Metody badawcze i strategie genetyki i genomiki

Lektura

- Allison “Podstawy biologii molekularnej”, rozdział 8 i 9

Czym jest inżynieria genetyczna?

- Ang. *recombinant DNA* – manipulacje DNA *in vitro*
  - izolacja i amplifikacja DNA i cDNA
  - mapowanie i sekwencjonowanie DNA
  - tworzenie nowych cząsteczek DNA
    - przez rekombinację cząsteczek naturalnych
    - przez syntezę *de novo*
    - redagowanie genomów
  - wprowadzanie konstruktów DNA do komórek i organizmów
  - bioinformatyka

A co nie jest inżynierią genetyczną?

- Inżynieria embrionalna (np. klonowanie)
- Tworzenie nowych form organizmów przez selekcję

Zastosowania

- Badania podstawowe
- Biotechnologia

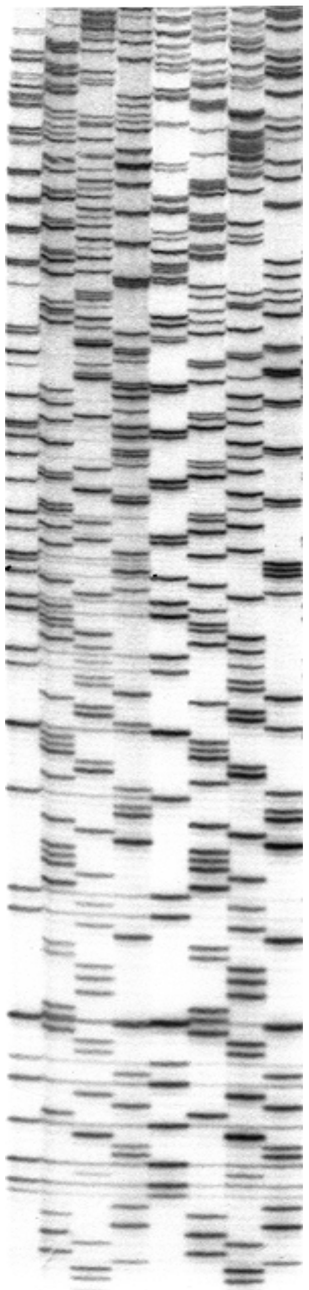
Granica między badaniami podstawowymi a stosowanymi jest płynna, stosowane techniki są podobne, różnice dotyczą głównie skali.

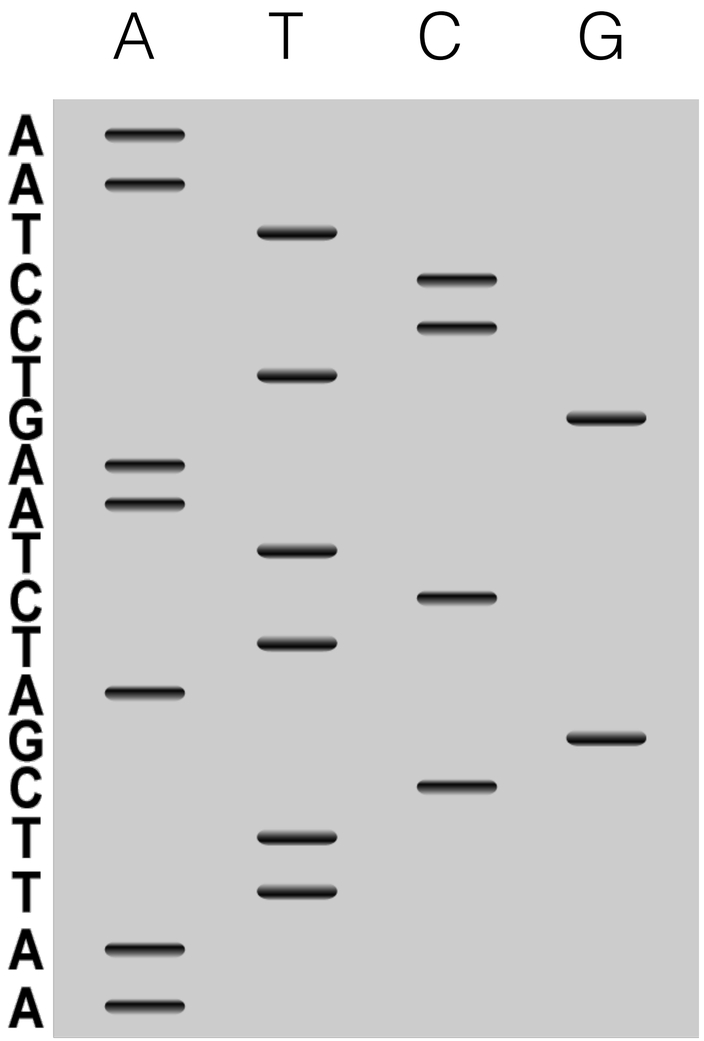
Podstawowe techniki

- Izolacja DNA lub RNA
  - cDNA – izolacja RNA i przepisanie na DNA
  - Chemiczna synteza DNA *de novo*
- PCR
- Klonowanie DNA
- Mutageneza losowa i ukierunkowana
  - w tym wprowadzanie modyfikacji do genomu
- Wykrywanie DNA, RNA i białek
- Sekwencjonowanie

Tradycyjny odczyt sekwencji

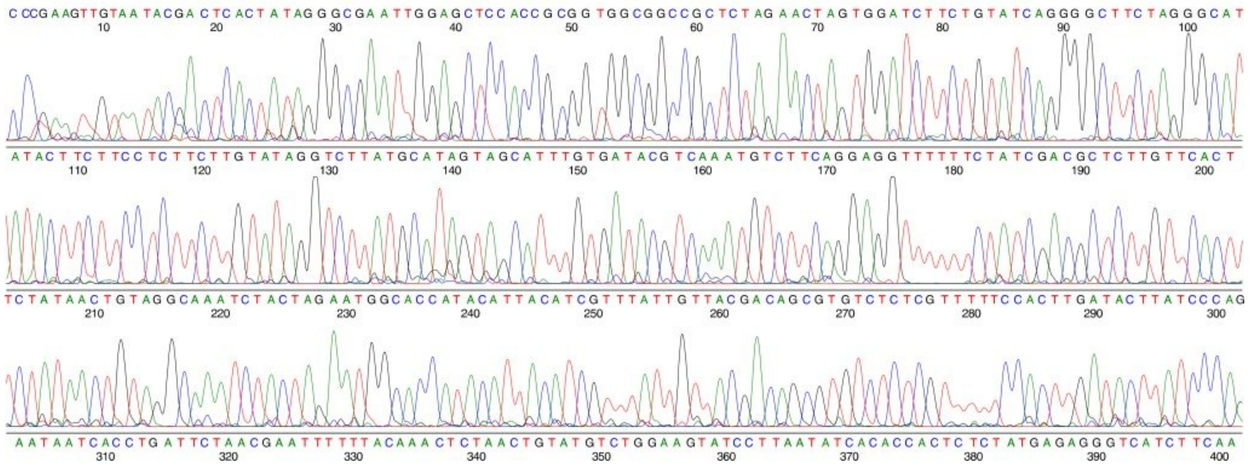
- Metoda Sangera (1977)
- Synteza DNA w obecności analogów nukleotydów (forma dideoksy) terminujących reakcję na określonym nukleotydzie
- Znakowanie radioaktywne, osobne reakcje
- Konkurencyjna metoda Maxama-Gilberta, oparta na degradacji DNA nie przyjęła się (trudniejsza)





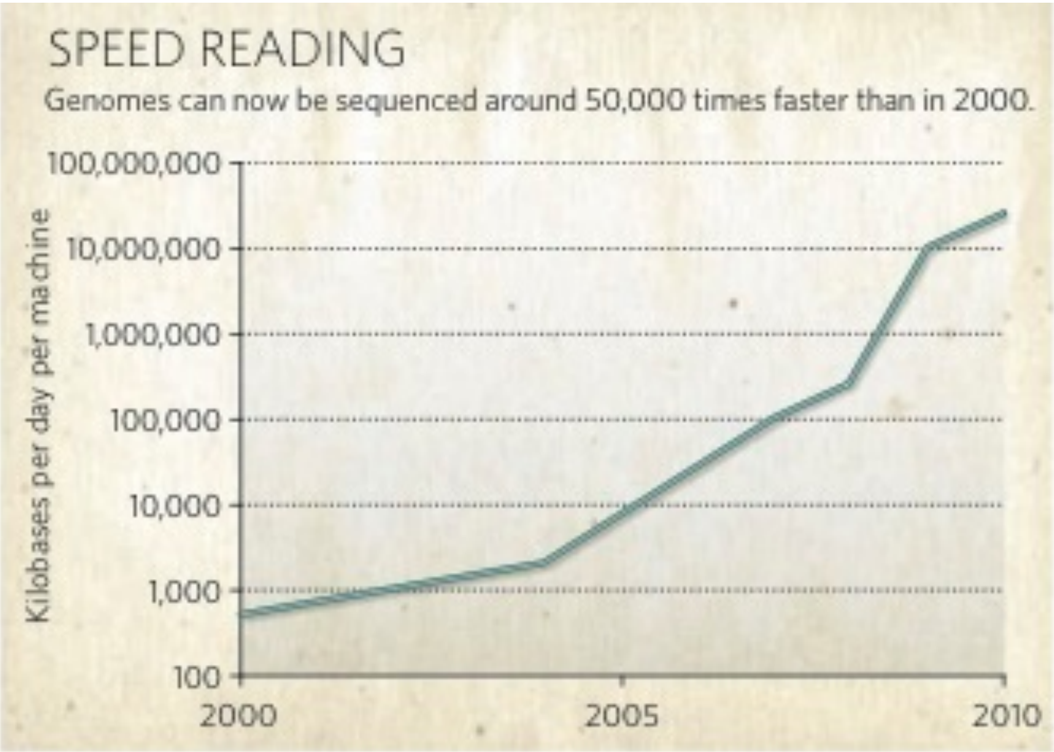
Sekwencjonowanie automatyczne - lata 90.

- Dideoksynukleotydy znakowane fluorescencyjnie (4 kolory)
- Elektroforeza kapilarna



Sekwencjonowanie - rewolucja XXI w.

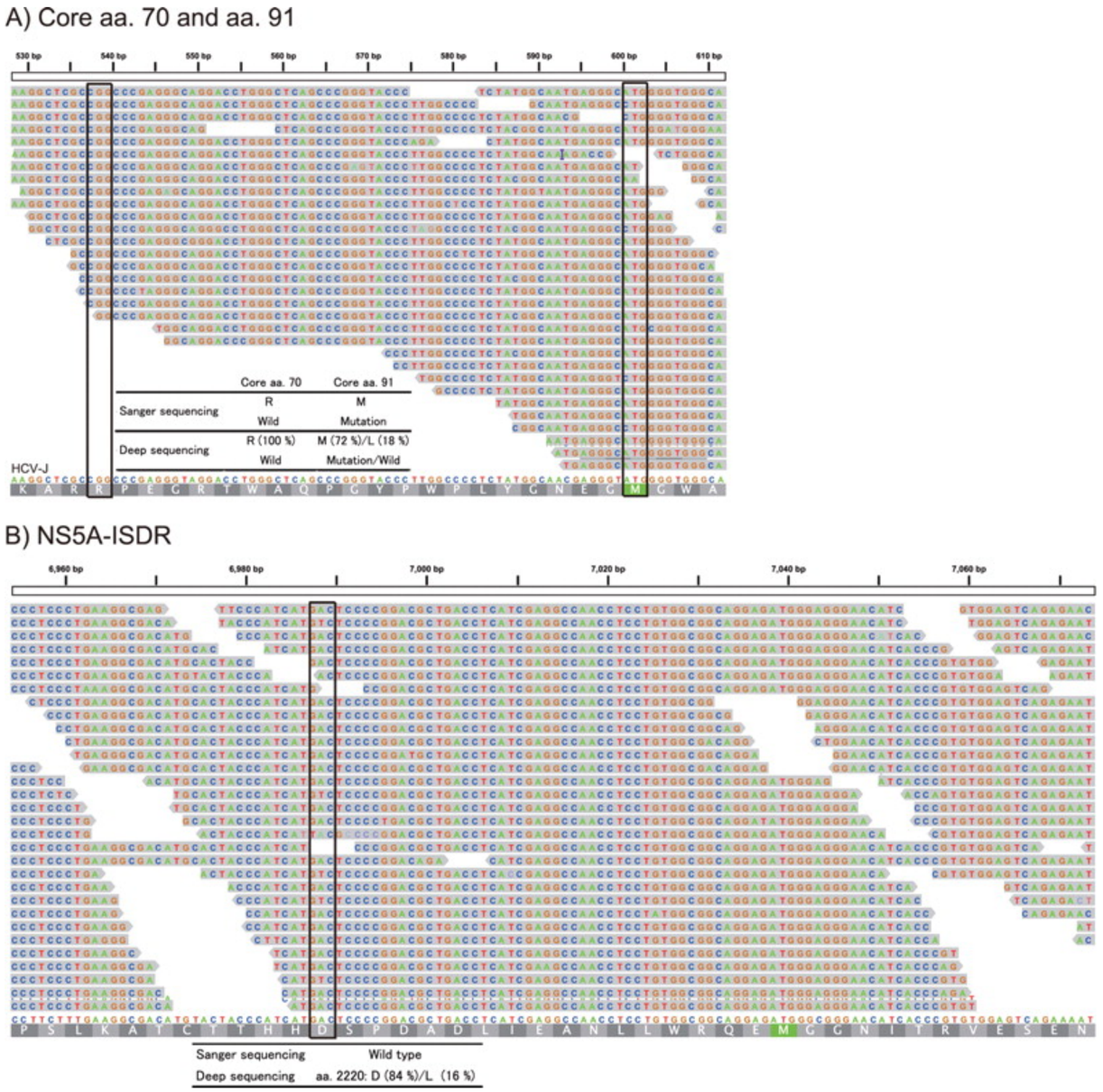
- Koszt sekwencjonowania między 1999 a 2009 obniżył sie 14 000 razy
- Prędkość odczytu sekwencji między 2000 a 2010 r. wzrosła 50 000 razy
- Cel: sekwencja genomu jednej osoby za 1000$ osiągnięty
- Im więcej znamy sekwencji, tym łatwiej poznajemy kolejne



© 2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

Sekwencjonowanie wysokoprzepustowe

- Tzw. *deep sequencing*, sekwencjonowanie nowej generacji (NGS)
- Generowanie w jednym przebiegu milionów niezależnych odczytów
- Pojedyncze odczyty krótkie (25-400 bp)
- Zastosowania
  - sekwencjonowanie nowych genomów
  - resekwencjonowanie
    - np. analiza zmienności
  - badanie ekspresji przez sekwencjonowanie cDNA



Sekwencjonowanie

- Głównym wyzwaniem w sekwencjonowaniu nie jest sam odczyt sekwencji
- Odczytywane fragmenty są krótkie
  - do ~700-800 nt (sekw. tradycyjne Sangera)
  - 50-400 nt (NGS)
  - Istnieją metody (PacBio, Nanopore) dające długie odczyty (>10 000 nt), ale z licznymi błędami
- Wyzwaniem jest złożenie długiej sekwencji z tych krótkich fragmentów

Genomika

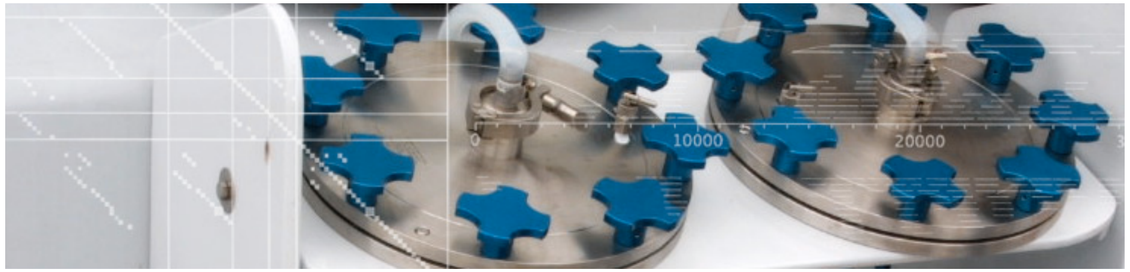
- Genomika jest dziedziną zajmującą się badaniem całych genomów (kompletu informacji genetycznej) różnych organizmów
- Sekwencjonowanie i charakteryzowanie genomów - genomika strukturalna
- Badanie funkcji zawartych w nich genów - genomika funkcjonalna

Metagenomika

- Izolacja DNA ze środowiska i sekwencjonowanie
- Jedyny sposób badania mikroorganizmów, które nie dają się hodować

Metagenomika

Analiza sekwencji całości DNA
wyizolowanego ze zbiorowiska organizmów



Odkrycia dzięki sekwencjonowaniu

- Tajemnicza UCYN-A
  - Sinica (cyjanobakteria)
  - Niewielki genom (1,4mln par zasad, 1200 genów)
  - Brak zdolności fotosyntezy, cyklu Krebsa, syntezy niektórych aminokwasów
  - Zdolność asymilacji azotu
  - Symbioza (gospodarz - *Haptophyta, Primnesiophyta* - jednokomórkowe glony)
  - Jeden z głównych czynników asymilacji azotu w środowisku morskim

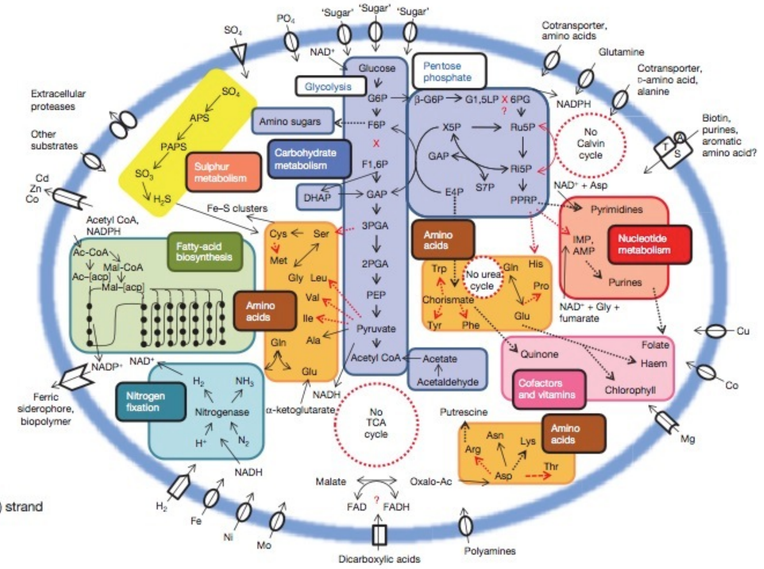
Candidatus Atelocyanobacterium thalassa

doi:10.1038/nature08786 nature

LETTERS

Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium

H. James Tripp[1], Shellie R. Bench[1], Kendra A. Turk[1], Rachel A. Foster[1], Brian A. Desany[2], Faheem Niazi[2], Jason P. Affourtit[2] & Jonathan P. Zehr[1]



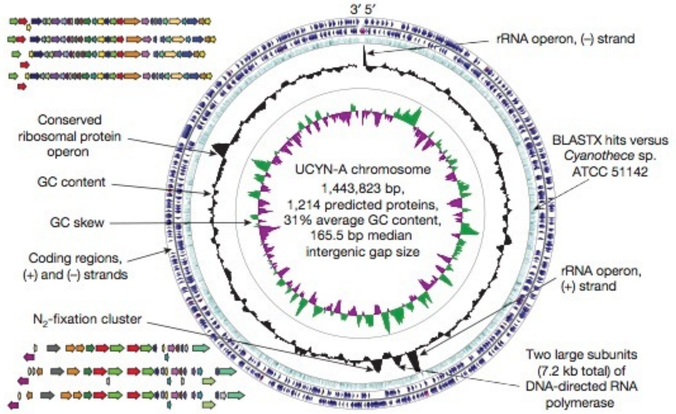
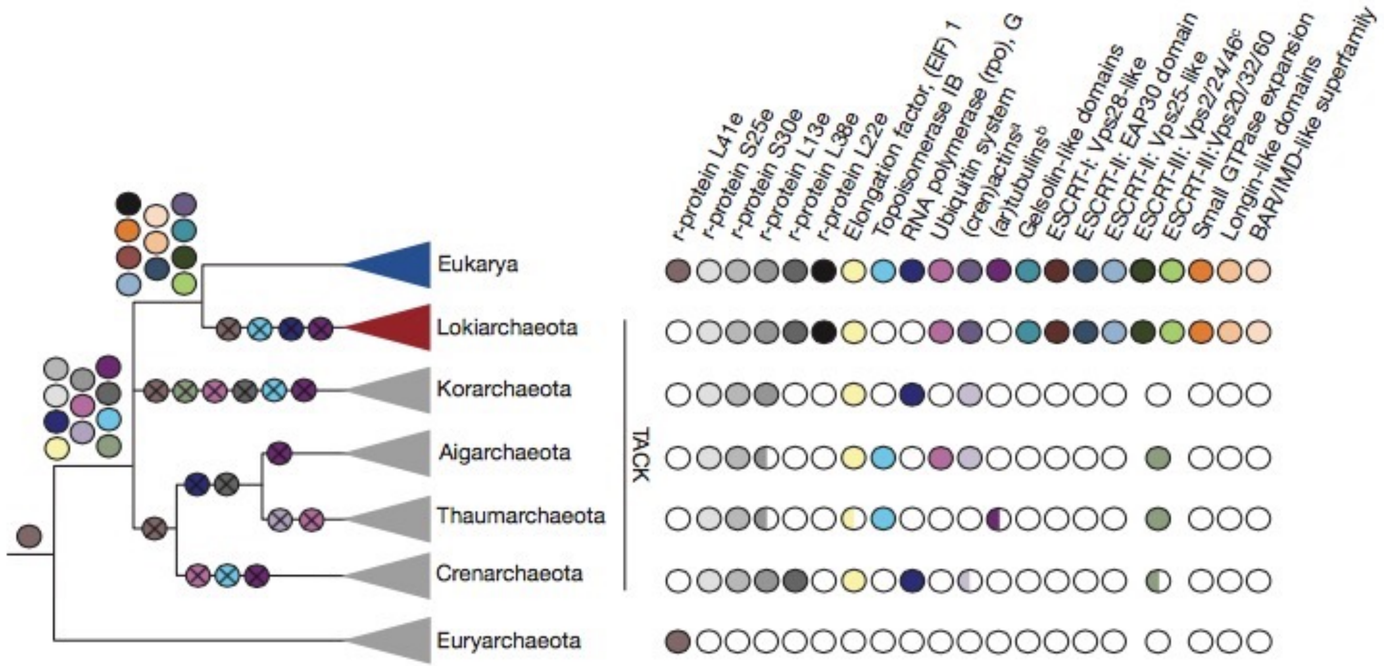


Figure 1 | Circular map of UCYN-A chromosome compared with *Cyanothece* sp. ATCC 51142. The outer two rings show the two strands of the

Lokiarcheota

- Typ w domenie Archaea
- Zidentyfikowany na podstawie analiz metagenomowych (2015)
- Najbliżej spokrewniona z Eukaryota
- Posiada geny kodujące białka umożliwiające tworzenie złożonych struktur błonowych
- Tak mógł wyglądać gospodarz endosymbiozy, która dała początek Eukaryota



ARTICLE

doi:10.1038/nature14447

Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes

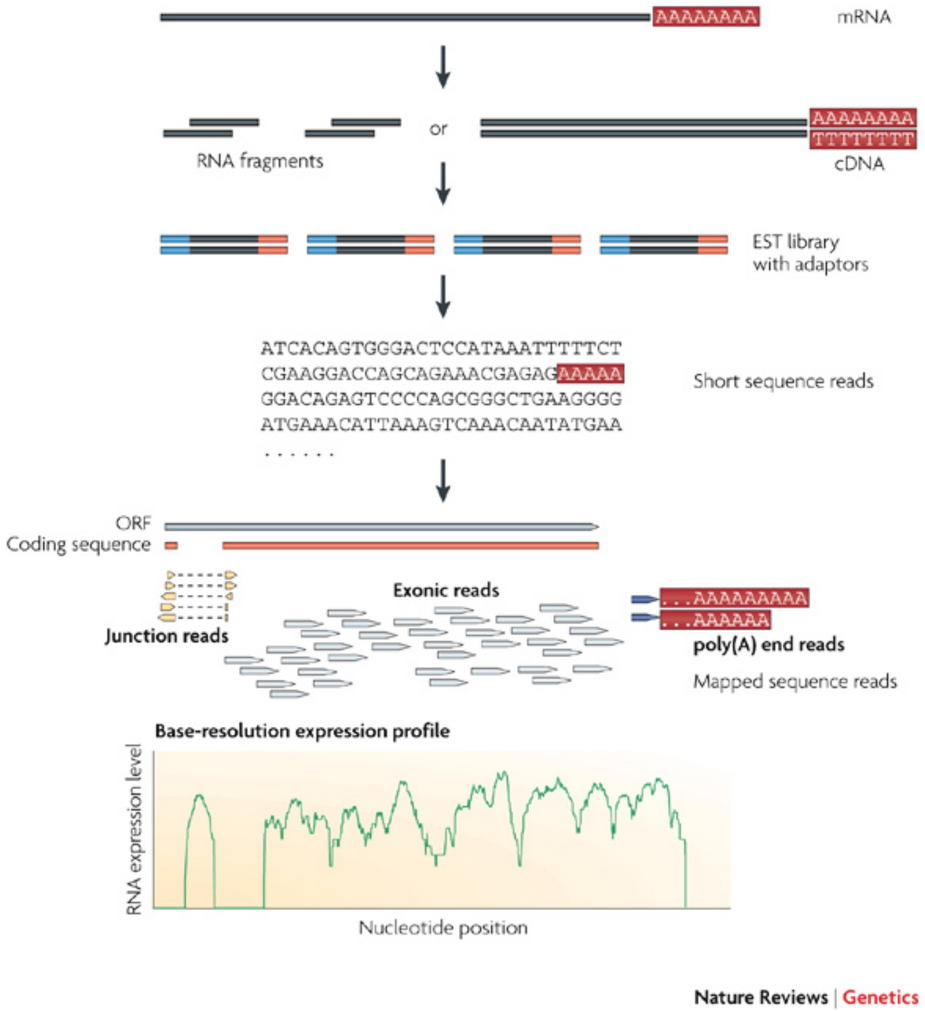
Anja Spang[1]*, Jimmy H. Saw[1]*, Steffen L. Jørgensen[2]*, Katarzyna Zaremba-Niedzwiedzka[1]*, Joran Martijn[1], Anders E. Lind[1], Roel van Eijk[1]†, Christa Schleper[2,3], I

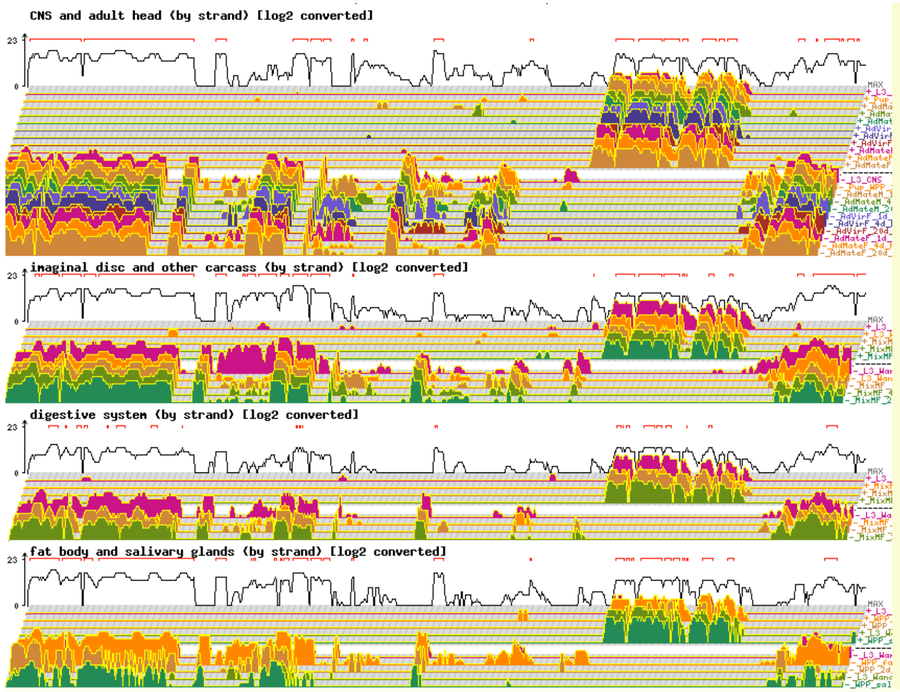
©2015 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

Wielkie projekty

- Projekt 1000 genomów - różnorodność genetyczna człowieka
- Metagenomika mikrobiomu przewodu pokarmowego człowieka
- Genomy wymarłych gatunków (np. Neandertalczyk)

RNA-seq

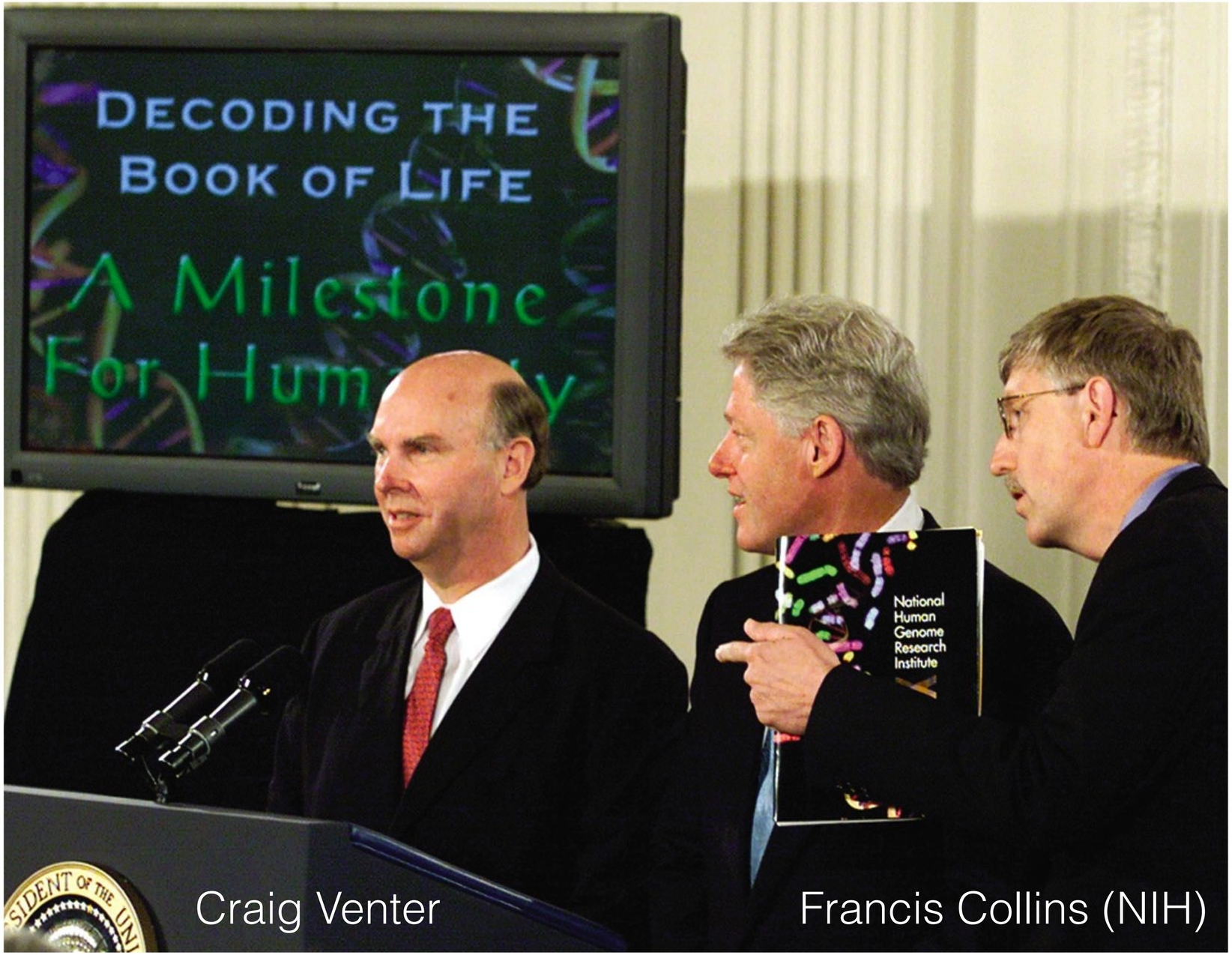

AAAAAAAA
mRNA
or
AAAAAAAA
TTTTTTTT
RNA fragments
cDNA
EST library
with adaptors
ATCACAGTGGGACTCCATAAATTTTTCT
CGAAGGACCAGCAGAAACGAGAGAAAAA
GGACAGAGTCCCCAGCGGGCTGAAGGGG
ATGAAACATTAAAGTCAAACAATATGAA
Short sequence reads
ORF
Coding sequence
Exonic reads
Junction reads
...AAAAAAAAA
...AAAAAA
poly(A) end reads
Mapped sequence reads
Base-resolution expression profile
RNA expression level
Nucleotide position
Nature Reviews | Genetics


CNS and adult head (by strand) [log2 converted]
imaginal disc and other carcass (by strand) [log2 converted]
digestive system (by strand) [log2 converted]
fat body and salivary glands (by strand) [log2 converted]

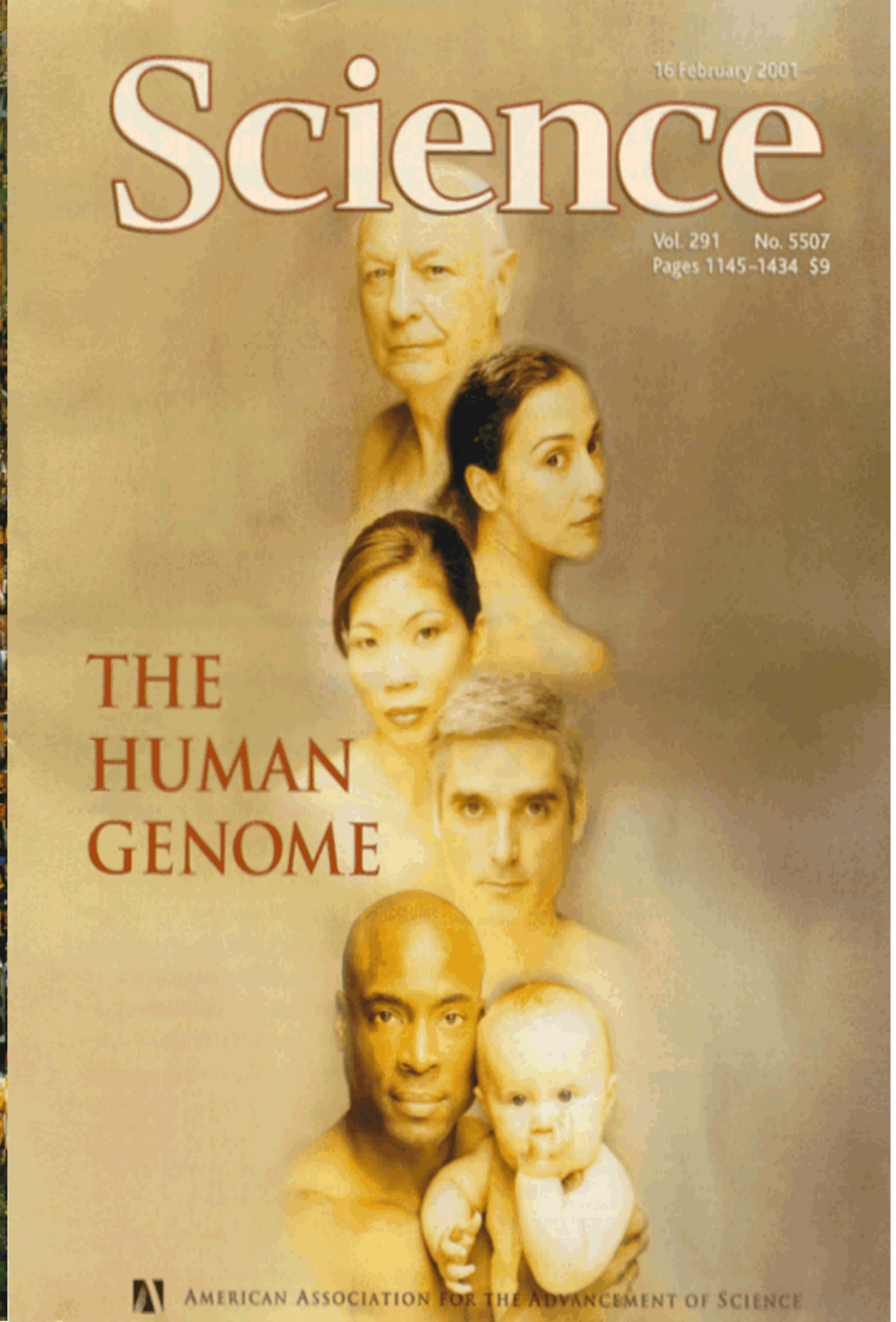
Sekwencjonowanie nowej generacji – wyzwanie dla bioinformatyki

- Krótkie odczyty (50-150 nt)
  - pojedyncze
  - “paired-end”
- Problem identyfikacji i składania sekwencji
- Indeksowanie i multipleks

Genomika funkcjonalna


DECODING THE
BOOK OF LIFE
A Milestone
National
Human
Genome
Research
Institute
Craig Venter
Francis Collins (NIH)

15 February 2001
nature
$10.00
www.nature.com
the human genome
Nuclear fission
Five-dimensional energy landscapes
Seafloor spreading
The view from under the Arctic ice
Career prospects
Sequence creates new opportunities
naturejobs
genomics special


16 February 2001
Science
Vol. 291 No. 5507
Pages 1145–1434 $9
THE HUMAN GENOME
AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE

Czym jest znajomość genomu

- Nie jest “odczytaniem księgi życia”
- Sama sekwencja nie daje jeszcze zrozumienia, jak funkcjonują komórki
  - Ale jest niezwykle cennym narzędziem w badaniach
- Sekwencja nie jest lekarstwem
  - Ale bardzo pomaga w zrozumieniu mechanizmów chorób i wynajdywaniu nowych terapii

Co genom już dał nauce

- Dużo ciekawych i zaskakujących odkryć
  - Dlaczego mamy tak mało genów
  - Jak ewoluował człowiek
- Narzędzie do badania funkcji genów

Czy warto badać genomy

- Nowoczesne techniki generują bardzo dużo danych
- Dwa podejścia
  - “*hypothesis driven*” – dane zbierane dla zweryfikowania jakiejś hipotezy. Klasyczna metoda naukowa.
  - “*data driven*” – dane zbierane bez wstępnych założeń, potem wyszukiwane w nich prawidłowości.

Koniec hipotezy?

- Podejście zakładające poszukiwanie prawidłowości w dużych zbiorach danych, zbieranych bez wstępnych założeń, może być produktywne
- Ale niesie też (dobrze znane w literaturze) ryzyko
  - Lem, S. Cyberiada, Wyprawa szósta: czyli jak Trurl i Klapaucjusz demona drugiego rodzaju stworzyli, aby zbójcę Gębona pokonać., 1965.

“[…] i pomału diabli go zaczynali brać, bo już mu świtało, że wszystkie owe całkiem prawdziwe i ze wszech miar sensowne informacje zupełnie nie są mu potrzebne, gdyż robił się z tego groch z kapustą, od którego głowa pękała, a nogi drżały.”

–Stanisław Lem, “Wyprawa szósta […]”

Co to znaczy? Genomika funkcjonalna.

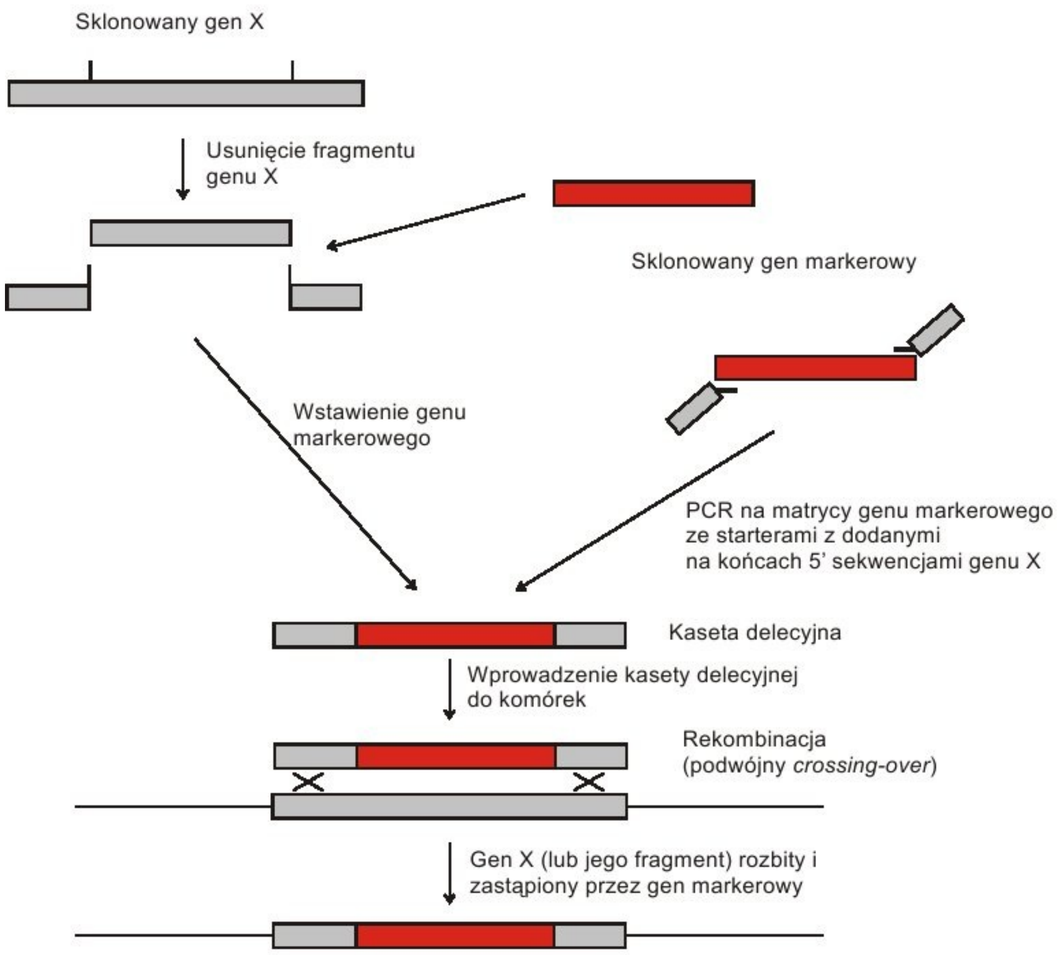
TCACAATTTAGACATCTAGTCTTCCACTTAAGCATATTTAGATTGTTTCCAGTTTTCAGCTTTTATGACTAAATCTTCTAAAATTGTTTTTCCCTAAATGTATATTTTAATTTG
TCTCAGGAGTAGAATTTCTGAGTCATAAAGCGGTCATATGTATAAATTTTAGGTGCCTCATAGCTCTTCAAATAGTCATCCCATTTTATACATCCAGGCAATATATGAGAG
TTCTTGGTGCTCCACATCTTAGCTAGGATTTGATGTCAACCAGTCTCTTTAATTTAGATATTCTAGTACATACAAAATAATACCTCAGTGTAACCTCTGTTTGTATTTCCCT
TGATTAACTGATGCTGAGCACATCTTCATGTGCTTATTGACCATTAATTAGTCTTATTTGTTAAATGTCTCAAATATTTTATACAGTTTTACATTGTGTTATTCATTTTTTAAA
AAATTCATTTTAGGTTATATGTATGTGTGTGTCAAAGTGTGTGTACATCTATTTGATATATGTATGTCTATATATTCTGGATACCATCTCTGTTTCATGCATTGCATATATATTT
GCCTATTTAGTGGTTTATCTTTTCATTTTCTTTTGGTATCTTTTCATTAGAAATGTTATTTATTTTGAGTAAGTAACATTTAATATATTCTGTAACATTTAATGAATCATTTTATG
TTATGTTTAGTATTAAATTTCTGAAAACATTCTATGTATTCTACTAGAATTGTCATAATTTTATCTTTTATATACATTGATATTTTTATGTCAAATATGTAGGTATGTGATATTATG
CACATGGTTTTAATTCAGTTAATTGTTCTTCCAGATGTTTGTACCATTCCAACATCATTTAAATCATTAAATGAAAAGCCTTTCCTTACTAGCTAGCCAGCTTTGAAAATC
CATTCATAGGGTTTGTGTTAATATATTTTTGTTCTTTTTTTTCCTTTCTACTGATCTCTTTATATTAATACCTACTGTGGCTTTATATGAAGTCATGGAATAATACGTAGTAAG
CCCTCTAACACTGTTCTGTTACTGTTGTTATTGTTTTCTCAGGGTACTTTGAAATATTCGAGATTTTATTATTTTTTAGTAGCCTAGATTTCAAGATTGTTTTGACGATCAAT
TTTTGAATCAATTGTCAATATTTTTAGTAATAAAATGATGATTTTTGATTGGAAATACATTAAATCTATAAGCCAAATTGGAGATTATTGATATATTAACAAAAATGAGTTTTCC
AGTCCATGAATGTATGCACATTATAAAATTCATTCTTAAGTATGTCATTTTTTAAGTTTTAGTTTCAGCAGTATATGTTTGTTACATAGGTAAACTCCTGTCATGGGGGTTA
GTTGTACAGGTTATTTTATCATCCAGGCATAAAGCCCAGTACCCAGTAGTTATCTTTTCTGCTCCTCTCCCTCCTGTCACCCTCCACTCTCAAGTAGACCCCAGTTTC
TGTTGTTCTCTTCTTTGCATTAATGACTTCTCATCATTTAGATTGCACTTGTAAGTGAGAACAGGACGTATGTGGTTTTCTACTCCTGTGTTAGTTTGCTAAGGATAACC
ACCTCCATCTCCATCCATGTTCCCACAAAAGACATGATCTCCTTTTTTATGGCTGCATATTATTCCATGGTATATATGTACCACATTTTCTTTATCCAATCTGTCATTGATG
GACATTTAGGTTGTTTCCACATCATTGCCGTTGTAAATACTGCTGCAGTGAATATTCGTGTGTATGTCTTTATGGTAGAATGATTTATATTCCTCTGGGTATATTTCCAAGT
AATGGGATGGTTGGGTCAAATGGTAATTCTGCTTTTAGCTTTTTGAGGAATTGCCATATTGCCTTTCACAACGGTTGAACTAATTTATACTCCCAAGAGTGTATAAGTTG
TTCCTTTTTCTCTGCAACCTCGACATCACCTGTTATTTATGACTTTTATATAATAGCCATTCTGCTGGTCTGAGATGGTATCTCATTATGATTTTGATTTGCATTTCTCTAAT
GCTCAGTGATATTGAGCTTGGCTGCATATATGTCTTCTTTTAAAAATATCTGTTCATGTCCTTTGCCTAATTTATAACGGGGTTGTTTGTTTTTCTCTTGTAAATTTGTTTAA
GTTCCTTATAGATTCTAGGTATTAAACCTTTTTTCAGAGGCGTGGCTTGCAAATATTTTCTCCCATTCTATAGGTTGTCTGTTTATTCTGTTGATAGTTTCCCTTGCTGTG
CAGAAGCTCTTAACTTTAATTAGATCCGACTTGTCAATTTTTGCTTTGGTCGCAATTGCTTTTGATGTTATTGTCGTGAAATCTTTGCTAGTTCTTAGGTCCAGGATGATA
TTGCCCAAGTTGTCTTCCAGGGCTTTTATAATTTTGGATTTTACATTTAAGTCTTAATATATTTATTAAATTTGTTAGGGTTTCAGGATACAAGGACAATATAGCAGCAAAC
AATGTAAAAGTAAAATCTGAAAAATAATAGAAAACAGTTTAATTGAACACTTTACCATTATGTAATGCCCTTCTTTGTCTTTCCTGATCTTTGTTGGTTTGAAGTTCAAAAA
AGACAAACTTAATGGTACAATAGGTATTGTAGATTTCAGGACTTTCTGTATAAAATATTTTGTATATATGAATAGATCATTTTTTATTTCCAGTCTTTAAACATTTTCTTAACAT
TTTCTTCTATTGCTTCACTTCACTCGCTAGGACCATCAGGACAGTGTTGAACAGAAATTGTCAGACTGATCATCACAACTTTTTCTAGATTTTAGAAGGAAATTTTTCTT
TATTTCAACATAAAGCAGCATGTTAATGCCAAGTTTTAATATGTGTTATCAGATTGAAATTTTTTTGTATATTTCTACATTACCAAGAATTTTTAGCAAGAGTTTTTGTTGAG
TTTTAATTTAAAAATCATTTGTTAATTTCATCTGATTTTTTTATTTCTCTTTTTACCTTAAGAGATTAAACTGACTACAGATTGAATATAAACAAACAAACAAACAAACAAAAA
CTCTAAAATGCTGTGGATCAACACCACTTAGTAATTTGTATACTTGGATTCAATTTGCTGAAATTTTGTTAGACATTTTTGCGTCGATATTTATGAGGGATGTTGATCTGT
AAAAGTATTAAAATGCCTTTGACAGATAGTGTCACCATATAAAAAACTTTGAACAAAATCAGATTATATCACTGTGGATATTTCTATTTTGAACTAACTTAGATGATAATTTT
AATCTATATCCTAGATGAACT

Mały fragment chromosomu 21

Odwrotna genetyka – od genu do funkcji

Genetyka tradycyjna	Genetyka „odwrotna”
Funkcja (mutacja, fenotyp)	Gen (z sekwencji całego genomu)
↓	↓
Klonowanie genu	Inaktywacja genu
↓	↓
Analiza sklonowanego genu	Analiza uzyskanego fenotypu

Odwrotna genetyka – inaktywacja przez rekombinację

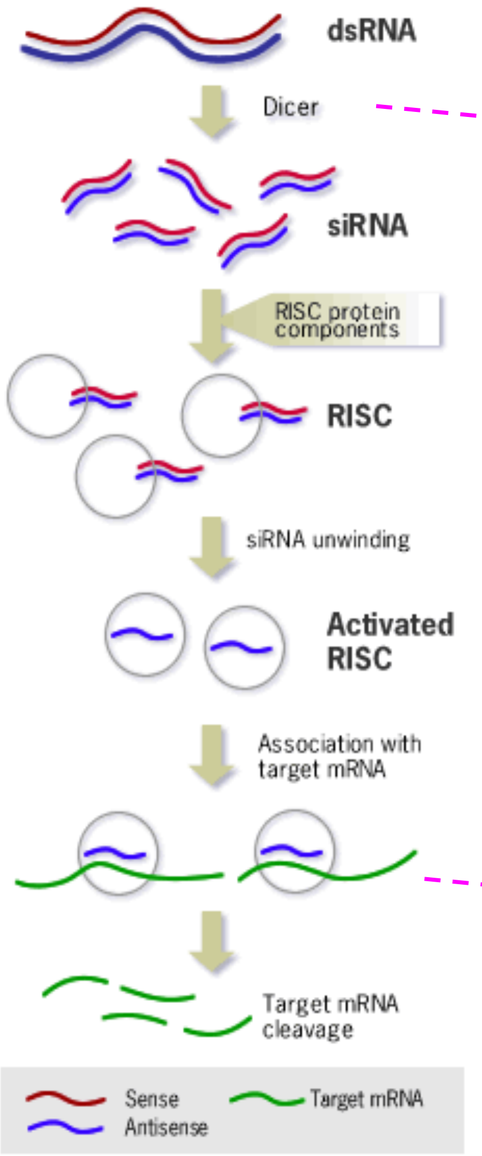


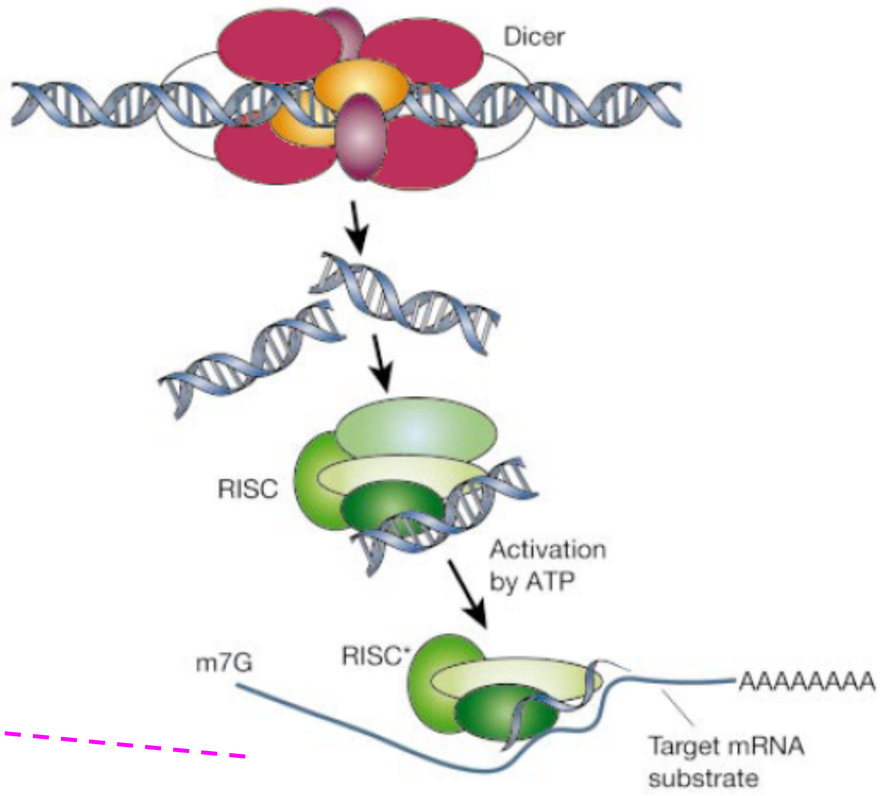
Odwrotna genetyka – interferencja RNA

Odkrycie roku 2002 –
regulacyjna rola małych RNA

Nagroda Nobla w dziedzinie medycyny 2006, za odkrycie mechanizmu interferencji RNA
A. Fire i C. Mello

siRNA - jak to działa?





Efekt – degradacja mRNA

Hannon G.J.: ‘RNA interference’, Nature 418, July 11, 2002

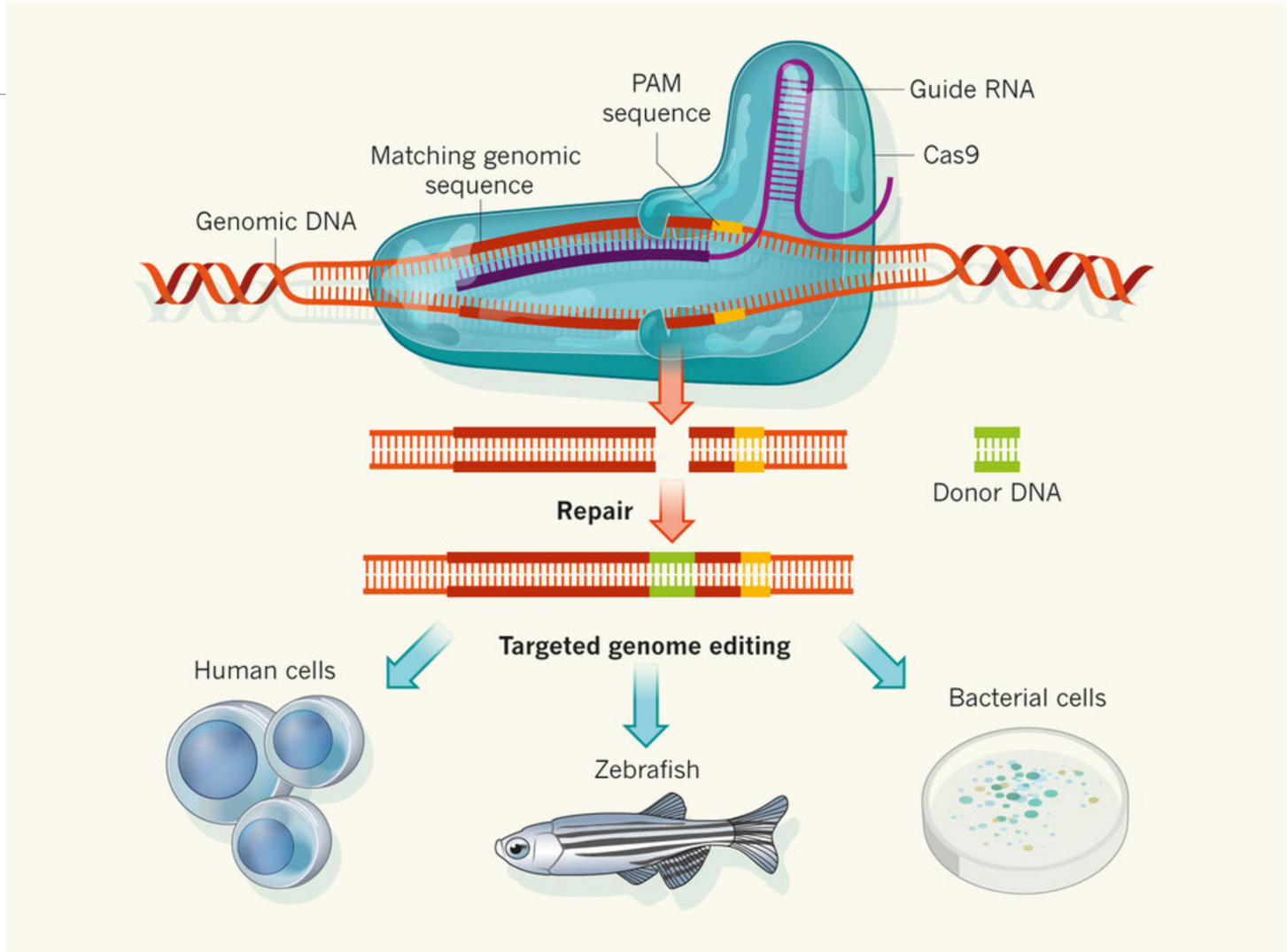
Zastosowania siRNA

- Badanie funkcji genów (“odwrotna genetyka”) - szczególnie skuteczne u nicienia *Caenorhabditis*, ale działa też w komórkach owadów, ssaków i roślin

- Hamowanie wybranych genów jako metoda leczenia (np. zwalczania wirusów czy nowotworów) – przykład: obniżenie poziomu receptora LDL („zły cholesterol”) u myszy

Redagowanie genomu - system CRISPR/Cas9

- System obronny bakterii przed fagami, zaadaptowany do edycji dowolnej sekwencji w genomie.
- Bakteryjna nukleaza (Cas9 i podobne) naprowadzana przez RNA (guide RNA)
- Po przecięciu DNA systemy naprawcze komórki powodują powstanie delecji lub zmiany sekwencji (zależnej od DNA donorowego)
- Działa także u organizmów, dla których nie istnieją stabilne wektory.



Nature 495, 50–51 (07 March 2013) doi:10.1038/495050a

Co to oznacza dla nauki i biotechnologii

- Można zmienić dowolny gen u roślin i zwierząt
- Można łatwo adaptować do kolejnych gatunków (w odróżnieniu od tradycyjnej inżynierii genetycznej)
- Modyfikacja nie pozostawia żadnego śladu, nie zostaje włączony obcy DNA
- Wg. prawa UE to nadal jest GMO

Common buckeye wings: normal (left) and with optix deleted (right) (Robert Reed)

A dla człowieka

- Możliwa jest zmiana sekwencji dowolnego genu w komórkach zarodkowych
- Skuteczność: około 50-80%
- W połączeniu z zapłodnieniem pozaustrojowym możliwość uzyskania zmodyfikowanego człowieka
- Pierwsze badania - na komórkach, z których nie mogły rozwinąć się zarodki (2015)
- Obecnie badania na komórkach zarodkowych człowieka

Anna Tärnhuvud

Fredrik Lanner, who will conduct gene-editing in human embryos at the Karolinska Institute in Sweden.

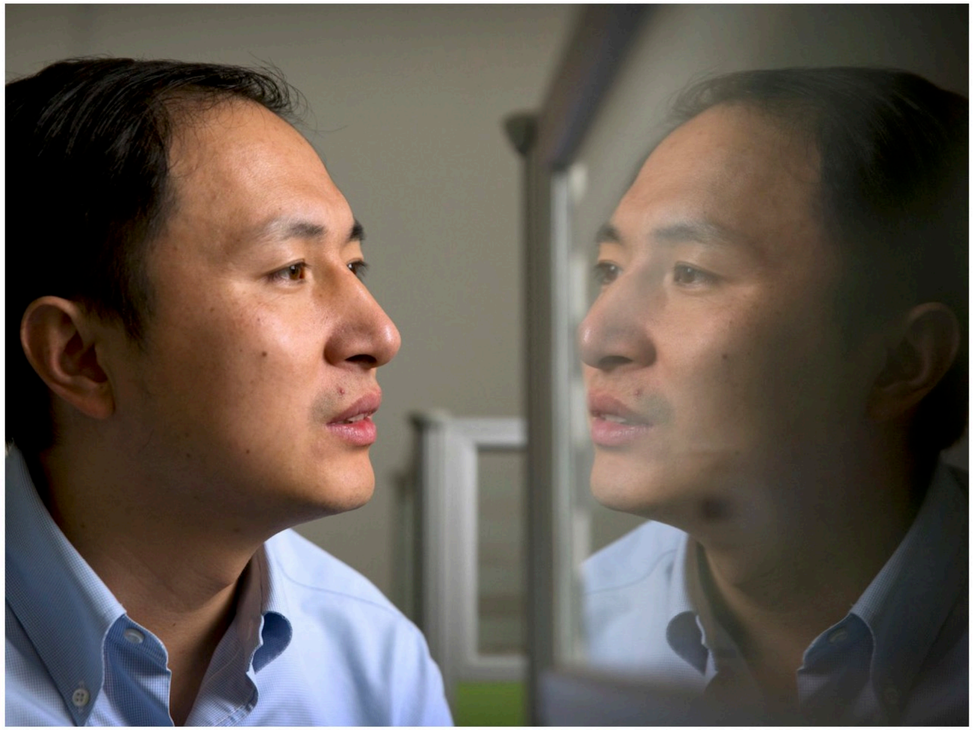
Dzieci na zamówienie?

Photosani/Shutterstock

?

19.11.2018

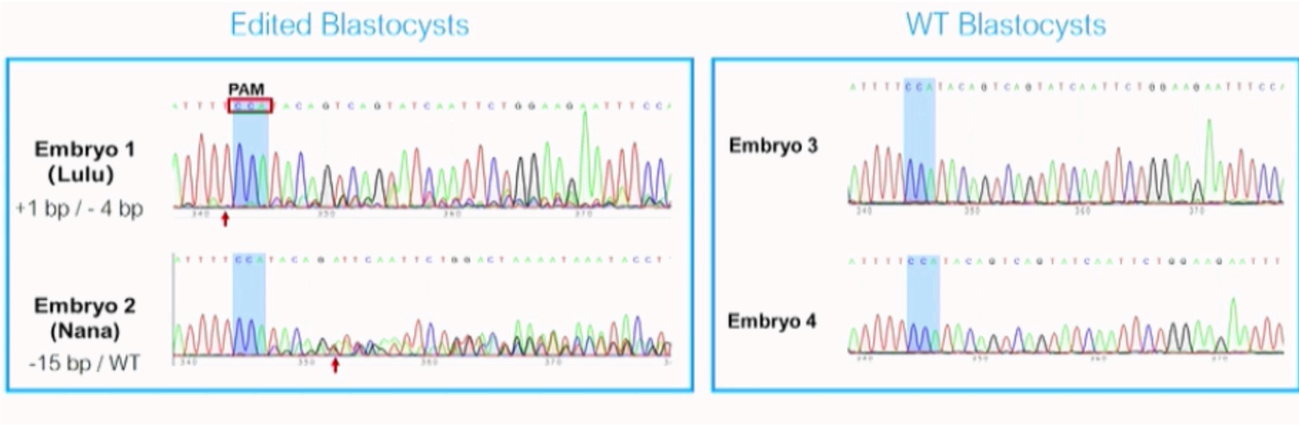
- He Jiankui ogłasza narodziny dzieci (dwóch dziewczynek), których genomy poddano edycji
- Cel: inaktywacja genu *CCR5* mająca chronić przed infekcją HIV
  - ojciec dziewczynek jest nosicielem
- Ogłoszenie poprzez wywiad prasowy i film na Youtube (!)
- Później prezentacja na konferencji
- Brak recenzowanej publikacji - trudno ocenić merytoryczną i techniczną jakość eksperymentu

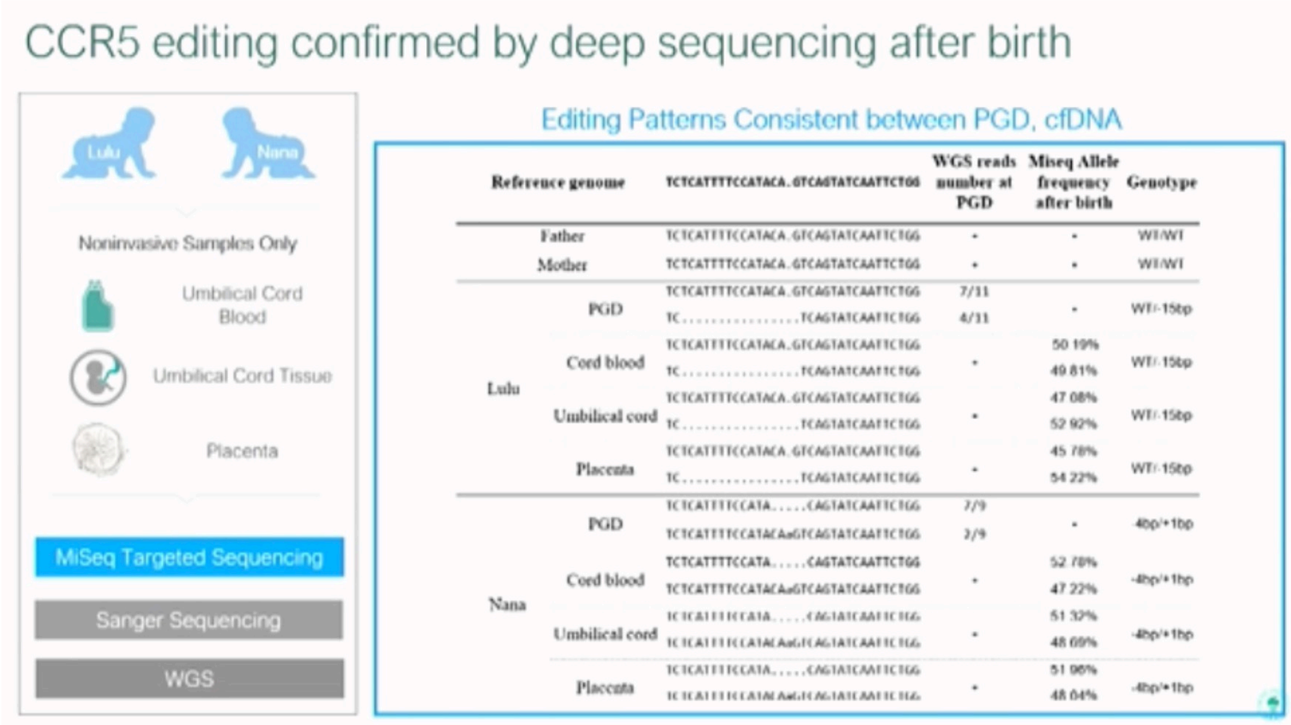


He Jiankui is reflected in a glass panel as he works at a computer at a laboratory in Shenzhen in southern China's Guangdong province. Mark Schiefelbein/AP Photo

Aspekt merytoryczny

- U jednej z dziewczynek (Nana) inaktywowane obie kopie genu, u drugiej (Lulu) tylko jedna (to nie daje pożądanego efektu)
- U obu dziewczynek nie wszystkie komórki są zmodyfikowane mozaikowość
- U obu dziewczynek inaktywacja nie jest kompletna
  - Nana: jedna kopia Δ15, druga nienaruszona
  - Lulu: obie kopie Δ4/+1

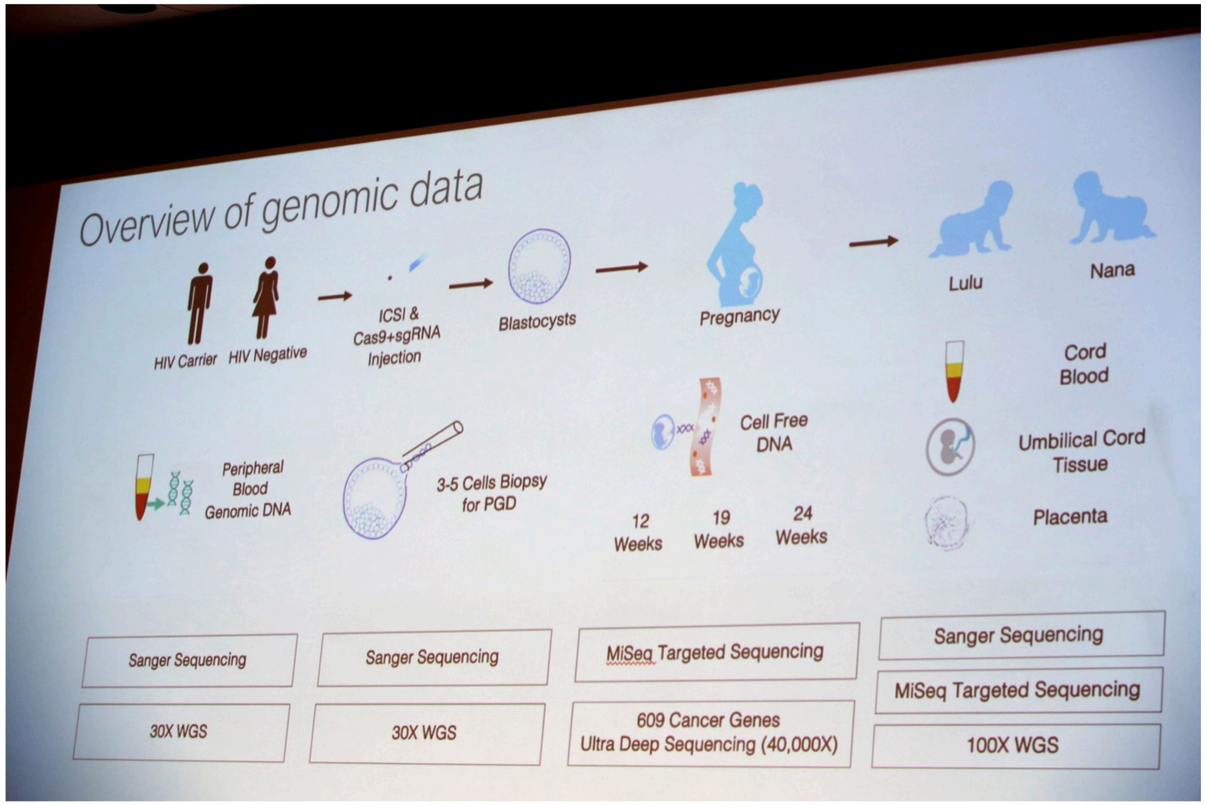




Reference genome		TCTCATTTTCCATACA..GTCAGTATCAATTCTGG	WGS reads number at PGD	Miseq Allele frequency after birth	Genotype
Father		TCTCATTTTCCATACA..GTCAGTATCAATTCTGG	-	-	WT/WT
Mother		TCTCATTTTCCATACA..GTCAGTATCAATTCTGG	-	-	WT/WT
Lulu	PGD	TCTCATTTTCCATACA..GTCAGTATCAATTCTGG	7/11	-	WT/-15bp
		TC.....TCAGTATCAATTCTGG	4/11		
	Cord blood	TCTCATTTTCCATACA..GTCAGTATCAATTCTGG	-	50.19%	WT/-15bp
		TC.....TCAGTATCAATTCTGG		49.81%	
	Umbilical cord	TCTCATTTTCCATACA..GTCAGTATCAATTCTGG	-	47.08%	WT/-15bp
		TC.....TCAGTATCAATTCTGG		52.92%	
	Placenta	TCTCATTTTCCATACA..GTCAGTATCAATTCTGG	-	45.78%	WT/-15bp
		TC.....TCAGTATCAATTCTGG		54.22%	
Nana	PGD	TCTCATTTTCCATA.....CAGTATCAATTCTGG	7/9	-	-4bp/+1bp
		TCTCATTTTCCATACAaGTCAGTATCAATTCTGG	2/9		
	Cord blood	TCTCATTTTCCATA.....CAGTATCAATTCTGG	-	52.78%	-4bp/+1bp
		TCTCATTTTCCATACAaGTCAGTATCAATTCTGG		47.22%	
	Umbilical cord	TCTCATTTTCCATA.....CAGTATCAATTCTGG	-	51.32%	-4bp/+1bp
		TCTCATTTTCCATACAaGTCAGTATCAATTCTGG		48.68%	
	Placenta	TCTCATTTTCCATA.....CAGTATCAATTCTGG	-	51.96%	-4bp/+1bp
		TCTCATTTTCCATACAaGTCAGTATCAATTCTGG		48.04%	

Aspekt merytoryczny

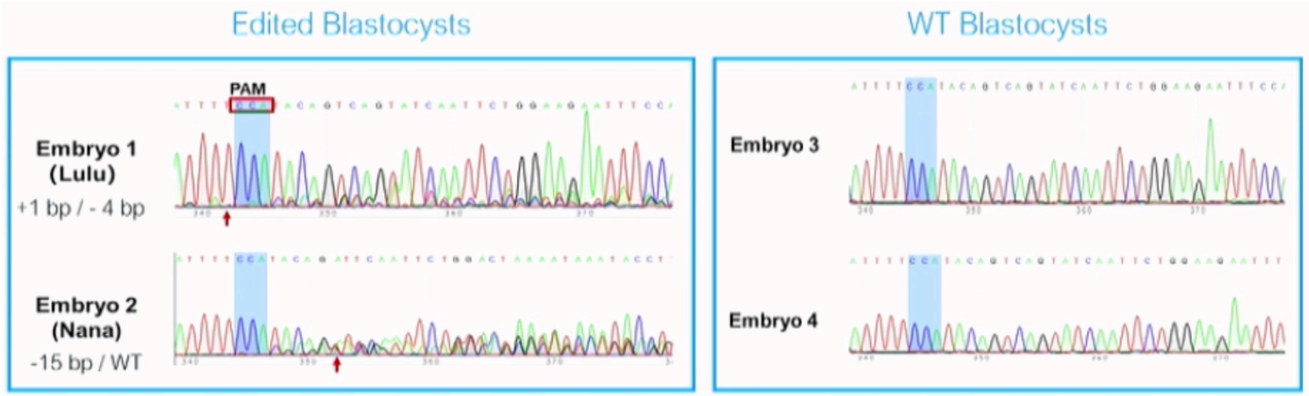
- Nie wiadomo, czy choć jedna z bliźniaczek rzeczywiście nabyła oporność na HIV
- He twierdzi, że sprawdził czy nie ma niepożądanych mutacji ubocznych (*off-target*), ale danych brak
  - badania nad tym, jak często takie mutacje występują i jak im zapobiegać trwają

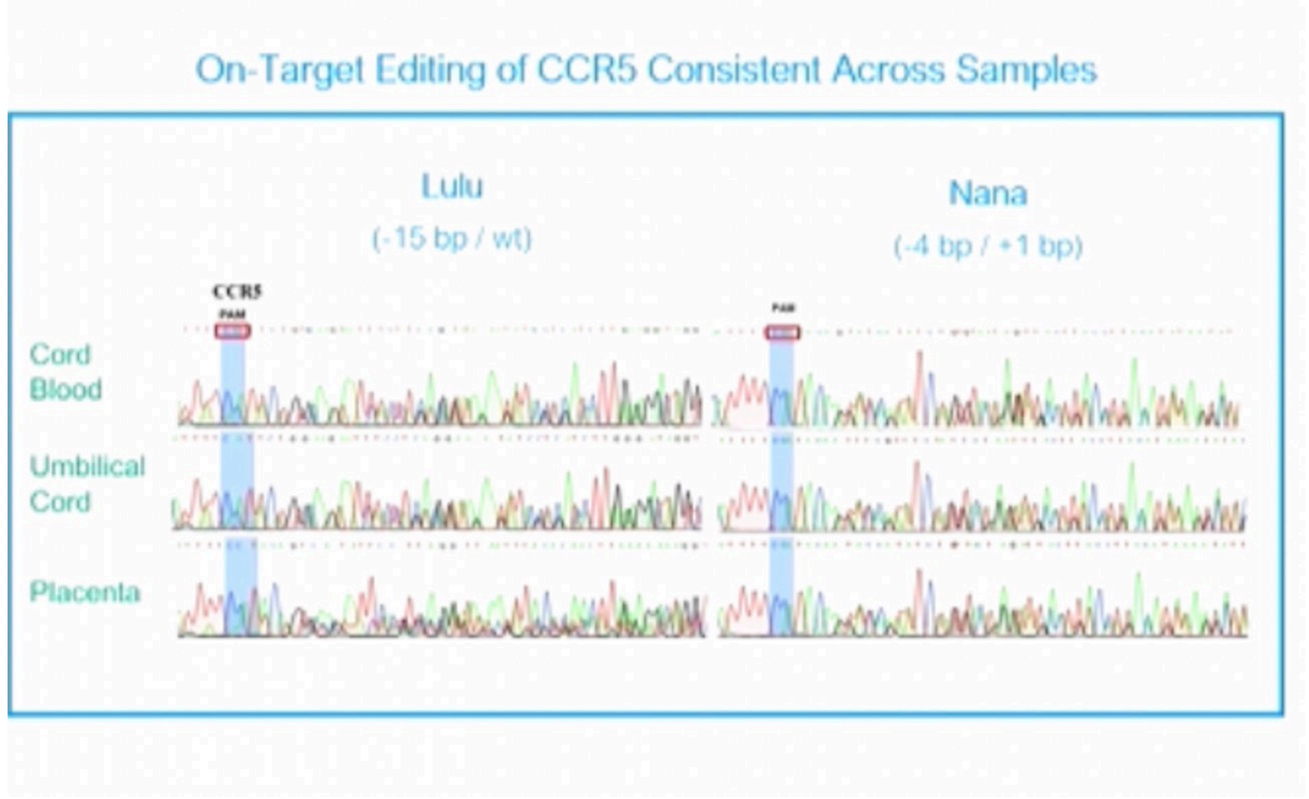


A slide presentation of genomic data from He's presentation in Hong Kong.
KIN CHEUNG/AP

Czy eksperyment się udał?

- Na podstawie dostępnych danych trudno stwierdzić, ale raczej nie
- Obie dziewczynki mają zmodyfikowane komórki, ale nie wszystkie (mozaikowość)
- Modyfikacja nie jest dokładnie delecją Δ32, tylko krótszą
- Lulu ma modyfikację tylko jednej z dwóch kopii genu - raczej nie będzie oporna na HIV
- Nana - zmodyfikowane obie kopie ale nie Δ32 tylko Δ4/+1 - nie wiadomo, czy zadziała





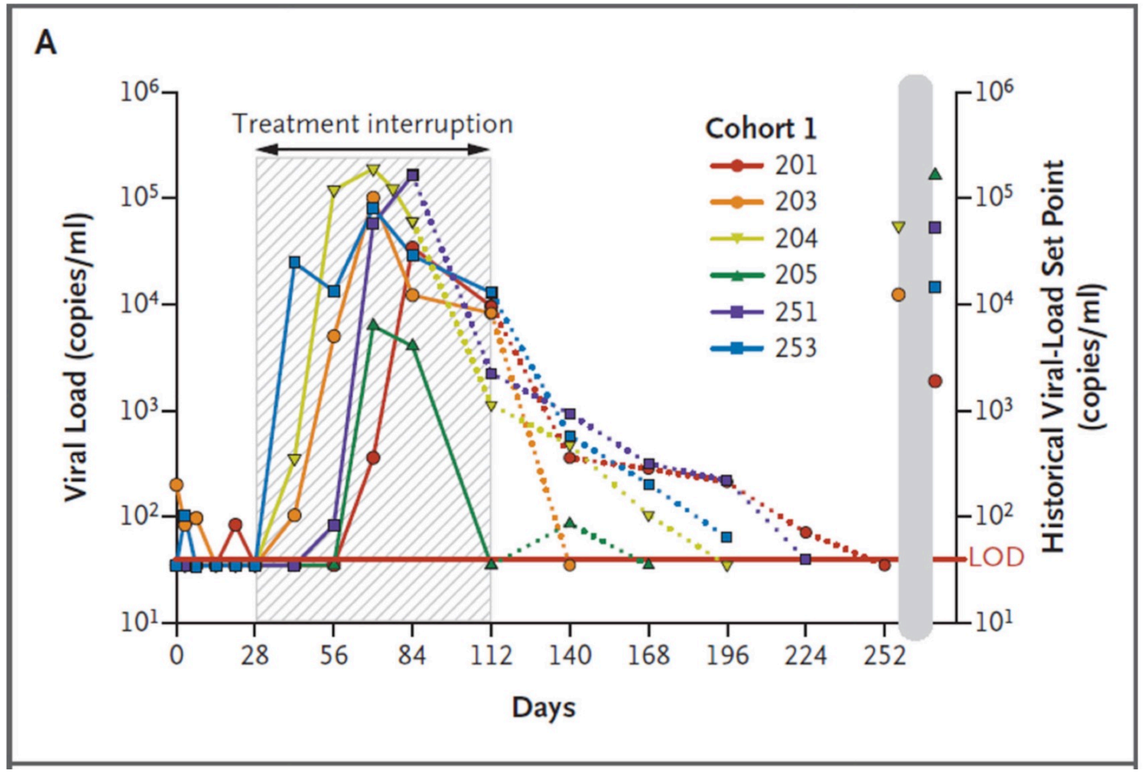
Redagowanie genomu w komórkach somatycznych

- Zasada *ex vivo*:
  - izolacja komórek chorego
  - modyfikacja genu
  - hodowla komórek/tkanek *in vitro*
  - przeszczep zmodyfikowanych komórek
- Obiecujące dla tych chorób, które dotykają tkanek, w których komórki się cały czas dzielą (np. szpik i krew), albo dają dobrze hodować (skóra)
  - np. szpik i mutacja CCR5Δ32

Published in final edited form as:
N Engl J Med. 2014 March 6; 370(10): 901–910. doi:10.1056/NEJMoa1300662.

Gene Editing of *CCR5* in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV

Pablo Tebas, M.D., **David Stein, M.D.**, **Winson W. Tang, M.D.**, **Ian Frank, M.D.**, **Shelley Q. Wang, M.D.**, **Gary Lee, Ph.D.**, **S. Kaye Spratt, Ph.D.**, **Richard T. Surosky, Ph.D.**, **Martin A. Giedlin, Ph.D.**, **Geoff Nichol, M.D.**, **Michael C. Holmes, Ph.D.**, **Philip D. Gregory, Ph.D.**, **Dale G. Ando, M.D.**, **Michael Kalos, Ph.D.**, **Ronald G. Collman, M.D.**, **Gwendolyn Binder-Scholl, Ph.D.**, **Gabriela Plesa, M.D., Ph.D.**, **Wei-Ting Hwang, Ph.D.**, **Bruce L. Levine, Ph.D.**, and **Carl**



Naprawiona skóra

- Pęcherzowe oddzielanie się naskórka (*epidermolysis bullosa*)
- Choroba genetyczna związana z mutacjami pojedynczych genów
- Wiele form śmiertelnych
- Pacjent (7 lat)
  - utrata >60% naskórka (>80% w momencie pierwszego zabiegu)
  - mutacja genu *LAMB3* (laminina)
- Do komórek pobranych od pacjenta wprowadzono prawidłowy gen (metoda inna, niż CRISPR) i wyhodowano skórę, którą przeszczepiono

Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells

Tobias Hirsch[1]*, Tobias Rothoeft[2]*, Norbert Teig[2]*, Johann W. Bauer[3]*, Graziella Pellegrini[4,5]*, Laura De Rosa[5]*, Davide Scaglione[6], Julia Reichelt[3], Alfred Klausegger[3], Daniela Kneisz[3], Oriana Romano[7], Alessia Secone Seconetti[5], Roberta Contin[5], Elena Enzo[5], Irena Jurman[8], Sonia Carulli[9], Frank Jacobsen[1], Thomas Luecke[10], Marcus Lehnhardt[1], Meike Fischer[2], Maximilian Kueckelhaus[1], Daniela Quaglino[7], Michele Morgante[8], Silvio Bicciato[7], Sergio Bondanza[9] & Michele De Luca[5]

16 NOVEMBER 2017 | VOL 551 | NATURE | 327

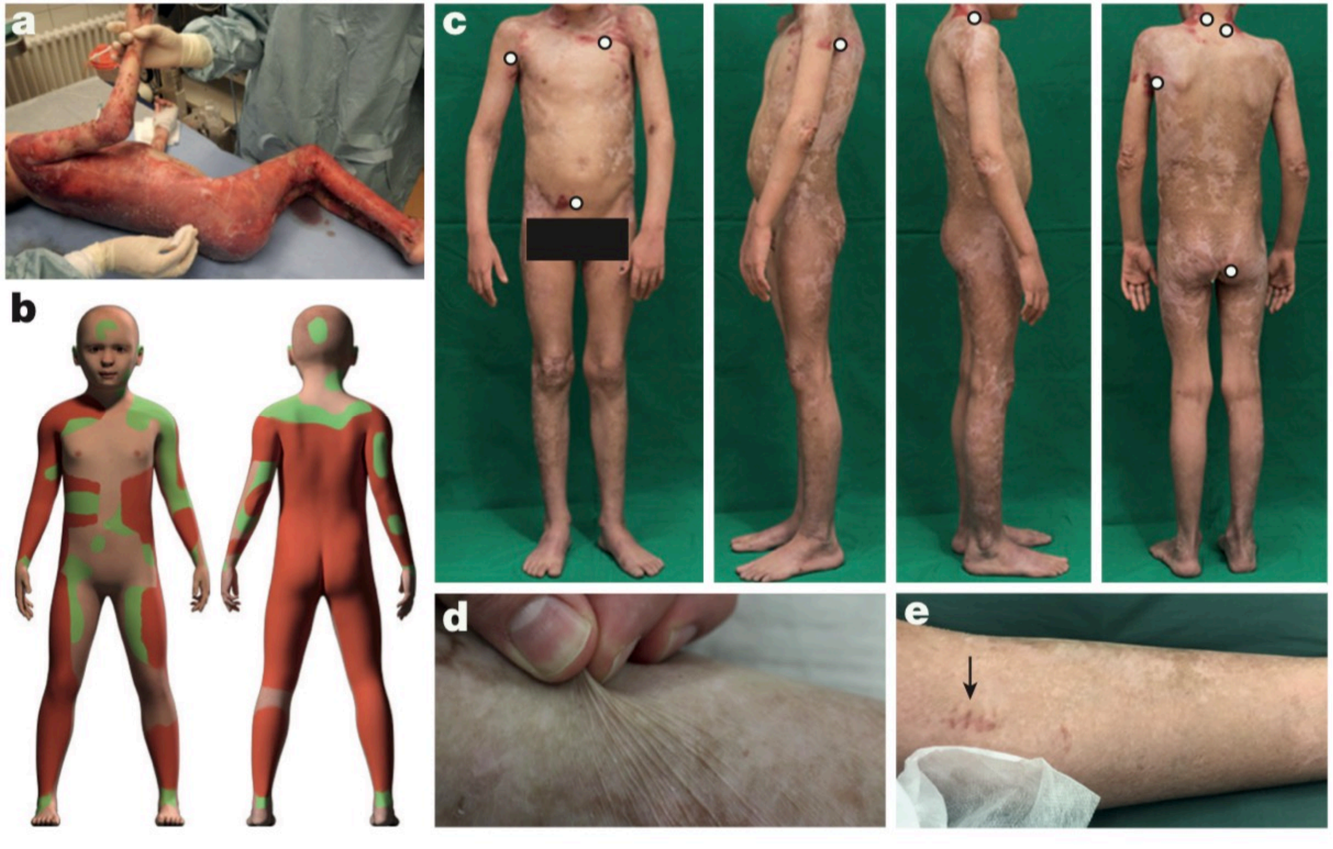


Figure 1 | Regeneration of the transgenic epidermis. a, Clinical picture

U zwierząt

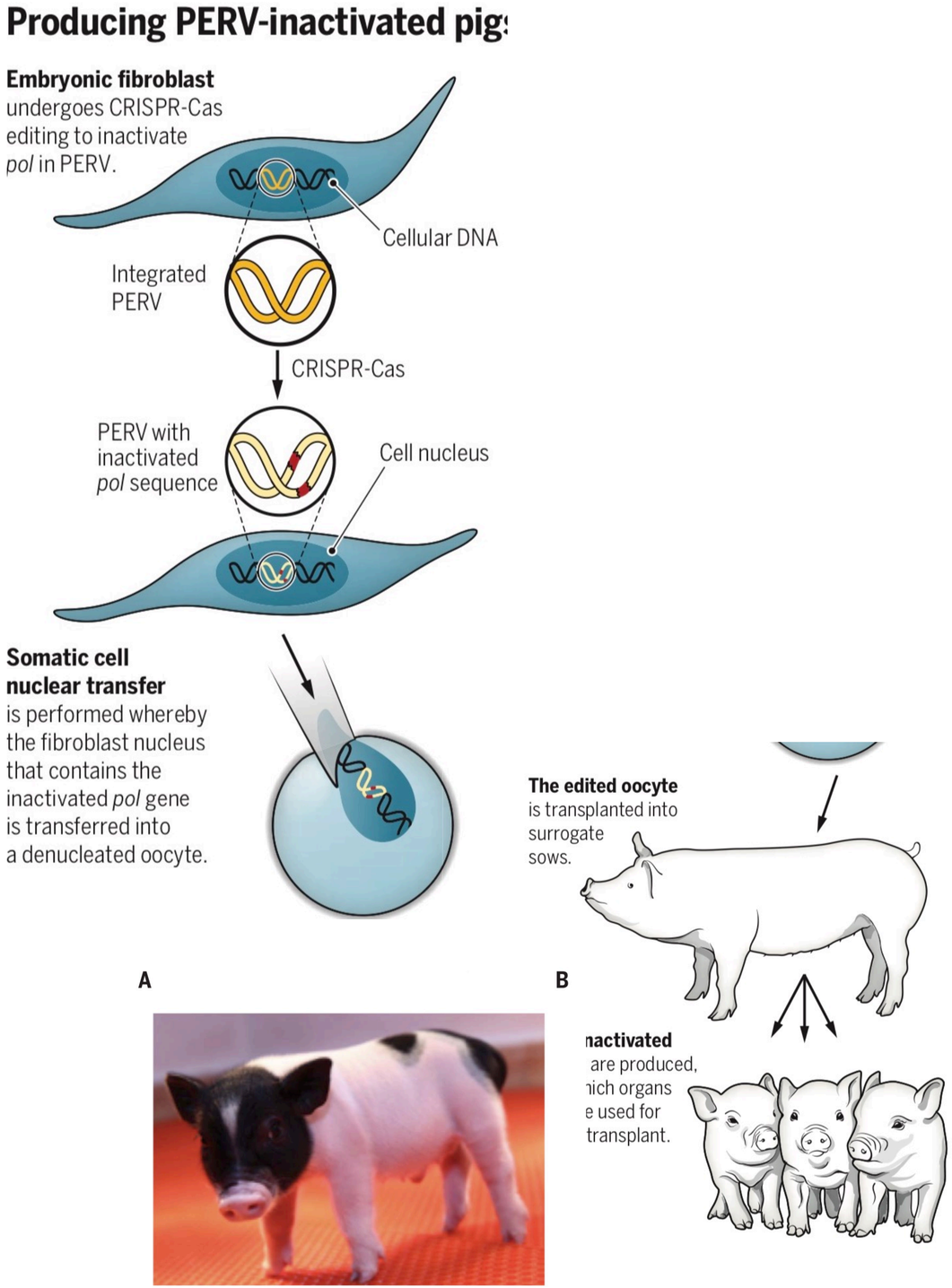
- Próby wykorzystania narządów świni do przeszczepów u ludzi napotykają na przeszkody:
  - obecność w DNA świni nieaktywnych wirusów (PERV), które mogą aktywować się u ludzi
  - immunogenność
- W 2017 r. uzyskano za pomocą CRISPR/Cas transgeniczne świnie pozbawione wszystkich utajonych wirusów w DNA

GENOME ENGINEERING

Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9

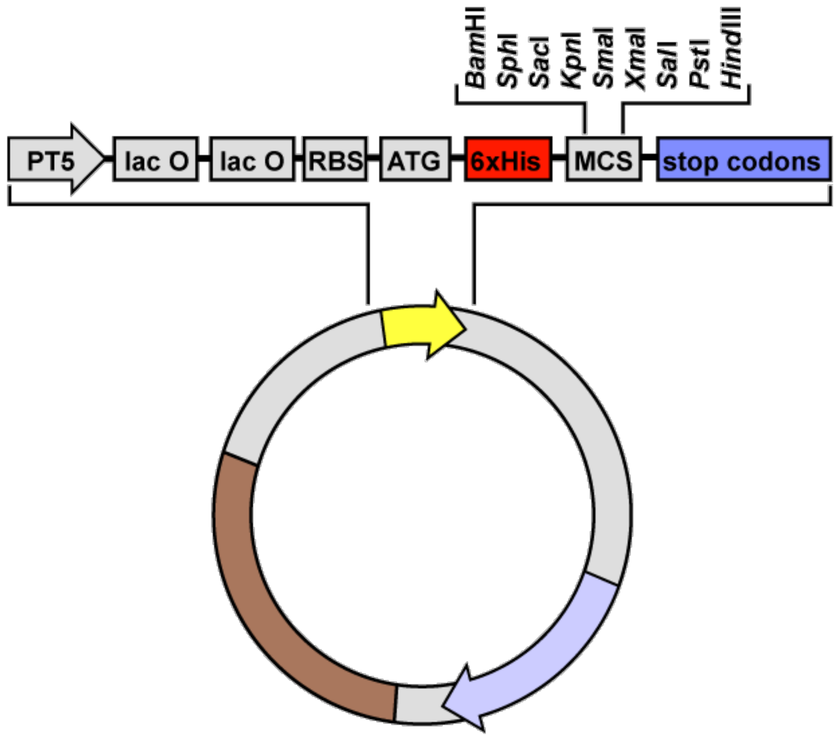
Dong Niu,[1,2]* Hong-Jiang Wei,[3,4]* Lin Lin,[5]* Haydy George,[1]* Tao Wang,[1]* I-Hsiu Lee,[1]* Hong-Ye Zhao,[3] Yong Wang,[6] Yinan Kan,[1] Ellen Shrock,[7] Emal Lesha,[1] Gang Wang,[1] Yonglun Luo,[5] Yubo Qing,[3,4] Deling Jiao,[3,4] Heng Zhao,[3,4] Xiaoyang Zhou,[6] Shouqi Wang,[8] Hong Wei,[6] Marc Güell,[1]† George M. Church,[1,7,9]† Luhan Yang[1]†‡

Niu *et al.*, *Science* **357**, 1303–1307 (2017)

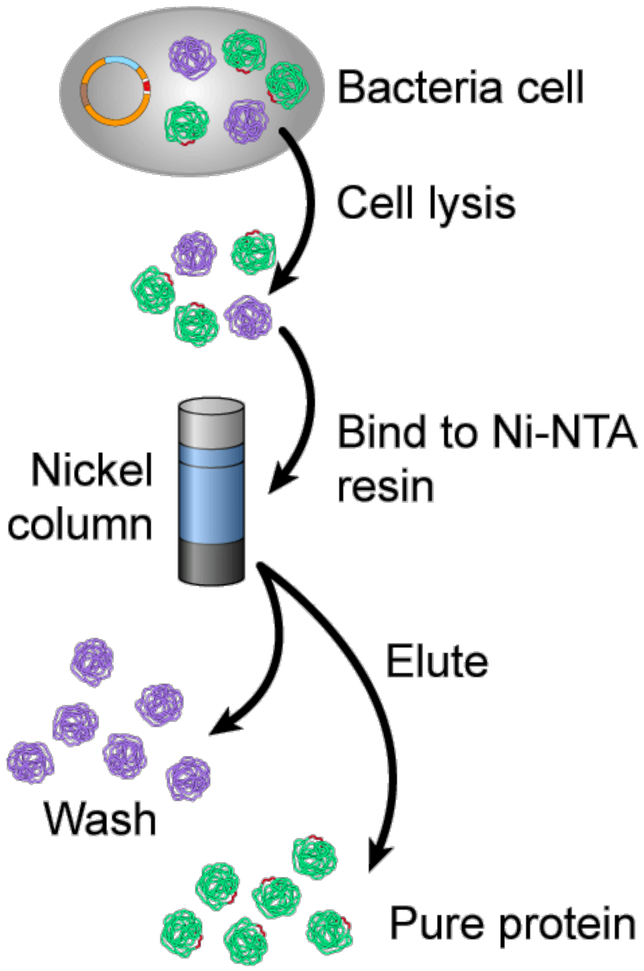


Badanie i inżynieria białek

Ekspresja heterologiczna



Wektor ekspresyjny

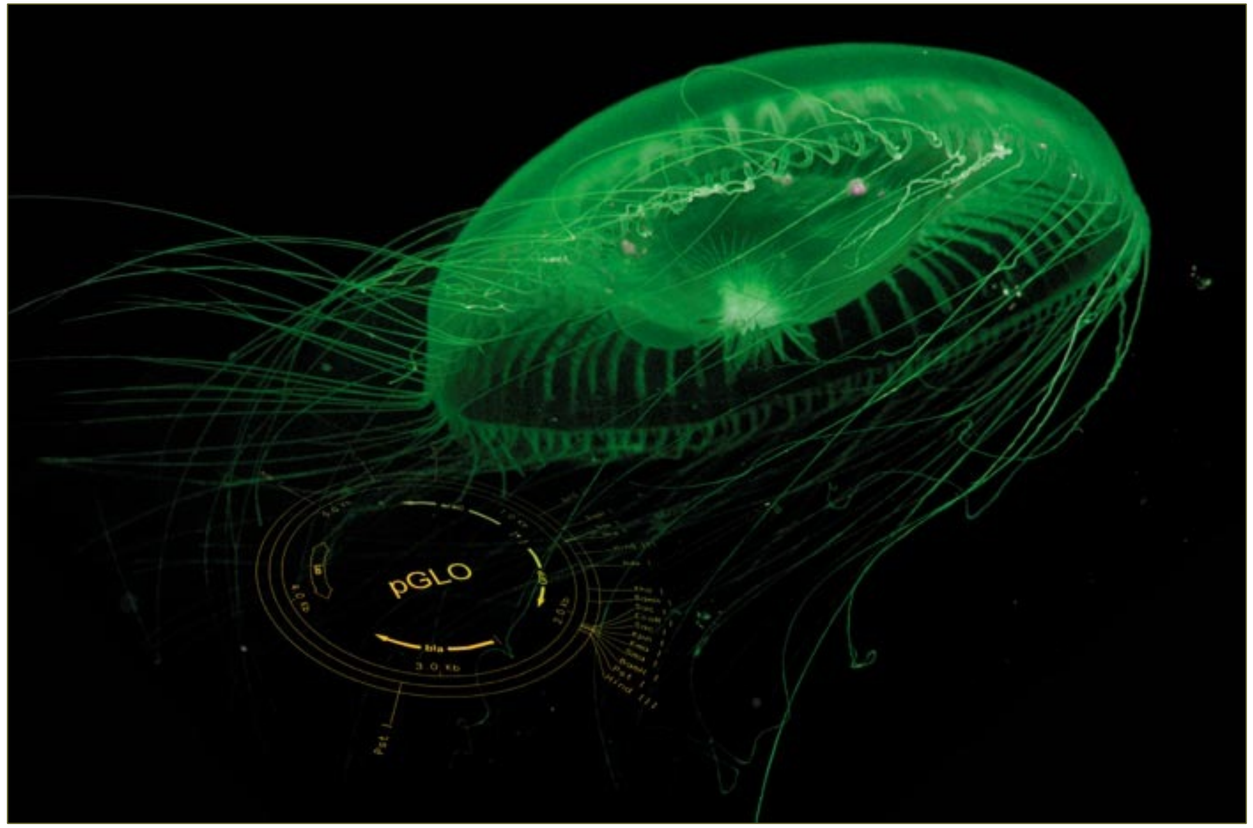


Oczyszczanie białka

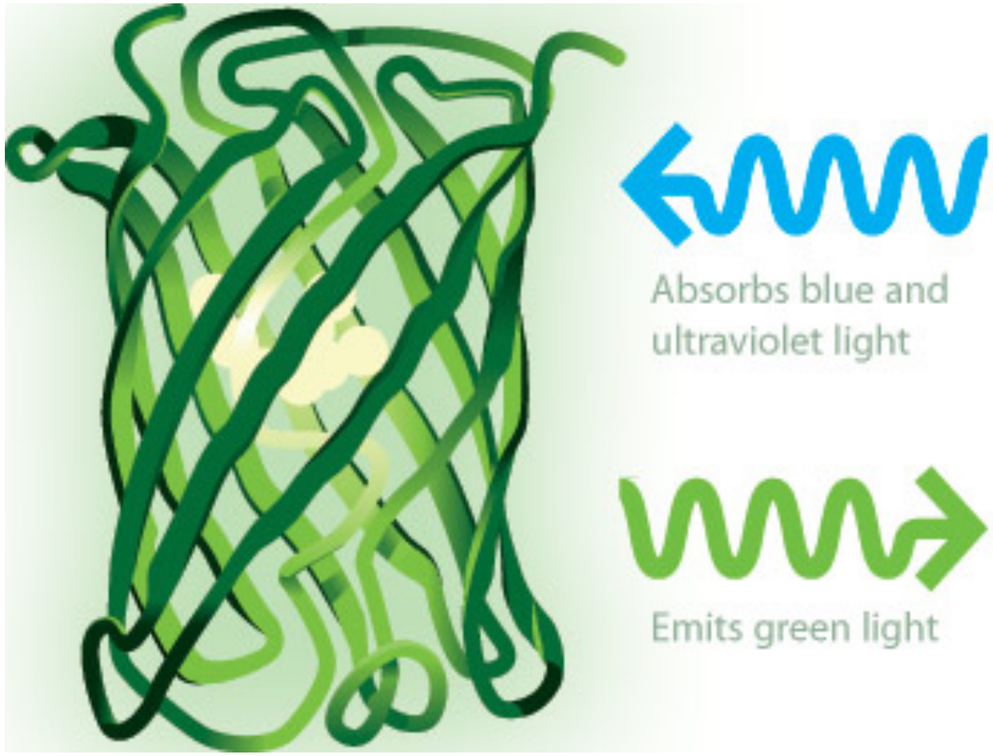
Fuzje białkowe

- Do sekwencji kodującej białko dołącza się inną domenę, np. ułatwiającą wykrycie i/lub oczyszczanie
  - znaczniki epitopowe
  - GFP (zielone białko fluorescencyjne)

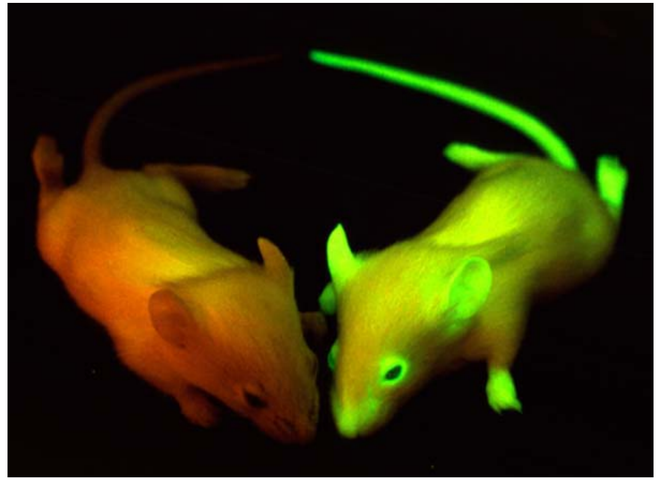
Green Fluorescent Protein-

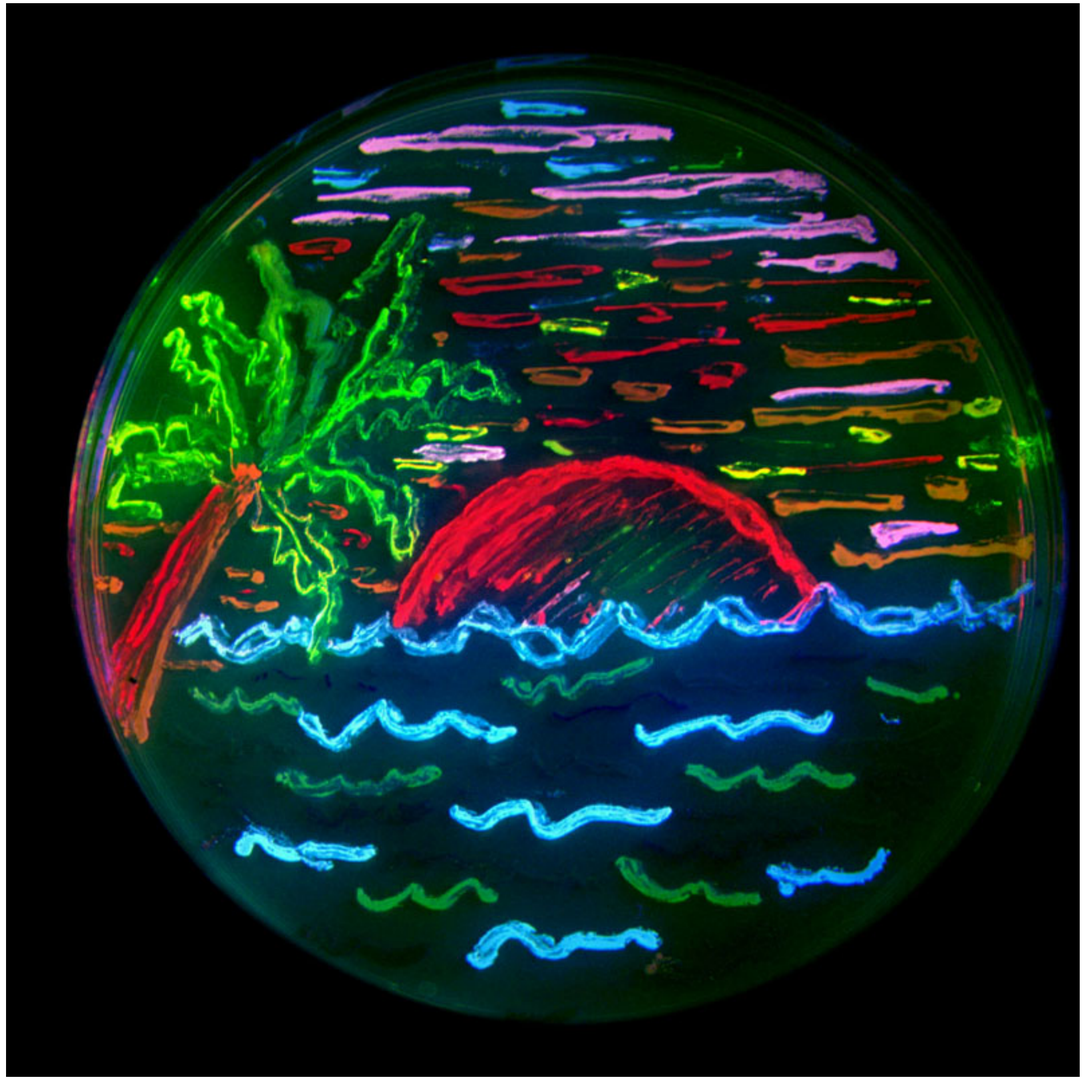


Aequorea victoria

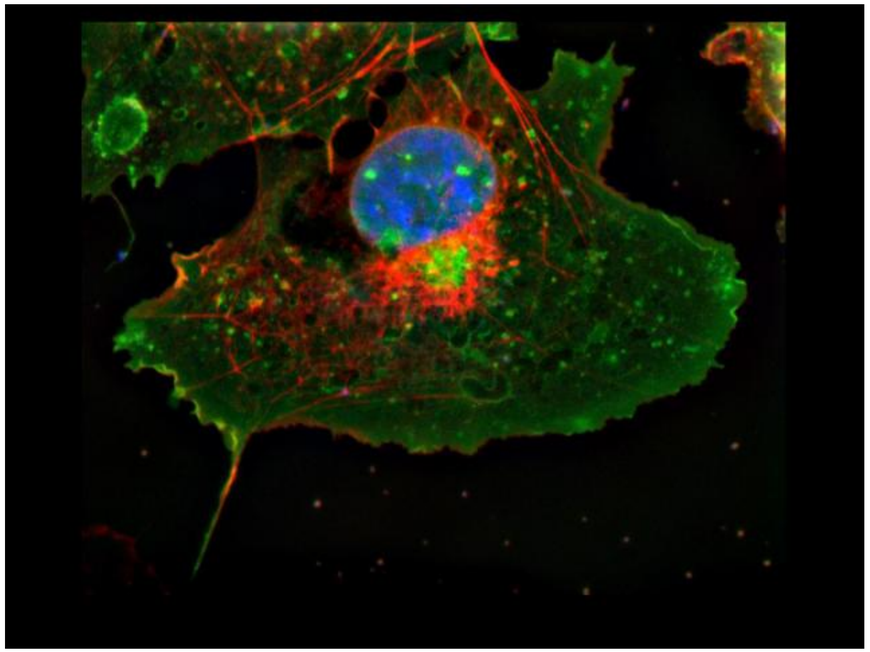


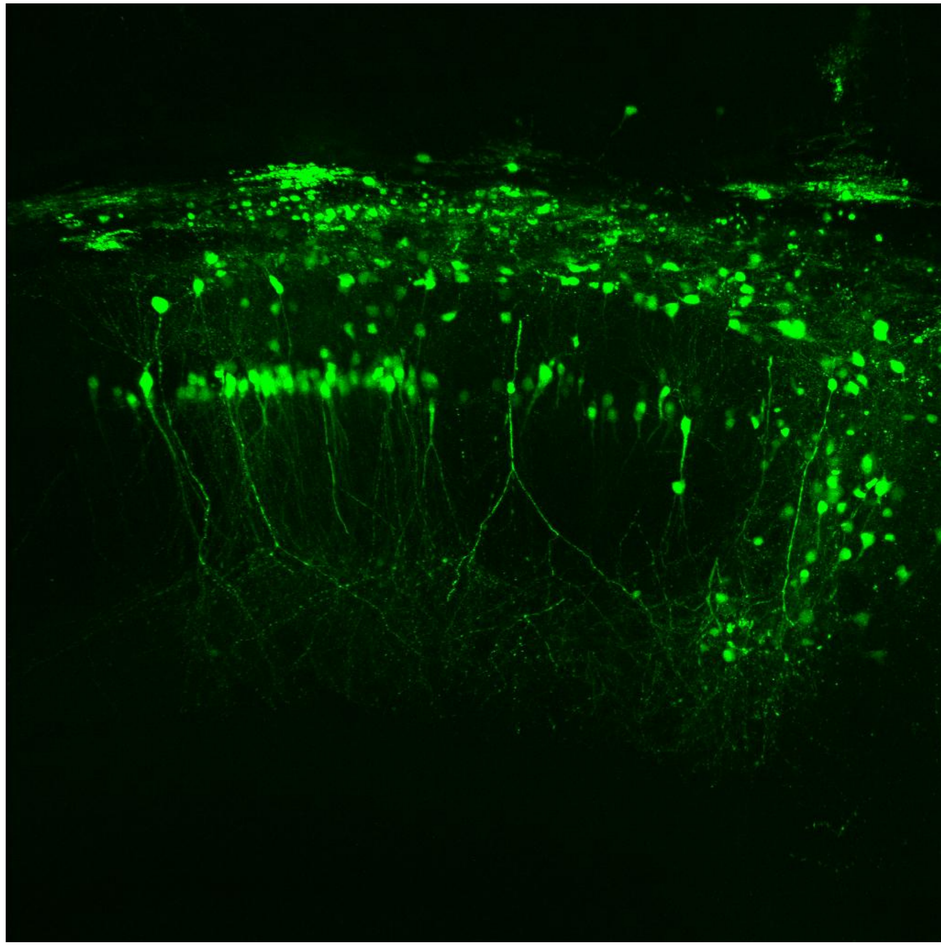
GFP



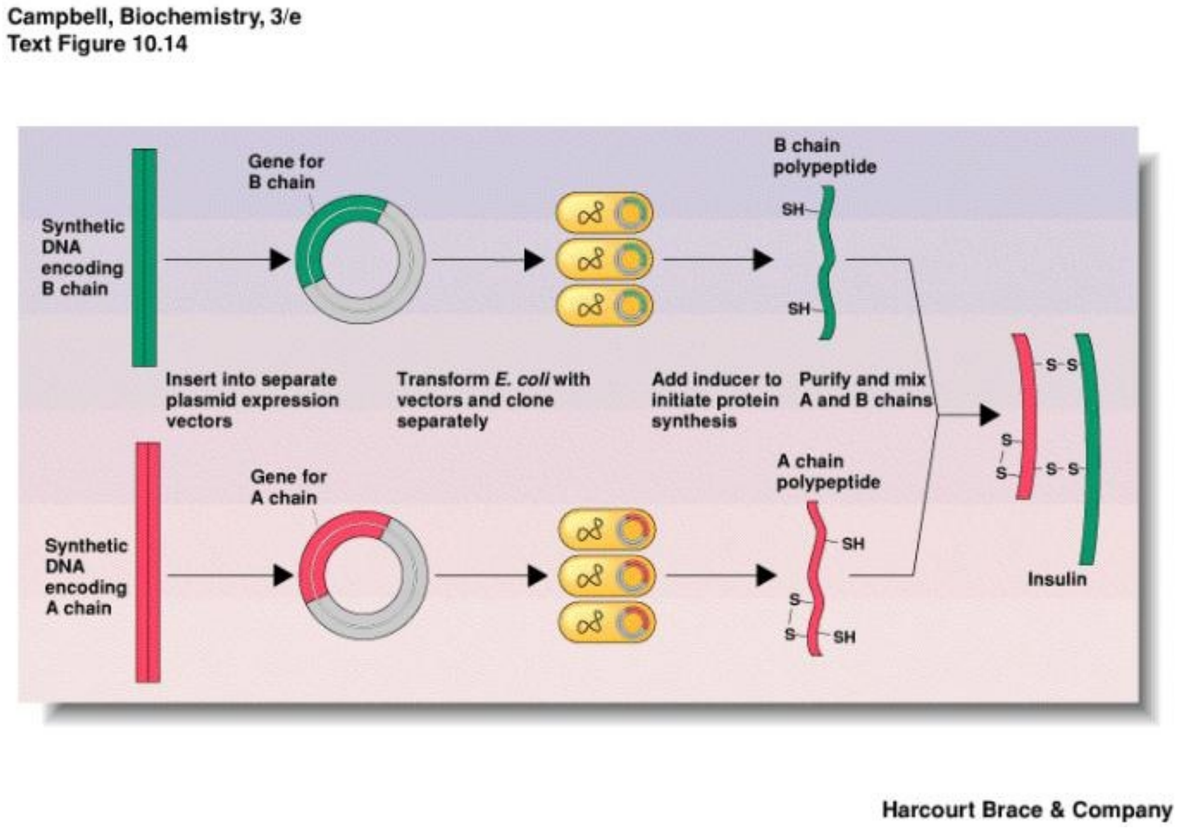


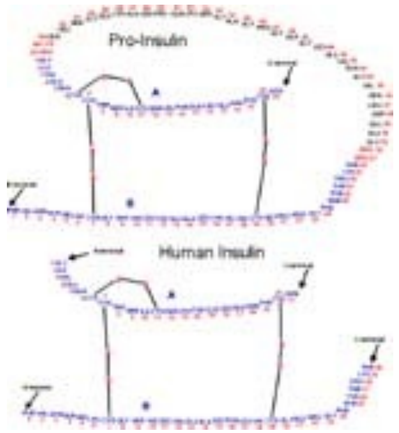
GFP

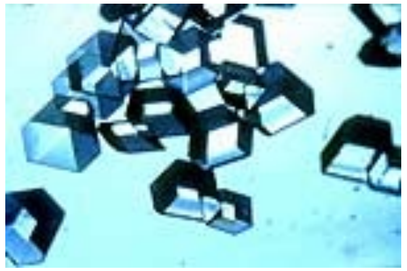




Ekspresja heterologiczna w biotechnologii

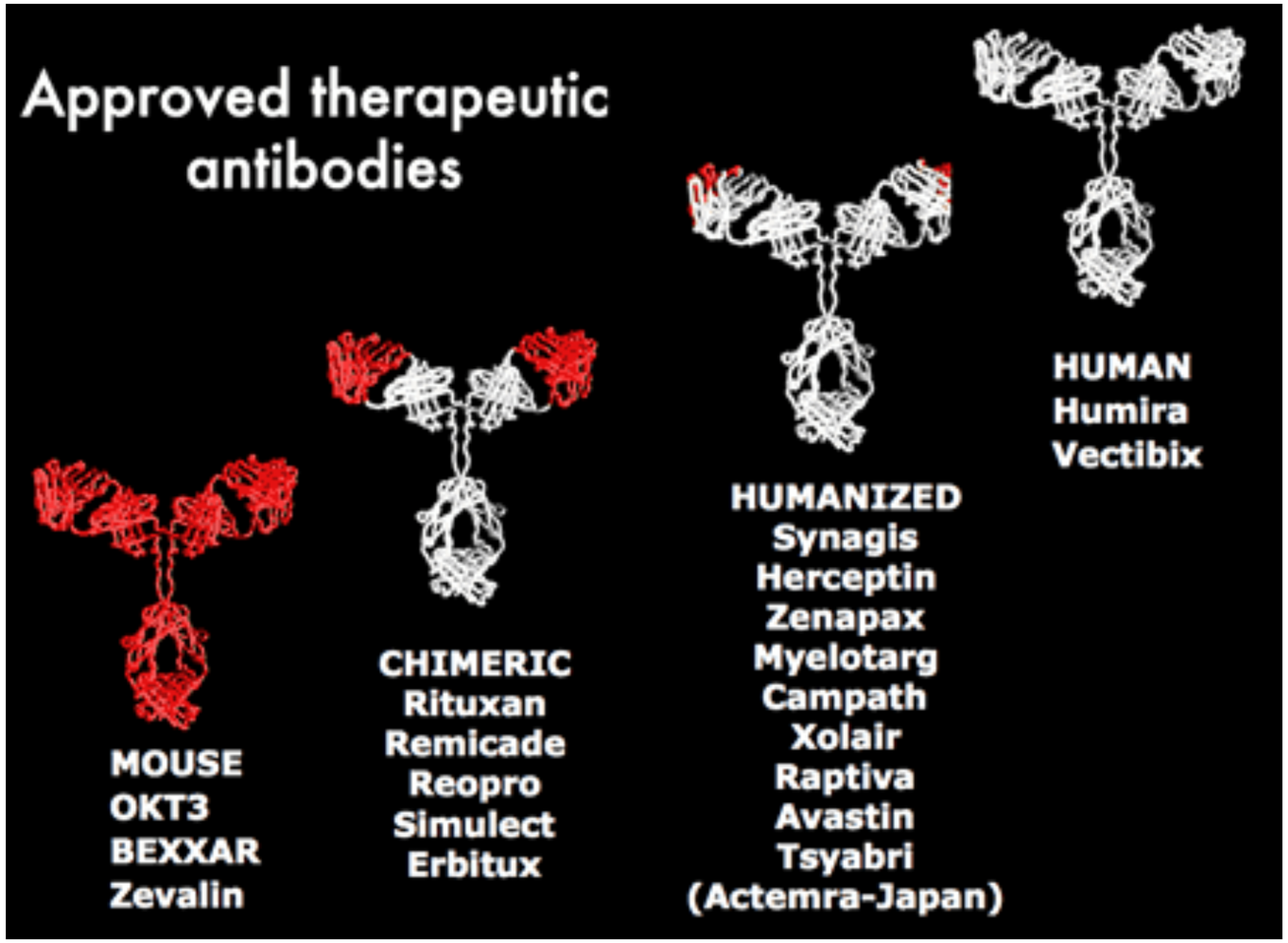






Ludzka insulina wytwarzana w bakteriach

Inżynieria przeciwciał



http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/

Humanizowane i rekombinowane przeciwciała są stosowane w terapii np. nowotworów

Inżynieria przeciwciał – leki przyszłości

- W łańcuchach immunoglobulin obszary zmienne odpowiadają za rozpoznawanie różnych antygenów, obszary stałe nadają specyficzność gatunkową
- W klasycznych metodach wytwarzania przeciwciał monoklonalnych uzyskiwano przeciwciała zwierzęce
- Klonowanie i ekspresja genów kodujących przeciwciała jest alternatywnym sposobem ich uzyskiwania
- Możliwe jest uzyskiwanie przeciwciał humanizowanych – obszary zmienne z genu przeciwciała zwierzęcego wstawione między obszary stałe przeciwciała ludzkiego
- Humanizowane i rekombinowane ludzkie przeciwciała są stosowane w terapii np. nowotworów

Biologia systemów i biologia syntetyczna

Biologia systemów

- Postęp biologii molekularnej - genomika
- Ogromne zbiory danych
- Ujawnienie złożoności interakcji genetycznych leżących u podstaw fenotypu
- Narzędzia teoretyczne do systemowego opisu życia

Biologia systemów - wyzwanie

A w biotechnologii?

- Współczesna biotechnologia molekularna bardzo sprawnie manipuluje pojedynczymi genami
  - ekspresja heterologiczna
  - transgeneza roślin

- A co z bardziej złożonymi, wieloczynnikowymi cechami?

Inżynieria ewolucyjna

Inżynieria ewolucyjna

Brassica oleracea var. *silvestris* (brzoskiew)

Brassica oleracea odmiany uprawne

Biologia syntetyczna

- Współczesna inżynieria genetyczna ograniczona jest do prostych systemów, gdzie za pożądaną funkcję odpowiada jeden lub kilka genów

- Biologia syntetyczna - projektowanie nowych systemowych właściwości organizmów żywych