

Nové přístupy v modifikaci funkce genů: CRISPR/Cas9 systém



Lesk a bída GM plodin



Lesk a bída GM plodin



Problémy konstrukce
GM plodin:

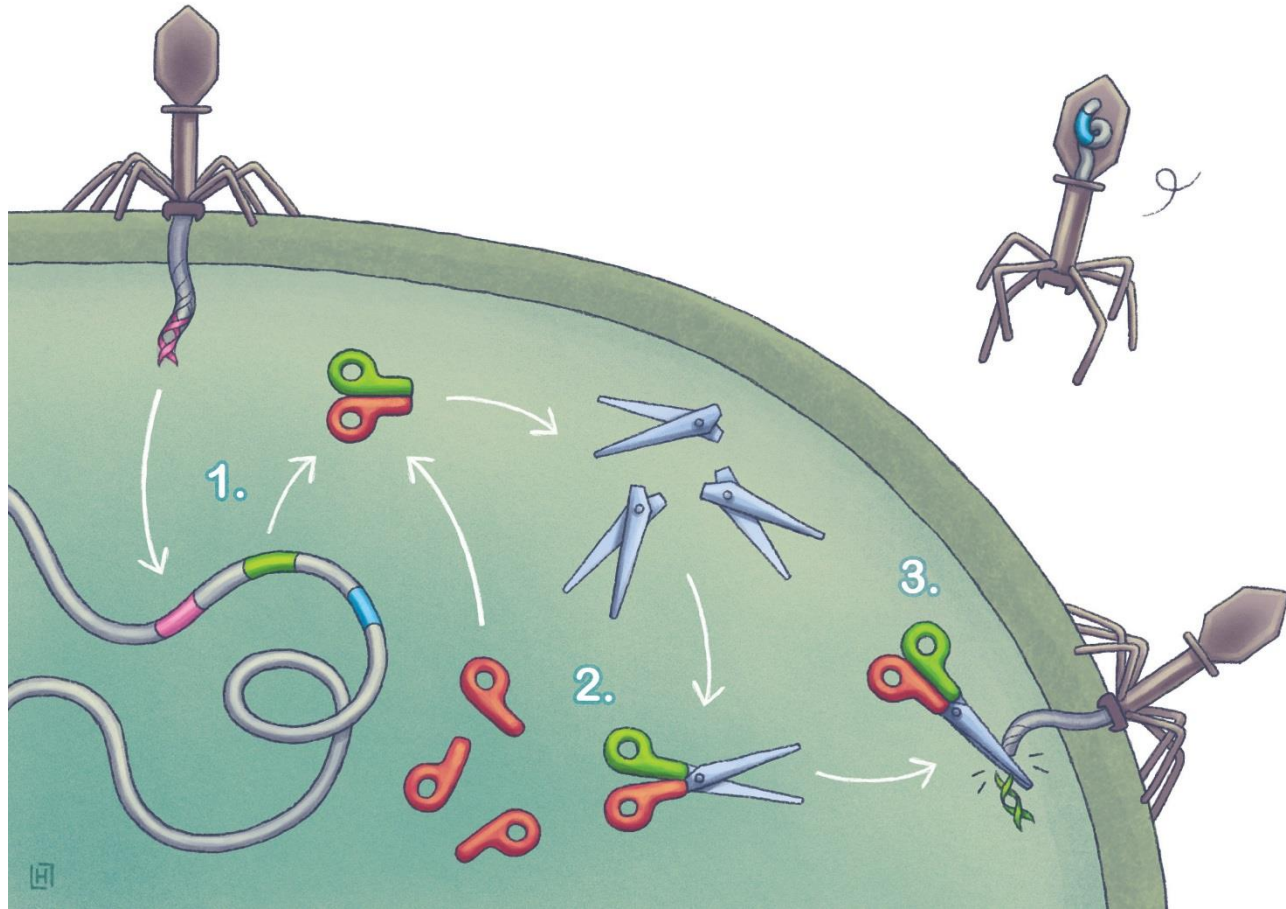
1) nízká efektivita

2) náhodnost integrace
transgenu

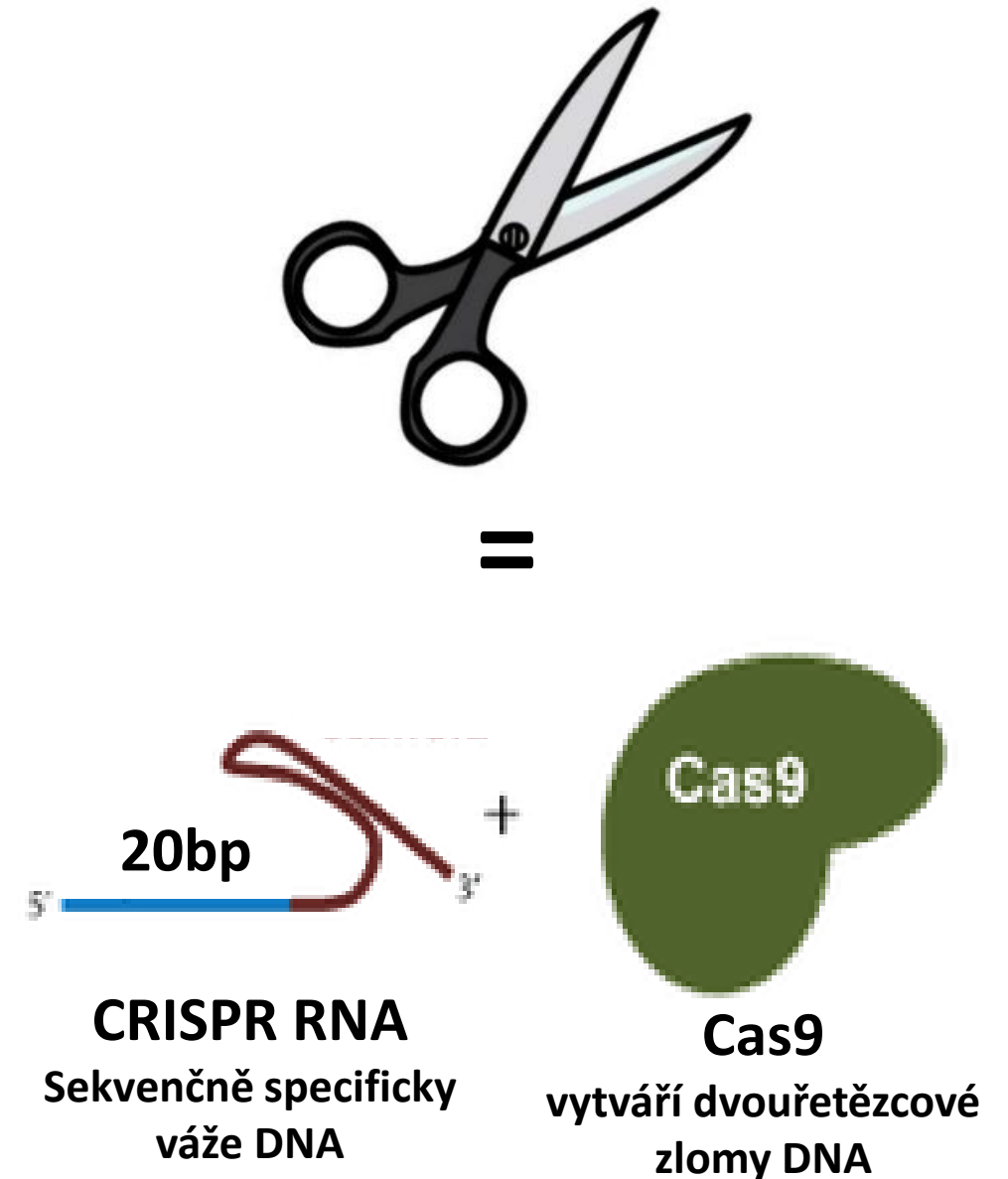
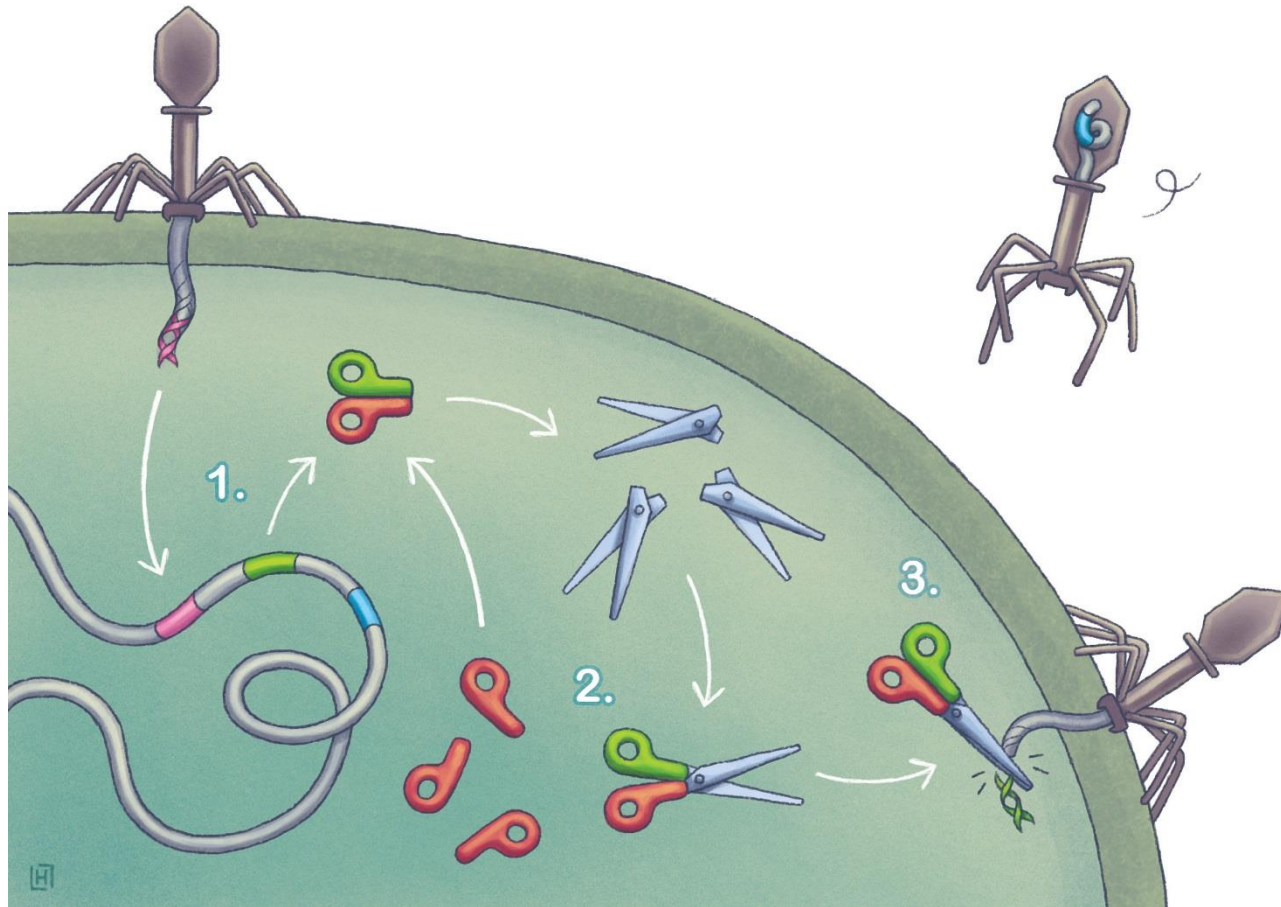
3) legislativa



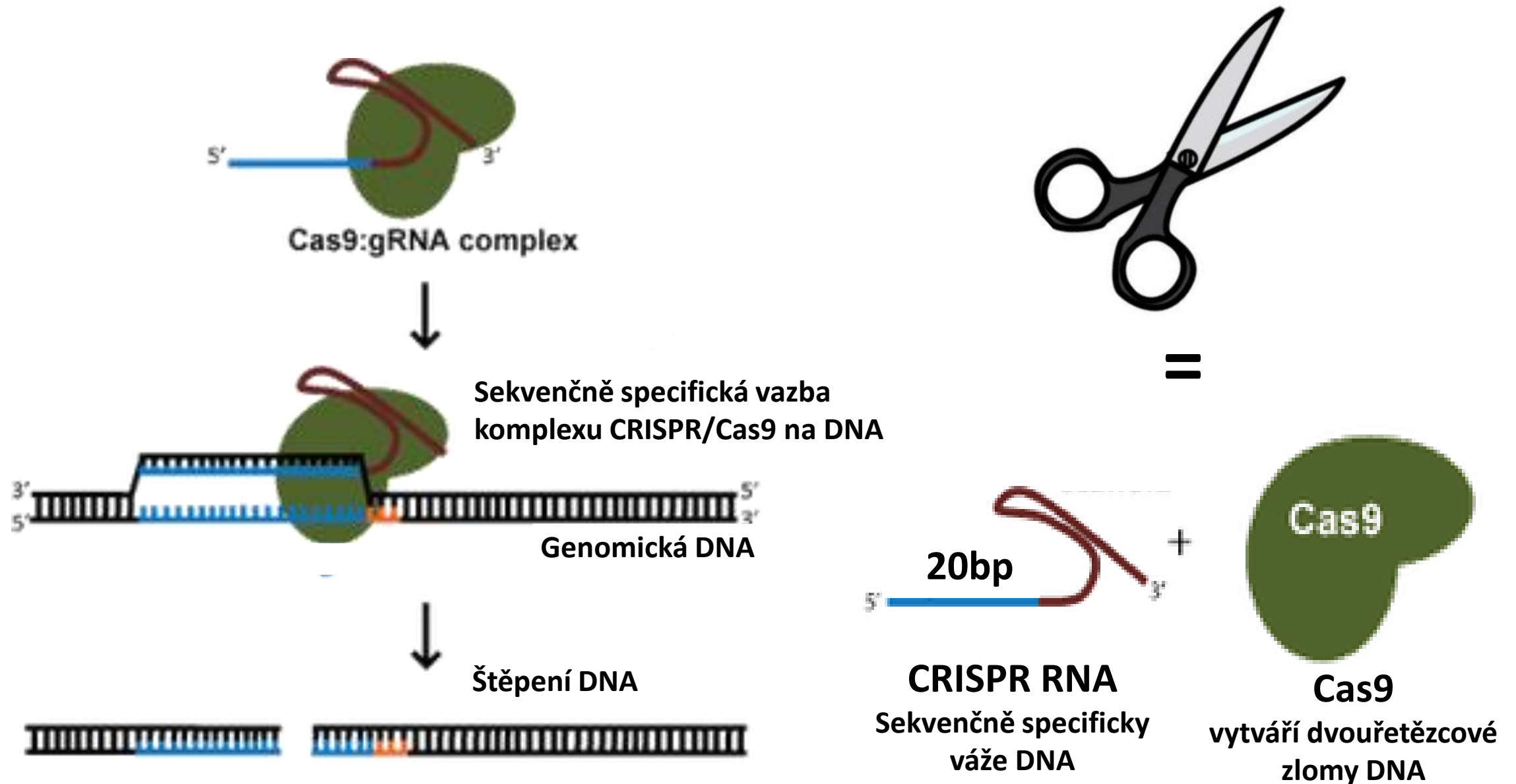
CRISPR/Cas9 nukleáza - "molekulární nůžky"



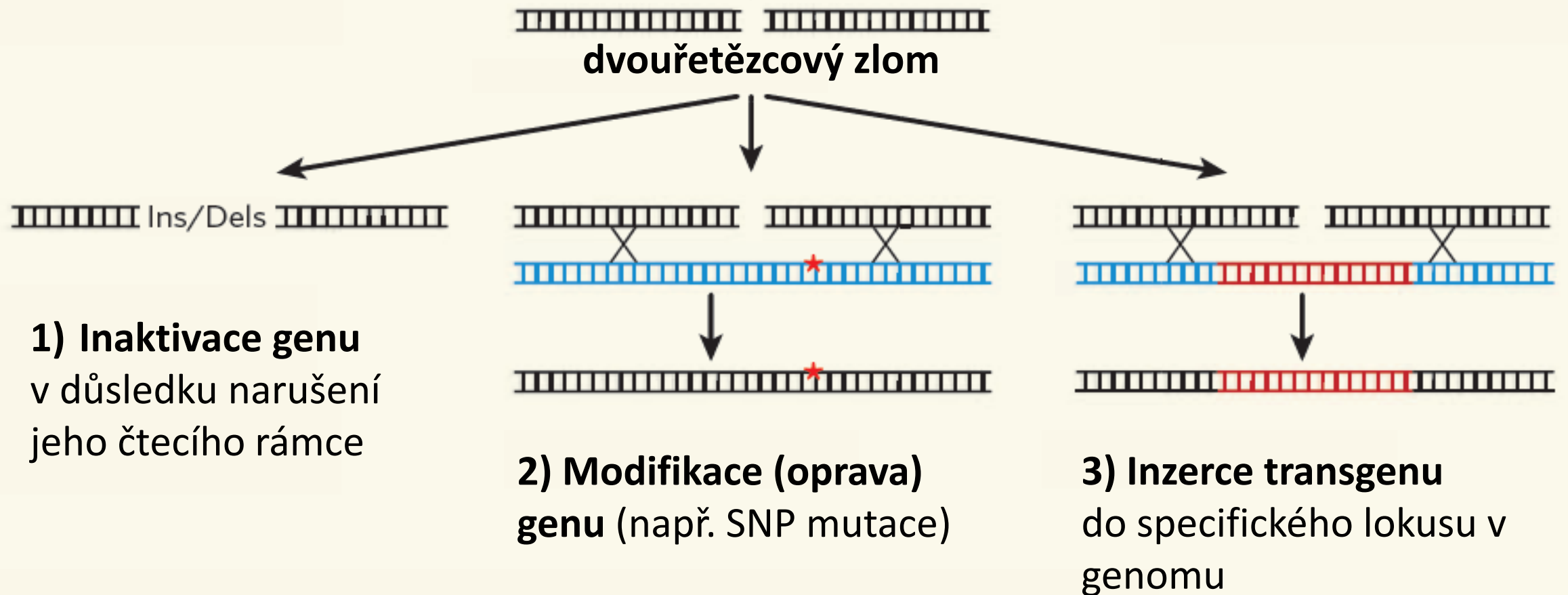
CRISPR/Cas9 nukleáza - "molekulární nůžky"



CRISPR/Cas9 nukleáza - "molekulární nůžky"

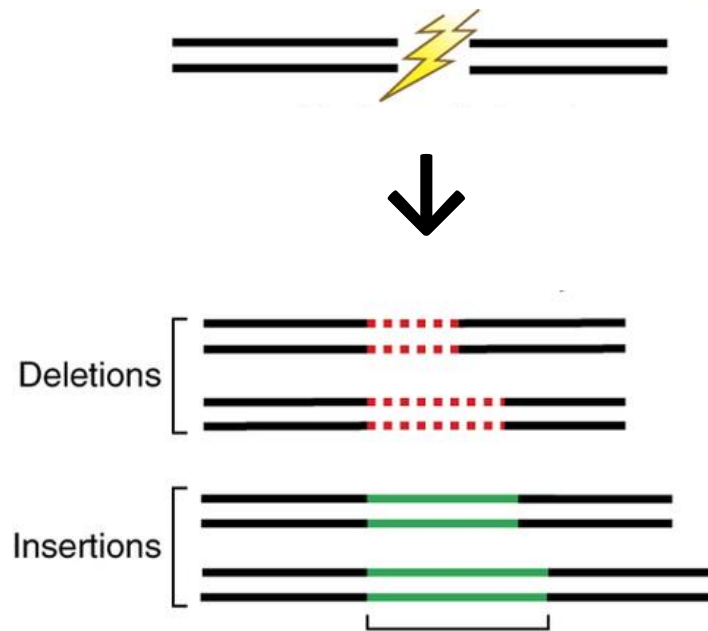


Cílená editace genomu rostlin



Inaktivace genu

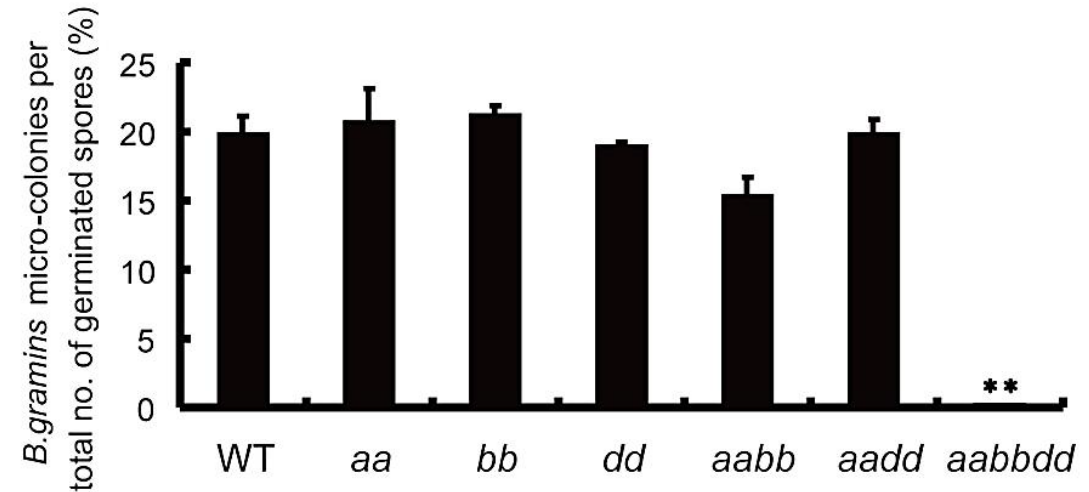
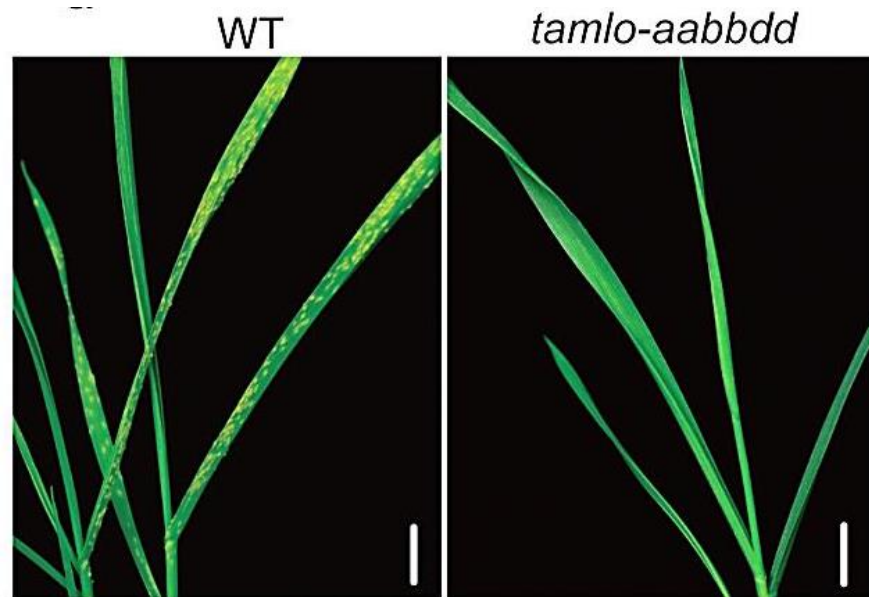
Posun čtecího rámce v důsledku vzniku krátké inserce/delece v místě štěpení DNA



WT	AAAAAGACGTACG AGACACCGGGGCTAAGGAAATGG TACAATTTGTGGGTGCTAGA
29.1-4	AAAAAGAC A TACGAGACACCGG-----AAATGGT G CAATTTGTGGGTGCTAGA
29.1-7	AAAAAGACGTACGAGACACCGGGG-----AAATGGTACAATTTGTGGGTGCTAGA
26.2-1	AAAAAGACGTACGAGACACCGGGG-----AAATGGTACAATTTGTGGGTGCTAGA
26.2-1	AAAAAGACGTACGAGACACCGGGGCTAA--AAATGGTACAATTTGTGGGTGCTAGA
26.2-1	AAAAAGACGTACGAGACACCGGGGCTA-----GGTGCTAGA
17.2-12	AAAAAGAC A TACGAGACACCGGGG-----AAATGGT G CAATTTGTGGGTGCTAGA
11.3-3	AAAAAGACGTACGAGACACCGGGG-----AAATGGTACAATTTGTGGGTGCTAGA
4.4-1	AAAAAGACGTACGAGACACCGG-----AAATGGTACAATTTGTGGGTGCTAGA
17.2-5	AAAAAGACGTACGAGACACCGGG-----AAATGGTACAATTTGTGGGTGCTAGA
17.2-5	AAAAAGACGTACGAGACA-----GAATGGTACAATTTGTGGGTGCTAGA

Využití CRISPR/Cas9 pro tvorbu rezistentní pšenice

Mutace všech 6 alel *MLO* (MILDREW RESISTANCE LOCUS) u pšenice vede k rezistenci k patogenu *Blumeria graminis* (padlí travní).



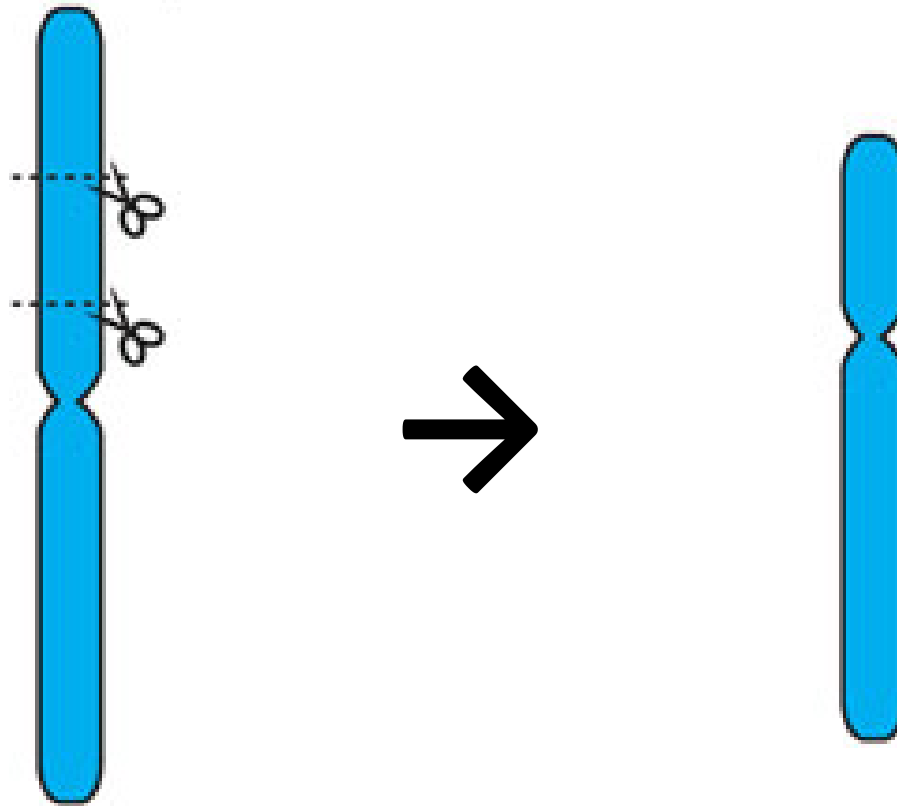
nature
biotechnology

LETTERS

Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew

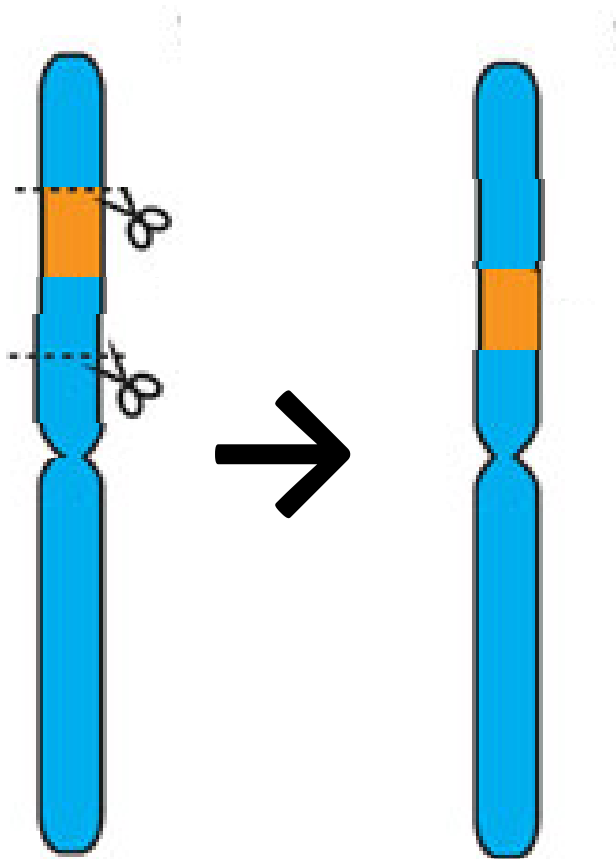
Yanpeng Wang^{1,3}, Xi Cheng^{2,3}, Qiwei Shan¹, Yi Zhang¹, Jinxing Liu¹, Caixia Gao¹ & Jin-Long Qiu²

Chromozomální aberace - delece

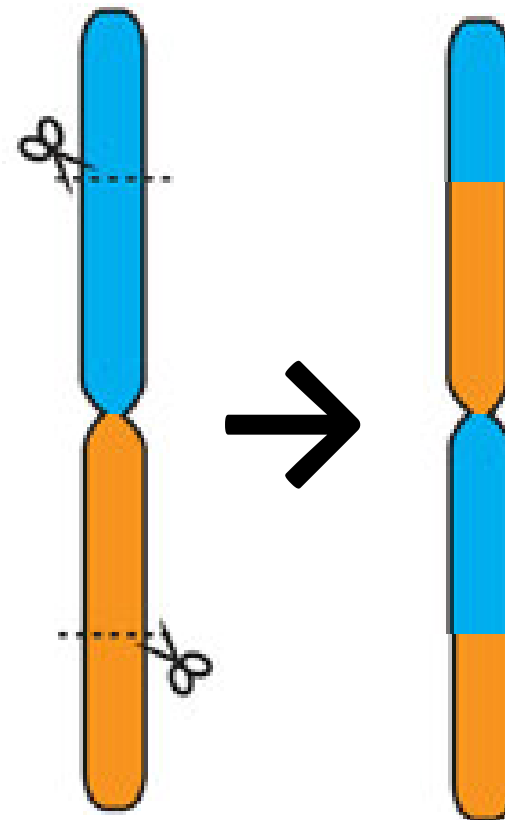


Delece v rozmezí cca 20bp – několik Mb

Chromozomální aberace - inverze

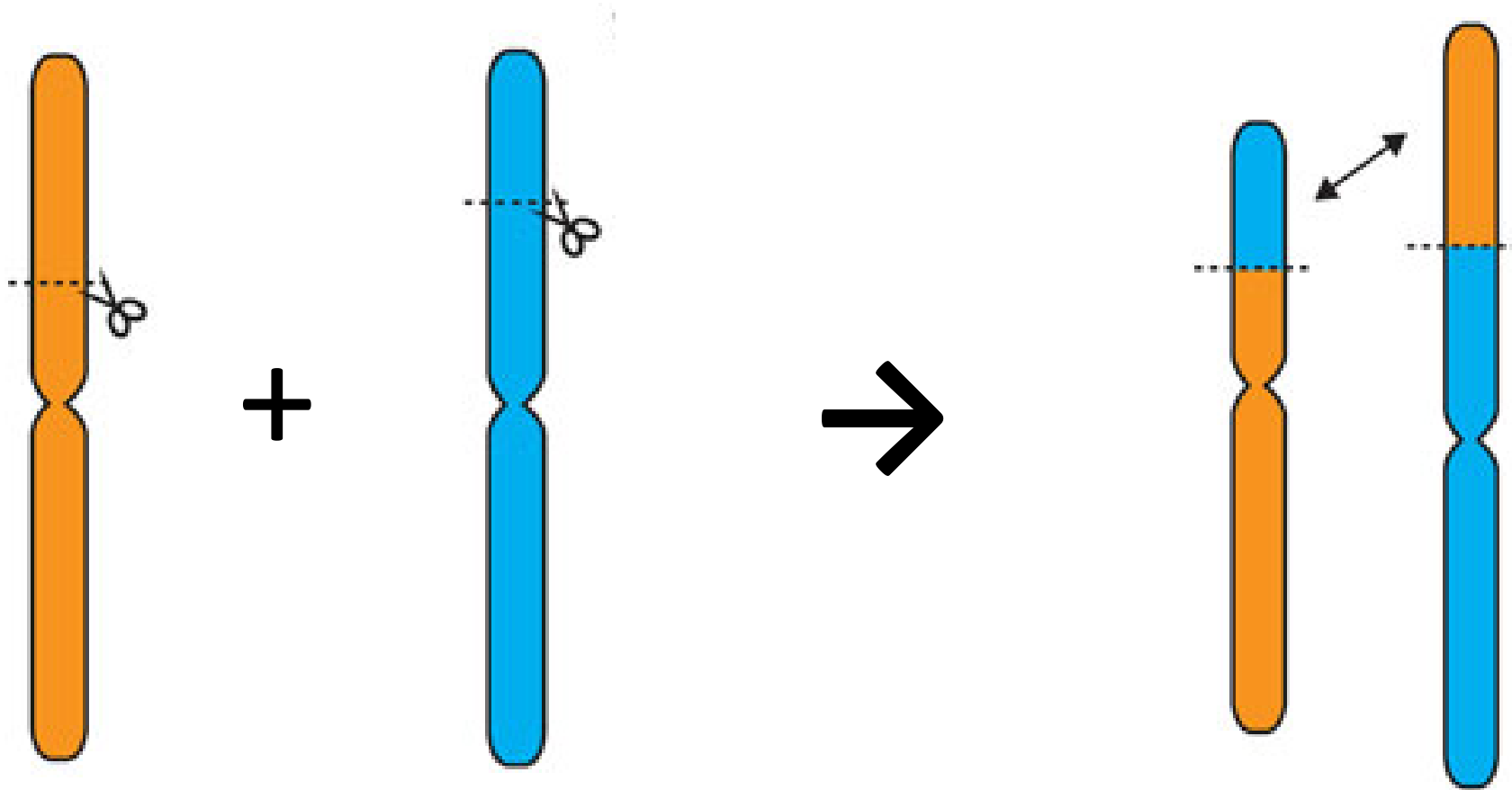


Paracentrická inverze



Pericentrická inverze

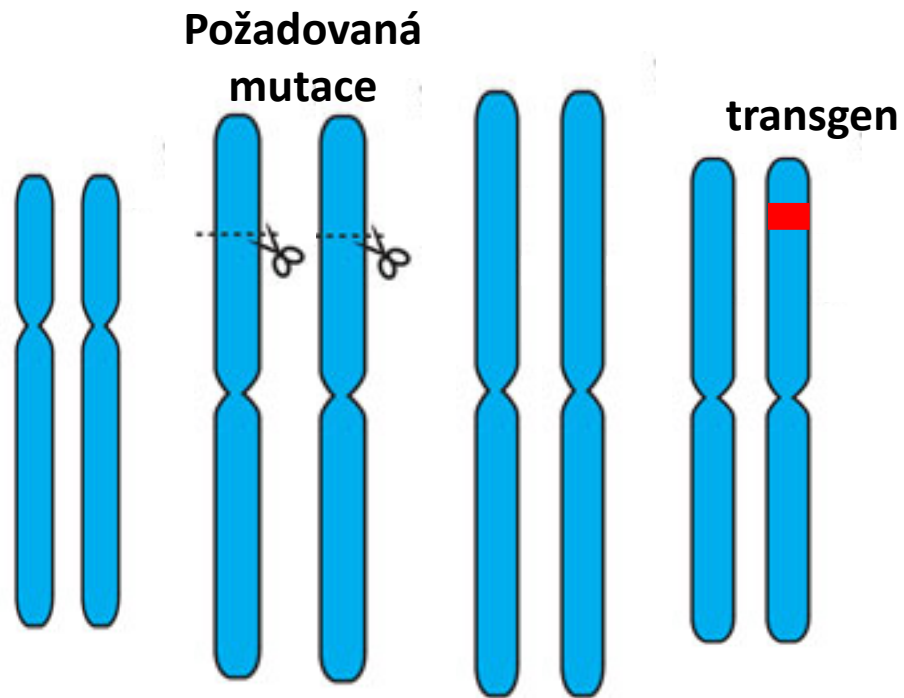
Chromozomální aberace - translokace



Reciproká translokace

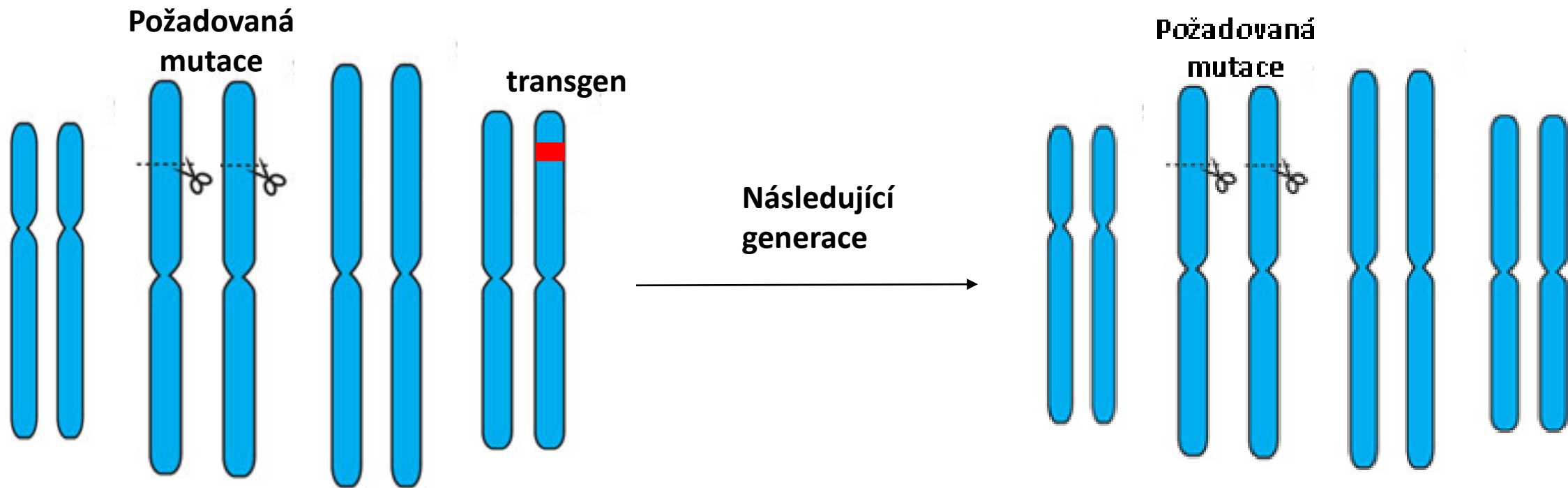
Tvorba "transgene-free" rostlin

- 1) transientní transformace protoplastů (nedochází k integraci konstruktu do rostlinného genomu)
- 2) segregace transgenu v následujících generacích



Tvorba "transgene-free" rostlin

- 1) transientní transformace protoplastů (nedochází k integraci konstruktů do rostlinného genomu)
- 2) segregace transgenů v následujících generacích



Legislative

Briefing

May 2016



Biotechnology and Biological Sciences Research Council

European Plant Science Organisation

French High Council for Biotechnology

Deutschen Akademien für Wissenschaften

Dutch Commission on Genetic Modification

New plant-breeding techniques Applicability of GM rules



In this briefing:

- The uncertain status of new plant breeding techniques
- Background
- Legal basis
- Regulating the new techniques
- European Parliament
- Further reading

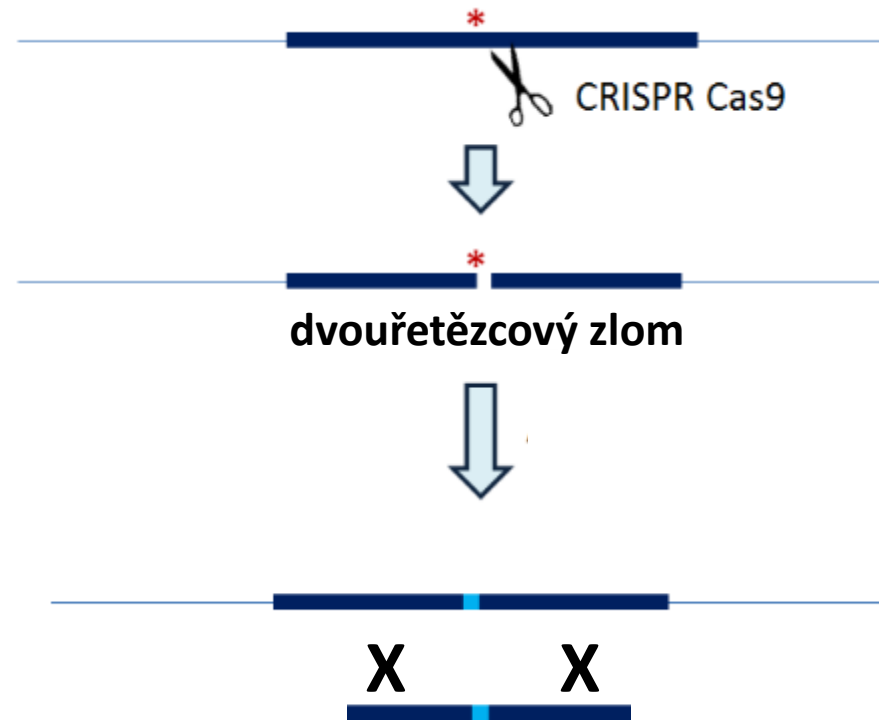


"...CRISPR/Cas9 should not be subject to European GMO legislation..."

"...and suggest case by case policy."

Modifikace (oprava) genu

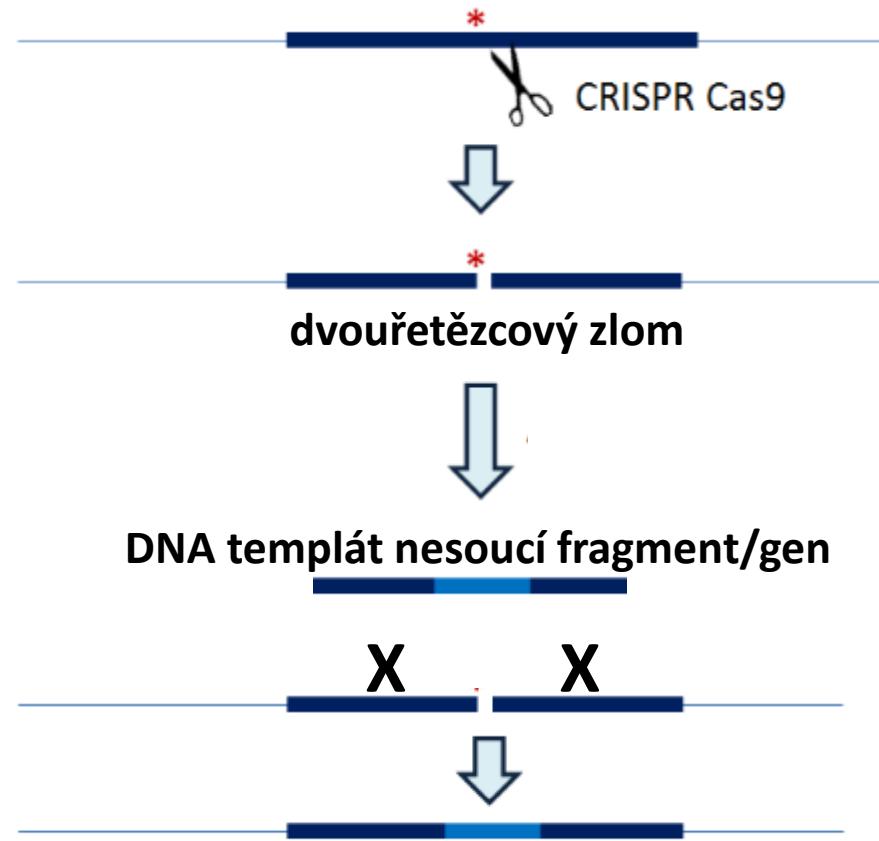
Modifikace zahrnující jednu či několik párů - tvorba žádoucích alel (může být alternativou cisgenních rostlin).



DNA templát nesoucí požadovanou alelovou variantu

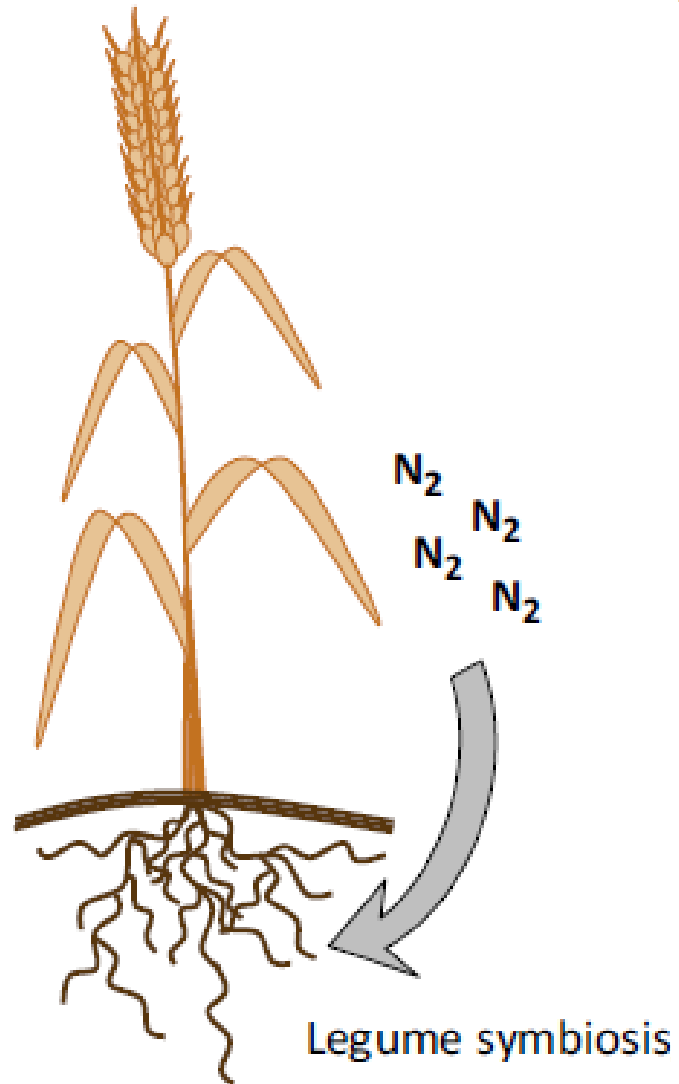
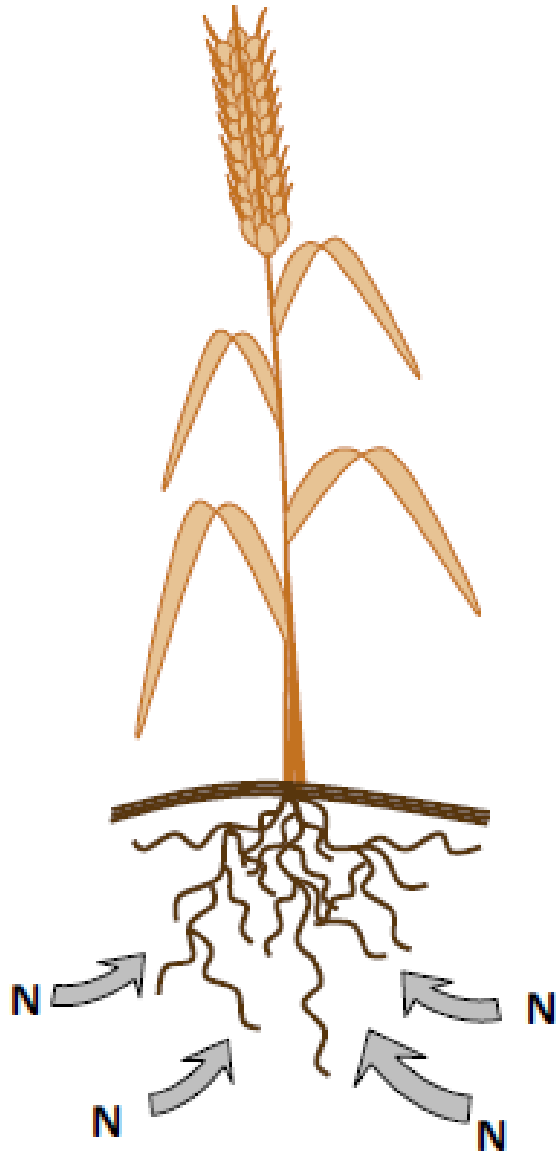
Cílená integrace genu/fragmentu

Vkládání DNA do požadovaných (předem stanovených) lokusů v genomu rostlin.



Výsledkem je genomový lokus s cíleně integrovaným genem/DNA fragmentem

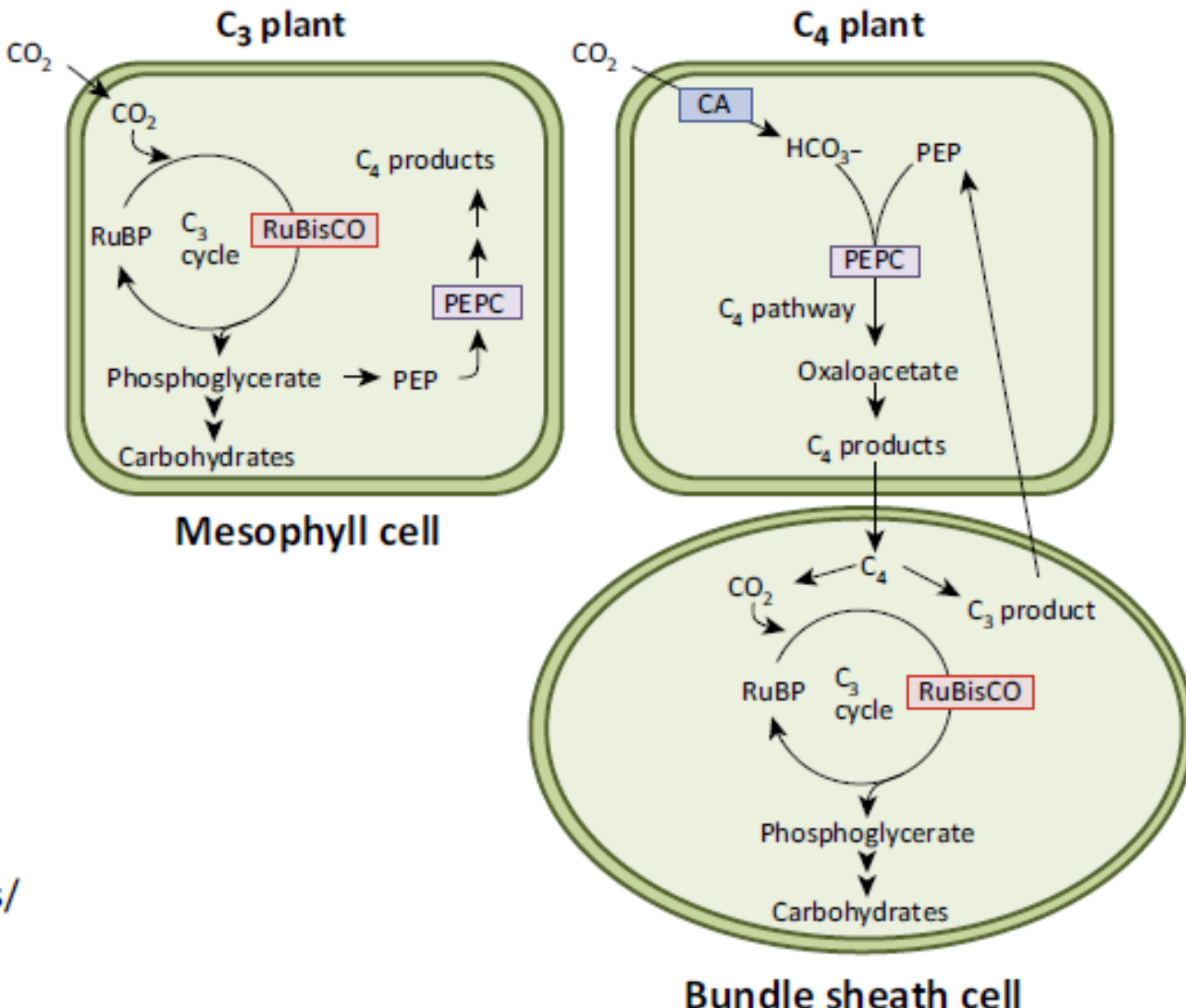
"Syntetická" pšenice



Symbióza mezi pšenicí a bakterií

- 1) odstranit geny rezistence vůči bakterii z genomu pšenice
- 2) do genomu vložit geny zodpovědné za symbiotické interakce

"Syntetická" rýže

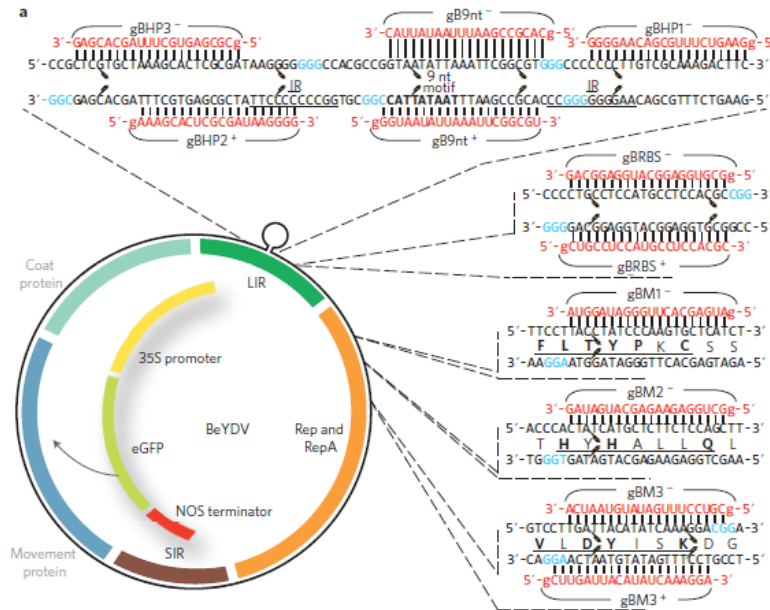


Zvýšení efektivity fotosyntézy u rýže

- 1) odstranit geny C₃ fotosyntézy
- 2) do genomu vložit geny pro C₄ fotosyntézu

CRISPR/Cas9 indukovaná virová rezistence

System CRISPR/Cas9 lze designovat tak, aby štěpil virovou nukleovou kyselinu např. rodu *Geminivirus*.



Cas9 only



Cas9 with gBM3⁺

nature
plants

BRIEF COMMUNICATION

PUBLISHED: 28 SEPTEMBER 2015 | ARTICLE NUMBER: 15145 | DOI: 10.1038/NPLANTS.2015.145

Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR-Cas prokaryotic immune system

Nicholas J. Baltes^{1,2†}, Aaron W. Hummel^{1,2†}, Eva Konecna^{1,2}, Radim Cegan³, Aaron N. Bruns⁴, David M. Bisaro⁴ and Daniel F. Voytas^{1,2*}

Shrnutí

Pomocí CRISPR/Cas9 nukleáz lze cílené dvouřetězcové zlomy v požadovaném genomovém lokusu.

Tyto cílené zlomy lze použít k:

- 1) inaktivaci genu
- 2) modifikaci (opravě) sekvence
- 3) vložení DNA fragmentu (transgenu)

British baby given genetically-edited immune cells to beat cancer in world first

A British baby has become the first in the world to receive genetically modified immune cells from a donor and is now cancer free



Úspěšný případ léčby
akutní lymfatické leukémie
(ALL) ve Velké Británii

Jennifer Lopez To Produce C.R.I.S.P.R., A TV Show About Bioterror

