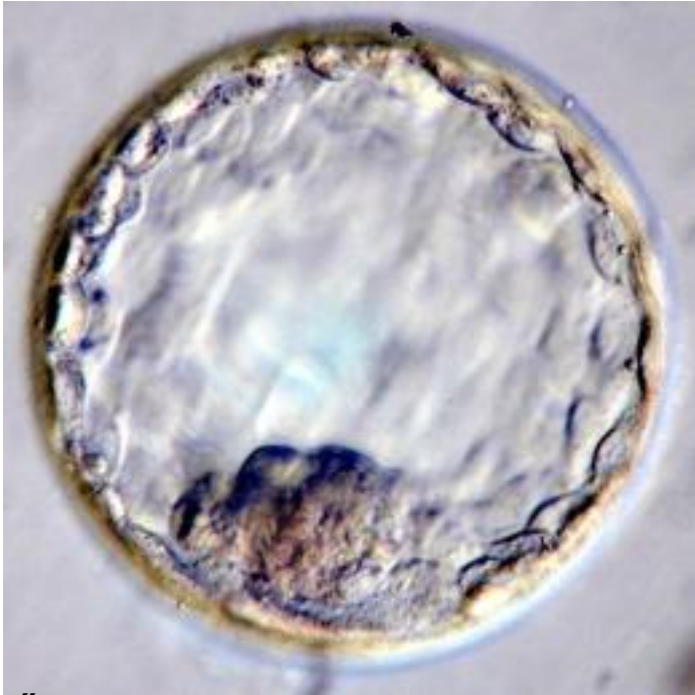


Genom editálás: Zn-finger nukleázok, Talen, CRISPR-Cas9 rendszerek



Hiripi László
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

Miért van szükség új technológiákra? A célzott transzgenézis nagyon fontos. (knock-out, knock-in, allélcseré)



Őssejtes transzgenézis

**Csak egérben működik
(patkány, ember)
Bonyolult
Drága
Gyenge hatékonyság**



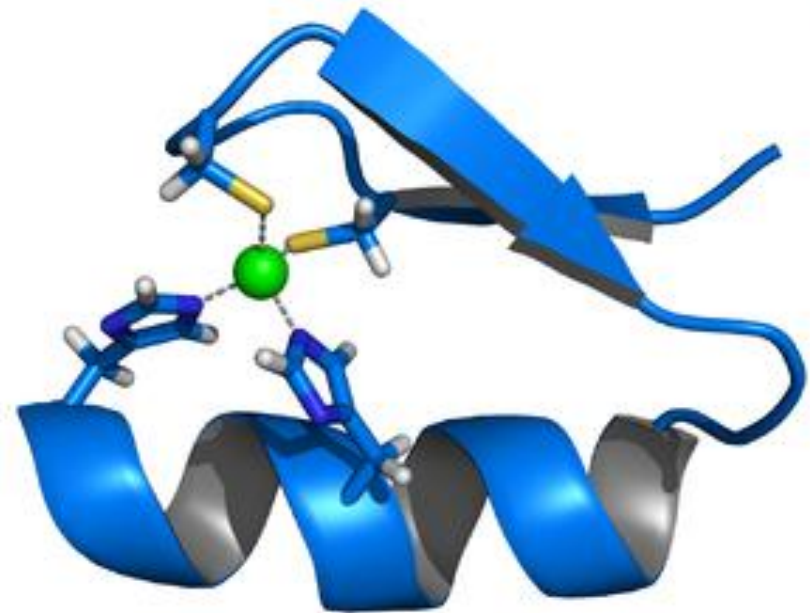
Klónozás

**Sok fajban működik
Bonyolult
Drága
Bizonyos szempontból gyenge hatékonyság
Rengeteg mellékhatás**

A nukleáz technológia a megoldás. Első képviselői a cink finger nukleázok.

A cink finger fehérjék kis strukturális fehérjemotívumok, a stabil szerkezetéhez cink ion(ok) kellene

Szerepük DNS,RNS, fehérjekötésben- interakciós félként



**Cink finger
fehérjedomén**

A rendszer másik fele a FokI restriktációs enzimről származik



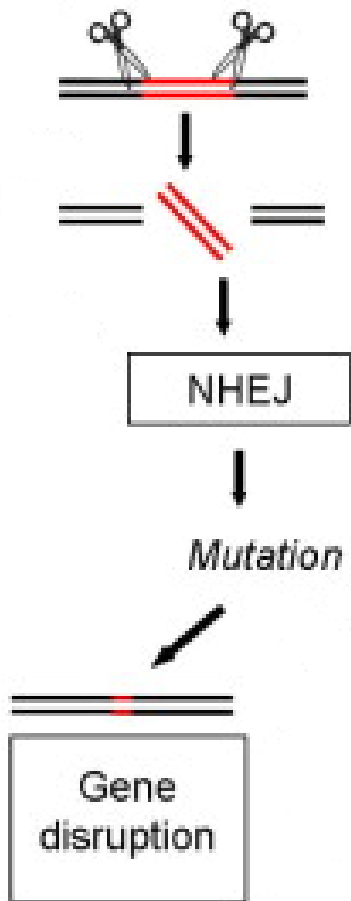
- DNS felismerő domén
- Nem specifikus hasító domén

Cink finger nukleázok



- Mesterséges fehérjerendszer, DNS specifikus hasítására. DNS kötő cink finger domének összekötése FOKI restrikciós doménnel
- Egér Zif268 transzkripciós faktorból származik a legtöbb cink finger domén
- Egy cink finger 3 bázist ismer fel
- Az összes lehetőséghez min 64 féle cink finger kell
 - Dimerként működik
 - Nagyon specifikussá tehető

Hogyan működik? Duplaszálú DNS törés-repair



| Allele | Sequence |
|-----------------------------|--|
| | TTCCTGCCCAGCTCCATTTTCCTTCTCCTGGAACTACCAGAACAACACTGAA |
| w.t., $\Delta 6$ | TTCCTGCCCAGCTCCATTTTCCTT:::GAACTACCAGAACAACACTGAA |
| w.t., $\Delta 1$ | TTCCTGCCCAGCTCCATTTTCCTTCTC:TGGAACTACCAGAACAACACTGAA |
| w.t., $\Delta 90$ | TTCCTGCCCAGCTCCATTTTCCT:::GAACTACCAGAACAACACTGAA |
| w.t., $\Delta 2$ | TTCCTGCCCAGCTCCATTTTCCTTCT::CTGGAACTACCAGAACAACACTGAA |
| w.t., $\Delta 1$ | TTCCTGCCCAGCTCCATTTTCCTTCT:CTGGAACTACCAGAACAACACTGAA |
| w.t., $\Delta 12, \Delta 4$ | TTCCTGCCCAGCTCCATTTTCCT:::ACCAGAACAACACTGAA TTCCTGCCCAGCTCCATTTTCCT:::CTGGAACTACCAGAACAACACTGAA |
| w.t., $\Delta 12$ | TTCCTGCCCAGCTCCATTTTCCT:::ACCAGAACAACACTGAA |

Frameshift mutáció, korai STOP így nincs megfelelő fehérje

A repairt követő lehetséges mutációk

- 1. Kicsi deléció 1-20 bp heterozigóta**
- 2. Nagyobb deléció 20 bp- heterozigóta**
- 3. Kisebb inszerció heterozigóta**
- 4. 1-3 bármilyen kombinációja heterozigóta**
- 5. Mozaikos események**
- 6. Homozigóta események (ugyanolyan és eltérő események is!)**

Felhasználási terület: Génkiütés

| Organism/Cells | Gene name | Reference |
|---------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| Human T cells | <i>CCR5</i> | Perez et al. (2008) ⁵ |
| CHO cells | <i>DHFR</i> | Santiago et al. (2008) ³ |
| Various human cells | <i>IL-2Rγ</i> | Lombardo et al. (2007) ⁴ |
| | | Moehle et al. (2007) ¹⁰ |
| HEK293 cells | <i>VEGF-A</i> | Maeder et al. (2008) ⁶ |
| HEK293 cells | <i>HoxB13</i> | Maeder et al. (2008) ⁶ |
| HEK293 cells | <i>CFTR</i> | Maeder et al. (2008) ⁶ |

**Korai génkiütések
sejtekben**

DNS vagy RNS formában vihető be.

Sejtekbe egyszerűbb a DNS, embriókba célszerűbb az RNS forma

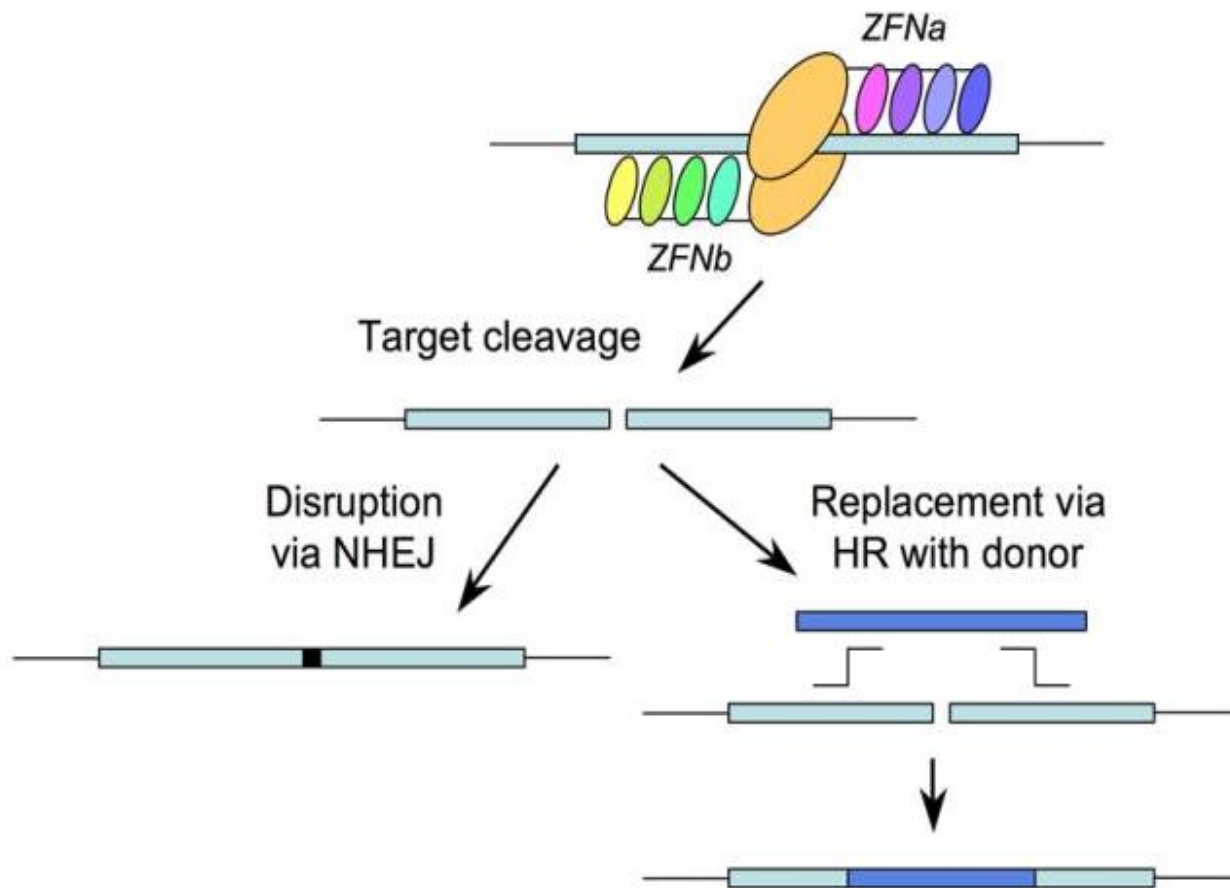
**A legtöbb sejtben működik. Ha nem akkor kombinálható
adenovírus, vagy lentivírus rendszerekkel.**

Génkiütés: Állatok



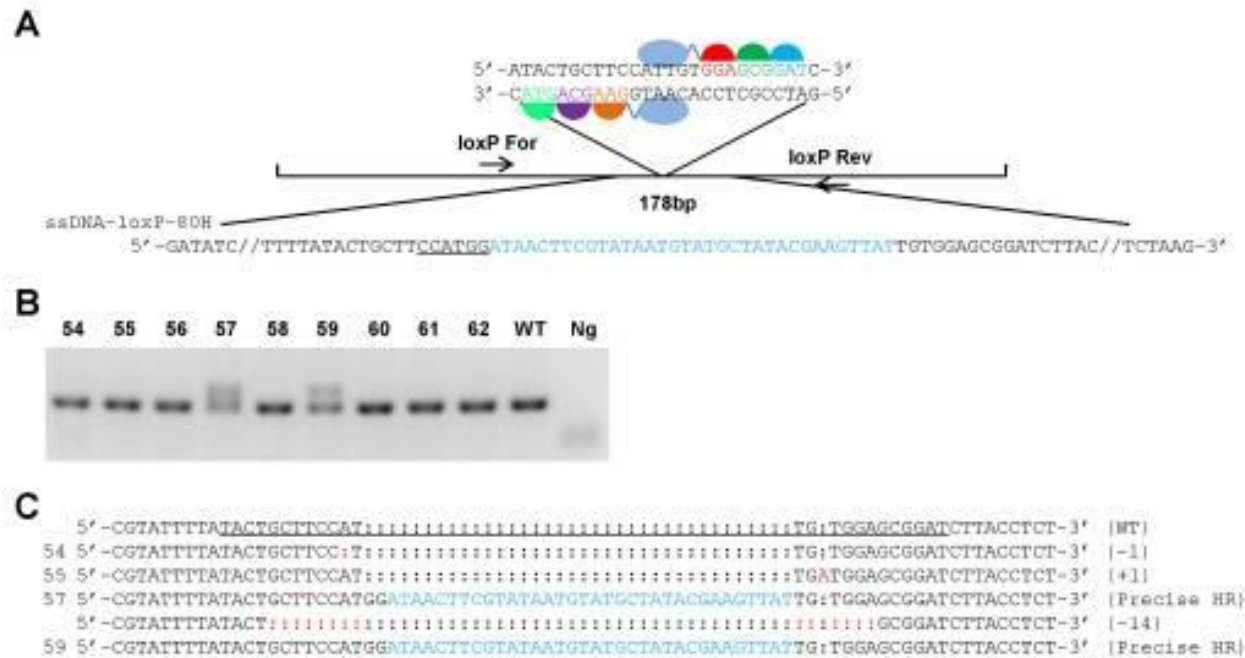
**Arabidopsis, dohány, szója, kukorica, drosophila, C.elegans, ten
geri
sün, selyemhernyó, zebradánió, Xenopus, egér, patkány, nyúl, se
rtés, szarvasmarha, ahol eddig kipróbálták, működött**

Génbeütés, illetve géncsere



**Ebben az esetben a homológ rekombináció működik (HR)
Plazmid donorral működik, de megy oligonukleotid donorral is**

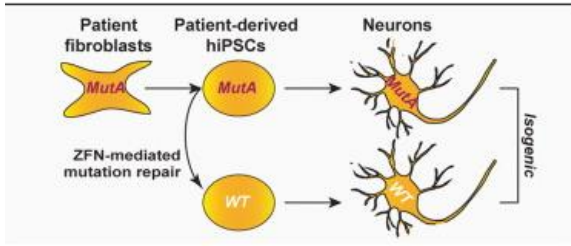
Célzott mutációval transzgénikus egér, mely lox-P helyeket hordoz



Másik példa: szarvasmarha génbeütés (lysostaphin)
casein lokuszra

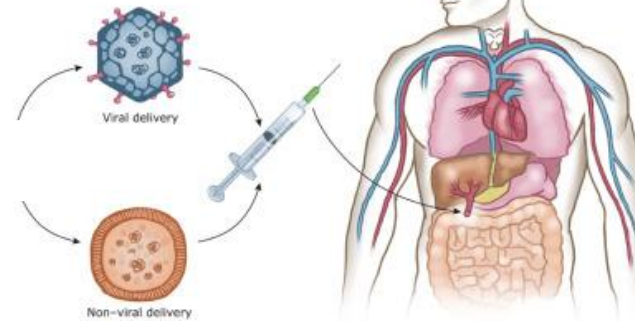


Példa knock-in használatra emberi sejtekben

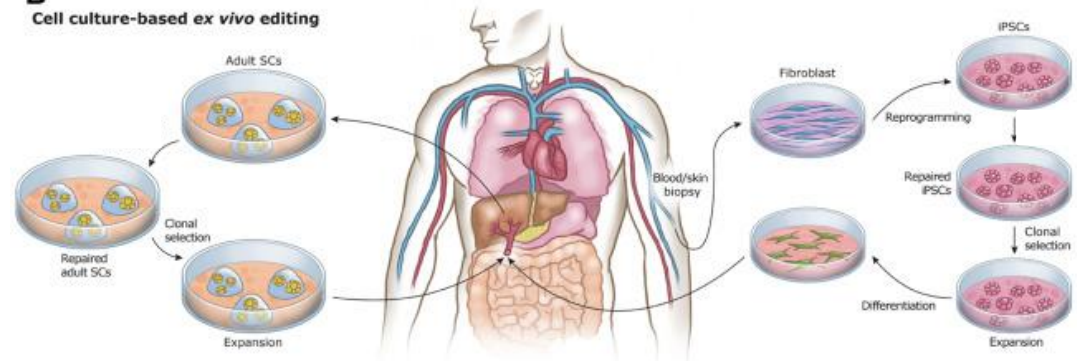


Parkinson kórban szerepet játszó két mutáció

A Direct delivery-based *in vivo* editing

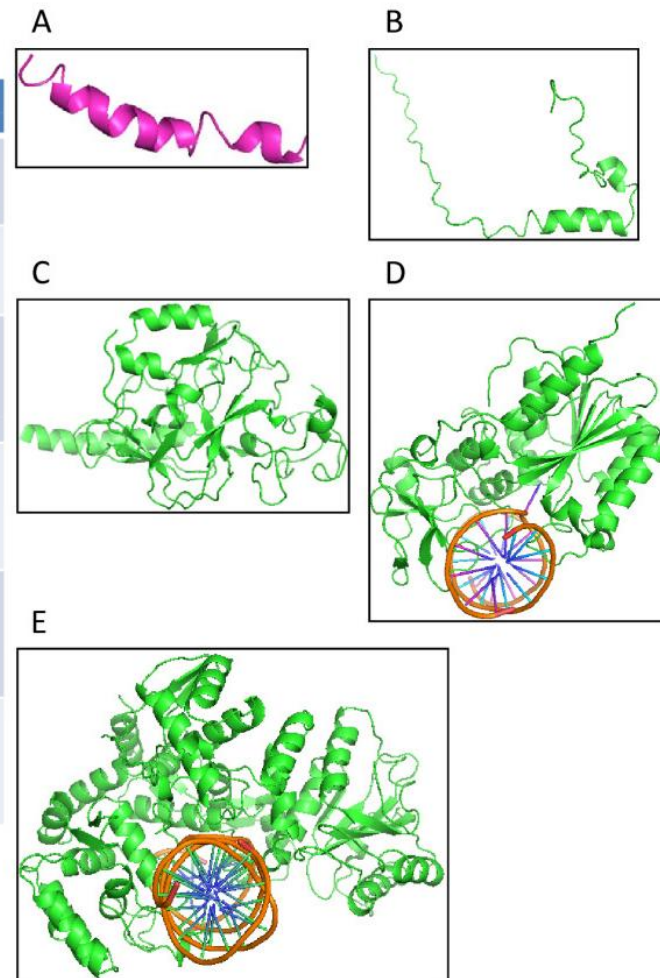


B Cell culture-based *ex vivo* editing



Nemcsak vágás, de transzkripció aktiválás, receptorfüggő aktivitás, represszálas, metiláció is kivitelezhető

| Fusion | Function | Reference |
|---|--|------------|
| VP16 ^a | Transcriptional activator | 24-33 |
| KRAB-A ^b | Transcriptional repressor | 24, 25, 32 |
| Progesterone Receptor and p65 | Ligand dependent transcriptional activator | 36 |
| Protein methyl transferase (Suv39H1) ^c | Transcriptional repressor | 37 |
| DNA methyl transferase (M.Sss1) ^d | Transcriptional repressor | 38, 39 |
| DNA endonucleases (Fok1) ^e | DNA cleavage | 43-48 |

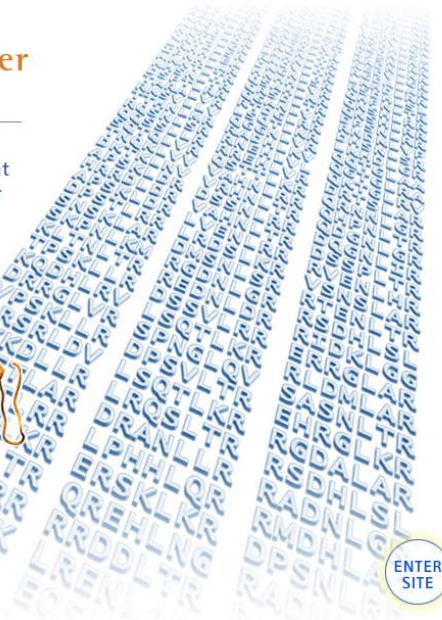
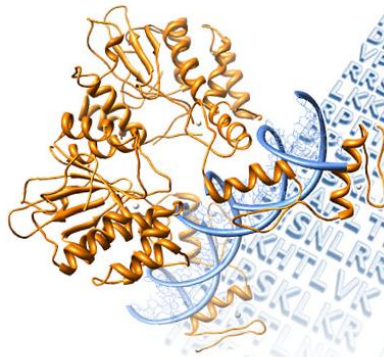


Honnan szerezhető be?



The Zinc Finger Consortium

to promote continued research and development of engineered zinc finger technology



ENTER SITE

SIGMA
Life Science

- Life Science Home
- ▶ Your Favorite Gene - Search
- Life Science Products
- ▶ Cell Biology
- ▶ Cells and Cell-Based Assays
- ▶ Cell Culture
- ▶ Core Bioreagents
- ▶ Custom Oligos
- ▶ Epigenetics
- ▶ Functional Genomics & RNAi
- ▶ Metabolomics
- ▶ Molecular Biology
- ▶ Nutrition Research
- ▶ Proteomics
- ▶ Stem Cell Biology
- ▶ Transgenics
- ▼ **Zinc Finger Nuclease (ZFN)**
 - ▶ Learning Center
 - CompoZr® Targeted Integration Kits
 - CompoZr® Custom ZFN Service
 - CompoZr® Knockout ZFNs
 - ZFN License Agreement
 - Zinc Finger Nuclease References
 - Zinc Finger Nuclease Applications Center
 - ZFN Webinar Series
 - ZFN Award Program
 - ▶ ADME/Tox Assays
 - ADME/Tox Partnerships
 - Transposon Knockout Assays

Functional Genomics & RNAi

Zinc Finger Nuclease (ZFN)

CompoZr® Zinc Finger Nuclease Technology

Zinc finger nucleases (ZFNs) are a class of engineered DNA-binding proteins that facilitate targeted editing of the genome by creating double-strand breaks in DNA at user-specified locations.

Double-strand breaks are important for site-specific mutagenesis in that they stimulate the cell's natural DNA-repair processes, namely homologous recombination and Non-Homologous End Joining (NHEJ).

Using well-established and robust protocols, these cellular processes can be harnessed to generate precisely targeted genomic edits resulting in cell lines, including somatic cell lines, with targeted gene deletions (Knockouts), integrations, or modifications.

Method of the Year 2011 – *Nature Methods*

“Genome Editing with Engineered Nucleases”

For its annual choice to highlight an important research method for biological researchers *Nature Methods* has selected “Genome Editing with Engineered Nucleases” - *Nat Methods*. 2011 Dec 28; 9(1):26. In 2011 there were many high profile publications using zinc finger nucleases with a wide range of genomic edits in a variety of cell lines and species, see [Zinc Finger Nuclease References](#).

2011 was also an important year as the leading genome editing technology, CompoZr ZFNs, had a reduction in price that the increased access of the most well-characterized and highly published genome editing technology in the market. Along with the reduction in price Knockout ZFNs are now available on the Sigma website for all human, mouse and rat genes providing easy access to the most common genome editing research application.

CompoZr ZFN Products

Knockout ZFNs

Custom ZFN Service

Targeted Integration Kits

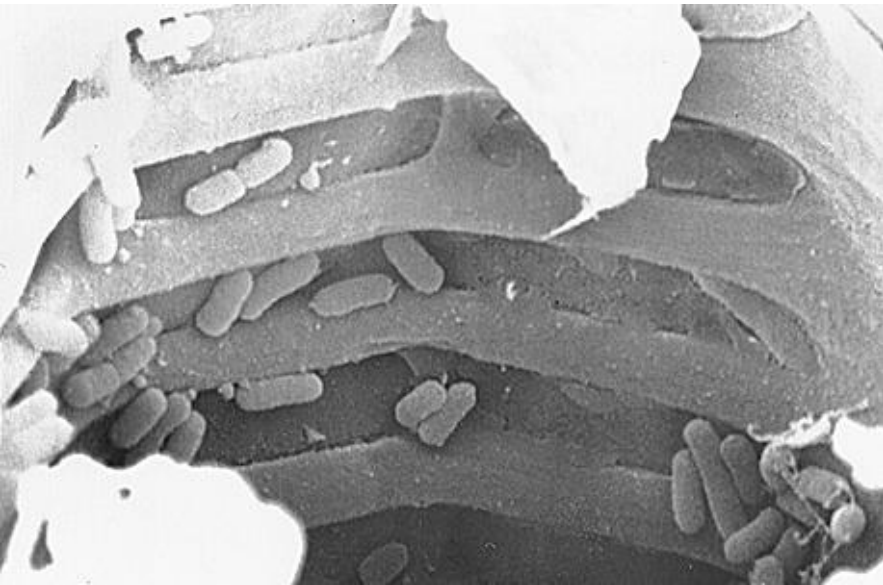
Hátrányok



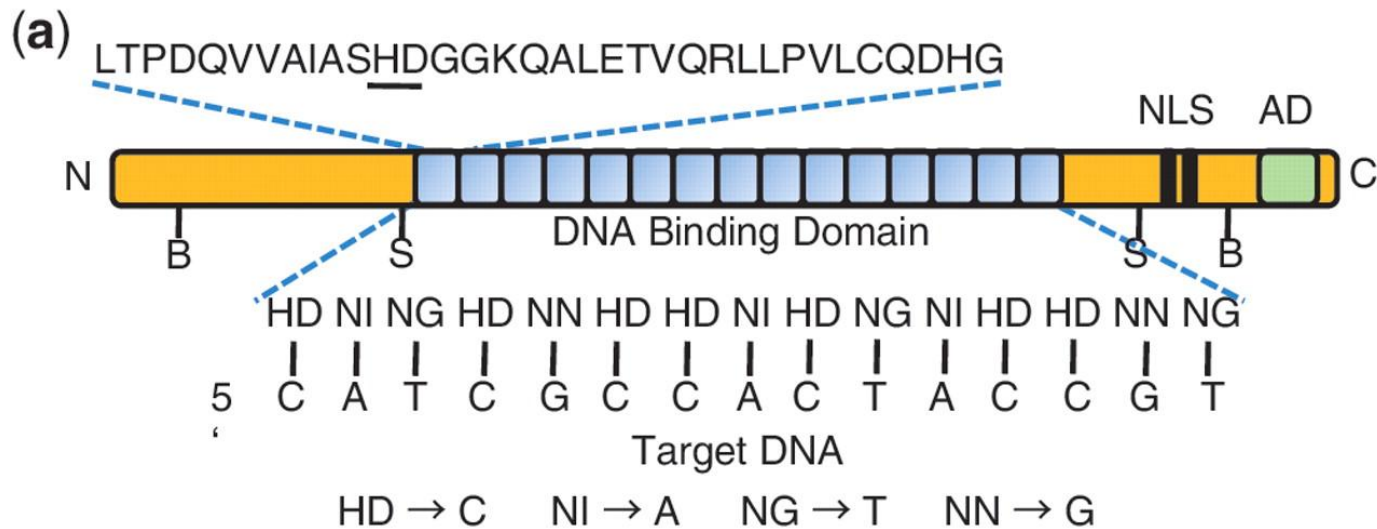
- **Nagyon erős protein mérnökség háttér kell**
- **Drága**
- **Szellemi tulajdon problémák (növényeseknél)**
- **Toxicitás**
- **Offtarget hatás**

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*

- Komoly penészt okoz rizsen, fűféléken, sáson.
- A baktérium TAL effector része transzkripcionálisan aktiválja a rizs betegség-fogékony *S* génjét.



A TALEN technológia: TAL effector+ FokI endonukleáz



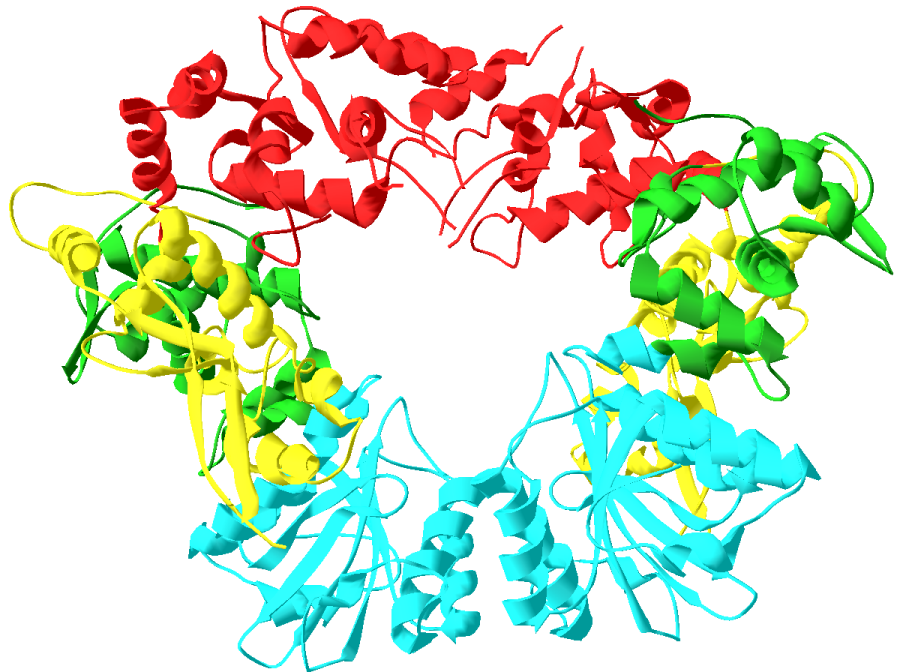
TAL effector DNS kötő domén felhasználása

Xantomonas baktérium termeli, bejut a növényi sejtmagba, és olyan géneket aktivál, mely a fertőzést elősegíti

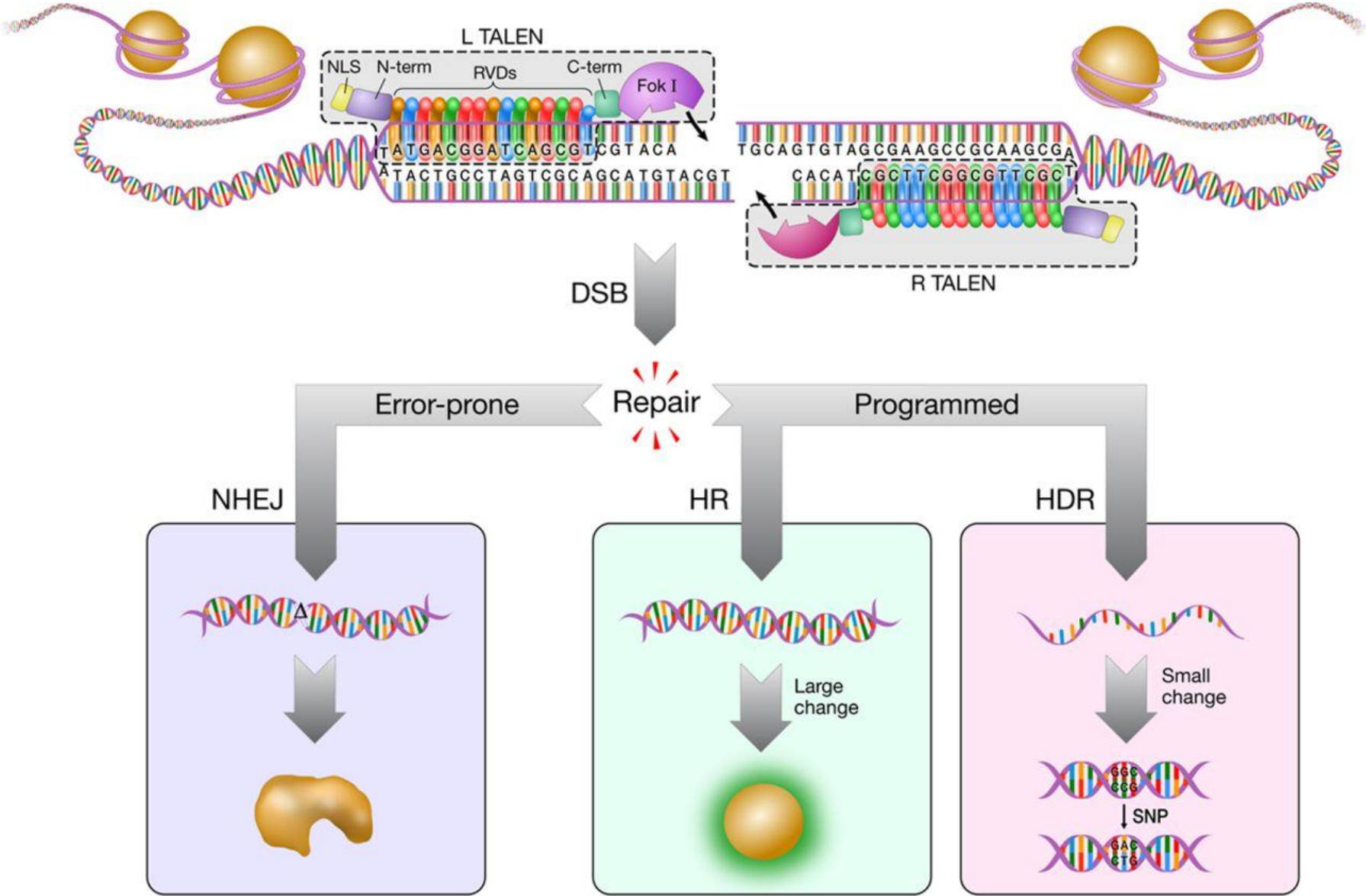
DNS kötő doménnel rendelkeznek, mely egy adott helyen hipervariábilis de pontosan lehet tudni, hogy mely aminosavcserek kellenek a megfelelő bázisok felismeréséhez

TALEN

- DNS hasító rész:
 - FokI restrikciós endonukleáz
 - Nem specifikus
 - DNS hasítását végzi



A TALEN rendszer működése



Kiütés mellett lehetőség van aktiválásra is, represszióra stb.



Emlős sejtenyészetben promóterre tervezve, aktivátor doménnal felszerelve az expressziót 20X növelték (idegi növekedési faktor)

TALLEN milyen fajokban működik (példák)

- **Növények**
- **Különböző állati sejtek**
- **ES sejtek, iPS sejtek**
- **Saccharomyces**
- **Zebradánió**
- **C. Elegans**
- **Patkány**
- **Egér**
- **Disznó, Szarvasmarha, kecske,**
- **Nyúl**

Hogyan szerezhető be?

Plazmid kitként megvásárolható



[Login](#) | [New User](#)

Search:

Home

Deposit Plasmids

Find Plasmids

How to Order

Plasmid Tools

About Addgene

[Special Collections](#) > TALEN Kits

TALEN Kits Available from Addgene



collectis
bioresearch



[Home](#) [About Us](#) [Genome Customization](#) [Drug Discovery](#) [Gene Function](#) [Protein Production](#)

[Home](#) » [TAL Effector Nuclease](#) » [Tag:TAL Effector Nuclease](#)

Tags

Custom TALEN® Service

>>> Check out now if your sequence's got talent: use our [TALEN® Hit™ software](#).

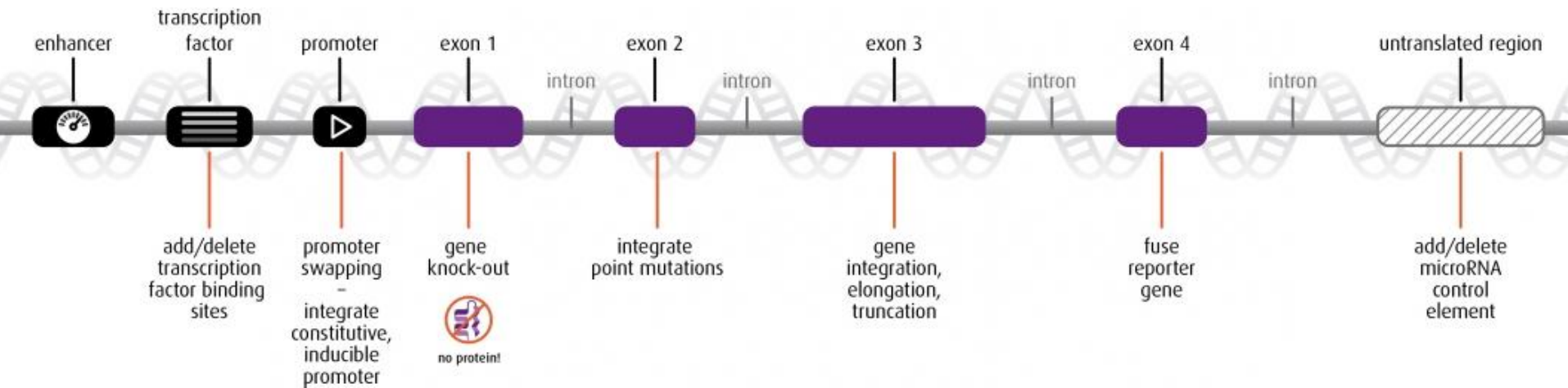
> [TALEN® Services](#)

- **TALEN® Access** and **TALEN® First**: Production of Custom TALENs® for all gene customization projects: to target any gene, at any position, in any genome.
- **NEW!!! TALEN® Sure KO™**: TALEN® Sure KO™ ensures gene knock-out by introducing frame shift mutations with the first coding exon of any gene.
- **Custom TALEN® Project Support**: Project-specific, personalized scientific support for the highest project success.

Meg is vásárolható szőröstől-bőröstől

TALEN tervezés


- <https://tale-nt.cac.cornell.edu/about>
- <http://talen-hit.collectis-bioresearch.com/target/talenHitSearch>
- <http://www.addgene.org/TALeffector/goldengate/voytas>



TALEN targeter eredménye

Results:

Result File (Tab-Delimited):

 fileVUwAve.txt

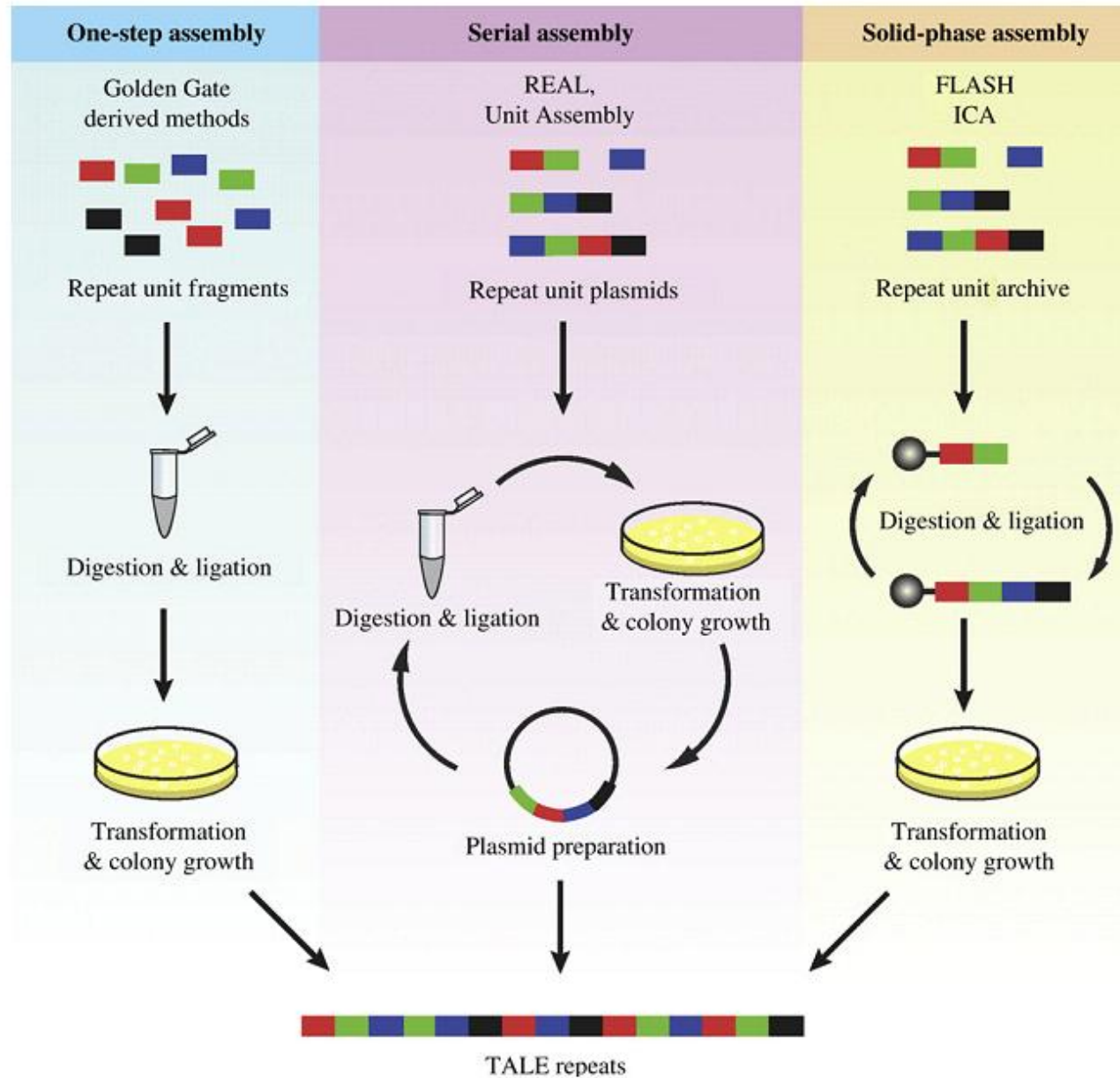
Tips for choosing TALENs/TAL effectors

Results:

1 2 next › last »

| Sequence Name | Cut Site ▲ | TAL1 start | TAL2 start | Spacer range | TAL1 RVDs | TAL2 RVDs | Plus strand sequence | Unique RE sites in spacer | % RVDs HD or NN/NH |
|--|------------|------------|------------|--------------|--|--|---|---------------------------|--------------------|
| TATGGATATA TCTGAGACC CGTGAAGAC TCCTACAAC AGTGTTTGTG CAA | 24 | 2 | 47 | 17-31 | HD HD NG NN NI NN NN HD NG HD NI NG HD NI NI | NG HD HD NI NN NG NI NG NI HD HD NG NG NN NG NI | T CCTGAGGCT CATCAA acctatgaaagac gg TACAAGGTAT ACTGGA A | none | 45 |
| TATGGATATA TCTGAGACC CGTGAAGAC TCCTACAAC AGTGTTTGTG CAA | 25 | 2 | 52 | 18-32 | HD HD NG NN NI NN NN HD NG HD NI NG HD NI NI NI | HD NN NN NI NG NG HD HD NI NN NG NI NG NI HD HD NG NG NN NG | T CCTGAGGCT CATCAA cctatgaaagacg gt ACAAGGTAT ACTGGAATC CG A | none | 47 |
| TATGGATATA TCTGAGACC CGTGAAGAC TCCTACAAC AGTGTTTGTG CAA | 26 | 2 | 52 | 19-33 | HD HD NG NN NI NN NN HD NG HD NI NG HD NI NI NI HD | HD NN NN NI NG NG HD HD NI NN NG NI NG NI HD HD NG NG NN | T CCTGAGGCT CATCAAAC ctatgaaagacg gta CAAGGTATA | none | 50 |

TALEN összeszerelése



Egy példa patkányban

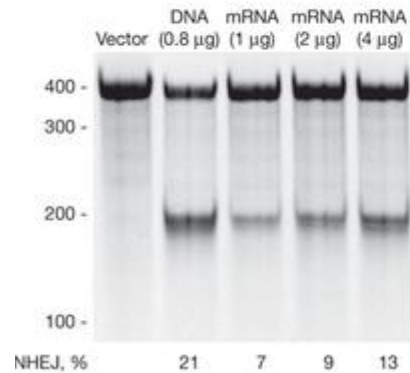
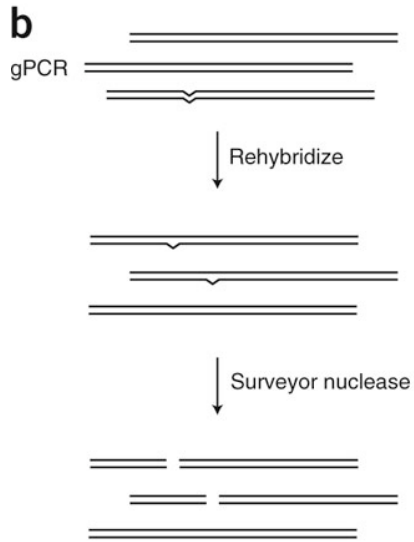
1. Talen és a FokI restriktációs domén összerakása
2. Target konstrukció: patkány IgM génre



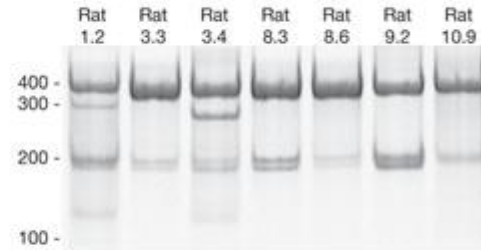
3. Injektálás patkány korai embriókba DNS formában



Eredmény ellenőrzése T7 nukleázal



Patkány sejt



Patkány 7/74

| Injection | Dose (ng/uL) | Pup | Allele | Sequence |
|-----------|--------------|------|---------------|---|
| Wild-type | | | | TTCCTGCCCAGCTCCATTTCCCTTCTCCTGGAACTACCAGAACAACACTGAA |
| DNA | 10 | 1.2 | w.t., Δ6 | TTCCTGCCCAGCTCCATTTCCCTT:::GAACTACCAGAACAACACTGAA |
| DNA | 10 | 3.3 | w.t., Δ1 | TTCCTGCCCAGCTCCATTTCCCTTCTC:TGGAACTACCAGAACAACACTGAA |
| DNA | 10 | 3.4 | w.t., Δ90 | TTCCTGCCCAGCTCCATTTCCCT:::: |
| DNA | 2 | 8.3 | w.t., Δ2 | TTCCTGCCCAGCTCCATTTCCCTC::CTGGAACTACCAGAACAACACTGAA |
| DNA | 2 | 8.6 | w.t., Δ1 | TTCCTGCCCAGCTCCATTTCCCTTCT:CTGGAACTACCAGAACAACACTGAA |
| DNA | 2 | 9.2 | w.t., Δ12, Δ4 | TTCCTGCCCAGCTCCATTTCCCT:::ACCAGAACAACACTGAA TTCCTGCCCAGCTCCATTTCCCT::CTGGAACTACCAGAACAACACTGAA |
| DNA | 2 | 10.9 | w.t., Δ12 | TTCCTGCCCAGCTCCATTTCCCT:::ACCAGAACAACACTGAA |

Technológia finomítása (koncentrációk és injektálási formák)

Table 1: Disruption of the rat *IgM* locus via TALEN cleavage

| Injection/route | Dose (ng/μl) | Injected | Transferred | Newborns | Founders |
|-------------------|--------------|----------|-------------|----------|----------|
| DNA/PNI | 10 | 166 | 98 (59%) | 13 (13%) | 3 (23%) |
| DNA/PNI | 2 | 236 | 150 (63%) | 53 (35%) | 4 (8%) |
| DNA/PNI | 0.4 | 84 | 48 (57%) | 8 (17%) | 0 (0%) |
| mRNA/IC | 10 | 200 | 146 (73%) | 20 (14%) | 15 (75%) |
| mRNA/IC | 4 | 187 | 127(68%) | 36 (28%) | 27 (75%) |
| mRNA/IC | 0.8 | 86 | 73 (85%) | 32 (44%) | 9 (28%) |
| Plasmid 1 DNA/PNI | 2 | 402 | 235 (58%) | 47 (20%) | 4 (9%) |
| Plasmid 2 DNA/PNI | 2 | 353 | 256 (73%) | 51 (20%) | 5 (10%) |

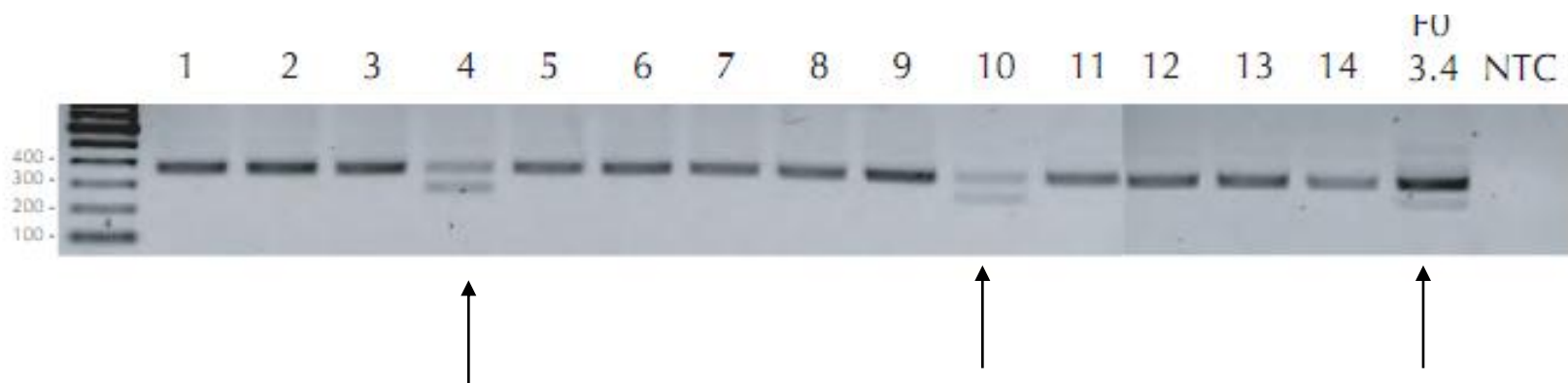
| | | | | |
|-----------|---|------|-----------|--|
| mRNA | 4 | 18.1 | mosaic | |
| mRNA | 4 | 18.2 | w.t., Δ5 | TTCTTGCCAGCTCCATTTCTT:::GGA ACT ACCAGAACAACACTGAA |
| mRNA | 4 | 18.4 | Δ2, Δ7 | TTCTTGCCAGCTCCATTTCTT::CCTGGA ACT ACCAGAACAACACTGAA TTCTTGCCAGCTCCATTTCC:::GGA ACT ACCAGAACAACACTGAA |
| mRNA | 4 | 18.6 | mosaic | |
| mRNA | 4 | 19.1 | Δ1, Δ1 | TTCTTGCCAGCTCCATTTCTTCTC: TGGA ACT ACCAGAACAACACTGAA TTCTTGCCAGCTCCATTTCTTCTC: TGGA ACT ACCAGAACAACACTGAA |
| mRNA | 4 | 19.2 | Δ6, Δ6 | TTCTTGCCAGCTCCATTTCTT:::GGA ACT ACCAGAACAACACTGAA TTCTTGCCAGCTCCATTTCTT:::GGA ACT ACCAGAACAACACTGAA |
| mRNA | 4 | 19.3 | mosaic | |
| mRNA | 4 | 19.4 | mosaic | |
| mRNA | 4 | 19.5 | Δ1, Δ7 | TTCTTGCCAGCTCCATTTCC: TCTCCTGGA ACT ACCAGAACAACACTGAA TTCTTGCCAGCTCCATTTCC:::TGGA ACT ACCAGAACAACACTGAA |
| mRNA | 4 | 19.6 | w.t., Δ12 | TTCTTGCCAGCTCCATTTCTT:::ACCAGAACAACACTGAA |
| mRNA | 4 | 19.7 | mosaic | |
| mRNA | 4 | 19.8 | mosaic | |
| mRNA | 4 | 19.9 | w.t., Δ12 | TTCTTGCCAGCTCCATTTCTT:::ACCAGAACAACACTGAA |
| mRNA | 4 | 20.1 | mosaic | |
| mRNA | 4 | 20.2 | Δ12, Δ12 | TTCTTGCCAGCTCCATTTCTT:::ACCAGAACAACACTGAA TTCTTGCCAGCTCCATTTCTT:::ACCAGAACAACACTGAA |
| mRNA | 4 | 20.3 | w.t., Δ3 | TTCTTGCCAGCTCCATTTCTTCT::GGA ACT ACCAGAACAACACTGAA |
| Wild-type | | | | TTCTTGCCAGCTCCATTTCTTCTCCTGGA ACT ACCAGAACAACACTGAA |

1-154 hosszú deléciók

Mozaikos egyedek is

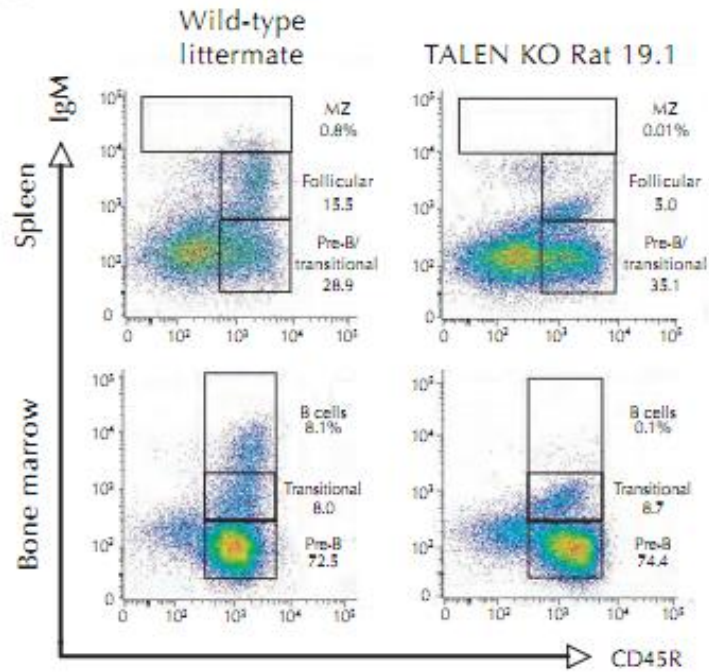
Dupla KO egyedek is

Az állatok örökítik a módosítást

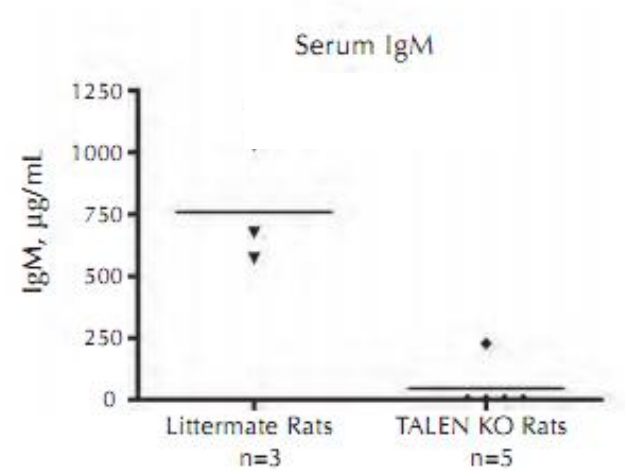


Funkcionális vizsgálatok

a



b



Példák

- Terápiás célkora – *in vitro* kísérletek

Table 2
Reported therapeutic applications of TALENs.

| Disease | Target gene/sequence | Study type | Cell line(s)/species | Reference(s) |
|---|----------------------------|-----------------|--|---|
| Sickle cell anemia | β -globin (HBB) | <i>in vitro</i> | hiPSCs | (Ma et al., 2013; Sun and Zhao, 2014) |
| Hemophilia A | F8 | <i>in vitro</i> | hiPSCs | (Park et al., 2014) |
| Duchenne muscular dystrophy (DMD) | Exon 51 of dystrophin gene | <i>in vitro</i> | Skeletal myoblasts, dermal fibroblasts | (Ousterout et al., 2013), (Li et al., 2014) |
| | Exon 45 of dystrophin gene | <i>in vitro</i> | hiPSCs | |
| Muscular dystrophy | MSTN | <i>in vitro</i> | HT1080, BAEC, NIH3T3, C2C12 | (Xu et al., 2013) |
| α 1-antitrypsin deficiency (A1ATD) | SERPINA1 | <i>in vitro</i> | hiPSCs | (Smith et al., 2014) |
| Polycythemia vera (PV) | JAK2 | <i>in vitro</i> | hiPSCs | (Smith et al., 2014) |
| Recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) | COL7A1 | <i>in vitro</i> | Human fibroblasts | (Osborn et al., 2013) |
| Severe combined immune deficiency X-1 (SCID) | IL2R γ | <i>in vitro</i> | Jurkat | (Matsubara et al., 2014) |
| Mitochondrial diseases | m.8483_13459d | <i>in vitro</i> | Human osteosarcoma cells | (Bacman et al., 2013) |
| | MT-ND6 | | 143B/206 cells | |
| Human immunodeficiency virus (HIV-1) resistance | PSIP1 | <i>in vitro</i> | 293T, Jurkat | (Fadel et al., 2014; Ye et al., 2014) |
| | CCR5 | <i>in vitro</i> | hiPSCs | |
| Hepatitis B virus (HBV) replication | C, S, an pol of HBV | <i>in vitro</i> | Huh7, HepG2.2.15 | (Bloom et al., 2013; Chen et al., 2014) |
| | | <i>in vivo</i> | Mouse | |
| HPV infection and cervical cancer | E6, E7 | <i>in vitro</i> | SiHA, S12, HeLa | (Hu et al., 2014b) |
| | | <i>in vivo</i> | Mouse | |
| Various cancers | miR-21 | <i>in vitro</i> | HeLa, Hek-293, Ramos lymphoma cells | (Chen et al., 2015) |
| Malaria | TEP1 (mosquito genome) | <i>in vitro</i> | Mosquito germ cells | (Smidler et al., 2013) |

Példák



Gene editing in mice with TALEN.

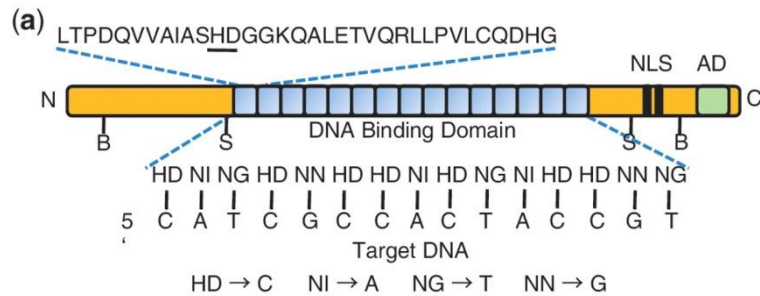
| Target genes | Genotype | Founder mutants knockout (%) | Founder mutants knockin (%) |
|---------------------------|------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| <i>Pibf1, Sepw1</i> | C57BL/6 | 56–77 | n.a. |
| <i>Rab38</i> | C57BL/6 × FVB | 6 | 2 |
| <i>Zic2</i> | CD1, C3H, C57BL/6 | 10–46 | n.a. |
| <i>Lepr</i> & nine others | FVB/N, C57BL/6 | 13–67 | n.a. |
| <i>Fus, C9orf72</i> | (C57BL/6 × BS) × FVB/N | 41 | 6.8 |
| <i>Fats</i> | C57BL/6 | 62 | n.a. |
| miRNAs | C57BL/6 × DBA2 | 3–30 | n.a. |



| Target gene | No. of embryos injected | No. of BL (%) | No. of BL sequenced | Mutants (%) | Bi-allelic mutations (%) |
|-------------|-------------------------|---------------|---------------------|-------------|--------------------------|
| CD36 | 25 | 15 (60.0) | 15 | 10 (66.7) | 8 (80.0) |
| LDLR | 18 | 11 (61.1) | 10 | 5(50.0) | 0 (0) |
| CFTR | 60 | 33 (55.0) | 19 | 11 (56.6) | 4 (36.3) |
| APOE | 67 | 33 (49.2) | 23 | 16 (69.6) | 16 (100) |
| APOCIII | 38 | 13 (34.2) | 9 | 4 (44.4) | 0 (0) |
| LEP | 18 | 12 (66.7) | 12 | 2(16.7) | 0 (0) |
| LEPR | 19 | 13 (68.4) | 10 | 1(10.0) | 0 (0) |
| RyR2 | 20 | 13 (65) | 10 | 10 (100.0) | 8 (80.0) |
| SCARB1 | 25 | 16 (64.0) | 8 | 2 (25.0) | 0 (0) |
| Total | 290 | 159 (54.8) | 116 | 61 (52.6) | 36 (59.0) |

| Target gene | No. of Embryos injected/transferred | No. of recipients | No. of kits (term rate) | No. of positive kits (KO rate) | Bi-allelic mutations (%) |
|-------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| APOE | 94 | 3 | 12 (12.8%) | 10 (83.3%) | 10 (100) |
| LDLR | 93 | 3 | 28 (30.1%) | 9 (32.1%) | 0 (0) |
| CD36 | 54 | 2 | 13 (24.1%) | 11 (84.6%) | 4 (36.4) |
| RyR2 | 60 | 2 | 15 (25.0%) | 8 (53.3%) | 1 (12.5) |
| Total | 301 | 10 | 68 (22.6%) | 38 (55.9%) | 15 (39.5) |

Előnyök/hátrányok



- Nem kell fehérjés szakértő

- Olcsóbb

- Szellemi tulajdonok ok

- Toxicitás

- Offtarget hatás

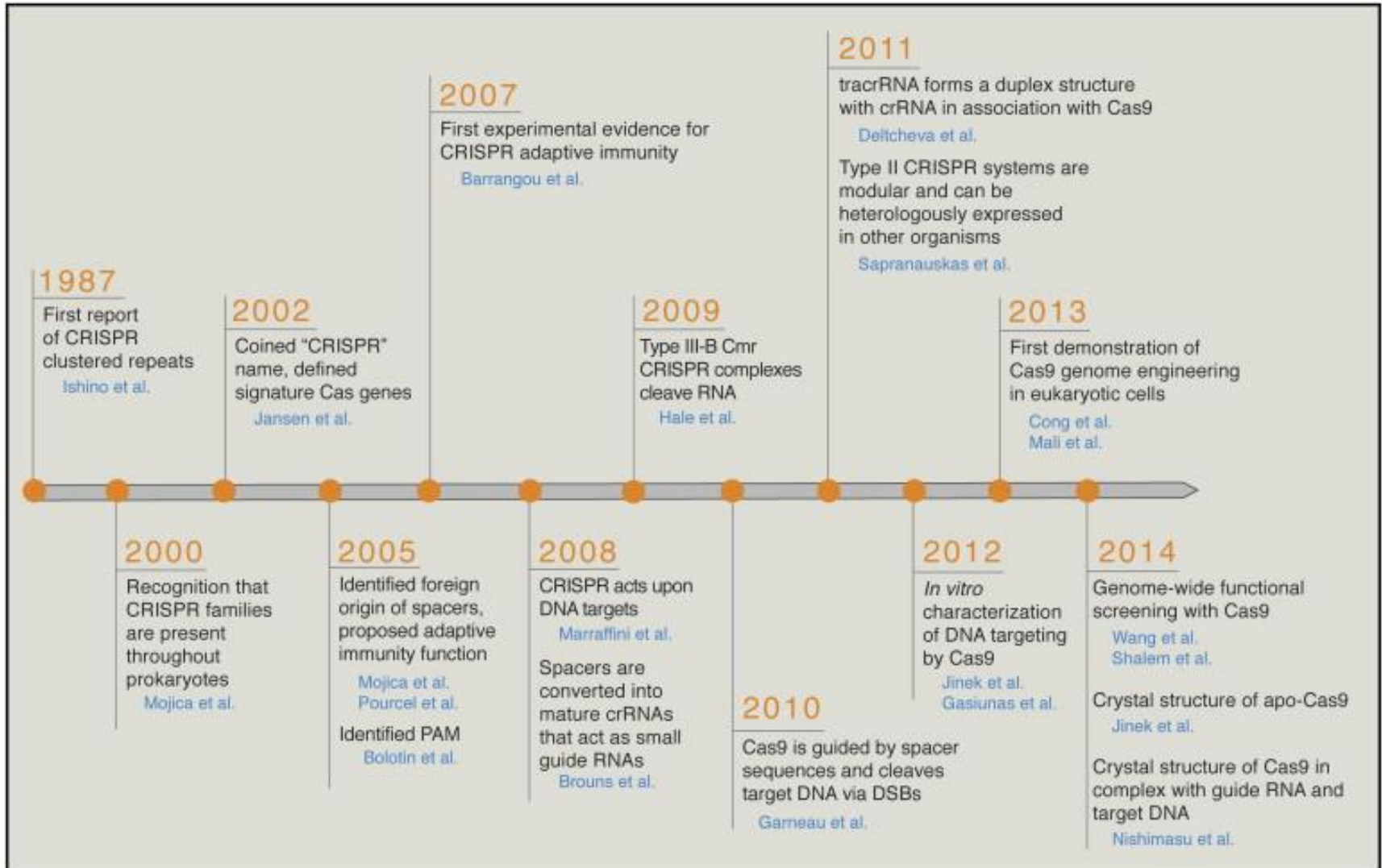
- Jó sok klónozás



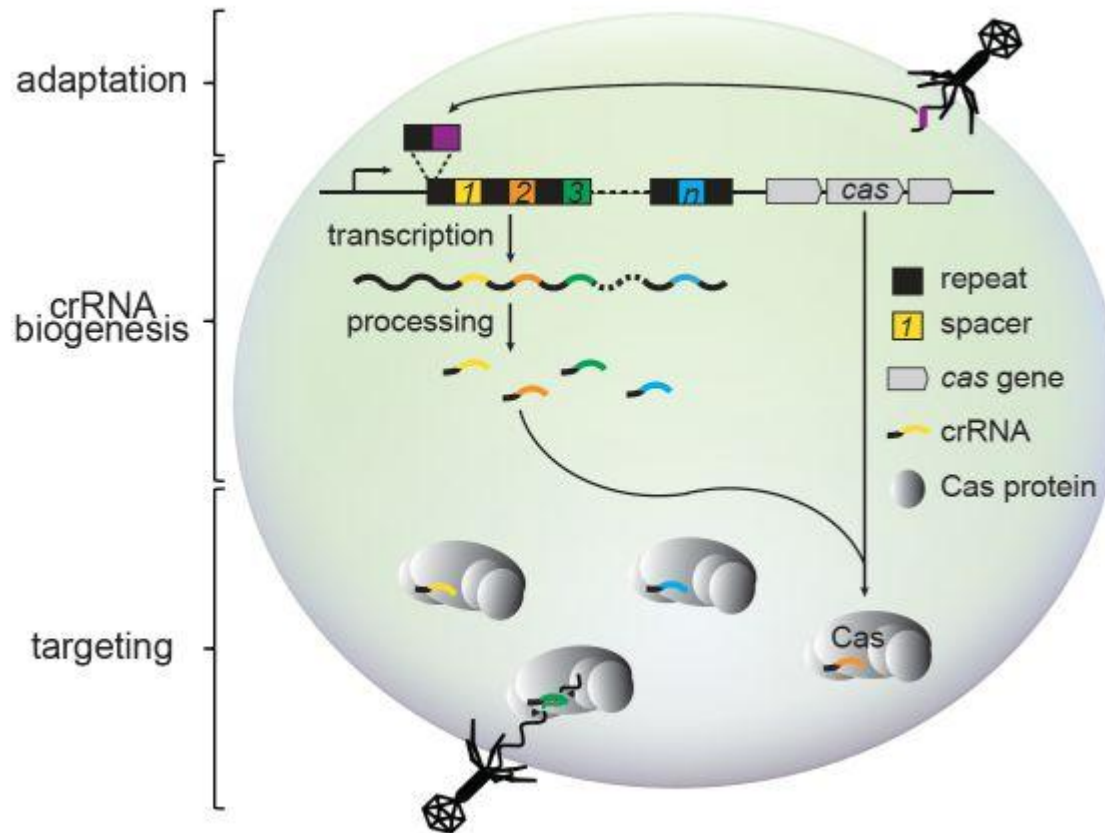
CRISPR/Cas9

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CRISPR/Cas9 rendszer



CRISPR/Cas9 rendszer



Baktériumok immunrendszere, behatóló fágok és plazmidok ellen

CRISPR/Cas9 rendszer

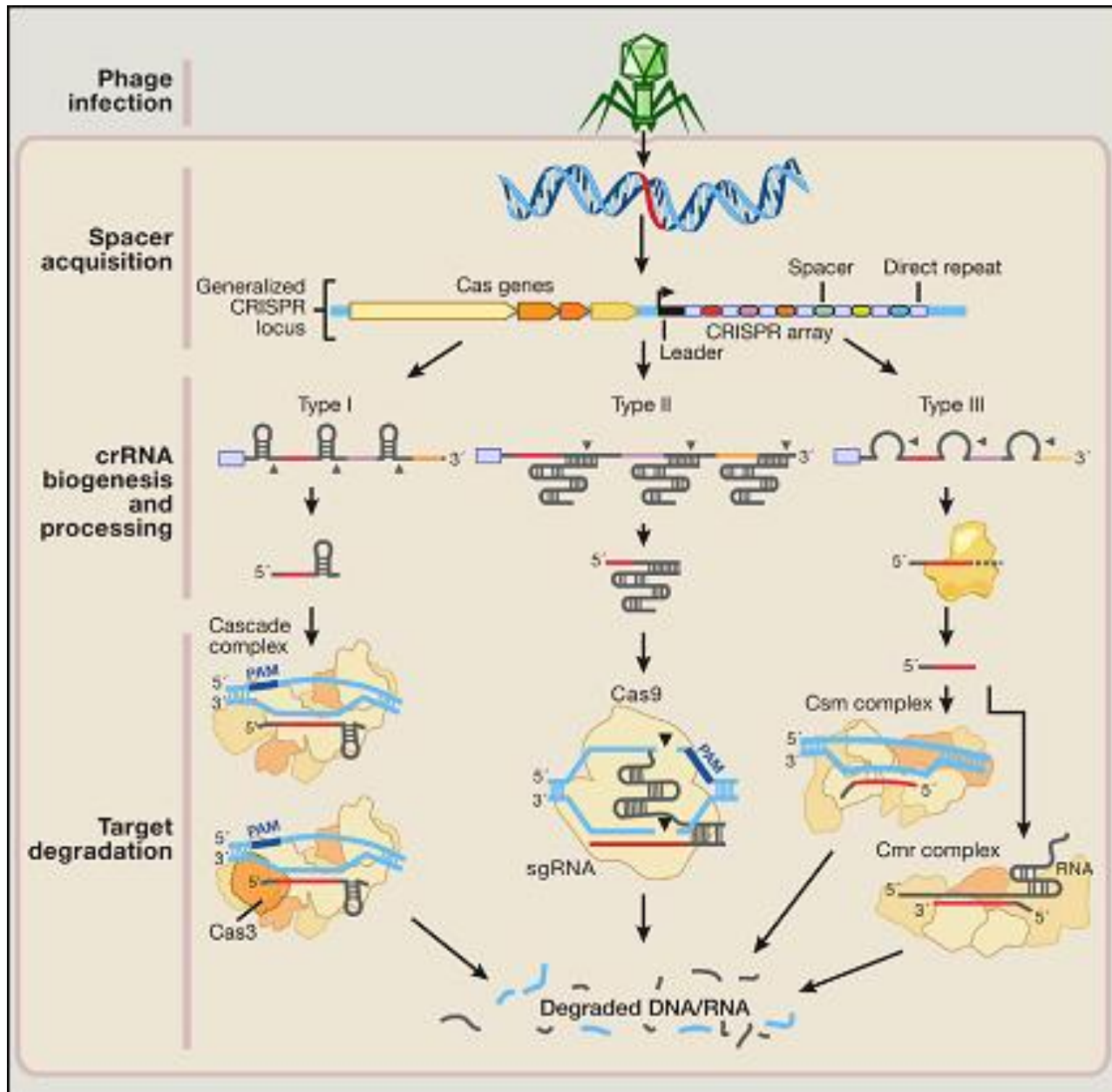
45 Cas gén család

3 fő divízió, sok aldivízió

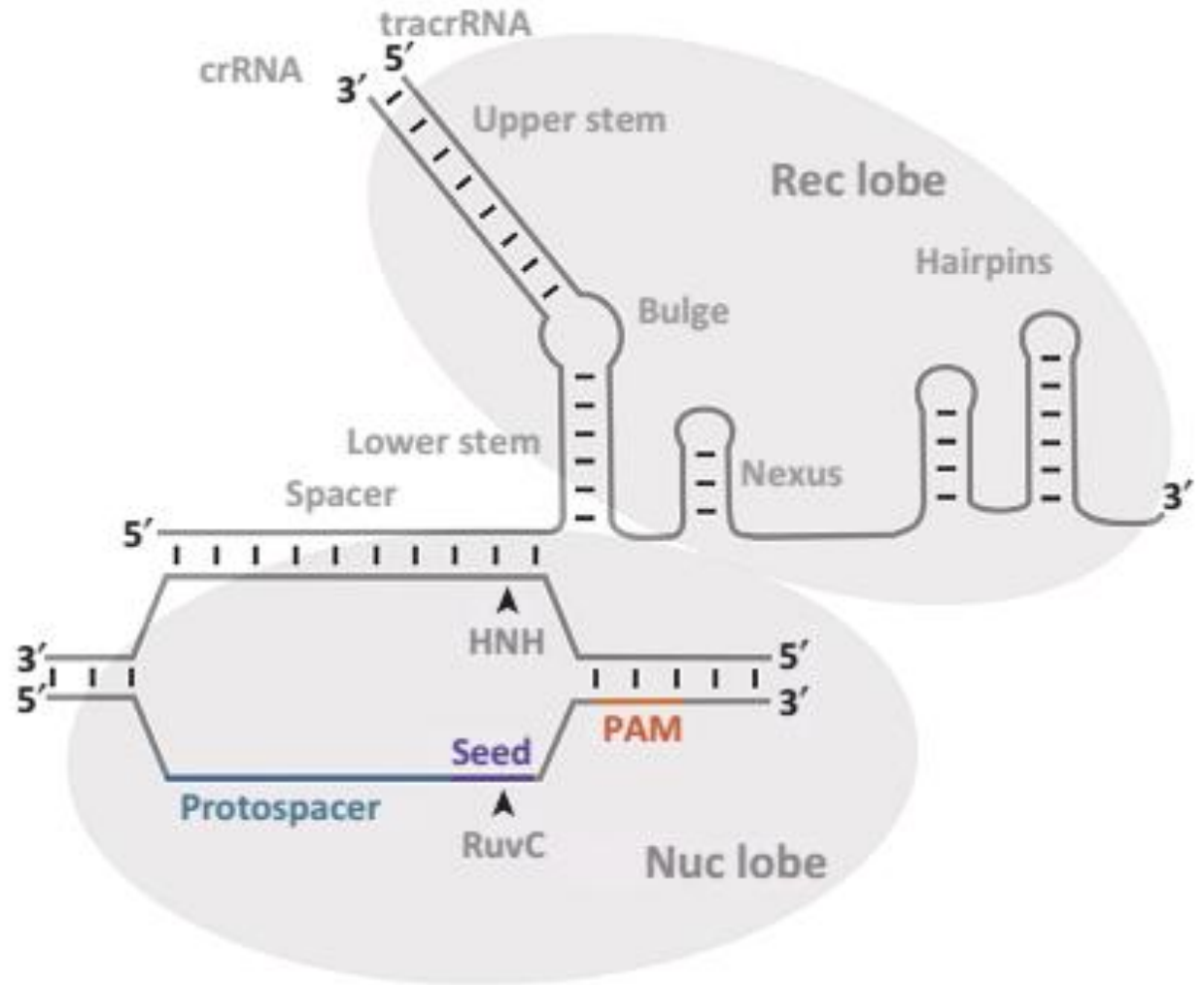
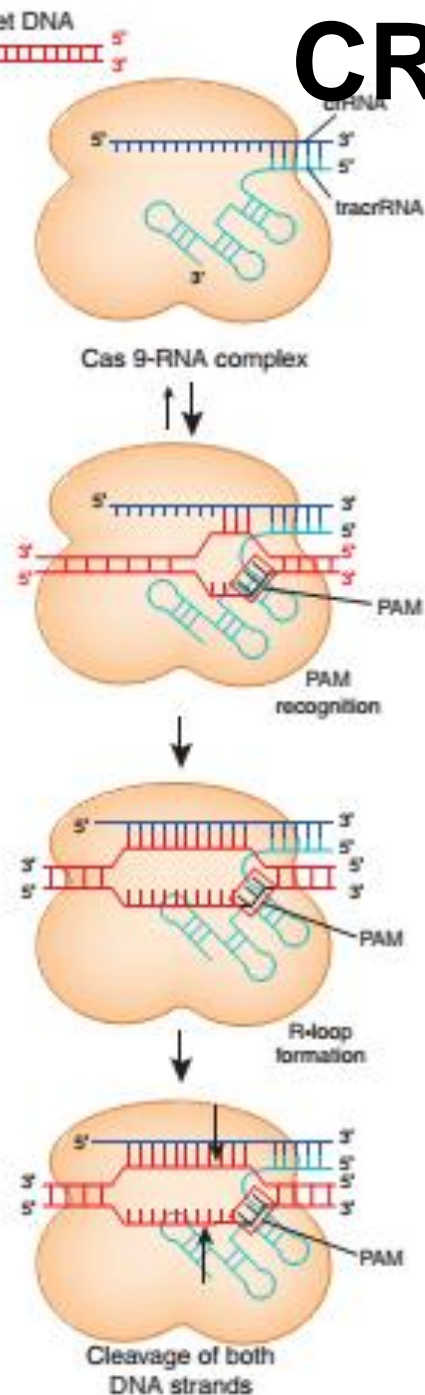
Signature genes and their putative functions for the major and minor CRISPR-cas types.

| Cas type | Signature gene | Function |
|----------|----------------|---|
| I | Cas3 | Single-stranded DNA nuclease (HD domain) and ATP-dependent helicase |
| IA | Cas8a | Subunit of the interference module. Important in targeting of invading DNA by recognizing the PAM sequence |
| IB | Cas8b | |
| IC | Cas8c | |
| ID | Cas10d | |
| IE | Cse1 | contains a domain homologous to the palm domain of nucleic acid polymerases and nucleotide cyclases |
| IF | Csy1 | Not Determined |
| II | Cas9 | Nucleases RuvC and HNH together produce DSBs, and separately can produce single-strand breaks. Ensures the acquisition of functional spacers during adaptation. |
| IIA | Csn2 | Not Determined |
| IIB | Cas4 | Not Determined |
| IIC | | Characterized by the absence of either Csn2 or Cas4 |
| III | Cas10 | Homolog of Cas10d and Cse1 |
| IIIA | Csm2 | Not Determined |
| IIIB | Cmr5 | Not Determined |

A bakteriális „immunrendszer” részletesebben



CRISPR/Cas9 rendszer



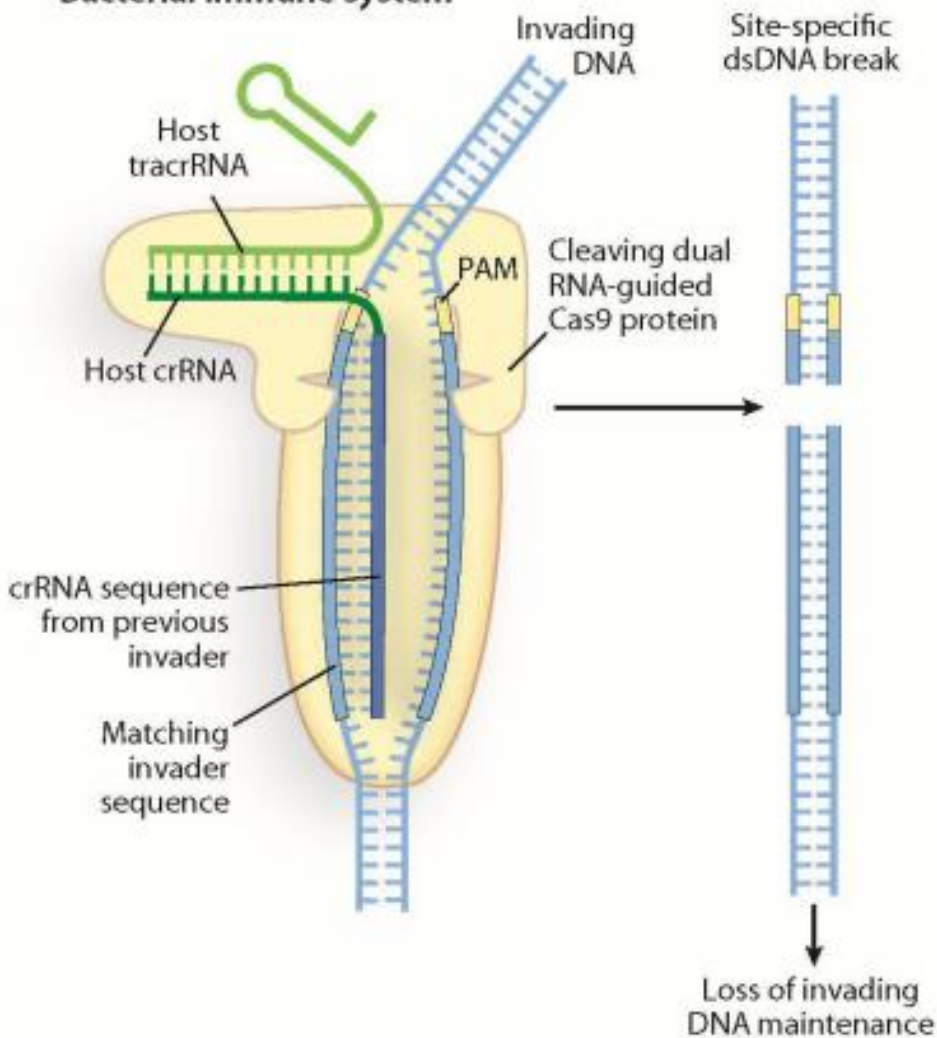
TRENDS in Microbiology

PAM szekvencia

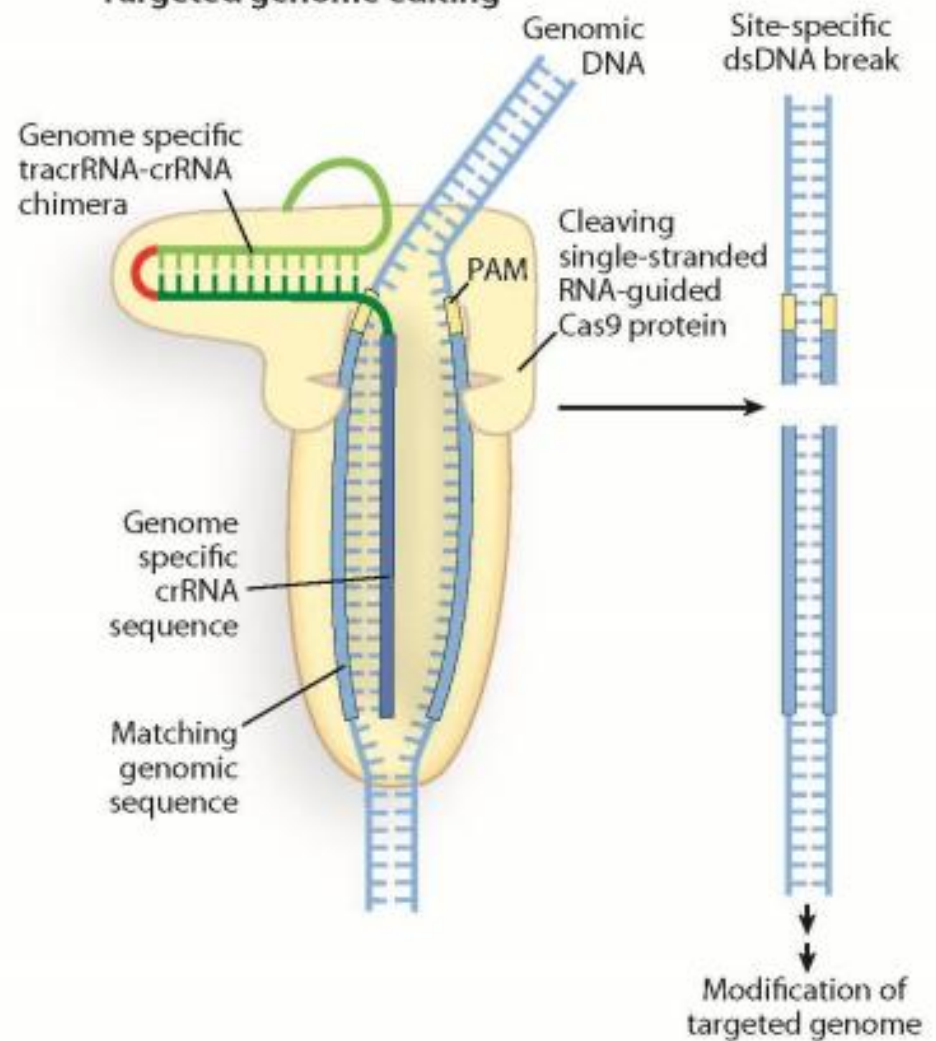
<http://www.casblastr.org/>

CRISPR/Cas9 rendszer átalakítása

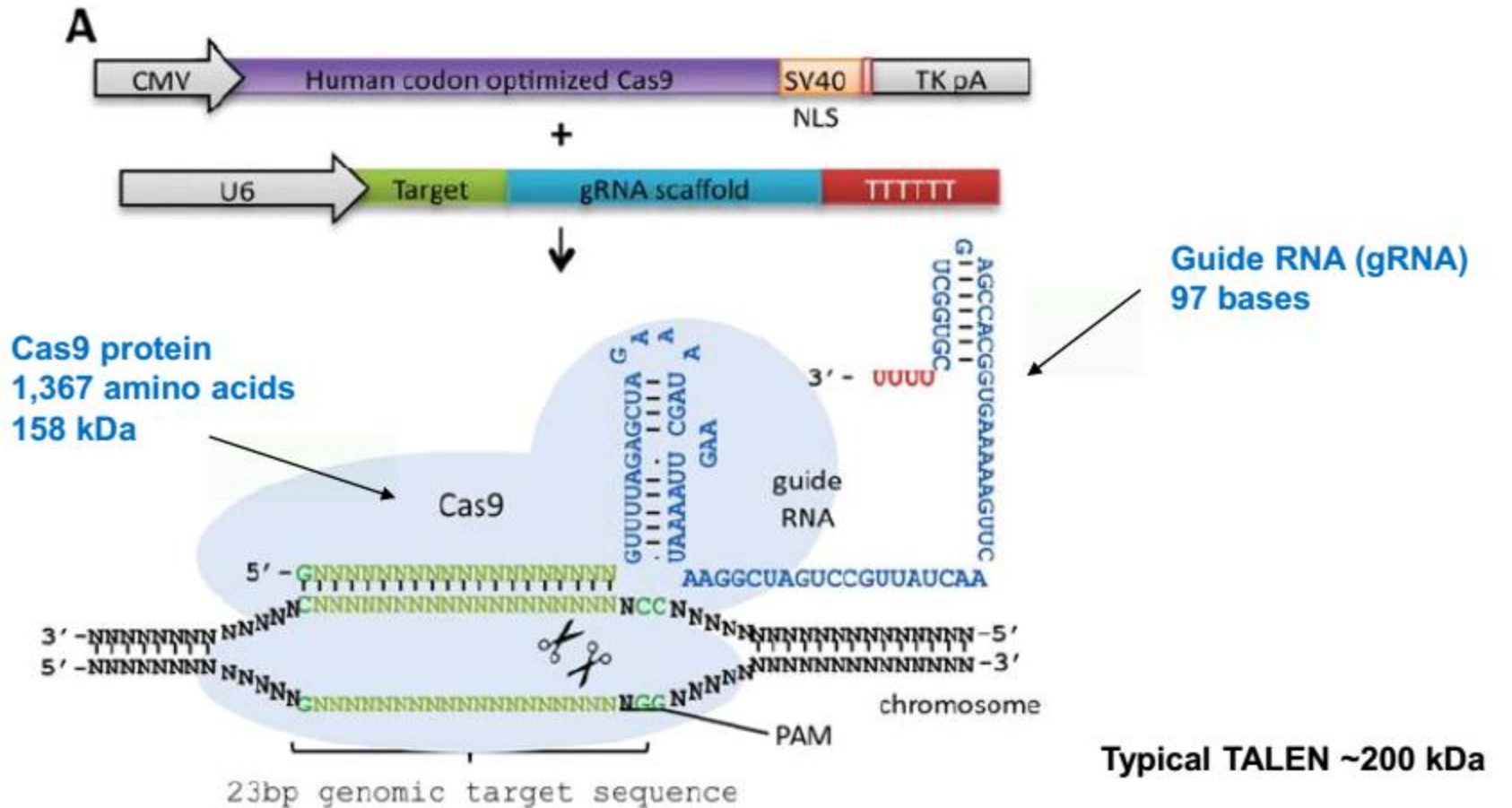
Bacterial immune system



Targeted genome editing



CRISPR/Cas9 rendszer



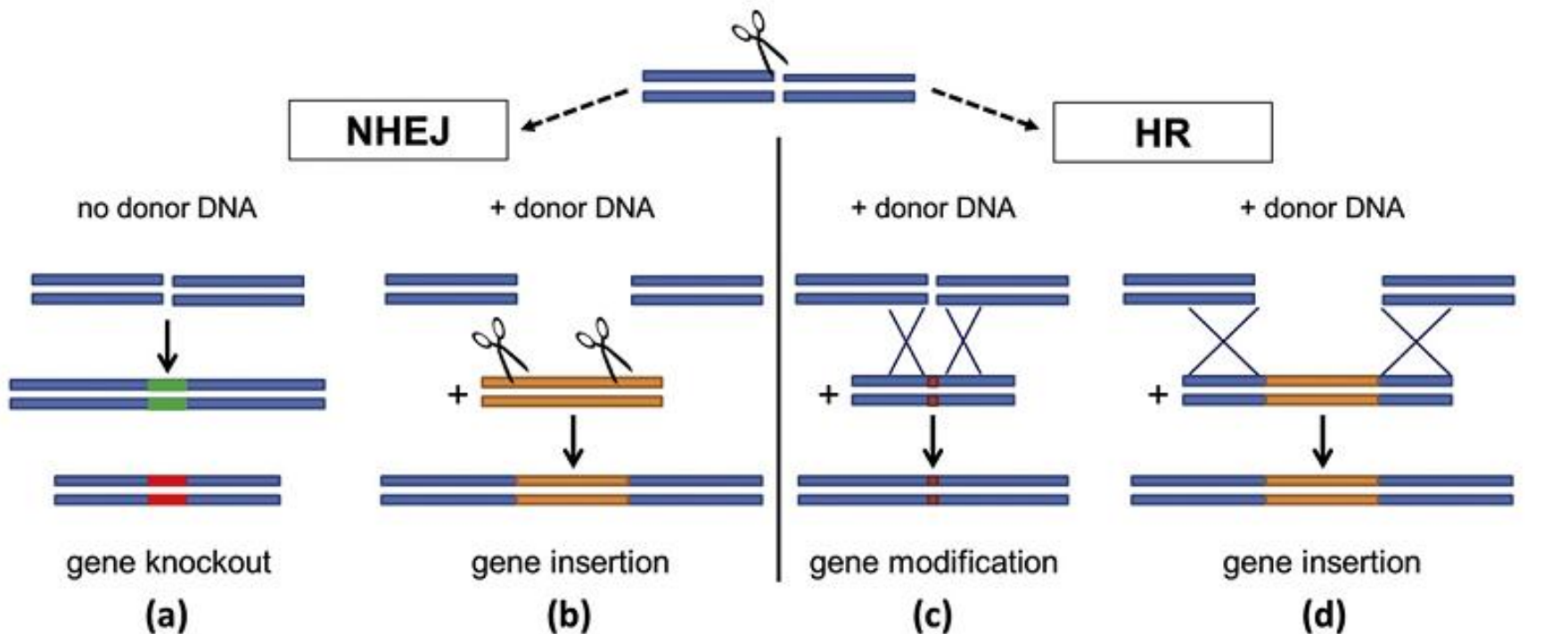
<https://www.youtube.com/watch?t=240&v=2pp17E4E-O8>

<https://www.youtube.com/watch?v=SuAxDVBt7kQ>

Lehetséges módosítások

Nonhomologous end joining

Homology-direct repair



Cas9 ált. módosítás 20-60%



Inszerációs mutagenézis hatékonysága: 0,5-20%

CRISPR/Cas9 rendszer

1. *guideRNS* tervezés

<http://crispr.mit.edu/>

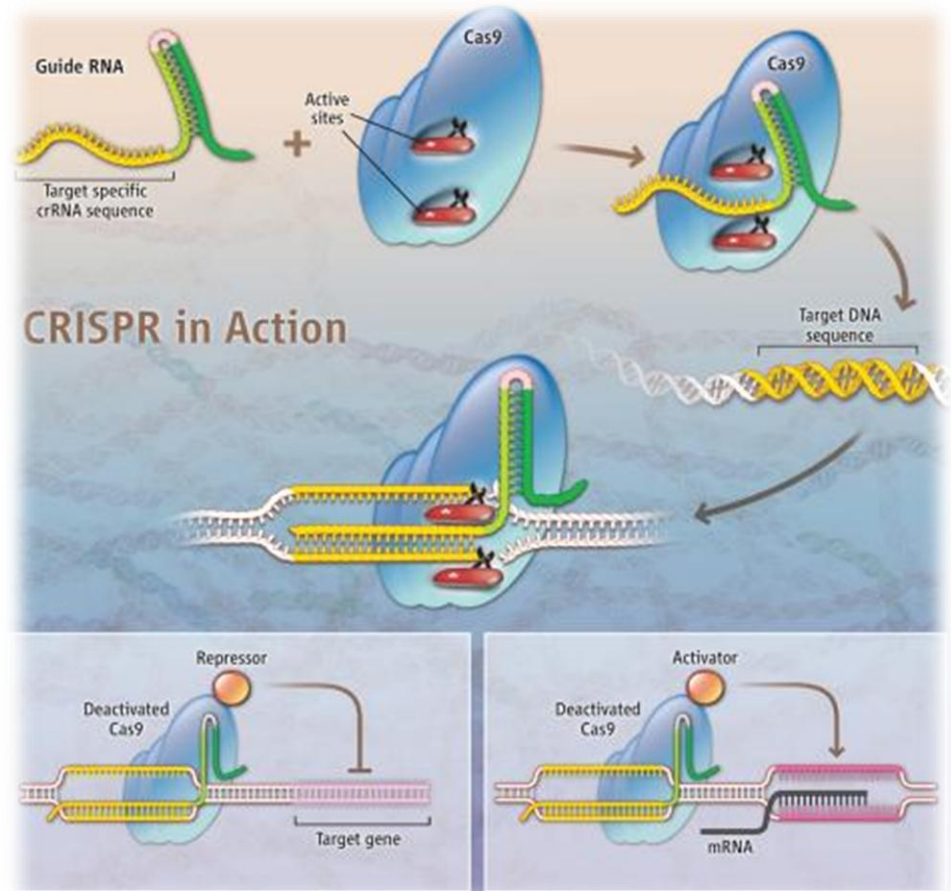
<http://crispr.mit.edu/guides/885437766687252>

<https://www.dna20.com/eCommerce/cas9/input>

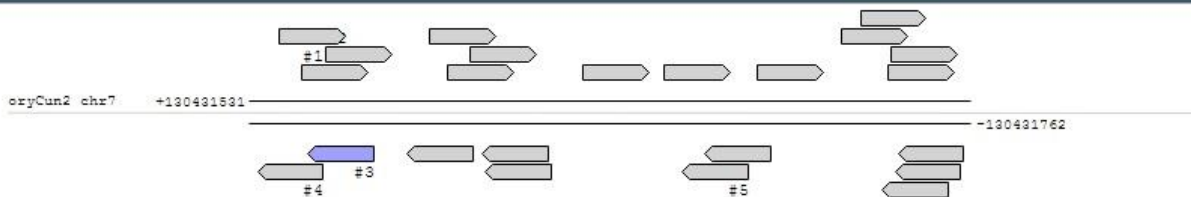
<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html>

<http://tools.flycrispr.molbio.wisc.edu/targetFinder/index.php>

<http://www.addgene.org/crispr/guide/#Design>



Egy CRISPR tervezés végeredménye



all guides

scored by inverse likelihood of offtarget binding
 mouse over for details [show legend](#)

guide #3 quality score: 85

guide sequence: TACCTTGTACCGTCTTTCAT AGG

on-target locus: chr7:-130431549

number of offtarget sites: 78 (0 are in genes)

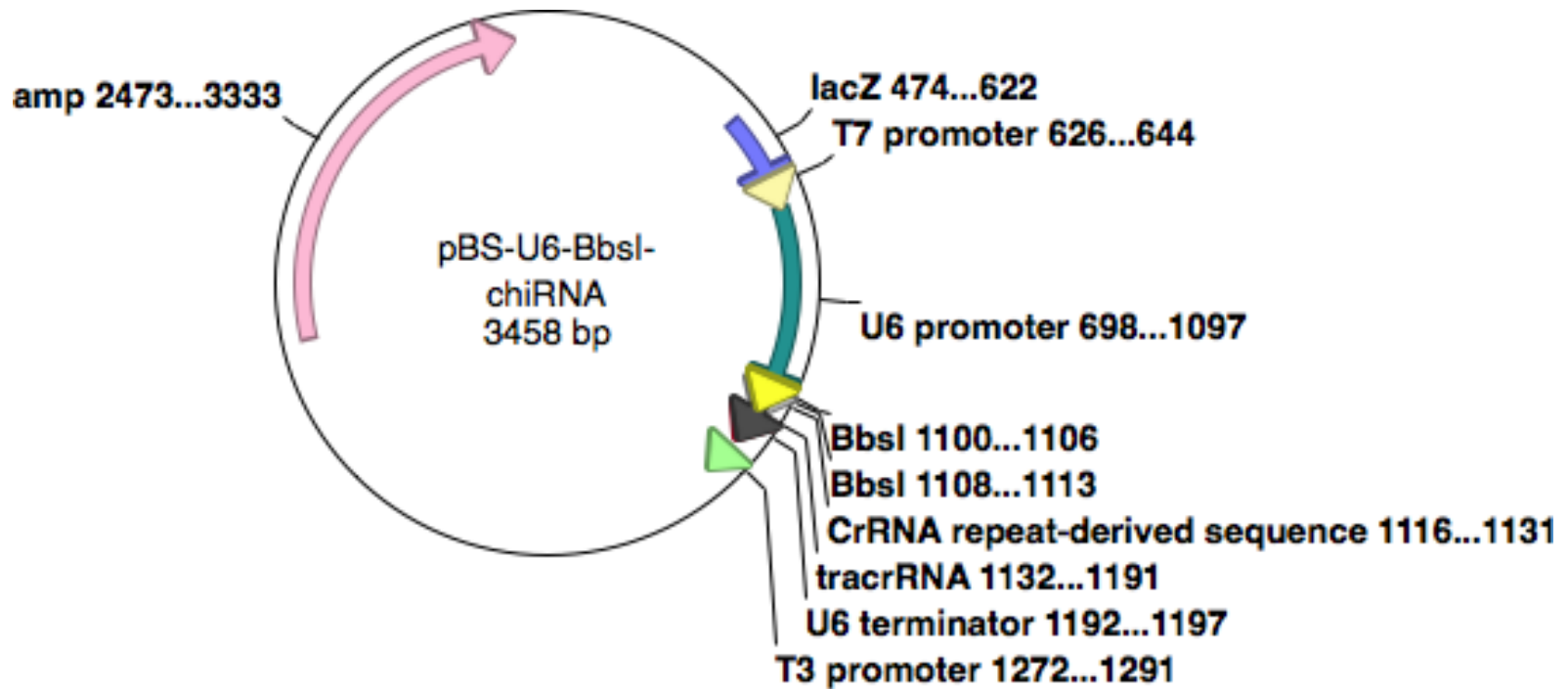
| | score | sequence | |
|-----------|-------|-----------------------|-----|
| Guide #1 | 88 | AACCTATGAAAGACGGTACA | AGG |
| Guide #2 | 87 | AAAGACGGTACAAGGTATAC | TGG |
| Guide #3 | 85 | TACCTTGTACCGTCTTTCAT | AGG |
| Guide #4 | 80 | TCATAGGTTTGATGAGCCTC | AGG |
| Guide #5 | 70 | TCAATGCCTAAGTTGGATTC | AGG |
| Guide #6 | 66 | GATCTTGCTGTAACCTTCCC | AGG |
| Guide #7 | 65 | TTTGATTTCAATGCCTAAGT | TGG |
| Guide #8 | 60 | CTGAAACTTGACATGAACCC | AGG |
| Guide #9 | 60 | AAACAACCTGAATCCAACCT | AGG |
| Guide #10 | 58 | CTCATCAAACCTATGAAAGA | CGG |
| Guide #11 | 57 | GCTGTAACCTTCCCAGGACC | AGG |
| Guide #12 | 55 | TCATGTCAAAGTTTCAGAGAT | CGG |
| Guide #13 | 52 | TCTGCCAAATACCAGTGCCT | GGG |

top 20 genome-wide off-target sites show all exonic

| sequence | score | mismatches | UCSC gene | locus |
|--------------------------|-------|------------------|-----------|-----------------|
| TACCATGTGCCTTCTTTCATGGG | 0.8 | 3MMs [5:9:12] | | chr8:+90340855 |
| AACCTTGTAAACATCTTTCATCAG | 0.7 | 4MMs [1:4:10:12] | | chrX:-7213213 |
| TGCCGTGTAACCTTCTTTCATCAG | 0.7 | 4MMs [2:5:10:12] | | chr11:-4666628 |
| GAGCTTGTAGCGTCTTTCAGTAG | 0.6 | 4MMs [1:3:10:20] | | chr12:+5011844 |
| GACCATGTAGCGTCTTCCATAAG | 0.6 | 4MMs [1:5:10:17] | | chr11:-71049226 |
| CACCATCTACAGTCTTTCATGGG | 0.6 | 4MMs [1:5:7:11] | | chrUN0:+4909595 |
| TAATTTTTACAGTCTTTCATAGG | 0.5 | 4MMs [3:4:7:11] | | chr18:+35760416 |
| TTCCTTTTATGGTCTTTCATGGG | 0.5 | 4MMs [2:7:10:11] | | chr6:-13437146 |
| TATCTTTGACCTTCTTTCATCAG | 0.5 | 4MMs [3:7:8:12] | | chrUN0:-809762 |
| TATCTTACACCTTCTTTCATTAG | 0.5 | 4MMs [3:7:8:12] | | chr9:+53586488 |
| TAACTTGCAACGTCTTTCCTCGG | 0.5 | 4MMs [3:8:10:19] | | chr8:-62006245 |

Munkamenet 1

- Cél oligonukleotid rendelése
- Vektorba ligálás
- Tisztítás, ellenőrzés



Munkamenet 2

PCR

Gélelektroforézis

Fragment-izolálás gélből

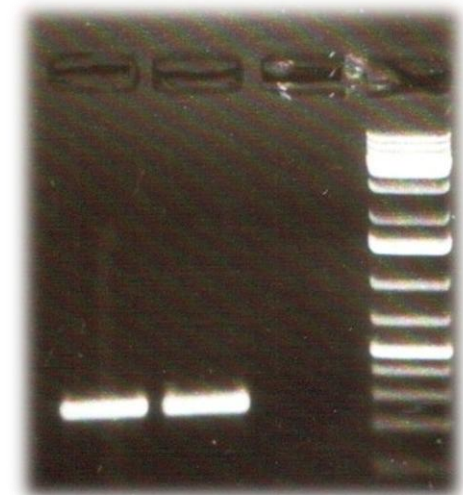
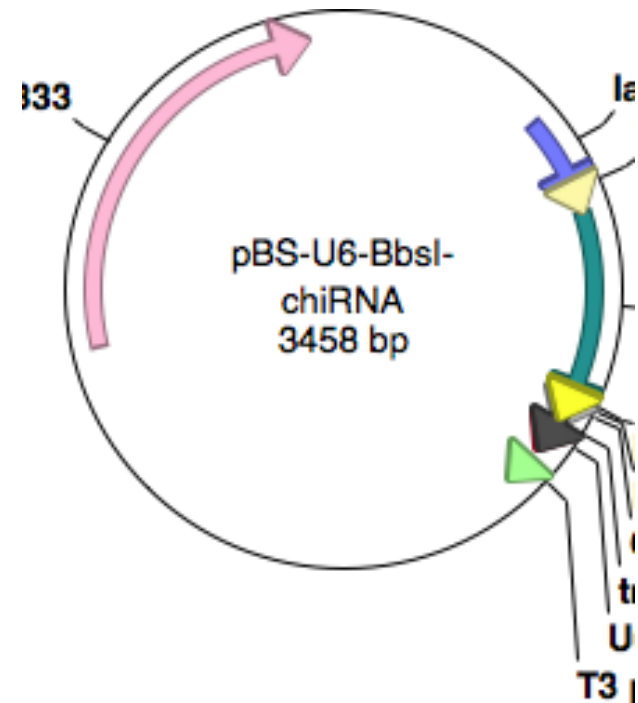
A PCR termék Prot. K és SDS kezelése

Fenol/kloroformos precipitáció

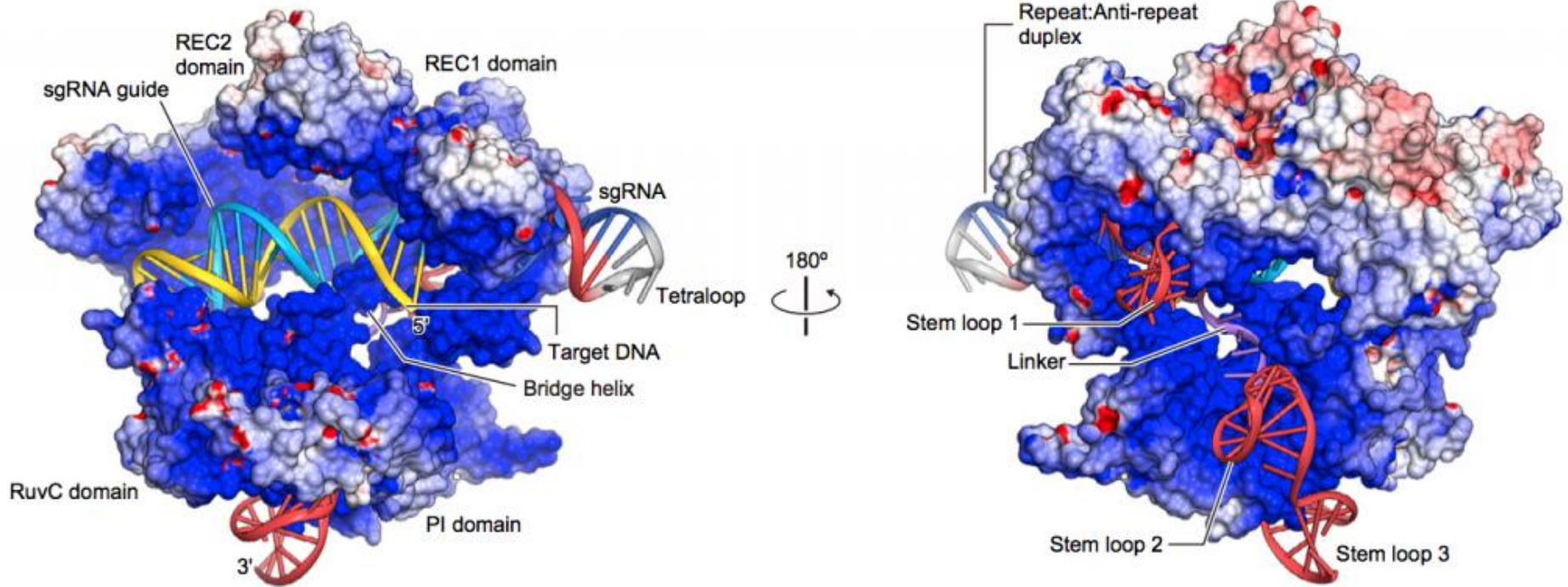
mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit *in vitro*

transzkripció

Tisztítás



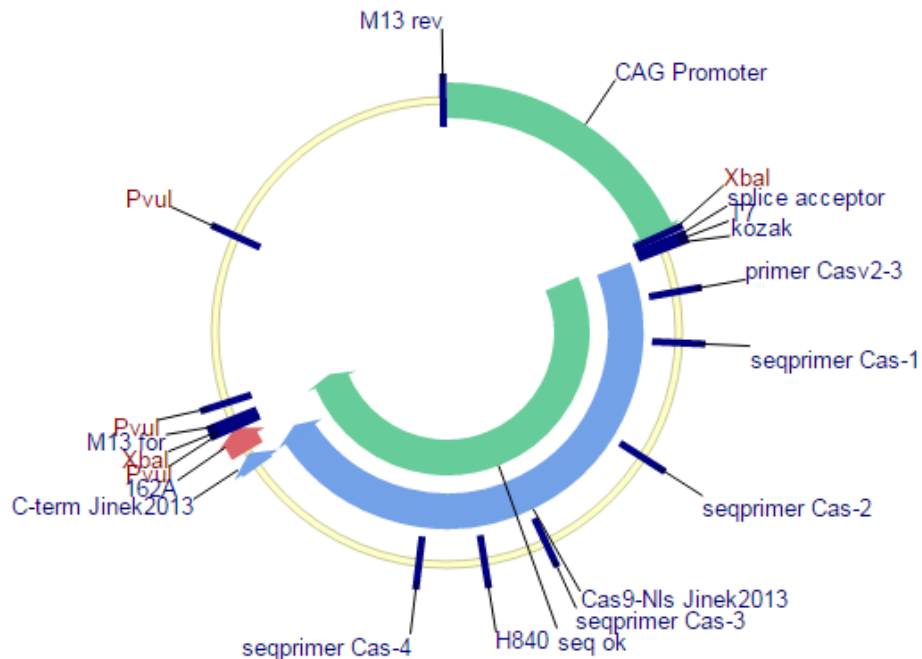
Cas9



Streptococcus pyogenes Cas9 (SpCas9)

Cas9

In vitro transzkripció, vagy meg kell venni



Cas9 mRNS

<http://www.trilinkbiotech.com/cart/scripts/prodView.asp?idproduct=7666>

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cas9mrna?lang=hu®ion=HU>

<https://www.systembio.com/genome-engineering-cas9-crispr-smartnuclease/ordering>

Cas9 fehérje

<https://www.neb.com/products/m0386-cas9-nuclease-spyogenes>

Mikroinjektálás



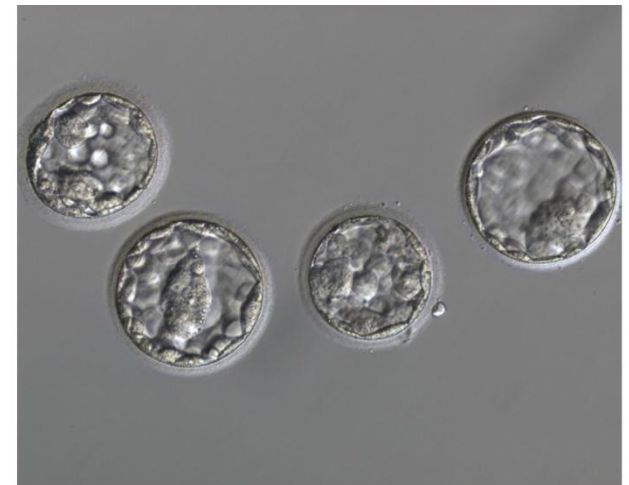
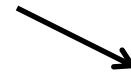
kecske



nyúl

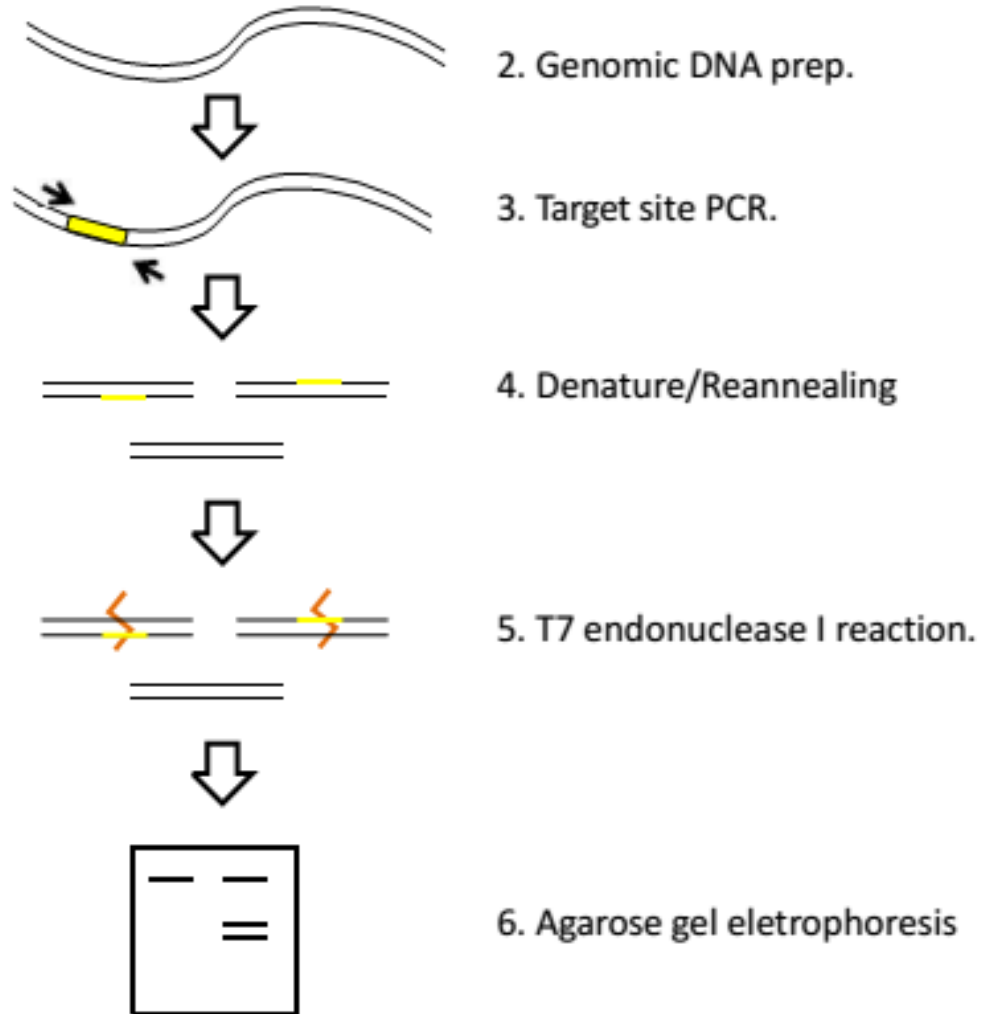


sertés

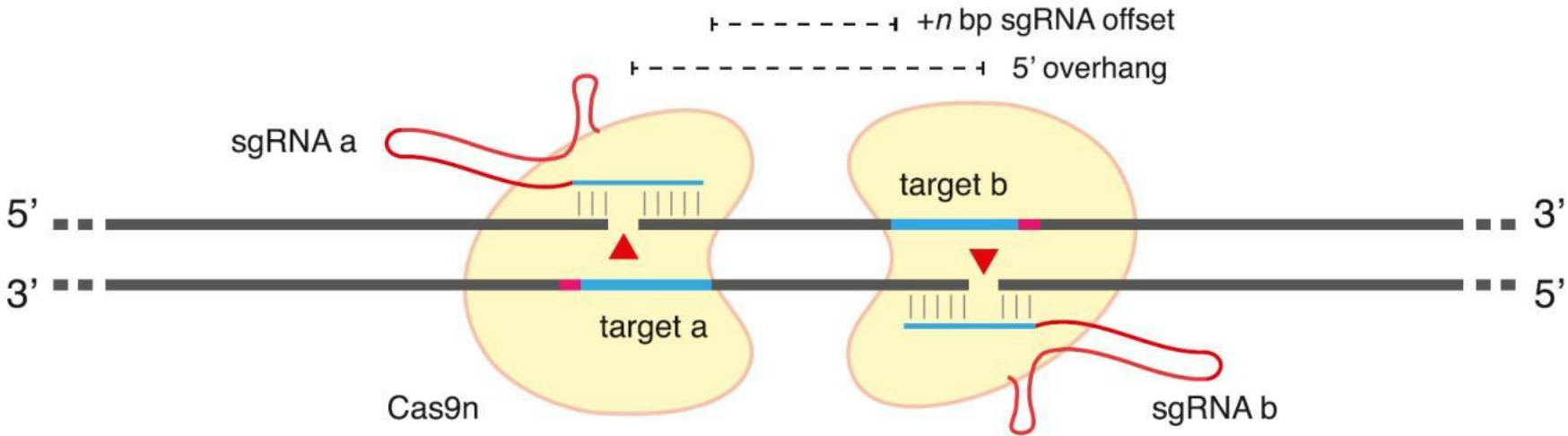
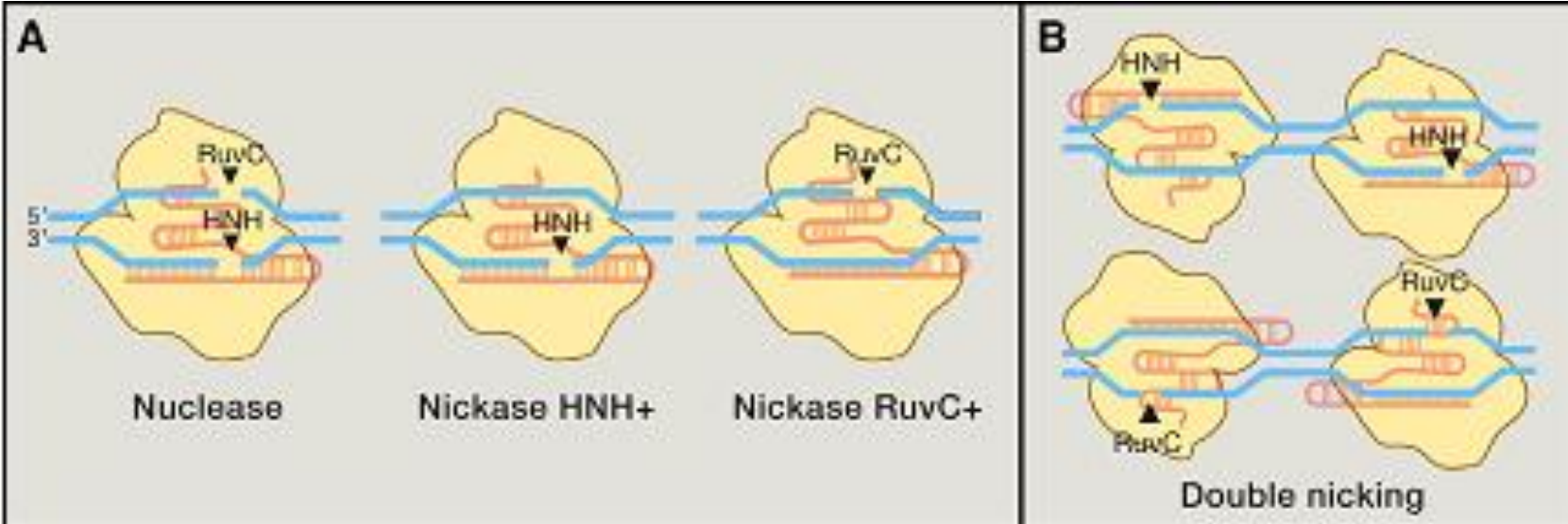


blasztociszta

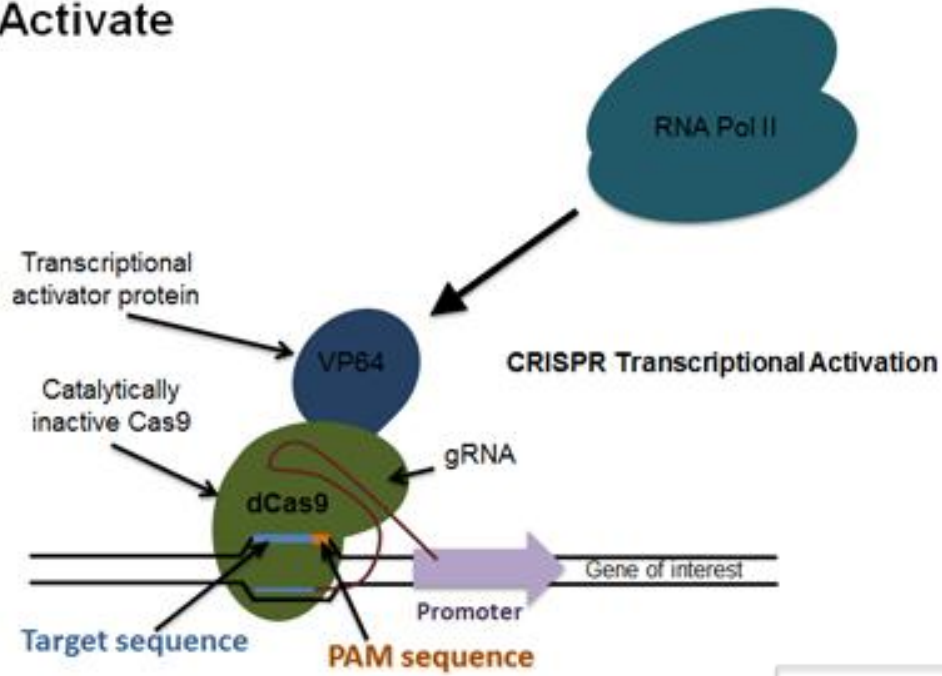
Ellenőrzés T7 endonukleáz emésztéssel



Cas9 Nickase



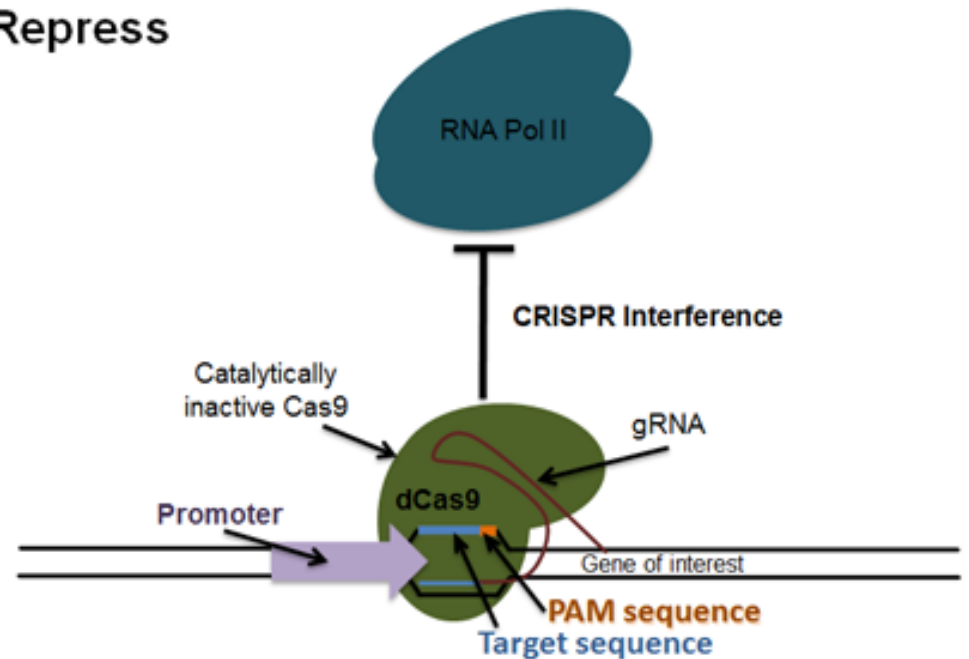
Activate



CRISPR/Cas9 rendszer, mint aktivátor

CRISPR/Cas9 rendszer, mint gátló faktor

Repress



Példák

- In vitro alkalmazás terápiás célokra

Table 3
Reported therapeutic applications of CRISPR/Cas9.

| Disease | Target gene/sequence | Study type | Cell line(s)/species | Reference(s) |
|---|--|-----------------------------------|---|---|
| Sickle cell anemia | β -globin (HBB) | <i>in vitro</i> | hiPSCs | (Song et al., 2014; Xie et al., 2014) |
| Duchenne muscular dystrophy (DMD) | Exon 45 of dystrophin gene Exon 23 of dystrophin gene | <i>in vitro</i> <i>in vivo</i> | hiPSCs <i>mdx</i> mice | (Li et al., 2014; Long et al., 2014) |
| Cystic fibrosis | CFTR | <i>in vitro</i> | SI and LI stem cells | (Schwank et al., 2013) |
| α 1-antitrypsin deficiency (A1ATD) | SERPINA1 | <i>in vitro</i> | hiPSCs | (Smith et al., 2014) |
| Polycythemia vera (PV) | JAK2 | <i>in vitro</i> | hiPSCs | (Smith et al., 2014) |
| Cataracts | Crygc | <i>in vivo</i> | Mouse | (Wu et al., 2013; Wu et al., 2015) |
| Barth syndrome | TAZ | <i>in vitro</i> | hiPSCs | (Yang et al., 2014) |
| Hereditary tyrosinemia type I (HTI) | Fah | <i>in vivo</i> | Mouse | (Yin et al., 2014b) |
| Human immunodeficiency virus (HIV-1) resistance | CCR5 | <i>in vitro</i> | hiPSCs | (Ye et al., 2014) |
| Human immunodeficiency virus (HIV-1) infection and immunization | LTR loci of integrated viral genome, T10. | <i>in vitro</i> | CHME5, HeLa-TZM-bl, U1, and J-lat T-cells | (Ebina et al., 2013; Hu et al., 2014a; Zhu et al., 2015) |
| Hepatitis B virus (HBV) | Multiple | <i>in vitro</i> <i>in vivo</i> | Huh7, HepG2, HepAD38, HepaRG Mouse | (Dong et al., 2015; Kennedy et al., 2015; Lin et al., 2014; Liu et al., 2015; Ramanan et al., 2015; Seeger and Sohn, 2014; Zhen et al., 2015) |
| Epstein-Barr virus (EBV) | Multiple | <i>in vitro</i> | Raji | (Wang and Quake, 2014) |
| Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer | E6 and E7 oncogenes | <i>in vitro</i> <i>in vivo</i> | SiHa and Caski Mouse | (Hu et al., 2014c; Yu et al., 2015; Zhen et al., 2014) |
| Osteosarcoma | CDK11 | <i>in vitro</i> | KHOS and U-20S | (Feng et al., 2014) |
| Cardiovascular disease | Pcsk9 | <i>in vivo</i> | Mouse | (Ding et al., 2014) |

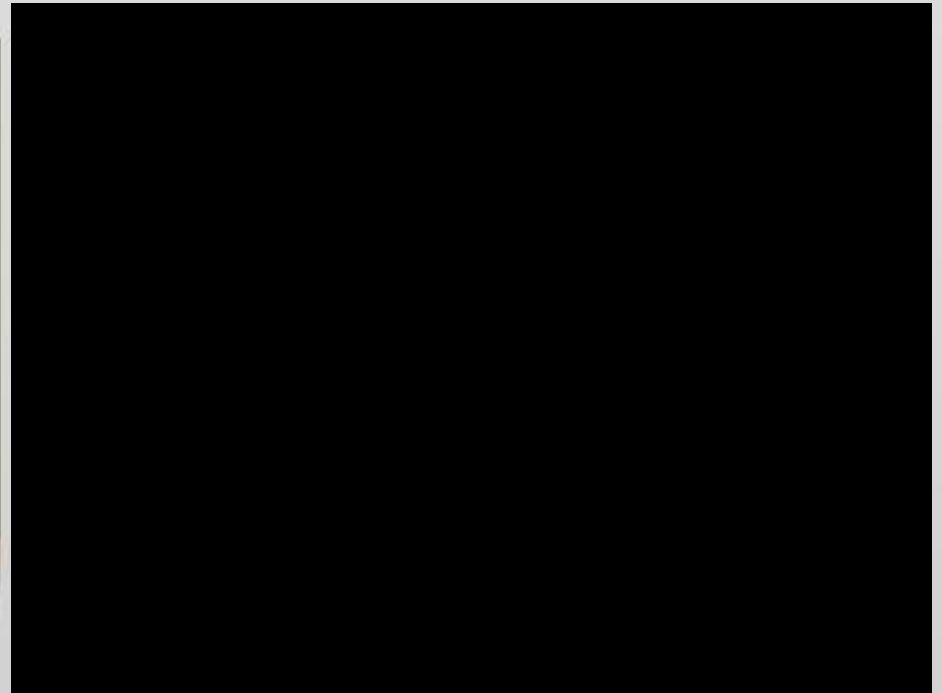
Példák

- B-sejt hiányos mutáns sertés
- IgM nehéz láncán mutáció
- Fibroblast sejteken, majd szomatikus sejtmag átültetéses technikával ötvözve 3 biallélikus mutáns utód.



Hasznosítás- alapkutatás

Rett szindróma- autizmus kutatás



MECP2 genom editált majmok az autizmus rengeteg tünetét mutatják

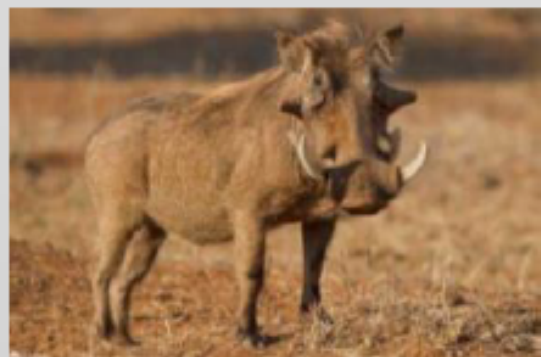
Védekezés új kórokozókkal szemben

Afrikai sertéspestis vírusa

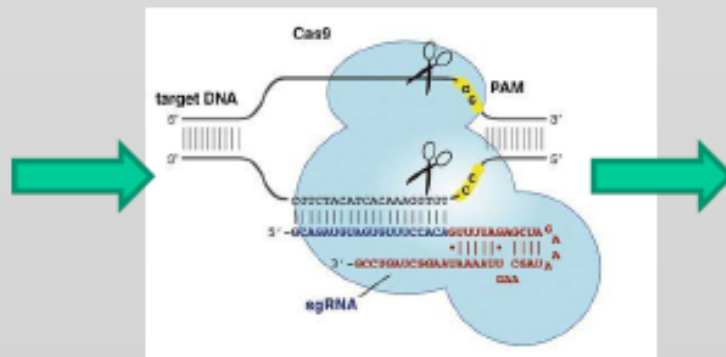
- **Áprilistól hazánkban is kimutatható**
- **Gyógyíthatatlan, karantén betegség**
- **Vakcina nincs**

Modern lehetőségek:

- **Újgenerációs rekombináns vakcinák**
(hosszú fejlesztési idő)
- **Precíziós nemesítés: genom editálás**



**Afrikai varacskos disznó-
rezisztens**



**Genom editálás:
CRISPR rendszer**



**Editált, rezisztens
házsértés**

• **Immunválaszban szerepet játszó „RELA” gén célzott mutációjával kialakítható a varacskos disznóra jellemző rezisztencia. Egyetlen mutáció nagyfokú, 5 mutáció teljes rezisztenciát eredményez. Skóciában elkészült mindkét változat. A NAIK-MBK is készen áll technológiai értelemben.**

Védekezés új kórokozókkal szemben

Afrikai sertéspestis vírusa

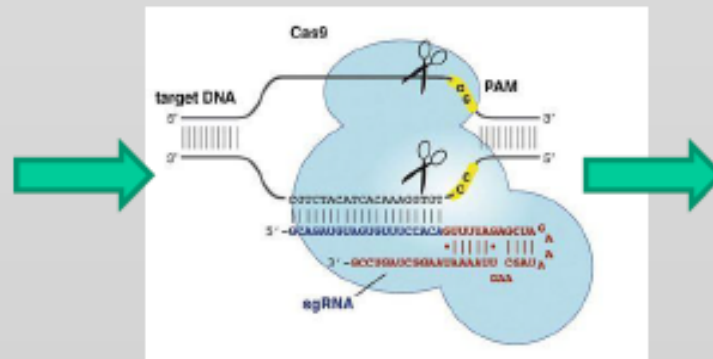
- 2018-ban valószínűleg megjelenik
- Gyógyíthatatlan, karantén betegség
- Vakcina nincs

Modern lehetőségek:

- Újgenerációs rekombináns vakcinák (hosszú fejlesztési idő)
- Precíziós nemesítés: genom editálás



**Afrikai varacskos disznó-
rezisztens**



**Genom editálás:
CRISPR rendszer**



**Editált, rezisztens
házsértés**

• Immunválaszban szerepet játszó „RELA” gén célzott mutációjával kialakítható a varacskos disznóra jellemző rezisztencia. Egyetlen mutáció nagyfokú, 5 mutáció teljes rezisztenciát eredményez. Skóciában elkészült mindkét változat. A NAIK-MBK is készen áll technológiai értelemben.

Védekezés új kórokozókkal szemben

PRRSV rezisztens sertések

- Gyógyíthatatlan, betegség
- Hatékony vakcina nincs



Fertőzött, beteg állomány



Genom editált, rezisztens állomány

A vírus egy sertés receptor molekula segítségével jut be a sejtekbe, ez a CD163. A génben létrehozott mutáció miatt az editált állatokban nincs CD163, így a vírus képtelen fertőzni. A CD163 hiányos állatok semmilyen termelési tulajdonságban nem különböznek egy normál sertéstől.

Más fajtákban meglévő kedvező tulajdonságok azonnali bevitele, a fajtajelleget megtartva



Holstein. Tülökkel rendelkezik,
veszélyt jelent.



Hagyományos megoldás.
Etikailag, orvosilag aggályos.



Angus fajta,
nem rendelkezik tülökkel.



Genom szerkesztett Holstein állatok, hasonló mutációval mint az Angus. A bikaborjú telepek 15%
-kal magasabb hasznot érhetnek el. (Mindent olcsóbb tervezni, mert az állatok nem veszélyesek.)

Tollmentes baromfi



Természetes mutáns (báziscsere)

Nagyon hasznos lenne a trópusi országokban a helyi fajtákban a mutáció kialakítása

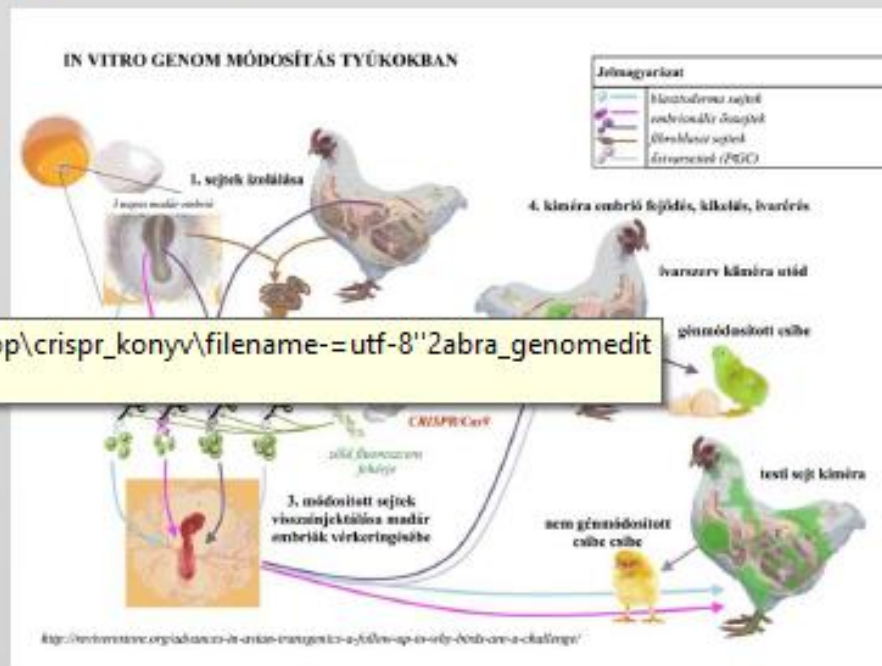
A megfelelő sejtvonal készen áll

Teljesen új, magas hozzáadott értéket képviselő fajták létrehozása speciális igényekre.

Hipoallergén tojás



C:\Users\Hiripi\Desktop\crispr_konyv\filename-=-utf-8''2abra_genomeditálás_Elen.jpg



Genom editált állatok, nem termelik az allergén ovalbumin, illetve ovomucoid fehérjéket tojásukban. Cél: olyan tojásban termelt vakcinák (influenza oltás), melyet allergiások is kaphatnak. Esetlegesen hipoallergén tojás étkezési célra.

Xenotranszplantáció- multkori előadásból

Állatból emberbe történő szervátültetés

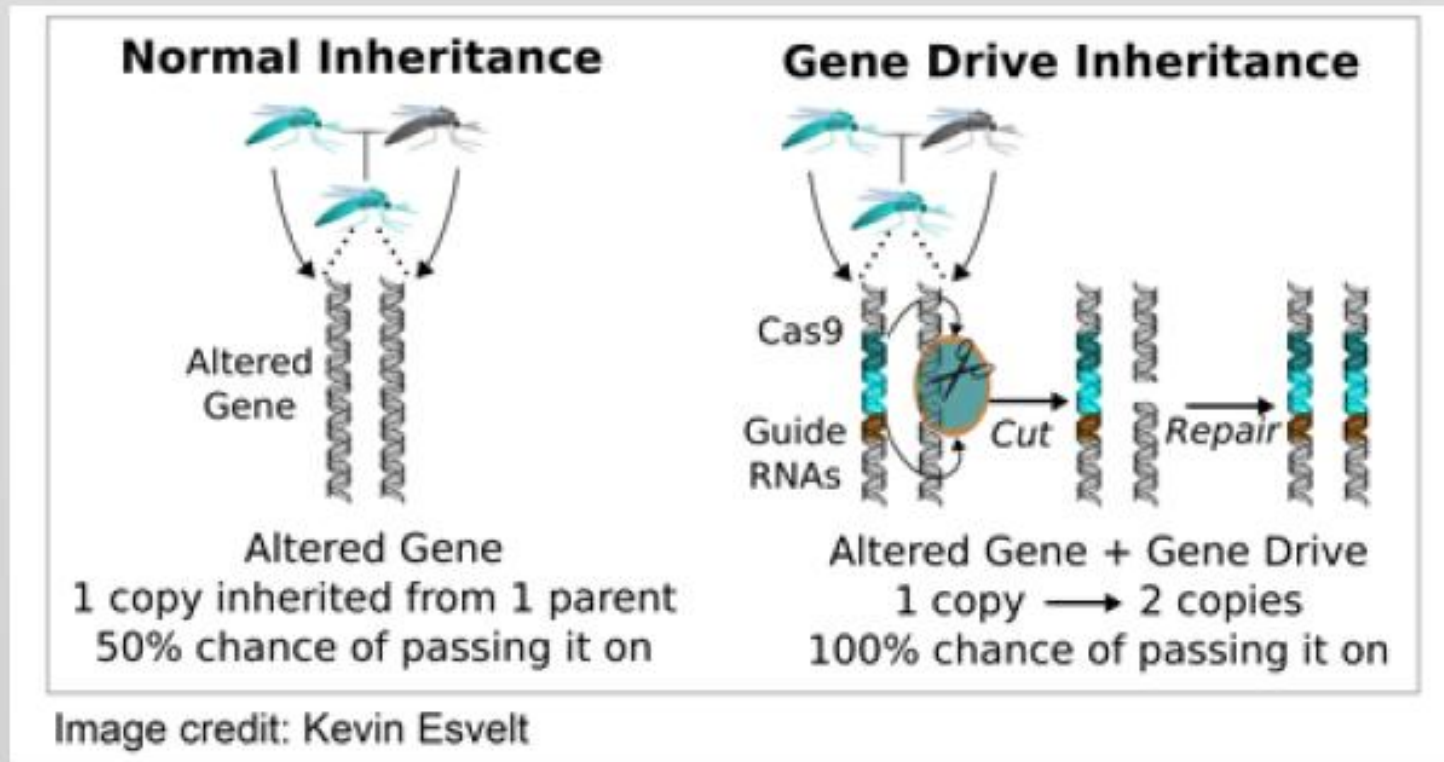
Probléma: azonnali kilökődés

A kilökődés kiváltója egy sejtfelszíni „cukor-oldallánc” mely nincs meg az emberben (Gal-alfa-1,3-Gal)



Klónozással készült KO sertések, melyek nem képesek ezt a sejtfelszíni markert szintetizálni. Gyakorlatilag alkalmasak szívatültetésre.

Gene drive- beépített CRISPR rendszer, minden utód genetikailag módosított



•Szúnyogpopulációk teljes kiirtása- ökológiai problémák?

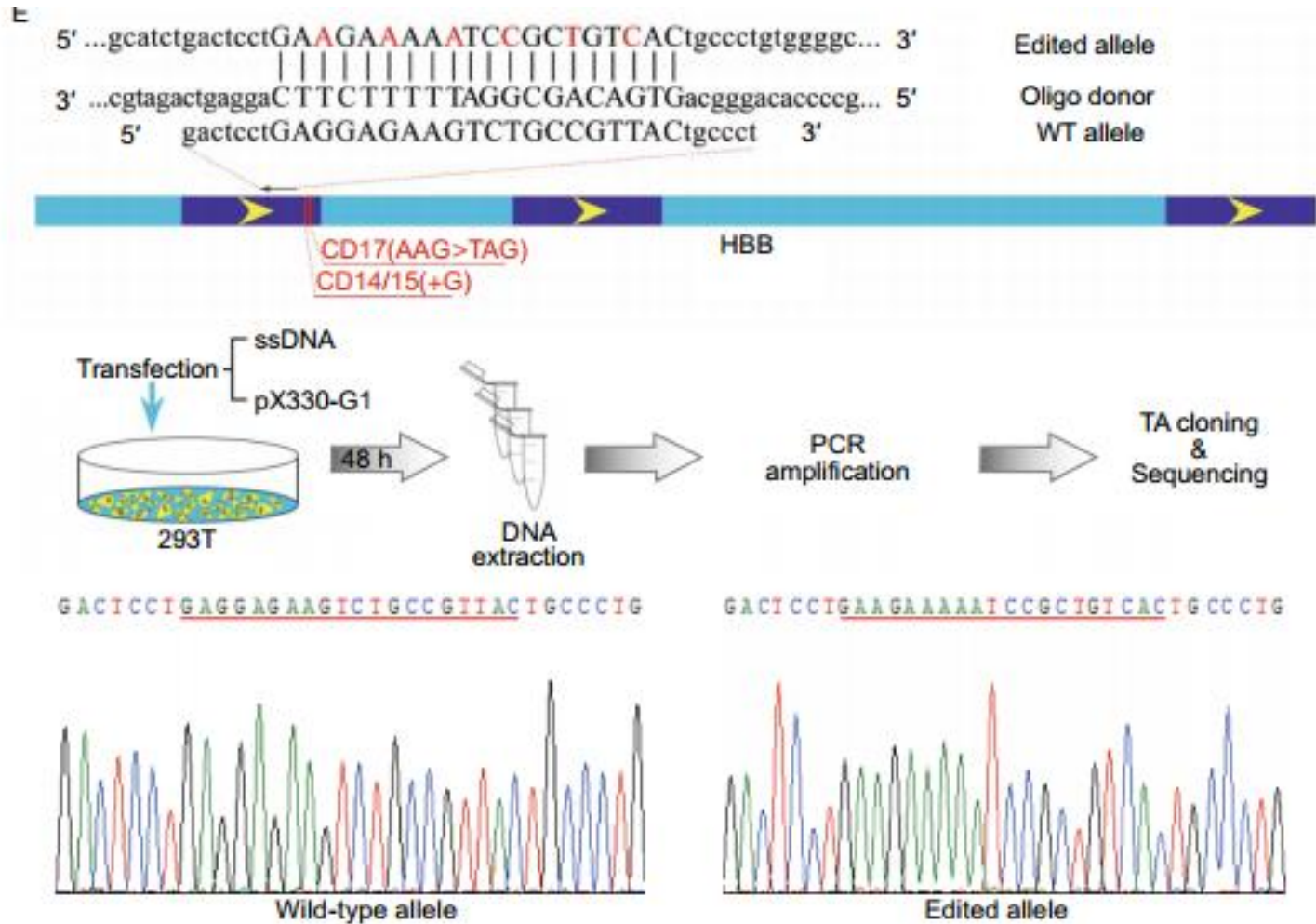
•Csak a betegséget nem adja tovább- jobb megoldás

Érdekességek: Szuper-mini sertés háziállatnak

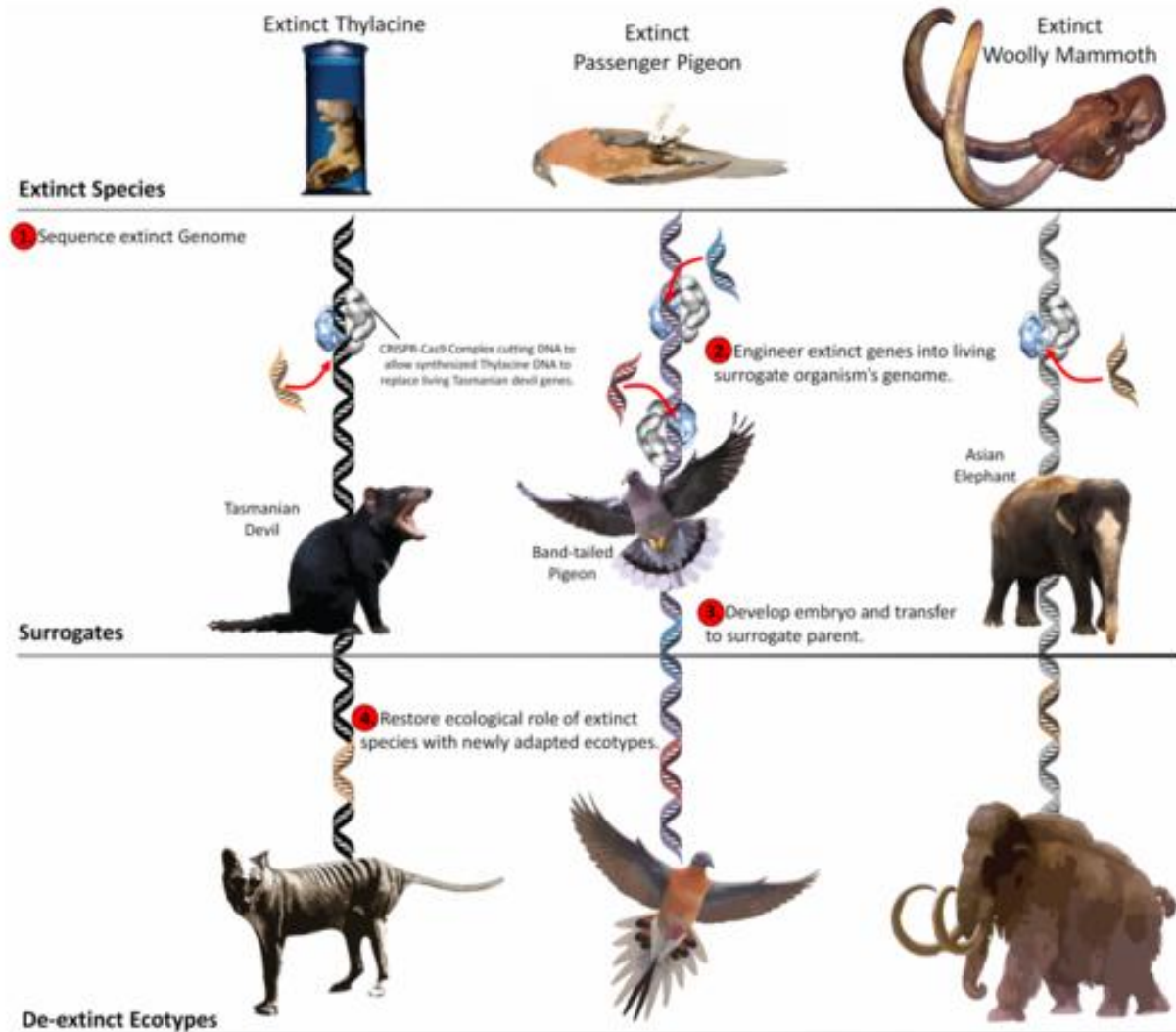


BAMA törpesertésből (35-50 kg) növekedési hormon receptor hiányos, 1600 dollár

Az első genetikailag módosított emberi embriók/B-globin gén



Érdekességek: Fajok újraélesztése CRISPR technikával



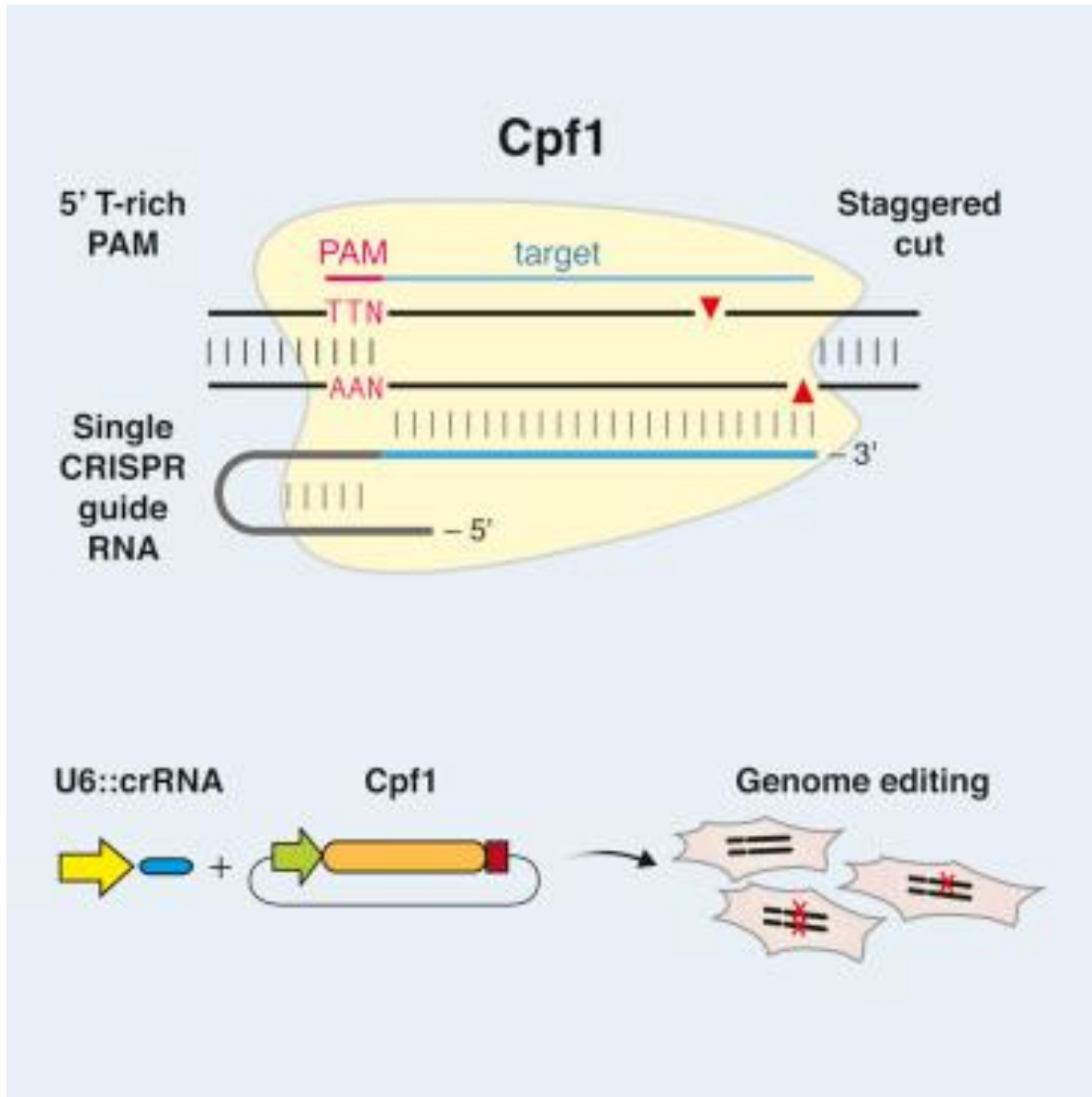
Meganucleases

- Archea, bacterial, algae origin
- Sequence recognition

The screenshot shows the Celectis website header. The logo 'celectis' is in blue lowercase letters. To the right is a search bar with the text 'Search' and a magnifying glass icon. Below the header is a navigation menu with buttons for 'Home', 'About us', 'Our Science', 'Activities', 'Investors', 'Media', 'Careers', and 'Events'. Below the navigation menu is a large banner image with a dark overlay. The text on the banner reads 'Our tools: the meganucleases' and 'Highly specific DNA scissors'. There are four numbered circular icons (1, 2, 3, 4) overlaid on the banner image.

The screenshot shows the Precision BioSciences website content. At the top right is the Precision BioSciences logo and a navigation menu with links for 'About Us', 'DNE Technology', 'Partnerships', 'News', and 'Contact'. Below the navigation menu is a large banner with a dark blue background and a yellow DNA double helix graphic. The banner contains the text 'TATTACGGAATGATCATGACAT' and 'CATGACATGGATTACGGTATAA' in white, with 'GAATGATCATGACATGGATTAT' in yellow. Below the banner are three columns of content: 'BIOTHERAPEUTICS', 'BIOTOOLS', and 'PLANTSCIENCES'. Each column contains a short paragraph of text and a 'More about' link. The 'BIOTHERAPEUTICS' column mentions 'Precision BioSciences is developing multiple DNE therapeutics targeted to enable the precise in situ correction of genes responsible for human disease.' The 'BIOTOOLS' column mentions 'Engineered DNE meganucleases are being used to engineer cell lines for disease models or optimize cell lines for the biomanufacturing of protein vaccines and therapeutics.' The 'PLANTSCIENCES' column mentions 'Custom DNE meganucleases produced by Precision BioSciences enable site-specific engineering of row crops and biofuel feedstocks.' To the right of these columns is a 'Recent News' section with two news items: '01.25.2012 Precision BioSciences Announces Allowance of Second U.S. Patent for Engineered Meganucleases' and '01.19.2012 Precision BioSciences Announces Establishment of Precision PlantSciences'. Below the news items is a 'Featured Publication' section with one item: '04.06.2010 Precision BioSciences and DuPont Detail Technology Efficacy in The Plant Journal'.

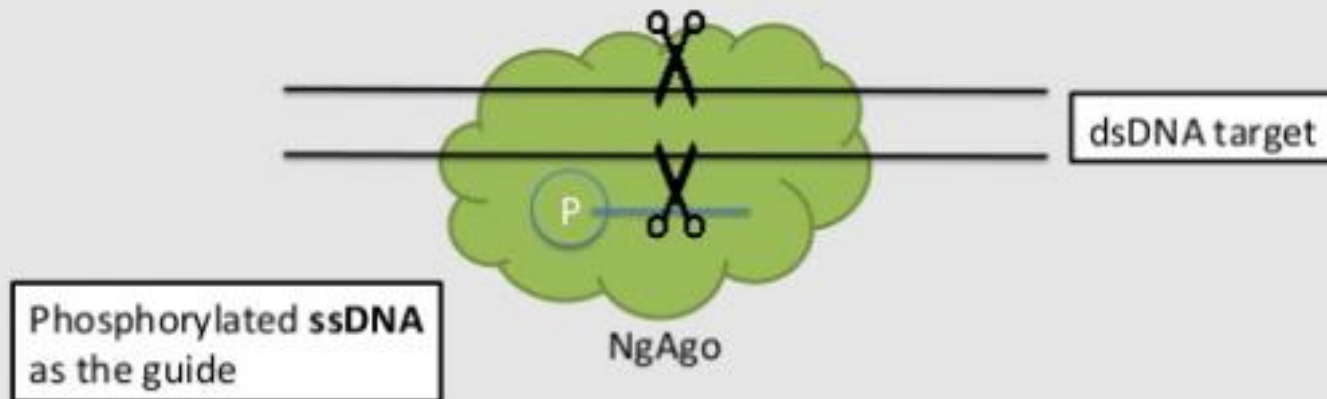
Új Crispr rendszer: Single RNS alapú Cpf1 rendszer



Van ami mégsem működik?

NgAgo

Argonaute from *Natronobacterium gregoryi*



(Gao et al., *Nature Biotech.* 2016)

Mit csinálhatunk a nukleázokkal

- Olcsón, gyorsan lehet bármilyen fajban TG állatot készíteni**
- Célzott módon (génkiütés)**
- Génbevitel is (donorplazmával) vagy akár csak egy oligonukleotiddal**
- Allélcseré (akár 1 nukleotid cseré is)**

Szabályozzuk, vagy ne?



- **Szabályozzuk**
- **Nem szabad a technológiát szabályozni**
- **A szabályozást a célok meghatározásánál érdemes elvégezni**
- **Előnyök/hátrányok teljes és átlátható feltérképezése**
- **Az egész társadalomnak kell elvégezni a döntést**

GMO vs. genomszerkesztés a magyar közvélemény szemében

GMO



● nem ● inkább nem ● nem tudja ● inkább igen ● igen

Ezt már tényleg meg lehet csinálni!!!

