

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: BBI



Eliška Čermáková

Genové manipulace u bezobratlých živočichů

Gene manipulations in invertebrates

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Michaela Schierová, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 23.8.2017

Podpis

Děkuji RNDr. Michaele Schierové, Ph.D. za trpělivost, pečlivost a ochotu, se kterou mi pomáhala a dávala cenné rady.

Abstrakt

Genové manipulace u bezobratlých využívají stejné metody jako u obratlovců. Přispívají k vytvoření nových genotypů u modelových organismů, využitelných např. při studiu příčin lidských chorob, ale mají i praktické uplatnění. Jedním z příkladů jsou transgenní komáři. V poslední době byly provedeny pokusy prokazující, že lze u bezobratlých úspěšně použít i programovatelné nukleázy.

Klíčová slova: Genové manipulace, bezobratlí, metody, *Drosophila melaogaster*, aplikace, *Anopheles*, *Bombyx mori*, malárie

Abstract

Gene manipulations in invertebrates are based on the same approaches used in vertebrates. They are applied for the development of new genotypes in model species, convenient as model systems of human hereditary diseases etc. Gene manipulations are important as well for practical purposes, which is shown by the example of transgenic mosquitoes. Recently, it has been proved that programmable nucleases can be successfully used in invertebrates.

Key words: Gene manipulations, invertebrates, methods, applications, *Drosophila melanogaster*, *Anopheles*, *Bombyx mori*, malaria

Obsah

Obsah.....	5
1 Úvod.....	1
2 Metody genových manipulací pomocí systémů programovatelných endonukleáz a jejich mechanismy.....	2
2.1 ZFN (Zinc-finger nukleázy)	2
2.2 TALENY (Transcription activator-like effector nukleázy).....	5
2.3 CRISPR/Cas9	6
3 Využití, význam a příklady genových manipulací.....	8
3.1 Genové manipulace u bource morušového.....	8
3.2 Genové manipulace v boji proti mlárii a žluté zimnici	11
3.2.1 Malárie - mechanismus přenosu, její původci a projevy.....	11
3.2.2 Transgenní komáři rodu Anopheles, narušující přenos parazita způsobujícího malárii	13
3.2.3 Aplikace transgenních komárů ve volné přírodě.....	15
4 Závěr.....	17
5 Seznam literatury.....	18

Seznam použitých zkratek

Cas	CRISPR-asociované systémy	CRISPR-associated systems
CP	karboxypeptidáza	carboxypeptidase
CRISPR	sdílené pravidelně rozmístěné krátké palindromové repetice	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNA	CRISPR RNA	CRISPR RNA
DNA	deoxyribonukleová kyselina	deoxyribonucleic acid
DSB (ds)	dvouřetězcové zlomy	double-stranded break
HDR	homologní rekombinace	homology-directed repair
NHEJ	nehomologní spojení konců	non-homologous end-joining
PAM	motiv přilehlý k protospaceru	adjacent protospacer motif
pre-crRNA	pre-CRISPR RNA	pre-CRISPR RNA
RGEN	RNA-řízené endonukleázy	RNA-guided endonucleases
RNA	ribonukleová kyselina	ribonucleic acid
RVD	opakující se variabilní dířezidua	repeat variable diresidues
SM1	peptid 1 ze slinných žláz a středního střeva	salivary gland- and midgutbinding peptide 1
TALEN	sekvenčně specifická nukleáza podobná transkripčnímu faktoru	transcription activator-like effector nucleases
Ttav	transkripční faktor reprimovaný tetracyklinem	tetracycline repressible transactivator variant
ZFN	nukleázy s motivem zinkového prstu	zinc-finger nucleases
ZFP	protein s motivem zinkového prstu	zinc-finger protein

1 Úvod

Zásadní objevy v oblasti molekulární biologie a genetiky, zejména v druhé polovině minulého století, umožnily manipulace s dědičnou informací organismů, způsobem, který přirozenou cestou není možný. Otevřely se zdánlivě neomezené perspektivy přenosu genů mezi mikroorganismy, rostlinami a živočichy navzájem, včetně možnosti vkládat lidské geny do jiných organismů.

Jako každá nová technologie, i genetické manipulace (genetické inženýrství nebo moderní biotechnologie), usilují o změnu fenotypu z ekonomických, lékařských či ekologických důvodů, mají mnoho kladů i záporů a tedy i mnoho zastánců a odpůrců.

Metody genových manipulací se zpřesňují a zefektivňují. Jedním z nejdůležitějších a nejvýznamnějších objevů na poli genetiky je použití systému CRISPR/Cas9, který byl poprvé popsán v roce 1987 (Ishino *et al.*, 1987). K širšímu používání metody došlo po roce 2007 (Wang & Qi, 2016).

Genové manipulace se ze studijních důvodů provádějí u několika druhů modelových zástupců bezobratlých živočichů. K těm nejčastěji používaným se řadí tradiční modelové organismy jako je hlístice *Caenorhabditis elegans* nebo octomilka *Drosophila melanogaster*. U těchto živočišných druhů je velkou výhodou, že je známa kompletní dědičná informace. Genetické modifikace tak lze podstatně lépe cílit. Určení kompletní sekvence jejich genomu vedlo k poměrně překvapivému zjištění, že genomy všech živočichů jsou si velice podobné, a díky tomu lze bezobratlé použít i k výzkumu molekulární podstaty dědičně podmíněných lidských chorob.

Cílem práce je popsat metody a teoretické cíle i praktické aplikace genových manipulací u bezobratlých živočichů.

2 Metody genových manipulací pomocí systémů programovatelných endonukleáz a jejich mechanismy

Základem pro úspěšnou úpravu genomu je vytvoření dvouřetězcových zlomů na DNA (DNA double-stranded break – DSB, zkráceně ds zlomů) v lokusu, který chceme modifikovat. Zlomy vytvořené nukleázou jsou opravovány dvěma různými způsoby. Buď pomocí homologických oprav (homology-directed repair – HDR), kdy se požadovaná sekvence vloží do cílového místa společně s námi přidaným homologickým donorovým vláknem DNA. Nebo pomocí opravy přes nehomologní spojení konců (non-homologous end-joining – NHEJ), které způsobí mutační inzerci nebo delecii, což naruší čtecí rámec kódované sekvence (Sander & Joung, 2014).

Mezi hlavní tři typy programovatelných endonukleáz se řadí ZFNs (zinc-finger nucleases), TALENs (transcription activator-like effector nucleases) a již zmíněné a v současné době nejvíce se rozvíjející CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats; neboli nahlučené pravidelně rozložené krátké palindromické repetice). Zmíněné systémy se vzájemně liší v mnoha aspektech. Liší se svou stavbou, místem, které jsou schopné rozpoznat, specifitou a dalšími vlastnostmi. Pro správný výběr a použití metody je důležité znát specifické vlastnosti každého z těchto systémů (Kim & Kim, 2014).

2.1 ZFN (Zinc-finger nukleázy)

ZFN jsou hybridy endonukleáz, které mají dvě oddělené domény, DNA vazebnou a štěpicí. Štěpení je zajištěno pomocí bakteriální endonukleázy FokI. Ta štěpí nespécificky místo, které rozezná její druhá vazebná doména zink-finger. Protein zink-finger (ZFP) se skládá z několika tandemově se opakujících sekvencí aminokyselin, které vážou Zn^{2+} (Miller *et al.*, 1985). Pro vznik ds zlomu je nezbytná dimerizace domény FokI, tedy je zapotřebí dvou molekul ZFN v obrácené orientaci, které se váží v dostatečné blízkosti (Bitinaite *et al.*, 1998). Dimerizace zdvojnásobuje délku rozpoznávaných míst, což zvyšuje specifitu ZFNs. Sekvenční specifitu ZFN určují ZFPs. Každý zinkový-prst rozpoznává DNA sekvenci o velikosti 3 nukleotidy. Použitím 3 až 6 zinkových prstů se vytvoří jedna ZFN podjednotka, která se váže na DNA sekvenci o délce 9-18 bp (Kim *et al.*, 2014). Cílová sekvence pro ZFN má obsahovat G, obě poloviny cílové sekvence musí být v opačné orientaci (Segal *et al.* 1999).

Zinkové prsty lze modifikovat tak, aby rozpoznaly libovolně zvolenou cílovou sekvenci.

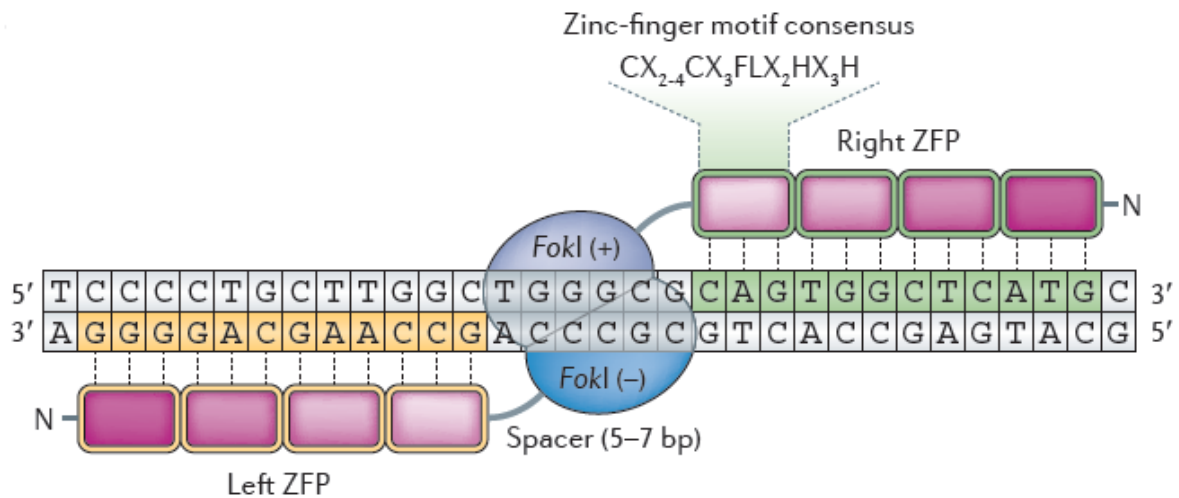
Pokusy s využitím ZFNs pro genové inženýrství provedla Bibikova *et al.*, v roce 2001 *in vitro* a následně i úspěšně aplikovala na modelový organismus *Drosophila melanogaster* (Bibikova *et al.* 2002). První lokus v genomu, který byl úspěšně zacílen pomocí navržených ZFN, byl gen *y* (yellow pigment) v modelovém organismu *D. melanogaster*. Dominantní alela genu *Y* se podílí na specifické pigmentaci důležité pro vytvoření vzoru na kutikule dospělého jedince a na pigmentaci larválních úst, recesivní alela podmiňuje žluté zbarvení (Biessmann, 1985). Gen je lokalizován na chromozómu X, a proto je detekce mutace snadná zejména u sameček.

Bibikova a kol. (2002) navrhli dvě ZFN *yA* a *yB* (obr. 2), které rozpoznávaly vždy jedno specifické místo o velikosti 9 bp v exonu 2 genu *y*. Navržené exonukleázy byly nasyntetizovány v bakteriích a jejich štěpící specifita byla ověřena *in vitro* na plazmidu nesoucí gen *y*.

Geny *yA* a *yB* byly odděleně vneseny do larev octomilky. Exprese obou genů byla řízena promotorem heat shock. Transformované larvy, s geny pro oba typy nukleáz současně po vystavení tepelnému šoku 35-37 °C exprimovaly ZFN. U 46% sameček byla detekována mozaika šedo-žlutého zbarvení v kutikule, ke germinální mutaci došlo u 5,7% sameček (Bibikova a kol. (2002).

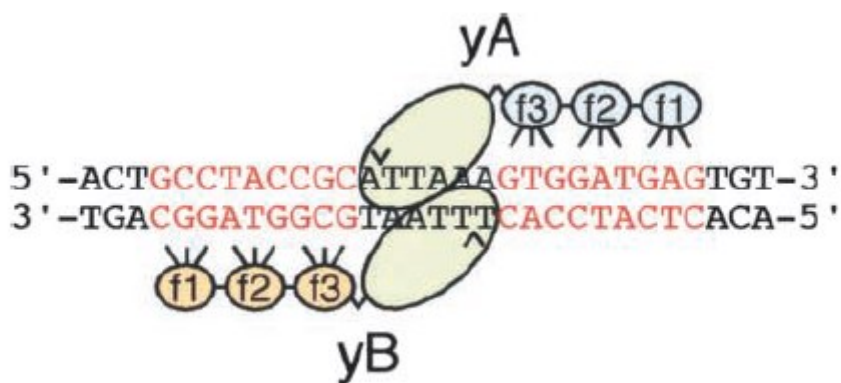
Po určení sekvencí DNA se ukázalo, že všechny mutace byly malé delece a/nebo inserce přesně v určeném místě. Jedná se o typy změn očekávaných od nehomologního spojování konců (NHEJ).

obr. 1



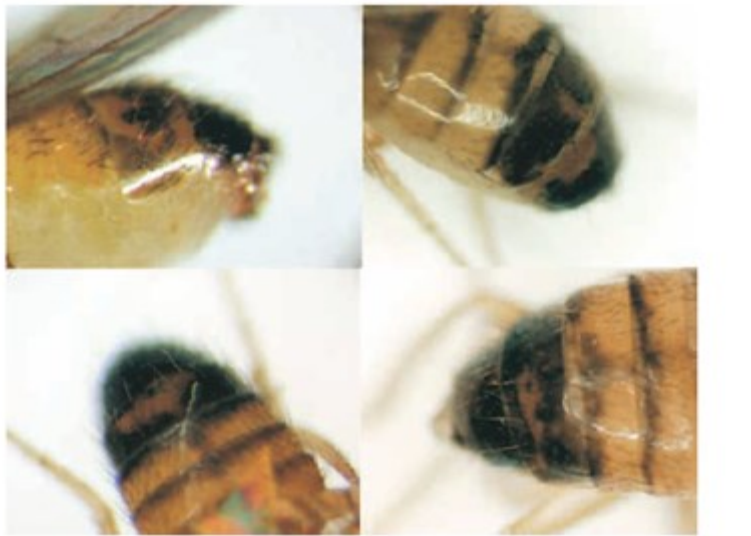
Schematické znázornění dvojice zink-finger nukleázy (ZFN). Každý ZFN se skládá z proteinu s doménou zinkových prstů (ZFP) na aminokonci a nukleázové domény FokI na karboxylovém konci. X znamená libovolnou aminokyselinu. Cílové sekvence párů ZFN jsou typicky dlouhé 18 až 36 bp, s výjimkou mezerníků (spacers). (Kim & Kim, 2014)

obr. 2



Cílová místa pro ZFN v exonu 2 genu y u octomilky. Každá z nukleáz cílí na 9 nukleotidů, rozpoznávaných prsty (1 až 3). Cílové místo pro nukleázu Fok1 je na obr. Označeno zeleně. (Bibikova et al., 2002)

obr. 3



Příklad sameček s mozaikovou formou genu y po aplikaci ZFN (Bibikova et al., 2002).

2.2 TALENY (Transcription activator-like effector nukleázy)

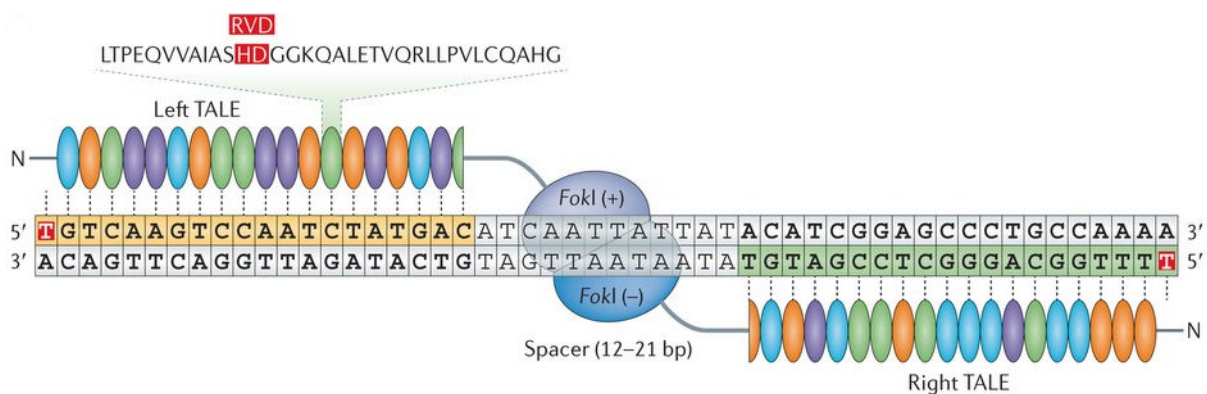
Obecná struktura TALEN je stejně jako u ZFNs chimérická, složená ze dvou částí. Stejně jako ZFNs i TALEN obsahují na svých karboxylových koncích restriční endonukleázovou doménu FokI, která zajišťuje štěpení (Christian *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2011). Oproti ZFN se však liší použitím jiné třídy DNA vazebných domén, které jsou známé jako efekторы transkripčního aktivátoru (TALE). Tyto DNA vazebné proteiny mají strukturu odvozenou z TALE u *Xanthomonas spp* (rostlinný patogen) (Bonas *et al.*, 1989), která přímo vstříkují efekторы TAL do rostlinných buněk prostřednictvím sekrečního systému typu III (T3SS), kde efekторы TAL specificky vážou a regulují rostlinné geny pro usnadnění bakteriální kolonizace (Jia *et al.*, 2014).

Rozpoznání a poté vazba TALE na cílovou sekvenci je zajištěna jeho centrální částí složené z 5,5 – 25,5 repetice, které jsou téměř identické a tandemově uspořádané. Přesný počet repetice se mění podle konkrétních bakterií. Tyto repetice neboli moduly obsahují 34 aminokyselin a rozpoznávají jediný nukleotid. Základní specifičnost je určena aminokyselinami v pozicích 12 a 13 v každém modulu (Schornack *et al.*, 2006), tzv. opakujícími se variabilními diresidui (RVD – repeat variable diresidues) (Deng *et al.*, 2012). Čtyři různé moduly RVD - jmenovitě Asn-Asn, Asn-Ile, His-Asp a Asn-Gly - se

nejčastěji používají k rozpoznání guaninu, adeninu, cytosinu a thyminu (Kim & Kim, 2014). TALE obsahují kromě centrální domény také jadernou signalizační sekvenci, která se nachází na C-konci a je důležitá pro přenos TALE do jádra buňky, a dále také doménu aktivující transkripci.

Každá specifická jednotka repetice TALE se váže k jedné bázi na cílové DNA. Některé typy repetic jsou schopné rozeznat pouze jednu konkrétní bázi, jiné mají širší rozpoznávací schopnosti. Na základě tohoto zjištění, ke kterému v roce 2009 dospěly rovnou dva týmy, byl vytvořen kód specifity TALE repetic (Boch *et al.*, 2009; Moscou & Bogdanove, 2009). Pro vytvoření funkčních talenů je potřeba podle kódu navrhnout sekvenci pro specifickou DNA vazebnou doménu (Boch *et al.*, 2009) a nahradit transkripčně aktivační doménu štěpící doménou FokI (Christian *et al.*, 2010).

obr. 4



Schematické znázornění TALEN. Každá TALE nukleáza se skládá z aktivátoru transkripce (TALE) na aminokonci a FokI nukleázové domény na karboxylovém konci. Každá repetice TALE se skládá z 33-35 aminokyselin a rozpoznává jediný pár bází přes aminokyseliny v pozicích 12 a 13, který se nazývá opakující se variabilní diresidua (RVD, znázorněna červeně). (Kim & Kim, 2014)

2.3 CRISPR/Cas9

CRISPR (z angl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats; sdružené pravidelně rozmístěné krátké palindromové repetice) je rodina přímých DNA repetic, které se nachází v genomu mnoha bakterií i *Archae*. Délka těchto repetic se nejčastěji pohybuje od 21 do 37 nukleotidů. Repetice jsou pravidelně proloženy nerepetitivními sekvencemi – mezerníky (spacers) o přibližně stejné délce jako mají samotné repetice.

Součástí CRISPR lokusů jsou CRISPR-asociované (Cas) systémy, což jsou původem úseky prokaryotické DNA obklopující repetice s mezerníky, které přirozeně poskytují bakteriím a archeím adaptivní imunitu vůči genetickým elementům, jako jsou viry a plazmidy. Prokázalo se, že počet mezerníků v lokusu negativně koreloval s citlivostí k fágové infekci. Viry totiž nejsou schopné se udržet v buňkách, které obsahují mezerníky odpovídající jejich virovému genomu. (Barrangou *et al.*, 2007; Bolotin *et al.*, 2005). Podle přítomnosti mezerníků se CRISPR lokusy dělí do několika typů. (Makarova *et al.*, 2011).

CRISPR vznikne v bakteriích vložením zachycených fragmentů DNA (o velikosti přibližně 20bp) z DNA invazních fágů nebo plazmidů do svého vlastního genomu. Tyto vložené sekvence se nazývají protospacery. V systémech CRISPR typu II jsou tyto oblasti CRISPR transkribovány jako pre-CRISPR RNA (pre-crRNA) a zpracovány s pomocí transkripční crRNA (tracrRNA) za účelem vzniku cílové specifické crRNA (Deltcheva *et al.*, 2011). Aktivní CRISPR-Cas9 endonukleáza se vytvoří spojením crRNA, tracrRNA a proteinu Cas9. Výsledná endonukleáza štěpí cílovou DNA sekvenci o velikosti 23 bp, která je složena z 20bp řídicí sekvence v crRNA (tj. protospaceru) a 5'-NGG-3' známou jako přilehlý motiv protospaceru (PAM), který je rozpoznán samotným Cas9 (Jinek *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014).

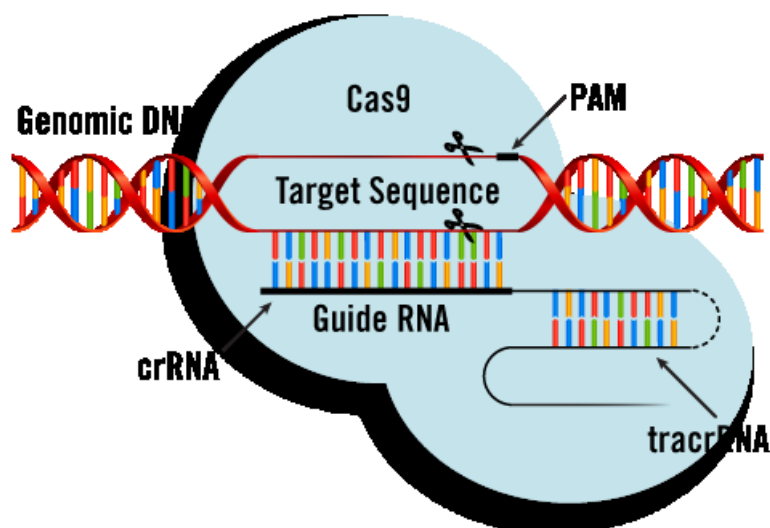
Protein Cas9 je v systému velmi důležitý, při jeho odstranění totiž došlo ke ztrátě rezistence. Potvrdilo se, že protein Cas9 je zodpovědný za štěpení cílové DNA (Garneau *et al.*, 2010).

S využitím poznatků o fungování systému CRISPR/Cas9 jako adaptivního imunitního mechanismu a jeho úpravou vznikl novodobý nástroj cíleného genového inženýrství CRISPR/Cas9, který patří mezi tzv. RGENs (RNA-guided endonucleases; RNA-řízené endonukleázy) (Cong *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2013).

Základním principem fungování CRISPR/Cas9 je vytvoření ds zlomů prostřednictvím aktivity Cas9. Na takto vytvořený zlom má buňka vícero reparačních mechanismů, z kterých jsou zásadními NHEJ a oprava HDR. NHEJ může vést k vytvoření inserce a/nebo delece (tzv. indel, z ang. insertion/deletion) (Kim *et al.*, 2014), která v ideálním případě naruší čtecí rámec kódující sekvence, a to jeho posunutím, případně vytvořením předčasného stop kodónu. HDR se může využít například k vytvoření specifických

bodových mutací a nebo k vložení sekvence za předpokladu poskytnutí templátu, čili předlohy (Ran *et al.*, 2013).

obr. 5



Endonukleáza Cas9 (modrá) je zaměřena na DNA pomocí řídicí RNA, která může být dodána jako buď dvoudílný systém sestávající z crRNA a tracrRNA nebo jako jediná řídicí RNA (sg RNA), kde crRNA a tracrRNA jsou spojeny linkerem (tečkovaná čára). Rozpoznání cílů je usnadněno prototypovým přilehlým motivem (PAM). (MIRUSBIO*)

3 Využití, význam a příklady genových manipulací

3.1 Genové manipulace u bource morušového

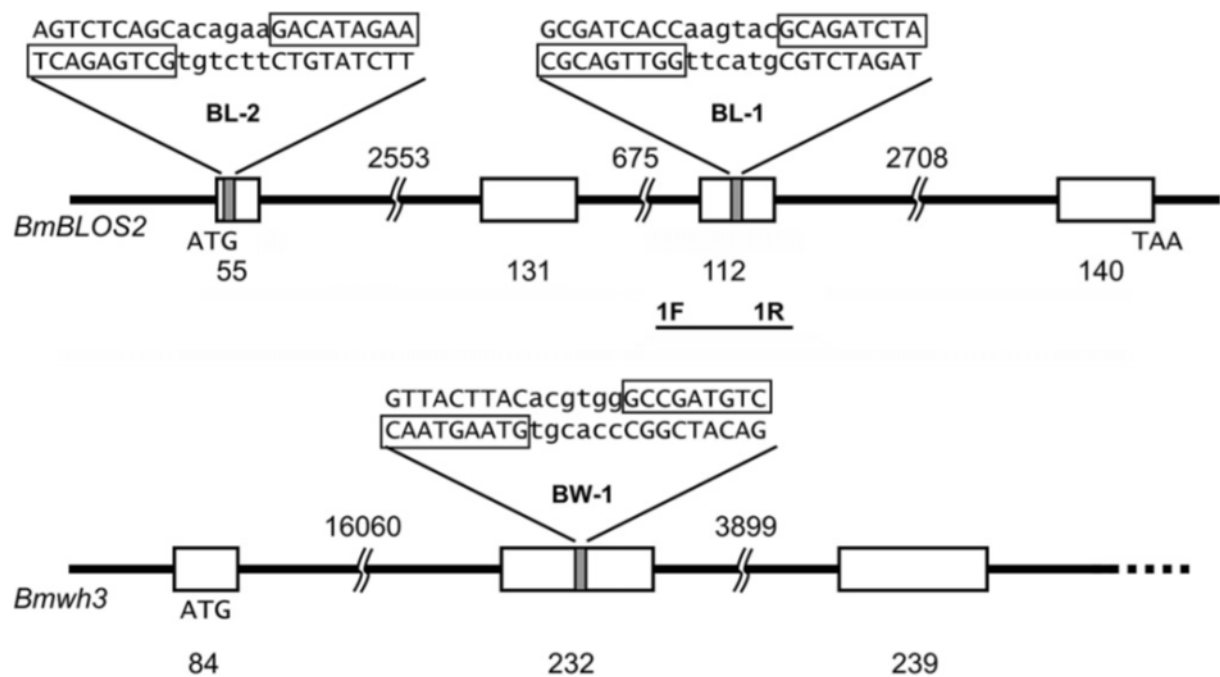
Současné pokroky v metodách genomového inženýrství, jako jsou právě již výše zmiňované nukleázy se zinkovými prsty (ZFN) (Urnov *et al.*, 2010), TALENy (Joung & Sander 2013) nebo systém CRISPR (CRISPR / Cas9) (Cho *et al.*, 2013, Hwang *et al.*, 2013a, b, Jiang *et al.*, 2013) umožnily genové manipulace u širokého spektra modelových i ne-modelových organismů.

Vědci z Jihočeské univerzity společně s vědci Národního institutu agrobiologie v Japonsku a Utažské lékařské univerzity v USA testovali možnosti aplikace ZFN u bezobratlých (Takasu *et al.*, 2010). Přímá mikroinjekce mRNA kódující ZFN se využívá jako zjednodušená varianta cílení genů do embryí octomilek (*Drosophila melanogaster*).

Aby zhodnotili použitelnost této metody i u jiného hmyzu, provedli genetické modifikace u bource morušového (*Bombyx mori*). K otestování metody využili dva markerové geny BmBLOS2 a Bmwh3, které řídí tvorbu granulí kyseliny močové v larvální epidermis.

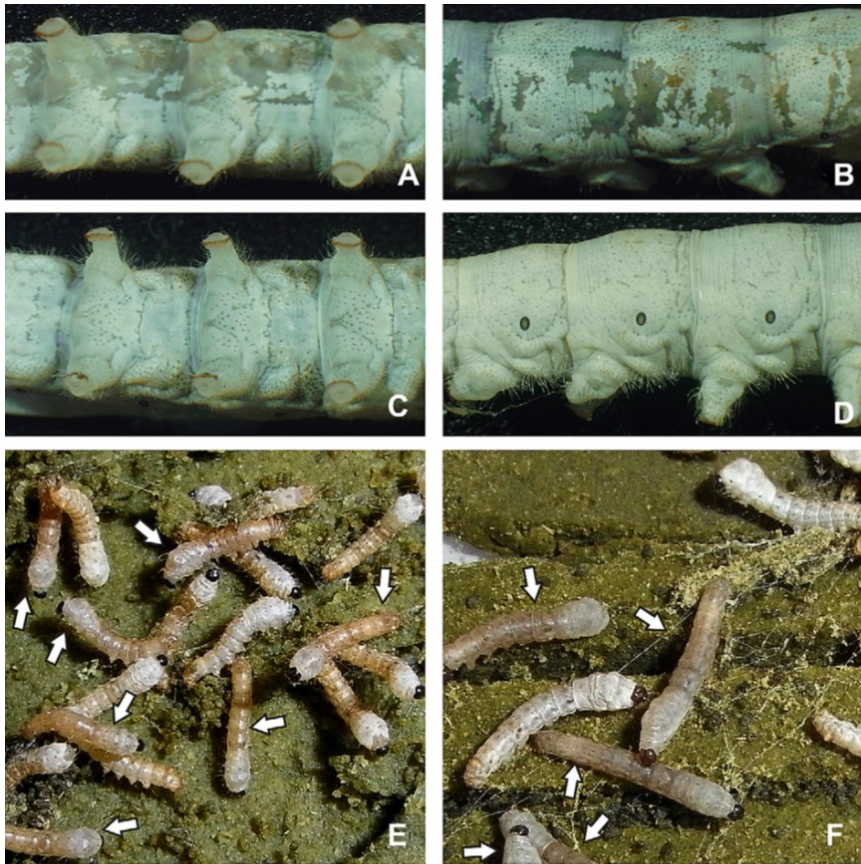
Granule dodávají larvální pokožce neprůhlednou bílou barvu. Ztráta granulí vede k viditelnému tzv. "mastnému" fenotypu s průsvitnou kůží (obr. 5) (Quan *et al.*, 2002; Komoto *et al.*, 2009; Fujii *et al.* 2010). Takasu *et al.* (2010) testovali dva páry ZFN pro BmBLOS2 a jeden pár pro Bmwh3.

obr. 6



Bílé obdélníky představují exony. Cíle ZFN jsou označeny jako šedé pruhy, jejichž sekvence jsou zobrazeny výše nad nimi (jsou zde uvedeny devíti nukleotidové motivy rozpoznávané zinkovými prsty). Dva cíle jsou v prvním a třetím exonu genu *BmBLOS2* (BL-2 a BL-1), jeden v druhém exonu genu *Bmwh3*. Velikosti exonů resp. intronů (v bp) jsou uvedena pod, resp. nad jejich znázorněními. (Takasu *et al.*, 2010)

obr. 7



Aplikace ZFN v epidermálních buňkách u bource morušového (inaktivace genu BmBLOS2) – detekce „mastné mozaiky“ v larvách 5. instaru na ventrální (A) dorzální (B) straně u vzorového jedince po aplikaci ZFN. Pohled na ventrální a dorzální pokožku u nemodifikovaného jedince bource morušového uveden pro porovnání (C a D). Mutované larvy v generaci G1 mezi larvami normálními, neinjikovanými jsou označeny šipkami, 1. a 2. instar (E a F) (Takasu et. al., 2010).

Vědci zjistili, že při aplikaci ZFN s cílovou sekvencí BL-1 (tab. 1) získali nečekaně vysoký podíl mozaikových jedinců v G0: 72% larev v pátém instaru vykazovalo mozaikový vzor průsvitné a normální kůže. Protože gen BmBLOS2 se nachází na pohlavním chromozomu Z (u *Bombyx mori* mají samičky karyotyp ZW a samečci ZZ) (Fujii et al., 2010), očekávalo se, že podíl jedinců s mozaikou v G0 bude vyšší u samic než u samců. Nicméně tento poměr byl srovnatelný u obou pohlaví (70% oproti 56%), což naznačuje, že ZFN typu BL-1 indukovala jak mono- tak i di-alelické mutace s podobnou účinností.

Mezi 16 350 larvami v generaci G1, vzniklé křížením sameček z generace G0 (po aplikaci ZFN) s normálními (neinjektovanými) samičkami, 46 larev (0,28%) vykazovalo mastný fenotyp a všichni jedinci s tímto fenotypem byli samičky, jak se očekávalo. Sekvenční analýza ukázala, že nejčastějšími změnami v cílovém místě byly krátké delece a inserce (Takasu *et al.*, 2010).

Počet vylíhnutých vajíček, kterým byl injekčně podán ZFN s cílovou sekvencí BL-2 (gen BmBLOS2) (tab. 1), byl velmi nízký: ze 480 vajíček se vylíhlo pouze 18, nebyly nalezeny žádné mozaiky v G0 ani mutované samičky v G1.

Při aplikaci ZFN s cílovým místem BW-1 z genu Bmwh3 byl opět podíl vylíhnutých vajíček nízký (tab. 1): ze 144 injikovaných vajíček se 41 vylíhlo a 27 dosáhlo posledního larválního instaru. U šesti jedinců generace G0 (22%) byla detekována somatická mozaika, ale nebyly získány žádné mutované larvy mezi 4000 larvami generace G1.

tab. 1

ZFN	kmen	injikovaná vajíčka (počet)	% vylíhnu- to	% somatická mozaika	% zesilovač	% germinální (zárodečná) mutace
BL-1	pnd w-1	480	51	72	5 – 9	0,28
BL-2	pnd w-1	480	4	0	0	0
BW-1	w-3ol / w-3ol	144	28	22	0	0

3.2.1 Tabulka upravena podle Takasu *et al.*, 2010

3.2 Genové manipulace v boji proti mlárii a žluté zimnici

3.2.1 Malárie - mechanismus přenosu, její původci a projevy

Malárie je stále jedno z nejnebezpečnějších onemocnění s nejvyšším počtem obětí ročně. Celosvětově je odhadováno, že až 3,2 miliardy lidí v 95 zemích a oblastech

je vystaveno riziku infekce malárií a rozvoje onemocnění a 1,2 miliardy lidí je vystaveno zvýšenému riziku. Podle „World Malaria Report 2015“ bylo v daném roce 214 milionů nových případů malárie a 438 000 úmrtí (GHO, 2015*). Vysoká úmrtnost na malárii přispěla k rozvoji výzkumných projektů zaměřených na účinnou a dlouhodobou redukci malárie.

Čeled' Plasmoiiidae s rodem *Plasmodium* je nejdůležitější skupinou řádu Haemosporida kmene Apikomplexa. Některé druhy tohoto rodu jsou původci lidské malárie. Sporozoiti jsou injikováni do krve hostitele při sání nakaženého vektoru, komára (Diptera, Culicidae, Anopheles). Po injikaci následuje řada cyklů. První cyklus, tzv. exoerytrocytární merogonie (nepohlavní dělení), probíhá u savčích hostitelů v buňkách jaterního parenchymu. Další merogonie následují v erytrocytech, kde se tvoří také gametocyty. Jsou-li gametocyty nasáty komárem společně s krví, ve střevě (středním střevě) komára se mění na gamety, které kopulují a vzniká pohyblivá zygota, ookineta. Ta se mění v tenkostěnnou oocystu čnicí do tělní dutiny komára. V oocystě se vytváří velké množství sporozoitů, kteří se po prasknutí oocysty po 10 až 15 dnech uvolní do hemocoelu a migrují do slinných žláz komára, kde čekají na jeho další sání, při kterém vnikají do dalšího hostitele (Volf *et al.*, 2007) (Gabrielle *et al.*, 2015).

Z celkového počtu přibližně 150 druhů *Plasmodií* u člověka parazitují čtyři druhy způsobující malárii (*Plasmodium falciparum* (nejrozšířenější a nejnebezpečnější), *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*). Po injikaci sporozoitů ze slin komára do krevního řečiště se do hodiny přesouvají do jaterních buněk, kde dochází k exoerytrocytární merogonii a sporozoit se mění v meront. Jeho jádra se dělí a přibližně po týdnu vzniká velké množství merozoitů. První merozoiti mohou migrovat do erytrocytů nebo zůstávají v játrech. Dělení v játrech i erytrocytech se může opakovat. Merozoiti, kteří pronikli do erytrocytu, se mění na meronty. Rozpad napadených erytrocytů a uvolnění merontů z nich je vysoce synchronizovaný proces, který spouští horečnatý malarický záchvat (Volf *et al.*, 2007).

Inkubační doba malárie je 1 až 4 týdny. Typický malarický záchvat začíná náhlým pocitem mrazení, třesavkou (10 až 15 minut), která je následována vysokou horečkou, která trvá zpravidla 2 až 6 hodin, a silným pocením. Po odeznění záchvatu se pacient cítí

zdráv až do začátku záchvatu dalšího. K záchvatům dochází v okamžiku, kdy se rozpadají napadené erytrocyty obsahující merozoity (Volf *et al.*, 2007).

Snaha snížit výskyt onemocnění je bohužel komplikována rezistencí *Plasmodia* vůči antimalarikům, rezistencí komárů k insekticidům a nedostatkem efektivních vakcín zapříčiněným mimo jiné také jejich vysokou cenou. Protože komáři jsou nutnými vektory a zároveň hostiteli, ve kterých probíhá pohlavní rozmnožování parazitů (*Plasmodií*), není divu, že se pozornost vědců zaměřila právě na ně (Volf *et al.*, 2007).

3.2.2 Transgenní komáři rodu *Anopheles*, narušující přenos parazita způsobujícího malárii

Vývojová stádia *Plasmodia* nacházející se v komárech musí pro své úspěšné přežití a rozšíření se do dalšího hostitele projít dvěma typy epitelů – epitelem středního střeva a epitelem slinných žláz. Toto procházení epitelů vyžaduje specifické interakce mezi molekulami na povrchu *Plasmodia* a epitelů, jimiž prochází.

Hlavním cílem při vytváření transgenních komárů je narušit vývoj a přenos parazita. K dosažení uvedeného cíle je nutné:

- a) optimalizovat metody přenosu vybraných genů do zárodečné linie komárů,
- b) nalézt vhodný promotor pro řízení exprese cizorodých genů a
- c) vybrat efektorové geny s antiparazitickými účinky.

Při hledání promotoru je důležité zaměřit se na tkáňově specifickou expresi transgenů, čímž lze snížit případný negativní efekt na fitness transgenních komárů. Snížení fitness transgenních komárů není žádoucí. Pokud by komáři exprimující transgen byli v jeho důsledku znevýhodněni v běžné populaci, nepodařilo by se transgen rozšířit do divoké populace a transgen by zcela vymizel.

Dalšími důležitými parametry při výběru promotoru jsou intenzita exprese a načasování exprese ve vztahu k ontogenezi parazita. V zásadě jsou preferovány silnější promotory, protože se předpokládá, že účinnost transgenů pozitivně koreluje s koncentrací antiparazitických proteinů (Jacobs *et al.*, 2003).

V souladu s uvedenými požadavky byl pro produkci inhibičního peptidu v buňkách komára vybrán promotor genu pro karboxypeptidázu (CP) (Ito *et al.*, 2002). Tento promotor zajišťuje silnou expresi genu v buňkách vnitřního povrchu středního střeva. Exprese genu je zahájena krátce před vstupem parazita do středního střeva, což je optimální (Jacobs *et al.*, 2003).

Ideální efektorový gen blokuje vývoj parazita nebo ho přímo zabíjí se 100% účinností a zároveň nesnižuje fitness komára. Mezi testovanými geny byly geny kódující monoklonální protilátky, které rozpoznávají antigeny na povrchu parazita, nebo geny pro proteiny, které selektivně zabíjejí parazita nebo interferují s invazí parazitů ve středním střevě či slinných žlázách komárů (Jacobs *et al.*, 2003).

Laboratoř v *Malaria Research Institute* v Baltimoru v USA zkoumala geny patřící do druhé třídy. Při výběru specifických efektorových genů využili knihovnu bakteriofágů produkujících krátké peptidy. V knihovně našli fága produkujícího peptid PCQRAIFQSICN označený SM1 (SM1 - salivary gland- and midgutbinding peptide 1), který se specificky váže na epitely středního střeva a slinných žláz, které jsou v kontaktu s parazitem. Autoři projektu předpokládali, že se SM1 a peptidy parazita váží na společný receptor vyžadovaný pro invazi střeva parazitem.

Připravili transgenní komáry *A. stephensi*, kteří produkují tetramer SM1 ve středním střevě, exprese inhibičního genu je řízena promotorem genu pro karboxypeptidázu. Zjistili, že vznik oocyst *P. berghei* je u transgenních komárů snížen o 80% a přenos z komára na savce byl rovněž dramaticky snížen (k přenosu parazita z infikované myši na druhou nedošlo ve dvou ze tří pokusů vůbec) (Jacobs *et al.*, 2003).

Laboratoř Univerzity CaseWestern Reserve v Ohio v USA ve spolupráci s laboratoří Univerzity Bayreuth v Německu již v roce 2002 vytvořila syntetický gen (nazvaný AgCP [SM1]₄) složený z promotoru CP a sekvence kódující čtyři jednotky SM1 připojené k signální sekvenci CP. Tento gen byl vložen do vektoru piggyBac a transformován do zárodečné linie komárů *Anopheles stephensi*. Northern blot analýza ukázala, že transgen AgCP [SM1]₄ je rychle a silně indukován nasátou krví ve středním střevě transgenních komárů a to s maximem kolem 3-6 hodin po nasátí (Ito *et al.*, 2002). Tento výsledek je v souladu s dřívějšími pozorováními pro geny řízené promotorem CP u *Anopheles gambiae* (Edwards *et al.*, 1997).

Pomocí imunofluorescenční mikroskopie sledovali produkci proteinu AgCP[SM1]₄ v epitelu středního střeva. Rekombinantní protein byl detekován po 6 i po 24 hodinách od nasátí krve, ale po 36 hodinách jeho produkce vymizela. Vzhledem k tomu, že ookinety napadají epitel středního střeva přibližně po 24 hodinách od nasátí, je důležité, aby syntéza a sekrece rekombinantního peptidu byla indukována před touto invazí.

Pro měření vlivu exprese transgenu AgCP[SM1]₄ na vývoj parazitů měli kontrolní i transgenní komáři možnost sát krev pouze ze stejné infikované myši. Po nasátí byl sledován počet vytvořených oocyst. V devíti experimentech byla produkce oocyst u transgenních komárů snížena o 68,7 až 94,9% .

V oblasti, kde většina komárů nese méně než pět oocyst, může být inhibice přenosu velmi účinná. Důležité také je, že všechny experimenty byly prováděny s heterozygotními komáři, kteří měli jednu kopii transgenu. Očekává se, že inhibice bude ještě účinnější u homozygotních komárů se dvěma kopiemi transgenu (Ito *et al.*, 2002).

Vzhledem k tomu, že vývoj parazitů u transgenních komárů není zcela zablokovan, existuje možnost, že budou vyselektovány "rezistentní" varianty. Pro řešení tohoto problému, bude důležité, aby komáři byli modifikováni několika geny, z nichž každý zabraňuje vývoji parazitů jiným mechanismem. Práce probíhající v laboratořích se zaměřují na identifikování dalších efektorových genů. (Ito *et al.*, 2002).

3.2.3 Aplikace transgenních komárů ve volné přírodě

Výrazná redukce počtu komárů, kteří jsou schopni přenášet infekční choroby, ať už jde o malárii, žlutou zimnici, horečku dengue apod. může zlepšit zdravotní stav obyvatel postižených oblastí.

Velká pozornost je věnována genetickým modifikacím komára *Aedes aegypti*, který má jako jeden z mála zástupců hmyzu kompletně přečtený genom. Tento druh komára je přenašečem virového onemocnění žlutá zimnice nebo horečky dengue. První pokusy v

terénu provedla britská biotechnologická společnost Oxitec v roce 2009 na Grand Caymanu, největším ostrově Kajmanských ostrovů.

Transgenní komáři druhu *Aedes aegypti* nesou v genomu tzv. self-limiting gene, tTAV (tetracycline repressible transactivator variant), jehož produktem je netoxický protein, který však v buňkách hmyzu potlačuje expresi esenciálních genů a tím zabraňuje vývoji komářích larev. Letální účinek proteinu tTAV je umocněn pozitivní autoregulací.

Součástí promotoru genu tTAV je vazebné místo pro protein tTAV. Vysoká exprese genu tTAV může kromě inhibice transkripce cílových genů zahltit transkripční aparát komářích larev. Protein tTAV je inhibován tetracyklinem, takže v laboratorních podmínkách lze tyto komáry pomnožit, ve volné přírodě však hynou. Kromě genu tTAV transgenní komáři nesou gen pro fluorescenční protein, který usnadňuje monitorování stavu transgenních komárů ve volné přírodě.

Do přírody byli vypuštěni pouze samečci, kteří nesají krev a nemohou tedy onemocnění přenášet. Počet vypuštěných geneticky modifikovaných samců byl desetkrát vyšší než počet samců ve volně žijící populaci.

Terénní testy v Grand Caymanu byly provedeny ve dvou etapách. Při první etapě byl do přírody vypuštěn malý počet komárů a hodnotilo se, zda transgenní samci mohou přežít ve volné přírodě a zkřížit se s divokými samicemi. Přítomnost transgenních larev potvrdila životaschopnost transgenních samců. Ve druhé etapě testovali vliv transgenních komárů na potlačení divoké populace. Dospělí komáři i vajíčka byli sledováni pomocí pastí na dospělé a pastí na vajíčka (černé sklenice s vodou a „padýlkem“ vedoucím dovnitř, na které komáři nakladli vajíčka). K identifikaci transgenních vajíček a larev byl použit fluorescenční marker. Ve druhé etapě se podařilo snížit populaci divokých komárů o 80% (11 týdnů po zahájení 2. etapy). Toto snížení populace trvalo dalších 7 týdnů až do konce studie (Subbaraman *et al.*, 2011).

Je důležité také zmínit, že transgenní larvy nejsou toxické pro ptáky, kteří se jimi živí.

4 Závěr

Genové manipulace u bezobratlých využívají stejné metody jako u obratlovců. Základními metodami jsou ZFN, TALE a CRISPR/Cas9 systém, tzv. programovatelné nukleázy, umožňující účinnou a sekvenčně specifickou editaci genomu. ZFN a TALEN jsou složeny ze dvou domén, DNA vázající a štěpící. Doména zajišťující štěpení, FokI, je jim společná. Systém CRISPR/Cas9 je v současné době nejpoužívanějším nástrojem pro genové manipulace. Programovatelné nukleázy byly úspěšně otestovány např. u *Drosophila melanogaster* a *Bombyx mori*.

Příklad praktického využití genových manipulací u bezobratlých představují pokusy s komáry rodu *Anopheles*, které přispívají k boji proti malárii, žluté zimnici a horečce dengue.

5 Seznam literatury

Barrangou *et al.*, 2007

Barrangou, Rodolphe; Fremaux, Christophe; Deveau, H el ene; Richards, Melissa; Boyaval Patrick; Moineau, Sylvain; Romero, Dennis A.; Horvath, Philippe "CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes." *Science* 315.5819 (2007): 1709-1712.

Bibikova *et al.*, v roce 2001

Bibikova, Marina; Carroll, Dana; Segal J., David; Trautman, Jonathan K.; Smith, Jeff; Kim, Yang-Gyun; Chandrasegaran, Srinivasan "Stimulation of Homologous Recombination through Targeted Cleavage by Chimeric Nucleases." *Molecular and cellular biology* 21.1 (2001): 289-297.

Bibikova *et al.* 2002

Bibikova, Marina; Golic, Mary; Golic, Kent G.; Carroll, Dana "Targeted Chromosomal Cleavage and Mutagenesis in *Drosophila* Using Zinc-finger Nucleases." *Genetics* 161.3 (2002): 1169-1175.

Biessmann, 1985

Biessmann, Harald. "Molecular Analysis of the Yellow Gene (*y*) Region of *Drosophila Melanogaster*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82.21 (1985): 7369-7373.

Bitinaite *et al.*, 1998

Bitinaite, Jurate; Wah, David A.; Aggarwal, Aneel K.; Schildkraut, Ira "FokI Dimerization is Required for DNA Cleavage." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95.18 (1998): 10570-10575.

Boch *et al.*, 2009

Boch, Jens; Scholze, Heidi; Schornack, Sebastian; Landgraf, Angelika; Hahn, Simone; Kay, Sabine; Lahaye, Thomas; Nickstadt, Anja; Bonas, Ulla "Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-type III Effectors." *Science* 326.5959 (2009): 1509-1512.

Bolotin *et al.*, 2005

Bolotin, Alexander; Quinkis, Benoit; Sorokin, Alexei; Ehrlich, Dusko S. "Clustered Regularly Interspaced Short Palindrome Repeats (CRISPRs) Have Spacers of Extrachromosomal Origin." *Microbiology* 151.8 (2005): 2551-2561.

Bonas *et al.*, 1989

Bonas, Ulla, Robert E. Stall, and Brian Staskawicz. "Genetic and Structural Characterization of the Avirulence Gene *avrBs3* From *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." *Molecular and General Genetics* MGG 218.1 (1989): 127-136.

Cong *et al.*, 2013

Cong, Le; Ran, F. Ann; Cox, David; Lin, Shuailiang; Barretto, Robert; Habib, Naomi; Hsu, Patrick D.; Wu, Xuebing; Jiang, Wenyan; Marraffini, Luciano A.; Zhang, Feng "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas systems." *Science* 339.6121 (2013): 819-823.

Deltcheva *et al.*, 2011

Deltcheva, Elitza; Chylinski, Krzysztof; Sharma, Cynthia M.; Gonzales, Karine; Chao, Yanjie; Pirzada, Zaid A.; Eckert, Maria R.; Vogel, Jörg; Charpentier, Emmanuelle "CRISPR RNA Maturation by Trans-encoded Small RNA and Host Factor RNase III." *Nature* 471.7340 (2011): 602-607.

Deng *et al.*, 2012

Deng, Dong, Yan, Chuangye; Pan, Xiaojing; Mahfouz, Magdy; Wang, Jiawei; Zhu, Jian-Kang; Shi, Yigong; Yan, Nieng "Structural Basis for Sequence-specific Recognition of DNA by TAL Effectors." *Science* 335.6069 (2012): 720-723.

Edwards *et al.*, 1997

Edwards, Marten J.; Lemos, F.J.A.; Donnelly-Doman, M.; Jacobs-Lorena, M. "Rapid Induction by a Blood Meal of a Carboxypeptidase Gene in the Gut of the Mosquito *Anopheles gambiae*." *Insect biochemistry and molecular biology* 27.12 (1997): 1063-1072.

Fujii *et al.* 2010

Fujii, T.; Daimon, T.; Uchino, K.; Banno, Y.; Katsuma, S.; Sezutsu, H.; Tamura, T.; Shimada, T. "Transgenic Analysis of the *BmBLOS2* gene that Governs the Translucency of the

Larval Integument of the Silkworm, *Bombyx mori*." *Insect molecular biology* 19.5 (2010): 659-667.

Gabrielle & Llinas, 2015

Josling, Gabrielle A., and Manuel Llinas. "Sexual Development in Plasmodium Parasites: Knowing when It's Time to Commit." *Nature reviews. Microbiology* 13.9 (2015): 573.

Garneau *et al.*, 2010

Garneau, Josiane E.; Dupuis, Marie-E`ve; Villion, M.; Romero, D. A.; Barrangou, R.; Boyaval, P.; Fremaux, Ch.; Horvath, P.; Magadán, A. H.; Moineau, S. "The CRISPR/Cas Bacterial Immune System Cleaves Bacteriophage and Plasmid DNA." *Nature* 468.7320 (2010): 67.

GHO, 2015*

<http://www.who.int/gho/malaria/en/>

Hwang *et al.*, 2013 a, b

Hwang, Woong Y., Fu, Y.; Reyon. D.; Maeder, M. L.; Kaini, P.; Sander J. D.; Joung, J. K.; Peterson, R. T.; Yeh, J. J. "Heritable and Precise Zebrafish Genome Editing Using a CRISPR-Cas System." *PloS one* 8.7 (2013): e68708. **a)**

Hwang, Woong Y., Fu, Y.; Reyon. D.; Maeder, M. L.; Sander J. D.; Peterson, R. T.; Yeh, J. J.; Joung, J. K.; Tsai, S. Q. "Efficient Genome Editing in Zebrafish Using a CRISPR-Cas system." *Nature biotechnology* 31.3 (2013): 227-229. **b)**

Cho *et al.*, 2013

Cho, Seung Woo, Kim, S.; Kim, J. M.; Kim, J. S. "Targeted Genome Engineering in Human Cells with the Cas9 RNA-guided Endonuclease." *Nature biotechnology* 31.3 (2013): 230-232.

Christian *et al.*, 2010

Christian, Michelle, Cermak, T.; Doyle E. L.; Schmidt, C.; Zhang, F.; Hummel, A.; Bogdanove A. J.; Voyta, D. F. "Targeting DNA Double-strand Breaks with TAL Effector Nucleases." *Genetics* 186.2 (2010): 757-761.

Ishino *et al.*, 1987

Ishino, Yoshizumi; Shinagawa, H.; Makino, K.; Amemura, M.; Nakata, A. "Nucleotide Sequence of the *lap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product." *Journal of bacteriology* 169.12 (1987): 5429-5433.

Ito *et al.*, 2002

Ito, Junitsu; Ghosh, A. Moreira, L. A.; Wimmer, E. A.; Jacobs-Lorena, M. "Transgenic Anopheline Mosquitoes Impaired in Transmission of a Malaria Parasite." *Nature* 417.6887 (2002): 452-455.

Jacobs, 2003

Jacobs-Lorena, Marcelo. "Interrupting Malaria Transmission by Genetic Manipulation of Anopheline Mosquitoes." *Journal of vector borne diseases* 40.3/4 (2003): 73.

Jia *et al.*, 2014

Jia, Jingyue; Jin, Y.; Bian, T.; Wu, D.; Yang, L.; Terada, N.; Wu, W.; Jin, S. "Bacterial Delivery of TALEN Proteins for Human Genome Editing." *PloS one* 9.3 (2014): e91547.

Jiang *et al.*, 2013

Jiang, Wenyan; Bikard, D; Cox, D.; Zhang, F.; Marraffini, L: A. "RNA-guided Editing of Bacterial Genomes Using CRISPR-Cas Systems." *Nature biotechnology* 31.3 (2013): 233-239.

Jinek *et al.*, 2013

Jinek, Martin; East, A.; Cheng, A.; Ma, E.; Doudna, J. A. "RNA-programmed Genome Editing in Human Cells." *elife* 2 (2013): e00471.

Joung & Sander 2013

Joung, J. Keith, and Jeffrey D. Sander. "TALENs: a Widely Applicable Technology for Targeted Genome Editing." *Nature reviews Molecular cell biology* 14.1 (2013): 49-55.

Kim & Kim, 2014

Kim, Hyongbum, and Jin-Soo Kim. "A Guide to Genome Engineering with Programmable Nucleases." *Nature Reviews. Genetics* 15.5 (2014): 321.

Komoto *et al.*, 2009

Kômoto, Natuo; Quan, G. X.; Sezutsu, H.; Tamura, T. "A Single-base Deletion in an ABC Transporter Gene Causes White Eyes, White Eggs, and Translucent Larval Skin in the Silkworm *w-3oe* mutant." *Insect biochemistry and molecular biology* 39.2 (2009): 152-156.

Makarova *et al.*, 2011

Makarova, Kira S.; Haft, D. H.; Barrangou, R.; Brouns, S. J. J.; Charpentier, E.; Horvath, P.; Moineau, S.; Mojica, F. J. M.; Wolf, Y. I.; Yakunin, A. F.; John van der Oost; Koonin E. V. "Evolution and Classification of the CRISPR-Cas Systems." *Nature reviews. Microbiology* 9.6 (2011): 467.

Miller *et al.*, 1985

Miller, J., A. D. McLachlan, and A. Klug. "Repetitive Zinc-binding Domains in the Protein Transcription Factor IIIA from *Xenopus* Oocytes." *The EMBO journal* 4.6 (1985): 1609.

Miller *et al.*, 2011

Miller, Jeffrey C.; Tan, S.; Qiao, G.; Barlow, K. A.; Wang, J.; Xia, D. F.; Meng, X.; Paschon, D. E.; Leung, E.; Hinkley, S. J.; Dulay, G. P.; Hua, K. L.; Ankoudinova, I.; Cost, G. J.; Urnov, F. D.; Zhang, H. S.; Holmes, M. C.; Zhang, L.; Gregory, P. D.; Rebar, E. J. "A TALE Nuclease Architecture for Efficient Genome Editing." *Nature biotechnology* 29.2 (2011): 143-148.

MIRUSBIO*

<https://www.mirusbio.com/applications/genome-editing-using-crispr-cas>

Moscou & Bogdanove, 2009

Moscou, Matthew J., and Adam J. Bogdanove. "A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors." *Science* 326.5959 (2009): 1501-1501.

Porteus *et al.*, 2005

Porteus, Matthew H., and Dana Carroll. "Gene Targeting Using Zinc Finger Nucleases." *Nature biotechnology* 23.8 (2005): 967.

Quan *et al.*, 2002

Quan, G. X., T. Kanda, and T. Tamura. "Induction of the White Egg 3 Mutant Phenotype by Injection of the Double-stranded RNA of the Silkworm White Gene." *Insect molecular biology* 11.3 (2002): 217-222.

Ran *et al.*, 2013

Ran, F. Ann; Hsu, P. D.; Lin, Ch. Y.; Gootenberg, J. S.; Konermann, S.; Trevino, A. E.; Scott, D. A.; Inoue, A.; Matoba, S.; Zhang, Y.; Zhang, F. "Double Nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity." *Cell* 154.6 (2013): 1380-1389.

Sander & Joung, 2014

Sander, Jeffrey D., and J. Keith Joung. "CRISPR-Cas Systems for Editing, Regulating and Targeting Genomes." *Nature biotechnology* 32.4 (2014): 347-355.

Segal *et al.* 1999

Segal, David J.; Dreier, B.; Beerli, R. R.; Barbas III, C. F. "Toward Controlling Gene Expression at will: Selection and Design of Zinc Finger Domains Recognizing Each of the 5'-GNN-3' DNA Target sequences." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96.6 (1999): 2758-2763.

Schornack *et al.*, 2006

Schornack, Sebastian; Meyer, A; Römer, P.; Jordan, T.; Lahaye, T. "Gene-for-gene-mediated Recognition of Nuclear-targeted AvrBs3-like Bacterial Effector Proteins." *Journal of plant physiology* 163.3 (2006): 256-272.

Subbaraman, 2011

Subbaraman, Nidhi. "Science Snipes at Oxitec Transgenic-mosquito Trial." (2011): 9-11.

Takasu *et al.*, 2010

Takasu, Yoko., Kobayashi, I., Beumer, K., Uchino, K., Sezutsu, H., Sajwan, S., Carroll, D., Tamura, T. & Zurovec, M. 2010. Targeted Mutagenesis in the Silkworm *Bombyx mori* Using Zinc Finger Nuclease mRNA Injection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 759–765.

Volf a kol., 2007

Volf P., Horák P. a kol.: Paraziti a jejich biologie 1. vydání, str. 90 – 115, 253, Triton, Praha 2007

Wang & Qi, 2016

Wang, Fangyuan, and Lei S. Qi. "Applications of CRISPR Genome Engineering in Cell Biology." Trends in cell biology 26.11 (2016): 875-888.