

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Cílená mutageneze endogenního genu v genomu**  
***D. melanogaster* programovatelnými nukleázami**

Diplomová práce

**Marek Renner**

Školitel: doc. RNDr. Michal Žurovec, CSc.

České Budějovice 2015

Renner, M., 2015: Cílená mutagenese endogenního genu v genomu *D. melanogaster* programovatelnými nukleázami [Targeted mutagenesis of the endogenous gene in *D. melanogaster* genome by engineered nucleases. Mgr. Thesis in Czech] – 59 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

Several techniques have recently been described for precise mutagenesis of selected target sites in the genome. This thesis establishes the method of gene targeting by CRISPR/Cas system in *D. melanogaster* and compares it with gene targeting using TALENs. To test the mutagenesis systems, we choose an endogenous gene encoding concentrative nucleoside transporter gene (*CNT1*). We have received two mutants containing large deletions affecting the N-terminal part of the *CNT1* gene. We show that CRISPR/Cas is useful tool for targeted gene disruption in *D. melanogaster*.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 24. 4. 2015

---

Marek Renner

## **Poděkování**

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Michalovi Žurovcovi za to, že mi umožnil pracovat v jeho laboratoři, za jeho odborné vedení a přátelský přístup. Dále bych chtěl poděkovat Ligii Marii Marques Cota Vieiře, která mi velmi pomohla při mikroinjkcích a následném křížení. Další můj velký dík patří Václavu Brožovi za jeho cenné rady. V neposlední řadě bych také chtěl poděkovat ostatním členům laboratoře za vytvoření přátelského prostředí.

Rád bych také poděkoval své rodině za to, že mě morálně a finančně podporovala po celou dobu studia.

## Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	<i>Drosophila melanogaster</i> a techniky editace jejího genomu .....	1
1.2	Programované nukleázy.....	2
1.2.1	Způsoby reparace dvouřetězcových zlomů .....	2
1.2.2	Transcription activator – like effector nucleases – TALENs .....	3
1.2.3	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) .....	4
1.3	Nukleosidy a nukleosidové transportéry.....	5
1.3.1	Koncentrativní nukleosidové transportéry, jejich molekulární struktura a specifita.....	6
1.3.2	Koncentrativní nukleosidové transportéry jako přenašeče adenosinu a metabolismus .....	7
2	Cíle práce.....	9
3	Materiál a metody.....	10
3.1	Cílená mutagenese genu <i>CNT1</i> metodami TALEN a CRISPR .....	10
3.1.1	Materiál a reagentie pro tvorbu programovaných nukleáz .....	10
3.1.2	Výběr specifických míst pro nukleázy TALEN a CRISPR.....	12
3.2	Syntéza specifických nukleáz TALEN k cílové sekvenci .....	14
3.2.1	„Golden Gate“ protokol.....	15
3.2.2	Mutagenese pomocí nukleáz TALEN .....	15
3.3	Navržení specifických nukleáz CRISPR k cílové sekvenci a jejich tvorba.....	16
3.3.1	Fosforylace a nasedání oligonukleotidů .....	16
3.3.2	Štěpení a defosforylace plasmidu pU6 – <i>BbsI</i> – chiRNA .....	16
3.3.3	Ligace komplementárně nasedlých oligonukleotidů a naštěpeného plazmidu pU6 – <i>BbsI</i> – chiRNA a následná transformace do chemicky kompetentních buněk .....	17
3.3.4	Ověřování úspěšnosti ligace .....	17
3.3.5	Extrakce a purifikace konstruktů z chemicky kompetentních buněk – „midiprep“ .....	18
3.3.6	Získání vajíček pro mikroinjikaci konstruktů.....	19
3.3.7	Mikroinjekce plazmidového konstruktů do vajíček .....	19
3.3.7.1	Mikroinjekční aparatura.....	19
3.3.7.2	Příprava vajíček pro mikroinjekci a vlastní mikroinjekce .....	20
3.3.8	Testování účinnosti štěpení pomocí CRISPR.....	21
3.3.8.1	Izolace genomové DNA z vajíček .....	22
3.3.8.2	Izolace genomové DNA z jedinců prvního larválního instaru .....	23

3.3.9	Schéma křížení mutagenizovaných jedinců .....	24
4	Výsledky.....	26
4.1	Vytvoření programovaných nukleáz TALEN pro gen CNT1.....	26
4.2	Vytvoření programovaných nukleáz CRISPR pro gen <i>CNT1</i> .....	27
4.2.1	Efektivita ligace oligonukleotidů do vektorového plazmidu pU6 – <i>BbsI</i> – chiRNA.....	28
4.2.2	Zvýšení úspěšnosti mikroinjekce konstruktů nukleáz CRISPR .....	30
4.2.3	Detekce úspěšnosti mikroinjekce .....	30
4.2.4	Vyhodnocení úspěšnosti mutageneze nukleázami CRISPR u F1 generace .....	30
4.3	Porovnání aminokyselinových sekvencí proteinu CNT1 a jeho lidského homologue SLC28A1 .....	33
5	Diskuze.....	36
5.1	<i>D. melanogaster</i> jako vhodný modelový organismus .....	36
5.2	Výběr metody cílené mutageneze.....	36
5.3	Optimalizace metod cílené mutageneze.....	37
5.4	Detekce mutací .....	37
5.4.1	Účinnost mikroinjekce v podmínkách naší laboratoře .....	38
5.5	Perspektiva do budoucna – homologní rekombinace .....	38
5.6	Budoucí možný význam programovaných nukleáz.....	38
6	Závěr.....	40
7	Seznam literatury.....	41
8	Přílohy .....	47
8.1	Sekvence genu <i>CNT 1</i> s vyznačenými sekvencemi nukleáz TALEN.....	47
8.2	„Golden Gate“ protokol .....	48
8.3	Aminokyselinové sekvence páru nukleáz TALEN, získaných překladem sekvenačních dat programem ExPASy.....	52
8.4	Sekvence genu CNT 1 s vyznačenými sekvencemi nukleáz CRISPR, včetně sekvencí primerů, použitých při zjišťování přítomnosti delece.....	56
8.5	Výsledná podoba genu <i>CNT1</i> s delecí .....	57
9	Seznam zkratk .....	59

# 1 Úvod

## 1.1 *Drosophila melanogaster* a techniky editace jejího genomu

*D. melanogaster* je hmyzí druh patřící do řádu Diptera, který se více než sto let uplatňuje v odvětvích výzkumu molekulární a vývojové biologie, genetiky, genomového inženýrství a dalších příbuzných oborech.

*D. melanogaster* je vhodný modelový organismus k provádění funkční analýzy genů zejména díky své krátké generační době, nenáročnosti chovu a rozvoji metod genetických manipulací. Funkční analýza genů zaznamenala v nedávné době převratný rozvoj umožňující pracovat na genomové úrovni a provádět editaci genomu. Editací genomu rozumíme genetickou metodu sloužící k zavádění změn do endogenní genové sekvence. Tyto změny zahrnují mnoho typů modifikací sahající od malých bodových mutací, inzercí nebo delecí až po například inserce exogenní DNA do specifického lokusu. První takovéto genetické manipulace u druhu *D. melanogaster* byly umožněny objevem P-elementů v sedmdesátých letech minulého století. P-elementy umožnily připravit transgenní jedince, indukovat mutace i větší delecce stimulovat homologní rekombinaci (Rubin, Spradling, 1982). Po P-elementech následovalo zavedení rekombinačních technik manipulace s klonu FLP/FRT a s modulárním systémem exprese transgenních sekvencí UAS-Gal4 (Golic et al., 1997). Počátkem roku 2000 byla u *D. melanogaster* publikována poprvé metoda provedení cílené mutagenese pomocí homologní rekombinace (HR) (Rong, Golic, 2000). V následujících letech se poznatky o transgenezi cílené mutagenesi velice rychle prohlubovaly, přičemž významnou roli sehrál objev specifické integrázy  $\Phi$ C31 a její použití pro transgenezi u drozofily (Baterman et al., 2006). Přestože výše zmíněné metody poskytují celkem slušnou škálu možností editace genomu, tak i ony mají svá omezení. Teprve až objev prvních umělých restričních enzymů, neboli programovaných nukleáz v roce 2000 – „zinc finger nucleases“ (ZFNs) zjednodušil indukci dvouřetězcových zlomů (DSB) v předem definovaném místě (Smith et. al, 2000). Později se objevily další programovatelné nukleázy, s vyšším účinkem a jednodušším kódem pro vazbu k DNA. Jedná se o „Transcription activator – like effector nucleases“ (TALENs) (Moscou, Bogdanove, 2009; Boch et al, 2009) a bakteriální „RNA – guided“ Cas9 nukleázu s pravidelně vmezeřenými krátkými palindromickými repetitivy (CRISPR) (Jinek et al., 2012), kterými se zabývám se své diplomové práci a pomocí nichž jsem se pokusil vytvořit mutantní mouchu v genu *CNT1*.

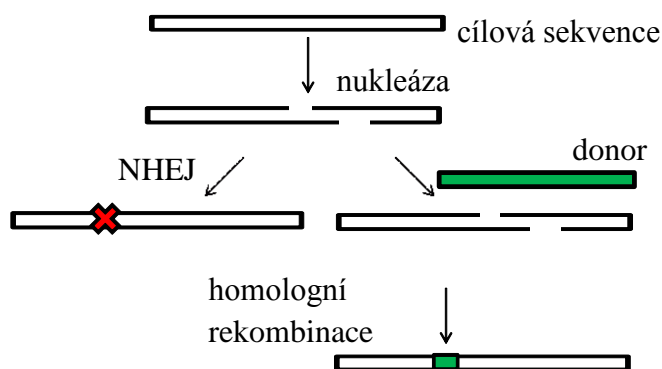
## 1.2 Programované nukleázy

Programované nukleázy, někdy také nazývané umělé restriční enzymy, jsou chimérické proteiny, které jsou schopné vytvářet dvouřetězcový zlom (DSB) v požadovaném cílovém místě v DNA. Umělé restriční enzymy lze v laboratoři vytvořit spojením, na míru vytvořené, DNA vázající domény s nespecifickou nukleázovou doménou. Vznik DSB vede k mutacím v cílovém místě, které se vyskytnou jako následek chyby během reparačního procesu. Této vlastnosti lze využít při tzv. reverzní genetice, což umožňuje provádět funkční studie.

### 1.2.1 Způsoby reparace dvouřetězcových zlomů

Reparační procesy opravující dvouřetězcové zlomy v buňce jsou naprosto esenciální pro udržení genomové integrity. V evoluci si eukaryotní buňky vyvinuly několik způsobů, kterými lze takto poškozenou DNA opravit. Jedním z nich je „Homology directed repair“ (HDR), který je využíván eukaryotickými somatickými buňkami k přesné reparaci dvouřetězcových zlomů (DSB), použitím homologního chromozomu jako templátu pro reparaci (Szostak et al., 1983). U kvasinek a savčích buněk bylo pozorováno několikanásobné zvýšení počtu rekombinací mezi lineární homologní DNA a genomovou DNA, v případě, že DSB byly vytvořeny v homologních oblastech chromozomu (Rudin et al., 1989; Plessis et al., 1992). V praxi je možné vytvořit zlom v DNA a do buňky přidat mutantní templát, podle kterého se do cílového místa vloží upravená sekvence podle potřeby.

Dalším způsobem, kterým jsou eukaryotické buňky schopny opravit DSB je méně přesný způsob rychlého spojování konců – „non homologous end joining“ (NHEJ). Tento způsob opravy pak často vede k narušení sekvence DNA (inzerce, delece) a posunu čtecího rámce (Moore et al., 1996). Grafické znázornění jednotlivých způsobů reparací je uvedeno na obr. číslo 1.



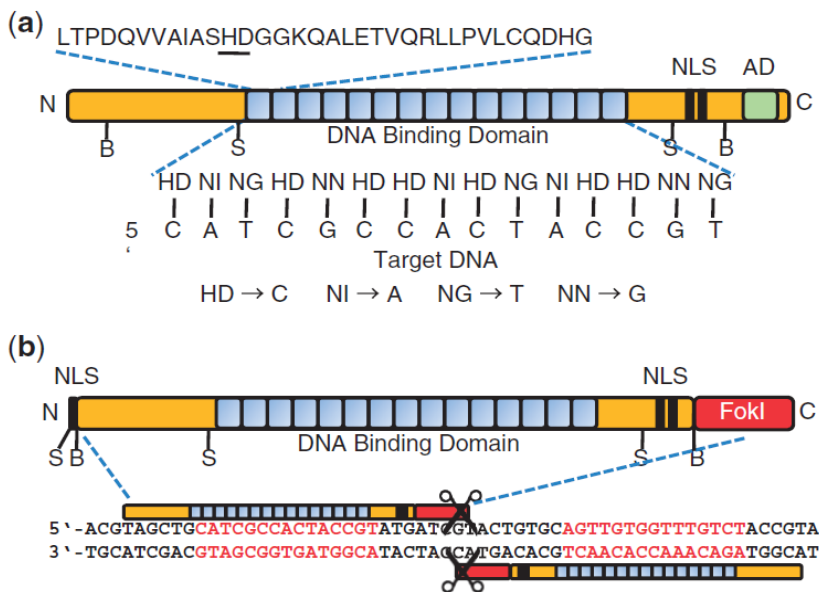
Obr. č. 1: Možné výsledky reparace po poškození molekuly DNA

### 1.2.2 Transcription activator – like effector nucleases – TALENs

Programované nukleázy typu TALEN představují dobře prostudovanou a vysoce účinnou skupinu chimérických enzymů, sloužící k indukcii dvouřetězcových zlomů u celé řady organismů, včetně savců. Tyto umělé enzymy se skládají z DNA-vázající domény a nespecifické štěpící domény *FokI*. Katalytická doména *FokI* pochází původně z restriční endonukleázy typu II, objevené u *Flavobacterium okeanoikoites*. Oblast, která váže DNA, byla z původní restriktázy odstraněna a nahrazena DNA – vázající doménou, odvozenou od „Transcription activator – like effectors“ (TAL efektorů), což je skupina bakteriálních proteinů (z bakterií rodu *Xanthomonas*), které vážou promotorové sekvence v hostitelské rostlině a napomáhají infekcím. Při průniku do buněk hostitele, pomocí bakteriálního sekrečního systému III, „TAL effectors“ vstupují do jádra, váží „effector“ – specifické sekvence hostitelských genových promotorů a aktivují transkripci (Bogdanove et al., 2010). Tyto proteiny lze modifikovat a lze jimi snadno manipulovat, za účelem požadované cílové specifity. Jejich cílová specifita je totiž určena centrální doménou, tvořenou 33 – 35 aminokyselinami, které jsou tandemově uspořádány a mají modulární charakter a jednoduchý vazebný kód pro rozpoznávání cílové sekvence DNA. Většina přirozeně se vyskytujících se „TAL effectors“ obsahuje 12 – 27 takových modulů. Zcela nezávisle na sobě bylo objeveno ve dvou laboratořích, že přilehlé aminokyselinové polymorfni zbytky v pozici 12 a 13 každé repetice, „repeat – variable di – residue“ (RVD), určují specifitu jednoho RVD k jednomu nukleotidu (Moscou et al., 2009; Boch et al., 2009). Pro potřeby genového inženýrství byly tedy TAL DNA – vazebné domény fúzovány s katalytickou doménou *FokI* nukleázy. *FokI* nukleáza je restriční enzym typu II, který štěpí molekulu DNA jako dimer. Katalytické domény *FokI* nukleázy musejí pro svou funkci dimerizovat a tuto vazbu vyžadují i výsledné umělé TALENy. V tomto dimerním stavu jsou tedy



TALENy schopny tvořit DSB v cílových sekvencích *in vivo* (Christian et al., 2010; Miller et al., 2011; Li et al., 2011; Mahfouz et al., 2011). Mezi vazebnými sekvencemi TALENového páru je vzdálenost 12 – 16 nukleotidů. Jeden člen páru váže a štěpí jedno vlákno, přičemž druhý pak vlákno komplementární. Naštěpená DNA obsahuje převis o délce 4 nukleotidů. Vzniklý dvouřetězcový zlom je ve většině případů opraven pomocí NHEJ, to ovšem často vede k drobným inzercím nebo delecím. Toho se dá ale například využít k porušení kontinuity genu a tím i jeho „vypnutí“. Alternativní způsob reparace je pak HR, která může umožnit vnášení genů nebo jejich částí (Urnov et al., 2010; Stoddart 2011). Schematická struktura TALENů je uvedena na obrázku číslo 2.



Obr. č. 2: Schematické znázornění struktury TALENů  
(převzato z Cermak et al., 2011)

### 1.2.3 Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)

V posledních několika letech byl objeven další mocný nástroj pro editaci genomu s názvem „Clustered regularly interspaced short palindromic repeats“ (CRISPR/CRISPR-associated Cas system), který je dobrou alternativou jiným technologiím jako je například „Zinc Finger“ nebo TALEN. Tento systém využívá krátké RNA k navádění nukleázy k cílové sekvenci DNA.

Systém CRISPR byl objeven u bakterií a *Archea*, kde slouží jako obrana proti cizorodé, plazmidové nebo virové DNA (Barrangou et al. 2007). Doposud byly objeveny tři odlišné varianty: systém I, systém II a systém III (Makarova et al., 2006). Pouze systém II je základem pro technologii CRISPR a v současné době je nejpoužívanější „RNA-guided“ endonukleázovou technologií, sloužící k editaci genomu. Guide-RNA (gRNA) je umělou kombinací endogenní crRNA (cílová specifita) a tracrRNA (konstrukce komplexu)

používanou při použití tohoto systému pro genové inženýrství. Původní přírodní crRNA vzniká úpravou pre-crRNA, která je transkribována ze sekvence DNA, známé jako „protospacer“. „Protospacer“ je asi 20 párů bází dlouhý klastr uvnitř bakteriálního genomu, tvořený již známou cizorodou DNA, jejíž sekvence je přerušena krátkými palindromickými opakováními. Tento protospacer slouží jako obranný nástroj pro případné budoucí setkání bakterie s patogenem. Jedná se tedy o jakousi primitivní bakteriální imunitu. Úprava pre-crRNA na crRNA je závislá na přítomnosti tracrRNA. crRNA je také nezbytná pro vazbu Cas9 endonukleázy (Brouns et al., 2008).

Pro úspěšné navázání Cas9 endonukleázy k cílové DNA a jejímu štěpení slouží tedy komplementární dvacetinukleotidová sekvence protospaceru a krátký „Protospacer adjacent motif“ (PAM), což je sekvence, která bezprostředně navazuje za komplementární sekvencí k gRNA. Cas 9 endonukleáza štěpí molekulu DNA v místě, které leží 3 bp. před PAM sekvencí. PAM sekvence má několik podob, které jsou závislé na druhu bakterie (Jinek et al., 2012). V tabulce č. I jsou uvedeny druhy bakterií s příslušnými motivy PAM sekvencí.

Tab. I. Bakteriální druhy a jejich motivy PAM sekvencí

<b>Druh</b>	<b>Motiv PAM sekvence</b>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	NGG
<i>Neisseria meningitidis</i>	NNNGATT
<i>Streptococcus thermophilus</i>	NNAGAA
<i>Treponema denticola</i>	NAAAAC

### 1.3 Nukleosidy a nukleosidové transportéry

Pro zavedení metody cílené mutagenese byl zvolen za cílový gen, sekvenci kódující koncentrativní nukleosidový transportér CNT1. Nukleosidy jsou klíčovými molekulami, zasahující do mnoha důležitých biologických procesů a signálních drah. Adenosin a purinové nukleosidy jsou významnými signálními molekulami v mnoha fyziologických procesech, pyrimidinové a i purinové nukleosidy slouží jako prekurzory nukleotidů, které jsou nezbytné pro syntézu nukleových kyselin, ATP, NADH atd. Důležitými sloučeninami jsou i analogy nukleosidů, kterých se využívá při různých nádorových, imunodeficientních, či antiparazitických terapiích.

Jak nukleosidy, tak jejich analogy jsou hydrofilní molekuly, které nemohou samovolně přecházet přes cytoplazmatickou membránu buněk, a tedy jejich přechod přes cytoplazmatickou membránu musí probíhat pomocí transportérů.

Nukleosidové transportéry jsou evolučně konservovanou skupinou transmembránových proteinů. Tato skupina proteinů se dá rozdělit na dvě podskupiny. První podskupinou jsou nukleosidové ekvilibrativní nukleosidové transportéry (ENT), patří do genové rodiny *SLC29* a druhou skupinou jsou koncentrativní nukleosidové transportéry (CNT), které patří do genové rodiny *SLC28* (Rose, Coe, 2008).

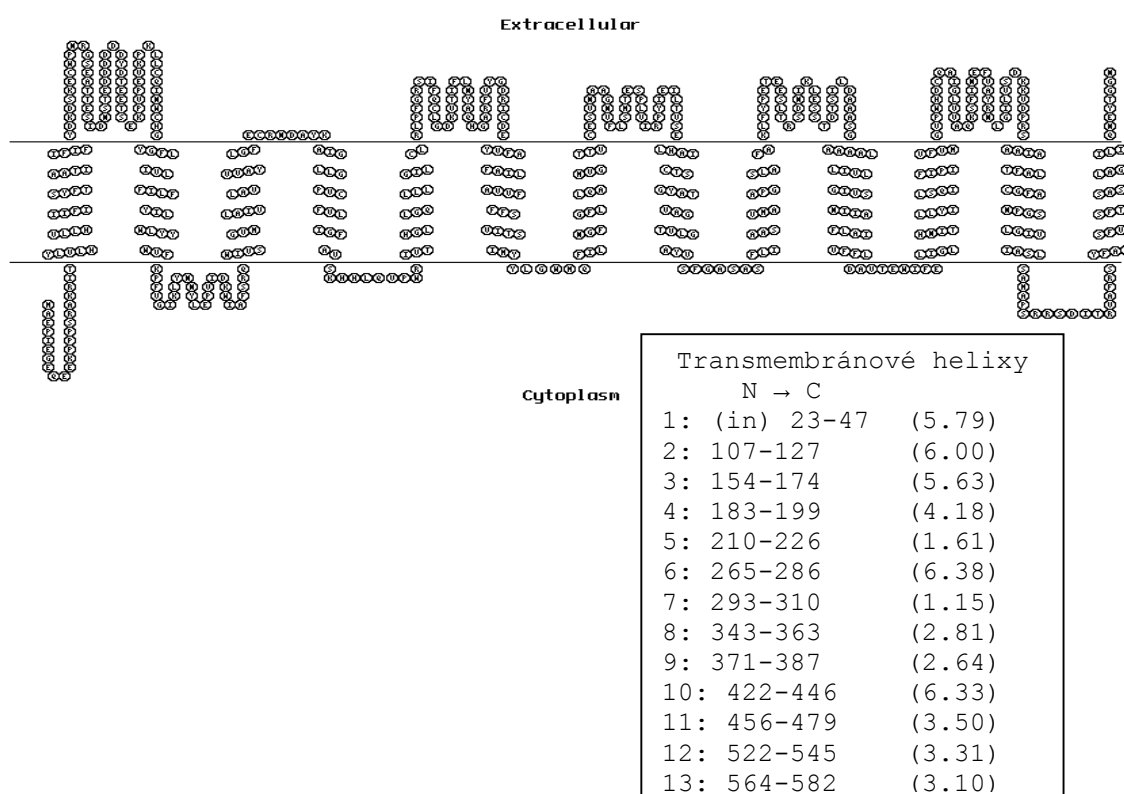
Oba typy nukleosidových transportérů byly také identifikovány jako vstupní dráhy pro léčiva (analogy nukleosidů), používaných při nádorových terapiích a parazitických infekcích. (Zhang et al., 2007; Downie et al., 2008).

### **1.3.1 Koncentrativní nukleosidové transportéry, jejich molekulární struktura a specifita.**

Lidské koncentrativní nukleosidové transportéry, patří do genové rodiny *SLC28*, jsou konservované integrované membránové proteiny, které zprostředkovávají přenos nukleosidů a nukleobází přes cytoplazmatickou membránu do buněk (Rose, Coe, 2008) a slouží jako jednosměrné Na<sup>+</sup> závislé synportéry (Pastro-Anglada et al., 2008; Young et al., 2008).

Genová rodina *SLC28* se skládá ze tří podtypů Na<sup>+</sup> - závislých, koncentrativních nukleosidových transportérů: CNT1 (*SLC28A1*), CNT2 (*SLC28A2*) a CNT3 (*SLC28A3*). Tyto tři podtypy se rozlišují na základě jejich substrátových preferencí: CNT1 – pro pyrimidinové nukleosidy, CNT2 – pro purinové nukleosidy, CNT3 – pro pyrimidinové nukleosidy i purinové nukleosidy. Tato substrátová preference je determinována pouhým jedním aminokyselinovým zbytkem a lokalizace jednotlivých podtypů je také tkáňově specifická. V savčích buňkách se CNT1 vyskytuje převážně v epitelích, zatímco CNT2 a CNT3 jsou zastoupeny víceméně rovnoměrně ve všech tkáních (Gray et al., 2004). Dva podtypy – CNT1 a CNT2 se rovněž vyskytují v buňkách *D. melanogaster* (Machado et al., 2007), ovšem jejich fyziologická funkce není ještě zcela objasněna. Struktura drozofilního proteinu CNT1 je uvedena v obrázku číslo 3. Struktura tohoto transmembránového proteinu je taková, že obsahuje celkem třináct  $\alpha$ -helixů, přičemž N-terminální konec proteinu leží na cytosolové straně cytoplazmatické membrány. Tento obrázek byl vytvořen pomocí programu SACS MEMSAT2 (<http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/memsat.py>).

Gen pro CNT1 u *D. melanogaster* leží na pravém rameni dlouhého chromozomu v oblasti 45A1 – 45A1 a má 8 exonů (z čehož první a poslední nejsou kódující), mRNA je dlouhá 2819 bp. a kóduje protein o délce 590 aminokyselinových zbytků. Dosavadní předběžné údaje o jeho funkci existují pouze na základě RNA – interference – údajně způsobuje změnu barvy těla a částečnou letalitu v období kukly (Kelemen et al., 2009). Podle údajů z naší laboratoře CNT1 z *D. melanogaster* zřejmě funguje pro purinové nikoliv pro pyrimidinové nukleosidy.



Obr. č. 3: Schematické znázornění nukleosidového transportéru. Tabulka obsahuje pozice aminokyselinových zbytků jednotlivých transmembránových  $\alpha$ -helixových úseků (vytvořeno pomocí online softwaru SACS MEMSAT2, <http://www.sacs.ucsf.edu/>)

### 1.3.2 Koncentrativní nukleosidové transportéry jako přenašeče adenosinu a metabolismus

V posledních několika letech se hodně hovoří o koncentrativních nukleosidových transportérech v souvislosti s buněčným transportem adenosinu.

Adenosin je všudypřítomný metabolit a jeho koncentrace, za standardních podmínek, v buňkách a tkáních kolísá v rozsahu 20 a 200 nM, přičemž během stresových podmínek jeho koncentrace vzrůstá (Fredholm, 2010). Uvolňování a absorpce adenosinu vyžaduje

nukleosidové transportéry, ovšem adenosin může být uvolňován i apoptickými buňkami. Střední doba cirkulace adenosinu je velice krátká, obvykle jen 1 až 10 vteřin (Jacobson, Gao, 2006).

Nedávné výzkumy ukázaly, velkou provázanost adenosinového receptoru s adenosinovými transportéry. Adenosinové transportéry přenáší adenosin přes cytoplazmatickou membránu buněk a tím významnou měrou přispívají k adenosinové signalizaci. Dalším překvapivým zjištěním bylo, že adenosinové transportéry mohou hrát významnou roli v buněčném metabolismu, nezávisle na signalizaci adenosinového receptoru (Huber-Ruano et al., 2010).

Hlavní fyziologickou funkcí adenosinového transportu je ovlivňování koncentrace adenosinu jako signální molekuly, zejména pak role terminátoru adenosinového signálu na příslušném receptoru (Choi et al., 2004).

## 2 Cíle práce

1. Optimalizovat a srovnat metody mutagenese pomocí nehomologického spojení konců za použití programovaných nukleáz TALEN a CRISPR u *D. melanogaster*.
2. Optimalizovat metody detekce mutantních alel.
3. Vytvořit mutantního jedince *D. melanogaster* v genu *CNT1*, jednou z výše uvedených metod.

### 3 Materiál a metody

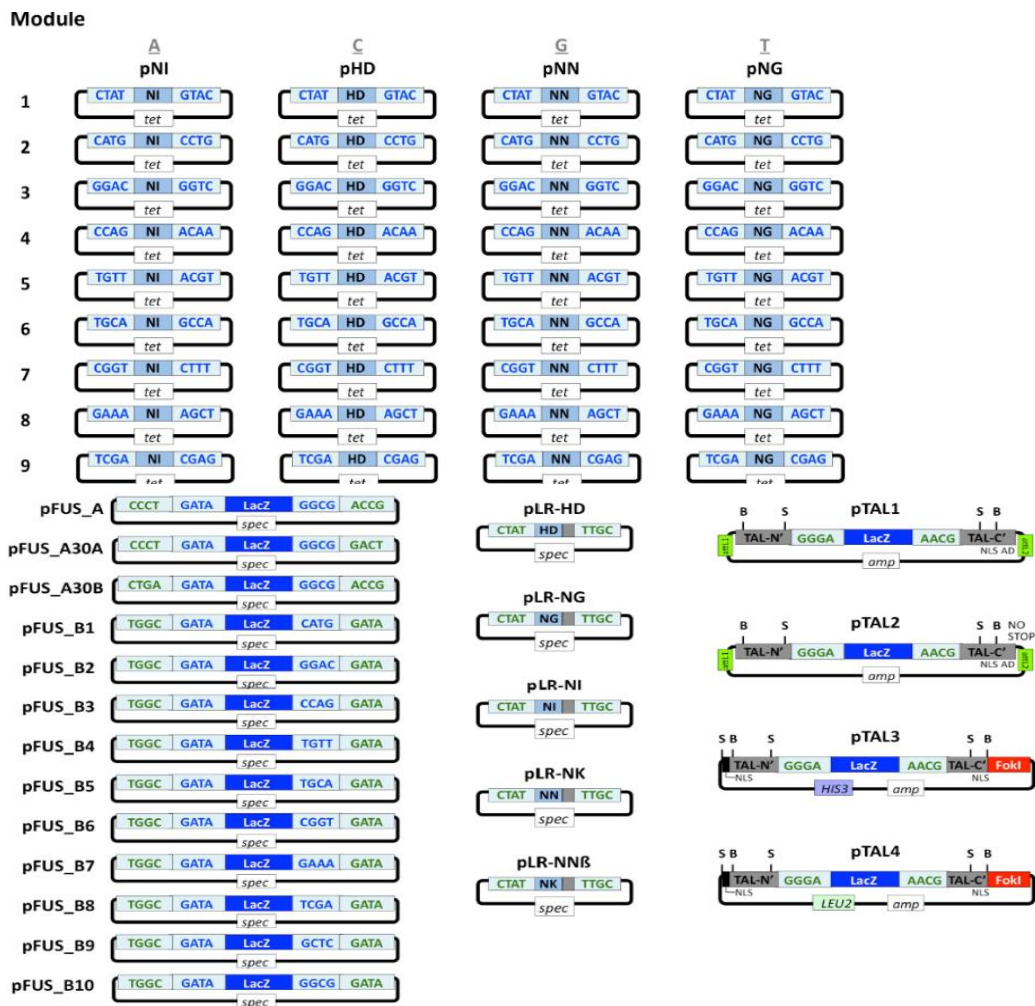
#### 3.1 Cílená mutageneze genu *CNT1* metodami TALEN a CRISPR

##### 3.1.1 Materiál a reagentie pro tvorbu programovaných nukleáz

K tvorbě programované nukleáz TALEN a CRISPR, je kromě běžně dostupného laboratorního materiálu a vybavení zapotřebí i některých méně obvyklých reagentů. V případě nukleáz TALEN se jedná zejména o sadu 62 plazmidů (dostupné ve firmě Addgene), pro vytvoření specifických RVDs, určujících specifitu k nukleotidům, a cílových plazmidů. Celý seznam plazmidů je uveden na obrázku číslo 4. K tvorbě nukleáz TALEN je rovněž třeba poměrně široká škála restrikčních enzymů: *BsaI* (NEB), *XbaI* (NEB), *SalI* (NEB), *Esp3I* (NEB), *AflIII* (NEB), *BamHI* (NEB), DNáza „Plasmid – Safe™“ (Epicentre-Biotechnologies) a antibiotikum spectinomycin.

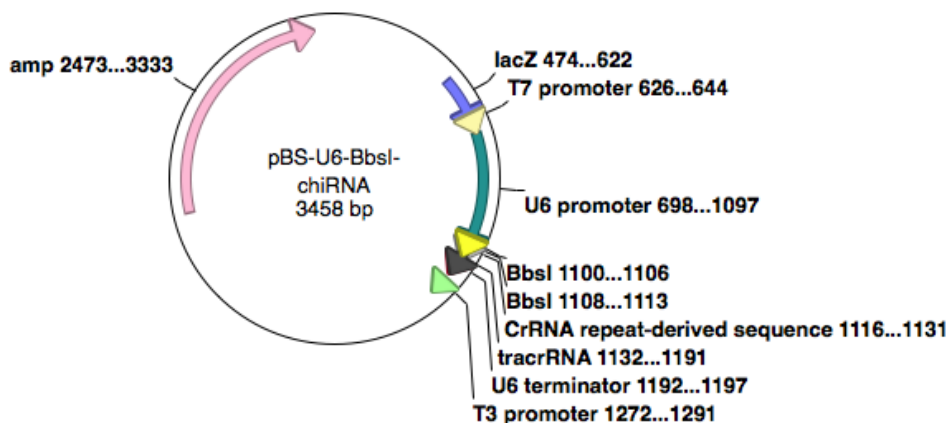
V případě tvorby nukleáz CRISPR je naprosto nezbytný plazmid pU6 – *BbsI* – chiRNA (dostupný ve formě Addgene), restrikční enzym *BbsI* a enzymy T4 – polynukleotid kináza a alkalická fosfatáza. Plazmid pU6 – *BbsI* – chiRNA slouží k expresi chimérické RNA pod promotorem U6:96Ab. Schematické znázornění plazmidu pU6 – *BbsI* – chiRNA je uvedeno na obrázku číslo 5.

Další reagentie jsou pro obě metody společné, jedná se pak o T4 – DNA ligázu, soupravu na izolaci plazmidové DNA, chemicky kompetentní buňky a antibiotikum ampicilin.



Obr. č. 4: Seznam všech plazmidů potřebných pro vytvoření specifických TALENových nukleáz

(převzato z Cermak et al., 2011)



Obr. č. 5: Mapa plazmidu pU6 – BbsI – chiRNA potřebného pro konstrukci gRNA pro systém CRISPR/Cas

(převzato z <http://www.addgene.org/>)



### 3.1.2 Výběr specifických míst pro nukleázy TALEN a CRISPR

Cílové sekvence DNA zájmového genu *CNT1*, pro nukleázy TALEN a CRISPR byly vždy vyhledány (*in silico*) pomocí online webových programů. V případě nukleáz TALEN se jednalo o program „TAL Effector Nucleotide targeter 2.0“ (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/node/add/talen>) (Cermak et al., 2011). V případě nukleáz CRISPR byl použit program „FlyCRISPR Optimal Target Finder“ (<http://tools.flycrispr.molbio.wisc.edu/targetFinder>) (O'Connor - Giles et al., 2013).

Pro gen *CNT1* byl navržen pár TALENů do prvního intronu genu. Webový program generuje návrh nukleáz TALEN ve formě RVD (repeat – variable di – residue). Každý tento RVD (dvojice aminokyselin) rozpoznává jeden nukleotid v primární sekvenci DNA cílového genu (viz tabulka číslo II). Počet RVDs může kolísat v rozmezí 12 – 31, přičemž navrhovaný pár TALENů se významně počtem RVDs neliší. Do webového online programu „TAL Effector Nucleotide targeter 2.0“, byla vložena sekvence genu ve formátu FASTA. Z mnoha návrhů byl nakonec vybrán návrh, který je uveden v tabulce číslo III. Mezi párem TALENů se nachází 14 nukleotidů dlouhý „spacer“.

Pro gen *CNT1* byly navrženy celkem tři programované nukleázy CRISPR, první do prvního exonu a druhá a třetí do třetího exonu (Obr. č. 10). Cílové sekvence musely splňovat určitá kritéria. Prvním z nich bylo, že cílová sekvence musí být 20 nukleotidů dlouhá, přičemž musí začínat nukleotidem G, což je nutné pro transkripci řízenou U6 promotorem a dále musí být tato sekvence následována PAM sekvencí, s konsenzem nukleotidů NGG.

Po výběru vhodných, specifických DNA míst (*in silico* pomocí FlyCRISPR Target Finder), musíme navrhnout příslušné oligonukleotidy, které pak zaklonujeme do restrikčního místa *BbsI* vektoru pU6 – *BbsI* – chiRNA. Pomocí těchto oligonukleotidů dosáhneme cílové specifity nukleázy CRISPR. Navržený nukleotid ve směru 5' - 3', musí mít vždy konsensus CTTCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN. Protisměrný oligonukleotid musí pak mít konsensus CNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAAA. Tento konsensus oligonukleotidů je dán kohezivními konci, které vzniknou při štěpení vektoru pU6 – *BbsI* – chiRNA restrikčním enzymem *BbsI*.

Sekvence oligonukleotidů, použitých při konstrukci programovaných nukleáz CRISPR, jsou uvedeny v tabulce číslo IV.

Tab. II: Kód, kterým jsou rozpoznávány báze dvojicí aminokyselin (RVD) v TALENech

RVD	Nukleotid
NI	A
HD	C
NN	G
NG	T

Tab. III: Sekvence RVD navrženého páru TALENů genu *CNT1*

TAL 1 RVDs					TAL 2 RVDs				
HD (1)	HD (2)	NN (3)	HD (4)	HD (5)	NN (1)	NN (2)	NI (3)	NN (4)	HD (5)
NI (6)	NG (7)	HD (8)	NN (9)	NI (10)	NI (6)	NN (7)	HD (8)	NI (9)	HD (10)
NN (11)	NN (12)	NN (13)	HD (14)	NI (15)	NI (11)	NG (12)	NN (13)	NN (14)	NI (15)
NI (16)	NI (17)	NN (18)			NN (16)	NG (17)	NI (18)	HD (19)	

Tab. IV: Sekvence oligonukleotidů, použitých při konstrukci programovaných nukleáz CRISPR, pro gen *CNT1*. První čtyři nukleotidy jsou komplementární ke kohezivním koncům v plazmidu pU6 – *BbsI* – chiRNA, štěpeným *BbsI*

1	CRISPR v prvním exonu	5' → 3'	<b>CTTCGGCAAAGCGAATCACCTATC</b>
		3' → 5'	<b>AAACGATAGGTGATTCGCTTTGCC</b>
2	CRISPR ve třetím exonu	5' → 3'	<b>CTTCCGTGCCGCAATGACGCATACA</b>
		3' → 5'	<b>AAACTGTATGCGTCATTGCGGAC</b>
3	CRISPR ve třetím exonu	5' → 3'	<b>CTTCGCATTATGTATTACCTTGGC</b>
		3' → 5'	<b>AAACGCCAAGGTAATACATAATGC</b>

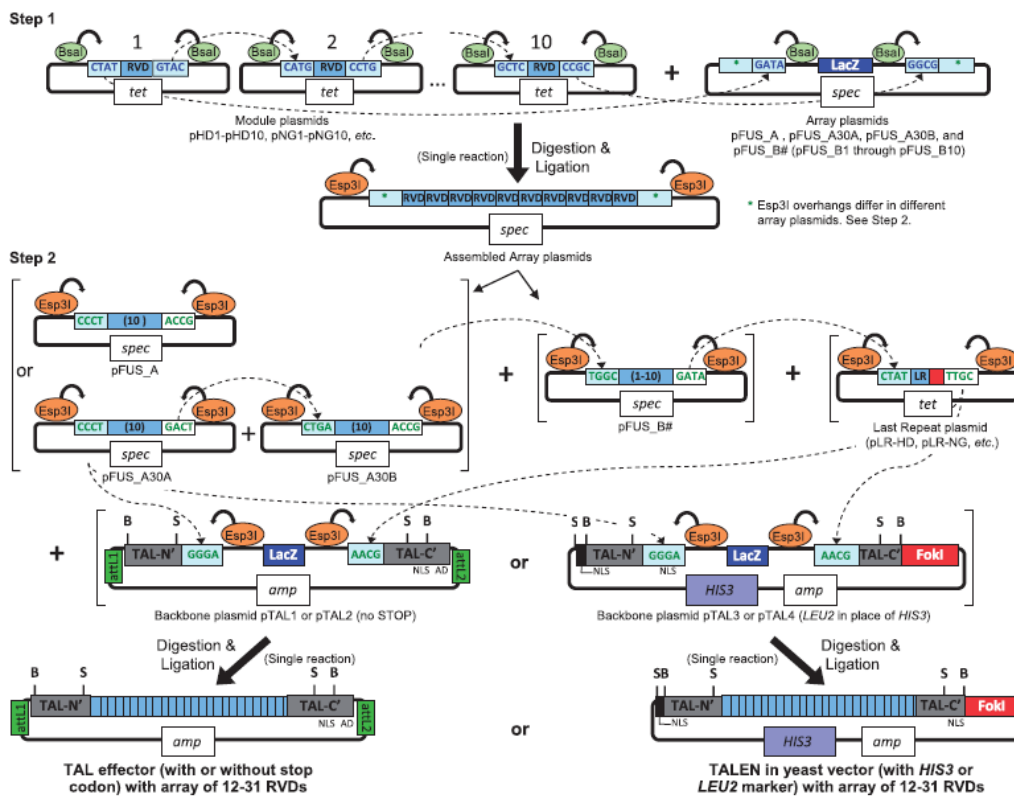
### 3.2 Syntéza specifických nukleáz TALEN k cílové sekvenci

Syntézy TALENu podle navržené sekvence v tabulce číslo III se dosáhne ve dvou krocích. Nejprve je nutné vložení (ligace) příslušných modulových plazmidů, které jsou předtím „sestřiženy“ restričním enzymem *BsaI* (rozpoznává sekvenci GGTCTC), do vektorového plazmidu. Každý modulový plazmid obsahuje dvě restriční místa *BsaI* a tudíž tento „sestřih“ vytvoří komplementární konce k následujícímu (z následující úrovně), ale i k předcházejícímu (z předchozí úrovně) modulovému plazmidu. Každá úroveň (1 – 10) je určena pořadím jednotlivých modulů v navrhovaném TALENu. Rovněž vektorový plazmid je štěpen restričním enzymem. V tomto případě se jedná o restriční enzym *Esp3I* (rozpoznává sekvenci CGTCTC). Štěpením restričním enzymem *Esp3I* se dosáhne zisku komplementárních konců k prvnímu a poslednímu modulovému plazmidu. Všechny tyto reakce probíhají v jednom kroku. Je tedy nezbytné dávat modulové plazmidy ve správném pořadí (z příslušné úrovně) do cílového vektoru, který je rovněž štěpen restričním enzymem *Esp3I*. Jak je patrné z obrázku číslo 4, tak počet jednotlivých modulů, pro všechny čtyři typy bazí, je 40 (4 typy bazí v 10 úrovních).

Cílové vektorové plazmidy (rezistence ke spectinomycinu) máme dvojího typu: pFUS\_A a pFUS\_B, přičemž pFUS\_B má dalších 10 podtypů. Moduly kódující 1. až 10. RVDs se vkládají do vektoru pFUS\_A, moduly následující se klonují do jednoho podtypu vektoru pFUS\_B, na základě toho, kolik modulů se do tohoto vektoru má vložit. Čísla jednotlivých podtypů pFUS\_B vektorů znamenají, kolik modulů mínus jedna, lze do tohoto vektoru zaklonovat (např. pFUS\_B6 – klonuje se 11. až 15. RVDs kódující modul).

V druhém kroku se vektorové plazmidy se správně vloženými moduly vkládají již do konečného vektoru (rezistence k ampicilinu), přičemž poslední RVD se „dodá“ právě v tomto okamžiku. Princip vkládání je obdobný. Pomocí restričního enzymu *Esp3I* se docílí zisku komplementárních konců vektoru pFUS\_A, příslušného vektoru pFUS\_B a příslušnému pLR modulu. Digescí tímto enzymem je rovněž umožněno vložení výše uvedených „komponentů“ do koncového vektoru. Stejně jako v prvním kroku, restrikce a ligace probíhá v jediné reakci.

Tato vlastnost nám umožňuje dosáhnout libovolné specifity a tedy i navrhnout TALEN pro jakýkoliv lokus v genomu. Schematické znázornění ligace jednotlivých modulů a tím i získání specifity TALENu je zobrazeno na obrázku číslo 6.



Obr. č. 6: Schematické znázornění ligace jednotlivých modulů a klonování do cílového vektoru

(Převzato z Cermak et al., 2011).

### 3.2.1 „Golden Gate“ protokol

Protokol „Golden Gate“ byl použit, v mírně modifikované podobě. Protokol vychází z metody publikované v práci Cermak et al., 2011. „Golden Gate“ protokol je rozdělen do dvou hlavních částí a je koncipován tak, aby bylo možné TALEN zkonstruovat během pěti dní.

Největší odchylka od originálního protokolu byla, použití jako koncového cílového plazmidu pBlue-Tal (Takasu et al., 2014) na místo plazmidů pTal 1, 2, 3 nebo 4. Plazmid pBlue-Tal obsahuje T7 promotor, zkrácenou TAL efektorovou sekvenci, 5' UTR, 3' UTR, *Esp3I* restriční místo a 3' poly (A) úsek. Tento plazmid má také optimalizovaný „codon usage“ a je tedy vhodnější při cílené mutagenезi u hmyzu. Celý „Golden Gate“ protokol uveden v příloze číslo 8.2. Po dokončení „Golden Gate“ protokolu je vhodné vyzolované konstrukty osekvenovat.

### 3.2.2 Mutagenéze pomocí nukleáz TALEN

Pro mutagenézi je nutné mikroinjektovat mRNA syntetizovanou in vitro polymerázou T7 podle plazmidových konstruktů nukleáz TALEN. K syntéze mRNA lze použít libovolně,

komerčně dostupnou soupravu, například mMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra Transcription kit (Lifetechnologies).

### 3.3 Navržení specifických nukleáz CRISPR k cílové sekvenci a jejich tvorba

Tvorba nukleázy CRISPR se specifitou k určitému místo v genomu spočívá v tom, že se do restrikčního místa *BbsI* v plazmidovém vektoru pU6 – *BbsI* - chiRNA, vloží specifický pár oligonukleotidů, navržený přesně do místa cílové sekvence, jak je popsáno v sekci 3.1.2.

#### 3.3.1 Fosforylace a nasedání oligonukleotidů

Oligonukleotidy (Sigma Aldrich), použité ke konstrukci všech třech programovaných nukleáz, byly nejprve fosforylovány enzymem T4 – polynukleotid kinázou (Thermo Scientific) podle následujícího protokolu:

- 1 µl přímoseměrný oligonukleotid (100 pmol/µl)
- 1 µl protisměrný oligonukleotid (100 pmol/µl)
- 1 µl T4 – polynukleotid kináza - pufr
- 1 µl T4 – polynukleotid kináza
- 6 µl PCR H<sub>2</sub>O

Tato reakční směs byla umístěna do inkubátoru, vyhřátém na 37 °C, na dobu 30 minut.

Poté oligonukleotidy byly zahřáty v 95 °C po dobu 5 minut a následně byly nechány zchladnout na teplotu 25°C, rychlostí - 0,1 °C/vteřinu, aby na sebe nasedaly.

#### 3.3.2 Štěpení a defosforylace plasmidu pU6 – *BbsI* – chiRNA

Pro ligaci fosforylovaných oligonukleotidů bylo třeba nejprve naštěpit vektorový plazmid pU6 – *BbsI* – chiRNA, restrikčním enzymem *BbsI* (NEB) podle následujícího protokolu:

- 1 µg pU6 – *BbsI* – chiRNA
- 2 µl 10x restrikční pufr
- 0,5 µl *BbsI* (NEB)
- 15,5 µl H<sub>2</sub>O („nuclease – free“)

Tato reakční směs byla umístěna na 6 hodin do inkubátoru, vyhřátém na 37 °C. V polovině doby, tzn. po 3 hodinách, byl do reakční směsi přidán 1 µl alkalické fosfatázy (NEB), za účelem defosforylace 5' konce vektorového plasmidu.

Naštěpený vektorový plazmid pU6 – *BbsI* – chiRNA byl purifikován, za účelem odstranění nenaštěpených molekul plazmidu, gelovou elektroforézou. Plazmidová DNA byla z agarozového gelu izolována pomocí kitu „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche).

### **3.3.3 Ligace komplementárně nasedlých oligonukleotidů a naštěpeného plazmidů pU6 – *BbsI* – chiRNA a následná transformace do chemicky kompetentních buněk**

Ligace fosforylovaných, komplementárně nasedlých oligonukleotidů, do vektorového plazmidu pU6 – *BbsI* – chiRNA probíhala podle následujícího protokolu:

- 50 ng pU6 – *BbsI* – chiRNA (naštěpený a purifikovaný plazmid)
- 1 µl přímoseměrného, komplementárně nasedlého oligonukleotidu
- 1 µl protiseměrného, komplementárně nasedlého oligonukleotidu
- 1 µl 10x T4 ligační pufr
- 1 µl T4 DNA ligáza (NEB)
- 11 µl H<sub>2</sub>O („nuclease – free“)

Ligační směs byla inkubována v 16 °C přes noc a následně transformována do chemicky kompetentních buněk bakterie *E.coli* kmene Zymo 5a

### **3.3.4 Ověřování úspěšnosti ligace**

Úspěšnost ligace inzertu do vektorového plazmidu byla nejprve testována pomocí PCR provedené z DNA, vyizolované z příslušných bakteriálních kolonií, s následnou vizualizací PCR produktů pomocí gelové elektroforézy a sekvenováním.

Kontrolní PCR z DNA bakteriálních kolonií byly prováděny pomocí polymeráz „DreamTaq“ (ThermoScientific) a „OneTaq“ (NEB) za podmínek uvedených v tabulce V.

Bakteriální kolonie obsahující vektor prvního CRISPRu, navrženého do prvního exonu genu *CNT1*, byly testovány pomocí PCR se specifickými primery

F1 (AAAGCCGAGTCAAATGCCGA) a R1 (AAACGATAGGTGATTCGCTTTGCC).

Sekvence primeru R1 je identická se sekvencí protiseměrného oligonukleotidu, který byl použit při ligaci do vektoru pU6 – *BbsI* – chiRNA. V případě druhého CRISPRu třetího exonu genu *CNT1*, byly pro kontrolní PCR reakce použity primery

F2 (AAAGCCGAGTCAAATGCCGA) a R2 (AAACTGTATGCGTCATTGCGGAC).

Primer R2 je rovněž protiseměrný oligonukleotid použitý při ligaci do příslušného vektoru.

Rovněž pro třetí CRISPR byly navrženy specifické primery

F3 (AAAGCCGAGTCAAATGCCGA) a R3 (AACGCCAAGGTAATACATAATGC).

Rovněž primer R3 je protisměrný oligonukleotid použitý při ligaci do vektoru. Specifická sekvence přímoseměrného oligonukleotidu je vzdálená 354 bazí od restrikčního místa *BbsI* plasmidu pU6 – *BbsI* – chiRNA, do kterého se ligovaly oligonukleotidy. V případě úspěšné ligace, lze pomocí gelové elektroforézy, detekovat PCR produkt o celkové délce 398 bazí.

Správnost výsledků PCR a gelové elektroforézy byla ověřena sekvenováním. K sekvenaci byl použit specifický primer pU6sqF (5' -AAAGCCGAGTCAAATGCCGA- 3').

Tab. V: Definované podmínky PCR reakcí, při použití dvou DNA polymeráz

	„DreamTaq“ polymeráza		„OneTaq“ polymeráza		
1.	94 °C	5 min.	94 °C	5 min.	
2.	94 °C	0,5 min.	94 °C	0,5 min.	← 30×
3.	55 °C	0,5 min.	55 °C	0,5 min.	
4.	72 °C	1 min.	68 °C	1 min.	
5.	72 °C	5 min.	68 °C	5 min.	
6.	16 °C	-----	16 °C	-----	

### 3.3.5 Extrakce a purifikace konstruktů z chemicky kompetentních buněk – „midiprep“

Z otestovaných bakteriálních kolonií se správně vloženým konstruktem, byl tento konstrukt izolován pomocí kitu „Genopure Plasmid Midi Kit“ (Roche). Ještě před vlastní extrakcí a purifikací, bylo nejprve nutné získat bakteriální sediment z příslušných bakteriálních kolonií. Příslušná bakteriální kolonie byla pomocí sterilní špičky z mikropipety přenesena do 3 ml LB média s přidanými 1,5 µl ampicilinu (50mg/ml) a následně umístěna do termoboxu, vyhřátém na 37 °C. Inkubace probíhala za nepřetržitého třepání 9 hodin. Posléze byl celý objem přenesen do 50 ml LB média a přidanými 25 µl (50mg/ml) ampicilinu a opět inkubován za stejných podmínek po dobu 12 hodin. Bakteriální sediment byl následně získán centrifugací (6000 rpm/10 min.). Takto izolovaný a purifikovaný konstrukt byl použit přímo pro mikroinjekci do vajíček.

### 3.3.6 Získání vajíček pro mikroinjekci konstruktů

Získání vhodných drozofilích vajíček pro mikroinjekci je velmi důležitým krokem v celé proceduře získání mutantního jedince. K mikroinjekci konstruktů byl vybrán transgenní kmen *D. melanogaster* s genotypem:

*w; +/-; vasaCas9/TM6 Tb*. Samice byly drženy v počtu cca 300 jedinců v kladoucí kličce, jejíž spodní část tvořila Petriho miska s médiem. Složení média je uvedeno v následujícím protokolu:

50 ml dH<sub>2</sub>O }  
1,5 g agar } směs 1

16,5 ml džus }  
1,65 g sacharóza } směs 2

Obě dvě směsi byly zahřívány v uzavřených nádobách z varného skla do té doby, než došlo k úplnému rozpuštění pevných látek v kapalinách. Poté byly obě směsi opatrně smíchány. Nakonec byla ve výsledné směsi rozpuštěna tableta aktivního uhlí (Carbosorb 320 mg), pro lepší viditelnost nakladených vajíček.

V této kličce s Petriho miskami setrvaly samice 30 minut. Po uplynutí této doby byla Petriho miska vyměněna za novou. Nakladená vajíčka v misce byla promyta, při použití jemné tkaniny jako filtru zachycena a tedy získána pro následnou mikroinjekci.

### 3.3.7 Mikroinjekce plazmidového konstruktů do vajíček

#### 3.3.7.1 Mikroinjekční aparatura

Použitá mikroinjekční aparatura se skládá ze třech hlavních částí: invertovaného mikroskopu vybaveného čočkou s dvacetinásobným zvětšením a mikromanipulátorem, vzduchotlakovým vstřikovacím zařízením a stativu s držákem jehly, který lze polohovat pomocí mikrošroubu v osách *x*, *y* a *z*. V našem případě vzduchotlakové zařízení tvořila injekční stříkačka, neboť po četných pokusech se jevila jako nejoptimálnější z hlediska ovladatelnosti a regulace tlaku vzduchu, na rozdíl od komerčně dostupného mikroinjektoru FemtoJet (Eppendorf).

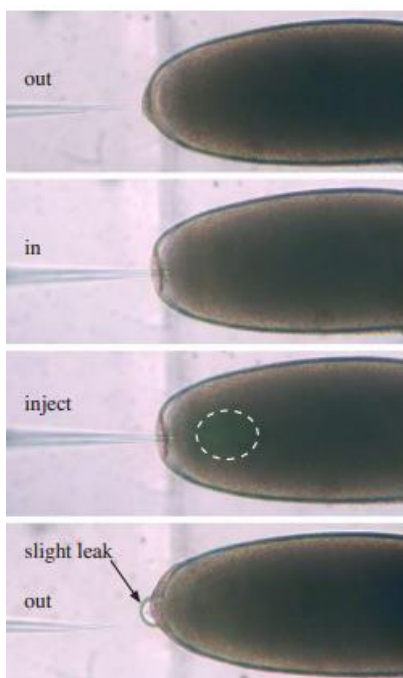
Jehla pro mikroinjekci byla vytažena, ze skleněné borosilikátové kapiláry na horizontálním vytahovači kapilár. Kvalita a průměr mikroinjekční jehly, je naprosto esenciální pro úspěšné provedení mikroinjekce.



### 3.3.7.2 Příprava vajíček pro mikroinjekci a vlastní mikroinjekce

Správná příprava vajíček před vlastní mikroinjekcí je naprosto nezbytná pro úspěch celé procedury. Hlavní roli při přípravě hraje čas. Maximální doba, kdy je možné mikroinjektovat je 80 minut po naklazení. V této době se ve vaječné ooplazmě nacházejí shluky buněčných jader, které po uplynutí této doby migrují do periferie vajíčka, kde vytváří vrstvu buněk zvanou syncytiální blastoderm. Když navíc odečteme 30 minut, kdy necháváme samice klást, tak se nám čas na vlastní mikroinjekci zkracuje na 50 minut. Proto je obvykle nutné pracovat velice rychle a nejlépe ve dvou lidech.

Před započítáním vlastní mikroinjekce byla vajíčka zbavena chorionu promytím v 5 % roztoku chlornanu sodného. Čerstvě nakladená, promytá vajíčka a zbavená chorionu byla umístěna na podložní sklíčko s vrstvou agaru a ovocné šťávy a srovnána tak, aby jejich posteriorový konec vždy směřoval stejným směrem a to vždy v orientaci k mikroinjekční jehle. Vajíčka na podložním sklíčku byla imobilizována pomocí krycího sklíčka o rozměrech 18 x 18 mm a podložní sklíčko umístěno na stolek mikroskopu. Před vlastní mikroinjekcí byla směs izolovaných a purifikovaných konstruktů naředěna pomocí Ringerova roztoku na koncentraci 250 ng/μl, z důvodu nižší destrukce vajíček. Do tohoto roztoku bylo také přidáno potravinářské barvivo v poměru 1:50. Takto naředěným roztokem konstruktů byla naplněna mikroinjekční jehla a byla upravena poloha jehly, umístěné v držáku na stativu tak, aby její hrot směřoval do ohniskové roviny vajíčka. Vlastní mikroinjekce probíhala tak, že pomocí mikro šroubu stolku mikroskopu, bylo posouváno stolkem v osách  $x$  a  $z$  tak, aby jehla mohla penetrovat do připraveného vajíčka. Při penetraci jehly chorionem je nutné dávat pozor na hloubku penetrace, která by neměla přesáhnout jednu pětinu délky vajíčka. V opačném případě může dojít k „prasknutí“ vajíčka. Postup mikroinjekce je znázorněn na obrázku číslo 7. Mikroinjektovaná vajíčka byla umístěna do inkubátoru, vyhřátém na 18 °C, kde se tyto vajíčka nechala vyvíjet.



Obr. č. 7: Průběh penetrace mikroinjekční jehly chorionem vajíčka  
(převzato z [http://www.ibdml.univ-mrs.fr/equipes/BP\\_NG/Methods-files/injection.pdf](http://www.ibdml.univ-mrs.fr/equipes/BP_NG/Methods-files/injection.pdf))

### 3.3.8 Testování účinnosti štěpení pomocí CRISPR

K testování účinnosti štěpení gRNA byla zvolena metoda PCR. Jako vstupní materiál sloužila genomová DNA z části mikroinjektovaných vajíček a DNA z jedinců prvního larválního instaru. PCR byla prováděna 48 hodin po mikroinjekci v případě vajíček, respektive 72 hodin po mikroinjekci v případě jedinců prvního larválního instaru.

V pokusech, kdy byla používána DNA z mikroinjektovaných vajíček, bylo odhadováno rovnoměrné rozložení mutagenizovaných embryonálních somatických buněk a buněk zárodečné linie a tedy, že poměr mutagenizovaných a nemutagenizovaných buněk zůstane zachován i u vzorků izolovaných z více vajíček. Na jeden izolovaný vzorek genomové DNA bylo použito 40 vajíček. Při pokusech, kdy byla používána DNA z jedinců prvního larválního instaru, byla tato DNA izolována s jednotlivých larev.

Pro tyto PCR byl navržen pár specifických primerů TestF1 (TAAGATCCACACAACACTTC) a TestR1 (AAGGACACATAAGCCCCCAA). Přísměrný primer nasedá 122 bp. před očekávaný dvouřetězcový zlom prvního CRISPRu, 873 bp. před očekávaný dvouřetězcový zlom druhého CRISPRu a 1196 bp. před očekávaný dvouřetězcový zlom třetího CRISPRu. Protisměrný primer nasedá 229 bp. za očekávaný dvouřetězcový zlom třetího CRISPRu.

Pro tyto PCR reakce byl zvolen „master mix“ PPP (Top-Bio), obsahující „Taq“ DNA polymerázu. PCR reakce probíhala za podmínek uvedených v tabulce číslo VI. PCR produkty byly vizualizovány pomocí gelové elektroforézy. Očekávané velikosti PCR produktů v případě vzniku delecí u jednotlivých CRISPRů jsou uvedeny v tabulce číslo VII.

Tab. VI: Definované podmínky PCR reakce při použití PPP master mixu

PPP master mix („Taq“ DNA polymeráza)		
1.	94 °C	1 min.
2.	94 °C	0,25 min.
3.	55 °C	0,25 min.
4.	72 °C	1 min.
5.	72 °C	7 min.
6.	16 °C	-----

← 35×

Tab. VII: Očekávaná velikost PCR produktů v závislosti na vzniku delecí u jednotlivých CRISPRů

Varianty vzniku delece	Očekávaná velikost PCR produktu
„wild type“ / bez delece	1425 bp.
CRISPR 1 + CRISPR 2	674 bp.
CRISPR 2 + CRISPR 3	1102 bp.
CRISPR 1 + CRISPR 3	351 bp.

### 3.3.8.1 Izolace genomové DNA z vajíček

Izolace genomové DNA z mikroinjektovaných vajíček byla prováděna pomocí reagentu DNazol (Life Technologies) podle následujícího protokolu:

1. Homogenizace a lýze: 40 vajíček bylo umístěno do 1,5 ml mikrozkušavky, bylo přidáno 40 µl reagentu DNazol® a proteináza K (100 µl/ml). Tato směs byla následně inkubována 20 minut při pokojové teplotě.
2. Centrifugace: inkubovaný lyzát byl centrifugován při 10 000 rpm po dobu 10 minut.

3. Precipitace DNA: centrifugovaný lyzát byl precipitován 20  $\mu$ l 100% etanolu a centrifugován při 5 000 rpm po dobu 5 minut.
4. Promývání I: po centrifugaci byl odstraněn supernatant, k sedimentu bylo přidáno 40  $\mu$ l 100% etanolu a následovala centrifugace při 5 000 rpm po dobu 5 minut.
5. Promývání II: byl odstraněn supernatant a k sedimentu bylo přidáno 40  $\mu$ l 75% etanolu, pak následovala centrifugace při 5 000 rpm po dobu 5 minut.
6. Rozpuštění DNA: po předchozí centrifugaci byl odstraněn supernatant, po té byl vzorek na vzduchu vysušen (20 vteřin) a rozpuštěn v 10  $\mu$ l NaOH (8mM).

### 3.3.8.2 Izolace genomové DNA z jedinců prvního larválního instaru

Izolace genomové DNA z jedinců prvního larválního instaru byla prováděna pomocí pufru, jehož složení je uvedeno níže:

Izolační pufr („Squishing buffer“):	10 mM TRIS-Cl, pH 8,2
	1 mM EDTA
	25 M NaCl
	200 $\mu$ l/ml proteináza K

Pomocí výše uvedeného pufru byla izolována DNA z jednotlivých jedinců prvního larválního instaru. Pro tyto účely byl experimentálně upraven izolační protokol tak, aby výtěžek DNA z jedné larvy byl natolik dostačující, aby byla možná amplifikace pomocí PCR. Tento experimentálně upravený protokol je uveden níže:

1. Připravit izolační pufr
2. Umístit 1 larvu do 0,5 ml mikrozkušavky a zkumavku ponořit na 1 minutu do kapalného dusíku
3. Do zkumavky přidat 15  $\mu$ l izolačního pufru a homogenizovat larvu pomocí sterilní špičky mikropipety
4. Inkubovat vzorek v 55 °C po dobu 1 hodiny
5. Inaktivovat proteinázu K inkubací v 95 °C po dobu 2 minut.

Takto vyizolovanou DNA lze přímo použít k analýze metodou PCR.

### 3.3.9 Schéma křížení mutagenizovaných jedinců

Schéma křížení mutagenizovaných jedinců je uvedeno na obrázku číslo 8. Pro účely prvního křížení byli mikroinjektovaní jedinci selektováni podle pohlaví (v případě samic pouze panny) Následně byly mikroinjektovaní jedinci kříženi s jedinci genotypu:

*w; +/-; vasaCas9/TM6B Tb* a rozděleni do skupin. Každá skupina měla 1 samici (pannu) a 3 samce. Část potomstva byla testována pomocí PCR se specifickými primery TestF1 (TAAGATCCACACAACACTTC) a TestR1 (AAGGACACATAAGCCCCCAA), s následnou vizualizací PCR produktů gelovou elektroforézou. První filiální generace mikroinjektovaných jedinců byla rovněž testována na přítomnost mutace tak, že z příslušné skupiny jedinců bylo vybráno náhodně pět jedinců, ze kterých byla vyizolovaná genomová DNA. Tato DNA byla použita k PCR analýze se z výše uvedenými primery, přičemž pro tyto PCR reakce byl použit stejný master mix (PPP) a izolační pufr („squishing buffer), jako v případě kontroly mikroinjektovaných jedinců. V případě, že část potomstva určité skupiny vykazovala delecí, byla tato skupina použita k dalšímu křížení.

Cílem mého křížení mikroinjektovaných jedinců bylo získat skupinu jedinců nesoucí mutaci genu *CNT1* oproti balancerovému chromozomu. Izolace genomové DNA probíhala pomocí následujícího protokolu:

1. Příprava izolačního pufru („Squishing buffer“) – 10mM TRIS – HCl (pH 8,2), 1mM EDTA, 25 mM NaCl, proteináza K (200 µg/ml)
2. Procedura homogenizace a izolace genomové DNA – jednotliví jedinci byli umístěni do 1,5 ml mikrozkušavek a homogenizováni (po dobu 5 – 10 vteřin) špičkou mikropipety s nataženým objemem 50 µl izolačního pufru, přičemž objem špičky nebyl vypuštěn, ale přidané množství izolačního pufru, bylo pouze to, které uniklo ze špičky při homogenizaci.

Po takto provedené homogenizaci byly vzorky inkubovány při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Po této inkubaci byly vzorky umístěny na 2 minuty do termobloku vyhřátého na 95 °C za účelem inaktivace proteinázy K. Takto získaná genomová DNA byla přímo použita k PCR.

$$\mathbf{G_0:} \quad \text{♀/♂ } w; \frac{*}{*}; \frac{vasaCas9}{TM6BTb} \quad \times \quad w; \frac{SM6B}{Sco}; \frac{+}{+}$$

$$\downarrow$$

$$\mathbf{F_1:} \quad w; \frac{*}{Sco}; \frac{vasaCas9}{+} \text{ nebo } w; \frac{*}{Sco}; \frac{+}{TM6BTb}$$

$$w; \frac{*}{SM6B}; \frac{vasaCas9}{+} \text{ nebo } w; \frac{*}{SM6B}; \frac{+}{TM6BTb}$$

Obr. č. 8: Schéma křížení mutagenizovaných jedinců

## 4 Výsledky

### 4.1 Vytvoření programovaných nukleáz TALEN pro gen *CNT1*

Pro gen *CNT1* byl vytvořen pár nukleáz TALEN podle protokolu „Golden Gate“, který byl však upraven. Při implementaci metody cílené mutagenese nukleázami TALEN se ukázalo, že štěpení vektorových plazmidů pFUS\_A a pFUS\_B #, restričním enzymem *BbsI*, ve stejném kroku jako vkládání modulových plazmidů do těchto vektorů, snižuje účinnost celé reakce. Byl zvolen tedy alternativní postup, kdy byly samotné vektorové plazmidy štěpeny, výše zmiňovaným restričním enzymem, samostatně a následně byly purifikovány gelovou elektroforézou. Při vlastní reakci, kdy se do cílových vektorů vkládají modulové plazmidy, byl samozřejmě také do reakce přidán restriční enzym *BbsI*. Tento postup se posléze ukázal jako vhodnější.

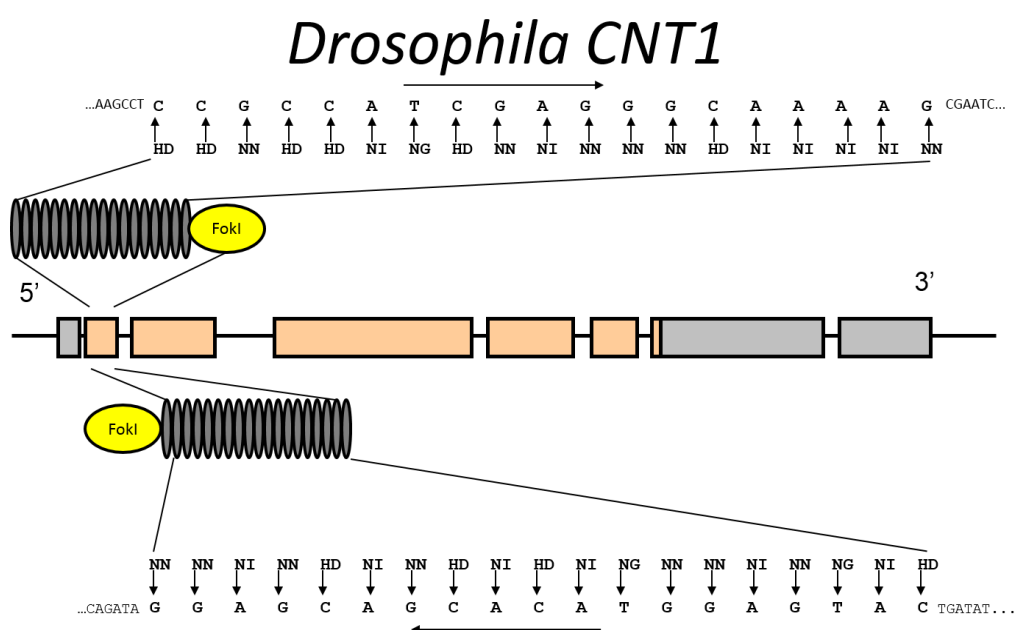
Další změnou oproti původnímu „Golden Gate“ protokolu bylo použití odlišného koncového vektoru. Použitý vektor (pBlue-TAL) obsahuje zkrácenou TAL efektorovou, DNA vázající doménu a codon usage“ pro lepší expresi u hmyzu. Vektor pBlue-TAL je však plně kompatibilní s ostatními reagensy z protokolu „Golden Gate“.

Schematické znázornění lokalizace páru TALENů uvnitř genu *CNT1* je uvedeno na obrázku číslo 9. Přesná lokalizace nukleáz TALEN, včetně jejich cílových sekvencí je uvedena na obrázku číslo 19 v příloze 8.1. Protokol „Golden Gate“ je koncipován tak, aby bylo možné konstrukty nukleáz TALEN vytvořit během 5 dní. V naší laboratoři však byla tato doba zhruba trojnásobná. Toto zdržení připisuji na vrub tomu, že účinnost vkládání modulů do vektorových plazmidů je poměrně nízká, což sebou nese i nutnost velkého množství kontrolních PCR reakcí. Plazmidové konstrukty tohoto páru nukleáz byly vyzolovány z chemicky kompetentních buněk (midiprep) a jejich správnost byla ověřena sekvenováním. Sekvenační data byly přeložena do sekvence aminokyselin pomocí online webového programu ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>). Tímto překladem se vizualizovala správnost ligací jednotlivých modulů (RVD). Tyto data jsou uvedena v příloze číslo 8.3.

Na obrázcích číslo 20; 21; 22 a 23 v příloze 8.3 jsou uvedeny aminokyselinové sekvence se žlutě vyznačenými RVD. Z těchto obrázků je patrné, že všechny moduly jsou v konečném vektoru vloženy správně a ve správném pořadí, navíc při sekvenování podle přímého a protisměrného primeru došlo i k částečnému překryvu sekvencí. Tyto překryvy vykazují shodu.

Ve své diplomové práci jsem se již mikroinjekcí mRNA nezabýval. Na základě výsledků od kolegů z naší laboratoře, jejichž mikroinjektovaná vajíčka měla nízkou míru přežívání a v důsledku nutnosti pracovat s in vitro připravenou mRNA, se tato metoda stala finančně velmi náročnou. Syntézu mRNA, podle mých konstruktů, rovněž nebylo možné provést úspěšně, neboť se později ukázalo, že souprava na syntézu mRNA byla kontaminována RNázami a nákup nové sady by tuto metodu ještě více prodražil.

Cílená mutagenese pomocí programovaných nukleáz TALEN, byla dovedena do fáze hotových a sekvenací ověřených konstruktů a uložena pro případné pozdější využití.



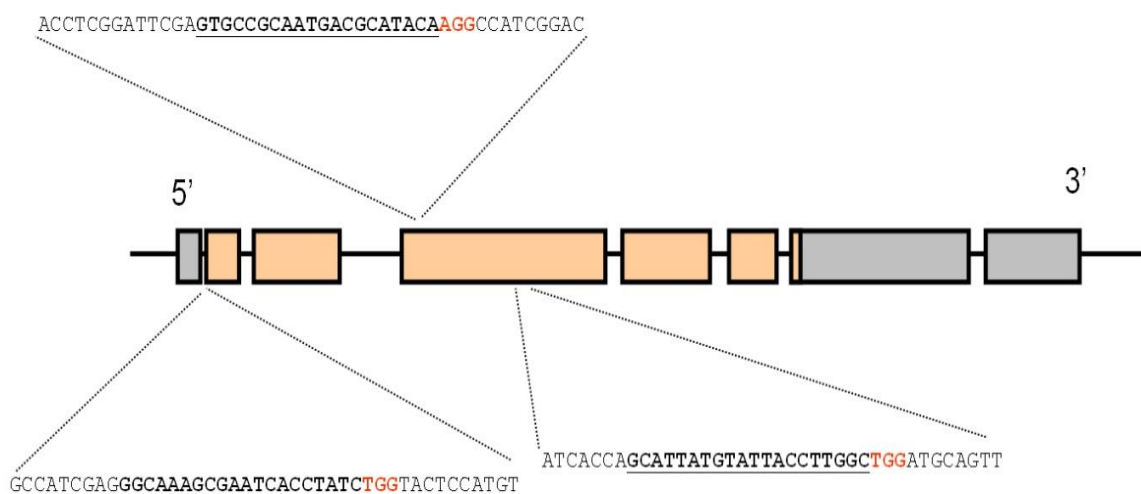
Obr. č. 9: Schematické znázornění umístění páru nukleáz TALEN v genu *CNT1*

#### 4.2 Vytvoření programovaných nukleáz CRISPR pro gen *CNT1*

Pro gen *CNT1* pak byly vytvořeny celkem tři nukleázy CRISPR. První nukleáza byla vytvořena do prvního exonu, druhá a třetí nukleáza byla vytvořena do třetího exonu. Schematické znázornění jejich lokalizace v genu *CNT1* je uvedeno na obrázku číslo 10. Celá sekvence genu s vyznačenými cílovými sekvencemi pro nukleázy CRISPR je uvedena v příloze číslo 8.4.



# *Drosophila CNT1*



Obr. č. 10 Schematické znázornění cílů nukleáz CRISPR/Cas v genu *CNT1*. Trinukleotidy PAM jsou vyznačeny červenými písmeny

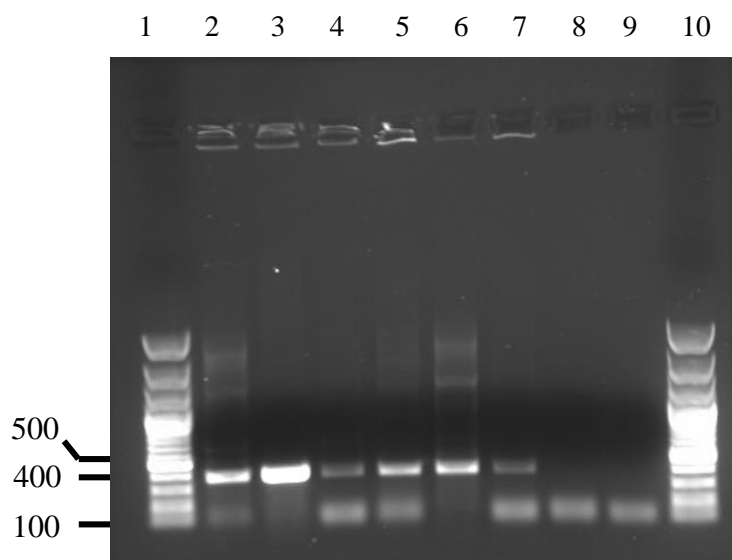
## 4.2.1 Efektivita ligace oligonukleotidů do vektorového plazmidu

### pU6 – *BbsI* – chiRNA

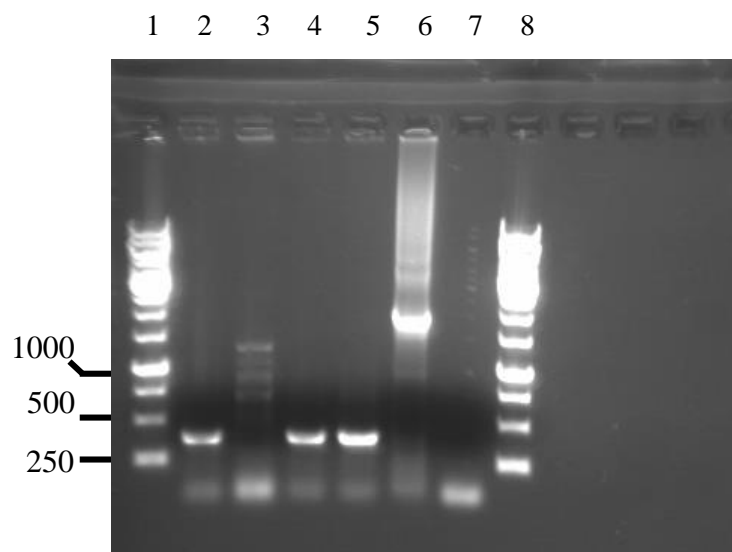
Za podmínek uvedených v odstavcích 3.3.1; 3.3.2 a 3.3.3 byla efektivita ligace oligonukleotidů vektorového plazmidu pU6 – *BbsI* – chiRNA poměrně vysoká, což je patrné z obrázků číslo 11 a 12.

U obrázku číslo 11 v dráhách číslo 2; 3; 4; 5, 6 a 7 je detekován PCR produkt o velikosti 398 bp., což indikuje správně vložené oligonukleotidy do plazmidu pU6 – *BbsI* – chiRNA. U obrázku číslo 12 je v dráhách číslo 2; 4; 5, je rovněž detekován PCR produkt o velikosti 398 bp., což také indikuje správně vložené oligonukleotidy do zmíněného plazmidu. Při ověřování úspěšnosti ligace do vektorového plazmidu, bylo vždy více než 50 % bakteriálních kolonií pozitivních na přítomnost vektorového plazmidu se správně vloženými oligonukleotidy.

Pro účely testování správné ligace oligonukleotidů do vektorového plazmidu se mi podařilo navrhnout specifický primer s „univerzálním“ použitím. Tento primer (AAAGCCGAGTCAAATGCCGA) je možné použít jako přímousměrný primer při testování pomocí PCR i jako přímousměrný sekvenační primer. Toto zjednodušení mírně snížilo finanční náklady na tuto metodu.



Obr. č. 11: Detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy (produkt o velikosti 398 bp. indikuje správně vložené oligonukleotidy do plazmidu pU6 – *Bbs*I – chiRNA, agarosa: SeaKem, ladder: GeneRuler 100 bp Plus – Thermo Scientific)



Obr. č. 12: Detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy (produkt o velikosti 398 bp. indikuje správně vložené oligonukleotidy do plazmidu pU6 – *Bbs*I – chiRNA, agarosa: SeaKem, ladder: GeneRuler 1 kb – Thermo Scientific)

#### **4.2.2 Zvýšení úspěšnosti mikroinjekce konstruktů nukleáz CRISPR**

Mikroinjekci jsme prováděli současně všemi třemi plazmidy kódujícími gRNA (koncentrace 250 ng/μl). Při prvních mikroinjekcích byla používána čerstvě nakladená a promytá vajíčka s chorionem. To se později ukázalo jako chybný krok, neboť chorion vajíček poškozoval mikroinjekční jehlu, přičemž docházelo k ucpávání jehly a jejímu ztupení, což způsobilo neúspěšnost mikroinjekce. Při pozdějších pokusech byly používány vajíčka zbavená chorionu. Odstranění chorionu spočívalo v promytí vajíček v 5 % roztoku chlornanu sodného. Při opakovaných mikroinjekcích byla do mikroinjektovaného roztoku přidána rovněž potravinářská barva, pro lepší vizualizaci toho, zda došlo k průniku roztoku do vajíčka. Při odstranění chorionu z vajíček se úspěšnost mikroinjekce mírně zvýšila, což je ovšem nízký počet.

#### **4.2.3 Detekce úspěšnosti mikroinjekce**

V prvních pokusech byla úspěšnost mikroinjekce testována u vajíček 48 hodin po mikroinjekci. Později se však ukázalo, že po 48 hodinách nelze s jistotou určit, zda mikroinjekce nebyla pro vajíčko letální. Docházelo tedy k tomu, že izolovaná DNA pocházela z velké části z „neživých“ vajíček a tudíž výsledky mikroinjekce byly negativní. Při pozdějších pokusech, kdy byla upravena mikroinjekční technika, spočívající v odstranění chorionu vajíček, přidání potravinářské barvy k mikroinjektovanému roztoku, byla izolace DNA prováděna z přeživších jedinců prvního larválního instaru. Prodloužení doby izolace DNA po mikroinjekci ukázalo skutečný dopad mikroinjekce na životaschopnost vajíček v našich podmínkách. Z průměrného počtu 150 mikroinjektovaných vajíček, při jedné mikroinjekci, přežily do larválního stádia maximálně 3 jedinci, což je velmi nízký počet. Z časových důvodů byly nakonec konstrukty nukleázy CRISPR odeslány k mikroinjekcím do laboratoře v Biologickém výzkumném centru, maďarské Akademie věd v Szegedu.

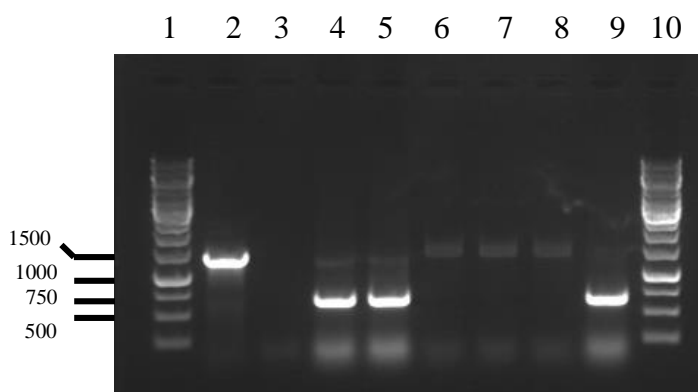
#### **4.2.4 Vyhodnocení úspěšnosti mutagenese nukleázami CRISPR u F1 generace**

PCR s následnou vizualizací produktů pomocí gelové elektroforézy, byla zvolena jako kontrolní metoda úspěšnosti mutagenese. Na níže uvedených obrázcích číslo 13 a 14 je vizualizace PCR produktů. Očekávané velikosti PCR produktů jsou uvedené v tabulce číslo V. Z obrázku číslo 13 je zřejmé, že velikost PCR produktů v drahách číslo 4; 5 a 9 odpovídá předpokládané velikosti 674 bp. to znamená, že došlo k delecí v místě první a druhé nukleázy CRISPR. Pro srovnání, v dráze číslo 2 je vizualizován PCR produkt nemutagenizovaných jedinců o velikosti 1425 bp. („wild-type“).

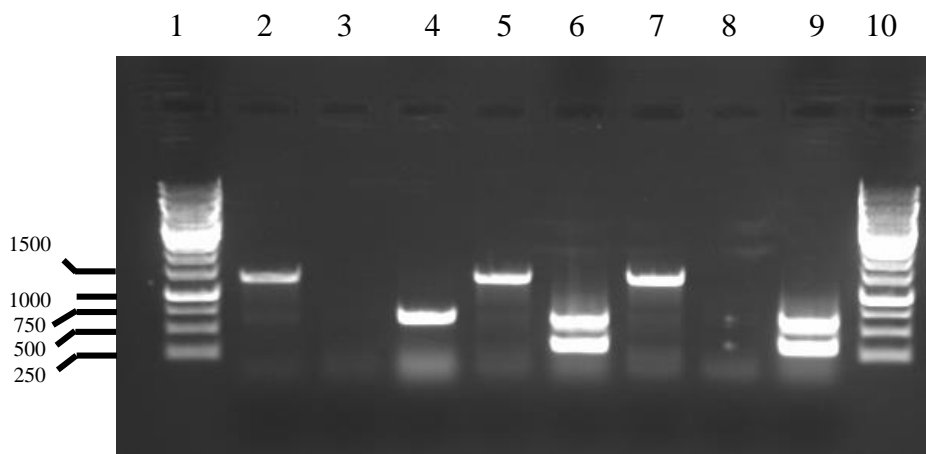
Z obrázku číslo 14 je rovněž zřejmé, že v dráze číslo 4 odpovídá velikost PCR produktu 674 bp., což indikuje delecí ve stejném místě jako předchozích vzorků. Na rozdíl v drahách číslo 6 a 9 lze pozorovat dva PCR produkty. Větší PCR produkt opět odpovídá velikosti 674 bp. a menší produkt velikosti 351 bp., což indikuje delecí mezi první a třetí nukleázou CRISPR, z čehož vyplývá, že ve vzorku se nacházely jedinci s oběma typy delecí. Pro definitivní potvrzení delecí byly z agarosového gelu vyizolovány PCR produkty a osekvenovány.

Na základě sekvenace PCR produktu, lze s jistotou říci, že u vzorku vizualizovaného na obrázku číslo 13 v drahách 4; 5 a 9 (stejný vzorek), došlo k delecí mezi první a druhou nukleázou CRISPR a ke zkrácení sekvence genu o 674 bp. Tato skutečnost vede k tomu, že se v mutantních jedincích bude tvořit zkrácený protein. Výsledná aminokyselinová sekvence proteinu je uvedena na obrázku číslo 15, kde žlutě zvýrazněná část představuje delecí. Výsledná podoba genu *CNT1* vyznačenou delecí je uvedena na obrázku číslo 25 v příloze 8.5.

Na obrázku číslo 16 je uvedeno schematické znázornění struktury transmembránového proteinu CNT1, včetně jeho 13 transmembránových  $\alpha$ -helixů. Z tohoto obrázku je patrné, že při mutagenезi došlo k delecí, která postihla protein tak, že tři  $\alpha$ -helixy jsou úplně odstraněny a že čtvrtý  $\alpha$ -helix má o jednu aminokyselinu méně, což zajisté ovlivní jeho trojrozměrnou strukturu. Tento obrázek byl vytvořen pomocí online programu HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop>). Lze tedy s jistotou říci, že výsledný protein nebude funkční.



Obr. č. 13: Detekce PCR produktů, amplifikované genomové DNA, získané z potomstva mikroinjektovaných jedinců (použita DNA z 5 jedinců na jamku, agarosa: SeaKem, ladder: GeneRuler 1 kb – Thermo Scientific)



Obr. č. 14: Detekce PCR produktů, amplifikované genomové DNA, získané z potomstva mikroinjektovaných jedinců (použita DNA z 5 jedinců na jamku, agarosa: SeaKem, ladder: GeneRuler 1 kb – Thermo Scientific)

MAEPIEGEQEEKPPPSRAKRIT~~YLVLVHVL~~LHIIIFISYFTAATIIIFIFYDKDSKECWPNRGSE  
 ATTESIDNSTEDDDDDDDYDTEETSEKPVPEVKPKLLCQINWCHGYGFLIVLFLFYILWLYY  
 WVKPFVGIKLYNNYLEPVIDKWIAFSRQWIVSGVMLAIVLAVVVAYLGFECRNDAYKAIGL  
 LGPVCFVLIGFAVSKHHLQVPWRIVTHGLLGQLLLGILCLRLPFGRSIFQCLGDKVTIFLNY  
 AQHGARFVYGDRICDEYVFAFAILAVVFFFVITSIMYYLGWMQFILNGFGFLQAMVGTTV  
 CESVNAAGNVFLSMTESPLVIRPYIEILTVSELHAICTSGYATVAGTVLGAYVSFGASASFL  
 IAASVMAAPGSLAFAKLFYPETEESLTRSDNIKLESSTDTSILDAAASGAAAALLIVLGIVS  
 NIIAFLAIVFFLDAVTEWIFELIGLHNITLLYILSQIFIPIVFVMGVPWHDCQAIGLVVAQK  
 SFINEFVAYRNLGILVSDKKVDPRSAAIATFALCGFANPGSLGIVIASLSAMAPSRSDITR  
 VAFRSYFAGSFVSFTSASLAGILIQNEYTGGN

Obr. č. 15: Aminokyselinová sekvence proteinu CNT1 se žlutě vyznačenou delecí, vytvořenou CRISPRy 1 a 2

**Protein:** CNT1

**Délka:** 589

**N-konec:** cytoplazmatická strana

**Počet transmembránových helixů:** 13

**Transmembránové helixy:** 21-45 108-132 153-173 182-199 210-234 265-289 296-320 351-375 421-445 456-480 487-511 520-544 563-581

```
seq  AEPIEGEQEE  KPPPSRAKRI  TYLVLVHVLLH  IIFISYFTAA  TIIFIFYDKD  50
pred  IIIIIIIIII  IIIIIiiiiii  HHHHHHHHHH  HHHHHHHHHH  HHHHHooooo

seq  SKECWPNRGS  EATTESIDNS  TEDDDDDDDYD  TEETSEKPVV  EVKPKLLCQI  100
pred  oooooooooo  OOOOOOOOOO  OOOOOOOOOO  OOOOOOOOOO  OOoooooooo

seq  NWCHGYGFLI  VLFILFYILW  LYYWVFKPFV  GIKLYNNYLE  PVIDKWIASF  150
pred  ooooooHHH  HHHHHHHHHH  HHHHHHHHHH  HHiIIIIIII  IIIIIIIIII

seq  RQWIVSGVML  AIVLAVVVA  LGEFECRNDAY  KAIGLLGPVC  FVLIGFAVSK  200
pred  iiHHHHHHHH  HHHHHHHHHH  HHHooooooo  oHHHHHHHHH  HHHHHHHHHI

seq  HHLQVPWRIV  THGLLGQLL  GILCLRLPFG  RSIFQCLGDK  VTIFLNQAQH  250
pred  IIIIIIIIIH  HHHHHHHHHH  HHHHHHHHHH  HHHHoooooo  oooooooooo

seq  GARFVYGDR  CDEYVFAFAI  LAVVFFFSVI  TSIMYYLGWM  QFILNGFGFL  300
pred  oooooooooo  oooHHHHHHH  HHHHHHHHHH  HHHHHHHHHH  IIIIIHHHHH

seq  LQAMVGTTC  ESVNAAGNVF  LSMTESPLVI  RPYIEILTVS  ELHAICTSGY  350
pred  HHHHHHHHHH  HHHHHHHHHH  oooooooooo  oooooooooo  oooooooooo

seq  ATVAGTVLGA  YVSGASASF  LIAASVMAAP  GSLAFKLFY  PETEESLTRS  400
pred  HHHHHHHHHH  HHHHHHHHHH  HHHHHiiiiii  IIIIIIIIII  IIIIIIIIII

seq  DNIKLESSTD  TSILDAAASG  AAAALLIVLG  IVSNIIAFLA  IVFFLDAVTE  450
pred  IIIIIIIIII  IIIIIiiiiii  HHHHHHHHHH  HHHHHHHHHH  HHHHHooooo

seq  WIFELIGLHN  ITLLYILSQI  FIPIVFVMGV  PWHDCQAIGL  VVAQKSFINE  500
pred  oooooHHHHH  HHHHHHHHHH  HHHHHHHHHH  IIIIIHHHHH  HHHHHHHHHH

seq  FVAYRNLGIL  VSDKKVDPRS  AAIATFALCG  FANPGSLGIV  IASLSAMAPS  550
pred  HHHHHHHHHH  HooooooH  HHHHHHHHHH  HHHHHHHHHH  HHHHiIIIII

seq  RRSDITRVAF  RSYFAGSFVS  FTSASLAGIL  IQNEYTGGN  589
pred  IIIIIIIIII  iiHHHHHHHH  HHHHHHHHHH  Hoooooo
```

Obr. č. 16: Schematické znázornění struktury zkráceného proteinu CNT1

### 4.3 Porovnání aminokyselinových sekvencí proteinu CNT1 a jeho lidského homologu SLC28A1

V práci Gray et al., 2004 se uvádí, že protein CNT1 má substrátovou specifitu k pyrimidinovým nukleotidům, ovšem údaje členů naší laboratoře naznačují, že CNT1 má spíše substrátovou specifitu k purinovým nukleotidům. Na základě těchto protichůdných údajů jsem se rozhodl porovnat aminokyselinové sekvence drozofilního proteinu CNT1 s jeho funkčním lidským homologem SLC28A1, který rovněž podle Gray et al., 2004 má substrátovou specifitu k pyrimidinovým nukleotidům. Z obrázků číslo 17 a 18 je zřejmé, že

protein CNT1 má s jeho funkčním lidským homologem 39 % sekvenční shodu, přičemž sekvenční shoda s lidským SLC28A2, který je funkčním homologem CNT2, je 42 %. Pro účely tohoto srovnání byl použit online webový program BLAST. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Shody: 190/456 (42 % )

D.mel	140	LEPVIDKWIAFSRQWIVSGVMLAIVLAVVVAYLGFECRNDAYKAIIGLLGPVCFVLIGFAV	199
		L+P + + +W+ +GV L ++ +L + + I G F+LI FA	
Člov.	135	LKPFENSRLRLWTKWVFAGVSLV----GLILWLALDTAQRPEQLIPFAGICMFILILFAC	190
D.mel	200	SKHHLQVPWRIVTHGLLQQLLLGILCLRLPFGRSIFQCLGDKVTIFLNYAQHGARFVYGD	259
		SKHH V WR V GL Q + GIL +R G ++FQ LG++V IFLNY G+ FV+GD	
Člov.	191	SKHHSAVSWRTVFSGLGLQFVFGILVIRTDLGYTVFQWLGEQVQIFLNYTVAGSSFFVFGD	250
D.mel	260	RICDEYVFAFMAILAVVFFFSVITSIMYYLQWQFILNGFGLLQAMVGTTCESVNAAGN	319
		+ + VFAF L ++ FF + SI+YYLG +Q+++ + LQ +GTT E++ AGN	
Člov.	251	TLVKD-VFAFQALPIIIFFGCVSILYYLGLVQWVQKVAWFLQITMGTATATETLAVAGN	309
D.mel	320	VFLSMTEsplVIRPYIEILTVSELHAICTSGYATVAGTVLGAYVSFGASASFLIAASVMA	379
		+F+ MTE+PL+IRPY+ +T+SE+HA+ T G+AT++GTVLGA+++FG AS LI+ASVMA	
Člov.	310	IFVGMTEAPLLIRPYLGDMTLSEIHAVMTGGFATISGTVLGAFAFGVDASSLISASVMA	369
D.mel	380	APGSLAFAKLFYPETEESLTRSDN-IKLESSTDTSILDAAASGAAAALLIVLGIIVSNIIA	438
		AP +LA +KL YPE EES +S+ +KL + ++L+AA++GA A+ + + +N+IA	
Člov.	370	APCALASSKLAYPEVEESKFKSEEGVKLPRGKERNVLEAASNGAVDAIGLATNVAANLIA	429
D.mel	439	FLAIVFFLDAVTEWIFELIGLHNITLLYILSQIFIPVFMGVPWHDCQAIGLVVAQKSF	498
		FLA++ F++A W+ EL+ + +T I S + P+VF+MGV W DC + +V K F	
Člov.	430	FLAVLAFINAALSWLGELVDIQGLTFQVICSYLLRPMVFMGVEWTDCCPMVAEMVGKFF	489
D.mel	499	INEFVAYRNLG-----ILVSDKKVDPRAAIATFALCGFANPGSLGIVIASL	545
		INEFVAY+ L I + + R+ I TF+LCGFAN S+GI + L	
Člov.	490	INEFVAYQQLSQYKNKRLSGMEEWIEGEKQWISVRAEIIITFSLCGFANLSSIGITLGGL	549
D.mel	546	SAMAPRRSDITRVAFRSYFAGSFVSFTSASLAGIL	581
		+++ P R+SD+++V R+ F G+ VS SA +AGIL	
Člov.	550	TSIVPHRKSDSLKVVVRALFTGACVSLISACMAGIL	585

Obr. č. 17: Porovnání aminokyselinové sekvence proteinu CNT1 a jeho lidského sekvenčního homologu SLC28A2

Shody: 186/471 (39 % )

D.mel	130	FVGIKLYNNYLEPVIDKWIAFSRQ-----WIVSGVMLAIVLAVVVAYLGFECRNDAYKAI	184
		F+G +L L P + +++ W G+ LA L +V+ +L + + +	
Člov.	122	FLGHRLLKRLLGPKLRRLKPKQGHPRLLLWFKRGLALAAFLGLVL-WLSLDTSQRPEQLV	180
D.mel	185	GLLGPVCFVLIGFAVSKHHLQVPWRIVTHGLLQQLLGLILCLRLPFGRSIFQCLGDKVTI	244
		G FV + FA SKHH V WR V+ GL Q +LG+L +R G F+ LG+++ I	
Člov.	181	SFAGICVFVALLFACSKHHCAVSWRAVSWGGLQFVLGGLLVIRTEPGFIAFEWLGEQIRI	240
D.mel	245	FLNYAQHGARFVYGDRICDEYVFAFAILAVVFFFSVITSIMYYLGWMQFILNGFGFLLQA	304
		FL+Y + G+ FV+G+ + + VFAF +L ++ FFS + S++Y++G MQ+++ +L+Q	
Člov.	241	FLSYTKAGSSVFVGEALVKD-VFAFQVLPPIVFFSVCVISVLYHVGLMQWVILKIAWLMQV	299
D.mel	305	MVGTTVCESVNAAGNVFLSMTESPLVIRPYIEILTVSELHAICTSGYATVAGTVLGAYVS	364
		+GTT E+++ AGN+F+S TE+PL+IRPY+ +T+SE+H + T GYAT+AG++LGAY+S	
Člov.	300	TMGTTATETLSVAGNIFVSQTEAPLLIRPYLADMTLSEVHVMTGGYATIAGSLLGAYIS	359
D.mel	365	FGASASFLIAASVMAAPGSLAFKLYPETEES-LTRSDNIKLESSTDTSILDAAASGAA	423
		FG A+ LIAASVMAAP +LA +KL YPE EES R + +KL +++++AA++GAA	
Člov.	360	FGIDATSLIAASVMAAPCALALSCLVPEVEESKFRREEGVKLTYGDAQNLEAASTGAA	419
D.mel	424	AALLIVLGIVSNIIAFLAIVFFLDAVTEWIFELIGLHNITLLYILSQIFIPVFMGVWPW	483
		++ +V I +N+IAFLA++ F++A W+ +++ + ++ I S I P+ F+MGV W	
Člov.	420	ISVKVVANIAANLIAFLAVLDFINAALSWLGMVDIQGLSFQLICSYILRPVAFMLMGVAW	479
D.mel	484	HDCQAIGLVVAQKSFINEFVAYRNLGIL-----VSDKK--VDPRSAAIATFALC	530
		DC + ++ K F+NEFVAY++L V D+K + R+ + TFALC	
Člov.	480	EDCPVVAELGLIKLFLNEFVAYQDLSKYKQRRLAGAEWVGDRKQWISVRAEVLTTFALC	539
D.mel	531	GFANPGSLGIVIASLSAMAPSRSDITRVAFRSYFAGSFVSFTSASLAGIL 581	
		GFAN S+GI++ L++M P R+SD +++ R+ F G+ VS +A +AGIL	
Člov.	540	GFANFSSIGIMLGGLTSMVPQRKSDFSQIVLRALFTGACVSLVNACMAGIL 590	

Obr. č. 18: Porovnání aminokyselinové sekvence proteinu CNT1 a jeho lidského funkčního homologu SLC28A1



## 5 Diskuze

### 5.1 *D. melanogaster* jako vhodný modelový organismus

*D. melanogaster* je vhodný modelový organismus, díky své krátké generační době, nenáročnosti chovu a širokému rozsahu viditelných fenotypů. Navíc s objevem programovaných nukleáz, je nyní možné, téměř libovolně, provádět genetické manipulace s vysokou účinností a specifitou. Tyto nástroje umožňují studovat základní funkce genů a to nejen pouhým „vypnutím“, ale i jejich další funkční analýzou. Programované nukleázy a jejich použití na modelových organismech rovněž zlepšují možnosti modelovat lidská genetická onemocnění, což pomáhá v objasňování jejich příčin, případně řešení.

Experimenty s programovanými nukleázami prováděnými u tohoto modelového organismu přispívají k prohlubování znalostí o jejich funkci a případném použití v humánní medicíně (Beumer et al., 2014).

### 5.2 Výběr metody cílené mutageneze

Programované nukleázy výrazně zdokonalily metody reverzní genetiky. Systémy TALEN a CRISPR, kterými jsem se zabýval ve své práci, jsou v současné době hojně využívány k cílené mutagenezi. Obě tyto metody se ale výrazně liší v cílové specifitě, manipulativnosti a v ceně. Programované nukleázy CRISPR jsou výrazně levnější a snadněji se s nimi manipuluje, na druhou stranu dostupnost vhodných cílových míst je nižší než u TALENů. Při navrhování nukleáz TALEN a CRISPR do cílového genu *CNTI* bylo na první pohled zřejmé, že počet vhodných TALENů výrazně převyšuje počet návrhů CRISPRů. TALENy jsou enzymy, které fungují s vyšší specifitou a jsou tedy například vhodné k mutagenezi krátkých cílových úseků (Blackburn et al., 2013). Ve své práci, kdy jsem se snažil narušit integritu genu *CNTI* a nikoliv vybrat konkrétní bodovou mutaci, která nenaruší zbytek přepisu genu, jako například doktor Sajwan ve své práci (Sajwan et al., 2015), plně postačovaly nukleázy CRISPR. V mém případě byly nukleázy CRISPR levnější a rychlejší variantou, jak narušit genovou integritu, bez nutnosti pracně a finančně nákladné syntézy mRNA.

Nelze s jistotou říci, která programovaná nukleáza je lepší. Výběr vhodné nukleázy závisí spíše na konkrétním případě a na preferencích uživatele.

### 5.3 Optimalizace metod cílené mutageneze

Před vlastní tvorbou programovaných nukleáz TALEN a CRISPR byly optimalizovány některé postupy. Za největší změnu lze považovat adaptaci „Golden Gate“ protokolu, publikovaného v článku Cermak et al., 2011, na naše podmínky.

Další adaptací oproti Cermak et al., 2011, bylo použití vhodnějšího koncového vektoru. Použitý vektor (pBlue-TAL). Vektor pBlue-TAL byl vytvořen kolegy naší laboratoře (Takasu et al., 2013).

Optimalizace metody CRISPR spočívala zejména ve správném nastavení detekčních metod, zejména pak v detekci správně sestaveného plazmidového konstruktů a detekci mutace u mutagenizovaných jedinců a jejich potomků. Použili jsme mikroinjekci směsí 3 gRNA, jež vytváří větší delece a umožňuje poměrně snadnou detekci mutací pomocí PCR. Účinnost mutageneze, byla poměrně nízká. Na základě analýzy potomků F1 generace jsme zjistili, že mutageneze byla úspěšná u G<sub>0</sub> jedince z 15 zkoumaných (tento jedinec obsahoval dvě mutace). Pro srovnání, výsledky publikované v Schnorrer et al., 2014, kdy počet mikroinjektovaných jedinců, přežívajících do dospělců dosahoval 10%. Pomocí námi použité metody detekce mutací jsme však byli schopni zaznamenat pouze velké delece vzniklé současným působením dvou nebo tří CRISPRů, což znamená, že při použití metody schopné detekovat bodové mutace bychom zřejmě získali mutantů mnohem více.

### 5.4 Detekce mutací

Ve své práci jsem se rovněž zabýval i mikroinjekcí plazmidových konstruktů nukleáz CRISPR. Tato metoda s sebou přinesla i nutnost detekovat správnost provedení mikroinjekčního experimentu. Tento tzv. „G<sub>0</sub> screening“ většinou spočívá v testování úspěšnosti mutageneze. K tomuto účelu slouží celá řada metod. Jedná se zejména o metody PCR, HRM analýzu, „mismatch“ analýzu, restrikční analýzu apd. (Beumer et al., 2014). Na základě těchto předpokladů jsem mikroinjektované jedince podrobil testování metodou PCR s navrženými primery, ohraničující předpokládanou oblast delece a sledoval velikost amplifikované oblasti pomocí gelové elektroforézy. Zvolená metoda PCR je pro mé účely vhodná a poměrně levná alternativa. Další zvažovanou, ale v současné době obtížně dostupnou metodou detekce delece, je tak zvaná „mismatch“ analýza, která se provádí pomocí enzymu T7 endonukleáza (NEB). T7 endonukleáza rozpoznává heteroduplexy DNA, které štěpí. Produkty této reakce lze následně vizualizovat pomocí gelové elektroforézy.

#### 5.4.1 Účinnost mikroinjekce v podmínkách naší laboratoře

Mikroinjekce plazmidových konstruktů nukleáz CRISPR byla v našich podmínkách velice nízká v porovnání s publikovanými výsledky v práci Schnorrer et al., 2014. V této práci počet mikroinjektovaných vajíček, která se vyvinula v první larvální instar, dosahoval přibližně 20% počtu mikroinjektovaných vajíček. Počty jedinců, kteří se vyvinuly v dospělce z mikroinjektovaných vajíček dosahovaly kolem 10%. V našich podmínkách přežili, z 900 mikroinjektovaných vajíček, pouze 3 jedinci do prvního larválního instaru a mikroinjekce se tak stala limitujícím faktorem, na který je potřeba se v budoucnu soustředit. Naše další mikroinjekce byla z časových důvodů provedena v rámci spolupráce s maďarským ústavem BRC v Szegedu.

#### 5.5 Perspektiva do budoucna – homologní rekombinace

Jednou z věcí, kterou je možné navázat na moji práci, je nahrazení části genu *CNT1* jiným genem, pomocí homologní rekombinace. Vhodným kandidátem by mohl být nějaký „markerový“ gen, který by umožnil identifikovat mutaci pouhým pozorováním „markeru“ ve fenotypu. Tímto kandidátním genem by se mohl stát například gen pro fluorescenční protein *DsRed*.

Donor dvouřetězcové DNA s „markerovým“ genem by měl být mikroinjektován v kruhové formě. Samotný „marker“ by měl být ohraničen homologními oblastmi, z nichž každá tato oblast by měla mít minimálně 200 – 500 bp. dlouhou homologii k cílovému místu, ideálně pak kolem 1 kbp. homologie k dosažení vysoké frekvence homologní rekombinace (Beumer et al., 2013).

Mutantní mouchy *CNT1* budou použity pro další výzkum v rámci projektu GA14-27816S – Funkce adenosinové signalizace v organismu.

#### 5.6 Budoucí možný význam programovaných nukleáz

Vzhledem ke značným možnostem regulace a modifikace programovaných nukleáz, je možné, že tyto enzymy jednou budou sloužit i jako terapeutika nové generace. Existují dvě hlavní cesty, kudy by se mohl vývoj programovaných nukleáz ubírat. První z nich je cílená editace genomu za účelem opravy různých genetických poruch (Urnov, 2005). Druhá možnost je, že programované nukleázy budou sloužit jako obrana před invazí virů do hostitelských buněk, případně jako nástroje na potlačení transkripce virových genů uvnitř hostitelských buněk. Bohužel ale, než toto bude moci být uvedeno do praxe, bude nutné nejprve vyvinout, tkáňově specifický a účinný nástroj na „dopravu“ programovaných

nukleáz do cílových buněk, bez vedlejších účinků. V případě nukleáz CRISPR to může představovat velký problém, neboť Cas9 protein je poměrně velký. Kromě problémů s velikostí domény Cas9, existuje další překážka v terapeutickém využití nukleáz CRISPR. Jejím už zmiňovaná malá specifita Cas9 domény. Proto se nyní jeví spíše nukleázy TALEN jako vhodnější nástroj, pro budoucí genetické humánní genetické manipulace.

## 6 Závěr

Pro mutagenезi genu *CNTI* byly vytvořeny programované nukleázy TALEN a CRISPR. Srovnal jsem postupy jejich přípravy a finanční dostupnost jejich praktického použití. V důsledku vyšších nákladů na syntézu TALENové mRNA pro mikroinjekce nebyly nukleázy TALEN pro cílenou mutagenезi použity. Jejich konstrukty byly uloženy pro případnou další potřebu. Pro další práci jsme zvolili platformu CRISPR/Cas.

## 7 Seznam literatury

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, A. D., Horvath, P. (2007) CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, 315, 1709 – 1712.

Bateman, J. R., Lee, A. M., Wu, C. T. (2006) Site-specific transformation of *Drosophila* via phiC31 integrase-mediated cassette exchange. *Genetics*, 173, 769 – 777.

Beumer, K. J., Carroll D. (2014) Targeted genome engineering techniques in *Drosophila*, *Methods*. 68, 29 – 37.

Beumer, K. J., Trautman, J. K., Mukherjee, K., Carroll, D. (2013) Donor DNA Utilization During Gene Targeting with Zinc-Finger Nucleases. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 3.4, 657 – 664.

Bhaya, D., Davison, M., Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual review of genetics*. 45, 273 – 297.

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

Blackburn, P. R., Campbell, J. M., Clark, K. J., Ekker, S. C. (2013). The CRISPR system – keeping zebrafish gene targeting fresh. *Zebrafish*, 1, 116 – 118.

Bogdanove, A. J., Schornack, S., Lahaye, T., (2010). TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Current opinions in Plant Biology*. 13, 394 – 401.

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

Brouns S. J., Jore, M. M., Lundgren M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J., Snijders, A.P., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V., van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 15, 960 – 964.

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

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

Del Santo B., Valdes, R., Mata, J., Felipe, A., Casado, F.J., Pastor-Anglada, M. (1998) Differential expression and regulation of nucleoside transport systems in rat liver parenchymal and hepatoma cells. *Hepatology*, 28, 1504 – 1511.

Downie, M. J., Kirk, K., Mamoun, C. B. (2008). Purine salvage pathways in the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell*, 7, 1231 – 1237.

Fredholm, B. B. (2010) Adenosine receptors as a drug targets. *Experimental Cell Research*, 316, 1284 – 1288.

Golic, M. M., Rong, Y. S., Petersen, R. B., Lindquist, S. L., Golic, K. G. (1997). FLP-mediated DNA mobilization to specific target sites in *Drosophila* chromosomes. *Nucleic Acid Research*, 25, 3665 – 3671.

Gray, J.H., Owen, R.P. (2004) The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflügers Archive: European Journal of Physiology*, 447, 728 – 734.

Huber-Ruano, I., Pinilla-Macua, I., Torres, G., Casado, F. J., Pastor-Anglada, M. (2010). Link between high – affinity adenosine concentrative nucleoside transporter-2 (CNT2) and energy metabolism in intestinal and liver parenchymal cells. *Journal of cellular Physiology*, 225, 620 – 630.

Choi, D. S., Cascini, M.G., Mailliard, W., Young, H., Paredes, P., McMahon, T., Diamond, I., Bonci, A., Messing, R. O. (2004). The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates ethanol intoxication and preference. *Nature Neuroscience*, 7, 855 – 861.

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

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

Jacobson, K. A., Gao, Z. G. (2006). Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 247 – 264.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, A., Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 17, 816 – 821.

Keleman, K., Micheler, T., VDRC project members, (2009.8.5). RNAi-phiC31 construct and insertion data submitted by the Vienna Drosophila RNAi Center. Osobní komunikace autora s organizací FlyBase.

Li, T., Huang, S., Jiang, W. Z., Wright, D., Spalding, M. H., Weeks, D.P., Yang, B. (2011). TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Research*. 39, 359–372.

Mahfouz, M. M., Li, L., Shamimuzzaman, M., Wibowo, A., Fang, X., Zhu, J.K. (2011). De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108, 2623–2628.



- Machado, J., Abdulla, P., Hanna, W.J., Hilliker, A.J., Coe, I.R. (2007). Genomic analysis of nucleoside transporters in Diptera and functional characterization of *DmENT2*, a *Drosophila* equilibrative nucleoside transporter. *Physiological Genomics* 28, 337 – 347.
- Makarova, K. S., Grishin, N. V, Shabalina, S. a, Wolf, Y. I., Koonin, E. V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, 1, 7 – 33.
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K.A., Wang, J., Xia, D.F., Meng, X., Paschon, D.E., Leung, E., Hinkley, S.J. et al. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology*. 29, 143–148.
- Moore J.K., Haber J.E., (1996). Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell Biology*. 16, 2164 - 2173.
- Moscou, M. J., Bogdanove, A.J., (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*. 326, 1501.
- O' Connor-Giles, M.K., Gratz, J.S., Cummings, M., Nguyen, N. J., Hamm, C. D., Donohue, K. L., Harrison, M. M., Wildonger, J. (2013). Genome Engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-Guided Cas9 Nuclease. *Genetics*, 194, 1029 – 1035.
- Pastor-Anglada, M., Cano-Soldado, P., Errasti-Murugarren, E., Casado, F. J. (2008). SLC28 genes and concentrative nucleoside transporter (CNT) proteins. *Xenobiotica*, 38, 972 – 994.
- Plessis, A., Perrin, A., Haber, J. E., Dujon B., (1992). Site-specific recombination determined by *I-SceI*, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. *Genetics*. 130, 451–460.
- Rong, Y. S., Golic, K. G. (2000). Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science*, 288, 2013 – 2018.

- Rose, J. B., Coe, I. R. (2008). Physiology of nucleoside transporters: back to the future. *Physiology*, 23, 41 – 48.
- Rubin, G. M., Spradling, A. C. (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, 218, 348 - 353.
- Rudin, N., Sugarman E., Haber, J. E. (1989). Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 519 – 534.
- Sajwan, S., Sidorov, R., Staskova, T., Zaloudikova, A., Takasu, Y., Kodrik, D., Zurovec, M. (2015) Targeted mutagenesis and functional analysis of adipokinetic hormone – encoding gene in *Drosophila*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. doi:10.1016/j.ibmb.2015.01.011.
- Schnorrer, F., Zhang, X., Koolhaas, W. H. (2014). A versatile two-step CRISPR- and RMCE-based strategy for efficient genome engineering in *Drosophila*. *G3-Genes-Genomes-Genetics*, 4, 2409 – 2418.
- Smith, J., Bibikova, M., Whitby, G. F., Reddy, R. A., Chandrasegaran, S., Carroll, D. (2000). Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acid Research*, 28, 3361 – 3369.
- Stoddard, B. L. (2011). Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. *Structure*. 19, 7–15.
- Szostak, J. W., Orr, W. T., Rothstein, R. J. and Stahl, F. W.(1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, 33, 25–35.
- Takasu Y., Sajwan S., Daimon T., Osanai-Futahashi M., Uchino K., Sezutsu H., Tamura T., Zurovec M. (2013). Efficient TALEN construction for *Bombyx mori* gene targeting. *PLoS ONE*. 8: e73458.
- Terns, M. P., Terns, R. M. (2011). CRISPR-based adaptive immune systems. *Current opinion of Microbiology*. 14, 321 – 327.

Urnov, F. D. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435, 646–651.

Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M.C., Zhang, H.S., Gregory, P. D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*. 11, 636–646.

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

Young, J. D., Yao, S.Y., Sun, L., Cass, C. E., Baldwin, S.A. (2008) Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins. *Xenobiotica*, 38, 995 – 1021.

Zhang, J., Visser, F., King, K. M., Baldwin, S. A., Young, J. D., Cass, C. E. (2007). The role of nucleoside transporters in cancer chemotherapy with nucleoside drugs. *Cancer Metastasis Review*, 26, 85 – 110.

**Internetové zdroje:**

<http://flybase.org/>

<http://www.addgene.org/>

<http://www.sacs.ucsf.edu/>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>


<http://web.expasy.org/translate/>

## 8 Přílohy

### 8.1 Sekvence genu *CNT 1* s vyznačenými sekvencemi nukleáz TALEN

TAAGGGGCTGTGGGATATAAGTCATAAGATCCACACAACACTTCTTTACTACTACACTGTT  
TCTCATTTTATACACACAATGCGCAGAACCAATAGAAGGCGAACAGGAGGAAAAGCCTCCGCCA  
TCGAGGGCAAAGCGAATCACCTATCTGGTACTCCATGTGCTGCTCCATATCATATTCATATC  
TTACTTTACGGCAGCCACAATCATTTTTATCTTTTACGgtaagttaccctttgagttcgaa  
tgtaaagtgtttatgaggaaaaaccagACAAGGATTCCAAAGAATGCTGGCCCAATAGGGGC  
TCGGAAGCCACAACCGAATCGATAGATAACTCAACCGAAGATGATGATGATGATGATTATGA  
CACAGAAGAACTTCTGAGAAGCCAGTGCCAGAGGTTAAGCCAAAACCTATTGTGCCAAATTA  
ACTGGTGTGATGGATACGGGTTTTCTCATCGTCTTGTTCATCTTGTTTTTATATCCTATGGCTG  
TACTACTGGGTATTTAAGCCATTCGTGGGCATCAAGCTGTATAATAACTACCTGGAACCAGT  
GATTGACAAATGGATTGCGTTTTAGTCGCCAGTGgtgagtacaagatcctttgagatgatctc  
ccttcagacttgaacagcagtaccataagtcaaaaaattgtagatgttcaGGACCTGTAAAG  
ATTATCCATTCGAATACAATATATATATATTTGGTTAAGAACTTTAGCTCCTGTCCACAATGT  
ATTTGaggctccaaaagattcttctaaaaagctaaatgctttaatccttattttccattttc  
tccaattctagGATAGTGTCCGGCGTAATGCTGGCGATTGTGCTCGCTGTGGTGGTGGCATA  
CCTCGGATTCGAGTGCCGCAATGACGCATACAAGGCCATCGGACTGCTCGGACCTGTGTGCT  
TTGTCCTTATCGGATTCGCCGTGTCCAAGCACCACCTTGCAAGTACCTTGGCGCATAGTGACC  
CACGGTCTCCTGGGACAGCTGCTGCTGGGCATACTCTGCCTGCGCCTCCCCTTTGGCCGGTC  
CATCTTTCAATGCCTTGGGGACAAGGTGACGATATTTCTGAACTACGCACAGCACGGAGCAC  
GCTTTGTGTACGGGGATCGCATTTGCGATGAGTACGTCTTTGCATTTGCCATACTGGCGGTG  
GTGTTCTTCTTCAGCGTGATCACCAGCATTATGTATTACCTTGGCTGGATGCAGTTCATCCT  
GAACGGTTTTTGGGTTCTTCTTGCAGGCCATGGTGGGCACCACCGTTTTGCGAAAGTGAAATG  
CAGCGGGCAACGTGTTTCTAAGCATGACCGAGAGCCCTCTGGTCATCCGGCCGTACATCGAA  
ATACTGACCGTCAGCGAGTTGCACGCTATATGCACCTCCGGCTACGCGACAGTGGCCGGTAC  
TGTCTTGGGGGCTTATGTGTCTTCCGGTGTTCGCCAGCTTTCTTATCGCAGCCAGCGTAA  
TGGCTGCTCCGGGTTCACTGGCTTTCCGCAAACTGTTCTACCCCGAGACCGAGGAATCTCTG  
ACCAGGTCCGACAACATTAAGCTGGAAAGCTCgtaagttcctcttcataagagtcaacattt  
gataatcgcccagacaccttgccaagGACGGATACGTCTATTTTGGATGCGGCCGCCTCGGG  
AGCTGCAGCAGCCTTGTGATTGTGCTCGGAATCGTCTCGAATATCATCGCCTTCTAGCCA  
TTGTGTTCTTCTAGACGCTGTAACGGAGTGGATTTTTCGAGCTAATTGGACTGCATAACATC  
ACCCTACTCTACATTCTCTCCCAGATCTTTATCCCGATTGTCTTTCGTGATGGGCGTGCCGTG  
GCACGATTGTCAAGCAATTGGCCTGGTGGTGGCCAAAAGTCGTTCATAAACGAGTTTGTGG  
CTTATAGAAACCTGGGCATATTGGTTAGCGATAAAAAGGTTGATgtgagtaccatctgcat  
attctattcttatagattattttaaaactagtattcttatagCCGCGGAGCGCTGCCATAGC  
CACTTTTGGCCCTTTGTGGGTTTGCCAATCCCGGATCCCTGGGCATTGTTCATCGCTTCGCTGA  
GTGCAATGGCACCATCCCGACGATCAGACATCACCAGGGTAGCCTTTTCGATCCTATTTTCGCA  
GGCAGTTTCGTTAGCTTTACATCCGCTTCGCTTGCAGgtaaactgtctttatttacacgtta  
tttttaaccgccttatcgcaacaacatcttaattagGGATTCTTATTCAAAATGAGTACACAG  
GTGGTAATTAATTGATTTAGGTAAGTGAGCGATACGAAAAGCATAGAGCAGGGAGCTAGGGT  
ACAATTCACACTCAAATTGGCCATTACCTTCTTGTAGCAATTCCCAGTCGGCAGCATCGAAATT  
CGCGGTGCACTGGGTCAGTTGAAGAGAAGCCTCATATATATTACGAAGGATTTCTTTAGGCG  
CCAATTCACCTCCGTGACGTTTTAGACTAGAGACCGGACATTTATGATCTCCATGGCGAATG  
TAGCTTGATTTACTGAGATCAAATGAACCGTCGACAACAGTTCCGGGTTTCGACATGCAATGC  
CTTAAACAATGGGTATATTGCATGGCGGGCACTAAATGCTCTTAGTTGGGCGTCATCGCTGA  
CTTTGCAGGAGTCGAGGAATTTCTCGCGATAACCAGTTTGTGCATCCAGCATTGAGGAGCAGT  
CCCCTAAGTATAAGTAATTTGGTGGATCCATTTCGCACGCGCTAGTAGTTTGAAGTAAACATT  
AGCAAAGCTAATGCTCTTGTCAATGCCTAAAAGTTTATTGGCCATTTCCGATGTCCGCTGAA  
ACCAATGGGAACAGTCGATTTGATCGTGGTGCACCAAAAGTTCCAGTAGAGCAACCTTTGGG  
TATAAAAAATCAAGgtatgtatatccattttataagtgtacttctacttgccttaccacttca

tagTACAACCTCAACTTTTGTGGGCGCTGAGGTGGAGATGAGTTCTAAGCGCTTCAATATCTT  
CATTCCCACGTGGCCATCTGATTTTGCAGACGACAGACAGGTGCCGGAAGTTTTGAATGCTTA  
TGACAGGAAGTTCCTGCTTTCCCAAGCAGTGGAAAGTACCTAAGGAATCGTTGTACATGCAAT  
TGGCTTGGATTTGTGGAAAACATGGCGTAAGAATTATTGCACCTTATGCCAGTGAGCCATAGC  
CTCTTTTATGGCATGATCTGTCCAGCATTGTGTTGGCCTCTTTTAGCCTAAAAACATAGAATA  
GTGAAATAAATTTTAAAATGTATGATTTATAATTACT

 TALEN

Obr. č. 19: Sekvence genu CNT1 s vyznačeným párem nukleáz TALEN

## 8.2 „Golden Gate“ protokol

Potřebné reagenty: sada 62 plazmidů  
10 × T4 – DNA ligáza  
10 × T4 – DNA ligáza - pufr  
restrikční enzym BsaI  
restrikční enzym Esp3I  
enzym „Plasmid – Safe“ nukleáza  
10 mM ATP  
chemicky kompetentní buňky  
LB médium  
LB Petriho misky  
Spectinomycin  
Ampicilin  
Sada na izolaci plazmidové DNA

Oligonukleotidy: pCR8\_F1(TTGATGCCTGGCAGTTCCT)  
pCR8\_R1 (CGAACCGAACAGGCTTATGT)  
TAL\_F1: (TTGGCGTCGGCAAACAGTGG)  
TAL\_R2: (GGCGACGAGGTGGTCGTTGG)

### Den 1

1) Navrhnout pár programovaných nukleáz TALEN (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/>)

V případě že navrhovaný TALEN má 12 – 21 RVD

- A. použijte plazmidy pro RVD (1 – 10) a pFUS\_A vektor
- B. Použijte příslušný pFUS\_B (pFU\_B1 – pFUS\_B10) vektor, podle pravidla N – 11, kdy N je počet RVD navrženého TALENu
- C. Použijte plazmidy kódující 11 a další (1 – 10) RVD + příslušný pFUS\_B vektor

V případě že navrhovaný TALEN má 22 – 31 RVD

- A. použijte plazmidy pro RVD (1 – 10) a pFUS\_A30A vektor, dále použijte plazmidy pro RVD (11 – 20) a pFUS\_A30B
- B. Použijte plazmidy (21 – N-1) a příslušný pFUS\_B vektor

2) Připravit „Golde Gate“ reakci #1

- Plazmidy pro RVD (1 - 10) + pFUS\_A vektor
  - Plazmidy pro RVD (11 – N – 1)
- nebo
- Plazmidy pro RVD (1 – 10) + pFUS\_A30A
  - Plazmidy pro RVD (11 – 20) + pFUS\_30B
  - Plazmidy pro RVD (21 – N-1) + příslušný pFUS\_B

150 ng každého modulového vektoru + 150 ng příslušných pFUS vektorů  
 1  $\mu$ l *Bsa*I  
 1  $\mu$ l T4 – DNA ligáza  
 2  $\mu$ l T4 – DNA ligáza – pufr  
 doplnit „nuclease – free“ H<sub>2</sub>O na výsledný reakční objem 20  $\mu$ l

} smíchat

- 3) Na thermocycleru nastavit program:
- |                 |        |
|-----------------|--------|
| 37 °C → 5 min.  | } 10 × |
| 16 °C → 10 min. |        |
| 50 °C → 5 min.  |        |
| 80 °C → 5 min.  |        |

- 4) „Plasmid – Safe nuclease treatment“ – odstraní všechny nezaligované lineární dsDNA fragmenty, včetně nekompletních produktů ligace

1  $\mu$ l 10 mM ATP  
 1  $\mu$ l „Plasmid – Safe“ nukleázy<sup>1</sup>

} smíchat

Inkubovat v 37 °C po dobu 1 hodiny

<sup>1</sup> „Plasmid – Safe“ nukleázu je možno inaktivovat v 70 °C po dobu 30 minut. V tomto případě to není nutné

- 5) Transformace do chemicky kompetentních buněk ( použít 5 $\mu$ l „Golde – Gate“reakce) + pěstování chemicky kompetentních buněk na LB Petriho miskách se spectinomycinem (50  $\mu$ l/ml)

### Den 2

- 6) Kontrolní PCR, kde jako vstupní materiál slouží DNA z příslušných bakteriálních kolonií. Jako primery se používá tento pár specifických oligonukleotidů pCR8\_F1 a pCR8\_R1. Doporučená teplota nasedání primerů je 55 °C. Doporučený počet cyklů je 30 – 35.

Následuje vizualizace PCR produktů pomocí gelové elektroforézy. Za pozitivní výsledek je považován produkt o přibližné velikosti 1,2 kb na vektor obsahující 10 modulů.

- 7) Inokulovat pozitivní kolonii v LB médiu v 37 °C přes noc

### Den 3

- 8) Izolace plazmidů (miniprep): pFUS\_A with first 10 repeats cloned (**A**)  
pFUS\_B with 11-(N-1) repeats cloned (**B**)

nebo

pFUS\_A30A s 10 moduly (**A1**)

pFUS\_A30B s dalšími 10 moduly (**A2**)

pFUS\_B s 21-(N-1) moduly (21 – N-1) (**B**)

- 9) Volitelný krok: restrikční analýza: Pomocí restrikčních enzymů *AflII* a *XbaI*, je možné vyštěpit z vektorových plazmidů moduly. Velikost vyštěpeného fragmentu závisí na počtu vložených modulů. Pro pFUS\_A s jeho deseti moduly je velikost vyštěpené fragmentu 1048 bp.

- 10) Připravit „Golde Gate“ reakci #2

- 150 ng každého vektoru **A** a **B** (nebo **A1**, **A2** a **B**)
- 150 ng příslušného pLR vektoru (kóduje poslední RVD)
- 75 ng koncového vektoru pBlue-TAL
- 1  $\mu$ l *Esp3I*
- 1  $\mu$ l T4 – DNA ligáza

- 2  $\mu$  T4 – DNA ligáza – pufr
- doplnit „nuclease – free“ H<sub>2</sub>O na výsledný reakční objem 20  $\mu$ l

11) Na thermocycleru nastavit program:

37 °C → 5 min.	}	10 ×
16 °C → 10 min.		
37 °C → 15 min.		
80 °C → 5 min.		

12) Transformace do chemicky kompetentních buněk + pěstování chemicky kompetentních buněk na LB Petriho miskách s ampicilinem (50  $\mu$ l/ml)

#### Den 4

13) Kontrolní PCR, kde jako vstupní materiál slouží DNA z příslušných bakteriálních kolonií. Jako primery se používá tento pár specifických oligonukleotidů TAL\_F1 a TAL\_R2.

Doporučená teplota nasedání primerů je 55 °C. Doporučený počet cyklů je 30 – 35.

Následuje vizualizace PCR produktů pomocí gelové elektroforézy. Za pozitivní výsledek je považován produkt o přibližné velikosti ~1 - 2 kb.

14) Inokulovat pozitivní kolonii v LB médiu v 37 °C přes noc

#### Den 5

15) Izolace plazmidové DNA z chemicky kompetentních buněk (miniprep)

16) Sekvence podle primerů TAL\_F1 a TAL\_R2



### 8.3 Aminokyselinové sekvence páru nukleáz TALEN, získaných překladem sekvenačních dat programem ExPASy

5' → 3'

L F Q T D P D Q V V A I A S **H D** G G K Q A L E T V Q R **pHD 1**  
 L L P V L C Q D H G L T P D Q V V A I A S **H D** G G K Q **pHD 2**  
 A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P D Q V V A I A  
 S **N N** G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P **pNN 3**  
 D Q V V A I A S **H D** G G K Q A L E T V Q R L L P V L C **pHD 4**  
 Q D H G L T P D Q V V A I A S **H D** G G K Q A L E T V Q **pHD 5**  
 R L L P V L C Q D H G L T P D Q V V A I A S **N I** G G K **pNI 6**  
 Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P D Q V V A I  
 A S **N G** G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T **pNG 7**  
 P D Q V V A I A S **H D** G G K Q A L E T V Q R L L P V L **pHD 8**  
 C Q D H G L T P D Q V V A I A S **N N** G G K Q A L E T V **pNN 9**  
 Q R L L P V L C Q D H G P D P G P S G G Y R Q Q H W R  
 Q A S A R N G A A A V A R C C A R T M G L T P G P S G  
 G Y R S **N N** W R S S A S K T M Q R L C S A V P G P C **pNN 11**  
 Stop T R N Q V V D

Obr. č. 20: TALEN 1 – aminokyselinová sekvence, vytvořená na základě sekvenačních dat podle přímého směru primeru

5' → 3'

L V C R V T V P R I I D L T P G P K C C Y R Q P R W R  
K Q R S K R C S G C A R C C A R T M A Stop P R T K V V  
A I A S **N N** G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G **pNN 9**  
L T P D Q V V A I A S **N I** G G K Q A L E T V Q R L L P **pNI 10**  
V L C Q D H G L T P D Q V V A I A S **N N** G G K Q A L E **pNN 11**  
T V Q R L L P V L C Q D H G L T P D Q V V A I A S **N N** **pNN 12**  
G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P D Q V  
V A I A S **N N** G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H **pNN 13**  
G L T P D Q V V A I A S **H D** G G K Q A L E T V Q R L L **pHD 14**  
P V L C Q D H G L T P D Q V V A I A S **N I** G G K Q A L **pNI 15**  
E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P D Q V V A I A S **N**  
**I** G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P D Q **pNI 16**  
V V A I A S **N I** G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D **pNI 17**  
H G L T P D Q V V A I A S **N N** G G K Q A L E S I V P S **pNN 18**  
Stop L V L Y D A F R

Obr. č. 21: TALEN 1 – TALEN 1 – aminokyselinová sekvence, vytvořená na základě sekvenačních dat podle protisměrného primeru

5' → 3'

V S D Stop P G P V V A I A S **N N** G G K Q A L E T V Q R **pNN 1**  
L L P V L C Q D H G L T P D Q V V A I A S **N N** G G K Q A **pNN 2**  
L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P D Q V V A I A S **N** **pNI 3**  
**I** G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P D Q V  
V A I A S **N N** G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G **pNN 4**  
L T P D Q V V A I A S **H D** G G K Q A L E T V Q R L L P V **pHD 5**  
L C Q D H G L T P D Q V V A I A S **N I** G G K Q A L E T V **pNI 6**  
Q R L L P V L C Q D H G L T P D Q V V A I A S **N N** G G K **pNN 7**  
Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P D Q V V A I A  
S **H D** G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P D **pHD 8**  
Q V V A I A S **N I** G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D **pNI 9**  
H G L T P D Q V V A I A S **H D** G G K Q A L E T V Q R L L **pHD 10**  
P G A V P G P W S Stop P R D Q V V G Y R Q H M G A A A L  
E R A A P V G R A C A D M D

Obr. č. 22: TALEN 2 – aminokyselinová sekvence, vytvořená na základě sekvenčních dat podle přímého směru primeru

5' → 3'




L L L D S A C P G S M A E P E Q L L L S A S H H A A S  
Q R S N V Q R C G R A V P R T M A Stop L R T Q V V A I  
A S **H D** G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T **pHD 10**  
P D Q V V A I A S **N I** G G K Q A L E T V Q R L L P V L **pNI 11**  
C Q D H G L T P D Q V V A I A S **N G** G G K Q A L E T V **pNG 12**  
Q R L L P V L C Q D H G L T P D Q V V A I A S **N N** G G **pNN 13**  
K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P D Q V V A  
I A S **N N** G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L **pNN 14**  
T P D Q V V A I A S **N I** G G K Q A L E T V Q R L L P V **pNI 15**  
L C Q D H G L T P D Q V V A I A S **N N** G G K Q A L E T **pNN 16**  
V Q R L L P V L C Q D H G L T P D Q V V A I A S **N G** G **pNG 17**  
G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P D Q V V  
A I A S **N I** G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G **pNN 18**  
L T P D Q V V A I A S **H D** G G K Q A L E S I V A Q L A **pHD 19**  
V V Y Y A L S

Obr. č. 23: TALEN 2 – aminokyselinová sekvence, vytvořená na základě sekvenačních dat podle protisměrného primeru

#### 8.4 Sekvence genu CNT 1 s vyznačenými sekvencemi nukleáz CRISPR, včetně sekvencí primerů, použitých při zjišťování přítomnosti delece

TAAGGGGCTGTGGGATATAAGTCA**TAAGATCCACACAACACTTC**TTTACACTACACACTGTT  
TCTCATTTTATACACACAATGGCAGAACCAATAGAAGGCGAACAGGAGGAAAAGCCTCCGCCA  
TCGAG**GGCAAAGCGAATCACCTATCTGG**TACTCCATGTGCTGCTCCATATCATATTCATATC  
TTACTTTACGGCAGCCACAATCATTTCATCTTTTACGgtaagttaccctttgagttcgaa  
tgtaaattgtttatgaggaaaaaccagACAAGGATTCCAAAGAATGCTGGCCCAATAGGGGC  
TCGGAAGCCACAACCGAATCGATAGATAACTCAACCGAAGATGATGATGATGATGATTATGA  
CACAGAAGAACTTCTGAGAAGCCAGTGCCAGAGGTTAAGCCAAAACCTATTGTGCCAAATTA  
ACTGGTGTGATGGATACGGGTTTCTCATCGTCTTGTTCATCTTGTTTTATATCCTATGGCTG  
TACTACTGGGTATTTAAGCCATTCGTGGGCATCAAGCTGTATAATAACTACCTGGAACCAGT  
GATTGACAAATGGATTGCGTTTAGTCGCCAGTGgtgagtacaagatcctttgagatgatctc  
ccttcagacttgaacagcagtaccataagtcaaaaaattgtagatggtcaggacctgtaaag  
attatccattcgaatacaatatatatattgggtaagaacttttagctcctgtccacaatgt  
atgtgaggtccaaaagattcttctaaaaagctaaatgctttaatccttattttccattttc  
tccaattctagGATAGTGTCCGGCGTAATGTGGCGATTGTGCTCGCTGTGGTGGTGGCATA  
CCTCGGATTTCGA**GTGCCGCAATGACGCATACAAGG**CCATCGGACTGCTCGGACCTGTGTGCT  
TTGTCTTATCGGATTCGCCGTGTCCAAGCACCACCTTGCAAGTACCTTGGCGCATAGTGACC  
CACGGTCTCCTGGGACAGCTGCTGCTGGGCATACTCTGCCTGCGCCTCCCCTTTGGCCGGTC  
CATCTTTCAATGCCTTGGGGACAAGGTGACGATATTTCTGAACCTACGCACAGCACGGAGCAC  
GCTTTGTGTACGGGGATCGCATTTGCGATGAGTACGTCTTTGCATTTGCCATACTGGCGGTG  
GTGTTCTTCTCAGCGTGATCACCA**GCATTATGTATTACCTTGGCTGG**ATGCAGTTCATCCT  
GAACGGTTTTGGGTTCTCTTGCAGGCCATGGTGGGCACCACCGTTTTGCGAAAGTGTAATG  
CAGCGGGCAACGTGTTTCTAAGCATGACCGAGAGCCCTCTGGTCATCCGGCCGTACATCGAA  
ATACTGACCGTCAGCGAGTTGCACGCCTATATGCACCTCCGGCTACGCGACAGTGGCCGGTAC  
TGTC**TTGGGGCTTATGTGTCCTT**CGGTGCTTCCGCCAGCTTTCTTATCGCAGCCAGCGTAA  
TGGCTGCTCCGGGTTCACTGGCTTTCCGCAAACTGTTCTACCCCGAGACCGAGGAATCTCTG  
ACCAGGTCCGACAACATTAAGCTGGAAAGCTCgtaagttcctcttcataagagtcaacattt  
gataatcgcccagacaccttgccaagGACGGATACGTCTATTTTGGATGCGGCGCCTCGGG  
AGCTGCAGCAGCCTTGTGATTGTGCTCGGAATCGTCTCGAATATCATCGCCTCCTAGCCA  
TTGTGTTCTTCTAGACGCTGTAACGGAGTGGATTTTCGAGCTAATTGGACTGCATAACATC  
ACCCTACTCTACATTCTCTCCCAGATCTTTATCCCATTGTCTTCGTGATGGGCGTGCCGTG  
GCACGATTGTCAAGCAATTGGCCTGGTGGTGGCCAAAAGTCGTTCATAAACGAGTTTGTGG  
CTTATAGAAACCTGGGCATATTGGTTAGCGATAAAAAGGTTGATgtgagtaccatctgcat  
attctattcttatagattatthtaaaactagtattcttatagCCGCGGAGCGCTGCCATAGC  
CACTTTTGCCCTTTGTGGGTTTGCCAATCCCGGATCCCTGGGCATTGTCATCGCTTCGCTGA  
GTGCAATGGCACCATCCCGACGATCAGACATCACCAGGGTAGCCTTTTCGATCCTATTTCGCA  
GGCAGTTTCGTTAGCTTTACATCCGCTTCGCTTGACGgtaaaactgtctttatttacacgтта  
ttthtaaccgccttatcgcacacaatcttaattagGGATTCTTATTCAAAATGAGTACACAG  
GTGGTAATTAATTGATTTAGGTAAGTGAGCGATACGAAAAGCATAGAGCAGGGAGCTAGGGT  
ACAATCCACTCAAATTTGGCCATTACCTTCTTGAGCAATTCAGTCGGCAGCATCGAAATT  
CGCGGTGCACTGGGTCAGTTGAAGAGAAGCCTCATATATATTACGAAGGATTTCTTTAGGCG  
CCAATTCACTCCGTGACGTTTTAGACTAGAGACCGGACATTTATGATCTCCATGGCGAATG  
TAGCTTGATTTACTGAGATCAAATGAACCGTCGACAACAGTTCCGGGTTTCGACATGCAATGC  
CTTAAACAATGGGTATATTGCATGGCGGGCACTAAATGCTCTTAGTTGGGCGTCATCGCTGA  
CTTTGCAGGAGTCGAGGAATTTCTCGCGATACCAGTTTGTGCATCCAGCATTGGAGGCAGT  
CCCCTAAGTATAAGTAATTTGGTGGATCCATTCGCACGCGCTAGTAGTTTGAAGTAAACATT  
AGCAAAGCTAATGCTCTTGTCAATGCCTAAAAGTTTATTGGCCATTTCCGATGTCCGCTGAA  
ACCAATGGGAACAGTCGATTTGATCGTGGTGCACCAAAAAGTTCCAGTAGAGCAACCTTTGGG

TATAAAAAATCAAGgtatgtatatccattttataagtgtacttctacttgcttaccacttca  
tagTACAACCTCAACTTTTGTGGGCGCTGAGGTGGAGATGAGTTCTAAGCGCTTCAATATCTT  
CATTCCCACGTGGCCATCTGATTTTGCACGACAGACAGGTGCCGGAAGTTTTGAATGCTTA  
TGACAGGAAGTTCCTGCTTCCCAAGCAGTGGAAAGTACCTAAGGAATCGTTGTACATGCAAT  
TGGCTTGGATTTGTGGAAAACATGGCGTAAGAATTATTGCACTTATGCCAGTGAGCCATAGC  
CTCTTTTATGGCATGATCTGTCCAGCATTGTGGCCTCTTTTAGCCTAAAAACATAGAATA  
GTGAAATAAATTTTAAAATGTATGATTTATAATTACT

-  CRISPR (1 – 3)
-  PAM sekvence
-  Primer (přímoseměrný/protiseměrný)

Obr. č. 24: Sekvence genu *CNT1* s vyznačenými nukleázami CRISPR a sekvencemi primerů, použitých při PCR a sekvenaci

## 8.5 Výsledná podoba genu *CNT1* s delecí

TAAGGGGCTGTGGGATATAAGTCATAAGATCCACACAACACTTCTTTACTACTACACACTGTT  
TCTCATTTTATACACACAATGCAGAACCAATAGAAGGCGAACAGGAGGAAAAGCCTCCGCCA  
TCGAGGGCAAAGCGAATCACCTATCTGGTACTCCATGTGCTGCCATATCATATTCATATC  
TTACTTTACGGCAGCCACAATCATTTCATCTTTTACGgtaagttaccctttgagttcgaa  
tgtaaagtgtttatgaggaaaaaccagACAAGGATTCCAAAGAATGCTGGCCCAATAGGGGC  
TCGGAAGCCACAACCGAATCGATAGATAACTCAACCGAAGATGATGATGATGATTATGA  
CACAGAAGAACTTCTGAGAAGCCAGTGCCAGAGGTTAAGCCAAAACCTATTGTGCCAAATTA  
ACTGGTGTCATGGATACGGGTTTCTCATCGTCTTGTTTCATCTTGTTTTATATCCTATGGCTG  
TACTACTGGGTATTTAAGCCATTCGTGGGCATCAAGCTGTATAAACTACCTGGAACCAGT  
GATTGACAAATGGATTGCGTTTAGTCGCCAGTGgtgagtacaagatcctttgagatgatctc  
ccttcagacttgaacagcagtaccataagtcaaaaattgtagatgttcaggacctgtaaag  
attatccattcgaatacaatatatatattggtaagaactttagctcctgtccacaatgt  
atgtgaggctccaaaagattcttctaaaaagctaaatgctttaatccttattttccattttc  
tccaattctagATAGTGTCCGGCGTAATGCTGGCGATTGTGCTCGCTGTGGTGGTGGCATA  
CCTCGGATTTCGAGTGCCCGCAATGACGCATACAAGGCCATCGGACTGCTCGGACCTGTGTGCT  
TTGTCTTATCGGATTCGCCGTGTCCAAGCACCCTTGCAAGTACCTTGCGGCATAGTGACC  
CACGGTCTCCTGGGACAGCTGCTGCTGGGCATACTCTGCCTGCGCCTCCCCTTTGGCCGGTC  
CATCTTTCAATGCCTTGGGGACAAGGTGACGATATTTCTGAACTACGCACAGCACGGAGCAC  
GCTTTGTGTACGGGGATCGCATTTGCGATGAGTACGTCTTTGCATTTGCCATACTGGCGGTG  
GTGTTCTTCTTCAGCGTGATCACCAAGCATTATGTATTACCTTGGCTGGATGCAGTTCATCCT  
GAACGGTTTTGGGTTCTCTTGCAGGCCATGGTGGGCACCACCGTTTTGCGAAAGTGTAATG  
CAGCGGGCAACGTGTTTCTAAGCATGACCGAGAGCCCTCTGGTCATCCGGCCGTACATCGAA  
ATACTGACCGTCAGCGAGTTGCACGCTATATGCACCTCCGGCTACGCGACAGTGGCCGGTAC  
TGTCTTGGGGGCTTATGTGTCCTTCGGTGTCTCCGCCAGCTTTCTTATCGCAGCCAGCGTAA  
TGGCTGCTCCGGGTTCACTGGCTTTCCGCAAACTGTTCTACCCCGAGACCGAGGAATCTCTG  
ACCAGGTCCGACAACATTAAGCTGGAAAGCTCGTAAGTTCCTCTTCATAAGAGTCAACATTT  
GATAATCGCCAGACACCTTGCCAAGGACGGATACGTCTATTTTGGATGCGGCCGCCTCGGG  
AGCTGCAGCAGCCTTGTGATTGTGCTCGGAATCGTCTCGAATATCATCGCCTTCTAGCCA  
TTGTGTTCTTCTTAGACGCTGTAACGGAGTGGATTTTTCGAGCTAATTGGACTGCATAACATC  
ACCTACTCTACATTCTCTCCAGATCTTTATCCCGATTGTCTTCGTGATGGGCGTGCCGTG

GCACGATTGTCAAGCAATTGGCCTGGTGGTGGCCAAAAGTCGTTTCATAAACGAGTTTGTGG  
CTTATAGAAACCTGGGCATATTGGTTAGCGATAAAAAGGTTGATgtgagtacccatctgcat  
attctattcttatagattatthtaaaactagtattcttatagCCGCGGAGCGCTGCCATAGC  
CACTTTTGCCCTTTGTGGGTTTGCCAATCCCGGATCCCTGGGCATTGTCATCGCTTCGCTGA  
GTGCAATGGCACCATCCCGACGATCAGACATCACCAGGGTAGCCTTTCGATCCTATTTGCA  
GGCAGTTTCGTTAGCTTTACATCCGCTTCGCTTGCAAGgtaaactgtctttatthtacagtta  
thtttaaccgccttatcgcacacacatcttaattagGGATTCTTATTCAAATGAGTACACAG  
GTGGTAATTAATTGATTTAGGTAAGTGAGCGATACGAAAAGCATAGAGCAGGGAGCTAGGGT  
ACAATTCCTACTCAAATGGCCATTACCTTCTTGAGCAATCCCAGTCGGCAGCATCGAAATT  
CGCGGTGCACTGGGTCAGTTGAAGAGAAGCCTCATATATATTACGAAGGATTTCTTTAGGCG  
CCAATTCCTCCGTCGACGTTTTAGACTAGAGACCGGACATTTATGATCTCCATGGCGAATG  
TAGCTTGATTTACTGAGATCAAATGAACCGTCGACAACAGTTCCGGGTTTCGACATGCAATGC  
CTTAAACAATGGGTATATTGCATGGCGGGCACTAAATGCTCTTAGTTGGGCGTCATCGCTGA  
CTTTGCAGGAGTCGAGGAATTTCTCGCGATACCAGTTTGTGCATCCAGCATTTGGAGGCAGT  
CCCCTAAGTATAAGTAATTTGGTGGATCCATTTCGCACGCGCTAGTAGTTTGAAGTAAACATT  
AGCAAAGCTAATGCTCTTGTCAATGCCTAAAAGTTTATTGGCCATTTCCGATGTCCGCTGAA  
ACCAATGGGAACAGTCGATTTGATCGTGGTGCACCAAAGTTCCAGTAGAGCAACCTTTGGG  
TATAAAAAATCAAGgtatgtatatccatthtataagtgtacttctacttgcttaccacttca  
tagTACAACCTCAACTTTTGTGGGCGCTGAGGTGGAGATGAGTTCTAAGCGCTTCAATATCTT  
CATTCCCACGTGGCCATCTGATTTTTCGACGACAGACAGGTGCCGGAAGTTTTGAATGCTTA  
TGACAGGAAGTTCCTGCTTTCCCAAGCAGTGGAAGTACCTAAGGAATCGTTGTACATGCAAT  
TGGCTTGGATTTGTGGAAAACATGGCGTAAGAATTATTGCACCTTATGCCAGTGAGCCATAGC  
CTCTTTTATGGCATGATCTGTCCAGCATTTGTTGGCCTCTTTTAGCCTAAAACATAGAATA  
GTGAAATAAATTTTAAAATGTATGATTTATAATTACT

Obr. č. 25: Výsledná podoba genu CNT1 s vyznačenou deleci

## 9 Seznam zkratek

<b>HDR</b>	„Homology directed repair“ - oprava homologní rekombinací
<b>DSB</b>	„Double strain break“- dvouřetězcový zlom
<b>NHEJ</b>	„Non homologous end joining“ – nehomologní spojení konců
<b>PCR</b>	„Polymerase chain reaction“ – polymeázová řetězcová reakce
<b>mRNA</b>	messenger RNA
<b>TALEN</b>	„Transcription activator – like effectors nucleases“
<b>RVD</b>	„Repeat – variable di – residue“
<b>CRISPR</b>	„Clustered regularly interspaced short palindromic repeats“
<b>ZFNs</b>	„Zinc Finger nuclease“