

## Ćwiczenie C09A: GMO

### Modyfikacje genetyczne a GMO Metody otrzymywania GMO Identyfikacja transgenów Wykorzystanie GMO w medycynie

Prof. dr hab. Roman Zieliński

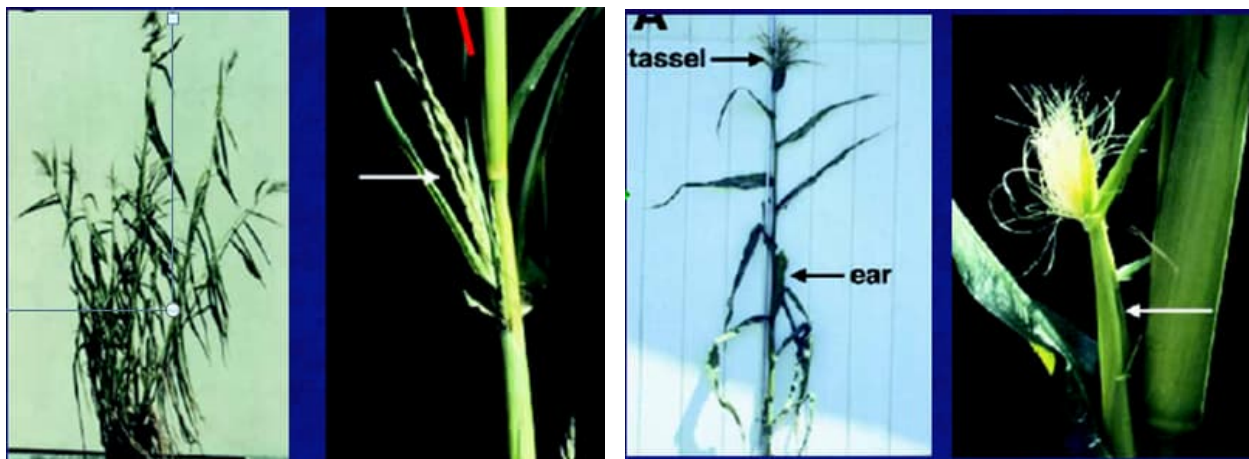
#### 1. Modyfikacje genetyczne a GMO



##### 1.1. Historia modyfikacji genetycznych

###### 1.1.1. Udomowienie jako modyfikacja

Zmiana genomu roślin i zwierząt w wyniku modyfikacji genetycznych była dokonywana od 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. 1.1.1a). Z kolei udomowienie zwierząt było złożonym procesem, który przyczynił się do znacznych zmian behawioralnych, morfologicznych i fizjologicznych. Różnice pomiędzy formami dzikimi a udomowionymi spowodowane były kontrolą rozrodu, selekcji osobników o specyficznych cechach, które w efekcie przystosowały się do ludzkiej opieki. Przykładem jest pies domowy (*Canis lupus f. familiaris*), którego rozliczne rasy nie przypominają swoich przodków (Rys. 1.1.1b).



**Rys. 1.1.1a.** 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 sztucznej dokonywanej przez tysiące lat.



**Rys. 1.1.1b.** Porównanie przodka psa – wilka, *Canis lupus* (po lewej) oraz ras psa domowego *Canis lupus* f. *familiaris*. Linia prowadząca do psa domowego od linii wilka oddzieliła się około 27-40 tys. lat temu. Udomowienie psa nastąpiło około 14 tys. lat temu, pod koniec ostatniego zlodowacenia.

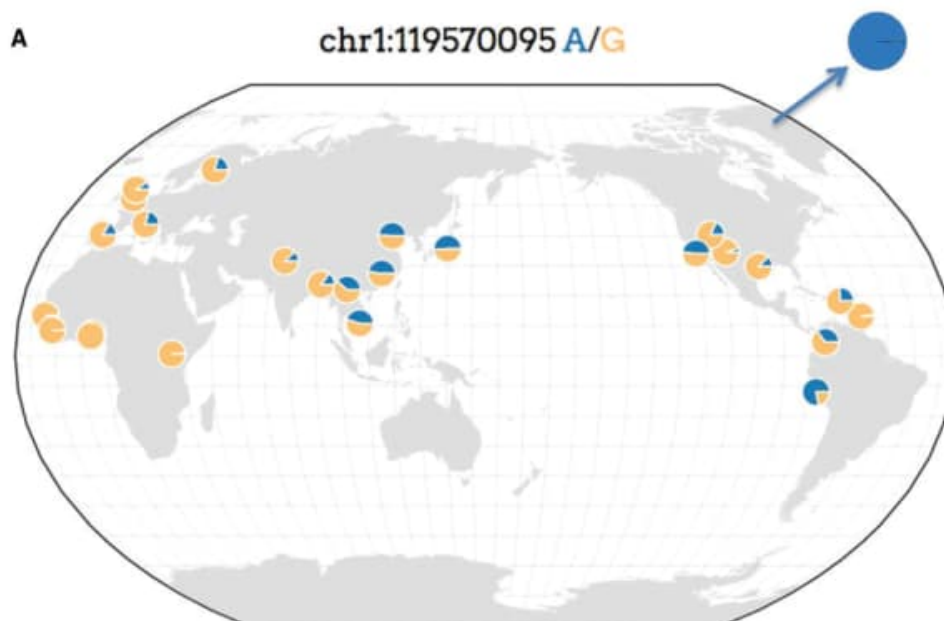
### 1.1.2. Introgresja

Tradycyjne metody modyfikacji genetycznej obejmują selekcję, krzyżowanie i mutagenezę.

**Introgresja polega na "przeniesieniu" pojedynczych genów pomiędzy gatunkami w wyniku ich krzyżowania. Introgresja może zachodzić spontanicznie w środowisku naturalnym i wówczas może być czynnikiem promującym ewolucję. Introgresja jest metodą tradycyjną. W jej wyniku nie powstają organizmy GMO.**

Introgresja odegrała istotną rolę w ewolucji człowieka. Wiele fragmentów DNA współczesnego człowieka pochodzi z genomu neandertalskiego lub denisowiańskiego. Oba te genomy dały prawdopodobnie początek allelom HLA występującym w populacji europejskiej i azjatyckiej. Z genomu denisowiańskiego pochodzi także region zawierający dwa geny, *WARS2* i *TBX15*. Zlokalizowane są one na chromosomie 1. Gen *WARS2* koduje mitochondrialną tryptofanylo-tRNA syntetazę. Gen *TBX15* jest czynnikiem transkrypcyjnym o plejotropowym działaniu, czyli podlega ekspresji w wielu tkankach, w różnych okresach rozwojowych, niezbędny jest do rozwoju szkieletu. Uważa się go za przystosowanie do warunków arktycznych u Inuitów. Z kolei

u Europejczyków związany jest z rozkładem tkanki tłuszczowej, a w populacji Ameryki Łacińskiej odpowiada za morfologię ucha zewnętrznego (Rys. 1.1.2a).



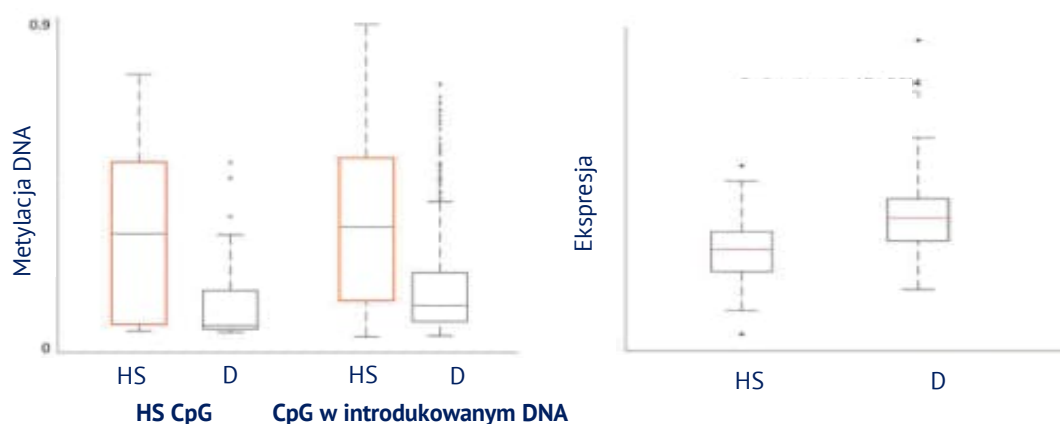
**Rys. 1.1.2a.** Częstość introgresji denisowiańskiej obejmującej geny *WARS2* i *TBX15* we współczesnej populacji ludzkiej. Region denisowiański (rs2298080) ma substytucję (tranzycja) A na G, pokazany jest on na niebiesko. W populacji Inuitów jego częstość wynosi 100%. Występuje również w populacjach północnoeuropejskich oraz amerykańskich (Racimo et al., 2016).

Geny te początkowo były związane z rozkładem tkanki tłuszczowej w organizmie. Introgresja regionu denisowiańskiego do genomu *Homo sapiens* spowodowała zmianę wzoru metylacji i zmianę ekspresji *WARS2* i *TBX15* w wielu tkankach (Rys. 1.1.2b).

*Homo sapiens* (region HS)



Region denisowiański (region D)



**Rys. 1.1.2b.** Fragment genomu *Homo sapiens*, w którym doszło do introgresji fragmentu denisowiańskiego. Obecność regionu z introgresją zmienia metylację w obrębie wysp CpG w DNA *Homo sapiens* oraz w introdukowanym fragmencie. Ekspresja na poziomie białka jest o 20% wyższa dla regionu pochodzenia denisowiańskiego (Racimo et al., 2016).

W hodowli, przy pomocy introgresji 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 pozwalają na 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.

## 1.2. Definicja GMO

### 1.2.1. Definicja biologiczna GMO

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

Organizmy modyfikowane genetycznie mogą być produkowane u roślin, zwierząt, grzybów i mikroorganizmów. Wiele mikroorganizmów jest modyfikowanych 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, zwiększenia odporności na owady, uzyskania form odpornych na herbicydy). Z kolei zwierzęta transgeniczne często wykorzystywane są do produkcji organów ludzkich, leków.

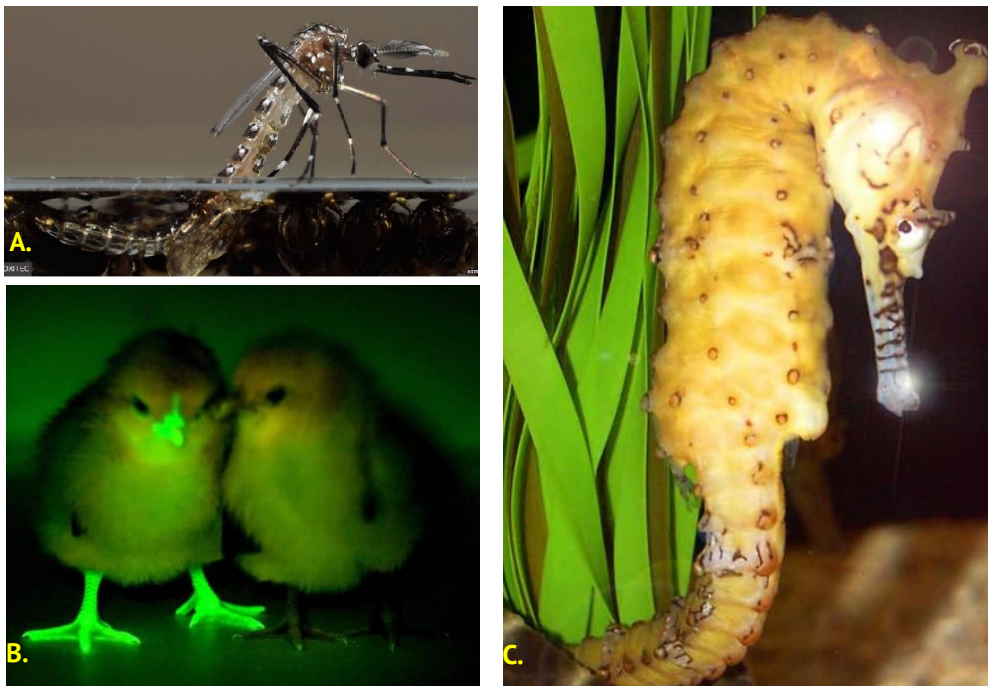
Pojęcie organizm modyfikowany genetycznie może być mylące, gdyż wiele konwencjonalnych technik, w tym krzyżowanie, introgresja, mutageniza także prowadzą do modyfikacji genetycznych. **Dlatego właściwszym terminem byłoby określenie: organizm otrzymany w wyniku metod inżynierii genetycznej. Przy czym wprowadzony gen musi dziedziczyć się zgodnie z prawami Mendla.** Niestety przestrzeń publiczna została



**Rys. 1.2.1a.** Transgeniczny ryż (u góry) i kukurydza (u dołu) z genami warunkującymi syntezę karotenu.

zdominowana przez termin GMO, co powoduje, że definicje są pełne szczegółów. A te są różnie interpretowane przez prawników.





**Rys. 1.1.2b.** Przykłady zwierząt GMO. A. Komary 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 reporterowy z meduzy, którego ekspresja prowadzi do luminescencji w ciemności. Dzięki temu można rozpoznać formy odporne. C. Konik morski z genem meduzy. Dodatkowo wprowadzono nanocząsteczki złota. W wyniku ekspresji genu meduzy, dochodzi do luminescencji oraz uwidocznienia mikrocząsteczek złota jako świecących punktów (Wietnam).

### 1.2.2. 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 "Organizmu" 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.
  - ▶ **Uwaga:** trafniejsze byłoby określenie „za pomocą inżynierii genetycznej”.
  - ▶ **Uwaga:** wyłącza się człowieka z ustawy.

- **Wektor:** cząstka kwasu nukleinowego pozwalająca na wprowadzenie i stabilne utrzymanie cząstek kwasu nukleinowego u 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, np. Biologii molekularnej. 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.).

### 1.3. GMO w bazach danych

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

#### 1.3.1. Przykłady modyfikacji

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



The screenshot shows the ISAAA website interface. At the top, there is a navigation bar with links for 'Contact' and 'Purchase Publications'. Below this is the ISAAA logo and the full name of the organization: 'INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRIBIOTECH APPLICATIONS'. There is also a 'Join our Crop Biotech Update mailing list' button. A horizontal menu contains links for 'ISAAA in Brief', 'ISAAA Programs', 'Knowledge Center', 'Biotech Information Resources', 'GM Approval Database', 'ISAAA Blog', and 'Donate'. The main content area is titled 'GM Approval Database' and includes a list of GM Plants on the left: Alfalfa, Apple, Argentine Canola, Bean, Carnation, and Chirney. The main text describes the database as an easy-to-use resource for biotech/GM crop approvals, mentioning that it features approved events for commercialization, planting, and importation, based on publicly available decision documents and peer-reviewed articles.

#### Rys. 1.2.1. Zrzut ekranu dla bazy ISAAA.

- Dla wybranego gatunku proszę podać: **(5 punktów)**

- 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.

### 1.3.2. Analiza gatunków

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

### 1.3.3. Państwa dopuszczające GMO

- W którym państwie jest najwięcej uprawianych odmian transgenicznych (pomiń Unię Europejską)?
- 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 konstruktu wraz z promotorem oraz markerami selekcyjnymi i genami reporterowymi;
- wstawić konstrukt do wektora plazmidowego lub wirusowego;
- wprowadzić wektor do organizmu docelowego;
- wyselekcjonować organizmy, komórki, które zawierają gen;
- określić dziedziczenie w kolejnych pokoleniach.

### 2.2. Definicje

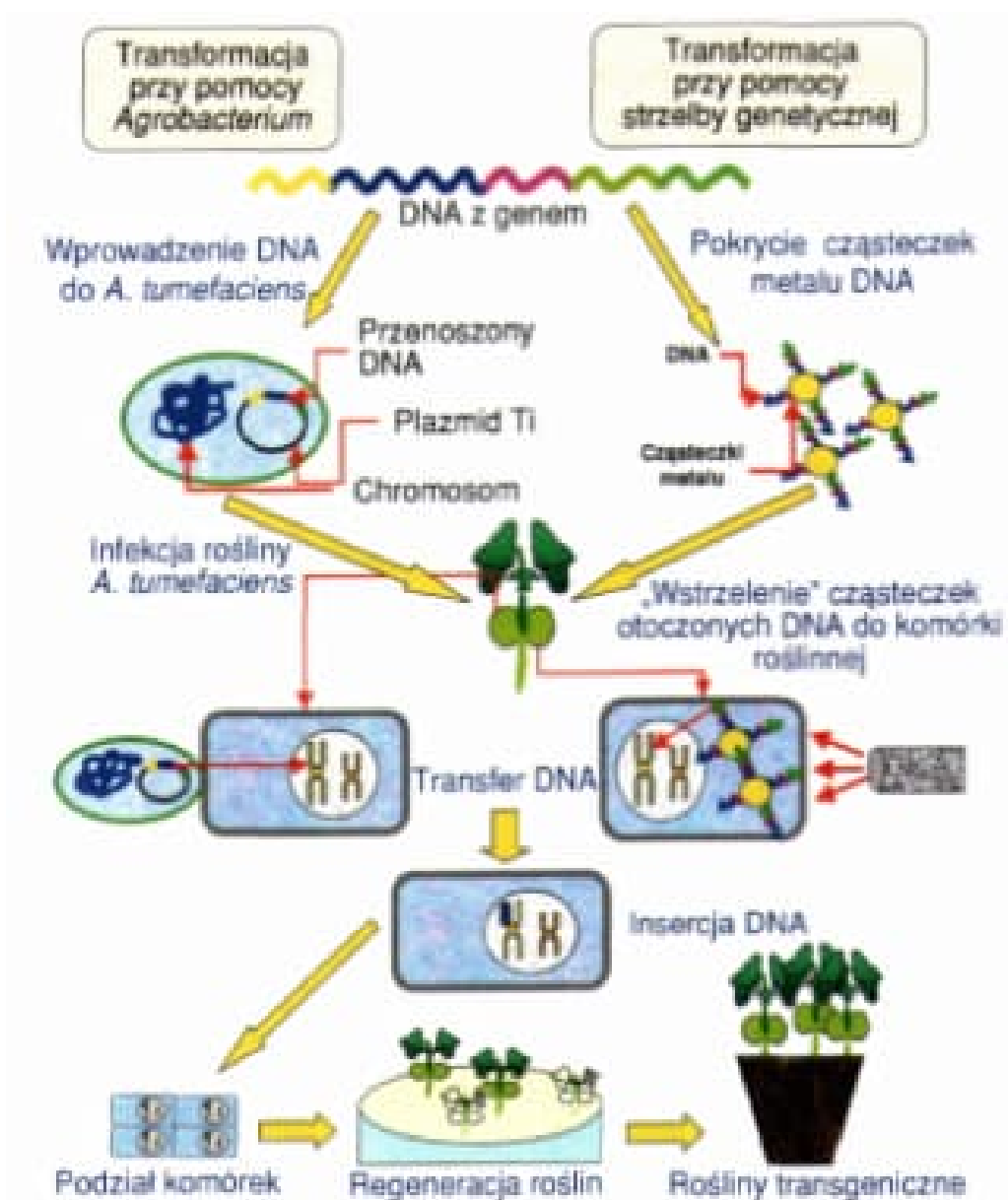
- **Transformacja:** proces, który prowadzi do wprowadzenia obcego materiału genetycznego, najczęściej na skutek pokonania bariery błony komórkowej. Pojęcie transformacji na ogół jest zarezerwowane do pobierania DNA ze środowiska bez pośrednictwa wektora. Transformacja zachodzi naturalnie u bakterii. Stanowi ona główny mechanizm horyzontalnego transferu genów. W laboratoriach wykorzystuje się ją na potrzeby inżynierii genetycznej. W przypadku GMO transformacja będzie występowała, gdy DNA inkubujemy z komórkami, do których ma być wprowadzony transgen.
- **Transdukcja:** proces polegający na wprowadzeniu obcego DNA za pośrednictwem wektora wirusowego.



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

- **Transfekcja:** wprowadzenie obcego DNA do komórek eukariotycznych bez wykorzystywania wektorów wirusowych, np. przy pomocy *Agrobacterium tumefaciens*, przez mikroiniekcję itd.
- **Transformat (T<sub>1</sub>, 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 organizmy, komórki, 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.
- ***Agrobacterium tumefaciens*:** bakteria zdolna do wprowadzenia DNA do roślin, dzięki obecności Ti-plazmidu.

### 2.3. Otrzymywanie roślin transgenicznych



Rys. 2.3. Schemat otrzymywania roślin transgenicznych z wykorzystaniem *Agrobacterium tumefaciens*.

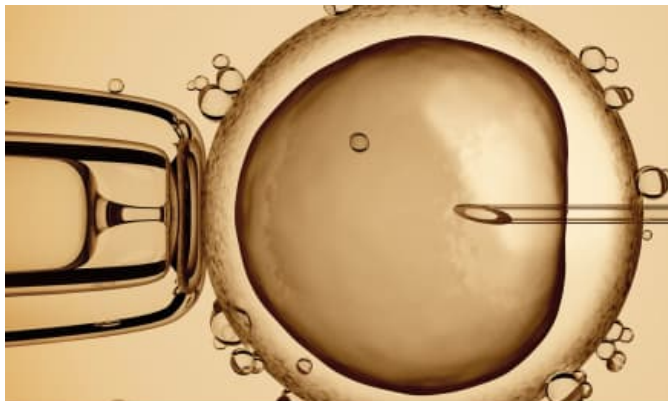


## 2.4. Otrzymywanie zwierząt transgenicznych

Zwierzęta transgeniczne produkują się począwszy od 1980 r. Wykorzystuje się szereg technologii wytwarzania zwierząt transgenicznych, przy czym największą popularnością cieszy się mikroiniekcja. Zwierzęta transgeniczne wytwarza się w celach hodowlanych, dla polepszenia jakości żywności, jako bioreaktory, a także w celu analizy funkcji genów ludzkich.

### 2.4.1. Mikroiniekcja

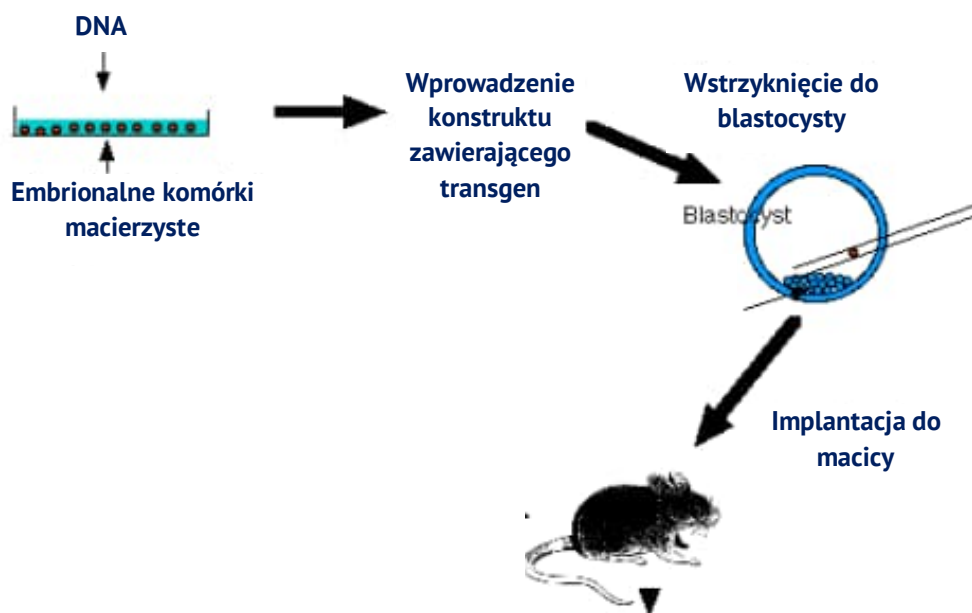
Przez kilka godzin po przedostaniu się plemnika do komórki jajowej widoczne są jądra komórkowe męskie oraz żeńskie. DNA może być w tym czasie wprowadzone do jednego z tych dwóch jąder. Po zlaniu jąder pochodzenia ojcowskiego i matecznego powstaje heterozygotyczne jądro potomne. Integracja transgenu z wykorzystaniem tej techniki zachodzi z częstością 0,5-3%.



**Rys. 2.4.1.** Mikroiniekcja transgenu do komórki jajowej ssaków.

Mikroiniekcja jest techniką czasochłonną. Transgen można wprowadzić tylko do ograniczonej liczby komórek. Korzyścią tej techniki jest możliwość wczesnej integracji transgenu, co zapewni, że wszystkie komórki go będą miały. Integracja zachodzi w miejscach losowych.

### 2.4.2. Transfer za pośrednictwem embrionalnych komórek macierzystych



**Test na obecność transgenu w potomstwie.  
Krzyżowanie heterozygot w celu otrzymania linii czystych.**

**Rys. 2.4.2.** Otrzymywanie transgenicznych zwierząt przy pomocy embrionalnych komórek macierzystych.

Embrionalne komórki macierzyste pozyskuje się z blastocysty, następnie hoduje się je w kulturze. Konstrukt zawierający transgen wprowadza się do komórek macierzystych. Następnie transformowane komórki wprowadzane są do blastocysty, którą umieszcza się w macicy samicy. Otrzymane potomstwo testuje się na obecność transgenu.

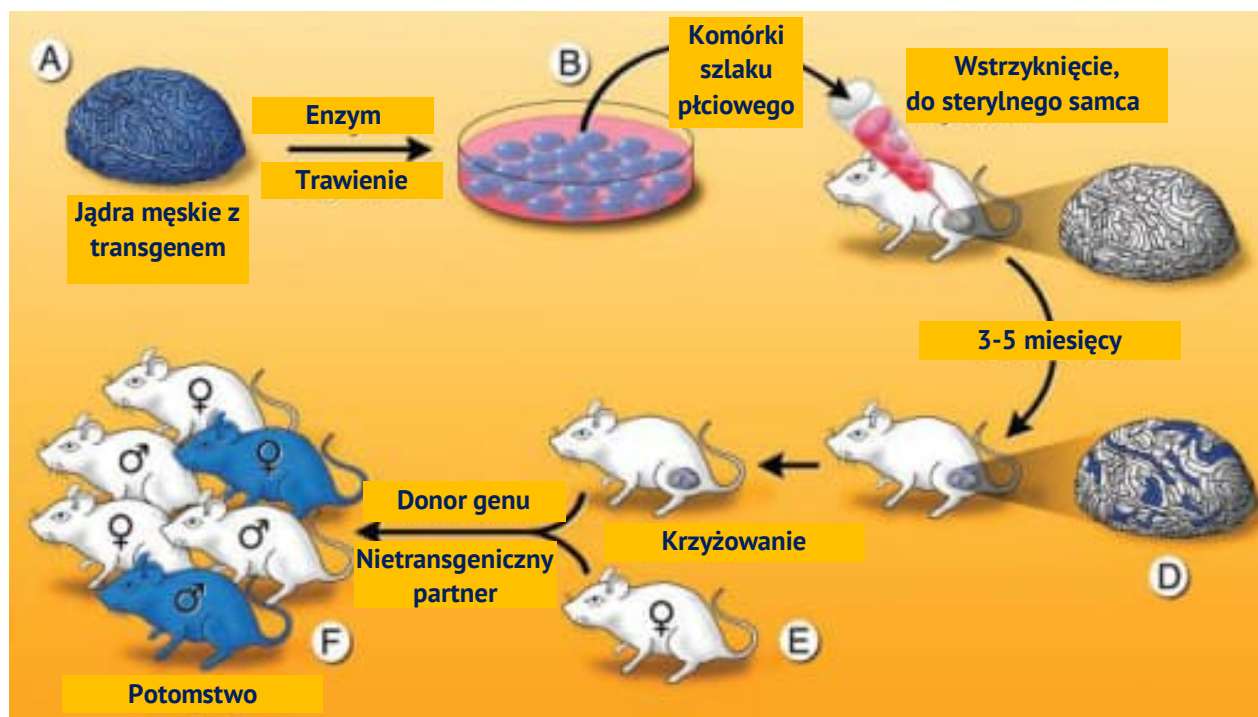
#### 2.4.3. Wykorzystanie retrowirusów

Retrowirusy są wykorzystywane jako wektory do transferu transgenu do komórki gospodarza. W efekcie powstaje chimera, która ma transgen tylko w części komórek. U myszy, chimery poddaje się hodowli wsobnej przez około 20 pokoleń, aby uzyskać linię czystą.

#### 2.4.4. Transformacja gamet

Gamety inkubowane są przez krótki okres z DNA będącym konstruktem zawierającym transgen. Gamety mogą pobierać DNA samoczynnie, ale często proces ten wspomaga się elektroporacją lub wprowadzeniem DNA do liposomów. Metoda ta jest wysoce efektywna, nawet 80% gamet zawiera obcy DNA.

#### 2.4.5. Transplantacja jąder męskich



**Rys. 2.4.5.** Otrzymywanie transgenicznych zwierząt przy transplantacji jąder męskich.

Metoda polega na wprowadzeniu transgenu do jąder samca w warunkach *in vitro*, utworzenia kultury pojedynczych komórek, wstrzyknięcia wyhodowanych komórek do nasieniowodów sterylnej samicy. Tylko komórki macierzyste transformowanych spermatogoniów mogą wytworzyć plemniki. Konstrukt może zawierać gen reporterowy, np. dający niebieskie zabarwienie. Umożliwia to śledzenie plemników z konstruktem. Samiec, któremu wstrzyknięto komórki szlaku płciowego jest krzyżowany z nietransgeniczną samicą. Potomstwo testuje się na obecność transgenów.

### 3. Identyfikacja transgenów

➔ Wprowadzenie transgenu do organizmu wymaga jego monitorowania zarówno dla celów badawczych, jak również później, po wprowadzeniu GMO do obrotu. Istnieje szereg metod molekularnych umożliwiających identyfikację transgenu na poziomie DNA, RNA i białka. Metody te różnią się kosztami, nakładem pracy, każda ma ograniczenia oraz pozytywne strony.

#### 3.1. Metody wykorzystujące DNA

##### 3.1.1. Hybrydyzacja Southern (DNA-DNA)

**Hybrydyzacja** jest to zdolność kwasów nukleinowych do tworzenia dwuniciowych struktur. Hybrydyzacja Southern zachodzi między niciami DNA.

**Sonda DNA to znakowany jednoniciowy DNA, który może być wykorzystany do identyfikacji komplementarnych cząsteczek.**

**Hybrydyzacja**

- Jest to zdolność kwasów nukleinowych do tworzenia dwuniciowych struktur na skutek parowania komplementarnych zasad.
- Różnice w stabilności wykorzystywane są w hybrydyzacji kwasów nukleinowych.
- Hybrydyzacja umożliwia wykrywanie sekwencji komplementarnych do sondy w materiale biologicznym.

Jeżeli nici nie są komplementarne to cząsteczka mieszańcowa jest niestabilna.

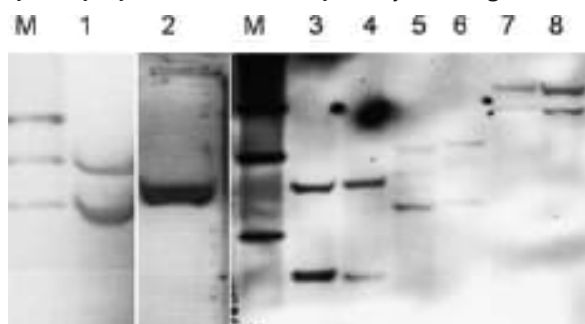
Jeżeli nici są komplementarne to cząsteczka mieszańcowa jest stabilna.

Sonda znakowana fluorescencyjnie umożliwia lokalizację komplementarnych sekwencji na chromosomach.

Sonda rDNA wykorzystywana do identyfikacji gatunków glonów.

Rys. 3.1.1a. Hybrydyzacja kwasów nukleinowych.

Hybrydyzacja DNA-DNA (Southern) jest często wykorzystywana do identyfikacji transgenów ze względu na jej wyższą wiarygodność niż metoda PCR. Polega ona na hybrydyzacji genomowego DNA organizmu transgenicznego z sondą, która odpowiada transgenowi. Metoda ta nie ustala lokalizacji w genomie transgeny, ale pozwala ocenić liczbę kopii transgeny. Przykładowo na rys. 3.2.1. pokazano linie transgeniczne grochu zawierające gen *Vst1* z winorośli. Zawierają one jedną (nr 2) lub dwie kopie transgeny (nr 1). Na tym samym rysunku pokazano linie transgeniczne grochu z genem *pgip1* z maliny (3-8). Pozycje 3-4 oraz 7-8



Rys. 3.1.1b. Hybrydyzacja Southern linii transgenicznych grochu zawierających gen *Vst1* z winorośli (linia 1 i 2) oraz gen *pgip1* z maliny (linie 3-8). M oznacza marker masowy.

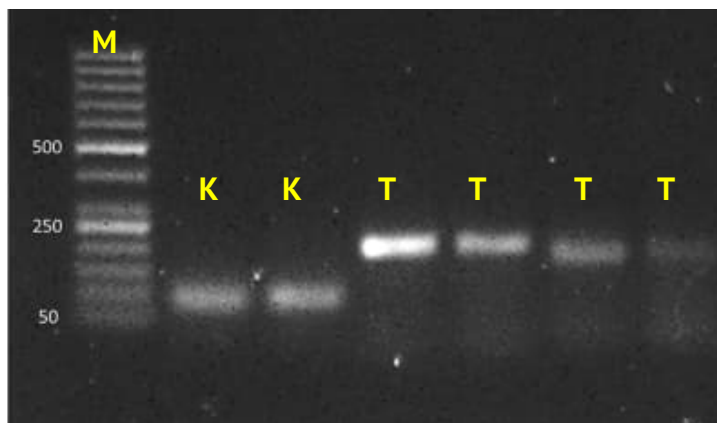


pokazują dwie kopie transgenu (dwa prążki), a pozycja 5 pokazuje 3 kopie transgenu. Gen *pgip1* jest inhibitorem poligalakturonaz grzybiczych. Obecność tego genu nadaje odporność na choroby grzybowe.

Hybrydyzacja Southern wymaga stosunkowo dużej ilości czystego DNA (około 1 µg), infrastruktury umożliwiającej pracę z izotopami promieniotwórczymi, Metoda nie nadaje się do automatyzacji.

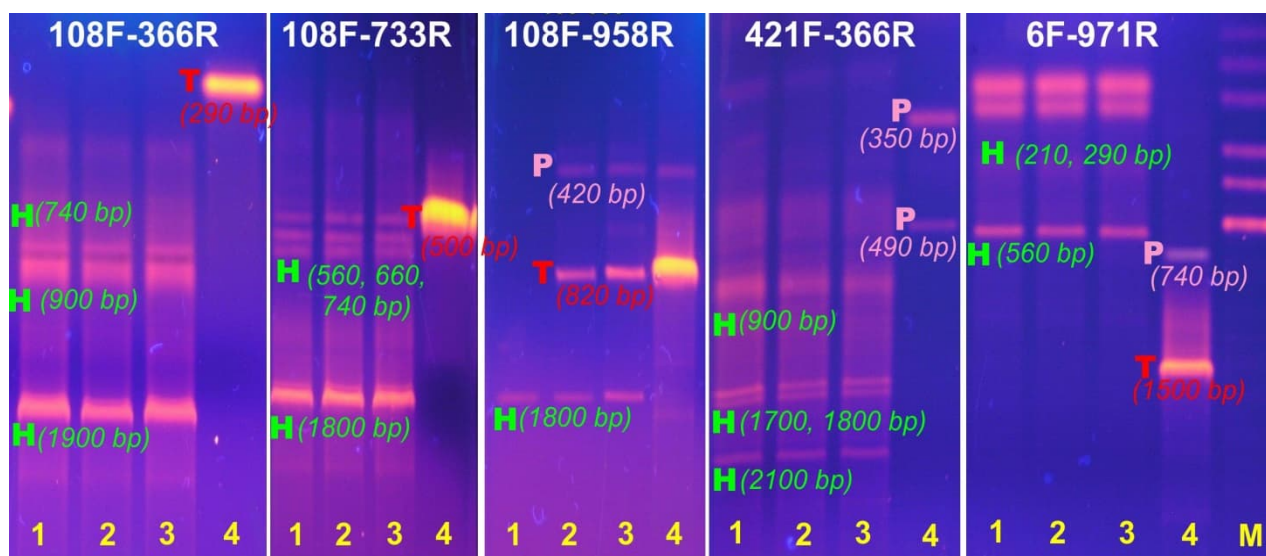
### 3.1.2. Reakcja PCR

Reakcja PCR opiera się na wykrywaniu transgenu z wykorzystaniem starterów specyficznych dla transgenu i wektora. Najczęściej wykorzystuje się kilka par starterów. Produkty reakcji wizualizowane są na żelu agarozowym. Reakcja PCR umożliwia identyfikację transgenu oraz sprawdzenie jego struktury. Kluczowym elementem jest prawidłowy dobór starterów oraz czysty materiał genetyczny.



**Rys. 3.1.2a.** Identyfikacja transgenu *egfp* metodą PCR u myszy. K: kontrola, T: transgeniczne myszy, różne tkanki. M oznacza marker masowy.

Identyfikacja transgenu metodą PCR nastęca pewne trudności wynikające z faktu, że sekwencje podobne (homologiczne) do transgenu znajdują się w genomie gospodarza. Przykładowo, wszystkie startery na rys. 3.1.2b. z wyjątkiem pary 421F-366R wykrywają transgen w plazmidzie. Reakcja jest specyficzna. Natomiast w roślinach transgenicznym transgen jest wykrywany tylko przez parę 108F-958R. Prążek o długości 820 bp występuje u obu linii transgenicznym, ale brakuje go w kontroli. Jednakże nawet ta para wykrywa dodatkowy prążek u wszystkich roślin,



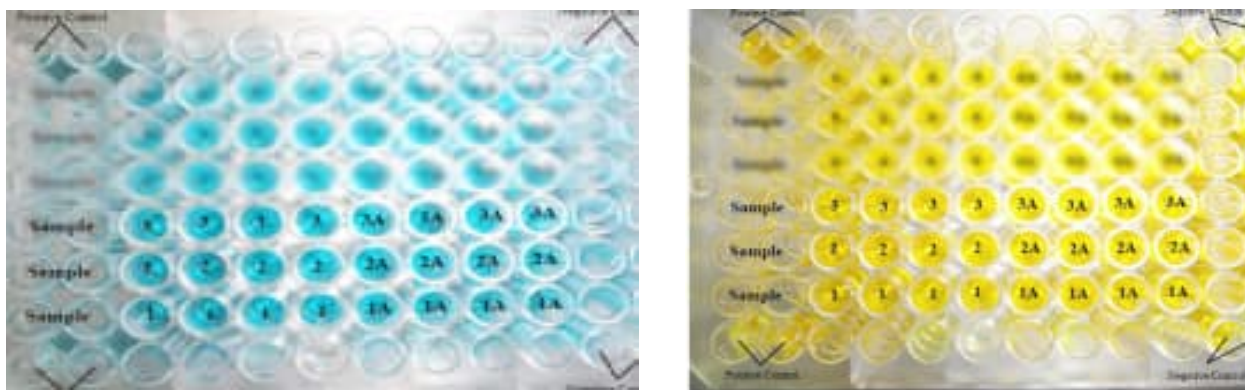
**Rys. 3.1.2b.** Analiza genu *pgip1* w liniach transgenicznym grochu. 1. Kontrola, 2. Linia PGIP. 3. Linia PGIP x VST. 4. Plazmid z genem *pgip1*. Gen *pgip1* został podzielony na fragmenty, do których zaprojektowano startery. Numery u góry pokazują zakres genu objęty starterami forward i reverse. T: transgen, H: homolog. Większość starterów specyficznych dla genu *pgip1* wykrywa homologi genu zamiast transgenu. Transgen jest prawidłowo wykrywany w plazmidzie, co oznacza prawidłowo przeprowadzoną reakcję PCR.



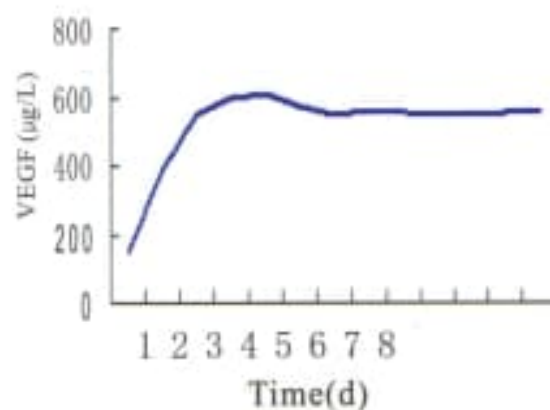
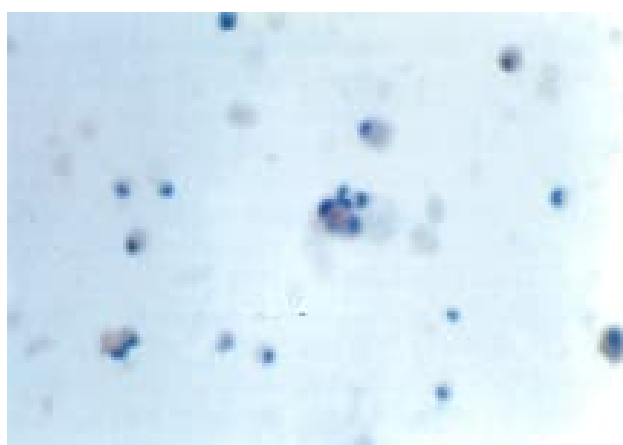
włącznie z kontrolą, który odpowiada homologom (długość 1800 bp). Pozostałe pary starterów wykrywają tylko homologii. Brak prążka odpowiadającego transgenowi u roślin transgeniczných może świadczyć o rearanzacji genu *pgip1* u roślin transgeniczných.

### 3.2. Identyfikacja na poziomie białka

Informacja o białku, które jest kodowane przez transgen dostarcza wiedzy o obecności transgenu i jego ekspresji. Często wykorzystuje się test Elisa lub jego odmiany. W teście Elisa wykorzystuje się specyficzne przeciwciała skoniugowane z enzymem umożliwiającym wizualizację reakcji. Jeżeli w ekstrakcie białkowym z organizmu transgenicznego znajduje się białko będące produktem transgenu dochodzi do reakcji między przeciwciałem a białkiem kodowanym przez transgen. Jednocześnie dodaje się substrat (barwnik), który zmienia barwę roztworu na skutek reakcji przeprowadzonej przez enzym skoniugowany z przeciwciałem. Jeżeli białko pochodzące z transgenu nie połączy się z przeciwciałem wówczas enzym jest nieaktywny i reakcja barwna nie zachodzi. Metoda ta jest czuła, ale wymaga dobrego oprzyrządowania laboratoryjnego.



**Rys. 3.2a.** Test Elisa dla białka Cry1Ac kodowanego przez transgen z *Bacillus thuringiensis*. Po lewej, ekstrakty białkowe z transgeniczných nasion przed dodaniem substratu, zabarwione są na niebiesko. Po prawej, po dodaniu substratu dla reakcji przeprowadzanej przez enzym, próby zabarwiają się na żółto.



**Rys. 3.2b.** Ekspresja czynnika wzrostu śródbłonna naczyń VEGF w transgeniczných neuronowych komórkach macierzystych. Po lewej, identyfikacja VEGF w komórkach (niebieskie zabarwienie), po prawej, poziom ekspresji w poszczególnych dniach oceniony za pomocą testu Elisa (Zhang et al., 2016).

### 3.3. Analiza dziedziczenia transgenu



3.3.1. Do homozygotycznej linii myszy wprowadzono gen *F* pochodzący od człowieka związany z otyłością. Otrzymane transformaty,  $T_1$  miały jedną kopię genu *F* i wykazywały tendencję do otyłości. Samice  $T_1$  skrzyżowano testowo. Proszę podać rozszczepienia otrzymane w krzyżówce testowej oraz genotyp transformanta  $T_1$ .

3.3.2. 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 świecące, szare, samice, natomiast samce były świecące, szare oraz nieświecące, żółte. Proszę podać, na którym chromosomie jest miejsce insercji genu lucyferazy. Proszę podać genotypy i fenotypy P,  $F_1$  i  $F_2$ .

3.3.3. W pewnym laboratorium otrzymano transgeniczne myszy ze wstawionym genem *egfp*, który koduje białko fluoryzujące na zielono. Transgenicznego, homozygotycznego samca z genem *egfp* skrzyżowano z nietransgeniczną samicą. Z jaką częstością wystąpią w pokoleniu  $F_2$  tej krzyżówki osobniki fluoryzujące na zielono. Proszę podać genotypy osobników fluoryzujących. Proszę uzasadnić odpowiedź.

## 4. Wykorzystanie GMO w medycynie

➔ Organizmy modyfikowane genetycznie wykorzystywane są w badaniach naukowych, w przemyśle farmaceutycznym, a także mogą być wykorzystane do dostarczania składników diety o korzystnym wpływie na organizm.

### 4.1. GMO w poznaniu przyczyn chorób człowieka

Naturalne modele chorób człowieka występują rzadko, ponieważ zwierzęta chore na ogół nie przeżywają. Jedną z możliwości analizy chorób człowieka u organizmów modelowych jest indukowanie mutacji. Jednakże mutacje zawsze będą związane z genami danego organizmu. Geny te mogą być homologiczne do genów ludzkich i efekty mutacji mogą być podobne, ale objawy zawsze będą specyficzne gatunkowo. Mutagenesa organizmów modelowych nie pozwala na bezpośrednie badanie genów człowieka, gdyż zawsze mamy do czynienia z genem homologicznym, a nie ludzkim. Inżynieria genetyczna stwarza możliwość analizy funkcjonowania genów ludzkich przez wstawienie ich do genomu organizmu modelowego. Tym samym GMO umożliwia badanie bezpośrednio genu ludzkiego, a nie jego homologa. Należy jednak pamiętać, że ekspresja genu zależy także od tła genetycznego i może ona się różnić u człowieka i transgenicznego modelu. Ponadto wprowadzenie obcego genu również może doprowadzić do remodelowania genomu, w tym remobilizacji transpozonów.

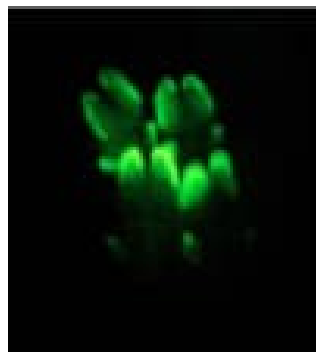
W analizie chorób człowieka najczęściej wykorzystuje się transgeniczne myszy ze względu na ich podobieństwo anatomiczne, fizjologiczne i genetyczne do człowieka. Ponadto są one łatwe w hodowli laboratoryjnej, dając wiele pokoleń w krótkim czasie, łatwo się krzyżują. Wykorzystuje się także szczury, króliki, świnię i inne.

#### 4.1.1. Modelowanie chorób serca

- Myszy transgeniczne z nadekspresją genu kodującego konwertazę *Pcsk9* oraz z wyłączonymi (knock-out) genami *Ldlr* (receptor lipoprotein o niskiej gęstości), *ApoE* (Apolipoproteina E). Myszy rozwijają arteriosklerozę.
- Modelowanie hipercholesterolemii u świni karłowej przez inaktywację *Ldlr*. Hipercholesterolemia rozwinęła się u homozygot *Ldlr*-/*Ldlr*- i u heterozygot.

#### 4.1.2. Modelowanie chorób neurodegeneracyjnych

- Myszy transgeniczne z mutacją w genie *APP* (prekursor białka  $\beta$ -amyloidnego) rozwijają blaszki amyloidowe, ale nie pojawiają się splątki neurofibrylarne oraz nie dochodzi do utraty nerwów.
- U transgenicznych świń z genem *APP* nie obserwowano zmian w mózgu.
- U transgenicznych świń z genem *APP* i *PSEN1* (preselinina) rozwijały się blaszki amyloidalne w wieku 10-18 miesięcy.



**Rys. 4.1.2.** Transgeniczne świny z genem *Mx1* warunkującym odporność na choroby wirusowe oraz genem *efgp*, który warunkuje białko świecące na zielono. Zielona fluorescencja widoczna w ryjku (Yan et al., 2014).

## 4.2. Produkcja leków i szczepionek

Szczepionki podjednostkowe to szczepionki zawierające jeden lub więcej antygenów. Można je pozyskać poprzez hodowlę szczepu mikroorganizmu i izolację określonego antygeny. Inną możliwością jest identyfikacja genu kodującego dany antygen i wstawienie tego genu do innego organizmu, np. komórek *E. coli*, drożdży, owadów, roślin. W tym przypadku mamy do czynienia ze szczepionkami rekombinowanymi będącymi produktami inżynierii genetycznej. Przykładem takich szczepionek są:

- Szczepionka przeciw gorączce Zachodniego Nilu: białko E otoczki wirusa podlega ekspresji w komórkach *D. melanogaster*.
- Szczepionka przeciw WZW B – gen kodujący antygen HbsAg wstawiono do komórek drożdży. Wprowadzona w 1986 r.

Organizmy transgeniczne stanowią wygodny bioreaktor do produkcji leków i szczepionek. Przykładem jest transgeniczny ziemniak, który w niektórych państwach azjatyckich wykorzystywany jest 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 w porównaniu z bakteriami i drożdżami 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. Istotnym aspektem „szczepionek” roślinnych jest także możliwość doustnego podawania, co znacznie upraszcza logistykę związaną z ich przechowywaniem i podaniem. Doświadczenia na myszach wykazały, że pokarm z roślin transgenicznych zawierający antygeny przeciw wirusom wywołującym choroby może indukować odpowiedź immunologiczną. Zagrożenia związane z wykorzystaniem roślin transgenicznych do produkcji szczepionek 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 nieziarnicy	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



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

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



## Odpowiedzi

### 1. Organizmy transgeniczne

#### 1.3. GMO w bazach danych

##### 1.3.1. Przykłady modyfikacji

Proszę wejść na stronę ISAAA (International Service for the Acquisition of Biotech Applications): <http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/default.asp>



**Rys. 1.3.1.** Zrzut ekranu dla bazy ISAAA.

- Proszę przejrzeć listę gatunków po lewej stronie i wybrać dowolny gatunek.
- Dla wybranego gatunku proszę podać:

**A.** Nazwę polską i łacińską (przykładowe odpowiedzi)

*Medicago sativa*, lucerna siewna

**B.** Liczbę odmian transgenicznych w bazie

5

**C.** Proszę podać nazwy handlowe tych odmian

- ▶ Roundup Ready Alfalfa
- ▶ HarvXtra



Lucerna siewna

#### Alfalfa (*Medicago sativa*) GM Events (5 Events)

Event Name and Code	Trade Name
Name: J101 Code: MON-00101-8	Roundup Ready™ Alfalfa
Name: J101 x J163 Code: MON-00101-8 x MON-00163-7	Roundup Ready™ Alfalfa
Name: J163 Code: MON-00163-7	Roundup Ready™ Alfalfa
Name: KK179 Code: MON-00179-5	HarvXtra™
Name: KK179 x J101 Code: MON-00179-5 x MON-00101-8	not available

Przykładowe dane dla lucerny siewnej

D. Proszę wybrać jedną z odmian i podać następujące dane (np. dla J101):

▶ Kto jest producentem odmiany?

Monsanto

▶ Jaką zastosowano metodę transformacji?

Za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*

▶ Jaką cechę wprowadzono?

Odporność na herbicydy, glifosat.

▶ Proszę podać symbol wprowadzonego genu i jego funkcję.

*Cp4epsps*: zmniejsza zdolność do wiązania glifosatu.

## Event Name: J101

Event Code : MON-ØØ1Ø1-8

Trade Name: Roundup Ready™ Alfalfa

Crop: [Medicago sativa - Alfalfa, Lucerne](#)

Basic Information	Authorizations	Documents and Links								
<p><b>Developer:</b> Monsanto Company and Forage Genetics International</p> <p><b>Method of Trait Introduction:</b> <a href="#">Agrobacterium tumefaciens-mediated plant transformation</a></p> <p><b>GM Trait :</b> <a href="#">Glyphosate herbicide tolerance</a></p> <p><b>Commercial Trait:</b> (Singular) <a href="#">Herbicide Tolerance</a></p> <p><b>Summary of Basic Genetic Modification</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Gene Introduced</th> <th>Gene Source</th> <th>Product</th> <th>Function</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><a href="#">cp4 epsps (aroA:CP4)</a></td> <td><i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain CP4</td> <td>herbicide tolerant form of 5-enolpyruvulshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) enzyme</td> <td>decreases binding affinity for glyphosate, thereby conferring increased tolerance to glyphosate herbicide</td> </tr> </tbody> </table>			Gene Introduced	Gene Source	Product	Function	<a href="#">cp4 epsps (aroA:CP4)</a>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain CP4	herbicide tolerant form of 5-enolpyruvulshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) enzyme	decreases binding affinity for glyphosate, thereby conferring increased tolerance to glyphosate herbicide
Gene Introduced	Gene Source	Product	Function							
<a href="#">cp4 epsps (aroA:CP4)</a>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain CP4	herbicide tolerant form of 5-enolpyruvulshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) enzyme	decreases binding affinity for glyphosate, thereby conferring increased tolerance to glyphosate herbicide							

Dane dla odmiany J101

## 1.3.2. Analiza gatunków

A. Ile gatunków roślin znajduje się w bazie danych?

- ▶ 32 gatunki są na liście

B. Dla którego gatunku otrzymano najwięcej odmian roślin transgenicznych?

- ▶ Dla kukurydzy, 244

C. Przeanalizuj listę gatunków, u których dokonuje się modyfikacji pod kątem zagrożenia dla bioróżnorodności (przepływ genów) w Polsce.

- ▶ Należy skupić się na gatunkach obcopolnych, gdyż w ich przypadku jest większe ryzyko przepływu genów.
- ▶ Należy także uwzględnić występowanie dziko rosnących, blisko spokrewnionych gatunków.
- ▶ Największe ryzyko w przypadku Polski:
  - Lucerna, może być obcopolna, występuje dziko (np. lucerna łąkowa).
  - Jabłoń: obcopolna, występuje dziko oraz liczne stare odmiany.
  - Rzepak: obcopolna, występują dzikie formy.
  - Cykoria podróżnik: obcopolna, pospolita na przydrożach, miedzach, łąkach.
  - Mietlica rozłogowa: obcopolna, pospolita na całym obszarze kraju.
  - Śliwa: obcopolna, dziczejąca, krzyżuje się z tarniną.
  - Topola: obcopolna, powszechna na terenie całego kraju, gatunek wszędobyłski.
  - Róża: obcopolna, liczne dzikie taksony, które stanowią cenny element naturalnych ekosystemów.

## 1.3.3. Państwa dopuszczające GMO

A. W którym państwie jest najwięcej uprawianych odmian transgenicznych (pomiń Unię Europejską)?

- ▶ 214, USA

B. Z jakich gatunków pochodzą odmiany transgeniczne dopuszczone w Unii Europejskiej?

- ▶ *Brassica napus*, 13
- ▶ *Dianthus caryophyllus*, 7
- ▶ *Gossypium hirsutum* L., 14
- ▶ *Zea mays* L., 52
- ▶ *Solanum tuberosum* L., 1
- ▶ *Glycine max* L., 20
- ▶ *Beta vulgaris*, 1
- ▶ *Nicotiana tabacum* L., 1

### 3. Identyfikacja transgenów

#### 3.3. Analiza dziedziczenia transgenów



3.3.1. Do homozygotycznej linii myszy wprowadzono gen  $F$  pochodzący od człowieka związany z otyłością. Otrzymane transformaty,  $T_1$  miały jedną kopię genu  $F$  i wykazywały tendencję do otyłości. Samice  $T_1$  skrzyżowano testowo. Proszę podać rozszczepienia otrzymane w krzyżówce testowej oraz genotyp transformanta  $T_1$ .

- Wstawiony gen nie ma odpowiednika u biorcy, zatem zawsze będzie dominujący.
- Linia biorcy była homozygotyczna. W wyniku transformacji wprowadzono gen, przy czym podano, że była tylko jedna kopia. Należy założyć, że została ona wstawiona tylko do jednego z chromosomów, zatem transformant  $T_1$  był heterozygotą  $Ff$ .
- Transformowane samice skrzyżowano testowo, tzn. z samcem nietransgenicznym, a więc niemającym genu  $F$ . Ma on genotyp  $ff$ .
- W wyniku krzyżowania testowego uzyskamy myszy narażone na otyłość,  $Ff$  i zdrowe,  $ff$  w stosunku 1:1.

3.3.2. 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 świecące, szare, samice, natomiast samce były świecące, szare oraz nieświecące, żółte. Proszę podać, na którym chromosomie jest miejsce insercji genu lucyferazy. Proszę podać genotypy i fenotypy  $P$ ,  $F_1$  i  $F_2$ .

- Samica była homozygotą dominującą względem genu lucyferazy,  $L$  ponieważ transgen nie ma odpowiednika u biorcy, zatem po wstawieniu będzie dominujący.
- Samiec miał żółte ciało, a więc cechę sprzężoną z płcią.
- W  $F_2$  zarówno zdolność świecenia jak i barwa ciała różniły się między samcami i samicami, **co oznacza, że gen lucyferazy został wstawiony do chromosomu X.**
- Samce  $F_2$  były świecące, szare oraz nieświecące, żółte. Oznacza to, że miały genotypy:
  - ▶ Świecące, szare:  $Ly^+/Y$
  - ▶ Nieświecące, żółte:  $ly/Y$
- Samice  $F_2$  były tylko świecące, szare, zatem ich genotyp był:  $Ly^+/ly$  lub  $Ly^+/Ly^+$
- Pokolenie  $F_1$ :
  - ▶ Samice:  $Ly^+/ly$
  - ▶ Samce:  $Ly^+/Y$
- Rodzice,  $P$ 
  - ▶ Transgeniczna samica:  $Ly^+/Ly^+$
  - ▶ Samiec  $ly/Y$



3.3.3. W pewnym laboratorium otrzymano transgeniczne myszy ze wstawionym genem *egfp*, który koduje białko fluoryzujące na zielono. Transgenicznego, homozygotycznego samca z genem *egfp* skrzyżowano z nietransgeniczną samicą. Z jaką częstością wystąpią w pokoleniu F<sub>2</sub> tej krzyżówki osobniki fluoryzujące na zielono. Proszę podać genotypy osobników fluoryzujących. Proszę uzasadnić odpowiedź.

- Wprowadzony transgen dziedziczy się dominująco, gdyż nie ma odpowiedniego genu u myszy nietransgenicznych. Oznaczamy transgen, np. jako *E*, brak transgeny jako *e*.
- Transgeniczny samiec był homozygotą o genotypie *EE*, nietransgeniczna samica była homozygotą recesywną, *ee*.
- Po ich skrzyżowaniu otrzymujemy pokolenie F<sub>1</sub> o genotypie *Ee*, które zawiera białko fluoryzujące na zielono, a więc osobniki też fluoryzują na zielono.
- Pokolenie F<sub>2</sub> to krzyżowanie dwóch heterozygot *Ee*. W pokoleniu F<sub>2</sub> otrzymujemy 3 osobniki fluoryzujące na zielono. Zatem osobniki fluoryzujące na zielono wystąpią z częstością 3/4 (75%).
- Genotypy osobników fluoryzujących na zielono to *EE* (1/4), *Ee* (2/4 = 1/2). Osobniki niefluoryzujące na zielono będą miały genotyp *ee*.

## 4. Wykorzystanie GMO w medycynie

### 4.2. Produkcja leków i szczepionek

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

#### ■ Wirus Zachodniego Nilu

A. Produkt kodowany przez transgen.

- ▶ Białko E otoczki wirusa

B. Dawcę

- ▶ Wirus Zachodniego Nilu

C. Biorcę

- ▶ *Drosophila melanogaster*

#### ■ Wirus WZWB

A. Produkt kodowany przez transgen.

- ▶ Antygen HbsAg

B. Dawcę

- ▶ Wirus WZW B

C. Biorcę

Drożdże