

A detailed, colorful microscopic image of various microorganisms, including bacteria, viruses, and possibly larger eukaryotic cells, serving as a background for the title slide.

DE WONDERE WERELD VAN SYNTHETISCHE BIOLOGIE

LES 2

INHOUD

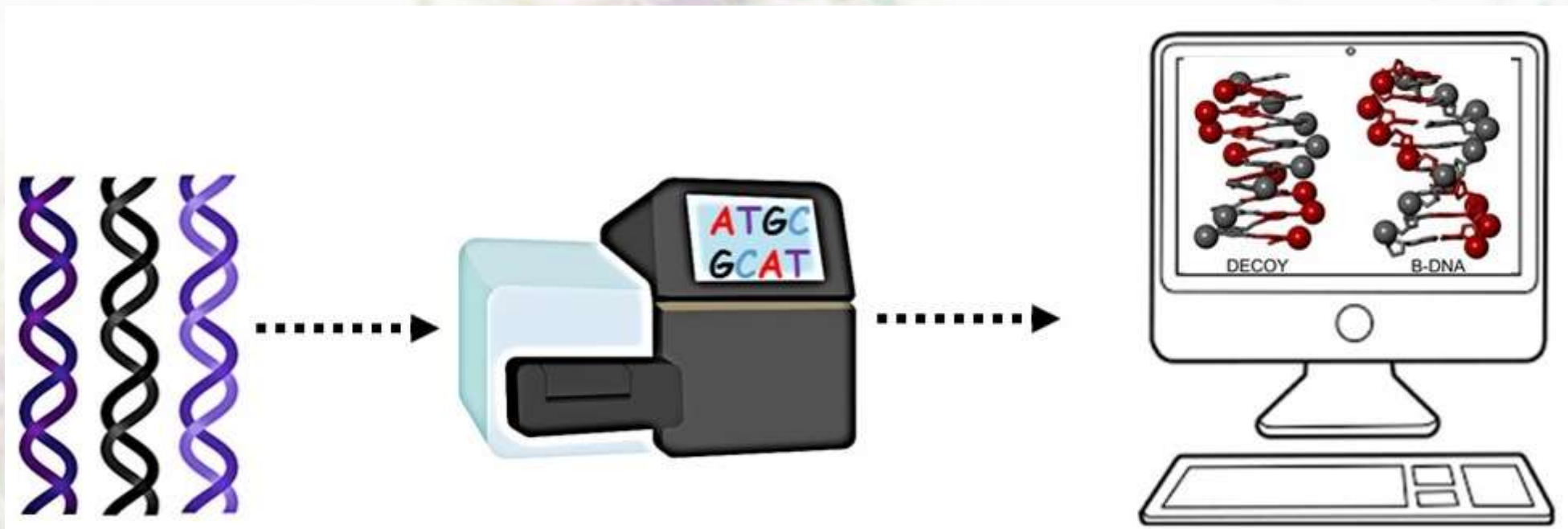


Sequencing



Recombinante proteïnen en plasmiden

Sequencing



1^e Generatie

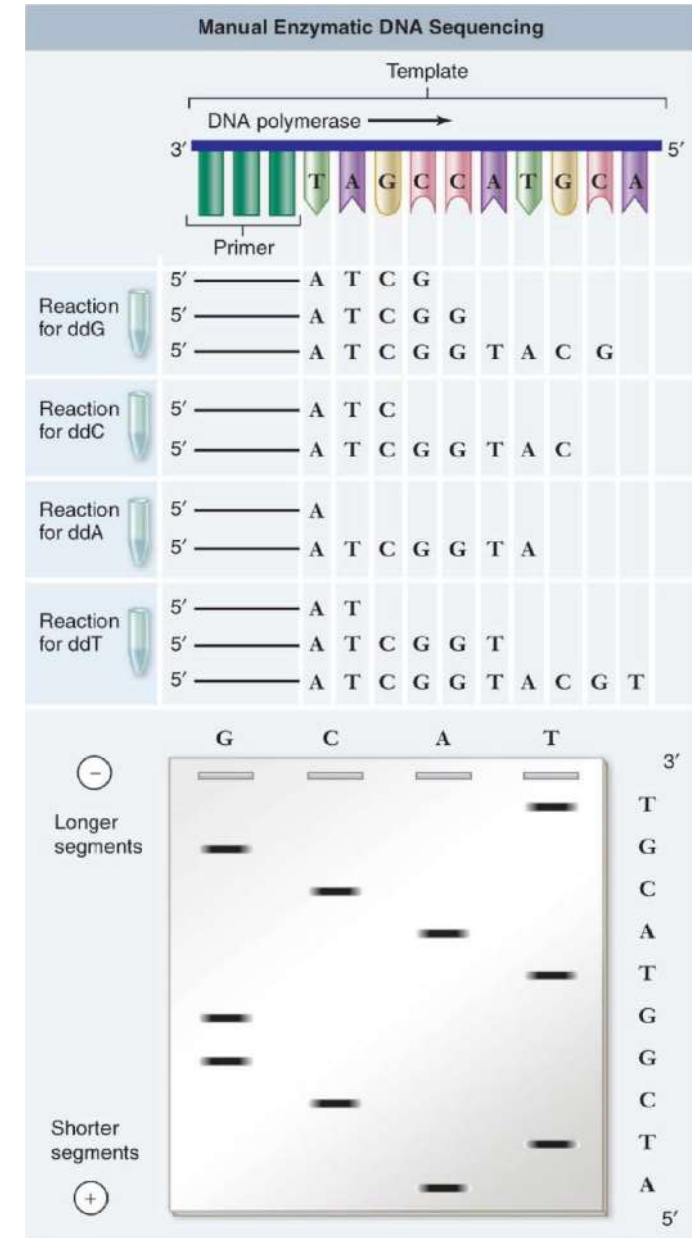
Enzymatische sequencing:

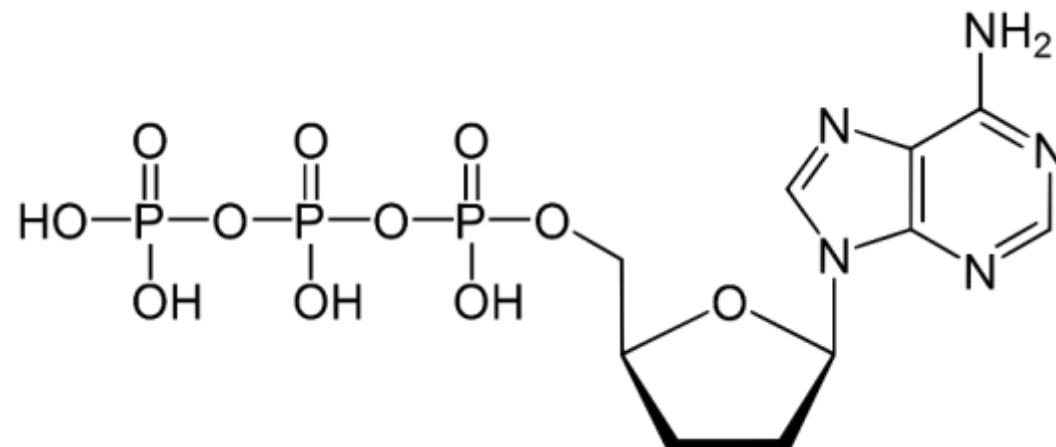
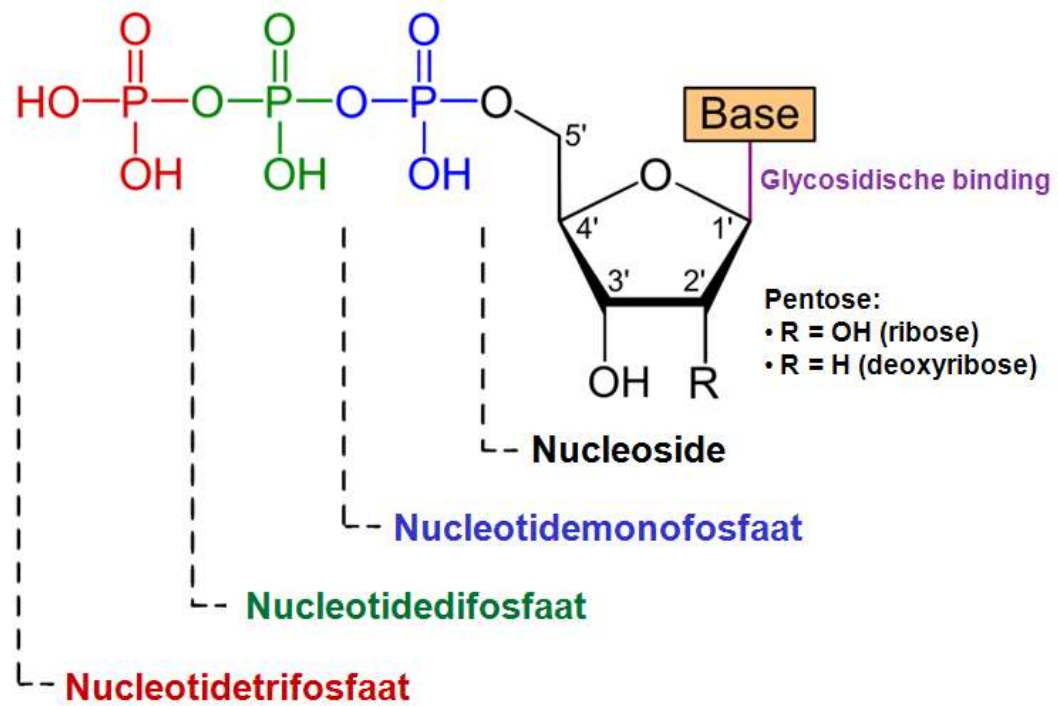
Gebaseerd op DNA polymerase met dideoxynucleotides (ddA, ddT, ddG, ddC).

Dit zijn nucleotides waarvan de OH groep op de 3'-positie is verwijderd en er zo geen ander nucleotide meer op kan binden.

Het template-DNA wordt gemengd met alle 4 nucleotidetypes in 4 recipiënten. Aan elk recipiënt wordt een van de 4 dd* toegevoegd, samen met polymerase.

Manueel: De resulterende ketens met verschillende lengte worden gescheiden m.b.v. gel-elektroforese en manueel uitgelezen.



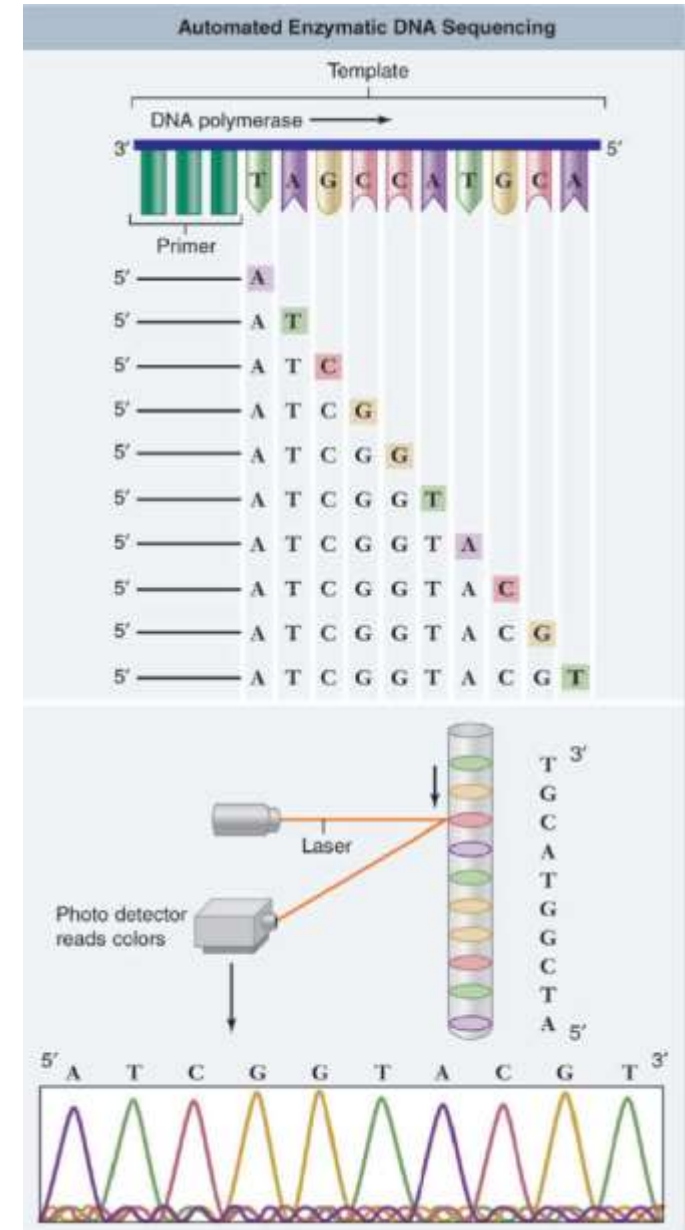


1^e Generatie

Enzymatische sequencing:

Gebaseerd op DNA polymerase en keten-terminatie met dideoxynucleotides.
Zie hiervoor.

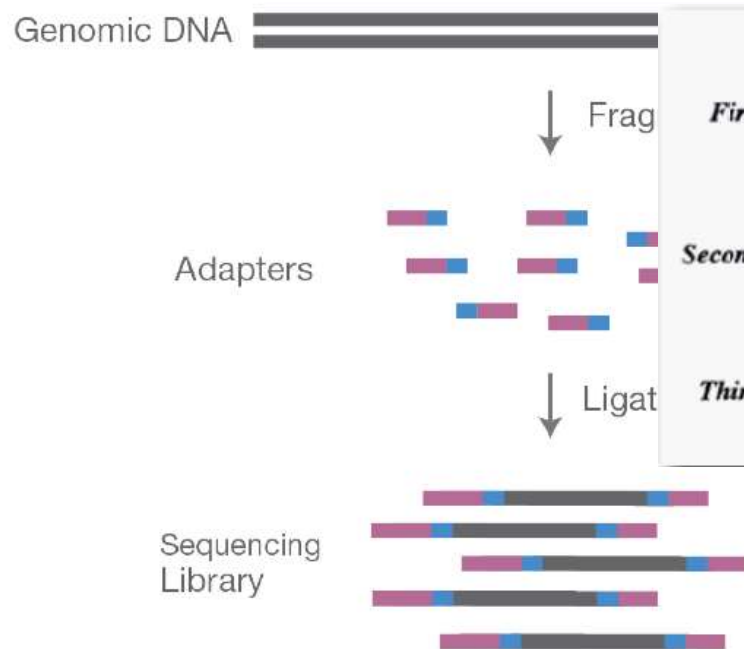
Automatisch: Een kleurstof wordt aan de dideoxynucleotides gebonden die uitgelezen wordt door een fotodetector.



Massively Parallel Sequencing (1) (MPS): Fragmentatie van DNA, gevolgd door amplificatie van de fragmenten.

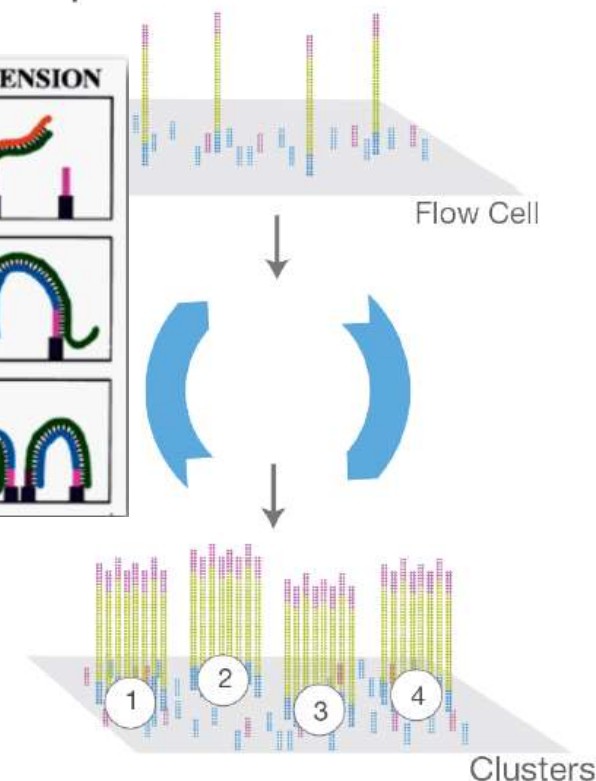
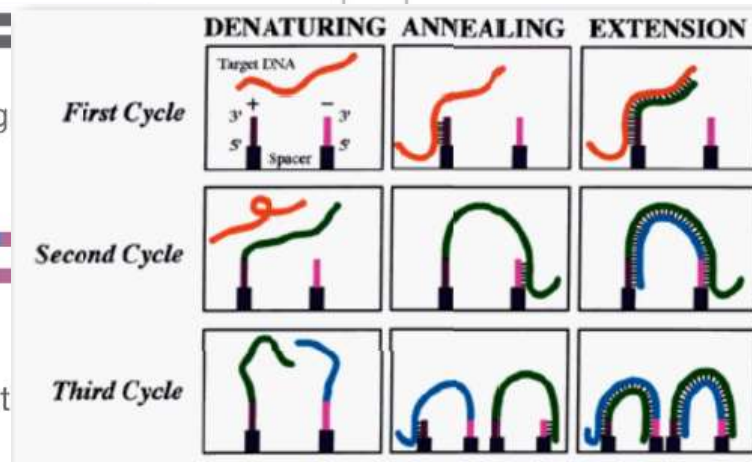
Verschillende producenten hebben elk hun eigen MPS-technologie. Illumina dye sequencing wordt getoond als voorbeeld.

A. Library Preparation



NGS library is prepared by fragmenting a gDNA sample and ligating specialized adapters to both fragment ends.

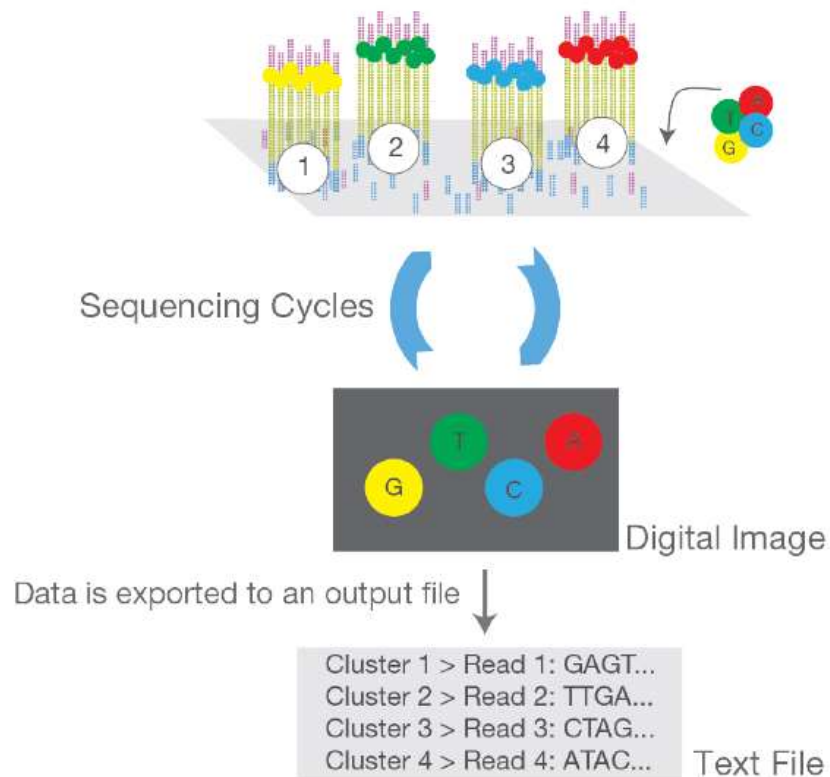
B. Cluster Amplification



Library is loaded into a flow cell and the fragments are hybridized to the flow cell surface. Each bound fragment is amplified into a clonal cluster through bridge amplification.

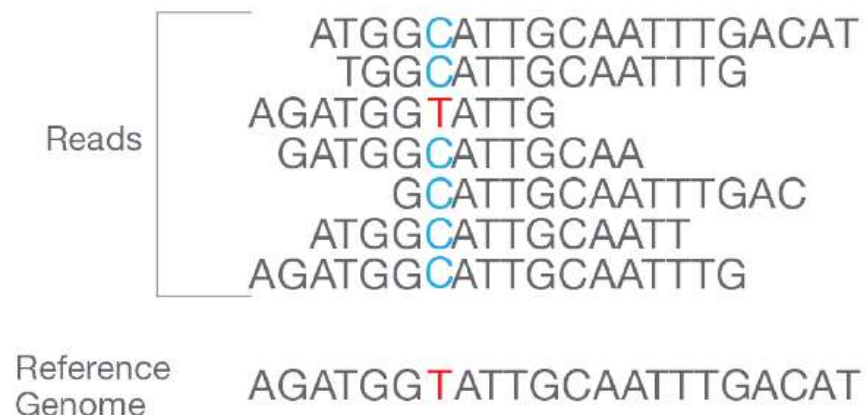
Massively Parallel Sequencing (2): Parallele sequencing van de clusters met fluorescerende nucleotides. Reconstructie van het genoom door te vergelijken met een referentie.

C. Sequencing



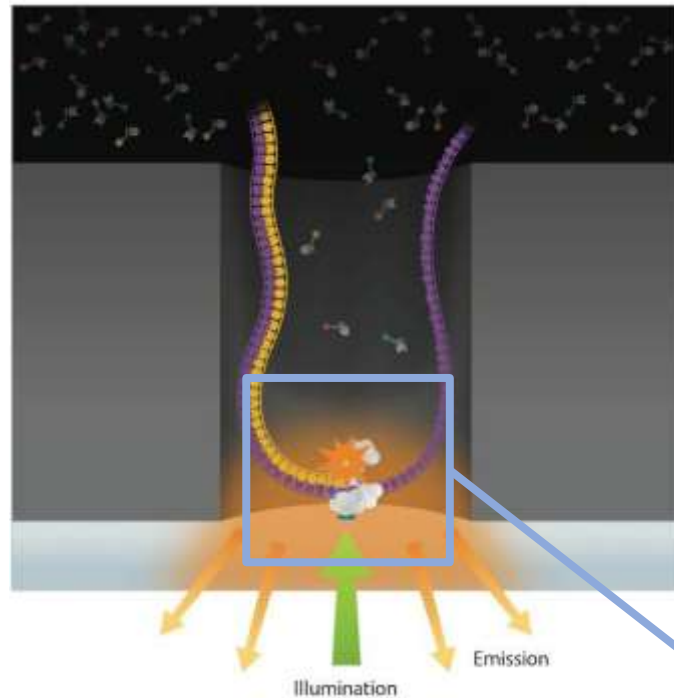
Sequencing reagents, including fluorescently labeled nucleotides, are added and the first base is incorporated. The flow cell is imaged and the emission from each cluster is recorded. The emission wavelength and intensity are used to identify the base. This cycle is repeated “n” times to create a read length of “n” bases.

D. Alignment and Data Analysis



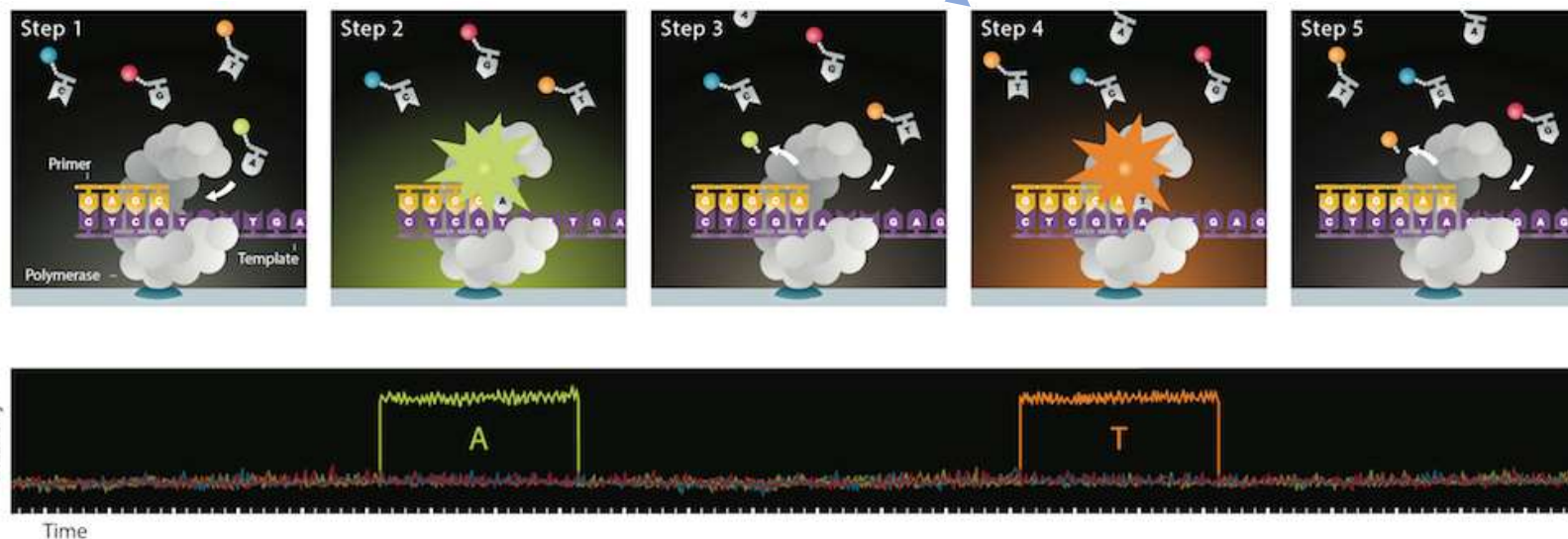
Reads are aligned to a reference sequence with bioinformatics software. After alignment, differences between the reference genome and the newly sequenced reads can be identified.

3^e Generatie



Long-Read Sequencing: DNA-keten wordt in zijn geheel gelezen. Dit is toepasbaar op het DNA van een enkele cel.

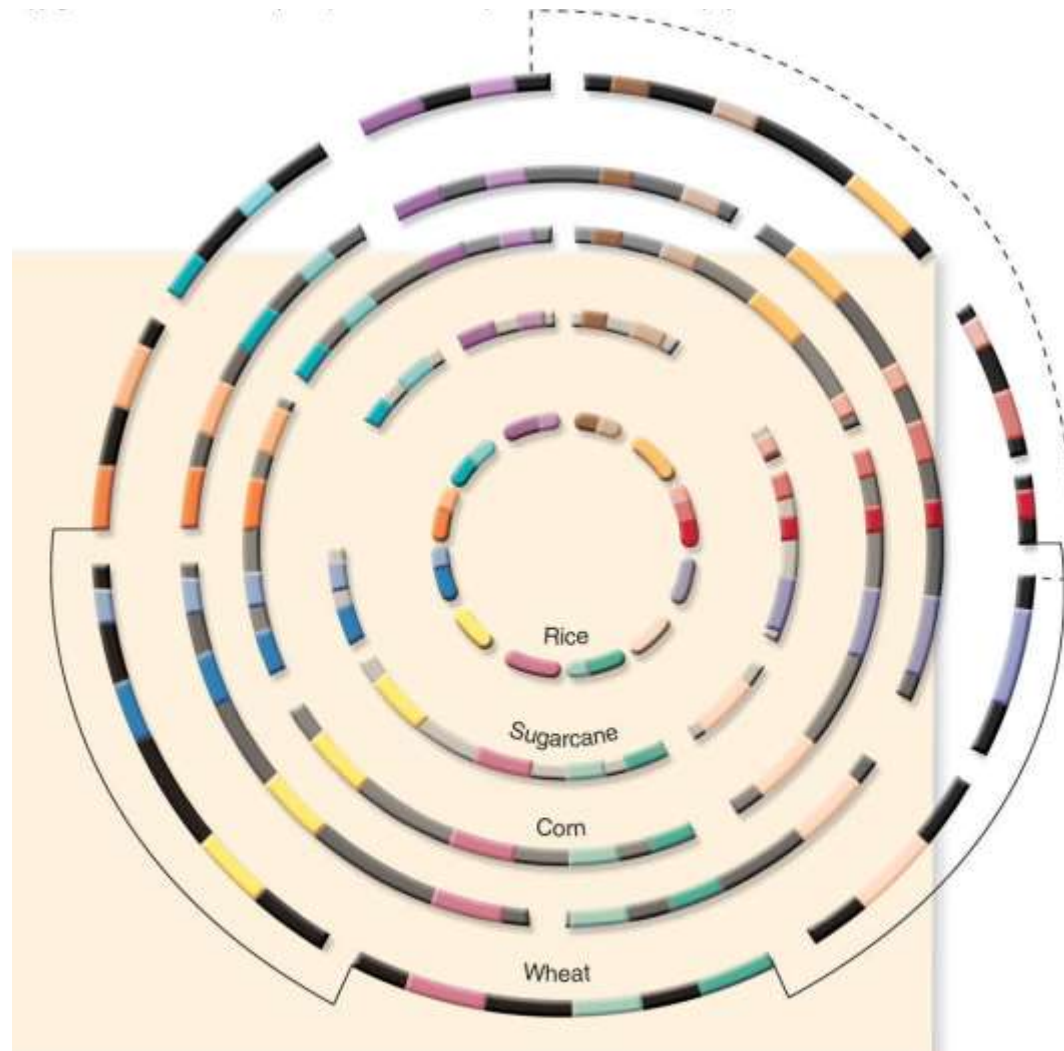
Verschillende methodes zijn ontwikkeld, bv. geïmmobiliseerd DNA-polymerase die het gedenateerd DNA vervolledigt met fluorescerende nucleotiden (zie figuur). Bij een binding wordt er een specifiek lichtsignaal uitgezonden.



Toepassingen

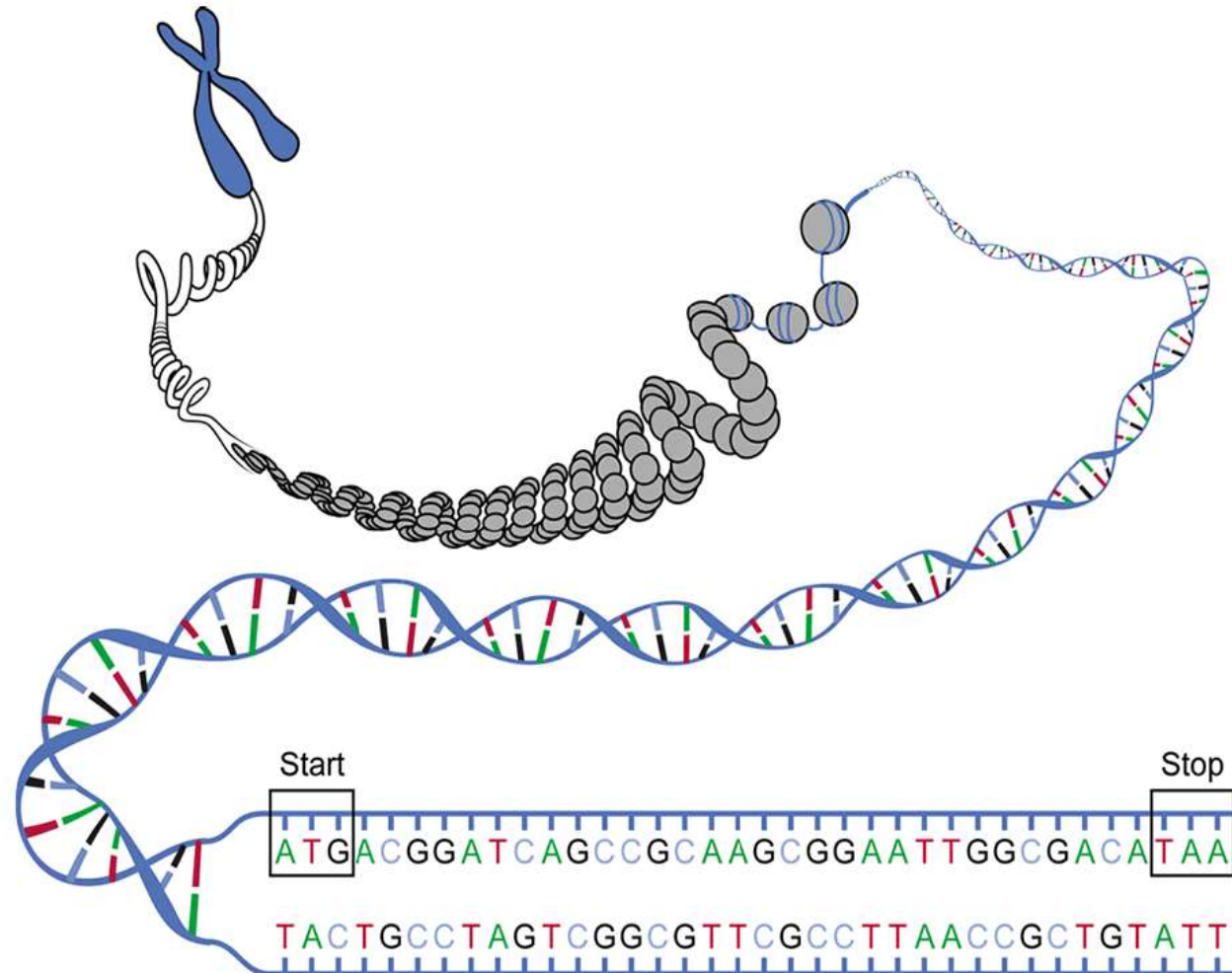
De ontdekking van de DNA-sequentie heeft een compleet nieuwe wetenschapstak geopend: de genetica.

De zoektocht naar hoe de natuur informatie over het leven heeft gecodeerd is nog maar pas begonnen...



Op zoek naar genen

De zoektocht naar genen gebeurt op basis van zogenaamde *open reading frames*, stukken DNA tussen de sequenties die coderen voor START- (ATG) en STOP-codons (TAG, TAA, TGA) en dus voor één proteïne. Deze stukken zijn genen.

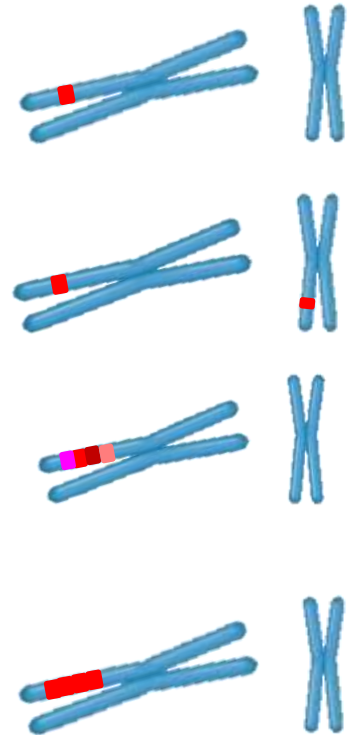


Op zoek naar genen

Opvallend: er bestaat coderend DNA en niet-coderend DNA. Het ene wordt actief afgeschreven, het andere lijkt geen genetische functie te hebben.

Coderend DNA:

- *Enkel-kopie:* eenmalig voorkomen van een bepaald gen
- *Segmentduplicaties;* Een gen dat gekopieerd werd van het ene chromosoom naar het andere
- *Multigenfamilies:* een heleboel gerelateerde genen die dicht bij elkaar liggen, bv. de reukzingenen
- *Tandem clusters:* Identieke kopies van een gen na elkaar voor een snellere transcriptie van dat gen



Op zoek naar genen

Opvallend: er bestaat coderend DNA en niet-coderend DNA. Het ene wordt actief afgeschreven, het andere lijkt geen genetische functie te hebben.

Niet-coderend DNA;

- *Structureel DNA*: zorgt voor fysische stevigheid van het DNA in bv. het chromosoom, bv. veel G en C in het DNA in de centromeren
- *Simple sequence repeat (SSR)*: kort DNA-patroon dat veelvuldig na elkaar wordt herhaald; aantal herhalingen verschilt per persoon
- *Pseudogenen*: genen die om een of andere reden niet meer werken omdat ze bv. kapot gemuteerd zijn
- *Transposons*: Korte DNA-sequenties die voortdurend veranderen

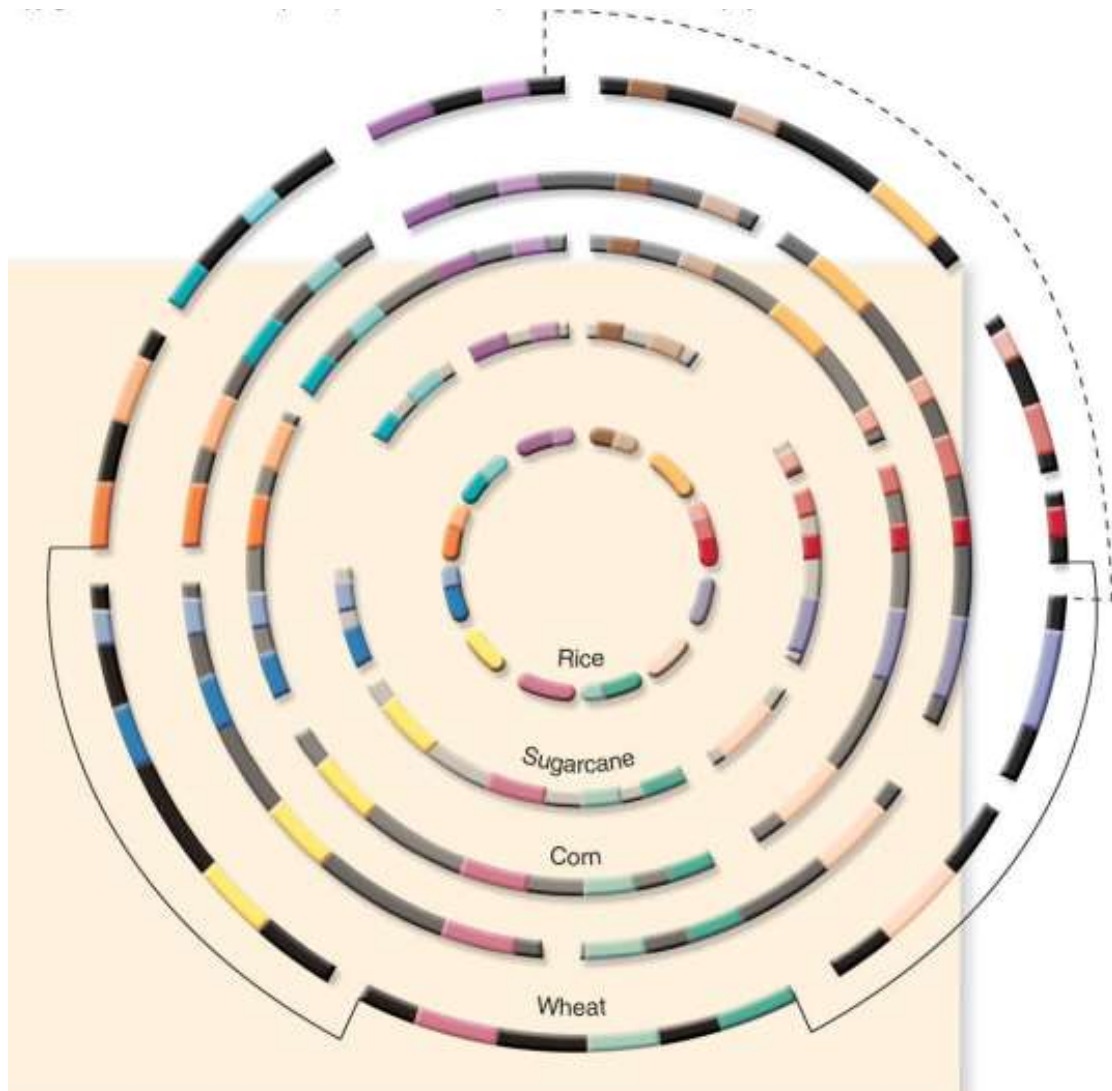


Genen vergelijken

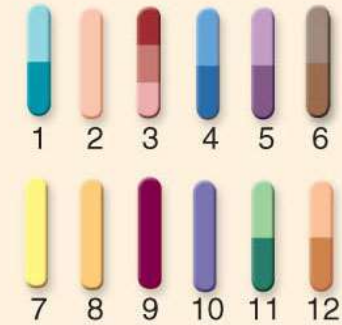
Eenmaal genen kunnen worden geïdentificeerd als verantwoordelijke voor een bepaalde reactie, kunnen ze effectief ingezet worden voor verschillende doeleinden.

- **Gentherapie:** als een zieke een specifiek defect gen heeft, kan het gemakkelijk gerepareerd worden door met genbewerking een werkende kopie te voorzien.
- **GMO's:** een organisme kan in staat kan worden gesteld om efficiënter en meer te produceren door de evolutie gericht te laten verlopen door bepaalde genen aan of uit te zetten.
- **Evolutiereconstructie:** Wanneer gelijkaardige genen van verschillende soorten in dezelfde volgorde en ongeveer op dezelfde plaats in hun chromosomen liggen, kun je wel aannemen dat ze een gemeenschappelijke voorouder hebben. Dit principe heet *genome alignment*.

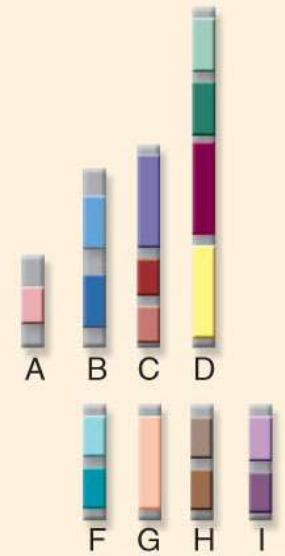
Genome alignment



Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Rice Genome



Sugarcane
Chromosome Segments

G. More, K.M. Devos, Z. Wang, and M.D. Gale: "Grass, line up and form a circle," Current Biology, 1995, vol. 5, pp. 737-739.

Plasmiden en
Recombinante
Proteinen

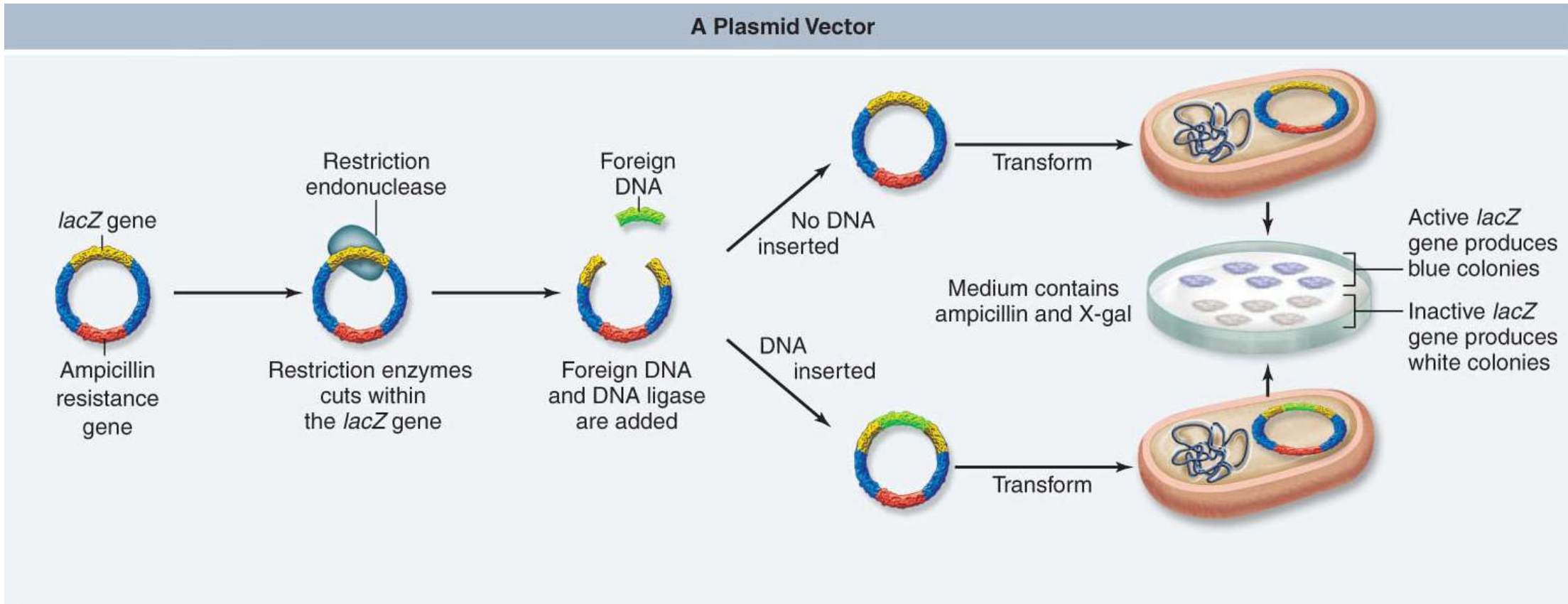
Plasmiden

Plasmide: cirkelvormige DNA-streng in prokaryoten.

Aanpasbaar met behulp van restrictie-endonuclease, vreemd DNA en DNA-ligase.

Vector (= plasmide) wordt in drager-organisme (= bacterie of gistcel) gebracht.

Eenvoudig te gebruiken technologie, maar de hoeveelheid in te brengen DNA is beperkt.



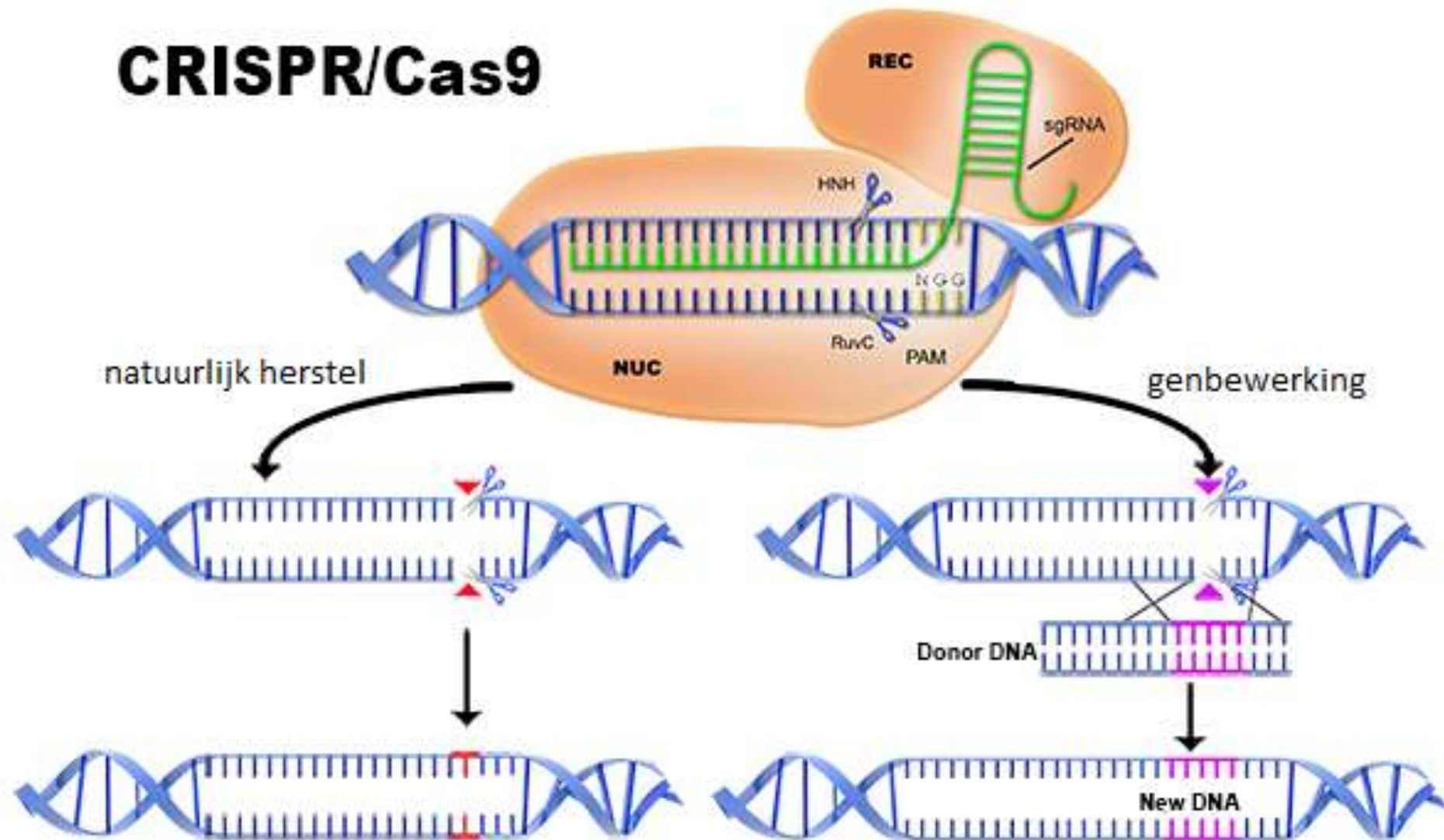
CRISPR-Cas

CRISPR-Cas is een revolutionaire nieuwe genbewerkingstechniek om ook niet-plasmide DNA te bewerken.

CRISPR-Cas is van oorsprong een verdedigingsmechanisme waarmee bacteriën vreemd DNA (bv. van fagen, zie later) uit hun DNA wegknippen.
Het bestaat uit een stukje gids-RNA dat een specifiek stuk DNA opzoekt. Eenmaal gevonden, wordt het weggeknipt door restrictie-enzymes.
Het DNA wordt dan weer heropgebouwd door DNA-polymerases en ligases.

Natuurlijkerwijs wordt dit gedaan met nieuwe nucleotides, maar het DNA kan aangepast worden door een nieuw stukje DNA (*donor-DNA*) te voorzien met aansluitingen op het oude, waarmee het zich aan de DNA-streng kan linken en ingepast wordt door de ligases.

CRISPR/Cas9



Recombinante proteïnen

Recombinant proteïne: Eiwit dat tot stand kwam door expressie van recombinant DNA. Dit DNA wordt samengesteld door verschillende DNA-fragmenten te combineren, bv. met behulp van plasmides. Bv.: insuline uit *E.coli*

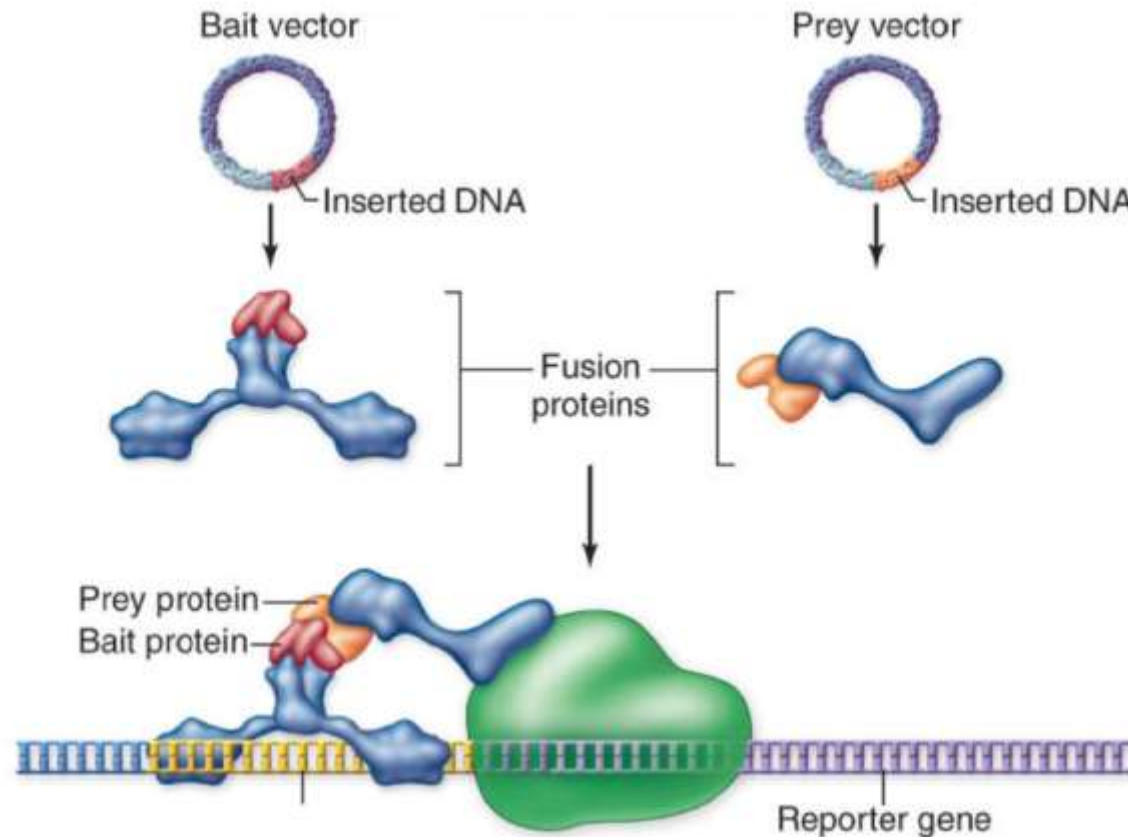
Een speciaal type recombinant proteïne zijn de **fusieproteïnes**. Deze ontstaan doordat verschillende DNA-stukken binnenin een open reading frame aan elkaar zijn gevoegd, waardoor de ribosomen twee proteïnes aan elkaar binden tijdens de translatie ervan.

Gepaste interactie van de verschillende subdomeinen (= translatie van deze verschillende DNA-fragmenten) is essentieel. E.g. extra verbindende subdomeinen kunnen tussen de oorspronkelijke geplaatst worden indien deze niet connecteren.

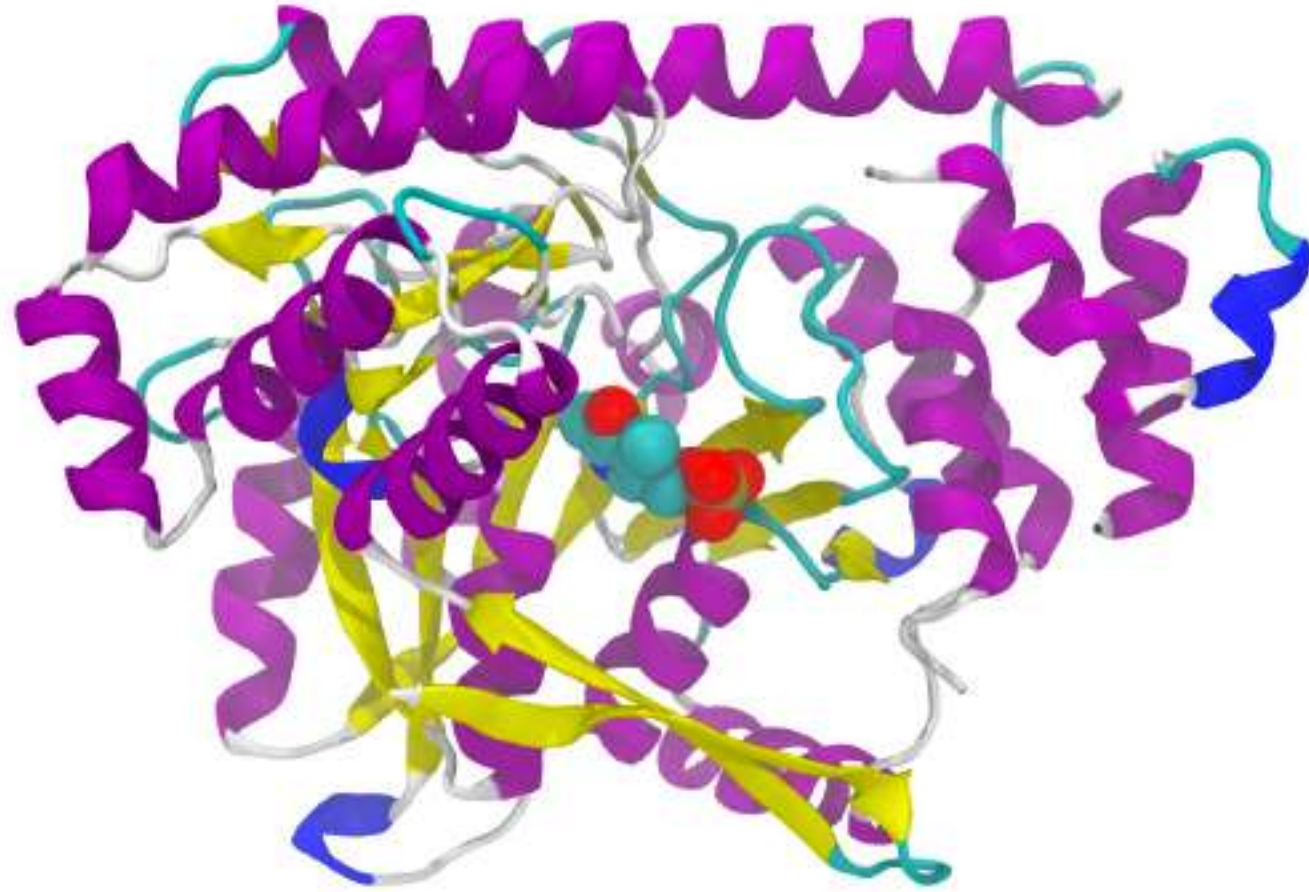
Fusieproteïnes

*Voorbeeld: **Gisthybrides**: test de interacties tussen 2 mogelijke subdomeinen door ze te koppelen aan een transcriptiefactor van RNA-polymerase.*

De transcriptiefactor wordt gesplitst in een DNA-bindend domein en een activerend domein dat de RNA-polymerase activeert. Aan beide fragmenten wordt er elk een van de te koppelen delen van het testproteïne gebonden. Als deze connecteren, kan het reporter-gen (bv. een fluorescent eiwit) tot expressie komen.



Recombinante proteïnes in de praktijk



Toepassingen

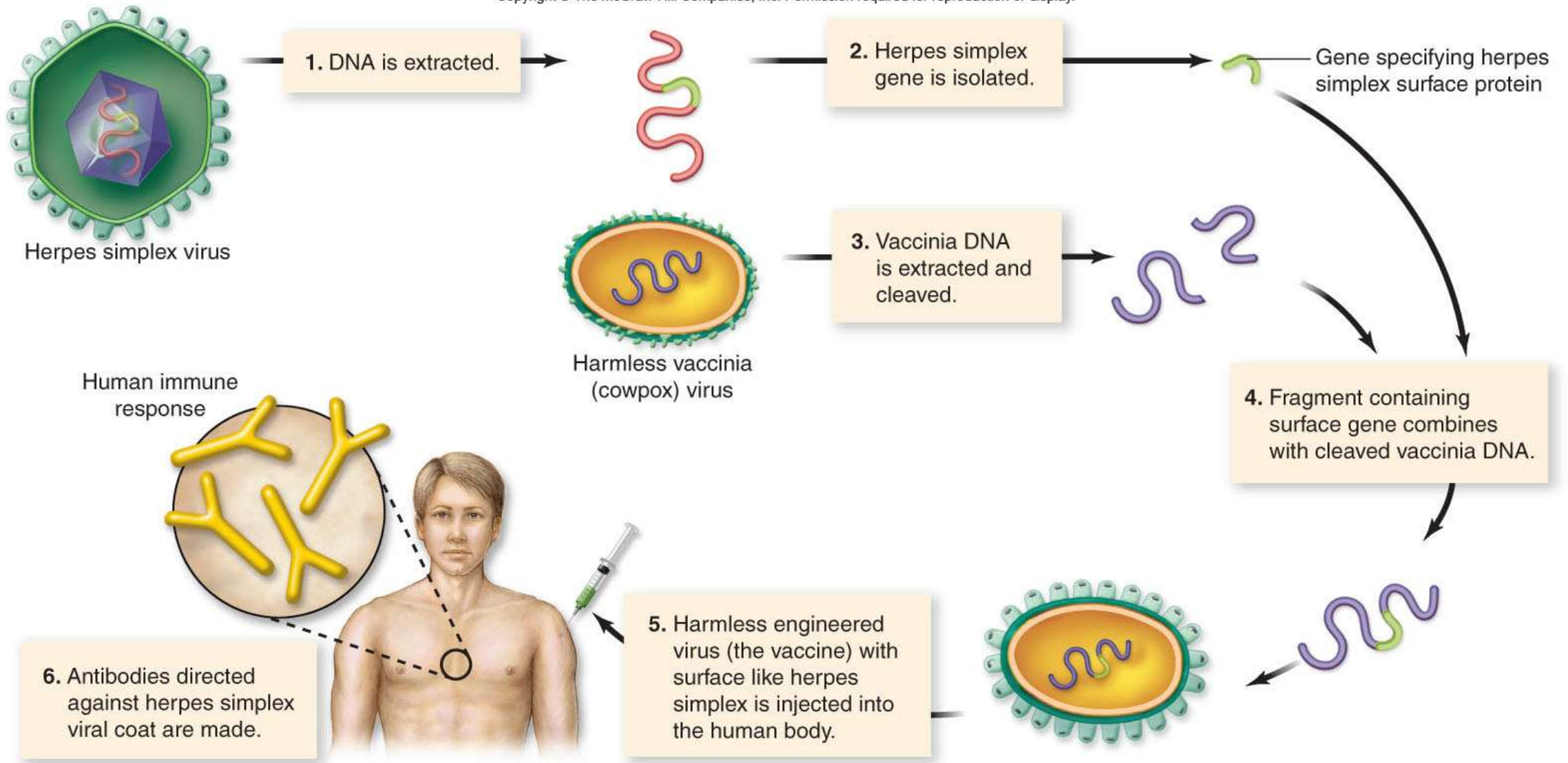
Een manier om vaccins te maken steunt volledig op het inbrengen van plasmiden of andere vectoren.

In een voor de mens onschuldig micro-organisme wordt het genetisch materiaal dat codeert voor de proteïnemantel van een ziekteverwekker ingebracht, bv. met plasmiden.

Aangezien het menselijke afweersysteem werkt door de ziekteverwekkers te herkennen aan hun proteïnemantel, komt het in actie en produceert antistoffen. De werking van het vaccin schuilt in het feit dat het afweersysteem de kenmerken zal onthouden.

Herpesvaccin (gelijkaardig voor vele andere ziektes)

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Toepassingen

Productie optimaliseren door genbewerking: metabolic maps

- Blokkeer transcriptie van een onnodig gen
- Versterk transcriptie van een ondersteunend gen
- Kopieer belangrijke genen (en maak een *tandem cluster*)
- <http://biochemical-pathways.com/>

Transgene organismen produceren nuttige proteïnen

- Insuline uit gist
- Antibiotica uit *E.coli*
- Biomarkers
- Biofarmaceutica

Bestaande organismen versterken

- Gewassen droogte-, hitte-, of zoutresistent maken

Faagtherapie

(Bacterio)fagen zijn virussen die bacteriën infecteren door hun genetisch materiaal in te spuiten. Door genbewerking kunnen fagen ingezet worden in de strijd tegen een ziekteverwekker. Door hun genetisch materiaal te bewerken kunnen we een faag een gevaarlijk gen in een bacterie laten uitschakelen of hem doden.

A green rectangular highway sign with rounded corners and a white border. The sign is positioned in the center-left of the frame. The background is a bright blue sky filled with large, white, fluffy clouds. To the right of the sign, a portion of a metal bridge or overpass structure is visible, consisting of horizontal and diagonal beams.

Your Future

JUST AHEAD