

Inżynieria genetyczna INGE1

Michał Mikula

Zakład Genetyki
Centrum Onkologii-Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie

email: mikula.michal@gmail.com
<http://www.ire.pw.edu.pl/~trubel/dydaktyka/inge/>

Inżynieria genetyczna - definicja

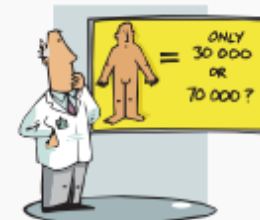


8000 Bc - na długo przed wiedzą o istnieniu DNA ludzie praktykowali selektywną hodowlę



1953 - Watson i Crick opisują strukturę DNA

1990 - start The Human Genome Project



2002 - zakończenie projektu sekwencjonowania genomu człowieka. Wątpliwości co do liczby genów.

Początek ery post-genomicznej

- **Inżynieria genetyczna*** - dziedzina nauki obejmująca **selektywne, celowe zmiany i przenoszenie materiału genetycznego (DNA) pomiędzy organizmami**

- **Inżynieria genetyczna*** - dziedzina nauki obejmująca **selektywne, celowe zmiany i przenoszenie materiału genetycznego (DNA) pomiędzy organizmami**

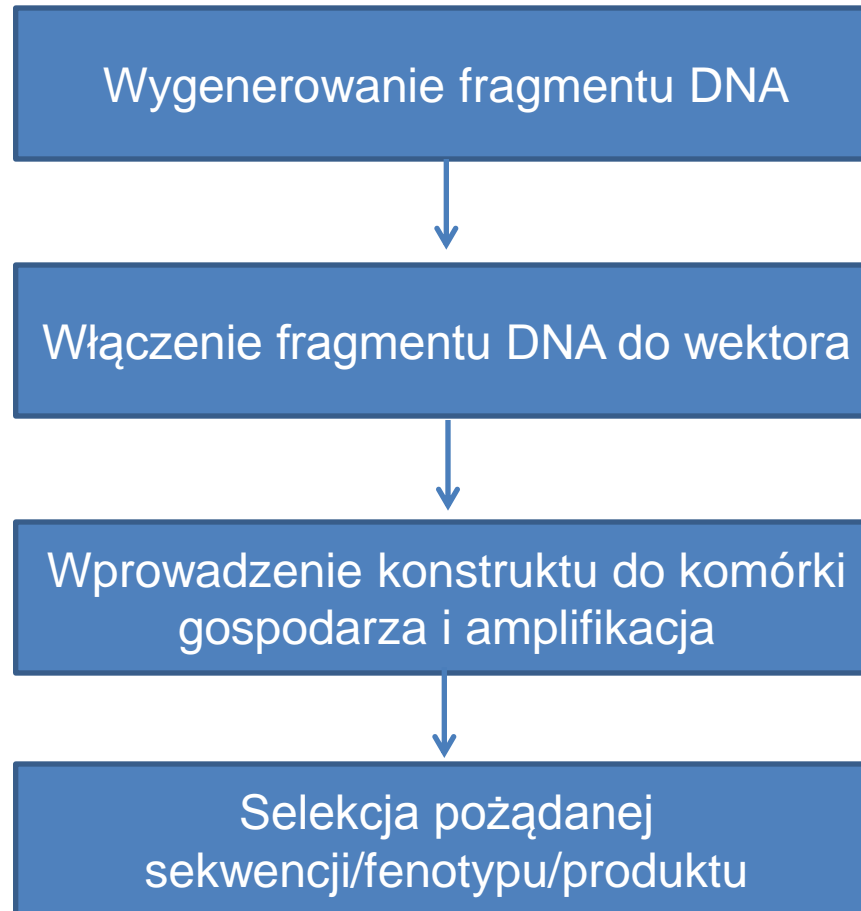
* W 1941 Duński mikrobiolog A. Jost pierwszy użył tego terminu publicznie podczas wykładu o rozmnażaniu drożdży wygłoszonego w Instytucie Technicznym we Lwowie

- Inżynieria genetyczna – inne terminy opisujące technologię
 - **Manipulacja genami**
 - **Klonowanie genów**
 - **Technologia rekombinowanego DNA**
 - **Modyfikacja genetyczna**
 - **Nowa genetyka**

Metody inżynierii genetycznej mogą mieć zastosowanie w:

- Badaniach podstawowych nad strukturą i funkcją genu
- Produkcji białek nowymi, wydajniejszymi metodami
- Generowaniu transgeniczných roślin i zwierząt
- Diagnostyce i terapii w medycynie
- Analizach molekularnych z użyciem technologii sekwencjonowania DNA

Etapy w eksperymencie klonowania genu



Dowody eksperymentalne na DNA jako materiał genetyczny

- W **1859** Charles Darwin publikuje "On the Origin of Species" proponuje, że ewolucja odbywa się na drodze selekcji naturalnej – podstawy genetyki nie są znane by wesprzeć teorię Darwina
- W **1865** Grzegorz Mendel prezentuje prawo dziedziczenia, a w 1866 publikuje "Experiments in Plant-Hybridization," gdzie opisuje niewidoczne jednostki („**factors**”) informacji odpowiedzialne za obserwowane cechy u *Pisum sativum* (groszek zielony), a jednostki te, podstawa dziedziczenia, są przekazywane kolejnym generacjom organizmów



Dowody eksperymentalne na DNA jako materiał genetyczny

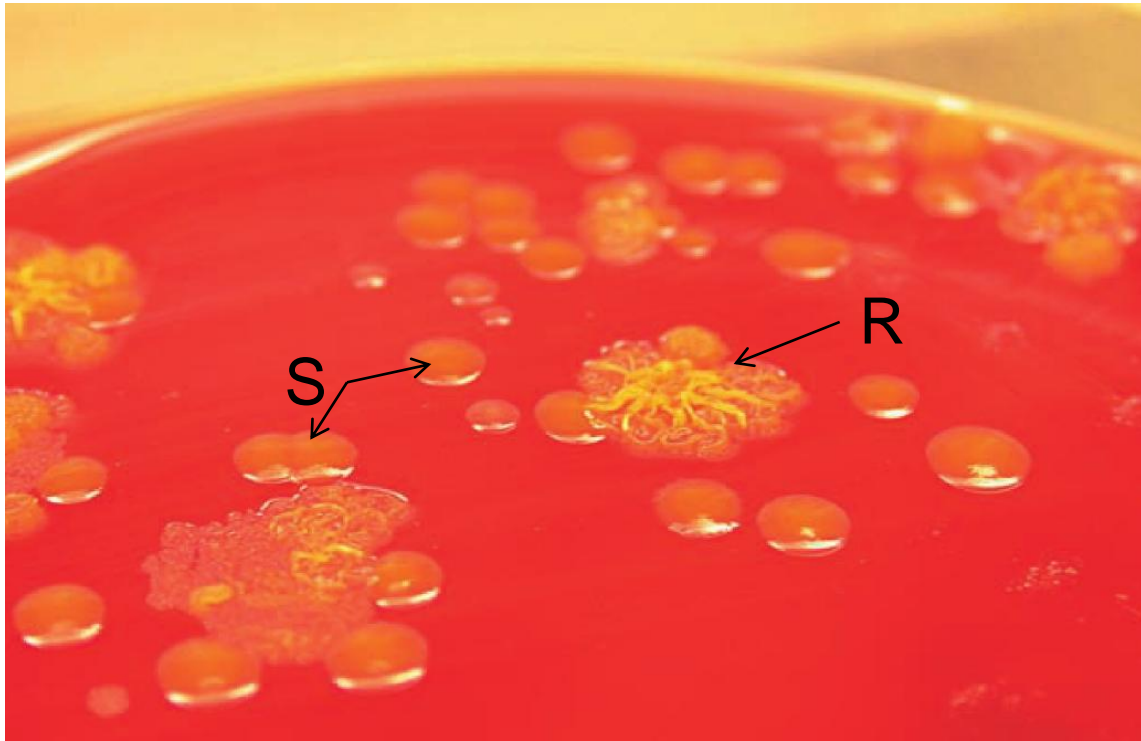
- W **1869** Friedrich Miescher izoluje kwaśną, bogatą w fosfor substancję z jąder komórek krwi i nazywa ją **nukleina**
- W latach **1879-1882** Niemiec Walter Flemming obserwuje i **opisuje proces mitozy**, odkrywa chromatynę, która przybiera strukturę **chromosomów** w trakcie podziału komórkowego
- W **1887** Edouard-Joseph-Louis-Marie van Beneden odkrywa, że każdy gatunek posiada charakterystyczną liczbę chromosomów; opisuje również tworzenie komórek haploidalnych podczas podziału komórek rozrodczych (**mejoza**)
- W **1889** August Weissman publikuje manuskrypt, w którym sugeruje, że materialna podstawa dziedziczenia mieści się w chromosomach

Dowody eksperymentalne na DNA jako materiał genetyczny

- Przełom XIX i XX wieku to odkrycie na nowo praw dziedziczenia Grzegorza Mendela
- W **1902** Walter Stanborough Sutton sugeruje, że medlowskie “factors” są zlokalizowane na chromosomach oraz, że kopia każdego z chromosomów jest dziedziczona od rodziców. Po raz pierwszy użył terminu „**gen**” (greckie *genos*, narodziny)
- W **1909** Wilhelm Johannsen used proponuje termin “**gen**” jako czynnik dziedziczenia, używa terminów “**genotyp**” do opisanie zespołu genów organizmu warunkujących jego właściwości dziedziczne oraz “**fenotyp**” do opisu wyglądu organizmu

Dowody eksperymentalne na DNA jako materiał genetyczny

Transformacja genetyczna eksperyment Fredericka Griffitha 1923

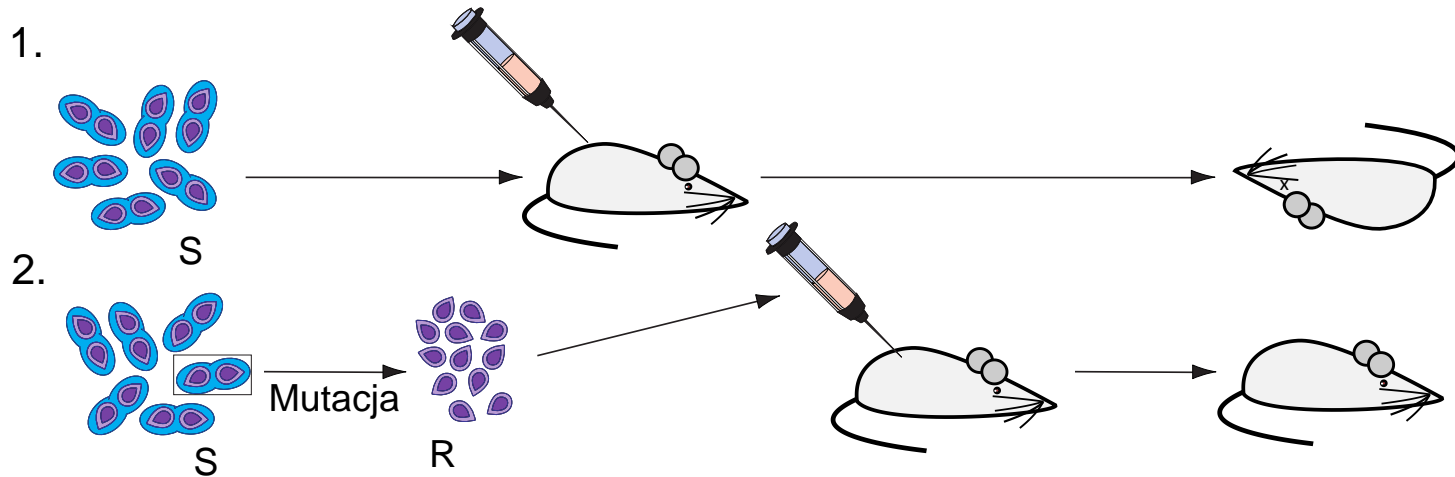


<http://news.sciencemag.org/sciencenow/2001/07/20-02.html?ref=hp>

Streptococcus pneumoniae (Dwoinka zapalenia płuc) dwie formy: gładka smooth (S) oraz krzaczkowata rough (R) – posiada spontaniczną mutację w genie kodującym enzym odpowiedzialny za produkcję polisacharydowej otoczki

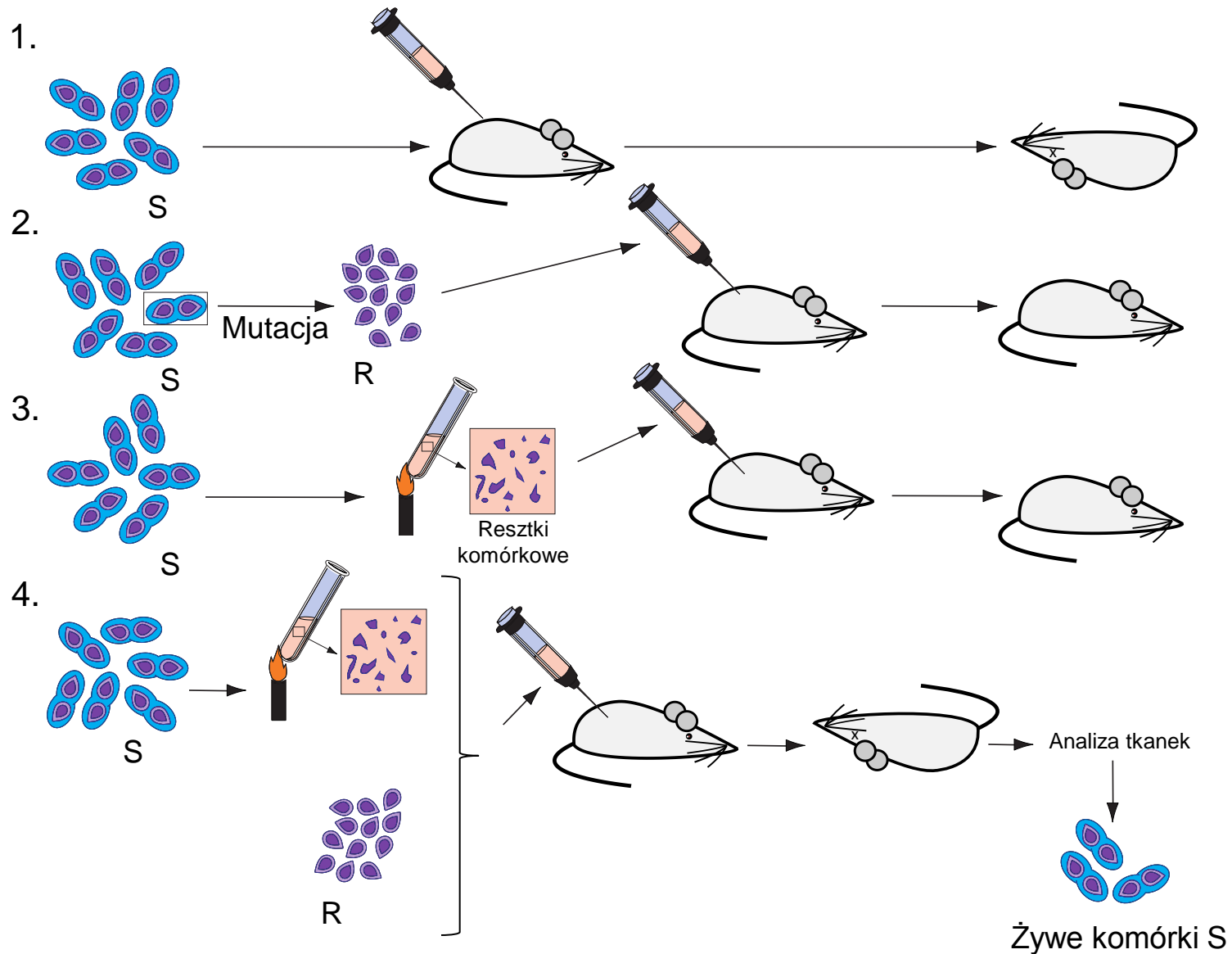
Dowody eksperymentalne na DNA jako materiał genetyczny

Transformacja genetyczna eksperyment Fredericka Griffitha 1923



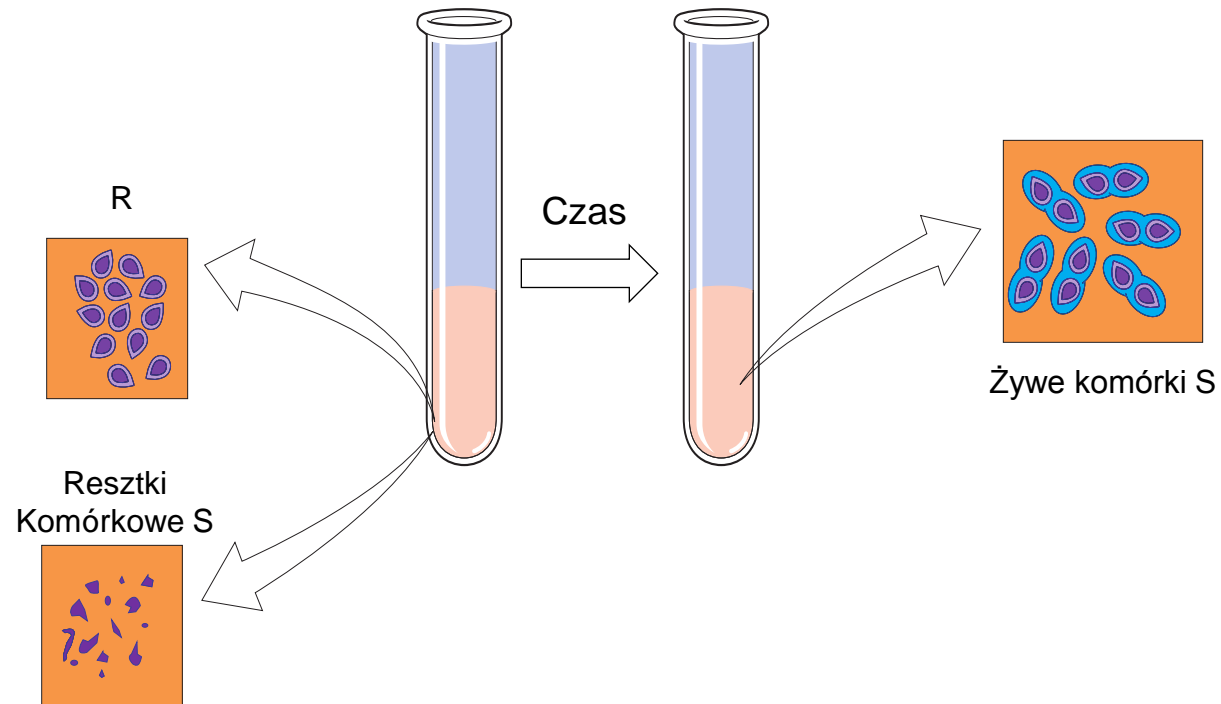
Dowody eksperymentalne na DNA jako materiał genetyczny

Transformacja genetyczna eksperyment Fredericka Griffitha 1923



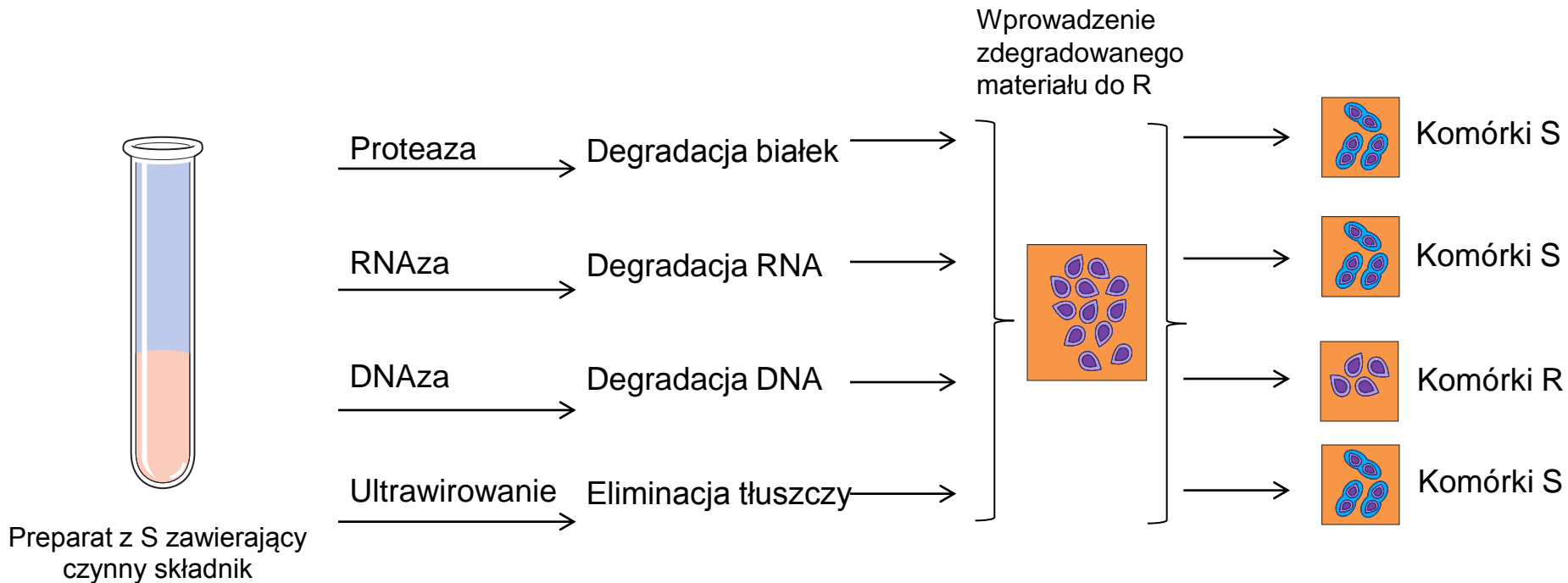
Dowody eksperymentalne na DNA jako materiał genetyczny

Doświadczenie Oswalda Avery'ego 1931-1944 w poszukiwaniu „składnika czynnego”



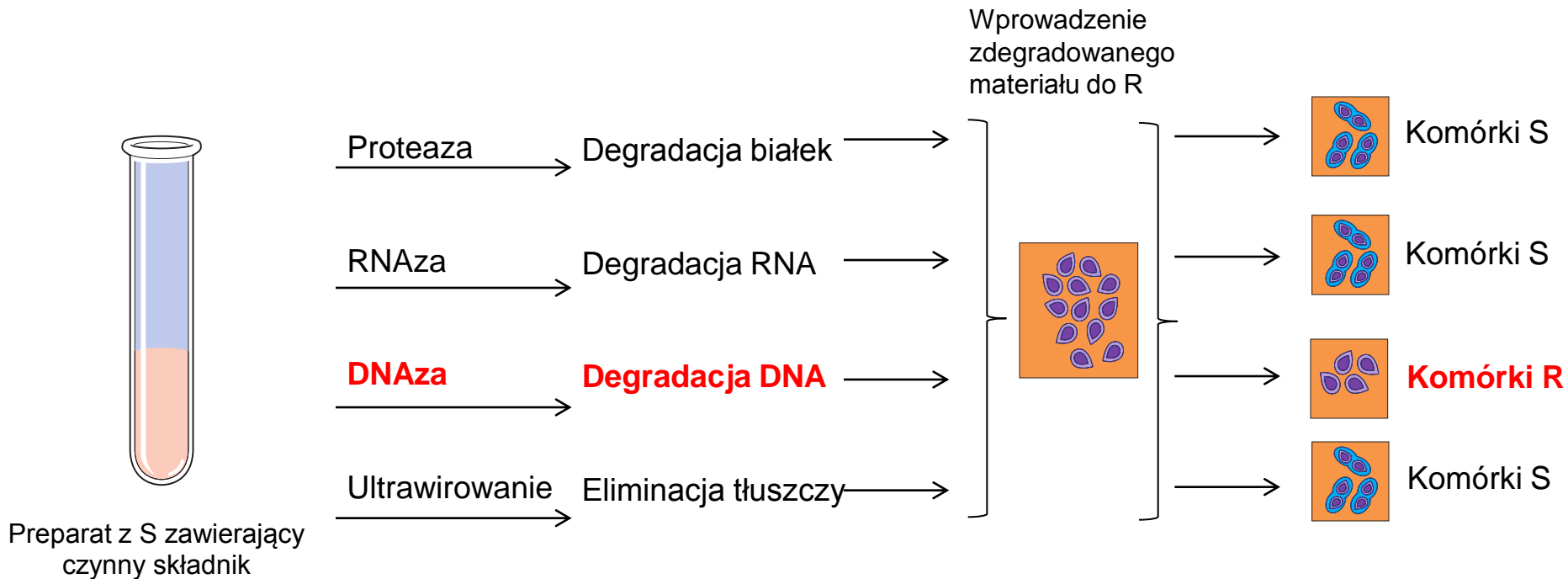
Dowody eksperymentalne na DNA jako materiał genetyczny

Doświadczenie Oswalda Avery'ego 1931-1944 w poszukiwaniu „składnika czynnego”



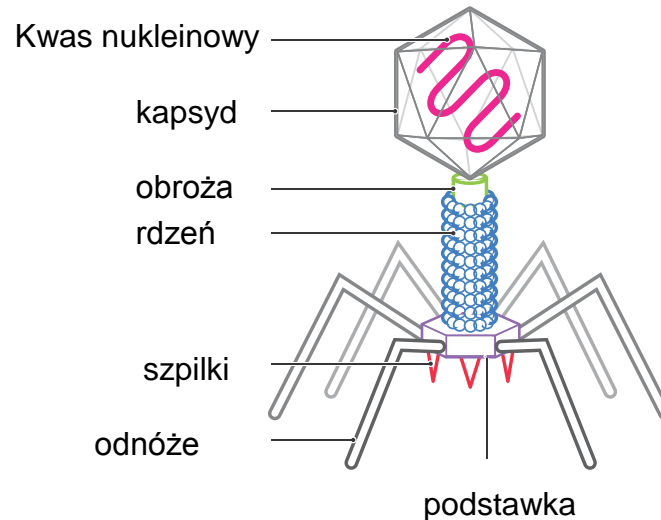
Dowody eksperymentalne na DNA jako materiał genetyczny

Doświadczenie Oswalda Avery'ego 1931-1944 w poszukiwaniu „składnika czynnego”



Dowody eksperymentalne na DNA jako materiał genetyczny

Doświadczenie Alfreda Hersheya i Marty Chase 1952

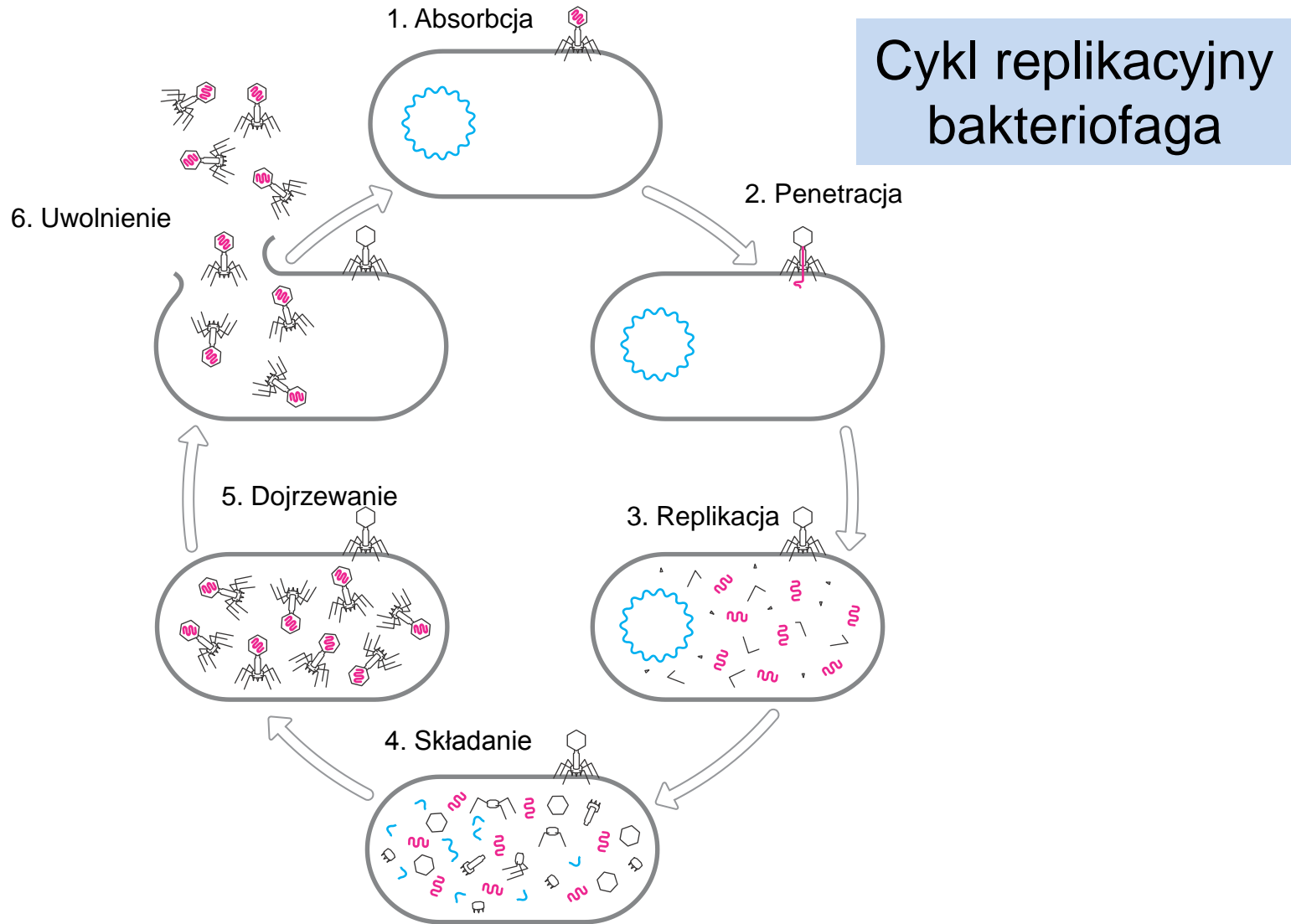


Budowa bakteriofaga

Bakteriofag – wewnątrzkomórkowy pasożyt bakterii zdolny do reprodukcji, ale pozbawiony własnego metabolizmu

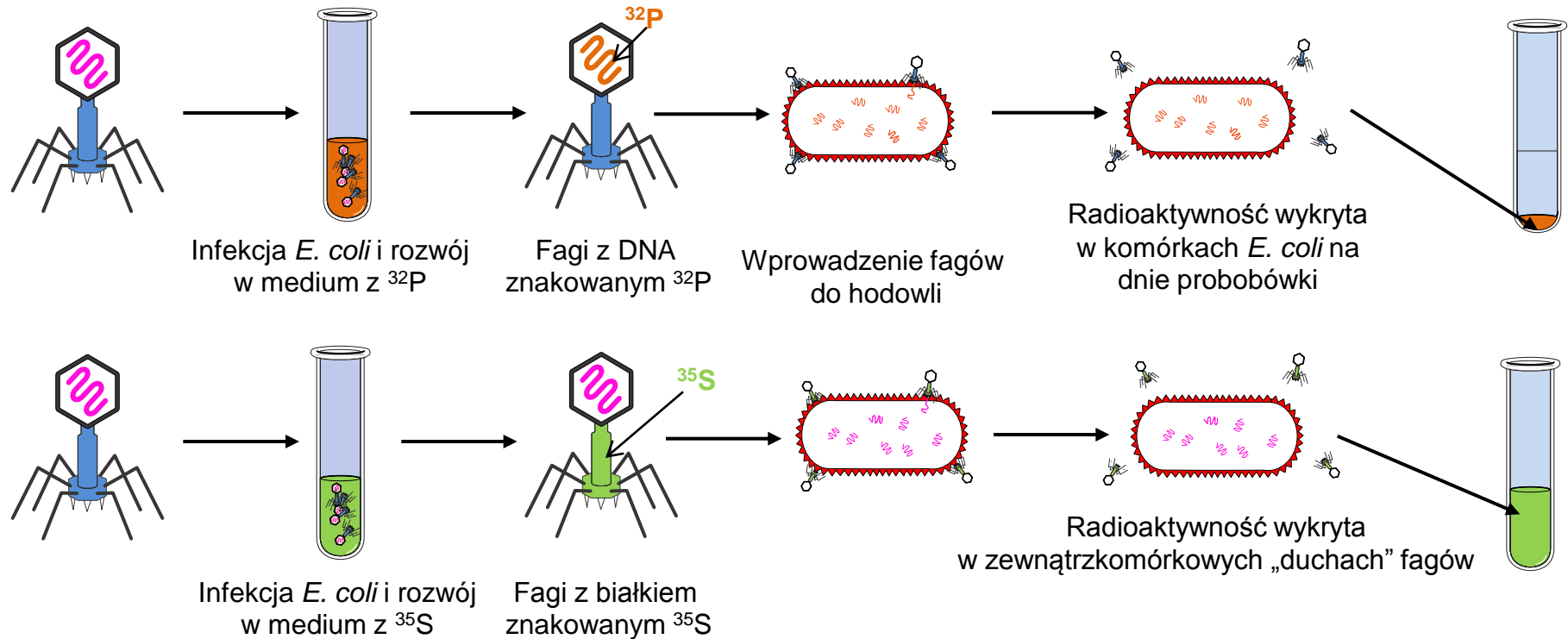
Dowody eksperymentalne na DNA jako materiał genetyczny

Doświadczenie Alfreda Hersheya i Marty Chase 1952



Dowody eksperymentalne na DNA jako materiał genetyczny

Doświadczenie Alfreda Hersheya i Marty Chase 1952



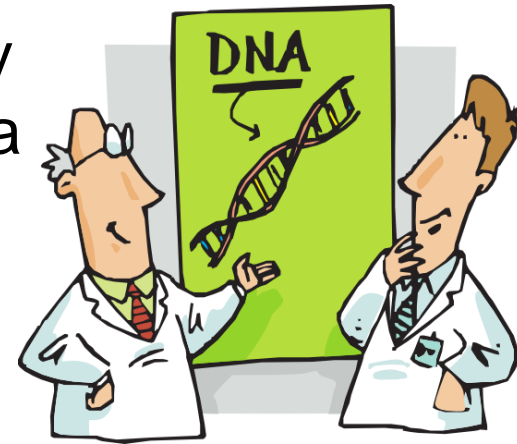
Radioaktywność wykryta w komórkach *E. coli* – geny faga znajdują się w DNA!

Dowody eksperymentalne na DNA jako materiał genetyczny

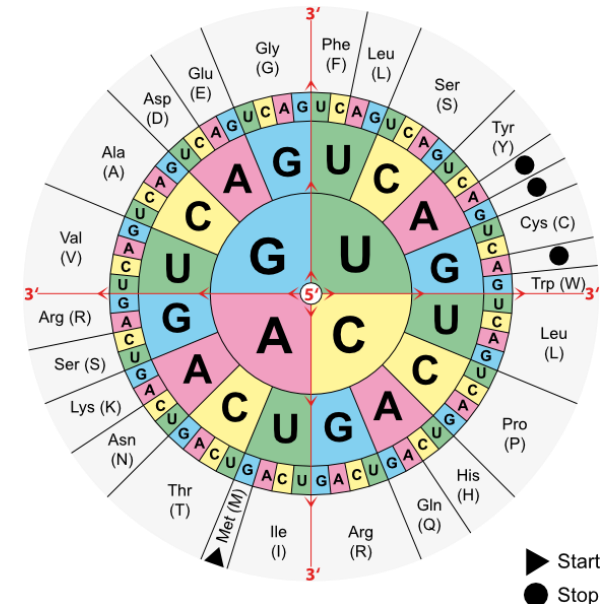
- Eksperymenty przeprowadzone do połowy XX wieku wskazały na DNA jako materiał genetyczny
- DNA zostało zidentyfikowane jako składnik chromosomów
- DNA było odpowiedzialne za transformację bakterii
- Udowodniono, że DNA jest związkiem zawierającym informację, którą bakteriofagi wstrzykują infekowanym bakteriom

Dowody eksperymentalne na DNA jako materiał genetyczny

- Odkrycie struktury DNA – podwójnej helisy – przez Jamesa Watsona i Francis Cricka w **1953** zastymulowało rozwój genetyki na poziomie molekularnym



- W ciągu kilku następnych lat opisano właściwości i transkrypcję genów
- Kumulacją tych odkryć było opisanie w **1966** roku kompletnego **kodu genetycznego**



- W **1967** roku zostaje zidentyfikowany enzym **ligaza** – narzędzie molekularne („**klej**”) umożliwiające łączenie fragmentów DNA – tworzenie wiązania fosfodiesterowego pomiędzy nukleotydami
- W **1970** izolacja pierwszego **enzymu restrykcyjnego** – narzędzie molekularne („**nożyczki**”) specyficznie rozpoznające i tnące zdefiniowaną sekwencję DNA
- W **1972** Paul Berg na Uniwersytecie Stanforda łączy dwa fragmenty DNA – powstaje **hybryda** wirusa SV40 oraz bakteriofaga lambda – nakłada auto-moratorium w obawie przed konsekwencjami transformacji do bakterii

- W **1973** Stanley Cohen oraz Herbert Boyer po raz pierwszy włączają obcy fragment DNA (*Xenopus laevis*, gen kodujący rRNA) do DNA bakteryjnego (pSC101 plazmid) – tworzą **rekombinowane DNA**, a szeroko informująca o wydarzeniu prasa codzienna preferuje termin „**inżynieria genetyczna**”

Proc. Nat. Acad. Sci. USA
Vol. 71, No. 5, pp. 1743–1747, May 1974

Replication and Transcription of Eukaryotic DNA in *Escherichia coli*

(restriction/plasmid/transformation/recombination/ribosomal DNA)

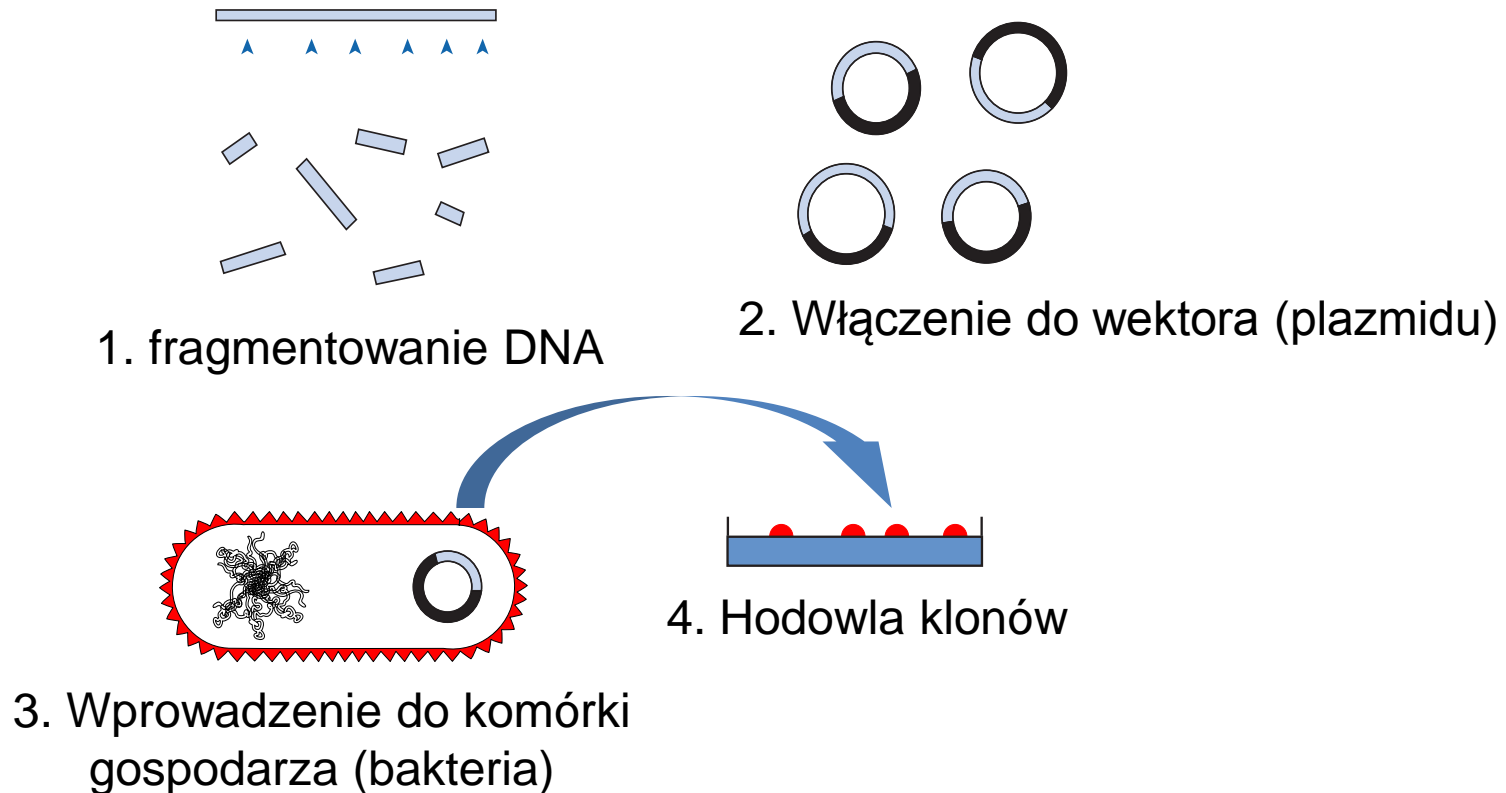
JOHN F. MORROW*†‡, STANLEY N. COHEN†, ANNIE C. Y. CHANG†, HERBERT W. BOYER§, HOWARD M. GOODMAN¶, AND ROBERT B. HELLING§||

Departments of *Biochemistry and †Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305; and Departments of §Microbiology and ¶Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, Calif. 94143

Communicated by Joshua Lederberg, January 4, 1974

ABSTRACT Fragments of amplified *Xenopus laevis* DNA, coding for 18S and 28S ribosomal RNA and generated by *EcoRI* restriction endonuclease, have been linked *in vitro* to the bacterial plasmid pSC101; and the recombinant molecular species have been introduced into *E. coli* by transformation. These recombinant plasmids, containing both eukaryotic and prokaryotic DNA, replicate stably in *E. coli*. RNA isolated from *E. coli* minicells harboring the plasmids hybridizes to amplified *X. laevis* rDNA.

Klonowanie fragmentów DNA

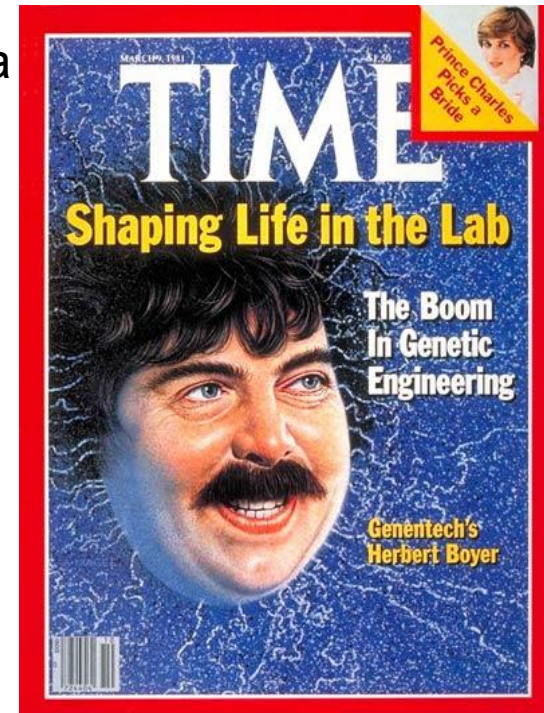


Termin „klon” wywodzi się od identycznych kolonii komórek gospodarza wyhodowanych w trakcie amplifikacji klonowanego fragmentu. **Klonowanie genów** jest stosowane zamiennie z **klonowaniem molekularnym** by rozróżnić je od procesu klonowania całego organizmu wielokomórkowego.

Inżynieria genetyczna – komercjalizacja

- Pomimo kontrowersji oraz publicznych obaw związanych z klonowaniem już w **1976** roku powstała pierwsza firma biotechnologiczna **Genentech** założona przez Boyera
- W **1977** Boyer oraz Keiichi Itakura wyprodukowali pierwsze ludzkie białko w bakteriach - **somatostatyna** - hormon wydzielany głównie przez podwzgórze w mózgu, blokuje wydzielanie hormonu wzrostu przez przysadkę mózgową oraz hamuje wydzielanie insuliny
- W **1978** Boyer oraz Keiichi Itakura skonstruowali plazmid z ludzką **insuliną**, zawiązali współpracę z Eli Lilly na produkcją **Humulin'y**, która w **1982** roku została pierwszym zatwierdzonym przez FDA produktem inżynierii genetycznej na rynku

Herbert Boyer
Mar. 9, 1981

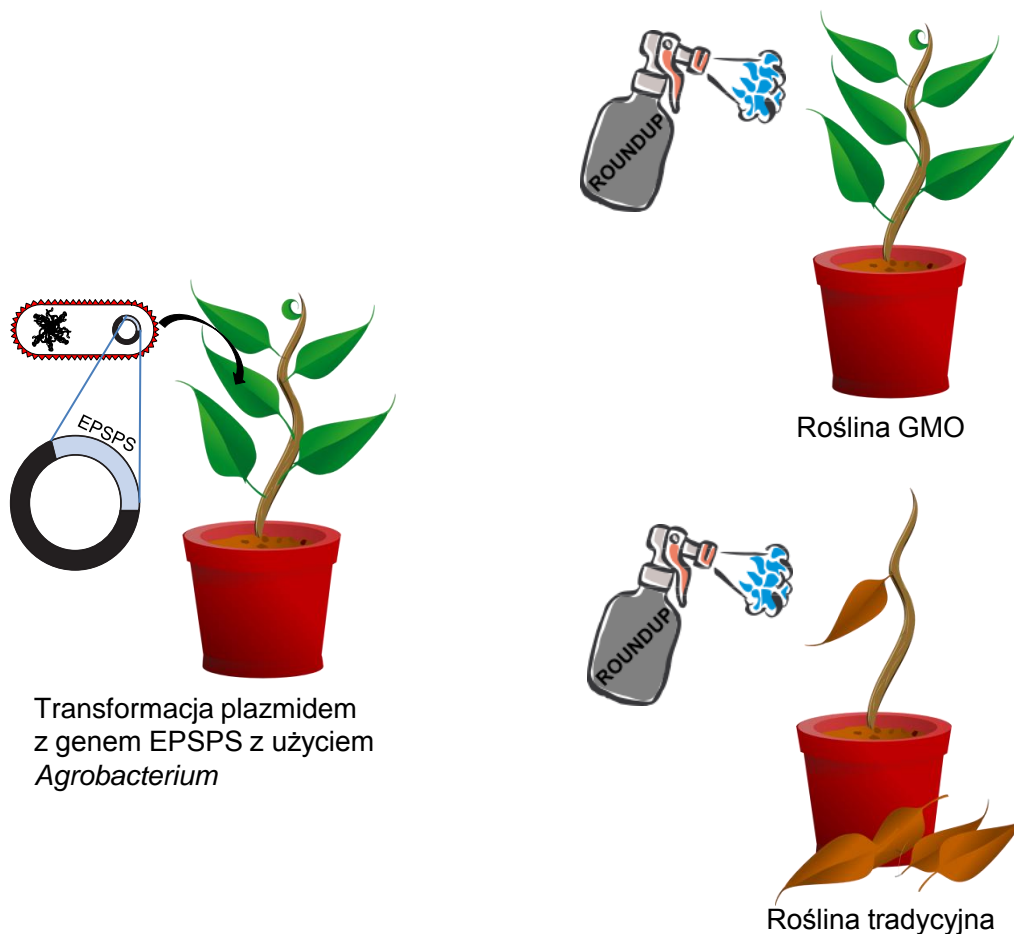


<http://www.time.com/time/covers/0,16641,19810309,00.html>

- Organizmy genetycznie zmodyfikowane, czyli w skrócie GMO (z ang. Genetically Modified Organism) według art. 3 ustawy z dnia 22 czerwca 2001 roku o organizmach genetycznie zmodyfikowanych jest to „**organizm inny niż ludzki, w którym materiał genetyczny został zmieniony w sposób nie zachodzący w warunkach naturalnych, wskutek krzyżowania lub naturalnej rekombinacji, a w szczególności z użyciem:**
- a) technik rekombinacji DNA z użyciem wektorów, w tym tworzenia materiału genetycznego poprzez włączenie do wirusa, plazmidu lub każdego innego wektora cząsteczek DNA wytworzonych poza organizmem i włączenie ich do organizmu biorcy, w którym w warunkach naturalnych nie występują, ale w którym są zdolne do ciągłego powielania,
- b) technik stosujących bezpośrednie włączenie materiału dziedzicznego przygotowanego poza organizmem, a w szczególności: mikroiniekcji, makroiniekcji i mikrokapsułkowania,
- c) metod niewystępujących w przyrodzie dla połączenia materiału genetycznego co najmniej dwóch różnych komórek, gdzie w wyniku zastosowanej procedury powstaje nowa komórka zdolna do przekazywania swego materiału genetycznego odmiennego od materiału wyjściowego komórkom potomnym” [Dz.U. 2001 nr 76 poz. 811]

Inżynieria genetyczna – GMO (genetically modified organism)

- Oporność na herbicydy** - glifosat, składnik aktywny produktu Roundup, hamuje aktywność enzymu (EPSPS) szlaku wytwarzania aminokwasów aromatycznych, które są niezbędne do prawidłowego wzrostu rośliny. Roślina GMO, np. burak cukrowy, posiada kopię enzymu odpornego na glifosat.



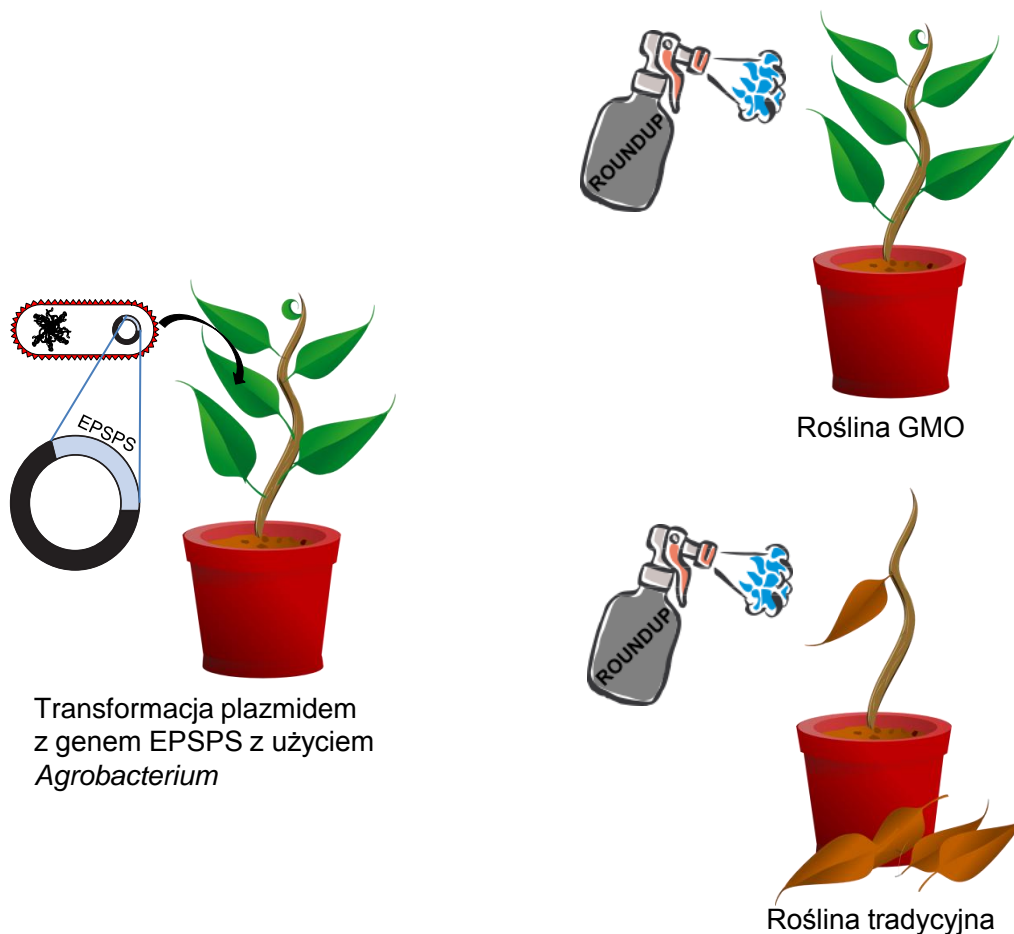
Uprawa buraka cukrowego GMO



<http://www.gmo-compass.org>

Inżynieria genetyczna – GMO (genetically modified organism)

- Oporność na herbicydy** - glifosat, składnik aktywny produktu Roundup, hamuje aktywność enzymu (EPSPS) szlaku wytwarzania aminokwasów aromatycznych, które są niezbędne do prawidłowego wzrostu rośliny. Roślina GMO, np. burak cukrowy, posiada kopię enzymu odpornego na glifosat.



Uprawa buraka cukrowego GMO



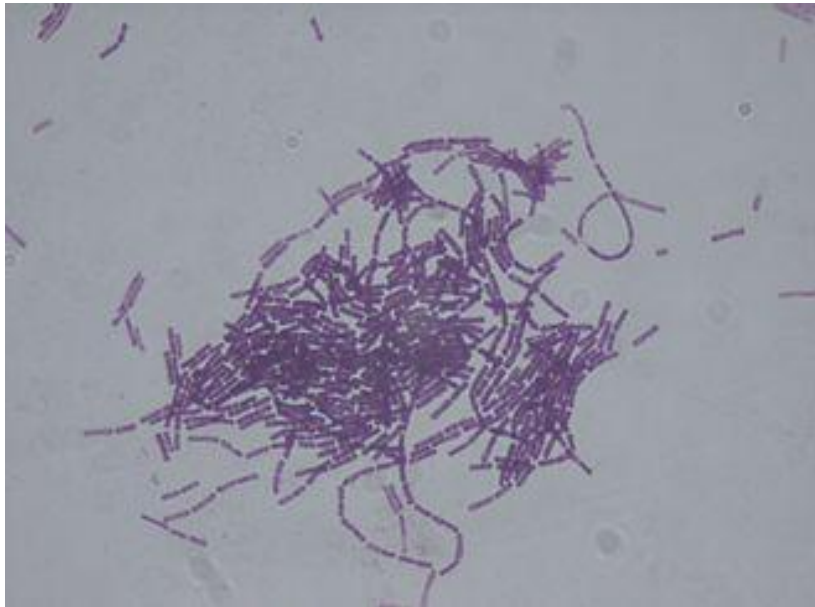
<http://www.gmo-compass.org>

Inżynieria genetyczna – GMO (genetically modified organism)

- **Oporność na owady** – białko **Cry1Ab**, pochodzące z bakterii *Bacillus Thuringiensis* wprowadzono do kukurydzy **MON 810**, zwalcza skutecznie **Omacnicę Prosoviankę**

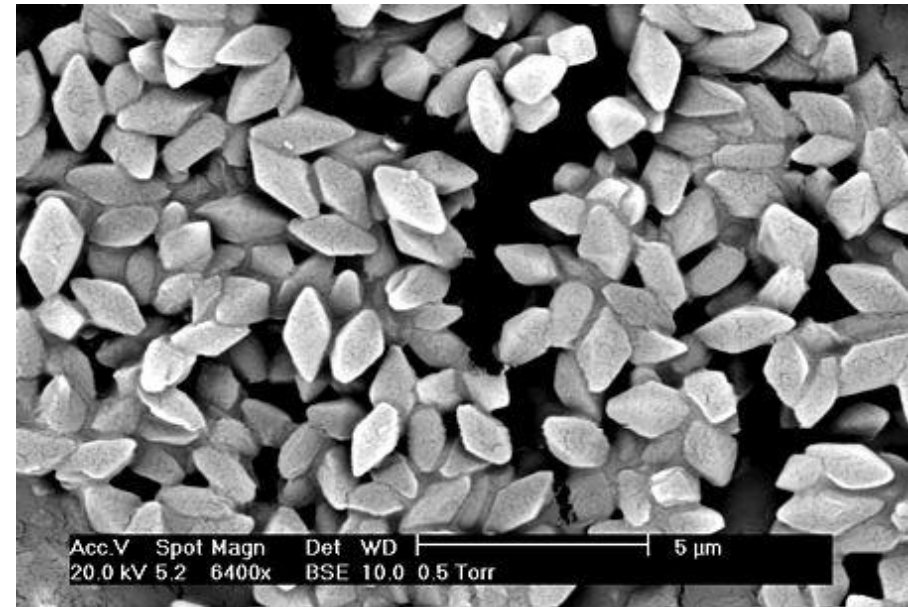


<http://www.gmo-compass.org>



Bacillus thuringiensis 1000x powiększenie

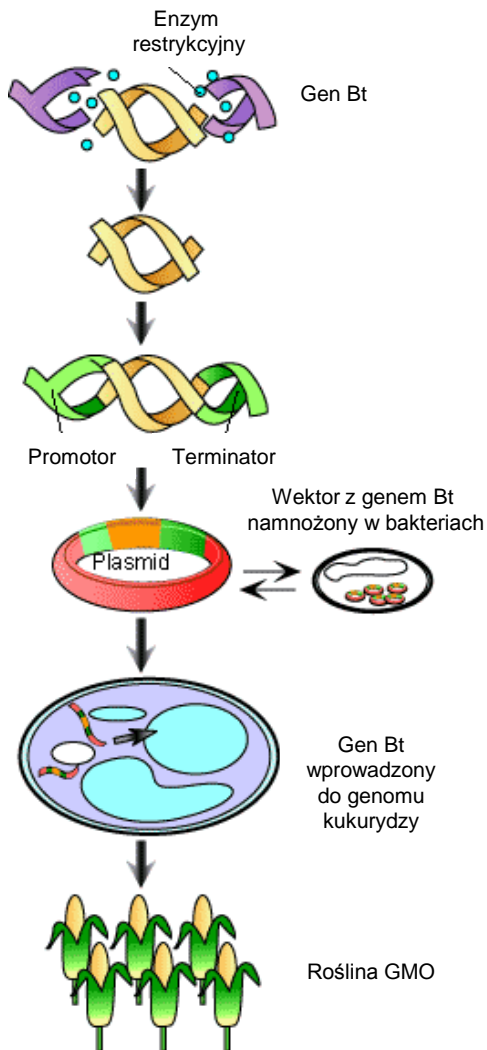
http://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_thuringiensis



Kryształy toksyny Bt

Inżynieria genetyczna – GMO (genetically modified organism)

- Oporność na owady** – białko **Cry1Ab**, pochodzące z bakterii *Bacillus Thuringensis* wprowadzono do kukurydzy **MON 810**, zwalcza skutecznie **Omacnicę Prosoviankę**



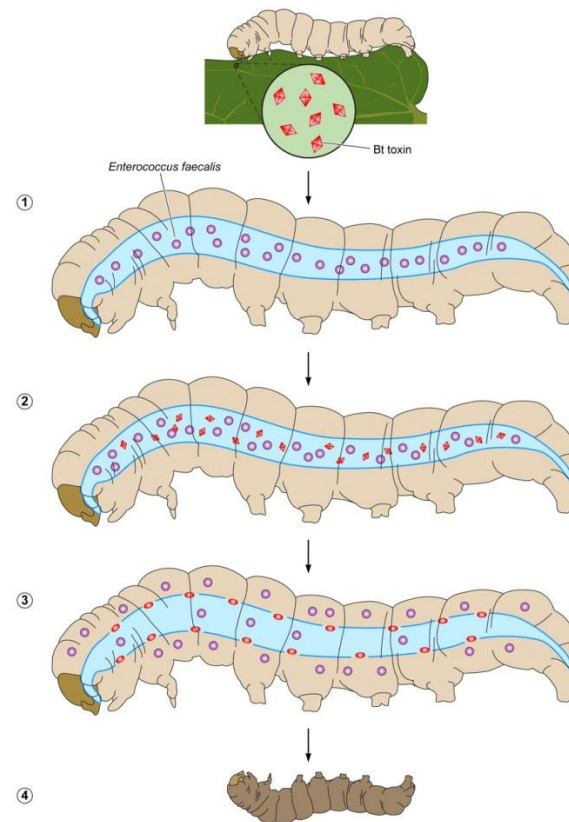
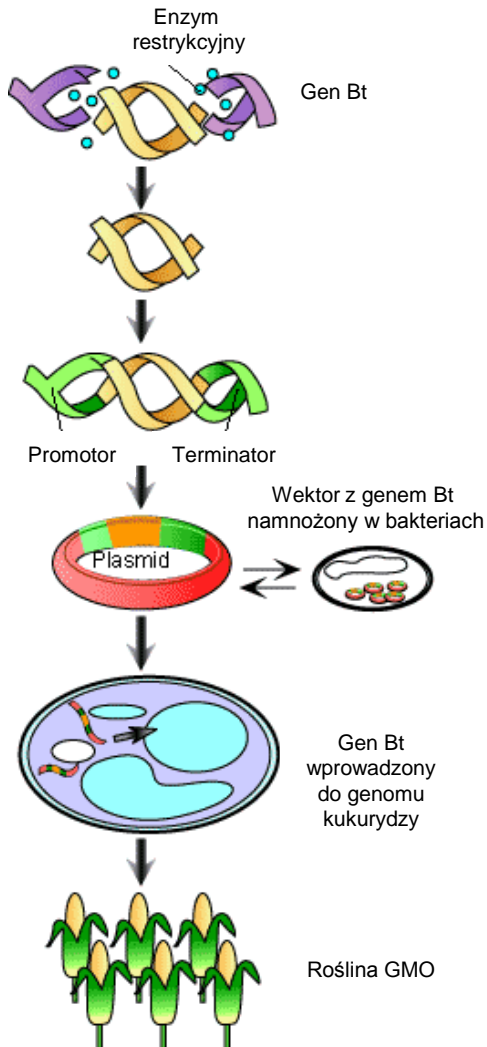
<http://www.gmo-compass.org>

Inżynieria genetyczna – GMO (genetically modified organism)

- Oporność na owady** – białko **Cry1Ab**, pochodzące z bakterii *Bacillus Thuringiensis* wprowadzono do kukurydzy **MON 810**, zwalcza skutecznie **Omacnicę Prosoviankę**



<http://www.gmo-compass.org>



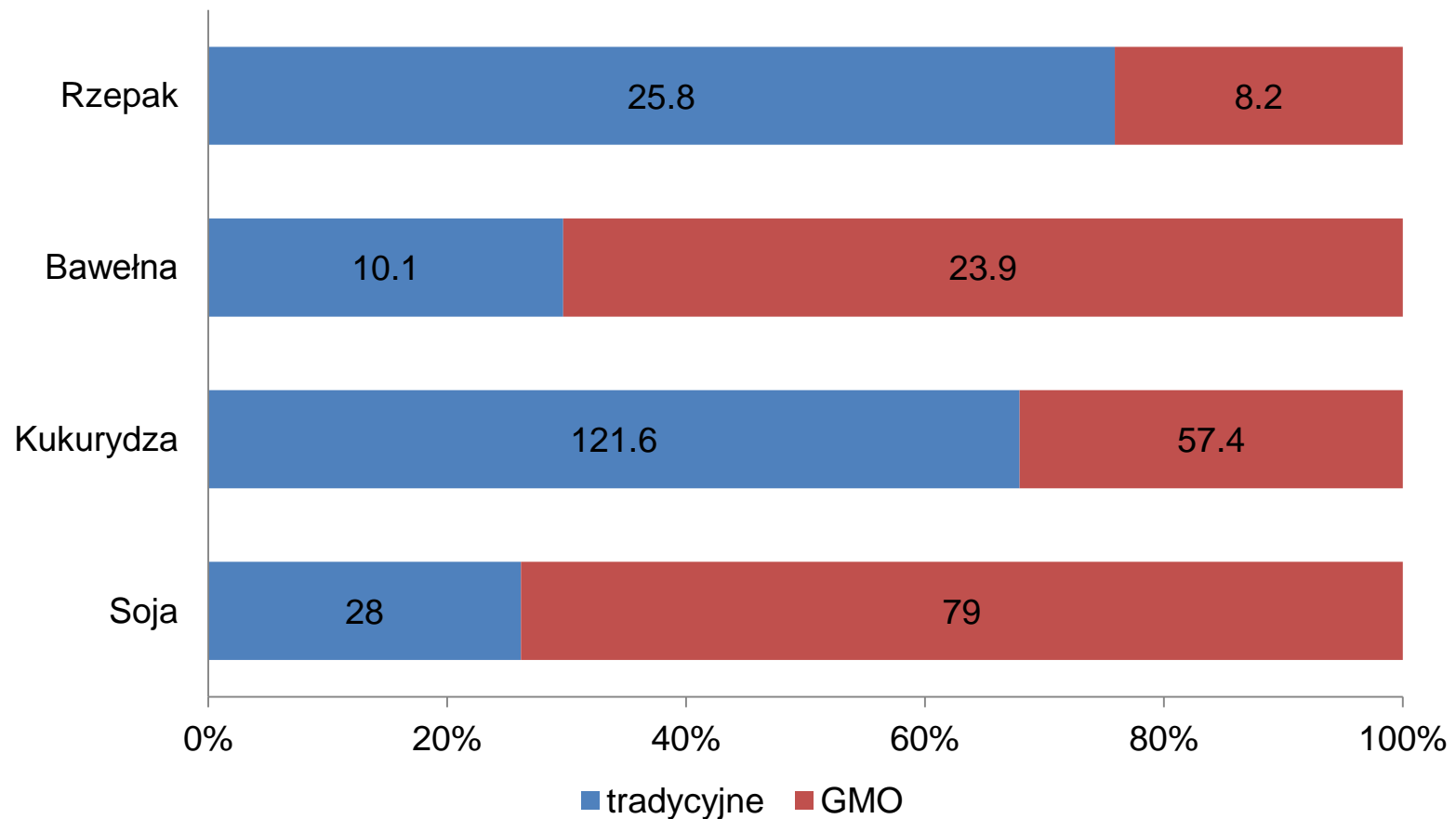
Joerg Graf mBio 2011; doi:10.1128/mBio.00161-11

Inżynieria genetyczna – GMO (genetically modified organism)

- Oporność na choroby wywoływane przez grzyby, wirusy i nicienie
- Rośliny ze zmienioną kompozycją np. ziemniak Amflora wytwarzający pożądaną rodzaj skrobi tzw. amylopektynę
- BioFarmacja – immunizacja/wprowadzenie antygeny w pożywieniu
- Oporność na stres – brak wody, zasolenie
- Eliminowanie zanieczyszczeń ze środowiska

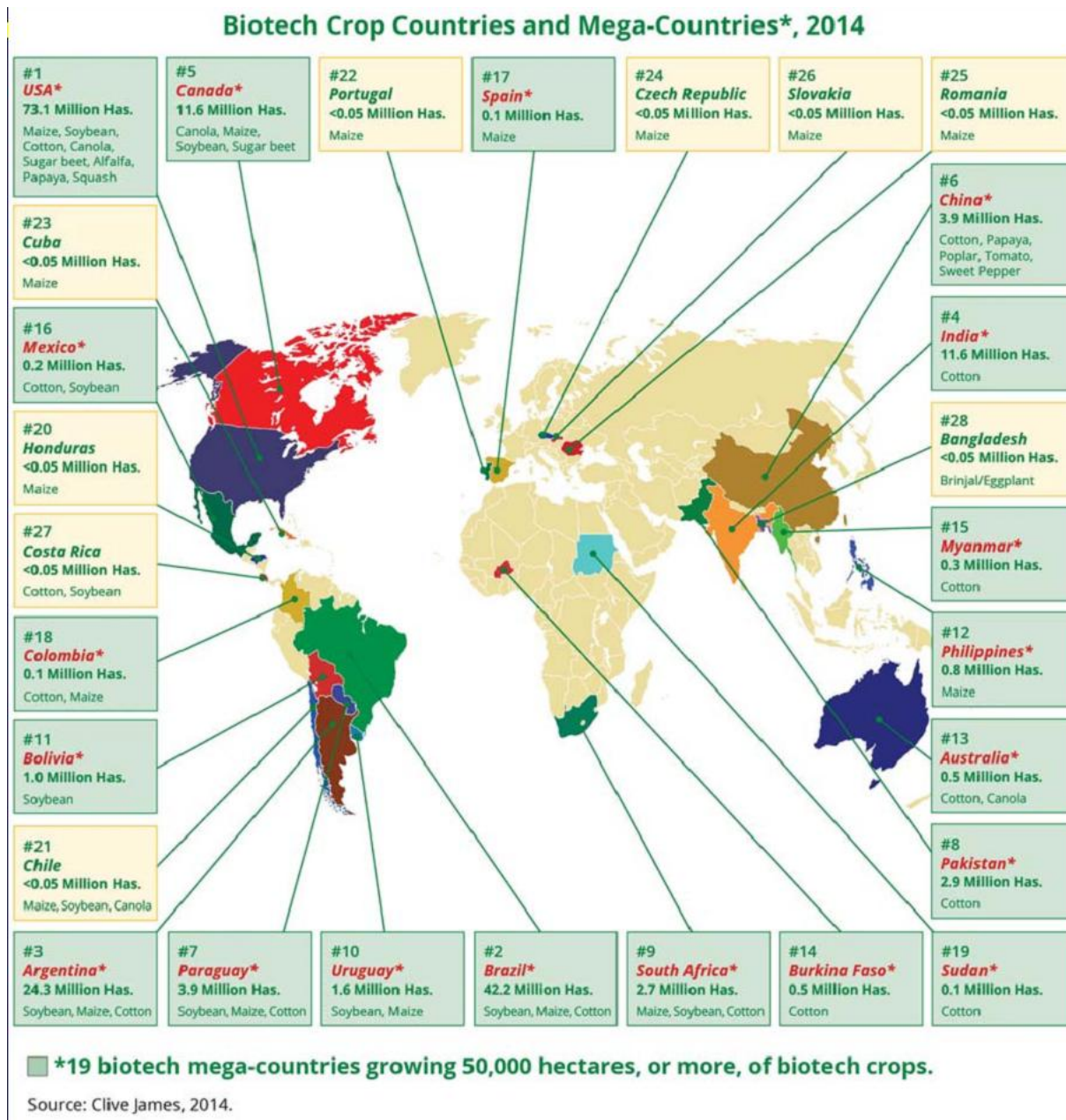
GMO - uprawy na świecie

Rośliny GMO: areał światowy w 2013 roku w Mln hektarów
(<http://www.gmo-compass.org>)

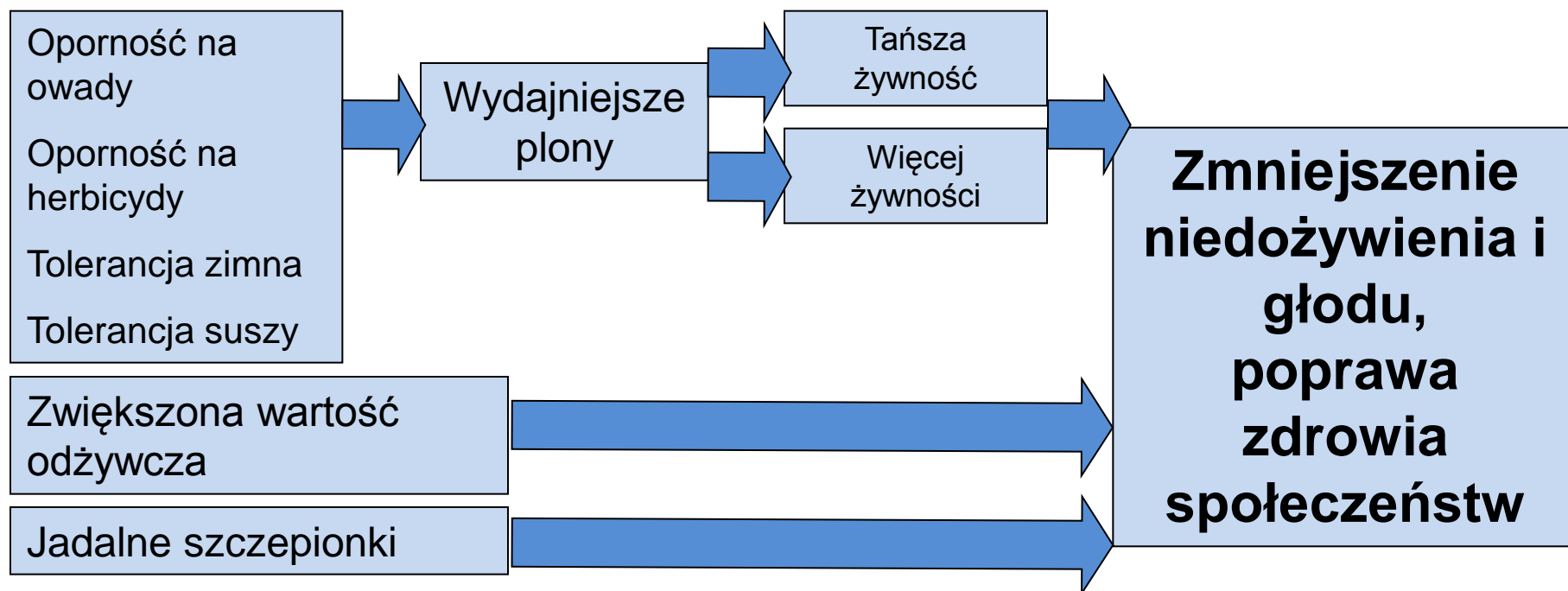


Areał całkowity ~ 174 Mln hektarów

GMO - uprawy na świecie 2014



Dla ludzkości:



Dla środowiska: zmniejszenie użycia herbicydów i insektycydów w rolnictwie.

GMO - potencjalne zagrożenia środowiskowe

- Możliwe obniżenie skuteczności pestycydów w momencie, gdy owady uodpornią się na rekombinowane białka
- Obniżenie bioróżnorodności
- Transfer genów do niepożądanych gatunków
 - Odporne na herbicydy gatunki roślin GMO mogą skrzyżować się z roślinami w naturze
 - Metody przeciwdziałania:
 - Tworzenie sterylnych nie produkujących pyłku roślin
 - Stworzenie metodami inżynierii roślin, których pyłek nie zawiera obcych genów
 - Tworzenie stref buforowych upraw nie-GMO wokół pól z GMO.

Alergeny

- GMO może potencjalnie wprowadzić alergeny

Nieznane działania niepożądane

- Procesy biologiczne to olbrzymia liczba interakcji
- W praktyce trudno przewidzieć wszystkie interakcje

- Zmniejszenie konkurencyjności na rynku
 - Nasiona GMO są patentowane
- Sterylne nasiona powodują, że rolnicy są zmuszeni kupować je przed rozsiewem
- Jednak potencjalne straty w uprawach np. kukurydzy konwencjonalnej, rekompensują wydatki na nasiona GMO

GMO - kontrola bezpieczeństwa na przykładzie białka Cry1Ab

- Żadna nowa odmiana rośliny, uzyskana zarówno przy pomocy metod inżynierii genetycznej jak i konwencjonalnego krzyżowania, w myśl obowiązujących przepisów, nie może zostać dopuszczona do hodowli i obrotu bez udowodnienia, że jest ona równie bezpieczna jak inne tradycyjne odmiany.
- wpływu białka Cry1Ab na organizmy małych ssaków (myszy)
- rozkład białka Cry1Ab w symulowanym przewodzie pokarmowym
- badanie alergenicności – metody *in silico*
- Badania toksyczności niespecyficycznej na organizmach występujących na uprawach np. pszczoł
- Badanie rozkładu w glebie
- Krzyżowanie z innymi odmianami kukurydzy

- Kukurydza **MON 810** oraz ziemniak **Amflora** (od 2010) były roślinami transgenicznymi, dopuszczonymi do uprawy na terytorium UE
- W 2013 zakazano upraw ziemniaka Amflora w UE, decyzją Europejskiego Trybunału Sprawiedliwości (ETS) cofnięto autoryzację upraw Amflory
- W Polsce uprawy MON 810 w 2012 roku szacowano na 3-30 tys. hektarów, z przeznaczeniem na cele paszowe
- Zabroniony był i jest handel nasionami
- 21 grudnia 2012 Prezydent podpisał ustawę o nasiennictwie **dopuszczającą uprawy** roślin GMO
- 28 stycznia 2013 wprowadzono rozporządzeniem **zakaz uprawy** GMO w Polsce
- 16 stycznia 2015 Sejm uchwalił ustawę o GMO regulującą prace laboratoryjne (**zamknięte użycie**) z wykorzystaniem organizmów i mikroorganizmów genetycznie zmodyfikowanych (GMO i GMM). Prezydent podpisał ustawę 6 lutego 2015.

Inżynieria genetyczna – Wykład 1 – podsumowanie

