

GENOVÉ TECHNOLOGIE

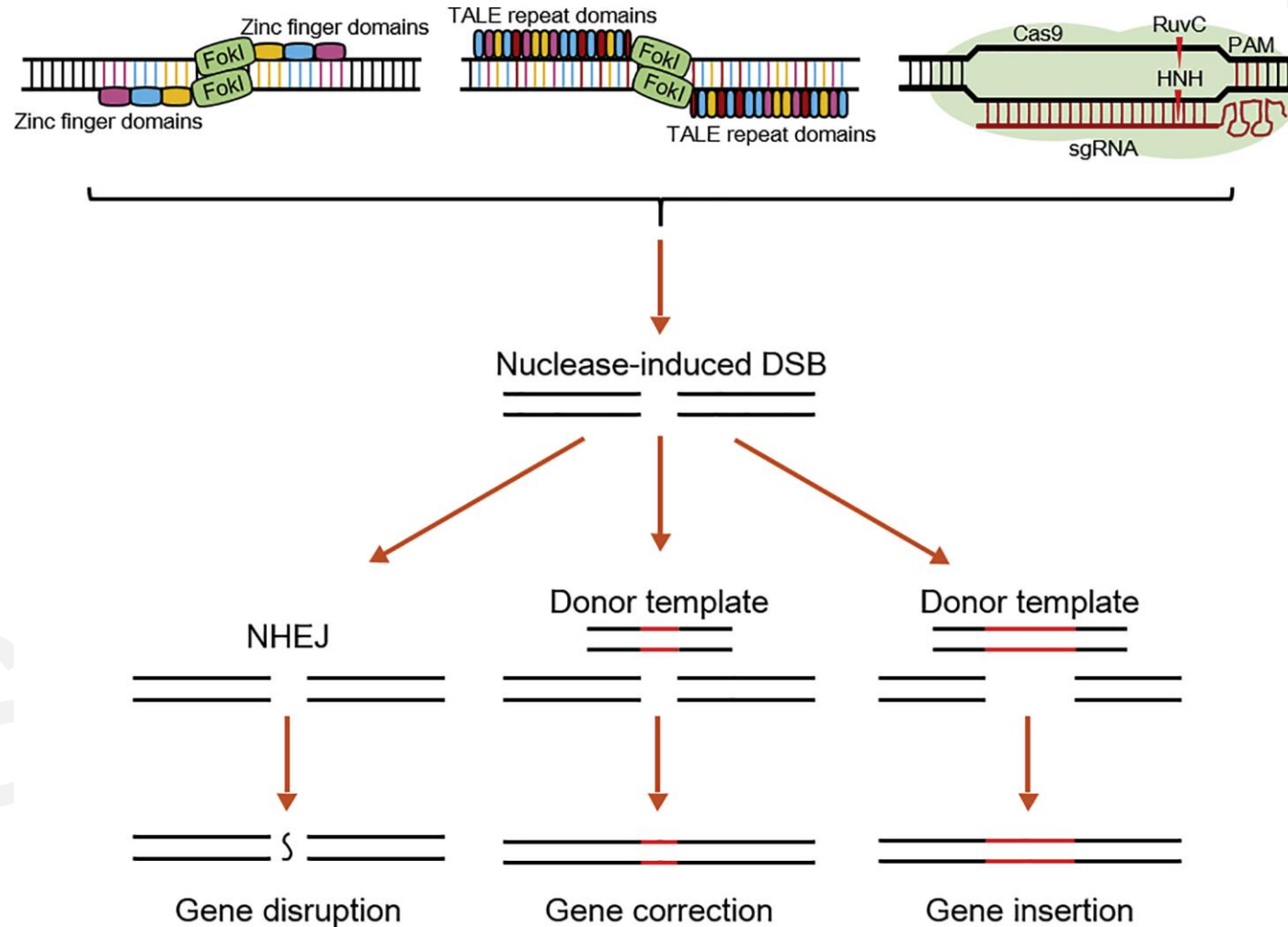
Editace genomu

ZFNs, CRISPR/Cas, TALLENS

Editace genomu

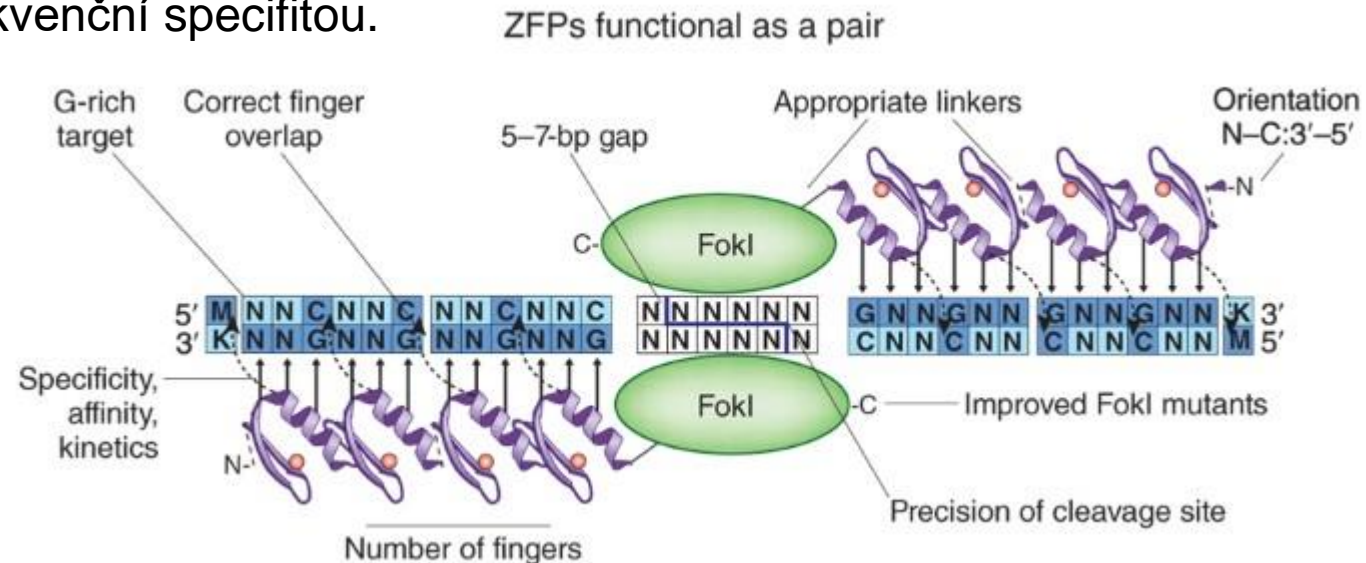
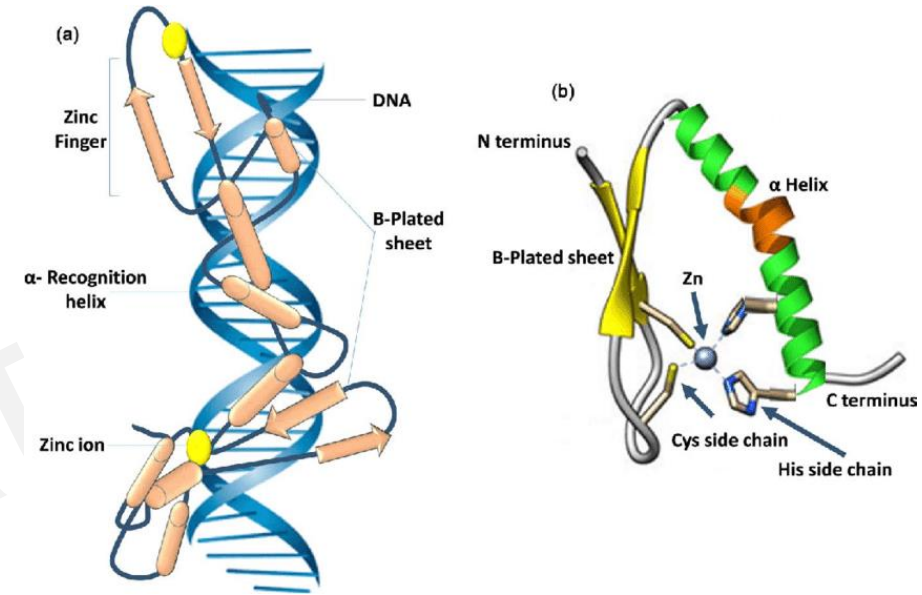
- Všechny techniky pracují na základě tvorby dvou-řetězcových zlomů
- Tyto zlomy jsou následně opraveny nehomologním párováním konců (NHEJ) nebo homologní rekombinací (HR)
- V rámci procesu může dojít k začlenění nového genu nebo vnesení krátké inserce/delece inaktivující daný gen
- Dvě základní metody pro tvorby dvou-řetězcových zlomů:
 - endonukleázy nebo restriční enzymy s dlouhou rozpoznávací sekvencí (až 40 bp)
 - použití CRISPR/Cas9 systému
- ZFNs (Zinc Finger Nucleases) – doména zinkového prstu rozpoznává sekvenci, DNA je štěpena FokI restriktázou.
- TALE nukleázy (TALENs) – rozpoznávací doména pochází z TALE (Transcription Activator-Like Effector) proteinu, DNA je štěpena FokI restriktázou

Editace genomu



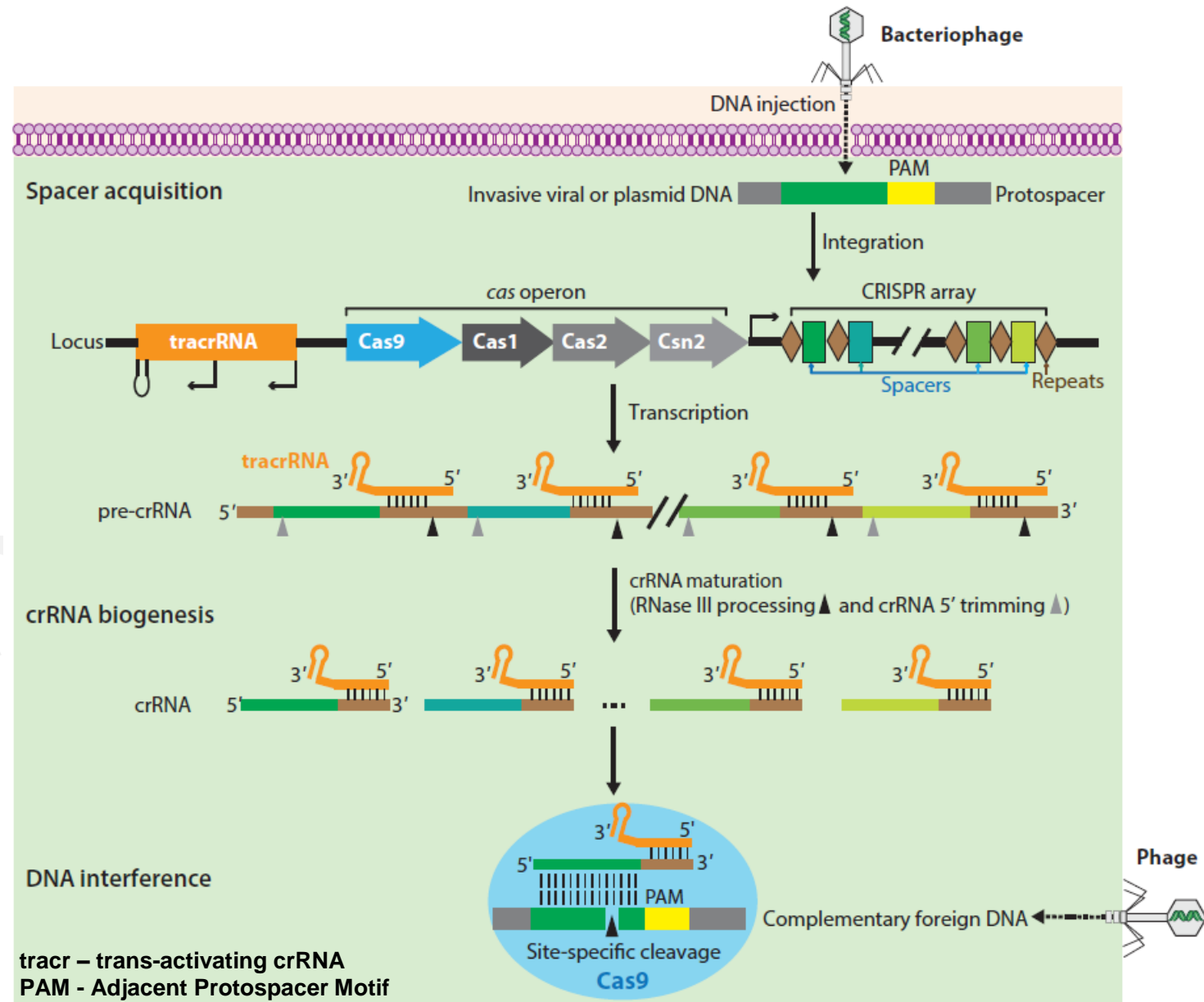
Zinc Finger Nucleases

- ZFN je umělá endonukleáza, poprvé úspěšně použita pro editaci genomu v roce 2003
- Skládá se z navržených proteinů majících DNA vazný motiv zinkového prstu (ZFP) spojeného se štěpnou doménou restričního enzymu *FokI*.
- ZFN může být přeprogramována tak, aby štěpila nové cíle, a to návrhem ZFPs s novou sekvenční specifitou.



CRISPR/Cas9

- The **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats (CRISPR)
- Začleňuje fragmenty cizí DNA (spacery) do CRISPR kazety a poté jsou zpracovány na gRNA
- Proteiny Cas zajišťují enzymatický mechanismus potřebný k získání nových spacerů zaměřených na invazivní elementy.
- Proteiny Cas (Cas9, Cas12, Cas13 a Cas14) byly využity k vývoji nových nástrojů pro genomové inženýrství.



Klasifikace CRISPR/Cas9

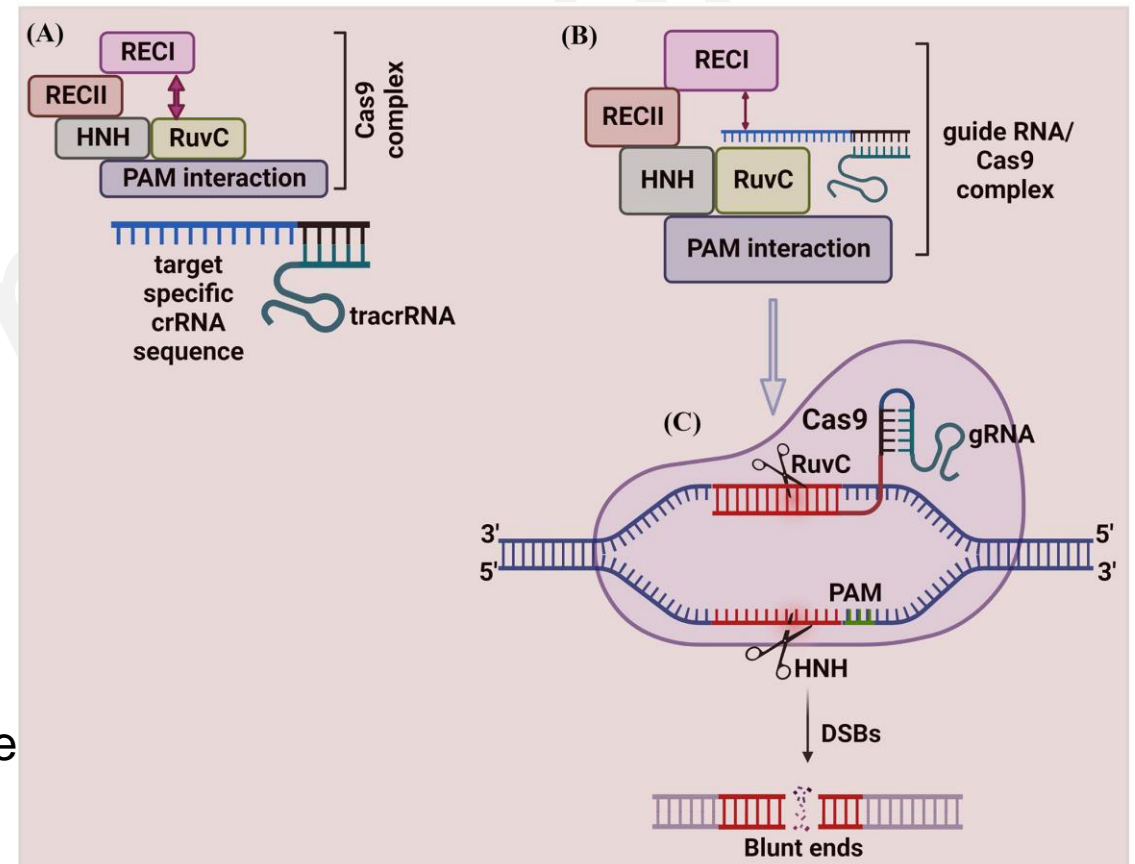
- V současné době je klasifikováno šest typů CRISPR systémů ve dvou třídách
- Třída 1 obsahuje velké multi-Cas komplexy, třída 2 používá jednu DNA endonukleázu Cas9, 12 nebo 13
- V současné době je nejpoužívanější Cas9 z bakterie *Streptococcus pyogenes*

Class	Type	Protein	Target	Spacer acquisition strategy	Name of CRISPR/Cas system	Pre-CRISPR processing	Self vs nonself-discrimination	Effectors of CRISPR system	Host organism
Class1	I	Cas3	ssDNA	Cas1/Cas2/ Cas4	Cas7, Cas5, Cas8, and Cas3	Cas6	PAM	Cas3, Cascade, and crRNA	<i>E. coli</i>
	III	Cas10	ssDNA	Cas1/Cas2	Cas7, Cas5, and Cas1	Cas6	CRISPR repeat	Cmr/Csm, crRNA, and Cas10	<i>S. epidermics</i>
	IV	Csf1	–	NA	Cas7, Cas5, and Csf1	–	–	–	–
Class2	II	Cas9	dsDNA	Cas1/Cas2/ Cas4	Cas9	RNase III, and tracrRNA	PAM	Cas9, tracrRNA, and crRNA	<i>S. thermophilus</i> and <i>S. pyogenes</i>
	V	Cpf1	ssDNA and dsDNA	Cas1/Cas2/ Cas4	Cas12	Cpf1	PAM	Cpf1, crRNA and tracrRNA	<i>F. novicida</i>
	VI	C2c2	ssRNA	Cas1/Cas2	Cas13	–	–	C2c1, and crRNA	–

<https://doi.org/10.1007/s12033-022-00567-0>

Mechanismus Cas9 proteinu

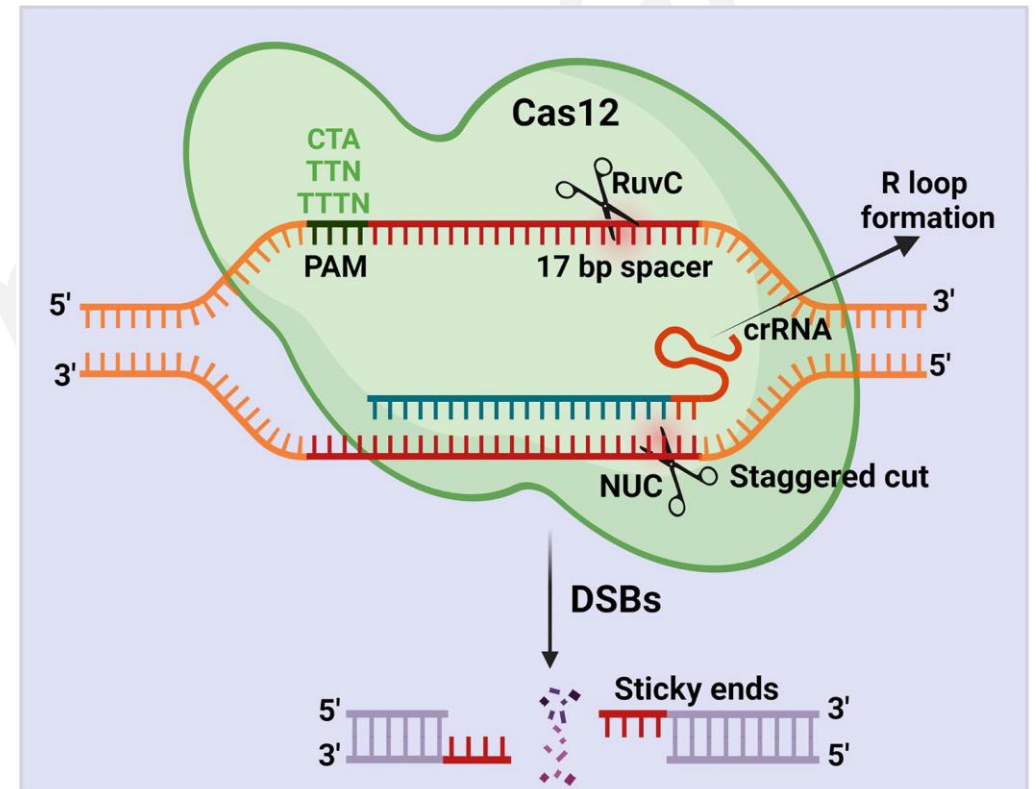
- Cas9 protein má 6 domén
- bez gRNA je protein neaktivní
- arginine-rich bridge helix iniciuje vlastní štěpení
- Po aktivaci Cas9 hledá PAM sekvenci (5'-**NGG**-3')
- Cas9 štípe dsDNA **3 bp před PAM** pomocí **HNH** a **RuvC** domén na základě komplementarity 20-nukleotidů na 5' konci gRNA s dsDNA
- Výhodou je možnost vícenásobné editace a jednoduchost návrhu
- Nevýhodou je vysoký off-target = nCas9 šípající pouze jedno vlákno je částečným řešením



<https://doi.org/10.1007/s12033-022-00567-0>

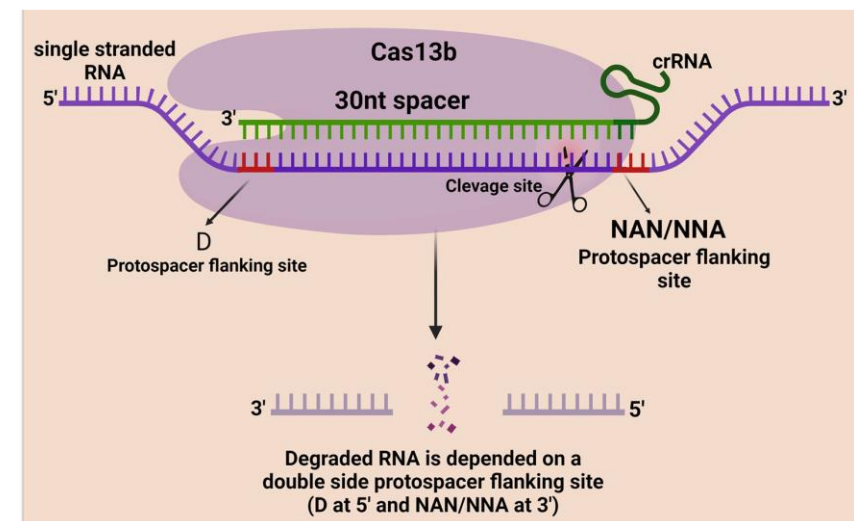
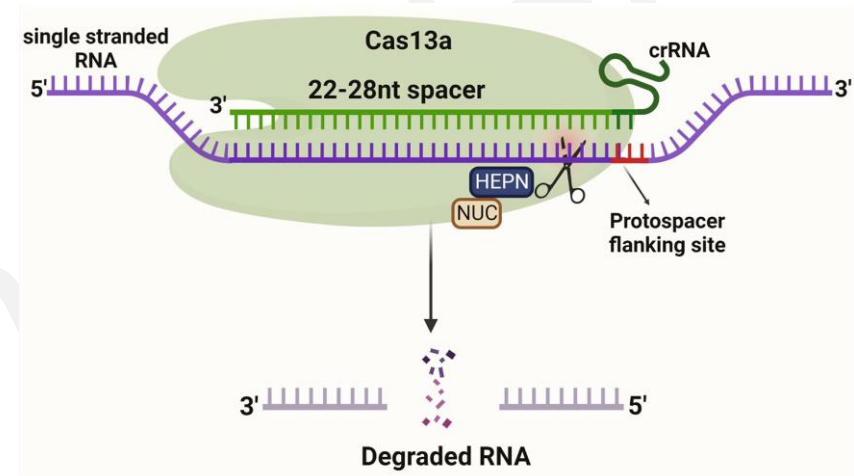
Mechanismus Cas12 proteinu

- větší přesnost než Cas9
- dokáže sám zpracovat crRNA – výhoda při multi-editaci
- Obsahuje RuvC a NUC (nuclease lobe) doménu, spacer má 17 bp
- Štípe ssDNA i dsDNA
- Využívá se v DETECTR systému pro identifikaci patogenů
- Díky dvouvláknovým zlomům je preferovaná oprava HDR a ne NHEJ = snazší provádění inzercí
- Málo efektivní u nedělicích se buněk

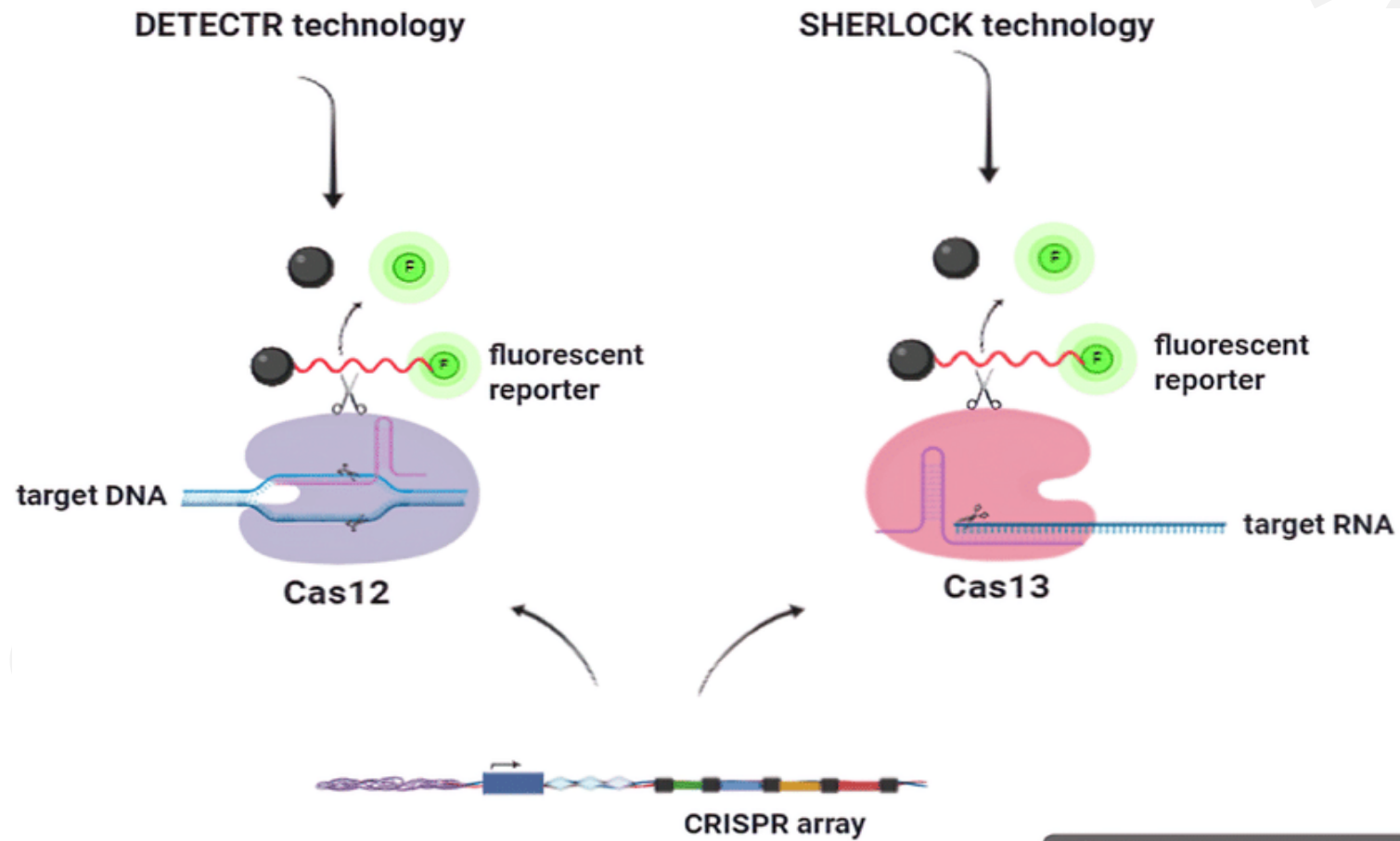


Mechanismus Cas13 proteinu

- Cas13 systém je proti RNA virům
- Cas13a obsahuje crRNA, NUC a HEPN (nucleotide binding) doménu, cílová sekvence 22-28 nt, PFS za cílovou sekvencí
- 13b štípe jen ssRNA, je přesnější (PFS a PAM)
- Kromě editace je používán pro analýzu SNPs
- Využívaný v SHERLOCK systému
- Umožňuje specificky zasáhnout pouze vybrané alelické variant v rámci onemocnění
- Výhody oproti RNAi strategii, stále však jistý OFF-target



DETECTR/SHERLOCK



TALENs

- Proteiny TALE byly poprvé popsány v roce 2009 a pocházejí z fytopatogenních bakterií rodu *Xanthomonas*.
- TALE je zvláštní třída proteinů, které mohou vázat DNA.
- Typická jednotka TALEN se skládá z centrální DNA vazebné domény o 12-28 opakováních, jaderného lokalizačního signálu (NLS), domény pro aktivaci transkripce cílového genu a nukleázy Fok1.
- Interakční oblast s DNA má 33-35 aminokyselin s polymorfními 12 a 13 opakuujícími se variabilními diresidii (RVD).
- Každá repetice se jedinečně váže na jeden nukleotid v orientaci 5' až 3' na cílové DNA.
- Čtyři nejčastější RVD jsou NN, NG, HD a NI s přednostní afinitou ke G/A, T, C, a A
- Pokud seřadíme opakuující se RVD v určitém pořadí, je možné vytvořit TALENS s požadovanou sekvenční specifikou.

TALLENs

Table 1 Comparison of TALEN and CRISPR/Cas9-mediated genome editing

Feature	TALEN	CRISPR/Cas9
Recognition type	DNA-Protein	DNA-RNA
Target site length	30-36 bp	23 bp
Endonuclease	FokI	Cas9
Dimerization	Required	Not required
Off-target	Low	High
Design and Assembly	Labour intensive	Easy
Target Range	Unlimited	Limited by PAM
Degenerate Recognition	Yes	No
Specificity	High, few mismatches tolerated	Moderate, comparatively more mismatches tolerated
DNA methylation sensitive	Yes	No
Mitochondrial Genome Engineering	Easy	Complicated
Precision of Genome Editing	High	Moderate

<https://www.youtube.com/watch?app=desktop&v=JARLDYv0Qw4> (ZFNs)

<https://www.youtube.com/watch?v=YkVVkzA7QpA> (TALLENs)

<https://www.youtube.com/watch?v=MzMmsgmeEOhI> (CRISPR)

<https://www.youtube.com/watch?v=2pp17E4E-O8> (CRISPR)

