

# Moderní metody analýzy genomu

Úvod

**CRISPR technológia – princípy a využitie**

Veronika Mančíková

23.9.2019



# Moderní metody analýzy genomu - syllabus

- 23.9. Úvod, CRISPR technológia – princípy a využitie (Mančíková)
- 7.10. Metody pro analýzu nekódujících RNA – miRNA, lncRNA (Mráz)
- 21.10. Sekvenování nové generace (NGS) – technologické aspekty různých NGS platforem (Tichý)
- 4.11. Příprava knihoven pro sekvenování nové generace (Tichý)
- 18.11. Analýza dat I (Bystrý)
- 2.12. Analýza dat II (Bystrý)
- 16.12. Aplikace - Využití moderních technologií, design experimentů (Tichý)

# Ukončení

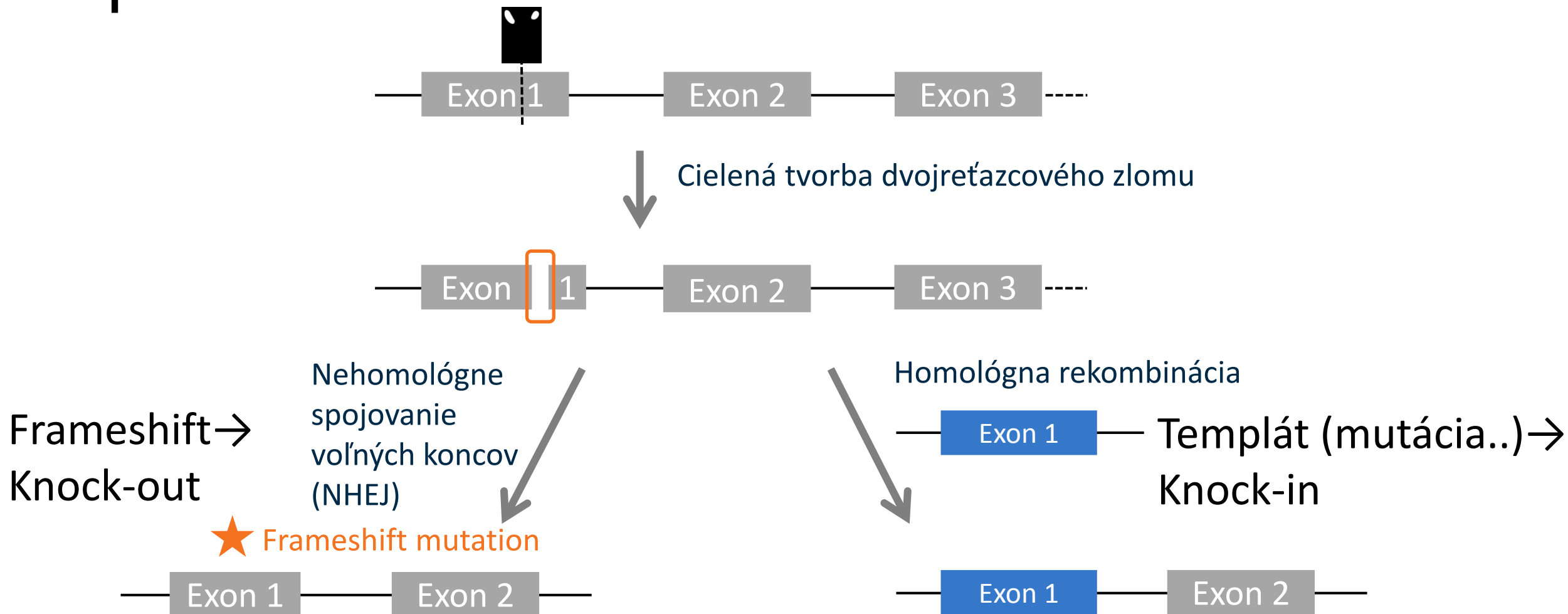
- Test na internete
- Aspoň polovica správnych odpovedí

# CRISPR/Cas



Klíč k úspěchu cíleného genomového inženýrstva: metoda na tvorbu dvojřetězcových zlomov.

# Reparačný systém buniek – endogénny proces



# Ako špecificky naštiepiť genóm?

Hybrid Meganuclease



Protein-based  
nucleases

RNA-guided  
nuclease

ZFN



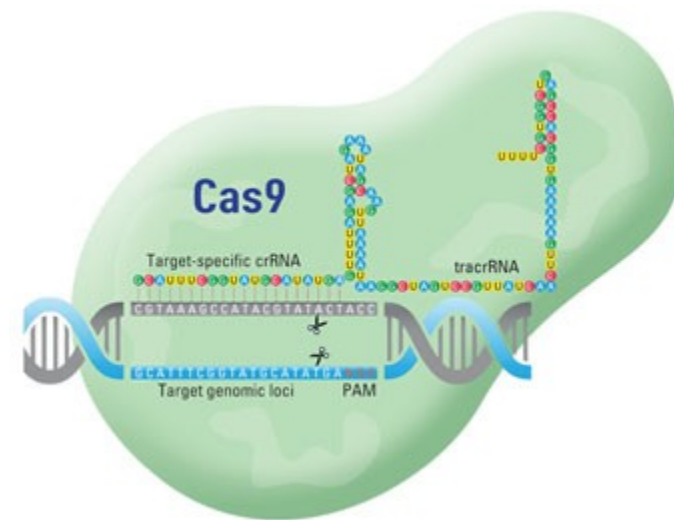
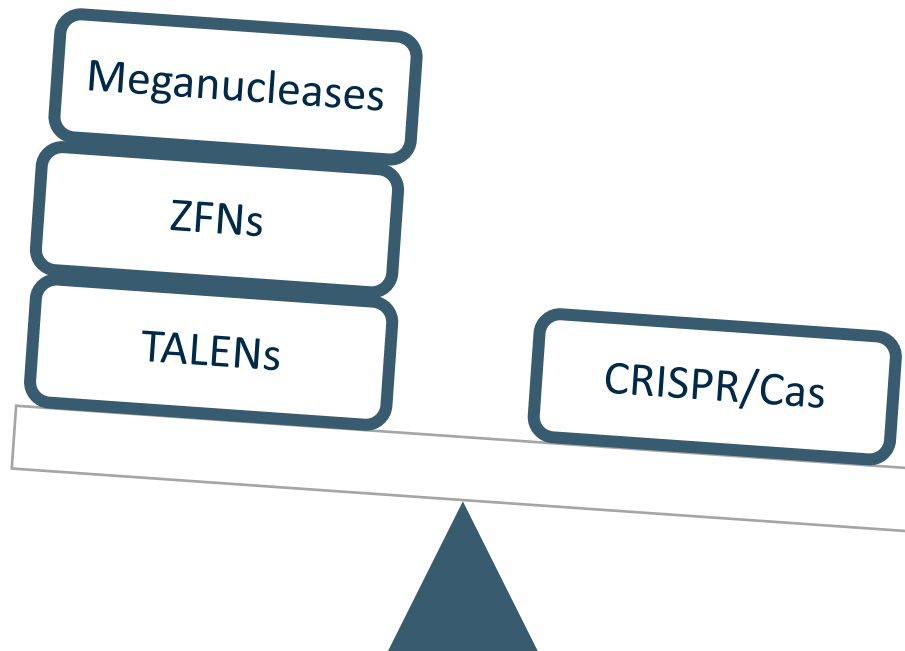
Zinc finger domains

TALEN



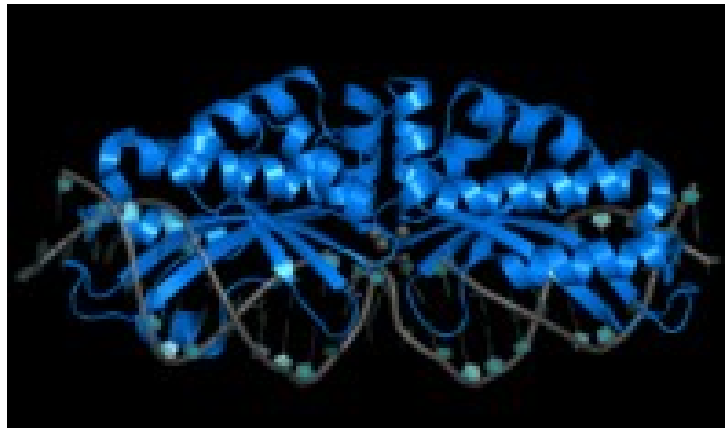
TALE subunits

active FokI catalytic subunit heterodimer



# Meganukleázy

- Najšpecifickejšie restričné endonukleázy rozpoznávajúce veľmi dlhé sekvencie (16-40nt), prirodzene sa vyskytujú málo
- Sekvencia 18 bp rozpoznaná meganukleázou I-SceI sa náhodne bude nachádzať v genóme 20x dlhšom ako ten ľudský
- Umelé vytváranie variant je náročné, nakoľko DNA väzobná a štiepiaca funkcia sú súčasťou jednej domény



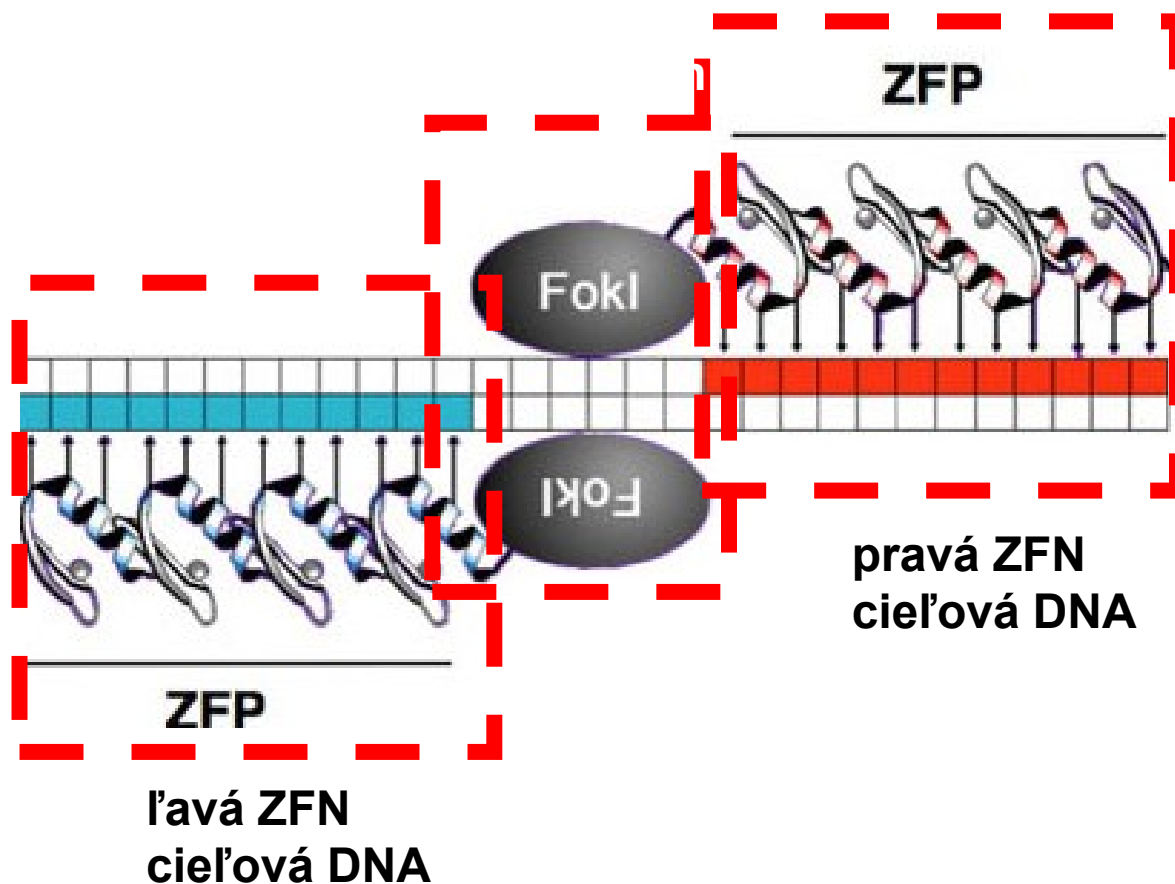
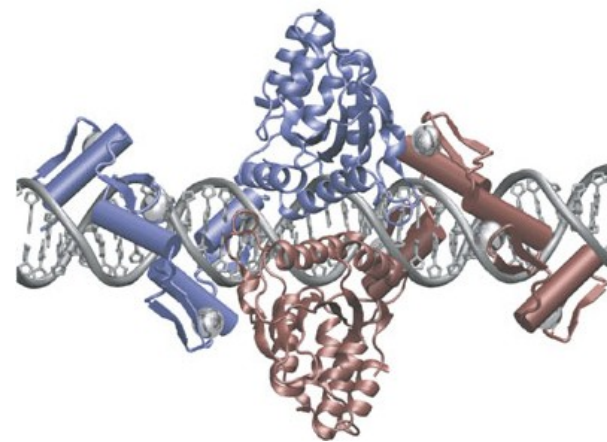


# ZFNs & TALENs

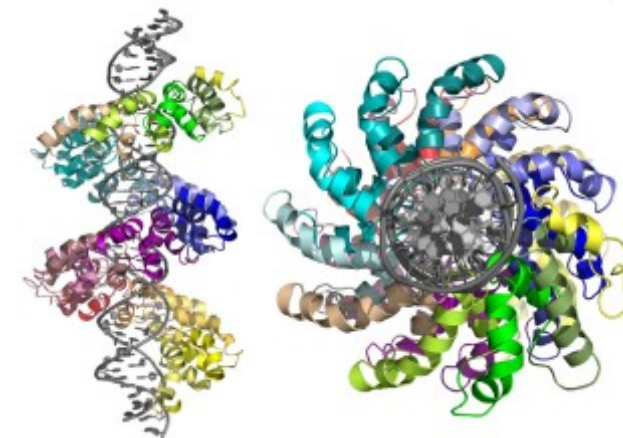
- Artificiálne restriktčné enzýmy (2 domény):
  - DNA väzba (Zinc Finger a TALE)
  - štiepenie (Fok I Nukleáza)
- Proteínové moduly rozpoznávajú DNA sekvenciu a **dimerizácia Fok I** indukuje štiepenie cieľovej DNA
- Rozpoznávajú dlhé úseky báz vhodné na štiepenie na úrovni genómu

# ZFNs (1985)

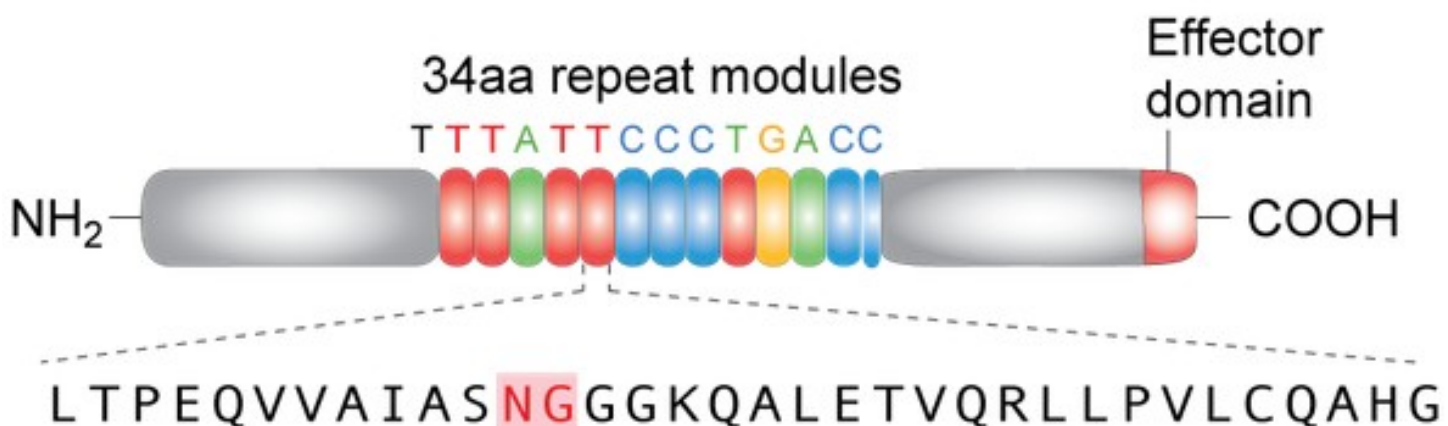
- Nová cieľová sekvencia (3-4 nt) = nová doména
- Design časovo náročný
- Miera neúspechu je veľmi vysoká (medzidoménové interakcie)
- Off-target veľmi časté



# TALENs (2009)



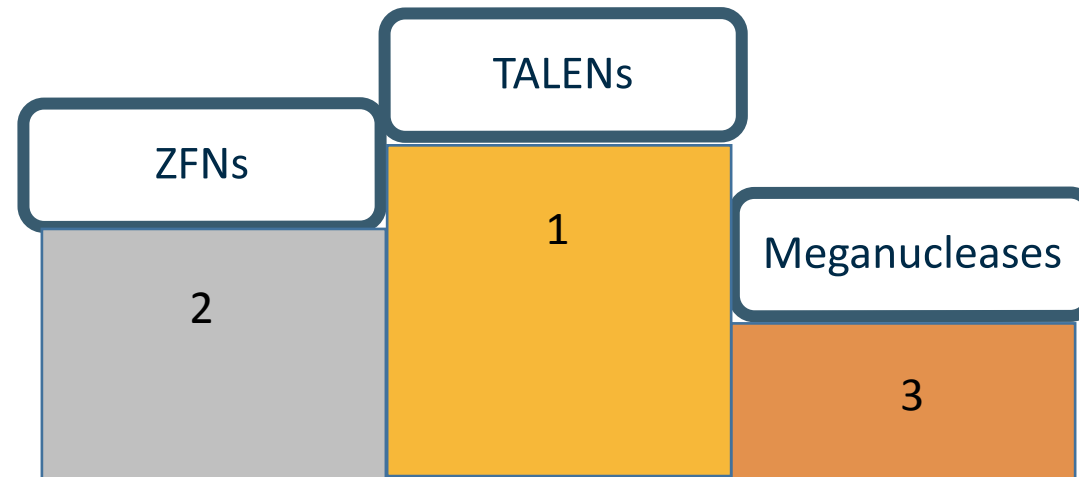
- Transcription **a**ctivator-**l**ike **e**ffector **n**uclease
- Opakujúce sa vysoko konzervované „moduly“ 33-34 aminokyselín
- Jednoduchší design ako u ZNFs (každý nukleotid má vlastný modul)



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

# Proteínové systémy

- sekvenčná špecifita je **daná interakciou DNA-protein**
- editácia prebieha s presnosťou **až 1 nt**
- Používajú se umelo pripravené nukleázy
- Nový cieľ=nový proteín → príprava často zložitá, výsledok nie vždy uspokojivý



# CRISPR/Cas: história

- Skromný začiatok ako exotické opakujúce sa sekvencie v bakteriálnom genóme
- 1987: Ishino *et al.*: "exotic junk DNA" s neznámou funkciou u *E.coli*

```
TCGAAATGGGACGGAGTTCTACCGCAGAGGCGGGGGAACTC CAAGTGATATCCATCATCGGCATCCAGTGCGCC (1,451)
(1,452) CGGTTTATCCCCGCTGATCCGGGGAACACCAAGCCTCAGGCGTGAAATCTCACCGTCCGTTGC (1,512)
(1,513) CGGTTTATCCCTGCTGGCGCGGGGGAACTC TCGGTTTCAGGCGTTCCAAACCTGGCTACCGGG (1,573)
(1,574) CGGTTTATCCCCGCTAACCGGGGGAACTC GTAGTCCATCATTCACCTATGCTCTGAACTCC (1,634)
(1,635) CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGGAACTC (1,664)
consensus: CGGTTTATCCCCGCTGGAACGGGGGAACTC
```

- 2002: Jansen *et al.*: v genóme väčšiny baktérií a Archae – CRISPR

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat

= priame opakovania (21 do 37 bp) rozdelené rovnako dlhými neopakujúcimi sa sekvenciami (medzerníky=spacery)

- CRISPR associated (*cas*) genes – vždy prítomné pri CRISPR lokuse

- 2005: Mojica *et al.*: sekvencia spacerov homológna k bakt. fágom

# CRISPR: bakteriálna imunitná pamäť

## CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes

Rodolphe Barrangou,<sup>1</sup> Christophe Fremaux,<sup>2</sup> H  l  ne Deveau,<sup>3</sup> Melissa Richards,<sup>1</sup> Patrick Boyaval,<sup>2</sup> Sylvain Moineau,<sup>3</sup> Dennis A. Romero,<sup>1</sup> Philippe Horvath<sup>2\*</sup>

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) are a distinctive feature of the genomes of most Bacteria and Archaea and are thought to be involved in resistance to bacteriophages. We found that, after viral challenge, bacteria integrated new spacers derived from phage genomic sequences. Removal or addition of particular spacers modified the phage-resistance phenotype of the cell. Thus, CRISPR, together with associated *cas* genes, provided resistance against phages, and resistance specificity is determined by spacer-phage sequence similarity.

Science, 2007

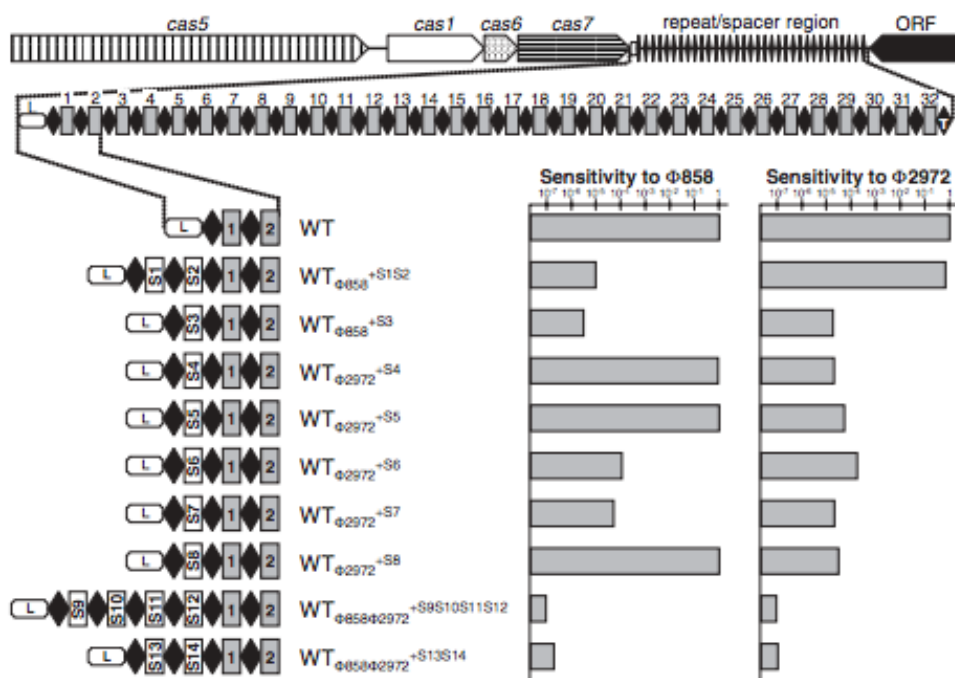
V  skum uskuto  nen   v spolo  nosti DANISCO.

Kontamin  cia f  gmi je najz  v  a  nej         problem vo fermenta  nom priemysle (jogurty a syry).

The screenshot displays the Danisco website interface. At the top, the Danisco logo is visible on the left, and navigation links for 'Homepage', 'Contact us', 'Downloads', and 'Dupont.com' are on the right. A search bar is also present. Below the logo, a horizontal menu lists categories: 'Food & beverages', 'Dietary supplements', 'Pet food', 'Product range', 'Global food challenges', and 'About DuPont'. A secondary menu lists product types: 'Bakery', 'Beverages', 'Confectionery', 'Culinary', 'Dairy', 'Frozen desserts', 'Fruit applications', 'Meat, poultry & seafood', and 'Oils & fats'. The main content area features a large banner for the 'International Cheese Technology Exposition April 22-24', highlighting a 'New Fungi Control Solution'. To the right, a 'Latest News' section lists several articles with expandable arrows. At the bottom, there are sections for 'Jobs', 'DuPont Food - putting science to work', 'Health & nutrition', and an 'Event calendar' for the 'International Cheese Expo FI Istanbul' from April 22-24, 2014.

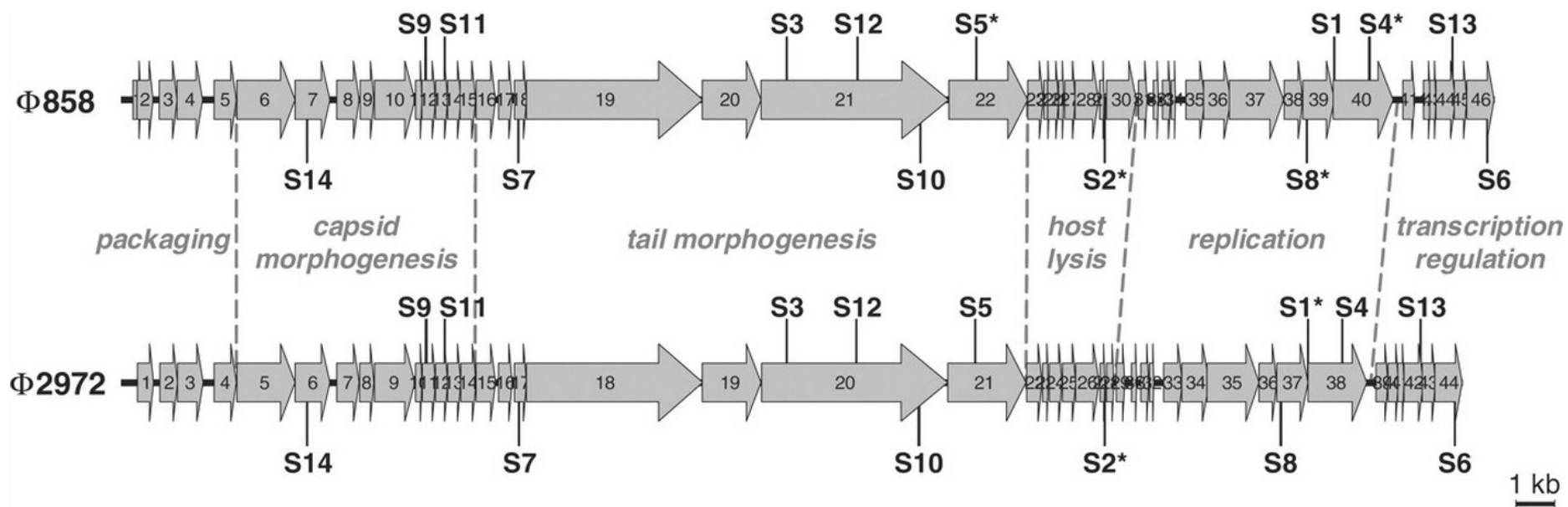
# CRISPR: bakteriálna imunitná pamäť

- Infekčné experimenty s *Streptococcus thermophilus* a lytickými fágmi
- Rezistentné bakt. kmene sa objavujú po fágovej pandémii → hypotéza: „Bakteriálna získaná imunita proti infekcii fágmi?“



- Čím viac spacerov, tým vyššia odolnosť voči infekcii
- Cudzorodá DNA rozpoznaná a začlenená do CRISPR lokusu ako nový medzerník (spacer)
- Cas gény-helikázové a nukleázové motívy → aktívna účasť na prestavbe CRISPR lokusu

# CRISPR: bakteriálna imunitná pamäť

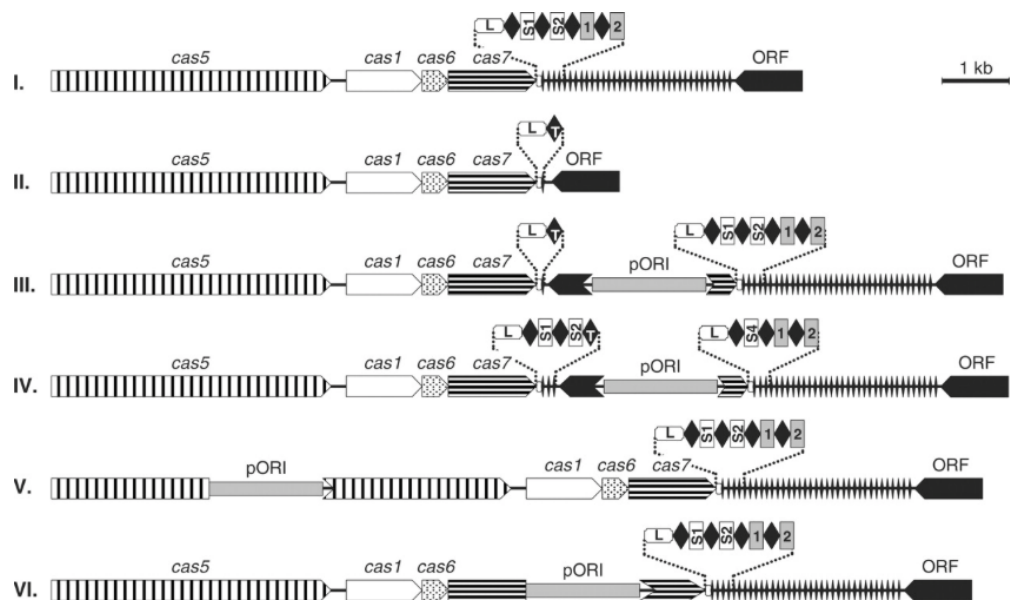


Nové spacery sú homológne ku genómu fágov.

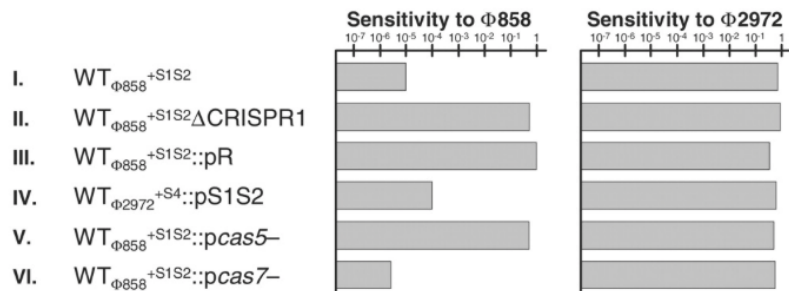


# CRISPR: bakteriálna imunitná pamäť

Ak vložíme nový spacer do bakt. genómu, bude táto rezistentná?



- spacery majú schopnosť poskytnúť fágová rezistencia *de novo*
- samotné spacery nie sú dostačujúce, musia byť v konkrétnom genetickom kontexte
- niektoré *cas* gény sú nevyhnutné k poskytnutiu rezistencie (*cas9*)



# CRISPR: bakteriálna imunitná pamäť

- relatívne malá populácia bakteriofága si zachovala schopnosť infikovať mutanty → tieto fágy zmutovali sekvenciu korešpondujúcu spaceru → imunita závisí na zhode v sekvencii

```
S1          CAACACATTCAACAGATTAATGAAGAATAC
Φ858       .....
Φ858-A     .....A.....
Φ858-B     .....C.....
```

**Fig. S3.** Alignment of CRISPR spacer S1 with the corresponding genomic region of phage 858 and the two mutant phages that have circumvented the CRISPR resistance of strain  $WT_{\Phi 858}^{+S1S2}$ .

# CRISPR/Cas systémy

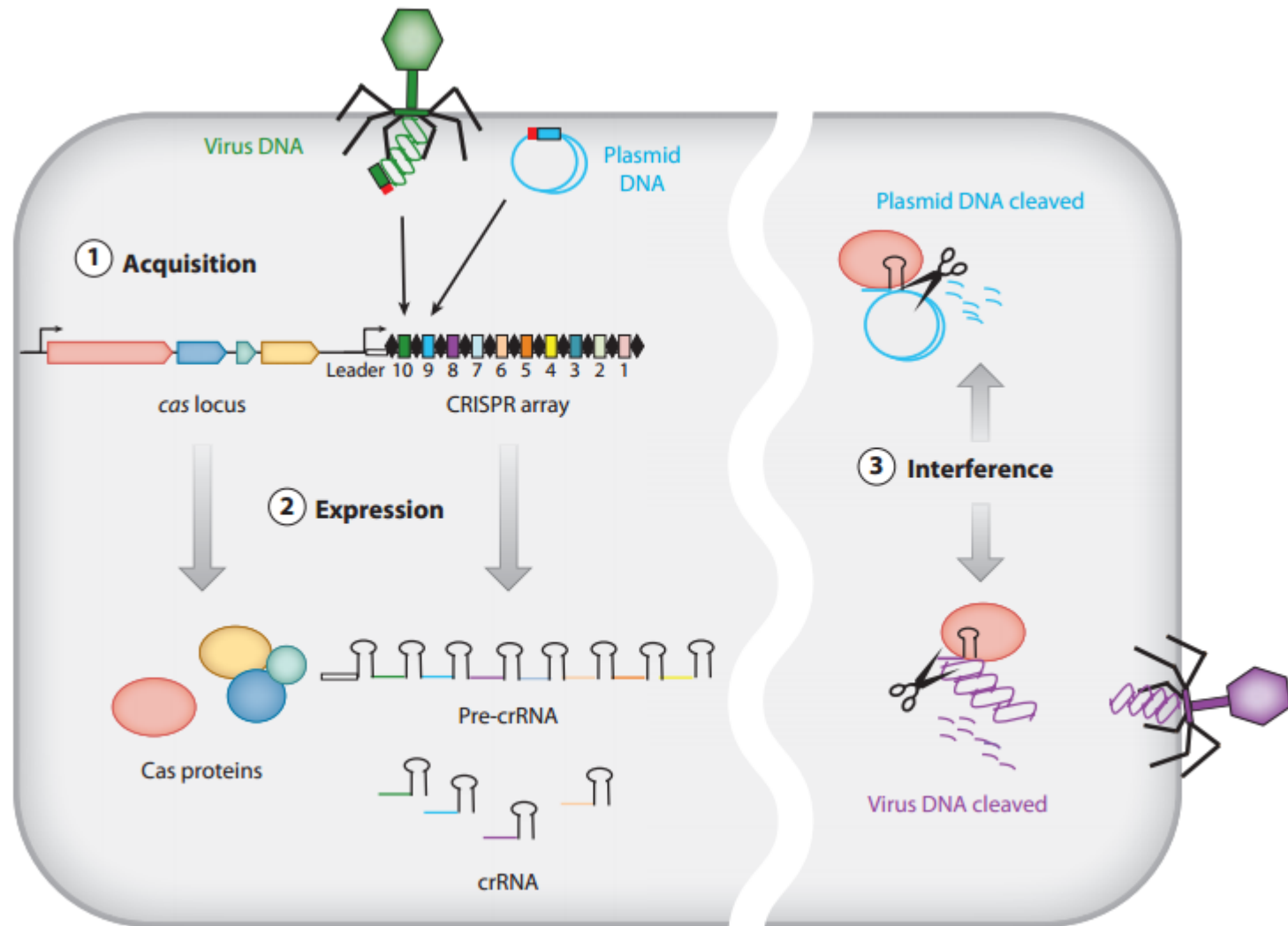
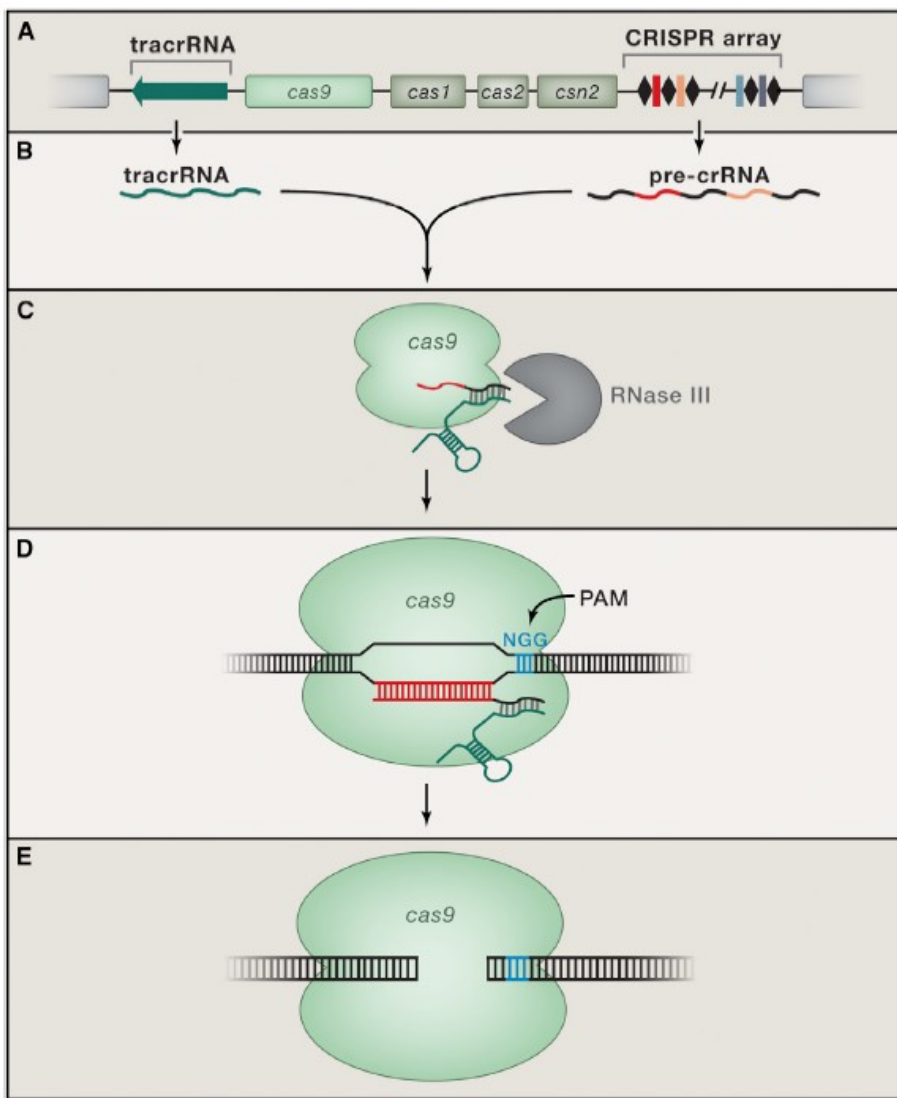
- 90% archae a 1/2 baktérií má nejakú formu CRISPR/Cas imunity.

**Table 1. Classification and Examples of CRISPR Systems**

Class	Type	Subtype	Hallmarks	Example effector	Example organism	Studies Cited
Class 1	Type I		multisubunit effector complex; Cas3	Cascade	<i>E. coli</i>	Brouns et al., 2008
	Type III	III-A	multisubunit effector complex; Csm effector module; DNA targeting	Cas10-Csm	<i>S. epidermidis</i>	Marraffini and Sontheimer, 2008
		III-B	multisubunit effector complex; Cmr effector module; RNA targeting	Cmr	<i>P. furiosus</i>	Hale et al., 2009
Class 2	Type II		single protein effector; tracrRNA	Cas9	<i>S. thermophilus</i>	Bolotin et al., 2005; Barrangou et al., 2007; Sapranaukas et al., 2011; Gasiunas et al., 2012
					<i>S. pyogenes</i>	Deltcheva et al., 2011; Jinek et al., 2012; Cong et al., 2013; Mali et al., 2013
	Type V		single protein effector; single-RNA guided	Cpf1	<i>F. novicida</i>	Zetsche et al., 2015

CRISPR systems are currently organized into two overarching classes: Class 1, which contain multi-subunit effectors, and Class 2, which contain single protein effectors. These classes are subdivided into five types (Makarova et al., 2015), with type IV remaining a putative type within Class 1. Although only Class 2 systems have been adapted for genome engineering, the results described in this review emerged from studying a diversity of CRISPR-Cas systems. (Type III-B systems are not discussed but represent an unusual system that targets RNA rather than DNA [Hale et al., 2009].)

# CRISPR/Cas9 (type II, class 2)





# „Praktická příručka“

## Protocol

Get the reagents



Prepare the mix



Set up conditions



Analyze the gel



Negative result

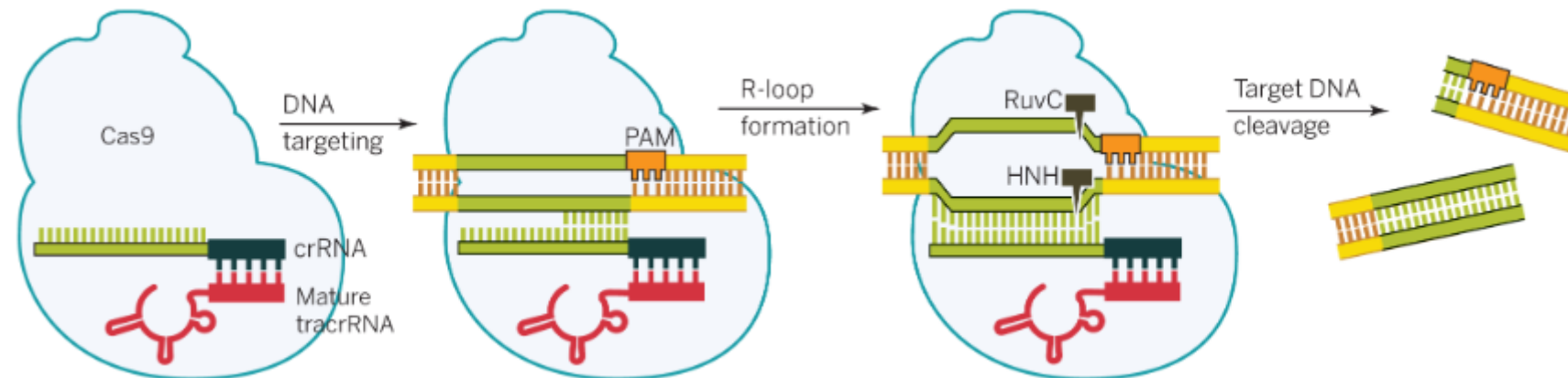


Cry



# Cas9

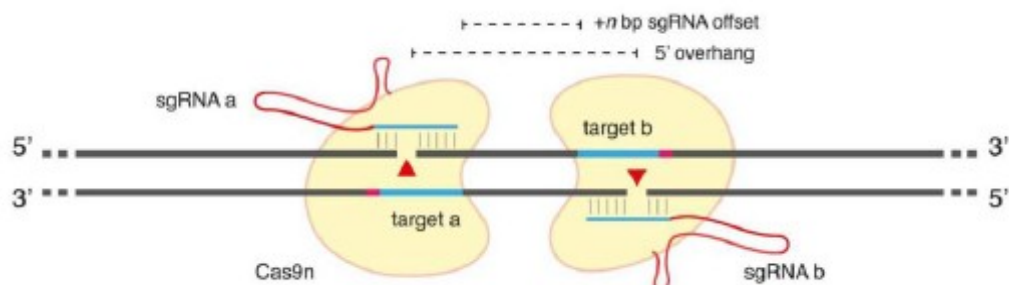
- Rôzne ortológy (podľa bakt.kmeňa pôvodu, najpoužívanejšia *Streptococcus pyogenes* Cas9)
- Multifunkčný proteín
  - 2x nukleázová doména (HNH, RuvC-like)-každá štiepi iný DNA reťazec
  - helikázová doména



- **Off-target** = tolerancia Cas9 k nesprávnemu párovaniu s cieľovou sekvenciou
  - Počet nespárovaných bází
  - Ich umiestnenie vrámci sekvencie
  - Ich distribúcia vrámci sekvencie
  - Množstvo Cas9 v bunke ( $\uparrow$  Cas9 =  $\uparrow$  off-target)

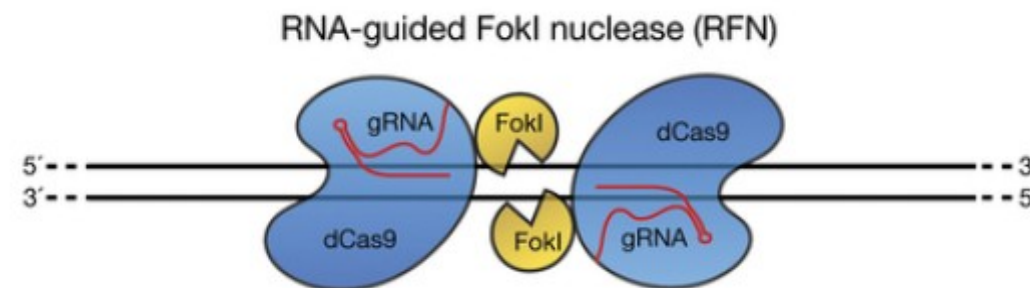
# Modifikácie Cas9

- nCas9
  - Mutant pre jednu z dvoch nukleázových domén (Cas9 nickase)
  - 50 - 1500x vyššia špecificita



Cas9 Wild type	Cas9 Nickase
Dvojreťazcové zlomy	Štiepi iba jeden reťazec
Vyžaduje single gRNA	Vyžaduje 2 gRNAs
Off-target	Menej off-targetov
Vysoká efektivita Špeciálne výkonná pre indely (= KO)	Efektivita určená „slabšou“ gRNA

- dCas9
  - katalyticky neaktívny mutant (Cas9 dead)
  - RNA riadený DNA väzobný proteín
  - slúži ako výborná platforma na nábor proteínov k cieľovej DNA





# Výber gRNA

- Výber gRNA štruktúry ovplyvňuje aktivitu Cas9
  - Duálna gRNA ( crRNA a tracrRNA exprimované separátne) – väčšinou nižšia účinnosť
    - Single gRNA
  - 2 kritické časti:
    - **5' koniec (20nt)** viaže cieľovú genómovú DNA (100% homológia v „seed“ regióne – 8-12nt)
    - Genómový cieľ môže byť akákoľvek DNA sekvencia (~20nt)
      - táto sekvencia je jedinečná
      - **sekvenca bezprostredne pred Protospacer Adjacent Motif (PAM, sekvencia špecifická pre jednotlivé druhy Cas9, napr. 5' NGG 3' u *Streptococcus pyogenes* Cas9)**

Target site: 5'- GTGTAACGGATAATGGACANGG

	Distal	Seed	PAM
--	--------	------	-----

- **3' koniec** sa viaže na Cas9 (špecifický pre rôzne ortológy Cas9, pre jeden ortológ rovnaký pre rôzne sgRNA)
- Schopnosť multiplexovaného cielenia viacerých génov
- sgRNA sa navrhujú pomocou *in silico* softwarov
- Výber génu (organizmu), Cas enzýmu...

Tool	Website	Type of CRISPR/Cas system	Species support	CRISPR/Cas designs		Off-target analysis	Batch mode	Comments
				Nucleases	Nickase			
ZIFIT	<a href="http://zifit.partners.org/ZIFIT">http://zifit.partners.org/ZIFIT</a>	Type II only	9	Yes	Yes	Yes	No	Analysis DNA sequence up to 1 kb; one of the earliest tools for searching potential target sites; this software also be applied in ZFNs design and TALENs design
CRISPR design	<a href="http://crispr.mit.edu">http://crispr.mit.edu</a>	Type II only	16	Yes	Yes	Yes	Yes	Analysis DNA sequence up to 500 bp; display the off-target scores in an unambiguous manner; limited exclusively to 'NGG' PAM sequences
CRISPR direct	<a href="http://crispr.dbcls.jp">http://crispr.dbcls.jp</a>	Type II only	18	Yes	No	Yes	No	Identify various PAM sequences; display main sequence features of the candidate sites
CRISPR RGEN tools	<a href="http://www.rgenome.net">http://www.rgenome.net</a>	Different Type II	16	Yes	No	Yes	No	Analysis DNA sequence up to 1 kb; standalone version available; random mismatches can be searched
CHOPCHOP	<a href="https://chopchop.rc.fas.harvard.edu">https://chopchop.rc.fas.harvard.edu</a>	Different Type II	25	Yes	No	Yes	No	Display in dynamic graphical interface; design sgRNAs for orthogonal Cas9 with different PAM sequences; this software also be applied in TALEN design
E-CRISPR	<a href="http://www.e-crisp.org/E-CRISP">http://www.e-crisp.org/E-CRISP</a>	Different Type II	33	Yes	Yes	Yes	No	Start application and design purpose can be set for specific experimental goals (e.g. knockout, N-terminal tagging, C-terminal tagging, CRISPRi/a); enable gene annotation filtering
sgRNA Designer	<a href="http://broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sgrna-design">http://broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sgrna-design</a>	Type II only	2	Yes	No	No	Yes	Analysis DNA sequences up to 10 kb; standalone version available; for human and mouse genes or interest gene only; use experimentally defined scoring scheme
CRISPR MultiTargeter	<a href="http://www.multicrispr.net">http://www.multicrispr.net</a>	Multiple types	12	Yes	Yes	No	Yes	Enable multiple CRISPR systems sgRNA design; scan off-target sites with the aid of GT-scan or Cas OFFinder; basic sgRNA target sites search in a set of similar genes or transcripts
CRISPR-ERA	<a href="http://crispr-era.stanford.edu/InitAction.action">http://crispr-era.stanford.edu/InitAction.action</a>	Type II only	9	Yes	Yes	Yes	No	Design sgRNAs for gene regulation; use E-score to reveal the sequence features and S-score to display off-target effects
sgRNA Scorer	<a href="https://crispr.med.harvard.edu/sgRNAScorer">https://crispr.med.harvard.edu/sgRNAScorer</a>	Different Type II	12	Yes	No	No	No	Analysis DNA sequences up to 10 kb; scan off-target sites with the aid of Cas OFFinder; use a new <i>in vivo</i> and multiplex library-on-library methodology to assess sgRNA activity across ~ 1400 genes
CRISPRscan	<a href="http://crisprscan.org">http://crisprscan.org</a>	Type II only	7	Yes	No	Yes	No	Provide a valuable resource for predicting the most efficient sgRNA for <i>in vivo</i> targeting, especially zebrafish; commonly criteria to design sgRNAs are outclassed

# Rekonštitúcia dvojkomponentového systému

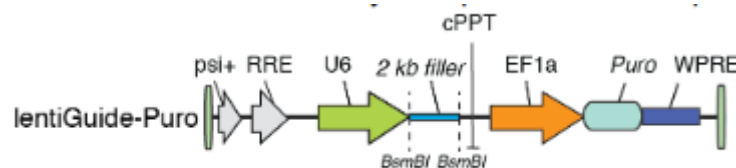
- Editácia vyžaduje ko-expressiou 2 komponentov: sgRNA špecifickej pre cieľový gén a endonukleázu Cas9 (na jednom/dvoch vektoroch)

- **Jednovektorový systém** (napr. lentiCRISPRv2) – plasmid s 2 expresnými kazetami (Cas9 a chimérna gRNA). Plasmid môže byť naštiepený restriktčným enzýmom v lokuse gRNA, a do miesta štiepenia vložená cieľiaca oligosekvencia (20nt).

- vhodný napr. pre primárne bunky (iba jedna transdukcia)



- **Dvojvektorový systém** (napr. lentiGuide-Puro a lentiCas9-Blast) – 1 plasmid exprimuje len gRNA, druhý Cas9 (najprv sa zavedie Cas9). Plasmid môže byť naštiepený restriktčným enzýmom v lokuse gRNA, a do miesta štiepenia vložená cieľiaca oligosekvencia (20nt).

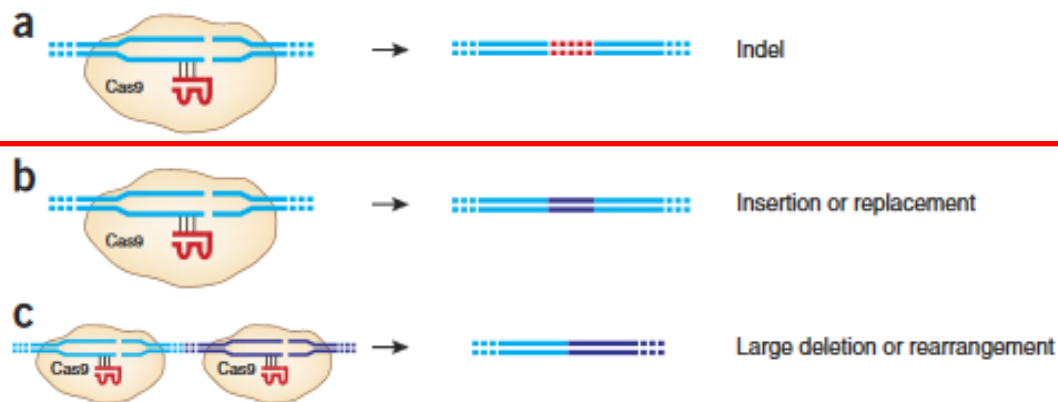


# Cas9 editovanie: potrebné komponenty

- ko-expresia sgRNA a Cas9 → špecifický expresný systém závisí od konkrétnej aplikácie

Expresný systém	komponenty systému	aplikácia
Savčie expresné vektory	<ul style="list-style-type: none"><li>Promótor Cas9 konštitutívny (CMV, EF1alfa) alebo indukovateľný (Tet-ON); Promótor gRNA typicky U6</li><li>Reportér. gén (GFP), selekčný marker (antibiotikum)</li></ul>	Ľahko transfekovateľné bunky (Hek293), dočasná alebo stabilná expresia
Lentivirálna transdukcia	<ul style="list-style-type: none"><li>Cas9 a sgRNA na 1/2 vektorech</li><li>Reportér. gén (GFP), selekčný marker (antibiotikum)</li><li>Obalové plazmidy na tvorbu víru</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>Stabilná, laditeľná expresia Cas9 a/alebo gRNA v širokej škále savčích línií</li><li>Užitočné pre ťažko transfekované bunky/<i>in vivo</i></li><li>Celogenómové screeniny</li></ul>
Cas9 mRNA a gRNA	Plazmidy s gRNA a Cas9 sa použijú na transkripciu <i>in vitro</i> na vytvorenie maturovej Cas9 mRNA a gRNA, potom sa dodajú do cieľových buniek (napr. mikroinjekcia alebo elektroporácia)	<ul style="list-style-type: none"><li>Dočasná expresia systému</li><li>Expresia klesá s časom (degraduje sa RNA)</li><li>Generovanie transgénnych embryí</li></ul>
Cas9-gRNA riboproteínový komplex	Purifikovaný Cas9 proteín a <i>in vitro</i> transkribovaná gRNA sa kombinujú za vzniku komplexu Cas9-gRNA a dodávajú sa do buniek použitím kationových lipidov	<ul style="list-style-type: none"><li>Dočasná expresia systému</li><li>Expresia klesá s časom (degradácia komplexu)</li></ul>

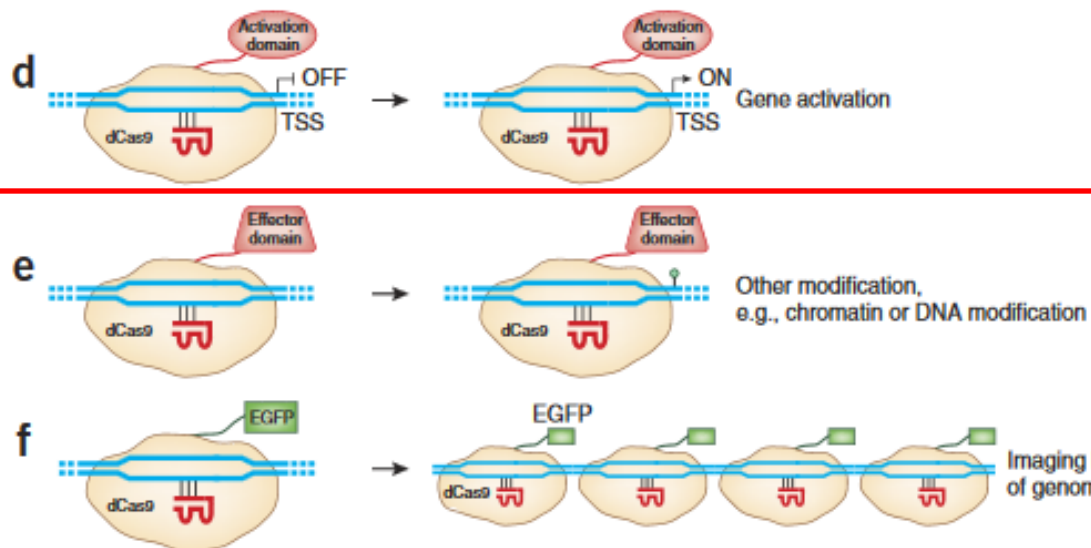
# Prehľad rôznych aplikácií



- Indel (knock-out) pomocou NHEJ

- Špecifická zmena (mutácia/insercia) pomocou HR

- Dvojica gRNA môžu stimulovať veľké delécie, a chrom. prestavby



- dCas9 fúzovaný s transkripčným regulátorom → zmena expresie cieľového génu

- dCas9 fúzovaný s rôznymi efektormi → zmeny v epigenetických značkách

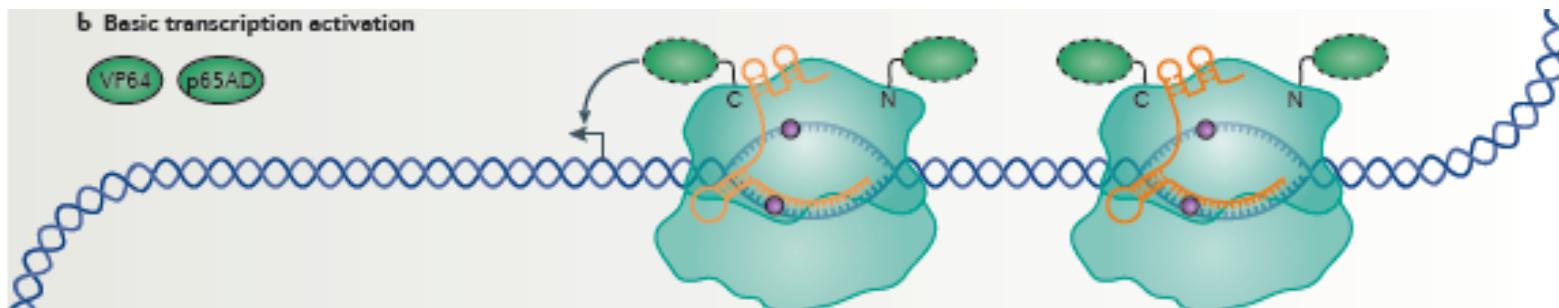
- dCas9 fúzovaný s florescenčným proteínom → florescenčná mikroskopia

dCas9 = kataliticky neaktívny proteín

# CRISPR interference & activation (CRISPRi&a)

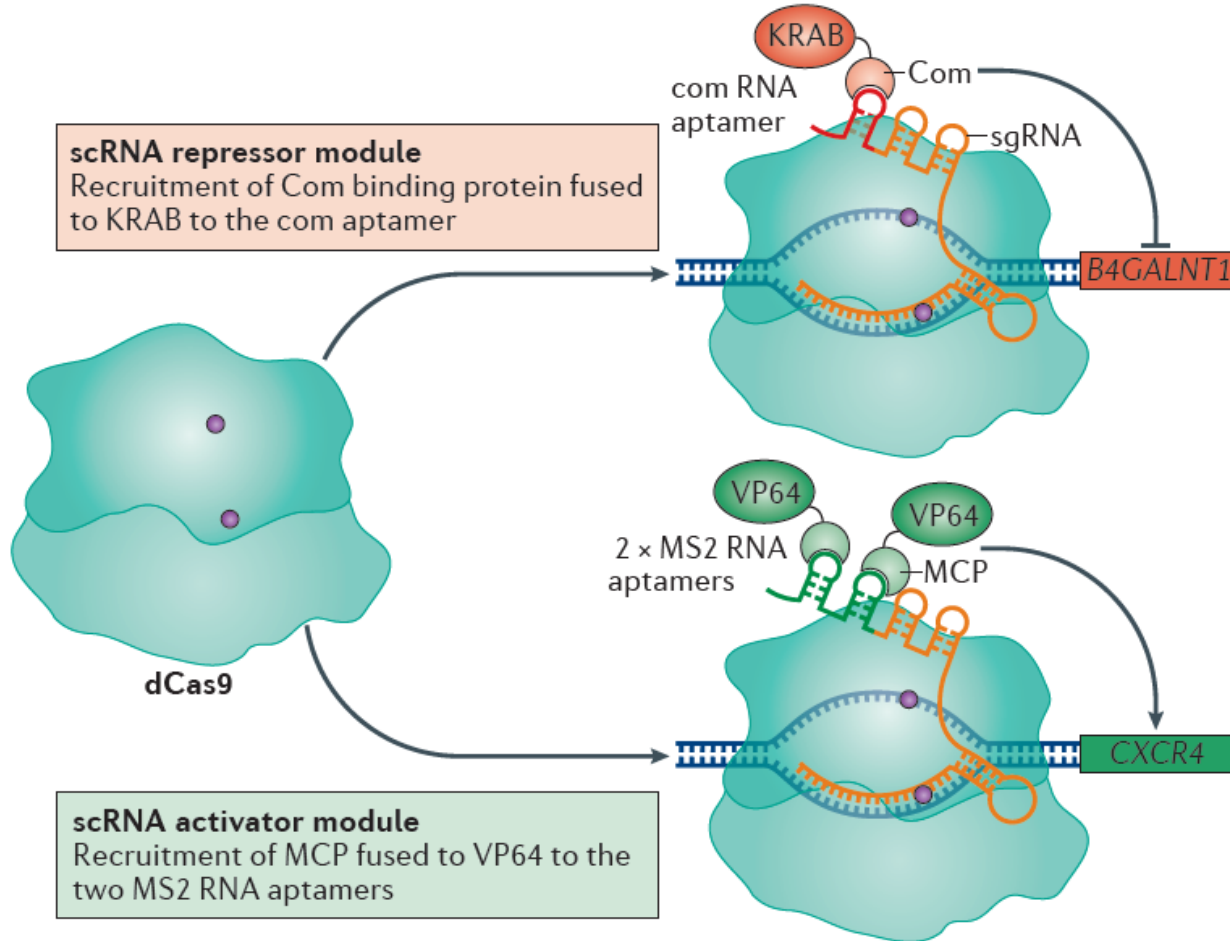


- dCas9-sgRNA môže blokovať RNA polymerázu
- zabrániť iniciácii transkripcie narušením viazania transkripčného faktora
- ↑ represia s KRAB, SID4X doménami
- KRAB-dCas9 silná represia -50 až +300bp od TSS



- CRISPRa používa dCas9 fúzne proteíny na nábor transkripčných aktivátorov
- často potrebné viaceré sgRNA
- Aktivácia -50 až -400bp od TSS

# Simultánna transkripčná aktivácia a repressia

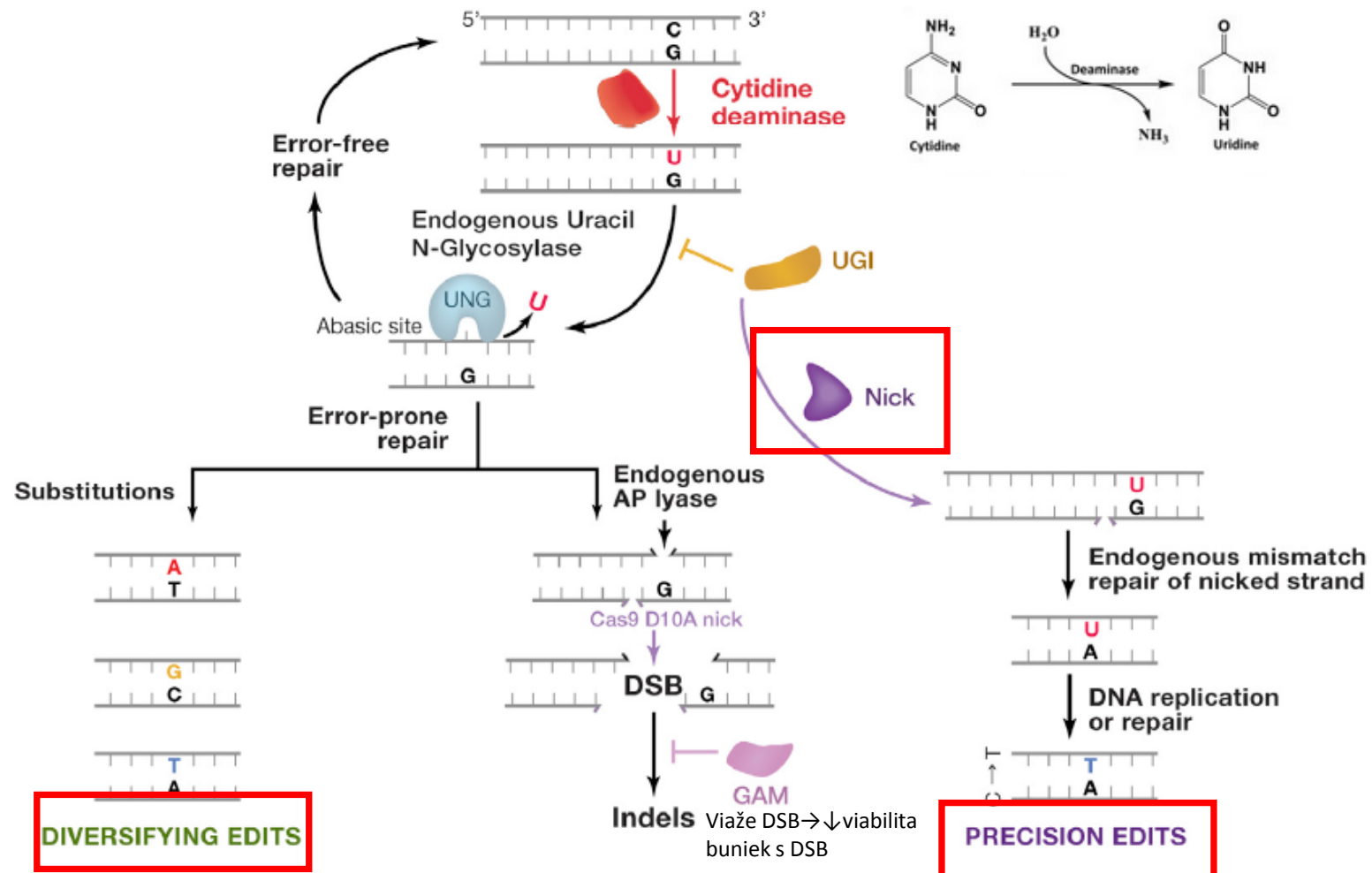


- Viaceré sgRNA → viac génov
- scRNA (scaffold)-predĺženia sgRNA o proteíny-viažúce RNA adaptéry → info o cieľovom gène a akcii (ON/OFF)

Manipulácia komplexných signálnych dráh (bez zmien v sekvencii DNA).

# CRISPR editácie báz (bez DSB): CRISPRx a iné

- Cas9 varianty / cytidín deaminázy / manipulácia DNA reparačného systému buniek → špecifická editácia bez DSB

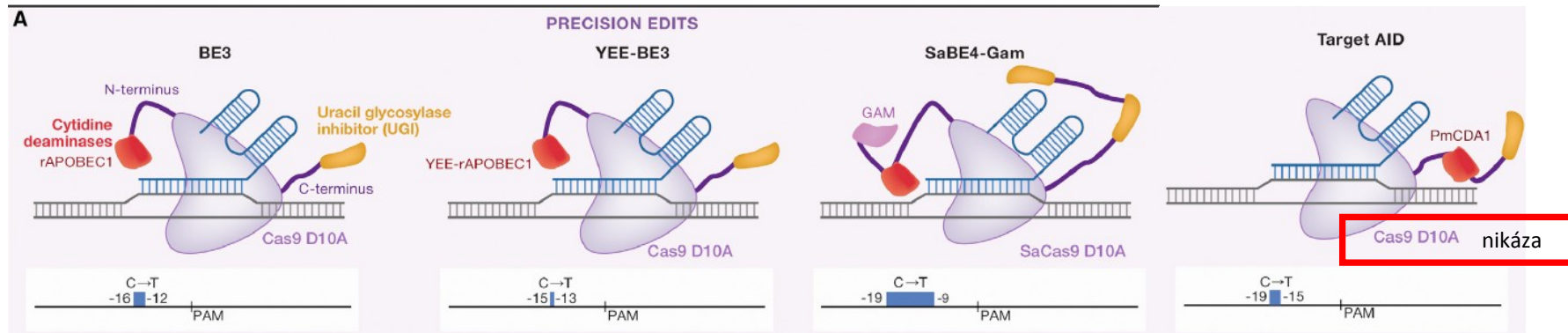




# CRISPR editácie báz (bez DSB): CRISPRx a iné

- Cas9 varianty / cytidín deaminázy / manipulácia DNA reparačného systému buniek → špecifická editácia bez DSB

→precízne jednonukleotidové zmeny





3000 genetických variant v ClinVar by bolo opravitelných C>T substitúciou

→miestna diverzifikácia sekvencie



Schopnosť generovať bodové mutácie na cytosínových a guanínových nukleotidoch s nízkou frekvenciou indelov.

# Aplikácie: výhody a nevýhody CRISPR/Cas

		Advantages	Disadvantages	Examples	Summary
Cut		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fast and simple</li> <li>• Efficient NHEJ-mediated mutagenesis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Random mutagenesis</li> <li>• Off-target cutting</li> </ul>	<p>[21]</p> <p>[77]</p> <p>[44]</p> <p>[34]</p> <p>[38]</p> <p>[43]</p> <p>[24]</p>	<p>Production of single and multiplex mutant mice via direct zygote injections of Cas9/sgRNAs</p> <p>Production of mutant mice and rats via direct zygote injections of Cas9/sgRNAs</p> <p>Cre-dependent (LSL) Cas9 transgene, enabling CRISPR editing following delivery of an exogenous sgRNA</p> <p>Somatic gene editing in the lung via lentiviral delivery of Cas9 and sgRNAs</p> <p>Somatic gene editing in the liver using hydrodynamic transfection of plasmid-based Cas9 and sgRNAs</p> <p>Inducible genome editing in mice carrying a dox-responsive Cas9 and single or multiple sgRNAs in one transgene</p> <p>Efficient knock-in alleles using Cas9-sgRNA (protein-RNA) complexes, delivered by zygote injection</p>
Nick		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fast and simple</li> <li>• Efficient NHEJ-mediated mutagenesis</li> <li>• Limited off-target effects</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Random mutagenesis</li> <li>• Requires 2 sgRNAs/target</li> </ul>	<p>[35]</p> <p>[25]</p> <p>[43]</p>	<p>Adenoviral-mediated delivery of Cas9 and sgRNAs to the mouse liver</p> <p>Generation of knock-in and mutant mice by direct zygote injection of Cas9n/sgRNA/donor template</p> <p>Inducible genome editing using a dox-responsive Cas9n transgene and multiple sgRNAs in one transgene</p>

		Advantages	Disadvantages	Examples	Summary
Knock-in		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Specific mutations</li> <li>• Endogenous protein tags &amp; fluorescent reporters</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Low efficiency</li> <li>• Frequent mutations in non-targeted allele</li> <li>• Requires HDR machinery</li> </ul>	<p>[26]</p> <p>[25]</p> <p>[38]</p> <p>[39]</p>	<p>Production of LoxP, epitope and fluorescent reporter mice via zygote injection of Cas9/sgRNAs/donor template</p> <p>Generation of knock-in and mutant mice by direct zygote injection of Cas9/sgRNA/donor template</p> <p>Somatic Ctmb1 gene substitution using hydrodynamic transfection of plasmid-based Cas9/sgRNA/donor</p> <p>Somatic Fah gene substitution using hydrodynamic transfection of plasmid-based Cas9/sgRNA/donor</p>
Rearrange		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deletions, inversions &amp; translocations</li> <li>• Endogenous rearrangements (regulation maintained)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Low efficiency</li> <li>• No way to specify type of rearrangement desired</li> </ul>	<p>[50]</p> <p>[48]</p> <p>[52]</p>	<p>Somatic chromosomal rearrangement of EML4-Alk locus in the lung via adenoviral delivery of Cas9 and sgRNAs</p> <p>Somatic chromosomal rearrangement of EML4-Alk locus in the lung via lentiviral delivery of Cas9 and sgRNAs</p> <p>Disruption of chromatin topology domains by inversion and deletion of chromosome regions in ESCs</p>
Activate		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reversible enforced expression</li> <li>• Potential for multiplexed activation</li> <li>• Endogenous transcript regulation maintained</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• May require multiple sgRNAs or accessory proteins</li> <li>• Thorough testing required to identify appropriate sgRNA combinations</li> </ul>	N/D	
Repress		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition of RNA production</li> <li>• Reversible gene silencing</li> <li>• Multiplexed gene suppression</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Potential for irreversible repression</li> </ul>	N/D	
Remodel		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Epigenome remodeling</li> <li>• Activation or suppression of promoters &amp; enhancers</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Potential for irreversible repression</li> <li>• Off-target effects not well characterized</li> </ul>	N/D	

# Kľúčové aspekty pri úprave génu

CRISPR/Cas

Bunečný typ/línia

✓ *Je vhodná?*

Cieľový gén

✓ *Je esenciálny/exprimovaný/amplifikovaný?*

Modifikácia

✓ *Knock-in vs knock-out/represia vs aktivácia*

Výber sgRNA

✓ *Efektívnosť vs špecifickosť*

Expresný systém

✓ *Maximalizácia efektivity*

Screening

✓ *Koľko klonov potrebujem na nájdenie pozitívneho?*

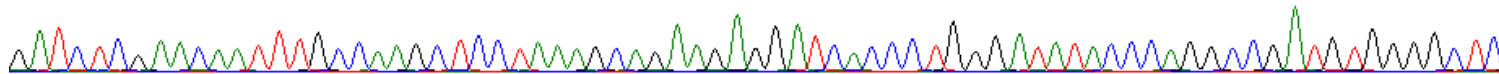
Validácia

✓ *Je výsledok podľa očakávaní?*

# Validácia

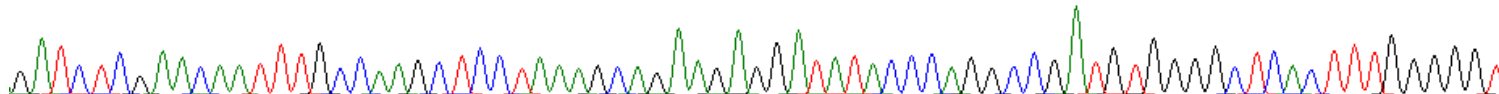
WT

230 240 250 260 270 280 290  
G A T C T C G A A C A A T T T G C C A A G C T C C T A A A G C A G A A G A G G A T XXXXXXXXXX A T A T A C C C A G G C C G A T G T G G G G C T C



Cas9/sgRNA

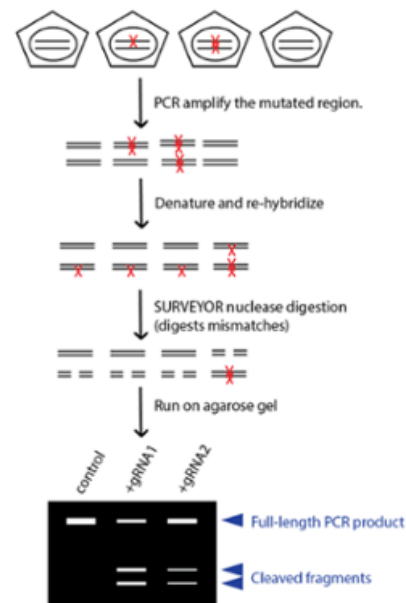
220 230 240 250 260 270 280 290  
G A T C T C G A A C A A T T T G C C A A G C T C C T A A A G C A G A A G A G G A T A T A T A C C C A G G C C G A T G T G G G G C T C A C T T T G G G G T



- DNA
  - priame sekvenovanie
  - T7 endonukleázová assay
  - Restrikčná assay
  - Mutácia homozygotná?, indel násobky 3?

• mRNA

• proteín

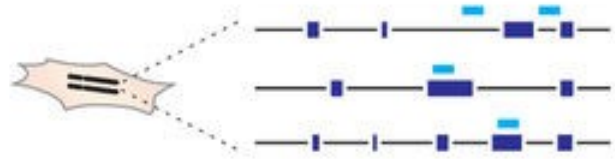


Optimálne je potrebné vylúčiť off-target (NGS).

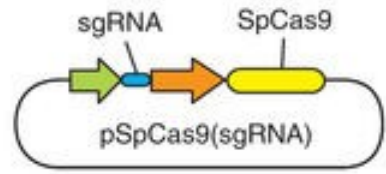
# Experimentálne stratégie na vylúčenie off-target

- Vylúčenie potenciálnych co-founder efektov off-target mutácií
  - spätné vloženie wild-type alely by malo zvrátiť fenotyp
- Použitie viacerých sgRNA
  - každá sgRNA má iné potenciálne off-targety, ak je fenotyp rovnaký u viacerých sgRNA, zrejme sa nejedná o off-target efekt

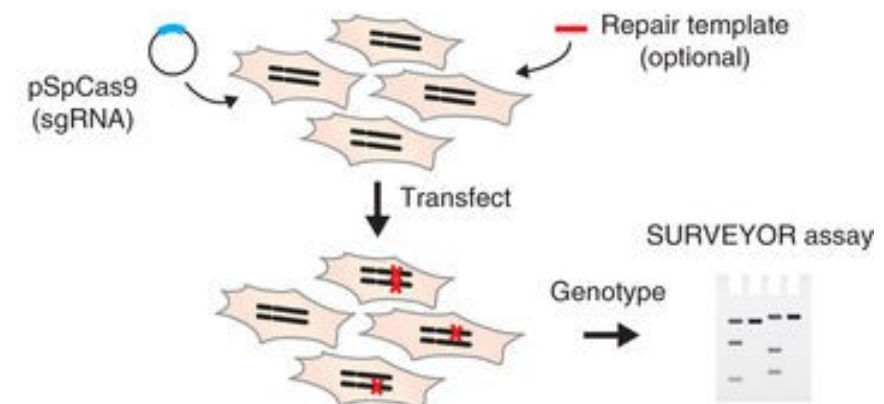
Day 1  
Steps 1-4  
*In silico* design



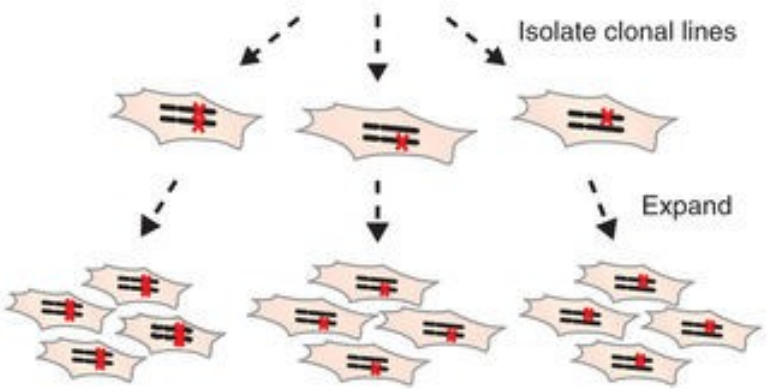
Days 2-5  
Step 5  
Reagent construction



Days 5-8  
Steps 6-126  
Functional validation



Days 9-28  
Steps 54-70  
Clonal expansion



- *In silico* návrh gRNA
- Objednanie oligonukleotidov

- Molekulárne klonovanie
- Transformácia baktérií
- (tvorba víru)

- Vloženie systému
- Selekcia (antibiotikum, GFP)
- Validácia editácie

- Tvorba izogénnych línií z jednobunečných klonov

# „CRISPR goes viral“

December 2013

Silkworm  
Zel  
Drosophila 23, 141  
2013.146

Simple and  
Mutagene

Takuya Nakayama  
Gerald M. Thomas

Pig  
Jan  
Yueqiang Wang, Zhiqiang  
Yazhou Chen, Yongpin  
September 2013



nt  
g You,

rapic  
resea

GENETICS

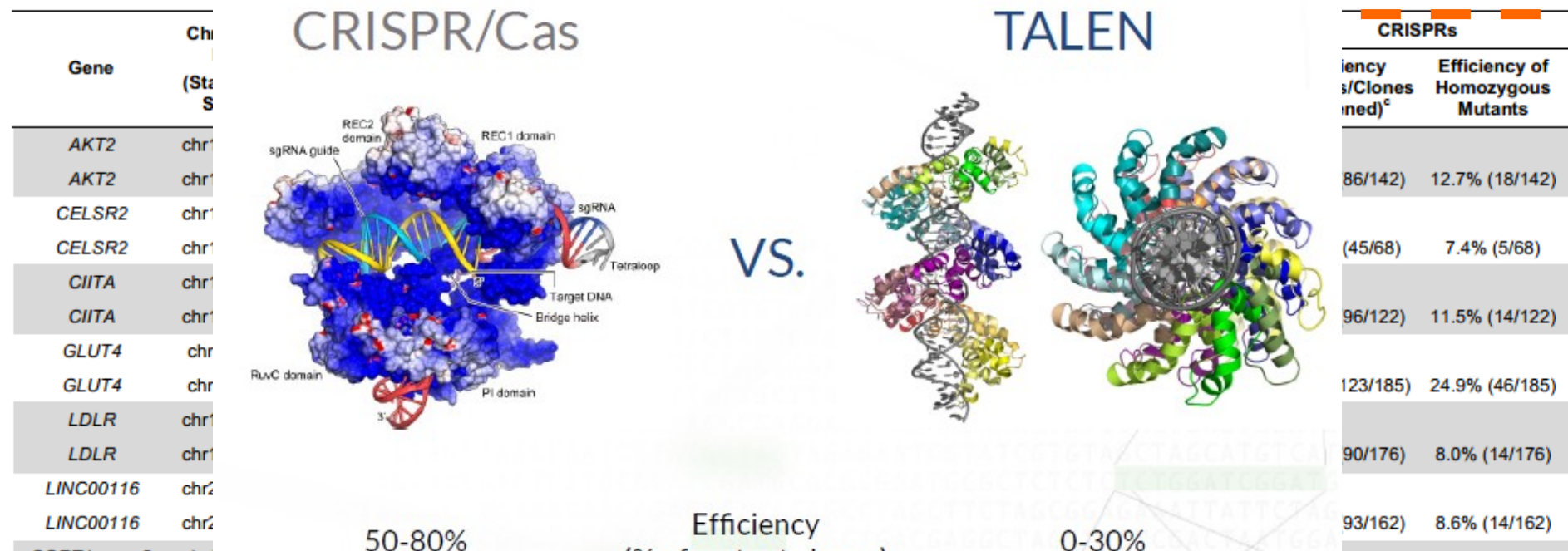
„Technika, ktorá dokáže presne meniť genómy všetkého od pšenice až po slony.“

Cen Rese  
and  
+ AUTHOR AFF



# CRISPR... proste funguje (lepšie).

Table S1. Targeting Efficiency of CRISPRs Versus TALENs in Human Pluripotent Stem Cells

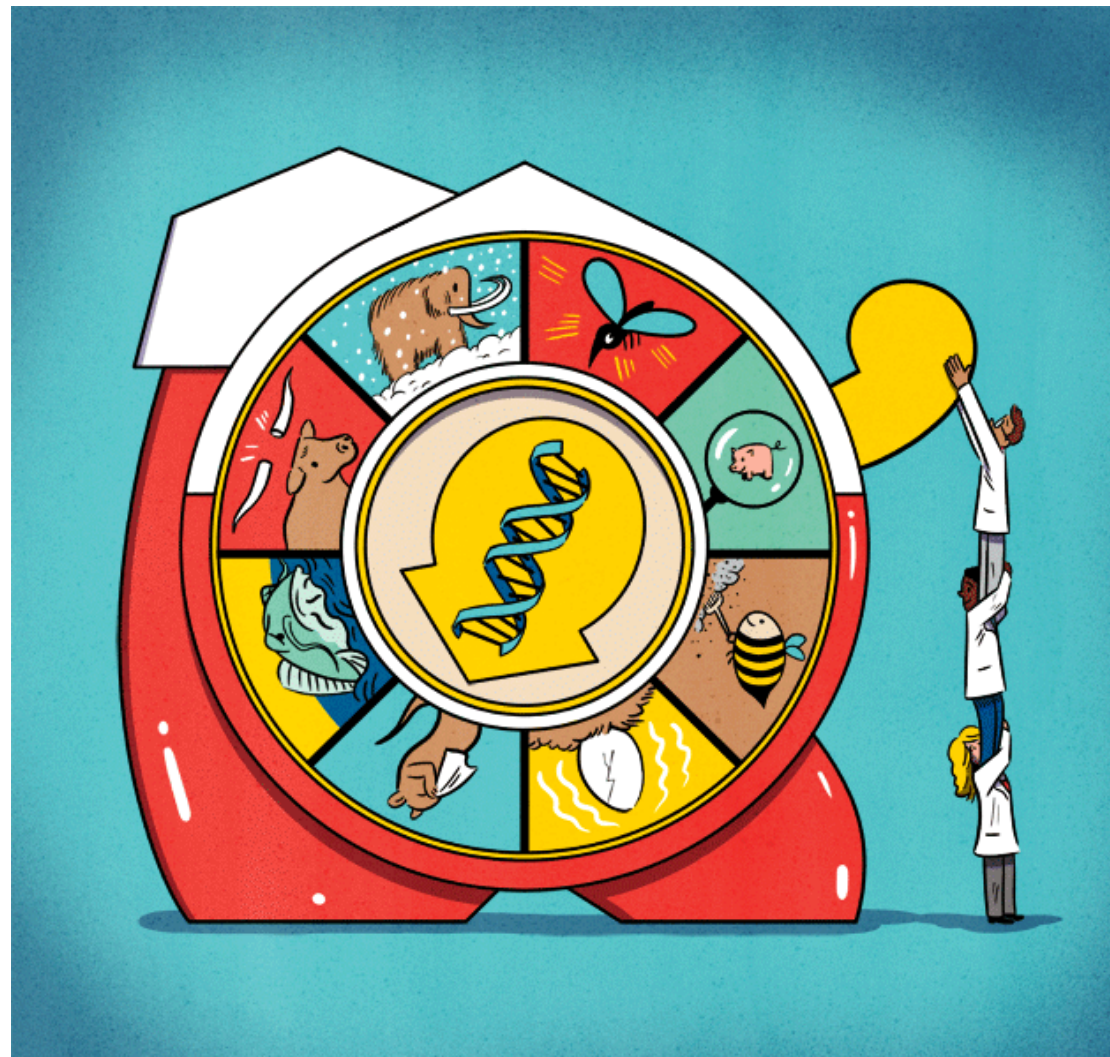


U TALENu každá nová target sekvencia vyžaduje značnú zmenu v proteínovej štruktúre TALENu, CRISPR/Cas vyžaduje len zmenu 20nt v sgRNA.

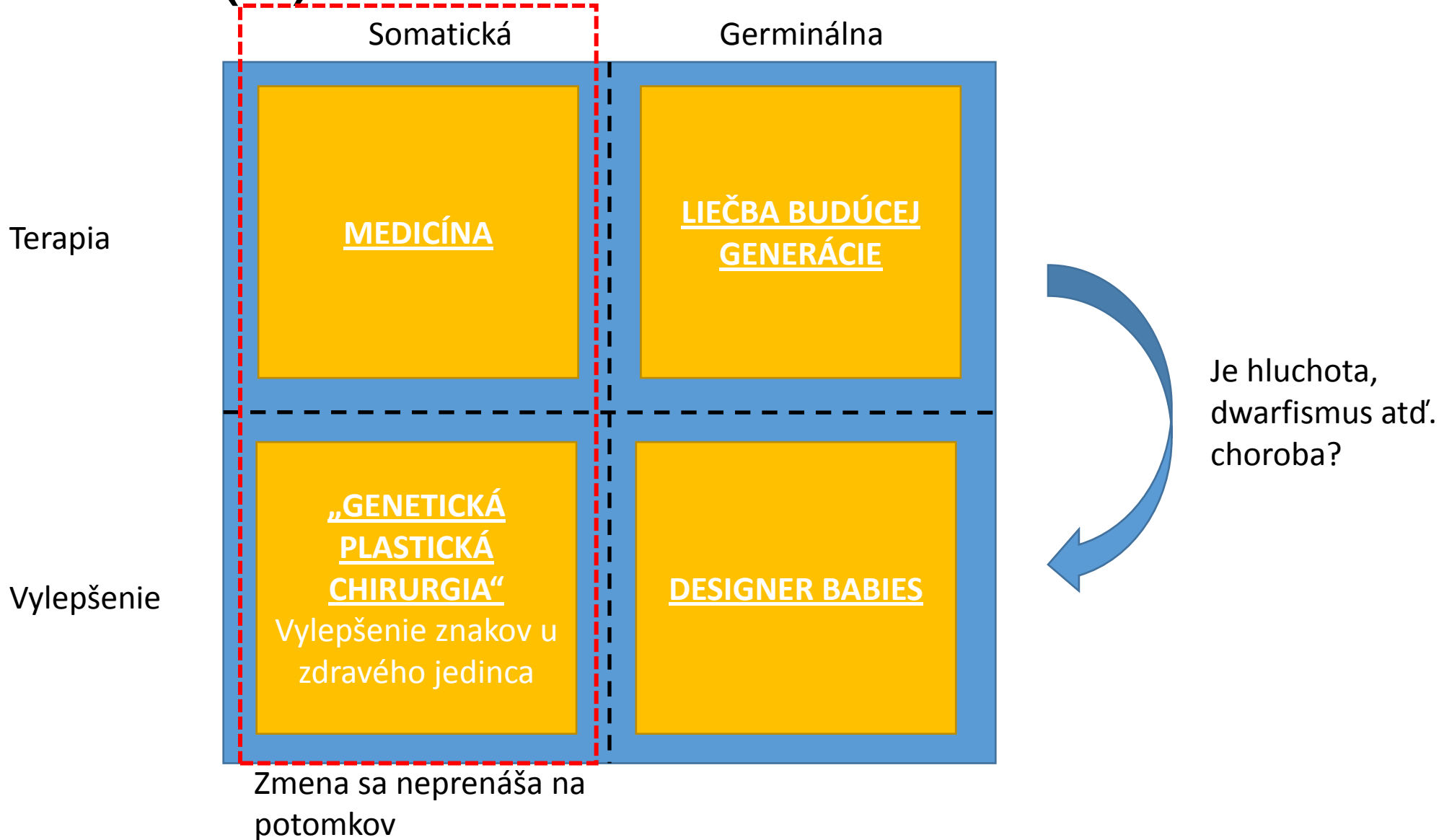
# CRISPR

- sekvenčná špecifita je **daná interakciou DNA-RNA**
- editácia prebieha s presnosťou **až 1 nt**
- veľmi efektívna editácia (hlavne na indel)
- možnosť multiplexného cielenia
- nový cieľ=nová gRNA → príprava **menej ako týždeň**
- 20-40\$/gén (4000\$ za TALEN)

# Aplikácie



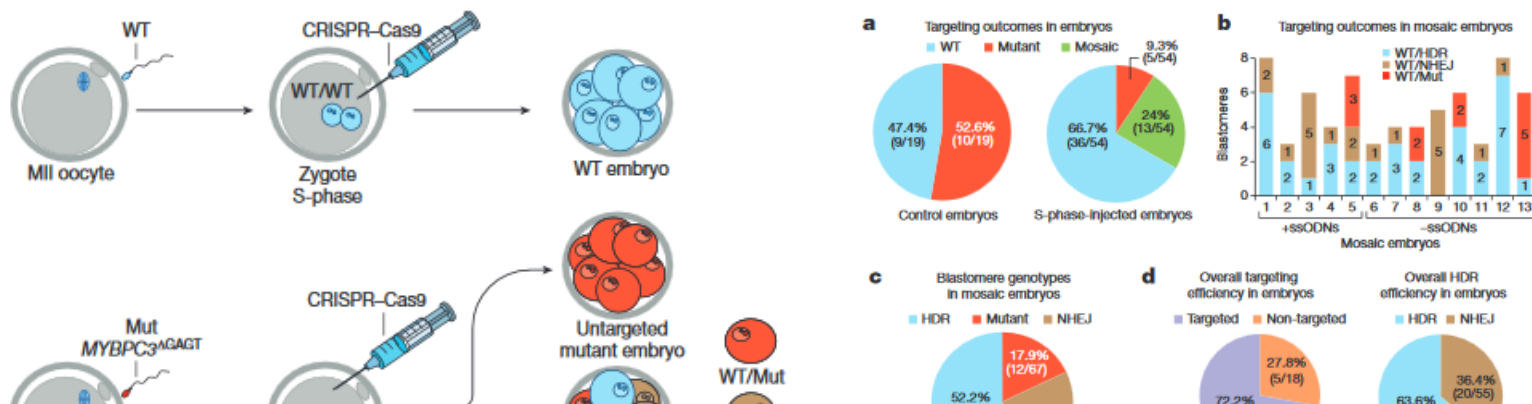
# Aplikácie: (1) medicína



# Aplikácie: (1) medicína

- Tisíce monogénnych chorôb (napr. hypertrofická kardiomyopatia - gén *MYBPC3*, incidencia 1:5000) → TERAPIA

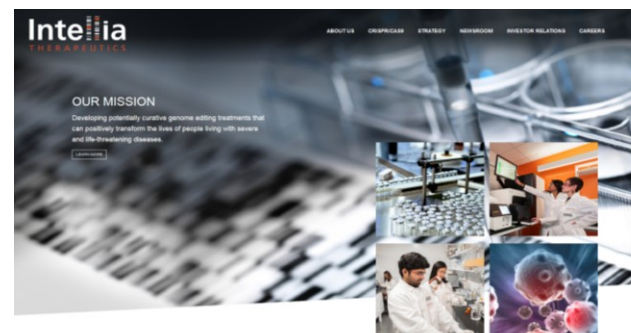
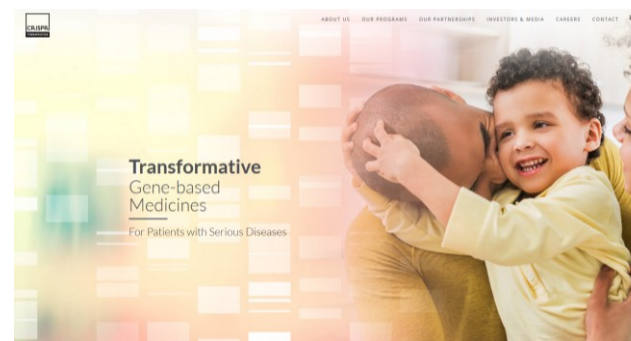
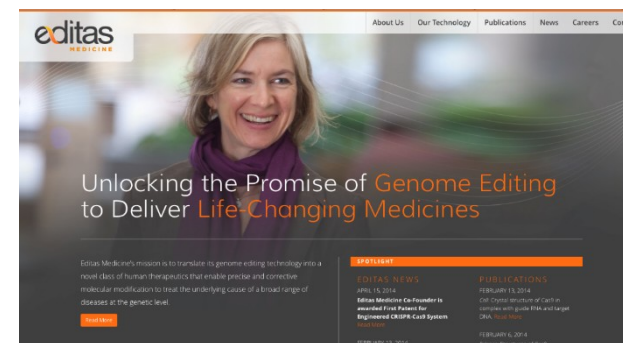
- 24/8/2017, Nature: **Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos**



- Etické aspekty
- Off-target efekt (latentné problémy)
  - „Designer babies“
- Do budúcnosti zníženie genofondu (?)

# Aplikácie: (1) medicína

- Terapia:
  - Genetické choroby
    - otázka vpravenia systému
    - najjednoduchšie v krvi (*ex vivo*+kontrola pred infúziou): srpkovitá anémia,  $\beta$ -thalassemia
  - Rakovina
    - vylepšené imunitné bunky (CAR T)



# Aplikácie: (1) medicína

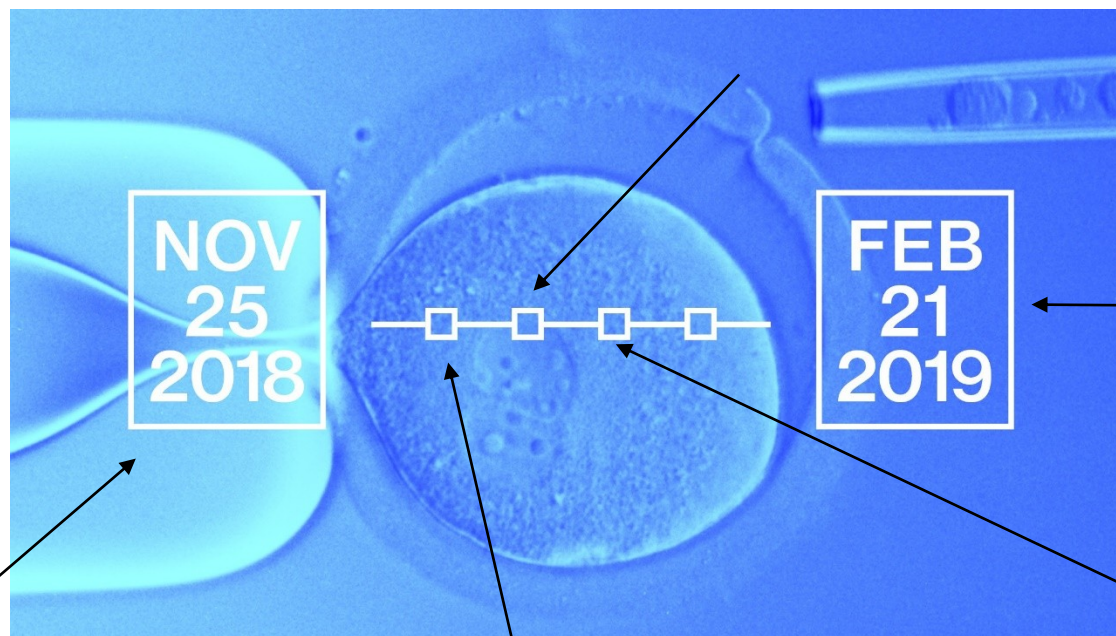
28/11/18 International Human Genome Editing summit v Hong Kongu

He: I am proud.

Ďalšie CRISPR tehotenstvo?.



- Medzičasom v Číne....



21/02/19 CCR5 hrá rolu v inteligencii a pamäti.

25/11/18 He Jiankui oznámil narodenie Lulu a Nana-dvojičkám odstránil gén CCR5 (vstup HIV, kiahne, cholera).

<https://www.youtube.com/watch?v=th0vnOmFltc&app=desktop>

26/11/18 He je vyšetrovaný, či neporušil zákon. Vedci volajú po globálnom moratóriu na využívanie tejto technológie pri vytváraní génovo upravených detí.

29/11/18 Zákaz ďalších pokusov pre He a jeho tím. Nasledovne sa zistilo, že o dvojičkách vedelo niekoľko vážených vedcov (NP, Stanford).

# Aplikácie: (2) kontrola infekčných chorôb

- Malária, dengue – kontrola nosičov týchto chorôb (komáre)
  - kmeň komárov, ktorý je vďaka CRISPR/Cas editácii rezistentný na maláriu, a táto rezistencia sa prenáša na potomstvo
  - Cas9 je exprimovaná iba v zárodočnej línii, kde kopíruje gén rezistencie z jedného chromozómu na druhý s  $\geq 98\%$  účinnosťou, pričom zachováva transkripčnú aktivitu génov
  - transgén je takto veľmi rýchlo rozšírený do potomstva

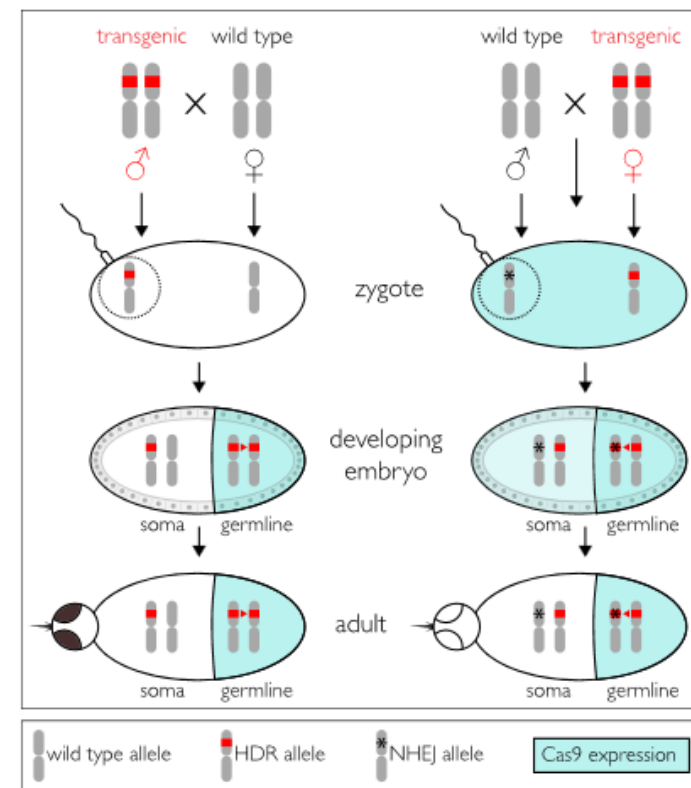
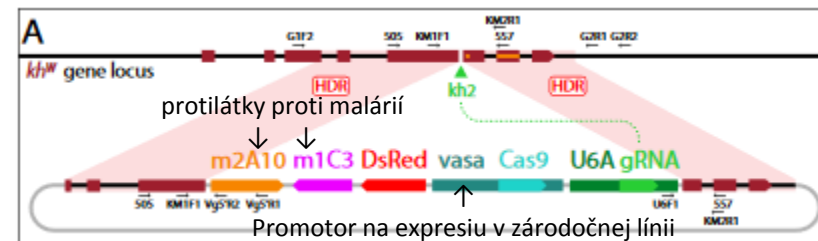
- HIV – využitie CRISPR/Cas9 na štiepenie vírového genómu v infikovaných bunkách

Molecular Therapy  
Original Article



In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models

Chaoran Yin,<sup>1,6</sup> Ting Zhang,<sup>1,6</sup> Xiyiing Qu,<sup>2,6</sup> Yonggang Zhang,<sup>1</sup> Raj Putatunda,<sup>1</sup> Xiao Xiao,<sup>1</sup> Fang Li,<sup>1</sup> Weidong Xiao,<sup>3</sup> Huaqing Zhao,<sup>4</sup> Shen Dai,<sup>1</sup> Xuebin Qin,<sup>1</sup> Xianming Mo,<sup>5</sup> Won-Bin Young,<sup>2</sup> Kamel Khalili,<sup>1</sup> and Wenhui Hu<sup>1</sup>

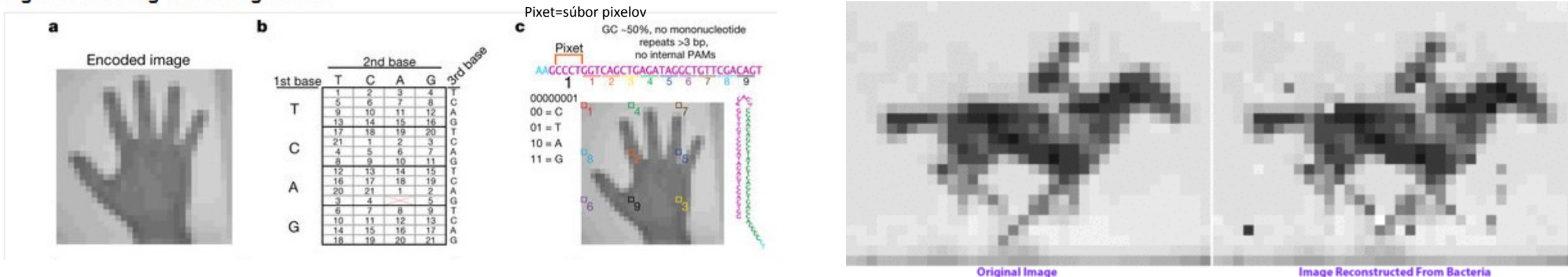




# Aplikácie: (3) úschovňa dát

- V CRISPR lokuse sa ukladá informácia od napadajúcich vírusov (až niekoľko 100 spacerov) → potenciál ukladať aj akúkoľvek inú informáciu
- Možnosť zakódovať informáciu do oligonukleotidovej sekvencie (protospacera), a zapísať ju do genómu baktérií a vytvoriť tak „živú úschovňu“

Figure 1: An image into the genome.



Tento systém bude schopný zaznamenávať viacrozmerné biologické informácie.

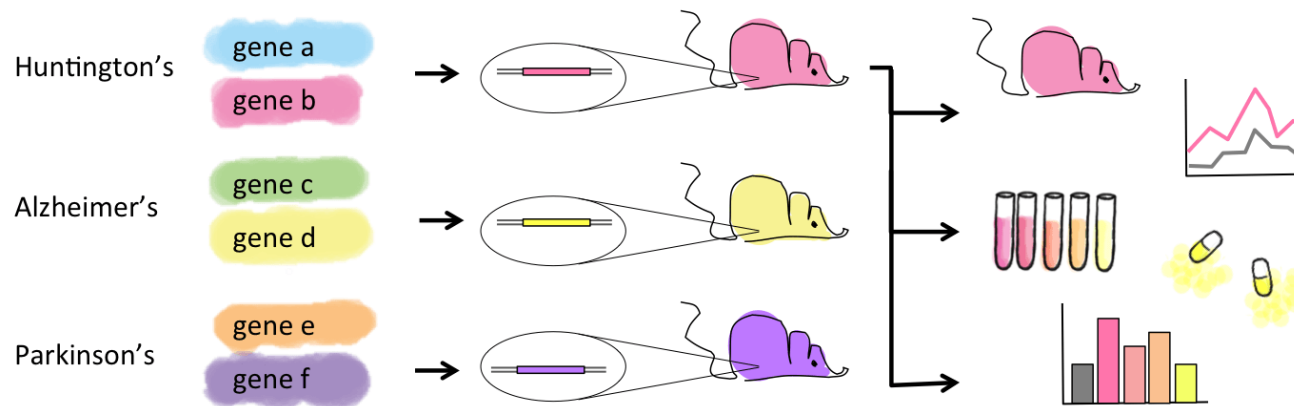
# Aplikácie: (4) príprava modelov (línií, organizmov)

- Oproti klasickým technikám, kedy príprava Knock-out / knock-in myši trvá najmenej 6 ~ 12 mesiacov, CRISPR/Cas9 je bleskurýchly = už za 2 mesiace (navyše odpadá nutnosť ESC)
- Prekvapujúco vysokú účinnosť pri produkcii jednoduchých (95%) a dvojitých mutantov (70-80%) myši priamou injekciou mRNA Cas9 a sgRNA do oplodnených zygot
- U bunecných línií otázka týždňov – možnosť pripraviť izogénne línie
- Možnosť študovať vo veľkom merítku kauzálne mutácie, či varianty objavené v GWAS

Genetic studies identify human gene mutations linked to neurologic diseases.

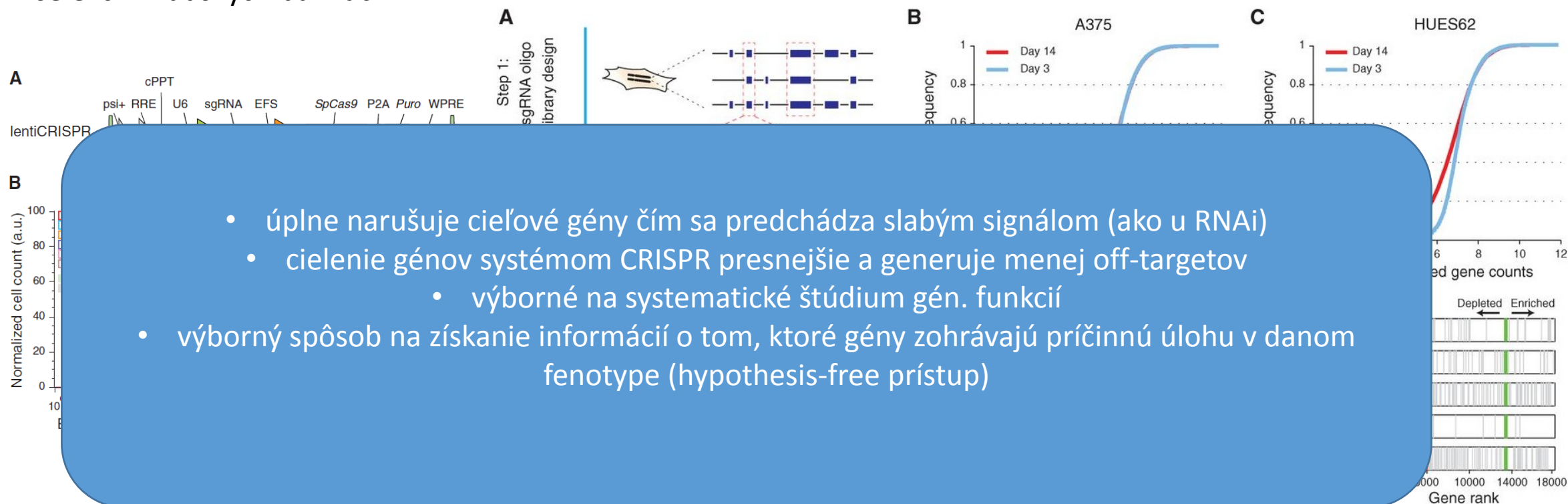
CRISPR is used to disrupt or introduce targeted mutations in the disease-linked genes in mice.

These mice are studied to learn how each gene and mutation affects disease, and used to test new drugs.



# Aplikácie: (5) celogenómový screening

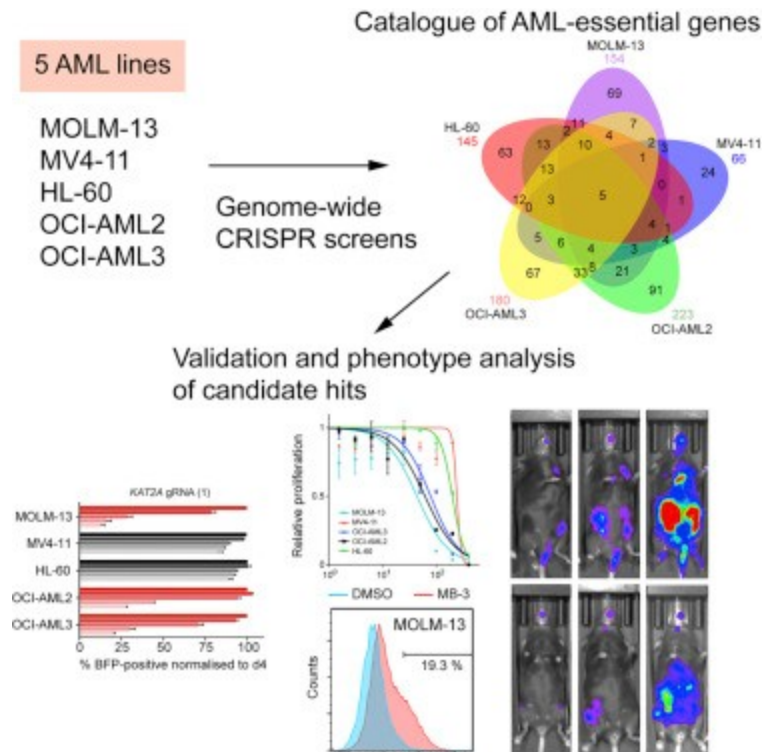
- študovať funkciu génov na celogenómovej úrovni
- napr. GeCKO knižnica = lentivírusová knižnica CRISPR-Cas9 proti 18 080 génom s 64 751 jedinečnými sgRNA (3 - 4 sgRNAs na gén, sústredené v 5' konštitutívnych exónoch) umožňuje skrining negatívnych aj pozitívnych selekcií v ľudských bunkách.



- úplne narušuje cieľové gény čím sa predchádza slabým signálom (ako u RNAi)
- ciele gény systémom CRISPR presnejšie a generuje menej off-targetov
  - výborné na systematické štúdium gén. funkcií
- výborný spôsob na získanie informácií o tom, ktoré gény zohrávajú príčinnú úlohu v danom fenotype (hypothesis-free prístup)

# Aplikácie: (5) celogenómový screening

- **Drop-out screening** na odhalenie genetickej zraniteľnosti



- Odhaliť esenciálne gény pre široké spektrum ľudských ochorení.
- Mnohé z nich by mohli byť úspešne použité na terapiu.

# Aplikácie: (6) agrikultúra – potlačenie chorobnosti, a iné modifikácie

- Napr. ošípané, ktoré sú odolné voči vírusovým ochoreniam, ale aj rastliny (napr. ryža, kukurica...)

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN **Mammalian interspecies substitution of immune modulatory alleles by genome editing**

Received: 20 October 2015  
Accepted: 27 January 2016  
Published: 22 February 2016

Simon G. Lillico<sup>1</sup>, Chris Proudfoot<sup>1</sup>, Tim J. King<sup>1</sup>, Wenfang Tan<sup>1</sup>, Lei Zhang<sup>1</sup>, Rachel Mandjuki<sup>2</sup>, David E. Paschon<sup>3</sup>, Edward J. Rebar<sup>3</sup>, Pyodor D. Urmov<sup>3</sup>, Alan J. Mileham<sup>3</sup>, David G. McLaren<sup>1</sup> & C. Bruce A. Whitelaw<sup>1</sup>

We describe a fundamentally novel feat of animal genetic engineering: the precise and efficient substitution of an agronomic haplotype into a domesticated species. Zinc finger nuclease in-embryo editing of the RELA locus generated live born domestic pigs with the warthog RELA orthologue, associated with resilience to African Swine Fever. The ability to efficiently achieve interspecies allele introgression in one generation opens unprecedented opportunities for agriculture and basic research.

## Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus

- Sterilita
- Viac svalovej hmoty
- Zvieratá bez rohov

## RNA-Guided Genome Editing in Plants Using a CRISPR–Cas System

Kabin Xie and Yinong Yang<sup>1</sup>

Department of Plant Pathology and Environmental Microbiology, The Huck Institute of the Life Sciences, Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA

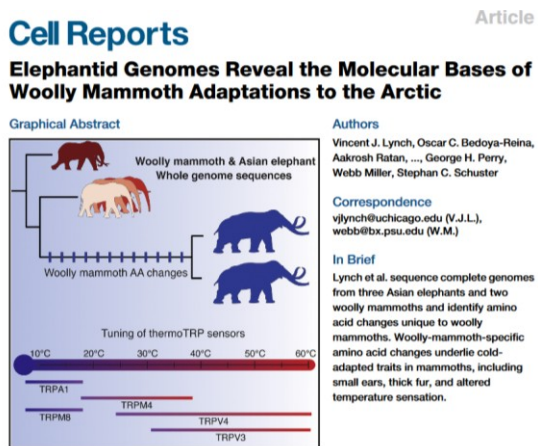
**ABSTRACT** Precise and straightforward methods to edit the plant genome are much needed for functional genomics and crop improvement. Recently, RNA-guided genome editing using bacterial Type II cluster regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated nuclease (Cas) is emerging as an efficient tool for genome editing in microbial and animal systems. Here, we report the genome editing and targeted gene mutation in plants via the CRISPR–Cas9 system. Three guide RNAs (gRNAs) with a 20–22-nt seed region were designed to pair with distinct rice genomic sites which are followed by the protospacer-adjacent motif (PAM). The engineered gRNAs were shown to direct the Cas9 nuclease for precise cleavage at the desired sites and introduce mutation (insertion or deletion) by error-prone non-homologous end joining DNA repairing. By analyzing the RNA-guided genome-editing events, the mutation efficiency at these target sites was estimated to be 3–8%. In addition, the off-target effect of an engineered gRNA–Cas9 was found on an imperfectly paired genomic site, but it had lower genome-editing efficiency than the perfectly matched site. Further analysis suggests that mismatch position between gRNA seed and target DNA is an important determinant of the gRNA–Cas9 targeting specificity, and specific gRNAs could be designed to target more than 90% of rice genes. Our results demonstrate that the CRISPR–Cas system can be exploited as a powerful tool for gene targeting and precise genome editing in plants.

Regulácia ohľadom zvierat a rastlín modifikovaných CRISPR... mali by byť regulované rovnakým spôsobom ako iné geneticky modifikované organizmy, aj keď neobsahujú DNA z iných druhov?

# Aplikácie: (7) „de-extinction“

Porovnať genóm vyhynutého druhu a jeho najbližšieho príbuzného druhu → multiplexný CRISPR/Cas systém

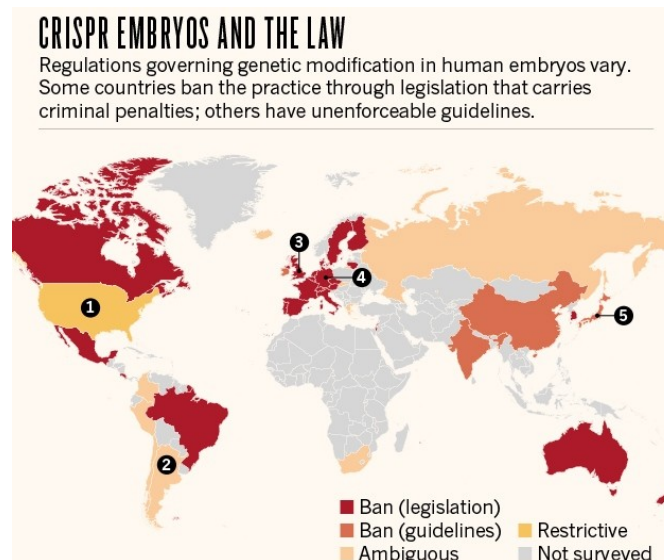
- Pomocou CRISPR transformovať slony na mamuty (neetické implantovať editované embryá do ohrozených slonov ako súčasť experimentu)



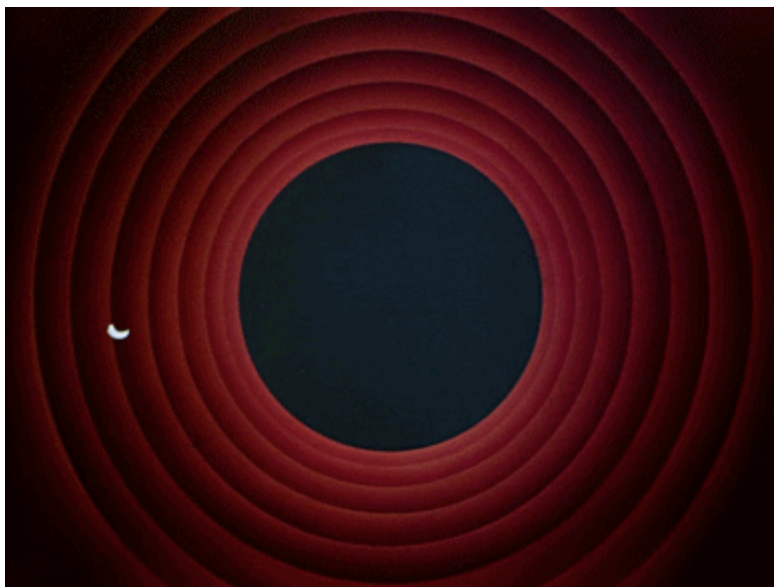
- Holub sťahovavý (*Ectopistes migratorius*) z moderných holubov

# Limitácie & Budúcnosť

- Nedoriešené otázky regulácie a etiky



- Minimalizácia off-target (napr. dvojica gRNA-dCas9 + Fok I), a stratégie na ich odhalenie
- Zlepšenie expresných systémov (expresia len v istých tkániach, vývojových štádiách...)
- Zvýšenie efektivity HDR oproti NHEJ



Ďakujem za pozornosť.  
Otázky?