

Inżynieria genetyczna (INGE)

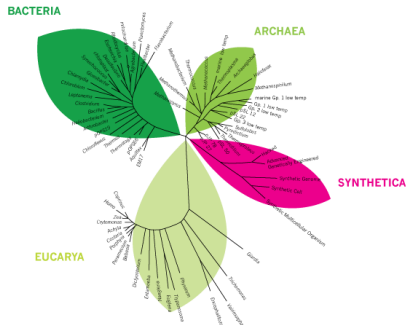
Wykład 7 - biologia syntetyczna, organizmy transgeniczne

Robert Nowak

2025L

Biologia syntetyczna

Biologia syntetyczna – dziedzina inżynierii, projektowanie i realizacja sztucznych systemów biologicznych.



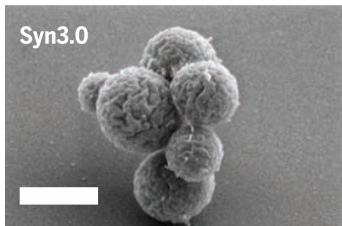
- ▶ chemiczna synteza DNA o zadanej sekwencji, 1970 r.
- ▶ synteza sztucznego genu, 1972 r.¹
- ▶ synteza sztucznego genomu
 - ▶ wirus, 7500 bp, 2002 r.²
 - ▶ bakteria, 1 Mbp, 2010 r.³

¹ Khorra, Total synthesis of the structural gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast

² Cello ..., Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template

Minimalna komórka

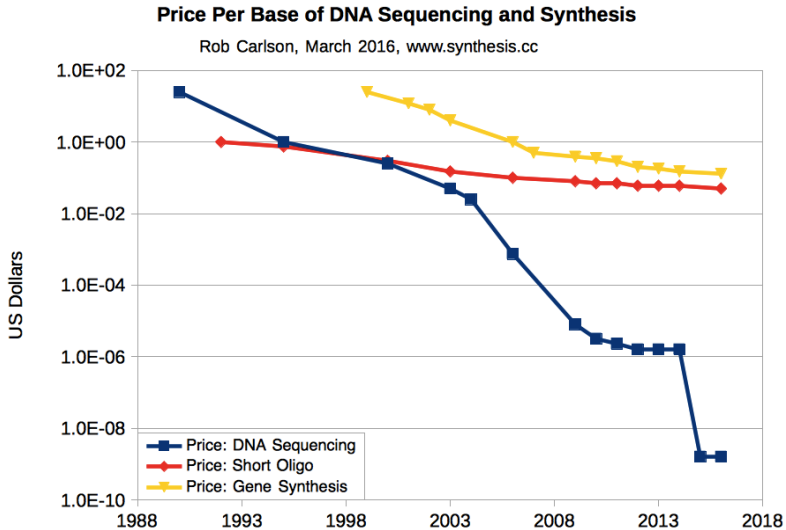
- ▶ człowiek ma ok. 20000 genów
- ▶ typowa bakteria: 4000 genów
- ▶ minimalny genom JCVI-syn3.0, 351kbp, 473 genów w tym nie jest znana funkcja 149 genów ⁴



zastosowania: możliwość umieszczania własnych genów (biological chassis), np. produkcja związków chemicznych przez bakterie

⁴ Design, and synthesis of a minimal bacterial genome, Science, 2016

Koszty sekwencjonowania i syntezy DNA



BioBricks

BioBricks - standardowy zbiór sekwencji, które kodują elementy wykorzystywane w biologii syntetycznej. Obecnie około 20 tys elementów. iGEM (International Genetically Engineered Machines) - konkurs wykorzystujący BioBricks.

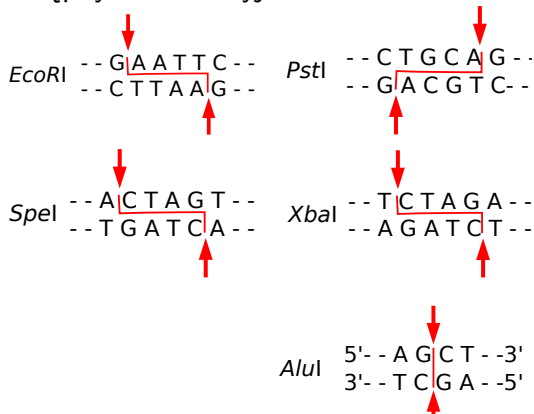
Podział:

- ▶ części (parts) - odcinki DNA o określonej funkcji, np. promotor
- ▶ urządzenia (devices) - zbiór części pełniąca określoną funkcję, np. aktywuje barwnik w obecności związku chemicznego
- ▶ systemy (systems) - zbiór urządzeń wykonujący zaprojektowane zadania

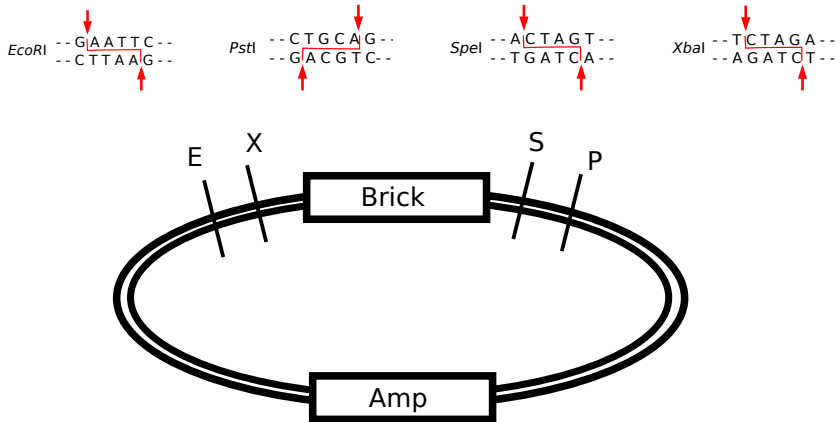
Sekwencje mają standardowe zakończenia rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne.

Restryktazy

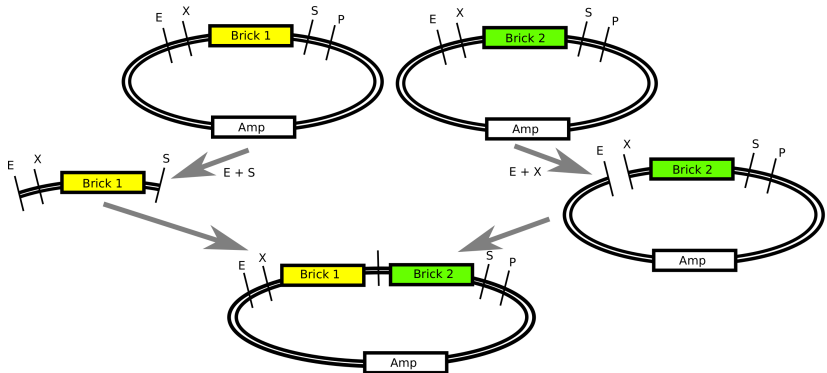
Enzym restrykcyjny to mechanizm obronny bakterii; tnie DNA (niszczy wiązanie fosforowe) w miejscu, które zawiera wzorec specyficzny dla danego enzymu. Zbadanych 3000, 600 dostępnych komercyjnie.



BioBricks części (Tom Knight 2003)



BioBricks - przykład operacji: dodawanie przed



Narzędzia informatyczne w biologii syntetycznej

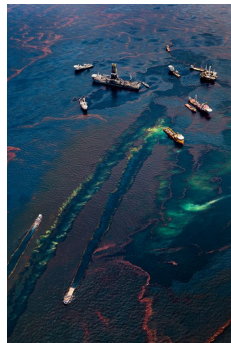
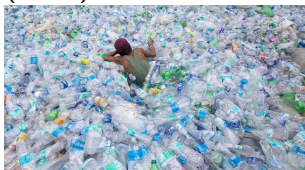
Narzędzia informatyczne stosowane do:

- ▶ katalogi cząstek
- ▶ symulacje reakcji i procesów biologicznych
- ▶ przewidywania struktur cząsteczek
- ▶ optymalizacji warunków reakcji

Istnieje potrzeba zbudowania modeli i narzędzi do tworzenia systemów.

Biologia syntetyczna - przykłady (1)

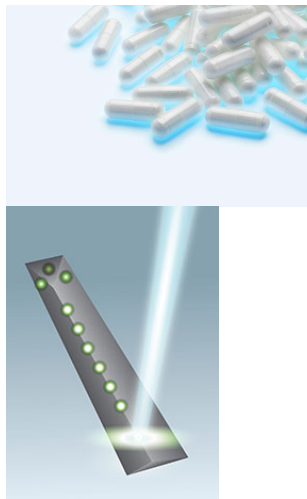
organizmy stosowane
do usuwania zanie-
czyszczeń, np. metale
ciężkie (2004), ropa
naftowa (2012), plastik
(2016)



Biologia syntetyczna - przykłady (2)

bakteria dezaktywująca toksyczny amoniak, nowy rodzaj probiotyku (2019)

organizmy do wykrywania toksyn, zmieniają kolor (2018)

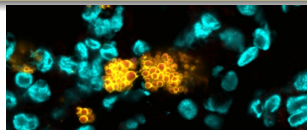


Biologia syntetyczna - przykłady (3)

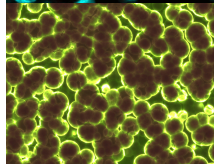
produkcja związków chemicznych - główne zastosowanie, bo

- ▶ bardzo wysoka wydajność
- ▶ minimalne efekty uboczne

produkcja bio-paliw (2016)



produkcja leków (2018)



Organizmy transgeniczne

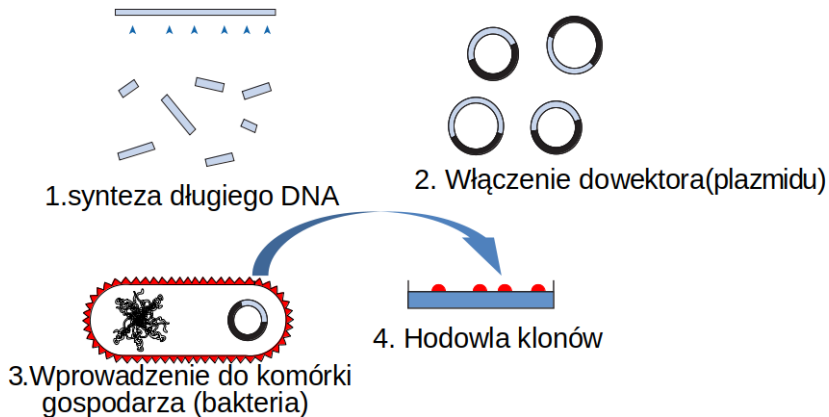
Trwała zmiana oryginalnej sekwencji genomu, aby mogła być dziedziczona w trakcie reprodukcji.

- ▶ dużo trudnych do przezwyciężenia naukowych i technicznych ograniczeń
- ▶ wzbudza publiczne kontrowersje i niepokoje

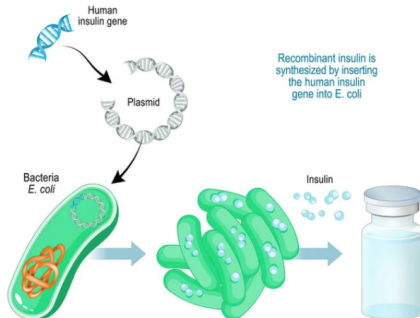
Powody tworzenia:

- ▶ poprawa wydajności upraw i hodowli
- ▶ używanie zwierząt jako bio-reaktorów do produkcji białek i lekarstw
- ▶ badania nad chorobami

Biorekombinowane białka - amplifikacja klonów

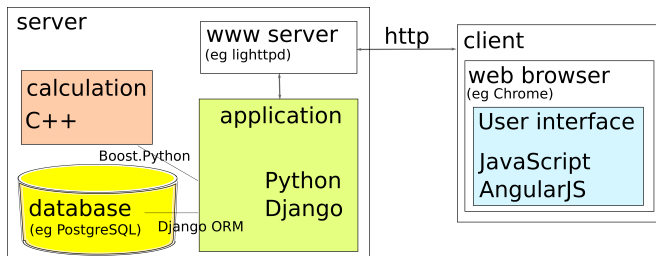


Przykład - insulina ludzka

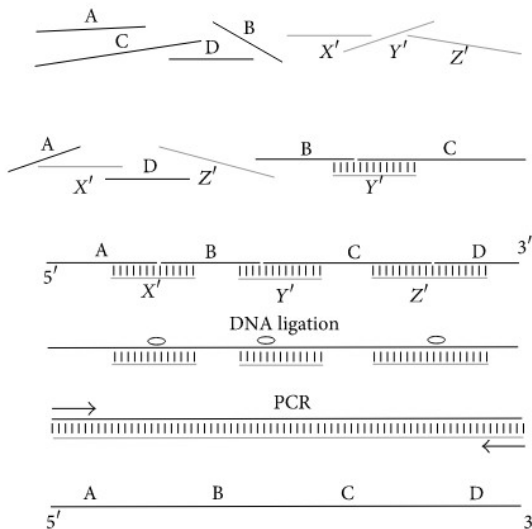


Aplikacja dnasynt - synteza sztucznych genów

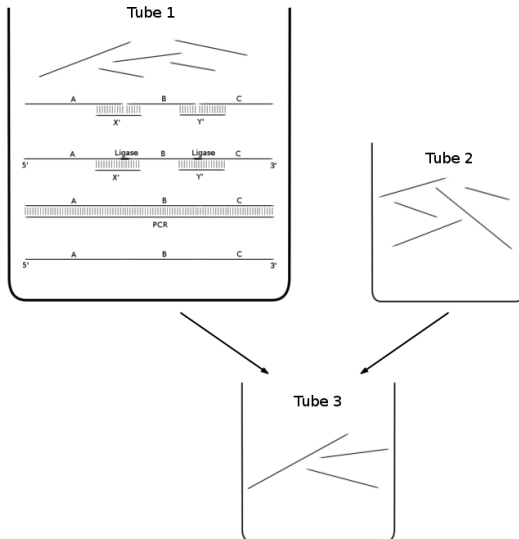
- ▶ aplikacja internetowa, wysoka wydajność (C++11),
<http://bioweb.sourceforge.net> 
- ▶ algorytm ewolucyjny do optymalizacji
- ▶ wejście: sekwencja białka, organizm gospodarza, zbiór restryktaz
- ▶ wyjście: protokół syntezy sztucznego genu



dnasynth - protokół syntezy



dnasynth - protokół syntezy (2)



dnasynth - oprogramowanie

HOME ZUKER ALGORITHM SYNTHESIS ACCOUNT LOGOUT

CODON USAGE TABLE OF HOMO SAPIENS :

CODON	FREQUENCY	CODON	FREQUENCY	CODON	FREQUENCY	CODON	FREQUENCY
GGG	16.47	GGA	16.47	GGT	10.75	GGC	22.22
GAG	39.59	GAA	28.96	GAT	21.78	GAC	25.1
GTG	28.12	GTA	7.08	GTT	11.03	GTC	14.46
GCG	7.37	GCA	15.82	GCT	18.45	GCC	27.73
AGG	11.96	AGA	12.17	AGT	12.13	AGC	19.46
AAG	31.86	AAA	24.44	AAT	16.96	AAC	19.1
ATG	22.04	ATA	7.49	ATT	16	ATC	20.82
ACG	6.05	ACA	15.11	ACT	13.12	ACC	18.89
TGG	13.17	TGA	1.56	TGT	10.58	TGC	12.62
TAG	0.79	TAA	0.99	TAT	12.19	TAC	15.31
TTG	12.93	TTA	7.67	TTT	17.57	TTC	20.28
TCG	4.41	TCA	12.21	TCT	15.22	TCC	17.68
CGG	11.42	CGA	6.17	CGT	4.54	CGC	10.42
CAG	34.23	CAA	12.34	CAT	10.86	CAC	15.09
CTG	39.64	CTA	7.15	CTT	13.19	CTC	19.59
CCG	6.92	CCA	16.92	CCT	17.54	CCC	19.79

YOU CAN CHOOSE RESTRICTION ENZYMES

pel

FspEI CC(12/16)

NspEI CYCGRG

Pel9403I GATC

PpeI GGGCC^C

PspEI G^GTNACC

SpeI A^CTAGT

TspEI ^AATT

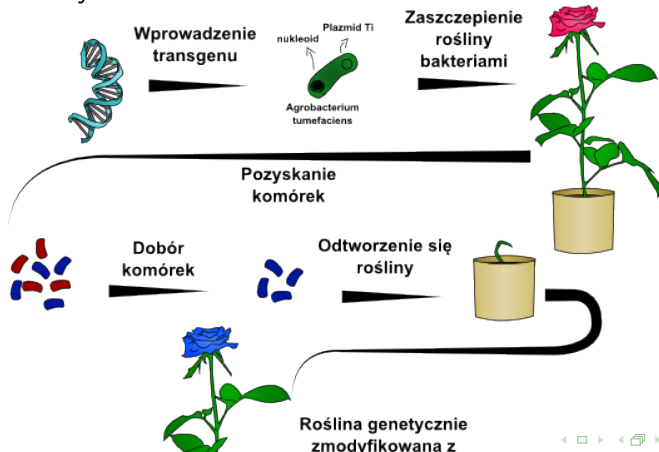
CHOSEN ENZYMES

BspAIIII G^GATCC

AclI CTGAAG(16/14)

Transgeniczne rośliny - wprowadzanie własnego DNA

metoda integracji z plazmidem, infekcja bakteriami (maj 1983) umożliwia wprowadzenie własnego DNA do jądrowego DNA rośliny.



Transgeniczne rośliny - przykłady (1)



Burak cukrowy
GMO odporny na
herbicydy (glifosat)

Transgeniczne rośliny - przykłady (2)



Kukurydza GMO
MON 810 posiada
białko Cry1Ab po-
chodzące z bakterii
Bacillus Thurin-
gensis, zwalcza
owady (Omacnicę
Prosowiankę)

Transgeniczne rośliny - przykłady (3)



Pomidor GMO Flavr Savr, pierwsze warzywo dopuszczone do konsumpcji. Dojrzały pomidor bez śladów gnicia do 3 tygodni. Ma wyłączony gen który produkuje enzym rozkładający pektynę.

Transgeniczne rośliny - przykłady (4)



Złoty ryż (Golden rice) - syntezuje β -Karoten. Dostarcza witaminę A dla populacji, gdzie wcześniej była wysoka zapadalność na ślepotę zmierzchową.

Transgeniczne rośliny - przykłady (5)



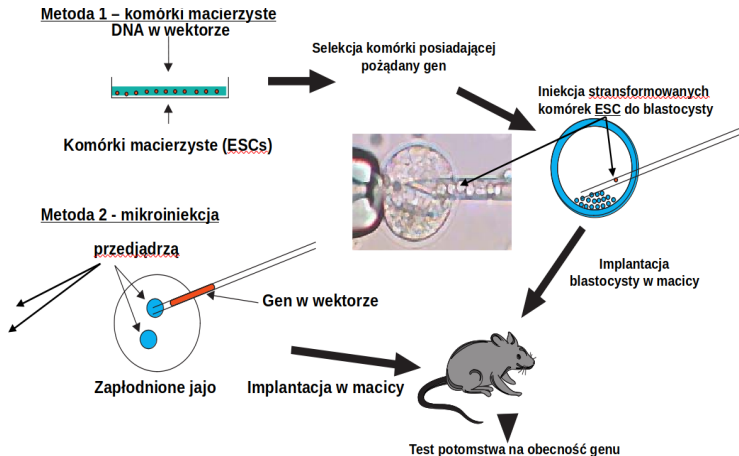
Cebula bez efektu łzawienia, zahamowanie syntezy enzymów które produkują podrażniający oczy związek.

Transgeniczne rośliny - przykłady (6)



Świecąca roślina
dla każdego (Glo-
wing plant)

Transgeniczne zwierzęta - wstawianie wektora

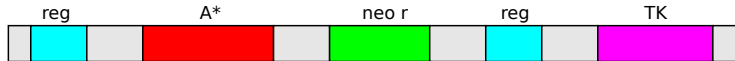


Pierwsze wektory wstawiały nawet 200 kopii gdziekolwiek w genomie.

Transgeniczne zwierzęta - wstawianie w konkretne miejsce

Wiedza o sekwencjach otaczających konkretny gen umożliwia:

- ▶ przywrócenie funkcji genu
- ▶ nadanie nowej funkcji genu
- ▶ wyłączenie genu (knock-out genu)



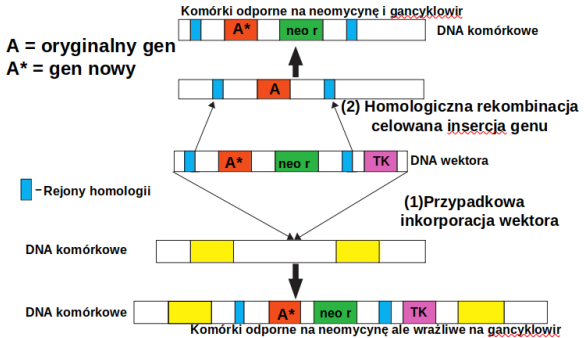
Budowa wektora transgenicznego:

- ▶ gen do transferu (A^*)
- ▶ gen odporności na antybiotyki (np. neomycynę neo r)
- ▶ gen kinazy tymidynowej (TK)
- ▶ sekwencje ułatwiające rekombinację (reg)

Metoda z użyciem komórek embrionowych

Hodowla komórek embrionowych inkubowana z wektorem

- ▶ użycie neomycyny - giną komórki bez wektora
- ▶ użycie gancyklowir - giną komórki z wektorem włączonym w sposób przypadkowy



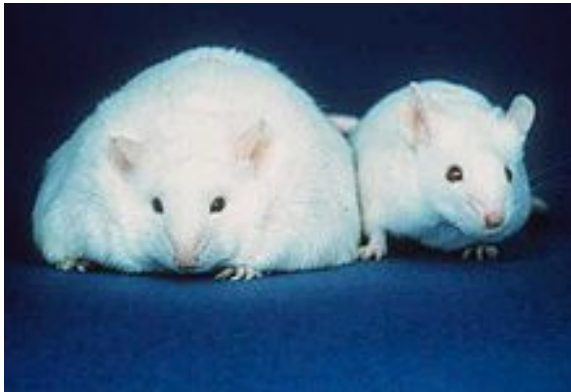
Komórki z rekombinacją są odporne na neomycynę (mają neo r) i gancyklowir (brak TK).

Transgeniczne zwierzęta - przykłady (1)



Mysz z szczurzym
hormonem wzrostu
(2x większe od rów-
wieśników)

Transgeniczne zwierzęta - przykłady (2)



Mysz z wyłączonym genem leptyny (odpowiada cukrzycy typu II)

Transgeniczne zwierzęta - przykłady (3)

Mysz z wyłączonym genem GDF8 (Miostatyna) - który hamuje rozrost tkanki mięśniowej



Zwierzęta z wyłączonym genem GDF8

Mutacja wystąpiła naturalnie



Transgeniczne zwierzęta - przykłady (4)



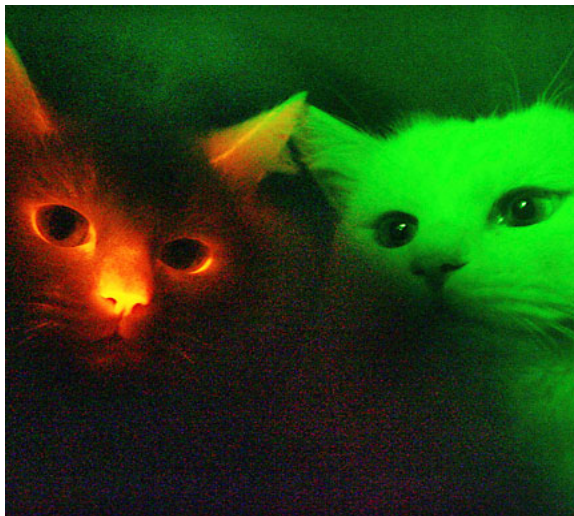
Transgeniczny królik z genem EGFP

Transgeniczne zwierzęta - przykłady (5)

Danio pręgowate z różnymi odmianami genu GFP, zwykle jest czarno-srebrne



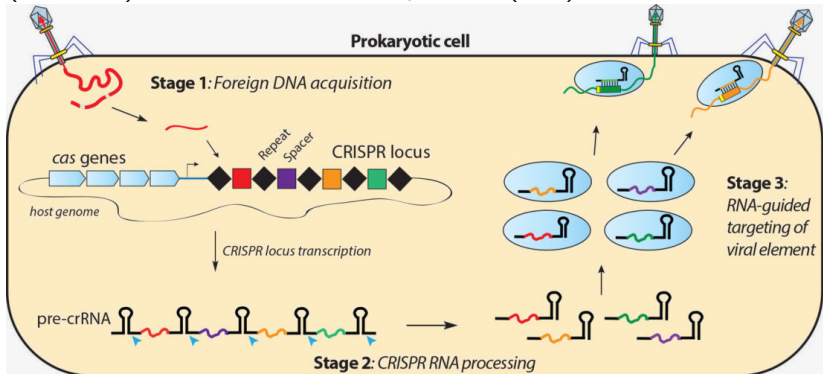
Transgeniczne zwierzęta - przykłady (6)



Transgeniczny kot z białkiem fluorescencyjnego białka (RFP), świecą w ciemności.

CRISPR/Cas - system obronny bakterii

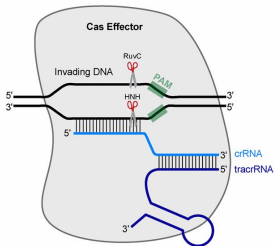
Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
(CRISPR) CRISPR associated protein (Cas)



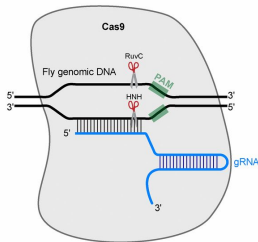
CRISPR/Cas9 - edycja genomu

- ▶ wyszukuje fragment genomu używając RNA
- ▶ wybrano najprostszy system (Białko Cas9, crRNA, tracrRNA)
- ▶ uproszczono go stosując jedną cząsteczkę (gRNA)

A BACTERIAL/ARCHEAL IMMUNITY



B GENOME EDITING



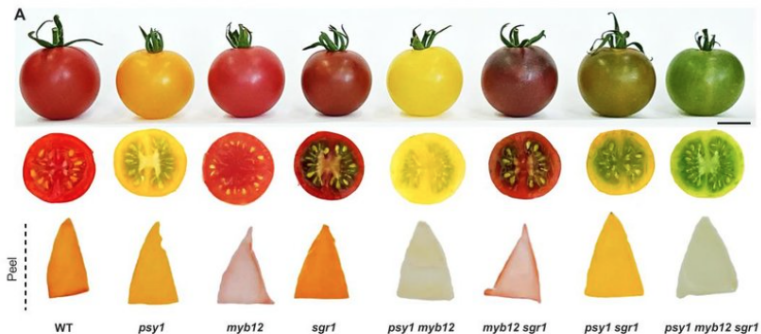
CRISPR/Cas9 - modyfikacje genetyczne roślin i zwierząt

2014	2016	2017	2018
			
2014: tomato, citrus 2016: cucumber, apple, grape 2017: watermelon 2018: kiwifruit, banana, cacao, strawberry, papaya, groundcherry			

Transgeniczny łosoś

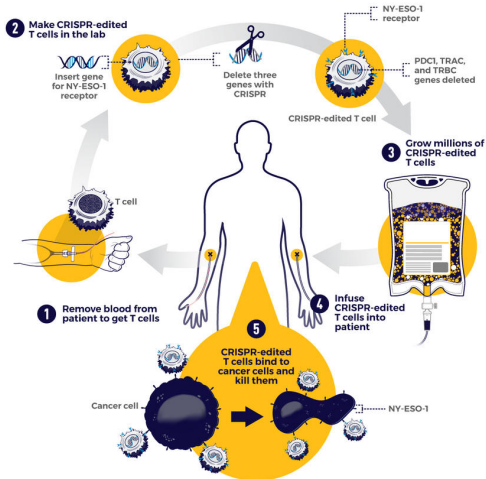


CRISPR/Cas9 - przykład: kolorowanie pomidorów



Wykorzystanie CRISPR/Cas9 - terapie genowe

CRISPR-edited T cells



Dziękuję