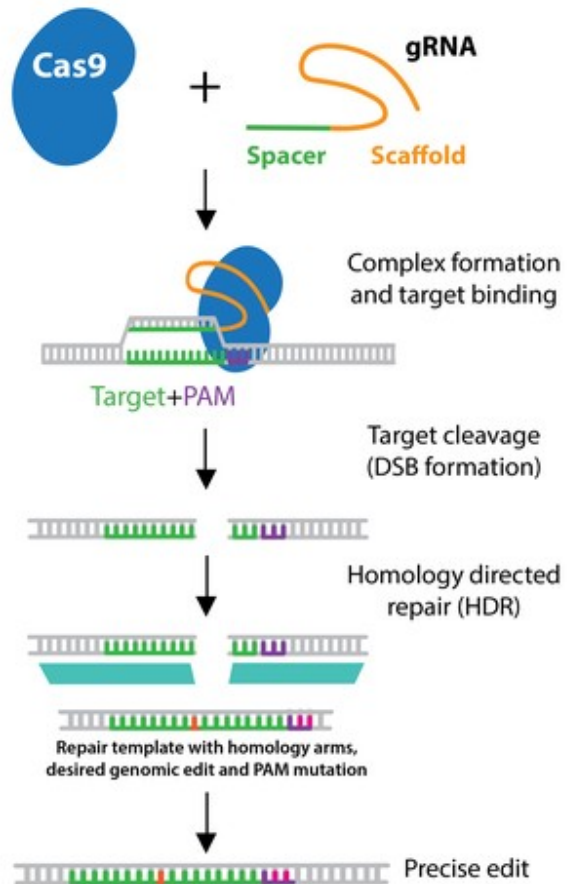
clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)

CRISPR-associated protein 9 (CAS9)

Objavené u baktérií, ktoré mali podobný obranný systém voči patogénom a vírusom – imunitná reakcia (baktérie vystrihnú časti vírusovej DNA, vytvoria z nej segmenty DNA, ktoré umožňujú si zapamätať ten konkrétny vírus. Pri ďalšom napadnutí týmto vírusom vytvárajú z CRISPR segmentov DNA RNA segmenty na zacielenie vírusovej DNA. Pomocou Cas9 (alebo iného enzýmu) odštiepia vírusovú DNA od seba, čím vírus deaktivujú)



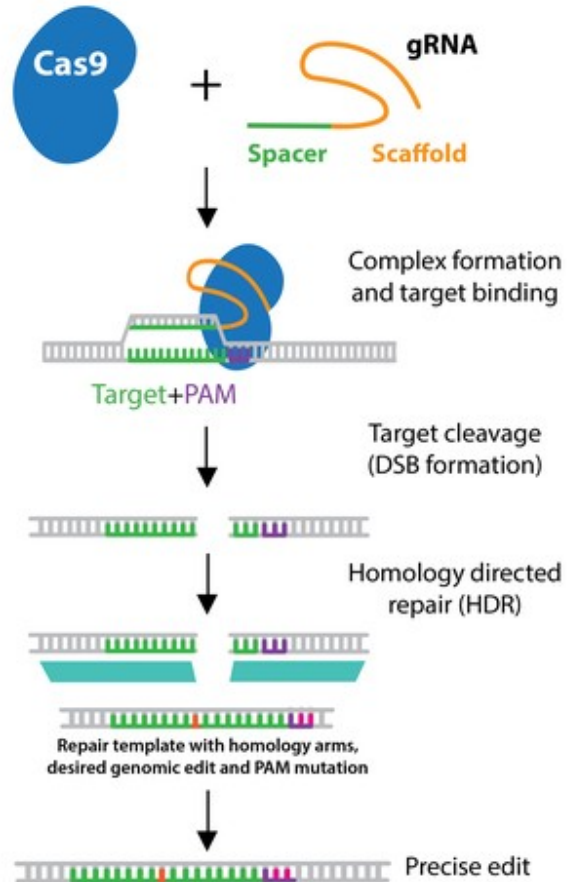
# CRISPR-CAS 9



Pre editáciu genómu potrebujeme

- Cas9, čiže enzým, kt. nastrihne DNA v presnom mieste ktoré chceme modifikovať
- gRNA (guide) – vopred pripravená RNA (cca 20 bází) umiestnená do dlhšej RNA (scaffold), ktoré sa viaže na DNA. Pomocou gRNA v nej spozná Cas9 konkrétne miesto kde má prestrihnúť DNA

# CRISPR-CAS 9



gRNA je presne dizajnovaná podľa špecifickej sekvencie DNA, ktorú chceme editovať (je zložená z RNA bází komplementárnych k cieľovej DNA sekvencii)

Cas9 nasleduje gRNA, naviaže sa na cieľovú sekvenciu DNA a rozstrihne ju v oboch reťazcoch

Bunka vtedy prirodzene rozpozná chybu a snaží sa ju opraviť -> prestrihnuté vlákno je dosyntetizované aj s navodenou mutáciou



# Využitie CRISPR-CAS9

---

Cielená editácia genómu ( aj u druhov, u ktorých boli tradičné techniky gen. Modifikácie neúčinné)

Skúma sa jeho využitie pri liečení chorôb s genetickým základom

Potenciál na úpravu genómu somatických buniek, ale teoreticky aj reprodukčných buniek

# Plusy a mínusy

---

+

Špecifická editácia genómu

Najjednoduchší, rýchly a všestranný systém

Štúdium génov, možnosť génovej terapie

-

Možné efekty mimo cielenej sekvencie

Etické obavy pri editácii reprodukčných buniek



Ďakujem  
e za  
pozornos  
t'

---