

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Klára Kostelníková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Epigenom a možnosti využití jeho změn pomocí CRISPR/Cas9
Bakalářská práce

2023

Klára Kostelníková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Klára Kostelníková**
Osobní číslo: **C20227**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Epigenom a možnosti využití jeho změn pomocí CRISPR/Cas9**
Téma práce anglicky: **Epigenome and Possibilities of Changes Using CRISPR/Cas9**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Rešerše na téma změny epigenomu prostřednictvím CRISPR/Cas9
 - a) Epigenom a jeho význam
 - b) CRISPR/Cas9 a jeho současné využití
 - c) Využití změn epigenomu pro terapii a diagnostiku

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Lucie Michalcová**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**
Herbacos Recordati s.r.o.
Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Epigenom a možnosti využití jeho změn pomocí CRISPR/Cas9 jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Klára Kostelníková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomohli v realizaci bakalářské práce. Zejména děkuji panu Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, Ph.D. za trpělivost, cenné informace a příjemnou spolupráci při vedení mé práce. Poděkování patří také mé rodině a přátelům, kteří mi byli oporou po celou dobu mého studia.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá tématem epigenomu a možností jeho využití v klinické praxi pomocí technologie CRISPR/Cas9. Tato práce shrnuje poznatky o epigenomu a jeho roli v buněčné regulaci a zdůrazňuje potenciál epigenetických změn pro vývoj nových terapeutických postupů. Práce také popisuje technologii CRISPR/Cas9, která umožňuje přesné a cílené úpravy DNA sekvence a epigenetických změn. Jsou zde zmíněna i úskalí a omezení spojená s touto technologií pro budoucí využití v praxi. Celkově lze tuto práci považovat za přínosný zdroj informací pro vědeckou komunitu i širší veřejnost, která se zajímá o téma epigenomu a CRISPR/Cas9 technologie.

KLÍČOVÁ SLOVA

epigenom, DNA, CRISPR/Cas9, modifikace, exprese, terapie, genetika

TITLE

Epigenome and Possibilities of Changes Using CRISPR/Cas9

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the topic of the epigenome and the possibilities of its use in clinical practice through the CRISPR/Cas9 technology. The thesis summarizes the knowledge about the epigenome and its role in cellular regulation and emphasizes the potential of epigenetic changes for the development of new therapeutic approaches. The work also describes the CRISPR/Cas9 technology, which allows for precise and targeted modifications of DNA sequence and epigenetic changes. The limitations and challenges associated with this technology for future use in practice are also mentioned. Overall, this thesis can be considered a valuable source of information for the scientific community and the general public interested in the topic of the epigenome and CRISPR/Cas9 technology.

KEYWORDS

epigenome, DNA, CRISPR/Cas9, modifications, expression, therapy, genetics

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	4
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	5
1 ÚVOD.....	9
2 EPIGENETIKA	10
2.1 METYLACE DNA	11
2.1.1 DNA-metyltransferázy	12
2.1.2 Demetylace DNA	13
2.1.3 TET.....	13
2.2 MODIFIKACE HISTONŮ.....	15
2.2.1 Metylace histonů	15
2.2.2 Acetylace histonů	17
2.2.3 Fosforylace histonů	18
2.3 NEKÓDUJÍCÍ RNA	18
2.3.1 Krátké ncRNA	19
2.3.2 Dlouhé ncRNA	21
3 CRISPR	22
3.1 HISTORIE.....	22
3.2 KLASIFIKACE SYSTÉMU	23
3.3 MECHANISMY	24
4 KLINICKÁ PRAXE.....	26
4.1 BIOMARKERY	26
4.2 VÝVOJ EPIGENETICKÝCH LÉČIV	27
4.2.1 První vlna.....	27
4.2.2 Druhá a třetí vlna	28
4.2.3 Úprava epigenomu.....	29
4.2.4 Čtvrtá vlna	30
5 CRISPR/CAS9 TERAPEUTIKA	31
5.1 dCAS9 SAMOSTATNĚ.....	31
5.2 dCAS9-EFEKTOR	31
5.3 SUNTAG	32

5.4	scrNA/SAM.....	33
5.5	TREE.....	33
6	OMEZENÍ VYUŽITÍ CRISPR/CAS.....	35
6.1	ZAVEDENÍ CAS9 SYSTÉMU DO BUNĚK	35
6.2	PŘIROZENÁ IMUNITA	36
6.3	EXPRESE SGRNA	37
6.4	MIMO CÍLENÉ VLIVY	37
6.5	DEAKTIVACE SYSTÉMU	37
7	ZÁVĚR	39
	POUŽITÁ LITERATURA.....	40

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Geneticko-epigenetický fenotyp	11
Obrázek 2: Metylace cytosinu	12
Obrázek 3: Kompletní průběh aktivní modifikace C.....	14
Obrázek 4: Znárodnění histonových modifikací	17
Obrázek 5: Biogeneze piRNA a circRNA	20
Obrázek 6: Schéma biogeneze miRNA a lncRNA a jejich mechanismus modifikace epigenomu	21
Obrázek 7: Klasifikace CRISPR/Cas systému do tříd a typů.....	24
Obrázek 8: Mechanismus azacitidinu a decitabinu	28
Obrázek 9: Schématický nákras dvou systémů pro úpravu genomu zaměřených na epigenom	30
Obrázek 10: Systémy založené na CRISPR/Cas9	34

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Typy epigenetických modifikací a jejich defekty a vznik onemocnění	26
Tabulka 2: Přehled epipefaktorů.....	29

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

5-azaC	5-azacytidin
5-aza-dC	5-aza-2'-deoxycytidin
5caC	5-carboxylcytosin
5fC	5-formylcytosin
5hmC	5-hydroxymethylcytosin
5mC	5-methylcytosin
7bS	seven-beta-strand
AAV	Adeno-asociované viry
AbMol	abazická molekula
Ad	adenovirové
AGO2	protein argonute
α -KG	α -ketoglutarát
AM	aktivní modifikace
BER	bazická excizní obnova
CAR	coxackie a Ad virové receptory
Cas	CRISPR asociované geny
CBP	CREB vázající protein
CD	katalytická doména
circRNA	cirkulární RNA
ciRNA	intronní RNA
CoA	koenzym A
COMPASS	Complex of proteins associated with SET1
CpG	cytosin párující guanin
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CRISPRa	aktivační CRISPR
CRISPRi	CRISPR interference
cr-RNA	CRISPR RNA
dCas9	deaktivovaná verze Cas9
dCTP	trifosfát-deoxycytidin
DHFR	destabilizační doména
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNMT	DNA-metyltransferáza

Dot1	distributor of telometric silencing-1
DOT1L	Dot1-like
DSB	dvouvláknová mezera
EcircRNA	exonní cirkulární RNA
EE	epiefektor
EED	protein vývoje embrionálního ektodermu
EIciRNA	exon-intron circRNA
EZH1	homolog enhanceru zeste 1
FAD	flavin adenosin dinukleotid
GCN4	Obecná kontrola nedeprese 4
GCN5	General control nonderepressible 5
GNAT	General control nonderepressible 5-related acetyl-transferases
H	histon
HAT	histonové acetyltransferázy
HDAC	histonové deacetylázy
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HMT	histonová metyltransferáza
HNH	histidin-asparagin-histidin nukleázová doména
Iap	alkaline phosphataseisozyme conversion protein
JARID1	Jumonji AT-rich interactivedomain 1
JMD2	Jumonji C domain – containing proteins
K	lysin
KAT	lysin acetyltransferáza
KDM1	lysin specifická histonová demetyláza
KMT	lysinová metyltransferáza
lncRNA	dlouhá nekódující RNA
LSD1	lysin specifická histonová demetyláza
MDNP	vícestupňové doručování nanočástic
me1	monometylace
me2	dimetylace
me3	trimetylace
miRNA	mikroRNA
MLL1/MLL2	mixed lineage-leukemia

mRNA	messenger RNA
MS2	Bakteriofág MS2
ncRNA	nekódující RNA
p65	transaktivační doména faktoru kappa B
PAM	proto-spacer-adjacent motifs
PD	pasivní diluce
piRNA	Piwi-interagující RNA
Pol II/III	RNA polymeráza II/III
Ppi	pyrofosfát
PRC2	Polycomb responzivní komplex 2
pre-crRNA	prekurzorová CRISPR RNA
pre-miRNA	prekurzor mikro RNA
pri-transkript	primární transkript
PRMT	proteiny argininových metyltransferáz
Q	dlouhé raménko chromosomu
R	arginin
RbAp	proteiny asociované s retinoblastomem
RBP	retinol-vázající protein
RNA	ribonukleová kyselina
Rta	Epstein-Barr virus R transaktivator
RuvC	podobná Ruv doméně resolvázy u <i>E. coli</i>
SaCas	<i>Staphylococcus aureus</i> Cas9 protein
SAH	S-adenosylhomocystein
SAM	S-adenosylmetionin
scFv	jednovláknový fragment protilátek
scRNA	lešeňovité RNA
SET	Su(var)3-9, Enhancer of zeste, Trithorax
sgRNA	jednoduchá navádějící RNA
siRNA	malá narušující RNA
SpCas	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9 protein
SRC	steroidní receptorový koaktivátor
SunTag	Supernova značený systém
SUV39H1	Suppressor of variegation 3-9 homologue 1

SUZ12	supresor zeste 12
T	translokace
TALE	transkripční jako-aktivační efektory
TDG	tymin DNA glukosidáza
TET	ten-eleven translokace
tracrRNA	transaktivující RNA
TREE	Třísloužková technologie pro pokročilejší expresi
VP16	herpes simplex protein
VPR	VP64-p65-Rta
ZFP	protein zinkového prstu

1 ÚVOD

V posledních letech se s rozvojem nových technologií, umožňujících komplexní analýzy celých genomů, stále více zdůrazňuje, že naše genetická informace není jediným faktorem ovlivňujícím vývoj a průběh onemocnění. Kromě genů hrají důležitou roli epigenetické změny, které prokazují významný vliv u celé řady onemocnění, u kterých se dříve předpokládalo čistě genetický základ. Epigenom obsahuje různé modifikace DNA a chromatinu, které mohou být ovlivněny vnějšími faktory (např. stres, strava nebo expozice toxickými látkami) a následně ovlivňovat projevy genů. V současné době se intenzivně zkoumá využitelnost epigenomu jako cíleného terapeutického cíle u mnoha onemocnění.

Jednou z možností, jak cíleně modifikovat epigenom, je využití technologie CRISPR/Cas9. Tento systém umožňuje velmi přesně zacílit na specifickou oblast genomu a modifikovat ji. V posledních letech tato nová oblast výzkumu poutá stále více pozornosti, jelikož nabízí zcela nové přístupy ke zlepšení diagnostiky a léčby řady vážných onemocnění.

I z tohoto důvodu jsem se rozhodla zaměřit svoji bakalářskou práci na řešení těchto témat. V první kapitole jsem se zaměřila na epigenom a jeho různé modifikace. Další část práce je věnovaná technologii CRISPR a jejím možnostem využití v oblasti modifikace epigenomu. Cílem práce je poskytnout ucelený přehled o této nové oblasti výzkumu a potenciálu využití epigenomu a CRISPR/Cas9 v klinické praxi.

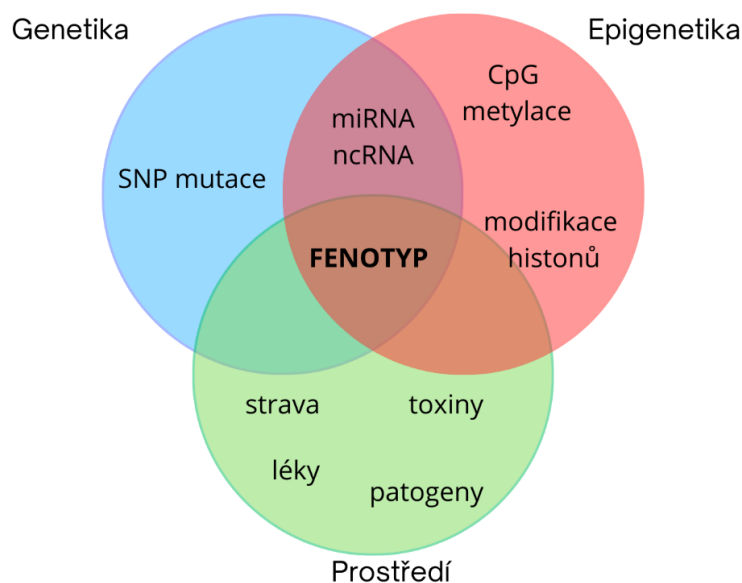
2 Epigenetika

Slovo „epigenetika“ bylo původně zavedeno složením slov epigeneze a genetika, popisovalo mechanismus diferenciaci buněk během vývoje zvířat (Rivera a Ren 2013). Od svého vzniku v roce 1942 se pojem „epigenetika“ postupně vyvíjel. Vystřídal řadu definic jako například „Příslušné interakce genetických faktorů a vývojových procesů vyjadřující fenotyp z genotypu.“ z roku 1982 (R. J. Lincoln et al. 1982) než našel současnou podobu definovanou na přelomu minulého století (Deans a Maggert 2015); „Studie změn fungování genomu, které jsou meioticky a /nebo mitoticky dědičné a nezpůsobují změnu DNA sekvence (Wu a Morris 2001).“

Epigenetika je v dnešní době vnímána jako nový obor vycházející z genetiky zabývající se dědičnými změnami genové aktivity a funkce, které nejsou způsobeny změnou DNA sekvence jako takové. Sjednocuje celou řadu nezávislých procesů ovlivňujících genovou expresi: metylaci DNA, posttranslační modifikace na histonech, remodeling chromatinu a další regulace zprostředkované nekódující RNA, do jednoho celku. (Pei et al. 2020). Epigenetické změny hrají klíčovou roli při vývoji jedince a také při vzniku různých onemocnění. Jsou schopny ovlivňovat fenotyp viz obrázek 1 bez změny pořadí nukleotidů nebo aminokyselin, mohou být reverzibilní a dědičné.

Na epigenetiku se tedy můžeme dívat jako na proces, který dokáže reagovat na vliv prostředí okamžitě, a to nejen v rámci jedné generace. Na rozdíl od genetiky, kde změny (mutace) probíhají pozvolna v řádu generací a jejich „vhodnost“ pro přežití se musí ověřit přirozeným výběrem. Epigenetické změny jsou také přirovnávány k jakýmsi přepínačům, které regulují prepis daných úseků DNA. Tyto změny mohou být benigní, tak maligní. Proto se pozvolna epigenetika dostává do oprávněného zájmu diagnostiky.

Na rozdíl od drobných genetických změn, jako jsou jednobodové mutace (SNP), případně drobnější inserce/delece, tak změny epigenetické jsou velmi komplexní a vyžadují rozsáhlejší analýzy a znalost spojitostí změn. V dnešní době díky vysokokapacitním technikám, jsme již schopni vyšetřovat např. tzv. metylační profil, který slouží i jako rakovinný marker.



Obrázek 1: Geneticko – epigenetický fenotyp Fenotyp každé buňky reflektuje její genetickou výbavu, vliv okolního prostředí a také její epigenetickou jedinečnost. Všechny tyto vlastnosti se pak dále odráží v projevech celého organismu. V takovéto situaci by mělo být nahlíženo na všechny genetické obojvy jednak v kontextu epigenomu (převzato z Dwivedi et al. 2011, upraveno).

2.1 Metylace DNA

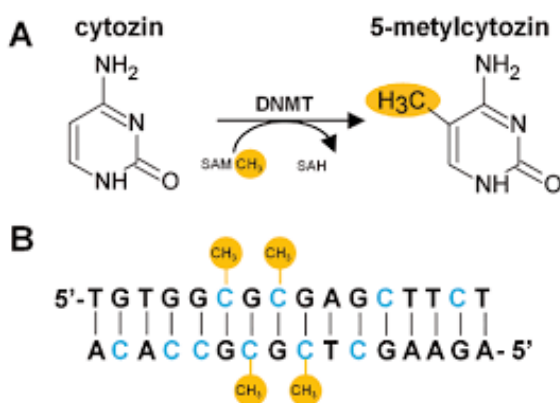
Výzkumy jednotlivých epigenetických procesů začaly probíhat již před zavedením pojmu epigenetika. Nejdéle známou genovou modifikací je metylace DNA; v savčích buňkách byla objevena současně s objevem genetického materiálu samotného. Teprve až v 80. letech minulého století Holliday a Riggs poprvé vznesli hypotézu, že by metylace mohla hrát roli v regulaci genové exprese (Holliday 2006). V dnešní době je potvrzeno, že metylace DNA je hlavním, a také dědičným, epigenetickým faktorem ovlivňujícím regulaci genů. Především se podílí na umlčování genů (tzv. „gene silencing“), genomovém imprintingu, regulaci tkáňové specifity a na inaktivaci X chromozomu (u homozygotních jedinců). Její vliv se mění dle regionu jejího výskytu (Bird 2002; Moore et al. 2013).

Jediným metylovaným nukleotidem v lidském genomu je cytosin, vyskytující se v dinukleotidovém páru s guaninem (CpG) a to pouze v oblastech genomu chudých na tento typ páru. 60–80 % CpG vyskytujících se v lidském genomu je metylováno. Oblasti genomu s vyšší četností výskytu CpG jsou nazývány CpG „ostrůvky“ a nacházejí se většinou v blízkosti promotorů, cytosin na v těchto ostrůvcích je odolnější vůči metylaci (Neidhart 2016). Metylace cytosinu probíhá na pátém uhlíku (5mC) viz obrázek 2.

Metylační vzorec každého jedince je založen během embryogeneze a přenášen na všechny vznikající somatické buňky. V průběhu replikace DNA je na mateřském vlákně metylace zachovávána a nově vznikající dceřiné vlákno je pro zachování symetrie hemimetylováno. Hemimetylované cytosiny jsou rozpoznávány DNA metyltransferázami a následně plně metylovány.

2.1.1 DNA-metyltransferázy

Při metylaci je dárce metylové skupiny (-CH₃) S-adenosylmetionin (SAM) a reakce je katalyzována 3 různými enzymy ze skupiny DNA-metyltransferáz (DNMT), DNMT1, DNMT3a a DNMT3b. Ačkoliv jsou si všechny tři enzymy strukturně velmi podobné s N- koncovou regulační oblastí a C-koncovou katalytickou oblastí, tak mají velmi specifické funkce.



Obrázek 2: Methylace cytosinu **A** Schéma reakce přenosu metylové skupiny z S-adenosylmetionin (SAM) pomocí DNA-metyltransferázy (DNMT) na pátý uhlík cytosinu za vzniku 5- metylcytosinu (5mC) **B** vyobrazení 5mC v DNA řetězci (Bartošík a Ondroušková 2016).

DNMT1 je nazývána udržovací (z angličtiny „maintenance“H1). Zajišťuje přepis metylace na nově syntetizované vlákno během DNA replikace. Její schopnost metylace je závislá na přítomnosti hemimetylačních řetězků. Zároveň má také schopnost opravovat DNA metylace, v těle je tedy syntetizována po celou délku života. Nezbytná je však pro správný vývoj embrya v ranném stádiu, kdy dochází k inaktivaci jednoho z X chromozomů.

Funkce DNMT3a a DNMT3b je zcela nezávislá na hemimetylací, z tohoto důvodu jsou označovány *de novo* DNMT. Tyto dva enzymy mají kromě podobné struktury i velmi podobnou funkci, dokáží metylovat jak nově syntetizované vlákno, tak i to původní. Jejich odlišnost spočívá v genové expresi, DNMT3a vzniká ve většině tkání, DNMT3b vzniká velmi zřídka v diferencované tkáni, výjimkou je štítná žláza a kostní dřeň. Obě jsou však syntetizovány primárně v embryonální fázi vývoje jedince, kde vytváří metylační vzorec. V tomto období je jejich metyltransferázová aktivita umocněna proteinem DNMT3L, který

individuálně postrádá katalytickou funkci. Jeho využití se uplatňuje také během gametogeneze, kde dochází k pozměnění metylačního vzorce vzhledem na pohlaví jedince. Ovlivňuje průběh genového imprintingu, tedy uchování metylace cytosinu dědičně z jedné z rodičovských alel.

Způsob výběru specifických genetických oblastí k metylaci není dosud zcela objasněn, existují však mnohé teorie zahrnující vliv interferenční RNA, nebo také vliv transkripčních faktorů, které se mohou vázat na genom a chránit je před metylací.

2.1.2 Demethylace DNA

Ačkoliv je metylace z chemického pohledu velmi stabilní modifikací cytosinu, za určitých okolností probíhá i její zvrtný proces, tedy demethylace. Přirozeně k tomuto procesu dochází ve dvou životních fázích u preimplantace embrya a u gametogonií (prvotních zárodečných buněk) (Ying a Chen 2023).

Krátce po oplození dochází k aktivní demethylaci paternální DNA, těsně před její replikací (Ying a Chen 2023). U savců aktivní demethylace probíhá přes sérii chemických reakcí, jež vedou ke kompletní výměně modifikovaného metylového cytosinu za nahý cytosin. Biochemická podstata těchto reakcí byla plně pochopena teprve v roce 2009 se zjištěním, že jsou do procesu zapojeny enzymy ten-eleven translokační (TET) metylcytosyn dioxygenázy (Pastor et al. 2013). Maternální demethylace probíhá při rýhování vajíčka pasivní formou. Enzym DNMT1 je inhibován a nedochází tak k zachování metylace na nově vznikajícím vláknu. U embrya zůstávají metylovány pouze speciální oblasti genomu, kterými jsou např. kontrolní regiony imprintingu.

Další demetylační fáze probíhající u gametogonií, tvoří zde epigenom nezbytný pro vývoj zárodečných buněk. Dochází zde k demethylaci oblastí zachovaných z předchozí fáze. Na začátku této fáze je celý genom pasivně demetylován, čehož výsledkem je celková hypomethylace. Následně probíhá současně jak pasivní i aktivní mechanismus demethylace postihující především speciální oblasti genomu (Ying a Chen 2023).

2.1.3 TET

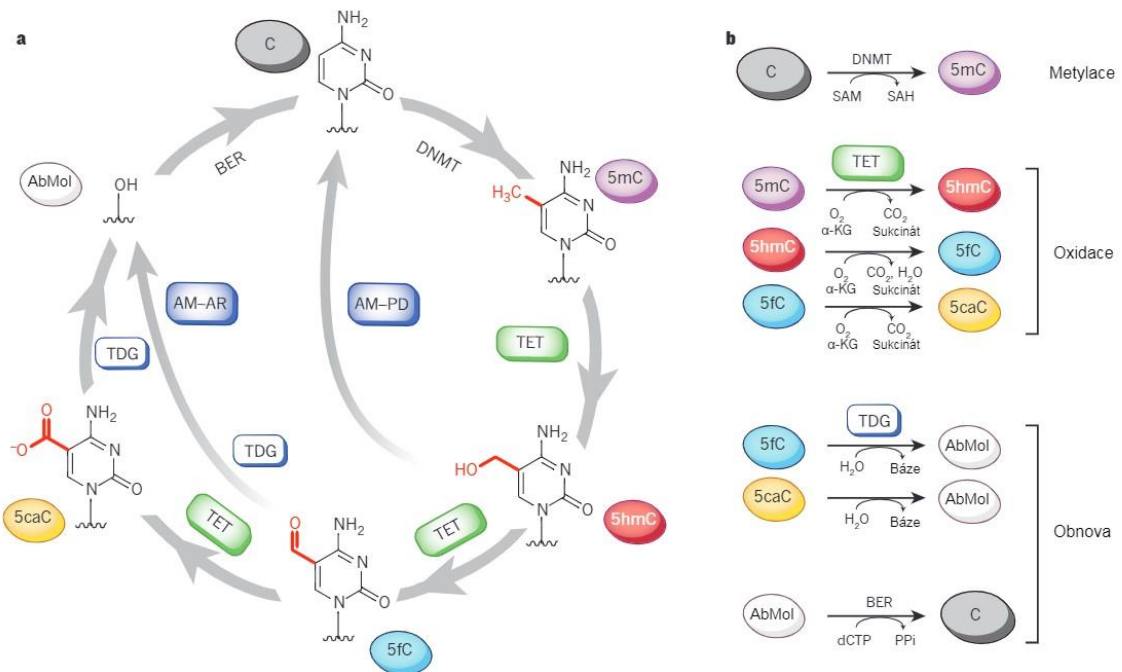
TET proteiny jsou pojmenovány po translokaci (t(10;11)(q22;q23)), vyskytující se u vzácných forem akutní myeloidní a lymfatické leukémie, kdy leukemický gen nacházející se na lidském chromosomu 22 spojen s genem TET1 nacházejícím se na chromosomu 11 (Pastor et al. 2013).

U savců nacházíme 3 proteiny skupiny TET, konkrétně TET1, TET2 a TET3. Jedná se o Fe^{2+} - a 2-oxoglutarát-dependentní dioxygenázy schopny oxidovat 5mC

na 5 - hydroxymetylcytosin (5hmC), 5-formylcytosin (5fC) a 5-carboxylcytosin (5caC) v DNA viz obrázek 3 (Kohli a Zhang 2013). TET proteiny mají významnou roli v celé řadě biologických procesů, jejichž mechanismy nejsou dosud zcela pochopeny.

Teorie, že by TET proteiny mohly mít vliv na DNA modifikaci vznikla při analýze obdobné skupiny proteinů u *Trypanosoma brucei*, kdy byla oxidována metylová skupina na tyminu. Chemická podobnost tyminu a 5mC oxidací vedla k návrhu zapojení TET proteinů v demetylačních procesech na DNA (Wu a Zhang 2014). Následně byla prokázána přítomnost oxidované formy 5hmC v různých koncentracích v savčích buňkách.

TET proteiny jsou zapojeny v procesu aktivní demethylace. Potvrzený mechanismus průběhu začíná oxidací 5mC na 5hmC a dále na 5fC s 5caC. 5fC a 5caC mohou být odstraněny tymin DNA glukosidázou (TDG) a jejich nahrazení cytosinem vede k demethylaci.



Obrázek 3: Kompletní průběh aktivní modifikace C a. Grafické znázornění biochemického průběhu modifikace C v DNA, kde je 5-metylcytosin (5mC) opětovně oxidován na 5- hydroxymetylcytosin (5hmC), 5-formylcytosin (5fC) a 5-carboxylcytosin (5caC). Aktivní modifikace (AM) následována pasivní dilucí (PD), kde je 5hmC zařazena do replikačně – dependentního procesu pro regeneraci na nemodifikovaný C (vysoce oxidovaný 5fC a 5caC není v tomto procesu znázorněn). Dalším vyobrazeným procesem je aktivní modifikace následovaná aktivní obnovou v rámci, něž je 5fC nebo 5caC odstraněn pomocí TDG, vznikající abazická molekula (AbMol) je zapojena do procesu bazické excizní obnovy (z angličtiny „BER“) a nahrazen nemodifikovaným C. b. Vyobrazení dílčích reakcí se všemi zapojenými reaktanty. Proces BER zahrnuje excizi abazické molekuly, náhradu nukleotidu nemodifikovaným trifosfát – deoxycytidinem (z angličtiny „dCTP“) a DNA polymerázou (za vzniku pyrofosfátu PPi). α -KG, α -ketoglutarát; SAM, S-adenosylmethionin; SAH, S-adenosylhomocystein (Převzato Kohli a Zhang 2013, upraveno).

2.2 Modifikace histonů

Genom eukaryotických buněk je organizován do vysoce kondenzovaných struktur, nazývaných chromatin, zajišťující ochranu a kontrolu nad genovou expresí. Z čehož vyplývá jeho zapojení do základních nukleárních procesů, jako je transkripce, replikace a oprava DNA. Chromatin se vyskytuje ve dvou funkčních formách, kondenzovanější forma bránící regulačním procesům na DNA nazývaná heterochromatin a méně kondenzovaná forma, euchromatin, která poskytuje prostor pro regulační procesy DNA. Základní stavební jednotkou chromatinu jsou nukleosomy, tvořeny oktamerem histonů, kolem něž je dvakrát obtočena DNA, konkrétně 147 bazických párů. Každý ze základních histonů H2A, H2B, H3 a H4 se v oktameru vyskytuje ve dvou podjednotkách. Pro větší kompaktnost je na začátku a na konci nukleosomu navíc umístěn spojovací histon H1 (Vanzan et al. 2023).

V buňkách je vyvinut epigenetický mechanismus upravující tuto chromatinovou strukturu kovalentními posttranslačními modifikacemi na histonech. Hlavním principem modifikací je ovlivnění interakce mezi dvěma nukleosomy případně nukleosomem a DNA změnou náboje a struktury na koncích histonů. Tyto úpravy probíhají primárně na N-terminálním konci, který vykazuje pozůstatky kladného náboje. Aktuálně je známo přes 80 různých typů histonových modifikací. Nejprozkoumanějšími modifikacemi jsou acetylace, metylace, fosforylace a ubiquitace, viz obrázek 4.

2.2.1 Metylace histonů

Metylace histonů nejběžněji probíhá na pozůstatcích lysinu (K) či argininu (R) vyskytujících se na histonech H3 a H4. Tento proces spočívá v kovalentní adici metylové skupiny na atomy dusíku ve zbylých postranních řetězcích. Donorem metylové skupiny do reakce je stejně jako v případě metylace DNA, SAM za katalýzy histonovou metyltransferázou (HMT). Lysinový pozůstatek může být mono-, di- nebo tri- metylován (me1, me2 nebo me3), zatímco arginin pouze mono- či di- metylován. Existují také dvě formy dimetylovaného argininu: symetrická a asymetrická.

Na rozdíl od jiných histonových modifikací, metylace histonů ovlivňuje aktivitu či pasivitu transkripce v závislosti na své poloze a stupni metylace histonu. Obecně by se dalo říci, že jako aktivující lysinové znaky jsou vnímány H3K4, H3K36, a H3K79 vyskytující se na chromatinu v oblastech s aktivní transkripcí genů. Naopak H3K9, H3K27, a H4K20 bývají vnímány jakožto potlačující a jsou spjaty s umlčováním genů (Vanzan et al. 2023). Mnoho studií navíc prokázalo spojitost mezi nedostatečnou regulací histonové metylace a mnohými onemocněními.

V lidském proteomu se většina lysinových metyltransferáz (KMT) vyskytuje s doménou SET (Su(var)3-9, Enhancer of zeste, Trithorax), která obsahuje metyltransferázovou aktivitu. Tuto doménu původně objevili v třech proteinech *Drosophila melanogaster*. První HMT popsanou u savců byla „Suppressor of variegation 3-9 homologue 1 (SUV39H1)“, která se podílí na umlčování pericentrického heterochromatinu. SUV39H1 může být klasifikována jako hlavní trimetylační enzym pro H3K9.

Výjimku u KMT tvoří protein Dot1 (distributor of telometric silencing-1) tedy konkrétněji jeho lidský homolog DOT1L (Dot1-like), obsahující jinou doménu, 7 β S (seven-beta-strand), který jakožto jediný protein v lidském organismu cílí na H3K79me (Crusio et al. [b.r.]; Husmann a Gozani 2019).

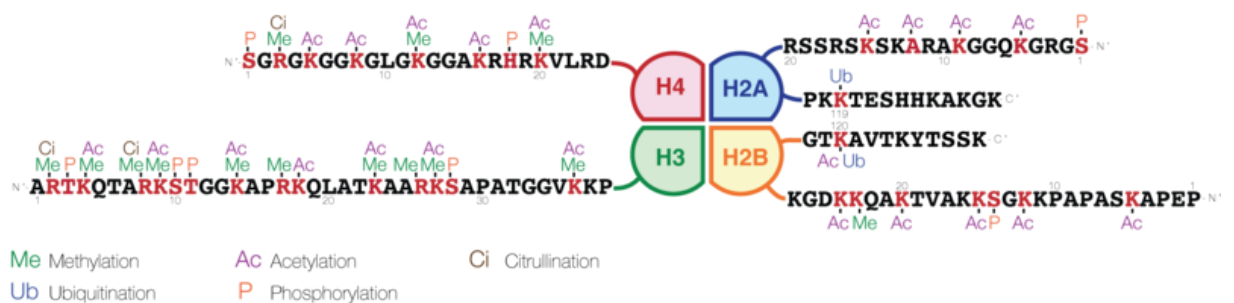
Komplex proteinů asociovaných se SET1 (z angličtiny „Complex of proteins associated with SET1; COMPASS) je enzymový komplex zodpovědný za metylaci konkrétně H3K4, což je modifikace, která zajišťuje vysokou transkripční aktivitu. Tento komplex zahrnuje mimo jiných i MLL1/MLL2 (mixed lineage-leukemia), které metylují H3K4 až na me3 (Morgan a Shilatifard 2020).

Na druhé straně, za charakteristický znak genové represe je považována metylace 27. lysinu na histonu 3 (H3K27). Trimetylovaný lysin díky připraveným zesilovačům a snižování výskytu monometylovaného lysinu u embryonálních zárodečných lidských buněk má významný represivní vliv na geny spojené s vývojem jedince. Tuto modifikaci katalyzuje komplex PRC2, který se skládá ze čtyř enzymatických podjednotek (Ezh2, Suz12, EED a RbAP46/48). Ezh1 nebo Ezh2 (homolog enhanceru zeste 1/2) jsou enzymy, které katalyzují přidání methyly na histon H3 na lysinu 27 (H3K27), což způsobuje heterochromatinizaci a potlačení genové exprese. EED (protein vývoje embryonálního ektodermu) se váže na methylovaný H3K27 a umožňuje tak další rekrutaci PRC2 komplexu k této oblasti. SUZ12 (supresor zeste 12) a RbAp46 nebo RbAp48 (proteiny asociované s retinoblastomem 46/48) stabilizují komplex a zajišťují jeho správnou funkci.

Existují tři třídy argininových metyltransferáz (PRMT) - typ I, typ II a typ III – které se liší mechanismem přenosu methylové skupiny a charakteristickými sekvencemi aminokyselin. Typ I PRMTs přenáší jednu methylovou skupinu na argininové zbytky v cílových proteinech, zatímco typ II PRMTs přenáší dvě methylové skupiny. Typ III PRMTs jsou schopné vytvářet monomethylace i asymetrické dimethylace.

Demethylace histonů je dalším důležitým procesem v buněčné regulaci. První lysin specifickou histonovou demetylázou (LSD1) objevili v roce 2004 (Perillo et al. 2020), později byla přejmenována na KDM1 dle aktuální nomenklatury. Tento enzym se specializuje na demetylaci H3K4 s kofaktorem flavin adenin dinukleotidem (FAD). Kromě toho dokáže demetylovat H3K9 v přítomnosti androgenního receptoru. Další objevené enzymy byly rozděleny do dvou rodin (Husmann a Gozani 2019). První z těchto rodin zahrnuje enzymy, jejichž reakce jsou FAD-dependentní a jsou nazývány JARID1 (Jumonji AT-rich interactive domain 1), zahrnující i KDM1. Druhá rodina enzymů, nazývaná „Jumonji C domain-containing proteins“ zkratka JMJD2 používá k odstraňování metylové skupiny oxidativní reakci založené na 2-oxoglutarátu (Varier a Timmers 2011).

Metylace histonů může mít významné dopady na různé biologické procesy, včetně vývoje a diferenciaci buněk, buněčného dělení a opravy DNA, apoptózy a genové exprese. Poruchy v metylaci histonů mohou být spojeny s řadou onemocnění, včetně rakoviny a neurologických poruch. Proto se v posledních letech intenzivně zkoumá role proteinových metyltransferáz v regulaci genové exprese a jejich potenciální terapeutické využití v léčbě různých onemocnění.



Obrázek 4: Znázornění histonových modifikací. Tento obrázek zobrazuje hlavní modifikace čtyř jádrových histonů (H4, H2A, H3 a H2B) jejich typ a polohu v aminokyselinové sekvenci proteinů. Aminokyseliny jsou znázorněny odpovídajícími písmeny. Me znamená metylace, Ac acetylce, C citrulinace, Ub ubiquitace, P fosforylace (Walter 2015).

2.2.2 Acetylce histonů

Jak již bylo výše zmíněno, většina úprav probíhá na N-terminálním konci histonů. Acetylací je přenesena acetylová skupina z acetyl-CoA na ε amino skupinu lysinu vyskytující se na N-terminálním konci a dochází tak k neutralizuje jeho náboje. Současné dochází také k oslabení elektrostatických sil působících mezi nukleosomy a negativně nabitou DNA, což zvyšuje přístupnost pro transkripční faktory a regulační komplexy. Adice je katalyzována skupinou enzymů původně nazývaných histon acetyltransferázy (HAT), nicméně

díky pozdějším studiím bylo zjištěno, že tyto enzymy cílí i na ne-histonové proteiny, z tohoto důvodu byly přejmenovány na lysin acetyltransferázy (KAT).

KAT se dále rozděluje na dva typy, typ A acetyluje již začleněný histon, typ B pak acetyluje pouze nově syntetizované histony v cytoplazmě. U savců však převládají pouze dvě třídy KAT typu A-GNAT (General control nonderepressible 5-related acetyl-transferases), jejíž zástupcem je GCN5 (KAT2A), která acetyluje transkripční faktory a funguje také jako spoluaktivátor, a p300/CBP (CREB vázající protein), do které patří dva nejvíce prozkoumané regulátory P300 a CBP, kteří převážně sdílejí strukturu i funkci a jsou mnohdy považováni za jednu entitu. Existuje také skupina NCoA spjatých KAT se steroidními receptorovými koaktivátory.

V případě, že je nutné snížit transkripční aktivitu v daných úsecích DNA, dochází k deacetylaci histonů za pomoci histonových deacetyláz (HDAC) a opětovnému zkonenzování chromatinového vlákna. Obdobně jako u KAT se i HDAC je u savců zastoupen vícero enzymy, rozdělujících se do čtyř tříd na základě jejich homologů vyskytujících se u kvasnic. Třídy I, II a IV obsahují zinkovou katalickou vazebnou doménu, třída III využívá k deacetylaci nikotinamidadeninukleotid.

2.2.3 Fosforylace histonů

Fosforylace histonů spočívá v adici fosfátové (PO_4) skupiny na postranní řetězec zbytkových aminokyselin. Pro všechny známé fosfokinázy je donorem fosfátové skupiny adenosintrifosfát. Nejčastěji s vyskytuje u serinu, treoninu nebo tyrosinu u nichž mění charakteristické biochemické vlastnosti z hydrofobních nepolárních na hydrofilní polární zbytky. Změna biochemických vlastností má následný vliv na celkové skládání proteinů a také na jejich vzájemné interakce. Což se mimořádně projevuje při buněčném cyklu a dělení buněk, transkripci a opravě DNA. V porovnání s acetylací a metylací histonů, fosforylace propojuje okolní modifikace a vytváří mezi nimi vzájemné interakce. Vzniklá propojení mají za následek komplexní snížení regulace chromatinové struktury. Příkladem může být H3S10 fosforylace, která přímo ovlivňuje úroveň acetylace dvou aminokyselinových zbytků na histonu H3, konkrétně H3K9ac a H3K14ac, mimoto H3S10ph může také aktivovat transkripci ovlivněním acetylace na H2K16 (Walter 2015; Morgan a Shilatifard 2020).

2.3 Nekódující RNA

Velká část transkribovaného genomu není v organismu translatována do funkčních proteinů nicméně i přes to má většina z nich vitální funkci. Nekódující RNA (ncRNA) jsou

shluky právě těchto částí přepsaného genomu, původně se vědci domnívali že nachází své uplatnění pouze při regulaci genové exprese na posttranslační úrovni. Nicméně novější studie zvažují možnost, že se jedná o nejběžněji se vyskytující regulační mechanismus v organismu, který hraje zásadní roli v kontrole genomu prostřednictvím epigenetických modifikací (Chhabra 2023). Dle délky řetězce se tato skupina RNA dále dělí na krátké nekódující RNA, kam řadíme malé narušující RNA (siRNA), micro RNA (miRNA) a Piwi – interagující RNA (piRNA) a na dlouhé nekódující RNA (lncRNA) Mimo skupinu regulačních ncRNA se v organismu vyskytují také udržovací ncRNA (Wei et al. 2017).

2.3.1 Krátké ncRNA

Mikro RNA jsou jednovláknové RNA. S pokročilým vývojem sekvenačních technologií jich bylo v lidském organismu nalezeno přes 2 500 druhů (Zhang a Pradhan 2014).

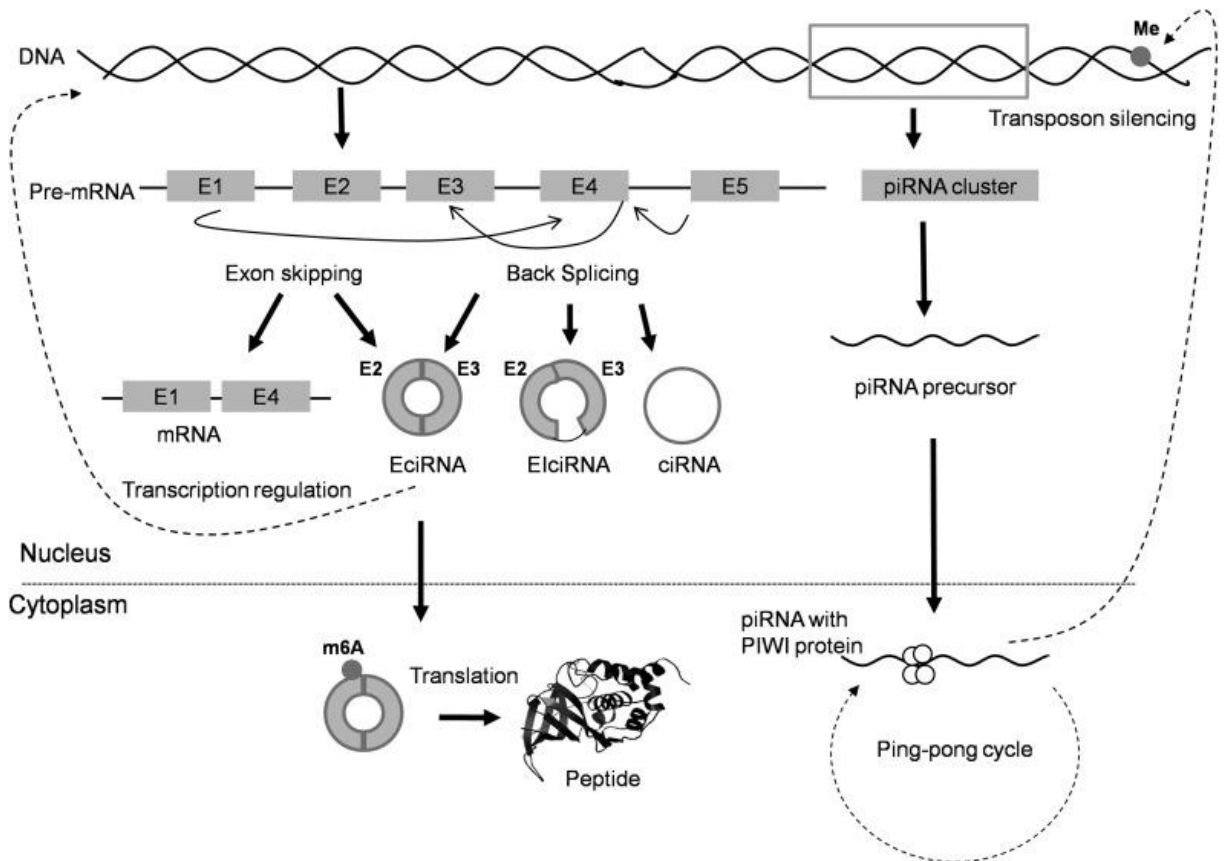
Jejich geny se z 50 % nacházejí v oblastech chromozomu náchylných na strukturální změny. Jsou přepisovány promotory RNA polymerázami II/III (Pol II/III) na primární transkript (pri-transkript) vlásenkové struktury, který je několik tisíc nukleotidů dlouhý. Ten je následně zkrácen Drosha a DGCR8 komplexem na prekurzor (pre-miRNA) o délce stovek nukleotidů a transportován z jádra komplexem Exportin5. Zde je opět zkrácen, tentokrát pomocí komplexu Dicer (TRBP) na finální jednovláknovou miRNA o délce přibližně 19–24 nukleotidů. Schéma celé biogeneze je znázorněno na obrázku 6. miRNA se v cytoplasmě váže s proteinem Argonate (AGO2) na RNA-indukovaný umlčující komplex (RISC), díky nimž a je schopna se úplně nebo částečně navázat na 3' -UTR konec messenger RNA (mRNA) a štěpit ji nebo zamezit její translaci (Wei et al. 2017; Hombach a Kretz 2016). Čímž toto štěpení cílených mRNA způsobuje transkripční umlčování genů. Předpokládá se, že více než 60 % všech mRNA má cílenou strukturu pro navázání miRNA a dochází tak k jejich úzké regulaci, jak při normální buněčné homeostáze, tak ve stádiích onemocnění. Mikro RNA jsou tak využitelné jako diagnostické a prognostické markery například u rakoviny (Wei et al. 2017).

Malé narušující RNA (siRNA) jsou deriváty dlouhých dvouvláknových RNA molekul střižených, stejně jako v případě miRNA, Dicer enzymem na fragmenty o délce přibližně 21 nukleotidů. Stejně tak se spolu s AGO proteiny váží na RISC komplex a degradují mRNA (Wei et al. 2017). Prostřednictvím DNA metylace a histonových modifikací mohou siRNA způsobovat transkripční umlčování genů.

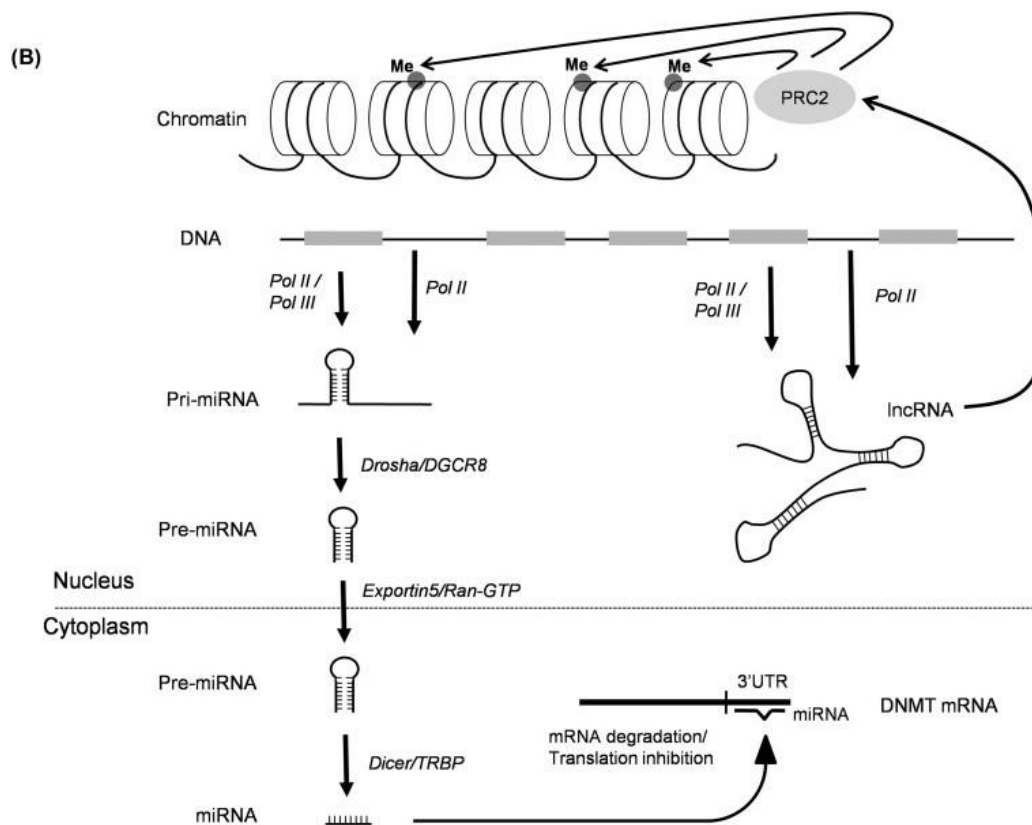
piRNA je skupina RNA molekul o přibližné délce 26-31 nukleotidů. Jsou přepisovány jako jedno vláknové prekurzory RNA z oblastí genomu obsahující transpozony a repetitivní

sekvence. Dozrávají v cytoplazmě, kde jsou vázány s PIWI proteiny, odkud také dostaly svůj název. U savců mají piRNA schopnost umlčovat transpozony, což hraje klíčovou roli při embryonálním vývoji.

Cyklická RNA (circRNA) byla objevena více než dvě desetiletí zpět. Nedávno se ovšem dostala zpátky do povědomí. Její biogeneze zahrnuje zpětné spojování nebo vynechávání exonu pre – mRNA při transkripci. Detailněji je biogeneze piRNA a circRNA popsána v obrázku 5.



Obrázek 5: Biogeneze piRNA a circRNA. CircRNA vzniká zpětným přepisem či vynecháváním exonových částí u přepisu prekurzoru mRNA. Mohou být dále rozděleny na exonní circRNA (EciRNA), 5' (EIciRNA) a intronní circRNA (ciRNA). Genomové lokusy pro circRNA jsou vysoce aktivní regiony s promotory H3K27Ac. Nedávná studie poukázala na N6-metyladenosin (m6A) jakožto na kódující potenciál právě pro circRNA. piRNA jsou přepisovány jako prekurzory ze specifických lokusů označovaných jako piRNA shluky. piRNA prekurzory jsou exportovány z jádra do cytoplazmy, kde na ně působí helikázy a nukleázy ve zobrazeném cyklu na který je často odkazováno jako na ping pongový cyklus. Z cyklu následně vzniká zralá piRNA, zodpovědná za metylaci transponovaných prvků v genomové linii. E1 – E5 ve schématu znázorňují exony 1-5, plné čáry představují intronní sekvence a Me značí metylaci (Převzato z Chhabra 2023).



Obrázek 6: Schéma biogeneze miRNA a lncRNA a jejich mechanismus modifikace epigenomu. Biogeneze miRNA začíná v jádře vytvářením primárního přepisu takzvaná pri-miRNA o délce několika tisíc bází. Transkripce je regulována jednou z RNA polymeráz II nebo III (Pol II/ Pol III). Při-miRNA je dále štěpena komplexem Drosha/DGCR8 a vzniká prekurzor miRNA (pre-miRNA) o délce několika stovek bází. Pre-miRNA je z jádra transportována do cytoplazmy přes Exportin 5 a zde je znovu štěpena tentokrát komplexem Dicer/TRBP na 21 nukleotidů dlouhou zralou miRNA. Zralá miRNA je schopna degradovat nebo potlačit transkripci u cílené mRNA. Většina vznikajících lncRNA jsou nukleárně vázány a jejich biogeneze je jednodušší. Intergenní lncRNA jsou přepisovány pomocí Pol II a intronní lncRNA jsou přepisovány Pol II. Pro regulaci epigenomu miRNA cílí na tvorbu proteinů jako jsou DNMT, lncRNA způsobují remodelaci chromatinové struktury navázáním proteinů PRC2 nebo DNMT na požadovaný lokus. Ve schématu šedé bloky znázorňují různé geny a linie spojující tyto bloky představují intergenní regiony na DNA. Me označuje metylaci (Převzato z Chhabra 2023).

2.3.2 Dlouhé ncRNA

lncRNA jsou dlouhé nekódující RNA molekuly, které hrají důležitou roli v regulaci genové exprese a v epigenetických mechanismech. V lidském genomu tvoří přibližně 60 % z ncRNA a byly nalezeny v jádře i v cytoplazmě buněk. lncRNA jsou převážně transkribovány RNA polymerázou II, po transkripci jsou sloučeny a polyadenylovány a vytváří často komplexní třídimenzionální struktury, tento proces je znázorněn na obrázku 6. Tyto molekuly mohou interagovat s DNA nebo jinými RNA a utvářet regulační sítě, které ovlivňují mnoho procesů, včetně epigenetiky. lncRNA jsou schopny ovlivňovat acetylaci a metylaci histonů, de-methylaci DNA a remodelaci chromatinové struktury. Jejich výzkum má velký potenciál pro léčbu různých onemocnění, zejména rakoviny.

3 CRISPR

System CRISPR (**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats) se vyskytuje v prokaryotních organismech, a slouží jako jakýsi imunitní systém, bránící fágové infekci. Rozeznává cizorodou DNA, se kterou se již setkal. Tato DNA je ukládána do lokusů. CRISPR lokusy, jsou složeny z pravidelně se opakujících palindromických genových sekvencí, tvořených přibližně 20 až 55 páry bází, ve většině případů jich však nenacházíme více než 40 (Ishino et al. 1987). Sekvence jsou od sebe odděleny, pravidelně umístěnými cizorodými úseky DNA o stejné délce tzv. mezerníky, jejich délka je také napříč druhy variabilní nejkratší úseky jsou složeny z 10 párů bází, ty nejdelší jich mohou mít více než 50 (Rath et al. 2015). K lokusům jsou dále přidruženy geny kódující *Cas* proteiny, které jsou nezbytné pro celý systém (Jansen et al. 2002).

Celý CRISPR/Cas systém se přirozeně vyskytuje jako součást genomu archeí a bakterií a funguje jako adaptivní RNA – naváděný (Jiang a Doudna 2017) obranný mechanismus. Tyto organismy si díky němu dokážou vytvořit rezistenci vůči virům, plazmidům a jiným patogenům.

3.1 Historie

Velká změna pro genové inženýrství nastala v 80. letech 19. století, konkrétně roku 1987, kdy při výzkumu *iap* (alkaline phosphatase isozyme conversion protein) genu v bakterii *Escherichia coli* japonští vědci objevili opakující se sekvence DNA ve směru transkripce genu (Bozorg Qomi et al. 2019). Nezávisle na předchozím výzkumu na tyto opakující se sekvence narazila španělská vědkyně Mojica, která se jimi začala zabývat. V roce 1995 spolu se svými kolegy prokázala jejich existenci ve všech prokaryotních organismech (Mojica et al. 1995). Později byly tyto sekvence označeny jako segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetit, zde z angličtiny (**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats) zkráceně CRISPR.

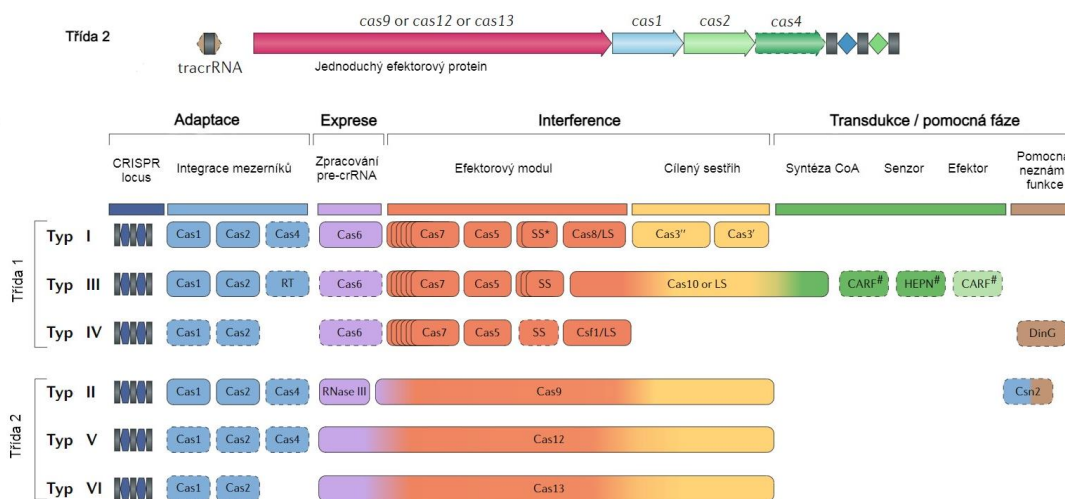
Jansen (Jansen et al. 2002), který začal tyto úseky také zkoumat, ve spolupráci s výzkumným týmem Mojica, objevil v různých bakteriích čtyři geny v návaznosti na CRISPR a označil je *Cas1* až *Cas4* (CRISPR-associated genes) (Jansen et al. 2002). V roce 2005 se Mojica podařilo vysvětlit význam CRISPRu v bakteriích který do té doby nebyl znám. Zjistila, že CRISPR hraje roli v ochraně těchto mikroorganismů proti vnějším patogenům a fágům. (Mojica et al. 2005; Singh 2020) Následný výzkum definoval CRISPR – Cas systém jako adaptabilní imunitní systém bakterií, který využívá proteiny Cas k rozpoznávání a štěpení

zaměřené DNA (Barrangou et al. 2007; Bolotin et al. 2005). Výsledky výzkumu byly ověřeny úspěšnou integrací fág-specifické sekvence do CRISPR locusu bakterie *Streptococcus thermophilus*, která poskytla rezistenci na příbuzné fágy (Makarova et al. 2011). Dále z výzkumu také vyplynula informace, že bakterie využívají různé typy systémů CRISPR, které mohou být zařazeny do tříd a typů dle svých specifikací (Bae et al. 2019). K roku 2011 byl popsán nespočet *Cas* genů a tři typy CRISPR systémů zahrnující i typ II s genem *Cas9* (dříve pojmenovány také jako *Cas5 csn1*).

Další pokrok, co se týče genového inženýrství nastal v roce 2012, kdy Jinek et al. předvedli právě protein CRISPR-Cas9 jako funkční RNA-řízenou DNA endonukleázu *in vitro* (Jinek et al. 2012). Studie mimo jiné poukázala i na potenciál tohoto proteinu jakožto biologické techniky, která může být aplikována za účelem vyvolat specifické mutace cílených genů. O rok později mnoho studií tento potenciál potvrdily a experimentálně provedly i genetické modifikace v lidských buňkách (Sternberg et al. 2013; Cong et al. 2013; Mali et al. 2013; Bae et al. 2019). Poté následovaly mnohé další studie s úspěšně řízenými úpravami genomu pomocí CRISPR-Cas9 v dalších živých systémech.

3.2 Klasifikace systému

Pro další výzkumy bylo nezbytné zavést klasifikační systém. Jelikož žádné geny nejsou sdíleny napříč celým systémem CRISPR-Cas, musel být systém zaveden na základě nejrozsáhleji prozkoumané skupiny operonů. Konkrétně se zaměřuje na složení *Cas* operonů, celkově na podobnosti genové vybavenosti, vnitřní genové organizaci, ale také na empirické poznatků. Tímto způsobem byly identifikovány signaturní geny jako zástupci pro jednotlivé typy a podtypy CRISPR systému. V současnosti se jedná o dvě třídy zahrnující šest typů (I-VI) a více než 30 podtypů (Makarova et al. 2020). Pro lepší přehlednost je klasifikace znázorněna schématem na obrázku 7.



Obrázek 7: Klasifikace CRISPR/Cas systému do tříd a typů. Schéma zobrazuje strukturální prvky všech šesti typů systému a zároveň je řadí dle jejich funkčních hodnot. Názvy proteinů jsou v souladu s aktuální nomenklaturou. Proteiny ohraničené přerušovanou čarou jsou pro některé podtypy postradatelné. Násobné ohraničení znázorňuje přítomnost kopií daného proteinu v komplexu. Vícebarevné proteiny jako např. Cas9 značí zapojení do více různých fází CRISPR/Cas odpovědi. (Převzato Makarova et al. 2020, upraveno).

3.3 Mechanismy

CRISPR-Cas imunitní systém probíhá ve třech fázích: adaptační, expresní a interferenční. Průběh jednotlivých fází může být lehce odlišný v závislosti na typech systému.

V první, adaptační fázi probíhá vystřížení části invazivní DNA sekvence (protospacerů) z CRISPR lokusů hostitele (Makarova et al. 2011). Protospacery jsou z invazivního organismu nejčastěji vybírány na základě rozpoznatelné sekvence o délce dvou až pěti párů bazí nazývaných proto-spacer-adjacent motifs (PAMs) (Jiang a Doudna 2017). Tyto sekvence jsou dále transkribovány a po úpravě ukotveny do CRISPR arrays, kde tyto sekvence pak dále tvoří mezerníky. Ukotvení probíhá za pomoci komplexu Cas proteinů, složených nejčastěji z Cas 1 a Cas 2 proteinů (Makarova et al. 2015). Mezerníky pak dále fungují jako genetická paměť chránící hostitelský organismus před napadením virem se stejnou rozpoznatelnou sekvencí.

Během druhé, expresní fáze, jsou CRISPR řetězce nejprve přepisovány do prekurzorových RNA (pre-crRNA). Komplexy Cas proteinů, čistý Cas protein nebo RNAsy dále upravují pre-crRNA do zralé CRISPR RNA (crRNA). Složené na 5' konci z mezerníkové sekvence komplementární cizorodé, a na 3' konci se nachází část repetitivní CRISPR sekvence (Jiang a Doudna 2017).

V poslední, interferenční fázi se vytvoří komplex složený z crRNA, specificky zaměřující protospacery, popřípadě jim podobné sekvence a navádějící Cas proteiny, fungující zde jako helikázy a nukleázy, zanechávající tupé konce. Výsledkem procesu je degradovaná cizorodá DNA (Jinek et al. 2012; Jore et al. 2011). Mimo to, může být CRISPR-Cas systém také využit jako regulační mechanismus kolektivní patogenity organismů (Makarova et al. 2015).

Typy I a III využívají velké množství Cas proteinů zapojených do komplexu v interferenční fázi. Oproti těmto systémům je typ II, podtyp C (nejčastěji se vyskytující u bakterií) založen pouze na dvou genech adaptační fáze a jedné DNA endonukleáze. Cas9, zajišťující štěpení obou vláken cizorodé DNA nukleázovými doménami HNH (histidin-asparagin-histidin nukleázová doména) a RuvC (podobná Ruv doméně resolvázy u *E. coli*). HNH štěpí komplementární vlákno DNA k crRNA a RuvC nekomplementární vlákno 3 páry bazí před úsekem PAM (Jiang a Doudna 2017).

Cas9 během této fáze spolupracuje s RNA průvodcem, který pomáhá vyhledávat cílené 20 nukleotidové úseky s přilehlými PAM úseky často obsahující guaniny. U typu II se konkrétně jedná o duální RNA, kdy se oproti ostatním systémům na každý repetitivní úsek pre-crRNA v expresní fázi navíc hydrolyzuje velmi krátká trans-aktivující RNA (tracrRNA) napomáhající její dozrávání enzymem RNasa III (Jiang a Doudna 2017; Gasiunas et al. 2012).

Roku 2012 se podařilo nahradit duální komplex tracrRNA:crRNA za jednoduchou naváděcí RNA (sgRNA), která je lépe využitelná pro genové inženýrství k cílenému vytvoření dvouvláknové mezery (DSB) s tupými konci (Jinek et al. 2012). Během výzkumu byla vyvinuta deaktivovaná verze Cas9 (dCas9) pro porozumění fungování štěpícího mechanismu, ze které se později vyvinula nová forma pro úpravu genomu (Ansari et al. 2022).

4 Klinická praxe

Epigenetika má zásadní vliv na různé fyziologické procesy. Zmíněné post-translační modifikace nacházející se na histonech chromatinu mají vliv na molekulární a buněčné procesy jako oprava DNA, transkripce, buněčný vývoj, diferenciace, homeostáza a další. Nicméně mutace epigenetických enzymů, misregulace genů vlivem aberací epigenetického kódu, má za následek vznik řady onemocnění, především rakoviny, diabetu, neurologických změn, infekčních onemocnění, autoimunitní onemocnění viz Tabulka 1 (Sar a Dalai 2021). Určitou roli hrají i vnější vlivy nebo stárnutí, zvyšující dysfunkčnost epigenetických mechanismů a pravděpodobnost vzniku život ohrožujících onemocnění.

Tabulka 1: Typy epigenetických modifikací a jejich defekty a vznik onemocnění (převzato z Sar a Dalai 2021, upraveno)

TYP MODIFIKACE	MÍSTO MODIFIKACE	DISREGULACE ZPŮSOBUJÍCÍ ONEMOCNĚNÍ
DNA metylace	CpG ostrůvky	Rakovina, autoimunitní, neurologické poruchy, infekční onemocnění
Methylace histonů	H3 a H4	Hyper/hypo methylace vede k rakovině, autoimunitním, neurologickým poruchám a infekčním onemocněním
Acetylace histonů	H3 a H4	Hyper/hypo acetylace vede k rakovině autoimunitním, neurologickým poruchám a infekčním onemocněním
Fosforylace histonů	H3 a H4	H3Ser10 fosforylace byla nalezena u diabetické nefropatie
Nekódující RNA	Enzymy spjaté s histonovými modifikacemi	Rakovina, autoimunitní, neurologické poruchy, infekční onemocnění

Epigenetické studie jsou v klinické praxi využívány ve dvou oblastech, k identifikaci biomarkerů onemocnění a k vývoji jejich léčiv.

4.1 Biomarkery

Epigenetické mohou ovlivnit exprese genů, a tak i riziko vzniku některých nemocí. Výzkum ukázal, že epigenetické změny jsou často přítomny v klinicky významných oblastech genomu a mohou sloužit jako biomarkery onemocnění. Například u některých typů rakoviny byly identifikovány specifické epigenetické změny, které se mohou použít k diagnostice, prognóze a výběru vhodné terapie.

Epigenetické biomarkery mohou být detekovány pomocí různých technik, jako jsou metylace DNA, modifikace histonů, změny RNA, nebo použitím nových technologií, jako jsou epigenetické markery v krvi.

V současné době se výzkum v této oblasti rychle rozvíjí a již byly identifikovány epigenetické biomarkery pro mnoho onemocnění, včetně rakoviny, Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, *diabetes mellitus* a dalších.

4.2 Vývoj epigenetických léčiv

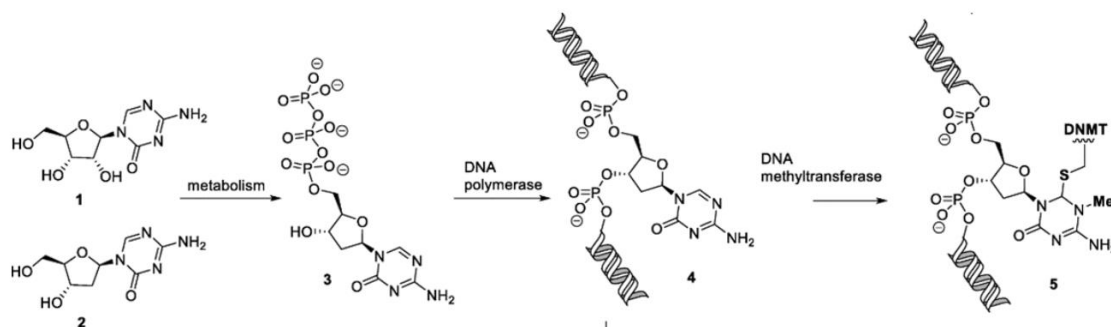
Na enzymy katalyzující dílčí reakce probíhající v rámci epigenetických změn, které byly popsány v kapitole 2.2, je často odkazováno jako na zapisovače. Proběhlé vazebné interakce jsou pak následně kontrolovány takzvanými čtecími doménami rozpoznávající charakteristické vlastnosti chemicky modifikovaných nukleových kyselin a histonových proteinů. Aby byla zachována vratnost reakcí, vyskytují se v organismech přirozeně i série mazacích enzymů, které zajišťují dynamický charakter odstraněním příslušných epigenetických modifikací.

Všechny zmíněné druhy epigenetických proteinů, jak zapisovače, čtecí domény, tak i mazací enzymy mohou být cíleny medikačně skrze nízko molekulární inhibitory.

Zpočátku však byly syntetizovány léky především na základě fenotypového pozorování a následném prokázání účinnosti. Jedná se až o fenomén dnešní doby, kdy jsou jejich mechanismy spojovány s epigenetickými modifikacemi a nové léky jsou již vyráběny na základě přesně známého molekulárního cíle.

4.2.1 První vlna

Vývoj první generace epigeneticky zaměřených léčiv byl zahájen v období mezi 50. a 60. lety minulého století. Do popředí zájmu medicínské chemie se dostaly DNA a RNA stavební báze, následně relativně mírné modifikace pyrimidinové nukleové báze cytidinu vedly k lékům, jako 5-azacytidin (5-azaC nebo azacytidin) a 5-aza-2'-deoxycytidin (5-aza-dC nebo decitabin), jejich mechanismus je znázorněn na obrázku 8. Tyto konkrétní uvedené případy byly vyvinuty jako klasické antimetabolity pro rakovinnou chemoterapii v 60. letech 20. století na Československé Akademii věd v Praze.



Obrázek 8: Mechanismus azacitidinu a decitabinu. 5-azacitidin (sloučenina 1) a decitabin (sloučenina 2) jsou po metabolické přeměně na fosforylovanou aktivní formu (sloučenina 3) začleněni DNA polymerázou místo cytosinu, v tomto případě do DNA řetězce (sloučenina 4) (mohou být zakomponovány i do RNA, v závislosti na průběhu jejich metabolismu). Během replikace se DNA metyltransferázy (DNMT) nevratně naváží kovalentní vazbou na inkorporovaný azacitidin nebo decitabin (sloučenina 5) v DNA řetězci a znemožní tak metylaci dané báze (Převzato z: Ganesan et al. 2019, upraveno).

V principu se jedná o DNA metylační inhibitory (DNMTI). Díky podobnosti s cytidinem jsou obě sloučeniny rozpoznány polymerázami a zařazeny do vznikajícího DNA nebo RNA řetězce. Nahrazení cytidinu v CpG místech vede k nereverzibilnímu navázání DNMT1 kovalentní vazbou na dusík modifikovaného pyrimidinu. Takto zachycený DNMT1 zamezuje opětovnou metylaci hemimetylovaného místa. Pokud délka léčby přesahuje trvání 2 buněčných cyklů dochází k úplné demetylaci u dceřiných buněk (Ganesan et al. 2019).

Mimo již zmíněných DNMT inhibitorů byla v první vlně také syntetizována léčiva na principu HDAC inhibitorů, oba systémy však postrádají specifitu a jsou tedy vysoce toxické pro lidský organismus, jelikož cílí i na normální buňky.

4.2.2 Druhá a třetí vlna

Pro minimalizaci vedlejších účinků byly v dalších vlnách vývoje využívány nanopřenašeče, které měly zajistit dodání léčiva ke konkrétnímu cíli a také jejich vyšší stabilitu v organismu. K těmto účelům byly nejčastěji využívány liposomy, dendrimery, nano gely a nanočástice polymerů. Jejich bezpečnost pro lidský organismus však i nadále zůstala diskutabilní. Nanočástice totiž mohou přímo reagovat s genetickým materiálem a způsobit tak poškození DNA nebo abnormality chromozomů. Ve zkoumaných savčích buňkách byly prokázány celkové i specifické post-translační modifikace histonů, exprese ncRNA a DNA metylace. Třetí vlna vývoje se nesla ve znamení rychlého progresu. Do vývoje léčiv byly zařazeny další tři cíle KMT, KDM a bromodomény (Ganesan et al. 2019).

4.2.3 Úprava epigenomu

V minulosti, při studiu mechanismů a principů fungování epigenetických modifikací byly využity první dva nástroje původně vyvinuty pro úpravu genomu – nukleáza zinkový prst (ZFN) a TALE (transkripční jako-aktivační efekty), spojující epigenetické modifikátory, které lze zkráceně nazývat jako epigenetické efekty (epiefekty; EE), nebo pouze jejich izolované funkční domény s DNA-vázajícími proteiny, schopny zaměřit epigenetické modifikace na konkrétních lokusech. Jednalo se o velký krok vpřed, co se týče úpravy genomu a epigenomu.

4.2.3.1 Epiefekty

Epigenetické modifikátory jsou enzymatické domény skupiny enzymů, která je zapojené do epigenetických úprav DNA a histonových proteinů. Samostatně nejsou epiefekty schopny se vázat na specifické DNA sekvence a využívají k tomu již zmíněné nástroje jako ZFP nebo TALE. Mohou být zodpovědné jak za aktivaci, tak i za represi transkripce genomu. Přestože dochází k úpravám přístupnosti chromatinové struktury, zůstává DNA sekvence nedotčena.

Tabulka 2: Přehled epiefektorů. Souhrn epiefektorů, které jsou často využívány ve spojitosti s CRISPR systémem a jejich epigenetické funkce.

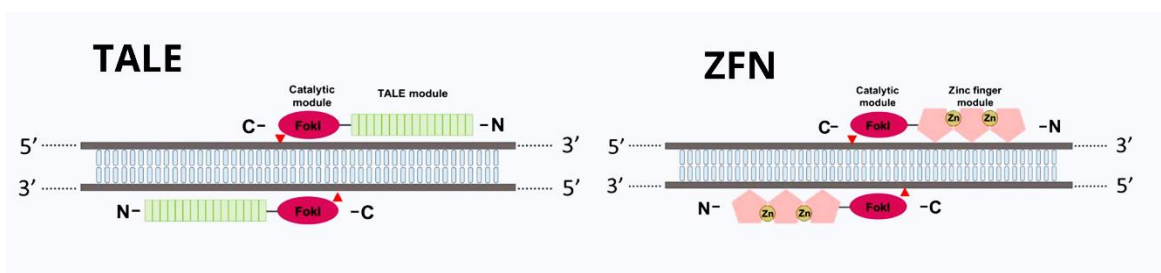
EPIGENETICKÁ FUNKCE	ZKRATKA	NÁZEV EPIEFKTORU	ZKRATKA
DNA metyltransferázy	DNMT		DNMT1
			DNMT3A
			DNMT3B
Demethylázy DNA		ten-eleven translokované proteiny	TET1
			TET2
Histonové metyltransferázy	HMT	Enhancer of zeste homolog 2	EZH2
			G9a
		SET domain bifurcated 1	SETDB1
Demethylázy histonů		Lysin specifická demethyláza 1	LSD1
		Jumonji domain-containing protein 3	JMJD3
Histonové acetyltransferázy	HAT	cAMP response element-binding protein	p300/CBP
			GCN5
Histonové deacetylázy	HDAC		HDAC1
			HDAC2
			HDAC3
Transkripční faktory		herpes simplex viral protein 16	VP16
		transaktivací doména faktoru kappa B	p65

4.2.3.2 ZFN

Nukleáza zinkový prst je z velké skupiny DNA-vázajících proteinů, byla objevena roku 1994 jako první upravitelný prostředek na úpravu genomu. Využívá ionty zinku ke stabilizaci typického beta-beta-alfa skladu v jimi regulovaném úseku DNA. Každá jejich doména obsahuje přibližně 30 aminokyselin k rozpoznání specifické sekvence o délce 3 až 4 nukleotidů. Pro zvýšení specifity fungují proteiny zinkového prstu v tandemu obsahujícím 4-6 těchto domén. V nukleáze jsou pak zinkové prsty spojeny se štěpící endonukleázovou doménou, nejčastěji s FokI monomerem.

4.2.3.3 TALE

Transkripční jako-aktivační efektorů jsou DNA-vázající proteiny, které původně pocházejí z patogenních bakterií rostlin. Byly vyvinuty v roce 2009, s prakticky stejnou funkcí jako ZNF, ale se zvýšenou specifitou. Jsou složeny z 33 nebo 34 opakujících se úseků aminokyselin. TALE repetice mohou být stejně jako ZFP využity v tandemu pro rozpoznání cíleného úseku na DNA, a také využívají stejnou štěpící endonukleázu FokI. Oba systémy jsou znázorněny na obrázku 9 níže. Nicméně specifita navrženého TALE musí být vždy ověřena *in vivo* nebo *in vitro*.



Obrázek 9: Schématický náčrt dvou systémů pro úpravu genomu zaměřených na epigenom. (TALE) Transkripční jako-aktivační efektorová nukleáza zobrazuje vazbu dvou monomerů na DNA, katalytickou FokI doménu (růžová elipsa). Zelené obdélníky reprezentují DNA vazebnou doménu s proměnnými repeticemi aminokyselin pro rozpoznání specifické DNA sekvence. (ZFN) Nukleáza zinkových prstů znázorňuje vazbu dvou monomerů na DNA. ZNF obsahuje katalytickou doménu FokI (růžová elipsa) a DNA-vazebnou doménu zinkových prstů (růžové pentagony)(Převzato z: Romay a Bragard 2017).

4.2.4 Čtvrtá vlna

Využití obou mechanismů (ZFP i TALE) bylo velmi nápomocné v začátcích při cíleném a systematickém zaměřování efektorových genových lokusů. Nicméně jedná se o velmi komplexní mechanismy a navrhování jejich funkčních zaměřovacích systémů je velmi náročné, proto byly oba systémy s představením CRISPR systému z většiny kompletně nahrazeny. Na její podrobnější fungování a využití se zaměříme v následující kapitole.

5 CRISPR/Cas9 terapeutika

CRISPR/Cas9 systém, popsáný v kapitole 3. je pro úpravu epigenomu přizpůsoben deaktivací endonukleázové aktivity Cas9. Deaktivovaná forma je známá jako dCas9, na rozdíl od aktivní Cas9 dokáže rozpoznat daný cíl, aniž by jej rozštěpila. Schopnost epigenetických úprav dále zajišťuje spojení dCas9 s klasickými transkripčními aktivátory, represorovými doménami nebo epiefektory (Sar a Dalai 2021). Vzniklý dCas9-EE komplex společně se sgRNA modifikují epigenom na konkrétním genomovém lokusu. Všechny designy dCas9-EE komplexu, které jsou popsány v této kapitole jsou současně schematicky znázorněny obrázkem 10 na konci kapitoly.

5.1 dCas9 samostatně

Nejprostším designem, je využití dCas9 proteinu bez přidaného efektoru. Toto provedení zasahuje do transkripce sterickým blokováním vazby RNA polymerázy nebo transkripční elongace a v prokaryotních buňkách se projevilo jako velmi úspěšné a vede až k 300násobnému snížení mRNA, když je k cílení dCas9 použita jediná sgRNA, nebo dokonce až 1000násobku, když jsou dvě sgRNA kombinovány k blokování prodloužení transkripce (Brocken et al. 2018; Ansari et al. 2022). Nicméně tento zásah do procesu transkripce pojmenovaný jako CRISPR Interference (CRISPRi) se neprokázal úspěšně u savčích buněk, jelikož poskytuje pouze 2násobné snížení hladin transkriptu. Kromě interferenčního efektu na existuje i aktivační CRISPR (CRISPRa) s aktivujícím transkripčním potenciálem, nicméně se stejnou úspěšností v savčích buňkách. Pro účinnější modulaci genové exprese v savčích buňkách je protein dCas9 spojen se specifickými epiefektory.

5.2 dCas9-efektor

Pro kýžený výsledek bylo vyzkoušeno několik variant spojení epiefektorů s dCas9, dle jejich přirozené funkce mohou být kategorizovány jako (i) epigenetické modifikátory a (ii) transkripční modifikátory. Epigenetické modifikátory, jako například p300, LSD1, DNMT3A a TET1 mají obvykle enzymatickou funkci, která jim umožňuje přemísťovat nebo odstraňovat epigenetické markery. Zatím co, transkripční modifikátory pouze posilují transkripční faktory s aktivující nebo represivní funkcí. Příkladem aktivujících transkripčních faktorů je například herpes simplex viral protein 16 (VP16) nebo jeho mnohé kopie VP48, VP64, VP120 a transaktivační doména faktoru kappa B (p65), z represivních faktorů lze uvést KRAB, WRPW, CS, SID4x a další.

V jednom z designů byla DNA metyltransferáza 3a (DNMT3a) spojena s dCas9 ve výsledný komplex dCas9-DNAMT3A, potlačující genovou expresi zvyšováním metylace na promotorových oblastech enzymatickou aktivitou DNMT3a (McDonald et al. 2016). Liu et al. úspěšně navrhli komplex dCas-TET1 pro demetylaci DNA promotorových oblastí (Liu et al. 2016). V dalším protokolu se Vojta et al. podařilo využít pouze katalytickou doménu (CD) DNMT3A, čímž se podařilo odstranit některé z potíží spojených s využitím celého enzymu (Vojta et al. 2016). Obdobným způsobem Xu et al. využili katalytickou doménu v dCas9-TET1 CD komplexu (Xu et al. 2016). Dalšími designy s využitím pouze jediného efektoru jsou komplexy dCas9-p300 nebo dCas9-LSD1 (Kearns et al. 2015; Hilton et al. 2015). Pokročilejším designem pro zvýšení výkonnosti je za využití vícero efektorových domén současně. Zajímavým příkladem je práce Stepper et al., kdy byly využity dvě DNA metyltransferázy DNMT3a a DNMT3L. Metylaci cíleného genu byla 4-5násobná oproti využití pouze DNMT3A samostatné (Stepper et al. 2017). Amabile et al. využili kombinaci tří efektorových domén (DNMT3ACD-DNMT3L-KRAB) pro dosažení dlouhodobého genového scilencinu (Amabile et al. 2016).

Do této skupiny lze ještě zahrnout VPR systém, který byl však vyvinut až po Supernova tagging (SunTag) a Synergickém aktivačním modifikátorovém (SAM) systému, ty jsou blíže popsány v následujících kapitolách. VPR se skládá z VP64-p65-Rta aktivačních efektorů spojených do tandemu spolu s dCas9. Aktivační potenciál tohoto systému je velmi vysoký, v porovnání se samotným VP64 představuje zlepšení až o 320násobek při zaměření na samostatný endogenní cíl.

5.3 SunTag

Nadále bylo snahou zvýšení účinnosti využívaných epiefektorů, novou strategií bylo zvýšení počtu vazebných míst pro navázání efektorových proteinů. Příkladem designu je Supernova značený systém (SunTag) navržený Tanenbaum et al. roku 2014.

Využívá lešeňovité struktury bílkovin, kdy proteiny váží dva a více dalších proteinů a organizují vazebné partnery do funkční jednotky s vyšší účinností. Struktura obsahující 10 nebo 24 bílkovinných epitopů váže efektorové domény prostřednictvím charakteristického proměnlivého jedno-vláknového fragmentu protilátek (scFv). Principem je schopnost protilátek se navázat na krátkou peptidovou sekvenci s vysokou afinitou a specifitou, navržené epitopy se liší od přírodně se vyskytujících, což snižuje šanci na chybné navázání (Shakirova et al. 2020; Brocken et al. 2018).

SunTag systém prokázal zvýšení účinnosti při dCas9- SunTag-VP64, zvýšením genové exprese v porovnání s jednoduchým spojením dCas9-VP64 (Brocken et al. 2018). Kromě již zmíněného VP64 je scFv schopno vázat DNMT3A nebo TET1CD (Ansari et al. 2022).

5.4 scRNA/SAM

Kromě různých způsobů a počtu vazeb epiefektorů byla zkoumána i možnost úpravy sgRNA. Průkopnickým systémem tohoto druhu je „Lešení“ (z angličtiny „Scaffold“), založený na lešeňovitém RNA (scRNA) tvořeném doménou vlásenkovitého aptameru, většinou pocházející z MS2 bakteriofága, spojené dvojnou vazbou se sgRNA na jejím 3' konci. Proteiny specifické pro aptamer, například ze skupiny retinol-vázajících proteinů (RBP), se mohou vázat na tyto sekvence a měnit tak expresi cílového genu (Shakirova et al. 2020).

Pozdější vývoj tohoto jednoduššího systému „Lešení“ vedl ke zhotovení Součinného aktivačního modifikátoru (SAM), který je složen ze tří hlavních komponent: chimérický dCas9-VP64, sgRNA se syntetickým aptamerem pro MS2 a chimérický MS2-p65-HSF1 pomocný aktivační protein. SAM má schopnost výrazně upregulovat geny, jelikož vázané transaktivační faktory fungují synergicky, aby aktivovaly požadovaný gen.

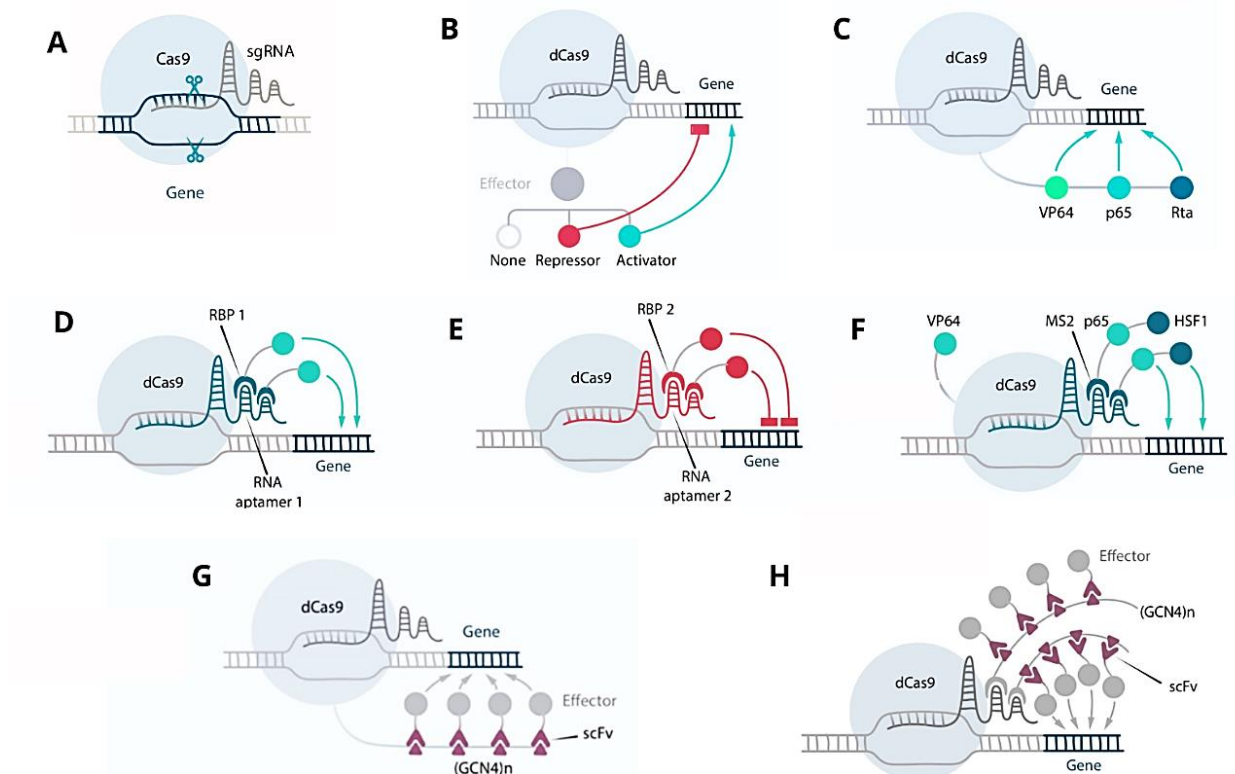
Tato technologie byla úspěšně aplikována například pro trvalé odstranění skrytých HIV - 1 rezervoárů přesnou identifikací oblasti zesilovače a reaktivací proviru HIV-1 v HIV-1 latentních buňkách (Zhang et al. 2015; Shakirova et al. 2020).

5.5 TREE

Třísložková technologie pro pokročilejší expresi (TREE) je silný transkripční aktivační systém, který kombinuje spojení efektorů pomocí RNA aptamerů a proteinového značení. Skládá se z dCas9-VP64, sgRNA se dvěma MS2 aptamery, SunTag spojeného s MS2 proteinem, a scFv-efektoru. V porovnání s Lešeňovitým systémem, kde jsou molekuly efektoru přímo vázány MS2 proteiny, v TREE systému jsou efekторы vázány pomocí scFv protilátek, které jsou vázány na GCN4 epitop obdobně jako v SunTag systému. Výsledkem je vyšší kumulace molekul efektoru kolem cílené oblasti. Bohužel dosud neexistují data o využití tohoto systému, ale jedná se o výborný příklad, jak kombinace různých technologií mohou zlepšit výsledek a jednu z hlavních strategií pro vylepšení úprav CRISPR systémem (Shakirova et al. 2020).

Jsou známy také další designy založené na mnohem sofistikovanější kontrole napojení efektorů. Příkladem může být split-dCas9 systém, který má srovnatelnou funkci s DNA-

vazebným proteinem. Stimulem pro něj mohou být chemické a světelné indukce nebo přítomnost sgRNA.



Obrázek 10: Systémy založené na CRISPR/Cas9 **A** Klasický CRISPR/Cas9 systém, kde dochází ke dvojitému zlomení řetězce v cílovém lokusu pomocí sgRNA. K úpravě epigenomu byl navržen deaktivovaný protein Cas9 (dCas9) bez nukleotické aktivity. První generace CRISPR/dCas9 systémů byla složena spojením efektoru s dCas9 proteinem a sgRNA. Obsahovala **B** chimérickou dCas9, která může fyzicky blokovat přístup RNA polymerázy a potlačit elongaci, nebo v závislosti na připojeném efektoru aktivovat nebo potlačit genovou expresi; **C** VPR systém obsahující tři aktivační domény VP64, p65, Rta spojeny s dCas9. Druhá generace systému s amplifikovaným zapojením efektorových kopií pomocí RNA. **D a E** Lešeňový systém využívá aptamery pro současné zapojení různých efektorů k sgRNA pomocí vazebných proteinů (v tomto případě retinol-vázajícího proteinu 1; RBP1). **F** V SAM je RNA vazebný proteinem MS2 spojen se dvěma aktivačními doménami p65 a HSF1 a dCas9 je současně ještě spojena s aktivátorem VP64. **G** Do druhé generace patří také systém SunTag ve kterém násobné kopie GCN4 váží několik aktivačních proteinů přes chimerní molekuly scFv protilátek. **H** TREE systém je kombinací lešeňovitého a SunTag systému, kde se několik GCN4 váže na RNA aptamery pomocí MS2 vazebných proteinů (Převzato z Shakirova et al. 2020).

6 Omezení využití CRISPR/Cas

CRISPR/dCas9 má velký potenciál pro léčbu rakoviny a imunitních onemocnění s využitím úpravy epigenomu, vzhledem k prokázané přímé spojitosti epigenetických úprav a tumorogenezi. Sám o sobě však nemusí řešit všechny aspekty léčby rakoviny, vzhledem k tomu, že příčinou je z pravidla kombinace genetických a epigenetických změn. Mimo to se v jeho systému vyskytuje i další řada nedostatků popsaných níže. Mnohé z nich bude jistě možné dalšími studii a výzkumy zcela nebo alespoň částečně eliminovat.

6.1 Zavedení Cas9 systému do buněk

Zavedení cizorodého genetického materiálu do cílené buňky vždy představovalo výzvu. Rozsáhlé výzkumy se stále snaží vyvinout efektivní vektory, které by umožnily zavedení genetického materiálu v jeho nedotčené podobě do nádorových buněk a buněk imunitního systému. Fyzikální způsoby, virové i ne-virové vektory byly již využity pro zavedení CRISPR/Cas systému a úpravu genomu rakovinných a imunitních buněk (Shakirova et al. 2020; Ansari et al. 2022).

Mezi hojně využívané fyzikální metody patří elektroporace, dosud byla využita k zavedení CRISPR/Cas systémů hned do několika orgánů a tkání jako například děloha, sítnice, kosterní svalovina, kůže nebo mícha při experimentech na zvířatech. Neexistují však záznamy o jejím využití pro léčbu rakoviny, zřejmě z důvodu jejího velkého vlivu na buněčnou membránu. Mikroinjekce je jednou z hlavních zaváděcích metod pro CRISPR/Cas9 systém, jelikož umožňuje zavedení velkých objemů do buňky, její nevýhodou je obtížná manipulace a cena. Zatímco hydrodynamické zavádění je jedna z nejspolehlivějších fyzikálních metod pro CRISPR/Cas9 *in vivo*. Využívá vysokého tlaku pro vytvoření dočasných pórů v buněčné stěně, jimiž zavádí plasmid do buňky (Shakirova et al. 2020; Song et al. 2021). Jedná se o velmi jednoduchý a relativně bezpečný proces využívaný v klinické praxi, existuje zde však riziko poškození jater z důvodu vysokého zaváděného objemu.

Široce využívanou metodou pro zavádění genetického materiálu a CRISPR/Cas systému pro *in vivo* využití, jsou také virové vektory. Pro CRISPR/Cas9 jde především o lentoviry, adenovirové (Ad) a adeno-asociované virové vektory. Hlavní výhodou spojenou s využitím lentovirů, je jeho velká kapacita a to až 8,5 kb, nicméně byly při jeho využívání zjištěny vedlejší onkogenní a imunogenní účinky v důsledku jeho nespecifické integrace. Jeho využití je přes zmíněná rizika přípustné za využití *in vitro*, ovšem při využití *in vivo* je tolerance tohoto rizika velmi nízká, zvláště při aplikaci v klinických studiích. Obdobně velkou přenosnou

kapacitu mají (také Ad vektory, přibližně mezi 8,1 až 8,2 kb cizorodé DNA, což je činní ideálními pro přenos CRISPR/Cas9 systému v jediném vektoru. Jediným nedostatkem Ad vektorů je absence coxackie a Ad virových receptorů (CAR) u většiny cílených buněk (Song et al. 2021). Využití adeno-asociovaných virů (AAV) jsou bez vedlejších účinků, z tohoto důvodu jsou také přijatelnějšími vektory pro klinické studie, a jejich využití bylo také schváleno. Nevýhodou je však jejich nízká přenosová kapacita pohybující se do 5 kb, a tudíž je k přenosu celého systému CRISPR/Cas9 zapotřebí více jak jeden vektor AAV. Přesto, že lentoviry, AAV a Ad představují dobrý potenciál pro *in vivo* rakovinové terapie, další vektory si stále zaslouží další výzkum (Ansari et al. 2022).

V porovnání s virovými vektory jsou ne-virové vektory mnohem rozmanitější a silnější co se týče *in vivo* zavádění CRISPR/Cas systému. Obecně je většina z ne-virových přenašečů o nano-rozměrech a vychází zejména z tradičních genových zaváděcích metod. Jedna ze studií navrhla víceúrovňové doručování nanočástic (MDNP) za využití responzivních polymerů pro cílené dodání systému dCas9 (Liu et al. 2018; Ansari et al. 2022).

6.2 Přirozená imunita

Jeden z dalších problémů, který částečně souvisí se zaváděním CRISPR/Cas9 léčby, je vyvolání autoimunitní odpovědi organismu. Cas9 proteiny jsou ve většině případů derivovány z bakterií, nejčastěji se jedná o *Streptococcus pyogenes* (*S.pyogenes*; SpCas) a *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*; SaCas9). Jedná se o vcelku běžně se vyskytující patogeny vyvolávající infekční onemocnění v lidském organismu a imunitní systém při kontaktu s nimi vyvolává příslušnou imunitní odpověď.

Poměrně nedávno se Charlesworth et al. zabývali pre-existencí protilátek zaměřených proti oběma typům Cas9 proteinu. Analýza lidského séra potvrdila přítomnost anti- SaCas9 i anti-SpCas9 protilátek u 78 % a 58 % testovaných jedinců. Respektive CD8+ cytotoxické T lymfocyty reagovaly na přítomnost Cas9 proteinu v buňkách, což vedlo k jejich následné destrukci.

Tato skutečnost by měla být při vytváření CRISPR/Cas9 terapeutik uvážena, vzhledem k tomu, že mediátory imunitní odpovědi mohou výrazně snížit účinnost v případě využití SpCas9 a SaCas9 proteinů. Lze také využít poznatky z oblasti genové terapie, kde byla imunitní odpověď z cytotoxických T lymfocytů řešena obezřetným zvážením a následnou úpravou vektoru, dávky, cílové tkáně, cesty podání a imunosuprese, ke zdokonalení přístupu úpravy epigenomu.

6.3 Exprese sgRNA

Důležitým technickým aspektem je také exprese sgRNA uvnitř buňky, která závisí na promotorech. V savčích buňkách se může jednat o Pol III, s vysokou kvalitou nebo Pol II se zvýšenou procesivitou. Aktuálně je většina exprese zprostředkovávána promotery polymerázy III, vzniklé RNA mají velmi krátký poločas. Použití promotorů polymerázy II by mohlo umožnit produkci více sgRNA z jednoho transkriptu a nabídnout tak komplexní kontrolu nad chováním buněk. Hlavním problémem je rychlý export většiny transkriptů polymerázy II do cytoplazmy, kterému lze snadno předejít přidáním intronové sekvence. Problémem násobné produkce sgRNA, je snížení efektivity vlivem kompetice o dCas9 protein.

6.4 Mimo cílené vlivy

Přestože je v současnosti CRISPR/Cas systém považován za jeden s nejpřesnější schopností úpravy genomu a specifitou, v některých případech prokázala dCas9 vyšší specifitu než standardní Cas9, i tak se u něj vyskytují vedlejší vlivy. Protože cílem dCas9 mohou být nejen genové promotory, ale také regulační prvky, jejich zacílení může ovlivnit expresi mnoha dalších genů v závislosti na jejich vzájemné interakci.

Dvěma hlavními důvody mimo cíleného vlivu je mírná flexibilita v rozpoznávání PAM úseků a případná tolerance v chybného párování sgRNA na PAM úsek. Vzhledem k tomu, že mimo cílené vlivy i efektivní zaměření genů závisí na kvalitě sekvence sgRNA, je nezbytné navržení optimální sekvence. Cílené úsek lze snadno identifikovat bioinformatickými nástroji, případně skenováním 18-23 přilehlých párů bazí k PAM úsekům. Následně lze vyhodnotit optimální sgRNA vzhledem k účinnosti a specifitě pro daný cíl. Je tedy možné v budoucnu úpravou designu toto omezení značně limitovat.

6.5 Deaktivace systému

Diferenciace buněk je složitým procesem, při kterém různé geny spolupracují na fenotypizaci buňky. Následky genových interakcí nejsou nijak omezeny přítomností proteinů nebo RNA produktů, ale na životnosti a míře exprese. Také z tohoto důvodu je zásadní kontrola nad pracovní dobou CRISPR/Cas, dále se tímto způsobem dá také předcházet mimocíleným účinkům.

Pro *in vivo* manipulaci je nezbytné mít možnost aktivovat i deaktivovat celý systém, aby bylo možné předcházet nekontrolovatelným modifikacím. Za tímto účelem byly navrženy metody pro deaktivaci systému, inhibitory anti-CRISPR. Příkladem z praxe je spojení navozující destabilizační domény DHFR z bakterie *Escherichia coli* s dCas9 pro rychlé

potlačení řízené aktivity dCas9, která zamezila diferenciaci lidské pluripotentní kmenové buňky na pankreatické progenitorové buňky. Cas9 protein může být selektivně aktivován a deaktivován využitím světlem nebo chemicky indukovaných promotorů.

7 Závěr

Již několik desetiletí lidstvo zkoumá DNA, jakožto stěžejní molekulu buněčné informace a do dnešní doby nalézá nové poznatky v oblasti jejího fungování. Mezi něž patří i mechanismy epigenetických změn, které ovlivňují míru exprese genů hned na několika úrovních současně a mají následný vliv na tvorbu proteinů. Tento fakt vytváří zcela novou rovinu pohledu na vztah mezi DNA a nemocemi. I přesto, že se jedná o velmi složitou problematiku, hledá lidstvo způsoby, jak do epigenetických změn zasáhnout a využít je ve svůj prospěch, např. pro terapii rakoviny.

V předložené práci jsou stručně, tak jak rozsah práce dovoluje, shrnuty poznatky o epigenomu, který si získává pozornost nejen ve vědecké obci, ale postupně je brán v potaz i v diagnostice a terapii. Dále je v práci věnována pozornost systému CRISPR/Cas, jednomu z hlavních potenciálních modifikátorů DNA, a to včetně modifikací epigenetických. Ačkoliv se jedná o velmi slibný nástroj, má svá zásadní úskalí, která zatím brání jeho většímu použití, a právě této problematice je věnován prostor v jedné z kapitol. Terapie v oblasti epigenetických změn má dlouhou tradici (první léčiva se objevila v 60. letech), především pro léčbu rakoviny. V posledních letech ruku v ruce s novými možnostmi se více diskutují i složitější biologické molekuly určené pro terapii (např. dCas9). Epigenetika do budoucna jistě pozná zajímavý rozvoj a jistě se objeví nové způsoby terapie, které přinesou úlevu pacientům, pro které v současné době buď neexistuje léčba, nebo její účinnost není dostatečná.

POUŽITÁ LITERATURA

AMABILE, Angelo, Alessandro MIGLIARA, Paola CAPASSO, Mauro BIFFI, Davide CITTARO, Luigi NALDINI a Angelo LOMBARDO, 2016. Inheritable Silencing of Endogenous Genes by Hit-and-Run Targeted Epigenetic Editing. *Cell* [online]. **167**(1), 219-232.e14 [vid. 2023-04-04]. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/J.CELL.2016.09.006

ANSARI, Imran, Animesh CHATURVEDI, Deepak CHITKARA a Saurabh SINGH, 2022. CRISPR/Cas mediated epigenome editing for cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology* [online]. **83**, 570–583. ISSN 1044579X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2020.12.018

BAE, Taegeun, Junseok W. HUR, Dokyoung KIM a Junho K. HUR, 2019. *Recent trends in CRISPR-Cas system: genome, epigenome, and transcriptome editing and CRISPR delivery systems* [online]. 1. srpen 2019. B.m.: Genetics Society of Korea. ISSN 20929293. Dostupné z: doi:10.1007/s13258-019-00830-w

BARRANGOU, Rodolphe, Christophe FREMAUX, Hélène DEVEAU, Melissa RICHARDS, Patrick BOYAVAL, Sylvain MOINEAU, Dennis A. ROMERO a Philippe HORVATH, 2007. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* [online]. **315**(5819), 1709–1712 [vid. 2022-08-15]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1138140

BARTOŠÍK, M. a E. ONDROUŠKOVÁ, 2016. *Nové metody studia metylace DNA – MS-HRM analýza a elektrochemie* [online]. 2016. B.m.: Czech Medical Association J.E. Purkyne. ISSN 18025307. Dostupné z: doi:10.14735/amko20164S64

BIRD, A., 2002. *DNA methylation patterns and epigenetic memory* [online]. 1. leden 2002. ISSN 08909369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.947102

BOLOTIN, Alexander, Benoit QUINQUIS, Alexei SOROKIN a S. DUSKO EHRlich, 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* [online]. **151**(8), 2551–2561 [vid. 2022-08-15]. ISSN 13500872. Dostupné z: doi:10.1099/MIC.0.28048-0

BOZORG QOMI, Saeed, Amir ASGHARI a Majid MOJARRAD, 2019. An Overview Of The Crispr-Based Genomic- And Epigenome-Editing System: Function, Applications, And Challenges. *Advanced Biomedical Research* [online]. **8**(1), 49. ISSN 2277-9175. Dostupné z: doi:10.4103/abr.abr_41_19

BROCKEN, Daan J.W., Mariliis TARK-DAME a Remus T. DAME, 2018. dCas9: A Versatile Tool for Epigenome Editing. *Current Issues in Molecular Biology* [online]. 15–32. ISSN 14673037. Dostupné z: doi:10.21775/cimb.026.015

CONG, Le, F Ann RAN, David COX, Shuailiang LIN, Robert BARRETTO, Naomi HABIB, Patrick D HSU, Xuebing WU, Wenyan JIANG, Luciano A MARRAFFINI a Feng ZHANG, 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems HHS Public Access. *Science* [online]. **339**(6121), 819–823 [vid. 2022-08-15]. Dostupné z: doi:10.1126/science.1231143

CRUSIO, Wim E, Haidong DONG a Heinfried H RADEKE, [b.r.]. *Volume 1283 Series Editors* [online]. Dostupné z: <http://www.springer.com/series/5584>

DEANS, Carrie a Keith A. MAGGERT, 2015. What do you mean, “Epigenetic”? *Genetics* [online]. **199**(4), 887–896. ISSN 19432631. Dostupné z: doi:10.1534/genetics.114.173492

DWIVEDI, Rama S., James G. HERMAN, Timothy A. MCCAFFREY a Dominic S.C. RAJ, 2011. Beyond genetics: epigenetic code in chronic kidney disease. *Kidney International* [online]. **79**(1), 23–32 [vid. 2023-03-12]. ISSN 0085-2538. Dostupné z: doi:10.1038/KI.2010.335

GANESAN, A., Paola B. ARIMONDO, Marianne G. ROTS, Carmen JERONIMO a Mariá BERDASCO, 2019. *The timeline of epigenetic drug discovery: From reality to dreams* [online]. 2. prosinec 2019. B.m.: BioMed Central Ltd. ISSN 18687083. Dostupné z: doi:10.1186/s13148-019-0776-0

GASIUNAS, Giedrius, Rodolphe BARRANGOU, Philippe HORVATH a Virginijus SIKSNYS, 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **109**(39) [vid. 2022-11-04]. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/PNAS.1208507109/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201208507SI.PDF

HILTON, Isaac B., Anthony M. D’IPPOLITO, Christopher M. VOCKLEY, Pratiksha I. THAKORE, Gregory E. CRAWFORD, Timothy E. REDDY a Charles A. GERSBACH, 2015. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology* 2015 33:5 [online]. **33**(5), 510–517 [vid. 2023-04-04]. ISSN 1546-1696. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.3199

HOLLIDAY, Robin, 2006. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* [online]. 1(2), 76–80 [vid. 2022-11-13]. ISSN 1559-2308. Dostupné z: doi:10.4161/EPI.1.2.2762

HOMBACH, Sonja a Markus KRETZ, 2016. Non-coding RNAs: Classification, biology and functioning. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [online]. 937, 3–17. ISSN 22148019. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-42059-2_1

HUSMANN, Dylan a Or GOZANI, 2019. *Histone lysine methyltransferases in biology and disease* [online]. 1. říjen 2019. B.m.: Nature Publishing Group. ISSN 15459985. Dostupné z: doi:10.1038/s41594-019-0298-7

CHHABRA, Ravindresh, 2023. The Epigenetics of Noncoding RNA. In: *Handbook of Epigenetics* [online]. B.m.: Elsevier, s. 55–71. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-323-91909-8.00010-4

ISHINO, Yoshizumi, Hideo SHINAGAWA, Kozo MAKINO, Mitsuko AMEMURA a Atsuo NAKATA, 1987. *Nucleotide Sequence of the iap Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in Escherichia coli, and Identification of the Gene Product* [online]. Dostupné z: <http://jb.asm.org/>

JANSEN, Ruud, Jan D.A. VAN EMBDEN, Wim GAASTRA a Leo M. SCHOOLS, 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* [online]. 43(6), 1565–1575 [vid. 2022-08-15]. ISSN 0950382X. Dostupné z: doi:10.1046/J.1365-2958.2002.02839.X

JIANG, Fuguo a Jennifer A. DOUDNA, 2017. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822> [online]. 46, 505–529 [vid. 2022-08-20]. ISSN 19361238. Dostupné z: doi:10.1146/ANNUREV-BIOPHYS-062215-010822

JINEK, Martin, Krzysztof CHYLINSKI, Ines FONFARA, Michael HAUER, Jennifer A. DOUDNA a Emmanuelle CHARPENTIER, 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* [online]. 337(6096), 816–821 [vid. 2022-08-15]. ISSN 10959203. Dostupné z: doi:10.1126/SCIENCE.1225829

JORE, Matthijs M., Magnus LUNDGREN, Esther VAN DUIJN, Jelle B. BULTEMA, Edze R. WESTRA, Saktham P. WAGHMARE, Blake WIEDENHEFT, Ümit PUL, Reinhild WURM, Rolf WAGNER, Marieke R. BEIJER, Arjan BARENDREGT, Kaihong ZHOU, Ambrosius P.L. SNIJDERS, Mark J. DICKMAN, Jennifer A. DOUDNA, Egbert J.

BOEKEMA, Albert J.R. HECK, John VAN DER OOST a Stan J.J. BROUNS, 2011. Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nature Structural and Molecular Biology* [online]. **18**(5), 529–536. ISSN 15459993. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb.2019

KEARNS, Nicola A., Hannah PHAM, Barbara TABAK, Ryan M. GENGA, Noah J. SILVERSTEIN, Manuel GARBER a René MAEHR, 2015. Functional annotation of native enhancers with a Cas9–histone demethylase fusion. *Nature Methods* 2015 12:5 [online]. **12**(5), 401–403 [vid. 2023-04-04]. ISSN 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.3325

KOHLI, Rahul M. a Yi ZHANG, 2013. *TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation* [online]. 2013. ISSN 00280836. Dostupné z: doi:10.1038/nature12750

LIU, Qi, Kai ZHAO, Chun WANG, Zhazhan ZHANG, Chunxiong ZHENG, Yu ZHAO, Yadan ZHENG, Chaoyong LIU, Yingli AN, Linqi SHI, Chunsheng KANG a Yang LIU, 2018. Multistage Delivery Nanoparticle Facilitates Efficient CRISPR/dCas9 Activation and Tumor Growth Suppression In Vivo. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)* [online]. **6**(1) [vid. 2023-04-11]. ISSN 2198-3844. Dostupné z: doi:10.1002/ADVS.201801423

LIU, X. Shawn, Hao WU, Xiong JI, Yonatan STELZER, Xuebing WU, Szymon CZAUDERNA, Jian SHU, Daniel DADON, Richard A. YOUNG a Rudolf JAENISCH, 2016. Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cell* [online]. **167**(1), 233-247.e17 [vid. 2023-04-04]. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/J.CELL.2016.08.056

MAKAROVA, Kira S., Daniel H. HAFT, Rodolphe BARRANGOU, Stan J.J. BROUNS, Emmanuelle CHARPENTIER, Philippe HORVATH, Sylvain MOINEAU, Francisco J.M. MOJICA, Yuri I. WOLF, Alexander F. YAKUNIN, John VAN DER OOST a Eugene v. KOONIN, 2011. *Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems* [online]. červen 2011. ISSN 17401526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2577

MAKAROVA, Kira S., Yuri I. WOLF, Omer S. ALKHNABASHI, Fabrizio COSTA, Shiraz A. SHAH, Sita J. SAUNDERS, Rodolphe BARRANGOU, Stan J.J. BROUNS, Emmanuelle CHARPENTIER, Daniel H. HAFT, Philippe HORVATH, Sylvain MOINEAU, Francisco J.M. MOJICA, Rebecca M. TERNS, Michael P. TERNS, Malcolm F. WHITE, Alexander F. YAKUNIN, Roger A. GARRETT, John VAN DER OOST, Rolf BACKOFEN a Eugene v. KOONIN, 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **13**(11), 722–736. ISSN 17401534. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro3569

MAKAROVA, Kira S., Yuri I. WOLF, Jaime IRANZO, Sergey A. SHMAKOV, Omer S. ALKHNABASHI, Stan J.J. BROUNS, Emmanuelle CHARPENTIER, David CHENG, Daniel H. HAFT, Philippe HORVATH, Sylvain MOINEAU, Francisco J.M. MOJICA, David SCOTT, Shiraz A. SHAH, Virginijus SIKSNYS, Michael P. TERNS, Česlovas VENCLOVAS, Malcolm F. WHITE, Alexander F. YAKUNIN, Winston YAN, Feng ZHANG, Roger A. GARRETT, Rolf BACKOFEN, John VAN DER OOST, Rodolphe BARRANGOU a Eugene v. KOONIN, 2020. *Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants* [online]. 1. únor 2020. B.m.: Nature Research. ISSN 17401534. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-019-0299-x

MALI, Prashant, Luhan YANG, Kevin M. ESVELT, John AACH, Marc GUELL, James E. DICARLO, Julie E. NORVILLE a George M. CHURCH, 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* [online]. **339**(6121), 823–826 [vid. 2022-08-15]. ISSN 10959203. Dostupné z: doi:10.1126/SCIENCE.1232033

MCDONALD, James I., Hamza CELIK, Lisa E. ROIS, Gregory FISHBERGER, Tolison FOWLER, Ryan REES, Ashley KRAMER, Andrew MARTENS, John R. EDWARDSAND a Grant A. CHALLEN, 2016. Reprogrammable CRISPR/Cas9-based system for inducing sitespecific DNA methylation. *Biology Open* [online]. **5**(6), 866–874 [vid. 2023-04-04]. ISSN 20466390. Dostupné z: doi:10.1242/BIO.019067/-/DC1

MOJICA, F. J.M., C. FERRER, G. JUEZ a F. RODRÍGUEZ-VALERA, 1995. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Molecular Microbiology* [online]. **17**(1), 85–93 [vid. 2022-08-15]. ISSN 13652958. Dostupné z: doi:10.1111/J.1365-2958.1995.MMI_17010085.X

MOJICA, Francisco J.M., César DíEZ-VILLASEÑOR, Jesús GARCÍA-MARTÍNEZ a Elena SORIA, 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution* [online]. **60**(2), 174–182 [vid. 2022-08-15]. ISSN 00222844. Dostupné z: doi:10.1007/S00239-004-0046-3

MOORE, Lisa D., Thuc LE a Guoping FAN, 2013. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* [online]. **38**(1), 23–38 [vid. 2022-11-21]. ISSN 1740-634X. Dostupné z: doi:10.1038/NPP.2012.112

MORGAN, Marc A.J. a Ali SHILATIFARD, 2020. Reevaluating the roles of histone-modifying enzymes and their associated chromatin modifications in transcriptional regulation. *Nature Genetics* [online]. **52**(12), 1271–1281. ISSN 15461718. Dostupné z: doi:10.1038/s41588-020-00736-4

NEIDHART, Michel, 2016. DNA Methylation – Introduction. In: *DNA Methylation and Complex Human Disease* [online]. B.m.: Elsevier, s. 1–8. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-420194-1.00001-4

PASTOR, William A., L. ARAVIND a Anjana RAO, 2013. *TETonic shift: Biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription* [online]. červen 2013. ISSN 14710072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm3589

PEI, Wen di, Yan ZHANG, Tai Lang YIN a Yang YU, 2020. Epigenome editing by CRISPR/Cas9 in clinical settings: Possibilities and challenges. *Briefings in Functional Genomics* [online]. **19**(3), 215–228 [vid. 2022-08-11]. ISSN 20412657. Dostupné z: doi:10.1093/BFGP/ELZ035

PERILLO, Bruno, Alfonso TRAMONTANO, Antonio PEZONE a Antimo MIGLIACCIO, 2020. LSD1: more than demethylation of histone lysine residues. *Experimental & molecular medicine* [online]. **52**(12), 1936–1947 [vid. 2023-03-02]. ISSN 2092-6413. Dostupné z: doi:10.1038/S12276-020-00542-2

R. J. LINCOLN, G. A. BOXSHALL a compilers P. F. CLARK, 1982. *A Dictionary of Ecology, Evolution and Systematics*. [online]. B.m.: Cambridge University Press [vid. 2022-11-13]. ISSN 1469-7769. Dostupné z: doi:10.1017/S0025315400047457

RATH, Devashish, Lina AMLINGER, Archana RATH a Magnus LUNDGREN, 2015. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie* [online]. **117**, 119–128 [vid. 2022-11-01]. ISSN 0300-9084. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOCHI.2015.03.025

RIVERA, Chloe M. a Bing REN, 2013. Mapping human epigenomes. *Cell* [online]. **155**(1) [vid. 2022-11-13]. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/J.CELL.2013.09.011

ROMAY, Gustavo a Claude BRAGARD, 2017. Antiviral defenses in plants through genome editing. *Frontiers in Microbiology* [online]. **8**(JAN), 47 [vid. 2023-03-26]. ISSN 1664302X. Dostupné z: doi:10.3389/FMICB.2017.00047/BIBTEX

SAR, Pranati a Sarat DALAI, 2021. CRISPR/Cas9 in epigenetics studies of health and disease. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [online]. B.m.: Elsevier B.V., s. 309–343. ISBN 9780323853231. Dostupné z: doi:10.1016/bs.pmbts.2021.01.022

SHAKIROVA, Ksenia M., Viktoriia Y. OVCHINNIKOVA a Erdem B. DASHINIMAEV, 2020. Cell Reprogramming With CRISPR/Cas9 Based Transcriptional Regulation Systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. **8**. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.00882

SINGH, Vijai, 2020. An introduction to genome editing CRISPR-Cas systems. In: *Genome Engineering via CRISPR-Cas9 System* [online]. B.m.: Elsevier, s. 1–13. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-818140-9.00001-5

SONG, Xiangrong, Chao LIU, Ning WANG, Hai HUANG, Siyan HE, Changyang GONG a Yuquan WEI, 2021. *Delivery of CRISPR/Cas systems for cancer gene therapy and immunotherapy* [online]. 1. leden 2021. B.m.: Elsevier B.V. ISSN 18728294. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2020.04.010

STEPPER, Peter, Goran KUNGULOVSKI, Renata Z. JURKOWSKA, Tamir CHANDRA, Felix KRUEGER, Richard REINHARDT, Wolf REIK, Albert JELTSCH a Tomasz P. JURKOWSKI, 2017. Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9–Dnmt3a–Dnmt3L methyltransferase. *Nucleic Acids Research* [online]. **45**(4), 1703–1713 [vid. 2023-04-04]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/NAR/GKW1112

STERNBERG, Samuel H., Sy REDDING, Prashant BHAT, Martin JINEK, Blake WIEDENHEFT, Jennifer A. DOUDNA a Eric C. GREENE, 2013. Single-Molecule Observation of Viral DNA Targeting by CRISPR/Cas Immune Systems. *Biophysical Journal* [online]. **104**(2), 198a [vid. 2022-08-15]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/J.BPJ.2012.11.1120

TANENBAUM, Marvin E, Luke A GILBERT, Lei S QI, Jonathan S WEISSMAN a Ronald D VALE, 2014. A Protein-Tagging System for Signal Amplification in Gene Expression and Fluorescence Imaging. *Cell* [online]. **159**, 635–646 [vid. 2023-04-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2014.09.039

VANZAN, Ludovica, Athena SKLIAS, Maria BOSKOVIC, Zdenko HERCEG, Rabih MURR a David M. SUTER, 2023. Mechanisms of Histone Modifications. In: *Handbook of Epigenetics* [online]. B.m.: Elsevier, s. 27–54. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-323-91909-8.00019-0

VARIER, Radhika A. a H. T. Marc TIMMERS, 2011. Histone lysine methylation and demethylation pathways in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* [online]. **1815**(1), 75–89 [vid. 2023-03-02]. ISSN 0304-419X. Dostupné z: doi:10.1016/J.BBCAN.2010.10.002

VOJTA, Aleksandar, Paula DOBRINIC, Vanja TADIC, Luka BOCKOR, Petra KORAC, Boris JULG, Marija KLASIC a Vlatka ZOLDOS, 2016. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Research* [online]. **44**(12), 5615–5628 [vid. 2023-04-04]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/NAR/GKW159

WALTER, Marius, 2015. *Histone_modifications* [online]. 5. červenec 2015. [vid. 2023-03-15]. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b1/Histone_modifications.png/199px-Histone_modifications.png?20150705135419

WEI, Jian Wei, Kai HUANG, Chao YANG a Chun Sheng KANG, 2017. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncology Reports* [online]. **37**(1), 3–9 [vid. 2023-03-22]. ISSN 17912431. Dostupné z: doi:10.3892/OR.2016.5236/HTML

WU, C. T. a J. R. MORRIS, 2001. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **293**(5532), 1103–1105 [vid. 2022-11-13]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/SCIENCE.293.5532.1103

WU, Hao a Yi ZHANG, 2014. Reversing DNA Methylation: Mechanisms, Genomics, and Biological Functions. *Cell* [online]. **156**(1–2), 45–68 [vid. 2023-02-20]. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/J.CELL.2013.12.019

XU, Xingxing, Yonghui TAO, Xiaobo GAO, Lei ZHANG, Xufang LI, Weiguo ZOU, Kangcheng RUAN, Feng WANG, Guo Liang XU a Ronggui HU, 2016. A CRISPR-based approach for targeted DNA demethylation. *Cell Discovery 2016 2:1* [online]. **2**(1), 1–12 [vid. 2023-04-04]. ISSN 2056-5968. Dostupné z: doi:10.1038/celldisc.2016.9

YING, Zhengzhou a Taiping CHEN, 2023. Mechanisms of DNA Methylation and Demethylation During Mammalian Development. In: *Handbook of Epigenetics* [online]. B.m.: Elsevier, s. 11–26. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-323-91909-8.00009-8

ZHANG, Guoqiang a Sriharsa PRADHAN, 2014. *Mammalian epigenetic mechanisms* [online]. 2014. B.m.: Wiley-Blackwell. ISSN 15216551. Dostupné z: doi:10.1002/iub.1264

ZHANG, Yonggang, Chaoran YIN, Ting ZHANG, Fang LI, Wensheng YANG, Rafal KAMINSKI, Philip Regis FAGAN, Raj PUTATUNDA, Won Bin YOUNG, Kamel KHALILI a Wenhui HU, 2015. CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs. *Scientific reports* [online]. 5 [vid. 2023-04-10]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/SREP16277