

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Možnosti editování savčího genomu

Bakalářská práce

Martin Liptay

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce: Mgr. Juraj Kramara, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod odborným vedením Mgr. Juraje Kramary, Ph.D. a pouze s použitím citované literatury.

V Olomouci, 9. 5. 2014

.....

Martin Liptay

Souhrn

Účelem teoretické části této práce je poskytnout přehled nejpoužívanějších nástrojů, které v posledních letech umožňují precizní a efektivní provádění cílených modifikací genomů savců. Těmito nástroji jsou *zinc finger* nukleázy, TALE nukleázy a CRISPR/Cas9 systém.

Všechny tyto metody jsou založeny na rozpoznávání specifických míst v genomu a indukci dvouvláknových zlomů v určité vzdálenosti za rozpoznávanou oblastí. Vznikem těchto zlomů je iniciována kaskáda dějů vedoucí k reparaci poškozené oblasti DNA. Tato oprava je prováděna cestou nehomologního spojování konců chromozomů (NHEJ), nebo cestou homologní rekombinace (HR). Při provádění cílených změn jsou ve skutečnosti využívány přirozené vlastnosti těchto mechanismů. Zatímco nepřesný a chybový proces NHEJ může být využit při indukci delecí a genových disrupcí, precizní proces HR může být využit např. pro účely přesných inzercí či substitucí.

Experimentální část se zabývá praktickými aspekty designu TALE nukleázy a sestavením disrupční kazety pro účely přípravy reportérové linie exprimující fúzní protein MDC1-GFP pod kontrolou nativního promotoru.

Summary

The purpose of the theoretical part of this work is to provide a summary of the recent most widely used tools allowing precise and effective introduction of targeted modifications into mammal genomes. These tools are represented by the zinc finger nucleases, TALE nucleases and the CRISPR/Cas9 system.

All of these methods are based on recognition of specific sites within the genome and induction of the double strand breaks in certain distances behind the recognition site. Induction of these breaks initiates a cascade leading to reparation of the damaged DNA region. This reparation is performed by the non-homologous end joining (NHEJ), or homologous recombination (HR) repair pathway. Interestingly, intrinsic attributes of these pathways are used for introducing targeted changes in the genome. While inaccurate and error-prone NHEJ can be used for inducing deletions and gene disruptions, precise HR can be used e.g. for accurate insertions or substitutions.

Experimental part of this work is focused on practical aspects of TALE nuclease design and construction of a disruption cassette that will be used for establishing a reporter cell line expressing MDC1-GFP fusion protein controlled by native promoter.

Tímto bych chtěl poděkovat svému školiteli Mgr. Juraji Kramarovi, Ph.D. za odborné vedení při tvorbě této práce, za jeho ochotu, trpělivost a cenné rady a předané praktické zkušenosti, zcela jistě přesahující rámec této práce. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Jiřímu Kohoutkovi, Ph.D. z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně a Mgr. Janu Vrbskému, Ph.D. z Biologického ústavu LF MU v Brně za poskytnutí části materiálu.

Obsah

1. Úvod	8
2. Vývoj současných metod editování genomů savců	11
3. ZFN	16
3.1 Struktura.....	16
3.2 Design.....	19
4. TALEN.....	24
4.1 Struktura.....	24
4.2 Design.....	29
5. Crispr/Cas	32
5.1 Struktura.....	33
5.2 Design.....	36
6. Možnosti nukleáz a jejich aplikace	39
7. Cíle práce	44
8. Materiál a metodika	45
8.1 Chemikálie	45
8.2 Roztoky a média	46
8.3 Přístrojové vybavení.....	47
8.4 Materiál	48
8.4.1 Plazmidy	48
8.4.2 Kmen bakterií.....	50
8.4.3 Oligonukleotidy	50
8.5 Software	51
8.6 Příprava a transformace kompetentních bakterií.....	51
8.7 Kultivace bakterií pro izolaci plazmidů	51
8.8 Izolace plazmidové DNA z bakterií.....	52

8.9 Štěpení vektoru	52
8.10 Defosforylace vektoru	52
8.11 Purifikace vektoru.....	52
8.12 PCR amplifikace.....	52
8.13 Elektroforéza v agarózovém gelu.....	54
9. Výsledky.....	55
9.1 Návrh páru TALE nukleáz	55
9.2 Příprava rekombinantního vektoru s disruptivní kazetou pro vytvoření fúze MDC1-GFP	56
9.3 Amplifikace oblastí genu MDC1	58
10. Diskuze.....	60
11. Závěr	63
12. Seznam literatury.....	64
13. Seznam zkratk.....	79

1. Úvod

Ve výzkumu v oblastech biologie a biomedicíny stále více stoupá poptávka po metodách, které by umožnily genové manipulace v konkrétních místech genomu, jakými jsou např. genové inaktivace, delece, opravy, či inserce celých genů. Od těchto nástrojů se také očekává, že ulehčí studium toho, jak genotyp ovlivňuje fenotyp ať už buňky, či celého organismu.

Nástroje a techniky, které byly dosud středem výzkumu v oblasti manipulování se savčími genomy, se potýkaly s celou řadou zásadních nedostatků, mimo jiné nespolehlivostí, nepřesností, nízkou účinností správné inkorporace vytvořených konstruktů do cílových míst na chromozomu, časovou náročností *screeningové* strategie a zvýšeným rizikem vzniku nechtěných mutací (Gaj *et al.*, 2013). K těmto dříve používaným technikám patří manipulování s genomy organismů prostřednictvím homologní rekombinace. Tyto manipulace byly rozsáhle prováděny v bakteriích, kvasinkách a v některých specializovaných buněčných liniích, nebyly však použitelné pro jiné genetické systémy, např. savčí somatické buňky (Porteus, 2010).

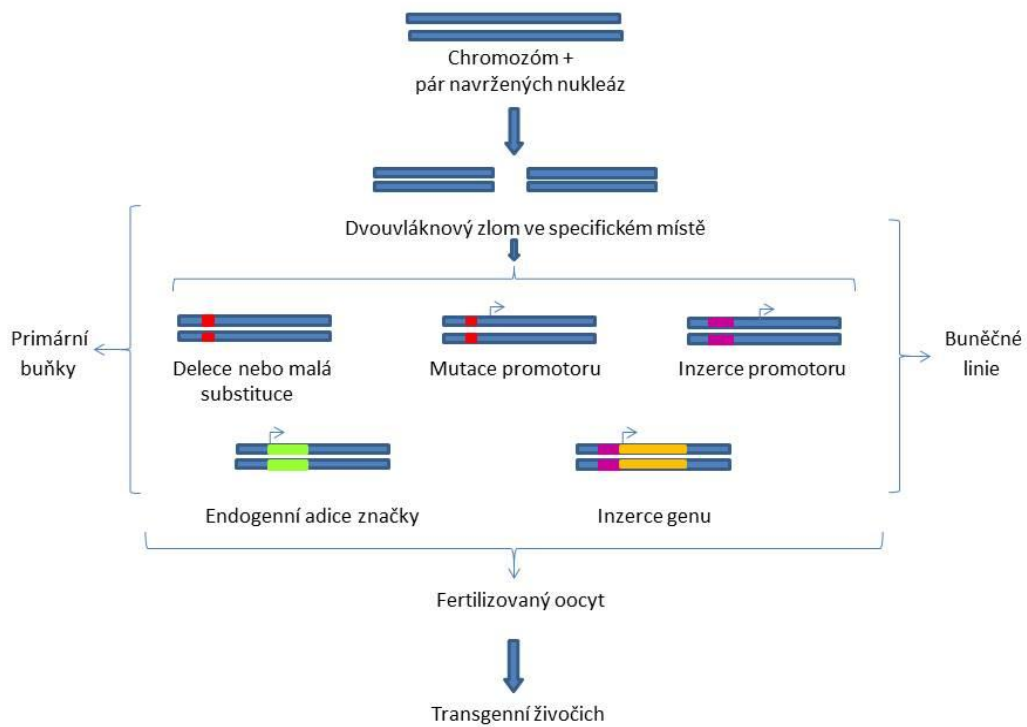
Vytrvalost a tvrdá práce při hledání dostatečně účinných nástrojů pro genové modifikace se vyplatila. V posledních letech se na scéně těchto technologií objevily nové, zatím nejefektivnější nástroje. Prvními dvěma jsou chimerické enzymy, z nichž jedna skupina enzymů je složena z nukleáz a zinkových prstů (*Zinc finger nucleases*, *ZFNs*), druhá je složena z nukleáz a efektorů podobných transkripčním aktivátorům (*Transcription activator-like effector nucleases*, *TALENs*). Třetí systém využívá komponenty CRISPR/Cas (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins*) imunitního systému prokaryot. Všechny tři metody umožňují jednoduché provádění genových modifikací v širokém spektru modelových organismů včetně lidských buněčných linií (Gaj *et al.*, 2013).

Přesné genové modifikace jsou prováděny prostřednictvím indukce dvouvláknových zlomů (*double strand breaks*, *DSBs*) v definovaných místech genomu. Vlivem chybovosti mechanismu NHEJ při opravách poškození DNA, dochází k delecím částí sekvencí, případně celých genů, a následné disrupci genů

(Wyman *et Kanaar*, 2006). Oproti tomu přesnost procesu HR může být využita pro „citlivější“ a „jemnější“ modifikace, např. malé cílené inserce v přesných místech (Urnov *et al.*, 2010).

Přesnost vazby těchto nukleáz do cílových míst chromosomů je dána modulární strukturou DNA vazebné domény, čímž získávají tyto systémy obrovskou flexibilitu v ohledu vazby do konkrétních cílových sekvencí v genomu (Gaj *et al.*, 2013). Právě programovatelná specifita domén těchto proteinů pro různé sekvence v genomu dostala tyto nástroje do popředí genomového editování.

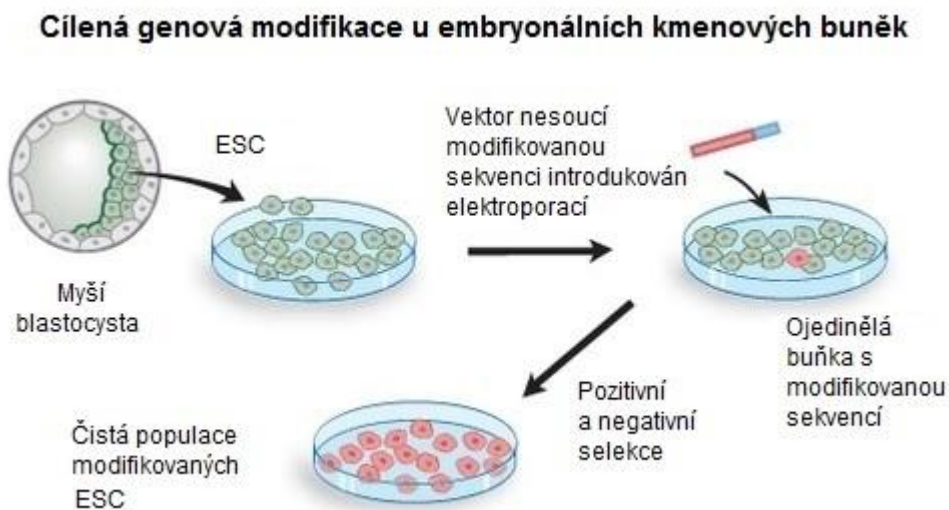
Změny indukované výše zmíněnými přístupy zasahují do nejhlubší možné úrovně genetické informace, což z nich dělá ideální nástroje pro studium provázanosti genotypu s fenotypem. Zavedené změny jsou trvalé, na rozdíl od změn vyvolaných RNA interferencí, kdy je *knockdown* genu nekompletní, obtížně reprodukovatelný a má i další negativa, která limitují praktické aplikované využívání RNAi technologie (Gaj *et al.*, 2013). Kromě plného *knockoutu* genu je na rozdíl od RNA interference také možné modifikovat netranskribované úseky DNA, čímž je umožněno i studium nekódujících oblastí genomu (Gutschner *et al.*, 2011; Sanyal *et al.*, 2012).



Obr. 1: Přehled možností genomového editování za využití páru sestavených nukleáz. Indukce dvouvláknového zlomu může být využita jako iniciátor cílených, záměrných modifikací genetické informace. Metody prezentované v této práci umožňují editovat genetickou informaci v genomech buněčných linií, primárních buněk (včetně somatických a pluripotentních kmenových buněk) a fertilizovaných oocytů za účelem generování transgenních živočichů. (Upraveno podle McMahon *et al.*, 2012)

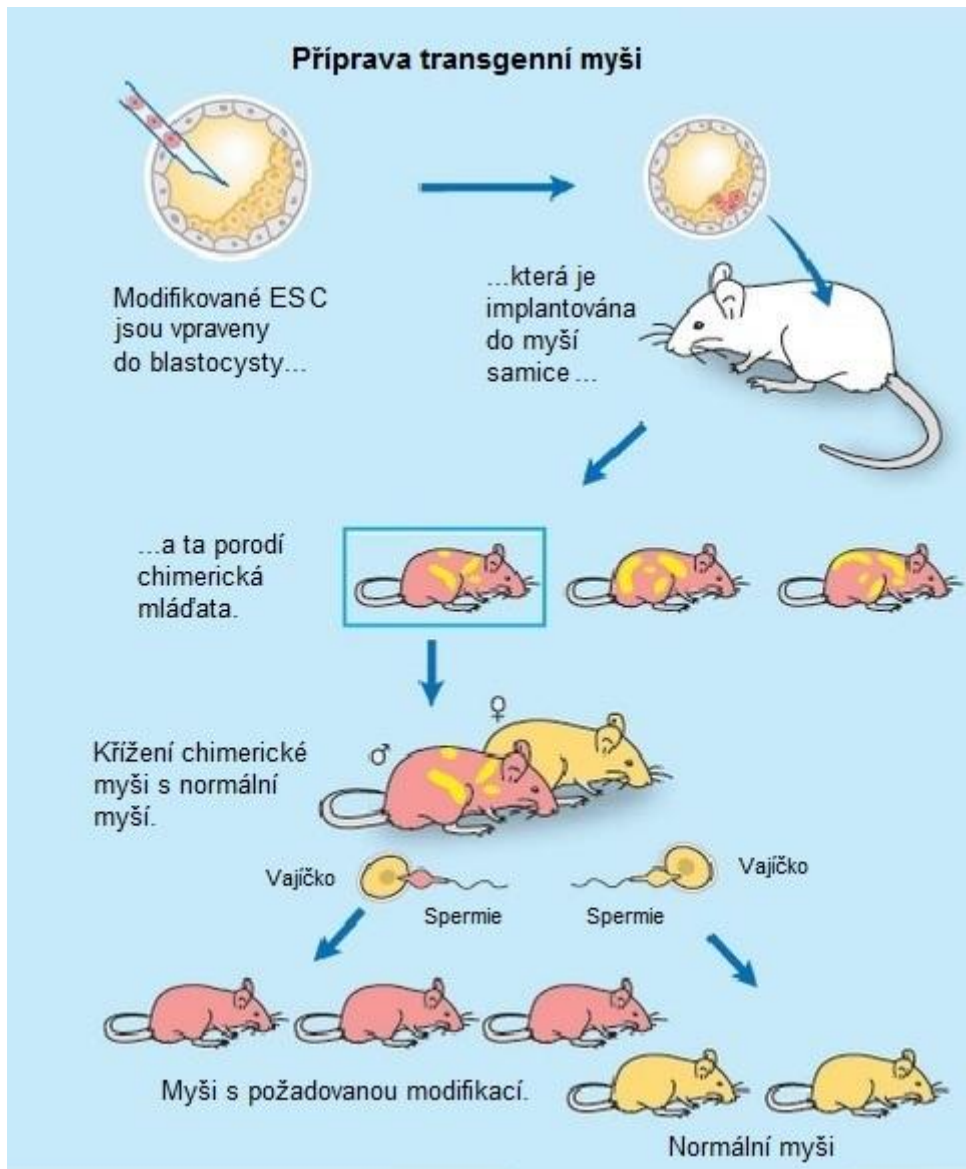
2. Vývoj současných metod editování genomů savců

První úspěšné cílené změny savčího genomu bylo dosaženo v rámci výzkumu, v němž byly indukovány cílené a specifické změny v genomu myších embryonálních kmenových buněk mechanismem homologní rekombinace (viz Obr. 2). Kmenové buňky s požadovanou genovou disrupcí byly posléze vloženy do blastocysty a embryo bylo vloženo do myši samice. Výsledkem byla chiméra s *wild type* (*wt*) i rekombinantními buňkami (viz Obr. 3). Myši s požadovanou disrupcí v germinální linii byly dále kříženy s *wt* jedinci, přičemž v F1 generaci se vyšťepila polovina homozygotů s *wt* genotypem a polovina heterozygotů s rekombinantním genotypem. Dalším křížením heterozygotů nesoucích modifikovanou alelu, bylo možné získat *knockout* myši, tj. jedince se sestavou dvou modifikovaných alel (viz Obr. 3).



Obr. 2: Obecná strategie přípravy linie embryonálních kmenových buněk s modifikací v požadovaném genu.

(Upraveno podle http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/advanced.html)



Obr. 3: Embryonální kmenové buňky s požadovanou disrupcí byly injikovány do blastocysty a ta byla vložena do myši samice.

(Upraveno podle http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/advanced.html)

V roce 2007 byla trojice vědců stojících za touto prací, Mario Capecchi, Sir Martin Evans a Oliver Smithies, oceněna Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu za objevy v oblasti indukce specifických genových modifikací v myších prostřednictvím embryonálních kmenových buněk (Mak, 2007).

Nicméně i navzdory nesmírnému přínosu tohoto objevu přetrvávala potřeba jednoduchého nástroje umožňujícího účinně modifikovat savčí genetickou informaci bez nutnosti časově a finančně náročného vytváření myších zárodečných linií.

Současně bylo žádoucí, aby nové přístupy umožnily editovat také genetickou informaci lidských buněk, kterou, pochopitelně, není možné měnit výše uvedenou strategií.

Otcem nejmodernějších metod editování genomů využívajících vysoce specifických fúzních nukleáz je Srinivasan Chandrasegaran z Univerzity Johna Hopkinse z laboratoře Hamiltona Smitha. Chandrasegaran se zabýval možnostmi *redesignu* restričních enzymů za účelem zvýšení specifity jejich vazby v různých místech genomu. Pro začátek svého výzkumu si zvolil enzym *FokI*, restriční endonukleázu druhého typu, která je přirozeně produkována bakterií *Flavobacterium okeanoicoites* (Baker, 2012; Mahfouz *et al.*, 2011). Tento protein má N terminální DNA vazebnou doménu a C terminální nescifickou restriční doménu (Kim *et al.*, 1997). Enzym ve své přirozené konfiguraci váže N terminální doménou do nepalindromické sekvence 5'-GGATG-3', přičemž restriční doména štěpí obě vlákna DNA, jedno 9 a druhé 13 nukleotidů (nt) *downstream* od rozpoznávaného místa (Kim *et Chandrasegaran*, 1994).

Při práci s *FokI* Chandrasegaran došel k myšlence, že by k restriční doméně mohl připojit DNA vazebné motivy proteinů jiného původu a vytvořit tak chimerický enzym, který by rozpoznával a štěpil předem zvolenou sekvenci DNA. I přes počáteční úspěch s *Ubx* homeodoménou octomilek, nakonec volba padla na proteiny obsahující motivy zinkových prstů (*Zinc fingers*), především díky jejich modulární struktuře (Kim *et al.*, 1996). Jedná se o motivy, které se běžně vyskytují jako součásti transkripčních faktorů a DNA regulačních proteinů (Pabo *et al.*, 2001). Tou dobou zároveň probíhal výzkum Jeremyho Berga pracujícího také na univerzitě Johna Hopkinse, který se zabýval možnostmi designu nových zinkových prstů (Baker, 2012).

V roce 1996 byla publikována práce o prvních úspěšně sestavených fúzních nukleázách, které dostaly název *Zinc finger* nukleázy (ZFN) (Baker, 2012; Kim *et al.*, 1996). Tento úspěch otevřel dveře mnoha odvětvím výzkumu. Možnost sestavení nukleáz s vazebnou doménou specifickou pro požadované sekvence zjednodušilo např. vytváření *knockout* mutantů u různých modelových organismů, studium funkce genů prostřednictvím komplementace, vytváření reportérových systémů aj. (Baker, 2012).

Před několika lety byl také úspěšně k enzymu *FokI* připojen vazebný motiv, který byl objeven v proteinech TALE (*transcriptional activator-like effector*) a tento konstrukt se označuje jako TALEN (*transcriptional activator-like effector nuclease*). I přes to, že zatím TALE nukleázy nebyly využívány do té míry jako ZF nukleázy, od začátku bylo jasné, že budou mít širší pole aplikací, převážně díky jednoduché struktuře a primitivnímu vazebnému kódu (Baker, 2012).

Přirozeně se TALE proteiny vyskytují jako virulentní faktory některých fytopatogenních bakterií. Tyto bakterie využívají pro mikroinjekci virulentních faktorů do rostlinné buňky sekreční systém III. typu. Proteiny jsou poté translokovány do jádra, kde se váží ke svým cílovým sekvencím v DNA a napodobují přirozené transkripční faktory rostlinné buňky, čímž deregulují expresi genů, jejichž produkty se podílejí např. na mechanismech rezistence, nebo naopak projevu infekce (Gurlebeck *et al.*, 2005; Romer *et al.*, 2009).

Dana Carroll působící na Utažské univerzitě jako první přišel s myšlenkou, že při indukci dvouvláknového zlomu v konkrétním místě genomu, by mohl vzniknout požadovaný efekt indukce změny v genetické informaci pouze na základě chybovosti, resp. nepřesnosti vlastních buněčných reparačních mechanismů. Tento předpoklad vyústil ve vzájemnou spolupráci Dana Carrolly s Chandrou Srinivasanem. Úspěšně se jim podařilo za využití navržených nukleáz indukovat dvouvláknové zlomy v DNA žabích oocytů a detekovat proces reparace v těchto místech. Dalším krokem bylo provedení cílené mutace v genomu. Provedli experiment, v němž do larvy octomilky vnesli DNA kódující ZF nukleázu specifickou pro sekvenci genu *yellow*. Předpokládali, že dojde k přerušení a následné inaktivaci genu v důsledku chybovosti opravných mechanismů. Skutečně, tělo larvy exprimující tuto ZFN vykazovalo změny v pigmentaci (Baker, 2012).

Struktura domén těchto proteinů umožňuje vazbu i jiných efektorových domén, než jen nukleázové, a to např. transkripční aktivátorové, rekombinázové, transpozázové a represorové (Gaj *et al.*, 2013). Vazebné domény odvozené od těchto proteinů tudíž poskytují širokou škálu potenciálních možností aplikací. Kromě již zmíněné indukce dvouvláknových zlomů umožňují regulovat, resp. cíleně ovlivňovat expresi cílových genů díky připojené transkripční aktivátorové doméně (Uhde-Stone *et al.*, 2014) a provádět introdukci, inverzi, či translokaci požadovaných

sekvencí rekombinázovou nebo transpozázovou doménou, čímž umožňují komplexně měnit strukturu genomu a regulovat či ovlivňovat expresi genů (Mercer *et al.*, 2012).

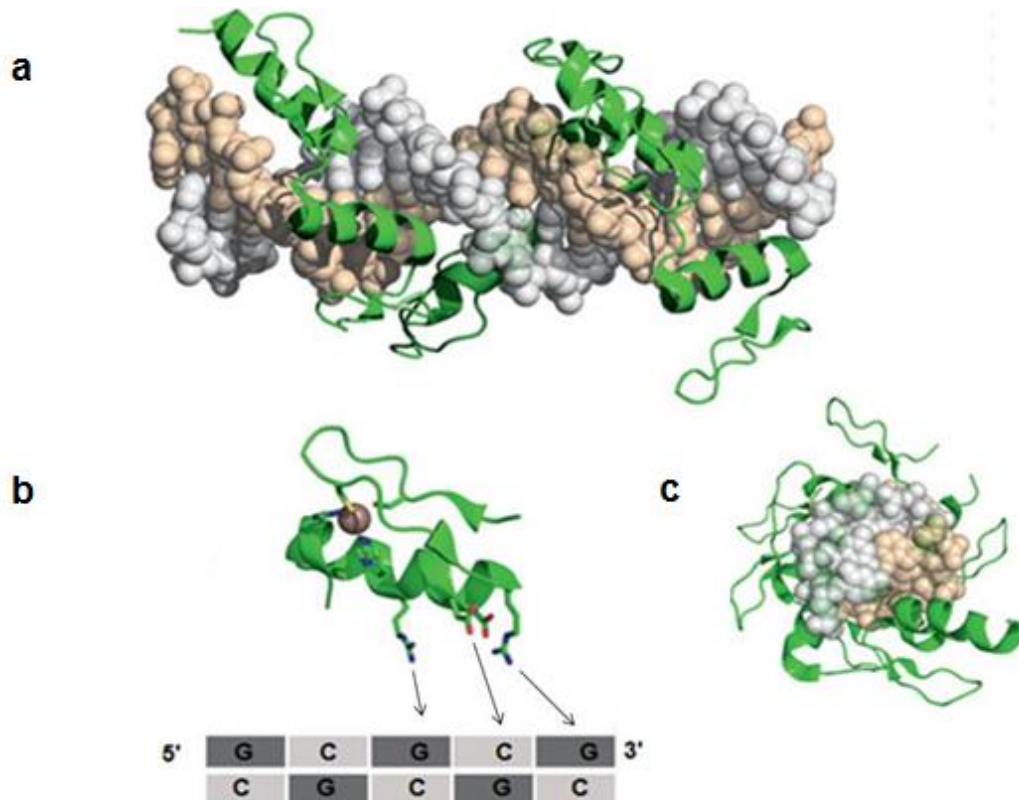
3. ZFN

3.1 Struktura

Struktury zinkového prstu jsou v eukaryotických organismech častými DNA vazebnými motivy. Svůj název dostaly podle kovalentně vázaného atomu zinku, na němž je závislá stabilita celé struktury (Lai *et Elliot*, 2007; Struthers *et al.*, 1998). Rozlišují se tři základní skupiny zinkových prstů, i) Cys₆ v metabolických regulátorech hub, ii) Cys₂Cys₂ nacházejících se v jaderných receptorech steroidních hormonů a iii) prsty s doménou Cys₂His₂. Nejběžněji se vyskytujícími jsou proteiny zinkových prstů s konfigurací Cys₂His₂ (Papworth *et al.*, 2006). Tato skupina zinkových prstů je nejčastěji používána v proteinovém inženýrství, včetně konstrukce ZF nukleáz (Lai *et Elliot*, 2007).

Každý ze zinkových prstů je tvořen sekvencí 30 aminokyselin a celý peptidový řetězec má konzervativní konfiguraci ββα (Beerli *et Barbas*, 2002; Wolfe *et al.*, 2000). Jeden z cysteinů je lokalizován na β skládaném listu, druhý v sekvenci aminokyselin spojující tyto dva listy a oba histidiny se nacházejí v α šroubovici (Lai *et Elliot*, 2007). ZF motivy se váží na DNA do oblastí velkého žlábků, přičemž každý z motivů se váže ke třem bázím v sekvenci (viz Obr. 4b) (Wolfe *et al.*, 2000).

Tato interakce je zprostředkována především argininovými aminokyselinovými rezidui, které se nacházejí na povrchu vedlejších řetězců α-šroubovice motivu zinkového prstu (Wolfe *et al.*, 2000).



Obr. 4: Trojrozměrné modely ZF proteinů. **a)** Struktura ZF proteinu vázaného na DNA při laterálním pohledu. Struktura je tvořena šesti motivy zinkového prstu vázících se do oblasti velkého žlábků v DNA. **b)** Model struktury jednoho motivu zinkového prstu vázícího se k tripletu v sekvenci DNA. **c)** Struktura ZF proteinu vázaného na DNA při pohledu zepředu. (Upraveno podle Perez-Pinera *et al.*, 2012)

Pro požadovanou funkci proteinu je potřeba k doméně vazebné připojit doménu efektorovou. Pro účely delecí, inaktivací, substitucí, či inzercí, se používá doména s endonukleázovou aktivitou. Bylo zjištěno, že nejvhodnějším enzymem pro účely těchto manipulací je nukleáza *FokI* (Baker, 2012; Urnov *et al.*, 2010). Jedná se o endonukleázu IIS typu, jejíž účinnost byla zvýšena dodatečnými modifikacemi. Mezi jinými byla identifikována hyperaktivní varianta nukleázy *FokI*, která byla pojmenována *Sharkey*. Při jejím použití bylo docíleno vyšší četnosti úspěšných sestřihů DNA jak v *in vitro*, tak *in vivo* podmínkách (Guo *et al.*, 2010).

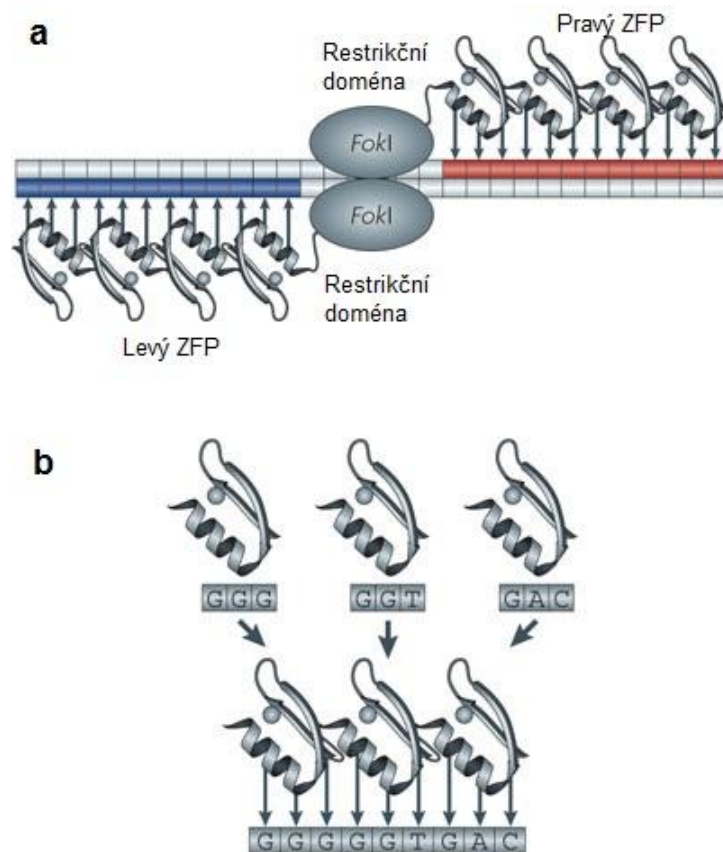
FokI je aktivní jako dimer a proto je velmi důležité precizně navrhnout jejich strukturu s ohledem na sekvenci cílového místa, opačnou orientaci každé z vazebných domén v dimeru a dodržení vhodné vzdálenosti mezi vazebnými

doménami tak, aby měli katalytické domény *FokI* prostor pro dimerizaci a štěpení DNA (Perez-Pinera *et al.*, 2012).

V současné době používaná varianta katalytické domény *FokI* vykazuje v důsledku nahrazení některých aminokyselin v místě dimerizace aminokyselinami s opačným nábojem, aktivitu pouze za formace heterodimerů (Doyon *et al.*, 2011). Byly ale identifikovány i varianty umožňující simultánní použití více autonomních párů nukleáz specifických pro odlišné lokusy, přičemž nedochází ke křížení reaktivity monomerů jednotlivých párů. Použití těchto variant katalytické domény nukleázy *FokI* výrazně redukuje frekvenci cytotoxických účinků ZF nukleáz (Sollu *et al.*, 2010).

3.2 Design

Pro aplikace ZFN je klíčovou vlastností možnost jejich sériového řazení, čímž vzniká vazebná doména složená z několika zinkových prstů, rozpoznávající konkrétní sekvenci v genomu. Pro dosažení vyšší specifity však bylo potřebné propojit více než běžně se vyskytující 3 zinkové prsty. V tomto ohledu byl velmi významný objev vysoce konzervativní polypeptidové spojnicové sekvence, která umožnila propojení až šesti zinkových prstů (Liu *et al.*, 1997). Takto připravené ZFN rozeznávají úseky DNA o velikostech 9 až 18 bp (Liu *et al.*, 1997), přičemž šest domén je maximálním možným počtem zinkových prstů, které je možné propojit (Kim *et Pabo*, 1998; Liu *et al.*, 1997; Mani *et al.*, 2005). K této vazebné doméně je připojena doména efektorová.



Obr. 5: Struktura a design ZF nukleázy. **a)** Model dimeru ZF nukleázy rozpoznávající cílovou sekvenci. Každý z monomerů nese *FokI* restriční doménu připojenou k DNA vazebné doméně tvořené motivy zinkových prstů. Na tomto schématu jsou ukázány proteiny složené ze čtyř zinkových prstů rozpoznávající sekvence vybarvené modře a červeně. Rozpoznávaná místa jsou od sebe oddělena nejčastěji pěti až šesti bázemi. **b)** Strategie *modular assembly* tvorby proteinu rozpoznávajícího 9 bp. Prsty specifické pro jednotlivé triplety jsou připojovány k sobě za vzniku kompletní DNA vazebné domény. (Upraveno podle Urnov *et al.*, 2010)

Navzdory desetiletí trvajícím výzkumu a velkému množství provedených studií v této oblasti, stále ještě tato technologie nedosáhla naplno svého potenciálu a to především z důvodu některých obtíží znepříjemňujících jejich konstrukci (Perez-Pinera *et al.*, 2012).

Jedním z limitujících faktorů této metody je, že nelze připravit konstrukt specifický pro jakoukoli sekvenci v DNA vzhledem k preferenční vazbě zinkových prstů na G bohaté sekvence DNA (Isalan, 2012). Byla prováděna řada pokusů o cílenou vazbu do oblastí chudých na guanin, ale tyto pokusy končili převážně neúspěchem (Ramirez *et al.*, 2008). Preference vazby ZF na G bohaté sekvence je

dána interakcemi mezi DNA a proteinem ve velkém žlábků, kam se ZF proteiny váží. Argininové zbytky ZF odpovědné za specifickou vazbu na DNA interagují především s guaninem (Isalan, 2012; Seeman *et al.*, 1976). Navíc překrývající se části dvou sousedních zinkových prstů mají prostorovou konfiguraci, při které je nejstabilnější vazba v první a třetí pozici rozpoznávaného místa právě na guanin (Isalan, 2012; Isalan *et al.*, 1997). Toto chování ZF proteinů znesnadňuje design ZF nukleáz, jelikož důsledkem preferenční vazby do G bohatých oblastí je mj. to, že je prakticky velmi obtížné sestavit dimerickou nukleázu s monomery v opačné orientaci, v požadované vzájemné vzdálenosti, a zároveň dodržet požadavek na vazbu všech motivů do G bohaté sekvence, ideálně v genomu jedinečně se vyskytující (Isalan, 2012; Pabo *et al.*, 2001).

Jak jsem již zmínil, jedním z faktorů omezujících konstrukci funkčních ZF nukleáz je také potřebná vzdálenost mezi dvěma vazebnými doménami dvou monomerů. Ta je rovna 5 až 7 nukleotidům a je dána designem a strukturou spojníku mezi vazebnou a restriční doménou obou monomerů. Pro většinu aplikací se používají spojníky -LRGS- (Maeder *et al.*, 2008) vytvářející mezeru 5-6 bází, -QNKK- (Bibikova *et al.*, 2001) vytvářející mezeru 6 bází a -TGQKD- vytvářející mezeru 7 bází. Všechny tyto spojníky optimálně propojují terminální histidin ZFP a -QLV počátek restriční domény *FokI* (Isalan, 2012).

Celá řada vědeckých týmů se zabývala syntézou zinkových prstů specifických pro různé kombinace nukleotidů v tripletech. V dnešní době je již sestavená knihovna těchto proteinů specifických pro téměř všech 64 kombinací nukleotidových tripletů (Pabo *et al.*, 2001; Perez-Pinera *et al.*, 2012). Samotná struktura zinkových prstů umožňuje sériové propojení jednotlivých proteinů specifických pro dílčí triplety (viz Obr. 5), čímž je umožněno sestavit vazebnou doménu specifickou pro odlišné a různě dlouhé sekvence rozdílných biologických druhů.

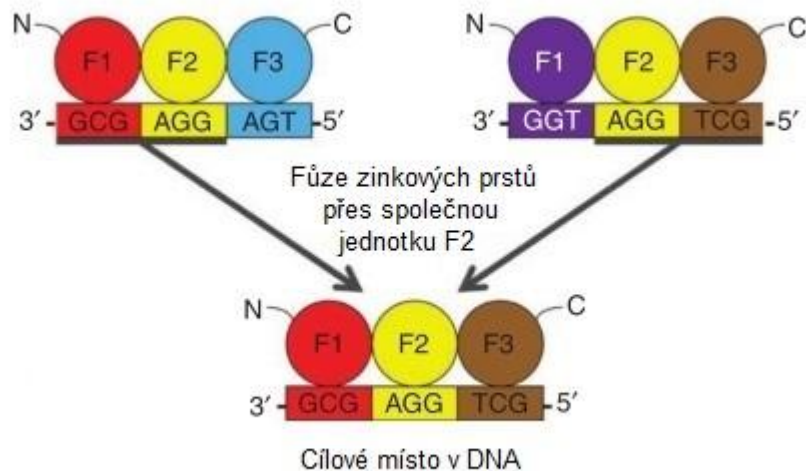
Stále více se tato technologie stává dostupnější jak cenově, rychlostí sestavení požadovaných enzymů, tak i metodami jejich sestavování, kdy se využívá běžných DNA rekombinantních metod a technologie se tak stává dostupnější širšímu okruhu výzkumných laboratoří. Postupně se rozvíjí strategie syntézy nových konstruktů, přičemž tyto přístupy se dají rozdělit do dvou základních kategorií (Maeder *et al.*, 2008). Nejzákladnější strategií syntézy nových konstruktů je tzv. MA

system (*modular assembly*), který umožňuje výběr jednotlivých tripletů vázících zinkových prstů s charakterizovanými specifikacemi (Beerli *et* Barbas, 2002; Kim *et al.*, 2009; Maeder *et al.*, 2008). Prostřednictvím bioinformatických nástrojů je poté možné vybrat další moduly do vazebné domény enzymu (Mandell *et* Barbas, 2006; Perez-Pinera *et al.*, 2012). I přesto, že je tento přístup skládání konstruktů snadno proveditelný, efektivita přípravy funkčního páru ZFN je nižší než 6 % (Ramirez *et al.*, 2008) a sestavené nukleázy mohou mít navíc nízkou aktivitu, případně mohou být cytotoxické (Cornu *et al.*, 2008; Maeder *et al.*, 2008).

Druhý běžně využívaný přístup je založen na kombinatorické selekci. Prostřednictvím vzájemného porovnávání proteinů tvořených různými zinkovými prsty, jsou vybírány varianty proteinů s nejlepšími vlastnostmi. Rozhodujícími parametry jsou DNA vazebná afinita a specifita (Greisman *et* Pabo, 1997; Maeder *et al.*, 2008), vysoká aktivita a nízká toxicita při expresi v lidských buňkách (Cornu *et al.*, 2008; Maeder *et al.*, 2008).

Jednou ze strategií sestavování konstruktů specifického pro konkrétní cílovou sekvenci prostřednictvím výše uvedených selekčních metod je systém OPEN (*oligomerized pool engineering*). Jedná se o snadnou a veřejně dostupnou platformu pro sestavování domén zinkových prstů zkonstruovaných skupinou Zinc Finger Consortium. Platforma prostřednictvím webových nástrojů umožňuje výběr jednotlivých zinkových prstů z archivu již dříve charakterizovaných motivů a organizuje tento výběr na základě specifity zinkového prstu vůči danému tripletu. Výsledný protein vázící úsek 9 bp je získán náhodným skládáním prstů ze směsi obsahujících zinkové prsty s afinitou a specificitou k jednotlivým tripletům (Davis *et* Stokoe, 2010; Maeder *et al.*, 2008). Rozdílem oproti MA systému jsou časově náročné screeningové kroky pro ověření funkčnosti jednotlivých zinkových prstů a následně i celé domény, výhodou je však mnohem vyšší účinnost.

Jiným přístupem je metoda označovaná jako „*context-dependent assembly*“ (CoDA). CoDA vychází z předchozího jmenovaného systému OPEN a umožňuje kombinovat části různých domén zinkových prstů na základě jejich společného motivu s ohledem na to, zda byla již tato konkrétní kombinace motivů dříve evidována jako funkční (viz Obr. 6). Tento přístup se ukázal být velmi efektivním (Perez-Pinera *et al.*, 2012; Sander *et al.*, 2011).



Obr. 6: Schematické znázornění sestavování konstruktů metodou CoDA. Tento přístup je založen na kombinování částí původně odlišných domén zinkových prstů, u nichž už ale byla dříve evidována funkčnost. (Upraveno podle Sander *et al.*, 2011)

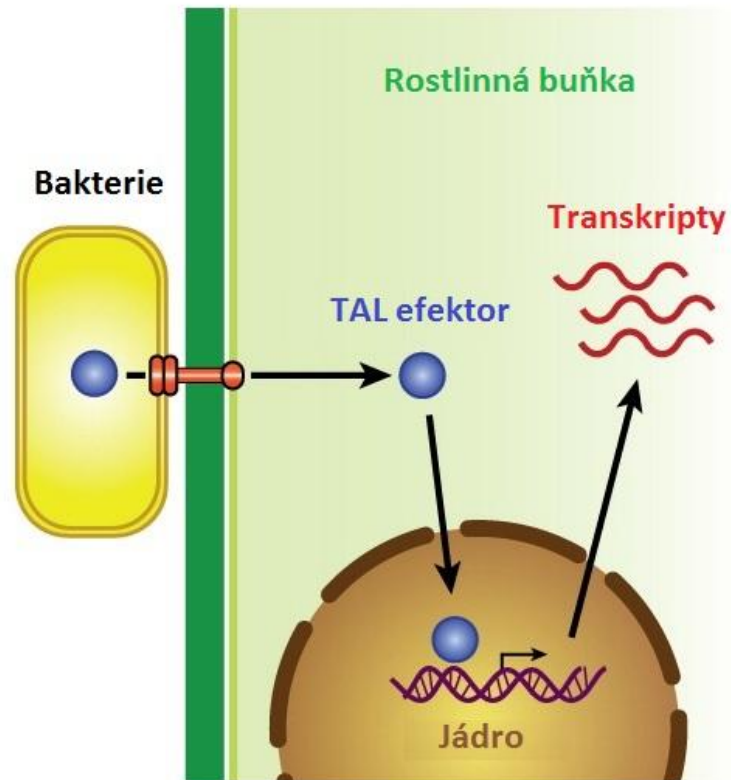
Díky spolupráci firem Sigma Aldrich a Sangamo Biosciences je však komerčně dostupná i služba Sigma-Aldrich Corporation's CompoZr Zinc Finger Nuclease platform, která uživateli umožňuje výběr z již kompletních, sestavených enzymů pro *knockout* genů, případně integrace sekvencí do některých lokusů genomické DNA, přičemž účinnost těchto enzymů již byla ověřena (Perez-Pinera *et al.*, 2012; Sander *et al.*, 2011).

4. TALEN

Mnoho let byly jediným prostředkem pro tvorbu místně specifických DNA vazebných proteinů a enzymů zinkové prsty. V roce 2009 vstoupila na pomyslnou scénu technologií umožňujících editace v genomu technologie nová, využívající jako DNA vazebnou doménu efektorů podobné transkripčním aktivátorům (TALE), a to především díky jednoduchosti jejího vazebného kódu (Perez-Pinera *et al.*, 2012).

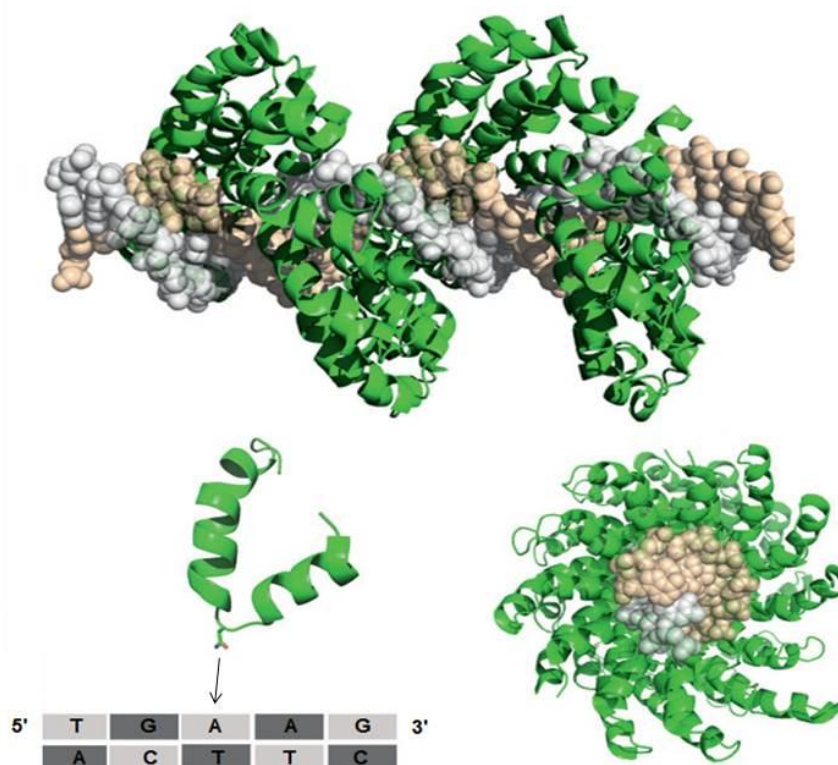
4.1 Struktura

TALE jsou přirozeně se vyskytující transkripční faktory bakterií rodu *Xanthomonas*, které jsou rostlinnými patogeny a TALE proteiny využívají jako virulentní faktory pro modulaci genové exprese hostitelské buňky (Munoz Bodnar *et al.*, 2013). Po překonání buněčné stěny patogenem je indukována obranná reakce rostlinné buňky v důsledku rozpoznání MAMPs (*microbial associated molecular patterns*) produkovaných patogenem. K supresi této imunitní odpovědi označované jako MTI (*MAMP-triggered immunity*), ale i jiných imunitních reakcí indukovaných v průběhu infekce (Dodds *et Rathjen*, 2010; Chisholm *et al.*, 2006), využívá patogen mikroinjekci efektorových proteinů sekrečním systémem III. typu, které po translokaci do jádra interagují se specifickými oblastmi DNA a modulací genové exprese mohou např. spouštět degradaci receptorů rozpoznávajících patogen, regulovat metabolismus hostitelské buňky a obecně zasahovat do její fyziologie (Block *et al.*, 2008).



Obr. 7: *Xanthomonas* prostřednictvím sekrečního systému typu III infikují rostlinnou buňku TAL efekty, které po translokaci do jádra indukují expresi cílových genů. (Upraveno podle Boch *et* Bonas, 2010)

Pozornost vědců si tyto efekty získaly především tím, že ačkoli byly vazebné domény vysoce repetitivní, byly specifické pro odlišné cílové sekvence a navíc byl počet repetice roven počtu nukleotidů, což naznačovalo jednoduchost vazebného kódu těchto proteinů (Baker, 2012).



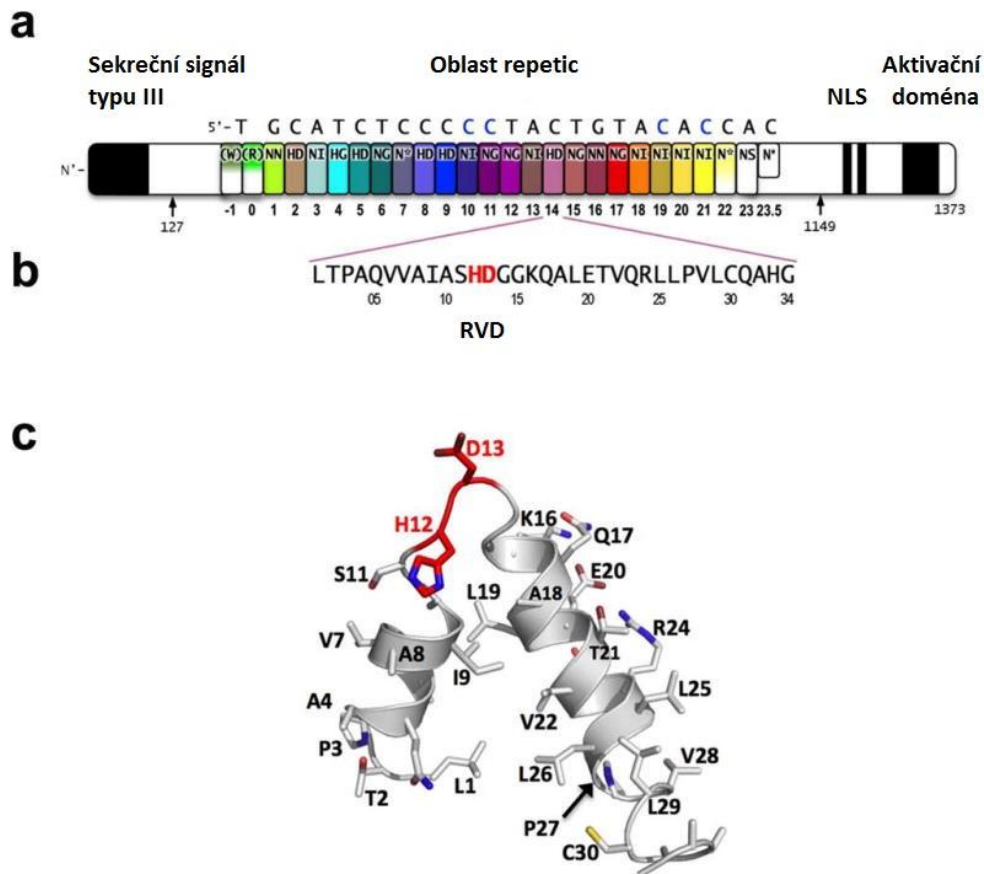
Obr. 8: Trojrozměrná struktura komplexu TALE proteinu s DNA a ukázka vazby jedné repetitivní jednotky. Sekundární struktura každé z jednotek vytváří dvě α šroubovice. Vazba k nukleotidu v sekvenci DNA je zprostředkována aminokyselinou na 13. pozici. (Upraveno podle Perez-Pinera *et al.*, 2012)

Bylo ukázáno, že na rozdíl od ZF proteinů, které jsou složeny z 30 aminokyselin, a každý protein váže 3 nukleotidy, moduly tandemových repetitivních vazebných domén TALE proteinů jsou tvořeny obecně 33 až 35 aminokyselinami, nejčastěji však 34 aminokyselinami (Kay *et al.*, 2005). Výjimkou je poslední zkrácená repetice, která je tvořena 19 až 20 aminokyselinami a označuje se jako poloviční repetice (*half repeat*) (Boch *et Bonas*, 2010). Každá z repetitivních jednotek proteinu váže pouze jeden nukleotid sekvence DNA (Boch *et al.*, 2009). Počet repetitivních jednotek v centrální doméně proteinu, umožňující vazbu na DNA, se může velmi lišit, a to v rozmezí od 1,5 do 33,5 jednotek, přičemž u efektorů s počtem repetitivních jednotek menším, než 6,5, je předpokládána nefunkčnost, jelikož právě počet 6,5 repetitivních jednotek je minimálním nezbytným počtem pro indukci cílené genové exprese TALE proteinu (Boch *et al.*, 2009). Nejčastěji vyskytující se proteiny jsou varianty obsahující 17,5 tandemových

repetic (viz Obr. 9a) (Boch *et Bonas*, 2010). Jednotlivé repetice jsou vysoce konzervované, výjimkami jsou pouze aminokyseliny na pozicích 4, 12, 13 a 32, vykazují nejvyšší variabilitu v rámci repetic (Boch *et Bonas*, 2010). Samotná specifita každého z modulů je určena pouhými dvěma aminokyselinami v každé z repetic. Tyto dvě aminokyseliny se vyskytují na 12. a 13. pozici v sekvenci každé z repetic a označují se jako RVDs (*repeat variable di-residues*) (viz Obr. 9b). V přírodě se vyskytuje pouze 15 různých párů RVD, přičemž 6 z nich vykazuje vyšší zastoupení (Munoz Bodnar *et al.*, 2013). Různé repetice jsou pak rozlišovány na základě jednopísmenných zkratk aminokyselin na hypervariabilní 12. a 13. pozici. Specifita některých typů repetic byla experimentálně ověřena a bylo zjištěno, že zatímco některé repetice vykazují silnou preferenci k jedné konkrétní bázi (NI – A, NG – T, HD – C), jiné rozpoznávají dvě různé báze (NN – G, A) a některé jsou neselektivní (NS – A, C, G, T) (Boch *et al.*, 2009; Boch *et Bonas*, 2010). Z hlediska designu a modulárního sestavování mají tyto proteiny oproti ZF nukleázám výraznou výhodu v tom, že specifita a afinita každé z tandemově řazených repetic k jednotlivým nukleotidům v DNA, nevykazuje rozdíl vlivem lokalizace repetice v kontextu celého proteinu (Moscou *et Bogdanove*, 2009).

Každá z repetic vytváří v prostoru dvě α šroubovice propojené krátkou smyčkou obsahující tyto dvě RVD. Zatímco aminokyselina na 12. pozici stabilizuje smyčku, aminokyselina na 13. pozici zprostředkovává bázově specifickou vazbu (viz Obr. 9c) (Deng *et al.*, 2012; Gaj *et al.*, 2013; Mak *et al.*, 2012).

Import proteinů do jádra probíhá prostřednictvím interakce jaderných receptorů s jaderným lokalizačním signálem (NLS) lokalizovaným na C-terminální doméně TALE proteinu. Přesný mechanismus interakce efektoru s transkripčním aparátem hostitelské buňky není zatím plně objasněn, pravděpodobně se ale na této interakci podílí aktivační doména (AC) nacházející se mezi NLS a C koncem proteinu (Munoz Bodnar *et al.*, 2013; Saijo *et Schulze-Lefert*, 2008). V N-terminální doméně proteinu je lokalizovaný translokační signál řídící sekreci proteinu bakterií při napadení hostitele (viz Obr. 9a) (Boch *et al.*, 2009).



Obr. 9: Doménová organizace PthXo1 proteinu rodiny TAL efektorů *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* a struktura jedné z repetitivních jednotek. **a)** Schematicky znázorněná struktura TALE proteinu s C-terminální, centrální a N-terminální doménou. **b)** Primární struktura jedné z repetitivních jednotek centrální domény proteinu. **c)** Model sekundární struktury jedné repetice s červeně vyznačenými aminokyselinami na 12. a 13. pozici. (Upraveno podle Mak *et al.*, 2012)

Stejně jako u zinkových prstů, je délka sekvence rozpoznávaná na DNA určena počtem jednotlivých modulů, které mohou být sériově připojovány. Sekvence variabilního počtu repetitivních jednotek je poté stejně jako je tomu v případě ZF proteinů zřizována s efektorovou doménou s nukleázovou aktivitou. Po fúzi vazebné domény s restriční doménou se vzniklý produkt označuje jako TALE nukleáza (TALEN). K aktivaci nukleáz *FokI* dochází po jejich dimerizaci na DNA. Ta je stericky umožněna vznikem mezerkové oblasti ohraničené dvěma TALE proteiny navázaných na komplementárních vláknkách. Nejčastěji je tato mezerková sekvence dlouhá 14 až 18 bp a právě v této oblasti dochází k indukci dvouvláknového zlomu (Miller *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2013).

4.2 Design

Převážně díky jednoduchosti vazebného kódu těchto proteinů, kdy každý jeden modul rozpoznává a váže jediný nukleotid v sekvenci DNA, rychlosti a jednoduchosti sestavení nového enzymu, je v současnosti řadou laboratoří tato technologie úpravy genomů upřednostňována oproti nukleázám s vazebným motivem zinkových prstů (DeFrancesco, 2011).

Postupně byly k vazebné doméně připojeny různé druhy efektorů, kromě restričních domén s nukleázovou aktivitou (Christian *et al.*, 2010) to byly domény s aktivitou transkripčních aktivátorů (Miller *et al.*, 2011) a místně specifických rekombináz (Mercer *et al.*, 2012) či integráz. Možnost fúze vazebné domény s těmito efektorovými doménami otevřela dveře novým přístupům pro kontrolu hladiny exprese vybraných genů, novým postupům při začleňování heterologních sekvencí do genomu a obecně ovlivňování struktury genomu (Gaj *et al.*, 2013; Mercer *et al.*, 2012).

Jednoduchost vazebného kódu TALE proteinů a absence interakcí mezi repeticemi, kdy jednotlivé repetice neovlivňují specifitu a afinitu repetice sousedních, umožňují syntézu řetězce modulů vázícího se teoreticky na jakoukoli sekvenci v DNA. Limitujícím faktorem je pouze nutnost, aby 5' konci vázané sekvence předcházely thymin, stejně jako je tomu u přirozeně se vyskytujících TALE proteinů (viz Obr. 9a). Důvodem je to, že přítomnost thyminu před začátkem vázané sekvence je esenciální pro aktivitu TAL efektorů (Boch *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2013).

Plnohodnotné využívání TALE nukleáz závisí na rychlosti a efektivitě konstrukce požadovaných TALE tandemových repetic. Konstrukce dlouhých TALE proteinů s velkým množstvím repetitivních jednotek však byla časově velmi náročná. Za účelem překonání tohoto problému byla vyvinuta řada metod a postupů konstrukce požadovaných proteinů, z nichž většina je založena na klonovací strategii Golden Gate (Sanjana *et al.*, 2012; Weber *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2013) využívající restričních endonukleáz typu IIS¹. Při správném designu restričních míst umožňuje tato strategie ligaci několika vyštěpených fragmentů v požadovaném sériovém řazení v jedné reakci. To je umožněno vznikem unikátních čtyř-nukleotidových přesahů,

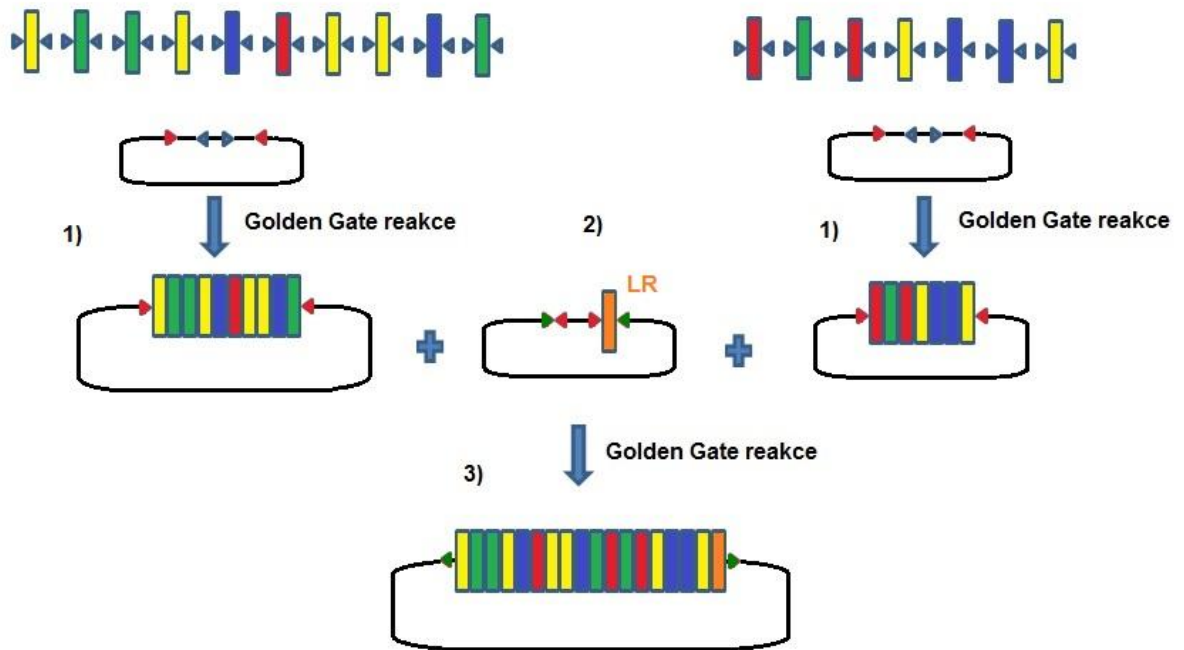
¹ Restriční endonukleázy štěpí DNA mimo rozpoznávanou oblast.

přičemž výsledný produkt neobsahuje přebytečnou sekvenci původních rozpoznávaných míst (Cermak *et al.*, 2011; Engler *et al.*, 2008).

Byla vytvořena řada protokolů umožňujících rychlé a snadné sestavení libovolného souboru TALE repetice, přičemž funkční enzym je možné vytvořit za několik dní (Cermak *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Stejně jako v případě ZF nukleáz jsou i reagenty pro konstrukci TALE nukleáz komerčně dostupné. Toto komerční rozšíření umožnily jako první francouzská firma Collectis Biosearch a americká firma Life Technologies (DeFrancesco, 2011).

Prostřednictvím veřejně dostupného online softwaru TAL Effector-Nucleotide Targeter (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/>), je možné nechat navrhnout pro libovolnou sekvenci různé varianty TALE proteinů vážících se do této sekvence. Generování variant je podřízeno předvoleným parametrům TALE designu, kterými jsou rozpětí délek rozpoznávaného místa a mezerkové sekvence, uživatel má však možnost zvolit i své vlastní hodnoty těchto parametrů. Tabulkově uspořádaný výstup analýzy zadané sekvence poskytuje informace o souřadnicích a sekvencích vazebných míst levých a pravých TALEN monomerů a mezerkové sekvence, přičemž automaticky jsou v seznamu uvedeny pouze proteiny, jejichž DNA vázanému boxu předchází thymin (T). Software také poskytuje sekvence RVD potřebných pro konstrukci TALE nukleáz odpovídající výše zmíněným vazebným sekvencím v DNA (Cermak *et al.*, 2011).

Protokol podle Cermak *et al.* (2011) pro sestavení modulární TALE nukleázy *de novo* je rozdělen do pěti dnů. Podle tohoto protokolu bude sestaven pár TALE nukleáz v práci navazující na cíle prezentované v praktické části této práce. Postup má tři základní kroky. Prvním krokem je sestavení intermediárních konstruktů nesoucích 1 až 10 repetitivních modulů, druhým krokem je ligace dílčích intermediárních konstruktů a jejich vložení do vektoru kódujícího poslední repetici, třetím krokem je vložení celé kazety kódující vazebnou doménu TALE nukleázy do cílového vektoru kódujícího N- a C-terminální domény TAL efektoru a FokI endonukleázu (viz Obr. 10) (Cermak *et al.*, 2011).



Obr. 10: Schéma Golden Gate klonovací strategie. Centrální DNA vazebná doména TALE nukleázy je skládána vždy po 1 až 10 modulech. Vzájemné propojení jednotlivých repetitivních jednotek (modulů) je umožněno díky přesahům, které jsou komplementární vždy u dvou sousedních modulů, které vznikají po vyštěpení sekvence modulu z nosičového vektoru endonukleázou typu IIS. Kazety tvořené intermediárními konstrukty jsou následně ligovány do vektoru kódujícího poslední repetici a celé kazeta je nakonec vložena do cílového vektoru nesoucího sekvenci pro zbylé části TALE nukleázy.

5. Crispr/Cas

V roce 2012 byl objeven další velmi nadějný nástroj pro specifické genomové editování a velmi brzy tato metoda začala naplňovat svůj potenciál snadnější a efektivnější alternativy k ZF a TALE nukleázám. Stejně jako tomu bylo u nástrojů popsaných výše, i tento využívá přirozeně se vyskytující mechanismy, tentokrát však pro specifickou degradaci cizorodých nukleových kyselin v bakteriích.

CRISPR (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) jsou esenciální součástí systému adaptivní imunity bakterií a archeí proti nukleovým kyselinám exogenního původu (Ishino *et al.*, 1987; Wiedenheft *et al.*, 2012). Jeho komponenty byly identifikovány ve více než 40 % všech dosud osekvenovaných bakteriálních genomů (Sorek *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2013).

Systém, podobně jako RNA interference u eukaryot, využívá malých RNA specificky detekujících nukleové kyseliny exogenního původu, které jsou po rozpoznání degradovány (Gaj *et al.*, 2013; Wiedenheft *et al.*, 2012). Tímto způsobem jsou např. likvidovány plazmidová DNA a DNA virového původu (Wiedenheft *et al.*, 2012).

Krátké fragmenty nukleové kyseliny extrachromozomálního původu jsou nejprve integrovány na jeden konec repetitivního elementu mikrobiálního genomického CRISPR lokusu (Barrangou *et al.*, 2007; Wiedenheft *et al.*, 2012). Tento lokus tvořený repetitivními sekvencemi slouží jako knihovna imunitního systému zachycující úseky veškerého genetického materiálu cizího původu, který se kdy dostal do dané bakterie. Dlouhé transkripty této oblasti jsou procesovány CRISPR asociovanými nukleázami nebo rodinou RNáz III (Carte *et al.*, 2008; Deltcheva *et al.*, 2011; Gesner *et al.*, 2011). Krátké segmenty RNA (crRNA – CRISPR RNA) vzniklé sestřihem transkriptu CRISPR lokusu jsou komplementární k sekvencím nukleových kyselin, které se dostaly do buňky např. při napadení virem, a tvoří s Cas proteiny komplexy katalyzující degradaci cizorodého genetického materiálu, pokud se nějaký komplementární k crRNA v buňce nachází (Brouns *et al.*, 2008; Garneau *et al.*, 2010; Wiedenheft *et al.*, 2012).

5.1 Struktura

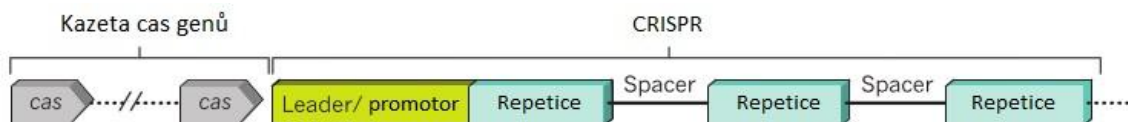
CRISPRy byly poprvé popsány v genomu bakterie *E. coli* v roce 1987 jako neobvyklé úseky sekvence tvořené sérií repeticí obsahujících 29 nt, oddělených od sebe 32 nt dlouhými unikátními sekvencemi označovanými jako *spacery* (Ishino *et al.*, 1987; Wiedenheft *et al.*, 2012). Lokusy se strukturou repetitivních sekvencí o délce 25 až 50 nt oddělených od sebe těmito *spacery* podobné délky byly později objeveny i u fylogeneticky odlišných bakterií a archeí, nicméně jejich biologický význam byl odhalen až když bylo počítačovými analýzami zjištěno, že sekvence některých *spacerů* jsou homologní s některými extrachromozomálními elementy, nejčastěji s fágovými sekvencemi, ale také plazmidovými (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2005).

V rámci jednoho lokusu jsou sekvence přímých repetic vždy konzervované, zatímco mezi CRISPR lokusy různých druhů vykazují tyto repetice variabilitu jak v sekvenci tak délce této sekvence. Velmi se také mohou lišit i počty základních jednotek repetice-*spacer* mezi rozdílnými organismy (Kunin *et al.*, 2007; Wiedenheft *et al.*, 2012). Detekce a identifikace těchto sekvencí byla zpočátku velmi náročná, právě z důvodu diferencí v tomto lokusu u různých jedinců a druhů. Až s rozvojem bioinformatických metod byl vytvořen algoritmus rozpoznávající daný motiv repetice-*spacer*-repetice (Edgar, 2007; Grissa *et al.*, 2007).

U většiny druhů se dvěma, nebo více CRISPR lokusy byla identifikována sekvence dlouhá 300 až 500 bází nacházející se na jedné straně tohoto lokusu předcházející repeticím. Stejně jako repetitivní sekvence, i tato *leader* sekvence je druhově konzervovaná, mezidruhově však variabilní (Jansen *et al.*, 2002). Jedná se o AT bohatou oblast, která slouží jako promotor pro transkripci lokusu (viz Obr. 11) (Jansen *et al.*, 2002; Wiedenheft *et al.*, 2012).

Dále byly u CRISPR nesoucích prokaryot objeveny čtyři CRISPR-asociované geny (*cas1* až *4*) sousedící s tímto lokusem, které se u prokaryot bez tohoto lokusu nevyskytovaly. Tyto geny vykazovaly charakteristické motivy typické pro některé enzymy podílející se na regulaci exprese a metabolismu, např. gen *cas3* vykazoval v sekvenci motivy charakteristické pro helikázy rodiny II a *cas4* motivy charakteristické pro rodinu RecB exonukleáz (Jansen *et al.*, 2002). Následnými bioinformatickými analýzami bylo zjištěno, že těchto CRISPR-asociovaných genů je

velké množství a jsou velmi diverzifikované (Makarova *et al.*, 2006; Wiedenheft *et al.*, 2012).



Obr. 11: Struktura CRISPR lokusu a lokusu CRISPR asociovaných genů. (Upraveno podle Wiedenheft *et al.*, 2012)

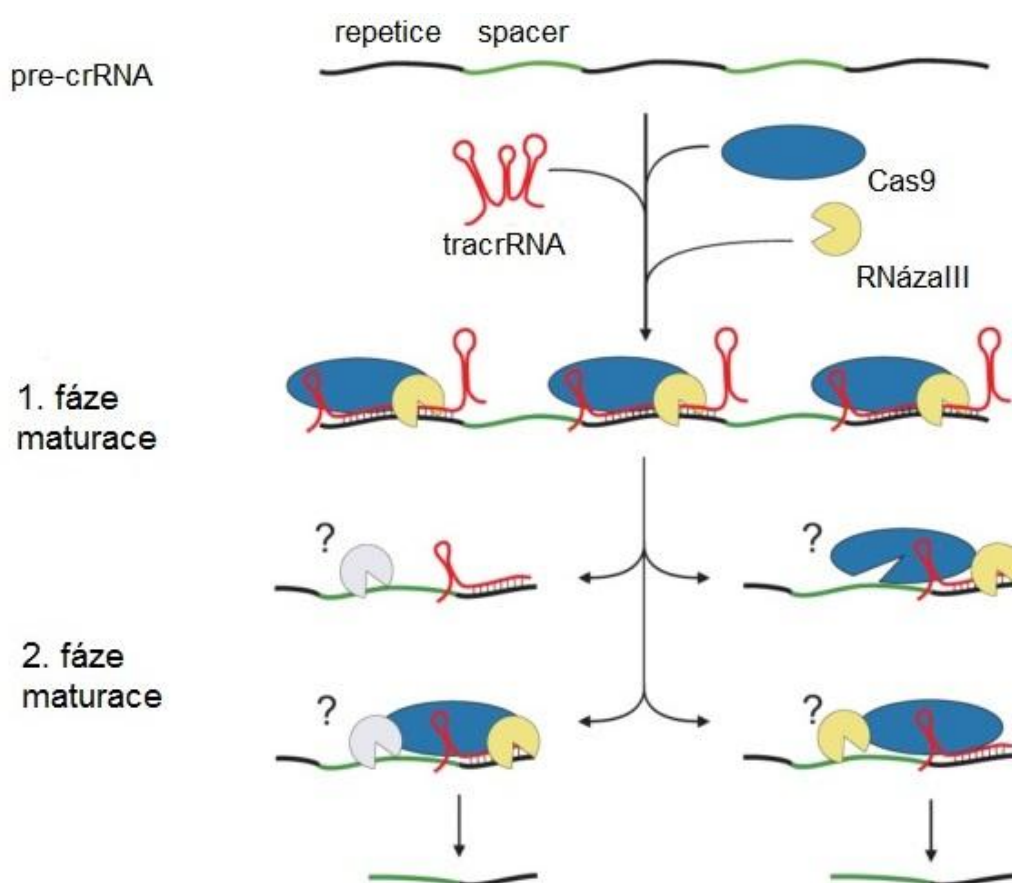
Na základě rozdílů v organizaci lokusu a genové konzervaci je možné rozlišit tři základní typy CRISPR imunitních systémů, ty je možné dále rozdělit do subtypů a chimérických variant. Jednotlivé typy jsou pravděpodobně vzájemně kompatibilní a mohou sdílet některé funkční komponenty, jelikož je možné v některých případech detekovat dva z těchto systémů v jednom organismu (Makarova *et al.*, 2011).

Bez ohledu na diverzitu v rámci cas genů a jejich variability v počtu, je pro systém typu I typický gen kódující protein Cas3 s N-terminální HD fosfohydrolázovou doménou a C-terminální doménou s helikázovou aktivitou (Makarova *et al.*, 2006; Wiedenheft *et al.*, 2012). Pro typ II je charakteristický výskyt pouze čtyř cas genů, přičemž jedním z nich je vždy gen cas9, dříve označovaný jako csn1. Jedná se o velký protein, s různými nukleázovými doménami. V rámci typu III byly identifikovány dvě varianty III-A a III-B s odlišnými funkčními charakteristikami (Hale *et al.*, 2009; Marraffini *et al.*, 2008; Wiedenheft *et al.*, 2012). Zatímco u typu III-A bylo prokázáno, že štěpí plazmidovou DNA *in vivo*, purifikované komponenty typu III-B vykazovaly katalytickou aktivitu pouze vůči jednovláknové RNA v podmínkách *in vitro* (Wiedenheft *et al.*, 2012).

U CRISPR systému typu II se vyskytuje i další RNA, označovaná jako tracrRNA (*trans-activating* CRISPR RNA), která vykazuje komplementaritu k pre-crRNA prekurzoru crRNA transkriptu. Je kódovaná na komplementárním vlákně *upstream* od CRISPR lokusu a po transkripci hybridizuje s pre-crRNA. Tyto

heteroduplexy jsou následně zpracovávány RNázou III za vzniku produktů s krátkými přesahy na 3' konci jako pozůstatků štěpení (Deltcheva *et al.*, 2011).

Bylo prováděno několik studií na *Streptococcus pyogenes* a *Streptococcus thermophilus*, které ukázaly, že se protein Cas9 účastní kromě degradace cílené nukleové kyseliny i zpracování komplexu tracr-crRNA spolu s RNázou III (Barrangou *et al.*, 2007; Deltcheva *et al.*, 2011; Garneau *et al.*, 2010), přesný mechanismus, kterým se na zpracování tracr-crRNA Cas9 podílí, však zatím není důkladně prozkoumáný (viz Obr. 12) (Xie *et al.*, 2013).



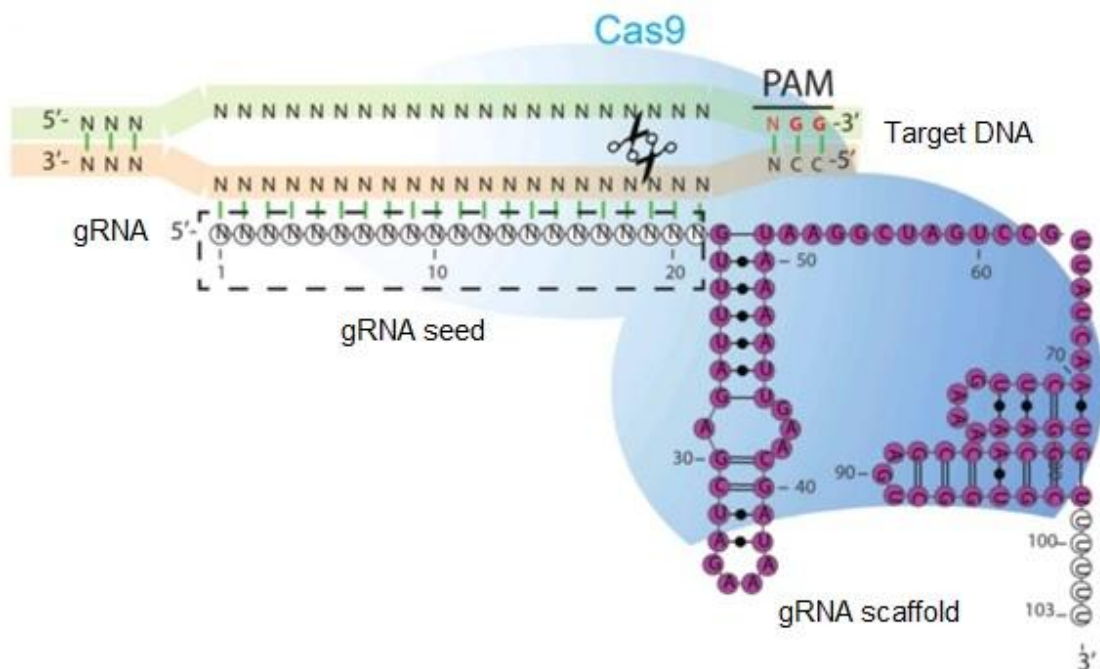
Obr. 12: Schéma procesu maturace crRNA zprostředkované tracrRNA, Cas9 a RNázou III. Maturace crRNA probíhá ve dvou fázích, přičemž přesná úloha proteinu Cas9 a RNázy III zatím není plně objasněna. (Upraveno podle Deltcheva *et al.*, 2011)

5.2 Design

Jako nástroj pro editování genomů je využíván systém fungující na principu typu II CRISPR/Cas9 adaptivního imunitního systému v komplexu se dvěma krátkými RNA molekulami, které se označují jako CRISPR RNA (crRNA) a transkripční crRNA (tracrRNA). Tyto RNA slouží jako navigační sekvence Cas9 endonukleázy ke komplementární sekvenci DNA extrachromozomálního původu (Gasiunas *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2013). V místě genomu komplementárnímu k crRNA, indukuje HNH nukleázová doména proteinu Cas9 zlom v komplementárním vlákně, zatímco RuvC – podobná doména indukuje zlom ve vlákně nekomplementárnímu k crRNA (Wei *et al.*, 2013).

Heteroduplex crRNA-tracrRNA je možné nahradit jednou nasyntetizovanou chimerickou RNA komplementární k požadované sekvenci. Tato hybridní RNA je označována jako *guide* RNA (gRNA) (Jinek *et al.*, 2012). Tento přístup umožňuje využití CRISPR/Cas9 systému jako nástroje pro editování genomů (Karginov *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2013).

Při designu gRNA je důležité dodržet kritéria pro vazbu a správnou funkci gRNA-Cas9 komplexu. Mezi 5' koncem gRNA (gRNA *seed* oblast) a cílovou sekvencí musí být komplementarita minimálně 15 bp. V této oblasti by nemělo docházet k chybám v párování. Druhým kritériem je přítomnost libovolné báze následované dvěma guaniny (motiv NGG) přímo za párující se oblastí na komplementárním vlákně. Tento trinukleotid je označován zkratkou PAM (*protospacer adjacent motif*). Pokud jsou obě tato kritéria splněna, nukleáza indukuje dvouvláknový zlom v DNA v konzervované pozici 3 bp před PAM motivem (viz Obr. 13) (Xie *et al.*, 2013).



Obr. 13: Schéma sekundární struktury gRNA, nahrazující heteroduplex crRNA-tracrRNA, v komplexu s Cas9 nukleázou. Bílou barvou je označena oblast gRNA párující se s cílovou DNA, fialovou barvou je označena oblast gRNA plnící strukturální funkci tracrRNA. Na komplementárním vlákně k vlákně rozpoznávanému je lokalizován PAM motiv NGG. (Upraveno podle Xie *et al.*, 2013)

CRISPR/Cas9 systém byl úspěšně použit pro editování genomu nejen v myších a lidských buněčných liniích, včetně lidských pluripotentních kmenových buněk, ale i v embryích *Danio rerio*, a to s porovnatelnou účinností jako ZF a TALE nukleázy (Hwang *et al.*, 2013).

Velmi atraktivní alternativou ostatním nástrojům pro editování genomů je tato technologie díky snadnému, někdy i nepotřebnému klonování, možnosti konverze Cas9 proteinu na nikázu iniciující homologní rekombinaci s minimální mutagenní aktivitou a možnosti simultánního použití několika gRNA komplementárních k různým genomickým cílům bez rizika křížové reaktivity (Cong *et al.*, 2013).

I přes velká očekávání, která jsou na CRISPR/Cas9 technologii kladena, stále ještě zbývá zodpovědět mnoho otázek. Stále není znám přesný mechanismus vazby gRNA ke svému cílovému místu v DNA a zdali je tento systém závislý na procesech transkripce či replikace, které rozplétají DNA a umožňují vazbu celého komplexu,

není také známa závislost funkce systému na lokálním kontextu chromatinu, jaká délka gRNA je ideální pro nejvyšší efektivitu modifikací a řada dalších (Wei *et al.*, 2013).

6. Možnosti nukleáz a jejich aplikace

Prvním experimentem, který prokázal, že použití ZF nukleáz může prostřednictvím tvorby dvouvláknových zlomů stimulovat homologní rekombinaci, byl experiment provedený na oocytech žáby *Xenopus laevis*. Výsledky experimentu byly publikovány v roce 2000 v časopise *Molecular and Cellular Biology* (Bibikova *et al.*, 2001). Možnost využití NHEJ mechanismu opravy DSB pro účely genových manipulací poprvé prokázal experiment, jehož výsledky byly publikovány v roce 2002 v časopisu *Genetics*. Byla při něm provedena cílená disrupce genu *yellow* *Drosophily melanogaster* za použití páru ZF nukleáz štěpícím DNA v oblasti tohoto genu. Výsledkem *knockoutu* tohoto genu byly změny v pigmentaci jedinců (Bibikova *et al.*, 2002).

Při procesu homologní rekombinace je k opravě poškozeného úseku využívána homologní sekvence jako sekvence templátová (Johnson *et Jasin*, 2001). Jako templátová sekvence může být při rekombinaci použita i sekvence extrachromozomálního původu. Vektorem nesoucím tuto templátovou sekvenci je zapotřebí buňky transfekovat spolu s vektorem kódujícím nukleázu (Perez-Pinera *et al.*, 2012).

Efektivita těchto procesů také velmi závisí na délce homologní sekvence. Běžně se používají donorové plazmidy nesoucí 200 až 800 bp dlouhé úseky homologní k oblastem před zlomem a za ním (Chen *et al.*, 2011; Moehle *et al.*, 2007; Urnov *et al.*, 2005). V některých případech však může být příprava donorové sekvence o délce větší než 700 bp komplikovaná a pracná (Perez-Pinera *et al.*, 2012).

Poměrně snadná je však příprava a použití sekvencí krátkých, které indukují pouze malé lokální substituce či inserce. Tyto úseky mohou obsahovat pouze 50 homologních bázových párů a byly již mnohokrát úspěšně použity v lidských buňkách (Orlando *et al.*, 2010).

Další možností je využití jednovláknových oligodeoxyribonukleotidů spolu s navrženými nukleázami. Tímto způsobem již bylo docíleno indukce cílených bodových mutací, krátkých substitucí a insercí (Chen *et al.*, 2011). Výhodou použití těchto krátkých DNA oligonukleotidů je to, že obsahují minimální množství genetické

informace, která je potřebná k vyvolání požadovaných změn v chromosomální DNA a snižuje se tak pravděpodobnost indukce nežádoucích změn mimo cílová místa a tím i potenciální cytotoxický efekt (Perez-Pinera *et al.*, 2012).

Při genových manipulacích obecně je také nutné zvolit vhodná místa pro vznik zlomu a indukci změny. Např. při inserci cizí sekvence by měl být tento úsek vložen přesně do místa zlomu, aby byla inserce efektivní (Moehle *et al.*, 2007). U ostatních manipulací není přesná lokalizace natolik důležitá a poskytují tak větší volnost ve volbě cílového místa pro vazbu proteinu a indukci zlomu. V případě oprav či indukci bodových mutací homologní rekombinací, může být místo střihu vzdáleno od místa požadované opravy či vzniku bodové mutace 200 až 400 bp, což je vzdálenost, kterou obvykle při opravách homologní rekombinace postihuje (Moehle *et al.*, 2007; Porteus, 2006). Největší flexibilitu ve volbě cílového místa ze všech genových manipulací poskytuje inaktivace genů a indukce mutací způsobených posunem čtecích rámců, při nichž není důležité, ve kterém místě kódující sekvence vybraného genu se změny indukují, nicméně většinou jsou pro tyto účely cíleny oblasti genu kódující N-terminální část produktu genu (Isalan, 2012).

Za normálních okolností během provádění změn v genomu prostřednictvím nukleáz dochází k opravám chyb jak pomocí homologní rekombinace, tak prostřednictvím nehomologního spojování konců a buněčné kultury jsou tak nehomogenní z hlediska mechanismu, kterým byl zlom v dané buňce buněčné kultury opraven (Bozas *et al.*, 2009).

Pro monitorování těchto mechanismů byl vytvořen reportérový systém umožňující detekci každého z mechanismů na základě odlišnosti vlnové délky fluorescenčního signálu NHEJ a HR. Následně tak bylo možné pomocí průtokové cytometrické analýzy diferencially monitorovat zastoupení jednotlivých opravných mechanismů (Certo *et al.*, 2011).

Díky této studii bylo také potvrzeno zjištění, že na rozdíl od dvouvláknových zlomů, stimulují zlomy jednovláknové indukované nikázou především proces opravy mechanismem homologní rekombinace a oprava mechanismem nehomologního spojování konců je utlumena (McConnell Smith *et al.*, 2009; Ramirez *et al.*, 2012). Tohoto zjištění by bylo možné využít při experimentech, v nichž jsou chyby způsobené opravou NHEJ vysoce nežádoucí. Je např. možné inhibovat katalytickou

aktivitu jednoho z monomerů ZFN, přičemž po dimerizaci začne druhý monomer vykazovat aktivitu ZFN nikázy (Ramirez *et al.*, 2012).

Podstatným faktorem při úpravách genomů těmito nukleázami je fakt, že jejich možnosti použití přímo závisí na jejich specifitě vůči jednomu cílovému místu. Vazba mimo cílová místa může být potenciálním zdrojem cytotoxicity a je tak velmi nežádoucím jevem. Stále je ještě velmi náročné prokázat, zejména u komplexních genomů, zdali došlo pouze k vazbě specifické. Dříve byly vědecké týmy odkázány pouze na analýzy založené na predikci potenciálních mimo cílových míst z vazebných profilů v podmínkách *in vitro*. Tento problém byl částečně vyřešen s rozvojem nových metod sekvencování, které umožňují detailní mapování aktivity nukleáz jak v *in vitro* tak *in vivo* podmínkách s rozlišením jedné báze (Perez-Pinera *et al.*, 2012; Perez *et al.*, 2008). Aktivita nukleáz byla mapována např. pomocí celogenomového nebo exomového sekvencování (Li *et al.*, 2014; Yusa *et al.*, 2011). Pro účely klinických aplikací je zapotřebí provádět celogenomové hluboké sekvencování poskytující komplexní informace o aktivitě nukleáz mimo cílová místa (Yusa *et al.*, 2011).

Pro dosažení větší efektivity při úpravách genomů byla používána řada metod, patří mezi ně např. regulace nukleázové aktivity malými molekulami, čímž byl snížen cytotoxický účinek aktivity enzymu (Pruett-Miller *et al.*, 2009) a experimenty prováděné za podmínek přechodné hypotermie, čímž bylo dosaženo větší expresní hladiny nukleázy v buňkách (Doyon *et al.*, 2010).

V současné době probíhá řada nejrůznějších výzkumů, jejichž cílem je aplikace těchto nástrojů pro editování genomů např. v genové terapii, biotechnologiích, ale i různých odvětvích základního výzkumu. Kromě studia glykosylace proteinů (Steentoft *et al.*, 2011), proteinové lokalizace a dynamiky (Doyon *et al.*, 2011; Goldberg *et al.*, 2010) a oprav DNA (Simsek *et al.*, 2011), umožňují tyto nástroje např. přípravu modelů lidských onemocnění (Soldner *et al.*, 2011) nebo přípravu stabilních izogenních buněčných linií s uniformní expresí transgenů (Perez-Pinera *et al.*, 2012).

V oblasti zemědělských biotechnologií mají tyto nukleázy velký význam např. pro zlepšování vlastností hospodářsky významných plodin a pro produkci potravin a biopaliv, jelikož jsou mnohem efektivnější než běžně používané metody náhodné

mutageneze a transgenoze (Shukla *et al.*, 2009). Úspěšně byla např. u *Zea mays* provedena disrupce genu IPK1 kódujícího enzym katalyzující poslední krok biosyntézy fytátu v semenech kukuřice (Shukla *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2007). Disrupce tohoto genu je u hospodářsky významných plodin velmi atraktivním cílem. Úspěšně byly také do rostlinného genomu začleněny geny rezistence vůči herbicidům (Shukla *et al.*, 2009).

Tyto metody byly za účelem editování genomů aplikovány i v biofarmaceutickém průmyslu (Perez-Pinera *et al.*, 2012). Pomocí ZF nukleáz byly připraveny buněčné kultury s inaktivovanými geny pro Bak a Bax proteiny, které spouštějí apoptózu jako reakci na některé formy stresu, např. při nedostatku živin, nebo přítomnosti některých produktů vlastního metabolismu. Linie s delecemi v genech pro Bak a Bax proteiny mohou naopak při těchto podmínkách produkovat několikanásobně více požadovaného produktu (Cost *et al.*, 2010).

Svůj význam mají místně specifické nukleázy i ve výzkumu v oblasti genových terapií díky možnosti výběru konkrétního místa v genomu např. pro inzerci, delecii, či substituci (Lombardo *et al.*, 2011; Lombardo *et al.*, 2007; Perez-Pinera *et al.*, 2012). Mohou tak být vhodnou alternativou konvenčním plazmidovým a virovým vektorům integrujícím transgenní informaci náhodně do chromozomální DNA.

V kombinaci s technologií iPSC odvozených od buněk pacienta pak mohou být tyto nástroje novým přístupem pro autologní transplantační terapie (Sebastiano *et al.*, 2011) využívané při léčbě monogenních onemocnění jak bylo ukázáno např. u chronického granulomatózního onemocnění (Zou *et al.*, 2011). Tento přístup však může být použit i pro opravu mutací vyvolávajících onemocnění, jakým je např. těžká kombinovaná imunodeficeience (SCID). Toto onemocnění je vázáno na X chromozom a je způsobeno mutací genu IL2Rgamma. V roce 2005 se týmu profesora Urnova podařilo mutaci v tomto genu opravit pomocí ZF nukleáz, přičemž X chromozom byl úspěšně modifikován u více než 18 % lidských buněk bez selekce (Urnov *et al.*, 2005).

Opravami mutovaných genů by však mohlo být možné léčit i další onemocnění, např. srpkovitou anémií (Sebastiano *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2011), hemofilií typu B (Li *et al.*, 2011), neoplazmus vyvolaný mutacemi v genu p53

(Herrmann *et al.*, 2011), nebo onemocnění způsobené deficiencí α 1-antitrypsinu (Perez-Pinera *et al.*, 2012; Yusa *et al.*, 2011).

V současné době také probíhají klinické testy vedené Sangamo Biosciences evaluující terapeutické účinky transplantovaných CD4+ T-lymfocytů s disrupcí v genu pro CCR5 transmembránový protein umožňující infekci buněk virem HIV-1 (Perez-Pinera *et al.*, 2012).

7. Cíle práce

Cílem teoretické části této práce je podat formou rešerše odborné literatury ucelený souhrn nejdůležitějších informací o nejnovějších metodách umožňujících precizní, místně specifické a efektivní modifikování genetické informace savců v *in vitro* a *in vivo* podmínkách, a přiblížit tak tuto do budoucna velmi perspektivní technologii širšímu okruhu lidí.

Druhá, experimentální část, měla dva cíle. Prvním cílem bylo navrhnout TALE nukleázu za účelem indukce dvouvláknového zlomu v oblasti stop kodonu genu MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) a vytvořit přípravou materiálu pro sestavení TALE nukleáz výchozí pozici pro využívání tohoto nástroje v běžném provozu Laboratoře integrity genomu LF UP. Druhým cílem bylo připravit rekombinantní vektor nesoucí disruptční kazetu pro integraci GFP na 3' konec genu MDC1.

8. Materiál a metodika

8.1 Chemikálie

2-propanol, Sigma-Aldrich

Agaróza, SERVA

Alkalická fosfatáza ze střevního epitelu telete (CIP; 10000U/ml), M0290 NEB

Barvivo DNA Midori green, NIPPON Genetics EUROPE GmbH

Dimethylsulfoxid (DMSO) 100%, F-515 Thermo Scientific

Ethanol – 96%, Penta

Hydrochlorid tetracyklinu, $\geq 95\%$, T3383-25G, Sigma-Aldrich

Kanamycin, Sigma-Aldrich

LB Broth High salt, Duchefa Biochemie

Luria Broth Agar, Miller, Duchefa Biochemie

Nanášecí roztok (Gel Loading Dye Blue) 6x, B7021S NEB

Phusion High-Fidelity DNA polymeráza (2000U/ml), M0530S NEB

Pufr CutSmart 10x, B7204S NEB

Pufr NEBuffer 3.1 10x, B7203 NEB

Pufr Phusion 5x GC, F-519 Thermo Scientific

Restrikční endonukleáza *AscI* (10000U/ml), R0558 NEB

Restrikční endonukleáza *NotI* (10000U/ml), R0189 NEB

Roztok směsi deoxyribonukleotidtrifosfátů pro PCR (12,5 mmol/l), SERVA

Sodná sůl ampicilinu, A9518-5G, Sigma-Aldrich

Spektinomycin, Sigma-Aldrich

Standard molekulové hmotnosti (1 kb DNA Ladder) (500 µg/ml), N3232S NEB

8.2 Roztoky a média

Zásobní roztok 5x TBE pufru

Tris 1,1 mol/l

Kyselina boritá (H_3BO_3) 900 mmol/l

EDTA 25 mmol/l

pH 8,3

PBS pufr

NaCl 137 mmol/l

KCl 2,7 mmol/l

Na_2HPO_4 10 mmol/l

KH_2PO_4 1,8 mmol/l

TE pufr

Tris 10 mmol/l pH 8,0

EDTA 1 mmol/l pH 8,0

Tekuté LB kultivační médium

1 % (w/v) Bacto-tryptonu

0,5 % (w/v) kvasinkového extraktu

1 % (w/v) NaCl

Úprava NaOH na pH 7,5

1,5 % (w/v) agaru

Pevné LB kultivační médium

1 % (w/v) Bacto-tryptonu

0,5 % (w/v) kvasinkového extraktu

1 % (w/v) NaCl

Úprava NaOH na pH 7,5

1,5 % (w/v) agaru

8.3 Přístrojové vybavení

Elektroforetická jednotka Advance Mupid-One, Japonsko

Chlazená centrifuga Hettlich Zentrifugen Rotina 420R, Německo

Inkubátor Heraeus B5061 EC/CO2 AUTO-ZERO, Německo

Inkubovaná orbitální třepačka Edmund Bühler KS-15 control, Německo

Inkubovaná orbitální třepačka IKA KS 4000 i control, Německo

Mikrocentrifuga Hanil Science Industrial Micro Centrifuge Smart15, Korea

Minicentrifuga Biosan Multi-Spin MSC-6000, Litva

Mixer a třepačka Scientific Industries Vortex-Genie 2, USA

Spektrofotometr IMPLEN NanoPhotometer P360, Německo

Suchá lázeň Genius MD-02N Major Science, USA

TProfessional Basic Gradient Biometra, Německo

UV transiluminátor Bio-Rad Laboratories Universal Hood III, USA

UV transiluminátor DNR Bio-Imaging Systems MiniLumi, Izrael

Váhy BOECO BBI-32, Německo

Váhy KERN 440-33N, ČR

8.4 Materiál

Genomická DNA izolovaná z buněk HeLa

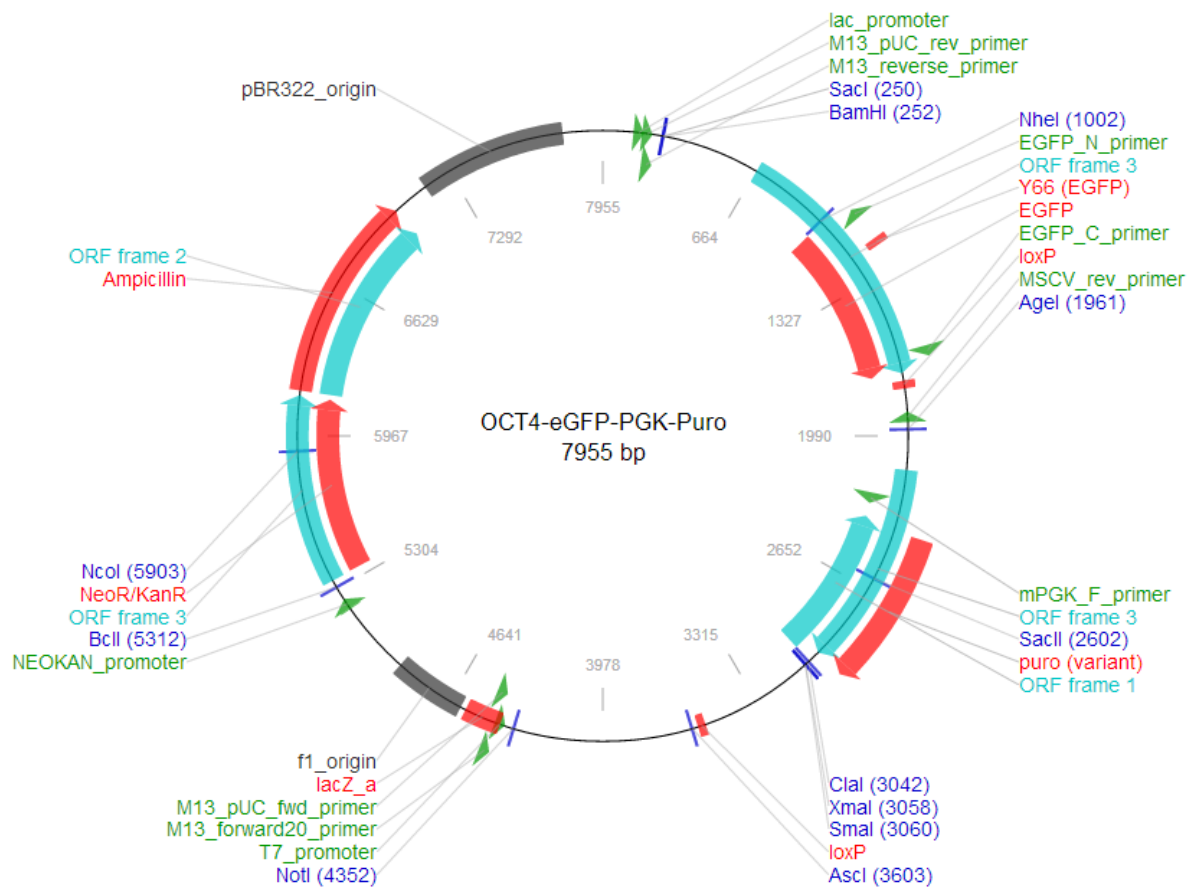
Kit MACHEREY-NAGEL NucleoBond Xtra Midi Plasmid DNA Purification, Německo

Kit MACHEREY-NAGEL NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Německo

8.4.1 Plazmidy

Golden Gate TALEN and TAL Effector kit 2.0 zakoupený z Addgene (<https://www.addgene.org/TALEffector/goldengateV2/>).

Plazmid OCT4-eGFP-PGK-Puro (Addgene, plazmid #31937)



Obr. 14: Mapa vektoru OCT4-eGFP-PGK-Puro (Addgene, plazmid #31937). (Převzato z <https://www.addgene.org/31937/>)

Tab. I: Přehled selekčních markerů použitých plazmidů. Selekcce byla prováděna při pracovních koncentracích: tetracyklin 15 µg/ml, spektinomycin 100 µg/ml, ampicilin 100 µg/ml.

Plazmidy	Selekční antibiotikum
pHD1 – pHD10	Tetracyklin
pNG1 – pNG10	
pNI 1 – pNI10	
pNN 1 – pNN10	
pLR-HD	
pLR-NG	
pLR-NI	
pLR-NN	
pFUS_A	Spektinomycin
pFUS_A30A	
pFUS_A30B	
pFUS_B 1 – 10	
pTAL1 – pTAL4	Ampicilin
OCT4-eGFP-PGK-Puro	

8.4.2 Kmen bakterií

E. coli, kmen Top10, **genotyp** F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG λ-

8.4.3 Oligonukleotidy

Tab. II: Sekvence oligonukleotidů použitých při amplifikaci úseků genu MDC1.

Oligonukleotid	Sekvence (5' → 3')
MDC1GFPUp.F.	GTATGCGGATCCGGCCAGGATGGTCTCGATCTCTTG
MDC1GFPUp.R.	*Phos – GCATGCGCTAGCGGTGGATGACATCTCCAAAGGGGA
MDC1GFDPwn.F.	*Phos – GCATGCGGCGCGCCTGAGAACTCCACTACCCTTTTCCC
MDC1GFDPwn.R.	GCATGCGCGGCCGCTGAGGTGGGACTATTGCTTGAAC

*Phos – fosfátová skupina

8.5 Software

ApE – A plasmid Editor v2.0.47 (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>)

TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0 (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/>)

8.6 Příprava a transformace kompetentních bakterií

Příprava kompetentních bakterií byla provedena podle protokolu Inoue *et al*, 1990. Kompetentní bakterie byly rozmrazeny na ledu. Ke kompetentním bakteriím bylo přidáno 1 až 10 ng plazmidu a směs byla inkubována na ledu 20 min. Poté byly mikrozkuhavky s bakteriemi umístěny na 30 s do suché lázně 42 °C. Následně byly mikrozkuhavky se suspenzí přeneseny na led, kde byly bakterie 2 min inkubovány. Poté bylo přidáno 900 µl SOC média předehřátého na 37 °C a bakterie byly za občasného promíchávání 1 hodinu kultivovány v inkubátoru při 37 °C. Následně bylo 100 µl suspenze rozetřeno po povrchu kultivačního média (LB + selekční antibiotikum, viz Tab. I) a bakterie byly kultivovány 24 h při 37 °C.

8.7 Kultivace bakterií pro izolaci plazmidů

Z Petriho misky byla vždy jedna kolonie bakterií přeočkována do 2 ml tekutého LB média s antibiotikem (viz Tab. I). Bakterie byly kultivovány 16 až 20 hodin při 37 °C. Poté bylo 300 µl bakteriální suspenze přidáno k 300 ml tekutého LB média s příslušným antibiotikem (viz Tab. I) a bakterie byly kultivovány 16 až 20 hodin při 37 °C. Bakteriální suspenze byla centrifugována 10 min při 6000 x g a 4 °C, následně byl odstraněn supernatant a sediment byl resuspendován v 15 ml PBS. Bakterie byly opět centrifugovány 10 min při 6000 x g a 4 °C.

8.8 Izolace plazmidové DNA z bakterií

Izolace plazmidové DNA byla provedena podle návodu NucleoBond Xtra plasmid purification kitu. Vyizolovaná DNA byl rozpuštěna v 500 µl TE pufru a plazmidy byly zamrazeny při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8.9 Štěpení vektoru

Na 1 µg plazmidu byly použity 2 až 3 U enzymu a reakce probíhaly v celkovém objemu 30 až 100 µl. Promíchaná a zcentrifugovaná směs byla inkubována 2 hodiny v suché lázni při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8.10 Defosforylace vektoru

Na 1 µg plazmidu byly použity 2 U enzymu a reakce probíhala v celkovém objemu 35 µl. Promíchaná a zcentrifugovaná směs byla inkubována 2 hodiny v suché lázni při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8.11 Purifikace vektoru

Produkty každého štěpení byly purifikovány pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up. Purifikace byla provedena dle protokolu, který je součástí kitu.

8.12 PCR amplifikace

Reakční směs pro PCR byla připravena napipetováním jednotlivých složek uvedených v Tab. III do 0,2ml PCR mikrozkušavky. Složky směsi byly přidávány v pořadí, v jakém jsou uvedeny v Tab. III.

Tab. III: Složení jedné reakční směsi pro PCR.

Složky PCR mixu	Objem (μl)
Deionizovaná voda	11,16
Phusion 5x GC Buffer	4
DMSO 100%	1,32
dNTPs (12,5 mmol/l)	0,32
Forward primer (0,1 mmol/l)	1
Reverse primer (0,1 mmol/l)	1
Templát	1
Phusion Hot Start II DNA polymerase (2 U/μl)	0,2

PCR mikroskopavky se zcentrifugovanými a zvortexovanými vzorky byly umístěny do termocykléru a byl spuštěn PCR program s profilem uvedeným v Tab. IV. Anelační teploty použité v teplotním gradientu viz Tab. V.

Tab. IV: Použitý PCR program.

Počet cyklů	čas (s)	Teplota (°C)
1x	30	98
35x	10	98
	15	54 – 64
	20	72
1x	300	72

Tab. V: Hodnoty anelačních teplot ve °C, kterým byly vystaveny jednotlivé vzorky při použití gradientu v rozsahu teplot 54 až 64 °C.

Teplotní gradient (°C)											
54,0	54,3	55,0	56,0	57,2	58,4	59,6	60,8	62,0	63,0	63,7	64,0

8.13 Elektroforéza v agarózovém gelu

Gel byl připraven rozvařením 0,7 až 1 % (w/v) v 0,5x TBE pufru. K rozpuštěné agaróze bylo napipetováno barvivo Midori Green v poměru 1:50000. Vzorek pro elektroforetickou separaci byl připraven smícháním PCR produktu s nanášecím roztokem 6x v poměru 5:1. Do první jamky byly nanесeny 4 μ l standardu molekulové hmotnosti (125 ng/ μ l), do dalších jamek byly nanесeny vzorky. Elektroforéza probíhala v 0,5x TBE pufru při napěťovém spádu 10 V/cm. Separovaná DNA byla vizualizována a vyfocena v UV transiluminátoru DNR Bio-Imaging Systems MiniLumi.

9. Výsledky

9.1 Návrh páru TALE nukleáz

Jedním z cílů experimentální části práce bylo navrhnout pár TALE nukleáz vážící se do oblasti genu MDC1 a indukující dvouvláknový zlom před stop kodonem v posledním exonu genu.

Návrh páru TALE nukleáz byl proveden prostřednictvím softwaru TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0 (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/>) provozovaného na webovém serveru Cornell University. Gen MDC1 je lokalizován na komplementárním vlákně, proto byla do pole pro sekvenci vložena *antisense* sekvence k sekvenci genu (ACC. no. NC_000006) získané z databáze NCBI. Pro hledání vazebných míst párů TALE nukleáz v požadovaném místě sekvence byly parametry zvoleny manuálně. Délka mezerníkové sekvence byla zvolena v rozmezí 15 až 30 nukleotidů a počet repetitivních jednotek vážících DNA v rozmezí 15 až 20. Dále byla zvolena souřadnice požadovaného místa vzniku zlomu v rámci vloženého segmentu *antisense* sekvence genu MDC1 a byla spuštěna analýza sekvence pro identifikaci párů TALE nukleáz.

Výsledkem analýzy zadané sekvence pro identifikaci různých variant párů nukleáz štěpících DNA v požadovaném místě byl tabulkově uspořádaný výstup (viz Obr 15). Tento výstup poskytl informace o téměř 100 různých variantách nukleáz lišících se délkou DNA vazebného místa v rozmezí 15 až 20 RVD a délkou mezerníkové sekvence. Dále poskytl informace o sekvenci repetitivních jednotek (RVD) vážících DNA každého z monomerů nukleáz, sekvenci kódujícího vlákna vázané oblasti, která je ohraničena dvěma monomery a mezerníkovou sekvencí mezi nimi, procentuální zastoupení RVD vážících cytosin nebo guanin a počet míst mimo cílovou sekvenci, v nichž by mohlo docházet v různých variantách formace dimerů k vazbě na DNA.

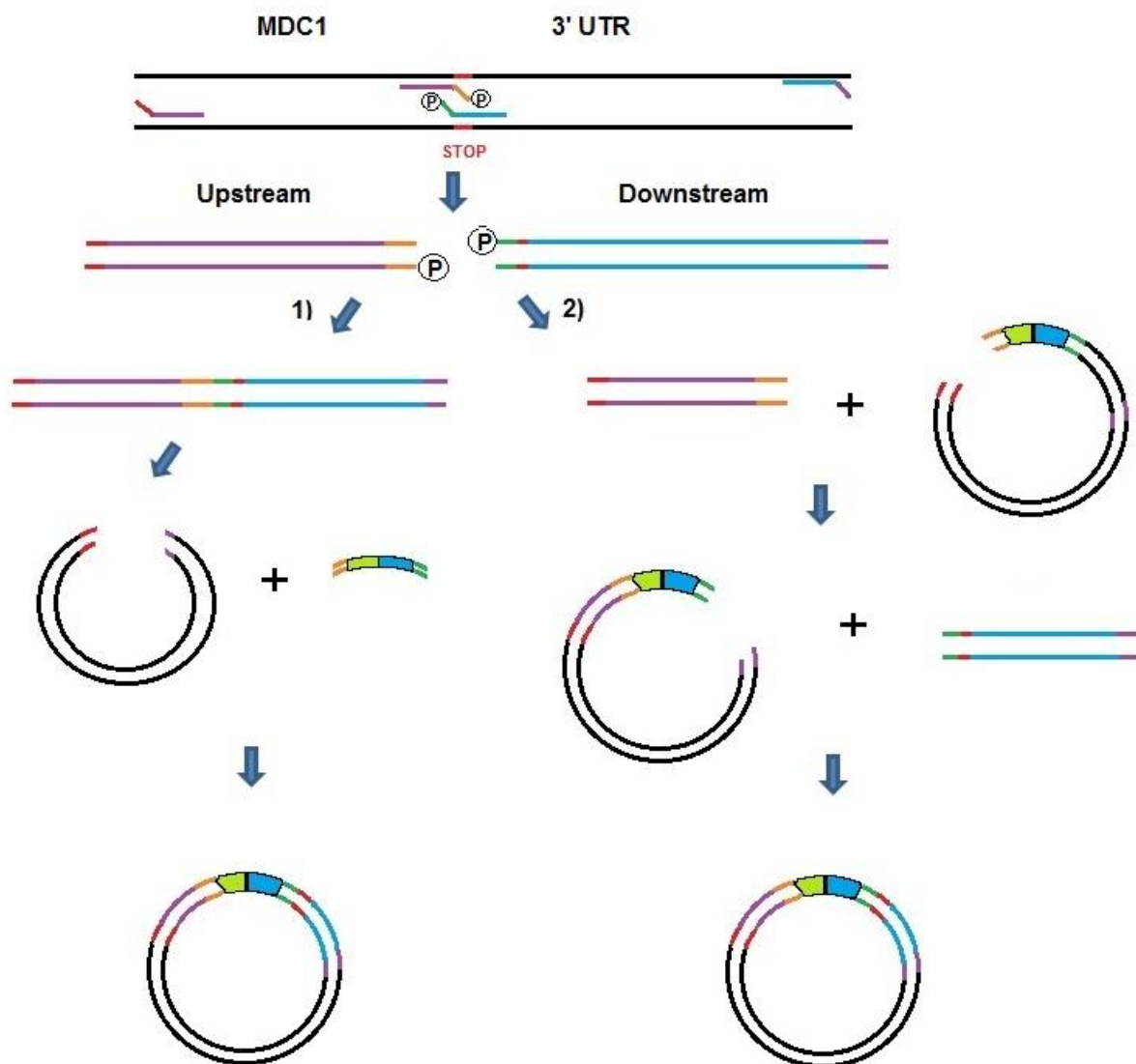
Sequence Name	Cut Site	TAL1 start	TAL2 start	Spacer range	TAL1 RVDs	TAL2 RVDs	Plus strand sequence	Unique RE sites in spacer	% RVDs HD or NN/NH	Off-Target Counts
MDC1rev-comp	300	272	330	287-312	NH NH NH NI NH NH NH NI NI NI NI NH NH NH NG	NG NH NG HD HD NG HD NG HD HD HD HD NG NG NG NH NH NI	T GGGAGGGA AAAGGGT agtggagttctc aggtggatgac atc TCCAAAGG GGAGAGGA CA A	FokI:GGATG CATCC BtsCI:GGAT G CATCC	57	8
MDC1rev-comp	300	272	331	287-312	NH NH NH NI NH NH NH NI NI NI NI NH NH NH NG	NG NG NH NG HD HD NG HD NG HD HD HD HD NG NG NG NH NH NI	T GGGAGGGA AAAGGGT agtggagttctc aggtggatgac atc TCCAAAGG GGAGAGGA CAA A	FokI:GGATG CATCC BtsCI:GGAT G CATCC	56	8
MDC1rev-comp	300	270	327	287-312	HD NG NH NH NH NI NH NH NH NI NI NI NI NH NH NH NG	HD HD NG HD NG HD HD HD HD NG NG NG NH NH NI	T CTGGGAGG GAAAAGGGT agtggagttctc aggtggatgac atc TCCAAAGG GGAGAGG A	FokI:GGATG CATCC BtsCI:GGAT G CATCC	59	8

Obr. 15: Část výstupu analýzy zadaného úseku sekvence genu MDC1 pro identifikaci variant párů TALE nukleáz štěpících DNA v pozici před stop kodonem.

9.2 Příprava rekombinantního vektoru s disruptivní kazetou pro vytvoření fúze MDC1-GFP

Příprava měla být provedena PCR amplifikací oblastí ležících přibližně 1 kb *up-* a *downstream* od konce čtecího rámce genu MDC1 a následným naklonováním těchto úseků do vektoru OCT4-eGFP-PGK-Puro. Pro účely klonování, byly k oligonukleotidům ohraničujícím oblasti amplifikace přidány sekvence míst štěpených restrikními enzymy *Bam*HI, *Nhe*I, *Asc*I a *Not*I a 5' konce *upstream reverse* a *downstream forward* oligonukleotidů byly modifikovány fosfátovou skupinou. Samotné klonování mělo být provedeno dvěma odlišnými strategiemi. První strategií bylo provést ligaci obou amplifikovaných úseků, vložit výsledný fragment do klonovacího vektoru (např. pJet, Thermo Scientific), následně provést štěpení restrikními enzymy *Nhe*I a *Asc*I, jejichž rozpoznávaná místa byla přidána na konce k sobě orientovaných částí amplifikovaných úseků, a vložit disruptivní kazetu tvořenou genem pro GFP a genem pro rezistenci vůči puromycinu mezi tato dvě restrikní místa (viz Obr. 16). Druhou strategií bylo postupné vkládání *up-*

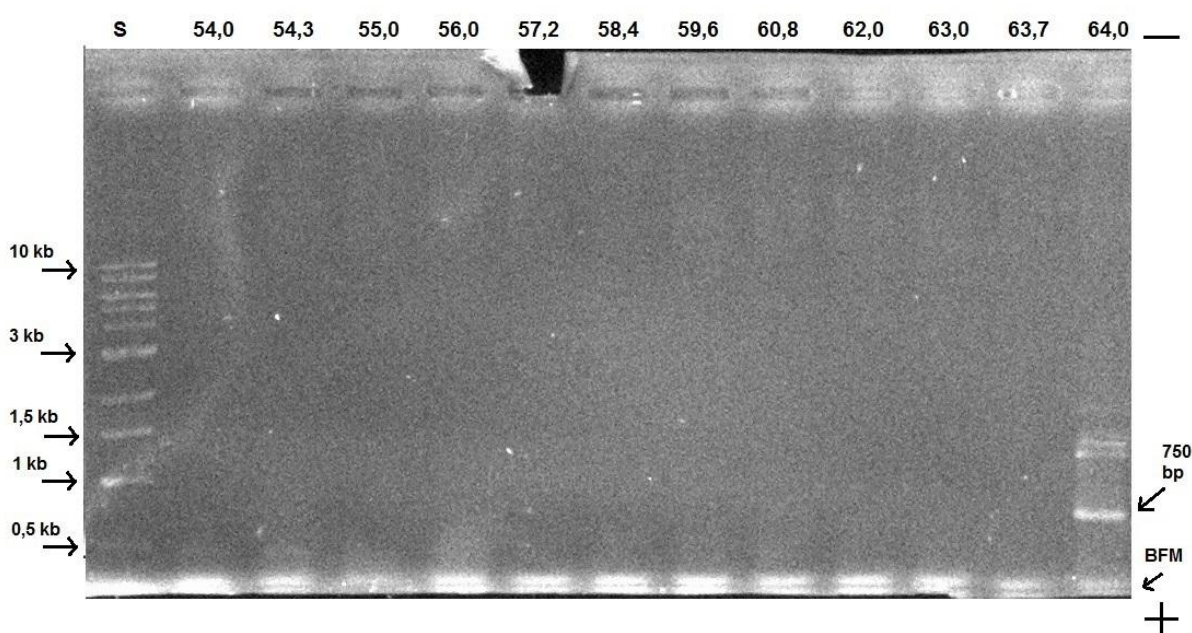
a *downstream* fragmentů do vektoru OCT4-eGFP-PGK-Puro nesoucího čtecí rámec GFP a gen pro rezistenci k puromycinu (viz Obr. 16).



Obr. 16: Dvě strategie přípravy rekombinantního vektoru OCT4-eGFP-PGK-Puro. Amplifikované úseky genu MDC1 jsou vyznačeny fialovou (*Upstream*) a modrou barvou (*Downstream*). Každý z úseků je ohraničen dvěma odlišnými restrikčními místy (*Bam*HI – červená; *Nhe*I – oranžová; *Asc*I – zelená; *Not*I – fialová). Disrupční kazeta nese dva geny, prvním je gen pro GFP (zelená), druhým je gen pro rezistenci k puromycinu (modrá).

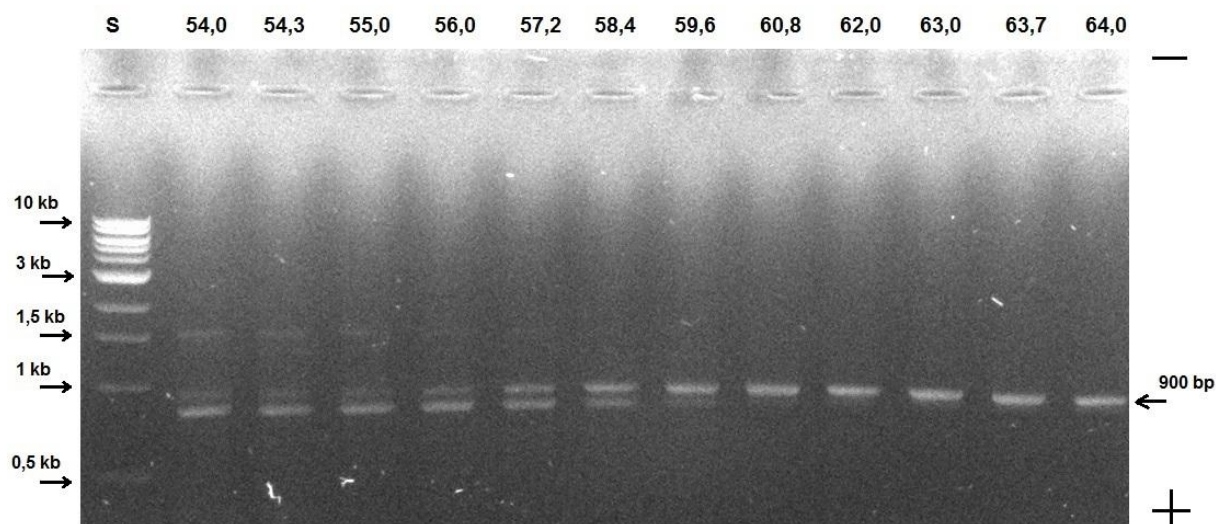
9.3 Amplifikace oblastí genu MDC1

Pro účely vytvoření rekombinantního vektoru, nesoucího disruptivní kazetu, obklopenou sekvencemi homologními k oblastem rozhraní mezi posledním exonem a 3' UTR genu MDC1, byla provedena PCR amplifikace těchto úseků. Z důvodu časově náročné optimalizace podmínek PCR amplifikace každé z oblastí byla provedena amplifikace v termocykléru s teplotním gradientem. Fotografie gelů s výsledky amplifikace *upstream* a *downstream* segmentů viz Obr. 17 a Obr. 18.



Obr. 17: Fotografie agarózového gelu po elektroforetické separaci produktů PCR amplifikace oblasti ležící *upstream* od oblasti stop kodonu genu MDC1 s gradientem teploty. Do první jamky gelu byl nanesen standard molekulové hmotnosti (S), do dalších jamek byly naneseny produkty amplifikace. Každá jamka je označena číslem odpovídajícím anelační teplotě (°C) v rámci gradientu. Šipkou je také znázorněna oblast, kam domigrovala bromfenolová modř z nanášecího roztoku.

Z fotografie je zřejmé, že k amplifikaci *upstream* fragmentu došlo až při anelační teplotě 64 °C. Vzorek sice obsahuje i nescifické produkty amplifikace dlouhé přibližně 1,2 až 1,3 kb, ale po purifikaci by mohl být požadovaný produkt použit pro klonování do vektoru OCT4-eGFP-PGK-Puro.



Obr. 18: Fotografie agarózového gelu po elektroforetické separaci produktů PCR amplifikace oblasti *downstream* od stop kodonu genu MDC1 s gradientem teploty. Do první jamky gelu byl nanesen standard molekulové hmotnosti (S), do dalších jamek byly naneseny produkty amplifikace. Každá jamka je označena číslem odpovídajícím anelační teplotě (°C) v rámci gradientu.

Z fotografie je zřejmé, že v rozmezí teplot anelace 54 °C až 60,8 °C, docházelo k nespecifické amplifikaci. Přibližně v rozmezí teplot 54 °C až 57,2 °C vznikaly kromě požadovaného produktu amplifikace i nespecifické produkty o délkách přibližně 1,5 kb a 850 bp. V rozmezí teplot 58,4 °C až 60,8 °C pak kromě požadovaného produktu vznikl už jen nespecifický produkt o délce 850 bp. Od teploty anelace 62 °C po teplotu 64 °C vznikl téměř výhradně už jen požadovaný produkt o délce 900 bp.

10. Diskuze

Hlavním cílem praktické části této práce bylo zavést využívání TALE nukleáz jako nástroje pro precizní a efektivní editování savčích genomů do provozu Laboratoře integrity genomu LF UP. Pro tento účel byla nejprve sada plazmidů kitu Golden Gate TALEN and TAL Effector 2.0 amplifikována.

Dalším cílem bylo navrhnout pár TALE nukleáz tak, aby se specificky vázal do oblasti posledního exonu genu MDC1 a indukoval v místě mezi posledním tripletem exonu a stop kodonem dvouvláknový zlom. Pro dimery TALE nukleáz zobrazených ve výstupu analýzy vložené sekvence (viz Obr. 15), bylo v lidském genomu softwarem identifikováno celkem 8 vazebných míst mimo místo cílové, odpovídajících heterodimerní formaci enzymu. Všechna tato místa však byla lokalizována ve stejné oblasti chromozomu 6, stejně jako cílové místo, a sekvence nesoucí tato místa byly pouze haplotypy uloženými v databázi Ensembl jako různé varianty stejného lokusu. Ukázalo se tudíž, že jako *off-target* bylo identifikováno vlastní cílové místo, pouze však na komplementárním vlákně, jelikož na opačném vlákně od cílového genu MDC1 je lokalizována sekvence hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). Podle analýzy by se v lidském genomu neměla vyskytovat další potenciální vazebná místa navrženého enzymu, tudíž by neměl mít takto navržený enzym při expresi v lidských buňkách cytotoxické účinky.

Tohoto precizního poškození DNA v přesném místě genu MDC1 by bylo možné využít pro inkorporaci genu pro GFP do tohoto místa prostřednictvím reparačního mechanismu cestou homologní rekombinace a připravit tak reportérovou buněčnou linii exprimující fúzní protein MDC1-GFP pod kontrolou nativního promotoru genu MDC1. Podobný experiment úspěšně provedli Hockemeyer *et al* (2011). Ve své studii provedli inkorporaci disruptční kazety GFP-Puro před stop kodon genu OCT4.

Dále byla praktická část zaměřena na přípravu rekombinantního vektoru nesoucího disruptční kazetu GFP-Puro obklopenou sekvencemi homologními k místu zlomu v DNA indukovaného výše zmíněnou TALE nukleázou v oblasti genu MDC1. Sekvence homologní k oblastem zlomu obklopující disruptční kazetu by sloužily jako

donorový templát pro homologní rekombinaci, která by vedla k inkorporaci kazety GFP-Puro do genomické DNA jak ukázal Hockemeyer *et al* (2011).

Hockemeyer *et al* (2011) prováděli inkorporaci různých variant disruptčních kazet do ORF posledního exonu genu OCT4. Těmito rozdílnými variantami disruptčních kazet byly OCT4-2A-eGFP-PGK-Puro, OCT4-eGFP-2A-Puro, a OCT4-eGFP-PGK-Puro. V posledních dvou jmenovaných disruptčních kazetách byla po stranách PGK-Puro zakomponována loxP místa, která po provedené selekci transfekovaných buněk umožnila vyštěpení nadbytečného PGK promotoru a genu pro rezistenci k puromycinu pomocí Cre rekombinázy.

Hockemeyer *et al* (2011) tak získali tři typy klonů buněk, kdy každý exprimoval jiný fúzní gen. U prvního typu klonů docházelo po expresi proteinu k odštěpení GFP, u druhého byl exprimován fúzní protein OCT4-GFP a u třetího byl exprimován fúzní protein OCT4-GFP-Puro.

Vektorem, jehož přípravě byla věnována část praktické části této práce a který bude v další práci použit pro přípravu reportérové buněčné linie exprimující fúzní protein MDC1-GFP, je vektor s variantou disruptční kazety OCT4-eGFP-PGK-Puro. Část PGK-Puro disruptční kazety je v tomto vektoru ohraničena loxP místy, která umožňují vyštěpení této části kazety a expresi čistého fúzního produktu MDC1-GFP. Vyštěpení tohoto úseku by bylo optimálním řešením. Nicméně Hockemeyer *et al* (2011) ukázali, že i varianta fúzního genu s neodštěpeným genem pro rezistenci k puromycinu umožňuje zřetelně detekovat GFP signál.

Reportérová linie připravená v návaznosti na tuto práci by umožnila studium dynamiky procesu opravy poškození DNA ve standardním genetickém pozadí vybraných buněčných linií. Protein MDC1 je výborným markerem probíhající opravy DNA – je jedním z prvních proteinů, které se váží do oblasti zlomu a iniciuje hromadění dalších reparačních proteinů v této oblasti a zároveň kontroluje zpoždění buněčného cyklu při poškození DNA (Stewart *et al.*, 2003). Právě zásah do konkrétní oblasti genu MDC1 uskutečněný prostřednictvím TALE nukleáz a přesná inkorporace disruptční kazety před stop kodon tohoto genu homologní rekombinací, kdy by byla exprese fúzního proteinu MDC1-GFP kontrolována nativním promotorem, by mohli umožnit studium opravy poškození DNA ve standardním genetickém pozadí.

Především bychom se chtěli zaměřit na dynamiku oprav v radiorezistentních gliomech².

² ve spolupráci s Mgr. Petrou Hamerlik Ph.D z Danish Cancer Society, Kodaň, Dánsko

11. Závěr

V teoretické části této práce byly shrnuty nejdůležitější informace o nukleázách, které jako první umožnily zasahovat do konkrétních míst genomu, a provádět v nich cílené změny jako delece, inserce a substituce prostřednictvím indukce dvouvláknových zlomů (DSBs). Těmito zlomy jsou stimulovány buněčné reparační mechanismy, kterými jsou homologní rekombinace a nehomologní spojování konců chromozomů.

V samostatných kapitolách byla tato práce postupně zaměřena na ZF nukleázy, TALE nukleázy a CRISPR/Cas9 systém. U každé z těchto nukleáz byly shrnuty nejdůležitější informace týkající se jejich struktury a designu.

V rámci experimentální části práce byla amplifikována sada plazmidů Golden Gate TALEN and TAL Effector 2.0 kitu, byl navržen pár TALE nukleáz určený pro konkrétní aplikaci a byla provedena část přípravy vektoru, který by při opravě dvouvláknového zlomu indukovaného tímto párem nukleáz sloužil jako donorová templátová sekvence pro proces homologní rekombinace a vedl by k vytvoření fúzního genu MDC1-GFP.

V návaznosti na tuto práci bude sestaven navržený pár TALE nukleáz a spolu se zkonstruovaným rekombinantním vektorem bude využit pro přípravu reportérové buněčné linie exprimující fúzní protein MDC1-GFP pod kontrolou nativního promotoru genu MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*). Tento protein spolu s fosforylovanou variantou H2AX histonu H2A iniciuje hromadění reparačních proteinů v místech zlomů DNA a je kontrolním proteinem buněčných cyklů zpožděných vlivem poškození DNA. Jeví se tak jako vhodný *marker* pro studium dynamiky procesů opravy DNA.

12. Seznam literatury

Baker M. (2012): Gene-editing nucleases. *Nat Methods* 9(1): 23-26.

Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romeroet D.A., Horvath P. (2007): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315(5819): 1709-1712.

Beerli R.R. *et* Barbas C.F. III (2002): Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. *Nat Biotechnol* 20(2): 135-141.

Bibikova M., Beumer K., Trautmanet J.K., Carroll D. (2003): Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* 300(5620): 764.

Bibikova M., Carroll D., Segal D.J., Trautman J.K., Smith J., Kimet Y.G., Chandrasegaran S. (2001): Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol* 21(1): 289-297.

Bibikova M., Golic M., Golicet K.G., Carroll D. (2002): Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* 161(3): 1169-1175.

Block A., Li G., Fuet Z.Q., Alfano J.R. (2008): Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr Opin Plant Biol* 11(4): 396-403.

Boch J. *et* Bonas U. (2010): Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol* 48: 419-436.

Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadtet A., Bonas U. (2009): Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326(5959): 1509-1512.

Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S.D. (2005): Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151(Pt 8): 2551-2561.

Bozas A., Beumer K.J., Trautmanet J.K., Carroll D. (2009): Genetic analysis of zinc-finger nuclease-induced gene targeting in *Drosophila*. *Genetics* 182(3): 641-651.

Brouns S.J., Jore M.M., Lundgren M., Westra E.R., Slijkhuis R.J., Snijders A.P., Dickman M.J., Makarova K.S., Koonin E.V., Oost J. van der (2008): Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321(5891): 960-964.

Carte J., Wang R., Li H., Ternset R.M., Terns M.P. (2008): Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev* 22(24): 3489-3496.

Cermak T., Doyle E.L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J.A., Somia N.V., Bogdanoveet A.J., Voytas D.F. (2011): Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* 39(12): e82.

Certo M.T., Ryu B.Y., Annis J.E., Garibov M., Jarjour J., Rawlingset D.J., Scharenberg A.M. (2011): Tracking genome engineering outcome at individual DNA breakpoints. *Nat Methods* 8(8): 671-676.

Chen F., Pruett-Miller S.M., Huang Y., Gjoka M., Duda K., Taunton J., Collingwood T.N., Frodin M., Davis G.D. (2011): High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nat Methods* 8(9): 753-755.

Chisholm S.T., Coaker G., Dayet B., Staskawicz B.J. (2006): Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124(4): 803-814.

Christian M., Cermak T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D.F. (2010): Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186(2): 757-761.

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.

Cornu T.I., Thibodeau-Beganny S., Guhl E., Alwin S., Eichinger M., Joung J.K., Cathomen T. (2008): DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases. *Mol Ther* 16(2): 352-358.

Cost G.J., Freyvert Y., Vafiadis A., Santiago Y., Miller J.C., Rebar E., Collingwood T.N., Snowdenet A., Gregory P.D. (2010): BAK and BAX deletion using zinc-finger nucleases yields apoptosis-resistant CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 105(2): 330-340.

Davis D. *et* Stokoe D. (2010): Zinc finger nucleases as tools to understand and treat human diseases. *BMC Med* 8: 42.

DeFrancesco L. (2011): Move over ZFNs. *Nat Biotechnol* 29(8): 681-684.

Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Voget J., Charpentier E. (2011): CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471(7340): 602-607.

Deng D., Yan C., Pan X., Mahfouz M., Wang J., Zhu J.K., Shiet Y., Yan N. (2012): Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science* 335(6069): 720-723.

Dodds P.N. *et* Rathjen J.P. (2010): Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11(8): 539-548.

Doyon Y., Choi V.M., Xia D.F., Vo T.D., Gregoryet P.D., Holmes M.C. (2010): Transient cold shock enhances zinc-finger nuclease-mediated gene disruption. *Nat Methods* 7(6): 459-460.

Doyon Y., Vo T.D., Mendel M.C., Greenberg S.G., Wang J., Xia D.F., Miller J.C., Urnov F.D., Gregoryet P.D., Holmes M.C. (2011): Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat Methods* 8(1): 74-79.

Doyon J.B., Zeitler B., Cheng J., Cheng A.T., Cherone J.M., Santiago Y., Lee A.H., Vo T.D., Doyon Y., Miller J.C., Paschon D.E., Zhang L., Rebar E.J., Gregory P.D., Urnovet F.D., Drubin D.G. (2011): Rapid and efficient clathrin-mediated endocytosis revealed in genome-edited mammalian cells. *Nat Cell Biol* 13(3): 331-337.

Edgar R.C. (2007): PILER-CR: fast and accurate identification of CRISPR repeats. *BMC Bioinformatics* 8: 18.

Engler C., Kandziaet R., Marillonnet S. (2008): A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* 3(11): e3647.

Gaj T., Gersbacht C.A., Barbas C.F. III (2013): ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 31(7): 397-405.

Garneau J.E., Dupuis M.E., Villion M., Romero D.A., Barrangou R., Boyaval P, Fremaux C., Horvath P., Magadanet A.H., Moineau S. (2010): The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468(7320): 67-71.

Gasiunas G., Barrangou R., Horvathet P., Siksnys V. (2012): Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(39): E2579-2586.

Gesner E.M., Schellenberg M.J., Garside E.L., Georgeet M.M., Macmillan A.M. (2011): Recognition and maturation of effector RNAs in a CRISPR interference pathway. *Nat Struct Mol Biol* 18(6): 688-692.

Goldberg A.D., Banaszynski L.A., Noh K.M., Lewis P.W., Elsaesser S.J., Stadler S., Dewell S., Law M., Guo X., Li X., Wen D., Chapgier A., DeKolver R.C., Miller J.C., Lee Y.L., Boydston E.A., Holmes M.C., Gregory P.D., Grealley J.M., Rafii S., Yang C., Scambler P.J., Garrick D., Gibbons R.J., Higgs D.R., Cristea I.M., Urnov F.D., Zhenget D., Allis C.D. (2010): Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* 140(5): 678-691.

Greisman H.A. *et* Pabo C.O. (1997): A general strategy for selecting high-affinity zinc finger proteins for diverse DNA target sites. *Science* 275(5300): 657-661.

Grissa I., Vergnaudet G., Pourcel C. (2007): CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue): W52-57.

Guo J., Gajet T., Barbas C.F. III (2010): Directed evolution of an enhanced and highly efficient FokI cleavage domain for zinc finger nucleases. *J Mol Biol* 400(1): 96-107.

Gurlebeck D., Szureket B., Bonas U. (2005): Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J* 42(2): 175-187.

Gutschner T., Baaset M., Diederichs S. (2011): Noncoding RNA gene silencing through genomic integration of RNA destabilizing elements using zinc finger nucleases. *Genome Res* 21(11): 1944-1954.

Hale C.R., Zhao P., Olson S., Duff M.O., Graveley B.R., Wells L., Ternset R.M., Terns M.P. (2009): RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell* 139(5): 945-956.

Herrmann F., Garriga-Canut M., Baumstark R., Fajardo-Sanchez E., Cotterell J., Minoche A., Himmelbauer H., Isalan M. (2011): p53 Gene repair with zinc finger nucleases optimised by yeast 1-hybrid and validated by Solexa sequencing. *PLoS One* 6(6): e20913.

Hockemeyer D., Wang H., Kiani S., Lai C.S., Gao Q., Cassady J.P., Cost G.J., Zhang L., Santiago Y., Miller J.C., Zeitler B., Cherone J.M., Meng X., Hinkley S.J., Rebar E.J., Gregory P.D., Urnovet F.D., Jaenisch R. (2011): Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol* 29(8): 731-734.

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

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. *J Bacteriol* 169(12): 5429-5433.

Isalan M. (2012): Zinc-finger nucleases: how to play two good hands. *Nat Methods* 9(1): 32-34.

Isalan M., Choet Y., Klug A. (1997): Synergy between adjacent zinc fingers in sequence-specific DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(11): 5617-5621.

Jansen R., Embden J.D., Gaastraet W., Schouls L.M. (2002): Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 43(6): 1565-1575.

Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudnaet J.A., Charpentier E. (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337(6096): 816-821.

Johnson R.D. *et* Jasin M. (2001): Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 29(Pt 2): 196-201.

Karginov, F.V. *et* Hannon G.J. (2010): The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol Cell* 37(1): 7-19.

Kay S., Bochet J., Bonas U. (2005): Characterization of AvrBs3-like effectors from a Brassicaceae pathogen reveals virulence and avirulence activities and a protein with a novel repeat architecture. *Mol Plant Microbe Interact* 18(8): 838-848.

Kim Y.G., Chaet J., Chandrasegaran S. (1996): Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(3): 1156-1160.

Kim Y.G. *et* Chandrasegaran S. (1994): Chimeric restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(3): 883-887.

Kim H.J., Lee H.J., Kim H., Choet S.W., Kim J.S. (2009): Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. *Genome Res* 19(7): 1279-1288.

Kim J.S. *et* Pabo C.O. (1998): Getting a handhold on DNA: design of poly-zinc finger proteins with femtomolar dissociation constants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6): 2812-2817.

Kim Y.G., Shi Y., Berget J.M., Chandrasegaran S. (1997): Site-specific cleavage of DNA-RNA hybrids by zinc finger/FokI cleavage domain fusions. *Gene* 203(1): 43-49.

Kunin V., Soreket R., Hugenholtz P. (2007): Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol* 8(4): R61.

Lai S. *et* Elliot D. (2007): Design of a novel polydactyl zinc finger with binding specificity for the proximal promoter region of PLN in the proposed treatment of cardiomyopathy. *Studies by Undergraduate Researchers a Guelph* 1(1): 2291-1367.

Li H., Haurigot V., Doyon Y., Li T., Wong S.Y., Bhagwat A.S., Malani N., Anguela X.M., Sharma R., Ivanciu L., Murphy S.L., Finn J.D., Khazi F.R., Zhou S., Paschon D.E., Rebar E.J., Bushman F.D., Gregory P.D., Holmeset M.C., High K.A. (2011): In

vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature* 475(7355): 217-221.

Li M., Suzuki K., Kim N.Y., Liu G.H., Izpisua Belmonte J.C. (2014): A cut above the rest: targeted genome editing technologies in human pluripotent stem cells. *J Biol Chem* 289(8): 4594-4599.

Liu Q., Segal D.J., Gharaei J.B., Barbas C.F. III (1997): Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(11): 5525-5530.

Lombardo A., Cesana D., Genovese P., Di Stefano B., Provasi E., Colombo D.F., Neri M., Magnani Z., Cantore A., Lo Riso P., Damo M., Pello O.M., Holmes M.C., Gregory P.D., Gritti A., Broccoli V., Bonini C., Naldini L. (2011): Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer. *Nat Methods* 8(10): 861-869.

Lombardo A., Genovese P., Beausejour C.M., Colleoni S., Lee Y.L., Kim K.A., Ando D., Urnov F.D., Galli C., Gregory P.D., Holmes M.C., Naldini L. (2007): Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol* 25(11): 1298-1306.

Maeder M.L., Thibodeau-Beganny S., Osiak A., Wright D.A., Anthony R.M., Eichinger M., Jiang T., Foley J.E., Winfrey R.J., Townsend J.A., Unger-Wallace E., Sander J.D., Muller-Lerch F., Fu F., Pearlberg J., Gobel C., Dassié J.P., Pruett-Miller S.M., Porteus M.H., Sgroi D.C., Iafrate A.J., Dobbs D., McCray P.B. Jr., Cathomen T., Voytaset D.F., Joung J.K. (2008): Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell* 31(2): 294-301.

Mahfouz M.M., Li L., Shamimuzzaman M., Wibowo A., Fanget X., J. K. Zhu (2011): De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(6): 2623-2628.

Mak T.W. (2007): Gene targeting in embryonic stem cells scores a knockout in Stockholm. *Cell* 131(6): 1027-1031.

Mak A.N., Bradley P., Cernadas R.A., Bogdanoveet A.J., Stoddard B.L. (2012): The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science* 335(6069): 716-719.

Makarova K.S., Grishin N.V., Shabalina S.A., Wolfet 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. *Biol Direct* 1: 7.

Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R., Brouns S.J., Charpentier E., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J., Wolf Y.I., Yakunin A.F., Oostet J. van der, Koonin E.V. (2011): Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 9(6): 467-477.

Mandell J.G. *et* Barbas C.F. III (2006): Zinc Finger Tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases. *Nucleic Acids Res* 34(Web Server issue): W516-523.

Mani M., Kandavelou K., Dy F.J., Duraiet S., Chandrasegaran S. (2005): Design, engineering, and characterization of zinc finger nucleases. *Biochem Biophys Res Commun* 335(2): 447-457.

Marraffini L.A. *et* Sontheimer E.J. (2008): CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 322(5909): 1843-1845.

McConnell Smith A., Takeuchi R., Pellenz S., Davis L., Maizels N., Monnat R.J. Jr., Stoddard B.L. (2009): Generation of a nicking enzyme that stimulates site-specific gene conversion from the I-Anil LAGLIDADG homing endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(13): 5099-5104.

McMahon M.A., Rahdaret M., Porteus M. (2012): Gene editing: not just for translation anymore. *Nat Methods* 9(1): 28-31.

Mercer A.C., Gaj T., Fulleret R.P., Barbas C.F. III (2012): Chimeric TALE recombinases with programmable DNA sequence specificity. *Nucleic Acids Res* 40(21): 11163-11172.

Miller J.C., Tan S., Qiao G., Barlow K.A., Wang J., Xia D.F., Meng X., Paschon D.E., Leung E., Hinkley S.J., Dulay G.P., Hua K.L., Ankoudinova I., Cost G.J., Urnov F.D., Zhang H.S., Holmes M.C., Zhang L., Gregoryet P.D., Rebar E.J. (2011): A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 29(2): 143-148.

Moehle E.A., Rock J.M., Lee Y.L., Jouvenot Y., DeKolver R.C., Gregory P.D., Urnovet F.D., Holmes M.C. (2007): Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(9): 3055-3060.

Mojica F.J., Diez-Villasenor C., Garcia-Martinez J., Soria E. (2005): Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 60(2): 174-182.

Moscou M.J. et Bogdanove A.J. (2009): A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326(5959): 1501.

Munoz Bodnar A., Bernal A., Szureket B., Lopez C.E. (2013): Tell me a tale of TALEs. *Mol Biotechnol* 53(2): 228-235.

Orlando S.J., Santiago Y., DeKolver R.C., Freyvert Y., Boydston E.A., Moehle E.A., Choi V.M., Gopalan S.M., Lou J.F., Li J., Miller J.C., Holmes M.C., Gregory P.D., Urnovet F.D., Cost G.J. (2010): Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. *Nucleic Acids Res* 38(15): e152.

Pabo C.O., Peisachet E., Grant R.A. (2001): Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biochem* 70: 313-340.

Papworth M., Kolasinskaet P., Minczuk M. (2006): Designer zinc-finger proteins and their applications. *Gene* 366(1): 27-38.

Perez E.E., Wang J., Miller J.C., Jouvenot Y., Kim K.A., Liu O., Wang N., Lee G., Bartsevich V.V., Lee Y.L., Guschin D.Y., Rupniewski I., Waite A.J., Carpenito C., Carroll R.G., Orange J.S., Urnov F.D., Rebar E.J., Ando D., Gregory P.D., Riley J.L., Holmeset M.C., June C.H. (2008): Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 26(7): 808-816.

Perez-Pinera P., Ousteroutet D.G., Gersbach C.A. (2012): Advances in targeted genome editing. *Curr Opin Chem Biol* 16(3-4): 268-277.

Porteus M. (2010): Creating zinc finger nucleases to manipulate the genome in a site-specific manner using a modular-assembly approach. *Cold Spring Harb Protoc* 2010(12): pdb top93.

Porteus M.H. (2006): Mammalian gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Mol Ther* 13(2): 438-446.

Pruett-Miller S.M., Reading D.W., Porteret S.N., Porteus M.H. (2009): Attenuation of zinc finger nuclease toxicity by small-molecule regulation of protein levels. *PLoS Genet* 5(2): e1000376.

Ramirez C.L., Certo M.T., Mussolino C., Goodwin M.J., Cradick T.J., McCaffrey A.P., Cathomen T., Scharenberget A.M., Joung J.K. (2012): Engineered zinc finger nickases induce homology-directed repair with reduced mutagenic effects. *Nucleic Acids Res* 40(12): 5560-5568.

Ramirez C.L., Foley J.E., Wright D.A., Muller-Lerch F., Rahman S.H., Cornu T.I., Winfrey R.J., Sander J.D., Fu F., Townsend J.A., Cathomen T., Voytaset D.F., Joung

J.K. (2008): Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nat Methods* 5(5): 374-375.

Romer P., Reicht S., Lahaye T. (2009): A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors from disparate pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(48): 20526-20531.

Saijo, Y. *et* Schulze-Lefert P. (2008): Manipulation of the eukaryotic transcriptional machinery by bacterial pathogens. *Cell Host Microbe* 4(2): 96-99.

Sander J.D., Dahlborg E.J., Goodwin M.J., Cade L., Zhang F., Cifuentes D., Curtin S.J., Blackburn J.S., Thibodeau-Beganny S., Qi Y., Pierick C.J., Hoffman E., Maeder M.L., Khayter C., Reyon D., Dobbs D., Langenau D.M., Stupar R.M., Giraldez A.J., Voytas D.F., Peterson R.T., Yehet J.R., Joung J.K. (2011): Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat Methods* 8(1): 67-69.

Sanjana N.E., Cong L., Zhou Y., Cunniff M.M., Fenget G., F. Zhang (2012): A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nat Protoc* 7(1): 171-192.

Sanyal A., Lajoie B.R., Jainet G., Dekker J. (2012): The long-range interaction landscape of gene promoters. *Nature* 489(7414): 109-113.

Sebastiano V., Maeder M.L., Angstman J.F., Haddad B., Khayter C., Yeo D.T., Goodwin M.J., Hawkins J.S., Ramirez C.L., Batista L.F., Artandi S.E., Wernig M., Joung J.K. (2011): In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *Stem Cells* 29(11): 1717-1726.

Seeman N.C., Rosenberget J.M., Rich A. (1976): Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(3): 804-808.

Shukla V.K., Doyon Y., Miller J.C., DeKolver R.C., Moehle E.A., Worden S.E., Mitchell J.C., Arnold N.L., Gopalan S., Meng X., Choi V.M., Rock J.M., Wu Y.Y., Katibah G.E., Zhifang G., McCaskill D., Simpson M.A., Blakeslee B., Greenwalt S.A., Butler H.J., Hinkley S.J., Zhang L., Rebar E.J., Gregory P.D., Urnov F.D. (2009): Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 459(7245): 437-441.

Simsek D., Brunet E., Wong S.Y., Katyal S., Gao Y., McKinnon P.J., Lou J., Zhang L., Li J., Rebar E.J., Gregory P.D., Holmeset M.C., Jasin M. (2011): DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation. *PLoS Genet* 7(6): e1002080.

Soldner F., Laganier J., Cheng A.W., Hockemeyer D., Gao Q., Alagappan R., Khurana V., Golbe L.I., Myers R.H., Lindquist S., Zhang L., Guschin D., Fong L.K., Vu B.J., Meng X., Urnov F.D., Rebar E.J., Gregory P.D., Zhanget H.S., Jaenisch R. (2011): Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell* 146(2): 318-331.

Sollu C., Pars K., Cornu T.I., Thibodeau-Beganny S., Maeder M.L., Joung J.K., Heilbronnet R., Cathomen T. (2010). Autonomous zinc-finger nuclease pairs for targeted chromosomal deletion. *Nucleic Acids Res* 38(22): 8269-8276.

Sorek R., Kuninet V., Hugenholtz P. (2008): CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* 6(3): 181-186.

Steenftoft C., Vakhrushev S.Y., Vester-Christensen M.B., Schjoldager K.T., Kong Y., Bennett E.P., Mandel U., Wandall H., Laveryet S.B., Clausen H. (2011): Mining the O-glycoproteome using zinc-finger nuclease-glycoengineered SimpleCell lines. *Nat Methods* 8(11): 977-982.

Stewart G.S., Wang B., Bignell C.R., Tayloret A.M., Elledge S.J. (2003): MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421(6926): 961-966.

Struthers M., Ottesen J.J., Imperiali B. (1998): Design and NMR analyses of compact, independently folded BBA motifs. *Fold Des* 3(2): 95-103.

Sun Y., Thompson M., Lin G., Butler H., Gao Z., Thornburgh S., Yau K., Smith D.A. Shukla V.K. (2007): Inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase from maize: molecular and biochemical characterization. *Plant Physiol* 144(3): 1278-1291.

Uhde-Stone C., Cheung E., Lu B. (2014): TALE activators regulate gene expression in a position- and strand-dependent manner in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 443(4): 1189-1194.

Urnov F.D., Miller J.C., Lee Y.L., Beausejour C.M., Rock J.M., Augustus S., Jamieson A.C., Porteus M.H., Gregory P.D., Holmes M.C. (2005): Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435(7042): 646-651.

Urnov F.D., Rebar E.J., Holmes M.C., Zhanget H.S., Gregory P.D. (2010): Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* 11(9): 636-646.

Weber E., Gruetzner R., Werner S., Engleret C., Marillonnet S. (2011): Assembly of designer TAL effectors by Golden Gate cloning. *PLoS One* 6(5): e19722.

Wei C., Liu J., Yu Z., Zhang B., Gao G., Jiao R. (2013): TALEN or Cas9 - rapid, efficient and specific choices for genome modifications. *J Genet Genomics* 40(6): 281-289.

Wiedenheft B., Sternberget S.H., Doudna J.A. (2012): RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482(7385): 331-338.

Wolfe S.A., Nekudova L., Pabo C.O. (2000). DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 183-212.

Wyman C. *et* Kanaar R. (2006): DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* 40: 363-383.

Xie K. *et* Yang Y. (2013): RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol Plant* 6(6): 1975-1983.

Yusa K., Rashid S.T., Strick-Marchand H., Varela I., Liu P.Q., Paschon D.E., Miranda E., Ordonez A., Hannan N.R., Rouhani F.J., Darche S., Alexander G., Marciniak S.J., Fusaki N., Hasegawa M., Holmes M.C., Di Santo J.P., Lomas D.A., Bradleyet A., Vallier L. (2011): Targeted gene correction of alpha1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature* 478(7369): 391-394.

Zhang F., Cong L., Lodato S., Kosuri S., Churchet G.M., Arlotta P. (2011): Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotechnol* 29(2): 149-153.

Zou J., Mali P., Huang X., Doweyet S.N., Cheng L. (2011): Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. *Blood* 118(17): 4599-4608.

Zou J., Sweeney C.L., Chou B.K., Choi U., Pan J., Wang H., Dowey S.N., Chenget L., Malech H.L. (2011): Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting. *Blood* 117(21): 5561-5572.

13. Seznam zkratek

AC	= Aktivační doména
Cas	= CRISPR-associated proteins
CCR5	= C-C chemokinový receptor 5
CIP	= Alkalická fosfatáza z jehněčího střevního epitelu
CoDA	= Context-dependent assembly
CRISPR	= Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNA	= CRISPR RNA
DSB	= Dvouvláknový zlom
ESC	= Embryonální kmenová buňka
GFP	= Zelený fluorescenční protein
gRNA	= Guide RNA
HR	= Homologní rekombinace
iPSC	= Indukovaná pluripotentní kmenová buňka
ILR2	= Interleukin 2 receptor
MA	= Modular assembly
MAMPs	= Microbial associated molecular patterns
MDC1	= Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MTI	= MAMP-triggered immunity
NHEJ	= Nehomologní spojování konců
NLS	= Jaderný lokalizační signál
Nt	= Nukleotid

OCT4	= Octamer-binding transcription factor 4
OPEN	= Oligomerized pool engineering
PAM	= Protospacer adjacent motif
PCR	= Polymerázová řetězová reakce
pre-crRNA	= Nezralá CRISPR RNA
RVD	= Repeat-variable di-residues
SCID	= Těžká kombinovaná imunodeficiencie
TALE	= Transcriptional activator-like effector
TALEN	= Transcriptional activator-like effector nuclease
tracrRNA	= Trans-activating CRISPR RNA
Ubx	= Ultrabithorax
Wt	= Wild type
ZF	= Zinc finger
ZFN	= Zinc finger nuclease
ZFP	= Zinc finger protein