

ΒΙΟΛ-491 Ειδικά Κεφάλαια Βιοτεχνολογίας και Απεικονιστικής Φυτών-ΔΙΑΛΕΞΗ 10



<https://www.imbb.forth.gr/en/research-en/plant-molecular-biology/item/4119-panagiotis-n-moschou>

<https://pmoschoulab.blog/home/>



FORTH

INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY & BIOTECHNOLOGY



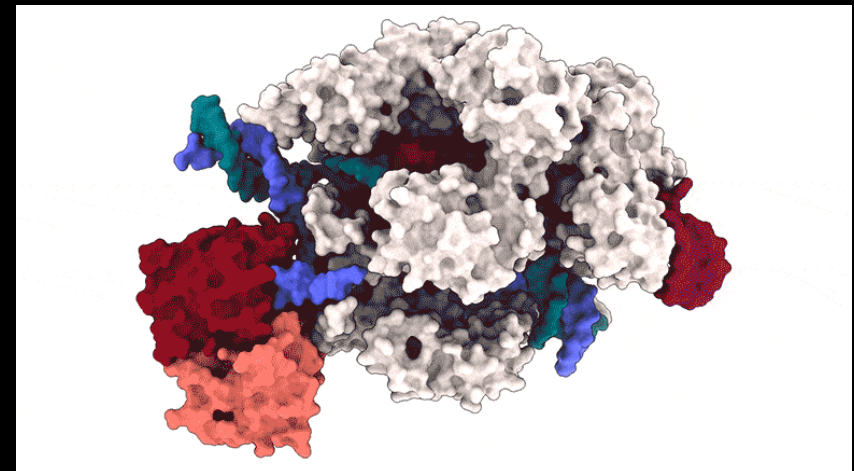
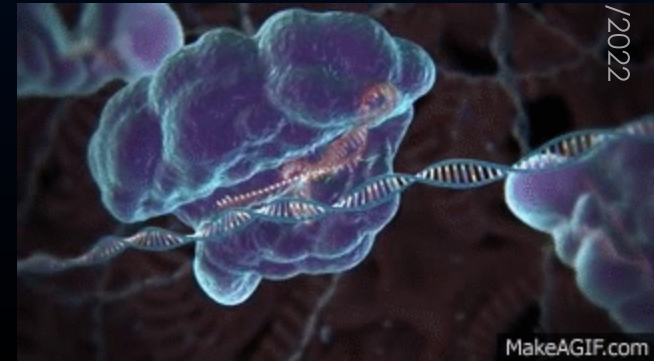
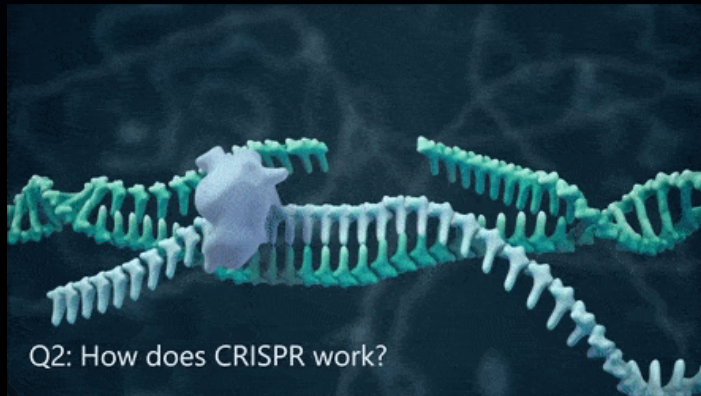
<https://twitter.com/Panosmoschou>



10. Γονιδιακή επεξεργασία απεικόνιση (CRISPR κτλ.)

&

2



Νέες δεξιότητες-Διάλεξη 10

1. Να **αναλύσετε** βασικές αρχές γονιδιακής επεξεργασίας
2. Να **αναλύσετε** τεχνικές απεικόνισης-ιχνηλασίας-
3. Να **περιγράψετε/αναλύσετε/σχολιάσετε** βιοτεχνολογικές εφαρμογές

Τι θα θέλατε να ακούσετε; Τι έχετε ακούσει; Τι θα θέλατε να μάθετε σχετικά με τις βιοτεχνολογικές εφαρμογές της γονιδιακής επεξεργασίας;

Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

- ΠΕ αναγνωρίζουν 6-8 βάσεις
- 46 4096bp ή 48 65536bp
- Ανθρώπινο γονιδίωμα: 3 b bp.
- Για ειδική κοπή ενός σημείου >18bp



Meganucleases

I-SceI



Απενεργοποίηση



Sce7

FokI



Σύντηξη με καταλυτική
επικράτεια



Τύπου 2 μεγανουκλεάσες

Γενετική μηχανική 2

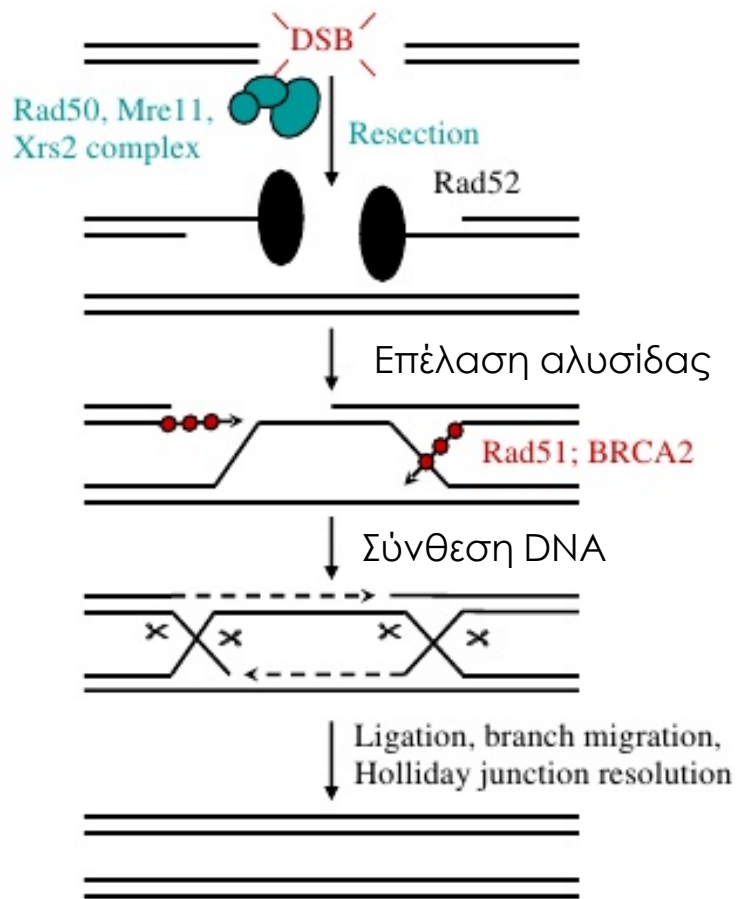
“Genetic Engineering v2.0”

- Βασίζεται στην επιδιόρθωση
- Νέα περιοριστικά ένζυμα
 - ZFN (Zinc-Finger Nuclease)
 - TALEN (Transcription activator-like effector nuclease)
- CRISPR/Cas

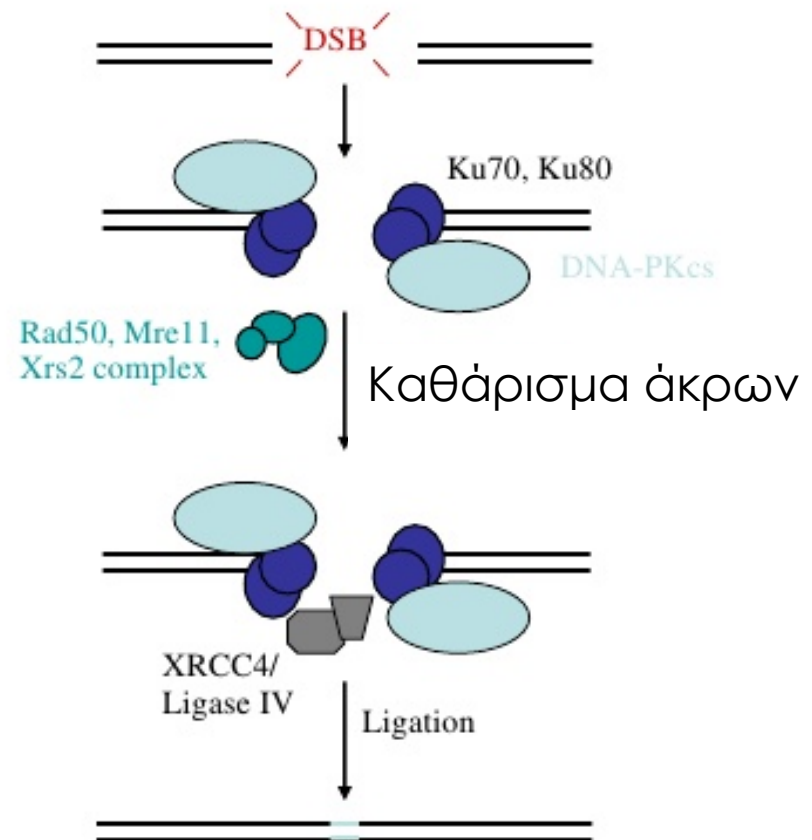
Τύποι ομόλογου ανασυνδυασμού

Ομόλογος ανασυνδυασμός

■



Μη ομόλογη συγκόλληση άκρων

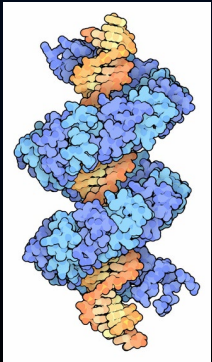


ZFN & TALEN

- Περιοριστικά ένζυμα που αποτελούνται:
 - ✓ Αναγνώριση DNA (Zinc Finger ή TALE)
 - ✓ Επικράτεια κοπής (FokI Nuclease)
- Πρωτεϊνικά επαναλαμβανόμενα σημεία (Zinc Finger or TALE) αναγνωρίζουν βάσεις DNA
- Διμερισμός της FokI nuclease επάγει τη κοπή του DNA

Από που προέρχονται;

TALEN



Οι τελεστές TAL επάγουν
NODULINS



alamy stock photo

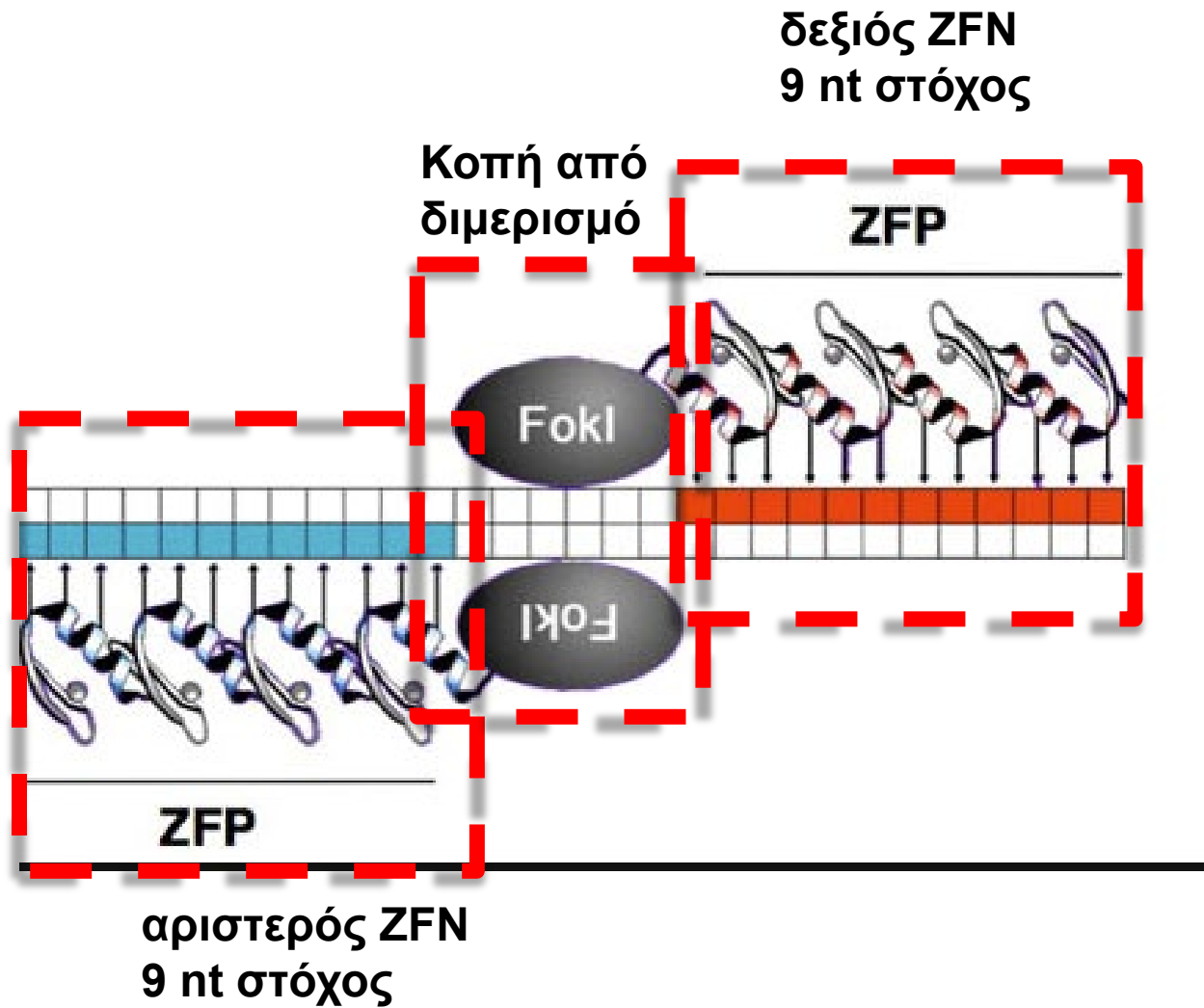
2A0WC3R
www.alamy.com



ASM MicrobeLibrary.org © Fett & Cooke



Cong, L., et al. (2012). "Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains." *Nature Communications* **3**(1): 968.



ZFN & TALEN

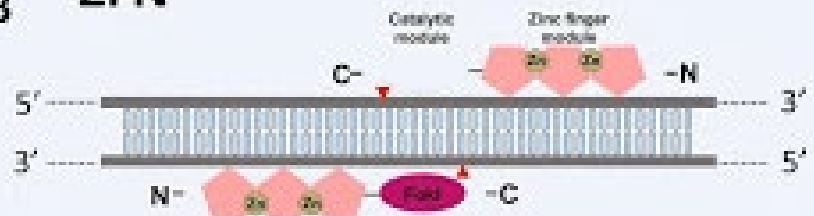
- Για την αναγνώριση νέων αλληλουχιών πρέπει να αναπτύξουμε **νέα σημεία πρόσδεσης!**
- **Αρθρωτή παραγωγή** από προηγούμενες επικράτειες
 - Επιλογή μέσω φαγικής παρουσίασης/σύστημα μονού υβριδίου
 - Απαιτεί **χρόνο**, υψηλή πιθανότητα αποτυχίας, δευτερεύοντες στόχοι (off-targets)

CRISPR/Cas9

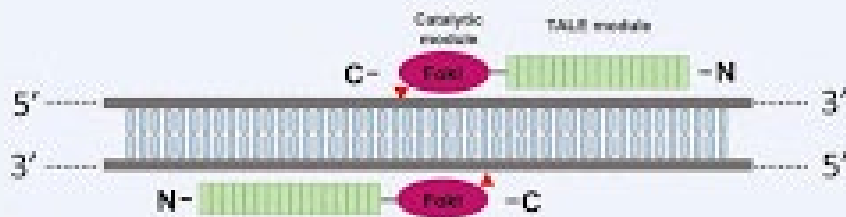
A Meganuclease



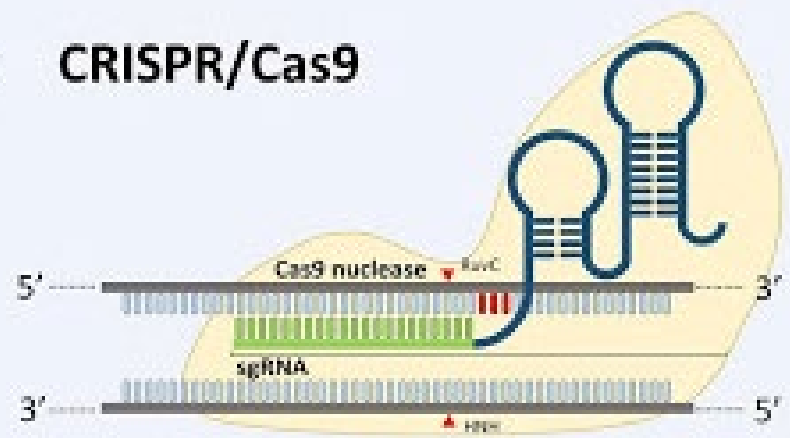
B ZFN



C TALEN

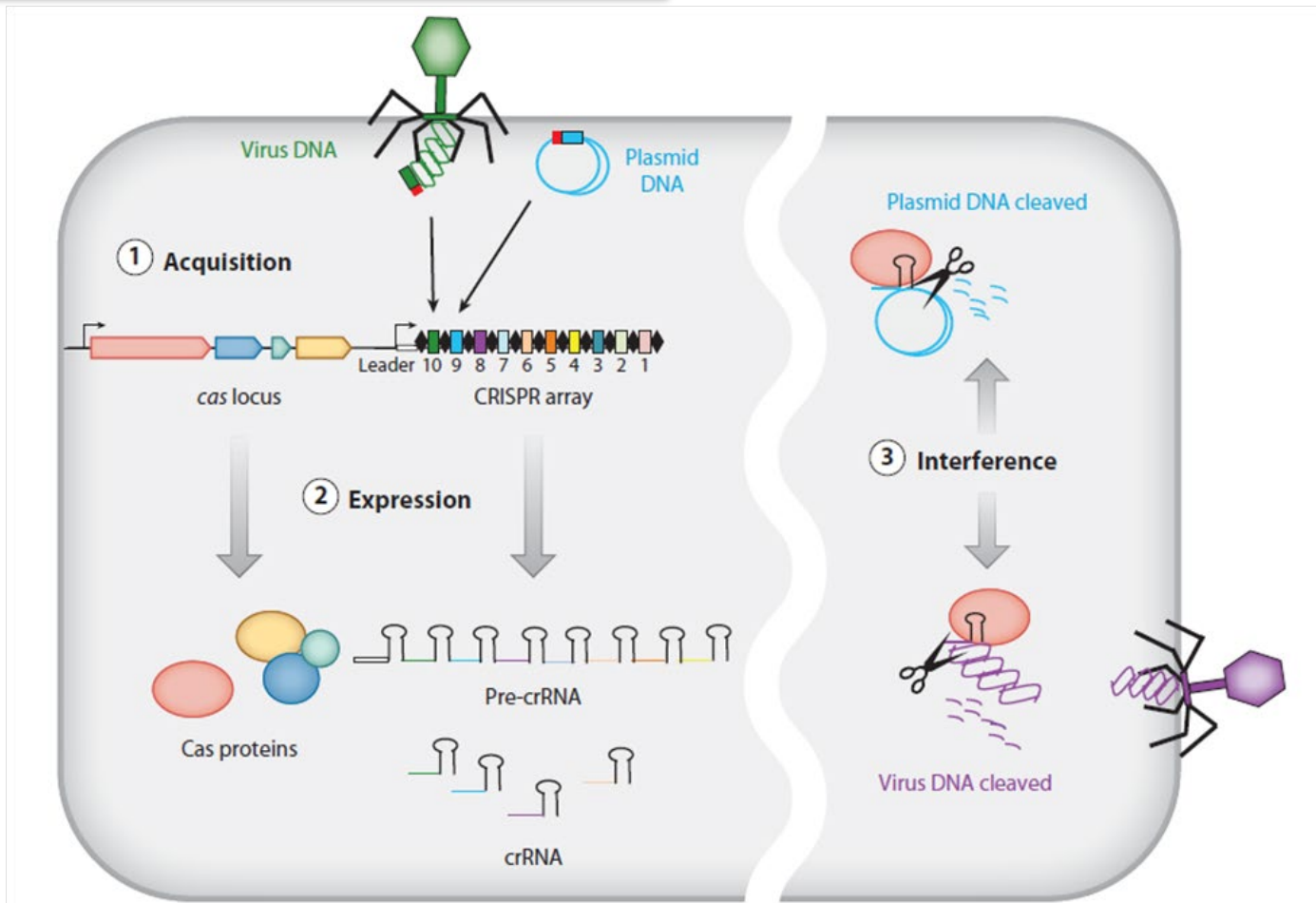


D CRISPR/Cas9



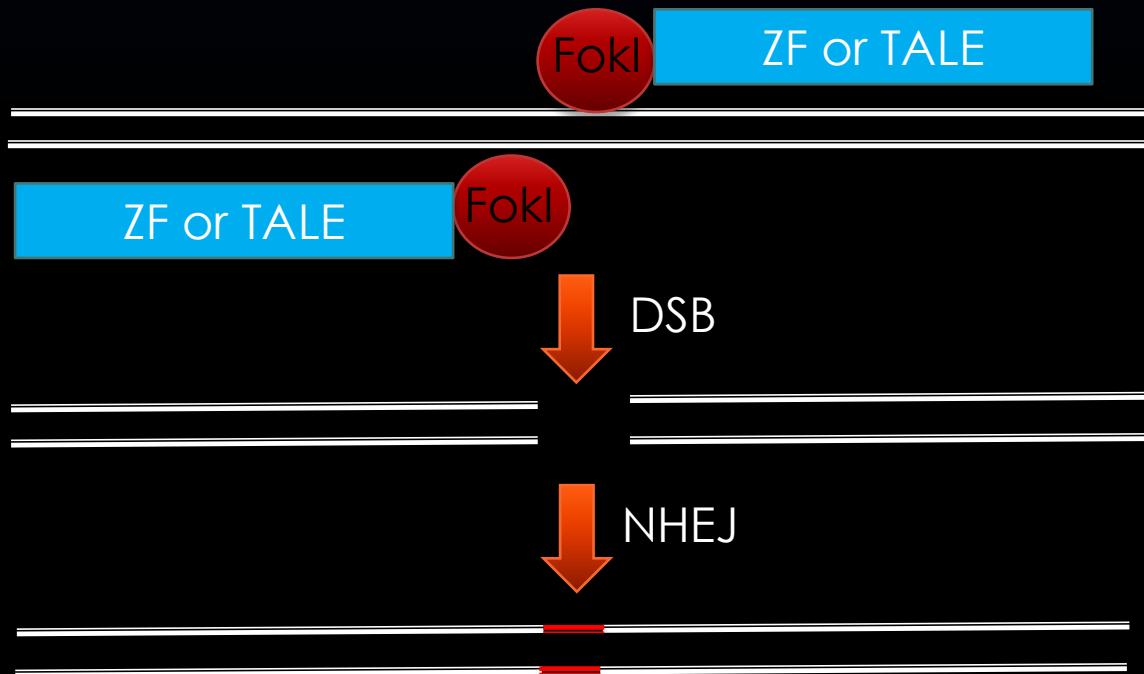
Προέλευση του συστήματος

Αμυντικός μηχανισμός των βακτηρίων



Nonhomologous end joining (NHEJ)

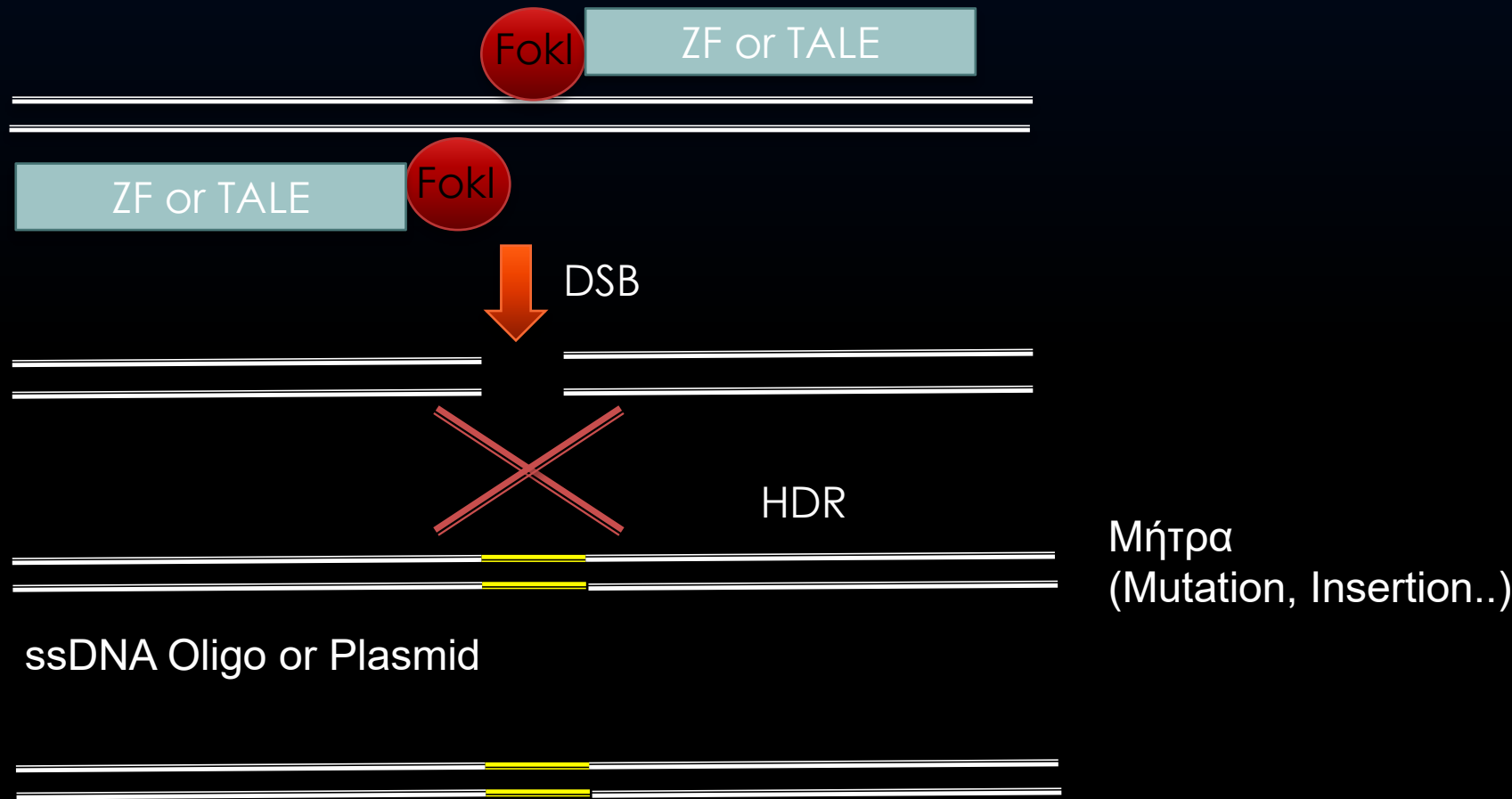
Μηχανισμός επιδιόρθωσης



Indel

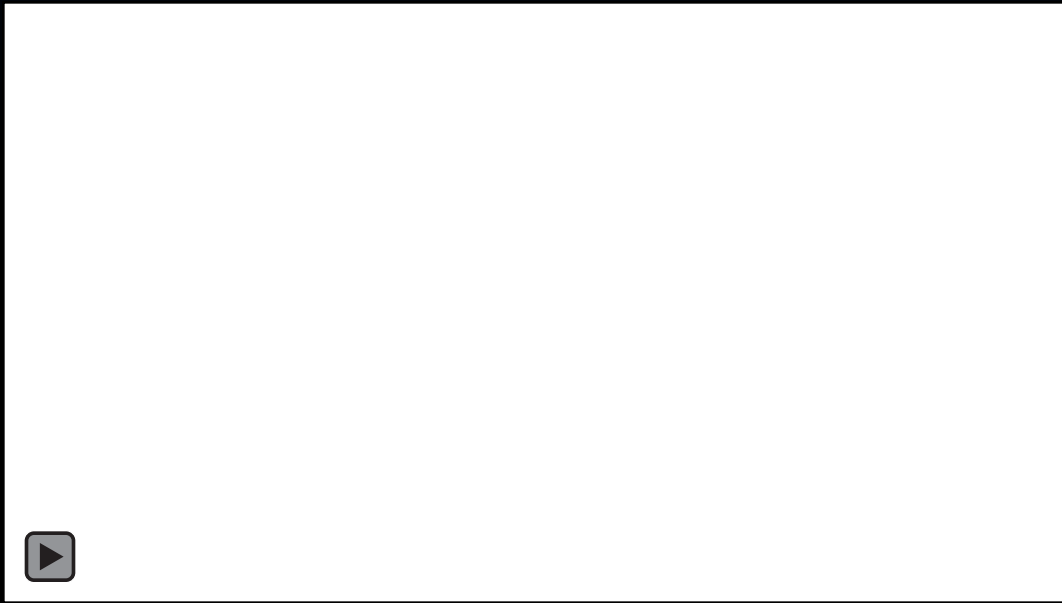
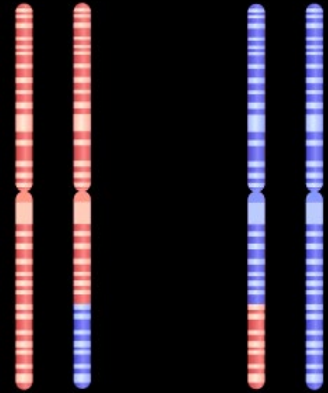
Αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης → knockout

Homology Directed Repair (HDR)



Ακριβής επιδιόρθωση (εισαγωγή γονιδίου ή μεταλλαγής σε ακριβές σημείο)

Τί μας προσφέρει η γονιδιακή/γονιδιωματική επεξεργασία;



Μία πολύ καλή
περίληψη

https://www.youtube.com/watch?v=4YKFw2KZA5o&a_b_channel=naturevideo

Τί μας προσφέρει η γονιδιακή/γονιδιωματική επεξεργασία;

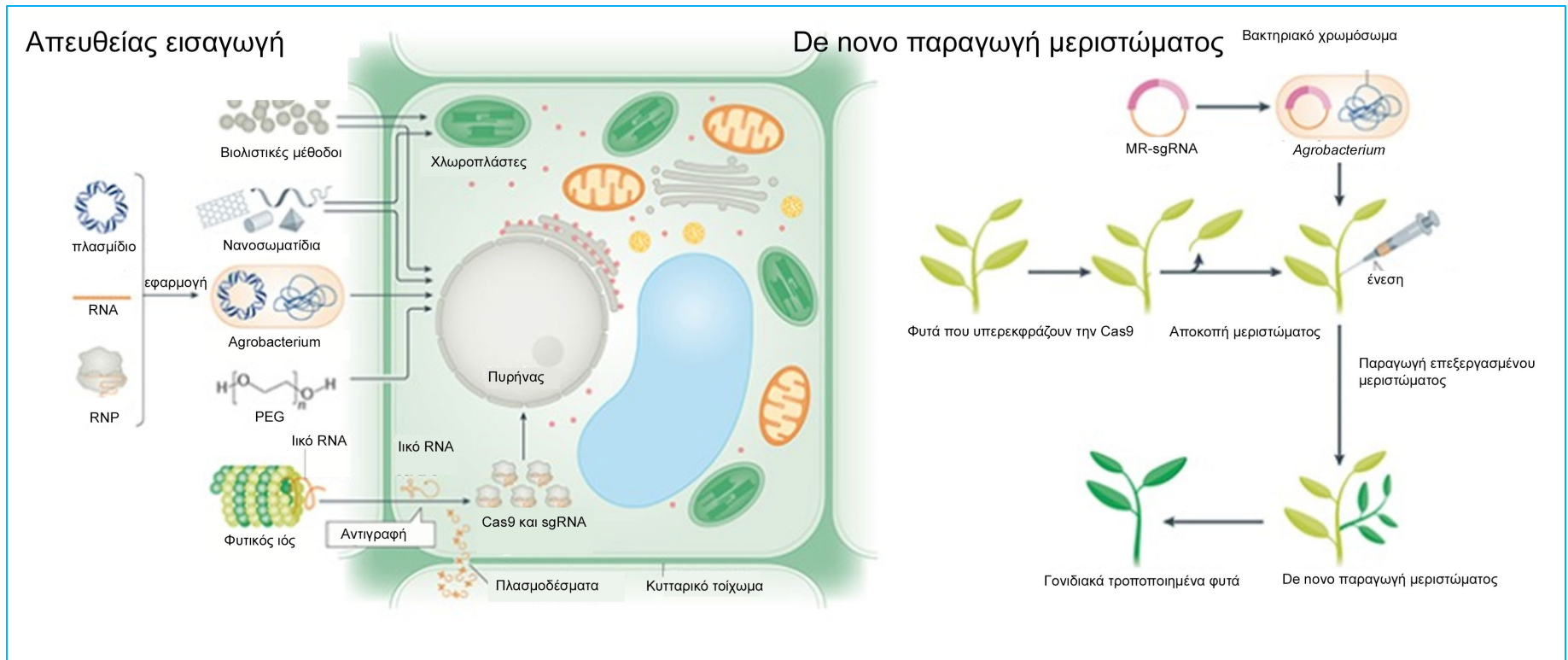


- ✓ Knock-in/out
- ✓ Αλλαγή έκφρασης
- ✓ Επιγενετικές τροποποιήσεις
- ✓ Ιχνηλάτιση αλληλουχιών
- ✓ Ανίχνευση αλληλουχιών και RNA
- ✓ Στόχευση αλληλουχιών για τοπικές μεταβολές

Επίσης, Liu, C. and P. N. Moschou (2018). "Phenotypic novelty by CRISPR in plants." Developmental Biology **435**(2): 170-175.

Πώς μπορεί να γίνει σε φυτά;

Σύνοψη όλων των μεθοδολογιών έως το 2021:



Προσαρμογή από Zhu H, Li C, Gao C (2020) Applications of CRISPR–Cas in agriculture and plant biotechnology. Nat Rev Mol Cell Bio 21 (11):661–677. doi:10.1038/s41580-020-00288-9

Προέρχεται από αλληλουχίες¹⁹ στο γονιδίωμα βακτηρίων

6/11/2022

- Βρέθηκαν ως 'exotic junk DNA' άγνωστης λειτουργίας

```
TCGAATGGGAGGGAGTTCTACCCGAGAGGCGGGGAACTCCAAGTGATCCATCGCATCCAGTGGCC (1,451)
(1,452) CGGTTTATCCCCGCTGATCGGGGAACACCAAGCTCAGGCGTGAAATCTCACCCTCGTTGC (1,512)
(1,513) CGGTTTATCCCTGCTGGCGGGGAACTCTCGGTTCAAGCGTTGCAAACTGGCTACCGGG (1,573)
(1,574) CGGTTTATCCCCGCTAACCGGGGAACTCGTAGTCCATCATTCACCTATGTCTGAATCC (1,634)
(1,635) CGGTTTATCCCCGCTGGCGGGGAACTCG (1,664)

consensus: CGGTTTATCCCCGCTCGAAAACGGGGAACTC
```

Ishino et al., J.Bacteriol (1987)

- Απαντούν σε Archaea και Bacteria
Jansen et al, Mol. Microbiol (2002)
- Ονομάστηκαν..



Clustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeat

Ishino, Y., et al. (1987). "Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product." *Journal of Bacteriology* **169**(12): 5429-5433.
Jansen, R., et al. (2002). "Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes." *Molecular Microbiology* **43**(6): 1565-1575.

CRISPR ως σύστημα ανοσίας έναντι φάγων

6/11/2022

CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes

Rodolphe Barrangou,¹ Christophe Fremaux,² Hélène Deveau,³ Melissa Richards,¹
Patrick Boyaval,² Sylvain Moineau,³ Dennis A. Romero,¹ Philippe Horvath^{2*}

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) are a distinctive feature of the genomes of most Bacteria and Archaea and are thought to be involved in resistance to bacteriophages. We found that, after viral challenge, bacteria integrated new spacers derived from phage genomic sequences. Removal or addition of particular spacers modified the phage-resistance phenotype of the cell. Thus, CRISPR, together with associated *cas* genes, provided resistance against phages, and resistance specificity is determined by spacer-phage sequence similarity.

DANISCO.Inc

(αγοράστηκε από τη DuPont το 2011)

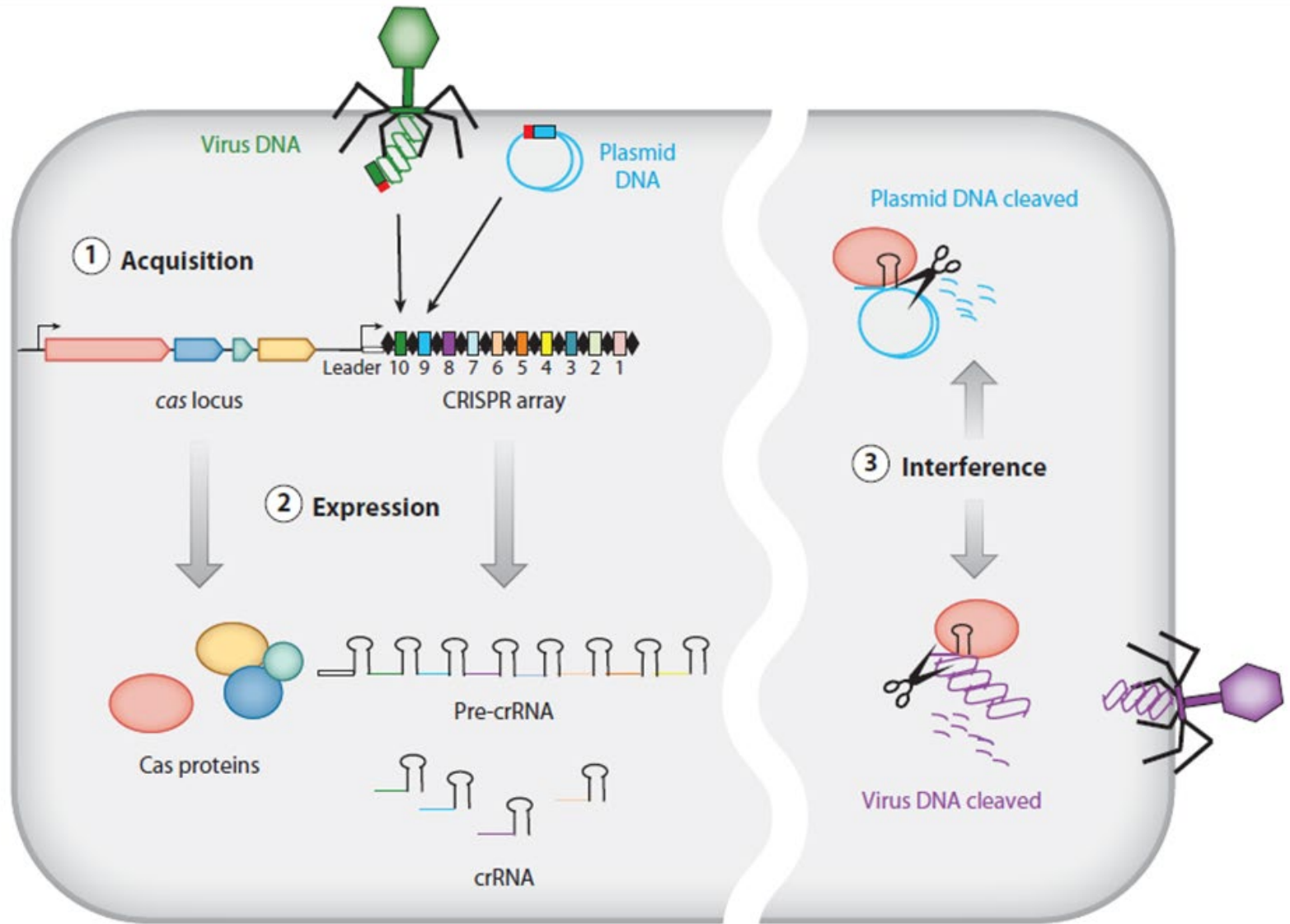
Science 2007

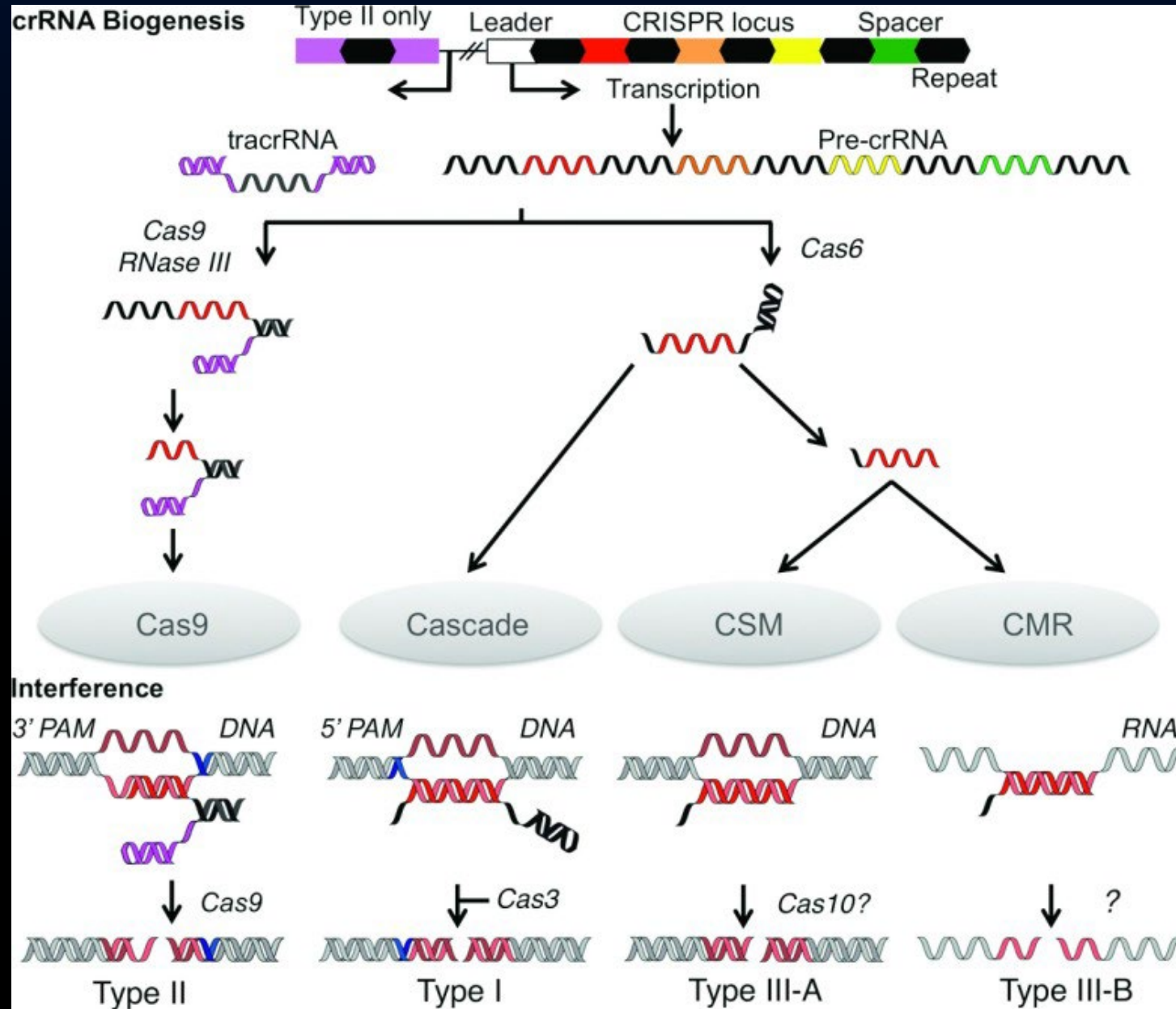
Πρακτικές ερωτήσεις από τη²¹ βιομηχανία γιαουρτιού

6/11/2022

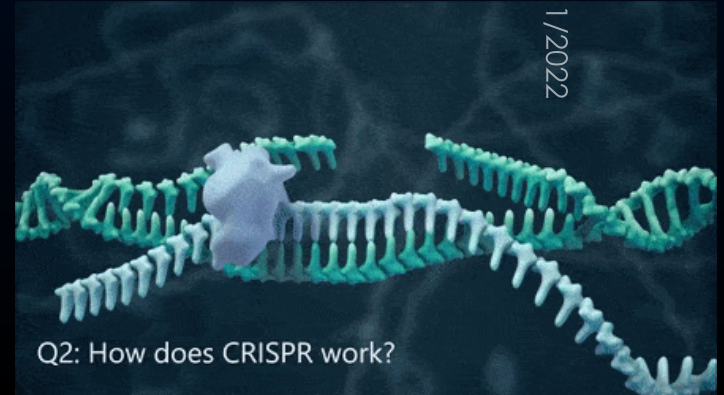
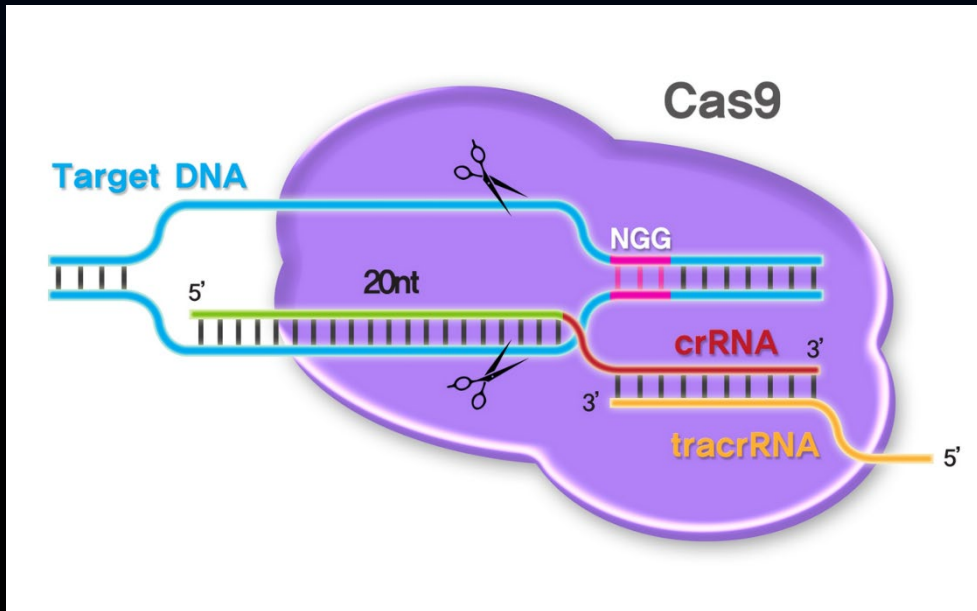
- Μόλυνση με φάγους:
Βασικό πρόβλημα στις εταιρείες
- Μετά από πανδημίες, θα προκύψουν ανθεκτικά στελέχη
- Υπόθεση

**“Βακτηριακή ανθεκτικότητα ενάντια
σε μολύνσεις από φάγους;”**

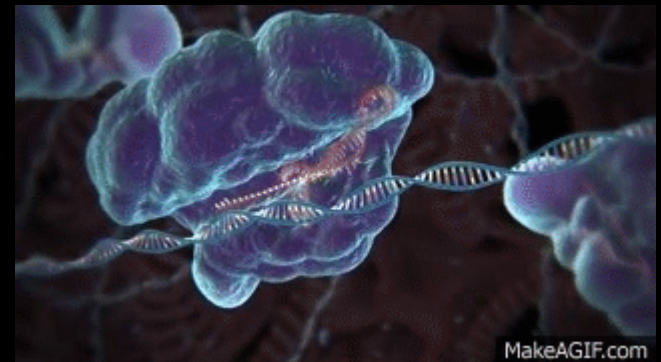




Cas9 : RNA-directed Endonuclease

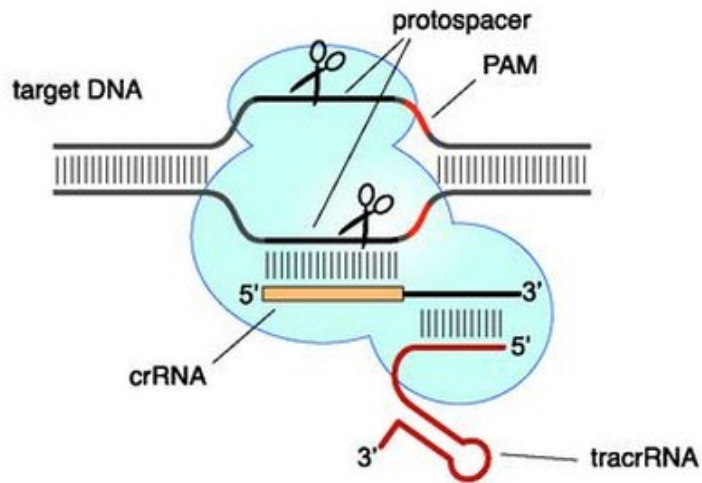


6/11/2022

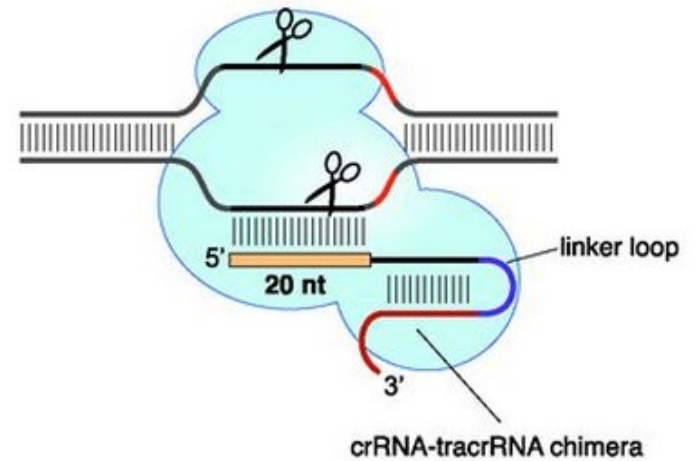


Εξέλιξη του συστήματος

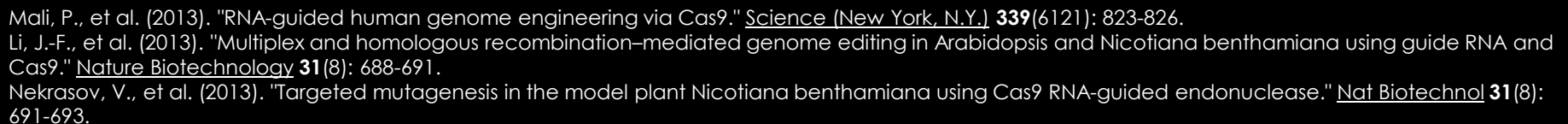
2 μόρια RNA



1 μόριο RNA



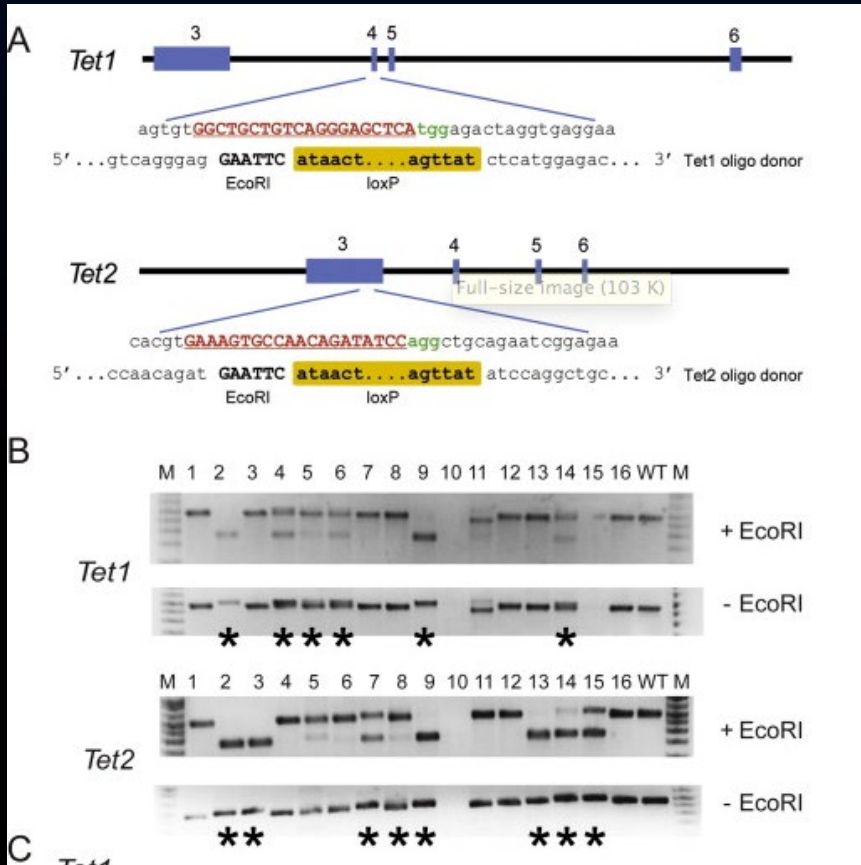
6/11/2022



Παραγωγή εισδοχών

Εξαρτάται από ομολογίες

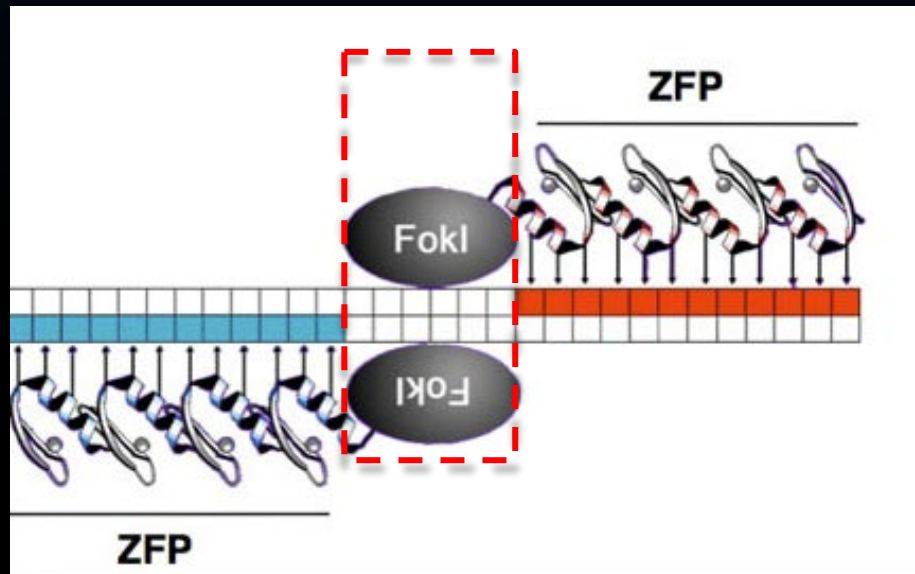
6/11/2022



Πλεονεκτήματα του CRISPR/Cas9 σε σχέση με τα TALEN ή ZFN (2)

- TALEN ή ZFN : δεν λειτουργεί το ίδιο καλά με τα φυσικά ένζυμα

6/11/2022



Εξαρτάται από τη συγγένεια και των δύο μερών

Θεωρητικά, όλα τα γονιδιώματα μπορεί να στοχευθούν από το CRISPR/Cas9

Φυτά

Arabidopsis
Rice
Tobacco
Wheat
Orange

Ζώα

Mouse
Rat
Xenopus
Drosophila
Pig
Zebrafish
Rabbit
Goat

Μύκητες

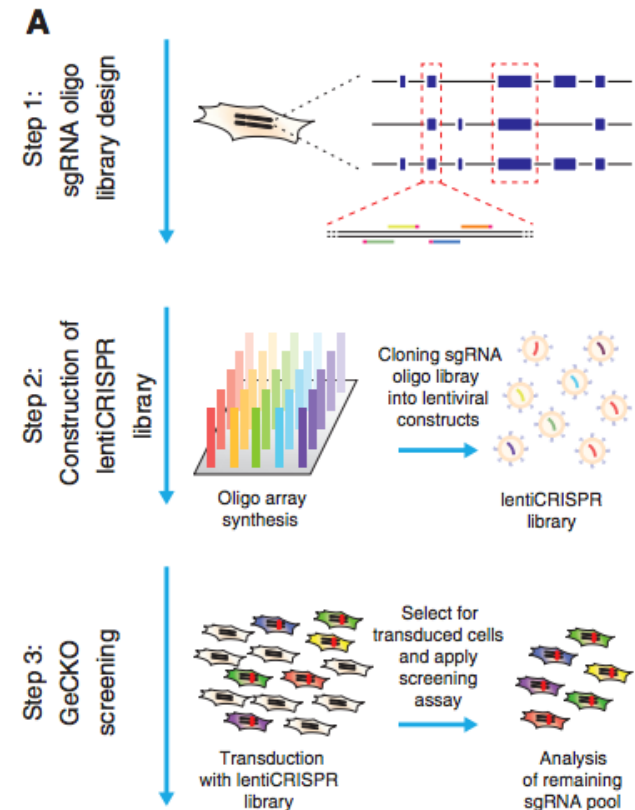
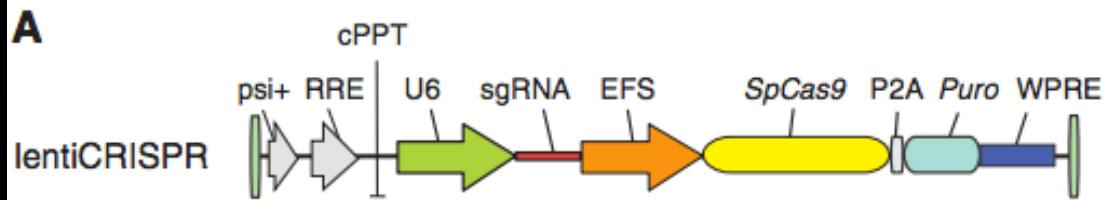
Βακτήρια

6/11/2022

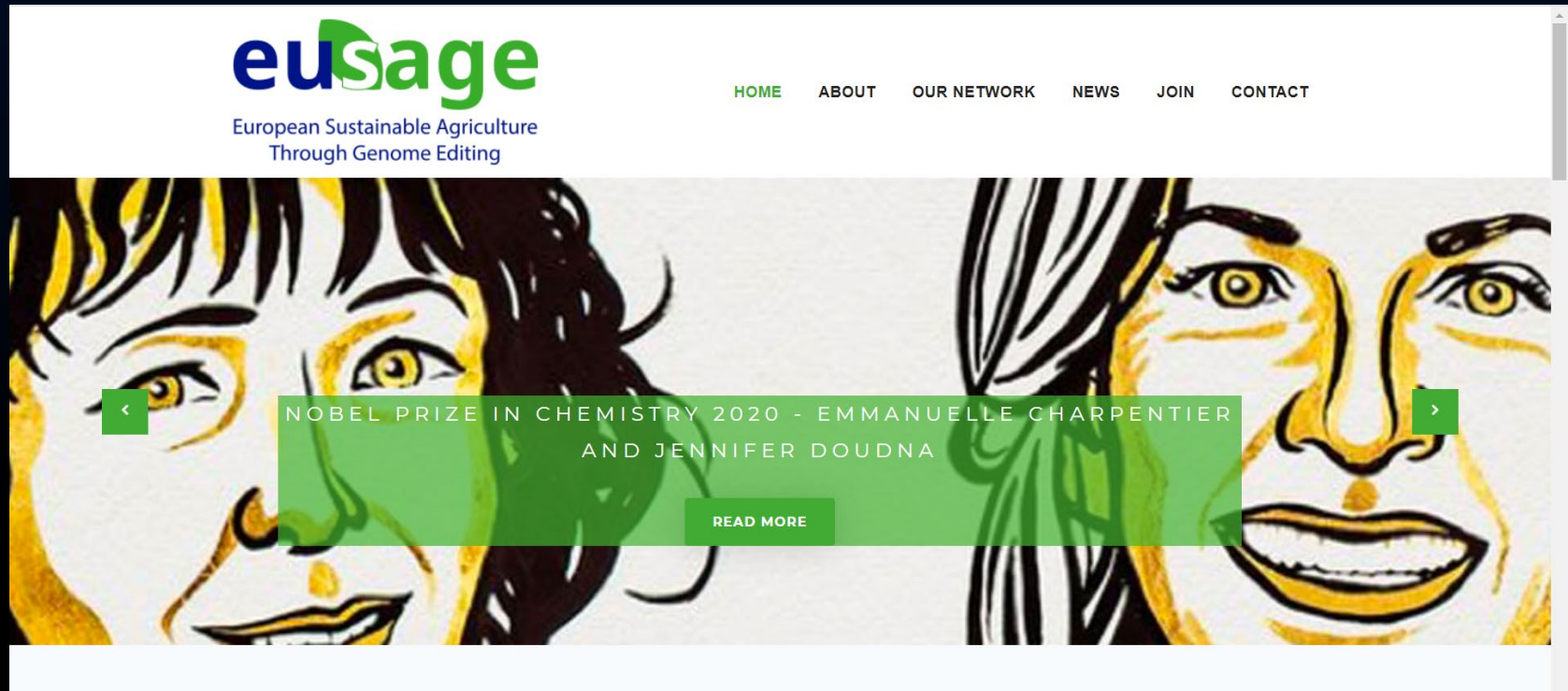
Σε λιγότερο από δύο χρόνια από την ανακάλυψη

Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells

Ophir Shalem,^{1,2*} Neville E. Sanjana,^{1,2*} Ella Hartenian,¹ Xi Shi,^{1,3}
David A. Scott,^{1,2} Tarjei S. Mikkelsen,¹ Dirk Heckl,⁴ Benjamin L. Ebert,⁴ David E. Root,¹
John G. Doench,¹ Feng Zhang^{1,2†}



Προβλήματα βιοηθικής



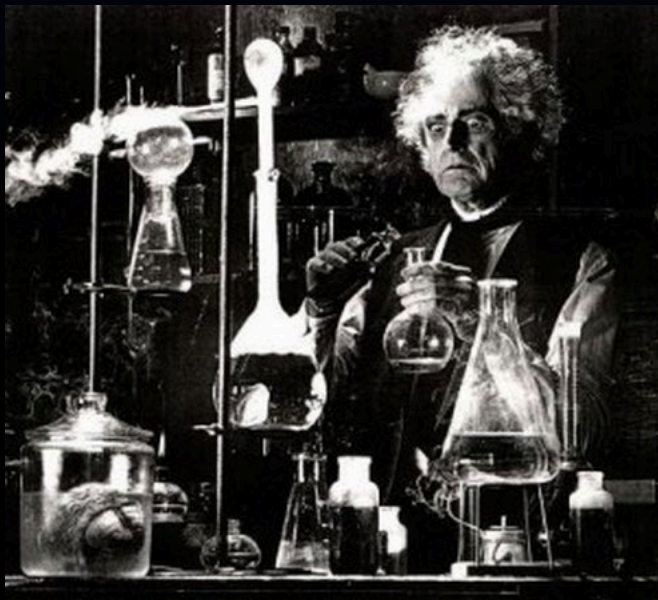
Emmanuelle Charpentier
Max Planck Unit for the Science of Pathogens, Berlin,
Germany

Jennifer A. Doudna
University of California, Berkeley, USA



"for the development of a method for genome editing"

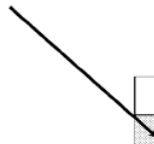
Ηθικοί προβληματισμοί



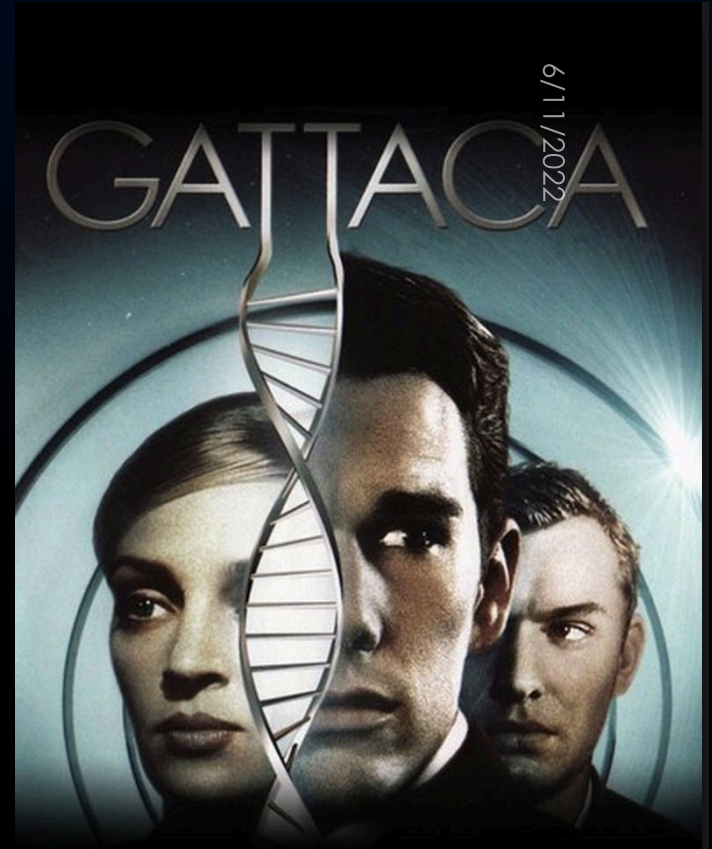
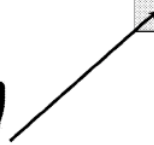
Τρελλός επιστήμονας aka
“Frankenstein builder”

“Γονέας ή σχεδιαστής?”

FIG. 1A



LOCUS>	01	02	03	04	05	06	...	N
John Smith	AC			CG		TT	...	AT
Jane Doe	AA			CC		TC	...	AA



“Designer Baby” Patent issued to 23andMe.com

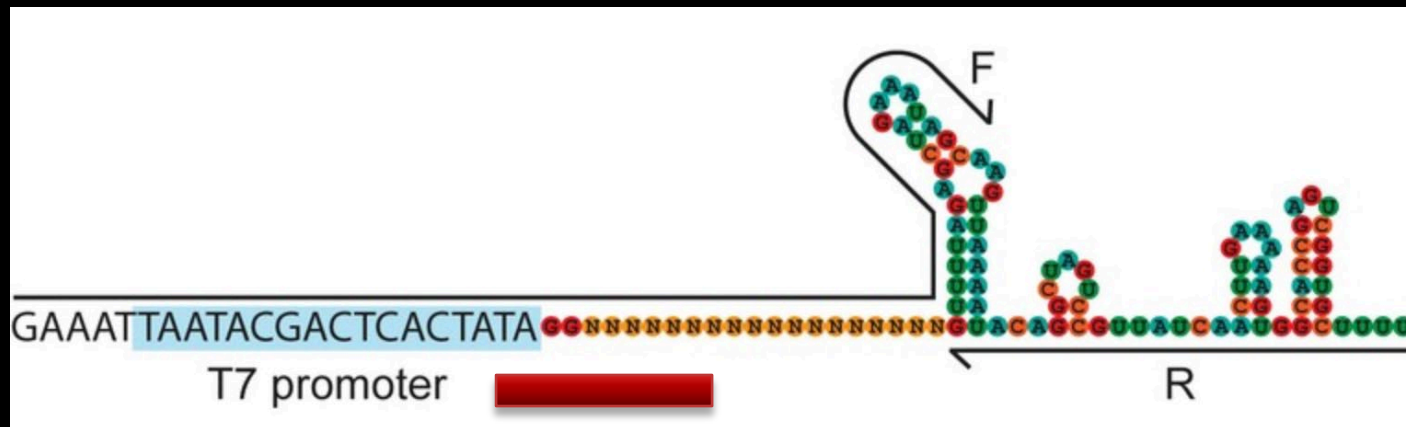
US. 8,620,594 B2

Μειονεκτήματα του CRISPR/Cas9

- Δευτερογενής στόχοι (EMS)

6/11/2022

-Η αναγνώριση από τη Cas9 εξαρτάται από ~15bp άνωθεν της αλληλουχίας PAM



Πώς μπορούν να αποφευχθούν;

6/11/2022

- Διάρκεια ζωής (λιγότερο cas9/sgRNA)
- Βιοπληροφορική : καλύτερος σχεδιασμός του RNA οδηγητή

“CRISPR Design” (<http://crispr.mit.edu>)



Σύστημα διπλής κοπής

- Cas9 Nickase (κόβει μόνο μία αλυσίδα DNA)

6/11/2022

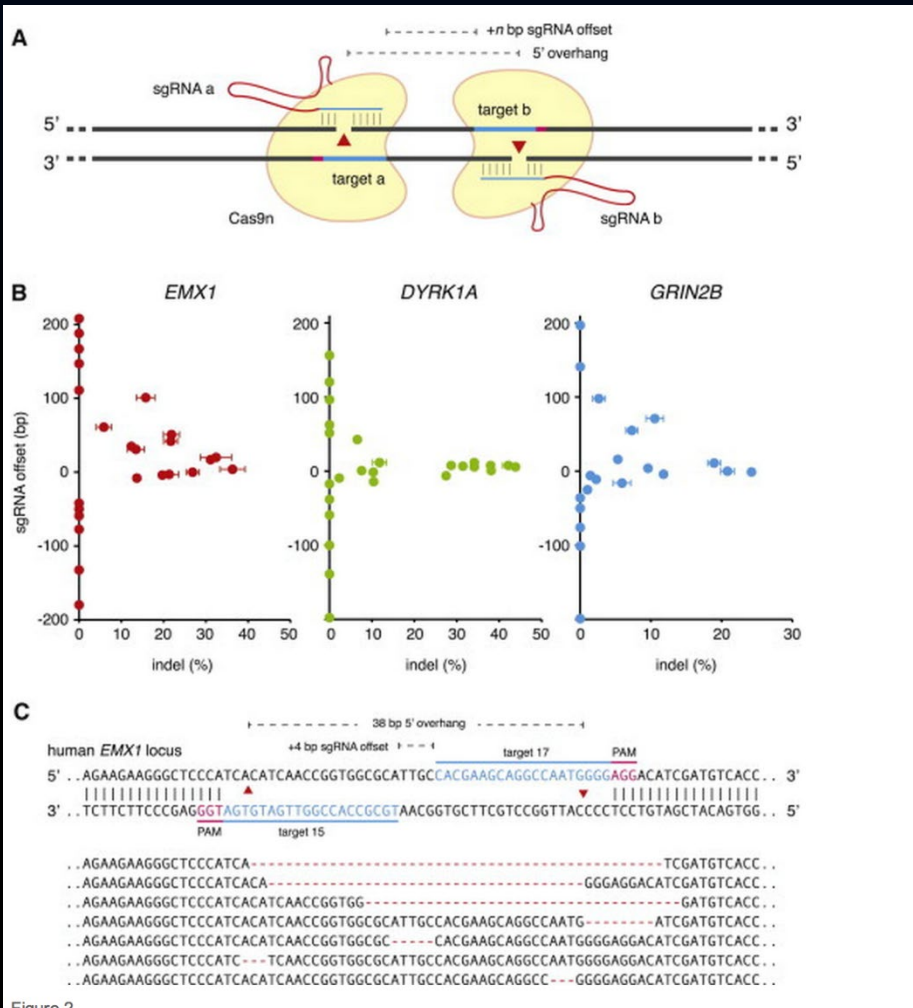
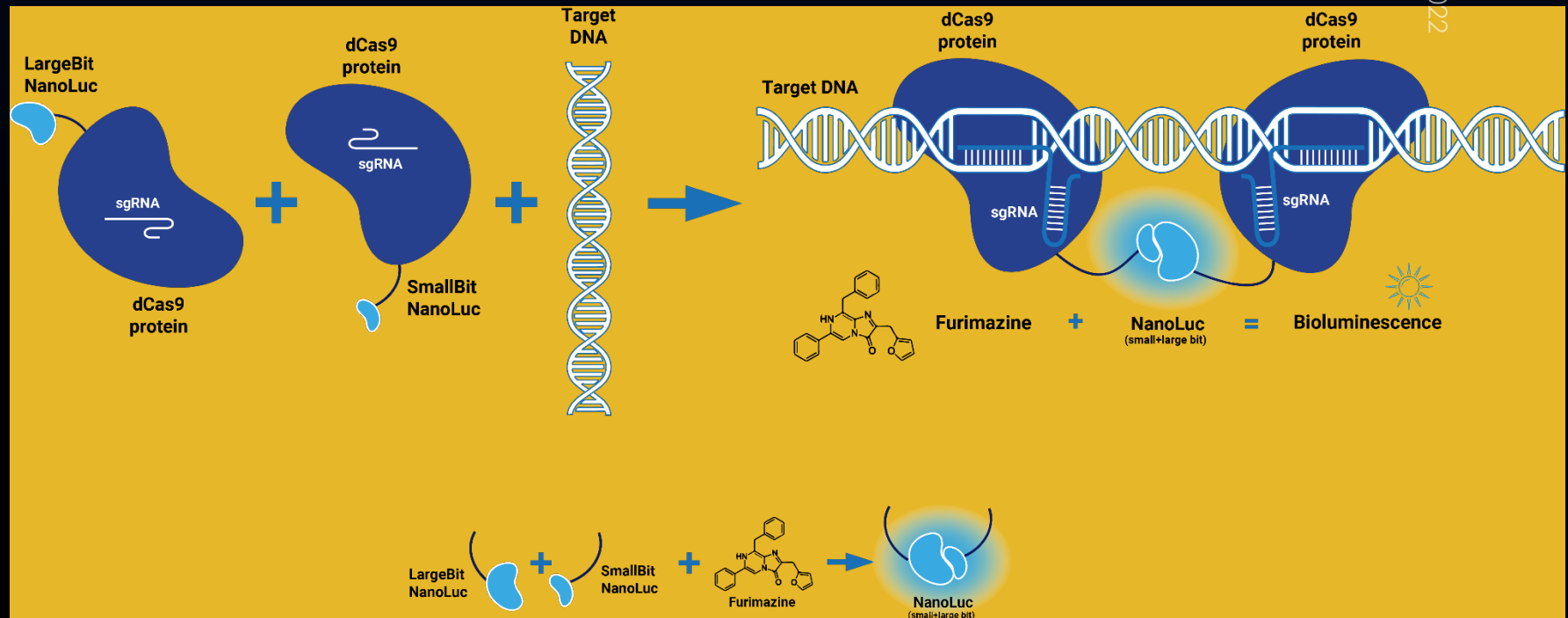


Figure 2

- Μειώνει τη παραγωγή off-targets κατά 50-1,000 φορές
- Επαρκές indel / HDR όπως η αγρίου τύπου wt Cas9
- Μεγαλύτερος περιορισμός στην επιλογή σημείων κοπής

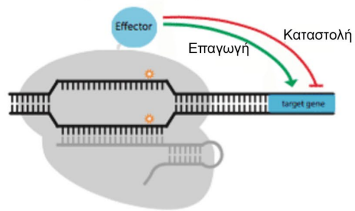
Ανίχνευση αλληλουχιών

6/11/2022

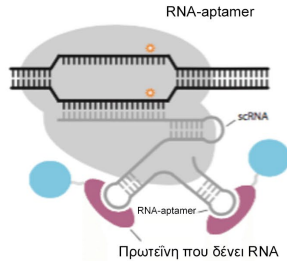
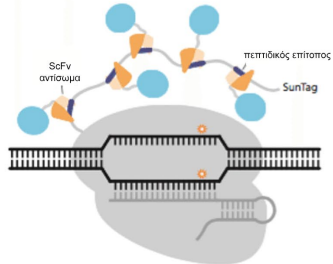


Ανίχνευση αλληλουχιών

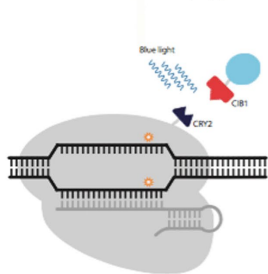
Α. Κλάση I, άμεση



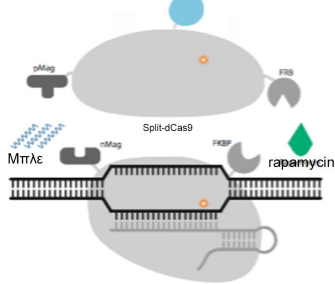
Β. Κλάση II, έμμεση επίτοπος-αντίσωμα



Γ. Κλάση III, χρονοτοπική έκφραση ενεργότητας, επαγόμενη από φως επαγωγή τελεστή



Επαγόμενη από φως συνάφεια dCas9 Χημική επανασύσταση dCas9

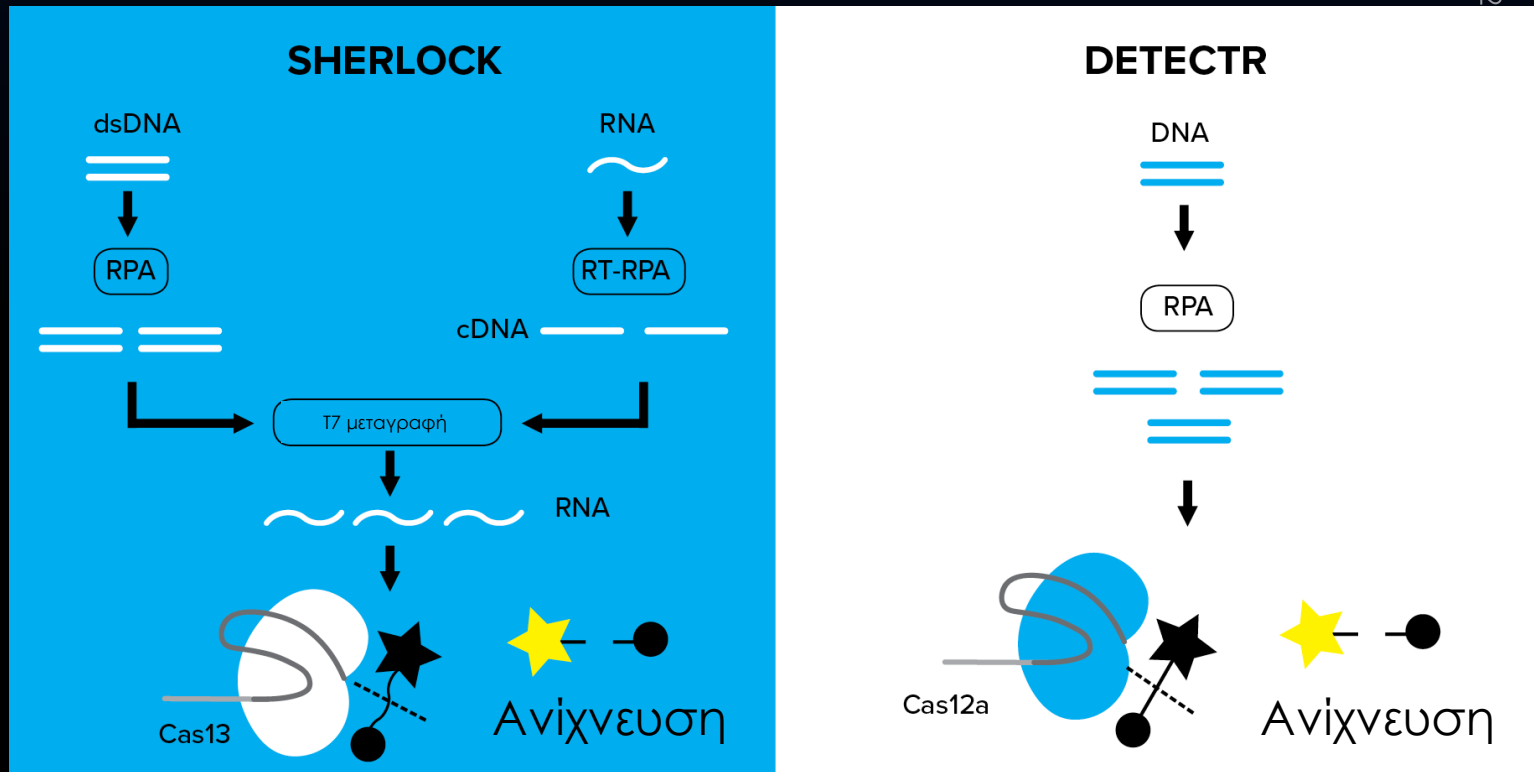


- Άμεσες μέθοδοι
- Έμμεσες μέθοδοι

Ανίχνευση αλληλουχιών

Η περίπτωση της cas13

6/11/2022



Specific High Sensitivity Enzymatic
Reporter UnLOCKING
(SHERLOCK and SHERLOCKv2)

DNA Endonuclease Targeted
CRISPR Trans Reporter (DETECTR)

11. Οργανίδια που δεν περικλείονται από μεμβράνη (πυρηνίσκος κτλ)