

Antropologie a moderní trendy v biologii

Jaroslav PETR
VÚŽV v.v.i.

petr@vuzv.cz

Biotechnologie



„Jakákoliv technologie využívající za specifickým účelem biologické systémy, živé organismy a jejich produkty k tvorbě nebo proměně produktů či procesů.“



OSN Smlouva o biodiverzitě

Pěstování zelí a jeho kysání – biotechnologie?



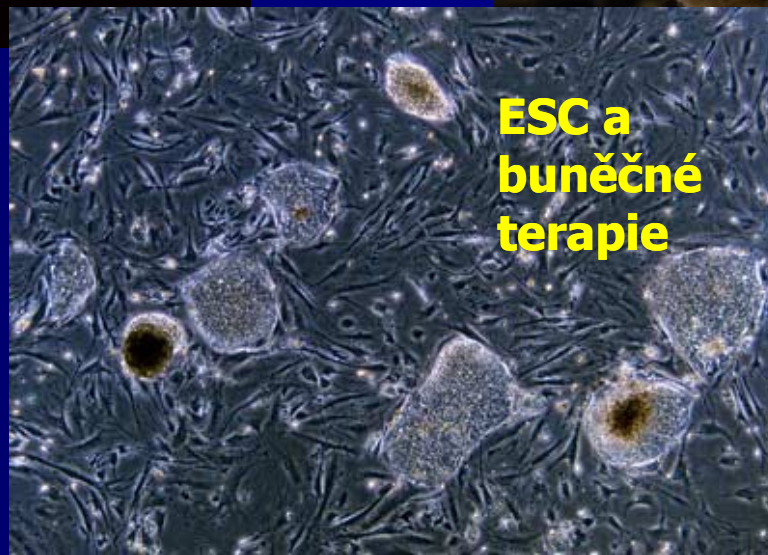
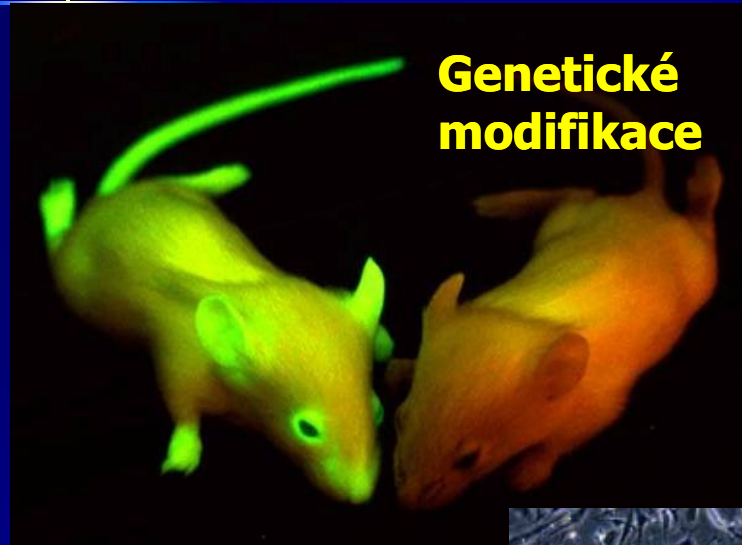
Biotechnologie

Těží z mnoha vědních oborů

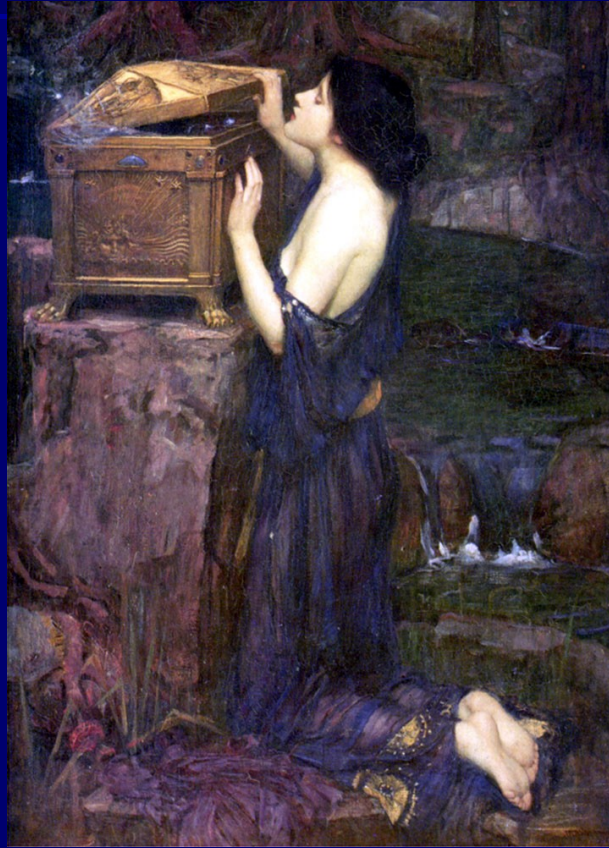
- Genetika
- Molekulární biologie
- Buněčná biologie
- Mikrobiologie
- Biochemie
- Embryologie
- aj.



Biotechnologie

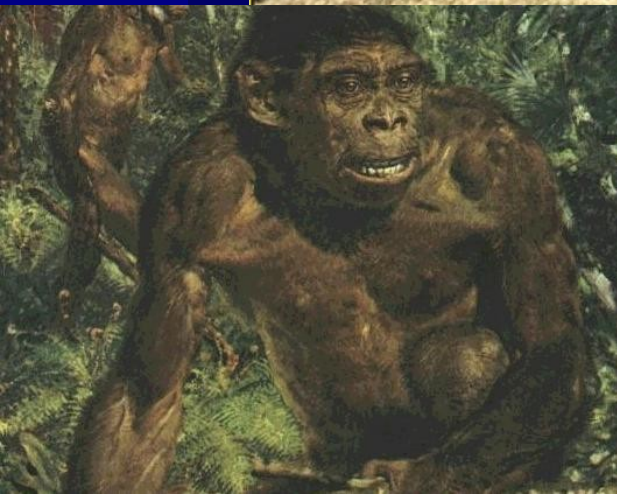


Přinášejí biotechnologie zásadní zvrát?



Otvíráme Pandořinu skříňku?

Člověk mění svět



Panenské pralesy?

1541-2 - splutí Amazonky
deníky Gaspara de Carvajal

Francisco de Orellana
1500 – 1549

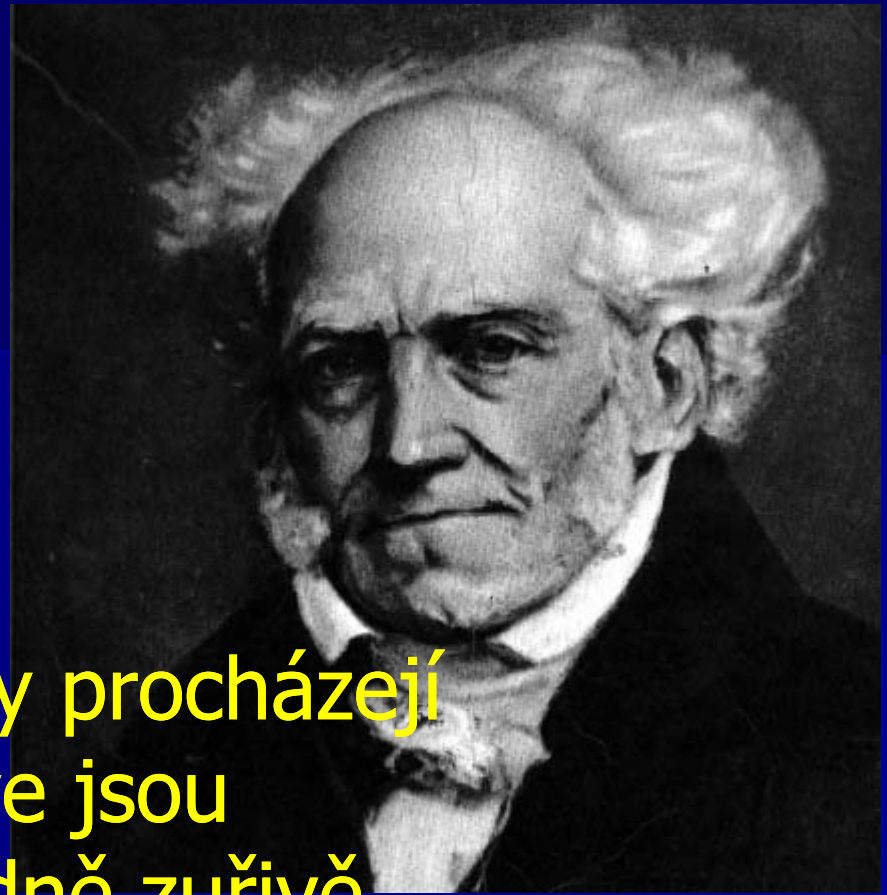


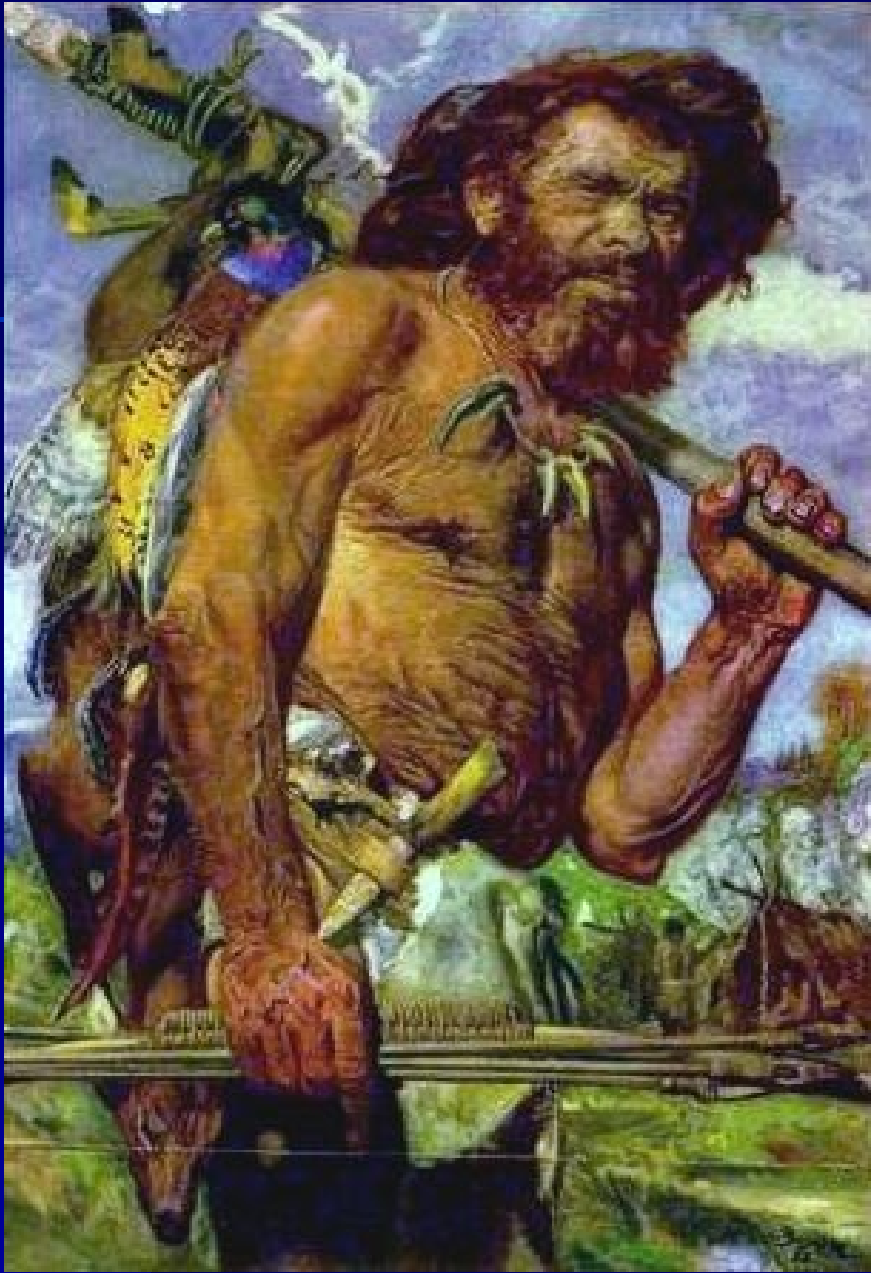
Změna rostlin a zvířat domestikací



„Všechny zásadní objevy procházejí třemi etapami. Nejprve jsou zesměšňovány, následně zuřivě popírány, aby byly nakonec přijaty jako naprostá samozřejmost.“

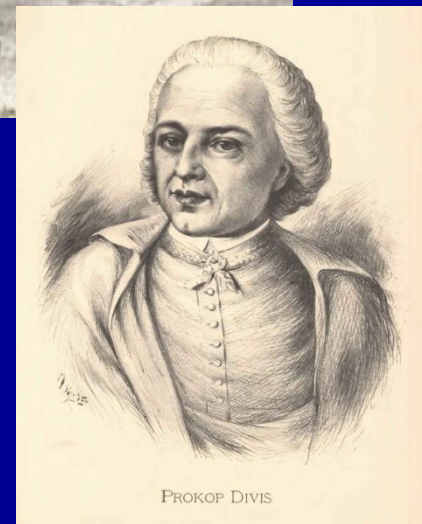
Arthur Schopenhauer



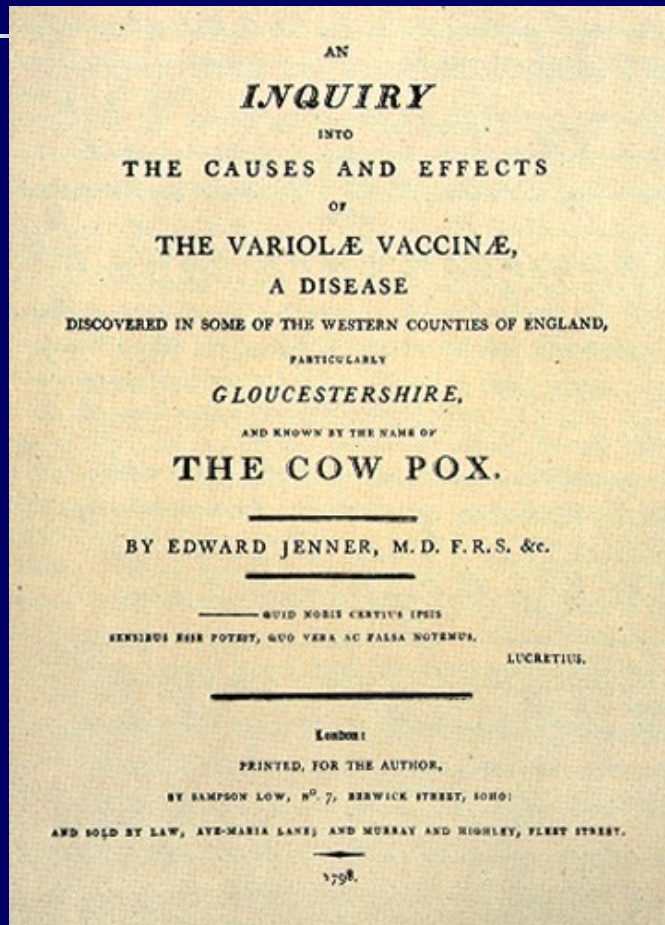


Benjamin Franklin

- Červen 1752



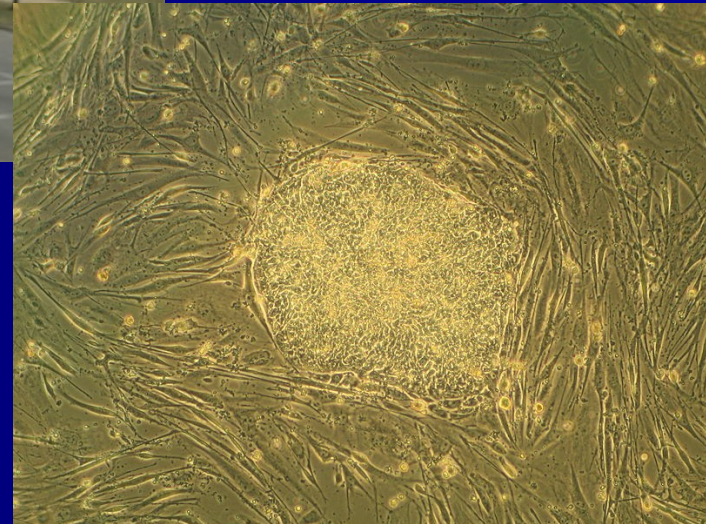
Edward Jenner - 1798



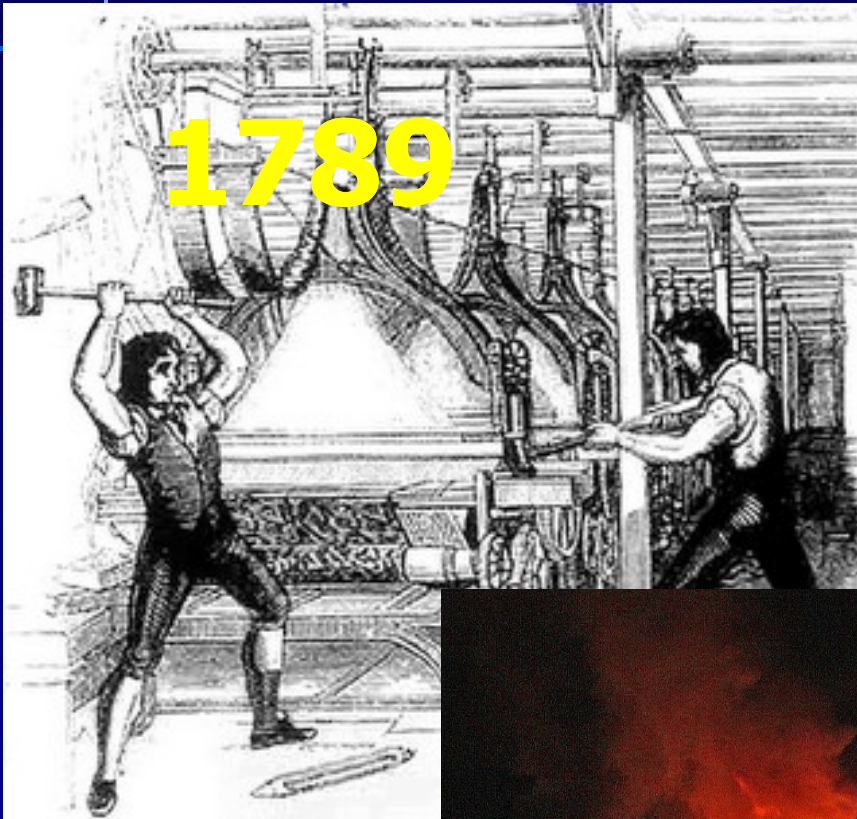
Od poklidných protestů...



... přes politické a právní kroky ...



... po násilí



Snahy omezit nebo zakázat biotechnologie

Zvláště silné v EU

- Genetické modifikace
- Klonování savců
- Embryonální kmenové buňky



Lidé poměřují rizika a přínosy



Významný přínos vyváží i velká rizika

■ ČR 2017

103 821 dopravních nehod

502 lidí usmrceno

2339 lidí zraněno těžce

24740 lidí zraněno lehce

Hmotné škody 6,3 mld. Kč



Pro pohodlí se vystavujeme smrtelným rizikům

- Všichni vědí o negativním vlivu pasivního životního stylu na lidské zdraví a přesto roste počet obézních a následně i počet lidí s cukrovkou druhého typu, rakovinou a kardiovaskulárními chorobami.



Významný přínos vyváží i neznámou míru rizika

Užívání mobilních telefonů se bouřlivě rozvíjelo i v době, kdy Světová zdravotnická organizace nebyla s to dát jednoznačnou záruku, že záření nemá negativní vliv na lidské zdraví.



Technologie mohou být snadno odmítnuty

- Není zjevný přínos pro konkrétního spotřebitele
- Jejich princip je komplikovaný
- V povědomí lidí jsou spojovány s negativními fenomény



Veřejnost

- Snadno podléhá emocím
- Je přístupná jednoduchým „příběhům“, které jsou nabízeny všemi informačními kanály
- Náchylná uvěřit ve „spiknutí“
- Vyžaduje důkazy „neexistence rizika“



Zájmové skupiny

- Nevládní organizace
- Politické strany
- Obchodní řetězce
- Výrobci



Odborníci

- Odmítají se bavit s laiky
- Když už se baví, tak odmítají přizpůsobit komunikaci veřejnosti
- Vysvětlení principu technologie je složité
nezáživné
- Nemohou dokázat „neexistenci“



Vzniká černobílé vidění - nepodložené fakty

Přírodní vs. Umělé

- Přírodní je „dobré“
- Umělé je „špatné“

ALE

- Přírodní katastrofa
- Umělá ledvina

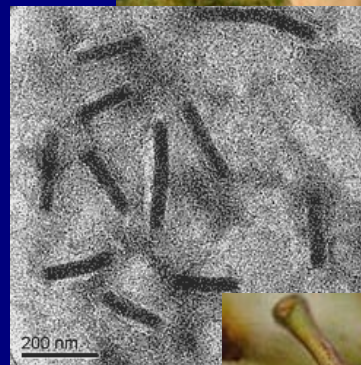


Ekologické zemědělství chrání přírodu



Ekologické zemědělství poškozuje přírodu

Ekologičtí zemědělci
vyseletovali
ekologickým
postřikem obaleče
jablečného
rezistentního
k bakulovirům



Konvenční zemědělství ničí přírodu



Konvenční zemědělství chrání přírodu

- V EU vynaloženy velké prostředky na ekologické hospodaření

- Vědecká pozorování prokázala
 - ptáci upřednostňují intenzivně obhospodařované území
 - počty i druhová pestrost jsou vyšší



**Co přináší a čím hrozí
genetické modifikace?**

Specifika genomů vyšších rostlin

- Rostliny mají v genomu i 25 Gbp (např. některé borovice)
- Geny mají v průměru 4 kbp
- Promotory 1 kbp
- Strukturní geny 3 kbp
- Počet genů může být vyšší než u obratlovců (pšenice asi 80 000 genů – pseudogeny)

Huseníček Thalův (*Arabidopsis thaliana*)



Jeden z nejmenších genomů
mezi vyššími rostlinami.

Kompletně „přečten“ - 25 498 genů

Nediferencované rostlinné pletivo - kalus

Lze pěstovat na živných půdách

Vyžadují auxiny

(např. kys. β indolylmásečná)

cytokininy

(např. kinetin)

Polyploidie, aneuploidie

Amplifikace i deamplifikace DNA



Z buněk vypěstované rostliny změnou přídatku růstových faktorů



Somatoklonální variabilita

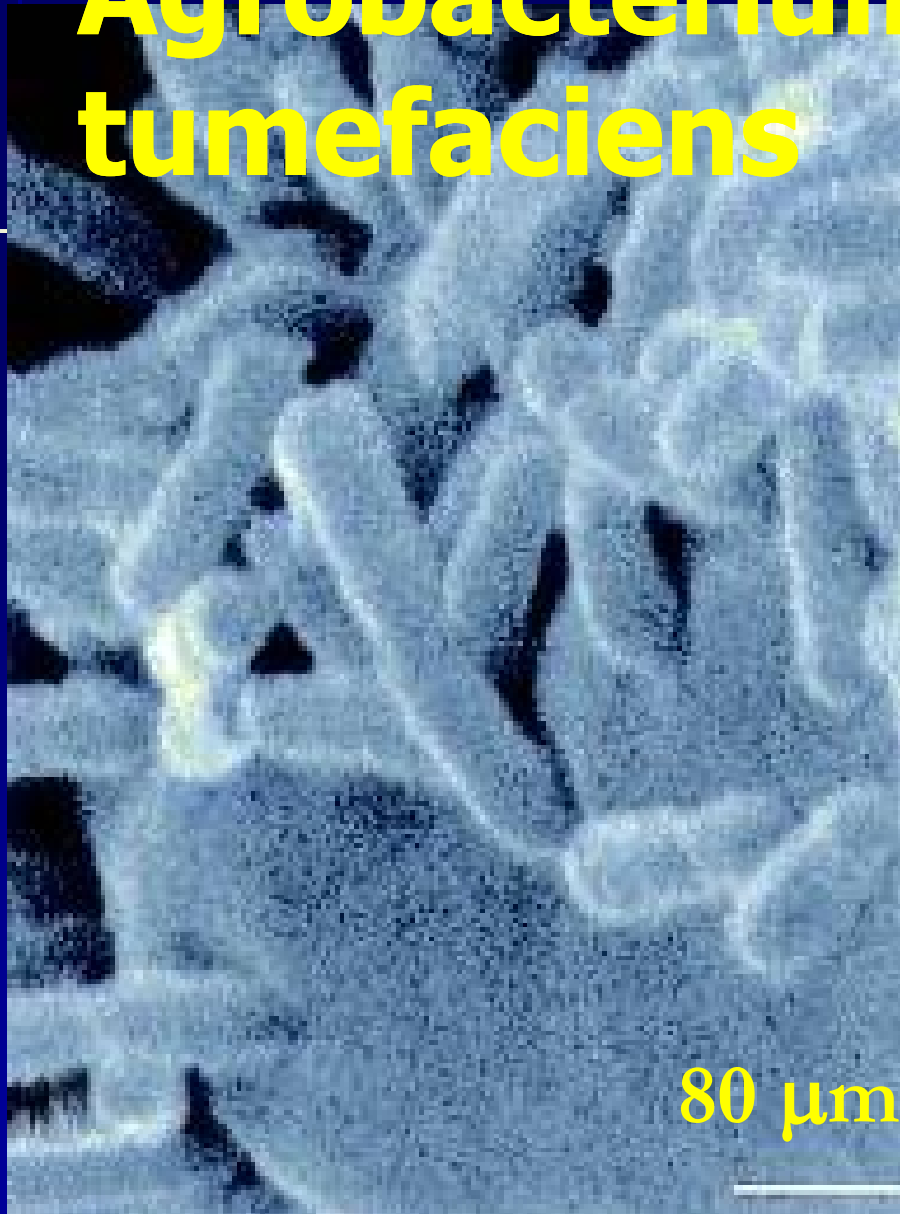
V důsledku genetických změn při kultivaci mají tyto rostliny jiné vlastnosti než původní rostlina. Dochází k selekci nejživotaschopnějších buněk.



Metody genetické modifikace



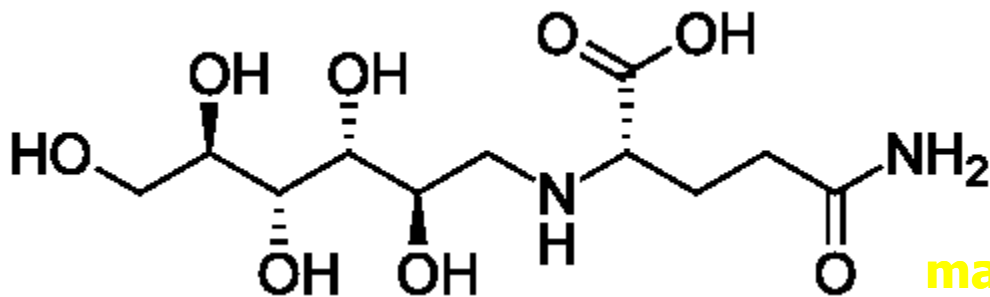
Agrobacterium tumefaciens



- Půdní bakterie
- Proniká do rostlin
- Vyvolává tvorbu nádorů
- Nádory rostou v kultuře bez auxinů a cytokininů

Nádor produkuje:

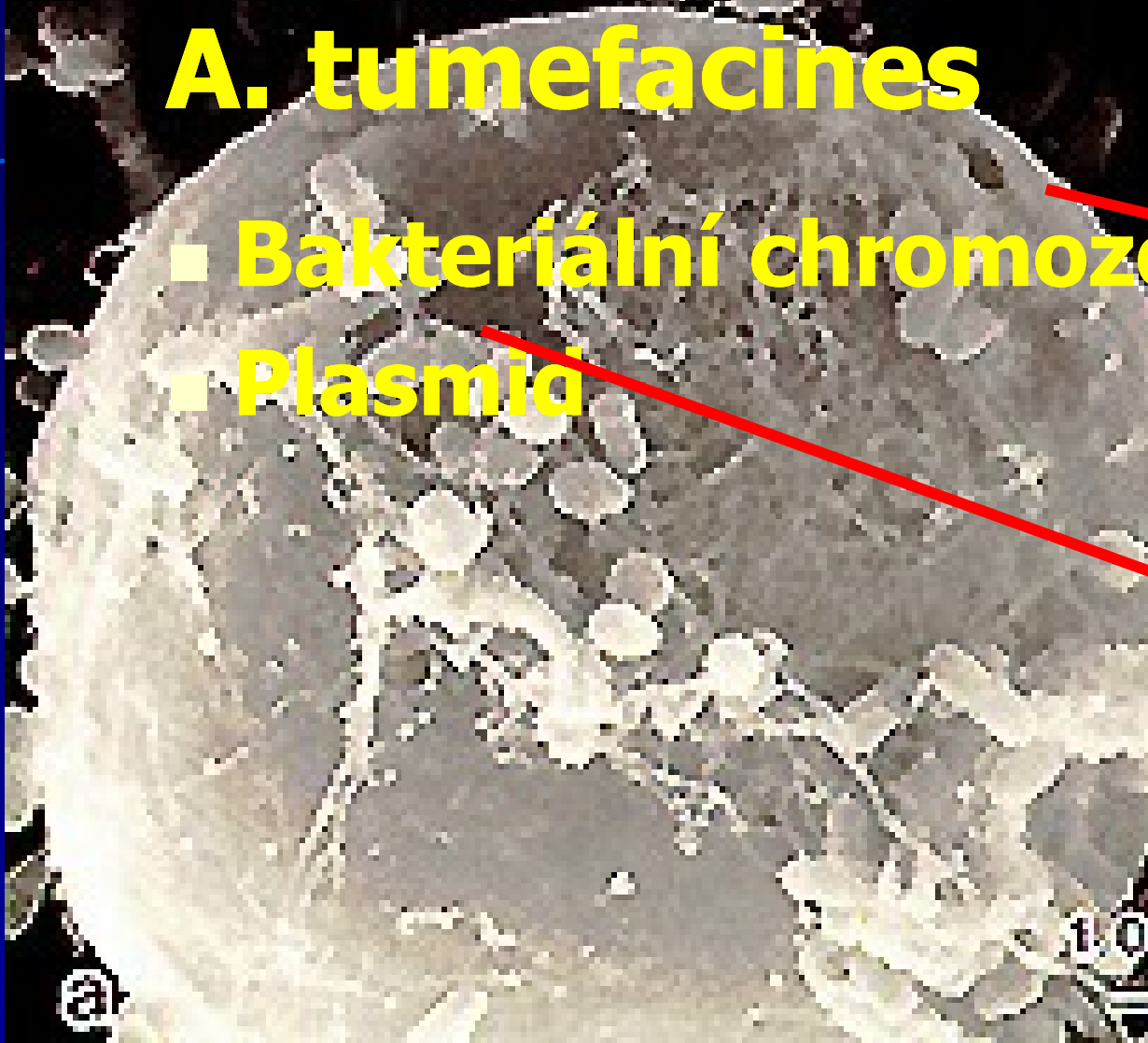
- Auxiny
 - Cytokininy
- růst nádoru
- Opiny
- výživa agrobakterií



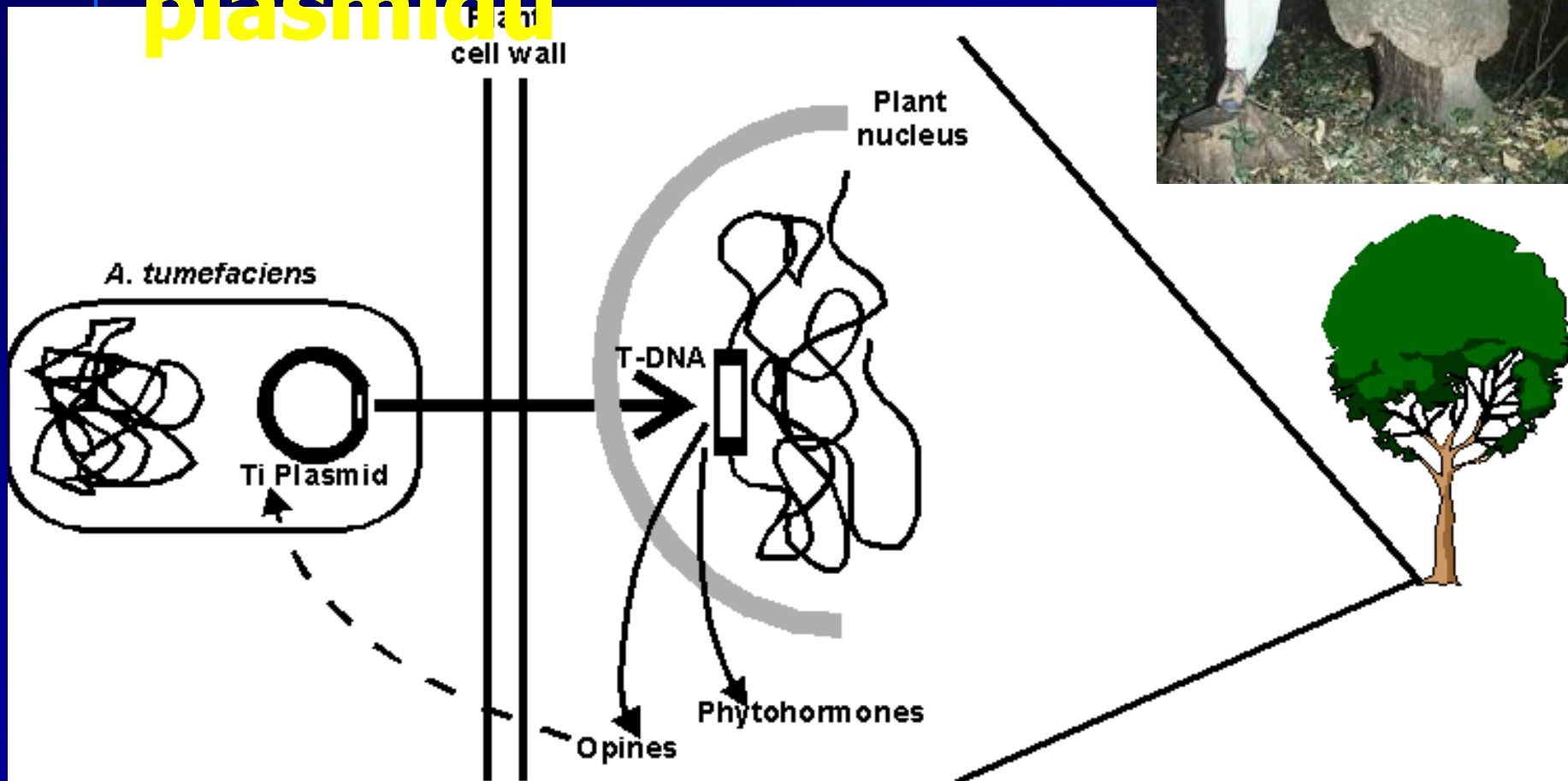
manopin

Dědičná informace *A. tumefaciens*

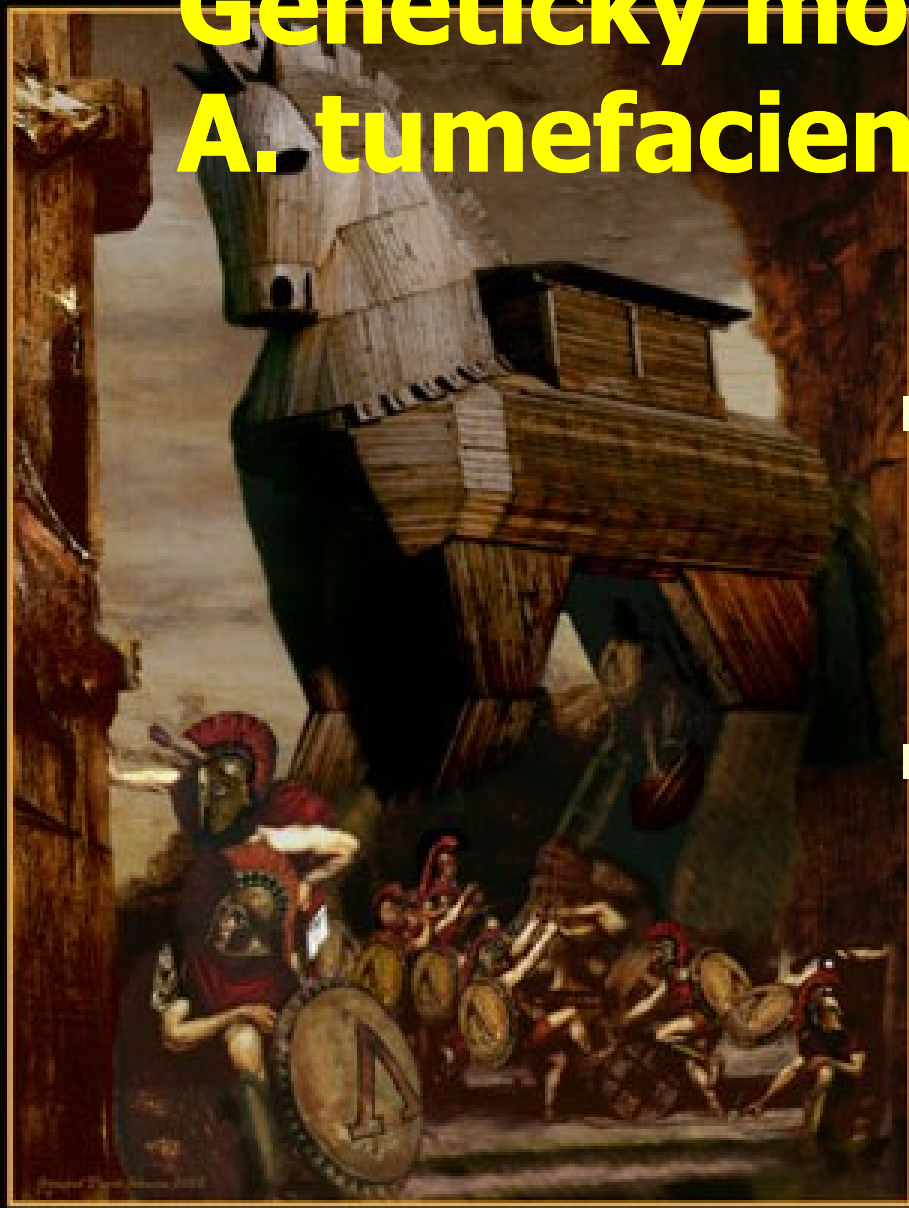
- Bakteriální chromozom
- Plasmid



Agrobacterium tumefaciens přenáší do jaderného genomu rostliny část plasmidu



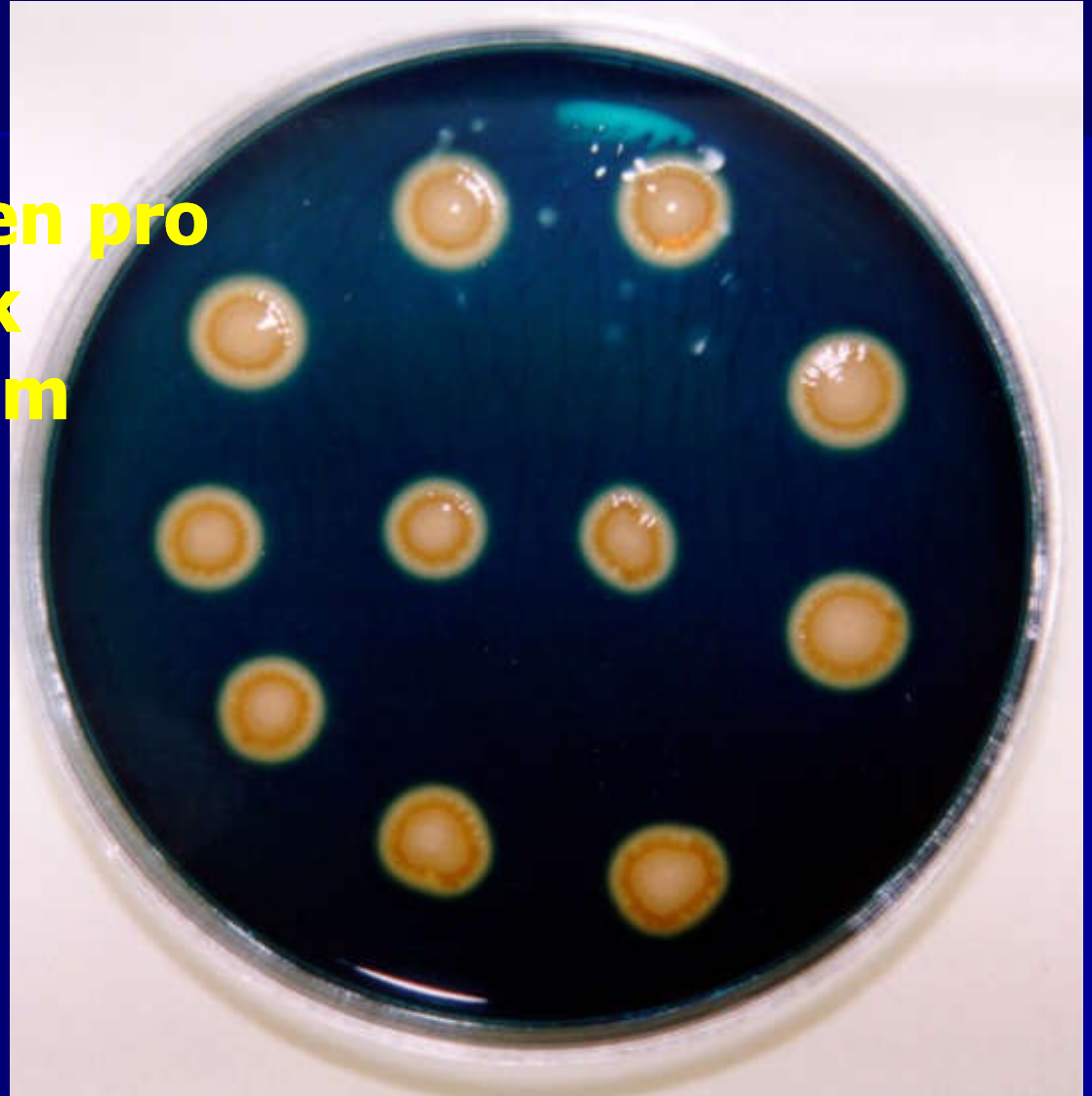
Geneticky modifikované *A. tumefaciens*

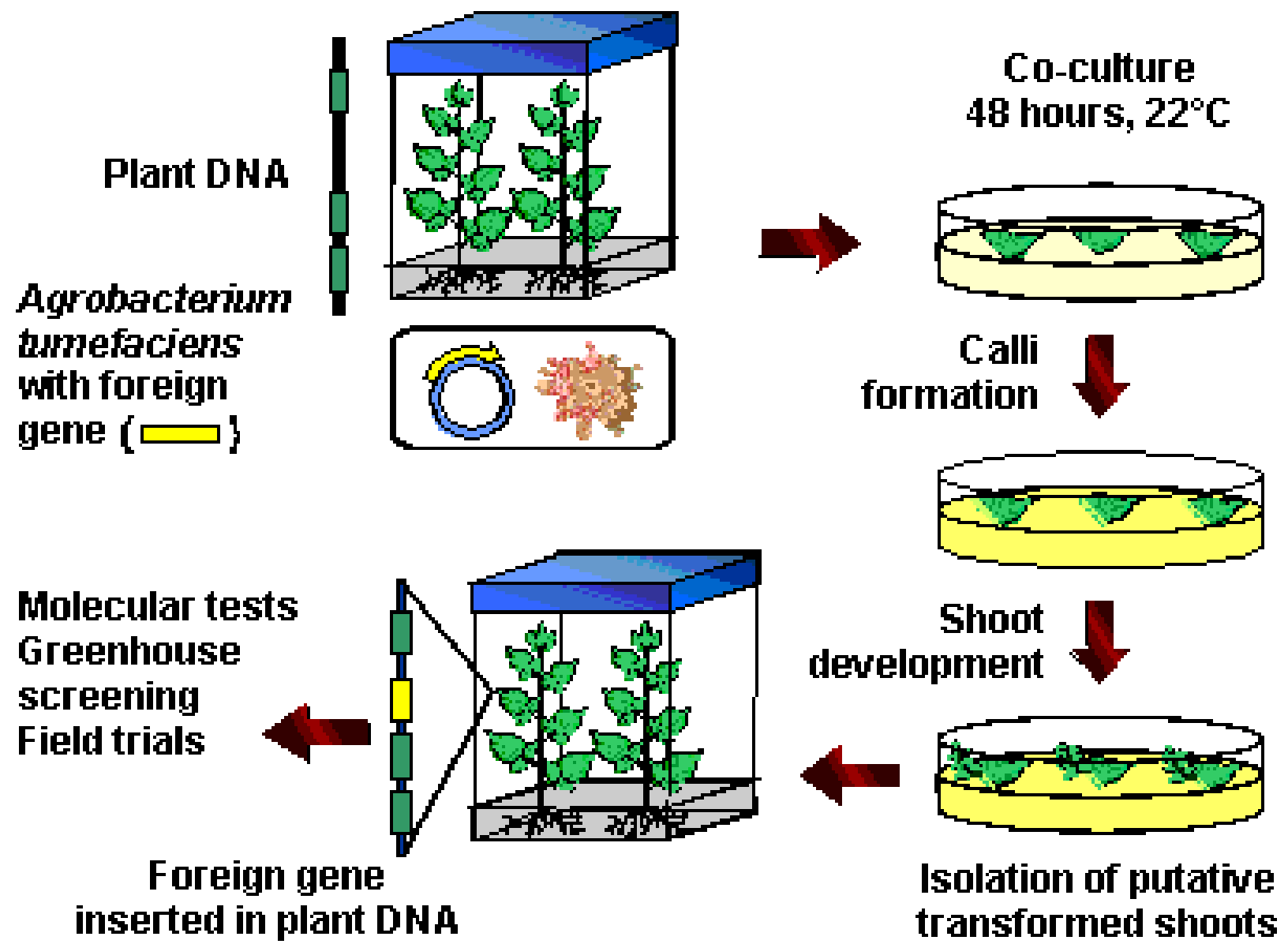


- Funguje jako „trojský kůň“
- „Pašuje“ námi „podvržené“ geny do genomu rostlin

Pro selekci „povedených“ bakterií

- Selekční gen pro rezistenci k antibiotikům



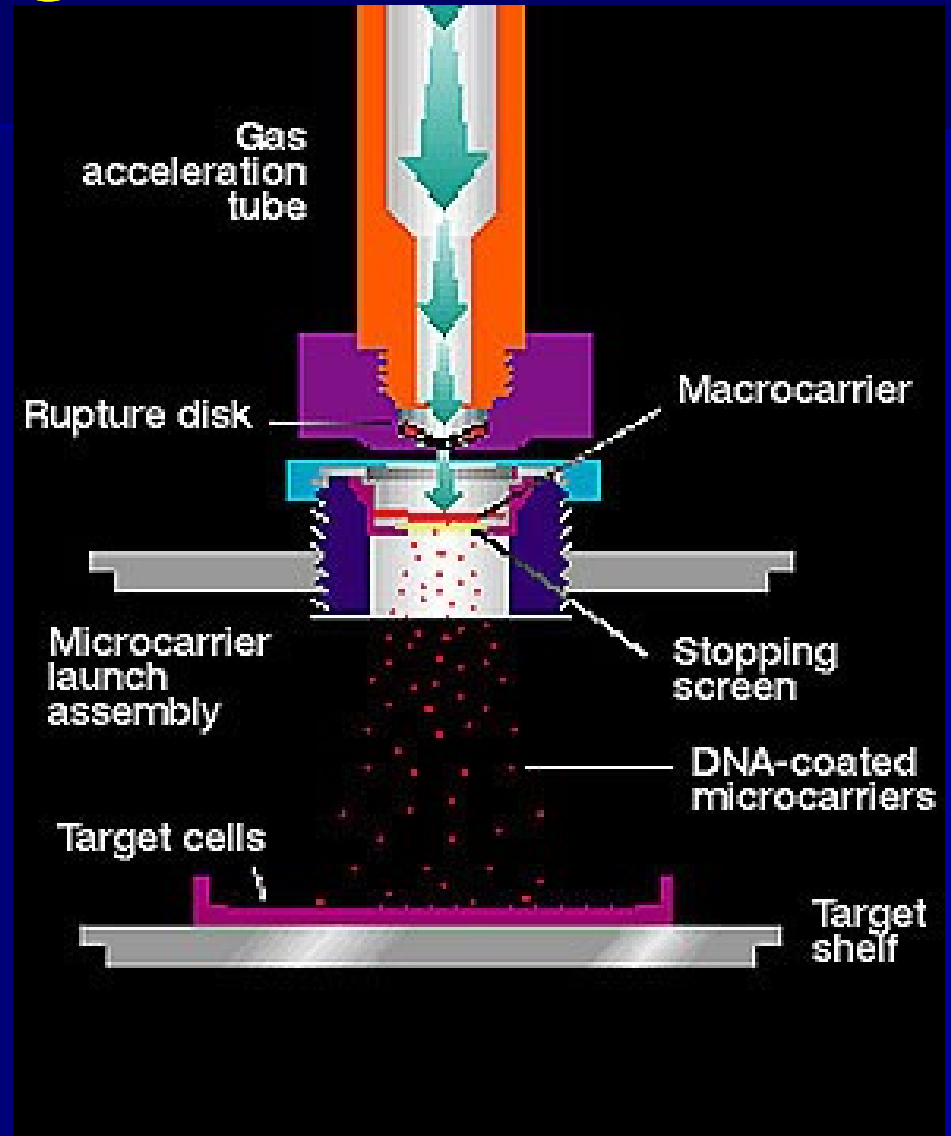


Pro selekci úspěšně transformovaných rostlinných buněk

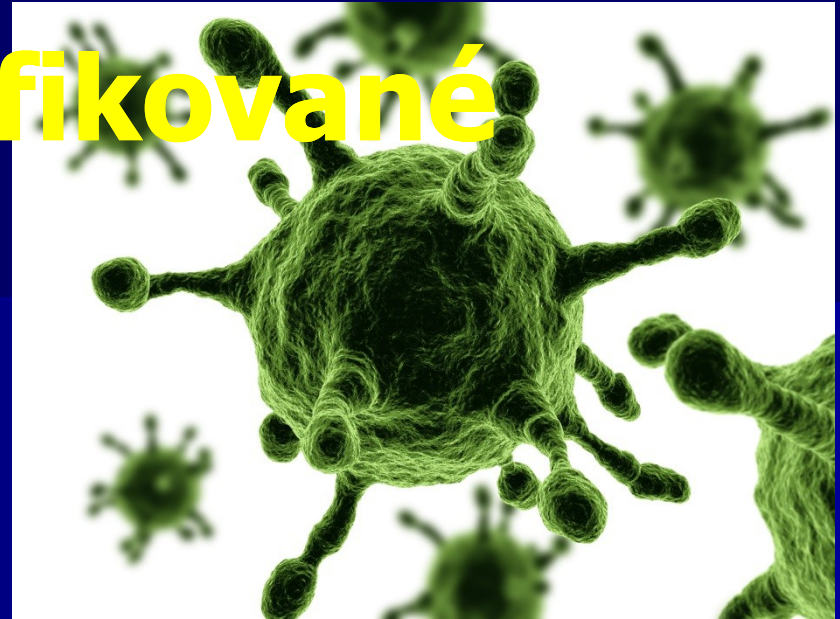
- Selekční geny pro odolnost k antibiotikům
- Selekční geny pro odolnost k herbicidům
- Markerové geny – např. GFP



Genové dělo



Geneticky modifikované organismy



Organismus – samostatně se rozmnožující subjekt včetně virů s výjimkou člověka

Modifikace – cílený zásah do dědičné informace, který nemůže nastat přirozenou cestou (nad 20 bp?)

Geneticky modifikované organismy?

V zemích EU – výčet technik pro genetické modifikace



Povijnice batátová

Přenos genů z *A. tumefaciens*



Bourec morušový

Přenos genů viry z lumčků

Nové techniky



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

Verdikt Evropského soudního dvora o mutagenezi - 2018

Mutageneze je genetická modifikace

Z legislativy pro GMO je vyňata „klasická“
mutageneze – chemická, radiační

Pod GMO legislativu patří „nové techniky“
včetně CRISPR-Cas9

Ve světě je mutageneze pomocí CRISPR-
Cas9 považována za non-GMO

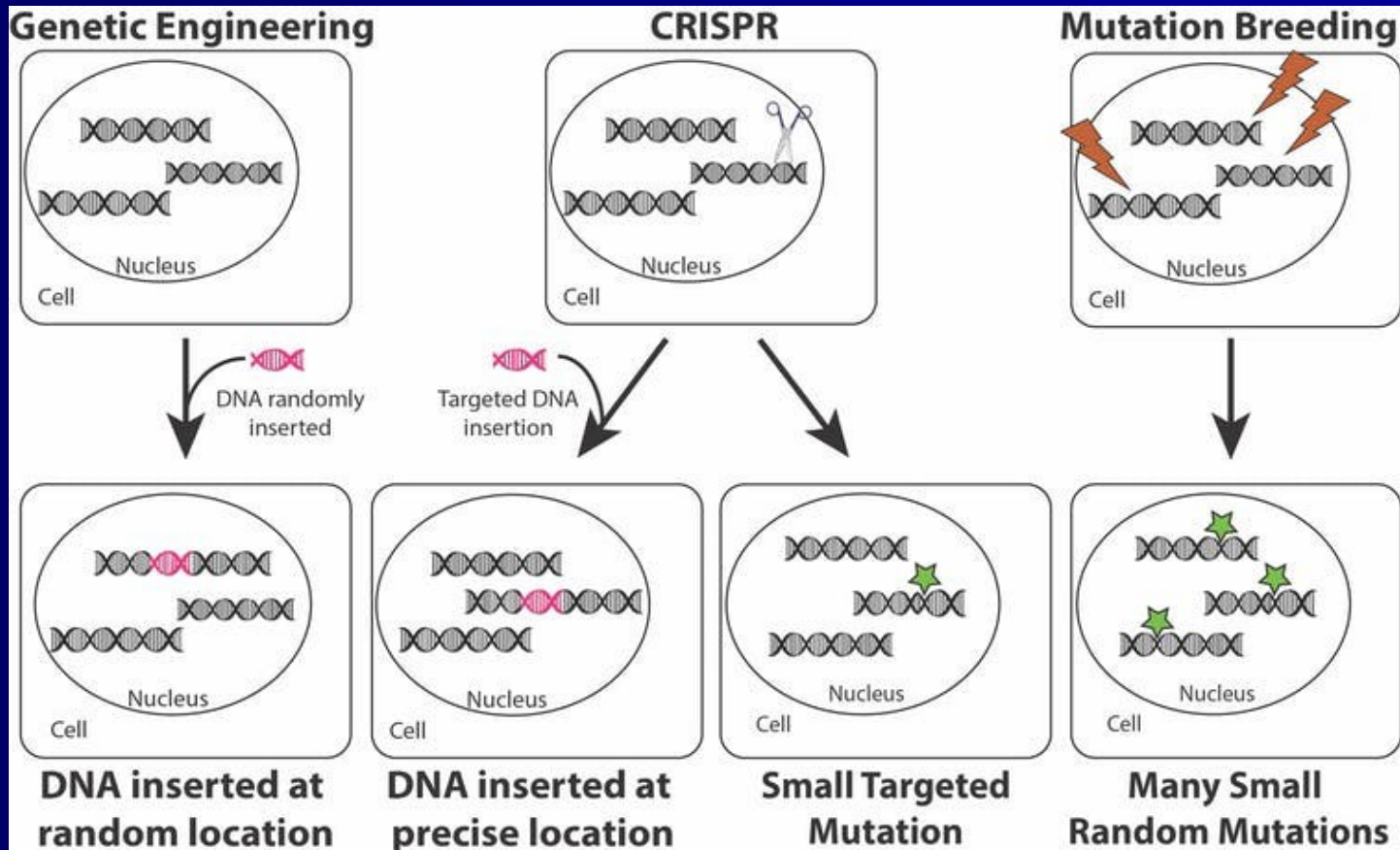
Detekce GMO při importu do EU?

Mutageneze a GMO legislativa

GMO

GMO

non-GMO



K čemu jsou genetické modifikace rostlin?

- Dnes pomáhají především pěstitelům
- Spotřebitelé nepřinášejí přímý efekt
- GM rostliny dalších generací
 - přínos spotřebitelé

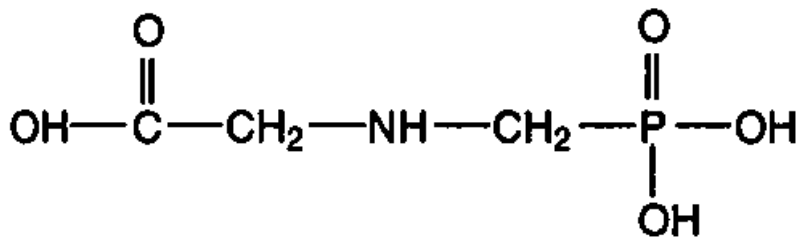


Odolnost rostlin k herbicidům

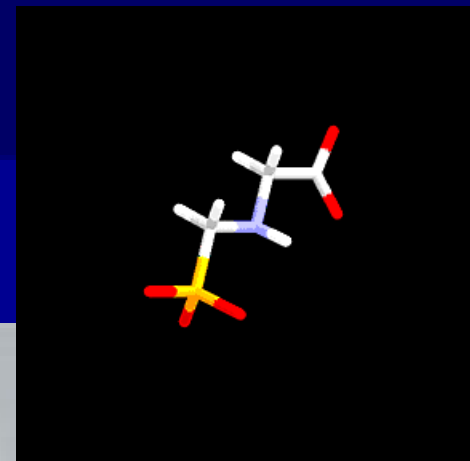
Totální herbicid Roundup

Derivát glycinu

GLYPHOSATE (Roundup®)



N-(phosphonomethyl)glycine
(isopropylamine salt)



Člověku neškodí ani dávka z 0,5 ha

Ničí spolehlivě všechny vyšší rostliny



Gen pro enzym rozkládající glyfosát enzym, který mu odolá



Glyphosate
1 mg/L

PV-LEGT02

control

Usnadňuje pěstování – boj s plevelem



Riziko vzniku rezistentních plevelů



Sója odolná vůči herbicidům



Více než 60% ploch na světě
90% v USA oseto RR sójou

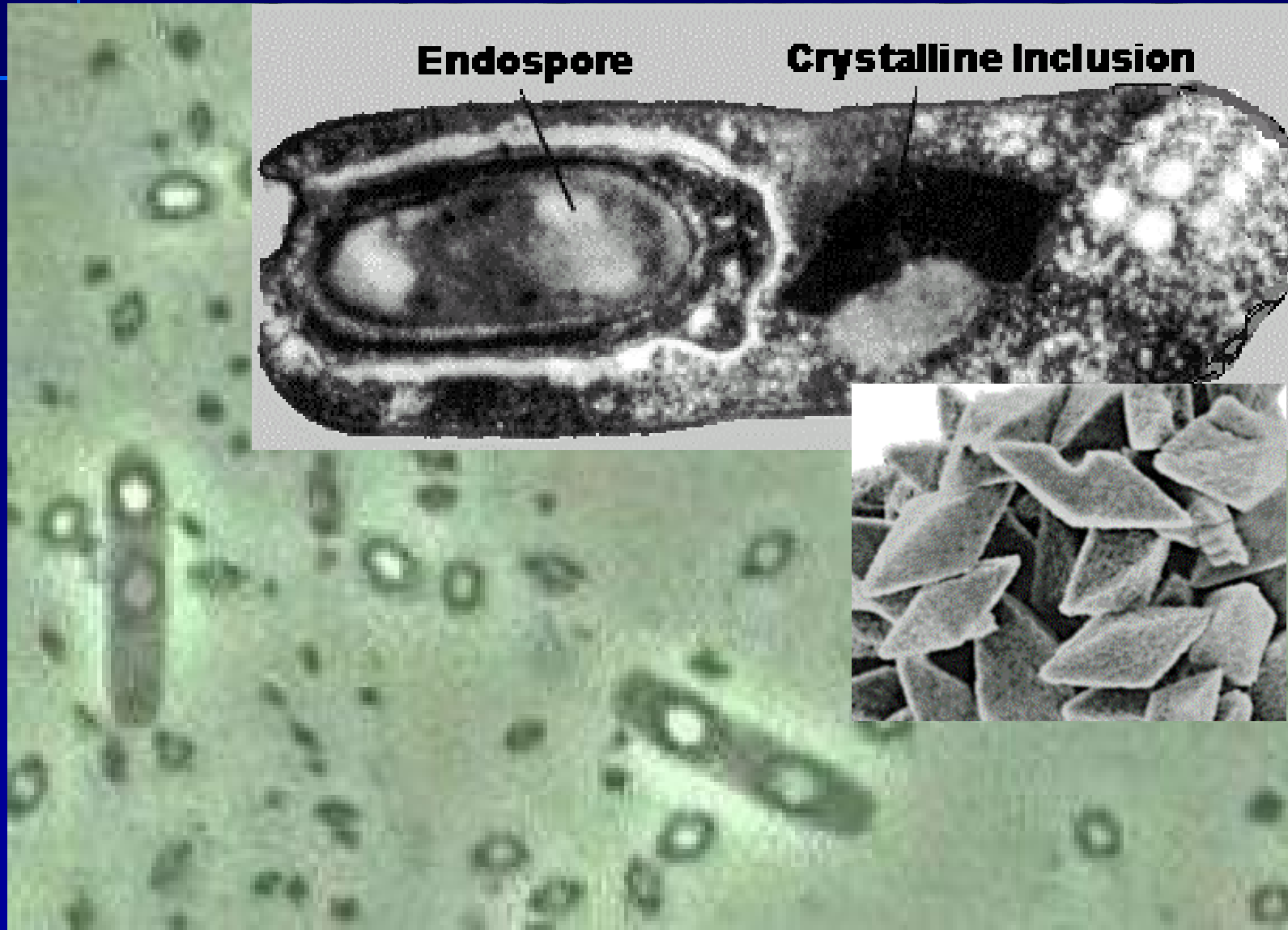
U nás povolena pro dovoz a zpracování



Rostliny odolné proti škůdcům

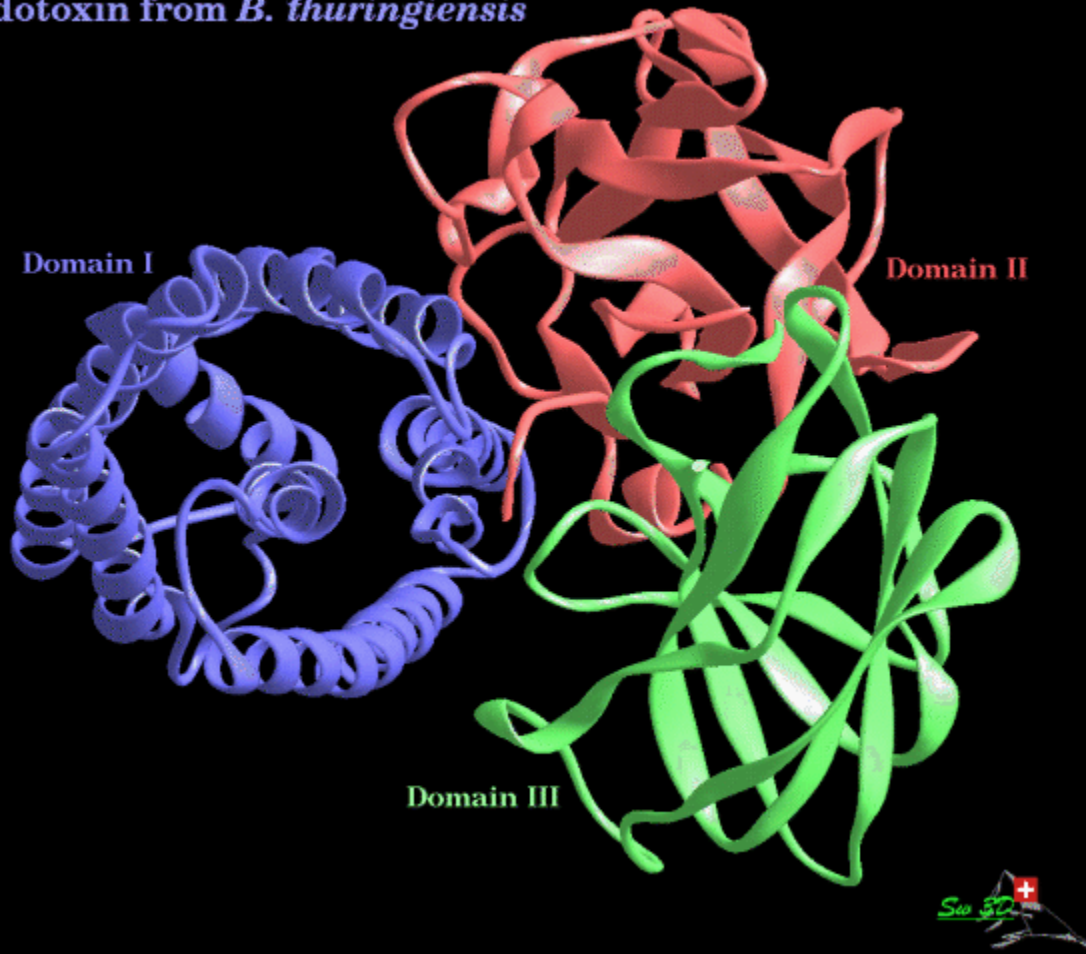


Bacillus thuringiensis



δ - endotoxin

δ -Endotoxin from *B. thuringiensis*



- **zásadité prostředí**
- **odštěpení obou konců**
- **vazba na receptor**
- **agregace**
- **perforace střeva**

Specifický účinek na danou čeleď hmyzu.

**Používá se jako ekologický
insekticid
obvykle směs delta toxinů**



**Obaleč *Choristoneura fumiferana*
Kanada na balzámové jedli**



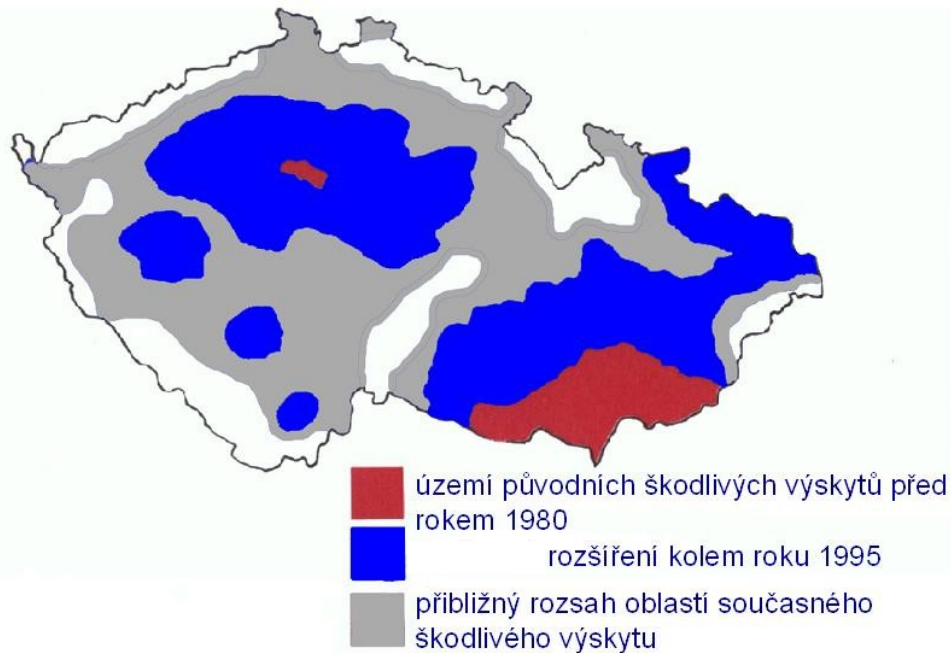
KUKUŘICE

- rozmach škůdců



Zavíječ kukuřičný v roce 1990

Rozšiřování škodlivého výskytu zavíječe kukuřičného



Poškození hmyzími škůdci vyvolává napadení plísněmi



- další škody
- mykotoxiny



Bt- kukuřice

odolná vůči hmyzím škůdcům



Je povolena k pěstování v EU.

Po vstupu do EU se může pěstovat i v ČR.

V roce 2008 se jí zasel 8000 ha

V roce 2012 se jí zasel 3 050 ha

Polní pokusy - Itálie



**Konvenční
kukuřice**

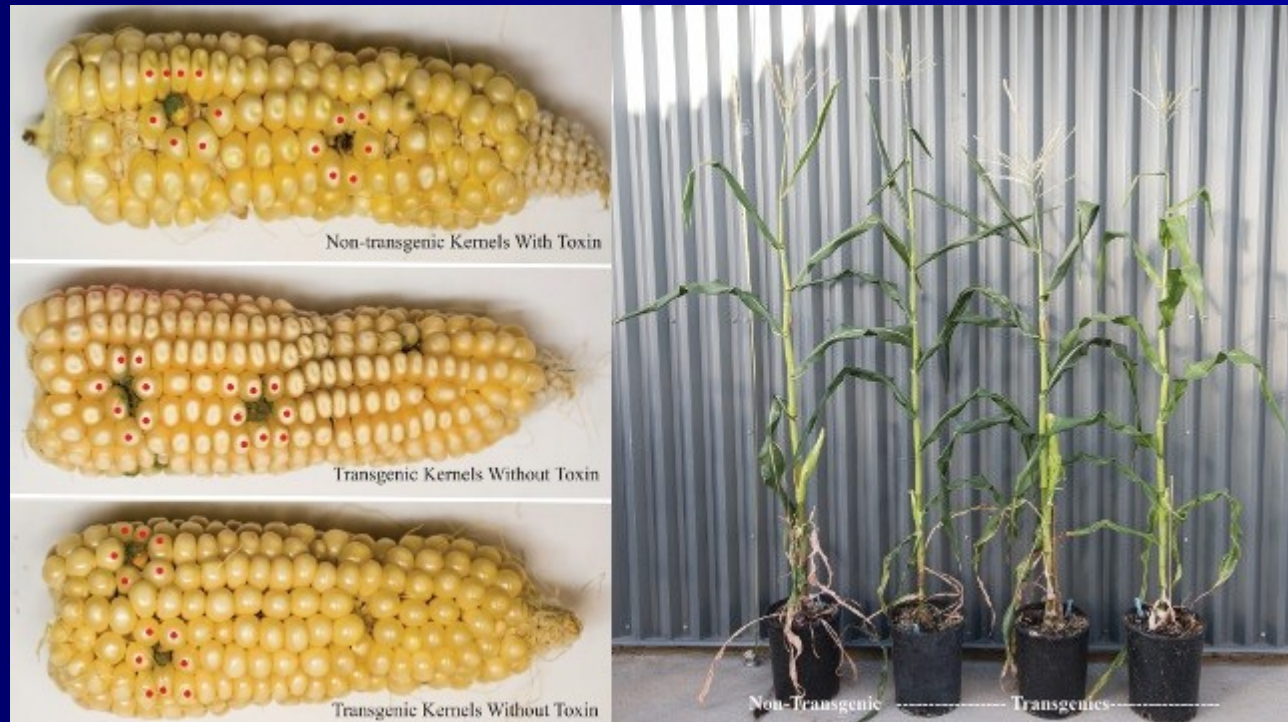
Bt- kukuřice

Výnos vyšší až o 43%

Hladiny fumonisinů nižší 130krát

Kukuřice bez aflatoxinů

- Produkce siRNA pro inaktivaci genů plísní *Aspergillus* – potlačí produkci aflatoxinů



Rizika vzniku rezistentních škůdců

- Rezistence je dědičná
- Založena recesivně
- Musí se udržovat refugia, kde nebudou škůdci vystaveni selekčnímu tlaku
- Křížením vzniknou heterozygoti, kteří jsou na Bt citliví



Rezistence vzniká na všechny pesticidy

Rezistence na Bt-toxin

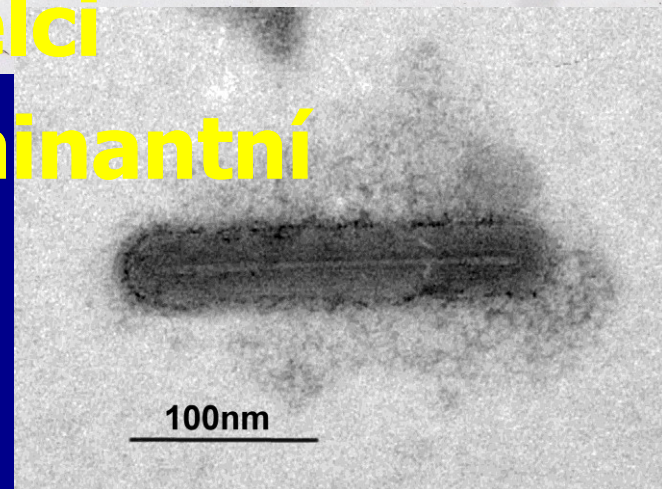
- Na polích u Bt-plodin – byla zjištěna výjimečně u zastaralých linií bavlníku
- Opakovaně vznikla po ekologických postřicích toxiny z *B. thuringiensis* záředníček polní

kovolesklec cizokrajný



Rezistence obaleče na bakuloviry

- Ekologičtí zemědělci
- Rezistence je dominantní



Brambor Amflora

2010 - schválen pro pěstování v EU

Antisense DNA ke genu GBSS

Narušení syntézy amylozy

Změna složení škrobu

Amylóza ve stopových množstvích

Většinu škrobu tvoří amylopektin

2012 – ukončeno pěstování v Evropě



Pro spotřebitele

- Pšenice E82 bez glutenu pro celiaky



- Soja Plenish zvýšený obsah kyseliny olejové

Typical Fatty Acid Composition

	C16:0 Palmitic Acid	C18:0 Stearic Acid	C18:1 Oleic Acid	C18:2 Linoleic Acid	C18:3 Linolenic Acid
Plenish® High Oleic Soybean Oil	6.5	4	75	7	2.5
Commodity Soybean Oil	11	4	22	55	8

Note: Fatty acid profiles may vary slightly.

Další genetické modifikace

- **Odolnost k virům**
- **Změna kvality produktů**
 - změna v obsahu a kvalitě tuků
 - zvýšení obsahu vitamínů, AA



produkce enzymů – fytáza

- **Produkce medikamentů**
- **Fytoremediace půdy**
- **Jedlé vakcíny**



Jedlé vakcíny

- Ročně umírají 3 miliony dětí na choroby, před kterými spolehlivě chrání očkování
- Každoročně se rodí 30 milionů dětí, které nemají ani základní očkování
- Za 17 \$ lze zajistit očkování obrna, záškrť, TBC, černý kašel, spalničky, tetanus



Jedlé vakcíny



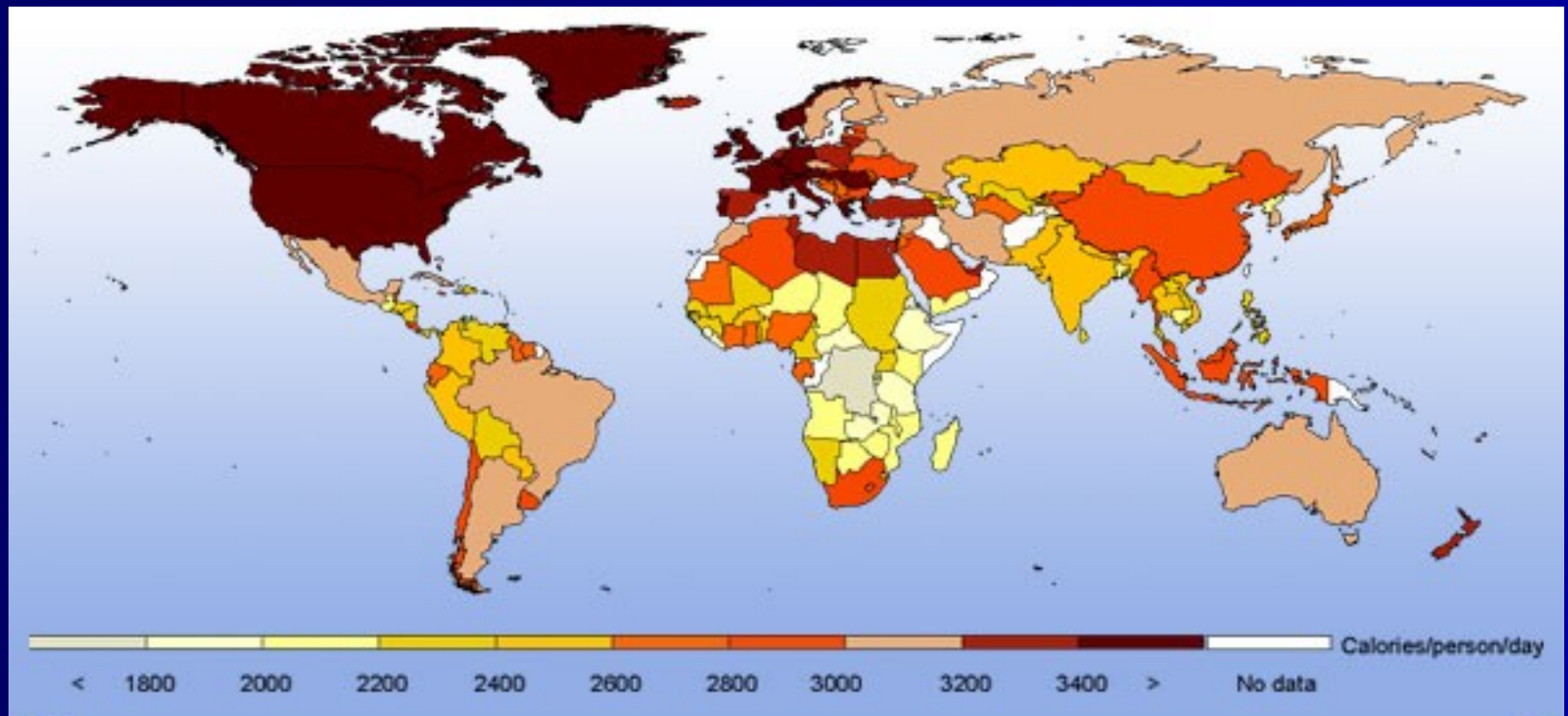
- Na některá místa nelze vakcíny dopravit
- Pěstování GM plodin s expresí antigenů
- Místní zdroj pro vakcinaci

Boj s hladem a chudobou



- 1,2 miliardy lidí vydělává méně než 1 dolar denně
- 800 milionů trpí hladem
- 6 milionů dětí do 5 let umírá
= předškolní populace Japonska

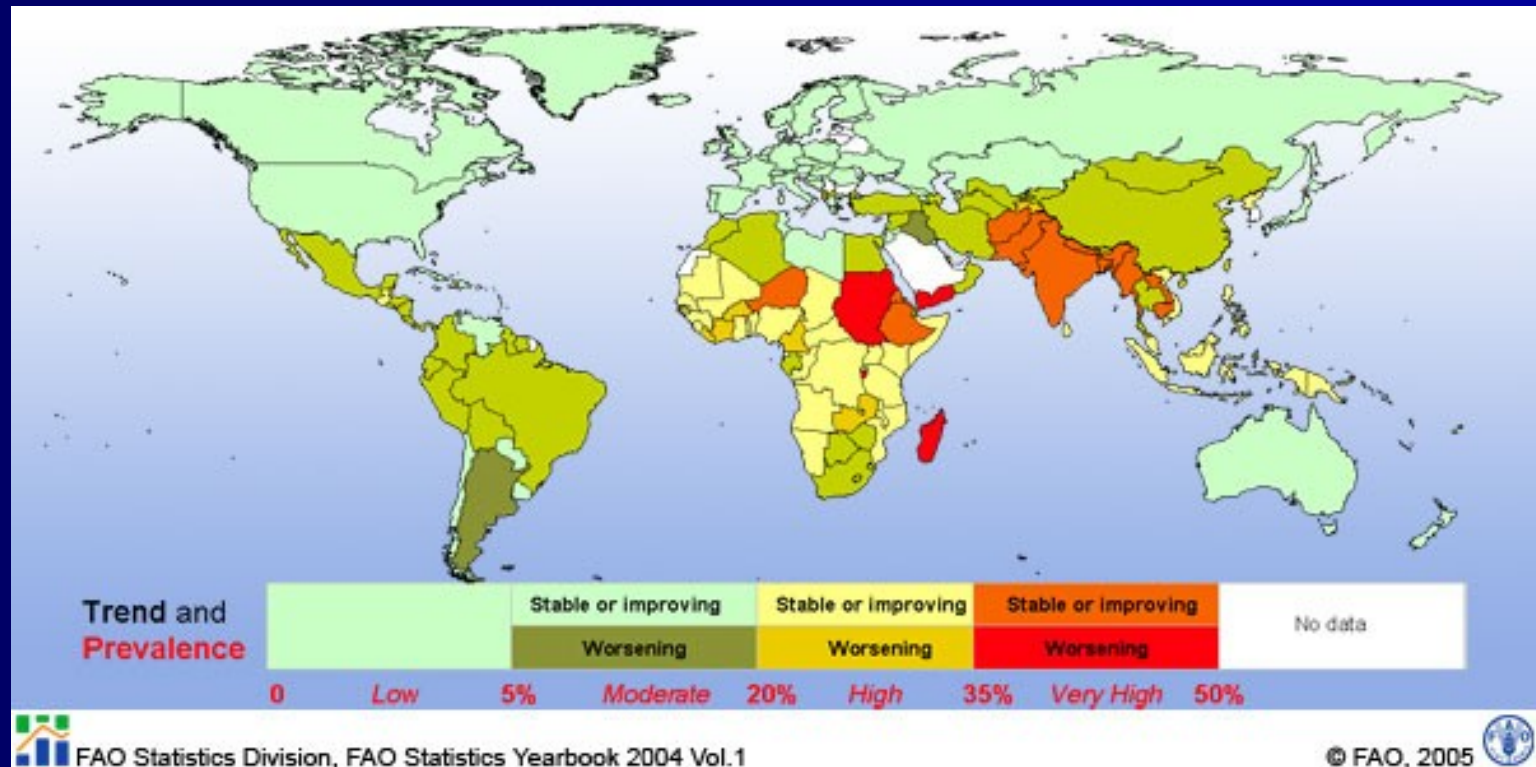
Příjem energie cal/den



**Denní porce 1 100 milionů
chronicky hladovějících lidí**



Dětská podvýživa



Hlavní příčiny hladu

- Ozbrojené konflikty
- Klimatické změny
- AIDS



Růst populace

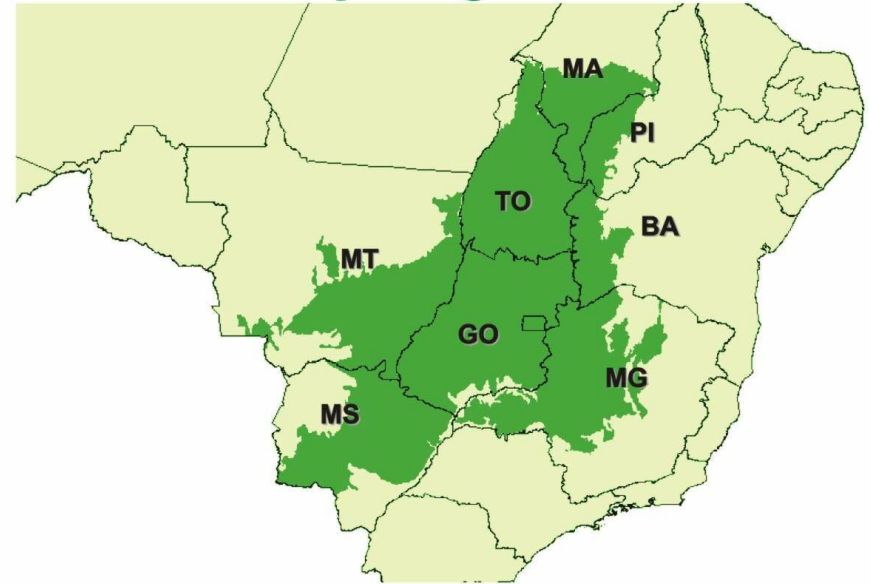
- Nezpomalil se
- Denně se rodí 250 000 dětí
- Při tomto tempu přibude 1 miliarda lidí za deset let
- Z toho
rozvinuté země **56 milionů**
nejchudší země světa **900 milionů**



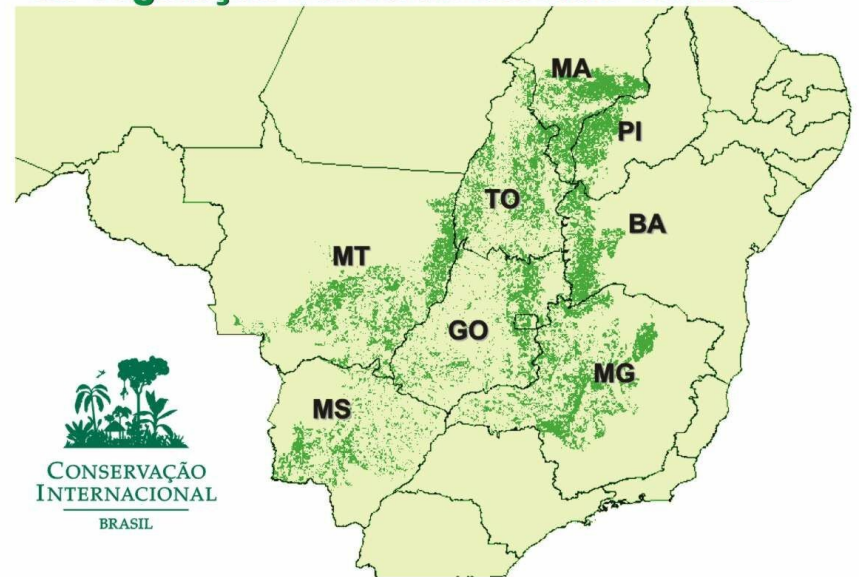
Čerpání přírodních zdrojů - ničení biotopů



Área de distribuição original do Cerrado



Principais remanescentes de vegetação nativa de Cerrado em 2002



Cerrado



Důvody hladu v Africe

- Afričané potřebují k přežití výnos alespoň 1 tunu z hektaru.
- Potenciál afrických polí je 3 tuny na hektar.
- Tento potenciál se nedaří naplnit.
- Výnosy často klesají pod 1 tunu z hektaru

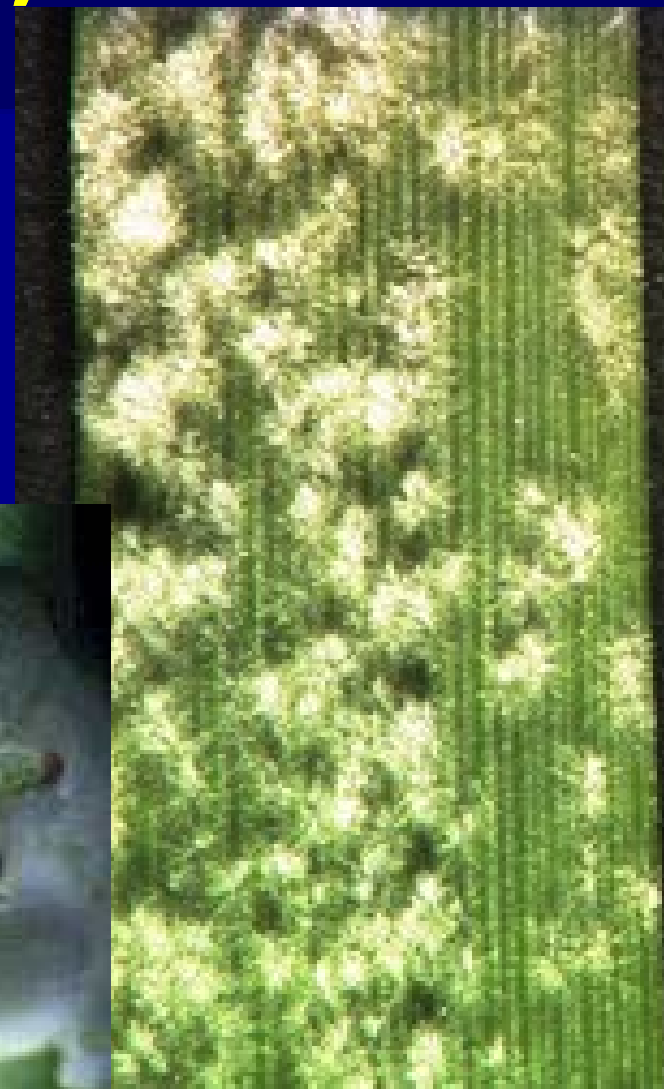


Nedostatek živin v půdě

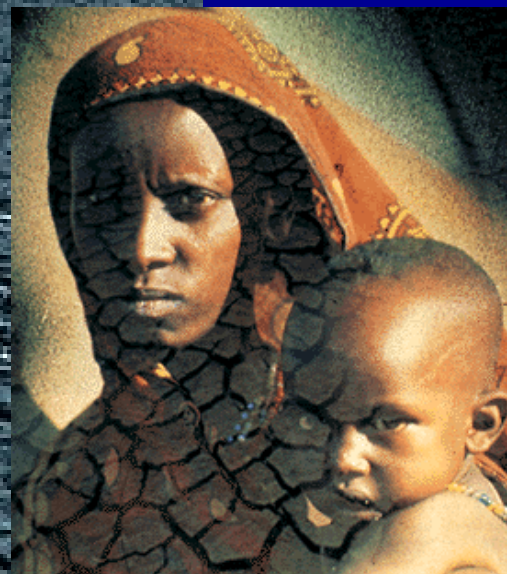


Hnojiva jsou mnohonásobně dražší než v Evropě.

Plevele, choroby, škůdci



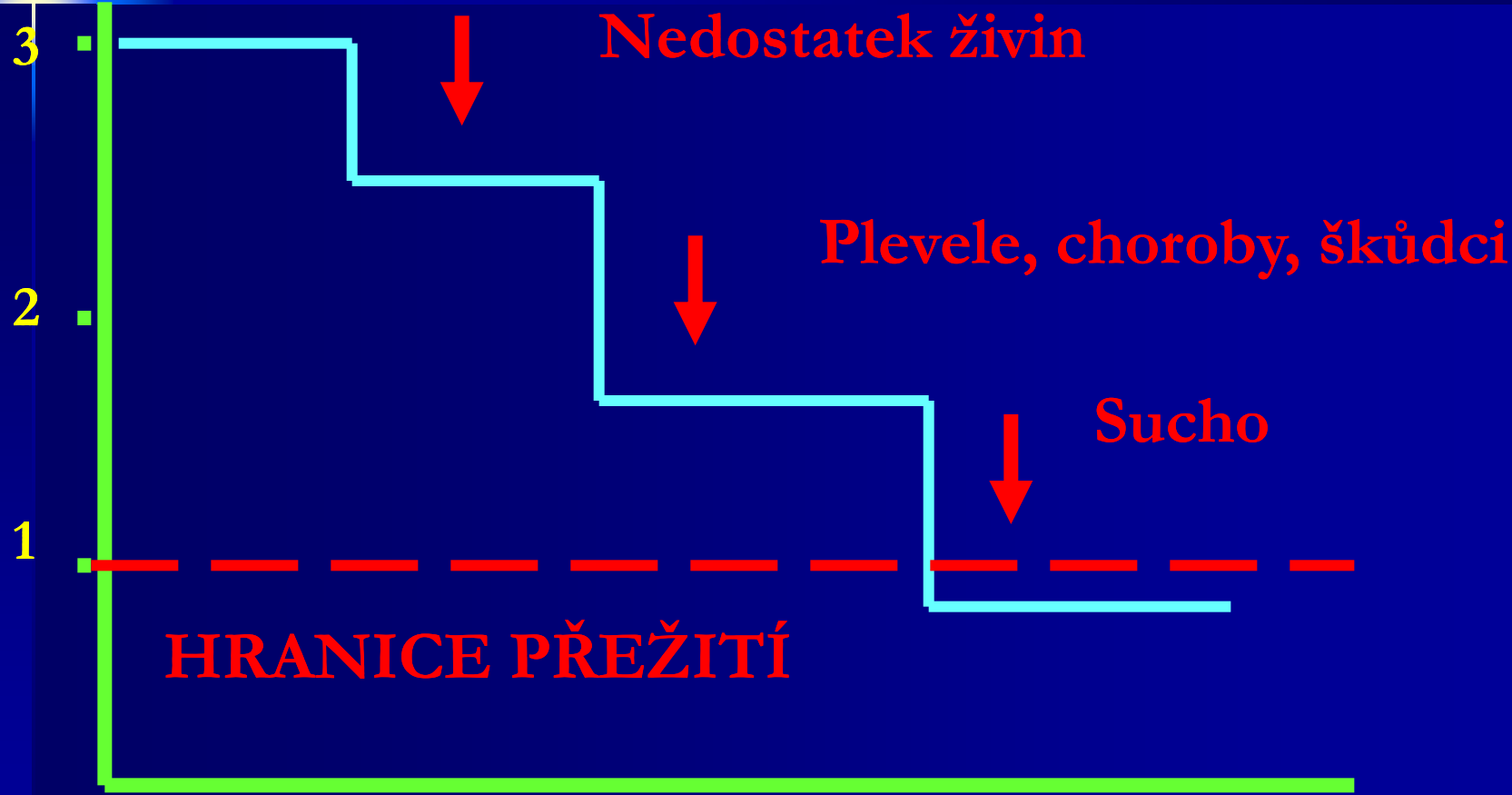
Sucho



Voda je v některých oblastech stejně drahá jako umělé hnojivo

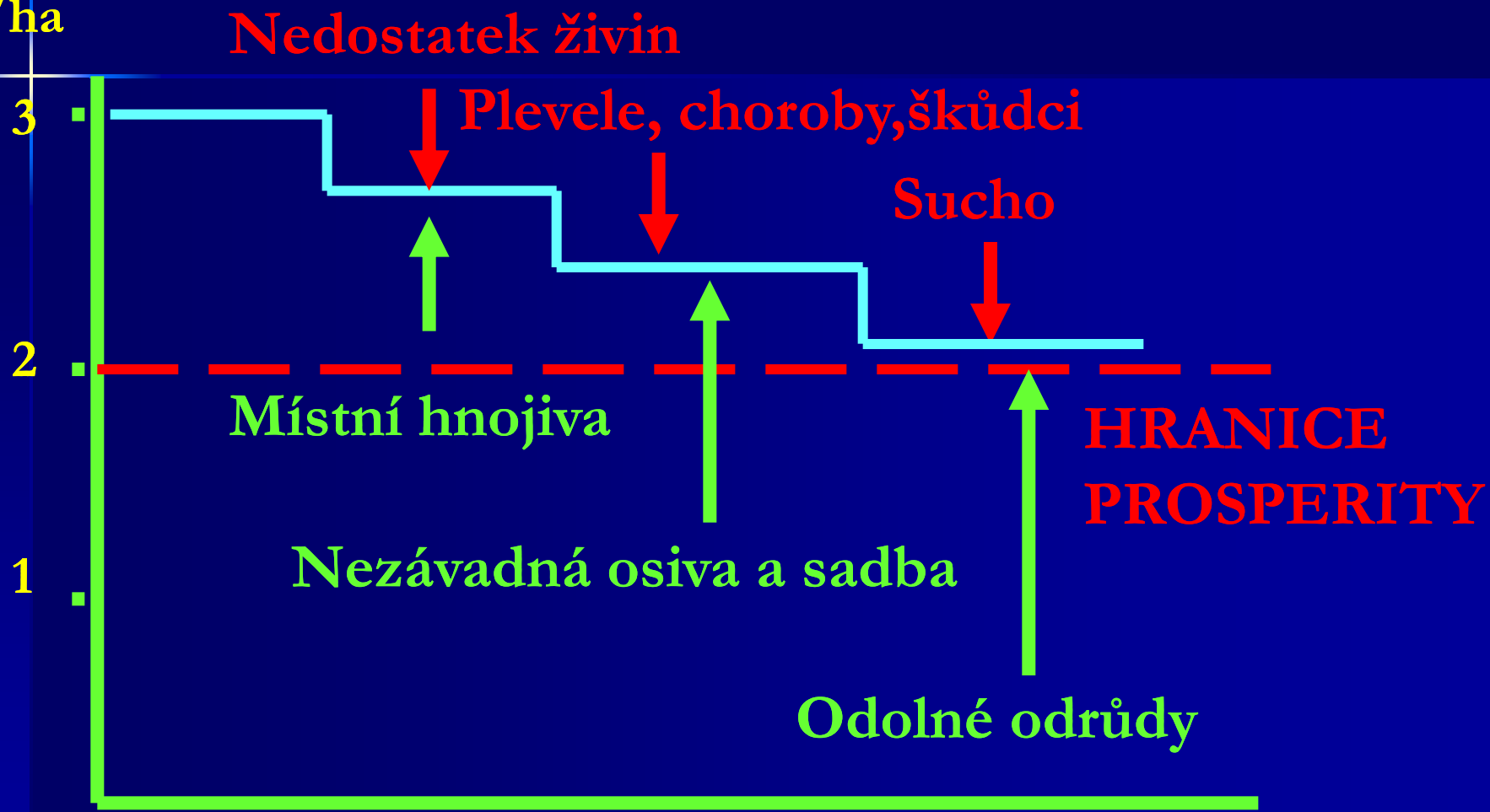
Vlivy na výnosy

t/ha



Možnost boje s hladem

t/ha

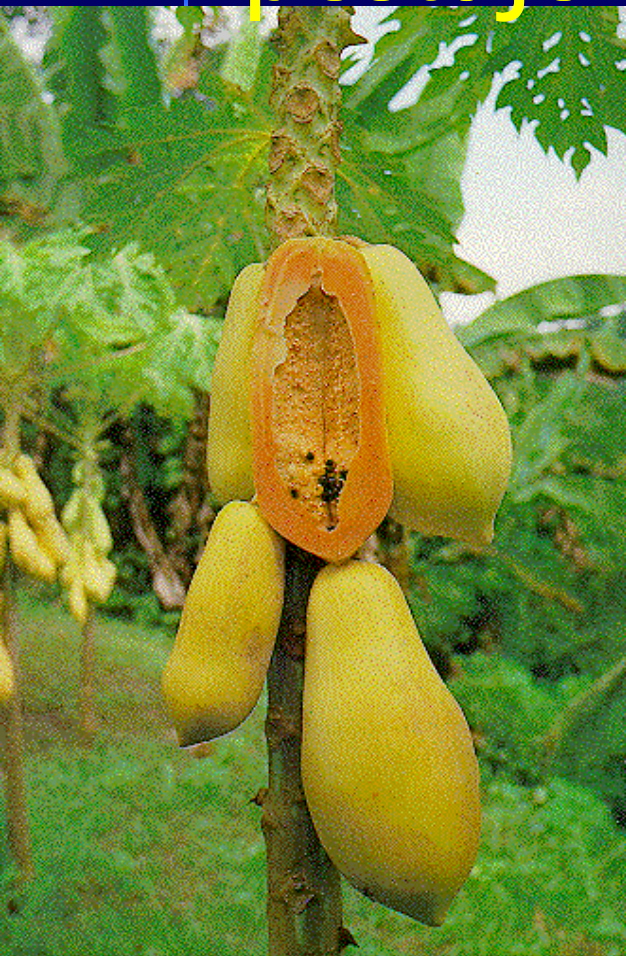


Nové odrůdy

- **Klasické šlechtění**
pomalé
dostává se na hranice možnosti
- **Genetické modifikace**
rychlé
zatím nejsou jasné jeho limity



1998 - GM papája odolná k viru
pěstuje se na Havaji a v JV Asii



Rezistence k suchu

- Zvýšení exprese fytohormonu cytokininu brání shazování listů za sucha
- Rostliny snášejí dlouhodobě sucho
- Vystačí s 30% vody při 12% redukci výnosu
- Vytvářejí se k suchu rezistentní linie

rajčata

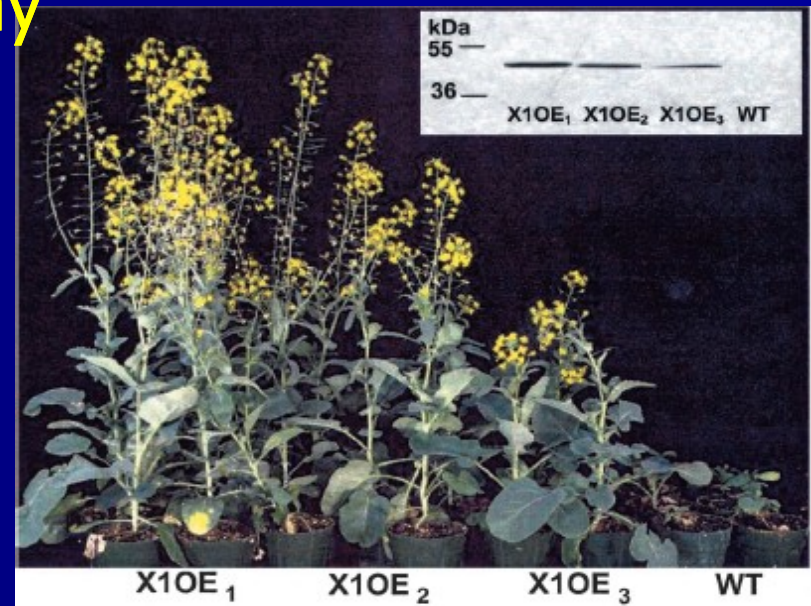
rýže

pšenice



Rezistence k zasolení půd

- Řepka - exprese genu *AtNHX1* z huseníčku
Transport Na iontů do vakuol až do 6% sušiny
- Vyloučí Na z cytoplasmy
- Udrží osmotický tlak pro příjem vody
- Výnos semen je ovlivněn jen nepatrně



Boj s podvýživou „zlatá rýže“



Avitaminóza A

- 250 milionů lidí

- Ročně

200 tisíc dětí oslepne

2,5 milionu lidí zemře

- 40 gramů „zlaté rýže“
denně pokryje potřebu

- Stravu obohatit o tuky

- Je k dispozici 10 let

- **Stále se nepěstuje**

Maniok

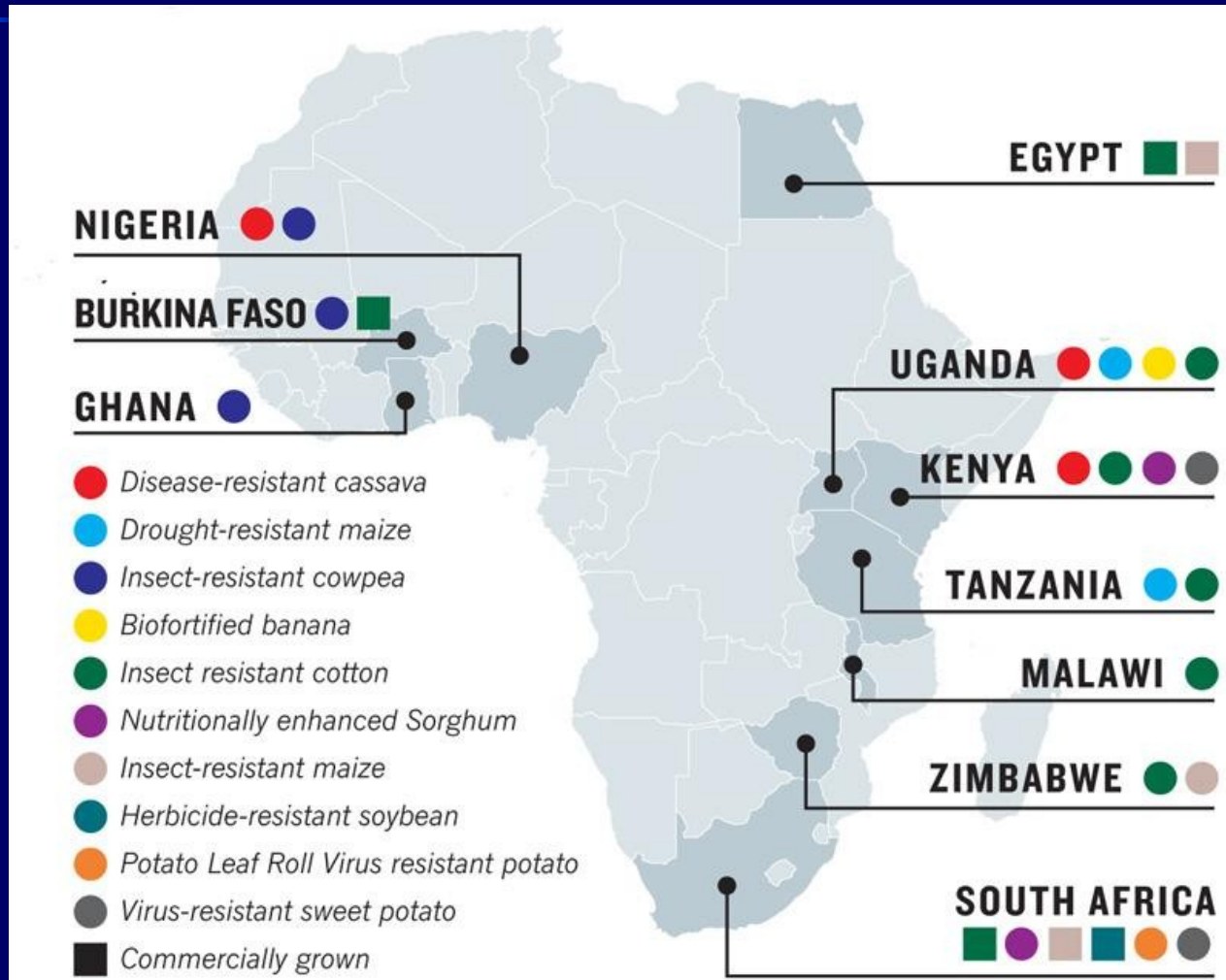


- Základ výživy - 600 mil. lidí
- V Africe -250 milionů lidí (40% obyvatel)
- Odolnost k virům
- ročně ztráty 45 milionů tun
- Gen pro metabolismus škrobu z E. coli

2,5krát větší kořeny
2krát více kořenů



GM plodiny v Africe



AFRIKA - SUCHO OD ROKU 2001



Opakovaná katastrofální neúroda



HLAD OHROZIL NA ŽIVOTĚ 20 – 40 MILIONŮ LIDÍ



Miliony lidí oslabených hladem zemřou na infekční choroby



Nejvíce jsou
ohroženy

- Děti
- Matky
- Staří lidé

Dovezená potravinová pomoc obsahuje GM

kukuřiči



Zambijský president Mwanawasa: „GM food is poison!“



**Distribuce potravinové
pomoci zastavena**

Důvody odmítání GM kukuřice:

Farmáři vysejí zrno z potravinové pomoci

Začne pěstování GM plodin

Kontaminace exportních produktů „geny“

Kontaminace medu pylem

EU přestane dovážet

■ Odvolání na stanovisko BMA

Vliv GM rostlin na životní prostředí



Bt kukuřice vs. monarch stěhovavý



- V laboratoři krmeny housenky monarcha klejichou poprášenou pylem z Bt kukuřice
- Housenky masově hynuly

Vyhubí Bt kukuřice motýla?

Výsledky experimentů nebyly potvrzeny



- Housenky se vyhýbají plevelům poprášeným pylem
- Šlo o odrůdu s vysokým množstvím Bt v pylu
- Tato odrůda se nikdy nepěstovala na polích.

Bt kukuřice mu svědčí

– klesá spotřeba insekticidů.

Ohrožuje ho kácení lesů v Mexiku.

Bt plodiny a chrostíci

- **Bt-kukuřice**
- Z polí se uvolňuje Bt-toxin do potoků
- V laboratoři se ve vodě s Bt-toxinem nedaří larvám chrostíků
- Znamená to, že v okolí polí s Bt-kukuřicí vymírají chrostíci?
- Jsou chrostíci v potocích u kukuřičných polí?



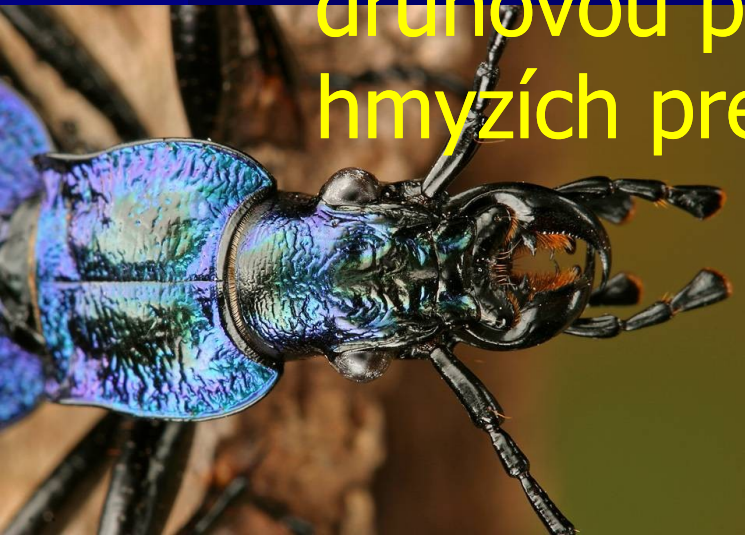
Bt-plodiny a včely

- Povinně se testuje, zda nektar či pyl Bt-plodin neškodí včelám
- Nebyl prokázán negativní vliv
- Bt-proteiny nejsou cíleny na blanokřídlý hmyz
- Pozitivní vliv na potlačení zavíječe voskového



Bt-plodiny vs. parasitoidi a predátoři

- Parasitoidů a hmyzích predátorů může být v porostech Bt-plodin méně, protože je tam méně hmyzích škůdců
- Není však přímý vliv na četnost a druhovou pestrost parasitoidů a hmyzích predátorů



Bt-plodiny vs. půdní mikroorganismy



Mikroorganismy

- Těžké posoudit – neznáme je
- Mění se v závislosti na mnoha faktorech

Půda, počasí, plodina, odrůda, agrotechnika, sezóna aj.

- Tyto výkyvy jsou větší než změny vyvolané pěstováním Bt-plodiny

Bt-plodiny vs. půdní makroorganismy

Makroorganismy

Např. hlístice, stinky, chvostoskoci,
roztoči, kroužkovci

Jejich četnost a druhové složení se s
pěstováním Bt-plodin mění

Jiné faktory ale způsobují ještě větší
změny – např. osevnické postupy, změny
odrůdového složení aj.



Britské studie biodiverzity



Vliv pěstebních postupů GM plodin odolných k herbicidům na biodiverzitu polí.

GM řepa



- Méně plevelů
- Méně včel
- Méně semen
- Méně semenožravých brouků
- Méně ptactva
- Více chvostoskoků a jejich predátorů

GM řepka



- Méně plevelů
- Méně včel
- Méně motýlů
- Méně semen plevelů
- Méně semenožravých brouků
- Méně ptactva
- Více chvostoskoků a jejich predátorů

GM kukuřice

- Ve všem lepší než tradiční kukuřice
- Tradiční kukuřice postihuje biodiverzitu mnohem více než jakákoli jiná plodina
- Platí i po zákazu atrazinu



GM řepa

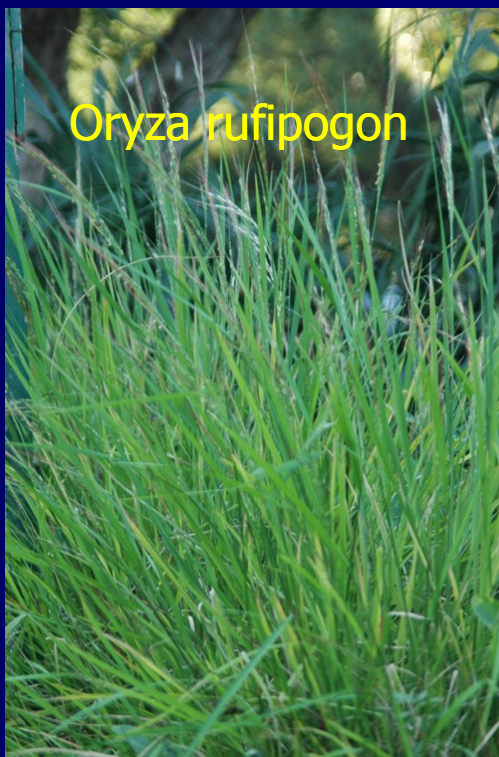


**S jinou agrotechnikou
a jinou organizací
porostů.**

**Výrazně vyšší
biodiverzita rostlin i
živočichů na poli a v
okolí než u porostů
konvenční řepy.**

Klasické plodiny už vytlačily planě rostoucí druhy

- Vojtěška – Švýcarsko
- Rýže - Tajwan



Klasické plodiny už vytlačily planě rostoucí druhy

- Vojtěška – Švýcarsko
- Rýže - Tajwan



Riziko vzniku rezistence proti herbicidům u plevelů

ATRAZIN



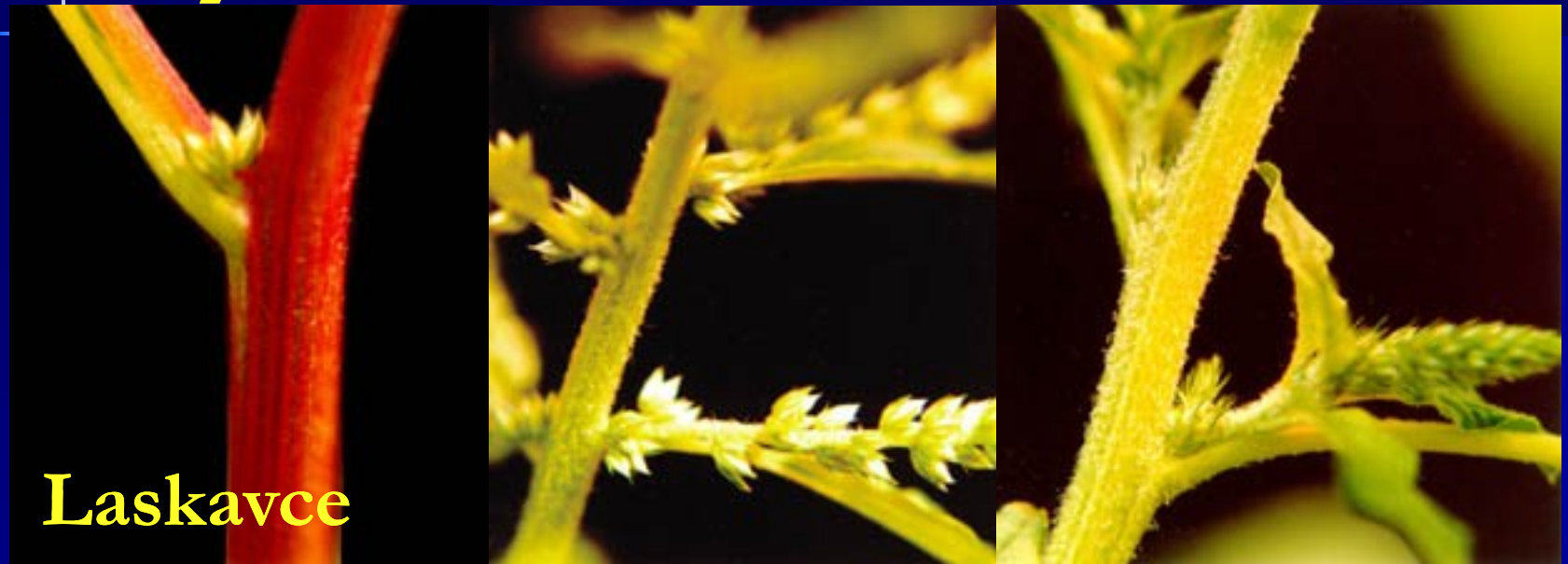
Laskavec

Amaranthus hybridus



Vznikají spontánně
např. železniční náspy

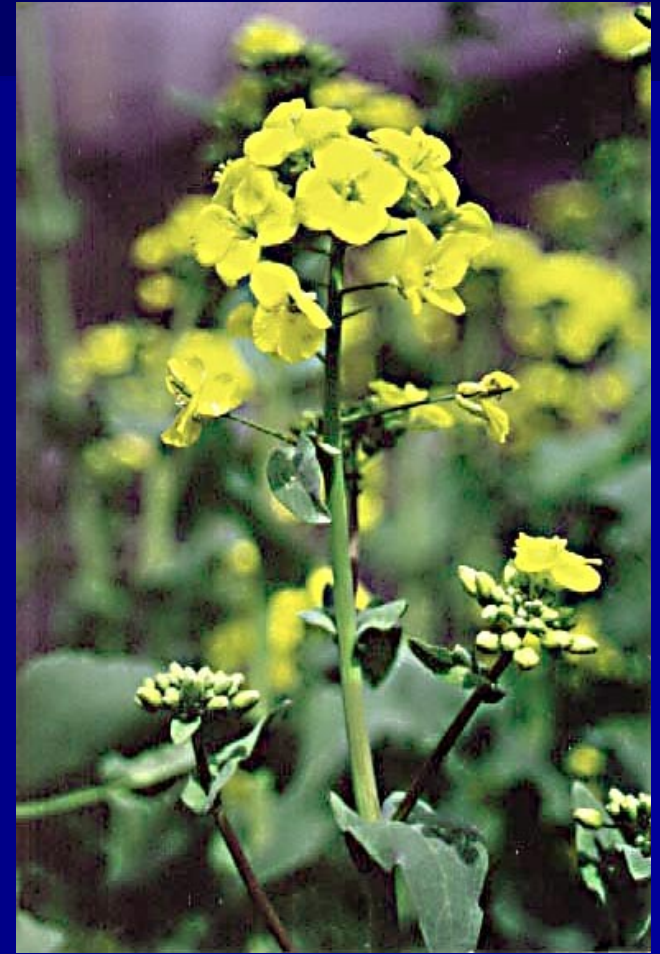
Vznik mezidruhových hybridů



Laskavce

Vznikají spontánně
Je to přirozený mechanismus
vzniku nových druhů.

Řepka a planá brukev



Výskyt hybridů ve Velké Británii

Celkem 50 000 hybridů

Brukev hojná u řek



Často v těsném sousedství
polí s řepkou

Hybridizace a introgrese

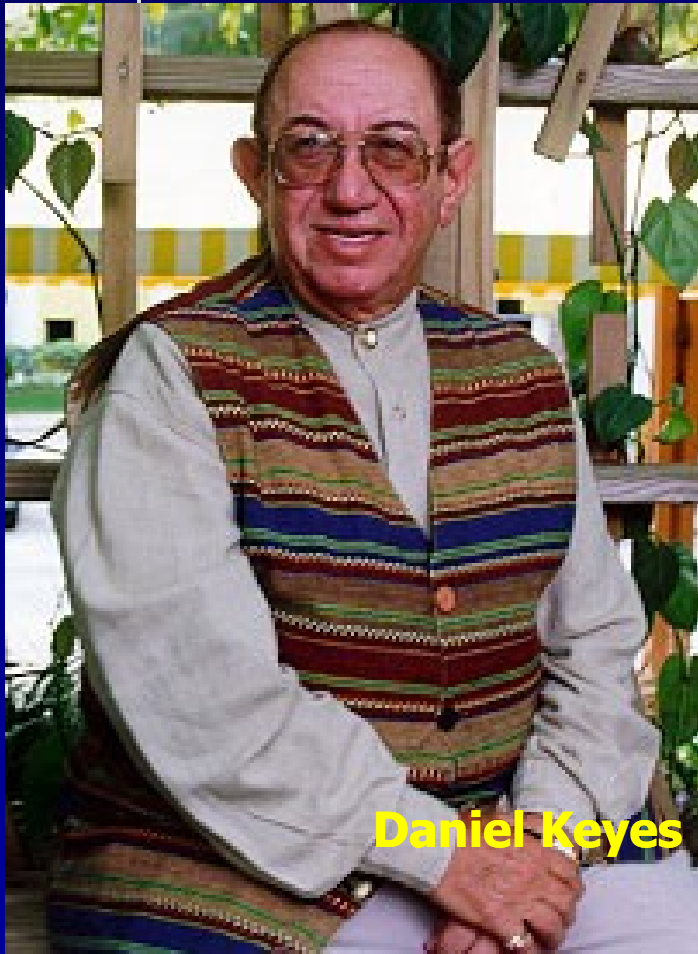
- Dochází k přenosu pylu?
- Dochází ke křížení?
- Vznikají životaschopné hybridy?
- Vytváří hybrid stabilní populaci?
- Kříží se hybridy s původním druhem?
- Kříží se opakovaně?
- **Přináší nový gen selekční výhodu?**



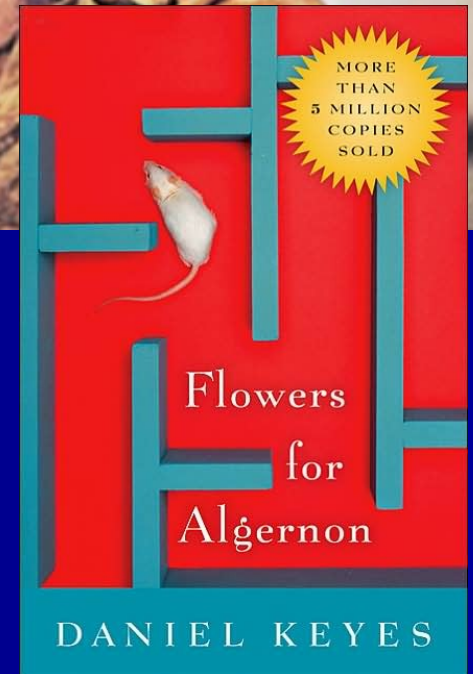
Genetické modifikace živočichů



Od Algernon ... (1959)



Daniel Keyes



...k Doogie (1999)



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

Hobbie-J (2009)

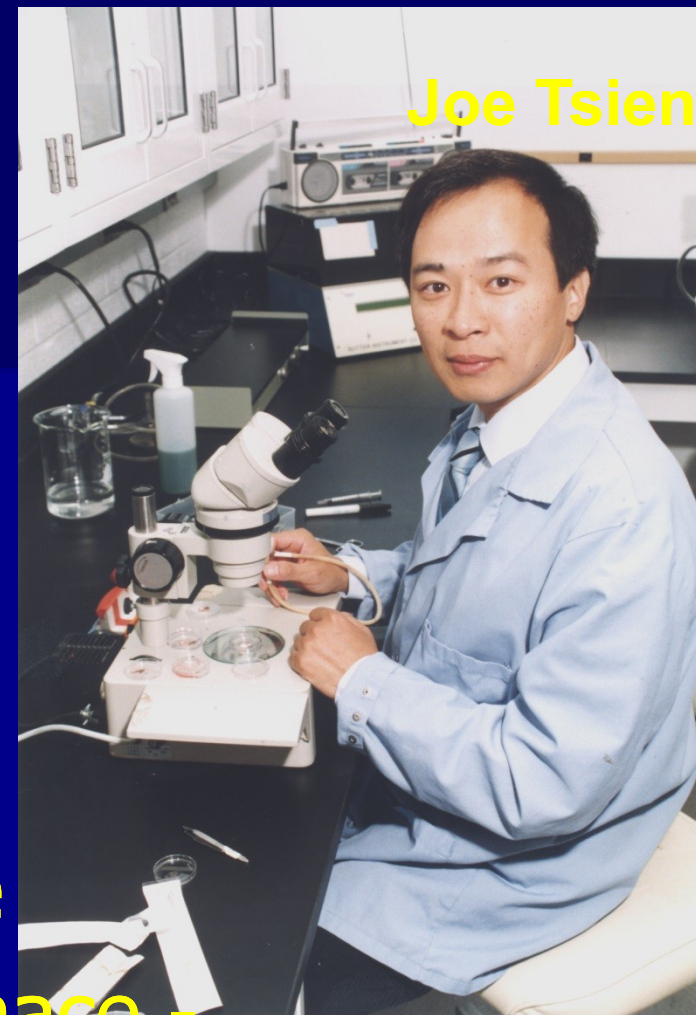
Pamatuje si 3x déle



- Činnost genu NR2B

v mozku s věkem slábne

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

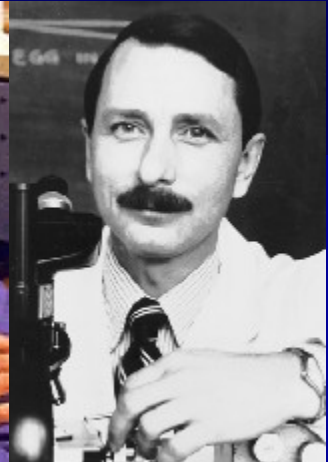
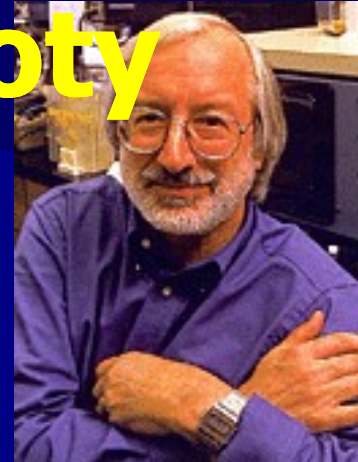


Joe Tsien

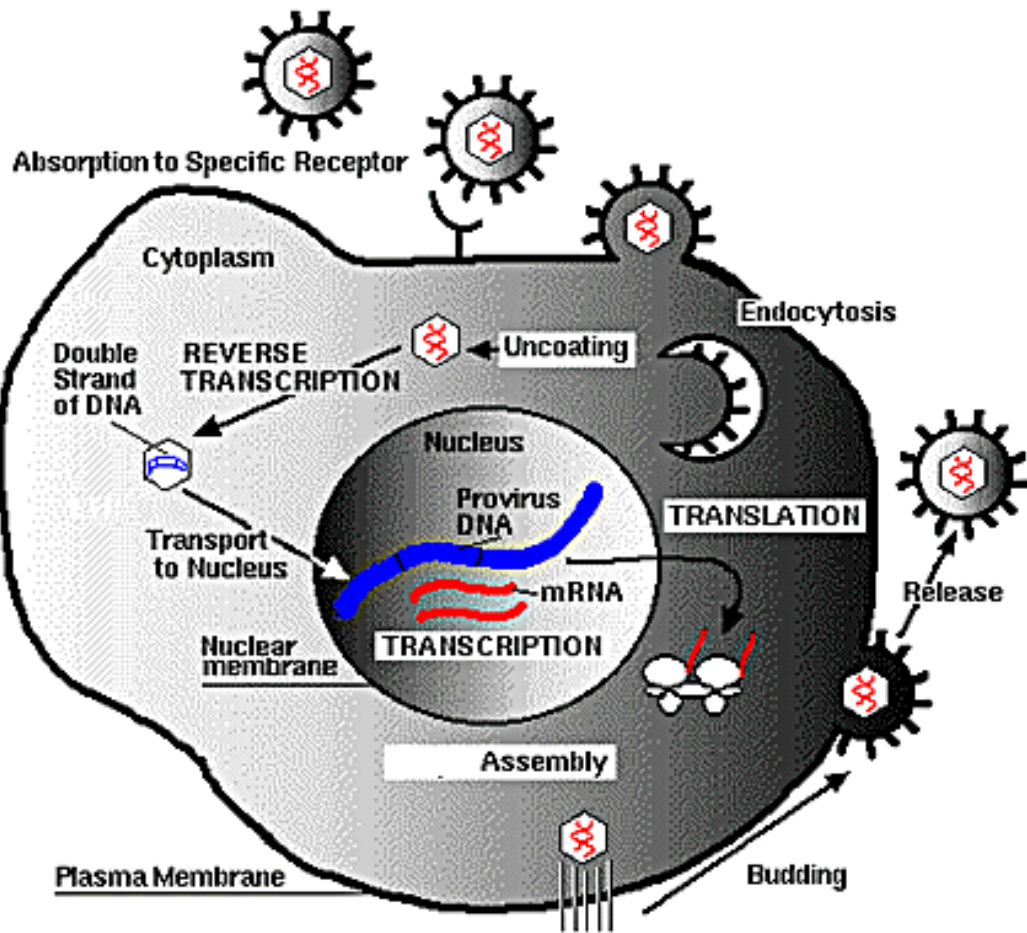


Metody tvorby geneticky modifikovaných savců

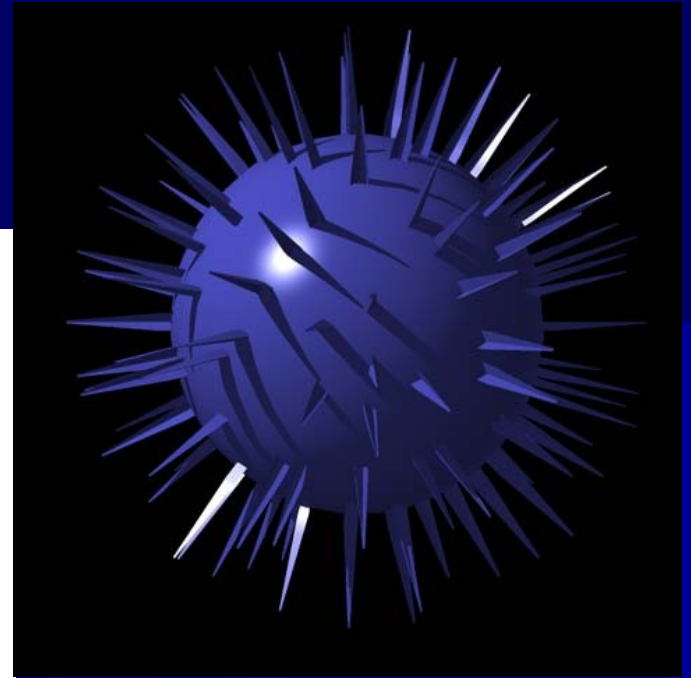
Mikroinjekce do prvojádra zygoty



Retroviry



Retrovirus replication

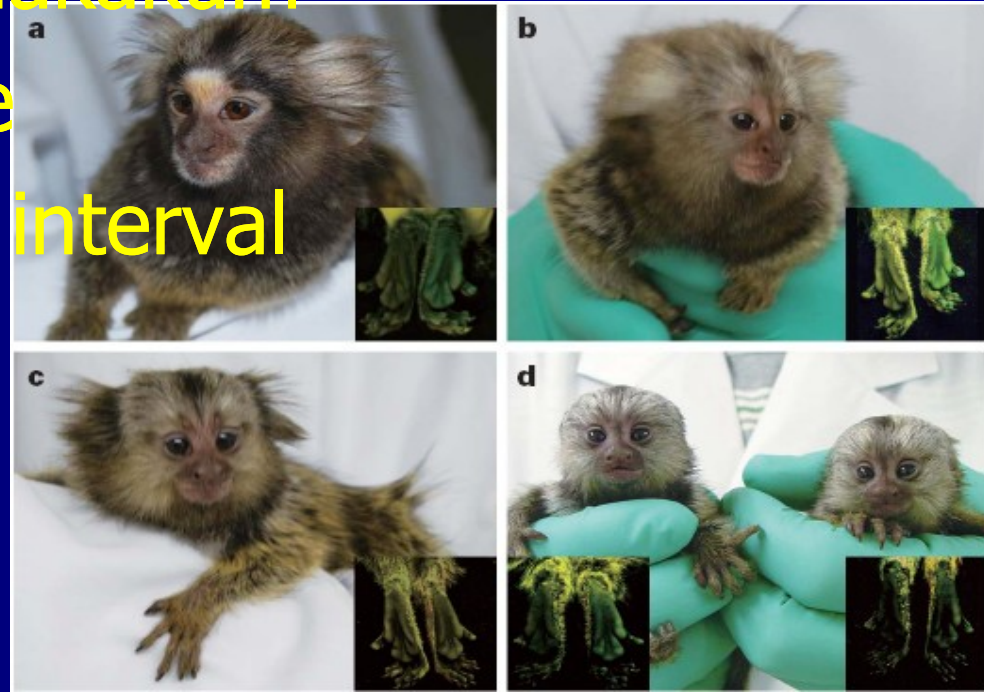


Mikroinjekce retrovirového vektoru do zralého oocyty



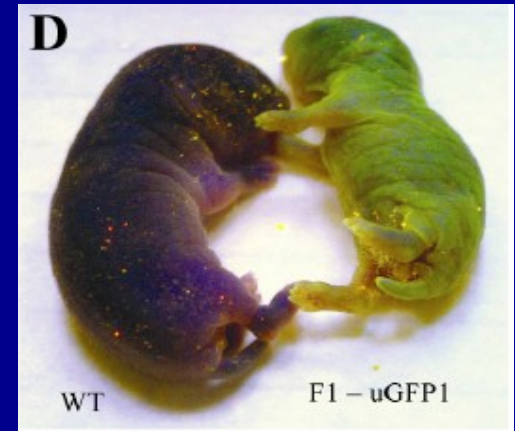
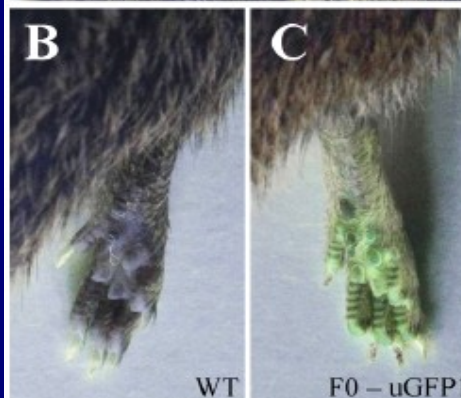
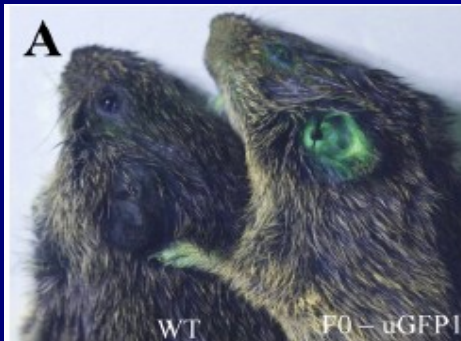
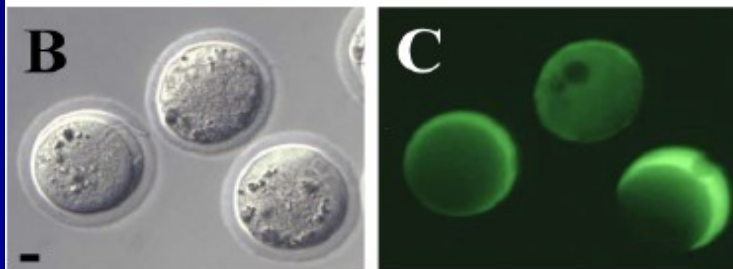
Mikroinjekce retrovirového vektoru do embrya

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

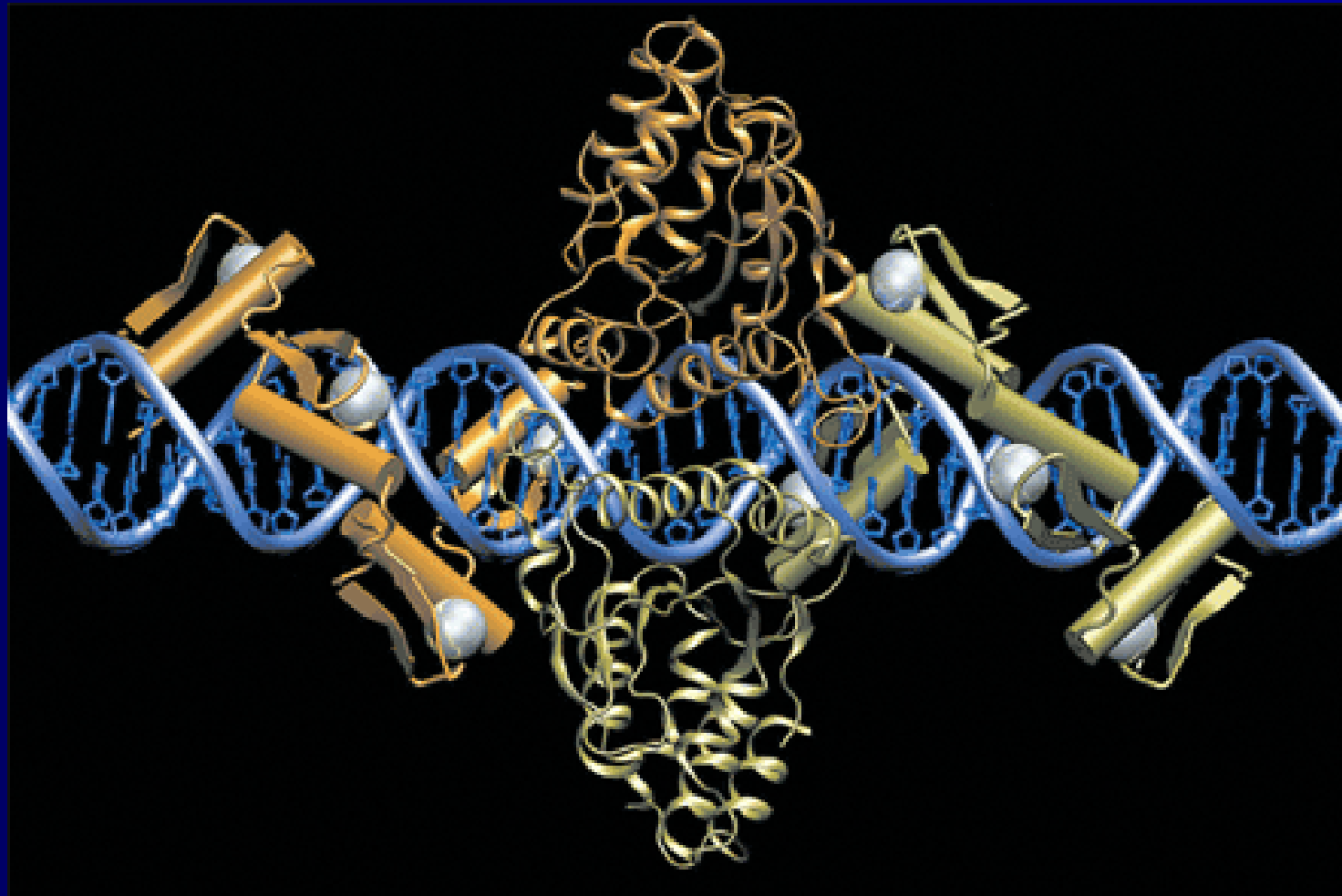


Lentivirové vektory

- Hraboš préríjní



Zinc finger nukleázy



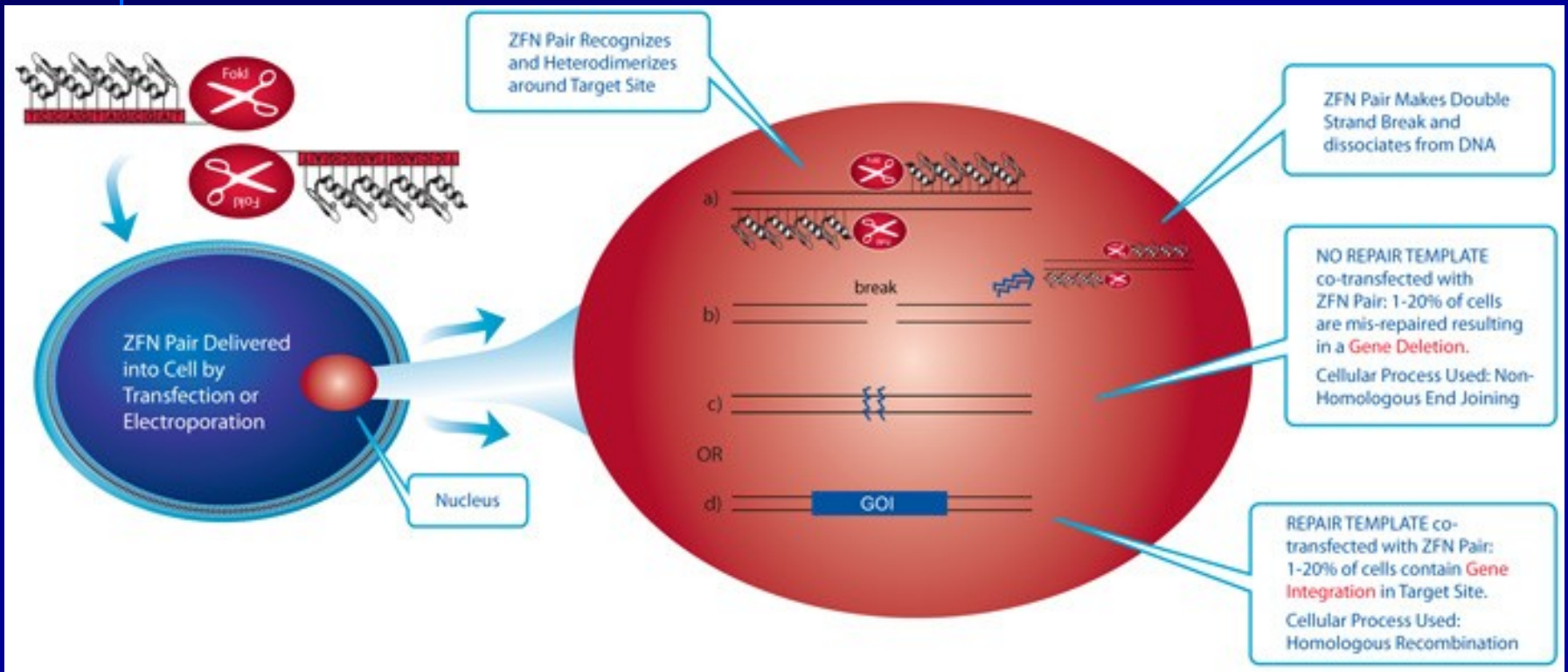
Zinc finger nukleázy

- „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“



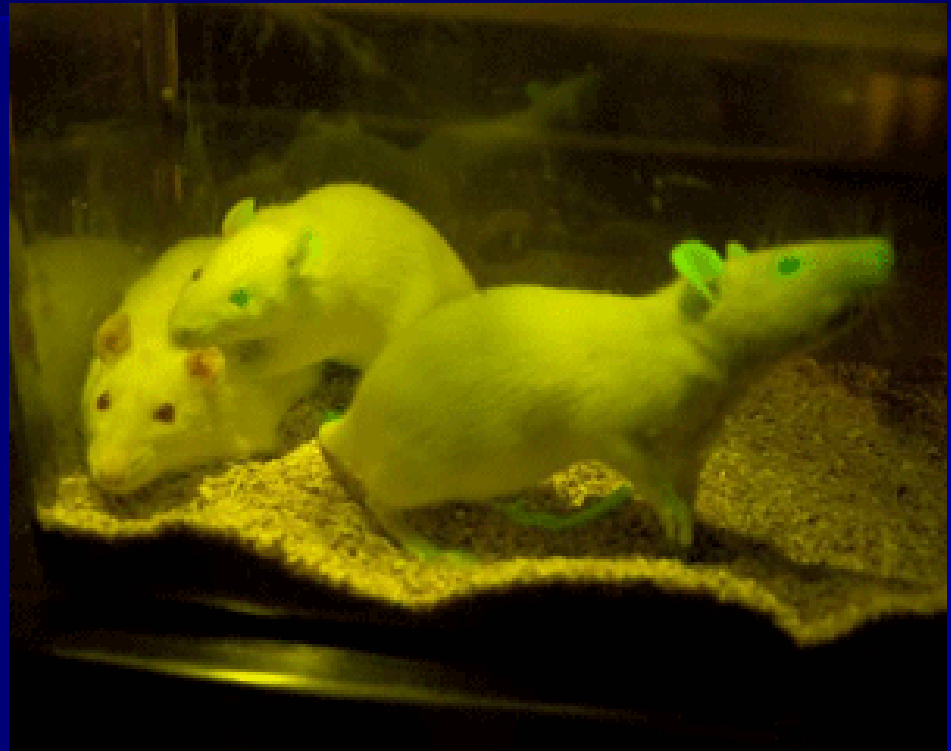
- **Kombinace tří „zinkových prstů“ stačí na určení specifického místa v genomu**
- **Navedou na něj nukleázu**
- **Ta dimeruje a štípne DNA**
- **Nastartují reparační procesy**
- **Homologní rekombinací se zabuduje dodaná sekvence – frekvence homologní rekombinace roste na 1:1000**

Zinc finger - nukleázy



Zinc finger - nukleázy

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



TALEN

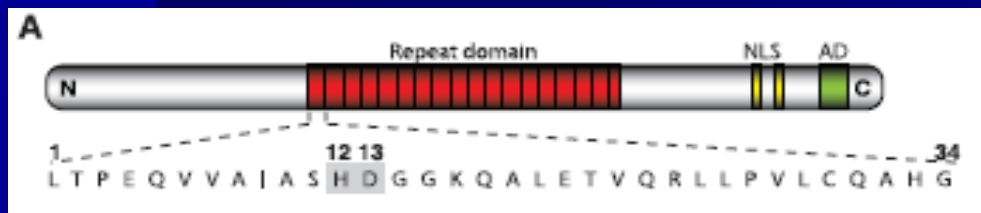


Bakterie *Xanthomonas* ovládá geny hostitelské rostliny speciálními bílkovinami - transkripčními aktivátory. Ty se vážou na zcela určité sekvence v genomu hostitelské rostliny.



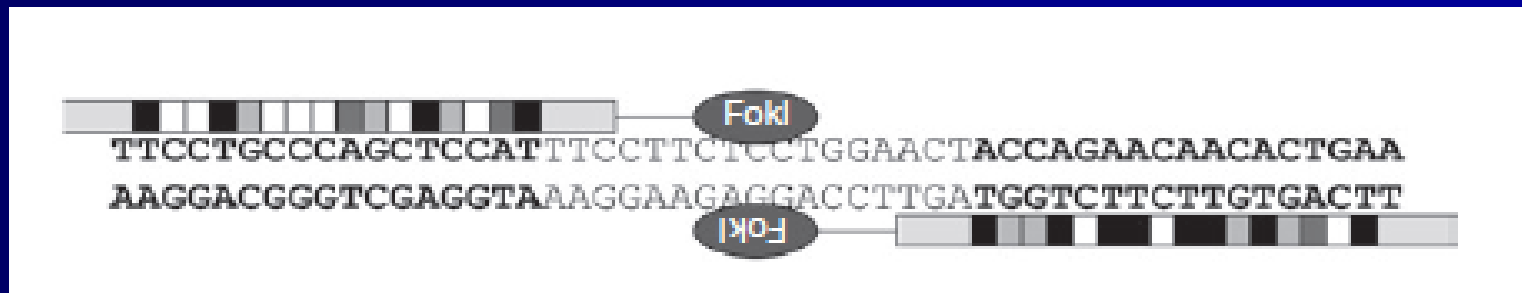
TALEN

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



TALENy

- Pro štěpení DNA se na Tal efektorový protein naváže nukleáza Fok1



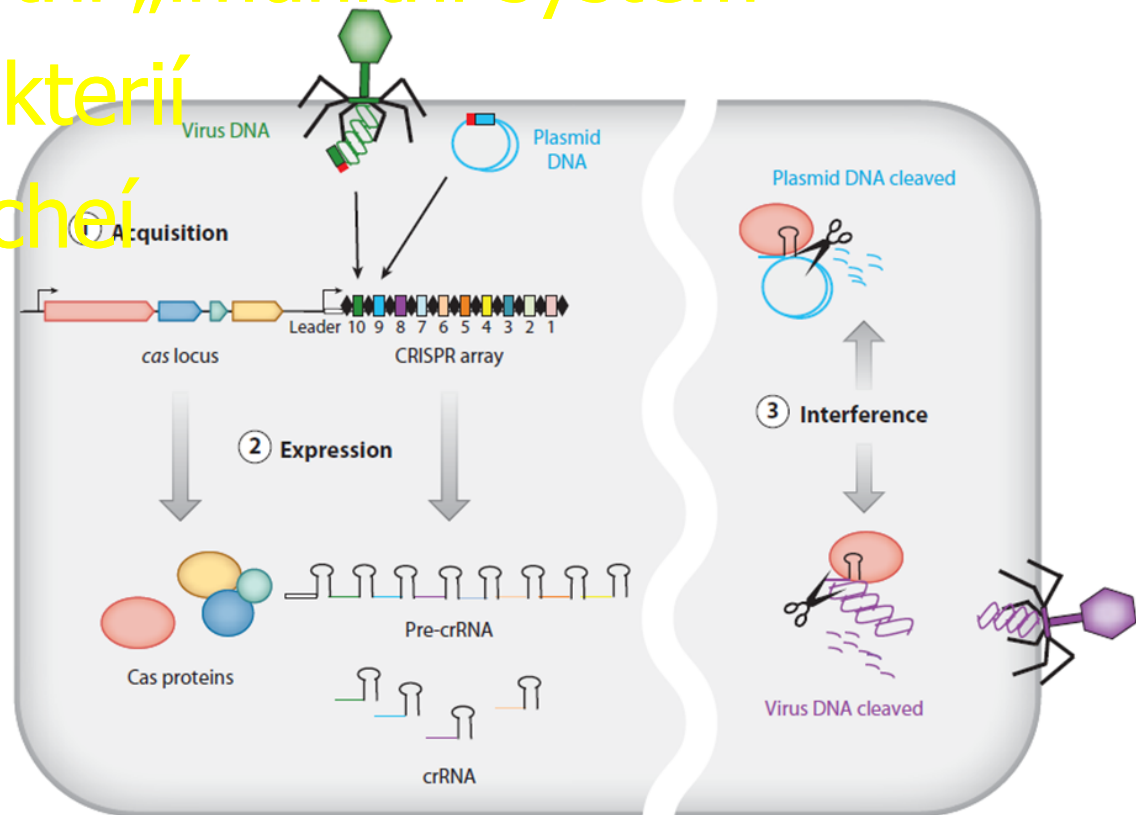
- Při injekci mRNA do cytoplasmy zygoty účinnost knockoutu kolem 75 %

System CRISPR-Cas

Prokaryotní „imunitní systém“

40 % bakterií

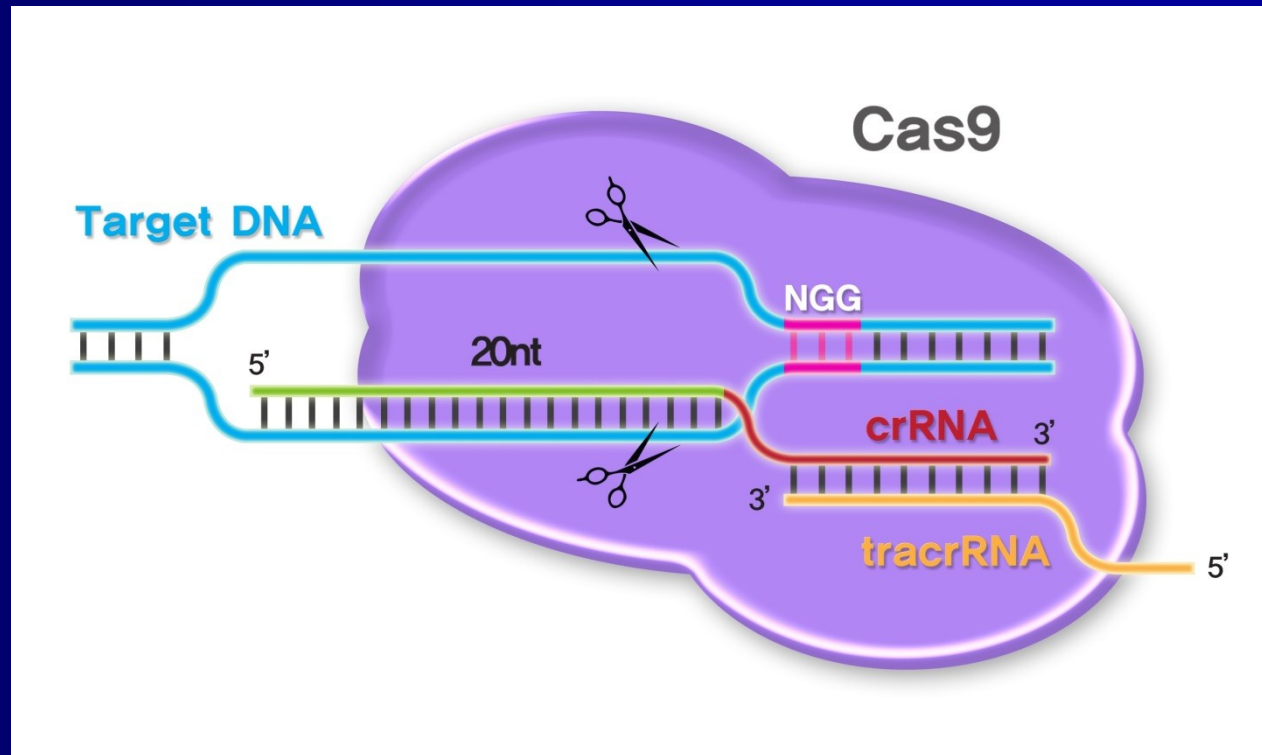
90 % archeí



CRISPR-Cas system

System CRISPR-Cas

- Synteticky připravené crRNA
- Cílí na specifické místo genomu



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



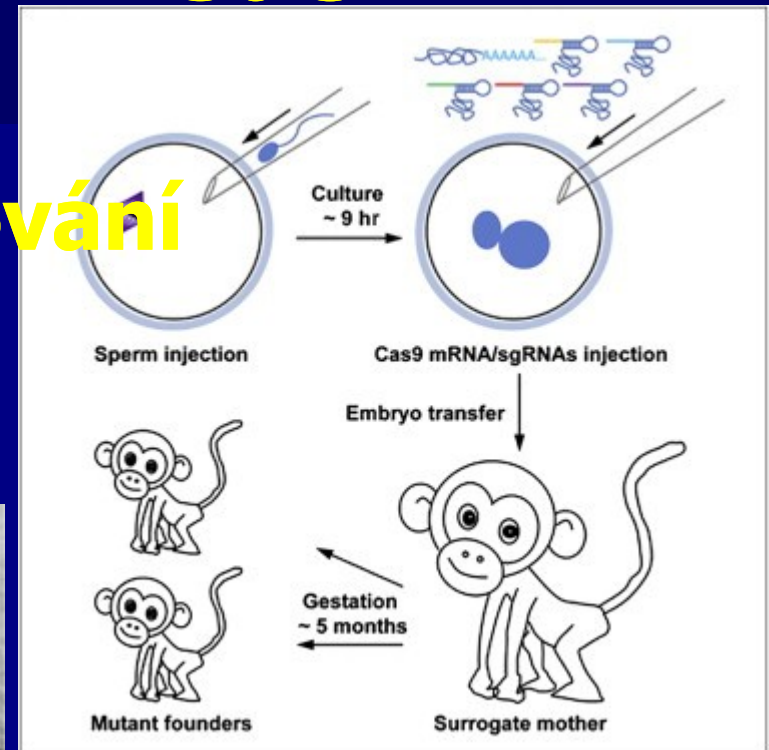
System CRISPR-Cas

Simultánní vyblokování

- 2 genů
- i homozygotně

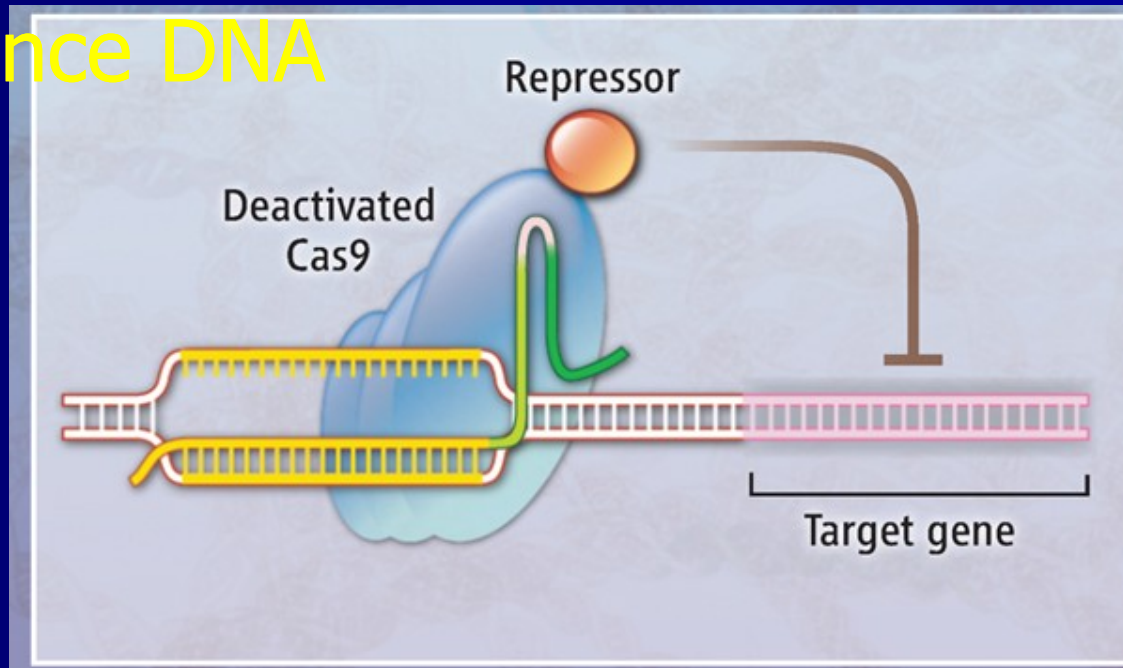


2013 - makak



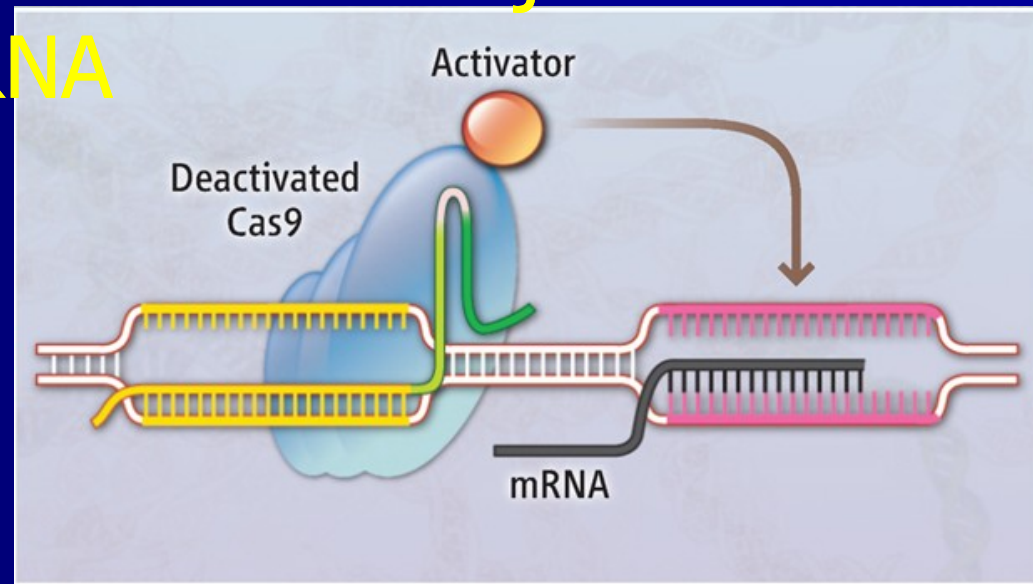
CRISPR-Cas aktivace a suprese genů

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



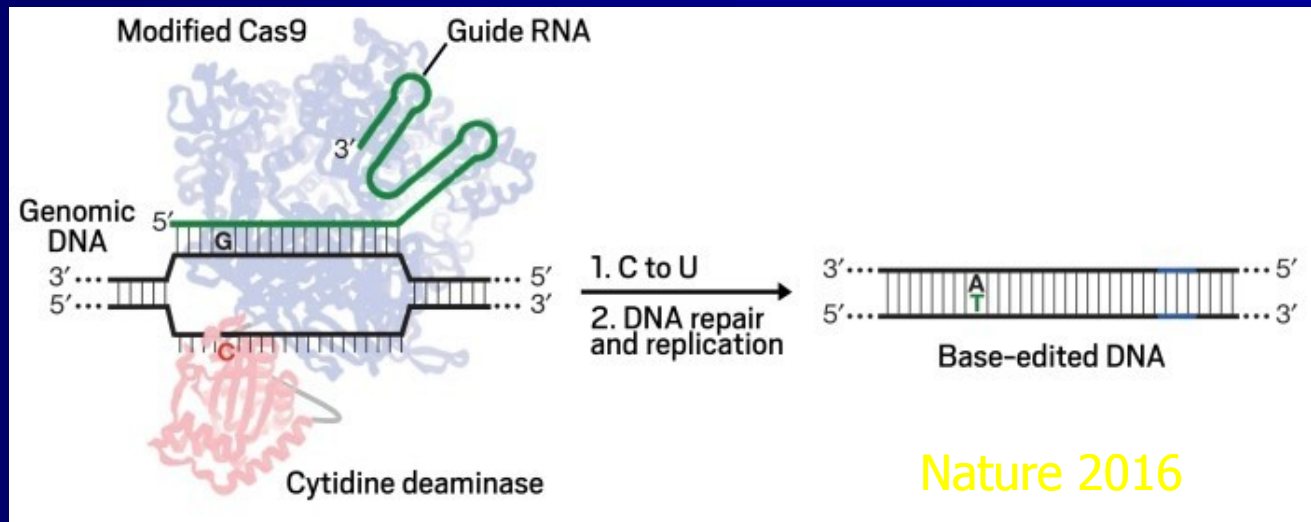
CRISPR-Cas aktivace a suprese genů

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



CRISPR-Cas base editing

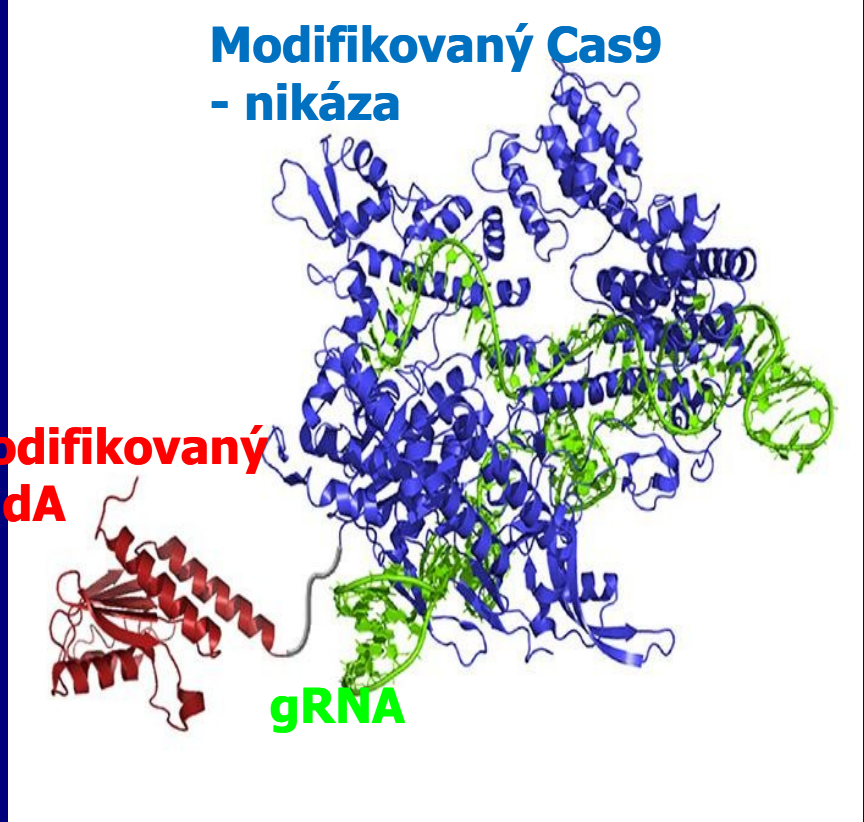
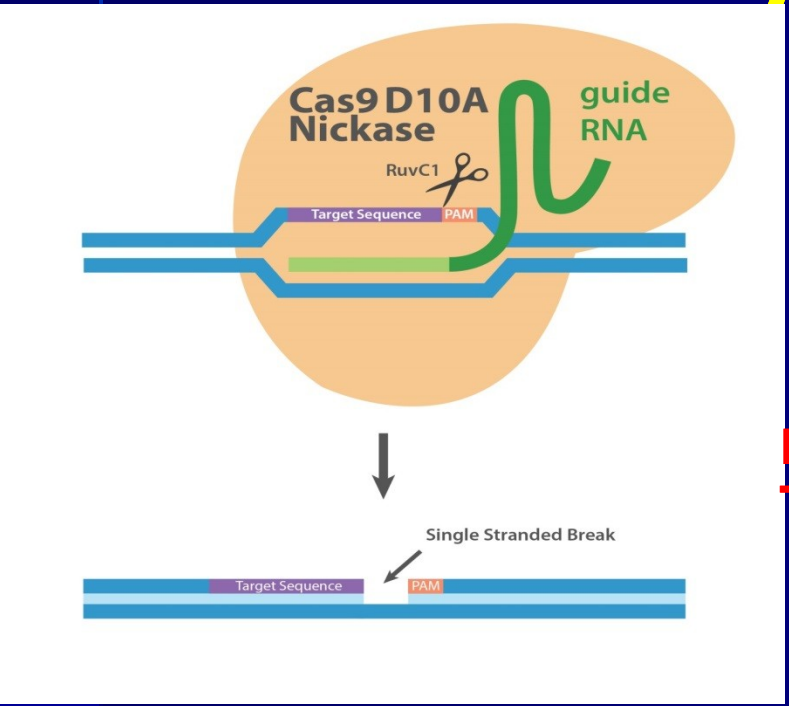
- Nefunkční Cas9 - nosič cytidin deaminázy (C mění na U)
- crRNA nasměruje deaminázu na cílový C
- DNA repair – opraví komplementární bázi
- Při replikaci DNA se U nahradí za T



Nature 2016

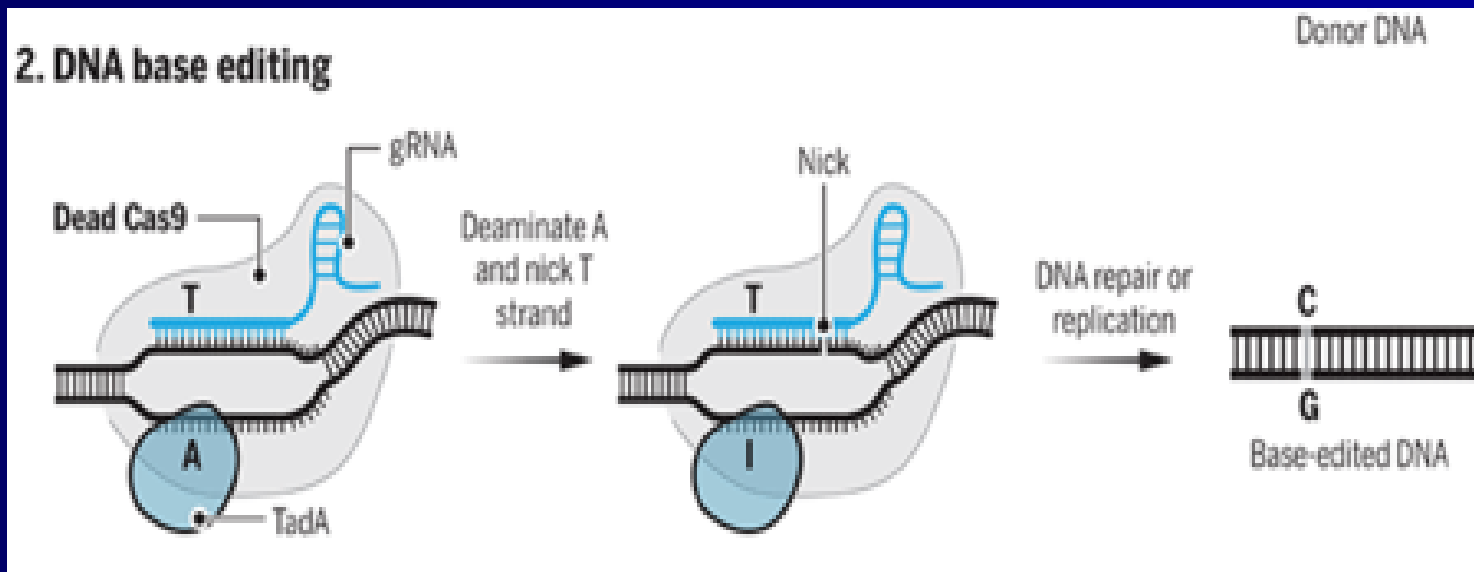
Base editing

■ Modifikovaný Cas9 (Dead Cas)



Base editing

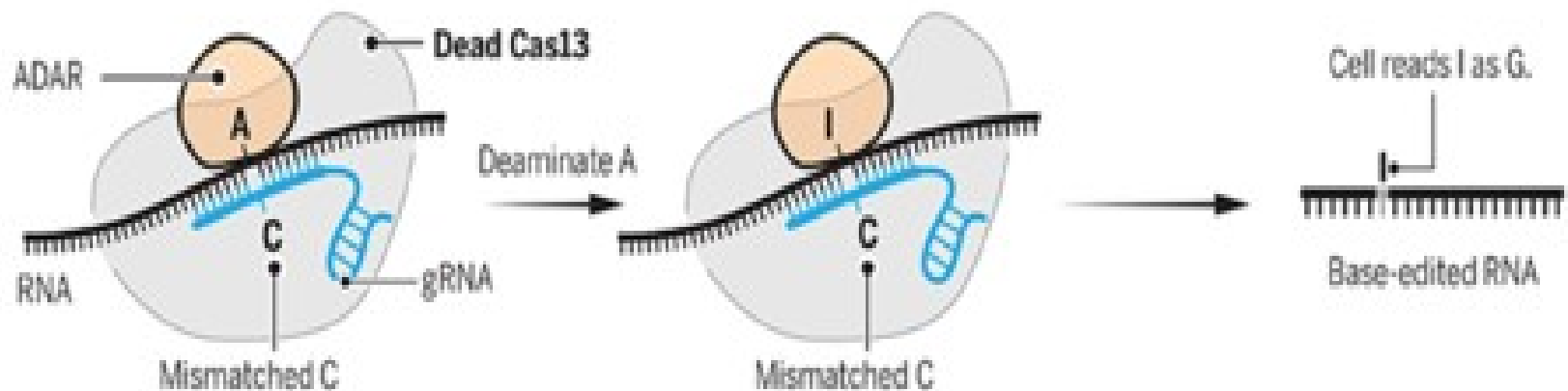
- Přepis A na G
- Není přírodní enzym – modifikovaný TadA
- Přepíše adenin na inosin (čte se jako G)
- Nick nastartuje mismatch-repair



Base editing

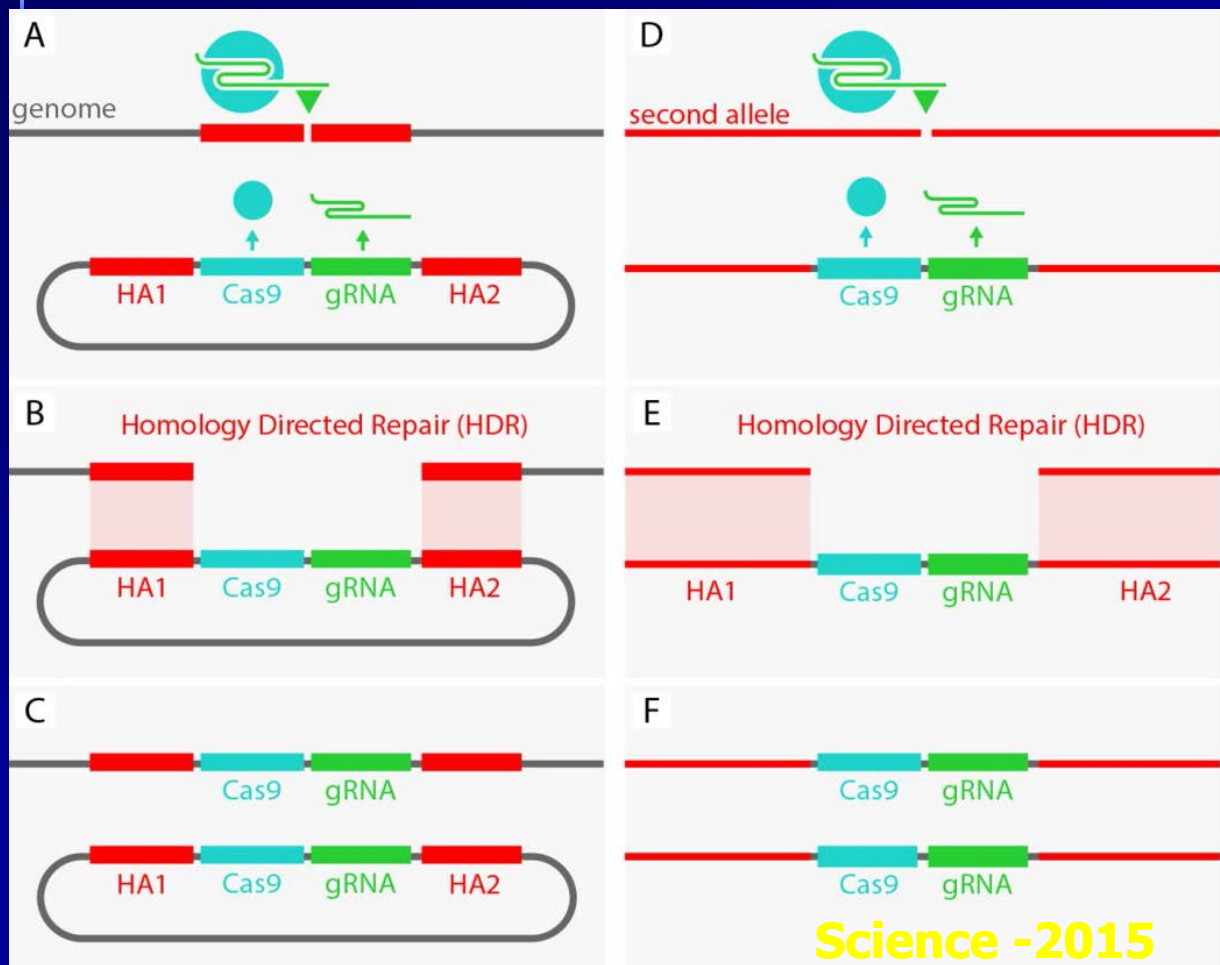
- Base editing na RNA

3. RNA base editing



Mutagenní řetězová reakce MCR

- Vyblokování druhé alely z 97 %



Ethan Bier
UC San Diego

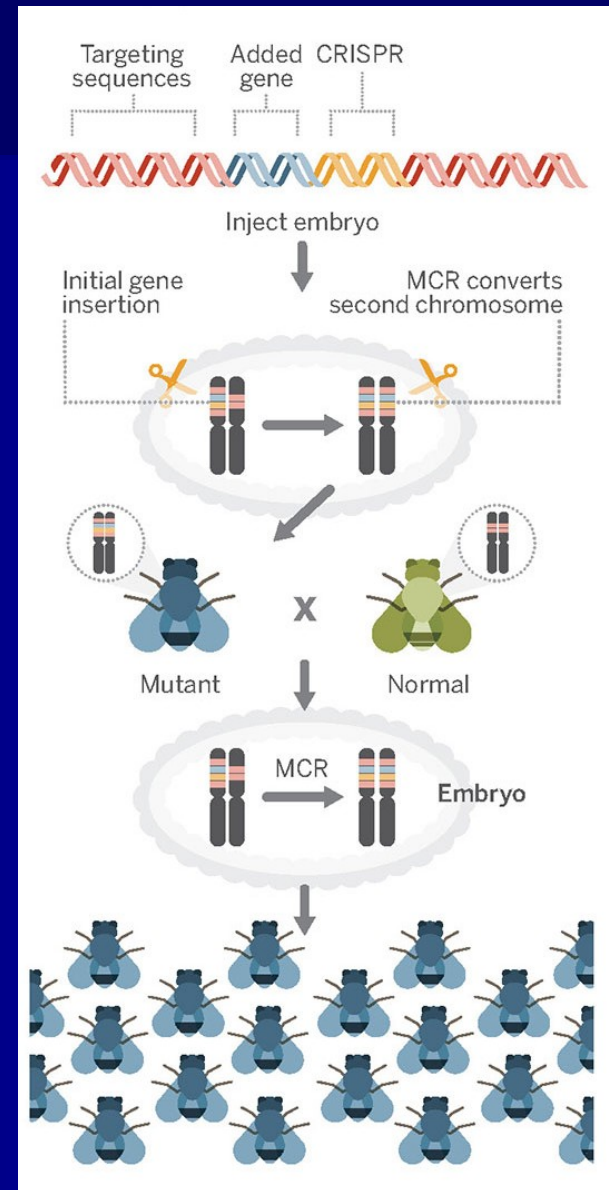


Valentino Gantz

Mutagenní řetězová reakce

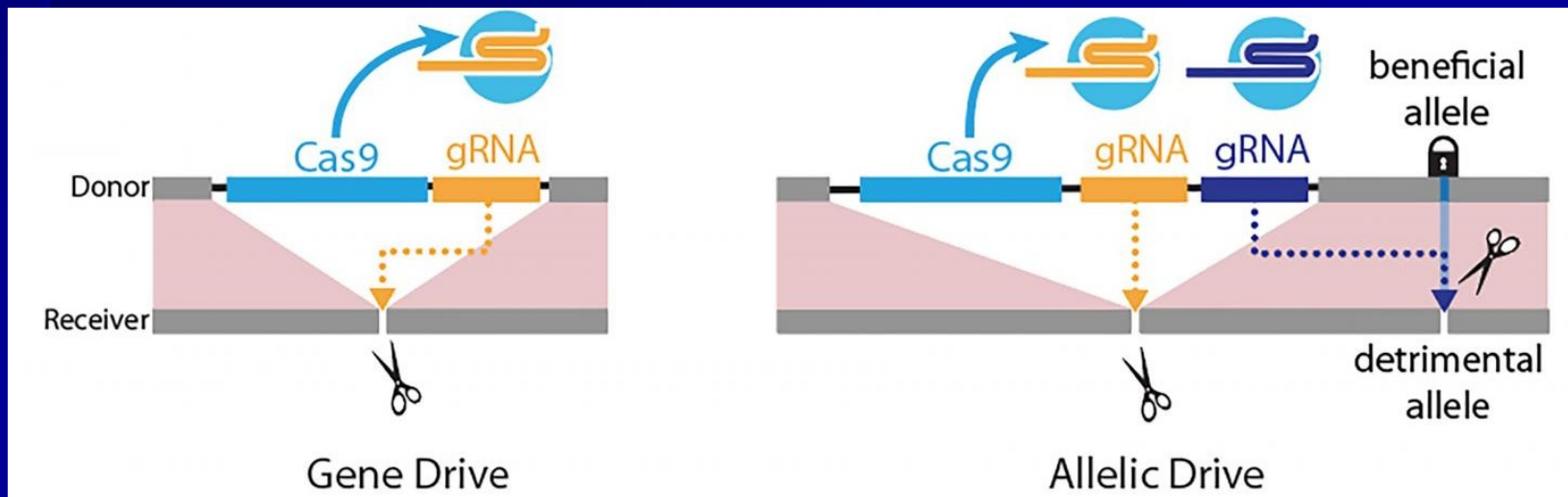
MCR

- 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



Allelic drive

- Editace na 2 místech genomu (2x gRNA)
- 1. přenos gene drive
- 2. vyřazení škodlivé alely a její náhrada prospěšnou alelou (CRISPR-rezistentní)



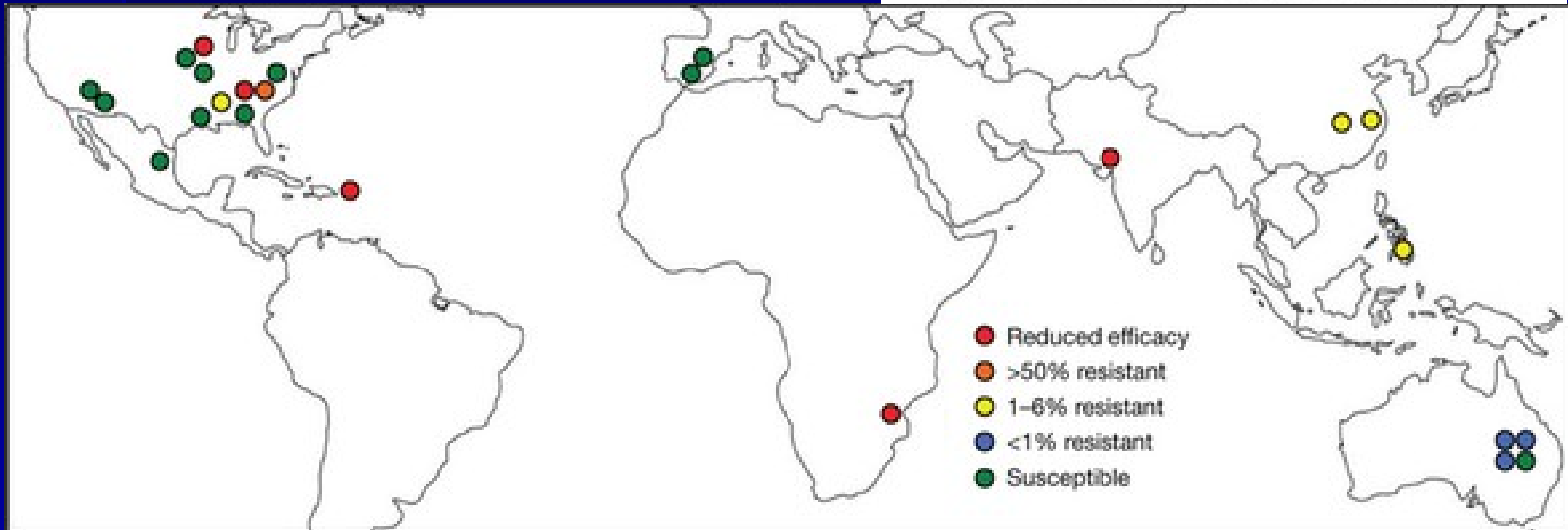
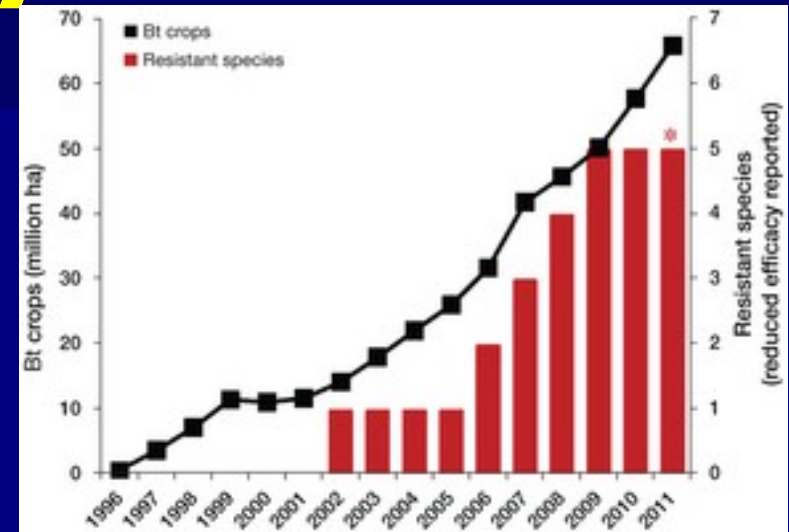
Potenciální využití



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

Potenciální využití

Zvrácení rezistence
u škůdců (Bt plodiny)



Potenciální využití

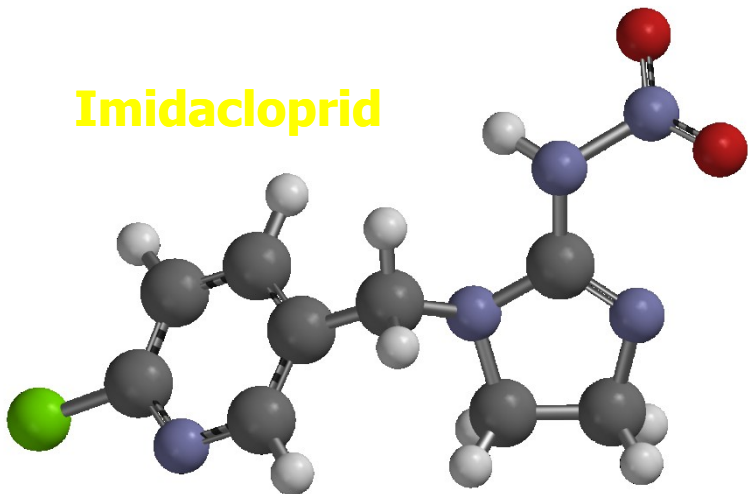
- Snížení životaschopnosti invazních druhů



Potenciální využití

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

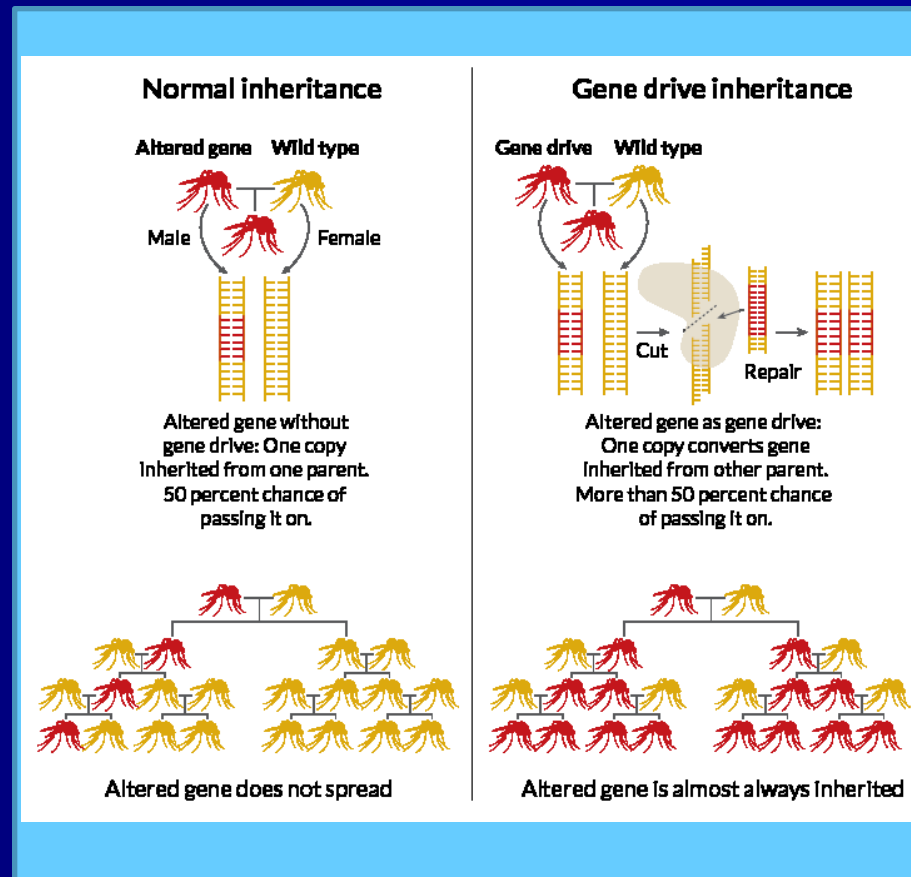
Imidacloprid



Potenciální využití

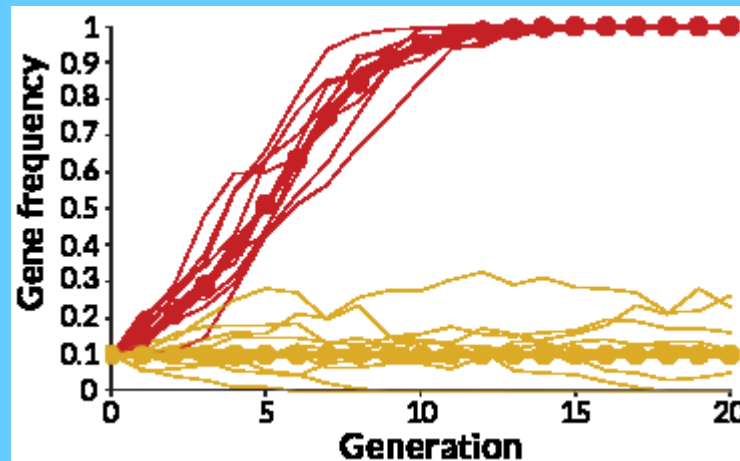
Laboratorní modely

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



Rizika gene drive

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



● Gene drive

● Mendelistická vloha

Rizika gene drive



- Zneužití pro bioterorismus

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



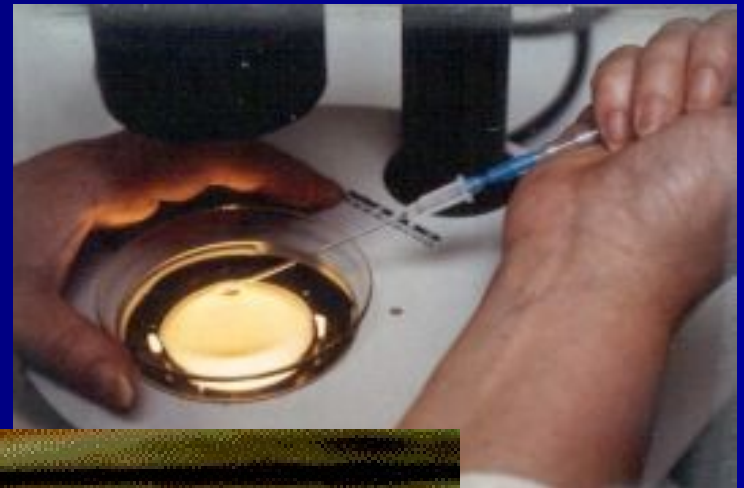
Rizika gene drive



DIY biology

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

Spermie jako vektor



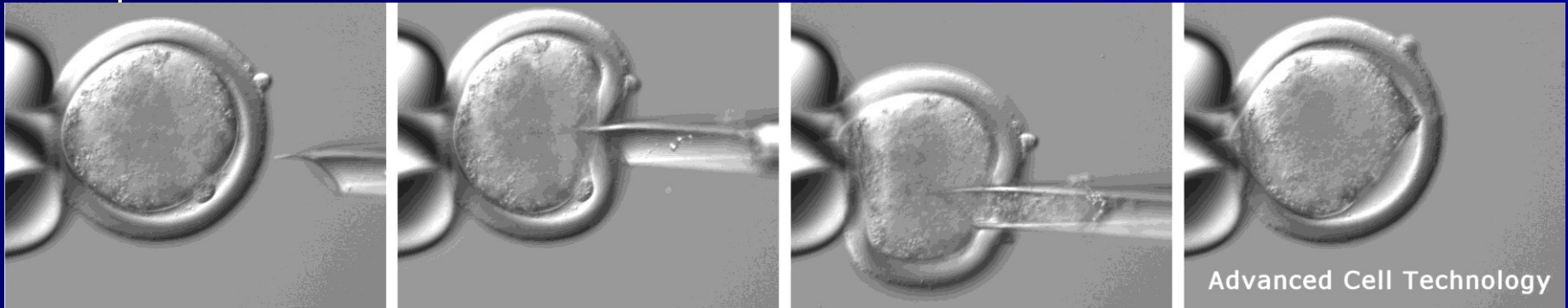
IVF spermatem s bakteriální kontaminací



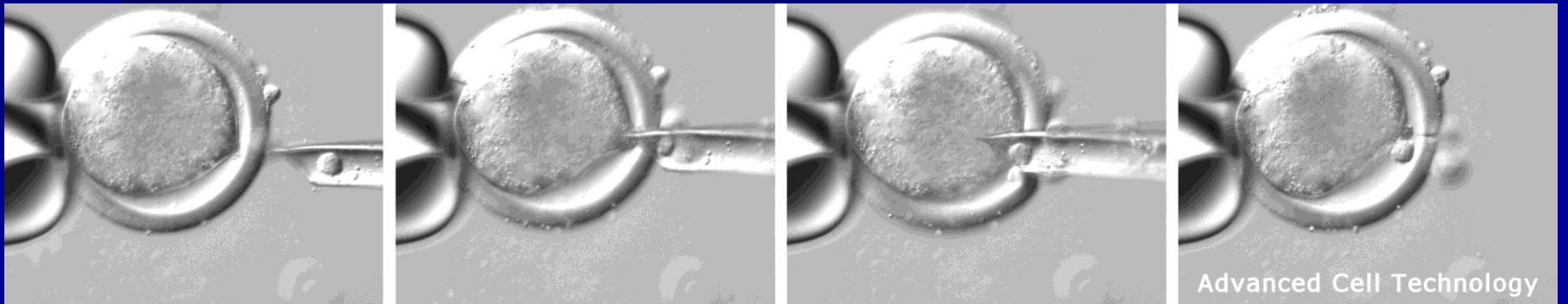
- Experimentálně u myši prokázána přítomnost bakteriálních sekvencí v genomu

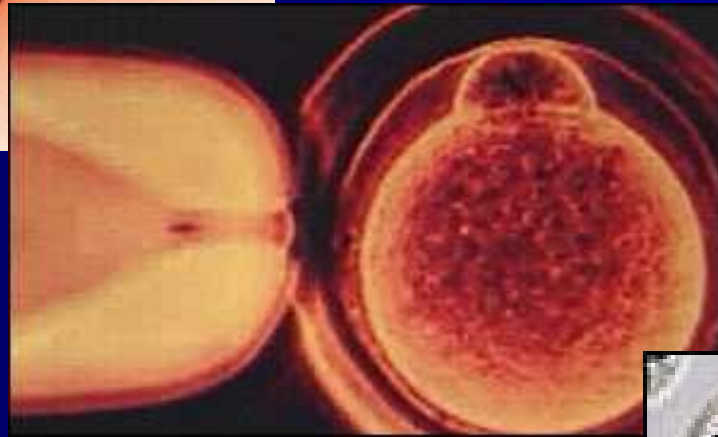
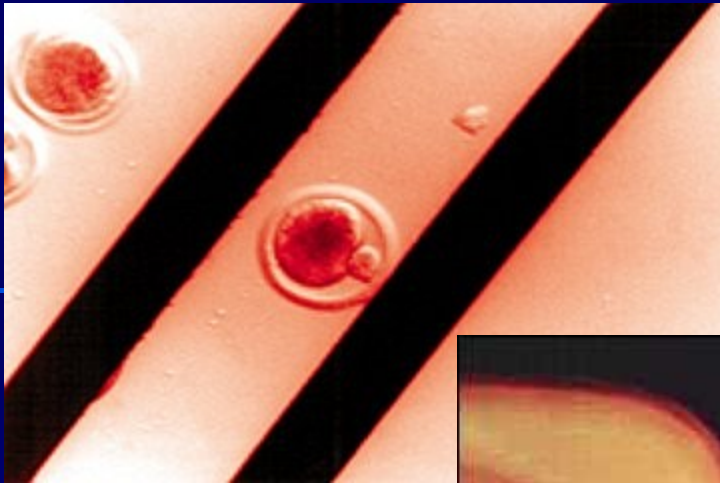
Přenos jader

Enukleace oocyty



Přenos somatické buňky pod zonu cytoplastu







Ian Wilmut
Roslin Institute
Skotsko



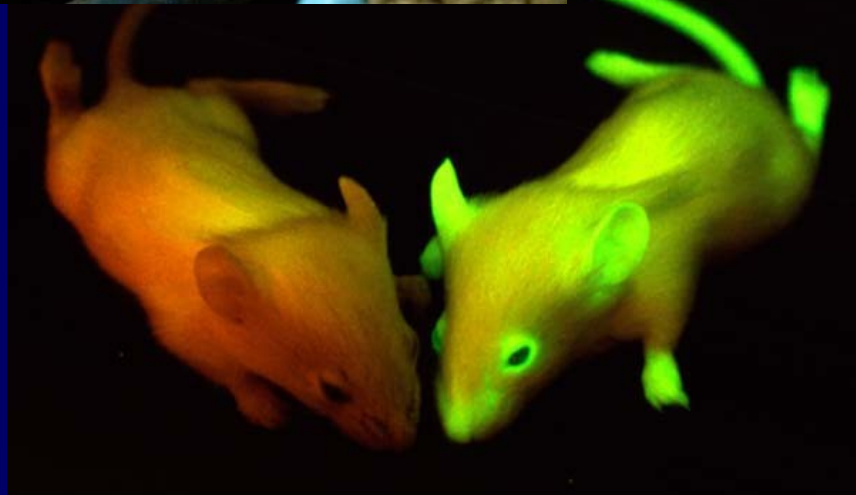
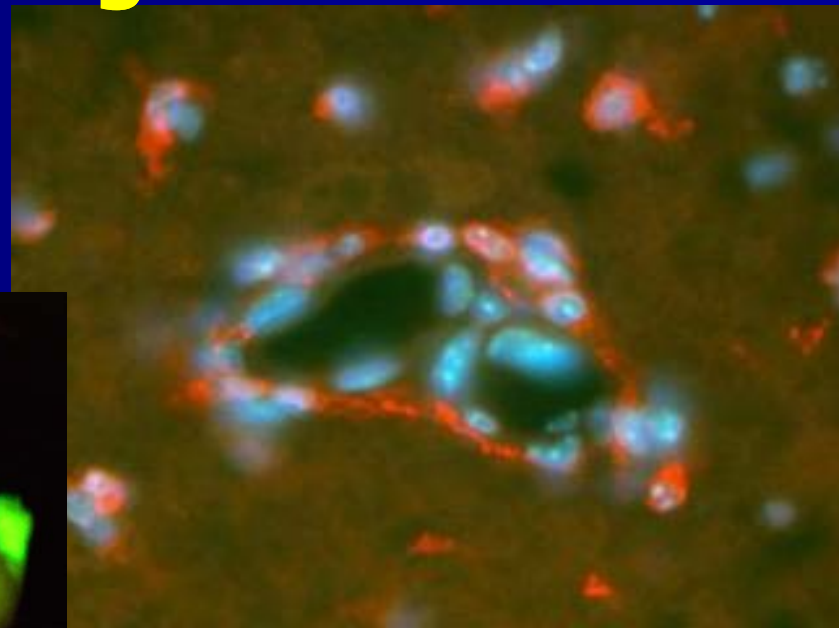
Ovce Dolly

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**

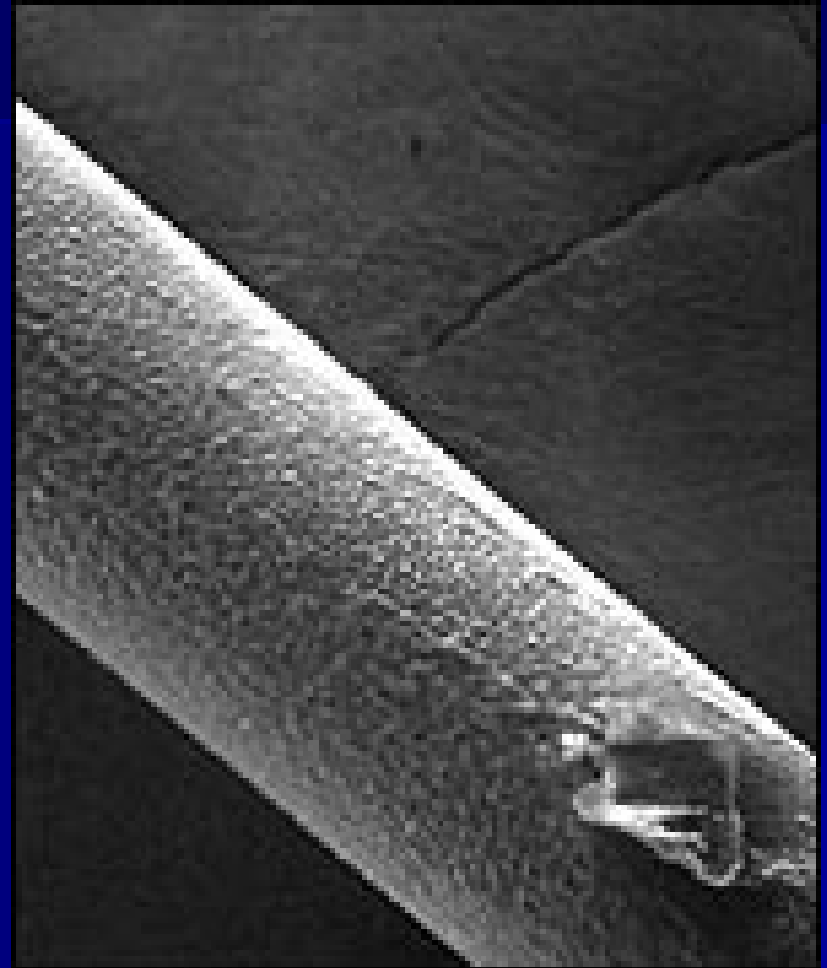


Nové materiály



BioSteel

**Nexia Bioscience
Kanada**



Resilin

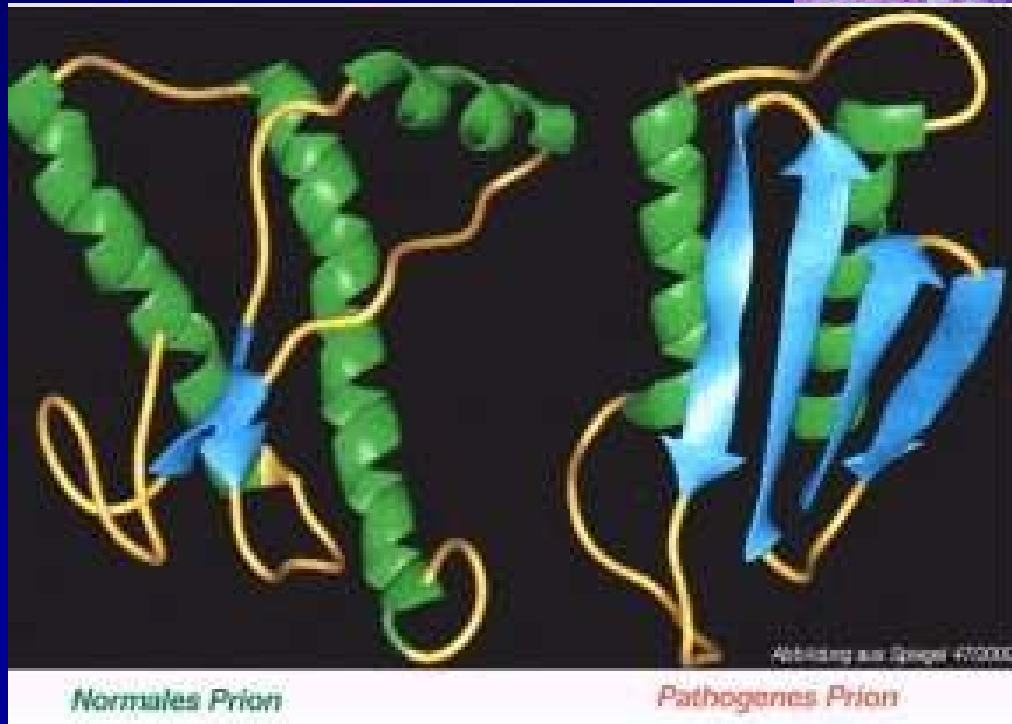
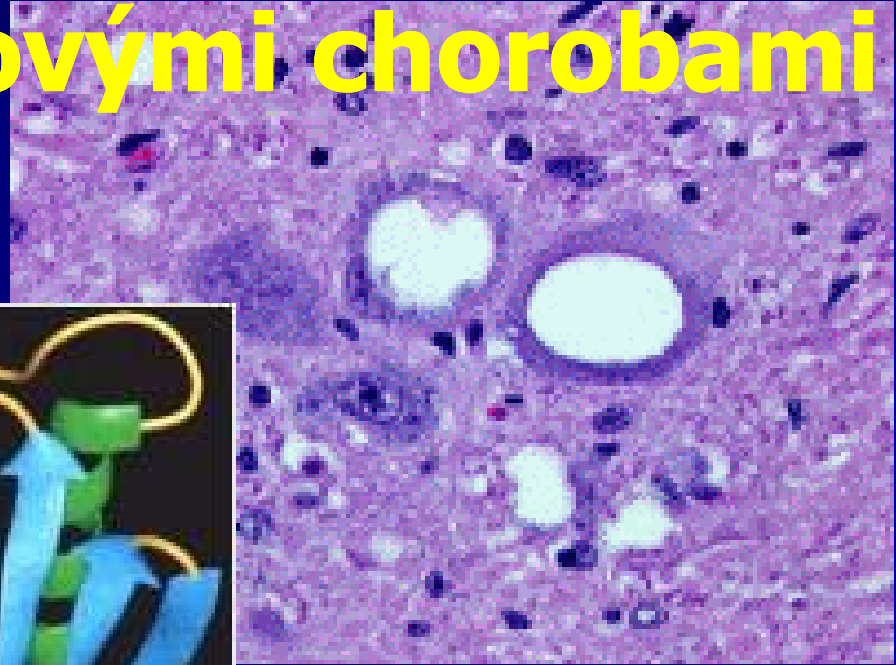


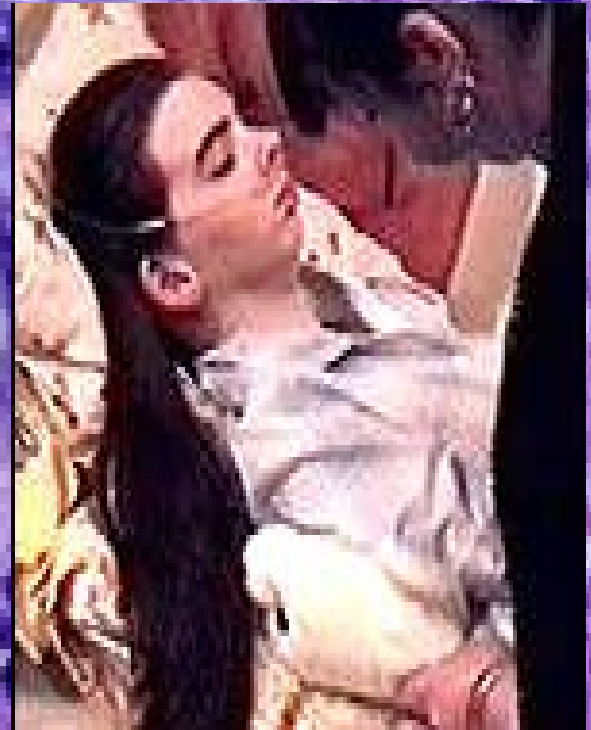
Genetický knockaut



Genový knokaut

– boj s prionovými chorobami





Skot rezistentní k BSE

Hematech – USA

RIKEN – Japonsko

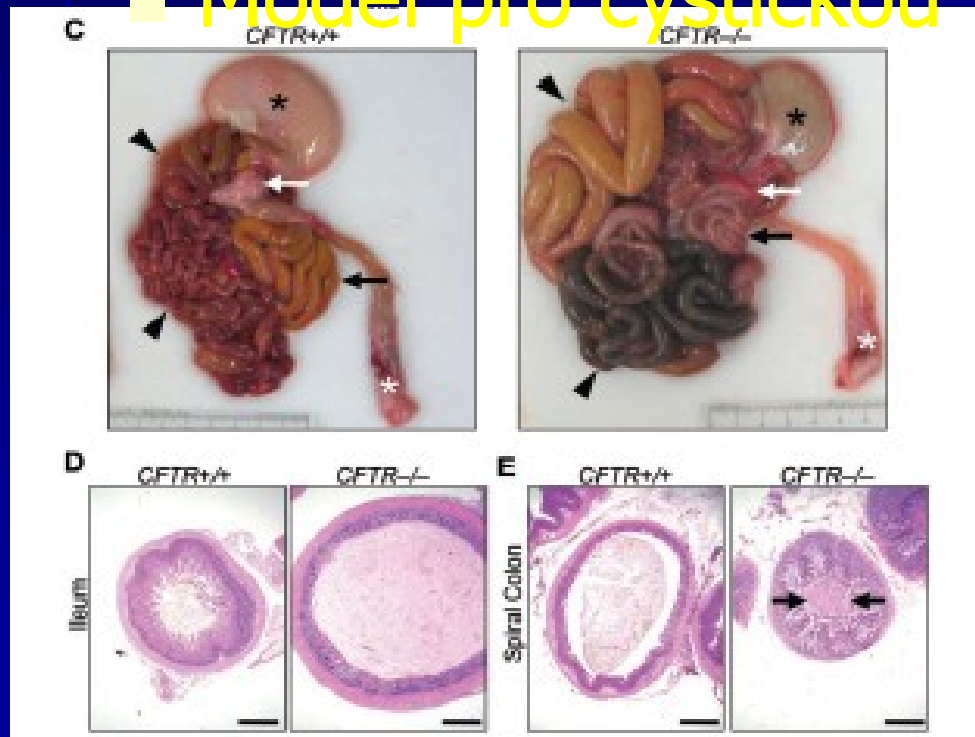
Texas A&M University

- 8 holštýnských býků
- Genový KO genu pro prionový protein

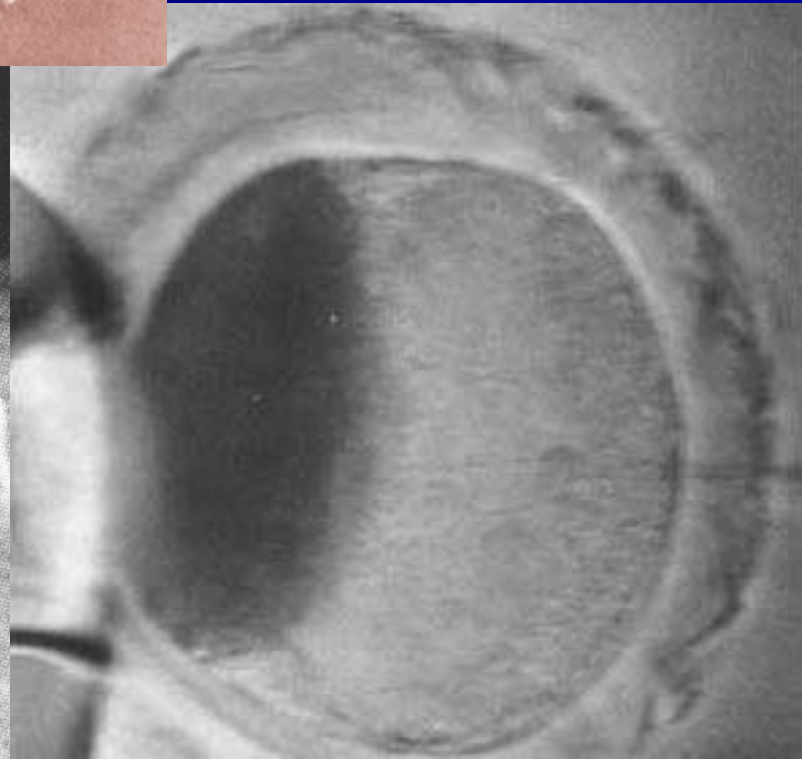
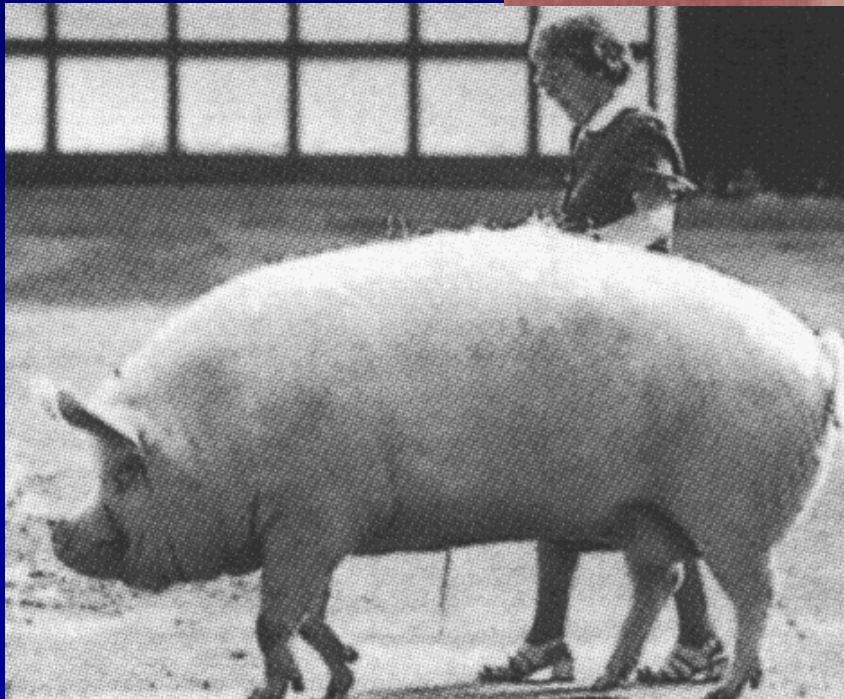


Zvířecí modely lidských dědičných chorob

- KO genu pro CFTR
- Model pro cystickou fibrózu



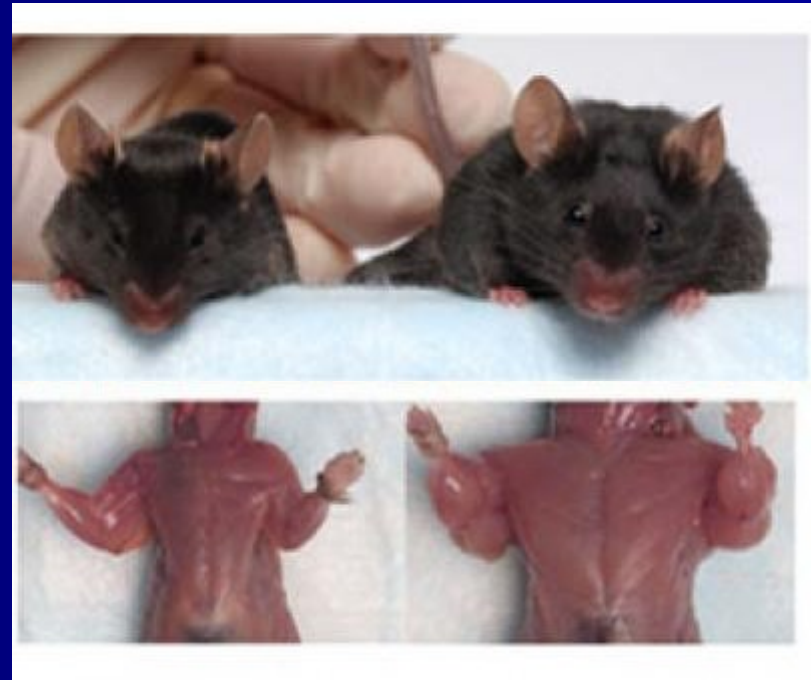
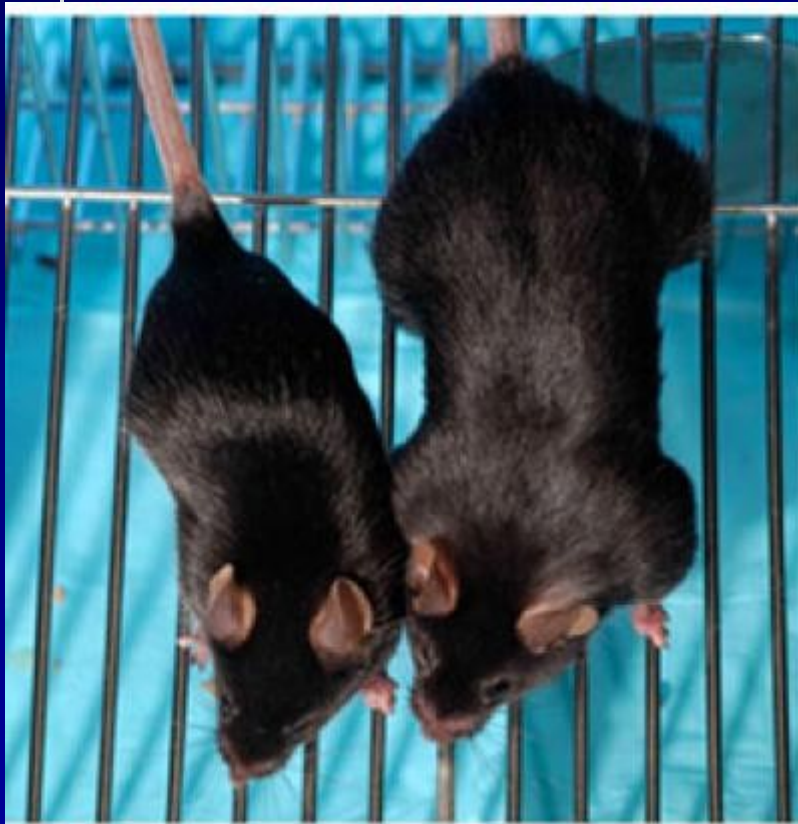
Beltsvillská prasata



Knokaut genu pro myostatin



Blok myostatatinu a zvýšená exprese follistatinu se doplňují



GM pstruh duhový

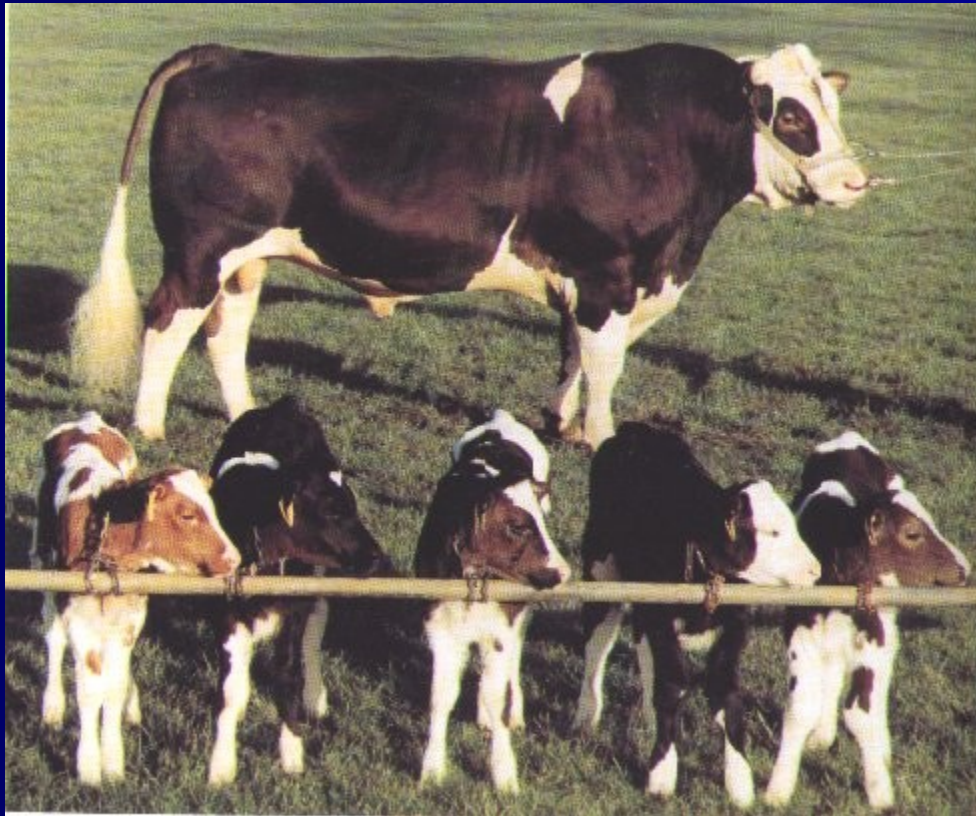
- Blok genu pro myostatin
- Funguje i u dalších obratlovců



Změna složení mléka prasnic



Herman – Pharming (NL)



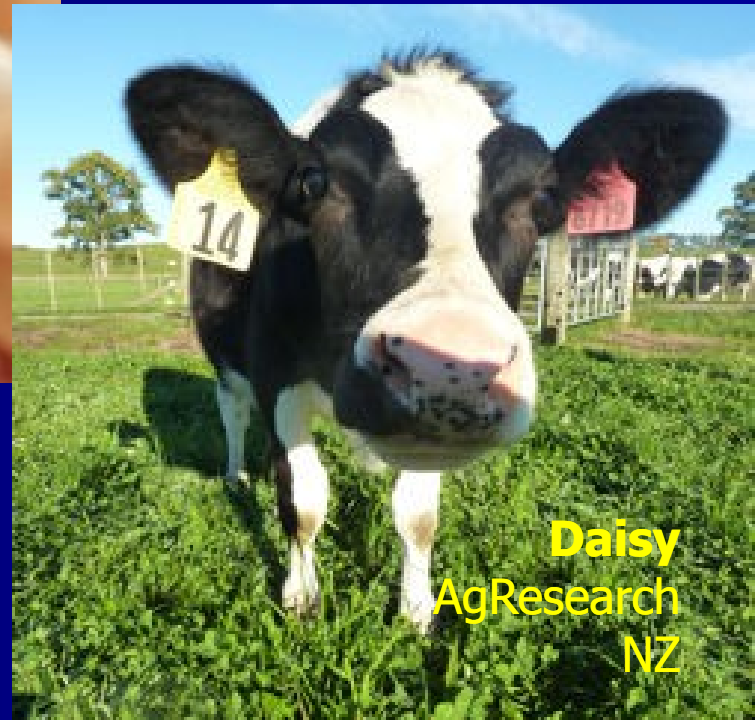
Prase s „omega-3“ ve svalech

- 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



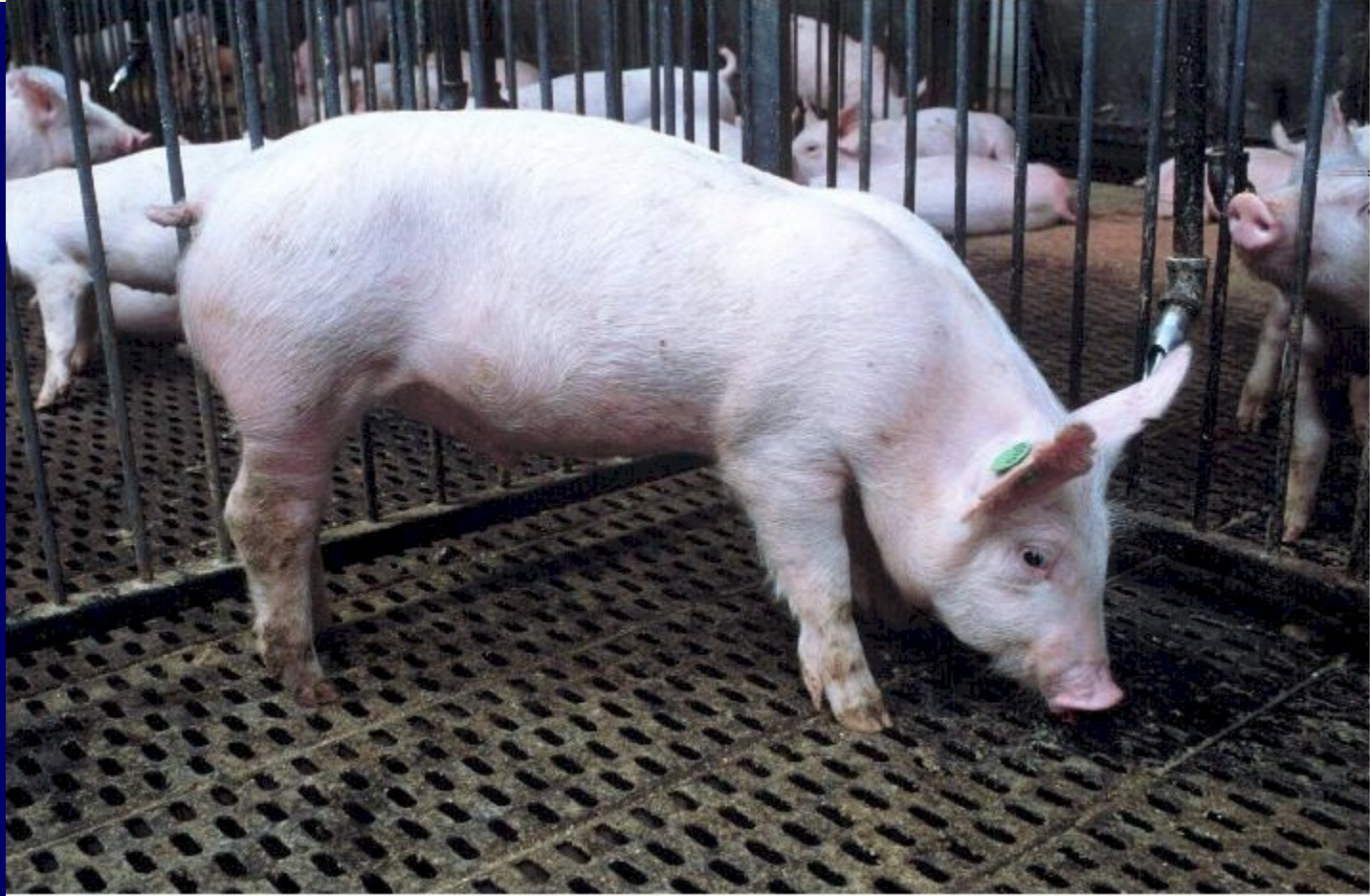
Hypoalergenní mléko

- 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

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



Ptáci



Problémy – zvláštnosti reprodukce ptáků

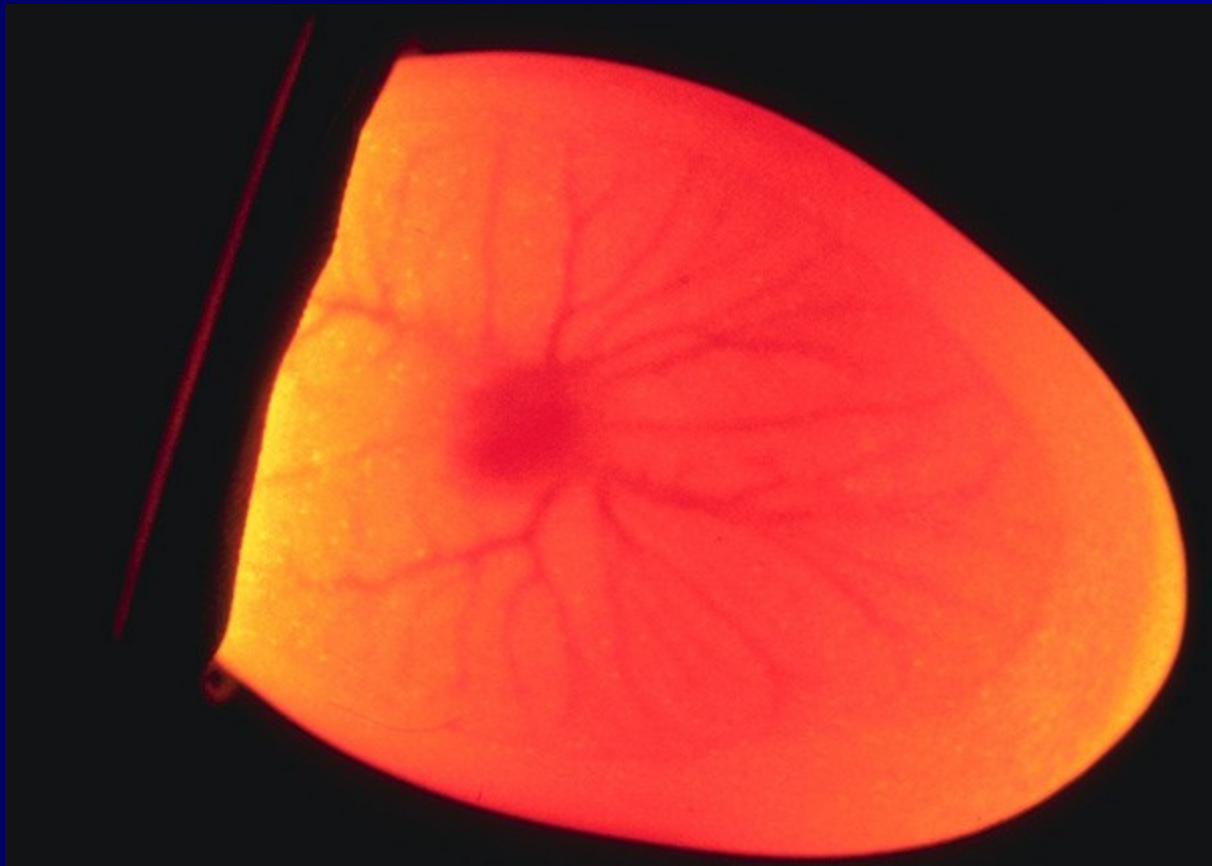


Za 24 hodin po ovulaci – 60 000 buněk

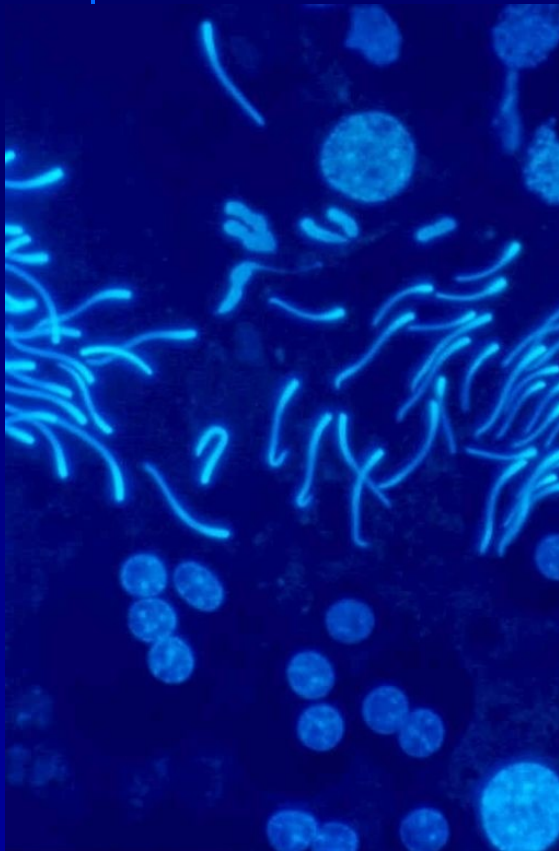
Metody tvorby geneticky modifikovaných ptáků



Transplantace PGC

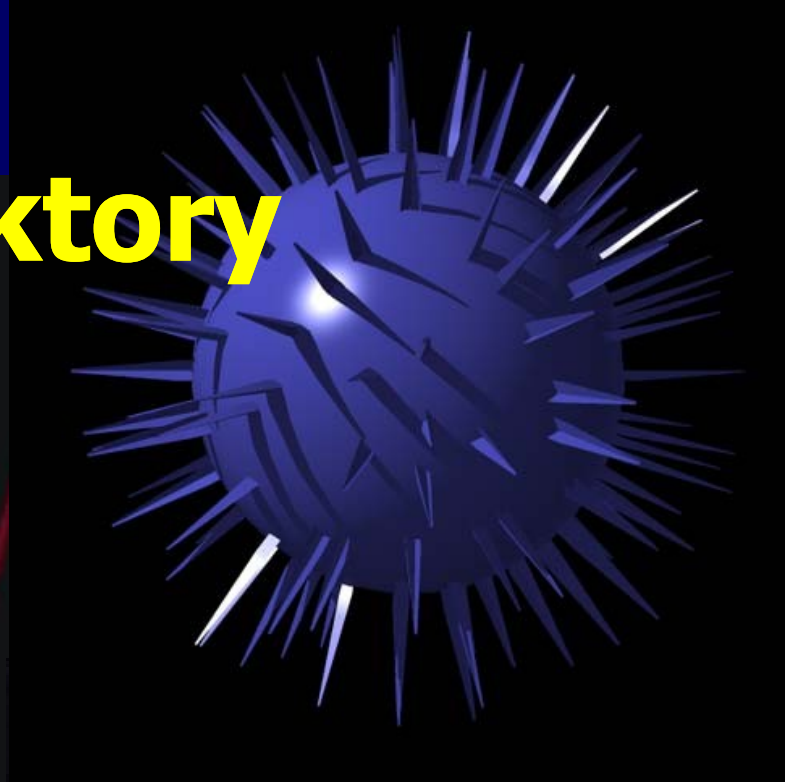
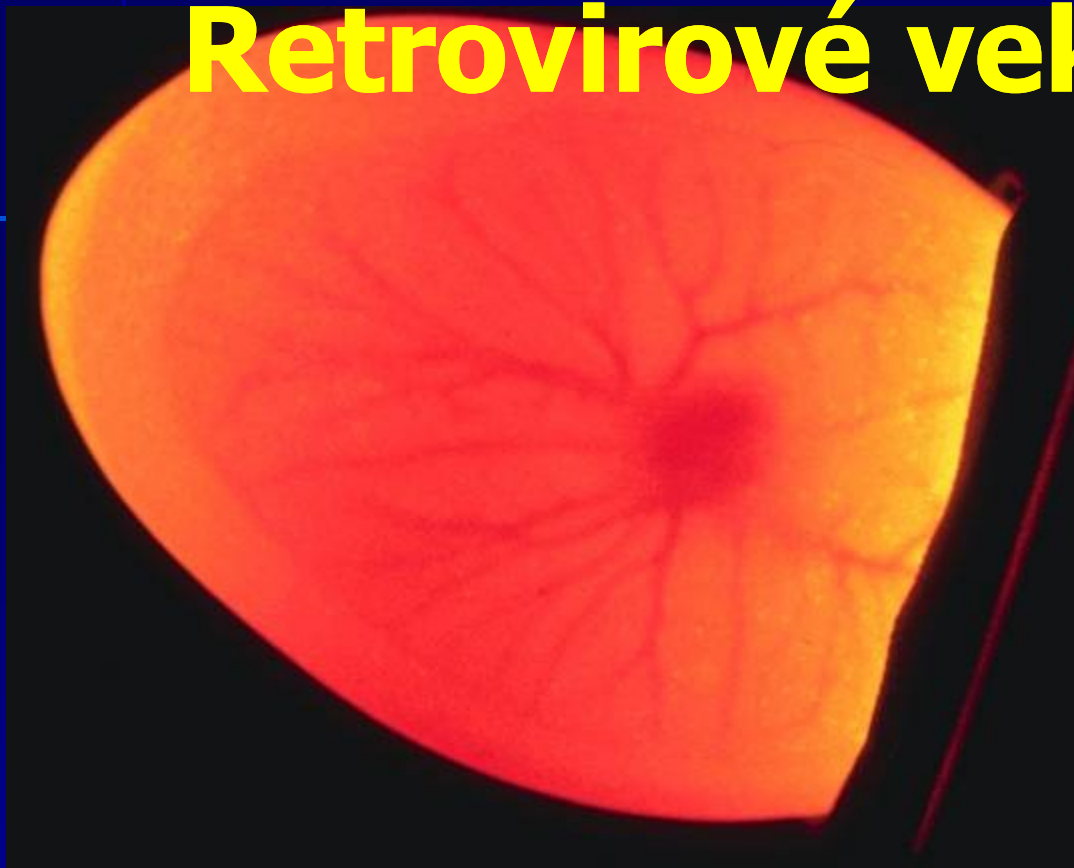


Transplantace spermatogonií



Eda

Retrovirové vektory



Využití geneticky modifikovaných ptáků



Odolnost k chorobám



Markova choroba

„Zlatá vejce“



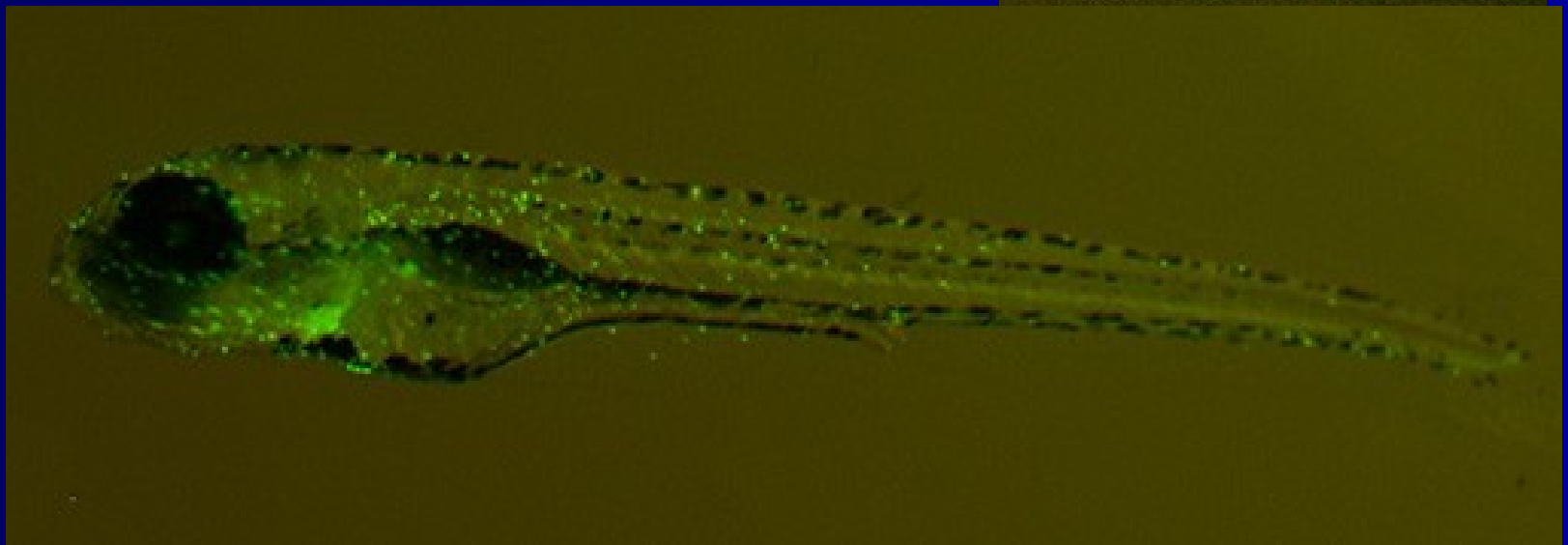
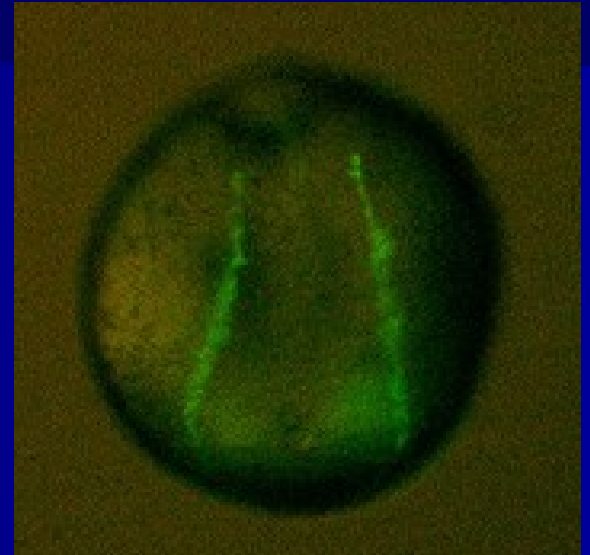
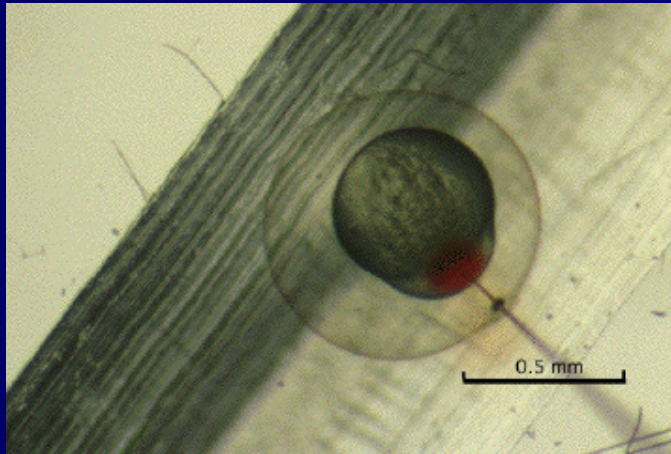
0,1 až 1 gram bílkoviny/ vejce
250 vajec/ rok
50 000 SF / 1 gram bílkoviny



Ryby



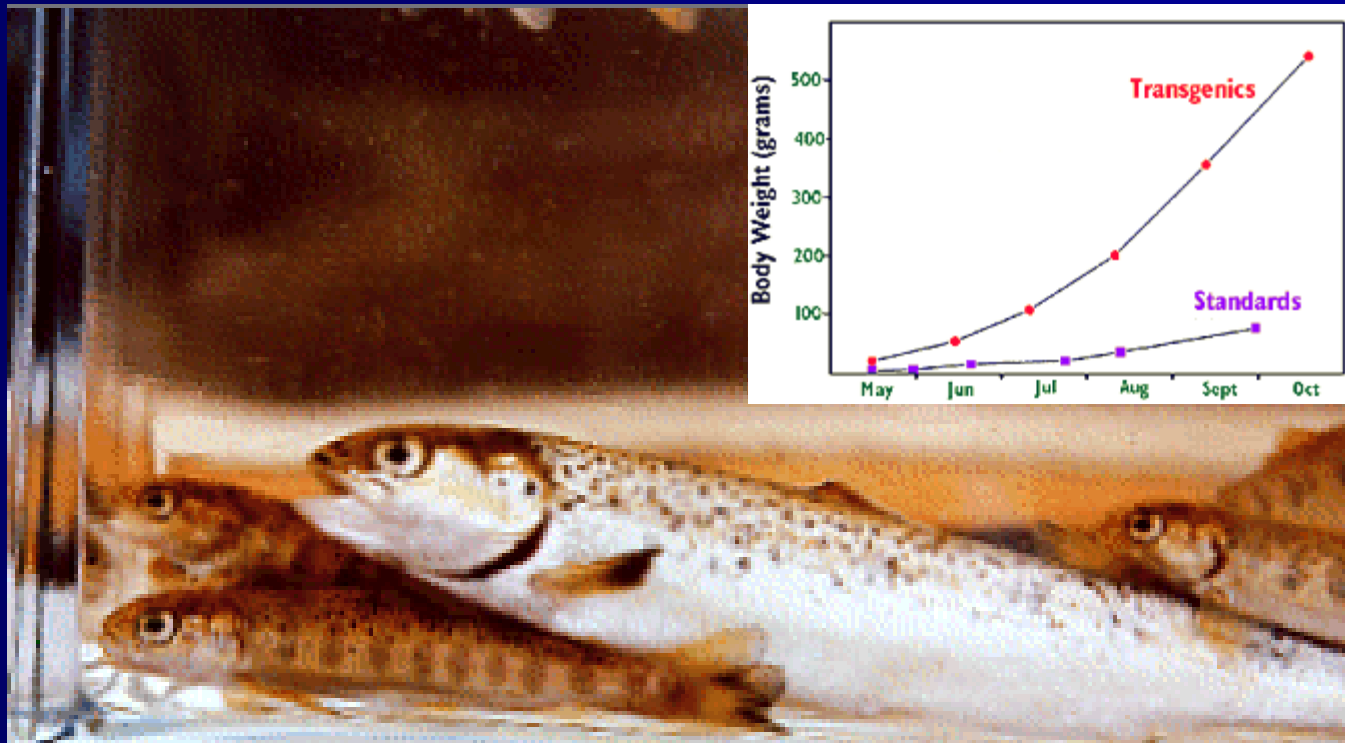
Mikroinjekce



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 úspěchu GM ryb po úniku do volné přírody

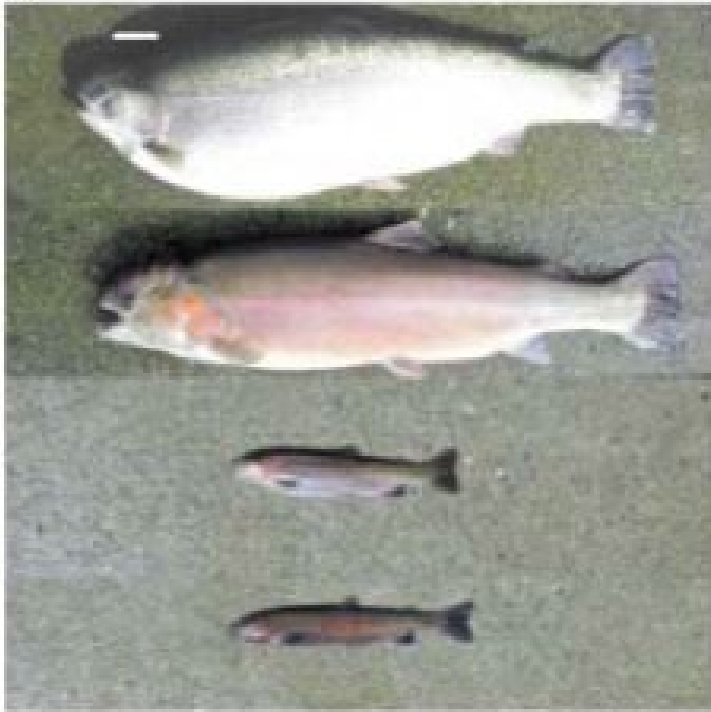
GM ryby – gen pro GH

- 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

b



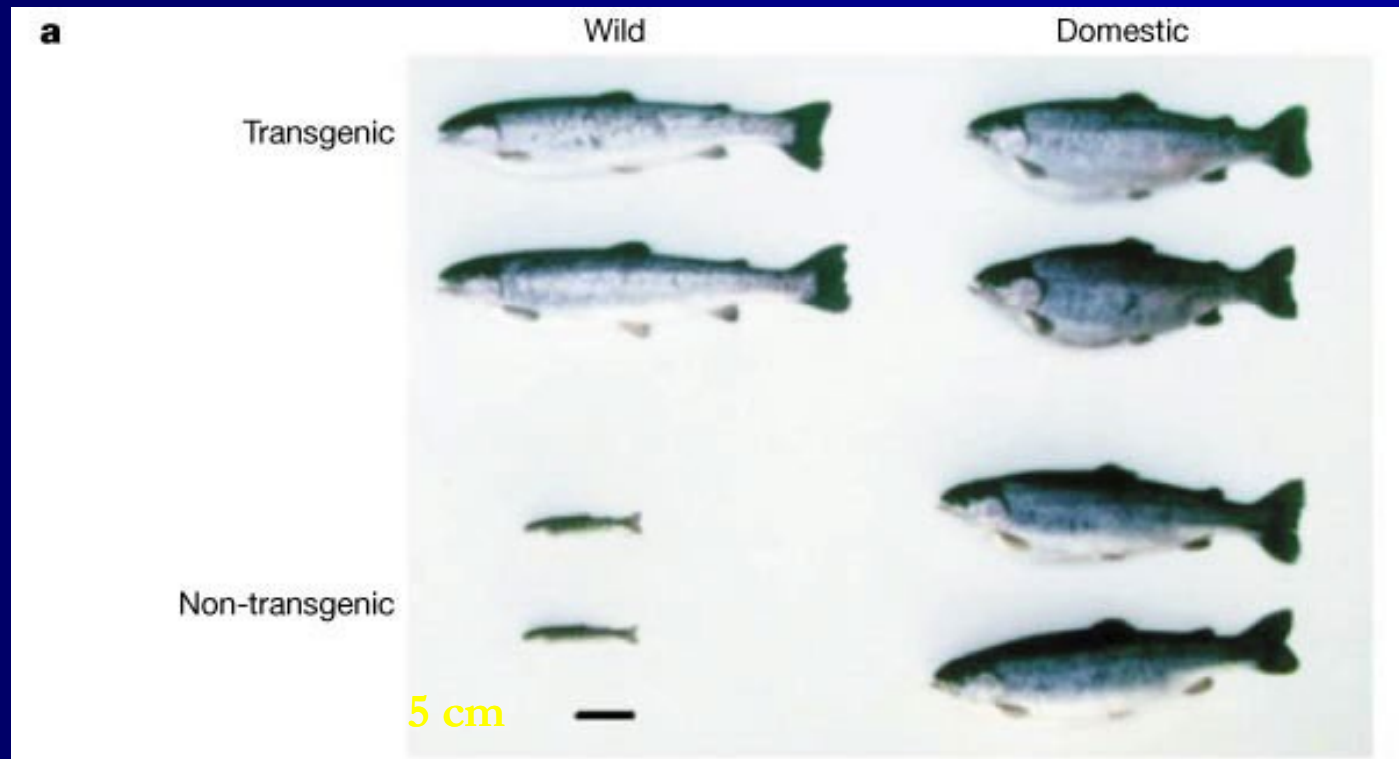
GM samice – 14,2 kg

GM samec – 8,2 kg

Divoká samice – 0,171 kg

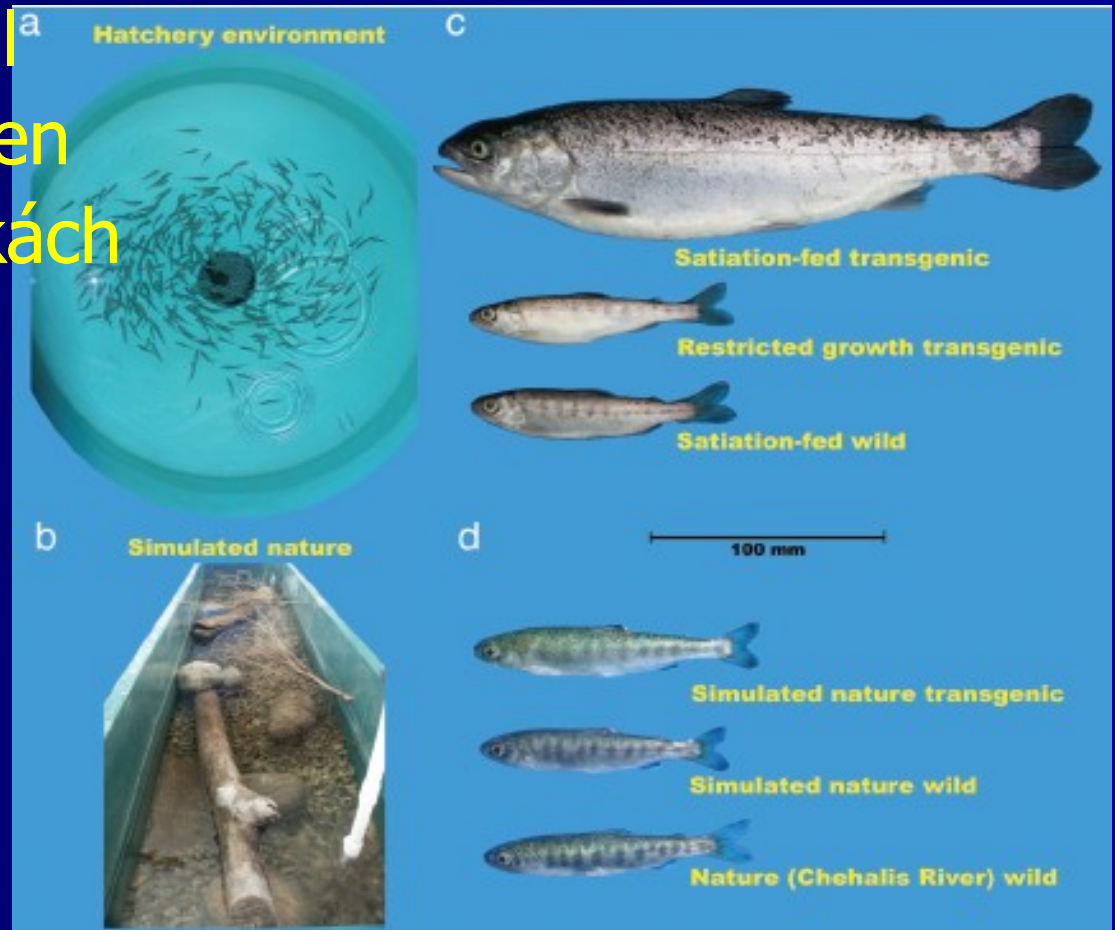
Divoký samec – 0,220 kg

U kulturních linií není výrazný efekt GM

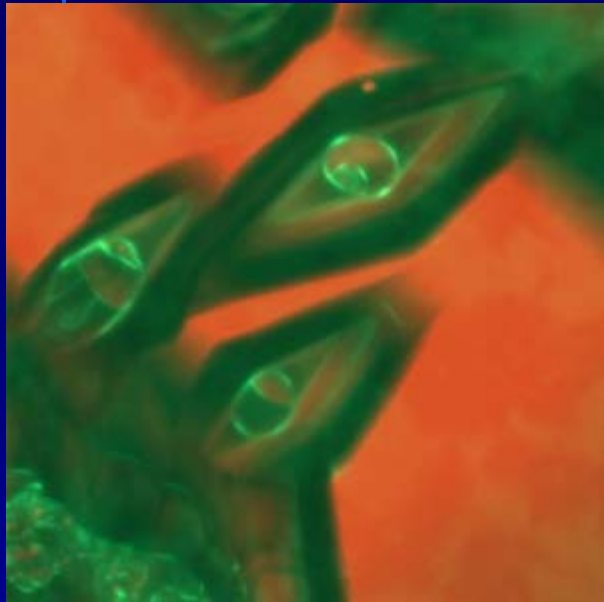


Vliv odchovu na růst GM losos kisuča

- 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

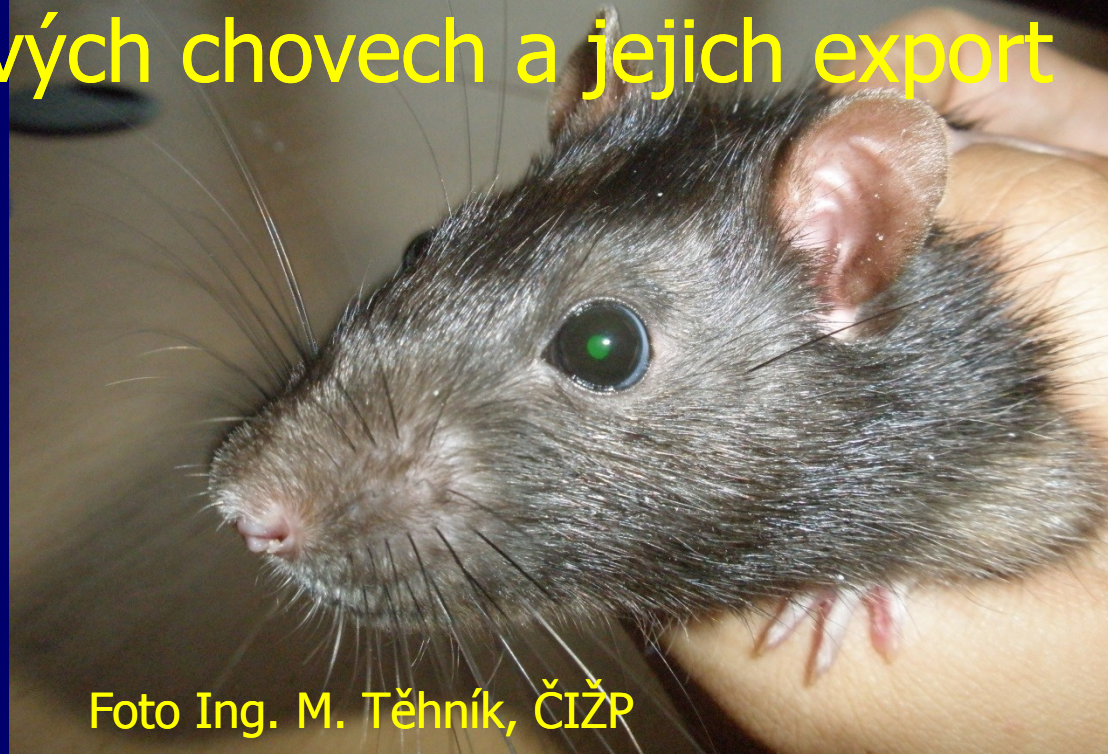


Foto Ing. M. Těhník, ČIŽP

Máme se bát GM živočichů?

- Domestikace změnila zvířata
k nepoznání

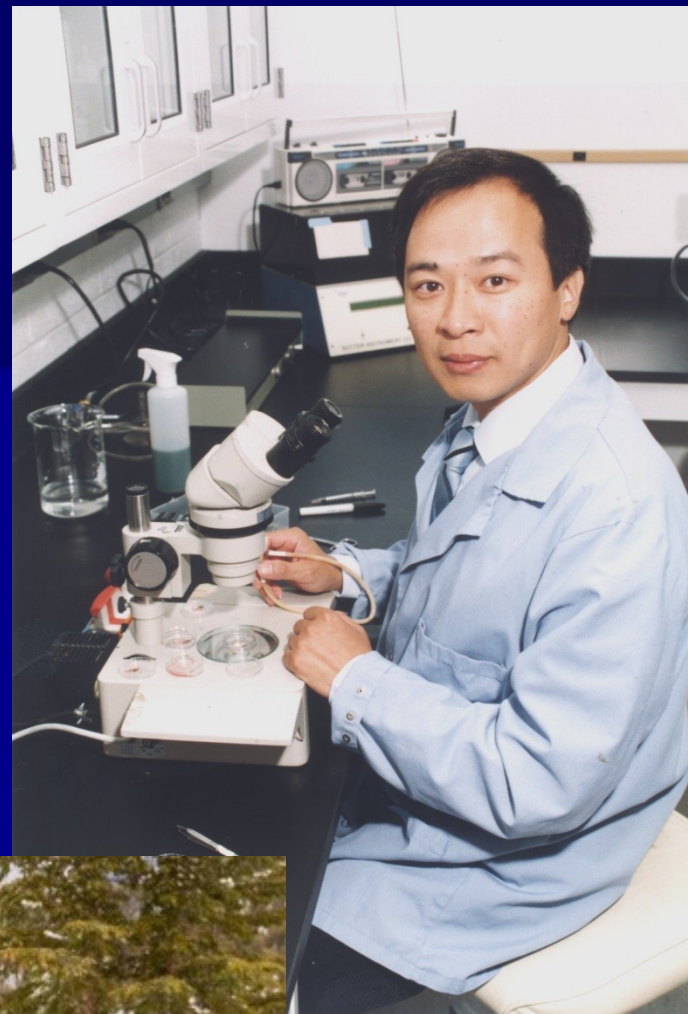


Máme se bát GM živočichů?



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

Chytrí psi



Chytří psi



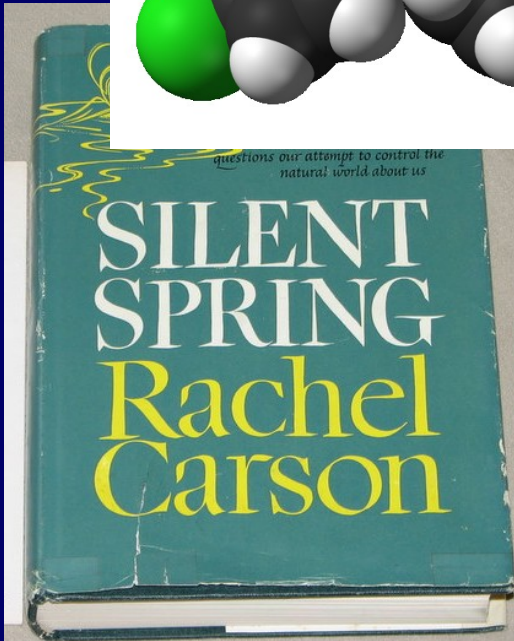
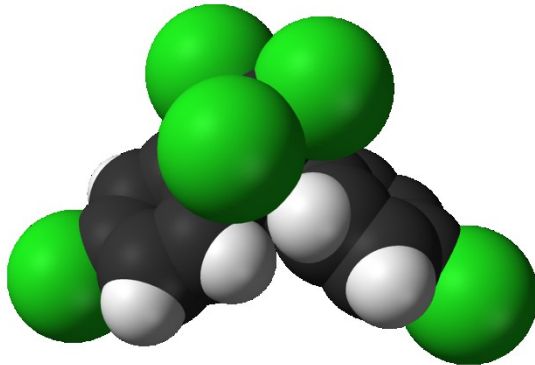
Zatím je to jen scifi, ale jednou ...

Geneticky modifikovaní komáři

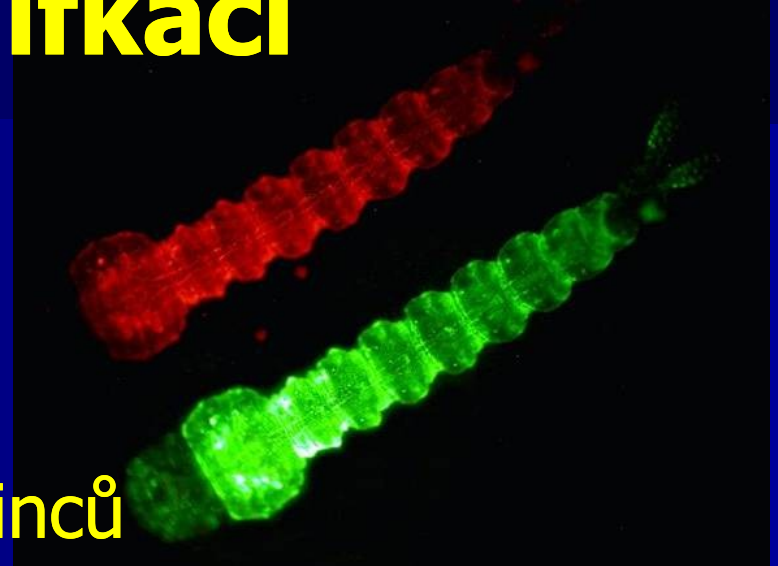


Postřiky insekticidy

- DDT

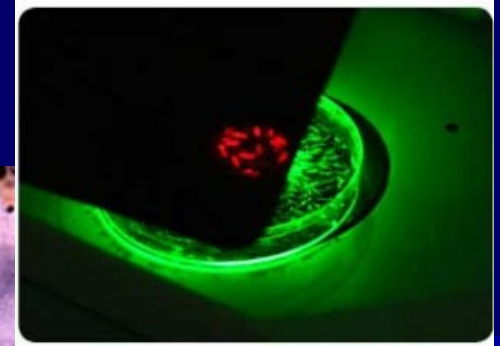


Eliminace komárů-přenašečů genetickou modifikací



- Vypuštění sterilních jedinců
- Vypouštění nositelů dominantní letální vlohy
- Rozšíření vloh pro rezistenci komárů k původci choroby
- Nákaza GM symbiontem

Aedes aegypti OX513A

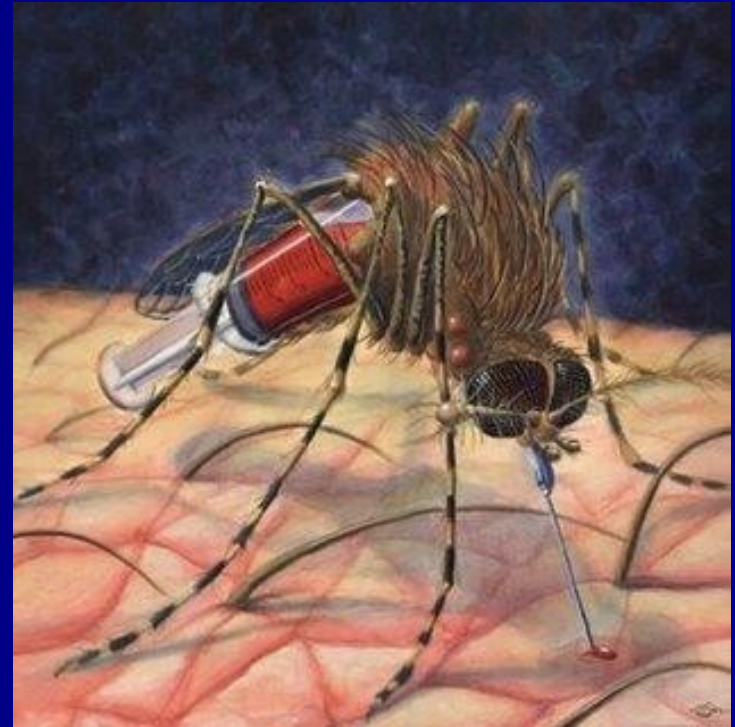


- Larvy hynou, pokud nejsou odchovány ve vodě s tetracyklinem
- Odchov velkého počtu samců
- Vypuštění do přírody
- Potomstvo zplozené s divokými samicemi hyne v larválním stádiu
- Exprese červeného fluoreskujícího proteinu

Další modifikace

Létající injekce

- GM komár by při bodnutí vnesl do těla člověka nebo zvířete vakcínu proti infekční chorobě



Vliv na necílové organismy



Komáři jako opylovači

- Podle některých odborníků plní komáři významnou roli opylovačů
- Pokud zmizí, poškodí to flóru
- „Zloději nektaru“ ?



Vemeník ***(Platanthera obtusata)***

Opylení

Komár jarní (*Ochlerotatus communis*)



Vypuštění do volné přírody

Oxitex

Aedes aegypti OX513A

Kajmanské ostrovy

Malajsie

Mexiko



Můžeme to jíst?



GMO

Těší se špatné pověsti



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



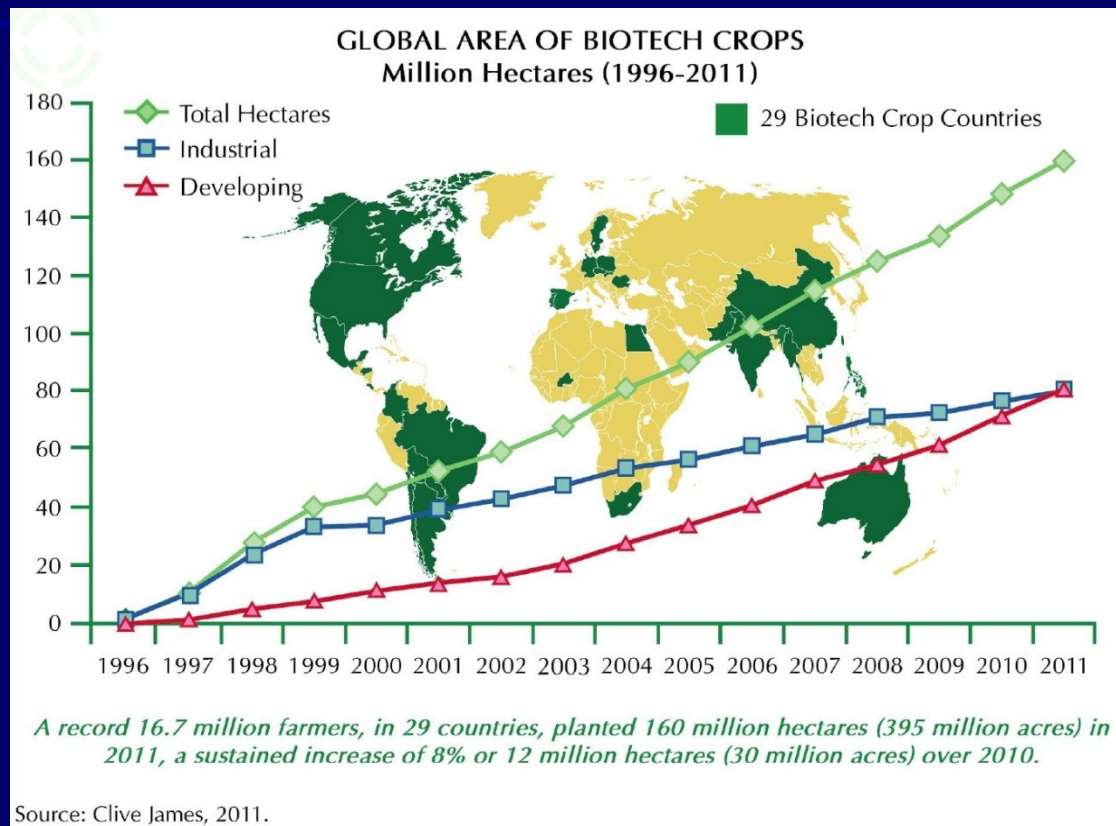
- „samozákaz“ potravin z produktů zvířat krmených GMO

Není to reakce na obavy zákazníků



Jde o obchodní trik.

GMO ve světě stále přibývá

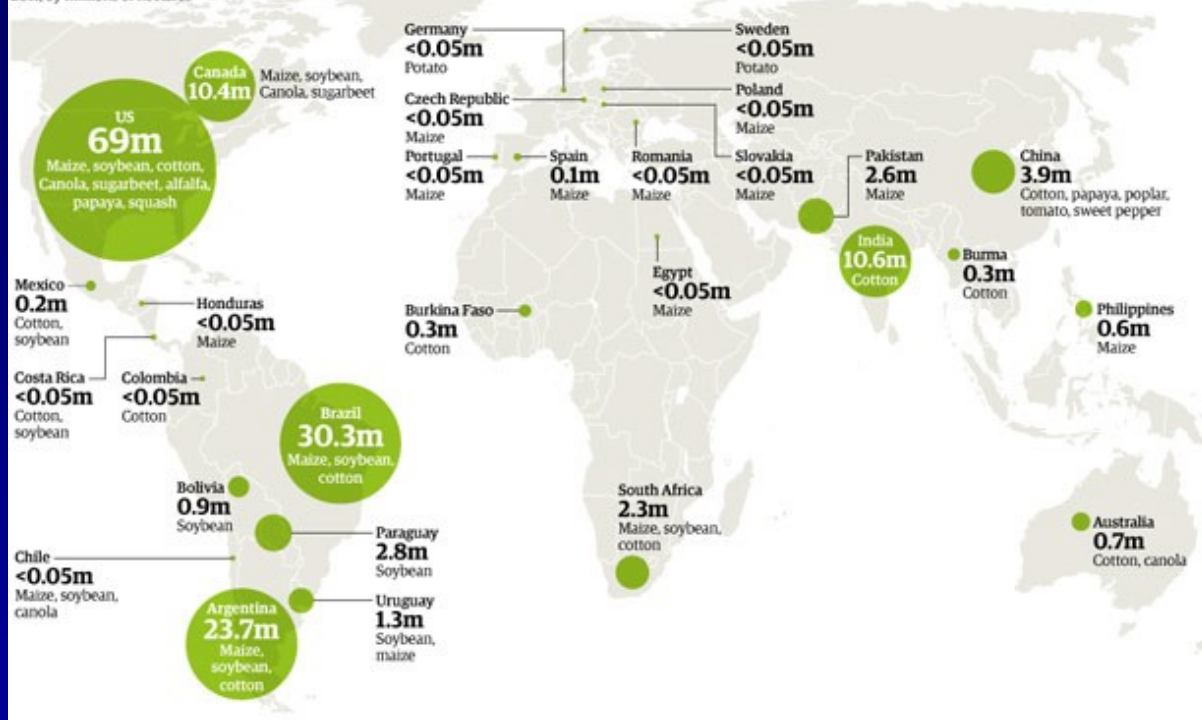


**Hlavní plodiny:
kukuřice, sója, bavlník**

GMO ve světě stále přibývá

Global status of commercial GM crops

2011, by millions of hectares

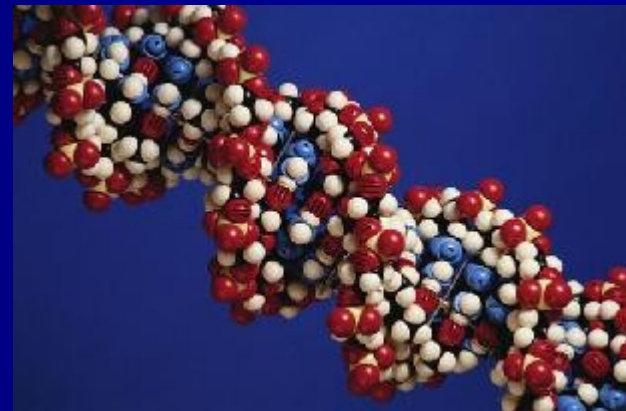


**Hlavní
producenti:
USA
Kanada
Argentina
Čína**

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 kukuřičné DNA
+
1 μ g „cizího genu“**

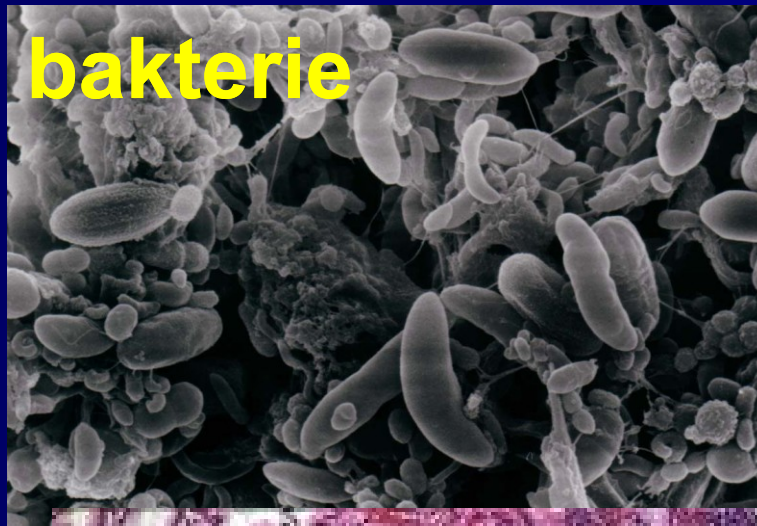
**Proč by měla kuřeti vadit „cizí“ DNA,
když mu nevadí DNA kukuřice?**

**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
 - 5000 druhů = 1,2 kg
 - 1200 druhů virů
 - ? druhů prvoků
 - ? druhů hub
- atd.

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 potravin a krmiv z GMO?



Toxicita potravin a krmiv z GMO

I geneticky nemodifikované
potraviny a krmiva
obsahují toxiny.

Sója – genistein

Brambor – solanin

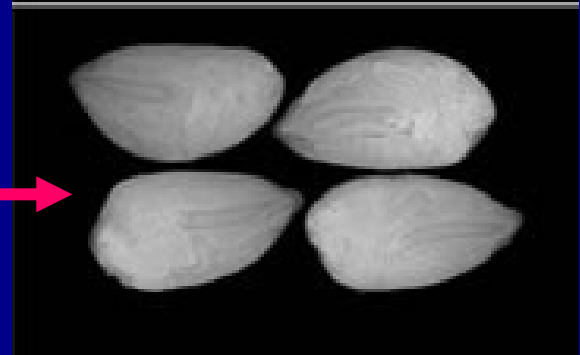
GMO – toxikologicky prověřena

U GMO lze snížit „přirozenou“ toxicitu.



Genetické modifikace pro redukci toxinů

- Bavlina
na 1 kg vlákna
1,65 kg semen
vysoký obsah proteinů
– terpenoid gosypol
- RNA interference
klíčový enzym pro syntézu
- Redukce gosypolu o 98%



Toxikologické testy

- **Testuje se**

- 1) GM plodina

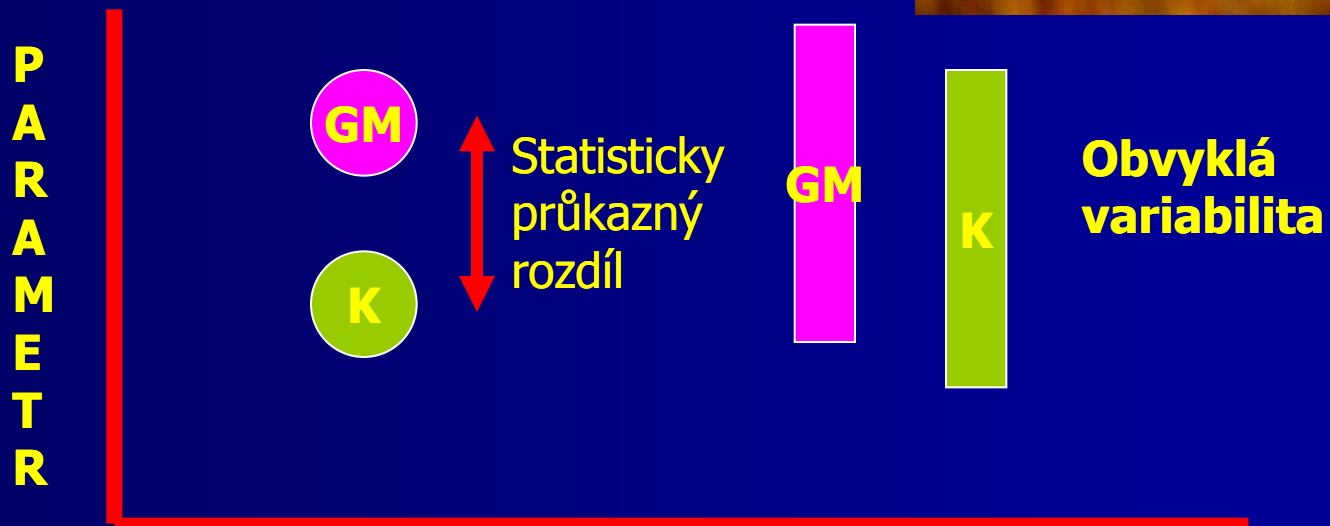
- 2) Odpovídají nemodifikovaná linie

- 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 testovaná zvířata?

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

Fyziologický
ukazatel



Statisticky
průkazný
rozdíl

Fyziologické
hodnoty

Alergenita krmiv a potravin z GMO

Alergenní jsou i ostatní potraviny a 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



Thomas Higgins

Vývoj ukončen 2006



Zrnokaz hrachový *Bruchus pisorum*



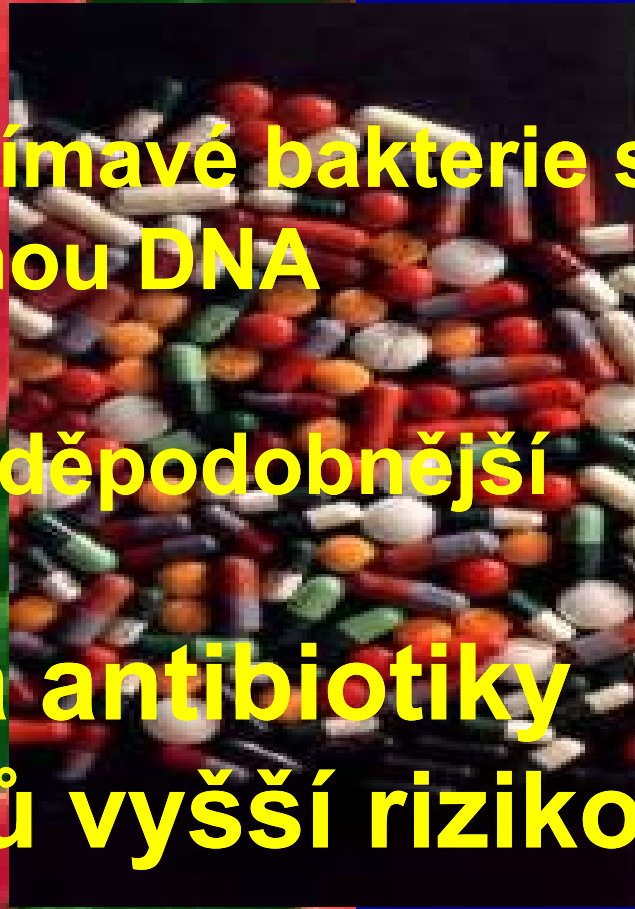


**Šance přenosu genu na bakterie
v prostředí i ve zvířeti je extrémně nízká**

**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 –zatím prospěch jen pěstitelům
- Velký potenciál pro spotřebitele
- Třetí svět – jedna z možností
- Vlivy na životní prostředí
- Každá zemědělská výroba ovlivňuje
- Je třeba hodnotit vlivy všech technologií

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

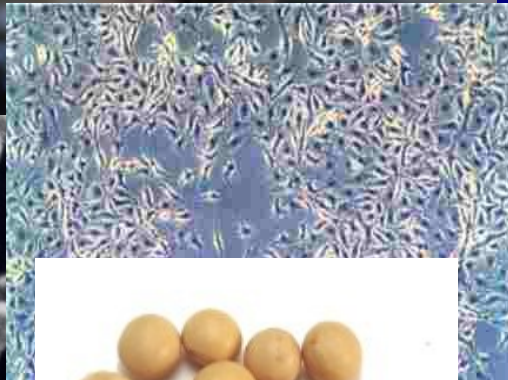
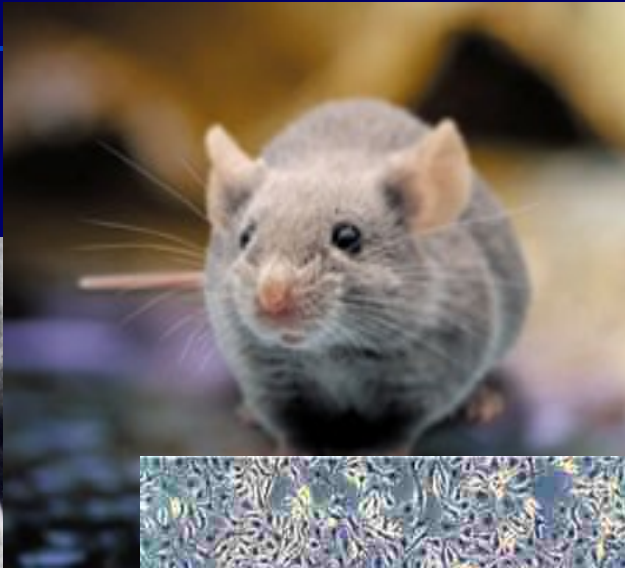
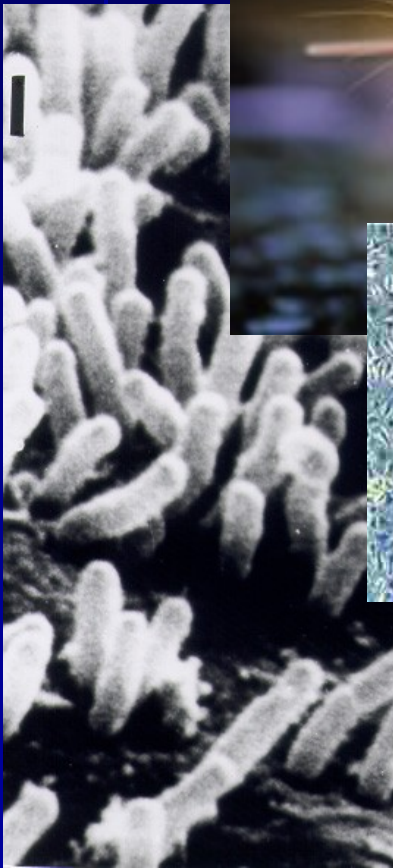
- bezpečné



**Kdo smí pracovat
s GMO?**

GMO

Ne- GMO



Jakákoli činnost s GMO = nakládání

- Uzavřené nakládání
- Uvedení do životního prostředí – polní pokusy
- Uvedení do oběhu
 - u nás RR sója
(pro zpracování)
 - kukuřice MON810
(pro pěstování)



Zákon 78/2004 Sb.

- o nakládání se musí se žádat MŽP ČR
- nakládat se smí jen na povolení

www.env.cz

- Neoprávněné nakládání

POKUTA až 5 MILIONŮ Kč !



Co do žádosti?

- Kdo nakládá?
- S jakým organismem?
- S jakým genem?
- K čemu to bude?
- Jak je na to vybaven?
- Jaká jsou rizika?
- Co se bude dělat, kdyby byl průšvih?



Hodnocení rizika

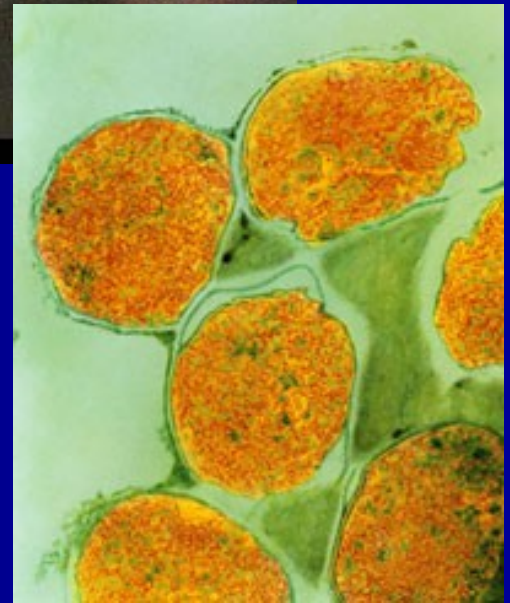
- **Jak je rizikový sám organismus?**
- **Jak je rizikový gen?**
- **Jak se změní organismus genem?**



Oblasti rizik

- **Lidské zdraví**
- **Zdraví zvířat a rostlin**
- **Životní prostředí**
- **Biologická rozmanitost**

Berou se v potaz i ekonomická, demografická a politická hlediska
(MZe - řepka)



Třídy rizika pro uzavřené nakládání

- A - žádné nebo jen minimální riziko
- B – následky lze snadno odstranit obecně známými prostředky
- C - následky lze odstranit jen zvláště náročnými prostředky
- D – nechává trvalé následky



Havárie



**Není to každá nehoda
na pracovišti s GMO**

**Je to únik GMO
mimo prostory určené k nakládání**



Co se děje s žádostí?

- MŽP – předá MZd a MZe
- Každé ministerstvo má komisi expertů
- Posudky, žádosti o doplnění
- Žadatel přepracuje, doplní a vrátí na MŽP
- Další kolo hodnocení
- Stanovisko ČK GMO
- Rozhodnutí ministra ŽP

