

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Lenka Forejtová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

CRISPR/Cas pro genovou terapii k léčbě hemoglobinopatií
Bakalářská práce

2024

Lenka Forejtová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Lenka Forejtová**
Osobní číslo: **C21166**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **CRISPR/Cas pro genovou terapii k léčbě hemoglobinopatií**
Téma práce anglicky: **CRISPR/Cas for Gene Therapy to Treat Hemoglobinopathies**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Rešerše na téma CRISPR/Cas pro genovou terapii k léčbě hemoglobinopatií
 - Metoda CRISPR/Cas
 - Hemoglobinopatie
 - Genová terapie hemoglobinopatií

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: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**
Herbacos Recordati s.r.o.

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

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

L.S.

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

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, 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 1. 7. 2024

Lenka Forejtová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu, trpělivost a věnovaný čas při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během celého studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se věnuje hemoglobinopatiím, tedy dědičným poruchám struktury hemoglobinu, konkrétně srpkovité anémii a talasémii. Zaměřuje se na nové možnosti léčby těchto onemocnění pomocí genové terapie založené na technologii CRISPR-Cas. Cílem práce je objasnit princip technologie CRISPR-Cas, popsat její varianty a využití pro cílenou genovou terapii. Součástí práce je stručný přehled metod, kterými lze ovlivnit průběh onemocnění, a to včetně schválených i probíhajících klinických studií.

KLÍČOVÁ SLOVA

CRISPR-Cas, genová terapie, hemoglobin, léčba, srpkovitá anémie, talasémie

TITLE

CRISPR-Cas for Gene Therapy to Treat Hemoglobinopathies

ANNOTATION

This bachelor's thesis focuses on hemoglobinopathies, which are hereditary disorders of hemoglobin structure, specifically sickle cell anemia and thalassemia. It explores new treatment possibilities for these diseases using gene therapy based on CRISPR-Cas technology. The aim of the thesis is to explain the principles of CRISPR-Cas technology, describe its variants, and its use for targeted gene therapy. The thesis includes a brief overview of methods to influence the course of these diseases through gene therapy, including both approved and ongoing clinical studies.

KEYWORDS

CRISPR-Cas, gene therapy, hemoglobin, sickle cell anemia, thalassemia, treatment

OBSAH

Seznam obrázků.....	8
Seznam zkratk.....	9
Úvod.....	12
1 Hemoglobin a poruchy jeho struktury.....	13
1.1 Hemoglobin.....	13
1.2 Hemoglobin a jeho varianty.....	13
1.3 Poruchy struktury hemoglobinu.....	15
1.3.1 Srpkovitá anémie.....	15
1.3.1.1 Typy SCD.....	18
1.3.1.2 Další faktory pro průběh onemocnění.....	21
1.3.2 Talasémie.....	21
1.3.2.1 β -talasémie.....	22
1.3.2.2 α -talasémie.....	23
2 Metoda CRISPR-Cas.....	24
2.1 Systém CRISPR-Cas a jeho původ.....	24
2.2 Metoda CRISPR-Cas pro editaci genomu.....	26
2.3 Typy CRISPR-Cas.....	28
2.3.1 CRISPR-Cas9.....	28
2.3.2 CRISPR-Cas12.....	29
2.3.3 CRISPR-Cas13.....	31
2.3.4 Další typy CRISPR-Cas.....	32
2.4 Doručení systému CRISPR-Cas do buňky.....	35
2.5 Kontrola účinnosti editace genomu.....	36
3 CRISPR-Cas pro léčbu hemoglobinopatií.....	38
3.1 Úprava genů pro léčbu onemocnění.....	38
3.1.1 Zesilovač BCL11A.....	40
3.1.2 Narušení vazebného místa transkripčních represorů.....	41
3.1.3 Tvorba nových vazebných míst pro aktivátory transkripce.....	42
3.2 Příklady použití – schválená léčiva FDA, studie.....	45

3.2.1	Casgevy.....	45
3.2.2	OTQ923	46
3.2.3	EDIT 301	47
3.2.4	Nula-cel.....	48
3.2.5	BEAM-101.....	48
3.2.6	BEAM-102.....	49
3.3	Porovnání s dalšími možnostmi léčby	49
3.3.1	Léčba SCD	49
3.3.2	Léčba talasémie.....	50
	Závěr	52
	Použitá literatura	53

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Umístění genů pro globiny na chromozomu.	14
Obrázek 2. Polymerace hemoglobinu S a vzniklá deformace erytrocytu.	16
Obrázek 3. Disociace kyslíku v hemoglobinu HbA a HbS.	17
Obrázek 4. Genetické změny v HBB	20
Obrázek 5. Schématické znázornění CRISPR/Cas lokusu.	24
Obrázek 6. Bakteriální imunita proti cizí genetické informaci.	26
Obrázek 7. Možnosti úpravy genomu.	27
Obrázek 8. Mechanismus editace genů pomocí CRISPR-Cas9.....	29
Obrázek 9. Štěpení DNA pomocí CRISPR-Cas12.....	31
Obrázek 10. Porovnání systémů CRISPR-Cas9, 12a a 13	32
Obrázek 11. Fúze nukleázy FokI s katalyticky neaktivní Cas9 a guide RNA.	33
Obrázek 12. Systém štěpení DNA využívající SpyCas9 nikázy.....	33
Obrázek 13. Editory bází.....	34
Obrázek 14. Prime editory.	34
Obrázek 15. Typy transportních forem systému CRISPR-Cas do buňky.....	35
Obrázek 16. Srovnání mezi Sangerovým sekvenováním a NGS	37
Obrázek 17. Možnosti úpravy genomu CRISPR-Cas9 pro SCD.	39
Obrázek 18. Erytroidní enhancer BCL11A jako místo pro editaci genomu.	41
Obrázek 19. Vazba transkripčního represoru BCL11A na promotor genu pro γ -globin. ...	42
Obrázek 20. Srovnání mezi normální erytropoézou a mutacemi zvyšující HbF.	44
Obrázek 21. Princip genové terapie pomocí OTQ923.	47

SEZNAM ZKRATEK

A	Adenin
AI	Arabsko-indický haplotyp
AVV	Adenoasociovaný virus
BAN	Bantuský haplotyp
BE	Editory bází
BEN	Beninský haplotyp
C	Cytosin
CAR	Haplotyp pro Středoafričskou republiku
Cas	CRISPR-asociovaný protein
CO ₂	Oxid uhličitý
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNA	CRISPR RNA
dCas9	Neaktivní forma Cas9
ddNTP	Dideoxynukleotid trifosfát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DSB	Dvouřetězcový zlom DNA
FDA	Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu léčiv)
G	Guanin
gRNA	Guide RNA
H ⁺	Vodíkový kationt
Hb	Hemoglobin
HbA	Hemoglobin tzv. dospělého typu
HBA1	Gen pro hemoglobin A1
HBA2	Gen pro hemoglobin A2
HbAC	Heterozygot pro C hemoglobin
HbAS	Heterozygot pro srpkovitou mutaci
HBB	Označení genu pro β -globin
HBB- β S	Mutovaný gen pro srpkovitou anémii
HbC	Hemoglobin C
HbCC	Homozygot pro C hemoglobin
HbF	Fetální hemoglobin
HBG1	Gen pro γ 1-globin
HBG2	Gen pro γ 2-globin
HbH	Hemoglobin H

HbS	Srpkovitý hemoglobin
HbSC	Heterozygot pro S i C hemoglobin
HbSS	Homozygot pro srpkovitou mutaci
HDR	Homologicky řízená oprava konců DNA
HLA	Human leukocyte antigen
HSPC	Hematopoetické kmenové a progenitorové buňky
KLF1	Kruppel-like faktor 1
LCR	Locus control region
mRNA	Messenger RNA
N	Libovolný nukleotid (např. v sekvenci NGG)
NGS	Sekvenování nové generace
NHEJ	Nehomologní spojování konců DNA
O ₂	Kyslík
PAM	Protospacer adjacent motif
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerázová řetězcová reakce)
pre-crRNA	Prekurzor CRISPR RNA
qPCR	Real-time polymerase chain reaction
RBC	Red blood cell – erytrocyt
RNA	Ribonukleová kyselina
RNP	Ribonukleoprotein
SCA	Sickle cell anemie – srpkovitá anémie
SCD	Sickle cell disease – srpkovitá anémie
SEN	Senegalský haplotyp
sgRNA	Single guide RNA
SNP	Jednonukleotidové polymorfismy
SpyCas	Protein Cas ze <i>Streptococcus pyogenes</i>
T	Thymin
TALEN	Transcription activator-like effector nuclease
TDT	Talasémie závislá na transfúzi
tracrRNA	Transaktivační RNA
U	Uracil
VOC	Vazookluzivní krize
ZFN	Zinc finger nuclease
βC	Alela s mutací pro C hemoglobin
βS	Alela se srpkovitou mutací

ÚVOD

Hemoglobinopatie, jako je srpkovitá anémie a talasémie, jsou závažná genetická onemocnění, která zásadně ovlivňují funkčnost hemoglobinu. Mutace v genech vedou buď ke kvalitativním nebo kvantitativním poruchám globinových podjednotek hemoglobinu. Tato onemocnění patří mezi nejčastější závažné dědičné choroby na světě, přesto jsou možnosti jejich léčby stále poměrně omezené. Současná léčiva pro pacienty s těmito onemocněními neřeší příčinu onemocnění a nejsou dostatečně účinná, aby zcela eliminovala související komplikace. Anémie je typickým příznakem hemoglobinopatií, další komplikace se většinou liší podle konkrétního typu onemocnění.

CRISPR-Cas se jeví jako efektivní technologie s velkým potenciálem pro léčbu geneticky podmíněných onemocnění, a to díky své schopnosti manipulace s genomem. Výroba tohoto systému je jednodušší a levnější než předešlé technologie. Existuje mnoho variant tohoto systému, z nichž každá má určité výhody i nevýhody. Kombinované systémy mohou být náročnější na výrobu, ale vedou k přesnějším výsledkům editace genomu a snižují riziko mimocílových účinků, které mohou vést k závažným komplikacím.

Genová terapie založená na technologii CRISPR-Cas představuje pro pacienty naději na život bez komplikací spojených s hemoglobinopatiemi a může výrazně prodloužit jejich život. Vzhledem ke stále aktuální potřebě efektivních léčebných metod probíhá intenzivní výzkum a vývoj mnoha typů genových terapií. Cílem této bakalářské práce je poskytnout přehled o hemoglobinopatiích a možnostech jejich léčby pomocí nových technologií založených na CRISPR-Cas. Současně je cílem informovat o nově vyvíjených genových terapiích, jejich úspěšnosti, možných výsledcích a klinickém využití.

1 HEMOGLOBIN A PORUCHY JEHO STRUKTURY

1.1 Hemoglobin

Hemoglobin (Hb) je tvořen dvěma páry globinových řetězců, čtyřmi cyklickými protoporfyriny IX a čtyřmi atomy dvojmocného železa. Atom železa je uložen ve středu každého protoporfyrinu IX. Protoporfyrin s centrálně navázaným atomem železa je nazýván jako hem. Globin je bílkovinná složka Hb, která je tvořena dvěma páry řetězců, přičemž typ přítomného řetězce je závislý na vývojovém stádiu jedince. Geny pro globinové řetězce se nacházejí na chromozomech 16., kde je tzv. α -like cluster a na chromozomu 11, kde je β -like cluster (Penka a Slavičková 2011).

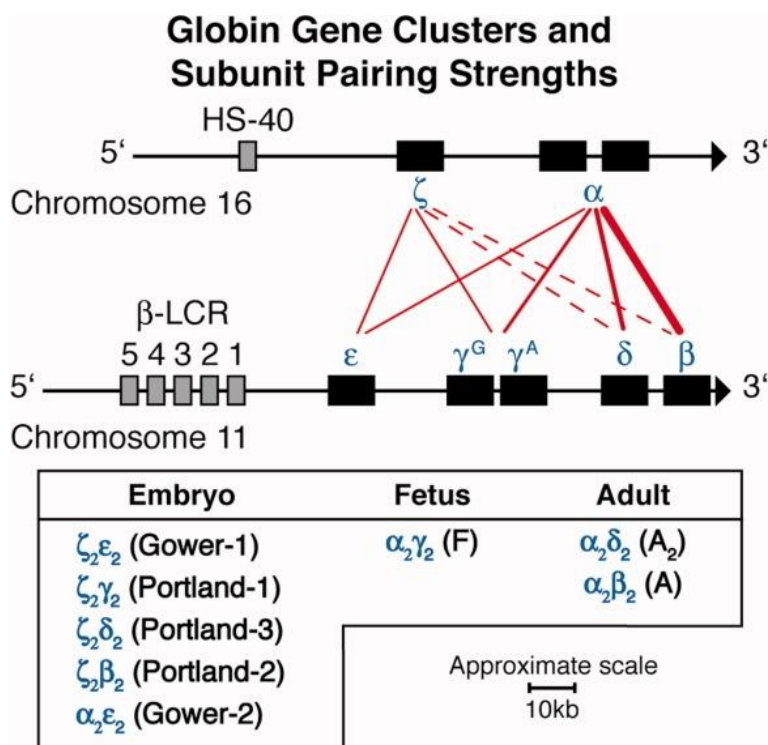
1.2 Hemoglobin a jeho varianty

V organismu lze najít různé varianty hemoglobinu. Kvůli rozdílné afinitě Hb ke kyslíku se jeho struktura během života mění (Penka a Slavičková 2011). Geny embryonálního, fetálního a dospělého hemoglobinu jsou umístěny podél genomu v pořadí exprese a jsou regulovány způsobem specifickým pro vývojové stádium a tkáň (Harteveld et al. 2022).

Během života se v těle vyskytuje až osm typů lidských Hb, ačkoliv některé jen ve stopových koncentracích. Jejich exprese je ovlivněna tzv. zapínáním a vypínáním různých globinových genů. Tento proces ovlivňují transkripční faktory, které interagují s regulačními oblastmi před shluky globinových genů. Tyto oblasti jsou tzv. otevřené oblasti chromatinu, což umožňuje přístup regulačních faktorů. Pro geny kódující α -globiny jsou to oblasti HS-40 a pro geny β -globinů jsou to oblasti nazývané jako β -LCR (Manning et al. 2010).

Během embryonální fáze vývoje se nejvíce vyskytují Hb Gower I ($\zeta 2\varepsilon 2$), II ($\alpha 2\varepsilon 2$) a Hb Portland ($\zeta 2\gamma 2$). Okolo 6. týdne jsou geny pro syntézu těchto hemoglobinů vypnuty a začíná se tvořit fetální hemoglobin HbF ($\alpha 2\gamma 2$) (Penka a Slavičková 2011). Kolem narození tvorba HbF ustává a začíná se tvořit β -globin (Harteveld et al. 2022).

HbF tvoří při narození až 80–90 % celkového Hb. Tato hladina se do 12 měsíců snížila na méně než 1 % (Liu et al. 2016). Zároveň se zvyšuje produkce β -globinu neboli tzv. dospělého typu hemoglobinu HbA, který se po narození stává hlavním typem Hb (Frangoul et al. 2021). Tento tetramer ($\alpha 2\beta 2$) v dospělosti za normálních okolností představuje asi 97 % z celkového Hb. Hemoglobin A2 ($\alpha 2\delta 2$) tvoří maximálně 3,2 % a zbytek připadá na fetální hemoglobin ($\alpha 2\gamma 2$) (Penka a Slavičková 2011).



Obrázek 1. Umístění genů pro globiny na chromozomu. Geny kódující tzv. α -like řetězce globinu jsou na chromozomu 16 a geny pro β -like řetězce globinu na chromozomu 11. Rámečky HS-40 a β -LCR označují oblasti, které umožňují transkripci těchto genů, což se děje v pořadí 5'→3', čímž vznikají podjednotky globinů, typické pro dané vývojové stádium organismu. Červené čáry mezi globinovými podjednotkami znázorňují možné varianty, jaké vznikají v průběhu vývinu jedince. Šířky těchto čar označují sílu interakcí těchto podjednotek konkrétního páru (Manning et al. 2010).

Geny kódující HbA mohou obsahovat mutace, které ovlivňují strukturu Hb. Změna ve struktuře Hb vede ke změnám funkčnosti a životnosti erytrocytu (RBC). Takováto onemocnění jsou označována jako hemoglobinopatie. Protože tato onemocnění postihují HbA, novorozenci se srpkovitou anémií a talasémií jsou asymptomatictí, protože mají stále vysokou hladinu HbF. Symptomy onemocnění se začínají projevovat až během prvního roku života, kdy dostatečně klesne hladina HbF. Pacienti kteří mají zvýšenou hladinu HbF, mají lepší průběh nemoci, proto zvýšení hladiny HbF je jednou z možností léčby (Frangoul et al. 2021). Reaktivace tvorby HbF se dá dosáhnout pomocí aktivace nebo inaktivace různých genů (Steinberg et al. 2019).

1.3 Poruchy struktury hemoglobinu

1.3.1 Srpkovitá anémie

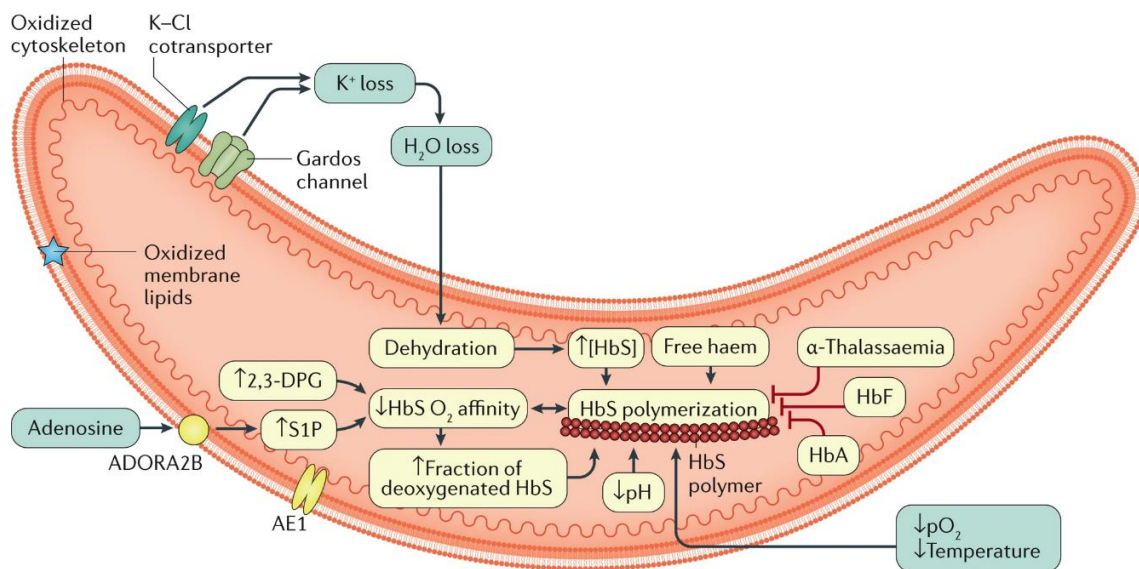
Srpkovitá anémie (sickle cell disease – SCD) je skupina dědičných krevních poruch, pro které je společná jedna konkrétní mutace. Označuje se jako rs334 a nachází se v genu kódujícího podjednotku β hemoglobinu, který se nazývá jako HBB (Kato et al. 2018). Aby se onemocnění dalo klasifikovat jako SCD, musí být tato mutace buď v homozygotní formě, nebo k ní musí být přidružena další mutace ovlivňující strukturu Hb (Williams a Thein 2018).

Mutace podporují polymeraci hemoglobinu a vznik srpkovitých erytrocytů tzv. drepanocytů. Tyto RBC nejsou funkčně plnohodnotné a rychle podléhají destrukci (Esoh a Wonkam 2021). SCD patří mezi nejčastější závažné dědičné choroby na světě. Předpokládá se, že jí trpí zhruba 3-6 milionů lidí (El Hoss et al. 2022). Podle odhadů tato mutace vznikla před více než 7000 lety, a přestože její důsledky mohou vést až k úmrtí pacienta, tak se tato mutace zachovala a rozšířila. Důvodem je ochrana, kterou mají heterozygoti proti těžké malárii, způsobenou prvokem *Plasmodium falciparum* (Esoh a Wonkam 2021).

Srpkovitý RBC vzniká při deoxygenaci, kdy HbS podléhá polymeraci (Ceglie et al. 2023). Samotná polymerace je proces zapříčiněný mutací, která vede k záměně hydrofilní kyseliny glutamové za hydrofobní valin. Hydrofobní valin interaguje s dalšími hydrofobními molekulami na řetězci β globinu jiných molekul deoxy-HbS. Dochází tak ke změně tvaru molekul a tvorbě dlouhých tuhých polymerů (Odièvre et al. 2011). Polymery mají šroubovicovou strukturu (Kato et al. 2018). Tvorba polymerů spouští další patologické procesy, jako je třeba abnormální funkce iontových kanálů, kdy dochází k poruše kationtové homeostázy, což vede k dehydrataci buňky (Odièvre et al. 2011). Dehydratace způsobí, že se zvyšuje koncentrace Hb a polymerace se tak dále prohlubuje. Nakonec vznikají nevratně deformované srpkovité erytrocyty (Williams a Thein 2018).

Dalším rozdílem mezi HbA a HbS je rozdílná afinita ke kyslíku (Kato et al. 2018). Mutace, která je odpovědná za různé formy SCD, nemá vliv na afinitu O₂ k Hb. Výrazné snížení afinity k O₂ způsobí až polymerace HbS při deoxygenaci, kdy dochází ke změně tvaru molekul Hb a je tak narušena jejich schopnost efektivně vázat O₂. Disociační křivka oxyhemoglobinu S je posunutá doprava oproti normálnímu HbA (Di Liberto et al. 2016). Velikost posunu se může u jednotlivých pacientů lišit, protože závisí na stupni polymerace. Disociační křivka je také posunutá doprava při zvýšeném parciálním tlaku CO₂, tělesné teplotě, zvýšené koncentraci

iontů H^+ (u acidózy) a 2,3-disfosfoglycerátu (2,3-DPG), což je produkt glykolýzy. Snížená afinita HbS k O_2 v kombinaci s chronickou anémií vede k hypoxii tkání. Díky tomu se začne uplatňovat glykolýza a sníží se proto pH (Wagner a Berry 2007).



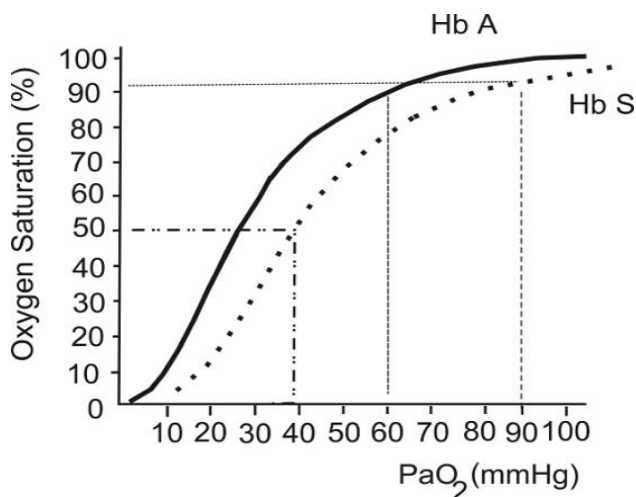
Nature Reviews | Disease Primers

Obrázek 2. Polymerace hemoglobinu S a vzniklá deformace erytrocytu (RBC). Při deoxygenaci dochází k polymeraci a vznikají dlouhá tuhá vlákna se šroubovicovou strukturou. Polymerace HbS závisí na dalších faktorech jako koncentrace HbS, parciálním tlaku O_2 (pO_2), teplotě, pH, koncentraci 2,3-difosfoglycerátu (2,3-DPG) a přítomnosti různých molekul Hb jako např. fetálního hemoglobinu. Před vznikem prvních polymerů nastává období latence, kdy deoxygenovaný HbS prvně tvoří malé jádro a až následně dochází k rychlé tvorbě polymerů. Volný cytoplazmatický hem může zvýšit přitažlivost molekul a urychlit tak nukleaci a tvorbu polymerů. U srpkovitých RBC je abnormální homeostáza kationtů, což vede k dehydrataci buněk. Ke ztrátě draslíku dochází K^+ kanály jako je Gardosův kanál a kotransportér K-Cl. Plasmatický adenosin může ovlivnit metabolismus RBC tím, že změní sfingosin-1-fosfát (S1P). ADORA2B označuje adenosinový receptor. AE1 je aniontový transportní protein. Převzato od (Kato et al. 2018).

Srpkovité erytrocyty jsou křehké a méně odolné, a tak se snižuje délka jejich přežití v krevním řečišti. Životnost srpkovitých RBC je zhruba 16 dní, přičemž normální RBC mají životnost 120 dní. Dochází tak k chronické hemolytické anémii (Williams a Thein 2018). Snížená elasticita RBC způsobuje poškození tkání, infarkty, cévní mozkové příhody, multiorgánové poškození, až předčasné úmrtí jedince (Penka a Slavičková 2011; Ceglie et al. 2023). Vážným problémem jsou také vazookluzivní krize (VOC), což je častá komplikace SCD,

kdy se malé cévy ucpávají. To vede k hypoxii, ischemii, poškození, zánětu tkáně a silné bolesti (Darbari et al. 2020).

Klinická závažnost SCD je různá a to kvůli dalším genetickým faktorům, které modifikují onemocnění (Menzel et al. 2010). S tímto onemocněním se každý rok narodí kolem 300 000 až 400 000 novorozenců na celém světě (Kato et al. 2018).



Obrázek 3. Disociace kyslíku v hemoglobinu HbA a HbS. Srpkovitý Hb má nižší afinitu k O₂, tudíž se křivka posune doprava. Z grafu je patrný rozdíl nasycenosti Hb O₂ u zdravého jedince s HbA a u pacienta s HbS. Pacient s HbS má při 50% saturaci okolo 38 mm Hg a při 90% saturaci O₂ se pacient na hodnotách tlaku 90 mm Hg, zatímco zdravý člověk dosáhne těchto hodnot už při mnohem nižším tlaku (Wagner a Berry 2007).

Pro všechny pacienty se SCD je společná mutace na chromozomu 11 v genu HBB (Steinberg et al. 2019). Ačkoliv tito lidé mají stejnou genetickou mutaci, je zde velké množství možných projevů onemocnění (Liu et al. 2016).

Mutace vzniká změnou v genu HBB na pozici 11p15.4, což vede ke vzniku mutovaného genu HBB-βS (Esoh a Wonkam 2021). Vzniká záměnou jediné báze adeninu za thymin (GAG>GTG) v kodonu 6. Tato mutace se také nazývá jako rs334 (Williams a Thein 2018). Takovéto mutace jsou jednobodové a označují se jako jednonukleotidové polymorfismy (Single Nucleotide Polymorphism – SNP). Jsou to substituční záměny jediné nukleotidu na určité pozici v genomu. Závažnost onemocnění pak závisí na typu SNP polymorfismu (Otová et al. 2021). V důsledku této mutace dojde k nahrazení hydrofilní kyseliny glutamové za hydrofobní valin. Tato záměna výrazně ovlivňuje funkci hemoglobinu. Vzniká patologický srpkovitý hemoglobin HbS (Ceglie et al. 2023). Za nízkého tlaku kyslíku tvoří HbS dlouhé polymery, což je způsobeno hydrofobní interakcí valinu v poloze 85 v globinovém řetězci a fenyلالaninu, který je na poloze 88 v globinovém řetězci (Da Guarda et al. 2020).

1.3.1.1 Typy SCD

SCD může být způsobena více než 15 možnými genotypy, ačkoliv většina z nich je velmi vzácná (El Hoss et al. 2022). SCD se dědí jako autozomálně kodominantní znak. To znamená, že heterozygoti pro alelu βS jsou sice nositeli srpkovitého znaku (HbAS) a mohou se u nich příznaky související s touto mutací projevit, ale nemají tak závažné projevy jako homozygoti pro alelu βS (HbSS), kteří mají většinou vážný průběh této nemoci (Kato et al. 2018)

Nejčastější a klinicky nejzávažnější typ SCD je srpkovitá anémie (sickle cell anemie) označovaná jako SCA (Esoh a Wonkam 2021). SCA se vyznačuje homozygotností pro mutaci rs334. Jako další typ SCD je pak označována heterozygotnost pro mutaci rs334 a přítomnost další mutace, která vede ke změně β globinu (Williams a Thein 2018). Druhá mutace může být například taková, která vede buď k jiným strukturním variantám β globinu, jako je například hemoglobin C, nebo ke snížené produkci β globinu, jako je β -talasémie (Williams a Thein 2018).

U pacientů afrického původu je SCA nejčastější příčinou SCD, a to až z 65-70 %. Následuje varianta HbSC, která tvoří asi 30 %. Většinu zbytku pak tvoří HbS/ β -talasémie (Williams a Thein 2018). Homozygoti pro rs334 mutaci (HbSS) a heterozygoti pro tuto srpkovitou mutaci a $\beta 0$ talasémii mají nejzávažnější průběh onemocnění (Liu et al. 2016).

Heterozygoti HbAS, kteří mají pouze jednu alelu βS , mají jen minimální komplikace. Proto se heterozygotnost HbAS nepočítá do skupiny onemocnění SCD. Vzácně se zde můžou vyskytovat komplikace jako hematurie (krev v moči), hyphema (krev v přední oční komoře), renální medulární karcinom a vzácně i malignita a další. HbAS může být také rizikovým faktorem pro chronické onemocnění ledvin a plicní embolii. Tito jedinci jsou částečně chráněni proti malárii způsobené *Plasmodium falciparum*. To vysvětluje masivní rozšíření této mutované βS alely v subsaharské Africe, ve Středomoří, na Blízkém východě a v Indii (Kato et al. 2018).

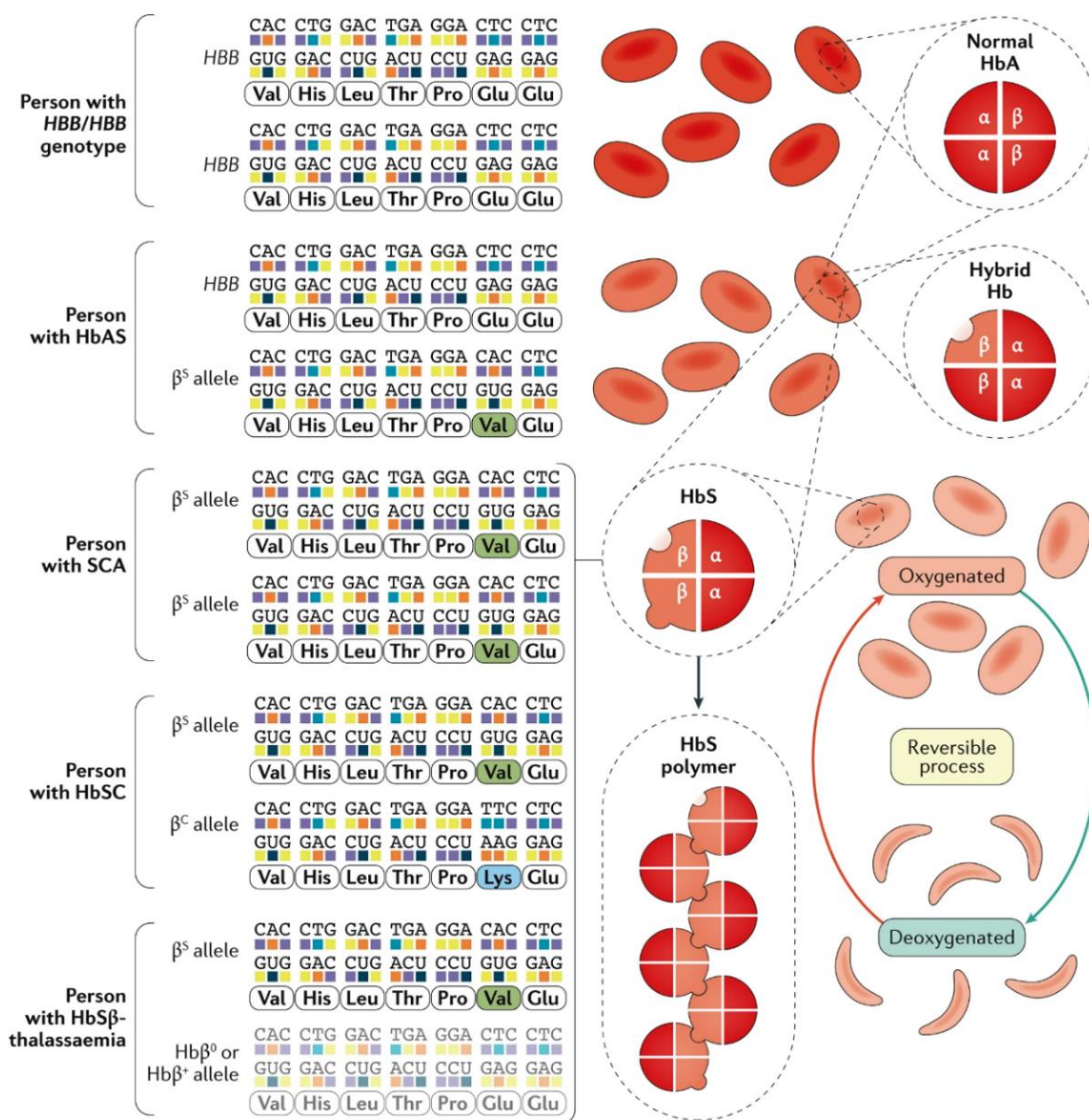
HbSC genotyp je druhý nejčastější typ SCD. Je to kombinace dvou typů mutací, kde je jedna βS alela (HbS) a druhá βC alela, která nese mutaci pro hemoglobin C (Kato et al. 2018). Mutace pro hemoglobin C (HbC) je změna z GAG na AAG na kodonu 6, kdy je v globinovém řetězci nahrazena kyselina glutamová za lysin (Da Guarda et al. 2020). Je to jednobodová mutace SNP, která se označuje jako rs33930165 (Mangano et al. 2015).

Samotná mutace C v heterozygotní formě (HbAC genotyp) je spíše asymptomatická. Homozygotní forma HbCC už se projevuje mírnou hemolytickou anémií (Mangano et al. 2015). Jedinci s těmito mutacemi jsou rovněž částečně chráněni proti malárii, což je pravděpodobně zapříčiněno nižší mírou replikace parazita uvnitř erytrocytu, kvůli jeho patologickým změnám.

Patří sem například abnormalita některých membránových proteinů, což vede ke snížené cytoadherenci a tudíž i snížené sekvestraci parazitů (Gonçalves et al. 2016).

Genotyp HbSC je většinou spojen s mírnější hemolytickou anémií a méně časté jsou i akutní a chronické komplikace než u pacientů s SCA. Časté jsou však komplikace jako retinopatie a osteonekróza (Kato et al. 2018).

HbS/ β -talasemie je další, stále relativně častý genotyp. Jedna alela nese mutaci pro vznik srpkovitého hemoglobinu a druhá alela nese mutaci, která vede ke snížené nebo žádné produkci β -globinu. Závažnost onemocnění může být různá, velice záleží na mutacích pro β -talasémii (Macharia et al. 2020).



Obrázek 4. Genetické změny v HBB. Normální hemoglobin (HbA) se skládá z 2 podjednotek α -globinu a 2 podjednotek β -globinu, ty jsou kódovány HBB. Srpkovitá alela β^S , je alela HBB, kde došlo k substituci adeninu za thymin. Dojde tak k nahrazení kyseliny glutamové valinem, což vede až ke změnám ve struktuře Hb. SCD vzniká, když jsou obě tyto alely HBB mutované a alespoň jedna z nich musí být mutace β^S . Jedinci s HbAS nemají onemocnění SCD, porucha se u nich nijak výrazně neprojeví. Pacienti se SCA mají obě alely β^S . Jedinci s HbSC mají jednu alelu β^S a na druhé alele je změna z guaninu na adenin, což vede k záměně kyseliny glutamové za lysin. Tato mutace dává vzniku HbC. Kombinace β^S s tzv. nulovou alelou neboli Hb β^0 , kdy se Hb netvoří, popřípadě Hb β^+ , vedoucí k produkci Hb v omezené míře. Takováto mutovaná alela je základem β -talasémie (Kato et al. 2018).

1.3.1.2 Další faktory pro průběh onemocnění

Průběh onemocnění závisí nejen na konkrétní mutaci, ale ovlivňují ho i další faktory. Nejdůležitějším faktorem je tvorba HbF. S určitými hladinami HbF jsou spojeny různé haplotypy β -globinových genových klastrů (Shaikho et al. 2017). Haplotyp je kombinací alel na jednotlivých lokusech, které jsou v těsné vazbě a dědí se s vysokou pravděpodobností pospolu. Shodný haplotyp se proto může vyskytovat i po několik generací (Otová et al. 2021). Nejčastěji se v populaci vyskytuje pět hlavních haplotypů (Adekile 2021). Pro každý z těchto haplotypů je charakteristická určitá hladina HbF, jehož přítomnost je zásadní pro lehčí průběh onemocnění. Zjištění haplotypu je tedy vhodné pro určení prognózy onemocnění (Shaikho et al. 2017).

Tyto haplotypy se nazývají podle předpokládaného zeměpisného původu (Joly et al. 2011). Nazývají se jako beninský (BEN), haplotyp pro Středoafričskou republiku (CAR), označovaný také jako bantuský (BAN), senegalský (SEN) a arabsko-indický, označovaný jako AI (Adekile 2021). V některých zdrojích je také uváděn haplotyp Kamerunu (CAM) (Steinberg et al. 2019).

Nejmírnější průběh onemocnění mají pacienti s AI, kde se hladina HbF pohybuje až kolem 20 % z celkového Hb. Následuje haplotyp SEN, který má okolo 10 % HbF a haplotypy CAM, BEN a BAN se pohybují okolo 4-7 %. Haplotyp BAN má obecně nejzávažnější průběh. Důvod rozdílné exprese HbF není zcela jasný, ale pravděpodobně se jedná o cis-působící efekt, který by mohl být zodpovědný za vyšší hladinu HbF (Steinberg et al. 2019).

1.3.2 Talasémie

Talasémie je heterogenní autozomálně recesivní dědičná anémie, která je typická sníženou nebo zcela chybějící syntézou některého z typů globinových řetězců (Asghar et al. 2022). Jedná se tedy především o kvantitativní, spíše než kvalitativní poruchu syntézy hemoglobinu (Penka a Slavičková 2011).

Rozdělení na α a β talasémii spočívá v tom, zda jsou postiženy geny pro α -globinové nebo β -globinové řetězce. Talasémie může být různě závažná, a to podle toho, zda dochází alespoň k částečné tvorbě globinových řetězců, nebo zda se netvoří vůbec. Podle stupně postižení se tedy jedná o talasémii minor, intermedia nebo major. Pro talasémie je typický pokles koncentrace Hb, hypochromie a snížený střední objem erytrocytů. V krevním nátěru pak lze nalézt i terčovité erytrocyty tzv. target cells (Penka a Slavičková 2011).

Stejně jako SCD se β -talasémie projeví, až když dojde poklesu HbF, který je vystřídán HbA. Závažné mutace, které vedou k úplné absenci α -globinových genů, se projeví už ve fetálním stádiu (Thein 2018).

1.3.2.1 β -talasémie

β -talasémie vzniká mutací v genu pro β -globin. Tato mutace vede buď ke snížené (β^+), nebo žádné (β^0) produkci β -globinu. To vede k nerovnováze mezi α - a β -globinovými řetězci (Hoy 2024). V důsledku nedostatečné syntézy β řetězců dochází k nadbytku α řetězců (Penka a Slavíčková 2011). Nadbytečný α -globin se shlukuje a vytváří precipitáty, které poškozují buněčnou membránu a dochází až k apoptóze (Gamage et al. 2023). Méně závažné formy jsou označovány jako β^{++} . Jsou u nich jen minimální poruchy produkce řetězců. Některé jsou tak mírné, že jejich nositelé nemají zjevné příznaky. V současné době bylo identifikováno více než 300 různých variant alel β -talasemie, avšak jen zhruba 40 z nich představuje okolo 90 % případů onemocnění β -talasemie na celém světě (Thein 2018).

Mutace β -talasemie je defekt β -globinového genu na 11. chromozomu, kde se nachází místo pro syntézu globinů (Karnpean et al. 2022). Mutace mohou být způsobeny jednobodovými substitucemi, malými insercemi, a spíše výjimečně i delecemi. Mutace tak ovlivňují produkci globinu ve všech fázích genové exprese, a to od transkripce, zpracování RNA až po translaci mRNA β -globinu. Až polovina nedelečních mutací zcela inaktivuje gen β , takže se β -globin netvoří vůbec a vzniká β^0 talasemie (Thein 2018).

β -talasemie major je nejzávažnější forma talasémie. Tito pacienti většinou zdědí homozygotní mutace a jsou celý život závislí na transfuzích, proto se tato forma dá označit také jako tzv. transfusion dependent thalassaemia (TDT) (Gamage et al. 2023). Opakované transfuze vedou k přetížení železem, tudíž je nutná chelatační terapie pro omezení ukládání železa do tkání. Účinek chelatační terapie není úplný, proto většina těchto pacientů umírá na srdeční selhání v důsledku sekundární hemochromatózy, nebo na hepatokarcinom u starších pacientů (Rahimmanesh et al. 2022). Nadbytečné řetězce α -globinu se hromadí a v prekurzorech erytrocytů tvoří inkluzní tělíčka, které se navážou na membránový skelet a způsobí oxidativní poškození membrány a předčasnou apoptózu (Asghar et al. 2022).

Pacienti s β -talasemie intermedia mají spíše mírnou anémii. Občas mohou potřebovat podstoupit transfuzi, ale zdaleka ne tak často jako pacienti s β -talasemie major, která vyžaduje celoživotní transfuze a chelatační terapii. Nejlehčí forma je β -talasemie minor, která je většinou asymptomatická, s lehkou či středně těžkou mikrocytární anémií (Gamage et al. 2023).

1.3.2.2 α -talasémie

Porucha α -talasémie zahrnuje mutace v genech HBA1 a HBA2. Zdravý jedinec má čtyři funkční geny α -globinu a od každého rodiče zdědí dvě alely. Často dochází k deleci jednoho nebo dvou genů pro α -globin na chromozomu 16, což vede ke snížení exprese α -globinu. Mutace ovlivní např. zpracování nebo stabilitu RNA, čímž se sníží syntéza proteinu (Vijian et al. 2021).

Příznaky a průběh onemocnění závisí na množství a typu postižených genů. Inaktivace či delece α -globinu vede k tichému nosičství. Dva postižené geny vedou k mikrocytární hypochromní anémii. Delece nebo mutace tří genů vede k tvorbě HbH, což se projevuje středně těžkou anémií a výraznou mikrocytózou. Porucha všech čtyř genů vede k tvorbě Hb, který je tvořen čtyřmi γ -řetězci. Takovýto Hb se nazývá jako Hb Bart's. Je to nejzávažnější forma způsobující hydrops fetalis (Vijian et al. 2021). Těhotenství, u kterých je známý Bartův syndrom hydrops fetalis, jsou ukončena, a to kvůli fetální i mateřské morbiditě (Harteveld a Higgs 2010).

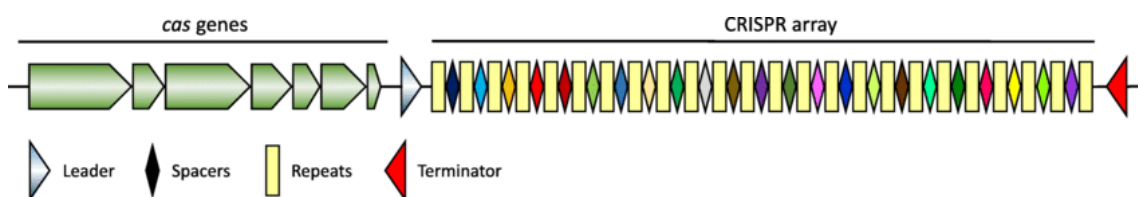
Onemocnění HbH je často u pacientů, kteří jsou heterozygoty pro dvě různé mutace, nebo homozygoti pro středně těžkou mutaci. Obvykle mají méně než 30 % normálního množství α -globinu. Obvyklá je anémie, přičemž hodnoty Hb se mohou lišit (26-130 g/l). Pacienti mají různé příznaky a komplikace jako je splenomegalie, žloutenka, zpomalení růstu u dětí, infekce a mnoho dalších. U Bartova syndromu hydrops fetalis je hlavním Hb nefunkční tetramer γ_4 . Embryonální Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$) je jediným funkčním Hb, který udržuje plod na živu. Tito jedinci téměř vždy zemřou in utero, nebo krátce po narození (Harteveld a Higgs 2010).

2 METODA CRISPR-CAS

2.1 Systém CRISPR-Cas a jeho původ

CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated proteins) je prokaryotický systém, který se stal oblíbeným nástrojem pro úpravu genů, a to díky své schopnosti přesné manipulace s genomem (Zakrzewska a Burmistrz 2023). Dá se využít pro inaktivaci genů (knock-out), ale i vložení nového genetického materiálu (knock-in) (Liu et al. 2019). CRISPR-Cas má proto velký potenciál v léčbě genetických onemocnění. Tento systém byl identifikován u většiny druhů ze skupiny *Archea* a asi u poloviny druhů ze skupiny *Bacteria* a poskytuje jim adaptivní imunitu proti cizím nukleovým kyselinám (Zakrzewska a Burmistrz 2023).

V roce 1987 byly u *Escherichia coli* rozpoznány charakteristické repetice (cluster repeats), o nichž bylo později zjištěno, že se mezi nimi nacházejí unikátní sekvence virového nebo plasmidového původu, označované jako spacers. V roce 2007 bylo potvrzeno, že jsou součástí adaptivní imunity, když byl proveden experiment, kde bakterie integrovaly do svého genomu spacers získané při fágové infekci (Kim et al. 2017). Pole CRISPR je tedy v podstatě archiv předchozích infekcí. V jeho blízkosti se pak nacházejí geny pro tvorbu proteinů Cas, které mají důležitou roli v získávání sekvencí cizí nukleové kyseliny a následné tzv. imunitní reakci při opakované infekci (Zakrzewska a Burmistrz 2023). Proto při opakovaném setkání se snížila citlivost na tuto fágovou popřípadě plasmidovou infekci (Kim et al. 2017).



Obrázek 5. Schématické znázornění CRISPR-Cas lokusu. Repetice (cluster repeats) jsou znázorněny žlutými obdélníky a mezi ně jsou ukládány spacers (kosočtverce různých barev), které jsou získány z virové DNA. Nejnovější spacer je vždy umístěn do vedoucího konce. V genomu vedle CRISPR array se nachází geny pro kódování Cas proteinů (Jeong et al. 2019).

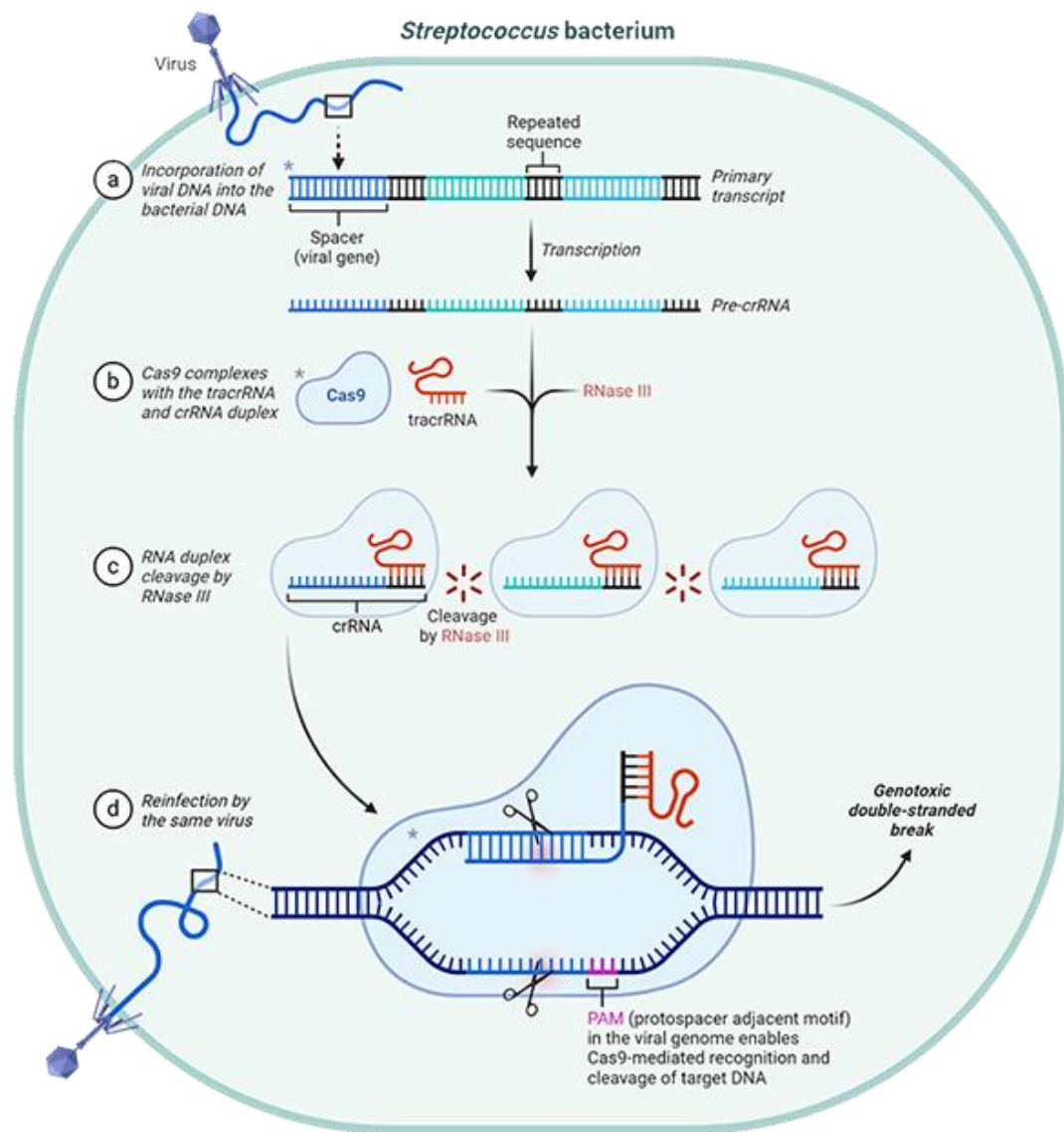
Samotný proces získání imunity proti virům se skládá ze tří fází: adaptace, rozpoznání a interference. Proces adaptace začíná tak, že do bakteriální buňky vstoupí virová DNA (Al-Turjman 2020). Během této fáze jsou z exogenní (virové) nukleové kyseliny získány její části, neboli spacers (Zakrzewska a Burmistrz 2023). Tyto spacers jsou následně integrovány do tzv. CRISPR lokusu, který je složen ze spacerů a opakujících se sekvencí DNA

(cluster repeat) (Al-Turjman 2020). Identické cluster repeats oddělují jednotlivé spacery a mají regulační roli. U mnoha typů CRISPR-Cas jsou nové spacery získány z exogenní nukleové kyseliny pomocí rozpoznání specifické sekvence PAM neboli Protospacer Adjacent Motif. PAM se nachází ve virové DNA v bezprostřední blízkosti protospaceru neboli části exogenní DNA, která ještě není zabudována do DNA bakterie (Zakrzewska a Burmistrz 2023).

Rozpoznání PAM a štěpení exogenní nukleové kyseliny je zajištěno proteiny Cas (Al-Turjman 2020). Sekvence protospacerů jsou následně začleněny do matrice CRISPR a stávají se z nich spacery (Zakrzewska a Burmistrz 2023). Spacer je umístěn do tzv. vedoucího konce bakteriální DNA (Al-Turjman 2020). PAM, které umožnily jejich rozpoznání, do CRISPR lokusu v DNA zakomponovány nejsou, protože jinak by mohlo dojít k autoimunitní reakci a štěpení vlastní bakteriální DNA. Tyto spacery při opakovaném setkání s infekcí umožňují rozpoznání sekvence, a to na základě komplementarity (Zakrzewska a Burmistrz 2023).

Ve druhé fázi je pole CRISPR v bakteriální DNA přepsáno pomocí transkripce, při které jsou uložené spacery přepsány do formy pre-CRISPR RNA (Al-Turjman 2020). Pre-crRNA je dlouhá molekula RNA, která je následně dále zpracovávána až na crRNA. Vyskytuje se více typů systémů CRISPR-Cas, proto zpracování pre-crRNA může probíhat různými mechanismy s použitím různých látek. Systémy třídy 1 obvykle využívají ribonukleázu Cas6, která zkracuje pre-crRNA a vytváří funkční zralé crRNA, přičemž každá crRNA obsahuje jednu spacerovou sekvenci lemovanou fragmenty opakujících se sekvencí (cluster repeats). Pro třídu 2 je štěpení pre-crRNA zajištěno proteiny, jako jsou například Cas9, Cas12 a Cas13. Zde je důležitý také enzym RNAsa a nekódující transkripční RNA (tracrRNA). TracrRNA je kódována poblíž genů Cas a je přepisována spolu s pre-crRNA. Je typická komplementárními sekvencemi k crRNA, takže tvoří komplex s tracrRNA (Zakrzewska a Burmistrz 2023). TracrRNA je klíčová složka podílející se na tvorbě a zpracování crRNA. Tento vzniklý komplex je rozpoznán enzymem Cas9 a RNAsou a je zpracován na zralou crRNA (Javaid a Choi 2021).

Fáze interference nastává, když virus napadne bakterii opakovaně. Zralá crRNA v komplexu s proteiny Cas začne vyhledávat sekvence ve virové DNA, které jsou komplementární k sekvenci kódované spacerovým fragmentem crRNA. Vyhledávání virové DNA opět umožňuje sekvence PAM. Různé druhy organismů mohou používat odlišné typy štěpících proteinů Cas a mohou se vzájemně lišit i v dalších faktorech (Zakrzewska a Burmistrz 2023). Po nalezení komplementární sekvence dochází ke štěpení a zničení virové DNA, takže se virus už nemůže replikovat (Al-Turjman 2020).



Obrázek 6. Bakteriální imunita proti cizí genetické informaci. V první fázi dochází ke vniknutí virové DNA do bakterie. Tato DNA je začleněna do bakteriálního genomu ve formě spaceru mezi tzv. cluster repeats, které oddělují jednotlivé spacery. Následně je bakteriální DNA transkribována do pre-crRNA, s ní je spárována tracrRNA a vytváří se komplex, který je rozpoznán proteiny Cas9 a štěpen RNAsou. Vznikají tak samostatné jednotky, specifické pro danou virovou infekci. Při opakované infekci tyto jednotky kontrolují DNA viru a když naleznou sekvenci PAM, která umožní navázání sgRNA na cílovou DNA, dochází ke štěpení exogenní DNA, čímž se zabrání jeho replikaci (Roberts 2024).

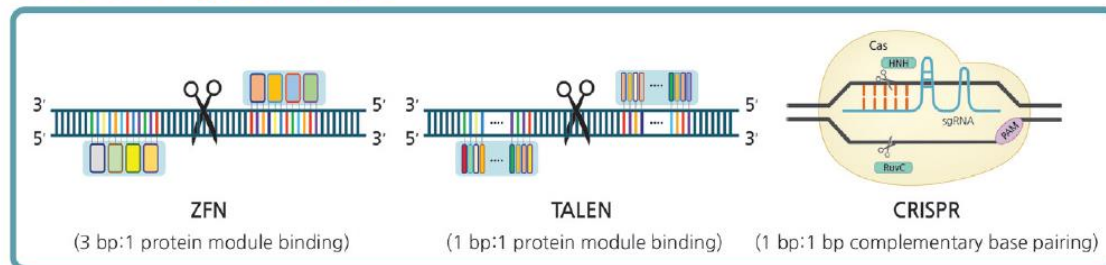
2.2 Metoda CRISPR-Cas pro editaci genomu

Objev systému CRISPR-Cas v prokaryotických organismech vedl k rozvoji technologie, umožňující manipulaci s genomem v eukaryotických buňkách, založené na tomto principu (Al-Turjman 2020). CRISPR-Cas se dá rozdělit do 6 typů a 21 podtypů (k roku 2020).

Nejpoužívanějším typem CRISPR-Cas pro editaci genů je systém využívající enzym Cas9, pocházející z bakterie *Streptococcus pyogenes*, protože se dá použít jako jediný protein (Shim et al. 2020). Dále se také dá využít např. protein Cas12 (Zakrzewska a Burmistrz 2023). Ostatní systémy jsou multiproteinové komplexy (Shim et al. 2020).

Ještě před objevením této metody mohli vědci k editaci genomu využívat metody jako jsou Zinc Finger Nuclease (ZFN) a Transcription activator-like effector nucleases (TALEN) (Kim et al. 2017). CRISPR-Cas je v porovnání s těmito metodami účinnější a může editovat více cílových genů současně (Liu et al. 2017). Nejrozšířenější metoda CRISPR-Cas9 je založena na principu komplementárního párování bází mezi cílovou DNA a guide RNA, zatímco principem ZFN a TALEN je rozpoznávání cílové DNA proteinem. ZFN jsou proteiny složené z endonukleázy, která dokáže štěpit dvouřetězcovou DNA, a z tzv. zinkového prstu, který umožňuje vazbu na DNA. Výroba ZFN je však finančně i časově náročná. U metody TALEN jsou podobně jako u ZFN základem složené proteiny z DNA-vázající efektorové části a endonukleázové části. Mechanismy jsou si v některých ohledech podobné, přesto má TALEN více výhod než ZFN. Konstrukce TALEN je jednodušší a zabere méně času než ZFN, navíc je TALEN specifitější a méně toxický (Shim et al. 2020).

Gene editing technique



Obrázek 7. Možnosti úpravy genomu. Může být upraven pomocí metod jako nazývané Zinc finger nucleases (ZFN), Transcription activator-like effector nucleases (TALEN) a Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) system. Metoda ZFN využívá k rozlišení DNA specifický protein, kdy každý zinkový prst se váže na triplet bází. Metoda TALEN využívá stejně jako ZFN specifický protein, ale každá jeho podjednotka se váže na konkrétní bázi, což dělá metodu přesnější. CRISPR-Cas využívá párování bází na základě komplementarity, přičemž místo proteinu je využívána RNA (Kim et al. 2017).

Oproti proteinovému inženýrství je výroba specifické RNA pro systém CRISPR-Cas mnohem jednodušší, rychlejší a levnější. Výroba sgRNA pro CRISPR-Cas9 vyžaduje změnu 20 nukleotidů tak, aby byly homologní s nukleotidy v cílové sekvenci. Guide RNA pak dokáže rozpoznat jakoukoliv sekvenci DNA, která sousedí se sekvencí PAM (Shim et al. 2020).

2.3 Typy CRISPR-Cas

2.3.1 CRISPR-Cas9

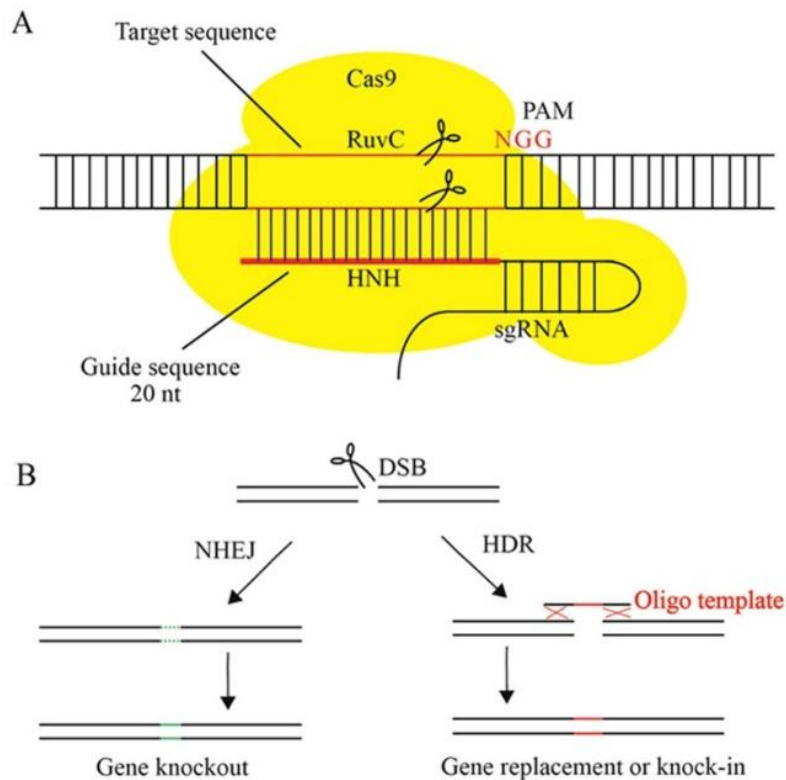
V současnosti je systém CRISPR-Cas, který využívá protein Cas9 z bakterie *Streptococcus pyogenes* (SpyCas9) nejrozšířenějším a univerzálním systémem používaným pro editaci genomu (Tyumentseva et al. 2023). Protein Cas9 se dá také získat z bakterií jako *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus laterosporus* i dalších (Al-Turjman 2020). Cas9 je RNA-dependentní nukleáza a pro její nasměrování se používají tzv. single guide RNA. SgRNA je jediná molekula vzniklá spojením crRNA a tracrRNA (Tyumentseva et al. 2023). Cas9 je oblíbený proto, že se dá využít pro štěpení DNA samostatně, zatímco ostatní Cas proteiny fungují v multiproteinovém komplexu (Shim et al. 2020). Nástroj CRISPR-Cas9 se do klinického využití dostal se schválením prvního léčiva Casgevy (Gamage et al. 2023).

SgRNA je syntetická molekula, která je dlouhá zhruba 100 nukleotidů. Na jejím 5' konci se nachází sekvence o 20 nukleotidech, která umožňuje identifikaci cílové DNA pomocí sekvence PAM (protospacer adjacent motif), což je často 5'-NGG-3', přičemž N značí libovolný nukleotid a G je guanin (Liu et al. 2017). Protein SpyCas9 nejprve rozezná PAM 5'-NGG-3' a poté dochází k párování bází cílové sekvence a komplementární části sgRNA. Tím se vytvoří struktura tzv. R-loop, čímž se aktivuje štěpicí aktivita Cas9 (He et al. 2023).

Nukleáza Cas9 obsahuje 6 domén (Hillary a Ceasar 2023). Důležitá je doména, která rozpoznává sekvenci PAM. Po rozpoznání PAM dochází v Cas9 k deformaci DNA, kdy jsou nukleotidy překlopeny směrem k sgRNA. Když se úsek cílové DNA shoduje se sekvencí v guide RNA, je vytvořen duplex, a druhé vlákno je částečně odděleno. Vazbou proteinu na cílovou DNA dochází ke změnám v proteinu a spouští se štěpení pomocí dalších domén (Zhou a Yao 2023). Dále jsou uplatněny domény nazývané jako RuvC a HNH, které jsou zodpovědné za vznik dvouřetězcového zlomu v cílové sekvenci DNA (Tyumentseva et al. 2023). HNH doména štěpí komplementární vlákno s crRNA, zatímco RuvC doména to opačně (Al-Turjman 2020). Funkce genu lze ovlivnit právě pomocí zlomů, po níž následuje oprava (Westermann et al. 2021).

Prvně se gRNA naváže na protein SpyCas9, čímž se tento neaktivní protein mění na aktivní. Po aktivaci vyhledá cílovou sekvenci, díky rozpoznání sekvence PAM (5'-NGG-3'). Následně Cas9 pomocí svých domén HNH a RuvC přestříhne dsDNA 3 bp před PAM. Doména HNH štěpí vlákno, které je komplementární k 20-nukleotidové sekvenci v sgRNA, zatímco

doména RuvC štěpí opačné vlákno DNA, než je to komplementární (Hillary a Ceasar 2023). Cas9 tak štěpí DNA a vytváří se tak dvouřetězcový zlom (DSB). Tyto vzniklé zlomy jsou následně opraveny mechanismy opravy DNA, a to buď pomocí nehomologního spojování konců (NHEJ) nebo homologicky řízenou opravou (HDR). Většinou dochází k opravě DNA pomocí NHEJ, přičemž je genom opraven pomocí inserce či delece, což vede k vyřazení genu. Pokud je však přítomen templát, tak může být pomocí metody HDR indukován vznik požadované báze, čímž se dá gen opravit (Liu et al. 2017).



Obrázek 8. Mechanismus editace genů pomocí CRISPR-Cas9. Nukleáza Cas9 je navázána na sgRNA. Tento komplex rozpozná cílovou DNA pomocí sekvence PAM, což umožní proteinu Cas štěpit DNA pomocí svých domén. HNH doména štěpí řetězec DNA komplementární k sgRNA, zatímco RuvC štěpí ten opačný a vzniká tzv. tupý dvouřetězcový zlom (DSB). Zlomy jsou následně opraveny pomocí nehomologního spojování konců NHEJ, což vede k inserci či delecii nukleotidů. Zlomy mohou být také opraveny prostřednictvím homologicky řízené opravy (HDR), kde jsou chybějící nukleotidy doplněny podle templátu (Liu et al. 2017).

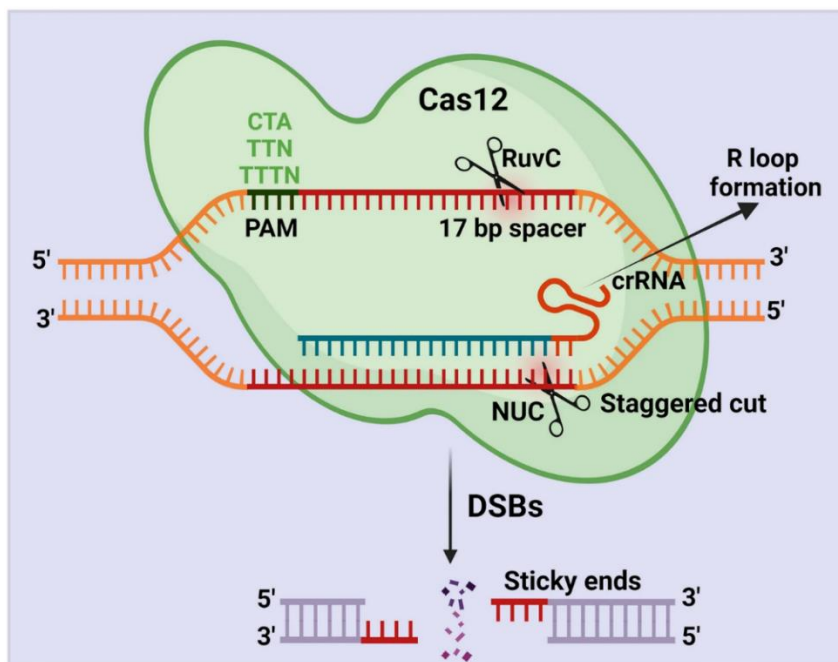
2.3.2 CRISPR-Cas12

Protein Cas12 se pro svoji jednoduchost a efektivitu stává alternativou k proteinu Cas9. Byl izolován z bakterií druhu *Acidaminococcus* (AsCas12a) a bakterie *Lachnospiraceae* (LbCas12a), pro jeho získání se však dají použít i další druhy jako třeba *Francisella*

(Hillary a Ceasar 2023). Cas12a, který se označuje také jako Cpf1, je jednoduchá crRNA-naváděná endonukleáza (Yang et al. 2023). Tento protein dokáže sám zpracovávat bakteriální pre-crRNA a nepotřebuje k tomu tracrRNA ani RNAsu III, na rozdíl od systému využívající Cas9. Ke štěpení DNA je zde potřeba pouze crRNA. Cas12 obsahuje domény RuvC a nukleázový lalok (NUC), díky nimž jsou štěpeny cílové sekvence (Hillary a Ceasar 2023). Je několik typů Cas12, ale jen některé se dají využít pro editaci savčích buněk. Například Cas12b je mechanismem účinku podobný Cas12a, ale vyžaduje pro svoji správnou funkci teplotu okolo 40 °C, takže je pro savčí buňky nepoužitelný (He et al. 2023).

Stejně jako Cas9 potřebuje tento systém sekvenci PAM pro rozeznání cílové sekvence DNA (Hillary a Ceasar 2023). Cas12 rozpoznává oblasti PAM bohaté na AT, jako jsou 5'-TTTV-3' (LbCas12, AsCas12a) a 5'-ATTN-3' pro protein BhCas12b (He et al. 2023). BhCas12b je protein získaný z bakterie *Bacillus hisashii* (Yang et al. 2023). Cas12 má proto lepší uplatnění než Cas9 pro štěpení sekvencí obsahujících větší podíl bází AT (He et al. 2023). Jakmile najde cílovou sekvenci, dochází k hybridizaci párů bází mezi crRNA a cílovým vláknem a vytváří se tzv. R-loop neboli R-smyčka. Jakmile se tato smyčka vytvoří, protein Cas9 začne být enzymaticky aktivní a využije svou RuvC doménu ke štěpení cílového vlákna DNA. Cas12 na rozdíl od Cas9 vytváří tzv. lepicé DSB neboli zlomy s předsazenými konci, což podporuje mechanismus opravy HDR, spíše než NHEJ (Hillary a Ceasar 2023).

Ačkoliv oba systémy Cas9 a Cas12 mohou upravovat DNA, existují mezi nimi rozdíly. Systém CRISPR-Cas9 se přirozeně v bakteriích skládá ze tří složek – crRNA, tracrRNA a Cas9. Uměle byl však zredukován na dvě složky neboli guide RNA a Cas9. Zatímco oba proteiny Cas12a i Cas12b se přirozeně skládají jen ze dvou složek – crRNA a Cas12, což vede ke větší přizpůsobivosti systému a širší možnost využití. Cas9 je však použitelná v širším teplotním rozmezí, zatímco nukleáza Cas12b má vyšší požadavky na konkrétní teplotní podmínky (He et al. 2023).



Obrázek 9. Štěpení DNA pomocí CRISPR-Cas12. Protein Cas12 rozpozná PAM sekvenci (CTA, TTN, TTTN) a vedle sekvence PAM rozpozná cílovou sekvenci DNA. Po rozpoznání dochází k párování úseku cílové DNA s crRNA (méně než 17 párů bází) a vytvoří se tak tzv. R-loop. Jakmile je tato R-smyčka vytvořena, začne být protein Cas12 enzymaticky aktivní a pomocí RuvC domény a nukleázového laloku štěpí vlákna DNA. Vytvářejí se tzv. lepkavé konce (Hillary a Ceasar 2023).

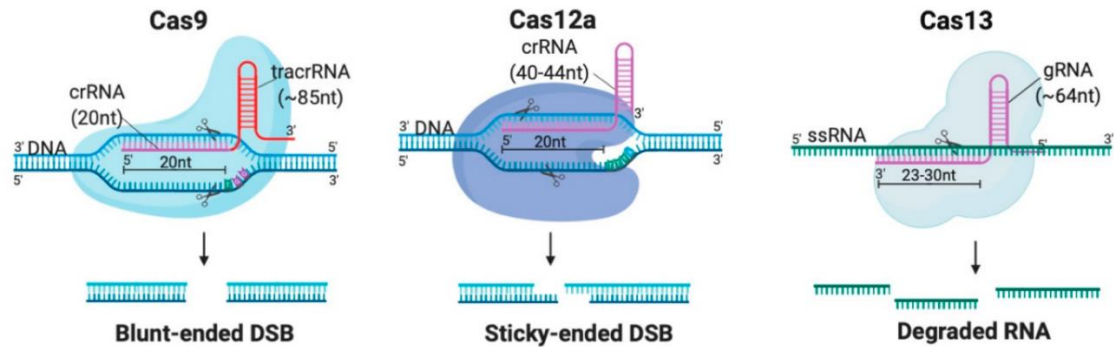
2.3.3 CRISPR-Cas13

CRISPR-Cas13 je systém, který na rozdíl od předchozích systémů dokáže upravit RNA. Dá se využít pro potlačení genové exprese bez rizika poškození DNA, protože proteiny Cas13 nemají DNAsovou aktivitu (Zeballos C. a Gaj 2021). Enzymy Cas13 postrádají domény RuvC a HNH potřebné ke štěpení DNA, proto nemohou genom upravovat (Bharathkumar et al. 2022).

Cas13 dokáže pod vedením crRNA štěpit jednořetězcovou RNA neboli ssRNA. Tento systém vyžaduje tzv. protospacer flanking sequence (PFS), který je podobný PAM sekvenci (He et al. 2023). Proteiny Cas13 mají dvě domény HEPN, což je zkratka higher eukaryotic and prokaryotic nucleotide binding, které mají RNAsovou aktivitu. CRISPR-Cas13 se dělí na několik podtypů (A, B1, B2, C, D, X). Nejvíce prozkoumaným systémem je Cas13a, který se skládá ze dvou částí. První část je lalok (REC), který rozpozná crRNA, a lalok nukleázy (NUC), který RNA štěpí (Liu a Pei 2022).

Jelikož se tato technologie zaměřuje na editaci RNA, má určitá omezení, a proto by se tato technologie dala využít k léčbě pouze některých onemocnění. Trvalá exprese proteinů Cas13 by navíc mohla vyvolat i imunitní odpověď organismu (Zeballos C. a Gaj 2021).

Cas13 by se dal využít například jako antivirotikum, které se zaměřuje na genom RNA virů, jako je chřipka a SARS-CoV-2, pro boj s onemocněním dýchacích cest. Jiné studie zase vidí využití systému s Cas13 pro léčbu neurodegenerativních onemocnění jako je Parkinsonova choroba (Shalaby et al. 2020).

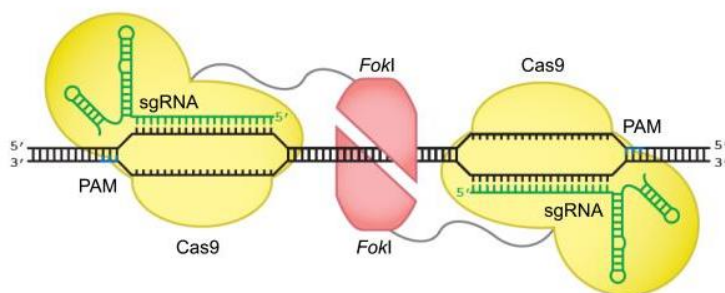


Obrázek 10. Porovnání systémů CRISPR-Cas9, 12a a 13, které se využívají pro editaci DNA nebo RNA. Všechny tyto systémy využívají dvě složky: endonukleázovou podjednotku (protein Cas) a guide RNA. Proteiny Cas9 a Cas12 umožňují štěpení DNA, zatímco Cas13 štěpí RNA (upraveno) (Shalaby et al. 2020).

2.3.4 Další typy CRISPR-Cas

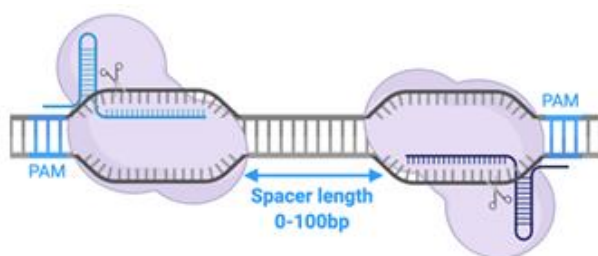
Existuje mnoho variant a modifikací systému CRISPR-Cas, a to z důvodu, že zmíněné systémy CRISPR-Cas mají poměrně velkou mimocílovou aktivitu, nebo byly vynalezeny alternativy, které mají další výhody (Saifaldeen et al. 2020). K mimocílovému účinku dochází, když se nukleáza Cas naváže na jiné než původně zamýšlené místo v genomu, a to kvůli toleranci neshody. Dochází tak k nechtěné genetické modifikaci (Shalaby et al. 2020). Nechtěné mimocílové (off-target) mutace pak mohou způsobit nefunkčnost buněk i karcinogenitu (Kim et al. 2017). Necílová aktivita omezuje možnosti použití těchto systémů, a tak se stále vyvíjí další pokročilejší technologie pro minimalizaci nežádoucích důsledků (Saifaldeen et al. 2020).

Jedna z těchto metod využívá spojení neaktivní tzv. dead formu Cas9 (dCas9), která je spojena s katalytickou doménou endonukleázy FokI, což vytváří komplex nazývaný jako FokI-dCas9. Tento systém vyžaduje párování dvou guide RNA s cílovými sekvencemi, nacházejícími se kolem požadovaného místa úpravy DNA. Vzniklé dvouvláknové zlomy DNA aktivují opravné mechanismy a genom je upraven. Tento systém má minimální mimocílové účinky (Saifaldeen et al. 2020).



Obrázek 11. Fúze nukleázy FokI s katalyticky neaktivní Cas9, který je v komplexu s guide RNA (sgRNA). Takto složený dimer umožňuje nalézt cílovou sekvenci a spustit štěpení dsDNA. Je to přesná metoda s minimální mimocílovou aktivitou. Upraveno (Guilinger et al. 2014).

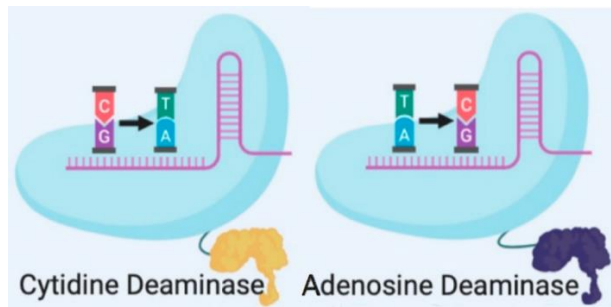
Dále jsou používány Cas9 s mutacemi v doménách HNH nebo RuvC, nazývané jako Cas9 nikázy (Huang et al. 2022). Nikázy jsou tak částečně neaktivní a produkují jednořetězcové zlomy. Tento systém je náročnější na výrobu, protože jsou používány současně dvě sgRNA a jsou zde vyžadovány dvě PAM sekvence na vnějším okraji. Použití dvou nikáz snižuje mimocílovou aktivitu, ale při opravě zlomů stále vznikají bodové mutace (Saifaldeen et al. 2020).



Obrázek 12. Systém štěpení DNA využívající SpCas9 nikázy. Každá obsahuje jednu sgRNA a kvůli snížené aktivitě vytváří jednořetězcový zlom. PAM sekvence se nachází na vnějším okraji nikáz a vzdálenost mezi štěpnými místy závisí na typu systému (Saifaldeen et al. 2020).

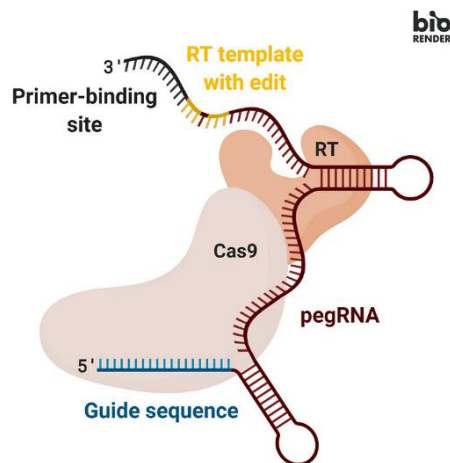
Editory bází (base editors, BE) jsou dalším alternativním systémem, založeným na dCas9, který je spojen s enzymem jako je cytidindeaminasa a adenosindeaminasa. Tyto BE umožňují změnu párování – cytosinové BE konvertují párování C•G na T•A a adeninové BE konvertují A•T na G•C. Tento systém má velký potenciál pro léčbu SNP (jednobodových mutací), ale je zde riziko mimocílového efektu i další omezení (Saifaldeen et al. 2020). Jelikož SCD je způsobena mutací jednoho páru bází (GAG na GTG), jevil by se tento systém jako ideální pro tuto opravu. Nicméně v současné době neexistuje žádný BE schopný převést T na A. V jedné studii se tímto problémem zabývali a použili BE, který převedl GTG na GCG, což vedlo ke vzniku nepatogenní varianty Hb-Makassar (Psatha et al. 2022). BE mohou být použity také pro tvorbu mutací v různých místech promotoru γ -globinu, což vede ke zvýšení

hladiny HbF. V současné době probíhá klinická studie na ověření účinnosti terapeutického produktu pro genovou terapii, který je založen na BE (Christakopoulos et al. 2023).



Obrázek 13. Editory bází. Je zde využita neaktivní dCas9 nukleáza, která je spojená s enzymem Cytidin-deaminasou nebo Adenosin-deaminasou. Cytosinové editory bází umožňují změnu z C•G na T•A a adeninové editory bází konvertují A•T na G•C (Shalaby et al. 2020).

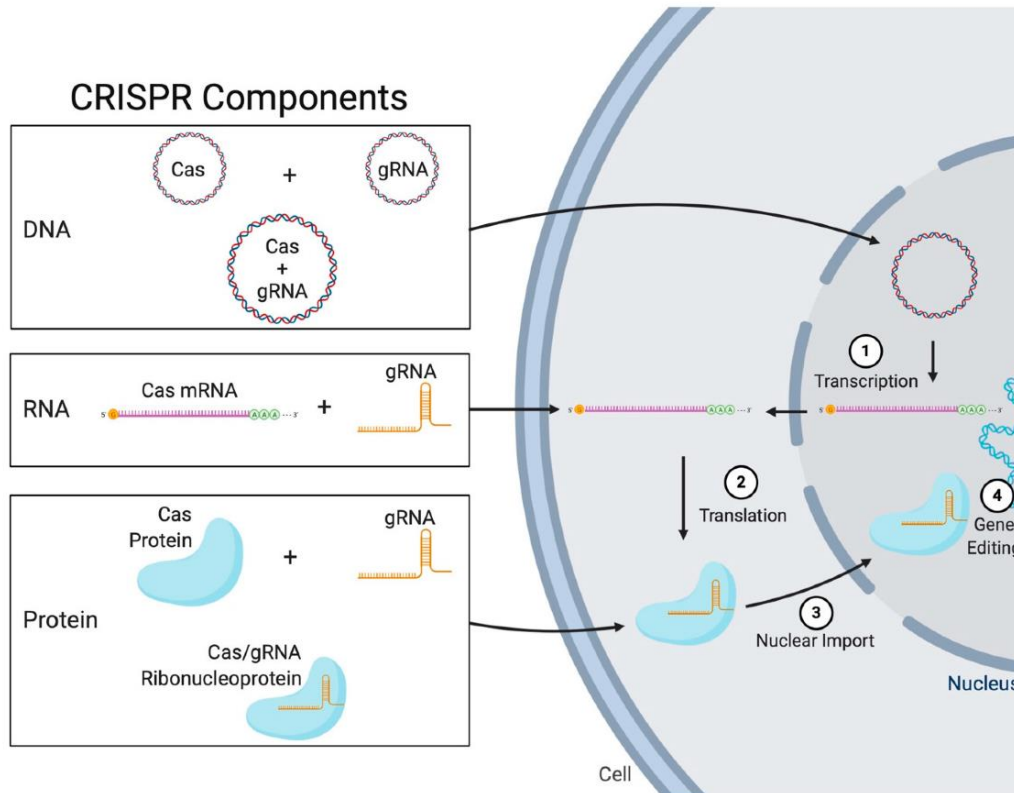
Prime editory umožňují všechny typy změn párů bází DNA, malé inserce, delece i kombinace, a to bez nutnosti dodat donorový templát DNA. Jsou složeny z nikázy Cas9 spojené s reverzní transkriptázou. Pro navedení na cílovou sekvenci využívají prime editing guide RNA (pegRNA), pomocí které je identifikováno startovací místo a zároveň obsahuje správnou sekvenci pro opravu původní DNA. Pomocí tohoto systému by bylo možné opravit i mutaci způsobující SCD, kterou pomocí Editorů bází není možné opravit. Úspěšnost editace pomocí tohoto systému však nebyla zcela bezchybná, ale s dalšími modifikacemi se jeví jako slibný nástroj pro úpravu genomu (Ceglie et al. 2023).



Obrázek 14. Prime editory. Jsou složeny z nikázy Cas9 (protein, který má mutovanou jednu štěpící doménu, štěpí pouze jedno vlákno DNA) a reverzní transkriptázy (RT) neboli enzymu který katalyzuje přenos z informace z RNA do DNA. Prime editing guide RNA obsahuje guide sekvenci pro komplementaci s cílovou DNA a templát, podle kterého je zprostředkována oprava (Acharje, 2020).

2.4 Doručení systému CRISPR-Cas do buňky

Aby mohl systém CRISPR-Cas plnit svoji funkci, musí být dopraven do jádra buňky ve strukturálně neporušené a biologicky funkční podobě. Systém CRISPR-Cas9 může být zaveden ve formě DNA, mRNA nebo proteinu (Huang et al. 2022).



Obrázek 15. Typy transportních forem systému CRISPR-Cas do buňky. Systém lze doručit do buňky ve formě plasmidové DNA, mRNA nebo proteinu. (1) Plasmid kódující protein Cas je v jádře buňky transkribován do mRNA a plasmid, který kóduje gRNA je transkribován do single guide RNA. (2) mRNA se dostává do cytoplazmy, kde proběhne translace a vznik nukleázy Cas, a vzniká ribonukleoproteinový komplex sgRNA/Cas (RNP). (3) Komplex RNP je importován do jádra. (4) RNP sRNA/Cas provádí editaci genu (Shalaby et al. 2020).

Běžně je systém CRISPR-Cas9 dodáván do buňky pomocí plasmidu, kdy je endonukleáza Cas9 a sgRNA kódována v jediné plasmidové DNA (Cottle et al. 2016). Mohou být ale také dva plasmidy, kdy první kóduje protein a druhý gRNA (Shalaby et al. 2020). Plasmidová DNA pro CRISPR-Cas9 lze snadno vyrobit, jsou zde nízké náklady na výrobu a je stabilní, ale má pomalý účinek a hrozí zde riziko integrace do genomu buňky (Huang et al. 2022). Další možností je kódování Cas proteinu v mRNA a gRNA je transkribována in vitro ze syntetického oligonukleotidu (Shalaby et al. 2020). Systém s mRNA má rychlý nástup, nízké riziko off-target účinku, ale mRNA je většinou nestabilní. Další možností je ribonukleoprotein (RNP)

sgRNA/Cas9, který má rychlý účinek a nízký off-target účinek, ale jeho výroba je poměrně složitá a nákladná. Velikost těchto komplexů a povrchový náboj však znemožňuje jejich průchod přes fosfolipidovou dvojrstvu buněčné membrány, proto jsou potřeba další systémy, které umožní jejich přenos (Huang et al. 2022).

Dodávání těchto komponent CRISPR-Cas je možné pomocí fyzikálních metod jako je mikroinjekce, elektroporace, a mnoho dalších. Tyto metody jsou vysoce účinné, ale obtížně aplikovatelné in vivo. Dále je také možnost dodání komponent pomocí virových a nevirových systémů. Pro dodávání systémů CRISPR-Cas9 jsou nejčastěji používány vektory adenoasociovaný virus (AAV), adenovirus (AdV), lentivirus a retrovirus (Huang et al. 2022). Virové vektory jako AAV a lentivirus mají nevýhodu v tom, že mají poměrně malou kapacitu pro přenos látek. Dále mohou vést k buněčné toxicitě a genomické nestabilitě (Kim et al. 2017). Mezi nevirové doručovací systémy pro CRISPR-Cas9 se mohou použít jak přirozeně získané, tak syntetické lipidové materiály, jako polymery (např. syntetické polymery, polypeptidy, proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny) a anorganické materiály např. zlaté nanočástice, magnetické nanočástice, uhlíkové a křemíkové bázi (Huang et al. 2022).

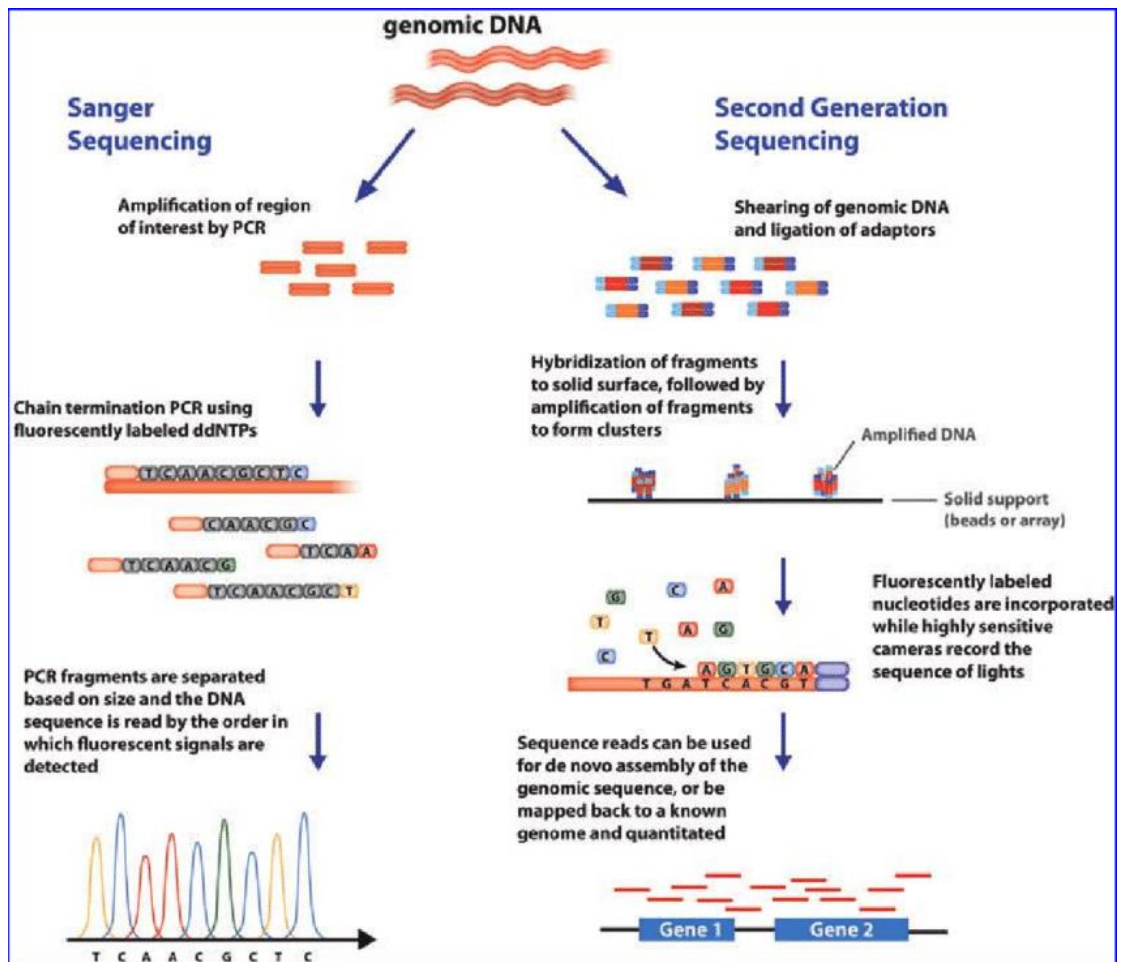
2.5 Kontrola účinnosti editace genomu

U všech nástrojů pro úpravu genomu je nezbytné provést testování jejich účinnosti a specifčnosti. Případné mimocílové reakce jsou předpovídány již při návrhu sgRNA, což je prováděno pomocí softwarových nástrojů. Po provedení editace genomu je kontrola efektivity povinná, pokud je plánována aplikace u zvířat a lidí, protože mimocílová aktivita může mít vážné důsledky a může vést ke vzniku dalších mutací (Germini et al. 2018).

Geneticky upravený plasmid je transfekován do vybraných cílových buněk, které jsou následně protříděny, aby se izolovaly pozitivní klonální buněčné populace. Poté je u některých buněk extrahována DNA, která je amplifikována a purifikována pro sekvenování DNA a následné vyhodnocení účinnosti editace genomu. Celý tento proces trvá minimálně jeden měsíc (Germini et al. 2018).

Pro účel kontroly úspěšnosti editace genomu byla vyvinuta celá řada metod a výpočetních nástrojů pro detekci indelů vzniklých editací genomu (Li et al. 2023). K tomuto účelu je možné využít data ze Sangerova sekvenování, které jsou následně zpracovány například pomocí algoritmu TIDE, který dokáže určit spektrum indelů a frekvenci cílených mutací, které vznikly editací genomu pomocí CRISPR-Cas9. New generation sequencing (NGS) je další často

využívanou metodou, která má oproti Sangerově metodě výhodu, že je rychlejší a umožňuje sekvenaci milionů bází (Li et al. 2023).



Obrázek 16. Srovnání mezi Sangerovým sekvenováním a sekvenováním nové generace (NGS). **Sangerovo sekvenování** začíná amplifikací požadovaného úseku DNA pomocí PCR, za použití specifických primerů, a vznikne tak mnoho kopií dané sekvence. Amplifikovaná DNA je štěpena na jednotlivá vlákna a následně je použit primer, který se k tomuto vláknu naváže a pomocí DNA polymerázy je syntetizováno komplementární vlákno. Během syntézy se do nově vznikajícího řetězce začlení fluorescenčně značený terminátor (ddNTP), který zastaví další růst řetězce. Každý terminátor pro každou bázi je označen jinou barvou. Vzniklé fragmenty se poté oddělí podle velikosti pomocí elektroforézy. Laser měří fluorescenci na konci každého fragmentu. Počítač zpracuje výsledky do chromatogramu, kde barvy fluorescence odpovídají jednotlivým bázím. Pořadí těchto bází určuje sekvenci cílové DNA. **Sekvenování nové generace (NGS)** začíná extrakcí nukleové kyseliny, které musí být dostatečné množství. Následuje fragmentace DNA pomocí endonukleáz, nebo mechanicky. Ke každému fragmentu jsou přidány značky (adaptéry) s jejichž pomocí jsou fragmenty přichyceny na pevný povrch a vznikají shluky. Fluorescenčně značené nukleotidy jsou přiřazeny k cílové sekvenci a kamera zaznamenává záření z jednotlivých úseků, čímž určí sekvenci genomu. NGS dokáže sekvenovat až miliony bází (Khare 2019). Obrázek od (Bunnik a Le Roch 2013).

3 CRISPR-CAS PRO LÉČBU HEMOGLOBINOPATIÍ

Genová terapie představuje pro pacienty s těmito genetickými onemocněními možnost na zlepšení kvality života. V současné době sice existuje léčba, která dokáže zmírnit projevy onemocnění, ale problémy nejsou odstraněny úplně a tato léčba neřeší příčinu onemocnění. Možností je podávání transfúzí a chelatace železa, léčba hydroxyureou a dalšími léčivými, nebo alogenní transplantací, ale méně než 20 % pacientů najde dárce se shodným HLA antigenem (Frangoul et al. 2021). Pro pacienty, kteří vhodného dárce najdou, tato možnost stále nese rizika jako je vznik štěpu, neplodnost či sekundární malignity (Samuelson et al. 2021).

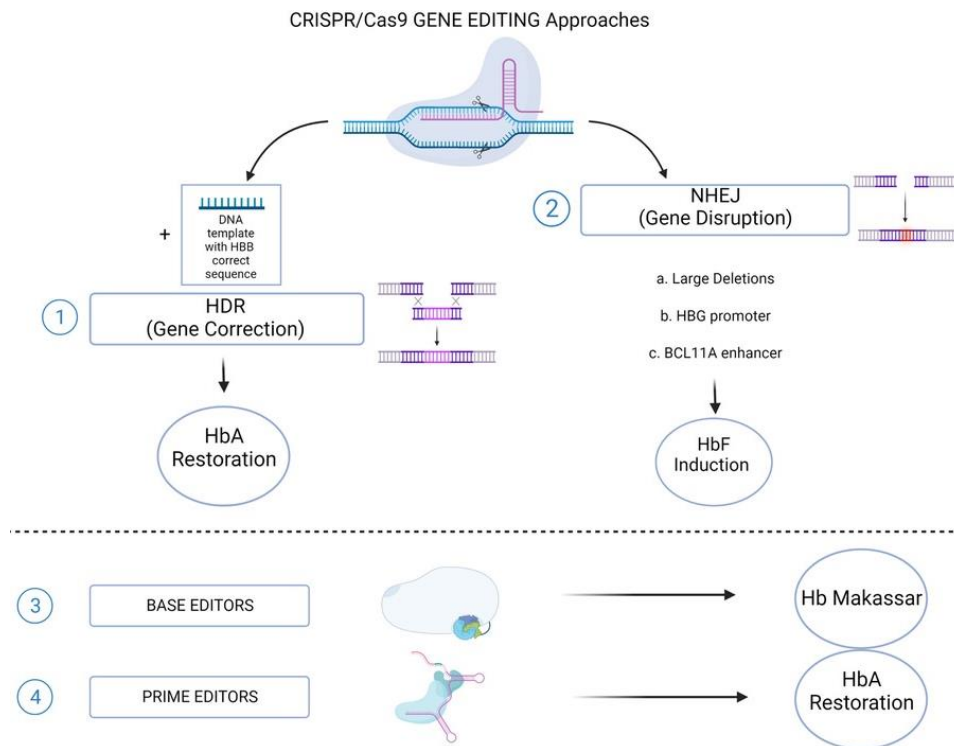
Editace genomu u hematopoetických kmenových a progenitorových buněk (HSPC) se provádí především ex vivo. Tato terapie obnáší výrobu jedinečného terapeutického produktu in vitro pro každého pacienta, který se vyrábí z jeho vlastních HSPC. Ex vivo editace genomu vyžaduje více kroků než in vivo, jako je např. odběr, separace konkrétních buněk, úprava a transplantace zpět pacientovi (Li et al. 2020). Takovýto postup vyžaduje velkou odbornost a specifické vybavení, což zvyšuje celkové náklady na produkt a omezuje tak jeho dostupnost pro běžné pacienty (Psatha et al. 2022). Tento přístup má však i výhody, že po editaci genomu buněk lze zjistit účinnost editace, a to ještě před podáním těchto upravených buněk pacientovi, čímž se omezí mimocílový účinek editace genomu (Li et al. 2020).

3.1 Úprava genů pro léčbu onemocnění

Je zde několik možností, jak editovat genom. První možností je homologicky řízená oprava (HDR), kdy je genom upraven podle dodaného templátu. Druhou možností je nehomologní spojování konců (NHEJ), při které dochází k narušení genu a omezení jeho funkčnosti (Park et al. 2019). NHEJ je nejčastěji používaný opravný mechanismus v buňkách, který zavádí do cílové oblasti genomu malé inserce a delece (Psatha et al. 2022).

Oprava genomu pomocí HDR se většinou zaměřovala spíše na SCD. HSPC byly editovány pomocí ribonukleoproteinů Cas9, které byly dodány do buňky pomocí AAV. Podle některých studií však editace genů pomocí HDR nemá tak velkou účinnost a paralelně s opravou genu pomocí HDR se uplatňují i opravy pomocí NHEJ, vedoucí k tvorbě nežádoucích insercí a delecí. Ty by mohly vést ke vzniku nestabilních a pozměněných variant Hb, včetně buněk zcela neschopných produkovat Hb (Ceglie et al. 2023). HDR oprava je navíc omezená na fázi S/G2 buněčného cyklu, proto dosažení vyšších frekvencí genetických úprav v převážně klidových dlouhožijících repopulačních HSPC buněk zůstává problémem (Zarghamian et al. 2023).

Více studií se proto zaměřuje na opětovnou aktivaci tvorby HbF pomocí NHEJ. Zvýšení množství HbF pomůže pacientům se SCD i β -talasémií. Bylo prokázáno, že jedinci, kteří mají jeho hladinu geneticky vyšší, mají lehčí průběh, popřípadě nemají žádné příznaky. Mutace, které zvyšují hladinu HbF mohou mít různý charakter (Ravi et al. 2022). Mohou například tvořit velké delece, protože se nukleáza zaměří na podobné sekvence v promotorech genů HBG1 a HBG2 a vzniká tak hybridní gen. Díky této deleci je produkováno větší množství HbF (Sharma et al. 2023). Mohou porušit vazebná místa represorů tvorby HbF, přičemž jako dva hlavní represory γ -globinu jsou uváděny BCL11A a ZBTB7A. Druhou variantou je omezit produkované množství těchto represorů. Zvýšení hladiny HbF lze také dosáhnout pomocí mutací, které vedou ke vzniku nových vazebných míst pro erytroidní aktivátory (Ravi et al. 2022).



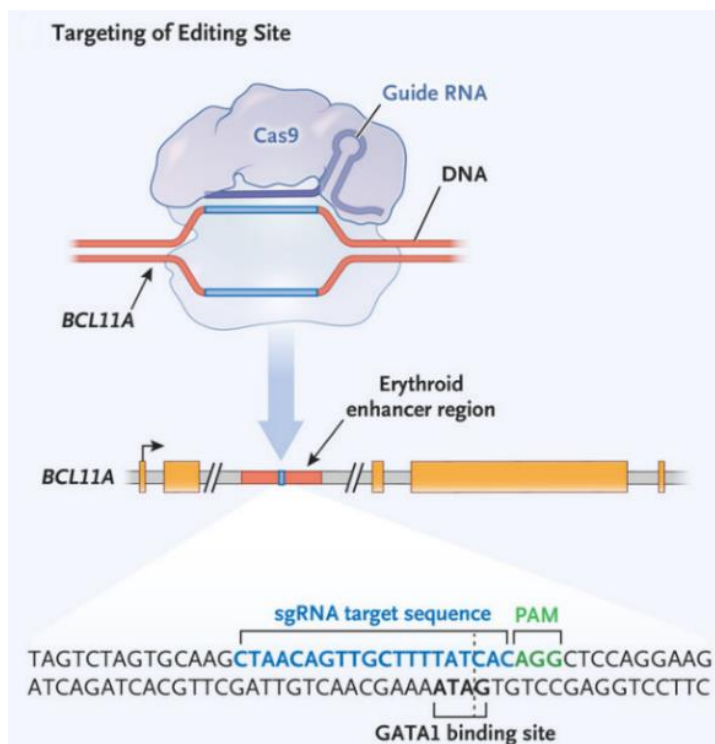
Obrázek 17. Možnosti úpravy genomu CRISPR-Cas9 pro SCD. **(1)** Oprava genomu pomocí templátu obsahujícím správnou sekvenci, vede k obnovení HbA. **(2)** Poškození vybraných sekvencí – dochází k vyřazení funkce genů, vede k indukci tvorby HbF. Je zde několik možností: a) Velké delece neboli odstranění úseků DNA, které obsahují inhibiční sekvence pro tvorbu HbF, b) Narušení promotorových oblastí genů HBG1/2 (geny pro tvorbu γ -globinu) – poškození vazebných míst pro transkripční represory, zvýšení tvorby HbF, c) narušení vazebného místa pro transkripční faktor GATA1 v intronovém zesilovači BCL11A, vede ke snížení množství produkovaného BCL11A, zodpovědného za potlačení HbF. Dále nově zavedené metody odvozené od CRISPR-Cas9 – **(3)** Editory bází, kdy vzniká nesprávný Hb Makassar a **(4)** Prime editory pro obnovení HbA (Ceglie et al. 2023).

3.1.1 Zesilovač BCL11A

Reaktivace tvorby HbF je často zmiňovanou možností pro léčbu těchto onemocnění. To lze docílit několika způsoby, jako například omezení produkce represoru HbF, označovaného jako BCL11A. Je to transkripční faktor, který tlumí produkci HbF (Rahimmanesh et al. 2022).

BCL11A je zkratka slov B-cell lymphoma/leukemia 11A a je kódován na chromozomu 2p16.1 (Yin et al. 2019). Jedna z možností, jak zvýšit hladiny HbF, je omezení jeho funkce. Gen pro tvorbu BCL11A však nelze zcela vypnout, protože BCL11A má zásadní vliv na vývoj organismu (Rahimmanesh et al. 2022). Je velmi důležitý nejen pro hematopoetický systém a přepínání hemoglobinů, jako například z HbF na HbA, ale je také vysoce exprimován v mozku a je nezbytný pro jeho vývoj. Je důležitý pro buněčnou proliferaci, diferenciaci i apoptózu v hematopoetickém systému a podílí se také na vývoji kůže a míšních neuronů (Yin et al. 2019). Delece v genu pro BCL11A způsobují úmrtí novorozenců (Rahimmanesh et al. 2022). Nadměrná exprese BCL11A se zase vyskytuje u hematologických malignit a u některých solidních nádorů (Yin et al. 2019).

Možností, jak ovlivnit tvorbu HbF, a přitom tento transkripční faktor nepoškodit, je narušení oblasti GATA v erytroidním enhanceru (zesilovači) BCL11A. GATA je vazebné místo, kam se váže transkripční faktor GATA1, který ovlivňuje funkci zesilovače BCL11A. Díky narušení vazebného místa pro GATA1 dochází ke snížené expresi BCL11A. Produkované množství represoru HbF je nedostatečné pro potlačení tvorby HbF, ale dostačující pro správný buněčný vývoj. Na tomto principu úpravy genomu je založena studie CTX001, která byla využita pro tvorbu v současné době již schváleného léčiva Casgevy (Rahimmanesh et al. 2022).

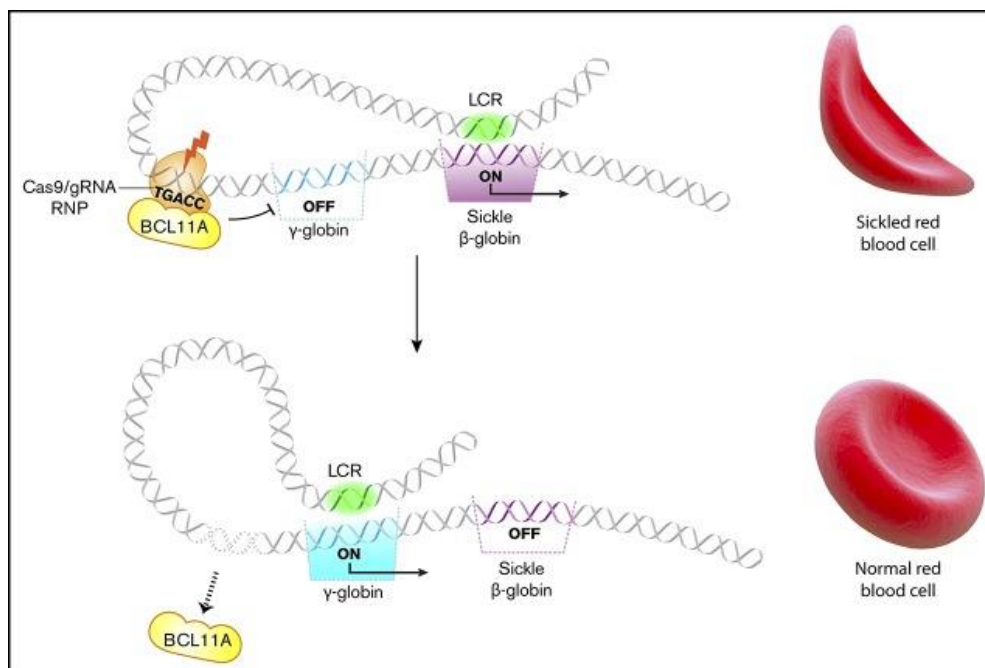


Obrázek 18. Erytroidní enhancer BCL11A jako místo pro editaci genomu. PAM sekvence v těsné blízkosti je důležitá pro navázání Cas9 k cílové DNA. Systém CRISPR-Cas9 je následně směřován do cílového místa pomocí sgRNA a Cas9 místo upraví. Sekvence GATA je specifické místo, kam se váže transkripční faktor GATA1, ovlivňující enhancer BCL11A. Poškozením místa se GATA1 nemůže navázat, což omezí funkčnost enhanceru BCL11A. To vede ke změně exprese genu BCL11A, tudíž se netvoří tolik proteinu BCL11A a nedochází tak k potlačení tvorby HbF (Frangoul et al. 2021).

3.1.2 Narušení vazebného místa transkripčních represorů

Další možností, jak zvýšit hladinu HbF, je cílené narušení vazebného místa pro transkripční represory γ -globinu, jako jsou BCL11A a ZBTB7A (Ceglie et al. 2023). Vazebné místo pro transkripční represor BCL11A se nachází v promotorové oblasti genů HBG1/HBG2 a je to specifická sekvence označovaná jako TGACC. Narušení úseku v promotoru genu lze provést pomocí CRISPR-Cas9 (Métais et al. 2019).

ZBTB7A, který je označován také jako leukemia/lymphoma-related factor (LRF), je rovněž regulátor transkripce. Má důležitou funkci v B i T lymfocytech a erytroidních buňkách. Jeho tvorba je, stejně jako u BCL11A, aktivována pomocí GATA1 a funguje jako represor tvorby HbF, nezávisle na BCL11A. Dále potlačuje proapoptotický faktor BCL2-like 11 (MIB) a zabraňuje tak apoptóze. Pomocí CRISPR-Cas9 lze narušit vazebná místa v promotorech pro ZBTB7A, čímž lze reaktivovat tvorbu HbF (Paschoudi et al. 2023).



Obrázek 19. Role vazby transkripčního represoru BCL11A na promotor genu pro γ -globin. V prvním případě je u pacienta produkován srpkovitý β -globin. LCR (locus control region) je navázán na oblast zodpovědnou za tvorbu HbA a je důležitý pro regulaci exprese různých typů Hb během vývoje. Pomocí systému CRISPR-Cas9 je narušena struktura vazebného místa (TGACC) pro represor tvorby HbF BCL11A. V druhém případě už se represor BCL11A nemůže navázat, dochází k reaktivaci tvorby HbF a LCR se váže na úsek kódující γ -globinu (Métais et al. 2019).

KLF1 neboli Kruppel-like factor 1, je důležitý transkripční aktivátor, který se podílí na regulaci různých erytroidních genů. Ovlivňuje enzymy zodpovědné za syntézu hemu či antigenů krevních skupin a další (Paschoudi et al. 2023). KLF1 přímo aktivuje tvorbu β -globinu a pomocí interakce s BCL11A potlačuje syntézu γ -globinu (Yin et al. 2019). Přirozeně se vyskytující mutace v genu kódujícím KLF1 jsou spojeny s vysokou hladinou HbF, proto je tento gen dalším potenciálním cílem pro editaci genomu pomocí CRISPR-Cas9 (Paschoudi et al. 2023).

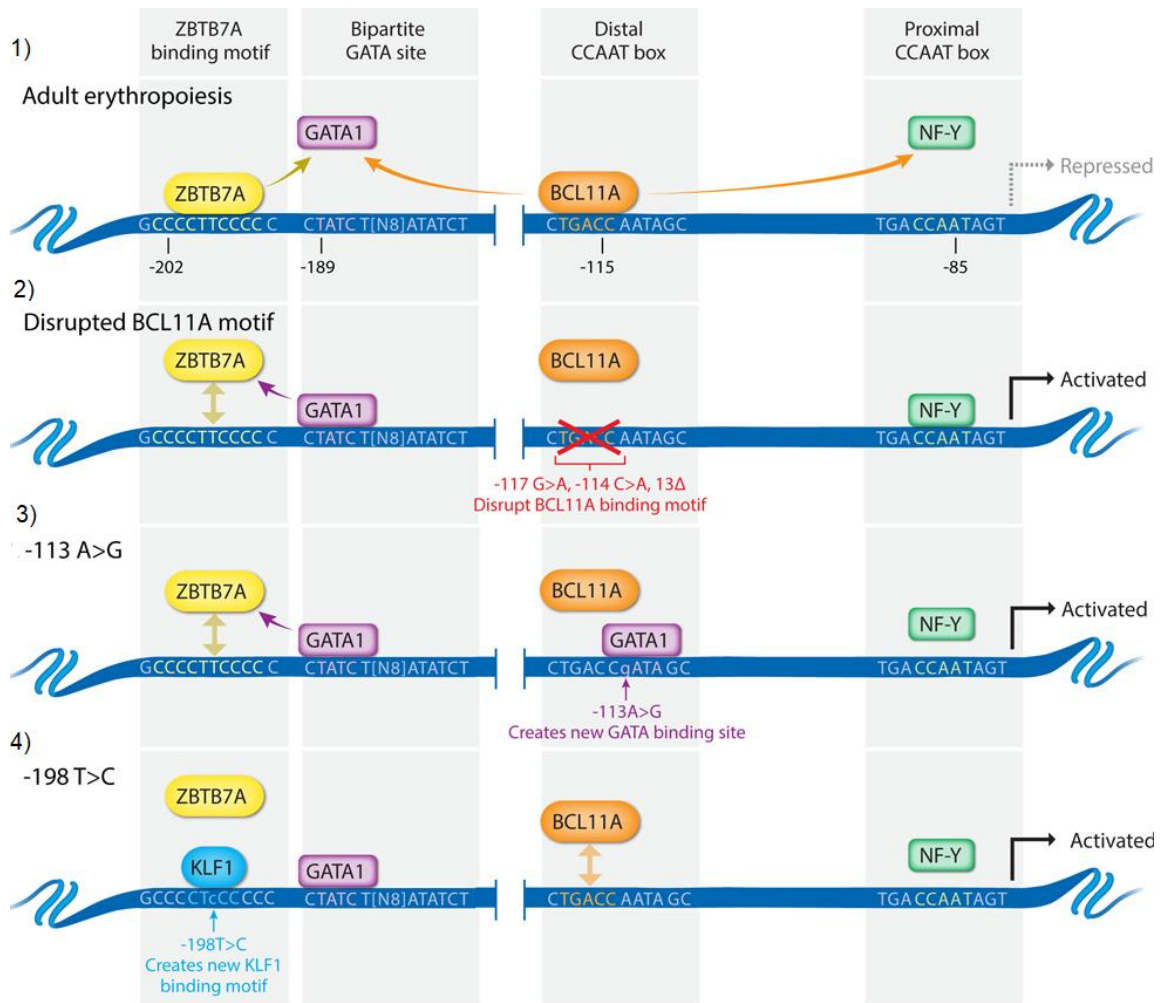
3.1.3 Tvorba nových vazebných míst pro aktivátory transkripce

Další možností je vytvoření nového vazebného místa pro transkripční aktivátor KLF1 na promotoru genu pro γ -globin (Antoniou et al. 2022). Editory bází jsou ideálním systémem pro vytváření těchto nových vazebných míst (Ceglie et al. 2023). Některé mutace, jako třeba -198 T > C vytvářejí de novo vazebné místo pro KLF1 (Paschoudi et al. 2023). Toto místo se nachází v promotoru HBG2 a HBG1, -198 nukleotidů před místem začátku transkripce genů

pro γ -globin (Antoniou et al. 2022). Navázáním se na nové vazebné místo transkripční aktivátor KLF1 vytěsňuje represor ZBTB7A a umožní tak navázání GATA1, jehož navázání je nezbytné pro tvorbu γ -globinu (Doerfler et al. 2021).

Pomocí bodových mutací lze vytvořit nová vazebná místa i pro další erytroidní aktivátory, jako je například GATA1. Pro tento transkripční aktivátor lze vytvořit vazebné místo mutací A>G na místě -113 nukleotidů před začátkem transkripce HBG. GATA1 vytěsňuje represor tvorby HbF BCL11A a částečně tím usnadní vazbu GATA1 na místo -189, kde je vazba GATA1 nezbytná, aby došlo k reaktivaci tvorby HbF (Doerfler et al. 2021).

Je mnoho možností, jak zvýšit hladinu HbF. Mechanismy, které ovlivňují expresi různých typů Hb, nejsou stále zcela jasné. Zkoušení, jakými dalšími mechanismy by se dala hladina HbF zvýšit, probíhá zaváděním mutací v buněčných kulturách HUDEP-2, což je imortalizovaný lidský erytroidní progenitor (Doerfler et al. 2021). Dále lze využít buněčnou linii K562, což je lidská fetální erytroleukemická linie (Antoniou et al. 2022). Pro výzkum mechanismů a účinků zaváděných mutací jsou také používány imunodeficitní myší modely, kterým jsou zaváděny lidské geneticky upravené CD45⁺ buňky. Díky tomu lze posoudit efektivitu in vivo, což je důležité pro potenciální klinické uplatnění (Doerfler et al. 2021).



Obrázek 20. Srovnání mezi normální erythropoézou a mutacemi způsobující zvýšení hladiny HbF. **1)** Normální erythropoéza – je tvořen HbA, HbF je tlumen pomocí represorů BCL11A a ZBTB7A, které jsou navázané na svých vazebných místech a inhibují navázání transkripčních aktivátorů GATA1 a NF-Y pomocí sterických účinků a modifikací. **2)** Narušení vazebného místa pro BCL11A. Tento represor tvorby HbF se nemůže navázat na DNA, tudíž aktivátory transkripce GATA1 a NF-Y se navážou do svých vazebných míst. Pro aktivaci tvorby HbF je vazba obou těchto aktivátorů důležitá. Represor ZBTB7A není ovlivněn, tudíž stále funguje jako inhibitor tvorby HbF, produkovaná hladina HbF je ale dostatečná pro lepší průběh nemoci. **3)** Mutace A>G v místě -113 nukleotidů před začátkem transkripce genů pro γ -globin vytváří nové vazebné místo pro aktivátor GATA1, který vytěsni represor BCL11A. GATA1, který má podobný účinek jako NF-Y, pravděpodobně způsobí, že zde není nutná vazba NF-Y k aktivaci tvorby HbF. ZBTB7A nebyl ovlivněn, tak může částečně inhibovat tvorbu HbF, nedojde však k úplnému umlčení genu. **4)** Mutace v místě -198 (T>C) vytváří vazebné místo pro aktivátor transkripce KLF1, který vytěsni ZBTB7A, čímž aktivuje GATA1, který je důležitý pro transkripci. Vazba GATA1 na sekvenci -189 je nezbytná pro normální expresi γ -globinu, na rozdíl od vazby NF-Y. BCL11A není ovlivněn, proto může inhibovat tvorbu HbF. Upraveno (Doerfler et al. 2021).

3.2 Příklady použití – schválená léčiva FDA, studie

3.2.1 Casgevy

Casgevy, pod jiným názvem také jako CTX001, je autologní ex vivo genová terapie. Je to schválený terapeutický produkt pro léčbu SCD i TDT, který zvyšuje hladinu HbF. Byl schválen 16. listopadu 2023 v UK a 8. prosince v US a vyvinuly ho společnosti CRISPR Therapeutics a Vertex Pharmaceuticals. Klinické studie na testování účinnosti probíhaly od roku 2018 (Zhang et al. 2024). U obou onemocnění je CTX001 použitelný od věku 12 let a starších, u kterých není k dispozici dárce kmenových buněk s odpovídajícím HLA antigenem (Vertex Pharmaceuticals 2023). U pacientů s vyšší hladinou HbF by se měla přestat vyskytovat srpkovitost a odstraní se závislost na pravidelném podávání erytrocytů (Adashi et al. 2024).

Pomocí systému CRISPR-Cas9 jsou upraveny hematopoetické kmenové a progenitorové buňky (HSPC) pacienta (Barak et al. 2024). CRISPR-Cas9 se zaměřuje na oblast GATA1 v zesilovači genu BCL11A, která je narušena (Zhang et al. 2024). Tím je omezeno produkované množství represoru tvorby HbF – BCL11A. Díky tomu se BCL11A neváže v takovém množství na své vazebné místo v promotoru γ -globinu, takže se mohou navázat aktivátory transkripce HbF a hladina HbF se zvýší (Rahimmanesh et al. 2022).

Samotný proces výroby terapeutického přípravku začíná tím, že pacient dostává minimálně 8 týdnů před odběrem buněk výměnné transfuze, aby se před odebráním kmenových buněk zajistil dostatek funkčních buněk. Poté je pacientovi podán přípravek plerixafor, který přesune buňky HSPC (CD34+) z kostní dřeně do krevního oběhu. Tyto buňky se získají pomocí aferézy, poté jsou kryokonzervovány a zaslány do laboratoře, kde jsou zpracovány. Pomocí elektroporace se do buněk dostává ribonukleoproteinový komplex, který obsahuje sgRNA a Cas9 nukleázu. Vzniká tak terapeutický produkt Casgevy. Uvádí se, že editace genomu proběhne úspěšně u 68,9 % buněk CD34+. Před podáním léčiva podstoupí pacient léčbu busulfanem, který vymytí původní populaci buněk (Frangoul et al. 2021).

V rámci klinických studií byla hodnocena účinnost této léčby u pacientů se SCD i TDT. Hladina HbF se po editaci buněk zvyšuje z 3 g/litr před editací na 84 g/litr ve 3. měsíci, 124 g/litr ve 12. měsíci a 131 g/litr v 18. měsíci. Exprese F-buněk se zvýšila z 10,1 % na počátku na 99,7 % v 6. měsíci a udržela se až do 18. měsíce. Podáním CTX001 se zvyšuje hladina HbF na hodnoty, jaké jsou běžné u dědičné perzistence HbF (Frangoul et al. 2021).

Byly hlášeny i nežádoucí účinky, nejčastější byly trombocytopenie, nevolnost, bolest hlavy, muskuloskeletární bolesti, febrilní neutropenie a svědění (Adashi et al. 2024).

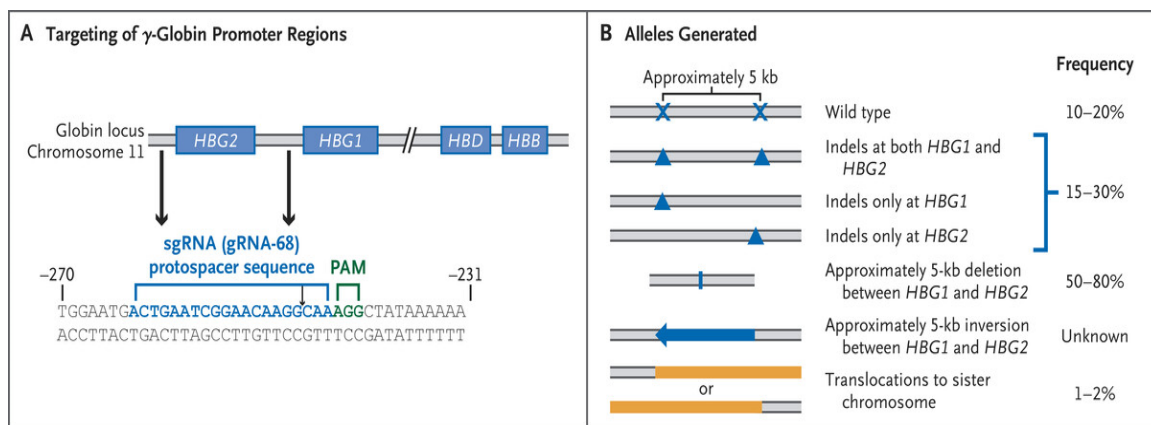
Genová terapie se jeví jako nejlepší řešení pro pacienty se SCD a TDT, cena terapie však omezí její dostupnost pro širokou veřejnost. Společnost Vertex Pharmaceuticals oznámila, že by se její cena mohla pohybovat okolo 2,2 milionu USD za pacienta (Adashi et al. 2024).

3.2.2 OTQ923

OTQ923 je vyvíjená autologní genová terapie od společnosti Novartis Pharmaceuticals. Funguje na principu ex vivo úpravy genomu pomocí CRISPR-Cas9, který narušuje specifické sekvence v promotorech HBG1 a HBG2 a tvoří velké delece, což vede ke zvýšení hladiny HbF (Sharma et al. 2023). To umožňuje léčbu SCD i TDT (Zhang et al. 2024).

Systém CRISPR-Cas9 je dodáván do HSPC buněk pomocí RNP komplexu, který obsahuje Cas9 protein, pocházející ze *Streptococcus pyogenes*, a tzv. single guide RNA (gRNA-68). To je specifická gRNA, která cílí na místo -246 bp proti směru transkripce od místa startu transkripce genů HBG1 a HBG2. Tyto geny jsou téměř identické, což umožňuje současné zacílení na oba promotory a dochází k vícenásobným editačním výsledkům. Většinou vzniká zhruba 5 kb dlouhá intergenová delece, čímž se vytvoří jediný hybridní gen, kdy část promotoru HBG2 je spojena s genem pro HBG1. Tato změna v genomu výrazně ovlivní produkci HbF, který je zvýšen na úroveň blízkou dědičným perzistencím HbF (Sharma et al. 2023).

Studie, prováděná u tří účastníků s těžkým srpkovitým onemocněním, došla k závěru, že došlo k trvalému zvýšení HbF a celkového Hb. Snížil se i výskyt vazookluzivních krizí, přesto u každého z nich minimálně jedna po podání přípravku proběhla. Tato genová terapie zřejmě zajistí zlepšení průběhu nemoci, přesto zcela nezbaví pacienta některých příznaků. Také zůstává problémem osteonekróza u pacientů, která se po léčbě možná i zhoršila. Zhoršení stavu kostí však mohlo pomoci i podání busulfanu (Sharma et al. 2023).



Obrázek 21. Princip genové terapie pomocí OTQ923. (A) Znárodnění cílového místa pro úpravu genomu pomocí RNP Cas9-gRNA-68. Rámečky označují geny pro globiny na chromozomu 11. Štěpení DNA probíhá v promotorech genů, místo řezu DNA označují šipky. Sekvence je číslována od začátku transkripce genu pro tvorbu γ -globinu a štěpení probíhá na pozici -246 bp (proti směru transkripce) v oblasti protospaceru, k němuž sousedí PAM sekvence. (B) Možné výsledky editace genomu. Největší podíl (50-80 %) tvořily 5 kb delece, vzniklé současným dvouvláknovým štěpením DNA, zkrácením vznikl jeden funkční gen HBG2-HBG1 s promotorovou sekvencí od HBG2, spojenou s genem HBG1. 15-30 % tvořily malé indely v promotorech a v úseku nebyla zjištěna žádná inverze. Detekce proběhla pomocí metod qPCR a NGS (Sharma et al. 2023).

3.2.3 EDIT 301

EDIT-301 je vyvíjená autologní buněčná terapie od společnosti Editas Medicine (Zhang et al. 2024). Zaměřuje na zvýšení produkce HbF pomocí CRISPR-Cas12a, čímž jsou modifikovány CD34+ buňky (Barak et al. 2024). Tato genová terapie je vhodná pro léčbu SCD i TDT (Zhang et al. 2024).

Je založená na principu úpravy buněk ex vivo, kdy je do buňky elektroporací dodán ribonukleoprotein (Zhang et al. 2024). EDIT-301 cílí na oblast tzv. distálního boxu CCAAT, která se nachází v promotorech HBG1/2 (Barak et al. 2024). Narušuje tak vazebné místo pro BCL11A (Zhang et al. 2024). V předklinických studiích vedla editace této oblasti k silné produkci HbF a významnému snížení srpkovitosti erytroidních buněk odvozených od EDIT-301 (Hanna et al. 2023).

Stejně jako u ostatních ex vivo úprav HSPC, prvně proběhne aferéza po mobilizaci buněk a následuje editace pomocí AsCas12a (Hanna et al. 2023). AsCas12a pochází od bakterií rodu *Acidaminococcus* (Hillary a Ceasar 2023). Po eliminaci původní populace je infúzí podán EDIT-301. Výsledkem byla ≥ 80 % editace buněk. Pacienti získali normální hladinu celkového Hb a hladiny HbF byly vyšší než 35 % (Hanna et al. 2023). Některé zdroje uvádí

až 54% indukci HbF u pacientů se SCD (Zarghamian et al. 2023). Zatím nebyly hlášeny žádné nežádoucí důsledky podání léčiva, ale je důležité pacienty nadále sledovat (Hanna et al. 2023).

3.2.4 Nula-cel

Vyvíjený terapeutický produkt Nulabeglogene autogedtemcel (nula-cel, dříve GPH101) od společnosti Graphite Bio (Bhokisham et al. 2023) cílí na léčbu SCD, prostřednictvím úpravy genu pomocí HDR. Je to tedy přímá oprava patogenní mutace v genu HBB v autologních buňkách CD34+ HSPC. Tato technika využívá metodu CRISPR-Cas9 spolu s templátem na AAV6, podle kterého je chybná sekvence opravena (Ceglie et al. 2023).

Postup odběru HSPC probíhá stejně jako u ostatních studií. Výrobní proces, který na začátku obsahoval $9,3 \times 10^6$ kryokonzervovaných buněk CD34+/kg, vedl k výtěžku $8,75 \times 10^6$ CD34+/kg. Korekce cílové alely se pohybovala okolo 33 %. Pacientka podstoupila před podáním léčiva myeloablativní kondicionační chemoterapii busulfanem. Studie, které zkoumaly apoptózu upravených buněk, uváděly, že dávka životaschopných buněk mohla být okolo $3,5 \times 10^6$ CD34+/kg. Po podání přípravku však docházelo k nedostatečné obnově erytrocytů a trombocytů, které vyžadovaly pokračování podávání transfúzí (Shyr et al. 2023).

Kvůli těžké pancytopenii u prvního pacienta byla studie CEDAR vývojáři pozastavena a léčba nebyla podána dalším pacientům (Ceglie et al. 2023). U pacientky byla nasazena další léčba, která byla po zlepšení počtu trombocytů a množství hemoglobinu vysazena. I po vysazení léčby se krevní obraz nadále zlepšoval. 307 dní po aplikaci léčby bylo pomocí elektroforézy Hb prokázáno, že zastoupení typů Hb je HbA=12,5 %, HbF >78 % a HbS=4,5 %. U pacientky už nedošlo k žádné VOC nebo jiným projevům SCD. Stále však nebylo dosaženo ustáleného stavu, proto je důležité pacienta nadále sledovat (Shyr et al. 2023).

Pomocí genové terapie bylo dosaženo snížení patologického HbS. Vysoká hladina HbF je však nečekaná a příčiny jeho zvýšení jsou dále zkoumány. Vývojáři pracují na zlepšování postupů ve výrobě buněk a obnovení studie a zapojení dalších pacientů v blízké době není vyloučeno (Shyr et al. 2023).

3.2.5 BEAM-101

BEAM-101 je rovněž zatím experimentální autologní terapie HSPC. Zaměřuje se na promotor HBG1/2, s tím rozdílem, že používá adeninové editory bází, založené na metodě CRISPR s katalyticky oslabenou Cas9 nukleázou. Touto metodou vznikají jednobodové mutace, které vedou ke zvýšení HbF (Barak et al. 2024). Mutace jsou zaváděny do promotoru

na blíže nespecifikované místo (Christakopoulos et al. 2023). V této metodě se pro zavedení opravného systému používá elektroporace RNA (Zarghamian et al. 2023).

V testech prováděných na myších bylo touto metodou upraveno více než 90 % HSPC, což vedlo k expresi HbF nad 65 %. V rámci studie BEACON, byl v lednu 2024 podán přípravek prvnímu pacientovi se SCD. Výsledky se očekávají v polovině roku 2024 (Barak et al. 2024).

3.2.6 BEAM-102

BEAM-102 je další experimentální genová terapie, založená na editorech bází. Ty přeměňují jednobodovou mutaci, která zapříčiňuje vznik SCD. Mění mutaci v HBB ze sekvence GTG na GCG. Výsledkem je záměna kyseliny glutamové na alanin, který převádí HbS na lépe snášený HbG-Makassar (Zarghamian et al. 2023). O této studii však zatím není dostatek informací, protože je teprve v raném stádiu a informace o ní nejsou veřejně dostupné.

3.3 Porovnání s dalšími možnostmi léčby

3.3.1 Léčba SCD

Kromě nově schválených genových terapií fungujících na principu CRISPR-Cas existují i další schválená léčiva na léčbu akutních komplikací SCD. Mezi nejběžněji užívané patří hydroxyurea (schválená v roce 1998) a další poměrně nově schválená léčiva: L-glutamin (2017), Crizanlizumab-tmca (2019), Voxelotor (2019) a Lyfgenia (2023). Další možností je alogenní transplantace HSPC, ale většina pacientů nenajde vhodného dárce. Pro pacienty, co vhodného dárce najdou, závisí úspěch léčby na mnohých faktorech a je tu stále riziko vzniku štěpu (Barak et al. 2024).

Hydroxyurea zvyšuje expresi HbF, čímž se zlepšuje průběh onemocnění. Přesný mechanismus jak funguje není stále zcela prozkoumaný (Barak et al. 2024). Léčivo snižuje frekvenci VOC až o 50 % a omezuje také riziko vzniku mrtvice a dalších komplikací. Problémem je, že účinnost hydroxyurey je různá, záleží na mnohých dalších faktorech jako je věk, hladiny Hb a další komplikace (Ma et al. 2023).

Aminokyselina L-glutamin zvyšuje dostupnost glutathionu, což je důležitý antioxidant, který chrání RBC před oxidačním poškozením a brání srpkovatení. L-glutamin snižuje četnost VOC až o 25 % a zlepšuje tak kvalitu života pacientům se SCD (Ma et al. 2023).

Léčivo Voxelotor inhibuje polymeraci HbS a zabraňuje tak srpkovitosti erytrocytů. Pomocí alosterické modifikace ovlivňuje afinitu Hb k O₂, když se reverzibilně váže na N-konec valinu v α -řetězci Hb a stabilizuje tak RBC v okysličeném stavu. HbS polymeruje pouze v deoxygenovaném stavu, proto toto léčivo významně ovlivní funkčnost a životnost RBC. Tím jsou omezeny komplikace související se sníženým dodáváním O₂ do orgánů. Toto léčivo je použitelné pro dospělé a děti od 12 let. Neřeší však příčinu onemocnění a je nutnost pravidelného užívání léků (Barak et al. 2024).

Crizanlizumab je monoklonální protilátka proti P-selektinu. Léčivo se nazývá také jako Crizanlizumab-tmca (ADAKVEO) a brání ulpívání RBC, leukocytů a trombocytů na stěnách cév pomocí inhibice P-selektinu. Podává se intravenózně a slouží k prevenci VOC u pacientů se SCD. Na základě dobrých výsledků studie SUSTAIN, FDA v roce 2019 schválila jeho použití pro pacienty od 16 let. Stále probíhá výzkum možných vedlejších účinků, který by měl skončit v roce 2026. Účinnost tohoto léčiva je však poměrně nejednoznačná a informace o pacientech léčených tímto přípravkem jsou omezené (Barak et al. 2024).

Lyfgenia (Lovoti-beglogene autotemcel, Lovo-cel) je ex vivo genová terapie, kdy jsou upraveny HSPC pomocí lentivirového vektoru BB305, který do genomu přidává modifikovaný funkční gen pro β -globin, a dochází k produkci tzv. antisrpkovitého hemoglobinu HbA^{T87Q} (Herring et al. 2024). Tento Hb funguje podobně jako HbA. V HbA^{T87Q} je aminokyselina threonin na 87. pozici nahrazena glutaminem, což mu umožňuje inhibovat sterickou polymeraci srpkovitého hemoglobinu (Barak et al. 2024). Tato genová terapie od společnosti Bluebird Bio byla schválena na konci roku 2023. Studie, která hodnotila účinnost léčiva, se zúčastnilo 43 pacientů. Po podání Lyfgenia se významně snížil, nebo úplně omezil výskyt vazookluzivních krizí (Baylot et al. 2024).

3.3.2 Léčba talasémie

β -talasémie major má za následek těžkou anémií. Tito pacienti jsou po celý život závislí na krevní transfuzi, bez které je onemocnění smrtelné. Neustálé transfuze však vedou k dalším komplikacím, jako je přetížení organismu železem. Nadbytečné železo se pak ukládá do orgánů, což posléze zapříčiní jejich selhání. Je proto nutné podávat látky, které chelatují toto nadbytečné železo (Premawardhena et al. 2024). V řadě zemí však opakované transfuze a chelatační léčba nejsou dostupné a pacienti s β -talasémií major umírají na srdeční selhání, nebo hepatokarcinom. Léčiva pro chelataci železa jsou například deferoxamin, deferasirox a deferipron. Žádný z chelátorů železa však není dostatečně účinný a pro mnohé pacienty

nemusí být ani cenově dostupný. Malá část pacientů, pro které se najde vhodný dárce, může být vyléčena alogenní transplantací HSPC (Rahimmanesh et al. 2022).

ZyntegloTM (betibeglogene autotemcel) je ex vivo genová terapie od společnosti Bluebird Bio, která je založená na lentivirovém vektoru (BB305). Je určena pro léčbu β -talasémie a byla schválena v roce 2022 (Baylot et al. 2024). Toto léčivo koriguje nerovnováhu v globinovém řetězci a zlepšuje produkci normálního hemoglobinu. Pomocí lentivirového vektoru jsou do buňky dodány funkční kopie modifikovaného genu HBB (Asghar et al. 2022). Prvnímu pacientovi byla tato genová terapie podána v únoru 2021 a v srpnu 2022 byl produkt schválen FDA. Proběhly dvě studie, kde zhruba 89 % pacientů přestalo být závislých na transfuzi a hladina Hb se pohybovala průměrně okolo 115 g/l (Baylot et al. 2024).

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo poskytnout všeobecný přehled o hemoglobinopatiích a informovat o nových možnostech jejich léčby pomocí velice perspektivní technologie CRISPR-Cas. Tato metoda se ukázala jako efektivní nástroj pro úpravu genomu a možnosti jeho využití se neustále rozšiřují. Metoda se osvědčila pro léčbu srpkovité anémie a talasémie, což potvrzuje schválení první genové terapie založené na CRISPR-Cas americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Další genové terapie, které jsou právě ve fázi klinického testování, rovněž naznačují slibné výsledky a možné budoucí uplatnění v léčbě pacientů s hemoglobinopatiemi. Je však nezbytné pokračovat ve výzkumu a dlouhodobém monitorování pacientů léčených genovými terapiemi, protože stále není dostatek informací o těchto terapiích a jejich dlouhodobých důsledcích.

Konkrétní postupy úpravy genomu, zaměřené na reaktivaci tvorby fetálního hemoglobinu, se v současnosti jeví jako vhodné pro léčbu srpkovité anémie i talasémie závislé na transfúzi. Další vyvíjené genové terapie, které se uplatní především pro léčbu srpkovité anémie, fungují na různých principech, jako je obnova tvorby dospělého hemoglobinu, či tvorba nepatologického hemoglobinu Makassar. Existuje však mnoho dalších možností, jak ovlivnit průběh onemocnění pomocí genové terapie. Tento výzkum rovněž přispívá k lepšímu pochopení procesu regulace tvorby různých typů hemoglobinů, včetně mechanismů ovlivňujících průběh hemoglobinopatií.

Genové terapie již nyní přinášejí nadějně výsledky, ačkoliv jsou v klinické praxi relativně krátce. Pacienti, kteří podstoupili tuto léčbu, jsou pravidelně monitorováni a dosažené výsledky jsou důkladně vyhodnocovány, včetně sledování možných nežádoucích účinků. Tento proces napomáhá k dalšímu zdokonalování těchto technologií. Navzdory dosaženým pokrokům je důležité pokračovat ve vývoji metod, které by minimalizovaly mimocílové účinky těchto systémů, aby se předešlo možným komplikacím.

V závěru lze říct, že genové terapie založené na technologii CRISPR-Cas představují významný technologický pokrok a možnost na zlepšení kvality a délky života pro mnoho pacientů po celém světě. Rozsáhlý výzkum a vývoj v oblasti genových terapií by mohl do budoucna vést k lepší dostupnosti této léčby pro větší počet pacientů.

POUŽITÁ LITERATURA

- ADASHI, Eli Y., Philip A. GRUPPUSO a I. Glenn COHEN, 2024. CRISPR Therapy of Sickle Cell Disease: The Dawning of the Gene Editing Era. *The American Journal of Medicine* [online]. S0002934323007982 [vid. 2024-03-12]. ISSN 00029343. Dostupné z: doi:10.1016/j.amjmed.2023.12.018
- ADEKILE, Adekunle, 2021. The Genetic and Clinical Significance of Fetal Hemoglobin Expression in Sickle Cell Disease. *Medical Principles and Practice* [online]. **30**(3), 201–211 [vid. 2024-03-30]. ISSN 1011-7571, 1423-0151. Dostupné z: doi:10.1159/000511342
- ACHARJEE, Aritra, 2020. Prime Editing: The Future of Gene-Editing Technology. *Medium* [online]. Jul 14, 2020 [cit. 2024-05-25]. Dostupné z: <https://medium.com/@aritra.acharjee/prime-editing-the-future-of-gene-editing-technology-23f40bb1f060>
- AL-TURJMAN, Fadi, ed., 2020. *Wireless Medical Sensor Networks for IoT-based eHealth*. Stevenage: The Institution of Engineering and Technology. ISBN 978-1-83953-057-9.
- ANTONIOU, Panagiotis, Giulia HARDOUIN, Pierre MARTINUCCI, Giacomo FRATI, Tristan FELIX, Anne CHALUMEAU, Letizia FONTANA, Jeanne MARTIN, Cecile MASSON, Megane BRUSSON, Giulia MAULE, Marion ROSELLO, Carine GIOVANNANGELI, Vincent ABRAMOWSKI, Jean-Pierre DE VILLARTAY, Jean-Paul CONCORDET, Filippo DEL BENE, Wassim EL NEMER, Mario AMENDOLA, Marina CAVAZZANA, Anna CERESETO, Oriana ROMANO a Annarita MICCIO, 2022. Base-editing-mediated dissection of a γ -globin cis-regulatory element for the therapeutic reactivation of fetal hemoglobin expression. *Nature Communications* [online]. **13**(1), 6618 [vid. 2024-05-25]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-022-34493-1
- ASGHAR, Adam Ali, Yumna KHABIR a Mahnoor Rehan HASHMI, 2022. Zynteglo: Betibeglogene autotemcel – An innovative therapy for β -thalassemia patients. *Annals of Medicine & Surgery* [online]. **82** [vid. 2024-06-01]. ISSN 2049-0801. Dostupné z: doi:10.1016/j.amsu.2022.104624
- BARAK, Mariam, Christopher HU, Alicia MATTHEWS a Yolanda M. FORTENBERRY, 2024. Current and Future Therapeutics for Treating Patients with Sickle Cell Disease. *Cells* [online]. **13**(10), 848 [vid. 2024-05-27]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells13100848
- BAYLOT, Virginie, Thi Khanh LE, David TAÏEB, Palma ROCCHI a Laurence COLLEAUX, 2024. Between hope and reality: treatment of genetic diseases through nucleic acid-based drugs. *Communications Biology* [online]. **7**(1), 489 [vid. 2024-06-01]. ISSN 2399-3642. Dostupné z: doi:10.1038/s42003-024-06121-9
- BHARATHKUMAR, Nagaraj, Abraham SUNIL, Prabhakar MEERA, Sam AKSAH, Muthu KANNAN, Konda Mani SARAVANAN a Thirunavukarasou ANAND, 2022. CRISPR/Cas-Based Modifications for Therapeutic Applications: A Review. *Molecular Biotechnology* [online]. **64**(4), 355–372 [vid. 2024-05-01]. ISSN 1073-6085, 1559-0305. Dostupné z: doi:10.1007/s12033-021-00422-8
- BHOKISHAM, Narendranath, Ethan LAUDERMILCH, Lindsay L. TRAEGER, Tonya D. BONILLA, Mercedes RUIZ-ESTEVEZ a Jordan R. BECKER, 2023. CRISPR-Cas System: The Current and Emerging Translational Landscape. *Cells* [online]. **12**(8), 1103 [vid. 2024-05-31]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells12081103

- BUNNIK, Evelien M. a Karine G. LE ROCH, 2013. An Introduction to Functional Genomics and Systems Biology. *Advances in Wound Care* [online]. **2**(9), 490–498 [vid. 2024-05-05]. ISSN 2162-1918, 2162-1934. Dostupné z: doi:10.1089/wound.2012.0379
- CEGLIE, Giulia, Marco LECIS, Gabriele CANCIANI, Mattia ALGERI a Giacomo FRATI, 2023. Genome editing for sickle cell disease: still time to correct? *Frontiers in Pediatrics* [online]. **11**, 1249275 [vid. 2024-03-12]. ISSN 2296-2360. Dostupné z: doi:10.3389/fped.2023.1249275
- COTTLE, Renee N., Ciaran M. LEE a Gang BAO, 2016. Treating hemoglobinopathies using gene-correction approaches: promises and challenges. *Human Genetics* [online]. **135**(9), 993–1010 [vid. 2024-05-02]. ISSN 0340-6717, 1432-1203. Dostupné z: doi:10.1007/s00439-016-1696-0
- DA GUARDA, Caroline Conceição, Sètonджи Cocou Modeste Alexandre YAHOUÉDÉHOU, Rayra Pereira SANTIAGO, Joelma Santana Dos Santos NERES, Camila Felix De Lima FERNANDES, Milena Magalhães ALELUIA, Camylla Vilas Boas FIGUEIREDO, Luciana Magalhães FIUZA, Suellen Pinheiro CARVALHO, Rodrigo Mota De OLIVEIRA, Cleverson Alves FONSECA, Uche Samuel NDIDI, Valma Maria Lopes NASCIMENTO, Larissa Carneiro ROCHA a Marilda Souza GONCALVES, 2020. Sickle cell disease: A distinction of two most frequent genotypes (HbSS and HbSC). *PLOS ONE* [online]. **15**(1), e0228399 [vid. 2024-03-20]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0228399
- DARBARI, Deepika S., Vivien A. SHEEHAN a Samir K. BALLAS, 2020. The vaso-occlusive pain crisis in sickle cell disease: Definition, pathophysiology, and management. *European Journal of Haematology* [online]. **105**(3), 237–246 [vid. 2024-06-03]. ISSN 0902-4441, 1600-0609. Dostupné z: doi:10.1111/ejh.13430
- DI LIBERTO, Gaetana, Laurent KIGER, Michael C. MARDEN, Laurent BOYER, Florence Canoui POITRINE, Marc CONTI, Marie Georgine RAKOTOSON, Anoosha HABIBI, Sanam KHORGAMI, Benoit VINGERT, Bernard MAITRE, Frederic GALACTEROS, France PIRENNE a Pablo BARTOLUCCI, 2016. Dense red blood cell and oxygen desaturation in sickle-cell disease. *American Journal of Hematology* [online]. **91**(10), 1008–1013 [vid. 2024-03-25]. ISSN 0361-8609, 1096-8652. Dostupné z: doi:10.1002/ajh.24467
- DOERFLER, Phillip A., Ruopeng FENG, Yichao LI, Lance E. PALMER, Shaina N. PORTER, Henry W. BELL, Merlin CROSSLEY, Shondra M. PRUETT-MILLER, Yong CHENG a Mitchell J. WEISS, 2021. Activation of γ -globin gene expression by GATA1 and NF-Y in hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nature Genetics* [online]. **53**(8), 1177–1186 [vid. 2024-05-26]. ISSN 1061-4036, 1546-1718. Dostupné z: doi:10.1038/s41588-021-00904-0
- EL HOSS, Sara, Wassim EL NEMER a David C. REES, 2022. Precision Medicine and Sickle Cell Disease. *HemaSphere* [online]. **6**(9), e762 [vid. 2024-03-19]. ISSN 2572-9241. Dostupné z: doi:10.1097/HS9.0000000000000762
- ESOH, Kevin a Ambroise WONKAM, 2021. Evolutionary history of sickle-cell mutation: implications for global genetic medicine. *Human Molecular Genetics* [online]. **30**(R1), R119–R128 [vid. 2024-03-12]. ISSN 0964-6906, 1460-2083. Dostupné z: doi:10.1093/hmg/ddab004

FRANGOUL, Haydar, David ALTSHULER, M. Domenica CAPPELLINI, Yi-Shan CHEN, Jennifer DOMM, Brenda K. EUSTACE, Juergen FOELL, Josu DE LA FUENTE, Stephan GRUPP, Rupert HANDGRETINGER, Tony W. HO, Antonis KATTAMIS, Andrew KERNYTSKY, Julie LEKSTROM-HIMES, Amanda M. LI, Franco LOCATELLI, Markus Y. MAPARA, Mariane DE MONTALEMBERT, Damiano RONDELLI, Akshay SHARMA, Sujit SHETH, Sandeep SONI, Martin H. STEINBERG, Donna WALL, Angela YEN a Selim CORBACIOGLU, 2021. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *New England Journal of Medicine* [online]. **384**(3), 252–260 [vid. 2024-03-12]. ISSN 0028-4793, 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa2031054

GAMAGE, Udani, Kesari WARNAKULASURIYA, Sonali HANSIKA a Gayathri N. SILVA, 2023. CRISPR Gene Therapy: A Promising One-Time Therapeutic Approach for Transfusion-Dependent β -Thalassemia—CRISPR-Cas9 Gene Editing for β -Thalassemia. *Thalassemia Reports* [online]. **13**(1), 51–69 [vid. 2024-03-12]. ISSN 2039-4365. Dostupné z: doi:10.3390/thalassrep13010006

GERMINI, Diego, Tatiana TSFASMAN, Vlada V. ZAKHAROVA, Nikolajs SJAKSTE, Marc LIPINSKI a Yegor VASSETZKY, 2018. A Comparison of Techniques to Evaluate the Effectiveness of Genome Editing. *Trends in Biotechnology* [online]. **36**(2), 147–159 [vid. 2024-05-05]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2017.10.008

GONÇALVES, Bronner P., Sunetra GUPTA a Bridget S. PENMAN, 2016. Sickle haemoglobin, haemoglobin C and malaria mortality feedbacks. *Malaria Journal* [online]. **15**(1), 26 [vid. 2024-03-21]. ISSN 1475-2875. Dostupné z: doi:10.1186/s12936-015-1077-5

GUILINGER, John P, David B THOMPSON a David R LIU, 2014. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nature Biotechnology* [online]. **32**(6), 577–582 [vid. 2024-05-03]. ISSN 1087-0156, 1546-1696. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.2909

HANNA, Rabi, Haydar FRANGOUL, Christopher MCKINNEY, Luis PINEIRO, Markus MAPARA, Kai-Hsin CHANG, Michael JASKOLKA, Keunpyo KIM, Maha RIZK, Olubunmi AFONJA, Adebayo LAWAL a Mark WALTERS, 2023. S264: EDIT-301 SHOWS PROMISING PRELIMINARY SAFETY AND EFFICACY RESULTS IN THE PHASE I/II CLINICAL TRIAL (RUBY) OF PATIENTS WITH SEVERE SICKLE CELL DISEASE USING HIGHLY SPECIFIC AND EFFICIENT ASCAS12A ENZYME. *HemaSphere* [online]. **7**(S3), e05170e0 [vid. 2024-05-29]. ISSN 2572-9241. Dostupné z: doi:10.1097/01.HS9.0000967968.05170.e0

HARTEVELD, Cornelis L., Ahlem ACHOUR, Sandra J. G. ARKESTEIJN, Jeanet TER HUURNE, Maaike VERSCHUREN, Sharda BHAGWANDIEN-BISOEN, Rianne SCHAAP, Linda VIJFHUIZEN, Hakima EL IDRISI a Tamara T. KOOPMANN, 2022. The hemoglobinopathies, molecular disease mechanisms and diagnostics. *International Journal of Laboratory Hematology* [online]. **44**(S1), 28–36 [vid. 2024-03-12]. ISSN 1751-5521, 1751-553X. Dostupné z: doi:10.1111/ijlh.13885

HARTEVELD, Cornelis L a Douglas R HIGGS, 2010. α -thalassaemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. **5**(1), 13 [vid. 2024-06-02]. ISSN 1750-1172. Dostupné z: doi:10.1186/1750-1172-5-13

HE, Yuxuan, Wei YAN, Likun LONG, Liming DONG, Yue MA, Congcong LI, Yanbo XIE, Na LIU, Zhenjuan XING, Wei XIA a Feiwu LI, 2023. The CRISPR/Cas System: A Customizable Toolbox for Molecular Detection. *Genes* [online]. **14**(4), 850 [vid. 2024-04-13]. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes14040850

HERRING, William L., Meghan E. GALLAGHER, Nirmish SHAH, Kc MORSE, Deirdre MLADSI, Olivia M. DONG, Anjulika CHAWLA, Jennifer W. LEIDING, Lixin ZHANG, Clark PARAMORE a Biree ANDEMARIAM, 2024. Cost-Effectiveness of Lovotibeglogene Autotemcel (Lovo-Cel) Gene Therapy for Patients with Sickle Cell Disease and Recurrent Vaso-Occlusive Events in the United States. *PharmacoEconomics* [online]. **42**(6), 693–714 [vid. 2024-06-01]. ISSN 1170-7690, 1179-2027. Dostupné z: doi:10.1007/s40273-024-01385-9

HILLARY, V. Edwin a S. Antony CEASAR, 2023. A Review on the Mechanism and Applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 Proteins Utilized for Genome Engineering. *Molecular Biotechnology* [online]. **65**(3), 311–325 [vid. 2024-04-11]. ISSN 1073-6085, 1559-0305. Dostupné z: doi:10.1007/s12033-022-00567-0

HOY, Sheridan M., 2024. Exagamglogene Autotemcel: First Approval. *Molecular Diagnosis & Therapy* [online]. **28**(2), 133–139 [vid. 2024-03-12]. ISSN 1177-1062, 1179-2000. Dostupné z: doi:10.1007/s40291-024-00696-z

HUANG, Kun, Daniel ZAPATA, Yan TANG, Yong TENG a Yamin LI, 2022. In vivo delivery of CRISPR-Cas9 genome editing components for therapeutic applications. *Biomaterials* [online]. **291**, 121876 [vid. 2024-05-02]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2022.121876

CHRISTAKOPOULOS, Georgios E., Rahul TELANGE, Jonathan YEN a Mitchell J. WEISS, 2023. Gene Therapy and Gene Editing for β -Thalassemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America* [online]. **37**(2), 433–447 [vid. 2024-05-30]. ISSN 08898588. Dostupné z: doi:10.1016/j.hoc.2022.12.012

JAVAID, Nasir a Sangdun CHOI, 2021. CRISPR/Cas System and Factors Affecting Its Precision and Efficiency. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. **9**, 761709 [vid. 2024-04-06]. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2021.761709

JEONG, Kwanho, Alejandra MUÑOZ-BODNAR, Nathalia ARIAS ROJAS, Lucie POULIN, Luis Miguel RODRIGUEZ-R, Lionel GAGNEVIN, Christian VERNIÈRE, Olivier PRUVOST a Ralf KOEBNIK, 2019. CRISPR elements provide a new framework for the genealogy of the citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri*. *BMC Genomics* [online]. **20**(1), 917 [vid. 2024-04-08]. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-019-6267-z

JOLY, Philippe, Philippe LACAN, Caroline GARCIA, Angelique DELASAUX a Alain FRANCINA, 2011. Rapid and reliable β -globin gene cluster haplotyping of sickle cell disease patients by FRET Light Cycler and HRM assays. *Clinica Chimica Acta* [online]. **412**(13–14), 1257–1261 [vid. 2024-03-12]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2011.03.025

KARNPEAN, Rossarin, Wanicha TEPAKHAN, Prame SUANKUL, Sitthikorn THINGPHOM, Apichaya POONSAWAT, Naritthakarn THANUNCHAIKUNLANUN, Rotsakorn RUANGSANNGAMSIRI a Wittaya JOMOU, 2022. Genetic Background Studies of Eight Common Beta Thalassemia Mutations in Thailand Using β -Globin Gene Haplotype and Phylogenetic Analysis. *Genes* [online]. **13**(8), 1384 [vid. 2024-03-12]. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes13081384

KATO, Gregory J., Frédéric B. PIEL, Clarice D. REID, Marilyn H. GASTON, Kwaku OHENE-FREMPONG, Lakshmanan KRISHNAMURTI, Wally R. SMITH, Julie A. PANEPINTO, David J. WEATHERALL, Fernando F. COSTA a Elliott P. VICHINSKY, 2018. Sickle cell disease. *Nature Reviews Disease Primers* [online]. **4**(1), 18010 [vid. 2024-03-14]. ISSN 2056-676X. Dostupné z: doi:10.1038/nrdp.2018.10

KHARE, Reeti, 2019. *Guide to clinical and diagnostic virology*. Washington (D.C.): ASM press. ISBN 978-1-55581-991-0.

KIM, Eun Ji, Ki Ho KANG a Ji Hyeon JU, 2017. CRISPR-Cas9: a promising tool for gene editing on induced pluripotent stem cells. *The Korean Journal of Internal Medicine* [online]. **32**(1), 42–61 [vid. 2024-04-02]. ISSN 1226-3303, 2005-6648. Dostupné z: doi:10.3904/kjim.2016.198

LI, Chao, Wen CHU, Rafaqat Ali GILL, Shifei SANG, Yuqin SHI, Xuezhi HU, Yuting YANG, Qamar U. ZAMAN a Baohong ZHANG, 2023. Computational Tools and Resources for CRISPR/Cas Genome Editing. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* [online]. **21**(1), 108–126 [vid. 2024-05-04]. ISSN 16720229. Dostupné z: doi:10.1016/j.gpb.2022.02.006

LI, Yamin, Zachary GLASS, Mingqian HUANG, Zheng-Yi CHEN a Qiaobing XU, 2020. Ex vivo cell-based CRISPR/Cas9 genome editing for therapeutic applications. *Biomaterials* [online]. **234**, 119711 [vid. 2024-06-01]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119711

LIU, Jie, Guangyu ZHOU, Li ZHANG a Qi ZHAO, 2019. Building Potent Chimeric Antigen Receptor T Cells With CRISPR Genome Editing. *Frontiers in Immunology* [online]. **10**, 456 [vid. 2024-04-06]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.00456

LIU, Li a De-Sheng PEI, 2022. Insights Gained from RNA Editing Targeted by the CRISPR-Cas13 Family. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **23**(19), 11400 [vid. 2024-04-30]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms231911400

LIU, Li, Alexander PERTSEMLIDIS, Liang-Hao DING, Michael D STORY, Martin H STEINBERG, Paola SEBASTIANI, Carolyn HOPPE, Samir K BALLAS a Betty S PACE, 2016. Original Research: A case-control genome-wide association study identifies genetic modifiers of fetal hemoglobin in sickle cell disease. *Experimental Biology and Medicine* [online]. **241**(7), 706–718 [vid. 2024-03-17]. ISSN 1535-3702, 1535-3699. Dostupné z: doi:10.1177/1535370216642047

LIU, Xuan, Surui WU, Jiao XU, Chun SUI a Jianhe WEI, 2017. Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta Pharmaceutica Sinica B* [online]. **7**(3), 292–302 [vid. 2024-04-06]. ISSN 22113835. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsb.2017.01.002

MA, Liangliang, Shanglun YANG, Qianya PENG, Jingping ZHANG a Jing ZHANG, 2023. CRISPR/Cas9-based gene-editing technology for sickle cell disease. *Gene* [online]. **874**, 147480 [vid. 2024-03-12]. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2023.147480

MACHARIA, Alexander W., George MOCHAMAH, Sophie UYOGA, Carolyne M. NDILA, Gideon NYUTU, Metrine TENDWA, Emily NYATICHI, Johnstone MAKALE, Russell E. WARE a Thomas N. WILLIAMS, 2020. β -Thalassemia pathogenic variants in a cohort of children from the East African coast. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* [online]. **8**(7), e1294 [vid. 2024-03-21]. ISSN 2324-9269, 2324-9269. Dostupné z: doi:10.1002/mgg3.1294

MANGANO, Valentina D., Youssouf KABORE, Edith C. BOUGOUMA, Federica VERRA, Nuno SEPULVEDA, Cyrille BISSEYE, Federica SANTOLAMAZZA, Pamela AVELLINO, Alfred B. TIONO, Amidou DIARRA, Issa NEBIE, Kirk A. ROCKETT, Sodiomon B. SIRIMA a David MODIANO, 2015. Novel Insights Into the Protective Role of Hemoglobin S and C Against *Plasmodium falciparum* Parasitemia. *Journal of Infectious Diseases* [online]. **212**(4), 626–634 [vid. 2024-03-20]. ISSN 0022-1899, 1537-6613. Dostupné z: doi:10.1093/infdis/jiv098

MANNING, Lois R., Anthony M. POPOWICZ, Julio PADOVAN, Brian T. CHAIT, J. Eric RUSSELL a James M. MANNING, 2010. Developmental expression of human hemoglobins mediated by maturation of their subunit interfaces. *Protein Science* [online]. **19**(8), 1595–1599 [vid. 2024-04-14]. ISSN 0961-8368, 1469-896X. Dostupné z: doi:10.1002/pro.441

MENZEL, Stephan, Jian QIN, Nisha VASAVDA, Swee Lay THEIN a Ramesh RAMAKRISHNAN, 2010. Experimental Generation of SNP Haplotype Signatures in Patients with Sickle Cell Anaemia. *PLoS ONE* [online]. **5**(9), e13004 [vid. 2024-03-13]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0013004

MÉTAIS, Jean-Yves, Phillip A. DOERFLER, Thiyagaraj MAYURANATHAN, Daniel E. BAUER, Stephanie C. FOWLER, Matthew M. HSIEH, Varun KATTA, Sagar KERIWALA, Cicera R. LAZZAROTTO, Kevin LUK, Michael D. NEEL, S. Scott PERRY, Samuel T. PETERS, Shaina N. PORTER, Byoung Y. RYU, Akshay SHARMA, Devlin SHEA, John F. TISDALE, Naoya UCHIDA, Scot A. WOLFE, Kaitly J. WOODARD, Yuxuan WU, Yu YAO, Jing ZENG, Shondra PRUETT-MILLER, Shengdar Q. TSAI a Mitchell J. WEISS, 2019. Genome editing of HBG1 and HBG2 to induce fetal hemoglobin. *Blood Advances* [online]. **3**(21), 3379–3392 [vid. 2024-05-25]. ISSN 2473-9529, 2473-9537. Dostupné z: doi:10.1182/bloodadvances.2019000820

ODIÈVRE, Marie-Hélène, Emmanuelle VERGER, Ana Cristina SILVA-PINTO a Jacques ELION, 2011. Pathophysiological insights in sickle cell disease. *The Indian Journal of Medical Research*. **134**(4), 532–537. ISSN 0971-5916.

OTOVÁ, Berta, Romana MIHALOVÁ a Klára BOBKOVÁ, 2021. *Základy biologie a genetiky člověka*. Place of publication not identified: Charles University in Prague, Karolinum Press : Charles University in Prague, Karolinum Press. ISBN 978-80-246-4583-4.

PARK, So Hyun, Ciaran M LEE, Daniel P DEVER, Timothy H DAVIS, Joab CAMARENA, Waracharee SRIFA, Yankai ZHANG, Alireza PAIKARI, Alicia K CHANG, Matthew H PORTEUS, Vivien A SHEEHAN a Gang BAO, 2019. Highly efficient editing of the β -globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease. *Nucleic Acids Research* [online]. **47**(15), 7955–7972 [vid. 2024-05-08]. ISSN 0305-1048, 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkz475

PASCHOUDI, Kiriaki, Evangelia YANNAKI a Nikoletta PSATHA, 2023. Precision Editing as a Therapeutic Approach for β -Hemoglobinopathies. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **24**(11), 9527 [vid. 2024-05-25]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms24119527

PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ, 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství. I, Hematologie*. 1. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3459-0.

PREMAWARDHENA, Anuja, Chamodi PERERA, Muditha Nayana WIJETHILAKA, Sakuni Keshani WANASINGHE, R H M G RAJAKARUNA, R A N K K SAMARASINGHE, Senani WILLIAMS a Sachith METTANANDA, 2024. Efficacy and safety of deferoxamine, deferasirox and deferiprone triple iron chelator combination therapy for transfusion-dependent β -thalassaemia with very high iron overload: a protocol for randomised controlled clinical trial. *BMJ Open* [online]. **14**(2), e077342 [vid. 2024-06-01]. ISSN 2044-6055, 2044-6055. Dostupné z: doi:10.1136/bmjopen-2023-077342

PSATHA, Nikoletta, Kiriaki PASCHOUDI, Anastasia PAPADOPOULOU a Evangelia YANNAKI, 2022. In Vivo Hematopoietic Stem Cell Genome Editing: Perspectives and Limitations. *Genes* [online]. **13**(12), 2222 [vid. 2024-05-07]. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes13122222

RAHIMMANESH, Ilnaz, Maryam BOSHTAM, Shirin KOUHPAYEH, Hossein KHANAHMAD, Arezou DABIRI, Shahrzad AHANGARZADEH, Yasaman ESMAEILI, Elham BIDRAM, Golnaz VASEGHI, Shaghayegh HAGHJOOY JAVANMARD, Laleh SHARIATI, Ali ZARRABI a Rajender S. VARMA, 2022. Gene Editing-Based Technologies for Beta-hemoglobinopathies Treatment. *Biology* [online]. **11**(6), 862 [vid. 2024-05-09]. ISSN 2079-7737. Dostupné z: doi:10.3390/biology11060862

RAVI, Nithin Sam, Beeke WIENERT, Stacia K WYMAN, Henry William BELL, Anila GEORGE, Gokulnath MAHALINGAM, Jonathan T VU, Kirti PRASAD, Bhanu Prasad BANDLAMUDI, Nivedhitha DEVARAJU, Vignesh RAJENDIRAN, Nazar SYEDBASHA, Aswin Anand PAI, Yukio NAKAMURA, Ryo KURITA, Muthuraman NARAYANASAMY, Poonkuzhali BALASUBRAMANIAN, Saravanabhavan THANGAVEL, Srujan MAREPALLY, Shaji R VELAYUDHAN, A. SRIVASTAVA, M. A DEWITT, M. CROSSLEY, J. E CORN a Kumarasampet M MOHANKUMAR, 2022. Identification of novel HPFH-like mutations by CRISPR base editing that elevate the expression of fetal hemoglobin. *eLife* [online]. **11**, [vid. 2024-05-05]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.65421

ROBERTS, Katie, 2024. How CRISPR Revolutionized Science. Bio-Rad Laboratories, Inc. [online] [cit. 2024-06-01]. Dostupné z: <https://www.bio-rad-antibodies.com/blog/how-crispr-revolutionized-science.html>.

SAIFALDEEN, Maryam, Dana E. AL-ANSARI, Dindial RAMOTAR a Mustapha AOUIDA, 2020. CRISPR FokI Dead Cas9 System: Principles and Applications in Genome Engineering. *Cells* [online]. **9**(11), 2518 [vid. 2024-05-03]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9112518

SAMUELSON, Clare, Stefan RADTKE, Haiying ZHU, Mallory LLEWELLYN, Emily FIELDS, Savannah COOK, Meei-Li W. HUANG, Keith R. JEROME, Hans-Peter KIEM a Olivier HUMBERT, 2021. Multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in hematopoietic stem cells for fetal hemoglobin reinduction generates chromosomal translocations. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* [online]. **23**, 507–523 [vid. 2024-05-09]. ISSN 23290501. Dostupné z: doi:10.1016/j.omtm.2021.10.008

SHAIKHO, Elmutaz M., John J. FARRELL, Abdulrahman ALSULTAN, Hatem QUTUB, Amein K. AL-ALI, Maria Stella FIGUEIREDO, David H.K. CHUI, Lindsay A. FARRER, George J. MURPHY, Gustavo MOSTOSLAVSKY, Paola SEBASTIANI a Martin H. STEINBERG, 2017. A phased SNP-based classification of sickle cell anemia HBB haplotypes. *BMC Genomics* [online]. **18**(1), 608 [vid. 2024-03-11]. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-017-4013-y

SHALABY, Karim, Mustapha AOUIDA a Omar EL-AGNAF, 2020. Tissue-Specific Delivery of CRISPR Therapeutics: Strategies and Mechanisms of Non-Viral Vectors. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **21**(19), 7353 [vid. 2024-04-29]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21197353

SHARMA, Akshay, Jaap-Jan BOELEN, Maria CANCIO, Jane S. HANKINS, Prafulla BHAD, Marjohn AZIZY, Andrew LEWANDOWSKI, Xiaojun ZHAO, Shripad CHITNIS, Radhika PEDDINTI, Yan ZHENG, Neena KAPOOR, Fabio CICERI, Timothy MACLACHLAN, Yi YANG, Yi LIU, Jianping YUAN, Ulrike NAUMANN, Vionnie W.C. YU, Susan C. STEVENSON, Serena DE VITA a James L. LABELLE, 2023. CRISPR-Cas9 Editing of the *HBG1* and *HBG2* Promoters to Treat Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine* [online]. **389**(9), 820–832 [vid. 2024-05-28]. ISSN 0028-4793, 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa2215643

SHIM, Gayong, Dongyoon KIM, Quoc-Viet LE, Junho BYUN, Jinwon PARK a Yu-Kyoung OH, 2020. Biomaterials for gene editing therapeutics. In: *Biomaterials for Cancer Therapeutics* [online]. B.m.: Elsevier, s. 187–231 [vid. 2024-06-15]. ISBN 978-0-08-102983-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-102983-1.00008-9

SHYR, David C, Robert LOWSKY, Weston MILLER, Mark A. SCHROEDER, Tonia BUCHHOLZ, Kirstin DOUGALL, Allison INTONDI, Alexandra CHARLES, Josh LEHRER, Ali BOUGE, Stacey WOLF, Blair MACDONALD, Hena DIN, Alana LERNER, Manal AMOURY, Sebastien TREUSCH, Glen CHEW, Brian SILVA, Haider MASHHEDI, Vincent SIU, Ian PERRONE, Twaritha VIJAY, Aayami JAIN, Kristina KRASSOVSKY, William MATERN, Premanjali LAHIRI, Ryan RODRIGUEZ, Jason SKOWRONSKI, Arpit BATISH, Dana MARGITTAI, Prachi WANI, Timothy VAN HORN, Claudia FLAUTERO, Rosalva FLORES, Jade LEE, Keri TATE, Maria-Grazia RONCAROLO, Steven FELDMAN, John DIPERSIO a Matthew PORTEUS, 2023. One Year Follow-up on the First Patient Treated with Nula-Cel: An Autologous CRISPR/Cas9 Gene Corrected CD34+ Cell Product to Treat Sickle Cell Disease. *Blood* [online]. **142**(Supplement 1), 5000–5000 [vid. 2024-06-01]. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2023-188963

STEINBERG, Martin H, Sara KUMAR, George J. MURPHY a Kim VANUYTSEL, 2019. Sickle cell disease in the era of precision medicine: looking to the future. *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development* [online]. **4**(6), 357–367 [vid. 2024-03-18]. ISSN 2380-8993. Dostupné z: doi:10.1080/23808993.2019.1688658

- THEIN, Swee Lay, 2018. Molecular basis of β thalassemia and potential therapeutic targets. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* [online]. **70**, 54–65 [vid. 2024-03-22]. ISSN 10799796. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcmed.2017.06.001
- TYUMENTSEVA, Marina, Aleksandr TYUMENTSEV a Vasiliy AKIMKIN, 2023. CRISPR/Cas9 Landscape: Current State and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **24**(22), 16077 [vid. 2024-04-02]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms242216077
- VERTEX PHARMACEUTICALS (Europe). (2023). Casgevy, Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. [online] [cit. 2024-05-15] Dostupné z: <https://products.mhra.gov.uk/>
- VIJIAN, Divashini, Wan Suriana WAN AB RAHMAN, Kannan Thirumulu PONNURAJ, Zefarina ZULKAFI a Noor Haslina MOHD NOOR, 2021. Molecular Detection of alpha Thalassemia: A Review of Prevalent Techniques. *Medeniyet Medical Journal* [online]. [vid. 2024-06-02]. ISSN 21492042. Dostupné z: doi:10.5222/MMJ.2021.14603
- WAGNER, Mary H. a Richard B. BERRY, 2007. A patient with sickle cell disease and a low baseline sleeping oxygen saturation. *Journal of clinical sleep medicine: JCSM: official publication of the American Academy of Sleep Medicine*. **3**(3), 313–315. ISSN 1550-9389.
- WESTERMANN, Lukas, Björn NEUBAUER a Michael KÖTTGEN, 2021. Nobel Prize 2020 in Chemistry honors CRISPR: a tool for rewriting the code of life. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* [online]. **473**(1), 1–2 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0031-6768, 1432-2013. Dostupné z: doi:10.1007/s00424-020-02497-9
- WILLIAMS, Thomas N. a Swee Lay THEIN, 2018. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* [online]. **19**(1), 113–147 [vid. 2024-03-13]. ISSN 1527-8204, 1545-293X. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-genom-083117-021320
- YANG, Yanhua, Dandan WANG, Peng LÜ, Shangshang MA a Keping CHEN, 2023. Research progress on nucleic acid detection and genome editing of CRISPR/Cas12 system. *Molecular Biology Reports* [online]. **50**(4), 3723–3738 [vid. 2024-04-13]. ISSN 0301-4851, 1573-4978. Dostupné z: doi:10.1007/s11033-023-08240-8
- YIN, Jiawei, Xiaoli XIE, Yufu YE, Lijuan WANG a Fengyuan CHE, 2019. BCL11A: a potential diagnostic biomarker and therapeutic target in human diseases. *Bioscience Reports* [online]. **39**(11), BSR20190604 [vid. 2024-05-09]. ISSN 0144-8463, 1573-4935. Dostupné z: doi:10.1042/BSR20190604
- ZAKRZEWSKA, Marta a Michal BURMISTRZ, 2023. Mechanisms regulating the CRISPR-Cas systems. *Frontiers in Microbiology* [online]. **14**, 1060337 [vid. 2024-04-03]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2023.1060337
- ZARGHAMIAN, Parinaz, Julia KLERMUND a Toni CATHOMEN, 2023. Clinical genome editing to treat sickle cell disease—A brief update. *Frontiers in Medicine* [online]. **9**, 1065377 [vid. 2024-05-31]. ISSN 2296-858X. Dostupné z: doi:10.3389/fmed.2022.1065377
- ZEBALLOS C., M. Alejandra a Thomas GAJ, 2021. Next-Generation CRISPR Technologies and Their Applications in Gene and Cell Therapy. *Trends in Biotechnology* [online]. **39**(7), 692–705 [vid. 2024-05-01]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2020.10.010

ZHANG, Zhenjie, Siqi ZHANG, Hoi Ting WONG, Dali LI a Bo FENG, 2024. Targeted Gene Insertion: The Cutting Edge of CRISPR Drug Development with Hemophilia as a Highlight. *BioDrugs* [online]. **38**(3), 369–385 [vid. 2024-05-29]. ISSN 1173-8804, 1179-190X. Dostupné z: doi:10.1007/s40259-024-00654-5

ZHOU, Lifang a Shaohua YAO, 2023. Recent advances in therapeutic CRISPR-Cas9 genome editing: mechanisms and applications. *Molecular Biomedicine* [online]. **4**(1), 10 [vid. 2024-04-11]. ISSN 2662-8651. Dostupné z: doi:10.1186/s43556-023-00115-5