

12. Genetické modifikácie a biotechnológia

Dnešná téma bude zameraná na genetické modifikácie a biotechnológie, prednáška je súčasťou modulu číslo 1 – genetika živočíchov, ktorý je súčasťou projektu ISAGREED. Táto prezentácia bola podporená grantom Erasmus plus KA2 partnerstva pre spoluprácu s názvom: Inovácia štruktúry a obsahu študijných programov v oblasti manažmentu živočíšnych genetických a potravinových zdrojov z využitím digitalizácie.

Genetické modifikácie môžeme definovať ako cielečné zmeny v genetickej informácii organizmu. Použitím týchto postupov vznikajú geneticky modifikované organizmy známe aj ako GMO. Najmodernejším prístupom úpravy genómu je génová editácia. Génová editácia je proces, ktorý umožňuje vysoko cielečnú genetickú modifikáciu rôznych častí cieľového genómu. Príkladom génovej editácie je CRISPR/Cas9 ktorý nachádza využitie v génovej terapii, ako aj v produkcii potravín s využitím precízneho fermentovania.

V prezentácii sa budeme venovať histórii a vzniku spomenutých technológií, pochopeniu fungovania ich procesov a spôsobom ich využitia pri produkcii potravín.

Postupy génovej editácie boli prvý krát popísané v roku 1979 kedy bol nahradený úsek DNA syntetickým úsekom DNA. Metódy editácie DNA sa vyvíjali od editácie prostredníctvom Zinc-finger proteínov, viažúcich sa cielečne na DNA cez technológiu HDR a NHEJ zameranú na homologickú ako aj nehomologickú rekombináciu. V roku 2012 sa samostatné dráhy výskumu génovej editácie využívajúce efekторы podobné transkribčným aktivátorom TALE spojili z výskumom imunitného systému baktérií a implementovali technológiu CRISPR-Cas9 RNA navádzaných DNA endonukleáz, ktoré v súčasnosti spôsobujú revolúciu v génovej editácii.

CRISPR repeat spacer array je súčasťou CRISPR-Cas systému, ktorý slúži ako obrana proti vírusom a iným cudzím DNA. CRISPR-Cas systém sa skladá z dvoch hlavných častí: CRISPR array a Cas proteínov. CRISPR array obsahuje spacers (krátke úseky DNA), ktoré sú oddelené opakujúcimi sa sekvenciami (repeats). Tieto spacers sú uložené v pamäťovom priestore bunky a slúžia ako záznamy o predchádzajúcich infekciách vírusmi alebo cudzou DNA. Cas proteíny dokážu rozpoznať spacers a následne zničiť vírus alebo cudziu DNA.

TracrRNA je malá RNA molekula, ktorá sa viaže na CRISPR RNA (crRNA) a Cas proteíny. TracrRNA spolu s RNase III štiepi crRNA na malé úseky a vytvára sa tak single-guide RNA (sgRNA), ktorá sa viaže na Cas proteíny a umožňuje im rozpoznať cieľovú sekvenciu DNA.

Pre vznik funkčnej editačnej jednotky je potrebné aby sa molekula Cas9 spojila s navádzacím systémom gRNA. Komplex sa zameriava na rozpoznanie sekvencie PAM, ktorá susedí s cieľovou sekvenciou a spúšťa proces rozpoznávania cieľovej sekvencie DNA prostredníctvom navádzacej molekuly gRNA.

V prípade, že komplex Cas9 a gRNA rozpozná komplementárnu sekvenciu nasledujúcu po úseku PAM, nastane rozpletenie vlákna DNA a následná aktivácia nukleáz. V prípade nezhody úseku DNA s navádzacou sekvenciou gRNA proces nepokračuje.

V prípade aktivácie nukleáz sa aktivujú HNH a RuvC-podobné domény systému Cas9, ktoré vytvoria zlom na dvojvláknne DNA, na konkrétnom mieste vedenom sekvenciou gRNA. Vzniknutú situáciu je možné využiť viacerými spôsobmi.

Samotný systém CRISPR/Cas9 spôsobuje zlom na vlákne DNA na mieste, kde sa má vykonať zmena. Po vytvorení zlomu vlákien DNA sa do bunky dodáva donorový fragment s požadovanou sekvenciou. Tento donorový fragment sa potom použije na opravu zlomu vlákna DNA. Pri použití systému HDR sa používa homologická rekombinácia na opravu zlomu vlákien DNA. Pri použití systému NHEJ sa zlom vlákna DNA spojí spolu pomocou proteínových faktorov.

Tieto proteíny sa viažu na zlom vlákna DNA a obnovia spojenie. Proteínové faktory NHEJ sú schopné opraviť zlom vlákna DNA bez použitia homologickej rekombinácie.

Využitie systému CRISPR-Cas9 nie je len vo vytváraní zmien na vlákne DNA ale napríklad aj v zmene expresie konkrétneho génu.

Systém SAM (Synergistic Activation Mediator) je proteínový komplex, ktorý sa používa na zvýšenie transkripčnej aktivity. Systém SAM sa skladá z nukleázy-dead SpCas9 (dCas9) a RNA sprievodcu ako nosiča pre dopravu SAM efektorových domén na cieľové génové promotéry. Tento systém umožňuje miestne špecifickú transkripčnú aktiváciu génu.

Budúcnosť využitia génovej editácie je v mnohých smeroch. Okrem vývoja nových druhov rastlín a živočíchov a radikálnych ekologických zásahov ako je už realizovaná sterilizácia komárov, môžeme identifikovať nasledovné smery výskumu.

1. CRISPR-Cas9 je možné použiť na identifikáciu nových cieľových proteínov pre lieky. Táto technológia umožňuje výskumníkom presne zmeniť alebo odstrániť gény v bunkách a sledovať, ako sa tieto zmeny prejavujú na bunkovej úrovni. Týmto spôsobom môžu výskumníci identifikovať nové cieľové proteíny pre lieky a vyvinúť nové lieky na liečbu rôznych chorôb.
2. Využitie CRISPR-Cas9 pre potreby génovej terapie, kde môže byť systém nasadený priamo "IN VIVO", pričom dokáže v reálnom čase meniť kauzálnu mutovanú alelu v cieľových génoch tak že obnoví produkciu funkčných génových produktov pri rôznych geneticky podmienených ochoreniach.
3. V oblasti syntetickej biológie technológia CRISPR-Cas9 poskytuje možnosť úpravy metabolických dráh tak aby sa bunky dostali do konkrétneho stavu, alebo tak aby bol podporený ich rast aj mimo v podmienkach "in vitro".

Cell based food je typ potraviny, ktorá sa vyrába z buniek izolovaných zo zvierat a pestovaných v laboratóriu. Cieľom je vytvoriť produkt, ktorý je podobný tradičnému mäsu, hydiny, rýb, mlieku alebo vajciam. Táto technológia sa považuje za možnú alternatívu k intenzívnemu chovu zvierat, ktorý môže v budúcnosti predstavovať etický, alebo ekologický problém.

Postup výberu buniek pri cell-based food závisí od typu produktu, ktorý sa chce vytvoriť. Zvyčajne sa vyberajú bunky zvierat, ktoré majú schopnosť proliferovať a diferencovať sa do požadovaných tkanív, ako sú svalové alebo tukové bunky. Bunky sa môžu získať z rôznych zdrojov, ako sú biopsie, embryonálne bunky, kmeňové bunky alebo inžiniersky upravené bunky.

Následným krokom je produkcia buniek. Postup bunkovej proliferácie v procese výroby cell-based meat spočíva v tom, že sa vybrané bunky zvierat umiestnia do bioreaktorov, kde sa im dodávajú živiny a rastové faktory, ktoré podporujú ich delenie a rast. Bunková proliferácia môže trvať niekoľko dní alebo týždňov, v závislosti od typu buniek a podmienok pestovania. Po dosiahnutí požadovaného počtu buniek sa môžu bunky diferencovať do svalových alebo tukových tkanív, ktoré tvoria základ cell-based meat. Bunková proliferácia je jednou z najnákladnejších a najzložitejších fáz výroby cell-based meat, preto sa vyvíjajú metódy na jej optimalizáciu a zefektívnenie.

Harvesting v procese cell-based food je fáza, kedy sa bunky alebo tkanivá odstránia z bioreaktorov a spracujú do finálneho produktu. Harvesting sa môže líšiť v závislosti od typu cell-based food, ktorý sa vyrába. Napríklad pri cell-based meat sa môžu bunky alebo tkanivá zbierať ručne alebo mechanicky, pričom sa musia dodržiavať prísne hygienické a bezpečnostné normy. Harvesting môže tiež zahŕňať ďalšie kroky, ako sú čistenie, sterilizácia, zmrazenie, balenie alebo kombinovanie s inými zložkami. Harvesting je podliehať regulácii príslušných orgánov, ktoré kontrolujú kvalitu a bezpečnosť cell-based food.

Posledným krokom výroby je formulácia produktu. Je to fáza, kedy sa bunky alebo tkanivá spracujú do finálneho produktu, ktorý má požadované organoleptické a nutričné vlastnosti. Tento proces môže zahŕňať rôzne kroky, ako sú zmrazenie, sušenie, fermentácia, extrúzia, 3D tlač alebo pridávanie iných zložiek, ako sú rastlinné bielkoviny, vláknina, farbivá alebo dochucovadlá. Napríklad pri cell-based meat sa môže použiť 3D tlač na vytvorenie štruktúry a textúry podobnej svalu. Formulácia produktu ovplyvňuje kvalitu, trvanlivosť, bezpečnosť a prijateľnosť produktu.

Proces prípravy cell based meat je možné graficky znázorniť aj použitím nasledovnej schémy.

Prvým krokom je biopsia svalu od živých zvierat, alebo prostredníctvom biopsie. Bunky sa podľa potreby roztriedia na svalové, spojivové a tukové. Samostatným krokom je proces imortalizácie.

Proces imortalizácie pri výrobe cell based food je proces, ktorý umožňuje bunkám rásť a deliť sa neobmedzene v laboratórnych podmienkach. Tento proces je potrebný na získanie dostatočného množstva buniek na výrobu potravín. Existuje niekoľko spôsobov, ako dosiahnuť imortalizáciu buniek, napríklad použitím telomerázy, onkogénov alebo vírusov. Každý spôsob má svoje výhody a nevýhody z hľadiska účinnosti, bezpečnosti a etiky.

Umiestnenie buniek do bioreaktora zabezpečuje oscilujúci pohyb média v komore na zabezpečenie rovnomerného rozdelenia živín a kyslíka medzi bunky. Bioreaktor tiež napodobňuje fyziologické podmienky tkanív, ako je tlak, napätie a deformácia, ktoré stimulujú bunkový rast a diferenciáciu.

Výber scaffoldu v procese výroby cell based meat je dôležitý krok, ktorý ovplyvňuje morfológiu, funkciu a kvalitu vytvoreného mäsa.

Scaffold je trojrozmerná štruktúra, ktorá poskytuje podporu a stimuláciu bunkám na rast a diferenciáciu v smerovanom tkanivovom usporiadaní, ktoré môže v niektorých prípadoch mať tvar finálneho produktu.

Scaffold musí spĺňať niekoľko kritérií, ako sú biokompatibilita, edibilita, nutričná hodnota, textúra, porozita, mechanické vlastnosti, degradabilita a nízka cena. Existuje mnoho typov

scaffoldov, ktoré sa líšia podľa materiálu, tvaru a metódy prípravy. Niektoré z nich sú vytvárané technológiou 3D tlače ako na obrázku s použitím rôznych materiálov a technológií.

Texturovaný sójový proteín (TSP): Jedná sa o jedlý bielkovinový materiál získaný z sóje, ktorý má poréznu štruktúru a mäsitú textúru. TSP môže podporovať rast a diferenciáciu svalových buniek a tvoriť 3D tkanivo bez potreby ďalších rastových faktorov.

Technológia bunkových listov: Jedná sa o techniku, ktorá umožňuje vytvárať scaffold-free cell based meat pomocou teplotne citlivých kultivačných misiek. Bunky sa na miske pripevnia pri 37°C a uvoľnia pri 32°C vo forme tenkej vrstvy. Viacero vrstiev buniek sa potom zloží na seba a vytvorí 3D tkanivo s vlastnou extracelulárnou matrixou³.

Mikronosiče: Jedná sa o malé častice z rôznych materiálov (napr. kolagén, alginát, želatína), ktoré slúžia ako substrát pre bunky. Mikronosiče sa môžu použiť na zvýšenie bunkovej hustoty v bioreaktoroch alebo na tvorbu 3D tkanív pomocou agregácie alebo tkania.

Textúra finálnych produktov cell based meat závisí od typu buniek, metódy pestovania a spracovania. Niektoré produkty sú vyrobené z jednej vrstvy buniek, ktoré majú tenkú a mäkkú konzistenciu, vhodnú pre mäsové plátky, nuggets alebo párky². Iné produkty sú vyrobené z viacerých vrstiev buniek, ktoré tvoria trojrozmerné tkanivo so štruktúrou podobnou svalovým vláknam. Tieto produkty majú tvrdšiu a vláknitejšiu textúru, vhodnú pre steak.

Finálne produkty cell based meat sa dajú tiež upraviť pridaním rastlinných proteínov, tukov, farbív alebo dochucovadiel, aby sa dosiahla požadovaná chuť, vôňa a vzhľad. Niektoré produkty sa dajú variť, smažiť alebo grilovať rovnako ako tradičné mäso².

Finálne produkty cell based meat sú stále vo fáze vývoja a výskumu a nie sú dostupné pre širokú verejnosť. V súčasnosti existuje len niekoľko schválených produktov, ktoré získali regulačné schválenie na predaj spotrebiteľom. V Singapure ide o kuracie kusky od spoločnosti Eat Just, ktoré sú zložené z 70% kultivovaných kuracích buniek a 30% rastlinných proteínov.