

“The era of human gene editing isn’t coming. It’s here.”

David Liu

MOŽNOSTI GENOVÉ TERAPIE U VROZENÝCH VAD A JEJICH ETICKÉ ASPEKTY

25. SYMPOZIUM PS CHLOPENNÍCH A VROZENÝCH SRDEČNÍCH VAD V DOSPĚLOSTI

Hradec Králové

Marek Vácha

Ústav etiky a humanitních studií

3. lékařská fakulta UK Praha

29. února 2024

Oviedo 1997:

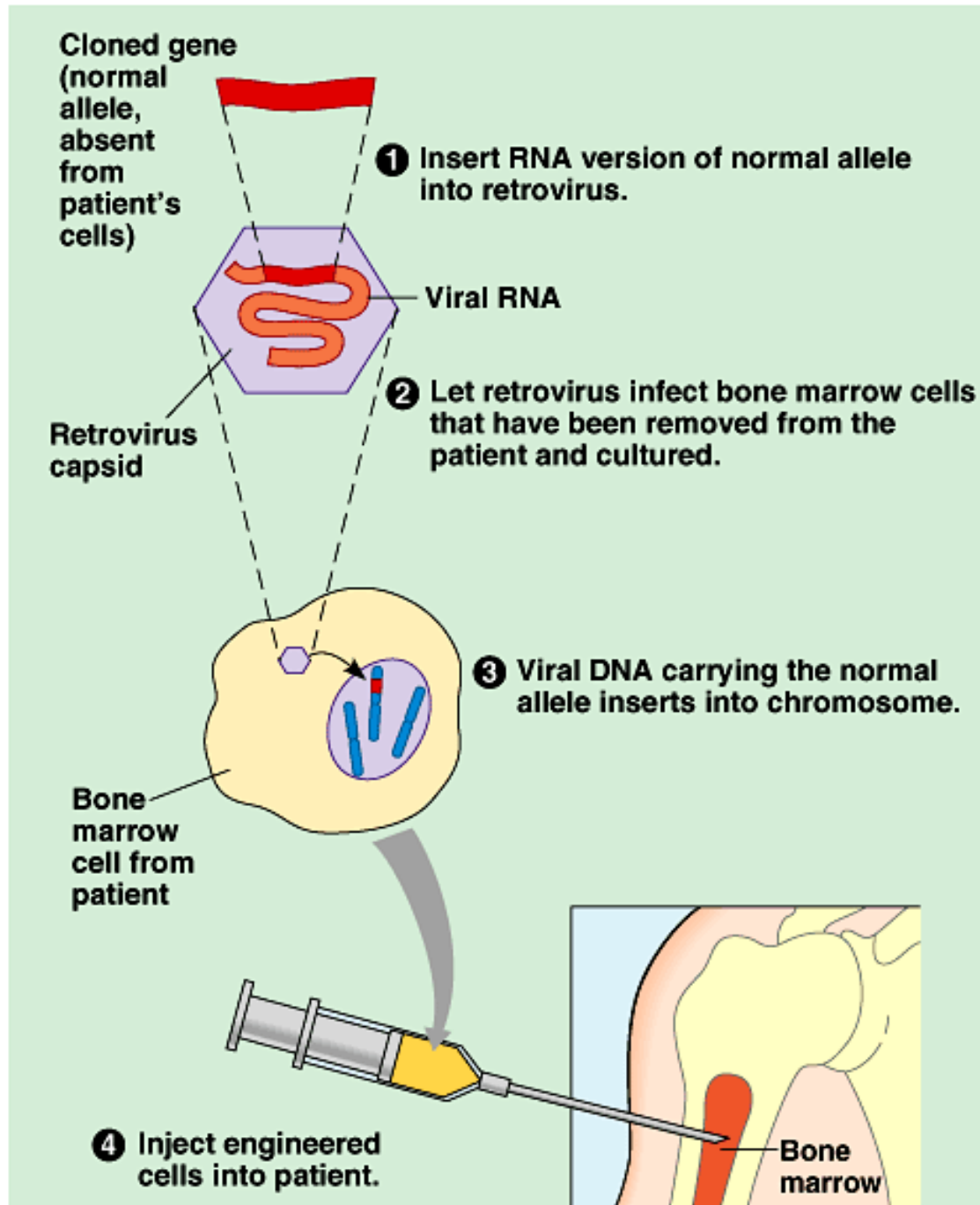
Úmluva o lidských právech a biomedicíně

CONVENTION ON HUMAN RIGHTS AND BIOMEDICINE

- ***Článek 13 - Zásahy do lidského genomu***
- Zásah, směřující ke změně lidského genomu, lze provádět pouze pro preventivní, diagnostické nebo léčebné účely, a **to pouze tehdy, pokud není jeho cílem jakákoliv změna genomu některého z potomků.**

Historie

Genové terapie



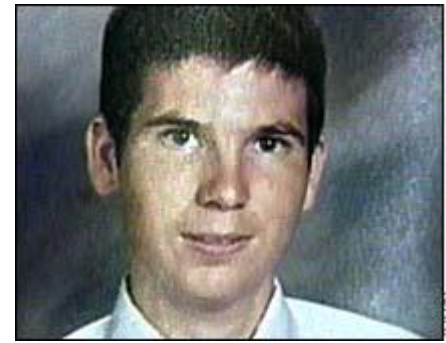
Jesse Gelsinger

- narozen 18. června 1981
- první příznaky nemoci 2 roky a osm měsíců
 - eratické chování, po dietě bohaté na proteiny, následuje prudké zhoršení stavu, upadá do komatu
- diagnostikován OTCD (ornithine transcarbamylase deficiency syndrome), vzácná metabolická choroba – 50 % dětí s touto chorobou umírá do 1 měsíce po porodu
 - JG má nemoc ovšem pouze v mírné formě, léčitelné medikamenty a dietou
 - pokud je potrava bohatší na proteiny, v krvi se objevuje množství amoniaku
- v roce 1990 bere JG padesát pilulek denně



Jesse Gelsinger's death from a gene therapy clinical trial in 1999 raised many questions concerning the safety of experimental gene therapy treatments.

Jesse Gelsinger



- čeká na den svých 18. narozenin, aby mohl poskytnout informovaný souhlas s léčbou
- 13. září 1999 dostává genovou terapii, večer je mu špatně, další den odpoledne upadá do kómatu
- 17. září 1999 umírá
 - během hodiny, kdy byla Gelsingerovi aplikována virová terapie s verzí zdravého genu do jater, Jesse dostává vysoké horečky, imunitní systém začíná nekontrolovatelně proliferovat bílé krvinky, krev se začíná srážet, dusík v krvi stoupá, játra krvácejí a proud bílých krvinek znemožňuje práci plic. Smrt nastává evidentně a jasně následkem terapie
- **případ vyvolal zděšení mezi vědeckou komunitou a zaplnil přední stránky novin**

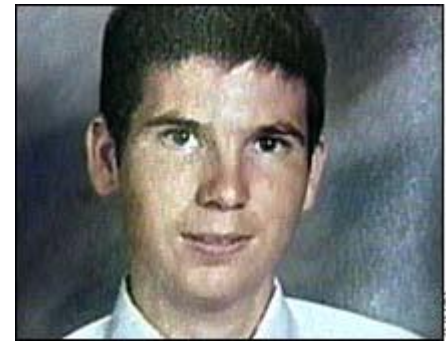
Jesse Gelsinger

- jednalo se ovšem jen o Fázi I., tedy o zkoušku toho, jak dostat do jater upravené adenoviry nesoucí zdravý gen tak, aby nenastaly nežádoucí reakce.
- pro tuto fázi bylo vybráno 18 dospělých buď s OCTD, nebo se jednalo o přenašeče.
 - V původním plánu byli v protokolu i děti, z etických důvodů však byly vyloučeny – byla totiž možnost, že zoufalí rodiče by podepsali Informovaný souhlas, který by nebyl zcela dobrovolný
 - navíc ve fázi I se nejedná o dosažení terapeutického benefitu, , nýbrž je o zhodnocení případných nežádoucích vedlejších efektů

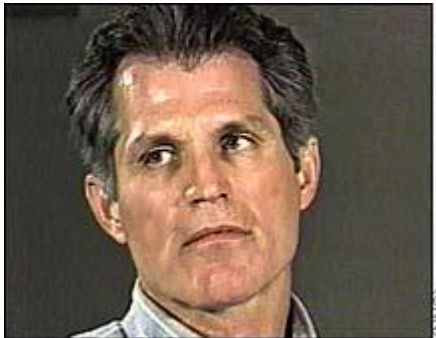
Jesse Gelsinger

- Jesse měl opravdu očekávané příznaky podobné chřipce. Horečka ale pak prudce vzrostla.
- Následně byl dán na dialýzu, připojen na ventilátor
- O čtyři dny později byl natolik opuchlý, že jej otec sotva poznal
- Pátý den bylo zřejmé, že došlo k závažným nevratným poškození mozku a že orgány přestávají pracovat.
- Byl zavolán nemocniční kaplan, Jesse byl odpojen a zemřel.
- Pitva nezjistila problém, který vedl ke smrti. Příčina smrti dodnes není známa

Jesse Gelsinger



- celá kauza rozvířila řadu otázek ohledně kvality informovaného souhlasu
 - řada důležitých informací totiž podléhala různým obchodním tajemstvím. Paul Gelsinger (otec) nyní obviňuje nemocnici ze zamlčení důležitých informací a z úmyslného riskování života jeho syna



Paul Gelsinger

První jednoznačný úspěch: léčba X-SCID (X-linked severe combined immunodeficiency) Paříž, 2000

- tři z nich ovšem následně onemocněly leukémií; **téměř jistě se jednalo o následek aktivace vloženého LMO2 onkogenu.**
 - jedno z dětí zemřelo
- všechny následné terapie, založené na retrovirální transdukci lymfocytů **byly následně celosvětově pozastaveny**, dokud přesně neporozumíme, co bylo důsledkem těchto tragických událostí.

Thérapie génique du déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X (DICS-X1)

S. Hacein-Bey^{1,2*}, F. Gross¹, P. Nusbaum¹, E. Yvon², A. Fischer¹,
M. Cavazzana-Calvo^{1,2}

¹INSERM U429, Hôpital Necker-Enfants-Malades, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France ; ²ETS, Hôpital Necker-Enfants-Malades, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France

Résumé

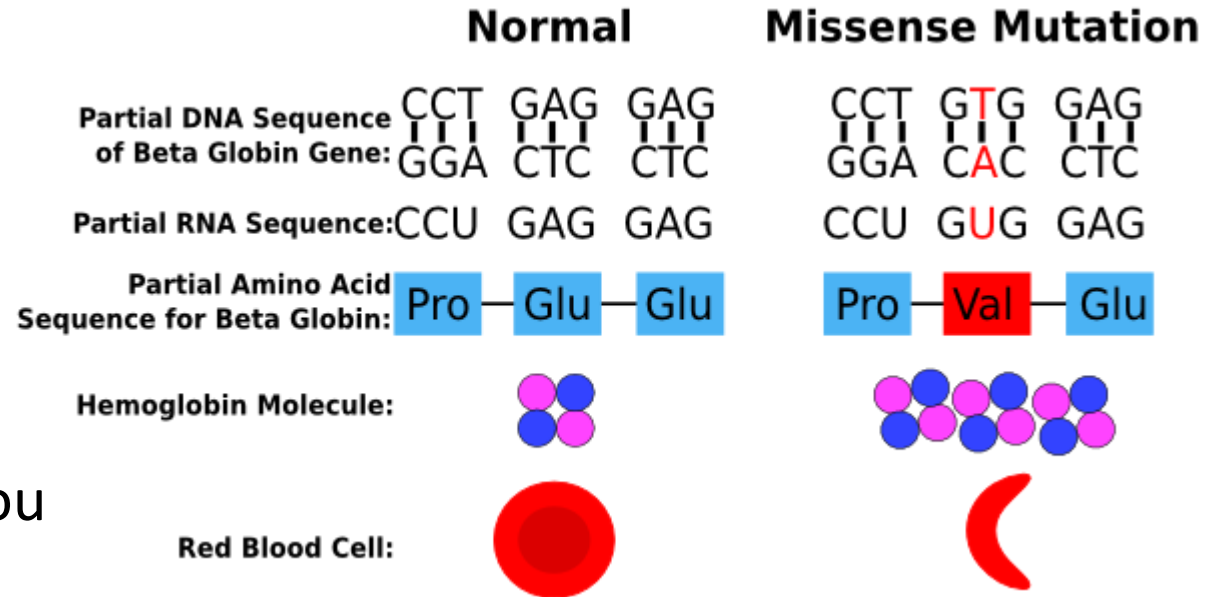
Le Déficit Immunitaire Combiné sévère lié à l'X (DICS-X1) se caractérise par un arrêt précoce du développement des lymphocytes T et Natural Killer (NK). Il résulte de mutations du gène codant pour la chaîne γ commune (γc) aux récepteurs à l'interleukine (IL)-2, IL-4, IL-7, IL-9 et IL-15. Ce DI est léthal en l'absence de greffe de moelle osseuse allogénique, qui outre les risques élevés, est limitée par les difficultés pour trouver un donneur compatible, ce qui justifie la décision de mettre au point une thérapie alternative par transfert de gène. Nous avons démontré que le transfert du gène γc à l'aide d'un vecteur rétroviral défectif dans des lignées B-EBV de patients permet la reconstitution d'un récepteur à l'IL-2 fonctionnel capable d'internaliser son ligand et d'induire les premières étapes de la signalisation comme la phosphorylation de la protéine kinase JAK-3. Les précurseurs hématopoïétiques des patients γc (-) représentent la cible réelle du transfert de gène avec comme objectif la restauration de la différenciation des deux lignées lymphoïdes Tet NK absentes chez les patients γc (-). Après avoir mis au point deux systèmes de différenciation in vitro, l'un pour les cellules NK en milieu liquide en présence de cytokines γc -dépendantes et l'autre en culture organotypique sur lobes thymiques foetaux murins (FTOC), nous avons montré que les progéniteurs médullaires CD34+ γc (-) étaient capables après transfert du gène γc , de se différencier d'une part en cellules NK fonctionnelles CD56+ et/ou CD16+ et d'autre part en lymphocytes T présentant un profil de réarrangement DJ β 1 polyclonal. Ainsi, l'ensemble de ces résultats a permis la mise au point d'un essai clinique pour le traitement des enfants atteints de DICS-X1. © 2001 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

- Editování genomu nové generace musí mít tři vlastnosti:
 - musí umět rozpoznat specifickou, cílenou sekvenci DNA
 - musí být schopen na daném místě sekvenci rozstříhnout
 - musí být jednoduše reprogramovatelný k zacílení a střížení různých cílových DNA sekvencí.

Srpkovitá anémie

Srpkovitá anémie

- nemoc je způsobena pozměněnou molekulou hemoglobinu: v šesté pozici β -globinového řetězce je místo kyseliny glutamové zařazen valin



Jennelle Stephenson

první úspěšná genová terapie srpkovité anémie



Jennelle Stephenson

první úspěšná genová terapie srpkovité anémie

- Provedena 25. prosince 2017 27mi leté Jennelle Stephenson
 - v NIH, Washington. Jennelle žije na Floridě
- Obdržela infuzi 500 miliónů geneticky modifikovaných vlastních kmenových buněk
- k přenosu byl využit virus HIV.
 - ukazuje se, že HIV je obzvláště vhodný k transferu DNA do buňky.
- kmenové buňky pacientky jsou odebrány z těla a v laboratoři jsou infikovány geneticky upraveným HIV, který nese správnou variantu genu.

Jennelle Stephenson

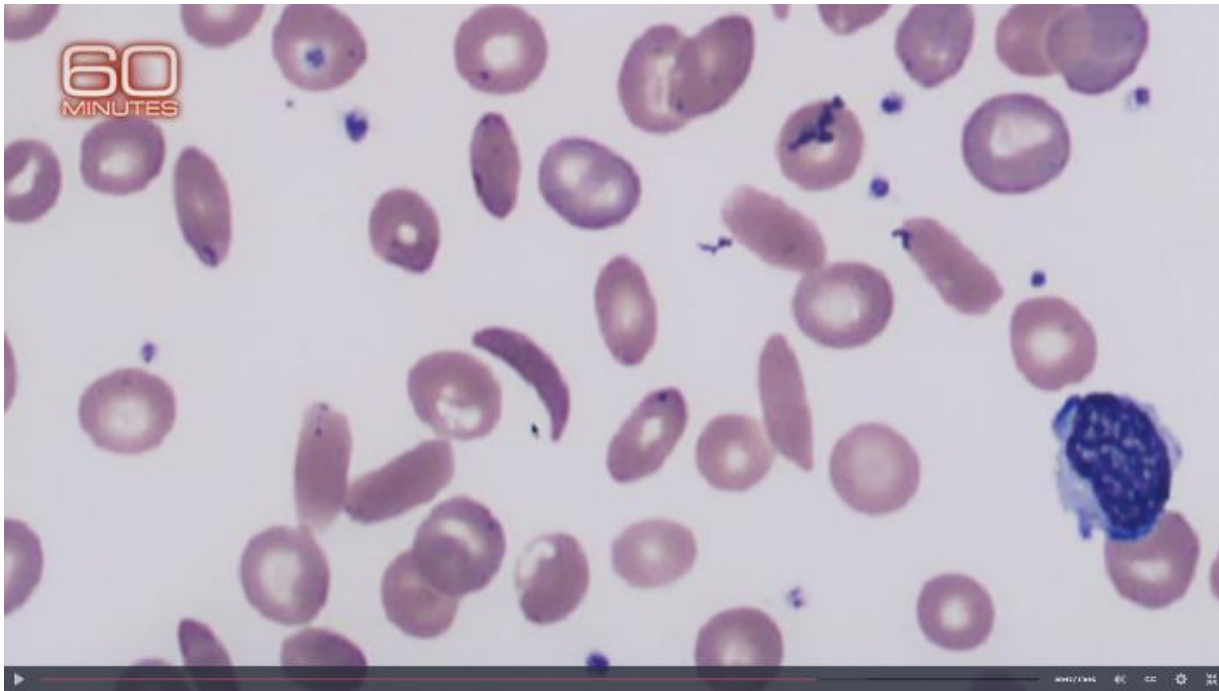
první úspěšná genová terapie srpkovité anémie

- pacientka musí dostat silnou chemoterapii, aby její tělo nezareagovalo proti pozměněným kmenovým buňkám.
- Několik dní po chemoterapii dostává Jennelle infusi geneticky modifikovaných kmenových buněk.

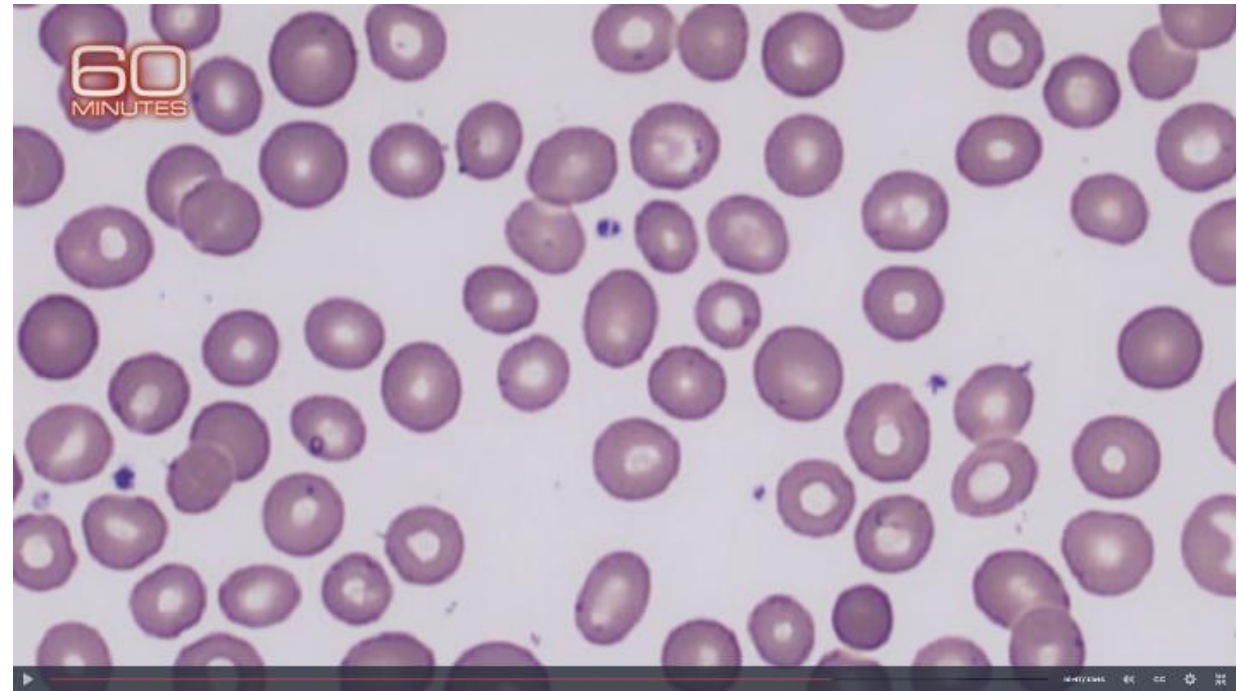
Jennelle Stephenson

první úspěšná genová terapie srpkovité anémie

"I believe that this looks like a cure. I gotta be careful. But from every angle that I know how to size this up, this looks like a cure.,, Dr. Francis Collins



Před léčbou



Po devíti měsících

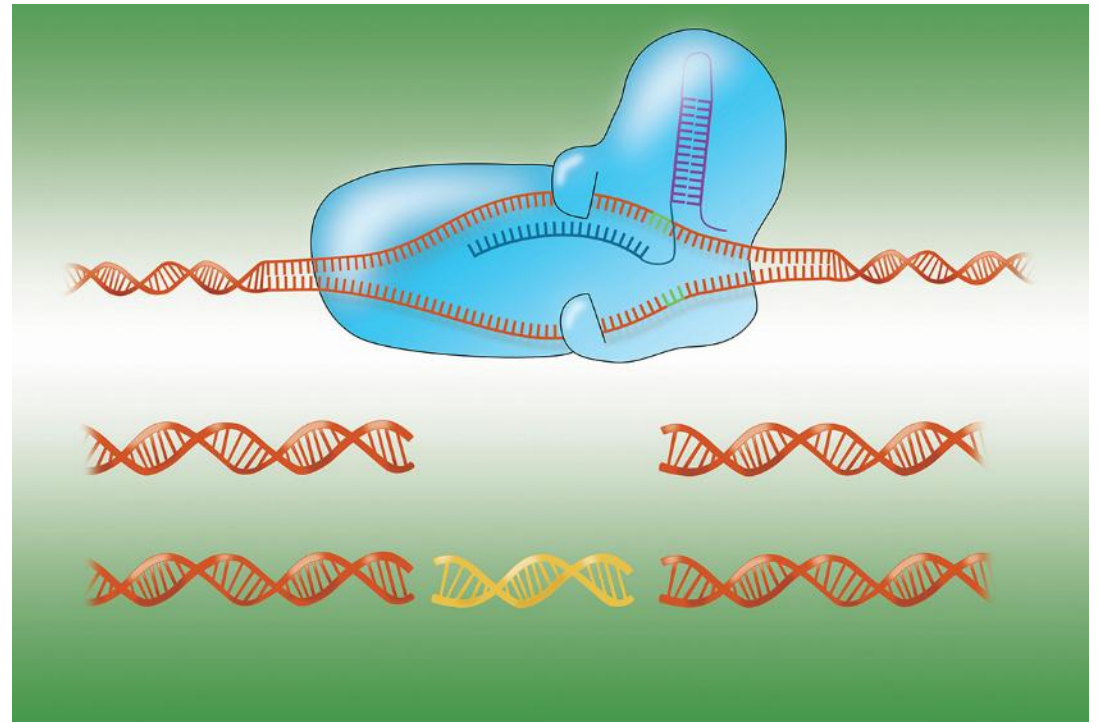
Další metody

- ZFNs - Zinc fingers
- TALENs

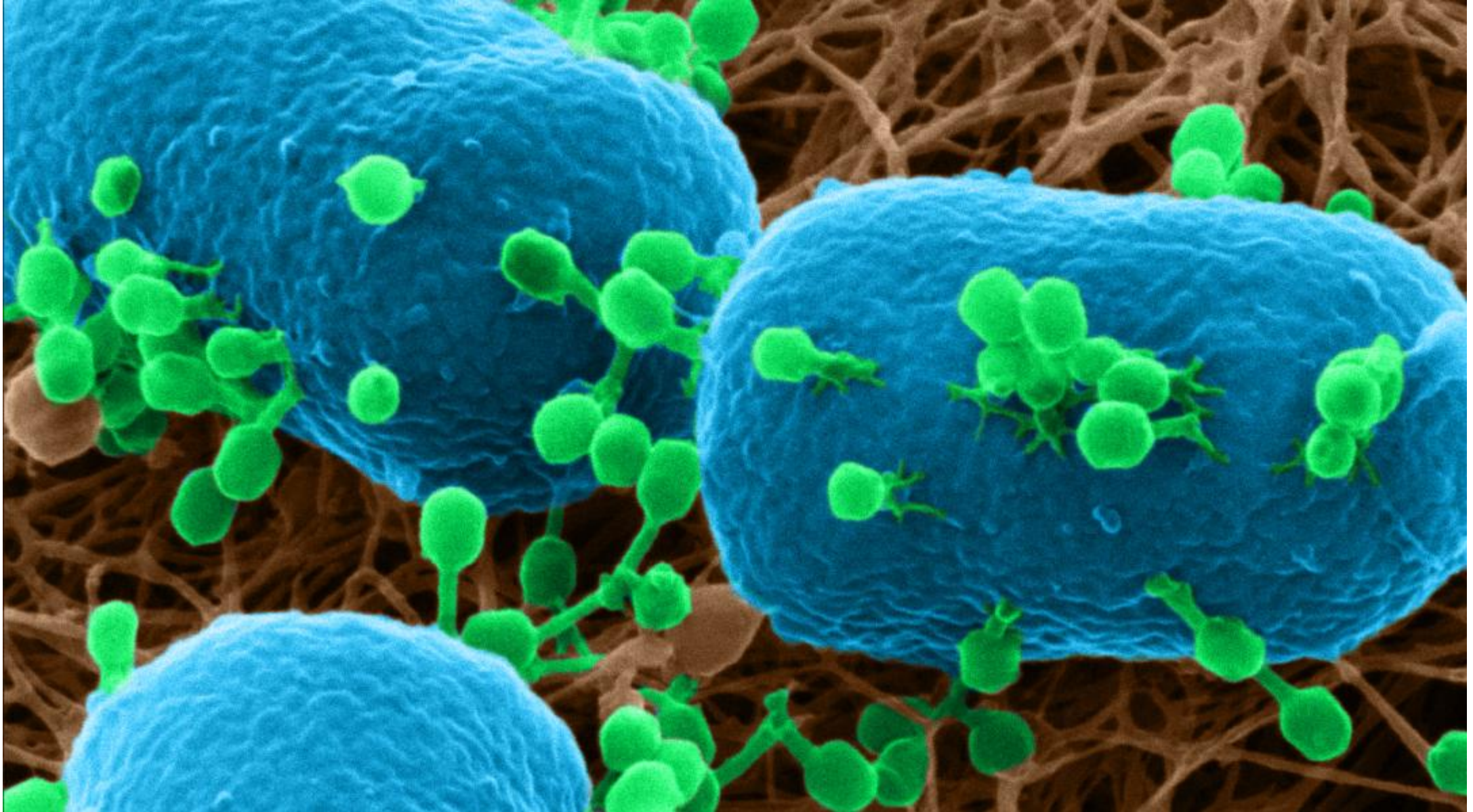
- ...drahé, časově náročné, byť funkční

Genome is as... „malleable as a piece of literary prose at the mercy of the editor's red pen.“

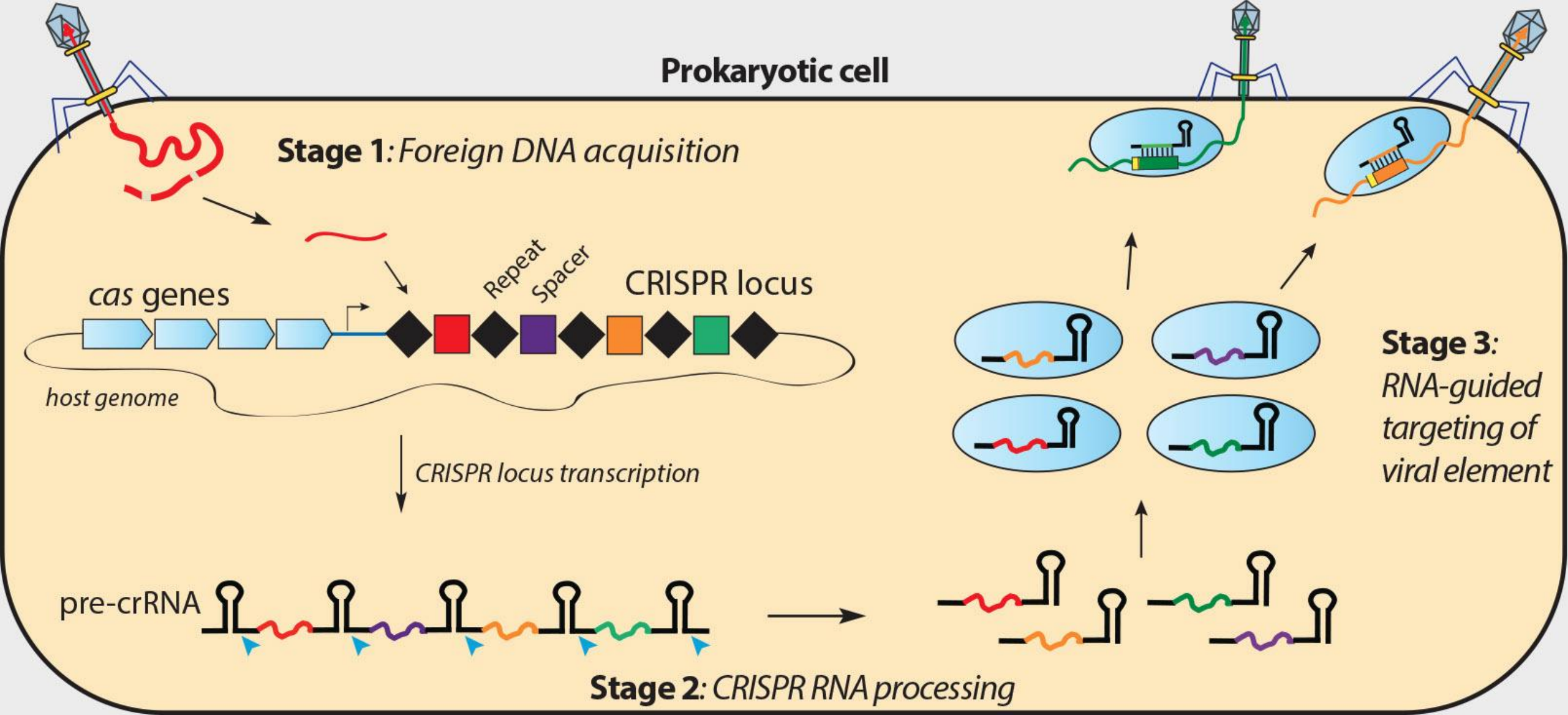
Jennifer Doudna.



CRISPR/Cas9



Bakteriofágy (zeleně) útočí na bakterii E. coli (modře), vše na agarovém substrátu (hnědě).



Po virovém napadení mají bakterie řádově minuty na to, aby nějak zničily virovou DNA. Spacery mají stejnou sekvenci jako virová DNA.

2012



Virginijus Šikšnys

Million-dollar Kavli prize recognizes scientist scooped on CRISPR

Award goes to biochemists Virginijus Šikšnys, whose lab independently developed the gene-editing tool, Emmanuelle Charpentier and Jennifer Doudna.

[Giorgia Guglielmi](#)



Profesor Virginijus Šikšnys, PhD. na Institutu Biotechnologie, vedoucí Ústavu pro interakce proteinů a DNA (Department of Protein–DNA Interactions) na univerzitě ve Vilniusu byl **jedním z prvních, kdo prokázal programované štěpení DNA pomocí proteinu Cas9.**

Virginus Šikšnys

- v únoru 2012 napsal článek, spolu s Barrangouem a Horvathem jako sekundárními autory, ve kterém popisoval, jak v CRISPR systému je enzym Cas9 navigován pomocí crRNA k napadajícímu viru.
- Text poslal do časopisu Cell, který jej odmítl.
 - ve skutečnosti **redaktoři Cell ani necítily potřebu článek poslat na peer-review**
 - „Co mě frustrovalo ještě víc byl fakt, že jsme text poslali do Cell Report, což je druh sesterského časopisu Cellu. Tam ho odmítli také.“
- **21. května 2012 se Barrangou rozhodl poslat abstrakt článku Jennifer Doudna.**
- Doudna poslala žádost o patent 25. května 2012
- Doudna submitovala svůj článek do Science 8. června 2012.
- Tento Doudna-Charpentier článek byl přijat v Science a byl publikován online 28. června 2012, zatímco Šikšnysův až 4. září 2012.

The German daily “Der Tagesspiegel” also questions the justice of the science community and highlights that, unfortunately, it is sometimes easier and quicker to recognize remarkable scientific discoveries if they are made in the laboratories of world’s renowned universities.

Německý deník „Der Tagesspiegel“ rovněž zpochybňuje spravedlnost vědecké komunity a vyzdvihuje fakt, že, naneštěstí, se zdá jednodušší a snazší rozeznat významné vědecké objevy, pokud jsou tyto udělány na významných světových univerzitách či laboratořích.



Virginijus Šikšnys

© DELFI / Karolina Pansevič

<https://www.delfi.lt/en/culture/forbes-prof-siksnys-deserves-to-share-the-glory-of-this-years-nobel-prize-in-chemistry.d?id=85521889>

A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity

MARTIN JINEK, KRZYSZTOF CHYLINSKI, INES FONFARA, MICHAEL HAUER, JENNIFER A. DOUDNA, AND EMMANUELLE CHARPENTIER [Authors Info & Affiliations](#)

SCIENCE • 28 Jun 2012 • Vol 337, Issue 6096 • pp. 816-821 • DOI: 10.1126/science.1225829

72 988 8 526



Ditching Invading DNA

Bacteria and archaea protect themselves from invasive foreign nucleic acids through an RNA-mediated adaptive immune system called CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/CRISPR-associated (Cas). **Jinek *et al.*** (p. 816, published online 28 June; see the Perspective by **Brouns**) found that for the type II CRISPR/Cas system, the CRISPR RNA (crRNA) as well as the trans-activating crRNA—which is known to be involved in the pre-crRNA processing—were both required to direct the Cas9 endonuclease to cleave the invading target DNA. Furthermore, engineered RNA molecules were able to program the Cas9 endonuclease to cleave specific DNA sequences to generate double-stranded DNA breaks.



28. června 2012

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J., A., Charpentier, E., (2012) A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821. doi:10.1126/science.1225829

Jennifer Doudna: “I suppose if I were writing the paper today, I would have chosen a different title.”

<https://web.s.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=2&sid=7aaf31c7-2b19-4aaa-8f10-15e8e844627a%40redis>

2015

Jennifer Doudna

- „Ačkoli jsem tu myšlenku chtěla vypudit z hlavy, byla náhle jasné, že moje a Emmanuellina práce, která začala s naprosto odlišným záměrem, vedla přímo k Huangově.“
- Doudna, J.A., Sternberg, S.H., (2018) *A Crack in Creation. Gene Editing and the Unthinkable Power to Control Evolution*. Mariner Books. Boston. str. 216

RESEARCH ARTICLE

CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes

Puping Liang, Yanwen Xu, Xiya Zhang, Chenhui Ding, Rui Huang, Zhen Zhang, Jie Lv, Xiaowei Xie, Yuxi Chen, Yujing Li, Ying Sun, Yaofu Bai, Zhou Songyang, Wenbin Ma, Canquan Zhou[✉], Junjiu Huang[✉]

Guangdong Province Key Laboratory of Reproductive Medicine, the First Affiliated Hospital, and Key Laboratory of Gene Engineering of the Ministry of Education, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China
✉ Correspondence: hjunjiu@mail.sysu.edu.cn (J. Huang), zhoucanquan@hotmail.com (C. Zhou)

Received March 30, 2015 Accepted April 1, 2015

ABSTRACT

Genome editing tools such as the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated system (Cas) have been widely used to modify genes in model systems including animal zygotes and human cells, and hold tremendous promise for both basic research and clinical applications. To date, a serious knowledge gap remains in our understanding of DNA repair mechanisms in human early embryos, and in the efficiency and potential off-target effects of using technologies such as CRISPR/Cas9 in human pre-implantation embryos. In this report, we used trippronuclear (3PN) zygotes to further investigate CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human cells. We found that CRISPR/Cas9 could effectively cleave the endogenous β -globin gene (*HBB*). However, the efficiency of homologous recombination directed repair (HDR) of *HBB* was low and the edited embryos were mosaic. Off-target cleavage was also apparent in these 3PN zygotes as revealed by the T7E1 assay and whole-exome sequencing. Furthermore, the endogenous delta-globin gene (*HBD*), which is homologous to *HBB*, competed with exogenous donor oligos to act as the repair template, leading to untoward mutations. Our data also indicated that repair of the *HBB* locus in these embryos occurred preferentially through the non-crossover HDR pathway. Taken together, our work highlights the

pressing need to further improve the fidelity and specificity of the CRISPR/Cas9 platform, a prerequisite for any clinical applications of CRISPR/Cas9-mediated editing.

KEYWORDS CRISPR/Cas9, β -thalassemia, human trippronuclear zygotes, gene editing, homologous recombination, whole-exome sequencing

INTRODUCTION

The CRISPR/Cas9 RNA-endonuclease complex, consisting of the Cas9 protein and the guide RNA (gRNA) (~99 nt), is based on the adaptive immune system of *streptococcus pyogenes* SF370. It targets genomic sequences containing the tri-nucleotide protospacer adjacent motif (PAM) and complementary to the gRNA, and can be programmed to recognize virtually any genes through the manipulation of gRNA sequences (Cho et al., 2013; Cong et al., 2013; Jinek et al., 2012; Jinek et al., 2013; Mali et al., 2013c). Following Cas9 binding and subsequent target site cleavage, the double strand breaks (DSBs) generated are repaired by either non-homologous end joining (NHEJ) or homologous recombination directed repair (HDR), resulting in indels or precise repair respectively (Jinek et al., 2012; Moynahan and Jasin, 2010). The ease, expedience, and efficiency of the CRISPR/Cas9 system have lent itself to a variety of applications, including genome editing, gene function investigation, and gene therapy in animals and human cells (Chang et al., 2013; Cho et al., 2013; Cong et al., 2013; Friedland et al., 2013; Hsu et al., 2014; Hwang et al., 2013; Ikmi et al., 2014; Irion et al., 2014; Jinek et al., 2013; Li et al., 2013a; Li et al., 2013b; Long et al., 2014; Ma et al., 2014; Mali et al., 2013c; Niu et al., 2014; Smith et al., 2014a; Wu et al., 2013; Wu et al., 2014b; Yang et al., 2013).

Puping Liang, Yanwen Xu, Xiya Zhang and Chenhui Ding have contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s13238-015-0153-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

1. dubna 2015

<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs13238-015-0153-5.pdf>

Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., et al. (2015) CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes. *Protein Cell* 2015, 6(5):363–372

- Článek byl publikován v on-line časopisu Protein & Cell. Huang konstatoval, že článek byl odmítnut jak v Science, tak i v Nature, a částečně i kvůli etickým námitkám; ani jeden z obou časopisů ale nechtěl kauzu dále komentovat.

- Cyranoski, D., Reardon, S., (2015) Chinese scientists genetically modify human embryos. Rumours of germline modification prove true — and look set to reignite an ethical debate. 22 April 2015. *Nature* doi:10.1038/nature.2015.17378
- <https://www.nature.com/news/chinese-scientists-genetically-modify-human-embryos-1.17378>

2016

Zbraně hromadného ničení

- V pravidelné roční zprávě Americké zpravodajské služby v odhadu největších světových hrozeb pro USA za rok 2015 vydané v únoru 2016 v kapitole „Zbraně hromadného ničení“ je identifikováno šest okruhů, které mohou znamenat bezpečnostní hrozbu pro USA: jaderný program Severní Koreje, jaderný program Iránu, jaderný program Číny, program řízených střel v Rusku, chemické zbraně v Sýrii a Iráku a editování genomů (Clapper 2016) odůvodněné následovně:
 -
 - „Výzkum v editování genomů prováděný v zemích s odlišnými regulatorními či etickými standardy než mají západní země pravděpodobně zvyšuje riziko vytvoření potenciálně škodlivých biologických agens nebo produktů. *Vzhledem k velkému rozšíření, nízké ceně a zrychlenému tempu vývoje těchto technologií využitelných v civilním i vojenském sektoru, jejich záměrné nebo nevědomé zneužití může vést k dalekosáhlým ekonomickým a národně-bezpečnostním problémům.* Pokroky v editování genomů v roce 2015 podnítily skupiny špičkových amerických a evropských biologů k tomu, aby zpochybnily praxi doposud neregulované technologie editace lidských zárodečných linií (buněk, které se týkají reprodukce), která může způsobit dědičné genetické změny“ (Clapper 2016, str. 9).

BIOTECHNOLOGY

Embryo editing gets green light

UK decision sets precedent for research on editing genomes of human embryos.

BY EWEN CALLAWAY

A team of scientists in London is preparing to edit the genomes of human embryos for research. The UK Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA) approved the work on 1 February in the world's first such endorsement. "It's an important first," says George Daley, a stem-cell biologist at Boston Children's Hospital in Massachusetts. "This establishes a strong precedent for allowing this type of research."

The successful applicant is developmental biologist Kathy Niakan, at the Francis Crick Institute in London. Her team plans to use the CRISPR-Cas9 technique in healthy human embryos to alter genes that are active just after fertilization. The researchers will stop the experiments after seven days, when the embryos will be destroyed.

The genetic modifications could lead to treatments for infertility, but will not themselves form the basis of a therapy.

Robin Lovell-Badge, a developmental biologist at the Crick institute, says that the HFEA's decision will embolden other researchers. He has heard from other UK scientists who are interested in pursuing embryo-editing research, he says, and expects more applications to follow. Researchers also expect the decision

1. února 2016



NATURE | NEWS



UK scientists gain licence to edit genes in human embryos

Team at Francis Crick Institute permitted to use CRISPR-Cas9 technology in embryos for early-development research.

Ewen Callaway

01 February 2016 | Updated: 01 February 2016

<https://www.nature.com/news/uk-scientists-gain-licence-to-edit-genes-in-human-embryos-1.19270>

The successful applicant is developmental biologist Kathy Niakan, at the Francis Crick Institute in London. Her team plans to use the CRISPR-Cas9 technique in healthy human embryos to alter genes that are active just after fertilization. The researchers will stop the experiments after seven days, when the embryos will be destroyed.

The genetic modifications could lead to treatments for infertility, but will not themselves form the basis of a therapy.

Robin Lovell-Badge, a developmental biologist at the Crick institute, says that the HFEA's decision will embolden other researchers. He has heard from other UK scientists who are interested in pursuing embryo-editing research, he says, and expects more applications to follow. Researchers also expect the decision to reverberate beyond the United Kingdom. "I think this will be a good example to countries who are considering their approach to regulating this technology," says bioethicist Sarah Chan at the University of Edinburgh, UK. "We can have a well-regulated system that is able to make that distinction between research and reproduction."

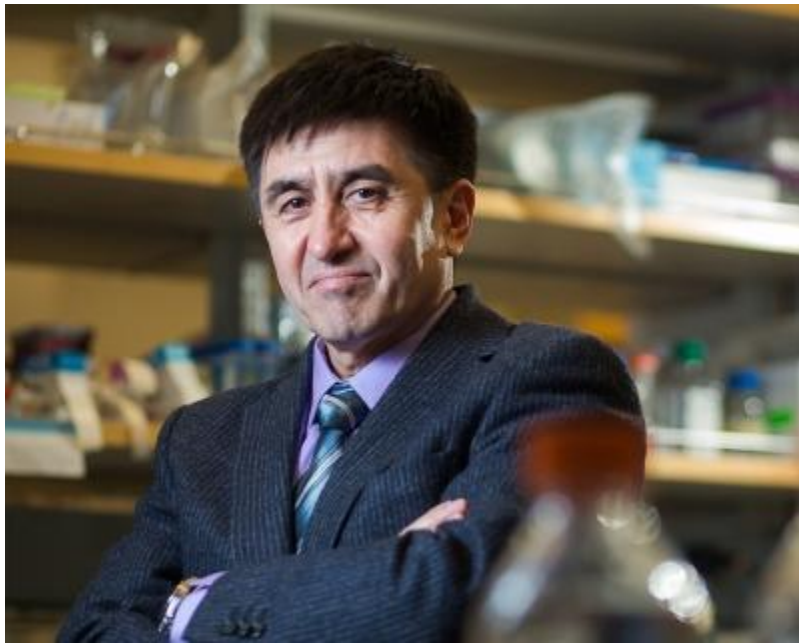
It remains illegal to alter the genomes of embryos used to conceive a child in the United Kingdom. But Tetsuya Ishii, a bioethicist at Hokkaido University in Sapporo, Japan, says that the HFEA decision could also stimulate debate over deploying embryo gene editing in clinical settings.

At a press briefing last month, Niakan said that her team could begin work within "months" of the HFEA approving the application. First,

however, a local research ethics board (similar to an US institutional review board) must approve the work. ■

NATURE.COM
For a longer version of this story, see: go.nature.com/lsluwv

2017



Mitalipov

Ma, H. et al. (2017) Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 548, 413–419 (24 August 2017) doi:10.1038/nature23305

Published online 02 August 2017

nature International weekly journal of science

Home | News & Comment | Research | Careers & Jobs | Current Issue | Archive | Audio & Video | Fo

Archive > Volume 548 > Issue 7668 > Articles > Article

NATURE | ARTICLE 🔗 🖨️

[日本語要約](#)

Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos

Hong Ma, Nuria Marti-Gutierrez, Sang-Wook Park, Jun Wu, Yeonmi Lee, Keiichiro Suzuki, Amy Koski, Dongmei Ji, Tomonari Hayama, Riffat Ahmed, Hayley Darby, Crystal Van Dyken, Ying Li, Eunju Kang, A.-Reum Park, Daesik Kim, Sang-Tae Kim, Jianhui Gong, Ying Gu, Xun Xu, David Battaglia, Sacha A. Krieg, David M. Lee, Diana H. Wu, Don P. Wolf
✚ *et al.*

[Affiliations](#) | [Contributions](#) | [Corresponding authors](#)

Nature **548**, 413–419 (24 August 2017) | doi:10.1038/nature23305
Received 28 March 2017 | Accepted 27 June 2017 | Published online 02 August 2017

[PDF](#) [Citation](#) [Rights & permissions](#) [Article metrics](#)

Abstract

[Abstract](#) • [Introduction](#) • [Subject with a heterozygous MYBPC3 \$\Delta\$ GAGT deletion](#) • [HDR efficiency in heterozygous MYBPC3 \$\Delta\$ GAGT zygotes](#) • [Targeting gametes eliminates mosaicism](#) • [Development and cytogenetics of repaired embryos](#) • [Off-target consequences in repaired human embryos](#) • [Discussion](#) • [Methods](#) • [References](#) • [Acknowledgements](#) • [Author information](#) • [Extended data figures and tables](#) •

Hypertrofická kardiomyopatie (HCM)

- autosomálně dominantní dědičnost
- Stačí jediná mutantní kopie tohoto genu, a mutace se projeví v podobě hypertrofické kardiomyopatie.
 - důsledkem je náhlá smrt zapříčiněná srdečním selháním
 - situace postihuje 1:500 lidí
 - jsme schopni léčit symptomy, ale nikoli chorobu jako takovou
 - jedná se o chorobu s pozdním nástupem
 - v indické populaci je mutace přítomna mezi 2%-8%

- Dhandapany, P. S. *et al.* A common *MYBPC3* (cardiac myosin binding protein C) variant associated with cardiomyopathies in South Asia. *Nat. Genet.* **41**, 187–191 (2009)

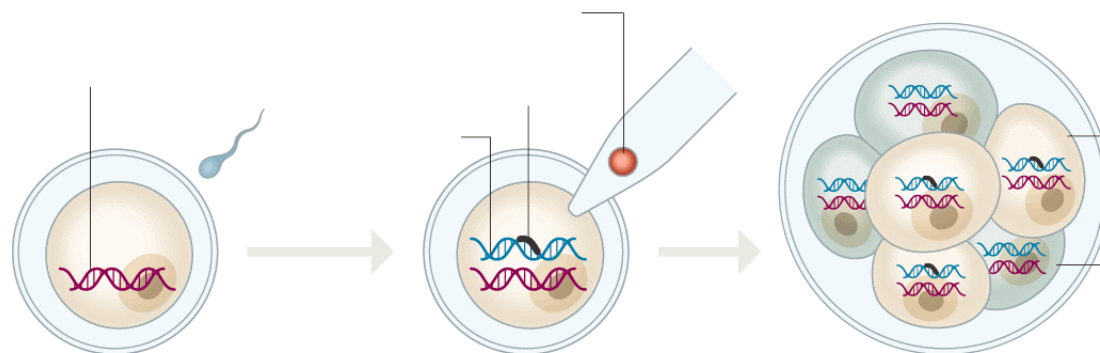
Hypertrofická kardiomyopatie

- HCM je nemocí myokardu, charakterizovaná hypertrofií levé komory
 - malé srdeční komory se zesílenou stěnou a vydatnými stahy
 - levá komora dvojnásob silná (20 mm) než normálně (7-11 mm)
 - dezorganizace svalových buněk (myofibrillar disarray)
 - Svalovina srdečních stěn obsahuje i nadměrné množství vaziva, tedy funkčně bezcenné hmoty nacházející se mezi jednotlivými svalovými strukturami.
 - mitrální chlopeň (oddělující levou komoru a levou síň) se zvětšuje a prodlužuje
 - HCM je nejčastější příčina náhlé smrti u jinak zdravých mladých atletů.
 - mutace v genu MYBPC3 odpovídá za přibližně 40% všech genetických defektů způsobujících HCM.

Vložení CRISPR/Cas9 do zygoty

- Z 54 použitých embryí jich bylo
- 36 bez mutací – což je významné zlepšení, neboť za přirozených podmínek by 50% embryí mělo nést mutaci.
- dalších 13 bylo mozaikovitých

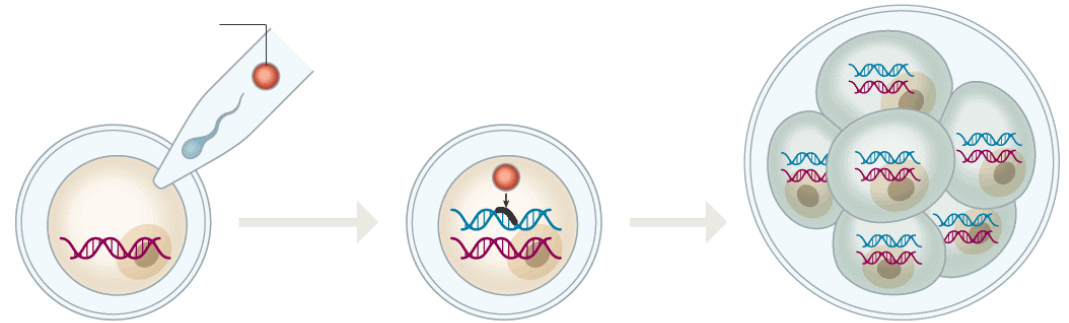
V této větvi experimentu byl genový editor vložen do zygoty den po oplození. Z 54 embryí bylo 13 mozaikovitých, tzn. obsahovaly jak opravené, tak i neopravené buňky.



...byly užity spermie muže trpícího hypertrofickou kardiomyopatií a oocyty získané od 12 zdravých žen

Vložení CRISPR/Cas9 do oocyty současně se spermií

- celkem vytvořeno 58 lidských embryí
- 42 z nich (72%) zcela zdravých v každé buňce
- nenalezeny žádné další nechtěné mutace
- po třech dnech byla embrya zničena
- zbylých 16 embryí vykazovalo nechtěné inserce nebo delece DNA.



„Germ-line Editing“

- Mutaci se zdařilo opravit u 72% testovaných embryí.
- Výzkum na buňkách kůže, přeprogramovaných tak, aby napodobovaly embrya, byl úspěšně zvládnut u méně než třetiny buněk.
- Pokud byť i jen jediná buňka u embrya zůstane needitovaná, zhatí to celý proces (that's going to screw up the whole process)
 - V USA platí zákaz jakéhokoli výzkumu, který by vložil do lidského embrya dědičné změny.
- Tzv. „germline editing“ je kontroverzní z důvodu obav před tzv. designer babies.

2018

...in the years B.C. (before CRISPR)

[Home](#) [News](#) [17 July 2018](#)

Heritable genome editing: action needed to secure responsible way forward

PRESS RELEASE

[Back](#)

An independent inquiry by the Nuffield Council on Bioethics has concluded that editing the DNA of a human embryo, sperm, or egg to influence the characteristics of a future person ('heritable genome editing') could be morally permissible. If that is to happen, a number of measures would need to be put in place first to ensure that genome editing proceeds in ways that are ethically acceptable.

The technique of genome editing – the deliberate alteration of a targeted DNA sequence in a living cell – could theoretically be used in assisted reproduction to alter the DNA of a human embryo, before it is transferred to the womb. This is not currently lawful in the UK, but could, in time, become available as an option for parents who wish to influence the genetic characteristics of their future child (for example, to exclude a heritable disease or a predisposition to cancer in later life). The Council says that the possibilities raised by this radical new approach to reproductive choices could have significant implications for individuals and for all of society, and there must be action now to support public debate and to put in place appropriate governance.

The new report, *Genome editing and human reproduction: social and ethical issues*, sets out the range of ethical issues that arise in relation to the prospect of genome editing becoming available as a reproductive option for prospective parents.

červen 2018

Sign up for alerts

Enter your email address and choose your alerts

<http://nuffieldbioethics.org/news/2018/heritable-genome-editing-action-needed-secure-responsible>



"Rogue"

"China's Frankenstein"

"stupendously immoral"

Geneticist He Jiankui apologises after claims of editing twin babies' genes with CRISPR are leaked
Updated 28 Nov 2018

28. listopadu 2018

The New York Times

Chinese Scientist Who Says He Edited Babies' Genes Defends His Work



He Jiankui, who claims to have created the world's first genetically edited babies, arriving to speak at a Hong Kong conference on Wednesday. Dr. He said he was proud of his work, but colleagues sharply questioned his conduct. Anthony Wallace/Agence France-Presse — Getty Images

Evropský přístup: požádej o povolení a pak to udělej.
Čínský přístup: udělej to a pak se omluv.





Dr. He vysvětluje svůj experiment na konferenci o editování lidského genomu v Hong Kongu 28. listopadu 2018. Dr. Quake jej žádá, aby „prosím odstranil moje jméno“ z diapozitivu děkujícím lidem, kteří mu pomohli s výzkumem



Na summitu před vystoupením Dr. He způsobují novináři takový hluk, že předseda sekce hrozí, že všechny novináře vykáže, pokud se neuklidní.

Nov

S
E



NIH

just

Sun

Hor

des

hur

He

sub

hav

dee

his

nor

in s

ina

utte

pos

pro

the

bin

deb

face

suc

pre

fea

Les

of g

Fra

Dir



m

é

a.

to

ce

f

2019



COMMENT · 13 MARCH 2019

Adopt a moratorium on heritable genome editing

Eric Lander, Françoise Baylis, Feng Zhang, Emmanuelle Charpentier, Paul Berg and specialists from seven countries call for an international governance framework.

Eric S. Lander , Françoise Baylis , Feng Zhang , Emmanuelle Charpentier , Paul Berg , Catherine Bourgain , Bärbel Friedrich , J. Keith Joung , Jinsong Li , David Liu , Luigi Naldini , Jing-Bao Nie , Renzong Qiu , Bettina Schoene-Seifert , Feng Shao , Sharon Terry , Wensheng Wei  & Ernst-Ludwig Winnacker 

<https://www.nature.com/articles/d41586-019-00726-5>

16. března 2019
George Church



“Nemyslím, že modré oči a 15 bodů IQ navíc je hrozba pro veřejné zdraví. Nemyslím, že je to ohrožení naší morálky.“

“Chvíli to vypadalo jako když začalo IVF a každý volal „děti ze zkumavky!“ to musí být něco hrozného. Pak se narodila v roce 1978 Louise Brown, a najednou to bylo ok.“

<https://www.telegraph.co.uk/news/2019/03/16/should-not-fear-editing-embryos-enhance-human-intelligence-says/>

30. prosince 2019

Odsouzen za “illegal medical practices.”
Krom vězení odsouzen k pokutě \$430,000

Další dva badatelé odsouzeni
Zhang Renli na dva roky
Qin Jinzhou podmíněčně na rok a půl

Čínská státní média oznámila, že se narodilo třetí dítě.

<https://www.nytimes.com/2019/12/30/business/china-scientist-genetic-baby-prison.html>

The New York Times

Chinese Scientist Who Genetically Edited Babies Gets 3 Years in Prison

He Jiankui's work was also carried out on a third infant, according to China's state media, in a new disclosure that is likely to add to the global uproar over such experiments.



The scientist He Jiankui at a medical conference in Hong Kong last year, when he announced he had created the world's first genetically edited babies. Kin Cheung/Associated Press

2020

Breaking News

<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/>

- 7 October 2020
- *“for the development of a method for genome editing”*

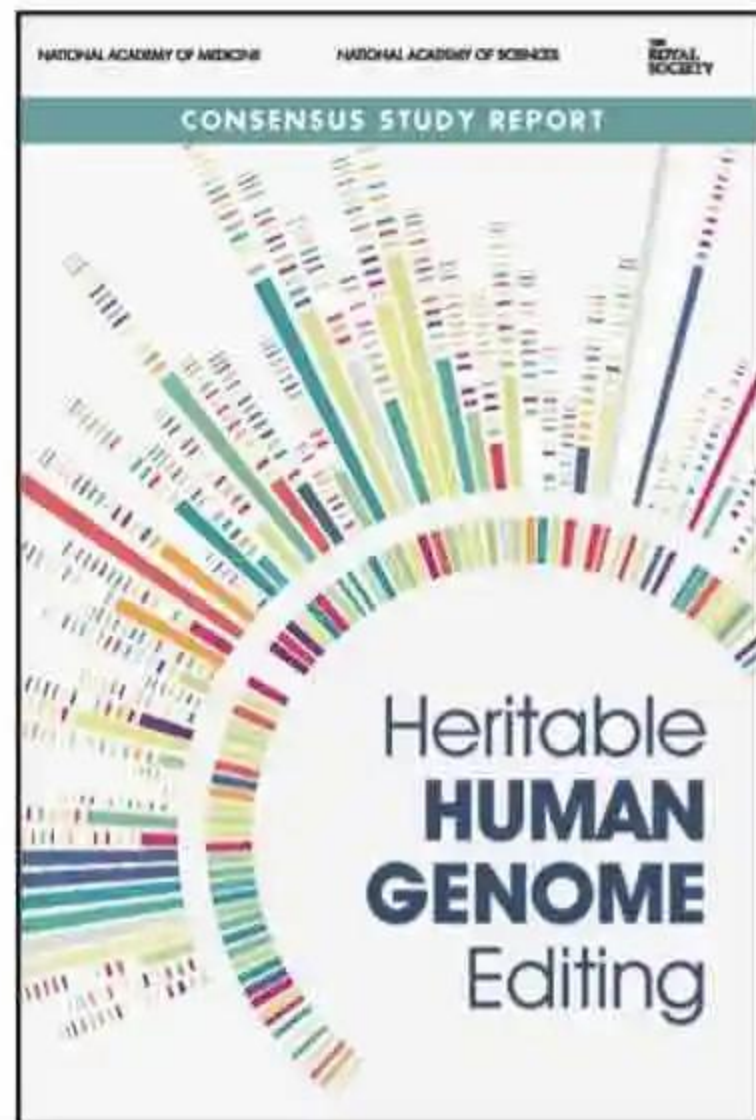


Emmanuelle Charpentier



Jennifer Doudna mluví na tiskové konferenci v UC Berkeley dopoledne 7. října 2020.

September 2020



Heritable Human Genome Editing 2020

- <https://www.nap.edu/download/25665#>
- National Academy of Sciences 2020. *Heritable Human Genome Editing*. Washington, DC: The National Academies Press.
<https://doi.org/10.17226/25665>.
- HHGE = Heritable Human Genome Editing
 - = termínem se míní jakákoli editace linií zárodečných buněk, která je prováděna v klinickém kontextu, **s úmyslem transferovat výsledné embryo do dělohy ženy pro navození těhotenství.**

Heritable Human Genome Editing

International Commission on the
Clinical Use of Human Germline Genome Editing

A Consensus Study Report of the

NATIONAL ACADEMY OF MEDICINE AND
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES

and

THE
ROYAL
SOCIETY

THE NATIONAL ACADEMIES PRESS
Washington, DC
www.nap.edu

This prepublication version of Heritable Human Genome Editing has been provided to the public to facilitate timely access to the report. Although the substance of the report is final, editorial changes may be made throughout the text and citations will be checked prior to publication.

Heritable Human Genome Editing 2020

National Academy of Sciences 2020. *Heritable Human Genome Editing*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25665>.

- je důležité si uvědomit, že samotná idea provádění úmyslných modifikací buněk zárodečných linií **evokuje u některých lidí eugenické hnutí 19. a první poloviny 20. století**, které podporovalo nyní zdiskreditované teorie vedoucí k persekuci celých skupin lidí, založených na jejich příslušnosti rasové, náboženské, třídní a na jejich mentálních schopnostech.
- **Žádný stát na světě se doposud nerozhodl, že je vhodné přistoupit ke klinickému využití HHGE**, a klinické využití daných technologií je v současné době v mnoha zemích explicitě zakázáno nebo není nijak regulováno.
- **Tento report nečiní žádné prohlášení ohledně toho, zda jakékoli klinické využití bezpečné a efektivní metodologie HHGE, pokud by tak prokázal preklinický výzkum, by mělo být povoleno.**
 - Tento report se na místo toho snaží stanovit, zda bezpečnost a účinnost metodologií týkajících se editace lidského genomu spojené s technologiemi asistované reprodukce jsou vyvinuty nebo by mohly být vyvinuty natolik dostatečně, aby umožnily odpovědné užití HHGE.

Heritable Human Genome Editing 2020

National Academy of Sciences 2020. *Heritable Human Genome Editing*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25665>.

- Stávající znalosti lékařské genetiky naznačují, že možnost užití HHGE pro to, aby se budoucím rodičům zajistila možnost mít geneticky příbuzné děti, které nebudou mít **monogenní chorobu, je realistická.**
- Vědecké poznatky **nejsou** ve stadiu, ve kterém by HHGE mohla být použita efektivně a bezpečně **pro polygenní choroby.**

WHO

- 2. prosince 2018, WHO Director-General Tedros Adhanom Ghebreyesus:
- editování genomů nemůže být prováděno bez jasně stanovených pravidel
- WHO organizuje panel expertů k diskusi a stanovení pravidel týkajících se „problémů etiky a sociální bezpečnosti“.
- "We have a big part of our population who say, 'Don't touch.'"

2021

WHO 2021

WHO Expert Advisory Committee on Developing Global Standards for Governance and Oversight of Human Genome

Editing. Human Genome Editing: recommendations. Geneva: World Health Organization; 2021.

- komise založena v prosince 2018
- 18 členů

WHO Expert Advisory Committee on
Developing Global Standards for Governance
and Oversight of Human Genome Editing

HUMAN GENOME EDITING:
RECOMMENDATIONS



World Health
Organization

WHO

2021: Human Genome Editing: Recommendations

- Doporučení
 - Vedoucí pozice WHO a jeho generálního ředitele
 - Mezinárodní spolupráce pro účinné vedení a dohled
 - Registry editací lidského genomu
 - dohled, aby každá klinická zkouška editace DNA somatických buněk byla dozorována místní Etickou komisí a zapsána do registru
 - Mezinárodní výzkum a lékařské cesty (medical travel)
 - záruky, aby každý výzkum byl jurisdikci daného státu
 - Ilegální, neregistrovaný, neetický nebo ne-bezpečný výzkum a další aktivity
 - Intelektuální vlastnictví
 - patentování
 - Vzdělávání, povinnosti, závazky
 - Etické hodnoty a principy

TREATMENTS

First sickle cell patient treated with CRISPR gene-editing still thriving

December 31, 2021 - 5:05 AM ET
Heard on Morning Edition



4-Minute Listen + PLAYLIST ↓ ↔ ☰



Victoria Gray



Photo Credit: Meredith Rizzo / NPR

Advertisement

NEWS

Meet Victoria Gray, The Thriving Sickle Cell Patient Who Was The First To Be Treated With CRISPR Gene Editing

Shanique Yates. 4. 1. 2022.

<https://www.npr.org/sections/health-shots/2021/12/31/1067400512/first-sickle-cell-patient-treated-with-crispr-gene-editing-still-thriving>

Victoria Gray

- je **první pacientkou v USA, léčenou pomocí technologie CRISPR.**
- Victoria Gray trpí srpkovitou anémií.
- Cílem terapie je obnovit produkci fetálního γ -globinu, což může zlepšit patologii jak srpkovité anémie, tak β -thalassaemie.
 - fetální hemoglobin může nahradit jak nefunkční hemoglobin (srpkovitá anémie) tak nedostatek funkčního hemoglobinu (β -thalassaemie).
- Léčba započala 2. července 2019 (pacientce bylo 34 let), kmenové buňky, izolované z periferní krve byly ex vivo editovány. **V roce 2021 necítí žádné obtíže**, křeče a bolesti spojené se srpkovitou anémií.
- 2021: 46% hemoglobinu v jejím systému je fetální hemoglobin. Fetální hemoglobin se nachází v 99,7% jejích erytrocytů.
- 81% kmenových buněk obsahuje zamýšlenou genetickou změnu pro produkce fetálního hemoglobinu.
- její **terapie stála dva miliony dolarů**
- [https://www.thelancet.com/journals/lanhae/article/PIIS2352-3026\(19\)30169-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanhae/article/PIIS2352-3026(19)30169-3/fulltext)
- The Lancet Haematology, CRISPR-Cas9 gene editing for patients with haemoglobinopathies, *The Lancet Haematology*, Volume 6, Issue 9, 2019, Page e438,ISSN 2352-3026,
- [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(19\)30169-3](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(19)30169-3).
- <https://www.npr.org/sections/health-shots/2019/12/25/784395525/a-young-mississippi-womans-journey-through-a-pioneering-gene-editing-experiment>

Copyrighted Material

THE

CODE BREAKER

Jennifer Doudna, Gene Editing,
AND THE Future of the Human Race

#1

New York Times
Bestseller

WALTER
ISAACSON

BESTSELLING AUTHOR OF *Leonardo da Vinci* AND *Steve Jobs*
Copyrighted Material

Isaacson, W., (2021) *The Code Breaker. Jennifer Doudna, Gene Editing and the Future of the Human Race*. Simon & Schuster. New York.

2022

The creator of the CRISPR babies has been released from a Chinese prison

He Jiankui created the first gene-edited children. The price was his career. And his freedom.

By Antonio Regalado

April 4, 2022

Lidé, kteří jej znají, ho popisují jako „idealistického, naivního a ambiciózního.“

Věřil, že našel novou cestu jak „kontrolovat epidemii HIV“ za kterou by zasloužil Nobelovu cenu.

Práce dr. He (Lulu, Nana) nebyla dodnes otištěna v žádném vědeckém časopise.

Regalado, A., (2022) The creator of the CRISPR babies has been released from a Chinese prison. *MIT Technology Review*. April 4, 2022

<https://www.technologyreview.com/2022/04/04/jiankui-prison-free-crispr-babies/>



David Bennett (57)

- První pacient, který přežil s transplantovaným, geneticky upraveným srdcem z prasete
- žil po transplantaci dva měsíce, od 7. ledna do 8. března 2022
 - editace genů v prasečích buňkách
 - z těchto buněk se vytvoří prasečí embryo
 - prase vyrůstá ve speciálním prostředí
 - jeho srdce se použije k transplantaci
 - pacient musí brát immunosupresiva



Chirurg Bartley P Griffith na obrázku s David Bennett v březnu 2022

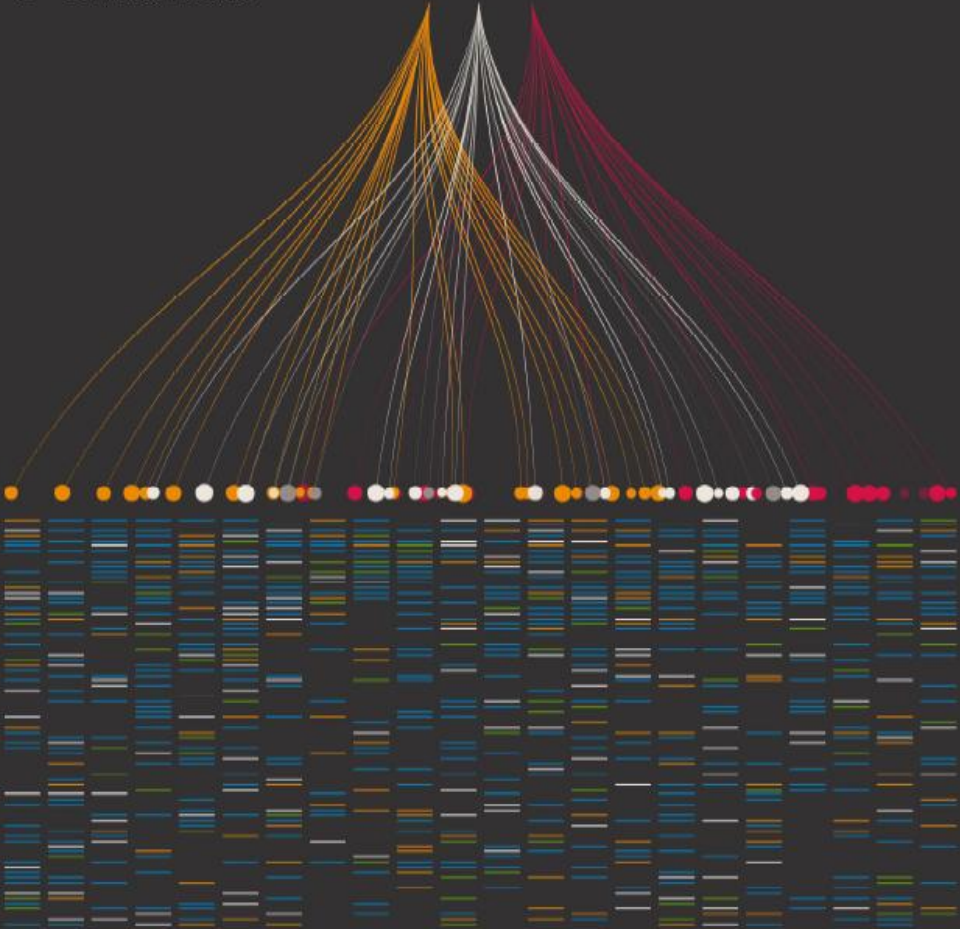
David Bennett (57)

- Jednalo se o genovou editaci na **celkem deseti místech genomu srdečních buněk**, konkrétně
 - o knock-out tří prasečích genů schopných vyvolat imunitní odpověď člověka
 - **přidání šesti lidských genů**, pomáhajících lidskému tělu přijmout orgán
 - a zabránění srdci odpovědět na růstový hormon s cílem, aby srdce odpovídalo svou velikostí tělu příjemce
- **Etické otázky**
 - (1) zda, pokud je dosud i transplantace srdce z člověka na člověka riskantní, je riziko xenotransplantace z prasete na člověka přijatelné
 - (2) zda je vyloučen možný přenos patogenů z prasečího srdce do člověka
 - (3) byly zaznamenány protesty aktivistů za práva zvířat a
 - (4) může nastat konflikt pro jednotlivé příslušníky těch náboženství, které zapovídají konzumaci vepřového; byť např. zástupci židovského náboženství se vyjádřili k této xenotransplantaci kladně

2023

Third international summit on human genome editing

6 – 8 March 2023



500 expertů z celého světa plus 1 600 dalších připojených online.

A screenshot of a video player showing a presentation slide. The slide has a blue background and white text. The title is "CRISPR and Human Genome Editing: Progress & Opportunities". The speaker is identified as Jennifer Doudna, Professor UC Berkeley, Gladstone, HHMI Investigator, and Founder and Chair, Innovative Genomics Institute. The video player interface includes a play button, a progress bar showing 0:06 / 23:28, and a small video feed of Jennifer Doudna in the top right corner.

CRISPR and human genome editing: progress and opportunities | Jennifer Doudna

Third International Summit on Human Genome Editing

CRISPR and Human Genome Editing: Progress & Opportunities

Jennifer Doudna
Professor UC Berkeley, Gladstone
HHMI Investigator
Founder and Chair, Innovative Genomics Institute

0:06 / 23:28 Posunutím zobrazíte více

<https://royalsociety.org/science-events-and-lectures/2023/03/2023-human-genome-editing-summit/>

2023: Třetí mezinárodní summit Editování lidského genomu

The Third International Summit on Human Genome Editing

- **Editování lidského zárodečného genomu pro výzkum (nikoli pro reprodukci)**
- Základní výzkum pro editování buněk lidských embryí pokračuje, cílem je porozumění aspektům raného vývoje embrya a porozumění tomu, jaké metody by bylo možné využít pro korigování genetických variant vedoucím nemocím. Bylo rovněž dosaženo významného pokroku v derivování funkčních gamet z linií kmenových buněk. Základní výzkum na tomto poli by měl pokračovat.
- **Dědičné editování lidského genomu (HHGE)**
- Doposud nebyly ustanoveno preklinické zajištění bezpečnosti a účinnosti HHGE, ani nebyla uzavřena společenská a politická debata na tato témata. (V některých případech je alternativou preimplantační diagnostika). HHGE by nemělo být prováděno, pokud přinejmenším,
 - nebudou stanoveny přiměřené standardy zajišťující bezpečnost a účinnost metody,
 - nebude legálně sankcionováno a
 - bude vyvíjeno a užito pod rigorózním dohledem, které podléhá odpovědnému vedení.
- **Tyto podmínky v současnosti nejsou naplněny.**

2023: Třetí mezinárodní summit Editování lidského genomu

The Third International Summit on Human Genome Editing

- Kritici zdůrazňují fakt, že **pouze jeden den** ze tří byla debatována editace spermií, oocytů a raných embryí, přesto, že se jednalo o první konferenci po roce 2018, na které bylo ohlášeno narození editovaných dětí.
- Avšak zda vůbec nebo nikoli budou dědičné modifikace povoleny záleží na rozhodnutí společnosti a nikoli na rozhodnutí vědců.
- Dr. He se summitu v Londýně nezúčastnil, založil novou laboratoř v Pekingu, ve které vyvíjí nové genové terapie pro nemoci jako je svalová dystrofie, dává přednášky a snaží se získat peníze.
- David Liu: technologie nové generace umožní lidem aby mohli ovlivnit sekvence svých genů a nebyli již tolik závislí na překlepech ve své DNA.

2023: Třetí mezinárodní summit Editování lidského genomu

The Third International Summit on Human Genome Editing

- třetí summit byl méně skandální než druhý a víc zaměřený na vědu
- soustředění se na „somatický genom“
 - snížení ceny
 - ekvita, dostupnost pro pacienty všech zemí
- pro editaci zárodečných linií je ještě příliš brzy
 - je zde stále „a big if“
- spermie vyrobeny z linií kmenových buněk
- Čína po aféře roku 2018 má nové zákony a regulace, stále však nikoli dostatečné
- podpora dalšího výzkumu
- další velkou výzvou je editace DNA lidského mikrobiomu
 - mikrobiom je stále více spojován s mnoha nemocemi, od infekcí, **astma** po neurodegenerace
 - v zemědělství krávy, které nebudou produkovat tolik metanu



Na Třetím mezinárodním Summitu Editování lidského genomu promluvila i Victoria Gray, 37mi letá matka čtyř dětí, která byla vyléčena ze srpkovité anémie pomocí technologie editace genomu.

Experimentální léčba započala v roce 2019.

Nyní pracuje na plný úvazek a věnuje se rodině.

Gray měla po své řeči potlesk ve stoje.

CASGEVY

Vertex Pharmaceuticals, Boston and CRISPR Therapeutics in Zug, Switzerland.

- Britský The Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (**MHRA**) schválila terapii, která využívá CRISPR-Cas9.
- Casgevy se užije na léčbu **srpkovité anémie** a **β -talasemie**.
 - Ve studii srpkovité anémie bylo sledováno 29 ze 45 účastníků. Po aplikaci 28 pacientů více netrpělo oslabujícími epizodami bolesti po dobu nejméně jednoho roku po léčbě.
 - Ve studii s β -talasemií dostávalo Casgevy 42 osob, 39 z nich nepotřebovalo transfuzi červených krvinek po dobu nejméně jednoho roku. U zbývajících tří se potřeba krevních transfuzí snížila o více než 70 %.

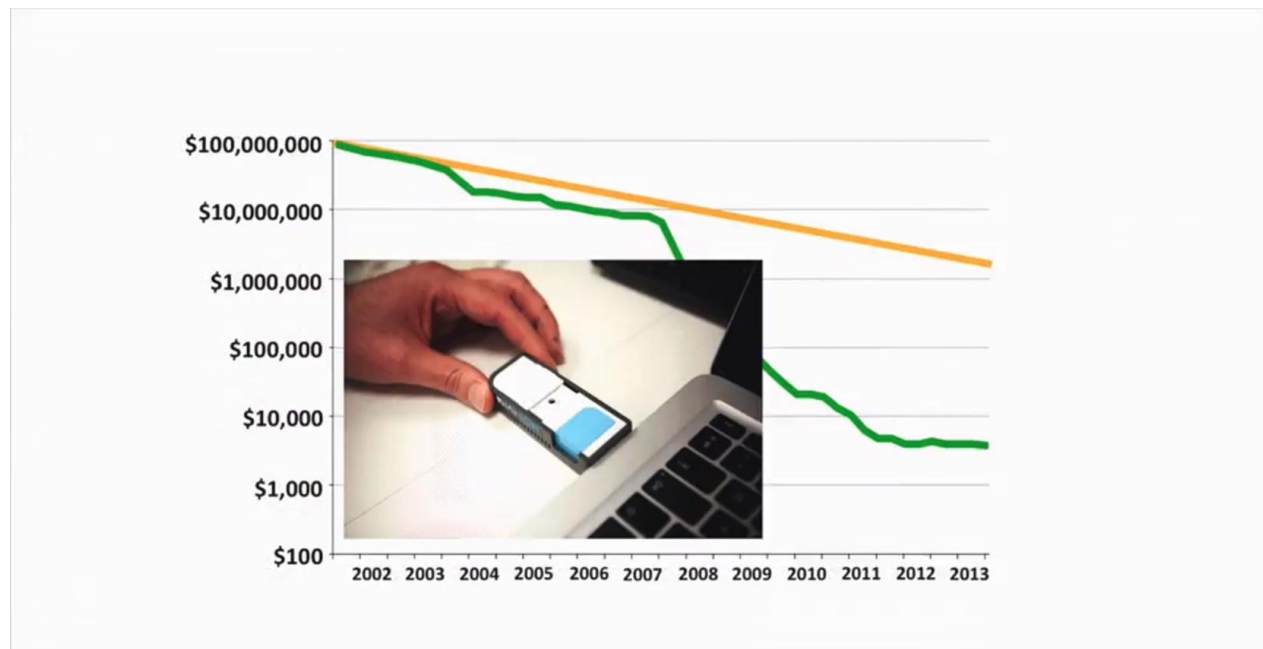
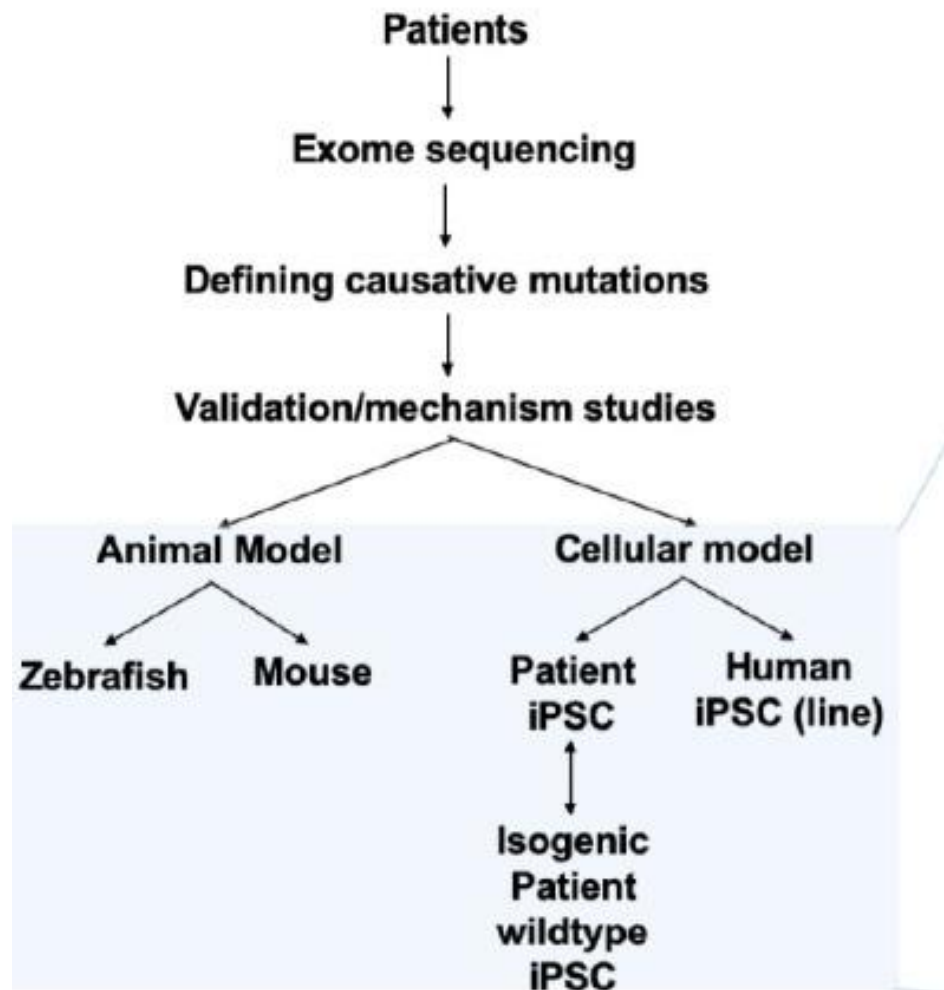
- Wong, C., (2023) UK first to approve CRISPR treatment for diseases: what you need to know. *Nature* 623, 676-677 (2023) doi: <https://doi.org/10.1038/d41586-023-03590-6>
<https://www.nature.com/articles/d41586-023-03590-6>

(Vrozené) srdeční vady a CRISPRy

CHD a CRISPRs

- CHD je obecně spojena s genomickými poruchami kombinovanými s vlivy prostředí, které často ústí v onemocnění nejasné etiologie. Přestože genetické faktory hrají u CHD důležitou roli, detailní informace většinou nejsou známy.
- Identifikace genů a mutací způsobujících CHD se urychlila s nedávným rozvojem technologií „next-generation“ sekvenování

CHD a CRISPRs

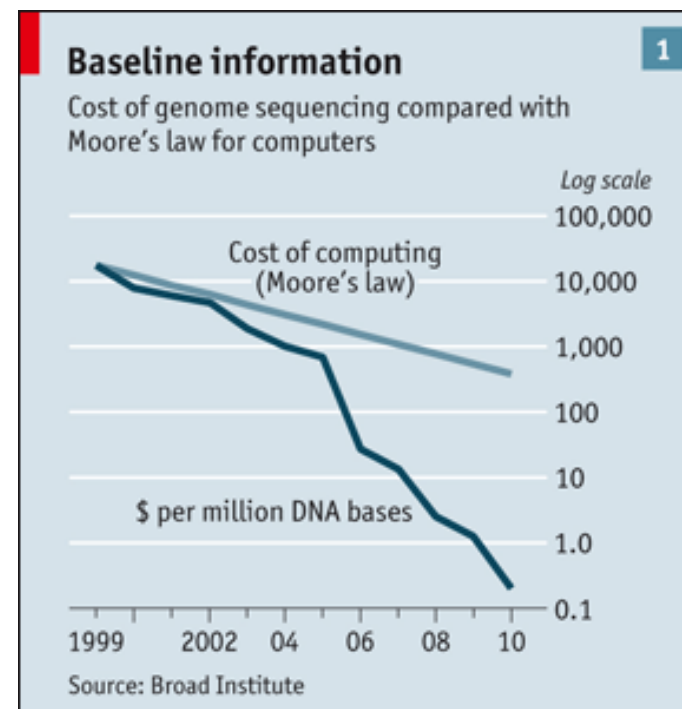


Na označené místo v přístroji s portem USB se umístí kapka krve a v notebooku se během hodiny objeví kompletní sekvence DNA. V 2021 se stalo realitou.

Jednoduchost systému CRISPR-Cas9 umožnila rychlé modelování mutací u myší a lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC).

Moorův zákon

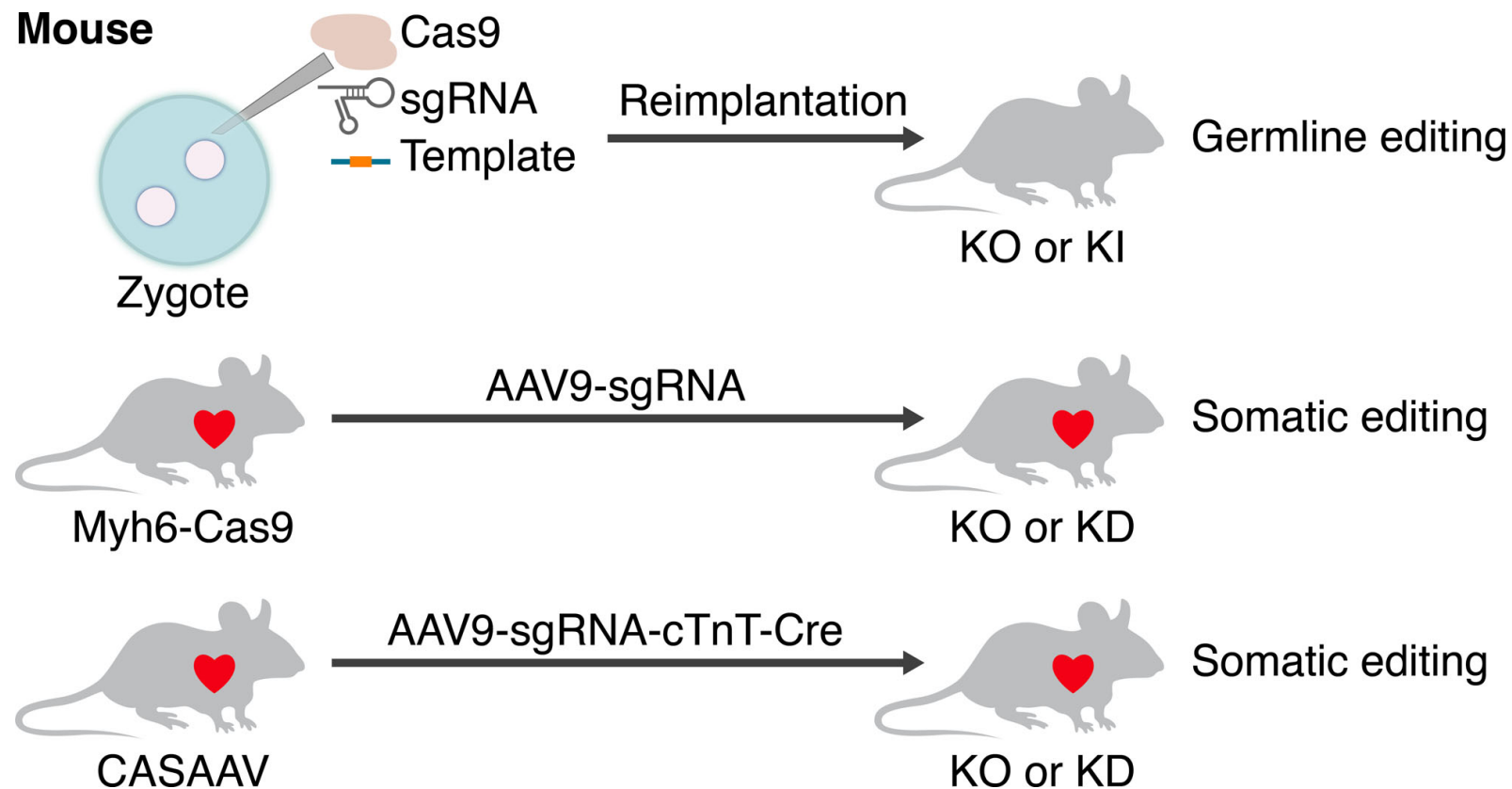
- cena za sekvenování se během deseti let snížila milionkrát
 - jen málo věcí na světě milionkrát zlevní v průběhu deseti let!



Moorův zákon = počítače se stávají zhruba dvakrát výkonnější během dvou let. Během dekády se tedy 30x zvýší jejich výkon s odpovídající redukcí ceny.

Zákon je pojmenován podle spoluzakladatele Intelu Gordon E. Moore, který tento trend předpověděl v roce 1965.

Modelování kardiovaskulárních onemocnění pomocí editace genomu CRISPR-Cas9 u myši.



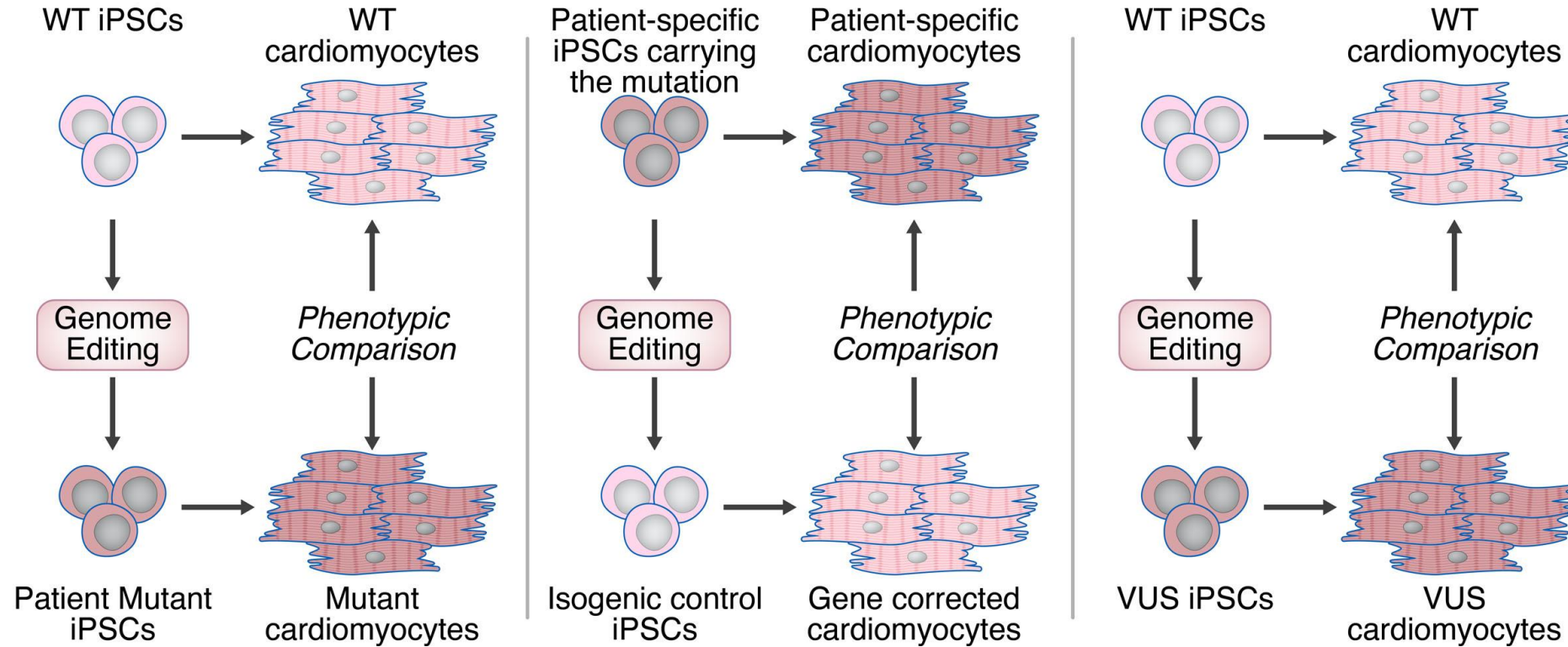
Při editaci zárodečných linií se KO (knock-out) nebo KI (knock-in) myši vytvářejí vpravením CRISPR-Cas9 s templátem DNA nebo bez něj do myších zygot.

Somatická editace pro KO nebo KD (knock-down) v srdci zahrnuje dodání virů AAV-sgRNA nebo AAV-sgRNA-cTnT-Cre myším Myh6-Cas9, respektive CASA AV.

CASA AV = recombinant adeno-associated virus (AAV)

...zde ovšem bez větších etických otázek

iPSC



CRISPR-Cas9 lze použít k inserci mutací způsobujících onemocnění do iPSC WT (divokého typu), k opravě genových mutací v iPSC odvozených od pacientů a ke screeningu variant nejistého významu (VUS). Ve všech případech se provádí srovnání fenotypu kardiomyocytů diferencovaných z iPSC mezi kardiomyocyty WT, specifickými kardiomyocyty z pacienta, korigovanými kardiomyocyty a kardiomyocyty s VUS.

CRISPRs a Microbiom

IGI's 'Audacious' New Frontier for CRISPR: Editing Microbiomes for Climate and Health

April 17, 2023

Andy Murdock, UC Berkeley

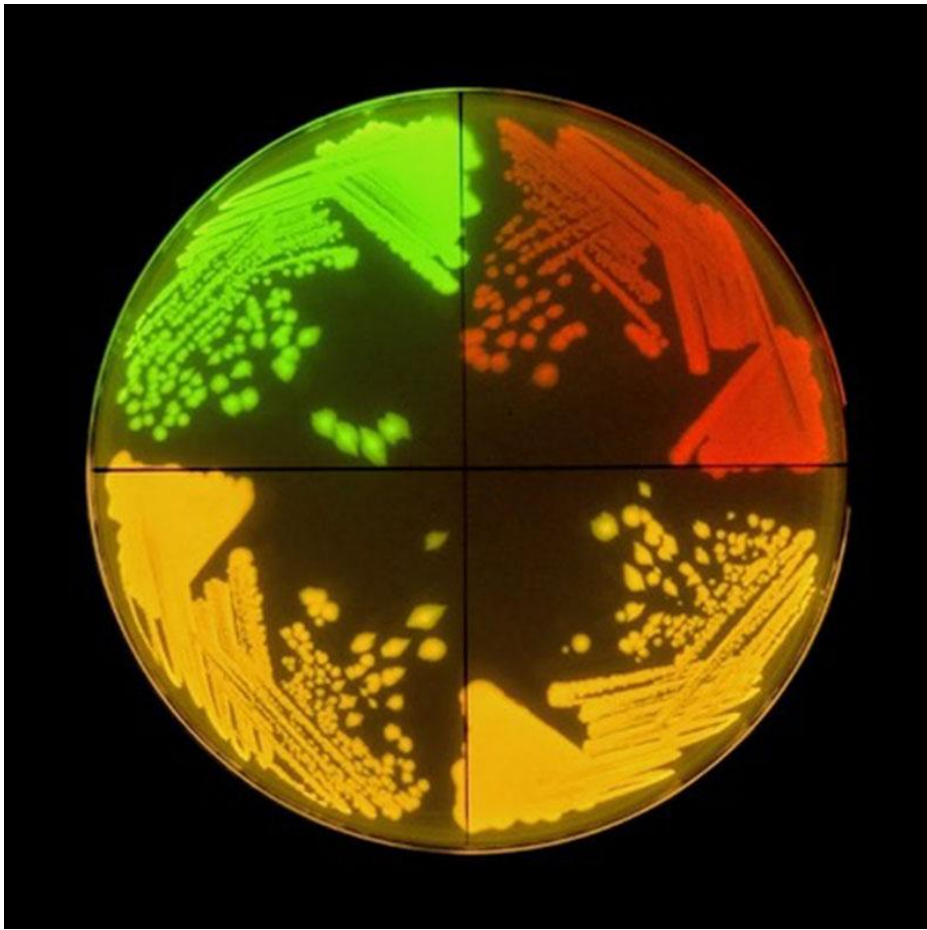
'We are bringing together these two breakthrough technologies – metagenomics and Crispr – to create a brand new field of science called precision microbiome editing.'



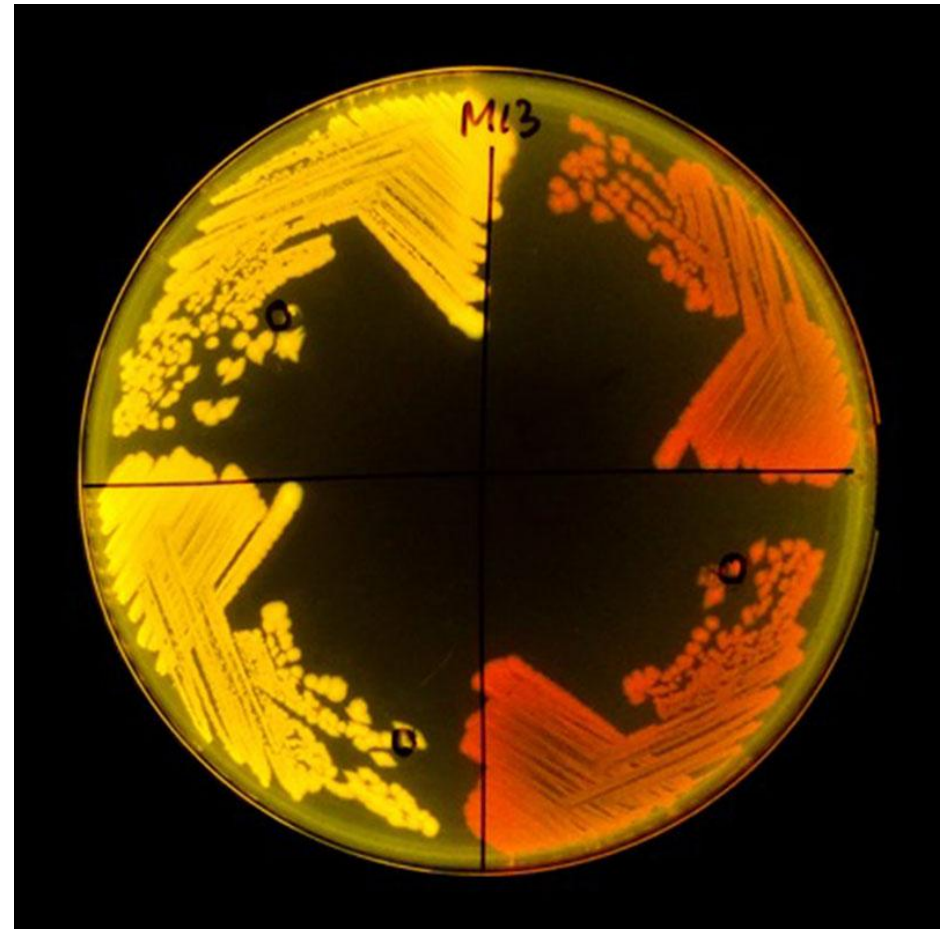
<https://www.universityofcalifornia.edu/news/igis-audacious-new-frontier-crispr-editing-microbiomes-climate-and-health>

2019: Allergy, Asthma Risk Are Increased by Microbial Compound in Infant Gut

- Objeven specifický bakteriální lipid v GIT novorozenců který ovlivňuje imunitní dysfunkci spojenou s alergickým astmatem
 - tento lipid může být použit k posouzení, u kterých dětí hrozí riziko vzniku tohoto onemocnění v dětství
- Jednoměsíční kojenci s nezdravým mikrobiálním ekosystémem v GIT mají zvýšené riziko rozvoje astmatu v pozdějším dětství.
- specifický lipid 12,13-diHOME, který se ve vysokých koncentracích nachází ve stolici těchto kojenců, **snižuje počet a aktivitu klíčové skupiny imunitních buněk zvaných regulační T-buňky (Tregs), které za normálních okolností potlačují alergický zánět.**
- Počet kopií tří bakteriálních genů pro 12,13 DiHOME nebo koncentrace samotného lipidu ve vzorcích stolice dětí je ukazatelem , u kterých dětí se ve věku 2 let vyvine alergie nebo ve věku 4 let astma.
- <https://www.ucsf.edu/news/2019/07/414991/allergy-asthma-risk-are-increased-microbial-compound-infant-gut>



Three separate *E. coli* strains that express green, red, and both (yellow).



Here, CRISPR gene editing machinery was delivered to the mouse's gut using a virus, editing out the gene responsible for the green color.

The role of CRISPR in microbiome engineering

- CRISPR jsou využívány ke zmírnění poruch mikrobiomu.
 - CRISPR-Cas9, stříhají specifické sekvence bakteriální DNA a eliminují tak patogenní bakterie.
- SNIPR Biome používá CRISPR k eliminaci patogenních bakterií E.coli
 - systém umí zabít E. coli
- standardně dnes používám antibiotika. Dnes však zvýšená rezistence vůči antibiotikům, čímž se antibiotika stávají neúčinnými.
- **Výhodou CRISPRů:**
 - nerozlišuje mezi bakteriemi citlivými na antibiotika a bakteriemi rezistentními na antibiotika
 - může cíleně zasáhnout patogenní bakterie a ušetřit ty prospěšné, které jsou nedílnou součástí zdravého střevního mikrobiomu

Krávě produkující méně metanu

„low-methane cow“

- Přibližně 980 milionů krav na celém světě se podílí na cca 27 % všech emisích metanu spojených s lidskou civilizací.
- krmení skotu určitým druhem červených mořských řas snižuje expresi genů produkujících metan u některých mikrobů ve střevech zvířat.
- Zajistit dostatek mořských řas pro denní spotřebu celosvětové populace krav je však náročný úkol a pravděpodobně by se to nepodařilo u volně se pasoucího dobytka, který tvoří většinu hospodářských zvířat na světě.
 - Včasný zásah pomocí CRISPR by však mohl vést k „low-methane cow“ a poskytnout léčbu dostupnou téměř každému teleti.
- **prospívá nejen životnímu prostředí, ale i zemědělcům, protože snížená produkce metanu znamená efektivnější přeměnu krmiva na potraviny.**
- Snahou je dosáhnout stavu, kdyby látka v potravě podávaná mladému teleti mu mohla zajistit celoživotní nízké emise.

Asthma

- určité složení mikrobiomu v GIT dětí zvyšuje riziko vzniku astmatu. Výzkum již identifikoval specifickou zánětlivou sloučeninu produkovanou střevními bakteriemi u dětí, u nichž se rozvíjí astma, a také bylo zjištěno, které bakterie produkují největší koncentraci této sloučeniny, což by mohly být slibné cíle pro intervenci.
- dysfunkční mikrobiom u člověka je asociován se zdravotními problémy jako je **astma, alergie a obezita**.
- <https://www.chemistryworld.com/news/the-launch-of-a-new-field-precision-microbiome-editing/4017260.article>

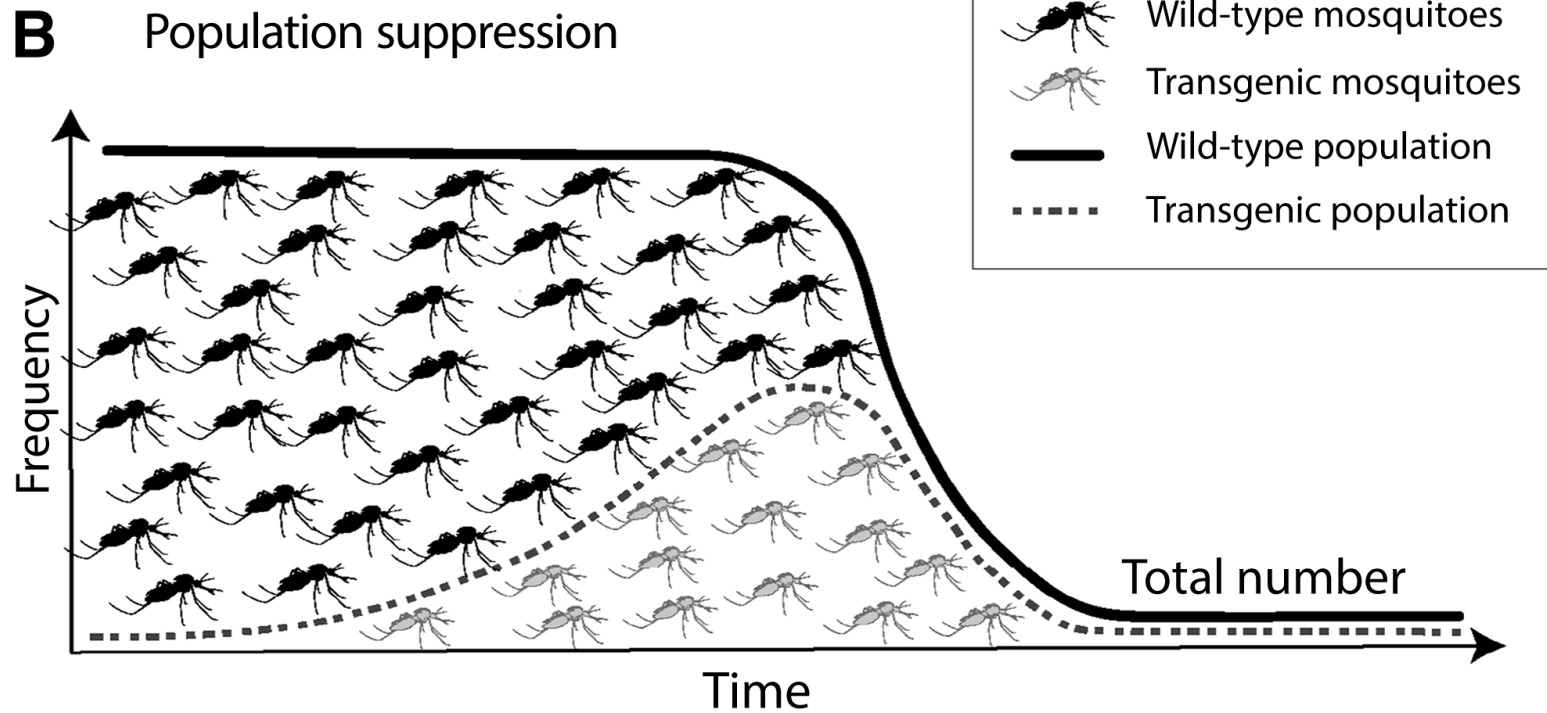
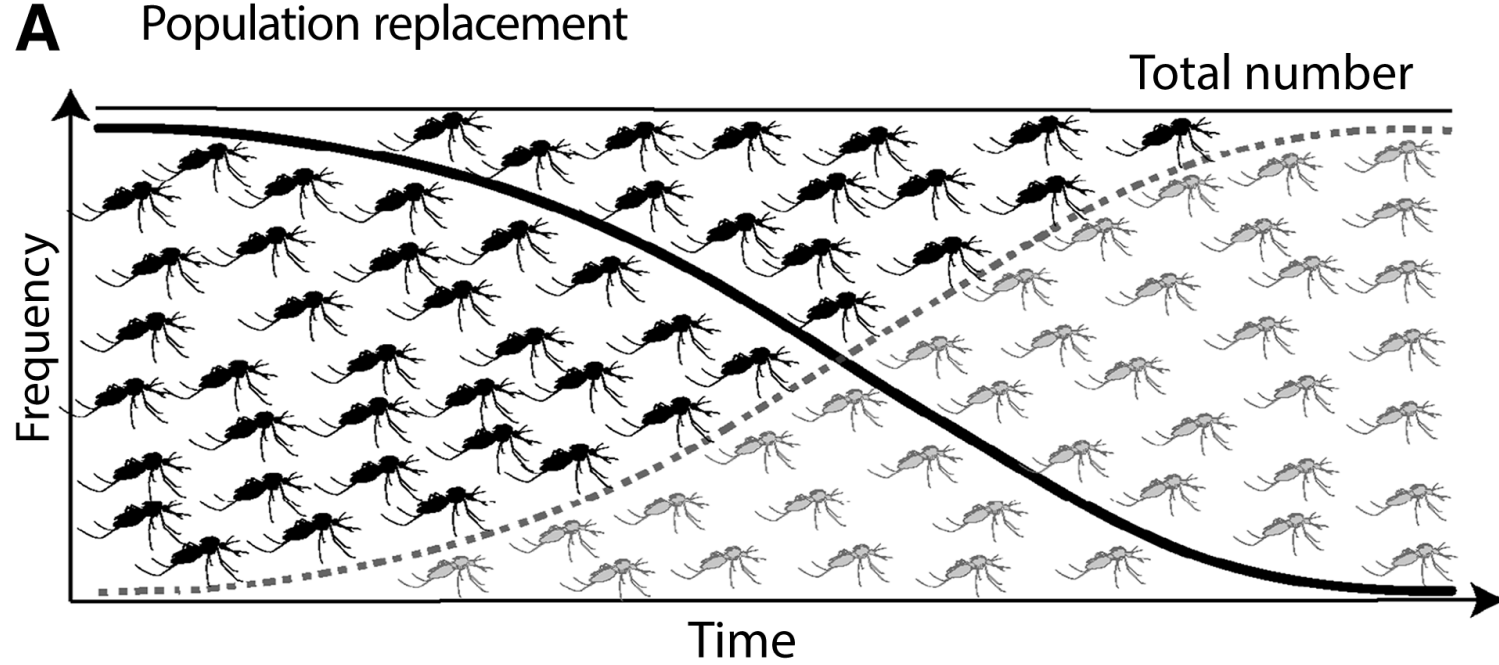
Méně obvyklé využití

Gene Drive

Gene Drive

Malárie

- 2019: každé dvě minuty někde na světě zemře dítě na malárii
- Každým rokem je hlášeno 200 miliónů nových případů malárie.
- V roce 2018 zemřelo 405 000 lidí na malárii.
- V roce 2017 zemřelo na malárii odhadem 416 000 lidí, a v roce 2010 celkem 585 000.
 - <https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019>
- na světě je celkem 3 500 druhů komárů.
- Plasmodium ale přenáší jen tři, *Anopheles gambiae*, *Anopheles coluzzii* a *Anopheles arabiensis*





Golden toad (*Incilius periglenes*)

The golden toad has not been seen since 1989, and is believed to be extinct

Anti-CRISPR

- je objeveno kolem padesáti anti-CRISPRových proteinů, každý se svým specifickým způsobem blokace cut-and-paste systému CRISPRů.

Využití:

- jemnější kontrola aktivity CRISPRů při editování genů v rámci biotechnologií a medicíny.
- testování, zdali by tyto proteiny nebo jiné CRISPR-zastavující molekuly mohly sloužit v rámci biobezpečnosti poslední instance, schopné zastavit biozbraně na bázi editování genomů nebo gene drive, který se vymkl kontrole.
- Jennifer: ví někdo, jak je použít, abychom mohli provádět smysluplnou kontrolu? Tak daleko ještě nejsme.

The kill-switch for CRISPR that could make gene-editing safer

How anti-CRISPR proteins and other molecules could bolster biosecurity and improve medical treatments.

[Elie Dolgin](#)



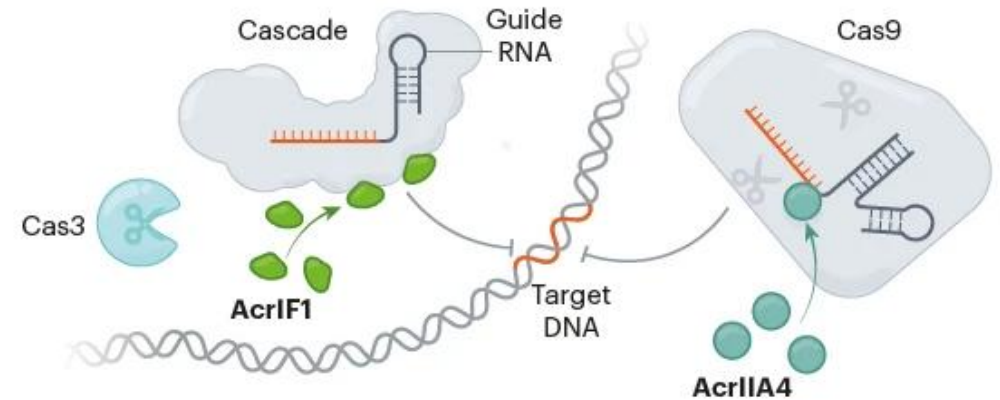
<https://www.nature.com/articles/d41586-020-00053-0>

CRISPR CORRECTIVES

There are two particularly well-studied types of CRISPR DNA editing. Type I uses a Cascade complex and guide RNA to bind a DNA target, which is then cut with the Cas3 enzyme. Type II uses a single enzyme, such as Cas9, to bind and cut the target sequence. Researchers have discovered more than 50 anti-CRISPR (Acr) proteins that turn off DNA-editing activity in a variety of ways. Here are two commonly observed mechanisms.

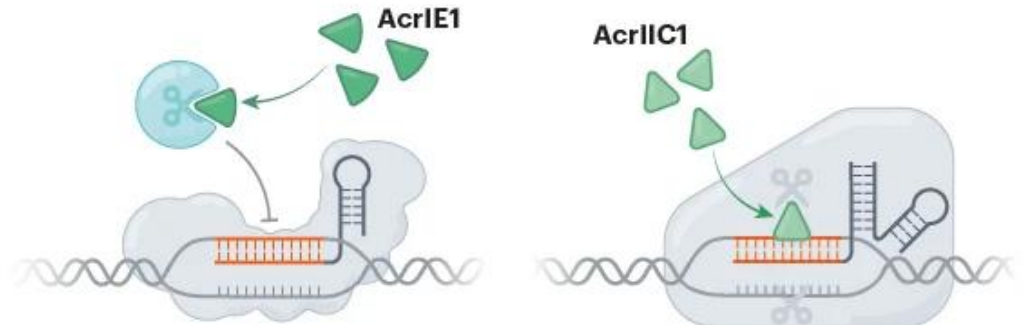
DNA-binding inhibition

Some Acr proteins prevent CRISPR complexes from binding target DNA.



DNA-cleavage inhibition

Some Acr proteins specifically block the cutting action.



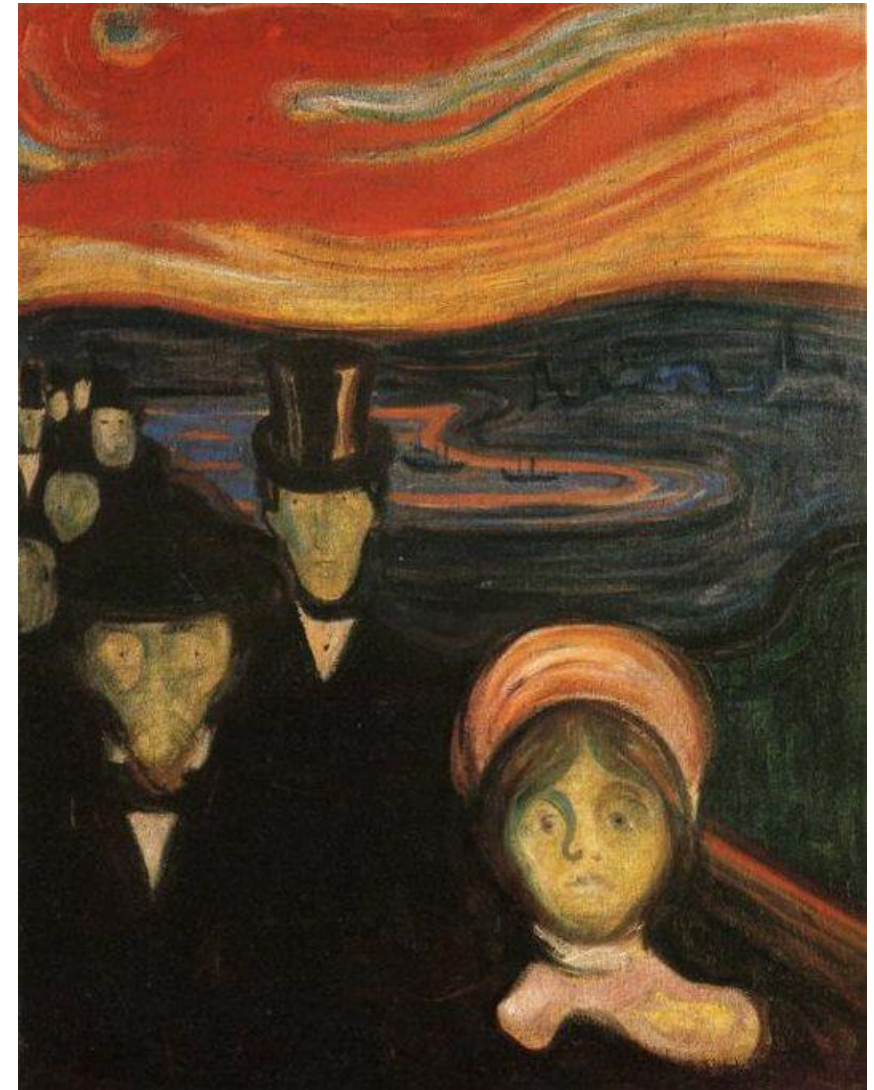
Edvard Munch

1863-1944

- v jeho pěti letech matka umírá na tuberkulózu
- v jeho třinácti letech umírá jeho tehdy patnáctiletá sestra na tuberkulózu
 - celý život se bojí, že onemocní též
- další sestra opakovaně hospitalizována se schizofrenií
- nejvíce ceněné obrazy před rokem 1920
- jeden z mála umělců, který byl schopen zachytit lidskou zkušenost a transformovat ji do vizuálně vyjádřitelné podoby.
- považuje za nezbytné použít privátní subjektivní zkušenost pro vytvoření „univerzální“ výpovědi a zobrazení

• <https://www.munchmuseet.no/en/edvard-munch/edvard-munchs-sensitive-lungs/>

• <https://www.edvardmunch.org/biography.jsp>

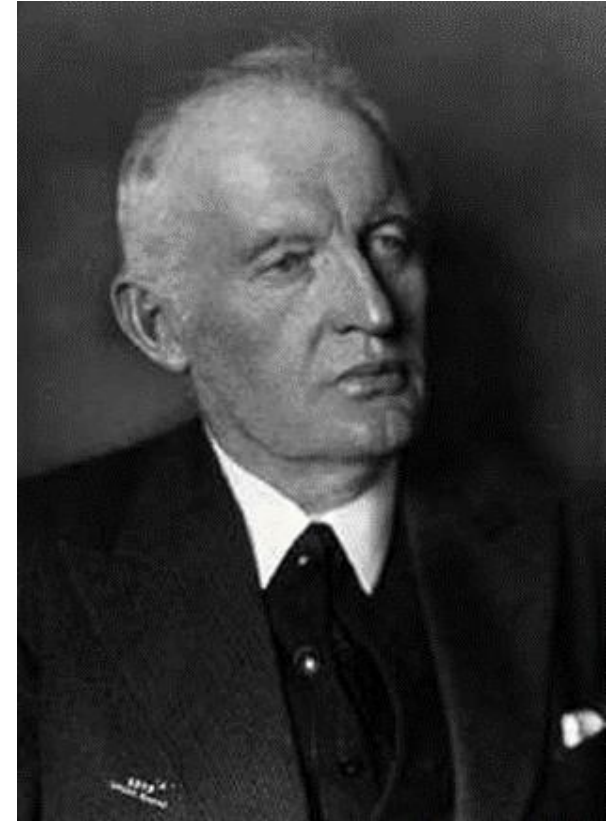


Úzkost 1894

Smrt otce 1889

- „Můj otec byl povahově nervózní a obsesivně religiózní – až na hranici psychoneurózy. Od něj jsem zdědil semena šílenství. Andělé strachu, smutku a smrti mi stáli po boku ode dne, kdy jsem se zrodil.“
- Munch byl diagnostikován s depresí, úzkostí a bipolární poruchou, mezi jinými nemocemi.

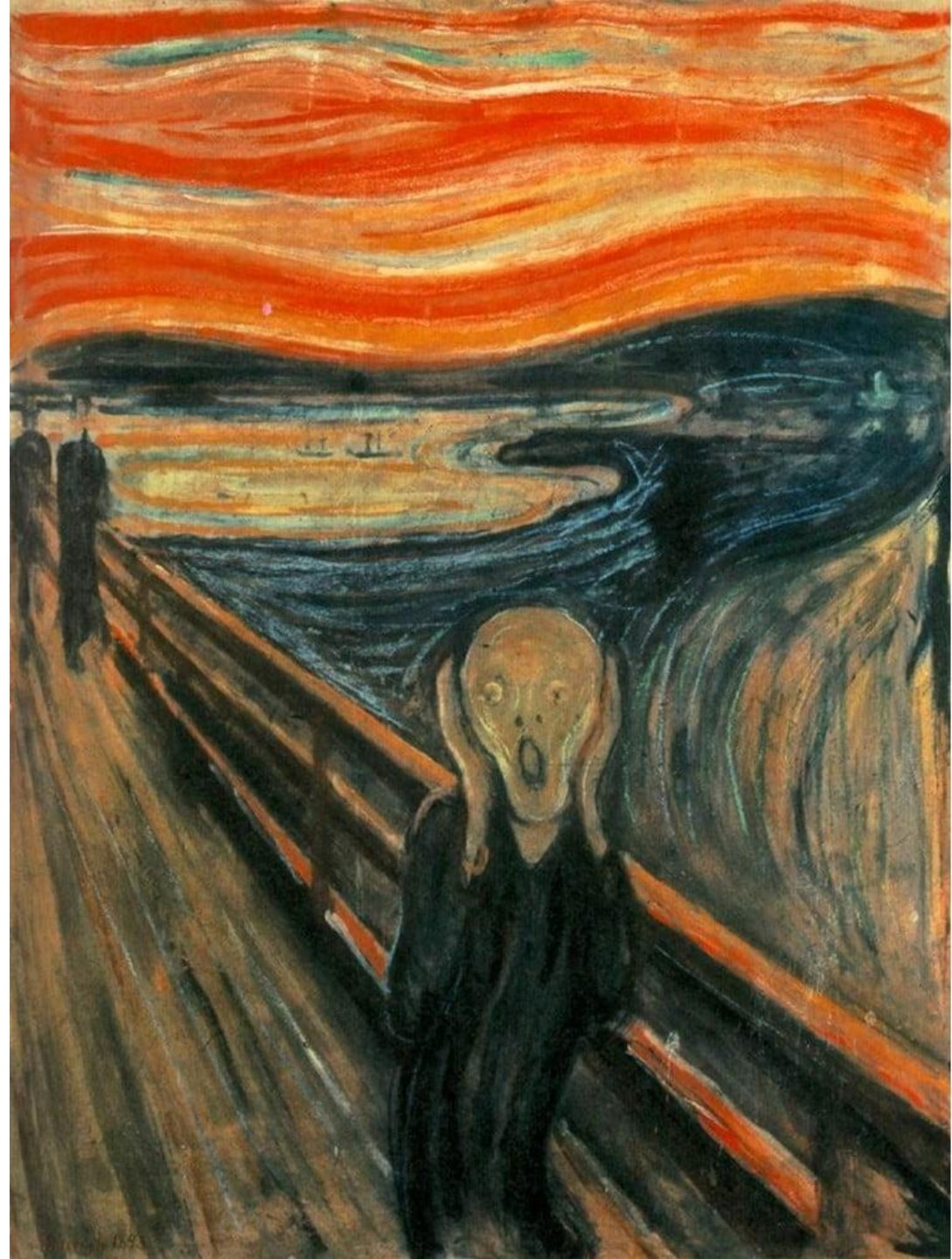
- <https://www.cambridge.org/core/journals/bjpsych-advances/article/art-of-edvard-munch-a-window-onto-a-mind/747AD9F91000C9CF26957BE8E88C4E8D>



Edvard Munch 1930

Výkřik 1893

- 1908 hluboká osobní krize
zhroucení, alkoholismus, léčba osm
měsíců v Kodani na psychiatrii
- po návratu změna uměleckého stylu
 - klidnější, lyrický, ale již ne tak
oceňovaný





Vincent van Gogh

Pšeničné pole s vránami. 1890.

Obecně je považováno za poslední obraz, který van Gogh vytvořil před svou smrtí.

Colossal

De-extinkce „mamutů“

- cílem je vytvořit nový typ zvířete podobného již vyhynulému mamutovi cestou geneticky modifikovaného slona indického tak, aby zvládl arktické teploty a byl zároveň odolný herpes viru. .
- cílem je vytvoření stád těchto zvířat, které by se zvládly mezi sebou úspěšně rozmnožovat a znovu osídlit Arktidu. Následně pak použít tyto technologie k promyšlené „disruptivní konzervaci“.
- Colossal chce spolupracovat s ruskými kolegy za účelem vytvoření Pleistocenního parku na řece Kolymě v severovýchodní oblasti Sibiře.
- <https://www.cnbc.com/2021/09/13/geneticist-george-church-gets-funding-for-lab-grown-woolly-mammoths.html>



Ben Lamm and George Church

What it would take to bring back the dodo

An audacious plan to 'de-extinct' dodos depends on huge leaps in biotechnology and resurrecting a lost habitat.

[Ewen Callaway](#)



The flightless dodo went extinct in the seventeenth century. Biotech company Colossal Biosciences plans to resurrect it. Credit: Hart, F/Bridgeman Images

<https://www.nature.com/articles/d41586-023-00379-5>

<https://colossal.com/dodo/>

Dronte mauricijský vymřel kolem roku 1662

DNA z muzejního exempláře starého 500 let v Dánsku

Výchozím druhem by byl holub nikobarský (*Caloenas nicobarica*)

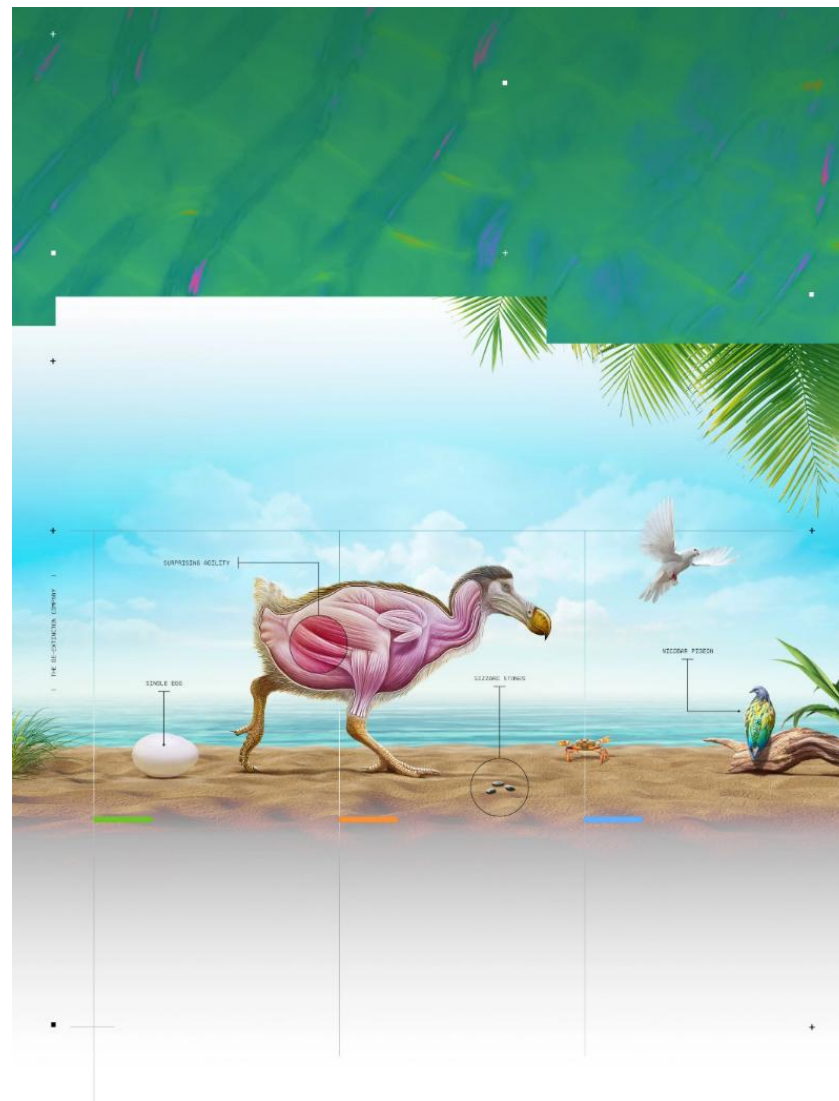


Nevznikl by dronte – ale vlastně nový druh
Na Mauriciu je však dnes mnoho krys a dalších nepůvodních predátorů

Odhad Colossalu je rok 2029

EXTINCTION DATE

Between
1662 and 1690



Prvním krokem bylo sekvenovat celý genom dronteho.
Vzorek tkáně byl získán z exempláře z muzea v Dánsku.

possessed a lean and athletic appearance with sandy yellowish-brown to gray fur and 15-20 distinct dark stripes across the back from shoulders to tail. Its canid-like skull and large jaws held 46 sharp teeth.

The marsupial thylacine also had an abdominal pouch and is one of only two known marsupials to have pouches in both sexes. For males the pouch served as a protective sheath for reproductive organs, while for females, the pouch served as a carrying vessel for its young, as seen in modern day kangaroos. The average litter size was up to four and the young were dependent on the mother until they are at least half-grown.

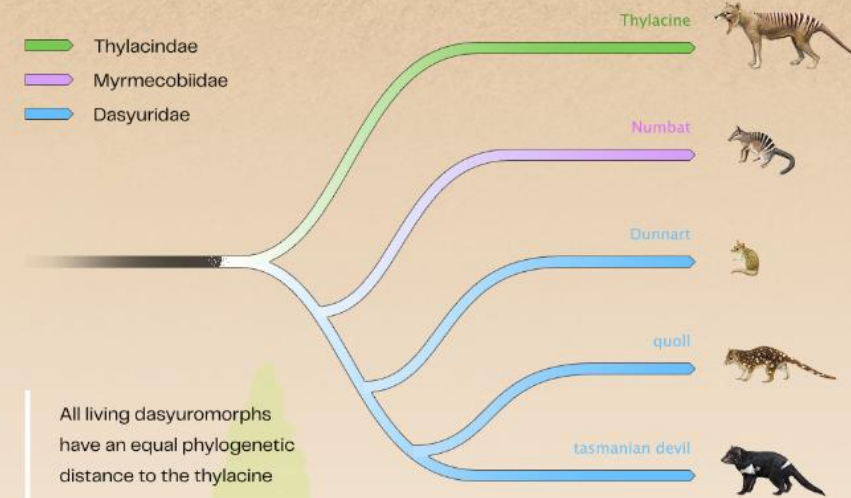


The thylacine was mostly nocturnal or semi-nocturnal, eating at night and sleeping in caves or hidden within thick tree clusters during the day. Thylacines were exclusively carnivores whose diet consisted of other marsupials, small rodents, lizards and birds. They were reported to have preyed on sheep and poultry after European colonization, although the extent of this was almost certainly exaggerated.

Exaggerated or not, this pest reputation clashed with farmers of the region, ultimately leading to their overhunting and eventual extinction in 1936.

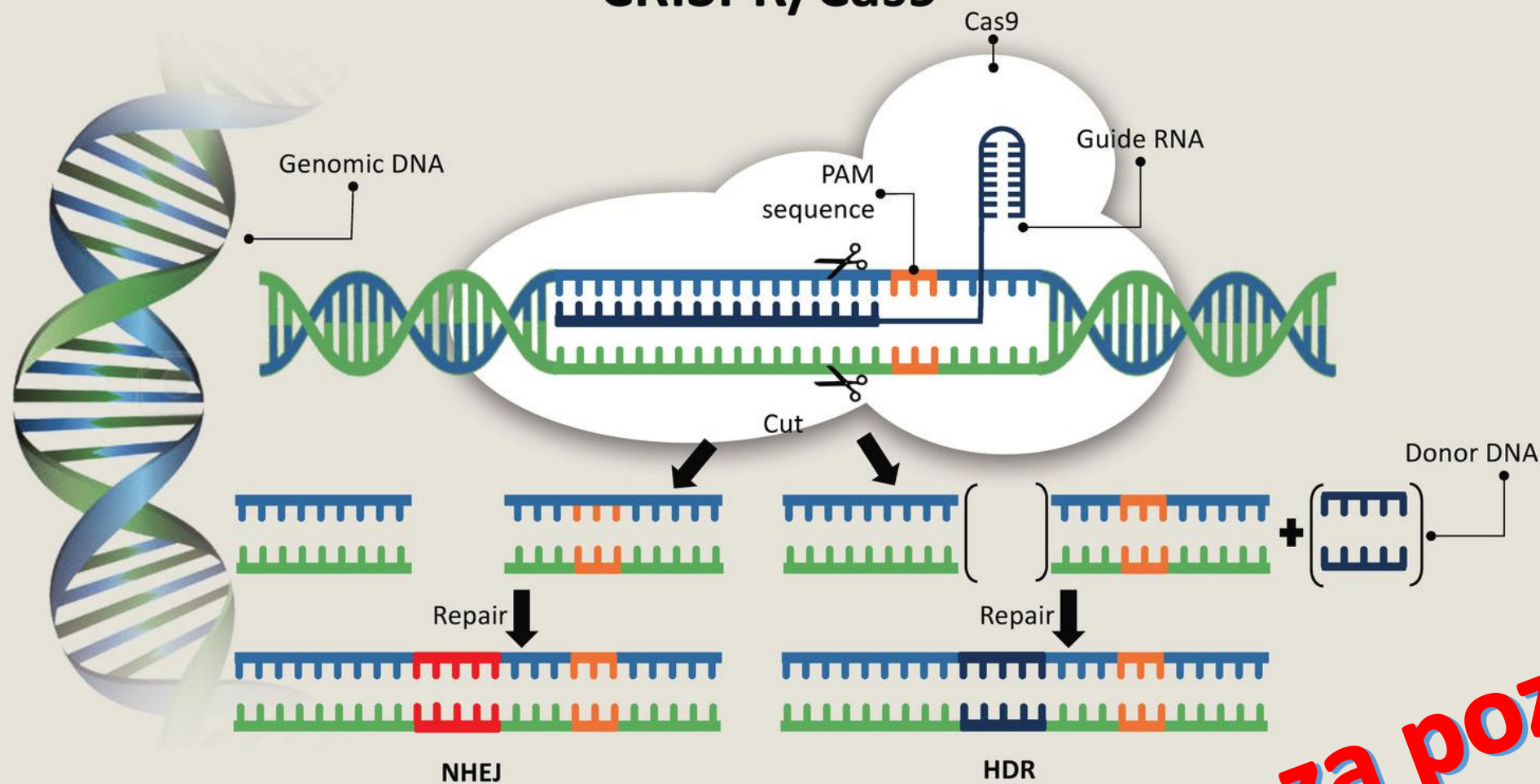
Thylacine Phylogenetic Tree

Dasyurids (Dasyuridae), are a family of carnivorous marsupials that are the closest living relatives of the Thylacine. They are 70 million years evolutionarily divergent from the Tasmanian Tiger.



Dasyurids are easily distinguished from other Australian marsupials because they possess three pairs of incisors in the lower jaw, front feet with five toes, and hind feet with never less than four toes.

CRISPR/Cas9



**Š díky za pozornost
Marek Vácha**

Oprava přestřižené DNA může proběhnout dvěma způsoby: buď pomocí tzv. **non-homologous end joining (NHEJ)**, kdy se jedná o náhodné vložení nebo delecí DNA, nebo tzv. **homology directed repair (HDR)**, kde se homologní kus DNA využije jako templát. Tato druhá možnost dovoluje precizní genovou editaci, když homologní kus DNA s požadovanou sekvencí může být dodán do buňky spolu se sgRNA a Cas9 nukleázou, což by teoreticky umožnilo precizní opravu DNA s přesností na jednu bázi.