



GMO a klonování zvířat

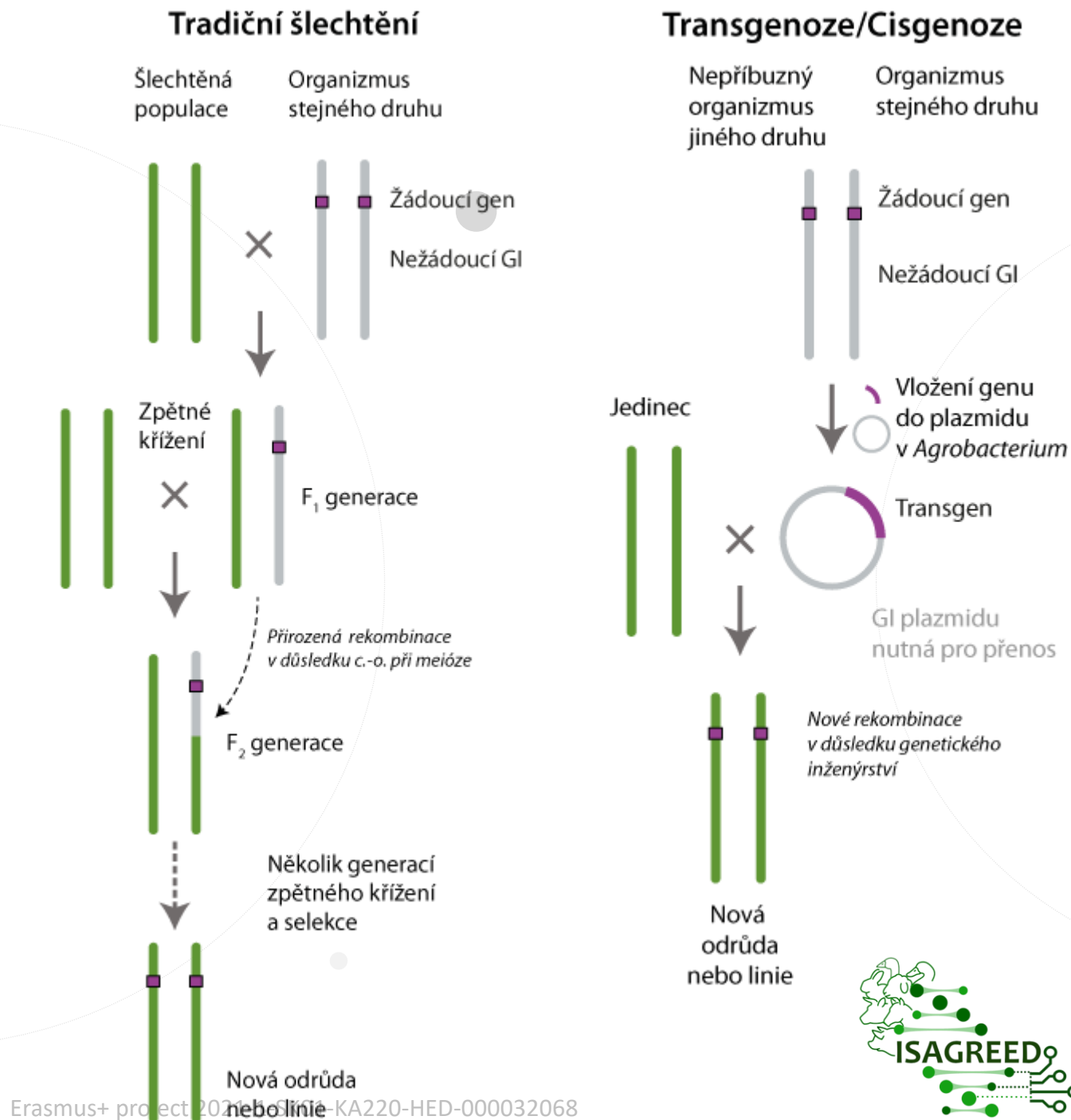
Modul no. 2: Conservation and Sustainable Use of Animal Genetic Resources

Aleš Knoll

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

- Šlechtění i transgenoze mají jeden cíl...

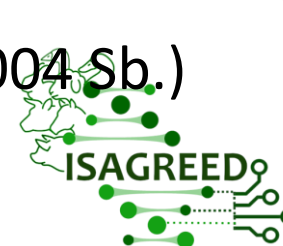


Genetické modifikace – cílené zásahy do GI

- nahodilé zásahy působením mutagenů nebo ionizujícího záření (tvorba odrůd pšenice, řepky...) **nejsou** považovány za genetickou modifikaci

Genetické modifikace:

- Změna aktivity genů
 - Změna „místa působení“
 - Záměna genu za jinou variantu
 - Vyblovování genů
 - Vnášení cizích genů - transgenóza
 - rostliny, do nichž byl za pomoci bakterie *Agrobacterium tumefaciens* vnesen gen pro odolnost k herbicidům nebo gen pro produkci insekticidů - např. Bt-kukuřice.
- regulace vyplývající ze zákona o nakládání s GMO (zákon č. 78/2004 Sb.)



Genetické modifikace

- **Synonymum pro techniky rekombinantní DNA** (vliv legislativy EU)
- přímé a cílené zásahy do dědičného materiálu organismu (DNA)
 - **transgenoze** -> rekombinaci DNA mezi druhy
 - **Vnášení jednotlivých genů do genomu metodami genetického inženýrství**
- **Geneticky modifikovaný organismus (GM organismus, GMO)** je organismus (kromě člověka), jehož genetický materiál byl úmyslně změněn, a to způsobem, kterého se nedosáhne přirozenou rekombinací.
- Geneticky modifikovaný organizmus (GMO)
 - Transgenní mikroorganismus (GMM)
 - Transgenní rostliny (GMR)
 - Transgenní živočichové



Co-funded by
the European Union

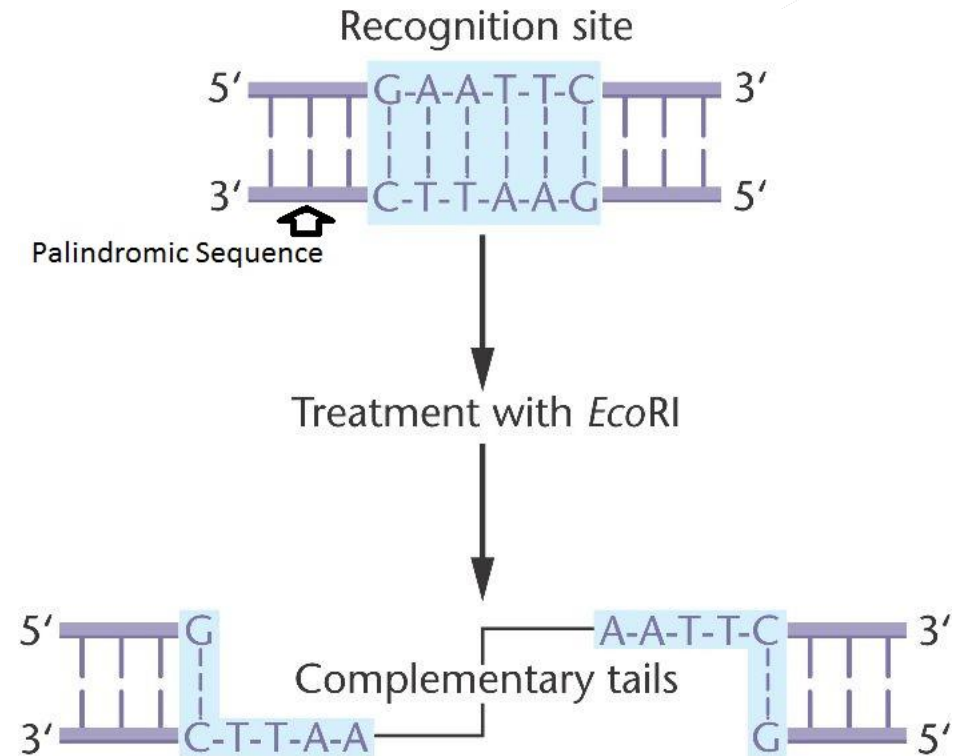
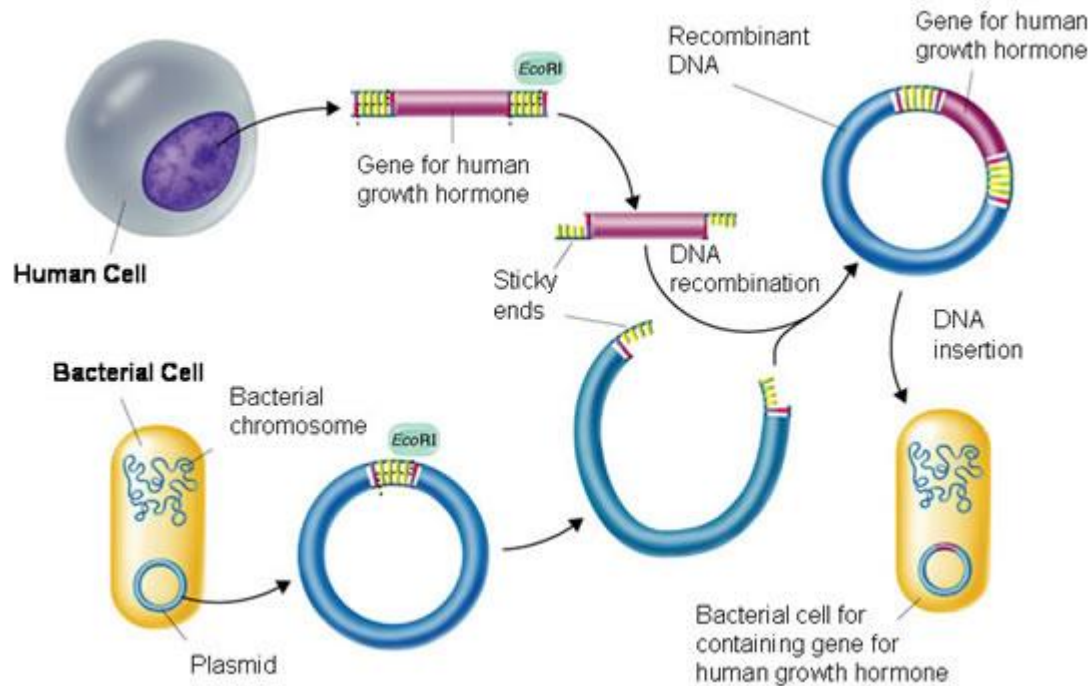
Problémy GM

- Nízká účinnost vkládání inzertů.
- Začlenění inzertu a jeho kopií probíhá dosud náhodně.
- Produkt se může tvořit v nízké nebo vysoké koncentraci, protože dosud neznáme a neumíme ovládat regulaci strukturního genu v jeho expresi
- Začlenění cizí DNA je často nestabilní a ve sledu generací se může vytratit
- Genové manipulace jsou stále nákladné a cíl je dosažen s velkou nejistotou
- ...



Co-funded by
the European Union

Proces technologie rekombinantní DNA (Genetické inženýrství)



Metody transfekce – biologické metody

- **lipofekce** (prostřednictvím micel z lipidů – enkapsulují NA do lipozomů -> do jádra buňky)
- **transfekce pomocí vektorů** (viry nebo plazmidy)
- **retroviru** (insert 8 – 10 kb, pouze dělicí se buňky),
 - RNA se reverzně přepíše do DNA -> do hostitelské buňky (zárodečné buňky!) -> potomci jsou chiméry
 - Jednoduchá technika, infekční retroviry neinfektují lidské buňky
 - Limitující je velikost inzertu, virová sekvence může interferovat s expresí transgenu, nízká integrace
- **adenoviru** (dsDNA viry, napadají všechny typy buněk, exprese je silná ale dočasná, vyvolává silnou imunitní odpověď),
- **lentiviru** (infikují a integrují svůj genom do nedělících se buněk – neurony, makrofágy, svalové buňky, jaterní buňky; integrují se náhodně; delece v LTR (long terminal repeat) -> není schopen produkovat infekční částice, ale je schopen integrace: např. kočičí lentivirus nepůsobí na člověka, FIV – feline imunodeficiency virus)

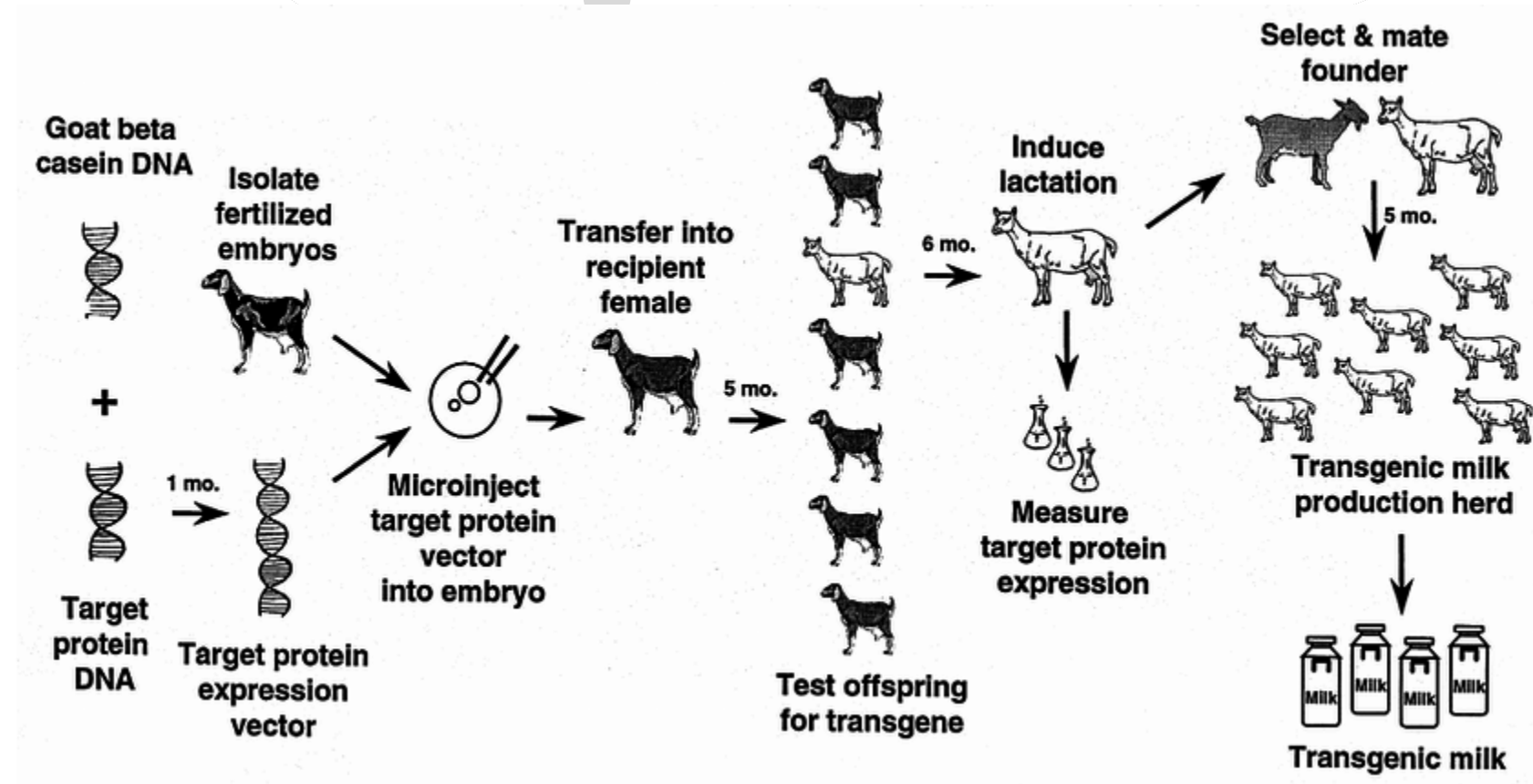
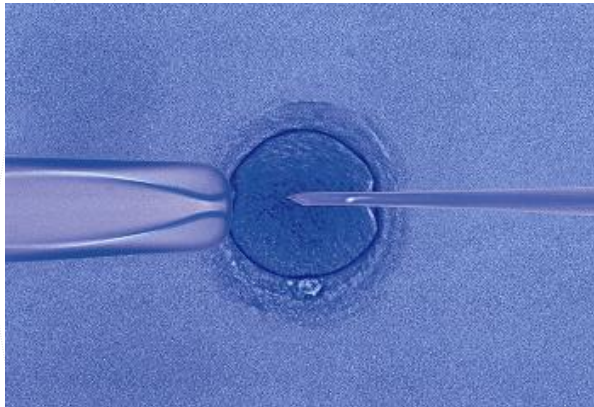


Fyzikální metody

- **Mikroinjekce** (vneseení DNA do oplozeného vajíčka nebo do embryonálních kmenových buněk)
 - Jednoduchá, nenáročná technika, cizí geny se exprimují účinně
 - Nelze využít v pozdějším vývojovém stádiu, nízká úspěšnost, náhodné začleňování
- **Přenos genů pomocí embryonálních kmenových buněk (Embryonic stem (ES) cells mediated gene transfer)** (pluripotentní buňky blastocysty s in vitro vloženou DNA -> do cizího embrya -> do dělohy náhradní matky (Capecchi, 1994) -> narozena **chiméra**.
 - Homologická rekombinace DNA s precizním zacílením v embr. kmenových buňkách – mutace nebo cizí geny, kdy nová sekvence nahradí specificky zacílený gen -> inaktivace genů – metoda „**knock-out**“
- **Gene gun** (biolistická transfekce – částice obalené DNA jsou „nastřelovány do buněk“)
- Elektroporace (el. impulzy -> póry v buněčné membráně)
- Heat shock
- Magnet Assisted Transfection (MATra) – DNA je uchycena na magnetické nanočástice a do buňky se dostávají v silném magnetickém poli
- Všechny metody mají nízkou účinnost (max. 5%)



Př. techniky mikroinjekce -> transgenní mléko



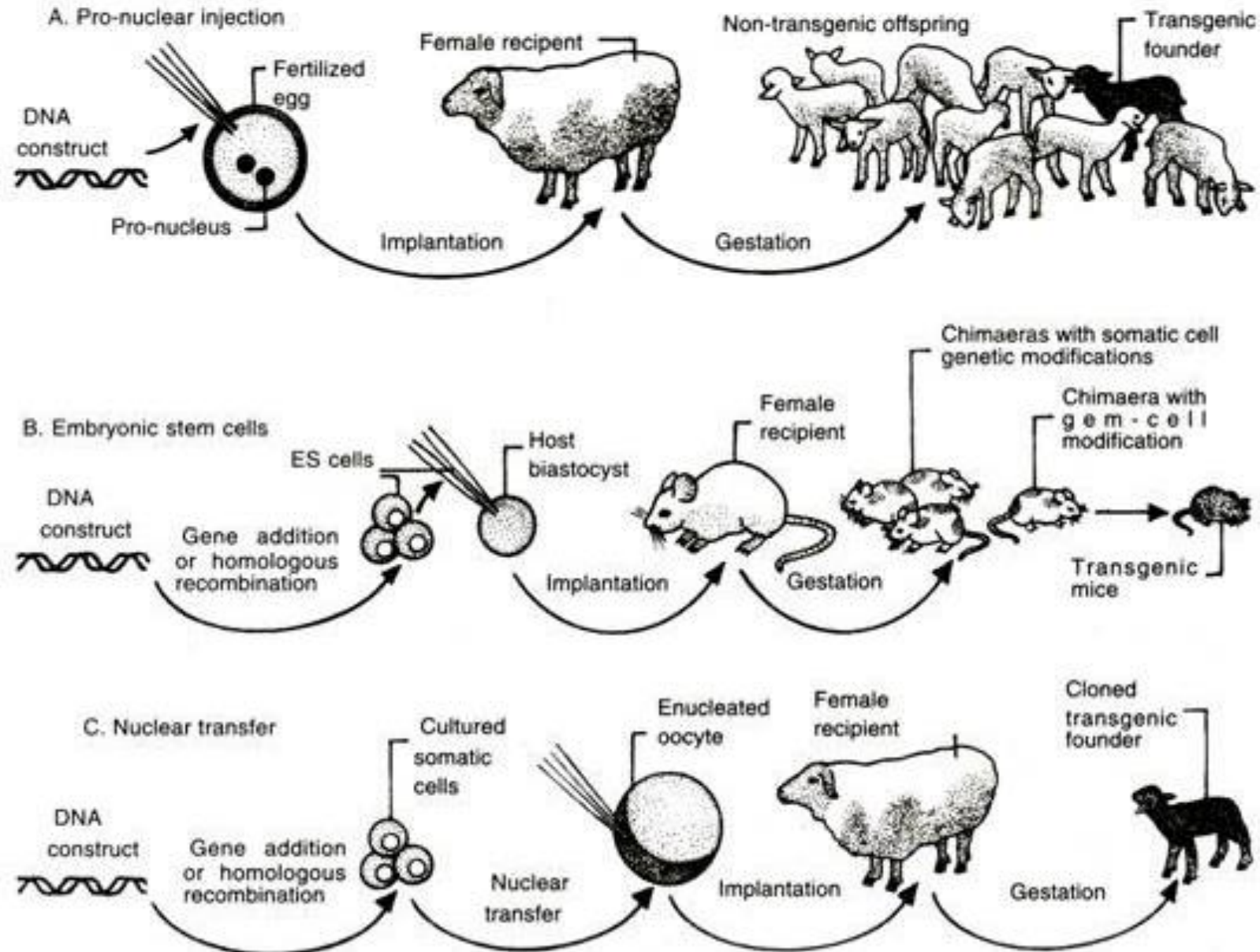


Fig. 18.2. Various approaches of producing transgenic animals using microinjection.

CRISPR- editované vyřazení genů u hospodářských zvířat: aplikace v zemědělství

Species	Gene	Purpose of manipulation	Approach	Mosaicism (%)	References
Sheep	<i>ASIP</i>	Coat color pattern	MI	2/5 (40.0%)	Zhang X. et al. (2017)
	<i>FGF5</i>	Wool growth	MI	(6.3–100%)	Hu et al. (2017), Li W. R. et al. (2017), Zhang R. et al. (2020)
	<i>MSTN, ASIP, and BCO2</i>	Economically important traits	MI	2/2 (100%)	Wang X. et al. (2016b)
	<i>MSTN</i>	Meat production	MI or SCNT	(0–100%)	Deng et al. (2014); Crispo et al. (2015), Zhang Y. et al. (2019); Yi et al. (2020)
Goat	<i>BLG</i>	Milk quality	MI	3/4 (75.0%)	Zhou et al. (2017)
	<i>MSTN and FGF5</i>	Meat and cashmere production	MI	5/10 (50.0%)	Wang X. et al. (2015a)
	<i>MSTN</i>	Meat production	MI or SCNT	(0–100%)	Ni et al. (2014); Guo et al. (2016), He et al. (2018); Zhang Y. et al. (2019)
Pig	<i>NANOS2</i>	Surrogate sires for genetic dissemination	SCNT	N/A	Ciccarelli et al. (2020)
	<i>EDAR</i>	Cashmere yield	SCNT	N/A	Hao et al. (2018)
	<i>IGF2 regulatory element</i>	Meat production	MI (nCas9)	6/6 (100%)	Xiang et al. (2018)
	<i>NANOS2</i>	Surrogate sires for genetic dissemination	MI	6/18 (33.3%)	Park et al. (2017)
	<i>ANPEP</i>	Viral resistance	MI	1/9 (11.1%)	Whitworth et al. (2019)
	<i>CD163</i>	Resistance to PRRS virus	MI, EP, or SCNT	No	Whitworth et al. (2014); Yang et al. (2018), Tanihara et al. (2019)
	<i>IRX3</i>	Reduced fat content in Bama minipigs	SCNT	N/A	Zhu et al. (2020)
	<i>NANOS2</i>	Surrogate sires for genetic dissemination	SCNT	N/A	Ciccarelli et al. (2020)
	<i>MSTN</i>	Meat production	SCNT	N/A	Wang K. et al. (2015), Wang K. et al. (2017), Li R. et al. (2020)
	<i>CD163 and pAPN</i>	Viral resistance	SCNT	N/A	Xu et al. (2020)
Cattle	<i>FBXO40</i>	Meat production	SCNT	N/A	Zou et al. (2018)
	<i>NANOS2</i>	Surrogate sires for genetic dissemination	MI	1/3 (33.3%)	Ciccarelli et al. (2020)

SCNT, somatic cell nuclear transfer; MI, zygote microinjection; EP, zygote electroporation; nCas9, Cas9 nickase; N/A, not applicable.



Co-funded by
the European Union

Species	Gene	Purpose of manipulation	Type of KI	Approach	SCNT or MI	KI Animals produced	Mosaicism (%)	References
<u>Agriculture: improvements in</u>								
Sheep	<i>SOCS2</i>	Reproductive traits	Point mutation	Crispr/Cas9 BE	MI	3/4 (25%)	3/3 (100%)	Zhou et al. (2019)
	<i>BMPR1B</i>	Reproductive traits	Point mutation	Crispr/Cas9	MI	5/21 (23.8%)	Not stated	Zhou et al. (2018)
Goat	<i>Tβ4</i>	CCR5-targeted KI, cashmere yield	Gene insertion	Crispr/Cas9	SCNT	1	N/A	Li X. et al. (2019)
	<i>FGF5</i>	Cashmere yield	Point mutation	Crispr/Cas9 BE	MI	5/5 (100%)	5/5 (100%)	Li G. et al. (2019)
	<i>GDF9</i>	Reproductive traits	Point mutation	Crispr/Cas9	MI	4/17 (23.5%)	2/4 (50.0%)	Niu et al. (2018)
	<i>FAT-1</i>	Disease resistance	Gene insertion	Crispr/Cas9	SCNT	1 from 8 pregnancies	N/A	Zhang J. et al. (2018)
Cattle	<i>Pc</i>	Generation of a polled genotype	Gene insertion	Crispr/Cas12a	SCNT	1, died on D1 after birth	N/A	Schuster et al. (2020)
Pig	<i>NRAMP1</i>	Tuberculosis resistance	Gene insertion	Crispr/Cas9n	SCNT	9	N/A	Gao et al. (2017)
	<i>IARS</i>	Correction of IARS syndrome	Gene insertion	Crispr/Cas9	SCNT	5 viable fetuses	N/A	Ikeda et al. (2017)
	<i>PBD-2</i>	Disease-resistant pigs	Gene insertion	Crispr/Cas9	SCNT	5 pigs	N/A	Huang et al. (2020)
	<i>MSTN</i>	Meat production	Gene insertion	Crispr/Cas9	SCNT	2 pigs	N/A	Zou Y.-L. et al. (2019)
	<i>UCP1</i>	Reproduction traits	Gene insertion	Crispr/Cas9	SCNT	12 piglets	N/A	Zheng et al. (2017)
	<i>MSTN</i>	Meat production	Point mutation	Crispr/Cas9	SCNT	1 stillborn piglet	N/A	Wang K. et al. (2016)
	<i>MSTN</i>	MSTN-KO without selectable marker	Gene insertion	Crispr/Cas9	SCNT	2 piglets	No	Bi et al. (2016)
	<i>RSAD2</i>	Generation of pigs with viral resistance	Gene insertion	Crispr/Cas9	SCNT	1 pig	No	Xie et al. (2020)
<u>Biomedical applications:</u>								
Sheep	<i>ALPL</i>	Model of hypophosphatasia	Point mutation	Crispr/Cas9	MI	6/9 (66.6%)	No	Williams et al. (2018)
	<i>PPT1</i>	Infantile neuronal ceroid lipofuscinoses	Point mutation	Crispr/Cas9	MI	6/24 (25.0%)	Not stated	Eaton et al. (2019)
	<i>tGFP</i>	Rosa26-targeted KI	Gene insertion	Crispr/Cas9	MI	1/8 (12.5%)	Not stated	Wu et al. (2016)
	<i>OTOF</i>	Hearing loss phenotype	Point mutation	Crispr/Cas9	MI	8/73 (11.0%)	2/8 (25.0%)	Menchaca et al. (2020b)
Cattle	<i>CMAH</i>	Xenotransplantation	Point mutation	Crispr/Cas12a	SCNT	2	N/A	Perota et al. (2019)
Pig	<i>hF9</i>	Gene therapy for hemophilia B pigs	Gene insertion	Crispr/Cas9	SCNT	5 pigs	N/A	Chen et al. (2020)
	<i>BgEgXyAp</i>	Salivary gland as bioreactor	Gene insertion	Crispr/Cas9	SCNT	4 piglets (1/4 alive)	N/A	Li G. et al. (2020)
	<i>hIAPP</i>	Type 2 diabetic miniature pig model	Gene insertion	Crispr/Cas9	SCNT	24	N/A	Zou X. et al. (2019)
	<i>SNCA</i>	Parkinson's disease model	Gene insertion	Crispr/Cas9	SCNT	8 piglets	N/A	Zhu et al. (2018)
	<i>HTT</i>	Huntingtin KI model	Gene insertion	Crispr/Cas9	SCNT	6 piglets	N/A	Yan et al. (2018)
	<i>GGTA1</i>	Xenotransplantation	Gene insertion	<i>FokI</i> -dCas9	SCNT	2 piglets	N/A	Nottle et al. (2017)
	<i>tdTomato</i>	porcine Oct4 reporter system	Gene insertion	Crispr/Cas9	SCNT	2 piglets	N/A	Lai et al. (2016)
	<i>hALB</i>	Tg animals as bioreactors	Gene insertion	Crispr/Cas9	MI	16/16 (100%)	1/16 (6.3%)	Peng et al. (2015)
	<i>GFP</i>	H11-targeted KI	Gene insertion	Crispr/Cas9	SCNT	1 piglet	N/A	Ruan et al. (2015)

SCNT, somatic cell nuclear transfer; MI, zygote microinjection; BE, base editing; N/A, not applicable.



Co-funded by
the European Union

Etika transgenní technologie

- Je nový produkt akceptovatelný
- Zvířata se mohou trápit v důsledku exprese transgenů indukující tumory nebo neurodegenerativí nemoci
- Postranní efekty v důsledku modifikujících genů
- Lidé mohou mít benefity z transgenních zvířat – transgenní zvířata sama je nemají
- Cizí geny ovlivňují hostitele a je mnoho hrozeb pro ekologickou rovnováhu a diverzitu druhů (Miao, 2013)



Co-funded by
the European Union

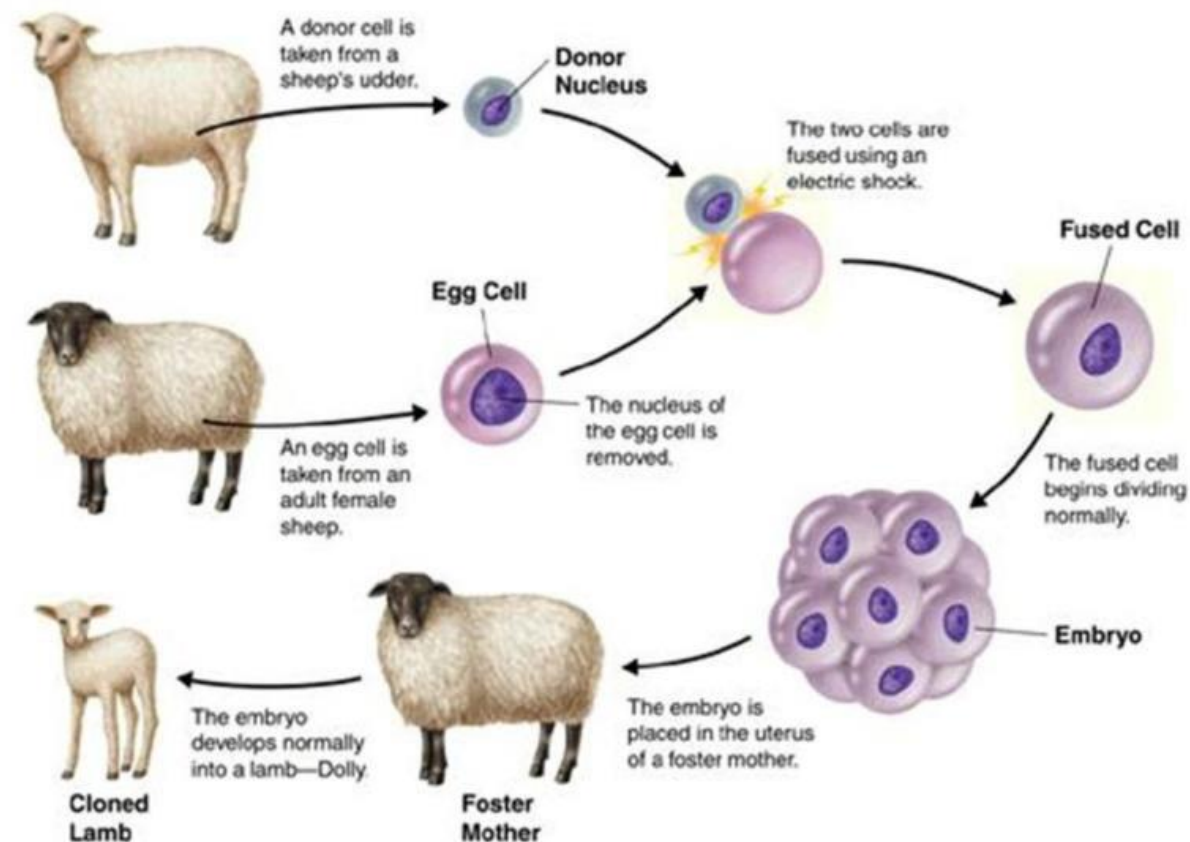
Klonování – generování geneticky identických potomků

- Techniky klonování u savců:
 - microsurgical embryo bisection (mikrochirurgická disekce embrya),
 - isolation and proliferation or aggregation of single blastomeres (izolace a proliferace nebo agregace jednotlivých blastomer)
 - **nuclear transfer (jaderný přenos, přenos jádra)!!!**



Co-funded by
the European Union

Klonování – metodou přenosu jader u ovečky Dolly



Problémy spojené s klonováním

- Malé procento zabřezávání
- Vývojové vady – rané zmetání, narození mrtvých potomků, časná úmrtí po narození, krátká životnost, obezita, malformace různých orgánů, špatná imunita – „large offspring syndrom“
- savci, intrauteriní vývoj
- Nepřijetí chovateli – koně (nejsou zařazováni do plemenných knih,...)
- Legislativní problémy
- Etické problémy
- Potravinové produkty z klonovaných zvířat („klonované maso“) – podle FDA je bez rizika konzumovat maso klonovaných zvířat – ekonomicky však vysoce neefektivní (zatím)
- Evropská ESFA také prohlásila bezpečnost produktů živočišného původu z klonů, problém je s welfare příjemkyň a vlastních klonů



Co-funded by
the European Union

Mammals

Mice (*Mus musculus*)Rats (*Rattus rattus*)Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)Sheep (*Ovis aries*)Pigs (*Sus domestica*)Cattle (*Bos taurus*)Goats (*Capra hircus*)Dogs (*Canis familiaris*)Marmosets (*Callithrix jacchus*)Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*)

Birds

Chickens (*Gallus gallus*)Japanese quail (*Coturnix japonica*)

Amphibians

Frogs (*Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*)

Fish

Zebra fish (*Danio rerio*)Goldfish (*Carassius auratus*)Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)Carp (*Cyprinus carpio*)Channel catfish (*Ictalurus punctatus*)Atlantic salmon (*Salmo salar*)

Invertebrates

Arthropod fruit fly (*Drosophila melanogaster*)Nematode (*Caenorhabditis elegans*)Mollusk Japanese abalone (*Haliotis diversicolor suportexta*)Mollusk Eastern oyster (*Crassostrea virginica*)Mollusk dwarf surfclam (*Mulinia lateralis*)

Gordon et al. (1980), Joyner and Sedivy (2000)

Hamra et al. (2002), Kato et al. (2004), Hirabayashi et al. (2005), Agca et al. (2008)

Fan and Watanabe (2003)

McCreath et al. (2000), Denning and Priddle (2003), Wheeler (2003)

Lai et al. (2002), Houdebine (2009), Kragh et al. (2009)

Donovan et al. (2005), Richt et al. (2007), Houdebine (2009)

Wheeler (2003), Houdebine (2009)

Hong et al. (2009)

Sasaki et al. (2009)

Yang et al. (2008)

Mozdziak and Petite (2004)

Huss et al. (2008)

Macha et al. (1997), Sinzelle et al. (2006), Ishibashi et al. (2008)

Zelenin et al. (1991), Davidson et al. (2003), Huang et al. (2008)

Houdebine and Chourrout (1991), Wang et al. (1995)

Martinez et al. (2000), Maclean et al. (2002), Hrytsenko et al. (2009)

Yoshizaki et al. (1991)

Dunham et al. (2002)

Sin et al. (2000), Houdebine (1997)

Rubin and Spradling (1982), Fujioka et al. (2000)

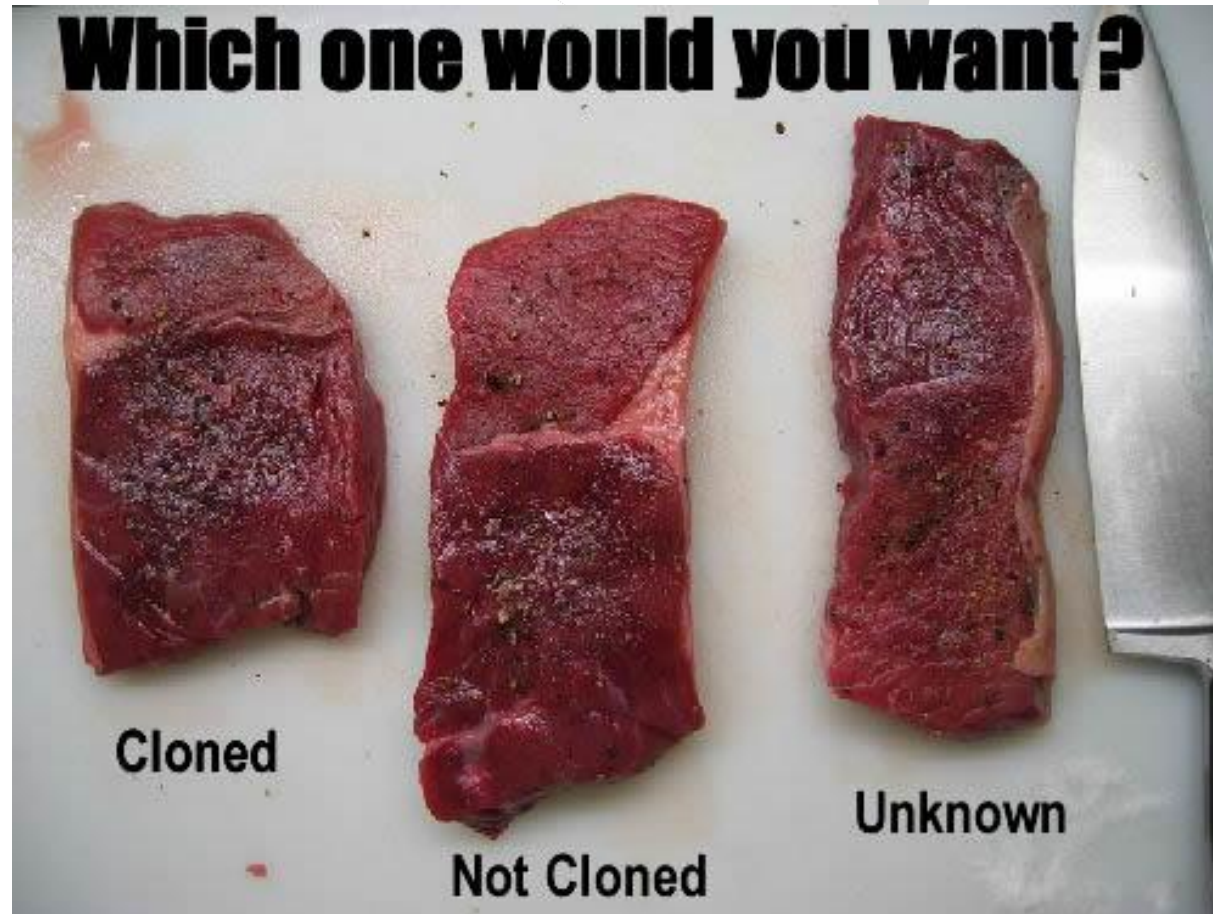
Fire (1986), Mello et al. (1991)

Tsai et al. (1997)

Cadoret et al. (1997)

Lu et al. (1996)

Co-funded by
the European Union





Děkuji za pozornost!

Partners:



Mendel
University
in Brno



Siedlce University
of Natural Sciences
and Humanities



Czech University
of Life Sciences Prague

This presentation has been supported by the Erasmus+ KA2 Cooperation Partnerships grant no. 2021-1-SK01-KA220-HED-000032068 "Innovation of the structure and content of study programs in the field of animal genetic and food resources management with the use of digitalisation - Inovácia obsahu a štruktúry študijných programov v oblasti manažmentu živočíšnych genetických a potravinových zdrojov s využitím digitalizácie". The European Commission support for the production of this presentation does not constitute an endorsement of the contents which reflects the views only of the authors, and the Commission cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein.



Aleš Knoll



knoll@mendelu.cz

