

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Daniela Uhrinová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Regulace genové exprese prostřednictvím
CRISPR interference a CRISPR aktivace**

Bakalářská práce

Daniela Uhrinová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: Mgr. Agáta Kubíčková, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Daniela UHRINOVÁ**
Osobní číslo: **R21759**
Studijní program: **B0511A030011 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Regulace genové exprese prostřednictvím CRISPR interference a CRISPR aktivace**
Zadávací katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracování literární rešerše zaměřené na CRISPR/Cas9 technologie a aktivaci exprese prostřednictvím CRISPRa systémů
2. Osvojení základních technik práce v laboratoři tkáňových kultur
3. Transdukce buněčné linie K562 dCas9 KRAB lentiviry nesoucími sgRNA vůči celému lidskému genomu za účelem identifikace molekulárních cílů nukleosidového derivátu PNH173
4. Selektce transdukované linie látkou PNH173 a selekčními antibiotiky
5. Ověření exprese dCas9 a sgRNA v transdukované a selektované linii, izolace DNA
6. Zpracování výsledků a sepsání bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*. 2014 Oct 23;159(3):647–61.
2. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. 2013 Jul 18;154(2):442–51

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Agáta Kubičková

Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání bakalářské práce: 30. března 2023
Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2024

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 21. března 2024

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Daniela Uhrinová

Název práce: Regulace genové exprese prostřednictvím CRISPR interference a CRISPR aktivace

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Agáta Kubičková, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2024

Klíčová slova: CRISPR, Cas9, dCas9, sgRNA, PNH 173

Počet stran: 41

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

SOUHRN

Bakalářská práce se věnuje regulaci genové exprese pomocí CRISPR interference (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Současná CRISPR/Cas9 technologie využívající single-guide RNA (sgRNA) a endonukleázu Cas9 je odvozená od prokaryotního imunitního systému bránící buňku před napadením proti cizorodému genetickému elementu. Technologie je hojně využívána v oblasti editace genomu, jelikož pomocí jediné molekuly sgRNA, která má sekvenci komplementární k sekvenci genu našeho zájmu, jsme schopni díky endonukleáze Cas9 specificky narušit oblast DNA právě v tomto místě. Ve vědeckém světě je již používána i modifikovaná verze endonukleázy Cas9, která se označuje jako dCas9 (dead Cas9), která na rozdíl od modifikace molekuly DNA jen reguluje expresi daného genu. Gen tedy můžeme buď aktivovat, nebo inhibovat s použitím příslušných aktivačních a inhibičních domén navázaných na dCas9.

Nukleosidový derivát PNH 173 je látka, která významně ovlivňuje proliferační vlastnosti nádorových buněčných linií. K odhalení molekulárních cílů daného nukleosidového derivátu byla použita data z CRISPR inaktivačního screeningu, ve kterém bylo využito spojení proteinu dCas9 s inhibiční doménou KRAB (Krüppel associated box). Smyslem shromáždění poznatků o CRISPR aktivaci je potenciální použití metody ke srovnávacímu CRISPR aktivačnímu screeningu, který by sloužil primárně k odhalení mechanismu rezistence potenciálních antineoplastických léčiv.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Daniela Uhrinová

Title: Regulation of Gene Expression Through CRISPR Interference and CRISPR Activation

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, UP Olomouc

Supervisor: Mgr. Agáta Kubičková, Ph.D.

The year of presentation: 2024

Keywords: CRISPR, Cas9, dCas9, sgRNA, PNH 173

Number of pages: 41

Number of appendices: 0

Language: Czech

SUMMARY

This bachelor thesis focuses on the regulation of gene expression by CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) interference. The current CRISPR/Cas9 technology using single-guide RNA (sgRNA) and Cas9 endonuclease is derived from the prokaryotic immune system defending the cell from an attack against a foreign genetic element. The technology is widely used in the field of genome editing, as by using a single molecule of sgRNA - which has a sequence complementary to that of the gene of our interest - we can cut a region of DNA at this specific location thanks to the Cas9 endonuclease. A modified version of Cas9 endonuclease, called dCas9 (dead Cas9), is already being used in the scientific world, which, unlike cutting a DNA molecule, only regulates the expression of the genes. The gene can, therefore, be either activated or inhibited using the appropriate activation and inhibition domains linked to dCas9.

The nucleoside derivative PNH 173 is a chemical compound significantly affecting the proliferative properties of cancer cell lines. Data from a CRISPR inactivation screen was used to uncover the molecular targets of the nucleoside derivative, in which the fusion of the dCas9 protein to the Krüppel associated box (KRAB) inhibitory domain was utilized. The purpose of collecting more theoretical information about CRISPR activation is to potentially use this method to perform a comparative CRISPR activation screen to uncover the mechanism of resistance toward studied compounds.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Agáty Kubičkové, Ph.D. a s použitím zdrojů uvedených v závěru práce.

V Olomouci dne

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat mé vedoucí bakalářské práce Mgr. Agátě Kubíčkové, Ph.D. z Ústavu molekulární a translační medicíny za odborné vedení, praktickou pomoc a veškeré rady, kterými mě doprovázela během experimentů a psaní závěrečné práce. Poděkovat bych chtěla také Ústavu molekulární a translační medicíny za umožnění práce v jejich laboratořích a Ing. Rastislavu Slavkovskému, Ph.D. a Mgr. Patřiciii Žižkovičové za zpracování sekvenačních dat.

Tato studie byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (Evropská infrastruktura translační medicíny EATRIS-CZ-LM2023053 a Národním ústavem pro výzkum nádorů – program EXCELES, ID projektu č. LX22NPO5102, financovaný Evropskou unií - Next Generation EU).

V neposlední řadě jsem vděčná a děkuji za podporu mých přátel a rodiny během celého studia.

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 CÍLE PRÁCE	2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1 CRISPR/Cas9	3
3.1.1 Historie.....	3
3.1.2 Obecná charakteristika CRISPR systému	4
3.1.3 CRISPR/Cas9 systém třídy II	6
3.2 Endonukleázy a jejich různé druhy	7
3.2.1 Endonukleáza Cas9	8
3.2.2 Endonukleáza Cpf1	9
3.2.3 Endonukleáza C2c1	10
3.3 Využití CRISPR/Cas9	11
3.3.1 GMO vytvořené pomocí CRISPR/Cas9	11
3.3.2 Aktivace exprese pomocí dCas9 systému	12
3.4 RNA interference.....	15
4 MATERIÁL A METODY	17
4.1 Biologický materiál	17
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky	17
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	19
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	20
4.4.1 Identifikace molekulárních cílů nukleosidového derivátu PNH 173 pomocí genetického celogenomového screeningu	20
4.4.2 Detekce sgRNA v transdukované buněčné linii K562 dCas9 KRAB	22
4.4.3 Izolace proteinů a jejich detekce za použití Western blottingu	25
5 VÝSLEDKY	29
5.1. Selekce buněčné linie K562 dCas9 KRAB a kontrola exprese proteinu dCas9.....	29

5.2. Transdukce buněčné linie celogenomovou sgRNA knihovnou	29
5.3. Identifikace molekulárních cílů nukleosidového derivátu PNH 173 pomocí sekvenování na Illumina platformě.....	30
6 DISKUSE.....	32
6.1 Vlastnosti a funkce molekulárních cílů testované látky PNH173	32
6.1.1 KIF24	32
6.1.2 RDH10	32
6.1.3 PHKB	33
6.2 Vlastnosti a funkce genů podmiňujících rezistenci vůči testované látce PNH 173.....	33
6.2.1 BEND3	33
6.2.2 HIBADH.....	34
7 ZÁVĚR.....	35
8 LITERATURA.....	36

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

3HiB	3-hydroxyisomáselná kyselina
AD	aktivační doména (Activation Domain)
AsCpf1	Cpf1 z <i>Acidaminococcus sp</i>
atRA	kyselina all- <i>trans</i> -retinová
CGI	CpG Island (CpG ostrvov)
Cpf1	CRISPR z <i>Prevotella</i> a <i>Francisella</i>
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CRISPRa	CRISPR-mediated gene activation
CRISPRi	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Interference
crRNA	CRISPR RNA
dCas9	dead Cas9
DSB	dvouvláknové zlomy (DNA Double-Strand Breaks)
GMO	geneticky modifikované organismy
gRNA	guide RNA
hATTR	hereditární transthyretinová amyloidóza (Hereditary transthyretin amyloidosis)
HDR	homologní rekombinace (homology-directed repair)
HNH	Endonukleázová doména obsahující histidinové a asparaginové zbytky
HSF1	heat-shock factor 1
KRAB	Krüppel-associated box
LbCpf1	Cpf1 z <i>Lachnospiraceae bacterium</i>
MCP	MS2 coating protein
MS2	bakteriofág MS2
NGS	sekvenování nové generace (New Generation Sequencing)
NHEJ	non-homologous end joining
p65AD	P65 subunit activation domain
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PHK	fosforyláza kináza
PHKB	regulační podjednotka Beta fosforylázy kinázy (Phosphorylase Kinase Regulatory Subunit Beta)
PIC	preiniciační komplex

PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
pre-crRNA	prekurzorová crRNA
PTA	programovatelný transkripční aktivátor
RDH10	retinol-dehydrogenáza 10
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA interference
RNP	ribonukleoproteinový komplex
Rta	R transaktivátor viru Epstein-Barrové
RuvC	endonukleázová doména Cas9
SaCas9	Cas9 z <i>Staphylococcus aureus</i>
SAM	Synergistic activation system
ScFV	jednovláknový variabilní fragment (Single-chain fragment variable)
SDN	site-directed nucleases
sfGFP	Superfolder GFP
sgRNA	single-guide RNA
shRNA	short-hairpin RNA
siRNA	malé interferující RNA (short-interfering RNA)
SpCas9	Cas9 z <i>Streptococcus pyogenes</i>
SPH	SunTag-p65-HSF1
SSN	site-specific nucleases
TALLEN	transcription activator-like nukleázy
TLR	toll-like receptor
tracrRNA	trans-activating CRISPR RNA
ZFN	zinc-finger nukleázy (Zinc-finger nucleases)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Obecný mechanismus CRISPR/Cas systému u prokaryot

Obrázek 2: Rozpoznání cizího genetického elementu systémem CRISPR/Cas

Obrázek 3: Princip fungování opravných mechanismů NHEJ a HDR

Obrázek 4: Způsoby regulace genové exprese pomocí technologiím odvozených od CRISPR/Cas9 systému

Obrázek 5: Schéma pracovního postupu při identifikaci molekulárních cílů nukleosidového derivátu PNH 173 (A) a struktura látky PNH 173 (B)

Obrázek 6: Schéma znázorňující sekvenci kazety s sgRNA vložené v genomu buněk a vazbu primerů ke vnesení adapterů a indexů pro NGS

Obrázek 7: Výsledek Western blottingu detekujícího expresi dCas9 proteinu u buněčné linie K562 dCas9 KRAB

Obrázek 8: Výsledek detekce a separace PCR produktů získaných cílenou amplifikací sgRNA kazety začleněné v genomu linie K562 dCas9 KRAB

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rozpis komponent pro restrikční štěpení pomocí restriktázy SbfI

Tabulka 2: Rozpis látek na PCR reakci

Tabulka 3: Sekvence použitých primerů pro PCR reakci

Tabulka 4: Koncentrace DNA ve vzorcích po čtyřech *ovlivněních* látkami DMSO a PNH 173

Tabulka 5: Rozpis látek na přípravu 12% gelu pro SDS-PAGE elektroforézu

Tabulka 6: Rozpis použitých primárních protilátek vůči studovaným proteinům

1 ÚVOD

Eukaryotický imunitní systém zahrnuje okamžitou detekci a neutralizaci napadajících parazitů a cizích antigenů převážně pomocí specifických protilátek a imunitních buněk. Díky buněčnému aparátu a komplexu signálních drah mohou eukaryota provést efektivní imunitní reakci proti cizímu elementu napadající buňku.

Avšak i v prokaryotických organismech se nachází velmi sofistikovaný adaptivní imunitní systém chránící buňku před původci napadení (Sorek *et al.*, 2013). CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) je mechanismus, kterým se bakterie a archea brání proti fágovým infekcím a přenosu cizího genetického materiálu. Tyto organismy inkorporují fragmenty cizí DNA do CRISPR lokusu přítomném v jejich genomu a tím umožní rychlé rozpoznání a eliminaci při budoucím napadení. V prokaryotním imunitním systému hraje důležitou roli zejména nukleáza Cas9.

Existuje několik prokaryotních CRISPR-Cas systémů, nicméně k účelům genetického inženýrství a k cílené genové editaci je využíván jen CRISPR typu II. Zmíněný typ využívá malé RNA molekuly (především crRNA a tracrRNA), aby co nepřesněji navedly nukleázu Cas9 ke specifickému místu v genomu, což je sekvence komplementární k crRNA. Cas9 nukleáza může být využita například k aktivaci nebo represii exprese konkrétních genů nebo k vizualizaci specifických míst v genomu žijících buněk (Czarnek, Bereta, 2016).

2 CÍLE PRÁCE

- Vypracování literární rešerše zaměřené na CRISPR/Cas9 technologie a aktivaci exprese prostřednictvím CRISPRa systémů
- Osvojení základních technik práce v laboratoři tkáňových kultur
- Transdukce buněčné linie K562 dCas9 KRAB lentiviry nesoucími sgRNA vůči celému lidskému genomu za účelem identifikace molekulárních cílů nukleosidového derivátu PNH173
- Selektce transdukované linie látkou PNH173 a selekčními antibiotiky
- Ověření exprese dCas9 a sgRNA v transdukované a selektované linii, izolace DNA
- Zpracování výsledků a sepsání bakalářské práce

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 CRISPR/Cas9

CRISPR je technologie umožňující editaci genů, a sice korekci vad v genomu či tzv. zapnutí a vypnutí genů v buňkách a organismech. Je to metoda velmi rychlá, levná a relativně snadná. Ve vědeckém světě je již obecně známo, že CRISPR/Cas9 technologie je schopná napravit poškozenou DNA např. v myších modelech a vyléčit je tak z geneticky podmíněných onemocnění. Dokonce je toho schopná podobným mechanismem i u lidských embryí. CRISPR/Cas9 technologie využívá pouze dvou komponent, a to guide RNA a endonukleázu Cas9 (Redman *et al.*, 2016).

3.1.1 Historie

Prokaryota si vyvinula několik obranných mechanismů, aby se dokázala ochránit před konstantní hrozbou, představovanou rozličnými patogeny jako např. bakteriofágy a exogenními genetickými elementy (Nussenzweig, Marraffini, 2020). V rozmezí let 1990 – 2000 probíhalo rozsáhlé sekvenování bakteriálních a archálních genomů, v němž taktéž došlo k odhalení CRISPR lokusu a jeho podrobnějšímu popsání (Han, She, 2017).

Objev CRISPR společně s Cas proteiny je jednou z nejpřevratnějších událostí v moderní biologii. Není proto divu, že se aktuálně CRISPR/Cas využívá zejména k editaci genomu a ke genetickému inženýrství. Navíc pomohl mnoha vědcům pokročit v pochopení a k odstartování genových terapií týkající se široké škály lidských nemocí a k identifikaci genetických onemocnění a jejich mechanismů (Lino *et al.*, 2018).

První neobvyklé opakující se sekvence byly popsány v roce 1987 v genomu *Escherichia coli* (*E. coli*) skupinou japonských vědců, vedených Yoshizumi Ishinem, který zjistil, že na 3' konci genu *iap* (jehož produkty jsou zodpovědné za izoenzymatickou přeměnu alkalické fosfatázy) se nachází pět vysoce homologních sekvencí o délce 29 nukleotidů uspořádaných jako přímé repetice se sekvencemi o délce 32 nukleotidů, sloužícími jako určité „mezerníky“. Jeho objev byl však dlouhou dobu přehlížen a až do roku 2007 byla jeho práce citována pouze jednou až dvakrát do roka.

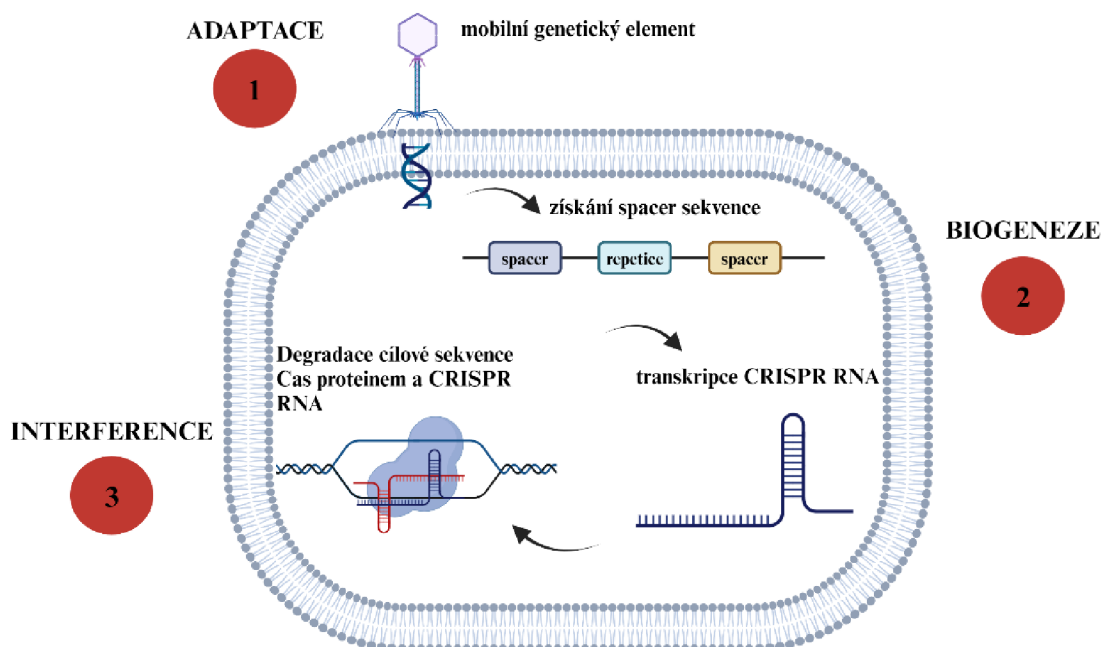
O pár let později, tyto zvláštní sekvence zaujali španělského vědce Francisca Mojica, který je našel v genomu archea *Haloferox mediterranei* v roce 1993 (Shmakova *et al.*, 2022). Rozhodl se věnovat dlouholetému výzkumu těchto „tandemových“ repetic, který ale nebyl jednoduchý a byl protkán spousty problémy a nepříjemnostmi. Výzkum tandemových repetic ho nakonec svedl na správnou cestu a Mojica úspěšně předpověděl, že zkoumané repetice souvisí s adaptivním imunitním systémem. Mojica se poté spojil s nizozemským

mikrobiologem Ruudem Jansenem a společně nazvaly tyto repetice jako CRISPR. Ruud Jansen poprvé použil tento termín již v roce 2002 (CRISPR Timeline, 2015). V témže roce *Jansen et al.* objevili s CRISPRem asociované Cas proteiny (Shmakova *et al.*, 2022).

3.1.2 Obecná charakteristika CRISPR systému

Oblast s opakujícími se sekvencemi typicky začíná vedoucí sekvencí, což je region bohatý na adenin a thymin. S CRISPRem asociované (*cas*) geny, což je soubor konzervovaných protein kódujících genů, jsou obvykle přítomny na jedné straně tohoto seskupení. Podrobnější analýzy objevily podobnosti mezi spacer sekvencemi a sekvencemi cizích, mobilních genetických elementů, jako jsou plazmidy a bakteriofágy. Navazující studie odhalily imunitní funkci CRISPR lokusu, která je v mnoha směrech analogická eukaryotické RNA interferenci, která obdobně používá sekvence nukleových kyselin k regulaci genové exprese (Marraffini, Sontheimer, 2010).

Obranný mechanismus CRISPR/Cas systému funguje na základě tří kroků, a sice adaptaci, biogenezi a interferenci (Obrázek 1). Adaptace sestává z vložení spaceru do hostitelského genomu. Biogeneze je proces, který zahrnuje pre-crRNA transkripci a její zpracování. A na závěr stádium interference, kde probíhá zánik cílového genetického elementu efektorovým komplexem crRNA-Cas protein (Bhatia *et al.*, 2023).

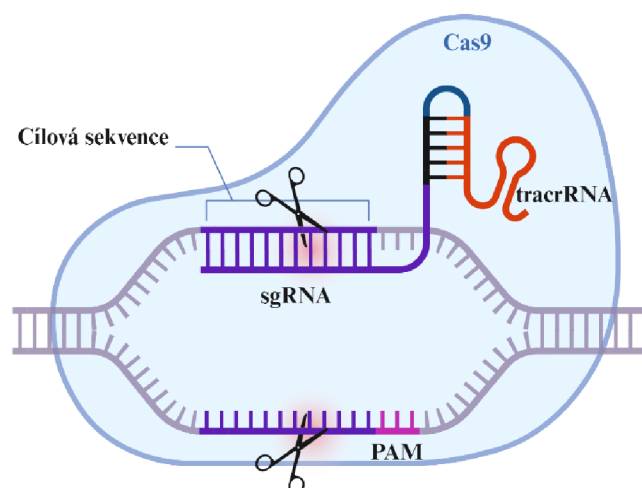


Obrázek 1: Obecný mechanismus CRISPR/Cas systému u prokaryot (Upraveno dle Rath *et al.*, 2021 pomocí programu BioRender.com)

Jelikož jsou spacers odvozené od cizorodých genetických elementů a virů, tak můžeme říci, že CRISPR je součástí určitého antivirového systému prokaryotní buňky. Přidáním nových spacerů dokáže buňka rozpoznat další neznámé bakteriofágy a poté je zneškodnit.

Imunitní ochrana je dědičná, tím pádem můžeme nalézt v dceřiných buňkách upravený genom od buňky mateřské. Nové spacer sekvence jsou přidávány obvykle na jedné straně CRISPR lokusu, čímž je CRISPR v podstatě chronologický záznam patogenů, s nimiž se prokaryotní buňka a její předchůdci v minulosti setkali (Rath *et al.*, 2015).

Prozkoumání jednoduchého CRISPR/Cas systému - později klasifikovaného jako CRISPR/Cas systém třídy II – otevřelo vrátka pro CRISPR technologii, schopnou díky jedinému Cas proteinu, označovaného jako Cas9, interferovat s DNA molekulou. Invazivní DNA molekuly jsou rozpoznávány CRISPR/Cas systémem na základě krátkého DNA motivu, tzv. protospacer adjacent motif (PAM) (Obrázek 2). Na základě tohoto motivu je buňka schopna rozeznat organismu vlastní a cizí molekuly DNA (Han, She, 2017). Ukázalo se, že jak navázání, tak i štěpení DNA molekuly komplexem Cas9 protein s RNA závisí na rozeznání této krátké trinukleotidové sekvence (Sternberg *et al.*, 2014). PAM závisí na variantě CRISPR-Cas systému, z čehož vyplývá, že dochází ke specifickému (motivem řízenému) výběru spacerů, které následně určují cíl interference. Taktéž řídí orientaci spacerů v soustavě repetit (Mojica *et al.*, 2009). Sekvence se nenachází v bakteriálním CRISPR lokusu, tudíž spacers nebudou cílem pro pozdější destrukci DNA. Sekvence obklopující PAM mohou být editovány a reprogramovány, aby byly poté rozpoznány CRISPR/Cas systémem. Aktuálně se tento postup úpravy sekvencí DNA používá pro speciální genovou editaci. (Han, She, 2017).



Obrázek 2: Rozpoznání cizího genetického elementu systémem CRISPR/Cas (Upraveno dle „The CRISPR-Cas9 Genetic Scissors“ pomocí programu BioRender.com)

V roce 2012 vědecký tým vedený Emmanuelle Charpentierovou a Jennifer Doudnovou přizpůsobil CRISPR/Cas II systém z bakterie *Streptococcus pyogenes* pro editaci genomu spojením CRISPR RNA (crRNA) s transactivating CRISPR RNA (tracrRNA). Vytvořili tak jedinou single-guide RNA (sgRNA), která rekrutuje Cas9 nukleázu k specifickým místům v genomu přes standardní Watson-Crickovo párování bází (Savić, Schwank, 2016).

3.1.3 CRISPR/Cas9 systém třídy II

Klasifikace CRISPR/Cas systému a jeho rozřazení do tříd, typů a dále subtypů je velmi složitá a komplexní. Postupem času se objevují stále nové a nové poznatky skrze screening nepřetržitě rostoucí genomické a metagenomické databáze poznatků. Pro pokrok ve studiu CRISPR je důležité zaznamenat komplexní klasifikaci CRISPR/Cas systémů na základě jejich evolučních vztahů. Střetáváme se tu však se složitým problémem, kterým je rychlá evoluce CRISPR lokusu.

V roce 2015 vznikla klasifikace, která rozdělila CRISPR/Cas systém do dvou hlavních tříd, které se vzájemně liší efektorovými moduly zahrnutými ve zpracování crRNA a interferenci. Třída I má efektorové moduly složené z několika Cas proteinů, zatímco třída II zahrnuje jediný multidoménový protein vázající crRNA (v případě typu II je to protein Cas9), který kombinuje všechny aktivity potřebné pro interferenci a v některých případech i pro zpracování pre-crRNA. Od té doby si prošla studie zkoumající diversitu CRISPR/Cas systému

několika velkými změnami, které byly potřeba zaznamenat a klasifikaci tím pádem zevrubně upravit (Makarova *et al.*, 2020).

CRISPR/Cas systém je podle nejnovější klasifikace rozdělen do dvou tříd, které jsou dále rozřazeny do různých typů a subtypů. Třída první je složena z typu I, typu III a typu IV, zatímco třída druhá sestává z typů II, V a VI (Bhatia *et al.*, 2023).

Nejjednodušší a zároveň nejhojněji používaný je typ II, ve kterém je endonukleázová aktivita, potřebná k interferenci s cizí nukleovou kyselinou, koncentrovaná v jediném multidoménovém proteinu Cas9 (Chylinski *et al.*, 2014).

Pokaždé, když prokaryotická buňka přijde do styku s cizorodým invazivním patogenem (vírem nebo plasmidem) se jeho DNA sekvence uloží jako spacer do CRISPR lokusu hostující prokaryotické buňky a obklopí se repetitivními sekvencemi. Následně RNA polymeráza začne produkovat pre-CRISPR RNA (pre-crRNA) ze spacer regionů v CRISPR lokusu a zároveň se s pre-crRNA transkripcí tvoří i trans-activating crRNA (tracrRNA) v proti směru CRISPR lokusu. tracrRNA je transkribovaná ze dvou důvodů, a sice aby indukovala maturaci pre-crRNA za účasti enzymu RNázy III a aby aktivovala štěpení řízené crRNA. Poté se komplex tracrRNA:crRNA naváže na nukleázu Cas9, aby společně vytvořili ribonukleoproteinový komplex (RNP), který nakonec způsobí dvouřetězcové zlomy v DNA patogenu v místě komplementárním k crRNA (Wang *et al.*, 2022).

Zajímavé je, že se mohou endonukleázové domény proteinu Cas9 geneticky upravit prostřednictvím mutací a vytvořit tak programovatelný RNA-dependentní protein, vážící se na DNA molekulu. Takto vznikl např. katalyticky neaktivní Cas9 protein (dCas9), jenž byl geneticky modifikován speciálně pro účely regulace genové exprese. Disponuje funkcí cíleně se navázat na úsek DNA a zablokovat tím transkripce v bakteriích. V savčích buňkách byl u dCas9 vyzorován jen mírný blok transkripce, a proto jej můžeme aplikovat na programovanou represi nebo aktivaci genů. Použit jej můžeme upravený ve spojení s doménami modulujícími transkripce (Gilbert *et al.*, 2013).

3.2 Endonukleázy a jejich různé druhy

Mnoho nemocí je způsobeno změnami v genové expresi nebo mutacemi v jednom konkrétním genu, a tak se vědci snažili přijít na způsob, jak geny upravit *in vivo*, aby výskyt těchto nemocí byl co nejmenší. Jako nejefektivnější způsob se ukázala tzv. „editace genů“, kdy se genom specificky modifikuje např. inzercí, delecí nebo substitucí bazí. Abychom mohli zmíněné modifikace vytvořit, můžeme k tomu použít i speciální enzymy, které štěpí řetězce DNA nebo RNA, tzv. endonukleázy.

Editace genů skrze užití endonukleáz si prošla celkově třemi generacemi vývoje: editace skrze zinc-finger nukleázy (ZFN), následně transcription activator-like nukleázy (TALEN) a nakonec, nejrozšířenější z nich, technologie CRISPR/Cas9 (Li *et al.*, 2023).

Ve světě molekulární biologie a genetického inženýrství se objevily i nové enzymy, které vykazují odlišný způsob rozpoznání DNA molekuly a způsob štěpení než již známý Cas9. Endonukleáza Cas9, Cpf1 (taktéž nazývána jako Cas12a) a C2c1 (Cas12b) jsou efektorové proteiny třídy 2, které tvoří dvouřetězcové zlomy buď tupé, či s přesahem v cílové molekule DNA. Díky této schopnosti můžeme endonukleázy využít např. k inaktivaci genů, korekci nebo ke změně úlohy genu.

Proteiny druhé třídy disponují pouze jediným multidoménovým efektorovým proteinem cíleným k umožnění interference a dříve byly upraveny k precizní genomové manipulaci změněním spacer RNA sekvence v crRNA. Jsou rozděleny do typů II a V, zaměřující se na DNA, a na typ VI, který cílí na RNA. Mezi typy V patří i již zmíněné proteiny Cpf1 a C2c1, označené jako další potenciální nástroje k editaci genů (Stella *et al.*, 2017).

3.2.1 Endonukleáza Cas9

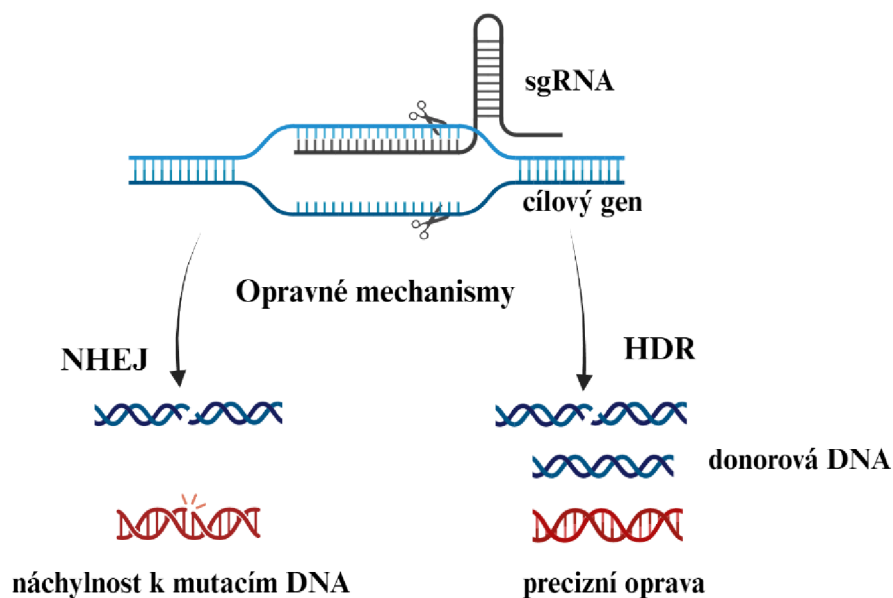
Cas9 původem ze *Streptococcus pyogenes*, později označován zkratkou SpCas9, byl používán jako první pro genomovou editaci v savčích buňkách. Specifita SpCas9 je založena na 20 nukleotidů dlouhém spaceru a na PAM sekvenci 5'-NGG (N znamená jakýkoliv nukleotid) (Zhang *et al.*, 2021). PAM je krátká DNA sekvence obklopující cílovou sekvenci, která je definovaná typem endonukleázy a je klíčová k rozpoznání genetického cílu komplexem Cas-gRNA (Okada *et al.*, 2021). Mechanismus štěpení probíhá tak, že sgRNA navede Cas9 endonukleázu k oběma vláknům DNA požadovaného genu. Štěpení DNA se poté nachází v sekvenci tři báze v proti směru od PAM.

Kromě SpCas9 bylo izolováno i několik dalších variant tohoto proteinu z různých bakterií nabízející nám širší rozhled v oblasti editace genů, díky jejich odlišným PAM sekvencím. Jednou z variant je např. protein SaCas9 (Bhowmik, Chaubey, 2022). Byl identifikován v roce 2015 Nishimasem *et al* z organismu *Staphylococcus aureus* s šestinukleotidovou PAM sekvencí NNGRRT (R znamená adenin nebo guanin). SaCas9 disponuje skvělou štěpící aktivitou a dobrou precizností při zacílení (Zhang *et al.*, 2021).

Specifita CRISPR/Cas9 ke komplementární sekvenci je zprostředkována 17–20 nukleotidy, přítomnými na 5' konci gRNA. Komplex gRNA-PAM nám zajistí, že zacílení systému bude zcela přesné.

Cas9 sestává z dvou nukleázových domén HNH (histidinn-asparagin-histidin) a RuvC (Recombination UV C), které štěpí jednotlivé DNA řetězce. Doména HNH štěpí cílový řetězec, zatímco doména RuvC ten zbývající. Nově vytvořené DSB jsou opraveny skrze opravný mechanismus NHEJ (Non-homologous end joining) nebo HDR (Homology-directed repair), které se od sebe liší svým způsobem fungování (Bhowmik, Chaubey, 2022).

Opravný mechanismus NHEJ je náchylný ke tvorbě náhodných mutací, jako jsou např. inserce a delece, jelikož jednoduše spojí dva zlomené konce dohromady. To může následně vést k mutacím vzniklým v důsledku posunu a výsledné ztrátě funkce genu. Na druhou stranu opravný mechanismus HDR používá homologní DNA templáty k opravě a rekonstrukci poškozených vláken DNA (Obrázek 3). Teoreticky je tedy možné přesně upravit genovou sekvenci vygenerováním nových DSB na specifickém místě v genomu a dodat příhodný templát cílové buňce (Wang *et al.*, 2022).



Obrázek 3: Princip fungování opravných mechanismů NHEJ a HDR (Upraveno dle Zhang *et al.*, 2021 pomocí programu BioRender.com)

3.2.2 Endonukleáza Cpf1

Endonukleáza Cpf1 je momentálně hojně využívána např. v editaci rostlinného genomu nebo i lidských buněk, a to zejména proto, že oplývá vlastnostmi, které klasická endonukleáza Cas9 postrádá. Zajímavá studie byla provedena na nukleázách Cpf1 různého původu, označovanými zkráceně AsCpf1 (*Acidaminococcus sp.*) a LbCpf1 (*Lachnospiraceae*

bacterium), kde vědci zkoumali jejich aktivitu a specifitu k budoucímu terapeutickému využití (Kleinstiver *et al.*, 2016).

Nejdůležitější z těchto rysů je pravděpodobně schopnost vytvořit lepivé DNA konce s přesahem 4–5 nukleotidů, zatímco klasická endonukleáza Cas9 může vygenerovat jen konce tupé bez přesahu. Tyto lepivé konce vytvářejí lepší prostředí pro inzerci požadovaného DNA fragmentu do štěpeného místa Cpf1 enzymem s použitím komplementárních DNA konců opravným mechanismem HDR. Zmíněný postup by měl výrazně zvýšit šanci pro genovou inzerci ve specifickém lokusu v genomu.

Další z vlastností, kterou se liší od endonukleázy Cas9, je způsob štěpení cílené DNA molekuly. Cpf1 štěpí molekulu DNA s jedinou crRNA molekulou, která je kratší než sgRNA používaná pro Cas9 (přibližně 43 nt oproti 100 nt). Z toho důvodu je editace genomu s Cpf1 snazší a levnější než s Cas9.

Třetí z vlastností je rozeznání odlišné PAM sekvence bohaté na thymin a obsahující 5'-TTTN-3' (nebo 5'-TTTV-3'; V=A, C v některých případech G).

Je evidentní, že Cpf1 disponuje několika výhodnějšími vlastnostmi než endonukleáza Cas9. Nakonec je třeba zmínit i schopnost tvořit větší množství zralých crRNA nebo menší riziko nerozeznání specifického místa u rostlinných a živočišných buněk (Zaidi *et al.*, 2017).

3.2.3 Endonukleáza C2c1

I když není pochyb o využitelnosti Cpf1 a Cas9, byly nalezeny i další typy endonukleáz odvozené od CRISPR/Cas systému třídy II, které byly kategorizovány do tří skupin: C2c1, C2c2, C2c3. C2c1 a C2c3 byly společně zahrnuty do typu V a C2c2 do nového typu VI. Nukleáza C2c2 disponuje unikátní vlastností, díky které může zacílit na jednovláknovou RNA molekulu, místo tradičně cílené dvouvláknové DNA molekuly. Jsou diskutovány výhody, které tato endonukleáza nabízí, jako např. aplikace ve vysokokapacitním screeningu nebo při degradaci transkriptu a inhibici translace (Nakade *et al.*, 2017).

Nukleáza C2c1 však cílí na molekulu DNA a mechanismus fungování tohoto proteinu není zcela odhalen. Vědci se průběžně snaží zjistit zejména způsob, jakým C2c1 rozeznává sgRNA a cílovou DNA molekulu. Nicméně, bylo zjištěno několik vlastností, kterým se C2c1 podobá i zároveň odlišuje s endonukleázami Cas9 a Cpf1 (Wu *et al.*, 2017).

Na rozdíl od Cas9, endonukleáza C2c1 obsahuje jen doménu RuvC a HNH doménu postrádá. Endonukleáza C2c1 má navíc i podobnou PAM sekvenci jako Cpf1, konkrétně tedy sekvenci 5'-TTN-3'. Avšak pokud se zaměříme na způsob, jakým C2c1 štěpí molekulu DNA, narazíme na první bod, kterým se právě tato endonukleáza odlišuje od Cpf1. Pro svou štěpící

aktivitu totiž vyžaduje C2c1 jak crRNA, tak tracrRNA - molekuly, které endonukleázu následně navedou na cílové místo v genomu (Yang *et al.*, 2016).

Strukturní a biochemické studie C2c1 nabídly srovnání s příbuzným Cas9 a Cpf1 a taktéž ukázaly podobnosti a odlišnosti v mechanismu štěpení v rámci této skupiny endonukleáz. Ačkoli C2c1 vykazuje menší štěpicí aktivitu v 37 °C než za teplot vyšších, výzkum C2c1 poskytuje užitečné poznatky pro budoucí inženýrství dalších ortologů C2c1 s potenciálem vyšší štěpicí aktivity za pokojové teploty, což značně usnadňuje využití této endonukleázy jako univerzálního nástroje pro editaci genomu (Yang *et al.*, 2016).

Různorodost CRISPR/Cas systému třídy II nám umožňuje neustále objevovat nové strategie a molekulární mechanismy, které se následně dají využít v genovém inženýrství a biotechnologiích. Ku příkladu endonukleáza C2c1 nám odhalila mechanismus, který se opět trošku liší od endonukleáz zde zmíněných a který můžeme použít pro studium funkce CRISPR/Cas systému a ke zkoumání jeho evoluce (Shmakov *et al.*, 2015).

3.3 Využití CRISPR/Cas9

Technologie CRISPR/Cas9 disponuje širokou škálou uplatnění v několika oblastech, jako např. medicína, zemědělství a biotechnologie. Navzdory své efektivitě čelí tento genetický nástroj mnoha překážkám a nedostatkům, týkajících se imunogenicity, způsobu aplikace, nežádoucích účinků a etických problémů (Asmamaw, Zawdie, 2021).

Avšak i přes všechny své nedokonalosti je CRISPR/Cas9 považován za pokrokovou metodu, ve které hraje hlavní roli zejména možnost cílených genetických oprav a transkripční regulace - jak v živočišných buňkách, tak v rostlinných (Liu *et al.*, 2017).

3.3.1 GMO vytvořené pomocí CRISPR/Cas9

V roce 2013 byl proveden první *knock-out* genů s použitím CRISPR/Cas9 technologie, kde vědci vložili sgRNA cílicí na dva geny a Cas9 do myši zygoty. Na konci experimentu bylo v myších jedincích odhaleno až 80 % mutací ve zkoumaných genech. Tento a další experimenty na podobné bázi ukázaly, že CRISPR/Cas9 je rychlý a užitečný k jednokrokové produkci *knock-out* myši a dalších generací transgenních zvířat (JIN, LI, 2016).

Jelikož se nároky na kvalitní potraviny čím dál tím víc zvětšují, a zároveň roste i tlak na vylepšení nutriční hodnoty a tolerance potravin vůči enviromentálnímu stresu, tak se zvyšuje i poptávka po GMO potravinách. Své uplatnění v rámci genetického inženýrství nachází nyní CRISPR, společně s SDN (site-directed nucleases) a ZFN. Tyto techniky umožňují precizní genovou editaci, aniž by došlo k transferu cizího genu do organismu. Vyskytuje se tu však jeden konkrétní problém, a sice regulace GMO potravin a jejich společenská akceptovatelnost.

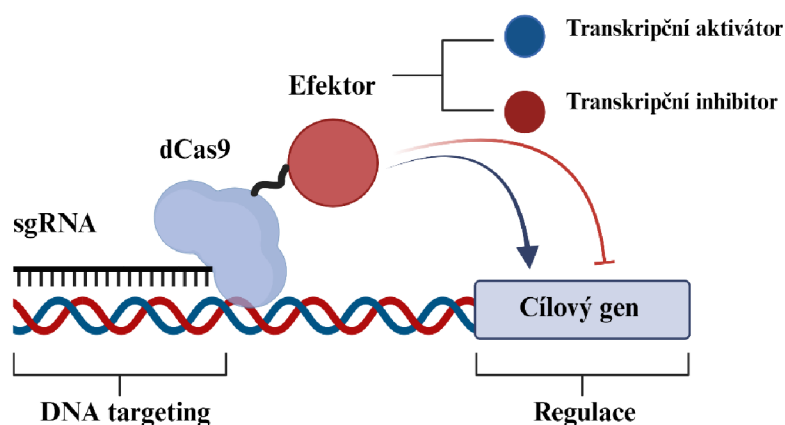
V evropských zemích a na Novém Zélandu spadají geneticky upravené potraviny pod kategorii GMO regulace, zatímco v USA jsou GMO potraviny této regulace zbaveny. Skutečnost, že geneticky upravené potraviny jsou v některých zemích přísně regulovány, z nich vytváří potraviny komplikovaně přístupné a tím se snižuje jejich komerční hodnota (Gupta *et al.*, 2021).

3.3.2 Aktivace exprese pomocí dCas9 systému

Využití CRISPR/Cas9 systému je vsuktu všestranné a vědci se průběžně naučili s tímto nástrojem pracovat zejména v oblasti genetických modifikací. Pomocí tohoto nástroje dokážeme jednoduše regulovat expresi na úrovni transkripce, a to díky technologiím nazývaným CRISPRi (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats interference) a CRISPRa (CRISPR-mediated gene activation). Obě jmenované technologie jsou odvozené od CRISPR/Cas9 systému, avšak mají společnou jednu věc, a sice složení komplexu. Obsahují katalyticky neaktivní protein Cas9 (dCas9), transkripční efektor a v neposlední řadě sgRNA.

Pozoruhodné na dCas9 je, že již nedokáže štěpit úseky DNA molekuly, stále si však uchovává schopnost specifického navázání na cílovou sekvenci. Důvodem této abnormality je pozměnění nukleázové domény proteinu Cas9 mutací H840A v HNH doméně a D10A v RuvC doméně. Jakmile se komplex dCas9/sgRNA naváže na cílový gen, způsobí to tzv. transkripční interferenci. Umlčení dCas9 je však reversibilní, tudíž dCas9 je schopný regulovat expresi genu, aniž by modifikoval genom permanentně (Karlson *et al.*, 2021).

Katalytický neaktivní Cas9 řadíme mezi tzv. SSN (site-specific nucleases), které nedokáží způsobit dvouřetězcové zlomy v DNA molekule v různých místech v genomu. Ve známých oblastech v DNA se poté inaktivovaný dCas9 zfúzuje s transkripčními aktivátory či represory a může efektivně regulovat několik genů s pomocí různých gRNA (Obrázek 4). Můžeme tak aktivovat více genů zároveň pomocí metody CRISPRa, nabízející tak více možností v oblasti molekulární biologie (Ding *et al.*, 2022).



Obrázek 4: Způsoby regulace genové exprese pomocí technologií odvozených od CRISPR/Cas9 systému. Podle toho, zda aktivujeme či inhibujeme expresi, používáme buď transkripční aktivátor, nebo transkripční inhibitor (sestaveno dle Gilbert *et al.*, 2013, vytvořeno v programu v BioRender.com)

Jakmile jsou tzv. transkripční aktivační domény proteinu sfúzovány s dCas9, může výsledný protein indukovat expresi genů v blízkém okolí a tím se z něho v podstatě stává programovatelný transkripční aktivátor tzv. PTA.

Aktivační domény (AD) jsou motivy schopné rekrutovat transkripční preiniciační komplex (PIC) k promotoru. Často jsou tyto aktivační domény využity ve spojení s dCas9, kvůli jejich schopnosti aktivovat transkripci (Casas-Mollano *et al.*, 2020). Známy transkripční aktivátor je např. VP64, který se skládá ze čtyř tandemových kopií aktivačních domén herpes simplex viru VP16, které jsou navzájem spojeny Gly-Ser vazbami. VP64 je často spojen s DNA-binding proteiny k specifické transkripční aktivaci (Dominguez *et al.*, 2016).

Komplex dCas9 s aktivační doménou VP64 reprezentuje první generaci tzv. CRISPRa systému, který je schopný aktivovat cílené endogenní geny. Mechanismus fungování probíhá nejdříve spojením aktivační domény s C-koncem dCas9, což následně může způsobit aktivaci jak reportérového genu, tak endogenního s použitím jediné sgRNA. Tímto způsobem byla použita aktivační doména VP64 i VP160 (až deset kopií VP16), avšak ovlivněné geny prokazovaly jen mírné známky transkripční aktivace (Casas-Mollano *et al.*, 2020).

Postupem času bylo zjištěno, že aby byla aktivace genů signifikantní, musí se použít několik sgRNA molekul. Tento objev však není dostačující pro celogenomové aktivační screeny, jejichž složitost vyžaduje použití jediné sgRNA na každý gen. Jestliže bylo ke zlepšení aktivace použito několik sgRNA, předpokládalo se, že stejného účinku dosáhneme

aplikací většího množství aktivátorů (Dominguez *et al.*, 2016). Tento způsob transkripční aktivace se již považuje za druhou generaci (Casas-Mollano *et al.*, 2020). Jedna studie zkoumala dCas9 spojený s tzv. karboxy terminální SunTag array složenou z 10 kopií malých peptidových epitopů. Příbuzný jednovláknový variabilní fragment (scFV) připojený k superfolder GFP (sfGFP; ke zlepšení skládání proteinů) a k VP64 (celkově tedy scFV-sfGFP-VP64) dokázal rozpoznat tyto peptidy a shromáždit několik kopií VP64 k jedinému dCas9. Díky aplikaci dCas9-SunTag se dosáhlo např. významné aktivace genu *CXCR4*, vedoucí k modulaci buněčné migrace (Dominguez *et al.*, 2016).

Další ze známých CRISPRa systémů patří mezi druhou generaci je komplex dCas9 s aktivační doménou VPR, která je složená z VP64, nuclear Factor NF- κ -B P65 subunit activation domain (p65AD) a R transaktivátoru viru Epstein-Barrové (Rta) (Chen, Qi, 2017). Spojení VP64-p65-Rta se ukázalo jako velmi účinné. Obdivuhodné bylo, že dCas9-VPR vykazovalo lepší výsledky než komplex dCas9-VP64, nebo jakýkoliv jiný CRISPRa systém. dCas9-VPR je transkripční aktivátor, který je natolik silný, aby vyvolal i fenotypové změny daného organismu (Casas-Mollano *et al.*, 2020).

Výše zmíněné vylepšené strategie transkripční aktivace se týkají úpravy dCas9, avšak ke zlepšení efektivity aktivace můžeme využít i modifikace sgRNA. Konkrétně tzv. synergistic activation system (SAM), jehož podstatou je připojení MS2 RNA aptamerů k sgRNA (RNA aptamer je molekula RNA, disponující vysokou afinitou a specifitou k cílovým molekulám). MS2 rekrutuje svůj příbuzný MS2 coating protein (MCP), který je spojený k p65AD a heat shock faktoru 1 (HSF1). Tento postup můžeme např. aplikovat společně se systémem dCas9-VP64 a tím dosáhneme lepší aktivace, než kdybychom použili jen dCas9-VP64 (Dominguez *et al.*, 2016).

dCas9 se dá aplikovat i ve spojení s histony nebo DNA modifikujícími proteinovými doménami. Bylo například zkoumáno spojení dCas9 s CBP, což je acetyltransferáza, která cílí na lyzin 27 v histonu H3K27, H3K18, H4K8, několik lyzinů v H2B a také na nehistonové proteiny. CBP funguje jako transkripční ko-regulátor a interaguje s mnoha transkripčními faktory a sekvencemi enhancerů. Jedna studie např. porovnávala transkripční aktivaci dCas9-CBP a SAM, čímž se zjistilo, že každé místo v genomu reaguje na tyto dva aktivátory různě. To indukuje, že dCas9-CBP a SAM kontrolují různé limitující procesy v transkripčním cyklu, a že dCas9-CBP může být využit pro nadměrnou expresi genů, které jsou odolné vůči aktivaci SAM systémem (Sajwan, Mannervik, 2019).

Strategií, jak aktivovat jeden gen nebo i několik genů současně je nespočet a jedna z nich byla např. prezentována ve studii zabývající se současnou aktivací několika genů v mozkové

tkáni. V experimentu byl použit systém SunTag-p65-HSF1 (SPH), kdy VP64 v SunTag byl vyměněn za p65-HSF1, používaný v systému SAM. Předpokládali, že GCN4 repeticce, rekrutující několik kopií p65-HSF1, mohou indukovat účinnější transkripční aktivaci. Tato strategie byla porovnávána s dalšími způsoby transkripční aktivace (např. VP64, SunTag, SAM atd.) ve dvou buněčných liniích (lidské HEK293T a myši N2a), a nakonec byla SPH prokázána jako nejefektivnější. S dCas9-SPH můžeme nejen simultánně aktivovat několik genů, ale zkoumat se dají i jejich různé aktivační profily. Různé rozsahy aktivace jsou pravděpodobně dány jejich základním stupněm exprese, epigenetickým stavem nebo cílovými místy pro sgRNA (Zhou *et al.*, 2018).

3.4 RNA interference

Manipulovat s geny a regulovat jejich expresi můžeme různými způsoby, technologie CRISPR/Cas9 je jen jednou z mnoha, se kterou jsme se obeznámili. V roce 1998 Fire *et al.* objevili mechanismus dnes již známý jako RNA interference (zkráceně RNAi), když zjistili, že za umlčení některých genů v organismu *Caenorhabditis elegans* můžou dvouvláknové RNA molekuly. O tři roky později vědci Elbashir, Caplen a jejich kolegové objevili, že dvouvláknové RNA molekuly o délce pouhých 21 a 22 nukleotidů můžou vyvolat tzv. RNAi - tedy umlčení v savčích buňkách. Tyto malé interferující RNA (siRNA) se brzy staly všudypřítomnými nástroji v biologickém výzkumu pro inhibici jakéhokoliv genu pouze pomocí krátkých sekvencí RNA (Setten *et al.*, 2019).

siRNA jsou malé interferující RNA skládající se z 21–23 nukleotidů, které jsou používané právě pro knockdown cílových genů. Jakmile jsou transfekované do určených buněk, tak jsou dvouvláknové siRNA molekuly odděleny ATP-dependentní helikázou a následně se váží do tzv. RNA-induced silencing complex neboli RISC. Komplex RISC je následně veden právě těmito vlákny k cílovým mRNA, aby došlo ke specifickému navázání a degradaci těchto molekul (Zhao *et al.*, 2019).

Molekula siRNA je negativně nabitá makromolekula, která je náchylná k degradaci sérovými endonukleázami a disponuje nízkou permeabilitou (propustností) pro buněčné membrány. Další z nepatrných nedokonalostí těchto molekul je požadovaná délka řetězce. Molekuly delší než 30 nukleotidů navozují interferonem zprostředkovanou imunitní reakci přes aktivaci toll-like receptorů (TLR). Výsledkem je hromadné umlčení genů a eventuální smrt buňky. Vnesení siRNA do organismu může také vést k vedlejším účinkům interakcí s mRNA molekulami, které jsou částečně homologní s naší cílovou mRNA. Tento problém ovlivňuje

konečná data a navozuje potenciální toxicitu, jelikož siRNA umlčuje geny, které nejsou našim předmětem zájmu (Alshaer *et al.*, 2021).

V roce 2018 Food and Drug Administration (FDA) schválili první RNA-interferenční léčivo Onpattro (Patisiran), používané k léčbě poškozených nervů v důsledku dědičné transthyretinové (hATTR) amyloidózy. hATTR je vzácné progresivní a smrtelné onemocnění, které zasahuje hned několik orgánů, jako např. srdce, nervový systém, gastrointestinální trakt a ledviny, což samozřejmě vede k nejrůznějším komplikacím. Toto onemocnění je charakterizované extracelulárním ukládáním chybného transthyretinového (TTR) proteinu. V normálním uspořádání je TTR tetramer složen ze čtyř jednořetězcových monomerů. Mutace v genu TTR způsobí destabilizaci tetrameru a jeho následnou disociaci do monomerů, které se dále agregují do amyloidových fibril, ukládajících se v několika orgánech po celém těle, což je pro poškozeného fatální. Umlčení TTR genu má za cíl zvrácení efektu mutace a tedy i vyléčení nemoci (Saw, Song, 2020).

Bylo navrženo již několik úspěšných chemických modifikací siRNA molekuly, aby se docílilo vlastností, jako např. delší poločas rozpadu, větší stabilita v krvi a zmírnění některých vedlejších účinků. Nativní siRNA je dvouvláknová molekula, ale existují i malé interferující RNA molekuly, skládající se ze tří vláken, které disponují lepšími schopnostmi a mírnějšími vedlejšími účinky. Jiné molekuly, jako např. short hairpin RNA (shRNA) jsou tvořené jen z jednoho řetězce, který formuje smyčku. Struktura smyčky zvyšuje jejich rezistenci vůči nukleázám (Alshaer *et al.*, 2021).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro experimentální část této bakalářské práce byla použita lidská suspenzní linie K562 dCas9 KRAB klon 5 získaná od vedoucí bakalářské práce. Tato linie stabilně exprimuje dCas9 KRAB konstrukt, jelikož byla připravená transdukcí lentiviry nesoucími vektor Lenti-dCas9-KRAB-blast (Addgene, kat.č. 89567). Lentiviry nesoucí celogenomovou knihovnu sgRNA byly rovněž získané vedoucí práce a připravené za použití vektorů Human Genome-wide CRISPRi-v2 Libraries (Addgene, kat.č. 83969). Oba vektory získal Ústav molekulární a translační medicíny darem od prof. Jonathana Weissmana z Massachusetts Institute of Technology a doc. Gary Hon z UT Southwestern Medical Center. Kultivace buněčné linie K562 byla provedena v kultivačním médiu IMDM (HyClone, kat.č. SH30228.01) s přidanými antibiotiky – penicilinem a streptomycinem (Gibco, kat.č. 15140122) a 10% (v/v) fetálním bovinním sérem (Gibco™ Thermo Scientific, kat.č. 26140079). Pro kultivaci buněk byly použity kultivační láhve Nunc™ Non-treated TripleFlask (Thermo Scientific). Buňky byly umístěny v inkubátoru při 37 °C, 95% vlhkosti a 5% CO₂ atmosféře.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- GelRed™ Nucleic Acid (Biotium, kat.č.41003)
- Gel Loading Dye (New England BioLabs, kat.č. B7024A)
- 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs, kat.č. N3231L)
- Agaróza (Sigma-Aldrich, kat.č.A9414)
- RIPA pufr (Thermo Scientific, kat.č. 89901)
- Inhibitor fosfatáz (Sigma-Aldrich, kat.č. 4906837001)
- Inhibitor proteáz (Sigma-Aldrich, kat.č. 4693159001)
- Luminata Forte Western HRP Substrát (Merck, kat.č. WBLUF0100)
- 5x SDS loading buffer
- Chlorid sodný (mikroCHEM, kat.č. 10122SP20-00500)
- Chlorid draselný (Sigma-Aldrich, kat.č. P9333-500G)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich, kat.č. 11332465001)
- Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lach Ner, kat.č. 30017-APO)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach Ner, kat.č. 30016-APO)
- Tris-HCl (Sigma-Aldrich, kat.č.T3253)

- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS, SERVA, kat.č.37180.05)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, kat.č. 93443)
- 10x TBE Buffer (Thermo Scientific, kat.č. B52)
- Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer (New England Biolabs, kat.č. M0532S)
- Polybren 10 mg/ml (Merck, kat.č. TR-1003-G)
- SPRIselect Bead-Based Reagent (Beckman Coulter)

Použité primární a sekundární protilátky

- Rabbit monoclonal Cas9 antibody (Abcam, kat.č. ab210752)
- Mouse monoclonal β -actin antibody (Sigma-Aldrich, kat.č. A-2228)
- Sekundární protilátka Anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugate (Sigma-Aldrich, kat.č. A-0545)
- Sekundární protilátka Anti-Mouse IgG (Fab specific) Peroxidase Conjugate (Sigma-Aldrich, kat.č. A-2304)

Použité soupravy

- MagCore® Cultured Cells DNA Kit (RBC Bioscience, kat.č. MCC-01)
- TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 12% (BioRad, kat.č. 1610185)
- Trans-Blot® Turbo™ RTA Transfer Kit, Nitrocellulose (BioRad, kat.č. 170-4270)
- BSA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, kat.č. 23208)

Použité roztoky a jejich příprava

10x PBS pufr (Phosphate Buffered Saline, pH = 6,8): 80 g NaCl + 2 g KCl + 14,4 g Na₂HPO₄ · 2H₂O + 2 g KH₂HPO₄ rozpustit za stálého míchání v 800 ml dH₂O, upravit pomocí HCl na žádané pH a doplnit vodou na konečný objem 1000 ml, sterilizovat autoklávováním.

1x PBS pufr: 100 ml 10x PBS pufru doplnit vodou na konečný objem 1000 ml.

10x TBS pufr (TRIS buffered saline, pH = 7,6): 24,2 TRIS + 80 g NaCl rozpustit za stálého míchání v 800 ml dH₂O, upravit pomocí HCl na žádané pH a doplnit vodou na konečný objem 1000 ml.

1x TBS – T pufr: 100 ml 10x TBS pufru, 1 ml Tween-20 a doplnit vodou na objem 1000 ml.

1x TBE pufr: 100 ml 10x TBE pufru doplnit vodou na konečný objem 1000 ml.

5x SDS loading buffer: 1,576 250mM Tris-HCl (pH = 6,8) + 3,085 g 0,5M DTT (pH = 6,8) + 12 ml 30% glycerolu + 4 g 10% SDS (pH = 7,1) + 24 mg 0,06% bromfenolové modři (pH = 6,8)

8 µg/ml polybren: 160 µl polybrenu s koncentrací 10 mg/ml a následně doplněno na celkový objem 200 ml kultivačního média.

1 µg/ml puromycin: 40 mg puromycinu (10 mg/ml) + 200 ml tkáňové vody, poměr ředění byl 1:200.

Blasticidin: na 200 ml kultivačního média bylo použito 2 ml blasticidinu s koncentrací 50 µg/ml, poměr ředění byl 1:100.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga Rotina 420R (Hettich)
- Inkubátor Heracell 150i (Thermo Scientific)
- Mikrocentrifuga (Labnet)
- Pipetor (Eppendorf)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Sérologické pipety (SPL Life Sciences)
- Centrifugační zkumavky 15 ml, 50 ml (Techno Plastic Products)
- Lednice (Liebherr)
- Mrazicí box (New Brunswick Scientific)
- Dokumentační systém ChemiDoc MP (BioRad)
- Transferový systém Trans-Blot Turbo (BioRad)
- Kývačka (IKA ROCKER)
- Kývačka Unimax 1010 (Heidolph)
- Suchá lázeň (LAB MARK)
- Elektroforetická komora (BioRad)
- Fluorescenční reader (ChemiDoc)
- EnVision Plate Reader (PerkinElmer)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Identifikace molekulárních cílů nukleosidového derivátu PNH 173 pomocí genetického celogenomového screeningu

Před prací jsou nejdříve předeřhány všechny potřebné komponenty ve vodní lázni (Memmert) nastavené na 37 °C po dobu aspoň 30 minut. Před prací v laminárním boxu (Thermo Scientific) je jeho povrch řádně vyčištěn pomocí dezinfekčního roztoku a 70% ethanolu. Buňky v kultivační nádobě jsou pozorovány ve světelném mikroskopu (Zeiss), než je s nimi jakkoliv manipulováno. Taktéž je zkontrolována změna barvy média jako indikátor případné kontaminace.

Po vizuálním zkontrolování buněk je zjištěna jejich viabilita a koncentrace pomocí přístroje Vi-Cell XR (Beckman Coulter).

Při zamrazování buněčné linie se postupuje obdobně – proběhne vizuální kontrola, připraví se laminární box pro práci s buňkami a spočítá se jejich viabilita. Buněčnou suspenzi následně centrifugujeme při 1500 RPM po dobu 5 minut. Při tomto procesu se používá zamrazovací médium, které je složeno z fetálního bovinního séra a 5% DMSO. Po centrifugaci oddělíme supernatant od pelety (přibližně 5×10^6 buněk) a k peletě přidáme 1 ml zamrazovacího média. Následně uložíme do mrazicího boxu při teplotě -80 °C. Během procesu můžeme odebrat vzorek buněčné suspenze na kontrolu přítomnosti mykoplazmat, pro který je potřeba $0,25 \times 10^6$ – $0,5 \times 10^6$ buněk. Po centrifugaci opět odebereme supernatant a k peletě přidáme 100 μ l lyzačního pufru s proteinázou K (Sigma-Aldrich, kat.č. 82452). Detekce kontaminace mykoplazmou proběhla za využití RT-PCR.

Nejdříve byla rozmražená buněčná linie K562 dCas9 KRAB (ampule byly zamrazeny po 50×10^6 buněk). Buněčná linie byla kultivována a selektována antibiotikem blastidinem (Invivogen, kat.č. ant-bl-05) s finální v médiu koncentrací v médiu 50 μ g/ml. Následně, po dokončení selekce testovanými látkami, byla hladina exprese dCas9 proteinu zkontrolována pomocí western blottingu viz kapitola 4.4.6 a přítomnost celogenomové knihovny pomocí PCR viz kapitola 4.4.2.

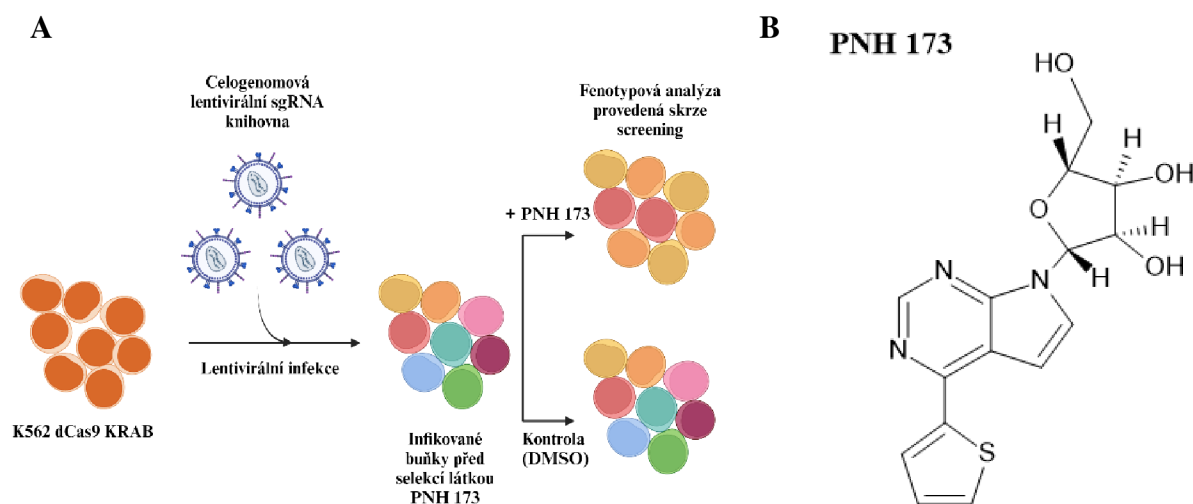
Celkový počet sgRNA molekul v celogenomové knihovně byl 106 430. Na počátku experimentu bylo nutné dodržet zastoupení knihovny 1000x větší, tudíž cílem bylo nainfikovat $106\,430\,000$ buněk sgRNA knihovnou. Lentiviry nesoucí sgRNA celogenomovou knihovnu byly již připravené a natitrované od vedoucí práce. Při následném ředění lentivirů 10x došlo k infekci 50 % buněk, MOI tedy dosáhlo hodnoty 0,5. Pro tento krok bylo potřeba nakultivovat přibližně 200×10^6 buněk.

Nejprve byla připravena buněčná suspenze o koncentraci 100 000 buněk/ml. Jedna láhev obsahovala 20×10^6 buněk ve 200 ml, takže bylo použito celkem deset lahví Nunc Non-treated TripleFlask, buňky byly dány do IMDM média s připravenými a naředěnými lentiviry a polybrenem s koncentrací 8 $\mu\text{g/ml}$, následně byla buněčná suspenze inkubována přes noc. Přidáním polybrenu do IMDM média byla zvýšena účinnost lentivirální transdukce.

Další den byly transdukované buňky promyty v 1x PBS a bylo vyměněno médium. Po 72 hodinách od transdukce byla započata selekce puromycinem (Sigma-Aldrich, 10 mg/ml, kat.č. P9620) s finální koncentrací v médiu 1 $\mu\text{g/ml}$, abychom zajistili přežití buněk obsahujících sgRNA. Po týdenní selekci puromycinem a blasticidinem byla buněčná kultura namnožena na 850 000 - 1 000 000 buněk/ml, poté byla část buněčné kultury zamrazena. Následně byly připravené dva vzorky každý s počtem buněk 5×10^6 na izolaci genomické DNA a proteinů pro ověření přítomnosti obou složek CRISPR systému, tedy dCas9 a sgRNA.

Buněčná linie byla podrobena působení nukleosidového derivátu PNH 173 o koncentraci 0,5 μM s prokázanými antineoplastickými účinky projevujícími se specifickou cytotoxicitou vůči nádorovým buněčným liniím. Další působení látkou PNH 173 byly prováděny tak dlouho dokud rozdíl doublingu mezi buněčnou populací ovlivněnou PNH 173 a kontrolní populací s DMSO nebyl minimálně 6. Buňkám bylo umožněno zotavení na 80% viabilitu a výše.

Působením látky PNH 173 dojde k přežití jen části populace buněk, u které je snížena exprese molekulárních cílů zkoumaných látek. Z této přeživší populace buněk byla po třech a čtyřech 72hodinových ovlivněních látkou PNH 173 izolována genomická DNA a nakonec bylo provedeno sekvenování na Illumina platformě. Ze získaných sekvenačních dat, jejichž analýzu provedl Ing. Rastislav Slavkovský, Ph.D., byly určeny mechanismy působení a rezistence testované látky PNH 173. Celý princip identifikace molekulárních cílů látky PNH 173 pomocí genetického celogenomového screeningu za použití CRISPR interference a struktura látky je znázorněna na Obrázek 5.



Obrázek 5: Schéma pracovního postupu při identifikaci molekulárních cílů nukleosidového derivátu PNH 173 (A) a struktura látky PNH 173 (B)

4.4.2 Detekce sgRNA v transdukované buněčné linii K562 dCas9 KRAB

Izolace DNA pomocí MagCore Cultured Cells DNA Kitu

Z kultivovaných buněčných linií byla vyizolována DNA pomocí MagCore Cultured Cells DNA Kitu. Z každé kultivační láhve bylo k izolaci DNA odebráno 20×10^6 buněk.

Restrikce DNA pomocí restriktázy SbfI

Pro restrikční štěpení DNA pomocí restriktázy SbfI byl nejdříve připraven restrikční mix skládající se ze vzorku genomové DNA, 10x CutSmart pufru a SbfI (Tabulka 1). Mix byl následně inkubován v 37°C přes noc.

Po restrikci vznikne templát pro PCR reakci o velikosti přibližně 500 bp. Pro vyšší účinnost a specifitu PCR reakce byl začleněn krok purifikace sgRNA sekvencí vložených do genomů buněčných linií použitím magnetické separace konkrétně SPRIselect Bead-Based Reagent.

Tabulka 1: Rozpis komponent pro restrikční štěpení pomocí restriktázy SbfI

Reagencie	Objem pro 50 μl reakci [μl]
DNA	1 μg
10x rCutSmart Buffer	5
SbfI	1
Nuclease-free Water	Doplněno do 50 μl

Polymerázová řetězová reakce - PCR

Nejprve byl připraven master mix pro osm reakcí s rezervou jedné reakce podle následující tabulky (Tabulka 2). Sekvence použitých primerů jsou uvedené v Tabulka 3.

Tabulka 2: Rozpis látek na PCR reakci

Reagencie	Objem pro jednu reakci [μ l]	Objem pro osm reakcí s rezervou [μ l]
DEPC voda	-	-
GC pufr	20	180
DMSO	3	27
100 μ M 3' primer	0,4	3,6
100 μ M 5' primer	0,4	3,6
10 mM dNTPs	2	18
Phusion polymeráza	1	9
Požadovaná koncentrace DNA ve vzorku	500 ng	

Tabulka 3: Sekvence použitých primerů pro PCR reakci

Primer	Sekvence (5' - 3')
Forward	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTA CACGATCGGAAGAGCACACGTCTGA ACTCCAGTCACCTTGTAGCACAAAAG GAAACTCACCT
Reverse	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATC GACTCGGTGCCACTTTTTC

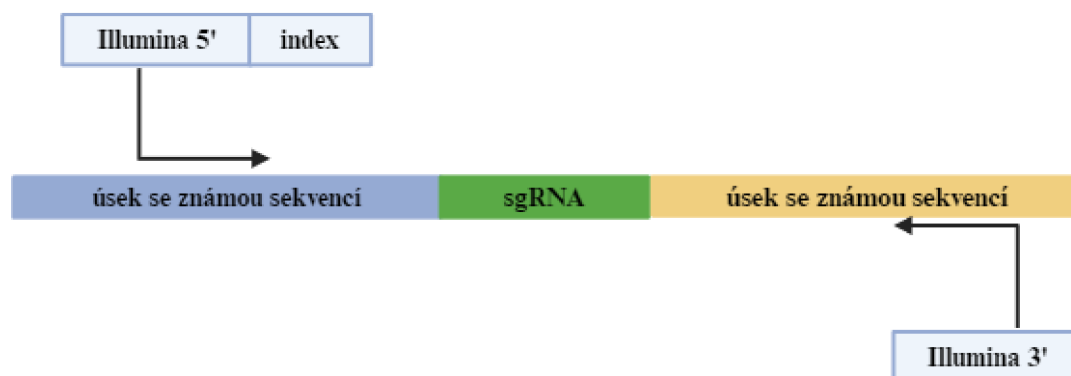
Na každou PCR reakci o objemu 100 μ l bylo požadované množství DNA vzorku 500 ng. Jelikož měl každý vzorek jinou koncentraci, tak byly jejich objemy vypočítány zvlášť. Na základě těchto objemů byl nakonec zjištěn i výsledný objem DEPC vody pro PCR reakci. (Tabulka 4).

Tabulka 4: Koncentrace DNA ve vzorcích po čtyřech ovlivněných látkami DMSO a PNH 173

Vzorek	Koncentrace DNA [ng/μl]	Objem pro PCR reakci [μl]	Objem DEPC vody pro PCR reakci [μl]
1	1278,12	0,391	72,809
2	1288,38	0,388	72,812
3	1431,76	0,349	72,851
4	382,66	1,307	71,893
5	756,74	0,661	72,539
6	903,49	0,553	72,647
7	1	1	72,2
8	-	-	73,2

Legenda k Tabulce 4: Vzorky 1, 2, 3 pocházely z třech biologických replikátů buněk K562 dCas9 KRAB ovlivněných látkou DMSO. Vzorky 4, 5, 6 jsou původem z třech biologických replikátů buněk K562 dCas9 KRAB ovlivněných látkou PNH 173. Vzorek 7 jsou buňky K562 wild type neobsahující sgRNA a dCas9, vzorek 8 je DEPC voda. Tyto dva vzorky sloužily jako negativní kontrola.

Provedená PCR reakce byla speciálně navržena tak, aby tzv. „obohatila“ sekvence sgRNA o Illumina 5' a Illumina 3' adaptéry, které byly přidány na 3' a 5' konec sgRNA kazety společně s indexem pro identifikování vzorků po NGS sekvenování na Illumina platformě (Obrázek 6). Nakonec byla provedena elektroforetická separace k ověření přítomnosti sgRNA kazet v připravených vzorcích.



Obrázek 6: Schéma znázorňující sekvenci kazety s sgRNA vložené v genomu buněk a vazbu primerů ke vnesení adaptérů a indexů pro NGS

Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu

Separace PCR produktů byla provedena v 2% agarózovém gelu za použití TBE pufru. K vizualizaci DNA bylo použito fluorescenční barvivo GelRed.

Mezitím byly připraveny vzorky do nanášecích jamek agarózového gelu v následujícím poměru - 20 μ l vzorku a 5 μ l nanášecího pufru. Do jamek bylo následně přidáno 20 μ l vzorku. Do první a poslední jamky bylo přidáno 3 μ l 100 bp DNA Ladderu pro zjištění velikosti našich PCR amplikonů.

Elektroforetická separace probíhala 1 hodinu a 50 minut za konstantního napětí 90 V. Po provedení separace byl gel vyhodnocen pomocí fluorescenčního readeru.

4.4.3 Izolace proteinů a jejich detekce za použití Western blottingu

Lyzace a izolace proteinů

Veškerá práce probíhala na ledu. Do jednotlivých zkumavek bylo přidáno potřebné množství RIPA lyzačního pufru obsahujícího inhibitory proteáz a fosfatáz přibližně podle velikosti pelety buněk (minimum je 20 μ l). Po dobu 25 minut byl obsah zkumavky špičkou 3x řádně propipetován do rozbití pelety. Aby došlo k dostatečnému rozbití organel, tak byly vzorky dány do ultrazvuku po dobu 2 min. Následně byly zkumavky se vzorkem centrifugovány po dobu 25 minut při 4 °C a 14 000 RPM. Vznikl tekutý supernatant obsahující veškeré proteiny a peleta s nukleovými kyselinami a lipidy. Poté se vzniklý supernatant s proteiny přepipetoval do nových zkumavek a bylo stanoveno celkové množství proteinů ve vzorku za použití PierceTM BCA Protein Assay Kit v 96jamkové mikrotitrační destičce.

Stanovení koncentrace proteinů s použitím PierceTM BCA Protein Assay Kit

PierceTM BCA Protein Assay Kit je založen na reakci, která využívá sodné soli kyseliny bicinchoninové (BCA) komplexující ionty Cu^{I} , které vznikly reakcí iontů Cu^{II} s peptidovou vazbou. Výsledný fialový produkt vykazuje absorbanci při 562 nm. Tímto způsobem můžeme efektivně a rychle zjistit koncentraci proteinů ve studovaných vzorcích.

Nejdříve byl připraven pracovní roztok smícháním BCA Reagentu A a BCA Reagentu B v poměru 1:50. Aby nedošlo k překročení maximální hodnoty detekce kitu a vzorek byl spotřebován co nejméně, je vhodné vzorky naředit destilovanou vodou. Do každé jamky bylo přidáno 7,5 μ l destilované vody a následně 2,5 μ l vzorku. Vzorky byly přidávány do mikrotitrační destičky v duplikátech. Pro kontrolu bylo napipetováno i 10 μ l každého ze standardů a blank – destilovaná voda. V první vertikální řadě mikrotitrační destičky tedy byla postupně se zvyšující koncentrační řada standardů, v dalších řadách již následovaly

studované vzorky. Následně bylo multikanálovou pipetou přidáno 200 μ l pracovního roztoku do každé jamky.

Mikrotitrační destička byla inkubována v 37 °C po dobu 30 min. Po inkubaci byla změřená absorbance při 562 nm pomocí EnVision Plate Readeru a podle kalibrační řady byla spočítána koncentrace proteinů ve vzorcích.

SDS-PAGE elektroforéza a semi-dry western blotting

Podle molekulární hmotnosti proteinů našeho zájmu - očekávaná hmotnost proteinů byla 10 – 200 kDa – byl připraven 12% polyakrylamidový gel se šířkou 1,5 mm podle návodu Tabulka 5. Na přípravu byl použit TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit. Látky TEMED a 10% APS byly přidány těsně před nanesením gelu mezi skla.

Tabulka 5: Rozpis látek na přípravu 12% gelu pro SDS-PAGE elektroforézu

Šířka 12% gelu [mm]	1,5	
	Dělicí gel	Zaostřovací gel
Resolver A	4 ml x n	-
Resolver B	4 ml x n	-
Stacker A	-	1,5 ml x n
Stacker B	-	1,5 ml x n
TEMED	4 μ l x n	3 μ l x n
10% APS	40 μ l x n	15 μ l x n

Legenda k Tabulce 5:

n...počet použitých gelů

APS...peroxidisíran amonný

Pipetou byl nanesen roztok dělicího gelu do elektroforetické komůrky přibližně 2 cm od okraje kratšího skla. Roztok byl opatrně převrstven 2–3 kapkami butanolu. Gel se nechal tuhnout minimálně 30 minut při laboratorní teplotě.

Po zatuhnutí dělicího gelu byl gel propláchnut dostatečným množstvím destilované vody tak, aby se odstranil všechn butanol. Zbytek vody byl odstraněn odsáním kouskem buničiny.

Pomocí pipety byl nanesen roztok zaostřovacího gelu až k okraji kratšího skla. Pro vytvoření požadovaných nanášecích jamek o dané velikosti byl vsazen hřeben a následně bylo zkontrolováno, zda se nevytvořili bubliny. Gel se nechal tuhnout minimálně 30 minut v pokojové teplotě.

Připravená skla s gelem byla umístěna do drážek v elektrodovém držáku tak, aby byla kratší skla orientována dovnitř směrem k sobě - vytvářející tak vaničku pro nalití pufru. Gely byly přitlačeny na zelené těsnění pomocí klipsen. Upínací rámeček byl poté vložen do elektrodové vany. Do komůrky mezi skly v elektrodovém držáku byl nalit 1x TBS pufr až po okraj, následně bylo zkontrolováno, neprotéká-li pufr. Do elektrodové vany byl nalit elektrodový pufr 1x TBS na celkově 4 gely.

Nejdříve byly vzorky naředěny tak, aby bylo v každé jamce stejné množství proteinů, konkrétně 50 µg. Byl přidán nanášecí Laemmliho pufr. Vzorky byly zahřáty v termobloku na 95 °C po dobu 5 minut. Jakmile byly vzorky zahřáty, tak byly nanášeny na gel v množství 50 µg celkových proteinů na jamku. Do krajní jamky bylo nanášeno 4 µl markeru molekulové hmotnosti a do dalších jamek bylo přidáno 20 µl studovaných vzorků.

Na elektrodovou vanu bylo nasazeno víko s přívody elektrického proudu a napětí bylo nastaveno na 80 V. Za 30 min bylo napětí zvýšeno na 120 V.

Elektroforetická separace byla zastavena, jakmile čelo elektroforézy dosáhlo na konec dělicího gelu. Separace byla ukončena přerušením přívodu elektrického proudu.

Z elektroforetických komůrek byla vyndána skla, nakonec byl zaostřovací gel oddělen od dělicího gelu. Připravený dělicí gel se použil pro imunodetekci semi-dry western blottingem.

Semi-dry western blotting

Před nanášením gelu na membránu a sestavení aparatury byly filtrační papíry a nitrocelulózová membrána namočené zvlášť do transferového pufru. Transferový pufr byl připraven smícháním 200 ml 5x pufru od BioRad, 600 ml destilované vody a 200 ml 95% ethanolu. Sestavení aparatury probíhalo v následujícím pořadí: filtrační papíry, nitrocelulózová membrána, dále gel a nakonec opět filtrační papíry. Po nanášení každé vrstvy byly bubliny opatrně vytlačovány přejížděním speciálním válečkem. K přebílení byl nastaven program pro 1,5mm gel 25 V na 10 min. Abychom zjistili, zda byly proteiny správně přeneseny z gelu na membránu, tak bylo provedeno barvení Ponceau S. Barvivo se následně odmylo v 1x TBS pufru do úplného odbarvení.

Imunodetekce

Membrána byla přenesena do 5% roztoku BSA v 1x TBS-T. Blokování membrány probíhalo 1 hodinu na kývačce při laboratorní teplotě. Blokovací roztok musí být vždy shodný s roztokem, v němž je rozpuštěna primární i sekundární protilátka.

Primární protilátka byla naředěna v blokovacím roztoku. Koncentrace protilátky v roztoku by neměla přesáhnout 5 µg/ml. Informace ohledně použitých primárních protilátek jsou přehledně sepsány v Tabulka 6.

Tabulka 6: Rozpis použitých primárních protilátek vůči studovaným proteinům

Protein	Molekulární hmotnost proteinu [kDa]	Původ prim. protilátky	Poměr ředění prim. protilátky	Výrobce	Katalogové číslo
Cas9	164	Králík	1:5000	Abcam	Ab210752
β-aktin	45	Myš	1:4000	Sigma Aldrich	A2228

Legenda k Tabulce 6: Byly použity dvě primární protilátky, a sice vůči proteinu Cas9, abychom zkontrolovali jeho hladinu exprese v buněčné kultuře, a vůči β-aktinu pro kontrolu stejného množství proteinů ve vzorcích.

Po 1 hodině blokování byla membrána vyjmuta z blokovacího roztoku, promyta v TBS pufru s 0,1% Tweenem 20 (TBS-T) a vložena do roztoku naředěné primární protilátky. Roztoky primárních protilátek byly připraveny do 50ml centrifugačních zkumavek v objemu přibližně 4–5 ml. Membrána s primárními protilátkami byla inkubována přes noc na rolleru při 4 °C.

Po ukončení inkubace byla membrána 3x po 5 minutách promyta na kývačce v TBS pufru s 0,1% Tweenem 20. Během posledního oplachu byla naředěna sekundární protilátka v poměru 1:10 000 v roztoku 5% BSA. Během experimentu byly použity primární protilátky z myši a králíka, tudíž jako sekundární protilátky byly použity Anti-mouse a Anti-rabbit. Propláchnutá membrána byla vložena do roztoku sekundární protilátky a inkubována při laboratorní teplotě 1 hodinu na kývačce.

Po inkubaci byla membrána opět 3x po 5 minutách promyta v TBS s 0,1% Tweenem 20.

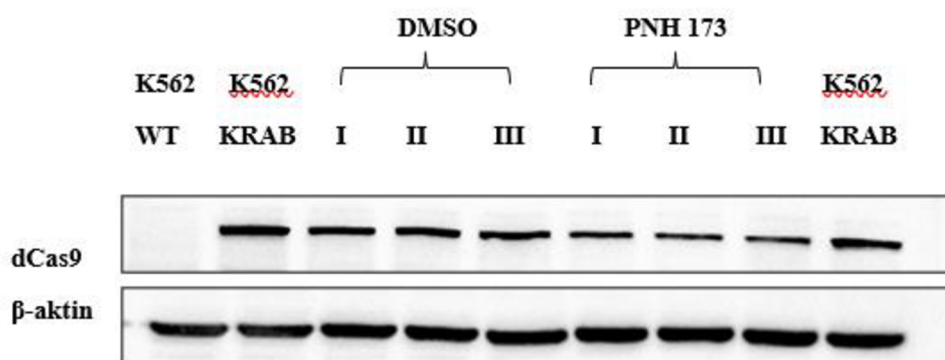
Před vložení membrány do dokumentačního systému byla membrána převrstvena pár kapkami luminiscenčního substrátu Luminata HRP Forte.

5 VÝSLEDKY

5.1. Selekcce buněčné linie K562 dCas9 KRAB a kontrola exprese proteinu dCas9

U linie K562 dCas9 KRAB byla nejdříve provedena kultivace za přítomnosti selekčního antibiotika blasticidinu s koncentrací 50 $\mu\text{g/ml}$ pro dostatečnou expresi proteinu dCas9 v námi studovaných buňkách. Pro kontrolu exprese proteinu byl proveden western blotting, ve kterém byla prokázána přítomnost proteinu dCas9 v buňkách K562 s dCas9 KRAB doménou a v téže linii po selekci testovanou látkou PNH173 a DMSO, které sloužilo jako kontrola.

Zároveň s ověřením hladiny exprese dCas9 proteinu byl proveden WB pro detekci β -aktinu, abychom ověřili ekvivalentní množství proteinů ve všech vzorcích (Obrázek 7). Expresi dCas9 proteinu byla stanovena ve všech zkoumaných replikátech.



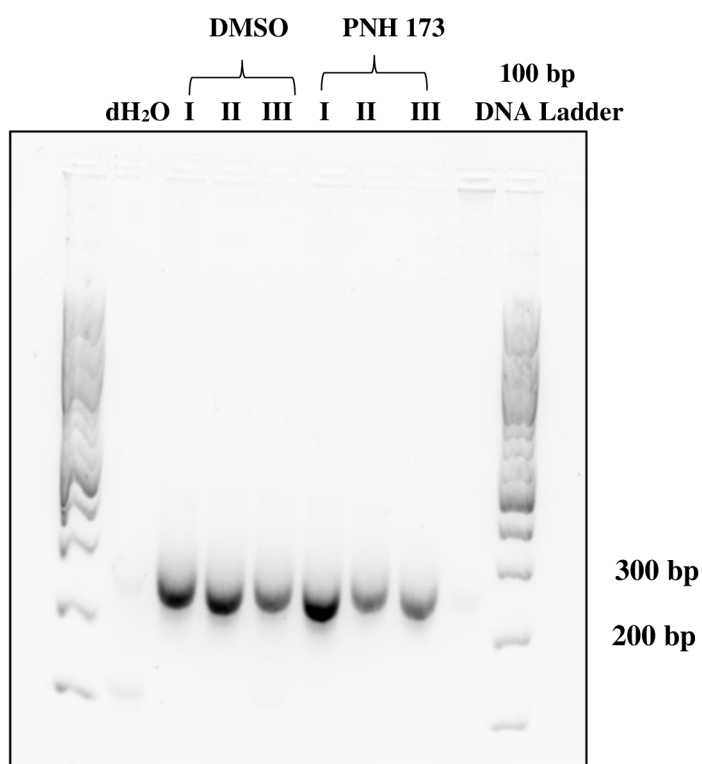
Obrázek 7: Výsledek Western blottingu detekujícího expresi dCas9 proteinu u buněčné linie K562 dCas9 KRAB

5.2. Transdukce buněčné linie celogenomovou sgRNA knihovnou

Buněčná linie K562 dCas9 KRAB byla lentivirálně transdukována knihovnou sgRNA cílící sekvence promotorů každého genu v lidském genomu. Protein dCas9 je speciálně modifikován tak, aby reguloval expresi genů v buňkách při současném zachování jejich struktury, tím pádem bylo v buněčné linii inhibován vždy odlišný gen na základě korespondující sekvence sgRNA. Buněčná linie byla zároveň pod selekcí antibiotikem puromycinem, abychom kultivovali jen buňky s vloženou sgRNA knihovnou a blasticidinem pro zachování exprese dCas9 enzymu.

První krok pro zjištění molekulárních cílů nukleosidového derivátu PNH 173 pomocí Illumina sekvenování je provedení izolace DNA, frakcionace genomické DNA a nakonec PCR reakce s elektroforetickou separací (Obrázek 8). Frakcionace genomické DNA byla provedena z důvodu redukce celkové velikosti izolované DNA, aby vzorky PCR obsahovaly jen fragmenty se sekvencí sgRNA kazety. Frakcionace byla provedena pomocí restriktázy SbfI, následovalo přečištění za použití SPRI select Bead-Based Reagent.

Výsledný PCR amplikon odpovídal predikované velikosti v rozmezí 260–280 bp. V negativní kontrole, což byla v našem případě destilovaná voda, se neobjevil žádný produkt podle očekávání.



Obrázek 8: Výsledek detekce a separace PCR produktů získaných cílenou amplifikací sgRNA kazety začleněné v genomu linie K562 dCas9 KRAB

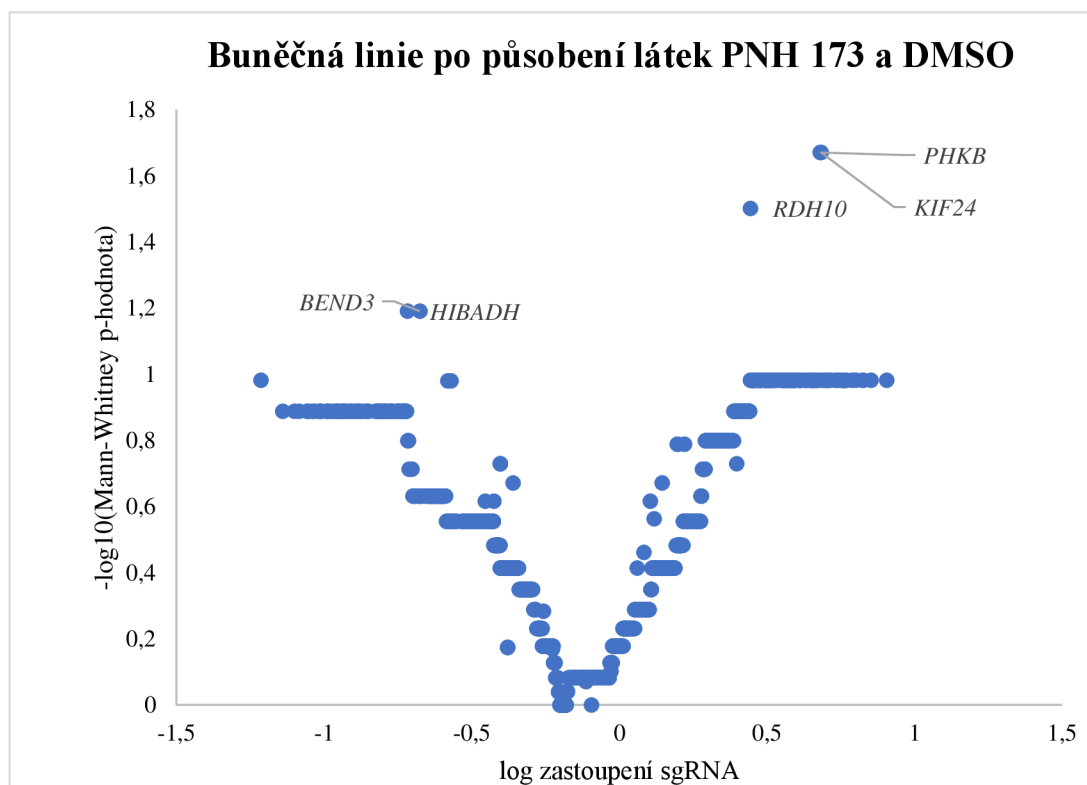
Legenda k Obrázku 8: V první a poslední jamce byl aplikován 100 bp DNA Ladder od firmy New England BioLabs. V druhé jamce se nachází negativní kontrola, v dalších buňky K562 dCas9 KRAB pod vlivem látky DMSO v triplikátu a pod vlivem nukleosidového derivátu PNH 173 v triplikátu.

5.3. Identifikace molekulárních cílů nukleosidového derivátu PNH 173 pomocí sekvenování na Illumina platformě

Po selekčním tlaku, který byl vytvořen na populaci buněk K562 dCas9 KRAB přidáním nukleosidového derivátu PNH 173 došlo k přežití té části populace buněk, která měla sníženou

expresi molekulárních cílů zkoumané látky. Buněčné linie byly během experimentu celkem čtyři krát ovlivněny studovanou látkou a DMSO jakožto kontrolou po dobu 72 hodin. Z takto získaných vzorků byla následně izolována genomická DNA a provedeno sekvenování na Illumina platformě.

Pomocí sekvenování nové generace (NGS) na Illumina platformě bylo zjištěno relativní zastoupení sgRNA molekul v populaci kultivované pod vlivem látky PNH 173 a v kontrolní populaci ovlivněné látkou DMSO. Výsledky sekvenování byly statisticky zpracovány pomocí Mann-Whitneyho analýzy a znázorněny ve formě Volcano plotu viz Graf 1. Jako molekulární cíle nukleosidového derivátu PNH 173 byly označeny geny *PHKB*, *KIF24* a *RDH10*. Geny zapříčiňující rezistenci k této látce jsou *BEND3* a *HIBADH*. Těchto pět genů bylo identifikováno se signifikancí $p \leq 0,05$.



Graf 1: Volcano plot znázorňující na ose x zastoupení jednotlivých sgRNA v buněčné linii K562 dCas9 KRAB po selekci látkou PNH173 porovnané s kontrolou DMSO. Dále na ose y je vynesena signifikance dle Mann-Whitney statistického testu. Data byla souhrnně analyzována ze tří biologických replikátů.

Legenda ke Grafu 1: Jako molekulární cíle látky byly vyprofilovány geny *PHKB*, *KIF24*, *RDH10*. Za mechanismus rezistence vůči látce PNH 173 můžeme považovat geny *BEND3* a *HIBADH*.

6 DISKUSE

6.1 Vlastnosti a funkce molekulárních cílů testované látky PNH173

6.1.1 KIF24

Kinesiny jsou molekulární motory, které se účastní intracelulárního transportu. Dokážou se navázat na mikrotubuly a s pomocí ATP se posunují podél těchto vláknitých struktur a transportují proteinové komplexy, membránové vezikuly a organely. Existuje nejméně 45 savčích genů pro kinesin (Kif) a jejich genové produkty jsou následně členěny do tří typů na základě pozice motorové domény v rámci proteinu, a sice N-kinesiny, C-kinesiny a M-kinesiny. V podstatě můžeme říci, že N-kinesiny a C-kinesiny slouží k molekulárnímu transportu směrem k plus a minus konci mikrotubulů, zatím co u M-kinesinů bylo zjištěno, že dokážou depolymerizovat mikrotubuly. M-kinesiny mohou být dále fylogeneticky seskupeny do rodiny kinesin-13, která obsahuje čtyři lidské a myší proteiny: Kif2A, Kif2B, Kif2C/MCAK a KIF24 (Kobayashi *et al.*, 2011).

Bylo objeveno 45 genů kódujících KIF proteiny u člověka, mezi nimiž bylo několik členů asociováno s nádorovou patobiologií. Snížení exprese proteinů KIF2C, KIF3C, KIF22, KIF18A a KIF24 inhibovalo proliferaci karcinomu prsu skrze různé mechanismy, jako např. blok v přechodu G2/M fázi v buněčného cyklu, v jehož důsledku dochází ke zpožděnému výstupu z mitózy a celkově k deregulaci buněčného dělení (Li *et al.*, 2020).

6.1.2 RDH10

Kyselina all-*trans*-retinová (atRA) se účastní mnoha biologických procesů od embryonálního vývoje, buněčné diferenciaci a proliferaci, imunity, neurogeneze až po energetický metabolismus. Je to metabolit vitamínu A (retinolu) a vzniká dvěma po sobě následujícími dehydrogenacemi z právě zmíněného retinolu. Retinolové dehydrogenázy katalyzují první a rychlost limitující reakci za vzniku all-*trans*-retinalu. RDH10 je jedna z nejlépe popsaných dehydrogenáz v rámci biosyntézy atRA (Obrochta *et al.*, 2015).

Gliomy náleží mezi jedny z nejfatálnějších typů lidských nádorů a současně neexistuje žádná efektivní léčba. Ukázalo se, že *RDH10* je vysoce exprimován v lidských gliomech a jeho exprese koreluje se stupněm závažnosti tumoru a dobou přežití pacientů. Cílené snížení exprese *RDH10 in vitro* pomocí shRNA nesených lentiviry potlačilo proliferaci gliomových buněk a celkově tumorigenezi. V *in vivo* experimentu provedeném na modelu myších gliomů došlo vlivem snížení exprese *RDH10* k výraznému omezení jejich růstu. Předpokládá se tedy, že *RDH10* může hrát důležitou roli v proliferaci gliomových buněk a její regulace by mohla vést k nalezení vhodného léku pro léčbu gliomů (Guan *et al.*, 2017).

6.1.3 PHKB

Metabolismus glykogenu řadíme mezi klíčové procesy v rámci metabolismu nádorových buněk. Fosforyláza kináza (PHK) reguluje glykogenolýzu aktivací glykogenfosforylázy, která katalyzuje fosfolytickou degradaci glykogenu (Yang *et al.*, 2019).

Fosforyláza kináza je polymer sestávající ze 16 podjednotek – čtyři podjednotky α , β , γ a δ vyskytující se vždy po čtyřech. Podjednotka α zahrnuje izoformy pro kosterní svalstvo a játra, které jsou kódované dvěma různými geny, to samé můžeme říct i podjednotce γ . Podjednotka β je stejná jak u svalové, tak jaterní izoformy a je kódovaná genem, který je členem rodiny regulačních podjednotek fosforylázy B kinázy. Poslední podjednotka δ je kalmodulin a je kódovaná třemi různými geny (PHKB section summary - The Human Protein Atlas).

Z pohledu nádorové biologie existuje jen omezené množství informací o PHKB, z nichž uvádíme následující. Nekódující RNA molekuly jsou často asociovány s genovou regulací během ontogeneze a průběhu různých onemocnění. Nedávno byla objevena dlouhá nekódující RNA s názvem Hmrhl, která je transkribována z intronu 14 *phkb* genu a je asociována s chromatinem. Bylo prokázáno, že Hmrhl funguje jako enhancer RNA pro svůj hostitelský gen - *Phosphorylase Kinase Regulatory Subunit Beta (phkb)* – v buňkách K562 chronické myeloidní leukémie (Fatima *et al.*, 2019). Dále ve studii z roku 2014 bylo prokázáno, že PHKB interaguje s C-koncem proteinu KIAA1199, což zapříčinilo delší dobu přežití nádorových buněk a zvýšenou proliferaci (Terashima *et al.*, 2014).

6.2 Vlastnosti a funkce genů podmiňujících rezistenci vůči testované látce PNH 173

6.2.1 BEND3

Proteiny obsahující BEN doménu jsou důležitou součástí v procesu regulace genové exprese, nicméně způsob a molekulární podstata, jakými regulují funkci chromatinu a transkripci je prozatím neznámý. BEND3 je protein obsahující čtyřnásobnou repetici BEN domény, která asociuje s heterochromatinem a funguje jako transkripční represor. Jedna studie ukázala, že BEND3 je více exprimován v pluripotentních buňkách a následná indukce diferenciace těchto buněk vyústí v down-regulaci BEND3, naopak odstranění BEND3 vede pluripotentní buňky k zvýšené regulaci exprese diferenciačních genů. BEND3 se váže na promotory faktorů spojených s vývojem organismu a klíčových regulátorů buněčného cyklu, jako např. CDKN1A (Kurniawan *et al.*, 2022).

BEND3 je lokalizován na chromozomu 6 v lidském genomu a obsahuje tři introny a čtyři exony. N-koncová část BEND3 je následována čtyřmi BEN doménami z 80

aminokyselin, z nichž každá disponuje odlišnými molekulárními interakcemi a funkcemi. NLS (Nuclear Localization Signal) je přítomný právě v N-koncové části proteinu. Protein tvoří oktamerickou strukturu vyššího řádu (Naiyer *et al.*, 2023).

Úloha BEND3 v karcinogenezi byla již vícekrát zkoumána. Např. mechanismus, jakým BEND3 rekrutuje PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) k nemethylovaným CGI (CpG Islands) v pluripotentních buňkách a jeho možná souvislost s rekrutací PRC2 i v jiných buněčných kontextech, konkrétně u nádorových buněk. Skutečně se ukázalo, že komponenty PRC2 (EZH2, SUZ12, EED) jsou frekventovaně deregulovány v několika onkologických onemocněních, tudíž pochopení specifického spojení BEND3-EZH2 (Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit) by mohlo vést k novým terapeutickým přístupům (Khan, Prasanth, 2023).

6.2.2 HIBADH

Valin je esenciální rozvětvená aminokyselina, která je v lidském organismu podrobena několika krokové degradaci. Určitý blok v degradaci valinu může způsobit akumulaci intermediátu 3-hydroxyisomáselné kyseliny (3HiB) a její exkrece v moči. Mutace v genu *HIBADH*, který kóduje 3-hydroxyisobutyryldehydrogenázu (HIBADH) může způsobit deficienci HIBADH a právě tuto metabolickou poruchu (Meyer *et al.*, 2021).

Taktéž byla zkoumána možná interakce HIBADH s 14-3-3 σ proteinem, který je úzce spojen s karcinogenezí. 14-3-3 proteiny jsou jedny z nejhojněji se nacházejících proteinů v buňce, které byly objeveny v roce 1967 jako skupina acidických proteinů v savčím mozku. Tyto proteiny existují celkově v sedmi izoformách a hrají důležitou roli v regulaci několika buněčných procesů, jako např. udržování kontrolních bodů v buněčném cyklu a DNA reparaci, prevence apoptózy, spuštění buněčné diferenciaci a senescence atd (Zou *et al.*, 2013).

7 ZÁVĚR

Ve sféře genetického inženýrství existuje spousta možností, jak editovat genom organismů, a tím například zjistit funkce a mechanismy regulace různých genů. Jeden ze způsobů, k tomuto studiu používaných, je i technologie CRISPR/Cas9 odvozená z prokaryotních organismů, jejíž hlavní podstata je narušení určité sekvence v genomu pomocí dvou hlavních komponent, a sice sgRNA (single-guide RNA) a endonukleázy Cas9. Single-guide RNA je molekula obsahující sekvenci komplementární k sekvenci našeho zájmu, a tím v podstatě slouží jako naváděcí molekula pro endonukleázu Cas9, která následně danou sekvenci rozstříhne.

Jestliže však našim cílem není štěpení určitého genu, ale jen regulace jeho exprese, tj. aktivace či inhibice jeho transkripce, tak můžeme využít modifikovaný dCas9 protein (dead Cas9), u kterého byla deaktivována endonukleázová aktivita a protein je tím pádem schopný se díky sgRNA jen navázat na určitou sekvenci a pomocí dalších komponent gen aktivovat či inhibovat. Pro účely experimentální části předkládané práce byla použita inhibiční doména KRAB (Krüppel associated box) ve spojení s dCas9 proteinem.

Buněčná linie K562 dCas9 KRAB byla úspěšně transdukována lentiviry nesoucími sgRNA vůči celému lidskému genomu. Exprese dCas9 a sgRNA v buněčné linii byla důkladně ověřena a následně byla provedena izolace DNA. Buněčná linie byla kultivována pod selekcí selekčními antibiotiky a nukleosidového derivátu PNH 173, což je látka ovlivňující proliferační aktivitu nádorových buněk. Hlavním cílem této práce bylo identifikovat molekulární cíle látky PNH173 a geny podmiňující rezistenci vůči tomuto slibnému antineoplastickému derivátu 7-deazaadeninu.

Pomocí genetického celogenomového screeningu byly zjištěny molekulární cíle nukleosidového derivátu PNH 173 a geny podmiňující rezistenci vůči testované látce. Jako molekulární cíle byly určeny geny *KIF24*, *PHKB* a *RDH10*. Buňky se brání cytotoxickému působení látky PNH 173 tím, že indukují expresi *BEND3* a *HIBADH*. Rezistence vůči PNH173 je pak způsobena aktivací dediferenciačních mechanismů.

8 LITERATURA

1. Alshaer W, Zureigat H, Al Karaki A, Al-Kadash A, Gharaibeh L, Hatmal MM, Aljabali AAA, Awidi A (2021): siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches. *European Journal of Pharmacology*, 905, 174178. doi:10.1016/j.ejphar.2021.174178.
2. Asmamaw M, Zawdie B (2021): Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing. *Biologics: Targets and Therapy*, 15, 353–361. doi:10.2147/BTT.S326422.
3. Bhatia S, Pooja, Yadav SK (2023): CRISPR-Cas for genome editing: Classification, mechanism, designing and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 238, 124054. doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.124054.
4. Bhowmik R, Chaubey B (2022): CRISPR/Cas9: a tool to eradicate HIV-1. *AIDS Research and Therapy*, 19, doi:10.1186/s12981-022-00483-y.
5. Casas-Mollano JA, Zinselmeier MH, Erickson SE, Smanski MJ (2020): CRISPR-Cas Activators for Engineering Gene Expression in Higher Eukaryotes. *The CRISPR Journal*, 3, 350–364. doi:10.1089/crispr.2020.0064.
6. Chen M, Qi LS (2017): Repurposing CRISPR System for Transcriptional Activation In: Li, L-C (ed): *RNA Activation*. Springer, Singapore, pp. 147–157.
7. Chylinski K, Makarova KS, Charpentier E, Koonin EV (2014): Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 42, 6091–6105. doi:10.1093/nar/gku241.
8. CRISPR Timeline (2015): <https://www.broadinstitute.org/what-broad/areas-focus/project-spotlight/crispr-timeline> (accessed: 02/10/2023).
9. Czarnek M, Bereta J (2016): The CRISPR-Cas system - from bacterial immunity to genome engineering. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, 70, 901–916. doi:10.5604/17322693.1216379.
10. Ding X, Yu L, Chen L, Li Y, Zhang J, Sheng H, Ren Z, Li Y, Yu X, Jin S, Cao J (2022): Recent Progress and Future Prospect of CRISPR/Cas-Derived Transcription Activation (CRISPRa) System in Plants. *Cells*, 11, 3045. doi:10.3390/cells11193045.
11. Dominguez AA, Lim WA, Qi LS (2016): Beyond editing: repurposing CRISPR–Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17, 5–15. doi:10.1038/nrm.2015.2.

12. Fatima R, Choudhury SR, T.r D, Bhaduri U, Rao MRS (2019): A novel enhancer RNA, Hmrhl, positively regulates its host gene, phkb, in chronic myelogenous leukemia. *Non-coding RNA Research*, 4, 96–108. doi:10.1016/j.ncrna.2019.08.001.
13. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, Lim WA, Weissman JS, Qi LS (2013): CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell*, 154, 442–451. doi:10.1016/j.cell.2013.06.044.
14. Guan F, Wang L, Hao S, Wu Z, Bai J, Kang Z, Zhou Q, Chang H, Yin H, Li D, Tian K, Ma J, Zhang G, Zhang J (2017): Retinol dehydrogenase-10 promotes development and progression of human glioma via the TWEAK-NF- κ B axis. *Oncotarget*, 8, 105262–105275. doi:10.18632/oncotarget.22166.
15. Gupta S, Kumar A, Patel R, Kumar V (2021): Genetically modified crop regulations: scope and opportunity using the CRISPR-Cas9 genome editing approach. *Molecular Biology Reports*, 48, 4851–4863. doi:10.1007/s11033-021-06477-9.
16. Han W, She Q (2017): Chapter One - CRISPR History: Discovery, Characterization, and Prosperity In: Torres-Ruiz, R, Rodriguez-Perales, S (ed): *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Academic Press, , pp. 1–21.
17. JIN L-F, LI J-S (2016): Generation of genetically modified mice using CRISPR/Cas9 and haploid embryonic stem cell systems. *Zoological Research*, 37, 205–213. doi:10.13918/j.issn.2095-8137.2016.4.205.
18. Karlson CKS, Mohd-Noor SN, Nolte N, Tan BC (2021): CRISPR/dCas9-Based Systems: Mechanisms and Applications in Plant Sciences. *Plants*, 10, 2055. doi:10.3390/plants10102055.
19. Khan A, Prasanth S (2023): BENDING with Polycomb in pluripotency and cancer. *BioEssays*, 45, 2300046. doi:10.1002/bies.202300046.
20. Kleinstiver BP, Tsai SQ, Prew MS, Nguyen NT, Welch MM, Lopez JM, McCaw ZR, Aryee MJ, Odkaz na externí stránky tento odkaz se otevře v novém okně, Keith JJ (2016): Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 34, 869–874. doi:10.1038/nbt.3620.
21. Kobayashi T, Tsang WY, Li J, Lane W, Dynlacht BD (2011): Centriolar Kinesin Kif24 Interacts with CP110 to Remodel Microtubules and Regulate Ciliogenesis. *Cell*, 145, 914–925. doi:10.1016/j.cell.2011.04.028.
22. Kurniawan F, Chetlangia N, Kamran M, Redon CE, Pongor L, Sun Q, Lin Y-C, Mohan V, Shaqildi O, Asoudegi D, Hao Q, Khan A, Aladjem MI, Prasanth KV, Prasanth SG

- (2022): BEND3 safeguards pluripotency by repressing differentiation-associated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119, e2107406119. doi:10.1073/pnas.2107406119.
23. Li T, Yang Y, Qi H, Cui W, Zhang L, Fu X, He X, Liu M, Li P, Yu T (2023): CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8, 36. doi:10.1038/s41392-023-01309-7.
24. Li T-F, Zeng H-J, Shan Z, Ye R-Y, Cheang T-Y, Zhang Y-J, Lu S-H, Zhang Q, Shao N, Lin Y (2020): Overexpression of kinesin superfamily members as prognostic biomarkers of breast cancer. *Cancer Cell International*, 20, 123. doi:10.1186/s12935-020-01191-1.
25. Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA (2018): Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*, 25, 1234–1257. doi:10.1080/10717544.2018.1474964.
26. Liu X, Wu S, Xu J, Sui C, Wei J (2017): Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7, 292–302. doi:10.1016/j.apsb.2017.01.002.
27. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, Charpentier E, Cheng D, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Scott D, Shah SA, Siksnyš V, Terns MP, Venclovas Č, White MF, Yakunin AF, Yan W, Zhang F, Garrett RA, Backofen R, van der Oost J, Barrangou R, Koonin EV (2020): Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature reviews Microbiology*, 18, 67–83. doi:10.1038/s41579-019-0299-x.
28. Marraffini LA, Sontheimer EJ (2010): CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*, 11, 181–190. doi:10.1038/nrg2749.
29. Meyer M, Hollenbeck JC, Reunert J, Seelhöfer A, Rust S, Fobker M, Biskup S, Och U, Linden M, Sass JO, Marquardt T (2021): 3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase (HIBADH) deficiency—A novel disorder of valine metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 44, 1323–1329. doi:10.1002/jimd.12410.
30. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C (2009): Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155, 733–740. doi:10.1099/mic.0.023960-0.
31. Naiyer S, Dwivedi L, Singh N, Phulera S, Mohan V, Kamran M (2023): Role of Transcription Factor BEND3 and Its Potential Effect on Cancer Progression. *Cancers*, 15, 3685. doi:10.3390/cancers15143685.

32. Nakade S, Yamamoto T, Sakuma T (2017): Cas9, Cpf1 and C2c1/2/3—What's next? *Bioengineered*, 8, 265–273. doi:10.1080/21655979.2017.1282018.
33. Nussenzweig PM, Marraffini LA (2020): Molecular Mechanisms of CRISPR-Cas Immunity in Bacteria. *Annual Review of Genetics*, 54, 93–120. doi:10.1146/annurev-genet-022120-112523.
34. Obrochta KM, Krois CR, Campos B, Napoli JL (2015): Insulin Regulates Retinol Dehydrogenase Expression and All-trans-retinoic Acid Biosynthesis through FoxO1*. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 7259–7268. doi:10.1074/jbc.M114.609313.
35. Okada S, Doi G, Nakagawa S, Kusumoto E, Ito T (2021): Simple-to-use CRISPR-SpCas9/SaCas9/AsCas12a vector series for genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 11, jkab304. doi:10.1093/g3journal/jkab304.
36. PHKB section summary - The Human Protein Atlas <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000102893-PHKB/summary/sections> (accessed: 11/04/2024).
37. Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M (2015): The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119–128. doi:10.1016/j.biochi.2015.03.025.
38. Redman M, King A, Watson C, King D (2016): What is CRISPR/Cas9? *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice*, 101, 213–215. doi:10.1136/archdischild-2016-310459.
39. Sajwan S, Mannervik M (2019): Gene activation by dCas9-CBP and the SAM system differ in target preference. *Scientific Reports*, 9, 18104. doi:10.1038/s41598-019-54179-x.
40. Savić N, Schwank G (2016): Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Translational Research*, 168, 15–21. doi:10.1016/j.trsl.2015.09.008.
41. Saw PE, Song E-W (2020): siRNA therapeutics: a clinical reality. *Science China Life Sciences*, 63, 485–500. doi:10.1007/s11427-018-9438-y.
42. Setten RL, Rossi JJ, Han S (2019): The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18, 421–446. doi:10.1038/s41573-019-0017-4.
43. Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K, Zhang F, Koonin EV (2015): Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Molecular Cell*, 60, 385–397. doi:10.1016/j.molcel.2015.10.008.

44. Shmakova AA, Shmakova OP, Karpukhina AA, Vassetzky YS (2022): CRISPR/Cas: History and Perspectives. *Russian Journal of Developmental Biology*, 53, 272–282. doi:10.1134/S1062360422040075.
45. Sorek R, Lawrence CM, Wiedenheft B (2013): CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 237–266. doi:10.1146/annurev-biochem-072911-172315.
46. Stella S, Alcón P, Montoya G (2017): Class 2 CRISPR–Cas RNA-guided endonucleases: Swiss Army knives of genome editing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24, 882–892. doi:10.1038/nsmb.3486.
47. Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA (2014): DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507, 62–67. doi:10.1038/nature13011.
48. Terashima M, Fujita Y, Togashi Y, Sakai K, Velasco MAD, Tomida S, Nishio K (2014): KIAA1199 interacts with glycogen phosphorylase kinase β -subunit (PHKB) to promote glycogen breakdown and cancer cell survival. *Oncotarget*, 5, 7040–7050. doi:10.18632/oncotarget.2220.
49. Wang S-W, Gao C, Zheng Y-M, Yi L, Lu J-C, Huang X-Y, Cai J-B, Zhang P-F, Cui Y-H, Ke A-W (2022): Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer. *Molecular Cancer*, 21, 57. doi:10.1186/s12943-022-01518-8.
50. Wu D, Guan X, Zhu Y, Ren K, Huang Z (2017): Structural basis of stringent PAM recognition by CRISPR-C2c1 in complex with sgRNA. *Cell Research*, 27, 705–708. doi:10.1038/cr.2017.46.
51. Yang H, Gao P, Rajashankar KR, Patel DJ (2016): PAM-Dependent Target DNA Recognition and Cleavage by C2c1 CRISPR-Cas Endonuclease. *Cell*, 167, 1814–1828.e12. doi:10.1016/j.cell.2016.11.053.
52. Yang W, Zhang C, Li Y, Jin A, Sun Y, Yang X, Wang B, Guo W (2019): Phosphorylase Kinase β Represents a Novel Prognostic Biomarker and Inhibits Malignant Phenotypes of Liver Cancer Cell. *International Journal of Biological Sciences*, 15, 2596–2606. doi:10.7150/ijbs.33278.
53. Zaidi SS-A, Mahfouz MM, Mansoor S (2017): CRISPR-Cpf1: A New Tool for Plant Genome Editing. *Trends in Plant Science*, 22, 550–553. doi:10.1016/j.tplants.2017.05.001.
54. Zhang H, Qin C, An C, Zheng X, Wen S, Chen W, Liu X, Lv Z, Yang P, Xu W, Gao W, Wu Y (2021): Application of the CRISPR/Cas9-based gene editing technique in

basic research, diagnosis, and therapy of cancer. *Molecular Cancer*, 20, doi:10.1186/s12943-021-01431-6.

55. Zhao Z, Lin C-Y, Cheng K (2019): siRNA- and miRNA-Based Therapeutics for Liver Fibrosis. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 214, 17–29. doi:10.1016/j.trsl.2019.07.007.
56. Zhou H, Liu J, Zhou C, Gao N, Rao Z, Li H, Hu X, Li C, Yao X, Shen X, Sun Y, Wei Y, Liu F, Ying W, Zhang J, Tang C, Zhang X, Xu H, Shi L, Cheng L, Huang P, Yang H (2018): In vivo simultaneous transcriptional activation of multiple genes in the brain using CRISPR–dCas9-activator transgenic mice. *Nature Neuroscience*, 21, 440–446. doi:10.1038/s41593-017-0060-6.
57. Zou J, Mi L, Yu X-F, Dong J (2013): Interaction of 14-3-3 σ with KCMF1 suppresses the proliferation and colony formation of human colon cancer stem cells. *World Journal of Gastroenterology*, 19, 3770–3780. doi:10.3748/wjg.v19.i24.3770.