

Ćwiczenie 10

Organizmy modyfikowane genetycznie (GMO)

Organizmy transgeniczne Metody otrzymywania GMO Wykorzystanie GMO

Kornelia Polok

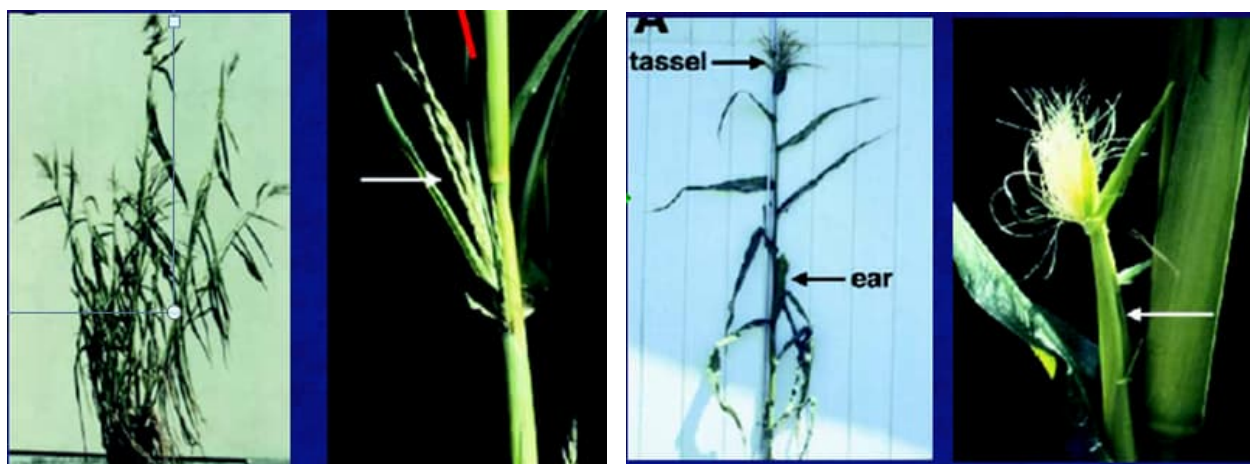
1. Organizmy transgeniczne

1.1. Definicje biologiczne i prawne

Organizmy modyfikowane genetycznie mogą być produkowane u roślin, zwierząt, grzybów i mikroorganizmów. Wiele mikroorganizmów jest modyfikowane genetycznie w celu otrzymywania leków, szczepionek, enzymów (np. polimerazy DNA wykorzystywanej w reakcji PCR). Rośliny transgeniczne tworzy się w celu ograniczenia rozprzestrzeniania patogenów, tworzenia jadalnych szczepionek, syntezy białek o znaczeniu komercyjnym (np. związanych z produkcją jedwabiu). Z kolei zwierzęta transgeniczne często wykorzystywane są do produkcji organów ludzkich, leków.

1.1.1. Historia modyfikacji genetycznych

Zmiana genomu roślin i zwierząt w wyniku modyfikacji genetycznych była dokonywana o wieków, a historia genetyki praktycznej jest znacznie dłuższa niż dotychczas przypuszczano. Ludzie prehistoryczni byli dobrymi praktykami w zakresie genetyki, czego przykładem są liczne udomowione rośliny, zwierzęta, a nawet drobnoustroje, które żywią nas, ubierają i pracują dla nas po dziś dzień. Przenosząc pyłek z jednej rośliny na znamię słupka drugiej hodowca istotnie ingeruje w naturalne procesy i przyczynia się do intensywnej wymiany genów między osobnikami danego gatunku, między gatunkami, a nawet między rodzajami. W efekcie współczesne rośliny uprawne uległy tak daleko idącym zmianom, że nie przypominają one swoich przodków i zawierają geny i genomy pochodzące od różnych gatunków.



Rys. 1.1.1. Porównanie przodka kukurydzy teosinte (po lewej) ze współczesną kukurydzą (po prawej). Zmiany są efektem mutacji w genie *tb1*, która spowodowała wystąpienie dominacji wierzchołkowej (jeden pęd). Obecne formy kukurydzy są wynikiem selekcji dokonywanej przez tysiące lat.

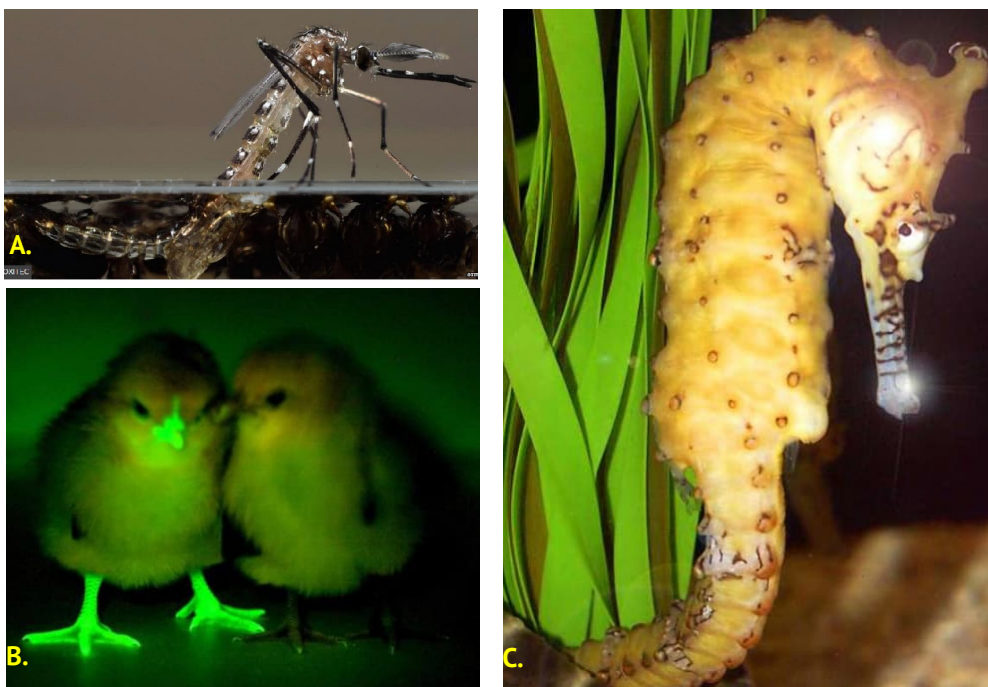
W celu **przeniesienia do odmiany pojedynczego genu z innego gatunku lub rodzaju, czyli tak zwanej introgresji**, wykonuje się krzyżowania pomiędzy odległymi genetycznie formami. W ten sposób przenosi się geny warunkujące odporność na choroby, owady, jakość nasion, czy tolerancję na stropy abiotyczne, zawartość składników odżywczych. I tak, współczesny pomidor posiada geny pochodzące od kilku innych gatunków z rodzaju *Lycopersicon*. Geny warunkujące odporność na choroby pochodzą od *L. hirsutum*, wysoki poziom witaminy C jest wynikiem działania genów *L. peruvianum*, podczas gdy intensywnie czerwoną barwę pomidor współczesny zawdzięcza *L. pimpinellifolium*.

Ograniczeniem metod opartych o introgresję jest fakt, że wraz z pożądanym genem przenosi się szereg genów kodujących cechy niekorzystne, których należy się pozbyć w wyniku wielokrotnych krzyżowań wstecznych. W przeciwieństwie do introgresji, metody inżynierii genetycznej powinny umożliwić wprowadzenie pojedynczego genu bez „zbędnego balastu”, którego trzeba się pozbyć w trakcie selekcji. Dodatkowo możliwe jest przenoszenie genów pomiędzy bardzo odległymi genetycznie organizmami, np. bakterią i rośliną.

1.1.2. Definicja biologiczna GMO

Organizmy, do których wprowadzono obcy gen metodami inżynierii genetycznej i stwierdzono jego ekspresję oraz przekazywanie zgodnie z prawami genetyki klasycznej noszą nazwę organizmów modyfikowanych genetycznie lub organizmów transgenicznych (GMO).

Nazwa „organizm modyfikowany genetycznie” może być myląca, gdyż wiele konwencjonalnych technik, w tym krzyżowanie, introgresja, mutageneza także prowadzą do modyfikacji genetycznych. **Dlatego właściwszym terminem byłoby określenie: organizm otrzymany w wyniku metod inżynierii genetycznej. Przy czym wprowadzony gen musi dziedziczyć się zgodnie z prawami Mendla.** Niestety przestrzeń publiczna została zdominowana przez termin GMO, co powoduje, że definicje są pełne szczegółów. A te są różnie interpretowane przez prawników.



Rys. 1.1.2. Przykłady zwierząt GMO. A. Komary o z wprowadzonym genem męskiej sterylności. Po skrzyżowaniu z normalnymi samicami wydają bezpłodne potomstwo. Wprowadzenie do środowiska ogranicza populację komarów i pozwala ją kontrolować. B. Kurczaki odporne na zakażenia wirusowe. Dodatkowo wprowadzono gen reporterowi z meduzy, którego ekspresja prowadzi do luminescencji w ciemności. Dzięki temu można rozpoznać formy odporne. C, Konik morki z genem meduzy. Dodatkowo wprowadzono nanocząsteczki złota. W wyniku ekspresji genu meduzy, dochodzi do luminescencji oraz uwidocznienia mikrocząsteczek złota jako świecących punktów (Wietnam).

1.1.3. Definicje prawne GMO

W Polsce zagadnienia związane z GMO są regulowane **Ustawą o mikroorganizmach i organizmach genetycznie modyfikowanych z dnia 22 czerwca 2001 r. z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2019, poz. 706; z 2020 r. poz 322).**

Ustawa wprowadza następujące definicje:

- **Dawca:** organizm, z którego pobiera się kwas nukleinowy.
- **Biorca:** organizm, do którego wprowadza się kwas nukleinowy.
- **Organizm:** każda jednostka biologiczna, komórkowa lub niekomórkowa, zdolna do replikacji lub przenoszenia materiału genetycznego.
 - ▶ **Uwaga:** definicja nie odpowiada biologicznej definicji organizmu jako istoty żywej charakteryzującej się procesami, które tworzą funkcjonalną całość zdolną do samodzielnego życia. Celem ustawodawcy było włączenie wirusów, ale w efekcie prawnicy zaliczają do organizmów także wektory czy konstrukty mRNA, co nie jest zgodne z sensem biologicznym i sensem ustawy.
- **Organizm genetycznie zmodyfikowany:** organizm inny niż ludzki, w którym materiał genetyczny został zmieniony w sposób niezachodzący w warunkach naturalnych.

- **Wektor:** cząstka kwasu nukleinowego pozwalająca na wprowadzenie i stabilne utrzymanie cząstek kwasu nukleinowego biorcy.
 - ▶ **Uwaga:** wektor to nie organizm, jednakże część prawników utożsamia wektor z organizmem, gdyż wektor przenosi materiał genetyczny. Dla biologa wektor i organizm to różne pojęcia.
- **Wprowadzenie do obrotu:** udostępnienie osobom trzecim.
- **Zamknięte użycie GMO:** prowadzenie modyfikacji genetycznej organizmów w jednostce inżynierii genetycznej (np. na uczelni), kontakt GMO z ludźmi i zwierzętami jest ograniczony.
- **Otwarte użycie GMO:** wprowadzenie do środowiska.

Obecna ustawa wprowadziła rejestr jednostek zajmujących się organizmami GMO nawet, gdy ich otrzymywanie dotyczy jednostek naukowych i stanowi element procedur laboratoryjnych w innych procesach. Tym samym wszystkie jednostki prowadzące badania molekularne powinny być wpisane do rejestru oraz powinny zgłaszać wszelkie przypadki użycia GMO np. podczas sekwencjonowania (tworzenie wektorów, sztucznych chromosomów itd.).

1.2. GMO w bazach danych

Liczne bazy danych zawierają informacje o GMO wprowadzanych do środowiska. ISAAA (International Service for The Acquisition of the Agri-Biotech Applications) zbiera informacje o genetycznie modyfikowanych gatunkach uprawnych. Dla których wydano pozwolenie na wprowadzenie do obrotu, na uprawę lub na import.

1.2.1. Przykłady modyfikacji

- Proszę wejść na stronę ISAAA (International Service for the Acquisition of Biotech Applications): <http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/default.asp>
- Proszę przejrzeć listę gatunków po lewej stronie.

Rys. 1.2.1. Zrzut ekranu dla bazy ISAAA.

- Dla wybranego gatunku proszę podać:

- A. Nazwę polską i łacińską
- B. Liczbę odmian transgenicznych w bazie
- C. Proszę podać nazwy handlowe tych odmian
- D. Proszę wybrać jedną z odmian i podać następujące dane (np. dla J101):

- ▶ Kto jest producentem odmiany?
- ▶ Jaką zastosowano metodę transformacji?
- ▶ Jaką cechę wprowadzono?
- ▶ Proszę podać symbol wprowadzonego genu i jego funkcję.

1.2.2. Analiza gatunków

- A. Ile gatunków roślin znajduje się w bazie danych?
- B. Dla którego gatunku otrzymano najwięcej odmian roślin transgenicznych?
- C. Przeanalizuj listę gatunków, u których dokonuje się modyfikacji pod kątem zagrożenia dla bioróżnorodności (przepływ genów) w Polsce.

1.2.3. Państwa dopuszczające GMO

- A. W którym państwie jest najwięcej uprawianych odmian transgenicznych (pomiń Unię Europejską)?
- B. Z jakich gatunków pochodzą odmiany transgeniczne dopuszczone w Unii Europejskiej?

2. Metody otrzymywania GMO

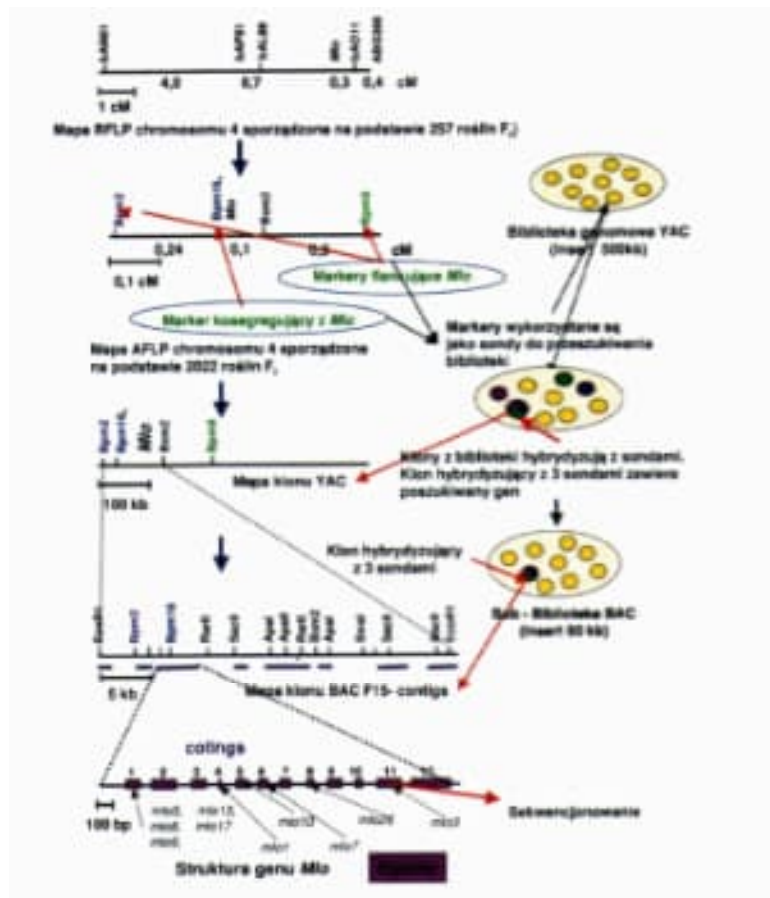
2.1. Informacje niezbędne do otrzymywania GMO

Aby otrzymać organizm genetycznie modyfikowany należy:

- ➔ znać gen, który chcemy wprowadzić;
- wyizolować gen z organizmu dawcy;
- wstawić gen do wektora wraz z promotorem oraz markerami selekcyjnymi i genami reporterowymi;
- wprowadzić wektor do organizmu docelowego;
- wyselekcjonować rośliny, które zawierają gen;
- określić dziedziczenie w kolejnych pokoleniach.

2.2. Definicje

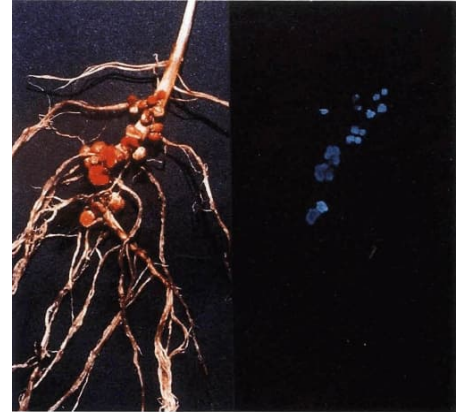
- ➔ **Transformacja:** proces, który prowadzi do wprowadzenia obcego materiału genetycznego najczęściej na skutek pokonania bariery błony komórkowej. Pojęcie transformacji na ogół jest zarezerwowane do pobierania DNA (konstraktu) ze środowiska bez pośrednictwa wektora. W przypadku GMO



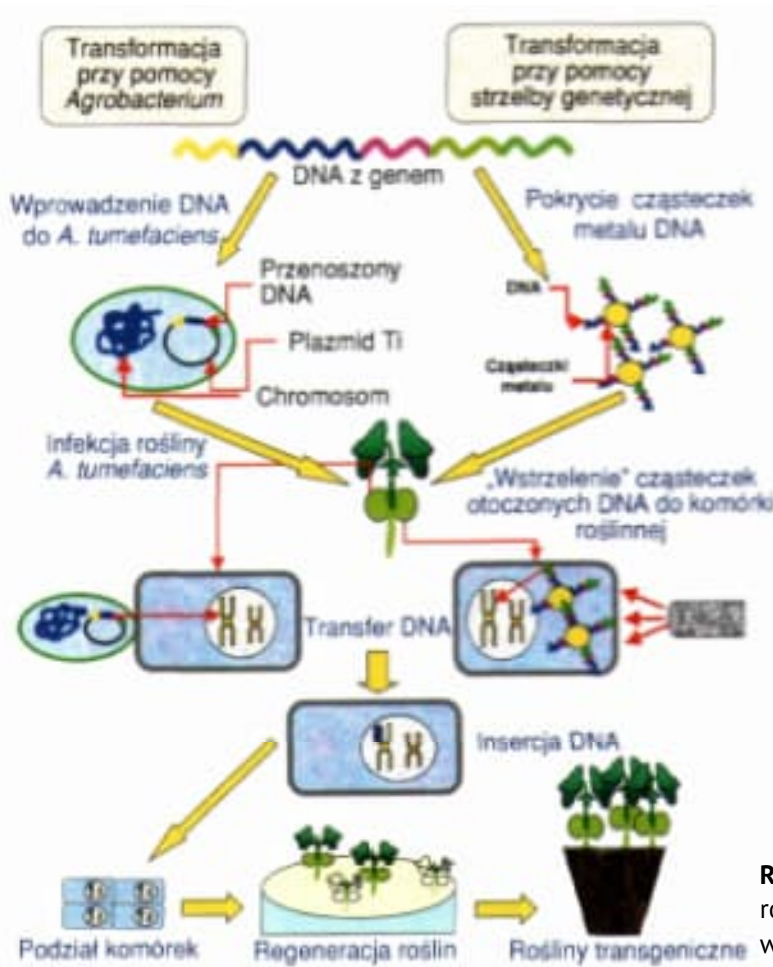
Rys. 2.1. Przykładowa metodyka izolacji genu z organizmu dawcy..

będzie ona występowała przy zastosowaniu elektroporacji, działka biologicznego, mikroiniekcji. Transformacja zachodzi naturalnie w przypadku bakterii. Stanowi ona główny mechanizm horyzontalnego transferu genów. W laboratoriach wykorzystuje się na potrzeby inżynierii genetycznej.

- **Transdukcja:** proces polegający na wprowadzeniu obcego DNA za pośrednictwem wektora wirusowego, ewentualnie za pośrednictwem *A. tumefaciens*.
- **Transformat (organizm transformowany):** organizm, do którego wprowadzono obcy materiał genetyczny, ale nie potwierdzono jego dziedziczenia.
- **Transgen:** gen, który wprowadzono metodami inżynierii genetycznej.
- **Marker selekcyjny:** geny wykorzystywane w inżynierii genetycznej, które pozwalają wyselekcjonować organizm, u których zaszła transformacja. Najczęściej są to geny odporności na antybiotyki lub herbicydy.
- **Gen reporterowy:** gen, który pozwala śledzić ekspresję wprowadzonego genu, np. gen lucyferazy.



Rys. 2.2a. Przykład luminescencji pozwalającej obserwować brodawki korzeniowe u soi dzięki wstawieniu genu *nifD-luxAB*, który koduje lucyferazę.



Rys. 2.2b. Schemat otrzymywania roślin transgenicznych z wykorzystaniem *A. tumefaciens*.



2.2.1. Do homozygotycznej linii grochu wprowadzono gen P pochodzący z maliny i warunkujący odporność na patogeny grzybowe. Otrzymane transformaty, T_1 miały jedną kopię genu P i były odporne na patogeny grzybowe. Rośliny te skrzyżowano testowo. Proszę podać rozszczepienia otrzymane w krzyżówce testowej oraz genotyp transformanta T_1 .

2.2.2. Transgeniczną samicę *D. melanogaster*, która była homozygotą względem genu lucyferazy warunkującym świecenie w ciemności, *L.* skrzyżowano z samcem o ciele żółtym, *y*. W F_2 otrzymano tylko szare, świecące samice, natomiast samce były szare świecące oraz żółte nieświecące. Proszę podać, na którym chromosomie jest miejsce insercji genu lucyferazy. Proszę podać genotypy P, F_1 i F_2 .

3. Wykorzystanie GMO w medycynie

➔ 3.1. Rośliny jako bioreaktory

Rośliny stanowią wygodny bioreaktor do produkcji leków i szczepionek. Przykładem są transgeniczne ziemniaki, które w niektórych państwach azjatyckich wykorzystywane są do produkcji zrekombinowanych antygenów dla szczepionek przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B. W państwach europejskich białko wykorzystywane w szczepionkach przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby jest produkowane w komórkach drożdży. Technologia ta jest jednak droga i dlatego trudna do zastosowania w uboższych krajach. Produkcja białek w komórkach roślinnych ma dodatkowe zalety związane z obecnością białek opiekuńczych, homologicznych do tych obecnych u ssaków. Białka opiekuńcze kontrolują skuteczność syntezy białek strukturalnych oraz ich potranslacyjne modyfikacje. Zagrożenia związane z wykorzystaniem roślin to przede wszystkim niska efektywność i zagrożenia środowiskowe.

Tabela 3.1. Produkty farmaceutyczne wytwarzane w roślinach

Produkt	Typ związku	Choroba	Roślina
Fragmenty przeciwciał Fv	Przeciwciało	Chłoniak nieziarniczny	Wektor wirusowy w tytoniu
CaroRx	Przeciwciało	Próchnica zębów	Transgeniczny tytoń
Lipaza	Enzym terapeutyczny	Mukowiscydoza, Zapalenie trzustki	Transgeniczna kukurydza
Czynnik wewnętrzny, Castla	Suplement diety	Niedobór witaminy B12	Transgeniczny rzodkiewnik (<i>A. thaliana</i>)
Laktoferyna	Suplement diety	Zakażenia przewodu pokarmowego	Transgeniczna kukurydza
Toksyna <i>E. coli</i> wrażliwa na temperaturę	Szczepionka	Ostra biegunka	Transgeniczna kukurydza, transgeniczny ziemniak
Antygen powierzchniowy WZW B	Szczepionka	Żółtaczkę typu B	Transgeniczna kukurydza, transgeniczna sałata
Białko kapsydu wirusa Norwalk	Szczepionka	Zakażenia przewodu pokarmowego spowodowane norowirusem	Transgeniczny ziemniak
Glikoproteina wirusa wścieklizny	Szczepionka	Wścieklizna	Wektor wirusowy w szpinaku

3.2. Szczepionki na bazie GMO

Szczepionki podjednostkowe to szczepionki zawierający jeden lub więcej antygenów. Można je pozyskać poprzez hodowlę szczepu mikroorganizmu i izolację określonego antygeny. Inną możliwością jest identyfikacja genów kodujących dany antygen i ekspresja tego genu w innym organizmie, np. komórkach *E. coli*, drożdży, owadów, roślin. W tym przypadku mamy do czynienia ze szczepionkami rekombinowanymi będącymi produktami inżynierii genetycznej.

- Szczepionka przeciw gorączce Zachodniego Nilu: białko E otoczki wirusa podlega ekspresji w komórkach *D. melanogaster*.
- Szczepionka przeciw WZW B – geny kodujące antygen HbsAg wstawiono do komórek drożdży. Wprowadzona w 1986 r.
- Szczepionki DNA: antygeny zostają wprowadzone do plazmidu bakteryjnego pod kontrolą silnego promotora wirusowego. Po przedostaniu się do organizmu gospodarza dochodzi do ekspresji genów zawartych w konstrukcie i produkcji antygenów.



3.2.1. Dla szczepionki przeciw gorączce Zachodniego Nilu oraz przeciw WZW B proszę podać:

- A. Produkt kodowany przez transgen.
- B. Dawcę
- C. Biorcę



3.2.2. Na podstawie materiałów internetowych proszę opisać po jednym przykładzie wykorzystania GMO

- W produkcji leków
- W poprawie jakości produktów żywnościowych.

W opisie proszę uwzględnić następujące elementy:

- A. Produkt (lek), który jest wytwarzany przez GMO.
- B. Nazwę polską i łacińską organizmu dawcy, z którego pochodzi gen kodujący produkt.
- C. Nazwę polską i łacińską organizmu biorcy, czyli organizmu, do którego wprowadzono obcy gen.
- D. Chorobę lub problem, który ma być rozwiązany poprzez wprowadzenie GMO.

Samodzielne wykonanie 3.2.2: 5p.

Termin: 04.02.2024. 23:59