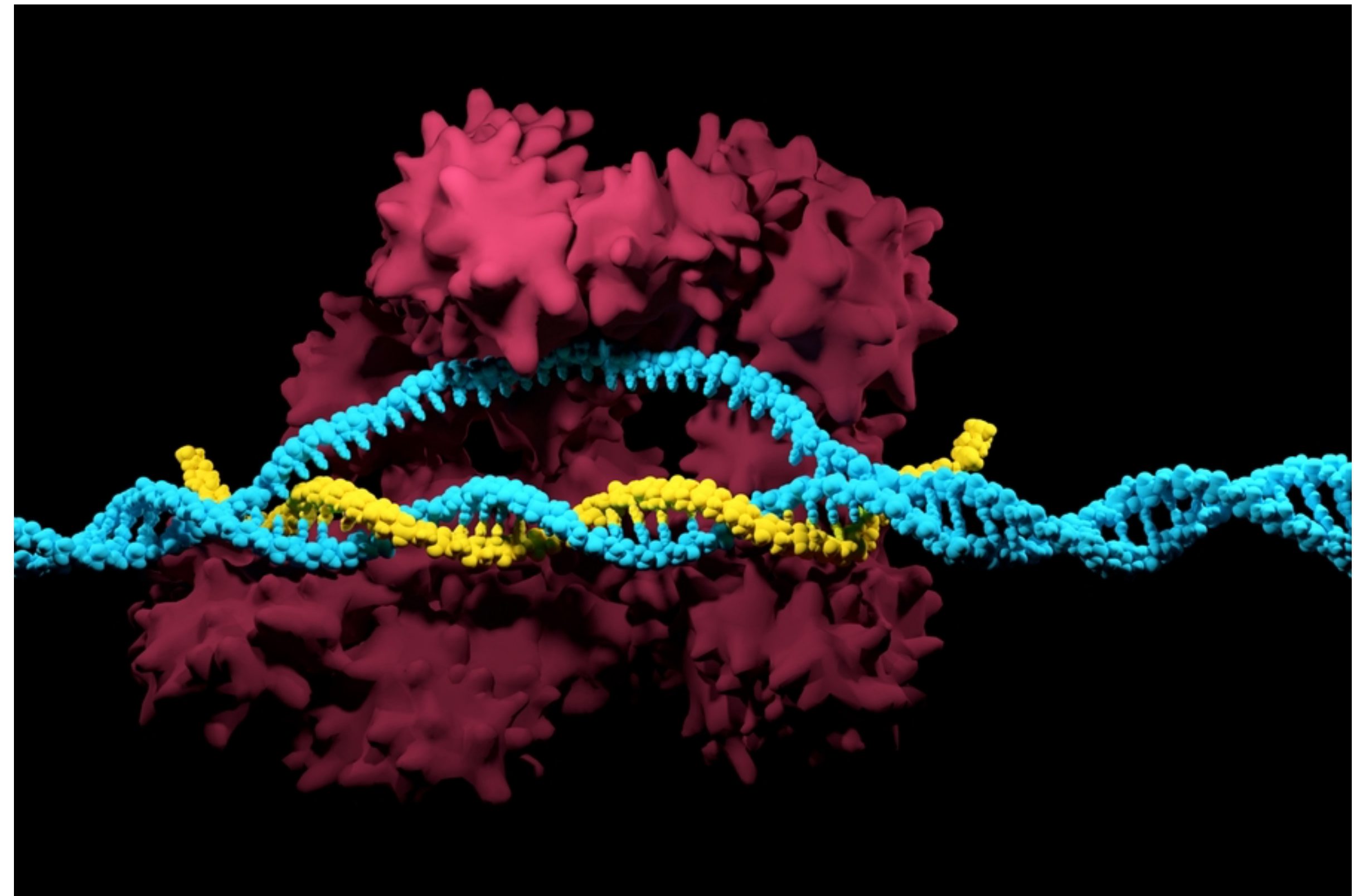


Metody genetyki i genomiki

Redagowanie genomów i biologia syntetyczna

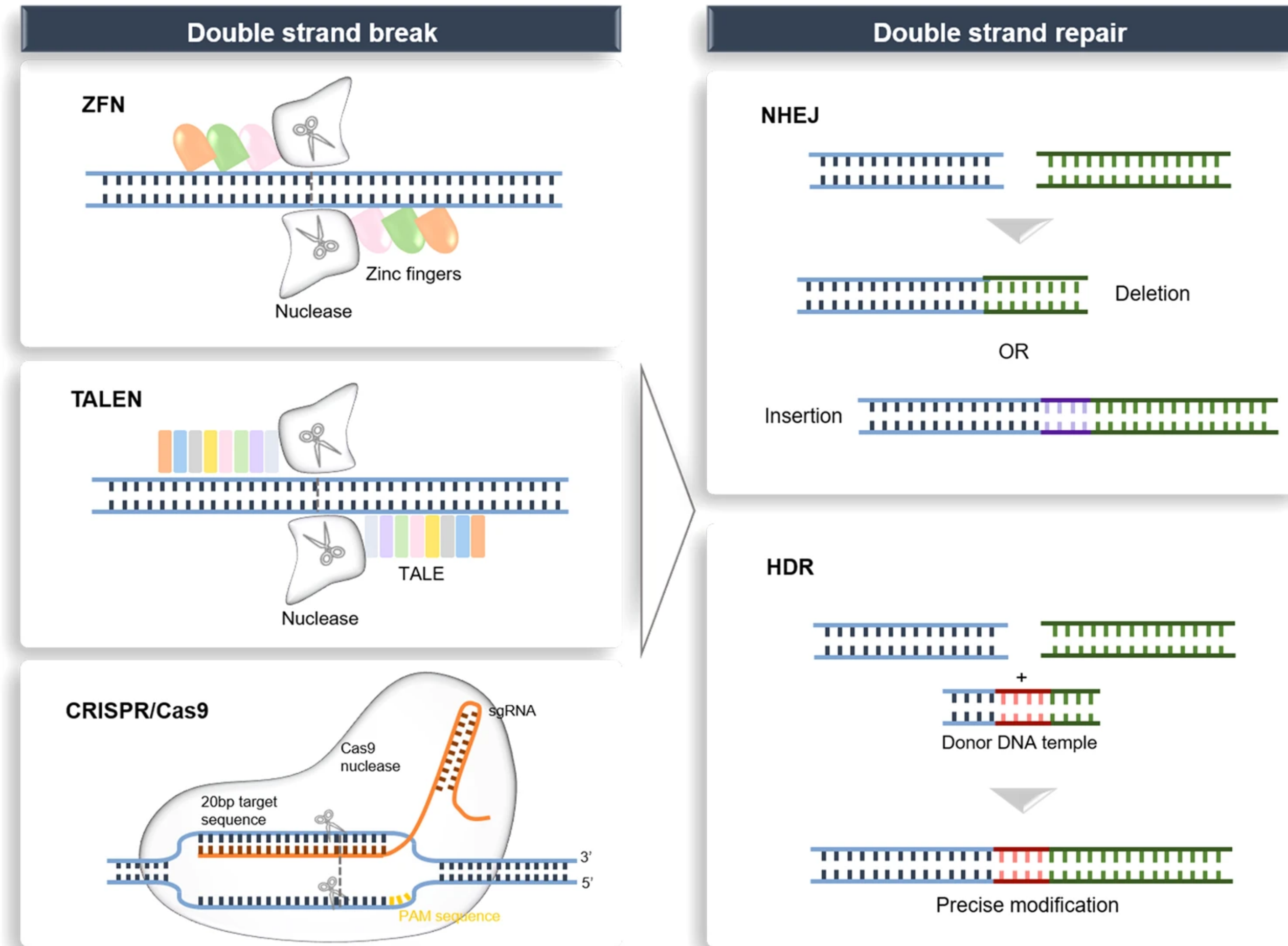
Redagowanie genomu

- Wprowadzenie zmiany w określonym miejscu genomu
- *In situ* - bez izolacji DNA i ponownego wprowadzenia zmienionej sekwencji!
- Do komórki wprowadzany jest system modyfikujący DNA



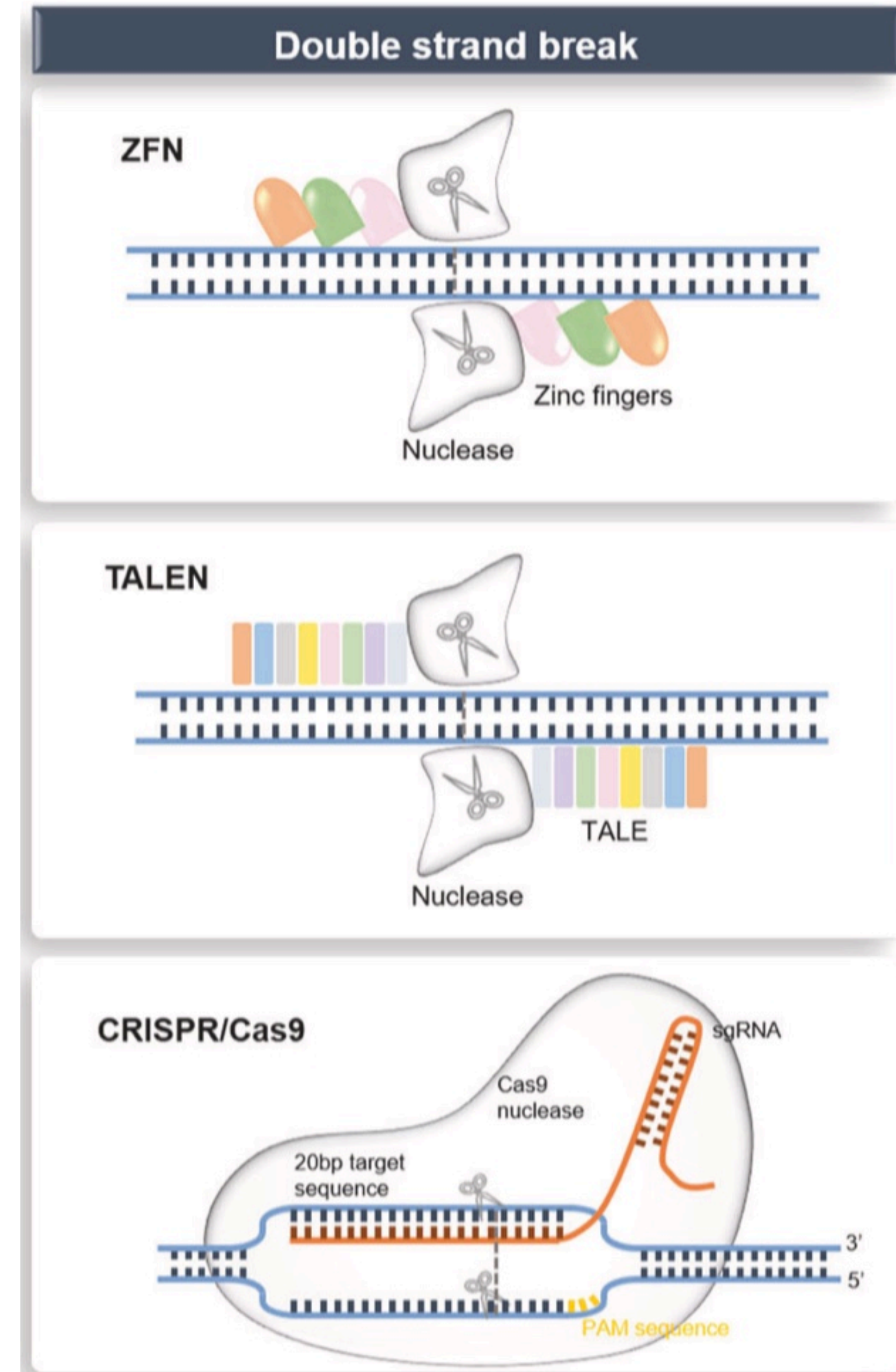
Zasady i narzędzia

- W redagowaniu genomu, podobnie jak w klasycznej inżynierii genetycznej wykorzystuje się zmodyfikowane systemy i procesy naturalne
- Dwa główne etapy
 - przecięcie lub nacięcie DNA w określonym miejscu w genomie
 - naprawa powstałego uszkodzenia przez komórkowe systemy naprawcze



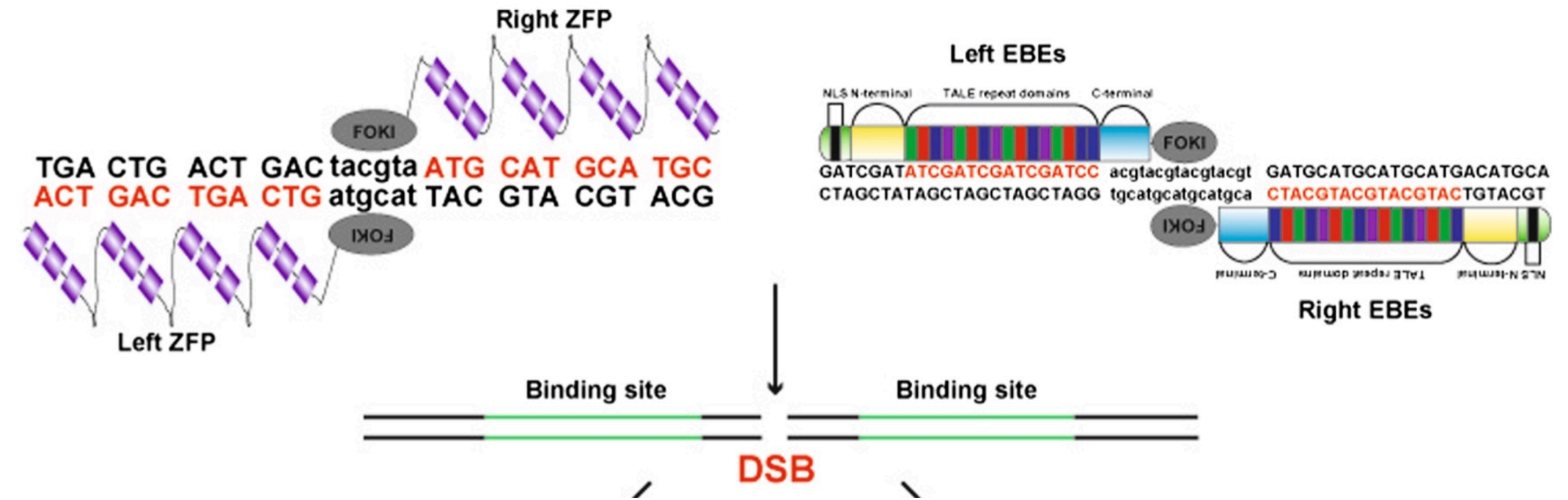
Cięcie DNA

- W redagowaniu genomu wykorzystuje się trzy główne grupy nukleaz
- ZFN - zinc-finger nucleases: rozpoznawanie DNA przez domenę palca cynkowego i cięcie przez restryktazę Fok1
- TALEN - Transcription activator-like effector nucleases: rozpoznawanie DNA przez domenę TAL (z białek wydzielanych przez bakterie *Xanthomonas* podczas infekcji roślin) i cięcie przez Fok1
- Cas9 - element systemu CRISPR/Cas9



ZFN i TALEN

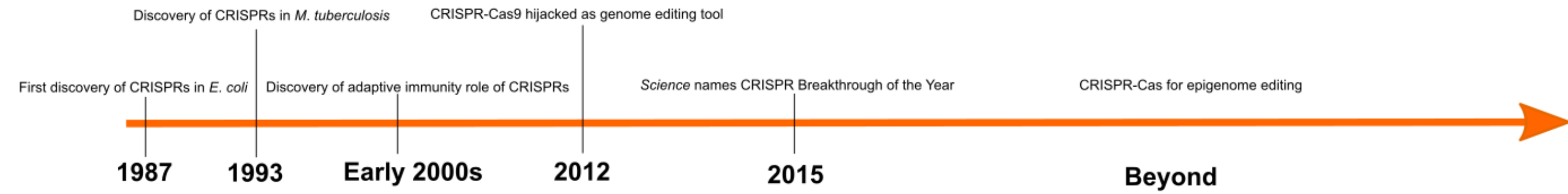
- Znane i stosowane dłużej, niż CRISPR/Cas9
- Do każdej edycji trzeba skonstruować metodami inżynierii genetycznej odpowiednie białko - trudne i kosztowne



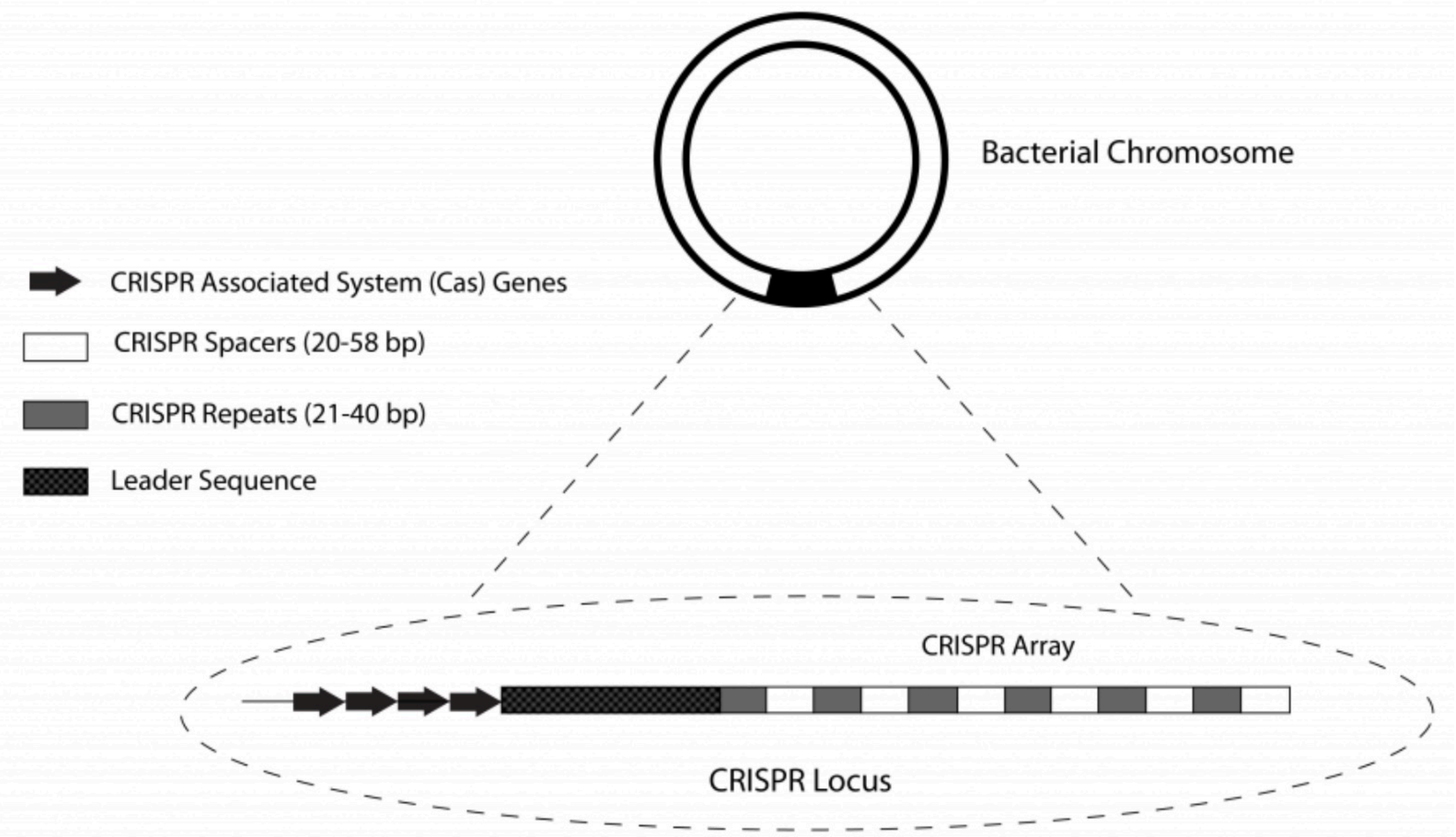
CRISPR

- Początki: badania nad nabytą odpornością bakterii na infekcję bakteriofagami (m. in. F. Mojica)
- Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)
- Znane od 1987, od lat 2000. powiązane z odpornością u bakterii

The CRISPR timeline: from discovery to genome editing and beyond

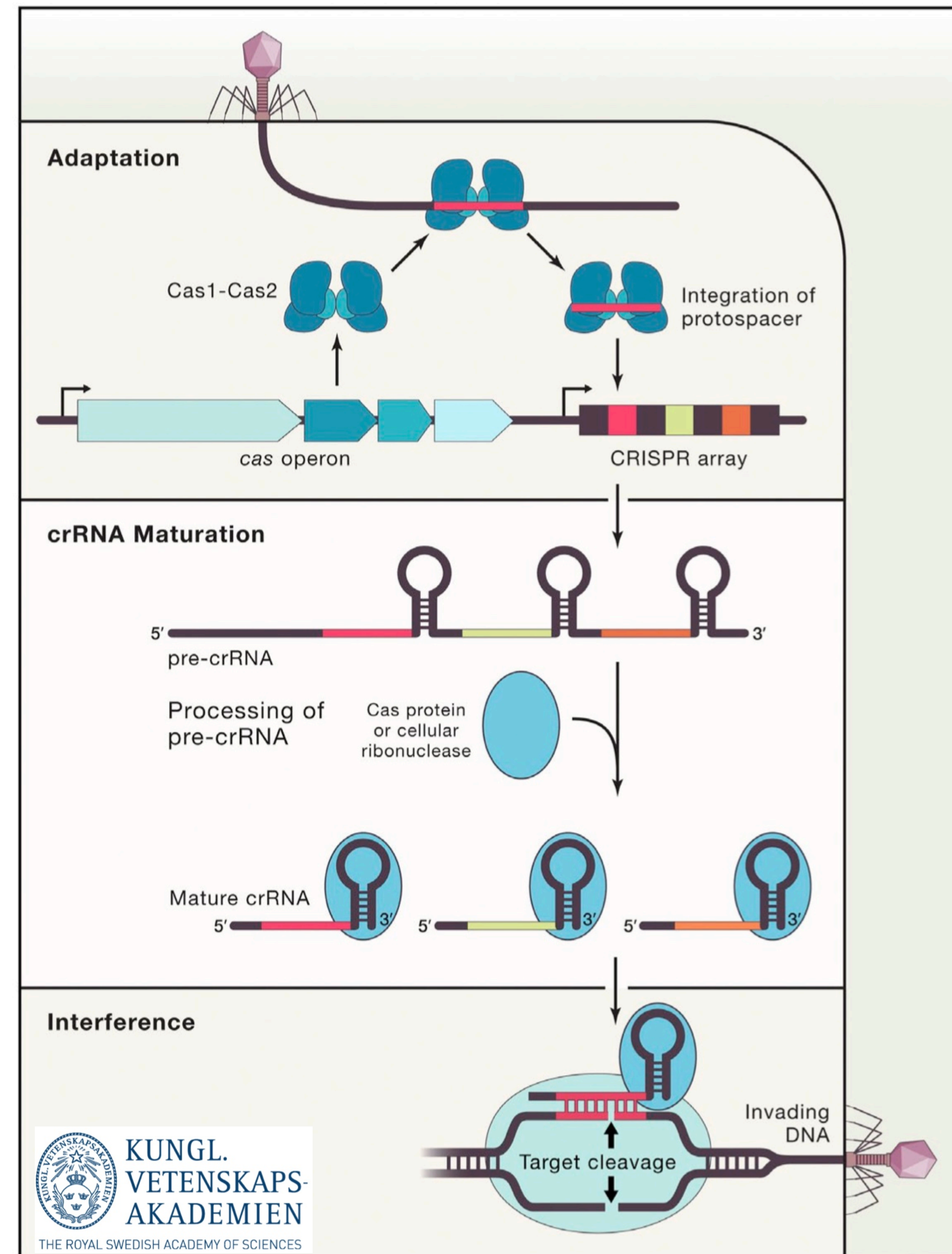


CRISPR Locus on a Bacterial Chromosome



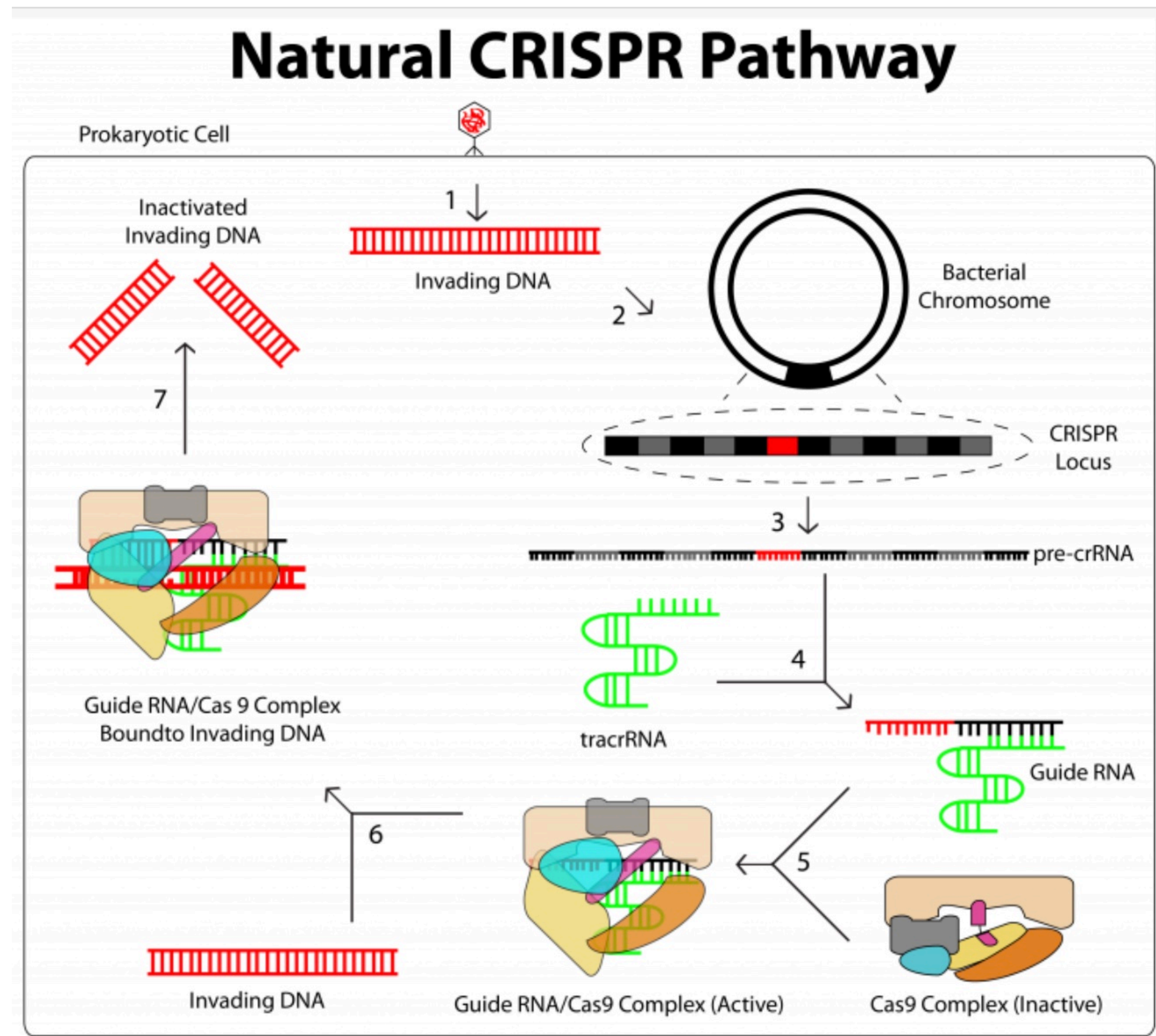
CRISPR

- DNA bakteriofaga cięty przez enzymy Cas1 i Cas2 jest wstawiany do genomu w obszar powtórzeń CRISP
- Transkrypcja i obróbka tego obszaru powoduje powstanie crRNA, który nakierowuje efektorowe nukleazy (np. Cas9) na cięcie DNA fagowego



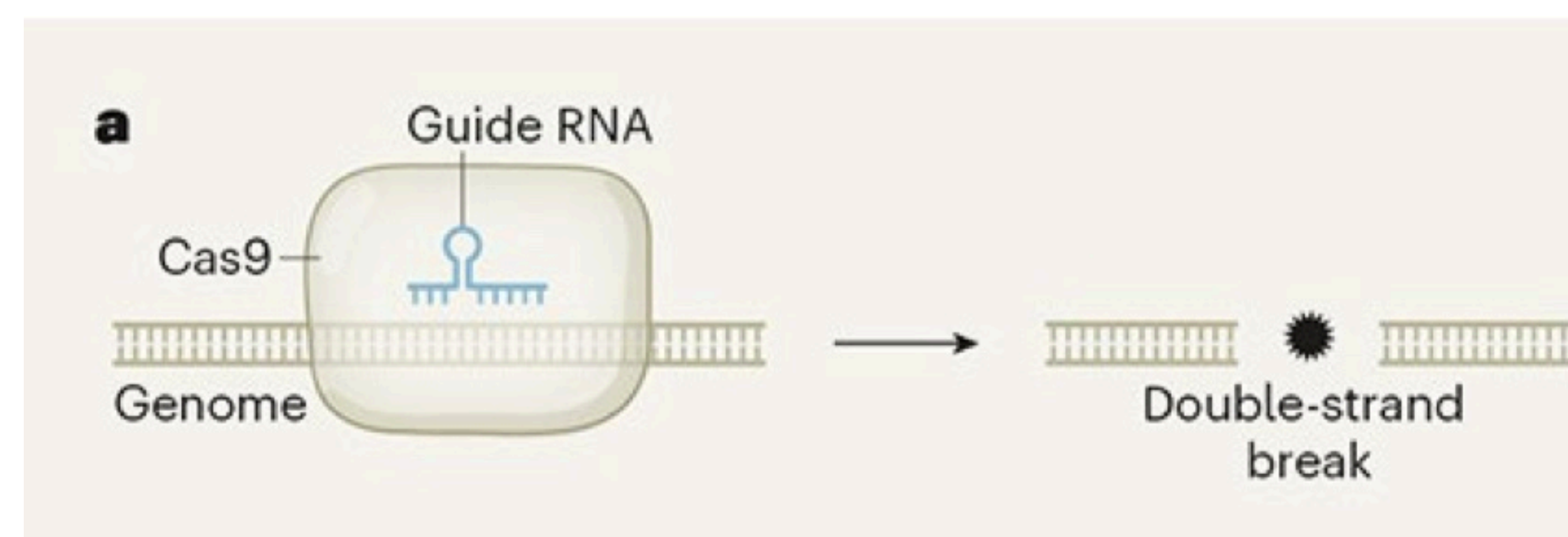
CRISPR w naturze

- System CRISPR u *Streptococcus pyogenes*
- Badania m. in. E. Charpentier
- Do nakierowania nukleazy Cas9 potrzebny kompleks crRNA i tracrRNA

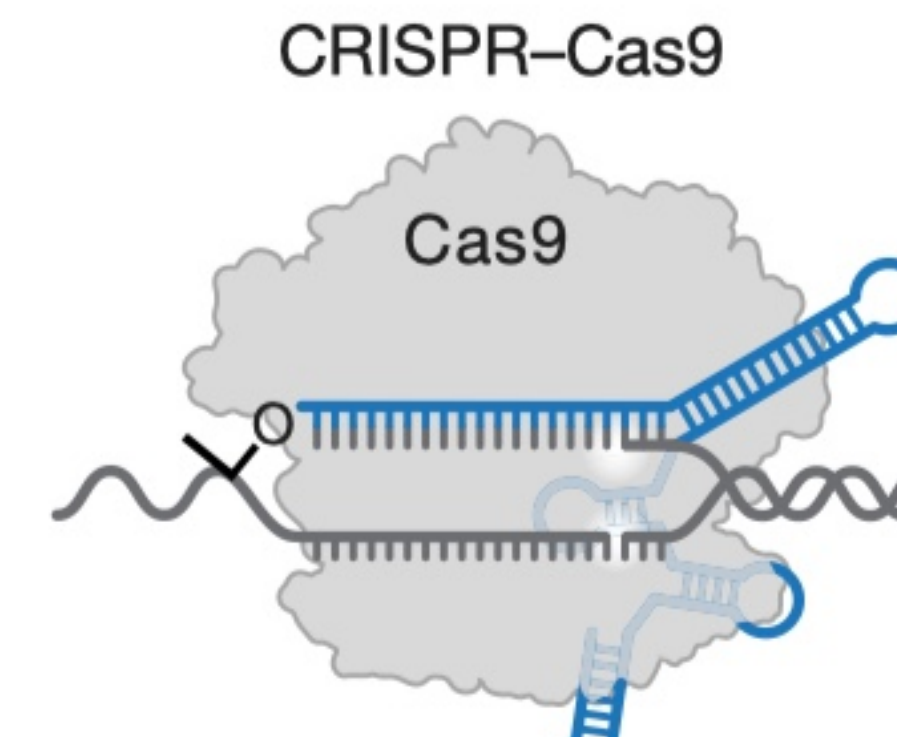


Przełom

- 2012: Charpentier i Doudna wykazały, że stosując odpowiednio zaprojektowaną cząsteczkę RNA można nakierować Cas9 na przecięcie dowolnego miejsca w genomie
- Wystarczy pojedyncza cząsteczka gRNA, będąca połączeniem sekwencji crRNA i tracrRNA - projektowanie synteza takiej cząsteczki są łatwe i niedrogie
- W tym samym roku podobny pomysł: Virginijus Šikšnys (Wilno)



Nature | Vol 576 | 5 December 2019



Nature | Vol 578 | 13 February 2020

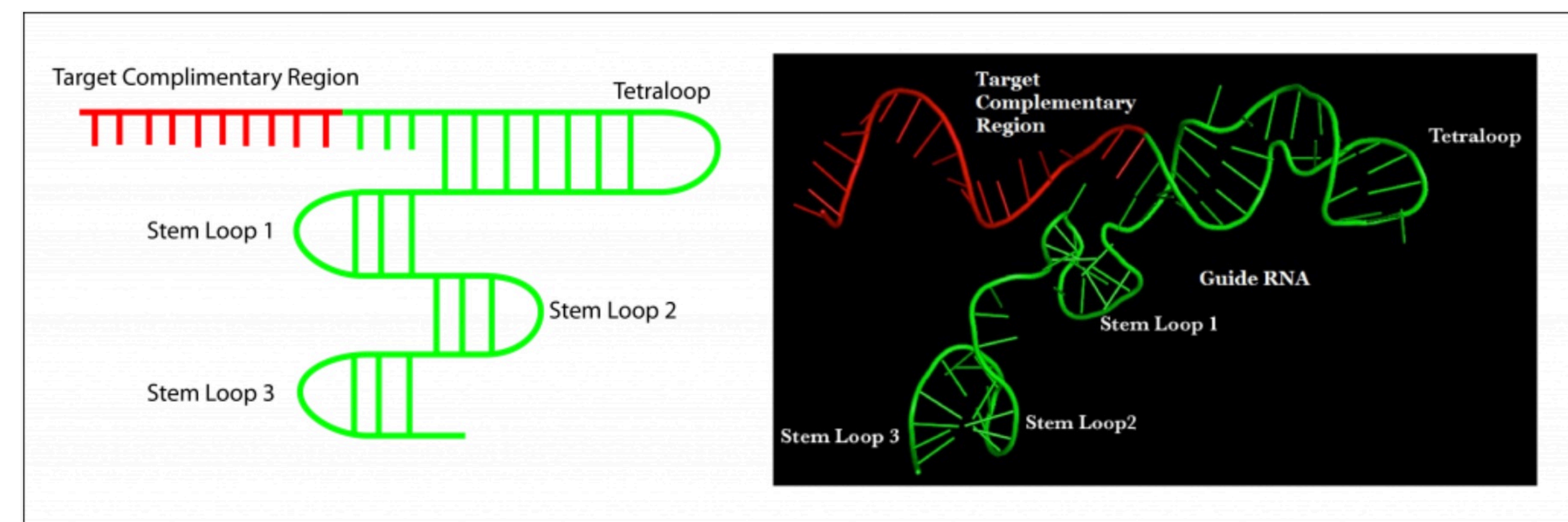
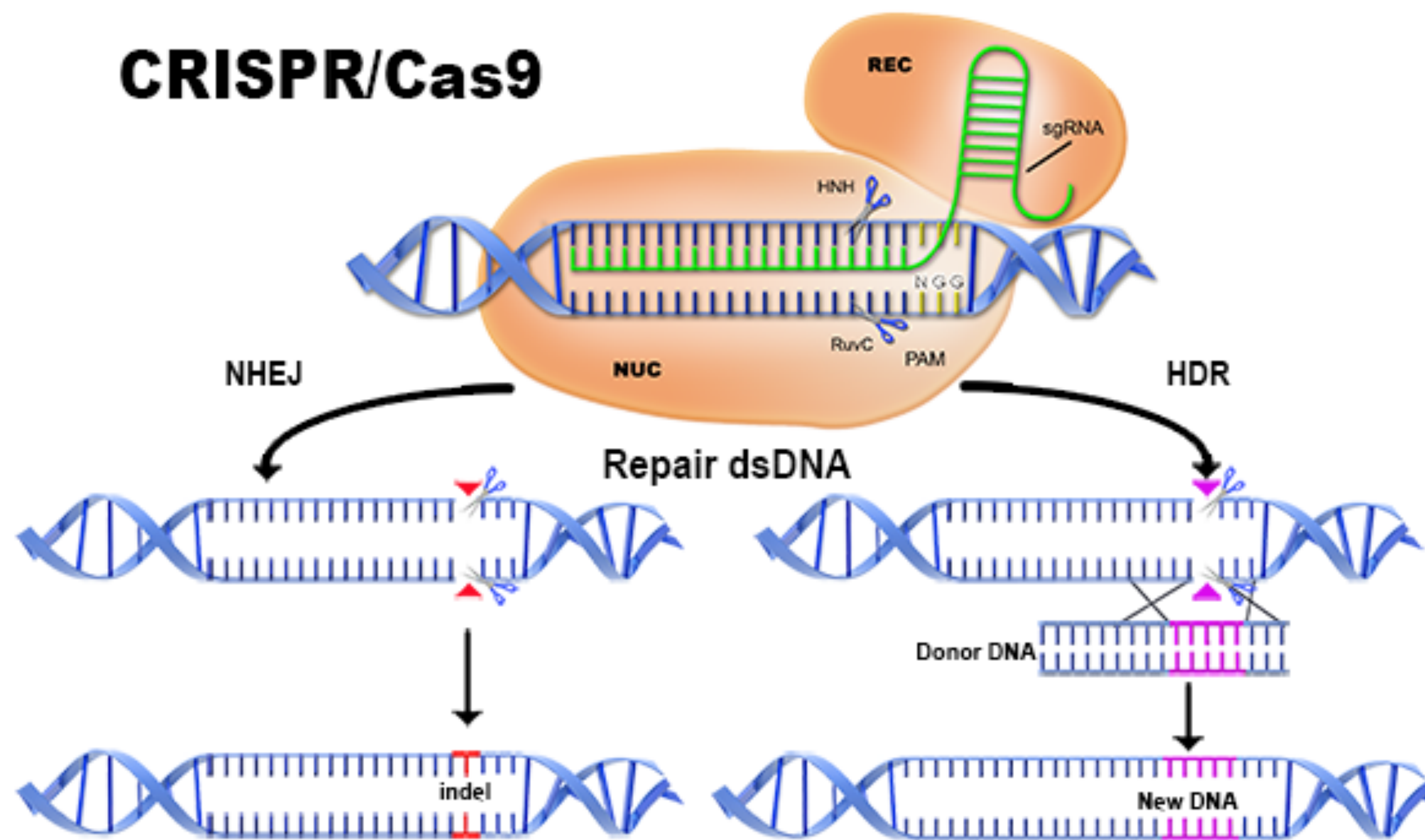


Figure 2: Engineered Guide RNA. Engineered guide RNA is a single strand of RNA. It forms one tetraloop and two or three stem loops (three shown). Target complimentary region is shown in red. (original figure) (crystal image rendered from PDB: 4UN3 Anders et al. 2014.)

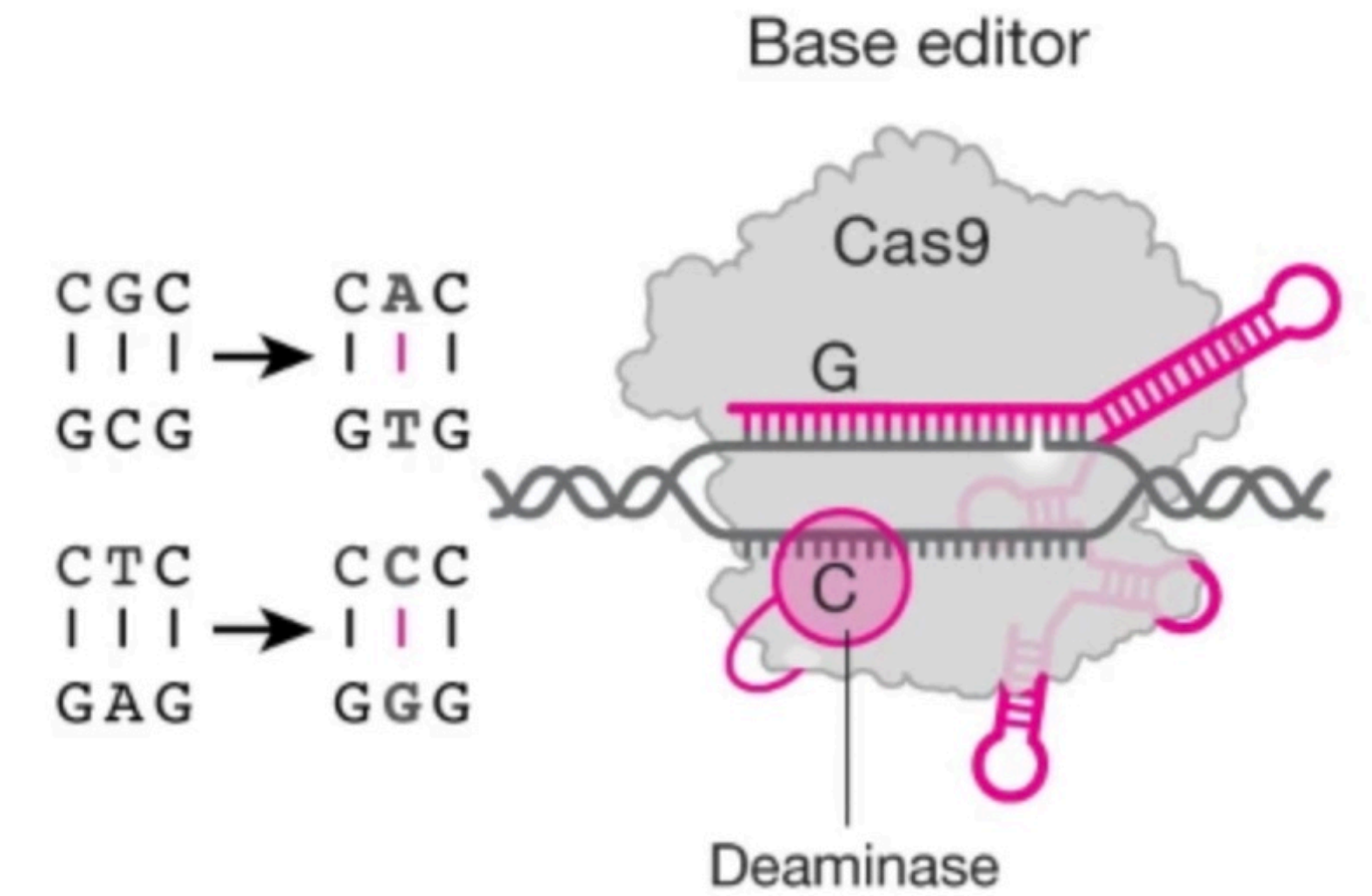
Po cięciu

- Przecięty DNA - pęknięcie dwuniciowe (DSB- double strand break) - przez komórkę traktowane jako poważne uszkodzenie
- Indukowane systemy naprawcze
- Powstaje mała delecja
- W obecności donorowego DNA naprawa rekombinacyjna - wstawienie zmodyfikowanej sekwencji

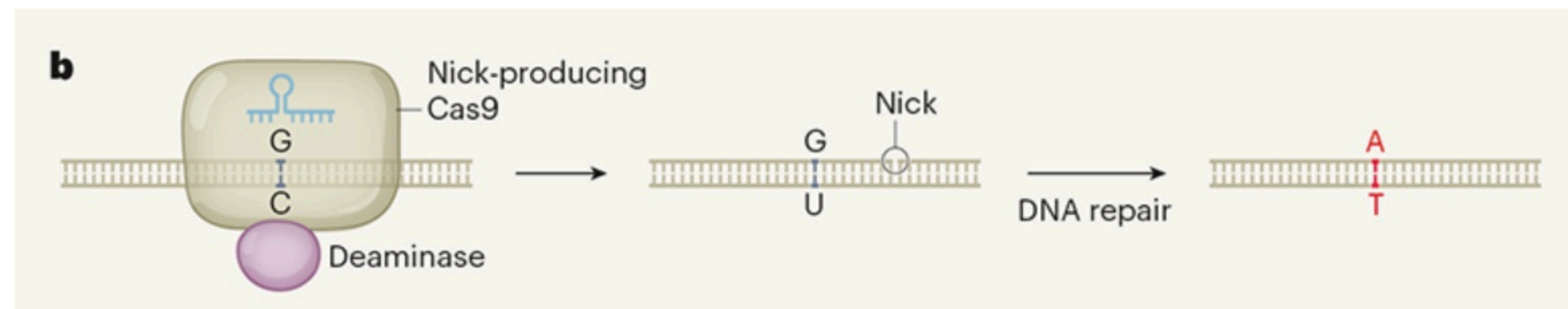


Modyfikacje

- Edycja bez cięcia
- Zmodyfikowana Cas9 tylko nacina jedną z dwóch nici - wystarczy do indukcji systemów naprawczych
- Domena deaminazy może zmienić np.:
 - C -> U (U potem naprawiane do T)
 - A -> I (przy replikacji jak G)
- Zmiany pojedynczych nukleotydów, bardzo precyzyjne



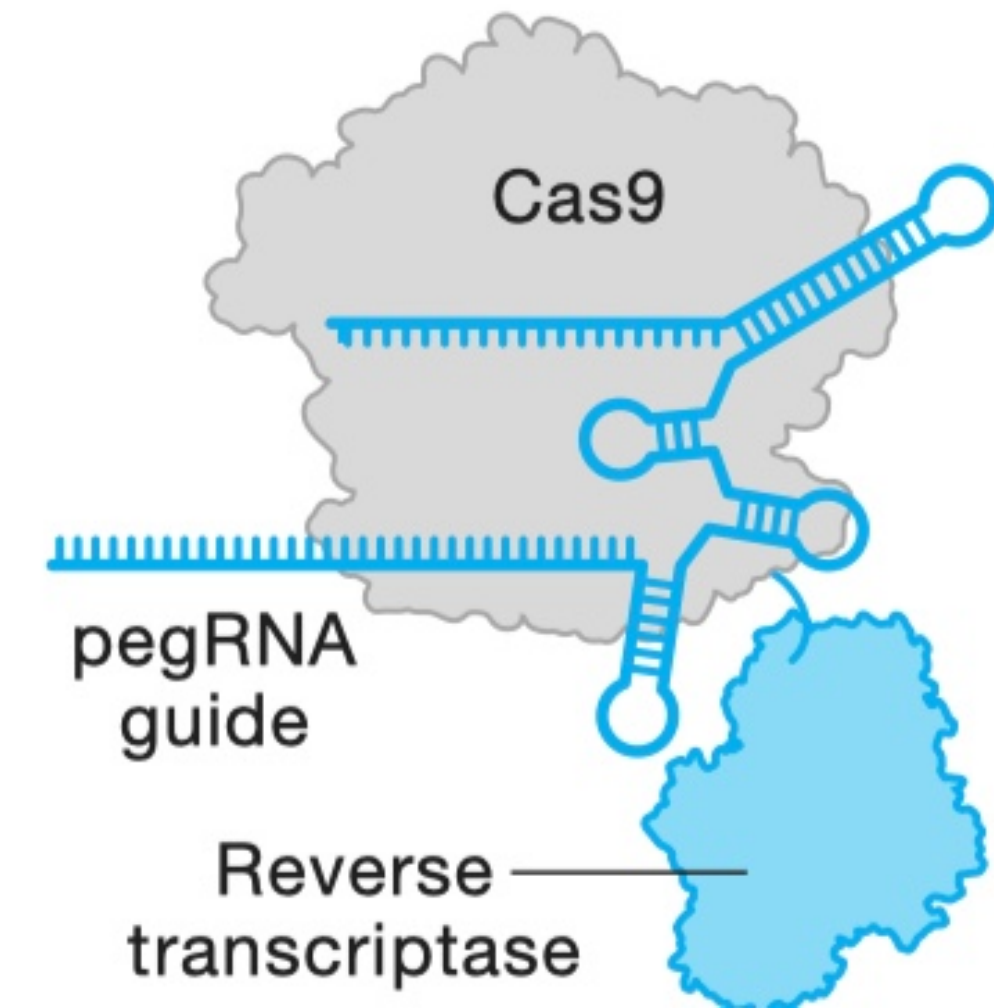
Nature | Vol 578 | 13 February 2020



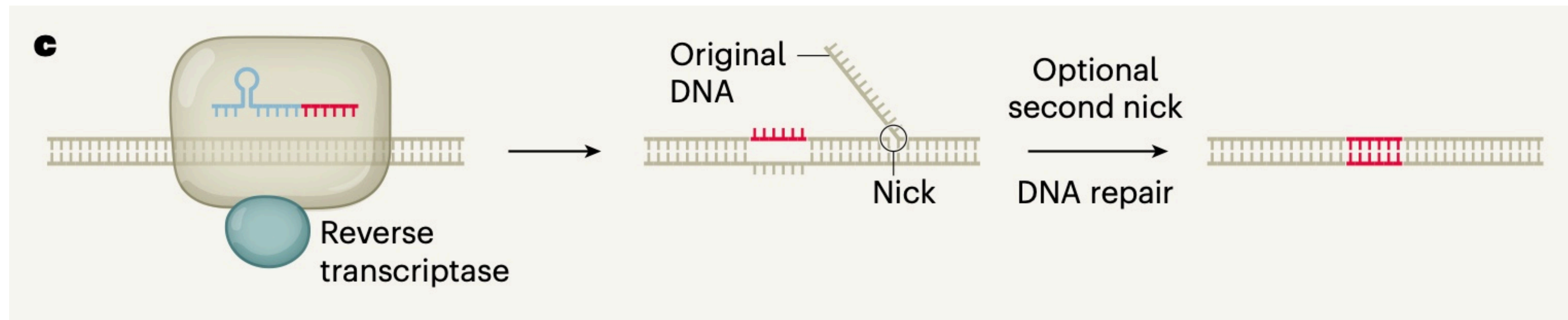
Nature | Vol 576 | 5 December 2019

Modyfikacje

- Edycja z odwrotną transkrypcją (“search & replace”)
- Zmodyfikowana Cas9 tylko nacina jedną z dwóch nici, połączona z domeną odwrotnej transkryptazy (RT)
- Wstawienie sekwencji z pegRNA



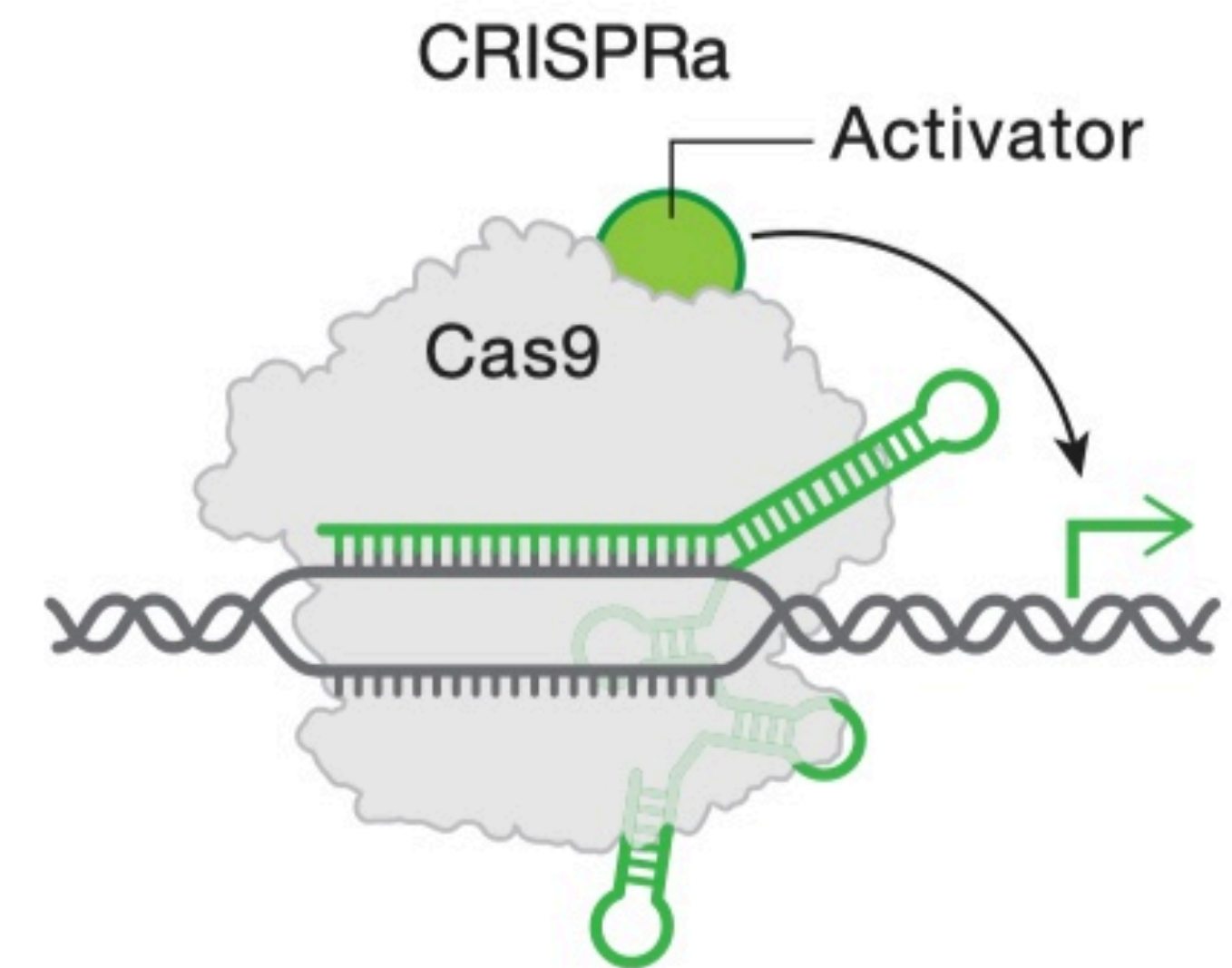
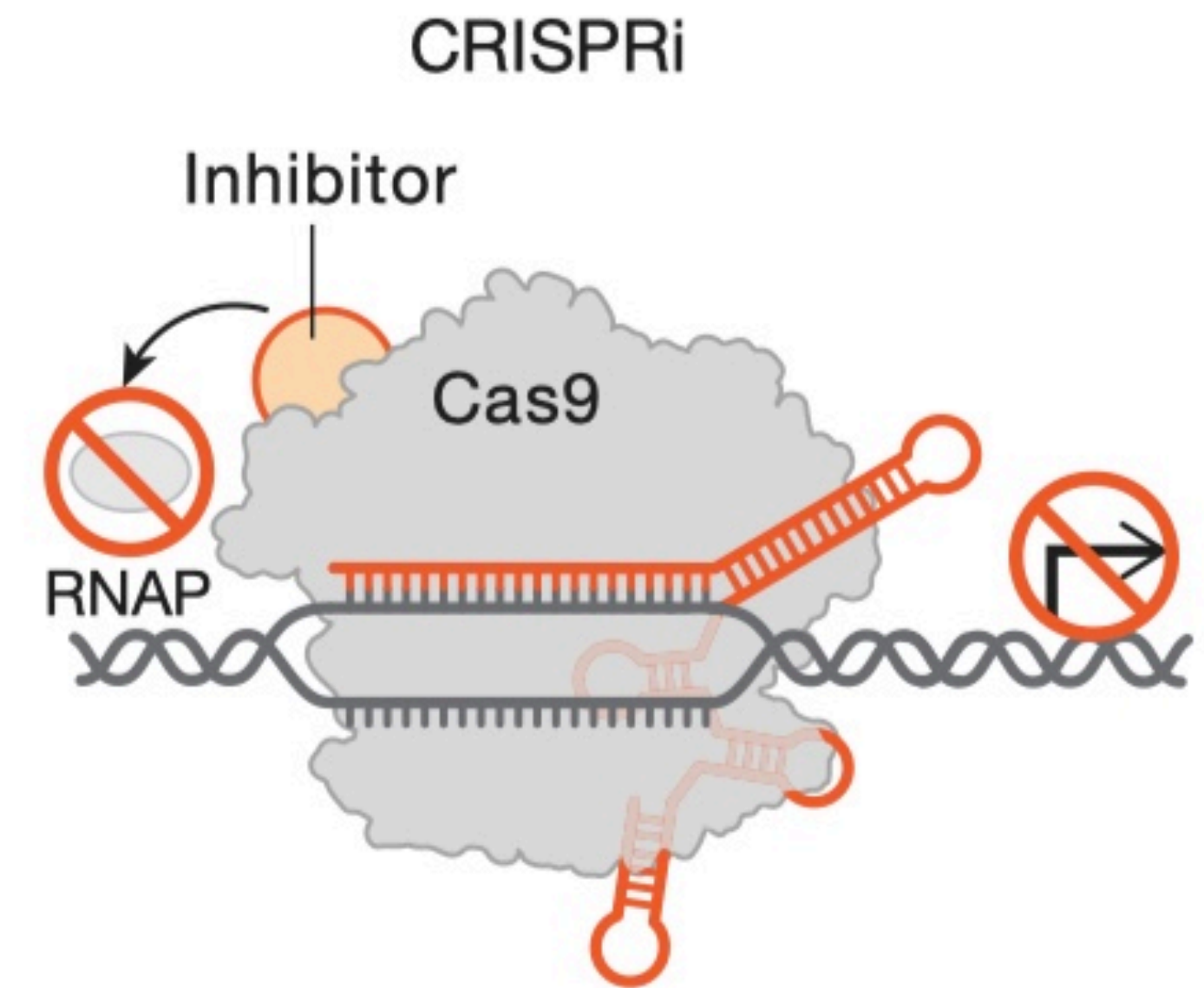
Nature | Vol 578 | 13 February 2020



Nature | Vol 576 | 5 December 2019

Modyfikacje - regulacja

- Cas9 nieaktywna - nie tnie DNA
- Związana domena aktywująca lub hamująca transkrypcje
- Związane domeny wprowadzające modyfikacje epigenetyczne (np. metylacja DNA) - dopiero rozwijane



Zastosowania - badania

- Metoda badawcza
- Odwrotna genetyka - poznajemy funkcję genu badając efekt fenotypowy mutacji (najczęściej utraty funkcji) - podstawowa metoda poznawcza genetyki
- Dotychczas stosowana u stosunkowo nielicznych organizmów modelowych
- CRISPR/Cas9 pozwala na rozszerzenie pola badań na inne organizmy, wcześniej rzadko badane w ten sposób



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

Zastosowania - biotechnologia

- Można modyfikować geny roślin i zwierząt
- Nie pozostawia śladów, nie wprowadza obcego DNA
- Dyskusja - czy powinno podlegać tym samym restrykcjom, co tzw. GMO
- Decyzja UE 2018 - tak, podlegają restrykcjom

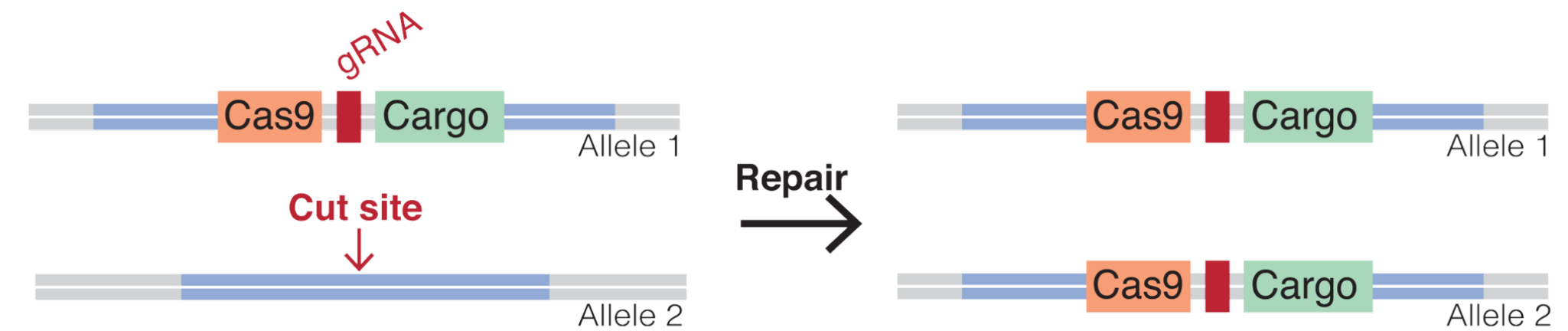


Umea University's Stefan Jansson served the CRISPR cabbage along with pasta, snowpeas, bruschetta bread and other veggies and herbs Stefan Jansson/Umea University

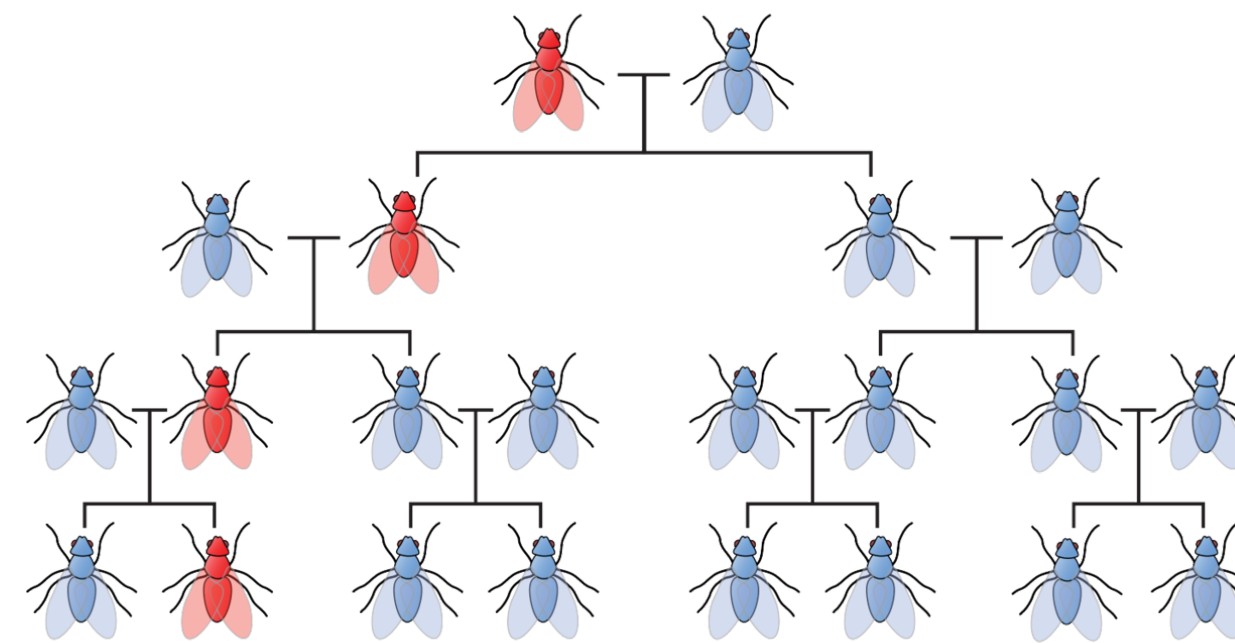
**First gene-edited meal served up from
CRISPR cabbage**

Napędy genowe - przełamanie I prawa Mendla

- *Gene drive*, inaczej "nadpisywarki genów"
- Organizm z wstawionym w genom systemem modyfikującym
- Przy krzyżówce z dzikim: całość potomstwa zmodyfikowana
- Próby zastosowania w walce z gatunkami inwazyjnymi
- Duże kontrowersje

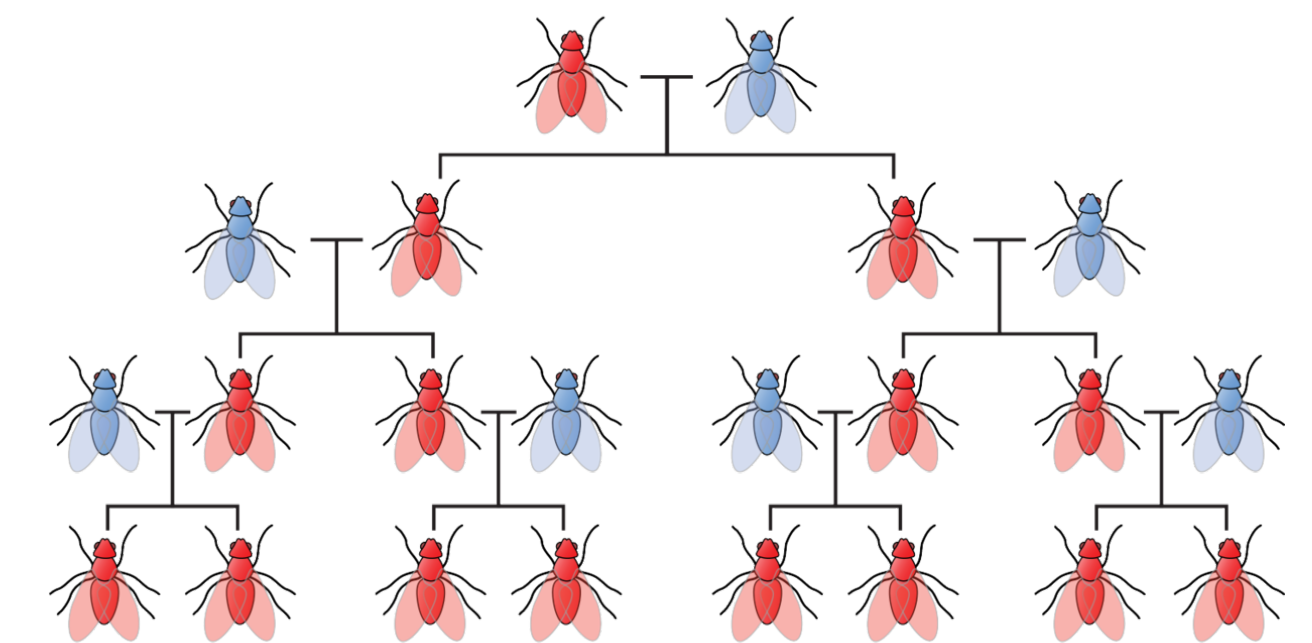


Normal inheritance



Altered gene does not spread

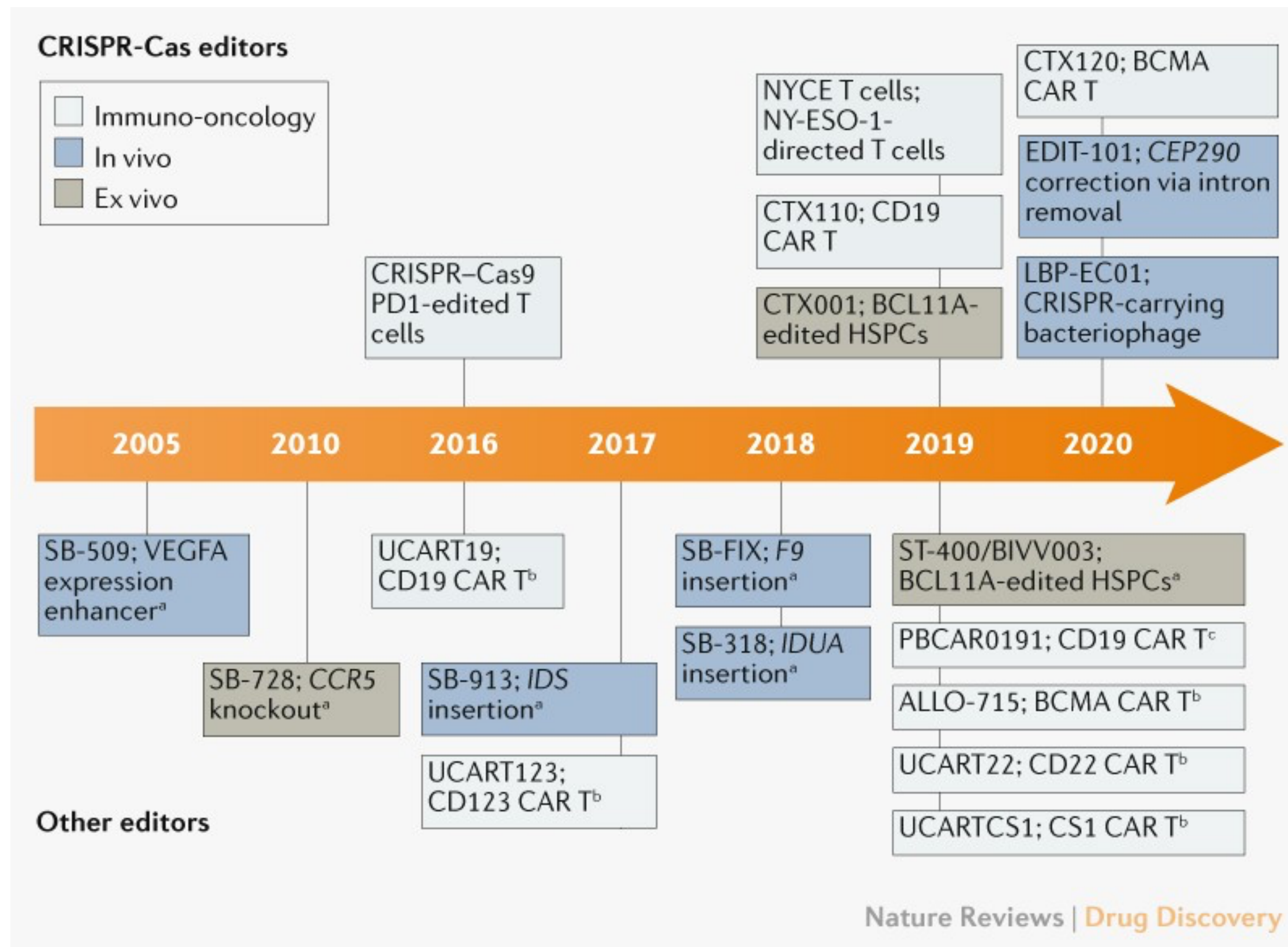
Gene drive inheritance



Altered gene is always inherited

Zastosowania - u człowieka

- *In vivo* - zmiany w komórkach somatycznych pacjenta
- *Ex vivo* - modyfikacja komórek pobranych od pacjenta i hodowanych *in vitro*, następnie wprowadzenie ich do organizmu
- W linii płciowej - modyfikacje zarodkowe



In vivo

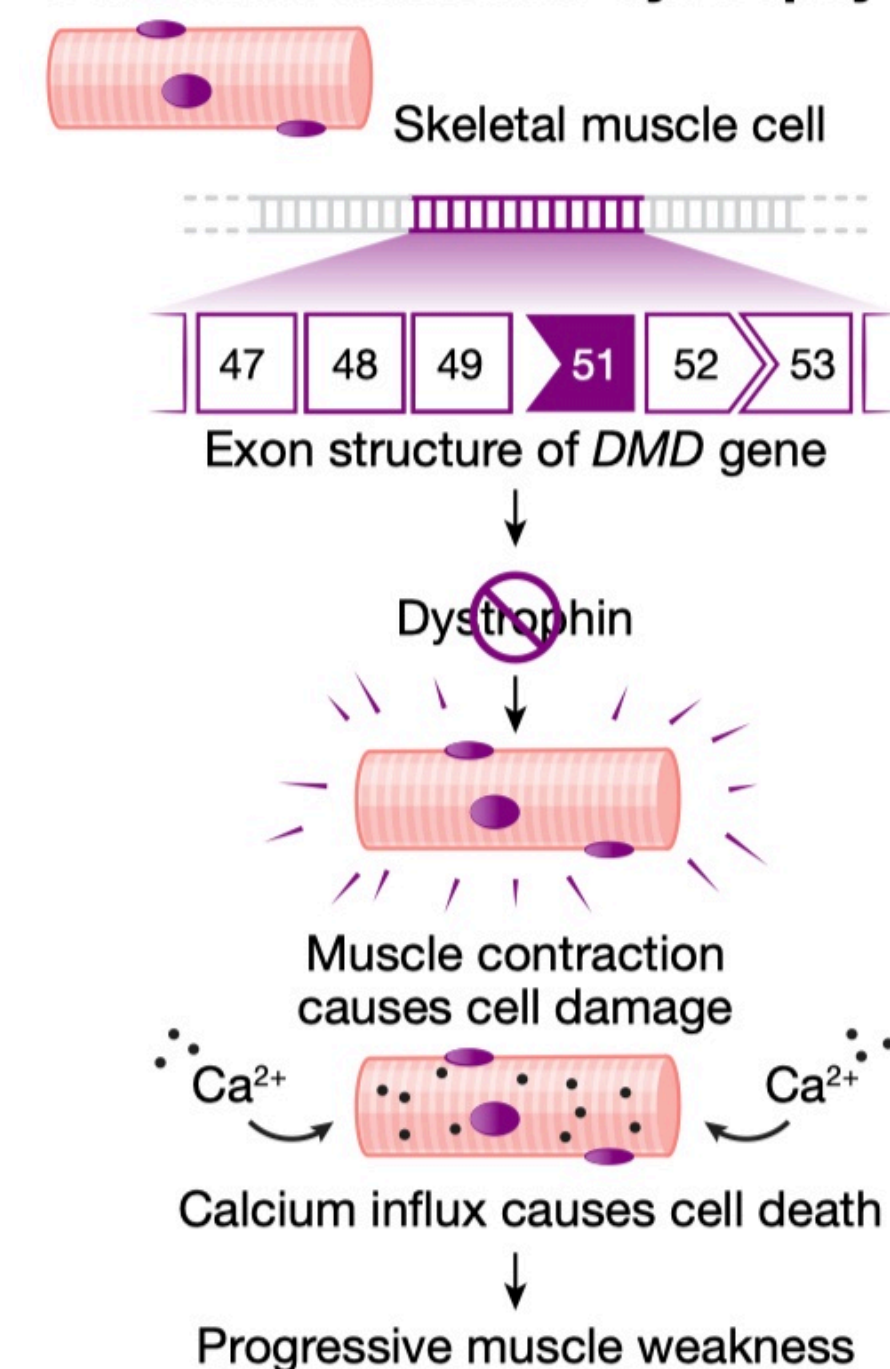
- Korekcja mutacji w komórkach chorych
- Główne wyzwanie - dostarczenie systemu do odpowiednich komórek z odpowiednią wydajnością
- Obecnie - badania na modelach zwierzęcych (np. dystrofia Duchenne’a, choroby oka)
- Niektóre na etapie badań klinicznych

Table 3 | Select list of in vivo gene-editing agents in or approaching the clinic

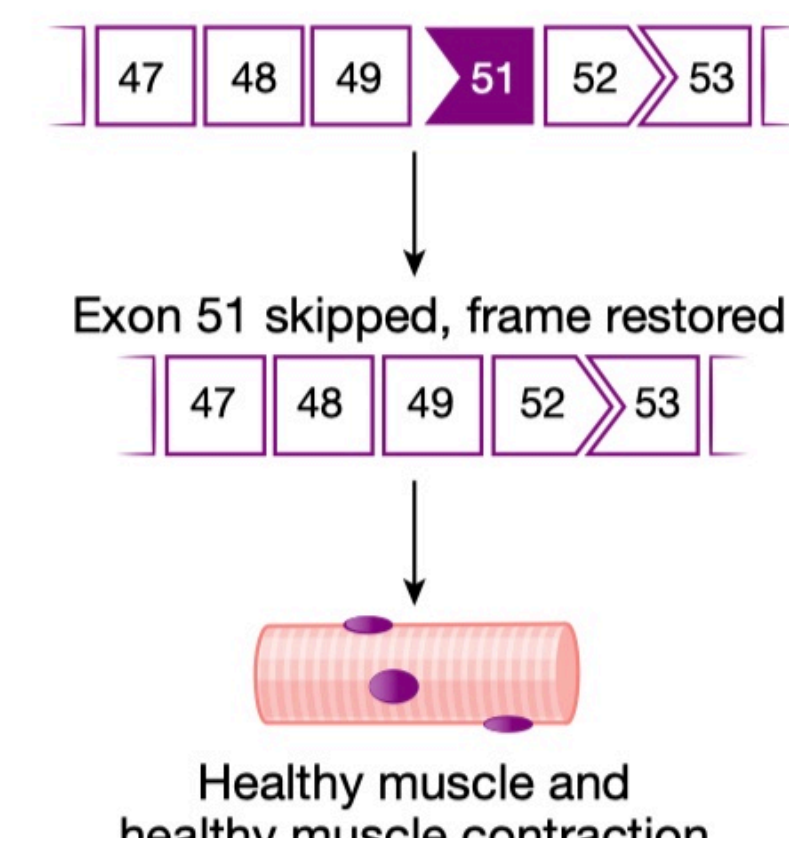
Drug	Sponsors	Editor	Properties	Indication	Status
SB-913	Sangamo	ZFN	IDS insertion	MPS II	Phase I/II failed
EDIT-101	Allergan/Editas Medicine	CRISPR-Cas9	CEP290 correction, via intron removal	LCA10	Phase I/II
LBP-EC01	Locus Biosciences	CRISPR-Cas3	CRISPR-carrying bacteriophage	UTI	Phase II
EBT-101	Excision BioTherapeutics	CRISPR-Cas9	HIV DNA excision	HIV	Phase I in 2020
NTLA-2001	Intellia/Regeneron	CRISPR-Cas9	TTR knockout	ATTR	Phase I in 2020
Undisclosed	Navega Therapeutics	CRISPR-dCas9	Nav1.7 epigenetic silencing	Pain	Phase I by 2021
Undisclosed	Precision Biosciences/Gilead	Meganuclease	HBV DNA	Hepatitis B	IND 2021

ATTR, transthyretin amyloidosis; HAE, hereditary angioedema; HBV, hepatitis B virus; IND, Investigational New Drug application; LCA10, Leber’s congenital amaurosis 10; MPS II, mucopolysaccharidosis type II; UTI, urinary tract infection; ZFN, zinc finger nuclease.

Duchenne muscular dystrophy



Muscle-cell editing



Nature | Vol 578 | 13 February 2020

Ex vivo

- Możliwe zastosowanie do komórek i tkanek, które można hodować i namnażać
- W połączeniu z rozwojem badań nad komórkami macierzystymi
- Np. komórki krwi (hemoglobinopatie, jak anemia sierpowata), AIDS, skóra
- Etap badań klinicznych

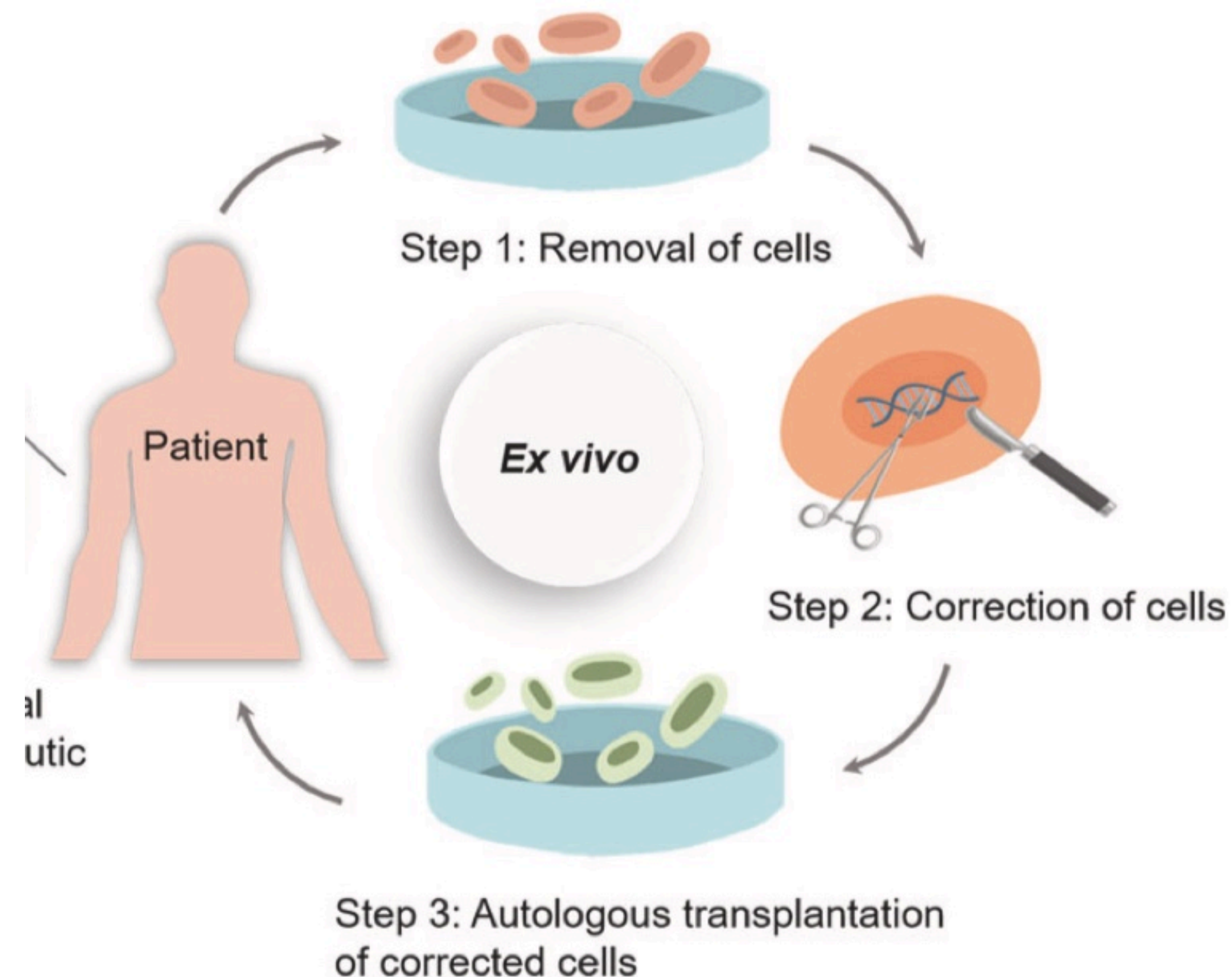


Table 1 | Select list of ex vivo gene-editing agents in or approaching the clinic

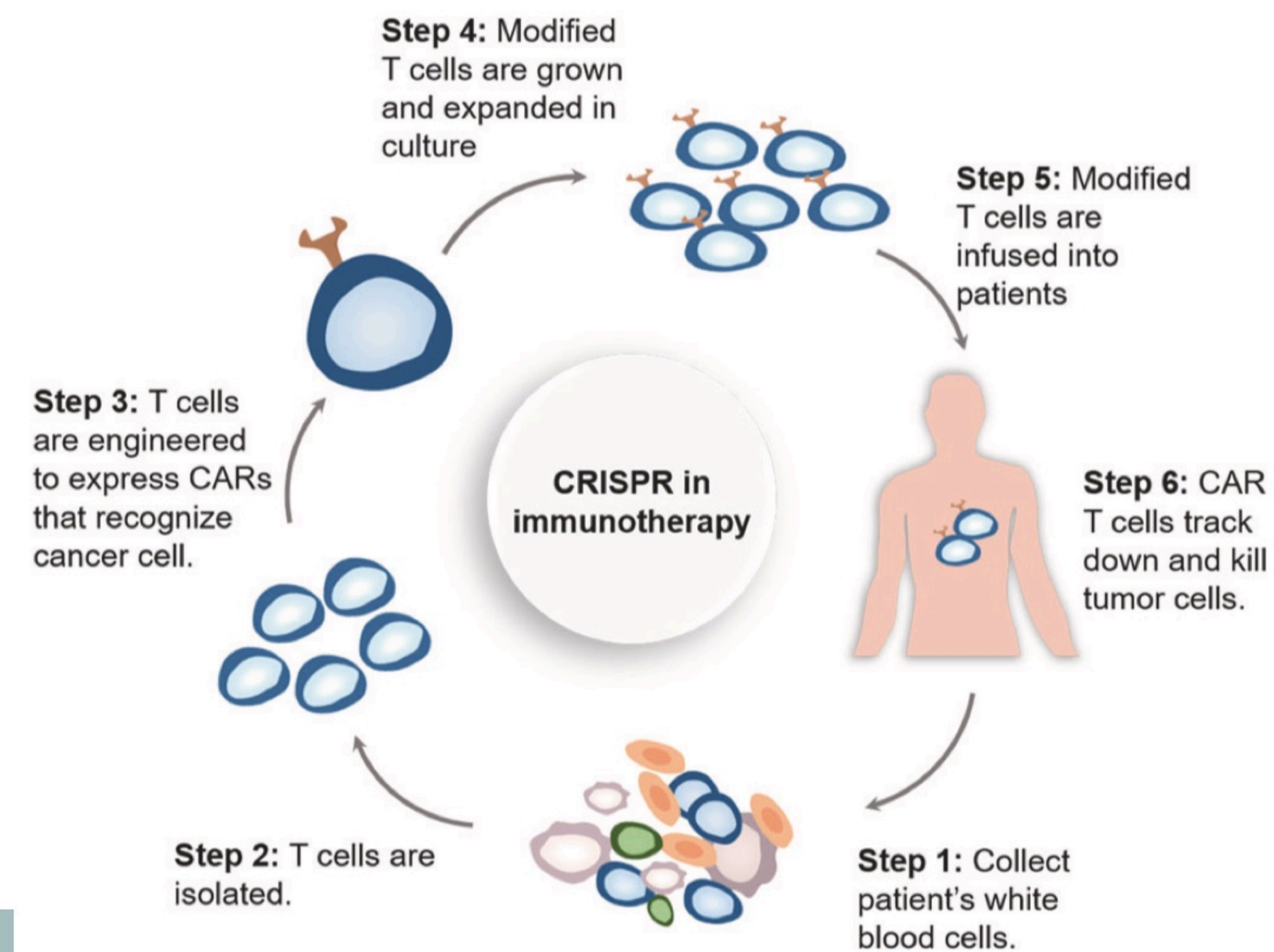
Signal Transduction and Targeted Therapy (2020)5:1

Drug	Sponsors	Editor	Properties	Indication	Status
ST-400/BIVV003	Sangamo/Sanofi	ZFN	<i>BCL11A</i> -edited HSPCs	SCD and β -thalassaemia	Phase I/II
CTX001	CRISPR Therapeutics/Vertex	CRISPR–Cas9	<i>BCL11A</i> -edited HSPCs	SCD and β -thalassaemia	Phase I
OTQ923	Intellia/Novartis	CRISPR–Cas9	<i>BCL11A</i> -edited HSPCs	SCD and β -thalassaemia	IND approved
EDIT-301	Editas	CRISPR–Cas12a	<i>HBG1/2</i> -edited HSPCs	SCD and β -thalassaemia	IND filing in 2020
Undisclosed	BEAM	CRISPR base editor	Undisclosed	Undisclosed	IND filing in 2021

HSPC, haematopoietic stem and progenitor cell; IND, Investigational New Drug application; SCD, sickle cell disease; ZFN, zinc finger nuclease.

Komórki CAR-T

- Immunoterapia np. nowotworów
- chimeric antigen receptor T cells
- zmodyfikowane białko receptorowe naprowadza limfocyty-T na komórki docelowe



Signal Transduction and Targeted Therapy (2020)5:1

Table 2 | Select list of immuno-oncology gene-edited candidates in or approaching the clinic

Drug	Sponsors	Editor	Properties	Indication	Status
UCART19/ALLO-501	Allogene/Cellectis/Servier	TALEN	CD19 CAR T, allogeneic	CD19 ⁺ cancers	Phase I
PBCAR0191	Precision Biosciences/Servier	Meganuclease	CD19 CAR T, allogeneic	NHL and ALL	Phase I
CTX110	CRISPR Therapeutics	CRISPR-Cas9	CD19 CAR T, allogeneic	CD19 ⁺ cancers	Phase I/II
NYCE T cells	University of Pennsylvania/ Parker Institute/Tmunity	CRISPR-Cas9	NY-ESO-1 TCR	MM	Phase I
ALLO-715	Allogene	TALEN	BCMA CAR T, allogeneic	MM	Phase I
CTX120	CRISPR Therapeutics	CRISPR-Cas9	BCMA CAR T, allogeneic	MM	Phase I/II
UCART123	Cellectis	TALEN	CD123 CAR T, allogeneic	AML	Phase I
UCART22	Cellectis	TALEN	CD22 CAR T, allogeneic	B-ALL	Phase I
UCARTCS1	Cellectis	TALEN	CS1 CAR T, allogeneic	MM	Phase I
NTLA-5001	Intellia	CRISPR-Cas9	WT1 TCR, allogeneic	AML	IND in 2021
Undisclosed	Refuge Biotech	CRISPR-dCas9	HER2 CAR T	Cancer	IND in 2021
EDIT-201	Editas	CRISPR-Cas	NK cells, allogeneic	Solid cancers	IND-enabling studies

AML, acute myeloid leukaemia; B-ALL, B cell acute lymphoblastic leukaemia; CAR, chimeric antigen receptor; IND, Investigational New Drug application; MM, multiple myeloma; NHL, non-Hodgkin lymphoma; NK, natural killer; TALEN, transcription activator-like effector nuclease; TCR, T cell receptor.

Modyfikacje zarodkowe

- Modyfikacja zarodkowych komórek macierzystych przy zapłodnieniu pozaustrojowym
- Trwała i dziedziczna modyfikacja
- Obecnie uznane za nieetyczne - dobrowolne moratorium

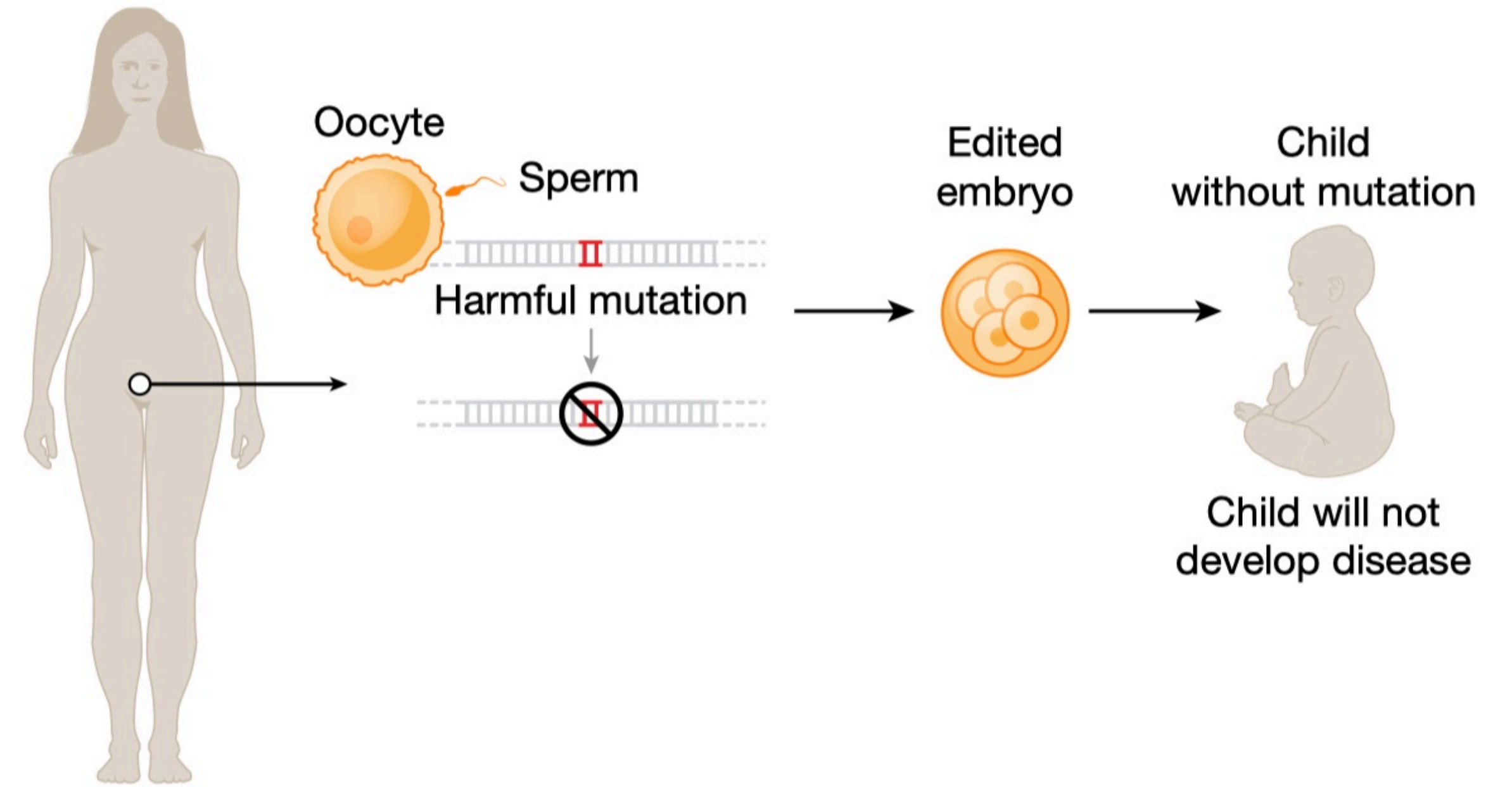


Fig. 4 | Editing the human germline. Genomic changes made during or after

Etyka i redagowanie genomu

- Propozycja moratorium
 - konieczne dopracowanie strony technicznej
 - konieczne dobre zbadanie strony naukowej (konsekwencje modyfikacji)
 - konieczna ocena skutków społecznych
- Nie dotyczy:
 - komórek somatycznych
 - eksperymentów nie związanych z implantacją zarodka

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](#)

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

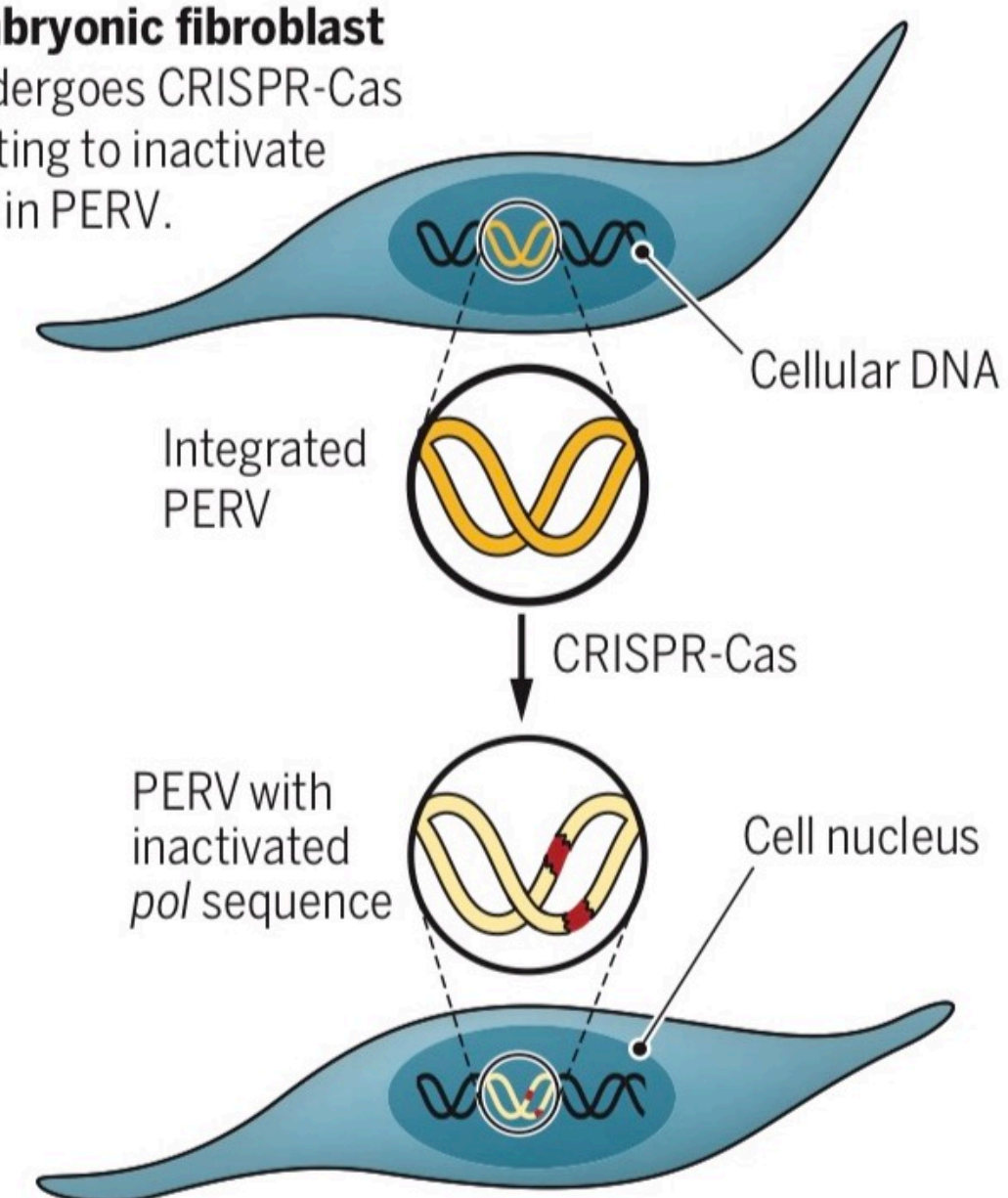
GENOME ENGINEERING

Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9

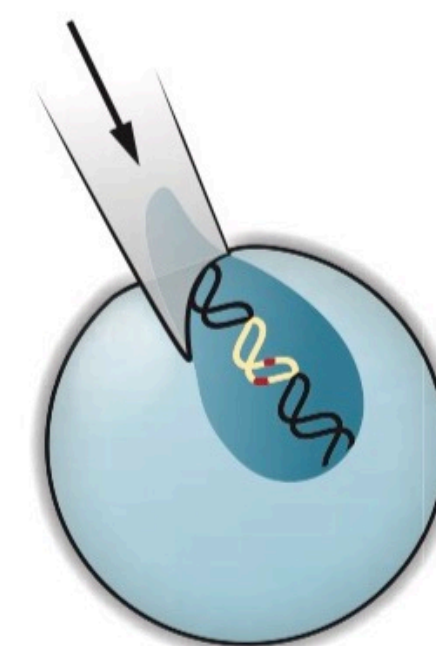
Dong Niu,^{1,2*} Hong-Jiang Wei,^{3,4*} Lin Lin,^{5*} Haydy George,^{1*} Tao Wang,^{1*} I-Hsiu Lee,^{1*} Hong-Ye Zhao,³ Yong Wang,⁶ Yinan Kan,¹ Ellen Shrock,⁷ Emal Lasha,¹ Gang Wang,¹ Yonglun Luo,⁵ Yubo Qing,^{3,4} Deling Jiao,^{3,4} Heng Zhao,^{3,4} Xiaoyang Zhou,⁶ Shouqi Wang,⁸ Hong Wei,⁶ Marc Güell,^{1†} George M. Church,^{1,7,9†} Luhan Yang^{1††} Niu *et al.*, *Science* **357**, 1303–1307 (2017)

Producing PERV-inactivated pig:

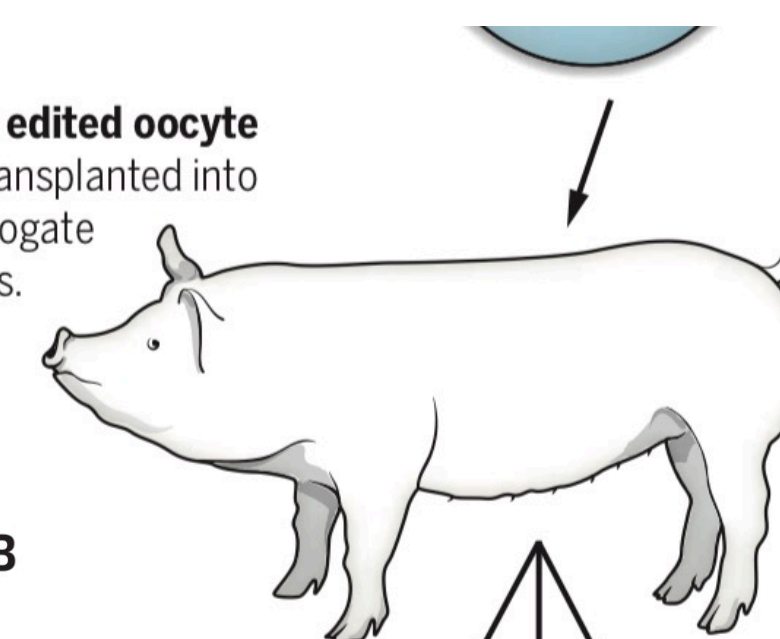
Embryonic fibroblast undergoes CRISPR-Cas editing to inactivate *pol* in PERV.



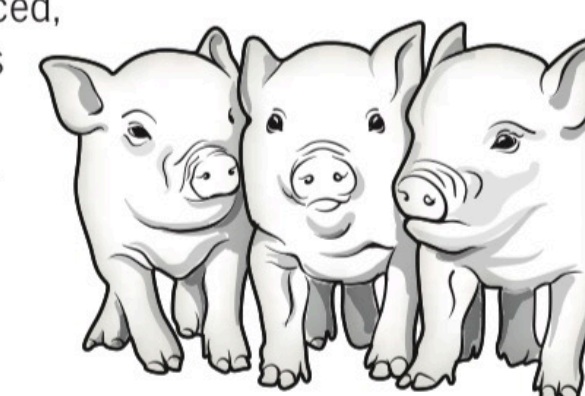
Somatic cell nuclear transfer is performed whereby the fibroblast nucleus that contains the inactivated *pol* gene is transferred into a denucleated oocyte.



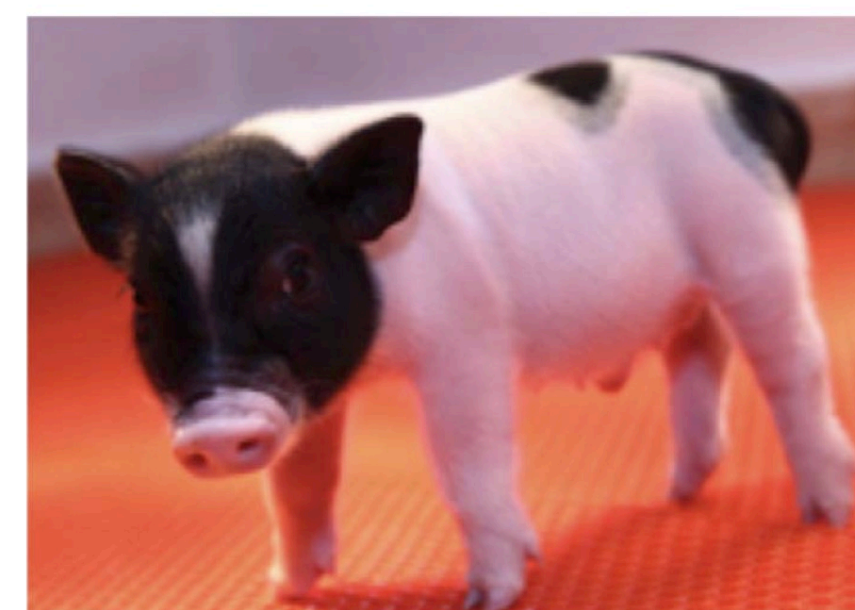
The edited oocyte is transplanted into surrogate sows.



Inactivated are produced, rich organs are used for transplant.



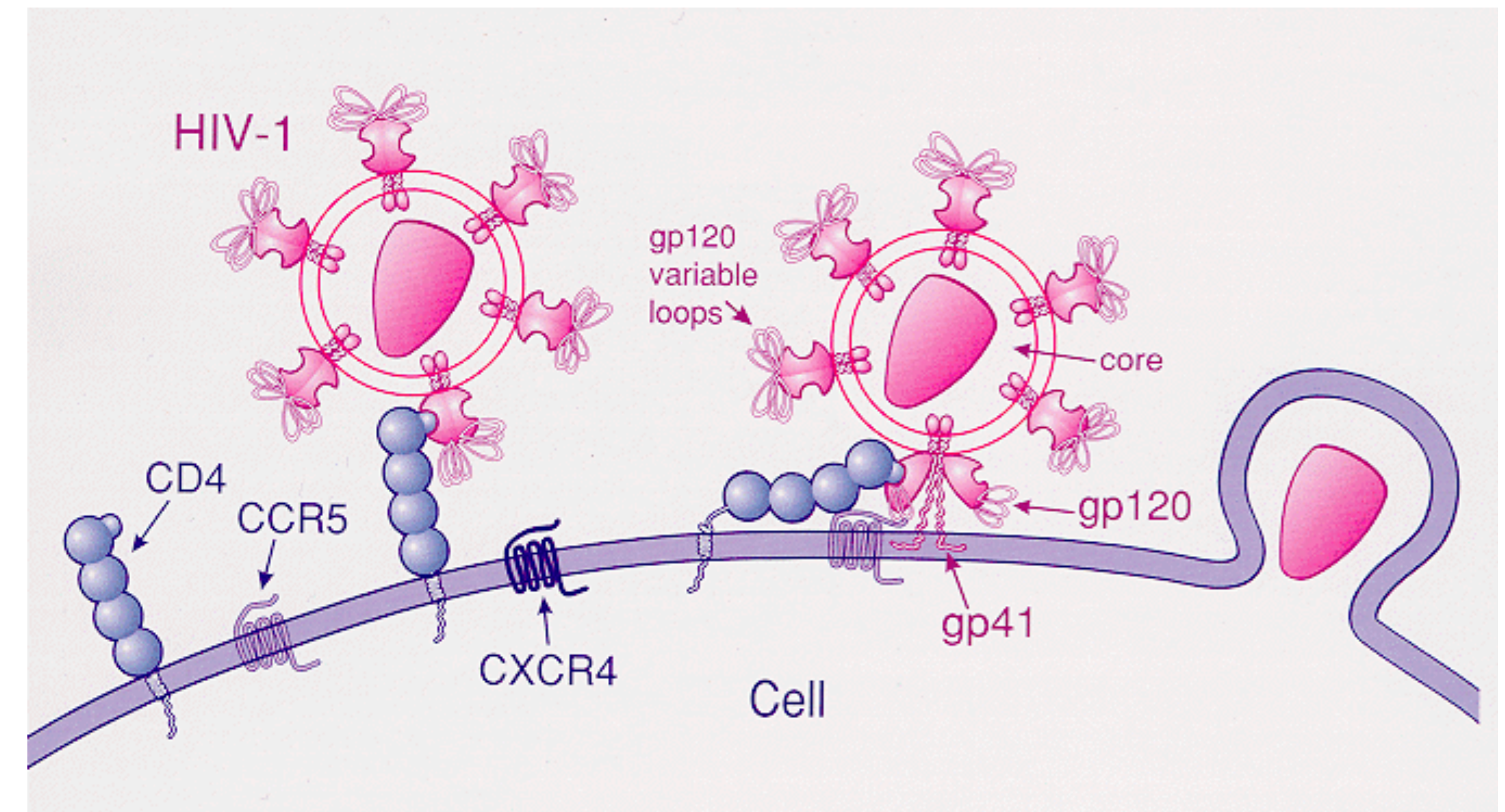
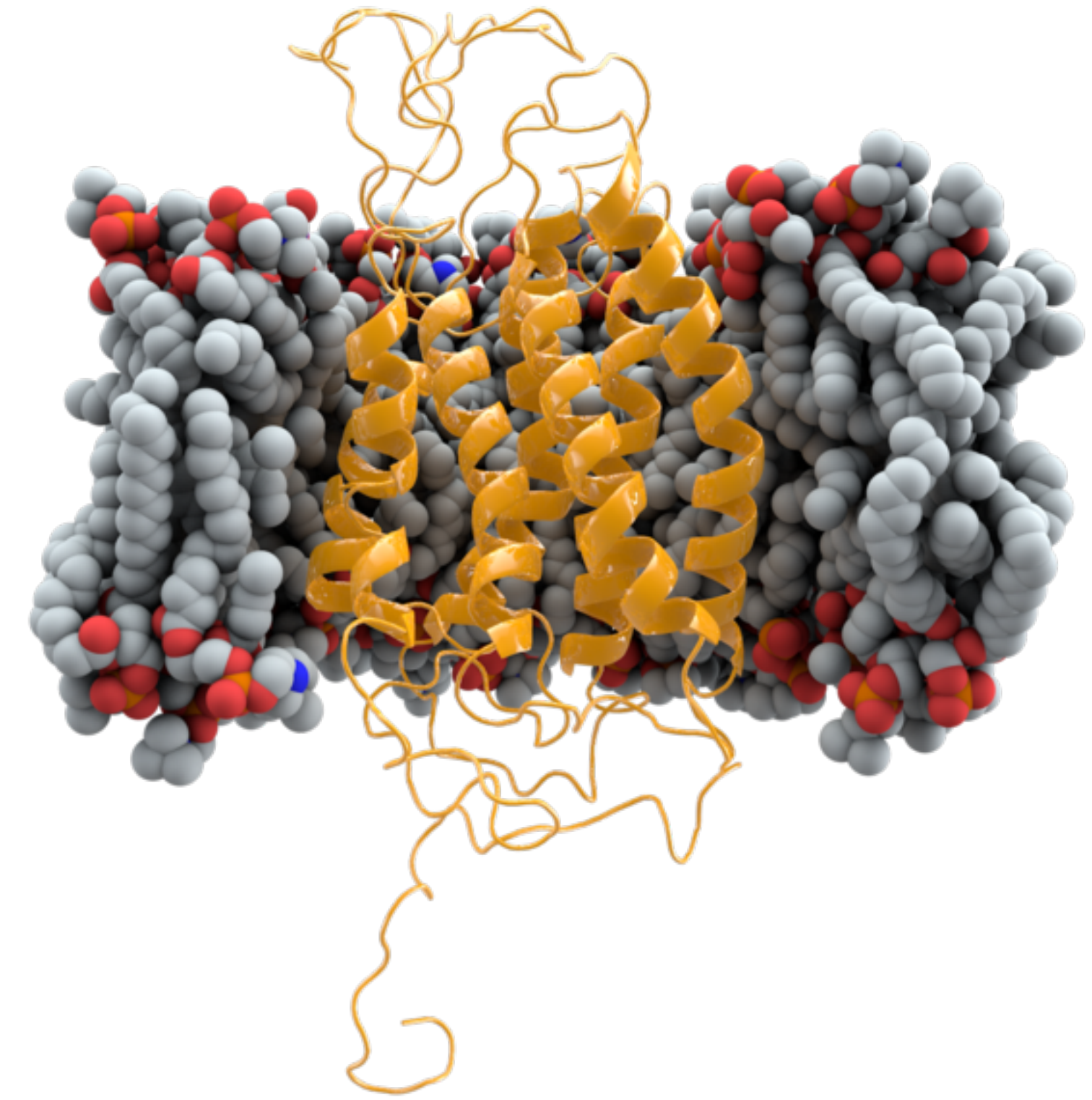
A



B

CCR5 i AIDS u człowieka

- CCR5 koduje receptor chemokin
 - uczestniczy w komunikacji między komórkami układu odpornościowego
 - dokładna rola nie w pełni poznana
- Jest wykorzystywany jako koreceptor przez wirusa HIV
 - Białko, do którego przyłącza się wirus wnikając do komórek
- Homozygoty $\Delta 32/\Delta 32$ są odporne na infekcję niektórymi szczepami HIV
 - takich osób jest nie więcej niż 2-4%, w większości populacji znacznie mniej



Berliński pacjent

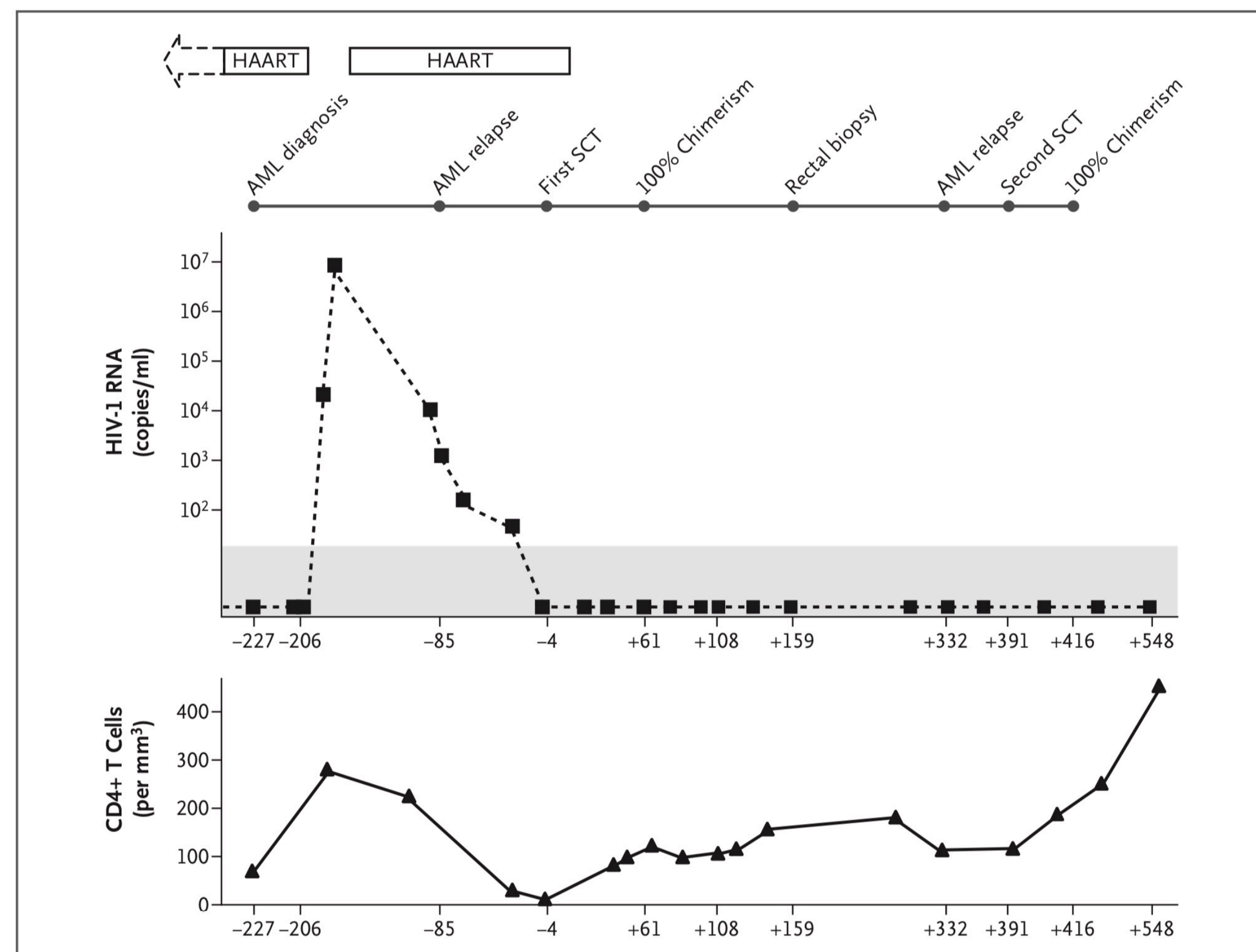
- 40-letni mężczyzna z ostrą białaczką szpikową, 10 lat wcześniej zdiagnozowany jako nosiciel HIV i leczony terapią HAART
- Przeszczep szpiku, dawca był homozygotą $CCR5\Delta32$
- Po przeszczepie zanik wirusa
- Poważne komplikacje po przeszczepie (choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi - GVHD)
- Redagowanie genomu umożliwi wprowadzenie mutacji $CCR5\Delta32$ do własnych komórek pacjenta - w badaniach klinicznych

BRIEF REPORT

Long-Term Control of HIV by $CCR5\Delta32/\Delta32$ Stem-Cell Transplantation

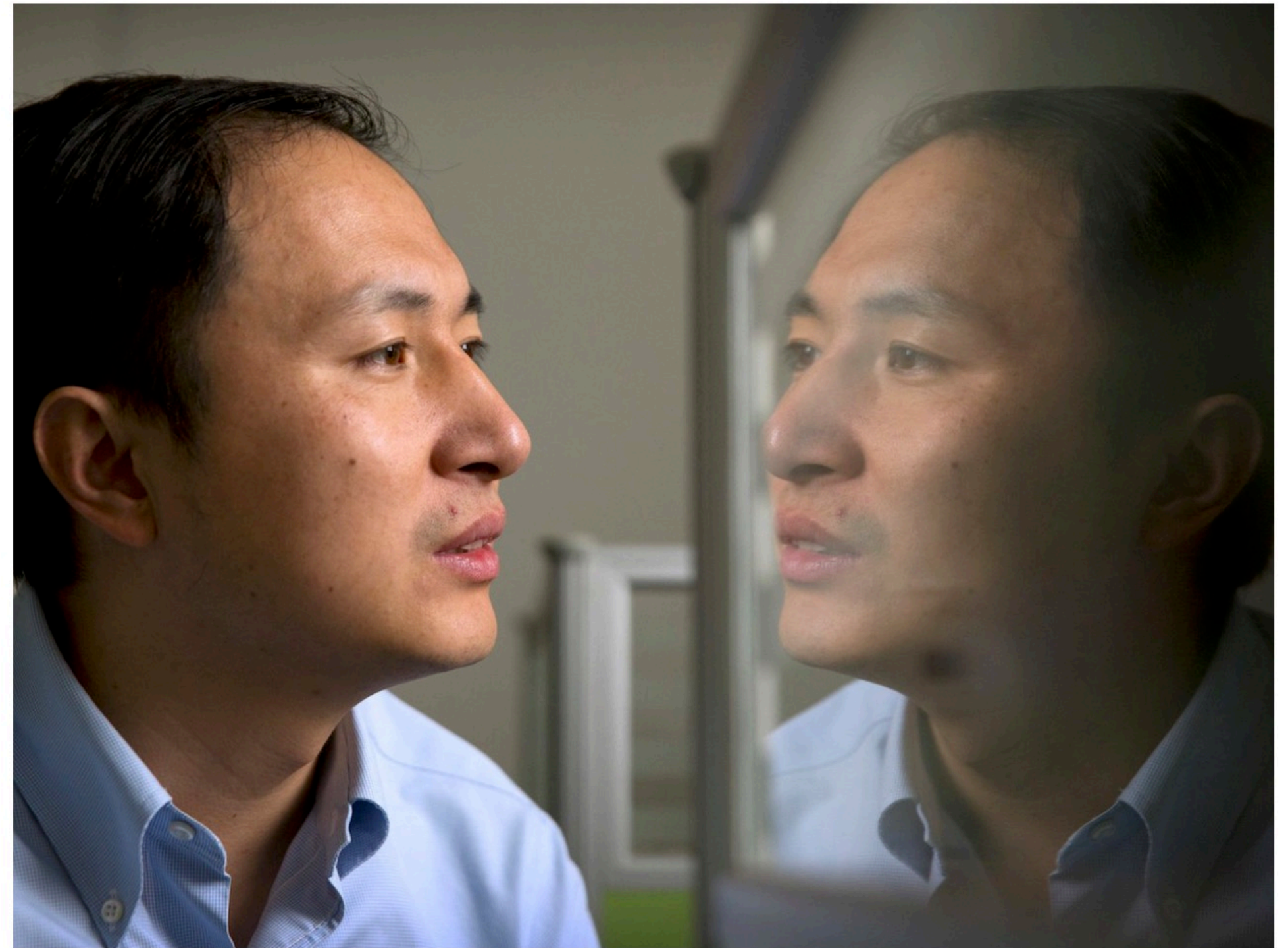
Gero Hütter, M.D., Daniel Nowak, M.D., Maximilian Mossner, B.S., Susanne Ganepola, M.D., Arne Müßig, M.D., Kristina Allers, Ph.D., Thomas Schneider, M.D., Ph.D., Jörg Hofmann, Ph.D., Claudia Kücherer, M.D., Olga Blau, M.D., Igor W. Blau, M.D., Wolf K. Hofmann, M.D., and Eckhard Thiel, M.D.

N Engl J Med 2009;360:692-8.



19.11.2018

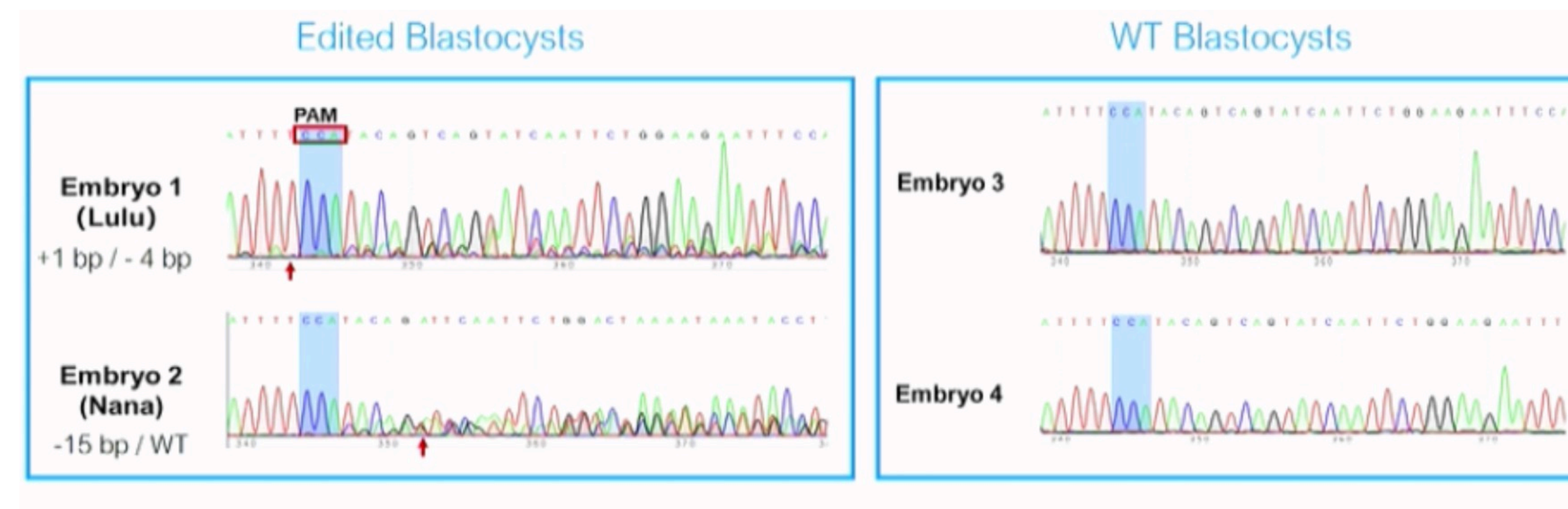
- He Jiankui ogłasza narodziny dzieci (dwóch dziewczynek), których genomy poddano edycji
- Cel: inaktywacja genu *CCR5* mająca chronić przed infekcją HIV
 - ojciec dziewczynek jest nosicielem
- Ogłoszenie poprzez wywiad prasowy i film na Youtube (!)
- Później prezentacja na konferencji
- Brak recenzowanej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



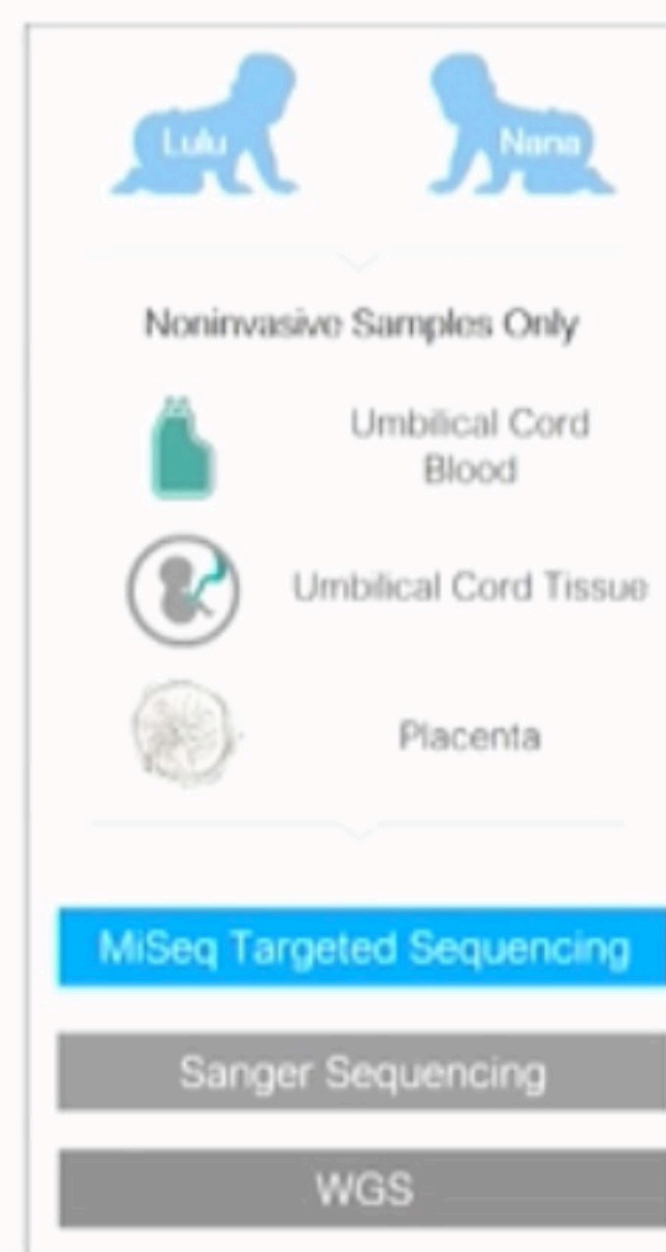
He Jiankui is reflected in a glass panel as he works at a computer at a laboratory in Shenzhen in southern China's Guangdong province. [Mark Schiefelbein/AP Photo](#)

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 $\Delta 15$, druga nienaruszona
 - Lulu: obie kopie $\Delta 4/+1$



CCR5 editing confirmed by deep sequencing after birth

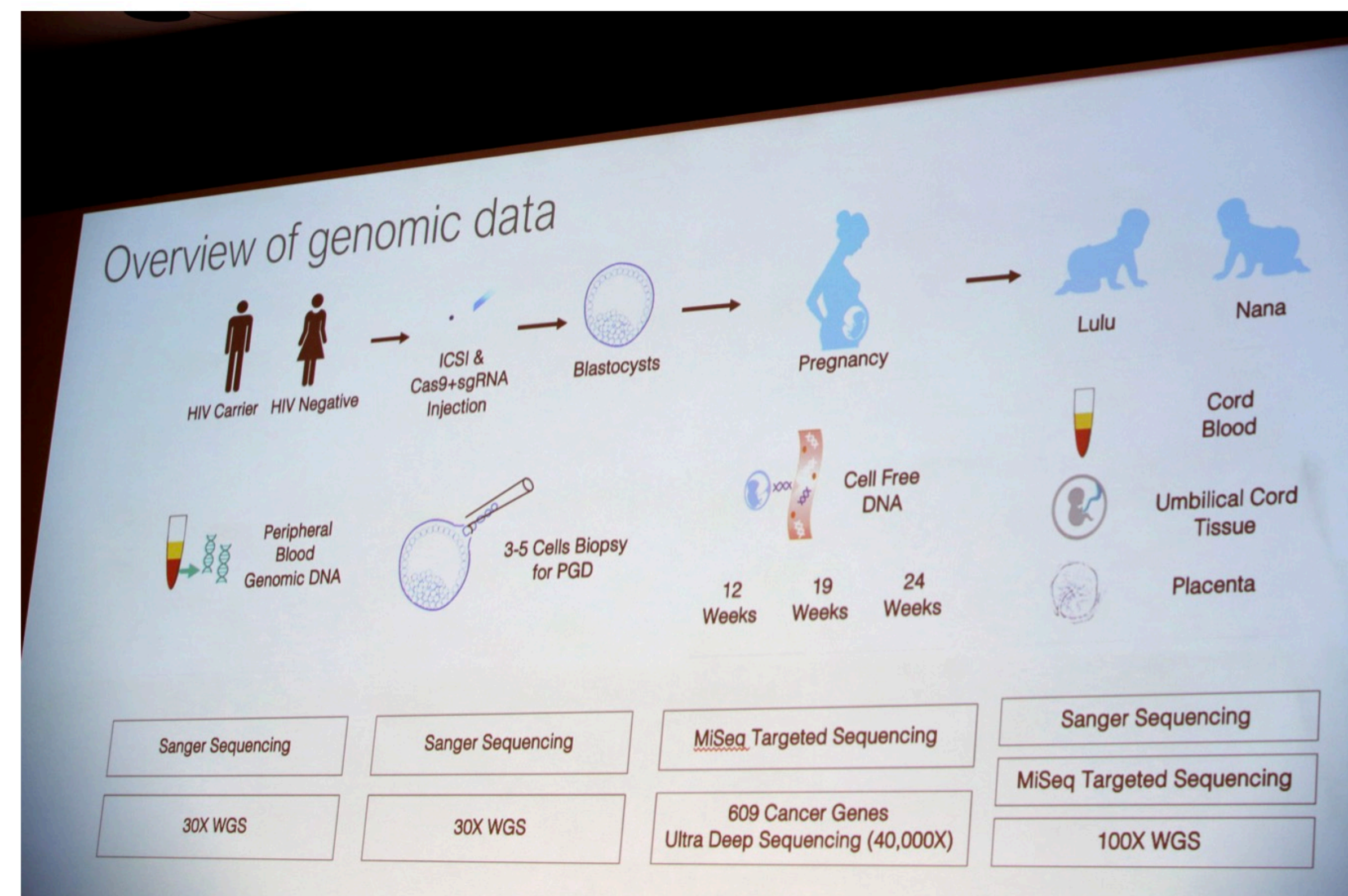


Editing Patterns Consistent between PGD, cfDNA

Reference genome	TCTCATTTCCATA...GTCAGTATCAATTCGG	WGS reads number at PGD	Miseq Allele frequency after birth	Genotype	
Father	TCTCATTTCCATA...GTCAGTATCAATTCGG	-	-	WT/WT	
Mother	TCTCATTTCCATA...GTCAGTATCAATTCGG	-	-	WT/WT	
Lulu	PGD	7/11	-	WT/-15bp	
	Cord blood	TC.....TCAGTATCAATTCGG	4/11	-	WT/-15bp
		TC.....TCAGTATCAATTCGG	-	50 19%	WT/-15bp
		TC.....TCAGTATCAATTCGG	-	49 81%	WT/-15bp
Umbilical cord	TC.....TCAGTATCAATTCGG	-	47 08%	WT/-15bp	
	TC.....TCAGTATCAATTCGG	-	52 92%	WT/-15bp	
	TC.....TCAGTATCAATTCGG	-	45 78%	WT/-15bp	
Placenta	TC.....TCAGTATCAATTCGG	-	54 22%	WT/-15bp	
	TC.....TCAGTATCAATTCGG	-	-	-	
	TC.....TCAGTATCAATTCGG	-	-	-	
Nana	PGD	7/9	-	-4bp/+1bp	
	Cord blood	TCTCATTTCCATA...GTCAGTATCAATTCGG	2/9	-	-4bp/+1bp
		TCTCATTTCCATA...GTCAGTATCAATTCGG	-	52 78%	-4bp/+1bp
		TCTCATTTCCATA...GTCAGTATCAATTCGG	-	47 22%	-4bp/+1bp
Umbilical cord	TCTCATTTCCATA...GTCAGTATCAATTCGG	-	51 32%	-4bp/+1bp	
	TCTCATTTCCATA...GTCAGTATCAATTCGG	-	48 69%	-4bp/+1bp	
	TCTCATTTCCATA...GTCAGTATCAATTCGG	-	51 00%	-4bp/+1bp	
Placenta	TCTCATTTCCATA...GTCAGTATCAATTCGG	-	48 64%	-4bp/+1bp	
	TCTCATTTCCATA...GTCAGTATCAATTCGG	-	-	-	

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

Inne wątpliwości

- Niejasny status zgody komisji etycznej (zgłoszenie po rozpoczęciu projektu, niepewna autentyczność dokumentów)
- Wątpliwości do do świadomej zgody uczestników - rodziców
- Niejasny tryb rekrutacji uczestników (przez grupę wsparcia nosicieli HIV)
- Niepewne jest to, czy władze szpitala i rząd Chin wiedziały o projekcie i go wspierały
- Niejasna dalsza sytuacja He Jiankui
 - wersja oficjalna: projekt zatrzymany, He zwolniony z pracy przebywa w areszcie domowym

Co z eksperymentem He?

- Ojciec dziewczynek jest nosicielem HIV
- Przy zapłodnieniu pozaustrojowym łatwo zapobiec przeniesieniu infekcji od ojca (płukanie spermy)
- Nawet gdy nosicielką jest matka, można zapobiegać przeniesieniu infekcji przez odpowiednie leczenie (ryzyko <1%)
- Profilaktyka dla osób żyjących z nosicielami dobrze znana
- **Lulu i Nana nie były znacząco zagrożone infekcją HIV!**

Paediatric and Perinatal Epidemiology 1995, 9, 1–29

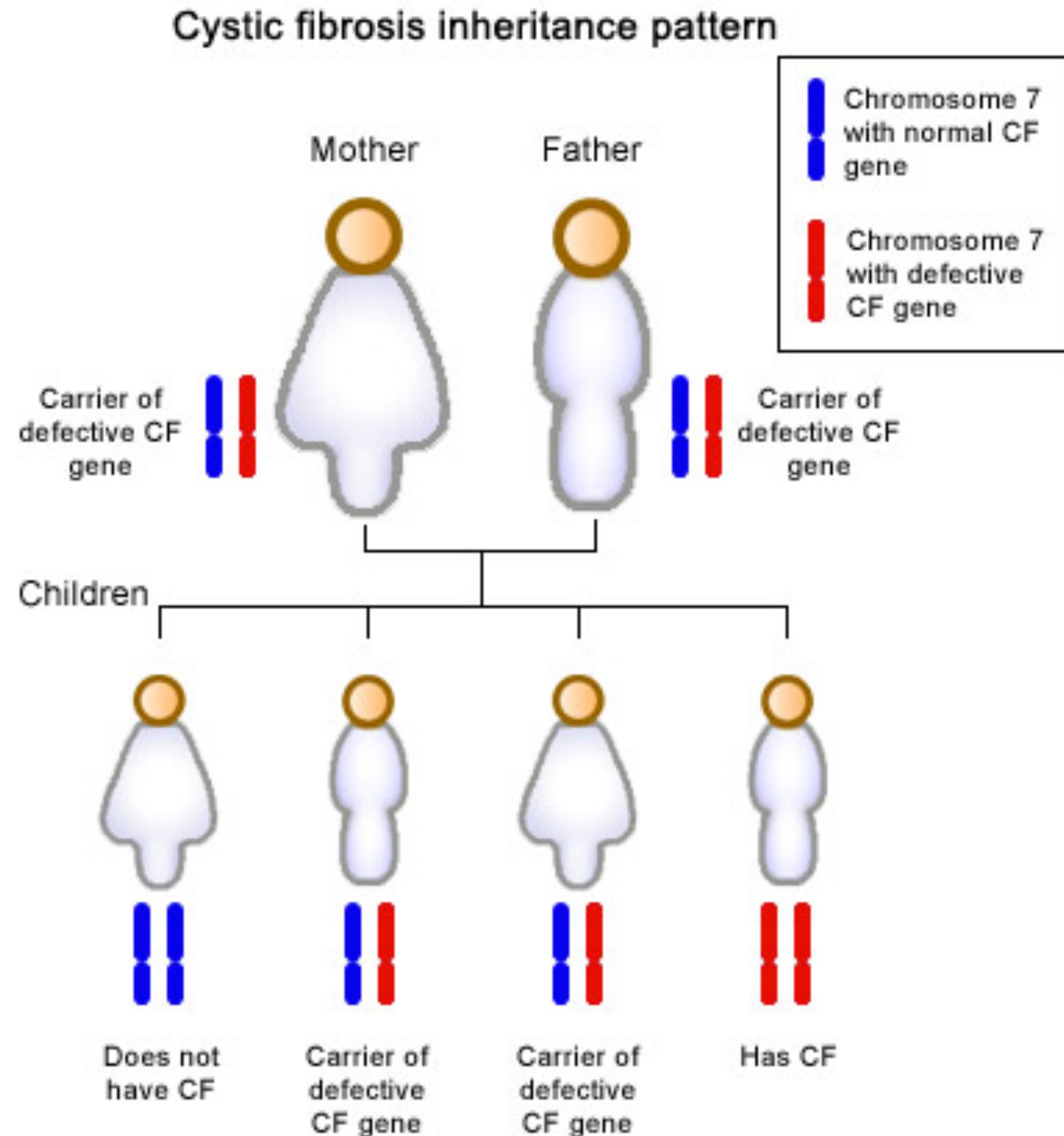
Review Article

Mother-to-infant HIV transmission: timing, risk factors and prevention

Louise Kuhn and Zena A. Stein
Columbia University, Division of Epidemiology, Gertrude H. Sergievsky Center and HIV Center for Clinical and Behavioral Studies, New York, USA

Zastosowania modyfikacji genomu

- Kliniczny pożytek z modyfikacji *CCR5* w zarodkach (jak w eksperymencie He) jest wątpliwy (można prościej zapobiec infekcji u noworodków)
- A co z chorobami genetycznymi?
- Cechy jednogenowe (jeden gen - jedna cecha) u człowieka to rzadkie choroby genetyczne (np. mukowiscydoza, choroba Huntingtona)
- Cechy zmienności prawidłowej i podatność na częste choroby zależą od oddziaływań setek genów i środowiska - **cechy wieloczynnikowe**



Choroby jednogenowe - czy konieczne redagowanie?

- Ryzyko urodzenia chorego dziecka zależy od rodziny i cechy, ale zwykle nie więcej niż 25% - 50%
- Zapłodnienie pozaustrojowe i diagnostyka preimplantacyjna pozwala uniknąć choroby
- Problemy etyczne takie same, jak przy ewentualnym redagowaniu genomu

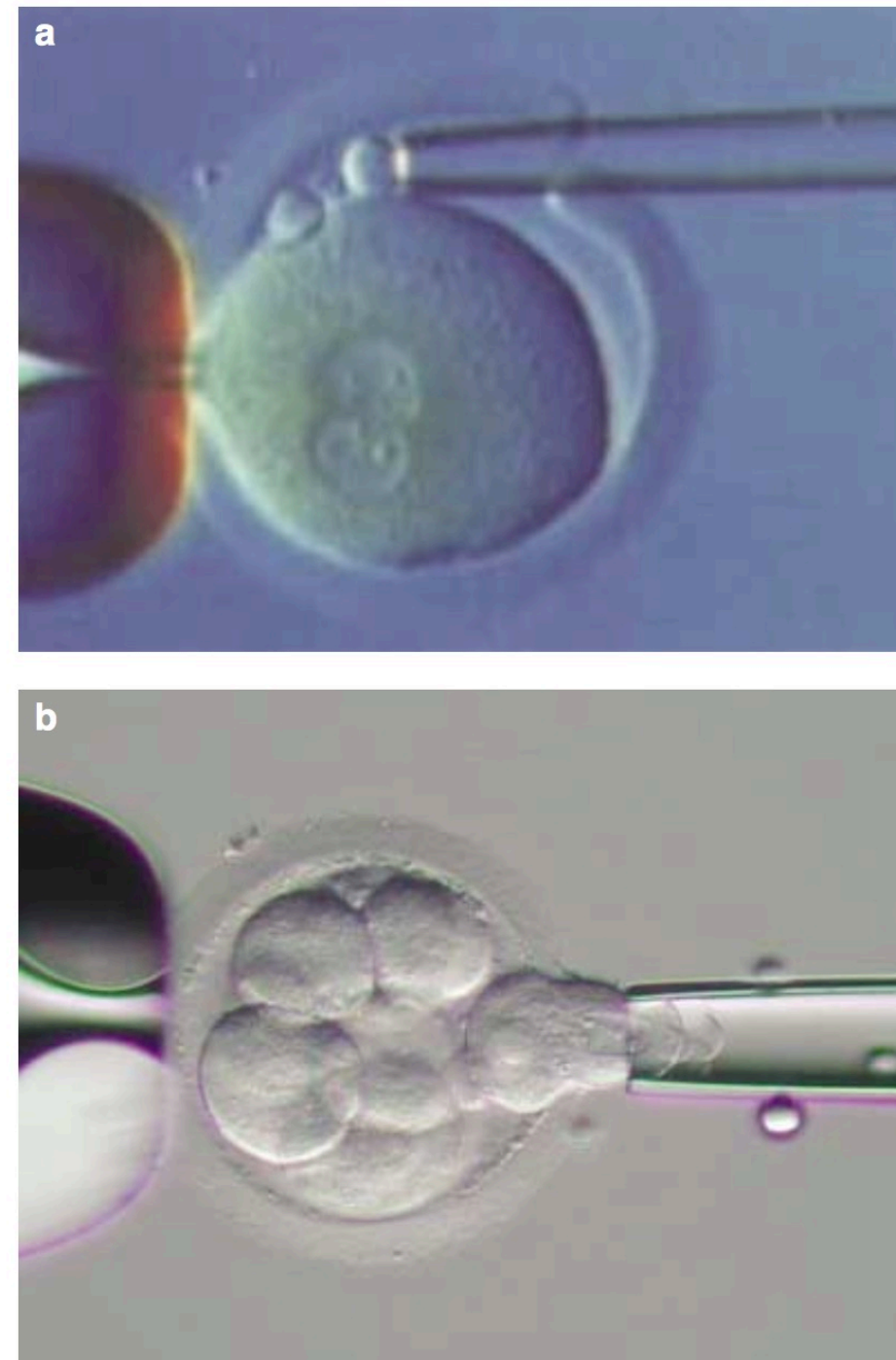
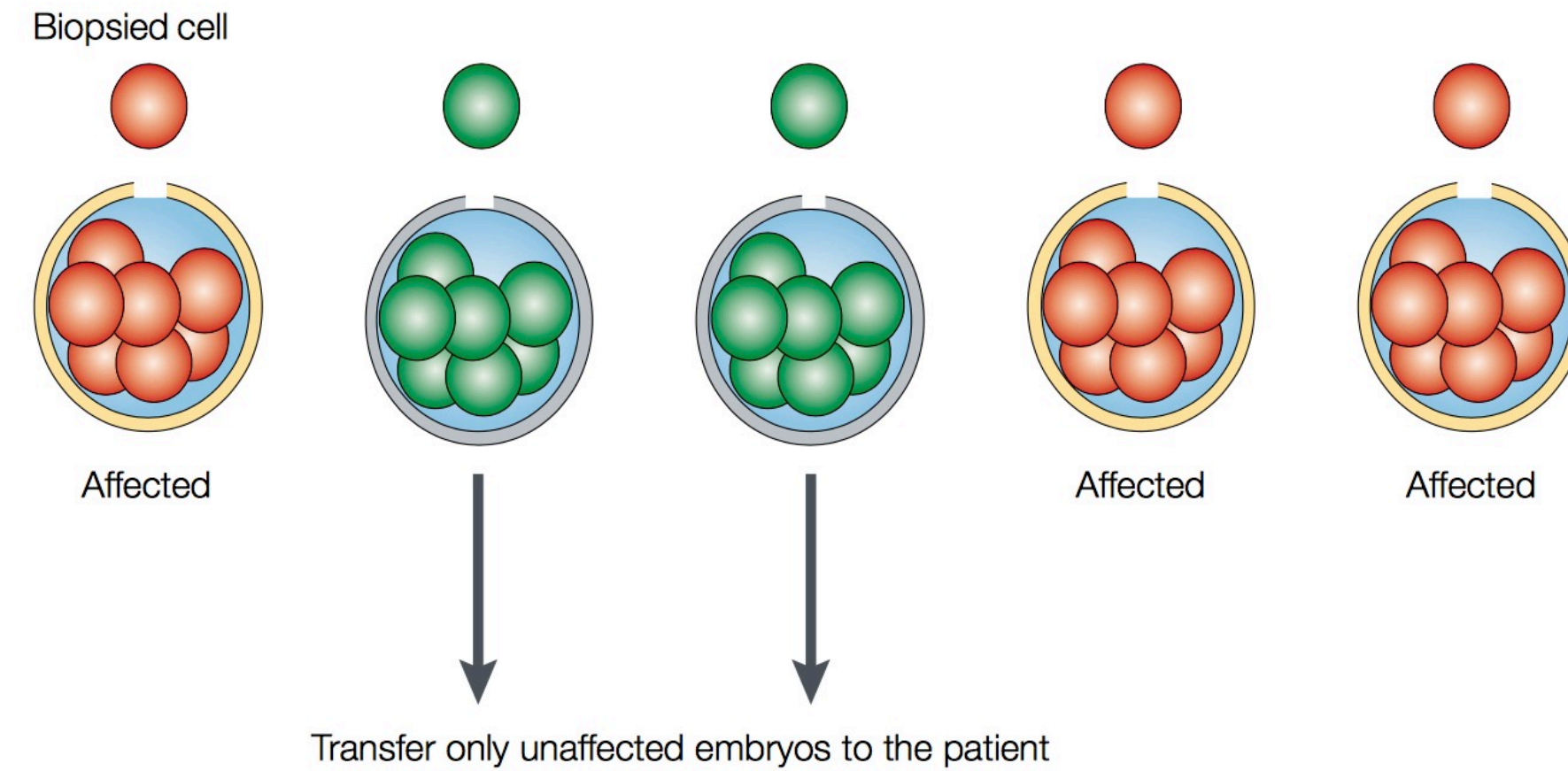


Figure 3 | Polar body and cleavage stage biopsies.

Kwestia modyfikacji

- Cechy zależne od pojedynczych genów mogą być łatwo modyfikowane za pomocą redagowania genomu
- Cechy wieloczynnikowe?
 - nie rozumiemy zależności między zmiennością pojedynczych elementów a fenotypem
 - konieczna skoordynowana modyfikacja setek genów jednocześnie
 - w przewidywalnej przyszłości - *science fiction*



Najbardziej obiecujące medyczne zastosowania redagowania genomu

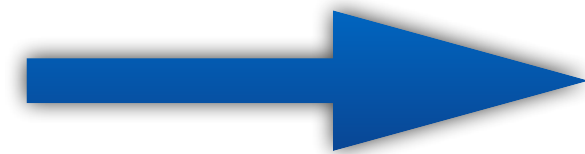
- Modyfikacje komórek somatycznych
- Korekta defektów w komórkach chorego, ale już po jego urodzeniu - redagowanie *ex vivo*
- Nie będzie przenoszona na kolejne pokolenia
- **Jako metoda badania genów!!**

Co dalej?

- Współczesna genetyka dobrze rozumie działanie pojedynczych genów
- Współczesna biotechnologia molekularna bardzo sprawnie manipuluje pojedynczymi genami

- A co z bardziej złożonymi, wieloczynnikowymi cechami?

Biologia systemów - wyzwanie



Inżynieria ewolucyjna



chow chow



poodle



schnauzer



bulldog

www.visualdictionaryonline.com



collie



German shepherd

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

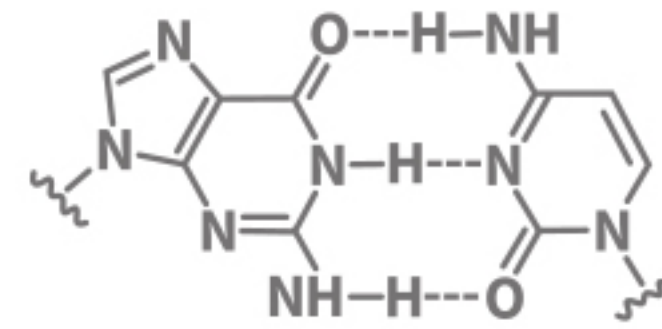
- Biologia syntetyczna - projektowanie nowych systemowych właściwości organizmów żywych

Biologia syntetyczna

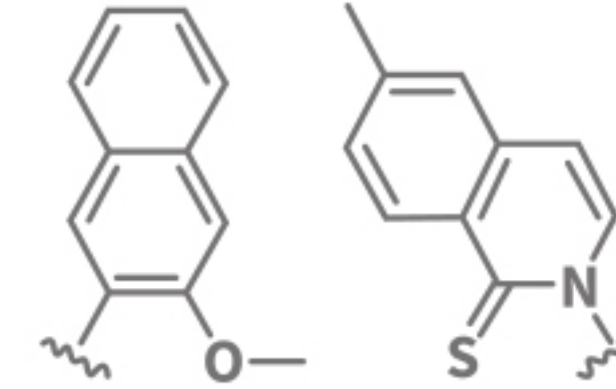
- Dwa oblicza biologii syntetycznej:
 - Odtworzenie właściwości układów żywych (właściwości emergentne) za pomocą cząsteczek niewystępujących w naturze
 - E. Kool, R. Rawls, 2000 – podejście chemików
 - Wykorzystanie elementów układów biologicznych do konstrukcji nowych systemów o zaprojektowanych właściwościach
 - W. Szybalski, B. Hobom, 1980 – inżynieria genetyczna

Nowe zasady DNA

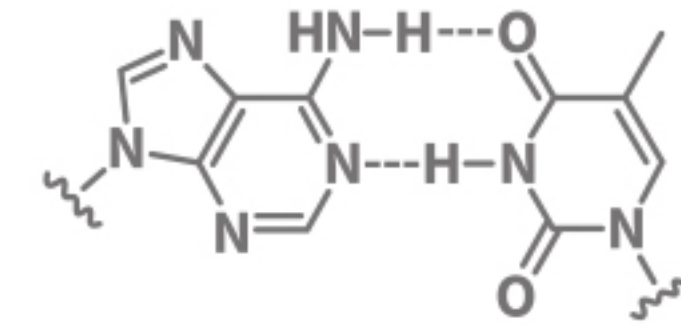
- Dodatkowa para zasad w DNA
- Utrzymuje się w genomie



GC



XY



AT

synthorx.com

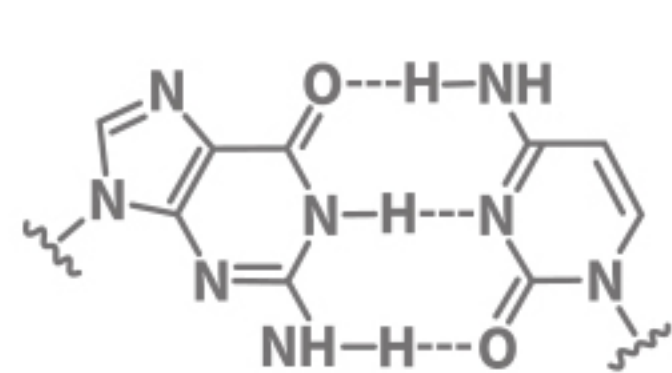
doi:10.1038/nature13314

A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet

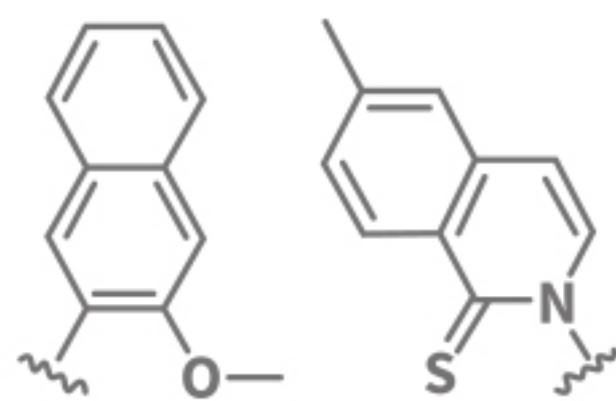
Denis A. Malyshev¹, Kirandeep Dhani¹, Thomas Lavergne¹, Tingjian Chen¹, Nan Dai², Jeremy M. Foster², Ivan R. Corrêa Jr² & Floyd E. Romesberg¹

Syntetyczna biochemia

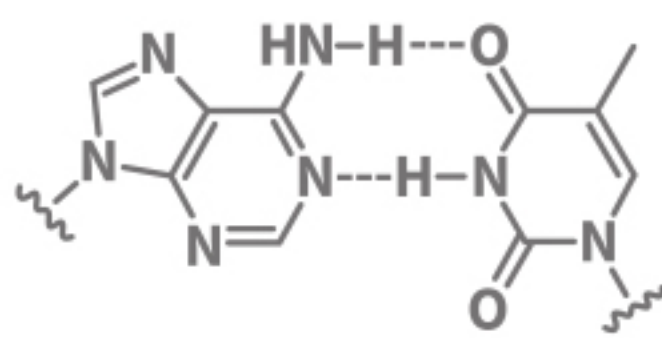
- Analogi cząsteczek biologicznych o nowych, rozszerzonych możliwościach
- DNA z dodatkowymi parami zasad
- Białka z nowymi aminokwasami



GC



XY

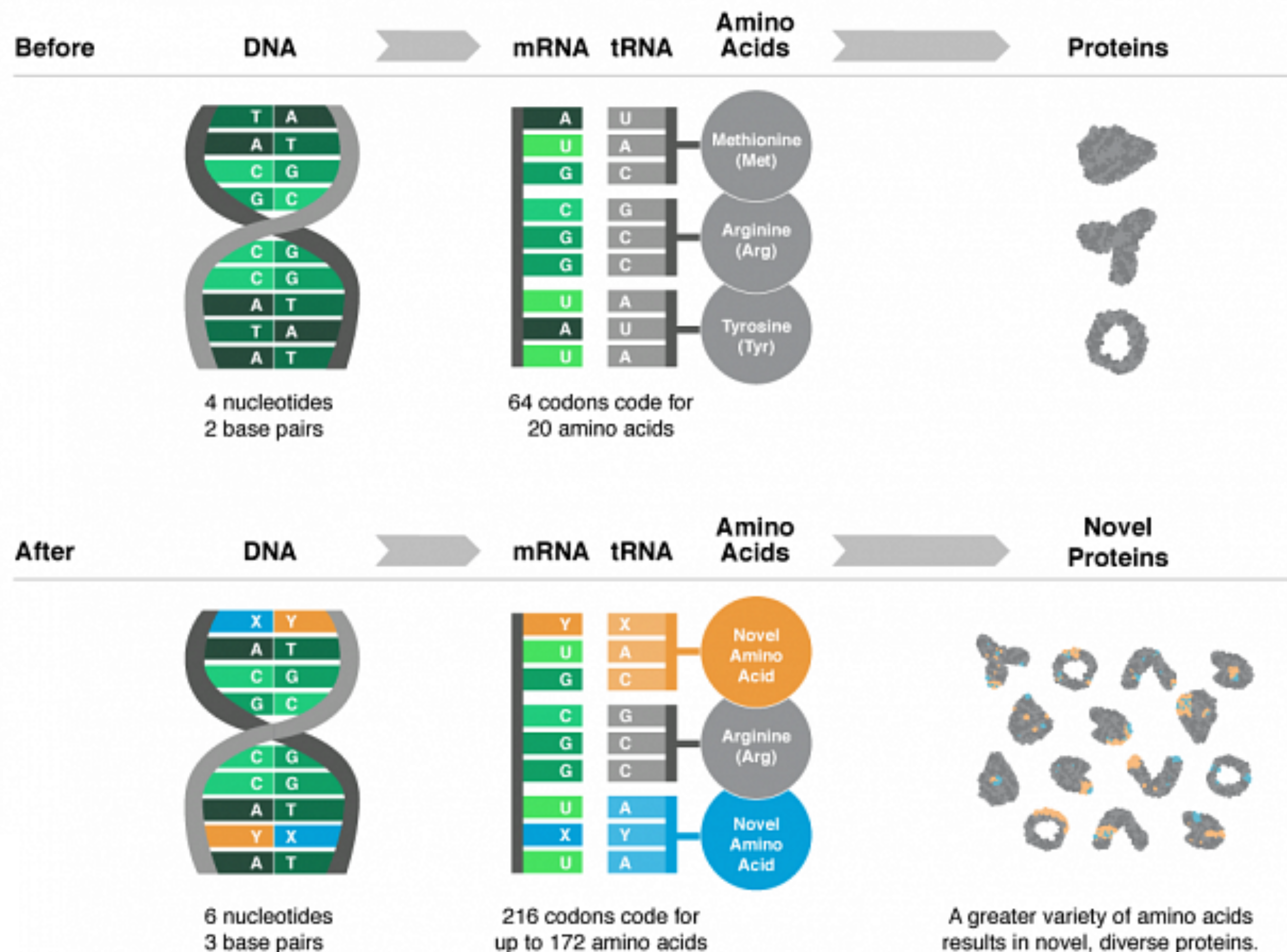


AT

©2015 Synthorx Inc.

Expanded Genetic Alphabet - In Action

By adding a synthetic base pair—nicknamed X and Y—to DNA, the number of possible amino acids a cell can use to construct proteins increases from 20 to 172. This opens new possibilities to add multiple novel amino acids to create novel and diverse proteins for improved enzymes, drugs, diagnostics, and vaccines.



<https://synthorx.com/>

Biologia syntetyczna

- Wykorzystanie elementów układów biologicznych do konstrukcji nowych systemów o zaprojektowanych właściwościach

Biologia syntetyczna a inżynieria genetyczna

- Inżynieria genetyczna - manipulacje pojedynczymi genami - zmiany pojedynczych cech
 - bakterie wytwarzające insulinę
 - rośliny broniące się przed szkodliwymi owadami (wytwarzaniem jednego białka pochodzenia bakteryjnego)
- Biologia syntetyczna - konstrukcje organizmów o nowych właściwościach (*“biokonstruktorystwo”* - *S. Lem*)

Stan współczesny

- Możliwe są coraz bardziej zaawansowane manipulacje poszczególnymi składnikami życia
 - syntetyczne peptydy i białka, lipidy, DNA, RNA
 - syntetyczne geny i genomy
 - proste syntetyczne replikatory
- Nie udało się jeszcze stworzyć układu żywego w całości, bez udziału elementów uzyskanych z istniejących układów żywych

Podjęcia biologii syntetycznej

- “od góry” (top-down) - głęboka modyfikacja istniejących systemów
 - minimalne genomy
 - syntetyczne genomy
 - przeprojektowane genomy
- Przykład - ortogonalny kod genetyczny

Manipulacje DNA

- DNA można manipulować w probówce, amplifikować, zmieniać itp.
- Ponownie wprowadzony do komórki funkcjonuje równie dobrze, jak “naturalny”



Synteza chemiczna DNA

- DNA można “skopiować” z istniejącego DNA lub RNA
- nie więcej niż 10-20 tys. nukleotydów na raz

- DNA można syntetyzować chemicznie
- Ograniczenie – nie więcej niż ~100 nukleotydów na raz

- Większe cząsteczki trzeba składać z tych małych fragmentów



Syntetyczne geny

- 1972, Khorana i wsp., gen kodujący tRNA drożdży, 77 par nukleotydów z 15 fragmentów (po 5-20 nt)
 - 1979 – pierwszy, który działał (207 pz)
- 1981, Edge i wsp., gen kodujący białko – interferon człowieka (514 pz), wprowadzony do bakterii

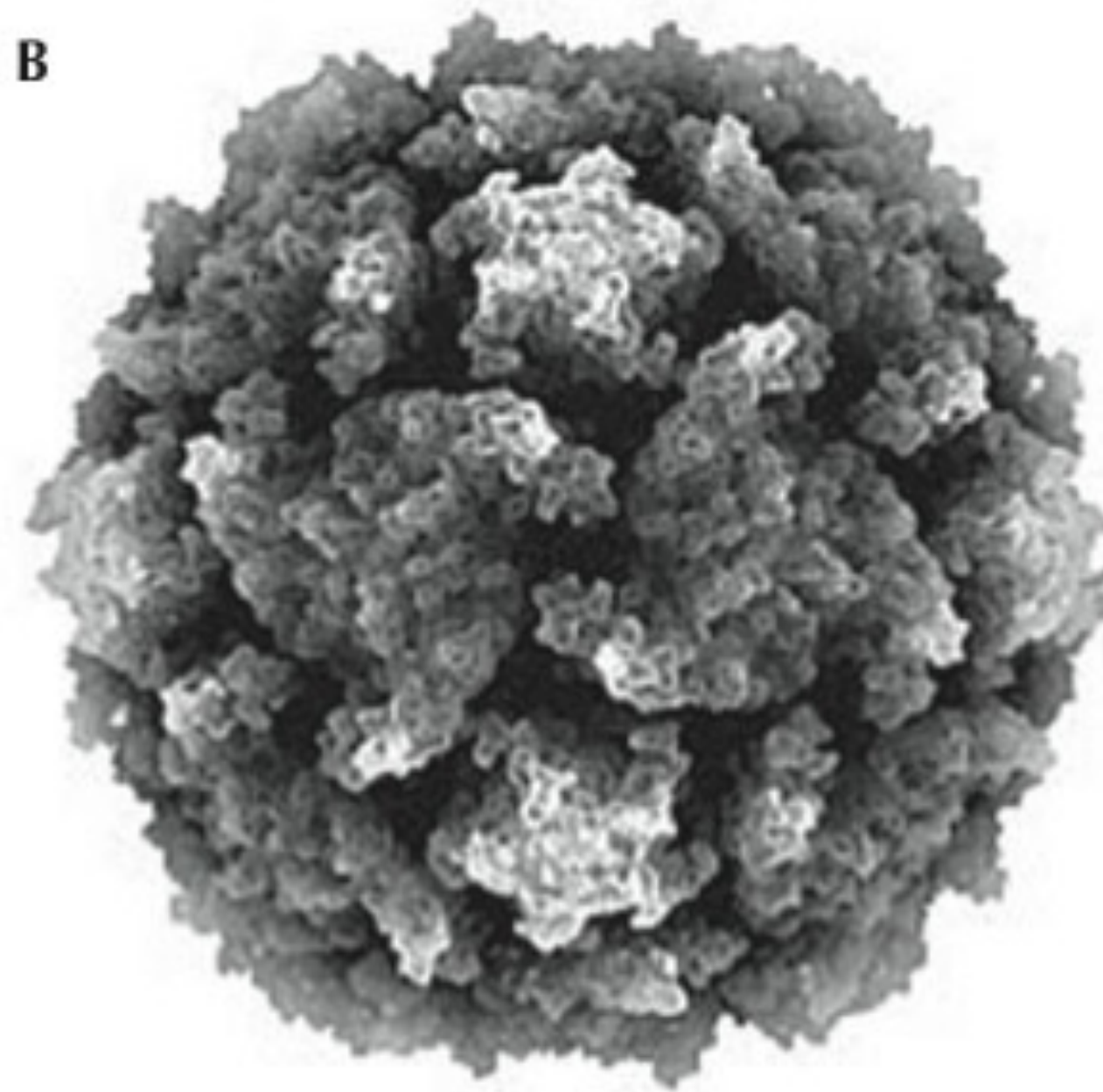
Pierwszy syntetyczny wirus

- 2002, Cello, Paul & Wimmer
- Matryca DNA wirusa polio złożona z syntetycznych fragmentów i przepisana na RNA
- Genom wprowadzony do komórek w hodowli namnaża się i produkuje cząstki wirusowe

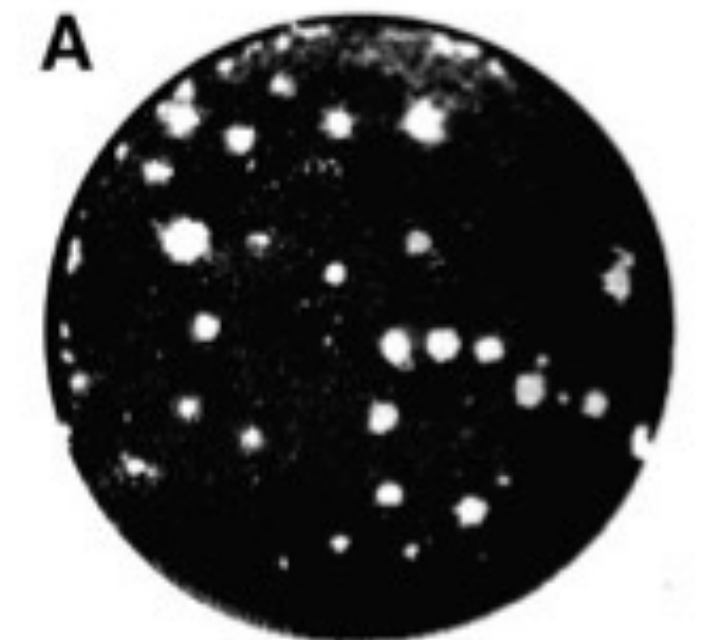
A

$C_{332,652} H_{492,388} N_{98,245} O_{131,196} P_{7,501} S_{2,340}$

B



A



B

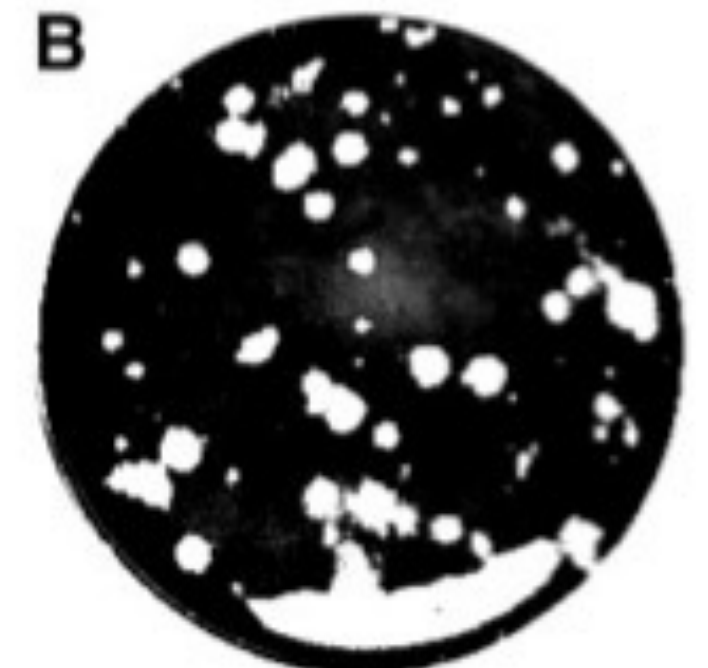



Fig 1 | Poliovirus and its empirical formula.

Syntetyczne wirusy

- Synteza genomów wirusowych stała się powszechnym narzędziem
- Odtwarzanie wirusów nieistniejących już w naturze

Grypa 1918

- Na podstawie sekwencji z tkanek ciał ofiar odtworzono sekwencję wirusa grypy epidemii 1918 (hiszpanki)
 - ~50 milionów ofiar śmiertelnych
- Odtworzono genom i uzyskano zdolne do infekcji wirusy (2005)

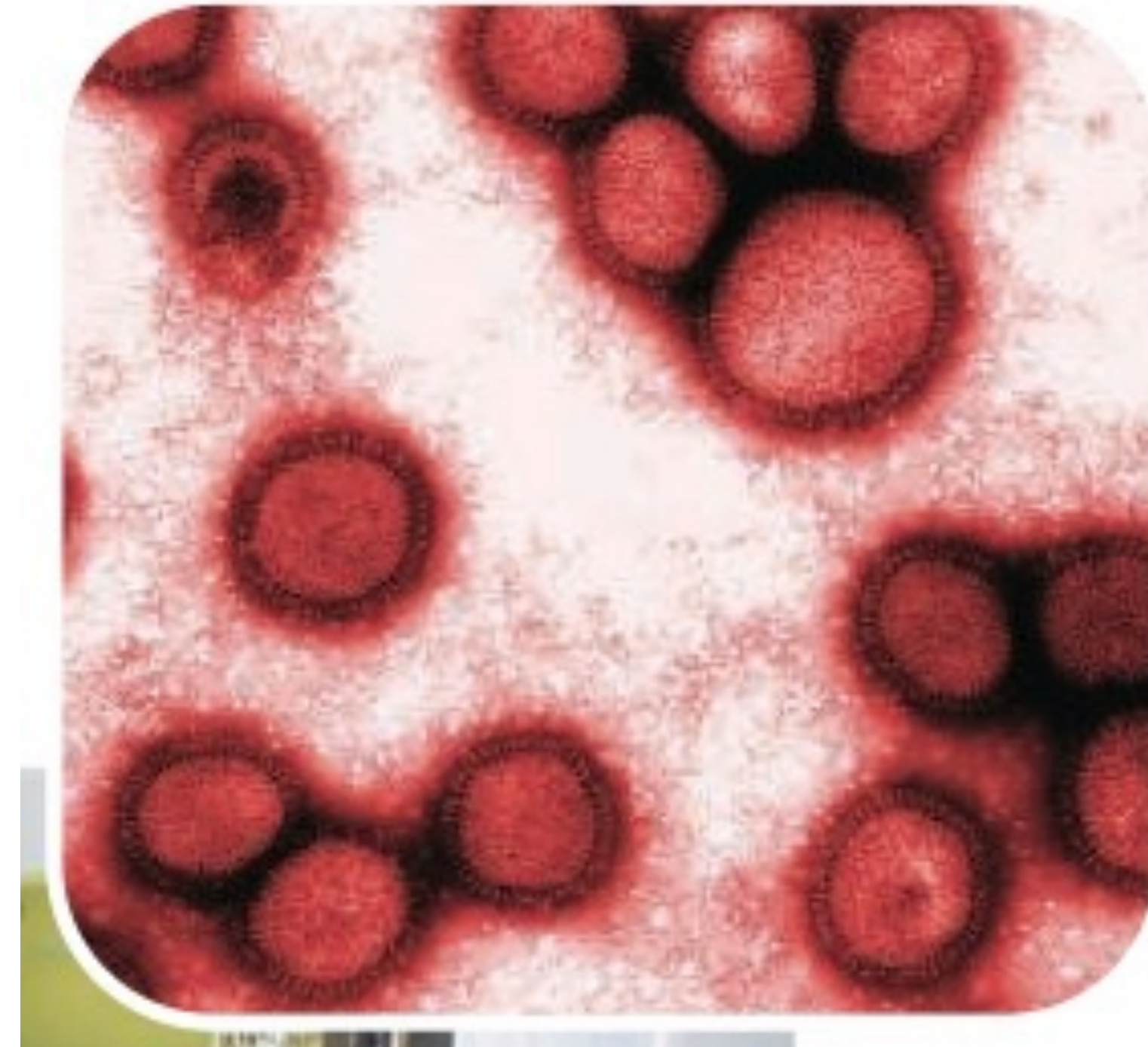


Characterization of the Reconstructed 1918 Spanish Influenza Pandemic Virus

Terrence M. Tumpey,^{1*} Christopher F. Basler,²
Patricia V. Aguilar,² Hui Zeng,¹ Alicia Solórzano,²
David E. Swayne,⁴ Nancy J. Cox,¹ Jacqueline M. Katz,¹
Jeffery K. Taubenberger,³ Peter Palese,² Adolfo García-Sastre²

1918 – tajemnice zabójcy

- Odtworzony wirus jest bardzo zjadliwy
- Infekuje i zabija myszy silniej niż współczesne wirusy grypy
- Wiadomo, który gen (i która cząsteczka) wirusa odpowiada za taką wirulencję – hemaglutynina (HA)
- Wiadomo, dlaczego ten wirus dobrze namnaża się nie tylko w komórkach płuc
- Wiadomo, że może infekować ptaki i prawdopodobnie pochodzi od ptasiego wirusa



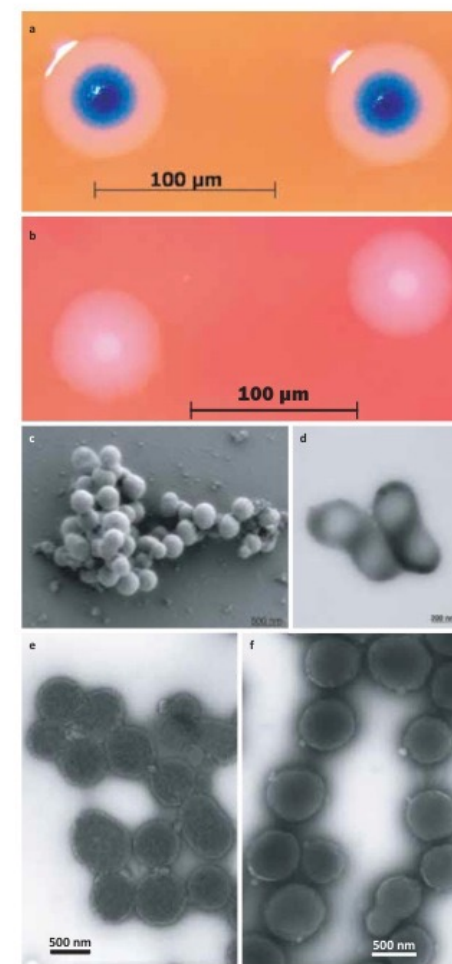
Grypa 1918 - bezpieczeństwo

- Projekt wzbudził wiele kontrowersji
- Zagrożenie, ale i korzyści
 - Lepiej rozumiemy, dlaczego pewne szczepy wirusa są bardziej niebezpieczne od innych
 - Wielu ludzi wciąż ma częściową odporność na wirusa 1918
 - Wiadomo, które leki na niego działają
 - W razie problemu łatwo będzie można stworzyć szczepionkę



Pierwszy syntetyczny funkcjonujący genom

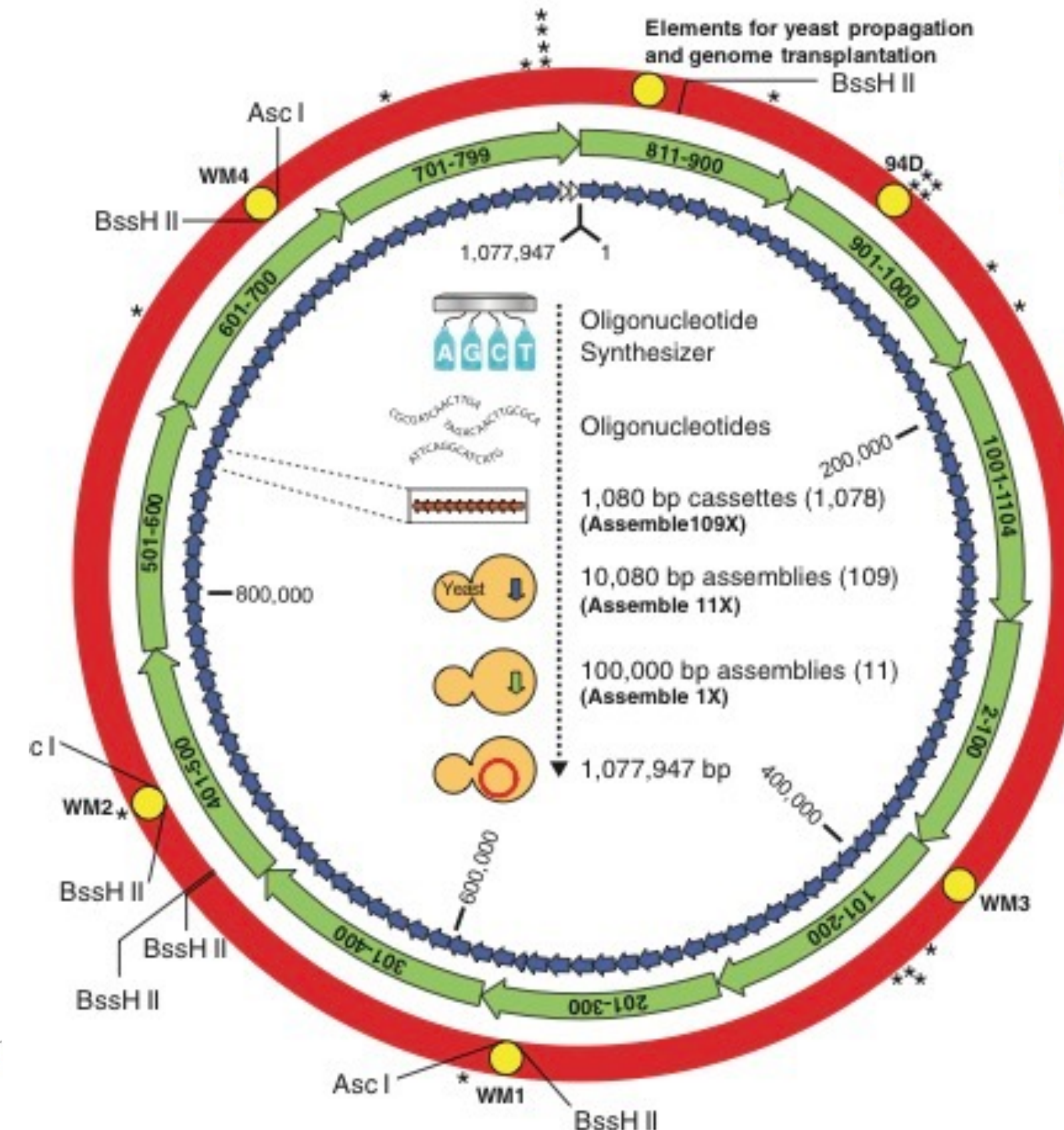
- 2010
- Syntetyczny genom *M. mycoides* JCVI-syn1.0 (~1 mln par zasad)
- Złożony z 1000 kaset po 1080 pz
- Składanie z pomocą drożdży



Gibson, D. G., J. I. Glass, C. Lartigue, V. N. Noskov, R.-Y. Chuang, M. A. Algire, G. A. Benders, M. G. Montague, L. Ma, M. M. Moodie, C. Merryman, S. Vashee, R. Krishnakumar, N. Assad-Garcia, C. Andrews-Pfannkoch, E. A. Denisova, L. Young, Z.-Q. Qi, T. H. Segall-Shapiro, C. H. Calvey, P. P. Parmar, C. A. Hutchison III, H. O. Smith, and J. C. Venter. 2010. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. Science, Published online May 20 2010.

Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome

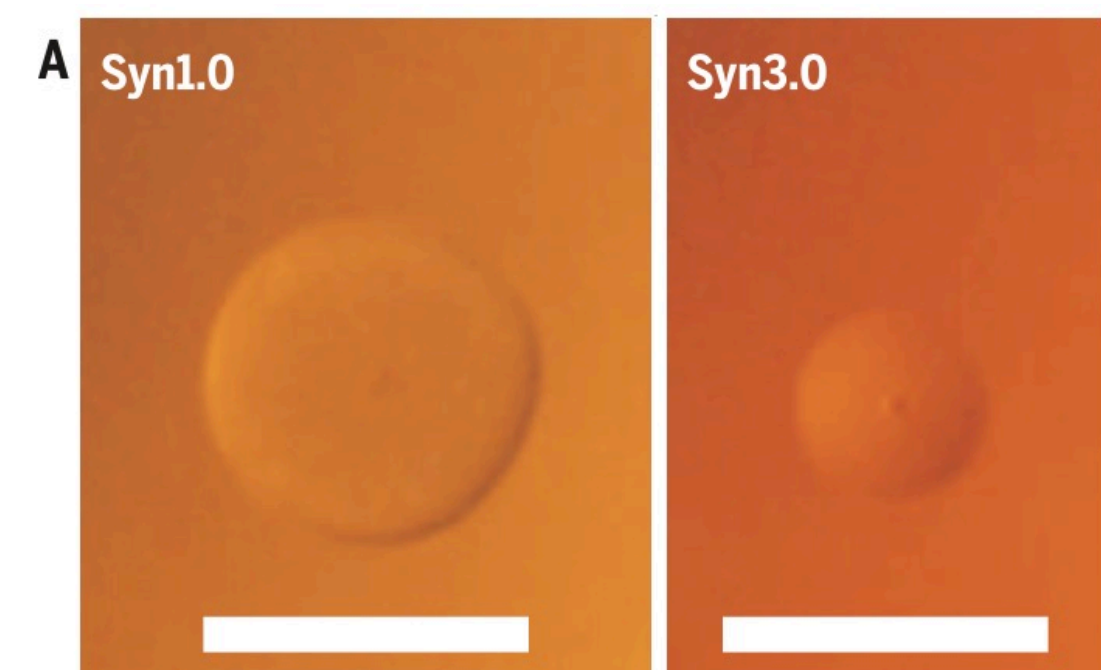
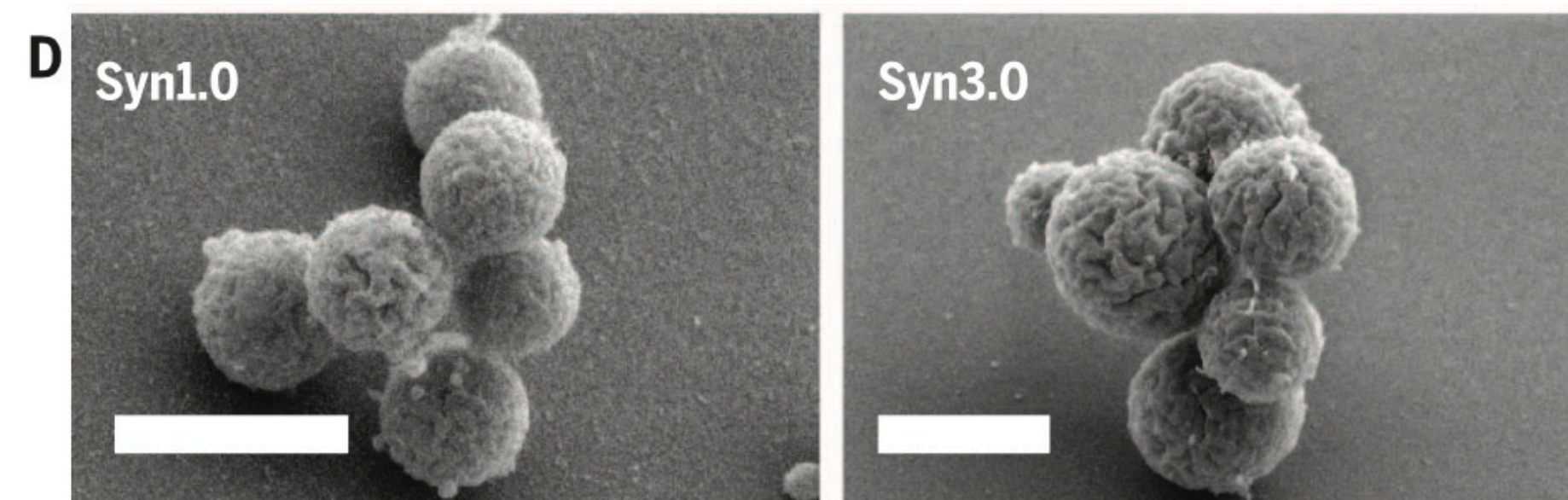
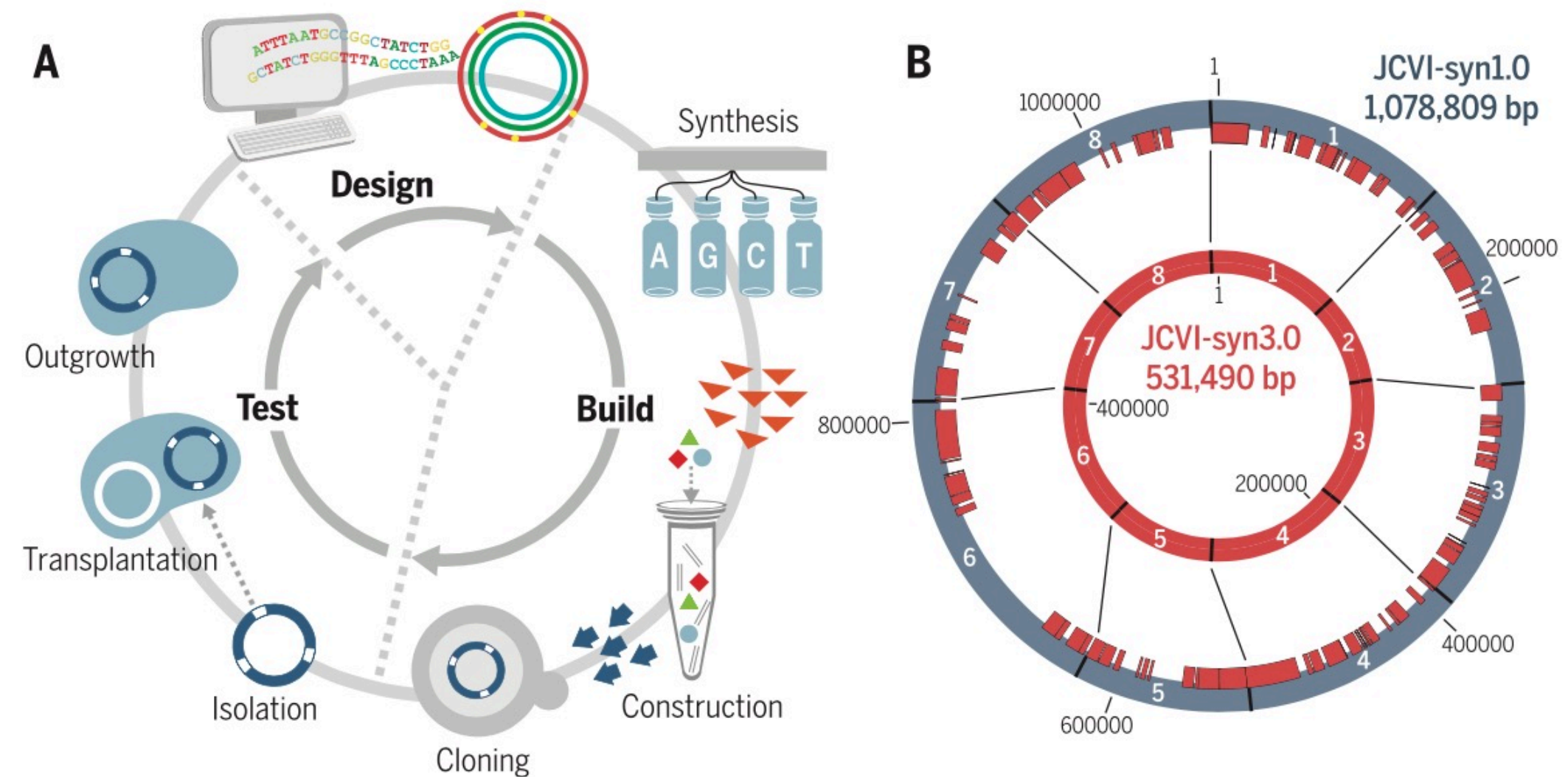
Daniel G. Gibson,¹ John I. Glass,¹ Carole Lartigue,¹ Vladimir N. Noskov,¹ Ray-Yuan Chuang,¹ Mikkel A. Algire,¹ Gwynedd A. Benders,² Michael G. Montague,¹ Li Ma,¹ Monzia M. Moodie,¹ Chuck Merryman,¹ Sanjay Vashee,¹ Radha Krishnakumar,¹ Nacyra Assad-Garcia,¹ Cynthia Andrews-Pfannkoch,¹ Evgeniya A. Denisova,¹ Lei Young,¹ Zhi-Qing Qi,¹ Thomas H. Segall-Shapiro,¹ Christopher H. Calvey,¹ Prashanth P. Parmar,¹ Clyde A. Hutchison III,² Hamilton O. Smith,² J. Craig Venter^{1,2*}



● “znaki wodne”

Kolejny krok - syntetyczny genom minimalny

- Na podstawie JCVI-syn1.0
- Usunięte geny, które nie są niezbędne do życia (w warunkach laboratorium)
- 531 kb, 473 geny

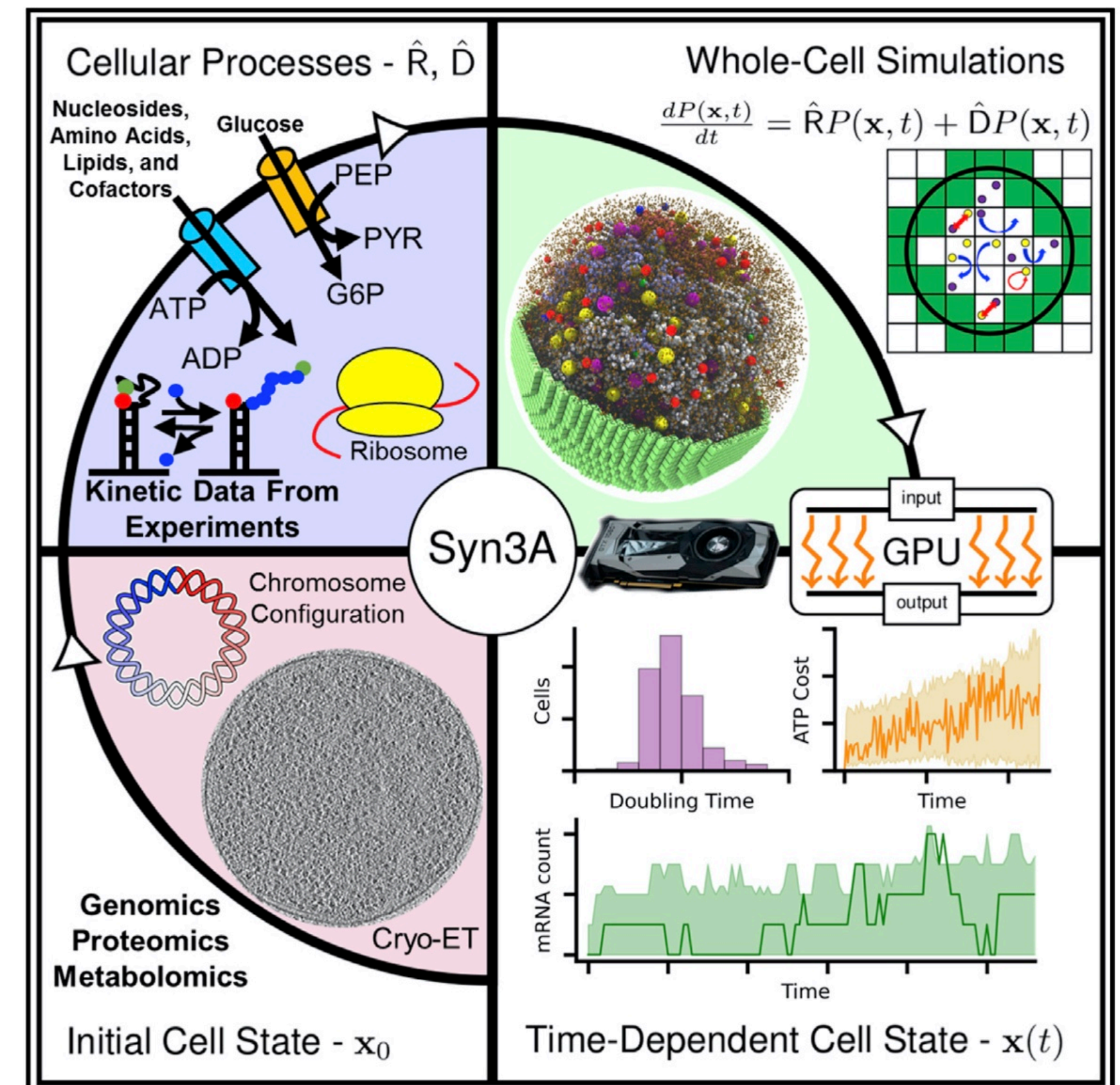


Design and synthesis of a minimal bacterial genome

Clyde A. Hutchison III,^{*,†} Ray-Yuan Chuang,[†] Vladimir N. Noskov, Nacyra Assad-Garcia, Thomas J. Deerinck, Mark H. Ellisman, John Gill, Krishna Kannan, Bogumil J. Karas, Li Ma, James F. Pelletier, Zhi-Qing Qi, R. Alexander Richter, Elizabeth A. Strychalski, Lijie Sun, Yo Suzuki, Billyana Tsvetanova, Kim S. Wise, Hamilton O. Smith, John I. Glass, Chuck Merryman, Daniel G. Gibson, J. Craig Venter*

Modelowanie

- Minimalne komórki dają się modelować matematycznie
- Ale nie jest to model pozwalający na powiązanie zmienności genotypu ze zmiennością fenotypu!

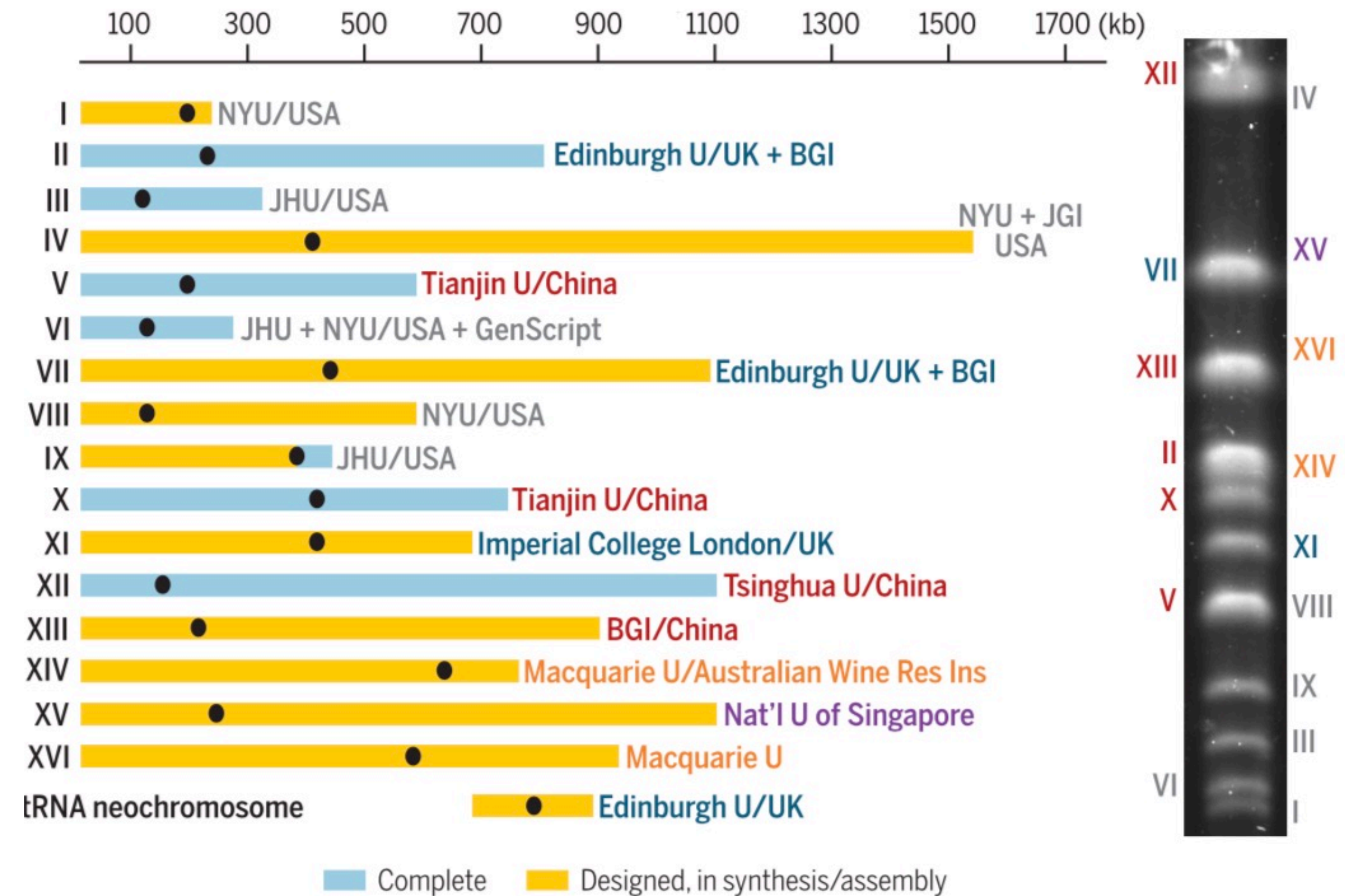
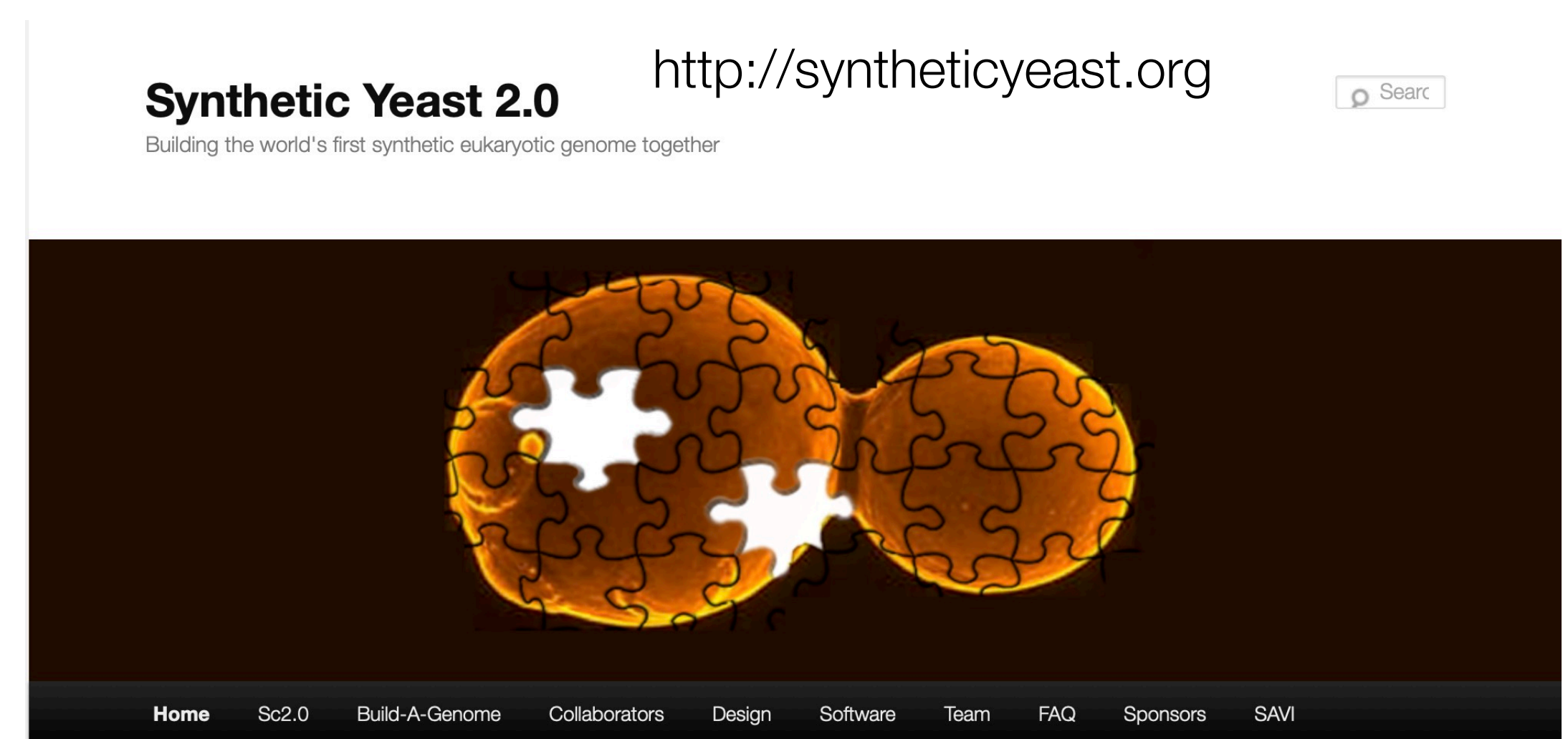


Highlights

- 3D spatial resolution of a fully dynamical whole-cell kinetic model
- Detailed single-reaction, single-cell accounting of time-dependent ATP costs
- Genome-wide mRNA half-lives emerge from length-dependent kinetics and diffusion
- Connections among metabolism, genetic information, and cell growth are revealed

Drożdże 2.0 - syntetyczny genom eukariotyczny

- Projekt stworzenia syntetycznego genomu *S. cerevisiae*



Design of a synthetic yeast genome

Sarah M. Richardson,^{1,2*} Leslie A. Mitchell,^{2,3} Giovanni Stracquadanio,^{1,2,4} Kun Yang,^{1,2} Jessica S. Dymond,^{2,†} James E. DiCarlo,^{2,‡} Dongwon Lee,^{1,§} Cheng Lai Victor Huang,² Srinivasan Chandrasegaran,⁵ Yizhi Cai,^{2,6} Jef D. Boeke,^{2,3,#} Joel S. Bader^{1,2,#}

Richardson *et al.*, *Science* **355**, 1040–1044 (2017)

Podójście “od dołu” (bottom-up)

- Repertuar elementów i podstawowych obwodów
- Matematyczny model elementów
- Projektowanie i skłádanie systemów z elementów (cegiełek)

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial [mRNA_{cl}]}{\partial t} = \frac{p_{cl} \max \text{transcription rate} \times K_{mLacI}^n}{K_{mcl}^n + [LacProtein]^n} - \text{degradation rate}[clmRNA] \\ \frac{\partial [Protein_{cl}]}{\partial t} = \max \text{translation rate}[clmRNA] - \text{degradation function} \\ \text{degradation function}[clProtein] \begin{cases} \text{degradation rate}[clProtein] & \text{if } T < 40C \\ \text{current } cl \text{ protein concentration} & \text{if } T \geq 42C \end{cases} \end{array} \right.$$

When LacI dependent promoter is active:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial [mRNALacI]}{\partial t} = \frac{p_{Lac} \max \text{transcription rate} p_{Lac} \times K_{mcl}^n}{K_{mcl}^n + [clProtein]^n} - \text{degradation rate}[LacImRNA] \\ \frac{\partial [LacIProtein]}{\partial t} = \max \text{translation rate}[LacImRNA] - \text{degradation rate}[LacIProtein] \\ \frac{\partial [IPTG]}{\partial t} = -kb[LacI][IPTG] + kd[IPTGLacIcomplex] \\ \frac{\partial [IPTGLacIcomplex]}{\partial t} = kb[LacI][IPTG] - kd[IPTGLacIcomplex] \end{array} \right.$$



Obwody biologiczne

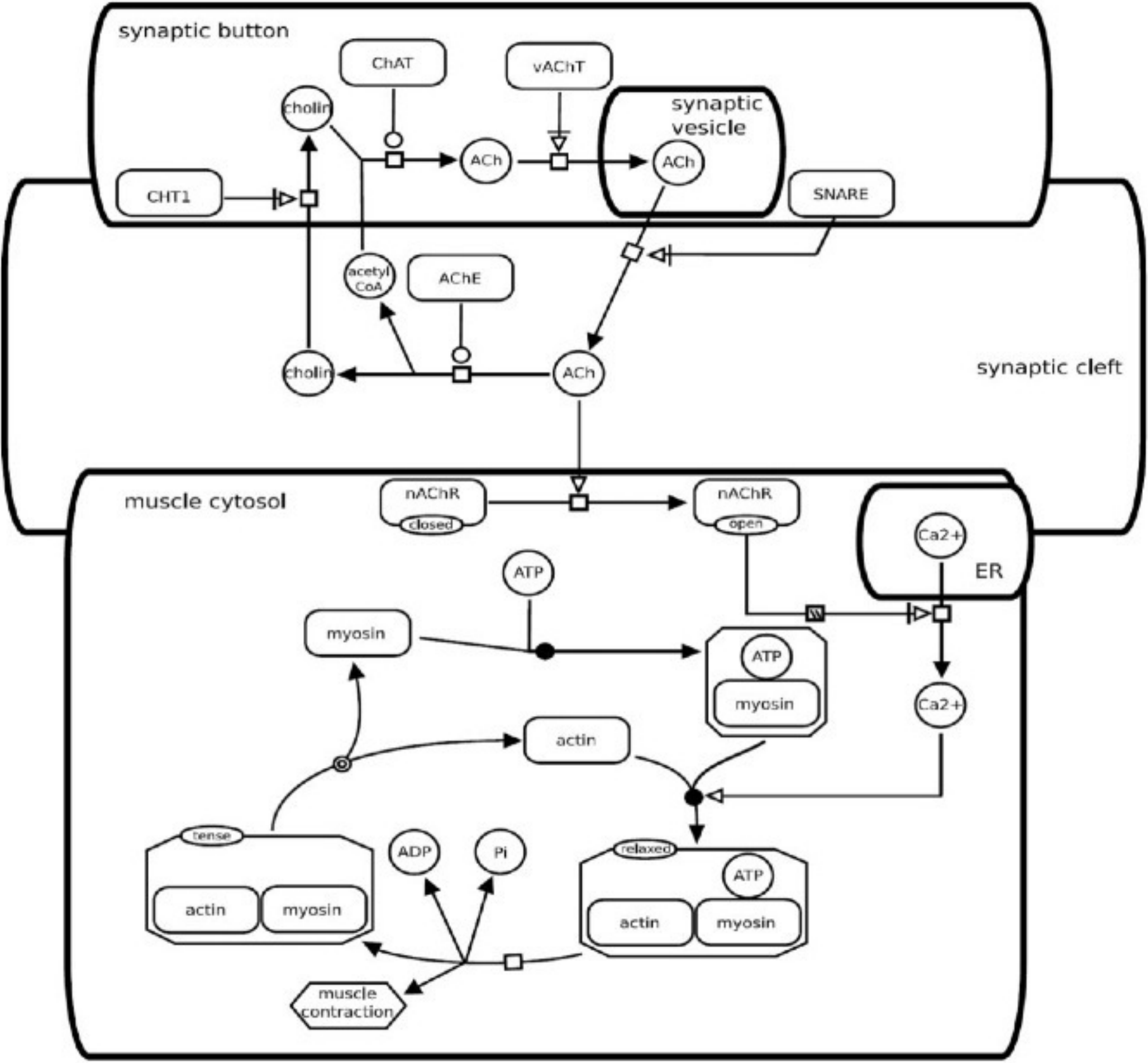
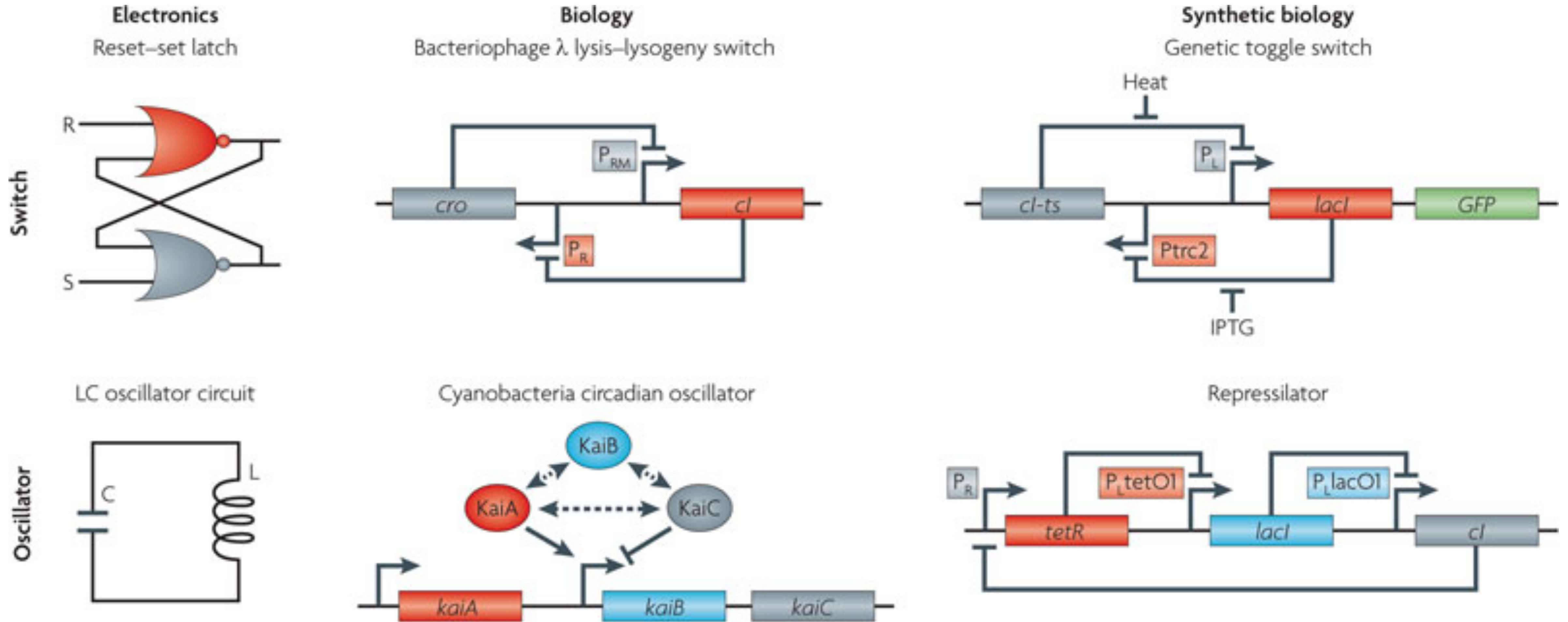


Figure 3: SBGN network example. of inter-cellular signaling near the neuromuscular junction [22, 23]. Biological

Alterovitz G, Muso T, Ramoni MF. The challenges of informatics in synthetic biology: from biomolecular networks to artificial organisms. *Brief Bioinform.* 2010 Jan;11(1):80-95

Metafora obwodu



Biologia syntetyczna *open source*

- Etos otwartości i wymiany informacji w biologii syntetycznej silniejszy, niż w tradycyjnej biologii molekularnej
- OpenWetware



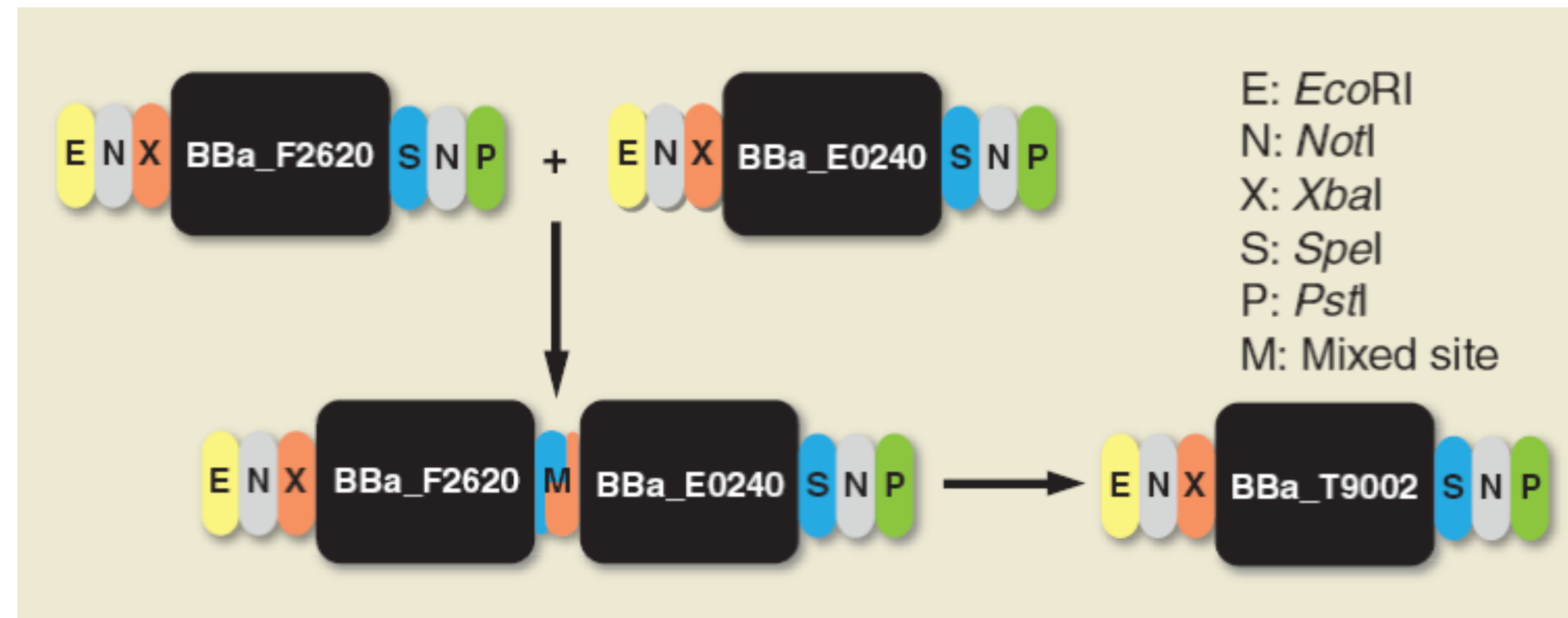
OpenWetWare is an effort to promote the sharing of information, know-how, and wisdom among researchers and groups who are working in biology & biological engineering. **Learn more about us.** **If you would like edit access, would be interested in helping out, or want your lab website hosted on OpenWetWare, please join us.** OpenWetWare is managed by the **BioBricks Foundation** [↗](#).

Format BioBrick



BBa standard:

- prefix: EcoRI/NotI/XbaI
- suffix: BcuI/NotI/PstI



http://partsregistry.org/Main_Page

iGEM

- International Genetically Engineered Machine competition (iGEM)
- Studenci i doktoranci



Synthetic Biology
based on standard parts

“What I cannot build I cannot understand”

– Richard Feynman

Podsumowanie

- Nowe techniki manipulowania genomami otwierają możliwość łatwego wprowadzania zmian w różnych organizmach
- Biologia systemów i biologia syntetyczna podejmują wyzwanie zrozumienia i konstruowania coraz bardziej złożonych układów

Podsumowanie

- Genomika to **nie jest** genetyka i biologia, tylko na większą skalę
- Nie osiągniemy dalszego znaczącego postępu w zrozumieniu genetyki posługując się dotychczasowym językiem biologii (opisowy + statystyka)
- Konieczne jest stworzenie teoretycznych podstaw systemów biologicznych
- Biologią musi stać się bardziej podobna do fizyki
 - ale nie wystarczy redukcja do współcześnie rozumianej fizyki



*“I think the next century
will be the century
of complexity.”*

Stephen Hawking
January 23, 2000`