

Możliwości wykrywania, identyfikacji i monitorowania produktów powstałych przy zastosowaniu nowych technik genomowych

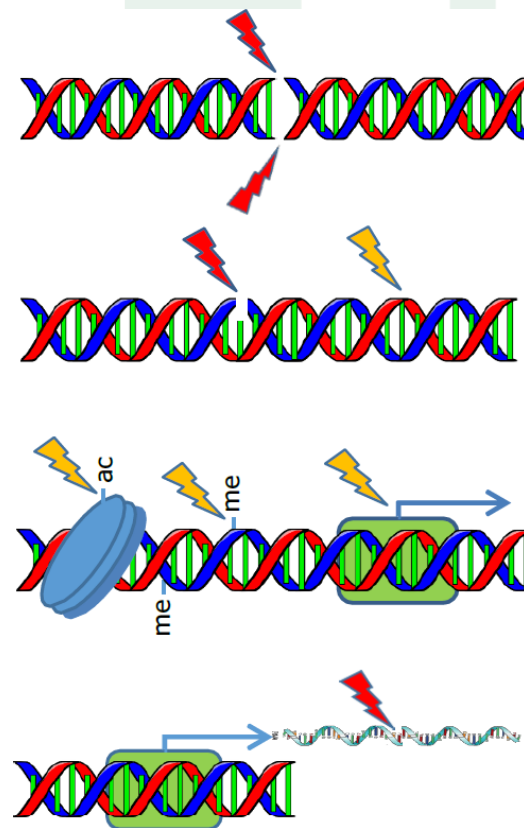
Sławomir Sowa
Laboratorium Kontroli GMO
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB

Nowe techniki genomowe - grupy

1. Różne warianty transformacji genetycznej
2. **Edytowanie genomu poprzez kierunkową mutagenезę lub modyfikację**
3. Negatywne segreganty (null segregants)

NGT – opracowywane są nowe metody

- 1 grupa: techniki wykorzystujące przerwanie dwuniciowego DNA
- 2 grupa: techniki indukujące przerwanie jednoniciowego DNA lub bez przerywania DNA.
- 3 grupa techniki modyfikacji epigenetycznych (grup metylowych, grup acetylowych DNA), białek histonowych, kompleksów transkrypcyjnych.
- 4 grupa: NGT działa na transkrybowane RNA



Edytowanie genomu poprzez kierunkową mutagenezę lub modyfikację

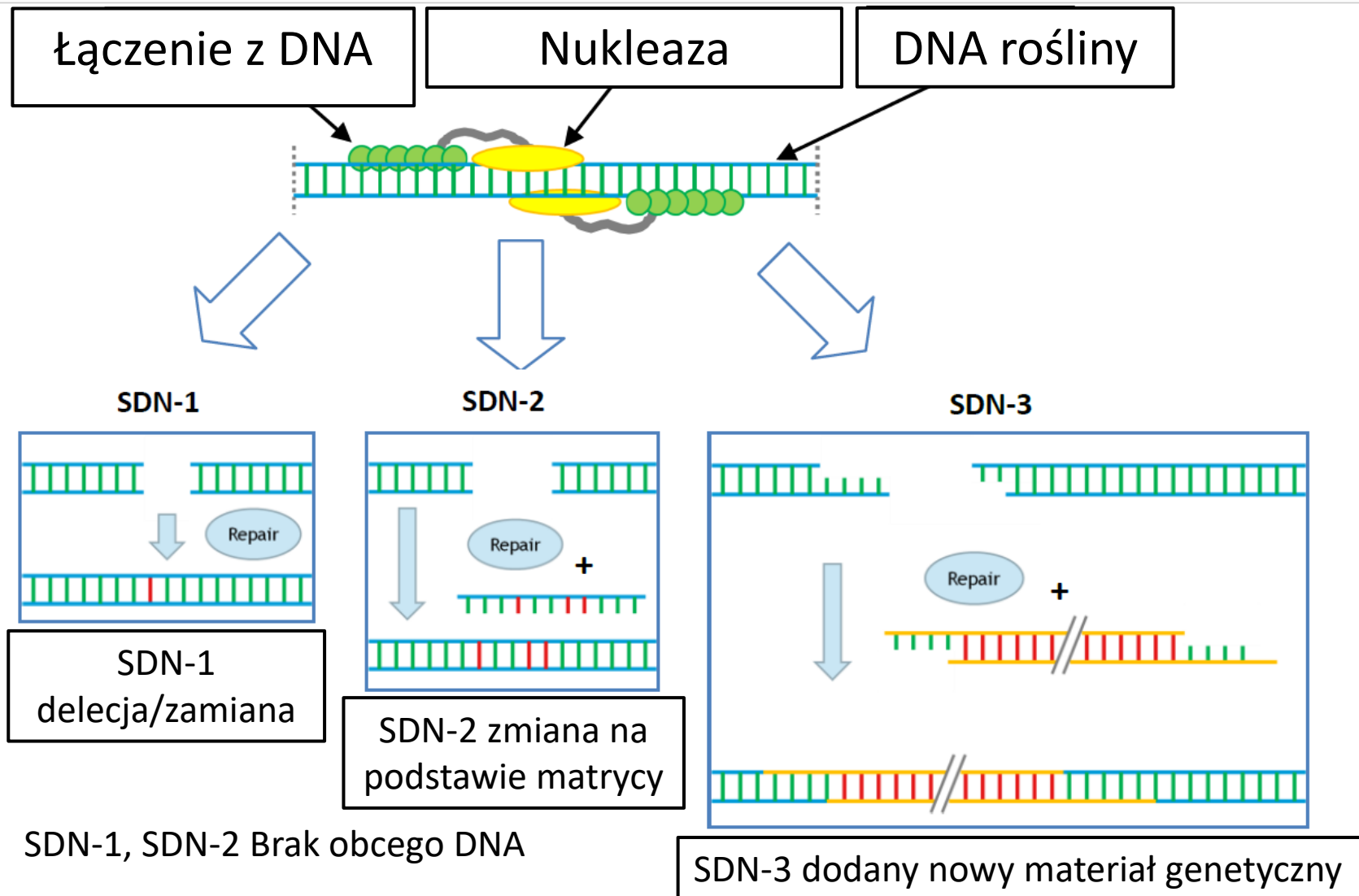
- Miejscowo specyficzne nukleazy oparte o naturalne mechanizmy naprawy DNA (HR, NHEJ)
- ✓ Meganukleazy
- ✓ Nukleazy z motywem palca cynkowego ZFN 1-3
- ✓ Aktywujące transkrypcję nukleazy TALENs
- ✓ Bakteryjny system CRISPR Cas9
- ✓ Prime editing (bez udziału DNA)

- Mutageneza sterowana oligonukleotydami - (ODM)



SDN-1, SDN-2, SDN-3 – różne produkty zastosowania miejscowo specyficznych nukleaz

SDN-1, SDN-2, SDN-3 – produkty miejscowo specyficznych nukleaz



System kontroli i monitorowania GMO w UE

- Opiera się na rozróżnieniu produktów powstałych przy użyciu konwencjonalnych metod hodowli (włączając konwencjonalną mutagenezę) od produktów powstałych przy użyciu technik rekombinowanego DNA (włączając transgenezę).

TSUE w swoim wyroku stwierdził, że

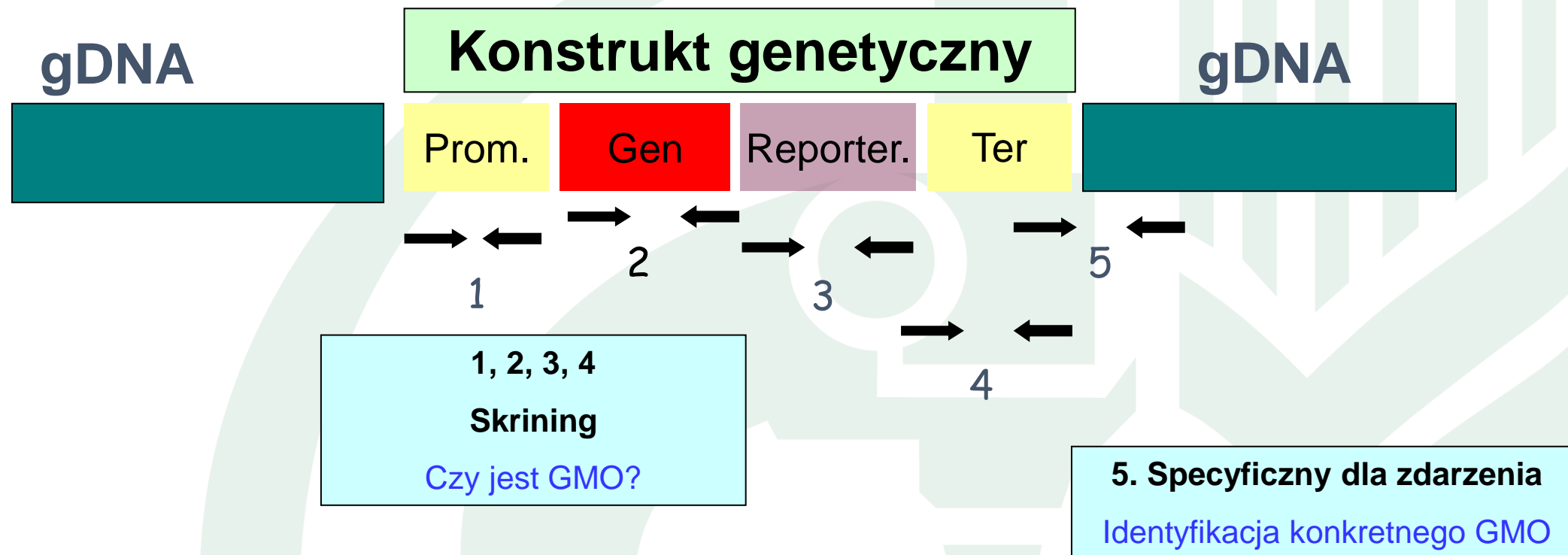
- wykorzystanie metod opartych o konwencjonalną mutagenezę nie prowadzi do uzyskania GMO, podlegających regulacjom prawa GMO.
- Wykorzystanie miejscowo specyficznych nukleaz czyli metod kierunkowej mutagenezy prowadzi do uzyskania GMO podlegającym prawu GMO.

Takie GMO wymagają procesu autoryzacji oraz kontroli obecności na rynku UE.

Pojęcie GMO „event” – zdarzenie modyfikacji genetycznej

- Modyfikacja genetyczna to unikatowa insercja materiału genetycznego
- Identyfikacja opiera się o wykrycie unikatowej sekwencji 70-150 pz
- Zastosowania metod edycji genomu delecja, insercja lub substytucja
- W przypadku krótkich sekwencji trudno mówić o nowym materiale genetycznym - takie same zmiany mogą powstać lub istnieć w naturze.
- Prawdopodobieństwo wystąpienia takiej mutacji rośnie wraz ze zmniejszającym się fragmentem DNA i wzrostem wielkości genomu.
- Nie można wykluczyć, że taka sama mutacja nie powstanie w naturze np. w innym genotypie
- Opracowanie metody wykrycia tej mutacji nie będzie wystarczająco specyficzne aby w sposób jednoznaczny zidentyfikować GMO

Wykrywanie i identyfikacja konwencjonalnych GMO - metody PCR



Każde GMO jest unikatowe – zdarzenie transformacyjne (GMO-event)

Produkty NGT – zwykle nie mają sekwencji skringingowych i nie muszą być unikatowe np. SNP!

Elementy regulatorowe/geny/konstrukty stosowane w analizach skringowych w PIORIN

Metody indywidualne dla każdego elementu genetycznego

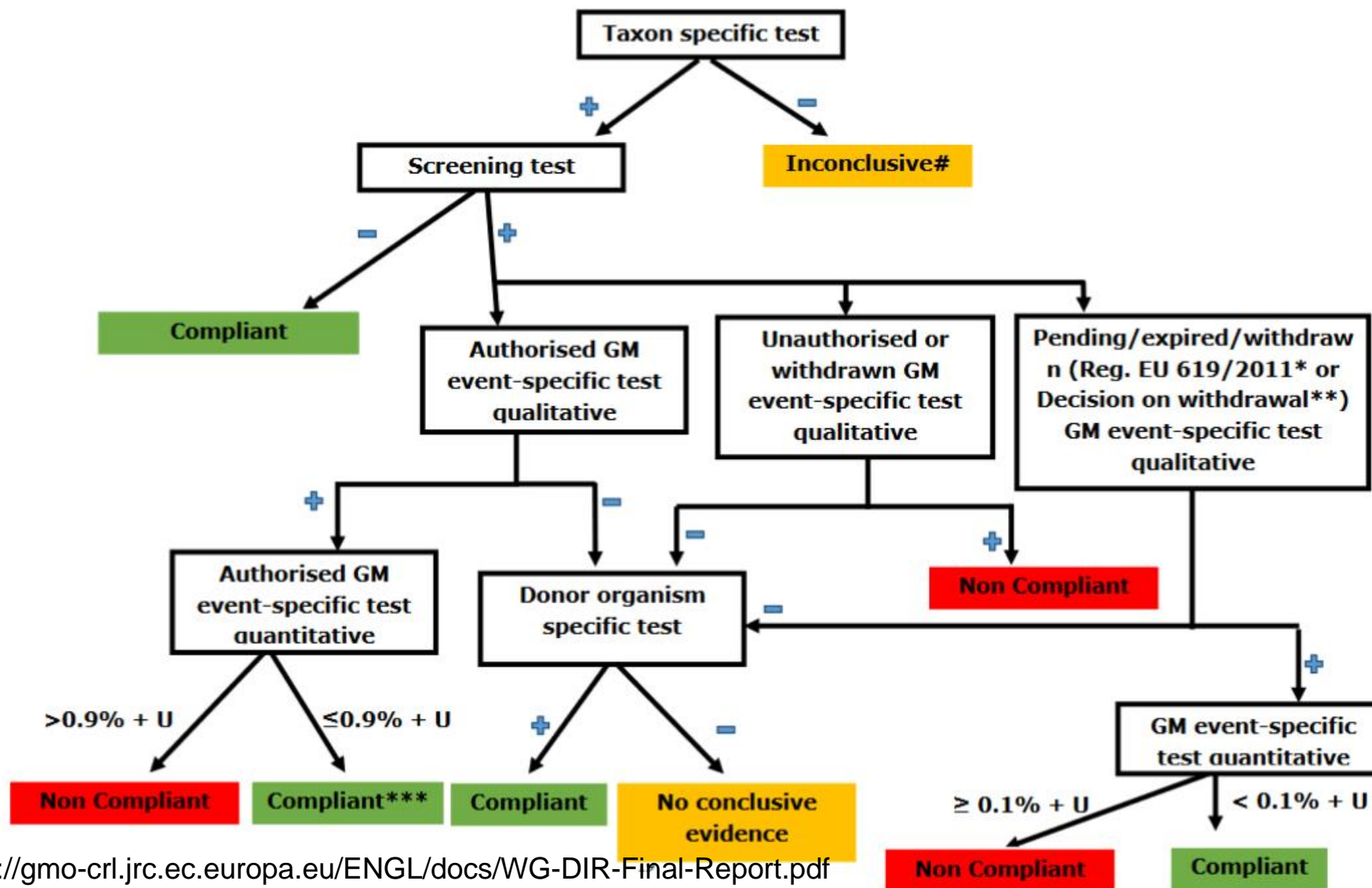
- promotor 35S z wirusa mozaiki kalafiora (CaMV P35S)
- promotor 35S z wirusa mozaiki trędownika (FMV P35S)
- promotor nos z *Agrobacterium tumefaciens* (Pnos)
- terminator nos z *Agrobacterium tumefaciens* (Tnos)
- gen *bar* ze *Streptomyces hygrosopicus*
- gen *barnase* z *Bacillus amyloliquefaciens*
- gen *epsps* z *Agrobacterium tumefaciens*, szczep CP4
- gen *gox* z *Ochrobactrum anthropi*
- gen *pat* ze *Streptomyces viridochromogenes*
- gen *nptII* z *Escherichia coli*
- gen Cry1Ab/Ac
- konstrukc promotor 35S z wirusa mozaiki kalafiora/gen *pat* ze *Streptomyces viridochromogenes* (CaMV P35S/pat)
- konstrukc CTP2-CP4 *epsps*
- konstrukc Pnos/*nptII*
- CaMV

Metoda wykrywania i identyfikacji GMO element autoryzacji GMO w UE.

Walidacja metody – wymagana przy autoryzacji GMO w UE

1. dokładność
2. odtwarzalność
3. powtarzalność
4. czułość
5. precyzja
6. poprawność
7. liniowość
8. granica wykrywalności
9. granica oznaczalności
10. selektywność,
- 11. specyficzność?**
12. zakres roboczy
13. stabilność
14. wydajność amplifikacji
15. niepewność

Wykrywanie autoryzowanych i nieautoryzowanych GMO



Autoryzowane vs nieautoryzowane GMO

- **Cel autoryzacji:** uprawa, żywność, pasze, przetwarzanie,
- **autoryzowane** - legalne wg. konkretnego prawa (EU, USA, Japonia, Australia, Chiny, etc.)
- **nieautoryzowane** – nielegalne wg. konkretnego prawa

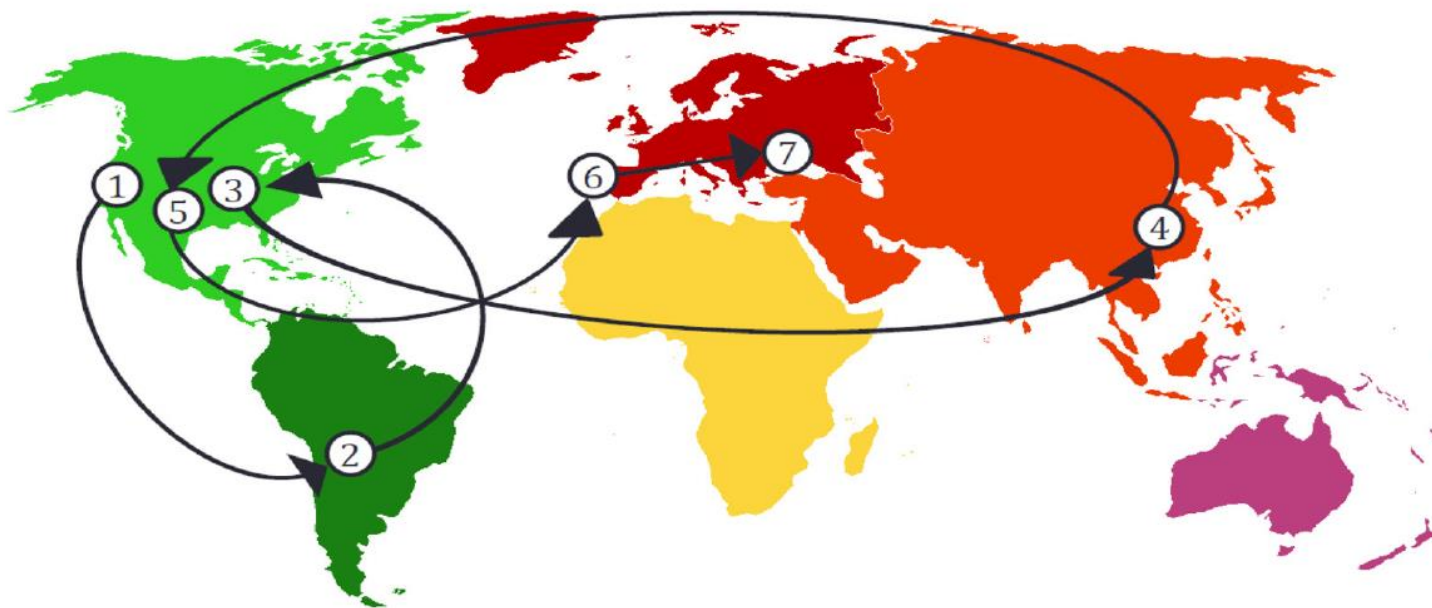
Zwiększone ryzyko

- **asynchroniczna autoryzacja** – (GMOs autoryzowane w jednym kraju ale jeszcze nieautoryzowane w drugim kraju)
- **asymetryczna autoryzacja**- GMO, które nie są przeznaczone na konkretne rynki
- **brak harmonizacji** w klasyfikacji NGT w UE i krajach trzecich

Globalizacja hodowli roślin i produkcji nasion ryzyko domieszek GMO i produktów NGT

Schemat produkcji nasion pomidora:

1. Produkcja nasion w stopniu przed-elitarne,
2. Produkcja nasion w stopniu elitarne,
3. Magazyn nasion,
4. Produkcja nasion kwalifikowanych,
5. Oczyszczanie, uszlachetnianie, pakowanie,
6. Dostawa nasion do głównego magazynu,
7. Dostawa do kraju finalnego przeznaczenia



Metody oparte o PCR

- Każda metoda PCR wymaga znajomości poszukiwanej sekwencji DNA
- Bez informacji o GMO wiarygodna identyfikacja nie jest możliwa
- Metody oparte o PCR pozwalają na wykrywanie i identyfikację z bardzo wysoką czułością i specyficznością
- Pozwalają wykryć organizmy nawet z małymi zmianami (SNP)
- Nie pozwalają odróżnić mutacji powstałych w sposób naturalny od tych generowanych przy użyciu NGT!

Wykrywanie przez sekwencjonowanie

NGS sekwencjonowanie nowej generacji (wysokoprzepustowe)

- wymaga informacji na temat intencjonalnie zmienionych sekwencji DNA
- NGS wykrywanie wielu GMO – kierunkowe sekwencjonowanie
- Sekwencjonowanie całogenomowe mimo coraz niższych kosztów nie ma zastosowania w rutynowym wykrywaniu GMO

Aktualnie prowadzone są prace w celu określenia minimalnych wymagań dla parametrów analiz NGS – Grupa Robocza ENGL/JRC

JRC TECHNICAL REPORTS

Explanatory Note

Challenges for the detection of genetically modified food or feed originating from genome editing

EU Reference Laboratory for Genetically Modified Food & Feed (EURL GMFF)

in consultation with the European Network of GMO Laboratories (ENGL)

Emons, H., Broothaerts, W., Bonfini, L.,
Corbisier, P., Gatto, F., Jacchia, S.,
Mazzara, M., Savini, C.

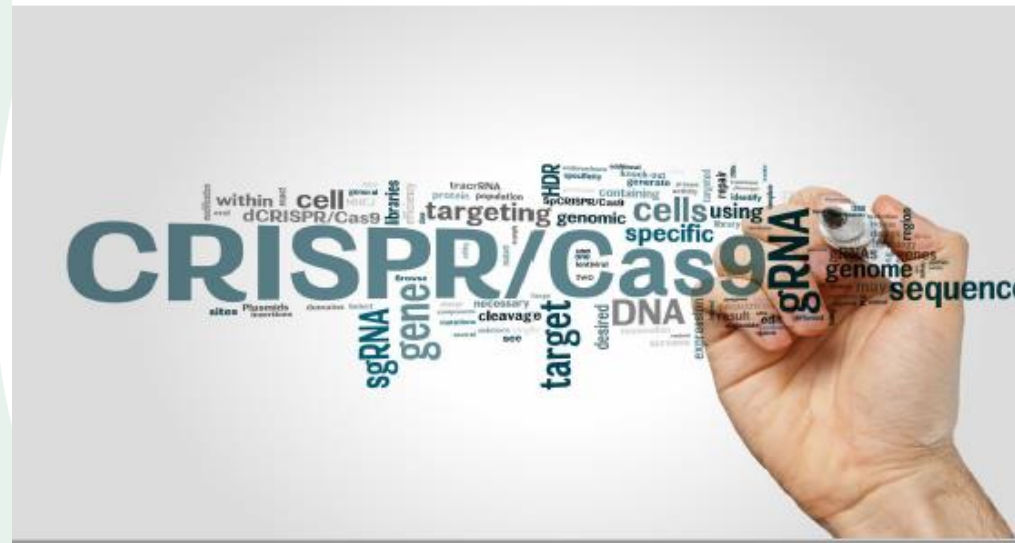


Detection of food and feed plant products obtained by new mutagenesis techniques

European Network of GMO Laboratories (ENGL)

Report endorsed by the ENGL Steering Committee

Publication date: 26 March 2019



Do portu w Gdańsku przy pływa statek (20 000 t ziarna kukurydzy)

Hodowca otrzymuje nowy genotyp kukurydzy

- W dokumentach brak informacji o GMO.
- Laboratorium musi stwierdzić czy towar nie zawiera kukurydzy GM
- Analiza skringowa nie wykazuje, sekwencji DNA używanych w konstrukcjach genetycznych, co może wskazywać na brak obecności GMO
- Jednak jeśli zastosowano metody edytowania genomu laboratorium musi stwierdzić
- Czy odmiana powstała w wyniku „naturalnej” hodowli czy mutagenezy?
- Czy zastosowano techniki „konwencjonalnej mutagenezy” czy techniki edytowania genomu?

Możliwości wykrycia i identyfikacji „NGT GMO”

- Przy użyciu konwencjonalnej mutagenезy otrzymano przynajmniej 3281 odmian 175 gatunków roślin (min. kukurydza, ryż, pszenica, jęczmień, soja)
- Te mutacje to SNP, duplikacje, duże delecje.
- W literaturze mało informacji o mutacjach konkretnych genów.
- Dostępne info. nie obejmują wszystkich losowych zmian
- Bez dokładnych informacji nie można odróżnić tych roślin od roślin bez indukowanych mutacji

„FAO/IAEA Mutant Variety Database”

Możliwości wykrycia i identyfikacji „NGT GMO”

Jeśli odmiana kukurydzy została wytworzona przy użyciu mutacji to była to naturalna mutacja czy wynik edytowania genomu?

- Roślin powstałych przy użyciu edytowania genomu nie możemy wykryć stosując metody do wykrywania „konwencjonalnych GMO”

Trzy rodzaje GMO – produktów Nowych technik Genomowych (UE)

1. autoryzowane w UE (zgłoszone)
2. nieautoryzowane w UE, dla których mamy informacje o mutacji
3. nieautoryzowane, dla których informacje o mutacji nie są znane

1. Autoryzowane w UE rośliny - produkty NGT

- Metoda qPCR lub dPCR, materiał referencyjny, walidacja dostępna
- Dla mniejszych mutacji problem ze specyficznością i stabilnością metody
- Wolne od konstruktywów genetycznych

- Problem z ilościowym oznaczeniem jeśli taka sama mutacja jest w naturze

2. Nieautoryzowane w UE, produkty NGT znane informacje o mutacji

- Metoda qPCR lub dPCR może być opracowana na podstawie informacji z baz danych
- Kierunkowe sekwencjonowanie nastawione na prawdopodobnie edytowane sekwencje
- W przypadku małych zmian np. SNV nie będzie można wykryć źródła mutacji.
- Wykryte mutacje >20 pz mogą wskazywać raczej na indukowane niż spontaniczne mutacje.
- Wolne od konstruktyw genetycznych

3. Nieautoryzowane w UE, produkty NGT informacje o mutacji nie są znane

- Bardzo trudne – brak możliwości zaprojektowania PCR
- Screening przez sekwencjonowanie, sekwencjonowanie całogenomowe lub eksomowe najprawdopodobniej nie wykryje takich zmian ze względu na dostępność i kompletność genomów referencyjnych
- W przypadku dużych zmian łatwiejsze ale kosztowne
- Utworzenie baz pan-genomowych dla wielu gatunków bardzo kosztowne, czasochłonne i również niedoskonałe ze względu na dynamiczne zmiany w genomach

Podsumowanie

- W wielu przypadkach konieczne zastosowanie NGS, które jest mniej efektywne od PCR stosowanych do wykrycia konwencjonalnych GMO
- NGS wymaga analizy danych, trwa dłużej niż analiza PCR – problem z odprawą np. statków
- Wyniki często nie spełniają kryteriów określonych w prawie (100 % specyficzność), możliwość ich podważenia
- Trudności w wykryciu w próbkach złożonych
- Problem ze stwierdzeniem, że SNP jest efektem indukowanej mutagenyzy przy użyciu metod edycji genomu
- Problem z implementacją prawa w zakresie znakowania GMO

Wnioski

- W ciągu ostatnich 20 lat powstało wiele nowych techniki hodowli roślin, wywodzących się z biotechnologii.
- Różne modyfikacje (insercje, delecje, mutacje SNP).
- Prawo UE wymaga wykrywania, identyfikacji i oznaczania GMO
- Aktualnie stosowane metody PCR pozwalają na wykrycie produktów NGT ale nie na ich identyfikację
- Potencjalne problemy ilościowym oznaczaniem
- Konieczne opracowanie i walidacja metod qPCR, dPCR, NGS

Rozbieżności w zakresie ewentualnego statusu prawnego dla niektórych NGT są już widoczne co może spowodować duże problemy w handlu międzynarodowym.

Problem z identyfikacją oraz z autoryzacją

Bez harmonizacja prawa problemy będą narastać !

Dziękuję za uwagę

Sławomir Sowa

e-mail: s.sowa@ihar.edu.pl

Radzików

05-870 Błonie

tel. +48 22 733 45 00

NIP: 5290007029

REGON: 000079480

e-mail: postbox@ihar.edu.pl

www.ihar.edu.pl