

# **Nowe techniki genomowe a konwencjonalne metody modyfikacji genetycznych wprowadzenie do technologii**

## **Część 1: przegląd Nowych Technik**

### **Genomowych**

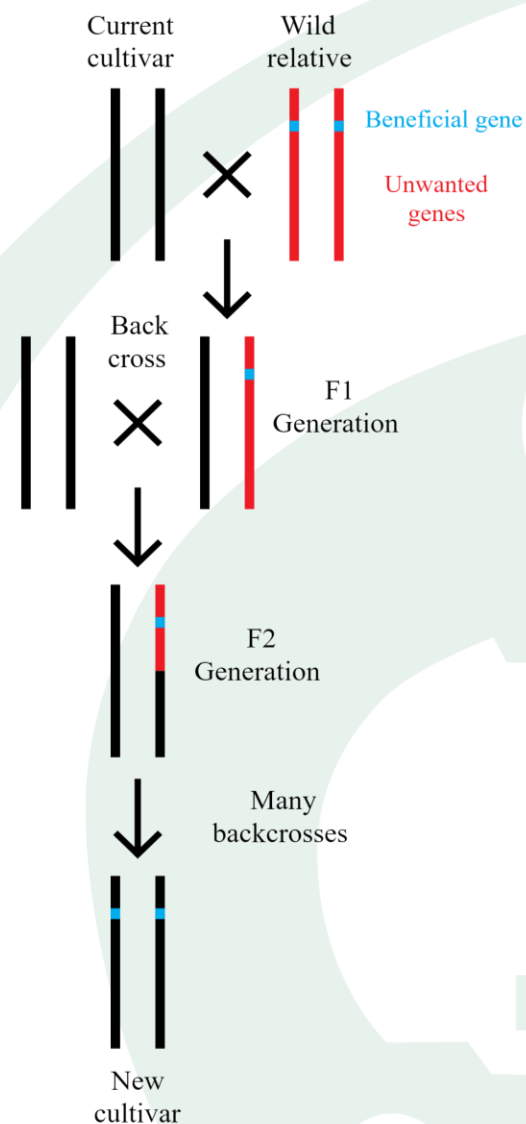
**Krzysztof Michalski**

Laboratorium Kontroli GMO

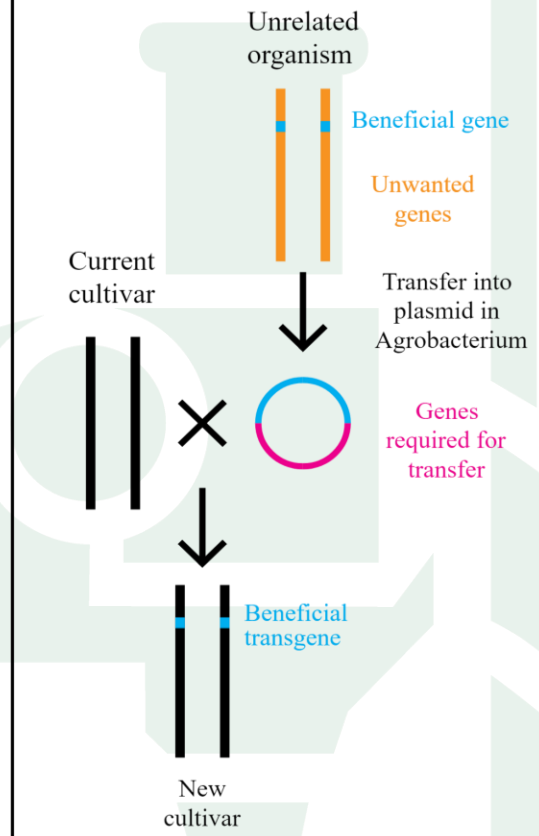
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - PIB

# Nowe Techniki Genomowe versus techniki konwencjonalne

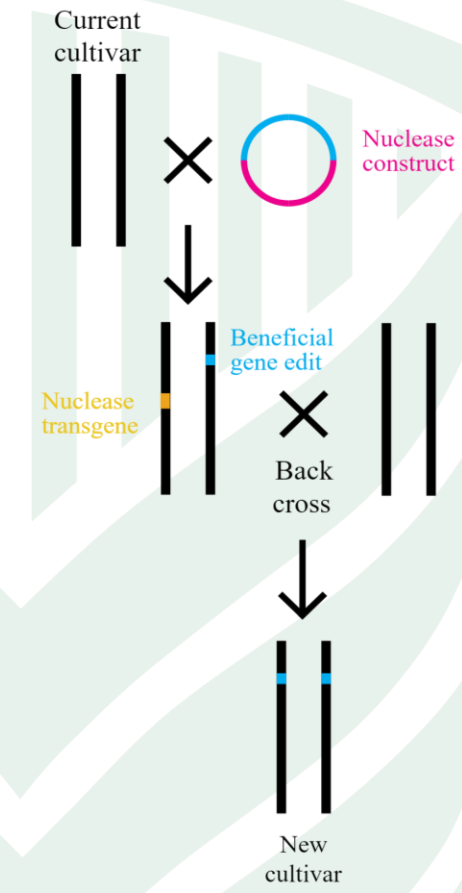
## Conventional breeding



## Transgenesis



## Genome editing



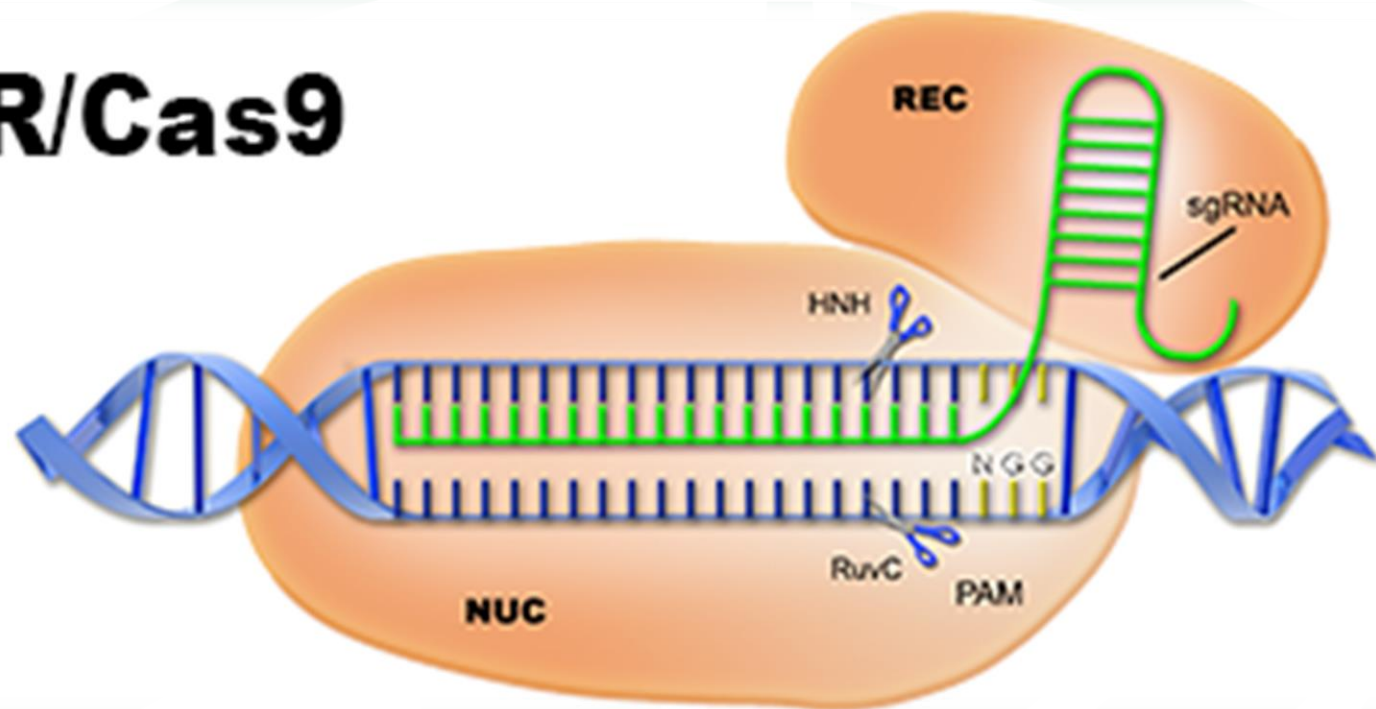
# Nowe Techniki Hodowlane (New Breeding Techniques)

- Szczepienie na podkładce GM
- Cisgeneza, Intrageneza
- Mutageneza kierowana nukleotydami - (ODM)
- Metylacja DNA zależna od RNA (RdDM)
- Nukleazy (ZFN, TALENs, CRISPR/Cas9, Prime editing etc)
- Hodowla odwrócona (Reverse breeding)
- Agro-infiltracja
- Syntetyczna biologia

**Nowe techniki  
genomowe**

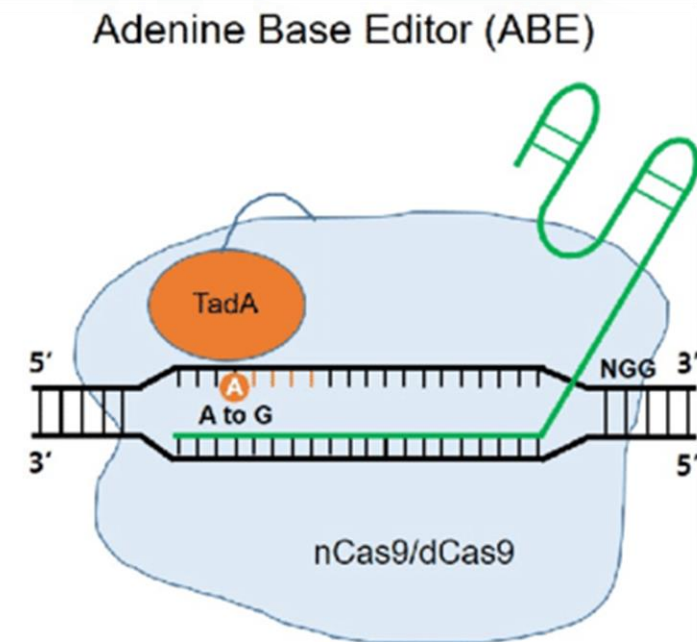
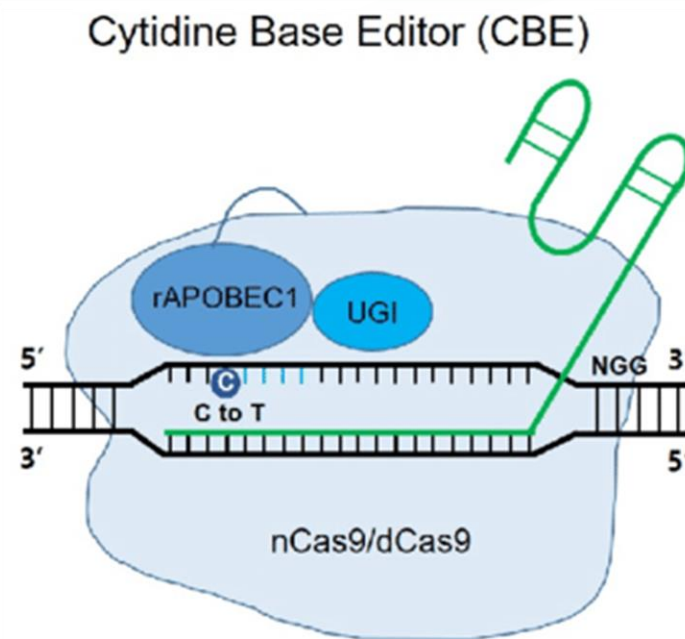
## Miejscowo- specyficzne nukleazy

# CRISPR/Cas9



- Trzy generacje narzędzi molekularnych:  
**ZNF < TALEN < CRISPR/Cas**
- Metoda kierunkowa:  
**znajdź i przetnij**
- **Efekt:** dwuniciowe przerwanie cząsteczki DNA i indukcja mechanizmów naprawy

# Edytory zasad (base editors)



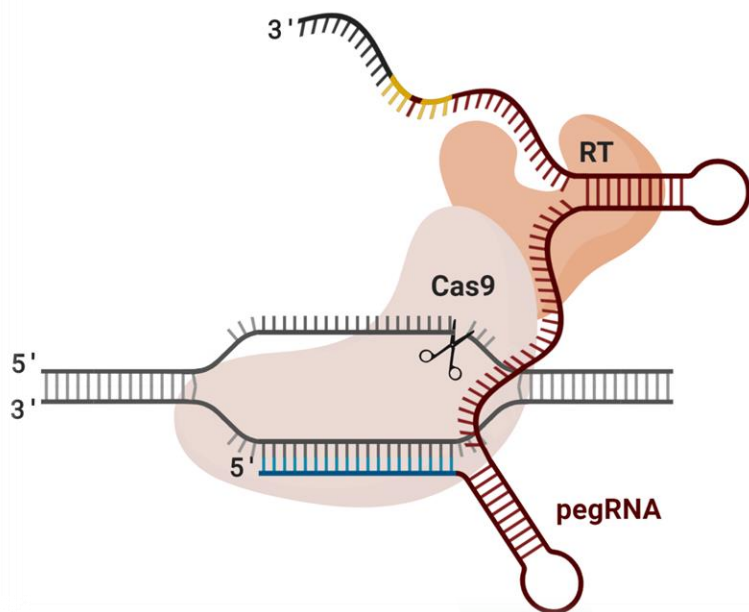
SM Ryu i in., 2019

- Zmiany generowane bez przecinania cząsteczki DNA
- Stosowany wariant Cas9 pozbawiony jest funkcji nukleazy – za modyfikację odpowiada białko fuzyjne
- **Efekt:** substytucja pojedynczego nukleotydu

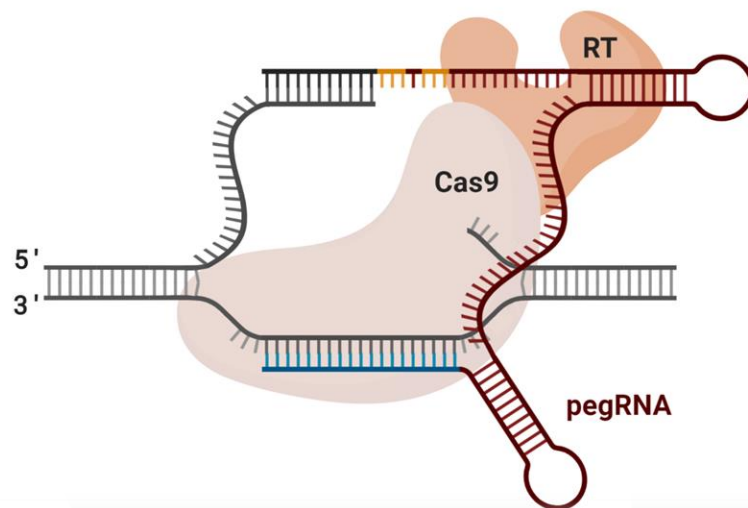
# Prime editing

- Fuzja nCas9 z odwrotną transkryptazą
- RNA odpowiada miejscową-specyficzność, ale niesie także wprowadzaną modyfikację
- Rozcinana i „nadpisywana” jest tylko jedna nić DNA
- **Efekt:** bardzo precyzyjne insercje lub substytucje

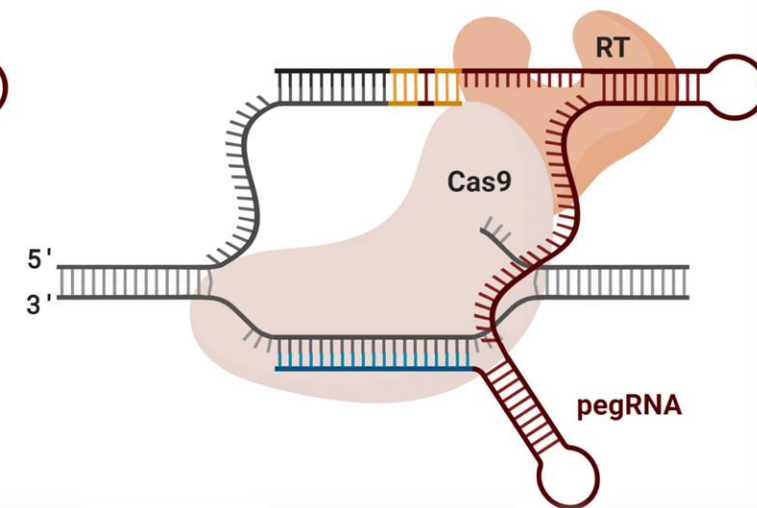
## 1 Nicking of PAM strand



## 2 Hybridization of primer-binding site to PAM strand

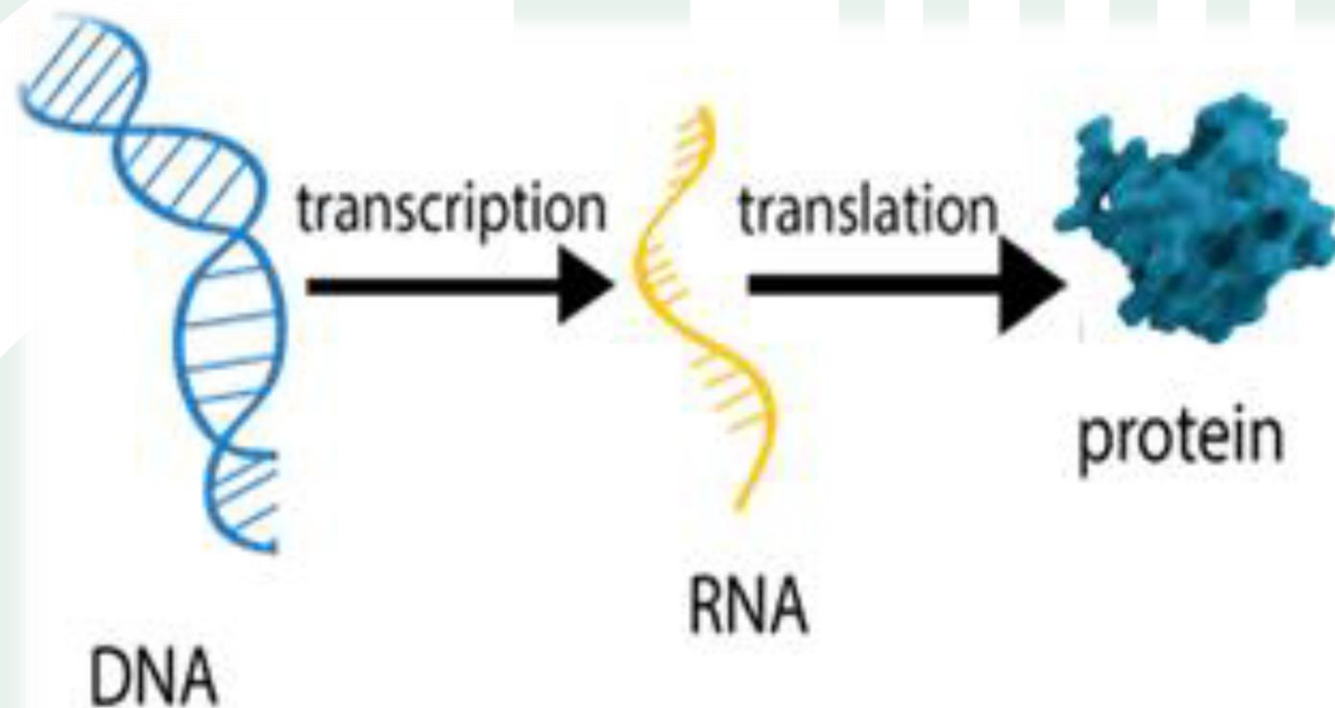


## 3 Reverse transcription



# Strategie dostarczenia

- **DNA:** sekwencja może być integrowana do genomu gospodarza, ale nie musi
- **RNA:** sekwencja nie jest integrowana do genomu gospodarza
- **Białko:** cząsteczki ulegają degradacji po wypełnieniu swojej roli
- Wybór metody uzależniony od sposobu regeneracji *in vitro* gospodarza



# Podsumowanie – różne typy modyfikacji

Mutageneza kierowana nukleotydami - (ODM)	Małe substytucje (ew. insercje/delecje)	Aktywacja lub inaktywacja genów; podmiana alleli (SNP)
Metylacja DNA zależna od RNA (RdDM)	Wyciszenie transkrypcji dziedziczone w kilku kolejnych pokoleniach	
<b>Nukleazy (ZFN, TALENs, CRISPR/Cas9)</b>	<b>Indele różnej wielkości (rzadziej substytucje)</b>	<b>Inaktywacja genu, rzadziej wprowadzenie całej nowej sekwencji</b>
<b>Edytory zasad</b>	<b>Substytucje pojedynczego nukleotydu</b>	<b>Aktywacja lub inaktywacja genów; podmiana alleli (SNP)</b>
<b>Prime editing</b>	<b>Niewielkie substytucje lub insercje (kilkanaście nt)</b>	<b>Podmiana alleli (dłuższe polimorfizmy)</b>



**Dziękuję za uwagę**

Radzików  
05-870 Błonie  
tel. +48 22 733 45 00  
NIP: 5290007029  
REGON: 000079480  
e-mail: [postbox@ihar.edu.pl](mailto:postbox@ihar.edu.pl)  
[www.ihar.edu.pl](http://www.ihar.edu.pl)

**Krzysztof Michalski**  
e-mail: [krzysztof.michalski@ihar.edu.pl](mailto:krzysztof.michalski@ihar.edu.pl)