

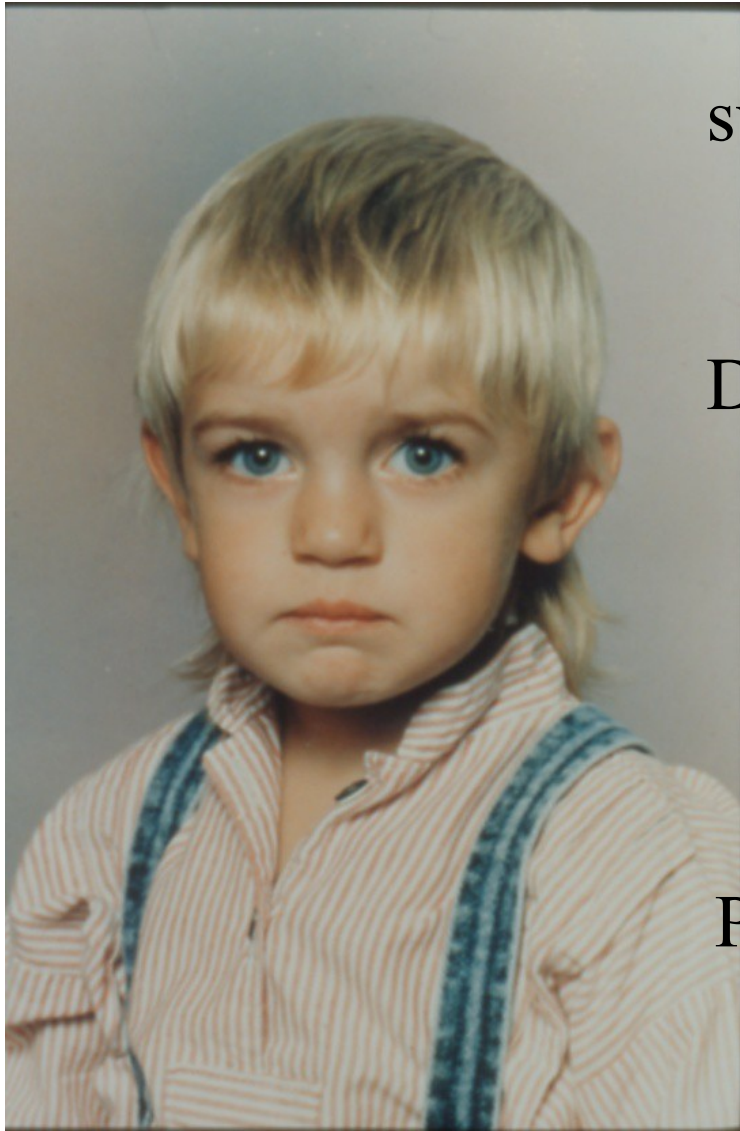
CRISPR/Cas9

Průlom v editaci genomu

Nejdůležitější vědecký objev roku
2015

Dr. Guenter Scheuerbrandt

“Science“, 18 December 2015



Tady je Christianovi 5 let. Má svalovou dystrofii Duchenne – DMD
-Duchenne muscular dystrophy

DMD jsem u něj zjistil, když mu byly 3 týdny z jeho CK screeningového testu.

Duchenne je dědičné onemocnění, které postihuje pouze chlapce. První příznaky se objevují ve věku 4 až 6 let.



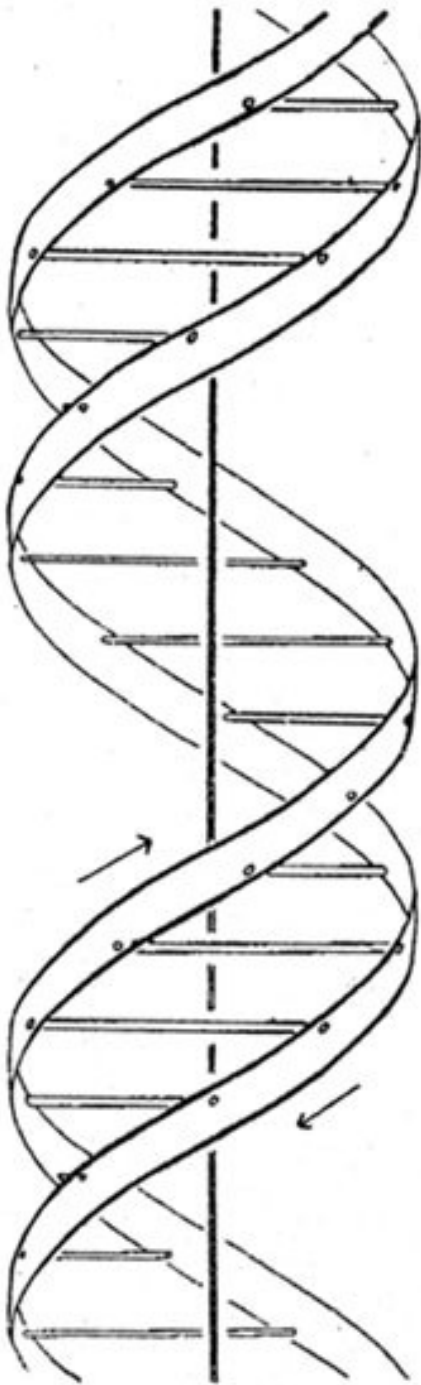
Přibližně okolo 12. roku již chlapci potřebují ke svému životu invalidní vozík, ale jinak můžou žít prakticky normální život a věnovat se svým koníčkům, jak je vidět na tomto obrázku z demonstrace za další výzkum DMD ve Washingtonu.

Děti s DMD se narodí bez příznaků onemocnění.

Ale v jednom z jejich největších genů z celkového počtu 20488 se nachází chyba. V jejich těle nedochází k výrobě nezbytně důležitého proteinu pro fungování svalů. A protože je toto dědičné onemocnění dosud nevyléčitelné, je tato diagnóza smrtelná. K srdečnímu nebo dechovému selhání dochází kolem 25. roku.

Přibližně 1 z 5 000 narozených chlapců má
Duchenne.

Dnes žije na celém světě přibližně 300,000 –
400,000 chlapců a mužů s DMD.



DMD je způsobena chybami v dystrofinovém genu.

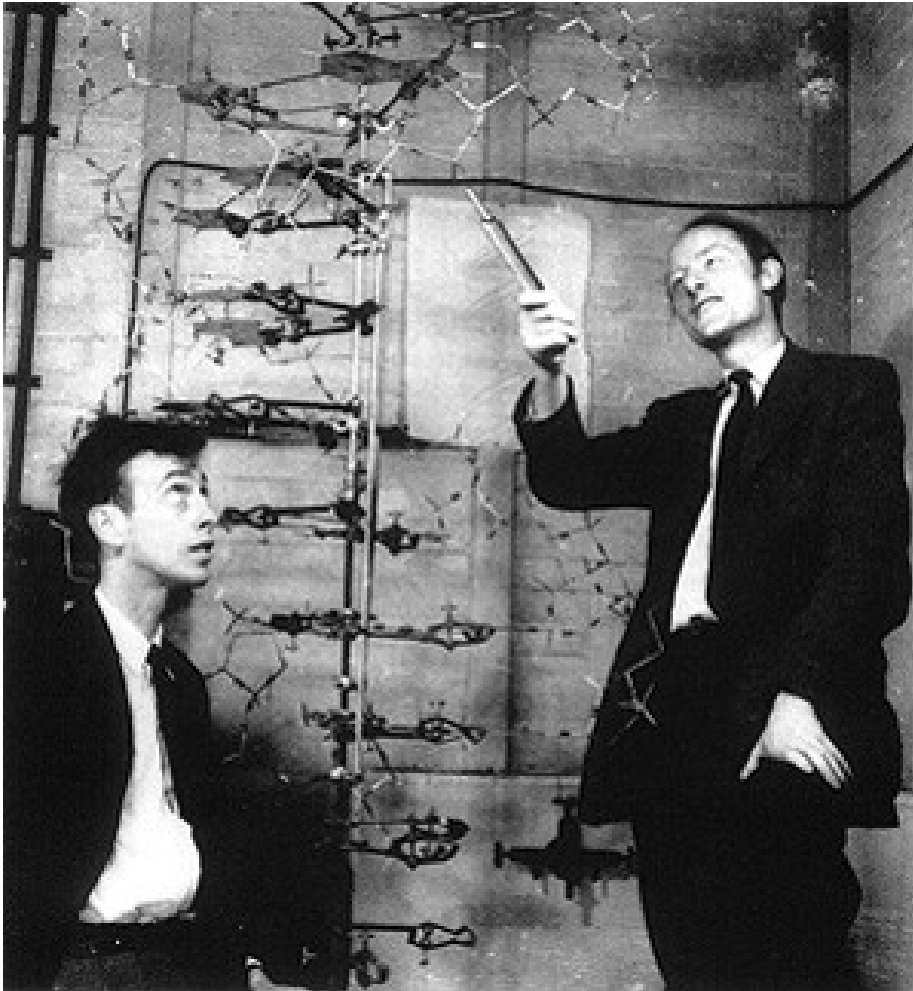
Geny jsou dlouhé úseky dvojšroubovice genetického materiálu.

Jednotlivé příčky žebříčku šroubovice jsou čtyři druhy bází - - písmena genetické abecedy.

Písmena jsou chemické látky, jejichž jména jsou ve zkratce A, G, C a T (nebo U).

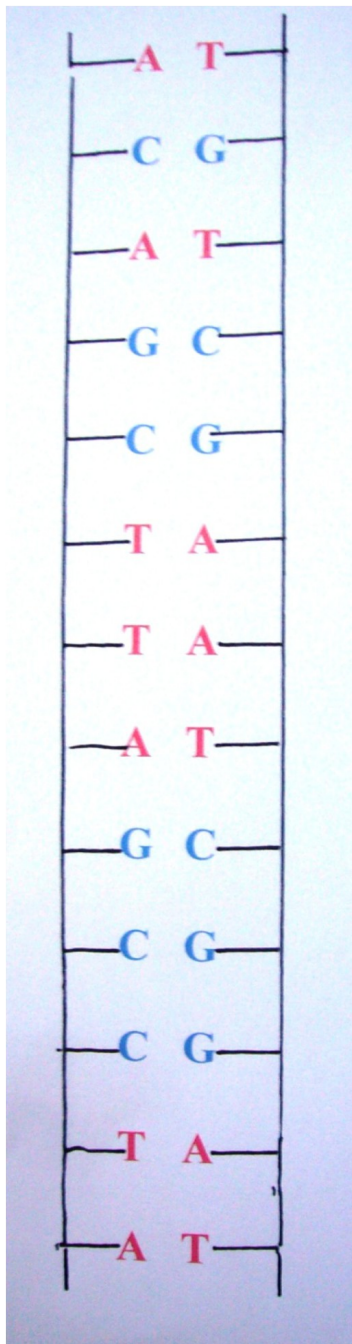
Gen obsahuje informace pro výrobu proteinu dystrofinu, který stabilizuje svaly.

Gen pro dystrofin je největší z našich 20,488 genů a obsahuje 2.220.223 genetických písmen



V roce 1953 správně popsali dvoušroubovicovou strukturu DNA James Watson a Francis Crick v časopise Nature a sestavili její model.

Chemický název dvojité šroubovice je deoxyribonukleová kyselina, zkráceně DNA.



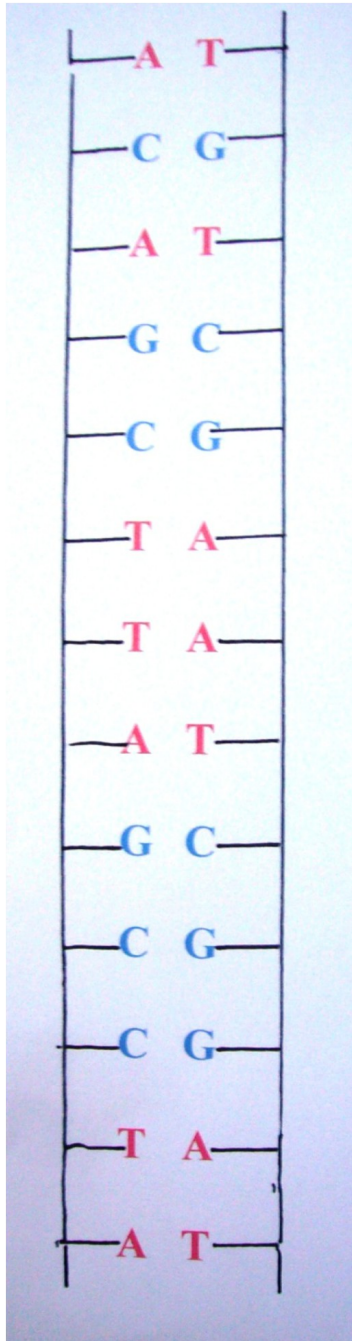
Jednou z nejdůležitějších vlastností
dvojité šroubovice je
"Watson-Crick" vazba obou řetězců.

Zde je , krátká část šroubovice
rozprostřená jako žebřík.
Strany drží pohromadě příčky, které se
vždy skládají z
dvou různých párů bází:

A-T nebo T-A

a

G-C nebo C-G



Co znamenají
4 genetická písmena?

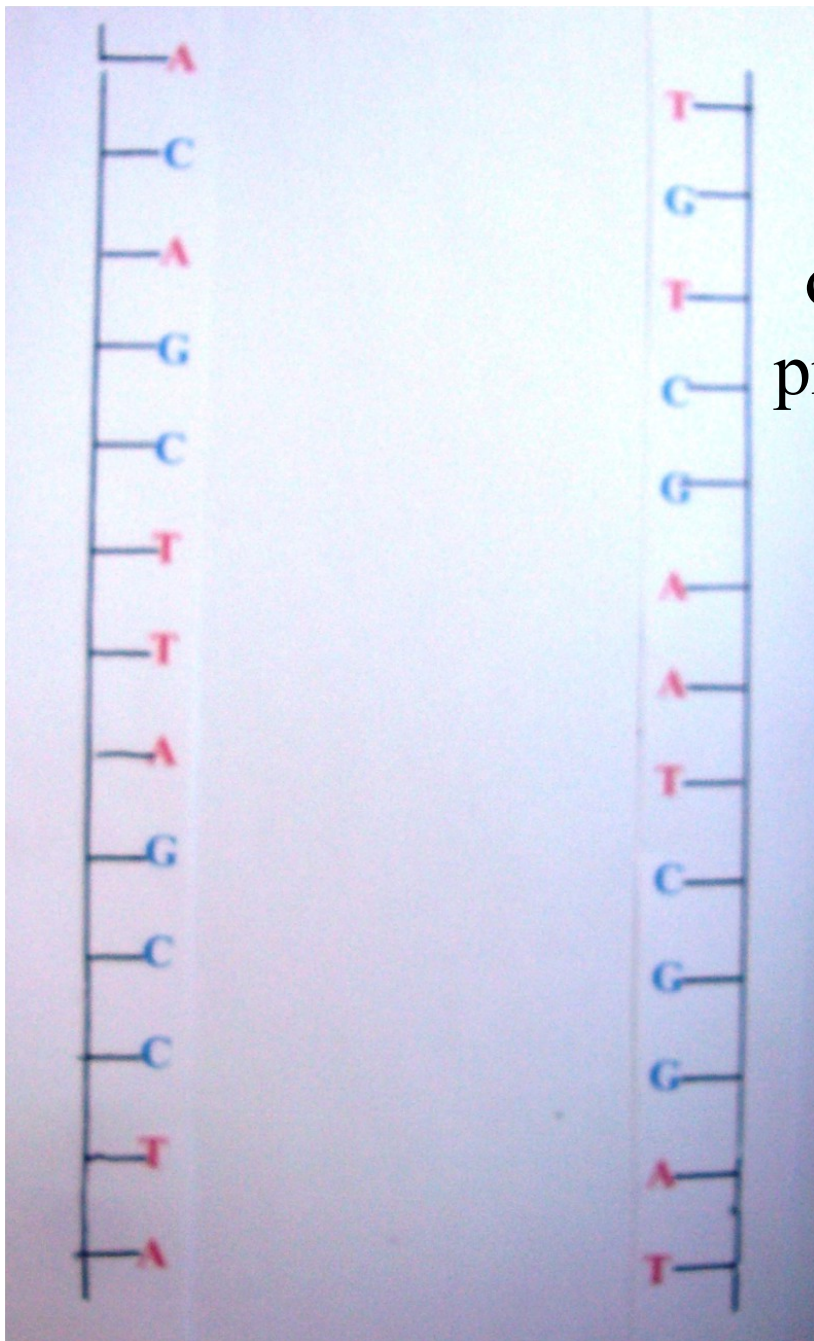
A = Adenine

T = Thymine

G = Guanine

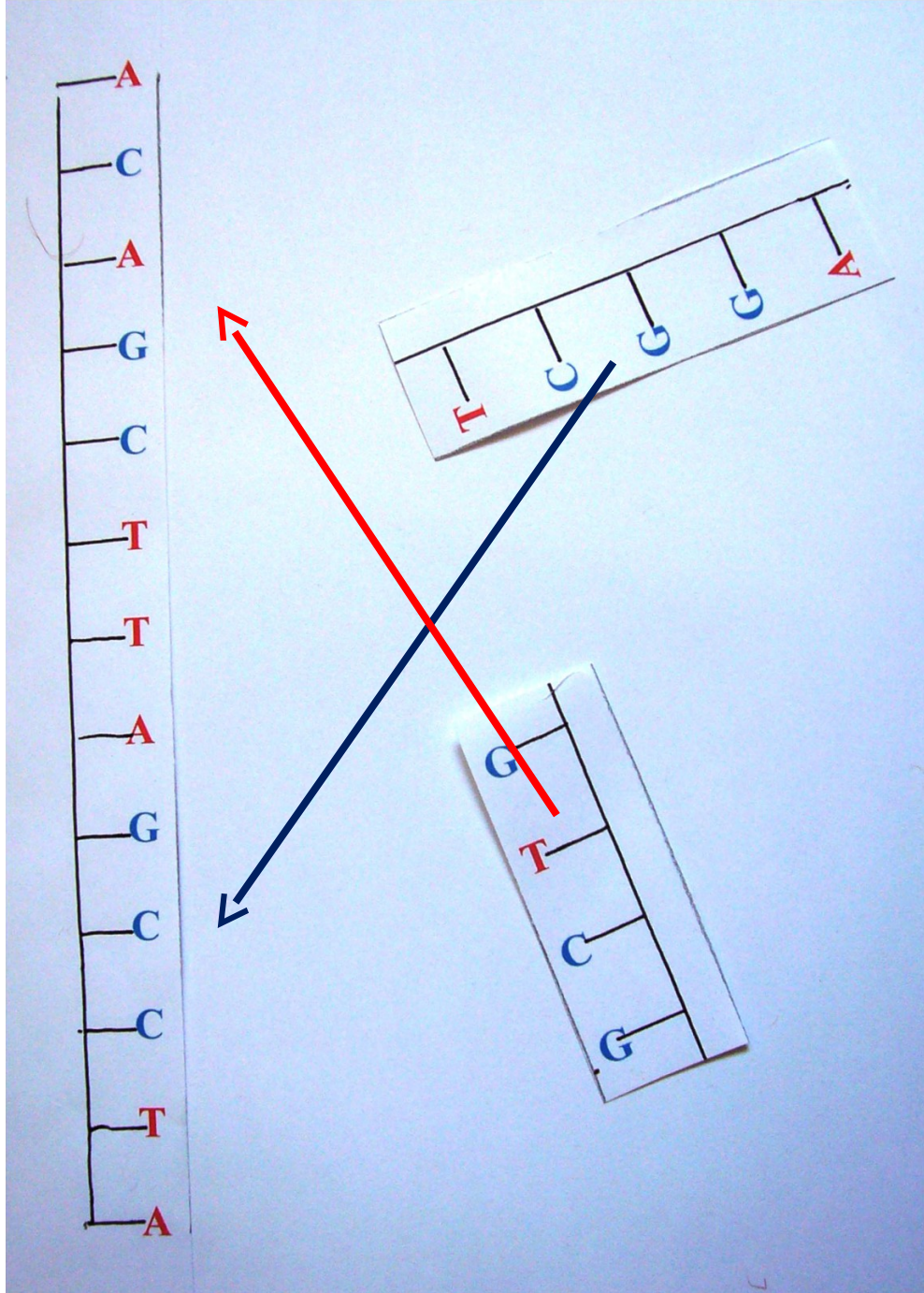
C = Cytosine

Jsou to chemické látky, základny, které přesně
zapadají mezi strany žebříku



Řada písmen
z párů bází,
obsahuje genetickou informaci
pro funkci živé buňky. To je také
dědičné.

Tyto strany lze oddělit,
takže informace
lze číst nebo měnit.



Při párování bází se přesune sekvence bází na určité místo DNA a tam se připojí podle Watson-Crickovského párování..

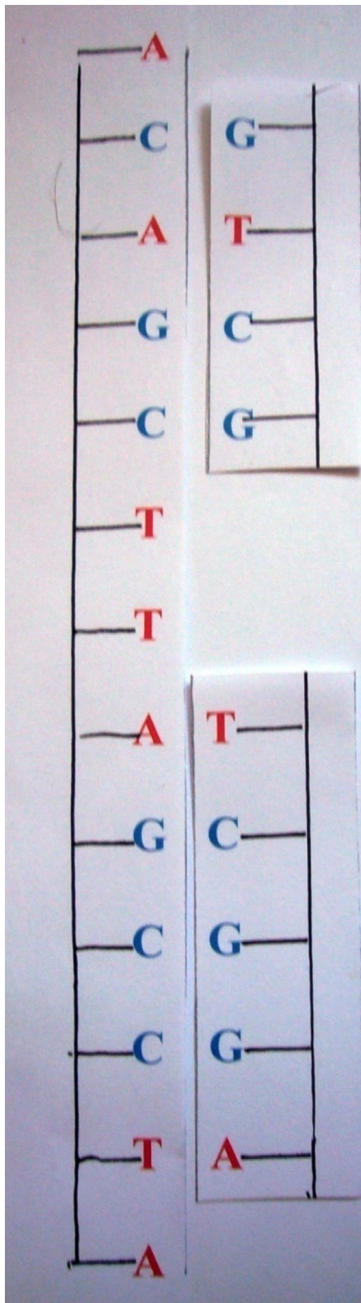
Zde jsou dvě sekvence na požadovaných místech v DNA.

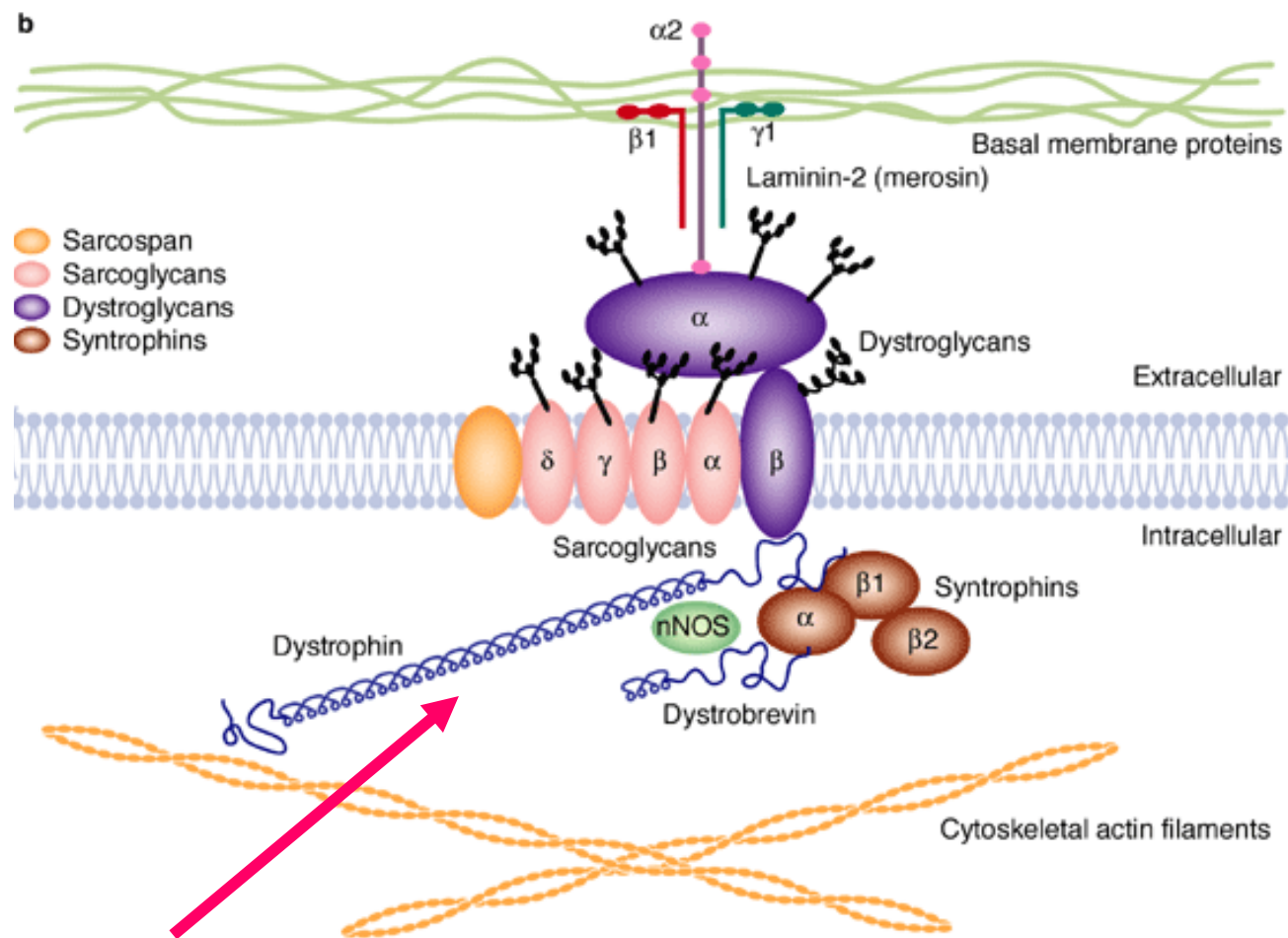
Sekvence jsou *komplementární*:

A se vždy váže na T,
a G na C, (nebo naopak).

Funguje to jako zip se 4 různými zuby.

Toto hledání a nalézání
je velmi specifické a hraje
Klíčovou roli pro metodu CRISPR





Dystrofin, jehož mutace způsobuje DMD, je součástí komplexu mnoha proteinů v membránách svalových buněk.

Stabilizuje svalové membrány během kontrakce svalů a funguje jako tlumič nárazů.

Chcete-li získat představu o skutečných rozměrech :

Dystrofinový gen se svými 2,2 miliony genetických písmen je 0,75 mm dlouhý, pokud jej natáhnete.

Zatočený dohromady se vejde do
buněčného jádra o průměru 0,01 mm.

Molekula dystrofinu je velká 0.000125 mm.

8,000 molekul dystrofinu se vejde do 1 mm.

Jeden gram svalové tkáně
obsahuje 114 miliard dystrofinových molekul.

Více než 20 let hledají vědci možné terapie léčby:
Exon skipping – tato metoda by mohla zpomalit
degeneraci svalů.

Zde je krátké shrnutí:

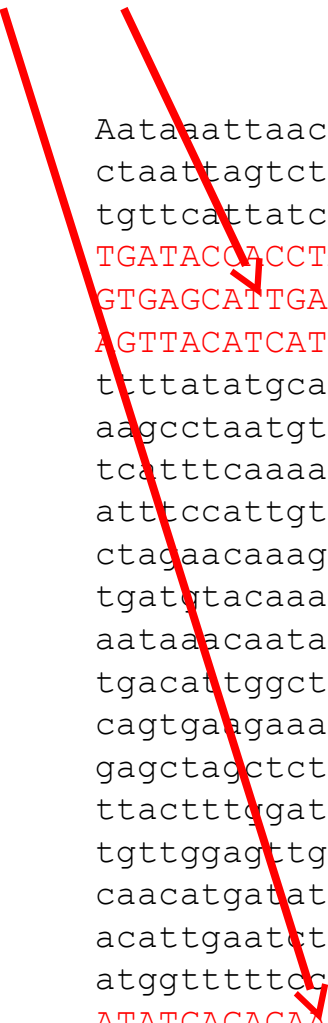
Z 2,2 milionu genetických písmen dystrofinového genu, se
používá jen 11,000
pro biosyntézu proteinu dystrofin.

Ty jsou seskupeny do 79 aktivních sekvencí takzvaných
exonů.

Část základní sekvence genu pro dystrofin

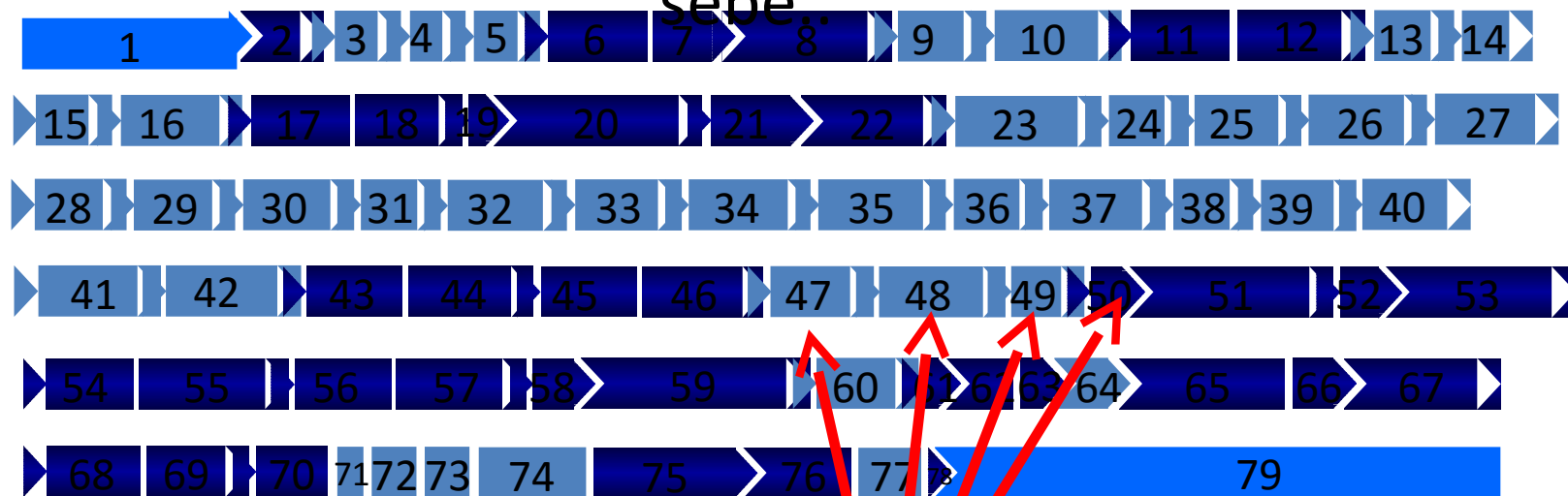
Dva exony

Mezi exony jsou introny, které nevyrábí proteiny a jsou často mnohem delší než exony.



```
Aataaattaactttactgctcatctcattgggtctgccaaattggaaagacatttttaggcctcatttctcatggt  
ctaattagtctcttgaggacattcatggacaattcactgttcattaatctatcgtcttcctttaactttgatt  
tgttcattatccttttagagtctcaaatatagaaacaaaaaattgatgtgtagtttaatgtgcttacagATGT  
TGATACCACTATCCAGATAAGAAGTCCATCTTAATGTACATCACATCACTCTTCCAAGTTTTGCCTCAACAA  
GTGAGCATTGAAGCCATCCAGGAAGTGGAAATGTTGCCAAGGCCACCTAAAGTGAATAAAGAAGAACATTTTC  
AGTTACATCATCAAATGCACTATTCTCAACAGgt aagtgtgtaaaggacagctactattcaagatgttttctg  
ttttatatgcatttttaggtattacgtgcacatatatatataacttatatgtatatacacgtgtatatataca  
aagcctaattgtatgtatatgtacaaaaagagacagactaaaccttttcaattttgcttcattgactacaatat  
tcattttcaaaacatattttaaaaaatactattcatatgtaccatatcataggaatatagaacataatatattaa  
atttccatttgtgtaacacacaatgaaatgaaaggcaaacttacgtacatatataaactctaaaatcttcatcaa  
ctagaacaaagagctagagaaagattaaaggcaaatacagtttttaattcattaaaaaatactttatgacaata  
tgatgtacaaagtcagattttgattattcaggataacaattttgaaaatagaaaagtgttttaaactatttca  
aataaacaataaagaaaaacattgatgaaattcttcgttacataattgtatagaatttagtgggggtcttcca  
tgacattggcttggttcttctctcaacagtggggtgggttggttgatgttttcttatgctttctcaggcacaacaa  
cagtgaagaaaccttttagcaacatttctgctgaatgtgtggagagctcttaggccaaactctctcactttgct  
gagctagctctgtattagcttatgaaattttttagtcctttccagggtatggacctgatgaattctgtttttat  
ttacttttgatttagagaaaattgcttatggatgcctgtttttgccggattgaagagtaccatcccatataaa  
tgttggagttgtgttactttggaatcctcatggctaaatagcatgctcatatcttcccagatcatttactctc  
caacatgatattaagtgccttcattctgggagtataccaatttcgaatatcatttatatatgttttagtattaa  
acattgaatctcaccatttccatttaattgttctgttttctaccatgttggaaagtagtcctttcgggttactt  
atgggtttttccctcctctctatccactcccccaaacccttctctgcagATCACGGTCAGTCTAGCACAGGG  
ATATGAGAGAACTTCTTCCCCTAAGCCTCGATTCAAGAGCTATGCCTACACACAGGCTGCTTATGTCACCACC  
TCTGACCCTACACGGAGCCCATTTCCTTCACAGgtctgtcaacatttactctctgttgtacaaaccagagAAC  
tgcttccaagataatctaactgcttttacttgcttgaatttttcagtgcccttttatctcctcgtgaagagc  
tggtttgtttttccaagttttattgattccctcatgtgattctgctttgttattgagtcttctctaggtttac
```

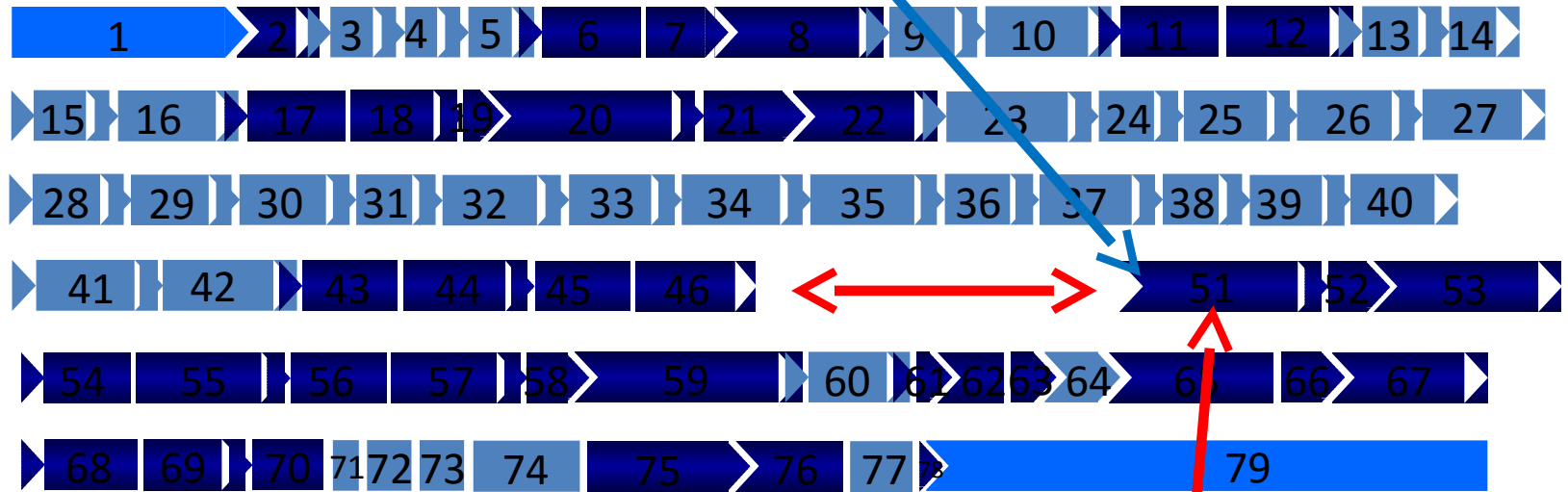
Okraje všech 79 exonů normálního
dystrofinového genu přesně zapadají do
sebe.



— 100 nt

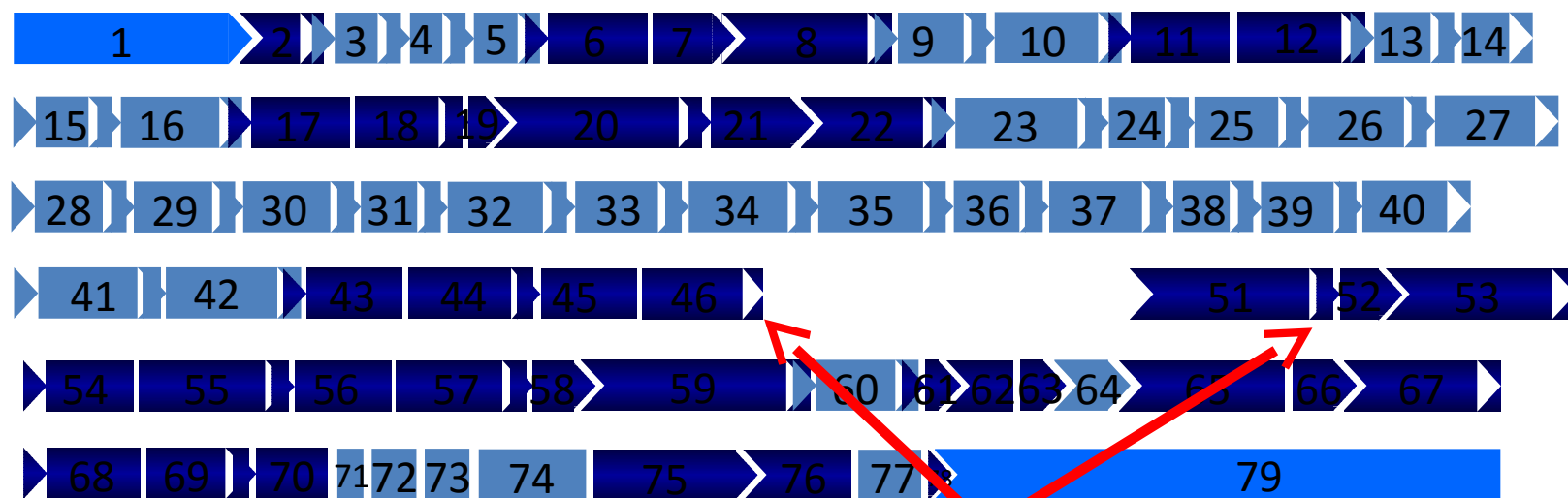
Pokud 4 exony 47, 48, 49 a
50 chybí jedná se o
mutaci.....

Zastavení v exonu 51



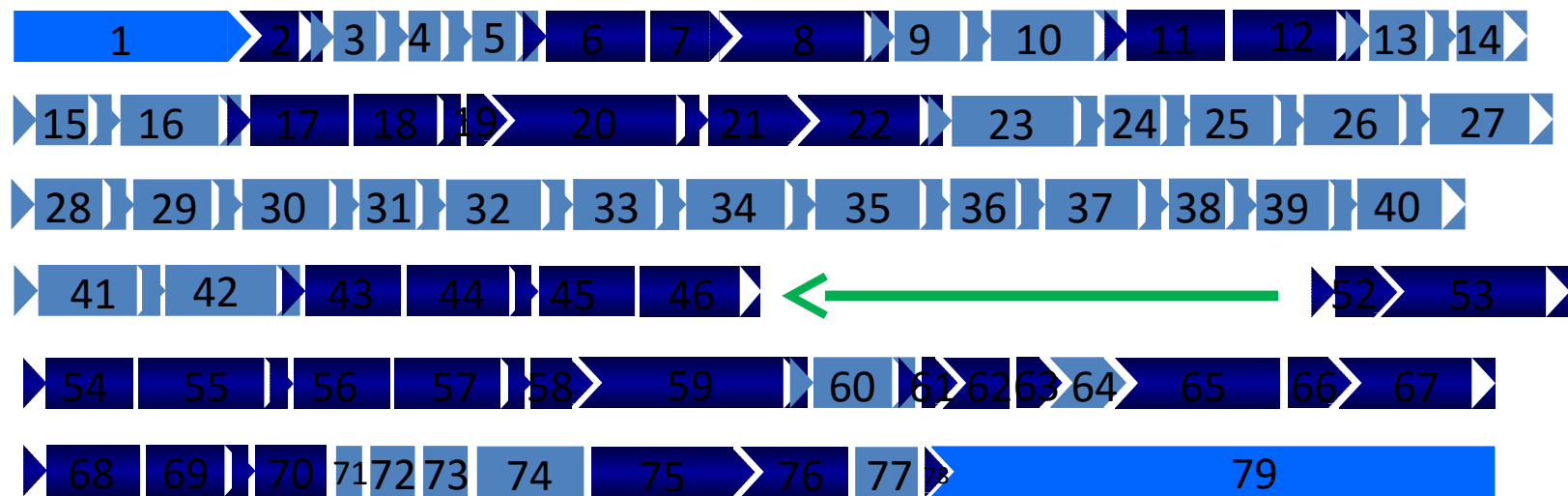
— 100 nt

.. pak exony 46 a 51 do sebe nezapadají a dítě má DMD, objeví se STOP pro čtení kódu v exonu 51. Chceme-li obnovit čtení, musíme vynechat exon 51, aby mohla pokračovat biosyntéza dystrofinu.



— 100 nt

Levá část konce exonu 52 bude pasovat do
pravého konce exonu 46.



Pak se ^{100 nt}neobjeví žádná značka STOP a dojde k výrobě dystrofinu, který bude kratší než je obvyklé.

To způsobí převrácení DMD na mírnější formu onemocnění
Beckerovu dystrofii.

Z tohoto důvodu exon skipping není lék, ale léčba, která by
měla pouze zpomalit průběh onemocnění.

Lék, který může přeskočit exon 51 je antisense-oligoribonukleotid (AON) se sekvencí 20 genetických znaků. Ta se připojí na komplementární sekvenci v exonu 51 s použitím Watson-Crick (WC) párování a zablokuje celý exon. Ten je pak vynechán a není využíván pro syntézu dystrofínu.

Zde jsou dvě sekvence (místo T se používá U).

UCUUUACGGUAGAAGGAACU
AGAAAUGCCAUCUUCCUUGA

Modrá sekvence je lék Kyndrisa (Drisapersen). Ten se skládá z 700 atomů. Červená sekvence je komplementární sekvence v exonu 51.

A je vždy naproti U, a G naproti C.

Přeskočení exonu 51 by pomohlo 13% všech pacientů s DMD.

80% všech pacientů s DMD by potřebovalo přeskočení jiných exonů

K prokázání účinnosti exon skippingu 51 bylo od roku 2004 provedeno mnoho klinických studií.

Konečně v letech 2013/14 velká farmaceutická společnost Glaxo-Smith-Kline provedla rozhodující III. dvojitě zaslepenou fázi s 186 pacienty ve 42 zemích, která trvala 1 rok.

Bohužel výsledky léčené skupiny v porovnání se skupinou s placebem nebyly dostatečně významné.

Proto FDA

Oznámila dne 14. ledna 2016, že:

„...výzkum není připraven ke schválení v jeho současné podobě. “

To znamená, že mnoho chlapců s DMD, se této léčby nedočká.

A nyní k druhé části prezentace:

Vědecký časopis Science vyhlásil
vědeckým průlomem roku techniku
CRISPR / Cas9 . Tato technika, by mohla
vyléčit
DMD v blízké budoucnosti.

Nejvýznamnější vědci zabývající se touto
technikou
jsou dvě dámy a jeden muž.



Emmanuelle Charpentier z Max-Planck-Institutu v Berlíně a Jennifer Doudna z University of California v Berkeley. Každá z nich dostala Cenu od skupiny miliardářů v hodnotě 3 mil. dolarů v listopadu 2015.

A 14. března 2016 dostanou cenu Paul-Ehrlicha ve Frankfurtu nad Mohanem v hodnotě 100.000 Euro.



Dr. Feng Zhang z Harvard Broad Institute a MIT v Cambridge, pracoval na rozdíl od předchozích týmů s celými buňkami.

Z tohoto důvodu Dr. Zhang dostal patent na CRISPR / Cas9.

Ohledně prvenství jsou tam nyní velké diskuze.

CRISPR je zkratka pro *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* - enzymatický komplex, který se dokáže navázat na vybrané místo v DNA, vystřihne kus sekvence a nahradí ji jinou.
Nikdo to neumí nazpaměť!

CRISPR-DNA-sekvence s enzymem Cas9 byl objeven bakteriích, které je využívají k obraně proti virům.

Dělají to „přestřižením“ obou pramenů virové DNA na kousky.

V roce 2012 se Jennifer a později i Emmanuelle a Feng rozhodli použít tento důmyslný způsob a použili ho na šroubovici DNA k jejímu rozstřížení ve zcela přesně definovaných místech.

Pak připojili sekvenci nukleové kyseliny na CRISPR protein, který přesně zapadá do genové sekvence, která má být vyříznuta.

CRISPR potom vyhledá tuto sekvenci a provede stříh uprostřed 3 miliard genetických písmen všech chromozomů a vloží tam Cas9 s kusy DNA.

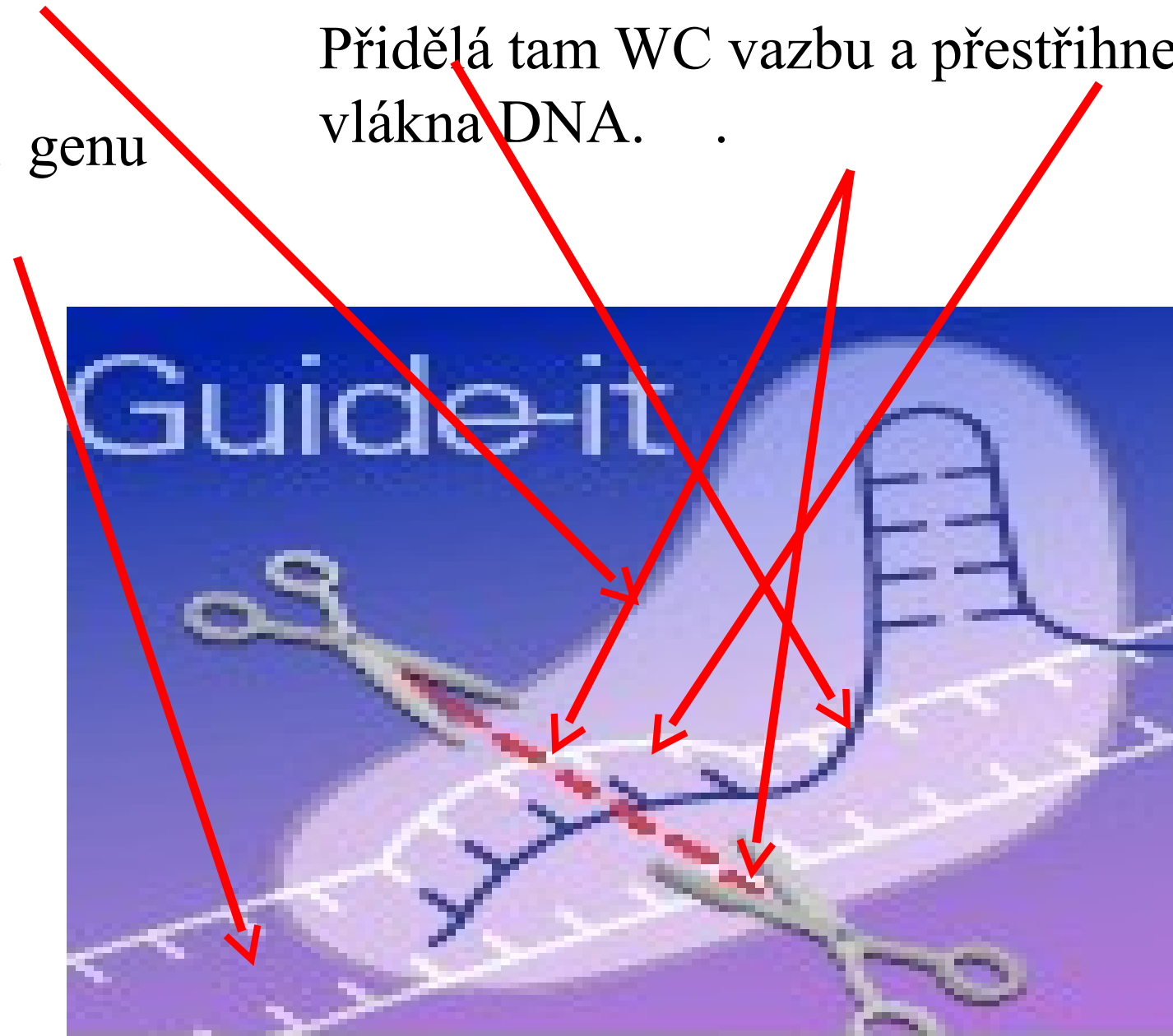
Další snímek ukazuje zjednodušeně jak se to dělá.

Protein Crispru

Vodící RNA, která hledá místo v genu pro
střih

Přidělá tam WC vazbu a přestřihne obě
vlákna DNA.

DNA genu

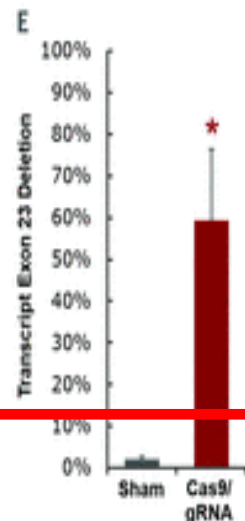
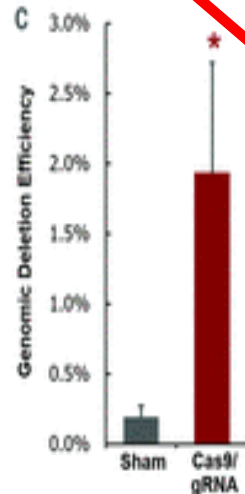
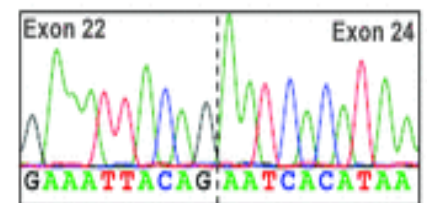
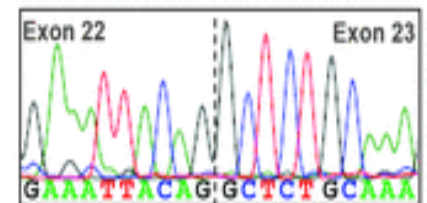
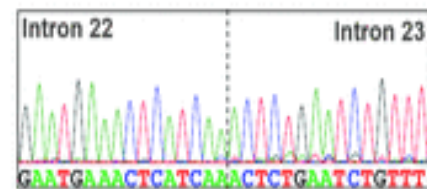
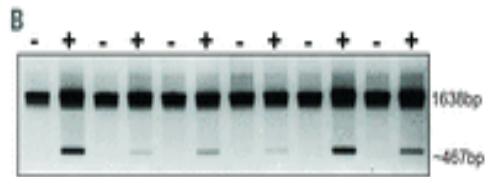
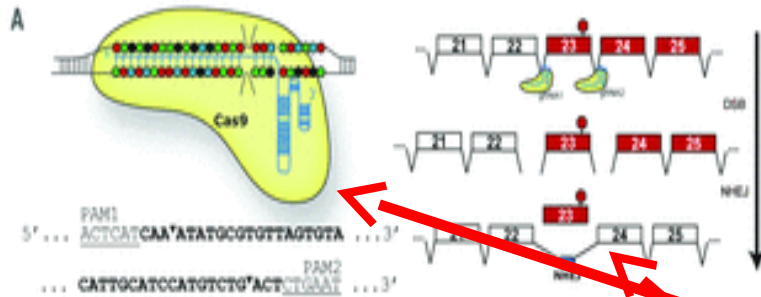


Cílem CRISPR techniky (genových nůžek) je opravit DNA s mutacemi, s chybami, které způsobují dědičná onemocnění.

DMD bylo jedno z prvních onemocnění, na které byla tato technika vyzkoušena a popsána 22. ledna 2016 v časopise Science.

Práci týmu Charlese Gersbacha jsem popisoval na Duke University v Durhamu v Severní Karolíně.

Zpočátku se tato technika zkoušela na modelu mdx myši, která má také DMD. U tohoto malého zvířete musí být odstraněn exon 23, aby došlo k obnově výroby dystrofínu. Pomocí adenovirů byl přenesen do svalů myši systém CRISPR / Cas9 a odstříhnul DNA napravo a nalevo od exonu 23 a opravený systém opět spojoval dva konce DNA.



Na těchto obrazcích vidíte ,
že exon 23
byl opravdu vystřižnuto:

Oba použité CRISPRy se
svými vodícími sekvencemi

Řada exonů se stříhem
exonu 23

a důkaz
že u myši
exon 24 navazuje
Přímo na exon 22

Tady je jedna z mdx myší, která byla ošetřena pomocí systému CRISPR.

Gustav běhal velmi pomalu před zahájením léčby.



A po ošetření může běhat mnohem rychleji a jeho jeho problémy se srdcem také zmizely.

Takto bylo prokázáno, že nová technika dokáže skutečně vyléčit dědičné onemocnění.

Ale v současné době lze použít pouze na malé zvíře.

Dítě je mnohem větší.

Přenos CRISPR systému s jeho Cas9 proteiny do svalů dítěte vyžaduje vývoj nové techniku.

Vývoj pro člověka je teprve na začátku.

Proto bude ještě několik let trvat výzkum této techniky než bude použitelná pro léčbu DMD.

.

Proto je třeba, aby vývoj exon skipping léků i všech dalších terapií pokračoval .

Na závěr něco důležitého:

Exon skipping nezmění gen sám o sobě, pouze část jeho informací. Takže účinek této léčby neovlivní dědičnou informaci.

Ale CRISPR technika dokáže gen změnit a proto i účinky této léčby budou dědičné.

Diskuse o této nadějně technice jsou intenzivní.

Použití by mělo být přísně kontrolováno.

Co může CRISPR ovlivnit?

Mnohé ze vzácných dědičných chorob budou léčitelné, pokud budeme znát jejich podrobné genetické příčiny.

Můžou být zničeny celé populace škodlivého hmyzu, které přenáší nakžlivé nemoci.

Například: Komáři rodu *Anopheles* a s nimi i malárie.

To bylo 20 let výzkumu zaměřeného na
DMD zkrácených na 45 minut!

Děkuji Vám
Za Vaši
pozornost