

Podstawy genetyki II

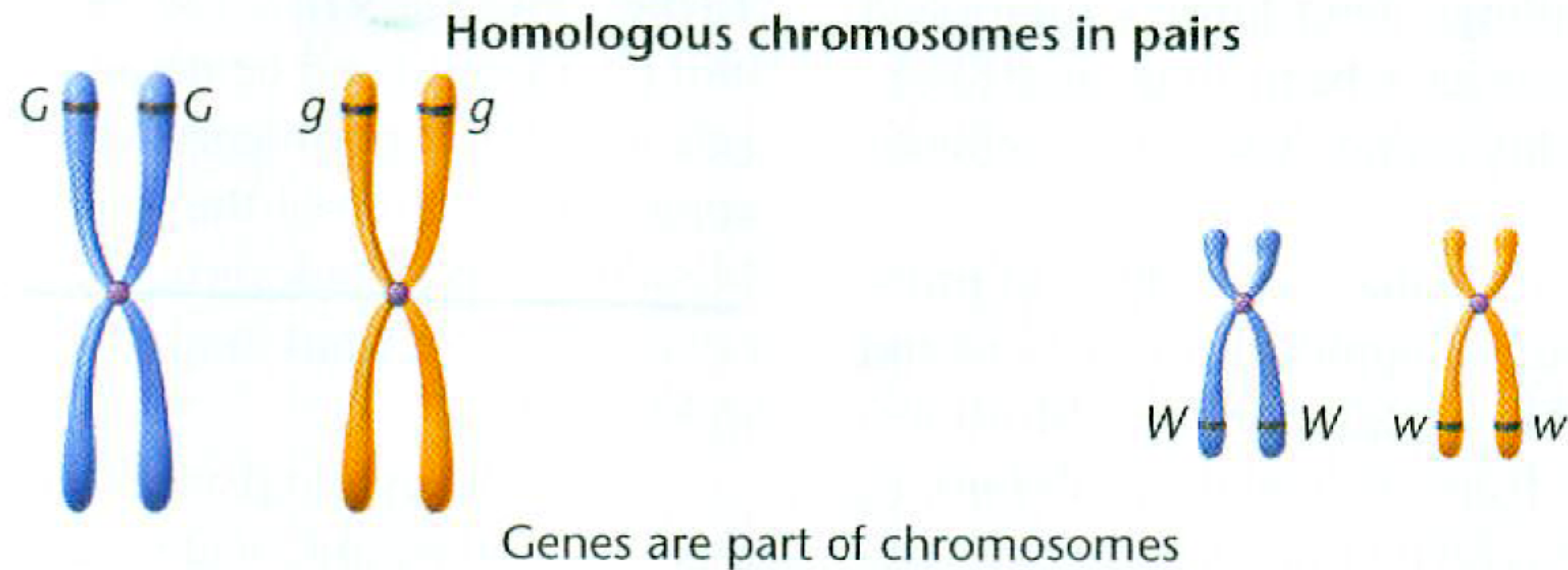
Metody badawcze i strategie genetyki i genomiki.

Klasyczne metody genetyki

Geny i chromosomy

Dwa allele genu – dwa chromosomy homologiczne u organizmów diploidalnych

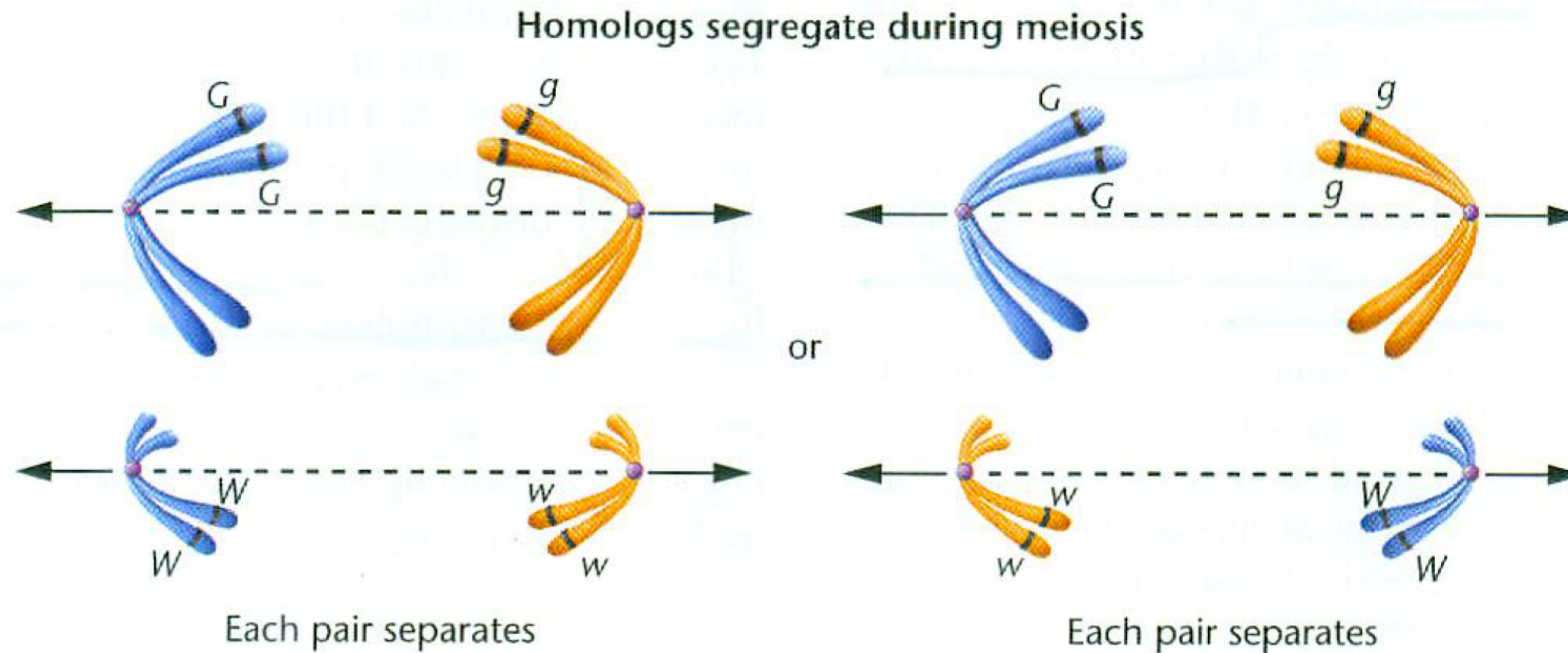
(a) Unit factors in pairs (first meiotic prophase)



Geny i chromosomy

Segregacja alleli do gamet (I prawo Mendla) koreluje z zachowaniem chromosomów podczas mejozy

(b) Segregation of unit factors during gamete formation (first meiotic anaphase)

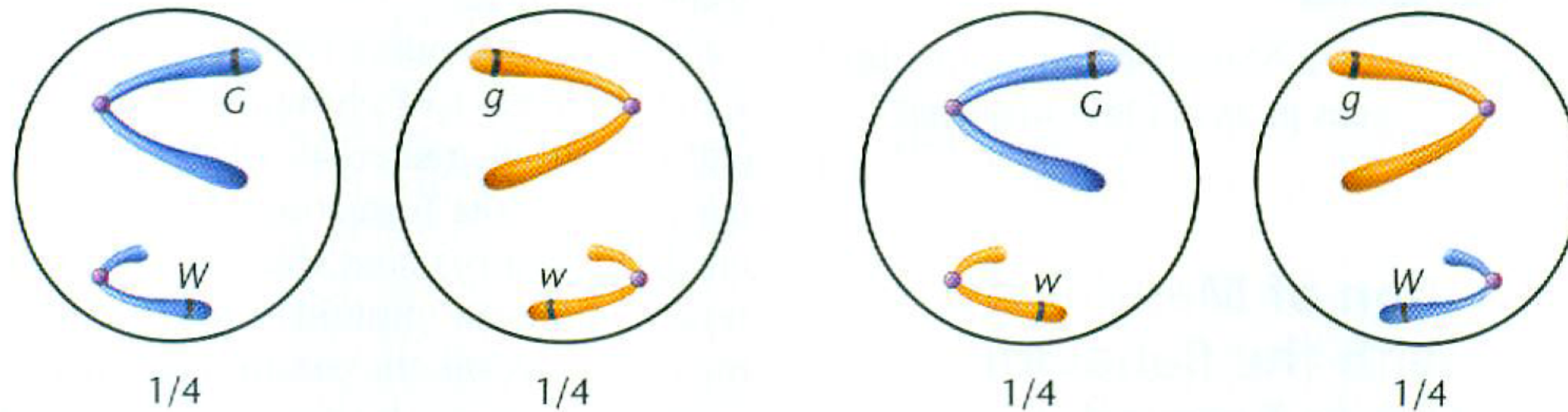


Geny i chromosomy

Niezależne dziedziczenie alleli różnych genów – niezależna segregacja różnych chromosomów

(c) Independent assortment of segregating unit factors (following many meiotic events)

Nonhomologous chromosomes assort independently

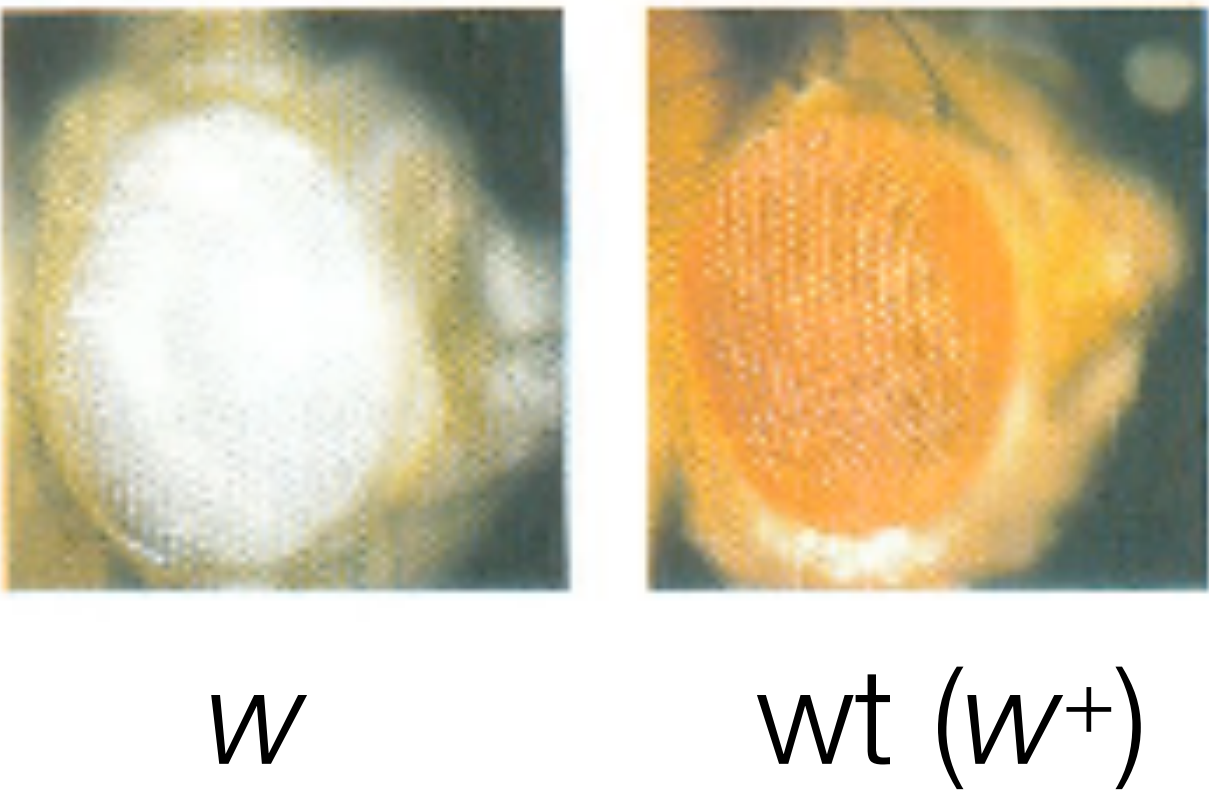
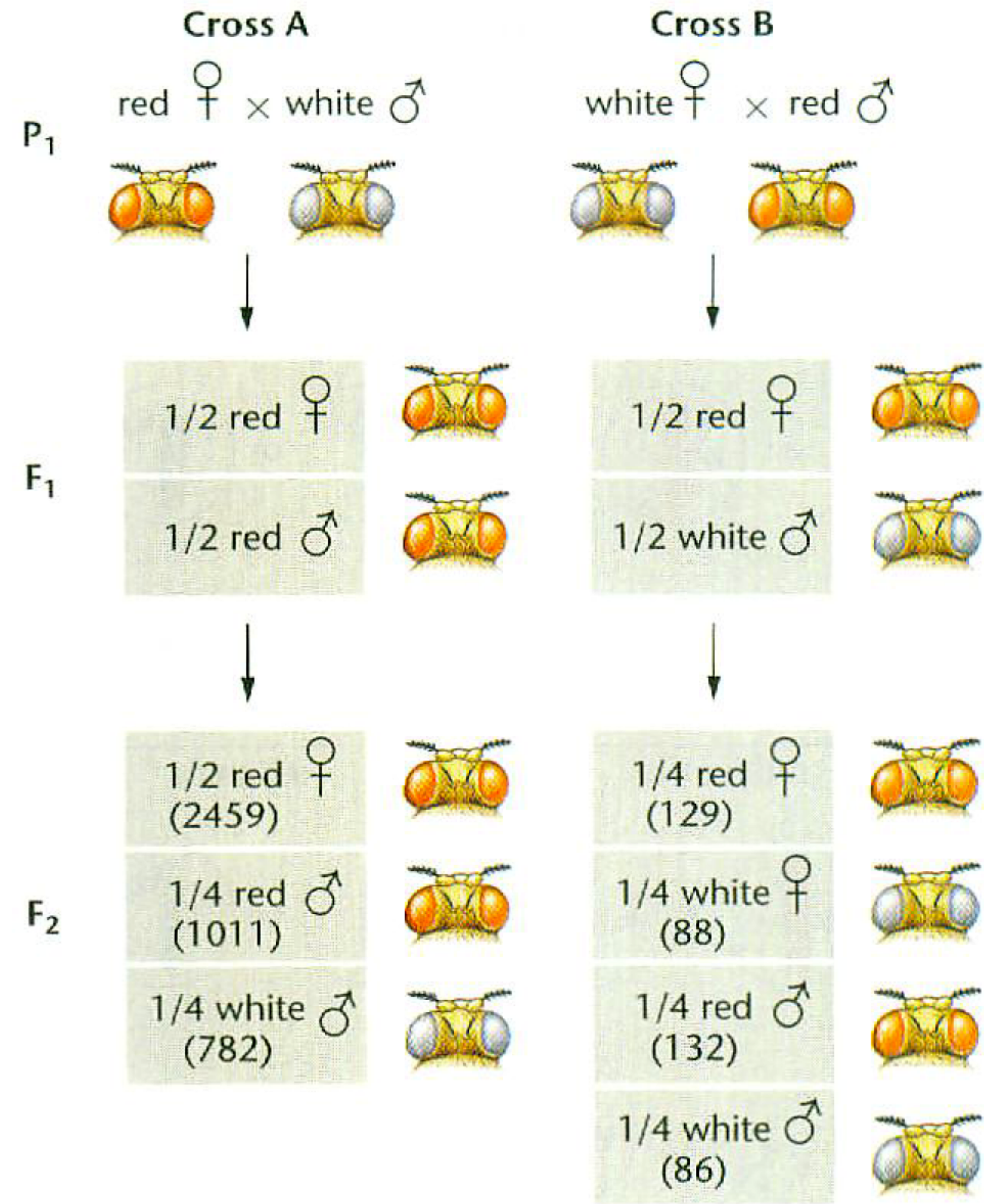


All possible gametic combinations are formed with equal probability

Chromosomy płci

- U wielu (ale nie wszystkich) organizmów płeć jest determinowana przez specjalną parę chromosomów
- Ssaki łożyskowe
 - XX ♀; XY ♂
 - Y niezbędny do rozwoju fenotypu męskiego, X0 (zespół Turnera) fenotypowo kobiecy
- *Drosophila*
 - XX ♀; XY ♂
 - Fenotyp determinowany przez stosunek X do autosomów, X0 fenotypowo samiec (niepłodny u *D. melanogaster*)
- Ptaki, owady, niektóre jaszczurki
 - ZW ♀; ZZ ♂

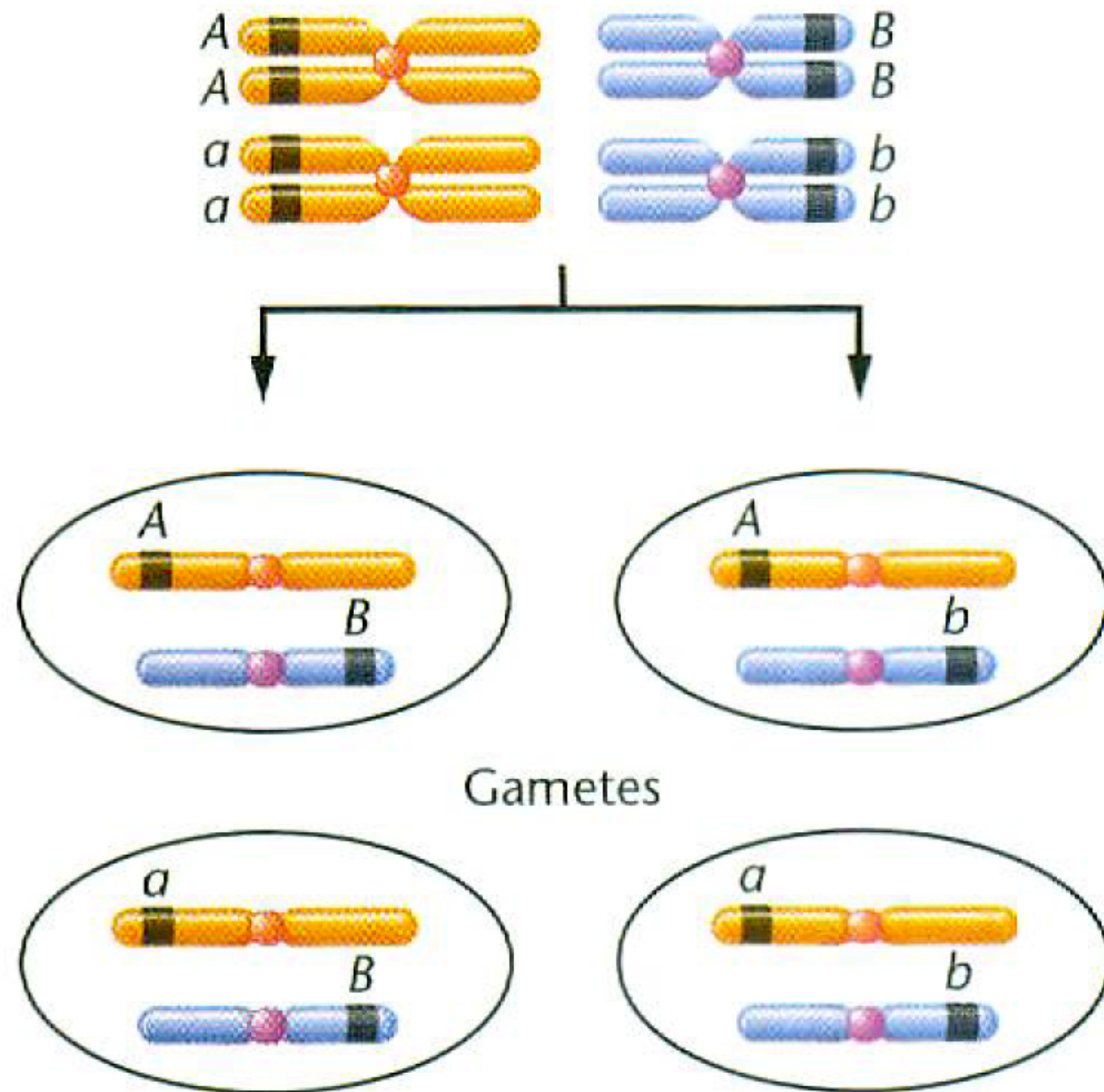
Sprzężenie z płcią



Thomas H. Morgan - 1910

Sprzężenie

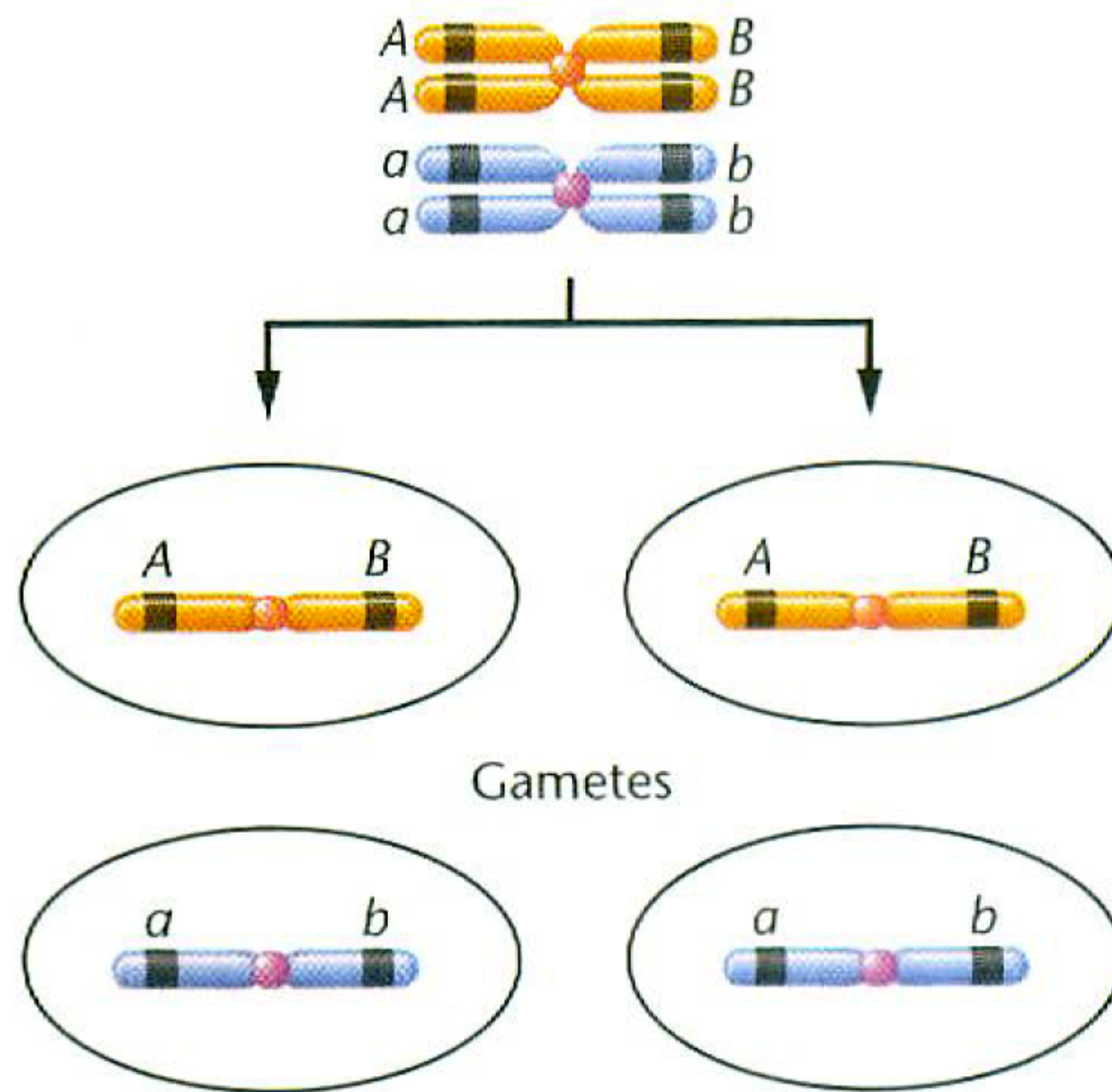
Geny leżące na różnych chromosomach spełniają II prawo Mendla



Dla 2 genów:
4 równoliczne klasy gamet

Sprzężenie

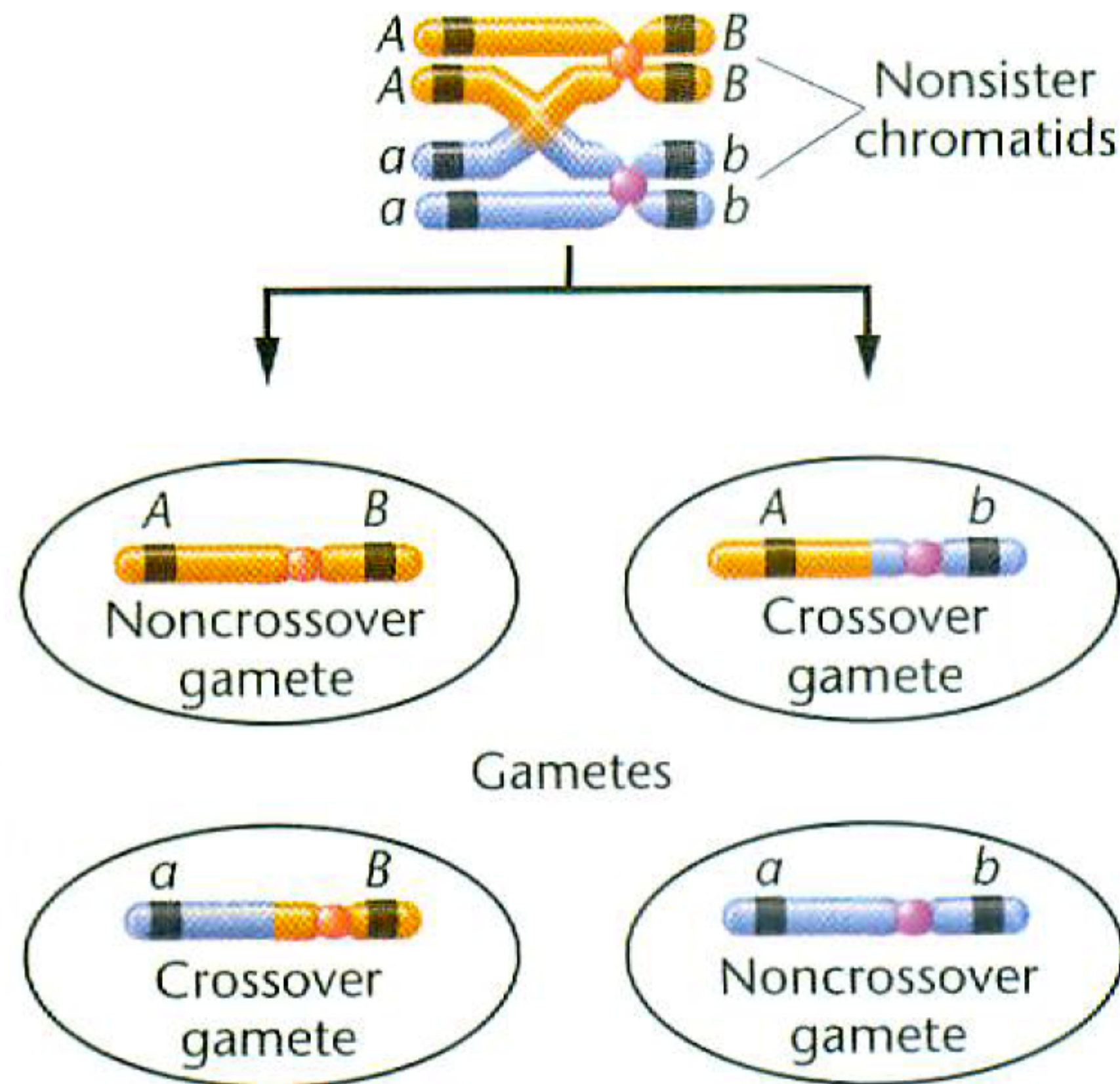
Allele genów leżących na tym samym chromosomie dziedziczą się razem – sprzężenie



Dla 2 genów:
2 równoliczne klasy
gamet rodzicielskich

Sprzężenie

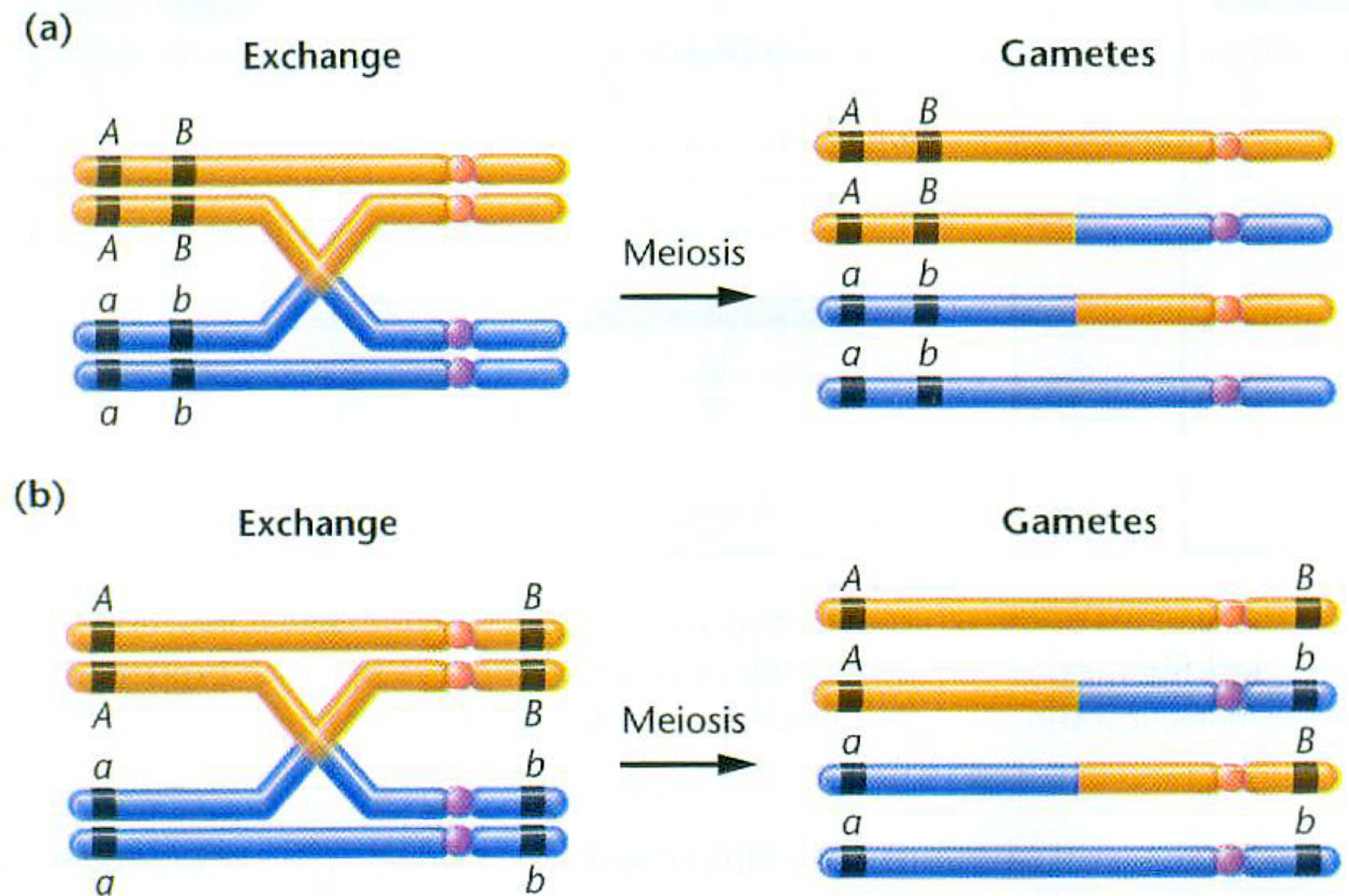
Crossing-over (rekombinacja chromatyd niesiostrzanych)



Dla 2 genów:
2 równoliczne klasy gamet rodzicielskich
2 równoliczne klasy gamet zrekombinowanych
Klasy zrekombinowane mniej liczne od rodzicielskich

Mapowanie genów

Aby powstały gamety zrekombinowane, crossing-over musi zajść pomiędzy genami (loci)



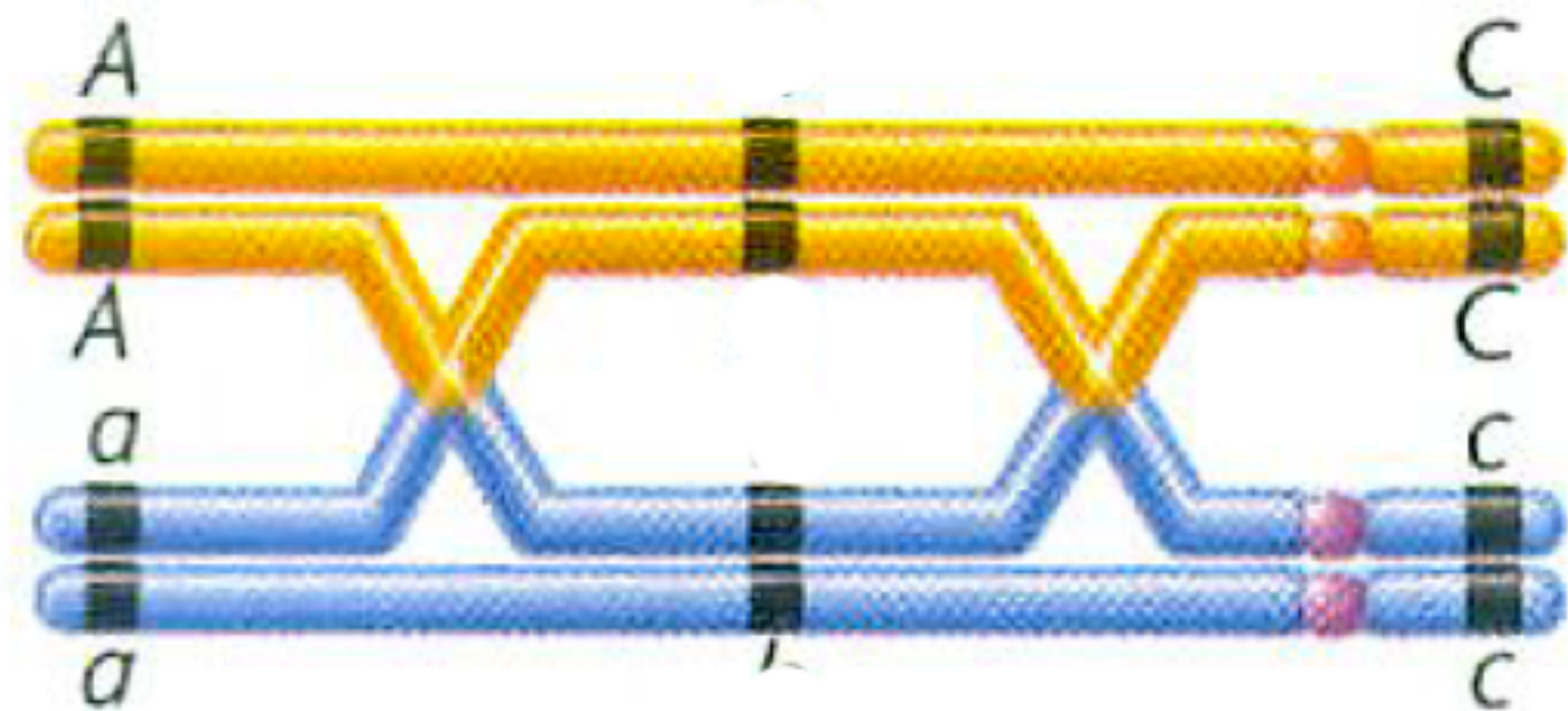
powstają gamety zrekombinowane

Mapowanie genów

- Prawdopodobieństwo crossing-over pomiędzy genami jest proporcjonalne do odległości między nimi na chromosomie
- Liczebność klas rodzicielskich w potomstwie jest miarą odległości genetycznej
- U *Drosophila* najlepiej mapować za pomocą heterozygotycznej samicy i samca recesywnego

Mapowanie

- Jednostka cM (centymorgan) = 1% rekombinacji
- W rzeczywistości zależność nie jest liniowa
- Podwójny crossing-over – gamety typu rodzicielskiego
- Interferencja – zajście crossing-over w danym miejscu wpływa na prawdopodobieństwo zajścia kolejnego w pobliżu



Funkcja mapowa

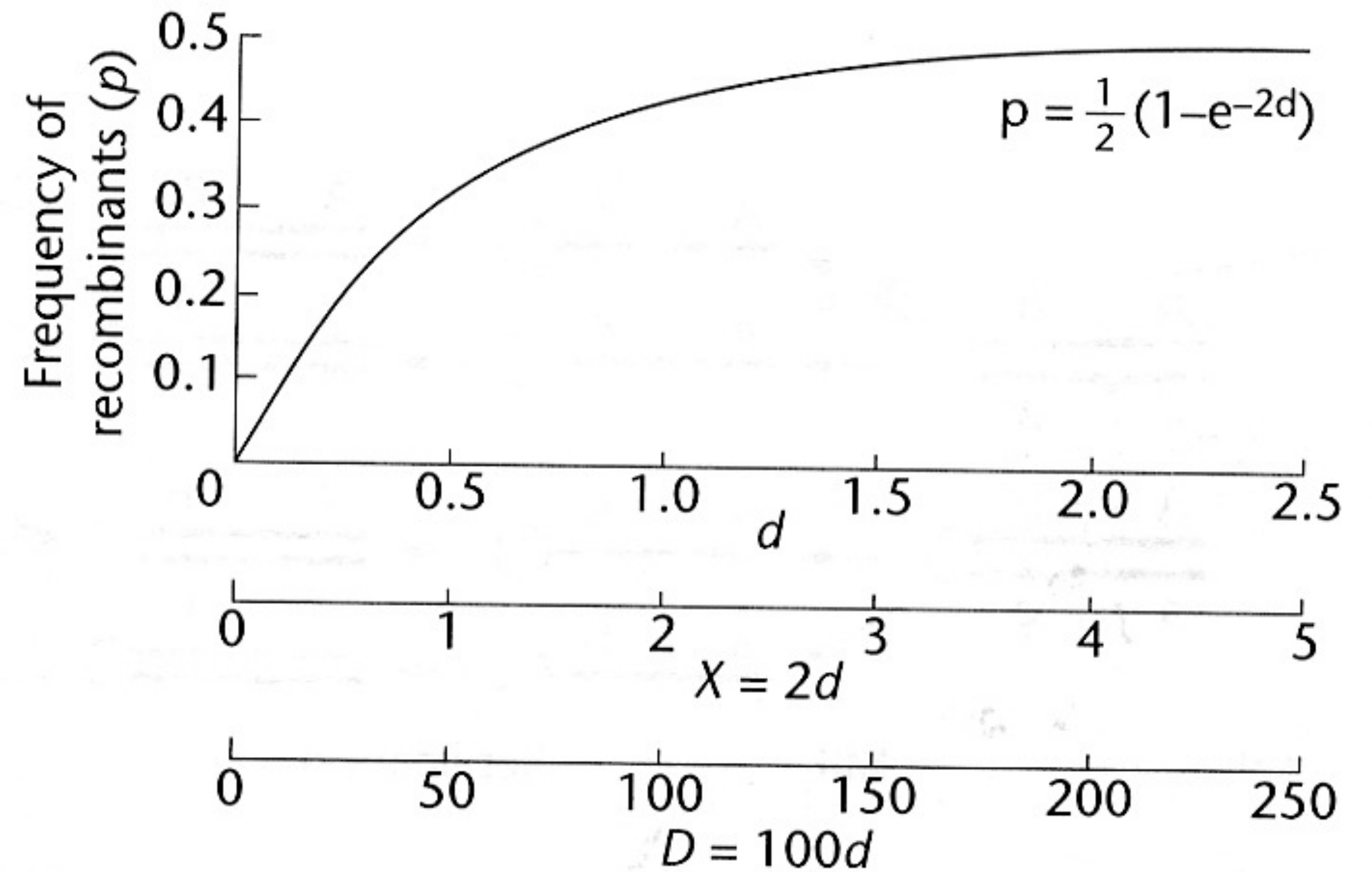
- Zależność odległości genetycznej od częstości rekombinacji
- Funkcja mapowa Haldane'a
 - wielokrotne c-o, bez interferencji
- Funkcja Kosambi'ego
 - uwzględnia też interferencję, szeroko stosowana
- Dla małych θ : $d \approx \theta$

$$d = \frac{\ln(1 - 2\theta)}{2}$$

$$d = \frac{\ln\left(\frac{1 + 2\theta}{1 - 2\theta}\right)}{4}$$

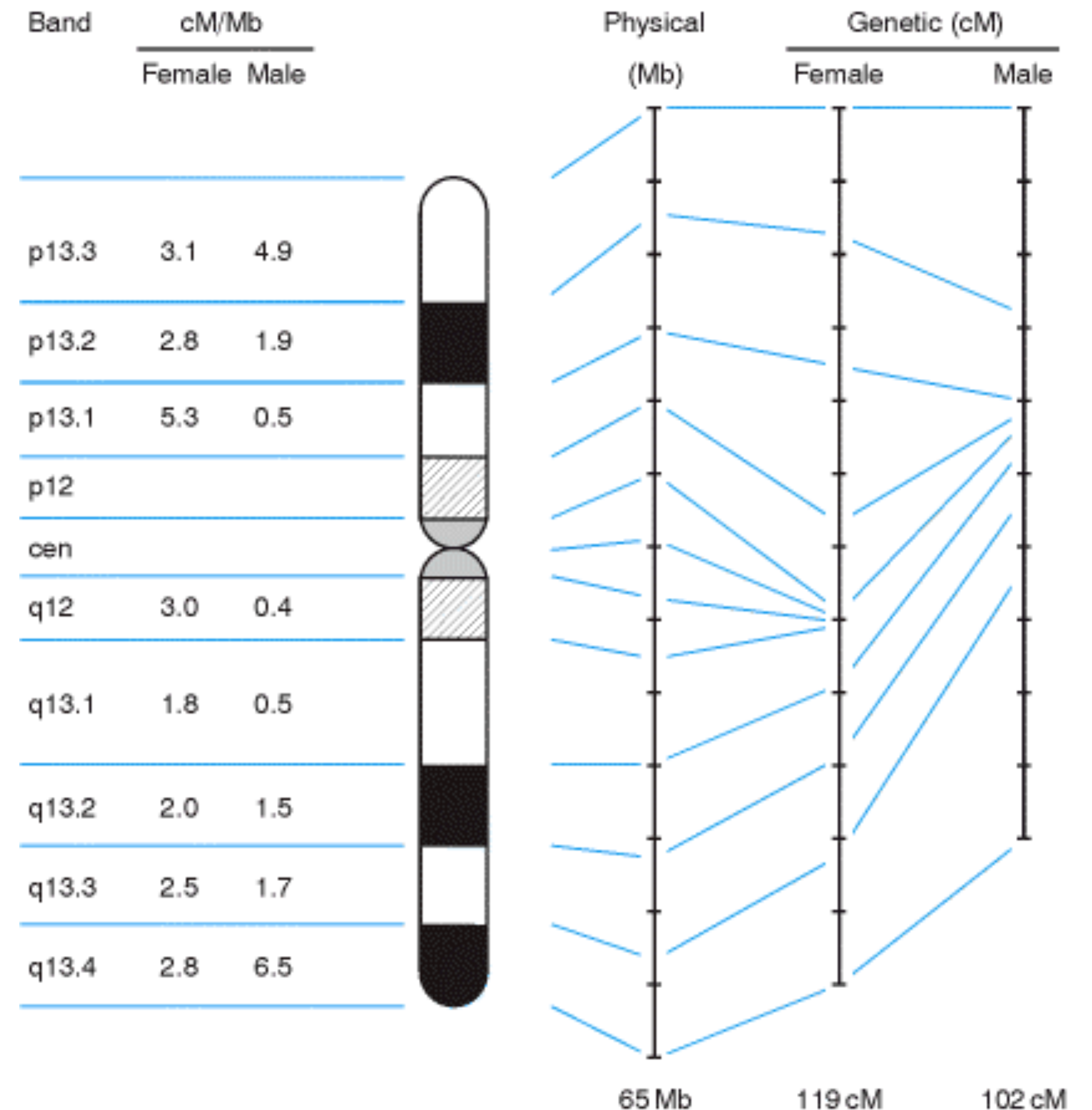
Funkcja mapowa

- Wraz ze wzrostem odległości częstość obserwowanych c-o dąży do 0,5
- Dla genów niesprzężonych “rekombinantów” jest 50%, podobnie jak dla genów leżących w dostatecznie dużej odległości



Mapy genetyczne człowieka i innych organizmów

- Całkowita mapa mężczyzny = 2851cM
- Całkowita mapa kobiety = 4296cM (wyłączając X)
- Dla 3000Mb genomu autosomalnego
 - 1 cM u mężczyzny \approx 1,05 Mb
 - 1 cM u kobiety \approx 0,88Mb
- 1 cM u *Drosophila* \approx 0,5 Mb
- 1cM u drożdży \approx 3 kb



Jak mapować geny człowieka

- Bezpośrednie zliczanie klas potomstwa - niepraktyczne

Wiarygodność (*likelihood*)

- Wiarygodność: prawdopodobieństwo uzyskania zaobserwowanych danych przy założeniach modelu i jego określonych parametrach

Wiarygodność (*likelihood*)

- W rodowodzie w pełni informatywnym
 - dane: R =liczba rekombinantów; NR =liczba genotypów rodzicielskich
 - parametr: częstość (prawdopodobieństwo) rekombinacji θ
- Hipoteza zerowa – brak sprzężenia ($\theta=0,5$)
- Stosunek wiarygodności dla danej wartości θ : $L(\theta)/L(\theta=0,5)$
- lod score (Z) = *logarithm of odds* – logarytm dziesiętny stosunku wiarygodności

Proste przykłady obliczeń *lod*

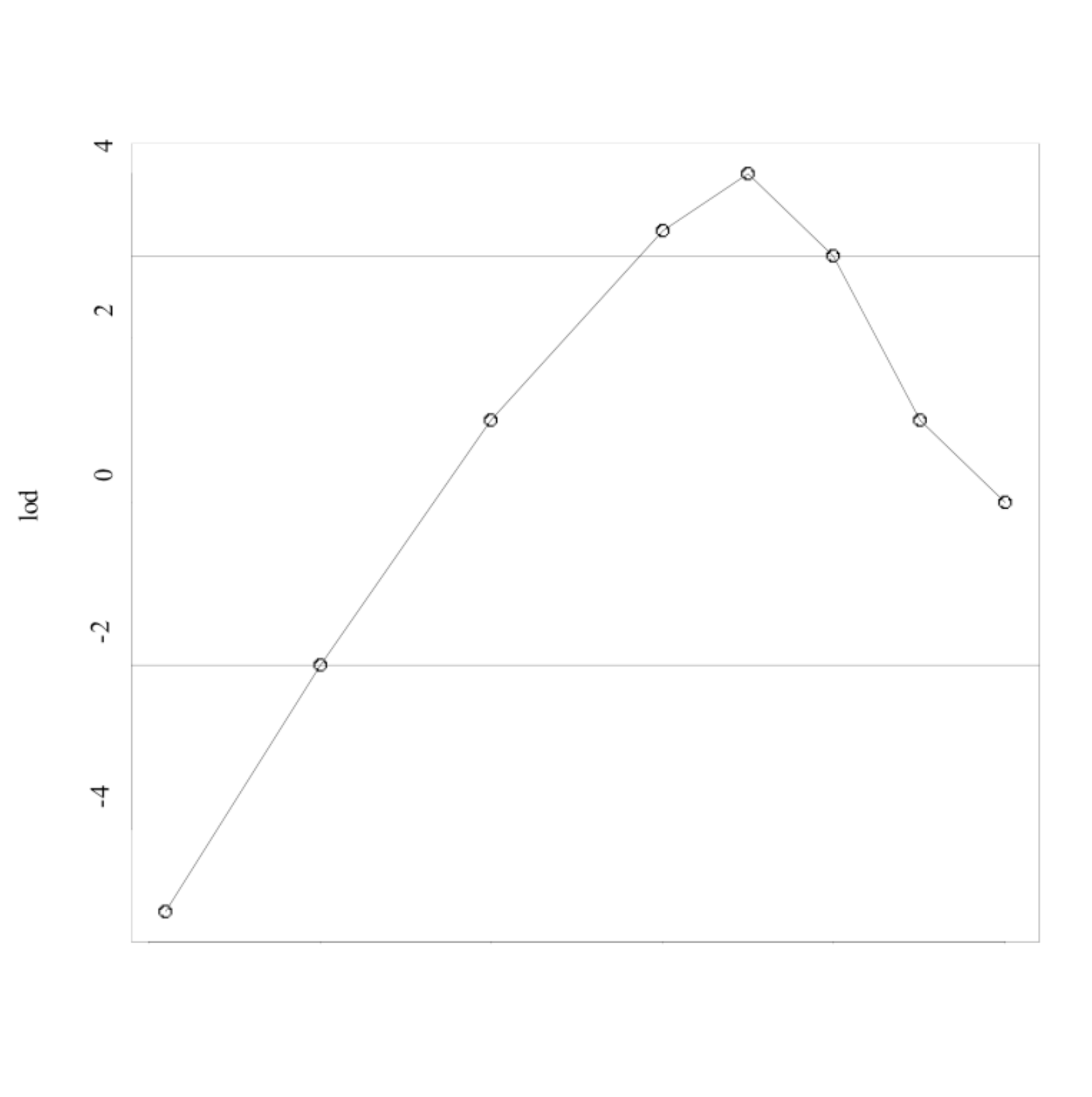
Dla danego rodowodu (i), *lod* dla danego θ wynosi:

$$Z_i(\theta) = \log_{10} \frac{L(\text{rodowód} / \theta)}{L(\text{rodowód} / \theta = 0,5)}$$

Dla danej wartości θ , sumuje się *lod*-score z różnych rodowodów (F):

$$Z(\theta) = \sum_{i=1}^F Z_i(\theta)$$

Analiza dwupunktowa



znaczące
($Z > 3$,
 $Z > 2$ dla sprzężonych z płcią)

wykluczone

Tabela

$\theta =$	0.01,	0.10,	0.20,	0.30,	0.35,	0.40,	0.45,	0.50
lod=	-5.0,	-2.0,	1.0,	3.3,	4.0,	3.0,	1.0,	0.0

Markery w analizie sprzężeń u człowieka

- Sprzężenie dwóch genów o obserwowalnym fenotypie – praktycznie niespotykane
 - wyjątek – zespół paznokciowo-rzepkowy (NPS – *Nail Patella Syndrome*) i grupy krwi AB0
 - *Loci* w obrębie kompleksów MHC
- Markery molekularne
 - PCR, RFLP

Czy genetyka klasyczna ma dziś znaczenie?

- Wciąż aktualne metody:
 - Izolacja i charakterystyka mutantów
 - Test komplementacji
 - Interakcje genetyczne! – jedna z podstaw biologii systemów
 - Konstrukcje organizmów (głównie mikroorganizmy) przez odpowiednio dobrane krzyżówki
 - Dziedziczenie mendlowskie w medycynie – poradnictwo genetyczne. Metody probabilistyczne

Metody i strategie genetyki i genomiki

Inżynieria genetyczna, sekwencjonowanie, redagowanie genomów, biologia syntetyczna

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
 - modyfikacje syntezy białek
 - ekspresja heterologiczna
 - bioinformatyka

A co nie jest inżynierią genetyczną?

- Inżynieria embrionalna (np. klonowanie)
- Tworzenie nowych form organizmów przez selekcję
- nie jest prawnie uznawane za inżynierię genetyczną (GMO), nawet przy użyciu mutagenyzy losowej (radiacyjnej)



Zastosowania

- Badania podstawowe
- Biotechnologia

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

Podstawowe techniki

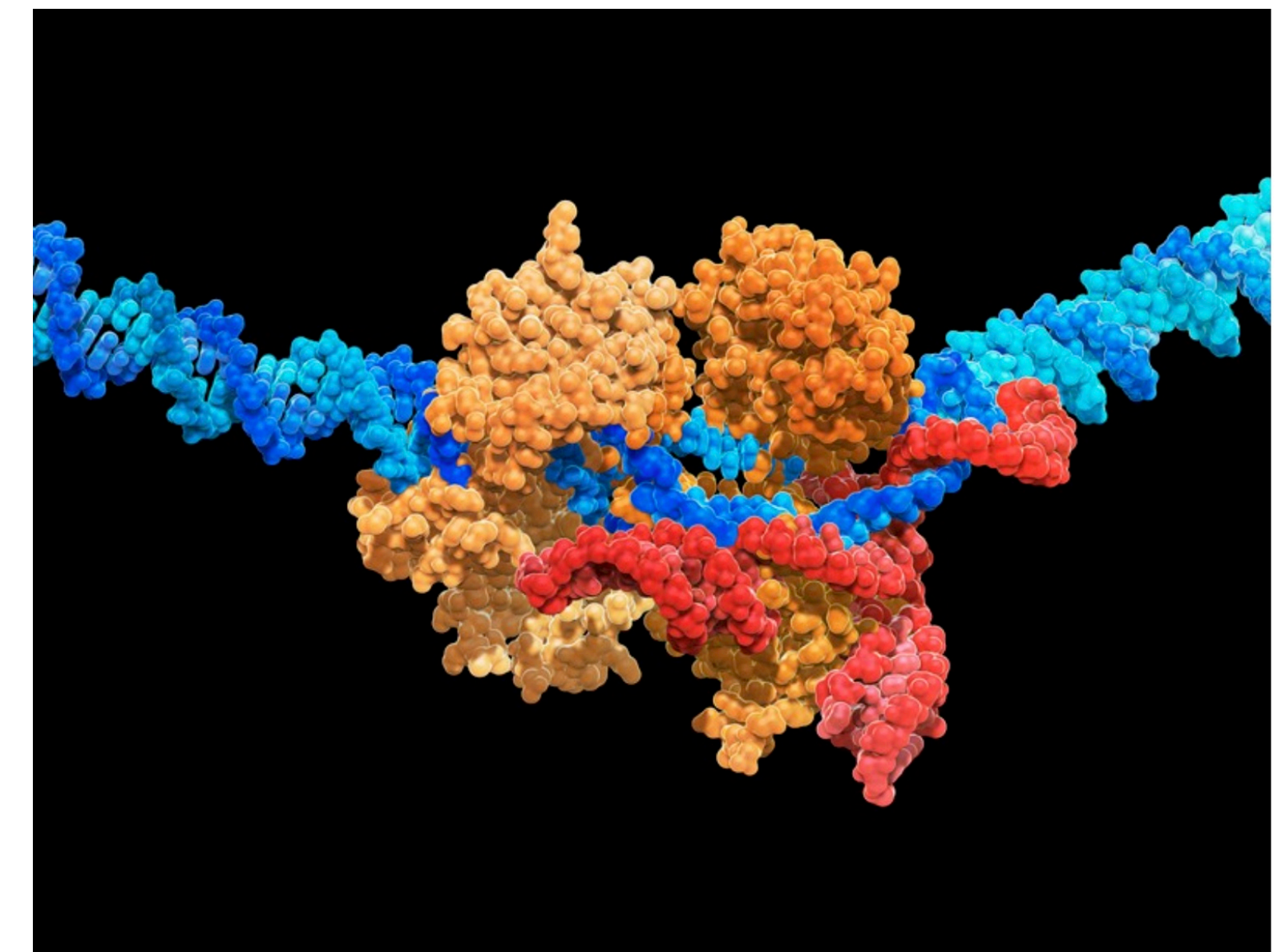
- Izolacja DNA lub RNA
 - cDNA – izolacja RNA i przepisanie na DNA
 - Chemiczna synteza DNA *de novo*
- PCR
- Klonowanie DNA
- Mutageneza losowa i ukierunkowana
 - w tym wprowadzanie modyfikacji do genomu
- Wykrywanie DNA, RNA i białek
- Sekwencjonowanie

Narzędzia genetyki

- Narzędzia inżynierii genetycznej to nie są maszyny
- Wykorzystujemy narzędzia wytworzone przez ewolucję: enzymy i komórki
- Potrafimy modyfikować systemy biologiczne
- Ale nie potrafimy stworzyć maszyn dorównujących cząsteczkom powstałym w wyniku ewolucji



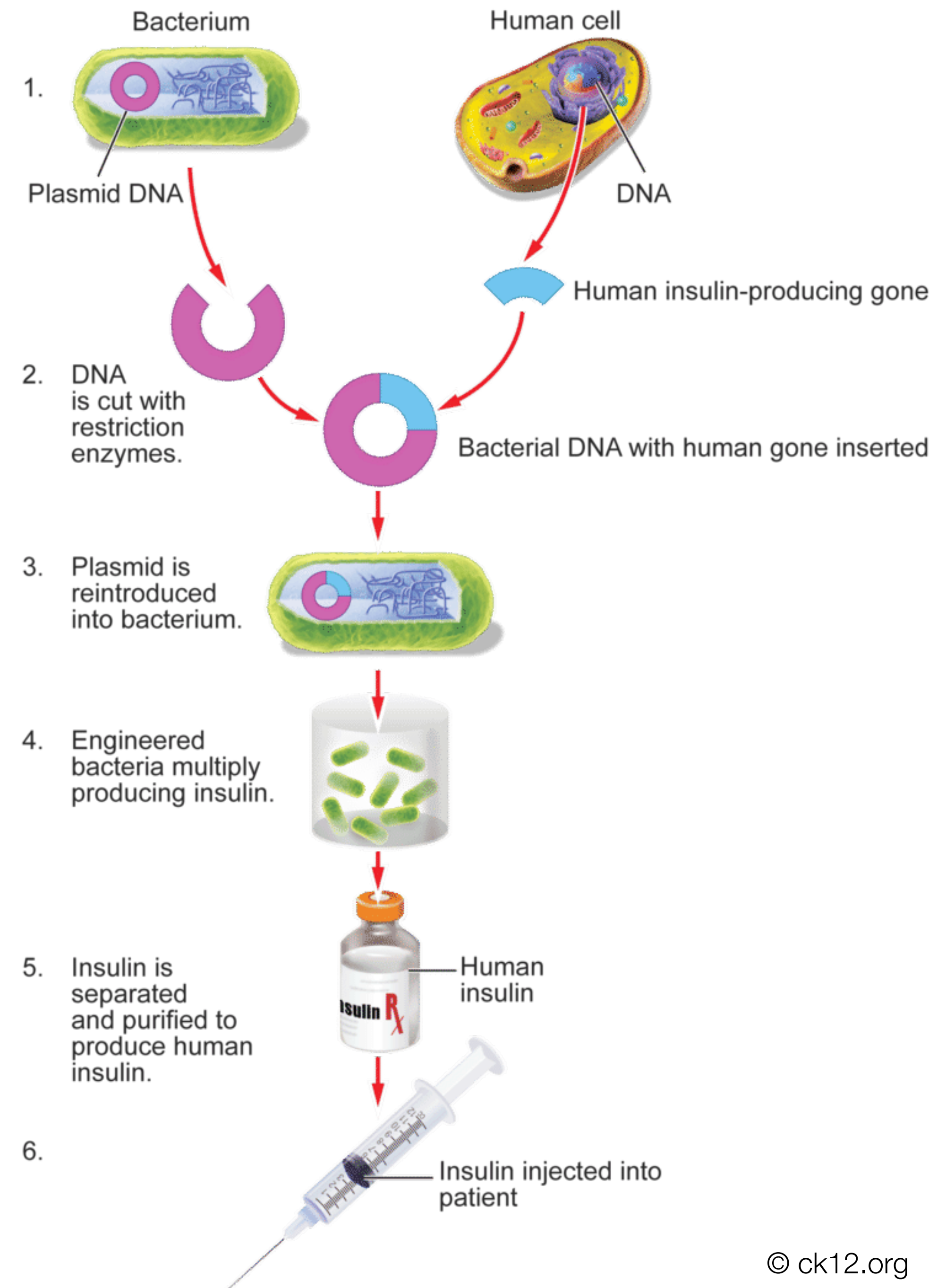
Un bout d'ADN retiré par une pince (vision d'artiste). wikipedia.fr



Base editing offers greater control than the conventional CRISPR-Cas9 system (pictured). Credit: Carlos Clarivan/Science Photo Library

Inżynieria genetyczna

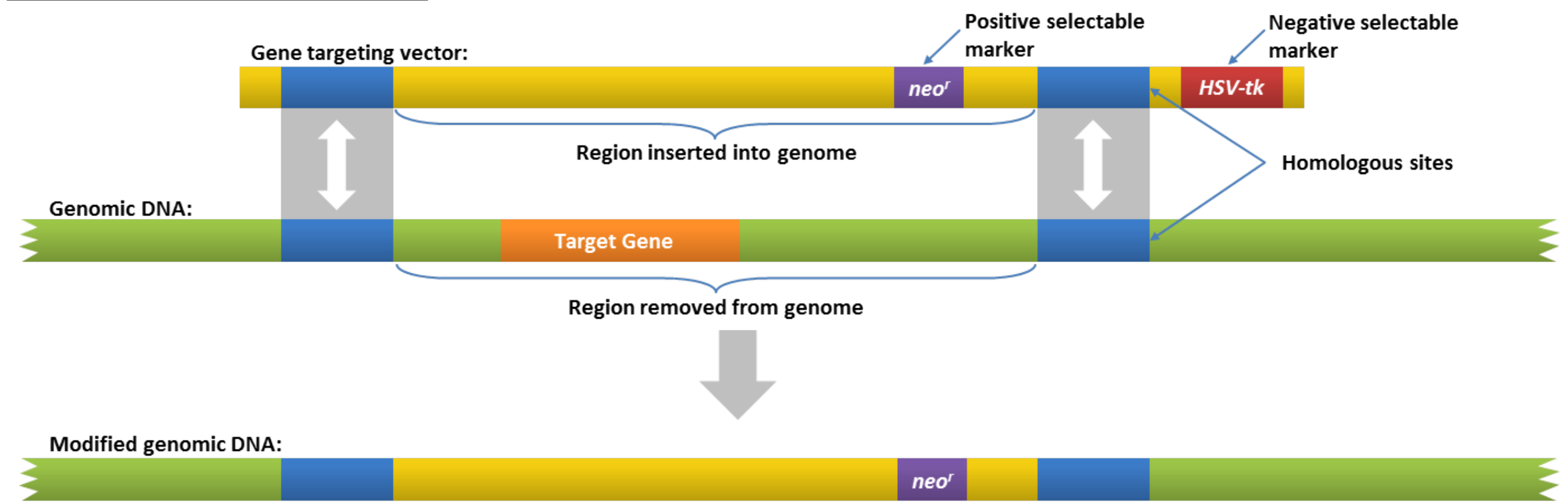
- Zbiór metod w użyciu od lat 70.
- Dla zmodyfikowania genomu należy:
 - wyizolować DNA
 - zmodyfikować DNA *in vitro*
 - wprowadzić zmodyfikowany DNA do komórek (tego samego lub innego organizmu)



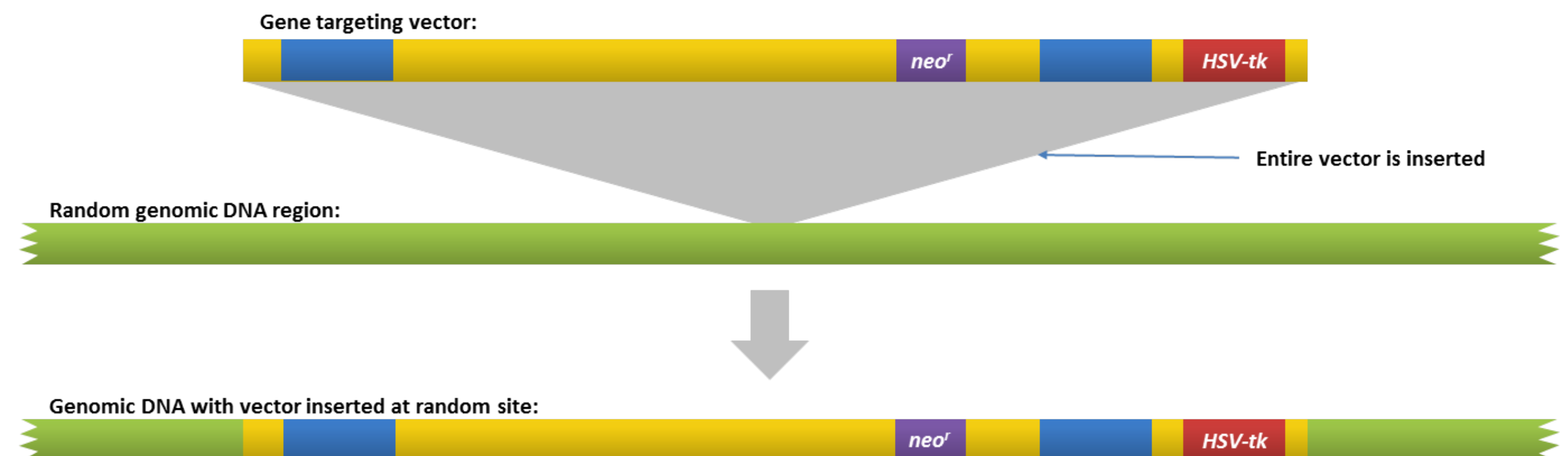
Główne wyzwania inżynierii genetycznej

- Wprowadzenie zmienionego DNA do genomu gospodarza
- W ściśle określone miejsce (targeting)
- Wydajność różna u różnych organizmów
 - np. drożdże - b. wysoka
 - człowiek - b. niska
- Dodatkowe kroki potrzebne by nie pozostawić śladów w genomie (np. markerów selekcyjnych)

a) Homologous recombination:



b) Random integration:

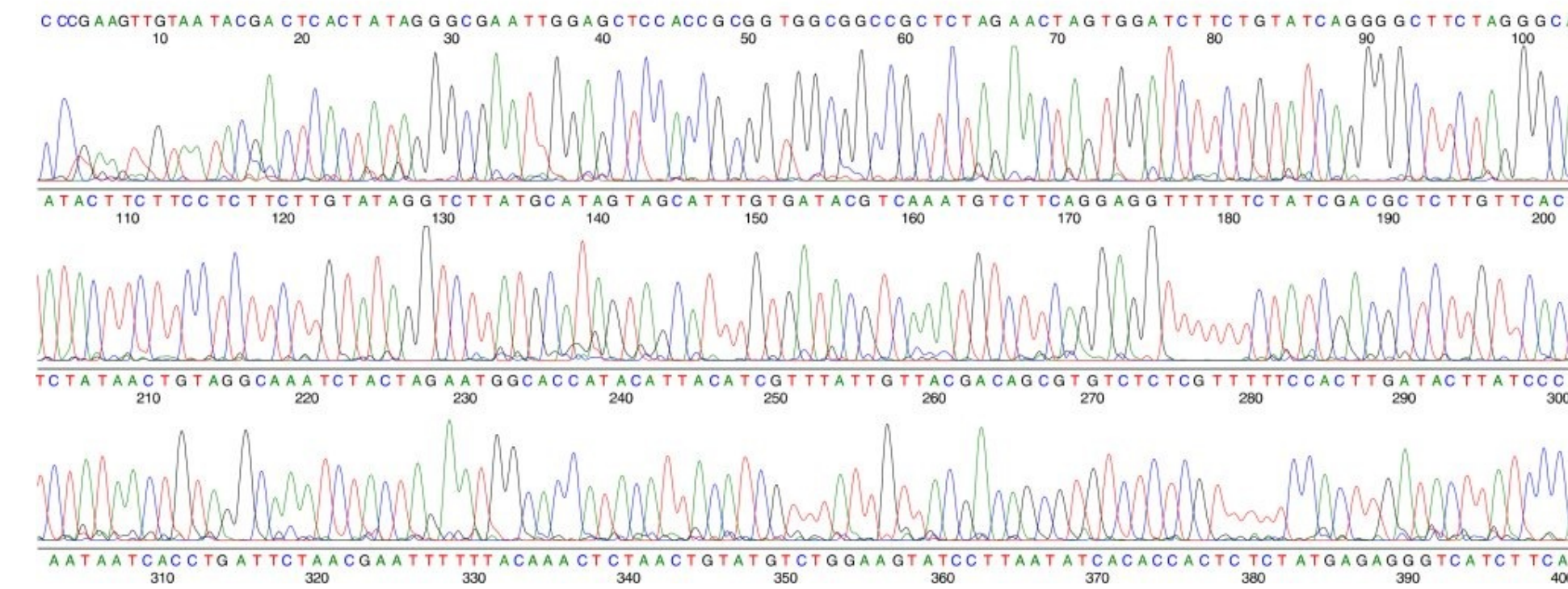
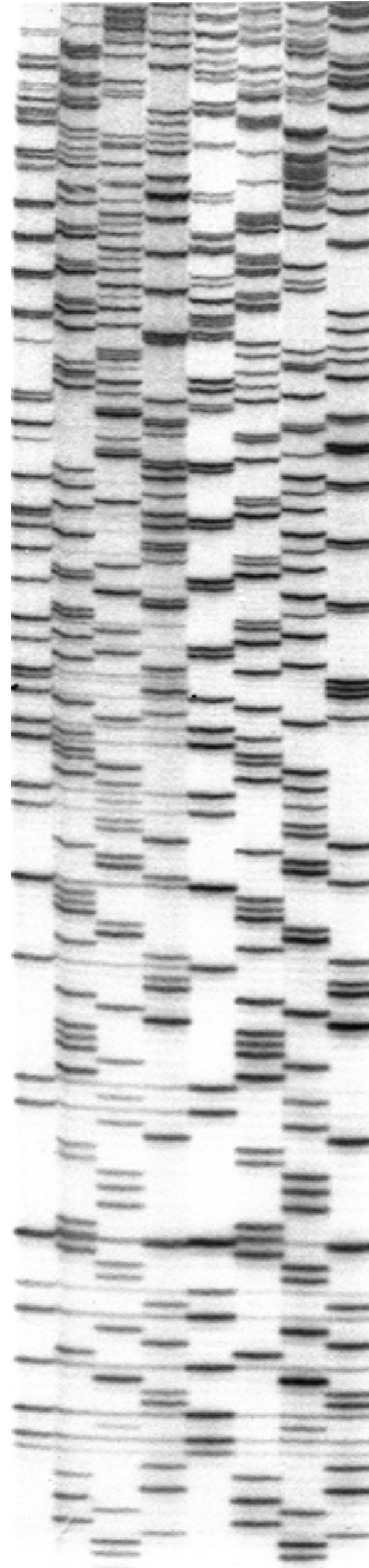


Lektura

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

Sekwencjonowanie tradycyjne (Sangera) - pierwszej generacji

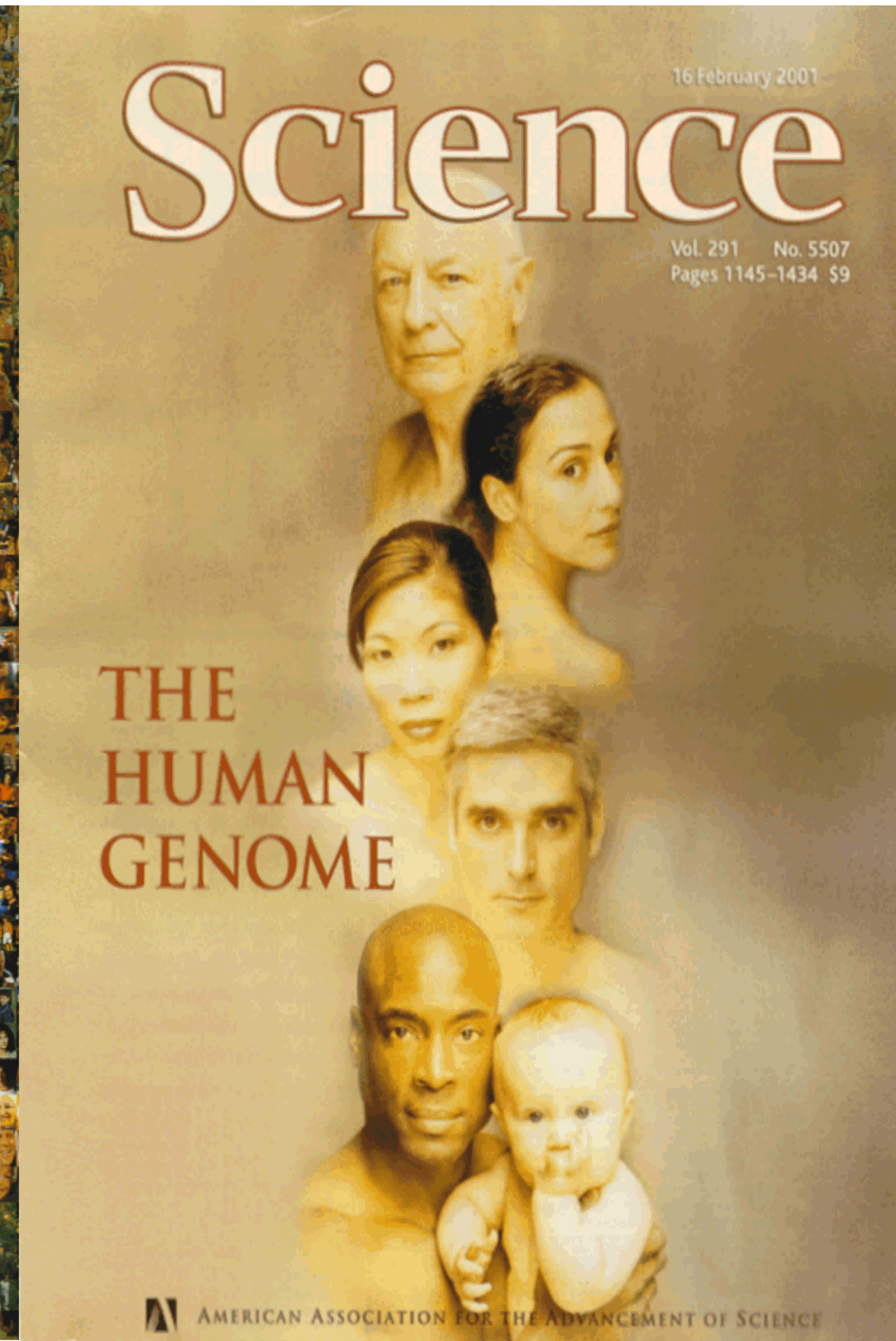
- Sanger, 1977 (konkurencyjna metoda Maxama i Gilberta się nie przyjęła)
- Pierwsze automatyczne sekwenatory kapilarne (ABI Prism) w 1986
- Sekwencjonowanie przez syntezę
- Odczyty do 800 zasad, typowo ~600
- Niska przepustowość (96 odczytów/ urządzenie/przebieg)
- Wciąż standard dla krótkich sekwencji i małych zadań



Genomika

- Pierwsze genomy prokariotyczne - 1994
- Genom drożdży - 1996
- *Drosophila* - 1999
- Człowiek

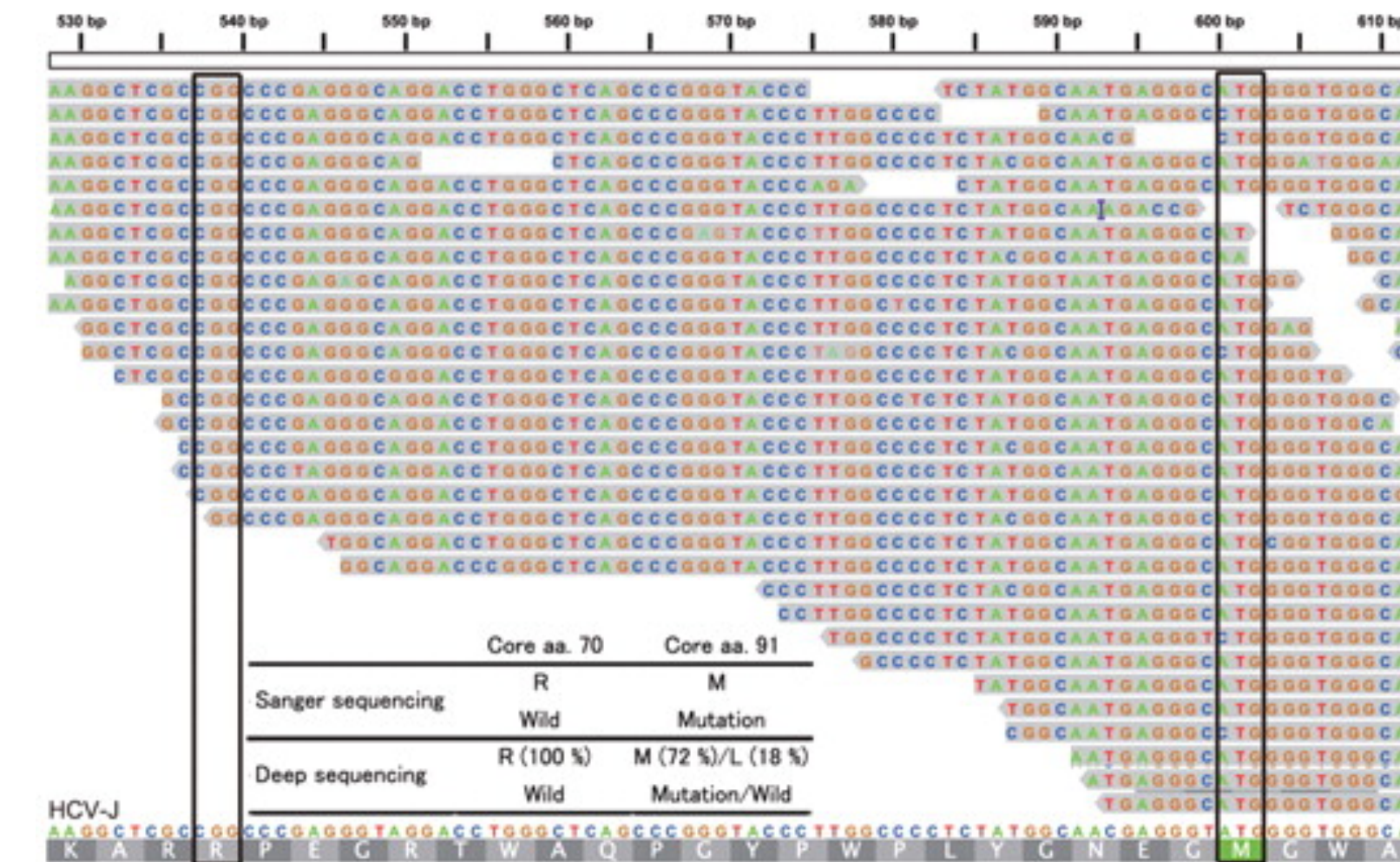
Genom człowieka (2001)



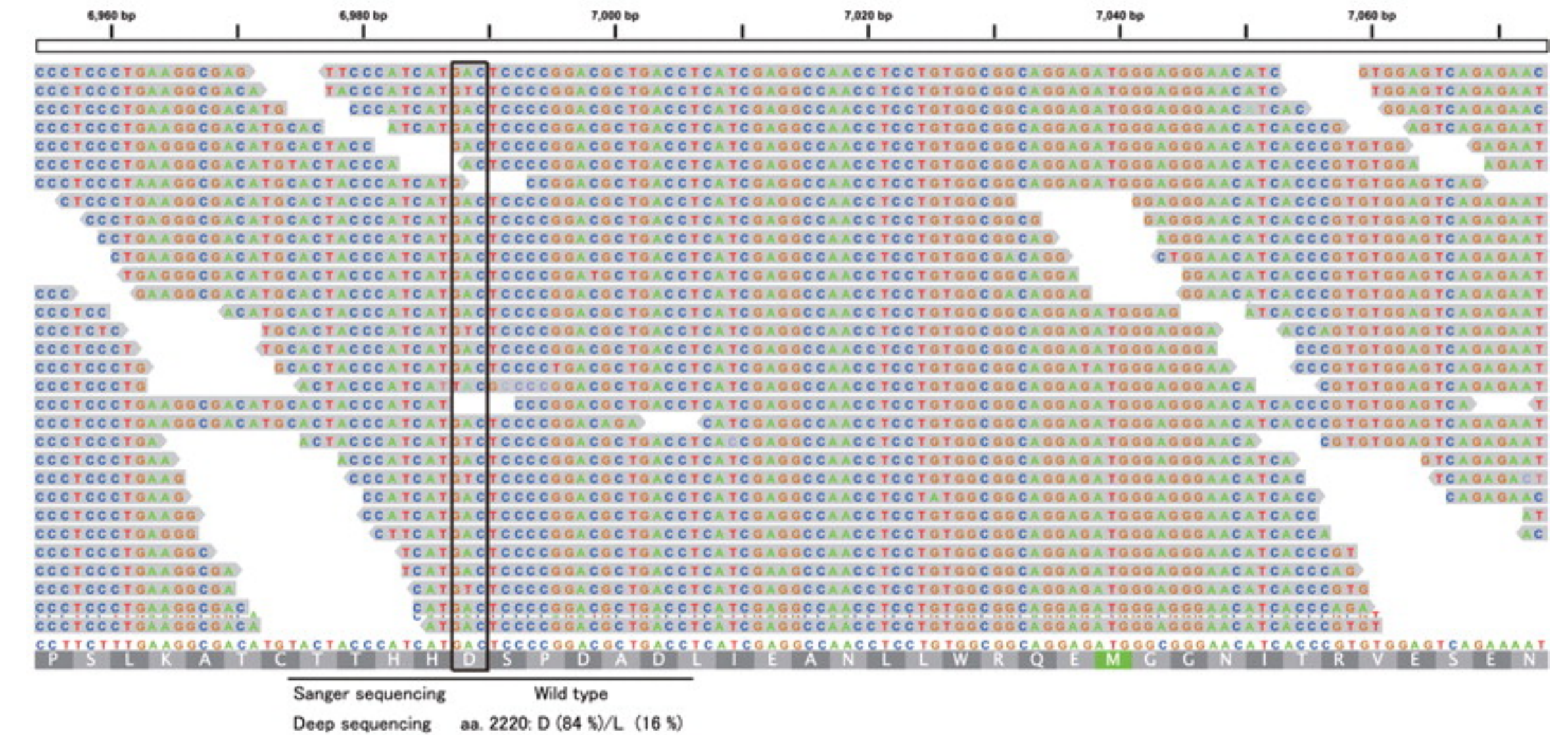
Sekwencjonowanie nowej (drugiej) generacji - NGS

- Od 2005 (454)
- Tzw. głębokie sekwencjonowanie (deep sequencing) albo sekwencjonowanie masywnie równoległe
- Sekwencjonowanie przez syntezę
- Miliony odczytów w jednym przebiegu do 10^{12} zasad
- Odczyty krótkie: 50-400 zasad

A) Core aa. 70 and aa. 91

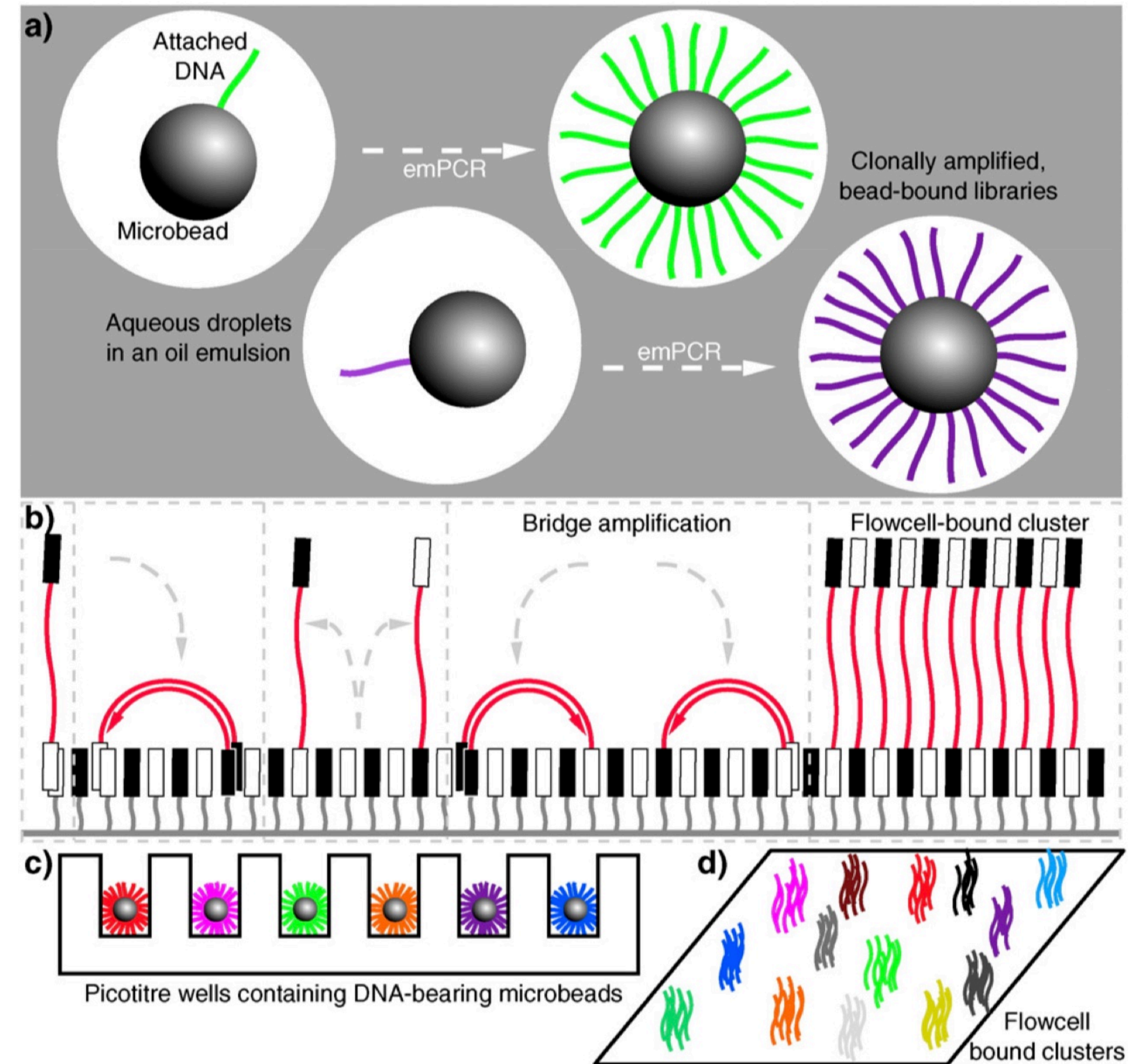


B) NS5A-ISDR



NGS drugiej generacji

- Obecnie dwie główne platformy
- Illumina
 - Amplifikacja "mostkowa" na podłożu stałym
 - Sekwencjonowanie przez syntezę - odwracalne terminatory i detekcja fluorescencyjna
- Ion Torrent (Life Technologies)
 - Biblioteki namnażane przez PCR w emulsji
 - Sekwencjonowanie przez syntezę, detekcja zmian pH po uwalnianiu protonów przy dodaniu nukleotydu



The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA

James M. Heather *, Benjamin Chain

Genomics 107 (2016) 1-8

Sekwencjonowanie

- Głównym wyzwaniem w sekwencjonowaniu nie jest sam odczyt sekwencji
- Odczytywane fragmenty są krótkie
 - do ~700-800 nt (sekw. tradycyjne Sanger)
 - 50-400 nt (NGS)
- Wyzwaniem jest złożenie długiej sekwencji z tych krótkich fragmentów
 - różne technologie sekwencjonowania wymagają różnych metod obróbki bioinformatycznej



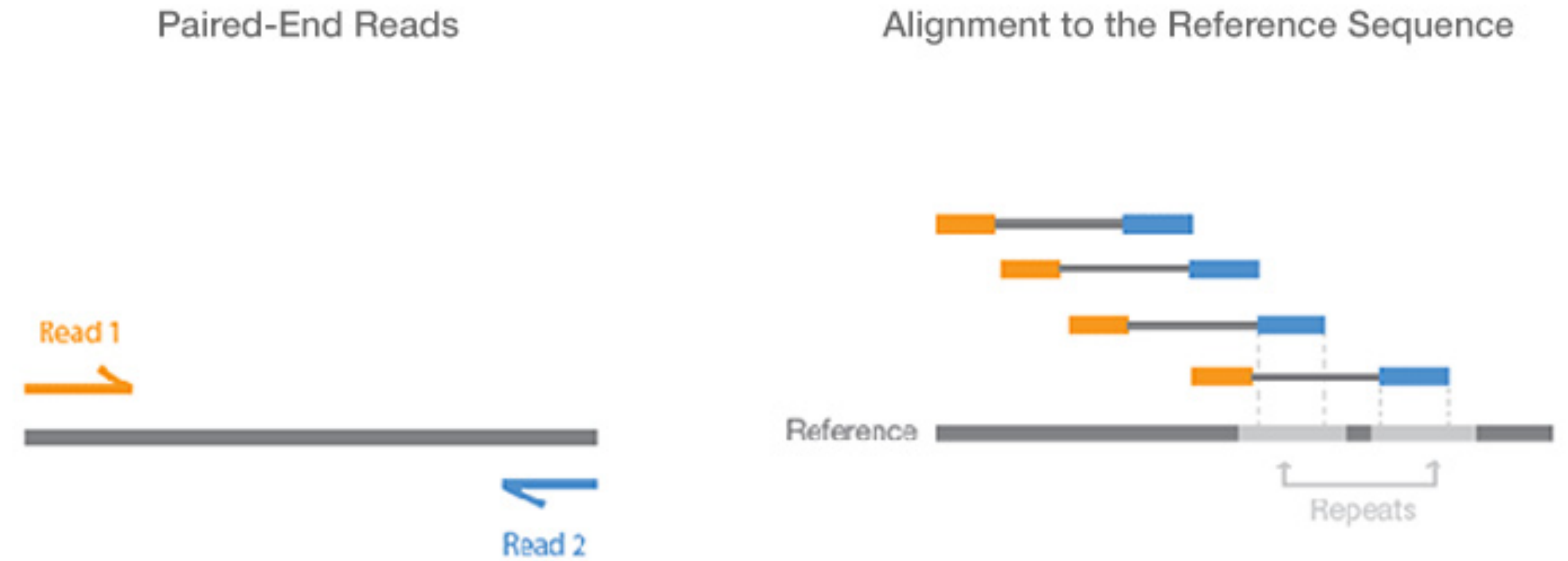
Wyzwania NGS

- Narzędzia bioinformatyczne ciągle rozwijane
- Mapowanie odczytów do znanej sekwencji referencyjnej ułatwia zadanie, ale nadal są problemy
 - sekwencje repetytywne
 - zmienność strukturalna
 - faza haplotypu
- NGS to nie jest "czarna skrzynka"



Sparowane odczyty (paired ends)

- Sekwencje z obu końców dłuższego (kilka kb) fragmentu
- Ułatwia zmapowanie



Paired-end sequencing enables both ends of the DNA fragment to be sequenced. Because the distance between each paired read is known, alignment algorithms can use this information to map the reads over repetitive regions more precisely. This results in much better alignment of the reads, especially across difficult-to-sequence, repetitive regions of the genome.

NGS ukierunkowane (targeted)

- Wzbogacenie o wybrane obszary genomu
- amplifikacja (PCR)
- wychwytywanie przez hybrydizację
- WES - Whole Exome Sequencing - tylko obszary kodujące
- panele wybranych genów

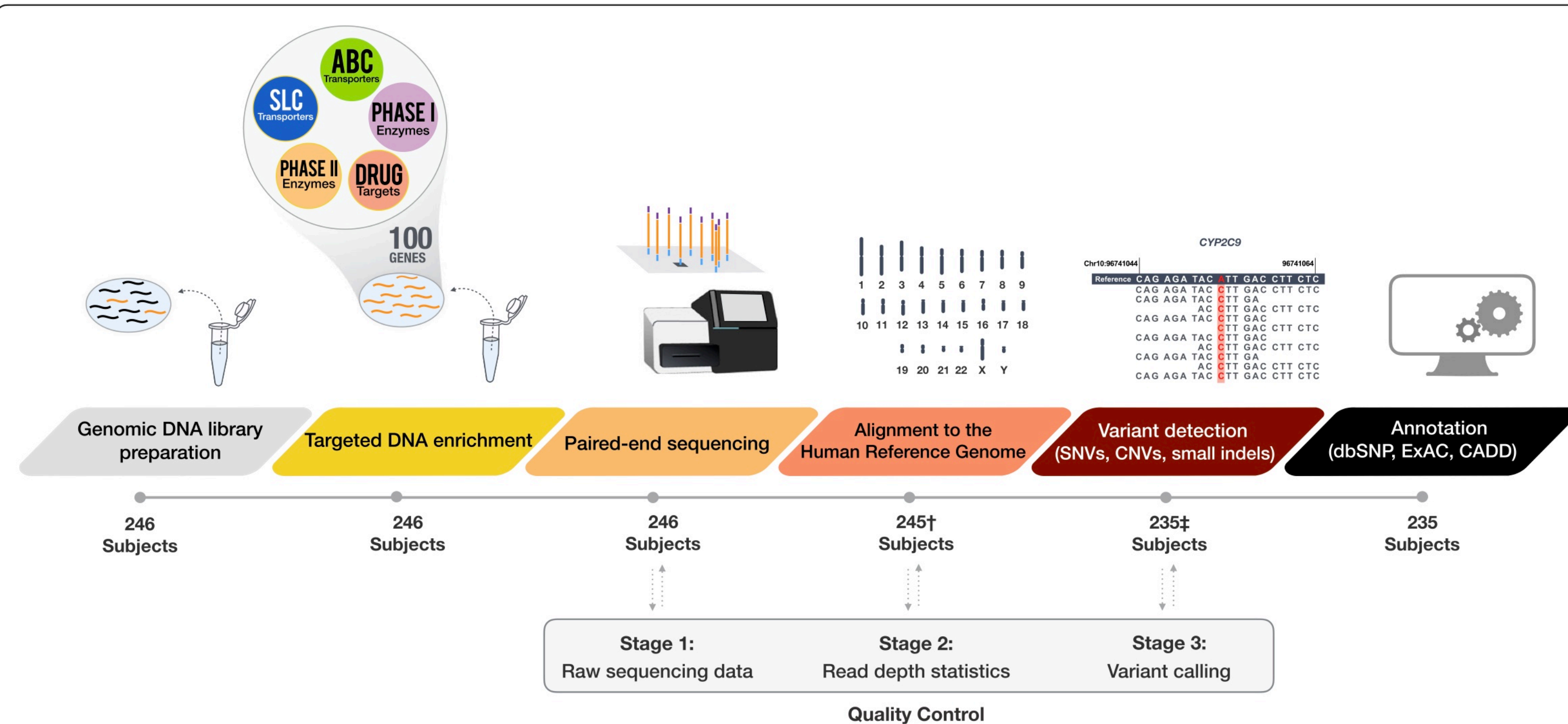
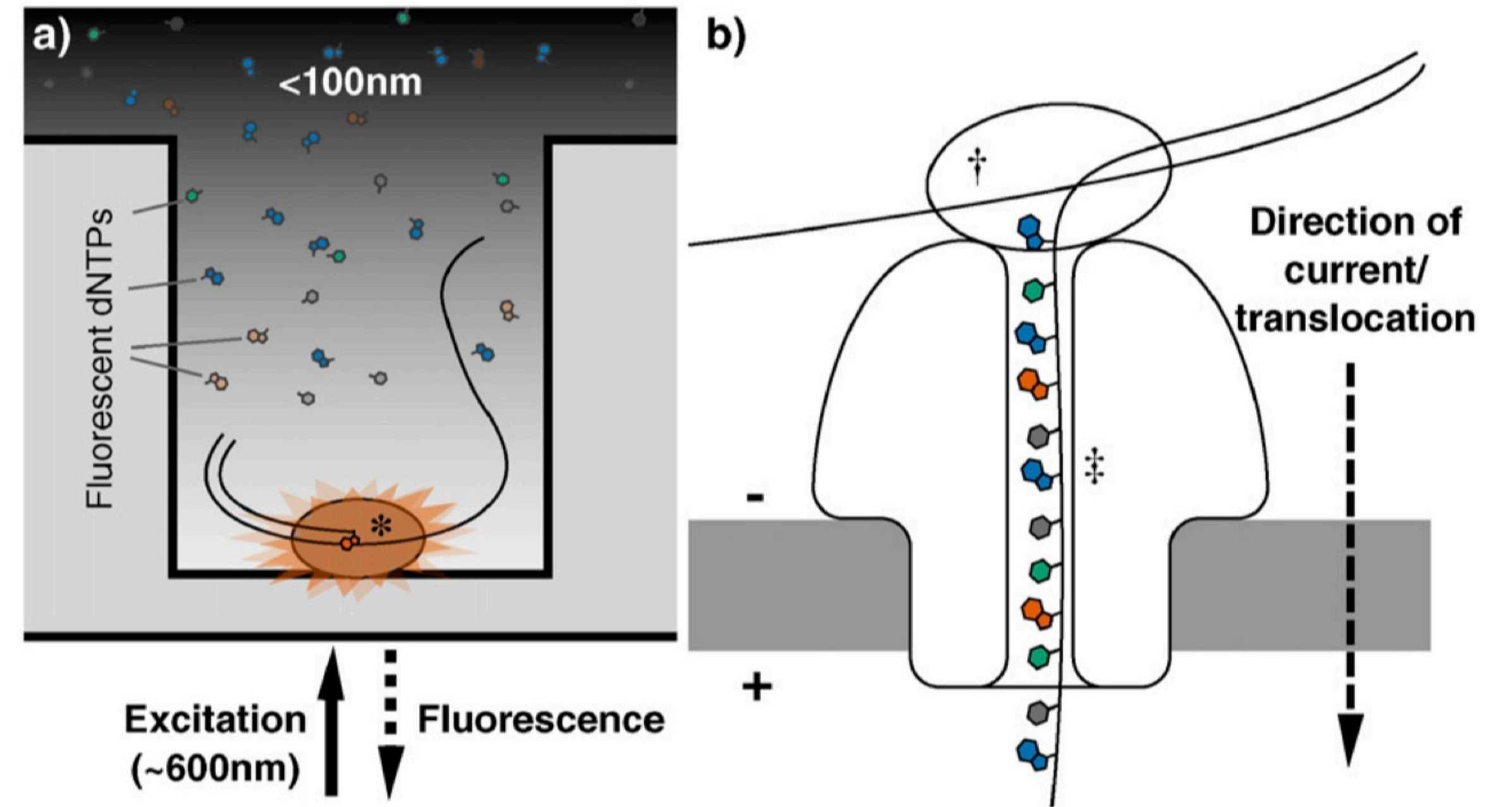


Fig. 1 PGxSeq sample and data processing workflow ($n = 246$). Eleven subjects were excluded from variant analysis due to low read count (\dagger ; $n = 1$) and high GC content (\ddagger ; $n = 10$). All clip art depicted in this Figure has been created by the authors

NGS trzeciej generacji

- Sekwencjonowanie z długimi odczytami
- Obecnie dwie główne platformy
 - single-molecule real time sequencing (SMRT) - Pacific Biosystems
 - nanopore sequencing (MinION) - Oxford Nanopore
- Odczyty 20-30 kb



The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA

James M. Heather *, Benjamin Chain

Genomics 107 (2016) 1-8

Sekwencjonowanie III generacji

- Metody (PacBio, Nanopore) dające długie odczyty (>10 000 nt)



Powerful

Get up to 50 Gb data from a single flow cell*.

* Theoretical max output when system is run for 72 hours at 420 bases / second. Outputs may vary according to library type, run conditions, etc.



Portable

Sequence anywhere, including at sample source.



Real time

Immediate data streaming for rapid, actionable results.



Unrestricted read length

Generate short to ultra-long (>4 Mb) reads for ultimate experimental flexibility.

Zalety długich odczytów

- Umożliwia sekwencjonowanie obszarów repetytywnych
- W 2022 pierwszy kompletny genom człowieka, łącznie z centromerami i telomerami (T2T - telomere to telomere)
- Wykrywanie zmian strukturalnych (duże delecje, zmienna liczba kopii, rearanżacje)
- Bezpośrednie wykrywanie modyfikacji epigenetycznych (metylacja DNA) - nanopore

STATISTICS	GRCH38	T2T-CHM13	DIFFERENCE (±%)
Summary			
Assembled bases (Gbp)	2.92	3.05	+4.5
Unplaced bases (Mbp)	11.42	0	-100.0
Gap bases (Mbp)	120.31	0	-100.0
Number of contigs	949	24	-97.5
Contig NG50 (Mbp)	56.41	154.26	+173.5
Number of issues	230	46	-80.0
Issues (Mbp)	230.43	8.18	-96.5
Gene annotation			
Number of genes	60,090	63,494	+5.7
Protein coding	19,890	19,969	+0.4
Number of exclusive genes	263	3,604	
Protein coding	63	140	
Number of transcripts	228,597	233,615	+2.2
Protein coding	84,277	86,245	+2.3
Number of exclusive transcripts	1,708	6,693	
Protein coding	829	2,780	
Segmental duplications			
Percentage of segmental duplications (%)	5.00	6.61	
Segmental duplication bases (Mbp)	151.71	201.93	+33.1
Number of segmental duplications	24097	41528	+72.3
RepeatMasker			
Percentage of repeats (%)	51.89	53.94	
Repeat bases (Mbp)	1,516.37	1,647.81	+8.7
Long interspersed nuclear elements	626.33	631.64	+0.8
Short interspersed nuclear elements	386.48	390.27	+1.0
Long terminal repeats	267.52	269.91	+0.9
Satellite	76.51	150.42	+96.6

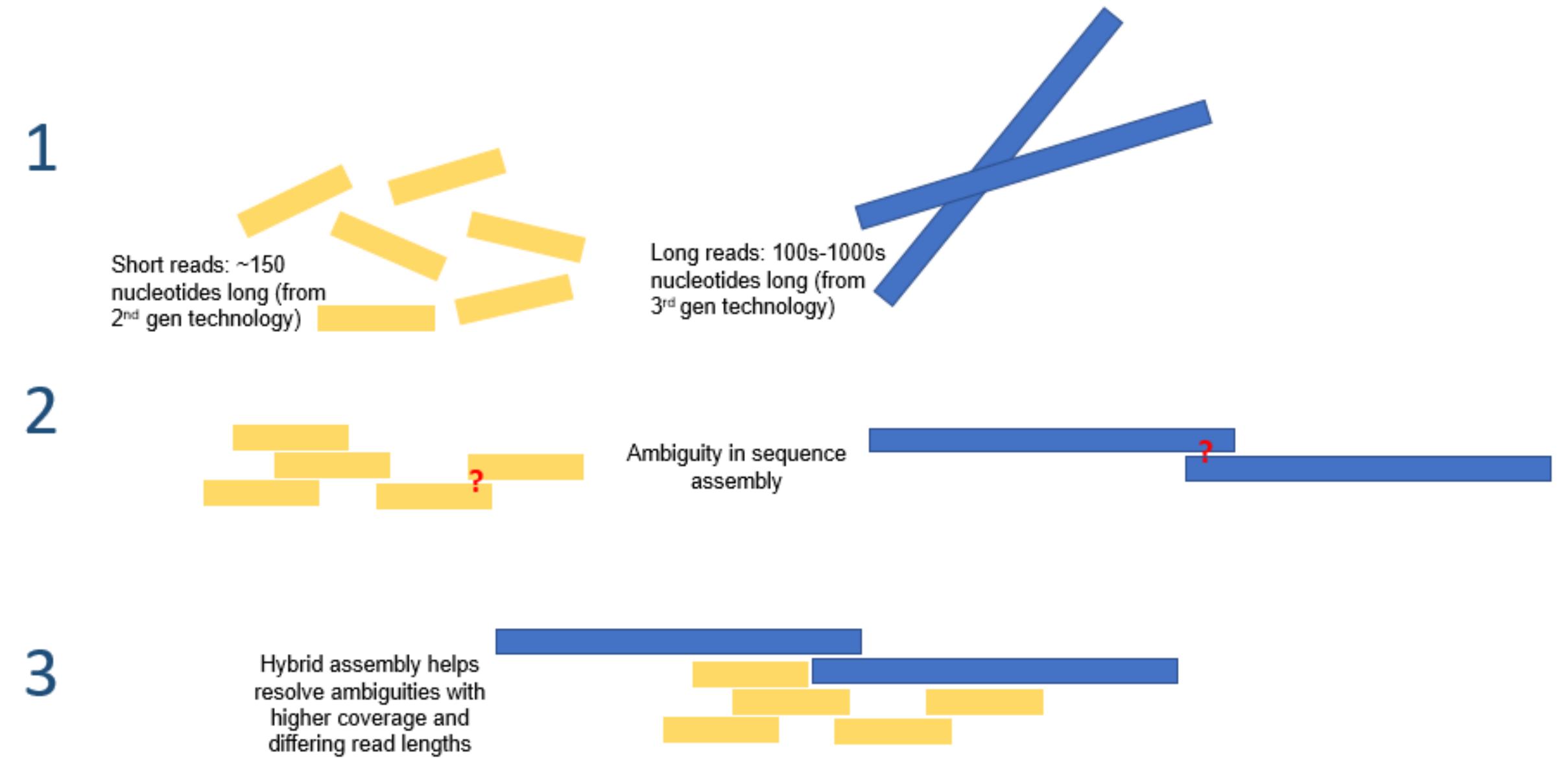
HUMAN GENOMICS

The complete sequence of a human genome

Nurk *et al.*, *Science* **376**, 44–53 (2022) 1 April 2022

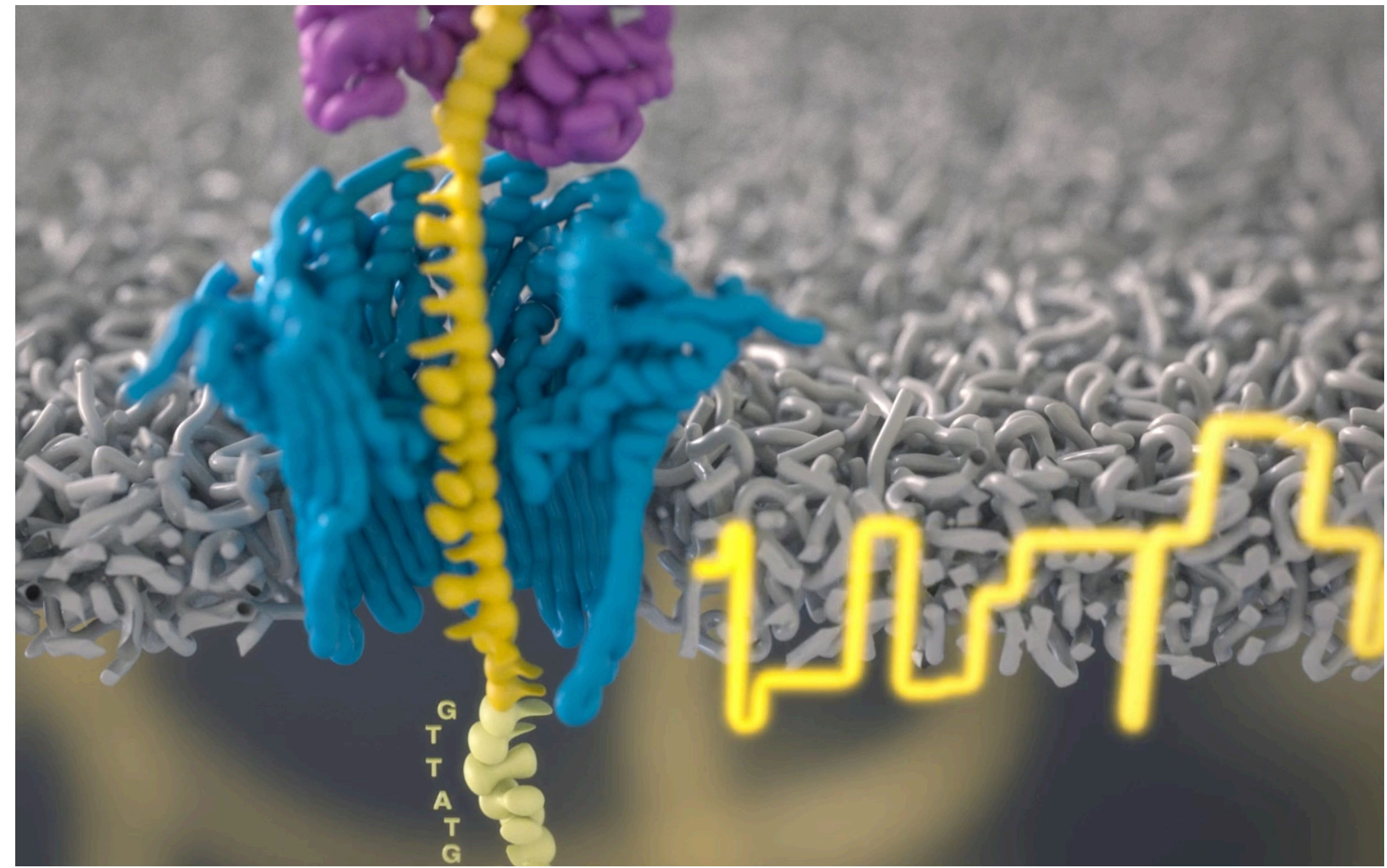
NGS trzeciej generacji - wyzwania

- Mniejsza przepustowość
- Niższa dokładność
 - szybkie postępy ostatnio
- sekwencjonowanie hybrydowe - składanie odczytów krótkich na matrycy długich
- Narzędzia bioinformatyczne mniej rozwinięte



Ukierunkowane sekwencjonowanie nanopore

- Sekwencja odczytywana w czasie rzeczywistym
- Można usunąć lub zaakceptować na podstawie początkowej sekwencji
- Bez amplifikacji
 - zachowany stan metylacji



© nanoporetech.com

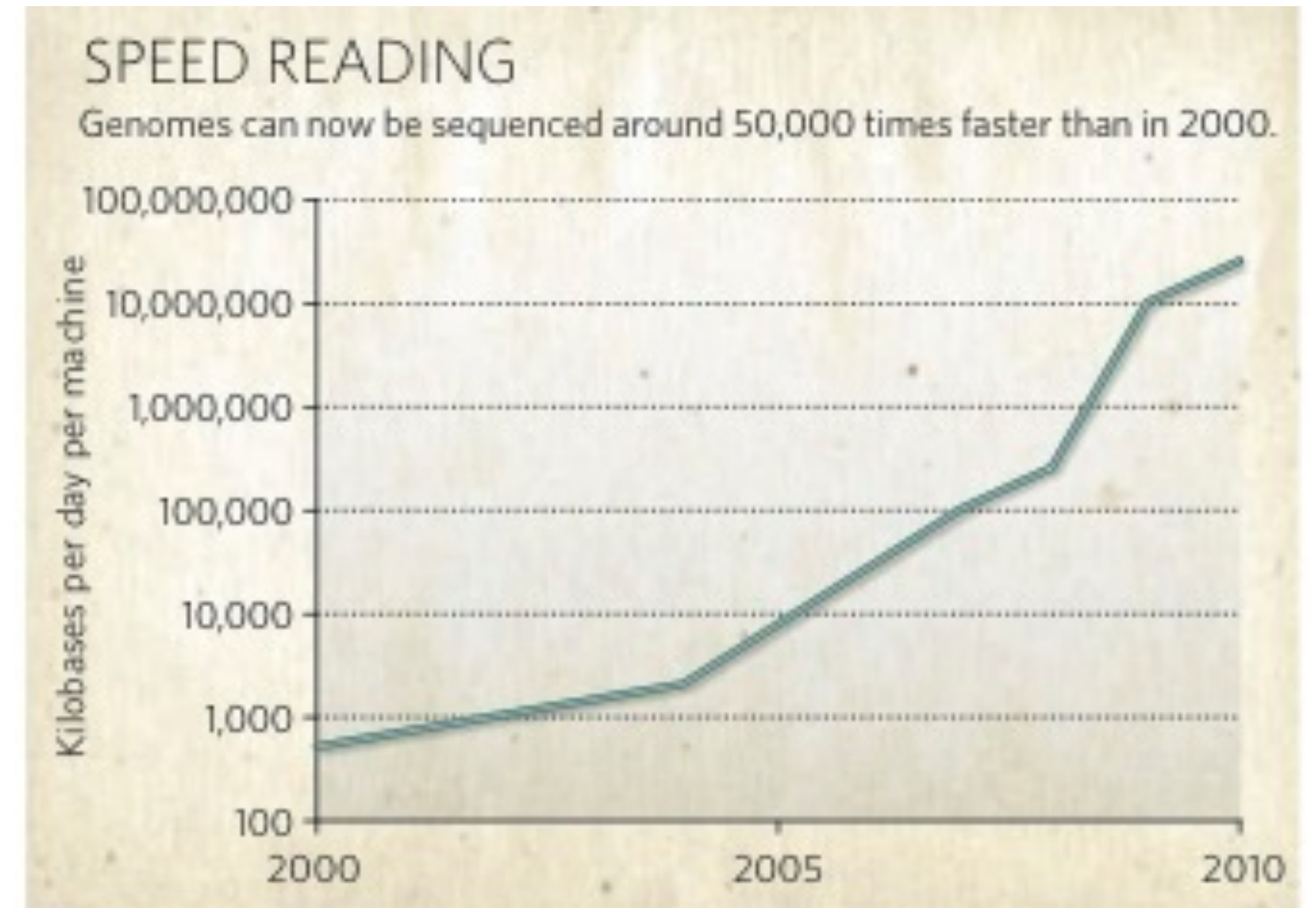
Targeted long-read sequencing identifies missing disease-causing variation

Danny E. Miller,^{1,2,*} Arvis Sulovari,^{1,21} Tianyun Wang,^{1,21} Hailey Loucks,² Kendra Hoekzema,¹ Katherine M. Munson,¹ Alexandra P. Lewis,¹ Edith P. Almanza Fuerte,^{2,22} Catherine R. Paschal,^{3,4} Tom Walsh,^{1,5} Jenny Thies,² James T. Bennett,^{2,3,6,7} Ian Glass,² Katrina M. Dipple,^{2,7,8} Karynne Patterson,¹ Emily S. Bonkowski,² Zoe Nelson,² Audrey Squire,² Megan Sikes,² Erika Beckman,² Robin L. Bennett,⁵ Dawn Earl,² Winston Lee,^{9,10} Rando Allikmets,^{10,11} Seth J. Perlman,¹² Penny Chow,¹³ Anne V. Hing,¹³ Tara L. Wenger,² Margaret P. Adam,² Angela Sun,^{2,8} Christina Lam,^{2,7,14} Irene Chang,² Xue Zou,¹⁵ Stephanie L. Austin,¹⁶ Erin Huggins,¹⁶ Alexias Safi,¹⁶ Apoorva K. Iyengar,^{17,18} Timothy E. Reddy,¹⁷ William H. Majoros,¹⁷ Andrew S. Allen,¹⁷ Gregory E. Crawford,¹⁶ Priya S. Kishnani,¹⁶ University of Washington Center for Mendelian Genomics, Mary-Claire King,^{1,5} Tim Cherry,⁶ Jessica X. Chong,^{2,7} Michael J. Bamshad,^{1,2,7} Deborah A. Nickerson,^{1,7} Heather C. Mefford,^{2,7,22} Dan Doherty,^{2,7,19} and Evan E. Eichler^{1,7,20,*}

The American Journal of Human Genetics 108, 1436–1449, August 5, 2021

Sekwencjonowanie - postęp techniczny

- Koszt sekwencjonowania między 1999 a 2009 obniżył się 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



Genomika

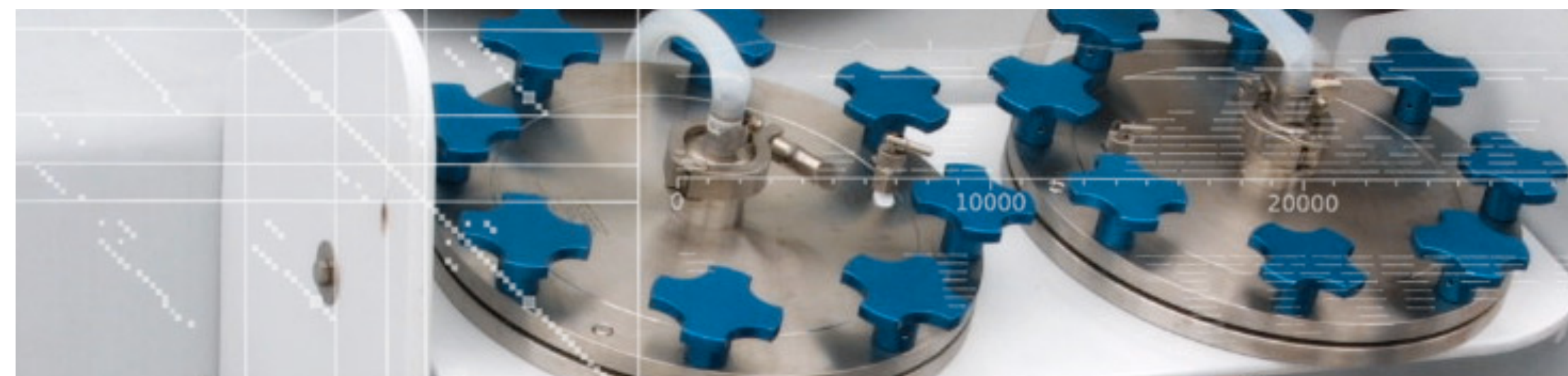
- Genomika jest dziedziną zajmującą się badaniem całych genomów (kompletu informacji genetycznej) różnych organizmów
- Sekwencjonowanie i charakteryzowanie genomów - genomika strukturalna
- Badanie funkcji zawartych w nich genów - genomika funkcjonalna

Metagenomika

- Izolacja DNA ze środowiska i sekwencjonowanie
- Jedyne sposoby badania mikroorganizmów, które nie dają się hodować

Metagenomika

Analiza sekwencji całości DNA
wyizolowanego ze zbiorowiska organizmów



Odkrycia dzięki sekwencjonowaniu

- 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

Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium

H. James Tripp¹, Shellie R. Bench¹, Kendra A. Turk¹, Rachel A. Foster¹, Brian A. Desany², Faheem Niazi², Jason P. Affourtit² & Jonathan P. Zehr¹

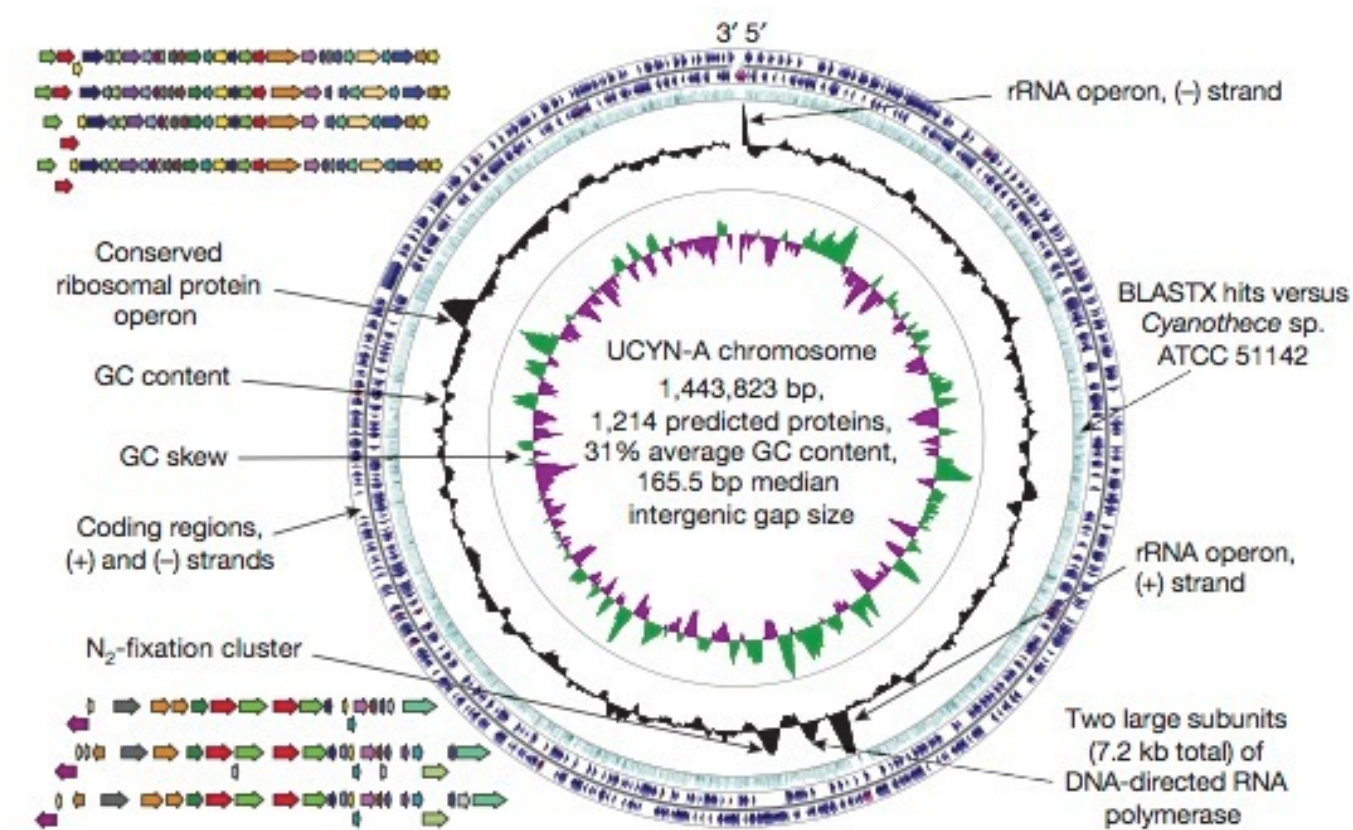
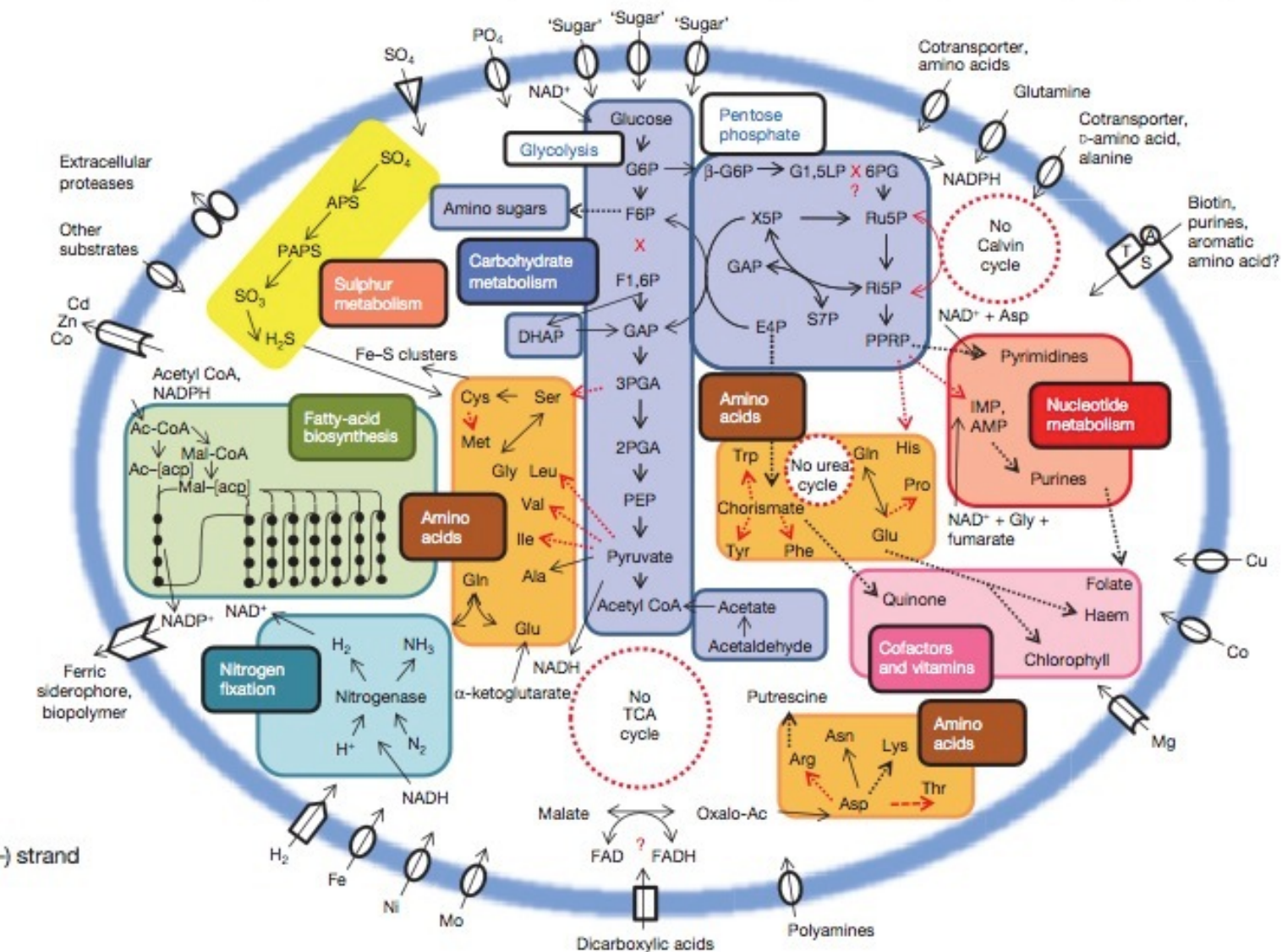
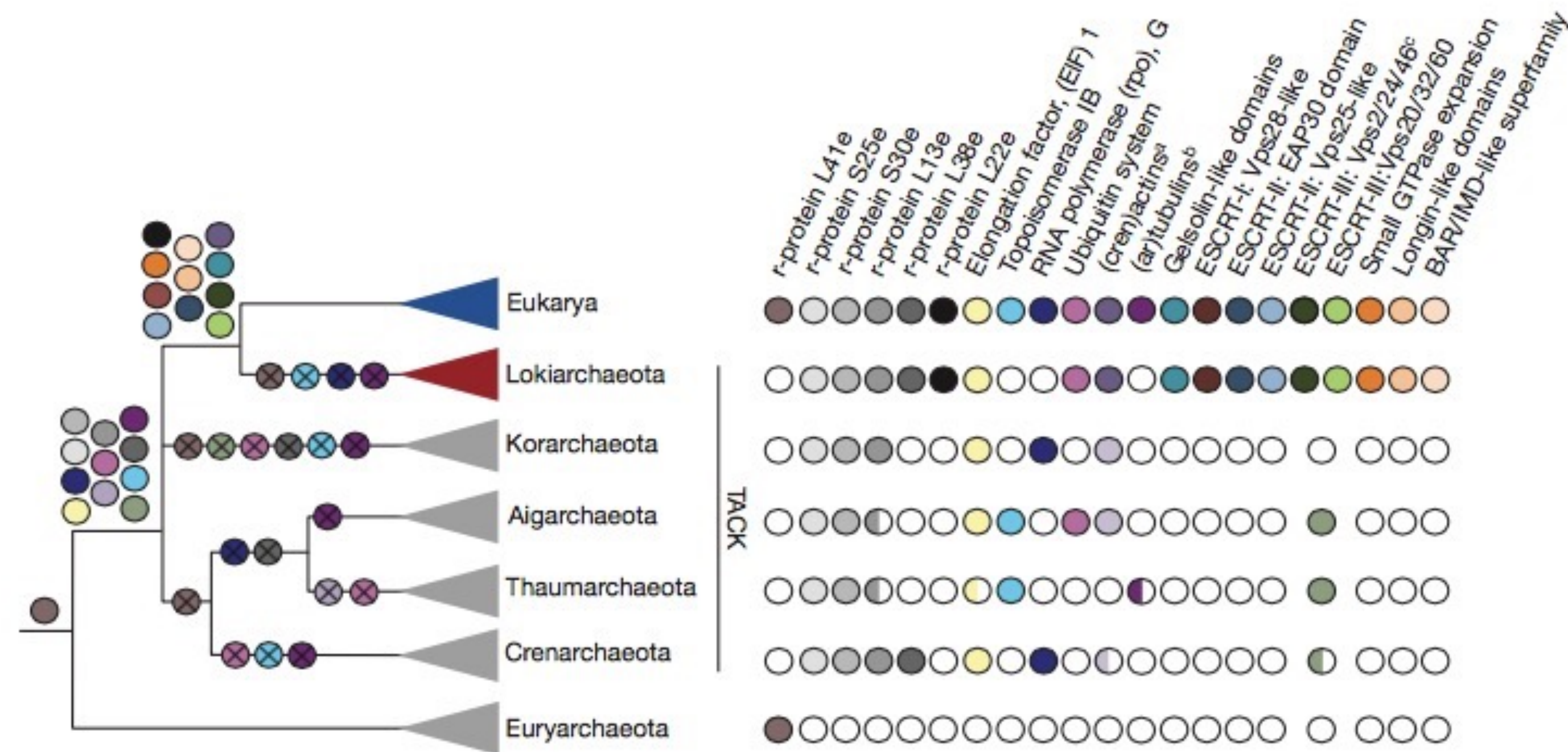


Figure 1 | Circular map of UCYN-A chromosome compared with *Cyanotheca sp. ATCC 51142*. The outer two rings show the two strands of the

Candidatus Atelocyanobacterium thalassa

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

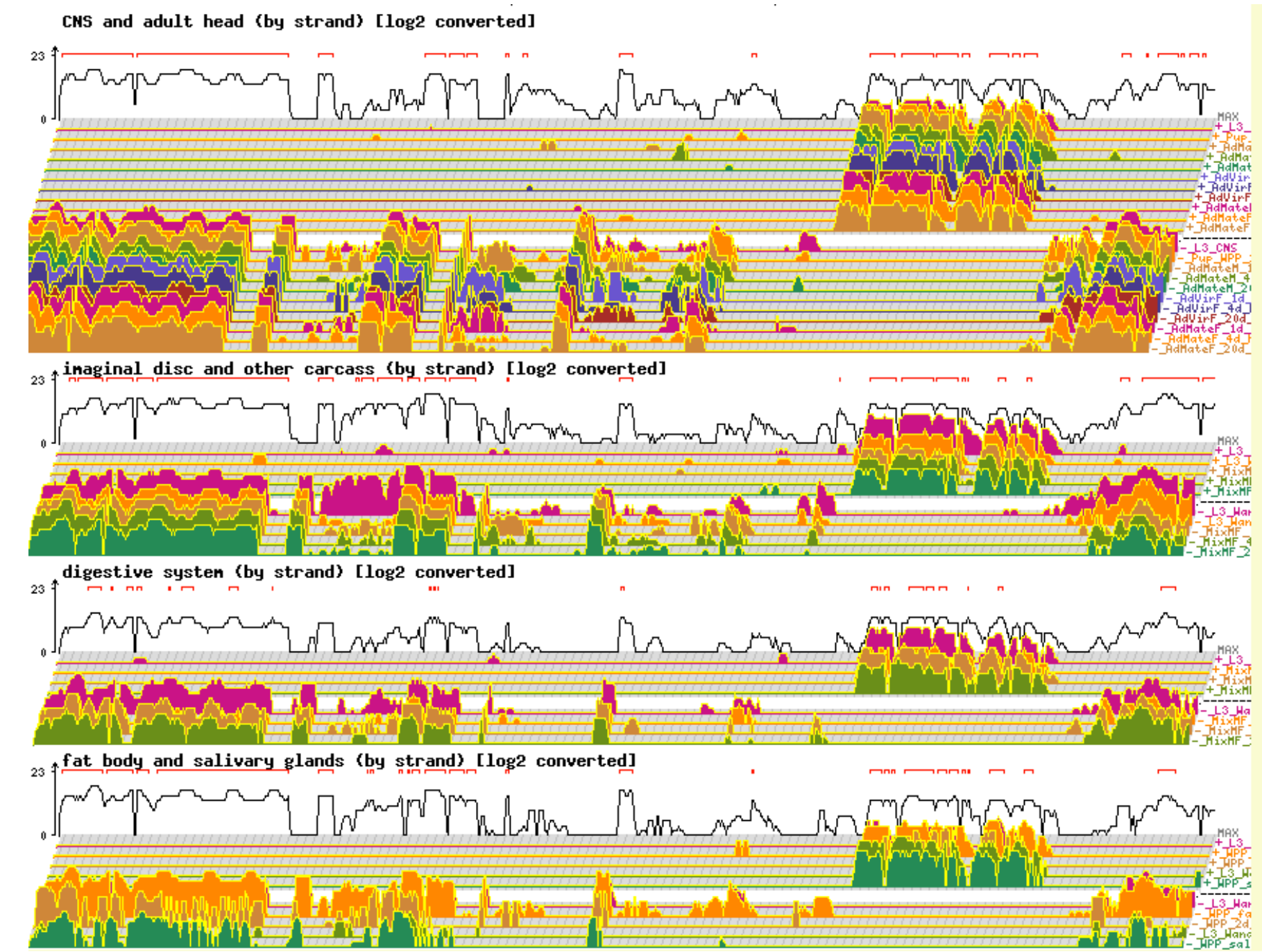
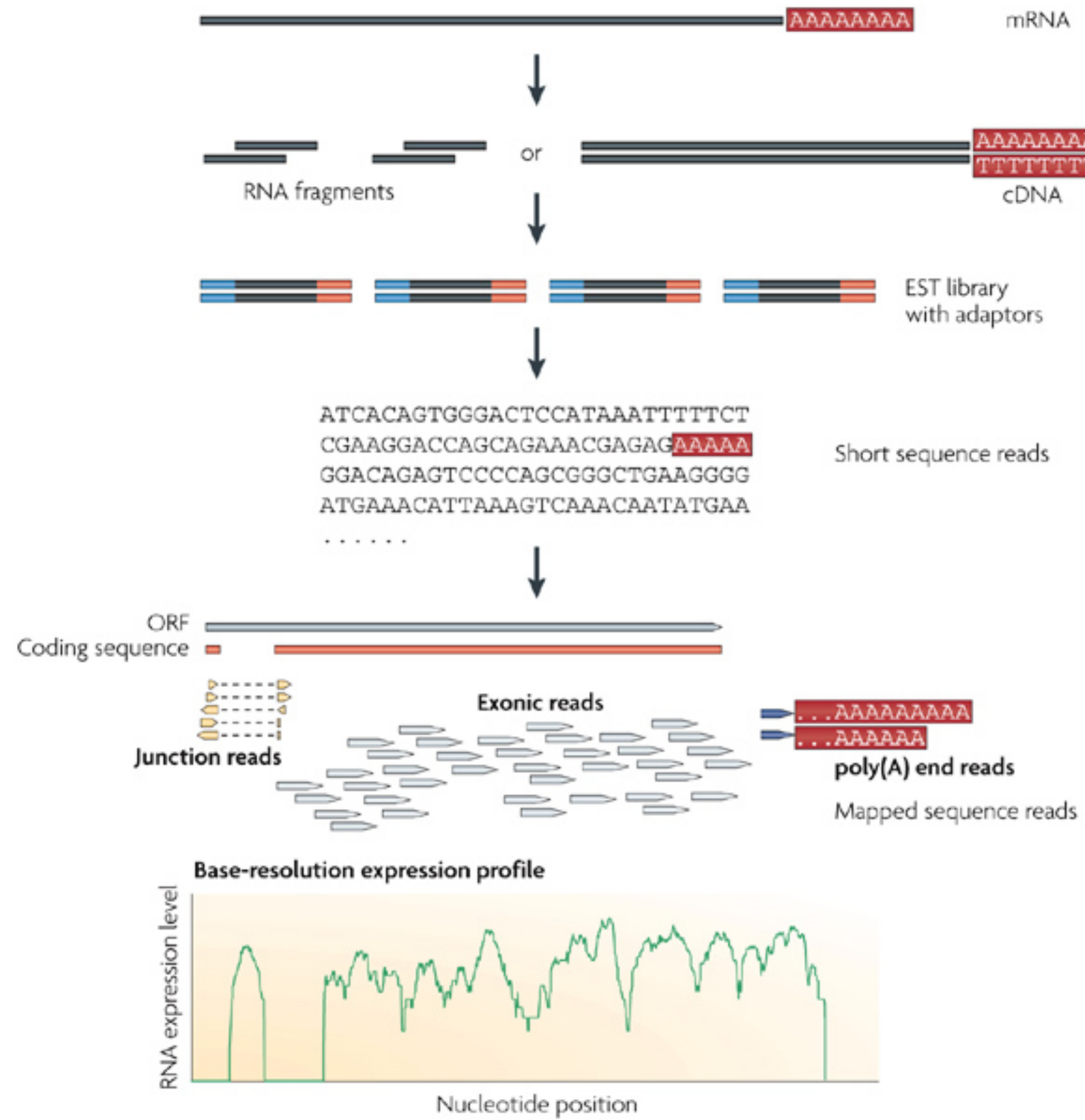
Anja Spang^{1*}, Jimmy H. Saw^{1*}, Steffen L. Jørgensen^{2*}, Katarzyna Zaremba-Niedzwiedzka^{1*}, Joran Martijn¹, Anders E. Lind¹, Roel van Eijk[†], Christa Schleper^{2,3,1}

©2015 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

Wielkie projekty

- Projekt 1000 genomów - różnorodność genetyczna człowieka
 - Obecnie dziesiątki tysięcy genomów różnych populacji
 - 2021 - projekt 1000 polskich genomów
- Metagenomika mikrobiomu przewodu pokarmowego człowieka
- Archeogenomika
- Genomy wymarłych gatunków (np. Neandertalczyk)

RNA-seq



Genomika funkcjonalna

- Wysokoprzepustowe analizy:
 - ekspresji genów (mikromacierze, RNA-seq)
 - proteomu
 - interakcji genetycznych i fizycznych
 - fenotypów



Odwrotna genetyka – od genu do funkcji

Genetyka tradycyjna

Funkcja (mutacja, fenotyp)



Klonowanie genu



Analiza sklonowanego genu

Genetyka „odwrotna”

Gen (z sekwencji całego genomu)

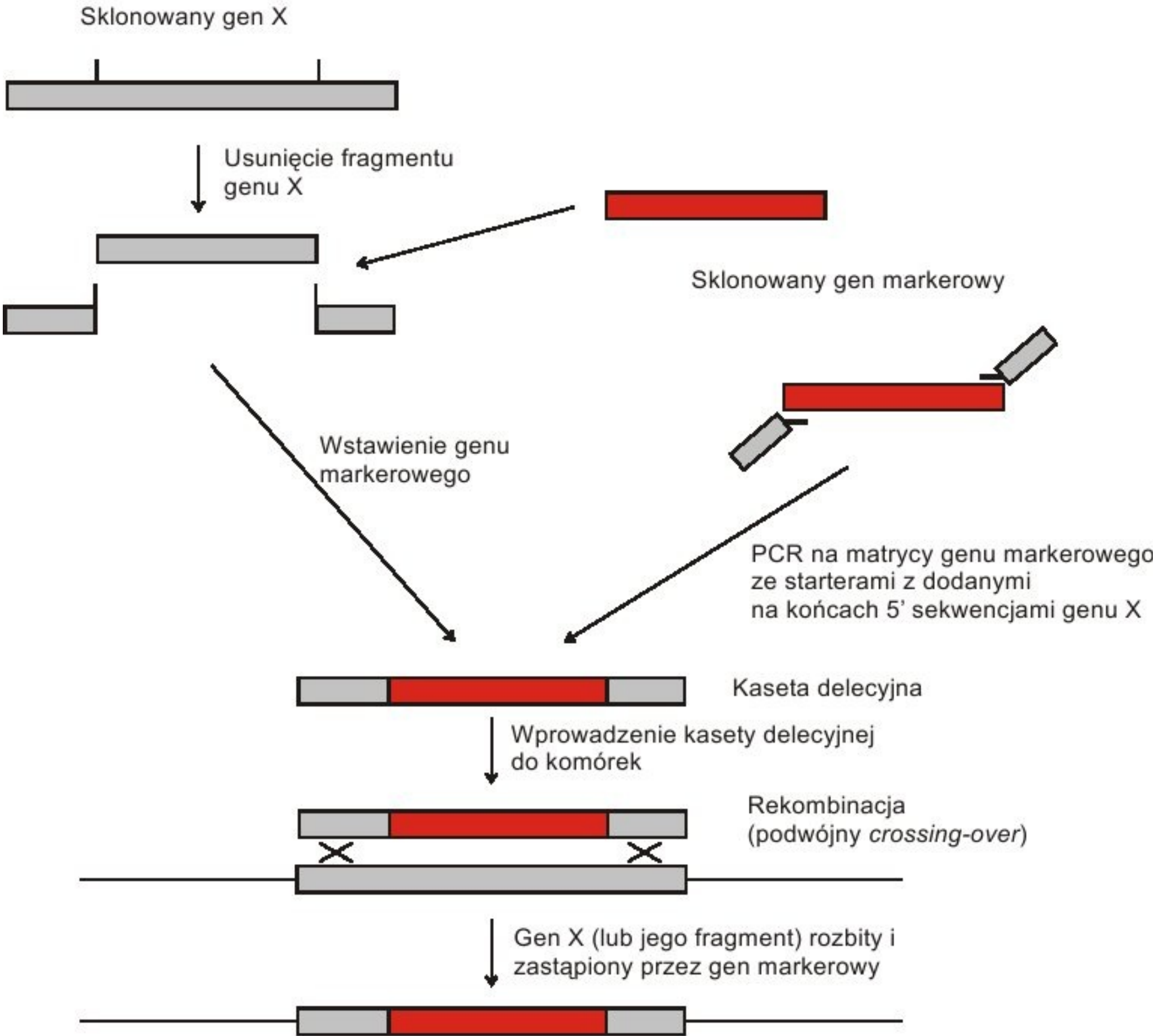


Inaktywacja genu



Analiza uzyskanego fenotypu

Odwrotna genetyka – inaktywacja przez rekombinację



Odwrotna genetyka – interferencja RNA



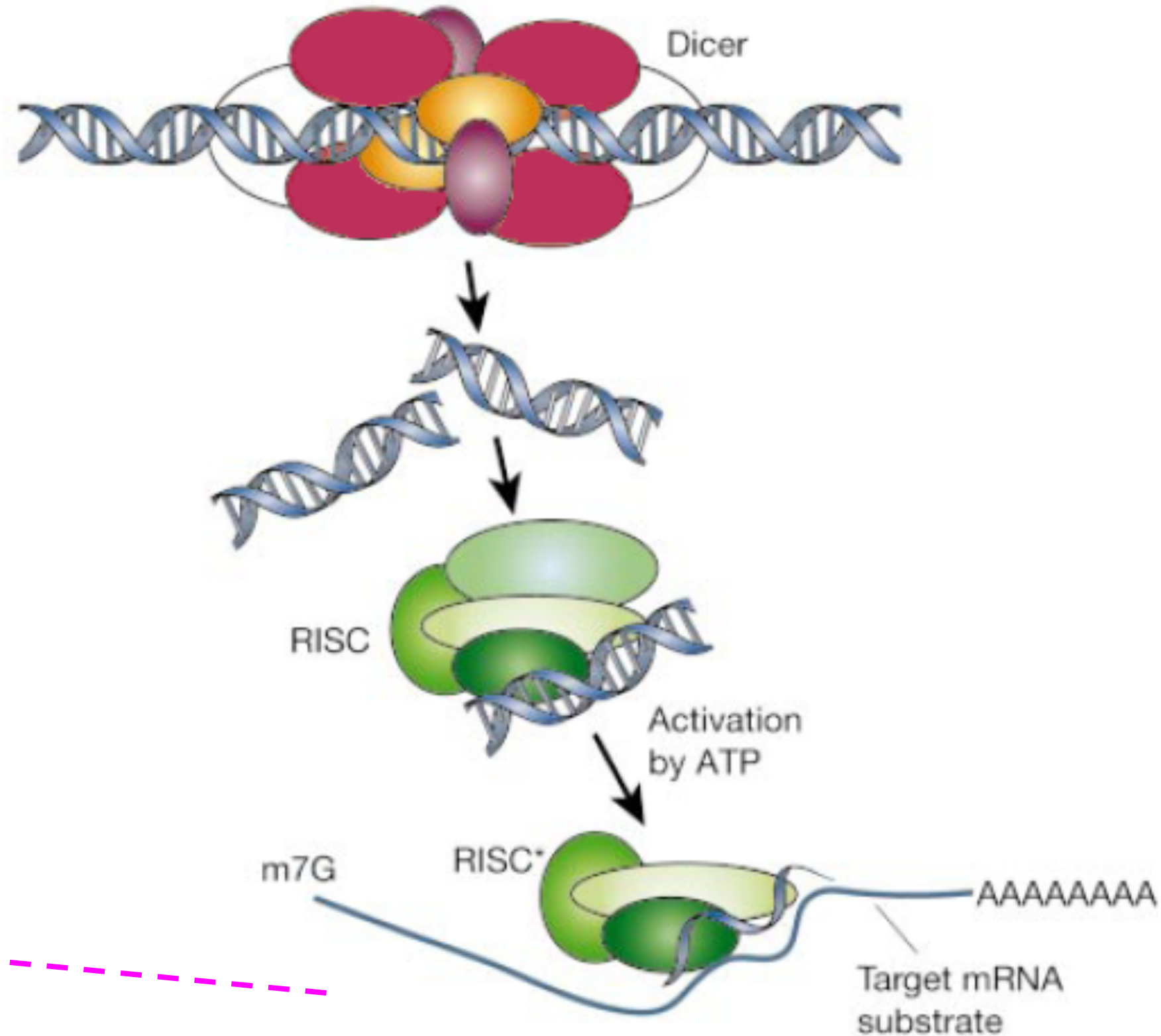
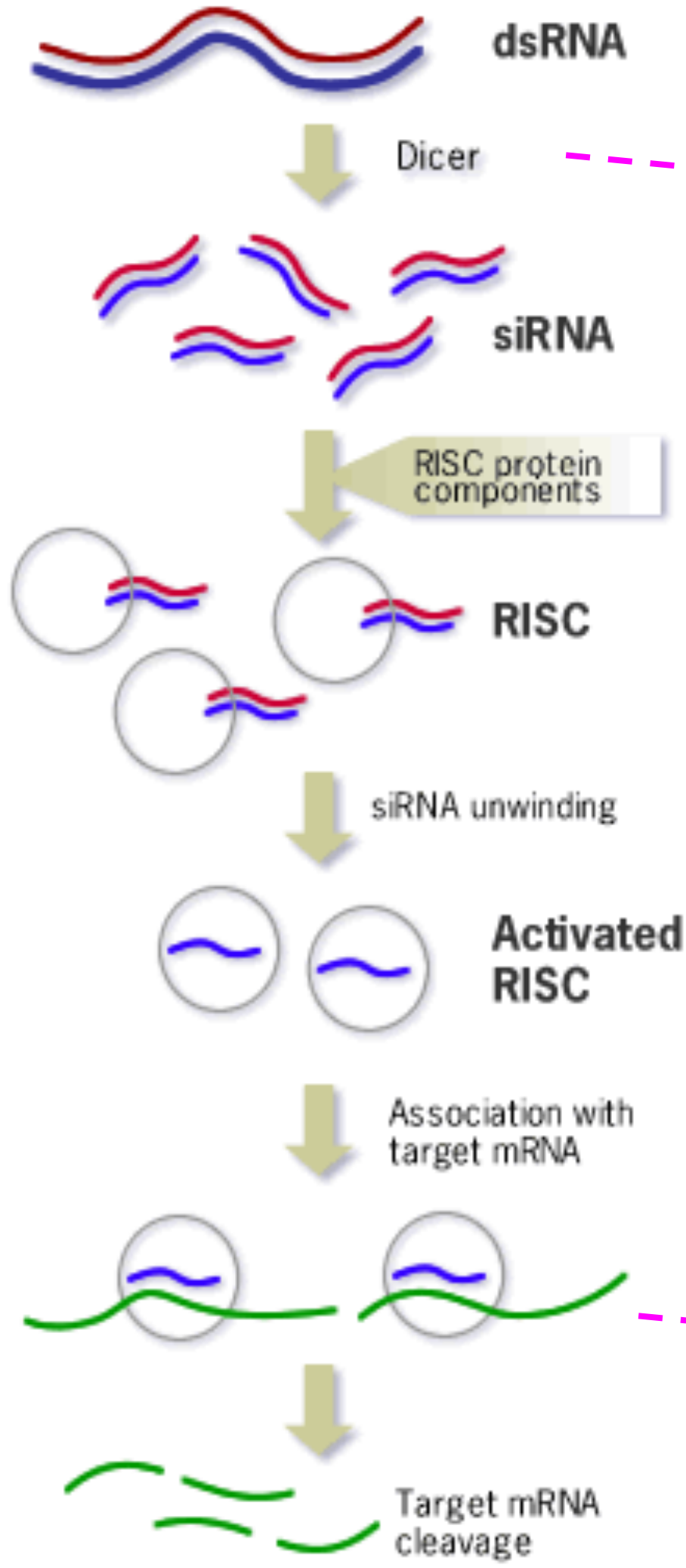
Odkrycie roku 2002 –
regulacyjna rola małych RNA

Nagroda Nobla w dziedzinie
medycyny 2006, za odkrycie
mechanizmu interferencji

RNA

A. Fire i C. Mello

siRNA - jak to działa?



Efekt – degradacja mRNA

Zastosowania siRNA

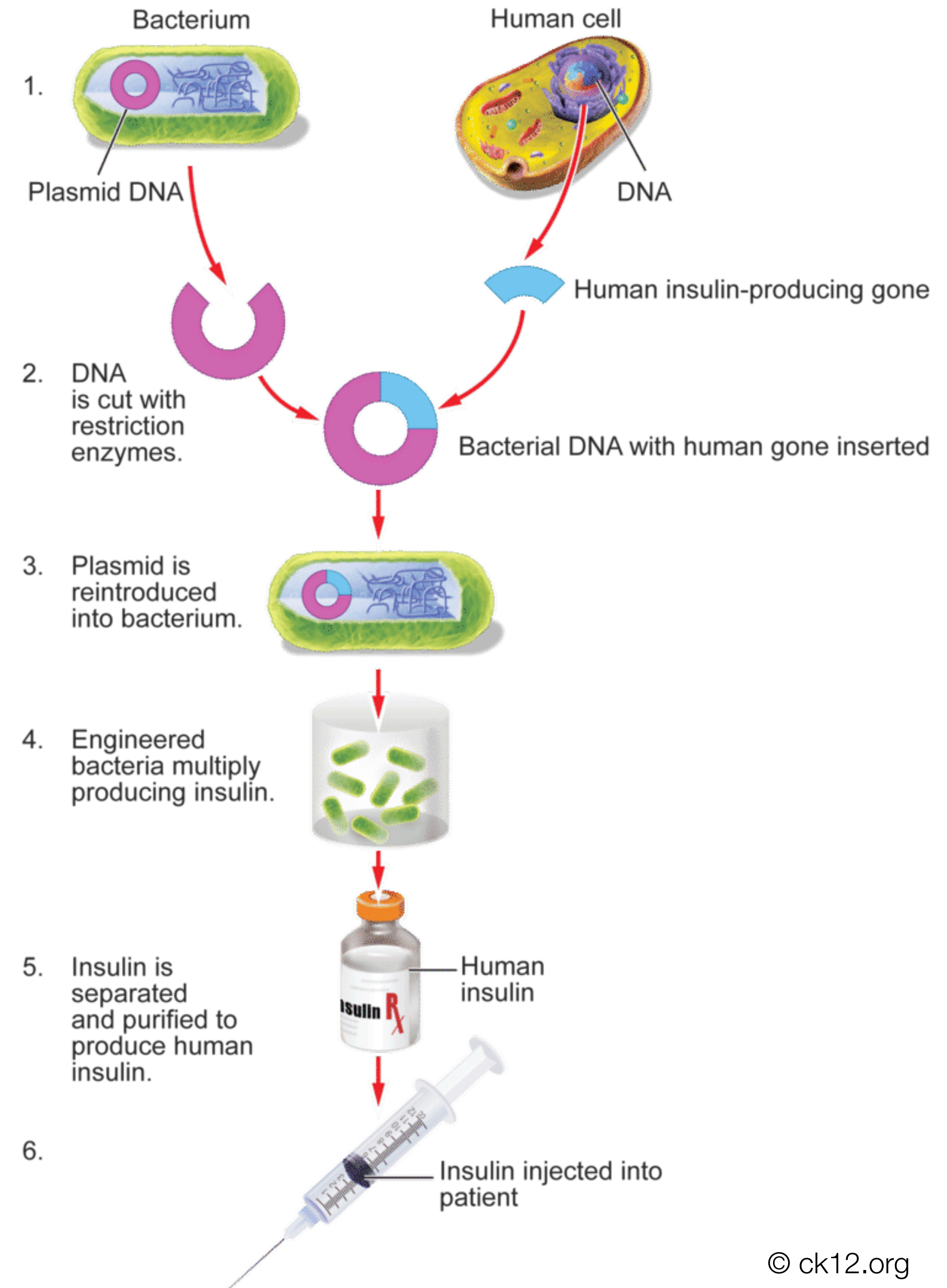
- Badanie funkcji genów (“odwrotna genetyka”) - szczególnie skuteczne u nicienia *Caenorhabditis*, ale działa też w komórkach owadów, ssaków i roślin



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

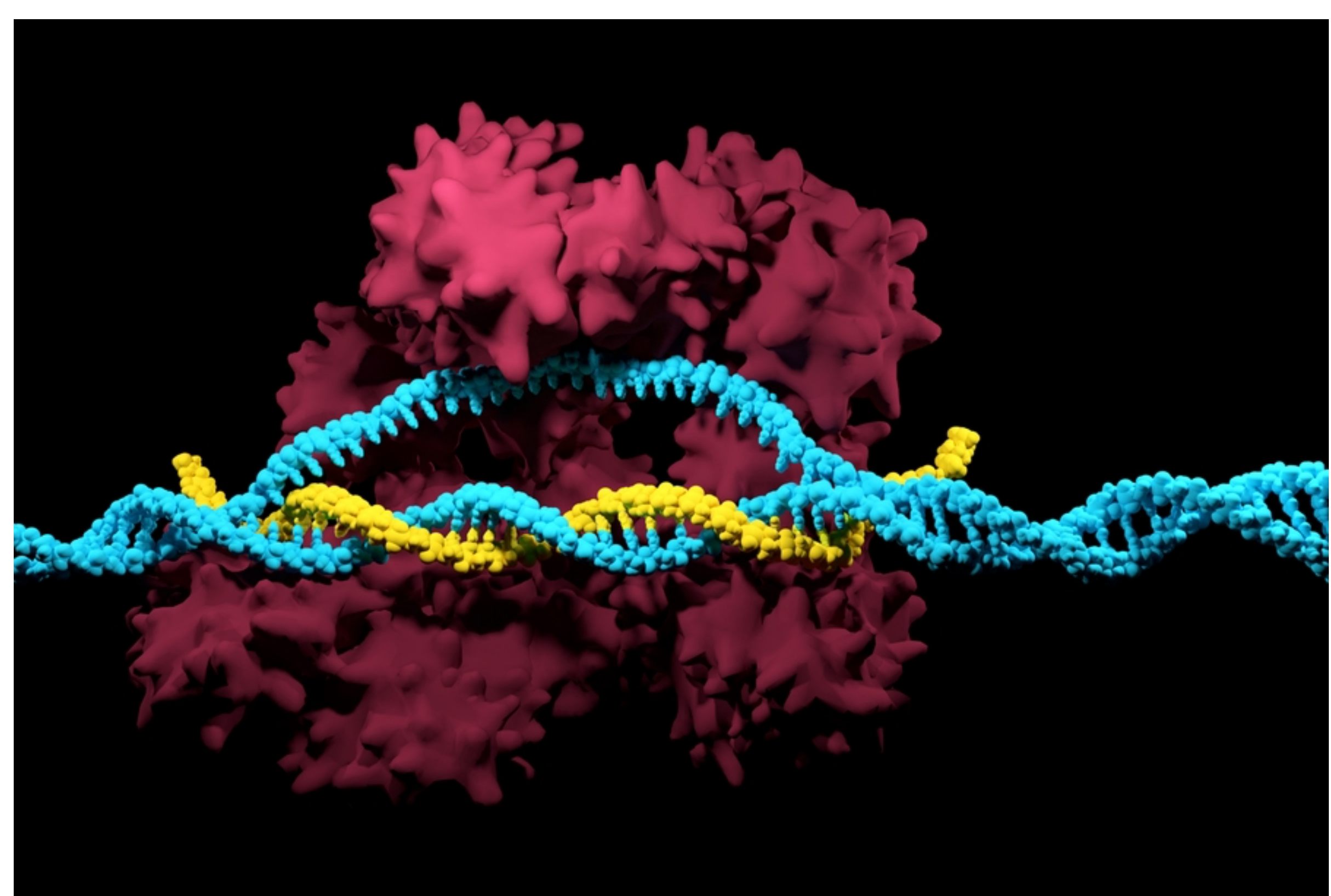
Inżynieria genetyczna

- Zbiór metod w użyciu od lat 70.
- Dla zmodyfikowania genomu należy:
 - wyizolować DNA
 - zmodyfikować DNA *in vitro*
 - wprowadzić zmodyfikowany DNA do komórek (tego samego lub innego organizmu)



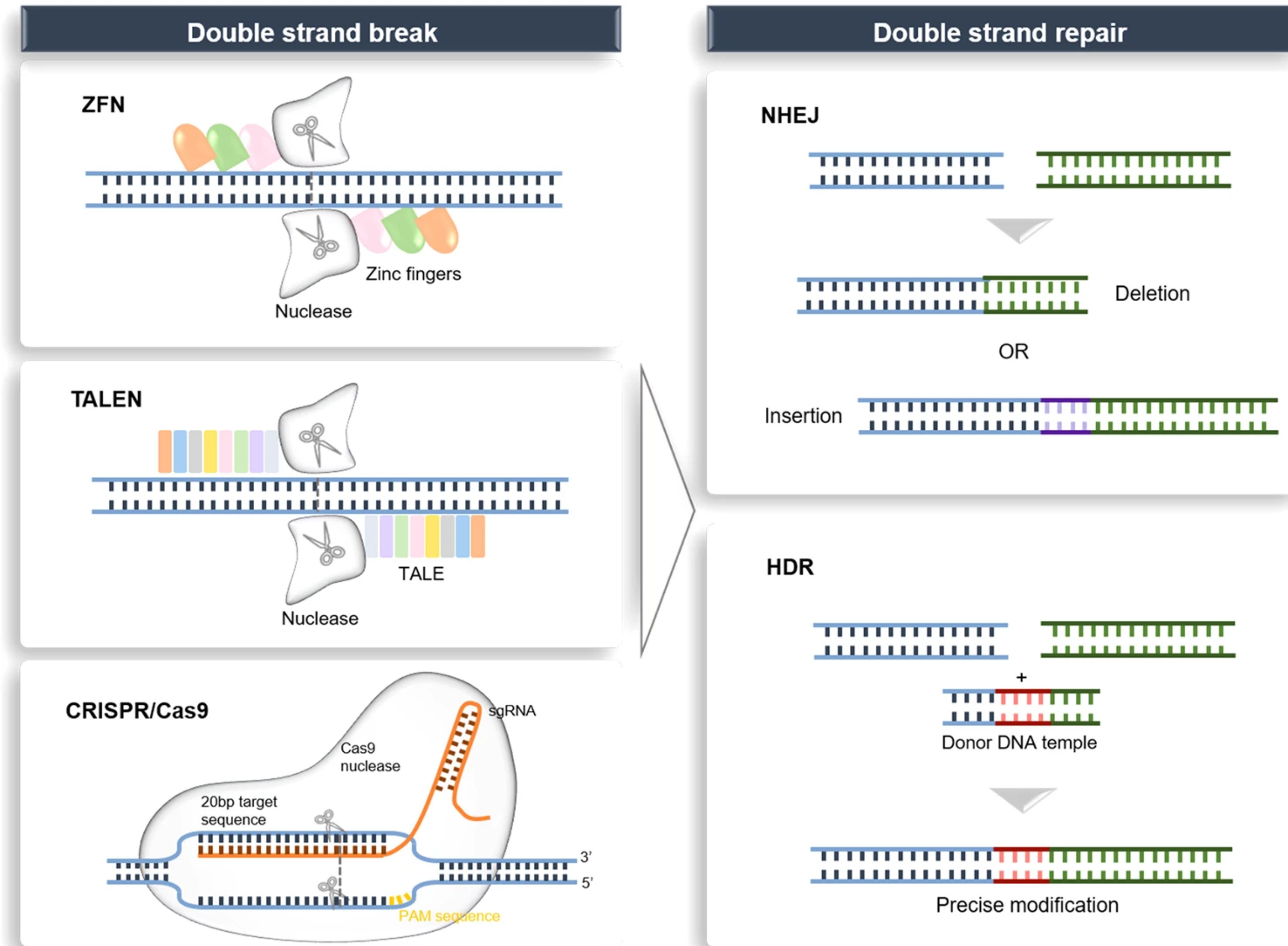
Redagowanie genomu

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



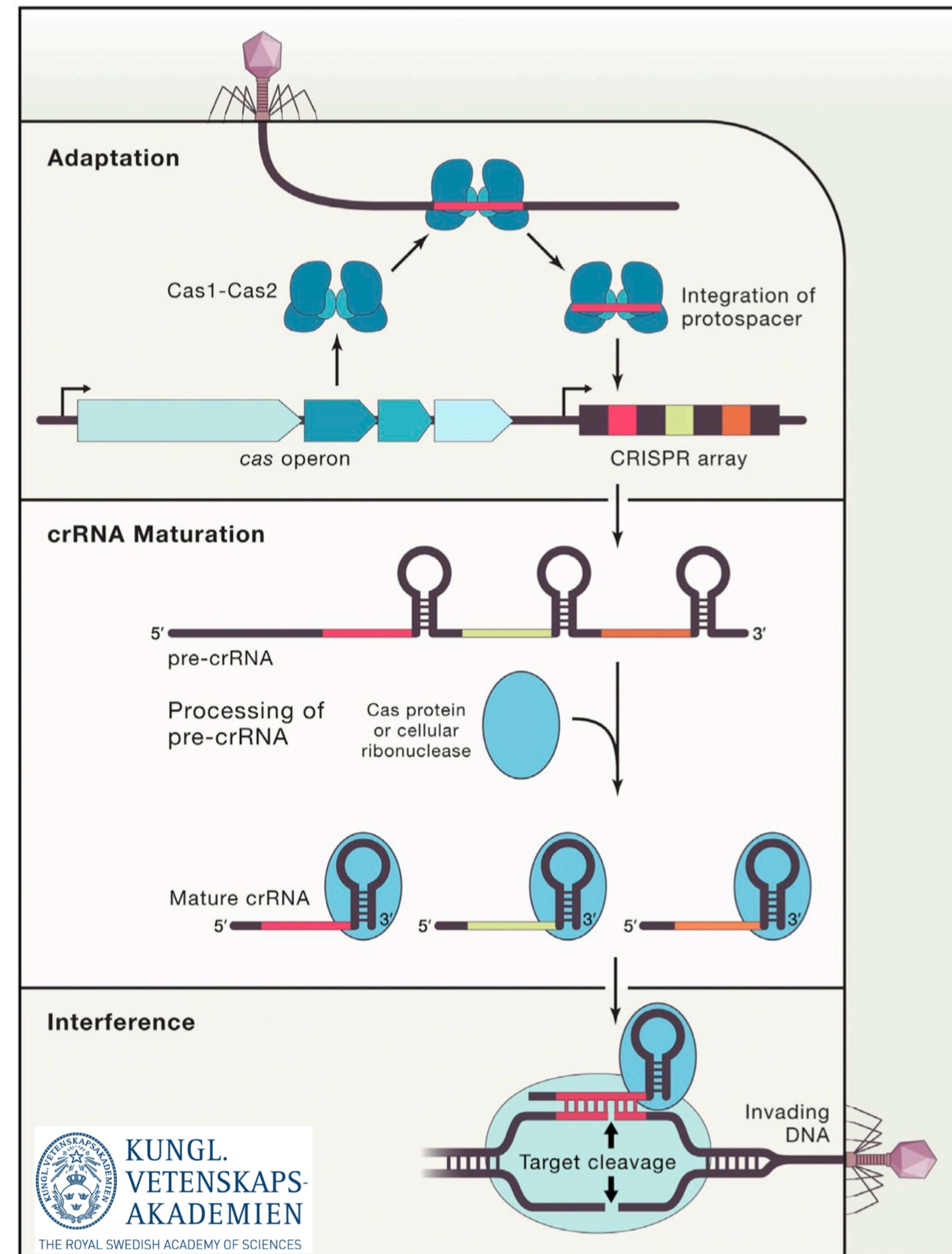
Zasady i narzędzia

- 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



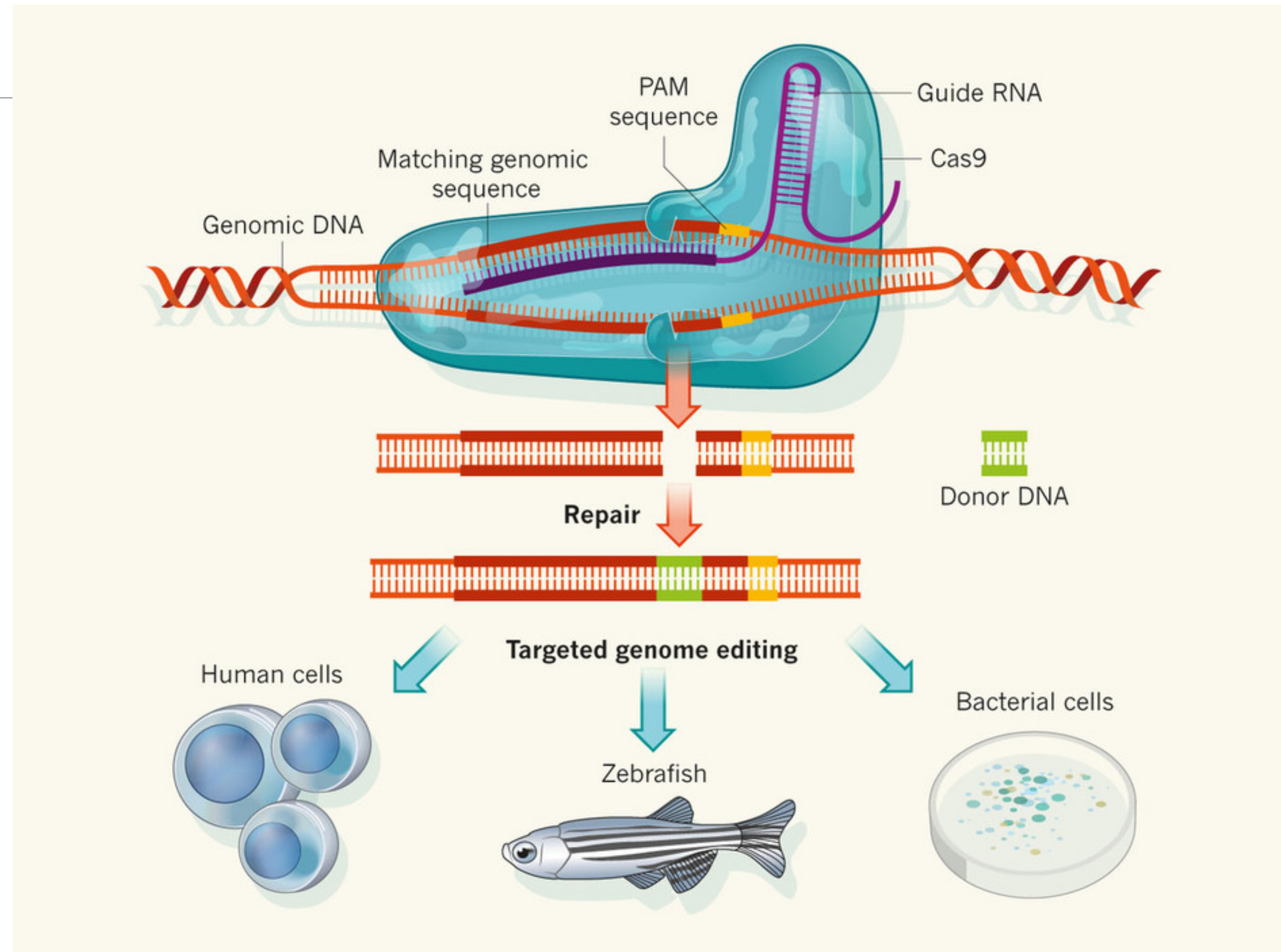
CRISPR

- 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



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.



Nobel 2020

- Kontrowersje
 - Virginijus Šikšnys - publikację wysłał wcześniej, ale początkowo była odrzucona, ostatecznie ukazała się później
 - Wcześniejsze badania nad CRISPR u bakterii: Francisco Mojica, Yoshizumi Ishino
 - Feng Zhang - zastosowanie u ssaków, patent



© Nobel Media. Ill. Niklas
Elmehed.
Emmanuelle
Charpentier

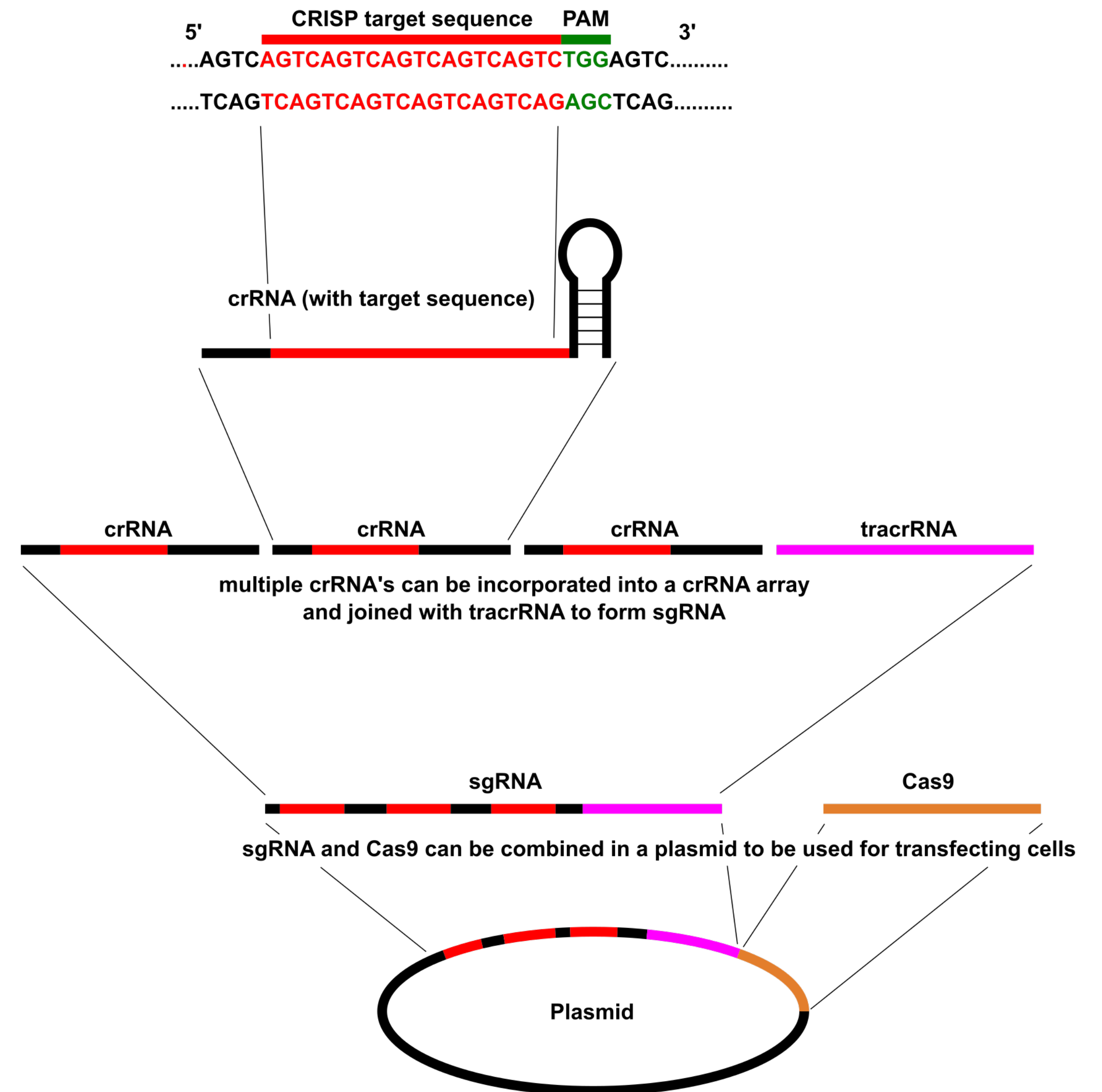


© Nobel Media. Ill. Niklas
Elmehed.
Jennifer A. Doudna

CRISP-Cas9 AND GENOME EDITING

sgRNA

- W natywnym bakteryjnym systemie crRNA (rozpoznający cel) i tracrRNA (aktywujący kompleks) to osobne cząsteczki
- W zastosowaniach są połączone w jedną cząsteczkę sgRNA (Doudna & Charpentier)



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 Tämhuud

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

Dzieci na zamówienie?



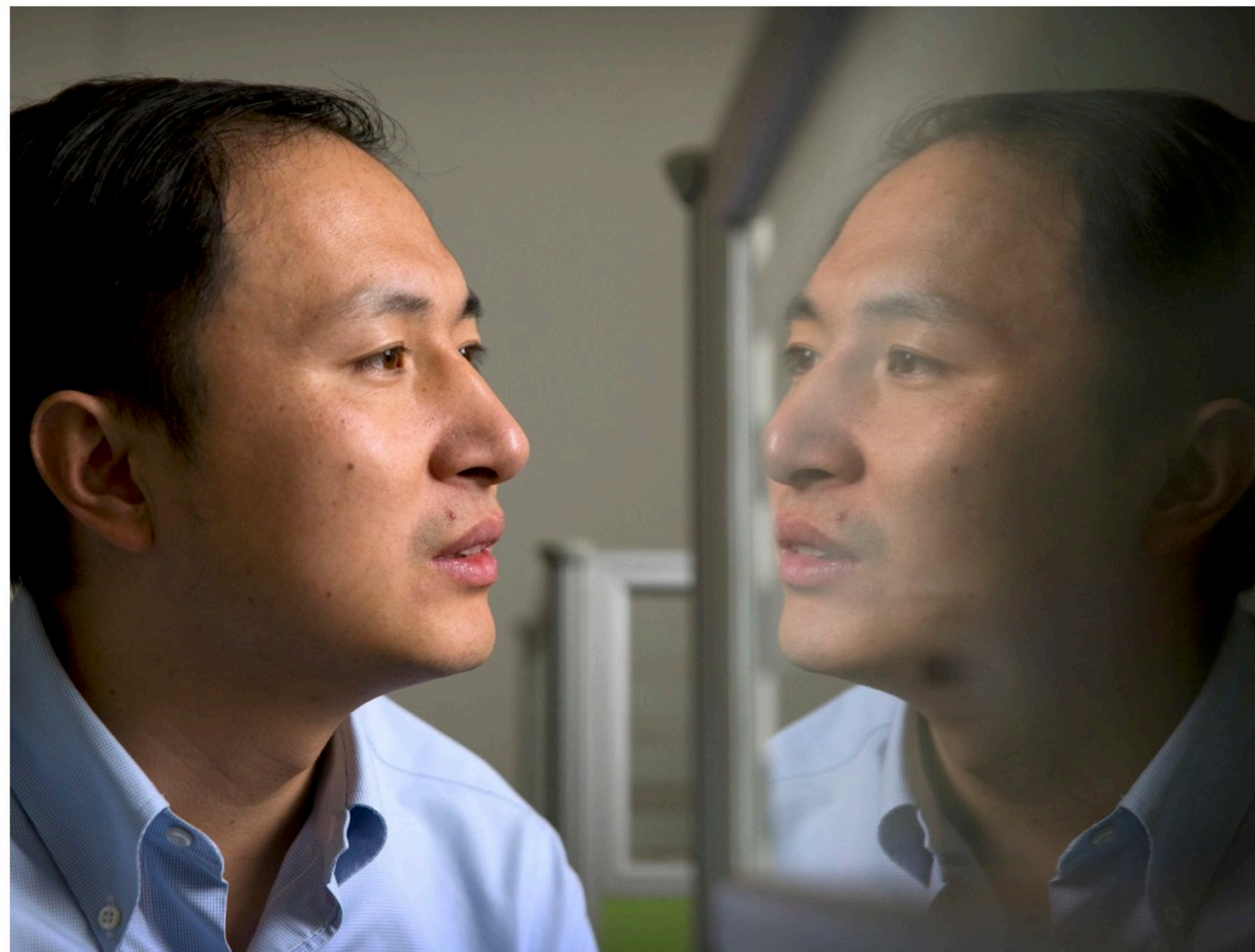
<http://www.shutterstock.com/gallery-54706p1.html> Photosani/Shutterstock



?

19.11.2018

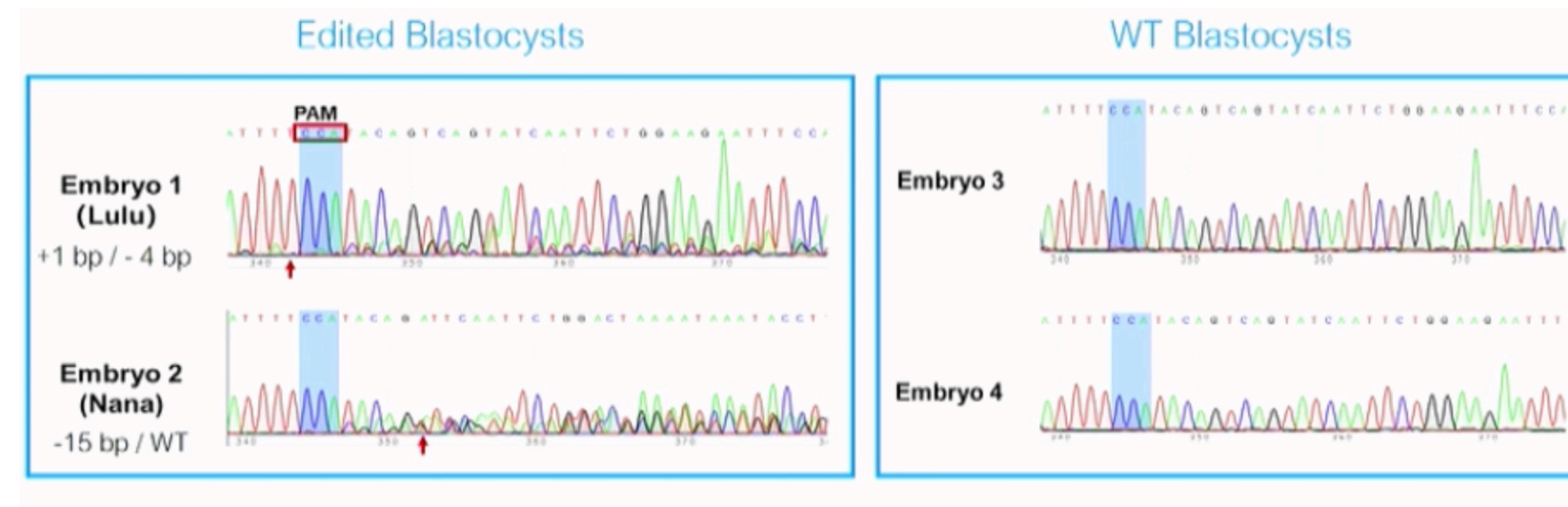
- He Jiankui ogłasza narodziny dzieci (dwóch dziewczynek), których genomy poddano edycji
- Cel: inaktywacja genu *CCR5* mająca chronić przed infekcją HIV
 - ojciec dziewczynek jest nosicielem
- Ogłoszenie poprzez wywiad prasowy i film na Youtube (!)
- Później prezentacja na konferencji
- Brak recenzowanej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



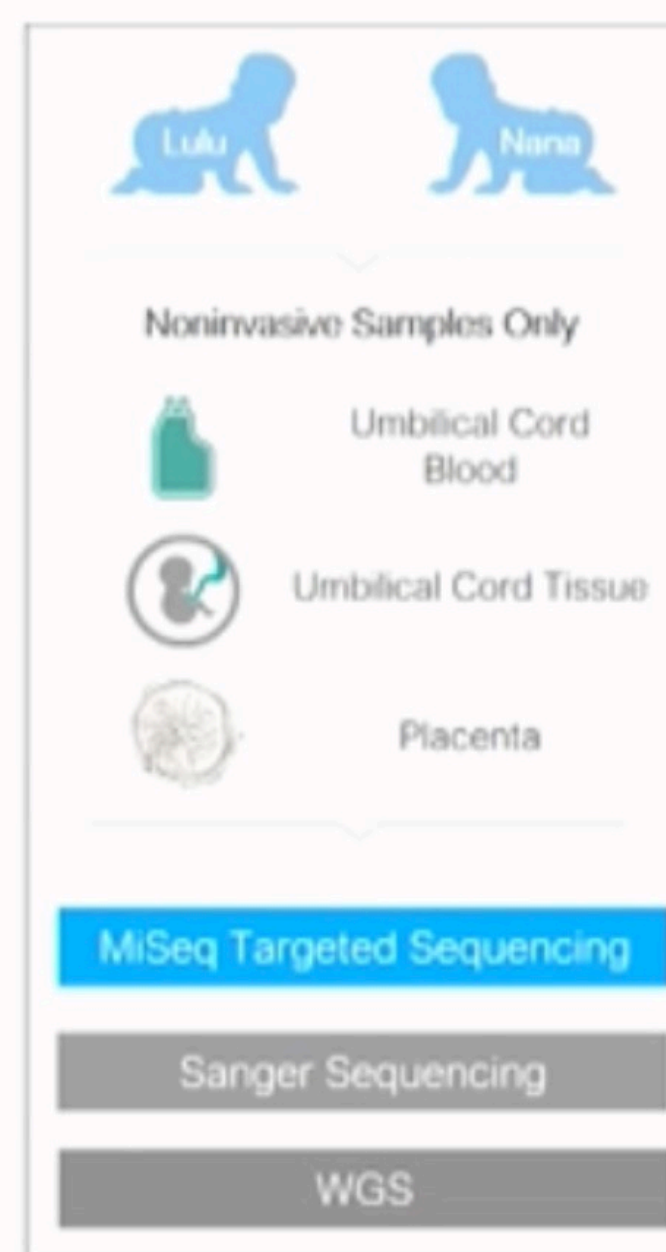
He Jiankui is reflected in a glass panel as he works at a computer at a laboratory in Shenzhen in southern China's Guangdong province. [Mark Schiefelbein/AP Photo](#)

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



CCR5 editing confirmed by deep sequencing after birth

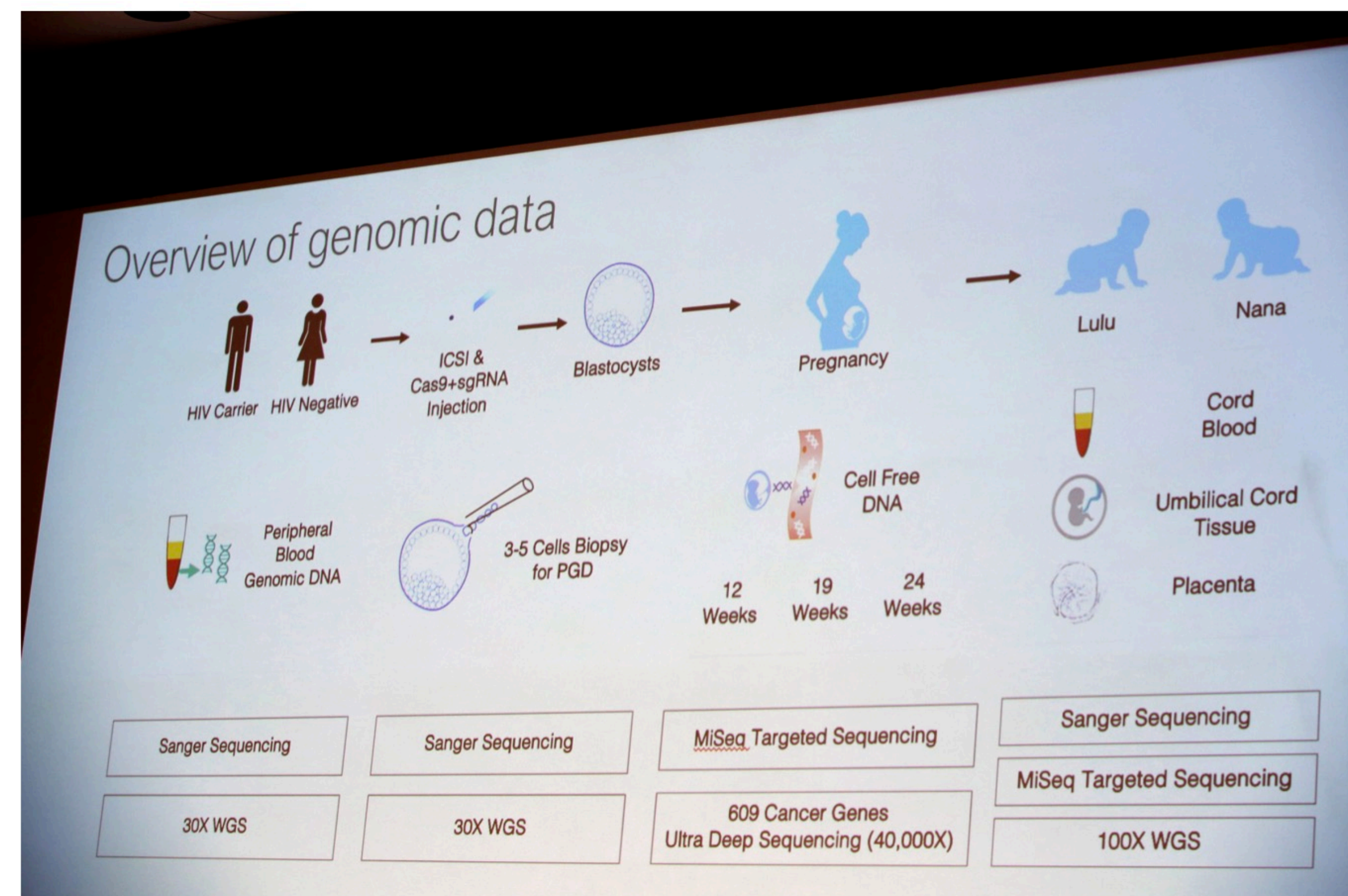


Editing Patterns Consistent between PGD, cfDNA

Reference genome	TCTCATTTC CATA CA . GTCAGTATCAATTC TGG	WGS reads number at PGD	Miseq Allele frequency after birth	Genotype	
Father	TCTCATTTC CATA CA . GTCAGTATCAATTC TGG	-	-	WT/WT	
Mother	TCTCATTTC CATA CA . GTCAGTATCAATTC TGG	-	-	WT/WT	
Lulu	PGD	TCTCATTTC CATA CA . GTCAGTATCAATTC TGG	7/11	-	WT/-15bp
	Cord blood	TC TCAGTATCAATTC TGG	4/11	-	WT/-15bp
		TCTCATTTC CATA CA . GTCAGTATCAATTC TGG	-	50 19%	WT/-15bp
		TC TCAGTATCAATTC TGG	-	49 81%	WT/-15bp
Umbilical cord	TCTCATTTC CATA CA . GTCAGTATCAATTC TGG	-	47 08%	WT/-15bp	
	TC TCAGTATCAATTC TGG	-	52 92%	WT/-15bp	
	TCTCATTTC CATA CA . GTCAGTATCAATTC TGG	-	45 78%	WT/-15bp	
Placenta	TC TCAGTATCAATTC TGG	-	54 22%	WT/-15bp	
	TCTCATTTC CATA CAGTATCAATTC TGG	7/9	-	-4bp/+1bp	
	TCTCATTTC CATA CA . GTCAGTATCAATTC TGG	2/9	-	-4bp/+1bp	
Nana	PGD	TCTCATTTC CATA CAGTATCAATTC TGG	7/9	-	-4bp/+1bp
	Cord blood	TCTCATTTC CATA CAGTATCAATTC TGG	-	52 78%	-4bp/+1bp
		TCTCATTTC CATA CA . GTCAGTATCAATTC TGG	-	47 22%	-4bp/+1bp
		TC TCAGTATCAATTC TGG	-	51 32%	-4bp/+1bp
Umbilical cord	TCTCATTTC CATA CA . GTCAGTATCAATTC TGG	-	48 69%	-4bp/+1bp	
	TC TCAGTATCAATTC TGG	-	51 90%	-4bp/+1bp	
	TCTCATTTC CATA CAGTATCAATTC TGG	-	48 64%	-4bp/+1bp	

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

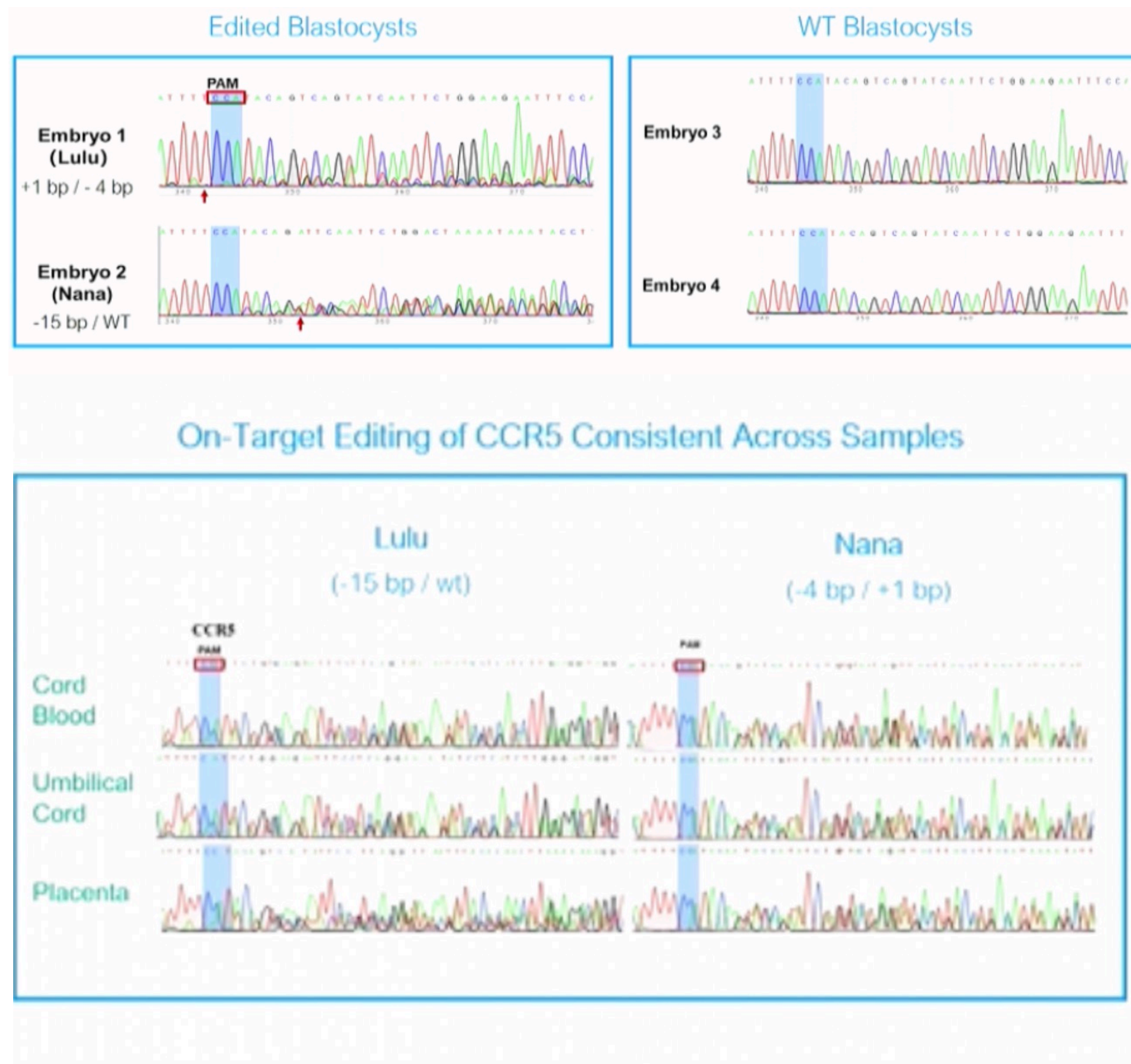


A slide presentation of genomic data from He's presentation in Hong Kong.

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 $\Delta 32$, tylko krótszą
- Lulu ma modyfikację tylko jednej z dwóch kopii genu - raczej nie będzie oporna na HIV
- Nana - zmodyfikowane obie kopie ale nie $\Delta 32$ tylko $\Delta 4/+1$ - nie wiadomo, czy zadziała



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 Rothoefl^{2*}, Norbert Teig^{2*}, Johann W. Bauer^{3*}, Graziella Pellegrini^{4,5*}, Laura De Rosa^{5*}, Davide Scaglione⁶, Julia Reichelt³, Alfred Klaussegger³, Daniela Kneisz³, Oriana Romano⁷, Alessia Secone Seconetti⁵, Roberta Contin⁵, Elena Enzo⁵, Irena Jurman⁸, Sonia Carulli⁹, Frank Jacobsen¹, Thomas Luecke¹⁰, Marcus Lehnhardt¹, Meike Fischer², Maximilian Kueckelhaus¹, Daniela Quaglino⁷, Michele Morgante⁸, Silvio Bicciato⁷, Sergio Bondanza⁹ & Michele De Luca⁵

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

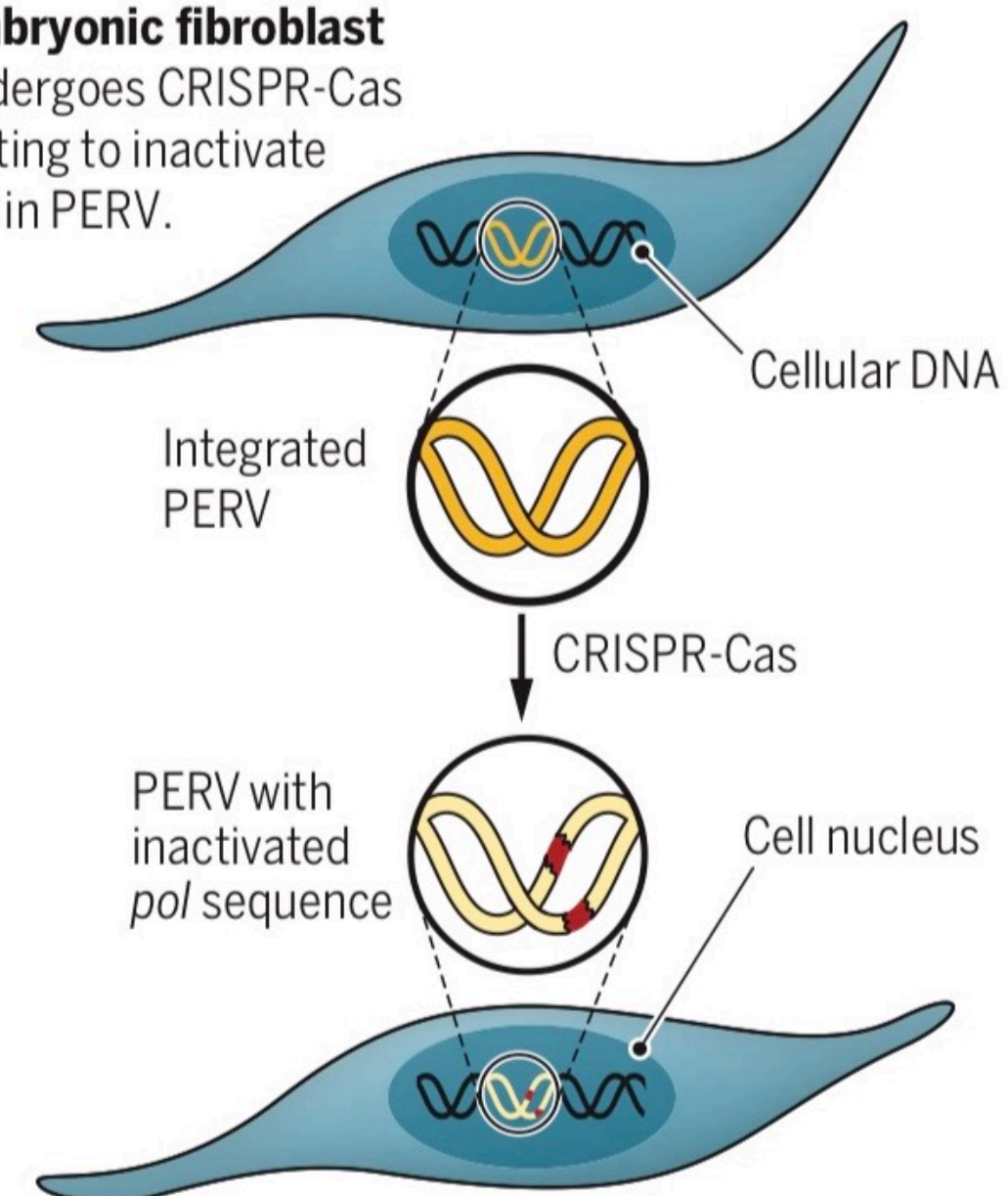
GENOME ENGINEERING

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 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)

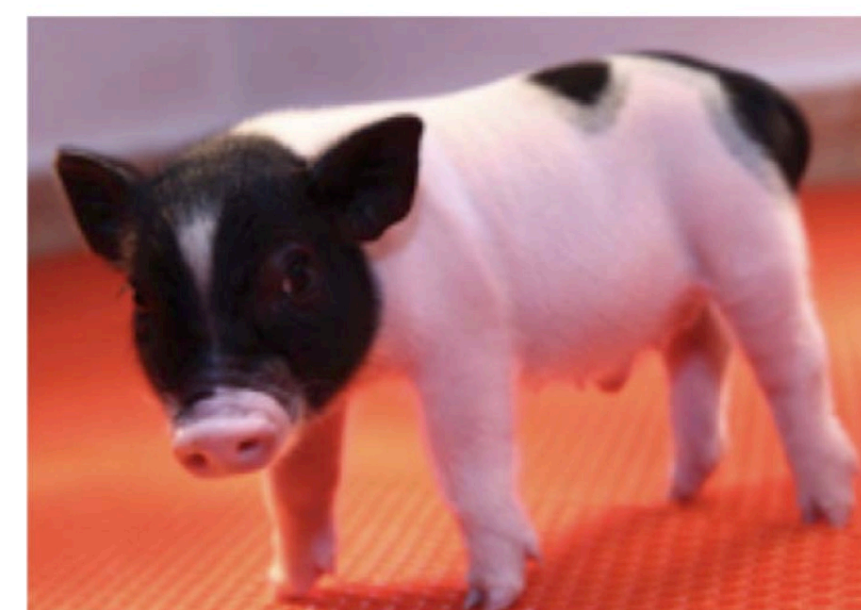
Producing PERV-inactivated pig:

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

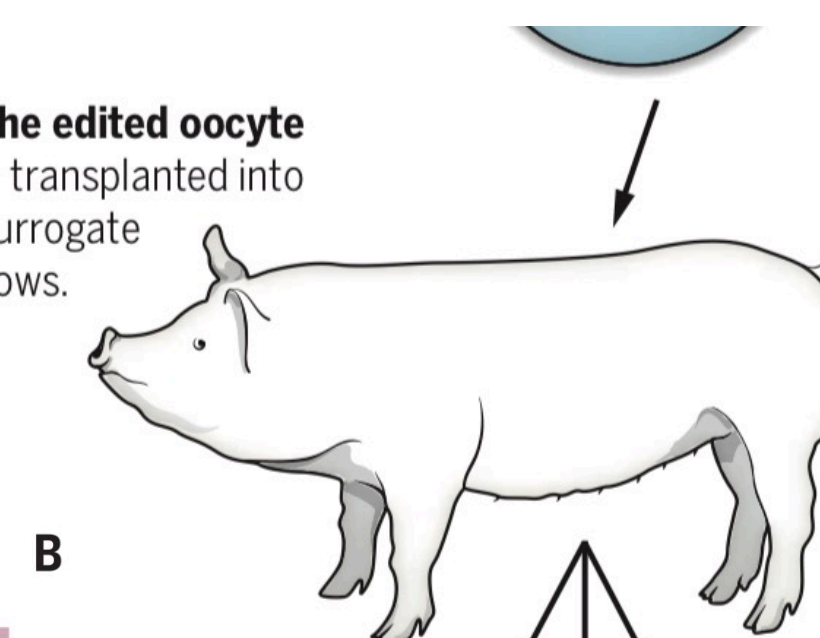


Somatic cell nuclear transfer is performed whereby the fibroblast nucleus that contains the inactivated *pol* gene is transferred into a denucleated oocyte.

A

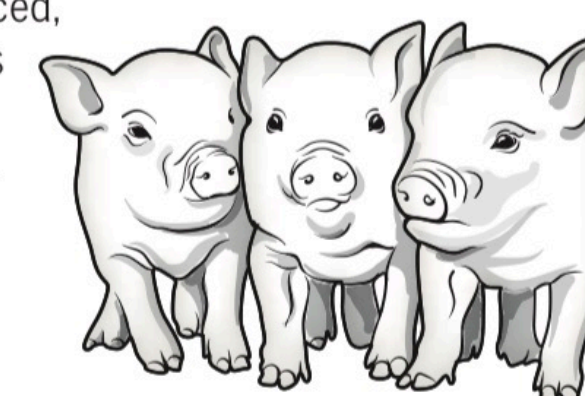


The edited oocyte is transplanted into surrogate sows.



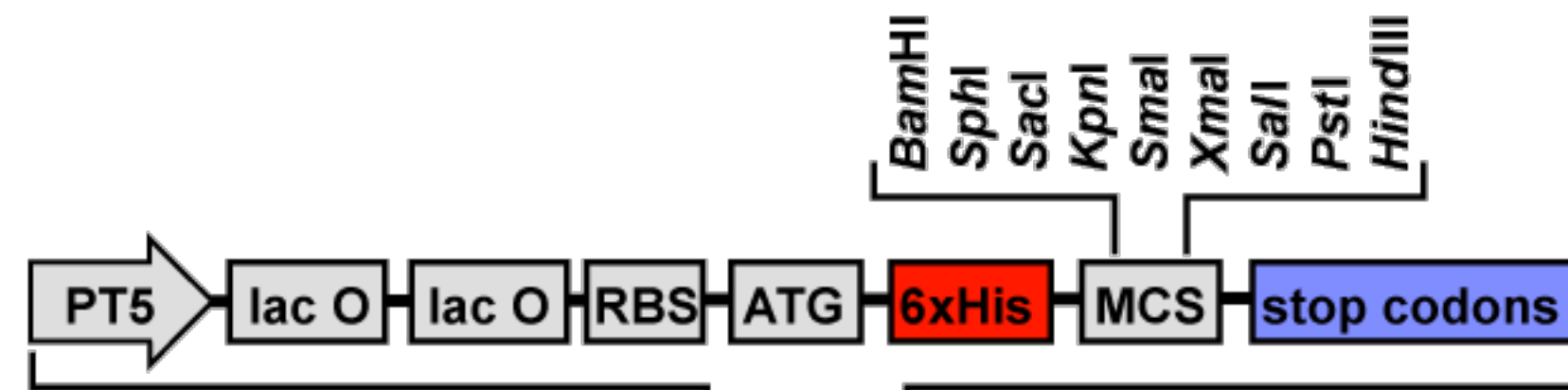
B

Inactivated are produced, rich organs are used for transplant.

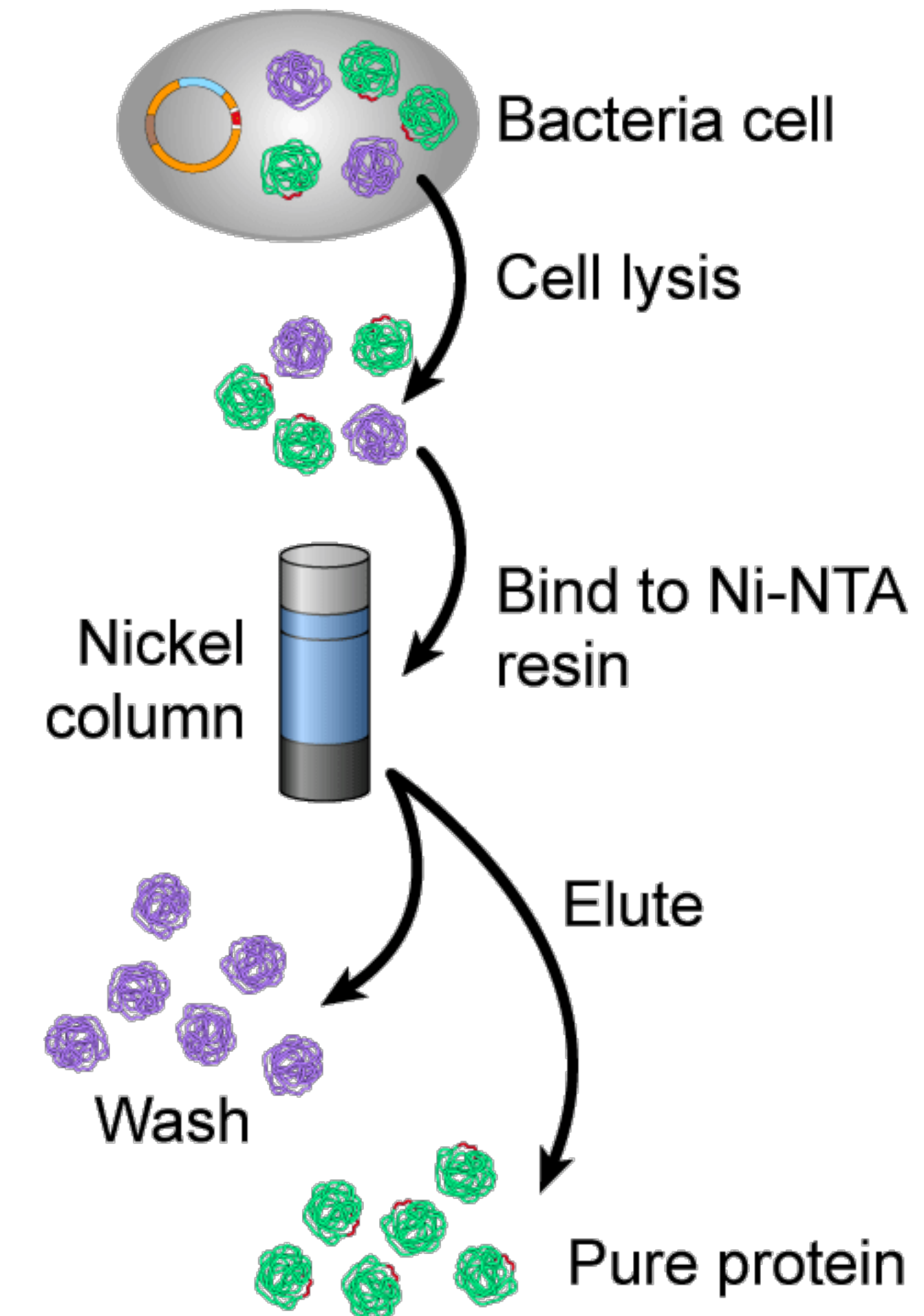


Badanie i inżynieria białek

Ekspresja heterologiczna



Wektor ekspresyjny



Oczyszczanie białka

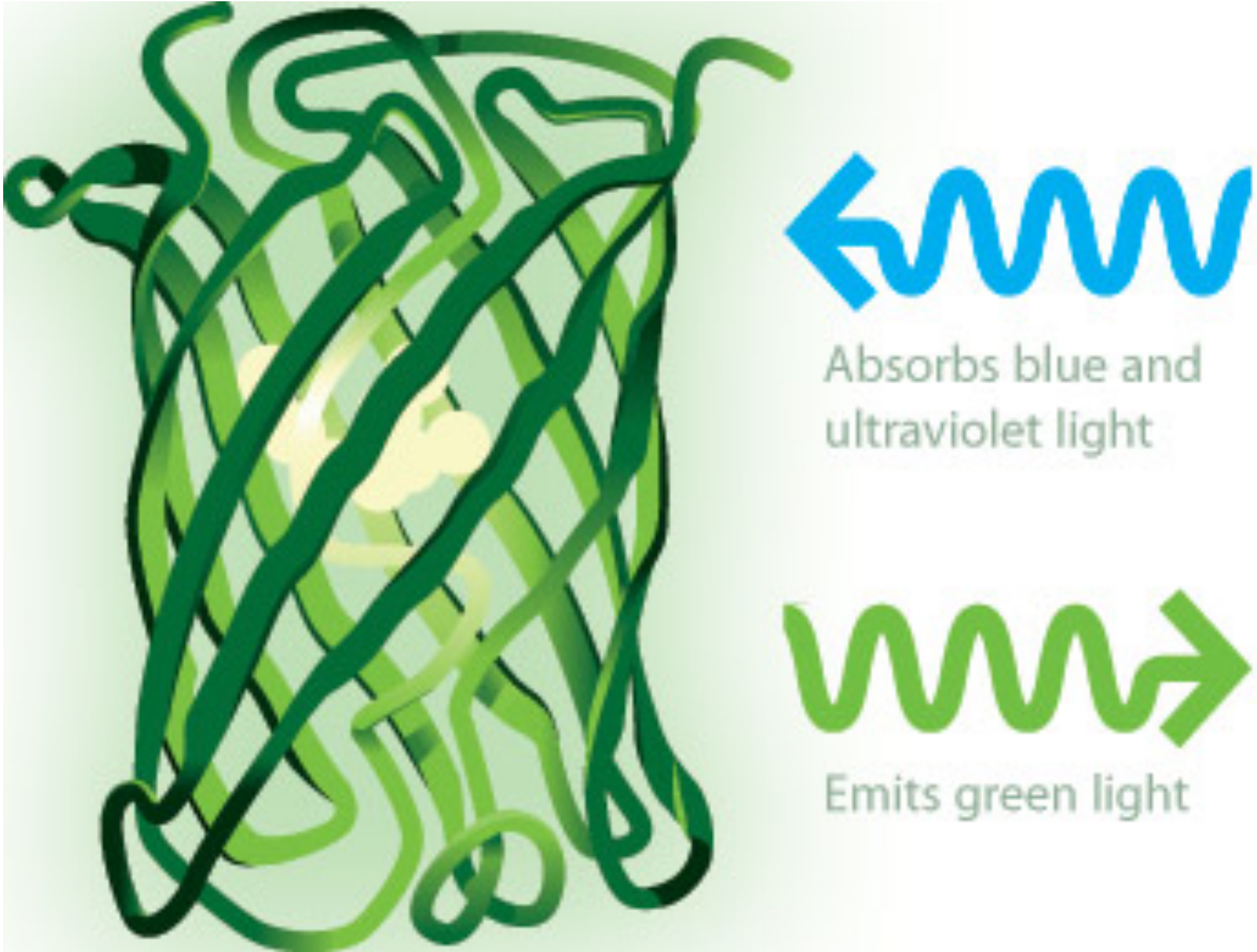
Fuzje białkowe

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

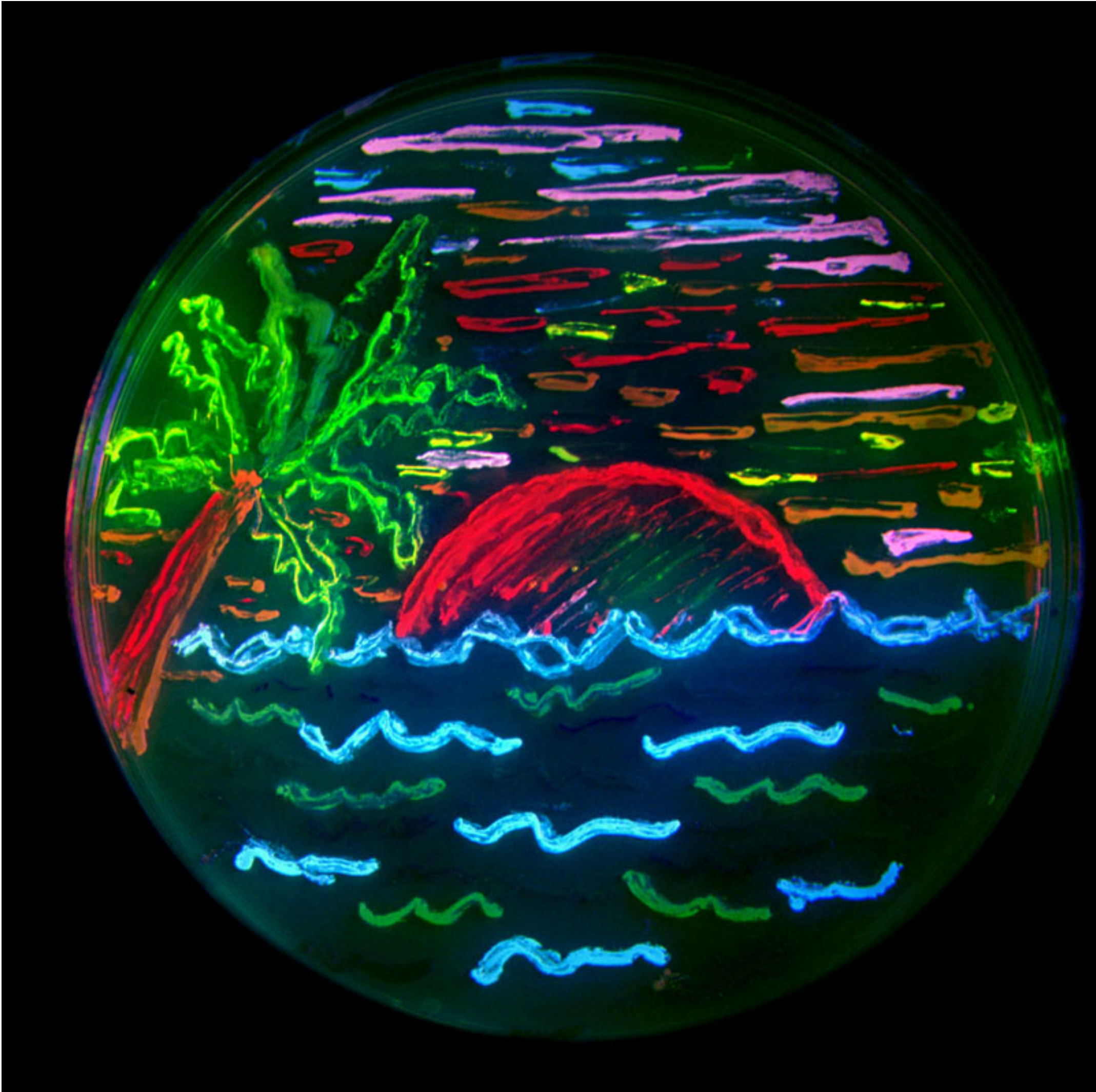
Green Fluorescent Protein-



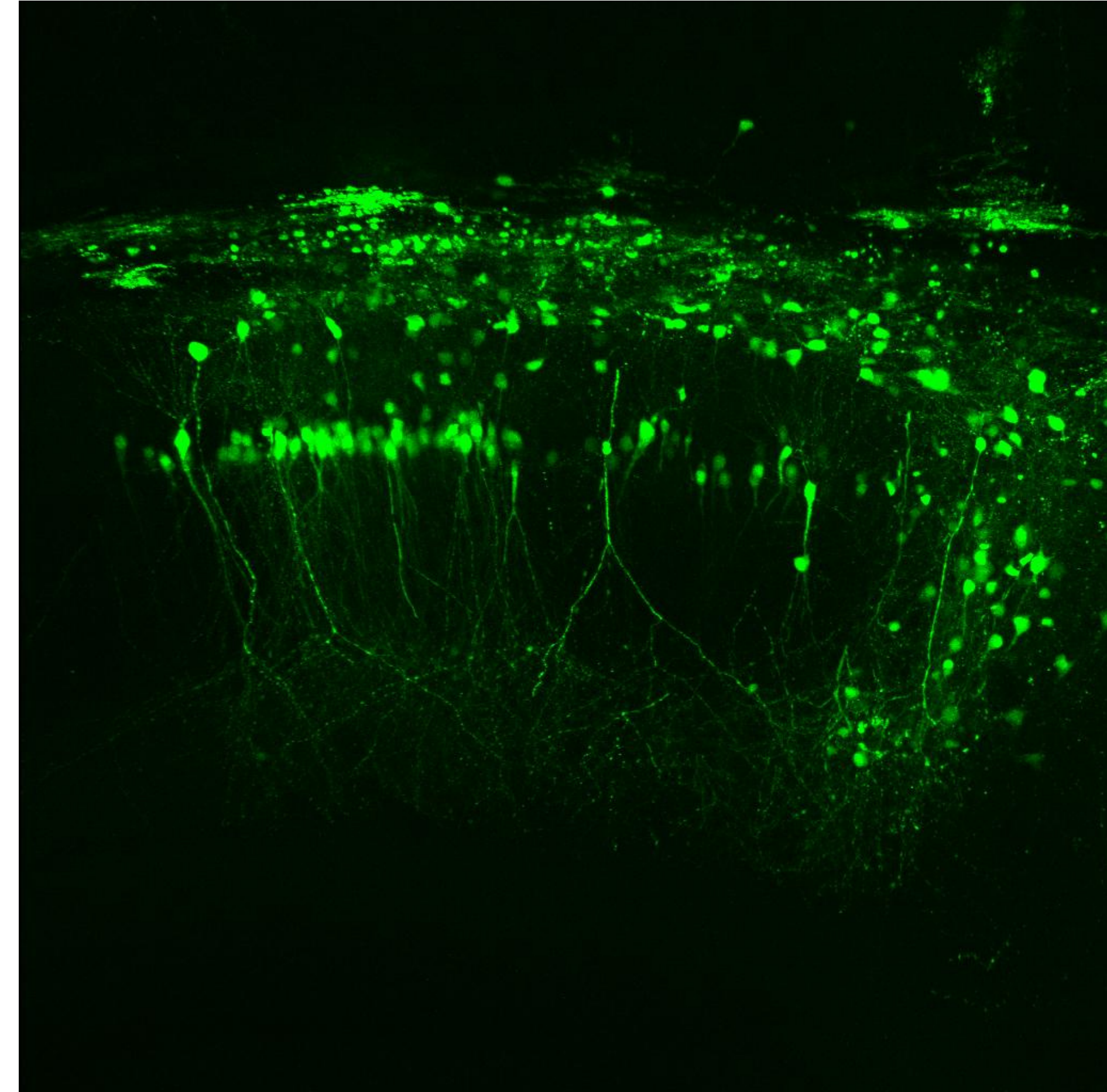
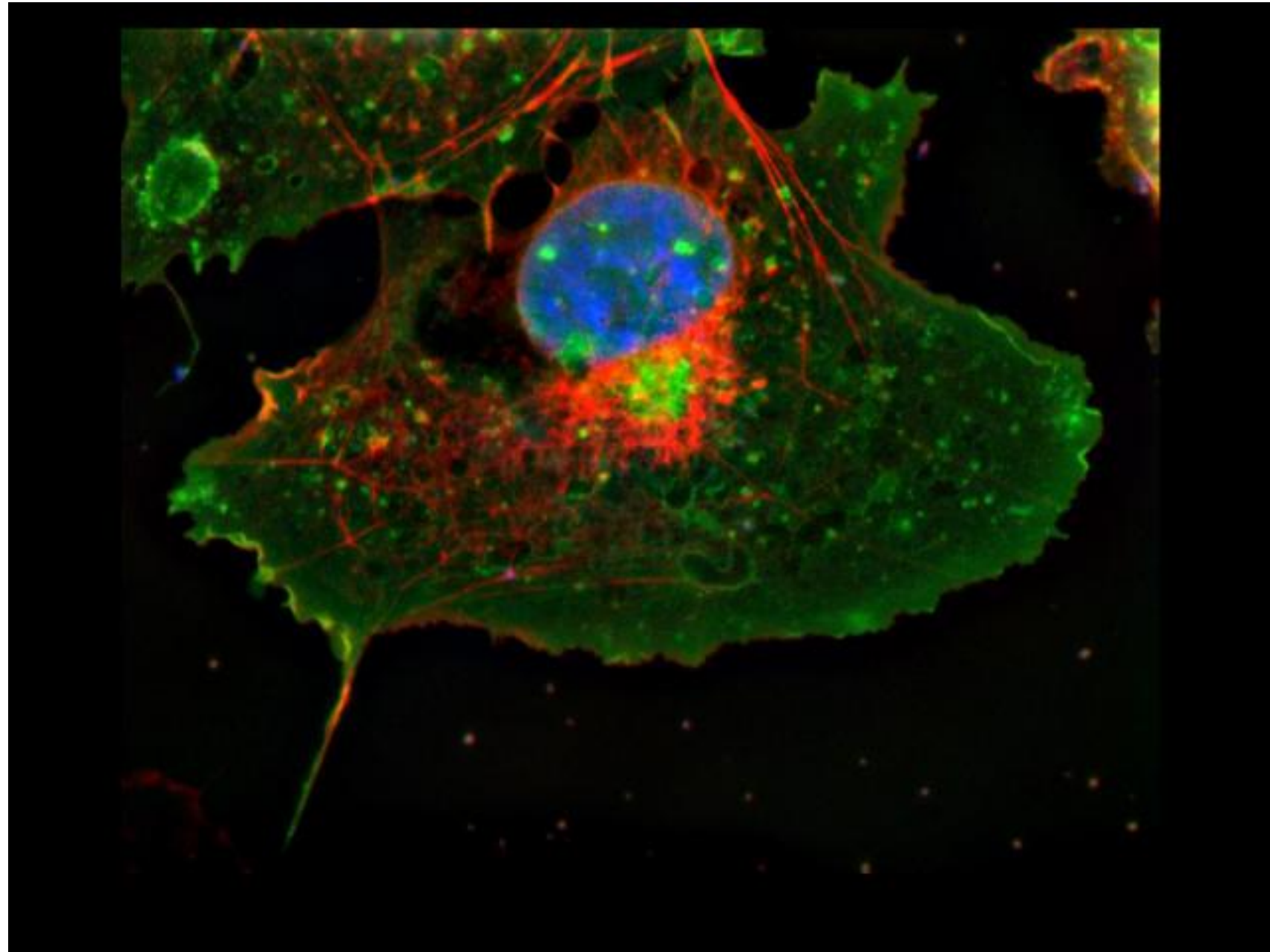
Aequorea victoria



GFP

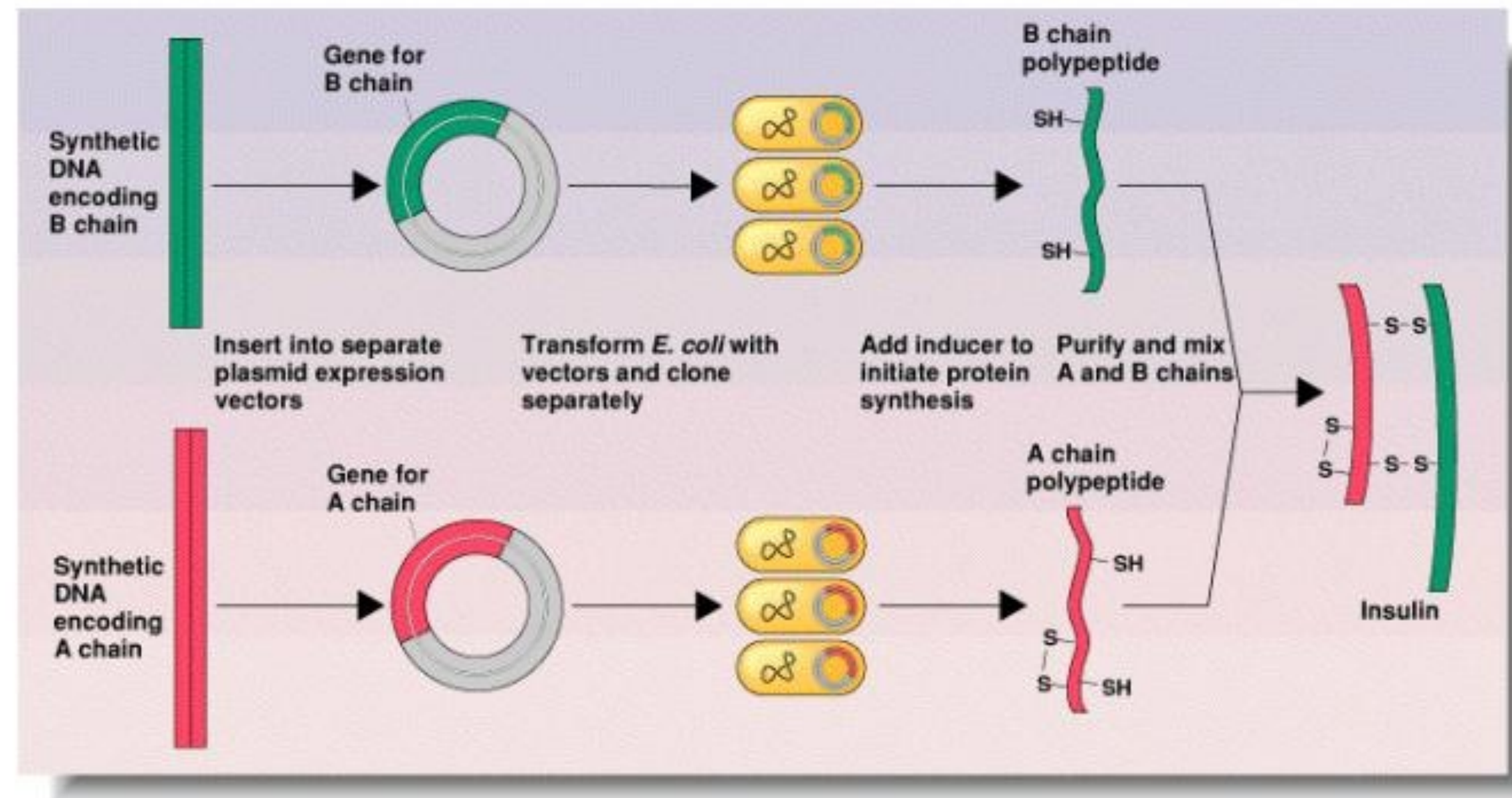


GFP

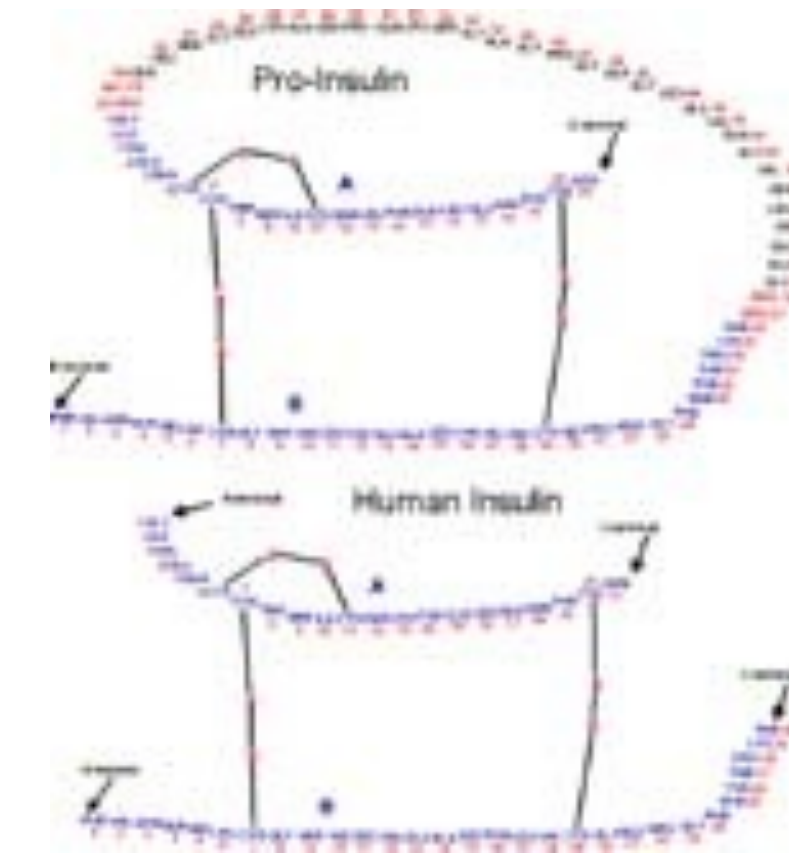


Ekspresja heterologiczna w biotechnologii

Campbell, Biochemistry, 3/e
Text Figure 10.14

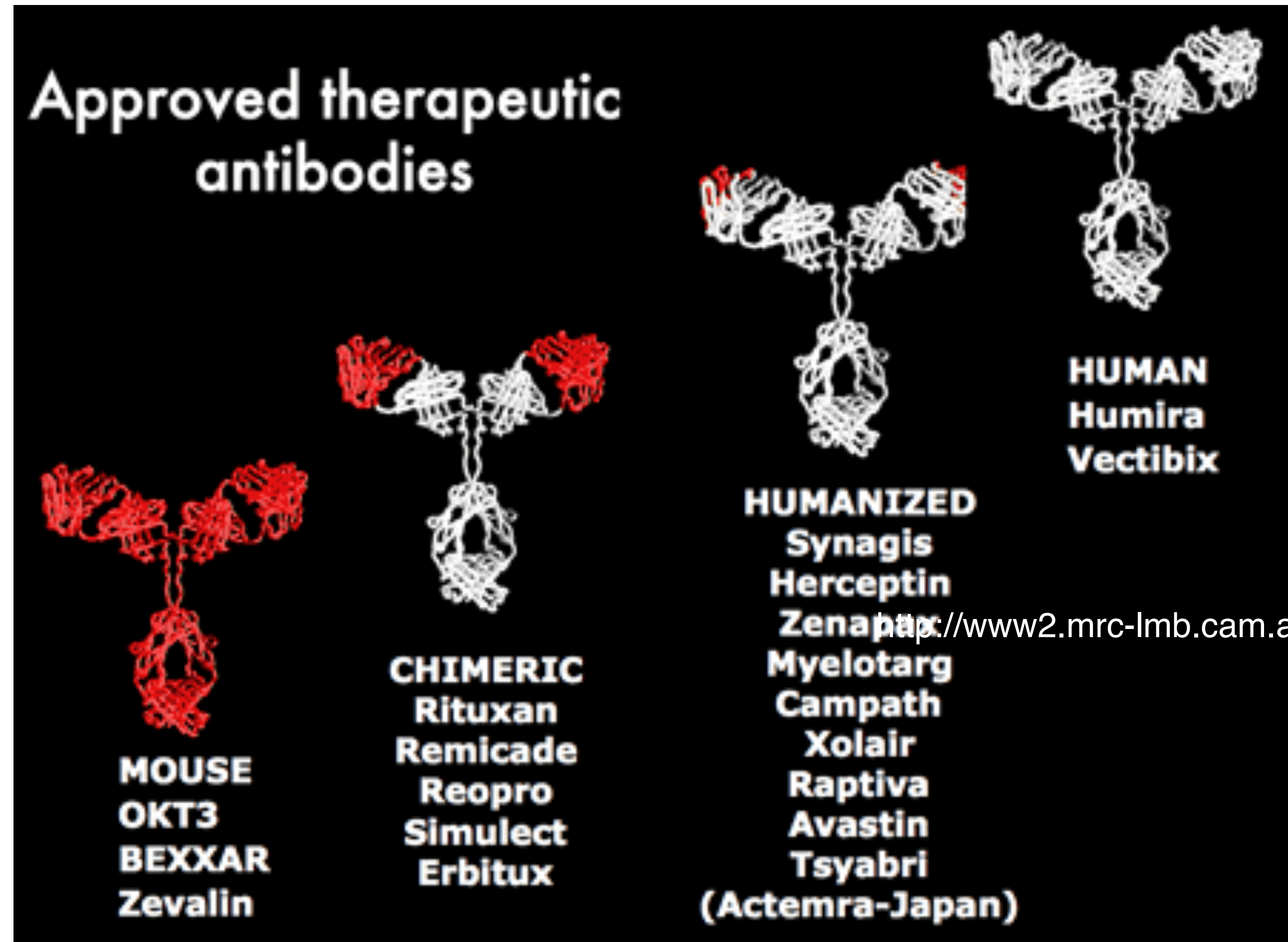


Harcourt Brace & Company



Ludzka insulina wytwarzana w bakteriach

Inżynieria przeciwciał



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