

EFOP-3.4.3-16-2016-00014

2020

AP4_TTIK KÁRPÁT-MEDENCEI OKTATÁSI TÉR
KIALAKÍTÁSA ÉRDEKÉBEN TETT TEVÉKENYSÉGEK A TTIK-N
BBTE OKTATÁSI EGYÜTTMŰKÖDÉS

Genomszerkesztés eukariótákban

HENN LÁSZLÓ

TUDOMÁNYOS MUNKATÁRS

2019.04.05

SZÉCHENYI 



MAGYARORSZÁG
KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Szociális
Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

Bevezetés

Hogyan működik az élő szervezet?

Genetikai anyag (gének) kifejeződése határozza meg sejt és szervezet szintű működést

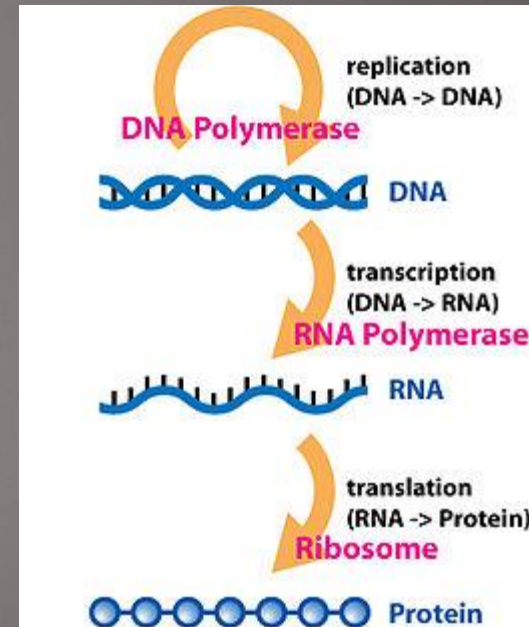
DNS (gén)



RNS



Fehérje



Vizsgálati módszer:

Forward genetika: fenotípus → gén

Reverz genetika: gén → funkció (fenotípus változása)

Gén kifejeződésének megváltoztatása

Bevezetés

Gén kifejeződésének megváltoztatása:

- Megszüntetés
 - Csökkentetés
 - Fokozás
 - Kifejeződési mintázat (térben, időben) módosítása
 - Funkció megváltoztatása
 - Kifejeződés nyomonkövetése
- **DNS szintjén (genom szerkesztés)**
 - RNS szinten (pl.: RNSi)
 - Fehérje szinten (inaktiválás, aktiválás, stb)

Előzmények

Mutánsok előállítása: random

Természetes mutációk (szelekció)

Mutagén ágensek:

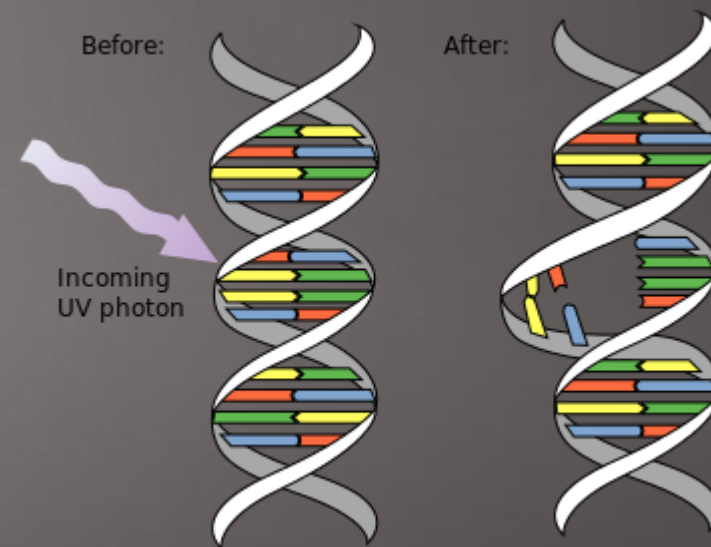
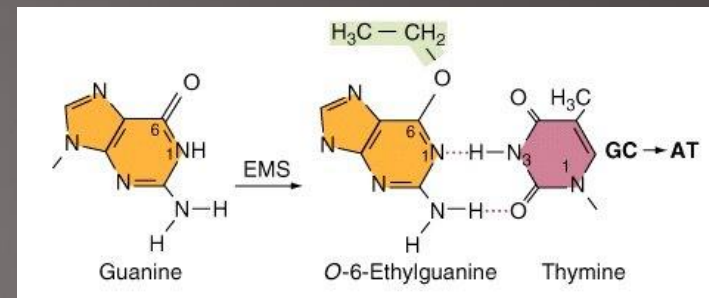
Kémiai anyagok (pl. EMS) → pontmutációk

Röntgen sugárzás → kromoszóma törések

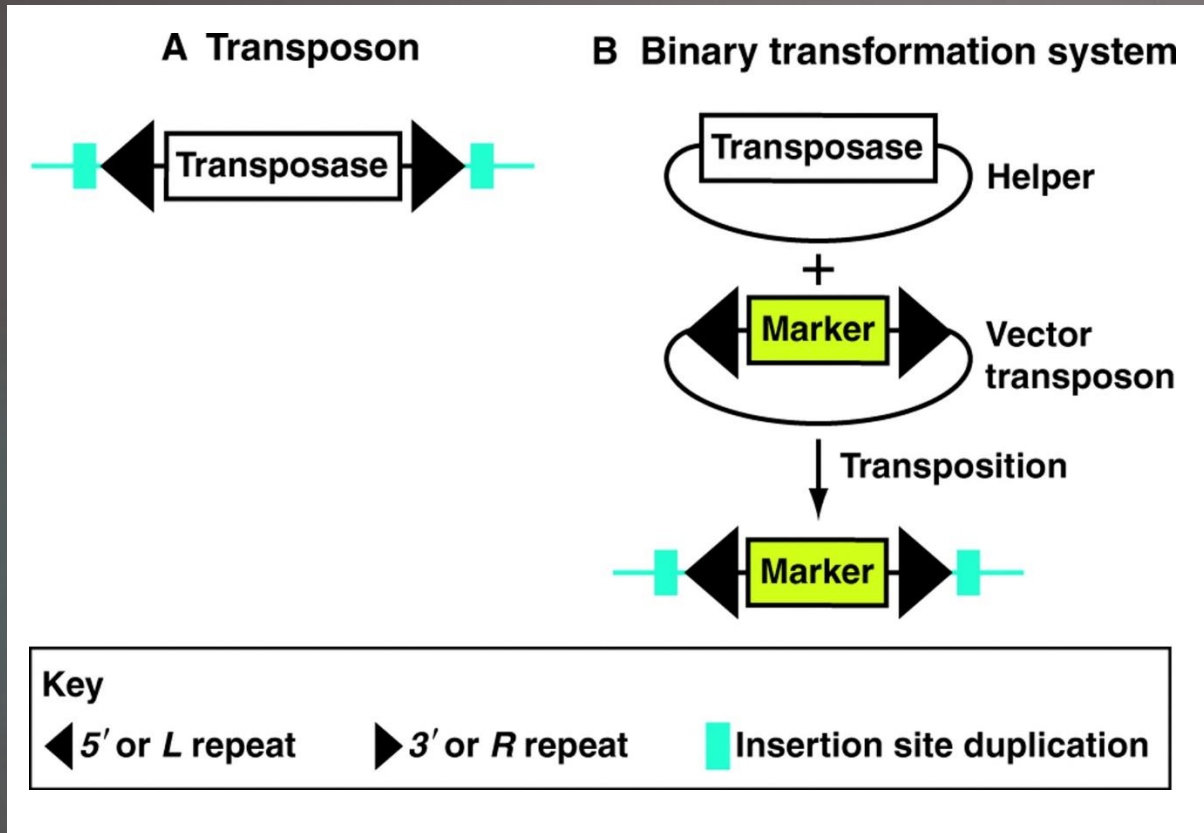
UV sugárzás → változatos hatás

Vírus vagy transzpozon

Beépülő DNS szerkeszthető



Transzpozon alapú genommódosítás



Transzpozáz enzim: transzpozon iszerció

Eredetileg a transzpozonon által kódolt

Inverted repeat (IR)-ek: a transzpozon

beépüléshez kivágáshoz szükségesek

Transzpozon rendszer megszelidítése:

- transzpozáz kódozó transzpozon nem tud ugrani
- Az ugrani tudó transzpozon nem kódol transzpozáz
- Markergén (Antibiotikum rezisztencia, szemmel látható fenotípus)

Transzpozon alapú genommodosítás

Drosophila P-elemek

A legjobban kidolgozott transzpozon rendszer

Transzpozon alapú mutagenézis:

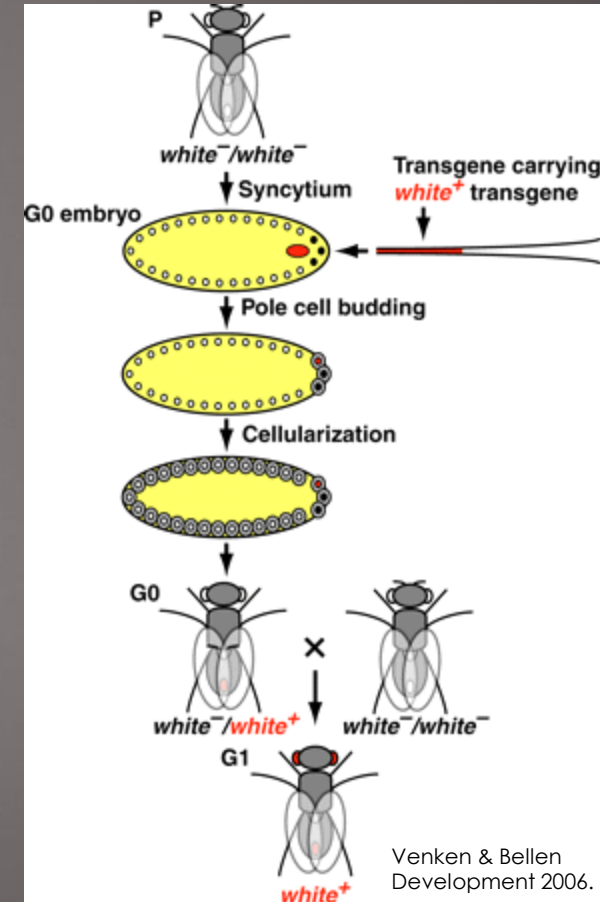
- A genomba épülő P-elemek elrontanak géneket
- A genomi pozícióból kiugratott P-elem nyomot hagy (pl. deléció)

A transzpozonba tetszőleges DNS beépíthető

Transzgének

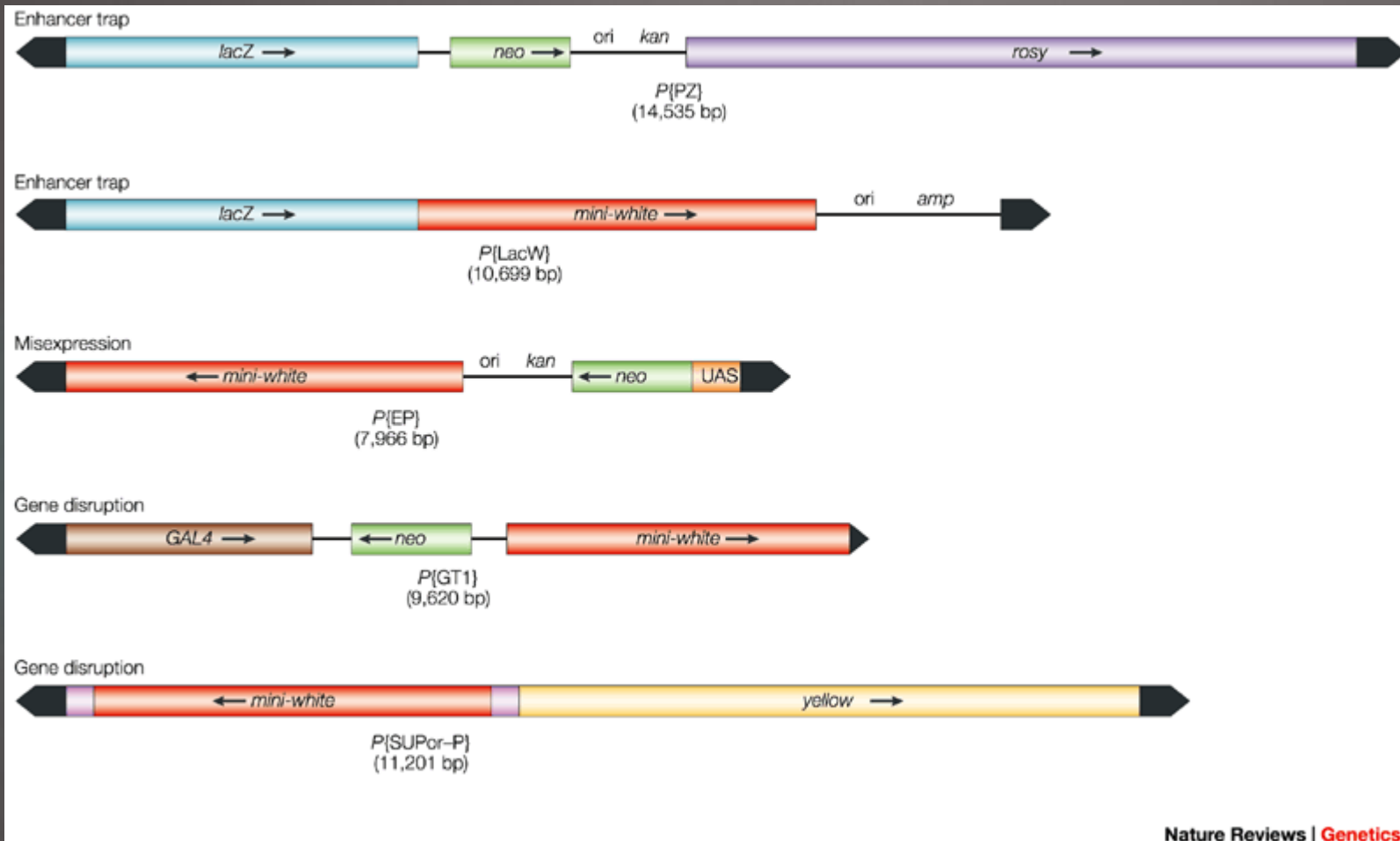
Szabályozó elemek

A transzgenikus állatok előállításának módja



Transzpozon alapú genommodosítás

Drosophila P-elemek



Gén és szabályozó eleme közé épülve egy markergén (*LacZ*) követi a gén kifejeződési mintázatát.

A gén, ami elé beépül a P-elem tetszőlegesen kifejezhető

Génrontó elemek

Transzpozon alapú genommodosítás

Drosophila P-elemek

Table 1 | **P-element insertion stocks available from stock centres**

Chromosome	X	2	3
Bloomington Drosophila Stock Center			
<i>P</i> {LacW}	442	482	167
<i>P</i> {PZ}	0	245	277
<i>P</i> {EP}	166	0	0
<i>P</i> {GT1}	141	160	173
Total ^a	800	957	767
Szeged P-insertion Mutant Stock Centre			
<i>P</i> {LacW}	0	1204	2368
<i>P</i> {EP}	410	937	942
Exelixis, Inc. EP flyStation			
<i>P</i> {EP}	410	937	946

^aTotal number of stocks with *P*-elements mapped at least to a cytological region, including constructs not listed, as of January 2002.

Transzpozon alapú genommodosítás

Egyéb transzpozonok

Transposons for *Drosophila* transgenesis

Transposon	Inverted repeats (bp)	Insertion site preference	Target site duplication (bp)	Species compatibility
<i>P</i> element	31	5' end of genes	8	Drosophilidae only
<i>piggyBac</i>	13	TTAA	4	Broad
<i>Minos</i>	255	TA	2	Broad
<i>Mariner</i>	28	TA	2	Broad
<i>Hermes</i>	17	Low sequence specificity	8	Broad
<i>hobo</i>	12	Low sequence specificity	8	Broad



U betűs aranybagoly

Sleeping Beauty: Gerincesek genommanipulációjára alkalmas

Transzpozon alapú genommodosítás

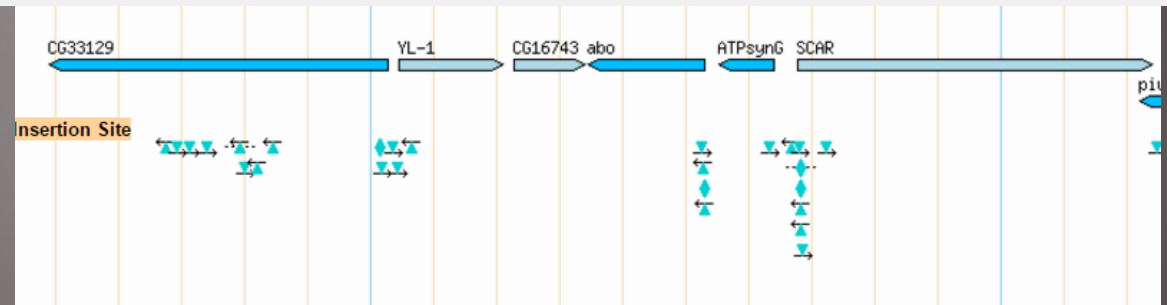
Korlátai

Beépülés véletlenszerű:
Nem tudunk irányítottan módosítani egy adott gént.

Azaz mégsem véletlenszerű:
A transzpozonoknak beépülési preferenciája van.

Transposons for *Drosophila* transgenesis

Transposon	Inverted repeats (bp)	Insertion site preference	Target site duplication (bp)	Species compatibility
<i>P</i> element	31	5' end of genes	8	Drosophilidae only
<i>piggyBac</i>	13	TTAA	4	Broad
<i>Minos</i>	255	TA	2	Broad
<i>Mariner</i>	28	TA	2	Broad
<i>Hermes</i>	17	Low sequence specificity	8	Broad
<i>hobo</i>	12	Low sequence specificity	8	Broad



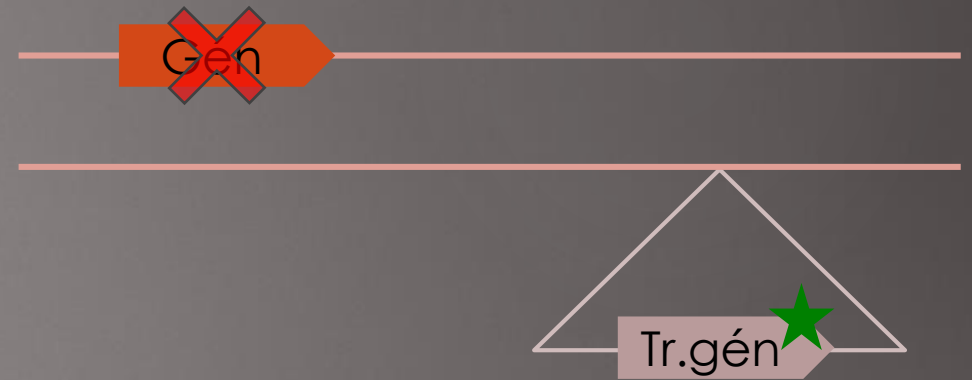
Transzpozon alapú genommodosítás

Korlátai

Gén módosítása: (pl. egy meghatározott pontmutáns létrehozása, GFP jelölése)

Az adott gén nullmutáns háttérén kifejezteni a megfelelően módosított transzgént

- Technikailag összetett
- Kell hozzá nullmutáns
- A transzgén expressziós mintázata/erőssége eltérő lehet



Hogyan lehetne jobban?

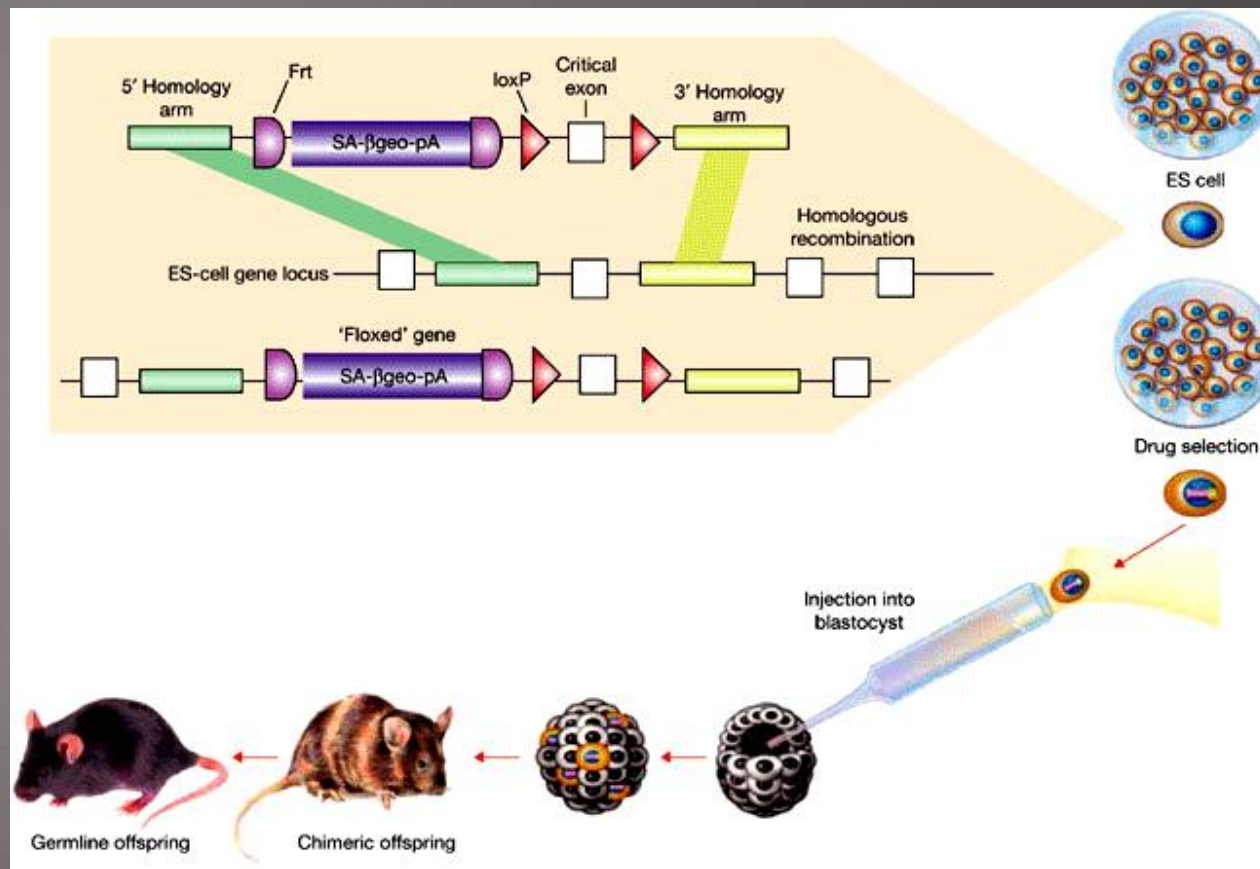
A géneket eredeti pozíciójukban (*in situ*) kell módosítani

- Nincs szükség null mutánsra, sem transzgénre
- Expressziós mintázat megmarad

Homológ rekombináción alapuló helyspecifikus mutagenézis

Elv: Hosszú homológ karokkal rendelkező DNS szakasz bevitele (plazmidon)
A homológ karok és a kromoszóma között rekombináció
Kromoszóma szakasz helyspecifikusan kicserélhető

Bonyolult, drága, ES sejt alapú, kis hatékonyságú módszer.
Csak néhány fajnál (pl. egér) végezhető rutinszerűen.



In situ genommodosítás

Kívánalmak:

- legyen gyors és olcsó
- alkalmazható legyen minden élőlényben
- bármilyen genetikai elem manipulálható legyen
- ne maradjon a genomban idegen (extra) genetikai elem, csak a kívánt mutáció
- legyen specifikus („biztonságos”)

Szekvencia specifikus genomszerkesztés

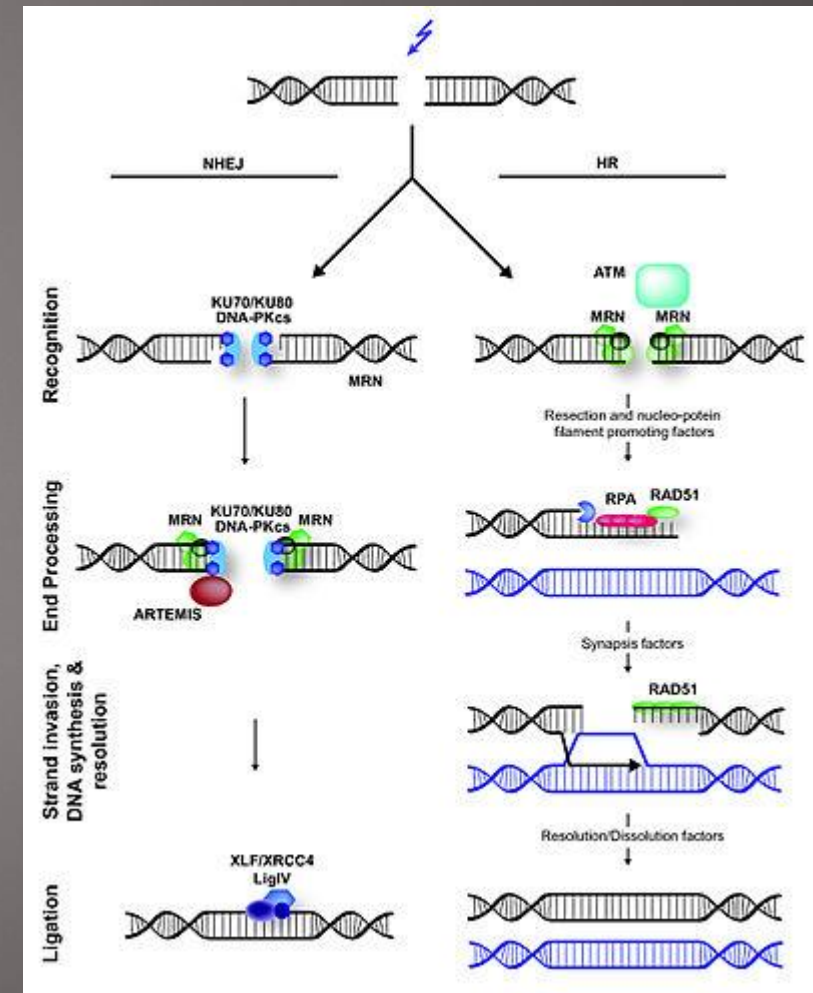
Feltétele: a genomi DNS megfelelő pozíciójában történő felnyitása

Kettős szálú DNS törés (DSB: double strand break) a módosítandó DNS szakasz környezetében

Kettős szálú DNS törés kijavítása: eukarióta sejtek természetes hibajavító mechanizmusai

NHEJ: non-homologous end joining: nem homológ végek összekapcsolása

HR: homológ rekombináció: kijavítás másolással homológ szekvenciáról (HDR: homology directed repair)



Szekvencia specifikus genomszerkesztés

Fő kihívásai

1. Hogyan idézzünk elő kettős szálú DNS törést a genom meghatározott pozíciójában?
2. Hogyan vegyük rá a hibajavító mechanizmusokat a kívánt módosításokra javítsák az eredeti szekvenciát?

Hogyan állíthatunk elő DNS kettős szálú töréseket?

ENDONUKLEÁZOKKAL!

Endonukleázok típusai

Restrikciós endonukleázok:	általában rövid (4-8 nukleotidos) felismerő hely
DNázI:	nincs szekvencia specificitás
Meganukleázok (pl. I-SceI, HO):	hosszú (12-40 nukleotidos) felismerő hely

Az ismert endonukleázok önmagukban nem alkalmasak arra, hogy tetszőleges helyen hasítsák a DNS-t (okozzanak kettős szálú törést)

Hogyan állíthatunk elő DNS kettős szálú töréseket szekvencia specifikusan?

Szekvencia specifikus DNS-kötő fehérje + specifitás nélküli DNáz aktivitás

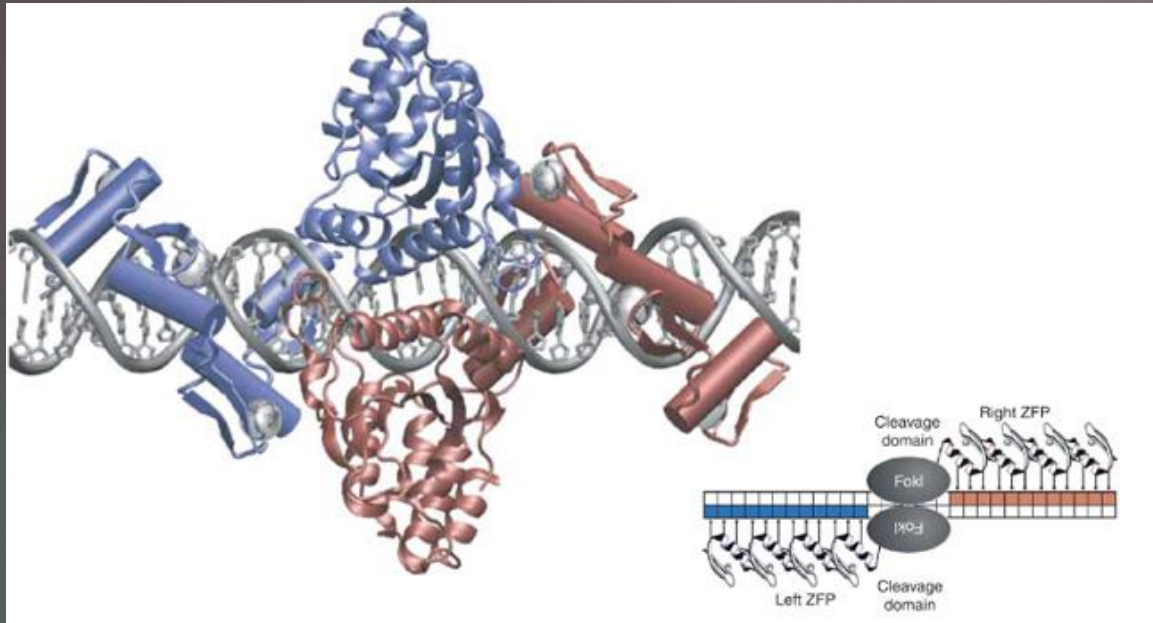


Kiméra fehérjék

Zinc-finger nucleases (**ZNF**)

Transcription Activator-Like Effector nucleases (**TALEN**)

ZFN technológia alapjai



Nukleáz domén: kettős szálú DNS törés

FokI DNáz doménje: csak dimerként aktív

2 db ZNF kell egyszerre használni

C2H2 típusú Zinc-finger (ZF) domén:

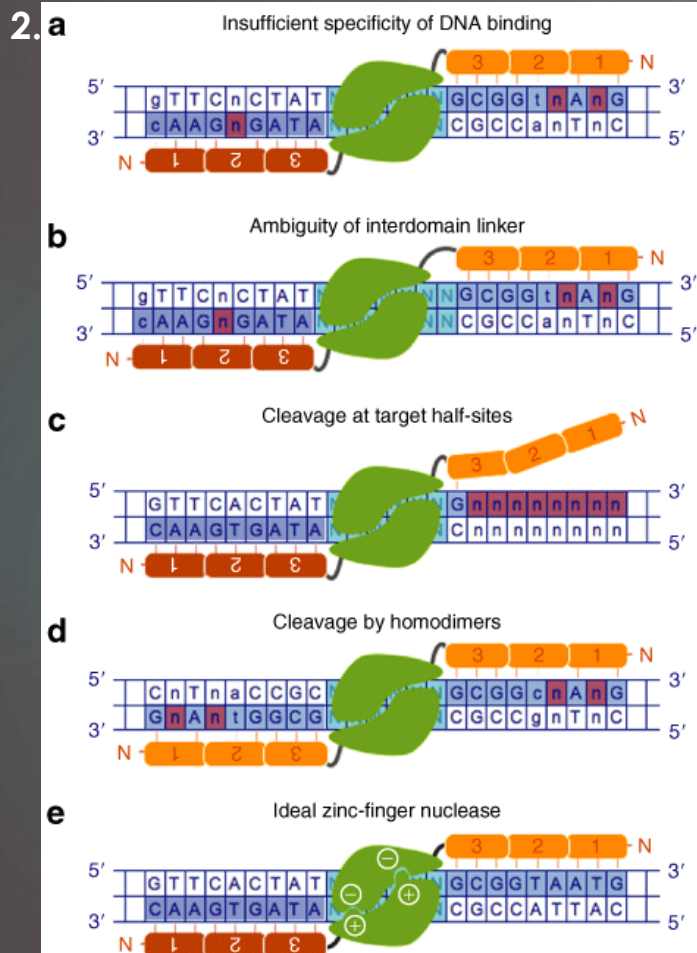
- ~30aa, $\beta\beta\alpha$
- 3 bp felismerésre képes
- Sokféle specificitással rendelkező domén ismert (gyakorlatilag bármelyik tripletre)
- Modulárisan építhető

ZF „oligomerek”: Tetszőleges DNS szekvenciát fel tud ismerni.

Egy 18-23 nukleotid hosszú szekvencia már egyedi a legtöbb genomban!!!!

ZFN technológia kifejlesztése

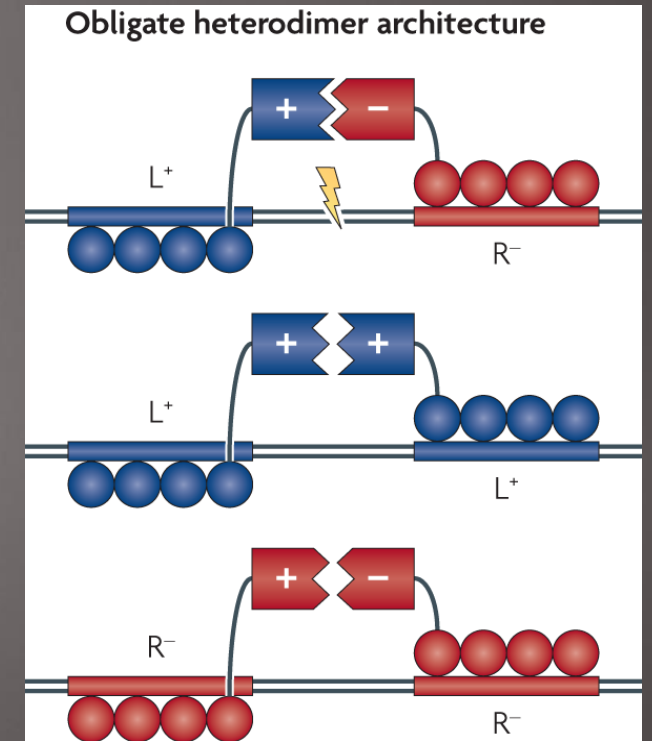
1. A szomszédos Zn-ujjak befolyásolhatják egymás szekvencia specificitását.



Körültekintő tervezés, előzetes DNS kötési kísérletek (pl. 2-hibrid tesztek)

Az ideális linker kifejlesztése

A dimerizációs domén tervezett elrontásával a ZFN-ok csak heterodimerként működőképesek.



ZFN technológia alkalmazása

A megfelelő ZFN pár sejtekbe juttatása:

- DNS formában transzfekcióval (szövetkult.)
- Genomi integrációval
- mRNS formában
- Fehérjeként

Alkalmas szelekciós rendszer a kívánt mutációk azonosítására:

- Fenotípus
- Molekuláris marker (RFLP, SNP)
- Marker gén beépítése (neo, GFP, stb.)

Szomatikus és csíravonal sejtekben is működik!

Table 1 Reported instances of successful ZFN-induced gene targeting

Organism	Latin name	Method	TM	TGR
Animals				
Fruit fly	<i>Drosophila melanogaster</i>	Heat-shock induction	+	+
Nematode	<i>C. elegans</i>	Embryo injection	+	+
Silkworm	<i>Bombyx mori</i>	Gonad injection	+	
Zebrafish	<i>Danio rerio</i>	Embryo injection	+	
		Zygote injection	+	
Sea urchin	<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	Embryo injection	+	
Frog	<i>Xenopus tropicalis</i>	Embryo injection	+	
Rat	<i>Rattus norvegicus</i>	Zygote injection	+	+
Mouse	<i>Mus musculus</i>	Zygote injection	+	+
Plants				
Cress	<i>A. thaliana</i>	Agrobacterium	+	
Tobacco	<i>Nicotiana sp.</i>	Protoplasts	+	+
		Agrobacterium	+	+
		Viral delivery	+	
Maize	<i>Zea mays</i>	Cell culture	+	+
Petunia	<i>Petunia sp.</i>	Viral delivery	+	
Mammalian cells in culture				
Human	<i>Homo sapiens</i>	DNA transformation	+	+
Mouse	<i>M. musculus</i>	Viral delivery	+	+
		DNA transformation	+	+
Hamster	<i>Cricetulus griseus</i>	DNA transformation	+	+
Pig	<i>Sus domestica</i>	DNA transformation	+	

ZFN technológia korlátai

Kiméra fehérjék létrehozása: ZF domének és nukleáz domén összeépítése

A ZF-ek *in vivo* specificitása nem mindig felel meg az elméleti elvárásoknak, vagy az *in vitro* teszteknek, a gyakorlatban nem teljesen tetszőleges a célszekvencia.

Megoldás: több ZFN pár használata az adott célra

Off-target hatás

Megoldás: több ZF domén használata, rövid spacer szekvenciák illesztése a ZF domének közé

Profi cégek: pl. Sigma-Aldrich, Sangamo Biosciences

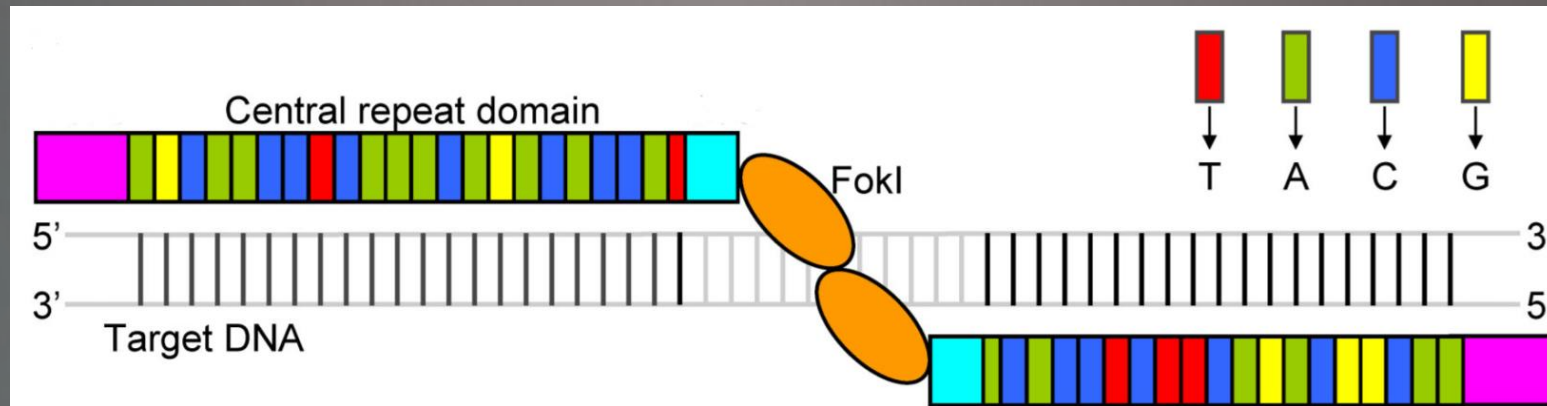
Drága

TALEN technológia alapjai

TALE: transcription activator-like effector protein Xanthomonas baktériumból

A DNS felismerő domén 30-35 as-as ismétlődő doménekből épül fel (TALE domén)

Minden domén 1 nt felismerésére képes, mind a 4 nt (A, T, G, C) létezik TALE domén



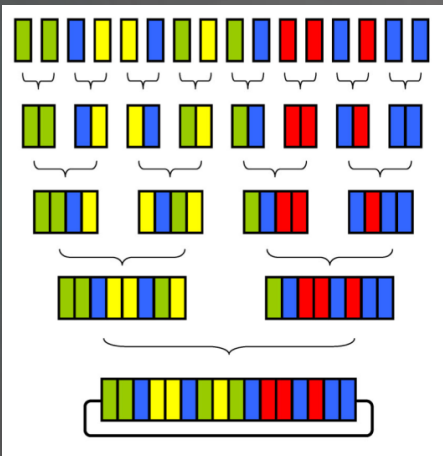
A TALEN célszekvenciának T-vel kell kezdődnie

FokI domének a ZFN-hez hasonlóan

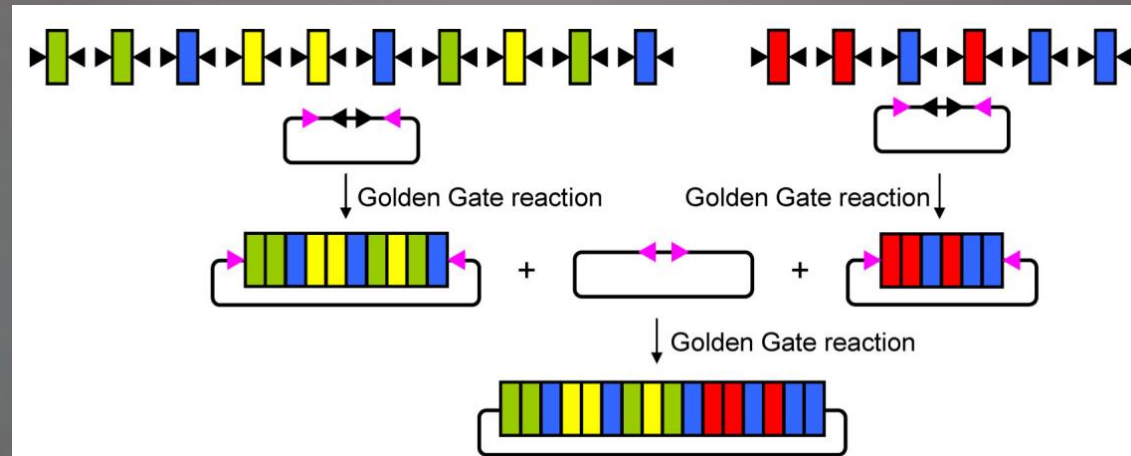
TALEN technológia

Az ismétlődő TALE egységek klónozási nehézségeket okozhatnak (repeat szekvenciák miatt)

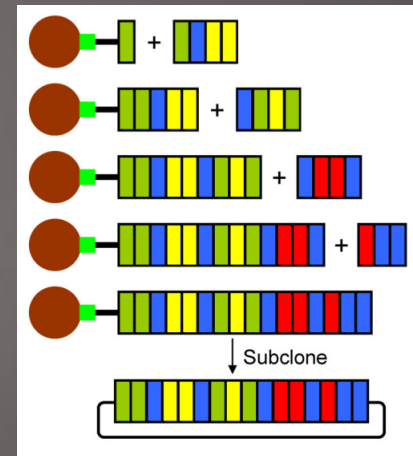
1. Restriction enzyme and ligation method



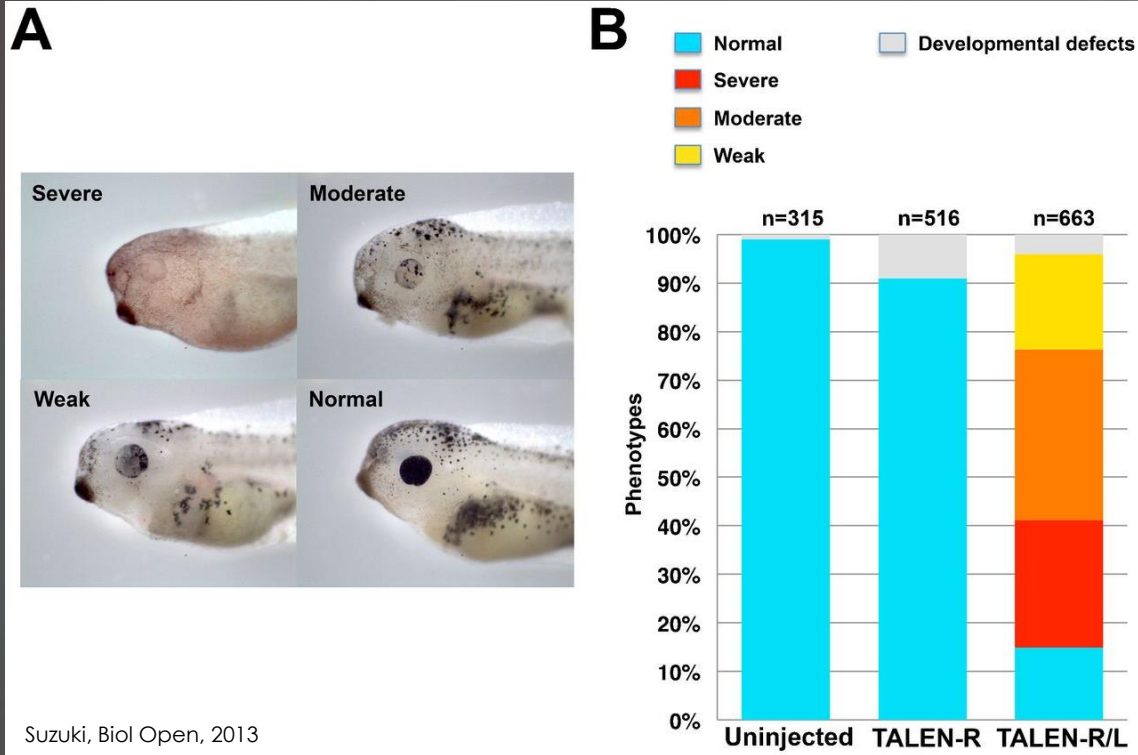
2. Golden Gate cloning with type IIS restriction enzymes



3. Fast ligation-based automatable solid-phase high-throughput (FLASH) method



TALEN technológia



Talen alapú genom szerkesztés

Table I. Applications of TALENs for targeted genome editing in various organisms.

Organisms	Genes	Refs.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ADH1	Cermak et al. (2011)
<i>Brachypodium</i>	BdABA1, BdCKX2, BdCOI1, BdHTA1, BdRHT, BdSBP, BdSMC6, BdSPL	Shan et al. (2013)
Cattle (<i>Bos taurus</i>)	ACAN, GDF8, GGTA, PRNP	Carlson et al. (2012)
Cricket (<i>Gryllus imaculatus</i>)	Gb'lac2	Watanabe et al. (2012)
Frog (<i>Xenopus tropicalis</i>)	ets1, foxd3, grp78/bip, hhcx, noggin, ptf1a/p48, sox9, tyr, vpp1	Ishibashi et al. (2012), Lei et al. (2012)
Fruitfly (<i>Drosophila melanogaster</i>)	CG9797, yellow	Liu et al. (2012)
Hamster (<i>Cricetulus griseus</i>)	FUT8	Cristea et al. (2013)
Human (<i>Homo sapiens</i>)	ABL1, AKT2, ALK, ANGPTL3, APC, APOB, ATGL, ATM, AXIN2, BAX, BCL6, BMPRIA, BRCA1, BRCA2, C6orf106, CIITA, CBX3, CBX8, CCND1, CCR5, CDC73, CDK4, CELSR2, CFTR, CHD4, CHD7, CTNBN1, CYLD, DDB2, DDX60, DHX58, DHX9, DICER1, EIF2AK2, EIF2C2, ERCC2, EWSR1, EXT1, EXT2, EZH2, FANCA, FANCC, FANCF, FANCG, FES, FGFR1, FH, FLCN, FLT4, FOXO1, FOXO3, GLI1, GLUT4, HBB, HDAC1, HDAC2, HDAC6, HMG2, HOXA13, HOXA9, HOXC13, HPR1, IFI44L, IFIT1, IFIT2, IL2RG, JAK2, KRAS, LINC00116, MAOA, MAP2K4, MB21D1, MDM2, MET, MLH1, MSH2, MUTYH, MYC, MYCL1, MYCN, NAMPT, NBN, NCOR1, NCOR2, NDUFA9, NLRC5, NTF3, NUB1, OASL, OCT4, PDGFRA, PDGFRB, PHF11, PHF8, PITX3, PLA2G4A, PLIN1, PMS2, PPP1R12C, PTCH1, PTEN, QRI1, RARA, RBBP5, RECQL4, RET, RIPK4, RTP4, RUNX1, SDHB, SDHC, SDHD, SETDB1, SIRT6, SMAD2, SORT1, SS18, STAT1, STAT6, SUZ12, TBK1, TFE3, TP53, TRIB1, TSC2, TTN, UNC93B1, VHL, XPA, XPC	Cermak et al. (2011), Hockemeyer et al. (2011), Kim et al. (2011), Miller et al. (2011), Mussolino et al. (2011), Sanjana et al. (2012), Wang et al. (2012), Reyon et al. (2012b), Sun et al. (2012b), Ding et al. (2013), Schmid-Burgk et al. (2013), Stroud et al. (2013)
Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	DJ-1	Ansai et al. (2013)
Mouse (<i>Mus musculus</i>)	Pibf1, Sepw1	Sung et al. (2013)
Nematode (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	ben-1	Wood et al. (2011)
Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	BMPR2, IgM	Tesson et al. (2011), Tong et al. (2012)
Rice (<i>Oryza sativa</i> L.)	Os11N3, OsBADH2, OsCKX2, OsDEP1, OsSD1	Li et al. (2012b), Shan et al. (2013)
Silkworm (<i>Bombyx mori</i>)	BmBlos2	Ma et al. (2012), Sajwan et al. (2013)
Swine (<i>Sus scrofa</i>)	AMELY, DMD, GDF8, GGTA, GHRHR, IL2Rg, p65, RAG2, RELA, SRY	Carlson et al. (2012)
Tobacco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	SurA, SurB	Zhang et al. (2013)
Yeast (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	ADE2, LYS2, URA3	Li et al. (2011b)
Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	aanat2, abcc9, adora1b, adora2aa, bmi1, cdh5, clc, crhr1, dip2a, elmo1, epas1b, fgf21, fh, golden, gpr103a, gri3a, hdc, hey2, hif1ab, ikzf1, jak3, moesina, myod, nmu, npy, phf6, pmch, pmchl, ponzr1, ppp1cab, prok2, prokr1, prokr2, ptpmt1, qrfp, ryr1a, ryr3, scl6a, tbx6, tgfa, tnkb, vip	Huang et al. (2011), Sander et al. (2011), Bedell et al. (2012), Cade et al. (2012), Dahlem et al. (2012), Moore et al. (2012), Chen et al. (2013)

CRISPR-Cas9:

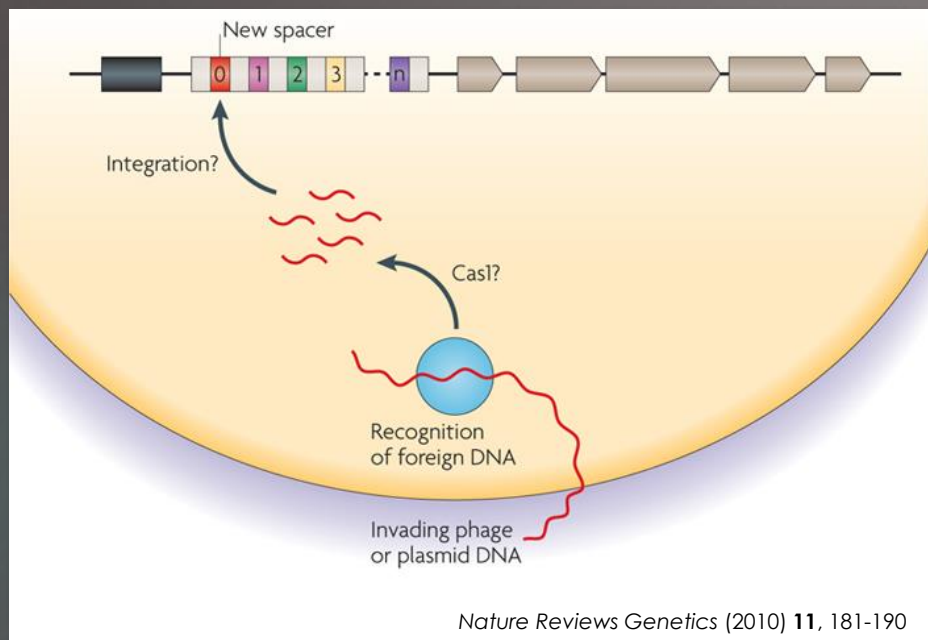
Alternatív technika helyspecifikus DSB létrehozására

A genom szekvenciárészletének felismerésében nem fehérje, hanem ssRNS molekula vesz részt

A DNS hasítását egy helikáz + nukleáz aktivitású fehérje végzi: bakteriális eredetű

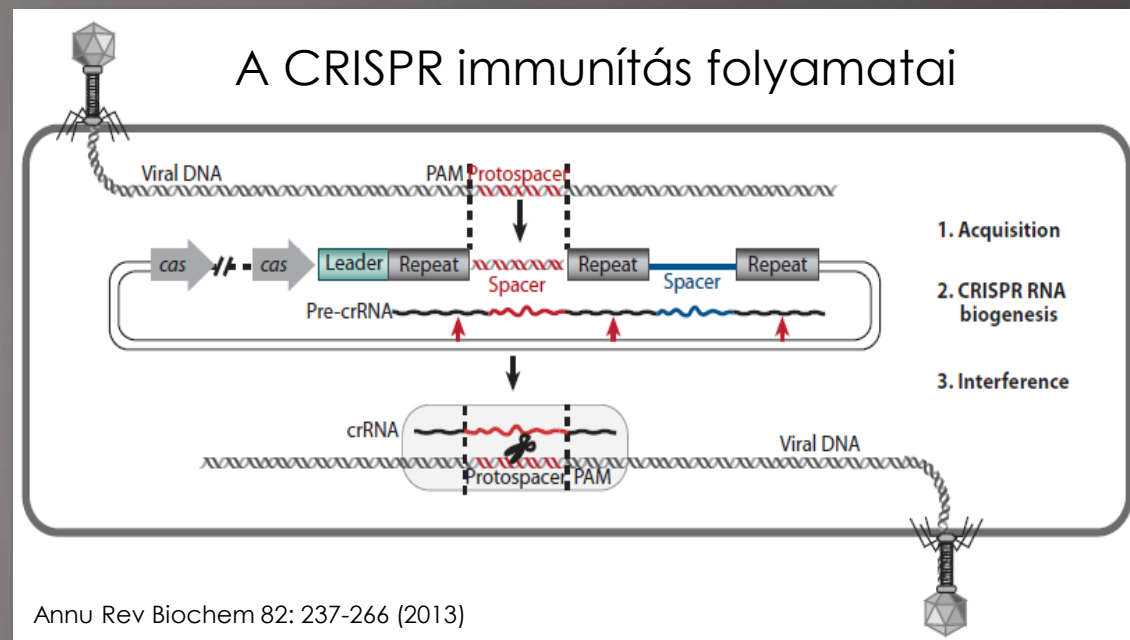
CRISPR-Cas9:

Eredeti funkciója a prokarióta immunitásban



Fág DNS elleni védelem: genomban elraktározott rövid DNS szakaszból átiródó RNS részt vesz a fertőző fág DNS-ének lebontásában.

Adaptív immunitás



Protospacer: idegen DNS elraktározandó vagy felimerendő szekvencia részlete.

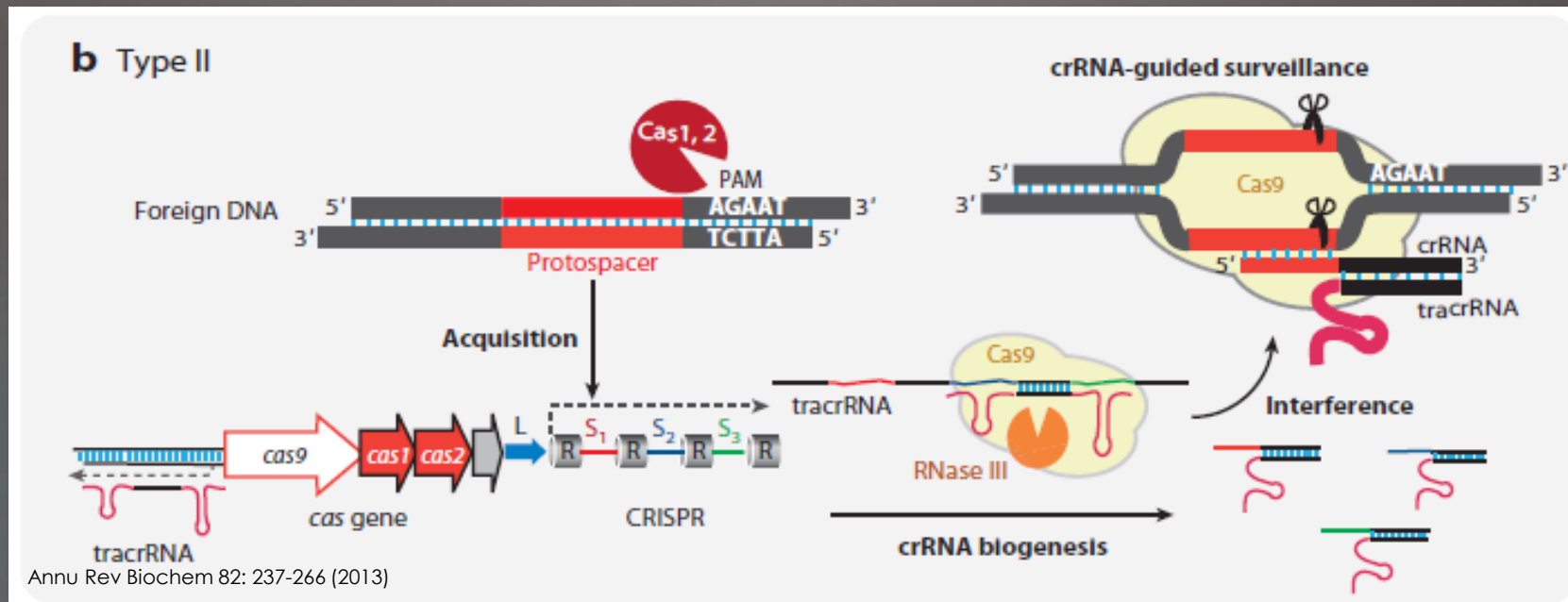
Spacer: A bakteriális genomban elraktározott szekvencia.

PAM: protospacer adjacent motif (NGG)

crRNS (Crispr-RNS): A virális DNS lebontásban vesz részt

CRISPR-Cas9

II-es típusú CRISPR rendszer



A CRISPR RNS-ek érésében és a fág DNS feldarabolásában egy multifunkciós fehérje vesz részt:

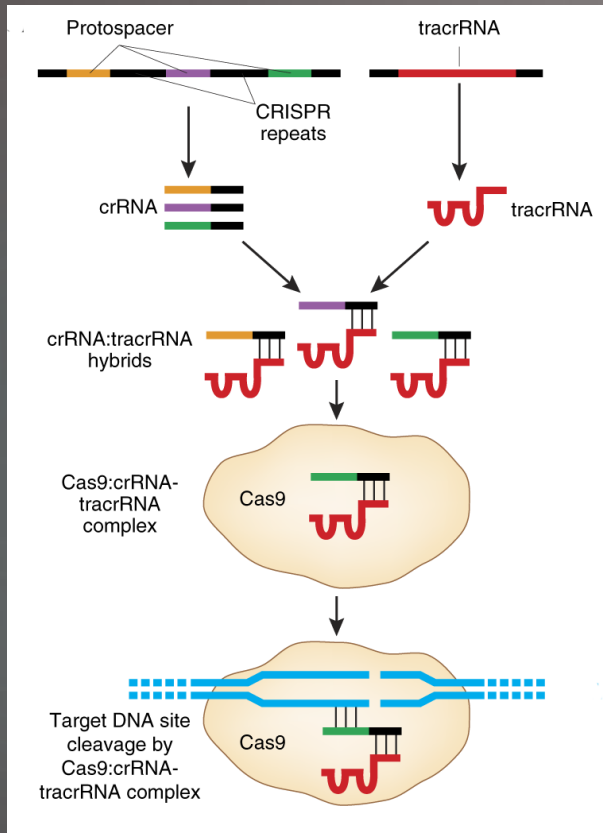
Cas9: RNS-kötés, PAM-szekvencia felismerés, DNS-helikáz, DNáz funkció (HNH: targetszekv. hasítás;

RuvC: nem targetspecifikus ssDNS hasítás)

A **crRNS** éréséhez egy **tracrRNS** (trans activating crRNA) szükséges: megfelelő térszerkezet kialakítása

CRISPR-Cas9 megszelídítése

Eredeti rendszer

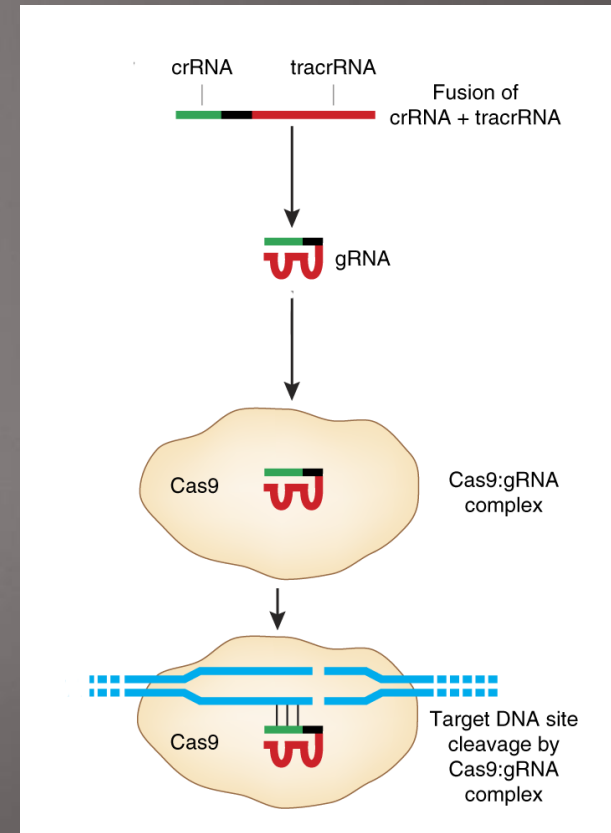


3 komponens

Streptococcus pyogenes
CRISPR lókus

- Cas9 kodon optimalizálás
- U6 **promoter** használata
- 2x **NLS** a Cas9-re
- crRNA+tracrRNA → **chiRNA** (chimera RNA) vagy **gRNA** (guide RNA)

„Megszelídített” rendszer



2 komponens

CRISPR-Cas9

JELLEMZŐK

- Kétkomponensű rendszer: Cas9 endonukleáz + guideRNS
- Felismerőhely: **20 bp targethely + PAM** (NGG) szekvencia
- Szimultán targetálás lehetősége
- Az egyik DNS szál szelektív hasítására is alkalmas (nickase aktivitás), HR>NHEJ

GYAKORLATI KÉRDÉSEK

Tervezés nagyon fontos (**off-target** hatás elkerülése), professzionális szerverek

A Cas9 és a gRNS bejuttatása a sejtekbe

- mRNS
- plazmid (transziens expresszió)
- transzgenikus

Klónozás kevésbé problémás: kész vektorok, oligorendelés

Sikeres felhasználás számtalan modellrendszerben

Optimalizálás folytatódik (térszerkezet ismertté vált, PAM „kiütése”)

CRISPR-Cas9

Off-target hatás detektálás

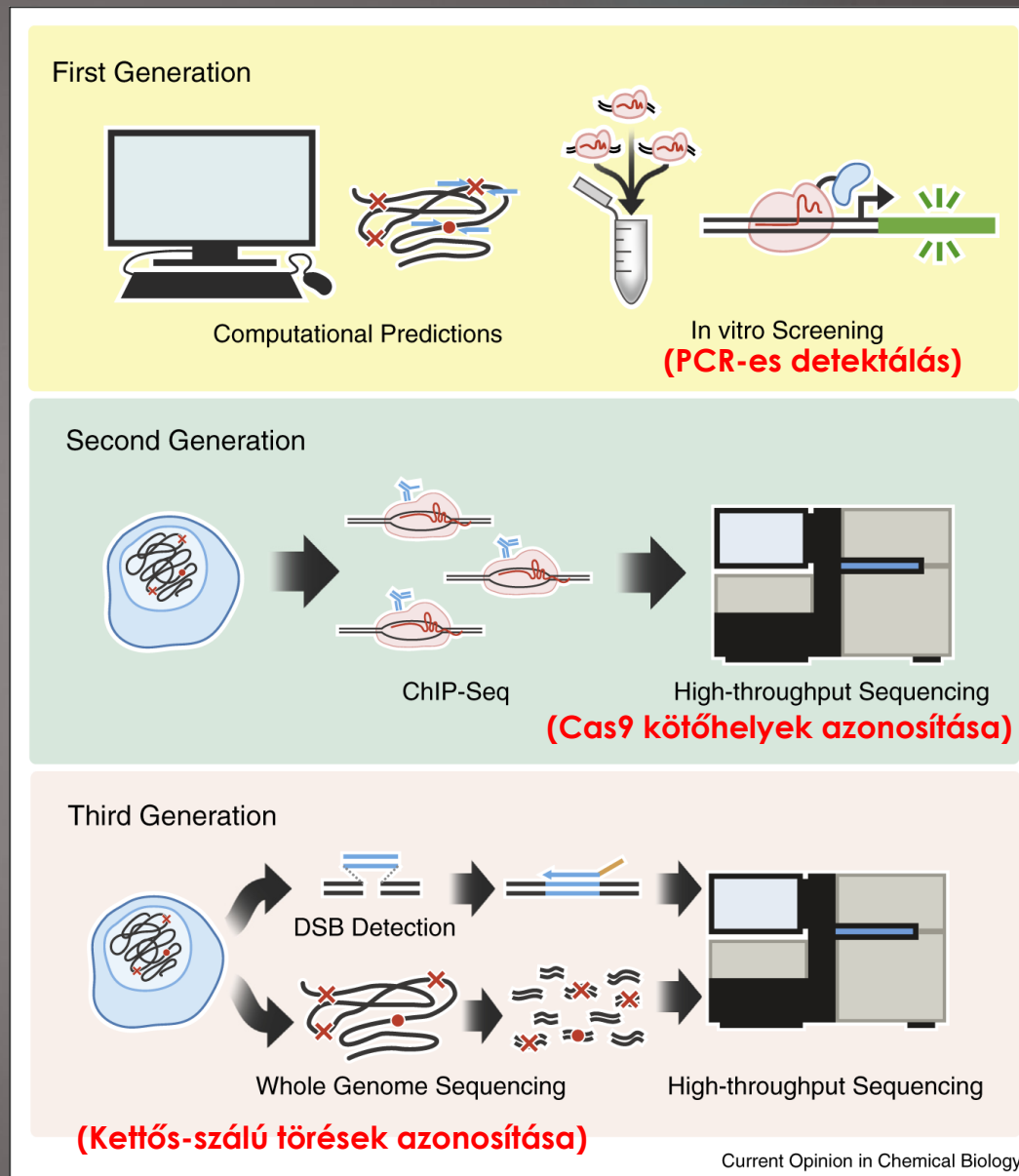
Sok szekvencia adat



in silico módszerek fejlesztése



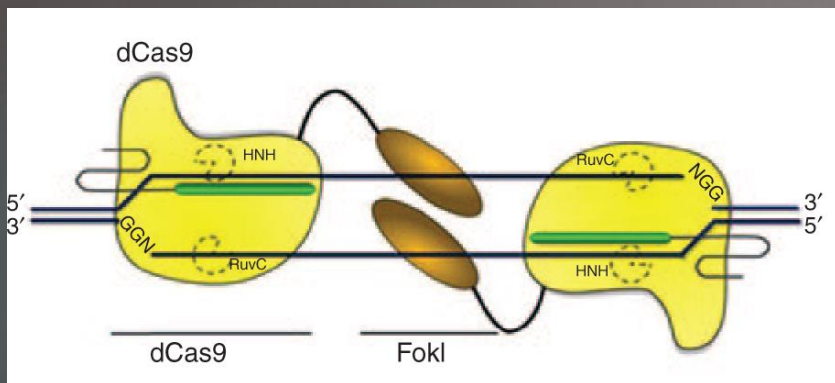
Professzionális szoftverek



CRISPR-Cas9

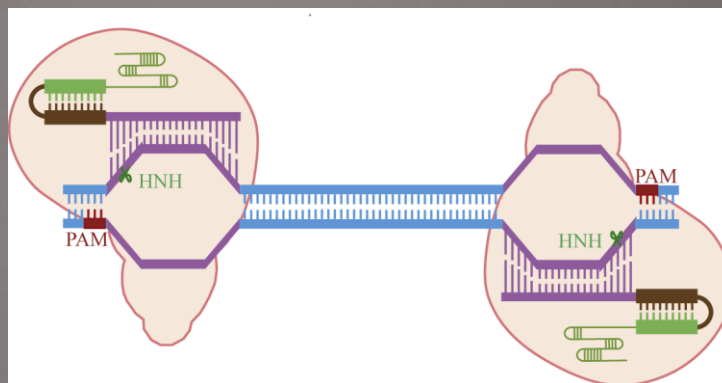
Off target hatás minimalizálása

dCas9-FokI fúziós fehérje



- dead-Cas9: nukleáz aktivitás kiütve
- **FokI** doménnel fuzionáltatva (mint a ZFN és TALEN módszereknél)
- Targetszekvencia 2x-es

Double nicking



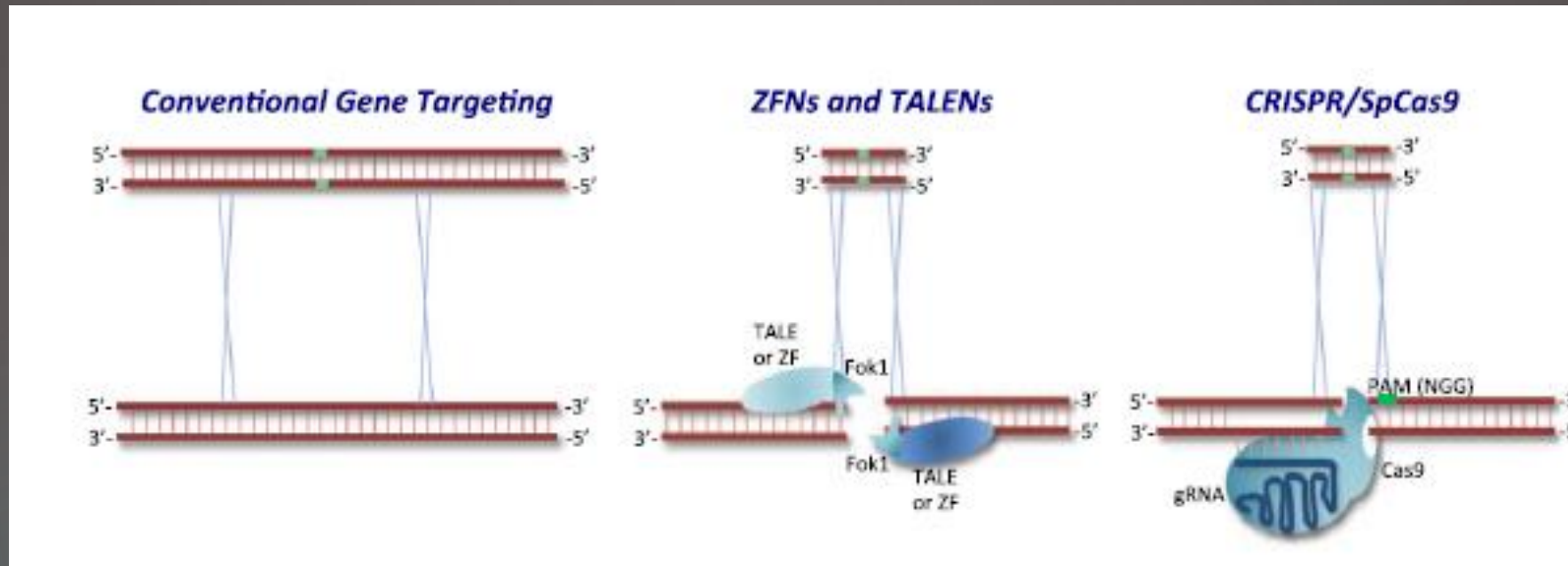
- csak **nickase** aktivitás (RuvC aktivitás kiütve)
- a két ssDNA törés közötti szakasz kicserélése: HDR (HR)
- Targetszekvencia 2x-es

Cas9 eltávolítása

A Cas9 permanens jelenléte off-target hasításokat eredményez

- Degradáció
- Inaktiválás
- Kihorgonyzás (eltávolítás a sejtmagból)

Genom szerkesztési módszerek összehasonlítása



Előnyök

- Tetszőleges genommodosítás
- Hasítás nem szükséges
- Nincs off-target hatás

- Közepes/nagy hatékonyság
- Bármilyen genomi régióra

- Olcsó, egyszerű
- Könnyen tervezhető
- Nagy hatékonyság
- Multiplex genommodosítás

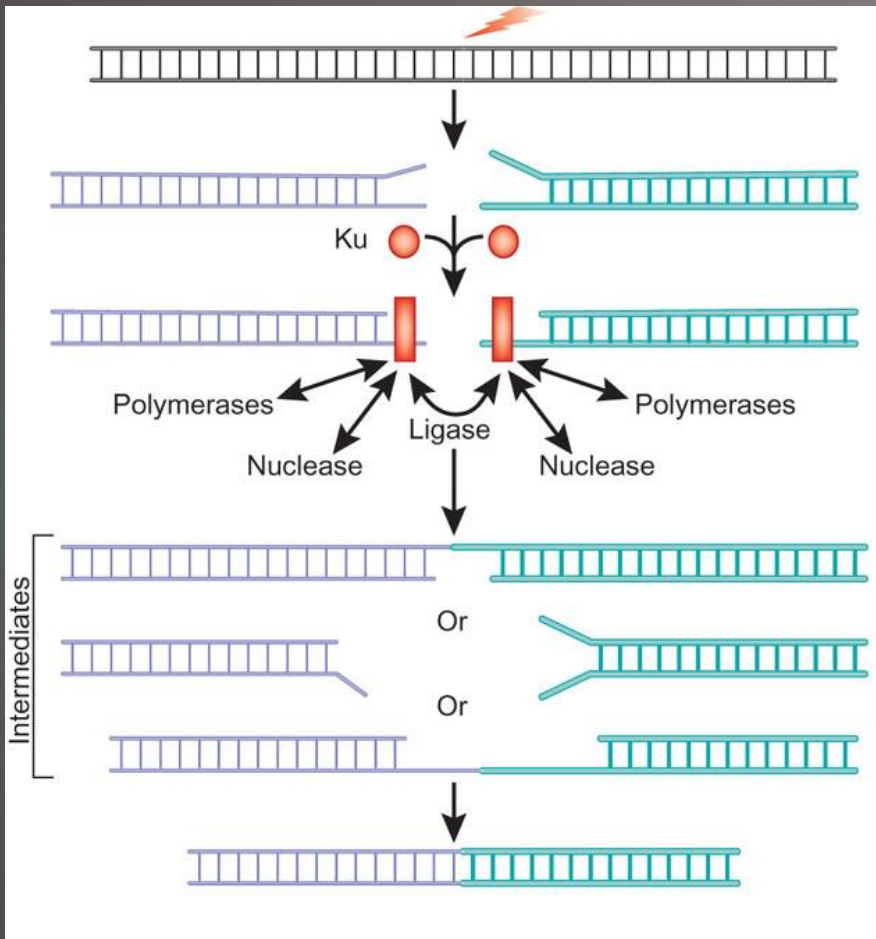
Hátrányok

- Időigényes
 - Nehéz tervezni
 - Nagyon gyenge hatásfokú
 - Kevés modellorganizmusban működik
- Drága
 - Nehéz tervezni
 - Nehézkes klónozás
 - Off-target hatás

Mára a CRISPR „mindent visz”!

Genomszerkesztés technikái I.

NHEJ



A természetben gyakoribb hibajavítás

Hibaráta: polimerázok, exonukleázok miatt

Nukleotidok kiesése/beépülése az eltört DNS végekre

Gén/szabályozó szekv. elrontása

- **Nagyobb deléció**
- **Indel**-ek: kis méretű deléciók, inszerciók: gén elrontása
 - **Frameshift mutációk**
 - Aminósav kiesés
- **Pontmutációk**: polipeptidláncban aminósav megváltoztatása

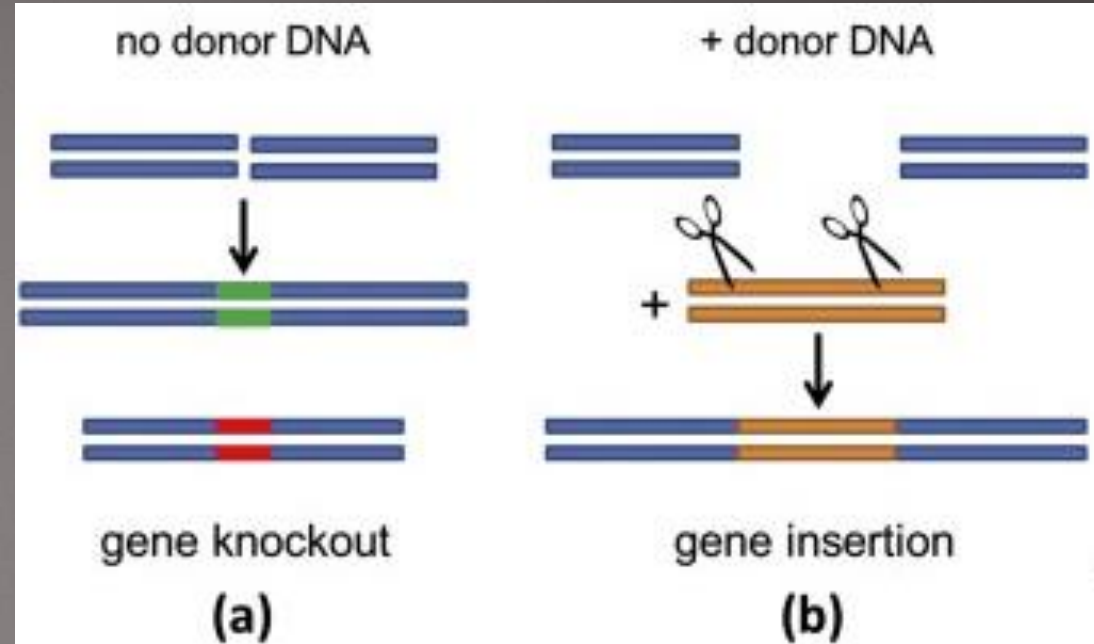
Genomszerkesztés technikái I.

NHEJ

1. Definiált deléció generálás: két gRNS között

- gének kiejtése
- Domének eltávolítása
- Kis méretű régiók kiejtése (miR, TF-kötőhely)

2. Száttörés helyére DNS beépítés

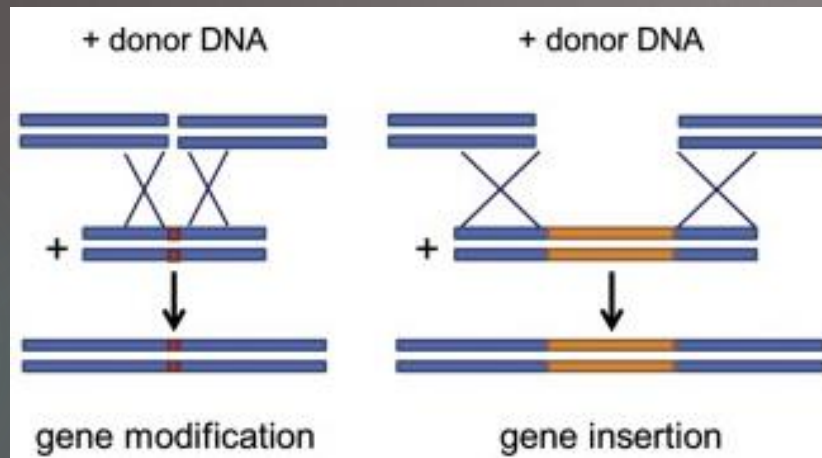


Probléma lehet: A DSB általában nem pontosan a tervezett helyen van



Genomszerkesztés technikái II.

HR-n alapuló genomszerkesztés



Száltörés homológ rekombinációval javítódik ki.

A természetben: NHEJ > HR

- NHEJ útvonal gyengítése: pl. *ligase4* mutáns
- Hibajavítás homológ szakaszból: homológ kromoszóma.
Plazmidon homológ szakaszokkal (**homológia karok**)
határolt beépítendő rész

A hatékonyság fokozható ha a homológ kromoszóma
adott szakasza hiányzik: átfedő deléció.

Genomszerkesztés technikái II.

HR-n alapuló genomszerkesztés

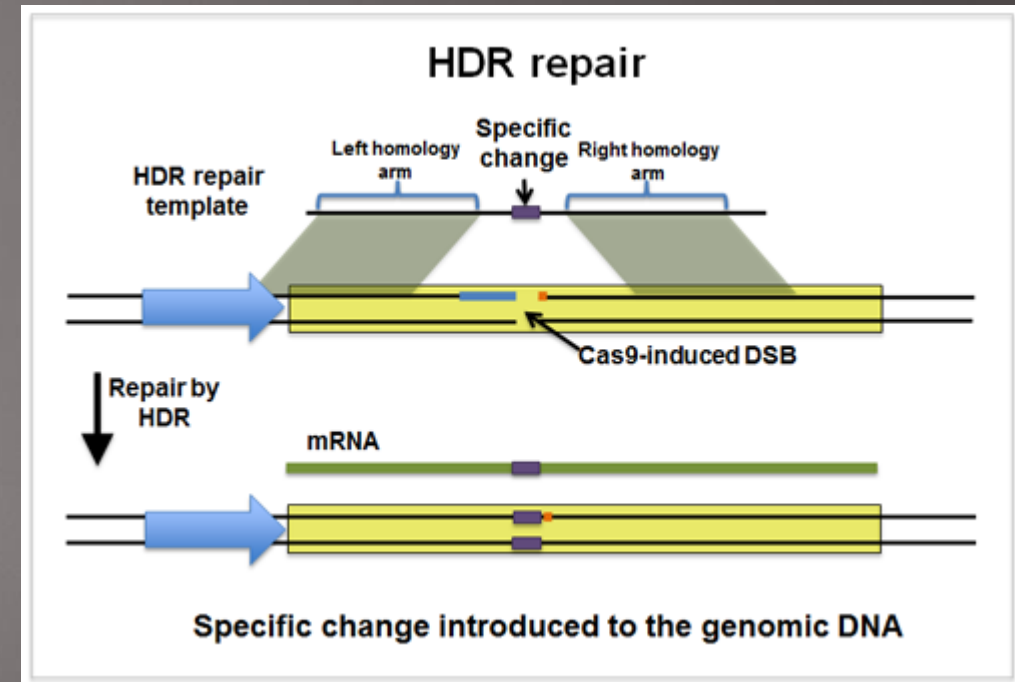
Sajátosságai

bp pontosságú genomszerkesztés

Mindegy, hogy a törés mennyire pontos, mert a gRNS által felismert szakasz a templátról másolódik be

A homológ szakasz nem lehet targetje a gRNS-nek

- PAM hiánya (legalább 1 bp különbség a genom és templát között) →
- gRNS célszekvenciát úgy kell megválasztani, hogy a változtatás ne okozzon bajt (pl. intronban legyen; ne okozzon aminosav cserét, stb))

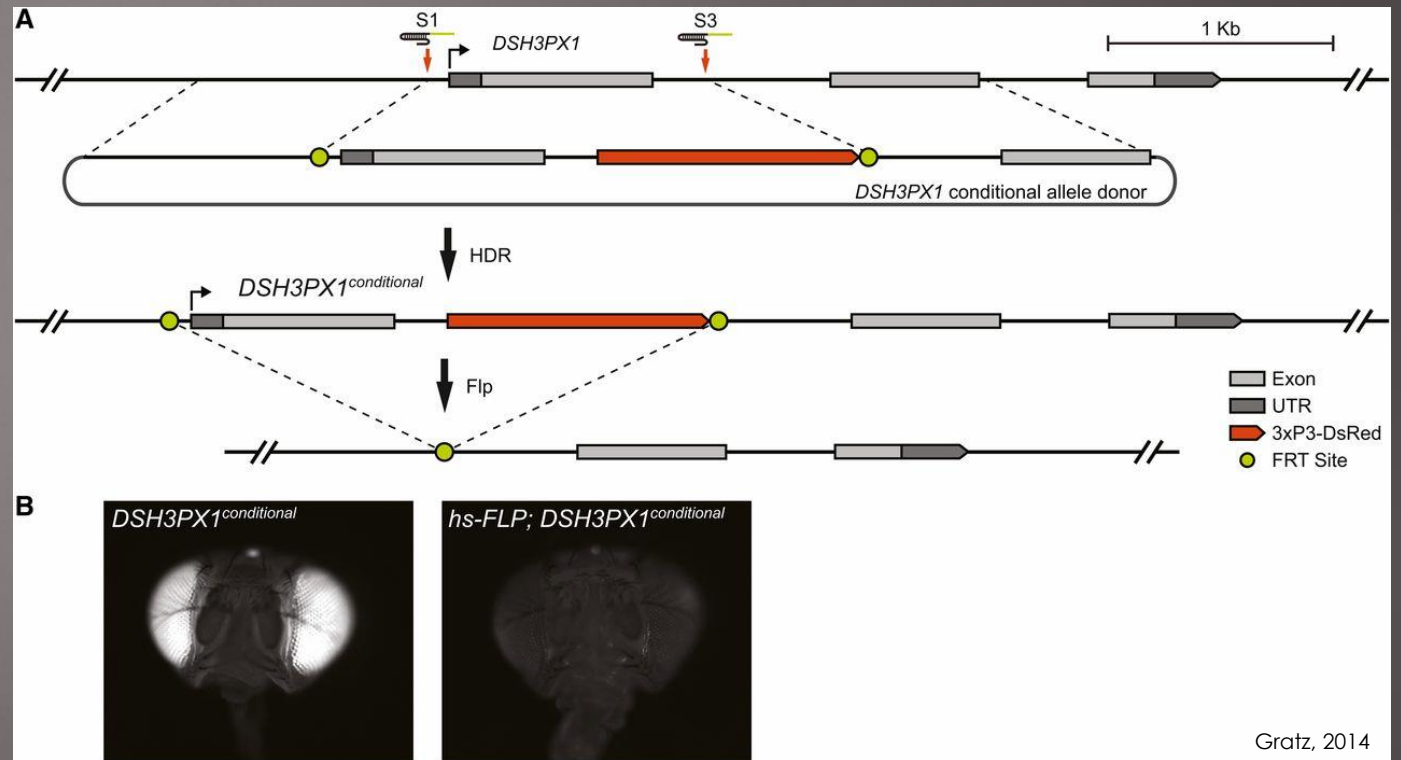


Genomszerkesztés technikái II.

HR-n alapuló genomszerkesztés

A beépült szakasz nyomkövetése

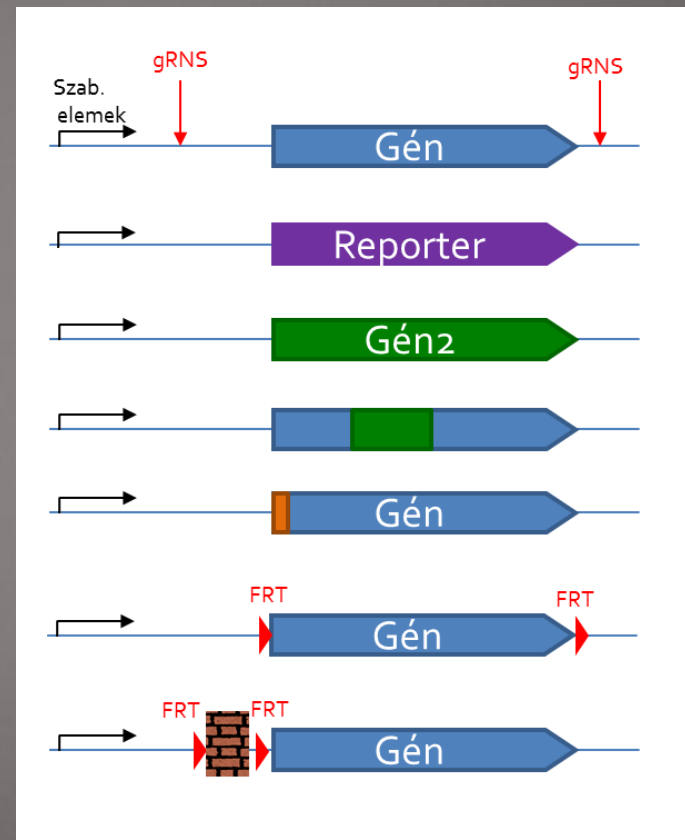
- Markergén
- Kivágható markergén
- Molekuláris marker



Genomszerkesztés technikái II.

HR-n alapuló genomszerkesztés

- ❖ Reporter konstrukt : gén kicserélése reporterre
- ❖ Génkicserélés
- ❖ Domén csere
- ❖ Gén tagelése: (epitóp tagek, GFP)
- ❖ Kondicionális génkiütés
- ❖ Kondicionális génaktiválás

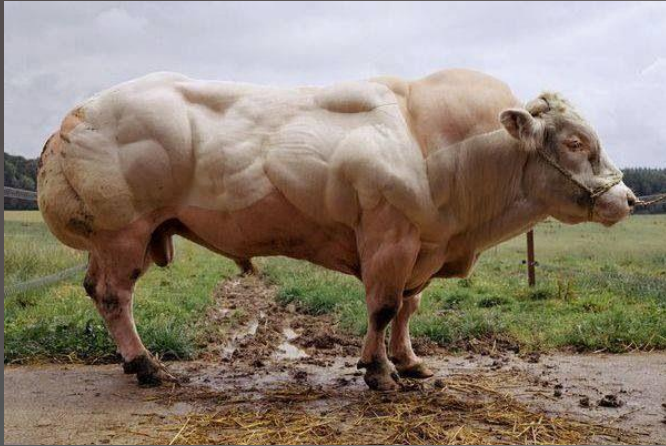


Egyéb:

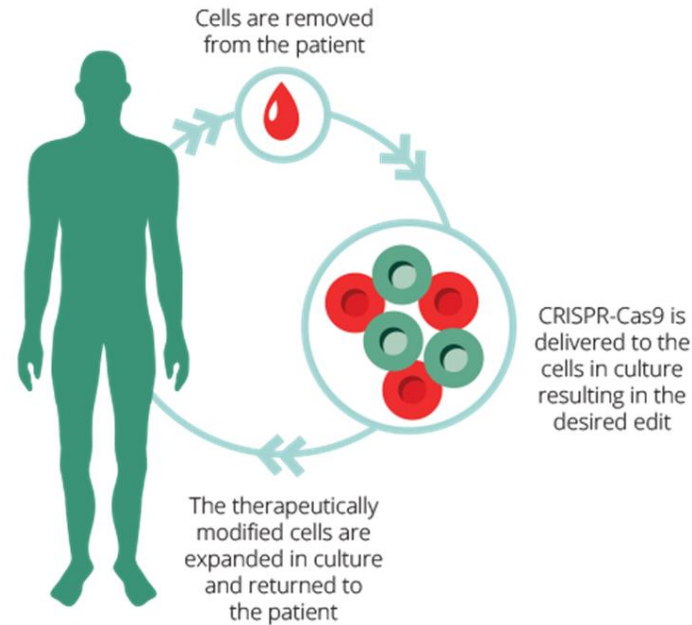
- Szabályozó elemek
- UTR-ek manipulálása
- Csonkolt fehérjék
- Kiméra fehérjék létrehozása
- Hibás gének javítása

→ GÉNTERÁPIA

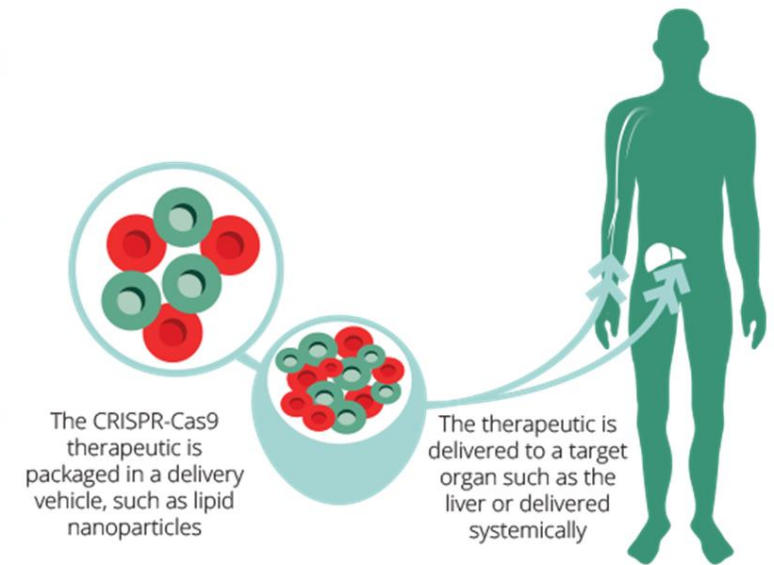
Genomszerkesztés gyakorlati alkalmazásai



Ex vivo



In vivo



Állattenyésztés, növénytermesztés, biotechnológia, gyógyászat
Egyelőre nincs engedélyezett eljárás!

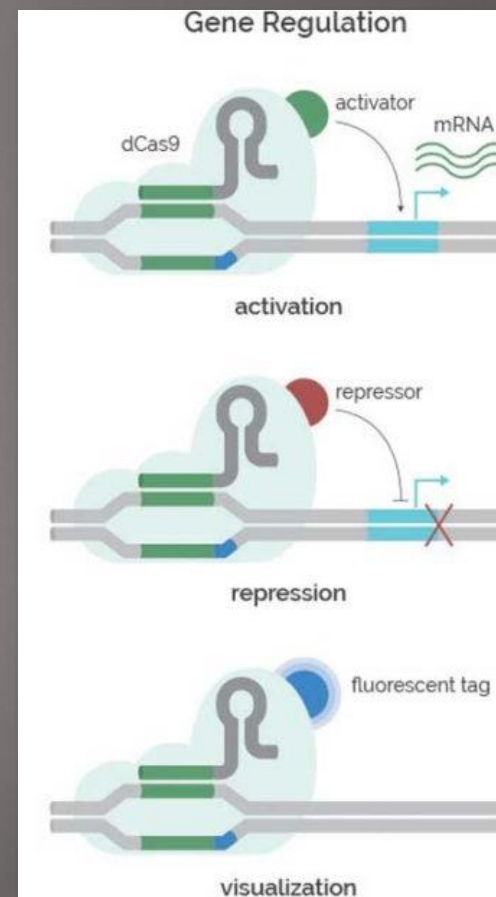
Genomszerkesztési módszerek módosítása

Módosított Cas9 (dead Cas9) fehérje: nem hasítja a DNS-t, de hozzákötődnek más fehérjék:

- Transzkripciós faktorok
- Szupresszorok
- Kromatin módosító fehérjék
- Jelmolekulák

A gRNS határozza meg, hogy a Cas9 kiméra fehérjék melyik genomi DNS-hez kötődjenek

Nem csak Cas9-cel, hanem ZFN és TALEN-nel is (nincs nukleáz funkció)



Összefoglalás

Az utóbbi néhány évben elért felfedezések forradalmasították a molekuláris genetikát

90-es évektől: **transzpozon alapú genomszerkesztés**: sok mindent meglehetősen egyszerűen lehet csinálni a transzpozon beépülés helyén

2005-től **Homológ rekombináción alapuló genomszerkesztés** egérben: kis hatékonyságú és bonyolult

2006-tól: **ZFN** , 2009-től **TALEN** hatékony genomszerkesztési módok, de megfelelő háttértudást igényelnek és drágák

2013-tól **CRISPR-Cas9** olcsó, hatékony és rutinszerűen végezhető genomszerkesztés

Publikációk száma
(PubMed)/év

