

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

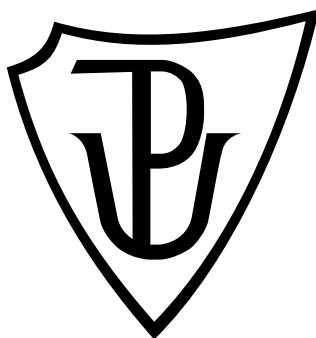
**Olomouc 2017**

**Petr Nickl**

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Specifická editace genomu pomocí nukleáz**

**Bakalářská práce**

**Petr Nickl**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2017**

**Vedoucí práce: Mgr. Natálie Táborská**

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Natálie Táborské, dále prohlašuji, že veškeré podklady, ze kterých jsem čerpal, jsou uvedeny v přehledu literatury.

V Olomouci: .....

Podpis: .....

## SOUHRN

Geneticky podmíněná onemocnění jsou v současné době většinou léčena pouze symptomaticky. Vývoj místně specifických nukleáz, jako je nukleáza zinkového prstu, TALEN či CRISPR/Cas9, může velkým způsobem přispět ke genové terapii dědičných onemocnění na úrovni DNA, kde je využito přirozených procesů opravy genetické informace.

Místně specifické nukleázy pronikají do jádra, kde vytváří zlomy DNA v konkrétních sekvencích. Buňka reaguje na tyto zlomy spuštěním reparačního systému, přičemž volí ze dvou způsobů opravy – spojování nehomologních konců nebo homologně řízená oprava. Na základě způsobu, kterým buňka DNA opraví, mohou být vkládány delece či inserce v konkrétních místech genomu, a to za předpokladu, že je porušená DNA opravována způsobem spojování nehomologních konců. Dále může být do konkrétního místa v genomu přepsána sekvence podle přítomného templátu prostřednictvím homologně řízené opravy DNA.

Experimentální část této práce byla věnována vypnutí genu *RPS19* pomocí CRISPR/Cas9 systému. Jako cílové místo byl v rámci genu zvolen exon 3. Tento úsek byl vybrán z důvodu umístění bodové mutace R56Q, která se vyskytuje u pacientů s Diamond – Blackfanovou anémií a jako jedna z mnoha dalších mutací v ribosomálních proteinech se podílí na projevu tohoto onemocnění. Postup zahrnoval analýzu vhodných míst pro editaci v rámci exonu 3 a navržení příslušných DNA oligonukleotidů kódujících sgRNA, které jsou nutné pro navedení proteinu Cas9 na cílovou sekvenci. Následně byl připraven expresní vektor kódující protein Cas9, který dále obsahoval naváděcí informaci pro protein v podobě inzerovaného specifického DNA oligonukleotidu. Nakonec byl tento vektor transfekován do lidských buněk a následné změny v cílových sekvencích byly analyzovány sekvenováním nové generace.

## SUMMARY

Genetically-mediated diseases are recently treated mainly symptomatically. The development of site-specific nucleases, such as zinc finger nuclease, TALEN or CRISPR / Cas9 system, can greatly contribute to the gene therapy of genetic disorders at the DNA level, where natural processes of genetic information repair are used.

Site - specific nucleases penetrate the nucleus, where they generate DNA breaks in specific loci. The cell responds to these breaks by activation of a repair system that chooses from two ways of repairing the DNA break - non-homologous ends joining or homology directed repair. Based on the chosen way of repair, deletions or insertions might be created at specific sites of the genome, provided that the broken DNA is corrected by the method of non-homologous ends joining. Additionally, a sequence in a specific site in the genome can be transcribed in accordance with present template via homologous DNA repair.

The experimental part of this work was devoted to knock-out the *RPS19* gene using the CRISPR/Cas9 system. The target site within the gene was exon 3. This segment was selected due to the occurrence of the R56Q mutation that has been found among the patients with Diamond-Blackfan anemia and as one of many other mutations in genes for ribosomal proteins is involve in the manifestation of this disease. The procedure comprised of analyzing suitable sites for editing within exon 3 and designing the appropriate DNA oligonucleotides encoding sgRNAs. These sgRNAs are essential for directing the Cas9 protein to the target sequence. Subsequently, an expression vector encoding Cas9 protein was prepared. The vector also contained a guiding sequence for the protein in the form of inserted specific DNA oligonucleotide. Eventually, this vector was transfected into human cells and subsequent changes in target sequences were analyzed by the next generation sequencing.

#### Poděkování:

Rád bych poděkoval svému vedoucímu práce Mgr. Natálii Táborské za metodické vedení, za odborné rady, připomínky a čas. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Petrovi Vojtovi, a to za zpracování výsledků sekvenční analýzy a také Mgr. Ivoovi Frydrychovi Ph.D. za třídění buněk na průtokovém cytometru. Stejně tak děkuji ostatním zaměstnancům ÚMTM za jejich ochotnou pomoc a vstřícnost.

1 ÚVOD .....	1
2 CÍLE PRÁCE .....	2
3 SOUČASNÝ STAV DANÉ PROBLEMATIKY .....	3
3.1 Vývoj genového inženýrství.....	3
3.2 Nukleáza zinkového prstu (Zinc Finger Nuclease).....	8
3.2.1 Doména zinkového prstu .....	9
3.2.2 Endonukleáza FokI .....	12
3.2.3 Mechanismus působení nukleázy zinkového prstu .....	13
3.2.4. Metody tvorby ZFN.....	15
3.2.4 Tvorba resistance vůči HIV pomocí ZFN .....	17
3.3 Transcription activator-like effector nuclease (TALEN).....	20
3.3.1 Struktura TALEN .....	20
3.3.2 Metody tvorby TALEN .....	24
3.3.3 Využití TALEN systému.....	26
3.3.3.1 Gen APOB hraje roli v replikačním cyklu HCV.....	27
3.3.3.2 Posun čtecího rámce v genu PLIN1 dominantně mění lipolýzu v adipocytech .....	28
3.4 CRISPR/Cas9 systém.....	30
3.4.1 Klasifikace CRISPR/Cas systémů .....	31
3.4.2 Mechanismus působení CRISPR systému typu II .....	32
3.4.3 Použití CRISPR/Cas9 systému pro editaci genomu .....	36
3.4.4 Účinnost cílení na danou sekvenci DNA a mimo cílové působení .....	37
3.4.5 Tvorba CRISPR/Cas9 systému cíleného na konkrétní úsek DNA.....	38
3.4.6 Využití CRISPR/Cas9 k úpravě lidských embryonálních buněk .....	40
4 MATERIÁL A METODY .....	43
4.1 Biologický materiál.....	43

4.2 Sekvence exonu 3 genu <i>RPS19</i> a navržení sgRNA pro daný exon.....	43
4.3 Příprava vektoru PX458 a klonování sgRNA oligonukleotidů.....	43
4.3.1 Kultivace bakterií a izolace plazmidu PX458 .....	44
4.3.2 Restrikce vektoru PX458.....	45
4.3.3 Příprava komplementárních oligonukleotidů .....	46
4.3.4 Ligace hybridizovaných oligonukleotidů do vektoru PX458.....	46
4.3.5 Transformace kompetentních bakterií <i>E. coli</i> kmen DH5 $\alpha$ vektorem PX458.....	48
4.3.6 Příprava konzerv bakteriálních buněk a izolace vektoru.....	48
4.3.7 Ověření úspěšné ligace pomocí sekvenování .....	48
4.4 Transfekce a třídění buněk RPE-1.....	51
4.4.1 Transfekce buněk RPE-1 .....	51
4.4.2 Zamražení RPE-1 buněk.....	51
4.4.2 Třídění pomocí FACS .....	52
4.5 Sekvenování exonu 3 genu <i>RPS19</i> pomocí metody sekvenování nové generace.....	52
4.5.1 Izolace gDNA z buněk RPE-1 a amplifikace exonu 3 genu <i>RPS19</i> .....	52
4.5.2 Příprava knihovny pro NGS z PCR produktu .....	54
4.6 Použité chemikálie.....	57
4.7 Použité roztoky a jejich složení.....	58
4.8 Použité přístroje.....	59
5 VÝSLEDKY .....	60
5.1 Sekvence exonu 3 genu <i>RPS19</i> a navržení oligonukleotidů kódující sgRNA.....	60
5.2 Příprava vektoru PX458 a klonování DNA kódující sgRNA.....	62
5.2.1 Izolace vektoru PX458 .....	62
5.2.2 Restrikce vektoru PX458.....	62
5.2.3 Příprava komplementárních oligonukleotidů .....	64
5.2.4 Ligace hybridizovaných oligonukleotidů do vektoru PX458, transformace bakterií a izolace vektoru.....	64



4.4	Transfekce a třídění buněk s následnou analýzou exonu 3.....	65
5.3.1	Transfekce a třídění transfekovaných buněk RPE-1 .....	65
5.3.2	PCR amplifikace exonu 3 genu <i>RPS19</i> a purifikace PCR produktu .....	66
5.3.3	Příprava knihovny pro NGS .....	67
5.3.4	Sekvenace exonu 3 genu <i>RPS19</i> pomocí metodou Next-Generation Sequencing .....	68
6	DISKUZE.....	70
7	ZÁVĚR.....	73
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	74
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	85
10	PŘÍLOHY.....	87
10.1	Ověření ligace oligonukleotidů do vektoru PX458 sekvenováním.....	87
10.2	Nespecifické působení sgRNAs navržených oligonukleotidů.....	90

# 1 ÚVOD

Dědičně podmíněné choroby jsou patologické změny v konkrétních sekvencích DNA. Změny genetické informace jsou přenášeny na další generace a mohou být děděny v heterozygotním či homozygotním stavu, dále mohou být i pohlavně podmíněny. Tyto choroby se vyskytují v lidské populaci minoritně a jejich léčba většinou končí pouze u potlačení symptomů nemoci.

Od roku 1990, kdy byla poprvé genová terapie úspěšně použita na člověka, se zásadně rozvinul výzkum tohoto odvětví (Culver *et al.*, 1991). Nejvyšší metou vědců v oblasti lidského genového inženýrství je nalezení metody, která dokáže vyléčit tak rozáhlou změnu genomu jedince jako je chromozomová aberace. Od tohoto úspěchu nejsou vědci daleko díky moderním přístupům manipulace s genetickou informací, v tomto případě by se dal tento zásah do genomu člověka označit jako „chromozomová terapie“ (Jiang *et al.*, 2013)

V současné době hraje významnou roli v lidském genovém inženýrství umlčování genů pomocí RNA interference (RNAi). RNAi zajišťuje snížení exprese daného genu pomocí antisense RNA, která se váže na cílovou mRNA a znemožňuje tím její překlad do sekvence aminokyselin (Waterhouse *et al.*, 1998).

Dalším způsobem je vnášení genů pomocí virových vektorů, většinou jsou u tohoto přístupu používány retroviry, které mají schopnost integrace virové DNA do genomu hostitele. Pokud je patogenický integrující se úsek virové DNA vyměněn za terapeutický gen kódující cílový produkt, lze takto geneticky modifikovat buňky, které jsou napadány těmito viry. Terapie retroviry je riziková metoda, u které nelze určit místo integrace virové DNA, integrace do životně důležitých genů může vést ke smrti buňky nebo vývoji rakoviny (Naldini *et al.*, 1996).

Genová terapie pomocí místně specifických nukleáz oproti výše zmíněným přístupům modifikace genetické informace nabízí tvorbu změn v konkrétních sekvencích v rámci genomu na úrovni DNA. Mezi místně specifické nukleázy jsou řazeny nukleáza zinkového prstu, TALEN a Cas9, tyto nukleázy jsou schopny přerušit vlákno definované sekvence DNA v jádře živé buňky a tím aktivovat následné reparační procesy. Přirozené opravné mechanismy buňky pak mohou vytvořit delece či inserce, v případě že je v blízkosti homologní templát může dojít k opravě těchto zlomů podle templátu. Způsob, jakým je vlákno opraveno, může mít za následek vypnutí, zapnutí či změnu sekvence genu (Khalili *et al.*, 2015). A právě místně specifickým nukleázám je tato práce věnována.

## 2 CÍLE PRÁCE

- Vypracování rešerše na téma 'Specifická editace genomu pomocí nukleáz'.
- Optimalizace CRISPR metody.
- Vypnutí cílového genu *RPS19* (Human Ribosomal Protein S19) metodou CRISPR
- Analýza výsledků a vypracování bakalářské práce

## 3 SOUČASNÝ STAV DANÉ PROBLEMATIKY

### 3.1 Vývoj genového inženýrství

Genové inženýrství je vědní obor zabývající se vývojem a aplikací vědeckých metod, procedur a technologií, které umožňují přímou manipulaci genetického materiálu za účelem změny vlastností dané buňky, organismu či populace (Somnath, 2016).

Genetická modifikace, kterou se genové inženýrství zabývá, je proces změny DNA v genomu daného organismu. To může znamenat například změnu jedné báze (A-T za C-G), delecii nebo naopak inzerci úseku DNA. Dále je možné vyjmout konkrétní část genetické informace z jednoho organismu a následně vložit tuto část do genomu organismu jiného. Genové inženýrství je používáno k vylepšení a úpravě konkrétních vlastností konkrétního organismu. Genové inženýrství může být použito na jakýkoliv organismus od viru až po ovci a ve výjimečných případech i na člověka (yourgenome.org, 2016).

Již od znovu objevení Mendelova článku *Pokusy s hybridy rostlin* v roce 1900 se začal rozvíjet vědní obor zabývající se studiem informace, která je nutná k tvorbě komplexního organismu. Gregor Mendel tuto informaci nazýval „dědičný faktor“, my ji dnes známe pod pojmem gen. Mendel sice chápal gen jako informaci děděnou z generace na generaci v určité formě, ale nevěděl, kde je tato informace v buňce uložena nebo co taková informace vůbec je (Mendel, 1866).

Až v roce 1944 se třem vědcům Averymu, MacLeodovi a McCartymu podařilo dokázat, že materiálem nesoucím genetickou informaci je deoxyribonukleová kyselina. Pomocí experimentu prokázali, že za transformaci bakterie *Streptococcus pneumoniae* stojí právě DNA (Avery *et al.*, 1944).

Dalším experimentem dokazujícím, že i bakteriální virus nese informaci potřebnou k jeho replikaci uloženou v deoxyribonukleové kyselině, byl v roce 1952 pokus A. D. Hersheyho a M. Chaseové. Bakteriofág T2, který je parazitem bakterie *Escherichia coli* (*E.coli*), je tvořen z 50 % proteiny a 50 % DNA. Hershey a Chaseová dokázali, že DNA virové částice je injikována do cytoplazmy bakterie, zatímco většina virových proteinů zůstávala adsorbována na povrchu buňky. Z těchto výsledků vyplynulo, že genetický materiál zajišťující reprodukci viru v buňce je uložen v DNA (Hershey *et al.*, 1952).

O rok později roku 1953 James Watson a Francis Crick se znalostí chemického složení deoxyribonukleové kyseliny vytvořili strukturní model dvouvláknové molekuly DNA na základě krystalografického snímku Rosalind Franklinové. To vedlo k pochopení komplementárního párování bází DNA a tvorbě teorie popisující proudění genetické informace

uvnitř buňky z DNA přes RNA k proteinu, dnes známou jako tzv. centrální dogma (Watson *et* Crick, 1953).

Dalším velkým krokem kupředu k pochopení vlastností genetické informace byl vynález sekvenační metody Frederikem Sangerem a jeho kolegy. Tato metoda umožňuje určení sekvence nukleotidů v konkrétním pořadí za sebou (Sanger *et* Coulson, 1975). Využití tohoto nového objevu na sebe nenechalo dlouho čekat a Sangerovo sekvencování se v té době stalo velmi důležitým nástrojem nově se rozvíjejícího oboru - genové inženýrství. Objev sekvenačních metod zajistil široký rozvoj genového inženýrství. Rázem bylo možné zkoumat sekvence nukleotidů v DNA, popř. genů, sledovat záměny – mutace a pozorovat změny ve funkci těchto genů (Lander *et al.*, 2001).

Jako první se středem výzkumu genového inženýrství stala bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, která nese Ti-plazmid (tumor inducing plasmid) (Hamilton *et* Chopan, 1975), součástí tohoto plazmidu je sekvence T-DNA (transferred DNA). T-DNA je oblast plazmidu transdukovatelná do genomu rostliny. Ti-plazmid dále obsahuje tzv. úsek *vir* (virulence), který kóduje proteiny potřebné k vyjmutí, přenosu a začlenění T-DNA do rostlinného genomu (Klee, 1983).

Studium vlastností Ti-plazmidu umožnilo pochopit princip fungování přenosu genetické informace z T-DNA oblasti do genomu hostitelského rostlinného organismu. Přirozeně tato oblast nese gen pro tumorogenezi - po infekci rostliny *Agrobacteriem* vzniká nádor, který produkuje živiny pro rostlinu nepotřebné, ale pro bakterii nezbytné (Stachel, 1986).

Vědci Ti-plazmid upravili, nahradili gen pro tumorogenezi za gen zvýhodňující rostlinu. Například do rostliny tabáku (*Nicotiana*) byl vnesen gen rezistence proti antibiotiku kanamycin. Po expresi daného genu rezistence byla rostlina schopna růst na médiu obsahujícím právě kanamycin (Bevan, 1984). Tento objev otevřel nové množství modifikací rostlinných organismů, dnes lze například vložit do rostlin geny rezistence vůči parazitům (Bartoszewski *et al.*, 2003), škůdcům, nebo geny ovlivňující vlastnosti plodů (Gatehouse, 2008).

Dalším příkladem genetické modifikace je rostlina tabáku rezistentní proti X viru brambor (*potato virus X*, PVX), tabák produkuje protein potřebný k tvorbě obalu viru, tím je v rostlině samotné spuštěn proces interference vedoucí k rezistenci. Do genomu rostliny může být přímo vložena sekvence DNA kódující anti-sense RNA, která interferuje s virovou RNA a dochází k degradaci genetického materiálu potřebného k reprodukci viru (Hemenway *et al.*, 1988).

Úprava genomu nezůstala pouze u rostlin, aplikuje se dnes i na živočichy a vytvářejí se tzv. transgenní organizmy. Mechanismus transgenozy u živočichů je odlišný a složitější než u rostlinných modelů. Mezi nepoužívanější přístupy k vytvoření transgenního živočicha patří například aplikace transgenní genetické informace do jádra buňky použitím lipofekce (Ran *et al.*, 2013) či mikroinjekce (Smith *et al.*, 2006). Dále může být použita transfekce pomocí retrovirů (O'Keefe, 2013) či embryonálních buněk (Thomas *et al.*, 1987). Tyto metody jsou ale málo účinné, pouze u 5 % takto upravených živočichů je pozorována požadovaná změna.

Mezi nejdůležitější modelové organismy patří *Xenopus laevis* (drápatka vodní). Kvůli nadměrné velikosti vajíček a jejich mimotělnímu vývoji je zajištěno snadné pozorování a manipulace. Pro transgenozu vajíček se obvykle používá mikroinjekce. Tento modelový organismus se využívá k pozorování vývoje zárodka a jeho základních orgánů (Smith *et al.*, 2006).

Dopravení genetické informace pomocí mikroinjekce se také používá pro tvorbu transgenních lososů obecných (Shears *et al.*, 1992). Gen pro růstový hormon z lososa čavyči, který během svého života dosahuje větší velikosti než losos obecný, je vložen pod specifickým promotorem do vajíček lososa obecného. Vnesení genu má za následek rychlejší růst a dospívání ryby. Toho se využívá při umělém pěstování ryb v sádkách. Systém zrychleného vývoje má, ale velké riziko, pokud dojde k úniku transgenních ryb, může být vážně ohrožena populace ve volné přírodě. Upravené ryby jsou zvýhodněny při páření, ale jsou méně zdatné (Stokstad, 2002).

Dále jsou známy experimenty s tvorbou transgenních myší. Dvě nejčastěji používané metody při vnášení transgenů do myší jsou mikroinjekce lineární DNA do oplozeného vajíčka (Gordon *et al.*, 1980). Druhou možností je vyjmutí embryonální kmenové buňky z blastocysty myšího embrya, následná transfekce dané buňky a navrácení pozměněných kmenových buněk zpět do blastocysty myšího embrya. Pokud se vnesené buňky vyvíjí v zárodečné buňky, je vysoká pravděpodobnost, že se transgeny přenesou do další generace (Thomas *et al.*, 1987). Těmito způsoby je například možné vložit gen medúzy *Aequorea victoria* kódující zelený fluorescenční protein (*angl. green fluorescent protein*, GFP) do myšího zárodka a následně pozorovat *in vivo* charakteristickou fluorescenci myších buněk, které tento cizorodý gen v exprimují (Pratt *et al.*, 2000).

Jedním z vrcholů genového inženýrství je naklonování ovce Dolly. Roku 1996 se vědcům z Roslin Institute v Edinburghu podařilo naklonovat životaschopný klon savce. Ovce byla vytvořena použitím techniky přenosu jádra somatické buňky, kdy buněčné jádro z dospělé

buňky bylo přeneseno do neoplozeného oocyту, z něhož bylo jeho původní buněčné jádro odejmuto. Hybridní buňka byla dále stimulována elektrickým proudem k dělení. A poté, jakmile dosáhla stádia blastocysty, byla implantována do náhradní matky (Campbell *et al.*, 1996).

Dolly byla první klon vytvořený z buňky odebrané z dospělého savce. Vytvoření Dolly ukázalo, že geny v jádře diferenciované somatické buňky jsou stále schopny být navráceny do embryonálního totipotentního stavu a vytvořit buňku, která se následně může vyvinout do jakéhokoliv druhu tkáně (Niemann *et al.*, 2008).

Ovce Dolly zemřela v únoru roku 2003 ve věku 6,5 let i přes to, že její druh se běžně dožívá 11 až 12 let. Příčinou smrti byla rakovina plic. Dlouho se spekulovalo, zdali příčinou předčasného úmrtí Dolly nebyl její genetický věk šesti let - věk matky - dárkyně jádra somatické buňky. Základem této domněnky bylo nalezení zkrácených telomer v buňkách ovce, což je přirozený výsledek procesu stárnutí. Rosalind Institute tedy započal výzkum, který měl potvrdit či vyvrátit hypotézu, zda délka telomer a příčiny smrti Dolly mají hlubší souvislost. Výsledky však nepotvrdily žádné abnormality v těle ovce, které by mohly být spojeny se stárnutím. (Roslin.ed.ac.uk, 2016).

Transfekce pomocí virů (nejčastěji lentivirů) je další používaná metoda zejména v genové terapii. Lentiviry jsou rod virů patřící do čeledi *Retroviridae*, charakteristické svojí dlouhou inkubační dobou (Weiss, 1996). Lentivirus je schopen integrace značného množství virové RNA do genomu hostitelské buňky pomocí enzymu reverzní transkriptázy (RT). Unikátní vlastností lentiviru mezi retroviry je schopnost infikovat nedělicí se buňky, a proto je hojně využíván jako genový vektor (Cockrell *et Kafri*, 2007). Uměle vytvořené lentivirální vektory mohou nést cílovou sekvenci DNA o velikosti až 8 kbp. Tyto vektory se dnes využívají například pro multigenní léčbu Parkinsonovy choroby (Jakobsson *et Lundberg*, 2006).

Nejlépe prostudovaný a také možná nejznámějším wild-type lentivirem je human imunodeficiency virus typu I (HIV), virus způsobující syndrom získané imunodeficiency (*angl. acquired immune deficiency syndrome, AIDS*) (Connolly, 2002).

Kvůli spojitosti s tímto vážným onemocněním je používání lentivirů jako vektorů pro přenos transgenů spojeno s mnoha bezpečnostními opatřeními. V rámci bezpečnosti byly vytvořeny nereplikující se a auto-inaktivující se lentiviry, které mohou například vykazovat tropismus ke konkrétním buňkám a mohou být schopny trvalé exprese nesených genů uvnitř těchto buněk (Mandel *et al.*, 2008; Schambach *et Baum*, 2008).

Od 80. let minulého století se snaží vědci manipulovat s genomy organismů s vyšší přesností, efektivitou a hlubším porozuměním celého mechanismu zásahu. Jedním z hlavních přístupů, který cílenou úpravu dovoluje, je použití specifiky navržených endonukleáz schopných navázat se na konkrétní sekvenci nukleotidů a případně k tomu provést řízené přerušování vlákna DNA. Přírozenou reakcí buňky na takto porušenou DNA je její reparace.

Cílem těchto metod je indukovat poškození DNA, které vede k vypnutí (*angl. knock-out*), zapnutí (*angl. knock-in*) či nahrazení genu za jiný pomocí přirozených DNA opravných mechanismů buňky. Vypínání a zapínání genů je následkem vzniku inzercí a delecí (indel), které nastávají při nepřesné reparaci mechanismem nehomologního spojování konců vláken dvoušroubovice DNA (*angl. non-homologous end joining, NHEJ*).

Rozsáhlejší změna části nukleotidového řetězce může být provedena reparací podle přítomného templátu (např. nesesterský chromozom či krátký úsek DNA), tento mechanismus opravy se označuje jako homologně řízená oprava (*angl. homology directed repair, HDR*). NHEJ je v porovnání s HDR častější, avšak vede k pouze vypnutí/zapnutí genů vznikem indelů, cílených např. bodových oprav není schopen.

Jednotlivé druhy endonukleáz umožňují specificky řízené stříhy dvouvláknové DNA. Konkrétně se jedná o endonukleázy využívané v systémech pro editaci genomu: nukleázy zinkového prstu, Transcription Activator Like Effector Nuclease (TALEN) a nejaktuálnější CRISPR/Cas9 technologie (Khalili *et al.*, 2015).



Obr. 1: Nukleázami zinkového prstu (ZFN), TALEN a CRISPR/cas9 indukované dvouvláknové zlomy vedoucí k HDR nebo k NHEJ opravě (převzato z Khalili *et al.*, 2015)

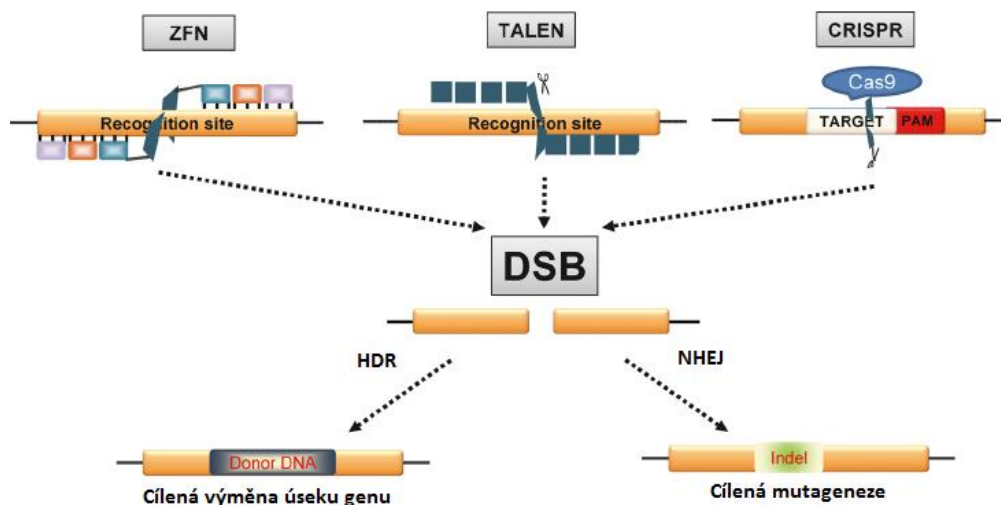


Schéma působení ZFN, TALEN, CRISPR (zleva do prava). Specifický úsek DNA, na který se váže nukleáza (recognition site). Místo stříhu je znázorněno tmavě zelenými lichoběžníky a symbolem nůžek. Červený obdelník znázorňuje sekvenci PAM, která je nutná pro rozpoznání místa stříhu nukleázou Cas9 (viz kapitola CRISPR/Cas9).

Hlavní oblasti, kde se využívá genových úprav za použití ZFN, TALEN a CRISPR/Cas9 lze rozdělit do tří hlavních kategorií:

- Tvorba buněčných nebo rostlinných/živočišných modelů vybraných onemocnění.
- Modifikace genomu ekonomicky významných druhů pro zemědělství a průmysl.
- Lidská genová terapie.

### 3.2 Nukleáza zinkového prstu (Zinc Finger Nuclease)

Nukleázy zinkového prstu (*angl. zinc finger nuclease, ZFN*) patří do třídy uměle vytvořených nukleáz, které se skládají z DNA vazebné a restrikční domény. Restrikční doména je tvořena proteinem s enzymatickou funkcí odvozeného od katalyticky aktivní domény restrikční endonukleázy *FokI* a je zodpovědná za stříh DNA. Série proteinů tvořících vazebnou doménu slouží k navázání na DNA nekovalentní vazbou (Kim *et al.*, 1996).

Sekvenční specifitu a vazebnou afinitu ZFN zajišťuje proteinový motiv zinkového prstu (*angl. zinc finger protein, ZFP*), který je odvozená od přirozených eukaryotických transkripčních faktorů. Tyto proteiny jsou schopny vázat se na specifický úsek DNA (Klug *et al.*, 1986). Uspořádání aminokyselin vázající se na zinečnatý iont určuje celkovou terciární strukturu proteinu a jeho výslednou funkci (Zhong *et Zhao*, 2011).

Afinita a specificita vazebného modulu k cílovému úseku DNA byla testována *in vitro*, v takovém prostředí byla vazba vysoce specifická. Ale při testech *in vivo* se obvykle ZFN nevázála na konkrétní endogenní lokus v živých buňkách. Jedním z důvodů neúspěchu mohla být přítomnost opakujících se kopií sekvencí, které jsou identické nebo velmi podobné cílovému úseku (hlavně jde o paralogní geny nebo pseudogeny). ZFN se tak může vázat na úseky genomu, které nejsou cílem editace a vzniká tzv. mimo cílové působení (*angl. off-target effect*). Další překážkou pro ZFN může být kondenzovaná struktura heterochromatinu znesnadňující přístup nukleázy k požadovanému úseku (Urnov *et al.*, 2010)

### 3.2.1 Doména zinkového prstu

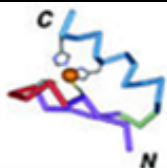

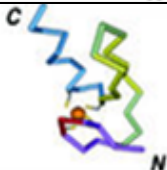
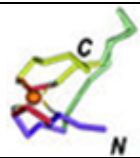

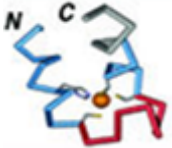
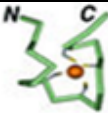
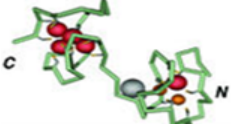
Proteiny zinkového prstu jsou velká rozmanitá rodina proteinů, která slouží k mnoha biologickým účelům. Kvůli jejich diverzitě je velmi těžké přijít s všeobecnou definicí. Lze je šířeji definovat jako malé funkční domény, které pro svoji koordinaci vyžadují přítomnost alespoň jednoho zinečnatého iontu v jejich struktuře (Laity *et al.*, 2001).

S termínem zinc finger protein se můžeme v literatuře také setkat pod pojmem *zinc finger motif* nebo *zinc finger array*. V proteinu zinkového prstu lze pozorovat konzervativní motivy aminokyselin (ZF motiv), které se podílejí na vazbě s iontem podle těchto motivů se dělí ZFP do tří hlavních subtypů Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>, Cys<sub>4</sub> a Cys<sub>6</sub>. (MacPherson *et al.*, 2006).

Původně byl za ZFP považován jen transkripční faktor nalezený v drápatce vodní. Momentálně se zahrnují proteiny podobné strukturou a vazbou se zinečnatým ionem do skupiny proteinů zinkového prstu. Obecně ZFP kovalentně váže ve své struktuře ion Zn<sup>2+</sup> vázaný na různé kombinace cysteinových a histidinových reziduí. Původně počet a pořadí těchto reziduí řídilo klasifikaci různých typů ZFP (např. Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>, Cys<sub>4</sub>, Cys<sub>6</sub>). Nová klasifikace řadí proteiny zinkového prstu do skupin podle struktury - základního uspořádání domény, jak je znázorněno v Tab. 2. Nejběžnějšími strukturními skupinami jsou Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-like (klasický protein zinkového prstu), trojitý klíč (*angl. treble clef*) a zinková stuha (*angl. zinc ribbon*) (Krishna *et al.*, 2003).

Tab. 1: Klasifikace motivů zinkového prstu podle struktury

(převzato a upraveno podle Krishna et al., 2003)

Strukturální skupina	Struktura	Poloha vazeb vážící zinečnatý ion
1. Cys2His2		Dvě vazby z ohybu mezi $\beta$ -listy a dvě vazby z C-konce $\alpha$ -helixu
2. Gag knuckle		Dvě vazby z ohybu mezi $\beta$ -listy a dvě krátké z $\alpha$ -helixu
3. Treble clef		Dvě vazby z ohybu a dvě další z N-konce $\alpha$ -helixu
4. Zinc ribbon		Dvě vazby každá ze dvou ohybů
5. Zn2/Cys6		Dvě vazby z N-konce $\alpha$ -helixu a dvě další ze smyčky
6. TAZ2 domain like		Dvě vazby na každém z konců dvou $\alpha$ -helixů
7. Zinc binding loops		Čtyři vazby ze smyčky
8. Metallothionein		Na cystein bohatá, kov vážící smyčka

Struktury jsou rozděleny do osmi skupin podle jejich strukturálních vlastností v oblasti  $Zn^{2+}$  vazebného místa. Aminokyselinové zbytky chelatující zinek (vybarven oranžově) jsou znázorněny jako kulička a šedé tyčky se žlutými konci. Helixy jsou znázorněny modře. Ohyb vážící zinek a spojující dva  $\beta$ -listy je vybarven červeně. Primární  $\beta$ -listy, které sousedí ohybem, jsou vybarveny fialově, nesousedící  $\beta$ -listy žlutě. Smyčky jsou zobrazeny světle zelenou. Zbylé části struktury, které nepatří do zinek-vazebné části, jsou vybarveny šedě. Tabulka obsahuje stručný popis umístění zinek-vazebného místa v rámci sekundární struktury proteinu. Žádné dvě strukturální skupiny nesdílejí více než 50 % identických sekvencí aminokyselin v zinek-vazebné oblasti.

První objeveným motivem byl Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>, a to jako opakující se motiv v transkripčním faktoru IIIA (TFIIIA) africké vodní žáby drápatky vodní (*Xenopus laevis*) (Brown *et al.*, 1985; Miller *et al.*, 1985).

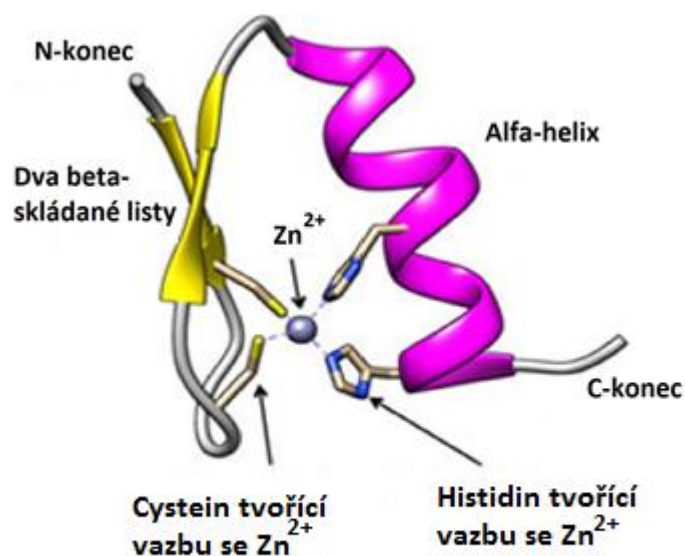
„Prst“ (*angl. finger*) motiv Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> je tvořen sekundárními strukturami ( $\alpha$ -helix a dvěma  $\beta$ -listy), které jsou formovány dohromady zmiňovaným zinečnatým ionem, kovalentně váží zinečnatý ion dvěma cysteiny na páru  $\beta$ -listů a dvěma histidiny na  $\alpha$ -helixu. Toto uspořádání dalo motivu název Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>. Zinečnatý ion zde slouží k stabilizaci motivu samotného a nezasahuje do vazby na cílové místo DNA. (Lee *et al.*, 1989). ZFP je dále tvořen motivy sloužící k interakci s DNA, RNA, proteiny a malými molekulami. (Laity *et al.*, 2001) Schématické zobrazení ZFP je na Obr. 2.

Zbylé části proteinu mohou podléhat široké sekvenční diversitě (Michael *et al.*, 1992). Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> zinc finger vážící se na DNA má obvykle 2-6 tandemových ZF motivů jako součást většího vazebného proteinu (Pavletich *et Pabo*, 1991). Části  $\alpha$ -helixu tvoří specifické kontakty s určitou sekvencí DNA ve velkém žlábkou dvoušroubovice (Elrod-Erickson *et al.*, 1996;). Obvykle dva sousedící ZF motivy k sobě nejsou přímo spojeny. Přirozeně se mezi motivy nachází tzv. *spacer* (místo mezi motivy) v podobě sekvence aminokyselin TGEKP (Looney *et al.*, 1989).

Pro tvorbu umělých nukleáz se hlavně využívá subtyp Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>. Tento ZFP se skládá z motivu o 30 aminokyselinách, v které je 8. a 13. aminokyselina cystein a 26. a 30. aminokyselina histidin, a ty společně váží zinečnatý iont, jak je znázorněno na Obr. 2. (Zhong *et Zhao*, 2011).

Uspořádání dvou cysteinů, dvou histidinů a Zn<sup>2+</sup> je evolučně konzervovaná struktura a Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> proteiny jsou největší skupinou transkripčních faktorů u většiny eukaryotických druhů. Mezi Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> proteiny patří například inhibitor apoptózy (*angl. inhibitor of apoptosis*, IAP) (Schwerk *et Schulze-Osthoff*, 2005) a transkripční represor CTFC (známý také jako *11-zinc finger protein nebo CCCTC-binding protein*) (Filippova *et al.*, 1996).

Obr. 2: Struktura Cys2-His2 domény zinkového prstu  
(převzato z [www.cbm.msoe.edu/scienceOlympiad/module2015/index.php](http://www.cbm.msoe.edu/scienceOlympiad/module2015/index.php))



Jakmile byla funkce a specifická proteinu zinkového prstu pochopena, vznikla myšlenka vytvoření umělého ZFP. O realizaci se pokoušelo mnoho biotechnologických společností. Každé Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> motivy rozeznávají specifický úsek nukleotidů v závislosti na složení jejich  $\alpha$ -helixu. Záměrem bylo tedy vytvořit jednoduchý aminokyselinový kód, který by mohl být použit k rozpoznání velmi specifické DNA sekvence, k tomu by měli sloužit fúzané ZF motivy, tvořící jeden komplexní vazebný protein. K vazebnému proteinu je následně připojena restriční doména, jejíž aktivita je podmíněna změnou konformace vazebného proteinu (Urnov *et al.*, 2010).

### 3.2.2 Endonukleáza *FokI*

*FokI* je restriční endonukleáza bakteriálního typu IIS objevena v bakterii *Flavobacterium okeanoikoites*, skládá se z oddělitelných částí DNA-vazebné a nukleázové. Nukleázová část se využívá v konstrukci ZFN a TALEN (Kim *et al.*, 2014).

*FokI* rozeznává nepalindromické pentadeoxyribonukleotidy 5'-GGATG-3' a 5'-CATCC-3' v dvoušroubovici DNA a stříhá vlákno 9 nukleotidů za vazebným místem na vlákne 5'-3' a 13 nukleotidů za vazebným místem na 3'-5' vlákne (9/13) (Hiroyuki *et al.*, 1981). V místě stříhu tento enzym nerozeznává žádnou specifickou sekvenci, musí tedy existovat i část, která definuje, kam má endonukleáza nasedat a kde má provést stříh. Enzym je tedy rozdělen na vazebnou doménu a katalytickou doménu. Jakmile se vazebná doména naváže na cílovou sekvenci, přenesení signálu alosterickou interakcí a dojde ke stříhu vlákna. Samotná restriční

část bez vazebné části není schopna uskutečnit stříh vlákna DNA, vždy je zapotřebí vazebné domény, která zajistí změnu konformace proteinu a tím i signál ke stříhu (Durai, 2005).

Jedna endonukleáza *FokI* je schopna uskutečnit stříh pouze jednoho ze dvou vláken DNA, pro dvouvláknový stříh (9/13) musí dojít k dimerizaci dvou nukleáz ve vazebných místech za přítomnosti  $Mg^{2+}$  iontu pro uskutečnění požadovaného dvouvláknového stříhu (Bitinaite *et al.*, 1998).

### 3.2.3 Mechanismus působení nukleázy zinkového prstu

Typ  $Cys_2His_2$  ZFP v kombinaci s restrikcí doménou endonukleázy *FokI* se typicky váže na DNA ve formě monomeru na každé vlákno. Dnes je většina ZFN designována ze základní struktury lidského transkripčního faktoru ZIF268. Byla analyzována krystalová struktura ZIF268 a popsána její tvorba vodíkových vazeb mezi (-1), +2, +3, +6 aminokyselinami v  $\alpha$ -helixu ZIF268 a cílovou DNA, viz Obr. 3 (Isalan *et al.*, 1998).

Aminokyseliny zodpovědné za tvorbu vodíkových vazeb s DNA jsou zodpovědné i za specifické rozpoznání úseku DNA. Předpokládá se, že druhá aminokyselina (+2) je schopna rozpoznat jednu bázi ve směru od 5' k 3' konci na jednom vlákně DNA, zatímco aminokyseliny v pozici (-1), +3 a +6 jsou schopny rozeznat triplet bází ve směru od 3' k 5' na druhém vlákně DNA (Dreier *et al.*, 2001). Jeden ZFP je tedy schopen obvykle rozpoznat 4 báze jednu na 5'-3' a tři na 3'-5' vlákně. Z technického hlediska je účinnější uchopit úsek tří bází ve směru 3'-5'.

Nejnovější technologie pro navrhování ZFNs umožňují vytvořit ZFN tak, aby byla endonukleáza prakticky využitelná pro úpravu genů. ZFN musí rozeznávat úsek o minimální velikosti 18 bp, je tedy potřeba minimálně 6 ZF proteinů k vytvoření vazebné části ZFN (Zhong *et Zhao*, 2011). ZFN se skládá ze dvou monomérů, kde minimální požadavek pro tvorbu monomeru je série 3 ZF proteinů a nukleázy *FokI* (Looney *et al.*, 1989).

Tvorba nukleáz zinkového prstu je velmi náročný proces, a to zejména kvůli skutečnosti, že ZFN není možné navrhnout na jakoukoliv DNA sekvenci (Pabo *et al.*, 2001). Navzdory tomu, že se inženýrství ZFN široce rozvinulo, není náhodou, že motivy zinkového prstu používané pro tvorbu chimérických proteinů se váží na G-bohatou konsenzuální sekvenci (např.: Zif268: 5'-GCG(G/T)GGGCG-3'). G-bohaté sekvence jsou přirozenou preferencí zinkových prstů a vazba na jiné druhy sekvencí je často neúspěšná ze dvou důvodů (Isalan *et al.*, 1998). Prvním důvodem je silnější interakce mezi argininovým zbytkem  $\alpha$ -helixu a guaninem ve velkém žlábků dvoušroubovice DNA (Seeman *et al.*, 1976). Druhým důvodem jsou překrývající se části sousedících ZF proteinů, kde překrytím tvoří uspořádání, které velmi stabilně interaguje s guaniny v první a třetí pozici každého ZF proteinem vázaného tripletu

(Isalan *et al.*, 2001). Tato preference znesnadňuje vazbu ZFN k sekvencím, které neobsahují dostatečné množství guaninů (Pabo *et al.*, 2001).

Byl proveden experiment zacílený na tvorbu nejúčinnější kombinace (-1), +3 a +6 aminokyselin v struktuře  $\alpha$ -helixu ZFP pro vazbu s třemi nukleotidy. Lze vytvořit ZFP schopný vázat všechny 3 báze v tripletu GNN (Segal *et al.*, 1999), složitější je design pro triplety ANN, CNN a TNN (Bae *et al.*, 2003).

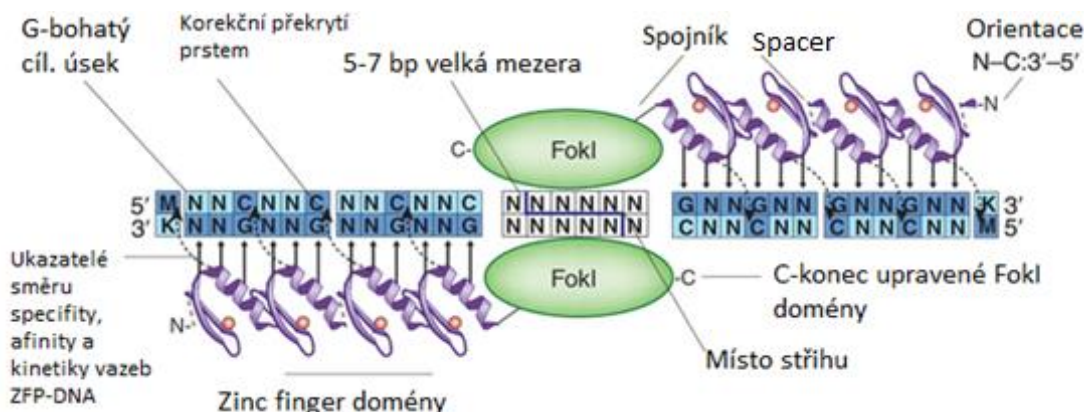
Mezi antiparalelně položenými vazebnými doménami ZFN se nachází mezera (*angl. gap*) velká 5 - 7 párů bází. Mezera se podílí na účinnosti a přesnosti střihu restričních domén. Delší mezery způsobují zvýšení pravděpodobnosti mimo cílového působení ZFN, nižší inhibují restriční funkci *FokI*. Pro určení délky mezer jsou používány spojníky složené z aminokyselin, například LRGS tvořící mezeru 5 - 6 bází (Maeder *et al.*, 2008), QNKK tvořící mezeru 6 bází (Bibikova *et al.*, 2001) a TGQKD tvořící mezeru 7 bází. Tyto spojníky propojují koncový histidin ZFP a QLV počátek restriční domény *FokI* (Isalan, 2011).

Nejjednodušší sekvence, kterou je možné ZFN uchopit, je 5'-MNNCNNCNCNCNCX<sub>5-7</sub>GNNGNNGNNGNKK-3' (kde M = A/C; N = ZFP kontaktní báze, nejlépe G; X = ZFP nekontaktní báze a K = G/T). Vazba ZFN na tuto sekvenci je detailněji popsána na Obr. 3 (Pabo *et al.*, 2001).

Dalo by se předpokládat, že čím více ZF motivů bude tvořit vazebnou doménu, tím větší bude vazebná schopnost domény a tím i specifita. Po řadě experimentů se však ukázalo, že nejvyšší vazebnou schopnost si zachovává doména pouze se třemi až čtyřmi ZF motivy. ZFN funguje jako dimer, složený ze dvou monomerů, kde jeden monomér je složen z *FokI* a série ZF proteinů. Vazebné domény jsou zodpovědné za rozpoznání a vazbu na DNA, zatímco *FokI* restriční doména střihá vlákno DNA a tvoří DSB ve chvíli, kdy oba monomery nasednou antiparalelně na dané sekvence DNA a vytvoří dimer, jako je zobrazeno na Obr. 3.

Uměle vytvořená ZFN má obvykle delší rozeznávající doménu než přirozeně se vyskytující *FokI*, délka *spacerů* mezi jednotlivými ZF proteiny má vliv na aktivitu nukleázy. Při navrhování ZFN je tedy nutné zahrnout i tento faktor (Fairall *et al.*, 1993).

Obr. 3: Struktura nukleázy zinkového prstu při vazbě na specifické místo DNA (převzato a upraveno podle Isalan, 2011)



M = A, C; N = ZFP kontaktní báze, nejlépe G; X = ZFP nekontaktní báze a K = G, T. Obrázek ukazuje schéma dimeru ZFN, každý monomer se skládá ze čtyř zinc finger motivů vázajících DNA. Cílová sekvence pro vazbu ZFP je zvýrazněna modře (tmavě modře hlavní kontaktní DNA báze). Podmínky pro stříh touto ZFN je přítomnost unikátní cílové sekvence DNA v genomu, absence podobných sekvencí a přístupný chromatin.

Experimenty ukázaly, že pokud byl *spacer* mezi vazebnými ZF proteiny 4 bp, tak byla enzymatická aktivita *FokI* téměř zcela potlačena. Prodloužením *spaceru* mezi vazebnými elementy na 8 bp či 16 bp bylo dosaženo zásadního zvýšení enzymatické aktivity *FokI* podjednotky (Bibikova *et al.*, 2001).

### 3.2.4. Metody tvorby ZFN

Pro tvorbu umělých ZFN s unikátní DNA vazebnou specificitou byly vyvinuty různé metody, které využívají DNA knihovny kódující ZFN proteinové jednotky specifické až pro 64 možných tripletů bází (Perez-Pinera *et al.*, 2012). Pochopení účelu *spaceru* mezi ZF motivy umožnilo přímé propojování a kombinování jednotlivých motivů, které jsou specifické pro dané trojice bází a sestavit tak vazebnou ZFP podjednotku nukleázy schopnou vázat specifickou sekvenci DNA (Maeder *et al.*, 2008).

Významnou metodou je OPEN (*angl. Oligomerized Pool Engineering*), která je založena na kombinatorické selekci různých ZF proteinů k vytvoření účinného vazebné podjednotky. K produkci ZFN vazebné podjednotky tento přístup využívá DNA pooly, kódující ZF proteiny, které rozeznávají daný DNA triplet. Produkty poolů jsou umístěny na jedné ze tří pozic N-koncové, centální a C-koncové místo vazebného proteinu. Pools jsou různě kombinovány a vznikají stovky až tisíce unikátních kombinací jejich produktů pro určený DNA úsek. Na základě testování jsou vybrány proteiny s nejlepšími vlastnostmi, přednostně



se hodnotí DNA vazebná afinita a specifita (Greisman *et Pabo*, 1997), vysoká aktivita a nízká cytotoxicita (Cornu *et al.*, 2008; Maeder *et al.*, 2008).

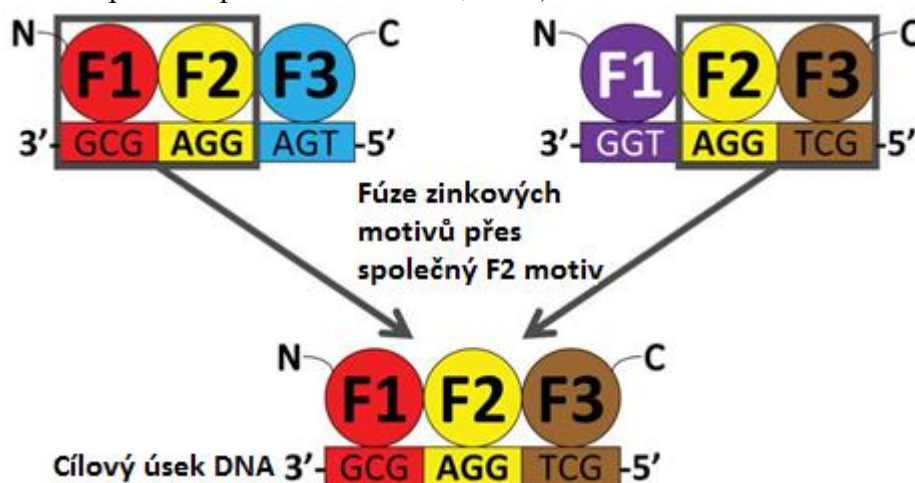
Metoda OPEN je veřejně přístupná platforma pro designování vazebných domén ZFN. Vytvořila ji skupina Zinc Finger Consortium. Platforma je dostupná přes webové stránky a nabízí z její knihovny širokou paletu jednotlivých ZF proteinů ([zifit.partners.org](http://zifit.partners.org)). Nevýhodou tohoto přístupu je jeho časová náročnost pro ověření účinnosti jednotlivých ZF proteinů a následně i celé vazebné domény, kterou tvoří.

Další metodou je „context-dependent assembly“ (CoDA), přístupem metody je spojení tří DNA fragmentů kódující ZF proteiny. Cílem je vytvořit kompletní ZFN vazebnou doménu za použití tří ZF proteinů, které budou tvořit N – koncovou, centrální a C – koncovou část vazebné domény. Tyto proteiny jsou specifické k daným tripletům DNA. Následně se spojují do trojice, aby vytvořily funkci ZFN vazebnou doménu. Kombinace nejúčinnějších N-koncových a C-koncových motivů je vybrána na základě účinného fungování s centrálním motivem, jak je zobrazeno na Obr. 4.

CoDA využívá velkého archivu N - koncových a C - koncových ZF proteinů, které musí být vhodně umístěny k příslušnému centrálnímu motivu, aby fungovaly správně (Sander *et al.*, 2010). Metoda CoDA nepracuje s ZF proteiny jako samostatnými moduly, ale místo toho zahrnuje i efekty závislé na interakci mezi sousedícími proteiny, tím zvyšuje pravděpodobnost, že výsledný vazebný protein bude fungovat správně (Isalan *et al.*, 1997 a 1998). CoDA je rychlá, nevyžaduje speciální expertízy a ZFN může být sestavena během jednoho či dvou týdnů.

Obr. 4: Schématické zobrazení tvorby ZFP metodou CoDA

(převzato a upraveno podle Sander *et al.*, 2010)



ZF proteiny jsou vyobrazeny jako barevné kuličky (F1 = N-koncový protein, F2 = centrální protein, F3 = C-koncový protein) a tři triplety DNA bází, které jsou zobrazeny jako barevné obdélníky. Schéma popisuje dvě ZFN vazebné domény, které jsou složeny ze tří ZF proteinů, každá váže různé úseky velikosti 9 bází. Odlišně specifické ZFN vazebné domény byly vytvořeny připojením různých F1 a F3 motivů k F2. Jako výsledná vazebná doména byl označen protein skládající se z konstatní F2 podjednotky a kombinace F1 a F3 podjednotek, které se váží specificky na cílové místo DNA a vhodně interagují s podjednotkou F2.

Vývoj ZFN otevřel nové možnosti úpravy genů s přímým využitím v genové terapii. Zvyšující se účinnost tvorby DSBs v cílové sekvenci DNA a následné úpravy poskytují širokou paletu možností, jak geny upravovat, zahrnujících jak vypnutí, tak vkládání genů. Vložení může být využito k opravě abnormálních či mutovaných genů začleněním externích “kousků genů“ a to za pomoci HDR opravy, která vyžaduje přítomnost vzoru pro opravu, je velmi přesná, ale méně častá v porovnání s NHEJ (Orlando *et al.*, 2010).

### 3.2.4 Tvorba resistance vůči HIV pomocí ZFN

V roce 2014 byly provedeny klinické testy účinnosti nukleázy zinkového prstu k úpravě CD4 T-lymfocytů a jejich resistenci vůči viru HIV. Výzkum byl zacílen na tvorbu rezistence, a to inaktivací genu kódujícího lidský chemokinový koreceptor 5 (*angl. chemokine co-receptor 5*, CCR5) pomocí cíleného vypnutí tohoto genu (Tebas *et al.*, 2014).

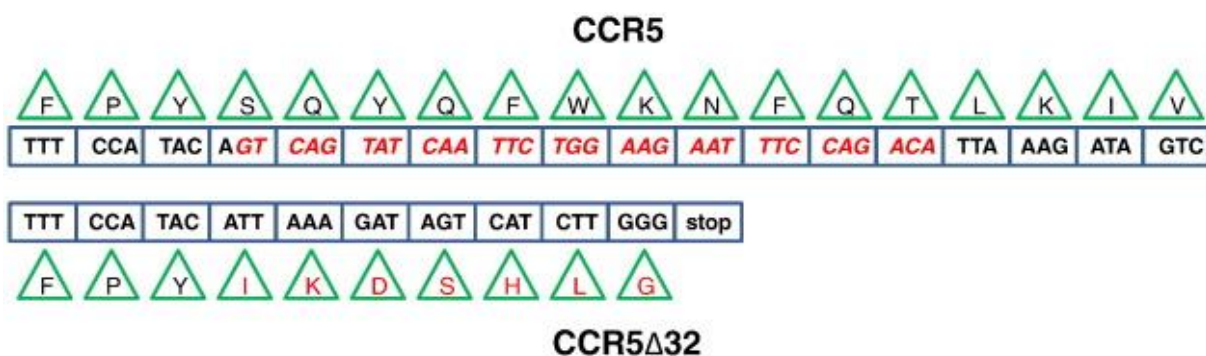
CCR5 je hlavním koreceptorem podílejícím se na rozpoznání a následném pohlcení viru imunitní deficiencie člověka (HIV) lymfocytární buňkou (Alkhatib *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996). Vědci se pokoušeli zjistit, zdali specificky řízená modifikace lymfocytárních buněk pacienta vypnutím určitého genu a jejich následným navrácením do těla může ovlivnit průběh onemocnění.

Metoda spočívala v podání jedné dávky ZFN-modifikovaných autologních CD4 T- buněk 12ti pacientům. Pacienti měli chronickou aviremickou HIV infekci a v té době byli léčeni vysoce aktivní antiretrovirální terapií (*angl. highly active antiretroviral therapy, HAART*). Pozorování výsledků bylo zaměřeno primárně na bezpečnost léčebné metody, sekundárně pak na pozorování imunitní reakce a případné HIV resistance (Tebas *et al.*, 2014).

Pro tento experiment byl využit pár ZF nukleáz, kde se každá ZFN skládala ze 4 ZF proteinů, které specificky tvořily vazbu s částí genu *CCR5*. V preklinických testech se modifikované CD4 T-lymfocyty množily normálně po ošetření mitogeny a byly resistantní k viru HIV. Následně byla pozorovaná i redukce virální RNA v humanizovaném myším modelu infekce HIV (Perez *et al.*, 2008).

*CCR5* koreceptor byl vybrán z tohoto důvodu, že je postradatelný pro buňku, na rozdíl od CD4 receptoru. Dále pak experimenty naznačují, že porušení tohoto genu zvyšuje pravděpodobnost přežití buňky v organismu infikovaném virem HIV. Homozygoti pro 32bp delecí ( $\Delta 32/\Delta 32$ ) v *CCR5* jsou resistantní vůči infekci virem HIV (Liu *et al.*, 1996). CD4 T-lymfocyty těchto lidí jsou v *in vitro* podmínkách vysoce resistantní vůči kmenům HIV, které se dominantně vyskytují v populaci (Samson *et al.*, 1996). U nakažených jedinců, kteří jsou heterozygoti pro *CCR5*  $\Delta 32$ , je průběh infekce oproti homozygotům bez delecí zpomalený (Eugen-Olsen *et al.*, 1997; Cohen *et al.*, 1997).

Obr. 5: Rozdíl mezi přirozeným *CCR5* a *CCR5* $\Delta 32$  (převzato z Barmania *et al.*, 2013)



Lze pozorovat delecí 32 bp u  $\Delta 32CCR5$  genu (dole), což způsobuje značné zkrácení produktu genu, jak je patrné ze sekvence aminokyselin (zelené trojúhelníky). Zkrácení má zásadní dopad na vlastnosti proteinu, vzniká nefunkční protein, virus se tedy nemůže vázat na daný koreceptor.

Po provedení klinických testů byla z celkového počtu 12 pacientů pouze u 4 léčba hodnocena jako účinná. Tito 4 pacienti dokončili 12ti týdenní pozorování po infúzi upravených buněk, aniž by u nich byl pozorován nárůst virové RNA nad limit 100 000 kopií/mm<sup>2</sup>. Zbýlých 8 pacientů přerušilo léčbu modifikovanými buňkami (po překročení limitu 100 000 kopií virové

RNA/mm<sup>2</sup>) a vrátilo se zpět k HAART. Nakonec pouze u jednoho pacienta ze čtyř pacientů s příznivou odpovědí na léčbu došlo k zásadnímu snížení počtu virových částic, tento pokles přetrval 6 týdnů od podání infúze, následně se počet stále mírně snižoval. Tento pacient přirozeně nesl heterozygotní mutaci delta32 v *CCR5*.

Medián CD4 T-lymfocytů v krvi pacientů byl 1517 buněk/mm<sup>2</sup> v prvním týdnu po ošetření, to byl značný nárůst v porovnání se 448 buňkami/mm<sup>2</sup> před ošetřením. Modifikované buňky měly průměrnou životnost 48 týdnů s rychlostí smrti 1,81 buňka/den, to bylo významně méně než u nemodifikovaných buněk (7,25 buňka/den). Hladina RNA viru HIV v krvi se snížila u většiny pacientů, u jednoho ze čtyř pacientů s nejpříznivější reakcí až pod detekovatelnou hranici.

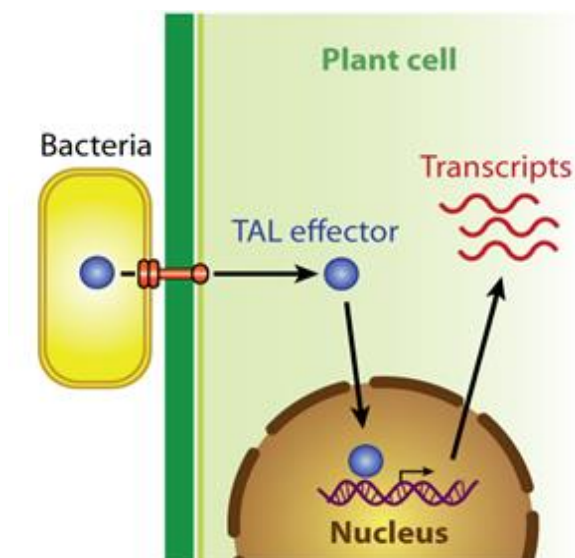
Na základě této studie lze říci, že metoda infúze *CCR5*-modifikovaných autologních CD4 T-lymfocytů je proveditelná a v rámci určitých omezení i bezpečná (Tebas *et al.*, 2014).

### 3.3 Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)

TALEN systém je velmi podobný systému ZFN, taktéž se skládá z nescifické nukleázové domény a “programovatelné“ DNA-vazebné domény. Vazebná doména je složena z vysoce konzervovaných repetitivních odvozených od transkripčního aktivátoru podobnému efektoru (*angl. transcription activator-like effector, TALE*). TALEs byly původně objeveny v rostlinném patogenu *Xanthomonas sp.* jako součást bakteriální invaze infekce rostlinné buňky (Bonas *et al.*, 1989). Tyto efekторы jsou injektovány do rostlinné buňky přes sekreční systém bakteriální buňky. Následně putují do jádra rostlinné buňky, kde se vážou na cílové genové promotory, aby aktivovaly transkripci genů podporujících kolonizaci eukaryotické buňky bakterií (Kay *et al.*, 2007; Romer *et al.*, 2007)

Obr. 6: Mechanismus působení přirozených TALE z bakterií *Xanthomonas sp.*

(převzato a upraveno z Boch *et al.*, 2010)



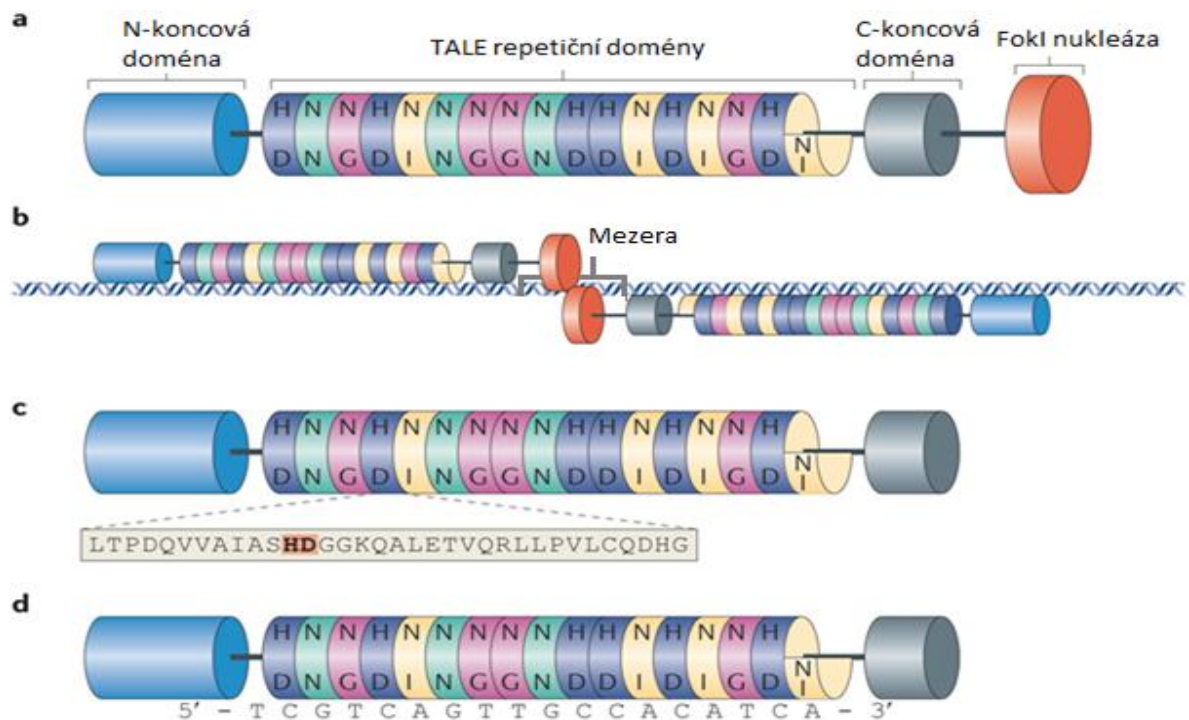
*Xanthomonas* (Bakteria) vnáší dávku efektorových proteinů přes sekreční systém typu III (červeně) do rostlinné buňky (Plant cell). Efektory podobné aktivátorům transkripce (TAL effector) přechází do jádra rostlinné buňky (Nucleus), kde indukují transkripci cílových genů (Transcripts).

#### 3.3.1 Struktura TALEN

TALE se skládá ze speciálních efektorových proteinů, jejichž N-konec a C-konec plní funkci aktivace centrální domény pro tvorbu specifické vazby DNA-protein (Boch *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010). Centrální doména je složena z variabilního počtu tandemových monomerních repetitivních sekvencí vyskytujících se v počtu od 5 do 30 (obvykle však 17,5). Každá repetice obsahuje 34 aminokyselin, které specificky rozpoznávají jeden cílový nukleotid (Boch *et al.*, 2010). Stálá aminokyselinová sekvence repetitivních sekvencí nazývaná se “repetitivní variabilní diresiduum“ (*angl. repeat variable diresidues – RVDs*) se nachází v pozici 12. a 13.

aminokyseliny. Jeho funkcí je určovat specifitu vazby každé TALE repetice ke konkrétnímu nukleotidu (Boch *et Bonas*, 2010; Miller *et al.*, 2010). Obvykle oblast tandemových repetic u C-konce proteinu končí zkrácenou repeticí, která se obecně nazývá poloviční repetice (*angl. half repeat*). Tato poloviční repetice obsahuje prvních 20 residuí včetně RVD (Boch *et Bonas*, 2010; Miller *et al.*, 2010).

Obr. 7: Schéma TALEN s vyznačenými RVDs (převzato a upraveno z Joung *et Sander*, 2012)



- Schéma TALEN. TALE repetice jsou vyznačeny jako vybarvené disky s koncovou poloviční repeticí na C-konci. Písmena v každé repetici reprezentují dvě hypervariabilní residua (RVDs). TALE repetice a C-koncová doména (šedě) jsou potřebné pro vazbu na DNA. Nspecifická nukleázová doména *FokI* je znázorněna červeně.
- TALEN se váže a stříhá vlákno DNA jako dimer. N-koncová doména a C-koncová doména ohraničují centrální repetice a také mohou interagovat s DNA. Střih *FokI* nukleázy probíhá v mezeře, což je sekvence, která leží mezi dvěma vazebnými doménami proti sobě umístěných TALEN monomerů.
- Schématické vyobrazení DNA vazebné domény. Aminokyselinová sekvence jedné TALE repetice nese dvě hypervariabilní residua. (zvýrazněny oranžově ve spodním textu)
- TALE - DNA vazebná doména nasazená na její cílovou DNA sekvenci. Repetice tvoří vazby se samostatnými bázemi v cílové sekvenci podle její TALE aminokyselinového kódu. Přítomnost 5'- tyminu předcházejícího první vázanou bázi TALE repeticí.

Přirozeně vyskytující se TALEs byly určeny k manipulaci DNA rostlin, výzkum tohoto mechanismu vedl k rozluštění kódu, který tento systém využívá k vytvoření specifické vazby mezi aminokyselinou a vláknem DNA (Kay *et al.*, 2007; Romer *et al.*, 2007). Specifická vazba je určena interakcí RVDs s bázemi (A, C, G, T). RVD páry aminokyselin jako NI (Asn, Ile) rozeznávají adenin, HD (His, Asp) cytozin, NN (Asn, Asn)/NK (Asn,Lys) guanin a NG (Asn,Gly) tvoří vazbu s thyminem (Boch *et al.*, 2009; Moscou *et Bogdanove*, 2009). Některé interakce aminokyselinových zbytků s bázemi jsou zobrazeny na Obr. 8.

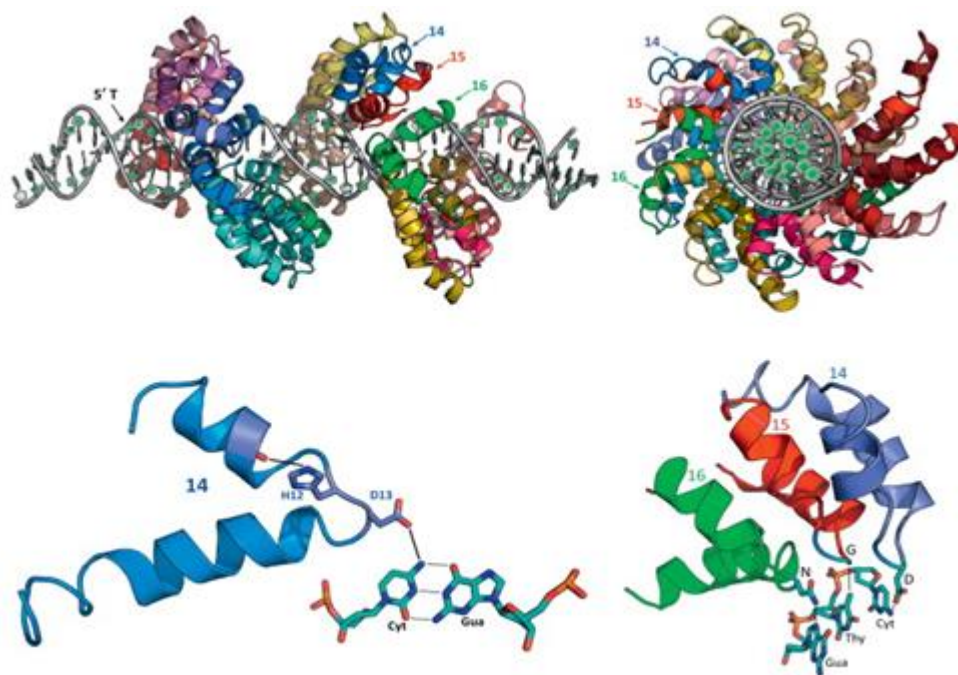
Další běžnou vlastností TALE je rozpoznání báze thyminu na 5' konci jeho cílové sekvence (Bogdanove *et Voytas*, 2011). Mechanismus, který TALE používá k rozpoznání cílové sekvence, byl využit k vývoji na TALE založeném editačním nástroji umožňujícím úpravu konkrétního úseku v genomu eukaryotické buňky. Nástroj vznikl fúzí s restriční doménou endonukleázy *FokI* a uměle vytvořeným TALE, výsledkem byla specificky řízená a programovatelná nukleáza - TALEN (Cermak *et al.*, 2011; Wood *et al.*, 2011).

TALEN je rozdělen do čtyř hlavních částí: N-koncové domény, centrální domény obsahující RVDs, C-koncové domény a efektorové domény *FokI*. N-koncové domény zahrnují jaderný lokalizační signál. Centrální doména se typicky skládá z tandemových TALE aminokyselinových repetitiv pro rozpoznání konkrétní DNA sekvence (obvykle dlouhé 14-20 bp) a C-koncová doména je umístěna za poslední poloviční repetitiv s *FokI* endonukleázou, která provádí stříh. TALEN funguje pro DSB pouze v dimerickém uspořádání, z toho vyplývá, že je potřeba dvou TALEN monomerů (stejně jako ZFN).

Pár navržených TALENs se váže na jeho cílovou DNA sekvenci, monomery vazebných domén mezi sebou vytvářejí mezeru (obvyklé délky 14-18 bp), což je místo pro dimer nukleázy *FokI* potřebný pro uskutečnění dvouvláknového stříhu. DSBs jsou pak opravovány dvěma způsoby, jak již bylo zmíněno výše, a to NHEJ nebo HDR opravnou dráhou. NHEJ většinou vede k delecím či inzercím (indel), které jsou esenciální pro modifikaci genomu v cílové oblasti. Pokud se indel nachází v kódující oblasti, způsobí posun čtecího rámce a následně může mít při translaci zásadní dopad na tvorbu či funkci proteinu. Alternativně může docházet k homologně řízené opravě, a to v případě, že je přítomen homologní templát (Bedell *et al.*, 2012).



Obr. 8: Struktura vazebné domény TALEN vázané k dvoušroubovici DNA a princip vazeb mezi aminokyselinami a jednotlivými bázemi (převzato z Doyle *et al.*, 2013)



Nahoře je zobrazena vazba mezi TALEN vazebnou doménou a DNA cílovým místem. Nahoře, vlevo je znázorněna vazba TALEN-DNA z boku DNA. Vpravo, nahoře je zobrazena vazba z pohledu střední osy DNA dvoušroubovice. TALEN vazebná doména obsahuje 22,5 repetice (každá je zbarvena odlišně). Při pohledu z boku v horní části obrázku je N-konec proteinu na levé straně. N-konec obsahuje zvláštní repetice, které se podílejí na tvorbě vazby s DNA přes sérii AMK zbytků, jsou zacíleny hlavně na vysoce konzervativní 5' Tymin v pozici 0 vazebného místa. Označené repetice (14, 15 a 16) jsou detailně zobrazeny ve spodní části obrázku. Vlevo dole jsou ukázány interakce vytvořené mezi HD RVDs (residua 12 a 13; H12, D13) v repetici 14. Histidin v pozici 12 tvoří vodíkový můstek s kyslíkem karbonylu AMK zbytku v pozici 8 na prvním  $\alpha$ -helixu, zatímco aspartát v pozici 13 tvoří vodíkový můstek s dusíkem aminoskupiny cytozinu, báze ve dvoušroubovici DNA. Vpravo dole jsou zobrazeny repetice 14, 15 a 16 interagující s DNA. Po sobě následující RVDs- HD, NG a NN interagují se sérií bází (v tomto případě cytozin, Cyt; tymin, Thy a guanin, Gua) na stejném vlákně DNA jako repetice 14.

Aplikace systému TALEN nabízí jednodušší vložení exogenní sekvence do některých endogenních genů. Tím se otevírají možnosti *in vivo* značení genů fluorescenčními značkami, což umožňuje vizualizaci exprese daného genu. Dále lze produkovat buňky nebo tkáň s vypnutými konkrétními geny (Carlson *et al.*, 2012). Genetické manipulace pomocí TALEN, jako je velké genomové přeuspořádání ve formě delecí, inverzí a reverzí, jsou snadno dosažitelné a mohou hrát důležitou roli při studiu nekódujících genů, protože posun čtecího rámce zapříčiněn malou delecí či inzercí, nemusí být dostatečně rozsáhlý k inaktivaci funkce těchto genů (Nyquist *et al.*, 2013).



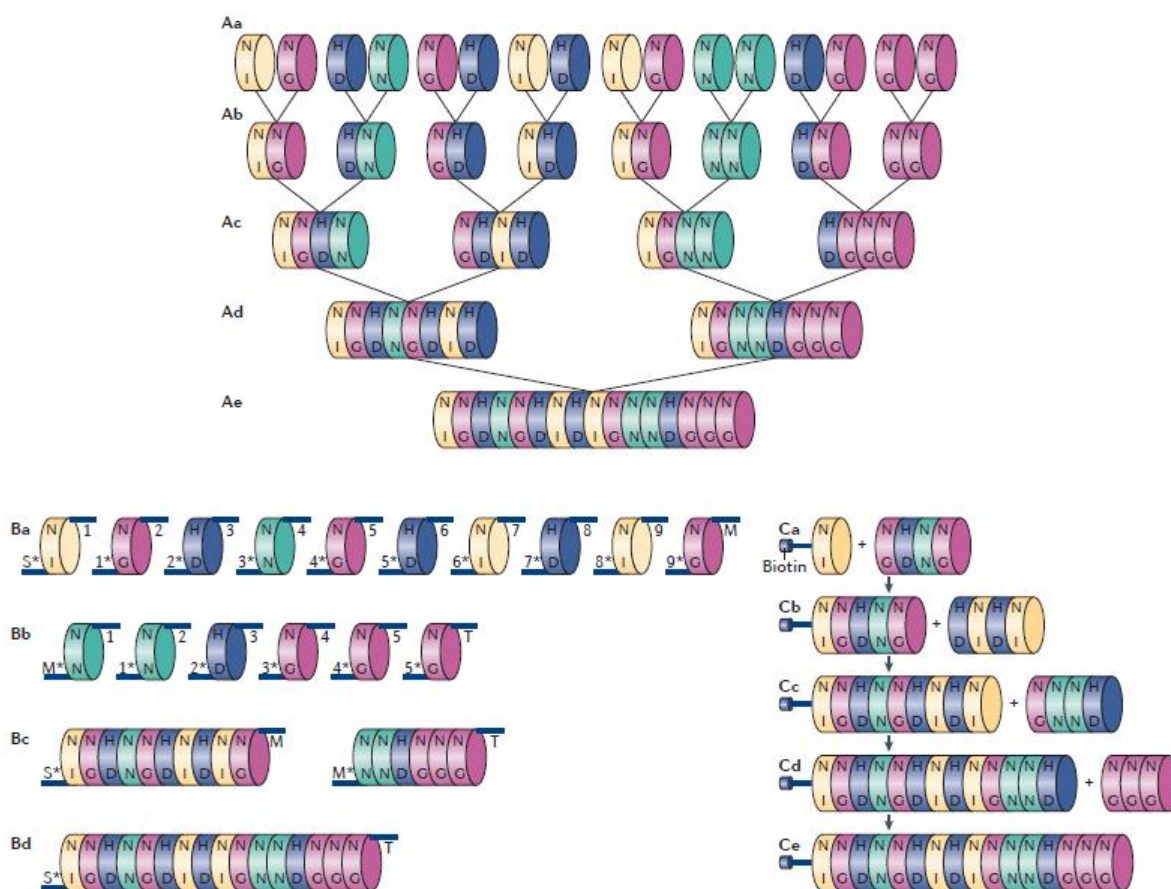
### 3.3.2 Metody tvorby TALEN

Konstrukce funkčního páru TALEN je složitý proces kvůli požadavkům, které musí nukleáza splňovat pro úspěšné nasednutí na sekvenci DNA. Za účelem tvorby účinných TALENs byly vyvinuty metody a postupy, kde je většina z nich založena na klonovacím principu.

Standartní metoda (*angl. standard cloning-based method*) je původní metoda konstruující vazebnou část TALEN z TALE repetice. Tato metoda využívá archiv plazmidů kódujících jednu nebo více TALE repetičních domén. Spojováním jejich kódujících sekvencí pomocí restričních endonukleáz a následnou ligací jsou následně řazeny do paralelní sekvence. Primární výhodou tohoto přístupu je, že využívá metod a postupů běžně používaných v mnoha laboratořích. Proces tvorby TALE repetiční domény obvykle trvá jeden až dva týdny a bohužel tuto metodu nelze použít k tvorbě většího počtu TALENs (Joung *et Sander*, 2012)

Další významnou klonovací metodou je Golden Gate metoda, která využívá multi-fragment ligační strategie. (Engler *et al.*, 2009). Jak je znázorněno na Obr. 9. Metoda Golden Gate je založena na spojování 5'-přesahů (tvořených po střihu restričním enzymem typu IIS) na obou koncích každého fragmentu DNA. Použití 5'-koncových přesahů zaručuje ligaci různých fragmentů do vektoru v určeném pořadí. Horní limit repetice na jednom fragmentu, který může být účinně ligován k jinému tímto způsobem, je 10 TALE repetice. Golden Gate metoda obvykle vyžaduje konstrukci meziproductových plazmidů kódujících pouze části opakujících TALE repetiční domény, které se následně spojují a tvoří finální požadovanou TALE repetiční doménu. Metoda umožňuje konstrukci TALE repetiční domény během méně než dvou týdnů, ale stejně jako u předešlé metody není možné efektivně konstruovat tímto způsobem velké množství různých TALENs (Joung *et Sander*, 2012).

Obr. 9: Přístupy tvorby DNA kódujících TALE repetice (převzato z Joung *et Sander*, 2012)



Obrázek zobrazuje metody tvorby DNA kódujících repetiční TALE domény. **(Aa-Ae)** Standardní na klonování založené metodě (angl. Standard cloning-based method) využívá běžně používané restriční enzymy pro stříh a následnou ligaci. Fragменты kódující jednotlivé TALE repetice jsou spojovány dohromady sériovým hierarchickým způsobem. **(Ba-Bd)** Golden Gate klonovací metody jsou schopny spojování fragментů s mnoha TALE repeticemi (maximálně 10) v jediné reakci, použitím 5' přesahů daných fragментů k navedení a spojení fragментů ve správném pořadí. V příkladě na Obr. 9Bb jsou znázorněny fragменты kódující 10 a 6 TALE repetice, kde jsou tyto mnohačlenné fragменты spojeny a následně vytvářejí úsek DNA, který kóduje 16 TALE repetice (Bd). **(Ca-Ce)** SAM nebo FLASH využívá opakující se ligace uskutečněné na streptavidinem potaženém povrchu pevné fáze, což umožňuje rychlé spojování dlouhých fragментů DNA kódujících mnohačetné reptice.

Třetím postupem pro tvorbu TALENs je tvorba na tuhém nosiči (*angl. Solid-phase assembly method, SAM*), jedná se o automatizovanou metodu s vysokým výstupem vytvořené DNA kódující TALE repetice na tuhém nosiči, jak je vyobrazeno na Obr. 9. Tento typ konstrukce je vhodný pro produkci TALENs ve velkém počtu, protože nevyžaduje tvorbu meziproductových plazmidů. S metodou FLASH (*angl. Fast Ligation-based Automatable Solid-phase High-throughput*) odvozenou od SAM je možné provést nespočet ligací fragментů DNA kódujících jednu nebo více TALE repetice a tím vytvořit konečnou DNA kódující úplnou

TALE repetiční doménu, která může být odejmuta z pevného nosiče a zaklonována přímo do expresního vektoru. Cílem FLASH metody je vytvořit plazmid kódující jednu, dvě, tři či čtyři TALE repetiční domény. FLASH je možné provádět manuálně pomocí multikanálové pipety a vytvořit tak tucty DNA fragmentů kódujících TALE repetiční domény během jednoho dne. Nebo lze FLASH automatizovat, což umožňuje vytvořit až 96 DNA fragmentů kódujících rozdílné TALE repetiční domény během jednoho dne (Reyon *et al.*, 2012).

Aktuálně je možné si TALE proteiny navrhnout prostřednictvím online softwaru - TAL Effector-Nucleotide Targeter ([tale-nt.cac.cornell.edu/](http://tale-nt.cac.cornell.edu/)) a vytvořit si TALEN *de novo* podle příslušných protokolů (Cermak *et al.*, 2011). Další možností je objednání zkonstruovaného plazmidu nesoucího kompletní informaci ke konstrukci TALEN vážící se na požadovanou sekvenci DNA například od firem *Collectis Biosearch* či *Life Technologies* (DeFrancesco, 2011).

TALEN může být například použita pro tvorbu lidského modelu onemocnění v indukovaných pluripotentních kmenových buňkách. Nedávno vědci vytvořili mutace v 15 genech a detailně zkoumali fenotypovou analýzou 4 z nich, a to geny *APOB* (gen pro apolipoprotein B), *SORT1* (gen pro sortilin 1), *AKT2* (gen pro ser/thr kinázu) a *PLIN1* (gen pro perilipin1), jejichž role v tvorbě kardiovaskulárních rakovinných onemocnění a virových infekcí byla nedávno odkryta (Ding *et al.*, 2013).

### 3.3.3 Využití TALEN systému

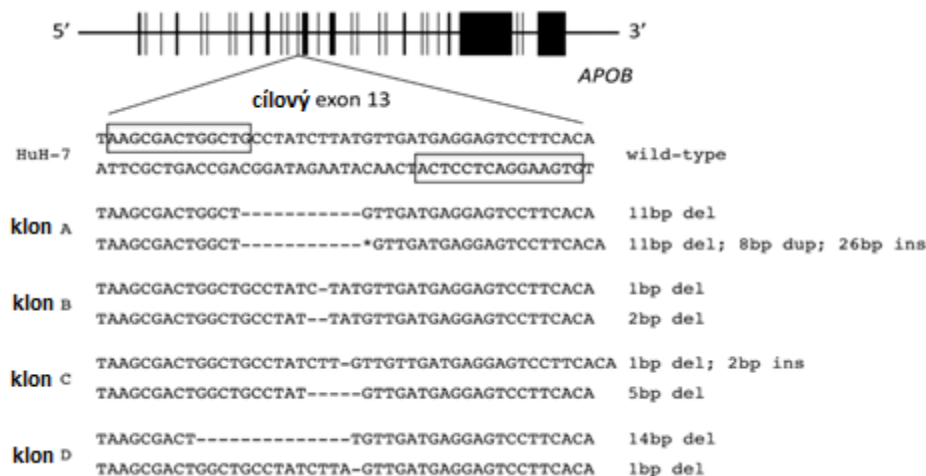
Ding a kolegové použili páry TALE nukleáz na 16 různých míst v 15 genech v linii lidských somatických buněk, linii lidských embryonálních kmenových buněk (hESC) a liniích indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC). Zásahy do genů zahrnovaly různé *knock-out* mutace a také *knock-in nonsense* mutace a funkční mutace, které posunují čtecí rámeček. Efektivnost mutací se lišila podle lokalizace cílového místa v genomu buňky a podle typu buňky. Indely vzniklé nepřesnou opravou NHEJ po použití nukleázy měli účinnost od 2 % do 34 %, knock-in vzniklý při HDR opravě měl frekvenci výskytu 1,6 %. Následně byla udělána fenotypizační analýza buněk nesoucích mutace ve čtyřech genech, které jsou spojeny s různými onemocněními člověka – *APOB*, *SORT1*, *AKT2* a *PLIN1*.

### 3.3.3.1 Gen *APOB* hraje roli v replikačním cyklu HCV

Gen *APOB* kóduje apolipoprotein B velký 512 kDa (apoB-100), který je součástí struktury VLD-lipoproteinu (*angl. very low density lipoprotein*) a LDL-lipoproteinu (*angl. low density lipoprotein*). Lipoproteiny jsou molekuly transportující cholesterol a triacylglyceroly z jater do tkání přes krevní řečiště. Protein APOB se podílí na replikaci viru hepatitidy C (HCV). Bylo zjištěno, že apolipoproteiny všeobecně hrají kritickou roli při infekci virem hepatitidy C. V modelech HCV využívajících hepatomálních buněk (HuH-7) se metodou RNA interference (iRNA) dokázalo, že částečným umlčením exprese genu *APOB* se redukuje sekrece HCV, ale nikoliv replikace viru (Huang *et al.*, 2007). Nicméně další poznatky naznačují, že apolipoprotein E, a ne apolipoprotein B, je potřebný pro produkci nových HCV částic (Jiang *et Luo*, 2009). Důležitost *APOB* a přesné body interakce s životním cyklem HCV bylo nutné objasnit, proto byl proveden experiment cílený na knock-out *APOB* genu v HuH-7 buňkách (Ding *et al.*, 2013).

Byl navržen pár TALEN, který cílil na část 13. exonu tohoto genu a způsoboval mutaci posunující čtecí rámec, což mělo za následek produkci zkráceného proteinu zhruba o 12,5 % z celkové velikosti. Klonální linie HuH-7 buněk se zvýšenou expresí CD81 (koreceptor pro vstup HCV do buňky; HuH-7/CD81<sup>high</sup>) byly transfekovány vektorem nesoucí TALEN pár navrženým na zmíněný *APOB* gen. Vektor nesoucí TALEN byl značený fluorescenčním markrem, což umožňovalo selekci pomocí FACS (*angl. fluoresce-activated cell sorting*) a následnou kultivaci jednotlivých buněk. Zjistilo se, že ze 126 sledovaných klonů byly přítomny inzerce nebo delece pouze u 9 z nich (u 4 byla přítomna mutace posunující čtecí rámec exonu 13 v obou alelách). Na rozdíl od wild-type (WT) kontrol stejné buněčné linie v *APOB* knock-outovaných buňkách nebyl detekován apoB-100 protein, ale také ani vně buněk v mediu nebyl nalezen (Ding *et al.*, 2013).

Obr. 10: Zobrazení modifikovaného úseku na exonu 13 genu *APOB* a výsledné mutace po zásahu TALEN (převzato a upraveno z Ding *et al.*, 2013)



Vytvořené *APOB* knock-out HUH-7 klony. Ohraničené sekvence znázorňují TALEN vazebná místa. Delece (del), inserce (ins) a duplikace (dup) ve dvou alelách každého klonu. Klony A-D nesou různé mutace na obou alelách.

*APOB*  $-/-$  a WT buňky byly infikovány virem HCV (kmen JFH-1). *APOB*  $-/-$  buňky měly zásadně sníženou hladinu intracelulární HCV RNA (až o 74%) s minimálním detekovatelným množstvím stavebních proteinů viru. Reintrodukce apoB-100 proteinu přidáním LDL do media *APOB*  $-/-$  buněk umožnila přijmutí LDL, což vedlo k částečnému obnovení hladin HCV stavebního proteinu v buňce. To je důkaz, že defekt replikace HCV byl zapříčiněn ztrátou funkce *APOB* genu, a ne mimo cílovým působením TALEN páru. Výsledky taky dokazují, že se apoB-100 podílí na životním cyklu HCV, a že léky cílené na *APOB* (např. Mipomersen, cholesterol redukující lék, antisense terapeutikum cílící na mRNA genu *APOB* (Merki *et al.*, 2008; El Harchaoui *et al.*, 2008; Athyros *et al.*, 2008) mohou být velmi účinné v léčbě HCV infikovaných pacientů (Ding *et al.*, 2013).

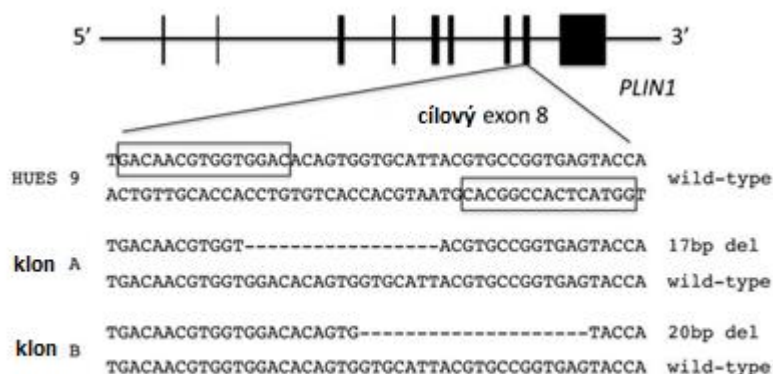
### 3.3.3.2 Posun čtecího rámce v genu *PLINI* dominantně mění lipolýzu v adipocytech

Gen *PLINI* kóduje protein perilipin - velmi abundantní protein obalující lipidové kapky v adipocytech. Je důležitý pro formaci kapek a jejich maturaci, dále zajišťuje uskladnění triacylglycerolů a uvolnění volných mastných kyselin z intracelulárních lipidových kapek (Brasaemle *et al.*, 2009). Mutace posunující čtecí rámec genu *PLINI* byla nedávno identifikována v pacientech s autosomálně podmíněným subtypem částečné lipodystrofie (Gandotra *et al.*, 2011). Mutace posunující čtecí rámec nalezená u pacientů vede k C-terminální elongaci perilipinu se značnou změnou aminokyselinové sekvence. Myši postrádající Plin1 vykazovaly zvýšenou hladinu bazální lipolýzy v adipocytech (Zhai *et al.*, 2010), což bylo

považováno za mechanismus, který u pacientů nesoucí posunovou mutaci způsoboval lipodystrofií. Studie mechanismu těchto mutací způsobujících onemocnění byly omezeny na overexpresi mutantní a wild-type cDNA (komplementární DNA) z myši adipocytů 3T3-L1. Závěrem těchto studií byl fakt, že wild-type a ne mutant *PLIN1* je schopen inhibovat basální lipolýzu (Gandotra *et al.*, 2011).

Byla navržena TALEN pro specifickou sekvenci DNA pacienta - mutace (Val398fs) na kódujícím exonu 8 *PLIN1*. Po prvním použití TALENs zacílených na daný usek v buňkách HUES9 bylo identifikováno 70 mutantních klonů z 293 kontrolovaných klonů. Byly charakterizovány dva mutantní typy. Jeden nesl mutaci posunující čtecí rámec, která prodlužovala perilipin do délky 558 aminokyselin (vytvořený *PLIN1*<sup>558</sup>, wild-type má pouze 522 aminokyselin), tento mutant vykazoval podobné vlastnosti jako přirozeně se vyskytující Val398fs mutace. Druhý mutantní klon nesl posunovou mutaci na C - konci proteinu, to mělo za následek tvorbu zkráceného produktu na 415 aminokyselin (*PLIN1*<sup>415</sup>) (Ding *et al.*, 2013).

Obr. 11: Zobrazení modifikovaného úseku na exonu 8 genu *PLIN1* a výsledné mutace po zásahu TALEN (převzato a upraveno z Ding *et al.*, 2013)



Ohraničené úseky znázorňují TALEN vazebná místa. Klon A nese mutantní *PLIN1*<sup>558</sup> (delece 17 bp, del). Klon B nese mutantní *PLIN1*<sup>415</sup> (delece 20 bp, del).

Nakonec byly diferenciovány tři alelické série klonů lidských pluripotentních kmenových buněk (hPSC) – wild-type, *PLIN1*<sup>558</sup> a *PLIN1*<sup>415</sup> do bílých adipocytů. Byla pozorována podstatná redukce v počtu buněk obsahujících lipidové kapky, a také výskyt malých lipidových kapiček u *PLIN1*<sup>558</sup> adipocytů. Přítomnost perilipinu ve všech adipocytech byla potvrzena metodou western-blot a zjistilo se, že *PLIN1*<sup>558</sup> adipocyty mají znatelně redukováné množství triacylglycerolů až o 38 % v porovnání s wild-type buňkami, zatímco *PLIN1*<sup>415</sup> adipocyty měly podobný obsah triacylglycerolů jako wild-type buňky. *PLIN1*<sup>558</sup> a *PLIN1*<sup>415</sup> adipocyty vykazovaly zvýšení bazální lipolýzy o 83 % a 52 %. Mutace *PLIN1*<sup>558</sup>

a *PLINI*<sup>415</sup> tedy vedly k celkovému zvýšení lipolýzy, ačkoliv tento efekt byl výrazněji spojen s mutací *PLINI*<sup>558</sup>.

Dále pak byly výrazné rozdíly v úrovni exprese pro adipocyty specifických genů mezi *PLINI*<sup>558</sup> a *PLINI*<sup>415</sup> buňkami. Tato skutečnost ukazuje na to, že dvě posunové mutace jedna, co vede k prodloužení perilipinu a druhá vedoucí ke zkrácení perilipinu mají odlišné funkční následky.

Výsledky ukazují, že prodloužení C-konce proteinu perilipinu prostřednictvím posunové mutace, která je podobná mutaci vyskytující se u lipodystrofických pacientů, hraje dominantní roli při změně lipolýzy a redukuje uskladnění triacylglycerolů a formaci lipidových kapek v lidských adipocytech (Ding *et al.*, 2013).

### 3.4 CRISPR/Cas9 systém

CRISPR (*angl. Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats*) je bakteriální nukleázový systém, který je zodpovědný za ochranu mikroorganismu proti bakteriofágům či za odstranění cizorodé DNA. CRISPR lokus v hostiteli obsahuje kombinaci nekódujících RNA elementů a CRISPR asociovaných genů (*angl. CRISPR-associated genes, Cas*) kódujících produkty, které jsou zodpovědné za fungování CRISPR systému (Cong *et al.*, 2013; Ran *et al.*, 2013)

CRISPR lokus byl poprvé objeven v roce 1987 v *E.coli*, jeho organizace repetice byla velmi neobvyklá, protože opakující se sekvence jsou typicky uspořádány hned za sebou na konkrétním lokusu DNA, v tomto případě repetice ohraničují nerepetitivní oblasti. Funkce přerušovaných klastrů repetice v té době nebyly známy (Ishino *et al.*, 1987). V roce 2002 byly nalezeny geny asociované s CRISPR repeticemi a byly pojmenovány Cas geny. Prvotní spekulace poukazyvaly na jejich možné funkce spojené s CRISPR repeticemi (Jansen *et al.*, 2002), jejich skutečné vlastnosti byly popsány až v roce 2007 (Barrangou *et al.*, 2007).

Doposud bylo popsáno pět typů CRISPR systémů, nejlépe prostudovaný je typ II. Systém zajišťuje rozštípání cizorodé DNA na malé fragmenty a jejich integraci do CRISPR lokusu mezi sérii krátkých repetice, tím vzniká tzv. CRISPR *spacer*. Následně je CRISPR *spacer* přepsán do RNA a z transkriptu je vytvořena crRNA (CRISPR RNA), která je následně spojena s tracrRNA (*angl. trans-activating crRNA*) a použita pro navedení efektorového Cas9 proteinu na komplementární DNA exogenního původu (Jinek *et al.*, 2012).

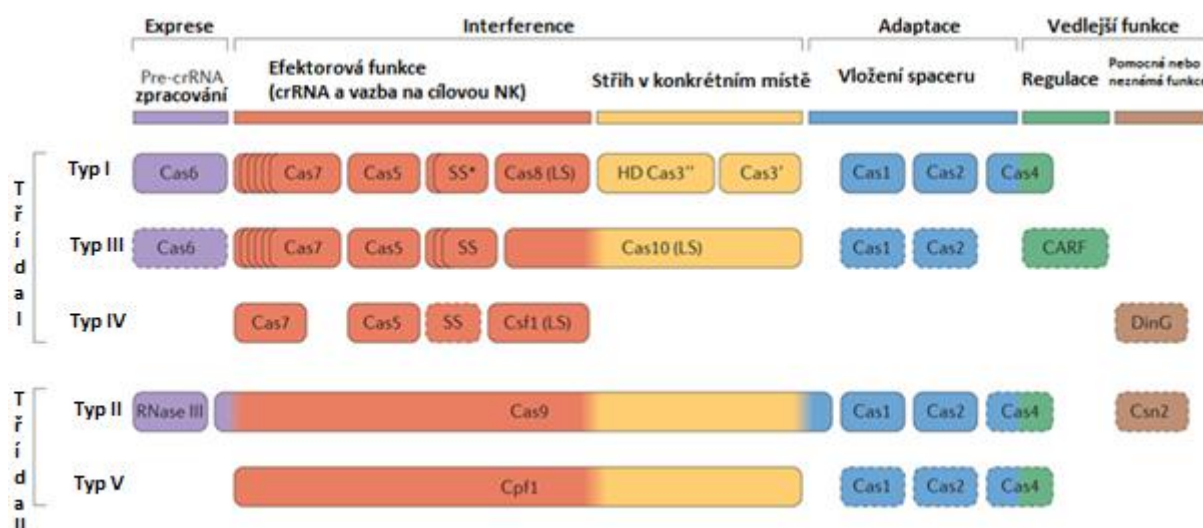


### 3.4.1 Klasifikace CRISPR/Cas systémů

Současná klasifikace řadí CRISPR/Cas systémy do dvou tříd. Systémy třídy 1 využívají komplex Cas proteinů k degradaci cizorodé nukleové kyseliny. Třída 2 zahrnuje systémy využívající jeden velký Cas protein ke stejnému účelu, jak lze vidět na Obr. 12. Třída 1 je rozdělena do třech typů, Typ I, III a IV; třída 2 obsahuje typ II a V. Systémy typu V jsou rozděleny do dalších subtypů. Každý typ a většina subtypů jsou charakterizovány tzv. unikátními geny (*angl. unique genes*), což jsou geny, které byly nalezeny pouze v dané kategorii. Klasifikace je dále založena na přítomnosti konkrétních Cas genů v dané skupině. Většina CRISPR/Cas systémů zahrnuje geny pro proteiny Cas1 a Cas2 (Makarova *et al.*, 2015). Organismy mohou obsahovat více typů CRISPR/Cas systémů, to poukazuje na propletenost a kompatibilitu různých CRISPR systémů. (Wiedenheft *et al.*, 2012).

Obr. 12: Funkční klasifikace CRISPR/Cas systémů

(převzato a upraveno z Makarova *et al.*, 2015)



Názvy proteinů jsou použity podle současné nomenklatury a klasifikace (podle Makarova *et al.*, 2011). Hvězdička znázorňuje domnělou malou podjednotku (small subunit, SS), ta je spojena s velkou podjednotkou-Cas8/LS (large subunit, LS), dohromady tvoří efektorový protein v systémech typu I. V systémech typu III a IV jsou velkými podjednotkami Cas10 a Csf1 (proteiny odvozeny od Cas8 rodiny proteinů). Postradatelné komponenty systémů jsou zvýrazněny přerušovaným ohraničením. Cas6 je plně ohraničen v systémech typu I, v systémech typu III je postradatelný, v ostatních Cas6 chybí. V těchto systémech jsou proteiny, které funkci Cas6 suplují nebo dosud nebyly systémy dostatečně prostudovány. Vybarvení Cas4 dvěma a Cas9 třemi barvami znázorňuje, že tyto proteiny se účastní v mnoha úrovních odpovědi na cizorodou DNA. Funkce komponentů v systémech typu IV a typu V jsou odvozeny podle strukturální homologie s komponenty v jiných systémech, a ještě nebyly experimentálně ověřeny jejich konkrétní funkce.



### 3.4.2 Mechanismus působení CRISPR systému typu II

CRISPR/Cas systém je přirozený obranný proces probíhající v bakteriích a archeích. Tento imunitní systém chrání buňky před invazí cizorodé DNA, která se do buňky dostává, a to její degradací (Aliyari *et al.*, 2009).

Jakmile je bakterie napadena virem, prvním krokem imunitní odpovědi je zachycení fragmentu virové DNA (Mojica *et al.*, 2005). Následně je DNA fragment vybrán adaptačním mechanismem, který vyžaduje přítomnost krátkých (3-7 bp) sekvencí na vybrané cizorodé DNA. Sekvence se nazývá *protospacer adjacent motif* (PAM) a je klíčová pro sekundární expozici cizorodé DNA imunitnímu systému bakterie (Shah *et al.*, 2013; Heler *et al.*, 2014).

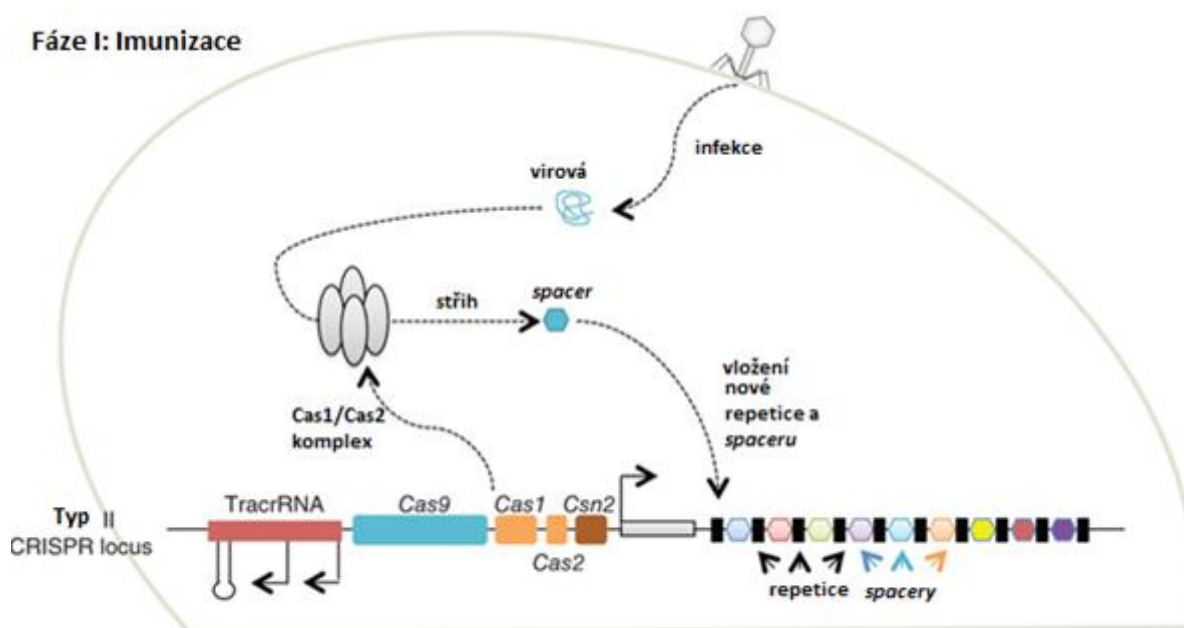
Integrace každého nového fragmentu DNA (o délce asi 20 bp) do CRISPR lokusu je doprovázena tvorbou nové repetice oddělující tento nový integrovaný fragment (*spacer*) od jiných *spacerů*. (Barrangou *et al.*, 2007). Mechanismus adaptace je řízen proteiny Cas1 a Cas2, které jsou přítomny u čtyř z pěti hlavních typů CRISPR/Cas9 systému, jak je znázorněno v Obr. 12 (Yosef *et al.*, 2012; Swarts *et al.*, 2012).

V *E.coli* Cas1 a Cas2 tvoří komplex, kde je Cas2 dimer spojen se dvěma Cas1 dimery. V tomto komplexu má Cas2 strukturální neenzymatickou roli (Nuñez *et al.*, 2014) – váže se na dvouvláknový fragment invazivní DNA. Zatímco Cas1 váže jednovláknové přesahy DNA a katalyzuje integraci do CRISPR lokusu. (Nuñez *et al.*, 2015a; Nuñez *et al.*, 2015b; Wang *et al.*, 2015)

Cas1 a Cas2 proteiny v odlišných typech CRISPR systémů se skládají z různých aminokyselinových sekvencí, nicméně jejich krystalová struktura je pro všechny subtypy velice podobná. Všechny Cas1 jsou metalodependentní nukleázy/integrázy, které se váží na exogenní DNA (Wiedenheft *et al.*, 2012) a Cas2 proteiny mají jak RNázovou (Beloglazova *et al.*, 2008), tak i DNázovou aktivitu (Nam *et al.*, 2012)

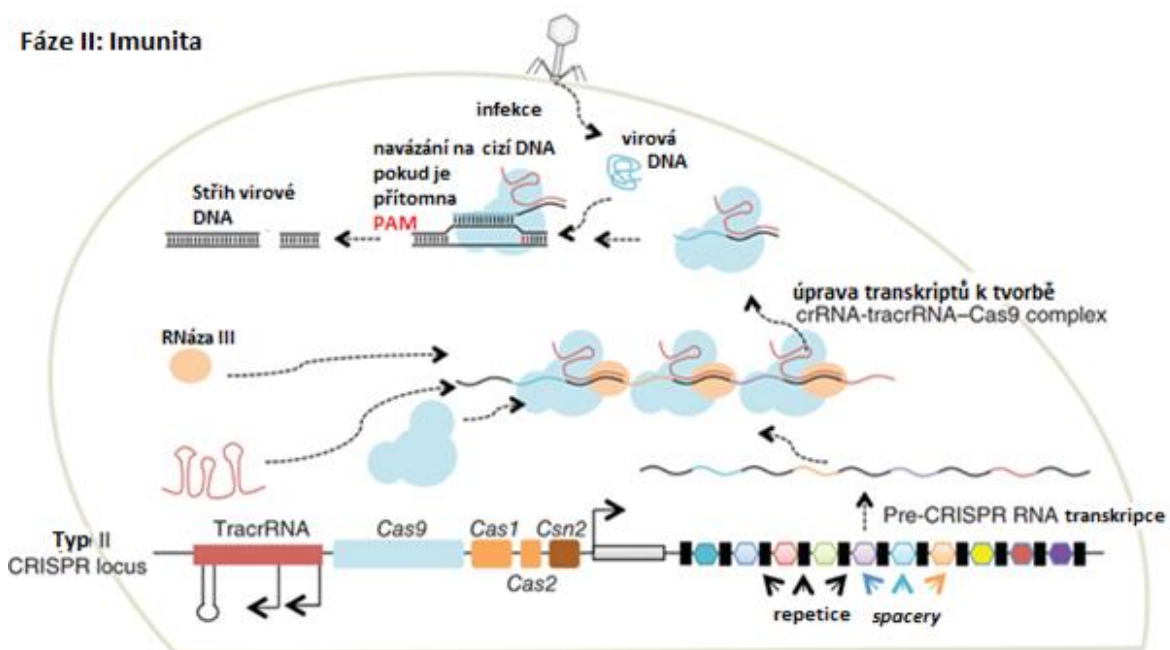
Existují tři subtypy CRISPR systému typu II (Chylinski *et al.*, 2014) a každý obsahuje tři Cas proteiny Cas1, Cas2 a Cas9, dále *trans-activating crRNA* (tracrRNA) (Deltcheva *et al.*, 2011) a CRISPR *spacer*. Později byl objeven také čtvrtý Cas protein u subtypu II-A (Csn2) a u subtypu II-B (Cas4), ale žádný u subtypu II-C (Chylinski *et al.*, 2014). Cas1 a Cas2 mají stěžejní roli v adaptaci *protospacerů* v systému typu II (Datsenko *et al.*, 2012; Yosef *et al.*, 2012). Zásadní funkce výše zmíněných proteinů jsou zobrazeny v Obr.13a a 13b.

Obr. 13a: CRISPR/Cas9 *in vivo*: Bakteriální adaptivní imunitní systém typu II  
(převzato a upraveno podle Mali *et al.*, 2013b)



Dvě fáze mechanismu fungování bakteriálního imunitního systému. Fáze I Imunizace: Zde probíhá adaptace virální DNA do CRISPR lokusu, který posléze slouží jako endogenní zdroj pro tvorbu crRNA. Po vstupu cizorodé DNA je tato nukleová kyselina zpracována Cas1/Cas2 komplexem a vmezerena mezi repetice CRISPR za vzniku nové repetice (černé obdélníky) oddělující nové a staré sekvenční (barevně šestiuhelníky). Před místem, kde jsou uloženy repetice v genomu, jsou také uloženy Cas geny (angl. *CRISPR associated genes*), jako je *Cas9* (světle modrá), *Cas1*, *Cas2* (oranžová) a *Csn2* (hnědá). Tyto geny kódují proteiny zajišťující manipulaci s vlastní, ale také cizorodou genetickou informací. Před Cas geny je umístěn úsek DNA kódující tracrRNA, která je posléze připojena k crRNA a napojena na Cas9.

Obr. 13b: CRISPR/Cas9 *in vivo*: Bakteriální adaptivní imunitní systém typu II  
(převzato a upraveno podle Mali *et al.*, 2013b)



Fáze II Imunita: V této fázi probíhá obranná reakce bakterie vůči invazivní DNA prostřednictvím komplexu tracrRNA-crRNA-Cas9. Při napadení bakterie virem je jsou exprimovány Cas geny a *spacer* a jeho přecházející repetice jsou přepsány do crRNA, dále je přepsána i tracrRNA sekvence (červeně) do RNA. Dochází k vazbě mezi tracrRNA a částí přepsané repetice na crRNA. Tvoří se duplex tracrRNA-crRNA, který je zpracován RNázou III (oranžová koule) a následně spojen s Cas9. Konečnou fází je navázání tracrRNA-crRNA-Cas9 komplexu na cílovou DNA a její následné rozrušení na základě přítomnosti PAM.

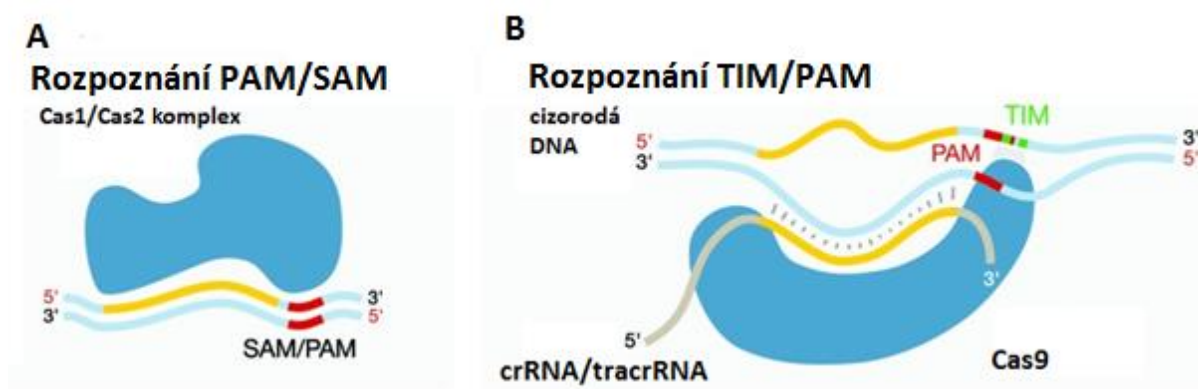
CRISPR *spacery* přesně odpovídají sekvencím virů a plazmidů exogenního původu (*protospacerům*) (Pourcel, 2005; Mojica *et al.*, 2005, Bolotin *et al.*, 2005). Některé *spacery* mohou vykazovat homologii také k úsekům vlastního prokaryotního genomu (*self-targeting spacers*), které pravděpodobně mají regulační funkce (Stern *et al.*, 2010). Nové *spacery* mohou být zpracovány a začleněny mezi repetice velmi rychle a tvořit tím část imunitního systému, který je připraven pohotově reagovat proti původci začleněného úseku (Tyson *et Banfield*, 2007). CRISPR repetice mají obvykle 24 až 48 párů bází (Haft *et al.*, 2005).

RNA přítomny v proteinu Cas9 jsou polyribonukleotidy a jsou transkribovány z konkrétního integrovaného CRISPR *spaceru*. Po transkripci vzniká crRNA (CRISPR RNA), která se inkorporuje do efektorového komplexu s Cas9, kde řídí specifické navádění komplexu na cílovou sekvenci DNA (Terns *et Terns*, 2011). Existují však procesy, které před integrací crRNA tuto ribonukleovou kyselinu upravují a aktivují tím funkci komplexu protein-RNA. Jeden z procesů je vazba tracrRNA s crRNA. TracrRNA je v dané části komplementární k pre - crRNA (premature crRNA) a tvoří s ní RNA heteroduplex. Ten je následně upraven

RNázou III a vzniká crRNA/tracrRNA heteroduplex, který je stabilizován v molekule proteinu Cas9, jak je zobrazeno v imunitní fázi na Obr. 13b. RNA duplex zajišťuje navedení Cas9 na cílovou sekvenci, která je následně rozstřížena (Deltcheva *et al.*, 2011).

Protein Csn1 je jedním z Cas ribonukleoproteinů, více známý jako Cas9 (společný pro všechny subtypy typu II), podílí se na tvorbě crRNA a deaktivaci invazivní DNA. Cas9 řízena RNA duplexem crRNA/tracrRNA, který je zodpovědný za specifitu vazby na cílové místo (Jinek *et al.*, 2012), následně stříhá antiparalelní vlákna cizorodé DNA, které jsou komplementární k crRNA. Střih provádí dvě nukleázové domény RuvC a HNH (Garneau *et al.*, 2010). Jak již bylo zmíněno Cas9 je důležitým komponentem ve fázi destrukce invazivní DNA. Důležitou vlastností cizorodého DNA fragmentu je přítomnost PAM u typu I a II CRISPR systémů (Shah *et al.*, 2013; Heler *et al.*, 2014). PAMs jsou důležité pro prvotní selekci *protospaceru* (v kontextu selekce k adaptaci se spíše hovoří o SAM, *angl. spacer acquisition motif*) a následně při navázání na *protospacer* jako cílové místo pro Cas9 (v tomto případě mluvíme o TIM, *angl. target interference motif*) (Shah *et al.*, 2013). PAM sekvence potřebná pro přesné fungování CRISPR/Cas systému doposud nebyla nalezena v CRISPR lokusu, to zajišťuje, že pokud je vytvořen *spacer* (úsek stejné sekvence jako *protospacer*, ale bez PAM) mezi CRISPR repetice, nepůsobí imunitní systém proti tomuto adaptovanému fragmentu. Bylo dokázáno, že C-koncová doména Cas9 interaguje s TIM cizorodé DNA a v případě dostatečné komplementarity této cizorodé DNA s crRNA Cas9 proteinu, provádí střih. (Anders *et al.*, 2014; Nishimasu *et al.*, 2014; Sternberg *et al.*, 2014).

Obr. 14: Umístěním PAM sekvence při adaptaci a imunitní odpovědi na cizorodou DNA (Shah *et al.*, 2013)



- A) U CRISPR systému typu II jsou SAM/PAM cizorodé DNA rozpoznávány adaptačním komplexem proteinů (Cas1/Cas2). V jejich blízkosti je proveden střih a fragment DNA bez SAM/PAM je vložen ve formě *spaceru* do lokusu CRISPR.
- B) Rozpoznání TIM proteinem Cas9 je uskutečněno na antiparalelním vlákně, které není komplementární k crRNA. PAM je rozpoznávána v blízkosti heteroduplexu crRNA-DNA.

### 3.4.3 Použití CRISPR/Cas9 systému pro editaci genomu

Jednoduchost Cas9 v CRISPR systému typu II, který ke svému fungování potřebuje pouze tři komponenty (Cas9, crRNA a trRNA), přivedla vědce k myšlence přesně programovatelného nástroje k editaci genomu. Tuto skutečnost si jako první uvědomila dvojice vědkyň Doudna a Charpentier v roce 2012. Na základě CRISPR systému typu II autorky vytvořily zjednodušenou verzi tohoto systému. Ten vyžadoval pouze dva komponenty, a to Cas9 a sgRNA (single synthetic guide RNA), která byla kombinací trRNA a crRNA v jedné molekule (jednom polyribonukleotidu). Tato strategie programovatelné nukleázy přes sgRNA se později ukázala jako levnější, rychlejší a efektivnější alternativa TALENs a ZFNs.

V současné době existuje mnoho způsobů využití Cas9 nukleázy k úpravě exprese genů. Mezi nejvýznamnější tři způsoby použití CRISPR/Cas9 editačního nástroje patří indukce dvouvláknového zlomu (Overballe-Petersen *et al.*, 2013), jednovláknového zlomu (Jinek *et al.*, 2012) a epigenetické umlčování/aktivace genů pomocí dCas9 (*angl. nuclease-deficient Cas9*) (Jinek *et al.*, 2012; Gasiunas *et al.*, 2012).

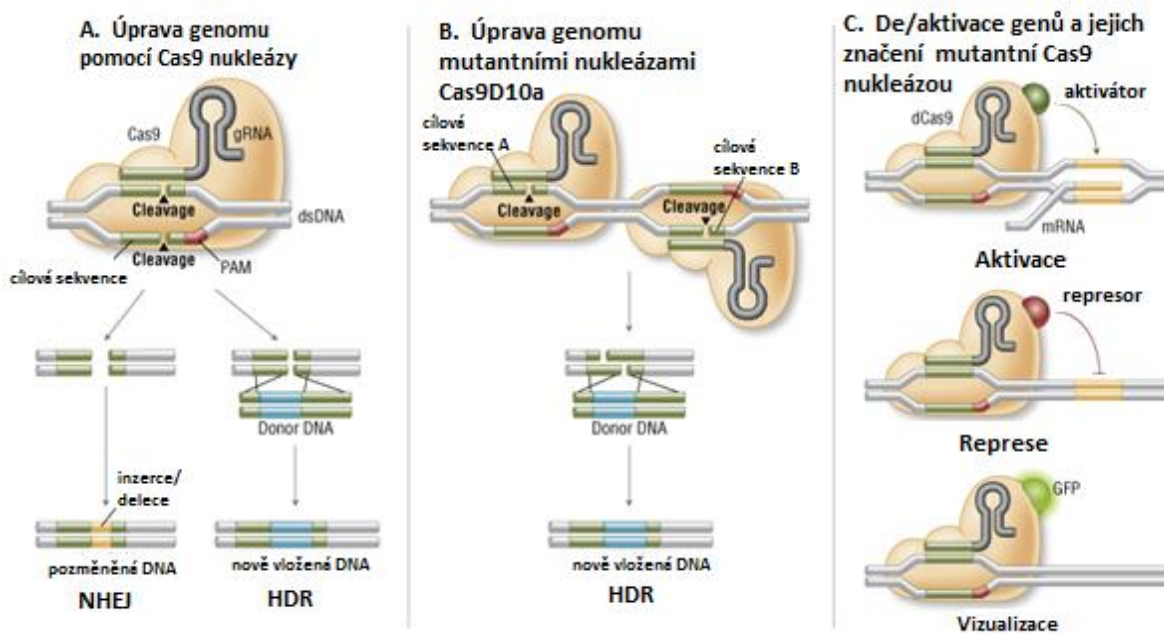
Původním způsobem využití Cas9 je tvorba sekvenčně specifických DSBs a navození reparační mašinerie v podobě NHEJ či HDR opravy. Tyto opravy mají pak za následek vznik indels v případě NHEJ či změnu sekvence způsobenou templátovou DNA, jak je znázorněno na Obr.15A (Overballe-Petersen *et al.*, 2013).

Přesnějším způsobem, jak zajistit úpravu sekvence DNA, byla tvorba mutantní Cas9, známé jako Cas9D10a (mutace v místě D10a) s aktivitou nukleázy stříhající pouze jedno vlákno DNA. Strategie Cas9D10A využívá páru Cas9 komplexů, navrženého k tvorbě blízkých jednovláknových stříhů na komplementárních vláknech DNA, jak lze vidět na Obr. 15B (Ran *et al.*, 2013b). Tato strategie umožnila tvorbu dvouvláknového stříhu, jenž není opraven NHEJ. Místo toho je oprava řízena způsobem HDR, a to vždy pokud je přítomen homologní templát. Tímto způsobem se snižuje pravděpodobnost opravy přes NHEJ a tedy i vzniku indelů (Cong *et al.*, 2013).

Třetí variantou použití CRISPR/Cas9 systému je umlčování či aktivace genů na transkripční úrovni. Systém využívá upraveného dCas9, který nese mutace v místech H840a v doméně HNH a D10a v doméně RuvC. Mutace mají za následek deaktivaci nukleázové aktivity těchto domén za současného zachování DNA vazebných vlastností (Jinek *et al.*, 2012; Gasiunas *et al.*, 2012). Tento přístup může být využit k navázání dCas9 proteinu do jakéhokoliv místa v genomu, aniž by byl proveden stříh. Po fúzi proteinu dCas9 s aktivátorem či represorem vzniká nástroj, který může být použit k aktivaci či represu transkripce daného genu a tím ke studiu epigenetických procesů, jak je zobrazeno na Obr. 15C (Qi *et al.*, 2013; Maeder *et al.*,

2013; Gilbert *et al.*, 2013; Perez-Pinera *et al.*, 2013). Dále může být dCas9 použit jako vizualizační sonda, pokud je k němu připojen fluorescenční protein, jako je tomu na Obr. 15C (Chen *et al.*, 2013).

Obr. 15: Aplikace CRISPR/Cas9 technologie (převzato a upraveno z webu [www.neb.com/tools-and-resources/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology](http://www.neb.com/tools-and-resources/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology))



Obrázek znázorňuje možnosti použití nukleázy Cas9 (oranžově) řízené sgRNA (zvýrazněna tmavě-šedě a zeleně) k úpravě (A a B), aktivaci/represi transkripce genů (C nahoře) či vizualizaci daného úseku DNA (C dole). Černé šipky s nápisem *cleavage* značí místo stříhu provedeného nukleázou.

### 3.4.4 Účinnost cílení na danou sekvenci DNA a mimo cílové působení

Účinnost nebo procento požadovaných úprav dosažených při použití editačních nástrojů jsou důležitým parametrem při hodnocení daného přístupu. Lze srovnat účinnost CRISPR/Cas9 s účinností dalších editačních metod, jako jsou TALEN či ZFN (Barrangou *et al.*, 2007). Například v lidských buňkách navržené ZFNs a TALENs běžně dosahují účinnosti v rozmezí od 1 do 50 % (Miller *et al.*, 2010; Mussolino *et al.*, 2011). Při použití CRISPR/Cas9 systému byla zaznamenána účinnost zásahu vyšší než 70 % v zebřičce (Hwang *et al.*, 2013) a huseníčku (Feng *et al.*, 2013). Dále bylo dosaženo účinnosti požadovaného zásahu metodou CRISPR až 78 % v jednobuněčných myších embryích (Zhou *et al.*, 2014) a v lidských pak 52 % (Liang *et al.*, 2015).

Dalším důležitým parametrem je incidence mimo cílového působení. Tento jev v případě Cas9 nastává, pokud je v genomu přítomen úsek lišící se od cílové sekvence pouze

malým množstvím rozdílných bází, nacházejících se v blízkosti PAM sekvence. Cas9 je schopna tolerovat až 5-bázový rozdíl mezi sgRNA komplementárním k úseku *protospaceru* (Fu *et al.*, 2013) nebo 1-bázový rozdíl přímo v sekvenci PAM (Hsu *et al.*, 2013). Mimo cílové působení nukleáz je obecně obtížné detekovat, detekce často obnáší sekvenaci celého genomu upravované buňky.

Pro předpověď potencionálních vedlejších úseků, které by byly schopny vázat komplex Cas9/sgRNA, byly vytvořeny online softwary. Ty zajišťují identifikaci cílových úseků používaných sgRNA a jejich příbuzné sekvence, které by nebyly cílem zásahu, jsou to například *CRISPR design tool* (Hsu *et al.*, 2013) a *ZiFiT Targeter* (Sander *et al.*, 2007).

Od roku 2012, kdy byl systém CRISPR/Cas9 poprvé využit k řízené úpravě genů, byly provedeny experimenty s mnoha buněčnými liniemi a organismy zahrnující i, bakterie (Fabre *et al.*, 2014), kvasinky (DiCarlo *et al.*, 2013), rostliny (Feng *et al.*, 2013), hlístice (Friedland *et al.*, 2013), octomilky (Gratz *et al.*, 2014), zebříčku (Hwang *et al.*, 2013), žáby (Guo *et al.*, 2014), myši (Mashiko *et al.*, 2013), krysy (Ma *et al.*, 2013), opice (Niu *et al.*, 2014), prasata (Hai *et al.*, 2014) a člověka (Mali *et al.*, 2013b)

CRISPR/Cas9 systém vyžaduje pouze navržení sgRNA pro změnu konkrétního cíle. To je v porovnání s metodami jako je ZFN či TALEN snazší, protože je vynechána složitá konstrukce proteinu vážícího DNA. Dále pak CRISPR/Cas9 díky svým již rozsáhlým sgRNA knihovnám umožňuje rychlou analýzu funkce jednotlivých genů v celém genomu (Mali *et al.*, 2013; Koike-Yusa *et al.*, 2013).

### **3.4.5 Tvorba CRISPR/Cas9 systému cíleného na konkrétní úsek DNA**

Nejpoužívanějším a základním systémem pro úpravu genů je komplex SpCas9 (Cas9 ze *Streptococcus pyogenes*) a sgRNA, která byla navržena na danou sekvenci v genomu daného organismu. Výběr správné sgRNA s vlastnostmi přesného navázání na cílovou sekvenci, a to bez mimo cílového navázání na sekvenci jinou, je základním předpokladem pro úspěšný experiment.

Pro návrh sgRNA je umístění PAM sekvence na *protospaceru* zcela stěžejní, protože zaručuje její správné navázání a následný stříh. Pokud v cílovém úseku nejsou PAM sekvence potřebné pro aktivaci proteinu Cas9, je nutné použít Cas9 z jiného druhu bakterie, který rozeznává odlišnou sekvenci (Addgene CRISPR 101 ebook, 2016).



Tab. 2: PAM sekvence u jednotlivých druhů bakteriálních organizmů  
(převzato a upraveno z Addgene CRISPR 101 ebook)

Druh/Varianta nukleázy Cas9	PAM sekvence (5'-3')
<i>Streptococcus pyogenes</i> (SP); SpCas9	NGG
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA); SaCas9	NNGRRT nebo NNGRR(N)
<i>Neisseria meningitidis</i> (NM)	NNNNGATT
<i>Streptococcus thermophilus</i> (ST)	NNAGAAW
<i>Treponema denticola</i> (TD)	NAAAAC
Cpf1 (z různých druhů)	TTN

N = (any Nucleotide) jakákoliv báze se může vyskytovat v této pozici, R = (puRine) v této pozici se vyskytuje jakákoliv purinová báze, W = (Wweak) báze tvořící slabou vazbu – adenin a thymin

Po prověření, zda je příslušná PAM na sekvenci *protospaceru* přítomna, lze navrhnout sgRNA pro cílový úsek DNA v programu ChopChop ([chopchop.rc.fas.harvard.edu/](http://chopchop.rc.fas.harvard.edu/)) nebo CRISPR design ([crispr.mit.edu/](http://crispr.mit.edu/)). Jakmile je cílová sekvence vybrána, jsou navrženy oligonukleotidy sgRNA, které jsou zaklonovány do vektoru a dále se řeší otázka dopravy vektoru do buňky.

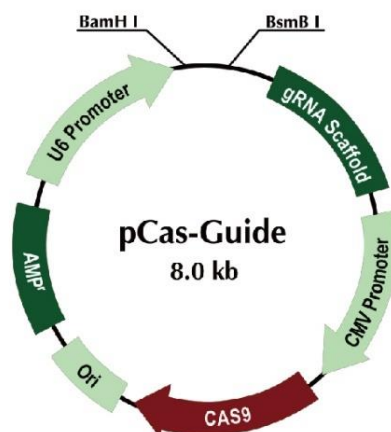
Metoda dopravení Cas9/sgRNA do buňky se volí v závislosti na buněčném typu či druhu organismu. Doprava do buňky může být uskutečněna za použití plazmidů, lentivirů, AAVs (angl. Adeno-Associated Virus) či přímou lipofekcí komplexů Cas9 s asociovanými sgRNA pomocí kationtových lipidů (Addgene CRISPR 101 ebook, 2016).

Na základě typu zásahu, který bude proveden, se volí nukleáza Cas9 s danými vlastnostmi. Pokud by byl experiment zacílen na provedení HDR opravy v místě stříhu podle dodaného templátu, je nutné templát dodat kotransfekcí plasmidu, který templát nese. Templát, jinými slovy homologní ramena (*angl. homology arms*), lze navrhnout na veřejně dostupných platformách jako je například Blenching ([benchling.com](http://benchling.com)) nebo Deskgen ([www.deskgen.com](http://www.deskgen.com)).

Jako vektor, který nese informaci o sgRNA a Cas9 proteinu, se většinou používá plazmid. Plazmidy CRISPR/Cas9 obsahují klonovací místo uvnitř sgRNA kostry, selekční marker k amplifikaci v bakteriích, počátek replikace, druhově specifický promotor a gen pro fluorescenční značení nebo gen rezistence proti konkrétnímu antibiotiku pro selekci v eukaryotických buňkách, jak je zobrazeno na Obr. 16.



Obr. 16: Mapa vektoru/plasmidu pCas-Guide (převzato z pCas-Guide manual Origene, 2016)



Plasmidový vektor obsahuje klonovací místa BamH I a BamB I pro zaklonování DNA kódující sgRNA. Vektor dále nese promotor (CMV promotor) pro proteín Cas9 (červeně). Počátek replikace (Ori), gen resistance k antibiotiku Ampicilinu (AMP<sup>r</sup>) a promotor pro přepis zaklonované DNA do sgRNA (U6 promotor).

### 3.4.6 Využití CRISPR/Cas9 k úpravě lidských embryonálních buněk

Technologie CRISPR/Cas9 již byla využita k editaci DNA dospělých lidských buněk a zvířecích embryí, ale teprve v roce 2015 byla poprvé aplikována k úpravě lidského embrya.

Skupina čínských vědců použila CRISPR/Cas9 systém k úpravě genu, který ve své mutantní formě způsobuje potenciálně fatální krevní onemocnění  $\beta$ -talasemii (Liang *et al.*, 2015). Mnoho vědců věří, že takovýto zásah, pokud bude úspěšně vykonán ve viabilním embryu, může vést k eradikaci této devastující geneticky podmíněné nemoci již před narozením postiženého dítěte. Jiní zase tvrdí, že takový druh výzkumu již překračuje etické hranice, že úprava zárodečných buněk může být velmi nepředvídatelná a může mít negativní efekt na další generace. Dále existuje riziko nebezpečného zneužití technologie pro neetické a nemedicínské účely (Cyranoski *et Reardon*, 2015).

Tento výzkum byl veden za účelem objasnit mechanismus reparace poškozené DNA v embryonálních buňkách, analyzovat účinnost a potenciální mimo cílové působení při použití CRISPR/Cas9 systému (Liang *et al.*, 2015).

Pro vypnutí genu podmiňujícího onemocnění červených krvinek ( $\beta$ -talasemii) byly použity rané tripronukleární (3PN) zygoty, protože se ukázalo, že polyspermické zygoty jako je 3PN zygoty mohou být použity jako alternativa pro studium vývoje normální lidské zygoty (Balakier, 1993). Polyspermické zygoty vznikají při *in vitro* fertilizaci a jsou schopny vytvářet blastocysty, ale již nejsou schopny se normálně vyvinout *in vivo* (Munne *et Cohen*, 1998).

Lidský *HBB* je gen umístěn na chromozomu 11, kóduje podjednotku proteinu hemoglobinu a jeho mutací vzniká onemocnění  $\beta$ -talasemie (Muncie *et* Cambell, 2009). *HBB* je součást globin genového klastru, který obsahuje další čtyři globinové geny v pořadí (od 5' k 3') *HBE*, *HBG2*, *HBG1*, *HBD* a *HBB* (Schechter, 2008), protože jsou *HBB* a *HBD* velmi podobné, spekuluje se, že může být *HBD* použit jako templát pro opravu *HBB*.

Byly navrženy a testovány tři sgRNA označeny G1, G2 a G3, které cílily na odlišné úseky v genu *HBB*. Z těchto tří gRNAs byla vybrána G1 jako nejlepší kandidát, u něhož nebylo detekováno působení mimo cílovou sekvenci při analýze 7 předpokládaných úseků, na které by se mohl G1 alternativně vázat.

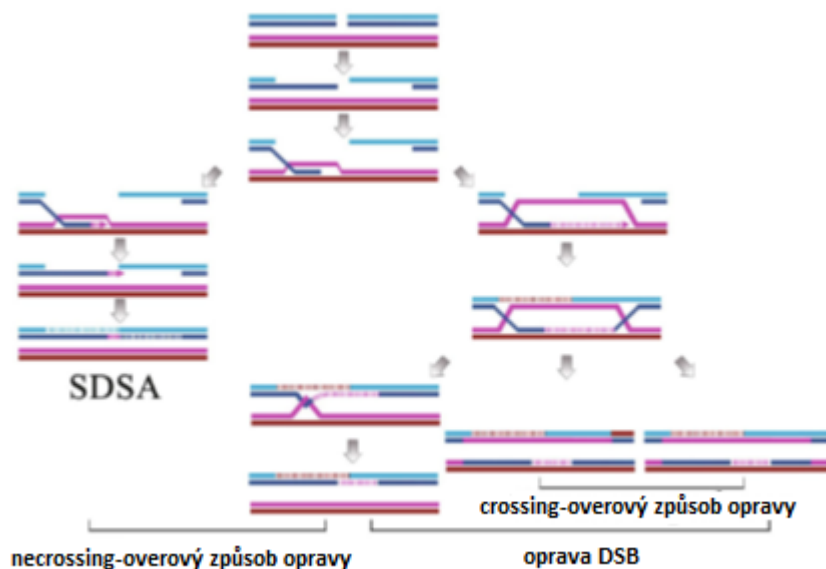
Pro testování specifity a účinnosti v embryích bylo nutné komponenty k modifikaci genu dopravit do cytoplazmy 3PN mikroinjekcí. Vpravená směs obsahovala G1 sgRNA, Cas9 mRNA, GFP mRNA a ssDNA oligonukleotidy v různých koncentracích. Dále byla vybrána embrya exprimující GFP pro amplifikaci potenciálně upraveného úseku pomocí G1 sgRNA, produkt amplifikace byl následně osekvenován.

Z 54 testovaných embryí bylo 28 upraveno Cas9, což ukazuje 52% účinnost zásahu. Dále 4 z 28 upravených embryí byly opraveny podle ssDNA templátu. Sedm embryí neslo čtyři identické bodové mutace za sebou, což mohl být důkaz, že pro HDR u těchto embryí byl použit *HBD* gen jako templát. U zbylých analyzovaných embryí hlavní cestou opravy dvouvláknového stříhu byla NHEJ oprava.

Náhodně bylo vybráno 6 *HBB* upravených embryí pro exomové sekvenování, aby se analyzovalo případné mimo cílové působení G1sgRNA/Cas9 komplexu. Byla nalezena dvě pozměněná místa v exonech genů *CIQC* (gen kódující subkomponent C1qC komplementu) a *TTR* (gen kódující protein transthyretin), obě vykazovala schopnost vázat G1sgRNA/Cas9 komplex.

Ukázalo se, že DSBs v genu *HBB* mohou být preferenčně opraveny pomocí mechanismu nevyužívající crossing-overu (Liang *et al.*, 2015). DSBs mohou být opraveny způsobem NHEJ či vysoce přesnou alternativou HDR opravy (Ciccia *et* Elledge, 2010; Moynahan *et* Jasin, 2010). Existuje však další možnost opravy přes HDR a to přes jednosměrný přenos úseku DNA mezi homologními geny (*angl. synthesis-dependent strand annealing, SDSA*), jde o jednosměrný přenos úseku DNA mezi částečně homologními úseky genů. Ze všech analyzovaných 3PN embryích byl DSB právě tímto způsobem opraven u 7 embryí.

Obr. 17: Oprava DSBs v genu *HBB* v raných lidských embryích  
(převzato a upraveno z Liang *et al.*, 2015)



V lidských buňkách DSBs jsou opravovány dvěma hlavními způsoby necrossing-overové (NHEJ nebo SDSA) a crossing-overové (HDR). Oprava DSB v lidských embryích způsobených působením CRISPR/Cas9 probíhá hlavně procesem NHEJ. Pokud je oprava započata přes HDR preferenčně je využita necrossing overová varianta opravy-SDSA. V případě opravy dvouvláknového stříhu v genu *HBB* je jako templát využíván gen *HBD*.

Zjistilo se, že CRISPR/Cas9 je schopen efektivně rozstříhnout endogenní gen pro  $\beta$  - globin (*HBB*). Nicméně účinnost HDR při opravě genu *HBB* byla nízká a upravená embrya byla mozaikou buněk obsahující mnoho různých podob stejné alely. Mimo cílové působení bylo také možno pozorovat v 3PN zygotách, jak potvrdilo exomové sekvenování. Dále přítomnost genu pro  $\delta$ -globin (*HBD*) homologního k *HBB* způsobovala kompetici s exogenními oligonukleotidy, které měly sloužit jako templát pro reparaci narušeného *HBB*, což vedlo k nežádoucím opravám (mutacím).

Výsledky poukázaly na to, že oprava *HBB* genu v těchto embryích preferenčně využívá mechanismu SDSA (Liang *et al.*, 2015), tento mechanismus byl pozorován také při opravách DSBs v iPS buňkách (Byrne *et al.*, 2014).

Po tomto výzkumu lze říci, že CRISPR/Cas9 systém je nutné vylepšit - zvýšit jeho specificitu a přesnost, aby mohl být bezpečně používán ke klinickým aplikacím při léčbě geneticky podmíněných chorob (Liang *et al.*, 2015).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

Buněčná linie RPE-1 (Retinal pigmented epithelial cells 1) imortalizovaná pomocí metody hTERT pocházela ze sbírky Ústavu molekulární a translační medicíny v Olomouci. Buňky byly kultivovány v Dulbecco Modified Eagle's Medium (Sigma Life Science) s 10% fetálním bovinním sérem, antibiotiky penicilinem (100 µg/ml) a streptomycinem (100 µg/ml) a kultivovány v inkubátoru při 37 °C.

Bakterie *Escherichia coli* kmen DH5α z knihovny Ústavu molekulární a translační medicíny v Olomouci byly kultivovány v Luria-Bertani mediu (Invitrogen) s antibiotikem ampicilinem (100ng/ml). Bakterie *Escherichia coli* kmen Stb13 nesoucí vektor pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) dodané firmou Addgene ve formě vpichu bakteriální kultury v šikmém agaru.

### 4.2 Sekvence exonu 3 genu *RPS19* a navržení sgRNA pro daný exon

Práce byla zaměřena na indukci mutace v konkrétním místě exonu 3 genu *RPS19* kódujícího ribosomální protein malé podjednotky číslo 19 (Ribosomal protein subunit 19) a to pomocí metody CRISPR/Cas9. Pro tento účel byly navrženy oligonukleotidy pomocí online softwaru ChopChop (chopchop.cbu.uib.no), které ve své sgRNA podobě navádějí protein Cas9 k cílové sekvenci. Cas9 je společně s oligonukleotidy exprimován z jednoho vektoru (PX458) a tvoří se ribonukleoproteinový komplex, který je schopen přerušit dvouvláknovou DNA v požadovaném místě.

### 4.3 Příprava vektoru PX458 a klonování sgRNA oligonukleotidů

Pro účely této práce bylo nutné připravit funkční plazmid PX458 vložení navržených oligonukleotidů, které kódují sgRNA a namnožit kultivací v bakteriích. Bakterie nesoucí prázdný konstrukt (PX458) byly dodány firmou Addgene ve formě vpichu bakteriální kultury do šikmého agaru.

### 4.3.1 Kultivace bakterií a izolace plazmidu PX458

K namnožení dodaného vektoru byla připravena tekutá kultura bakterií *Escherichia coli* kmene Stb13, ze které byl následně cílový vektor izolován pomocí kitu HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen) - Postup 1 (návod výrobce byl částečně upraven).

Postup 1: Izolace vektoru PX458 z tekuté kultury

1. Tekutá kultura byla založena přenesením bakterií ze šikmého agaru plastovou špičkou do Erlenmayerovy baňky obsahující 100 ml LB media s 25  $\mu$ l ampicilinu (100 ng/ml) a kultivována v 37 °C po dobu 16 hodin za stálého třepání (125 rpm).
2. Objem tekuté kultury byl rozdělen do 50 ml falkon a centrifugován 15 minut v 4 °C při 4500 rpm.
3. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován ve 6 ml chlazeného P1 pufru.
4. Do falkony byly přidány 6 ml P2 pufru, následně byla směs důkladně promíchána (převrácením 4-6 x) a inkubována v laboratorní teplotě po dobu 5 minut.
5. Do falkony byly přidány 6 ml chlazeného P3 pufru a obsah byl okamžitě důkladně promíchán převrácením, dokud nevznikla bílá sraženina.
6. Patrona s filtrem byla utěsněna pomocí uzávěru, suspenze bakterií i se sraženinou byla přenesena do patrony a inkubována 10 minut při laboratorní teplotě.
7. Kolona QIAGEN-tip 20 byla aktivována aplikací 4 ml QBT pufru (samovolný průchod).
8. Obsah patrony byl nanesen na filtr aktivované kolony (samovolný průchod).
9. Kolona byla 2x promyta 10 ml QC pufru (samovolný průchod).
10. Plazmidová DNA byla eluována do 5 ml QF pufru (samovolný průchod).
11. K eluovanému vzorku byly přidány 3,5 ml izopropanolu o laboratorní teplotě, obsah falkony byl promíchán a inkubován 5 minut v laboratorní teplotě.
12. Obsah falkony byl rozpipetován po 2 ml do mikrozkuavek (2ml).
13. Mikrozkuavky byly centrifugovány 30 minut při 15 000 rpm v 4 °C.
14. Supernatant byl odstraněn a vzniklý pelet resuspendován v 0,5 ml 70% chlazeného etanolu.
15. Vzorky byly centrifugovány 10 minut při 15 000 rpm v 4 °C.
16. Supernatant byl odstraněn, zbývající etanol byl odpařen v laboratorní teplotě během 10 minut a pelet byl následně resuspendován v 250  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O.
17. Koncentrace izolované plazmidové DNA byla změřena spektrofotometricky.

### 4.3.2 Restrikce vektoru PX458

Po izolaci vektoru následovala jeho restrikce enzymem FastDigest *BpiI* (*BbsI*) a defosforylace enzymem FastAP (alkalická fosfatáza) podle General Cloning Protocol Zhang Lab, tento krok byl nutný pro následné zaligování cílových sekvencí. Do mikrozkušavky (0,2ml) byly pipetovány reagenty podle Tab. 3, poté byly vzorky promíchány a stočeny ve stolní centrifuze. Restrikce probíhala 30 min při 37 °C.

Tab. 3: Reakční směs pro restrikci a defosforylaci vektoru PX458 (1 reakce = 20 µl)

Reagenty	Objem [µl]
vektor PX458	1 µg
10 U/µl FastDigest <i>BpiI</i>	1
1 U/µl FastAP	1
10 x Fast Digest Buffer	2
ddH <sub>2</sub> O	doplněno do 20 µl

Produkt restrikce byl rozdělen elektroforetickou separací v 0,7% agarózovém gelu/TBE s GelRed™ za 1 hodinu při stejnosměrném napětí 90 V za účelem odlišení střihaného a nestřihaného vektoru. Dále byl rozstřížený vektor extrahován z gelu pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) podle návodu QIAquick Spin Handbook (04/2015) - Postup 2.

Postup 2: Extrakce střihaného vektoru PX458 z agarózového gelu

1. Před samotnou extrakcí byly zváženy zkumavky (1,5ml).
2. Gel byl po separaci umístěn do UV transluminátoru určeného pro řezání gelu.
3. Sterilním skalpelem byl vyříznut produkt separace ve formě bločku, umístěn do mikrozkušavky (1,5ml) a zvážen.
4. Váha agarózového bločku byla zjištěna odečtením hmotnosti mikrozkušavky před a po vložení vyřezaného bločku.
5. Do zkumavky byl přidán QG pufr v poměru 3:1 vzhledem k hmotnosti gelu, tj. na 100 mg gelu přidat 100 µl QG pufru. Následně byl vzorek inkubován v termobloku po dobu 10 minut při 50 °C. Během inkubace byly vzorky promíchávány na vortexu, dokud se bloček nerozpustil.
6. Následně byl přidán izopropanol v poměru 1:1 k původní váze gelu (100 mg gelu : 100 µl izopropanolu).
7. Směs byla přenesena na kolonu pro izolaci DNA umístěné ve sběrné zkumavce (2ml).

8. Kolona byla centrifugována 1 minutu při 13 400 rpm ve stolní centrifuze. Proteklý objem byl odstraněn.
9. Na kolonu bylo přidáno 750  $\mu\text{l}$  PE pufru a kolona byla opět centrifugována 1 minutu při 13 400 rpm. Proteklá tekutina byla odstraněna.
10. Kolona byla přenesena do 1,5ml sběrné zkumavky.
11. Plazmid byl nakonec eluován z kolony přidáním 50  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O a centrifugací 1 minutu při 13 400 rpm. Pro zvýšení výtěžku byl krok 11 zopakován.
12. Koncentrace byla změřena spektrofotometricky.

#### 4.3.3 Příprava komplementárních oligonukleotidů

Navržené jednovláknové oligonukleotidy bylo nutné hybridizovat do dvouvláknové formy. Během hybridizace byla také provedena fosforylace na 5'-konci enzymem T4 polynukleotid kináza (T4 PNK). Rozpis reakční směsi je v Tab. 4. Po přípravě reakční směsi v 0,2ml zkumavce byl její obsah promíchán na vortexu a stočen na stolní centrifuze. Oligonukleotidy byly hybridizovány za specifických podmínek: v 37 °C 30 minut, 95 °C 5 minut a poté byla teplota postupně snižována až na 25 °C a to rychlosti 5 °C/minutu. Nakonec byla fluorometricky změřena koncentrace produktů reakce.

Tab. 4: Reakční směs pro fosforylaci a hybridizaci oligonukleotidů (1 reakce = 10  $\mu\text{l}$ )

Reagencie	Objem [ $\mu\text{l}$ ]
100 $\mu\text{M}$ oligonukleotid 1	1
100 $\mu\text{M}$ oligonukleotid 2	1
10x T4 Ligation Buffer	1
10 U/ $\mu\text{l}$ T4 PNK	0,5
ddH <sub>2</sub> O	6,5

#### 4.3.4 Ligace hybridizovaných oligonukleotidů do vektoru PX458

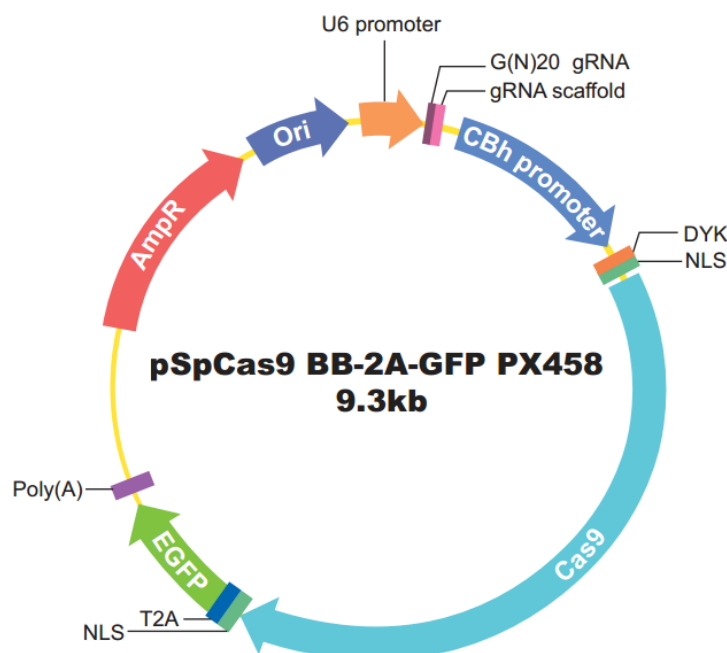
Ligace oligonukleotidů z kroku 4.3.3 byla provedena dle Tab. 5. Po přípravě reakční směsi v 0,2ml zkumavce byl její obsah promíchán a centrifugován. Pro kalkulaci ligační reakce byl použit poměr 5:1 (inert : vektor) a online kalkulátor NEBioCalculator™ v 1.6.0. (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) Reakce probíhala po dobu 18 hodin při 16 °C. Na konci inkubace byl enzym inaktivován 65 °C po dobu 15 minut.

Tab. 5: Reakční směs pro ligaci oligonukleotidů do vektoru PX458 (1 reakce = 20 µl)

Reagencie	Objem [µl]
10x T4 DNA Ligase Reaction Buffer	2
vektor PX458	350 ng
inzert	4,7 ng
400 U/µl T4 DNA Ligáza	1
ddH <sub>2</sub> O	doplnit do 20 µl

Obr. 18: Schéma vektoru PX458

(převzato z [http://www.axybio.com/crispr\\_cas9\\_zai\\_ti\\_gou\\_jian.html](http://www.axybio.com/crispr_cas9_zai_ti_gou_jian.html))



U6 promotor – U6 promotor je lidský promotor pro transkripci genů ve vektoru v lidských buňkách, G(N)20 grana – místa restrikce enzymu *BpiI* (*BbsI*) v pozicích báze 245 a 267, CBh promotor – CBh je lidský promotor umožňující expresi genů ve vektoru, DYK (FLAG tag) - značka pro chromatografii obsahující sekvenci aminokyselin DYKDDDDK to je místo pro štěpení enterokinázou, NLS (nuclear localisation signal) - jaderný lokalizační signál, Cas9 – gen pro nukleoprotein Cas9, NLS – jaderný lokalizační signál pro GFP, T2A – signál pro ribozom k přeskočení syntézy určitých aminokyselin – oddělení produktů translace, EGFP – gen pro GFP, Poly(A) – Poly(A) oblast, AmpR – gen rezistence proti antibiotiku ampicilin, Ori – počátek replikace vektoru pro *E. coli*.



#### 4.3.5 Transformace kompetentních bakterií *E. coli* kmen DH5 $\alpha$ vektorem PX458

Pro namnožení plazmidového vektoru PX458 se zaligovanými oligonukleotidy bylo nutné transformovat kompetentní bakterie *E. coli* (Postup 3), vytvořit tekuté kultury a nakonec cílový vektor izolovat.

Postup 3: Transformace chemicky kompetentních bakterií teplotním šokem

1. Kompetentní bakterie *E. coli* DH5 $\alpha$  byly rozmrazeny na ledu.
2. 4  $\mu$ l ligační směsi byly přidány k bakteriím a obsah zkumavek byl lehce promíchat špičkou.
3. Suspenze byla inkubována na ledu po dobu 30 minut.
4. Transformace teplem byla provedena inkubací směsi v termobloku při 42 °C po dobu 30 sekund.
5. Zkumavky s bakteriemi byly okamžitě zchlazeny na ledu.
6. Následně bylo přidáno 250  $\mu$ l tekutého LB média k samotné suspenzi bakterií, následovala inkubace po dobu 1 hodiny v 37 °C za neustálého horizontálního třepání (150 rpm).
7. Mezitím byly připraveny agarové plotny s LB médiem a ampicilinem (100 ng/ml) v Petriho miskách a to rozvařením 0,3 g agaru v 20 ml LB v mikrovlnné troubě, po zchládnutí byl přidán ampicilin jako selekční faktor (0,5  $\mu$ l ampicilinu o koncentraci 100 ng/ml na 1 ml tekutého LB media).
8. Na Petriho misky byl nanesen celý objem transformované bakteriální suspenze a rozetřen sterilní bakteriologickou hokejkou.
9. Petriho misky byly uzavřeny a inkubovány dnem vzhůru v 37 °C po dobu 16 hodin.

#### 4.3.6 Příprava konzerv bakteriálních buněk a izolace vektoru

Tekuté kultury bakterií byly připraveny a vektor izolován podle - Postup 1. Konzervy bakteriálních buněk byly vytvořeny z připravené bakteriální suspenze odebráním 750  $\mu$ l tekuté suspenze bakterií do mikrozskumavky (1,5 ml) s přidáním 250  $\mu$ l glycerolu. Suspenze s glycerolem byla promíchána na vortexu a skladována v -80 °C.

#### 4.3.7 Ověření úspěšné ligace pomocí sekvenování

Pro ověření úspěšné ligace oligonukleotidů do plazmidového vektoru PX458 byla cílová sekvence amplifikována v polymerázové řetězové reakci (PCR). To pomocí primerů (CRISPR\_oligo\_control\_FP 1 GACTATCATATGCTTACCGT; CRISPR\_oligo\_control\_RP 2 CGACTCGGTGCCACTTTTTC) navržených pro daný úsek vektoru zahrnující místo zaklonování oligonukleotidů, které byly vypůjčeny ze sbírky ÚMTM. PCR reakční směs byla

připravena podle Tab. 6. Obsah byl promíchán vortexováním a centrifugován. Reakce probíhala podle specifických podmínek, které jsou shrnuty v Tab. 7.

Tab. 6: Reakční směs pro amplifikaci cílové sekvence v PX458 (1 reakce = 20  $\mu$ l)

Reagencie	Objem [ $\mu$ l]
10 x Thermo-Start PCR Buffer	2
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,6
10 mM dNTPs	0,4
10 $\mu$ M CRISPR_oligo_control_FP 1	1
10 $\mu$ M CRISPR_oligo_control_RP 2	1
5U/ $\mu$ l Thermo-Start Taq DNA polymeráza	0,4
Templát	50 ng
ddH <sub>2</sub> O	doplnit do 20 $\mu$ l

dNTPs = směs deoxyribonukleotidtrifosfátů (ATP, TTP, GTP a CTP)

Tab. 7: Specifické podmínky pro PCR vektoru PX458

Teplota	Čas	
95 °C	5 min	
95 °C	1 min	35 x opakování
57 °C	30 sek	
72 °C	1 min	
72 °C	3 min	
4 °C	$\infty$	

Za účelem kontroly sekvence zaklonovaného úseku do vektoru byla využita metoda Sangerova sekvenování od společnosti SeqMe™, proto bylo nutné nachystat vzorky k sekvenaci purifikací PCR produktů pomocí kitu QIAquick Mini Elute PCR Purification Kit QIAGEN podle QIAquick Spin Handbook 11/2006.

#### Postup 5: Purifikace PCR produktu

1. 20 µl PCR produktu bylo smícháno se 100 µl PB pufru v 2ml mikrozkušavce (v poměru 1 : 5).
2. Na QIAquick kolona v 2ml sběrné zkumavky byl nanesen vzorek s PB a centrifugován 60 sekund při 13 400 rpm.
3. Proteklý objem byl odstraněn a QIAquick kolona umístěna zpět do stejné sběrné zkumavky.
4. Pro promytí bylo přidáno 750 µl PE pufru a kolona byla centrifugována 60 sekund při 13 400 rpm.
5. Proteklý objem byl odstraněn a kolona umístěna zpět do stejné sběrné zkumavky.
6. Následně byla centrifugována prázdná kolona po dobu 1 min při 13 400 rpm pro vysušení filtru.
7. Kolona byla umístěna do čisté sběrné mikrozkušavky (1,5ml), na filtr kolony bylo rovnoměrně naneseo 20 µl ddH<sub>2</sub>O a kolona byla centrifugována 60 s při 13 400 rpm.
8. Proteklý eluát byl opět rovnoměrně aplikován na kolonu (opakování kroku 7).
9. Koncentrace purifikovaného PCR produktu byla měřena fluorometricky.

Pro každý vzorek byly připraveny dvě reakční směsi podle Tab. 8. Jedna směs obsahovala forward primer a druhá reverse primer.

Tab. 8: Složení reakční směsi k sekvenaci společností SeqMe™ (1 reakce=10 µl)

Reagencie	Objem [µl]
10 mM FP 1 nebo RP 2	2,5 µl
purifikovaný PCR produkt vektoru	50 ng
ddH <sub>2</sub> O	doplnit do 10 µl

FP = forward primer

RP = reverse primer

## 4.4 Transfekce a třídění buněk RPE-1

Vektor PX458 nesoucí sekvenci kódující naváděcí sgRNA pro protein Cas9 byl vnesen transfekcí do buněk linie RPE-1 X-tremeGENE 9 DNA reagentem (Sigma-Aldrich) za účelem indukce změny v exonu 3 genu *RPS19*. V lidských buňkách tento vektor exprimuje nukleoprotein Cas9 s příslušnou sgRNA, jako reporterový gen v tomto vektoru slouží GFP (*angl. green fluorescent protein*).

### 4.4.1 Transfekce buněk RPE-1

Pro tento krok bylo nutné si nachystat do T75 kultivační láhve  $2 \times 10^6$  buněk v 20 ml média MEME (+ pen/strep), aby následujícího dne kultivované buňky dosáhly konfluency 60 %. Toho bylo dosaženo pasáží T125 kultivační láhve, bylo vylito medium obsahující transfekční směs a buňky byly omyty 2 x 5 ml 1 x PBS pufru, následně byly buňky ošetřeny TrypLE a inkubovány 3 min v inkubátoru při 37 °C. TrypLE byl neutralizován 10 ml média. Deadherované buňky v buněčné suspenzi byly spočítány zařízením Vi-cell pro analýzu počtu a viability buněk. Po přenesení příslušného množství buněk do T75 kultivační lahve byl zbytek buněk z T125 láhve dále kultivován. Buňky v T75 určené následující den k transfekci byly inkubovány přes noc v 37 °C a atm. 5,0 % CO<sub>2</sub>.

Následující den dosahovala konfluency buněk určených pro transfekci v T75 kultivačních láhvách 60 %. Transfekční směs byla připravena podle protokolu X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent a to smícháním 1 ml OptiMEM media (medium bez séra a antibiotik) laboratorní teploty, 10 µg plazmidové DNA a 30 µl transfekčního reagentu laboratorní teploty. Tato směs byla inkubována po dobu 20 min při laboratorní teplotě. Následně byla celá transfekční směs aplikována na buňky a dobře promíchána s kultivačním médiem. Buňky byly dále inkubovány 48 hodin v 37 °C a atm. 5,0 % CO<sub>2</sub>.

### 4.4.2 Zamražení RPE-1 buněk

Zmražení bylo provedeno za účelem uchování zbylých netransfekovaných buněk. Při konfluenci buněk nad 80 % byla kultivační láhev zpasážována a deadherované buňky byly centrifugovány v 12 ml falkoně 5 min, při 1620 rpm, v 25 °C. Následně byl odsát supernatant a pelet resuspendován v 900 µl MEME, takto vniklá suspenze byla následně přenesena do zamrazovací zkumavky. Na závěr bylo k obsahu zkumavky přidáno 100 µl DMSO, suspenze byla promíchána a uskladněna v -80 °C.

#### 4.4.2 Třídění pomocí FACS

FACS (*angl. fluorescence-activated cell sorting*) je laboratorní metoda průtokové cytometrie, která umožňuje hodnocení a třídění buněk na základě jejich fluorescence při dopadu laserového paprsku. Buňky byly tříděny pomocí fluorescenčního cytometru BD FASCARIA™ II Mgr. Ivem Frydrychem Ph.D na základě jejich fluorescence v zelené oblasti viditelného světla po excitaci zářením o vlnové délce 395 nm. Emise zeleného světla byla důkazem exprese vektoru PX458, který nesl reporterový gen pro GFP.

Transfekované buňky z kultivační láhve T75 byly pasážovány podle 4.4.1 a obsah láhve byl přenesen do 50 ml falkony a centrifugován 5 min, v 25 °C při 1620 rpm. Nakonec byl supernatant odsát, pelet buněk resuspendován v 750 µl media MEME (+pen/strep) a tato suspenze přenesena do kyvety pro cytometr. GFP-pozitivní buňky byly selektovány do 15ml falkony a následně zpracovány dle postupů v kapitole 4.5.

#### 4.5 Sekvenování exonu 3 genu *RPS19* pomocí metody sekvenování nové generace

Metoda sekvenování nové generace (*angl. Next-Generation Sequencing*, NGS) umožňuje sekvenaci jednotlivých úseků a je schopna poskytnout data procentuálního zastoupení změn ve zkoumaném úseku DNA. Tato metoda byla použita pro zjištění, zdali komplex Cas9 + sgRNA zasáhl cílovou sekvenci, popřípadě jaké změny byly vytvořeny v požadovaném úseku v rámci exonu 3 genu *RPS19*. Před samotnou sekvenací bylo nutné izolovat genomovou DNA z vyselektovaných buněk pomocí kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) podle DNeasy Blood & Tissue Handbook 07/2006 – Postup 6 a dále získat dostatečný počet kopií exonu 3 z těchto buněk k analýze sekvenací. K tomuto účelu byly použity primery (RPS19\_ex3\_FP 3 GGGCATTGGGATATGGGGT; RPS19\_ex3\_RP 4 GTATGGTTTGTGCCAGGGGT), vypůjčené ze sbírky ÚMTM, které amplifikovaly úsek na genu *RPS19* o velikosti 250 bp včetně exonu 3 (101 bp). Nakonec bylo nutné PCR produkty purifikovat – Postup 5 a dodat ve vhodné koncentraci k sekvenaci.

##### 4.5.1 Izolace gDNA z buněk RPE-1 a amplifikace exonu 3 genu *RPS19*

Postup 6: Izolace genomové DNA z tranfekovaných buněk linie RPE-1

1. Po třídění tranfekovaných buněk do falkony (15 ml) s 5 ml MEME media (+ pen/strep) byla falkona centrifugována v 25 °C při 1620 rpm, 5 minut.
2. Supernatant byl odsát a pelet resuspendován v 5 ml 1 x PBS pufru a opět centrifugován v 25 °C, 1620 rpm, 5 minut.

3. Supernatant byl odsát a pelet resuspendován v 200  $\mu$ l 1 x PBS pufru a bylo přidáno 20  $\mu$ l proteinázy K.
4. Suspenze byla přenesena do mikrozkušavky (1,5ml) a k suspenzi bylo přidáno 200  $\mu$ l AL pufru, suspenze byla důkladně promíchána na vortexu a inkubována 10 minut v 56 °C.
5. Do zkumavky se suspenzí bylo přidáno 200  $\mu$ l etanolu (96-100%) a důkladně promícháno na vortexu.
6. Celý obsah mikrozkušavky byl přenesen na kolonu DNeasy Mini Spin, která byla umístěna v 2ml sběrné zkumavce a centrifugována při 13 400 rpm 1 minutu. Proteklý objem byl odstraněn.
7. Na kolonu v nové sběrné zkumavce (2ml) bylo aplikováno 500  $\mu$ l AW1 pufru, kolona byla centrifugována při 13 400 rpm, 1 minutu. Proteklý objem byl odstraněn.
8. Na kolonu v nové sběrné zkumavce (2ml) bylo aplikováno 500  $\mu$ l AW2 pufru, kolona byla centrifugována 14 000 rpm, 3 minuty pro odstranění zbylého pufru ve filtru kolony. Proteklý objem byl odstraněn.
9. Kolona byla umístěna do čisté mikrozkušavky (1,5ml), na filter bylo přidáno 50  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, následovala inkubace 1 minutu při laboratorní teplotě, poté byla celková gDNA eluována centrifugací po dobu 1 minuty při 13 400 rpm.
10. Pro zvýšení výtěžku byl proteklý objem opět pipetován na kolonu, opakování kroku 9.

Pro přípravu vzorku bylo nutné amplifikovat část genu *RPS19* nesoucí exon 3 podle genomové DNA izolované z transfekovaných buněk RPE-1. PCR reakční směs byla připravena podle Tab. 9. Reakce probíhala podle specifických podmínek, které jsou shrnuty v Tab. 10.

Tab. 9: Reakční směs pro amplifikaci cílového úseku v genu *RPS19* zahrnující exon 3 (1 reakce 20  $\mu$ l)

Reagence	Objem [ $\mu$ l]
10 x Thermo-Start PCR Buffer	2
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,6
10 mM dNTPs	0,4
10 $\mu$ M RPS19_ex3_FP 3	1
10 $\mu$ M RPS19_ex3_RP 4	1
5U/ $\mu$ l Thermo-Start Taq DNA polymeráza	0,4
gDNA	50 ng
ddH <sub>2</sub> O	doplnit do 20 $\mu$ l

dNTPs = směs deoxyribonukleotidtrifosfátů (ATP, TTP, GTP a CTP)

Tab. 10: Specifické podmínky pro amplifikaci úseku v genu *RPS19* zahrnující exon 3

Teplota	Čas	
95 °C	5 min	
95 °C	1 min	35 x opakování
57 °C	30 sek	
72 °C	1 min	
72 °C	3 min	
4 °C	∞	

Purifikace PCR produktu byla provedena pomocí kitu QIAquick Mini Elute PCR Purification Kit (Qiagen) podle QIAquick Spin Handbook 11/2006 - Postup 5. Následně byla změřena koncentrace přečištěného produktu na fluorimetru Qubit podle návodu výrobce a provedena elektroforéza v agarozovém gelu při napětí 120V po dobu 45 minut.

#### 4.5.2 Příprava knihovny pro NGS z PCR produktu

Knihovny byla připravena tagmentací purifikovaného PCR produktu z podkapitoly 4.5.1. Příprava byla udělána podle kitu Nextera XT DNA Library Preparation Kit.

## Postup 7 – Příprava knihovny pro NGS

1. Purifikovaný PCR produkt byl 100 x ředěn.
2. Ředěný vzorek a reagenty z kitu byly pipetovány do 0,2ml mikrozkušavky podle Tab.11.

Tab. 11: Reakční směs pro tagmentaci PCR produktu (1 reakce = 10  $\mu$ l)

Reagencie	Objem [ $\mu$ l]
TD pufr	5
ATM	2,5
pur. PCR produkt	2,5

3. Směs byla 5x promíchána pipetou a centrifugována při 2000 rpm, 1 minutu.
4. Zkušavka byla nechána 5 minut v laboratorní teplotě.
5. Po tagmentaci byly vzorek neutralizován 2,5  $\mu$ l NT pufru, směs byla promíchána pipetováním a centrifugována při 2000 rpm, 1 minutu.
6. Následně byla provedena indexační PCR. Do zkušavky byly jednotlivé reagenty pipetovány podle Tab. 12. Reakce proběhla za specifických podmínek podle Tab. 13.

Tab. 12: Reakční směs pro indexační PCR (1 reakce = 12,5  $\mu$ l)

Reagencie	Objem [ $\mu$ l]
NPM	3,75
i7 index primer (společný pro všechny vzorky)	1,25
i5 index primer (lišící se pro konkrétní vzorek)	1,25
tagmentovaný PCR produkt	6,25

Tab. 13: Specifické podmínky pro indexační PCR

Teplota	Čas	
72 °C	3 min	16 x opakování
95 °C	30 sek	
95 °C	10 sek	
55 °C	30 sek	
72 °C	30 sek	
72 °C	5 min	
10 °C	udržení reakce	



7. Ověření úspěšného proběhnutí indexační PCR bylo provedeno fluorometricky na zařízení Qubit v programu dsDNA HS podle postupu výrobce.

Po indexační PCR bylo nutné vzniklé produkty purifikovat pomocí magnetických kuliček SPRI (Beckman Coulter) – Postup 8, aby byly ve vzorku pouze produkty příslušné velikosti pro sekvenační analýzu. Požadovaný produkt měl velikost 250 bp přečištěním byl vzorek zbaven nespecifických produktů a reagensů z předešlých reakcí.

#### Postup 8 – Purifikace pomocí magnetických kuliček SPRI

1. Před použitím byla magnetické kuličky řádně protřepány.
2. Vzorek byl doplněn ddH<sub>2</sub>O na konečný objem 50 µl a převeden do 1,5ml mikrozkuhavky.
3. K 50 µl vzorku bylo přidáno 75 µl roztoku magnetických kuliček a dokonale promícháno pipetováním.
4. Suspenze se inkubovala 3 minuty při laboratorní teplotě.
5. Suspenze v mikrozkuhavce byla umístěna do magnetického stojanu a nechala se magnetizovat do vyčerení.
6. Čirý supernatant byl odpipetován.
7. Do zkuhavky, která byla stále umístěna v magnetické stojanu bylo přidáno 180 µl 80% etanolu.
8. Etanol byl odsát a zbylý etanol se nechal odpařit.
9. Mikrozkuhavka byla vyjmuta z magnetického stojanu a do ní bylo přidáno 20 µl ddH<sub>2</sub>O, uvolněné magnetické kuličky byly důkladně resuspendovány v ddH<sub>2</sub>O a tato suspenze se inkubovala 4 minuty v laboratorní teplotě.
10. Suspenze v mikrozkuhavce byla opět umístěna do magnetického stojanu a nechala se magnetizovat do vyčerení.
11. Čirý supernatant byl odebrán a skladován, ten obsahoval přečištěný vzorek.

Na závěr přípravy knihovny pro NGS byla provedena kvantifikace přečištěných vzorků fluorometrickou metodou pomocí přístroje Qubit v programu dsDNA HS podle postupu výrobce. V tomto stavu byly knihovny předány zaměstnanci ÚMTM, který přípravu knihovny dokončil.

## 4.6 Použité chemikálie

Agar (Oxoid, LP0011)

Agaróza (Sigma Life Science, 9012-36-6)

Ampicilin (Sigma-Aldrich, 69-53-4)

Deionizovaná voda (ddH<sub>2</sub>O)

DMSO (AppliChem Pancreac, 4E013941)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium-DMEM (Sigma Life Science, D5546)

Etanol (Penta)

Fast AP-alkalická fosfatáza (ThermoFisher Scientific, EF0651)

FastDigest *BpiI* (*BbsI*) (ThermoFisher Scientific, FD1014)

FastDigest buffer (ThermoFisher Scientific, FD1014)

Fetální bovinní sérum (Gibco, 10270-106)

GelRed™ (Biotium, 41003)

GeneRuler 1 kb (Thermo Fisher Scientific, SM1331)

Glycerol (Sigma-Aldrich, BC1576)

HyperLadder™ 100 bp (Bioline, BIO-33056)

chlorid hořečnatý – MgCl<sub>2</sub> (ThermoFisher Scientific, AB0908B)

Isopropanol (Lach-Ner)

Loading Dye 6x (ThermoFisher Scientific, R0611)

Luria Broth (LB) Base (Invitrogen, 12790-029)

Magnetické kuličky SPRI (Beckman Coulter, B23318)

Opti-MEM® (Gibco, 31985062)

Směs deoxyribonukleotidů - dNTPs (ThermoFisher Scientific, R0186)

Streptomycin a penicilin (Sigma Aldrich, P4333)

T4 DNA Ligase (New England Biolabs, 101228-176)

T4 DNA Ligase Reaction Buffer + ATP (New England Biolabs, 101228-176)

T4 PNK-polynukleotidkináza (ThermoFisher Scientific, EK0032)

TBE směs (Duchefa Biochemie)

Thermo-Start PCR Buffer (ThermoFisher Scientific, AB0908B)

Thermo-Start Taq DNA polymeráza (ThermoFisher Scientific, AB0908B)

TrypLE (ThermoFisher Scientific, 12605036)

X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Sigma-Aldrich, 06 366 511 001)

#### 4.7 Použité roztoky a jejich složení

LB médium (250 ml):	destilovaná voda .....	250 ml
	LB Base.....	6,25 g
	agar (pro tuhé LB médium).....	3,75 g
1 x PBS pufr:	destilovaná voda .....	1000 ml
	chlorid sodný.....	8 g
	chlorid draselný.....	0,2 g
	hydrogenposforečnan sodný.....	1,42 g
	dihydrogenfosforečnan draselný.....	0,24 g
	pH 7,4	
TBE pufr:	destilovaná voda.....	1000 ml
	TBE směs.....	17,02 g
	pH 8,2 - 8,4	

## 4.8 Použité přístroje

Centrifuga (Eppendorf centrifuge 5810R)

Flowbox pSafe 1.2 (Bioair)

Flowbox-HERA Safe KS (Thermo Scientific)

Flowbox-MS advantage (Thermo Scientific)

Fluorometr Qubit 2.0 (Invitrogen)

Hlubokomrazící box U725 Imowa (New Brunswick)

Chlazená centrifuga Rotina 420R (Schoelter)

Inkubátor (Thermo Scientific)

Lednice (Bosch)

Lednice (Liebherr)

Mikrovlnná trouba (ECG)

Nanofotometr (Implen)

Pipetor (Pipetus)

Pipety a špičky (Eppendorf)

Počítač buněk Vi-Cell XR (Beckman-Coulter)

Sekvenátor Illumina (MiSeq)

Sorter FASCAria (

Stolní centrifuga MiniSpin (Eppendorf)

Světelný mikroskop (Olympus IX51)

Termoblok Genius (Major Science)

Termocyklér C1000 (BioRad)

Transluminátor pro focení Li-COR Odyssey Fc + Software Image Studio 2.0

Transluminátor pro vyříznutí z gelu Gel Logic 1500 (Kodac)

Váhy (Sartorius ED4235-OCE)

Vodní lázeň (Mettler WNB)

Vortex (Labnet International, Inc.)

Zdroj ELFO PowerPac HC (BioRad)

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Sekvence exonu 3 genu *RPS19* a návržení oligonukleotidů kódující sgRNA

Pomocí online softwaru ChopChop byly lokalizovány úseky v exonu 3 v rámci genu *RPS19* (NG\_007080) (pozice v genu *RPS19* 6194-6294) na chromozomu 19 vhodné k editaci nukleoproteinem Cas9. Vybrané úseky byly umístěny nejbližší bázím v pozicích 95, 96 a 97 v rámci exonu 3, tento triplet je místem mutace R56Q u pacientů s Diamond-Blackfanovou anémií.

Sekvence exonu 3 genu *RPS19* se zvýrazněným zdravým tripletem (a) bazí a tripletem nesoucí u pacientů s Diamond-Blackfanovou anémií mutaci R56Q (b) (zvýrazněny jsou pozice bazí 95, 96 a 97 v rámci exonu 3):

#### a) Zdravý typ

```
GTCCGGGAAGCTGAAAGTCCCCGAATGGGTGGATACCGTCAAGCTGGCCAAGCACAAAGAGCTTGCTCCCTACGA  
TGAGAACTGGTTCTACACGCGAGCTG
```

#### b) Mutovaný typ

```
GTCCGGGAAGCTGAAAGTCCCCGAATGGGTGGATACCGTCAAGCTGGCCAAGCACAAAGAGCTTGCTCCCTACGA  
TGAGAACTGGTTCTACACGCAAGCTG
```

Ze třinácti lokalizovaných sekvencí, obsahující PAM sekvenci byly vybrány čtyři vhodné cílové sekvence označeny čísly 3, 4, 5 a 6 na základě vzdálenosti od bázi 95, 96 a 97 v rámci genu, předpovídané účinnosti zásahu v sekvenci, počtu potenciálních mimocílových vazeb naváděcích sgRNA, autokomplementarity sgRNA a procentuálního zastoupení GC (%) v rámci cílové sekvence, ja je uvedeno v Tab. 14.

Tab. 14: Vybrané cílové sekvence a jejich vlastnosti

Označení	Cílová sekvence	Vláknko	GC (%)	Off-targets				Účinnost
				0**	1**	2**	3**	
3	ATGGGTGGATACCGTCAAGCT <b>TGG</b>	+	57	1*	2*	0*	1*	0,55
4	TTTGTGCTTGGCCAGCTTGAC <b>CGG</b>	-	57	3*	0*	0*	1*	0,48
5	TAGAACCAGTTCTCATCGTAG <b>GGG</b>	-	48	1*	2*	0*	2*	0,44
6	TTGCTCCCTACGATGAGAAC <b>TGG</b>	+	52	2*	0*	2*	1*	0,51

Off-targets sloupec znázorňuje \*počet potenciálních mimocílových vazeb v rámci lidského genomu lidské a \*\* znázorňuje počet chyb párování v rámci těchto mimocílových působení. Sloupec „Vláknko“ udává umístění sekvence na vlákně - templátové (-), kódující (+). Tučně zvýrazněné jsou PAM sekvence. Konkrétní umístění a sekvence identifikovaných vazebných míst jsou uvedeny v Přílohy – 10.2.

Naváděcí sgRNA pro všechny cílové sekvence nevykazovaly žádnou autokomplementritu, jejich *self-complementary* index byl 0. Na základě orientace vlákna cílové sekvence byly pak navrženy a objednány oligonukleotidy, kódující naváděcí sgRNA.

Schéma 1: Cílové sekvence naváděcí sgRNA v rámci exonu 3 (5'-3')

a) Cílová sekvence sgRNA kódovaná oligonukleotidem 3

↓

GTCCGGGAAGCTGAAAGTCCCCGAATGGGTGGATACCGTCAAGCTGGCCAAGCACAAAGAGCTTGCTCCCTACGA  
 TGAGAACTGGTTCTACACG**CGA**GCTG

b) Cílová sekvence sgRNA kódovaná oligonukleotidem 4

(Pozn.: cílová sekvence s PAM sekvencí je v tomto případě na nekódujícím vlákně, zvýrazněna je k ní komplementární sekvence na kódujícím vlákně)

↓

GTCCGGGAAGCTGAAAGTCCCCGAATGGGTGGATACCGTCAAGCTGGCCAAGCACAAAGAGCTTGCTCCCTACGA  
 TGAGAACTGGTTCTACACG**CGA**GCTG

c) Cílová sekvence sgRNA kódovaná oligonukleotidem 5

(Pozn.: cílová sekvence s PAM sekvencí je v tomto případě na nekódujícím vlákně, zvýrazněna je k ní komplementární sekvence na kódujícím vlákně)

↓

GTCCGGGAAGCTGAAAGTCCCCGAATGGGTGGATACCGTCAAGCTGGCCAAGCACAAAGAGCTTGCTCCCTACGA  
 TGAGAACTGGTTCTACACG**CGA**GCTG

d) Cílová sekvence sgRNA kódovaná oligonukleotidem 6

↑

GTCCGGGAAGCTGAAAGTCCCCGAATGGGTGGATACCGTCAAGCTGGCCAAGCACAAAGAGCTTGCTCCCTACGA  
 TGAGAACTGGTTCTACACG**CGA**GCTG

Pozn.: šipky znázorňují předpokládaná místa stříhu proteinem Cas9, podtržené sekvence jsou cílové sekvence naváděcí sgRNA

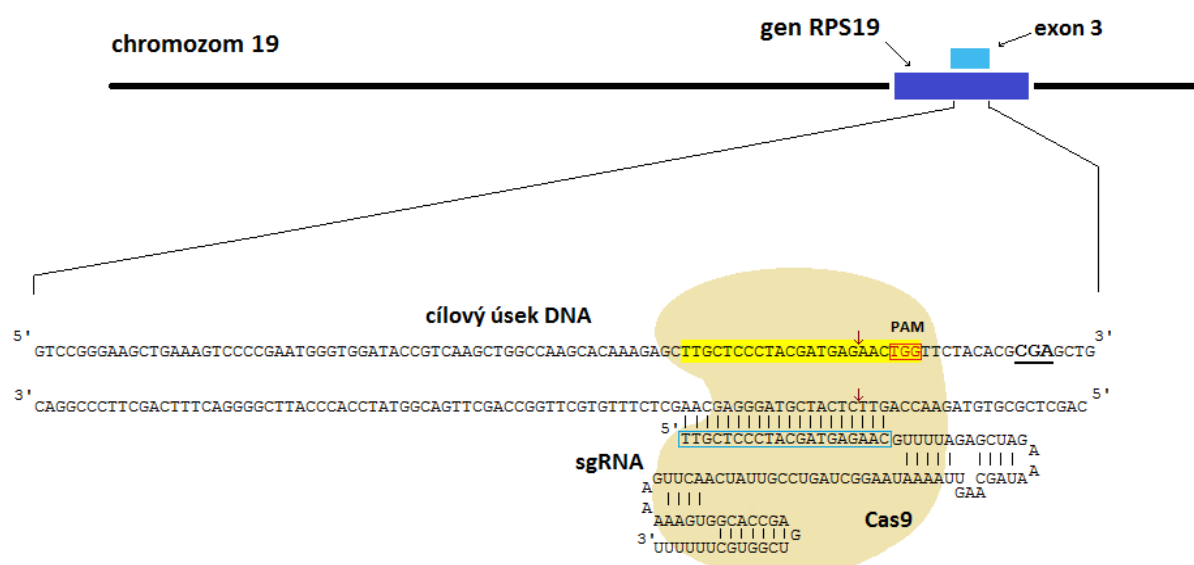
Po lokalizaci příslušných cílových sekvencí a analýze, jak protein Cas9 interaguje s danou sekvencí DNA, byly navrženy oligonukleotidy s adaptory pro snadné zaklonování do vektoru PX458 podle Tab. 15.

Tab. 15: Sekvence oligonukleotidů s přidáním lepivými konci

Označení	Sekvence (kódující vlákno vektoru: 5'-3')	Sekvence (templátové vlákno: 5'-3')
3	CACCGATGGGTGGATACCGTCAAGC	AAACGCTTGACGGTATCCACCCATC
4	CACCGTTTGTGCTTGGCCAGCTTGA	AAACTCAAGCTGGCCAAGCACAAAC
5	CACCGTAGAACCAGTTCTCATCGTA	AAACTACGATGAGAACTGGTTCTAC
6	CACCGTTGCTCCCTACGATGAGAAC	AAACGTTTCTCATCGTAGGGAGCAAC

Přidané adaptérové konce jsou zvýrazněny červeně, kódující oligonukleotidy pro sgRNA jsou černě.

Obr. 19: Vazba sgRNA kódovaná oligonukleotidem 3 na cílovou sekvenci



Cílový úsek na exonu 3, který obsahuje PAM sekvenci (červeně) je znázorněn žlutě. Naváděcí část sgRNA kódovaná oligonukleotidem 3 je ohraničena modře. Místa stříhu proteinu Cas9 jsou vyznačena červenými šipkami.

## 5.2 Příprava vektoru PX458 a klonování DNA kódující sgRNA

### 5.2.1 Izolace vektoru PX458

Vektor byl izolován ze 100 ml přesnoční kultury *E.coli* kmene DH5 $\alpha$  kitem HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen). Koncentrace izolovaného vektoru v roztoku o objemu 250  $\mu$ l byla změřena spektrofotometricky. Naměřená hodnota koncentrace byla 404 ng/ $\mu$ l.

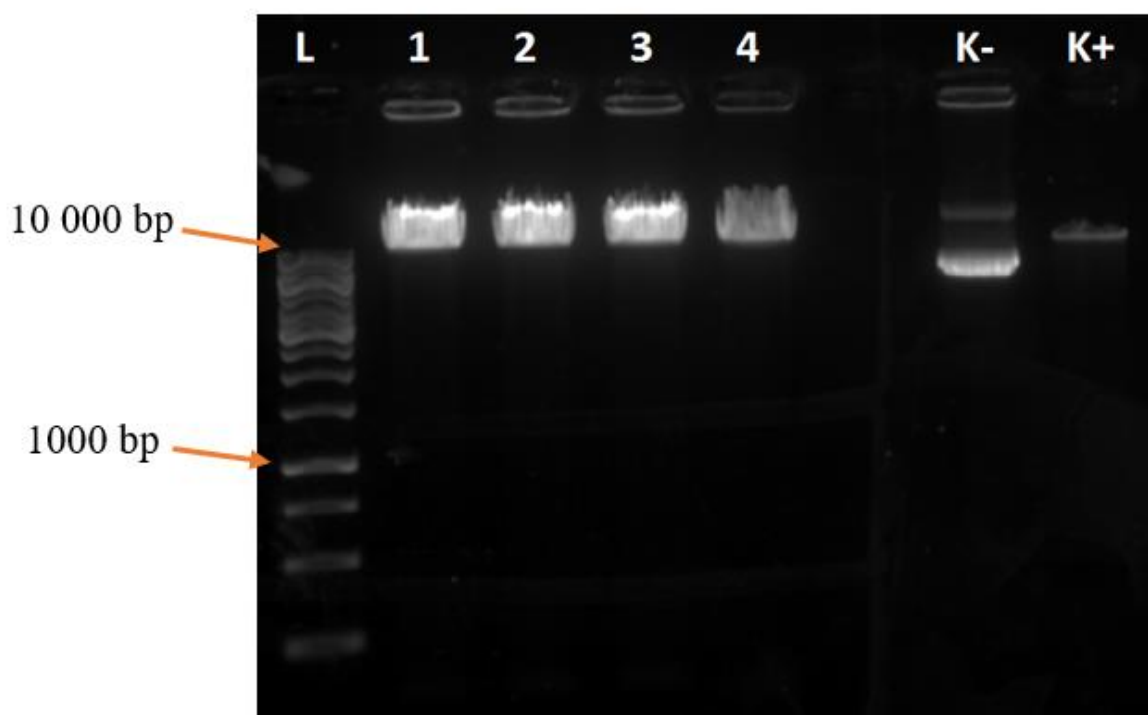
### 5.2.2 Restrikce vektoru PX458

Restrikce izolovaného vektoru PX458 vektor (404 ng/ $\mu$ l) byla provedena ve 4 opakováních. V každé reakci byl 1  $\mu$ g (2,475  $\mu$ l) vektoru ošetřen restriční endonukleázou

*Bbs*I (10U/μl) a alkalickou fosfatázou (1U/μl). Produkty restrikce byly rozděleny elektroforetickou separací v agarózovém gelu pro odlišení stříhaného a nestříhaného vektoru, viz Obr. 20. Kruhový vektor má velikost 9289 bp. Vektor PX458 po ošetření má velikost 9266 bp a je lineární.

Kruhový vektor v nadšroubovicovém stavu migruje gelem rychleji než lineární a než kruhový v rozvolněném stavu. Na Obr. 20 ve sloupci K<sup>+</sup> (pozitivní kontrola) lze pozorovat utvoření bandu znázorňující lineární stav vektoru. V K<sup>-</sup> (negativní kontrola) sloupci lze pozorovat band kruhového vektoru v nativním stavu, který migruje v gelu pomaleji kvůli jeho velkému povrchu. Dále ve sloupci lze pozorovat band vektoru ve stavu nadšroubovice, ten migruje v gelu rychleji kvůli jeho kompaktnímu stavu a tím i menšímu povrchu. Jamky 1 až 4 jsou separované produkty restrikce a defosforylace.

Obr. 20: Produkty restrikce a defosforylace vektoru PX458 s negativní a pozitivní kontrolou



L= ladder GeneRuler 1 kb, 1-4 separované produkty restrikce, K<sup>-</sup> = negativní kontrola/cirkulární vektor PX458 – nativní stav a nadšroubovice, K<sup>+</sup> = pozitivní kontrola/linearizovaný vektor PX458

Produkty restrikce byly extrahovány z gelu (QIAquick Gel Extraction Kit). Spektrofotometricky změřená koncentrace extrahovaného vektoru PX458 byla 35,1 ng/μl.



### 5.2.3 Příprava komplementárních oligonukleotidů

Příprava zahrnovala hybridizaci a fosforylaci navržených oligonukleotidů z kapitoly 5.1. Hybridizace a fosforylace daných párů oligonukleotidů a konečná koncentrace dvouvláknového produktu hybridizace je zahrnuta v Tab. 16.

Tab.16: Koncentrace dvouvláknových oligonukleotidů po hybridizaci

Hybridizace a orientace vláken		Koncentrace dvouvláknového produktu
5'-3'	3'-5'	
CRISPR oligo_3 A	CRISPR oligo_3 B	49,4 ng/μl
CRISPR oligo_4 A	CRISPR oligo_4 B	51 ng/μl
CRISPR oligo_5 A	CRISPR oligo_5 B	50 ng/μl
CRISPR oligo_6 A	CRISPR oligo_6 B	65,6 ng/μl

### 5.2.4 Ligace hybridizovaných oligonukleotidů do vektoru PX458, transformace bakterií a izolace vektoru

Ligační reakce proběhla s 10 μl vektoru PX458 (35,1 ng/μl) ošetřeného restriční endonukleázou *Bpi*I a 4,7 ng oligonukleotidu (inzertu) ředěného podle Tab. 17.

Tab. 17: Ředění roztoků oligonukleotidu pro ligační směs

Inzert	Koncentrace po ředění 1:9	Objem v ligační reakci
Oligonukleotid 3	4,94 ng/μl	1 μl
Oligonukleotid 4	5,1 ng/μl	0,9 μl
Oligonukleotid 5	5 ng/μl	0,9 μl
Oligonukleotid 6	6,56 ng/μl	0,7 μl

Po přesnoční ligaci byly pipetovány 4 μl ligační směsi každé varianty vektoru s daným inzertem k bakteriím *E. coli* kmene DH5α a byla provedena přesnoční selekce na Petriho misce s ampicilinem. Dále byly připraveny negativní a pozitivní kontrola. Pozitivní kontrola byly bakterie transformované vektorem PX458 bez inzertu. Negativní kontrola byla v podobě netransformovaných bakterií kultivovaných na v Petriho misce bez antibiotik. Následující den bylo možné na všech miskách pozorovat nárůst bílých kolonií.

Tekutá kultura byla založena odpíchnutím jedné kolonie z každé Petriho misky bakterií nesoucích vektor s daným inzertem.

Po izolaci plazmidové DNA – vektoru ze 100 ml bakteriální suspenze byla výsledná koncentrace změřena spektrofotometricky na přístroji NanoDrop. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 18.

Tab. 18: Koncentrace izolované plazmidové DNA

Vektorem s inzertem	Koncentrace
PX458 + oligonukleotid 3	1229,3 ng/μl
PX458 + oligonukleotid 4	1203,3 ng/μl
PX458 + oligonukleotid 5	1091 ng/μl
PX458 + oligonukleotid 6	1311,5 ng/μl

Jelikož velikost vystřihnutého fragmentu z vektoru PX458 po působení restriční endonukleázou *Bpi*I byla 23 bp a velikost vloženého inzertu 25 bp, bylo nutné ověřit úspěšnou ligaci inzertu Sangerovým sekvenováním. Získané údaje o sekvencích potvrdily úspěšné vložení všech oligonukleotidů do vektoru PX458. Výsledky sekvenování - Přílohy 10.1.

#### 4.4 Transfekce a třídění buněk s následnou analýzou exonu 3

##### 5.3.1 Transfekce a třídění transfekovaných buněk RPE-1

Buňky linie RPE-1 byly transfekovány ve čtyřech T75 kultivačních lahvích, každá láhev byla transfekována vektorem PX458 nesoucí jeden ze 4 oligonukleotidů. Pro každou láhev obsahovala transfekční směs 10 μg vektoru podle doporučení výrobce X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagentu. Objemy použitého vektoru do transfekční směsi jsou shrnuty v Tab. 19.

Tab. 19: Použité objemy vektoru PX458 v transfekční směsi

Vektor s inzertem	Objem
PX458 + Oligonukleotid 3	8,2 μl
PX458 + Oligonukleotid 4	8,3 μl
PX458 + Oligonukleotid 5	9,2 μl
PX458 + Oligonukleotid 6	7,6 μl

Po transfekci byly buňky tříděny na základě intenzity emise zeleného světla. Účinnost transfekce je shrnuta v Tab. 20.

Tab. 20: Účinnost transfekce buněk linie RPE-1 vektorem PX458 + oligonukleotid

Inzert v PX458	Celkový počet buněk	Počet transfekovaných b.	Účinnost [%]
Oligonukleotid 3	$9,23 \cdot 10^6$	$1,65 \cdot 10^6$	17,9
Oligonukleotid 4	$9,4 \cdot 10^6$	$2,33 \cdot 10^6$	24,8
Oligonukleotid 5	$9,07 \cdot 10^6$	$1,673 \cdot 10^6$	18,4
Oligonukleotid 6	$8,7 \cdot 10^6$	$1,86 \cdot 10^6$	21,5
Průměrná účinnost transfekce			20,65

### 5.3.2 PCR amplifikace exonu 3 genu *RPS19* a purifikace PCR produktu

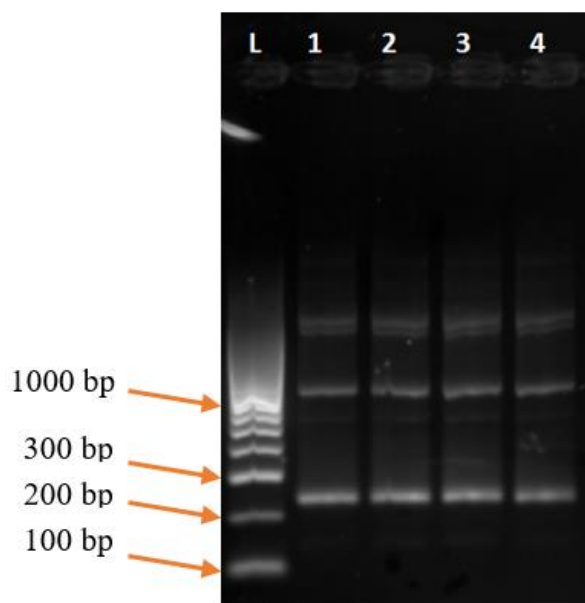
Z transfekovaných buněk byla izolována genomová DNA (gDNA), která následně sloužila jako templát do PCR reakce (4 pro každý vzorek). Koncentrace izolované gDNA a PCR produktu po přečištění jsou uvedeny v Tab. 21.

Tab. 21: Koncentrace izolované gDNA a PCR produktů po purifikaci

DNA z buněk transfekovaných vektorem s inzertem	Koncentrace gDNA	Koncentrace PCR produktu po purifikaci
PX458 + Oligonukleotid 3	839 ng/μl	102 ng/μl
PX458 + Oligonukleotid 4	780 ng/μl	89 ng/μl
PX458 + Oligonukleotid 5	440 ng/μl	85,2 ng/μl
PX458 + Oligonukleotid 6	553 ng/μl	88,4 ng/μl

Pro ověření velikosti produktu byla po přečištění provedena elektroforéza v agarózovém gelu. Na Obr. 21 je elektroforetogram separovaných produktů PCR genomové DNA.

Obr. 21: Elektroforetogram separace PCR produktů po purifikaci



L = ladder HyberLadder 100 bp, 1 = separovaný produkt PCR exonu 3 buněk ošetřených vektorem PX458 + oligonukleotid 3, 2 = separovaný produkt PCR exonu 3 buněk ošetřených vektorem PX458 + oligonukleotid 4, 3 = separovaný produkt PCR exonu 3 buněk ošetřených vektorem PX458 + oligonukleotid 5, 4 = separovaný produkt PCR exonu 3 buněk ošetřených vektorem PX458 + oligonukleotid 6

### 5.3.3 Příprava knihovny pro NGS

Purifikované PCR produkty byly 100x zředěny a tagmentovány. Pro následnou indexační PCR byly vybrány indexové primery, které jsou uvedeny v Tab. 22 (i7 index společný pro všechny vzorky, i5 index specifický). Koncentrace produktů indexační PCR jsou uvedeny v Tab. 23. PCR produkty pro sekvencování budou následně označeny čísly (3-6) podle linie buněk, ze kterých sekvence pocházejí.

Tab. 22: Indexační primery daných vzorků

Purifikovaný PCR produkt	Indexační primer i7	Indexační primer i5
3	N703	S505
4	N703	S506
5	N703	S507
6	N703	S508

Tab. 23: Koncentrace produktů indexační PCR

Produkt indexační PCR	Koncentrace [ng/μl]
3	25,4
4	23
5	19,4
6	23,2

Koncentrace produktu indexační PCR po purifikaci na magnetických kuličkách jsou uvedeny v Tab. 24.

Tab. 24: Koncentrace produktů indexační PCR po purifikaci

Produkt indexační PCR	Koncentrace [ng/μl]
3	5,91
4	7,95
5	4,86
6	7,5

#### 5.3.4 Sekvence exonu 3 genu *RPS19* pomocí metodou Next-Generation Sequencing

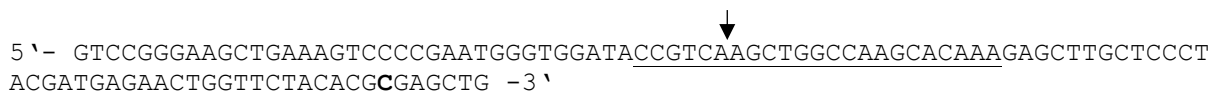
Sekvenční analýza ampliconů exonu 3 nepotvrdila zvýšený výskyt změn v této oblasti genu *RPS19* u 3 ze 4 modifikovaných míst po porovnání s referenčním lidským genomem GRCh38/hg38. Podle Tab. 25 pouze konstrukt vektoru PX458 a vloženého oligonukleotidu 4 vykazoval vznik indel (inzerce/delece) mutace v 6,93 % z celkového počtu 317 196 mapovaných sekvencí. Minimální hranice procentuálního zastoupení změn byla 5 %. Jiné typy mutací touto analýzou nemohly být analyzovány.

Tab. 25: Výsledky sekvenční analýzy

Číslo buněčné linie/ oligonuklotidu	3	4	5	6
Procentuální zastoupení indel mutací [%]	0	6,93	0	0
Celkový počet mapovaných sekvencí	381806	317196	318610	287856
Množství analyzovaných sekvencí z celkového počtu mapovaných sekvencí [%]	98,68	98,48	98,51	98,68

Schéma 2: Označení cílové sekvence sgRNA kódované oligonukleotidem 4 a místo změny v exonu 3

5´- GTCCGGGAAGCTGAAAGTCCCCGAATGGGTGGATACCGTCAAGCTGGCCAAGCACAAAGAGCTTGCTCCCT  
ACGATGAGAACTGGTTCTACACGCGAGCTG -3´



Pozn.: Cílová sekvence sgRNA kódované oligonukleotidem 4 je podtržena, šipka znázorňuje místo stříhu proteinu Cas9 a zároveň místo nejvyšší četnosti změn.

Pozorované změny v sekvenci nastávaly za bazí 41861152 v rámci chromozomu 19, což odpovídá pozici 41. báze v rámci exonu 3 genu *RPS19*, jak je znázorněno ve Schématu 2.

## 6 DISKUZE

Bodová mutace v pozici 96 v rámci exonu 3 genu *RPS19* je jedna z mutací způsobující Diamond - Blackfanovu anémii – onemocnění kmenových krvetvorných buněk (Cmejla *et al.*, 2000). Cílem experimentální části této práce bylo vytvořit dvouvláknový zlom a indukovat tak NHEJ opravu v blízkosti pozice 96 v exonu 3. Tato změna v kódující oblasti by měla vyvolat vypnutí (*angl. knock-out*) genu *RPS19*. Pro tyto účely byly navrženy oligonukleotidy, kódující naváděcí sgRNA pro protein Cas9. Předpokládanými cíly těchto sgRNAs jsou kódující či nekódující vlákno v rámci exonu 3 podle přítomnosti PAM sekvence nezbytné pro úspěšné navázání proteinu Cas9. Změny v cílových úsecích exonu by potvrdily správnou funkci naváděcích sgRNAs a dále by se s nimi potenciálně dalo pracovat při změně sekvence v pozicích 95, 96 a 97 podle konkrétního navrženého homologního templátu.

Po identifikaci vhodných sekvencí v rámci exonu 3 genu *RPS19* v online softwaru ChopChop a CRISPR design byly výsledky vzájemně srovnány a vzhledem k podobným výsledkům byly vybrány konkrétní sekvence.

Úspěšné vložení navržených oligonukleotidů do vektoru bylo potvrzeno sekvenováním podle Sangerova (Přílohy - 10.1). U všech analýz čtení sekvence od forward primeru byly silné signály a sekvence byly jasně čitelné. Čtení sekvencí od reverse primerů u všech vzorků mělo horší rozlišení signálu a sekvence musely být čteny manuálně podle výšky křivek elektroforetogramu, ale i přesto byla přítomnost zkoumané sekvence potvrzena.

Další postup zahrnoval transfekci imortalizovaných buněk linie RPE-1 cílovými vektory. Účinnost transfekce byla dostačující vzhledem k velkému počtu buněk, průměrně se pohybovala kolem 20 %, jak lze vidět v Tab. 20, což je dostatečné vzhledem k relativně obtížné transfekovatelnosti buněk RPE-1. Obvykle je přenos DNA do těchto buněk prováděn elektroporací, jejíž účinnosti je v řádu jednotek procent (Chiang *et al.*, 2016).

Úsek zahrnující exon 3 genu *RPS19* byl amplifikován a separován v agarózovém gelu, což potvrzuje Obr. 21. Elektroforetogram na Obr. 21 znázorňuje separaci produktů amplifikace z genomické DNA. Cílový úsek měl velikost 250 bp, další rozdělené produkty byly větší než 1000 bp. Jednalo se o nespecifické produkty amplifikace, ne o rozsáhlé změny v podobě inzercí do upravovaného úseku, protože je velmi nepravděpodobné, aby ke stejnému prodloužení došlo ve všech liniích buněk, které byly ošetřeny vektory cílené na odlišné oblasti v exonu. Nespecifické amplifikaci velkých produktů se dalo předejít zpřísněním podmínek, jako je například: zvýšení teploty hybridizace primerů, zkrácení času syntézy, snížení koncentrace

templátu a primerů zároveň. Amplifikace mohla být dále zpřesněna použitím polymerázy s *proofreading* aktivitou, například *Pfu* polymerázy (Lorenz, 2012).

Před samotnou sekvenací byly produkty větší než 300 bp odstraněny a takto purifikované produkty byly použity k přípravě sekvenační knihovny.

Výsledky sekvenování potvrdily změny pouze při použití jednoho ze čtyř vytvořených vektorů, a to vektoru nesoucího oligonukleotid 4. Podařilo se tedy navrhnout jeden funkční konstrukt cílící na studovaný exon. Důvodem neúspěšné detekce změn sekvence v exonu 3 konstrukty s oligonukleotidy 3,5 a 6 může být jejich nefunkčnost v *in vivo* podmínkách. Nebo naopak neúspěšná detekce může být zapříčiněna funkčností konstruktů a účinností jejich zásahu do DNA, s tím že tyto zásahy způsobily smrt buňky. Poškození genu *RPS19*, které vede k jeho vypnutí, může totiž způsobit vznik rakoviny nebo apoptózu (Danilova *et al.*, 2014; Goudarzi *et Lindstrom*, 2016). Jediná mutace způsobená konstruktem nesoucím oligonukleotid 4 nemusela mít tak zásadní dopad na viabilitu buňky.

Dalším důvodem smrti buněk mohly být nespecifické vazby proteinu Cas9 s daným sgRNA v rámci genomu, které zapříčinily mutace v životně důležitých genech pro buňku, umístění dalších vazebných míst konstruktů je uvedeno v Přílohy – 10.2.

Dalším problémem při analýze změn v exonu je skutečnost, že gDNA byla izolována ze suspenze buněk, které byly vybrány na základě signálu GFP. Dané buňky mohly CRISPR konstrukt exprimovat, ale samotná exprese vektoru neznamena tvorbu změny v DNA. Suspenze tříděných buněk byla tedy složena z buněk se změnou v sekvenci DNA a buněk beze změny, to znesnadnilo analýzu konkrétních změn v DNA kvůli vysokému zastoupení přirozené varianty sekvence. Také je možné zpřísnit podmínky třídění transfekovaných buněk, vybírat pouze živé buňky, které vykazují vysokou expresi reporterového genu pro GFP, a tím zvýšit účinnost tohoto kroku (Chiang *et al.*, 2016) nebo by bylo vhodné vytvořit monoklonální linii buněk na základě GFP signálu pomocí průtokové cytometrie (Ran *et al.*, 2013).

Z výsledků nelze určit, zdali v případě buněk ošetřených konstruktem s oligonukleotidem 4 došlo k vypnutí genu *RPS19*. Pro potvrzení úspěšného vypnutí mohla být použita analýza exprese genu pomocí RT-PCR (PCR s reverzní transkripcí) prepisem mRNA daného genu do cDNA a následnou kvantifikací změn použitím specifické próby pro přirozenou variantu sekvence v rámci exonu 3 (Lee *et al.*, 2016). Popřípadě by bylo možné cDNA osekvenovat a tím zjistit konkrétní změny v sekvenci (Deltcheva *et al.*, 2011). Další možností detailnější analýzy změny v požadované sekvenci je použití CRISPR konstruktů společně se syntetickým homologním templátem pro homologně řízenou opravu o dostatečné minimální velikosti (60 bp), aby byl při prepisu podle templátu pozměněn především triplet na pozici 95.,



96. a 97. báze v exonu 3. Přepsání konkrétní sekvence do požadovaného úseku DNA by umožnilo zaměřit se pouze na předem známou sekvenci, což by zjednodušilo identifikaci změn sekvenováním (Ran *et al.*, 2013) nebo AS-PCR (*angl. allele specific PCR*) pro kvantifikaci bodových mutací po zásahu CRISPR konstruktem pomocí fluorescenčně značených práb nasedající na možné varianty sekvence (Nazarenko *et al.*, 2002). Všechny výše navrhované postupy je také nutné aplikovat při studiu mimocílového působení konstruktů, aby se předešlo nežádoucím změnám v genomu buňky. Pokud jsou po důkladném ověření konstrukty účinné a pro buňku bezpečné, lze je aplikovat pro tvorbu transgenních organismů. V současné době se již podobně ověřené konstrukty používají i pro tvorbu *knock-out* organismů (Li *et al.*, 2013).

## 7 ZÁVĚR

Experimentální část této bakalářské práce byla věnována editaci sekvence exonu 3 genu *RPS19* pomocí CRISPR/Cas9 systému v buňkách imortalizované buněčné linie RPE-1. Čtyři sekvence oligonukleotidů označeny 3, 4, 5 a 6 navádějící protein Cas9 byly navrženy na základě analýzy online softwaru ChopChop a úspěšně vloženy do expresního vektoru PX458.

Buňky RPE-1 byly transfekovány vektory s vloženými oligonukleotidy a na základě fluorescence tříděny průtokovým cytometrem. Průměrná účinnost transfekce byla 20,65 %. Po izolaci genomové DNA a amplifikaci úseku zahrnující exon 3, byla účinnost konstruktů vektoru s danými oligonukleotidy analyzována sekvenováním další generace.

Sekvenační analýza ukázala, že pouze jeden ze čtyř konstruktů s navrženými oligonukleotidy, a to vektor s vloženým oligonukleotidem 4, se dá klasifikovat jako funkční, tedy kódující účinnou sgRNA navádějící Cas9 na požadovanou sekvenci. Jako jediný vytvořil mutace v podobě inzercí či delecí s četností 6,93 % z celkového počtu 312 374 mapovaných sekvencí. U zbylých tří konstruktů s oligonukleotidy 3, 5 a 6 nebyly detekovány mutace v podobě inzercí či mutací. Pro budoucí práci bude využit pouze konstrukt nesoucí sgRNA číslo 4 a to např. při ko-transfekci s použitím homologního templátu. Vypnutí genu konstruktem s oligonukleotidem 4 se nepodařilo sekvenováním potvrdit.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aliyari, R., Ding, S. (2009). RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors. *Immunological Reviews*, 227(1), pp.176-188.
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C., Feng, Y., Kennedy, P., Murphy, P., Berger, E. (1996). CC CKR5: A RANTES, MIP-1, MIP-1 Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1. *Science*, 272(5270), pp.1955-1958.
- Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513(7519), 569–573.
- Athyros, V., Kakafika, A., Tziomalos, K., Karagiannis, A., Mikhailidis, D. (2008). Antisense technology for the prevention or the treatment of cardiovascular disease: The next blockbuster?. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 17(7), pp.969-972.
- Avery, O., MacLeod C., M., McCarty M., (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *Journal of Experimental Medicine*, 79(2), pp.137-158.
- Bae, K., Do Kwon, Y., Shin, H., Hwang, M., Ryu, E., Park, K., Yang, H., Lee, D., Lee, Y., Park, J., Sun Kwon, H., Kim, H., Yeh, B., Lee, H., Hyung Sohn, S., Yoon, J., Seol, W., Kim, J. (2003). Human zinc fingers as building blocks in the construction of artificial transcription factors. *Nat. Biotechnol*, 21(3), pp.275-280.
- Barmania, F., Pepper, M. (2013). C-C chemokine receptor type five (CCR5): An emerging target for the control of HIV infection. *Applied & Translational Genomics*, 2, pp.3-16.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D., Horvath, P. (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, 315(5819), pp.1709-1712.
- Bartoszewski, G., Niedziela, A., Szwacka, M., Niemirowicz-Szczytt, K. (2003). Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gene from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Plant Breeding*, 122(4), pp.347-351.
- Bedell, V., Wang, Y., Campbell, J., Poshusta, T., Starker, C., Krug II, R., Tan, W., Penheiter, S., Ma, A., Leung, A., Fahrenkrug, S., Carlson, D., Voytas, D., Clark, K., Essner, J., Ekker, S. (2012). In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, 491(7422), pp.114-118.
- Balakier, H., MacLusky, NJ., Casper, R.F. (1993) Characterisation of the first cell cycle in human zygotes: implications for cryopreservation. *Fertility and Sterility*, 59, 359—365
- Beloglazova, N., Brown, G., Zimmerman, M., Proudfoot, M., Makarova, K., Kudritska, M., Kochinyan, S., Wang, S., Chruszcz, M., Minor, W., Koonin, E., Edwards, A., Savchenko, A., Yakunin, A. (2008). A Novel Family of Sequence-specific Endoribonucleases Associated with the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. *Journal of Biological Chemistry*, 283(29), pp.20361-20371.
- Bevan, M. (1984). Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*, 12(22), pp.8711-8721.
- Bibikova, M., Carroll, D., Segal, D., Trautman, J., Smith, J., Kim, Y., Chandrasegaran, S. (2001). Stimulation of Homologous Recombination through Targeted Cleavage by Chimeric Nucleases. *Molecular and Cellular Biology*, 21(1), pp.289-297.
- Biolabs, N. (2016). *CRISPR/Cas9 and Targeted Genome Editing: A New Era in Molecular Biology | NEB*. [online] Neb.com. Available at: <https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology> [Použito 9. října 2016].
- Bitinaite, J., Wah, D., Aggarwal, A., Schildkraut, I. (1998). *FokI* dimerization is required for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18), pp.10570-10575.
- Boch, J., Bonas, U. (2010). Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annual Review Phytopathology*., 48(1), pp.419-436.

- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., Bonas, U. (2009). Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science*, 326(5959), pp.1509-1512.
- Bogdanove, A., Voytas, D. (2011). TAL Effectors: Customizable Proteins for DNA Targeting. *Science*, 333(6051), pp.1843-1846.
- Bolotin, A., Ehrlich, S., Quinquis, B., Sorokin, A. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8), pp.2551-2561.
- Bonas, U., Stall, R., Staskawicz, B. (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Genetics and Genomics*, 218(1), pp.127-136.
- Brasaemle, D., Subramanian, V., Garcia, A., Marcinkiewicz, A., Rothenberg, A. (2008). Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 326(1-2), pp.15-21.
- Brown, R.S., Sander, C., Argos, P. (1985). The primary structure of transcription factor TFIIIA has 12 consecutive repeats. *FEBS Lett.* 186, 271-274.
- Byrne, S., Ortiz, L., Mali, P., Aach, J., Church, G. (2014). Multi-kilobase homozygous targeted gene replacement in human induced pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Research*, 43(3), pp.e21-e21.
- Campbell, K., McWhir, J., Ritchie, W., Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380(6569), pp.64-66.
- Carlson, D., Tan, W., Lillico, S., Stverakova, D., Proudfoot, C., Christian, M., Voytas, D., Long, C., Whitelaw, C., Fahrenkrug, S. (2012). Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(43), pp.17382-17387.
- Cermak, T., Doyle, E., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J., Somia, N., Bogdanove, A., Voytas, D. (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research*, 39(12), pp.e82-e82.
- Chen, B., Gilbert, L., Cimini, B., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G., Park, J., Blackburn, E., Weissman, J., Qi, L., Huang, B. (2013). Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System. *Cell*, 155(7), pp.1479-1491.
- Chiang, T., le Sage, C., Larrieu, D., Demir, M., Jackson, S. (2016). CRISPR-Cas9D10A nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing. *Scientific Reports*, 6(1).
- Chylinski, K., Makarova, K. S., Charpentier, E., Koonin, E. V. (2014). Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 42(10), 6091-6105.
- Ciccia, A., Elledge, S. (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell*, 40(2), pp.179-204.
- Cmejla, R., Blafkova, J., Stopka, T., Zavadil, J., Pospisilova, D., Mihal, V., Petrylova, K., Jelinek, J. (2000). Ribosomal Protein S19 Gene Mutations in Patients with Diamond-Blackfan Anemia and Identification of Ribosomal Protein S19 Pseudogenes. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 26(2), pp.124-132.
- Cockrell, A., Kafri, T. (2007). Gene delivery by lentivirus vectors. *Molecular Biotechnology*, 36(3), pp.184-204.
- Cohen, O., Vaccarezza, M., Lam, G., Baird, B., Wildt, K., Murphy, P., Zimmerman, P., Nutman, T., Fox, C., Hoover, S., Adelsberger, J., Baseler, M., Arthos, J., Davey, R., Dewar, R., Metcalf, J., Schwartzentruber, D., Orenstein, J., Buchbinder, S., Saah, A., Detels, R., Phair, J., Rinaldo, C., Margolick, J., Fauci, A. (1997). Heterozygosity for a defective gene for CC chemokine receptor 5 is not the sole determinant for the immunologic and virologic phenotype of HIV-infected long-term nonprogressors. *Journal of Clinical Investigation*, 100(6), pp.1581-1589.
- Cong, L., Ran, F., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L., Zhang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339(6121), pp.819-823.
- Connolly, J. (2002). Lentiviruses in gene therapy clinical research. *Gene Therapy*, 9(24), pp.1730-1734.

- Cornu T.I., Thibodeau-Beganny S., Guhl E., Alwin S., Eichtinger M., Joung J., Cathomen T. (2008) DNA-binding Specificity Is a Major Determinant of the Activity and Toxicity of Zinc-finger Nucleases. *Molecular Therapy*;16:352–358.
- Culver, K., Anderson, W., Blaese, R. (1991). Lymphocyte Gene Therapy. *Human Gene Therapy*, 2(2), pp.107-109.
- Cyranoski, D., Reardon, S. (2015). Embryo editing sparks epic debate. *Nature*, 520(7549), pp.593-595.
- Danilova, N., Bibikova, E., Covey, T. M., Nathanson, D., Dimitrova, E., Konto, Y., Lin, S. (2014). The role of the DNA damage response in zebrafish and cellular models of Diamond Blackfan anemia. *Disease Models & Mechanisms*, 7(7), 895–905.
- Datsenko, K., Pougach, K., Tikhonov, A., Wanner, B., Severinov, K., Semenova, E. (2012). Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. *Nature Communications*, 3, p.945.
- DeFrancesco, L. (2011). Move over ZFNs. *Nature Biotechnol*, 30(1), pp.112-112.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z., Eckert, M., Vogel, J., Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), pp.602-607.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R., Hill, C., Davis, C., Peiper, S., Schall, T., Littman, D., Landau, N. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, 381(6584), pp.661-666.
- DiCarlo, J., Norville, J., Mali, P., Rios, X., Aach, J., Church, G. (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 41(7), pp.4336-4343.
- Ding, Q., Lee, Y., Schaefer, E., Peters, D., Veres, A., Kim, K., Kuperwasser, N., Motola, D., Meissner, T., Hendriks, W., Trevisan, M., Gupta, R., Moisan, A., Banks, E., Friesen, M., Schinzel, R., Xia, F., Tang, A., Xia, Y., Figueroa, E., Wann, A., Ahfeldt, T., Daheron, L., Zhang, F., Rubin, L., Peng, L., Chung, R., Musunuru, K., Cowan, C. (2013). A TALEN Genome-Editing System for Generating Human Stem Cell-Based Disease Models. *Cell Stem Cell*, 12(2), pp.238-251.
- Dreier, B., Beerli, R., Segal, D., Flippin, J., Barbas, C. (2001). Development of Zinc Finger Domains for Recognition of the 5'-ANN-3' Family of DNA Sequences and Their Use in the Construction of Artificial Transcription Factors. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), pp.29466-29478.
- Durai, S. (2005). Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 33(18), pp.5978-5990.
- El Harchaoui, K., Akdim, F., Stroes, E., Trip, M., Kastelein, J. (2008). Current and Future Pharmacologic Options for the Management of Patients Unable to Achieve Low-Density Lipoprotein-Cholesterol Goals with Statins. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 8(4), pp.233-242.
- Elrod-Erickson, M., Rould, M.A., Nekludova, L., Pabo, C.O. (1996). Zif268 protein-DNA complex refined at 1.6 Å: a model system for understanding zinc finger-DNA interactions. *Structure* 4, 1171-1180.
- Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R. Marillonnet, S. (2009). Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type IIs Restriction Enzymes. *PLoS ONE*, 4(5), p.e5553.
- Eugen-Olsen, J., Iversen, A., Garred, P., Koppelhus, U., Pedersen, C., Benfield, T., Sorensen, A., Katzenstein, T., Dickmeiss, E., Gerstoft, J., Skinhøj, P., Svejgaard, A., Nielsen, J., Hofmann, B. (1997). Heterozygosity for a deletion in the CKR-5 gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4 T-cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals. *AIDS*, 11(3), pp.305-310.
- Fabre, L., Le Hello, S., Roux, C., Issenhuth-Jeanjean, S., Weill, F. (2014). CRISPR Is an Optimal Target for the Design of Specific PCR Assays for *Salmonella enterica* Serotypes Typhi and Paratyphi A. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(1), p.e2671.
- Fairall, L., Schwabe, J., Chapman, L., Finch, J., Rhodes, D. (1993). The crystal structure of a two zinc-finger peptide reveals an extension to the rules for zinc-finger/DNA recognition. *Nature*, 366(6454), pp.483-487.

- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D., Wei, P., Cao, F., Zhu, S., Zhang, F., Mao, Y., Zhu, J. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research*, 23(10), pp.1229-1232.
- Filippova, G., Fagerlie, S., Klenova, E., Myers, C., Dehner, Y., Goodwin, G., Neiman, P., Collins, S., Lobanenkov, V. (1996). An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Molecular and Cellular Biology*, 16(6), pp.2802-2813.
- Friedland, A., Tzur, Y., Esvelt, K., Colaiácovo, M., Church, G., Calarco, J. (2013). Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nature Methods*, 10(8), pp.741-743.
- Fu, Y., Foden, J., Khayter, C., Maeder, M., Reyon, D., Joung, J., Sander, J. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 31(9), pp.822-826.
- Gandotra, S., Le Dour, C., Bottomley, W., Cervera, P., Giral, P., Reznik, Y., Charpentier, G., Auclair, M., Delépine, M., Barroso, I., Semple, R., Lathrop, M., Lascols, O., Capeau, J., O'Rahilly, S., Magré, J., Savage, D., Vigouroux, C. (2011). Perilipin Deficiency and Autosomal Dominant Partial Lipodystrophy. *New England Journal of Medicine*, 364(8), pp.740-748.
- Garneau, J., Dupuis, M., Villion, M., Romero, D., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A., Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), pp.67-71.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), pp.E2579-E2586.
- Gatehouse, J. (2008). Biotechnological Prospects for Engineering Insect-Resistant Plants. *Plant Physiology*, 146(3), pp.881-887.
- Gilbert, L., Larson, M., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G., Torres, S., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E., Doudna, J., Lim, W., Weissman, J., Qi, L. (2013). CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell*, 154(2), pp.442-451.
- Goudarzi, K. M., Lindström, M. S. (2016). Role of ribosomal protein mutations in tumor development. *International Journal of Oncology*, 48(4), 1313–1324.
- Gordon, J., Scangos, G., Plotkin, D., Barbosa, J., Ruddle, F. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(12), pp.7380-7384.
- Gratz, S., Ukken, F., Rubinstein, C., Thiede, G., Donohue, L., Cummings, A., O'Connor-Giles, K. (2014). Highly Specific and Efficient CRISPR/Cas9-Catalyzed Homology-Directed Repair in *Drosophila*. *Genetics*, 196(4), pp.961-971.
- Greisman H.A., Pabo C.O. (1997). A general strategy for selecting high-affinity zinc finger proteins for diverse DNA target sites. *Science*; 275:657–661.
- Guo, X., Zhang, T., Hu, Z., Zhang, Y., Shi, Z., Wang, Q., Cui, Y., Wang, F., Zhao, H., Chen, Y. (2014). Efficient RNA/Cas9-mediated genome editing in *Xenopus tropicalis*. *Development*, 141(3), pp.707-714.
- Haft, D., Selengut, J., Mongodin, E., Nelson, K. (2005). A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. *PLoS Computational Biology*, 1(6), p.e60.
- Hai, T., Teng, F., Guo, R., Li, W., Zhou, Q. (2014). One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Research*, 24(3), pp.372-375.
- Hamilton, R., Chopan, M. (1975). Transfer of the tumor inducing factor in *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 63(1), pp.349-354.
- Heler, R., Marraffini, L., Bikard, D. (2014). Adapting to new threats: the generation of memory by CRISPR-Cas immune systems. *Molecular Microbiology*, 93(1), pp.1-9.

- Hemenway, C., Fang, R., K. Kaniewski, W., Chua, N., E. Tumer, N. (1988). Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *The EMBO journal*, 7(5), pp.1273–1280.
- Hershey, A. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *The Journal of General Physiology*, 36(1), pp.39-56.
- Hiroyuki, S., Susumu, K. (1981). New restriction endonucleases from *Flavobacterium okeanokoites* (FokI) and *Micrococcus luteus* (MluI). *Gene*, 16(1-3), pp.73-78.
- Hsu, P., Scott, D., Weinstein, J., Ran, F., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T., Marraffini, L., Bao, G., Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 31(9), pp.827-832.
- Huang, H., Sun, F., Owen, D., Li, W., Chen, Y., Gale, M., Ye, J. (2007). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(14), pp.5848-5853.
- Hwang, W., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M., Kaini, P., Sander, J., Joung, J., Peterson, R., Yeh, J. (2013). Heritable and Precise Zebrafish Genome Editing Using a CRISPR-Cas System. *PLoS ONE*, 8(7), p.e68708.
- Isalan, M., Choo, Y., Klug, A. (1997). Synergy between adjacent zinc fingers in sequence-specific DNA recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(11), pp.5617-5621.
- Isalan, M., Klug, A., Choo, Y. (1998). Comprehensive DNA Recognition through Concerted Interactions from Adjacent Zinc Fingers. *Biochemistry*, 37(35), pp.12026-12033.
- Isalan, M., Klug, A., Choo, Y. (2001). A rapid, generally applicable method to engineer zinc fingers illustrated by targeting the HIV-1 promoter. *Nat. Biotechnol.*, 19(7), pp.656-660.
- Isalan, M. (2011). Zinc-finger nucleases: how to play two good hands. *Nature Methods*, 9(1), pp.32-34.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), pp.5429-5433.
- Jakobsson, J., Lundberg, C. (2006). Lentiviral Vectors for Use in the Central Nervous System. *Molecular Therapy*, 13(3), pp.484-493.
- Jansen, R., Embden, J., Gaastra, W., Schouls, L. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), pp.1565-1575.
- Jiang, J., Luo, G. (2009). Apolipoprotein E but Not B Is Required for the Formation of Infectious Hepatitis C Virus Particles. *Journal of Virology*, 83(24), pp.12680-12691.
- Jiang, J., Jing, Y., Cost, G., Chiang, J., Kolpa, H., Cotton, A., Carone, D., Carone, B., Shivak, D., Guschin, D., Pearl, J., Rebar, E., Byron, M., Gregory, P., Brown, C., Urnov, F., Hall, L., Lawrence, J. (2013). Translating dosage compensation to trisomy 21. *Nature*, 500(7462), pp.296-300.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J., Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), pp.816-821.
- Joung, J., Sander, J. (2012). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(1), pp.49-55.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., Bonas, U. (2007). A Bacterial Effector Acts as a Plant Transcription Factor and Induces a Cell Size Regulator. *Science*, 318(5850), pp.648-651.
- Khalili, K., Kaminski, R., Gordon, J., Cosentino, L., Hu, W. (2015). Genome editing strategies: potential tools for eradicating HIV-1/AIDS. *Journal of NeuroVirology*, 21(3), pp.310-321.
- Kim, H., Kim, J. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet*, 15(5), pp.321-334.

- Kim, Y., Cha, J., Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), pp.1156-1160.
- Klee, H.J., White, F.F., Iyer, V.N, Gordon, M.P., Nester, E.W (1983). Mutational Analysis of the Virulence Region of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti Plasmid. *Journal Of Bacteriology*, Feb. 1983, p. 878-883
- Klug, A., Miller, J., McLachlan, A. (1986). Repetitive Zn<sup>2+</sup> -binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *Biochim. Soc. Trans.*, 14(2), pp.221.2-221.
- Koike-Yusa, H., Li, Y., Tan, E., Velasco-Herrera, M., Yusa, K. (2013). Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nature Biotechnology*, 32(3), pp.267-273.
- Krishna, S.S., Majumdar, I., Grishin, N.V., 2003. Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucl. Acid Res.* 31, 532–550
- Laity, J.H., Lee, B.M., Wright, P.E. (2001). Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology* 2001, 11:39–46
- Lander, E., Linton, L., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczy, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R., Wilson, R., Hillier, L., McPherson, J., Marra, M., Mardis, E., Fulton, L., Chinwalla, A., Pepin, K., Gish, W., Chissole, S., Wendl, M., Delehaunty, K., Miner, T., Delehaunty, A., Kramer, J., Cook, L., Fulton, R., Johnson, D., Minx, P., Clifton, S., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R., Muzny, D., Scherer, S., Bouck, J., Sodergren, E., Worley, K., Rives, C., Gorrell, J., Metzker, M., Naylor, S., Kucherlapati, R., Nelson, D., Weinstock, G., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Rosenthal, A., Platzter, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Smith, D., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H., Dubois, J., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R., Federspiel, N., Abola, A., Proctor, M., Roe, B., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blöcker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D., Burge, C., Cerutti, L., Chen, H., Church, D., Clamp, M., Copley, R., Doerks, T., Eddy, S., Eichler, E., Furey, T., Galagan, J., Gilbert, J., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L., Jones, T., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W., Kitts, P., Koonin, E., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J., Mulder, N., Pollara, V., Ponting, C., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A., Stupka, E., Szustakowki, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y., Wolfe, K., Yang, S., Yeh, R., Collins, F., Guyer, M., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K., Myers, R., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D., Olson, M., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G., Athanasiou, M., Schultz, R., Patrinos, A., Morgan, M. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), pp.860-921.
- Lee, M., Gippert, G., Soman, K., Case, D., Wright, P. (1989). Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. *Science*, 245(4918), pp.635-637.
- Lee, H. B., Schwab, T. L., Koleilat, A., Ata, H., Daby, C. L., Cervera, R. L., Clark, K. J. (2016). Allele-Specific Quantitative PCR for Accurate, Rapid, and Cost-Effective Genotyping. *Human Gene Therapy*, 27(6), 425–435.
- Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., Lv, J., Xie, X., Chen, Y., Li, Y., Sun, Y., Bai, Y., Songyang, Z., Ma, W., Zhou, C., Huang, J. (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*, 6(5), pp.363-372.



- Liu, R., Paxton, W., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S., Horuk, R., MacDonald, M., Stuhlmann, H., Koup, R., Landau, N. (1996). Homozygous Defect in HIV-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiplex-Exposed Individuals to HIV-1 Infection. *Cell*, 86(3), pp.367-377.
- Liu, J., Li, C., Yu, Z., Huang, P., Wu, H., Wei, C., Zhu, N., Shen, Y., Chen, Y., Zhang, B., Deng, W., Jiao, R. (2012). Efficient and Specific Modifications of the Drosophila Genome by Means of an Easy TALEN Strategy. *Journal of Genetics and Genomics*, 39(5), pp.209-215.
- Looney M.C., Moran L.S., Jack W.E., Feehery G.R., Benner J.S., Slatko B.E., Wilson G.G. Nucleotide sequence of the *FokI* restriction-modification system: separate strand specificity domain in the methyltransferase. *Gene*. 1989;80:209–216.
- Lorenz, T. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, (63).
- Ma, Y., Zhang, X., Shen, B., Lu, Y., Chen, W., Ma, J., Bai, L., Huang, X., Zhang, L. (2013). Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9. *Cell Research*, 24(1), pp.122-125.
- MacPherson, S., Larochelle, M., Turcotte, B. (2006). A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiology and Molecular Biology Rev.* 70, 583–604
- Maeder, M., Thibodeau-Beganny, S., Osiaik, A., Wright, D., Anthony, R., Eichinger, M., Jiang, T., Foley, J., Winfrey, R., Townsend, J., Unger-Wallace, E., Sander, J., Müller-Lerch, F., Fu, F., Pearlberg, J., Göbel, C., Dassié, J., Pruett-Miller, S., Porteus, M., Sgroi, D., Iafrate, A., Dobbs, D., McCray, P., Cathomen, T., Voytas, D., Joung, J. (2008). Rapid “Open-Source” Engineering of Customized Zinc-Finger Nucleases for Highly Efficient Gene Modification. *Molecular Cell*, 31(2), pp.294-301.
- Maeder, M., Linder, S., Cascio, V., Fu, Y., Ho, Q., Joung, J. (2013). CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nature Methods*, 10(10), pp.977-979.
- Makarova, K., Wolf, Y., Alkhnbashi, O., Costa, F., Shah, S., Saunders, S., Barrangou, R., Brouns, S., Charpentier, E., Haft, D., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F., Terns, R., Terns, M., White, M., Yakunin, A., Garrett, R., van der Oost, J., Backofen, R., Koonin, E. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), pp.722-736.
- Mali, P., Aach, J., Stranges, P., Esvelt, K., Moosburner, M., Kosuri, S., Yang, L., Church, G. (2013a). Cas9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature Biotechnology*, 31(9), pp.833-838.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J., Norville, J., Church, G. (2013b). RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), pp.823-826.
- Mandel, R., Burger, C., Snyder, R. (2008). Viral vectors for in vivo gene transfer in Parkinson's disease: Properties and clinical grade production. *Experimental Neurology*, 209(1), pp.58-71.
- Mashiko, D., Young, S., Muto, M., Kato, H., Nozawa, K., Ogawa, M., Noda, T., Kim, Y., Satouh, Y., Fujihara, Y., Ikawa, M. (2013). Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes. *Development, Growth & Differentiation*, 56(1), pp.122-129.
- Mendel, J. (1866). *Versuche über Pflanzen-Hybriden (Pokusy s rostlinými hybridy)*. Brno.
- Merki, E., Graham, M., Mullick, A., Miller, E., Crooke, R., Pitas, R., Witztum, J., Tsimikas, S. (2008). Antisense Oligonucleotide Directed to Human Apolipoprotein B-100 Reduces Lipoprotein(a) Levels and Oxidized Phospholipids on Human Apolipoprotein B-100 Particles in Lipoprotein(a) Transgenic Mice. *Circulation*, 118(7), pp.743-753.
- Michael, S.F., Kilfoil, V.J., Schmidt, M.H., Amann, B.T., Berg, J.M. (1992). Metal binding and folding properties of a minimalist Cys2His2 zinc finger peptide. *Proceed Nationa. Academy Science U. S. A.* 89, 4796-4800.
- Miller, J., McLachlan, A.D., Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 4, 1609-1614.

- Miller, J., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K., Wang, J., Xia, D., Meng, X., Paschon, D., Leung, E., Hinkley, S., Dulay, G., Hua, K., Ankoudinova, I., Cost, G., Urnov, F., Zhang, H., Holmes, M., Zhang, L., Gregory, P., Rebar, E. (2010). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnol*, 29(2), pp.143-148.
- Mojica, F., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., Soria, E. (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), pp.174-182.
- Moscou, M., Bogdanove, A. (2009). A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science*, 326(5959), pp.1501-1501.
- Moynahan, M., Jasin, M. (2010). Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(3), pp.196-207.
- Muncie, H., L., Campbell, J., S. (2009) Alpha and Beta Thalassemia. *Am Fam Physician*. 2009 Aug 15;80(4):339-344.
- Mussolino, C., Morbitzer, R., Lutge, F., Dannemann, N., Lahaye, T., Cathomen, T. (2011). A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Research*, 39(21), pp.9283-9293.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F., Verma, I., Trono, D. (1996). In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector. *Science*, 272(5259), pp.263-267.
- Nam, K., Ding, F., Haitjema, C., Huang, Q., DeLisa, M., Ke, A. (2012). Double-stranded Endonuclease Activity in *Bacillus halodurans* Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-associated Cas2 Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 287(43), pp.35943-35952.
- Nazarenko, I., Lowe, B., Darfler, M., Ikononi, P., Schuster, D., Rashtchian, A. (2002). Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Research*; 30 (9): e37.
- Niemann, H., Tian, X., King, W., Lee, R. (2008). Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reproduction*, 135(2), pp.151-163.
- Niu, Y., Shen, B., Cui, Y., Chen, Y., Wang, J., Wang, L., Kang, Y., Zhao, X., Si, W., Li, W., Xiang, A., Zhou, J., Guo, X., Bi, Y., Si, C., Hu, B., Dong, G., Wang, H., Zhou, Z., Li, T., Tan, T., Pu, X., Wang, F., Ji, S., Zhou, Q., Huang, X., Ji, W., Sha, J. (2014). Generation of Gene-Modified Cynomolgus Monkey via Cas9/RNA-Mediated Gene Targeting in One-Cell Embryos. *Cell*, 156(4), pp.836-843.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S., Dohmae, N., Nureki, O. (2014). Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*, 156(5), 935-949.
- Nuñez, J., Kranzusch, P., Noeske, J., Wright, A., Davies, C., Doudna, J. (2014). Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature Structural and Molecular Biology*, 21(6), pp.528-534.
- Nuñez, J., Harrington, L., Kranzusch, P., Engelman, A., Doudna, J. (2015a). Foreign DNA capture during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature*, 527(7579), pp.535-538.
- Nuñez, J., Lee, A., Engelman, A., Doudna, J. (2015b). Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature*, 519(7542), pp.193-198.
- Nyquist, M., Li, Y., Hwang, T., Manlove, L., Vessella, R., Silverstein, K., Voytas, D., Dehm, S. (2013). TALEN-engineered AR gene rearrangements reveal endocrine uncoupling of androgen receptor in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(43), pp.17492-17497.
- O'Keefe, E. (2013). Nucleic Acid Delivery: Lentiviral and Retroviral Vectors. *Materials and Methods*, 3.
- Orlando, S. J., Santiago, Y., Dekelver, 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., Urnov, F. D., Cost, G. J. (2010). Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. *Nucleic Acids Research*, 38, e152.

- Overballe-Petersen, S., Harms, K., Orlando, L., Mayar, J., Rasmussen, S., Dahl, T., Rosing, M., Poole, A., Sicheritz-Ponten, T., Brunak, S., Inselmann, S., de Vries, J., Wackernagel, W., Pybus, O., Nielsen, R., Johnsen, P., Nielsen, K., Willerslev, E. (2013). Bacterial natural transformation by highly fragmented and damaged DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(49), pp.19860-19865.
- Pabo, C., Peisach, E., Grant, R. (2001). Design and Selection of Novel Cys2His2Zinc Finger Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), pp.313-340.
- Pavletich, N.P., Pabo, C.O. (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 252, 809-817.
- Perez, E., Wang, J., Miller, J., Jouvenot, Y., Kim, K., Liu, O., Wang, N., Lee, G., Bartsevich, V., Lee, Y., Guschin, D., Rupniewski, I., Waite, A., Carpenito, C., Carroll, R., S Orange, J., Urnov, F., Rebar, E., Ando, D., Gregory, P., Riley, J., Holmes, M., June, C. (2008). Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology*, 26(7), pp.808-816.
- Perez-Pinera, P., Kocak, D., Vockley, C., Adler, A., Kabadi, A., Polstein, L., Thakore, P., Glass, K., Ousterout, D., Leong, K., Guilak, F., Crawford, G., Reddy, T., Gersbach, C. (2013). RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nature Methods*, 10(10), pp.973-976.
- Pourcel, C. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 151(3), pp.653-663.
- Pratt, T., Sharp, L., Nichols, J., Price, D., Mason, J. (2000). Embryonic Stem Cells and Transgenic Mice Ubiquitously Expressing a Tau-Tagged Green Fluorescent Protein. *Developmental Biology*, 228(1), pp.19-28.
- Qi, L., Larson, M., Gilbert, L., Doudna, J., Weissman, J., Arkin, A., Lim, W. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*, 152(5), pp.1173-1183.
- Ran, F., Hsu, P., Lin, C., Gootenberg, J., Konermann, S., Trevino, A., Scott, D., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., Zhang, F. (2013). Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell*, 154(6), pp.1380-1389.
- Reyon, D., Tsai, S., Khayter, C., Foden, J., Sander, J., Joung, J. (2012). FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nature Biotechnology*, 30(5), pp.460-465.
- Romer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U., Lahaye, T. (2007). Plant Pathogen Recognition Mediated by Promoter Activation of the Pepper Bs3 Resistance Gene. *Science*, 318(5850), pp.645-648.
- Roslin.ed.ac.uk. (2016). *The Roslin Institute (University of Edinburgh) - Public Interest: Dolly the Sheep*. [online] Available at: <http://www.roslin.ed.ac.uk/public-interest/dolly-the-sheep/a-life-of-dolly/> [Přidáno 15. září 2016].
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cogniaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R., Collman, R., Doms, R., Vassart, G., Parmentier, M. (1996). Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 382(6593), pp.722-725.
- Sander, J., Dahlborg, E., Goodwin, M., Cade, L., Zhang, F., Cifuentes, D., Curtin, S., Blackburn, J., Thibodeau-Beganny, S., Qi, Y., Pierick, C., Hoffman, E., Maeder, M., Khayter, C., Reyon, D., Dobbs, D., Langenau, D., Stupar, R., Giraldez, A., Voytas, D., Peterson, R., Yeh, J., Joung, J. (2010). Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nature Methods*, 8(1), pp.67-69.
- Sander, J., Zaback, P., Joung, J., Voytas, D., Dobbs, D. (2007). Zinc Finger Targeter (ZiFiT): an engineered zinc finger/target site design tool. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server), pp.W599-W605.
- Sanger, F., Coulson, A. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), pp.441-448.
- Schechter, A. N. (2008). Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*, 112(10), 3927-3938.

- Schwerk, C., Schulze-Osthoff, K. (2005). Regulation of Apoptosis by Alternative Pre-mRNA Splicing. *Molecular Cell*, 19(1), pp.1-13.
- Seeman, N., Rosenberg, J., Rich, A. (1976). Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(3), pp.804-808.
- Segal, D., Dreier, B., Beerli, R., Barbas, C. (1999). Toward controlling gene expression at will: Selection and design of zinc finger domains recognizing each of the 5'-GNN-3' DNA target sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(6), pp.2758-2763.
- Shah, S., Erdmann, S., Mojica, F., Garrett, R. (2013). Protospacer recognition motifs. *RNA Biology*, 10(5), pp.891-899.
- Shears, M., King, M., Goddard, S., Fletcher, G. (1992). Gene transfer in salmonids by injection through the micropyle. *World Scientific*, pp.44-60.
- Smith, S., Fairclough, L., Latinkic, B., Sparrow, D., Mohun, T. (2006). *Xenopus laevis* transgenesis by sperm nuclear injection. *Nature Protocols*, 1(5), pp.2195-2203.
- Somnath, D. (2016). *Basic Concept of Recombinant DNA Technology*. New Delhi: EduPedia Publications (P), Ltd., pp.1-2.
- Stachel, S.E. (1986). The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *The EMBO Journal*, 5(7), p.1445.
- Stern, A., Keren, L., Wurtzel, O., Amitai, G., Sorek, R. (2010). Self-targeting by CRISPR: gene regulation or autoimmunity?. *Trends in Genetics*, 26(8), pp.335-340.
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), 62-67.
- Stokstad, E. (2002). Transgenic species: Engineered Fish: Friend or Foe of the Environment?. *Science*, 297(5588), pp.1797-1799.
- Swarts, D., Mosterd, C., van Passel, M., Brouns, S. (2012). CRISPR Interference Directs Strand Specific Spacer Acquisition. *PLoS ONE*, 7(4), p.e35888.
- Tebas, P., Stein, D., Tang, W.W., Frank, I., Wang, S.Q., Lee, G., Spratt, S.K., Surosky, R.T., Giedlin, M.A., Nichol, G. (2014). Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *New England Journal of Medicine*, 370, 901-910.
- Terns, M., Terns, R. (2011). CRISPR-based adaptive immune systems. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), pp.321-327.
- Thomas, K., Capecchi, M. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 51(3), pp.503-512.
- Tyson, G., Banfield, J. (2007). Rapidly evolving CRISPRs implicated in acquired resistance of microorganisms to viruses. *Environ Microbiology*,
- Urnov, F., Rebar, E., Holmes, M., Zhang, H., Gregory, P. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), pp.636-646.
- Wang, J., Li, J., Zhao, H., Sheng, G., Wang, M., Yin, M., Wang, Y. (2015). Structural and Mechanistic Basis of PAM-Dependent Spacer Acquisition in CRISPR-Cas Systems. *Cell*, 163(4), pp.840-853.
- Waterhouse, P. M., Graham, M. W., Wang, M.-B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), 13959-13964.
- Watson, J., Crick, F. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171(4356), pp.737-738.
- Weiss, R. (1996). Retrovirus classification and cell interactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 37(suppl B), pp.1-11.

- Wiedenheft, B., Sternberg, S., Doudna, J. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482(7385), pp.331-338.
- Wood, A., Lo, T., Zeitler, B., Pickle, C., Ralston, E., Lee, A., Amora, R., Miller, J., Leung, E., Meng, X., Zhang, L., Rebar, E., Gregory, P., Urnov, F., Meyer, B. (2011). Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs. *Science*, 333(6040), pp.307-307.
- Yosef, I., Goren, M., Qimron, U. (2012). Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 40(12), pp.5569-5576.
- yourgenome.org. (2016). *What is genetic engineering?* <http://www.yourgenome.org/facts/what-is-genetic-engineering> [Přidáno 18. září 2016].
- Zhai, W., Xu, C., Ling, Y., Liu, S., Deng, J., Qi, Y., Londos, C., Xu, G. (2010). Increased Lipolysis in Adipose Tissues is Associated with Elevation of Systemic Free Fatty Acids and Insulin Resistance in Perilipin Null Mice. *Hormone and Metabolic Research*, 42(04), pp.247-253.
- Zhong, Q., Zhao, S. (2011). The mechanism and application of zinc finger nucleases. *Hereditas (Beijing)*, 33(2), pp.123-130.
- Zhou, J., Wang, J., Shen, B., Chen, L., Su, Y., Yang, J., Zhang, W., Tian, X., Huang, X. (2014). Dual sgRNAs facilitate CRISPR/Cas9-mediated mouse genome targeting. *FEBS Journal*, 281(7), pp.1717-1725.
- Zu, Y., Tong, X., Wang, Z., Liu, D., Pan, R., Li, Z., Hu, Y., Luo, Z., Huang, P., Wu, Q., Zhu, Z., Zhang, B., Lin, S. (2013). TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nature Methods*, 10(4), pp.329-331.

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3PN	tripronukleární
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
AKT2	(gen pro ser/thr kinázu)
APOB	gen pro apolipoprotein B
AS-PCR	allele specific PCR
CCR5	chemokine co-receptor 5
cDNA	komplementární DNA
CoDA	context-dependent assembly
CRISPR	Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats
Cas genes	CRISPR associated genes
crRNA	CRISPR RNA
dCas9	nuclease-deficient Cas9
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	deoxyribonukleotid
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FLASH	Fast Ligation-based Automatable Solid-phase High-throughput
GFP	green fluorescent protein
HAART	highly active antiretroviral therapy
<i>HBB</i>	gen kóduje podjednotku proteinu hemoglobinu
HCV	virus hepatitidy C
HDR	homology directed repair
HIV	human immunodeficiency virus
HNH	nukleázová doména proteinu Cas9
Indel	inzerce nebo delece
iPSC	indukované pluripotentní kmenové buňky
LDL	low density lipoprotein
NGS	Next-Generation Sequencing
NHEJ	non-nomologous end joining
OPEN	Oligomerized Pool Engineering
PAM	protospacer adjacent motif
PCR	polymerázová řetězová reakce
PLIN1	gen pro perilipin1

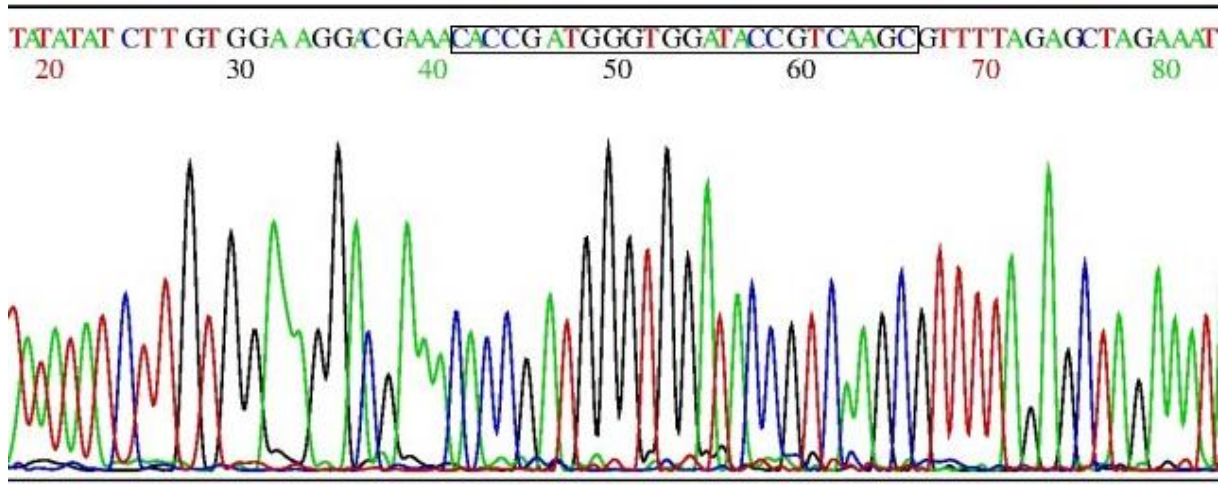
PNK	polynukleotidkináza
RNAi	RNA interference
RPE – 1	Retinal pigmented epithelial cells
RPS19	Human Ribosomal Protein S19
RT	reverzní transkriptáza
RT-PCR	PCR s reverzní transkriptázou
RuvC	nukleázová doména proteinu Cas9
RVD	repeat variable diresidue
SAM	Solid-phase assembly method
SAM	spacer acquisition motif
SDSA	synthesis-dependent strand annealing
sgRNA	single synthetic guide RNA
SORT1	gen pro sortilin 1
SpCas9	Cas9 z bakterie <i>Streptococcus pyogenes</i>
TALEN	Transcription Activator Like Effector Nuclease
TFIIIA	transkripční faktor IIIA
TIM	target interference motif
tracrRNA	trans-activating crRNA
VLD	very low density
WT	wild type
ZFN	zinc finger nuclease
ZFP	zinc finger protein

## 10 PŘÍLOHY

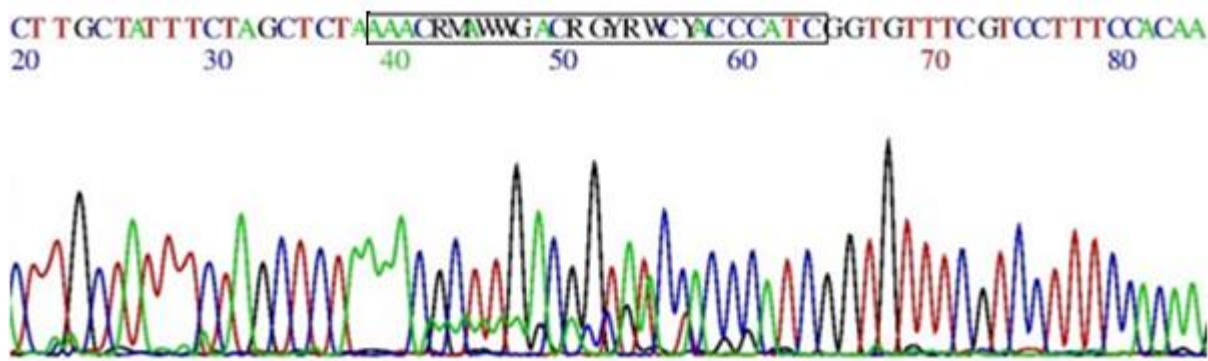
### 10.1 Ověření ligace oligonukleotidů do vektoru PX458 sekvenováním

Pro ověření úspěšného vložení navržených oligonukleotidů do vektoru PX458 byla provedena sekvenace úseku na vektoru, který obsahoval místo stříhu restriktivní endonukleázy *Bpi*I. Následující výstupy ze Sangerova sekvenování jsou vyhodnoceny programem BioEdit.

Obr. 22: Sekvenční analýza vektoru nesoucí oligonukleotid 3 – forward primer 1 (5'-3' vlákno)



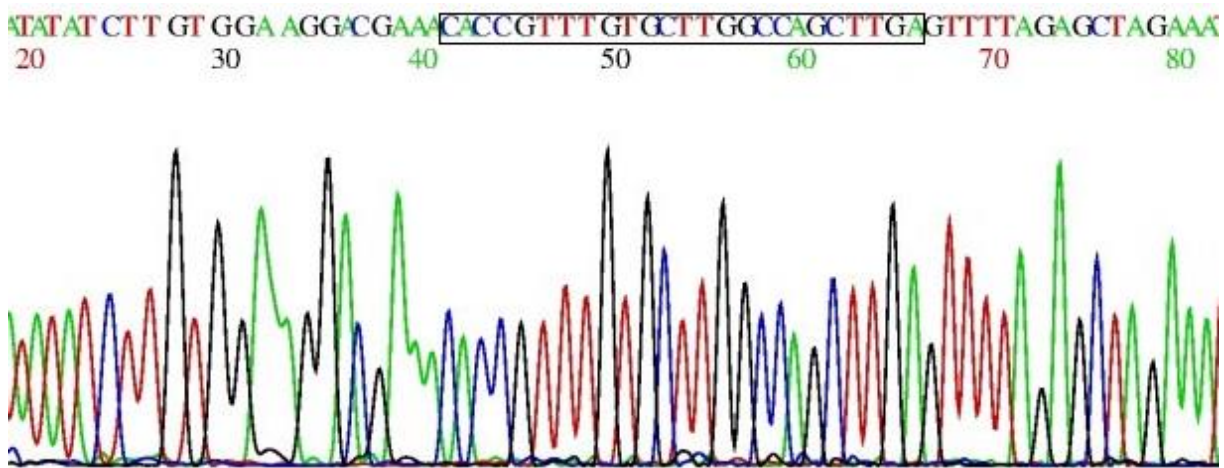
Obr. 23: Sekvenční analýza vektoru nesoucí oligonukleotid 3 – reverse primer 2 (3'-5' vlákno)



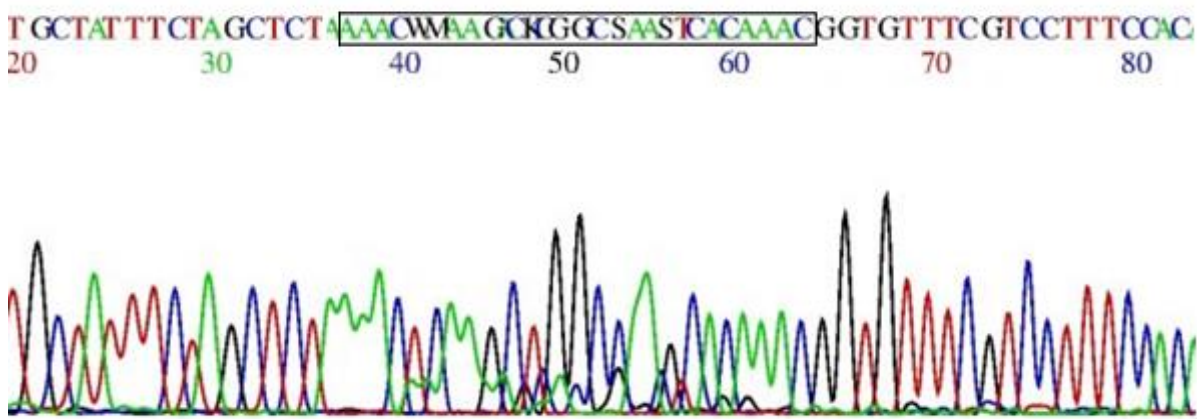
Na základě výšky píků lze určit sekvenci zájmu. Sekvence podle píků je AAACGCTTGACGGTATCCACCCATC.



Obr. 24: Sekvenční analýza vektoru nesoucí oligonukleotid 4 –forward primer 1 (5'-3' vlákno)

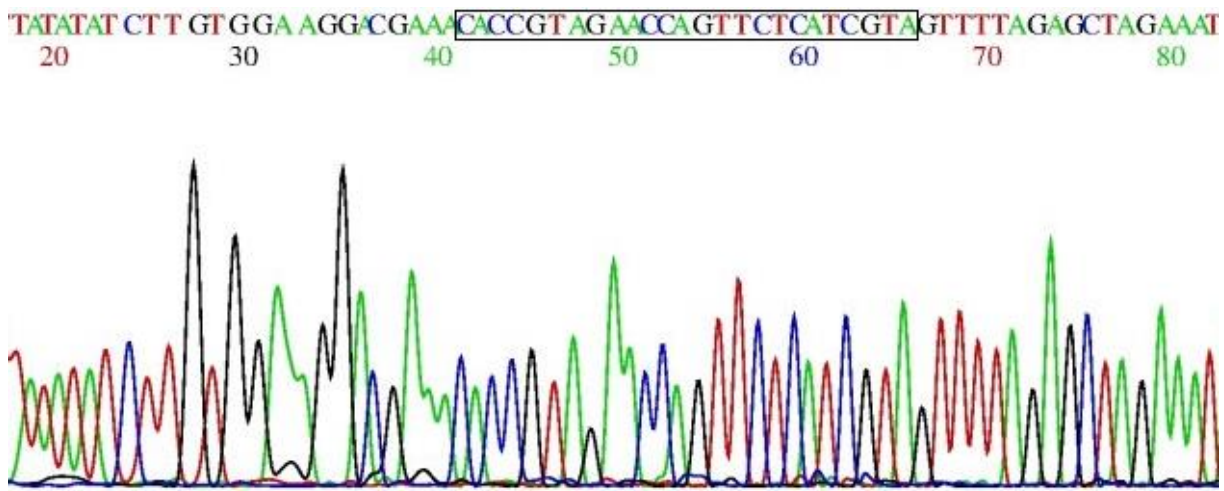


Obr. 25: Sekvenční analýza vektoru nesoucí oligonukleotid 4 – reverse primer 2 (3'-5' vlákno)



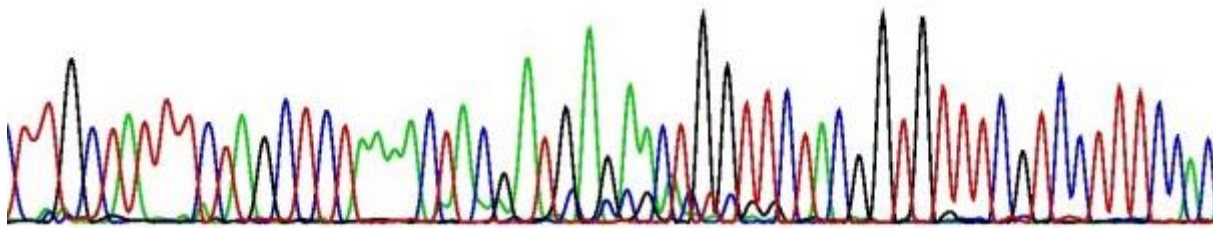
Na základě výšky píků lze určit sekvenci zájmu. Sekvence podle píků je AAACTCAAGCTGGCCAAGCACAAAC.

Obr. 26: Sekvenční analýza vektoru nesoucí oligonukleotid 5 –forward primer 1 (5'-3' vlákno)



Obr. 27: Sekvenční analýza vektoru nesoucí oligonukleotid 5 – reverse primer 2 (3'-5' vlákno)

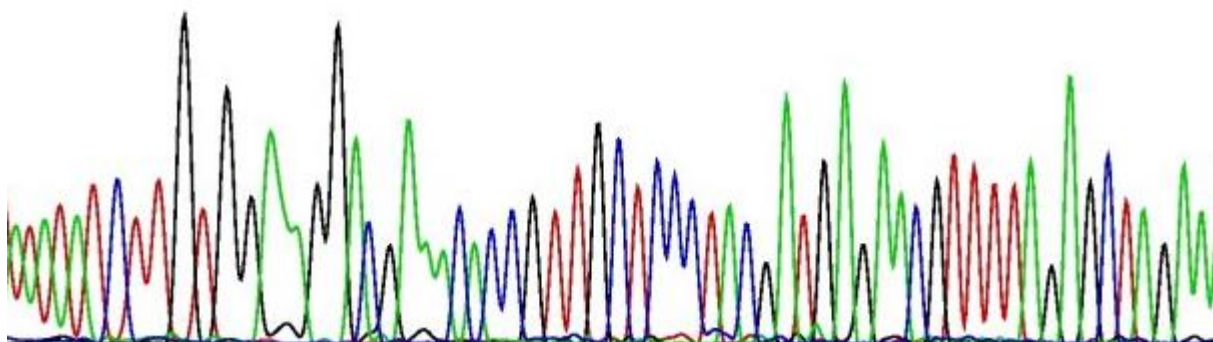
TTGCTATTTCTAGCTCTAAACTACRAT SAS ARMGGTTCTACGGTGTTTCGTCCTTTCCAC  
20 30 40 50 60 70 80



Na základě výšky píků lze určit sekvenci zájmu. Sekvence podle píků je AACTACGATGAGAACTGGTTCTAC.

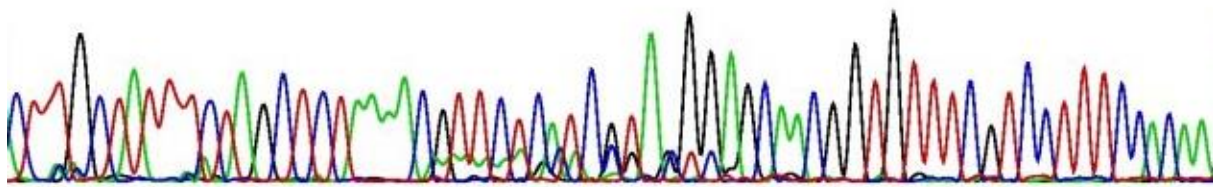
Obr. 28: Sekvenční analýza vektoru nesoucí oligonukleotid 6 – forward primer 1 (5'-3' vlákno)

ATATATCTTGTGGAGGACGAAAACCCGTTGCTCCCTACGATGAGAACGTTTATAGCTAGAA  
20 30 40 50 60 70 80



Obr. 29: Sekvenční analýza vektoru nesoucí oligonukleotid 6 – reverse primer 2 (3'-5' vlákno)

CTTGCTATTTCTAGCTCTAAACGTTTCWCMTCSTASGGAGCAACGGTGTTTCGTCCTTTCCACAA  
20 30 40 50 60 70 80



Na základě výšky píků lze určit sekvenci zájmu. Sekvence podle píků je AAACGTTTCATCGTAGGGAGCAAC.

## 10.2 Nespecifické působení sgRNAs navržených oligonukleotidů

Pomocí softwaru ChopChop byly identifikovány části genomu, které mohou být daným konstruktem potenciálně zasaženy. V tabulkách níže jsou uvedeny detaily k možným cílům připravených konstruktů.

Tab. 26: Identifikovaná místa působení konstruktů nesoucího oligonukleotid 3

Sekvence oligonukleotidu 3 kódující příslušnou sgRNA		
ATGGGTGGATACCGTCAAGCTGG (5'-3')		
Identifikované sekvence		
Umístění v genomu	Počet nespárovaných bazí	Sekvence (5'-3')
chr19:41861136	0	ATGGGTGGATACCGTCAAGCTGG
chr20:18504728	1	ATGGGTGGAcACCGTCAAGCTGG
chr5:53413920	1	ATGGGTGGAcACCGTCAAGCTGG
chr6:110562495	3	CCAGtTTGgtGGTATCCACCCAT

Červeně je znázorněna cílová sekvence navrženého oligonukleotidu 3, modře pak PAM sekvence. Malá písmena znázorňují místo, kde nedochází k párování s sgRNA daného konstruktů.

Tab. 27: Identifikovaná místa působení konstruktů nesoucího oligonukleotid 4

Sekvence oligonukleotidu 4 kódující příslušnou sgRNA (5'-3')		
TTGTGCTTGCCAGCTTGACGG		
Identifikované sekvence		
Umístění v genomu	Počet nespárovaných bazí	Sekvence (5'-3')
chr19:41861147	0	CCGTCAAGCTGGCCAAGCACAAA
chr20:18504739	0	CCGTCAAGCTGGCCAAGCACAAA
chr22:30301225	3	CCGTCAAGgTGGgCAAGgACAAA
chr5:53413931	0	CCGTCAAGCTGGCCAAGCACAAA

Červeně je znázorněna cílová sekvence navrženého oligonukleotidu 4, modře pak PAM sekvence. Malá písmena znázorňují místo, kde nedochází k párování s sgRNA daného konstruktů.

Tab. 28: Identifikovaná místa působení konstruktů nesoucího oligonuklotid 5

Sekvence oligonukleotidu 5 kódující příslušnou sgRNA (5'-3')		
<b>TAGAACCAGTTCTCATCGTAGGG</b>		
Identifikované sekvence		
Umístění v genomu	Počet nespárovaných bazí	Sekvence (5'-3')
chr1:113169117	3	CCCTgttATGAGAACTGGTTCTA
chr14:34568966	1	TAcAACCAGTTCTCATCGTAGGG
chr19:41861179	0	CCCTACGATGAGAACTGGTTCTA
chr20:18504771	1	CCCTACGtTGAGAACTGGTTCTA
chr5:53413963	3	CCCTgtGATGAaAACTGGTTCTA
chr1:113169117	3	CCCTgttATGAGAACTGGTTCTA

Červeně je znázorněna cílová sekvence navrženého oligonukleotidu 5, modře pak PAM sekvence. Malá písmena znázorňují místo, kde nedochází k párování s sgRNA daného konstruktů.

Tab. 28: Identifikovaná místa působení konstruktů nesoucího oligonuklotid 6

Sekvence oligonukleotidu 6 kódující příslušnou sgRNA (5'-3')		
<b>TTGCTCCCTACGATGAGAACTGG</b>		
Identifikované sekvence		
Umístění v genomu	Počet nespárovaných bazí	Sekvence (5'-3')
chr1:113169112	3	TTGCTCCCTgttATGAGAACTGG
chr10:45073416	2	CCAGTTCTtATCGTAGGcAGCAA
chr14:34568971	0	CCAGTTCTCATCGTAGGGAGCAA
chr19:41861174	0	TTGCTCCCTACGATGAGAACTGG
chr20:18504766	2	TTcCTCCCTACGtTGAGAACTGG
chr1:113169112	3	TTGCTCCCTgttATGAGAACTGG

Červeně je znázorněna cílová sekvence navrženého oligonukleotidu 6, modře pak PAM sekvence. Malá písmena znázorňují místo, kde nedochází k párování s sgRNA daného konstruktů.