

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Technologie CRISPR/Cas – princip, aplikace, rizika

Bakalářská práce

Autor: Michaela Paclíková

Studijní program: B0511A030001 – Biologie a ekologie

Studijní obor: Biologie a ekologie

Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.

Odborný konzultant: MVDr. Lenka Lecová, Ph.D.

Hradec Králové

květen 2024



Zadání bakalářské práce

Autor: Michaela Paclíková

Studium: S21BI023BP

Studijní program: B0511A030001 Biologie a ekologie

Studijní obor: Biologie a ekologie

Název bakalářské práce: **Technologie CRISPR/Cas - princip, aplikace, rizika**

Název bakalářské práce AJ: CRISPR/Cas technology - principle, applications, risks

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated proteins) systém je nejnovějším přírůstkem do sady nástrojů pro úpravu genomu, který nabízí jednoduché, rychlé a efektivní řešení. Systém CRISPR/Cas umožňuje cílené úpravy genů v různých eukaryotických buňkách a má velký příslib v širokém okruhu aplikací, jako je inženýrství kmenových buněk, genová terapie, modely nemocí tkání a zvířat, inženýrství transgenních rostlin apod. Cílem této bakalářské práce je přehledně zpracovat problematiku této unikátní technologie. Popsat evoluci, princip, shrnout nejvýznamnější aplikace a možná rizika, které genová editace může s sebou přinášet.

1. Mittal RD. Gene Editing in Clinical Practice: Where are We? *Indian J Clin Biochem.* 2019 Jan;34(1):19-25. doi: 10.1007/s12291-018-0804-4. Epub 2019 Jan 1. PMID: 30728669; PMCID: PMC6346614.
2. Peng R, Lin G, Li J. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS J.* 2016 Apr;283(7):1218-31. doi: 10.1111/febs.13586. Epub 2015 Nov 27. PMID: 26535798.
3. Ding Y, Li H, Chen LL, Xie K. Recent Advances in Genome Editing Using CRISPR/Cas9. *Front Plant Sci.* 2016 May 24;7:703. doi: 10.3389/fpls.2016.00703. PMID: 27252719; PMCID: PMC4877526.

Zadávací pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 7.2.2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne

Michaela Paclíková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své odborné konzultantce MVDr. Lence Lecové, Ph.D. za ochotu a trpělivost, ale taktéž i za přátelský přístup, cenné rady a v neposlední řadě za čas, který mi věnovala při psaní samotné práce. Poděkování patří i RNDr. Aleně Myslivcové Fučíkové, Ph.D. za přivedení mě k tomuto tématu a pomoc s administrativními záležitostmi na půdě Univerzity Hradec Králové. Dále bych zde ráda vyjádřila vděk své rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.

Anotace bakalářské práce

PACLÍKOVÁ, M. *Technologie CRISPR/Cas – princip, aplikace, rizika*. Hradec Králové, 2024. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D. 71 s.

Steprve nedávno objevenou technologií CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated proteins*) se v současné době můžeme setkávat čím dál častěji. Ať už ve vědeckém, biotechnologickém ale i ve zdravotnickém okruhu, přinesla tato unikátní metoda mnoho potenciálních uplatnění. Zmíněný nástroj genetického inženýrství, někdy přezdívaný jako „molekulární nůžky“, funguje na principu spolupráce komplexu nukleových kyselin a speciálních enzymů. Původ CRISPR/Cas mechanismu je v imunitním systému bakterií a archeí, avšak díky jednoduchosti použití, rychlosti a nízké finanční nákladnosti se během krátké doby stal velmi oblíbeným a používaným nástrojem širokého uplatnění. Ať už se jedná o aplikace na poli studia genů, mechanismů onemocnění, samotné terapeutické léčby nebo vytváření geneticky upravených organismů, je tato technologie spjata s mnoha etickými i morálními otázkami a riziky. Cílem této práce je shrnout vývoj, princip, provedené či potenciální aplikace napříč různými druhy organismů a obory a dále také sepsat potenciální rizika a možnosti jejich předejití.

Klíčová slova:

CRISPR technologie, Cas proteiny, CRISPR/Cas komplex, geny, genové inženýrství, mutace, DSB

Annotation of Bachelor Thesis

PACLÍKOVÁ, M. *CRISPR/Cas technology – principle, applications, risks*. Hradec Králové, 2024. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D. 71 s.

The recently discovered CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated proteins*) technology is nowadays more and more frequently encountered. Whether in the scientific, biotechnological, or medical fields, this unique method has many potential applications. This genetic engineering tool, sometimes referred to as "molecular scissors", works on the principle of cooperation between a complex of nucleic acids and special enzymes. The origin of the CRISPR/Cas mechanism is in the immune system of Bacteria and Archaea, but due to its ease of use, speed, and low financial cost, it has become a very popular and widely used tool within a short period of time. Whether the applications are in the field of studying genes, disease mechanisms, therapeutic treatment or the creation of genetically engineered organisms, this technology is associated with many ethical and moral issues and risks. The aim of this work is to summarize the development, principle, implemented or potential applications across different types of organisms and disciplines, as well as to list the potential risks and their minimizing.

Keywords:

CRISPR technology, Cas proteins, CRISPR/Cas complex, genes, genome engineering, mutations, DSB

Obsah

Úvod	9
Seznam zkratk.....	10
1. Systém CRISPR/Cas	14
1.1 <i>Součásti CRISPR/Cas systému.....</i>	<i>14</i>
1.2 <i>Klasifikace CRISPR/Cas systému.....</i>	<i>16</i>
1.2.1 <i>CRISPR/Cas systémy třídy 1</i>	<i>16</i>
1.2.2 <i>CRISPR/Cas systémy třídy 2</i>	<i>17</i>
1.3 <i>Mechanismus CRISPR/Cas systému</i>	<i>19</i>
2. Historie CRISPR/Cas technologie.....	22
3. Využití metod CRISPR/Cas.....	26
3.1 <i>Metody genového inženýrství.....</i>	<i>26</i>
3.2 <i>Principy opravy DNA.....</i>	<i>29</i>
3.2.1 <i>Nehomologní spojování konců (NHEJ).....</i>	<i>29</i>
3.2.2 <i>Homologně řízená oprava (HDR/HR)</i>	<i>30</i>
3.3 <i>Využití metody CRISPR/Cas u bakterií, hub a řas</i>	<i>33</i>
3.3.1 <i>Prokaryotické organismy</i>	<i>33</i>
3.3.2 <i>Houby</i>	<i>34</i>
3.3.3 <i>Řasy a mikrořasy</i>	<i>35</i>
3.4 <i>Využití metody CRISPR/Cas u rostlin.....</i>	<i>36</i>
3.5 <i>Využití metody CRISPR/Cas u živočichů.....</i>	<i>38</i>
3.6 <i>Využití metody CRISPR/Cas u lidí</i>	<i>39</i>
4. Rizika metody CRISPR/Cas a jejich potenciální řešení	42
4.1 <i>Tvorba DBS</i>	<i>43</i>
4.2 <i>Mozaicismus</i>	<i>44</i>

<i>4.3 Off-target štěpení DNA.....</i>	<i>44</i>
<i>4.4 Gene drive</i>	<i>45</i>
<i>4.5 Doprava komplexu CRISPR/Cas do buňky.....</i>	<i>45</i>
<i>4.6 Toxicita proteinu Cas9</i>	<i>46</i>
<i>4.7 Rizika spojená s viry, jejich vektory a cílovými geny.....</i>	<i>46</i>
<i>4.8 Legislativa spojená s genovou manipulací a GMO</i>	<i>47</i>
Diskuse.....	49
Závěr	53
Seznam použité literatury	54
Seznam použitých obrázků a tabulek	71

Úvod

Molekula DNA je nositelkou dědičné informace a každá její úprava v sobě nese potenciální riziko ohrožující základní životní funkce. Poškození nukleové kyseliny může být způsobeno působením přirozených intracelulárních faktorů, jakými jsou nukleázy nebo reaktivní formy kyslíku. Dalšími mutageny mohou být i vnější faktory v podobě ionizujícího záření a ultrafialového světla (Cortez, 2015). Tato práce se ale zabývá uměle vyvolanými změnami genetické informace, mezi něž patří i úpravy vytvořené CRISPR/Cas. Tato metoda umožňuje vytvářet takové změny v DNA, které jsou oproti těm přirozeně vzniklým přesnější, specifitější a bezpečnější.

Ačkoliv se první zmínky o záhadných sekvencích CRISPR v genomu bakterií objevily teprve na konci minulého století a dlouhou dobu se nevědělo, co se za těmito pravidelně se opakujícími repeticemi ukrývá, v současné době už víme, že se nejedná pouze o náhodné úseky. V rámci výzkumů se několikrát potvrdila informace, že tyto sekvence vysvětluje jako důsledek přirozeného imunitního systému zástupců domén Bacteria a Archea. Princip fungování metody CRISPR/Cas lze po určité modifikaci využít jako nástroj v běžné šlechtitelské i medicínské praxi.

Cílem mé práce je zachytit základní informace o této pokrokové metodě genového inženýrství, seznámit čtenáře s jednotlivými funkčními a stavebními prvky samotného komplexu CRISPR/Cas, ale i s jeho principem fungování. Spolu s tím bych chtěla poukázat na široké spektrum aplikací napříč celou živou říší, od bakterií a dalších jednoduchých organismů, přes houby a rostliny až k živočichům a lidem. Ačkoliv se zdá tato metoda z pohledu odborné veřejnosti velmi pokroková a revoluční, nikdo neví, jaký je její potenciál, co vše nám může do budoucna přinést a co naopak její používání může způsobit. Ať už se tedy tato technologie v pozitivním světle ukáže jako účinný nástroj pro diagnostiku a léčbu chorob nebo řešení s udržitelným hospodářstvím, nesmíme nikdy zapomínat na negativa v podobě etické otázky a jiných rizik.

Seznam zkratek

A	– adenin, purinová nukleová báze
AAV	– adeno-asociovaný virus (<i>Adeno-Associated Virus</i>)
AdVs	– adenoviry (<i>AdenoViruses</i>)
ATP	– adenosintrifosfát
BER	– oprava vyjmutí báze (<i>Base Excision Repair</i>)
BioGRID	– Obecný biologický repozitář pro interakční datasety (<i>Biological General Repository for Interaction Datasets</i>)
BIR	– replikace vyvolaná zlomem (<i>Break-Induced Replication</i>)
bp	– pár bazí (<i>base pair</i>)
BSL	– úrovně biologické bezpečnosti (<i>BioSafety Levels</i>)
C	– cytosin, pyrimidinová nukleová báze
CARF	– CRISPR asociovaný Rossmannův záhyb (<i>CRISPR-Associated Rossmann Fold</i>)
CARMEN	– kombinatorické uspořádané reakce pro multiplexní hodnocení nukleových kyselin (<i>Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleic acids</i>)
Cas	– CRISPR asociovaný protein (<i>CRISPR associated protein</i>)
Cas9n	– nikáza CRISPR asociovaného proteinu 9
Cascade	– komplex spojený s CRISPR pro antivirovou obranu (<i>CRISPR-associated complex for antiviral defense</i>)
CDSCO	– Ústřední organizace pro standardní kontrolu léčiv (<i>Central Drugs Standard Control Organisation</i>)
Clostron	– univerzální systém pro genový knock-out pro rod <i>Clostridium</i>
cOA	– cyklické oligoadenyláty
Cpf1	– centromerní a promotorový faktor 1 (<i>Centromere and promoter factor 1</i>)
CRISPR	– seskupené pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice (<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
CRISDA	– metoda amplifikace pomocí štěpení vlákna vyvolaná endonukleázami spuštěnými CRISPR/Cas9 (<i>CRISPR-Cas9-triggered nicking endonuclease-mediated Strand Displacement Amplification method</i>)
CRISPRa	– CRISPR aktivace
CRISPRi	– CRISPR interference

crRNA	– CRISPR RNA
ctRNP	– komplex skládající se z crRNA, tracrRNA a Cas9 ribonukleoproteinu
dCas	– protein Cas bez nukleolytické aktivity (<i>dead Cas</i>)
DETECTR	– CRISPR transkripční reportér zacílený na endonukleázu DNA (<i>DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter</i>)
DNA	– deoxyribonukleotidová kyselina (<i>DeoxyriboNucleic Acid</i>)
DSB	– dvouvláknový zlom (<i>Double Strand Break</i>)
DSBR	– oprava dvouřetězových zlomů (<i>Double-Strand Break Repair</i>)
DVR	– přímá variabilní opakování (<i>Direct Variable Repeats</i>)
E-CRISPR	– CRISPR elektrochemický biosenzor (<i>CRISPR Electrochemical biosensor</i>)
eIF(iso)4E	– iniciační faktor translace u eukaryotických buněk 4E (<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E</i>)
eSpCas9	– varianta SpCas9 se zvýšenou specifitou mající menší mimocílovou aktivitu („ <i>enhanced specificity</i> ” SpCas9)
EC	– Evropská komise (<i>European Commission</i>)
EU	– Evropská unie
FLASH	– hledání ojedinělých sekvencí za pomoci hybridizace (<i>Finding Low Abundance Sequences by Hybridization</i>)
Fok1/FokI	– restriční endonukleáza z bakterie <i>Flavobacterium okeanoikoites</i>
G	– guanin, purinová nukleová báze
GLP	– Projekt genetické gramotnosti (<i>Genetic Literacy Project</i>)
GMO	– geneticky modifikovaný organismus (<i>Genetically Modified Organism</i>)
gRNA	– vodící RNA (<i>guide RNA</i>)
HD	– histidin(H)-aspartátová(D) doména
HDR	– homologně řízená oprava zlomů nukleových kyselin (<i>Homology-Directed Repair</i>)
HEK293	– buněčná linie lidských embryonálních ledvinových buněk (<i>Human Embryonic Kidney cells</i>)
HEPN	– nukleotidy vázající doména vyšších eukaryot a prokaryot (<i>Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-binding domain</i>)
HIV	– virus lidské imunitní nedostatečnosti (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HNH	– histidin(H)-asparagin(N)-histidinová(H) doména

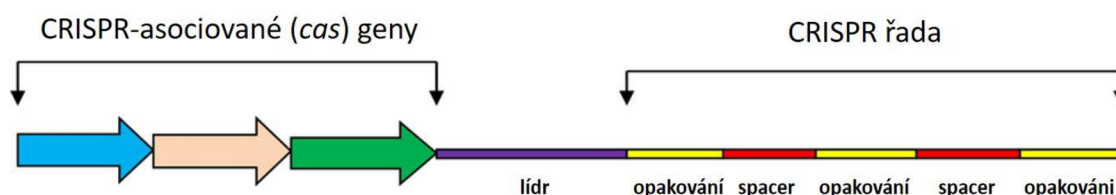
HOLMES	– hodinový nízkonákladový multifunkční a vysoce účinný systém (<i>an one-Hour Low-cost Multipurpose highly Efficient System</i>)
HPV	– lidský papilomavirus (<i>Human PapillomaVirus</i>)
HypaCas9	– velmi přesná varianta Cas9 (<i>Hyper-accurate Cas9 variant</i>)
CHO buňky	– vaječné buňky křečička čínského (<i>Chinese Hamster Ovary cells</i>)
iap	– izoenzym alkalické fosfatázy (<i>isozyme of alkaline phosphatase</i>)
InDel	– inserce a delece (<i>Insertion-Deletion</i>)
kbp	– jednotka délky nukleotidového řetězce – tisíc párů bazí (<i>kilobase pair</i>)
LCTR	– dlouhý klastr tandemových repetit (<i>Long Cluster of Tandem Repeats</i>)
LTRR	– dlouhé tandemově se opakující opakování (<i>Long Tandemly Repeated Repetitive</i>)
MMEJ	– mikrohomologicky zprostředkované spojování konců zlomů v nukleové kyselině (<i>Microhomology-Mediated End Joining</i>)
mRNA	– messengerová RNA (<i>messenger RNA</i>)
N	– jakákoliv nukleotidová báze
NASBACC	– amplifikace založená na sekvenci nukleové kyseliny štěpené CRISPR technologií (<i>NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) CRISPR Cleavage</i>)
NGT	– nové genomické techniky (<i>New Genomic Techniques</i>)
NHEJ	– nehomologní spojování konců zlomů v nukleové kyselině (<i>Non-Homologous End-Joining</i>)
NHP	– nehumánní primáti
NUC lalok	– nukleázový lalok (<i>NUClease lobe</i>)
ORCS	– Otevřený repozitář CRISPR screeningů (<i>Open Repository of CRISPR Screens</i>)
PAM	– protospaceru přilehlý motiv (<i>Protospacer Adjacent Motif</i>)
pegRNA	– prime editing navádějící RNA (<i>prime editing guide RNA</i>)
pre-crRNA	– prekurzorová CRISPR RNA
PRRS	– reprodukční a respirační syndrom prasat (<i>Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome</i>)
RAMP	– opakující se asociované „záhadné“ proteiny (<i>Repeat Associated Mysterious Proteins</i>)
REC lalok	– rozpoznávací lalok (<i>RECognition lobe</i>)
RNA	– ribonukleová kyselina (<i>RiboNucleic Acid</i>)

RNAi	– RNA interference
RuvC	– doména podobná Ruv doméně resolvázy u <i>Escherichia coli</i>
RVD	– opakující se variabilní zbytky (<i>Repeat Variable Residue</i>)
S fáze	– syntetická fáze buněčného cyklu
SDSA	– žíhání vláken závislé na syntéze (<i>Synthesis-Dependent Strand Annealing</i>)
sgRNA	– jediná samostatně navádějící RNA (<i>single guide RNA</i>)
SHERLOCK	– specifické enzymatické hlásiče s vysokou citlivostí pro odhalení umístění (<i>Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing</i>)
SHINE	– optimalizované zvýrazňování infekcí pro navigaci během epidemií (<i>Streamlined Highlighting of Infections to Navigate Epidemics</i>)
SPIDR	– mezi spacery vložené přímé repetice (<i>SPacer Interspaced Direct Repeats</i>)
Sp(y)Cas9	– <i>Streptococcus pyogenes</i> CRISPR asociovaný protein 9
SRSR	– krátké pravidelně rozmístěné opakování (<i>Short Regularly Spaced Repeats</i>)
SSA	– jednovláknové žíhání (<i>Single-Strand Annealing</i>)
SSB	– jednovláknový zlom na vlákně DNA (<i>Single-Stranded Break</i>)
ssDNA	– jednovláknová DNA (<i>single-stranded DNA</i>)
T	– thymin, pyrimidinová nukleová báze
TALE	– efektor aktivující transkripci (<i>Transcription Activator-Like Effector</i>)
TALENs	– nukleázy s motivem podobným transkripčnímu aktivátoru (<i>Transcription Activator-like Effector Nucleases</i>)
tracrRNA	– trans-aktivační CRISPR RNA (<i>trans-activating crRNA</i>)
TREP	– tandemové repetice (<i>Tandem REPeats</i>)
TuMV	– virus tuřínové mozaiky (<i>Turnip Mosaic Virus</i>)
USA	– Spojené státy americké
ZF	– zinkový prst (<i>Zinc Finger</i>)
ZFN	– nukleázy s motivem zinkových prstů (<i>Zinc-Finger Nucleases</i>)

1. Systém CRISPR/Cas

1.1 Součásti CRISPR/Cas systému

CRISPR/Cas představuje adaptivní imunitní systém prokaryotických organismů založený na schopnosti zachytit fragmenty cizorodé DNA (např. viru) a uložit si je do organizovaného lokusu ve svém genomu. Tento tzv. CRISPR lokus (Obr. 1) byl již prokázán u přibližně 40 % osekvenovaných bakterií a 90 % archeí (Makarova *et al.*, 2015). Jeho hlavní částí je řada CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), v překladu seskupené pravidelně rozmístěné krátké palindromické¹ repetice, představující úseky prokaryotické DNA (23-74 bp), které jsou pravidelně odděleny segmenty exogenní DNA (30-40 bp), tzv. mezerníky (*spacers*).

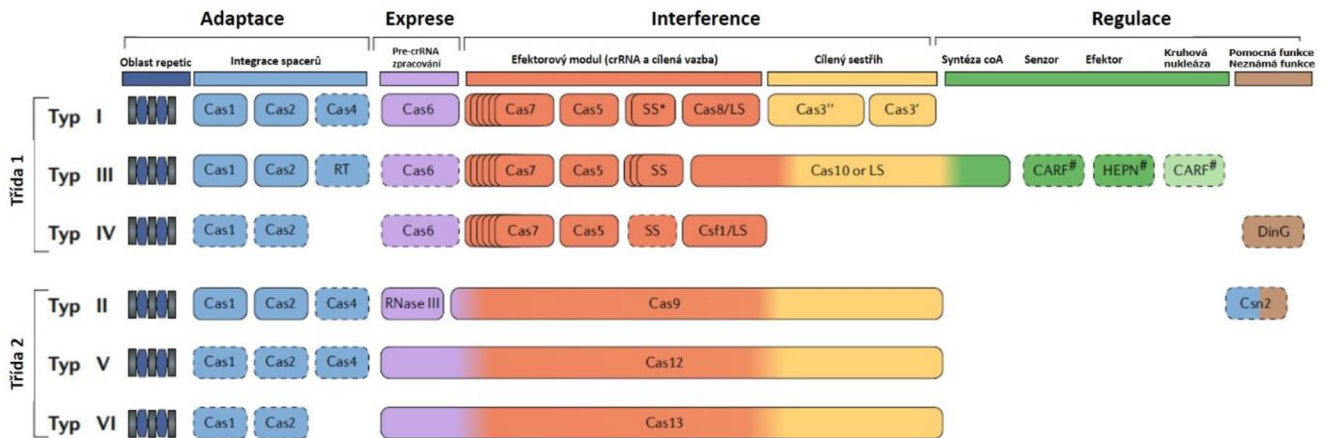


Obr. 1: Schéma CRISPR lokusu (převzato a upraveno z Barman *et al.*, 2020)

Další důležitou součástí CRISPR lokusu jsou tzv. CRISPR-asociované (*cas*) geny, které obklopují repetice s mezerníky. Existuje množství rozmanitých *cas* genů, které zastávají různou funkci a kódují proteiny patřící do nejméně 45 proteinových rodin (Haft *et al.*, 2005). Tyto proteiny mohou působit jako nukleázy, helikázy a RNA vážící proteiny (Makarova *et al.*, 2002). Fungují buď samostatně, nebo jsou součástí velkých vícepodjednotkových proteinových komplexů. To představuje jeden z hlavních znaků, podle kterého se CRISPR/Cas systémy klasifikují (Obr. 2). Některé Cas proteiny, jako například Cas1 a Cas2 jsou vysoce konzervované a vyskytují se ve všech typech CRISPR/Cas systémů (Mojica *et al.*, 2009; Makarova *et al.*, 2020). Cas9 je v současnosti nejznámější a nejpoužívanější nukleázou v experimentech

¹ palindrom – sekvence, která má při čtení z obou stran stejné pořadí nukleotidů (Morávková, 2017)

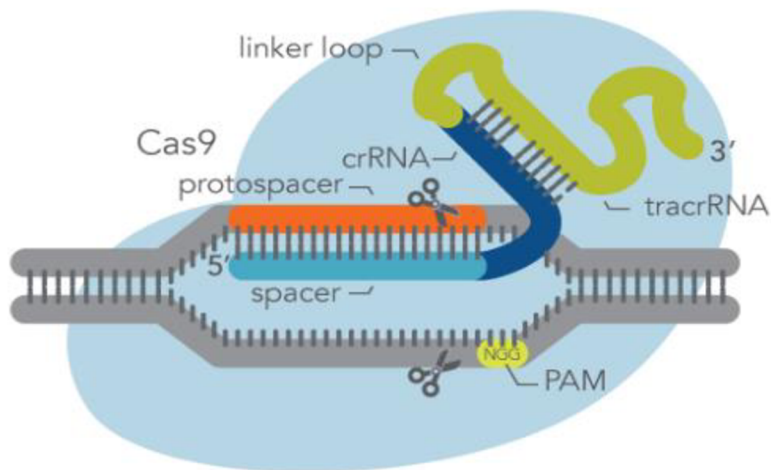
CRISPR. Konkrétně varianta Cas9 izolovaná z bakterie *Streptococcus pyogenes* (SpyCas9) disponuje nejen nukleázovou aktivitou, která slouží k rozštěpení vazby mezi nukleotidy, ale zároveň i schopností helikázovou a to nezávisle na zdroji energie (ATP) (Jiang *et al.*, 2016).



Obr. 2: Funkční klasifikace Cas proteinů (převzato a upraveno z Makarova *et al.*, 2020)

Klíčovou složkou CRISPR/Cas systémů je i specifická sekvence tzv. naváděcí RNA (*guide* RNA, gRNA), která rozpoznává oblast zájmu v cílové DNA (Obr. 3). Jedná se o chimérickou RNA skládající se z CRISPR RNA (crRNA) a trans-aktivační CRISPR RNA (tracrRNA). Každá gRNA obsahuje naváděcí spacer sekvenci (20 bp) na 5'-konci, která je komplementární k sekvenci DNA cílového místa (*protospacer*). Na 3'-konci obsahuje speciální smyčku (*linker loop*), která váže Cas protein (Ding *et al.*, 2016). Díky vzájemné komplementaritě spacerové oblasti na crRNA a protospacerové oblasti v samotné DNA je tak možné „vystříhnout“ cílený kus genetické informace. Avšak k zahájení této vazby crRNA-DNA jsou absolutně nezbytné krátké nukleotidové sekvence PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) dlouhé 2-5 bp nacházející se v bezprostřední blízkosti sekvence protospaceru. Díky PAM je pak CRISPR/Cas komplex schopen správně rozpoznat cizorodou nukleovou kyselinu (Amitai *et Sorek*, 2016). Nejčastější PAM sekvencí odvozenou od *S. pyogenes* je 5'-NGG-3' (kde „N“ může být jakákoli nukleotidová báze), která se běžně používá pro Cas9 nukleázu (Ding *et al.*, 2016). Výzkumy ukázaly, že SpyCas9 může také slabě rozpoznávat motivy 5'-NGA-3', 5'-NNGG-3' a další sekvence,

což odráží obecnou preferenci purinů a také určitou flexibilitu v oblasti PAM (Collias *et Beisel*, 2021).



Obr. 3: Schéma CRISPR/Cas9 systému s gRNA (převzato z <https://eu.idtdna.com/pages/technology/crispr/crispr-genome-editing>)

1.2 Klasifikace CRISPR/Cas systému

Počet a rozmanitost známých systémů CRISPR/Cas se v posledních letech podstatně zvýšily. Nejnovější klasifikace zahrnuje 2 třídy, 6 typů a 33 podtypů (Makarova *et al.*, 2020). Všechny proteiny Cas lze rozdělit do čtyř odlišných, i když částečně se překrývajících funkčních modulů (Obr. 2). Adaptační modul je společný pro většinu známých CRISPR/Cas systémů a obsahuje geny kódující nejvíce uplatňované proteiny Cas1 a Cas2 podléjící se na inzerci spacerů do CRISPR lokusů. Zjistilo se, že do této funkce se u velké části CRISPR/Cas systémů zapojuje i další protein Cas4, ačkoliv zůstává jeho mechanismus nejasný (Lee *et al.*, 2019).

1.2.1 CRISPR/Cas systémy třídy 1

Do této třídy řadíme tři základní typy: typ I, typ III a typ IV. Jedná se o rozšířenější třídu, jež má za efektorový komplex větší počet Cas proteinů – jmenovitě Cas3 (někdy fúzované s Cas2), Cas5–Cas8, Cas10 a Cas11, v různé kombinaci v závislosti na typu a podtypu (Makarova *et al.*, 2020). Základ těchto efektorových komplexů ve všech třech typech třídy 1 tvoří proteiny z nadrodiny RAMP (*Repeat Associated*

Mysterious Protein), kam patří například Cas5 a Cas7, které jsou obvykle přítomny ve více kopiích. Ve většině systémů CRISPR/Cas třídy 1 je přítomen i třetí RAMP protein – Cas6, který představuje RNázu zodpovědnou za zpracování prekurzorové crRNA (pre-crRNA) a může nebo nemusí být fyzicky spojen s efektorovým komplexem (Makarova *et al.*, 2020). CRISPR systémem třídy 1 disponuje velké množství zástupců Archaea (hypertermofilové) a bakterií (Barman *et al.*, 2020).

CRISPR/Cas systémy typu I obsahují ve všech lokusech charakteristický gen *cas3*, nebo jeho varianty *cas3'*, jež kódují velký protein s aktivitou ATP-dependentní ssDNA translokázy/helikázy. V mnoha CRISPR/Cas systémech je fúzován s HD-nukleázovou doménou a degraduje cizorodou DNA tím, že ji redukuje na fragmenty o délce 10 bp. Tím dojde k znefunkčnění exogenní DNA v rámci procesů nazývaných „interference CRISPR“ (He *et al.*, 2020).

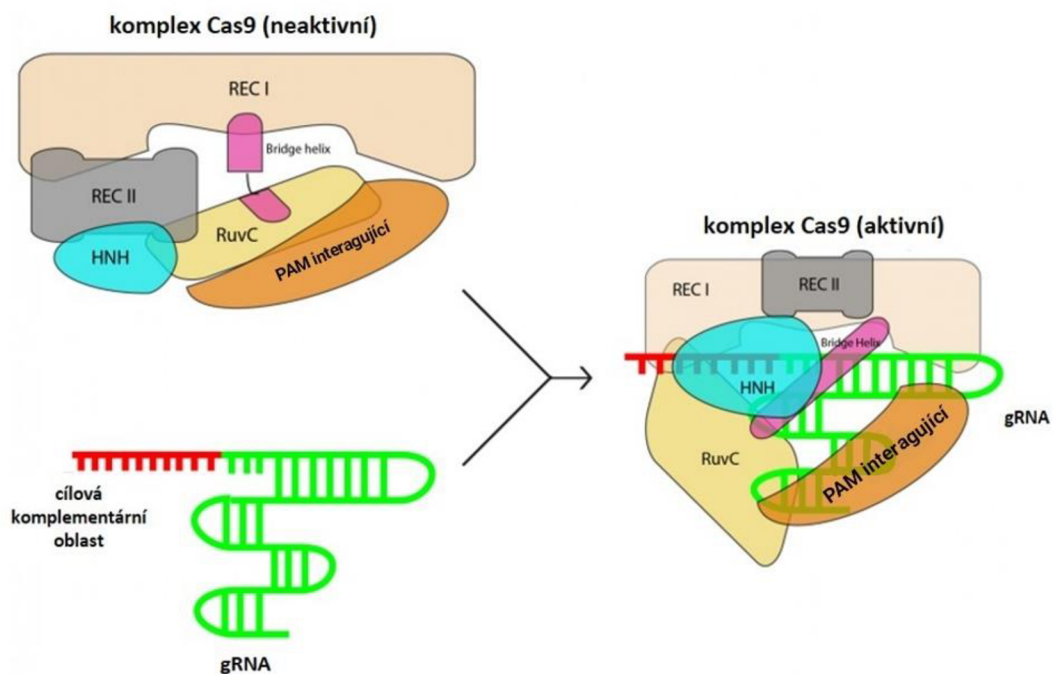
CRISPR/Cas systémy typu III jsou charakteristické výskytem genu kódujícího protein Cas10, který kromě aktivity DNázy (fúze s HD nukleázovou doménou) vykazuje i katalytickou aktivitu při převádění ATP na cyklické oligoadenyláty (cOA). Tyto signální molekuly následně aktivují další RNázy (z proteinových domén CARF (Csm6, Csx1) a HEPN) pro nespecifickou degradaci RNA, v případech kdy je cíl lokalizován v pozdě exprimovaných genech nebo pokud obsahuje neshody se spacerem (Wang *et al.*, 2019; Makarova *et al.*, 2020).

Typ IV CRISPR/Cas systémů postrádá adaptační moduly i nukleázy potřebné pro CRISPR interferenci. Identifikované byly pouze RAMP proteiny Cas5 a Cas7 a to na základě jejich sekvenční podobnosti s jejich protějšky v jiných typech CRISPR/Cas systémů. Srovnávací studie efektorových komplexů naznačuje, že systémy typu IV by mohly být vysoce odlišné deriváty typu I nebo typu III (Makarova *et al.*, 2020).

1.2.2 CRISPR/Cas systémy třídy 2

Obdobně jako u první třídy systémů se i zde vyskytují 3 typy: typ II, typ V a typ VI. Na rozdíl od třídy 1 se však systémy vyznačují efektorovými moduly, které se skládají jen z jednoho multidoménového proteinu, jako například Cas9, Cas12 nebo Cas13. Tento systém se přirozeně vyskytuje u bakterií, ale ne u hypertermofilů (Barman *et al.*, 2020).

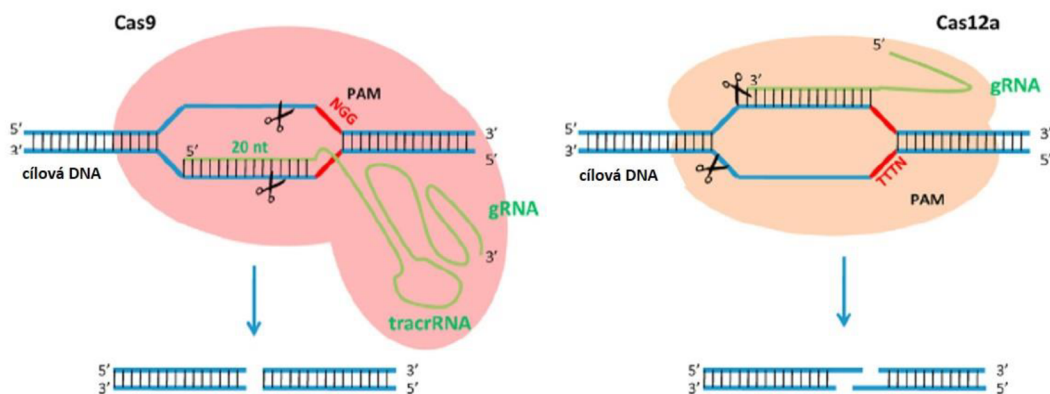
Typ II CRISPR/Cas systémů je význačný přítomností genu *cas9*, který kóduje vícedoménový protein s endonukleázovou aktivitou. Cas9 je v současnosti nejběžnějším a nejlépe prostudovaným efektorovým Cas proteinem. Jak již bylo zmíněno, je zodpovědný za lokalizaci a štěpení cílové DNA jak v přirozených, tak v umělých CRISPR/Cas systémech. Cas9 prostorově tvoří dva laloky: rozpoznávací (REC – *recognition*) a nukleázový (NUC – *nuclease*), které celkově zahrnují šest domén (Obr. 4). REC lalok zahrnuje domény REC1, REC2 a bridge helix. NUC lalok se skládá z domén RuvC, HNH a PAM-interagující (Jínek *et al.*, 2014; Nishimasu *et al.*, 2014). RuvC a HNH domény slouží ke generování dvouřetězcového zlomu (DSB) v cílovém místě v přítomnosti PAM sekvence (Singh, 2020).



Obr. 4: Schéma struktury proteinu Cas9 a jeho aktivace s gRNA (převzato a upraveno z Cavanagh *et Garity*, 2014)

Systémy typu V se liší od typu II doménovou architekturou. Efektory typu II obsahují dvě nukleázové domény (RuvC a HNH), kdežto efektory typu V (Cas12) obsahují pouze jednu doménu podobnou RuvC (Makarova *et al.*, 2020). Další rozdíly (Obr. 5) spočívají v tom, že systém CRISPR/Cas9 rozpoznává motiv 5'-NGG-3' a vytváří dvouřetězcové zlomy s tupým zakončením blízko místa PAM, zatímco systém CRISPR/Cas12a rozpoznává motiv 5'-TTTV-3' (kde „V“ může být zastoupeno

A, C nebo G) a vytváří stupňovité zlomy vzdáleně od oblasti PAM (Svitashev *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017). Tyto dva proteiny jsou tak použitelné pro editaci genů v různých genomických kontextech. Cas9 lze použít pro editaci oblastí bohatých na guanin a cytosin a naopak Cas12a lze použít pro editaci oblastí bohatých na adenin a thymin (Tang *et Fu*, 2018).



Obr. 5: Rozdíly systémů CRISPR/Cas9 a CRISPR/Cas12a (převzato a upraveno z Ouedraogo *et Tsang*, 2020)

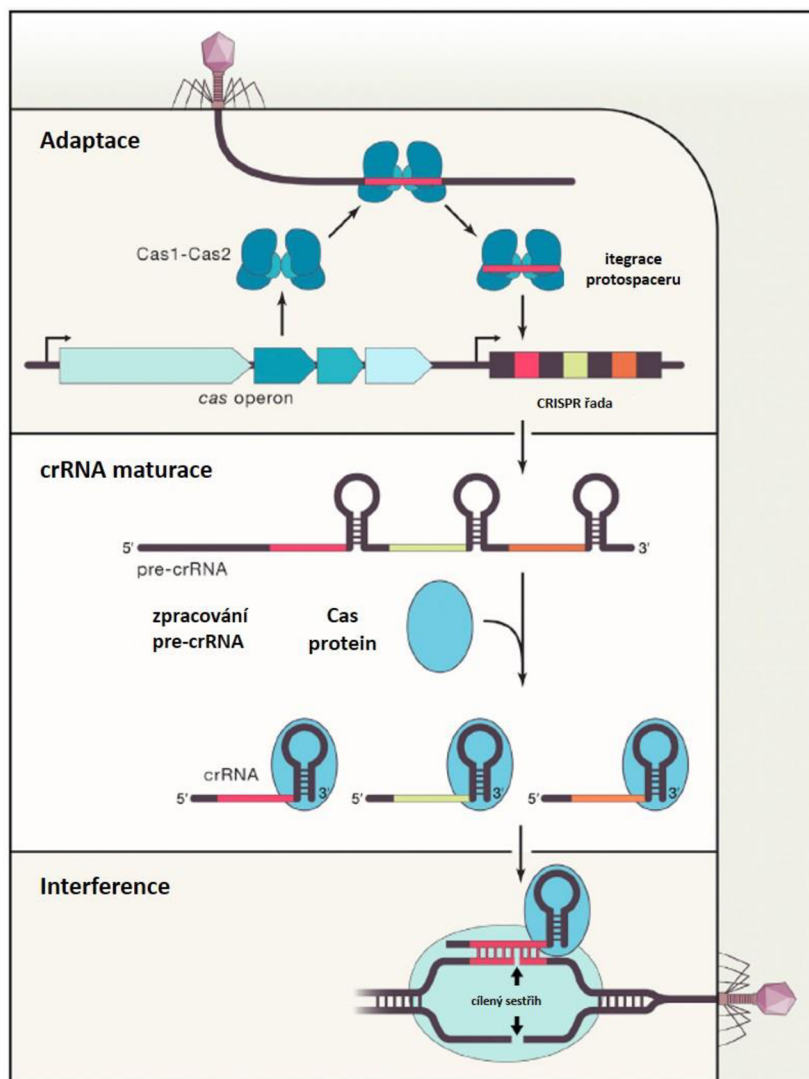
Systémy typu VI jsou charakteristické zejména proteinem Cas13, ale od typů II a V se navíc odlišují i přítomností dvou domén HEPN (Makarova *et al.*, 2020). Proteiny Cas13 fungují podobně jako Cas9. Avšak kromě programovatelné aktivity RNázy vykazují také kolaterální, nespecifickou aktivitu, která je spouštěna rozpoznáním cíle a indukuje dormanci u bakterií infikovaných virem (Meeske *et al.*, 2019). RNázová aktivita umožňuje navázání na RNA i DNA. Díky tomu byl tento typ využit k vývoji citlivé diagnostické metody pro detekci bakterií, virů a mutací v genech způsobujících rakovinné bujení (Singh, 2020).

1.3 Mechanismus CRISPR/Cas systému

Základní mechanismus CRISPR/Cas systému lze rozdělit do tří fází: adaptace, maturace a interference (Obr. 6).

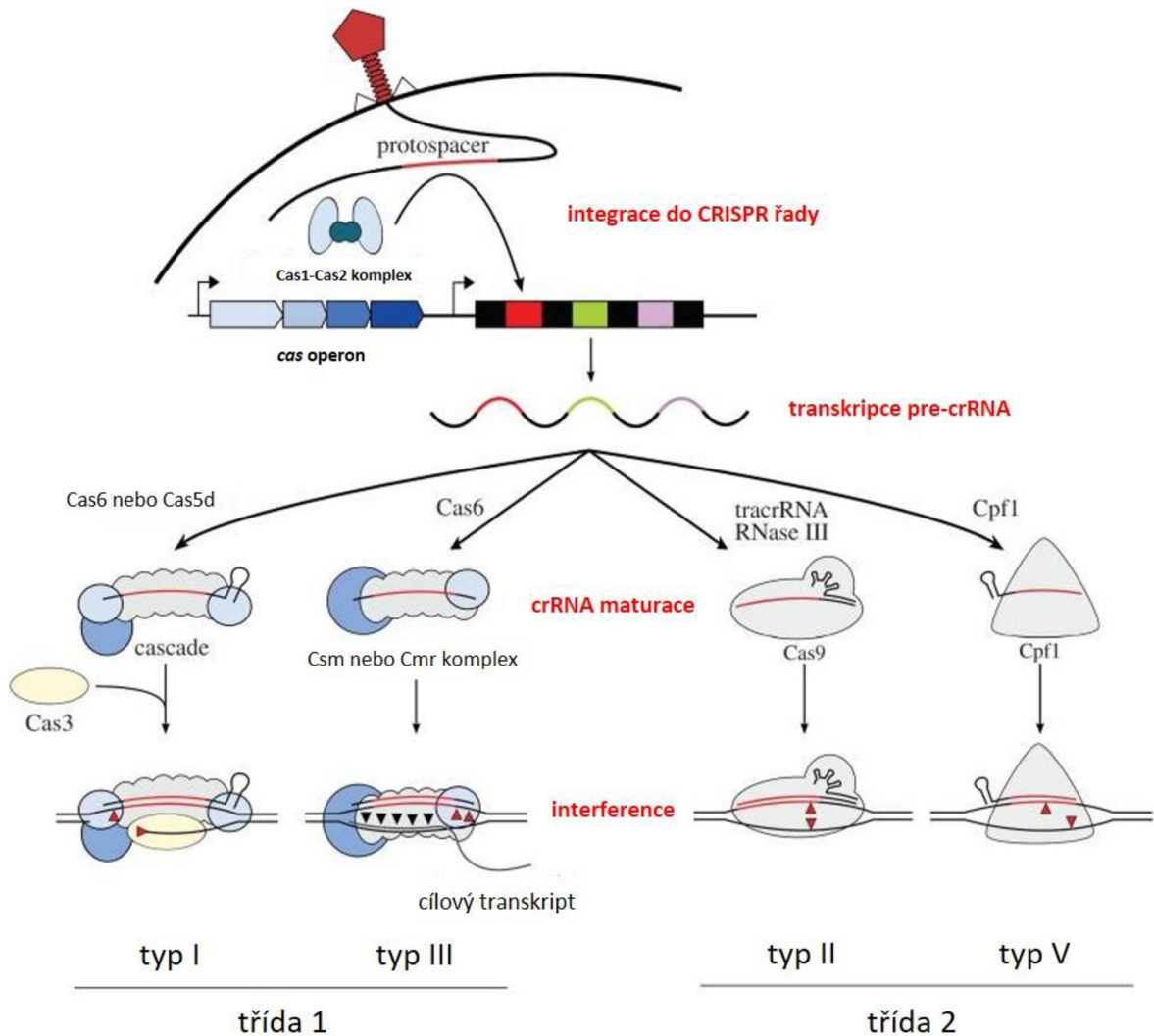
První fáze – fáze adaptace nebo akvizice, je komplexní, víceetapový proces. Dochází tu k rozeznávání cizorodé DNA, kde klíčovou roli sehrává většinou PAM sekvence, která pomáhá rozlišit cizorodou DNA od vlastní. Následuje vystřížení

sekvence prekursoru mezerníku z této DNA, tzv. extrakce protospaceru (30-40 bp) a následně jeho uložení do CRISPR řady jako spaceru (Barrangou *et al.*, 2007). Nejdůležitějšími funkčními jednotkami v této fázi jsou proteiny Cas1 a Cas2, vedoucí sekvence a první CRISPR repetice (Makarova *et al.*, 2015). Cas1 a Cas2 jsou obvykle kódovány ve stejném operonu a tvoří strukturálně stabilní proteinový komplex. Avšak pro získávání spacerů je nezbytná především endonukleázová aktivita proteinu Cas1. Protein Cas2 vykazuje různé aktivity štěpení DNA a RNA, ale není pro správnou funkci CRISPR adaptace nezbytně nutný (Amitai *et Sorek*, 2016).



Obr. 6: Obecný mechanismus CRISPR/Cas (převzato a upraveno z Hille *et al.*, 2018)

Fáze maturace, také označována jako fáze exprese nebo biogeneze crRNA, zahrnuje proces přepisu CRISPR oblasti do dlouhé prekurzorové CRISPR RNA, která je dále v CRISPR/Cas systémech typu I a III zpracovávána proteinem Cas6 (u typu I-C i proteinem Cas5d). Maturaci crRNA v systémech typu II zabezpečuje tracrRNA, RNáza III a protein Cas9, zatímco v systémech typu V-A stačí pro zrání crRNA samotný efektorový protein Cpf1 (Obr. 7; Hille *et* Charpentier, 2016).



Obr. 7: Funkční složky mechanismu CRISPR/Cas systému třídy 1 a 2 (převzato a upraveno z Hille *et* Charpentier, 2016)

V interferenční fázi u CRISPR/Cas systémů typu I je proteinový komplex „Cascade“ veden crRNA k navázání cizí DNA sekvenčně specifickým způsobem a následně rekrutuje protein Cas3, který degraduje cílový transkript

prostřednictvím své exonukleolytické aktivity. Systémy CRISPR/Cas typu III-A a III-B využívají pro štěpení komplexy Csm a Cmr, systém typu II zase ribonukleoproteinový komplex sestávající z proteinu Cas9 a tracrRNA:crRNA duplexu. V systémech typu V je za degradaci cíle zodpovědný efektorový protein Cpf1 (Obr. 7; Hille *et al.*, 2016).

2. Historie CRISPR/Cas technologie

První zmínka o existenci CRISPR podobných struktur se objevila v roce 1987. Během výzkumu profesora Yoshizumiho Ishina byla objevena první sekvence repetice u bakterie *Escherichia coli*. Při analýzách genů zahrnutých v metabolismu fosfátu bylo zjištěno, že gen *iap*, zodpovědný za izoenzymovou konverzi alkalické fosfatázy, nese na 3' konci neobvyklou strukturu. Jednalo se o pět vysoce konzervativních sekvencí s 29 nukleotidy opakujícími se v přímých repeticích s mezerníky o délce 32 nukleotidů (Ishino *et al.*, 1987).

V té době trvalo sekvenování několik měsíců a nikdo nevěděl, k čemu tyto opakující se sekvence v bakteriální buňce slouží. Ačkoli biologická funkce systému CRISPR nebyla ještě objasněna, vědci našli způsob, jak využít informace zakódované v lokusech CRISPR pro genotypizaci různých kmenů bakterií: zpočátku pro *Mycobacterium tuberculosis* (Groenen *et al.*, 1993) a později pro *Streptococcus pyogenes* (Hoe *et al.*, 1999). Jak se ukázalo, lokusy CRISPR měly vysoký stupeň polymorfismu u různých kmenů stejného druhu bakterií a to umožnilo jejich identifikaci v klinických podmínkách.

Významný průlom v chápání biologické funkce CRISPR sekvencí nastal až s objevem podobné struktury v archeálním genomu *Haloferax mediterranei* (Mojica *et al.*, 1993). Jejich přítomnost ve dvou evolučně vzdálených doménách naznačil velký funkční význam a posloužil jako impuls pro další výzkum. Mojica si všiml podobnosti prvků, které popsal v Archaea, s dříve nalezenými repeticemi DNA v bakteriálních genomech a byl jedním z prvních vědců, kteří vyslovili hypotézu, že tyto neobvyklé sekvence zahrnují fragmenty cizí DNA a jsou ve skutečnosti součástí imunitního systému bakterií a archeí (Mojica *et al.*, 1995).

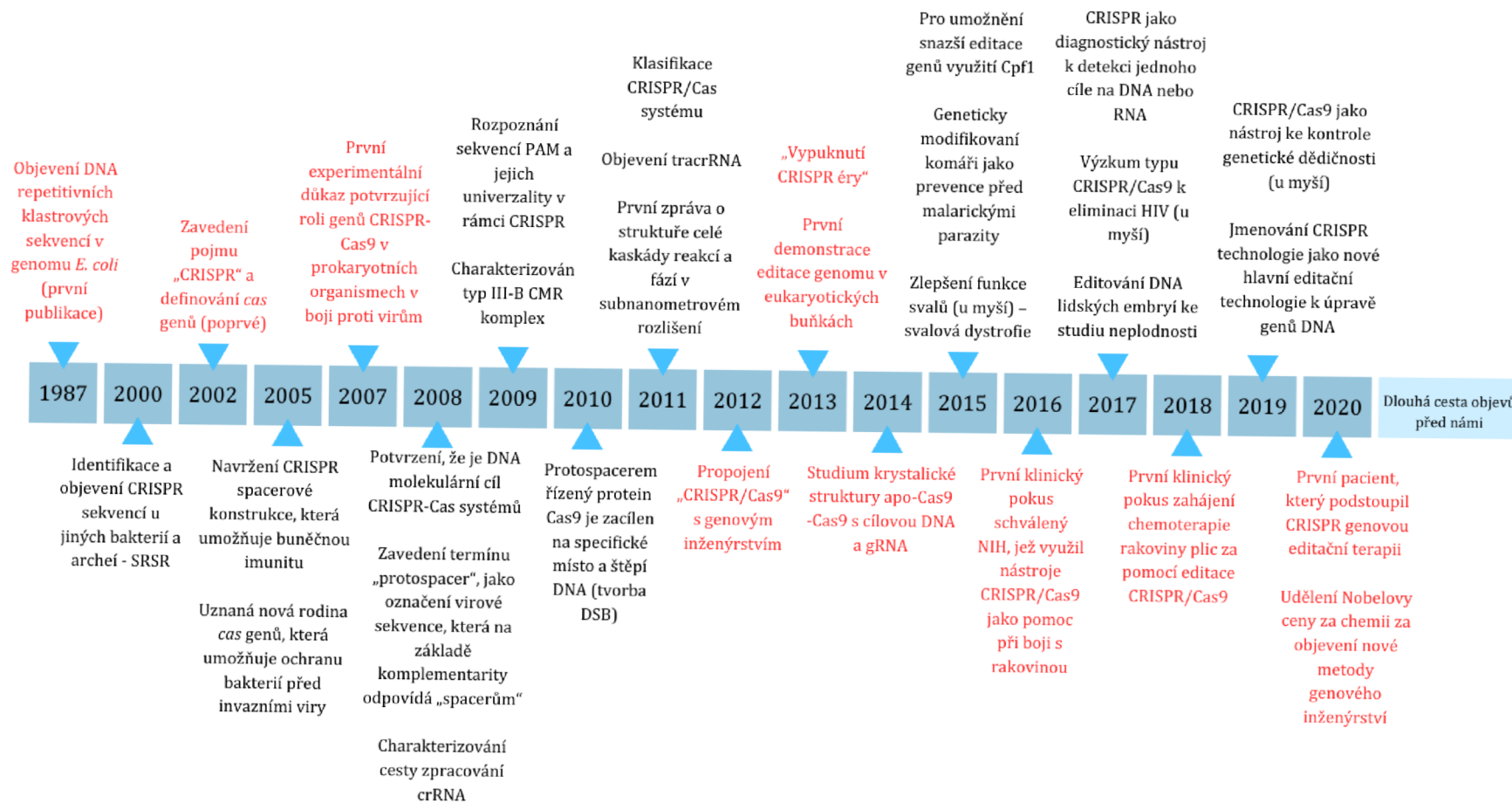
V důsledku rozmachu genomické éry se tyto struktury potvrzovaly ve stále větším počtu bakteriálních a archeálních genomů. Popsány však byly několika různými názvy: *Long Tandemly Repeated Repetitive* (LTRR) (Masepohl *et al.*, 1996), *Long Cluster of Tandem Repeats* (LCTR) (Nelson *et al.*, 1999), *Spacer Interspaced Direct Repeats* (SPIDR) (Jansen *et al.*, 2002a), *Tandem Repeats* (TREP) (Mojica *et al.*, 1995), *Direct Variable Repeats* (DVR) (Aranaz *et al.*, 2004), nebo *Short Regularly Spaced Repeats* (SRSR) (Mojica *et al.*, 2000). První, kdo použil termín *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats* (CRISPR), byl molekulární biolog Ruud Jansen (2002b). Jak sám uvádí, z důvodu většího množství objevitelů těchto repetitivních sekvencí, vznikly matoucí odlišné názvy. Proto, aby se ustanovila jednotná nomenklatura, domluvila se skupina okolo Jansena a Mojicy na používání pojmu CRISPR ve všech budoucích pracích (Jansen *et al.*, 2002b).

Stejná publikace (Jansen *et al.*, 2002b) byla první, která popsala přítomnost genů asociovaných s repeticemi CRISPR (*cas1-4*). Tyto geny byly nalezeny v těsné blízkosti CRISPR lokusů různých prokaryot a dva z nich obsahovaly motivy charakteristické pro helikázu a nukleázu, což podpořilo hypotézu o cílené asociaci genů *cas* s CRISPR oblastí a jejich zapojení do reparačních systémů DNA. Funkční spolupráci CRISPR/Cas komplexu neodmyslitelně spojil Barrangou *et al.* (2007), který zjistil, že sice mezerníky obsažené v CRISPR oblasti zodpovídají za rozeznání cizorodé DNA, ale výslednou rezistenci zajišťují Cas proteiny. Při inaktivaci genu kódujícího protein Cas9 (v práci označován ještě jako *cas5* ne *cas9*) totiž došlo ke ztrátě rezistence i přesto, že genom stále obsahoval daný mezerník. Garneau *et al.* (2010) pokus inaktivace genů zopakoval a potvrdil, že protein Cas9 je v rámci proteinů asociovaných s CRISPR typu II jako jediný zodpovědný za štěpení cílové DNA.

Jelikož celý systém CRISPR/Cas9 připomínal eukaryotický mechanismus umlčování genů pomocí RNAi (Makarova *et al.*, 2006), začala se věnovat velká pozornost myšlence, že by se CRISPR/Cas9 mohl využívat pro úpravu eukaryotických genomů. Roku 2012 se vědcům podařilo celý systém zdokonalit a využít. CRISPR z bakteriální buňky byl tak přeměněn na nástroj pro úpravu genů (Mittal, 2019). Jen o rok později, roku 2013, byly publikovány první dva významné články, které se staly skutečným průlomem v technologii úpravy genomu.

CRISPR/Cas9 byl použit pro cílené úpravy u savčích buněk (Mali *et al.*, 2013; Cong *et al.*, 2013). Následovala celá řada studií a pokroků, které významně přispěli k transformaci CRISPR/Cas systému jako nástroje genového inženýrství (Obr. 8).

Vývoj metody pro editaci genomu založené na technologii CRISPR/Cas9 byl oceněn Nobelovou cenou za chemii v roce 2020, méně než deset let po objevu všech hlavních molekulárních složek systému. Hlavní úlohu zde sehrály zejména Emmanuelle Charpentier a Jennifer Doudna, které učinily klíčové objevy v oblasti manipulace DNA systémem CRISPR/Cas. Šlo především o úpravy endonukleázy Cas9, které umožnily použití CRISPR/Cas9 v praxi jako tzv. „genetické nůžky“ (Gostimskaya, 2022).



Obr. 8: Hlavní milníky vývoje CRISPR/Cas9 systému (převzato a upraveno z Chavez-Granados *et al.*, 2022)

3. Využití metod CRISPR/Cas

3.1 Metody genového inženýrství

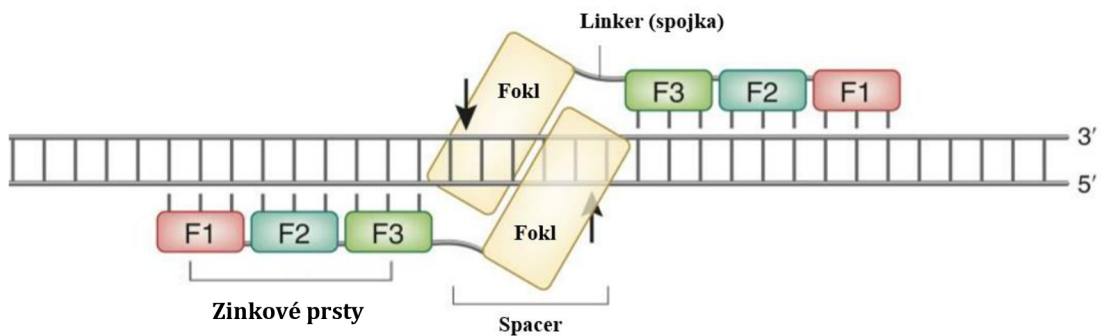
Genové inženýrství je obor, který svými nástroji umožnil prozkoumat složité genové interakce, ale i budovat a tvořit cesty nové za pomoci syntetické biologie. Svého největšího rozmachu se tato oblast vědy dočkala na konci 70. let minulého století. Zprvu se jednalo pouze o základní pokusy, při nichž se exogenní DNA náhodně integrovala do genomu bakterií a kvasinek. Avšak pozdější výzkumy ukázaly, že by mohl tento postup po určité modifikaci probíhat i cíleně (Gearing, 2015).

Milníkem v rozvoji metod editace genomů byl především objev nukleáz. Nejpoužívanějšími technikami byly metody, založené na nukleázách s motivem zinkových prstů (*Zinc-Finger Nucleases*, ZFNs, Obr. 9) a nukleázách s motivem podobným transkripčnímu aktivátoru (*Transcription Activator-like Effector Nucleases*, TALENs, Obr. 10), přičemž metoda TALEN byla upřednostňována před ZFN. Jedním z důvodů bylo snazší vytvoření proteinu, který spojuje DNA vázající opakující se domény TALE s jednotlivými bázemi v upravovaném genomu (Joung *et al.*, 2013), ale i vytvoření konvenčních webových nástrojů a protokolů pro vektorový design a konstrukci TALE (Luo, 2019).

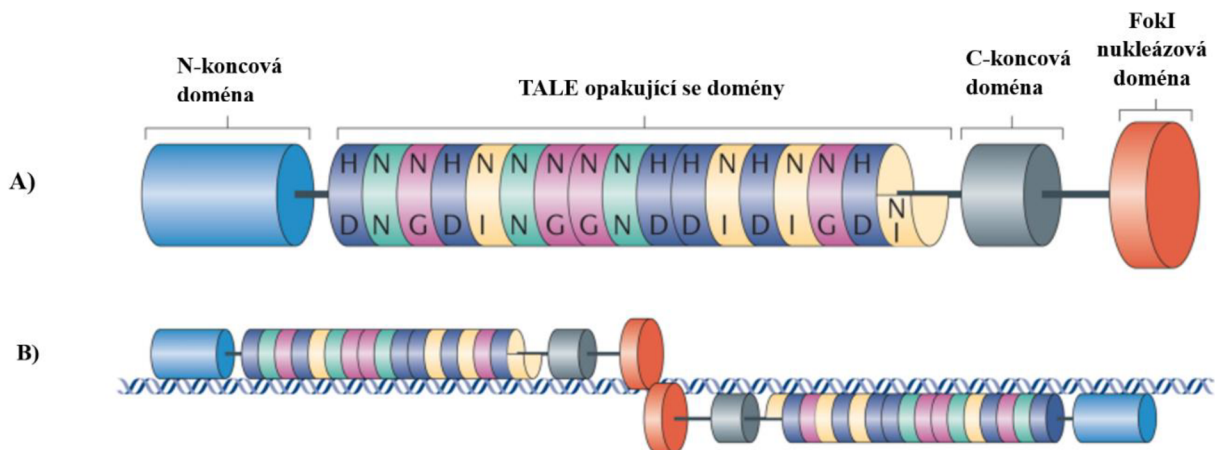
Významně k tvorbě těchto protokolů a postupů přispěl i výzkum Daniela F. Voyta (Luo, 2019). S americkým vědcem A. J. Bogdanove sepsali jednu z prvních rešeršních prací popisující dosavadní získané informace a využití metody TALENs (Bogdanove *et al.*, 2011). Ve stejném roce vyšla i vědecká studie zaměřená na efektivní navrhování a tvorbu specifických TALENs pro přesné cílení na DNA (Cermak *et al.*, 2011). Později se podílel na výzkumech zaměřených na využití metody TALENs. Spolu se Zhang *et al.* (2013) a Shan *et al.* (2013) se pokoušel lépe prozkoumat využití této metody genového inženýrství u rostlin tabáku (Zhang *et al.* 2013), rýže a traviny *Brachypodium* (Shan *et al.*, 2013). Do té doby se především aplikovala a zkoumala metoda TALENs u zvířat. Mimo jiné se Voyta podílel i na výzkumu D. F. Carlsona zabývajícím se využitím TALENs při modifikaci genomu hospodářských zvířat (Carlson *et al.*, 2012), genové korekci nemoci motýlích křídel (*epidermolysis bullosa*) (Osborn *et al.*, 2013), úpravy chromosomu Y u myší (Wang

et al., 2013) nebo u zkoumání a porovnání účinnosti metod ZFNs a TALENs při úpravě genomu organismu *Drosophila melanogaster* (Sander et al., 2010).

Výzkum v oblasti genového inženýrství zaznamenal celkově ohromné zrychlení, které dalo možnost vzniku moderní éře editace genomů s lepší přesností a specifičností. Jako nejnovější alternativa pro editaci genomů přibyla technika odvozená od CRISPR/Cas systémů a její různé modifikace (Khan, 2019). Ačkoli tato platforma získala velkou pozornost a uplatnění, metody ZFNs a TALENs zůstávají svým způsobem stále jedinečné a často aplikované.



Obr. 9: Obecné schéma ZFN komplexu navázaného na DNA. V místech označených šipkou dochází ke štěpení a tvorbě DSB. Jednotlivé Fok1 restriční domény jsou od sebe vzdáleny 4 bp. Zinkové „prsty“ jsou v tomto případě číslovány od N konce (převzato a upraveno z Carroll et al., 2011)



Obr. 10: Stavba komplexu TALEN. A) TALEN domény B) TALEN dimér (převzato a upraveno z Joung et Sander, 2013)

Oproti dimerním metodám ZFNs a TALENs, má monomerní CRISPR/Cas systém rozdílný mechanismus působení. První dvě zmíněné technologie jsou založené na dimerizaci restriční endonukleázy FokI a dvou ZF resp. TALE proteinů, které rozpoznávají cílovou sekvenci prostřednictvím interakce protein-DNA. Specifická rozpoznávací aktivita tak závisí pouze na proteinové struktuře samotného endonukleázového dimeru ZFN resp. TALEN (Sergeeva *et al.*, 2019). Oproti tomu CRISPR/Cas rozpoznává cílové sekvence prostřednictvím párování bází RNA-DNA. Štěpící protein Cas9 zůstává při opakovaném použití stejný a pro zacílení zvoleného genu stačí připravit pouze novou syntetickou gRNA. CRISPR/Cas tak může být navržen pro jakékoli genomové cíle, a dokonce i multiplexován přidáním více gRNA (Wang *et al.*, 2013). Oproti metodám TALENs a ZFNs tak není potřeba přepracovávat štěpící proteiny pokaždé, když je chceme zacílit na novou sekvenci (Horvath *et Barrangou*, 2013). Hlavní výhodou CRISPR/Cas systému je tak jeho časově nenáročná a zároveň i méně finančně nákladná příprava (Sergeeva *et al.*, 2019). Systém CRISPR/Cas9 je nepopíratelně jednodušší, levnější a efektivnější, avšak všechny tři techniky mají svá úskalí či omezení (Tab. 1). Jejich implementace je proto často ponechávána na uvážení výzkumníka.

Tab. 1: Srovnání metod genového inženýrství (převzato a upraveno z Rahim *et al.*, 2021)

	Specifita	Náročnost inženýrství	Enzymy	Rozpoznávací součást	Metody doručení do buňky
ZFNs	malý počet pozičních neshod	proteinové inženýrství	Fok1 nukleáza	vzor zinkových prstů	malá velikost umožňuje vstup virovými vektory
TALENs	malý počet pozičních neshod	klonovací metody komplexních molekul	Fok1 nukleáza	oblast TALE proteinu obsahující RVD tandemové repetice	problematický rozměrný komplex komponentů
CRISPR/Cas9	poziční či po sobě jdoucí neshody	oligosyntéza a standardní klonovací metody	Cas9 nukleáza	jednovláknová gRNA	objemná SpCas9, problematické balení (AVV)

3.2 Principy opravy DNA

Základním principem editace genomu je schopnost navodit v DNA dvouvláknové zlomy (DSB), které později indukují různé způsoby opravy, díky čemuž lze genetickou informaci editovat na předem specifikovaném místě. Dvouřetězcové zlomy DNA jsou nejnebezpečnějším typem poškození DNA, protože mohou vést ke ztrátě velkých chromozomálních oblastí, následné chromozomální přestavbě, genomové nestabilitě a buněčné smrti (Chang *et al.*, 2017). DSB jsou často způsobeny náhodnými událostmi na náhodných místech. Existují ale důkazy o tom, že některé oblasti v genomu jsou k těmto zlomům DNA náchylnější. Těmto oblastem se říká rekombinační hotspoty. U eukaryot pak také některé buňky umí samy DSB indukovat za účelem genetické rozmanitosti (Currall *et al.*, 2013). Zlomy v DNA se u somatických buněk savců vyskytují spontánně až padesátkrát denně, nejčastěji kvůli reaktivním formám kyslíku nebo ionizujícímu záření. V těchto případech se však často tvoří pouze SSB – jednovláknové zlomy (Stinson *et Loparo*, 2021).

Při vytvoření DSB, zahajuje buňka okamžitou reparaci své genetické informace. Opravný systém DSB je všudypřítomnou součástí všech živých buněk (Ding *et al.*, 2016) a probíhá prostřednictvím dvou odlišných signálních drah, nehomologním spojováním konců (*Non-Homologous End-Joining*, NHEJ) nebo homologně řízenou opravou (*Homology-Directed Repair*, HDR) resp. homologní rekombinací (*Homologous Recombination*, HR).

3.2.1 Nehomologní spojování konců (NHEJ)

U nehomologického spojování konců DNA dochází nejprve k rozpoznání DSB Ku heterodimerem (Ku70/Ku80), jež funguje jako „nakládací protein“. Díky němu se na dané místo mohou vázat další NHEJ proteiny podle potřeby, slouží tedy jako podpůrná struktura ke spojování konců. Na obnově vlákna DNA se účastní komplexy polymeráz, nukleáz a ligáz. Tyto proteinové enzymy mohou působit na DSB v jakémkoliv pořadí, aby resekovaly či přidávaly nové nukleotidy. Aktivita polymeráz a nukleáz na každém ze dvou konců DNA by měla být dle výzkumů nezávislá (Chang *et al.*, 2017).

Celý proces je však náchylný k chybám, neboť NHEJ systém opravy není vždy schopný spojit dva konce DNA bez ztráty nukleotidu, či bez adice nového páru bází

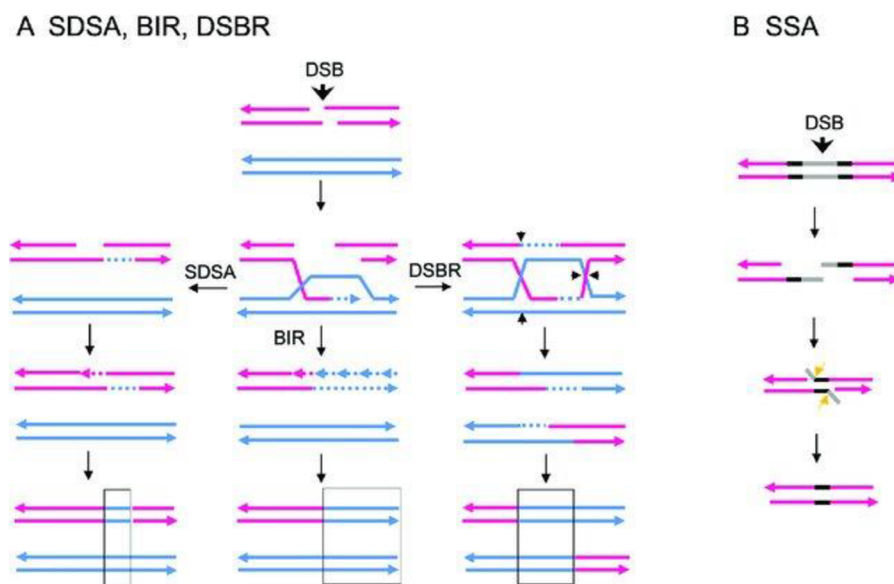
(Chang *et al.*, 2017). Tato nedokonalá oprava tak vede k mutacím jako: delece, inserce, inverze nebo translokace (Svitashev *et al.*, 2015). Chyby InDel generované v průběhu oprav jsou typicky malé (1-10 bp), ale extrémně heterogenní. V důsledku toho existuje asi dvoutřetinová šance, že bude po výsledné opravě způsoben posun čtecího rámce. Na druhou stranu NHEJ dokáže dokončit opravu většiny zlomů v řádu desítek minut. V porovnání s HDR se jedná o řádově rychlejší opravu (McDade *et al.*, 2015).

Nehomologické spojování konců NHEJ k opravě DSB využívají především organismy z domény Eukaryota. Praktická aplikace systému CRISPR/Cas pro editaci genomu eukaryotických buněk se proto ve světě vědy ujala velmi rychle (Ishino *et al.*, 2018). Díky metodě CRISPR/Cas9 bylo umožněno vložení až 5 kbp dlouhého plazmidu do genomu právě prostřednictvím NHEJ (Singh *et al.*, 2017). Podobné pokusy byly prováděny u savčích HEK293 buněk nebo u CHO buněk (Bachu *et al.*, 2015). K NHEJ zprostředkované inserci pak může napomáhat i štěpení DNA za pomoci Cpf1 (Kim *et al.*, 2017; Zetsche *et al.*, 2015). CRISPR by se tak jednou mohl stát kvalitním a spolehlivým nástrojem inserce velké cizí DNA do cílených genomových míst v savčích buňkách a být tak jednou ze stabilnějších a účinnějších platforem pro produkci požadovaných rekombinantních proteinů (Singh *et al.*, 2017).

3.2.2 Homologně řízená oprava (HDR/HR)

Při této cestě opravy může vést vytvoření DSB na DNA specifickou nukleázou k vyšší účinnosti inserce exogenního donorového DNA úseku. Pokud však není fragment přítomen, aktivují se endogenní dráhy NHEJ. Ty sice opraví zlom, ale jak bylo výše zmíněno, často zavedou chybné mutace narušující produkci funkčního produktu (Pattanayak *et al.*, 2014). Nicméně pokud fragment donorové DNA homologní s lemující sekvencí přítomen je, dochází k opravné cestě HDR (Ding *et al.*, 2016). Díky požadavku na přesnější sekvenční homologie mezi poškozeným a intaktním řetězcem DNA můžeme opravu HDR považovat za preciznější mechanismus oprav DSB (Cortez, 2015). Nevýhodou této opravy je ale omezenost na S a G2 fáze buněčného cyklu, zatímco NHEJ může nastat během kterékoli fáze (Heyer *et al.*, 2010).

Celý proces opravy je rozdělen do tří kroků. V prvním dochází k vytvoření zlomu v řetězci DNA. Na 3'-konci vlákna se ponechává krátký přesah, který slouží jako primer a také jako místo k navázání proteinů potřebných pro reparaci. Další krok začíná vytěsněním jednoho řetězce homologního duplexu DNA jiným invazivním vláknem. Vzniklá hybridní DNA (původní a uměle dodané vlákno DNA) se označuje jako vytěšňovací smyčka (*D loop – displacement loop*). V posledním kroku jsou vzniklé rekombinační produkty rozděleny a proces opravy DNA je dokončen. Výše popsaný postup je pouze obecný, podle specifických mechanismů ve druhém a třetím kroku můžeme totiž rozlišit čtyři různé cesty: SSA, DSBR, SDSA nebo BIR (Obr. 11) (Cortez, 2015).

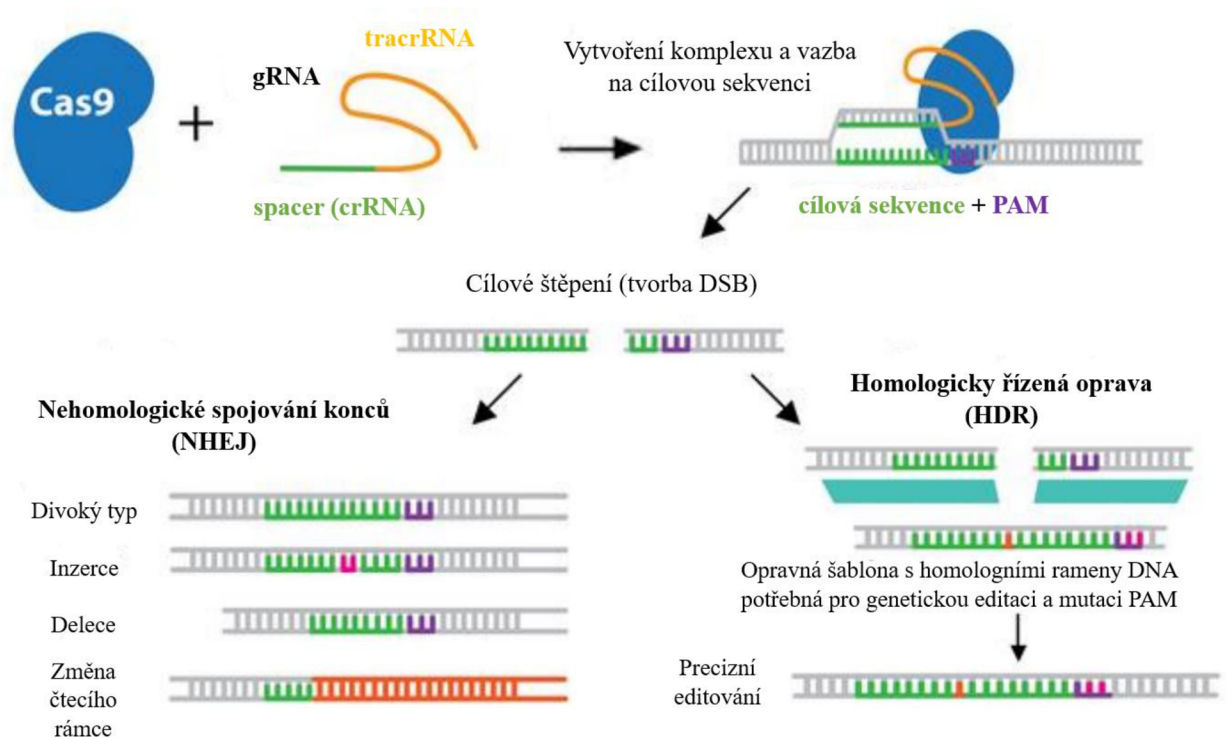


Obr. 11: Cesty homologní rekombinace: (A) Oprava dvouřetězcového zlomu (DSB) žiháním řetězce závislým na syntéze (SDSA), replikací indukovanou zlomem (BIR) a opravou dvouřetězcového zlomu (DSBR); (B) dráhou jednořetězcového žihání (SSA) (převzato z Qi *et al.*, 2023)

3.2.3 Oprava DSB pomocí metod genového inženýrství

Dříve používané metody TALENs a ZFNs dokázaly po vytvoření zlomu aktivovat HDR, nicméně konkurenční reparace pomocí NHEJ stále převažovala a vedla k nechtěným mutacím v původním vlákně DNA. Bylo tak důležité vytvořit obecnou metodu, jež by směřovala spíše k opravě cestou HDR. Pokusy s nikázami odvozenými od ZFN, jež dokázali štěpit pouze jeden řetězec namísto obou, dokázaly tuto rovnováhu posunout směrem k HDR (Joung *et Sander*, 2013). Proto se pozdější

výzkum zaměřil na zformování takové metody, kterou by bylo možné štěpit jen jedno vlákno DNA, nebo by ke tvorbě zlomů nedocházelo vůbec.



Obr. 12: CRISPR/Cas9 opravy DSBs pomocí NHEJ nebo HDR (převzato a upraveno z Adhikari *et Poude*, 2020)

Editace genomu na bázi CRISPR/Cas umožňuje účinnou a přesnou manipulaci s genomem. Je však důležité si uvědomit, že tato účinnost a přesnost závisí také primárně na výběru opravné dráhy DSB. Oprava prováděná cestou NHEJ obvykle vede k inzerčním/delečním mutacím (InDel) či posunu čtecího rámce (Obr. 12). To může následně způsobit vyřazení genů, či problémy s proteosyntézou. Proto se během vývoje metod editace genomu vynakládá rozsáhlé úsilí ke kontrole regulačních mechanismů jednotlivých drah. Cílem je upřednostnění přesné editace pomocí HDR nebo specifických indelů pomocí MMEJ (*Microhomology-Mediated End Joining*). Chauhan *et al.* (2023) ve své publikaci uvádí přehledné shrnutí několika přístupů, kterými se vědci snažili zvýšit efektivitu ve prospěch přesných úprav DSB.

Jednalo se o změny v návrhu, stabilizaci nebo lokalizaci templátu, inhibici NHEJ malou molekulou, synchronizaci buněk v buněčných cyklech a modulaci regulačních faktorů, které potlačují HDR a MMEJ (Chauhan *et al.*, 2023).

3.3 Využití metody CRISPR/Cas u bakterií, hub a řas

3.3.1 Prokaryotické organismy

U prokaryotických organismů nebyla metoda CRISPR/Cas natolik revoluční jako u eukaryotických. Rozvoj aplikací u prokaryot byl pomalejší, ale přesto se rychle přizpůsobil zejména několika druhům bakterií průmyslového a biomedicínského významu. Pro tyto bakteriální druhy byla primárně k editaci genomu vyvinuta řada klasických genetických metod, jako sebevražedné plazmidy, λ -Red system, nebo metoda Clostron. Tyto metody jsou však vysoce pracné a často vykazují nekonzistentní účinnost. V tomto ohledu se proto současným nejmodernějším přístupem v editaci genomu bakterií stala kombinace homologní rekombinace templátu DNA s cílením DNA pomocí programovatelných nukleáz ze systémů CRISPR/Cas (Arroyo-Olarte *et al.*, 2021).

Nejčastěji se editace bakteriálního genomu provádí za účelem antibakteriálních strategií, jako je výroba nových antibiotik, fágová terapie, diagnostika nebo výroba vakcín. Užitečnost těchto nástrojů spočívá i v pomoci při zacílení a úpravě patogenních bakteriálních genomů pro pochopení a zmírnění jejich mechanismů virulence, patogenity a rezistence vůči lékům (Krishnamurthy *et al.*, 2016). Naopak u užitečných bakterií, neboli těch co mají pozitivní vliv na lidskou populaci, se cíleně zasahuje do jejich genomu kvůli dosažení vyšší odolnosti k okolnímu prostředí, snazšímu a produktivnějšímu průmyslovému využití nebo rychlejšímu růstu (Singh, 2017).

Oproti asi 40 % bakterií jsou CRISPR/Cas systémy přirozeně obsaženy u asi 85 % archeálních genomů. Pro organismy z této domény bylo však vyvinuto pouze několik genetických nástrojů a CRISPR/Cas byl doposud zaveden a aplikován jen u druhů: *Sulfolobus solfataricus* (Zebec *et al.*, 2014), *Sulfolobus islandicus* (Li *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2015), *Haloferax volcanii* (Stachler *et al.*, 2016) a *Methanosarcina acetivorans* (Nayak *et al.*, 2017; Gophna *et al.*, 2017). Archaea významně přispívají ke globálnímu koloběhu živin a mají také obrovský ekonomický potenciál, který byl dosud plně realizován pouze při výrobě termostabilních polymeráz (Jarrel *et al.*, 2011). Methanogenní archaea hraje zase ústřední roli v globálním uhlíkovém cyklu s hlubokými důsledky pro změnu klimatu (Nayak *et al.*, 2017).

3.3.2 Houby

S houbami, jakožto surovinou využívanou ke konzumaci či přípravě fermentovaných jídel a nápojů, je lidstvo spjato již několik století. Mimo to jsou houby zdrojem mnohých enzymů, proteinů a bioaktivních sekundárních metabolitů, které mají široké uplatnění v mnoha oborech, včetně lékařství a zemědělství (Ouedraogo *et* Tsang, 2020; Wang *et al.*, 2023). Mezi tyto industriálně či farmaceuticky využívané sloučeniny patří například alkaloidy, polysacharidy, steroidy a terpeny. Některé látky mohou mít i antibakteriální a protinádorové účinky (Satish *et al.*, 2020). Vývoj nástrojů pro úpravu genů, jako je CRISPR/Cas, tak urychluje základní výzkum a využití hub v mnoha směrech.

Prvním geneticky upraveným organismem za pomoci metody CRISPR/Cas9 z této skupiny byl modelový organismus *Saccharomyces cerevisiae* (Ouedraogo *et* Tsang, 2020). Poprvé se o editaci pokusili vědci DiCarlo *et al.* (2013) a o pár měsíců později i Ryan *et al.* (2014). Zhang *et al.* (2014) pak během svého výzkumu konstruovali mutanty polyploidního kmene *S. cerevisiae*, kdy se jim podařilo prokázat u vytvořeného auxotrofického kmene ATCC 4124 mnohem vyšší odolnost vůči inhibitorům kvašení a vysoké teplotě. Mezi další důležité aplikace CRISPR/Cas9 pak patřila editace stejného druhu kvasinek, kdy se za pomoci funkčního knock-in zásahu podařilo vytvořit kmen produkující kyselinu mléčnou (Stovicek *et al.*, 2015). Technologie CRISPR/Cas9 byla následně implementována u mnoha dalších druhů kvasinek a vláknitých hub, jako: *Candida*, *Pichia*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cryptococcus* (Ouedraogo *et* Tsang, 2020).

Pro genomové inženýrství hub se může využít i editace za pomoci dalších Cas proteinů, např. Cas12a, jehož výhodou je jednodušší zpracování crRNA (nevyžaduje tracrRNA) a méně specifická rozpoznávací sekvence PAM (Ouedraogo *et* Tsang, 2020). Praktická aplikace tohoto jiného typu CRISPRu byla použita například u druhů *S. cerevisiae* (Verwaal *et al.*, 2018) nebo *Aspergillus nidulans* (Vanegas *et al.*, 2019).

Systémy CRISPR/Cas lze také použít pro editaci RNA. Tyto nástroje na bázi systémů typu II (Cas9), III (Cmr/Csm) a VI (Cas13), již byly využity pro endogenní knockdown RNA, místně specifickou úpravu RNA nebo sledování RNA v mnoha

organismech včetně hub. U kvasinek se řada proteinů Cas13 používá pro knockdown genu prostřednictvím spuštění degradace mRNA (Cas13a z *Leptotrichia shahii*, *L. wadei*, Cas13d z *Ruminococcus flavefaciens*, Nme1Cas9 z *Neisseria meningitidis*), nebo pro úpravu specifických nukleotidových zbytků (geneticky upravený fúzní protein dCas13-RNA modifikující domény) (Wang *et al.*, 2023).

Jedlé houby jsou taktéž ceněné pro svůj bohatý nutriční obsah a léčivé účinky, ale potřeba vysoce kvalitních a výnosných kmenů rychle narůstá a tradiční metoda šlechtění je neefektivní, časově náročná a pracná. V důsledku toho se techniky molekulárního šlechtění, jako je editace genomu pomocí CRISPR/Cas, ukázaly i v tomto ohledu jako slibná alternativa (Zhang *et al.*, 2023).

Mimo jiné je CRISPR/Cas účinným nástrojem při řešení široké škály zemědělských problémů, včetně rezistence rostlin k houbovým chorobám. Vědci se také domnívají, že by se za pomoci upravených hub CRISPR/Cas metodou mohla provádět bioremediace (Satish *et al.*, 2020).

3.3.3 Řasy a mikrořasy

Mikrořasy jsou mikroskopické fotosyntetické organismy, jež se vyznačují vysokou rychlostí růstu a schopností se přizpůsobovat okolnímu prostředí, z čehož plyne i jejich vysoká rozmanitost v oblasti genetických vlastností. Mají potenciál produkovat biomolekuly s využitím v potravinách, krmivech, kosmetice, nutraceutikách, palivech a dalších aplikacích (Tanwar *et Kumar*, 2020; Dhokane *et al.*, 2023; Gupta *et al.*, 2024). Navíc mikrořasy při výrobě těchto biomolekul zachycují a využívají oxid uhličitý (CO₂) z atmosféry, což pomáhá snižovat emise skleníkových plynů (Onyeaka *et al.*, 2021). Díky jejich vlastnostem se jedná i o potenciální zdroj biopaliva, který je oproti naftě a ropě šetrnější k životnímu prostředí.

Při účelné produkci řas, jakožto organismů schopných poskytnout alternativní zdroj energie, je tak důležité, aby se v rámci genetického inženýrství kladl důraz na tři faktory. Prvním z nich je zvýšení množství produkovaných lipidů (zvýšením exprese klíčových genů zapojených do dráhy jejich biosyntézy), druhým je zvýšení celkové produktivity tj. zvýšení rychlosti růstu a výtěžku na objem

(úpravou genů kódujících faktory podílející se na fotosyntéze) a posledním třetím bodem je narušení konkurenčních metabolických drah (úpravou genů kódujících enzymy metabolismu glukózy, nebo katabolických drah metabolismu lipidů) (Tanwar *et al.*, 2020).

Mezi úspěšné aplikace CRISPR/Cas9 u řas patří například editace genů u *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nannochloropsis* sp., *Thalassiosira pseudinana*, *Phaeodactylum tricornutum* nebo *Coccomyxa* sp. (Tanwar *et al.*, 2020).

3.4 Využití metody CRISPR/Cas u rostlin

Znalosti rostlinných genomů a transkriptomů se každým dnem rozšiřují a otevírají tak možnost vytvářet nové, lepší a odolnější kultivary plodin. Před objevem účinné technologie pro úpravu genomu byla tato schopnost přesně modifikovat rostlinné genomy velmi omezená, ale díky CRISPR/Cas technologii a sekvenčně specifickým nukleázám navrženým k zacílení zvolených míst v genomu je provedení úprav snazší (Ding *et al.*, 2016). Technologie a metody umožňující tvorbu DSB jako CRISPR/Cas mají u rostlin v zásadě tři hlavní aplikace. První z nich je genová mutageneze, jež vede k umlčování genů (tzv. genovým knockoutům). Další možností je editace genů umožňující modifikaci genového produktu nebo metabolické dráhy požadovaným způsobem. Poslední třetí významnou aplikací jsou místně specifické inserce, které napomáhají při šlechtění rostlin (Svitashev *et al.*, 2015). Avšak ve srovnání s genovým knockoutem, je právě inserce nových genů mnohem náročnější a málo účinná. Postupně se jednotlivé skupiny vědců snaží vymyslet metodu, jež by vedla k vyšší účinnosti (Zhang *et al.*, 2021).

Editace genomu rostlin je zacílena především na jejich toleranci vůči biotickým faktorům (bakterie, plísně, viry, hmyz). Ačkoliv je snaha o získání transgenních rostlin odolných vůči patogenům a škůdcům vysoká, konečná úspěšnost zůstává zatím nízká. Příčinou je především skutečnost, že na reakci rostlin k okolnímu prostředí a chorobám nemá vliv pouze jeden gen. Většinou se jedná o působení více genů (Zhang *et al.*, 2021). Pokusy, které se zabývaly umlčováním genů ve snaze zabránit rozvoji různých houbových onemocnění, se úspěšně provedly u pšenice (Wang *et al.*, 2014), rajčat (Nekrasov *et al.*, 2017), vodního melounu (Zhang *et al.*, 2020), rýže (Wang *et al.*, 2016a) či bavlny (Zhang *et al.*, 2021).

al., 2018). U modelového organismu *Arabidopsis* došlo k vypnutí genu *elf(iso)4E* čímž u transgenních jedinců došlo k zisku odolnosti vůči viru tuřínové mozaiky (TuMV) (Zhang *et al.*, 2021). Narušením stejného genu byl upraven i genom okurky (*Cucumis sativus* L.) za vzniku imunitních jedinců vůči ipomiviru a dalším chorobám (Chandrasekaran *et al.*, 2016).

Abiotické stresy, kterými jsou například sucho, obsah solí v půdě, extrémní teploty nebo i znečištěné životní prostředí, mají na rostliny také významný vliv. Nejen že mohou ovlivňovat množství biomasy a výnos, ale i kvalitu. Během úpravy genetické informace rostlin tak odborníci cílí na strukturní a regulační geny, stejně jako na nekódující RNA, které se podílejí na reakci rostlin na různé environmentální faktory. Avšak z důvodu toho, že s jedním stresovým faktorem může být spojeno více genů, bez výrazné dominance jednoho jediného, není v tomto směru zatím dosaženo žádného většího pokroku (Zhang *et al.*, 2021). Můžeme ale najít práce, jež se touto problematikou zabývají. Vědecké výzkumy se zajímaly například o zvýšení tolerance kukuřice vůči suchu (Shi *et al.*, 2017), o zlepšení využití vody v rajčatech za účelem zvládnutí stresu ze zasolení a osmotického stresu (Bouzroud *et al.*, 2020) nebo o rezistenci rýže vůči herbicidním přípravkům (Sun *et al.*, 2016).

CRISPR/Cas se může využít i při snaze o navýšení výnosu plodin. Opět je zde, jako u abiotických stresů, nevýhoda polygenního působení na jeden znak. Bylo však zjištěno, že exprese určitých genů má na výnos plodin negativní vliv. Tím pádem, pokud by se podařilo tento negativně působící gen inhibovat, mohlo by dojít k navýšení produkce. Nejčastěji jsou tyto pokusy prováděny na obilninách, jako je rýže, pšenice a kukuřice. Genetickou úpravou už bylo docíleno větší hmotnosti a velikosti zrn nebo hustších a vzpřímenějších klasů (Zhang *et al.*, 2021).

U hospodářských plodin je důležitý i obsah nutričních a jinak biologicky hodnotných látek jako např. proteinů, sacharidů, olejů a sekundárních metabolitů. Proto se CRISPR/Cas využil k vytvoření např. pšenice s nižším obsahem lepku, nebo rýže s vyšším obsahem amylozy (Zhang *et al.*, 2021). Zhai *et al.* (2020) se snažili u druhu *Brassica napus* za pomoci CRISPR/Cas metody docílit jedinců se žlutými semeny. Oproti přirozeně se vyskytujícím jedincům s černými semeny, mají totiž žlutosemenné rostliny plody bohatší na oleje a bílkoviny. Kvalitou bavlněného vlákna a semen se zase v roce 2023 zabýval Khan *et al.*, (2023).

CRISPR/Cas technologie umožňuje generovat geneticky upravené rostliny i bez tzv. transgenů (Wada *et al.*, 2020) a nachází své uplatnění i v oblasti tzv. molekulárních markerů. Právě díky tomuto funkčnímu spojení se zlepšují standardy v oborech zabývajících se šlechtěním, embryologií nebo taxonomií rostlin (Dheer *et al.*, 2020).

3.5 Využití metody CRISPR/Cas u živočichů

Se stále se zvyšující lidskou populací se čím dál častěji objevuje otázka, jakým způsobem zajistit lidské populaci kvalitní a dostatečnou produkci obživy. Ať už se jedná o rostlinnou či živočišnou produkci, zdají se být současné metody pro příští generace nedostatečné. CRISPR/Cas tak přinesl zcela nový přístup, jež by do budoucna mohl v oblasti živočišné produkce pomoci k vyřešení tohoto problému. Genetické inženýrství na bázi CRISPR/Cas se využívá především pro zlepšení užitkovosti (růst a vývoj kosterního svalstva pro vyšší zisk masa), odolnosti hospodářských zvířat vůči chorobám (např. tuberkulóza, reprodukční a respirační syndrom prasat (PRRS), prionová onemocnění) nebo ke zlepšení produkce biologických produktů (Kumar *et al.*, 2023).

Dále se tato technologie uplatňuje na poli biomedicíny při vytváření přesnějších modelů zvířat pro zkoumání lidských onemocnění (Kumar *et al.*, 2023). CRISPR/Cas umožňuje generování a studium mutací specifických pro pacienta v modelových systémech jako *Drosophila melanogaster*, která je využívána ke studiu neurodegenerativních onemocnění (Lambrechts *et al.*, 2017). Tropická sladkovodní ryba *Danio rerio* se pak uplatňuje při studiu rakoviny, objevování léků nebo při studiu jejích regeneračních schopností (Singh *et al.*, 2017). Mezi mnoha modelovými zvířaty jsou za nejdůležitější v této oblasti považovány myši (Rydell-Törmänen *et al.*, 2019). Vědci dosud úspěšně vytvořili mnoho geneticky modifikovaných myších modelů pro onemocnění jako rakovina, kardiomyopatie, Huntingtonova choroba, albinismus, hluchota, hemofilie B, obezita, porucha cyklu močoviny a svalová dystrofie (shrnutí v Xu *et al.*, 2020). Díky anatomické a fyziologické podobnosti s lidmi se ve velké míře využívají i prasata. Pro tvorbu nových metod terapeutické léčby tak byla záměrně vytvořena prasata s Huntingtonovou chorobou (Yan *et al.*, 2018), aterosklerózou (Huang *et al.*, 2017) či Parkinsonovou chorobou (Wang *et al.*, 2016b). Z hlediska genetického základu,

ve srovnání s jinými zvířecími modely, jsou nejvhodnější nehumánní primáti (NHP), kteří vykazují až 93% homologii s lidským genomem (Liang *et al.*, 2022). Proto jsou NHP hlavní volbou pro studium lidských onemocnění jako srdeční vady, diabetes, infekční, jaterní a neurodegenerativní onemocnění. Podobnost s lidmi ve struktuře a funkci mozku dělá z NHP jedinečný model také pro výzkum jeho poruch u lidí. Mezi tři hlavní NHP nejčastěji používané jako model lidských onemocnění patří *Macaca fascicularis* (makak jávský), *Macaca mulatta* (makak rhesus) a *Callithrix jacchus* (kosman bělovousý) (Kang *et al.*, 2019).

S pokrokem ve světě vědy souvisí i stále se zlepšující podmínky ve zdravotnictví. V důsledku toho se tak zvyšuje šance na delší dobu života. Občas se ale setkáváme s problematikou dárcovství orgánů. I přes mnohé snahy se stále číslo vhodných dárců nerovná počtu potřebných příjemců. Vědci se tak proto zabývají možnostmi, jak vytvořit chimérického živočicha pomocí techniky CRISPR/Cas, který by v sobě mohl potenciálně „nosit“ orgán kompatibilní s lidským tělem (Jamil *et al.*, 2023).

Technologie CRISPR/Cas nachází své uplatnění i v oblasti environmentálních aplikací. Ať už se jedná o obnovu ekosystémů, problematiku ohrožených druhů nebo monitoring prostředí, poskytuje tato čím dál častěji používaná metoda potenciální řešení. Možným uplatněním je studium genetické diverzity ohrožených druhů, kdy po analýze genomu a následném vyhodnocení mohou výzkumníci lépe porozumět struktuře populací. Dále se pak na základě dat mohou i lépe stanovit podmínky ochrany těchto druhů. Někdy se též uvádí, že by se díky CRISPR/Cas mohlo docílit „znovuzrození“ již vyhynulých druhů, nebo naopak zabránit invazivním druhům jejich nekontrolovatelnému rozmachu. V neposlední řadě své uplatnění nachází tato revoluční technologie i v modifikaci genů kultivovaných buněk ohrožených druhů, kdy potenciálně napomáhá asistované reprodukci a zachování genetické rozmanitosti (Deepak, 2023).

3.6 Využití metody CRISPR/Cas u lidí

Po mnoha úspěšně provedených úpravách DNA metodou CRISPR/Cas napříč širokým spektrem organismů, se další pomyslnou metou na poli genetického inženýrství stala editace lidského genomu. V rámci intenzivního výzkumu se

tak mimo výše zmíněné tvorby zvířecích a buněčných modelů lidských nemocí začaly čím dál častěji objevovat vědecké práce využívající tento nástroj jako detektor chybných sekvencí v samotné lidské DNA, nebo prostředek k porozumění genových dysfunkcí vedoucích k onemocnění, nebo jako cestu k samotné léčbě těchto chorob.

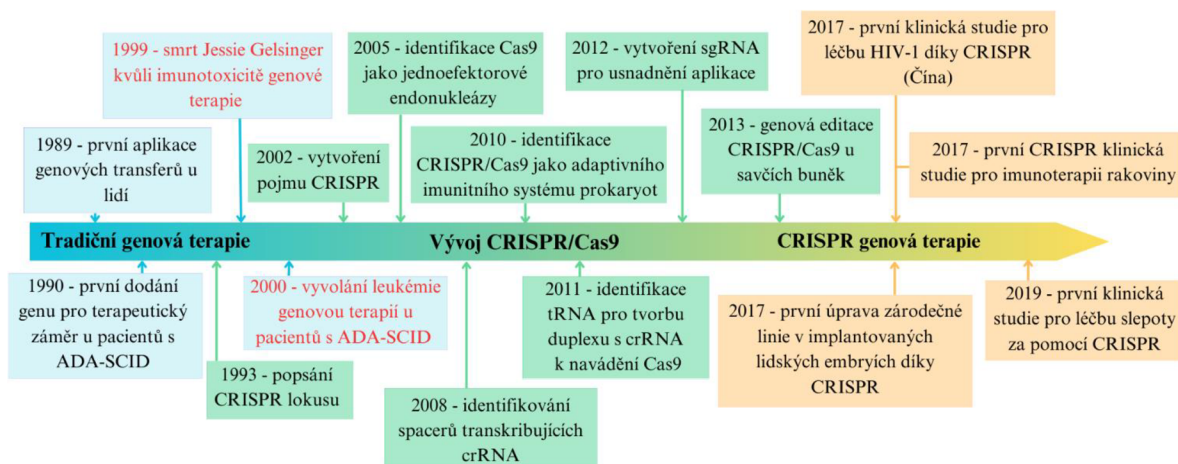
CRISPR/Cas lze mimo editace genomu využít jako biomolekulární senzor pro samotnou diagnostiku onemocnění, a to zejména pro detekci biomarkerů na bázi nukleových kyselin u původců infekčních a neinfekčních onemocnění a pro detekci mutací a delecí indikujících genetická onemocnění. Technologie byla navíc přizpůsobena i pro snímání proteinů a malých molekul (Kaminski *et al.*, 2021). Jako účinný nástroj tak může posloužit při snímání patogenních infekcí, mutagenních defektů nebo pro včasnou diagnózu rakoviny (Masi *et al.*, 2023). Diagnostické metody založené na CRISPR lze rozdělit dle použitého typu CRISPR/Cas: (1) využívající typ II – Cas9 (např. NASBACC, CRISDA, FLASH), (2) typ V – Cas12 (např. DETECTR, HOLMES, E-CRISPR), Cas14 (Cas14-DETECTR), a (3) typ VI – Cas13 (např. SHERLOCK, SHINE, CARMEN) (Kaminski *et al.*, 2021). Mezi úspěšně detekované patogeny pomocí CRISPR patří: virusy (např. zástupci čeledi Filoviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Herpesviridae, Polyomaviridae, Papillomavirida), bakterie (např. *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Salmonella enteritidis*). CRISPR byl také upraven tak, aby detekoval parazity rodu *Plasmodium* odpovědné za malárii (Kaminski *et al.*, 2021). V současné době se také mnoho biomedicínských společností snaží vyvinout diagnostické soupravy na bázi CRISPR/Cas pro „domácí“ použití, např. pro detekci HIV, vztekliny, *Toxoplasma gondi* apod. (Xu *et Li*, 2020).

Systém CRISPR/Cas našel své uplatnění i v oblasti funkční genomiky, která se pokouší porozumět tomu, jak genová dysfunkce vede k onemocnění. Funkční genomický screening založený na CRISPR/Cas9 nabízí účinný přístup k určení funkce genu vysoce výkonným způsobem. V současné době se v takových screeninzích využívají tři typy zásahu na bázi CRISPR: (1) CRISPR knockout (CRISPRn), který využívá nukleázu Cas9 k narušení cílového genu zavedením indelů a posunu čtecího rámce, (2) CRISPR interference (CRISPRi), která využívá katalyticky mrtvý Cas9 (dCas9) fúzovaný s doménou transkripčního represoru

k umlčení transkripce cílového genu, a (3) CRISPR aktivace (CRISPRa), která využívá dCas9 fúzovaný s doménami aktivátoru transkripce k aktivaci transkripce cílového genu (Li *et al.*, 2023). Praktickou aplikací může být například tvorba *in vitro* funkční genomické platformy na bázi CRISPR/Cas9, jež umožňuje lépe charakterizovat nové funkční cíle pro budoucí zacílení při léčbě rakoviny např. akutní myeloidní leukémie (Corbel *et al.*, 2023). Další možnou aplikací je i screening založený na přežití či proliferaci buněk, díky kterému se identifikují esenciální geny modifikující citlivost klíčivům (Li *et al.*, 2023). Screeniny se také využívají pro vyhledání esenciálních genů pro přežití rakovinných buněk nebo také k zlepšení imunitní funkce T lymfocytů v souvislosti právě s rakovinou (Zhou *et al.*, 2023). V současné době také existuje několik databází, ve kterých jsou shromážděné výsledky screeningů CRISPR. GenomeCRISPR a PICKLES jsou dvě z dřívějších databází, ale jejich datový obsah je již zastaralý. Portál DepMap zahrnující tři projekty (Achilles (DepMap 20Q2), Sanger CRISPR a GeCKO) je největší sbírka CRISPR screeningů. Databáze *Open Repository of CRISPR Screens* (ORCS) je nejnovější volně dostupný zdroj vyvinutý *Biological General Repository for Interaction Datasets* (BioGRID) (shrnuje v Choi *et al.*, 2020). Momentálně ORCS zastřešuje 336 publikací a 93 209 genů, ke shromáždění 1 850 CRISPR screeningů z 5 hlavních druhů modelových organismů, 777 buněčných linií a 132 buněčných typů (BioGRID, 2024).

Nástup technologie CRISPR v klinických studiích vytvořil cestu pro vznik nové éry i v oblasti genové terapie (Obr. 13). Stále však existuje několik důležitých technických a etických aspektů, které je třeba řešit při zvažování její aplikace u pacientů (Uddin *et al.*, 2020). Genová terapie spočívá v zavedení cizích genů do cílových buněk, které se dělí do dvou kategorií: somatické buňky a buňky zárodečné linie. Jelikož je však genová terapie zárodečných linií technicky komplikovaná a zahrnuje také etické a bezpečnostní otázky, je dnes omezena na somatické buňky (Steffin *et al.*, 2019). Mezi hlavní oblasti dle Ruikar *et al.* (2024), kde se genová terapie využívá, patří korekce genových mutací, modulace genové exprese, posílení imunitních reakcí nebo k jiným terapeutickým účelům jako je výše zmíněné umlčování genů, tvorba zvířecích modelů či editace kmenových buněk. V současné době jsou systémy CRISPR/Cas široce používány v genové terapii pro monogenní choroby (např. β -talasemie a srpkovitá anémie, hemofilie B, Duchennova svalová dystrofie, pigmentová retinopatie, Hutchinsonův-Gilfordův

syndrom), virové infekční choroby (např. HIV, HPV) nebo rakovinu (shrnuto v Xu *et al.*, 2020). V rešeršní práci Keshavan *et al.* (2024) jsou shrnuty dosavadní informace o použití genové terapie u primárních mitochondriálních chorob, kam se řadí například Leberova dědičná optická neuropatie.



Obr. 13: Časová osa zdůrazňující hlavní události a vývoj genové terapie. Červený text označuje události, které vyvolaly významné etické obavy (převzato a upraveno z Uddin *et al.*, 2020)

Výhodami a přínosem CRISPR/Cas technologie v oblasti léčby a prevence se zabývá i práce výzkumného týmu Chavez-Granados *et al.* (2022). Ten se se svými kolegy zaměřil na využití této technologie v oblasti zubního lékařství, kdy by bylo možné využít CRISPR/Cas metodu jako nadějný nástroj pro zubní lékaře k prevenci tvorby zubního plaku a v konečném důsledku i k úspěšnému snížení případů paradontózy a dalších onemocnění dutiny ústní (Chavez-Granados *et al.*, 2022).

4. Rizika metody CRISPR/Cas a jejich potenciální řešení

Jakákoliv úprava genetické informace v sobě ukrývá potenciální riziko. Během vědeckých experimentů je tedy nutné provádět pouze dostatečně ověřené metody, neboť i malé mutace v genech mohou vést k významným změnám. Jako příklad nám mohou posloužit výše uvedená genetická onemocnění, jež vznikají následkem

drobné mutace (Singh *et al.*, 2017). Ačkoliv tedy CRISPR/Cas technologie představuje revoluční nástroj v oblasti úpravy genomu, nesmíme zapomínat na jeho potenciální rizika.

4.1 Tvorba DBS

Dvouřetězcové zlomy jsou, jak již bylo zmíněno, jedním z hlavních kroků při editaci genomu za pomoci metod genového inženýrství, včetně CRISPR/Cas. Jejich vytváření však přináší určité riziko v podobě nestabilních a nepředvídatelných změn (Wada *et al.*, 2020). Jakmile dojde k vytvoření a opravení prvního zlomu v DNA, štěpící aktivita komplexu CRISPR/Cas stále pokračuje. Cas9 pokračuje v tvorbě zlomů do té doby, dokud cílové místo, gRNA nebo PAM sekvence zůstávají neporušené. Tím pádem bude stále docházet k opravě těchto zlomů cestami NHEJ nebo HDR. To může být problematické převážně tehdy, pokud se chystáme zavést pouze jednu velmi specifickou sekvenci či mutaci. Proto, aby se opakovanému štěpení zabránilo, je možností vytvořit takový fragment DNA, který zablokuje další aktivitu Cas9 hned, jakmile bude první zlom opraven (Cortez, 2015). Výzkumy se ale zabývaly i vytvořením postupů a metod, při nichž by k těmto opakujícím se zlomům vůbec nedocházelo.

Jednou z možností je například použití proteinu dCas9 (*dead Cas9*). Upravený protein sice nedokáže vlákno DNA rozštěpit, ale stále si zachovává schopnost se vázat na cílovou sekvenci. Z toho důvodu musí být dCas9 protein vždy spojen v jeden komplex s jiným efektorovým proteinem (Wada *et al.*, 2020).

Další možností je tzv. „*prime editing*“. Tato metoda byla zatím aplikována především v buňkách kvasinek a savců. Za editaci genetické informace je tu zodpovědná Cas9 nikáza (Cas9n) fúzovaná s reverzní transkriptázou a upravenou gRNA – tzv. pegRNA (*prime editing guide RNA*). Ačkoliv by využití této metody mělo ve srovnání s jinými editačními technologiemi mnoho pozitiv, není možné ji aplikovat u všech buněk. Například u rostlin zatím použita nebyla, neboť má nízkou účinnost HDR oprav a vložit nové fragmenty DNA do genomu by bylo obtížné (Wada *et al.*, 2020). Docílit vzniku proteinu Cas9n můžeme například inaktivací HNH (např. N891A) nebo RuvC (např. D10A) nukleázové domény. Takto vytvořená nikáza dokáže štěpit cílovou DNA pouze na jednom místě a vytvářet jednovláknový zlom

(SSB), který je následně opraven cestou BER (*base excision repair*) (Barman *et al.*, 2020).

4.2 Mozaicismus

Genetická mozaika znamená přítomnost více než jednoho genotypu u jednoho jedince. Mozaicismus může být výsledkem mnoha přirozených mechanismů jako non-disjunkce chromozomů, anafázové zpoždění, endoreplikace a mutace vznikající během vývoje (Taylor *et al.*, 2014), ale i manipulativních technik jako je editace genomu. To je zejména případ editace pomocí CRISPR/Cas9 na embryonálních zvířecích modelech. Pro účinné snížení nebo odstranění těchto mutací vyplývajících ze systému CRISPR/Cas9 však existuje několik možných strategií. Jedná se o zavedení komponentů CRISPR/Cas9 do zygot ve velmi raném stádiu, zkrácení životnosti proteinu Cas9, modifikace zárodečné linie nebo tzv. strategii Easi-CRISPR (*Efficient Additions with ssDNA inserts-CRISPR*) (Mehravar *et al.*, 2019). Easi-CRISPR je strategie cílení, ve které jsou dárčům dlouhé ssDNA do zygot injikovány předem sestavené komplexy ctRNP (crRNA + tracrRNA + Cas9 ribonukleoprotein). Přístup je robustní, univerzální a generuje alely podmíněné i cílené inserce. Je vysoce účinný, protože léčba průměrně pouze 50 zygot je dostatečná k produkci správně zacílené alely až u 100 % živých potomků (Quadros *et al.*, 2017).

4.3 Off-target štěpení DNA

Nejproblematičtějším faktorem, který při využívání metody CRISPR/Cas figuruje, je mimocílová štěpící aktivita, tzv. „*off-target*“ aktivita. Častěji se s ní setkáváme u živočichů než u rostlin (Zhang *et al.*, 2021).

Existuje však několik možností, jak tento efekt minimalizovat. V roce 2014 Lin *et al.* zjistili, že množství nechtěných změn v genomu by šlo omezit záměnou krátkého úseku nukleotidů na 5' konci sgRNA. Místo několika ribonukleotidů by zde byly umístěny báze DNA. Potenciální výhoda této záměny spočívá v tom, že vazba DNA-DNA má mnohem menší náchylnost k nesprávnému párování oproti vazbě DNA-RNA. Dalším možným řešením je úprava délky sgRNA (ideálně 18 bp), nebo obsahu guaninových a cytosinových bází v sgRNA (ideálně kolem 50-60 %) (Hajiahmadi *et al.*, 2019). Mezi další metody patří použití již zmíněných nikáz nebo tzv. „párových nikáz“ (např. 2xsgRNA-Cas9n, FokI-dCas9) a jiných speciálně

upravených nukleáz (např. eSpCas9, Cas9-HF1, HypaCas9). Dále také k zabránění mimocílové aktivity slouží inaktivace Cas9 bezprostředně po rozštěpení cílového místa např. využitím anti-CRIPSR proteinů z bakteriofágů, jež jsou odolné vůči adaptivní imunitě bakterií (Barman *et al.*, 2020).

S ohledem na provedené studie se jako nejefektivnější metodu snižující mimocílové úpravy ukázalo použití ligand dependentních ribozymů, tzv. aptazymů (Hajiahmadi *et al.*, 2019). He *et al.* (2017) vytvořili metodu, jejímž principem je zkonstruování takové sgRNA, jež je lemována ribozymem se schopností se později samokatalyzovat. Tím pádem dochází i k narušení a rozpadu samotné sgRNA. Tato chimérická jednotka je označována jako RGR (ribozym-gRNA-ribozym) (He *et al.*, 2017).

4.4 Gene drive

Rizikem při práci s nástroji CRISPR je i tzv. „*gene drive*“. Jedná se o pojem, který popisuje schopnost genetické modifikace se prostřednictvím pohlavně rozmnožující populace rychle a snadno šířit. Nejproblematictější by zde bylo nechtěné uniknutí mimo pokusnou laboratoř, například skrze geneticky upravené mouchy nebo komáry. Možností jak tomuto předejít by mohlo být mimo zvýšených bezpečnostních opatření daných laboratoří i nepoužívání DNA vektorů obsahujících zároveň geny jak pro Cas9 tak i gRNA (Gearing, 2016). Mezi další opatření pak patří i ekologická a reprodukční omezení. V praxi to tedy znamená, že experimenty je lepší provádět na místech, kde by po případném úniku nenašel organismus vhodné podmínky pro přežití nebo by se nemohl dále rozmnožovat (Esvelt, 2015).

4.5 Doprava komplexu CRISPR/Cas do buňky

Aby mohlo dojít k účinné editaci genomu za pomoci CRISPR/Cas metody, je nejprve nutné dostat tento komplex proteinů a RNA do buněčného jádra, přičemž správné načasování transportu a dávkování komponentů CRISPR/Cas komplexu je významným faktorem, co ovlivňuje mimocílové štěpení. V současné době existují tři hlavní možnosti, jak lze komplex CRISPR/Cas do jádra buněk dostat (Xue *et al.*, 2021). Dle typu nosiče dělíme mechanismy buněčného vstupu na biologické (např. AAVs, AdVs, lentivirus), chemické (např. lipidové, zlaté, polymerní nanočástice) a fyzikální (např. elektroporace, sonoporace, mikroinjekce) (Huang *et al.*, 2022; Taha *et al.*, 2022).

Často využívané virové plazmidy jsou běžnou a rychlou metodou, ale často dochází k jejich integraci do hostitelského genomu, následné imunitní reakci a narušení či přerušeni genové exprese. U některých buněk mohou vést až k cytotoxicitě. Proto, aby se předešlo těmto rizikům, byl proteinový komplex do buněk lidí, myši a zebříček vložen alternativní cestou elektroporace a mikroinjekce. Ale i zde je občas problém s nadměrným buněčným stresem (Peng *et al.*, 2016). Kromě toho, mikroinjekce je obtížná strategie, která si poradí maximálně se dvěma nebo třemi sty buňkami na jeden pokus a na rozdíl od elektroporace může být použita pouze *in vitro*. Elektroporace také přináší vyšší míru přežití embryí, což má potenciál snížit počet zvířat používaných k produkci transgenních modelů (Huang *et al.*, 2022).

Transportní mechanismus by měl v ideálním případě řešit omezení editace genomu v podobě nepřesného cílení na specifické tkáně a buňky, aktivaci imunitního systému, off-target štěpení a neschopnosti vstoupit do buněk (Wilbie *et al.*, 2019). Do budoucna se tak výzkum CRISPR/Cas zaměřuje v některých laboratořích právě tímto směrem.

4.6 Toxicita proteinu Cas9

Výkonost v editaci genů je také ohrožena toxicitou vyplývající ze samotného Cas9 proteinu, a to především v oblasti bakteriálního genomového inženýrství. V současnosti se nabízejí dvě účinné metody pro snížení této toxicity, a to buď regulace exprese genu kódujícího protein Cas9 nebo využití vlastního endogenního CRISPR/Cas systému bakterií (Zhao *et al.*, 2020).

4.7 Rizika spojená s viry, jejich vektory a cílovými geny

Každý experiment, který je za pomoci CRISPR/Cas metody vykonáván, musí být nejprve schválen výborem pro biologickou bezpečnost. Při práci s lentivirovými systémy nebo retrovirovými vektory, jako prostředky pro vpravení CRISPR komponentů do buňky, by se mělo zacházet na bezpečnostní úrovni BSL-2/+2. Při aplikaci za pomoci AAV (*Adeno-Associated Virus*) je možné pracovat při nižších bezpečnostních podmínkách BSL-1. Ty jsou povoleny především proto, že AAV je replikačně nekomplementární s naším genomem a zatím není známé žádné onemocnění, jež by dokázal lidem způsobit. Nicméně i samotný výběr cílového genu má vliv na požadovaný stupeň ochrany. Rizikové jsou pro výzkumníky pokusy,

během kterých se například manipuluje s nádor supresorovými nebo onkogenními geny (Gearing, 2016).

4.8 Legislativa spojená s genovou manipulací a GMO

Technologie CRISPR/Cas trpí problémy především v oblasti biologické bezpečnosti, vyplývajícími z jejího možného chybného použití nebo potenciálního zneužití, co by mohlo vést k nevratným ekologickým škodám či vzniku nových biologických zbraní (Braddick *et* Ramarohetra, 2020). Výzkum a vývoj nových technologií pro úpravu genomu (NGT), včetně CRISPR/Cas, probíhá v mnoha zemích, přičemž hlavními oblastmi aplikace zatím zůstávají lidské zdraví a zemědělství. Na mezinárodní scéně genové terapie nebo úpravy genomu však neexistuje žádný jednotný, právně závazný nebo všeobecně uznávaný soubor pravidel. Rozdílný přístup jednotlivých zemí nebo států v regulační legislativě tak představuje další riziko biologické bezpečnosti.

Evropská unie je jedním z mála světových regionů, kde je použití těchto technologií limitováno velice restriktivní legislativou, což ale brání praktickému využití GMO, a to vyvolává ostrou polemiku nejen ve vědecké komunitě, ale i mezi zástupci biotechnologického a farmaceutického průmyslu a zemědělství. Proto se Evropská komise rozhodla vypracovat studii o NGT, která byla publikována 29. dubna 2021. Tato studie potvrzuje, že podle stávající legislativy jsou NGT skutečně posuzovány jako GMO a poukazuje na omezenou schopnost stávajících právních předpisů držet krok s jejich vývojem, což způsobuje problémy a právní nejistotu při jejich uvádění do praxe (EC, 2021).

Další obsáhlé informace týkající se celosvětové regulace genové manipulace a GMO lze dohledat v „*Global Gene Editing Regulation Tracker*“ na webových stránkách <https://crispr-gene-editing-regs-tracker.geneticliteracyproject.org/> (GLP, 2020). Ve třech různých kategoriích „Člověk/Zdraví“, „Gene drives“ a „Zemědělství“ jsou tu na mapě světa snadno dohledatelné právní regulace v jednotlivých státech. Některé geografické oblasti zde autoři sdružili do jednotného celku, což se týká například jihovýchodní Asie, Afriky, Střední Ameriky nebo Evropské unie. U kategorie „Člověk/Zdraví“ se tu nabízí ještě odlišení na podkategorie „Genové terapie/Terapie kmenových buněk“ a „Zárodečné embryonální linie“, u mapy

zaměřené na zemědělství zas podkategorie „Zemědělské plodiny/Potraviny“ a „Zvířata“. Na jednotlivých webových stránkách lze snadno dohledat díky odlišným oddílům úroveň regulace, výzkumy v dané oblasti, významné historické legislativní milníky, názor nevládních organizací na danou problematiku a odkazy na další zdroje (GLP, 2020).

Diskuse

Technologie CRISPR/Cas se v posledních několika letech stává čím dál častěji diskutovanou problematikou nejen na úrovni vědecké komunity, ale i v rámci široké veřejnosti. Otevírají se tak dveře velkému množství otázek týkajících se vědeckých možností uplatnitelnosti, etiky a bezpečnosti. Potenciální aplikace této metody v různých oblastech, kam spadá i lékařství, zemědělství či výzkum a vývoj, se potýkají s mnoha riziky, a hlavně kritickým etickým pohledem.

Výzev, které s sebou používání „genetických nůžek“ přináší, je hned několik. Ať už se jedná o rizika spojená přímo s laboratorním zákrokem jako například mimocílové štěpení, toxicita samotného komplexu, mozaikovitost a neúplné úpravy (Selvakumar *et al.*, 2023) nebo naopak rizika spjatá s legislativou a právní regulací, je očividné, že nová technologie vyžaduje nutnou spolupráci jak vědců, veřejnosti, ale i vlády.

Jak již bylo v kapitole 4.8 zmíněno, rozdílný pohled na legislativu může do budoucna znamenat potenciální hrozbu. Pokud se porovná legislativní rámec většiny evropských států jako členů Evropské unie (EU), Spojených států amerických (USA) a jihovýchodní Asie, nalezneme tu určité rozdílnosti. I při pohledu na reference v této práci lze snadno posoudit, že vysoké procento studií a výzkumů pochází především z asijského kontinentu. Je tu více faktorů, proč tomu tak je. Mezi ně patří například vyšší financování výzkumu, ale významnou roli tu sehrává i volnější regulační prostředí. Na webových stránkách „*Global Gene Editing Regulation Tracker*“ si lze u vybraných států situaci porovnat. V EU či v USA je často výzkum i klinická praxe vysoce kontrolována nebo legislativně úplně zakázána. Při porovnání dat dostupných na tomto webu ke dni 5.4.2024 lze například říci, že v Indii a Číně je výzkum geneticky upravených plodin omezen minimálně a je tedy možné jejich výzkumné pěstování na polích. U obou zemí se také v současné době postupně vytváří právní rámec, jež bude regulovat úpravy genů u zvířat. Výzkum kmenových buněk podléhá v Indii legislativním úpravám, přičemž genová terapie vyžaduje schválení organizace CDSCO a následné dlouhodobé pozorování po provedeném zákroku. Úpravu lidské zárodečné linie zakazují ve stejném státě Národní směrnice pro výzkum kmenových buněk, ale žádné konkrétní a vymahatelné zákony neexistují. V Číně je úprava jak kmenových, tak zárodečných

buněk povolena, ale samotná implantace upravených embryí a založení těhotenství je několika předpisy zakázán (GLP, 2020).

Jak lze tedy z předchozích několika vět vyvodit, CRISPR/Cas se potýká s regulační heterogenitou jak při používání geneticky modifikovaných plodin a zvířat, tak ve výzkumných studiích, které využívají kmenové buňky nebo lidská embrya. Ačkoliv má výzkum lidských embryí obrovský význam především z hlediska zkoumání terapeutického potenciálu kmenových buněk, není snadné v této oblasti zajistit hladký průběh. Kontroverze v úpravě lidských embryí přitom nevyplývá ani tak ze samotné metody CRISPR/Cas, ale spíše z nejasného postavení lidského embrya. Je těžké rozhodnout, zda a kdy přesně má lidské embryo „osobnost“. Pro některé může představovat embryo pouze entitu skládající se z klubka buněk, pro jiné naopak entitu s úplným statutem osobnosti, jež má svá práva (Brokowski *et al.*, 2019).

Při srovnání několika vědeckých studií (např. Khan, 2019; Uddin *et al.*, 2020; Selvakumar *et al.*, 2023) se všechny shodují na výše zmíněné důležitosti regulace úpravy zárodečné linie, ať už z důvodu nemožnosti zárodku rozhodnout o svém osudu či nepředvídatelným vedlejším účinkům a možnému přenosu mutací do dalších generací. Roku 2018 ale výzkum He Jiankui rozpoutal vlnu kontroverzních debat, neboť se pokusil na lidských embryích pozměnit DNA za cílem rezistence vůči HIV, přičemž u dvou těhotných žen skutečně došlo k porodu potomků (Jiankui *et al.*, 2018). Samotný výzkum byl nakonec odvolán a Jiankui shledán vinným z provádění „nezákonných lékařských praktik“ a odsouzen ke třem letům vězení, nicméně v publikacích (Gostimskaya, 2022; Greely, 2019) lze dohledat podrobnější informace a výsledky snažení tohoto kontroverzního vědce. Jako další etický problém lze uvést i přístupnost a rovné zacházení u pacientů. Jak Selvakumar *et al.* (2023) nebo i Ruikar *et al.* (2024) ve své práci poznamenávají, rozdílný přístup ke genové terapii a léčbě CRISPR/Cas metodou by mohl stávající nerovnosti ve zdravotnictví ještě více prohloubit. Ať už by se jednalo o cenovou dostupnost, pojistné krytí nebo spravedlnost mezi pacienty z různých oblastí světa, je potřeba zajistit rovnocenný přístup a zmírnit tyto překážky (Ruikar *et al.*, 2024; Selvakumar *et al.*, 2023; Mittal, 2019). Otázkou pak zůstává i pohled na umělé zásahy do DNA z pohledu náboženství. Mezi další vyvstávající obavy patří například editace

genomu jako budoucí válečné zbraně, tvorba klonů či umělé upravení genetické informace na přání rodičů, či vytvoření „nadlidí“ (Khan, 2019).

Mimo etických otázek je důležité zvážit i výhody a nevýhody samotného praktického využití. Se spekulativními pohledy na editaci genů se mimo výše zmíněných lidských buněk potýkají i buňky resp. organismy ostatní. U rostlin se využívají úpravy genetické informace především ke zvýšení tolerance k abiotickým stresům, k vylepšení nutričních hodnot nebo k odolnosti vůči patogenům (Yogi *et al.*, 2024). Tím pádem se jedná o řešení možného nedostatku potravin a klimatické krize (Ghoshal, 2024). Na druhé straně se ale objevují obavy o bezpečnost těchto komodit a o jejich vliv na lidské zdraví či životní prostředí. Jak Yogi *et al.* (2024) ve své práci uvádí, k hlavním obavám z GMO patří jejich potenciální alergenita a toxicita. Dalším bodem na pomyslném seznamu hrozeb jsou rizika spojená s možným dopadem na necílové organismy, biologickou rozmanitost a na ekosystémy. Světová zdravotnická organizace tak podporuje strategie minimalizující tok genů z GMO plodin do volně rostoucích příbuzných rostlin nebo upřednostňuje cesty bránící nechtěnému genetickému míšení (Yogi *et al.*, 2024). Některé aplikace CRISPR/Cas u zvířat pomáhají zlepšovat současné standardní postupy v biomedicíně. K těmto pozitivním aplikacím patří například vytváření speciálně upravených linií živočichů, kteří mohou mít mutaci reprezentující lidskou vadu a sloužit jako modely pro studium chorob. Dále pak můžeme do této kategorie kladů zařadit i navyšování svalové hmoty a zkvalitnění nutričních hodnot zvířat chovaných k obživě, zvýšenou odolnost vůči nemocem či vytváření bezrohého skotu. Na opačné straně tu ale vyvstává otázka kvality životních podmínek pro tyto živočichy (Caplan *et al.*, 2015). Mimo jiné také může u geneticky upravených živočichů v důsledku „gene drive“ dojít k přenosu do dalších generací, což znamená riziko pro životní prostředí a ekosystém. Tito mutanti v sobě nesou určitý potenciál vyvolat změny v populační struktuře ostatních druhů, eliminovat zdroje potravy pro ostatní organismy a narušit tak trofické řetězce. Jejich vliv by se pak mohl projevit i jako nekontrolované množení a šíření invazivních druhů, jež nemají dostatečné kontrolní mechanismy (Piergentili *et al.*, 2021; Caplan *et al.*, 2015). V oblasti syntetické biologie umožnila technologie CRISPR/Cas navrhnout a upravit geny bakterií a virů, přičemž se ale opět objevují

obavy o náhodném či dokonce záměrném uvolnění do životního prostředí (Caplan *et al.*, 2015).

Na závěr lze také do obecných nevýhod aplikace CRISPR/Cas zařadit i již několikrát zmíněný legislativní a regulační rámec. Komercializace plodin, ale i upravených živočichů, ať už transgenních či jen geneticky upravených, se stát od státu liší, čímž dochází k určité nespravedlnosti na trhu. V některých státech se například jako obtížné jeví i samotné uvolňování geneticky modifikovaných organismů do prostředí za účelem jejich produkce.

Ve své práci jsme se pokusila shrnout základní informace k této revoluční technologii, přičemž motivací pro zpracování tohoto tématu mi bylo stále nízké povědomí široké veřejnosti o tomto novodobém nástroji genového inženýrství. Během studia literatury pro tuto rešeršní práci jsem se setkala se skutečností, že ačkoliv je metoda „molekulárních nůžek“ již přes dvacet let intenzivně zkoumána, je stále velmi obtížné objevit kvalitní a rozsáhlejší českou literaturu, mimo závěrečných vysokoškolských prací, jež by se touto problematikou podrobněji zabývala. Anglicky psané literatury se na trhu objevuje velké množství, ale co se týče překladů do českého jazyka, nesetkala jsem se ani s jedním. Do budoucna by tak určitě bylo vhodné vytvořit česky psanou publikaci, která by zároveň mohla umožnit popularizaci dané problematiky pro širokou veřejnost. Tím pádem by mohly být podpořeny české laboratorní výzkumy, například přísunem financí ze stran veřejných i soukromých institucí. V příštích letech by tak díky tomu mohla Česká republika využít svůj vlastní potenciál a dosáhnout dalšího pokroku a rozvoje.

Závěr

Technologie CRISPR/Cas se během necelých třiceti let od svého objevení stala revolučním nástrojem pro všestranný biologický výzkum. Ať se jedná o aplikace v soudobé medicínské výzkumné i klinické praxi, úpravy genomu organismů jako řešení blížící se krize hospodářství z důvodu změny klimatu a nárůstu populace nebo potenciální uplatnění v nových terapeutických diagnostických postupech, poskytuje tento komplex složený z proteinů a nukleových kyselin účinný prostředek k dosažení kýženého cíle.

V rámci práce byly splněny všechny cíle, které byly v úvodu stanoveny. První část shrnuje mimo historického vývoje a významných časových milníků základní seznámení se samotnou technologií, klasifikaci a princip, na jehož základě funguje. Následná nejrozsáhlejší část se věnuje různorodým aplikacím napříč mnohými obory a živou přírodou, ale i srovnání CRISPR metody s jinými dříve více využívanými úpravami genetické informace cestou ZFN a TALEN. Poslední kapitola popisuje vyvstávající rizika, jež s sebou používání „genetických nůžek“ přináší. Nejedná se vždy pouze o laboratorní záležitosti jako například mimocílové štěpení či gene drive, ale i o více všeobecná rizika jako je například nejednotná legislativa v oblasti genové manipulace a využití geneticky modifikovaných organismů.

Bakalářská práce tak zdůrazňuje obrovský potenciál pro výzkum a aplikace v oblasti biologie, ekologie, medicíny, ale i průmyslu. Následný výzkum by se měl zaměřit především na zacílení specifických typů buněk, zlepšení přesnosti a účinnosti editace, multiplexní editaci umožňující úpravu více genů najednou nebo i na kontroverzní oblast editace genetických vad ještě v embryonální fázi vývoje lidských potomků. Výzkum je ale potřebný i v oblasti dodání samotného komplexu do buňky, zvýšení efektivity a bezpečnosti.

Vzhledem k rychlému a nepřetržitému zdokonalování této techniky je vysoce pravděpodobné, že v budoucnu sehraje CRISPR další klíčové role při objevování nových poznatků v oblasti medicíny a léčbě nemocí. Důležitým faktorem, který bude v příštích letech rozhodující, bude ale i svědomité a řádné zacházení s touto metodou. Je tedy jen na nás, jak s touto pokrokovou technologií naložíme, aby přinesla co největší užitek a pokrok pro celou společnost.

Seznam použité literatury

ADHIKARI, P. & POUDEL, M., 2020. CRISPR-Cas9 in agriculture: Approaches, applications, future perspectives, and associated challenges. *Malaysian Journal of Halal Research*. 3(1), 6–16. ISSN 2616-1923. doi:10.2478/mjhr-2020-0002

AMITAI, G. & SOREK, R., 2016. CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nature Reviews. Microbiology*. 14(2), 67–76. ISSN 1740-1534. doi:10.1038/nrmicro.2015.14

ARANAZ, A., ROMERO, B., MONTERO, N., ÁLVAREZ, J., BEZOS, J., DE JUAN, L., MATEOS, A. & DOMÍNGUEZ, L., 2004. Spoligotyping Profile Change Caused by Deletion of a Direct Variable Repeat in a Mycobacterium tuberculosis Isogenic Laboratory Strain. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(11), 5388–5391. ISSN 0095-1137. doi:10.1128/JCM.42.11.5388-5391.2004

ARROYO-OLARTE, R.D., BRAVO RODRÍGUEZ, R. & MORALES-RÍOS, E., 2021. Genome Editing in Bacteria: CRISPR-Cas and Beyond. *Microorganisms*. 9(4), 844. ISSN 2076-2607. doi:10.3390/microorganisms9040844

BACHU, R., BERGARECHE, I. & CHASIN, L.A., 2015. CRISPR-Cas targeted plasmid integration into mammalian cells via non-homologous end joining. *Biotechnology and Bioengineering*. 112(10), 2154–2162. ISSN 1097-0290. doi:10.1002/bit.25629

BARMAN, A., DEB, B. & CHAKRABORTY, S., 2020. A glance at genome editing with CRISPR–Cas9 technology. *Current Genetics*. 66(3), 447–462. ISSN 1432-0983. doi:10.1007/s00294-019-01040-3

BARRANGOU, R., FREMAUX, CH., DEVEAU, H., RICHARDS, M., BOYAVAL, P., MOINEAU, S., ROMERO, R.A. & HORVATH, P., 2007. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*. 315(5819), 1709–1712. ISSN 0036-8075. doi:10.1126/science.1138140

BIOLOGICAL GENERAL REPOSITORY FOR INTERACTION DATASETS, 2024. *Open Repository of CRISPR Screens*. Online. [cit. 2024-04-11]. Dostupné z: <https://orcs.thebiogrid.org/>

BOGDANOVA, A.J. & VOYTAS, D.F., 2011. TAL Effectors: Customizable Proteins for DNA Targeting. *Science*. 333(6051), 1843–1846. ISSN 0036-8075. doi:10.1126/science.1204094

BOUZROUD, S.K., GASPARINI, K., HU, G., BARBOSA, M.A.M., ROSA, B.L., FAHR, M., BENDAOU, N., BOUZAYEN, M., ZSÖGÖN, A., SMOUNI, A. & ZOUINE, M., 2020. Down Regulation and Loss of Auxin Response Factor 4 Function Using CRISPR/Cas9 Alters Plant Growth, Stomatal Function and Improves Tomato Tolerance to Salinity and Osmotic Stress. *Genes*. 11(3), 272. ISSN 2073-4425. doi:10.3390/genes11030272

- BRADDICK, D. & RAMAROHETRA, R.F., 2020. Chapter 21 - Emergent challenges for CRISPR: biosafety, biosecurity, patenting, and regulatory issues. In: SINGH V. & DHAR, P.K., eds. *Genome Engineering via CRISPR-Cas9 System*. Cambridge: Academic Press, s. 281–307. ISBN 978-0-12-818140-9. doi:10.1016/B978-0-12-818140-9.00021-0
- BROKOWSKI, C. & ADLI, M., 2019. CRISPR Ethics: Moral Considerations for Applications of a Powerful Tool. *Journal of Molecular Biology*. 431(1), 88–101. ISSN 1089-8638. doi:10.1016/j.jmb.2018.05.044
- CAPLAN, A.L., PARENT, B., SHEN, M. & PLUNKETT, C., 2015. No time to waste—the ethical challenges created by CRISPR. *EMBO reports*. **16**(11), 1421–1426. ISSN 1469-221X. doi:10.15252/embr.201541337
- CARLSON, D.F., TAN, W., LILICO, S.G., STVERAKOVA, D., PROUDFOOT, CH., CHRISTIAN, M., VOYTAS, D.F., LONG, CH.R., WHITELAW C.B.A. & FAHRENKRUG, S.C., 2012. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(43), 17382–17387. ISSN 1091-6490. doi:10.1073/pnas.1211446109
- CARROLL, D., 2011. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*. 188(4), 773–782. ISSN 1943-2631. doi:10.1534/genetics.111.131433
- CAVANAGH, P. & GARRITY, A., 2014. *CRISPR mechanism*. Medford: Tufts University. Online. [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <https://sites.tufts.edu/crispr/crispr-mechanism/>
- CERMAK, T., DOYLE, E.L., CHRISTIAN, M., WANG, L., ZHANG, Y., SCHMIDT, C., BALLER, J.A., SOMIA, N.V., BOGDANOVA, A.J. & VOYTAS, D.F., 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research*. 39(12), e82. ISSN 1362-4962. doi:10.1093/nar/gkr218
- COLLIAS, D. & BEISEL, CH.L., 2021. CRISPR technologies and the search for the PAM-free nuclease. *Nature Communications*. 12(1), 555. ISSN 2041-1723. doi:10.1038/s41467-020-20633-y
- CONG, L., RAN, F.A., COX, D., LIN, S., BARRETTO, R., HABIB, N., HSU, P.D., WU, X., JIANG, W., MARRAFFINI, L.A. & ZHANG, F., 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*. 339(6121), 819–823. ISSN 0036-8075. doi:10.1126/science.1231143
- CORBEL, S., HODEL, K., TRAN, K., MEYERS, M., TONG, J., BALTAY, M., KILFEATHER, P., LI, Y., SCHMEDT, CH., SAMPATH S. & SAMPATH, S., 2023. Comprehensive CRISPR-enabled functional genomics profiling to identify targetable cancer genes in primary acute myeloid leukemia (AML). *Journal of Clinical Oncology*. 41(16), 3088–3088. ISSN 1527-7755. doi:10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.3088

- CORTEZ, CH., 2015. Editing with Homology Directed Repair. In: *CRISPR 101: A Desktop Resource*. 2nd Edition. Watertown: Addgene, s. 51–55. Online. [cit. 2023-11-16]. Dostupné z:

Yeu_Yau%2Fpost%2Fis_it_possible_for_genome_editing_in_Escherichia_coli_DH5al pha_with_pCas9_only%2Fattachment%2F5b23e297b53d2f63c3d1679d%2FAS%2 53A637815285100544%25401529078422289%2Fdownload%2FCRISPR%2B10 1%2B2nd%2BEd%2BFinal%2BMay%2B2018_2.pdf&usg=AOvVaw2TxF96cC_yLc2 JdAkEyV-l&opi=89978449

EUROPEAN COMMISSION, 2021. *New genomic techniques: European Commission study and first reactions*, Briefing 25-10-2021. Online. [cit. 2024-03-14]. Dostupné z: [https://www.europarl.europa.eu/thinktank/en/document/EPRS_BRI\(2021\)698760](https://www.europarl.europa.eu/thinktank/en/document/EPRS_BRI(2021)698760)

GARNEAU, J.E., DUPUIS, M.È., VILLION, M., ROMERO, D.A., BARRANGOU, R., BOYAVAL, P., FREMAUX, CH., HORVATH, P., MAGADÁN, A.H. & MOINEAU, S., 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 468(7320), 67–71. ISSN 1476-4687. doi:10.1038/nature09523

GEARING, M., 2015. Introduction to Genome Engineering. In: *CRISPR 101: A Desktop Resource*. 2nd Edition. Watertown: Addgene, s. 7–10. Online. [cit. 2023-16-11]. https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewjr_KXZ8fCDAX5iP0HHdGeDz8QFnoECBwQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fprofile%2FYuan-

Yeu_Yau%2Fpost%2Fis_it_possible_for_genome_editing_in_Escherichia_coli_DH5al pha_with_pCas9_only%2Fattachment%2F5b23e297b53d2f63c3d1679d%2FAS%2 53A637815285100544%25401529078422289%2Fdownload%2FCRISPR%2B10 1%2B2nd%2BEd%2BFinal%2BMay%2B2018_2.pdf&usg=AOvVaw2TxF96cC_yLc2 JdAkEyV-l&opi=89978449

GEARING, M., 2016. General CRISPR safety considerations. In: *CRISPR 101: A Desktop Resource*. 2nd Edition. Watertown: Addgene, s. 180–183. Online. [cit. 2023-11-16]. Dostupné z:

https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewjr_KXZ8fCDAX5iP0HHdGeDz8QFnoECBwQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fprofile%2FYuan-

Yeu_Yau%2Fpost%2Fis_it_possible_for_genome_editing_in_Escherichia_coli_DH5al pha_with_pCas9_only%2Fattachment%2F5b23e297b53d2f63c3d1679d%2FAS%2 53A637815285100544%25401529078422289%2Fdownload%2FCRISPR%2B10 1%2B2nd%2BEd%2BFinal%2BMay%2B2018_2.pdf&usg=AOvVaw2TxF96cC_yLc2 JdAkEyV-l&opi=89978449

GENETIC LITERACY PROJECT, 2020. *Global Gene Editing Regulation Tracker*. Online. [cit. 2024-03-14]. Dostupné z: <https://crispr-gene-editing-regs-tracker.geneticliteracyproject.org>

GHOSHAL, B., 2024. A birds-eye-view on CRISPR-Cas system in agriculture. *The Nucleus*. ISSN 0976-7975. doi:10.1007/s13237-023-00462-2

- GOPHNA, U., ALLERS, T. & MARCHFELDER, A., 2017. Finally, Archaea Get Their CRISPR-Cas Toolbox. *Trends in Microbiology*. 25(6), 430–432. ISSN 1878-4380. doi:10.1016/j.tim.2017.03.009
- GOSTIMSKAYA, I., 2022. CRISPR-Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing. *Biochemistry*. 87(8), 777–788. ISSN 1608-3040. doi:10.1134/S0006297922080090
- GREELY, H.T., 2019. CRISPR'd babies: human germline genome editing in the 'He Jiankui affair'. *Journal of Law and the Biosciences*. 6(1), 111–183. ISSN 2053-9711. doi:10.1093/jlb/lbz010
- GROENEN, P.M.A., BUNSCHOTEN, A.E., VAN SOOLINGEN, D. & VAN ERRTBDEN, J.D.A., 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Molecular Microbiology*. 10(5), 1057–1065. ISSN 0950-382X. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x
- GUPTA, A., KANG, K., PATHANIA, R., SAXTON, L., SAUCEDO, B., MALIK, A., TORRESTIJI, Y., DIAZ, C.J., DUTRA MOLINO, J.V. & MAYFIELD, S.P., 2024. Harnessing genetic engineering to drive economic bioproduct production in algae. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 12, 1350722. ISSN 2296-4185. doi:10.3389/fbioe.2024.1350722
- HAFT, D.H., SELENGUT, J., MONGODIN, E.F. & NELSON, K.E., 2005. A guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. *PLoS computational biology*. 1(6), e60. ISSN 1553-7358. doi:10.1371/journal.pcbi.0010060
- HAJIAHMADI, Z., MOVAHEDI, A., WEI, H., LI, D., OROOJI, Y., RUAN, H. & ZHUGE, Q., 2019. Strategies to Increase On-Target and Reduce Off-Target Effects of the CRISPR/Cas9 System in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(15), 3719. ISSN 1422-0067. doi:10.3390/ijms20153719
- HE, L., ST. JOHN JAMES, M., RADOVCIC, M., IVANCIC-BACE, I. & BOLT, E.L., 2020. Cas3 Protein—A Review of a Multi-Tasking Machine. *Genes*. 11(2), 208. ISSN 2073-4425. doi:10.3390/genes11020208
- HE, Y., WANG, R., DAI, X. & ZHAO, Y., 2017. Chapter Nine - On Improving CRISPR for Editing Plant Genes: Ribozyme-Mediated Guide RNA Production and Fluorescence-Based Technology for Isolating Transgene-Free Mutants Generated by CRISPR. In: WEEKS, D.P. & YANG, B., eds. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Cambridge: Academic Press, Gene Editing in Plants, s. 151–166. ISBN: 978-0-12-811743-9. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.03.012

- HEYER, W.D., EHMSSEN, K.T. & LIU, J., 2010. Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annual Review of Genetics*. 44, 113–139. ISSN 0066-4197. doi:10.1146/annurev-genet-051710-150955
- HILLE, F. & CHARPENTIER, E., 2016. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 371(1707), 20150496. ISSN 1471-2970. doi:10.1098/rstb.2015.0496
- HILLE, F., RICHTER, H., WONG, S.P., BRATOVIČ, M., RESSEL, S. & CHARPENTIER, E., 2018. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*. 172(6), 1239–1259. ISSN 0092-8674. doi:10.1016/j.cell.2017.11.032
- HOE, N., NAKASHIMA, K., GRIGSBY, D., PAN, X., DOU, S.J., NAIDICH, S., GARCIA, M., KAHN, E., BERGMIRE-SWEAT, D. & MUSSER, J.M., 1999. Rapid molecular genetic subtyping of serotype M1 group A Streptococcus strains. *Emerging Infectious Diseases*. 5(2), 254–263. ISSN 1080-6040. doi: 10.3201/eid0502.990210
- HORVATH, P. & BARRANGOU, P., 2013. RNA-guided genome editing à la carte. *Cell Research*. 23(6), 733–734. ISSN 1748-7838. doi:10.1038/cr.2013.39
- HUANG, L., HUA, Z., XIAO, H., CHENG, Y., XU, K., GAO, Q., XIA, Y., LIU, Y., ZHANG, X., ZHENG, X., MU, Y. & LI, K., 2017. CRISPR/Cas9-mediated ApoE^{-/-} and LDLR^{-/-} double gene knockout in pigs elevates serum LDL-C and TC levels. *Oncotarget*. 8(23), 37751–37760. ISSN 1949-2553. doi:10.18632/oncotarget.17154
- HUANG, J., ZHOU, Y., LI, J., LU, A. & LIANG, CH., 2022. CRISPR/Cas systems: Delivery and application in gene therapy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 10, 942325. ISSN 2296-4185. doi:10.3389/fbioe.2022.942325
- CHANDRASEKARAN, J., BRUMIN, M., WOLF, D., LEIBMAN, D., KLAP, CH., PEARLSMAN, M., SHERMAN, A., ARAZI, T. & GAL-ON, A., 2016. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Molecular Plant Pathology*. 17(7), 1140–1153. ISSN 1364-3703. doi:10.1111/mp.12375
- CHANG, H.H.Y., PANNUNZIO, N.P., ADACHI, N. & LIEBER, M.R., 2017. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 18(8), 495–506. ISSN 1471-0080. doi:10.1038/nrm.2017.48
- CHAUHAN, V. P., SHARP, P.A. & LANGER, R., 2023. Altered DNA repair pathway engagement by engineered CRISPR-Cas9 nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 120(11), e2300605120. ISSN: 1091-6490. doi:10.1073/pnas.2300605120
- CHAVEZ-GRANADOS, P.A., MANISEKARAN, R., ACOSTA-TORRES, L.S. & GARCIA-CONTRERAS, R., 2022. CRISPR/Cas gene-editing technology and its advances in

dentistry. *Biochimie*. 194, 96–107. ISSN 0300-9084.
doi:10.1016/j.biochi.2021.12.012

CHOI, A., JANG, I., HAN, H., KIM, M.S., CHOI, J., LEE, J., CHO, S.Y., JUN, Y., LEE, CH., KIM, J., LEE, B. & LEE, S., 2021. iCSDB: An integrated database of CRISPR screens. *Nucleic Acids Research*. **49**(D1), D956–D961. ISSN 0305-1048.
doi:10.1093/nar/gkaa989

ISHINO, Y., SHINAGAWA, H., MAKINO, K., AMEMURA, M. & NAKATA, A., 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*. 169(12), 5429–5433. ISSN 0021-9193. doi:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987

ISHINO, Y., KRUPOVIC, M. & FORTERRE, P., 2018. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *Journal of Bacteriology*. 200(7), e00580-17. ISSN 0021-9193.
doi:10.1128/JB.00580-17

JAMIL, A., LASKER, S.P., CHOWDHURY, A.R. & SEOW, S.M., 2023. Gene Modification in Non-Human Animal for Developing Human Compatible Organs: Ethical, Legal, Clinical and Societal Issues. *Bangladesh Journal of Bioethics*. 14(2), 13–18. ISSN 2078-1458. doi: 10.3329/bjbio.v14i2.57

JANSEN, R., VAN EMBDEN, J.D.A., GAASTRA, W. & SCHOULS, L.M., 2002a. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. *Omic: A Journal of Integrative Biology*. 6(1), 23–33. ISSN 1536-2310.
doi:10.1089/15362310252780816

JANSEN, R., VAN EMBDEN, J.D.A., GAASTRA, W. & SCHOULS, L.M., 2002b. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*. 43(6), 1565–1575. ISSN 0950-382X. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x

JARRELL, K.F., WALTERS, A.D., BOCHI WAL, CH., BORGIA, J.M., DICKINSON, T. & CHONG, J.P.J., 2011. Major players on the microbial stage: why archaea are important. *Microbiology*. 157(4), 919–936. ISSN 1465-2080. doi:10.1099/mic.0.047837-0

JIANG, F., TAYLOR, D.W., CHEN, J.S., KORNFELD, J.E., ZHOU, K., THOMPSON, A.J., NOGALES, E. & DOUDNA, J.A., 2016. Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science*. 351(6275), 867–871. ISSN 1095-9203.
doi:10.1126/science.aad8282

JIANKUI, H., FERRELL, R., YUANLIN, CH., JINZHOU, Q. & YANGRAN, CH., 2018. Retracted: Draft Ethical Principles for Therapeutic Assisted Reproductive Technologies. *The CRISPR Journal*. 1(6), e450–e453. ISSN 2573-1599.
doi:10.1089/crispr.2018.0051

- JÍNEK, M., JIANG, F., TAYLOR, D.W., STERNBERG, S.H., KAYA, E., MA, E., ANDERS, C., HAUER, M., ZHOU, K., LIN, S., KAPLAN, M., IAVARONE, A.T., CHARPENTIER, E., NOGALES, E. & DOUDNA, J.A., 2014. Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation. *Science*. 343(6176), 1247997. ISSN 1095-9203. doi:10.1126/science.1247997
- JOUNG, J.K. & SANDER, J.D., 2013. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 14(1), 49–55. ISSN 1471-0080. doi:10.1038/nrm3486
- KAMINSKI, M.M., ABUDAYYEH, O.O., GOOTENBERG, J.S., ZHANG, F. & COLLINS, J.J., 2021. CRISPR-based diagnostics. *Nature Biomedical Engineering*. 5(7), 643–656. ISSN 2157-846X. doi:10.1038/s41551-021-00760-7
- KANG, Y., CHU, CH., WANG, F. & NIU, Y., 2019. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in nonhuman primates. *Disease Models & Mechanisms*. 12(10), dmm039982. ISSN 1754-8411. doi:10.1242/dmm.039982
- KESHAVAN, N., MINCZUK, M., VISCOMI, C. & RAHMAN, S., 2024. Gene therapy for mitochondrial disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 47(1), 145–175. ISSN 1573-2665. doi:10.1002/jimd.12699
- KHAN, S.H., 2019. Genome-Editing Technologies: Concept, Pros, and Cons of Various Genome-Editing Techniques and Bioethical Concerns for Clinical Application. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*. 16, 326–334. ISSN 2162-2531. doi:10.1016/j.omtn.2019.02.027
- KHAN, Z., KHAN, S.H., AHMED, A., IQBAL, M.U., MUBARIK, M.S., GHOURI, M.Z., AHMAD, F., YASEEN, S., ALI, Z., KHAN, A.A. & AZHAR, M.T., 2023. Genome editing in cotton: challenges and opportunities. *Journal of Cotton Research*. 6(1), 3. ISSN 2523-3254. doi:10.1186/s42397-023-00140-3
- KIM, H., KIM, S.T., RYU, J., KANG, B.CH., KIM, J.S. & KIM, S.G., 2017. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nature Communications*. 8(1), 14406. ISSN 2041-1723. doi:10.1038/ncomms14406
- KRISHNAMURTHY, M., MOORE, R.T., RAJAMANI, S. & PANCHAL, R.G., 2016. Bacterial genome engineering and synthetic biology: combating pathogens. *BMC Microbiology*. 16(1), 258. ISSN 1471-2180. doi:10.1186/s12866-016-0876-3
- KUMAR, D. & KUES, W.A., 2023. Genome Engineering in Livestock: Recent Advances and Regulatory Framework. *Animal Reproduction Update*. 3(1), 14–30. ISSN 2583-326X. doi:10.48165/aru.2023.3.1.5
- LAMBRECHTS, R., FABER, A. & SIBON, O., 2017. Modelling in miniature: Using *Drosophila melanogaster* to study human neurodegeneration. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 25–26, Models of Neuroimmunology, 3–10. ISSN 1740-6757. doi:10.1016/j.ddmod.2018.09.004

- LEE, H., DHINGRA, Y. & SASHITAL, D.G., 2019. The Cas4-Cas1-Cas2 complex mediates precise prespacer processing during CRISPR adaptation. *eLife*. 8, e44248. ISSN 2050-084X. doi:10.7554/eLife.44248
- LI, K., OUYANG, M., ZHAN, J. & TIAN, R., 2023. CRISPR-based functional genomics screening in human-pluripotent-stem-cell-derived cell types. *Cell Genomics*. 3(5), 100300. ISSN 2666-979X. doi:10.1016/j.xgen.2023.100300
- LI, Y., SAIFU, P., ZHANG, Y., REN, M., FENG, M., PENG, N., CHEN, L., LIANG, Y.X. & SHE, Q., 2015. Harnessing Type I and Type III CRISPR-Cas systems for genome editing. *Nucleic Acids Research*. 44, e34. ISSN 1362-4962. doi:10.1093/nar/gkv1044
- LIANG, W., HE, J., MAO, CH., YU, CH., MENG, Q., XUE, J., WU, X., LI, S., WANG, Y. & YI, H., 2022. Gene editing monkeys: Retrospect and outlook. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 10, 913996. ISSN 2296-634X. doi:10.3389/fcell.2022.913996
- LIN, Y., CRADICK, T.J., BROWN, M.T., DESHMUKH, H., RANJAN, P., SARODE, N., WILE, B.M., VERTINO, P.M., STEWART, F.J. & BAO, G., 2014. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Research*. 42(11), 7473–7485. ISSN 1362-4962. doi:10.1093/nar/gku402
- LUO, Y., 2019. Preface. In: LUO, Y., ed. *CRISPR Gene Editing*. New York: Humana Press, Methods in Molecular Biology, 1961, s. 5–6. ISBN 978-1-4939-9170-9. Dostupné z: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4939-9170-9> - porovnat s jinými
- MAKAROVA, K.S., ARAVIND, L., GRISHIN, N.V., ROGOZIN, I.B. & KOONIN, E.V., 2002. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Research*. 30(2), 482–496. ISSN 1362-4962. doi:10.1093/nar/30.2.482
- MAKAROVA, K.S., GRISHIN, N.V., SHABALINA, S.A., WOLF, Y.I. & KOONIN, E.V., 2006. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*. 1, 7. ISSN 1745-6150. doi:10.1186/1745-6150-1-7
- MAKAROVA, K.S., WOLF, Y.I., ALKHNABASHI, O.S., COSTA, F., SHAH, S.A., SAUNDERS, S.J., BARRANGOU, R., BROUNS, S.J.J., CHARPENTIER, E., HAFT, D.H., HORVATH, P., MOINEAU, S., MOJICA, F.J.M., TERNS, R.M., TERNS, M.P., WHITE, M.F., YAKUNIN, A.F., GARRETT, R.A., VAN DER OOST, J., BACKOFEN, R. & KOONIN, E.V., 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 13(11), 722–736. ISSN 1740-1534. doi:10.1038/nrmicro3569
- MAKAROVA, K.S., WOLF, Y.I., IRANZO, J., SHMAKOV, S.A., ALKHNABASHI, O.S., BROUNS, S.J.J., CHARPENTIER, E., CHENG, D., HAFT, D.H., HORVATH, P., MOINEAU, S., MOJICA,

F.J.M., SCOTT, D., SHAH, S.A., SIKSNYS, V., TERNS, M.P., VENCLOVAS, Č., WHITE, M.F., YAKUNIN, A.F., YAN, W., ZHANG, F., GARRETT, R.A., BACKOFEN, R., VAN DER OOST, J., BARRANGOU, R. & KOONIN, E.V., 2020. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*. 18(2), 67–83. ISSN 1740-1534. doi:10.1038/s41579-019-0299-x

MALI, P., YANG, L., ESVELT, K.M., AACH, J., GUELL, M., DICARLO, J.E., NORVILLE, J.E. & CHURCH, G.M., 2013. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*. 339(6121), 823–826. ISSN 0036-8075. doi:10.1126/science.1232033

MASEPOHL, B., GÖRLITZ, K. & BÖHME, H., 1996. Long tandemly repeated repetitive (LTRR) sequences in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1307(1), 26–30. ISSN 0006-3002. doi:10.1016/0167-4781(96)00040-1

MASI, A., ANTONACCI, A., MOCCIA, M., FRISULLI, V., DE FELICE, M., DE FALCO, M. & SCOGNAMIGLIO, V., 2023. CRISPR-Cas assisted diagnostics: A broad application biosensing approach. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 162, 117028. ISSN 0165-9936. doi:10.1016/j.trac.2023.117028

MCDADE, J., WYATT, D., RAMSDEN, D. & FORD, T.J., 2015. Using Cas9 to Generate knock-outs via NHEJ. In: *CRISPR 101: A Desktop Resource*. 2nd Edition. Watertown: Addgene, s. 47–50. Online. [cit. 2023-11-16]. Dostupné z: https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUK Ewj_r_KXZ8fCDAX5iP0HHdGeDz8QFnoECBwQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fprofile%2FYuan-Yeu_Yau%2Fpost%2Fis_it_possible_for_genome_editing_in_Escherichia_coli_DH5alpha_with_pCas9_only%2Fattachment%2F5b23e297b53d2f63c3d1679d%2FAS%2F53A637815285100544%25401529078422289%2Fdownload%2FCRISPR%2B101%2B2nd%2BEd%2BFinal%2BMay%2B2018_2.pdf&usq=AOvVaw2TxF96cC_yLc2jdAkEyV-l&opi=89978449

MEESKE, A.J., NAKANDAKARI-HIGA, S. & MARRAFFINI, L.A., 2019. Cas13-induced cellular dormancy prevents the rise of CRISPR-resistant bacteriophage. *Nature*. 570(7760), 241–245. ISSN 1476-4687. doi:10.1038/s41586-019-1257-5

MEHRAVAR, M., SHIRAZI, A., NAZARI, M. & BANAN, M., 2019. Mosaicism in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Developmental Biology*. 445(2), 156–162. ISSN 1095-564X. doi:10.1016/j.ydbio.2018.10.008

MITTAL, R.D., 2019. Gene Editing in Clinical Practice: Where are We? *Indian journal of clinical biochemistry: IJCB*. 34(1), 19–25. ISSN 0970-1915. doi:10.1007/s12291-018-0804-4

MOJICA, F.J.M., DÍEZ-VILLASEÑOR, C., SORIA, E. & JUEZ, G., 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea,

Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*. 36(1), 244–246. ISSN 0950-382X. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x

MOJICA, F.J.M., FERRER, C., JUEZ, G. & RODRÍGUEZ-VALERA, F., 1995. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Molecular Microbiology*. 17(1), 85–93. ISSN 0950-382X. doi:10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010085.x

MOJICA, F.J.M., DÍEZ-VILLASEÑOR, C., GARCÍA-MARTÍNEZ, J. & ALMENDROS, C., 2009. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 155(3), 733–740. ISSN 1465-2080. doi:10.1099/mic.0.023960-0

MOJICA, F.J.M., JUEZ, G. & RODRIGUEZ-VALERA, F., 1993. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified Pst I sites. *Molecular Microbiology*. 9(3), 613–621. ISSN 0950-382X. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x

MORÁVKOVÁ DRDA, A., 2017. Bakteriální editační systém ve službách biologie. *Živa*. 2017(2), 47–49. ISSN 0044-4812.

NAYAK, D.D. & METCALF, W.W., 2017. Cas9-mediated genome editing in the methanogenic archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 114(11), 2976–2981. ISSN 1091-6490. doi:10.1073/pnas.1618596114

NEKRASOV, V., WANG, C., WIN, J., LANZ, CH., WEIGEL, D. & KAMOUN, S., 2017. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Scientific Reports*. 7(1), 482. ISSN 2045-2322. doi:10.1038/s41598-017-00578-x

NELSON, K.E., CLAYTON, R.A., GILL, S.R., GWINN, M.L., DODSON, R.J., HAFT, D.H., HICKEY, E.K., PETERSON, J.D., NELSON, W.C., KETCHUM, K.A., MCDONALD, L., UTTERBACK, T.R., MALEK, J.A., LINHER, K.D., GARRETT, M.M., STEWART, A.M., COTTON, M.D., PRATT, M.S., PHILLIPS, C.A., RICHARDSON, D., HEIDELBERG, J., SUTTON, G.G., FLEISCHMANN, R.D., EISEN, J.A., WHITE, O., SALZBERG, S.L., SMITH, H.O., VENTER, J.C. & FRASER, C.M., 1999. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature*. 399(6734), 323–329. ISSN 0028-0836. doi:10.1038/20601

NISHIMASU, H., RAN, F.A., HSU, P.D., KONERMANN, S., SHEHATA, S.I., DOHMAE, N., ISHITANI, R., ZHANG, F. & NUREKI, O., 2014. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*. 156(5), 935–949. ISSN 0092-8674. doi:10.1016/j.cell.2014.02.001

- ONYEAKA, H., MIRI, T., OBILEKE, K., HART, A., ANUMUDU, CH. & AL-SHARIFY, Z.T., 2021. Minimizing carbon footprint via microalgae as a biological capture. *Carbon Capture Science & Technology*. 1, 100007. ISSN 2772-6568. doi:10.1016/j.ccst.2021.100007
- OSBORN, M.J., STARKER, C.G., MCELROY, A.N., WEBBER, B.R., RIDDLE, M.J., XIA, L., DEFEO, A.P., GABRIEL, R., SCHMIDT, M., VON KALLE, CH., CARLSON, D.F., MAEDER, M.L., JOUNG, J.K., WAGNER, J.E., VOYTAS, D.F., BLAZAR, B.R. & TOLAR, J., 2013. TALEN-based Gene Correction for Epidermolysis Bullosa. *Molecular Therapy*. 21(6), 1151–1159. ISSN 1525-0024. doi:10.1038/mt.2013.56
- OUEDRAOGO, J.P. & TSANG, A., 2020. CRISPR_Cas systems for fungal research. *Fungal Biology Reviews*. 34(4), 189–201. ISSN 1749-4613. doi:10.1016/j.fbr.2020.10.002
- PATTANAYAK, V., GUILINGER, J.P. & LIU, D.R., 2014. Determining the Specificities of TALENs, Cas9, and other genome-editing enzymes. In: *Methods in Enzymology*. Cambridge: Elsevier, 47–78. ISBN 978-0-12-801185-0. doi:10.1016/B978-0-12-801185-0.00003-9
- PENG, R., LIN, G. & LI, J., 2016. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *The FEBS Journal*. 283(7), 1218–1231. ISSN 1742-4658. doi:10.1111/febs.13586
- PENG, W., FENG, M., FENG, X., LIANG, Y.X. & SHE, Q., 2015. An archaeal CRISPR type III-B system exhibiting distinctive RNA targeting features and mediating dual RNA and DNA interference. *Nucleic Acids Research*. 43(1), 406–417. ISSN 1362-4962. doi:10.1093/nar/gku1302
- PIERGENTILI, R., DEL RIO, A., SIGNORE, F., UMANI RONCHI, F., MARINELLI, E. & ZAAMI, S., 2021. CRISPR-Cas and Its Wide-Ranging Applications: From Human Genome Editing to Environmental Implications, Technical Limitations, Hazards and Bioethical Issues. *Cells*. 10(5), 969. ISSN 2073-4409. doi:10.3390/cells10050969
- QI, L., SUI, Y., TANG, X.X., MCGINTY, R.J., LIANG, X.Z., DOMINSKA, M., ZHANG, K., MIRKIN, S.M., ZHENG, D.Q. & PETES, T.D., 2023. Shuffling the yeast genome using CRISPR/Cas9-generated DSBs that target the transposable Ty1 elements. *PLoS Genetics*. 19(1), e1010590. ISSN 1553-7404. doi:10.1371/journal.pgen.1010590
- QUADROS, R.M., MIURA, H., HARMS, D.W., AKATSUKA, H., SATO, T., AIDA, T., REDDER, R., RICHARDSON, G.P., INAGAKI, Y., SAKAI, D., BUCKLEY, S.M., SESHACHARYULU, P., BATRA, S.K., BEHLKE, M.A., ZEINER, S.A., JACOBI, A.M., IZU, Y., THORESON, W.B., URNESS, L.D., MANSOUR, S.L., OHTSUKA, M. & GURUMURTHY, CH.B., 2017. Easi-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins. *Genome Biology*. 18(1), 92. ISSN 1474-760X. doi:10.1186/s13059-017-1220-4

- RAHIM, J., GULZAR, S., ZAHID, R. & RAHIM, K., 2021. A Systematic Review on the Comparison of Molecular Gene Editing Tools. *International Journal of Innovative Science and Research*. 6, 829-836. ISSN: 2456-2165.
- RUIKAR, S.S., MASURKAR, S.A. & GHATAGE, A.A., 2024. CRISPR-Cas9 in Gene Therapy: Ethical, Legal, and Social Implications. *NATURALISTA CAMPANO*. 28(1), 183–188. ISSN: 1827-7160. Dostupné z: <https://museonaturalistico.it/index.php/journal/article/view/54>
- RYAN, O.W., SKERKER, J.M., MAURER, M.J., LI, X., TSAI, J.C., PODDAR, S., LEE, M.E., DELOACHE, W., DUEBER, J.E., ARKIN, A.P. & CATE, J.H.D., 2014. Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system. *eLife*. 3, e03703. ISSN 2050-084X. doi:10.7554/eLife.03703
- RYDELL-TÖRMÄNEN, K. & JOHNSON, J.R., 2019. The Applicability of Mouse Models to the Study of Human Disease. *Methods in Molecular Biology*. 1940, 3–22. ISSN 1940-6029. doi:10.1007/978-1-4939-9086-3_1
- SANDER, J.D., REYON, D., MAEDER, M.L., FOLEY, J.E., THIBODEAU-BEGANNY, S., LI, X., REGAN, M.R., DAHLBORG, E.J., GOODWIN, M.J., FU, F., VOYTAS, D.F., JOUNG, J.K. & DOBBS, D., 2010. Predicting success of oligomerized pool engineering (OPEN) for zinc finger target site sequences. *BMC bioinformatics*. 11, 543. ISSN 1471-2105. doi:10.1186/1471-2105-11-543
- SATISH, L., SHAMILI, S., MUTHUBHARATHI, B.C., CEASAR, S.A., KUSHMARO, A., SINGH, V. & SITRIT, Y., 2020. Chapter 6 - CRISPR-Cas9 system for fungi genome engineering toward industrial applications. In: SINGH V. & DHAR, P.K., eds. *Genome Engineering via CRISPR-Cas9 System*. Cambridge: Academic Press, 69–81. ISBN 978-0-12-818140-9. doi:10.1016/B978-0-12-818140-9.00006-4
- SELVAKUMAR, P., KUMAR, P.S. & SHANTHAKUMAR, D.S., 2023. Biotechnology and its applications. In: GOHIL, D., PADHYAY, K.K., NAGAPURE, D.R. & PARASHURAMA, T.R., eds. *Research trends in science and technology - Volume II*. Nigave Khalasa: Bhumi Publishing, 49–62. ISBN 978-93-88901-71-0.
- SERGEEVA, D., CAMACHO-ZARAGOZA, J.M., LEE, J.S. & KILDEGAARD, H., 2019. CRISPR/Cas9 as a Genome Editing Tool for Targeted Gene Integration in CHO Cells. In: LUO, Y., ed. *CRISPR Gene Editing*. New York: Humana Press, Methods in Molecular Biology, 1961, 213–232. ISBN 978-1-4939-9170-9. doi: 10.1007/978-1-4939-9170-9_13
- SHAN, Q., WANG, Y., CHEN, K., LIANG, Z., LI, J., ZHANG, Y., ZHANG, K., LIU, J., VOYTAS, D.F., ZHENG, X., ZHANG, Y. & GAO, C., 2013. Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. *Molecular Plant*. 6(4), 1365–1368. ISSN 1752-9867. doi:10.1093/mp/sss162

- SHI, J., GAO, H., WANG, H., LAFITTE, H.R., ARCHIBALD, R.L., YANG, M., HAKIMI, S.M., MO, H. & HABBEN, J.E., 2017. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnology Journal*. 15(2), 207–216. ISSN 1467-7652. doi:10.1111/pbi.12603
- SINGH, V., 2020. Chapter 1 - An introduction to genome editing CRISPR-Cas systems. In: SINGH V. & DHAR, P.K., eds. *Genome Engineering via CRISPR-Cas9 System*. Cambridge: Academic Press, 1–13. ISBN 978-0-12-818140-9. doi:10.1016/B978-0-12-818140-9.00001-5
- SINGH, V., BRADDICK, D. & DHAR, P.K., 2017. Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology. *Gene*. 599, 1–18. ISSN 0378-1119. doi:10.1016/j.gene.2016.11.008
- STACHLER, A.E. & MARCHFELDER, A., 2016. Gene Repression in Haloarchaea Using the CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-Cas I-B System. *The Journal of Biological Chemistry*. 291(29), 15226–15242. ISSN 1083-351X. doi:10.1074/jbc.M116.724062
- STEFFIN, D.H.M., HSIEH, E.M. & ROUCE, R.H., 2019. Gene Therapy: Current Applications and Future Possibilities. *Advances in Pediatrics*. 66, 37–54. ISSN 1878-1926. doi:10.1016/j.yapd.2019.04.001
- STINSON, B.M. & LOPARO, J.J., 2021. Repair of DNA Double-Strand Breaks by the Nonhomologous End Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry*. 90(1), 137–164. ISSN: 1545-4509. doi:10.1146/annurev-biochem-080320-110356
- STOVICEK, V., BORODINA, I. & FORSTER, J., 2015. CRISPR–Cas system enables fast and simple genome editing of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Metabolic Engineering Communications*. 2, 13–22. ISSN 2214-0301. doi:10.1016/j.meteno.2015.03.001
- SUN, Y., ZHANG, X., WU, CH., HE, Y., MA, Y., HOU, H., GUO, X., DU, W., ZHAO, Y. & XIA, L., 2016. Engineering Herbicide-Resistant Rice Plants through CRISPR/Cas9-Mediated Homologous Recombination of Acetolactate Synthase. *Molecular Plant*. 9(4), 628–631. ISSN 1674-2052. doi:10.1016/j.molp.2016.01.001
- SVITASHEV, S., YOUNG, J.K., SCHWARTZ, CH., GAO, H., FALCO, S.C. & CIGAN, A.M., 2015. Targeted Mutagenesis, Precise Gene Editing, and Site-Specific Gene Insertion in Maize Using Cas9 and Guide RNA. *Plant Physiology*. 169(2), 931–945. ISSN 1532-2548. doi:10.1104/pp.15.00793
- TAHA, E.A., LEE, J. & HOTTA, A., 2022. Delivery of CRISPR-Cas tools for in vivo genome editing therapy: Trends and challenges. *Journal of Controlled Release*. 342, 345–361. ISSN 0168-3659. doi:10.1016/j.jconrel.2022.01.013

- TANG, Y. & FU, Y., 2018. Class 2 CRISPR/Cas: an expanding biotechnology toolbox for and beyond genome editing. *Cell & Bioscience*. 8(1), 59. ISSN 2045-3701. doi:10.1186/s13578-018-0255-x
- TANWAR, A. & KUMAR, S., 2020. Chapter 15 - Genome editing of algal species by CRISPR Cas9 for biofuels. In: SINGH, V. & DHAR, P.K., ed. *Genome Engineering via CRISPR-Cas9 System*. Cambridge: Academic Press, 163–176. ISBN 978-0-12-818140-9. doi:10.1016/B978-0-12-818140-9.00015-5
- TAYLOR, T.H., GITLIN, S.A., PATRICK, J.L., CRAIN, J.L., WILSON, J.M. & GRIFFIN, D.K., 2014. The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. *Human Reproduction Update*. 20(4), 571–581. ISSN 1460-2369. doi:10.1093/humupd/dmu016
- UDDIN, F., RUDIN, CH.M. & SEN, T., 2020. CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. *Frontiers in Oncology*. 10, 1387. ISSN 2234-943X. doi:10.3389/fonc.2020.01387
- VANEGAS, K.G., JARCZYNSKA, Z.D., STRUCKO, T. & MORTENSEN, U.H., 2019. Cpf1 enables fast and efficient genome editing in Aspergilli. *Fungal Biology and Biotechnology*. 6, 6. ISSN 2054-3085. doi:10.1186/s40694-019-0069-6
- VERWAAL, R., BUITING-WIESENHAAN, N., DALHUIJSEN, S. & ROUBOS, J.A., 2018. CRISPR/Cpf1 enables fast and simple genome editing of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 35(2), 201–211. ISSN 1097-0061. doi:10.1002/yea.3278
- WADA, N., UETA, R., OSAKABE, Y. & OSAKABE, K., 2020. Precision genome editing in plants: state-of-the-art in CRISPR/Cas9-based genome engineering. *BMC Plant Biology*. 20(1), 234. ISSN 1471-2229. doi:10.1186/s12870-020-02385-5
- WANG, D., JIN, S., LU, Q. & CHEN, Y., 2023. Advances and Challenges in CRISPR/Cas-Based Fungal Genome Engineering for Secondary Metabolite Production: A Review. *Journal of Fungi*. 9(3), 362. ISSN 2309-608X. doi:10.3390/jof9030362
- WANG, F., WANG, CH., LIU, P., LEI, C., HAO, W., GAO, Y., LIU, Y.G. & ZHAO, K. 2016a. Enhanced Rice Blast Resistance by CRISPR/Cas9-Targeted Mutagenesis of the ERF Transcription Factor Gene OsERF922. *PLoS One*. 11(4), e0154027. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0154027
- WANG, H., HU, Y.CH., MARKOULAKI, S., WELSTEAD, G.G., CHENG, A.W., SHIVALILA, CH.S., PYNTIKOVA, T., DADON, D.B., VOYTAS, D.F., BOGDANOVA, A.J., PAGE, D.C. & JAENISCH, R., 2013. TALEN-mediated editing of the mouse Y chromosome. *Nature Biotechnology*. 31(6), 530–532. ISSN 1546-1696. doi:10.1038/nbt.2595
- WANG, L., MO, CH.Y., WASSERMAN, M.R., ROSTØL, J.T., MARRAFFINI, L.A. & LIU, S., 2019. Dynamics of Cas10 Govern Discrimination between Self and Non-self in Type III CRISPR-Cas Immunity. *Molecular Cell*. 73(2), 278-290.e4. ISSN 1097-2765. doi:10.1016/j.molcel.2018.11.008

- WANG, X., CAO, CH., HUANG, J., YAO, J., HAI, T., ZHENG, Q., WANG, X., ZHANG, H., QIN, G., CHENG, J., WANG, Y., YUAN, Z., ZHOU, Q., WANG, H. & ZHAO, J., 2016b. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*. 6, 20620. ISSN 2045-2322. doi:10.1038/srep20620
- WANG, Y., CHENG, X., SHAN, Q., ZHANG, Y., LIU, J., GAO, C. & QIU, J.L., 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*. 32(9), 947–951. ISSN 1546-1696. doi:10.1038/nbt.2969
- WILBIE, D., WALTHER, J. & MASTROBATTISTA, E., 2019. Delivery Aspects of CRISPR/Cas for in Vivo Genome Editing. *Accounts of Chemical Research*. 52(6), 1555–1564. ISSN 0001-4842. doi:10.1021/acs.accounts.9b00106
- XU, Y. & LI, Z., 2020. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 18, 2401–2415. ISSN 2001-0370. doi:10.1016/j.csbj.2020.08.031
- XUE, CH. & GREENE, E.C., 2021. DNA Repair Pathway Choices in CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. *Trends in Genetics*. 37(7), 639–656. ISSN 0168-9525. doi:10.1016/j.tig.2021.02.008
- YAN, S., TU, Z., LIU, Z., FAN, N., YANG, H., YANG, S., YANG, W., ZHAO, Y., OUYANG, Z., LAI, CH., YANG, H., LI, L., LIU, Q., SHI, H., XU, G., ZHAO, H., WEI, H., PEI, Z., LI, S., LAI, L. & LI, X.J., 2018. A Huntingtin Knockin Pig Model Recapitulates Features of Selective Neurodegeneration in Huntington's Disease. *Cell*. 173(4), 989-1002.e13. ISSN 0092-8674. doi:10.1016/j.cell.2018.03.005
- YOGI, L., KATHAYAT, A., BHANDARI, S., PAUDEL, P. & MISHRA, P., 2024. An overview on the impact of genetically engineered organisms on crop yield and safety. *Archives of Agriculture and Environmental Science*. 9, 175–179. ISSN: 2456-6632. doi:10.26832/24566632.2024.0901025
- ZEBEC, Z., MANICA, A., ZHANG, J., WHITE, M.F. & SCHLEPER, CH., 2014. CRISPR-mediated targeted mRNA degradation in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Research*. 42(8), 5280–5288. ISSN 0305-1048. doi:10.1093/nar/gku161
- ZETSCHKE, B., GOOTENBERG, J.S., ABUDAYYEH, O.O., SLAYMAKER, I.M., MAKAROVA, K.S., ESSLETZBICHLER, P., VOLZ, S.E., JOUNG, J., VAN DER OOST, J., REGEV, A., KOONIN, E.V. & ZHANG, F., 2015. Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell*. 163(3), 759–771. ISSN 0092-8674. doi:10.1016/j.cell.2015.09.038
- ZHAI, Y., YU, K., CAI, S., HU, L., AMOO, O., XU, L., YANG, Y., MA, B., JIAO, Y., ZHANG, CH., KHAN, M.H.U., KHAN, S.U., FAN, CH. & ZHOU, Y., 2020. Targeted mutagenesis of

- BnTT8 homologs controls yellow seed coat development for effective oil production in *Brassica napus* L. *Plant Biotechnology Journal*. 18(5), 1153–1168. ISSN 1467-7652. doi:10.1111/pbi.13281
- ZHANG, D., ZHANG, Z., UNVER, T. & ZHANG, B., 2021. CRISPR/Cas: A powerful tool for gene function study and crop improvement. *Journal of Advanced Research*. 29, 207–221. ISSN 2090-1232. doi:10.1016/j.jare.2020.10.003
- ZHANG, G.CH., KONG, I.I., KIM, H., LIU, J.J., CATE, J.H.D. & JIN, Y.S., 2014. Construction of a Quadruple Auxotrophic Mutant of an Industrial Polyploid *Saccharomyces cerevisiae* Strain by Using RNA-Guided Cas9 Nuclease. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(24), 7694–7701. ISSN: 1098-5336. doi:10.1128/AEM.02310-14
- ZHANG, M., LIU, Q., YANG, X., XU, J., LIU, G., YAO, X., REN, R., XU, J. & LOU, L., 2020. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of *Clpsk1* in watermelon to confer resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*. *Plant Cell Reports*. 39(5), 589–595. ISSN 1432-203X. doi:10.1007/s00299-020-02516-0
- ZHANG, Y., CHEN, S., YANG, L. & ZHANG, Q., 2023. Application progress of CRISPR/Cas9 genome-editing technology in edible fungi. *Frontiers in Microbiology*. 14. ISSN 1664-302X. doi:10.3389/fmicb.2023.1169884
- ZHANG, Y., ZHANG, F., LI, X., BALLER, J.A., QI, Y., STARKER, C.G., BOGDANOVE, A.J. & VOYTAS, D.F., 2013. Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant Physiology*. 161(1), 20–27. ISSN 0032-0889. doi:10.1104/pp.112.205179
- ZHANG, Z., GE, X., LUO, X., WANG, P., FAN, Q., HU, G., XIAO, J., LI, F. & WU, J., 2018. Simultaneous Editing of Two Copies of *Gh14-3-3d* Confers Enhanced Transgene-Clean Plant Defense Against *Verticillium dahliae* in Allotetraploid Upland Cotton. *Frontiers in Plant Science*. 9, 842. ISSN 1664-462X. doi:10.3389/fpls.2018.00842
- ZHAO, J., FANG, H. & ZHANG, D., 2020. Expanding application of CRISPR-Cas9 system in microorganisms. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 5(4), 269–276. ISSN 2405-805X. doi:10.1016/j.synbio.2020.08.001
- ZHOU, X., RENAUER, P.A., ZHOU, L., FANG, S.Y. & CHEN, S., 2023. Applications of CRISPR technology in cellular immunotherapy. *Immunological Reviews*. 320(1), 199–216. ISSN 1600-065X. doi:10.1111/imr.13241

Seznam použitých obrázků a tabulek

Obrázek č. 1 – Schéma CRISPR lokusu; Barman *et al.*, 2020; str. 14

Obrázek č. 2 – Funkční klasifikace Cas proteinů; Makarova *et al.*, 2020; str. 15

Obrázek č. 3 – Schéma CRISPR/Cas9 systému s gRNA; In: Tufts Wordpress Blogs and Websites. Online. [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: <https://sites.tufts.edu/crispr/crispr-mechanism>; str. 16

Obrázek č. 4 – Schéma struktury proteinu Cas9 a jeho aktivace s gRNA; Cavanagh *et Garrity*, 2014; str. 18

Obrázek č. 5 – Rozdíly systémů CRISPR/Cas9 a CRISPR/Cas12a; Ouedraogo *et Tsang*, 2020; str. 19

Obrázek č. 6 – Obecný mechanismus CRISPR/Cas; Hille *et al.*, 2018; str. 20

Obrázek č. 7 – Funkční složky mechanismu CRISPR/Cas systému třídy 1 a 2; Hille *et Charpentier*, 2016; str. 21

Obrázek č. 8 – Hlavní milníky vývoje CRISPR/Cas9 systému; Chavez-Granados *et al.*, 2022; str. 25

Obrázek č. 9 – Obecné schéma ZFN komplexu navázaného na DNA; Carroll *et al.*, 2011; str. 27

Obrázek č. 10 – Stavba komplexu TALEN; Joung *et Sander*, 2013; str. 27

Obrázek č. 11 – Cesty homologní rekombinace; Qi *et al.*, 2023; str. 31

Obrázek č. 12 – CRISPR/Cas9 opravy DSBs pomocí NHEJ nebo HDR; Adhikari *et Poude*, 2020; str. 32

Obrázek č. 13 – Časová osa zdůrazňující hlavní události a vývoj genové terapie; Uddin *et al.*, 2020; str. 42

Tabulka č. 1 – Srovnání metod genového inženýrství, Rahim *et al.*, 2021; str. 28