

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Efektivní screening bázových editorů
v mutagenezi *Drosophila melanogaster***

Autor diplomové práce: Bc. Adéla Hejzlarová

Vedoucí diplomové práce: Mgr. David Doležel, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: MSc. Nirav Thakkar

České Budějovice, 2022

Hejzlarova, A., 2022: Efektivní screening bázových editorů v mutagenези *Drosophila melanogaster* [Efficient screening of base editors in *Drosophila melanogaster* mutagenesis. Mgr. Thesis, in Czech.] – 68 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Cílem bylo určit, jak dobře fungují již vytvořené bázové editory u drosofil, zejména zjistit účinnost a specificitu jejich působení. Podle potřeby sestavit konstrukt obsahující guide RNA pro editaci genu kódujícího viditelný marker genu *white*.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, dne 8. prosince 2022

.....

Bc. Adéla Hejzlarová

ABSTRAKT

Bázové editory jsou poměrně novou metodou založenou na systému CRISPR Cas9, zavádějící cílené změny na konkrétní místo v genomu. V této práci byly navrženy komplementární gRNA ke čtyřem cílovým úsekům ležícím na spliceozomálních stranách exonů a intronů *white* genu u octomilek (*Drosophila melanogaster*). Následně byla zkoumána efektivita čtyř vybraných bázových editorů Target-AID; nos-BE³; nos-ABE7.10 a nos-AID a enzymu Cas9. Celkem bylo v teplotách 18, 25 a 28 °C sledováno 116 556 samců. I když se efektivita pohybovala v řádu procent, tak bylo nasbíráno 1906 mutantů. Ačkoli nukleáza Cas9 vykazovala vyšší účinnost editace, ve většině případů docházelo k větším změnám (inzerce a delece), zatímco bázové editory byly velmi precizní. Pro specifikaci změn v DNA byli vybráni běloocí a mozaicisní jedinci, kteří byli genotypizováni a sekvenováni. Jediný editor, u kterého nebyli zaznamenáni žádní mutantní samci je nos-AID.

Klíčová slova:

Octomilka, bázové editory, CAS9, genová editace, gen *white*

ABSTRACT

Base editors are a relatively new method based on the CRISPR Cas9 enzyme introducing targeted changes to a specific site in the genome. In this work, complementary gRNAs have been designed to four target regions located on the spliceosomal sides of exons and introns of the white gene in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Subsequently, the efficiency of four selected base editors Target-AID; nos-BE³; nos-ABE7.10 and nos-AID and the nuclease Cas9 were investigated. A total of 116, 556 males were monitored at 18, 25 and 28 °C. Although efficiencies were in the order of percents, 1906 mutants were collected. Even though the Cas9 nuclease showed higher editing efficiency, the base editors provided way more precise changes in targeted regions. It also contained a higher number of unwanted indels, in contrast to single nucleotide changes generated using base editors. Selected white eyed and mosaic individuals were genotyped and sequenced. The only editor for which no mutant males were observed is nos-AID.

Key words:

Fruit fly, Base editors, CAS9, gene editing, *white* gene,

Poděkování

Děkuji Mgr. Davidu Doleželovi, Ph.D, za vedení práce a veškeré rady a připomínky v průběhu experimentu. Dále děkuji celému kolektivu Laboratoře molekulární chronobiologie, Entomologického ústavu, Biologického centra AV ČR v.v.i. za přátelské prostředí a veškerou pomoc. Můj velký dík patří kolegovi Brabcovi, který mi byl po celou dobu studia tím nejlepším parťákem. V neposlední řadě chci poděkovat rodině a příteli za podporu, i když si většina z nich dodnes přesně nepamatuje, co vlastně studuji.

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1 Opravy DNA	3
2.1.2 CRISPR-Cas.....	4
2.1.3 CRISPR-Cas9.....	5
2.2 Editace bází	8
2.2.1 Cytosinové editory	9
2.2.2 Adeninové editory.....	11
2.2.3 nos-AID/ TAM Duhový editor.....	12
3 CÍLE PRÁCE.....	13
4 MATERIÁL A METODIKA.....	14
4.1 Izolace genomové DNA	14
4.2 PCR.....	14
4.2.1 PCR genu <i>white</i>	14
4.2.2 PCR bázových editorů, Cas9 a gRNA konstruktů	16
4.3 Gelová elektroforéza	18
4.4 Měření čistoty produktů a příprava sekvenční reakce	19
4.5 Výběr cíleného místa a design vhodných gRNA	19
4.6 Klonování vektoru pro získání mnohočetného gRNA konstruktů	20
4.6.1 Výroba fragmentů obsahujících gRNA.....	21
4.6.2 Štěpení plazmidu pomocí restrikčního enzymu.....	22
4.6.3 Gibsonovo klonování	23
4.6.4 Transformace vektoru	24
4.6.5 PCR bakteriálních kolonií.....	24
4.6.6 Izolace plazmidové DNA.....	25
4.7 Chov a křížení linií <i>Drosophila melanogaster</i>	26
5 VÝSLEDKY	30
5.1 Design konstruktů kódujících gRNA	30
5.2 Klonování vektoru pro získání mnohočetného gRNA konstruktů	32
5.2.1 Restrikční štěpení enzymu	33
5.2.2 Gibsonovo klonování	34
5.2.3 PCR bakteriálních kolonií.....	35

5.3	Křížení a četnost mutageneze <i>Drosophila melanogaster</i>	35
5.3.1	Efektivita BE při 28 °C	37
5.3.2	Efektivita BE při 25 °C	39
5.3.3	Efektivita BE při 18 °C	41
5.3.4	Efektivita Cas9 nukleázy ve sledovaných teplotách	43
5.4	Molekulární charakterizace pomocí sekvenace.....	44
5.4.1	Design primerů.....	44
5.4.2	Sekvenace bělookých jedinců	45
5.4.3	Sekvenace mozaicisních jedinců.....	49
5.5	Genotypizace mozaicisních jedinců	51
6	DISKUZE.	53
7	ZÁVĚR	61
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	62

Seznam zkratek

A-adenin

AAG-alkyl adeninová DNA glykosyláza

ABE-adeninové báze editory

ADA-adenosin deamináza

APOBEC1-Apolipoprotein B mRNA editační katalytická podjednotka 1

BE-báze editory

bp-báze pár

CBE-cytosinové báze editory

C-cytosin

cDNA-komplementární DNA

CRISPR-pravidelně uspořádané krátké palindromické repetice

crRNA-krátké crRNA

dCas9-katalyticky neaktivní Cas9

DNA-deoxyribonukleová kyselina

DSB dvouvláknové zlomy

dsDNA-dvouvláknová DNA

E. coli-*Escherichia coli*

FACS-třídění buněk aktivovaných fluorescencí

fw primer-přímý primer

GFP-zelený fluorescenční protein

G-guanin

gRNA-vedoucí RNA

hAID-lidská aktivací indukovaná deamináza

ChIP-seq-chromatinová imunoprecipitace následována sekvenováním

nCas-Cas nickáza

ng/μl-nanogram na mikrolitr

NHEJ-nehomologní spojování konců

NUC-nukleová část Cas9

ORF-otevření čtecího rámce

PAM-motiv přilehlý k protospaceru

PCR-polymerázová řetězová reakce

PmCDA1-cytidindeamináza1 exprimovaná z *Petromyzon marinus*
pre-crRNA-primární transkript krátkých crRNA
REC-rozpoznávací část Cas9
RNA-ribonukleová kyselina
RNP-ribonukleoproteinový komplex bázového editoru
rv primer-zpětný primer
SaCas9-nukleáza pocházející od *Staphylococcus aureus*
sgRNA-jednotlivé gRNA
SNP-jednonukleotidový polymorfismus
SpCas9-nukleáza pocházející od *Streptococcus pyogenes*
ssDNA-jednovláknová DNA
TadA-tRNA adenin deamináza
TAE pufr-roztok obsahující směs Tris báze, kyseliny octové a EDTA
Ta-teplota nasedání
tracrRNA-trans-aktivační crRNA
T-thymin
UGI-uracil glykosilový inhibitor
UNG-uracilová DNA glykosiláza
U-uracil

1 ÚVOD

Krátké, pravidelně uspořádané palindromatické repetice (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, (CRISPR)) jsou sekvence DNA, nacházející se v genomu některých prokaryot. Během vývoje si bakterie a archaea vyvinuly řadu obranných mechanismů, aby se mohly bránit svým virovým predátorům (Jansen et al., 2002; Doron et al., 2018). CRISPR funguje tak, že ukládá záznamy o předchozích invazích a poskytuje imunologickou paměť pro rychlou a robustní reakci na následné virové infekce (Zheng et al., 2020). CRISPR-Cas systém obsahuje téměř 40 % všech bakterií a jedná se o velmi různorodý systém ovlivňující editaci DNA (Doudna et Charpentier, 2014).

Poprvé byly CRISPR sekvence nalezeny a popsány v roce 1987 v bakterii *Escherichia coli* (Ishino et al., 1987). V roce 1993 byla CRISPR sekvence poprvé pozorována u archeí, konkrétně u druhu *Haloferax mediterranei* (Mojica et al., 1993). V roce 2012 byla publikována studie, ve které byl využit CRISPR-Cas9 systém jako genetické nůžky a byla popsána možnost editace genů (Jinek et al., 2012; Doudna et Charpentier, 2014). Nástroje odvozené od CRISPR-Cas systému, a jeho modifikace, se považují za efektivní a nejběžněji využívané metody v genomovém inženýrství (Jinek et al., 2012; Doudna et Charpentier, 2014; Rees et Liu, 2018).

Editace genomu je proces, při kterém dochází k cílené změně v sekvenci DNA vybraného organismu. Momentálně se pro editaci genomů nejvíce využívají techniky odvozené od CRISPR-Cas systémů a jejich různé modifikace, s cílem zlepšit účinnost editace (Jia et al., 2019; Khan, 2019). Od metody CRISPR-Cas9 jsou odvozeny báze editory (BE), díky kterým je možné provádět velmi přesné a cílené nukleotidové substituce v genomu bez nutnosti vzniku dvouvláknových zlomů. V současné době jsou báze editory považovány za velmi elegantní formu úpravy genetické informace a do jejího dalšího rozvoje jsou vkládány velké naděje. Editory by mohly potenciálně korigovat tisíce patogenních jednonukleotidových polymorfismů (SNP) spojených s dědičnými chorobami. Editace genomu modelových organismů je nezbytná pro analýzu funkce genů, a proto má zásadní význam pro člověka (Jia et al., 2019).

Báze editory jsou poměrně novým nástrojem molekulární biologie, díky kterým můžeme cíleně editovat DNA na konkrétním místě. Ačkoliv je

D. melanogaster známa jako výborný genetický model, účinnost BE u ní nebyla v minulosti popsána. Proto jsme se rozhodli u octomilky *in vivo* otestovat efektivitu nejběžnějších editorů pro úpravu bází, jako jsou nos-BE³; nos-ABE7.10; Target-AID; nos-AID.

1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1 Opravy DNA

Základním principem editace genomu je docílit v DNA dvouvláknových zlomů ‚double-strand breaks‘ (DSB), které indukují různé způsoby opravy, čímž lze genetickou informaci editovat na přesném místě (Choulika et al., 1995). Mezi nejčastější opravné mechanismy řadíme opravu pomocí homologní rekombinace či nehomologním spojováním konců (NHEJ). Tyto mechanismy mohou způsobovat různé mutace, inserce či delece (Bassett et al., 2013; Rees et Liu, 2018). CRISPR Cas systém byl přizpůsoben ke vzniku dvouřetězcových zlomů například v lidských (Cong et al., 2013) a myších (Wang et al., 2013) buňkách, či u zebřiček (Hwang et al., 2013).

1.1.1.1 Homologní rekombinace

Oprava zlomů pomocí homologní rekombinace je přítomna ve všech organismech. Tento opravný mechanismus pracuje s vysokou přesností, ale liší se v závislosti na druhu. Pro správné fungování a přesnou úpravu DNA je nutné dodat templát donorové DNA, jenž kóduje požadovanou změnu. Oprava řízená homologní rekombinací pak vede k začlenění sekvence z templátu exogenní DNA do místa DSB (Krejci et al., 2012; Bassett et al., 2013). Templát může být v podobě krátké jednovláknové DNA (‚single-strand‘ DNA (ssDNA)), či dvouvláknové DNA (‚double-strand‘ DNA (dsDNA)), zde se obvykle jedná o PCR produkty nebo plazmid. Je to flexibilní nástroj se schopností provádět přesné inserce, delece nebo jakékoliv jiné požadované bodové mutace. Problémem je do značné míry omezenost na G2 a S fázi buněčného cyklu, což omezuje efektivitu na pouze aktivně se dělící buňky. Proto je homologní rekombinace funkční pouze pokud byl úsek genomu předem replikován (Komor et al., 2016; Rees et Liu, 2018).

Proces homologní rekombinace je založen na výměně nukleotidových sekvencí mezi dvěma molekulami DNA, které sdílejí podobné nebo identické sekvence. V meióze zprostředkovává výměnu informací mezi mateřskými a otcovskými alelami v prekurzorových buňkách gamet, čímž vytváří rozmanitost mezi potomstvem (San Filippo et al., 2008).

1.1.1.2 Nehomologní spojování volných konců (NHEJ)

NHEJ je velmi rychlý a flexibilní způsob opravy dvouvláknových zlomů a může být aktivován v jakémkoli stádiu buněčného cyklu. Další výhodou je, že není závislý na homologním templátu. Tato metoda však tvoří poměrně mnoho chyb. Vlivem těchto náhodných indelů jsou výsledky editace nespolehlivé (Burma et al., 2006; Bassett et al., 2013).

Na konce DNA, vytvořené při zlomu, se váže protein Ku a následně je navázána DNA ligáza D, která konce upraví tak, aby mohlo dojít k ligaci bez potřeby přítomnosti neporušené sesterské chromatidy (Brissett et al., 2007). Kvůli tomu je NHEJ reparační dráhou první volby především v G1 a brzké S fázi buněčného cyklu. Takovým způsobem mohou vznikat různé delece nebo inserce (Pitcher et al., 2007).

1.1.2 CRISPR-Cas

V blízkosti CRISPR sekvencí byly objeveny geny kódující Cas proteiny. Jedná se o velmi rozmanitou skupinu proteinů působící jako nukleázy, helikázy a RNA vázající proteiny, čímž interagují s genetickou informací (Makarova et al., 2011b). Cas geny byly objeveny pouze u prokaryot obsahujících CRISPR lokusy. Společným významným znakem jsou palindromické repetice a jejich délka se nachází obvykle v rozmezí 21 bp – 48 bp. Dalším znakem jsou mezerníky („spacers“). Jedná se o sekvence cizorodé DNA mezi jednotlivými CRISPR repeticemi. Počet mezerníků se u jednotlivých druhů liší a lze jich nalézt od jednotek až po stovky (Jansen et al., 2002). Díky těmto sekvencím umí bakterie, po opětovném infikování, fága rychle rozpoznat a pomocí CRISPR-Cas komplexu ho eliminovat. Na mezerníkové prekurzory přiléhají 2 až 5 nukleotidů dlouhé motivy (PAM) díky kterým je komplex schopen správně rozpoznat cizorodou nukleovou kyselinu (Cong et al., 2013; Amitai et Sorek, 2016; McGinn et al., 2019). Běžné strategie doručení DNA, kódující cílový protein, probíhají prostřednictvím virové infekce, elektroporace či přímé mikroinjekce mRNA (Chadwick et al., 2017; Kim et al., 2017a). Poté dochází k transkripci a translaci v cílové buňce a následné produkci požadovaného proteinu (Ma et al., 2018).

Systémy CRISPR-Cas jsou klasifikovány do tří typů (I, II a III). Některé Cas proteiny (Cas1, Cas2) jsou vysoko konzervovány a vyskytují se ve všech typech systémů. Jinak se tyto tři systémy podstatně liší ve funkci a signálních genech (Makarova et al., 2011a). Molekulární charakteristika Cas proteinů probíhá pomocí elektronové mikroskopie a rentgenové krystalografie. Ke stanovení počtu a typů vazebných míst Cas9 na chromozomu je využívána chromatinová imunoprecipitace a výkonné sekvenování pomocí CHIP-seq (Doudna et Charpentier, 2014).

1.1.2.1 Mechanismus působení

Obecně je působení CRISPR-Cas systému rozděleno do tří fází. Adaptace, první fáze, nastává po infikování bakterie cizorodou genetickou informací, kdy se mezerník integruje mezi CRISPR lokusy. Na procesu se podílejí dva konzervativní proteiny – Cas1 a Cas2. Ty spolu vytvářejí komplex a rozpoznají PAM sekvenci, čímž dojde k začlenění sousedící sekvence do CRISPR lokusu (Makarova et al., 2011a; Doudna et Charpentier, 2014).

Ve druhé fázi dochází vlivem Cas proteinů ke katalyzaci endoribonukleáz, což má za následek transkripci a štěpení primárního transkriptu (pre-crRNA), který je zpracován na krátké crRNA (crRNA). Každá molekula crRNA tak obsahuje mezerníkový motiv a část repetitivní sekvence (Bassett et al., 2013; Doudna et Charpentier, 2014).

Ve třetí fázi je zralá crRNA vázána proteiny, čímž vytváří komplex, který je schopný rozeznat a zneškodnit cizorodou RNA/DNA. Je naváděn crRNA, která po rozpoznání PAM místa s příslušnou sekvencí hybridizuje a způsobuje zlom. Proteiny, účastníci se druhé a třetí fáze, se liší v závislosti na typu CRISPR-Cas systému (Bassett et al., 2013; Doudna et Charpentier, 2014; Amitai et Sorek, 2016).

1.1.3 CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 je zařazen do systému II typu, jelikož vyžaduje pouze jediný protein, a to Cas9 endonukleázu pro rozpoznání a štěpení DNA, čímž způsobuje dvouvláknové zlomy. Tento typ CRISPRu je považován díky jednoduchosti efektorového komplexu za velmi užitečný, a proto se k editaci genomů využívá

nejčastěji (Doudna et Charpentier, 2014; Abadi et al., 2017; Jiang et Doudna, 2017). Důvodem flexibility Cas9 komplexu je skutečnost, že nejméně devět nukleotidů vlákna DNA není uspořádáno a spárováno při tvorbě Cas9:gRNA:DNA komplexu zvaného jako ‚R-smyčka‘. Díky tomu není jejich pohyb zcela omezen (Doudna et Charpentier, 2014; Komor et al., 2016; Niehrs et Luke, 2020).

Pro správnou funkci je nezbytná trans-aktivační crRNA (tracrRNA) spolu s krátkými crRNA. Tyto dvě složky spolu vytvářejí efektorový komplex, čímž vzniká vedoucí RNA („guide RNA“ (gRNA)), která má dvě hlavní funkce. 5' konec určuje cílové místo v DNA pomocí Watsonova-Crickova párování bází a na 3' konci dvouvláknovou strukturu gRNA, která se váže na protein Cas9. Dále komplex vyhledá komplementární PAM motiv, kde se naváže a vlivem konformační změny dojde k rozpletení dvoušroubovice a napojení gRNA na cílové místo (Doudna et Charpentier, 2014; Champer et al., 2017). PAM je kritický pro počáteční vazbu DNA, jelikož v jeho nepřítomnosti nejsou proteiny Cas9 rozpoznány. A to ani v případě plně komplementární cílové sekvence s gRNA (Doudna et Charpentier, 2014). Za PAM sekvencí je nejdůležitějších prvních 8-10 bází gRNA, kde vytvářejí editační okno, jelikož mutace v tomto krátkém úseku výrazně snižují pravděpodobnost zlomu. Následně proběhne sestřih pomocí Cas9 endonukleázy se dvěma doménami, kdy každá z nich stříhá jeden řetězec (Sternberg et al., 2014; Jiang et Doudna, 2017). Obvykle jsou všechny komponenty (Cas9, crRNA, tracrRNA) klonovány do jednoho plazmidu. Po přenesení do hostitelských buněk spolu tyto komponenty formují Cas9 komplex, který je schopný specificky se vázat na cílové místo a způsobit DSB (Bassett et al., 2013; Chen et al., 2019).

Protein Cas9 je složen ze dvou částí – rozpoznávací (REC), která je zodpovědná za rozpoznání nukleové kyseliny, a nukleové části (NUC). Nukleová část obsahuje HNH doménu a RuvC nukleázy, které štěpí vlákno DNA a formují duplex s druhým vláknem. Mutací buď HNH nebo RuvC domény vzniká varianta proteinu s jednořetězcovým štěpením DNA. Dále NUC část obsahuje koncový úsek C, který integruje s PAM místem (Doudna et Charpentier, 2014; Mir et al., 2018).

Fylogenetické studie ukazují, že přirozeně se vyskytující ortology Cas9 představují rozsáhlý zdroj systémů pro mnohočetné cílení genů (Chylinski et al., 2013; Fonfara et al., 2014). V současné době se k editaci genomu využívá několik nukleáz z různých bakteriálních druhů jako je *Streptococcus pyogenes*, označovaný jako

SpCas9, či *Staphylococcus aureus* (SaCas9) (Ran et al., 2015). Každá nukleáza rozpoznává svou specifickou PAM sekvenci a poskytuje tak možnost volby štěpných míst (Qi et al., 2013). Pro editaci se nejčastěji používá Cas9 systém organismu *Streptococcus pyogenes* kvůli jeho jednoduchému PAM motivu (5'-NGG-3') (Jinek et al., 2012; Qi et al., 2013). Ke snížení pravděpodobnosti vzniku nechtěných mutací v necílových pozicích bylo vytvořeno několik modifikací CRISPR-Cas9 systému. Mutace nukleázových domén proteinu Cas9 vytváří nikázu Cas (nCas), nebo katalyticky neaktivní ‚dead‘ Cas9 (dCas9) (Jiang et Doudna, 2017).

1.1.3.1 dCas-9

Jedná se o inaktivní formu bez endonukleázové aktivity, která byla vytvořena pomocí mutace v sestřihových doménách Cas9. V tomto případě jsou obě nukleázové domény (Asp10Ala a His840Ala) inaktivní. Největší výhodou dCas9 je, že nepotřebuje žádný opravný mechanismus a zachovává si schopnost vázat gRNA, ale neštěpí DNA (Komor et al., 2016; Calvo-Villamañán et al., 2020). Tyto katalyticky inaktivované nukleázy jsou užitečné jako DNA vazebné proteiny pro cílové lokusy DNA, čímž dochází ke zvýšení efektivity. Navíc také generuje zářez v needitovaném řetězci DNA, čímž indukuje buňky k jeho opravě dle šablony upraveného řetězce (Hess et al., 2017; Rees et Liu, 2018).

Upravený protein je používán jako transkripční faktor a vytváří CRISPRa a CRISPRi systémy. CRISPRa systém indukuje transkripci a patří tak mezi transkripční aktivátory, avšak jeho účinnost je poměrně nízká (Sanson et al., 2018). CRISPRi systém se váže na specifický lokus a inhibuje transkripci či elongaci. Umlčení genů pomocí tohoto systému má vysokou účinnost a specifitu, díky čemuž je široce využíván (Gilbert et al., 2014). Hojně se využívá k umlčení genů prokaryot místo RNA interference (Sanson et al., 2018).

1.1.3.2 nCas-9

Jedná se o Cas9 nikázu, která se liší v jednonukleotidové mutaci domény RuvC (D10A nebo H840A). Tím dochází k inaktivaci jedné ze štěpných domén, takže mohou vznikat pouze jednovláknové zlomy. Její použití zvyšuje specifitu celého systému (Liu et al., 2020). Pro zprostředkování dvouřetězcového zlomu je zapotřebí dvou

sgRNA. V případě souběžného donorového templátu s homologními rekombinačními rameny dochází k vysokému výskytu homologní rekombinace (Caruso et al., 2022).

Tyto modifikované Cas proteiny mohou být dále propojeny s katalytickou doménou jiných enzymů, jako je cytidindeamináza, která je důležitá pro správné fungování metylace DNA a editaci bází (Komor et al., 2016; Nishida et al., 2016).

1.2 Editace bází

Editace genomu je aktuálně nejvíce uskutečňována pomocí editace bází, jelikož nevyžaduje donorový templát, a hlavně dochází k eliminaci vzniku dvouvláknových zlomů. Navíc umožňují vyšší účinnost substituce jednotlivých cílových nukleotidů. Jejich široké využití je omezeno v rámci editačního okna vzdáleného několik párů bází od kanonického PAM motivu (Kim et al., 2017b; Wu et al., 2019).

Na rozdíl od CRISPR-Cas metody obsahuje několik enzymů, díky kterým probíhá jednotlivá editace bází. K tomuto účelu jsou využívány katalyticky inaktivované Cas proteiny a deaminační enzymy. Nicméně editace bází je limitována schopností produkovat pouze transverze, čímž dochází k nahrazování purinové báze za purinovou (adenin (A) \leftrightarrow guanin (G)) a pyrimidinovou za pyrimidinovou (cytosin (C) \leftrightarrow uracil (U (thymin (T)))). Editory bází jsou schopny deaminovat cytosinové i adeninové báze. Proto se rozdělují na cytosinové a adeninové bázové editory.

Mnoho studií probíhalo na úrovni buněčných kultur, či u rostlin. V jiných probíhala editace bází *in vivo* například prostřednictvím adeninového vektoru doručeného do myších jater (Chadwick et al., 2017), dále pomocí RNP (ribonukleoproteinového komplexu bázového editoru a sgRNA) vnitřního ucha myši (Rees et al., 2017) i myších embryí (Kim et al., 2017a; Liang et al., 2017), která byla následně implementována do těla náhradní matky, což mělo za následek vznik upravených potomků. Bázové editory byly také úspěšně použity u zebřiček (Rees et al., 2017; Zhang et al., 2017). Ze srovnání četnosti mimocílových mutací generovaných vlivem bázových editorů a štěpením aktivní nukleázou Cas9 vyplývá, že editace bází je více specifická (Kim et al., 2017a).

1.2.1 Cytosinové editory

Cytosinové bázové editory (CBE) zaměřují pomocí deaminace exocyklického aminu cytosin na uracil a poté thymin v cílových lokusech bez dvouřetězcového zlomu. CBE vykazují podstatně vyšší účinnost editace než pomocí konvenční endonukleázy Cas9 a zprostředkovanou homologicky řízenou opravou (Rees et Liu, 2018; Lee et al., 2020).

Za normálních podmínek by byl uracil díky opravnému mechanismu nahrazen původní bází, vlivem nesprávného párování. Avšak CBE využívá uracil glykosilový inhibitor (UGI), který zabraňuje zpětné přeměně uracilu na cytosin. Pro správnou funkci potřebují bázové editory dva hlavní komponenty, a to Cas enzym a ssDNA, které navádí komplex k cílovému místu v genomu. Výsledkem je aktivace ‚mismatch repair‘ systému, což má za následek záměnu UG páru za uracil-adeninový pár. Uracil je nakonec přeměněn na thymin (Komor et al., 2016; Rees et Liu, 2018). Nevýhodou současných CBE však je to, že mohou editovat i vedlejší cytosiny v rámci editačního okna v délce cca 5 nukleotidů, což může také vést k vedlejším nežádoucím mutacím (Lee et al., 2020).

Cytosinové editory by mohly potenciálně korigovat více než 5000 patogenních jednonukleotidových polymorfismů (SNP) spojených s lidskými dědičnými chorobami, jež byly zapříčiněny substitucí T na C (Komor et al., 2016; Wang et al., 2019). CBE dosahují vysoké úrovně konverze SNP s nízkou úrovní indelů u mnoha buněčných typů a organismů. Děje se tak navzdory tomu, že se mohou editory bází vázat na necílové lokusy vykazující vysokou sekvenční homologii s cílovým protospacerem (Rees et al., 2017; Doman et al., 2020; Liu et al., 2020).

APOBEC enzymy zprostředkovávají u obratlovců obranu proti retrovirům nebo retrotranspozonům tím, že deaminují cytosin na uracil ve virové komplementární DNA (cDNA) (Harris et al., 2002). APOBEC1 (BE³, získaný od potkana) a PmCDA1 (CDA1, odvozený od mihule mořské) jsou dva přírodní a nejmodernější enzymy, které jsou široce využívány cytosinovými bázovými editory (Luo et al., 2020).

1.2.1.1 Target-AID/ PmCDA1

U bázevého editoru Target-AID (aktivací indukovaná deamináza) bylo prokázáno, že indukuje mutace v rostlinách. Dlouho však zůstávalo nejasné, zda funguje i u savců. Poprvé byla prokázána funkce u savčích buněk (myších zygot) (Sasaguri et al., 2018). Účinnost cytosinového BE a deaminázy PmCDA1 byla zkoumána například u rajčat (Shimatani et al., 2017; Veillet et al., 2019).

V praxi dochází k fúzi nikázy D10A a několika variant *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) s cytidindeaminázou 1 (PmCDA1) exprimovanou z lymfocytů mihule mořské (*Petromyzon marinus*) a inhibítorem uracilové DNA glykosylázy (UGI) (Rogozin et al., 2007; Nishida et al., 2016; Wu et al., 2019).

1.2.1.2 nos-BE³/ BE³

Jedním z nejvíce používaných cytosinových bázevéch editorů je BE³ třetí generace, odvozený od deaminázy rAPOBEC1p1 (rA1), nCas9 nikázy obsahující mutaci v Asp10Ala (D10A), která zabraňuje štěpení dsDNA a UGI, čímž potlačuje bázevou excisní opravu (Komor et al., 2016). Tento editor je omezen nízkou úrovní editace a vysokou aktivitou sousedících cytosinů v editačním okně (Kim et al., 2017b). Tento editor byl použit k zavedení předčasného stop kodonu a ukončení genové exprese (Kuscu et al., 2017). Tímto způsobem dochází k bezpečnější a mnohem přesnější knockoutové strategii, než pomocí NHEJ zprostředkovaného pomocí Cas9 (Kim et al., 2017b; Komor et al., 2017).

Apolipoprotein B mRNA editační katalytická podjednotka 1 (APOBEC1) je ústřední složkou RNA editosomu podmiňující deaminaci. APOBEC1 je katalytickou složkou komplexu pro editaci RNA a vykazuje homologii s proteinem AID, jehož funkcí je zesílení diverzifikace genů (Harris et al., 2002; Jinek et al., 2012; Qi et al., 2013). Navíc přijímá ssDNA jako substrát, ale není schopna působit na dsDNA (Rees et Liu, 2018).

BE³ účinkuje v necílových oblastech nezávisle na jednotlivých sgRNA. Editor byl použit například u zygot myši (*Mus musculus*) (Zuo et al., 2019), či rýže (*Oryza sativa*) (Jin et al., 2019). Dle Komor et al. (2016) měl 15-75% účinnost editace bází s minimální tvorbou indelů. Při nadměrné expresi cytosinový BE³ indukuje náhodné

mutace v celém genomu s průměrnou frekvencí 5×10^{-8} až $5,3 \times 10^{-7}$ na bp, což je nižší mutační rychlost než míra spontánní deaminace u myší (Zuo et al., 2019; Doman et al., 2020). Byly vytvořeny modifikace jako YE¹-BE³, R³³A-BE³, které ve srovnání s BE³ vykazují podstatně nižší úroveň indelů a transkriptomové editace RNA mimo cíl (Koblan et al., 2018; Doman et al., 2020).

1.2.2 Adeninové editory

Adeninové editory (ABE) jsou využívány k editaci eukaryotických i prokaryotických buněk. Adenosin deamináza (ADA) katalyzuje přeměnu adeninu na inosin v jednovláknové smyčce tRNA-Arg. Inosin je rozpoznán jako guanin, čímž ovlivňuje purinový metabolismus (Gaudelli et al., 2017; Hao et al., 2019).

ADA není zdaleka tak využitelná jako cytosin deamináza, jelikož striktně působí pouze na RNA duplex či RNA/DNA hybridy s chybnou dvojicí bází místo jednovláknové DNA (Yan et al., 2018). Dle studií by měly adeninové editory vykazovat minimum necílených editací, jelikož dříve nebyly zaznamenány na rozdíl od cytosinových BE (Losey et al., 2006).

Vlivem relativně vysoké míry spontánní deaminace cytosinu (100-500 deaminačních událostí na buňku za den) dochází k mutaci páru bází G-C na A-T. Proto byla vyvinuta deoxyadenosin deamináza, která přijímá ssDNA vycházející z enzymu Tada u *Escherichia coli*, čímž umožňuje opravu nejběžnějšího typu patologických mutací (Gaudelli et al., 2017; Rees et Liu, 2018).

1.2.2.1 nos-ABE7.10/ ABE

Editor ABE7.10, obsahující 14 aminokyselinových záměn v katalytické doméně Tada*, je nejefektivnějším nezávislým ABE, který byl doposud popsán (Rees et Liu, 2018). Sedmá verze heterodimeru ABE7.10 je nejčastěji zkoumána v bakterii *Escherichia coli* (Komor et al., 2016). tRNA adenin deamináza (Tada), je jediným enzymem, který může vyvolat substituci A-G v DNA a interagovat s RNA substrátem. Heterodimer Tada je řízen Cas9/sgRNA komplexem do cílového místa, kde adenin deamináza přeměňuje adenin na inosin, což následně vede k mutaci během opravy či replikace DNA (Losey et al., 2006; Luo et al., 2020).

Pomocí nCas9, získané od *Streptococcus pyogenes*, a tRNA adenin deaminázy byl zkonstruován ABE systém, kde ADA způsobila dočasnou formaci hypoxantinu. Po replikaci DNA byl hypoxantin trvale změněn na guanin. Tím dochází ke konverzi páru AT na GC. Účinnost tohoto systému se například u *E. Coli* pohybovala v rozmezí 66-100 % (Zhang et al., 2020). ABE7.10 byl úspěšně použit v kosterním svalu myšního modelu Duchennovy svalové dystrofie, kde korigoval vznik předčasného stop kodonu (Ryu et al., 2018).

1.2.3 nos-AID/ TAM Duhový editor

TAM editor je složen z Sp dCas9 nukleázy, jejíž C konec je fúzován s lidskou aktivací indukovanou deaminázou hAID* P182X. Tento editor mění cytidiny a guaniny nezávisle na další tři báze, čímž vytváří široký repertoár variant v požadovaných lokusech. Skládá se z cytidin deaminázy AID, zodpovědné za diverzifikaci protilátek, která převádí cytidiny na uracily, což vede k záměnám C/G. Po báze excizi dochází k opravě neshod, kdy uracilová DNA glykosiláza (UNG) odstraňuje uracil a zanechává zde abazická místa, která podléhají somatické hypermutaci na A či T. Inhibice UNG vede výhradně ke konverzím C na T nebo G na A. Ve spojení s UGI lze převádět cílené cytidiny výhradně na tyminy, čímž dochází ke specifické bodové mutaci (Ma et al., 2016).

Poprvé byl TAM použit pro fluorescenci GFP, což vedlo k předčasnému stop kodonu u 2 % buněk. Jednalo se výhradně o nukleotidové substituce, indely se vyskytovaly s četností 0,5 % (s Cas9 proteinem více než 40 % indelů). Poměry nukleotidových substitucí byly vyrovnané u cytidinu (4T:3G:3A) i guaninu (5A:3C:2T) (Ma et al., 2016). Vlivem těchto vlastností je TAM jedinečný screeningový nástroj umožňující zvýšené vytváření substitucí, což by mohlo vést ke zlepšení generování funkčních variant proteinů.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo

- 1) Zpracovat literární rešerši o bázových editorech.
- 2) Navrhnout strategii pro mutagenezi genu *white* octomilek (*Drosophila melanogaster*) pomocí bázových editorů.
- 3) Připravit patřičný konstrukt kódující potřebné gRNA k editaci genu *white*.
- 4) Otestovat účinnost bázových editorů v octomilkách.
- 5) Vyizolovat DNA vybraných jedinců a pomocí PCR metody, elektroforézy a sekvenace specifikovat změny v DNA.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Izolace genomové DNA

Použitý materiál: ‚squishing‘ pufr: 10 mM Tris-Cl pH 8.2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl, proteináza K: 20 mg/ml (Invitrogen)

Do nadepsaných 2,5 ml mikrozkušavek byli jednotlivě vloženi vybraní jedinci octomilek. Následně byl připraven zásobní pracovní roztok. Na každou octomilku bylo potřeba 50 μ l ‚squishing‘ pufru a 5 μ l proteinázy K o koncentraci 20 ng/ml. Výsledný roztok byl přidán do jednotlivých mikrozkušavek a poté byly octomilky homogenizovány. Směs byla inkubována při 37 °C po dobu 30 minut. Po uplynutí doby byly mikrozkušavky na 2 minuty vloženy do termostatu vyhřátého na 95,5 °C, aby byla inaktivována proteináza K. Výsledný extrakt byl použit jako templát pro polymerázovou řetězcovou reakci (PCR).

3.2 PCR

Použitý materiál: PCR zkumavky, forward a reverse primer, genomová DNA, deionizovaná PCR voda (Top-Bio, s.r.o.), PPP Master Mix (pH 8,8; 150mM Tris-HCl; 40mM (NH₄)₂SO₄; 5mM MgCl₂; 400 μ M dATP; 400 μ M dCTP; 400 μ M dGTP; 400 μ M dTTP; 0,0 2 % Tween 20; 100 U/ml Taq-Purple DNA polymerázy, aditiva (Top-Bio, s.r.o.)).

Nejprve bylo do PCR zkumavek napipetováno 5 μ l namíchaného Master Mixu, 3 μ l deionizované vody, 0,5 μ l forward a 0,5 μ l reverse primeru. Jeden vzorek, do kterého byla namísto templátu přidána pouze voda, sloužil jako negativní kontrola. Nakonec byl do směsi přidán 1 μ l extrahované DNA, aby výsledný objem činil 10 μ l. Následně byla směs zvortexována a krátce centrifugována. Poté byly zkumavky vloženy do termocycleru

3.2.1 PCR genu *white*

Molekulární charakterizace mutantních jedinců byla provedena pomocí specifických primerů pro sledovaný gen *white*. Jelikož byl tento gen editován na třech specifických místech, bylo nutné navrhnout tři sady komplementárních primerů.

Každý vzorek tak musel být amplifikován pomocí tří nezávislých reakcí v termocycleru.

Amplifikační programy zahrnovaly následující kroky, opakující se ve 28 cyklech. Rozdílná velikost amplikonů měla vliv na délku extenze a odlišná stavba na teplotu nasedání primerů. Fragment 1 měl délku 472 bp, čili extenze probíhala 29 sekund.

Fragment 1	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	94 °C	2,5 minuty
Denaturace	94 °C	30 sekund
Nasedání primerů	49 °C	30 sekund
Extenze	72 °C	29 sekund
Finální extenze	72 °C	10 minut
Chlazení	18 °C	∞

Tabulka č.1: Amplifikační program fragmentu 1

Na fragmentu číslo 2 se nacházela cílová místa 2 i 3. Proto je tento fragment o několik kb delší a bylo nutné značně prodloužit délku extenze. Amplikon byl dlouhý 876 bp.

Fragment 2	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	94 °C	2,5 minuty
Denaturace	94 °C	30 sekund
Nasedání primerů	51 °C	30 sekund
Extenze	72 °C	53 sekund
Finální extenze	72 °C	10 minut
Chlazení	18 °C	∞

Tabulka č.2: Amplifikační program fragmentu 2

Třetí program byl navržen pro poslední cílové místo 4. Extenze WT4Fw2 a WT4Rv2 primerů trvala 29 sekund, jelikož výsledný produkt měl délku 477 bp.

Fragment 3	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	94 °C	2,5 minuty
Denaturace	94 °C	30 sekund
Nasedání primerů	52 °C	30 sekund
Extenze	72 °C	29 sekund
Finální extenze	72 °C	10 minut
Chlazení	18 °C	∞

Tabulka č.3: Amplifikační program fragmentu 3

3.2.2 PCR bázových editorů, Cas9 a gRNA konstruktů

Pomocí primerů komplementárních ke čtyřem druhům bázových editorů, Cas9 komplexu i primerů specifických pro námi vyrobený gRNA konstrukt, byla provedena genotypizace mutantních jedinců. Jednotlivé primery bázových editorů, Cas9 komplexu i gRNA konstruktů se lišily v závislosti na teplotě nasedání (T_a) a délce extenze. Společným znakem byla denaturace při 94 °C, opakování kroku dva až čtyři 28x a finální desetiminutová extenze.

Produkt primerů pro cytosinový bázový editor Target-AID měl délku 310 bp. Extenze tedy probíhala po dobu 19 sekund při teplotě 53 °C pomocí CD1Fw a CDA1Rv primerů.

Target-AID	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	94 °C	2,5 minuty
Denaturace	94 °C	30 sekund
Nasedání primerů	53 °C	30 sekund
Extenze	72 °C	19 sekund
Finální extenze	72 °C	10 minut
Chlazení	18 °C	∞

Tabulka č.4: Amplifikační program editoru Target-AID

Primery APOB1Fw2 a APOB1Rv2, které cílí na cytosinový BE³ editor, měli amplicon dlouhý 311 bp. Komplementární nasedání primerů probíhalo při 52,5 °C. Následná extenze trvala 19 sekund.

BE³	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	94 °C	2,5 minuty
Denaturace	94 °C	30 sekund
Nasedání primerů	52,5 °C	30 sekund
Extenze	72 °C	19 sekund
Finální extenze	72 °C	10 minut
Chlazení	18 °C	∞

Tabulka č.5: Amplifikační program cytosinového editoru BE³

K amplifikaci adeninového ABE7.10 editoru byly použity primery TadA1Fw a TadA1Rv. Produkt měl velikost 291 bp, tudíž extenze probíhala po dobu 18 sekund. Teplota nasedání primerů činila 53,5 °C.

ABE7.10	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	94 °C	2,5 minuty
Denaturace	94 °C	30 sekund
Nasedání primerů	53,5 °C	30 sekund
Extenze	72 °C	18 sekund
Finální extenze	72 °C	10 minut
Chlazení	18 °C	∞

Tabulka č.6: Amplifikační program adeninového editoru ABE7.10

Přítomnost TAM-AID editoru byla potvrzena pomocí primerů hAIDFw2 a hAIDRv2. Nasedací teplota dosahovala 52 °C. Extenze trvala 11 sekund, jelikož výsledná délka produktu byla pouze 171 bp.

TAM-AID	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	94 °C	2,5 minuty
Denaturace	94 °C	30 sekund
Nasedání primerů	52 °C	30 sekund
Extenze	72 °C	11 sekund
Finální extenze	72 °C	10 minut
Chlazení	18 °C	∞

Tabulka č.7: Amplifikační program duhového editoru TAM-AID

Cas9 komplex byl amplifikován pomocí nos-Cas9Fw a nos-Cas9Rv primeru. Jejich amplicon měl délku 190 bp a proto k extenzi stačilo pouze 12 sekund. Nasedání primerů probíhalo při teplotě 54 °C.

Cas9	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	94 °C	2,5 minuty
Denaturace	94 °C	30 sekund
Nasedání primerů	54 °C	30 sekund
Extenze	72 °C	12 sekund
Finální extenze	72 °C	10 minut
Chlazení	18 °C	∞

Tabulka č.8: Amplifikační program komplexu Cas9

Námi vyrobený konstrukt gRNA byl amplifikován pomocí U63seqfwd a pCFDseqrev primerů. Velikost produktu byla 964 bp, proto extenze trvala 58 sekund.

gRNA konstrukt	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	94 °C	2,5 minuty
Denaturace	94 °C	30 sekund
Nasedání primerů	53 °C	30 sekund
Extenze	72 °C	58 sekund
Finální extenze	72 °C	10 minut
Chlazení	18 °C	∞

Tabulka č.9: Amplifikační program konstruktů gRNA

3.3 Gelová elektroforéza

Použitý materiál: 1× TAE pufr (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA), agaróza, Quick-Load 1 kb Extend DNA Ladder (Bio Labs Inc., koncentrace 50 µg/ml), barvivo Gel Red 10 000x (Biotium), transiluminátor (UVP).

Byl připraven 1 % agarózový gel z 1x TAE pufru a agarózy. Směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě a často promíchávána. Před nalitím do formy s vloženými hřebeny byl gel obarven barvivem Gel Red a opět důkladně promíchán. Po ztuhnutí gelu byly vyndány hřebínky a nosič byl zcela zalit 1x TAE puftrem. Do krajních jamek bylo napipetováno 1,5 µl Quick-Load 1 kb Extend DNA ladderu a do

dalších jamek po 2 μ l amplifikovaného produktu, včetně negativní kontroly. Intenzita napětí byla nastavena na 90 V po dobu 50 minut, do doby, kdy viditelně došlo k separaci fragmentů. Nakonec proběhla vizualizace fragmentů DNA pomocí transiluminátoru a poté byl pořízen snímek výsledného gelu.

3.4 Měření čistoty produktů a příprava sekvenační reakce

Koncentrace DNA v izolovaném vzorku byla měřena pomocí přístroje NanoDrop 1000 Spectrophotometr (Thermo Fisher Scientific). 1 μ l měřeného vzorku byl nanášen na čidlo přístroje a pomocí softwaru byla zjištěna koncentrace cDNA.

Amplifikované produkty s dostatečnou koncentrací byly podrobeny enzymatickému čištění pomocí ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher Scientific), kdy byly v jediném kroku hydrolyzovány přebytečné primery a nukleotidy. Pro tyto účely byly použity 2 μ l činidla ExoSAP-IT™ a 8 μ l PCR produktu. Směs byla zvortexována a vložena do termocycleru na jeden cyklus viz. tabulka č. 10. Purifikované vzorky byly odeslány na sekvenaci (Eurofins Genomics/GenSeq).

	Teplota	Čas
Inkubace	37 °C	40 minut
Denaturace	80 °C	10 minut
Chlazení	4 °C	∞

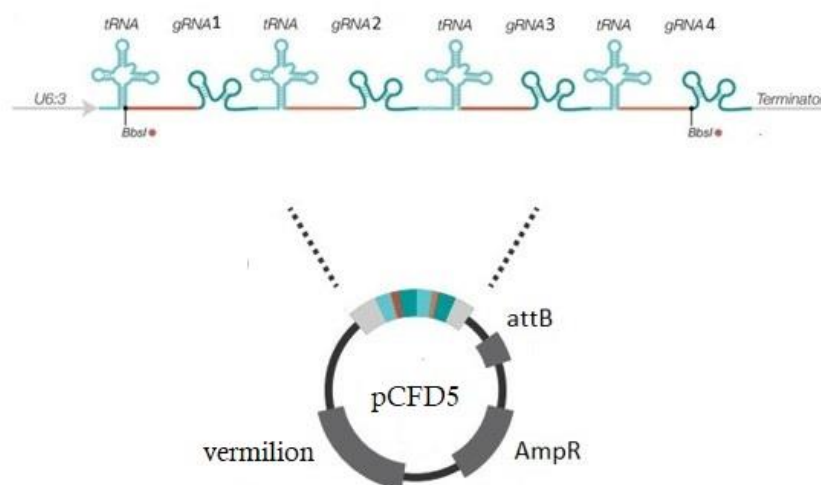
Tabulka č.10: Denurační program enzymatického čištění pomocí ExoSAP-IT™

3.5 Výběr cíleného místa a design vhodných gRNA

Cílem bylo poškození genu *white* pomocí báзовých editorů, které se projeví jasně viditelným fenotypem, kdy by měly mít octomilky bílé oči. Nejuniverzálnější místo umožňující působení všech námi testovaných báзовých editorů jsou donorová a akceptorová místa sestřihu *white* mRNA. Poškozením donorového místa sestřihu by nemělo dojít k vyštěpení intronu a vzniklý transkript by tak obsahoval předčasný stop kodon právě v intronové oblasti. Naopak cílení na akceptorové místo sestřihu na 3' konci intronu by mohlo mít za následek vynechání exonu, a tudíž jeho nepřepsání do proteinu. V obou výše uvedených případech by měl být protein *white* zcela nefunkční.

Byly navrženy takové komplementární gRNA, aby splňovaly délku 23bp a zároveň zacílily na vybrané místo adeninové i cytosinové BE. Nejdůležitější kritérium představovalo, aby byl PAM v podobě NGG, 10 až 18bp daleko od cílového místa a aby se nacházel maximálně na hranici exonu 5. Tím by došlo k poškození transkripce *white* genu. Obsah guaninových – cytosinových párů se pohyboval v rozmezí 40-60 %. Následně byla v počítači zkontrolována specifita a účinnost sestavených gRNA pomocí internetových nástrojů jako je Crispor (<http://crispor.tefor.net/>).

3.6 Klonování vektoru pro získání mnohočetného gRNA konstruktů



Obrázek č.1: pCFD5 vektor pro expresi více gRNA vlivem zpracování lemujících tRNA pod kontrolou promotoru RNA polymerázy III, U6:3. AmpR je promotorem rezistence k ampicilinu (upraveno, převzato z www.crisprflydesign.org; Supplementary Methods pCFD5 cloning protocol)

Fragmenty obsahující gRNA byly vytvořeny pomocí AccuPrime™ systému. Spolu s restričně štěpeným plazmidem pCFD5 byl pomocí Gibsonova klonování postaven mnohočetný konstrukt skládající se ze čtyř gRNA, jelikož jsme se rozhodli targetovat vybraný gen na čtyřech různých sestříhových místech. Vektor byl transformován do kompetentních buněk *Escherichia coli*. Získané kolonie byly podrobeny PCR, úspěšné klony identifikovány a plazmidová DNA byla vyzolována.

3.6.1 Výroba fragmentů obsahujících gRNA

Po zvolení vhodného místa byly navrženy komplementární primery ve směru 5'-3'. Po jejich získání, byly amplifikovány pomocí AccuPrime™ Taq DNA polymerázového systému. Protilátky Anti-Taq DNA polymerázy inhibují aktivitu polymerázy a poskytují automatický ‚hot start‘, který snižuje přítomnost nežádoucích produktů a dimerů v důsledku nespecifické amplifikace DNA. Navíc vazba protilátky s AccuPrime™ proteinem zlepšuje specifitu PCR a dvakrát zvyšuje věrnost Taq polymerázy. Následně proběhly tři PCR reakce, při kterých došlo ke spojení jednotlivých gRNA o délce 48 bp. Fragment 1 po skončení programu obsahoval gRNA 1 a gRNA 2. Fragment 2 obsahoval gRNA 2 a gRNA 3. Poslední fragment obsahoval 3 a 4 gRNA.

PCR 1	fw primer cílového místa 1
	rv primer cílového místa 2
PCR 2	fw primer cílového místa 2
	rv primer cílového místa 3
PCR 3	fw primer cílového místa 3
	rv primer cílového místa 4

Tabulka č.11: Vizualizace tří PCR programů obsahující primery pro čtyři cílová místa

Byly vytvořeny tři reakční směsi pro tři amplifikované fragmenty o objemu 50 μ l, a to pro fragment 1, fragment 2-3 a fragment 4.

Reagencie	Objem (μ l)
10x AccuPrime™ pufr I	5
Fw primer	1
Rv primer	1
DNA polymeráza	1
PCR H ₂ O	41
Templát	1

Tabulka č.12: Reakční směs pro výrobu fragmentů obsahujících cílené gRNA

Poté proběhly individuální PCR pro všechny tři fragmenty, kde plazmid sloužil jako templát. Nasedací teplota primerů byla 61 °C a zvyšovala se každým opakováním o 0,35 °C, než dosáhla 72 °C po dobu 32 cyklů.

	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	94 °C	2 minuty
Denaturace	94 °C	30 sekund
Nasedání primerů	61 (↑ 0,35) °C	30 sekund
Extenze	68 °C	16 sekund
Chlazení	4 °C	∞

Tabulka č.13: Amplifikační program fragmentů obsahujících cílené gRNA

Následně byly vzorky vloženy do elektroforézy na 1 % agarózový gel. Očekávané velikosti prvního a třetího fragmentu byly 224 bp a druhého fragmentu 194 bp. Produkty správné velikosti byly vyříznuty z gelu a byla provedena extrakce pomocí QIAquick PCR purifikační sady (Qiagen). Nejdříve byl vyříznutý kus inkubován 30 minut při 50 °C a poté byl 1 minutu centrifugován při 13 400 otáčkách za minutu. Supernatant byl nanesen na kolonu QIA quick spin (Roche Diagnostics), k čemuž byl přidán trojnásobek objemu pufru QG. Roztok se poté centrifugoval při 13 400 otáčkách za minutu, čímž se DNA adsorbovala na křemičitou membránu kolony. Poté bylo na kolonku předáno 750 µl pufru PE a směs byla znovu centrifugována 1 minutu při 13 400 g. Dále byla kolonka umístěna do nové mikrocentrifugační zkumavky, a poté na ní bylo nanesen 50 µl EB pufru, jenž sloužil k eluci DNA z povrchu kolony. Směs byla znovu centrifugována 1 minutu při 13 400 g, čímž byla získána purifikovaná DNA. Následně byla změřena koncentrace všech tří fragmentů.

3.6.2 Štěpení plazmidu pomocí restrikčního enzymu

Jako vektor byl vybrán plazmid pCDF5, jelikož obsahuje *vermilion* transformační marker, díky kterému je snadnější selekce transgenních much. Vektor usnadňuje expresi několika gRNA ohraničených tRNA. Systém je založen na uvolňování více funkčních gRNA zpracováním lemujících tRNA z jediného prekurzorového transkriptu v jádře, což umožňuje vysoce účinnou mutagenizi založenou na Cas9. Expres v zárodečných buňkách je řízena promotorem U6:3 RNA

polymerázy III. Nejprve byl plazmid pCFD5 štěpen restričním enzymem BbsI typu High Fidelity (NEB). Byla vytvořena reakční směs o objemu 50 μ l.

Reagencie	Objem (μ l)
Cut Smart pufr (10x)	5
Vektor (plazmid pCFD5)	30
BbsI restriční enzym	2
PCR H ₂ O	13

Tabulka č.14: Reakční směs pro štěpení plazmidu pCFD5 pomocí BbsI restričního enzymu

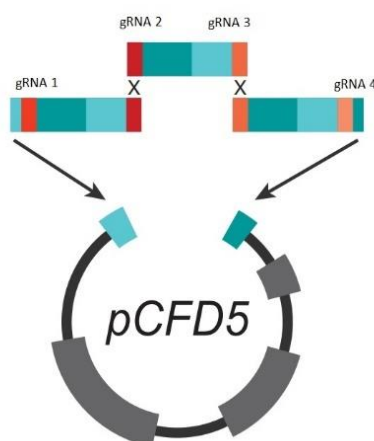
Plazmid byl štěpen v inkubátoru po dobu 90 minut při 37 °C., kdy enzym vytváří přilnavé konce, které umožňují bezproblémové klonování gRNA. Naštěpené vzorky plazmidu byly vloženy do elektroforézy na 1 % agarózový gel po dobu 60 minut při 85 V. Po skončení programu byl vyříznut produkt odpovídající velikosti 6447 bp a DNA byla purifikována opět pomocí komerční QIA quick purifikační soupravy (Qiagen). Nakonec byla u vzorku změřena koncentrace.

3.6.3 Gibsonovo klonování

Poté bylo provedeno Gibsonovo klonování (Bio Labs, Inc), při kterém se v rámci jedné isotermální reakce pospojovaly tři fragmenty (1,2-3,4) obsahující gRNA a plazmid v jeden úsek. Ke koncům klonovaných úseků byly navrženy vhodné primery, které docílily překrytí konců obou fragmentů. Celkový objem vzorku byl 20 μ l a následná inkubace trvala 60 minut při 50 °C. Poté byla směs přes noc inkubována při 4 °C.

Reagencie	Objem (μ l)
Gibsonův Master Mix	10
Vektor	5
Fragment 1	1
Fragment 2-3	1
Fragment 4	1
Deionizovaná H ₂ O	2

Tabulka č.15: Reakční směs Gibsonova klonování



Obrázek č.2: Vizualizace pCFD5 vektoru s komplementárními úseky gRNA (upraveno, převzato z [www. crisprflydesign.org](http://www.crisprflydesign.org); Supplementary Methods pCFD5 cloning protocol)

3.6.4 Transformace vektoru

Vektor pCFD5:vermillion_white-targeting_mgRNA_construct, obsahující požadované gRNA a gen rezistence na antibiotika, byl transformován do kompetentních buněk *Escherichia coli*. Nejprve byly připraveny agarové misky zahřátím agaru, při jeho chladnutí na 50 ° C byl přidán ampicilin s koncentrací 100 µg/µl a 200 µg/µl. Poté bylo rozmrazeno 100 µl kompetentní *E. coli*, která byla přidána do zkumavky spolu s 5 µl expresního vektoru gRNA. Směs byla ponechána 30 minut na ledu a následně byla podrobena teplotnímu šoku při 42 °C na 45 sekund. Posléze byl roztok ponechán 2 minuty na ledu, načež k němu bylo přidáno 250 µl SOC média. Ten byl inkubován v třepačce 1 hodinu při 37 ° C. Po skončení bylo na agarové misky sterilně naneseno 50µl transformované směsi kompetentních buněk, ty byly přes noc inkubovány při 37 °C.

3.6.5 PCR bakteriálních kolonií

Jednotlivé kolonie byly odebrány špičkou pipety a rozpuštěny v 10 µl bakteriálního kultivačního média obsahujícího ampicilin. 1 µl tohoto média posloužil jako templát při PCR reakci, jejíž primery byly komplementární k cílenému úseku. Nejprve byly v malých PCR zkumavkách připraveny reakční směsi skládající se z 5 µl

Master Mixu, 4 µl deionizované vody, 0,5 µl forward a 0,5 reverse primeru. Následně byl přidán 1 µl bakteriálního média do připravené PCR směsi. Poté byl roztok jemně promíchán a vložen do termocycleru. Program byl následující:

	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	95 °C	3 minuty
Denaturace	95 °C	30 sekund
Nasedání primerů	49 °C	20 sekund
Extenze	72 °C	75 sekund
Finální extenze	72 °C	10 minut
Chlazení	14 °C	∞

Tabulka č.15: Amplifikační program pro PCR bakteriálních kolonií

Výsledný produkt byl poté elektroforeticky rozdělen a byla určena jeho velikost na 1 % agarózovém gelu. Kolonie, která dávala produkt správné velikosti (tři gRNA, 1013 bp) byla kultivována v 5 ml média přes noc a bylo provedeno nasazení miniprepu.

3.6.6 Izolace plazmidové DNA

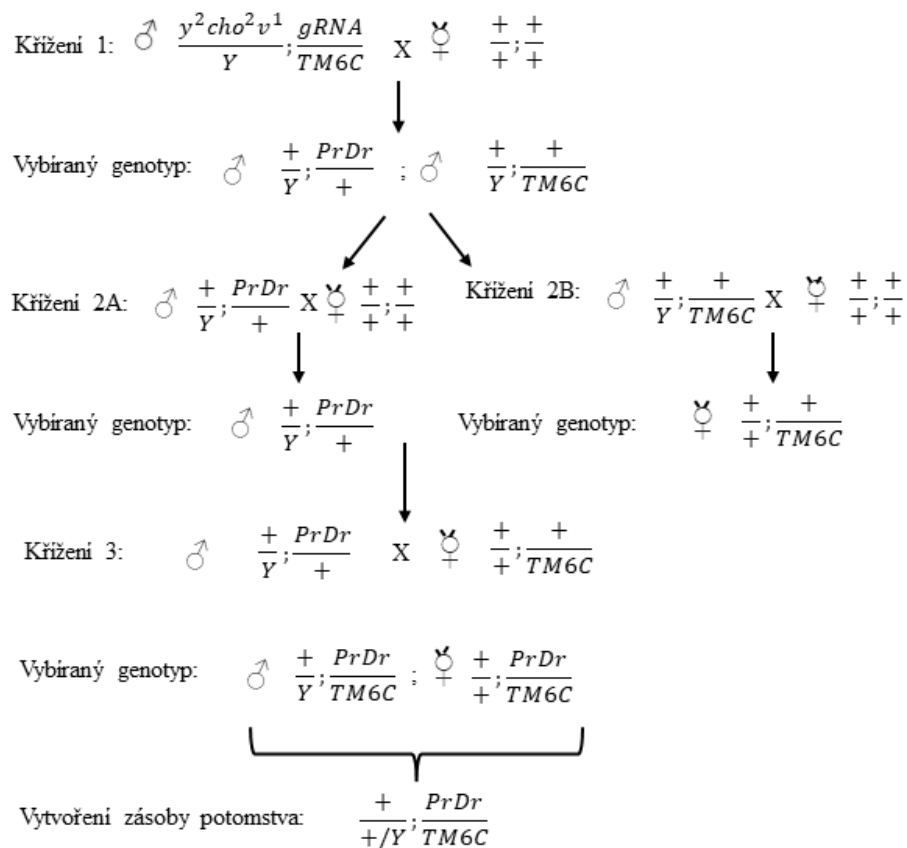
K izolaci plazmidů z miniprepu byla použita komerční sada High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics). Kolonie *E. coli* byly z agaru přeneseny do zkumavky s 3 ml LB média. Z toho bylo 1,5 ml média centrifugováno při 8 000 g po dobu 90 sekund při 4 °C, čímž byl oddělen supernatant od peletizovaných bakteriálních buněk. Po vylití supernatantu bylo do výsledného peletu přidáno 250 µl ‚suspension‘ pufru a směs byla inkubována po dobu 5 minut. Následně bylo přidáno 250 µl lyzačního pufru, směs byla lehce promíchána a ponechána opět inkubovat při pokojové teplotě 5 minut. Posléze bylo přidáno 350 µl vychlazeného ‚binding‘ pufru a po 5minutové inkubaci byl vzorek centrifugován při 4 °C a maximální rychlosti. Výsledný supernatant byl přenesen na filtrační membránu sběrné zkumavky a centrifugován další minutu při 13 400 g. Stočený odpad byl odstraněn a na membránu bylo připipetováno 700 µl ‚washing‘ pufru II předtím, než byl vzorek znovu centrifugován při maximální rychlosti 1 minutu. Následně byl vzorek znovu stočen kvůli odstranění zbytkového ‚washing‘ pufru II. Filtrační kolona byla poté přenesena

do nové sběrné zkumavky spolu s 25 μ l ‚elution‘ pufru. Ten byl inkubován 3 minuty na membráně a poté byl výsledný vzorek stočen opět při 13 400 g. Posléze byla změřena koncentrace DNA v roztoku, ta se měla pohybovat okolo 50-100 ng/ μ l.

3.7 Chov a křížení linií *Drosophila melanogaster*

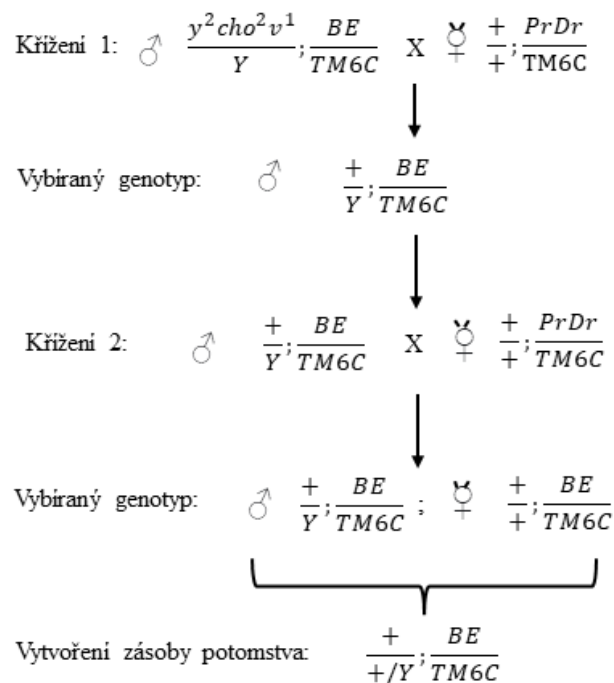
Účinnost bázových editorů byla zkoumána u octomilek *Drosophila melanogaster*, jelikož se jedná o ukázkový genetický model, díky nenáročné kultivaci v termostatu. Její největší předností je krátká generační doba, která trvá 10 dní při teplotě 25 $^{\circ}$ C, početné potomstvo a poměrně malý genom, který čítá asi 14 000 genů a čtyři chromozomy.

Nejprve proběhlo křížení, kdy byly samci octomilek genotypu $\frac{y^2cho^2v^1}{Y}; \frac{PrDr}{TM6C}$, kříženi s divokými pannami genotypu Canton-Special. Cílem bylo vyčistit pohlavní chromozom X, jelikož právě tam se gen *white* nachází. Na 3 chromozomu se nacházely balancery *PrDr* (zajišťuje hlavně deformaci očí) a *TM6C* (krátké štětky), díky kterým byla patrná fenotypová změna u cílových jedinců.



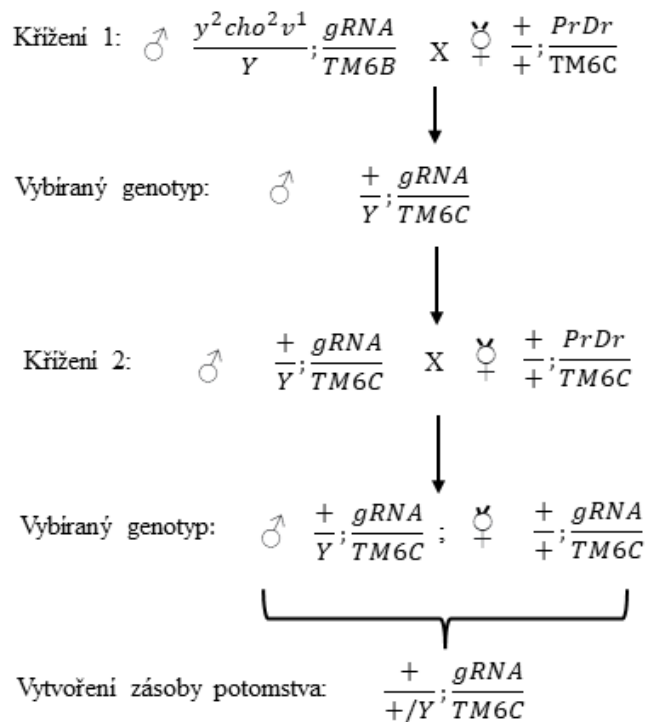
Obrázek č.3: Schéma křížení čistění chromozomu X

Následně byly panny octomilek z prvního křížení jednotlivě v tzv. „single crossech“ kříženy se čtyřmi druhy samců, kteří již obsahovali jeden ze čtyř druhů báze editoru a to 1) TAM/ nos-AID/ ‚Rainbow‘ editor; 2) nos-ABE 7.10/ABE adeninový editor, či dva cytosinové editory 3) Target-AID/ PmCDA1/ a 4) nos-BE³/BE³. Tito samci byli vyrobeni pracovníky Laboratoře molekulární chronobiologie, Entomologického ústavu, Biologického centra AV ČR v.v.i. Výsledkem křížení byl sběr jedinců s *TM6C* balancerem, ale bez *PrDr* markeru, což zapříčinilo normální velikost očí vybíraných jedinců. Jedinci s čistými pohlavními chromozomy, báze editorem a balancerem *TM6C* na třetím chromozomu byli ponecháni, aby vytvořili stabilní populaci.



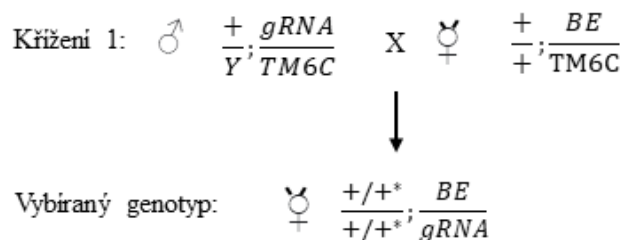
Obrázek č.4: Schéma křížení čištění chromozomu X báze editorů

Jelikož nám octomilky, s námi vyrobeným konstruktem, byly zpět zaslány s balancerem *TM6B*, museli jsme ho pomocí třetího křížení změnit na *TM6C*. Pro tyto účely byli jedinci s gRNA kříženi opět s pannami $\frac{+}{+}; \frac{PrDr}{+}; \frac{TM6C}{TM6C}$. Byly vytvořeny uniformní zásoby potomstva $\frac{+}{+}; \frac{gRNA}{+ / Y}; \frac{TM6C}{TM6C}$.



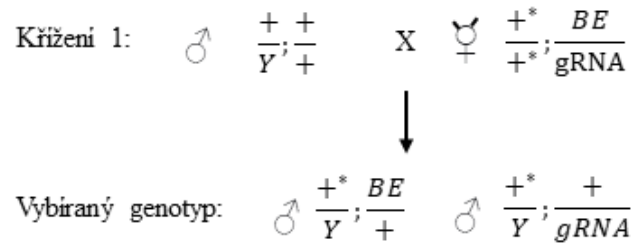
Obrázek č.5: Schéma křížení změny balanceru TM6B na TM6C

V dalším kroku došlo ke křížení samců s gRNA konstruktem a pannami s bázovými editory. Spojením těchto dvou složek došlo k buněčné expresi a bylo možné štěpit genom v požadovaném místě. Cílem tohoto křížení bylo vybrat $\frac{+/+^*}{+/+^*}; \frac{BE}{gRNA}$ panny, ve kterých mohla, či nemusela, proběhnout mutace.



Obrázek č.6: Schéma křížení bázových editorů a gRNA

Tyto panny byly dále kříženy s Canton-Special divokými samci, abychom získali samce s viditelnou fenotypovou změnou, která se projevila deformací červeného pigmentu. Byly vybírány dva typy samců, a to $\frac{+^*}{Y}; \frac{BE}{+}$ a $\frac{+^*}{Y}; \frac{+}{gRNA}$. V tomto případě se již bázový editor a gRNA nemusí nacházet na stejném chromozomu, jelikož editace genomu proběhla při křížení číslo 4. Tito jedinci byli podrobena molekulární charakterizaci viz. kapitola 4.1-4.4.



Obrázek č.7: Schéma křížení pro získání deformovaných jedinců

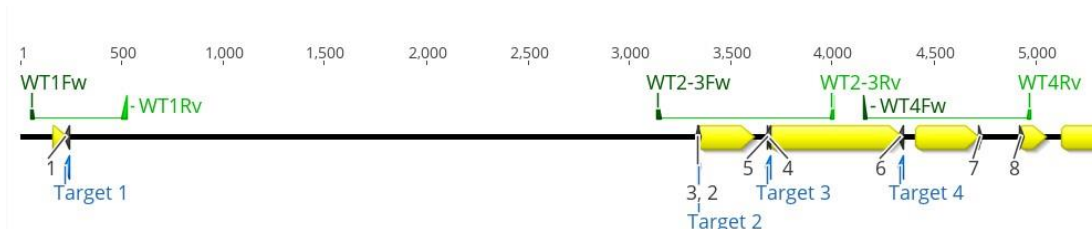
V další části experimentu jsme se zabývali účinností Cas9 nukleázy v cílových místech genu *white*. Proto byly samice gRNA kříženy jednotlivě samci Cas9, jako tomu bylo ve 4. křížení místo samice bazového editoru. Tyto samice byly získány od pracovníků Laboratoře molekulární chronobiologie, Entomologického ústavu, Biologického centra AV ČR v.v.i.. Z jejich potomstva byly vybrány samice, a ty kříženy s Canton-S samci, stejně jako tomu bylo při křížení s liniemi bazových editorů ve křížení 5. Efektivita bazových editorů tak mohla být porovnána s efektivitou nukleázy Cas9, získanou za úplně stejných podmínek.

4 VÝSLEDKY

4.1 Design konstruktů kódujícího gRNA

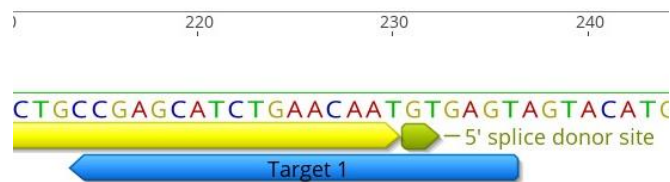
Ve spliceozomálních oblastech *white* mRNA byla hledána nejvhodnější donorová a akceptorová místa sestřihu v rozmezí exonu 1 až 5. Výsledkem měl být zcela nefunkční protein *white*. Podmínkou byla délka okolo 23 bp včetně vhodného PAM motivu, který se měl vyskytovat v podobě NGG. Dalším kritériem byla vysoká úroveň specifity, schopnost nevytvářet necílové mutace a stabilita gRNA, která závisí na poměru GC-AT párů. Dále muselo být editační okno, tedy rozmezí cca pěti nukleotidů, ve kterém dochází k editaci bází, univerzální pro oba typy bázových editorů.

První pár primerů WT1Fw-WT1Rv cílil na 5' donorovou stranu sestřihu exonu 1 a intronu 1, jejich produkt dával velikost 472 bp. Set primerů WT2/3Fw-WT2/3Rv, s ampliconem dlouhým 876 bp cílil na 3' místo akceptorové strany spliceozomální oblasti jak exonu 2, tak exonu 3. Poslední pár primerů WT4Fw a WT4Rv byl komplementární 5' donorovou stranu sestřihu exonu 3 a intronu 3.



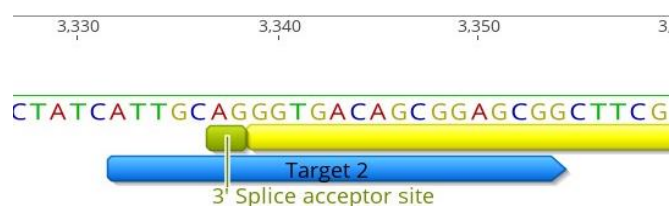
Obrázek č.8: Část sekvence cíleného *white* genu

5' donorová strana sestřihu exonu 1 a intronu 2 byla vybrána jako první cílové místo. Vhodná gRNA 1, dlouhá 23bp, byla navržena dle výše zmíněných kritérií a kvůli vhodně umístěnému PAM motivu byla syntetizována v opačném (reverse) směru.



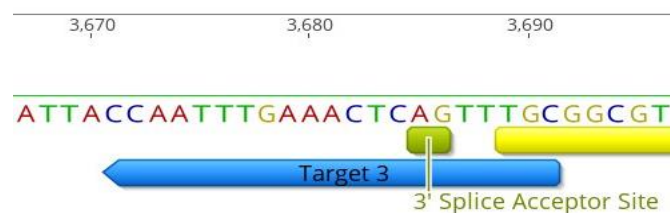
Obrázek č.9: Spliceozomální oblast exonu 1 a intronu 2 s komplementárně navrženou gRNA1

Druhé cílové místo bylo vybráno na hranici intronu 2 a exonu 2 *white* genu. gRNA s délkou 23 bp včetně PAM motivu (CGG), byla specificky navržena ve směru 5' → 3'.



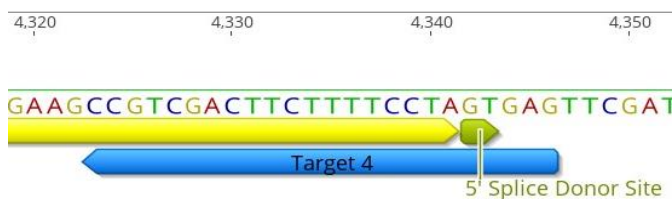
Obrázek č.10: 3' místo akceptorové strany spliceozomální oblasti intronu 2 a exonu 2 s komplementární gRNA2

Druhý cíl páru primerů WT2/3Fw-WT2/3Rv, byl opět na 3' místě akceptorové strany spliceozomální oblasti, tentokrát intronu 3 a exonu 3. gRNA s celkovou délkou 21bp byla komplementární v opačném směru 3' → 5'.



Obrázek č.11: Spliceozomální oblast intronu a exonu 3 s komplementárně navrženou gRNA3

Posledním cílovým místem byla vybrána 5' donorová strana sestřihu exonu 3 a intronu 4. 24 bp dlouhá gRNA 4 byla opět v reverse směru vlivem vhodně umístěného NGG PAM motivu (v našem případě GCC komplementární a následně přešpané do AGG).



Obrázek č.12: Spliceozomální oblast exonu 3 a intronu 4 s komplementární gRNA4

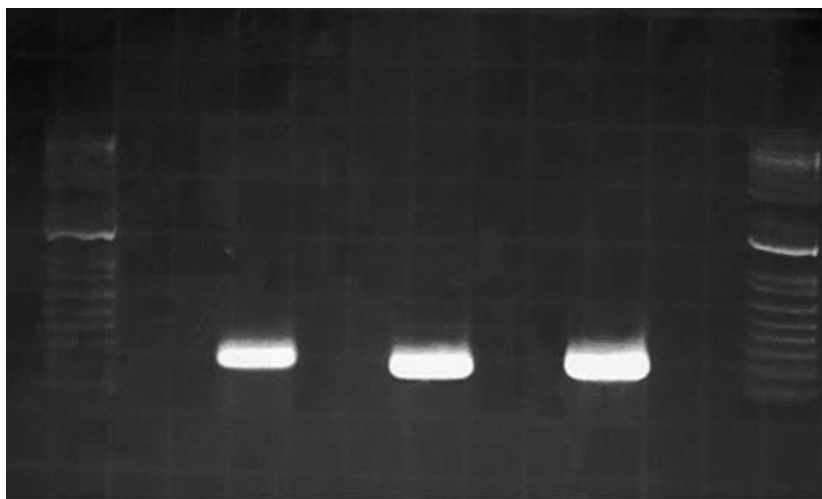
4.2 Klonování vektoru pro získání mnohočetného gRNA konstruktů

Navržené primery, zaslány od Generi Biotech, byly pomocí AccuPrime™ Taq DNA systému amplifikovány a spojeny tak, aby tvořily tři fragmenty obsahující komplementární sekvence k vybraným spliceozomálním oblastem.

PCR 1	fwd	GCGGCCCGGGTTCGATTCCCGGCCGATGCA ACTCAC ATTG TTCAGATGCT GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
	rev	CTCCGCTGTCACCCTGCAATTGCACCAGCCGGGAAT CGAACCC
PCR 2	fwd	ATTGCAGGGTGACAGCGGAG GTTTTAGAGCTAGAA ATAGCAAG
	rev	ATTTGAAACTCAGTTTGCTGCACCAGCCGGGAATCG AACCC
PCR 3	fwd	GCAA ACTGAGTTT CAAAT GTTTTAGAGCTAGAAATA GCAAG
	rev	ATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC TCGACTTC TTTTCCTAGTGAG TGCACCAGCCGGGAATCGAACCC

Tabulka č.16: Seznam primerů obsahujících vybrané gRNA (žlutě)

Po amplifikaci byly fragmenty vizualizovány pomocí elektroforézy a následně byly vyříznuty, aby mohly poté podlehnout extrakci pomocí extrakční gelové soupravy Qiagen. Dále byla změřena koncentrace PCR produktů.



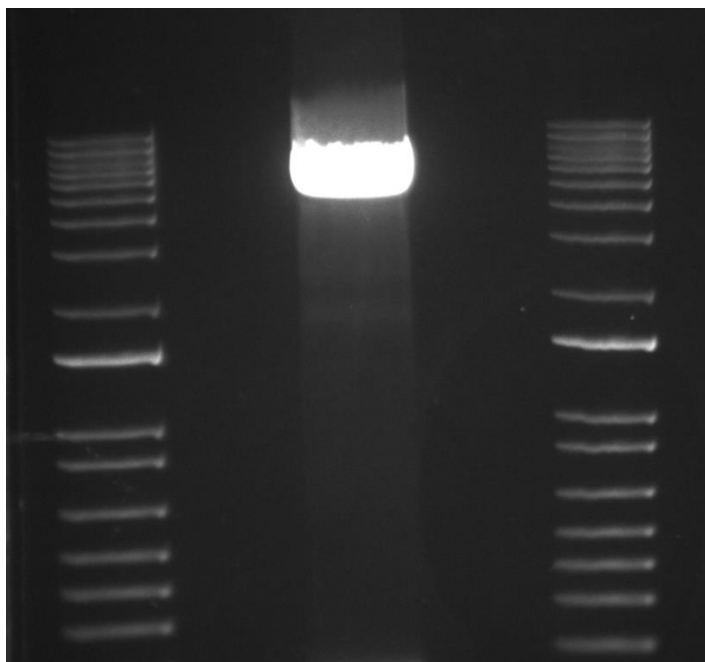
Obrázek č.13: Vizualizace všech tří fragmentů genu *white*. Délka prvního fragmentu byla 224 bp. Délka druhého fragmentu obsahujícího cílové místo 2 a 3 činila 194 bp a třetí fragment měřil opět 224 bp.

	Koncentrace	260/280
Fragment 1	36,5 ng/ μ l	1,54
Fragment 2	70,7 ng/ μ l	1,60
Fragment 3	69,5 ng/ μ l	1,61

Tabulka č.17: Výsledky měření koncentrace fragmentů obsahující cílové úseky

4.2.1 Restrikční štěpení enzymu

Nejprve byla změřena čistota pCDF5 plazmidu na 263 ng/ μ l. Po pár pokusech jsme došli k názoru, že k následnému klonování bude zapotřebí 8 ng plazmidu. Proto bylo do směsi s restrikčním enzymem přidáno 30 μ l vektoru. Po vyříznutí naštěpeného fragmentu z elektroforézy byla naměřena koncentrace 20 ng/ μ l.



Obrázek č.14: 6447 bp dlouhý restriktivně štěpený vektor pCFD5 s laddery po obou stranách

4.2.2 Gibsonovo klonování

Pro správný průběh Gibsonova klonování je nutné dodat pětkrát více insertu než vektoru. Proto musela proběhnout následná kalkulace dle vzorečku $\frac{\text{váha v ng} \times 1000}{\text{délka v bp} \times 650}$ následovně:

$$\text{BbsI-dig-Pcfd5: } \frac{20 \times 1000}{6447 \times 650} = 0,0047 \text{ pmol} \rightarrow 5 \mu\text{l} \rightarrow 5 \times 0,0047 = 0,024 \text{ pmol}/\mu\text{l}$$

5 x více insertu než vektoru tedy: $5 \times 0,024 = 0,12 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ od každého fragmentu

$$\text{Fragment 1: } \frac{36,5 \times 1000}{224 \times 650} = 0,24 \text{ pmol} \rightarrow \text{naředění 1 } \mu\text{l: 1 } \mu\text{l H}_2\text{O} \rightarrow 0,125 \text{ pmol}/\mu\text{l}$$

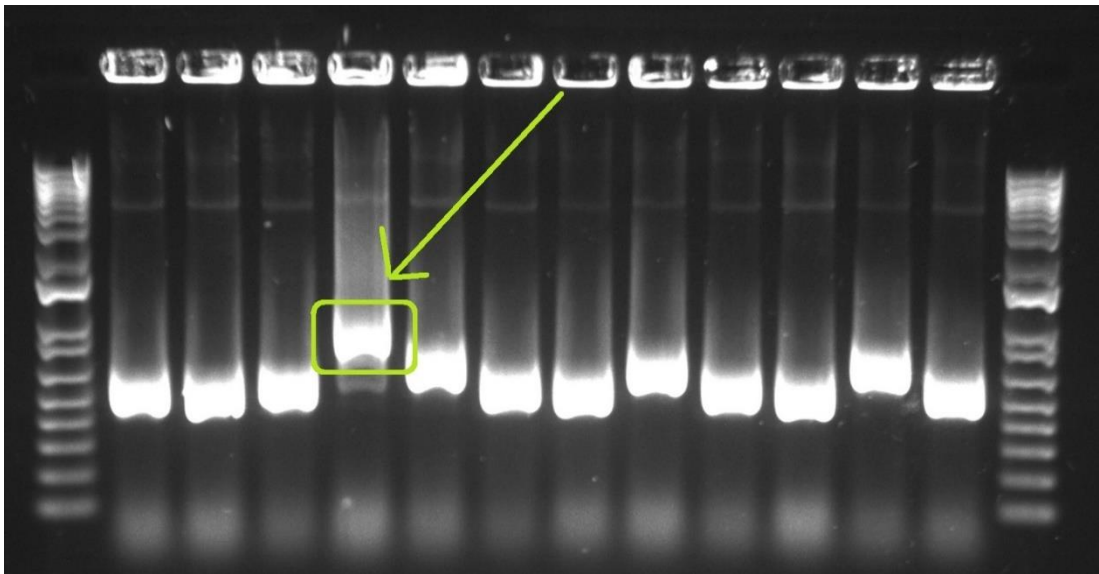
$$\text{Fragment 2: } \frac{70,1 \times 1000}{194 \times 650} = 0,53 \text{ pmol} \rightarrow \text{naředění 1 } \mu\text{l: 2 } \mu\text{l H}_2\text{O} \rightarrow 0,176 \text{ pmol}/\mu\text{l}$$

$$\text{Fragment 3: } \frac{36,5 \times 1000}{224 \times 650} = 0,46 \text{ pmol} \rightarrow \text{naředění 1 } \mu\text{l: 2 } \mu\text{l H}_2\text{O} \rightarrow 0,153 \text{ pmol}/\mu\text{l}$$

S takhle upravenými koncentracemi bylo nadále možné pokračovat v experimentu a další den proběhla transformace vektoru dle standartního protokolu. Po nárůstu kolonií proběhla jejich izolace a vizualizace pomocí elektroforézy. Ty fragmenty, které by mohly vykazovat správnou velikost sestaveného konstruktu, byly odeslány na sekvenaci, kde mohla být potvrzena přítomnost všech čtyř správně zaklonovaných gRNA.

4.2.3 PCR bakteriálních kolonií

Pomocí dvojice primerů U63Fw a pCFD5Rv byla provedena PCR pro amplifikaci insertu. Dále byla provedena vizualizace délky jednotlivých klonů. Kolonie číslo 15 byla shledána tou, která dávala produkt správné velikosti dlouhý 1013bp. Plazmidová DNA byla vyizolována a její koncentrace byla 105,7 ng/μl, což bylo dost na to, aby byla odeslána na sekvenování. Sekvence potvrdila přítomnost všech čtyř gRNA na správném místě, proto byly z plazmidové DNA vytvořeny glycerolové zásobní roztoky o koncentraci 76,3 ng /μl, které byly skladovány při -80 °C.



Obrázek č.15: Vizualizace kolonií 12 až 23, kde 15 kolonie odpovídá správně dlouhému produktu (1013 bp)

4.3 Křížení a četnost mutagenese *Drosophila melanogaster*

Po zkřížení již vlastněných samců octomilek genotypu $\frac{y^2 cho^2 v^1}{Y}; \frac{PrDr}{TM6C}$ s divokými pannami genotypu Canton-Special ($\frac{+}{+}; \frac{+}{+}$) bylo ve třech krocích získána uniformní populace s vyčištěnými pohlavními chromozomy a vybranými balanceru na 3. chromozomu $\frac{+}{+Y}; \frac{PrDr}{TM6C}$. Toto potomstvo bylo následně zkříženo s daným bázovým editorem, který nahradil místo balanceru PrDr ($\frac{+}{+Y}; \frac{BE}{TM6C}$).

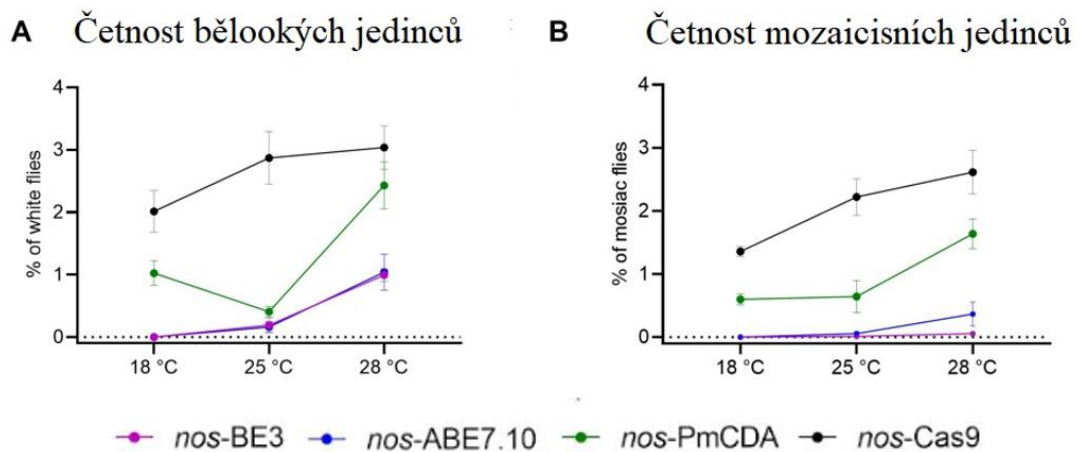
Po vložení námi vyrobeného konstruktru byly octomilky zaslány zpět do laboratoře spolu s balancerem TM6B a $y^2 cho^2 v^1$ na pohlavním chromozomu, jenž

zapřičiňuje tmavou barvu očí ($\frac{y^2cho^2v^1}{Y}; \frac{gRNA}{TM6B}$). Proto jsme museli pomocí další série křížení opět vyčistit pohlavní chromozom a pozměnit balancer z TMCB na TM6C. Pro tyto účely bylo nezávisle a simultánně kříženo šest získaných jedinců obsahujících gRNA konstrukt s $\frac{+}{+}; \frac{PrDr}{TM6C}$ pannami. Tyto linie byly dále pojmenovány jako gRNA 1 až 6. Ze dvou vybraných linií (gRNA 2 a gRNA 4) výsledného potomstva byli vybráni samci $\frac{+}{Y}; \frac{gRNA\ 2/4}{TM6C}$, a ti byli jednotlivě kříženi se čtyřmi druhy panen $\frac{+}{+}; \frac{BE^3}{TM6C}$; $\frac{+}{+}; \frac{PmCDA}{TM6C}$; $\frac{+}{+}; \frac{ABE}{TM6C}$; $\frac{+}{+}; \frac{AID}{TM6C}$ získanými při křížení číslo 2. Simultánně byly kříženy panny Cas9 $\frac{y^2cho^2v^1}{+}; \frac{nos-Cas9}{Sb.Tb}$ se samci obsahující konstrukt gRNA $\frac{+}{Y}; \frac{gRNA\ 1/2/4/6}{TM6C}$. Z výsledného potomstva byly vytvořeny četné zásoby, z nichž byly vybrány panny, jež obsahovaly gRNA konstrukt i daný básový editor, a mohlo tak dojít k buněčné expresi. Toto křížení bylo provedeno ve třech rozdílných teplotách a to v 18,25 a 28 °C. Cílem bylo pozorovat, zda má teplota vliv na účinnost buněčné exprese.

Panny byly jednotlivě oplodněny ve finálním křížení samci Canton-Special ($\frac{+}{Y}; \frac{+}{+}$) v jejichž potomstvu byla sledována četnost mutantních samců s viditelnou deformací červeného pigmentu, která značila změnu v cíleném *white* genu. Díky fenotypové změně jinak běžně červených očí, bylo snadné odhalit efektivitu básových editorů a Cas9 senzoricke, bez nutnosti molekulární charakterizace pomocí PCR a sekvenace.

Ve všech třech již zmíněných teplotách bylo založeno 20 jednotlivých křížení, skládající se z jedné panny, obsahující básový editor i gRNA 2 či gRNA 4 konstrukt, a dvou samců Canton-Special. Efektivita básových editorů byla měřena dvakrát. Efektivita nukleázy Cas9 jednou, ale rovnou se čtyřmi liniemi gRNA samců (gRNA1; gRNA2; gRNA4; gRNA6), aby byl zachován stejný poměr s výsledky BE.

Z Obrázku č. 16 lze vyčíst, že četnost mozaicisních jedinců je ve většině případů úměrná teplotě. Nejvyšší efektivitu vykazovala nukleáza Cas9 a poté Target-AID. V nejvyšší měřené teplotě vykazoval cytosinový BE³ a adeninový ABE7.10 editor násobně vyšší efektivitu. Z grafů můžeme vyčíst, že četnost mozaicisních a bělookých jedinců byla velmi podobná.



Obrázek č.16: Graf A, vyjadřující četnost bělookých jedinců. Graf B vyjadřuje množství detekovaných jedinců trpících mozaicismem

4.3.1 Efektivita BE při 28 °C

Při teplotě 28 °C trvala generační doba zhruba 10 dní, což mělo za následek mnohačetné potomstvo za relativně krátký čas. Nejvyšší účinnost vykazoval cytidinový editor Target-AID, který dal vzniknout v průměru 4,38 % mutantních samců. Z toho byla více než třetina mozaicisních jedinců. V obou simultánních kříženích byl zaznamenán výskyt žlutookých jedinců s deformovaným *white* genem. Jedinci vykazující mozaicismus byli zaznamenáni i u adeninového editoru, jinak se efektivita pohybovala v rozmezí 0,56 a 1,44 %. U cytosinového editoru BE³ nebyli zaznamenáni žádní mozaicisní jedinci.

Bázový editor, gRNA	Počet vitálních křížení	Počet získaných samců	Počet editovaných křížení	Počet mutantních jedinců (efektivita) ze všech jedinců	Počet mozaicisních jedinců
Target-AID, gRNA2	20	2295	18	127 (5,33 %)	50 + 9 žlutá
Target-AID, gRNA4	19	2679	17	92 (3,43 %)	31+ 6 žlutá
BE ³ , gRNA2	18	2500	8	25 (1,00 %)	0
BE ³ , gRNA4	20	2863	8	20 (0,70 %)	0
ABE7.10, gRNA2	17	2499	7	36 (1,44 %)	4
ABE7.10, gRNA4	19	2481	7	14 (0,56 %)	5
TAM-AID, gRNA2	16	2023	0	0	0
TAM-AID, gRNA4	18	2110	0	0	0

Tabulka č.18: Výsledky naměřených hodnot BE při 28° teplotě

4.3.1.1 Opakování měření efektivity BE ve 28 °C teplotě

Opakováním pokusu za této teploty bylo potvrzeno, že nejvyšší efektivitu vykazuje editor Target-AID a to 2,88 a 4,41 %. Opět valnou část tvořili mozaicisní jedinci. Téměř totožné hodnoty byly naměřeny u křížení cytosinového BE³ editoru, a to v průměru 1,25 %. Rozdílné výsledky byly zjištěny u ABE7.10, kdy komplex s gRNA2 vykazoval téměř 3x vyšší efektivitu než komplex s gRNA4. U TAM editoru nebyla ani na druhý pokus zaznamenána u pozorovaných jedinců žádná fenotypová změna.

Bázový editor, gRNA	Počet vitálních křížení	Počet získaných samců	Počet editovaných křížení	Počet mutantních jedinců (efektivita) ze všech jedinců	Počet mozaicisních jedinců
Target-AID, gRNA2	16	1943	11	56 (2,88 %)	26
Target-AID, gRNA4	16	1926	11	85 (4,41 %)	36+ 3 žlutá
BE ³ , gRNA2	15	1749	8	22 (1,26 %)	2
BE ³ , gRNA4	16	1856	8	23 (1,24 %)	2
ABE7.10, gRNA2	14	1621	11	43 (2,65 %)	15
ABE7.10, gRNA4	16	1696	6	15 (0,88 %)	3
TAM-AID, gRNA2	16	1857	0	0	0
TAM-AID, gRNA4	16	1900	0	0	0

Tabulka č.19: Výsledky získané při opakování pokusu BE ve 28 °C

4.3.2 Efektivita BE při 25 °C

V 25 °C teplotě byl opět nejvíce účinný cytosinový editor Target-AID, u kterého jsme zaznamenali 28 fenotypově odlišných jedinců v podobě bělookých octomilek či samců trpících mozaicismem. Druhým nejúčinnějším editorem byl opět cytosinový BE³. U toho bylo pozorováno 16 bělookých a 8 mozaicisních jedinců. I u adeninového editoru byl pozorován vznik mutantních jedinců, avšak jeho efektivita dosahovala účinnosti v průměru 0,12 %. U duhového editoru AID nebyli pozorováni žádní jedinci s deformovaným pigmentem.

Bázový editor, gRNA	Počet vitálních křížení	Počet získaných samců	Počet křížení s úspěšnou editací	Počet mutantních jedinců (efektivita) ze všech jedinců	Počet mozaicisních jedinců
Target-AID, gRNA2	17	2018	2	7 (0, 35 %)	3
Target-AID, gRNA4	18	2665	9	21 (0, 79 %)	8
BE ³ , gRNA2	17	2194	3	3 (0, 14 %)	0
BE ³ , gRNA4	19	2541	6	15 (0, 59 %)	1
ABE7.10, gRNA2	20	2295	4	5 (0, 20 %)	2
ABE7.10, gRNA4	17	2508	1	1 (0, 04 %)	0
TAM-AID, gRNA2	20	3633	0	0	0
TAM-AID, gRNA4	21	4465	0	0	0

Tabulka č.20: Výsledky BE z 25 °C teploty

4.3.2.1 Opakované měření efektivity BE ve 25 °C teplotě

Při opakovaném křížení bylo zjištěno, že nejvyšší účinnost vykazoval opět bázový editor Target-AID a to v průměru 1,55 %. Druhá nejvyšší zaznamenaná efektivita byla adeninového editoru (ABE 7.10), která se pohybovala v rozmezí 0,21-0,41 %. V potomstvu cytosinového editoru BE³ byl zaznamenán pouze jediný bělooký samec.

Bázový editor, gRNA	Počet vitálních křížení	Počet získaných samců	Počet editovaných křížení	Počet mutantních jedinců (efektivita) ze všech jedinců	Počet mozaicisních jedinců
Target-AID, gRNA2	15	1384	11	21 (1,52 %)	13
Target-AID, gRNA4	15	1328	12	21 (1,58 %)	16
BE ³ , gRNA2	14	1209	1	1 (0,08 %)	0
BE ³ , gRNA4	15	1350	0	0	0
ABE7.10, gRNA2	20	1438	3	3 (0,21 %)	2
ABE7.10, gRNA4	17	1447	5	6 (0,41 %)	0
TAM-AID, gRNA2	20	1447	0	0	0
TAM-AID, gRNA4	21	1511	0	0	0

Tabulka č.21: Výsledky z opakování pokusu BE při 25 °C

4.3.3 Efektivita BE při 18 °C

Generační doba octomilky v teplotě 18 °C trvá 14 až 18 dní, kdy záleží na stáří křížených pannen a dalších faktorech. Mutantní jedinci byli zaznamenáni pouze u cytosinového editoru Target-AID, a to průměrně u 1,60 % populace. Téměř v polovině případů se jednalo o mozaicisní jedince. V jednom případě byl detekován žlutooký jedinec, který byl následně podroben genotypizaci. Další fenotypově odlišní jedinci nebyli pozorováni.

Bázový editor, gRNA	Počet vitálních křížení	Počet získaných samců	Počet editovaných křížení	Počet mutantních jedinců (efektivita) ze všech jedinců	Počet mozaicisních jedinců
Target-AID, gRNA2	24	2011	17	34 (1,69 %)	13+ 1 žlutá
Target-AID, gRNA4	24	1800	12	27 (1,50 %)	14
BE ³ , gRNA2	22	1565	0	0	0
BE ³ , gRNA4	23	1620	0	0	0
ABE7.10, gRNA2	23	1722	0	0	0
ABE7.10, gRNA4	24	1861	0	0	0
TAM-AID, gRNA2	22	1439	0	0	0
TAM-AID, gRNA4	22	1397	0	0	0

Tabulka č.22: Výsledky BE získané ve 18 °C teplotě

4.3.3.1 Opakování měření efektivity BE při 18 °C teplotě

Ani při opakování pokusu nebyli detekováni žádní fenotypově odlišní jedinci editorů BE³, ABE7.10 ani TAM-AID, což se shoduje s výsledky prvního měření. Cytosinový Target-AID editor vykazoval efektivitu v rozmezí 1,67-1,93 %. Mezi mutantními samci byli opět jedinci vykazující mozaicismus.

Bázový editor, Grna	Počet vitálních křížení	Počet získaných samců	Počet editovaných křížení	Počet mutantních jedinců (efektivita) ze všech jedinců	Počet mozaicisních jedinců
Target-AID, gRNA2	15	1349	8	26 (1,93 %)	5
Target-AID, gRNA4	16	1501	8	25 (1,67 %)	9
BE ³ , gRNA2	16	1600	0	0	0
BE ³ , gRNA4	16	1649	0	0	0
ABE7.10, gRNA2	16	1655	0	0	0
ABE7.10, gRNA4	16	1696	0	0	0
TAM-AID, gRNA2	15	1445	0	0	0
TAM-AID, gRNA4	16	1596	0	0	0

Tabulka č.23: Výsledky BE zazanemané při opakovaném měření v 18 °C

4.3.4 Efektivita Cas9 nukleázy ve sledovaných teplotách

Z výsledků vyplývá, že teplota má významný vliv na efektivitu proteinu Cas9. Ve 28 °C teplotě byla zaznamenána efektivita v rozmezí 4,01-7,08 %. Žádný markantní rozdíl nevykazovala, o tři stupně nižší, 25 °C teplota. Ta se pohybovala v rozmezí 3,44-6,32 %. gRNA4 ve 25 °C vykazovala dokonce větší efektivitu než ve vyšší teplotě o více jak půl procenta. Velkým rozdílem ale byla efektivita Cas9 nukleázy v 18 °C, která se pohybovala v rozmezí 2,92-4,15 %, což je téměř o polovinu nižší četnost. Ve všech teplotách byl zaznamenán výskyt mozaicisních jedinců, a to v rozsahu 39,2 až 48,8 %. Jedinou výjimkou byl případ Cas9, gRNA2 v 18 °C, který vykazoval 27,7 % četnost jedinců trpících mozaicismem. Ve všech třech teplotách byli detekováni žlutoocí jedinci, i když v minimálním počtu.

Teplota; Cas9, gRNA	Počet vitálních křížení	Počet získaných samců	Počet editovaných křížení	Počet mutantních jedinců (efektivita) ze všech jedinců	Počet mozaicisních jedinců
28 °C; Cas9, gRNA1	20	2400	15	170 (7,08 %)	82
28 °C Cas9, gRNA2	19	2280	13	117 (5,13 %)	57+2žlutá
28 °C; Cas9, gRNA4	19	2172	15	87 (4,01 %)	38
28 °C; Cas9, gRNA6	17	1897	13	121 (6,38 %)	53
25 °C; Cas9, gRNA1	20	2326	14	80 (3,44 %)	39
25 °C Cas9, gRNA2	15	1820	12	115 (6,32 %)	47+2žlutá
25 °C Cas9, gRNA4	21	2664	15	120 (4,53 %)	47
25 °C Cas9, gRNA6	20	2361	17	143 (6,06 %)	67+1žlutá
18 °C; Cas9, gRNA1	19	1187	12	39 (3,29 %)	17
18 °C; Cas9, gRNA2	20	1301	14	54 (4,15 %)	15
18 °C; Cas9, gRNA4	20	1371	13	43 (3,14 %)	21
18 °C; Cas9, gRNA6	20	1440	13	42 (2,92 %)	19+1žlutá

Tabulka č.24: Výsledky Cas9 naměřené v 18, 25, 28 °C teplotě

4.4 Molekulární charakterizace pomocí sekvenace

Mutantní jedinci byli vloženi do 2,5 µl zkumavek a uchováni v mrazáku při -80 °C. Cílem bylo u pěti bělookých a pěti mozaicisních jedinců, jednotlivých typů báze editoru, osekvenovat všechny tři fragmenty, obsahující cílové oblasti, z každé sledované teploty (18,25,28 °C). V některých teplotách nebylo nasbíráno ani pět požadovaných jedinců. Proto byli nahrazeni jedinci z jiné teploty, aby byl výsledný počet osekvenovaných jedinců 15. Dále byli sekvenováni i vybraní žlutoocí jedinci.

4.4.1 Design primerů

Vhodný primer by měl mít délku okolo 18-24 bází a obsahovat 40-60 % G/C párů. Od toho se odvíjí i teplota tání, která se zvyšuje díky trojitě vazbě mezi guaninem a cytosinem. Ta by se měla pohybovat okolo 50-62 °C. Teplota tání forward a reverse primerů by se neměla navzájem lišit o více než 5 °C. Dále by primery měly být specifické a nebyť komplementární k necílovým místům v DNA.

WT1	Fw	20 nt	TGCTGTGCCAAAACCTCCTCT
	rev	22 nt	AATGAGGACTTCATGGTAAGCT
WT2/3	fwd	21 nt	GGCTGGGCTAGATTTATGCAC
	rev	20 nt	AAGCTCCTGGATCACCTGAT
WT4	fwd	20 nt	GACTGGACTCCTTTACCGCC
	rev	20 nt	CCCACCTGCGTGAGTTGTTG

Tabulka č.25: Seznam primerů komplementárních ke třem diagnostikovaným fragmentům

4.4.2 Sekvence bělookých jedinců

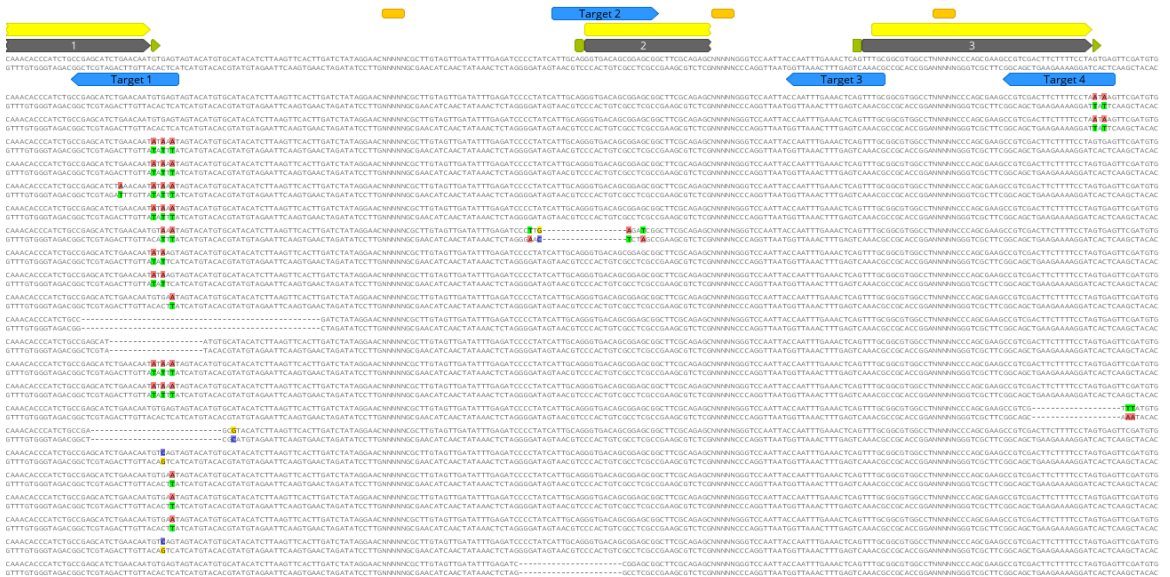
Sekvence potvrdila, že všichni vybraní jedinci byli editováni, ale ne vždy v na cílených pozicích (viz. kapitola 5.1). Někteří vykazovali očekávané jednotlivé substituce, jiní zase rozsáhlé delece či inserce.

Všech 15 jedinců linie Target-AID obsahovali aspoň jednu změnu v cílových oblastech. Drtivá většina (12/15 samců) byli targeťováni v první cílové oblasti. V 10 případech se jednalo o substituce a ve dvou případech o rozsáhlé delece dlouhé 20 a 51bp. Tyto delece se vykytovali u jedinců z 28 °C teploty. U zbylých tří jedinců byli změny zjištěny na posledním cílovém místě číslo čtyři. U dvou z nich, z 18 °C teploty, byly prokázány jednotlivé substituce. U posledního samce, z 28 °C, byla detekována 19bp delece. Jediný samec vykazoval změny na dvou cílových pozicích, kdy jsme u jedince č. 2 z 25 °C detekovali substitucí nukleotidů na cílovém místě 1 i deleci dlouhou 18 bp na cílové pozici 2.

Nažloutlí jedinci byli pozorováni pouze u bázevého editoru Target-AID. Z 18 získaných samců byla u sedmi z nich vyizolována DNA a zaslána na sekvenaci. Z výsledků lze pozorovat, že dva jedinci obsahovali 22 a 28 bp dlouhé delece, což se ale nikterak zásadně neliší od mutací vzniklých u bělookých samců. U zbylých pěti samců lze pozorovat jednonukleotidové substituce. Na první pohled je patrné, že běloocí samci vykazovali v některých případech více substitucí než ti s nažloutlýma očima. I to by mohl být důvod rozdílného fenotypového projevu.



Obrázek č.17: Přibližné osekvenované úseky editovaných jedinců pomocí Target-AID ve kterých aspoň v jednom případě došlo k editaci



Obrázek č.18: Všechny čtyři cílové úseky, a jejich blízké okolí, editovaných jedinců pomocí Target-AID v délce 245 bp

Jelikož nebyl v 18 °C teplotě detekován žádný fenotypově odlišný jedinec z lineje cytosinového BE³, sekvenováno jsme z 25 °C sedm samců, a z 28 °C zbylých osm. Ve 14-ti případech byly detekovány cílené substituce v první cílové pozici, na 5' donorové straně sestříhu exonu 1 a intronu 1 *white* genu. U jedno samce došlo k 25 bp dlouhé delecí. Jinak zde nedošlo k výskytu necílových substitucí, jako u editoru

Target-AID. Významným zjištěním je také fakt, že u žádného jedince nebyla detekována žádná jiná mutace na ostatních třech cílových místech.



Obrázek č.19: První cílový úsek bělokových jedinců BE³ ve kterém editace proběhla u 100% případů v první cílové oblasti

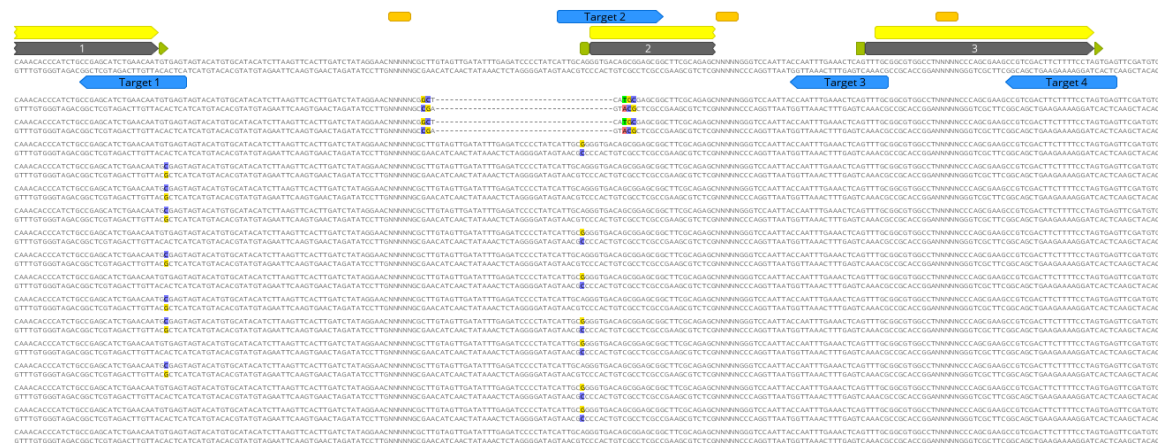


Obrázek č. 20: Všechny čtyři cílové úseky, a jejich blízké okolí, editovaných jedinců pomocí BE³ v délce 245 bp

Vlivem malého počtu bělokových jedinců linie editoru ABE7.10 bylo 11 z nich vybráno z 28 °C a zbylí čtyři z 25 °C. Polovina jedinců z 25 °C teploty obsahovali na druhém cílovém místě identickou delecí dlouhou 38 bp a v těsné blízkosti další nukleotidové substituce. U ostatních 13-ti mutantů bylo pozorováno 7 cílených substitucí v cílovém místě 1 a dalších 7 v cílové oblasti 2, na 3' místě akceptorové strany spliceozomální oblasti exonu 2. To znamená, že pouze u jediného samce proběhla editace na dvou cílových místech najednou.



Obrázek č.21: Výsledky sekvenace prvních dvou cílových míst editovaných jedinců pomocí ABE7.10



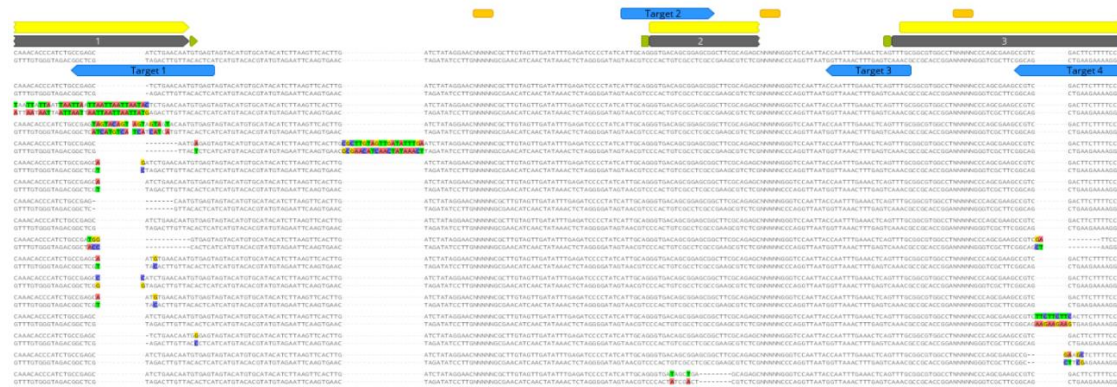
Obrázek č.22: Všechny cílové úseky, a jejich blízké okolí, editovaných jedinců pomocí ABE7.10 v délce 245 bp

V liniích Cas9 bylo detekováno více mutančních jedinců, ať už bělookých, či mozaicisních než u bazových editorů. Dva jedinci, generovaní při 18 °C, obsahovali 11-12 bp dlouhé inrezce, kterým předcházely náhodné substituce, jež se nacházely ve vzdálenosti 10 bp před prvním cílovou spliceozomální oblastí. I u dalších pěti jedinců byly pozorovány substituce, pohybující se v rozmezí jednoho až dvou nukleotidů. U dalších jedinců byly pozorovány delece dlouhé 1,8 a 10 bp, ty se, avšak nacházely také cca 10 bp před prvním cílovým místem. Jen u dvou jedinců proběhla požadovaná jednonukleotidová substituce přesně na hranici exonu 1 a intronu 2. Pouze čtyři jedinci z 16 nebyli editováni v okolí prvního cílového místa. U těch byla detekována například

8 bp dlouhá inzerce, nebo několika nukleotidové substituce cca 12 nukleotidů před čtvrtou cílenou pozicí. Byl sekvenován i jeden žlutooký jedinec, Ten vykazoval substituci šest a deset nukleotidů za cílovým místem 2 a následně osm bp dlouhou delecí, čímž se nijak významně nelišil od ostatních bělookých jedinců.



Obrázek č.23: Přibližné sekvenované úseky editovaných jedinců pomocí nukleázy Cas9, ve kterých aspoň v jednom případě došlo k editaci

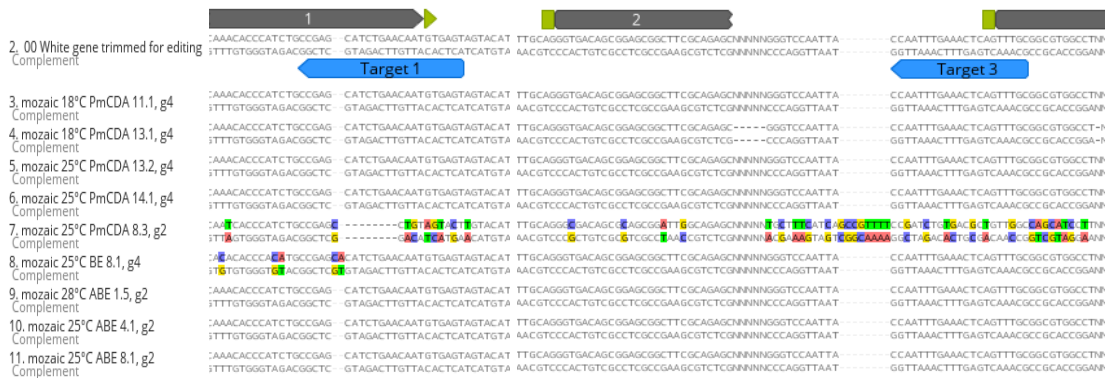


Obrázek č.24: Všechny čtyři cílové úseky, a jejich blízké okolí, editovaných jedinců pomocí Cas9 v délce 245 bp

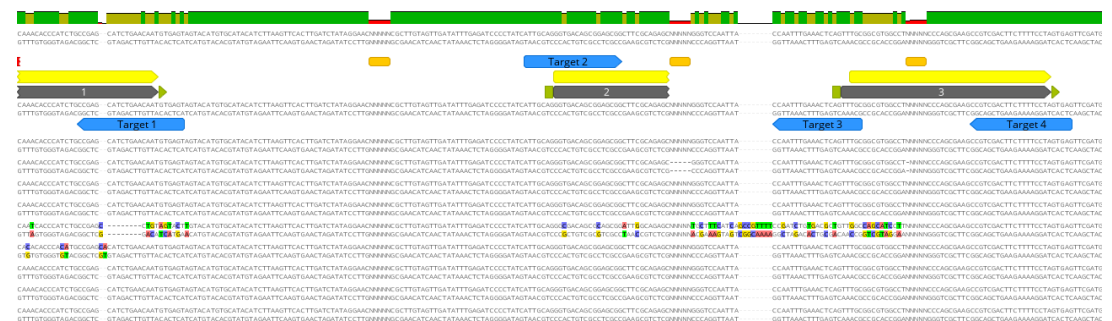
4.4.3 Sekvence mozaicisních jedinců

Nakonec proběhla genotypizace mozaicisních jedinců. Devět mutantů bylo zasláno na sekvenaci, abychom mohli porovnat výsledky s bělookými jedinci. Ve vzorku byly očekávány dva rozdílné genotypy z jednoho organismu. Genotypizace probíhala pouze u jedinců získaných v první části pokusu. Proto jí byl podroben pouze

jeden jedinec z linie BE³ trpící mozaicismem. Ten obsahoval více substitucí před první cílovou oblastí. Jediný jedinec linie Target-AID z 25 °C (8.3, gRNA2) byl editován na mnoha místech sekvenované oblasti v podobě jednotlivých substitucí i rozsáhlých delecí či insercí. Zbylí mozaicisní samci linií Target-AID a ABE7.10 neobsahovali žádné editované báze, ačkoliv byli fenotypově odlišni od zbytku červenookých jedinců.

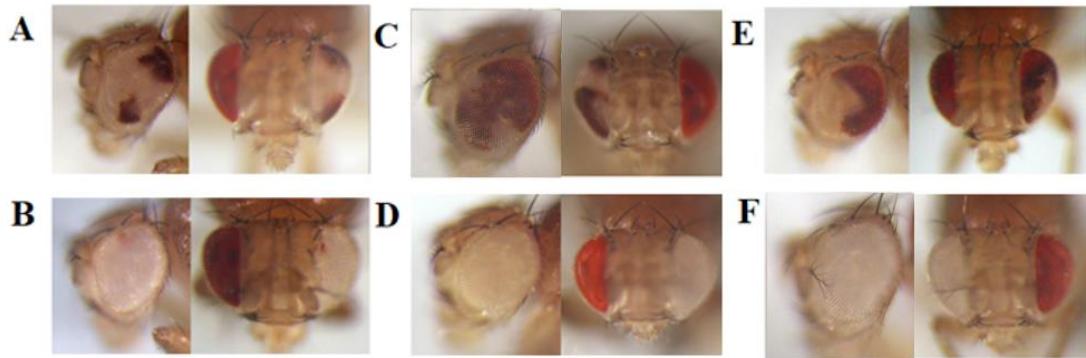


Obrázek č.25: Přibližné úseky mozaicisních jedinců ve kterých došlo alespoň v jednom případě k editaci



Obrázek č.26: Všechny čtyři cílové úseky, a jejich blízké okolí, editovaných jedinců pomocí Cas9 ve sledované délce 245 bp

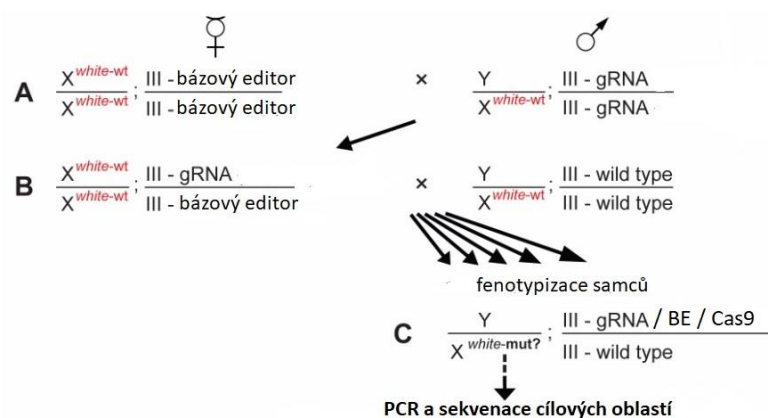
Někteří samci F2 měli zřetelně mozaikovitě rozložení pigmentu ve složených očích. Fenotypový projev mozaicismu se pohyboval od nejmenších defektů červeného pigmentu, až po úplný projev jednoho bílého a druhého červeného oka (viz. obr. 27). Pro co nejvyšší možnou detekci defektních octomilek bylo nutné se podívat na obě oči, a v případě potřeby samce otočit.



Obrázek č.27: Fotografie vybraných mutantních vykazujících mozaicismus. A,B jsou jedinci Target-AID z 28 °C. Na C,D lze pozorovat samce linie Cas9. E je genotypizovaný jedinec ABE7.10. Na posledním obrázku (F) se nachází samec linie BE³.

4.5 Genotypizace mozaicisních jedinců

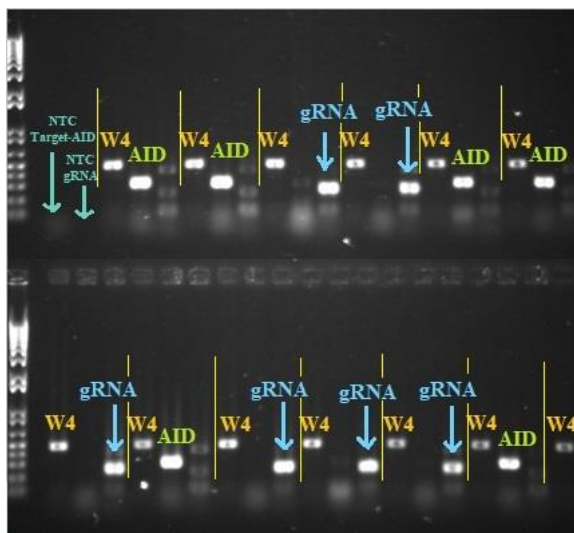
Jelikož byla během experimentu zaznamenána velká část jedinců vykazující mozaicismus, rozhodli jsme se detekovat, zda obsahují gRNA konstrukt či bázový editor. Schematické znázornění genotypu samců bylo objasněno pomocí transgenově specifické PCR. K tomuto účelu byly použity primery specifické pro námi vyrobený konstrukt gRNA, čtyři bázové editory a protein Cas 9 (viz. kapitola 3.2.2). Opět bylo posuzováno, zda měla teplota na četnost nějaký vliv.



Obrázek č.28: Schématické znázornění zisku mutantních samců

Genotypizace jedinců vykazujících mozaicismus byla provedena na agarózovém gelu. Na obrázku 27 můžeme pozorovat genotypizaci mozaicisních jedinců Target-

AID. V prvních dvou jamkách je NTC-negativní kontrola obou transgenů. Fragmenty W4 jsou pozitivní kontrolou přítomnosti genu *white* (oranžově), konkrétně fragmentu obsahující čtvrtou cílovou pozici. V prvním řádku jsou vizualizováni čtyři jedinci obsahující Target-AID (zeleně) a další dva, co obsahují gRNA konstrukt (modře). V druhém řádku naopak pozorujeme čtyři samce s gRNA a dva s bázovým editorem.



Obrázek č.29: Vizualizace genotypu jedinců vykazujících mozaicismus linie Target-AID na agarózovém gelu

Jelikož bázový editor Target-AID vyprodukoval 224 mozaicisních jedinců, rozhodli jsme se molekulárně charakterizovat pouze sto z nich. Z tabulky č. 26 lze vyčíst, že téměř 40 % jedinců obsahovalo bázový editor a 60 % gRNA konstrukt, což je stejná četnost, jako u druhého cytosinového editoru, BE³. I 29 ze 31 samců adeninového ABE7.10 bylo genotypizováno. U linií Cas9 bylo detekováno 502 jedinců trpících mozaicismem. Nakonec jsme se rozhodli jich genotypizovat také sto. V tomto případě bylo zaznamenáno téměř stejné zastoupení BE a gRNA konstruktu 1:1. V několika případech byla zaznamenána přítomnost obou transgenů v jedinci a to v 6, 8 a 17 %.

	Target-AID	BE ³	ABE7.10	Cas9
BE transgen	37 (39,8 %)	3 (60 %)	8 (33,3 %)	47 (51,1 %)
gRNA transgen	56 (60,2 %)	2 (40 %)	16 (66,7 %)	45 (48,9 %)
Oba transgeny	6	0	5	8

Tabulka č.26: Výsledné poměry genotypizovaných mozaicisních jedinců linie Target-AID, BE³, ABE7.10 a Cas9

5 DISKUZE.

Jako první prokázali Komor et al. (2016) potenciální využití bázových editorů korekcí mutací souvisejících s Alzheimerovou chorobou v astrocytech myších linií rakoviny prsu. Ještě vyšší důraz na porozumění deamináz klade fakt, že dle expresních studií se někteří členové rodiny APOBEC mohou přednostně objevovat v nádorových tkáních a jejich buněčných liniích. Tyto výsledky naznačují, že aktivita některých proteinů APOBEC může hrát roli v evolučních změnách sekvence genomu (Harris et al., 2002). Některé bodové mutace by mohly zlepšit mnoho funkcí, například editace ALS genu by poskytovala odolnost vůči herbicidům (Shimatani et al., 2017). Dále Kang et al. (2018) nedávno popsali změny generované transfekcí ABE7.10 u brukve řepky (*Brassica napus*), což mělo za následek fenotyp pozdního kvetení. Modifikace CRISPR-STOP používá BE³ k účinnému generování předčasných stop kodonů, čímž účinně způsobují inaktivaci genů (Kuscu et al., 2017). Sasaguri et al. (2018) také manifestoval, že pomocí jednonukleotidové substituce lze dosáhnout zásadních změn v genomu, jelikož díky změně párování dosáhli záměny prolinu za leucin, což mělo vliv na translaci proteinu. Dříve byly aktivní Cas9 a CRISPRi systémy cíleny na místa sousedící se zesilovači genů za účelem identifikace důležitých regulačních prvků řídicích genové procesy (Gilbert et al., 2014). Díky tomu mohou být BE systémy také vhodné pro zkoumání vztahů mezi sekvencí a funkcí nekódujících oblastí. BE rozšiřují schopnost a účinnost editace genomu pro zavádění bodových mutací. I když je významné dále vyvíjet vysoce účinné BE pro přesnou editaci, tak je velmi důležité posoudit potenciální necílové účinky na úrovni genomu i transkriptomu. Společnost nadále klade důraz na opatrnost, důkladné přezkoumání a uvážení následků editace genomů.

Pro vyšší efektivitu práce byl vytvořen systém HRMA, který v injektované generaci (G0) pomocí vysokorozlišovací analýzy tání účinně detekuje vzniklé indely. Ve studii Bassett et al. (2013) bylo takto rozpoznáno 100 % mozaicisních jedinců žluté či bílé barvy od homoduplexů needitovaných linií. To otevírá možnosti nové generaci velkoplošných metod genetického screeningu mozaicisních jedinců. Dalším příkladem je například selekce editovaných blastomer tříděním buněk aktivovaných fluorescencí (FACS), čímž lze efektivně šetřit čas v průběhu experimentu (Zuo et al., 2019).

Funkční optimalizací deaminázy můžeme dosáhnout minimalizace necílové editace. Důkazem je modifikace YEE-BE³, která vykazuje nižší aktivitu k DNA (Jin et al., 2019). Tím snížila počet nežádoucích substitucí generovaných v blízkosti cílového místa. Výsledkem bylo zúžení editačního okna na jednu až dvě báze (Kim et al., 2017b). Další generace po BE³, BE⁴, má na C konci delší UGI, což vyvolává přesnější konverzi bází. Účinnost TAM editoru by bylo možné zdvojnásobit odstraněním C-konce AID (AIDx), který obsahuje jaderný exportní signál omezující aktivitu AID. Sekvenování cílového lokusu experimentu Ma et al. (2016) odhalilo frekvence mutací GFP vyšší 20 % jak pomocí tranzicí, tak transverzí cytidinu a guaninu na ostatní tři báze.

Současné přístupy ke korekci bodových mutací bývají neúčinné, protože obvykle vyvolávají hojnost bodových mutací i indelů v cílovém lokusu. Vlivem účinnosti bázových editorů pouze v editačním okně, přibližně 4-8 bp daleko od PAM motivu, je jejich efektivita omezena pouze na některé úseky DNA. Pomocí modulace katalytické aktivity deaminázy lze zúžit velikost okna aktivity. Pro tyto účely používali Kim et al. (2017b) pevnější linkery mezi Cas9 a deaminázou. Na rozdíl od toho Tan et al. (2020) odstranili nedůležité deaminázové sekvence, čímž také dosáhli zúžení editačního okna. Mohli tak systematicky zvyšovat přesnost editace jednotlivých nukleotidů bez ohledu na blízké sekvenční kontexty. Nesmíme však zapomínat na požadavek vhodně umístěného PAM motivu, což také značně omezuje použití BE.

Přímá přeměna bází DNA na jinou, bez nutnosti DSB, by mohla zvýšit účinnost genové korekce, aniž by došlo k nadměrnému výskytu náhodných indelů. Dalším plusem editace bází, ve srovnání s opravou pomocí homologní rekombinace, je fakt, že je mnohem jednodušší zkonstruovat vektor pro BE než generovat plazmid pro homologní rekombinaci. Proto nabízejí BE velký potenciál pro šlechtění plodin (Li et al., 2017). Zajímavostí zůstává, že citlivé celogenomové metody (GUIDE-seq, BLESS) detekující necílové editace, spoléhají na dvouvláknové zlomy. Díky tomu nejsou kompatibilní s BE.

I když je dle Komor et al. (2016) nejvíce používaným editorem BE³, tak cytosinový Target-AID v našem experimentu vykazoval vyšší účinnost editace. Proto by bylo vhodné prohloubit znalosti a vytvořit ještě efektivnější modifikace. Editace Target-AID rajčete se pohybovala v rozpětí od 26,2 do 53,8 %. Frekvence mutací mimo cíl byla přibližně 0,14-0,38 %, což znamená, že byly nalezeny jen zřídka

(Shimatani et al., 2017). Nishida et al. (2016) přenesl pomocí lipofekce Target-AID do ovariálních buněk křečka. Bylo cíleno na gen *HPRT*, jehož narušení způsobilo rezistenci u cca 2 % buněk. Zaznamenali také, že editace bází je v některých místech méně přesná. Navzdory použití podobného Target-AID konstruktů je míra indelů u plodin výrazně vyšší (Shimatani et al., 2017) než u kvasinek, nebo savčích buněk (Nishida et al., 2016). To naznačuje, že se mechanismus úpravy DNA *in vivo* může lišit od mechanismu v kultivovaných buňkách (Jia et al., 2019).

Studie prokázaly, že transkripce *in vitro* a následná purifikace mRNA kódující BE³, v kombinaci s gRNA, může být společně dopravena do jednobuněčné zygoty myši (Liang et al., 2017), člověka (Li et al., 2017), krysy (Ma et al., 2018) či zygoty zebříčky (Rees et al., 2017; Zhang et al., 2017). Dále byly u rýže komplexně pozorovány mimo cílové mutace pomocí široce využívaných editorů BE³, HF1-BE³, a ABE7.10. Ve studii Jin et al. (2019) byl u jednoho vzorku, editovaného BE³, naměřen vysoký počet SNV. To se shoduje s našimi výsledky u sekvenovaného BE³ jedince, trpícího mozaicismem. Ten vykazoval vícero substitucí v první cílové oblasti. To je v souladu s předchozími studiemi, které ukazují, že nadměrná exprese různých deamináz vede ke zvýšené aktivitě mutací C → T u *Escherichia coli*, kvasinek i člověka (Harris et al., 2002; Rogozin et al., 2007; Nishida et al., 2016). Navíc inhibitor uracilglykosylázy (UGI), přítomný v BE³ i jeho modifikacích, zvyšuje konverzi C→T v celém genomu, což vysvětluje vyšší četnost náhodných mutací (Radany et al., 2000). Naproti tomu adeninový BE je odvozen od RNA adenosin deaminázy, která má schopnost vázat DNA, na rozdíl od BE³. Navíc nevykazuje nadměrnou editaci bází, čímž se úspěšně vyhýbá vzniku mimo cílových mutací A→G. Důvodem by mohla být slabší schopnost buněk odstranit inosin z DNA než uracil (Lau et al., 2000). Dalším důvodem vysoké přesnosti adeninových BE může být nedostatek alkyl adeninové DNA glykosylázy (AAG) enzymu, který rozpoznává a odstraňuje inosin v DNA. Tyto výsledky souhlasí se studiemi Rees et al. (2017); Koblan et al. (2018), kdy byla frekvence indelů u ABE výrazně pod 1 % jak pro rostliny, tak pro buňky ošetřené v kultuře. Nízký výskyt necílových mutací byl pozorován také u myších blastomer, starých 14 a půl dne, které byly editovány pomocí ABE7.10 a Cas9 (Zuo et al., 2019). To, na druhou stranu, nesouhlasí s našimi výsledky, jelikož jsme pozorovali řadu necílových mutací vzniklých vlivem Cas9 nukleázy. Naproti tomu cytosinové BE, dle studie Zuo et al. (2019) vyvolávaly necílovou editaci s více než 20x vyšší frekvencí.

Naopak v našem experimentu nebyly pomocí cytosinových Target-AID a BE³ pozorovány žádné necílové mutace. Tyto markantní rozdíly mohou být vysvětleny velkými anatomickými a morfologickými rozdíly mezi myšími blastomerami a F2 populací octomilek.

Účinnost editace bází *in vivo* byla sledována u cytosinových BE³ a Target-AID na myších zygotách. Účinnost editace BE³ se pohybovala v rozmezí 10,0-62,8 %. Avšak 26,9 % myší vykazovalo indely. Target-AID vykazoval nižší účinnost editace, a to 3,4-29,8 %. Na druhou stranu pouze 2 ze 36 myší (5,6 %) obsahovaly indely po injekci Target-AID. Tyto výsledky studie dle Sasaguri et al. (2018) naznačují, že BE³ má vysokou schopnost editace bází, ale s menší přesností, zatímco Target-AID upravuje méně účinně, ale s relativně vysokou přesností. To odporuje našim výsledkům, jelikož jsme u BE³ nezaznamenali žádné indely v sekvenovaných oblastech genu *white*. Target-AID obsahoval delece v 8 případech z 27 (29,6 %). Navíc jeden mozaicisní jedinec vykazoval inzerci dlouhou 8 bp. Kim et al. (2017a) rovněž zaznamenali tvorbu indelů u myší generovaných pomocí BE³ s podobnou frekvencí jako v předchozí studii (1/9 cílení na gen *Dmd* (11,1 %) a 2/7 myší na *Tyr* (28,6 %)). Po mikroinjekci BE³ mRNA a sgRNA byla embrya transplantována náhradním matkám, čímž byli získáni potomci s odlišným fenotypem. Pět z devíti myší neslo bodové mutace těchto dvou genů v cílovém místě. Jedna mutantní myš měla 20 bp dlouhou deleci, nikoliv bodovou mutaci. Jedná se o velmi rozdílné výsledky v porovnání s naší studií. Můžeme zde avšak podotknout skutečnost, že ve zmíněných studiích bylo experimentu podrobena mnohonásobně méně jedinců.

Jediný bázový editor, u kterého jsme nezaznamenali žádného mutanta je duhový TAM-AID. Jako jediný obsahoval dCas, který slouží k navedení a usměrnění cílení proteinu na specifické místo v DNA. Ostatním třem BE byla vrácena katalytická funkce v podobě nCas9, což umožnilo proteinu fungovat jako nikaža a stříhat proteiny Cas9. To zajišťuje BE účinnější indukci editace bází na úkor generování indelů, což pravděpodobně přispělo k pozorovaným změnám fenotypu u Target-AID, BE³ a ABE7.10. V průlomové studii Komor et al. (2016) byly porovnávány různé enzymy cytidindeaminázy například hAID, rAPOBEC1, a PmCDA1 a hodnocena deaminace *in vitro*. Z jejich výsledků vyplývá, že enzym rAPOBEC1 vykazoval za testovaných podmínek nejvyšší efektivitu, jelikož jeho spojení s N-koncem, zachovává dCas9 deaminázovou aktivitu. Cytosinový editor BE³ je ve srovnání s BE² až šestkrát

účinnější, jelikož narušuje fosfodiesterové vazby needitovaného vlákna. To zvyšuje efektivitu editace, přičemž se konverze C→T pohybovala okolo 37 %. Vykazuje také mírně zvýšenou frekvenci indelů, ta dosahovala v průměru 1,1 %. Komor et al. (2016) také sledovali cílenou účinnost Cas9 komplexu, která byla výrazně nižší, a to pouze 0,5 %. Zato tvorba indelů byla mnohem vyšší – dosahovala 4,3 %.

Během experimentu byl překvapivě detekován značný podíl mozaicisních jedinců, ačkoli inkriminovaní jedinci nemohou obsahovat oba konstrukty pro gRNA a bázový editor (detailní schéma na obrázku č. 26). Aby vznikl mozaicisní jedinec, musí být obě složky (BE i gRNA) přítomny u samce. Ten má ale pouze jeden chromozom X a tudíž by měl obsahovat právě jeden ze zmíněných dvou konstruktů. Po zkřížení linie BE a gRNA jsme získali heterozygotní samice F1. Tyto panny jsme poté zkřížili s divokými samci, čímž vznikli heterozygoti v F2 populaci. Přítomnost obou složek v F2 generaci lze vysvětlit tak, že nezděděný z konstruktů je do samců přenesen od F1 matek pomocí materiálního přenosu již jako produkt a druhá složka byla normálně endogenně exprimována. Ve většině případů se jednalo o podobné zastoupení obou složek napříč všemi teplotami. V některých případech byla pomocí genotypizace prokázána přítomnost obou konstruktů, ale ve většině případů byl potvrzen pouze jeden z nich (viz tabulka č. 26). Bassett et al., (2018) uvádí, že se snižováním koncentrace gRNA klesal i podíl mozaikových dospělců. Neschopnost generovat mutantní potomstvo může být způsobeno vysokou účinností indukce dvouřetězcových zlomů, která může mít za následek toxicitu nebo sterilitu. To naznačuje, že je třeba optimalizovat koncentraci injektované RNA na základě účinnosti štěpení. Při vývoji implementace systémů pro editaci bází je nutné brát v úvahu klíčové parametry jako je efektivita i čistota editace, či aktivita v editačním okně. Je také nutné vybrat vhodnou cílovou sekvenci, jelikož je dle Li et al. (2017) právě na ní účinnost úpravy báze závislá. Jejich skupina úspěšně zavedla přesné bodové mutace do tří cílových míst v rýži. To se liší od naší studie, ve které došlo téměř ve všech případech k editaci pouze jednoho cílového místa. Faktem zůstává, že v žádném jedinci nebyla potvrzena editace na více než dvou cílových místech.

Nejefektivnějším místem pro editaci je začátek čtecího rámce (ORF) cílového genu, čímž dojde k jeho posunu. To výrazně snižuje nebo vylučuje funkci genu. Některé indely způsobí pouze malou ztrátu či změnu AMK, což následně vede ke slabé ztrátě funkce alely. Kromě toho změněný genom již neodpovídá sekvenci sgRNA, a

proto je odolný vůči dalšímu štěpení. Z tohoto důvodu je obecně lepší použít více gRNA. Z jednoho transkriptu lze účinně zpracovat až šest sgRNA spojených prekurzory tRNA (Port et Bullock, 2016). Bázové editory lze zaklonovat do mnohočetného konstruktů, který by mohl účinně cílit na mnoho míst napříč celým genomem. Tím bychom mohli získat mutanty s diametrálně odlišným fenotypem. Ve studii Port et Bullock (2016) byly také použity vektory na bázi tRNA pro výrobu vícenásobných krátkých sgRNA z jediného transkriptu RNA polymerázy u octomilky. Systém, který je založen na uvolňování sgRNA zpracováním doprovodných tRNA, kdy dochází ke zpracování více sgRNA z jediného prekurzoru v jádře. To umožňuje vysoce efektivní mutagenézi založenou na Cas9. V některých případech byly pozorovány 10-20 bp dlouhé delece, podstatně větší než ty, které obvykle indukuje Cas9 (Port et Bullock, 2016). Naopak v naší studii jsme u Cas9 mutantů pozorovali delece i 10 bp dlouhé.

Naším cílem bylo narušit donorové místo 5' sestřihu a akceptorové místo 3' sestřihu, čímž by došlo ke zničení hranice exon-intron. Tím by došlo ke změně ORF a protein by náhle skončil stop kodonem v intronické oblasti. Bassett et al. (2013) prováděl podobnou studii jako my, kde vsřikoval směs Cas9 mRNA a sgRNA do embryí octomilek ve stádiu blastodermu. gRNA cílily dvouřetězcovým zlomem na začátek druhého exonu genu *yellow*, čímž docházelo, stejně jako u nás, k účinné ztrátě pigmentace u samců, jelikož je gen také vázaný na chromozom X. Studie ukázala, že vsřikování RNA do embryí *Drosophila melanogaster* může vyvolat vysoce účinnou mutagenézi požadovaných cílových genů. Celkem 34,5 % všech potomků obsahovalo mutaci v genu *yellow*. Dále Bassett et al. (2013) zacílili další dvě sgRNA na gen *white*. Ten vykazoval velmi odlišnou účinnost štěpení. Zatímco u genu *yellow* byla pozorována četnost mozaicisních jedinců 75 a 88 %, u *white* buď 0 anebo 25 % v generaci F0. Překvapivě to u genu *yellow* zahrnovalo i samičky, které vyžadují mutaci obou alel. Bohužel byla studie Bassett et al. (2013) provedena pouze u osmi samců, což není zrovna relevantní číslo pro děláni závěrů. Navíc byli tito jedinci pozorováni v generaci F0, na rozdíl od F2 generace pozorované v naší studii a Bosch et al. (2021). To odporuje výsledkům Gratz et al. (2013), kteří zaznamenali 10x až 100x nižší efektivitu u injektovaných octomilek. Ti generovali deleci genů pro žlutou a růžovou barvu očí pomocí CRISPR/Cas9 s podstatně nižší četností mutantního potomstva. Například žlutý fenotyp byl detekován u 1,4 % potomků.

V posledních letech byla vyvinuta metoda velmi podobná bázové editaci zvaná primární editace. Ta se od BE liší pouze v tom, že je nCas9 spojena s upravenou reverzní transkriptázou. Primární editace rovněž využívá modifikovaný enzym perRNA, která má, stejně jako gRNA, vodící funkci. Ve studii Bosch et al. (2021) byly úspěšně zavedeny předčasné stop kodony například u genu *white* a *ebony* octomilek. Účinnost editace *ebony* se pohybovala okolo 6 %, a *white* 2,5 % v somatických buňkách octomilek, přičemž gen *ebony* byl úspěšně zárodečně předán do F2 generace s úspěšností 36 %. Stejně jako u savčích buněk systém PE³ způsobil nízké procento indelů a to 0,86 % (Bosch et al., 2021). Ačkoliv byla účinnost editace mnohem nižší než u savčích buněk, bylo dokázáno, že je primární editace je u octomilky možná, a i podobně účinná jako bázová editace. Dále byla u experimentu zaznamenána vyšší efektivita při 29 °C než ve 25 °C teplotě. To se shoduje s našimi výsledky.

Jelikož jsou octomilky studenokrevné, a teplota pro ně hraje v jejich vývoji zásadní roli, provedli jsme proto experiment ve třech různých teplotách. Při pohledu na výsledky je patrné, že teplota má nezanedbatelný vliv na efektivitu BE. Na rozdíl od toho při experimentu Randall et al. (2021) nebyl zjištěn žádný významný rozdíl v účinnosti editace bází. Nesmíme zde opomenout fakt, že tento experiment probíhal u rajčete (*Solanum lycopersicum*). Používali podobné modifikace těm našim, a to hAID-BE³ a PmCDA1-BE³ při teplotách 22 °C, 28 °C a 32 °C. Dle Sasaguri et al. (2018) je nejvhodnější teplota pro použití Target-AID pravděpodobně kolem 25 °C, jelikož deamináza PmCDA pochází z mníka mořského. To by mohlo vysvětlovat nízkou, či žádnou, četnost mutantních samců octomilek v 18 °C v naší studii, nebo také například nízkou efektivitu BE pozorovanou u myších embryí, která byla inkubována při 37 °C (Kim et al., 2017a).

V naší studii byla prokázána funkčnost a efektivita tří vybraných bázových editorů *in vivo* u *Drosophila melanogaster*. Účinnost se sice pohybovala ve všech případech v řádu procent, i přesto jsme pozorovali stovky mutantních samců octomilky. První zmínky o použití BE u octomilky se objevily teprve v nedávné době, když už byl náš experiment v procesu. Ve studii dle Marr et Potter (2021) proběhla editace bází *in vitro* pomocí modifikace založené na cytosinovém BE², který se také skládá z fúzního proteinu cytidindeaminázy, dCas9 a UGI. Konverze C→T dosáhla až 100 % účinnosti na některých pozicích v editačním okně. Z 30 cílových míst bylo 15 úspěšně editováno. Důvodem použití BE² byla generace bází bez indelů, na rozdíl od BE³,

který jich vykazuje mnohonásobně více (Marr et Potter, 2021). Současně byly použity dvě gRNA zaměřené na genomové oblasti vzdálené 50 bp od sebe, což vedlo k mutacím mezi oběma cílovými gRNA. Podstatným rozdílem citované práce je ale to, že Marr et Potter (2021) sledovali editaci v somatických buňkách. Naše studie cílila na získání dědičných změn, a proto data a účinnosti nelze zcela srovnávat.

6 ZÁVĚR

V této práci byly úspěšně použity molekulární nástroje tak, že bylo možné zaznamenat efektivitu editace bázevých editorů *in vivo*. Ta byla sledována u fenotypově odlišných samců s deformovaným *white* genem, ve třech teplotách. Z výsledků vyplývá, že teplota má u octomilky významný vliv na efektivitu BE. V nejnižší měřené teplotě bylo zaznamenáno buď podstatně méně mutantních jedinců anebo vůbec žádní. Navržením specifické gRNA je možné v *Drosophila melanogaster* vytvářet širokou škálu přesných modifikací genomu.

I když je dle Komor et al. (2016) nejvíce používaným editorem BE³, tak cytosinový Target-AID v našem experimentu vykazoval nejvyšší účinnost editace (5,33 %). Proto by bylo vhodné prohloubit znalosti a vytvořit ještě efektivnější modifikace, jelikož je toto první zaznamenaný případ použití Target-AID u octomilky. Efektivita byla rovněž prokázána v nižší míře u adeninového BE ABE7.10 i cytosinového BE³. Efektivita editace BE byla porovnána s editací Cas9 nukleázy. Ta vykazovala vyšší produkci fenotypově odlišných samců s deformovaným *white* genem, avšak většina editací proběhla mimo cílová místa, vzdálená více než 10 bp daleko. Navíc byly pozorovány rozsáhlé delecce i inserce, na rozdíl od většiny jednotlivých substitucí dosažených pomocí bázevých editorů.

Genové inženýrství, a tedy i používání zmíněných metod, je velmi rychle se rozvíjející odvětví. Souhrnně lze říct, že BE představují užitečnou alternativu editace genomu, která se vyhýbá dvouřetězcovým zlomům a z nich vyplývajících indelů. Jednoduchost genů založených na CRISPR systému umožňuje generovat nové mutace ve vybraném genu během několika týdnů. Octomilka je důležitým modelem díky své snadné genetické manipulaci a ač malému, tak poměrně bohatému genomu pro genetiku *in vivo*. Proto je pravděpodobné, že nové nástroje založené na systému CRISPR budou mít široký dopad na editaci genomu tohoto organismu, jelikož poskytuje nové příležitosti pro studium funkce genů.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abadi, S., Yan, W.X., Amar, D. and Mayrose, I., 2017. A machine learning approach for predicting CRISPR-Cas9 cleavage efficiencies and patterns underlying its mechanism of action. *PLoS computational biology*, 13(10), p.e1005807.

Amitai, G. and Sorek, R., 2016. CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nature Reviews Microbiology*, 14(2), pp.67-76.

Bassett, A.R., Tibbit, C., Ponting, C.P. and Liu, J.L., 2013. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell reports*, 4(1), pp.220-228.

Bosch, J.A., Birchak, G. and Perrimon, N., 2021. Precise genome engineering in *Drosophila* using prime editing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(1), p.e2021996118.

Brissett, N.C., Pitcher, R.S., Juarez, R., Picher, A.J., Green, A.J., Dafforn, T.R., Fox, G.C., Blanco, L. and Doherty, A.J., 2007. Structure of a NHEJ polymerase-mediated DNA synaptic complex. *Science*, 318(5849), pp.456-459.

Burma, S., Chen, B.P. and Chen, D.J., 2006. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA repair*, 5(9-10), pp.1042-1048.

Calvo-Villamañán, A., Ng, J.W., Planel, R., Ménager, H., Chen, A., Cui, L. and Bikard, D., 2020. On-target activity predictions enable improved CRISPR–dCas9 screens in bacteria. *Nucleic acids research*, 48(11), pp.e64-e64.

Caruso, S.M., Quinn, P.M., da Costa, B.L. and Tsang, S.H., 2022. CRISPR/Cas therapeutic strategies for autosomal dominant disorders. *Journal of Clinical Investigation*, 132(9), p.e158287.

Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., and Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823.

Doman, J.L., Raguram, A., Newby, G.A. and Liu, D.R., 2020. Evaluation and minimization of Cas9-independent off-target DNA editing by cytosine base editors. *Nature biotechnology*, 38(5), pp.620-628.

Doron, S., Melamed, S., Ofir, G., Leavitt, A., Lopatina, A., Keren, M., Amitai, G. and Sorek, R., 2018. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science*, 359(6379), p.eaar4120.

Doudna, J.A. and Charpentier, E., 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), p.1258096.

Fonfara, I., Le Rhun, A., Chylinski, K., Makarova, K.S., Lecrivain, A.L., Bzdrenga, J., Koonin, E.V. and Charpentier, E., 2014. Phylogeny of Cas9 determines functional

exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic acids research*, 42(4), pp.2577-2590.

Gaudelli, N.M., Komor, A.C., Rees, H.A., Packer, M.S., Badran, A.H., Bryson, D.I. and Liu, D.R., 2017. Programmable base editing of A• T to G• C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551(7681), pp.464-471.

Gilbert, L.A., Horlbeck, M.A., Adamson, B., Villalta, J.E., Chen, Y., Whitehead, E.H., Guimaraes, C., Panning, B., Ploegh, H.L., Bassik, M.C. and Qi, L.S., 2014. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell*, 159(3), pp.647-661.

Gratz, S.J., Wildonger, J., Harrison, M.M. and O'Connor-Giles, K.M., 2013. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering and the promise of designer flies on demand. *Fly*, 7(4), pp.249-255.

Hao, L.I., Ruiying, Q.I.N., Xiaoshuang, L.I.U., Shengxiang, L.I.A.O., Rongfang, X.U., Jianbo, Y.A.N.G. and Pengcheng, W.E.I., 2019. CRISPR/Cas9-mediated adenine base editing in rice genome. *Rice Science*, 26(2), pp.125-128.

Harris, R.S., Petersen-Mahrt, S.K. and Neuberger, M.S., 2002. RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. *Molecular cell*, 10(5), pp.1247-1253.

Hess, G.T., Tycko, J., Yao, D. and Bassik, M.C., 2017. Methods and applications of CRISPR-mediated base editing in eukaryotic genomes. *Molecular cell*, 68(1), pp.26-43.

Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Peterson, R.T., Yeh, J.R. and Joung, J.K., 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*, 31(3), pp.227-229.

Chadwick, A.C., Wang, X. and Musunuru, K., 2017. In vivo base editing of PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) as a therapeutic alternative to genome editing. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 37(9), pp.1741-1747.

Champer, J., Reeves, R., Oh, S.Y., Liu, C., Liu, J., Clark, A.G. and Messer, P.W., 2017. Novel CRISPR/Cas9 gene drive constructs reveal insights into mechanisms of resistance allele formation and drive efficiency in genetically diverse populations. *PLoS genetics*, 13(7), p.e1006796.

Chen, K., Wang, Y., Zhang, R., Zhang, H. and Gao, C., 2019. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annual Review of Plant Biology* 70(1), pp.667-697.

Choulika, A., Perrin, A., Dujon, B. and Nicolas, J.F., 1995. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 15(4), pp.1968-1973.

- Chylinski, K., Le Rhun, A. and Charpentier, E., 2013. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA biology*, *10*(5), pp.726-737.
- Ishino, M., Sawada, Y., Yaegashi, T., Demura, M. and Fujinaga, K., 1987. Nucleotide sequence of the adenovirus type 40 inverted terminal repeat: close relation to that of adenovirus type 5. *Virology*, *156*(2), pp.414-416.
- Jansen, R., Embden, J.D.V., Gaastra, W. and Schouls, L.M., 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, *43*(6), pp.1565-1575.
- Jia, K., Lu, Z., Zhou, F., Xiong, Z., Zhang, R., Liu, Z., Ma, Y.E., He, L., Li, C., Zhu, Z. and Pan, D., 2019. Multiple sgRNAs facilitate base editing-mediated i-stop to induce complete and precise gene disruption. *Protein & cell*, *10*(11), pp.832-839.
- Jiang, F. and Doudna, J.A., 2017. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, *46*(1), pp.505-529.
- Jin, S., Zong, Y., Gao, Q., Zhu, Z., Wang, Y., Qin, P., Liang, C., Wang, D., Qiu, J.L., Zhang, F. and Gao, C., 2019. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science*, *364*(6437), pp.292-295.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, *337*(6096), pp.816-821.
- Kang, B.C., Yun, J.Y., Kim, S.T., Shin, Y., Ryu, J., Choi, M., Woo, J.W. and Kim, J.S., 2018. Precision genome engineering through adenine base editing in plants. *Nature Plants*, *4*(7), pp.427-431.
- Khan, Z., Khan, S.H., Ahmad, A., Aslam, S., Mubarik, M.S. and Khan, S., 2019. CRISPR/dCas9-mediated inhibition of replication of begomoviruses. *International Journal of Agriculture And Biology*, *21*, pp.711-718.
- Kim, K., Ryu, S.M., Kim, S.T., Baek, G., Kim, D., Lim, K., Chung, E., Kim, S. and Kim, J.S., 2017a. Highly efficient RNA-guided base editing in mouse embryos. *Nature biotechnology*, *35*(5), pp.435-437.
- Kim, Y.B., Komor, A.C., Levy, J.M., Packer, M.S., Zhao, K.T. and Liu, D.R., 2017b. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nature biotechnology*, *35*(4), pp.371-376.
- Koblan, L.W., Doman, J.L., Wilson, C., Levy, J.M., Tay, T., Newby, G.A., Maianti, J.P., Raguram, A. and Liu, D.R., 2018. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nature biotechnology*, *36*(9), pp.843-846.
- Komor, A.C., Badran, A.H. and Liu, D.R., 2017. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell*, *168*(1-2), pp.20-36.

- Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A. and Liu, D.R., 2016. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533(7603), pp.420-424.
- Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M. and Zhao, X., 2012. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic acids research*, 40(13), pp.5795-5818.
- Kuscu, C., Parlak, M., Tufan, T., Yang, J., Szlachta, K., Wei, X., Mammadov, R. and Adli, M., 2017. CRISPR-STOP: gene silencing through base-editing-induced nonsense mutations. *Nature methods*, 14(7), pp.710-712.
- Lau, A.Y., Wyatt, M.D., Glassner, B.J., Samson, L.D. and Ellenberger, T., 2000. Molecular basis for discriminating between normal and damaged bases by the human alkyladenine glycosylase, AAG. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), pp.13573-13578.
- Lee, S., Ding, N., Sun, Y., Yuan, T., Li, J., Yuan, Q., Liu, L., Yang, J., Wang, Q., Kolomeisky, A.B. and Hilton, I.B., 2020. Single C-to-T substitution using engineered APOBEC3G-nCas9 base editors with minimum genome-and transcriptome-wide off-target effects. *Science advances*, 6(29), p.eaba1773.
- Li, G., Liu, Y., Zeng, Y., Li, J., Wang, L., Yang, G., Chen, D., Shang, X., Chen, J., Huang, X. and Liu, J., 2017. Highly efficient and precise base editing in discarded human tripronuclear embryos. *Protein & Cell*, 8(10), pp.776-779.
- Liang, P., Sun, H., Sun, Y., Zhang, X., Xie, X., Zhang, J., Zhang, Z., Chen, Y., Ding, C., Xiong, Y. and Ma, W., 2017. Effective gene editing by high-fidelity base editor 2 in mouse zygotes. *Protein & cell*, 8(8), pp.601-611.
- Liu, Y., Li, X., He, S., Huang, S., Li, C., Chen, Y., Liu, Z., Huang, X. and Wang, X., 2020. Efficient generation of mouse models with the prime editing system. *Cell discovery*, 6(1), pp.1-4.
- Liu, Z., Chen, S., Shan, H., Jia, Y., Chen, M., Song, Y., Lai, L. and Li, Z., 2020. Efficient base editing with high precision in rabbits using YFE-BE4max. *Cell death & disease*, 11(1), pp.1-11.
- Losey, H.C., Ruthenburg, A.J. and Verdine, G.L., 2006. Crystal structure of *Staphylococcus aureus* tRNA adenosine deaminase TadA in complex with RNA. *Nature structural & molecular biology*, 13(2), pp.153-159.
- Luo, Y., Ge, M., Wang, B., Sun, C., Wang, J., Dong, Y. and Xi, J.J., 2020. CRISPR/Cas9-deaminase enables robust base editing in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4. 1. *Microbial cell factories*, 19(1), pp.1-14.
- Ma, Y., Yu, L., Zhang, X., Xin, C., Huang, S., Bai, L., Chen, W., Gao, R., Li, J., Pan, S. and Qi, X., 2018. Highly efficient and precise base editing by engineered dCas9-guide tRNA adenosine deaminase in rats. *Cell discovery*, 4(1), pp.1-4.

- Ma, Y., Zhang, J., Yin, W., Zhang, Z., Song, Y. and Chang, X., 2016. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nature methods*, 13(12), pp.1029-1035.
- Makarova, K.S., Aravind, L., Wolf, Y.I. and Koonin, E.V., 2011a. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biology direct*, 6(1), pp.1-27.
- Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J., Wolf, Y.I., Yakunin, A.F. and Van Der Oost, J., 2011b. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), pp.467-477.
- Marr, E. and Potter, C.J., 2021. Base editing using CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *bioRxiv*.
- McGinn, J. and Marraffini, L.A., 2019. Molecular mechanisms of CRISPR-Cas spacer acquisition. *Nature Reviews Microbiology*, 17(1), pp.7-12.
- Mir, A., Edraki, A., Lee, J. and Sontheimer, E.J., 2018. Type II-C CRISPR-Cas9 biology, mechanism, and application. *ACS chemical biology*, 13(2), pp.357-365.
- Mojica, F.J., Juez, G. and Rodriguez-Valera, F., 1993. Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular microbiology*, 9(3), pp.613-621.
- Mol, C.D., Arvai, A.S., Sanderson, R.J., Slupphaug, G., Kavli, B., Krokan, H.E., Mosbaugh, D.W. and Tainer, J.A., 1995. Crystal structure of human uracil-DNA glycosylase in complex with a protein inhibitor: protein mimicry of DNA. *Cell*, 82(5), pp.701-708.
- Niehrs, C. et Luke, B., 2020. Regulatory R-loops as facilitators of gene expression and genome stability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(3), pp.167-178.
- Nishida, K., Arazoe, T., Yachie, N., Banno, S., Kakimoto, M., Tabata, M., Mochizuki, M., Miyabe, A., Araki, M., Hara, K.Y. and Shimatani, Z., 2016. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 353(6305), p.aaf8729.
- Pitcher, R.S., Brissett, N.C., Picher, A.J., Andrade, P., Juarez, R., Thompson, D., Fox, G.C., Blanco, L. and Doherty, A.J., 2007. Structure and function of a mycobacterial NHEJ DNA repair polymerase. *Journal of molecular biology*, 366(2), pp.391-405.
- Port, F. and Bullock, S.L., 2016. Augmenting CRISPR applications in *Drosophila* with tRNA-flanked sgRNAs. *Nature methods*, 13(10), pp.852-854.
- Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L.A., Doudna, J.A., Weissman, J.S., Arkin, A.P., and Lim, W.A. 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*, 152(5), 1173–1183.

- Radany, E.H., Dornfeld, K.J., Sanderson, R.J., Savage, M.K., Majumdar, A., Seidman, M.M. and Mosbaugh, D.W., 2000. Increased spontaneous mutation frequency in human cells expressing the phage PBS2-encoded inhibitor of uracil-DNA glycosylase. *Mutation Research/DNA Repair*, 461(1), pp.41-58.
- Ran, F.A.C.L., Cong, L., Yan, W.X., Scott, D.A., Gootenberg, J.S., Kriz, A.J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K.S. and Koonin, E.V., 2015. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 520(7546), pp.186-191.
- Randall, L.B., Sretenovic, S., Wu, Y., Yin, D., Zhang, T., Eck, J.V. and Qi, Y., 2021. Genome- and transcriptome-wide off-target analyses of an improved cytosine base editor. *Plant Physiology*, 187(1), pp.73-87.
- Rees, H.A. and Liu, D.R., 2018. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nature reviews genetics*, 19(12), pp.770-788.
- Rees, H.A., Komor, A.C., Yeh, W.H., Caetano-Lopes, J., Warman, M., Edge, A.S. and Liu, D.R., 2017. Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery. *Nature communications*, 8(1), pp.1-10.
- Rogozin, I.B., Iyer, L.M., Liang, L., Glazko, G.V., Liston, V.G., Pavlov, Y.I., Aravind, L. and Pancer, Z., 2007. Evolution and diversification of lamprey antigen receptors: evidence for involvement of an AID-APOBEC family cytosine deaminase. *Nature immunology*, 8(6), pp.647-656
- Ryu, S.M., Koo, T., Kim, K., Lim, K., Baek, G., Kim, S.T., Kim, H.S., Kim, D.E., Lee, H., Chung, E. and Kim, J.S., 2018. Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nature biotechnology*, 36(6), pp.536-539.
- San Filippo, J., Sung, P. and Klein, H., 2008. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual Review of Biochemistry*, 77, pp.229-257.
- Sanson, K.R., Hanna, R.E., Hegde, M., Donovan, K.F., Strand, C., Sullender, M.E., Vaimberg, E.W., Goodale, A., Root, D.E., Piccioni, F. and Doench, J.G., 2018. Optimized libraries for CRISPR-Cas9 genetic screens with multiple modalities. *Nature communications*, 9(1), pp.1-15.
- Sasaguri, H., Nagata, K., Sekiguchi, M., Fujioka, R., Matsuba, Y., Hashimoto, S., Sato, K., Kurup, D., Yokota, T. and Saido, T.C., 2018. Introduction of pathogenic mutations into the mouse *Psen1* gene by Base Editor and Target-AID. *Nature communications*, 9(1), pp.1-8.
- Shimatani, Z., Kashojiya, S., Takayama, M., Terada, R., Arazoe, T., Ishii, H., Teramura, H., Yamamoto, T., Komatsu, H., Miura, K. and Ezura, H., 2017. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nature biotechnology*, 35(5), pp.441-443.

- Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C. and Doudna, J.A., 2014. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), pp.62-67.
- Tan, J., Zhang, F., Karcher, D. and Bock, R., 2020. Expanding the genome-targeting scope and the site selectivity of high-precision base editors. *Nature communications*, 11(1), pp.1-11.
- Veillet, F., Perrot, L., Chauvin, L., Kermarrec, M.P., Guyon-Debast, A., Chauvin, J.E., Nogu e, F. and Mazier, M., 2019. Transgene-free genome editing in tomato and potato plants using Agrobacterium-mediated delivery of a CRISPR/Cas9 cytidine base editor. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), p.402.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F. and Jaenisch, R., 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153(4), pp.910-918.
- Wang, Y., Gao, R., Wu, J., Xiong, Y.C., Wei, J., Zhang, S., Yang, B., Chen, J. and Yang, L., 2019. Comparison of cytosine base editors and development of the BEable-GPS database for targeting pathogenic SNVs. *Genome biology*, 20(1), pp.1-7.
- Wu, Y., Xu, W., Wang, F., Zhao, S., Feng, F., Song, J., Zhang, C. and Yang, J., 2019. Increasing cytosine base editing scope and efficiency with engineered Cas9-PmCDA1 fusions and the modified sgRNA in rice. *Frontiers in genetics*, 10, p.379.
- Yan, F., Kuang, Y., Ren, B., Wang, J., Zhang, D., Lin, H., Yang, B., Zhou, X. and Zhou, H., 2018. Highly efficient A·T to G·C base editing by Cas9n-guided tRNA adenosine deaminase in rice. *Molecular plant*, 11(4), pp.631-634.
- Zhang, Y., Qin, W., Lu, X., Xu, J., Huang, H., Bai, H., Li, S. and Lin, S., 2017. Programmable base editing of zebrafish genome using a modified CRISPR-Cas9 system. *Nature communications*, 8(1), pp.1-5.
- Zhang, Y., Zhang, H., Wang, Z., Wu, Z., Wang, Y., Tang, N., Xu, X., Zhao, S., Chen, W. and Ji, Q., 2020. Programmable adenine deamination in bacteria using a Cas9–adenine-deaminase fusion. *Chemical science*, 11(6), pp.1657-1664.
- Zheng, M., Zhang, L., Tang, M., Liu, J., Liu, H., Yang, H., Fan, S., Terzaghi, W., Wang, H. and Hua, W., 2020. Knockout of two Bna MAX 1 homologs by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis improves plant architecture and increases yield in rapeseed (*Brassica napus L.*). *Plant biotechnology journal*, 18(3), pp.644-654.
- Zirin, J., Bosch, J., Viswanatha, R., Mohr, S.E. and Perrimon, N., 2021. State-of-the-art CRISPR for in vivo and cell-based studies in *Drosophila*. *Trends in Genetics*.
- Zuo, E., Sun, Y., Wei, W., Yuan, T., Ying, W., Sun, H., Yuan, L., Steinmetz, L.M., Li, Y. and Yang, H., 2019. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science*, 364(6437), pp.289-292.