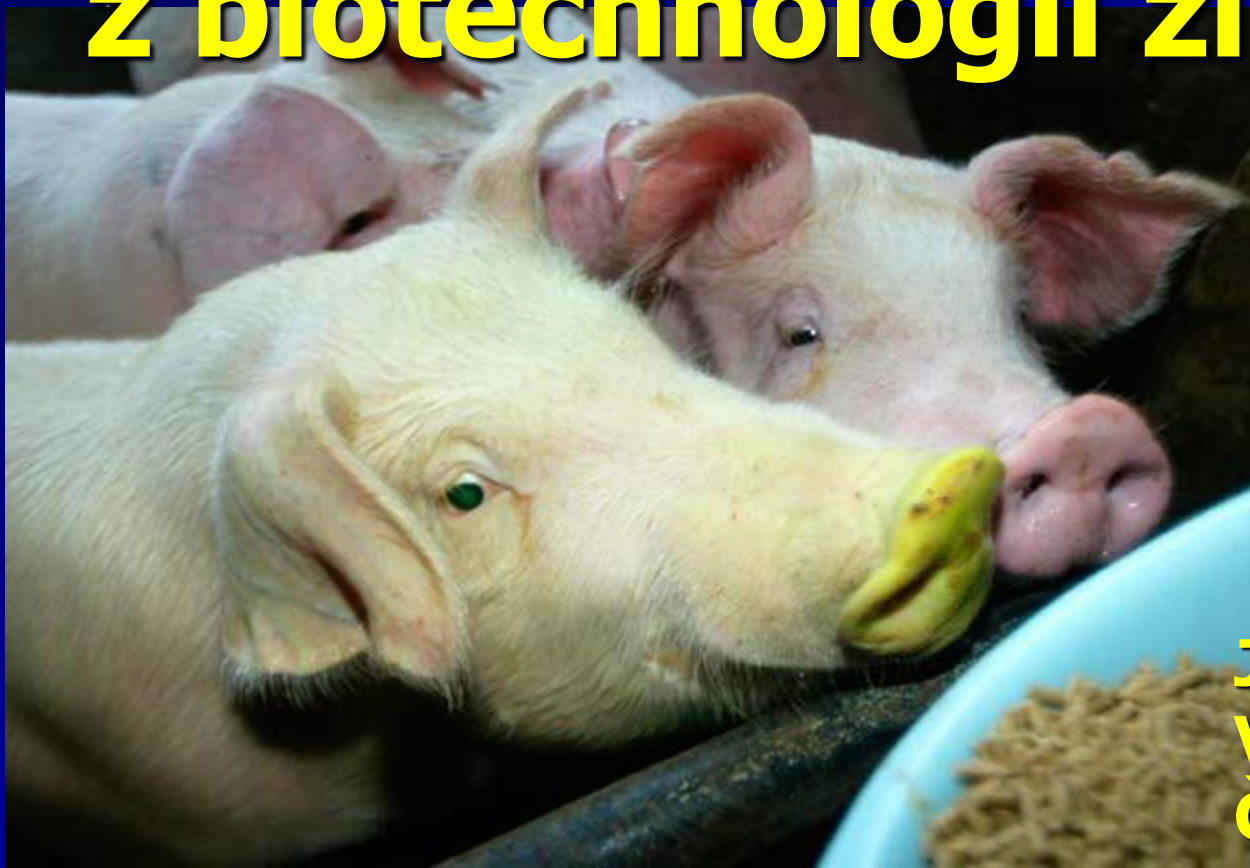
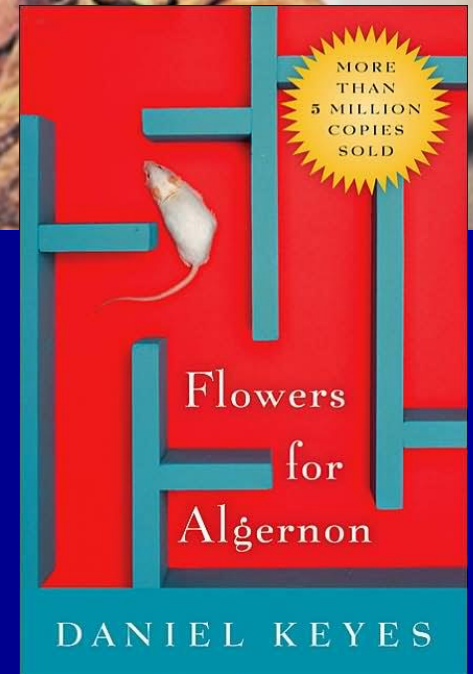


To nejlepší ... z biotechnologií živočichů



Jaroslav PETR
VÚŽV Uhřetěves
ČZU Praha
petr@vuzv.cz

Od Algernon ... (1959)



...k Doogie (1999)



Zvýšení skóre v myších „IQ testech“ **5x**

Hobbie-J (2009)

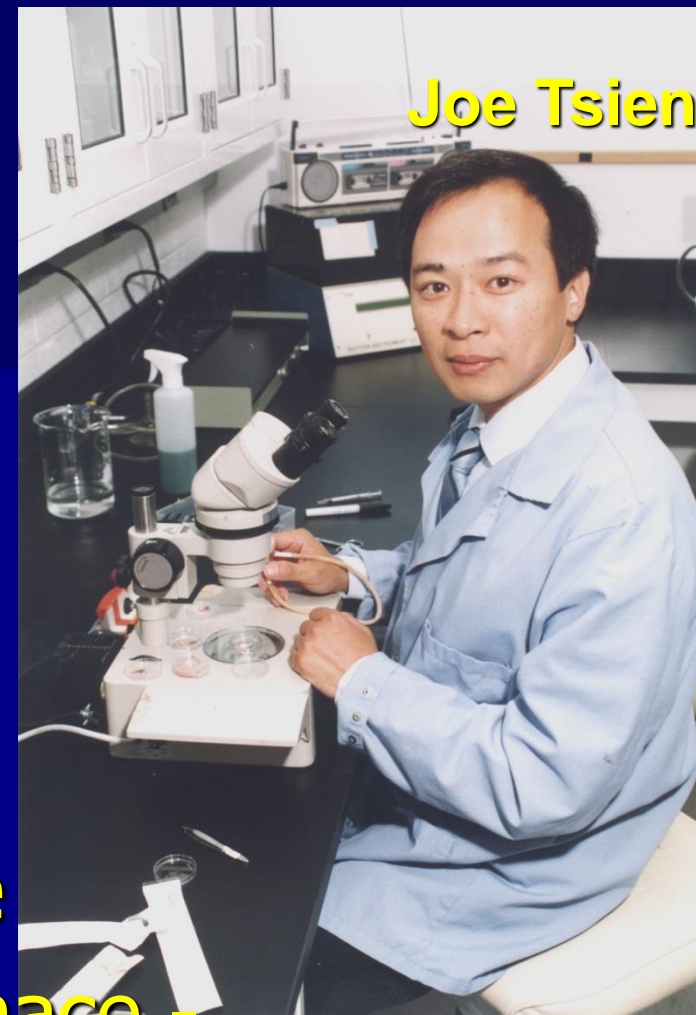
Pamatuje si 3x déle



- Činnost genu NR2B

v mozku s věkem slábne

- Zásah do dědičné informace -
posílením funkce genu NR2B v mozku
- Omlazení mozku



Metody tvorby geneticky modifikovaných organismů



V zemích EU – techniky dány výčtem

- Přibývá neustále nových technik pro cílené zásahy do dědičné informace
- Příslušné orgány EU nestačí rozhodovat o nových technikách
- **Rozhodování**

Neřídí se výsledným fenotypem

Hlavní kritérium je reálná detekce

Verdikt expertů nemusí respektovat politici

Výsledek:

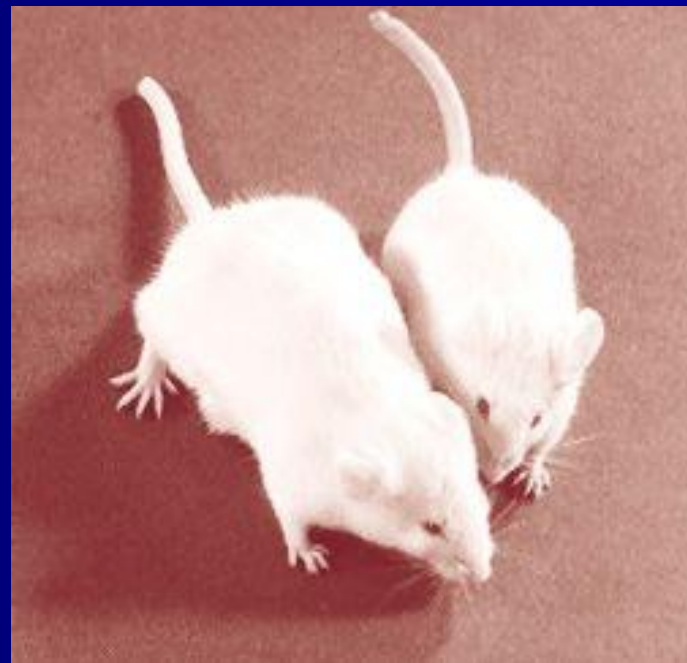
- Máme živočichy s cíleně pozměněnou dědičnou informací a nevíme, jestli se na ně vztahuje přísná evropská legislativa pro GMO



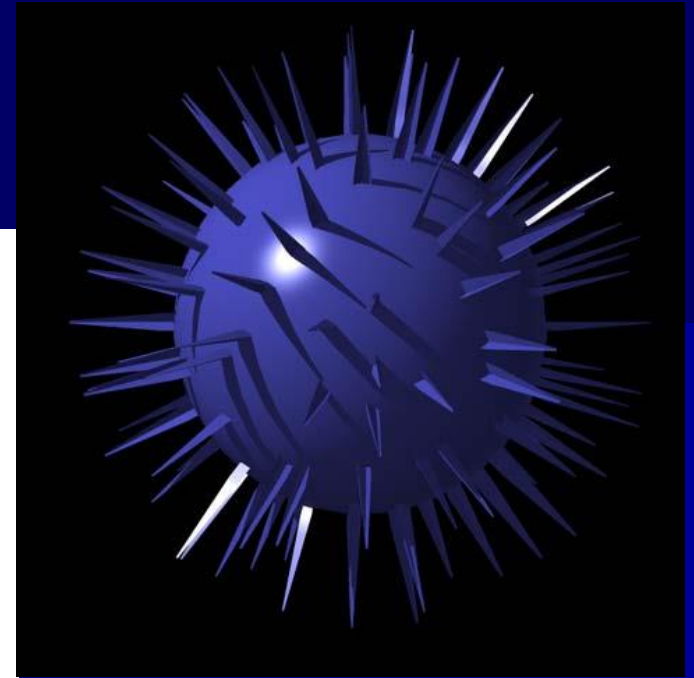
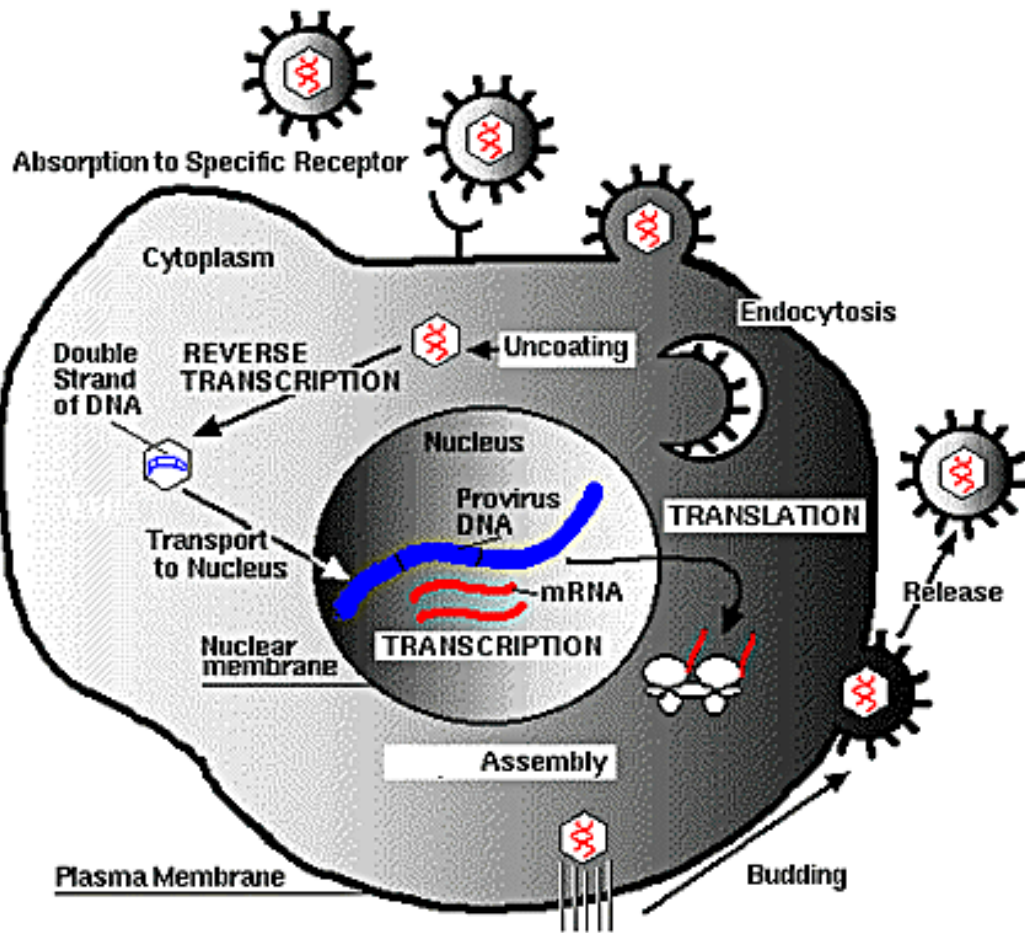


Metody tvorby geneticky modifikovaných savců

Mikroinjekce do prvojádra zygoty

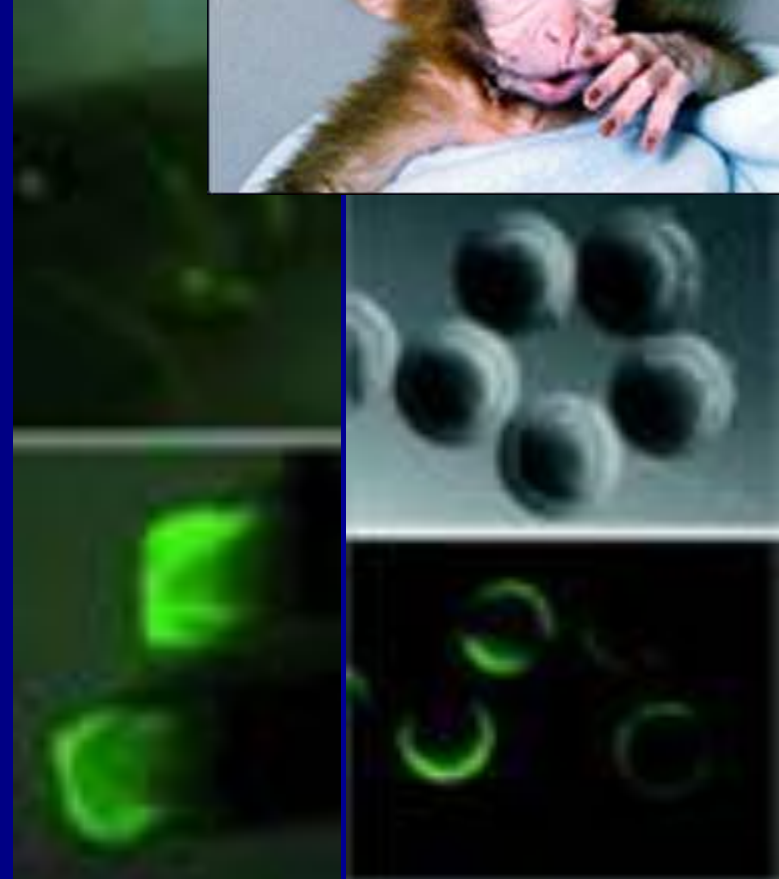
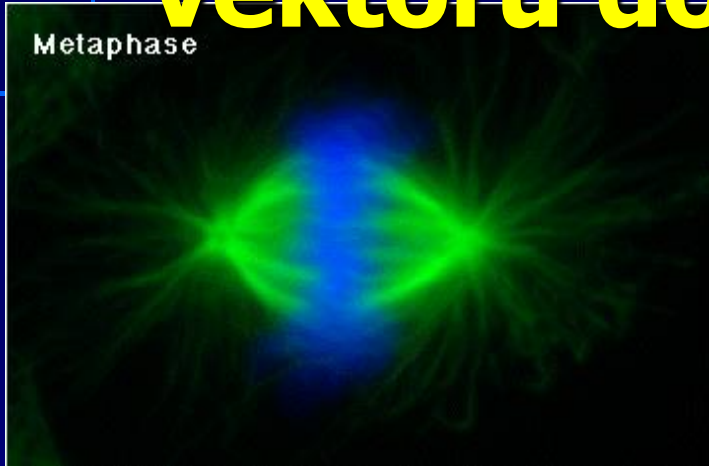


Retroviry



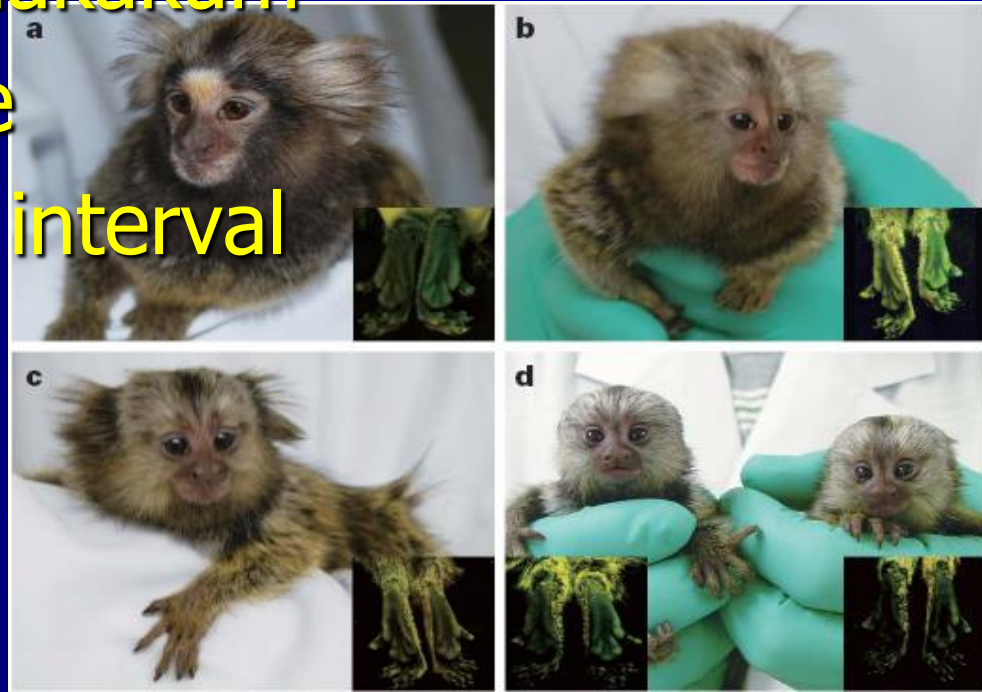
Retrovirus replication

Mikroinjekce retrovirového vektoru do zralého oocyty

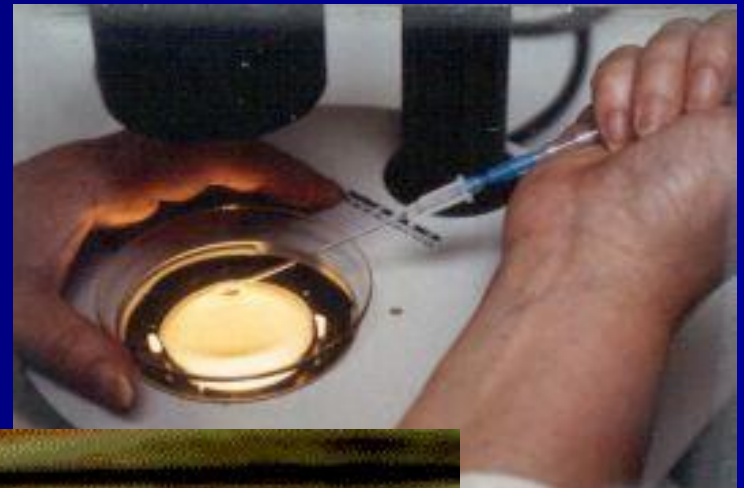


Mikroinjekce retrovirového vektoru do embrya

- Kosman bělovousý (2009)
Model pro lidské choroby
- Výhody oproti makakům
vyšší reprodukce
kratší generační interval



Spermie jako vektor

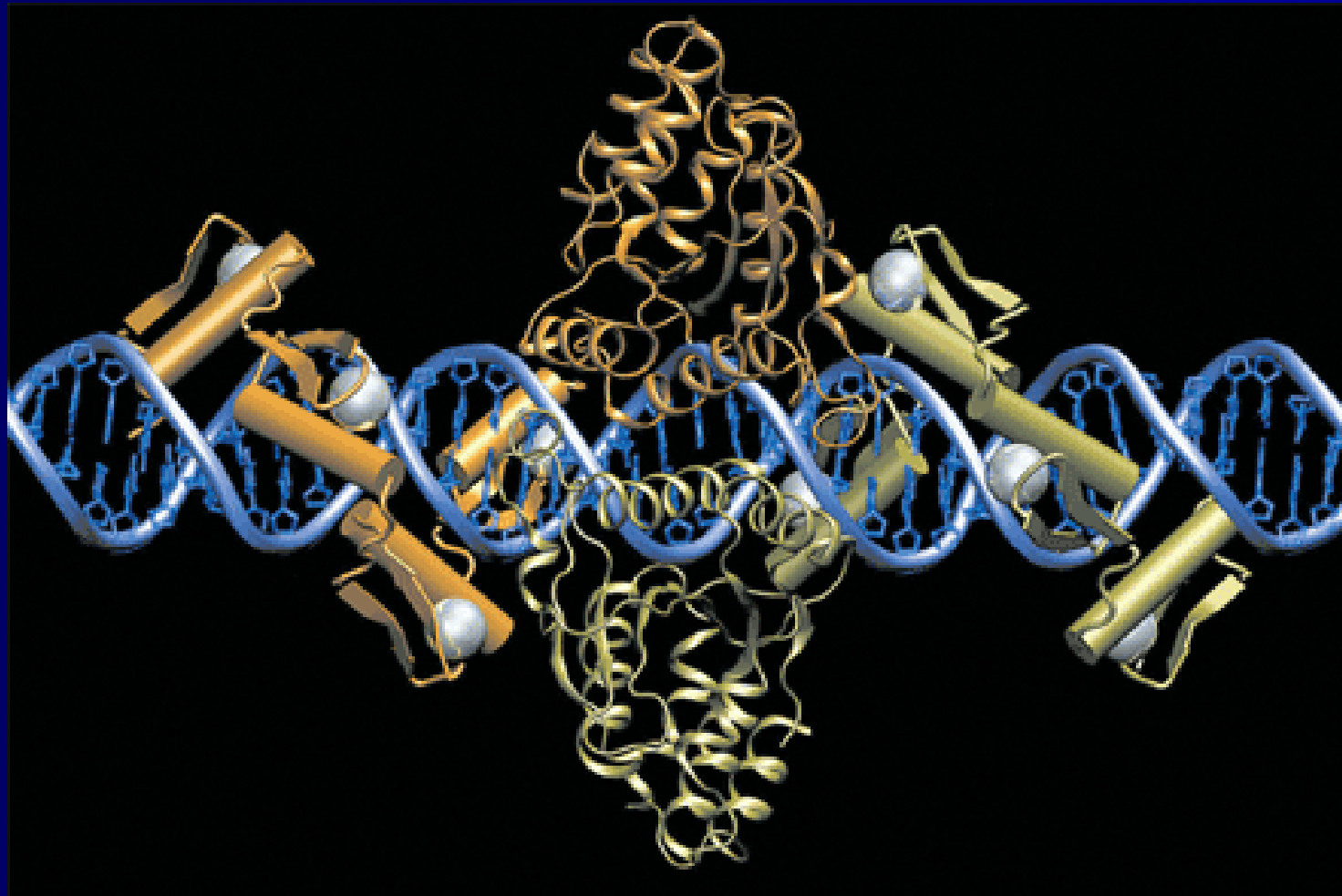


IVF spermatem s bakteriální kontaminací



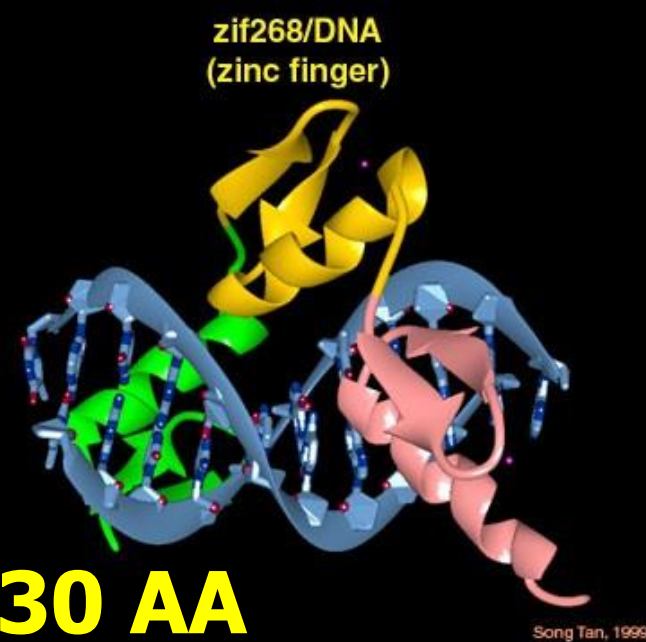
- Experimentálně u myši prokázána přítomnost bakteriálních sekvencí v genomu

Zinc finger nukleázy



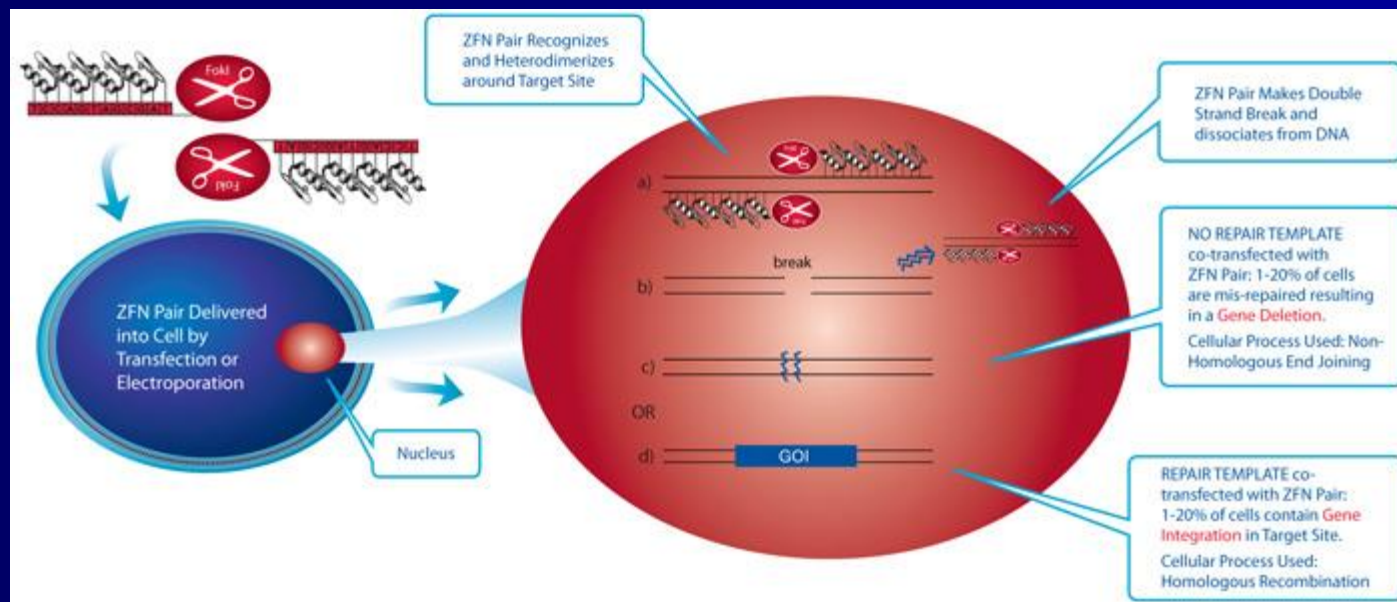
Zinc finger nukleázy

- „Zinkové prsty“ - zhruba 30 AA držných zinkovým iontem
- Objeveny v roce 1986
- Součást transkripčních faktorů
- Určují místo vazby na DNA
 - tři báze v DNA na jeden „prst“



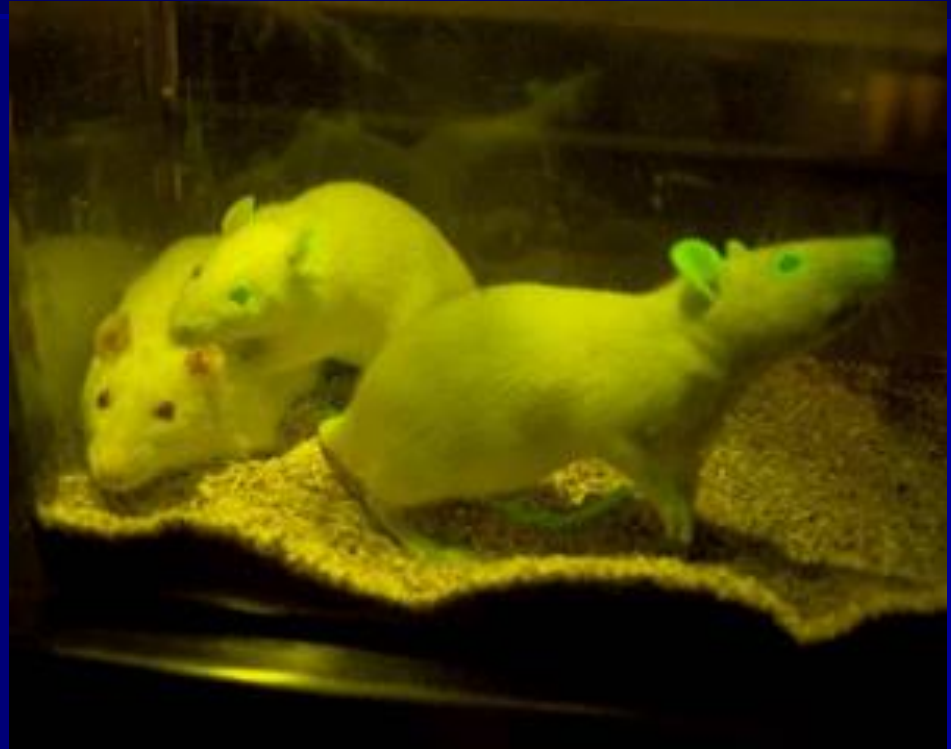
- **Kombinace tří „zinkových prstů“ stačí na určení specifického místa v genomu**
- **Navedou na něj nukleázu**
- **Ta dimeruje a štípne DNA**
- **Nastartují reparační procesy**
- **Homologní rekombinací se zabuduje dodaná sekvence – frekvence homologní rekombinace roste na 1:1000**

Zinc finger - nukleázy



Zinc finger - nukleázy

- Mikroinjekce do embrya
- Lze provést cílený knockout
- Lze dosáhnout homologní rekombinace



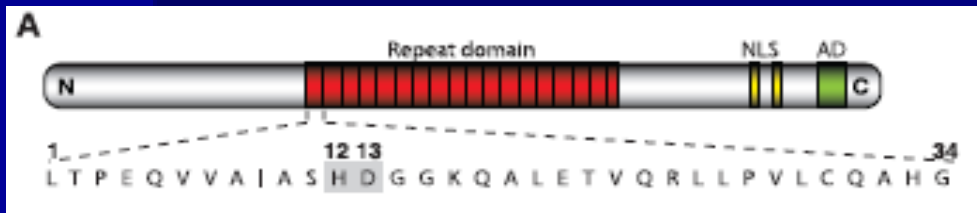
TALEN

Bakterie *Xanthomonas* ovládá geny hostitelské rostliny speciálními bílkovinami - transkripčními aktivátory. Ty se vážou na zcela určité sekvence v genomu hostitelské rostliny.



TALEN

- Pro určení specifické sekvence v modifikovaném organismu se vytváří speciální protein transcription-activator like (TAL) effector protein konstruovaný podle proteinů (transkripčních aktivátorů) bakterie *Xanthomonas*



TALEN

- Pro štěpení DNA se na Tal efektorový protein naváže nukleáza FokI



- Při injekci mRNA do cytoplasmy zygoty účinnost knockoutu kolem 75 %

Mikroprase pro výzkum

Čína - BGI - 2015

- Prasata zakrslého plemene bama
- Pomocí TALEN vyblokován gen GHR pro receptor růstového hormonu – homozygotně
- Prase o 50 % menší

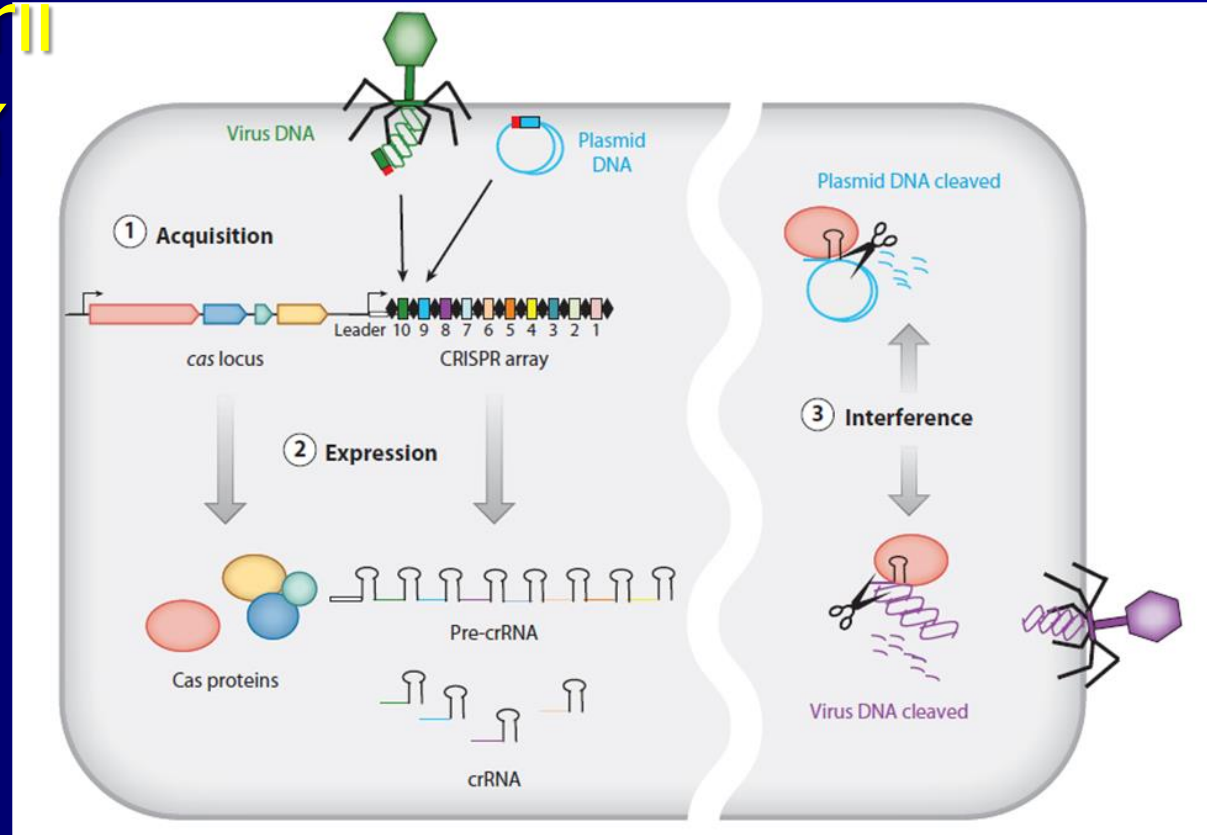


System CRISPR-Cas

Prokaryotní „imunitní systém“

40 % bakterií

90 % archeí



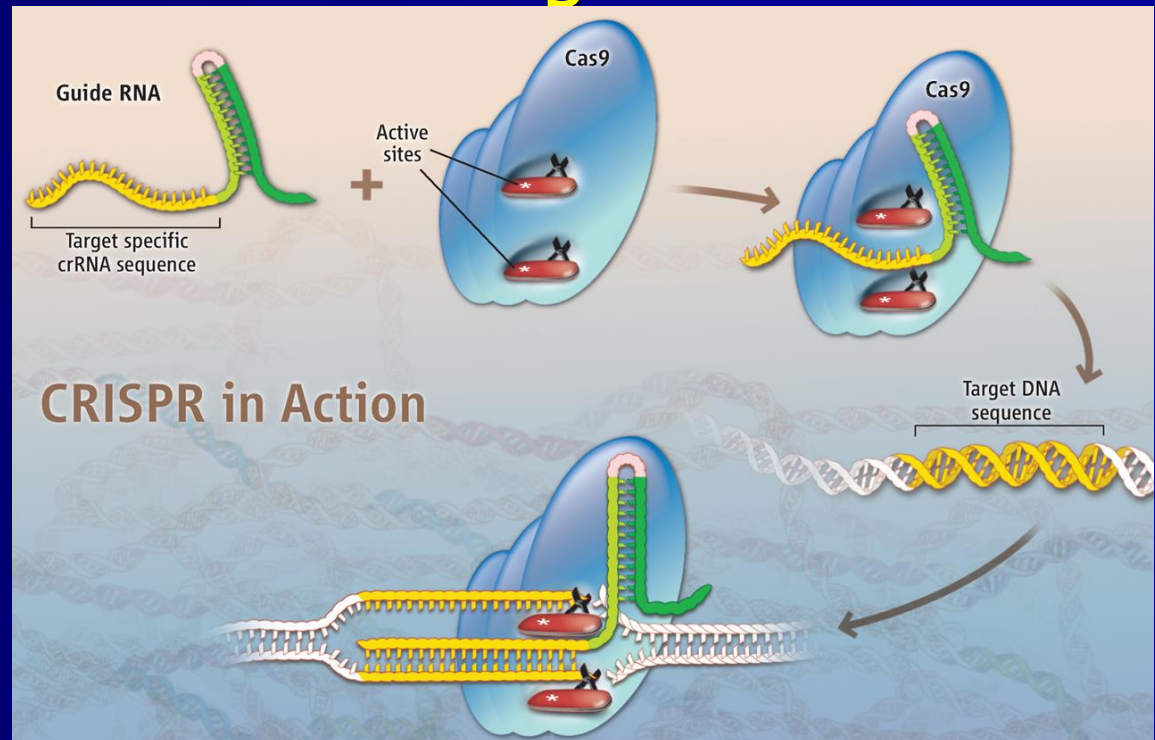
CRISPR-Cas system

System CRISPR-Cas

- Synteticky připravené crRNA
- mRNA pro nukleázu Cas9
- Cas cílí na specifické místo genomu



Martin Jínek
Universität Zurich



System CRISPR-Cas



- KO i homologní rekombinace
- RNA – snazší příprava a nižší cena
- Lze připravit crRNA pro libovolné sekvence
- Vysoce specifické – rozliší rozdíl i v jediné bazi
- Vysoce účinné – 90 % na obou chromozomech několik zásahů najednou



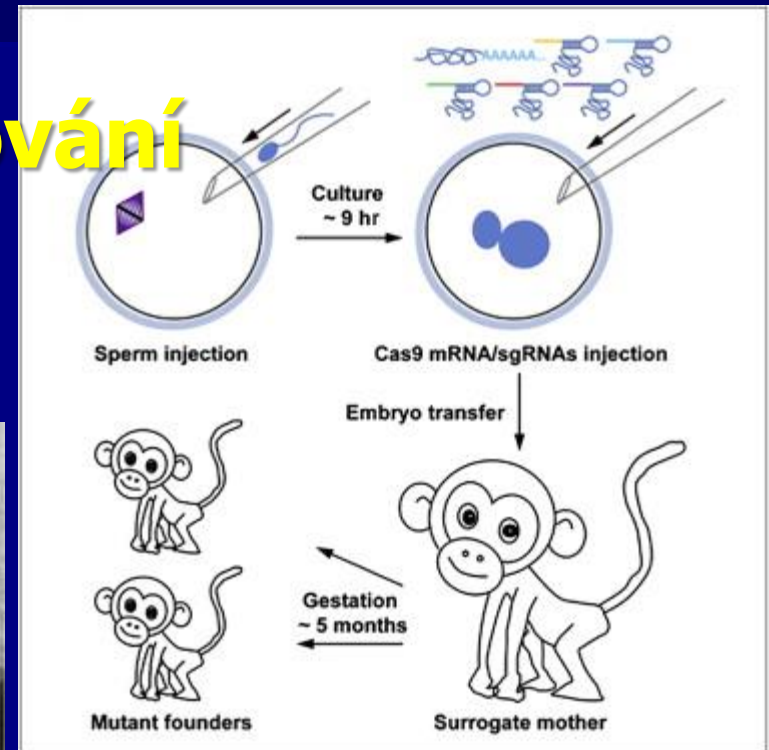
System CRISPR-Cas

Simultánní vyblokování

- 2 genů
- i homozygotně

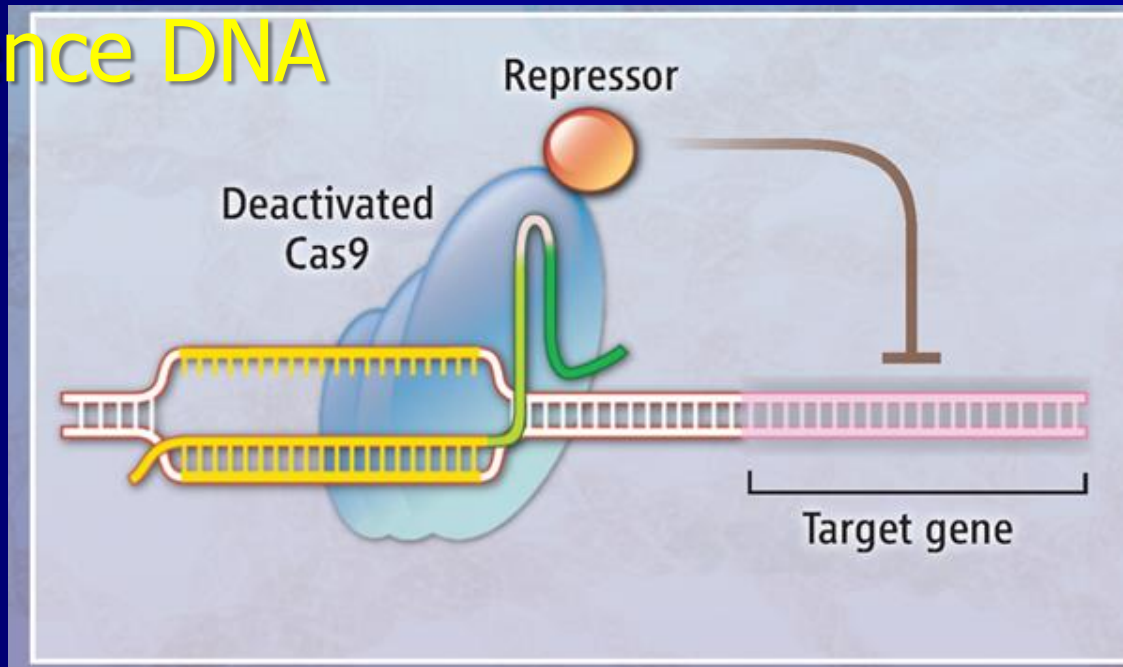


2013 - makak



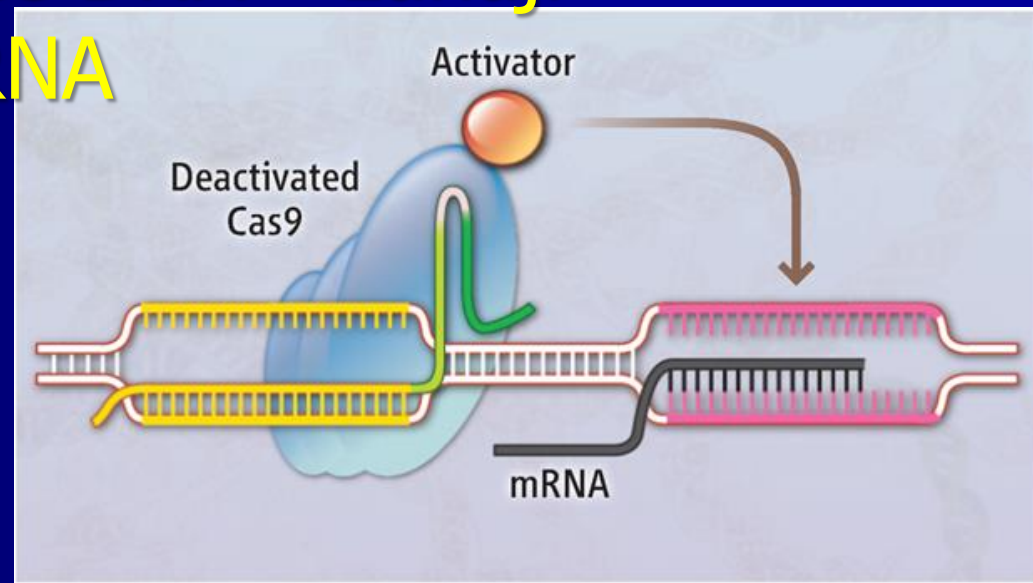
CRISPR-Cas aktivace a suprese genů

- Nefunkční Cas9 – neštípe DNA, ale slouží jako nosič pro represor
- crRNA nasměruje represor do blízkosti cílové sekvence DNA



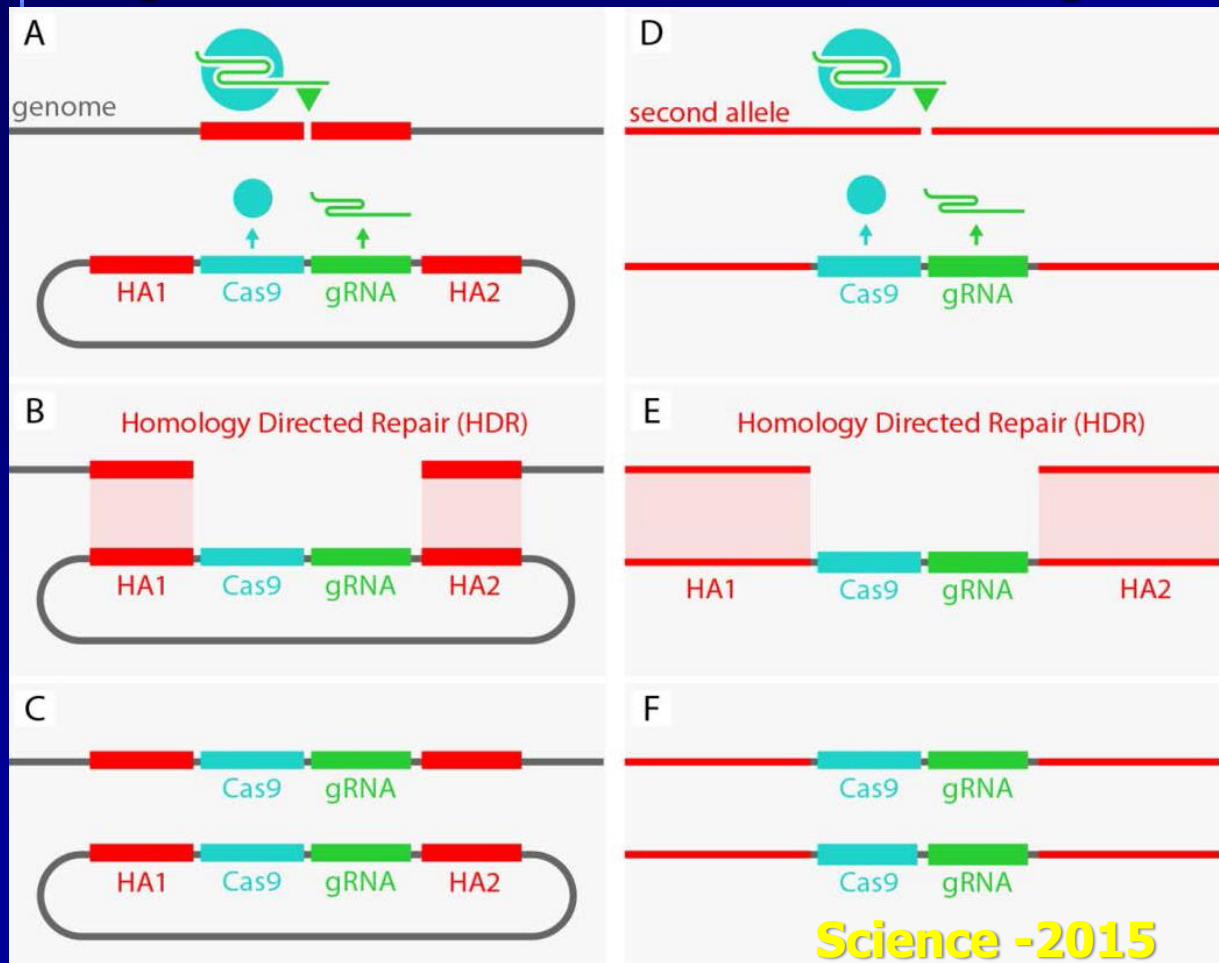
CRISPR-Cas aktivace a suprese genů

- Nefunkční Cas9 – neštípe DNA, ale slouží jako nosič pro aktivátor
- crRNA nasměruje aktivátor do blízkosti cílové sekvence DNA – zahájí transkripci mRNA

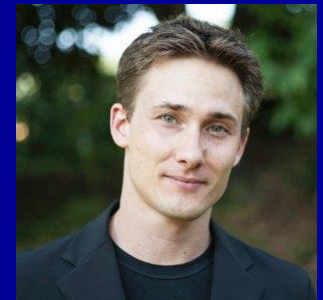


Mutagenní řetězová reakce MCR

- Vyblokování druhé alely z 97 %



Ethan Bier
UC San Diego

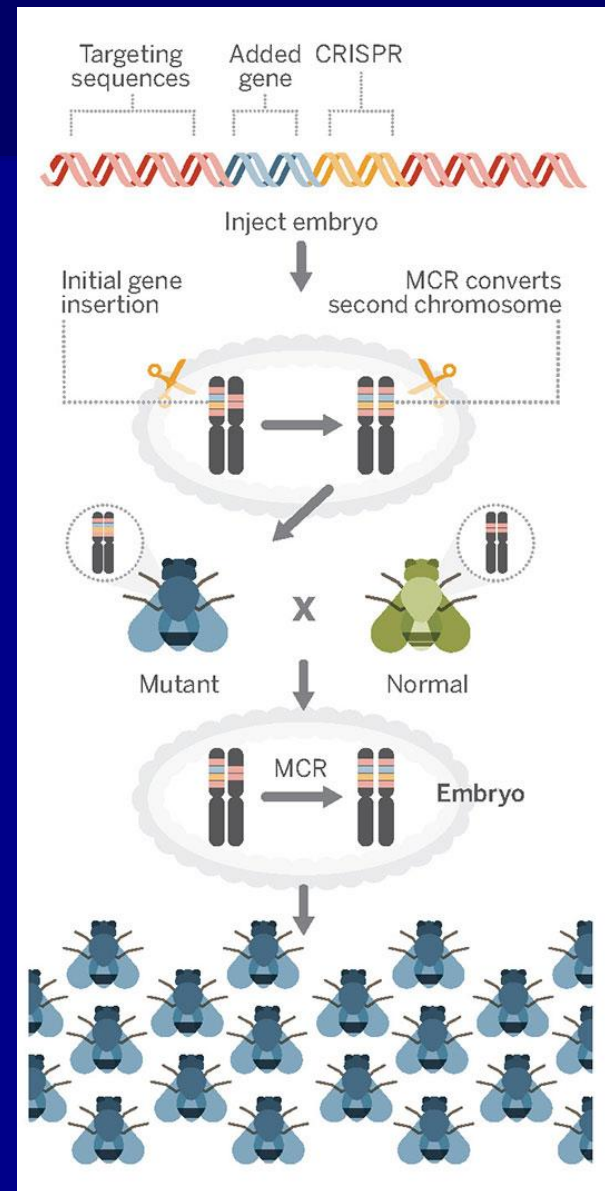


Valentino Gantz

Mutagenní řetězová reakce

MCR

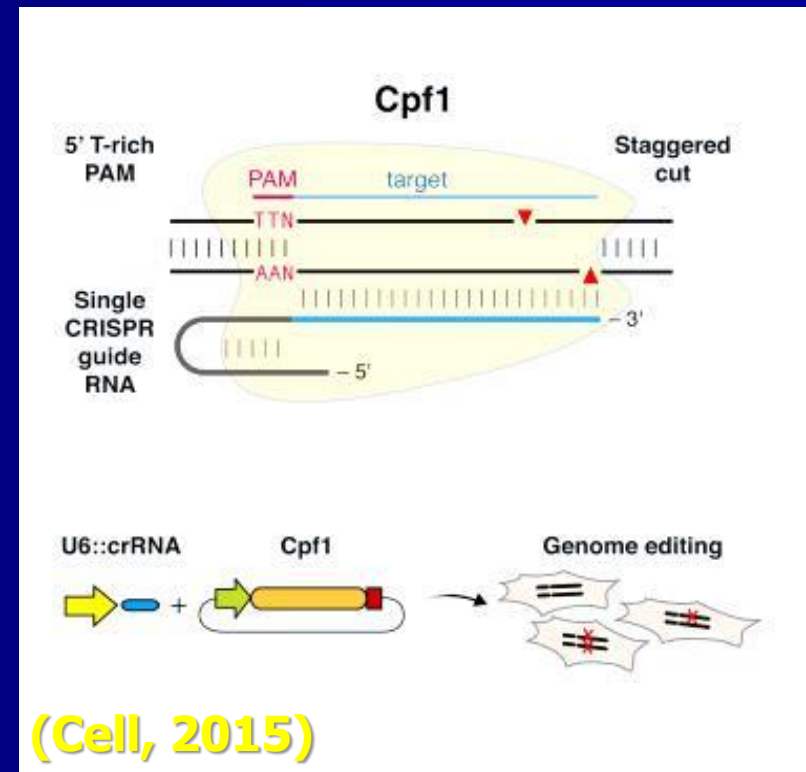
- Při křížení s nemutovanými homozygoty mají kříženci vyblokované oba geny (nad 95 %)
- Pokud je nositelem mutace 1% jedinců, převládnou nositelé mutace v populaci za 10 generací
- Otázka biologické bezpečnosti



CRISPR-Cpf1

- Cpf1 – CRISPR nukleáza *Staphylococcus aureus*
- Vyskytuje se i u *Acidaminococcus*, *Lachnospiraceae*.

Cpf1	Cas9
1 RNA Strand	2 RNA Strands
'Sticky Ends' created for easier gene insertion	Creates 'Blunt ends'
Different Target Sites (e.g. Malaria, HIV etc.)	Fewer Applications (non-specified)
Smaller (easier cell delivery)	Larger (needs packaging for intracellular use)



Mutagenní řetězová reakce MCR

Zvýšení bezpečnosti

- Výzkum v biosafety level 3
- Oddělení sekvence „naváděcí“ RNA (chromosom) od sekvencí Cas9 (plasmid)
- Možnost „přepsání“ mutace na „wild type“ novou MCR
- Otestováno úspěšně na *S. cerevisiae*

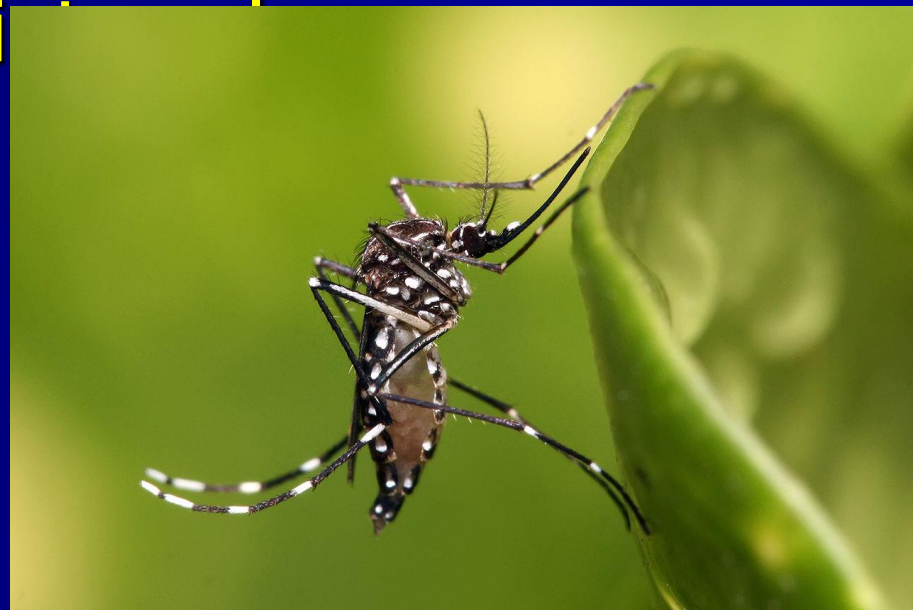
G. Church (Nature Biotech. 33, 1250-55, 2015)



Mutagenní řetězová reakce MCR

MCR (gene drive)

- pohlavně se rozmnožující organismy
- reparace homologní rekombinací



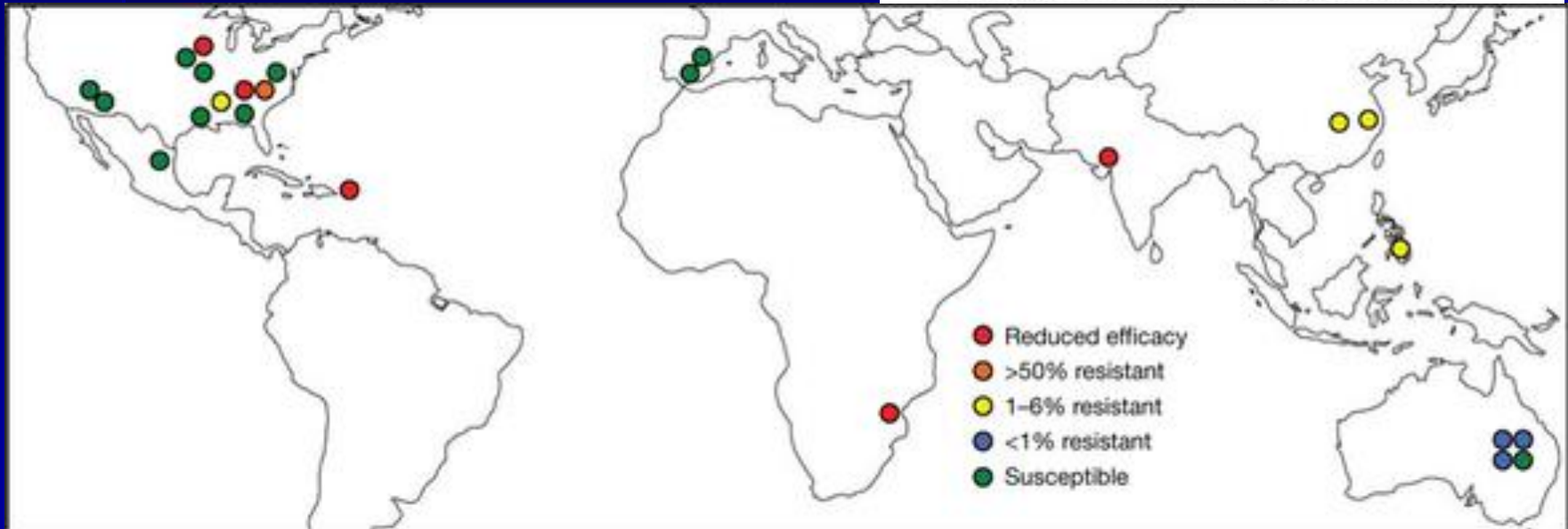
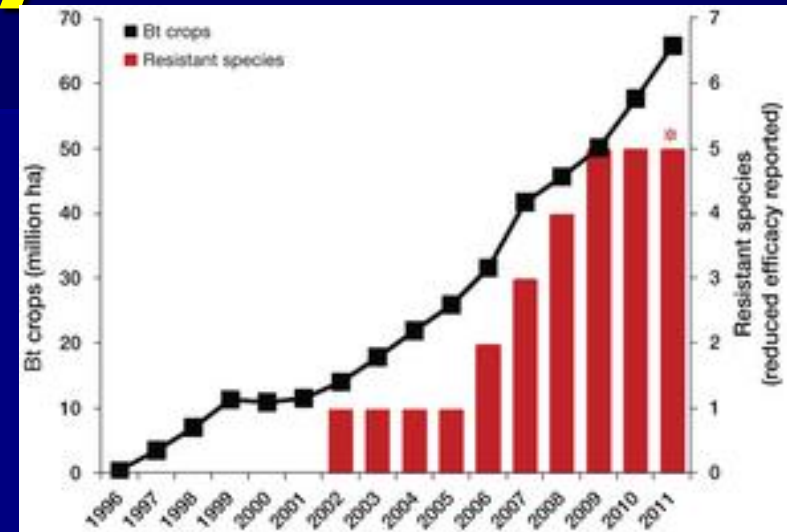
Potenciální využití



- Změny u přenašečů infekcí
Komár *Aedes aegypti*
Rezistence k zimničce
Snížená plodnost samic

Potenciální využití

Zvrácení rezistence
u škůdců (Bt plodiny)



Potenciální využití

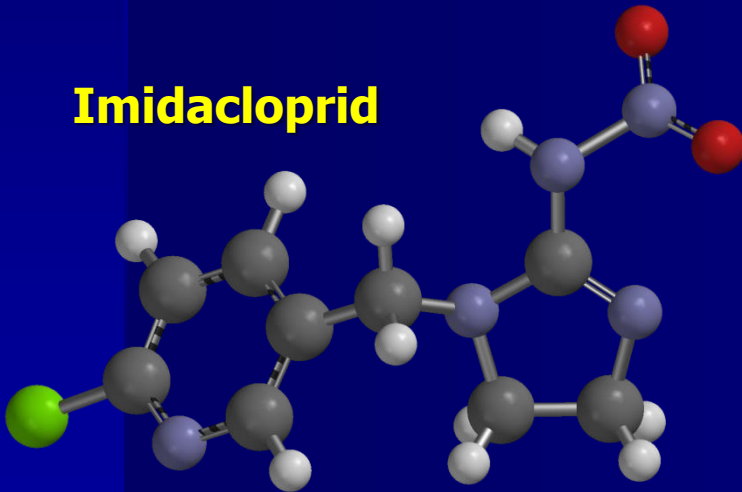
- Snížení životaschopnosti invazních druhů



Potenciální využití

- Zvýšení odolnosti užitečného hmyzu k negativním vlivům
(opylovači a insekticidy)

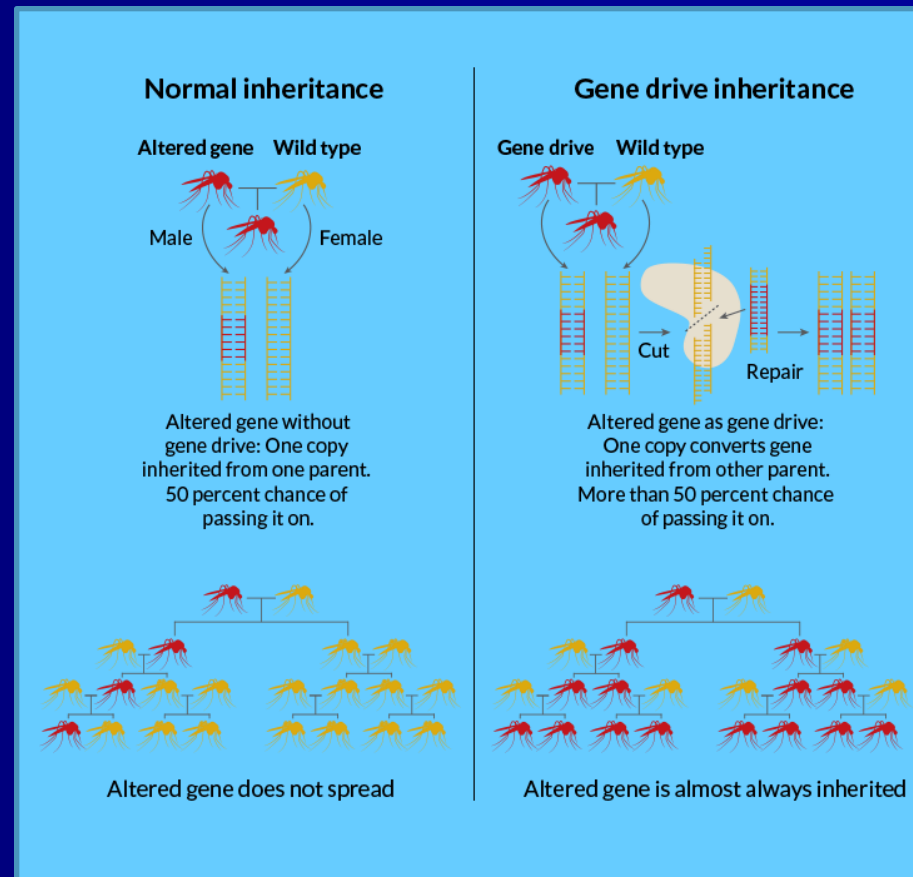
Imidacloprid



Potenciální využití

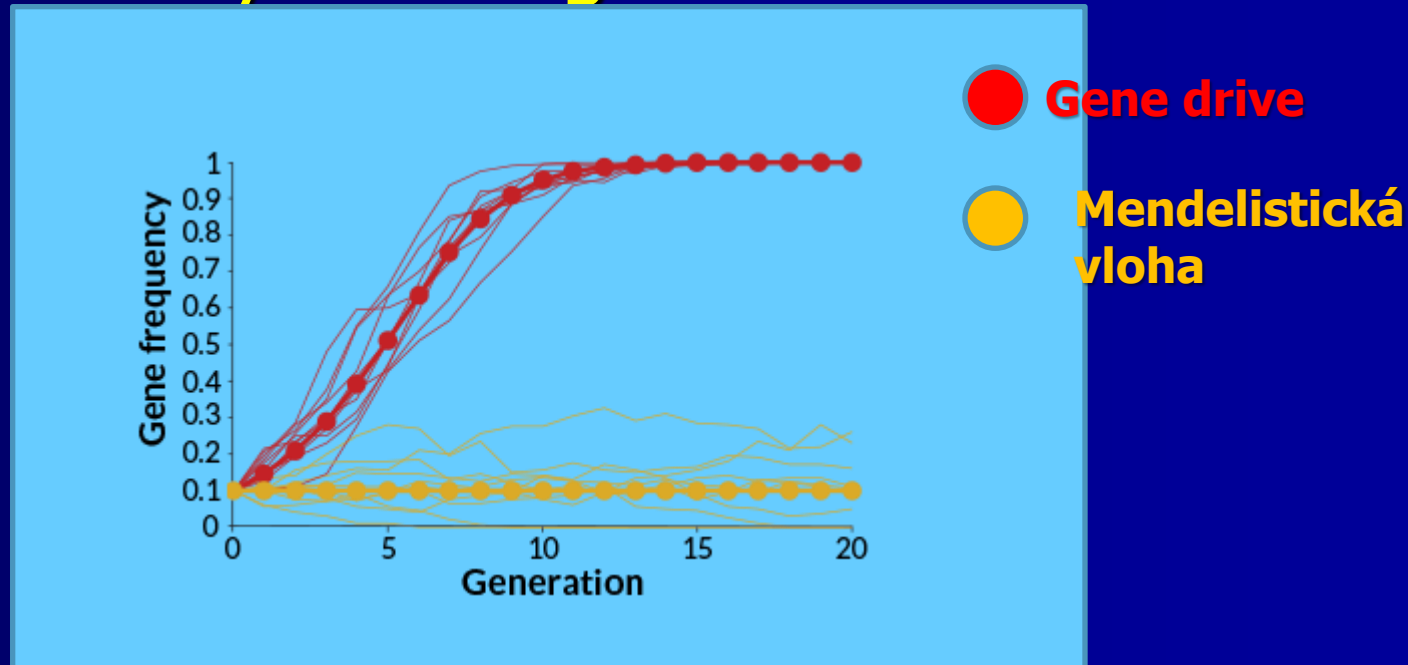
Laboratorní modely

- Pro získání organismů s žádoucím genotypem - bude třeba méně jedinců



Rizika gene drive

- Potenciál zásahu celé populace
- Navozuje ireverzibilní změny
- Nechtěné vytvoření gene drive



Rizika gene drive



- Zneužití pro bioterorismus

Vnesení genů pro toxin do populace členovců sajících krev lidí či zvířat



Rizika gene drive



DIY biology

- Mají k dispozici CRISPR-Cas9
- Distribuce ve formě kitů
 - Úmyslné vytvoření gene drive
 - Nechtěný vznik gene drive

Bezpečnost



- Gene drive v buněčných liniích
- Oddělení sekvence „naváděcí“ RNA od sekvencí Cas9
- Výzkum na organismech - biosafety level 3

Reverze gene drive

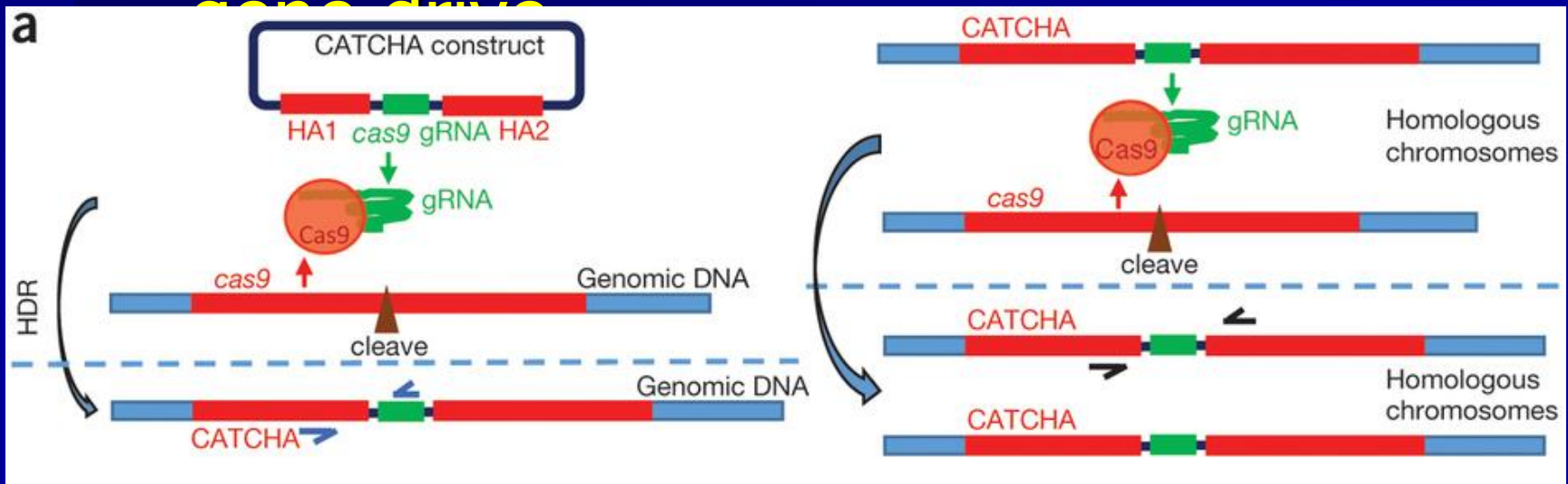
- Možnost „přepsání“ mutace na „wild type“ novou MCR
- Otestováno úspěšně na *S. cerevisiae*
G. Church (Nature Biotech. 33, 1250-55, 2015)



Reverze gene drive

CATCHA – Cas9-triggered chain ablation

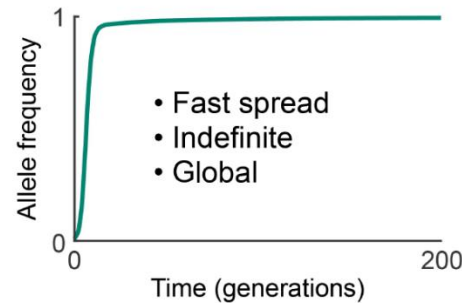
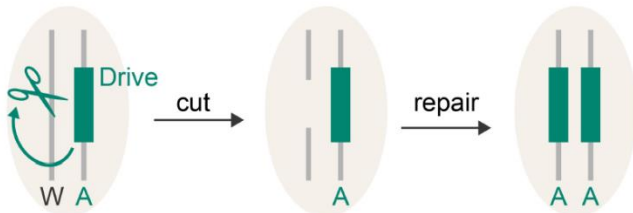
- Gene drive konstruovaný pro poškození sekvenční Cas9 původního gene drive



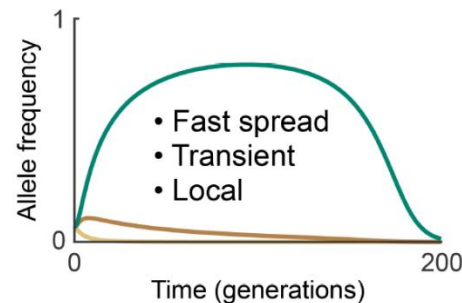
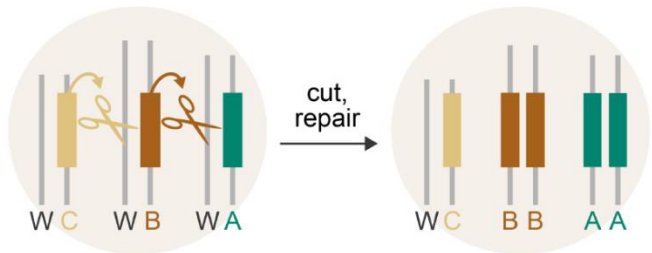
„Daisy chain“ gene drive

- A – gene drive závislý na aktivitě B
- B – gene drive závislý na aktivitě C
- C – mendelisticky děděný gen

a Standard drive: $A \xrightarrow{\text{drives}} A$



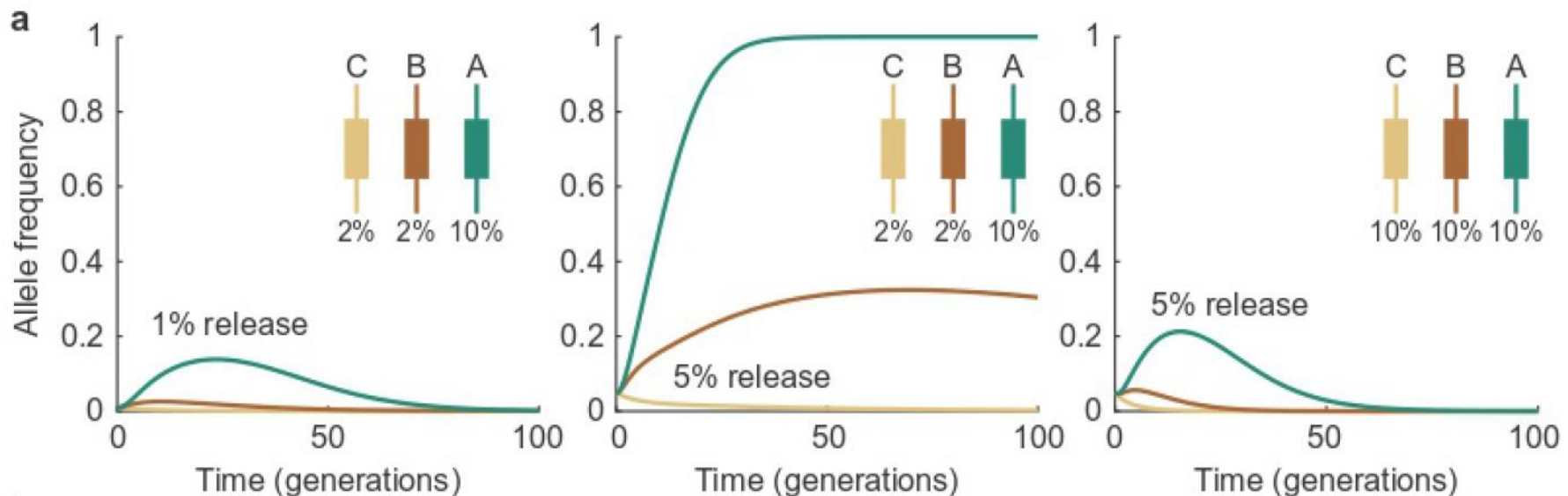
b Daisy drive: $C \xrightarrow{\text{drives}} B \xrightarrow{\text{drives}} A$



„Daisy chain“



- C – dědí polovina potomků
- B – gene drive ztrácí aktivitu
- A - gene drive ztrácí aktivitu

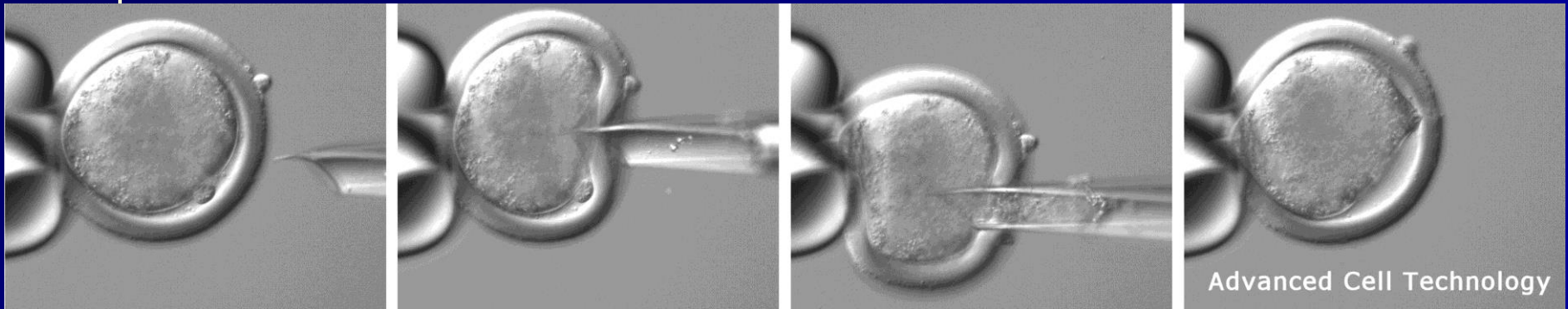


Anti-CRISPR proteiny

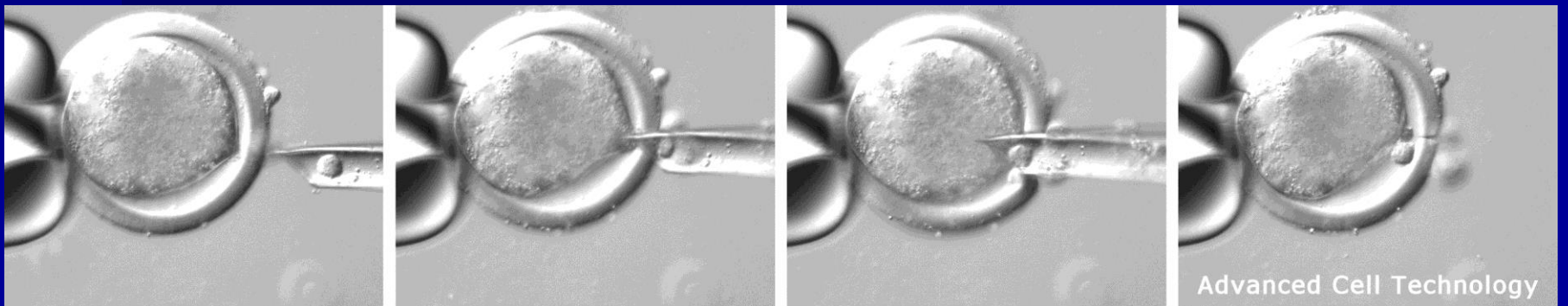
- Genom bakteriofágů obsahuje geny pro proteiny, které blokuji nukleázu Cas9
- Vyskytují se v bakteriích v plasmidech
- Obranný mechanismus bakteriofága proti „krisprové imunitě“
- Lze využít pro zablokování úpravy DNA systémem CRISPR-Cas9 jak v prokaryotech, tak v eukaryotech včetně lidských buněk.

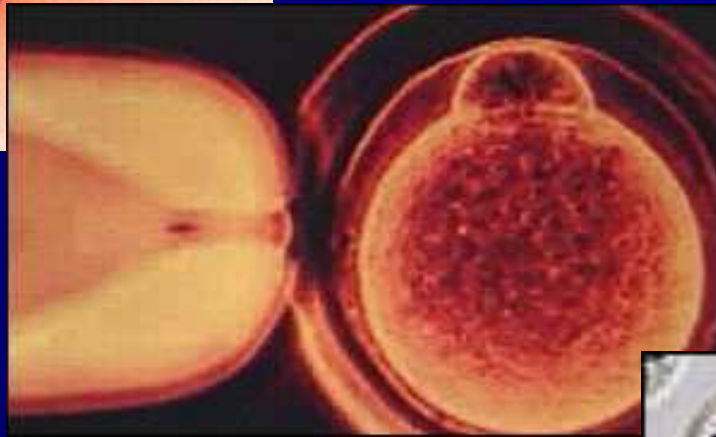
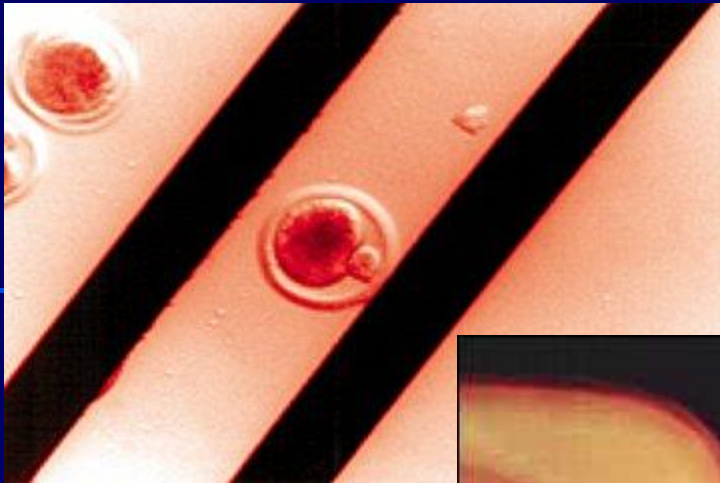
Přenos jader

Enukleace oocyty



Přenos somatické buňky pod zonu cytoplastu







Ian Wilmut
Roslin Institute
Skotsko



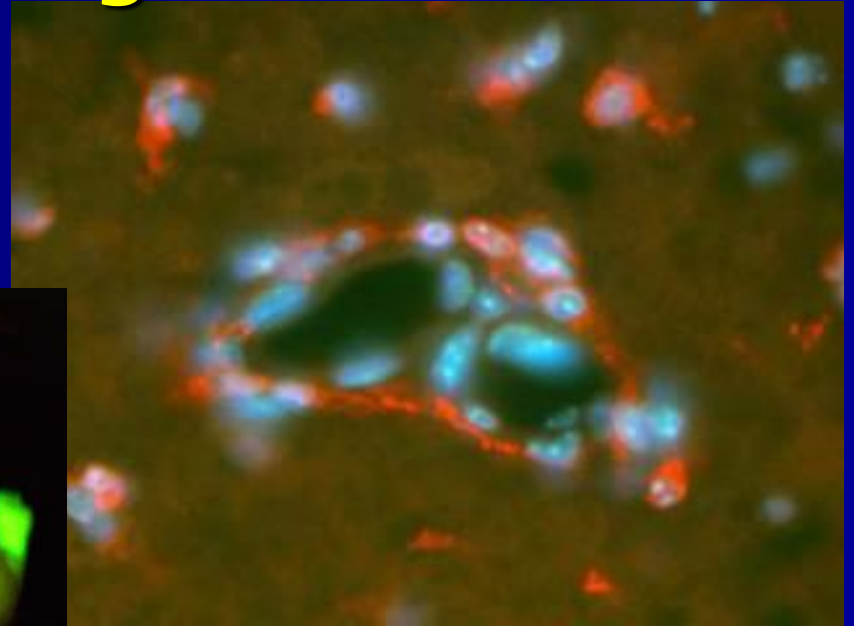
Ovce Dolly

Klony domácích zvířat



K čemu jsou GM živočichové?

Pouhý „kapric“ biologů?



Poznání funkce genů



Živé bioreaktory



Klony s genem pro lidský antitrypsin
léčba rozedmy plic

Živé bioreaktory



**Srážlivý faktor VIII a IX
léčba hemofilie**

První lék

z „živých bioreaktorů“



- **Atryn**
GTC Biotherapeutics
- **Povolen v EU 2006**
v USA 2009



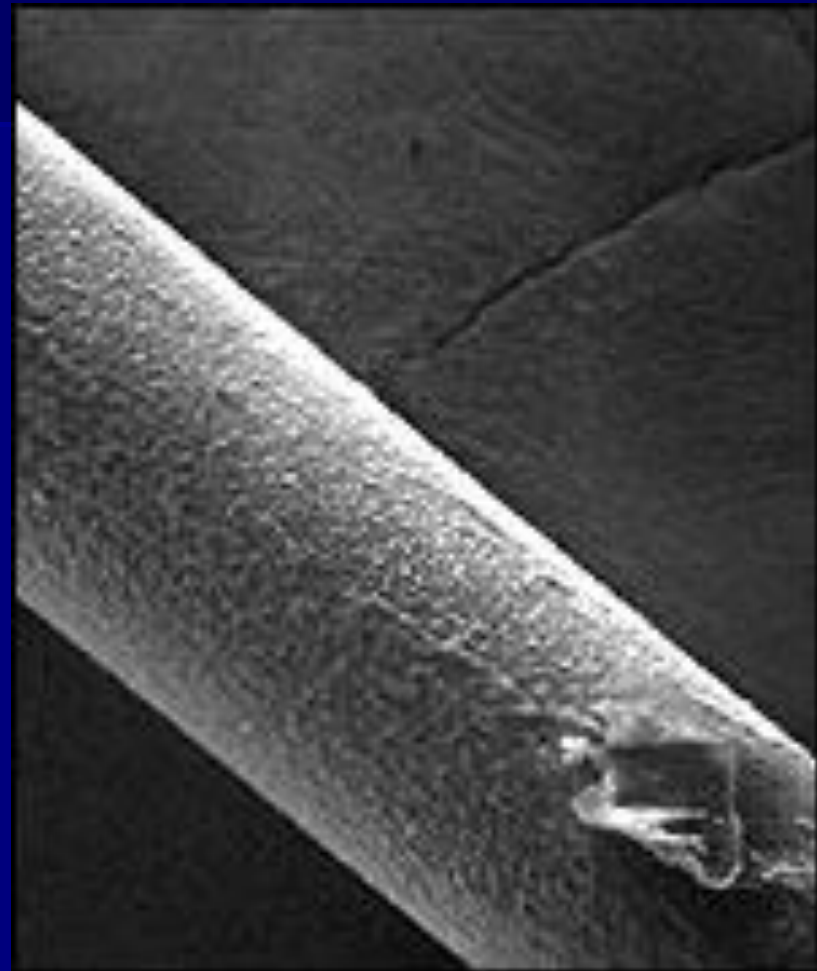
- **Antitrombin**
Potlačení nežádoucí
srážlivosti krve,
např. při operacích

Nové materiály



BioSteel

**Nexia Bioscience
Kanada**



Resilin

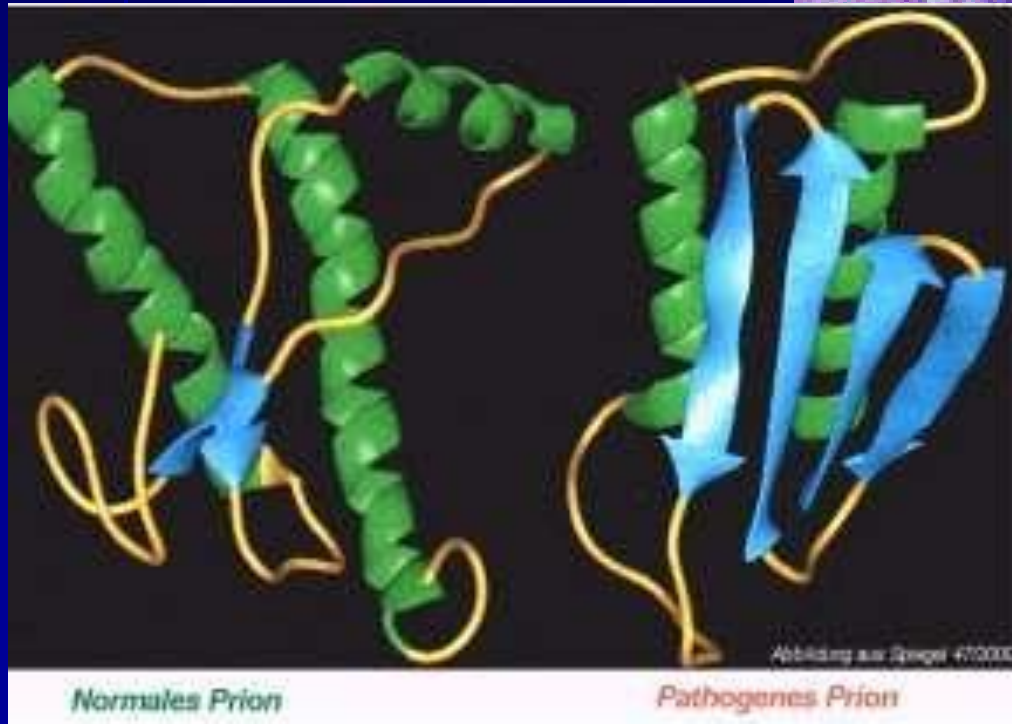
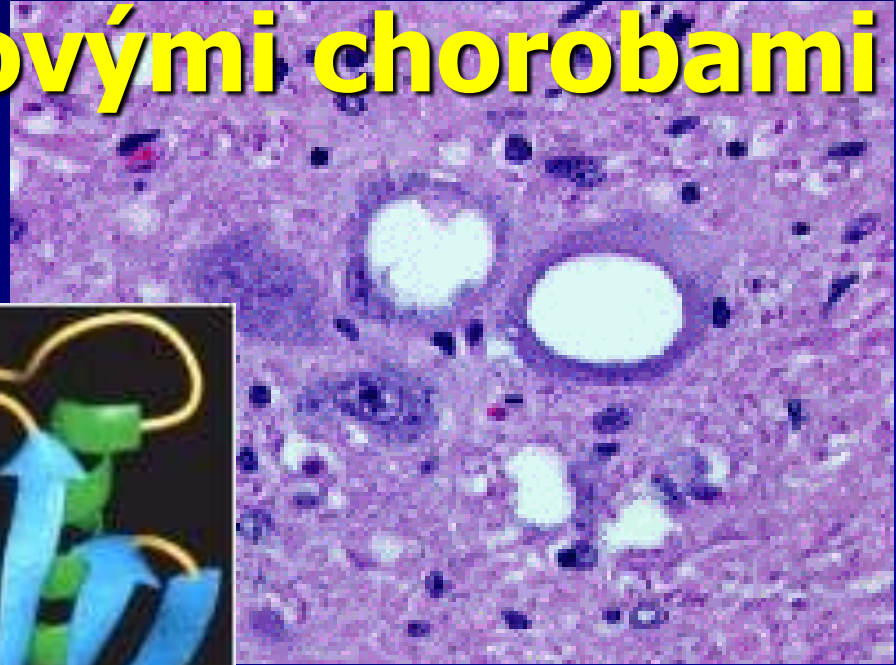


Genetický knockaut



Genový knockout

– boj s prionovými chorobami





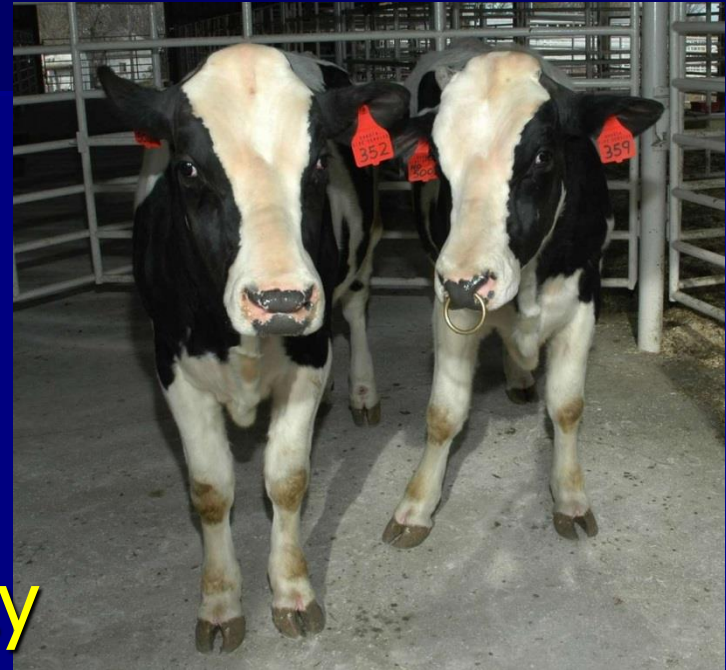
Skot rezistentní k BSE

Hematech – USA

RIKEN – Japonsko

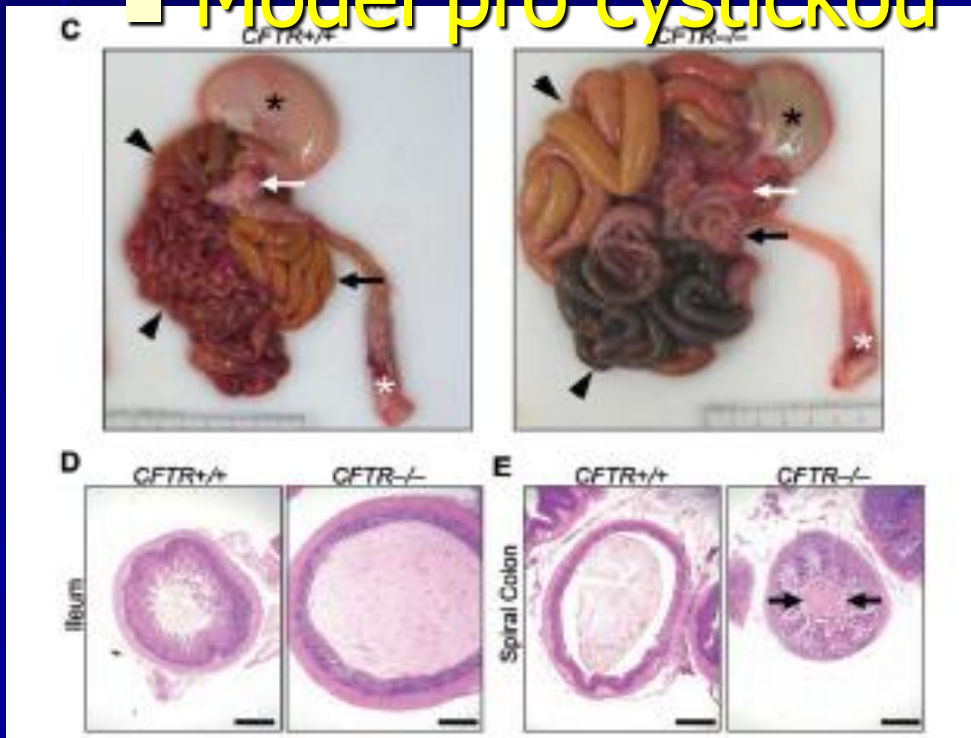
Texas A&M University

- 8 holštýnských býků
- Genový KO genu pro prionový protein

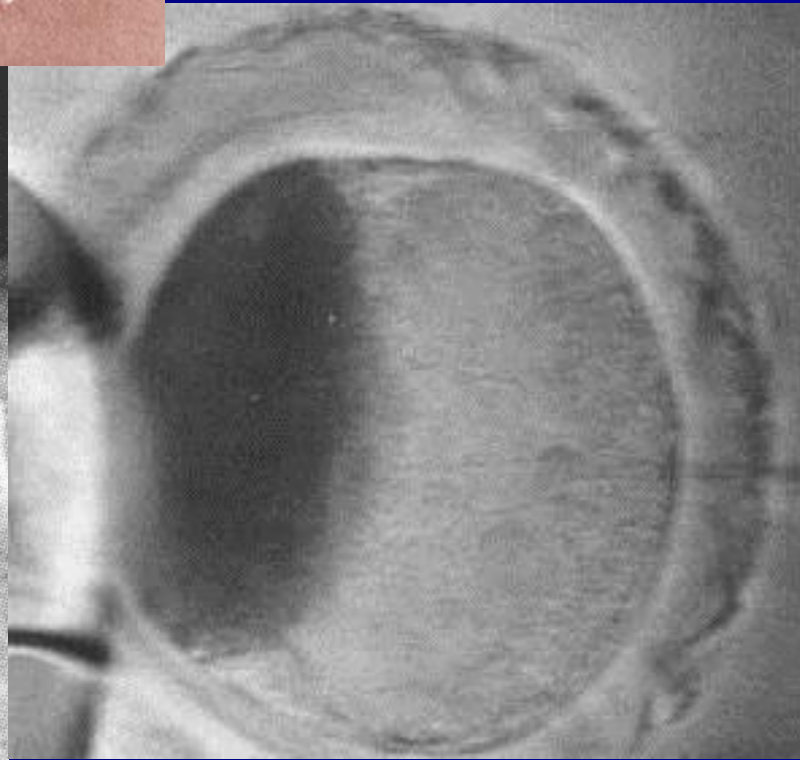
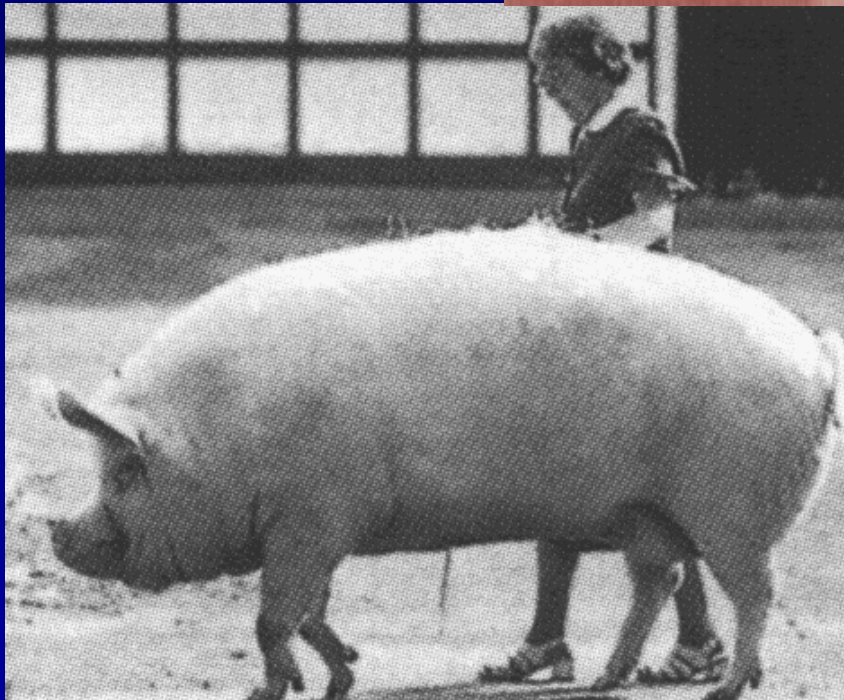


Zvířecí modely lidských dědičných chorob

- KO genu pro CFTR
- Model pro cystickou fibrózu



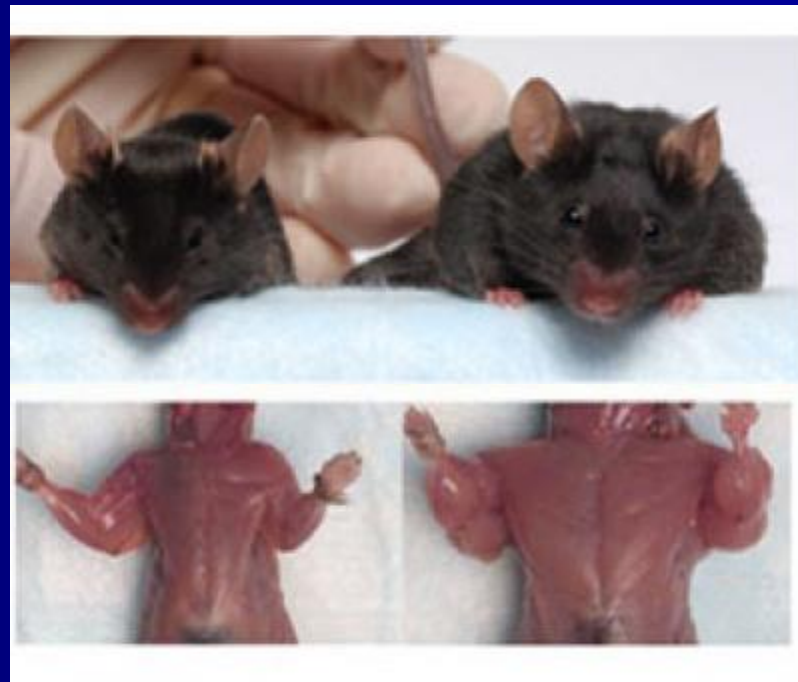
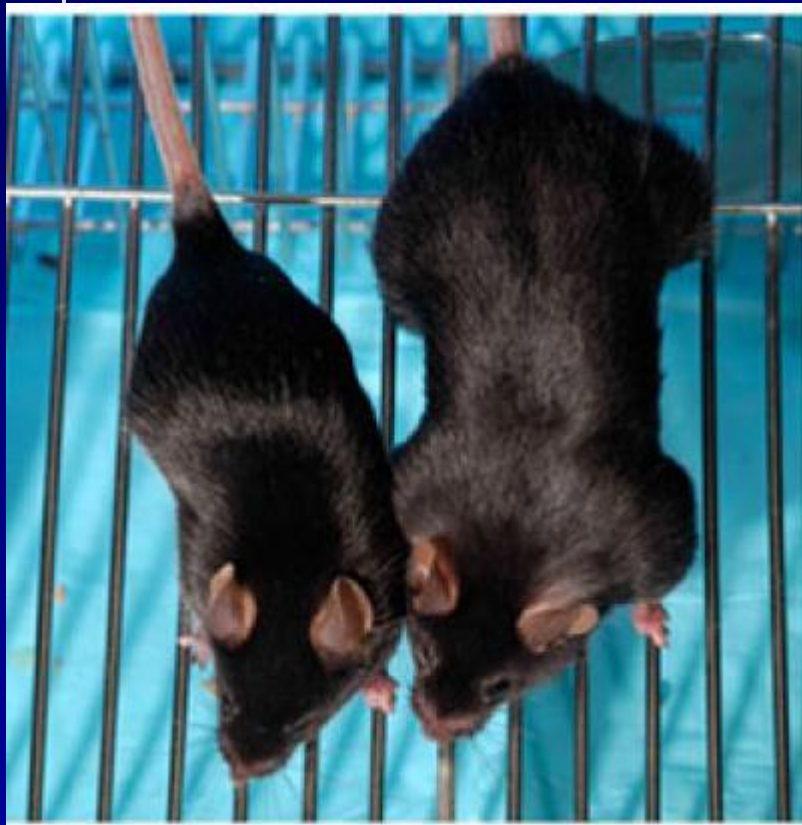
Beltsvillská prasata



Knokaut genu pro myostatin



Blok myostatatinu a zvýšená exprese follistatinu se doplňují



GM pstruh duhový

- Blok genu pro myostatin
- Funguje i u dalších obratlovců



Herman – Pharming (NL)



Prase s „omega-3“ ve svalech

- Do genomu prasete vnesen gen fat-1 z hlístice *Caenorhabditis elegans*
- Enzym konvertuje omega-6 polynenasycené mastné kyseliny na „omega-3“
- Se stejným genem byly modifikován i kur a ryby



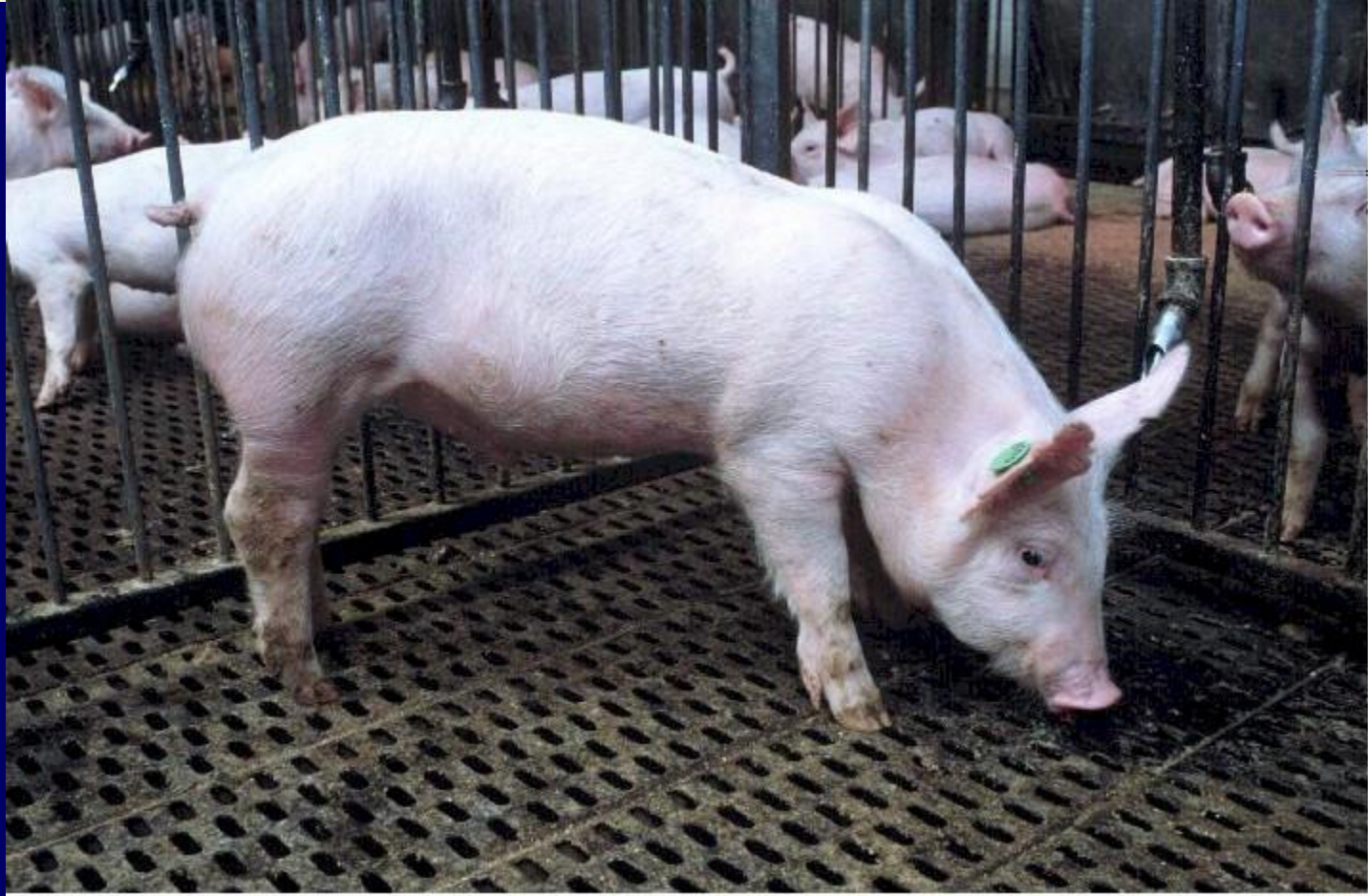
Hypoalergenní mléko

- Chybí alergenní beta-laktoglobulin



Daisy
AgResearch
NZ

Enviropig™



Xenotransplantace zvířecí orgány lidem

- **Není dost orgánů pro transplantace**



Pro

Proti

- Prasata je dost
- Jejich orgány mají vhodnou velikost
- Lze získat prasata bez patogenů
- Imunitní bariéra
- Hyperakutní rejekce – rychlé zničení orgánu
- Endogenní retroviry – riziko „děděných“ virů



Prasata pro xenotransplantace

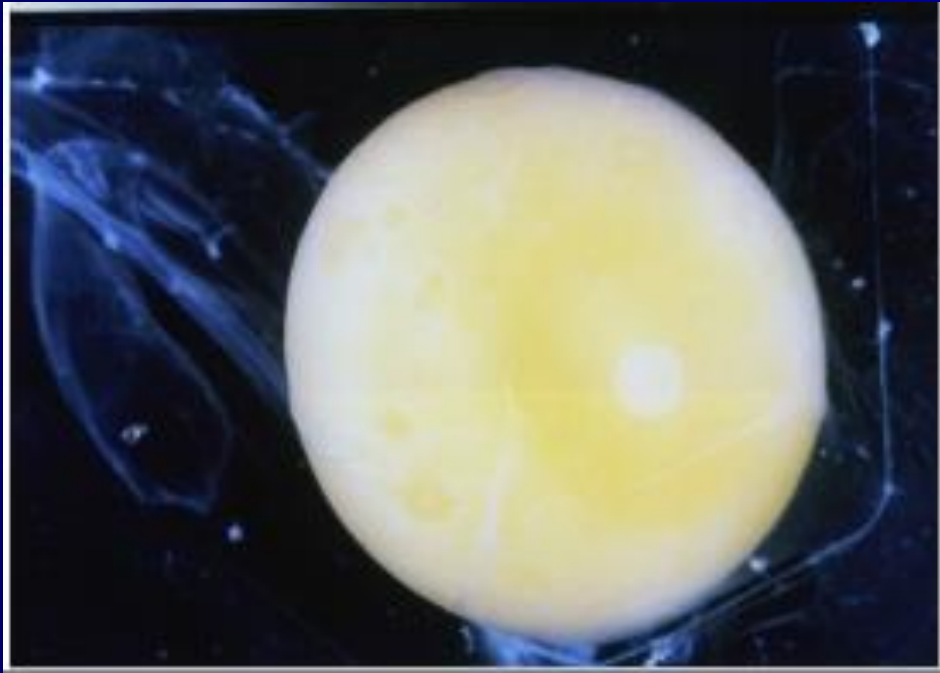
- Vyblokování prasečích genů (alfa-GAL)
- Vnesení lidských genů (hDAF, CD46)



Ptáci



Problémy – zvláštnosti reprodukce ptáků

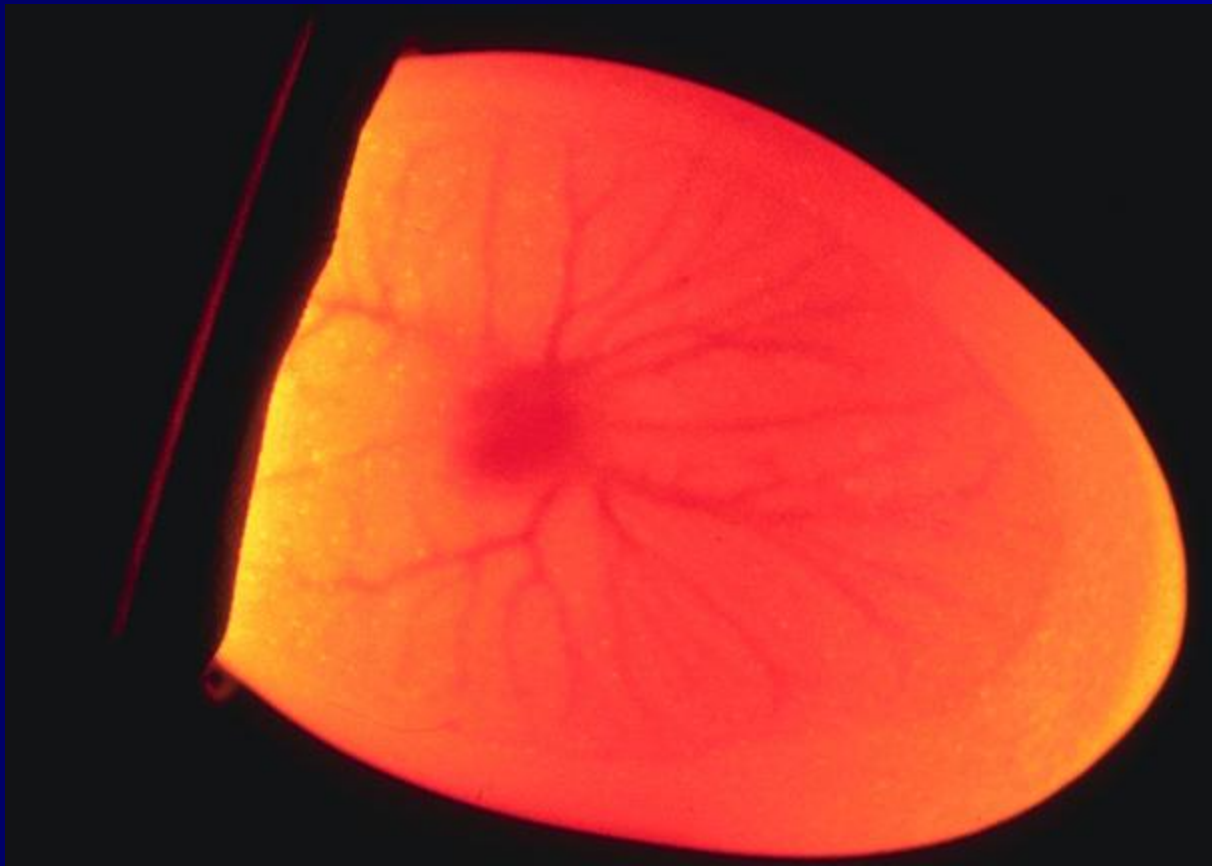


Za 24 hodin po ovulaci – 60 000 buněk

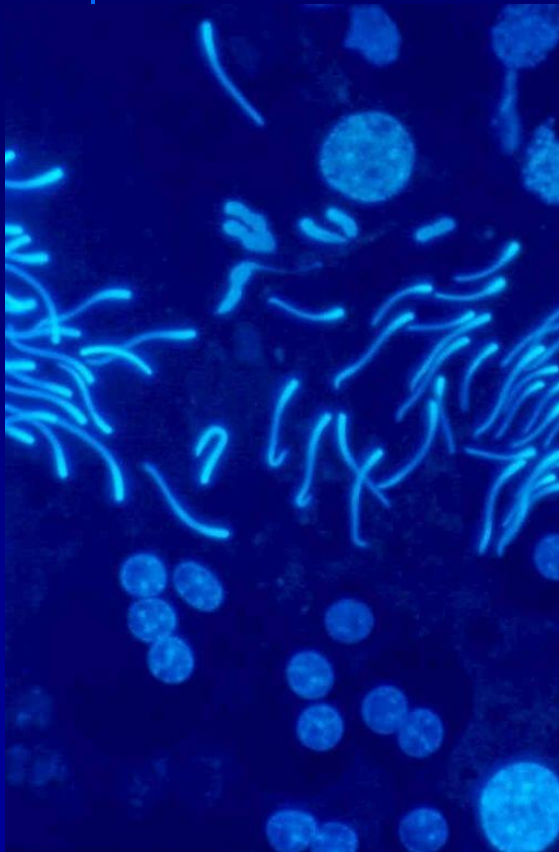
Metody tvorby geneticky modifikovaných ptáků



Transplantace PGC

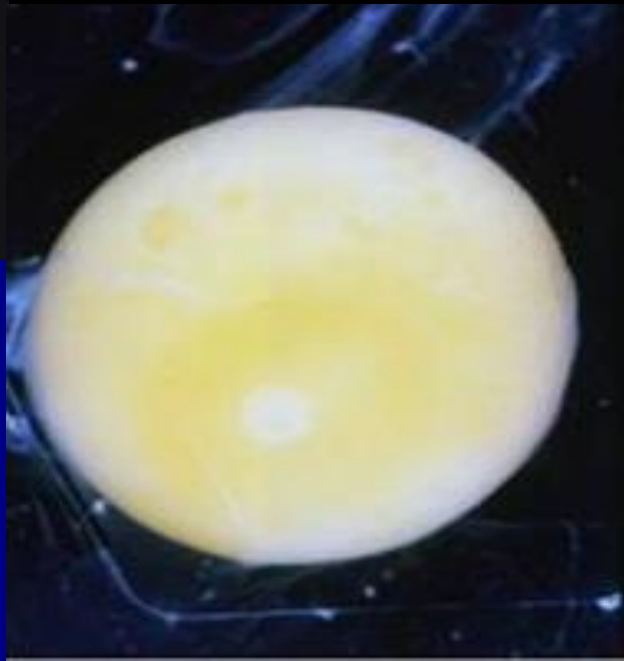
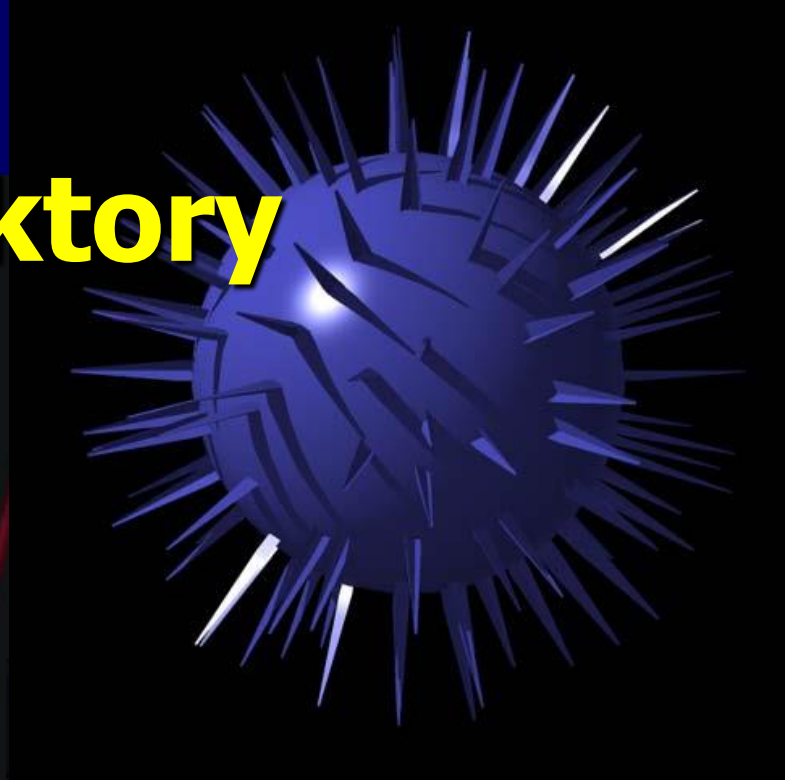
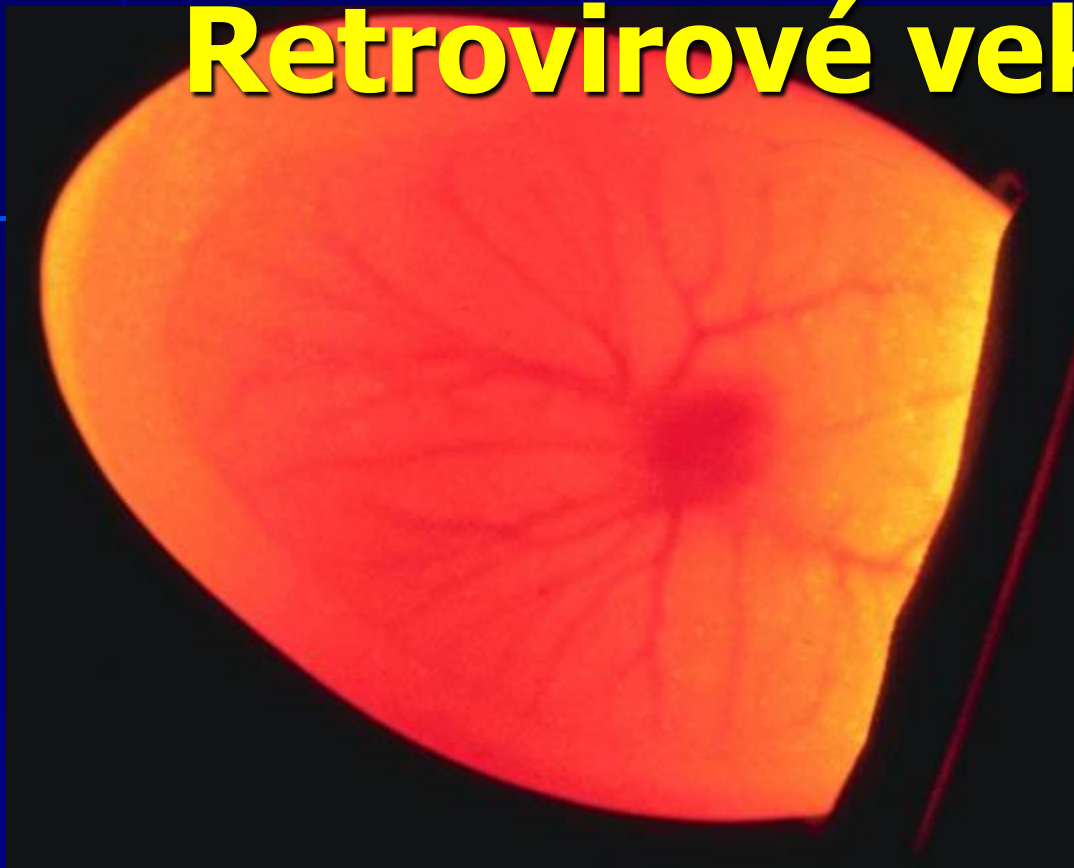


Transplantace spermatogonií



Eda

Retrovirové vektory





Využití geneticky modifikovaných ptáků

Odolnost k chorobám



„Zlatá vejce“



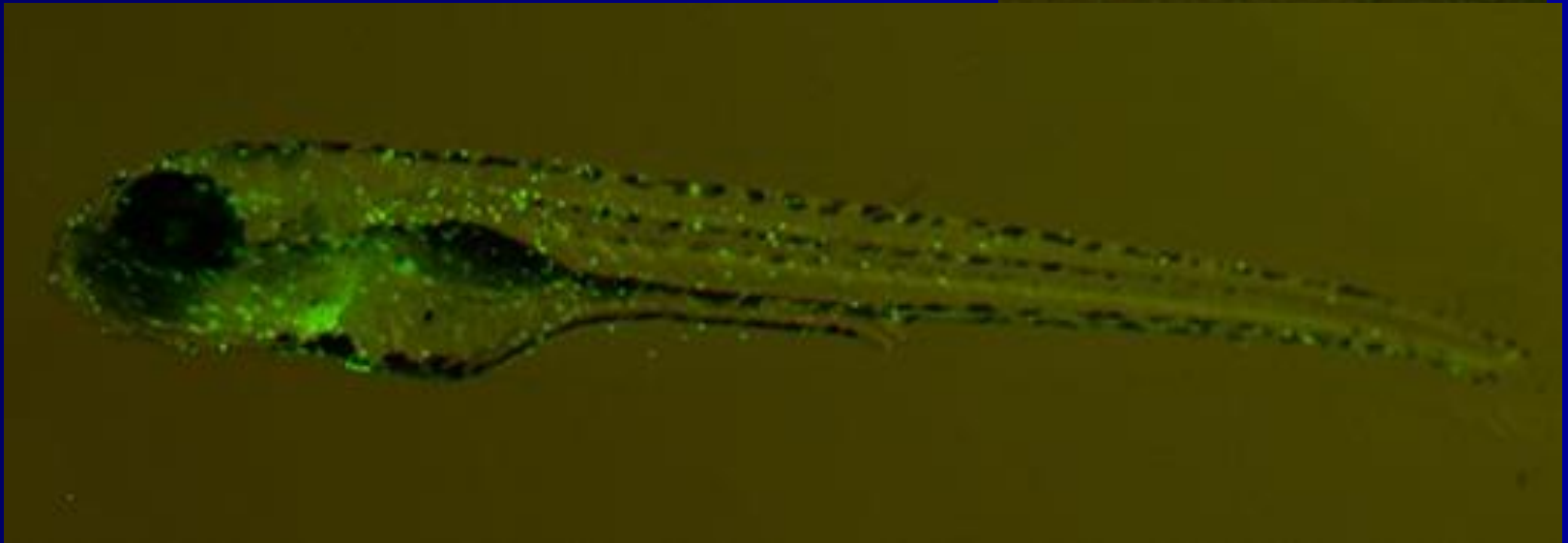
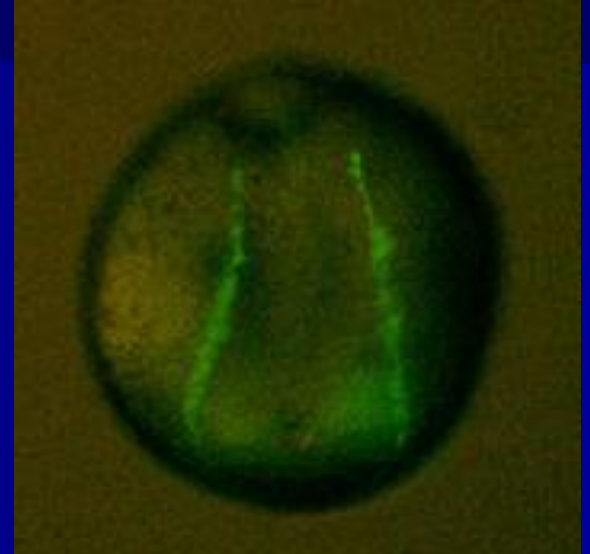
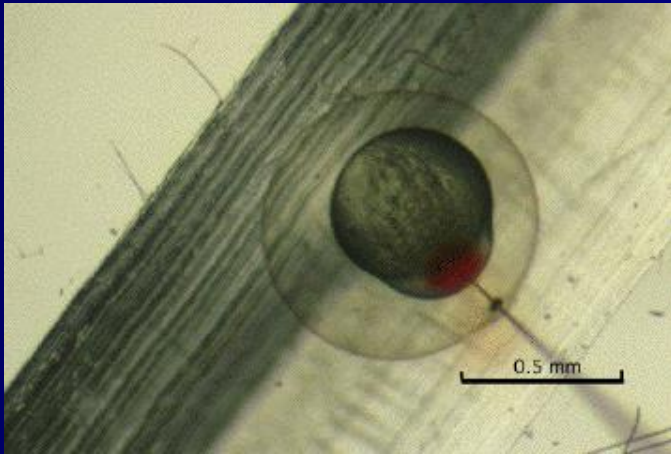
0,1 až 1 gram bílkoviny/ vejce
250 vajec/ rok
50 000 SF / 1 gram bílkoviny



Ryby



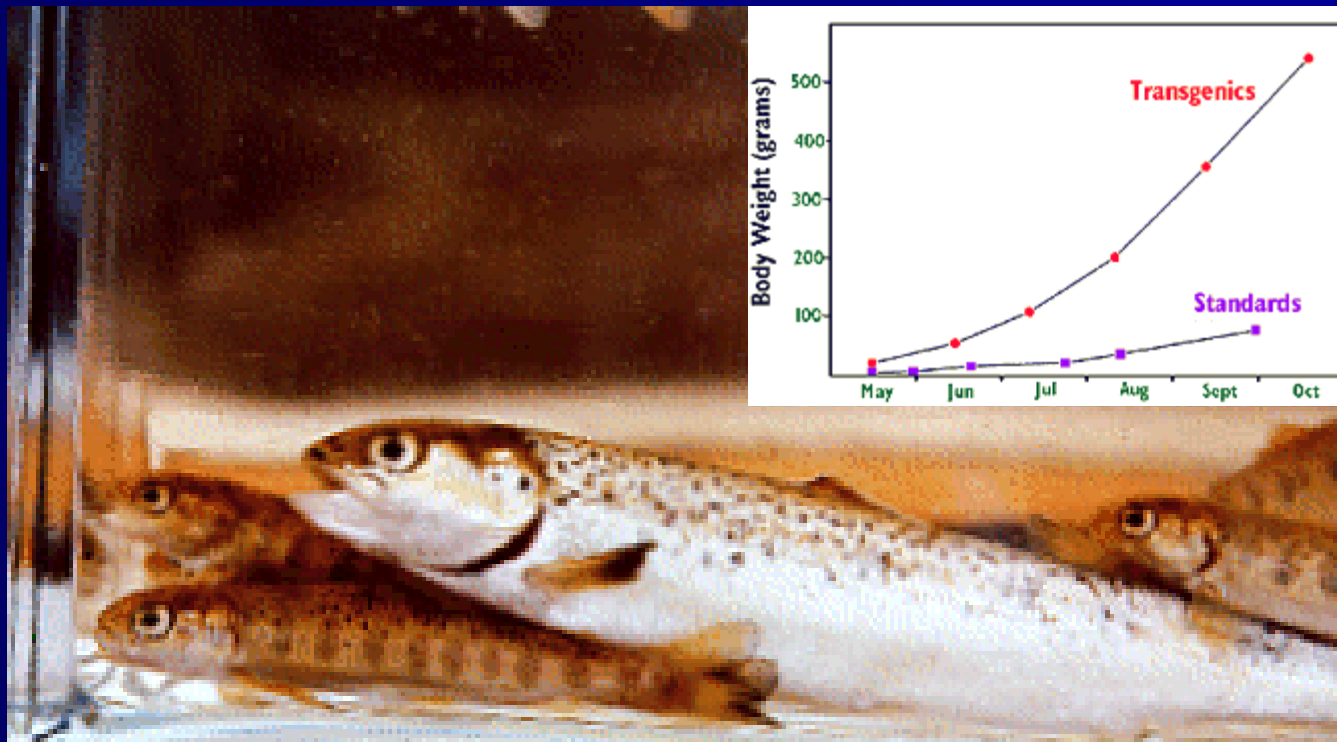
Mikroinjekce



Transplantace PGC



Indukce růstu přenosem genu pro GH „all fish gene“



GM losos AquAdvantage



William Muir Purdue University



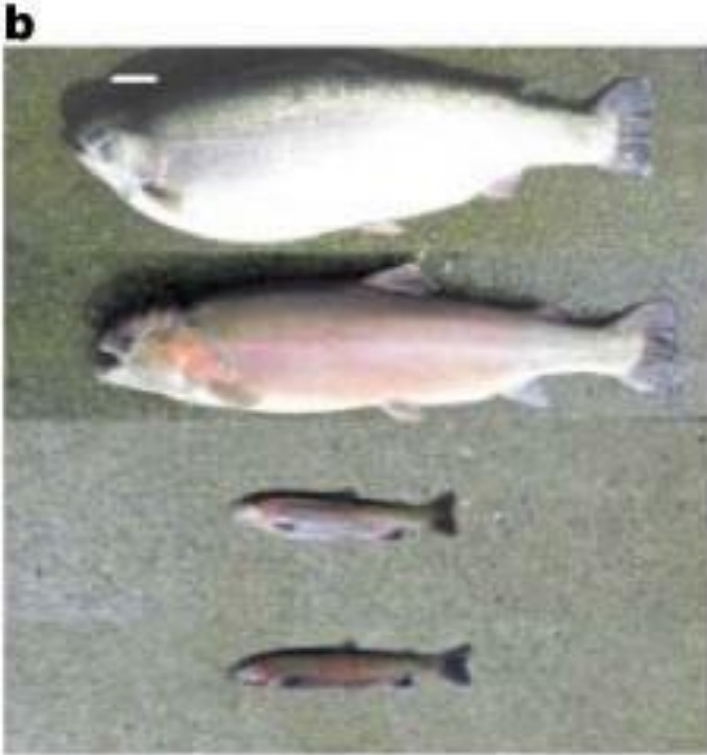
- Pokusy v laboratoři
- Počítačové modely
- Naznačují možnost úspěšnosti GM ryb v životním prostředí

GM ryby – gen pro GH

- Snížená životnost plůdku
- Zvýšená odolnost ke kanibalismu
- Lepší trávení bílkovin
- Jsou kompetitivnější
- Rychlost nejasná - menší (1/2) i větší (3x)
- Dříve pohlavně dospívají
- Pravděpodobně i úspěšnější při tření
- Vyšší produkce pohlavních buněk



GM ryby vs. divoké



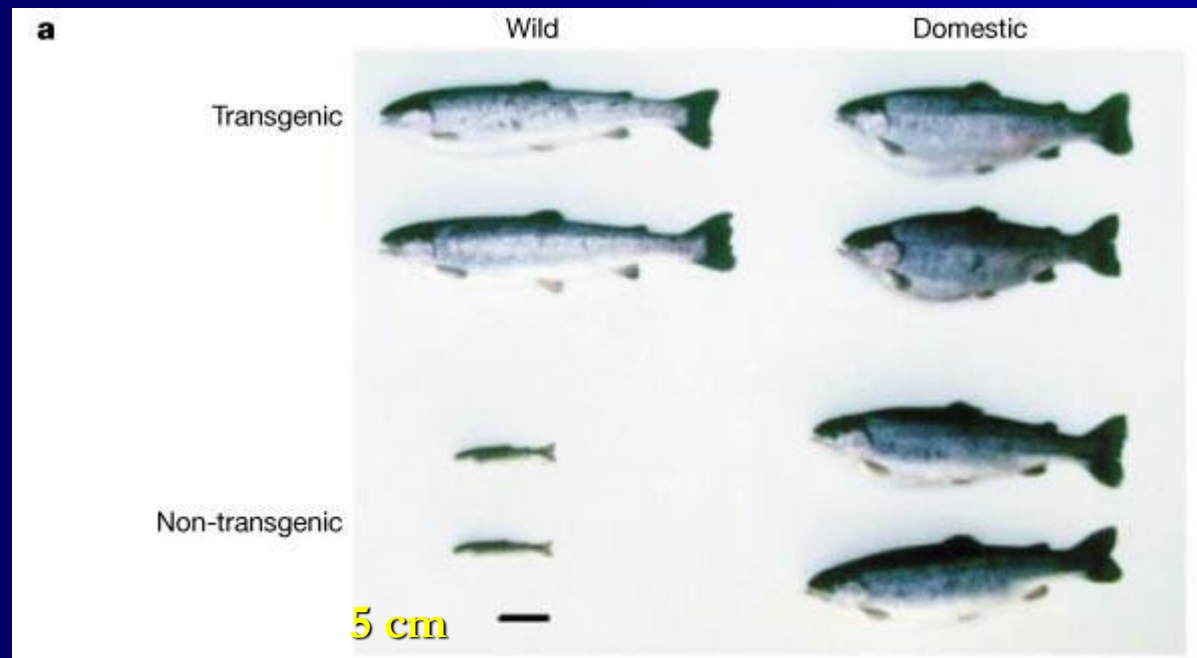
GM samice – 14,2 kg

GM samec – 8,2 kg

Divoká samice – 0,171 kg

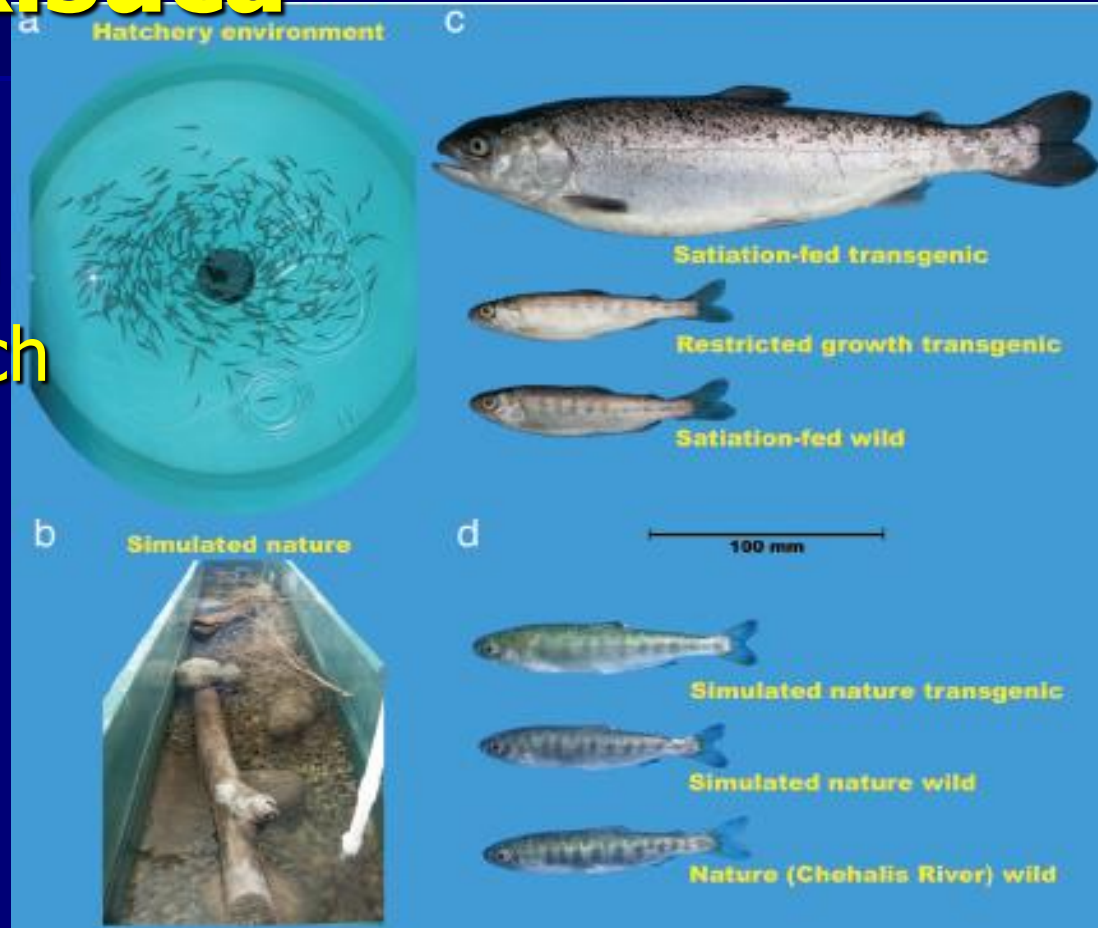
Divoký samec – 0,220 kg

U kulturních linií není efekt

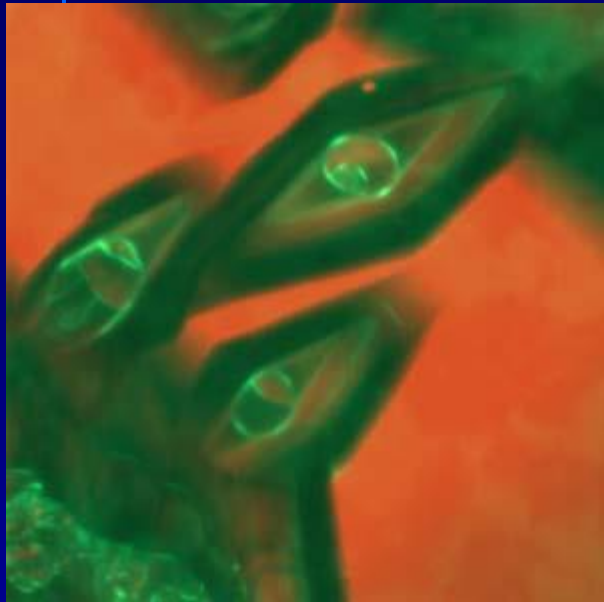


Vliv odchovu na růst GM losos kisuča

- Růstový potenciál GM ryb se uplatní jen v umělých podmínkách
délka GM ryby 3násobek
- V přírodních podmínkách GM větší o 20%



AFP



Geneticky modifikované akvarijní ryby



GLOFISH
GFP – danio pruhované

GM potkani - GFP

2011

- ČIŽP ujistila výskyt GFP+ potkanů v zájmových chovech a jejich export



Foto Dr. K. Angelis

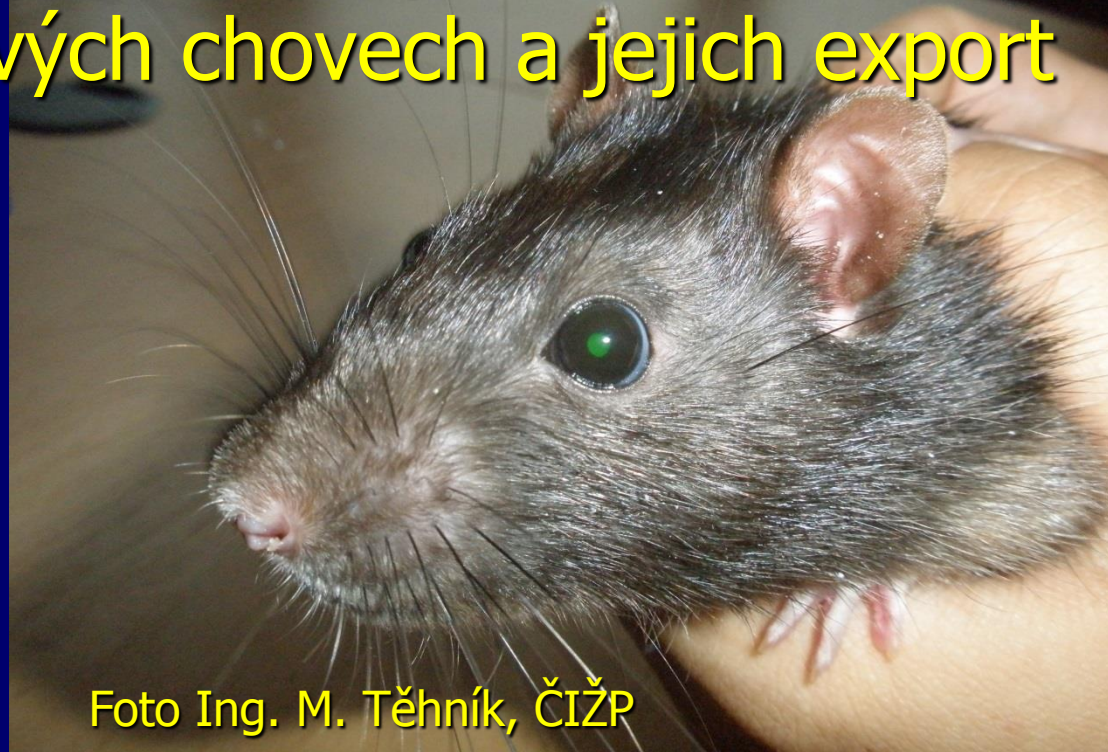


Foto Ing. M. Těhník, ČIŽP

Máme se bát GM živočichů?

- Domestikace změnila zvířata
k nepoznání

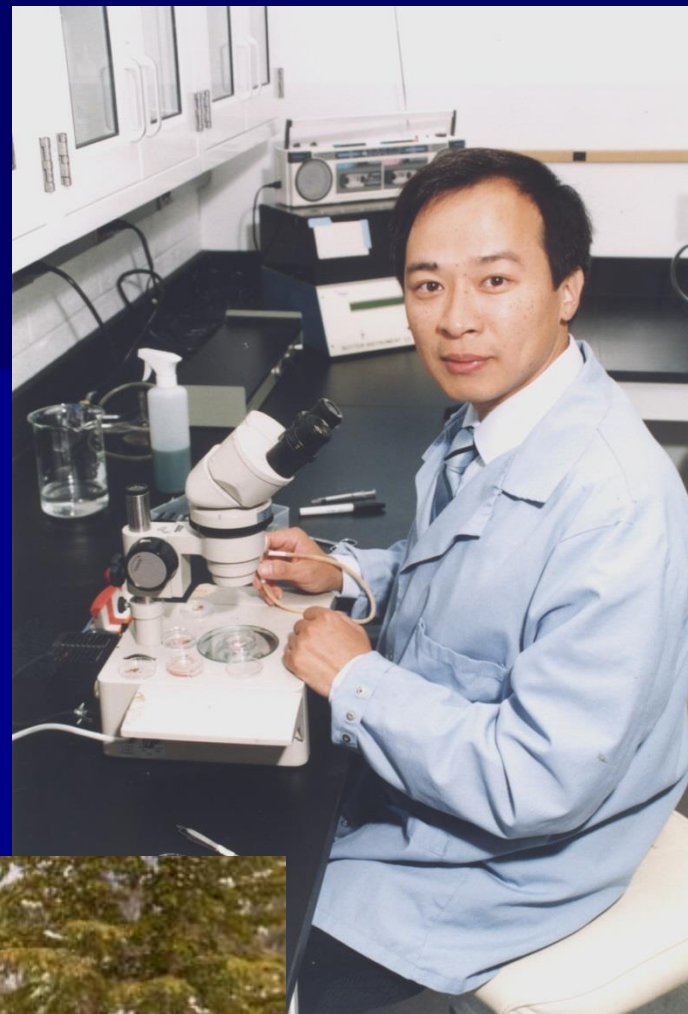


Máme se bát GM živočichů?



- Genetické modifikace - pokračování procesu, který začal před 10 000 roky

Chytrí psi



Chytrí psi



Zatím je to jen scifi, ale jednou ...

Děkuji za pozornost.

Můžeme jíst GMO?



GMO - free

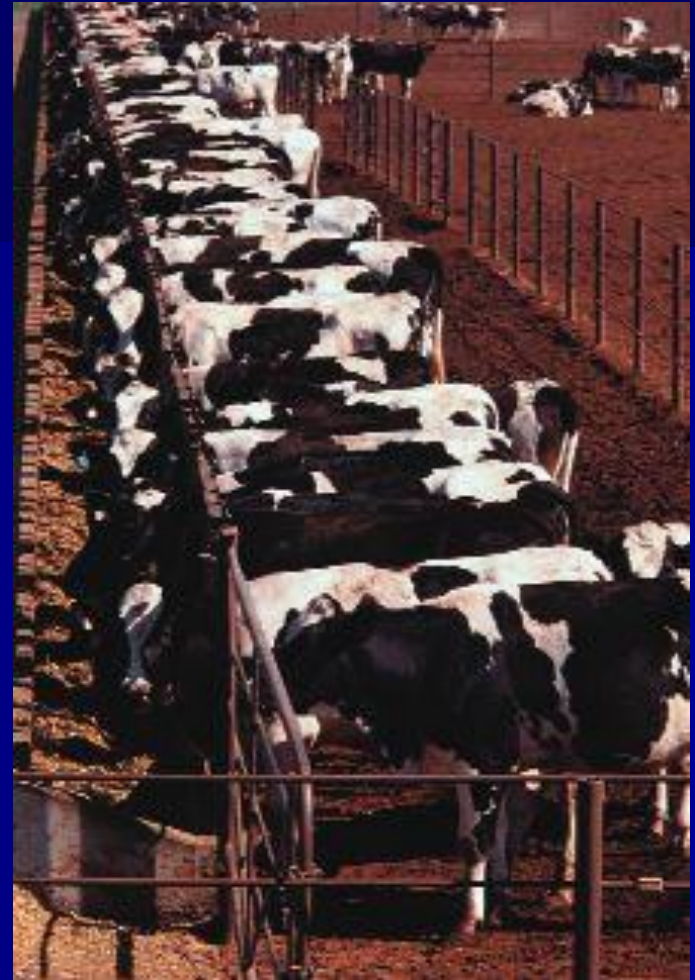


**1998 – obchodní řetězec Iceland (Flintshire)
zákaz GMO v prodávaných potravinách**

**1999 – „samozákazů“ velkých obchodních řetězců
Sainsbury's – UK
Carrefour – Francie
Migros – Švýcarsko
Effelunga – Itálie
Superquin – Irsko**



Ve druhé vlně



- „samozákaz“ potravin z produktů zvířat krmených GMO

V České republice



- Některé mlékárny dávají do smlouvy s dodavatelem mléka následující formulaci:
„Prodávající nebude pro přežvýkavce používat krmiva geneticky modifikovaná. U prodávajícího nebude používána geneticky modifikovaná setba ani rostliny.“

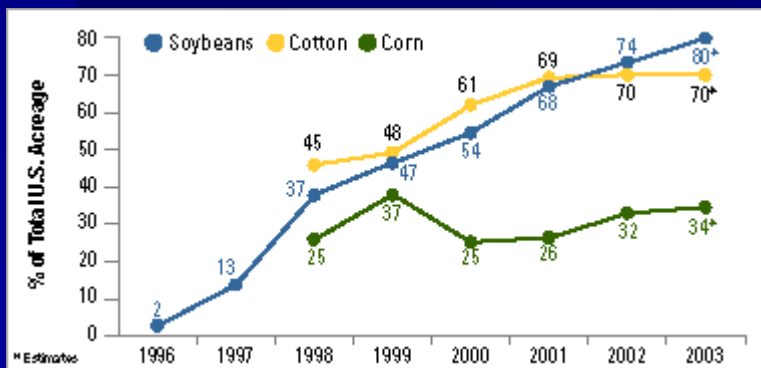
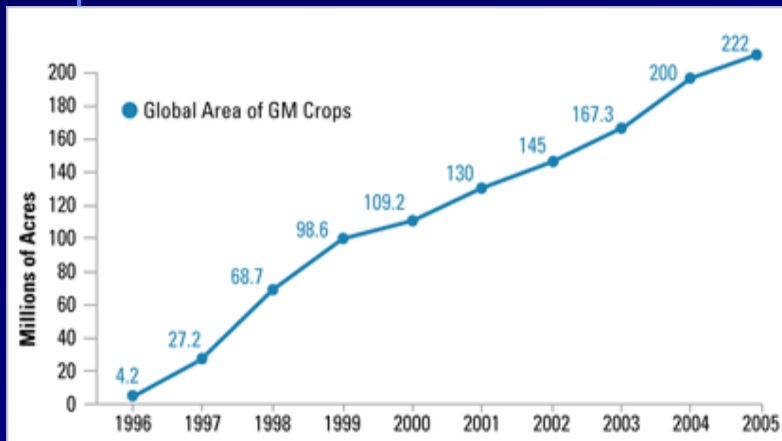
Není to reakce na obavy zákazníků



Jde o obchodní trik.

GMO ve světě stále přibývá

Hlavní producenti:
USA
Kanada
Argentina
Čína

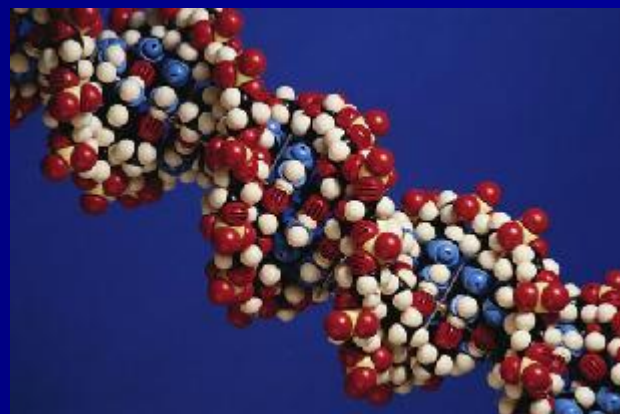


Hlavní plodiny:
Kukuřice
Sója
Bavlník

Kolik je DNA v krmivech a potravinách ?



0,005 až 0,02 %
sušiny





GM kukuřice

„cizí gen“ 4000 písmen



0,0004% DNA kukuřice

Hypotetický příklad: brojler

Krmná dávka - jen kukuřice



Veškerá kukuřice jen GMO

Brojler zkonzumuje za celý výkrm



300 mg DNA kukuřice

1 μ g „cizího genu“

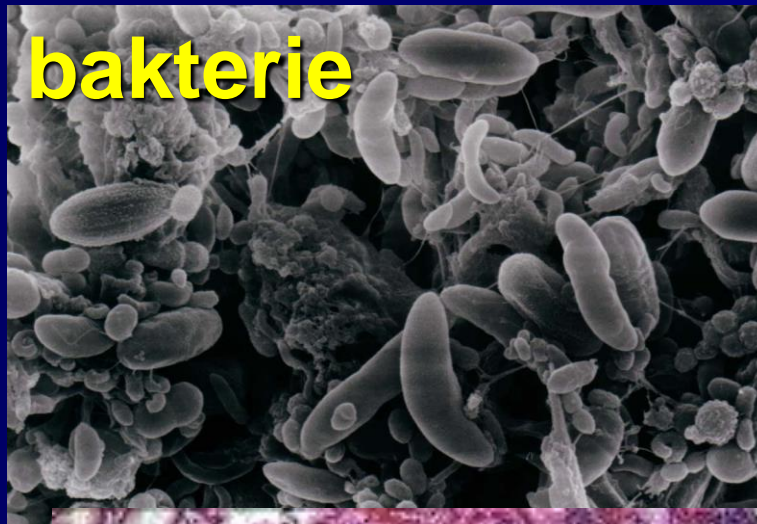
Proč by měla kuřeti vadit „cizí“ DNA, když mu nevadí DNA kukuřice?

**Pokud byl zjištěn efekt GM
krmiva na brojlerů či
nosnice, pak je pozitivní**

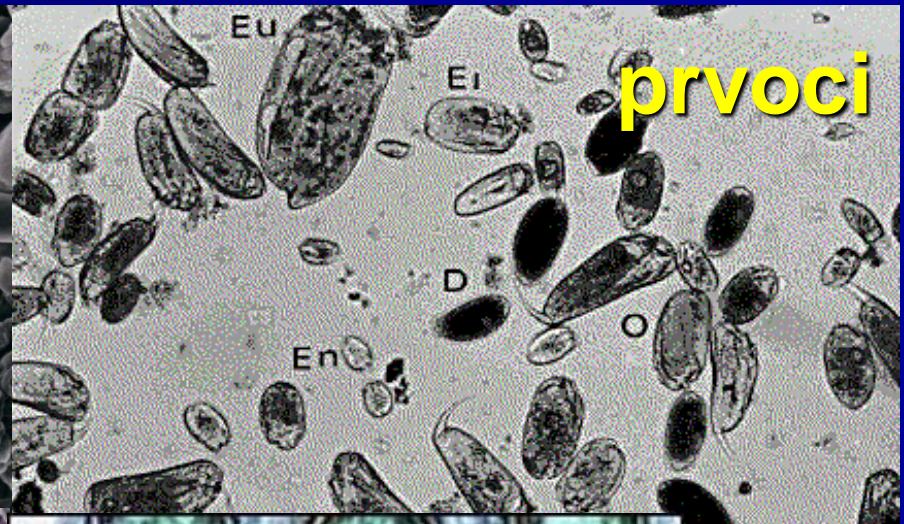


Neobsahují mykotoxiny

DNA z potravy není jediná



bakterie



prvoci



buňky sliznice



viry

Člověk má ve střevu



- **10^{14} ks bakterií**
- **500 druhů virů**
- **X druhů prvoků**

DNA se rozkládá

- Kyselým prostředím
- Enzymy (DNáza I a DNáza II)

85 % DNA z potravy je rozloženo na „písmena“ genetického kódu ještě před vstupem do dvanáctníku.



Jaká jsou rizika krmiv z GMO?



Toxicita krmiv z GMO

I geneticky nemodifikovaná krmiva obsahují toxiny.

Sója – genistein

Brambor – solanin

GMO – toxikologicky prověřena

U GMO lze snížit „přirozenou“ toxicitu.



Toxikologické testy

- **Testuje se**

- 1) GM plodina

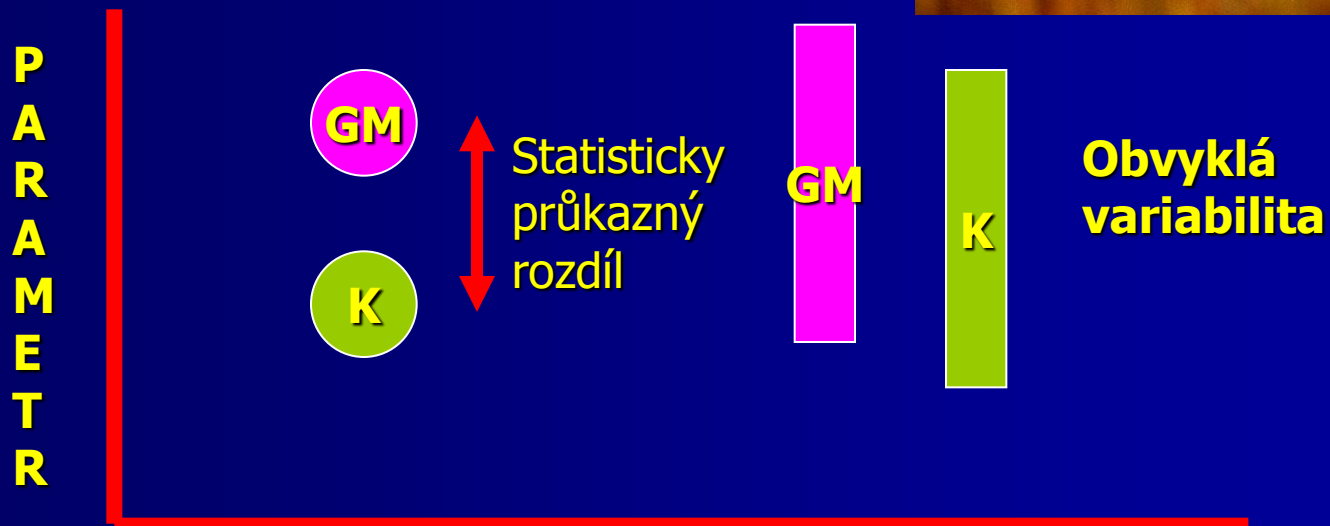
- 2) Odpovídají nemodifikovaná linie

- 3) Odpovídající nemodifikovaná linie s
přídavkem produktu genetické modifikace



Čím vším se liší plodiny?

- GM plodina a její nemodifikované kontroly nemohou být pěstovány ve stejných podmínkách



Čím se liší zvířata?

- Dostávají krmivo, které se liší obsahem mnoha látek, přičemž všechny rozdíly nejsou důsledkem modifikace

Fyziologický ukazatel



GM

K



Statisticky průkazný rozdíl

Fyziologické hodnoty

Alergenita krmiv z GMO

Alergenní jsou i ostatní krmiva.

Alergenní potraviny
– kiwi, ořechy, ryby atd.

Je třeba prověřovat alergenitu krmiv
snížit rizika při „zatoulání“ do potravin.



„Co se dá sníst, to lidé snědí!“

GM hrách inhibitor alfa-amylázy fazolu



Zrnokaz hrachový *Bruchus pisorum*



Vývoj ukončen 2006

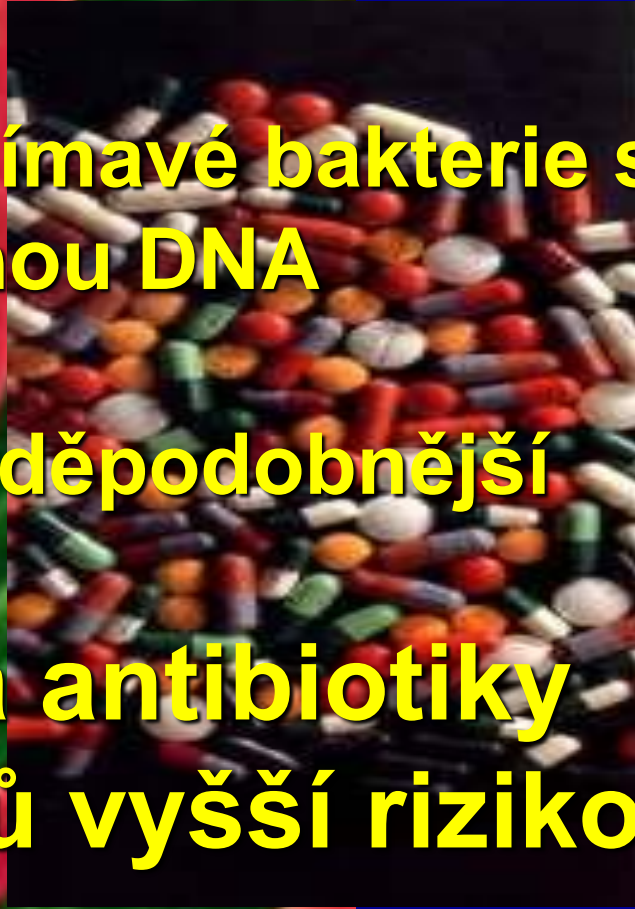


**Šance přenosu genu na bakterie
v prostředí i ve zvířeti je extrémně nízká**

**10^{-11} až 10^{-13} / 1 kontakt vnímavé bakterie s
vhodnou DNA**

Mutace – 1000krát pravděpodobnější

**Krmení a léčba antibiotiky
- o několik řádů vyšší riziko!**



Zdrojem rezistence jsou i akvakultury ve třetím světě



Při současné míře migrace neexistují proti šíření účinné bariéry.

Přenos genů z GMO potravy na zvíře a na člověka

Výjimečně

**(velké množství DNA,
hypometylace apod.)**

**může malé množství zlomků DNA
přejít přes střevní stěnu**

Pohlí je bílé krvinky.



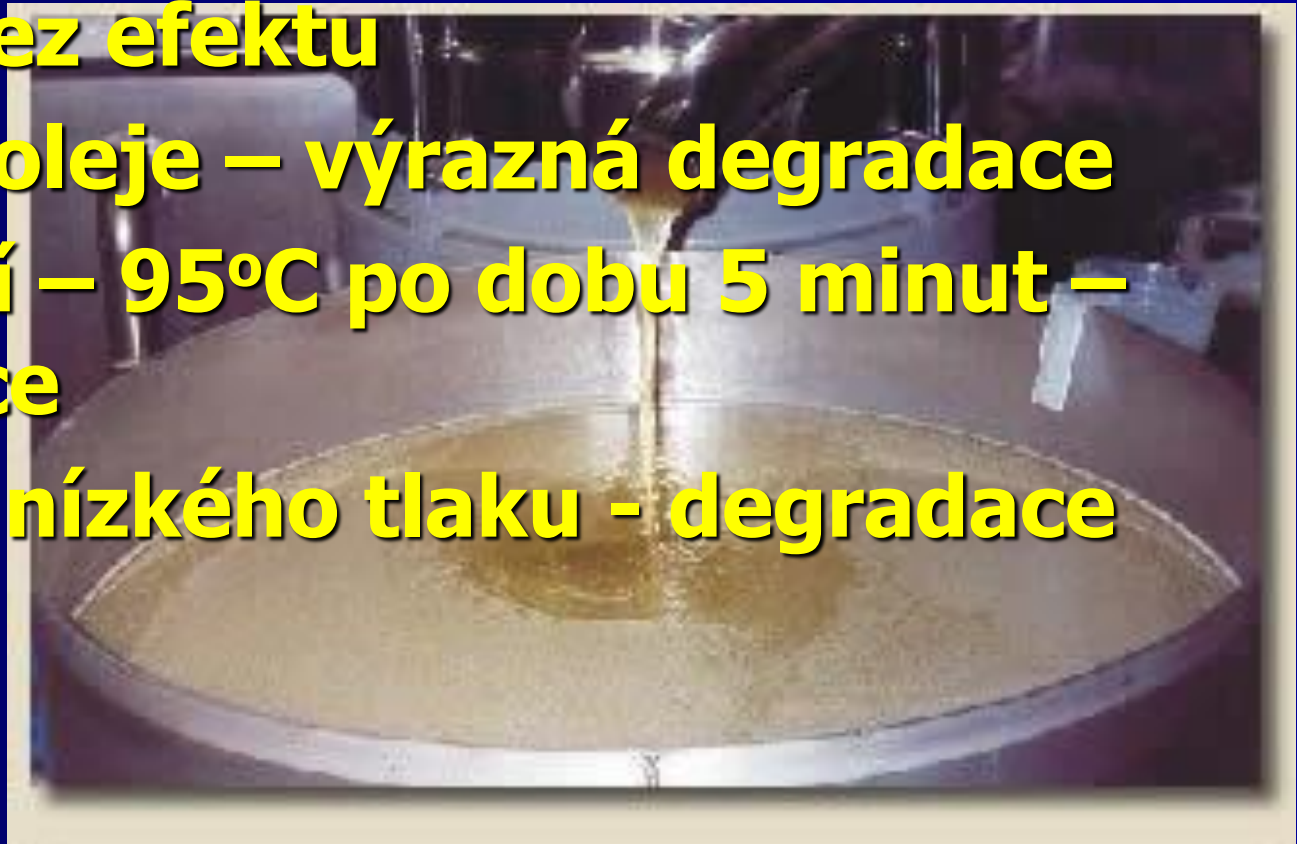
Pravděpodobnost zabudování genu do živočišné buňky



**V genomu živočichů včetně člověka
nebyly nalezeny geny vyšších rostlin.
Produkty používaných genů jsou
prověřeny (toxikologicky apod.)**

Rozklad DNA při zpracování krmiv

- Mletí – bez efektu
- Lisování oleje – výrazná degradace
- Zahřívání – 95°C po dobu 5 minut – degradace
- Pára i za nízkého tlaku - degradace





**Nelze od sebe odlišit
produkty zvířat krmených
GMO od produktů zvířat
krmených „GMO-free“
krmivy.**

„GMO-free“ krmiva a potraviny...



... jako chodit jen po bílých dlaždicích

Závěry:

GMO pro krmiva a potraviny

- testovány a schvalovány

Přenos genů z krmiv a potravin na mikroorganismy - nepravděpodobný

GMO jako krmiva a potraviny

- bezpečné

Produkty zvířat krmených GMO

- bezpečné