

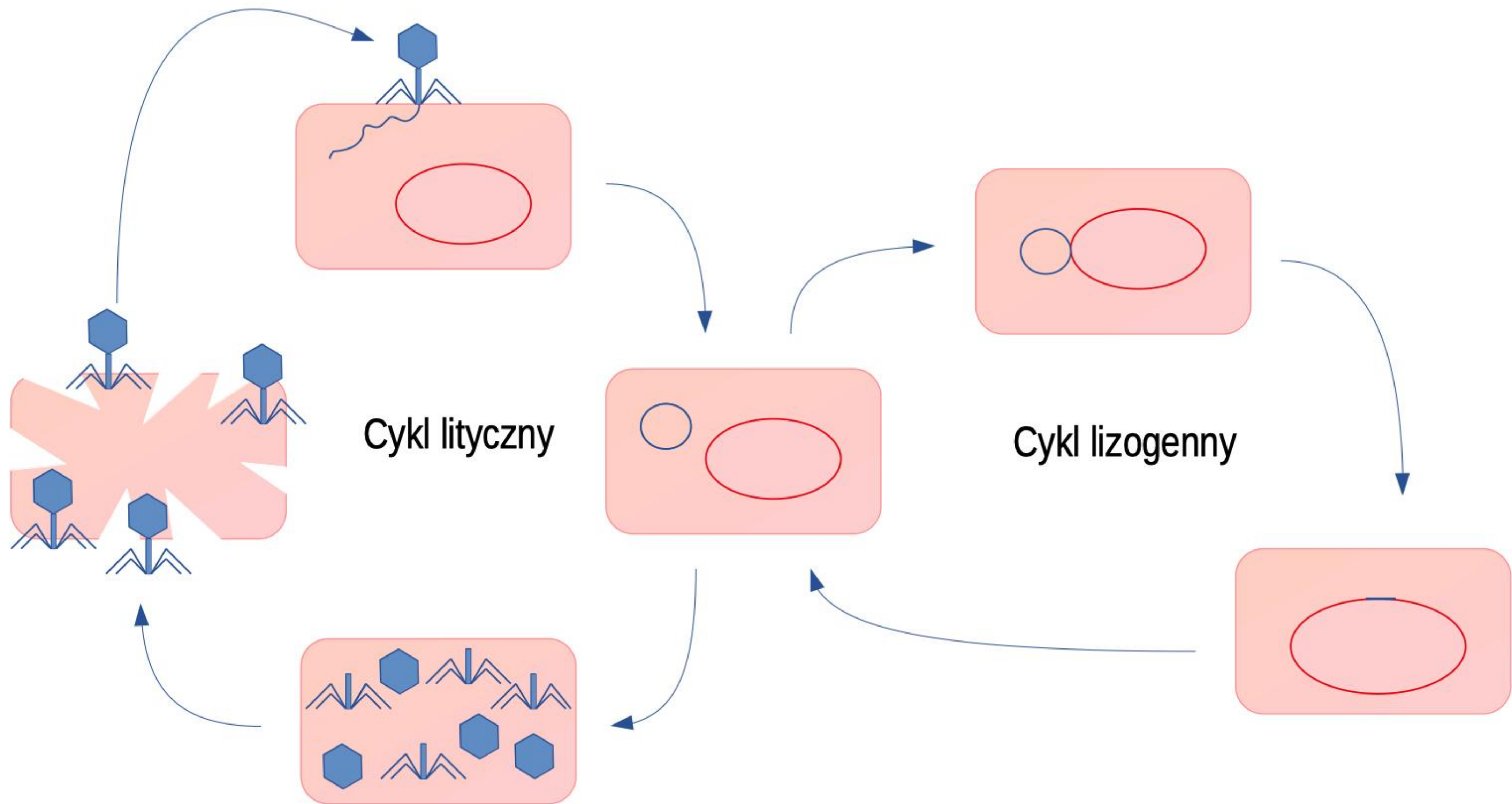


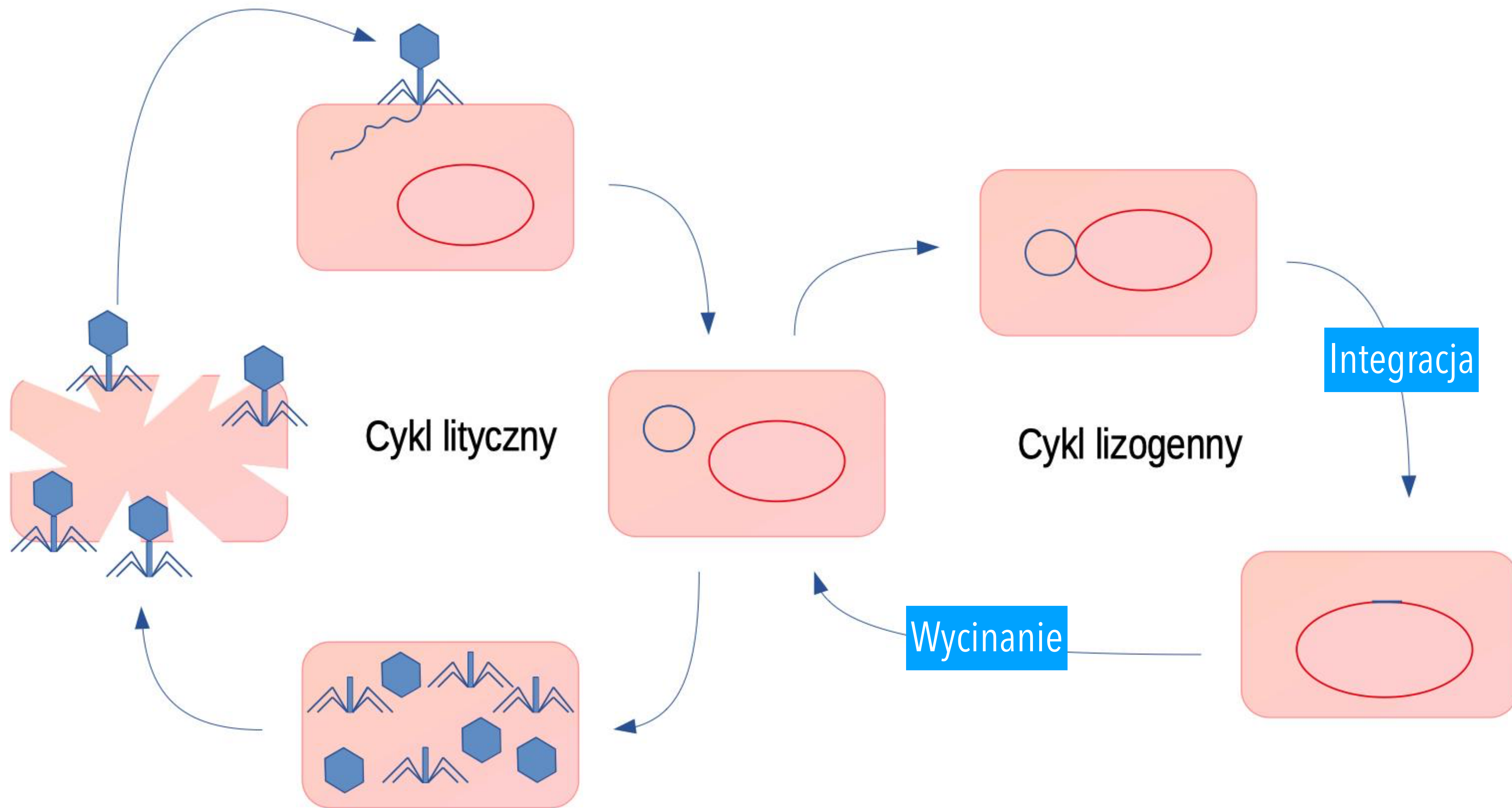
ZASTOSOWANIE INTEGRAZ SERYNOWYCH W INŻYNIERII GENETYCZNEJ

Paulina Smaruj
Zakład Genetyki Bakterii
Instytut Mikrobiologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski

BAKTERIOFAGI - CYKL LITYCZNY I LIZOGENNY

- Bakteriofagi (wirusy bakteryjne) można podzielić na dwie grupy: fagi wirulentne i łagodne.
- Fagi wirulentne mogą replikować się wyłącznie w cyklu litycznym. Kończy się on lizą zainfekowanej komórki gospodarza na końcu cyklu.
- Po zainfekowaniu komórki bakteryjnej fagi łagodne mogą wejść w cykl lityczny lub wybrać jego alternatywę - cykl lizogenny. W drugim przypadku materiał genetyczny faga wintegrowuje w DNA gospodarza i staje się profagiem.





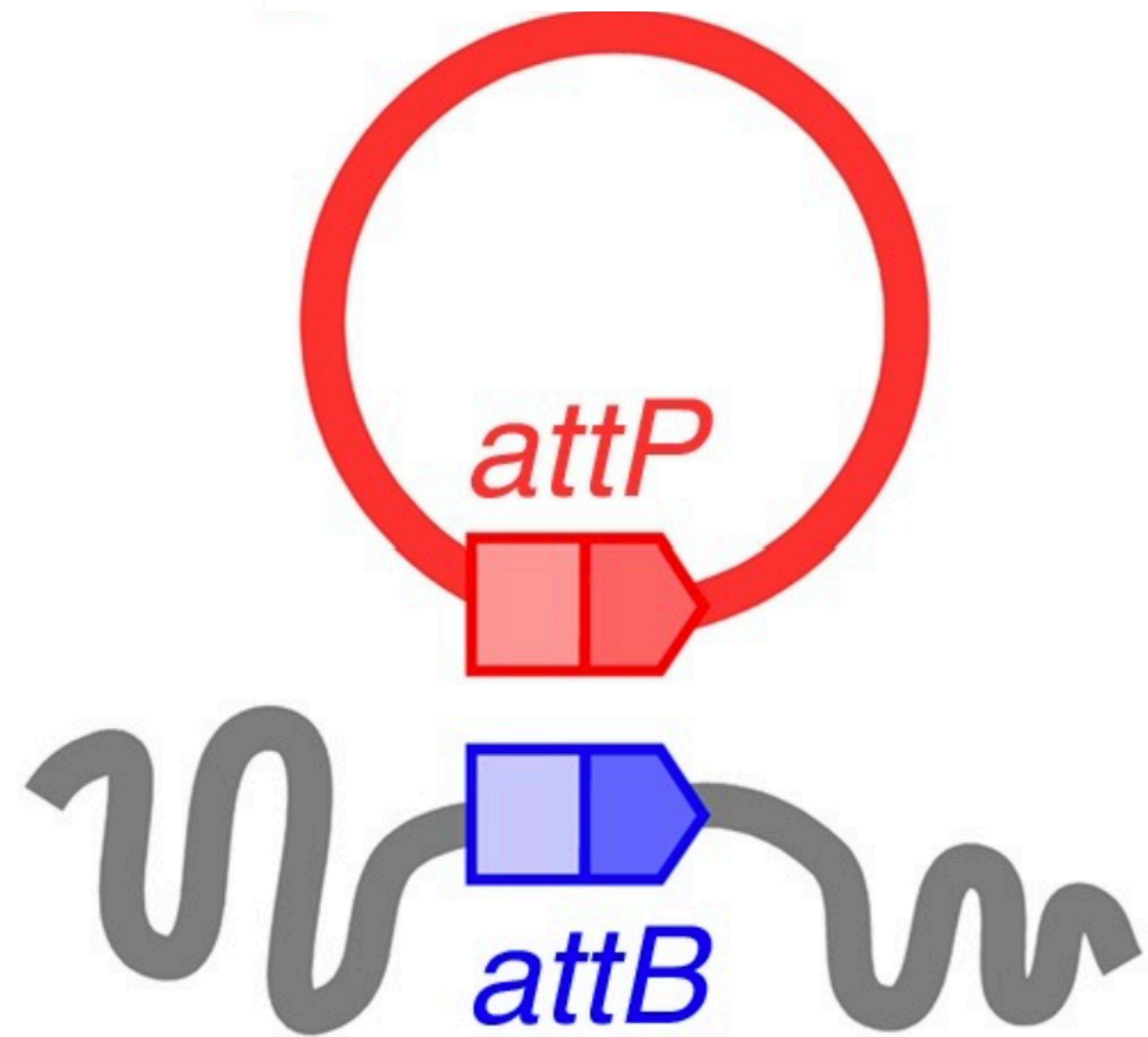
INTEGRACJA

- Integrację genomu faga do chromosomu gospodarza katalizuje enzym określany jako **integraza**. Katalizuje ona miejscowo-specyficzną rekombinację pomiędzy: sekwencją *attP* (w genomie bakteriofaga) a miejscem *attB* (w chromosomie bakteryjnym).
- W wyniku rekombinacji sekwencja profaga jest oflankowana dwoma sekwencjami, *attL* oraz *attR*, które składają się z połówek miejsc *attP* i *attB*.
- Wycięcie jest reakcją odwrotną do integracji - rekombinacją między miejscami *attP* oraz *attB*.

WYCINANIE

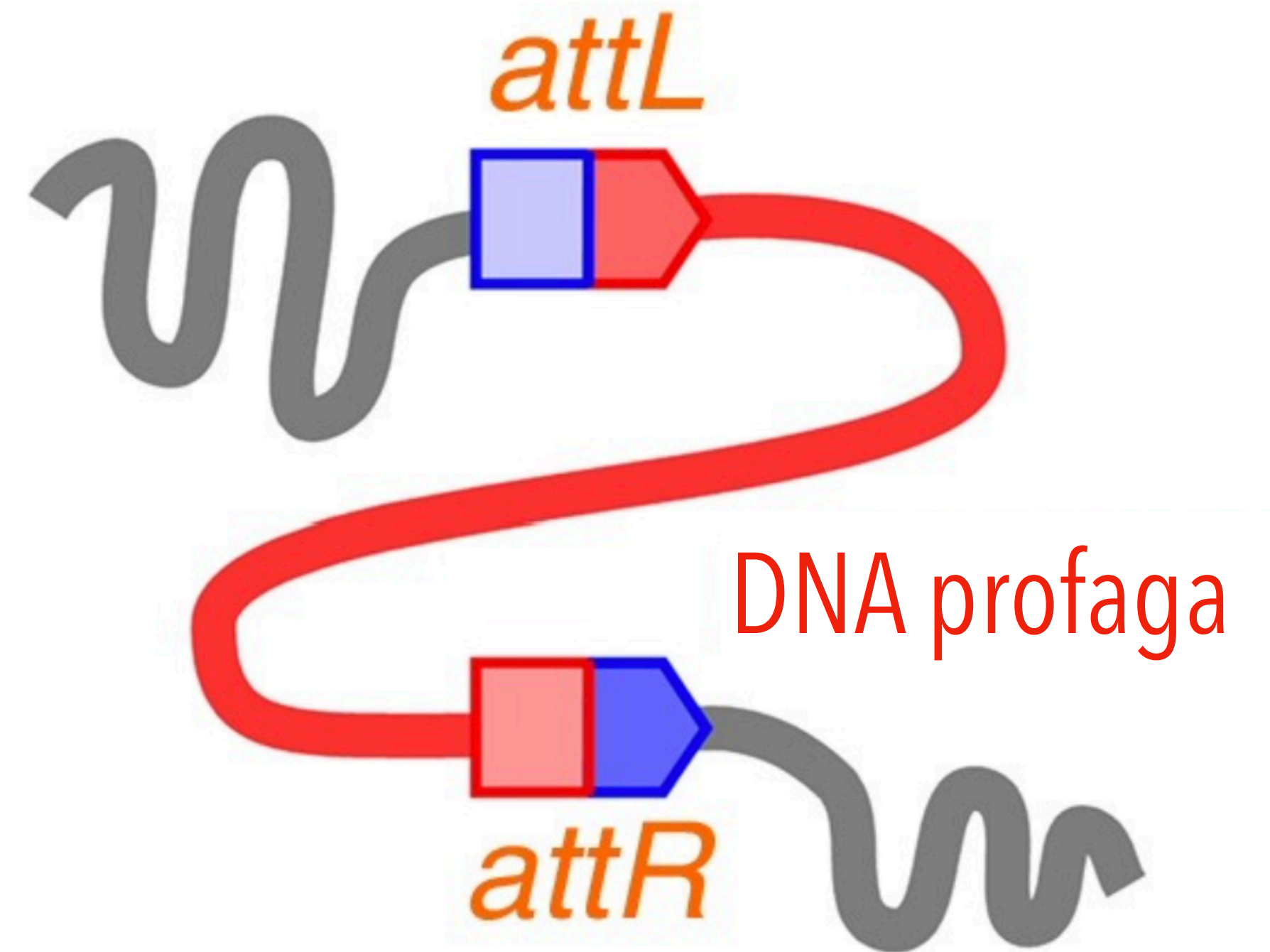
- Integraza katalizuje zarówno reakcję integracji, jak i wycięcia. Jednak biologia cyklu lizogennego wymaga preferowanej jednokierunkowości katalizy.
- Fagi łagodne kodują białka konieczne do rekombinacji *attL* x *attR*: Xis (ekscisionaza) dla integrazy bakteriofaga lambda (integraza tyrozynowa) oraz RDF (*Recombination Directionality Factor*) dla integraz serynowych.

DNA bakteriofaga



DNA chromosomu bakterii

INTEGRAZA
INTEGRAZA + RDF



PROBLEMATYCZNY RDF

- Na podstawie sekwencji DNA zidentyfikowano wiele prawdopodobnych integras serynowych.
- **W celu stworzenia systemu integracji o zastosowaniu aplikacyjnym należy jednak nie tylko zidentyfikować integrasę, ale także RDF.**
- Aktualnie ok. 20 integras serynowych zostało dobrze poznanych, dla około połowy z nich udało się zidentyfikować czynnik RDF.

CECHY IDEALNEJ INTEGRAZY

1. WYSOKA SPECYFICZNOŚĆ

Dotychczasowe badania in vivo i in vitro wskazują na wysoką specyficzność w oczekiwanym miejscu integracji.

Mimo to, integrazy serynowe wykazują niski poziom aktywności niespecyficznego (*off-target activity*) w miejscach podobnych do naturalnych sekwencji att (*pseudosites*).

2. PRECYZJA

Wydaje się, że integrazy serynowe ewoluowały w kierunku jak najwyższej precyzji minimalizując ryzyko uszkodzeń DNA i niekorzystnych mutacji.

Jednak zjawisko akumulacji negatywnych zmian z DNA zostało zaobserwowane. Dotyczyło ono układów, w których integraza wykazywała aktywność w komórkach niebędących naturalnym gospodarzem faga, z którego pochodził enzym.

3. SZYBKOŚĆ

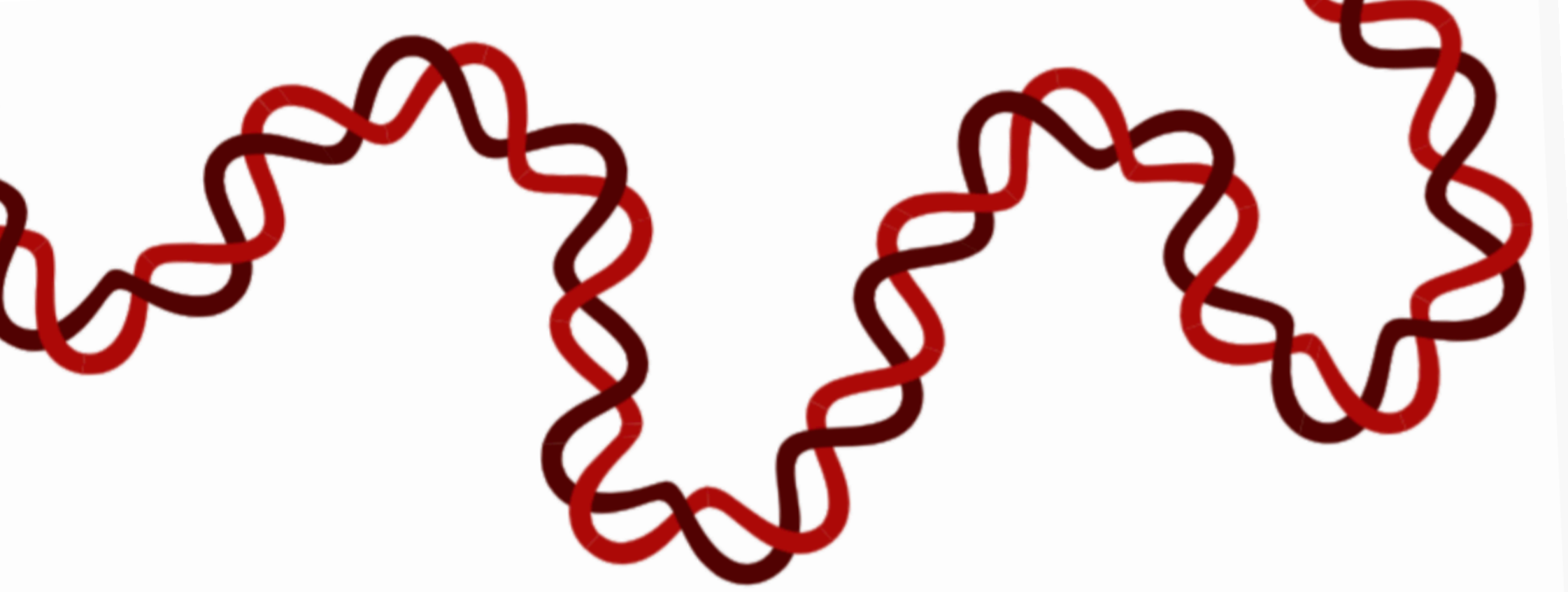
Dane dotyczące czasu koniecznego do efektywnej rekombinacji *in vivo* nie są jednoznaczne. Istnieją jednak systemy, dla których optymalny czas liczony jest w godzinach.

Reakcje *in vitro* są jeszcze szybsze, trwają kilka - kilkanaście minut.

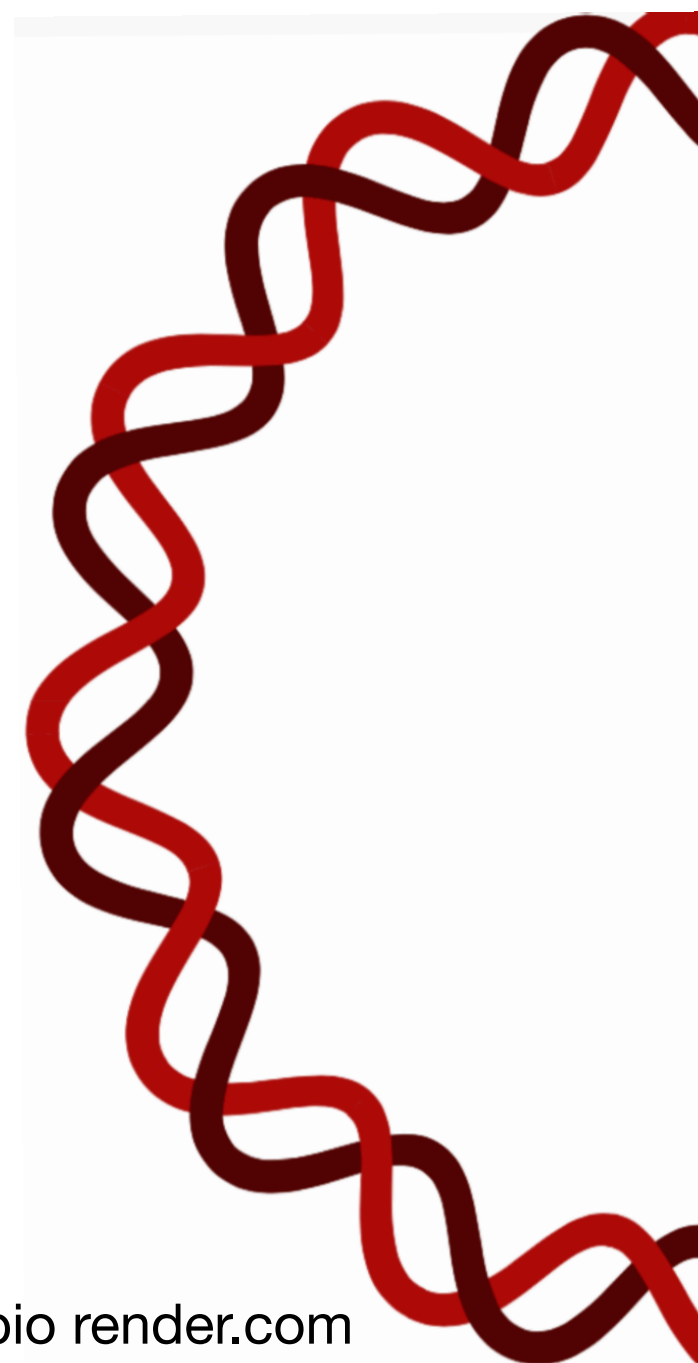
4. ORTOGONALNOŚĆ

W przypadku używania kilku integracji jednocześnie:

- nie mogą one rozpoznawać tych samych sekwencji
- nie powinny bezpośrednio ze sobą oddziaływać
- interakcja z czynnikiem RDF innej integracji jest także niewskazana



ZASTOSOWANIE INTEGRAZ SERYNOWYCH W EDYCJI GENOMU



1. WYKORZYSTANIE PSEUDOSITES

- Zamiast wprowadzać do genomu sekwencję *att* przed reakcją rekombinacji, można wykorzystać preegzystujące w DNA miejsca je przypominające - ***pseudosites***.
- Opisane podejście jest wykorzystywane w badaniach nad terapią genową. Skuteczna rekombinacja w *pseudosites* została udowodniona w komórkach mysich, szczurzych i ludzkich.

Plus:

- Technika omija etap wcześniejszej integracji miejsca *att* - niższe koszty, mniejszy nakład czasu i pracy.

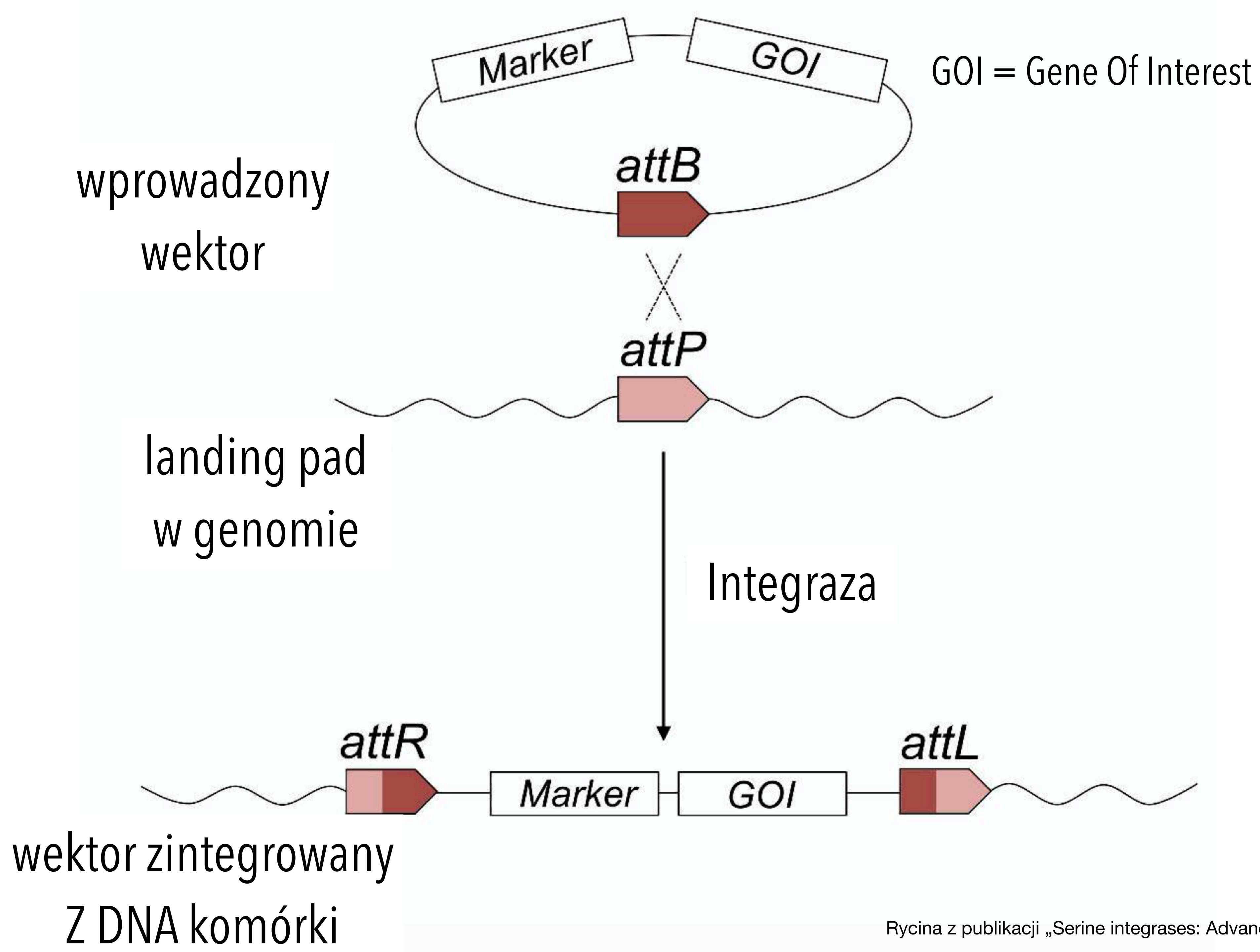
Minus:

- Zazwyczaj w DNA komórki będzie więcej niż jedno *pseudosite* (w genomie człowieka jest 19). Nie można nakierunkować rekombinacji na konkretny z nich.

2. LANDING PAD

- Podejściem alternatywnym jest wykorzystanie tzw. **landing pad** (dosłownie „lądowisko helikoptera”) - sekwencji *att* wprowadzonej wcześniej do genomu na drodze transpozycji lub rekombinacji homologicznej.
- Komórki (szczepy, np. *Drosophila*) ze skutecznie zintegrowaną sekwencją *att* są kolekcjonowane.





JUMP-IN TARGETED INTEGRATION SYSTEM

Jump-In™ GripTite™ HEK 293 Kit



Catalog number: A14150

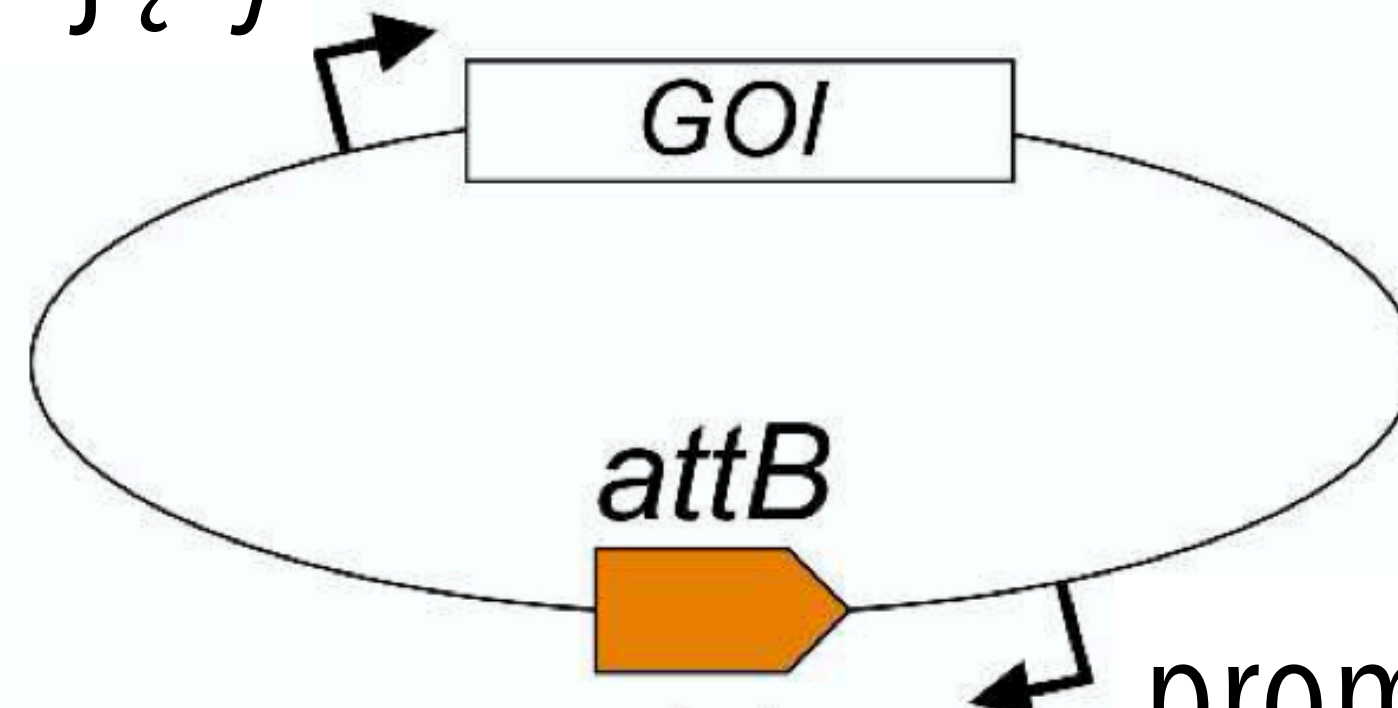
Related applications: [Protein Expression](#)

 [Contact us for support >](#)

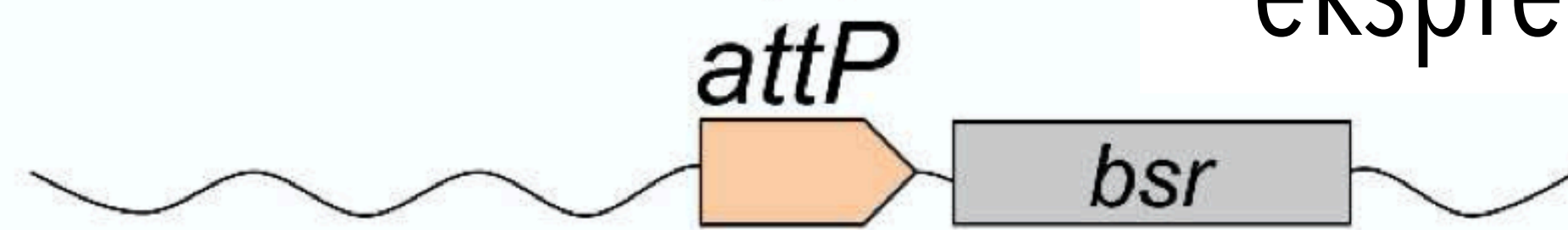
	Catalog number	Unit Size	Price (PLN)	Availability ⓘ	Qty
☆	A14150	1 kit	26 970,00 Your price: Sign In ⓘ	***	<input type="text"/>

- **Jump-In Targeted Integration System** oferowany przez ThermoFisher Scientific oferuje komórki HEK 293 (ludzkie komórki embrionalne nerki) zawierające zintegrowany *attP* dla integrazy faga R4 w znanym miejscu w genomie.
- Wektor niosący komplementarny *attB* oraz zadany fragment DNA ulega integracji w obecności integrazy faga R4, którego gen jest dostarczany do komórki na drugim wektorze.
- **GripTite** jest ulepszoną wersją, w której skuteczna integracja skutkuje ekspresją genu oporności na antybiotyki.

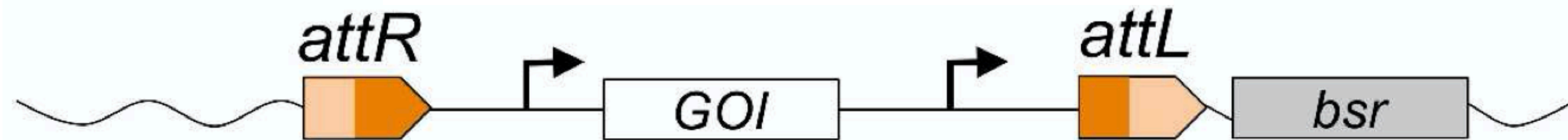
promotor zapewniający
ekspresję GOI



promotor warunkujący
ekspresję genu *bsr*



Integraza
faga R4



Ekspresja genu oporności
na blastycydynę

Plus:

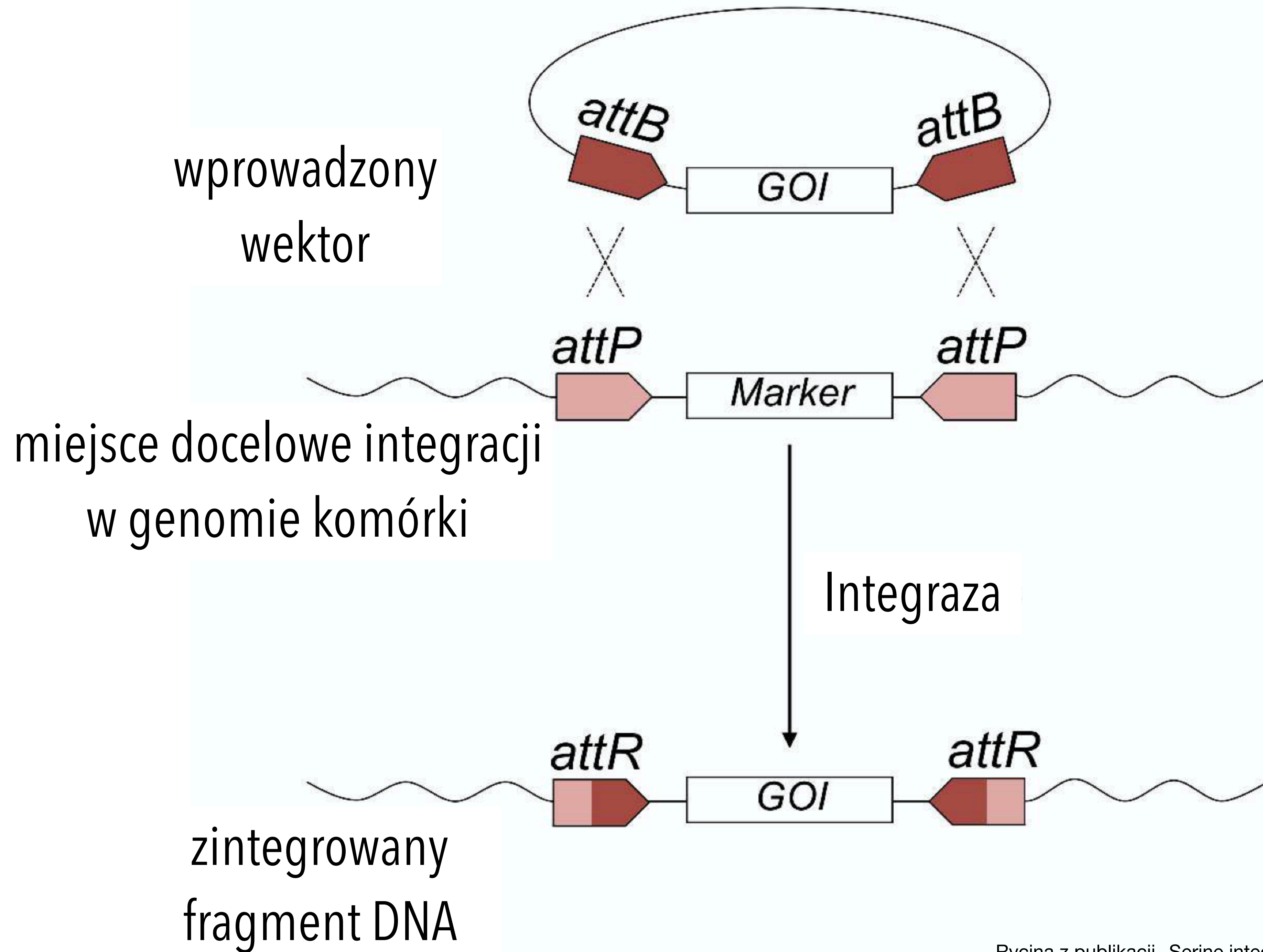
- Korzyścią wykorzystania landing pad jest znanie *loci*, w którym zajdzie rekombinacja.

Minus:

- Detekcja integracji wymaga wprowadzania dodatkowego DNA zapewniającego selekcję rekombinantów.

3. RMCE = Recombinase-Mediated Casette Exchange

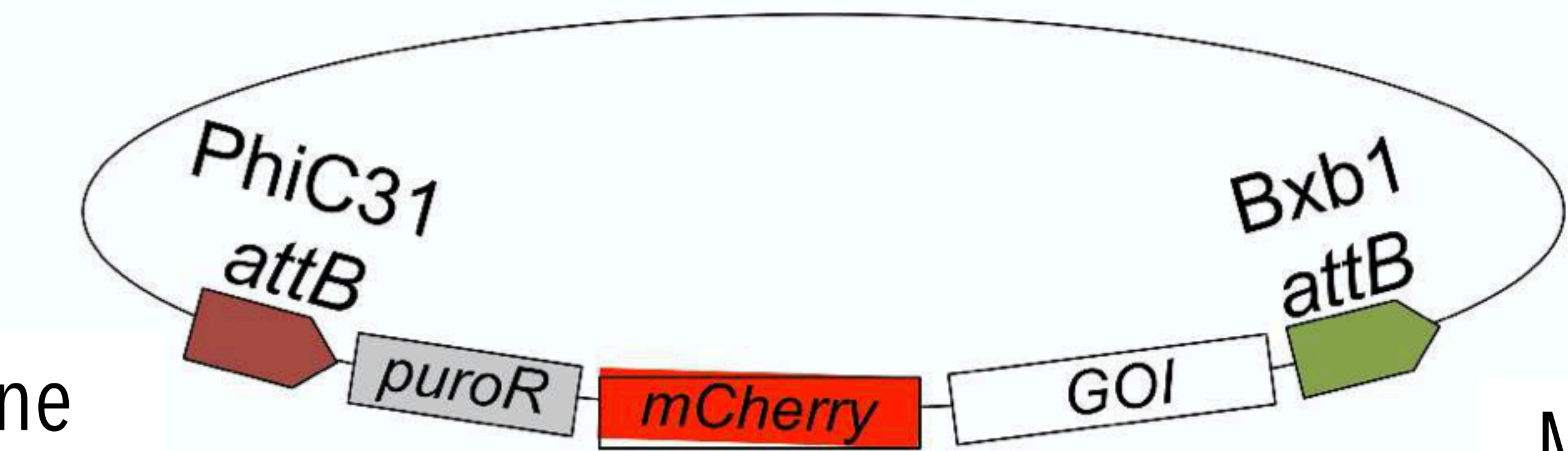
- Strategia polegająca na wprowadzeniu transgenu (bez pozostałej części wektora) poprzez zajście dwóch zjawisk rekombinacji.
- Docelowe miejsce integracji jest skonstruowane z genu markera selekcyjnego oflankowanego dwiema niekomplementarnymi sekwencjami *att*. Zostało ono wprowadzone do genomu na drodze transpozycji lub rekombinacji homologicznej.
- Wektor zawiera GOI oflankowany dwoma miejscami *att* komplementarnymi do sekwencji *att* w genomie.



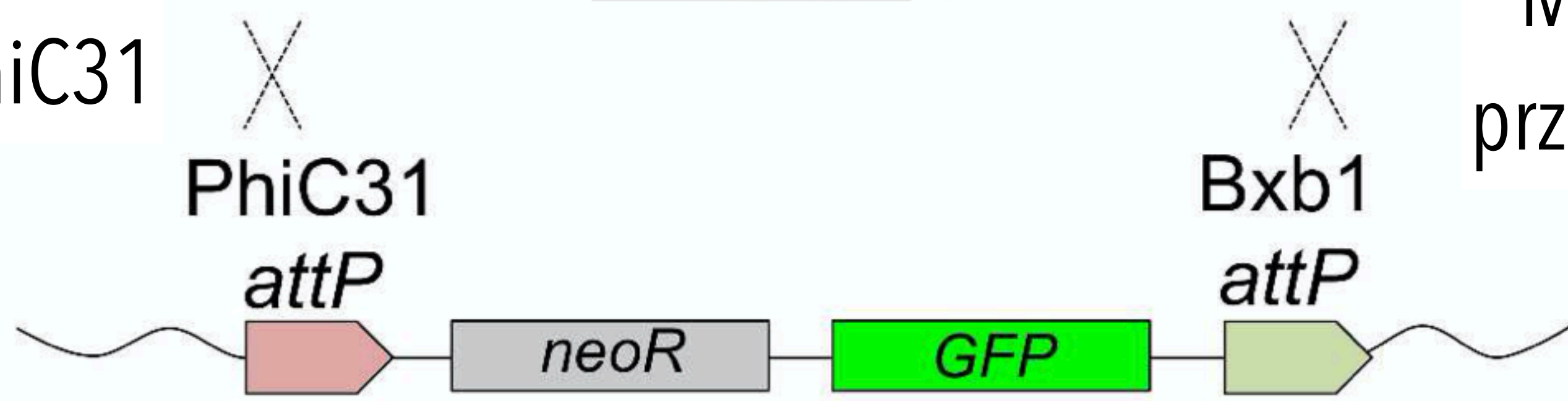
DICE = Dual Integrase Casette Exchange

- DICE jest wariantem techniki RMCE, w którym wykorzystuje się dwie ortogonalne integrazy serynowe.
- Strategia została stworzona przez grupę Calosa badającą pluripotencjalne komórki macierzyste.
- Docelowe miejsce integracji w genomie zawiera gen oporności na neomycynę (*neoR*) oraz białko zielonej fluorescencji (*GFP*). Wprowadzany wektor zawiera dodatkowe markery selekcyjne: gen oporności na puromycynę (*puroR*) oraz białko czerwonej fluorescencji (*mCherry*).

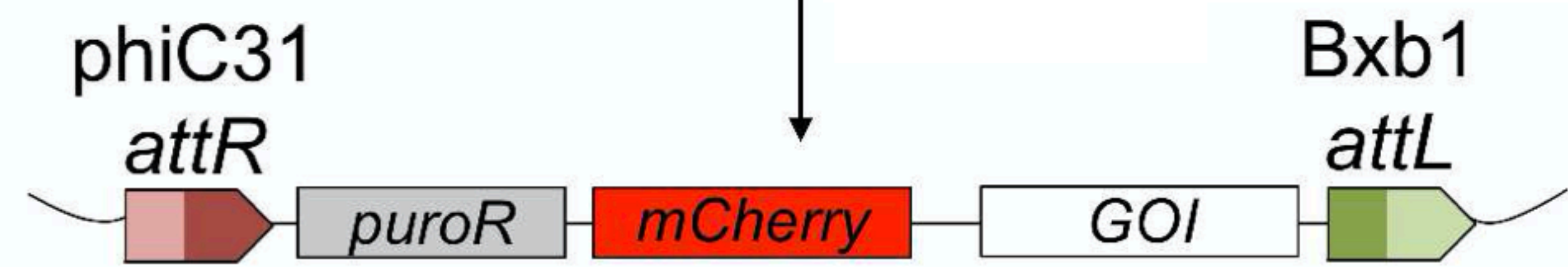
Miejsca rozpoznawane przez integrację faga PhiC31



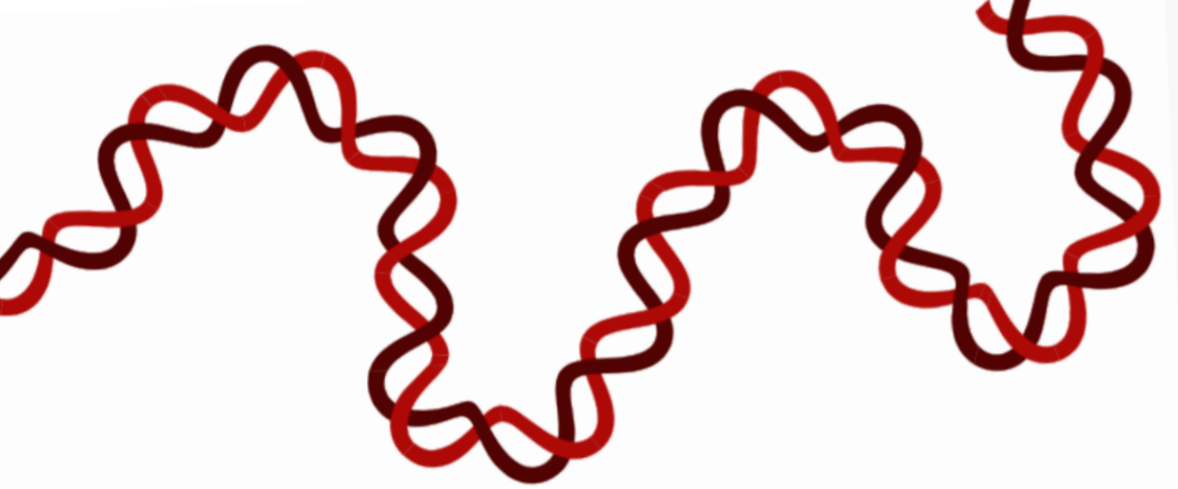
Miejsca rozpoznawane przez integrację faga Bxb1



Integratory: faga PhiC31 oraz faga Bxb1



- Przy wykorzystaniu techniki DICE grupa Calos bardzo szybko uzyskała biblioteki embrionalnych komórek macierzystych i indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych zawierających geny neuronalnych czynników transkrypcyjnych w różnych kombinacjach.
- Strategia okazała się być niesamowicie precyzyjna. Integracja zawsze miała miejsce w zaplanowanej orientacji.



BIBLIOGRAFIA

1. Fortier, L. C., & Sekulovic, O. (2013). Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*, 4(5), 354–365. <https://doi.org/10.4161/viru.24498>
2. Nafissi, N., Slavcev, R.; Bacteriophage recombination systems and biotechnological applications; *Appl Microbiol Biotechnol* 2014; DOI 10.1007/s00253-014-5512-2
3. Stark, M.W.; Making serine integrases work for us; *Current Opinion in Microbiology* 2017; 38:130-136
4. Merrick, Ch.A., Zhao, J., Rosser, S.J.; Serine Integrases: Advancing Synthetic Biology; *ACS Synth. Biol.* 2018, 7:299-300
5. Zhu F, Gamboa M, Farruggio AP, Hippenmeyer S, Tasic B, Schüle B, Chen-Tsai Y, Calos MP; DICE, an efficient system for iterative genomic editing in human pluripotent stem cells; *Nucleic Acids Res.* 2014.