

Genomszerkesztés: Zn-finger nukleázok, Talen, CRISPR-Cas9 rendszerek



Hiripi László
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

A hagyományos tenyésztési, termelési eljárásokkal évezredek óta szerkesztjük a növényi és állati genomokat

A görögdinnye őse



Feltörése: kés, kalapács

Gyümölcs méret: 5cm

Íz: extrém keserű

Hatás: gyulladást indukál

A modern görögdinnye



Feltörése: könnyedén

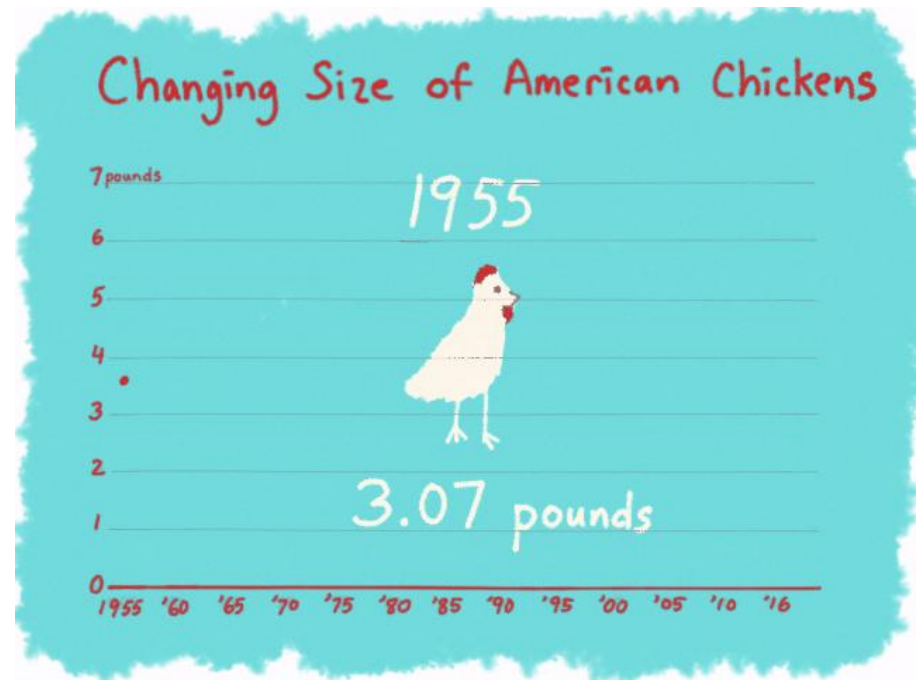
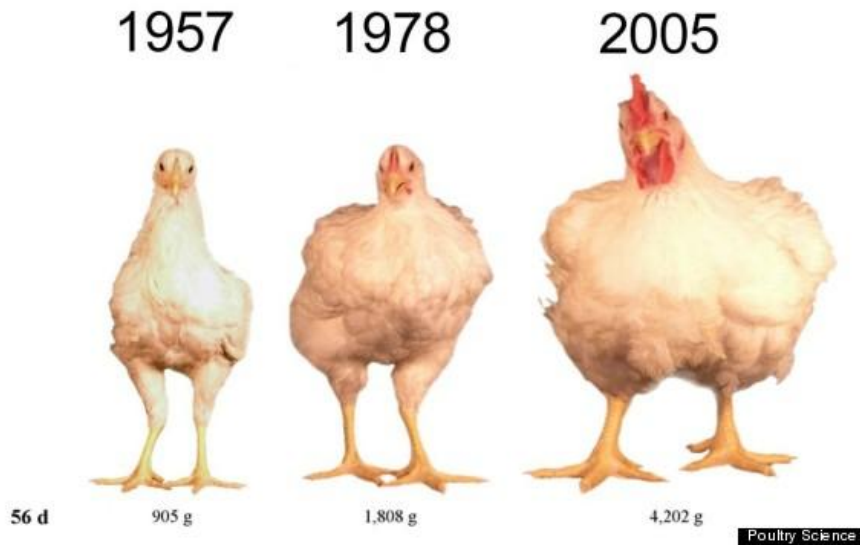
Gyümölcs méret: akár 20 kg

Íz: édes

Hatás: gyulladás csökkentő

A két növény genetikailag már nem is hasonlít. Hosszú munkával a megfelelő mutációk hosszú sorozata, és tudatos tenyésztése eredményezte a modern dinnye több ezer változatát.

Gyakorlatilag minden élelmiszerünk mögött genetikai módosítások sora rejtőzik



Egy tulajdonság tudatos fejlesztése rövid idő alatt is komoly megváltozott genetikai állományt eredményez.

A mutációk mesterségesen is előidézhetők, a mutációs nemesítés elfogadott, és sikeres.



Creso, az egyik legjobb durumbúza

Úgy hozunk létre mutációt, hogy fogalmunk sincs arról, pontosan hol és mit okozunk a genetikai állományban (általában nagyon durva mutációkat). A módszert mégis elfogadja a társadalom, és nem követeli a fajták különleges hosszú távú tesztelését, és a környezeti, ökológiai hatások teljes feltérképezését.



Kobalt ágyú, gamma sugárforrás

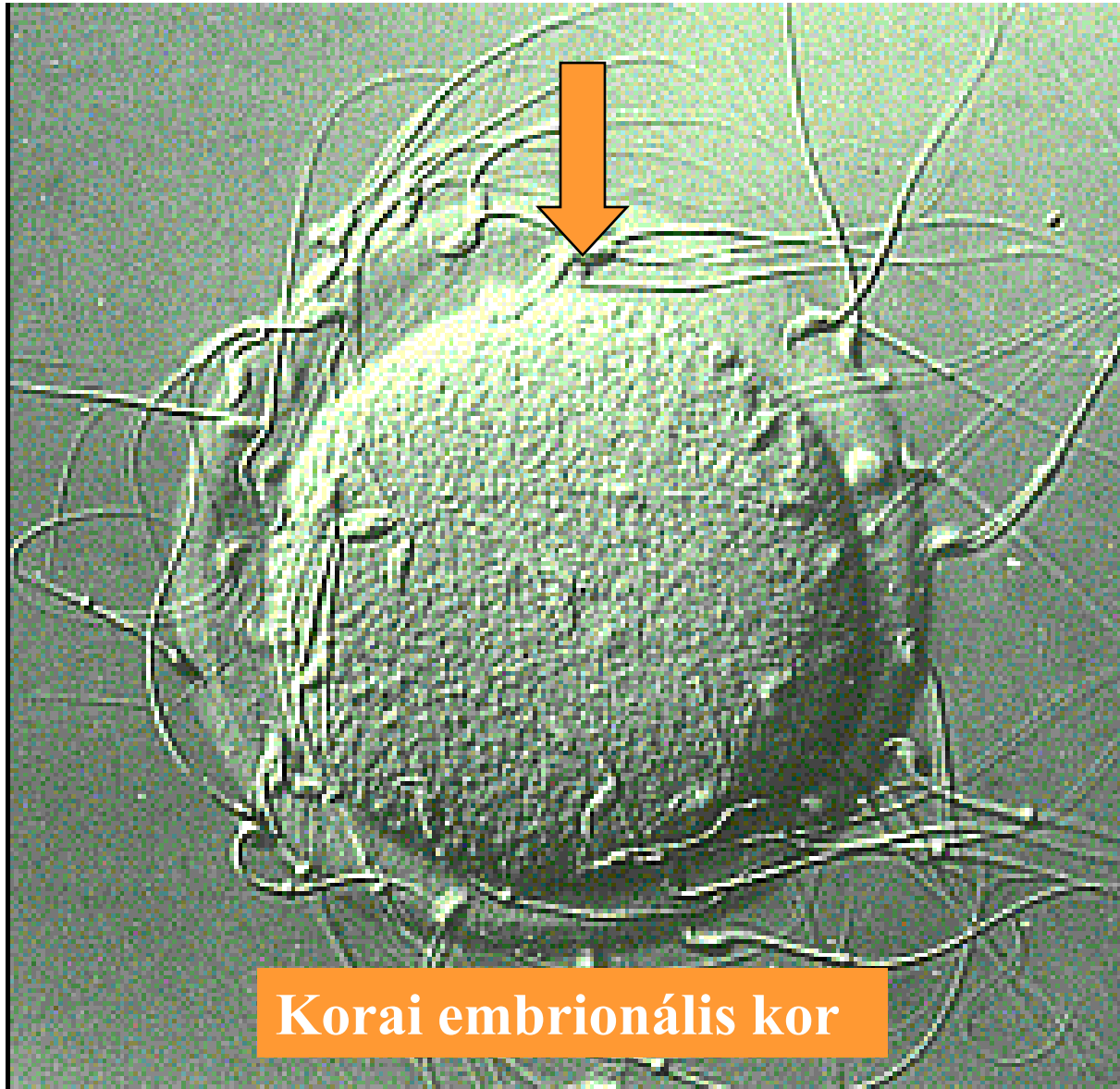


Kinnow, mag nélküli mandarin



Golden promise, kiváló árpa

Cél: olyan gyors módszerek fejlesztése ahol tudatosan, célzottan változtatjuk meg a genom szerkezetét.



Korai embrionális kor

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



Össejtes transzgenezis

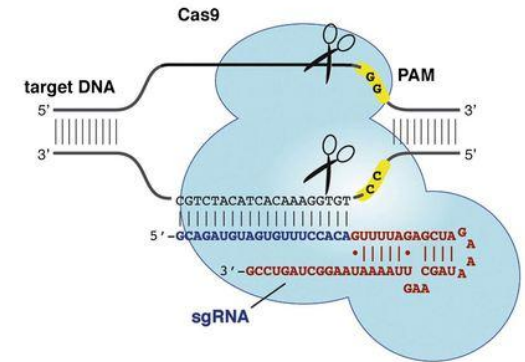
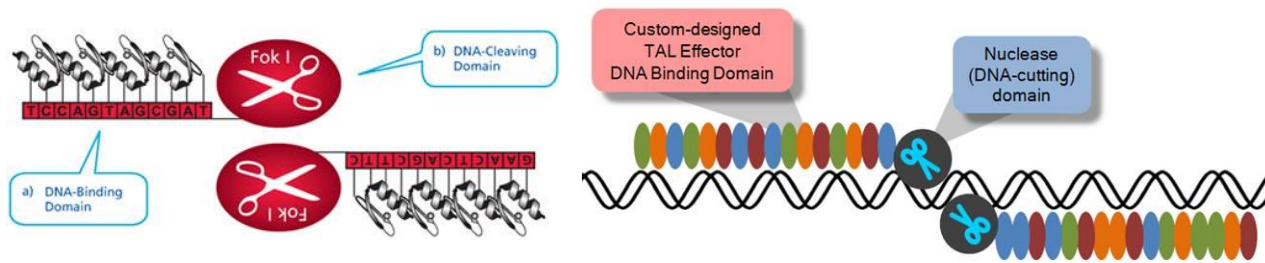
Csak egérben működik
Bonyolult
Drága
Gyenge hatékonyság



Klónozás

Sok fajban működik
Bonyolult
Drága
Bizonyos szempontból gyenge hatékonyság
Rengeteg mellékhatás

A megoldás a genom editálás



- Mesterséges rendszerek, mely természetes rendszereken alapulnak



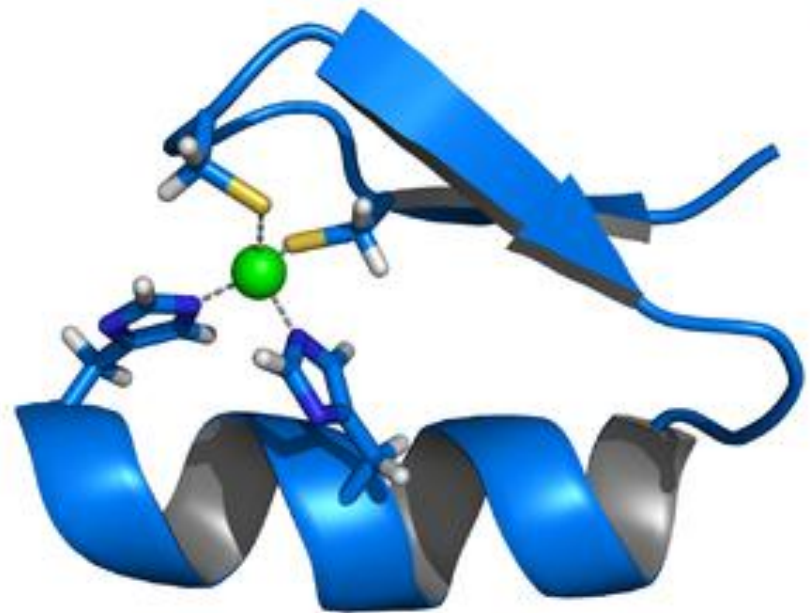
Specifikus molekuláris ollók

Segítségükkel pontosan, előre tervezetten lehet mutációkat kialakítani a DNS-ben, azaz az örökítő anyagban!!!

Genom editálás: 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



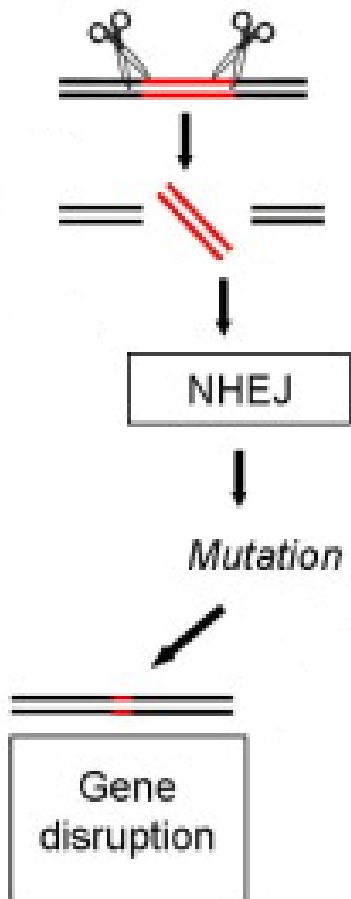
- DNS felismerő domén
- Nem specifikus hasító domén

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

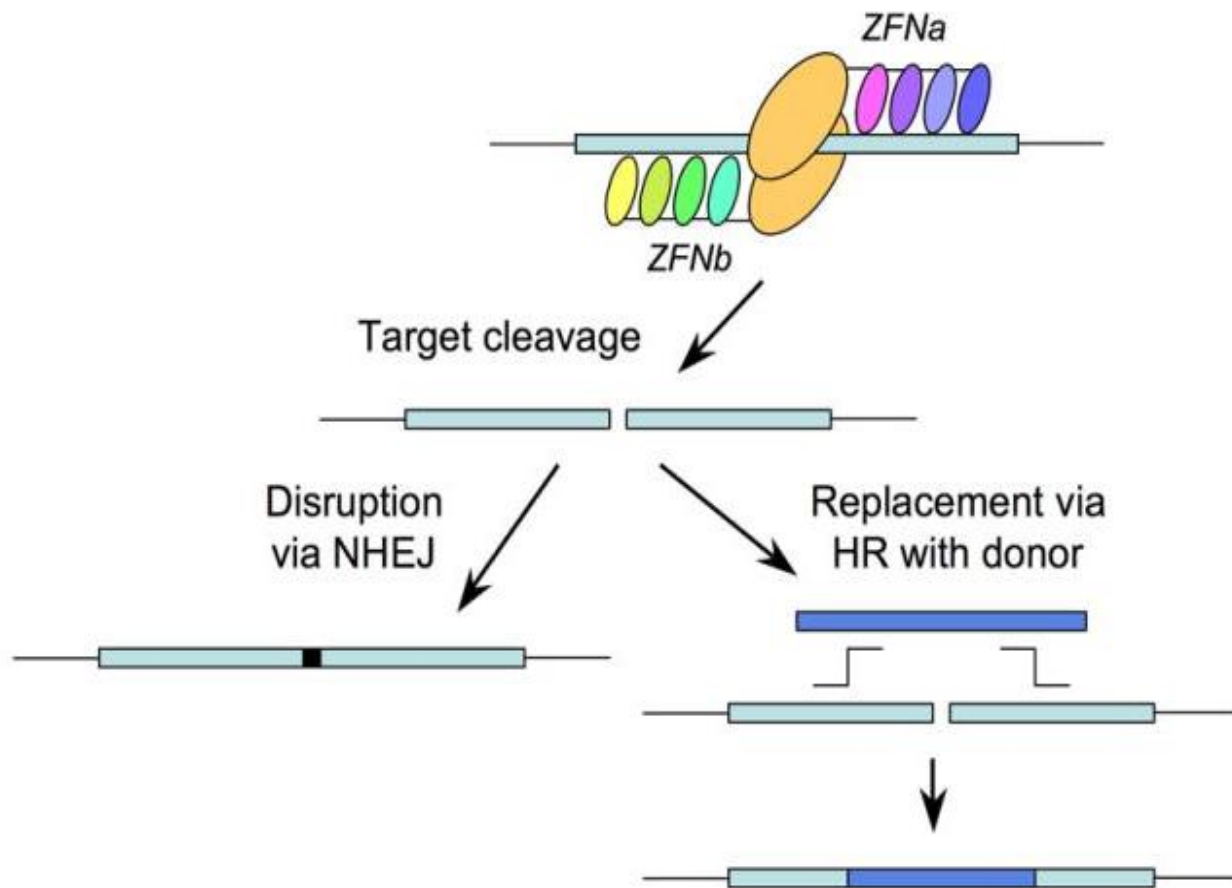
**A legtöbb sejtben működik. Ha nem akkor kombinálható
adenovírus, vagy lentivírus rendszerekkel.**

Génkiütés: Állatok



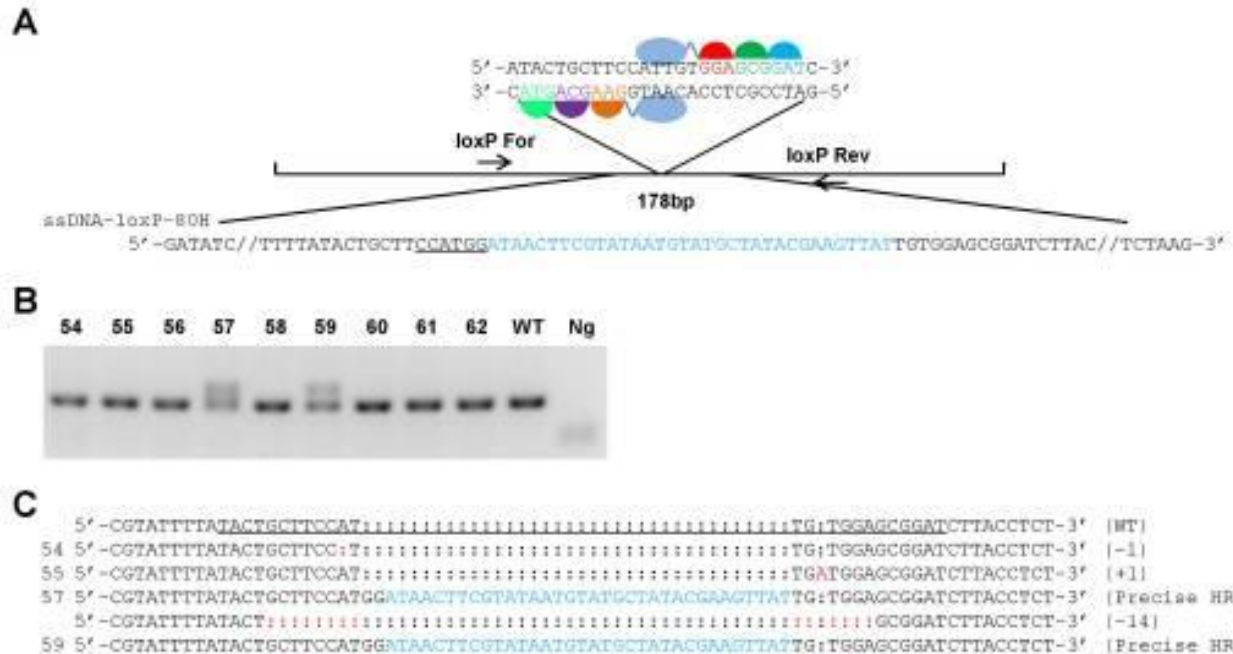
Arabidopsis, dohány, szója, kukorica, drosophila, C.elegans, tengeri sünn, selyemhernyó, zebradánió, Xenopus, egér, patkány, nyúl, sertés, szarvasmarha, ahol eddig kipróbálták, működött

Génbeütés, illetve géncsere



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

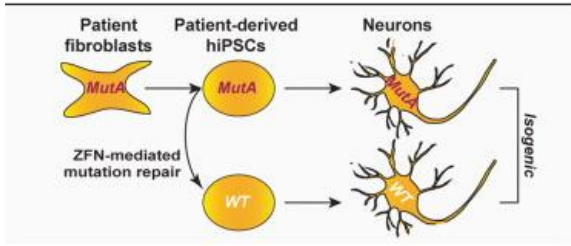
Célzott mutációval transzgénikus egér, mely lox-P helyeket hordoz



Másik példa: szarvasmarha génbeütés (lysostaphin) casein lokuszra

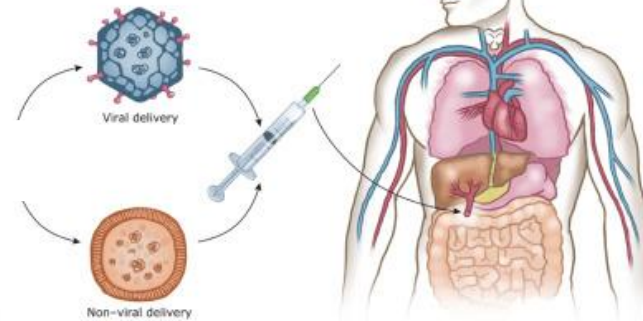


Példa knock-in használatra emberi sejtekben

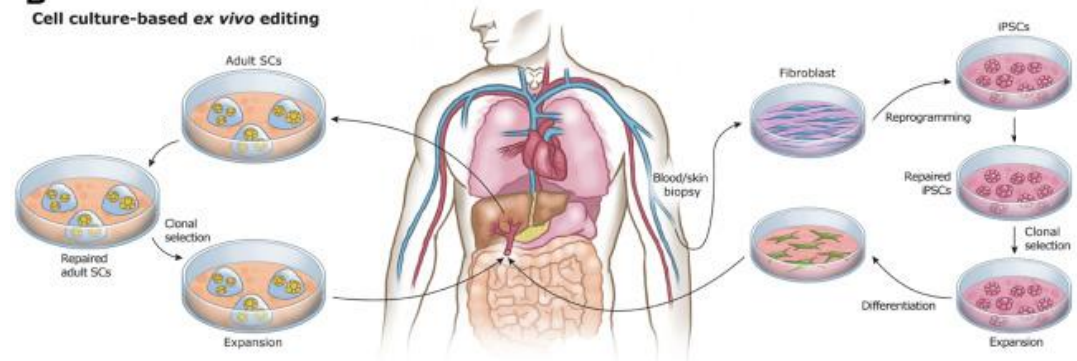


Parkinson kórban szerepet játszó két mutáció

A Direct delivery-based *in vivo* editing

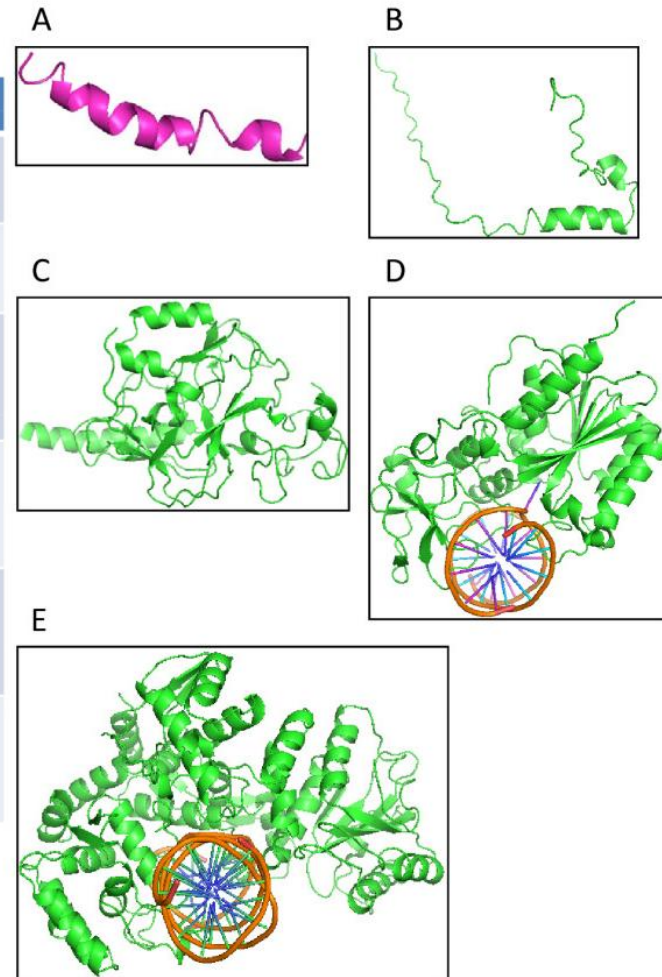


B Cell culture-based *ex vivo* editing



Nemcsak vágás, de transzkripció aktiválás, receptorfüggő aktivitás, represszálás, 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.SssI) ^d	Transcriptional repressor	38, 39
DNA endonucleases (Fok1) ^e	DNA cleavage	43-48

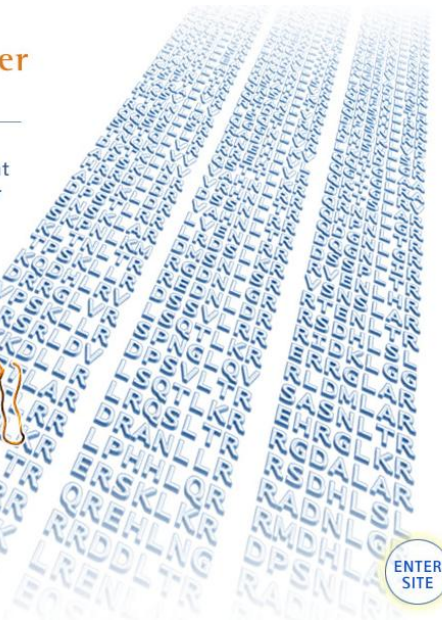
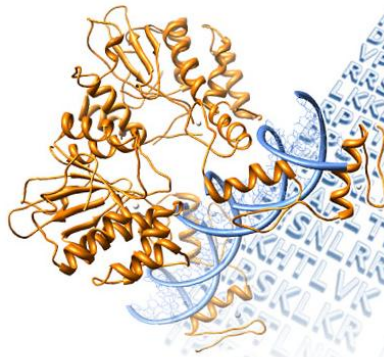


Honnan szerezhető be?



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

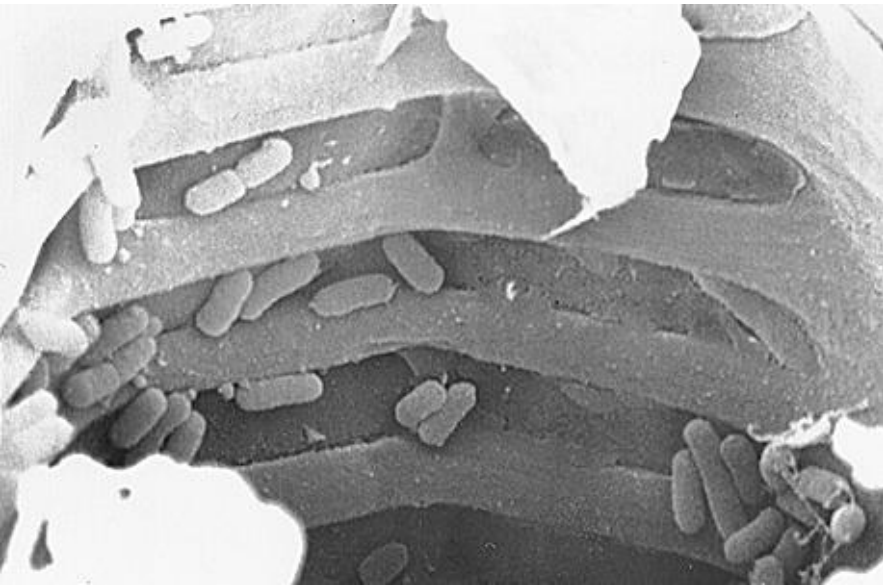
Hátrányok



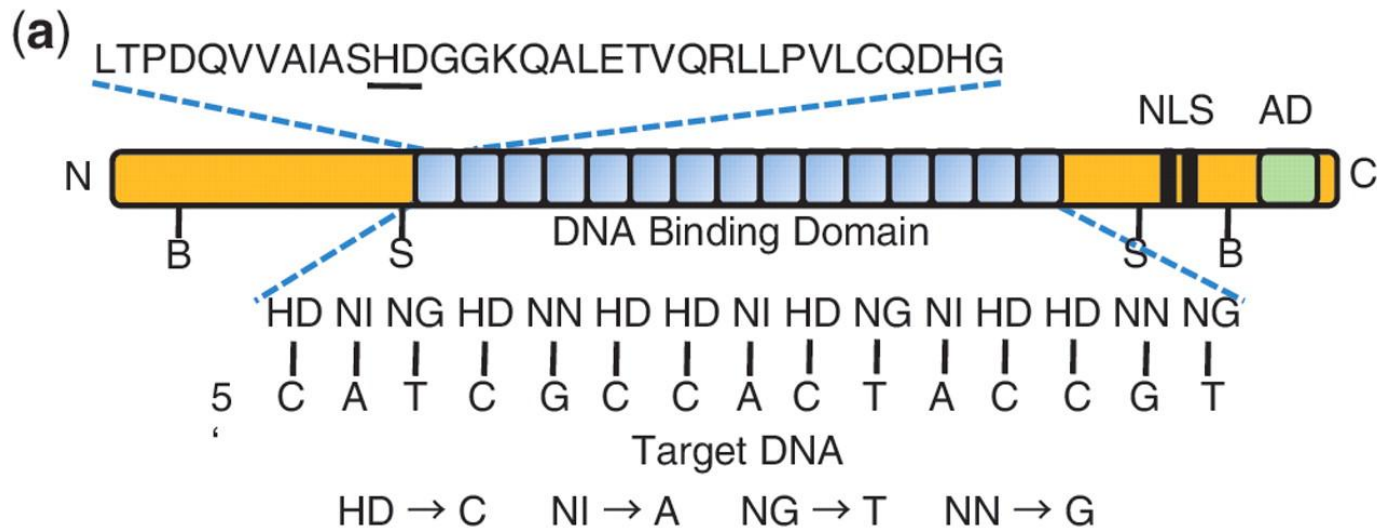
- **Nagyon erős protein mérnökség háttér kell**
- **Drága**
- **Szellemi tulajdon problémák (növényeseknél)**
- **Toxicitás**
- **Offtarget hatás**

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



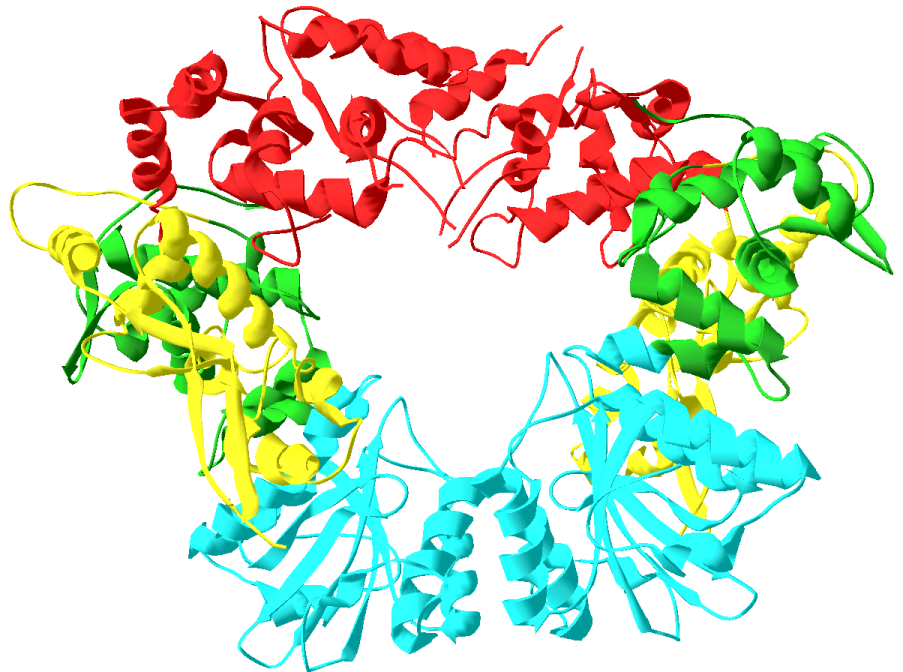
TAL effector DNS kötő domén felhasználása

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

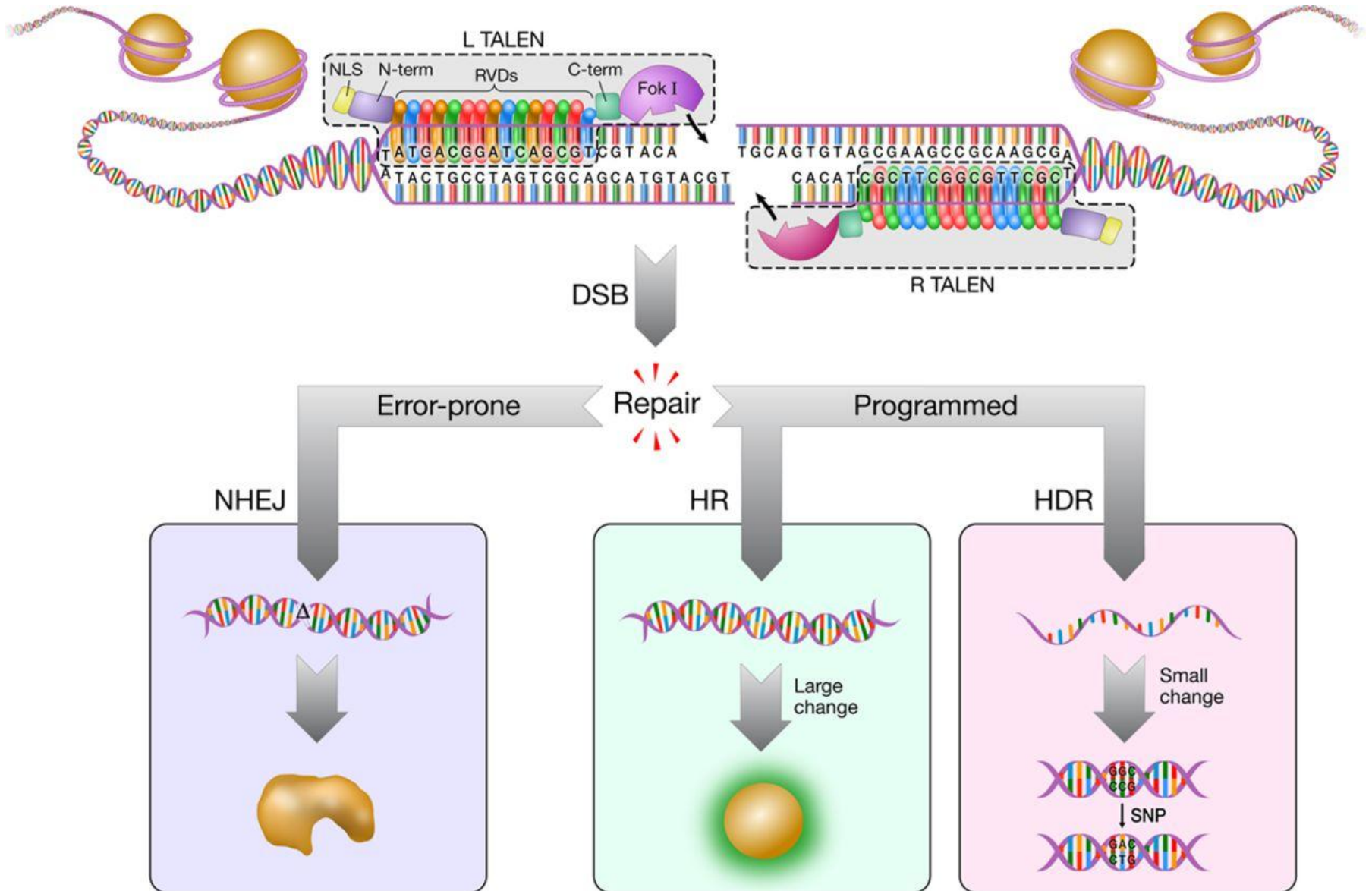
DNS kötő doménnel rendelkeznek, mely egy adott helyen hipervariábilis de pontosan lehet tudni, hogy mely aminosavcserek kellenek a megfelelő bázisok felismeréséhez

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)

TALEN 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



[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](#).

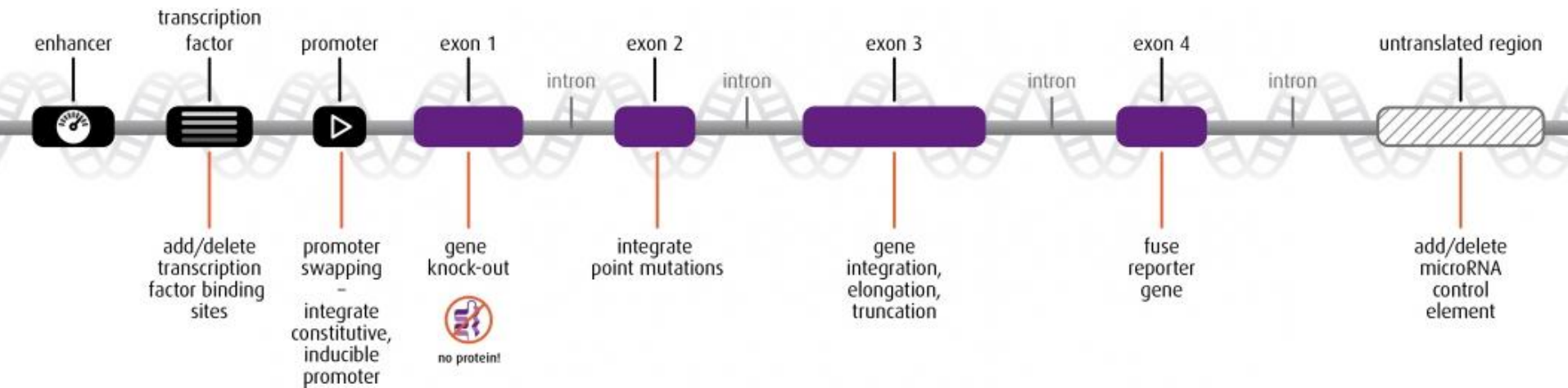
> [TALEN® Services](#)

- **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

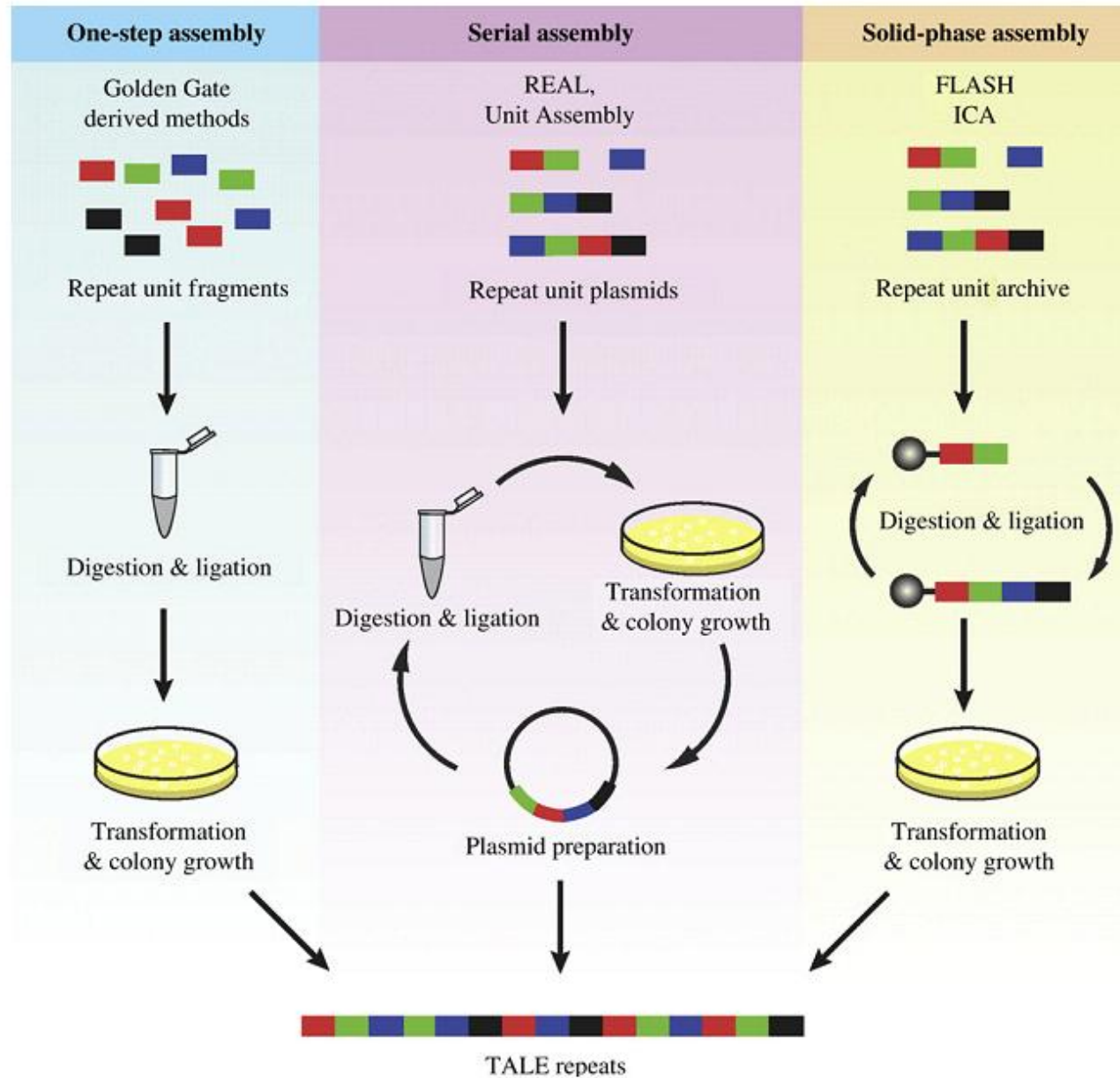
Tips for choosing TALENs/TAL effectors

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

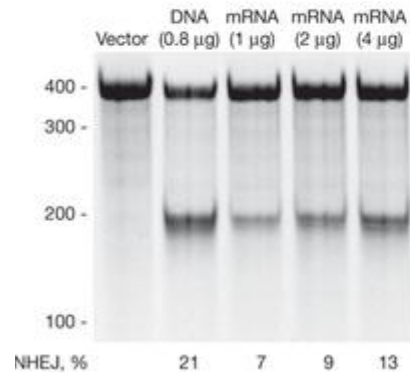
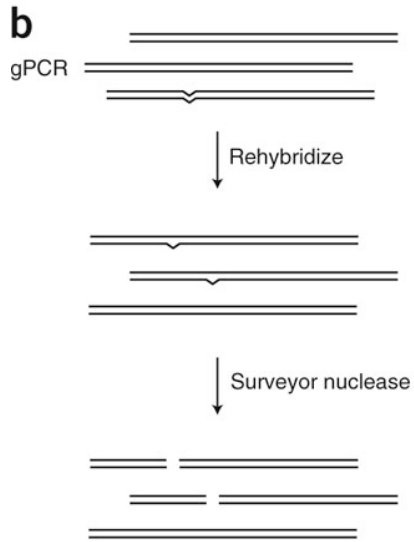
1. Talen és a FokI restriktációs domén összerakása
2. Target konstrukció: patkány IgM génre



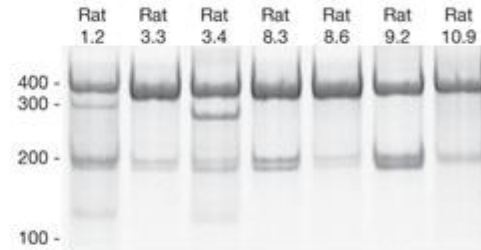
3. Injektálás patkány korai embriókba DNS formában



Eredmény ellenőrzése T7 nukleázzal



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%)

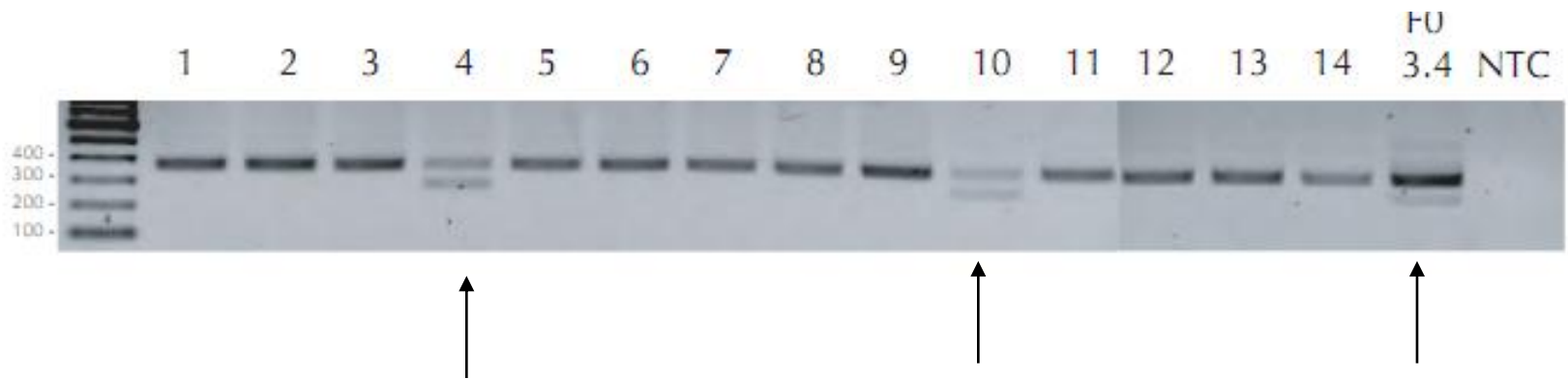
mRNA	4	18.1	mosaic	
mRNA	4	18.2	w.t., Δ5	TTCTTGCCAGCTCCATTTCTT:::GGA ACT ACCAGAACAACACTGAA
mRNA	4	18.4	Δ2, Δ7	TTCTTGCCAGCTCCATTTCTT::CCTGGA ACT ACCAGAACAACACTGAA TTCTTGCCAGCTCCATTTCT:::GGA ACT ACCAGAACAACACTGAA
mRNA	4	18.6	mosaic	
mRNA	4	19.1	Δ1, Δ1	TTCTTGCCAGCTCCATTTCTTCTC: TGGA ACT ACCAGAACAACACTGAA 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	TTCTTGCCAGCTCCATTTCTT: TCTCTGGA ACT ACCAGAACAACACTGAA TTCTTGCCAGCTCCATTTCTT:::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				TTCTTGCCAGCTCCATTTCTTCTCTGGA ACT ACCAGAACAACACTGAA

1-154 hosszú deléciók

Mozaikos egyedek is

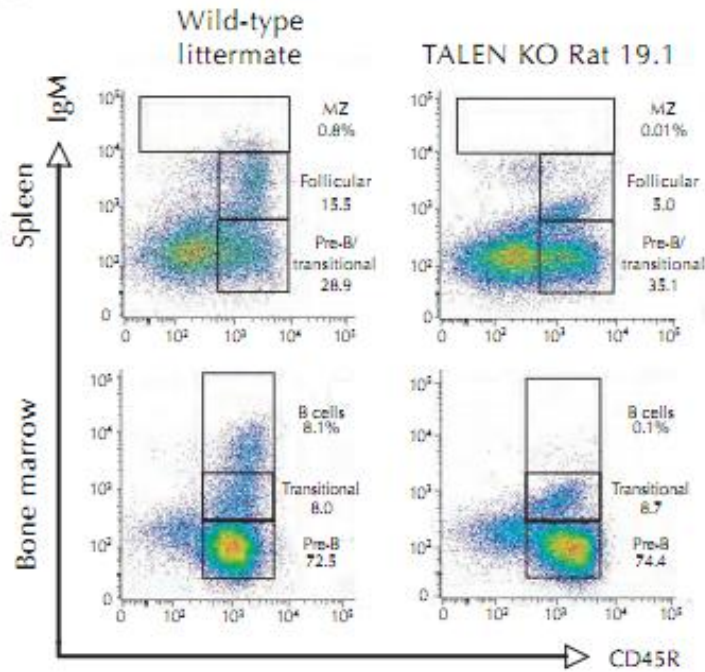
Dupla KO egyedek is

Az állatok örökítik a módosítást

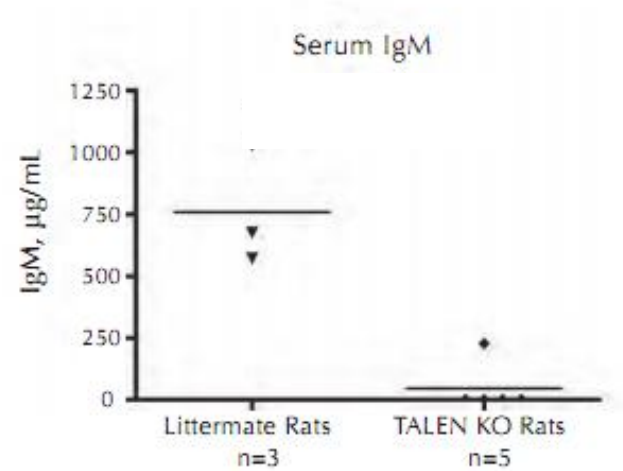


Funkcionális vizsgálatok

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.

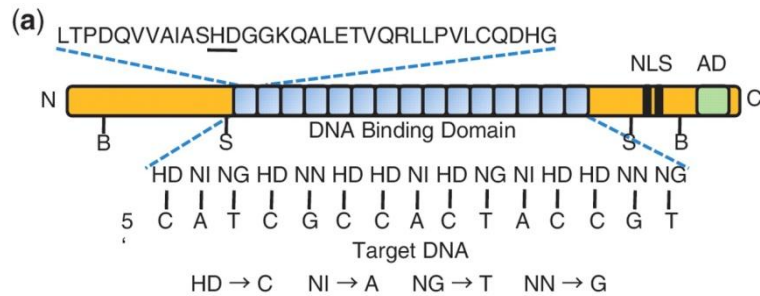
Target genes	Genotype	Founder mutants knockout (%)	Founder mutants knockin (%)
<i>Pibf1, Sepw1</i>	C57BL/6	56–77	n.a.
<i>Rab38</i>	C57BL/6 × FVB	6	2
<i>Zic2</i>	CD1, C3H, C57BL/6	10–46	n.a.
<i>Lepr</i> & nine others	FVB/N, C57BL/6	13–67	n.a.
<i>Fus, C9orf72</i>	(C57BL/6 × BS) × FVB/N	41	6.8
<i>Fats</i>	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 (55.6)	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 (52.8)	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

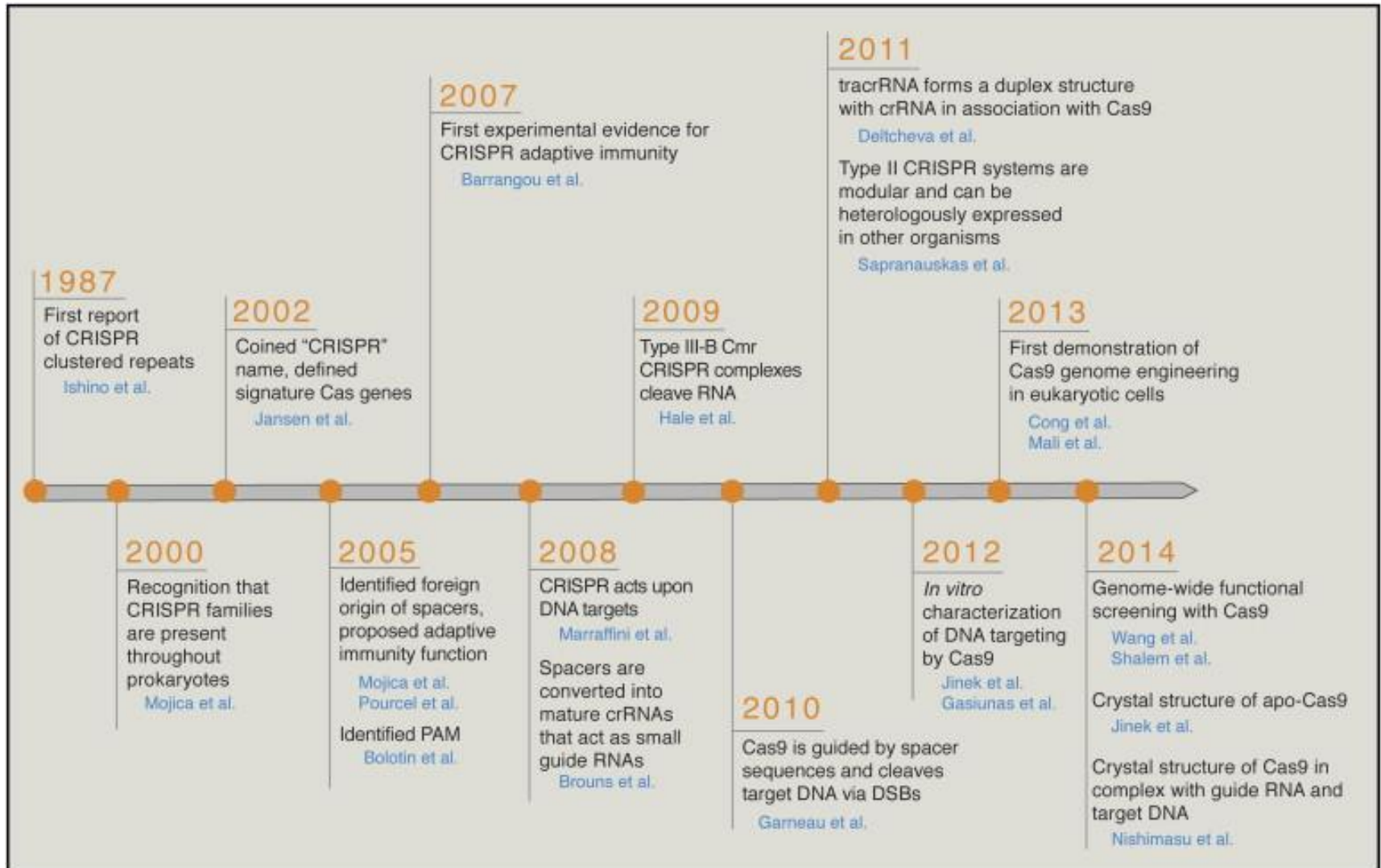
- Jó sok klónozás



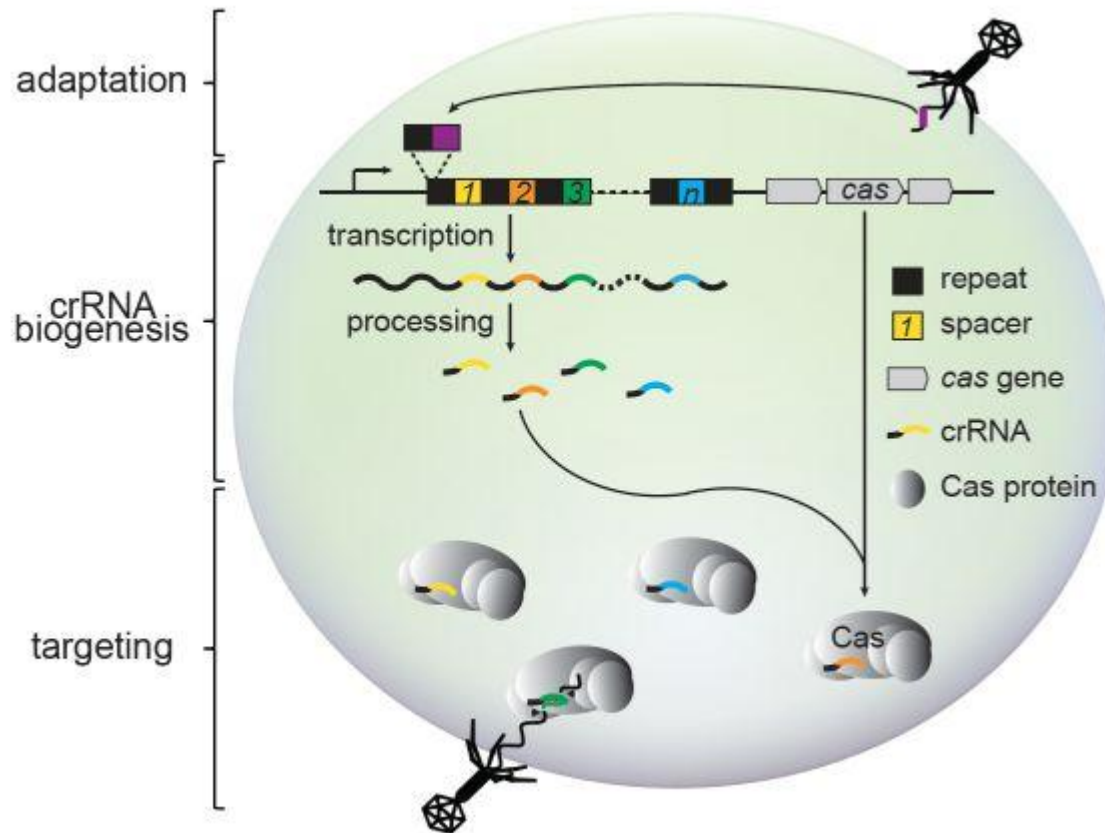
CRISPR/Cas9

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CRISPR/Cas9 rendszer



CRISPR/Cas9 rendszer



Baktériumok immunrendszere, behatóló fágok és plazmidok ellen

CRISPR/Cas9 rendszer

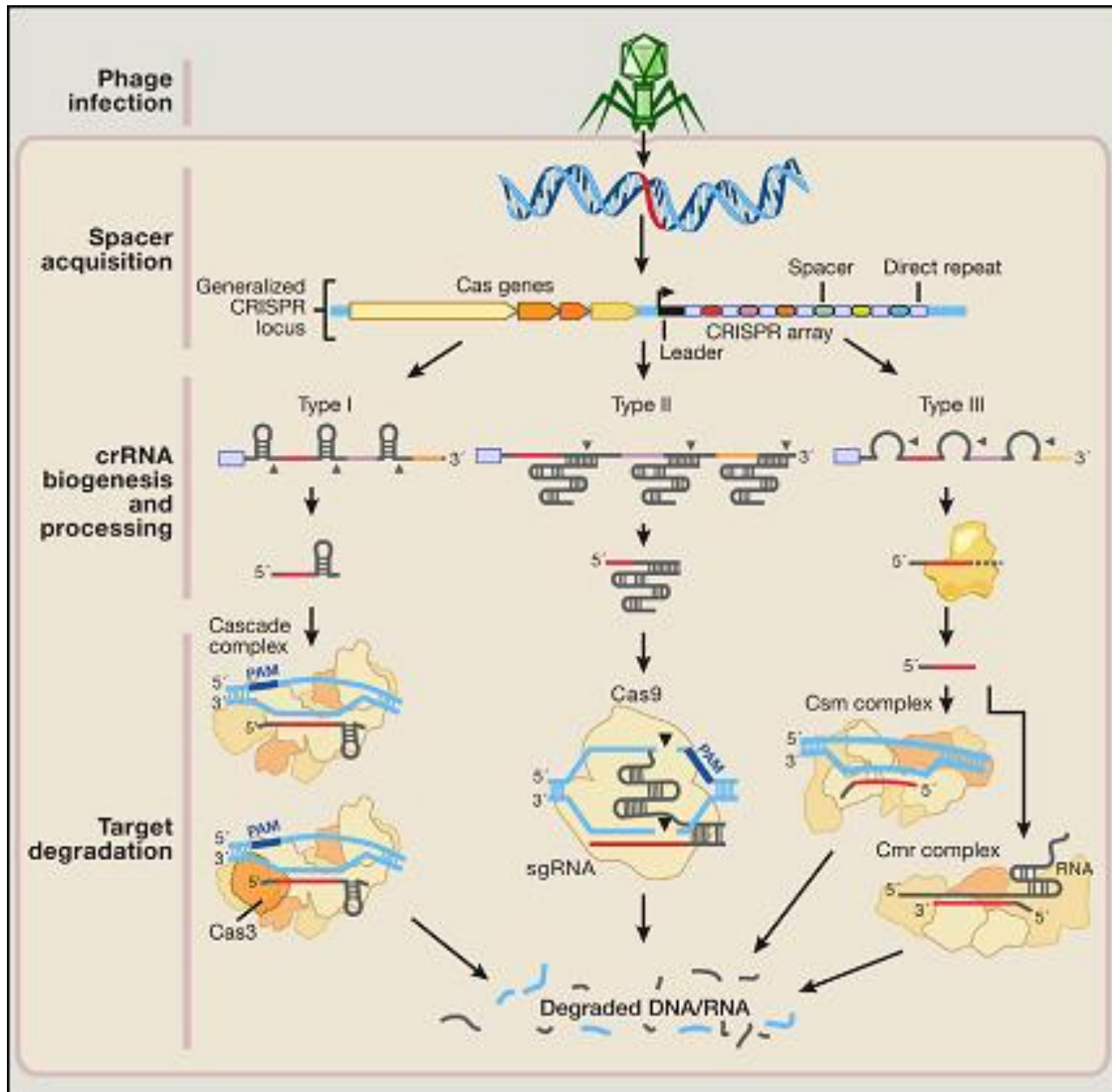
45 Cas gén család

3 fő divízió, sok aldivízió

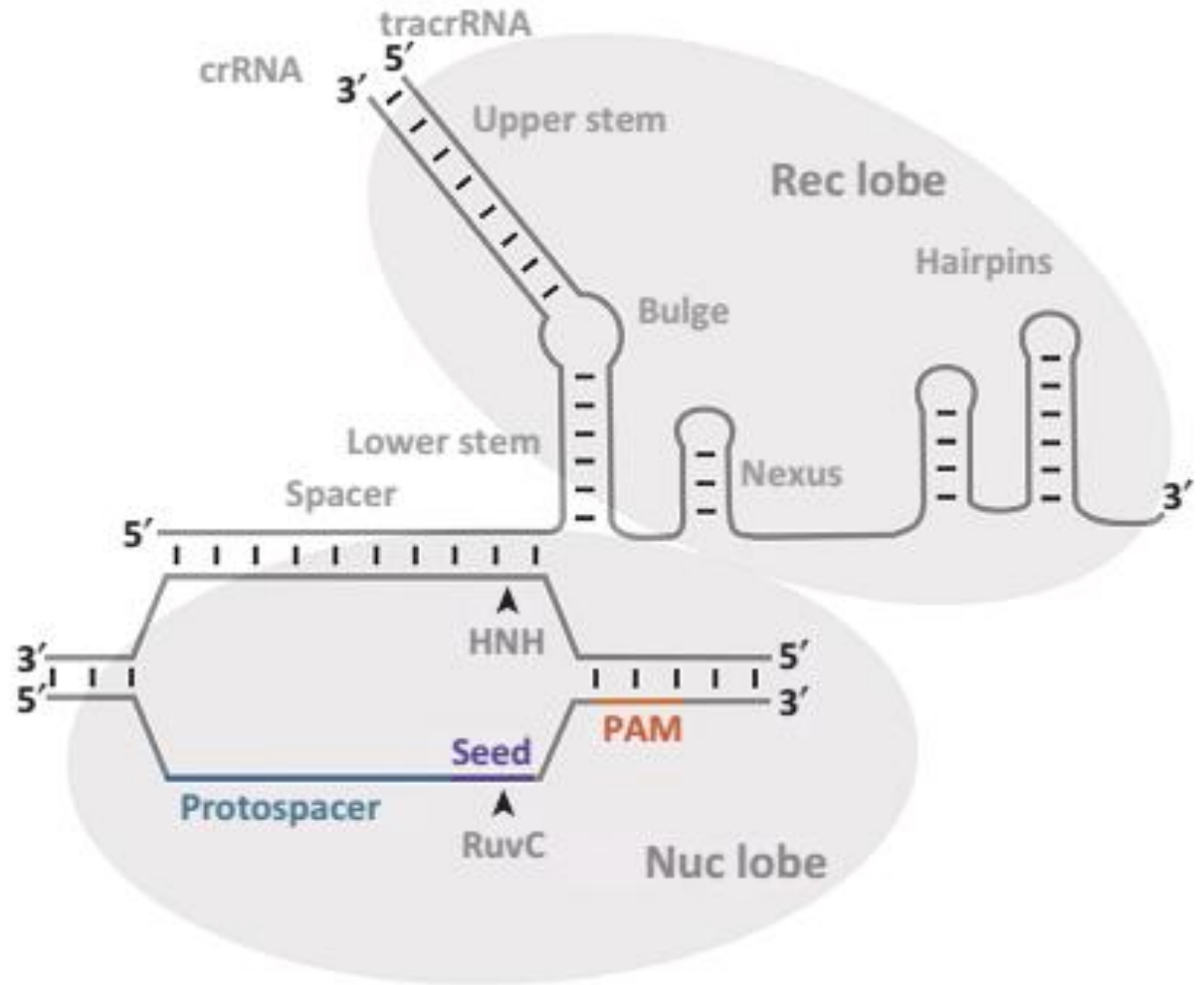
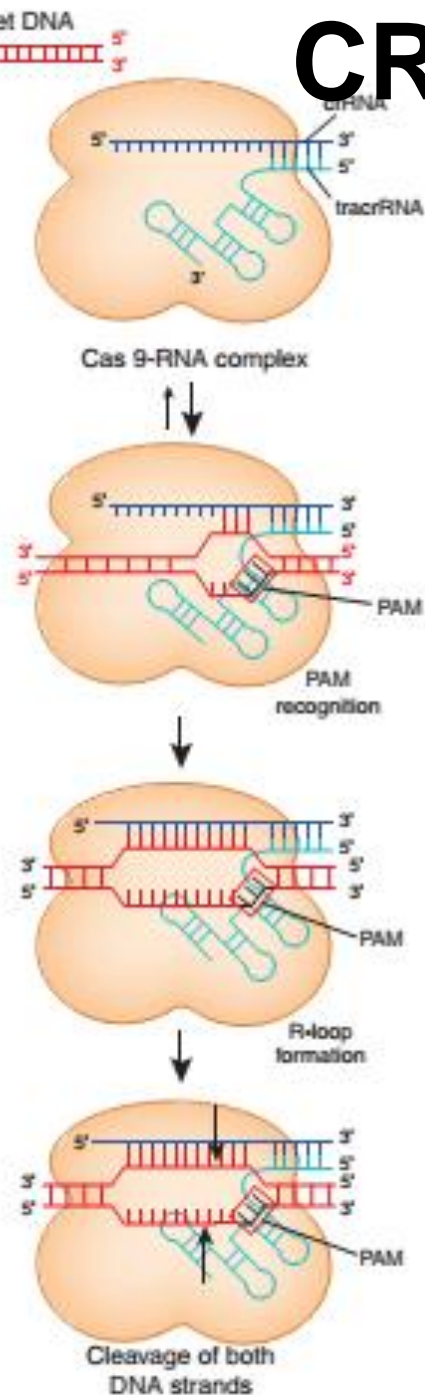
Signature genes and their putative functions for the major and minor CRISPR-cas types.

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



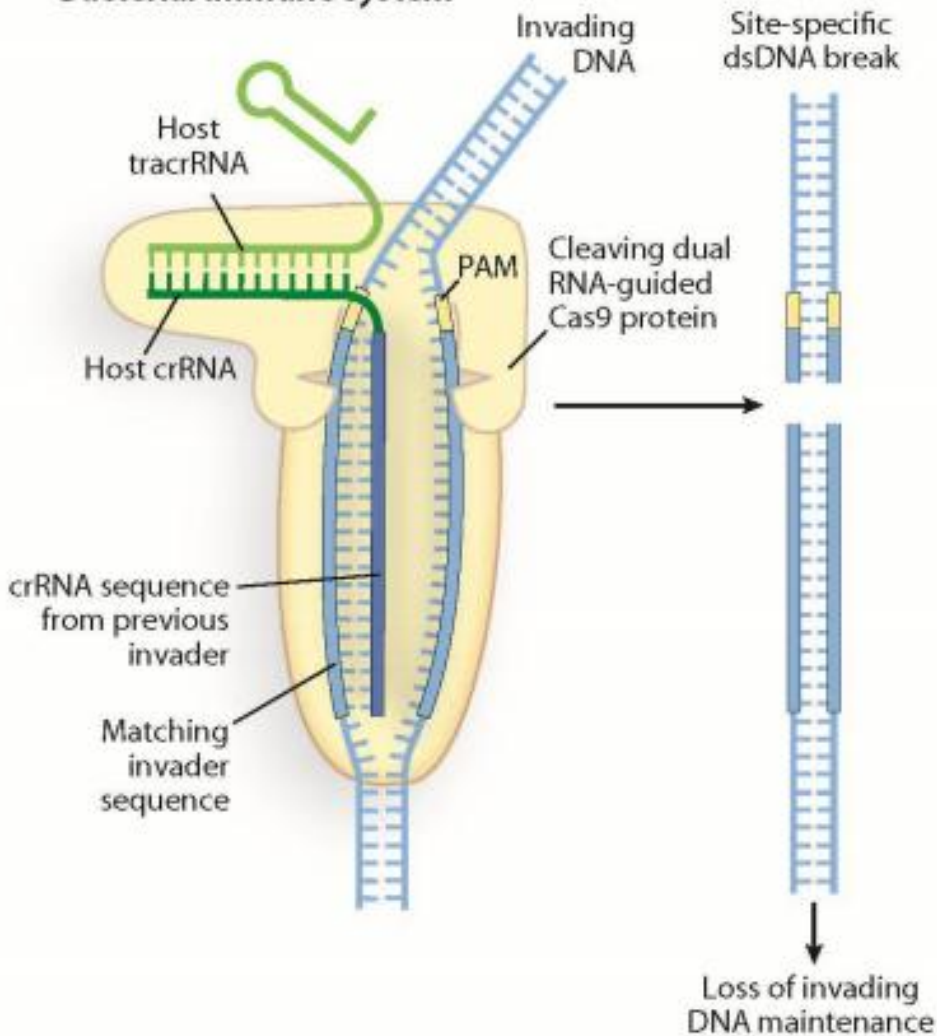
TRENDS in Microbiology

PAM szekvencia

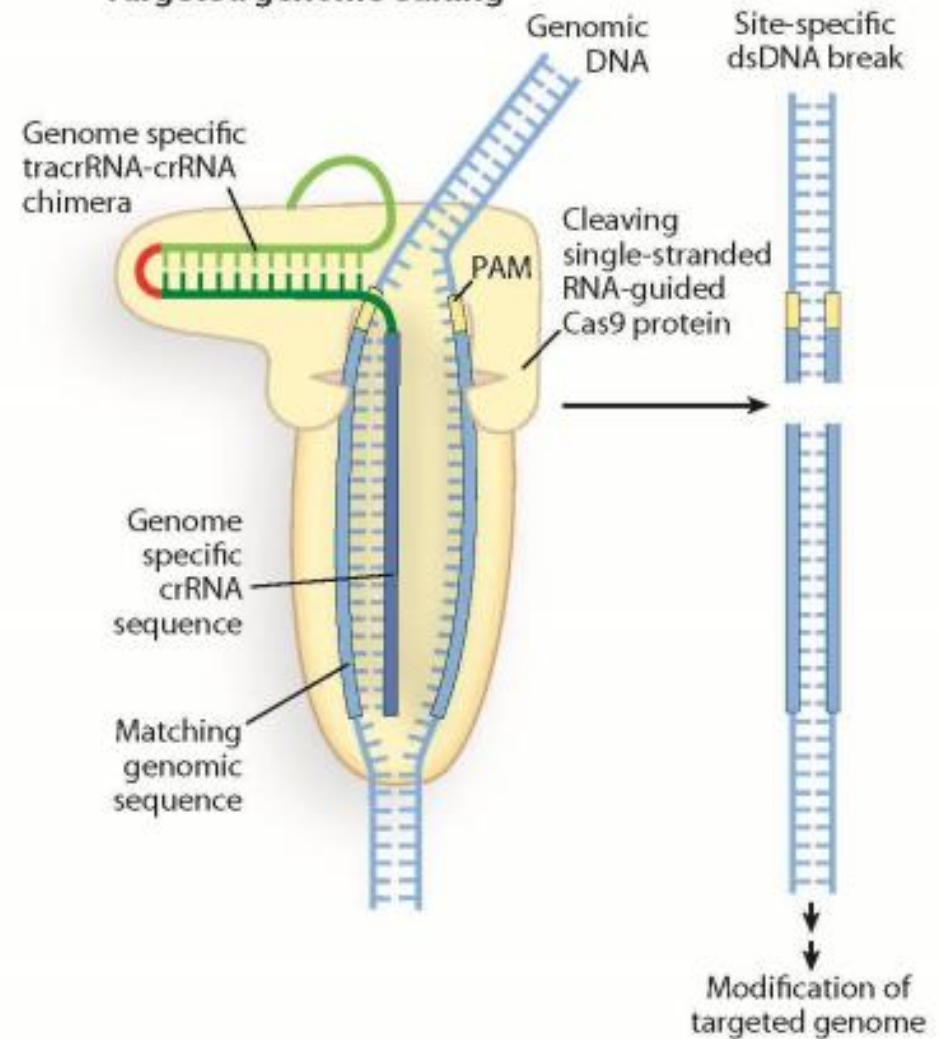
<http://www.casblastr.org/>

CRISPR/Cas9 rendszer átalakítása

Bacterial immune system



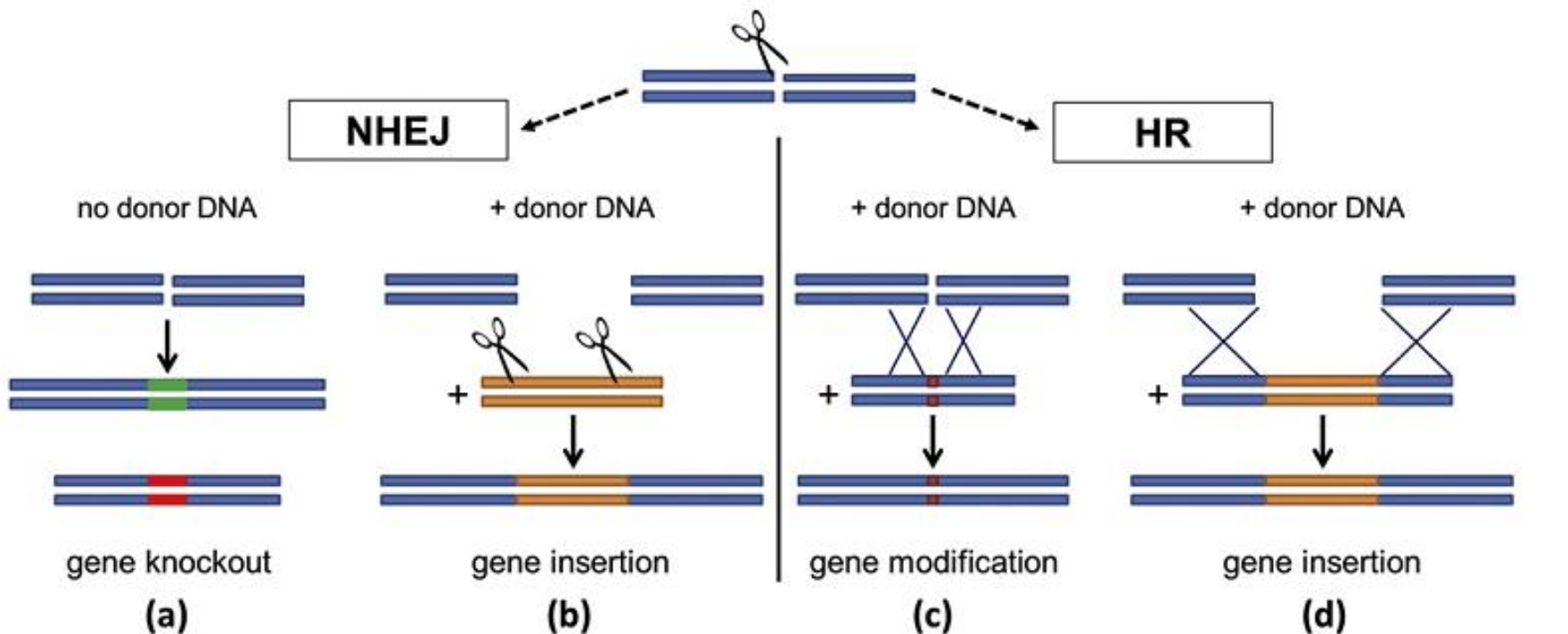
Targeted genome editing



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/>

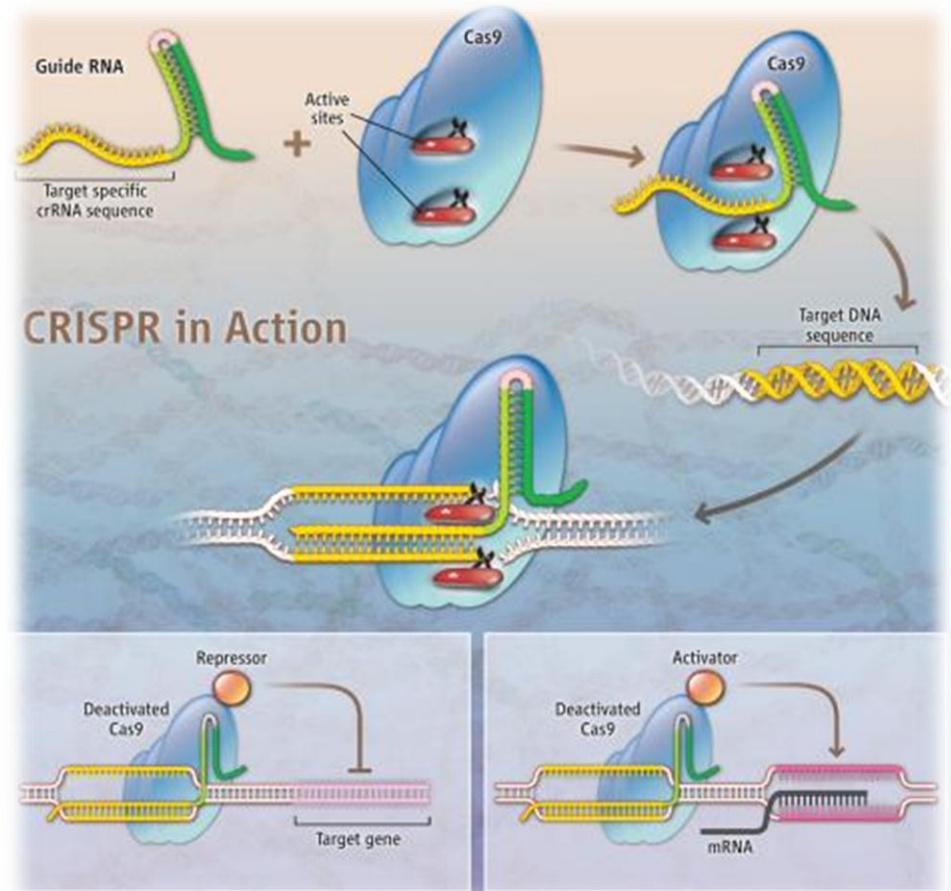
<http://crispr.mit.edu/guides/885437766687252>

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

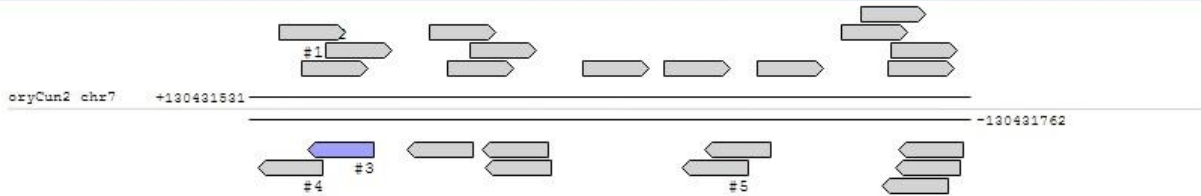
<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html>

<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)

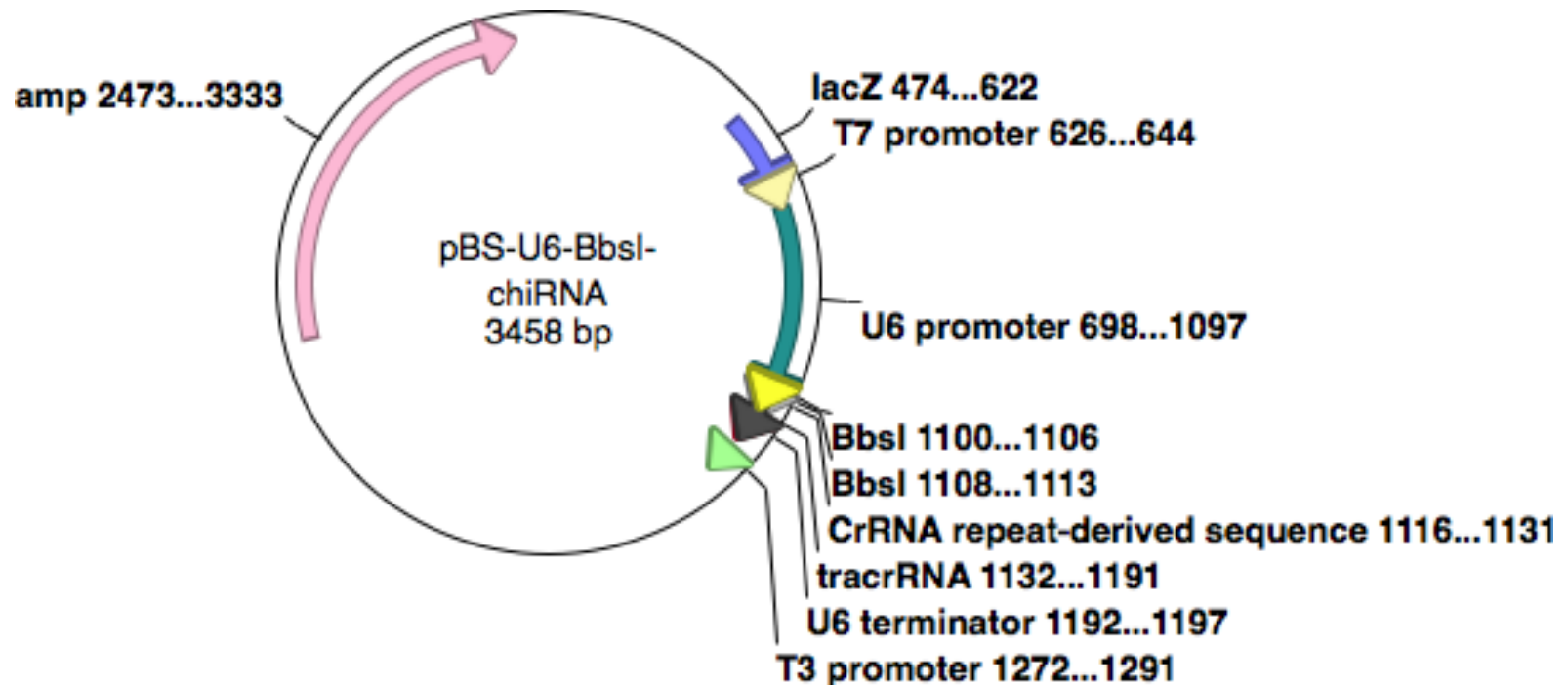
	score	sequence	
Guide #1	88	AACCTATGAAAGACGGTACA	AGG
Guide #2	87	AAAGACGGTACAAGGTATAC	TGG
Guide #3	85	TACCTTGTACCGTCTTTCAT	AGG
Guide #4	80	TCATAGGTTTGATGAGCCTC	AGG
Guide #5	70	TCAATGCCTAAGTTGGATTC	AGG
Guide #6	66	GATCTTGCTGTAACCTTCCC	AGG
Guide #7	65	TTTGATTTCAATGCCTAAGT	TGG
Guide #8	60	CTGAAACTTGACATGAACCC	AGG
Guide #9	60	AAACAACCTGAATCCAACTT	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
AAC TTTGTAACATCTTTCATCAG	0.7	4MMs [1:4:10:12]		chrX:-7213213
TGCCGTGTAAC TCTTTCATCAG	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
TAATTTTACAGTCTTTCATAGG	0.5	4MMs [3:4:7:11]		chr18:+35760416
TTCC TTTTATGGTCTTTCATGGG	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

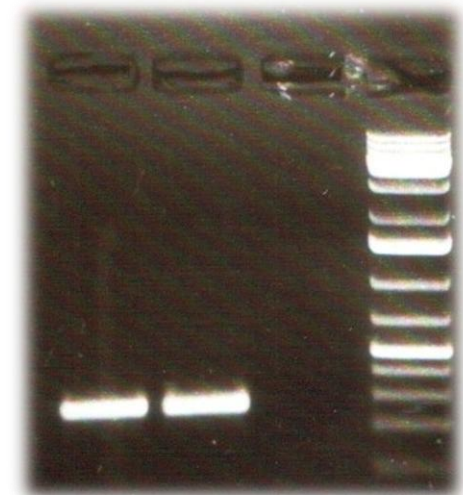
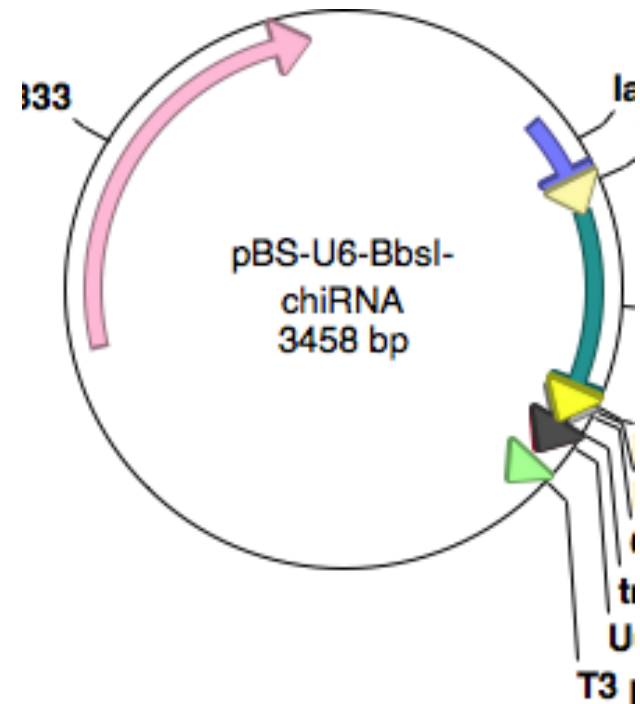
A PCR termék Prot. K és SDS kezelése

Fenol/kloroformos precipitáció

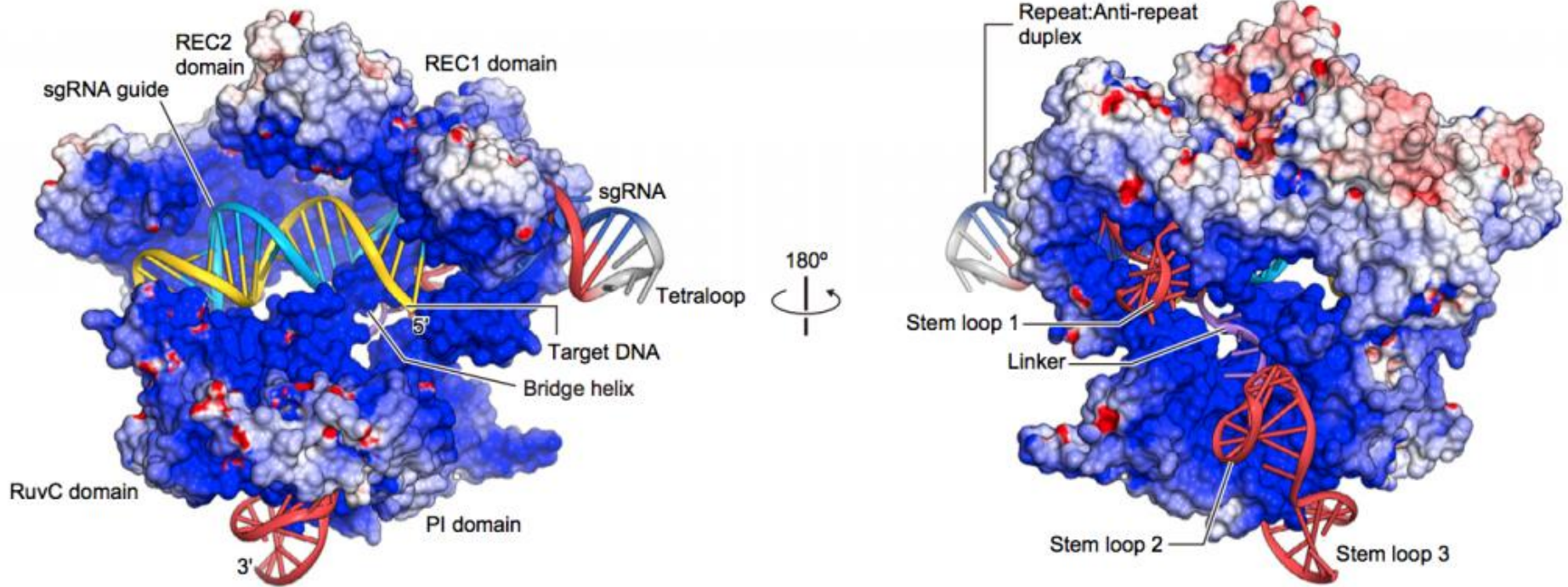
mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit *in vitro*

transzkripció

Tisztítás



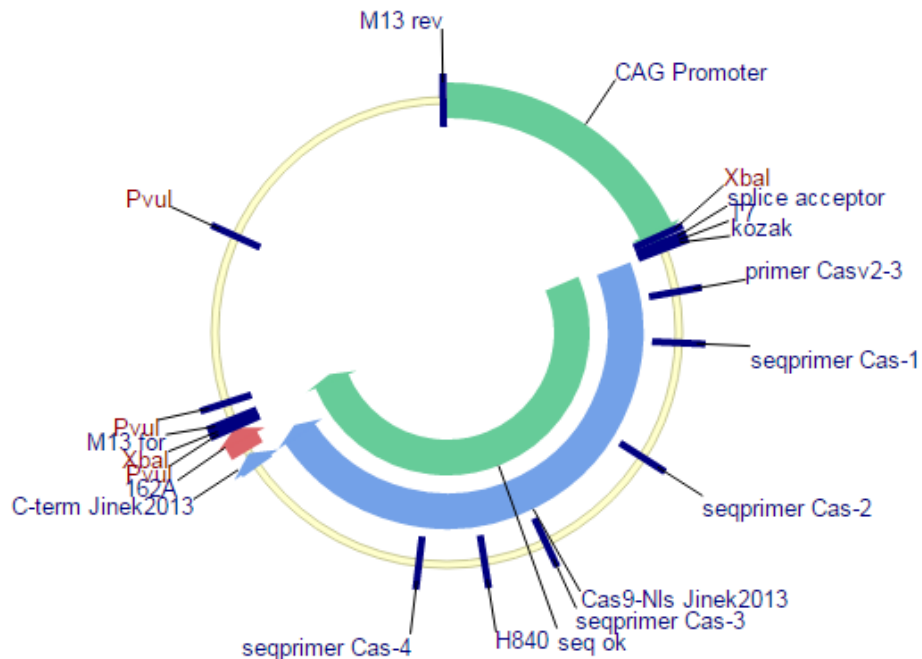
Cas9



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



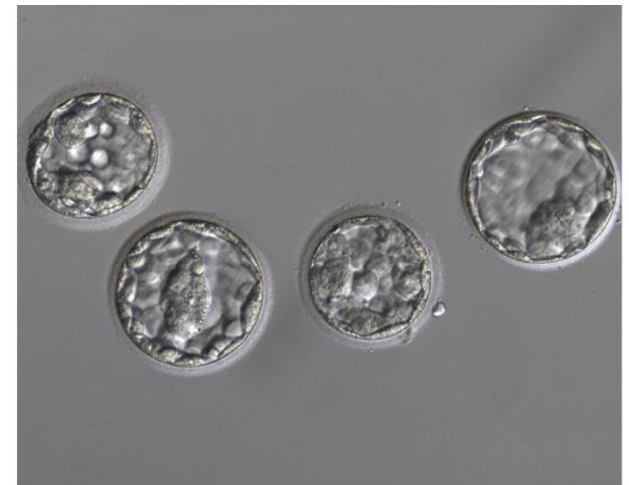
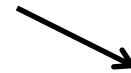
kecske



nyúl

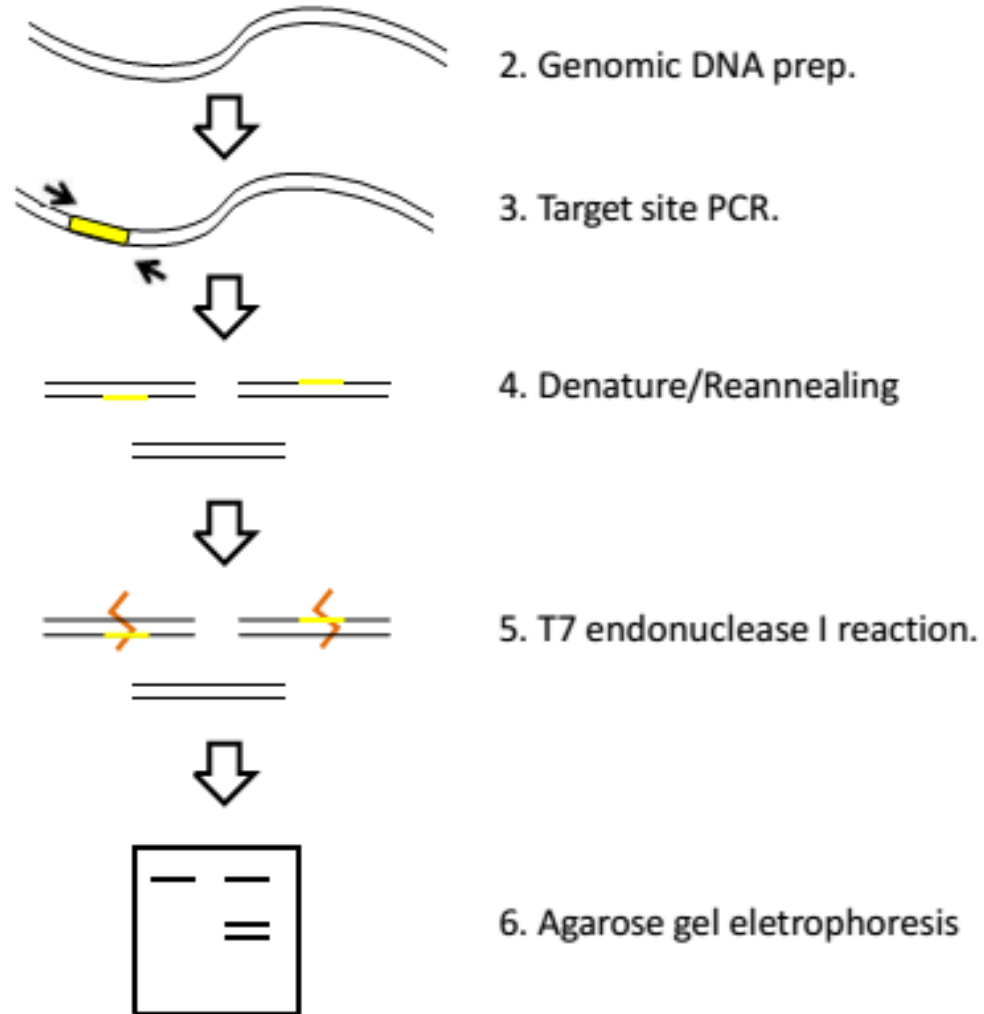


sertés

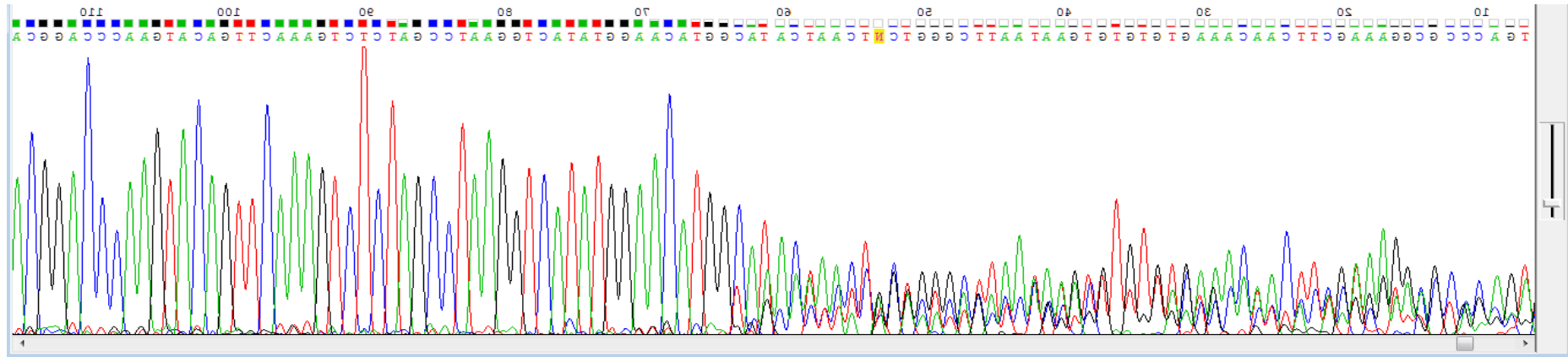


blasztociszta

Ellenőrzés T7 endonukleáz emésztéssel

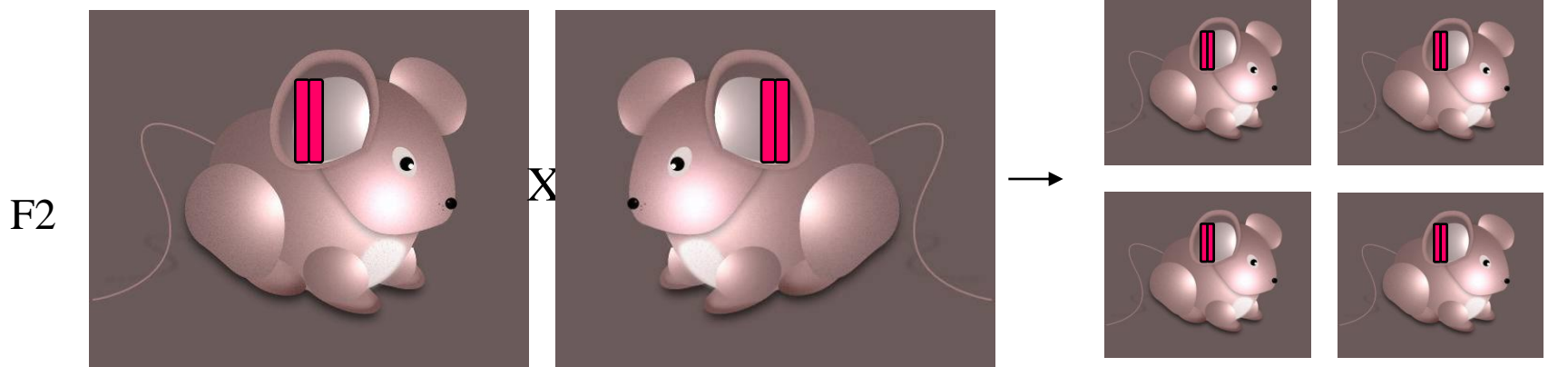
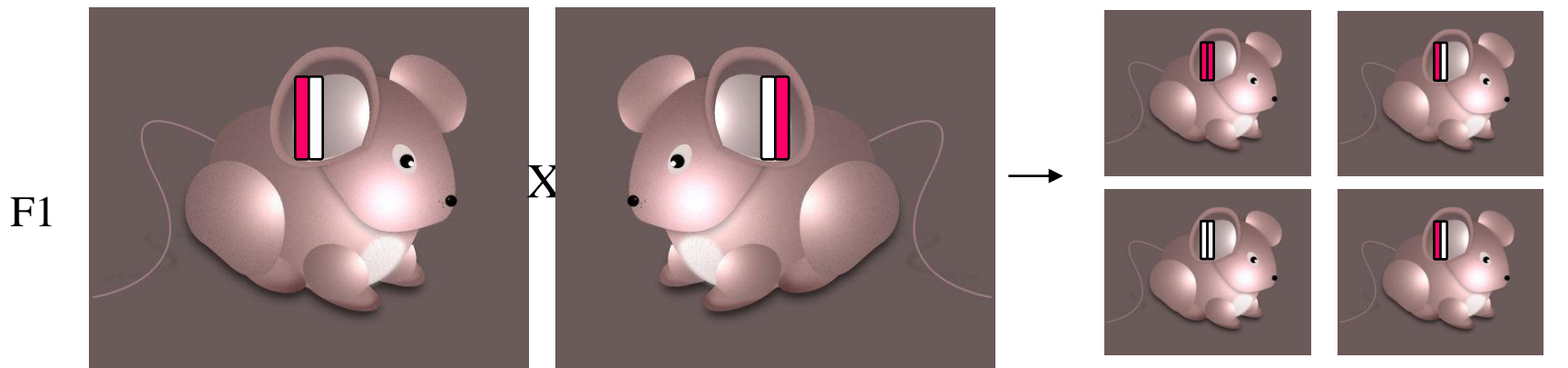
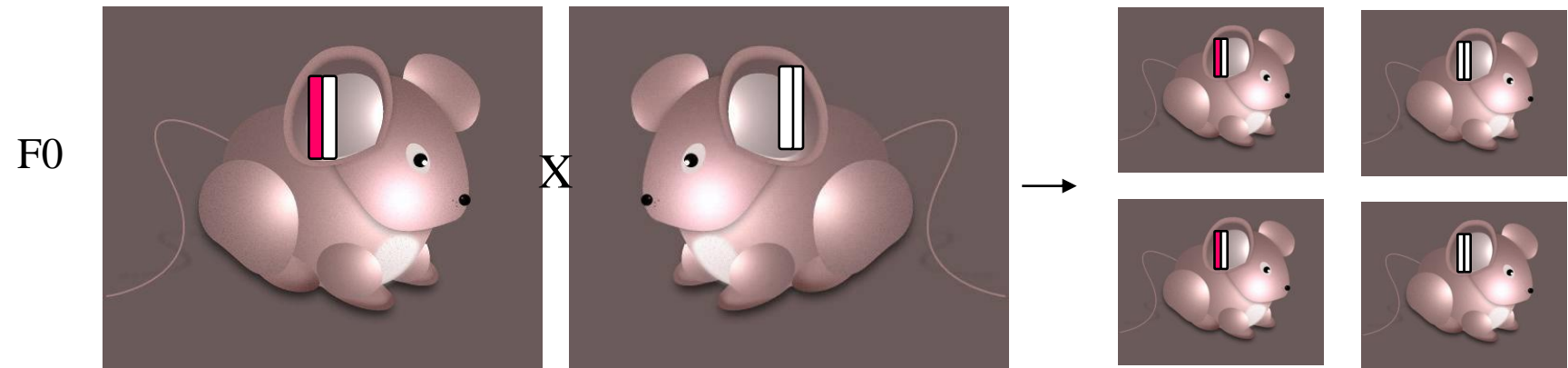


Az események szekvenálása

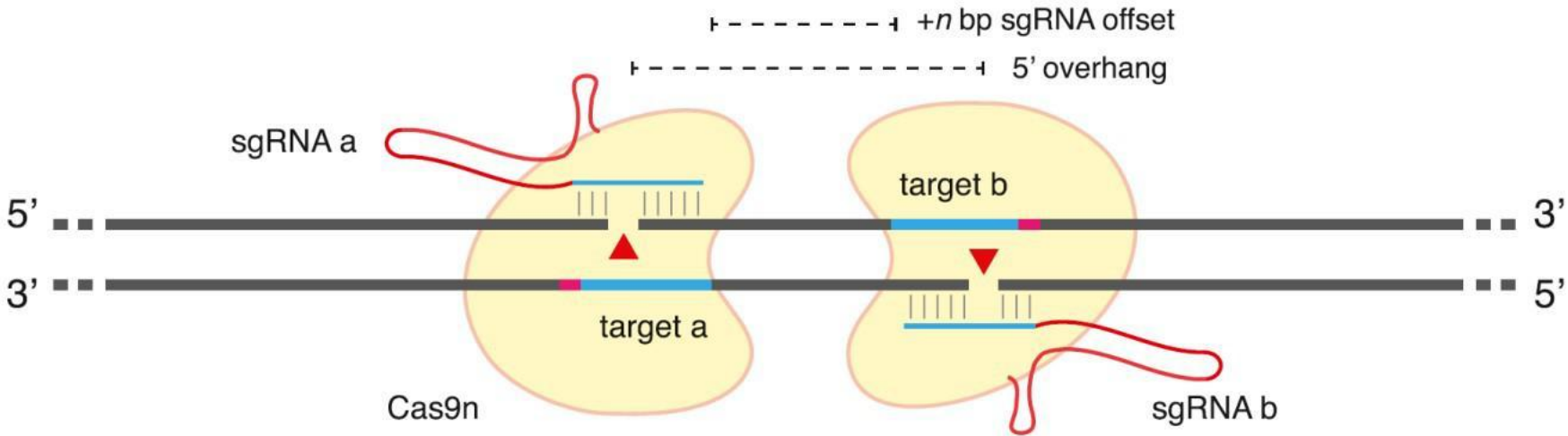
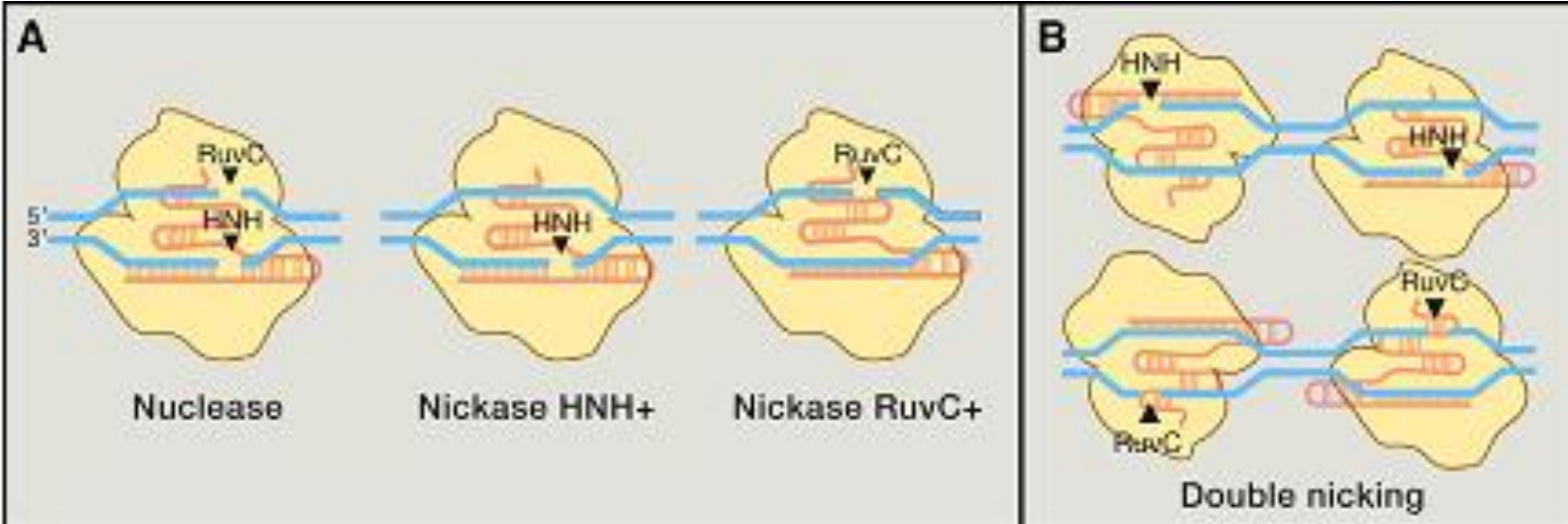


Wt	TTTGTGCAAATCCTGAGGCTCATCAAACCT ATGAAAGACGGTACAAGGT TATACTGGAATCCGA	
5BKK	TTTGTGCAAATCCTGAGGCTCATCAAAC-----GGTACAAGGTATACTGGAATCCGA	11 bp del
8BKK	TTTGTGCAAATCCTGAGGCTCA-----GACGGTACAAGGTATACTGGAATCCGA	14 bp del
5BT	TTTGTGCAAATCCTGAGGCTCATCAAACCTATG-----GTACAAGGTATACTGGAATCCGA	7 bp del
9FBL	TTTGTGCAAATCCTGAGGCTCATCAAACCTATGA----CGGTACAAGGTATACTGGAATCCGA	4 bp del
9F	TTTGTGCAAATCCTGAGGCTCATCAAACCTA---AAGACGGTACAAGGTATACTGGAATCCGA	3 bp del
7/3	TTTGTGCAAATCCTGAGGCTCATCAAAC-----GGTACAAGGTATACTGGAATCCGA	11 bp del
5JT	TTTGTGCAAATCCTGAGGCTCATCTAA-----AAAGACGGTACAAGGTATACTGGAATCCGA	6 bp del/3 ins

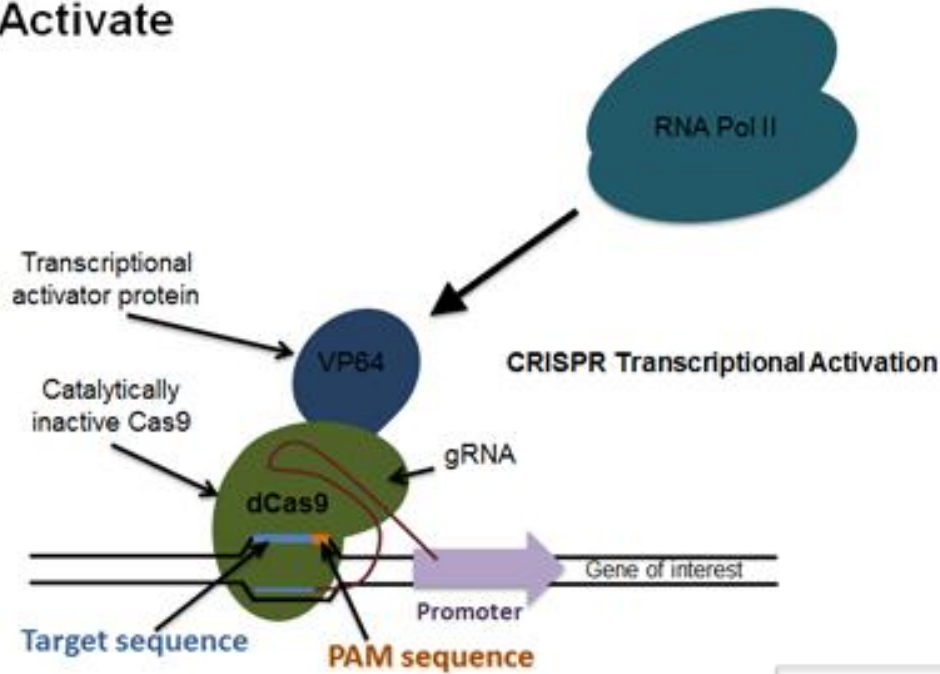
Öröklésmenet



Cas9 Nickase



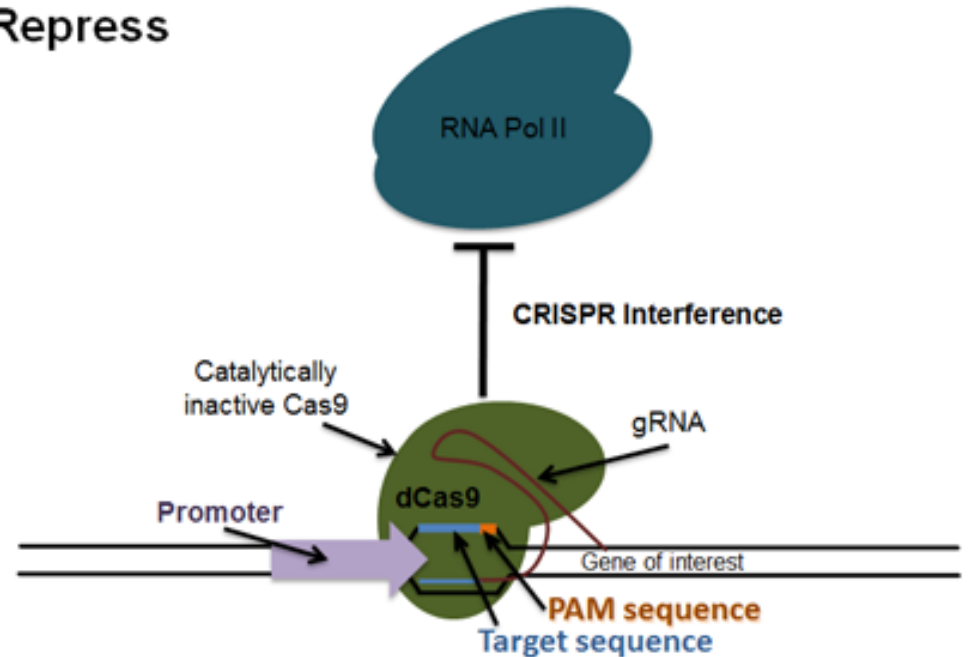
Activate



CRISPR/Cas9 rendszer, mint aktivátor

CRISPR/Cas9 rendszer, mint gátló faktor

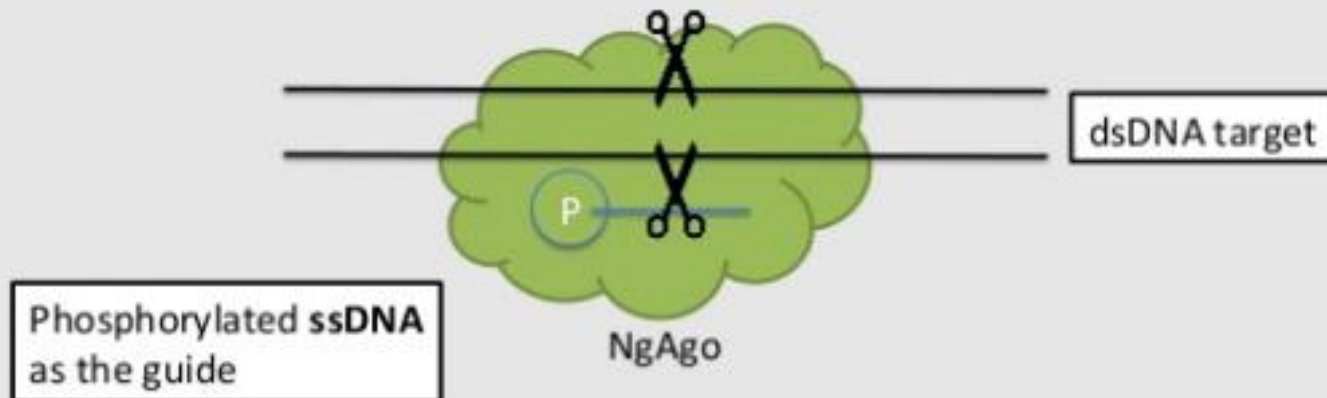
Repress



Vannak nem működő rendszerek!!!

NgAgo

Argonaute from *Natronobacterium gregoryi*



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

Példák

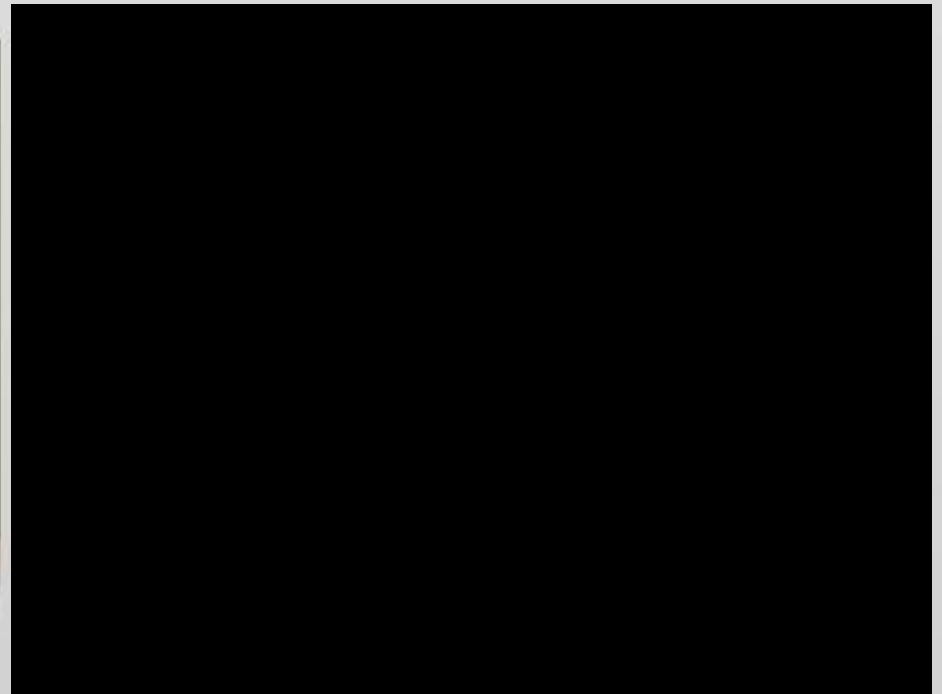
- In vitro alkalmazás terápiás célokra

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)

Hasznosítás- alapkutatás

Rett szindróma- autizmus kutatás



MECP2 genom editált majmok az autizmus rengeteg tünetét mutatják

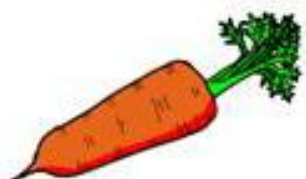
Hasznosítás- Emberi betegségek állati modelljei



Normál



Mérsékelt



Súlyos



Érelmeszesedés

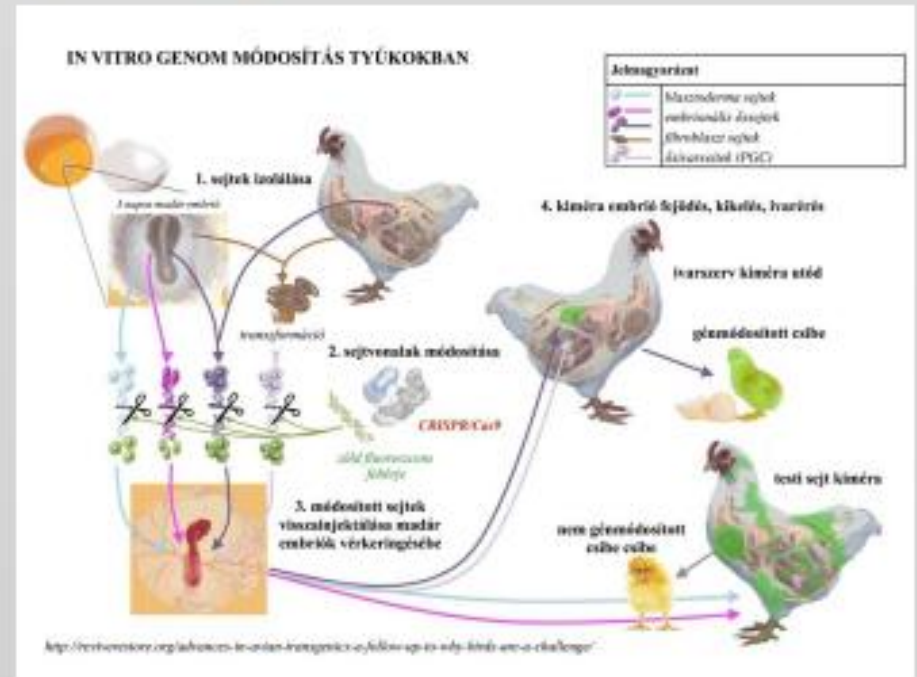
Mezőgazdasági alkalmazások: toll nélküli csirke



- Természetes mutáció
- Fontos lehet a trópusokon a helyi fajtákban
- A megfelelő PGC sejtek készen állnak

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

Hipoallergén tojás



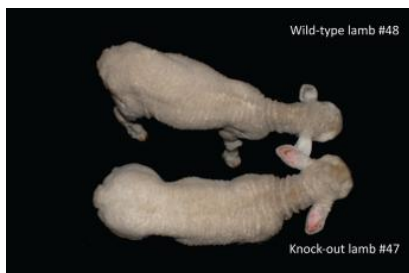
Genom editált állatok, nem termelik az allergén ovalbumin, illetve ovomucoid fehérjéket tojásukban. Cél: olyan tojásban termelt vakcinák (influenza oltás), melyet allergiások is kaphatnak. Esetlegesen hipoallergén tojás étkezési célra.

Termelési tulajdonságok akár ugrásszerű növelése: Myostatin gén elrontása

- A Myostatin az izom növekedés negatív szabályozó faktora.
- Ha nem működik szuperizmolt állatok alakulnak ki.
- Több állatfajban kialakult a természetes mutáns, genom editálással kialakítható olyan állatokban is, ahol eddig nem találtak mutánst.



Természetes



**Genom
editált**

A NAIK-MBK is bekapcsolódott ezekbe a kutatásokba (nyúl).

Védekezés új kórokozókkal szemben

PRRSV rezisztens sertések



**CD163 génben
hordoznak mutációt**



Védekezés új kórokozókkal szemben

Afrikai sertéspestis vírusa

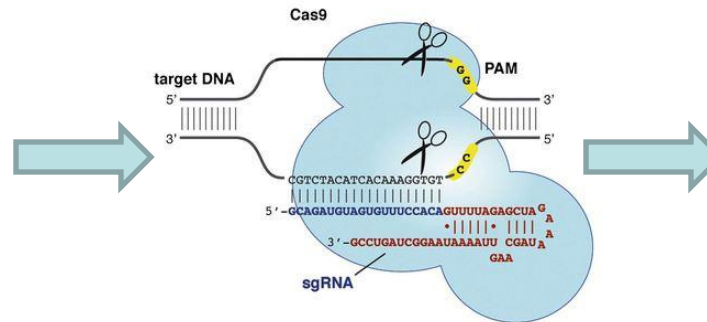
- 2018-ban megjelent
- Gyógyíthatatlan, karantén betegség
- Vakcina nincs

Modern lehetőségek:

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



Afrikai varacskos disznó-rezisztens



Genom editálás:
CRISPR rendszer



Editált, rezisztens házisertés

• 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.

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.)

Xenotranszplantáció

Endogén retrovírusok???



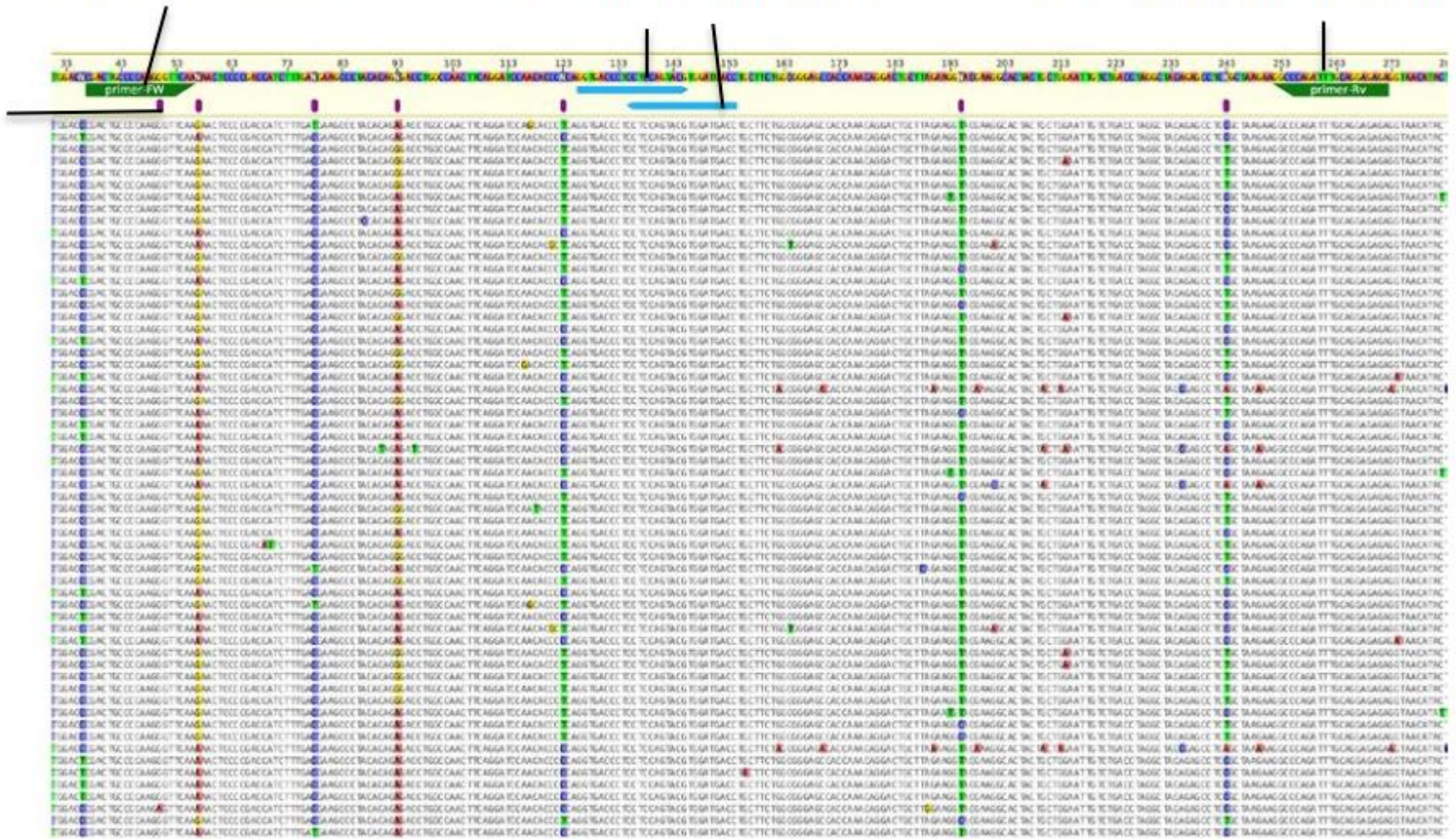
Klónozással készült KO sertések, melyek nem képesek ezt a sejtfelszíni markert szintetizálni. Gyakorlatilag alkalmasak szívatültetésre.

Sertés endogén retrovírus menetsítés

PERV amplification primer

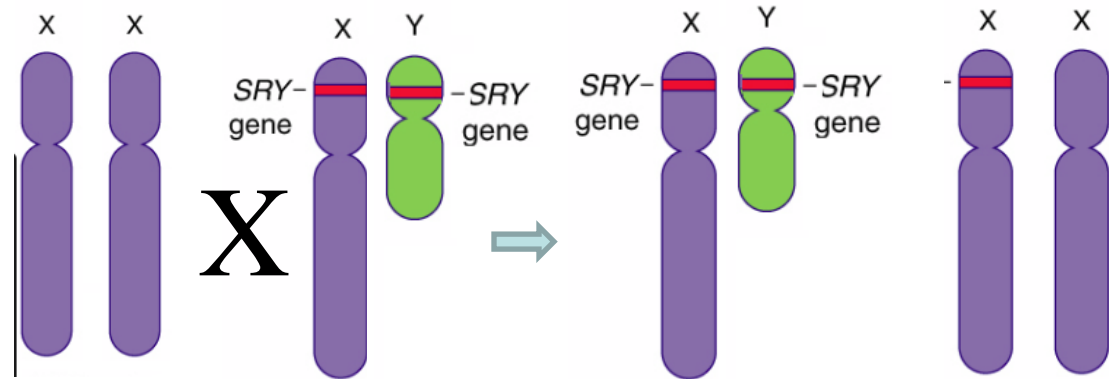
PERV gRNA 1, 2 targeting site

PERV amplification primer



„Unisex állatok”

CSAK FIÚ



CSAK LÁNY



**Mutáció az SRY
promóterben**



WT,XX

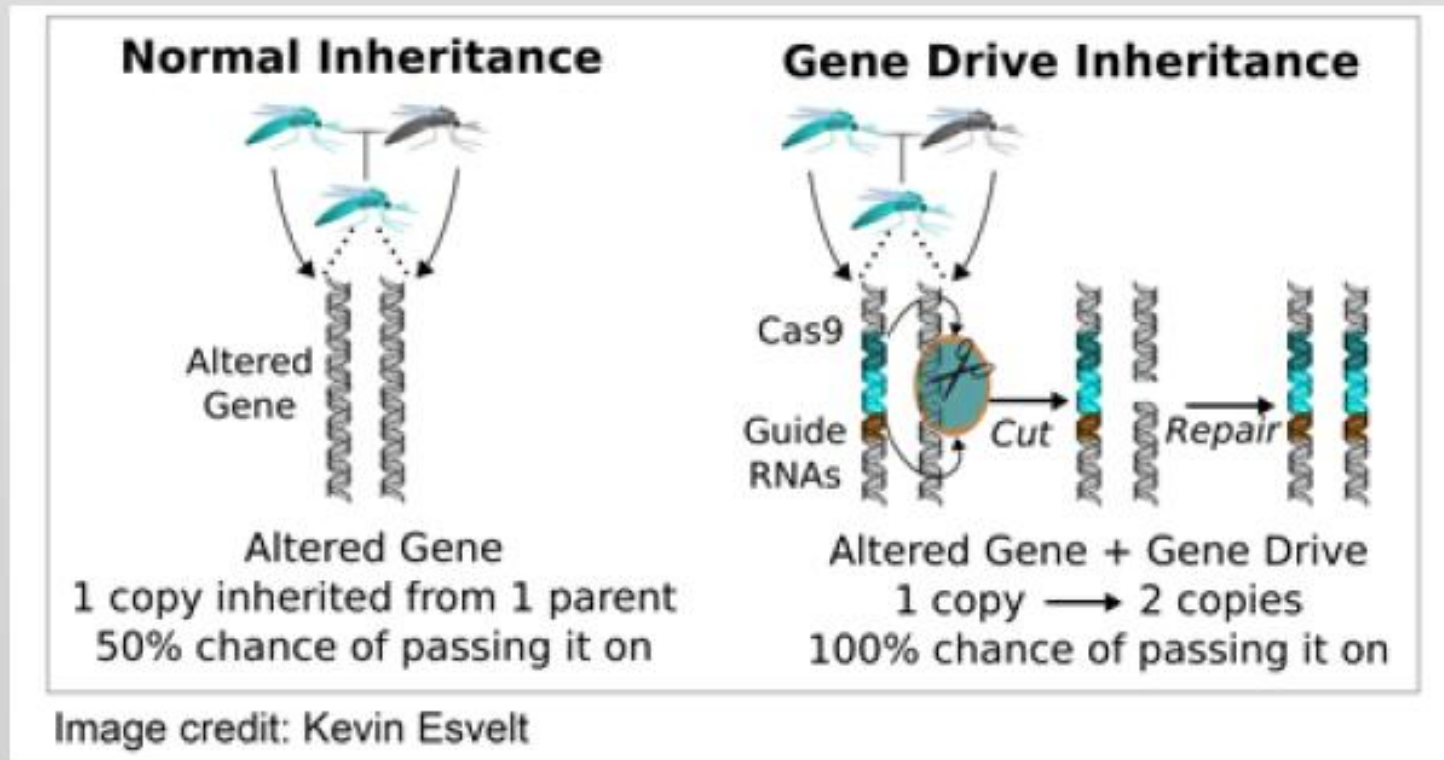


WT,XY



KO,XY(#9)

Gene drive- beépített CRISPR rendszer, minden utód genetikailag módosított



•Szúnyogpopulációk teljes kiirtása- ökológiai problémák?

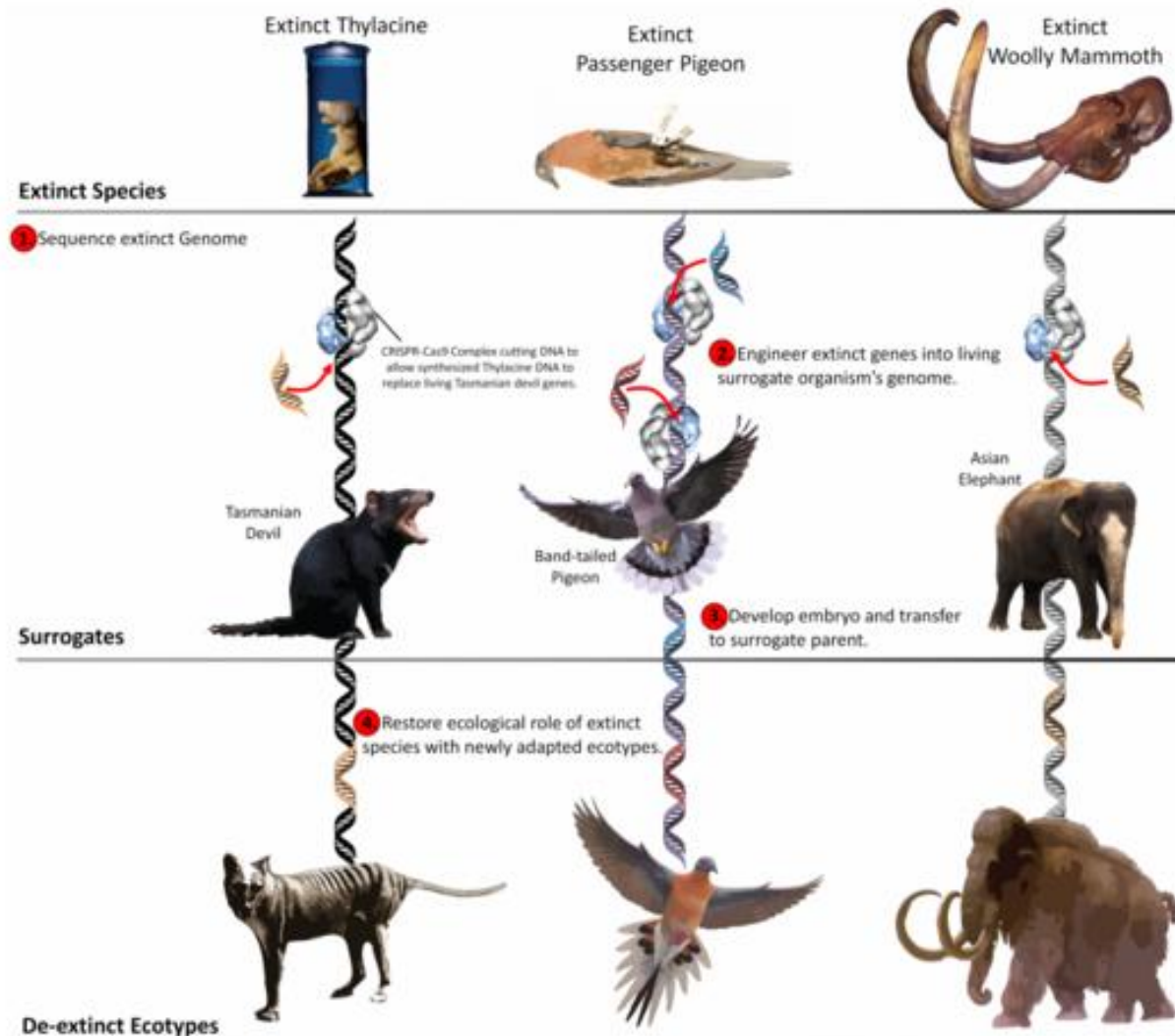
•Csak a betegséget nem adja tovább- jobb megoldás

Érdekességek: Szuper-mini sertés háziállatnak

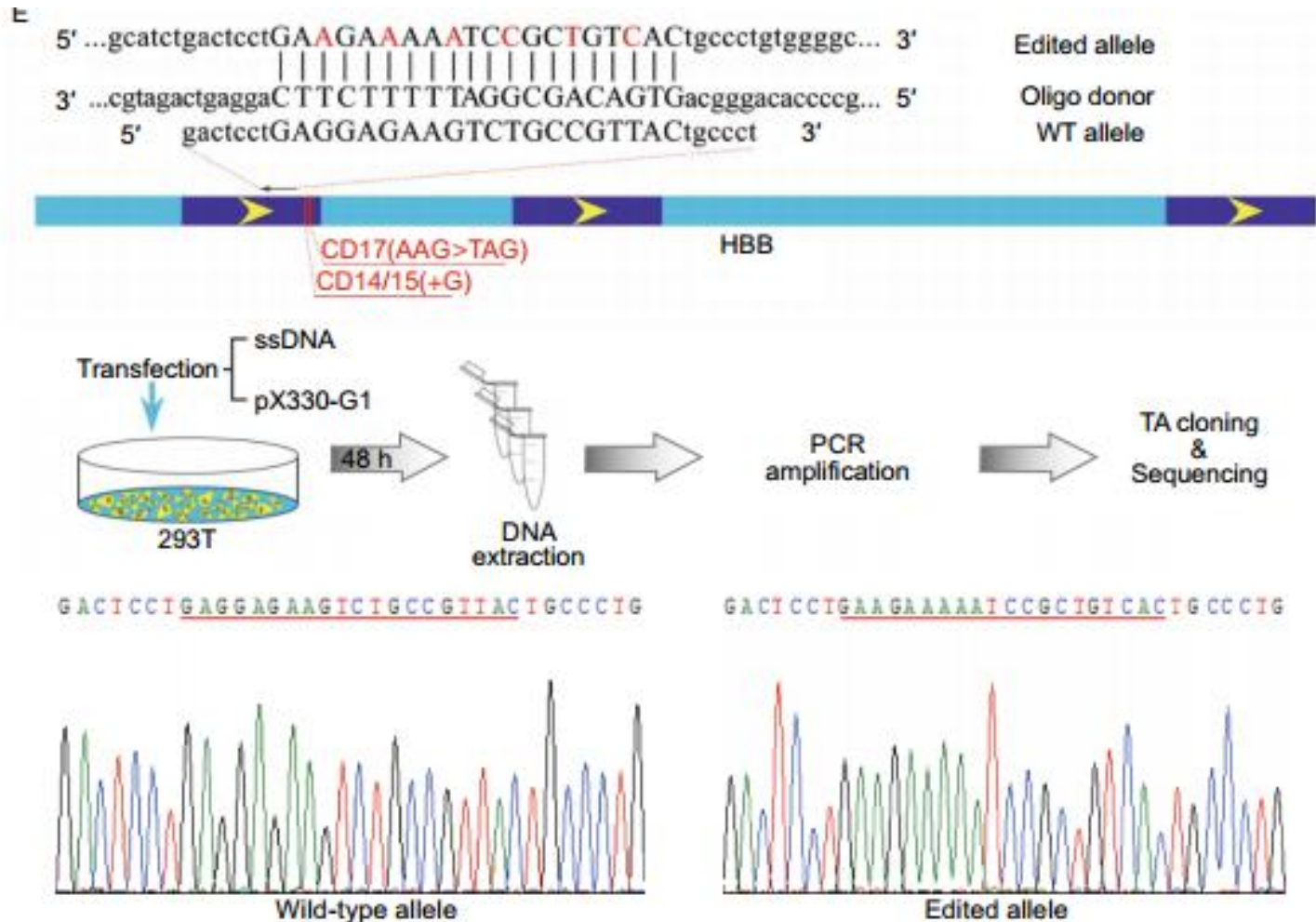


BAMA törpesertésből (35-50 kg) növekedési hormon receptor hiányos, 1600 dollár

Érdekességek: Fajok újraélesztése CRISPR technikával



Az első genetikailag módosított emberi embriók/B-globin gén



Asilomar árnyékában



- 1975 februárjában a kaliforniai Asilomar-ban gyűltek össze kutatók, hogy egy saját szabályrendszert dolgozzanak ki a rekombináns DNS-el való munkára

- 2015 január: a kaliforniai Napa-ban



A 2015-ös GeneEditSummit főbb ajánlásai:

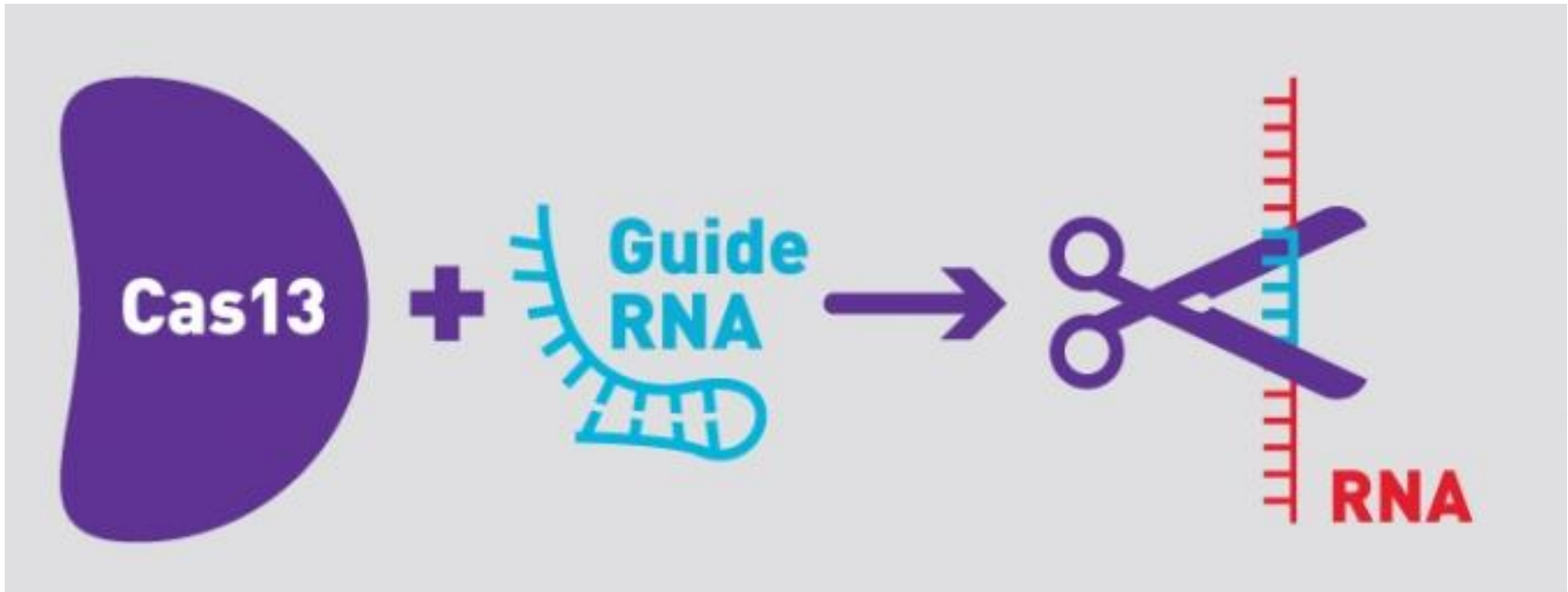
- az alap- és preklinikai kutatásban, ha azok nem végződnek terhességben, tulajdonképpen zöld fényt kapott a technológia
- a testi sejtek módosítása (vagyis nem örökíthető genomeditálás), akár klinikai szinten, szintén tovább fog folytatódni, természetesen a páciensek beleegyezése szükséges ehhez;
- az ivari sejtek módosítása azonban egyelőre még túlságosan sok kérdést vet fel, így ellenjavallt (vagyis, ha úgy vesszük részleges moratórium azért lesz), és ez addig nem is változik, amíg egyrészt az alapkutatások nem tisztázzák pontosan a CRISPR eljárás hatékonyságát és pontosságát, illetve nem alakul ki valamilyen szintű társadalmi konszenzus arról, hogy erre valóban szükség van.

Az első genom editált babák 2018



CCR52 gén célzott allélcseré- HIV fertőzés nem lehet

Új utakon?- RNS editing



Jelenleg sejtes rendszerekben működik

GMO vs. genomszerkesztés a magyar közvélemény szemében

GMO



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

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)**

Ezt már tényleg meg lehet csinálni!!!



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**