



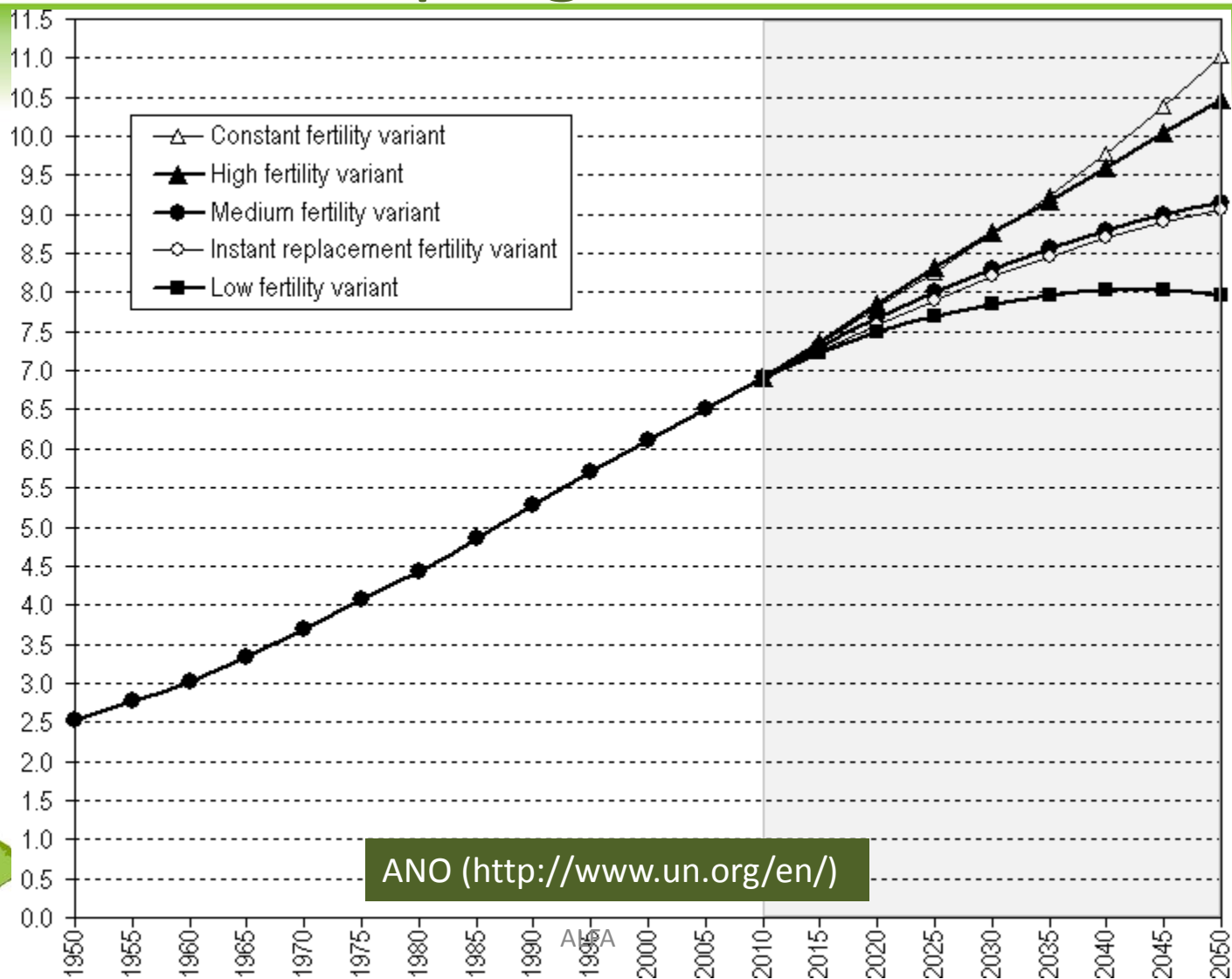
LATVIJAS
UNIVERSITĀTE
UNIVERSITY OF LATVIA
ANNO 1919



Pārtikas drošība un ģenētiski modificēti organismi

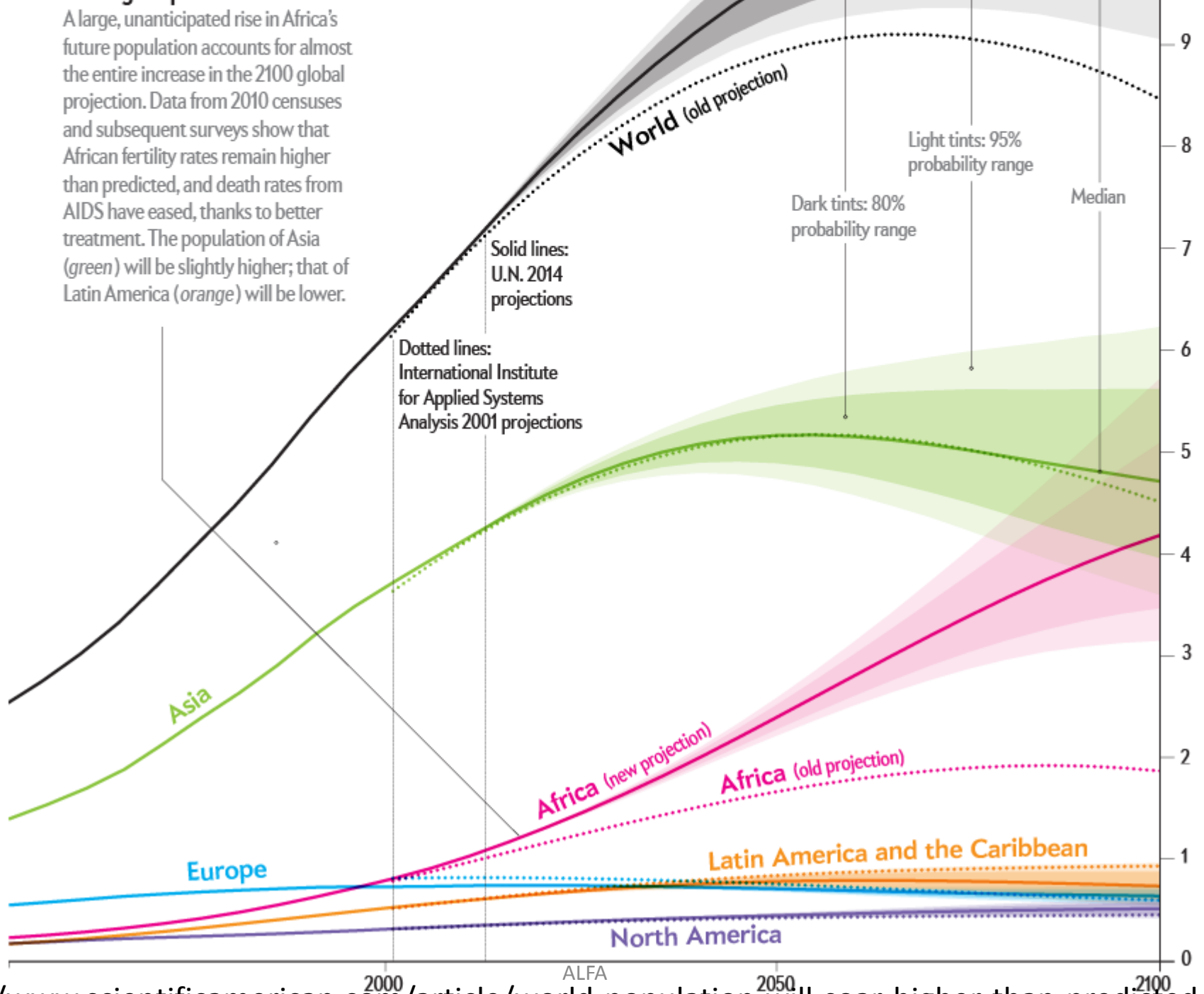
Dr. biol. Nils Rostoks
LU Bioloģijas fakultāte

Cilvēku populācijas attīstības prognozes



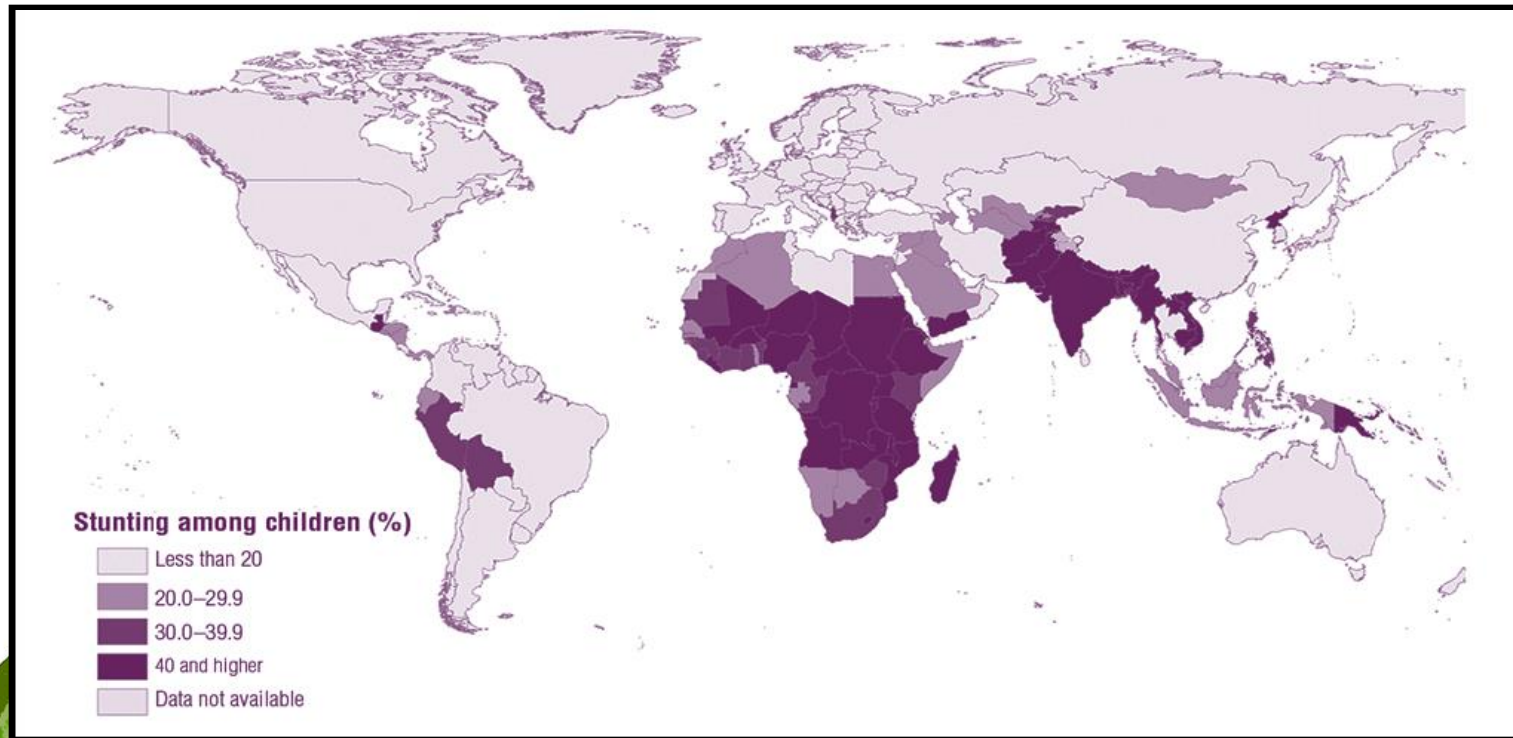
ANO (<http://www.un.org/en/>)

A large, unanticipated rise in Africa's future population accounts for almost the entire increase in the 2100 global projection. Data from 2010 censuses and subsequent surveys show that African fertility rates remain higher than predicted, and death rates from AIDS have eased, thanks to better treatment. The population of Asia (green) will be slightly higher; that of Latin America (orange) will be lower.



Ģeogrāfiskie rajoni, kuros trūkst pārtikas

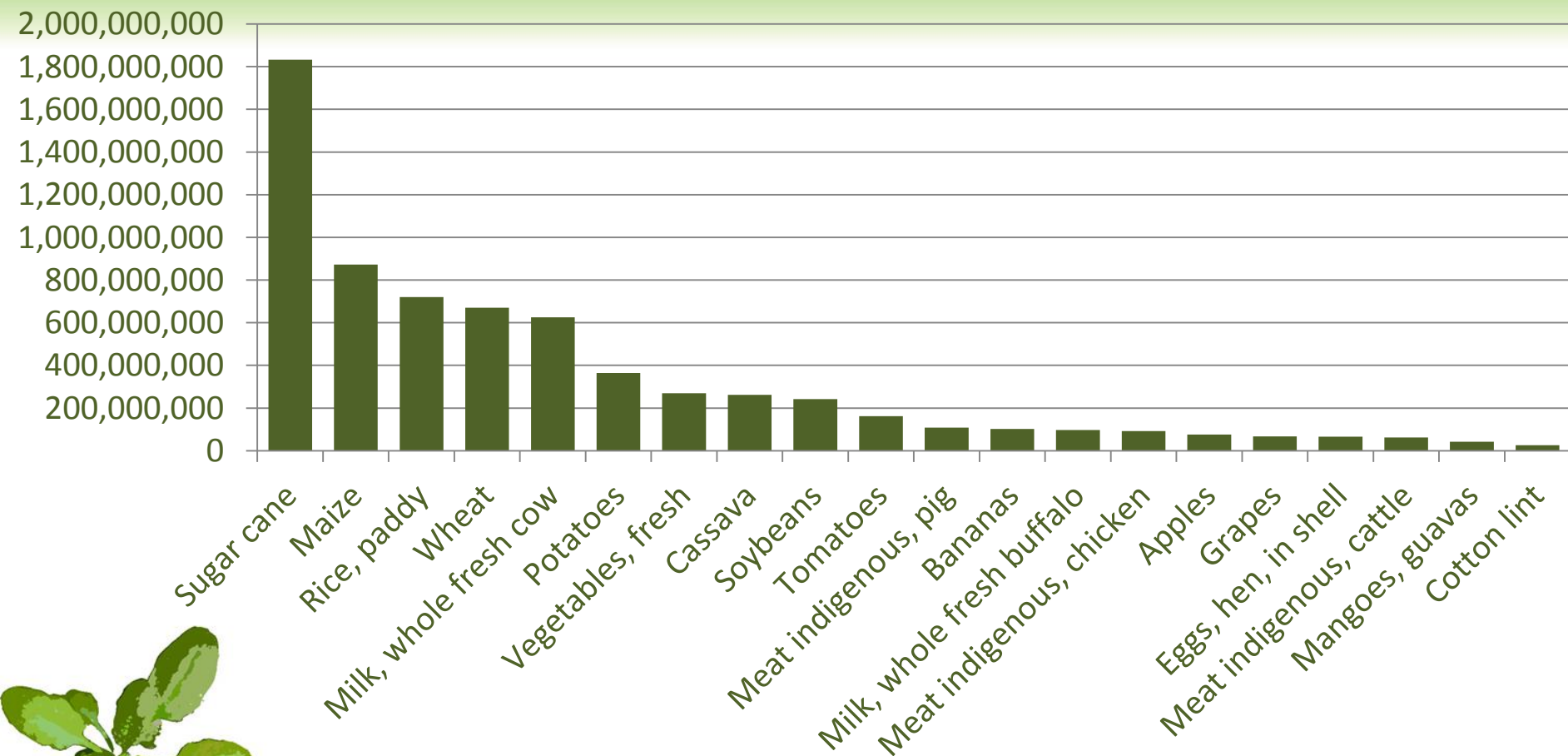
Geographical pattern of stunting in children under 5 years of age



World Health Organization (<http://www.who.int>)

Augi nodrošina mūs ar pārtiku

Production (Metric tons) 2012

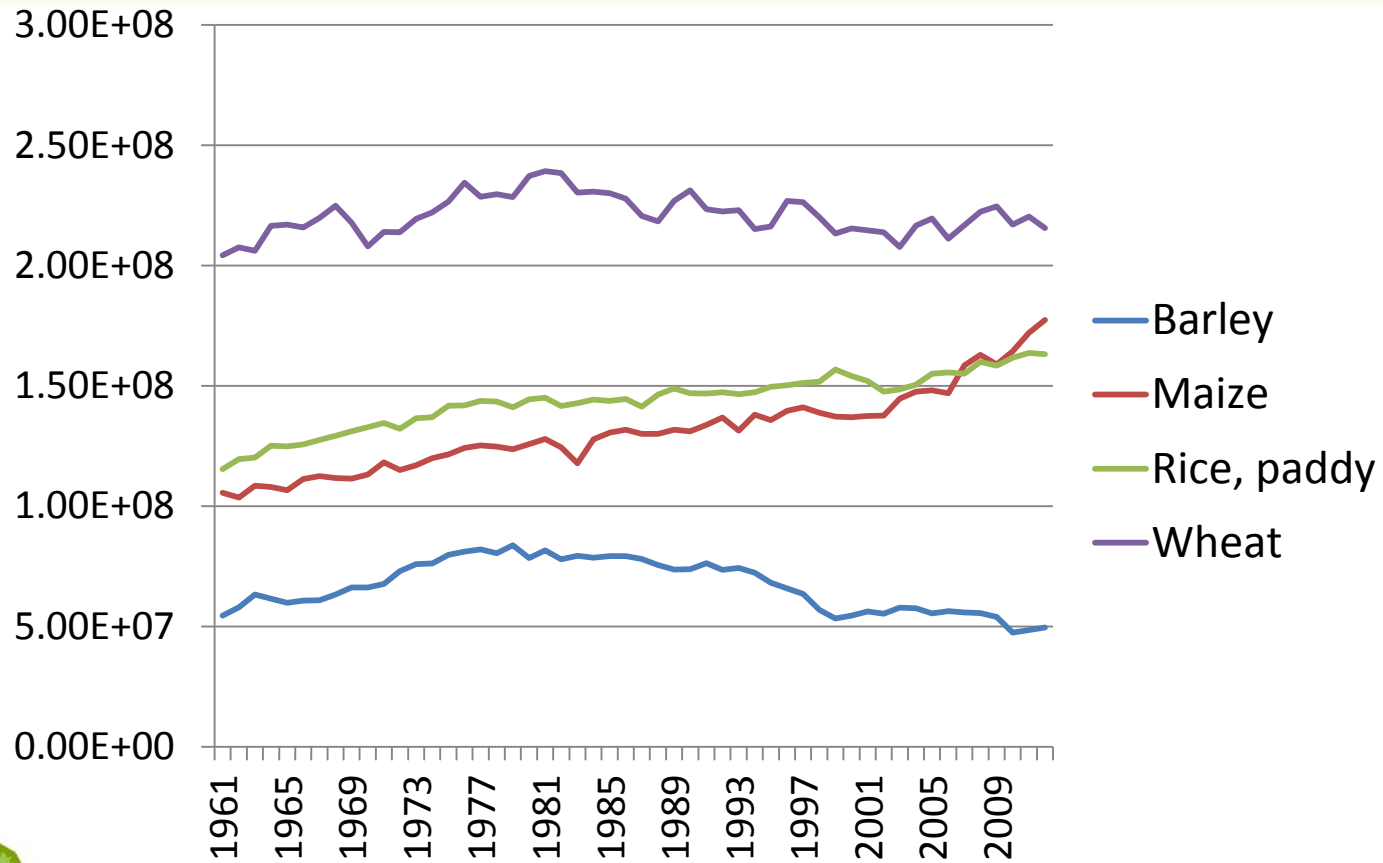


2015-07-23.

ANO Pārtikas un lauksaimniecības organizācijas (FAO) dati
www.fao.org

ALFA

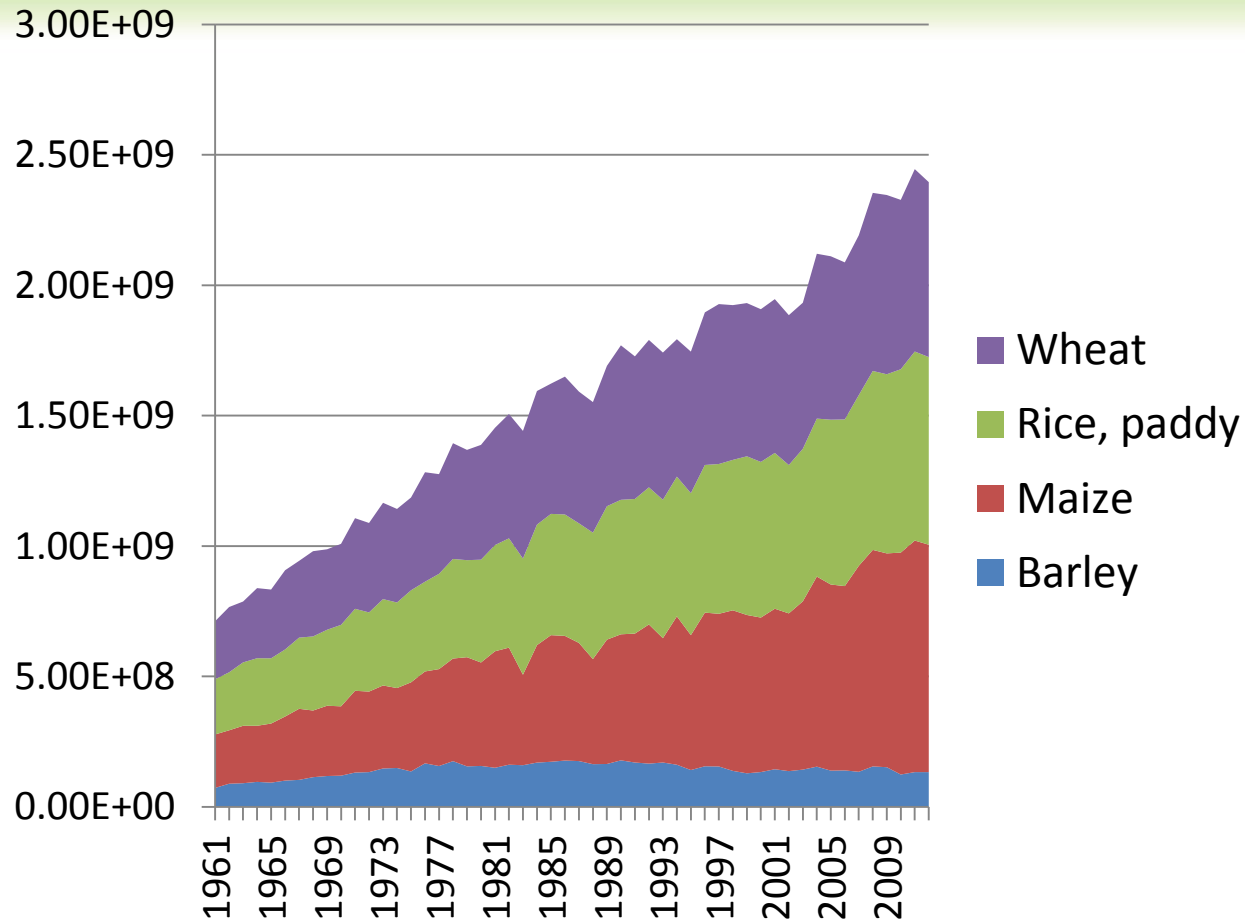
Platība (Ha)



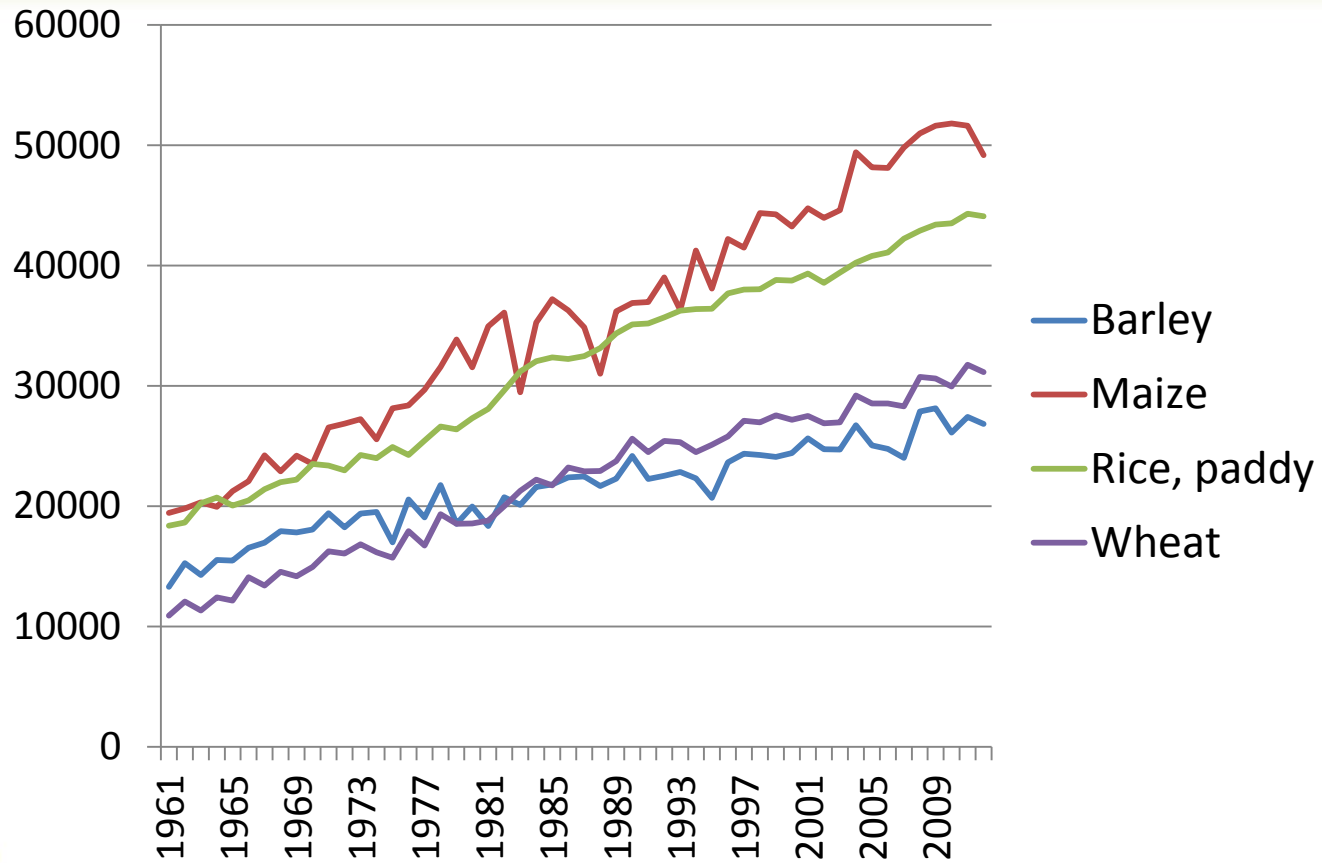
2016-07-23.

ALFA

Raža (metriskās tonnas)



Ražība (100 g/Ha)

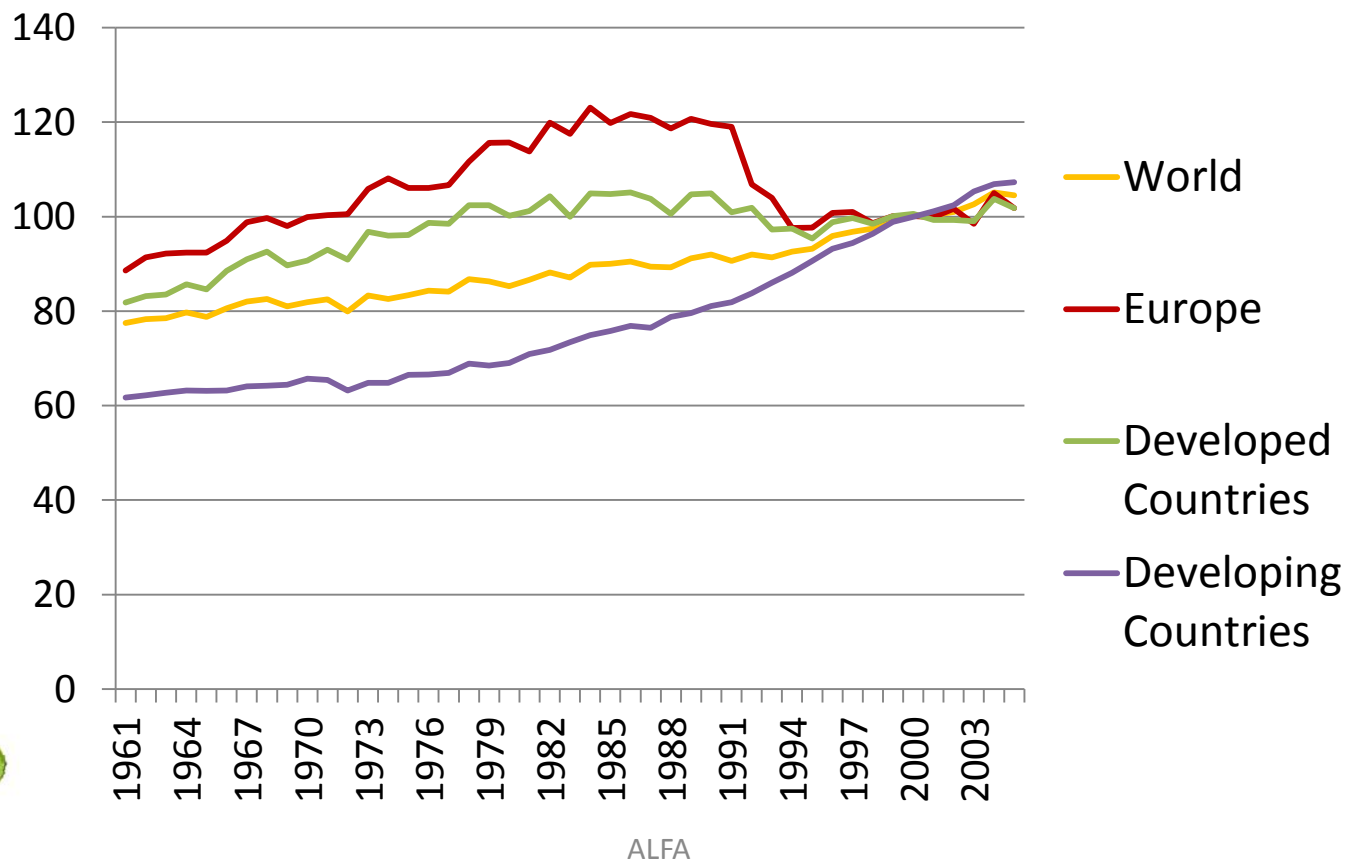


2019.07.23.

ALFA

Lauksaimniecības produkcija uz vienu iedzīvotāju

Food production per capita (percent of 1999 - 2001
average)



Tātad...

- Populācija pieaug un turpinās augt
- Platības pieaugt nevar
- Attīstības valstīs pieaug cilvēku labklājība un patēriņš
- Izmainās klimats, pieaug abiotiskā un biotiskā strese ietekme (20 – 40% ražas iet bojā, FAO)



Ko nu?

- Jāpalielina lauksaimniecības produkcijas apjoms no esošajām platībām vienlaicīgi nekaitējot videi un atbildot uz patērētāju vēlmi pēc drošības un kvalitātes



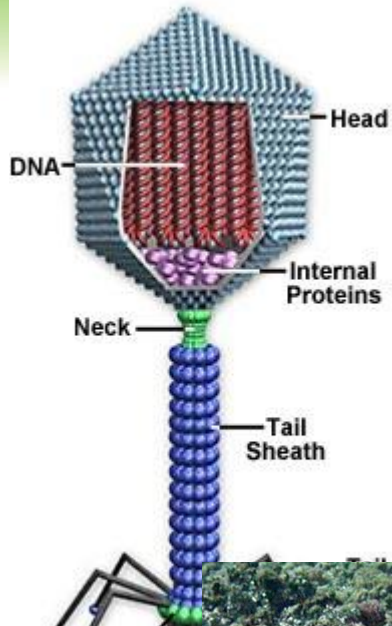
Vai biotehnoloģija var piedāvāt risinājumu?

- Efektīvāka tradicionālā selekcija, kas balstās modernajā ģenētikā un genomikā
- Dažādas jaunas selekcijas metodes
- Jaunas un labi aizmirstas senas lauksaimniecības kultūras
- Ģenētiski modificēti organismi

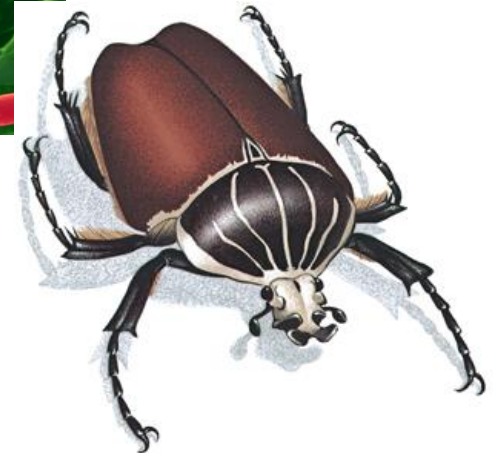


DNS – iedzimtības informāciju nesošais materiāls

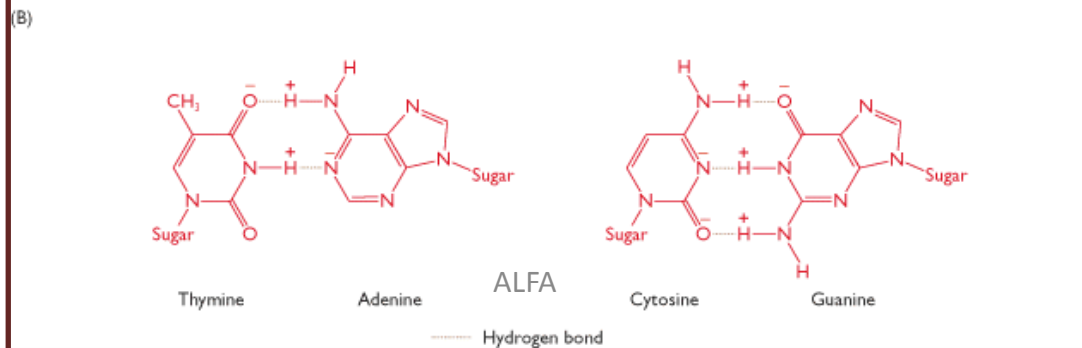
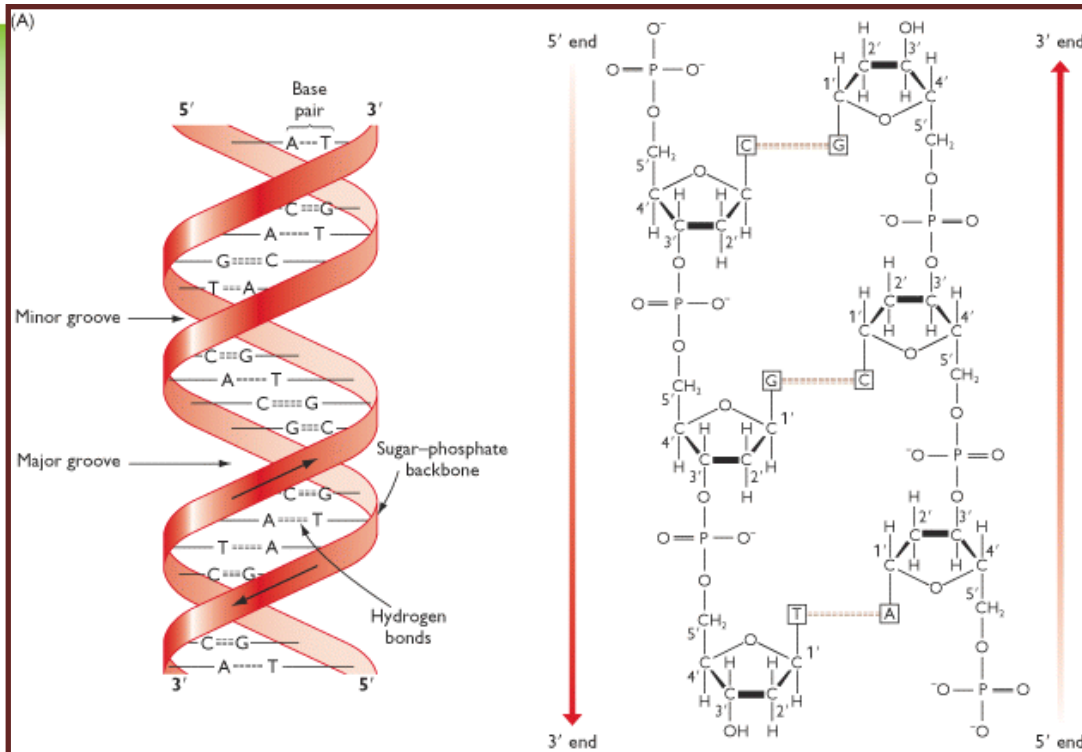
Bacteriophage Structure



End Plate
Fig



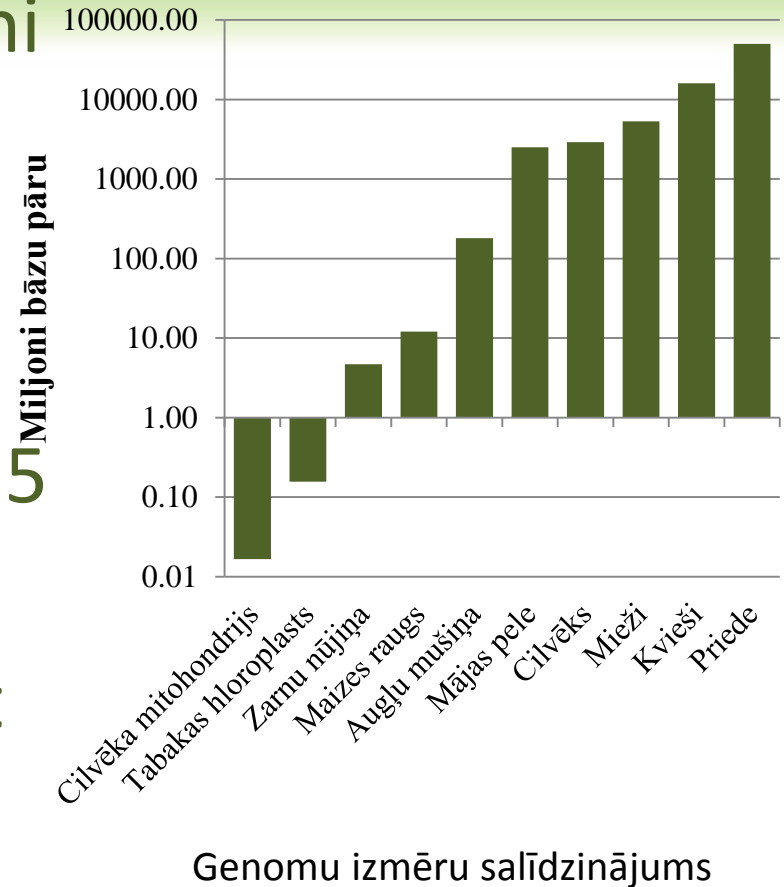
DNS – iedzimtības informāciju nesošais materiāls



2019.07.23.

Gēni – cik to vispār ir?

- Cilvēka genomā ir aptuveni 20 000 - 25 000 gēni
- Nematodes genomā ir aptuveni 20 000 gēni
- Rīsu genomā ir aptuveni 35 000 gēni
- Kviešu genomā varētu būt ap 50 000 – 70 000 gēni



'Sveši' gēni transgēnā organismā?

- Gēns no viena dzīva organisma ievietots citā dzīvā organismā izmantojot gēnu inženierijas metodes
- Transgēns organisms papildus savam gēnu komplektam parasti satur vēl vienu vai nedaudzus gēnus
- Transgēns parasti tiek translēts par proteīnu, tas nozīmē, ka transgēns organisms papildus savam proteīnu kopumam satur vēl vienu vai nedaudzus proteīnus



GMO - glābiņš bada cietējiem vai cilvēces iznīcība?



2019.07.23.

ALFA

GMO: definīcija

12.03.2001 Directive 2001/18/EC on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC

5.11.2007 Latvijas Republikas Ģenētiski modificēto organismu aprites likums (ar 10.07.2012 grozījumiem)

GMO tiek definēts kā „... organisms, izņemot cilvēku, kurā ģenētiskais materiāls, izmantojot vismaz kādu no šā panta 2.punktā minētajām metodēm, ir pārveidots citādi nekā dabiski krustojot vai dabiski rekombinējot”.

Vai

“genetically modified organism (GMO)” means an organism, with the exception of human beings, in which the genetic material has been altered in a way that does not occur naturally by mating and/or natural recombination



GMO iegūšanas metodes

Ģenētiskās modifikācijas metodes:

1. nukleīnskābju rekombinācijas metodes - jaunu ģenētiskā materiāla kombināciju veidošana, ārpus organisma ar dažādiem līdzekļiem ievadot nukleīnskābju fragmentus vīrusā, baktēriju plazmīdā vai citā vektorsistēmā, kā arī tādu nukleīnskābju nogādāšana šūnās, kuras tajās neveidojas dabiski, taču spēj turpināt vairošanos,
2. metodes, kas saistītas ar ārpus organisma vai mikroorganisma izveidota ģenētiskā materiāla tiešu ievadīšanu organismā vai mikroorganismā, arī izmantojot mikroinjekciju, makroinjekciju, mikroinkapsulāciju,
3. šūnu un protoplastu sapludināšanas vai hibridizācijas metodes - šūnu veidošana ar jaunām ģenētiskā materiāla kombinācijām, sapludinot divas vai vairākas šūnas no sistemātiski attālām organismu grupām un izmantojot paņēmienus, kas nav sastopami dabā

GMO regulācija

- GMO regulācija ir balstīta uz “procesu” – jebkurš organisms, kas izveidots ar GI metodēm, tiek regulēts
- Visi ar GMO saistītie aspekti – ierobežota izmantošana zinātnē, lauka izmēģinājumi, kultivēšana, vides risks un pārtikas drošība – tiek regulēti gan ES, gan citur pasaulē



Termini

- ĢMO – skat. definīciju ĢMO aprites likumā vai ES direktīvā 2001/18/EG
- Gēnu inženierija – metožu kopums manipulācijām ar organismu iedzimtības materiālu
- Transgēns – gēns, kas ticis ievietots cita organisma genomā ar GI metodēm
- Rekombinantā DNS – ar GI metodēm izveidota ‘mākslīga’ DNS molekula
- Ģģenēze – gēnu pārnese no viena organisma citā izmantojot GI metodes, ja tie savā starpā varētu brīvi krustoties



Gēnu inženierija

*“Genetic engineers don't make new genes,
they rearrange existing ones”*

Thomas E. Lovejoy



Horizontālā gēnu pārnese dabā

- ⦿ Horizontālā gēnu pārnese dabā (it īpaši starp mikroorganismiem) ir plaši izplatīta
- ⦿ <http://www.nature.com/nrmicro/focus/genetransfer/index.html>



GI pamatā esošie atklājumi

Restrikcijas endonukleāžu atklāšana un aktivitātes pētījumi



Pamatā ir *Werner Arber* 60-to gadu pētījumi par baktēriju restrikcijas - modifikācijas sistēmām (1978. gada Nobela prēmija)



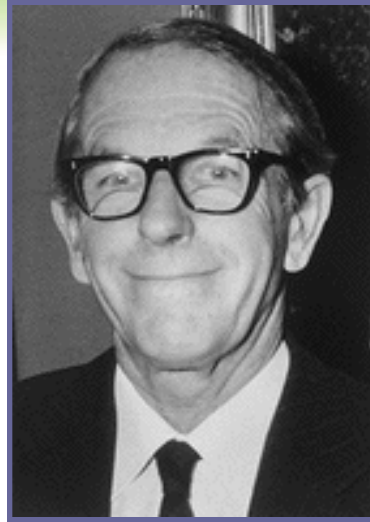
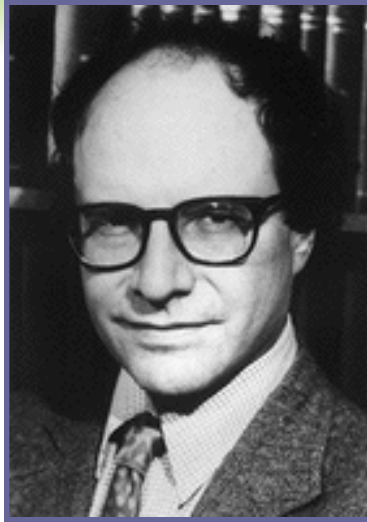
GI pamatā esošie atklājumi



Hamilton O. Smith 1970. gadā apraksta pirmo restrikcijas fermentu no *Haemophilus influenzae* - *HindII* un tā saitspecifiskumu. *HindII* šķeļ DNS secību GTPy*PuAC

Mertz un Davis 1972. gadā raksturo restrikcijas fermentu no *Escherichia coli* celma R, kuru nosauc par *EcoRI*, kas pazīst palindromisku secību G*AATTC un šķeļot veido 4 nukleotīdu pārkares

GI pamatā esošie atklājumi



Walter Gilbert Frederick Sanger Paul Berg

1980. gada Nobela prēmija ķīmijā par nukleīnskābju
secības noteikšanas metožu izstrādi un rekombinanto
DNS tehnoloģiju attīstību

(<http://www.nobel.se/laureates/chemistry-1980.html>)



GMO vēsture – pirmie ģmo

- Pirmie ĢMO – ģenētiski modificēti vīrusi un mikroorganismi
- Rekombinanto plazmīdu DNS konstruēšana no dažādām dabiskajām plazmīdām, antibiotiku rezistences marķieri, restrikcijas endonukleāzes

Cohen et al. (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. PNAS, 71: 1030



GMO vēsture – moratorijs

- 1974. g. zinātnieki nosaka moratoriju gēnu inženierijas eksperimentiem, līdz brīdim, kad izstrādās drošas darbības kritērijus ar transgēniem organismiem
- 1975. g. Asilomaras (ASV) konference par rekombinanto DNS tehnoloģijas drošību, kurā nosaka bioloģiskos un tehniskos kontroles pasākumus

Berg et al. (1974) Potential biohazards of recombinant DNA molecules. *Science*, 185: 303

Berg et al. (1975) Asilomar conference on recombinant DNA molecules. *Science*, 188: 991



GMO vēsture – Asilomaras konferences

- 1975. gada Asilomaras (ASV) konference par rekombinanto DNS tehnoloģijas drošību
- Izstrādā drošības kritērijus un principus
- - rDNS un to saturošo vīrusu, mikroorganismu un eikariotisko šūnu kultūru izplatības vidē kontrole jāiekļauj eksperimenta plānošanā
- - kontroles pasākumiem jāatbilst sagaidāmajiem eksperimenta riskiem
- Bioloģiskie kontroles pasākumi – vidē vairoties nespējīgas baktērijas; plazmīdas, kas replicējas tikai noteiktā saimniekorganismā
- Fiziskie kontroles pasākumi - lamināri, boksi, negatīvā spiediena telpas, kultūru un laboratorijas materiālu sterilizācija, laba mikrobioloģiskā prakse



GMO vēsture – GM augi



Marc van Montagu un Jozef Schell



Mary-Dell Chilton

Agrobacterium Ti plazmīdu T-DNS rajons tiek integrēts augu genomā. T-DNS sastāvā esošos gēnus iespējams aizvietot ar citiem un tādējādi panākt augu transformāciju

Zambryski et al. (1980) Tumor DNA structure in plant cells transformed by *A. tumefaciens*. *Science*, 209: 1385



GMO vēsture – GM augi

Dr. Luis Herrera-Estrella 1984. g. saņēma Ph.D. no Ģentes universitātes, Beļģijā

Doktorantūras laikā tika izstrādāts darbs, kurā tika pirmo reizi iegūti transgēni augi, kas saturēja antibiotiku rezistences gēnu no baktērijas

A. Caplan, L. Herrera-Estrella, D. Inzé, E. Van Haute, M. Van Montagu, J. Schell, P. Zambryski (1983) Introduction of genetic material into plant cells. *Science*, 222: 815 – 821



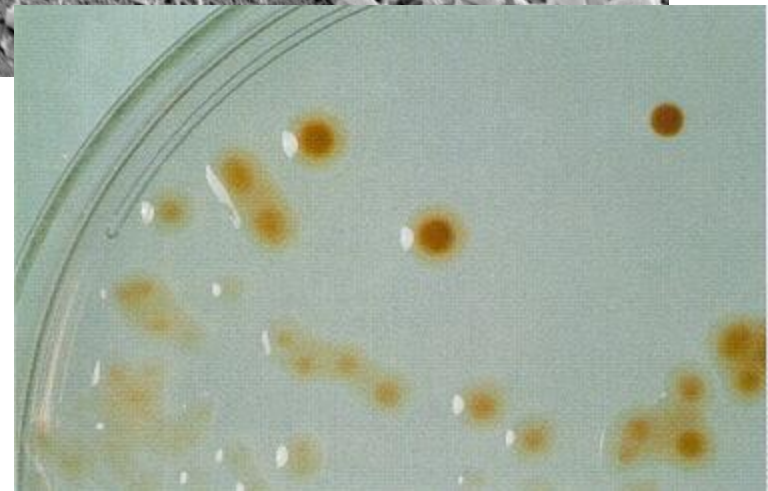
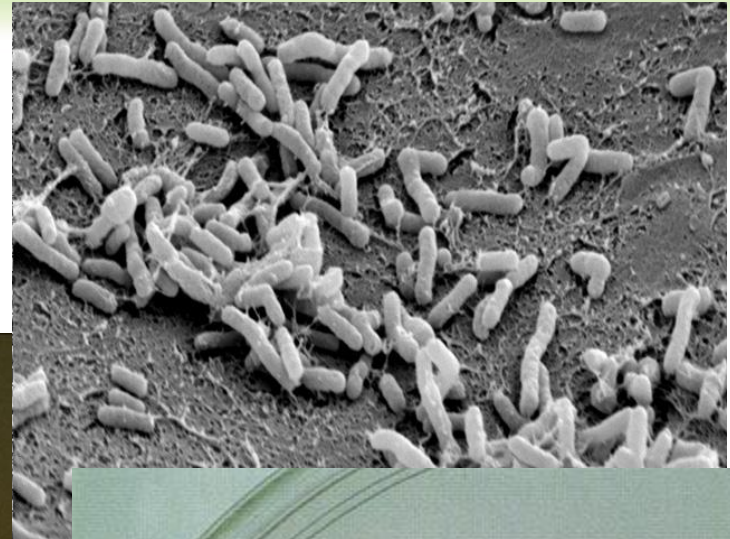
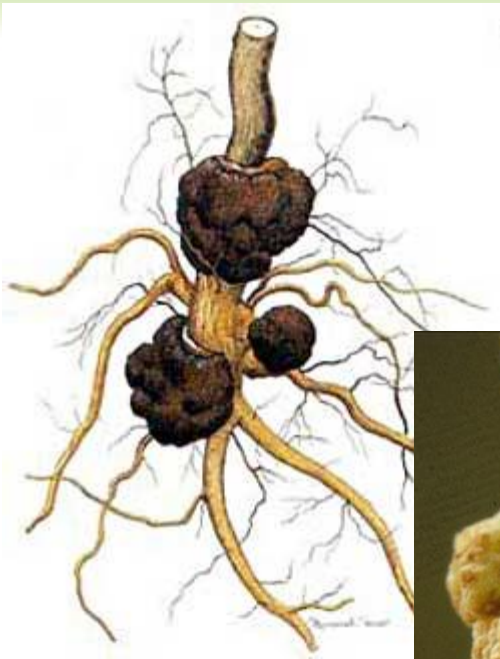
Gēnu inženierija Latvijā

- Ar gēnu inženieriju Latvijā sāk nodarboties 1978. gadā
- 1980. gadā tiek klonēts pilns hepatīta B vīrusa genoms
- 1984. gadā tiek atklāts jauns cilvēka interferona gēns *IFN- α N*
- 1985. gadā tiek noteikta pilna HBV genoma struktūra
- 80 - 90-tie gadi – rekombinanto cilvēka interferonu un interleikīnu producēšana *Escherichia coli* šūnās

Intervija ar prof. Paulu Pumpēnu krājumā Millenium. Skats uz Latviju. Valters un Rapa, 1999

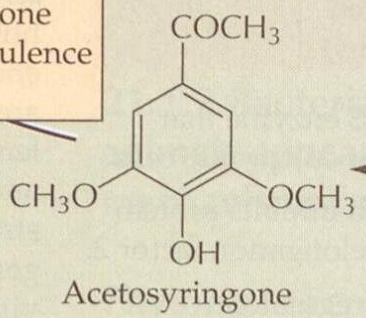
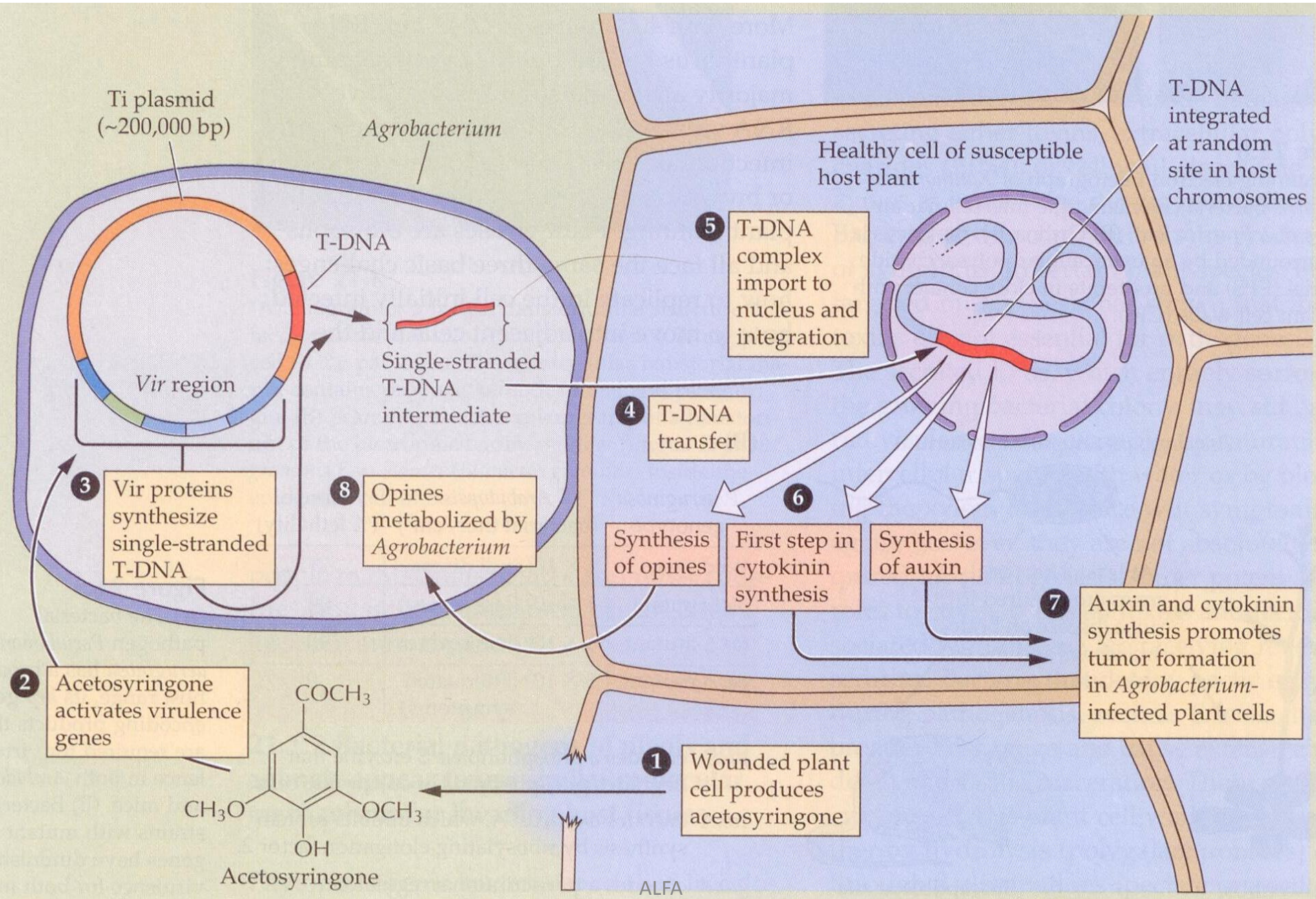


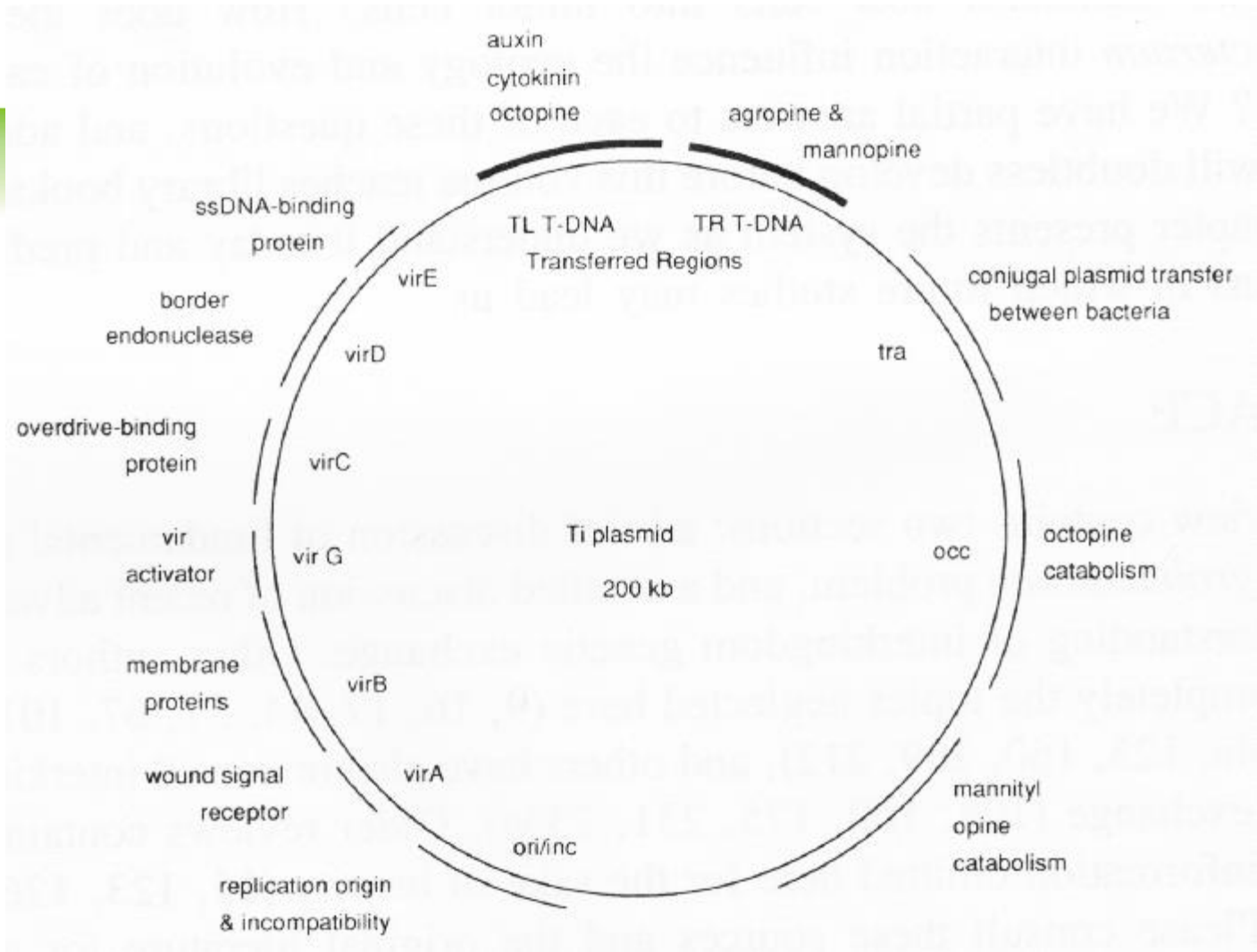
Agrobacterium izraisītās pangas



2019.07.23.

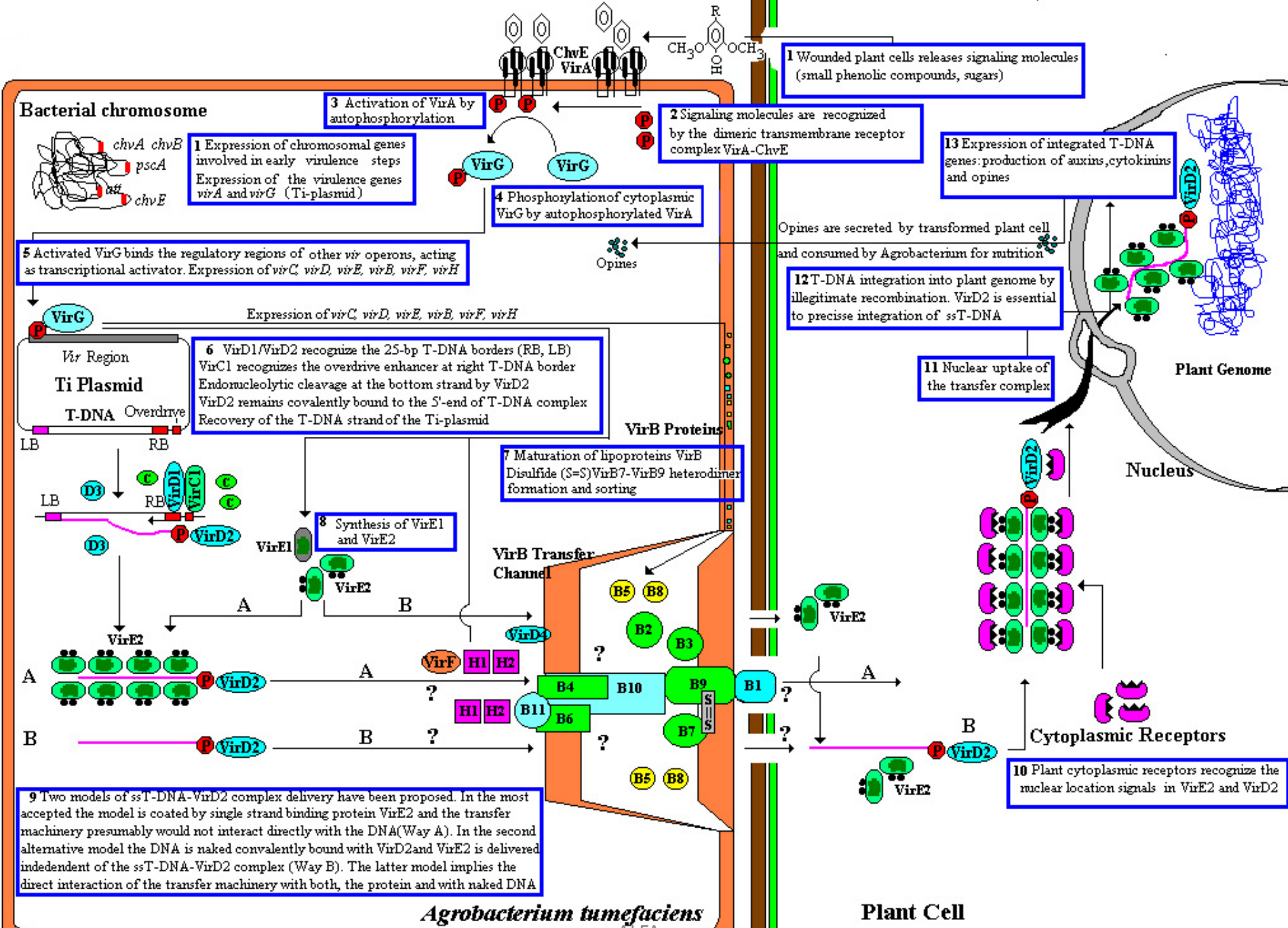
ALFA

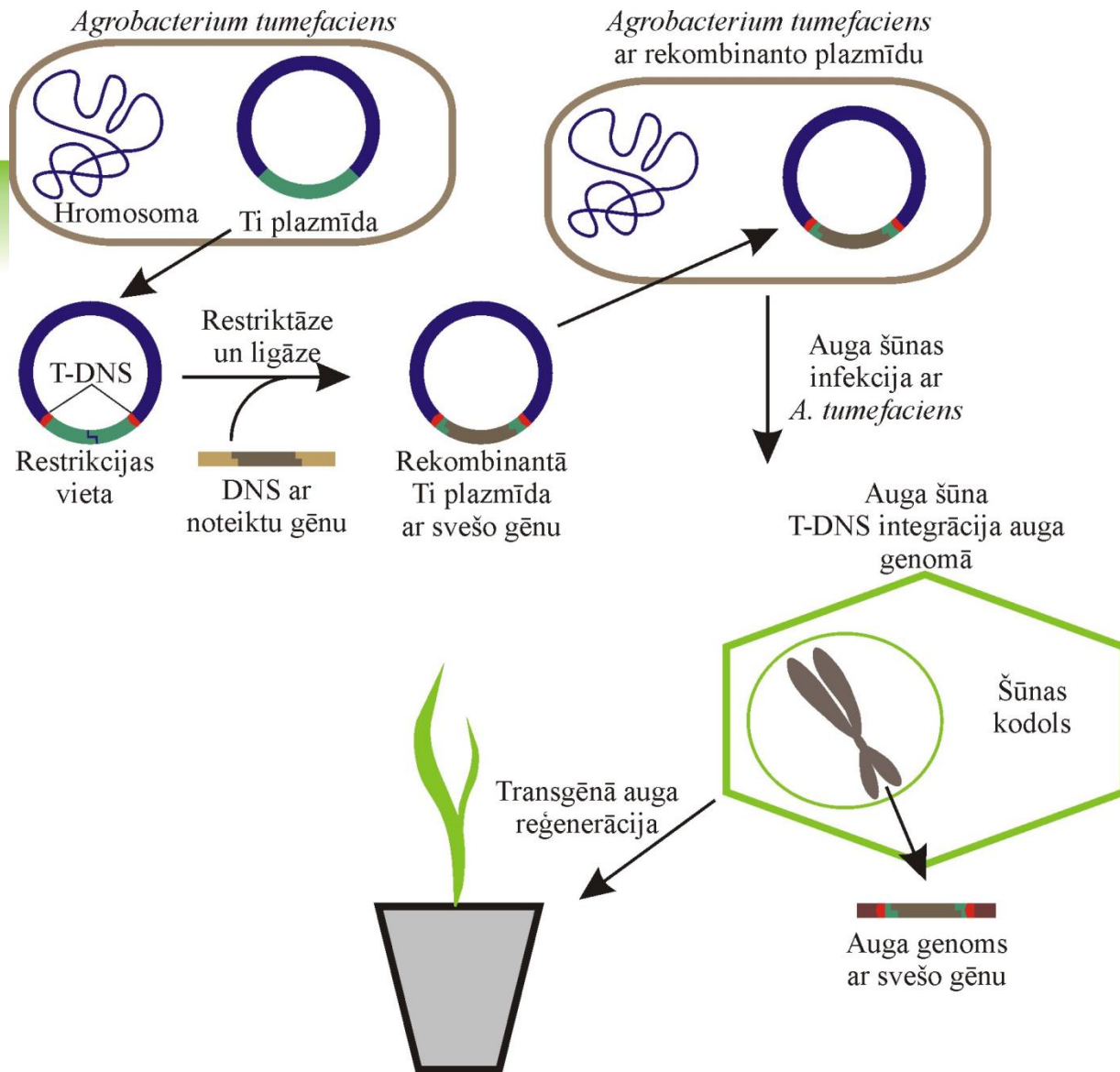




2019-07-23.

ALFA





ALFA

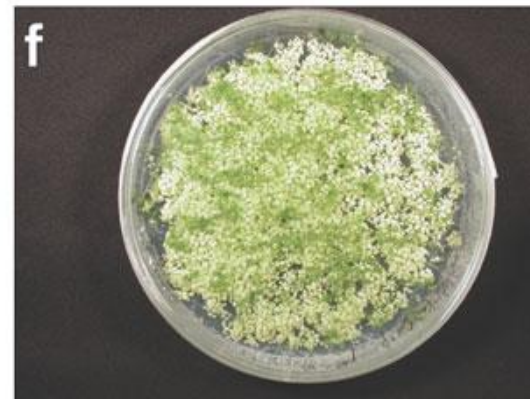
2019.07.23.



Transformējamie audi

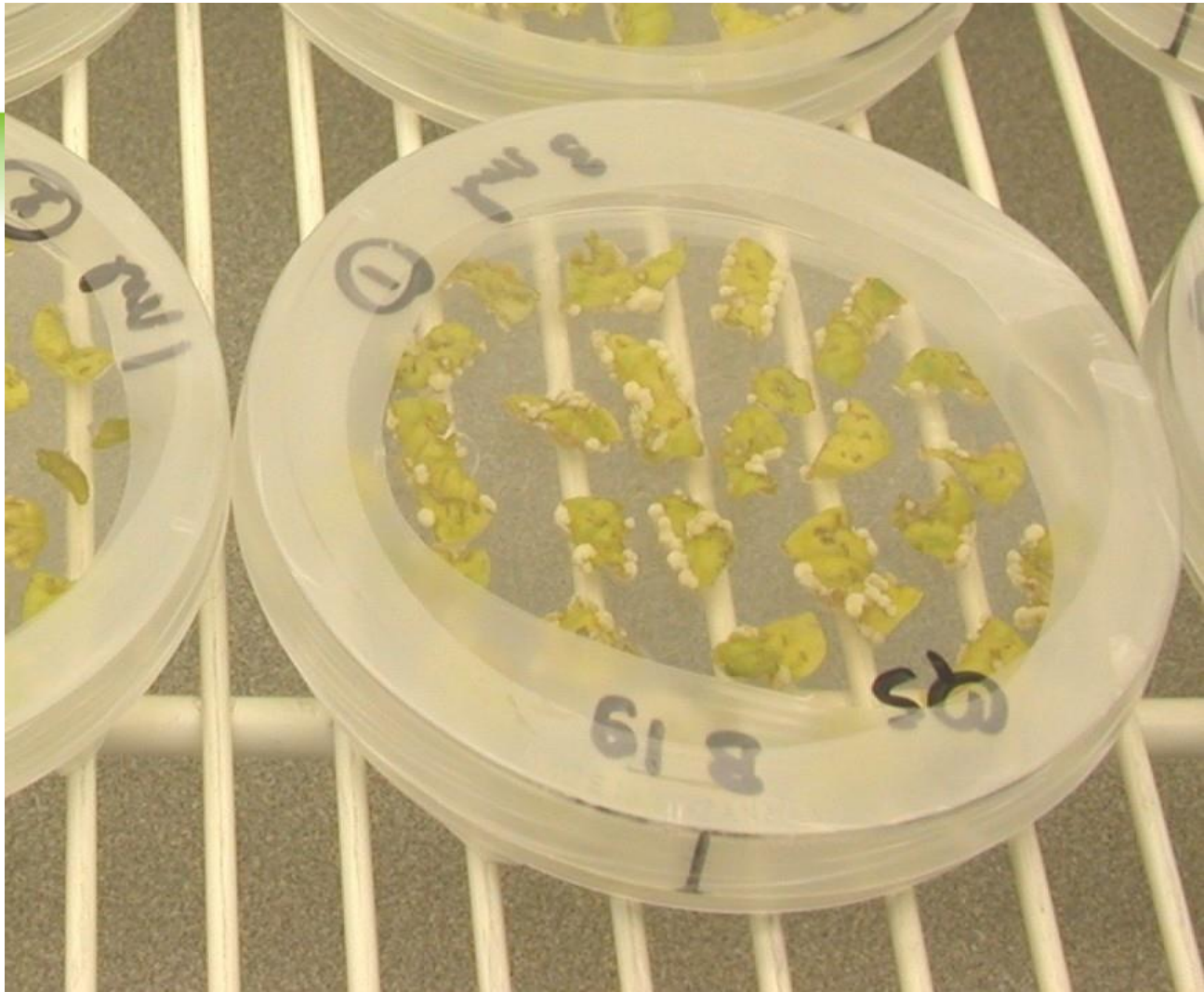
- *Ex planta* embriji
- *Ex planta* somatiskās šūnas, tai skaitā protoplasti
- *In planta Agrobacterium* transformācija
Clough and Bent (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16:735





2019-07-23.

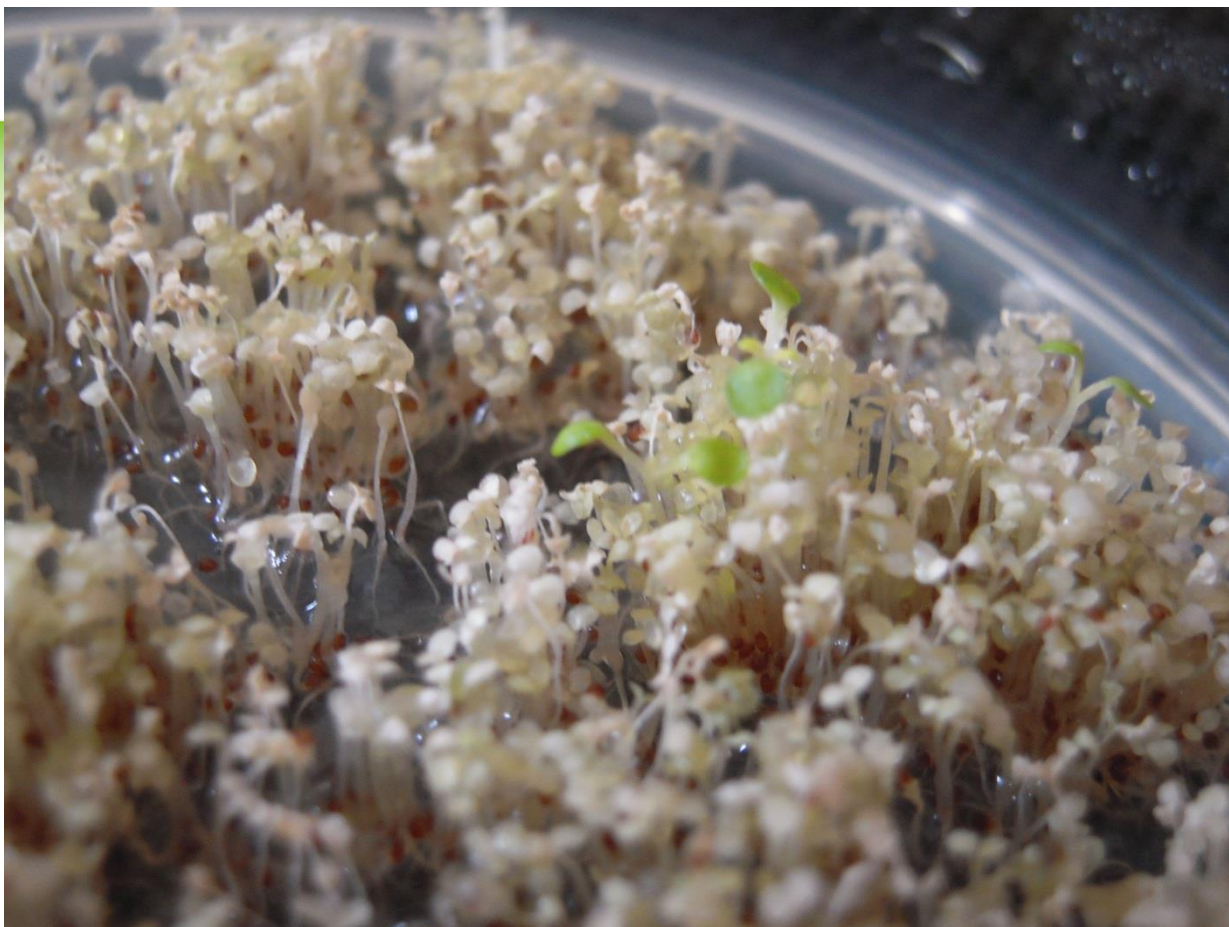
Zhang et al. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols* **1**, 641-646



http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ab/Transformation_with_Agrobacterium.JPG

2016-07-23.

ALFA



Transformētu *Arabidopsis* augu atlase uz Murashige –
Skoog barotnes ar kanamicīnu

2019.07.23.

ALFA

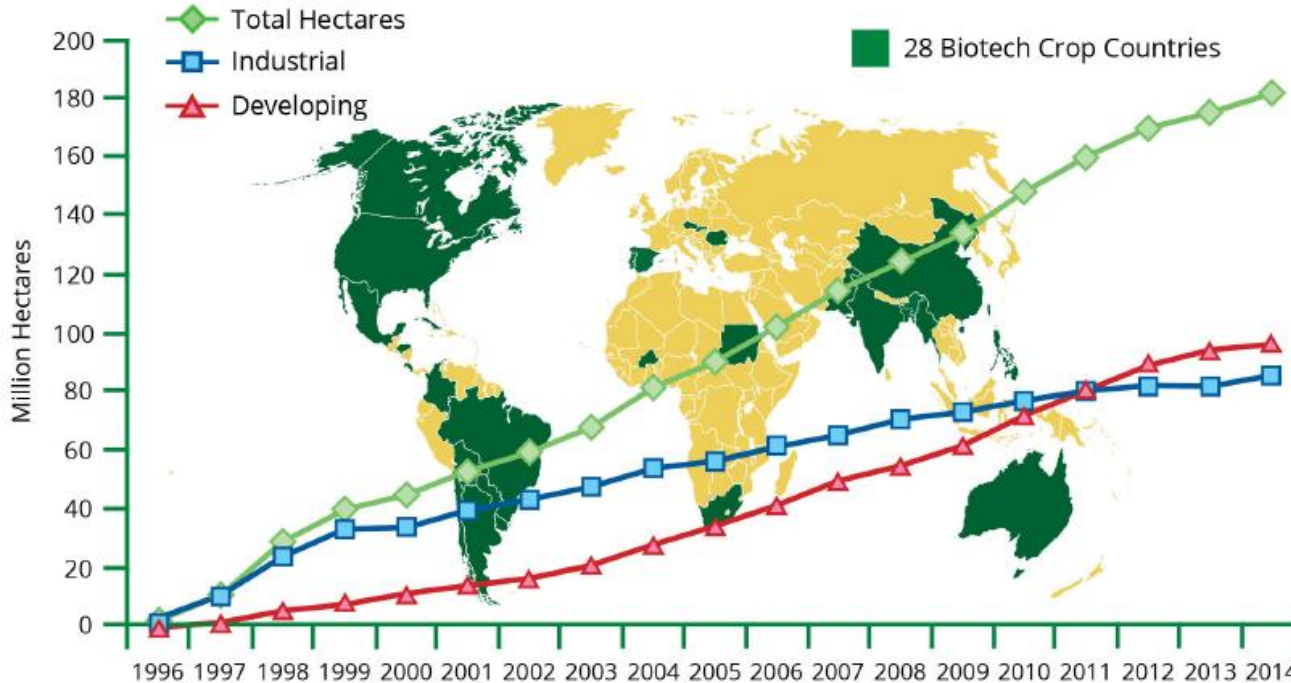
GMO pielietojuma kategorijas

- Izplatīšana vidē (*deliberate release*) – jebkura darbība, kuras rezultātā GМО nonāk vidē (runa ir par autorizētiem GМО konkrētam mērķim)
- Ierobežota izmantošana (*contained use*) – attiecas uz GМО, kuri tiek izmantoti pētniecības vajadzībām kontrolētos apstākļos
- Autorizēšanas veids - pielietojums pārtikā, dzīvnieku barībā, kā izejviela rūpnieciskai ražošanai, kultivēšana



ĢM kultūraugi pasaulē

GLOBAL AREA OF BIOTECH CROPS
Million Hectares (1996-2014)



2014. gadā – 181.5
miljoni ha

Salīdzinājumam:
Latvijas teritorija – 6.5
miljoni ha
Francijas teritorija –
67.5 miljoni ha
Kopējā
lauksaimniecības zemes
platība pasaulē 1400
miljoni ha

A record 18 million farmers, in 28 countries, planted 181.5 million hectares (448 million acres) in 2014, a sustained increase of 3 to 4% or 6.3 million hectares (~16 million acres) over 2013.

Source: Clive James, 2014.

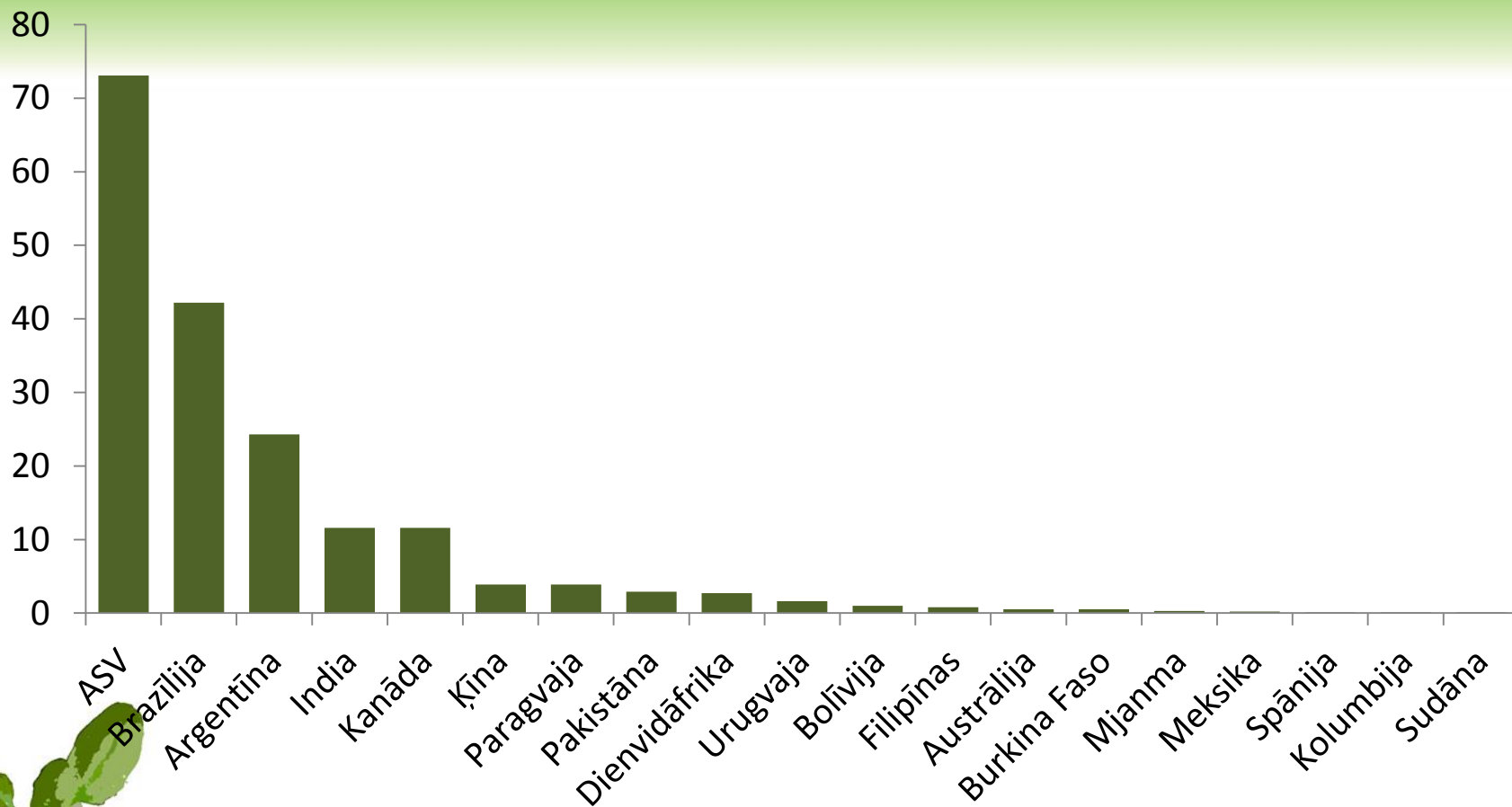
Ar ĢMO kultūraugiem apsēto platību pieaugums pasaulē

<http://www.isaaa.org>

ALFA



GMO audzēšanas platības 2014. gadā (miljoni ha)

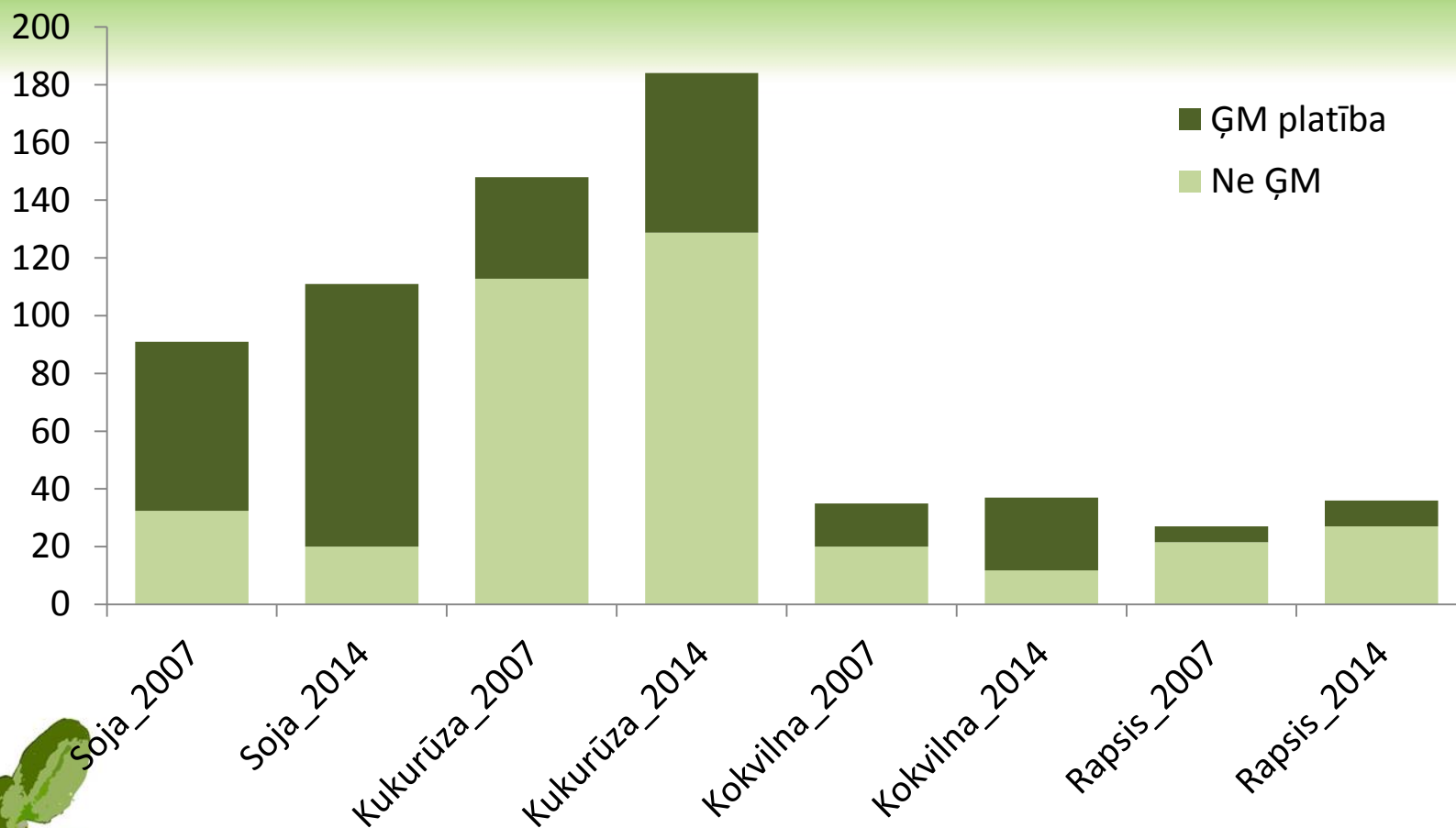


2016-07-23.

<http://www.isaaa.org>

ALFA

Galveno ĢM augu platība procentos no kopējās platības 2007. un 2014. gadā



<http://www.isaaa.org>

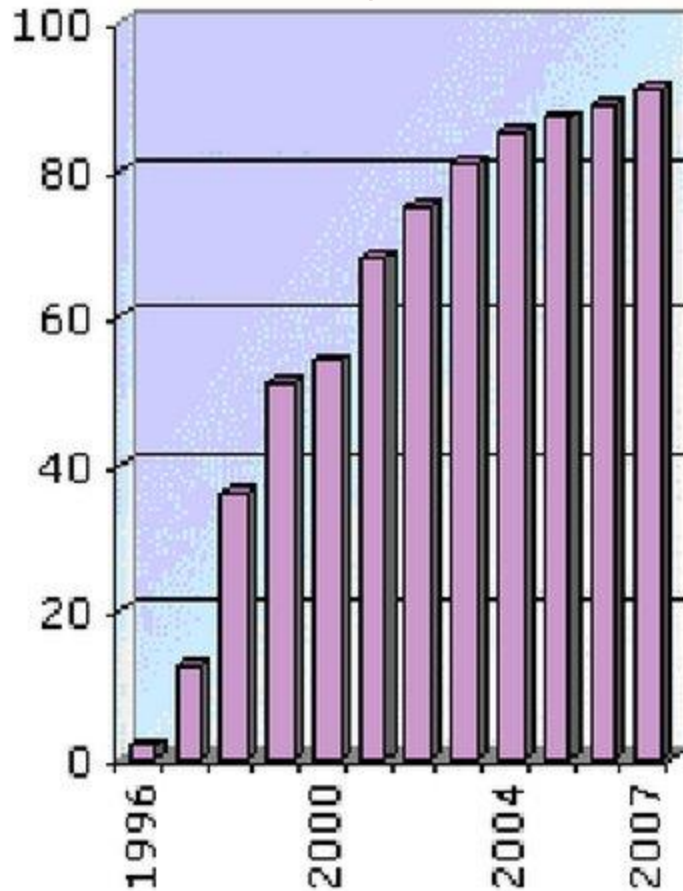


2014.07.23.

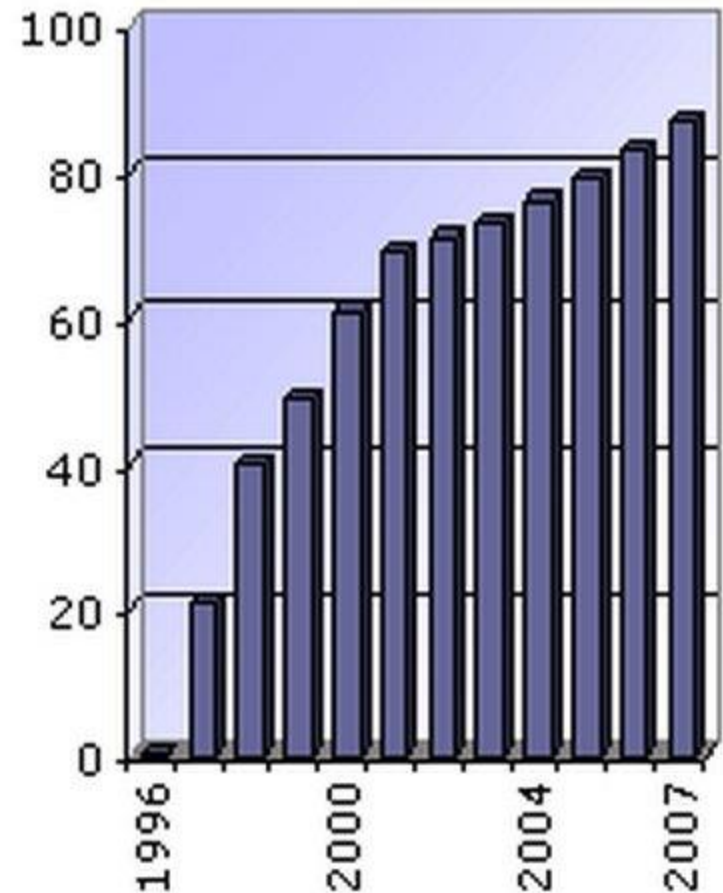
ALFA

ĢM kultūru platības ASV

Soja



Kokvilna

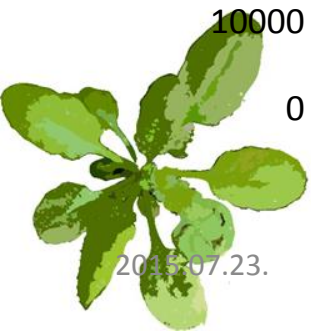
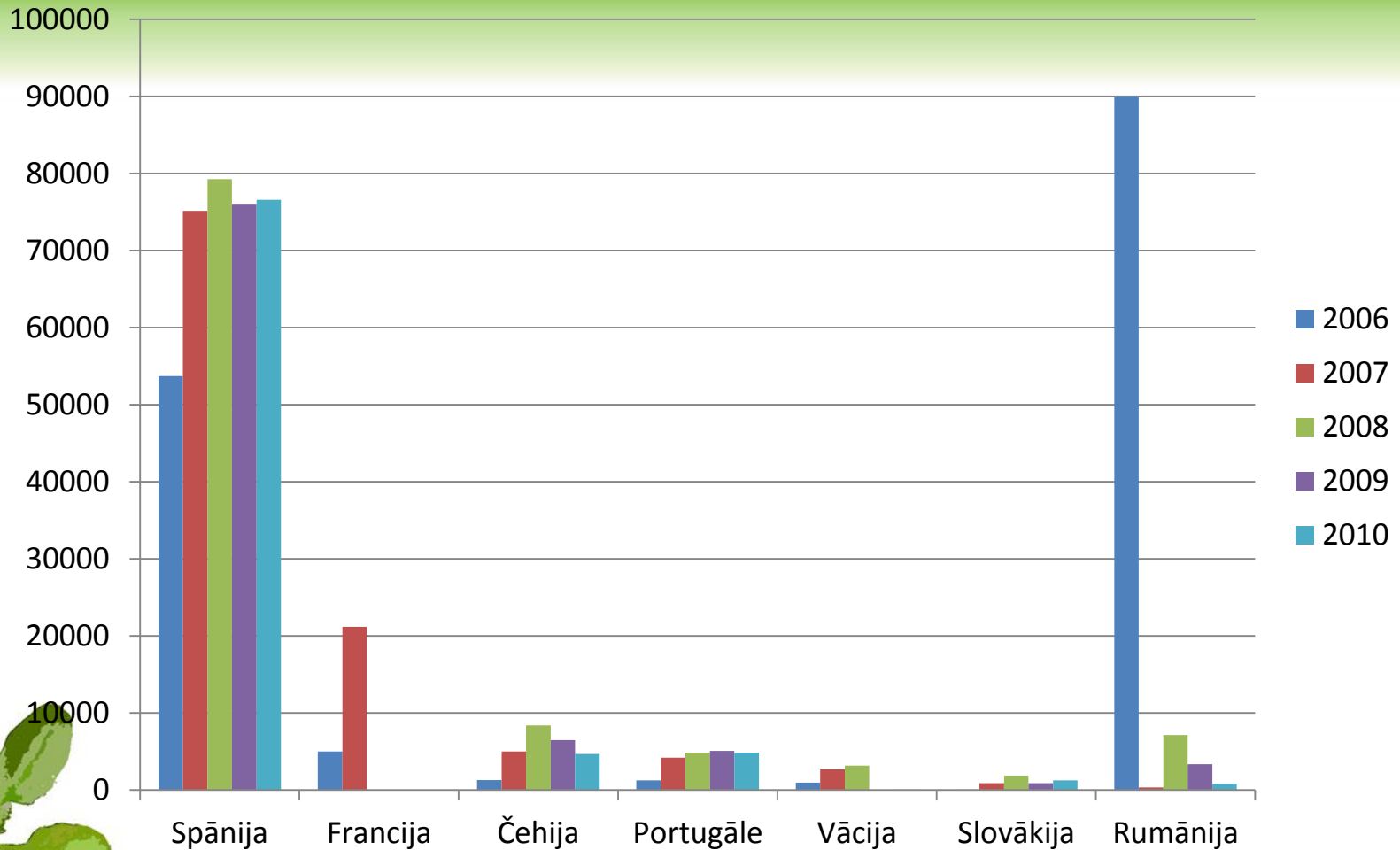


2016-07-23.

ALFA

<http://www.gmo-compass.org>

GM kultūras ES (ha)



2010-07-23.

<http://www.isaaa.org>

ALFA

GMO un Eiropas pārtikas nekaitīguma iestāde (EFSA)

- EFSA izveidota 2002. gadā (Eiropas Parlamenta un Padomes Regula Nr. 178/2002)
- Eiropas Savienības pārtikas un dzīvnieku barības drošības risku novērtēšanas iestāde
- Sadarbībā ar dalībvalstu kompetentajām iestādēm EFSA sniedz neatkarīgu zinātnisku atzinumu par dažādiem ar pārtikas un dzīvnieku barības drošību saistītiem jautājumiem



ES autorizētās ĢMO kultūras

- Kukurūza – 29 (**1 kultivēšanai – MON810**)
- Kokvilna – 7
- Soja – 7
- Rapsis – 3
- Mikroorganismi – 2
- Cukurbietes – 1
- http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm



ES autorizētās ĢMO kultūras 29.04.2015.

- 10 jaunas autorizācijas, 7 atjaunotas autorizācijas un 2 neļķu importa autorizācijas
- Kukurūza – 3
- Soja – 5
- Kokvilna – 7
- Rapsis – 2

http://europa.eu/rapid/press-release_IP-15-4843_en.htm



GMO ražotāji

- Monsanto – 23 (cukurbietes, soja, rapsis, kukurūza, kokvilna)
- Bayer – 7 (soja, rapsis, kukurūza, kokvilna)
- Pioneer and Dow AgroSciences – 7 (kokvilna, kukurūza, soja)
- Syngenta – 8 (kukurūza)
- BASF – 1 (kartupelis, atsaukts)
- Ajinomoto Eurolysine SAS – 1 (*Brevibacterium*)
- NOVO Nordisk – 1 (*Saccharomyces cerevisiae*)
- http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm



Gēni un pazīmes

- Herbicīdu tolerance – ~22
 - Izturība pret insektiem – ~18
- Vairumā gadījumu - herbicīdu tolerances un insektu izturības kombinācija
- Antibiotiku rezistence – ~6
 - Izmainīta garša, kvalitāte, sastāvs - piemēram, kartupeļi ar zemu amilozes saturu, vai izmainītu taukskābju profilu



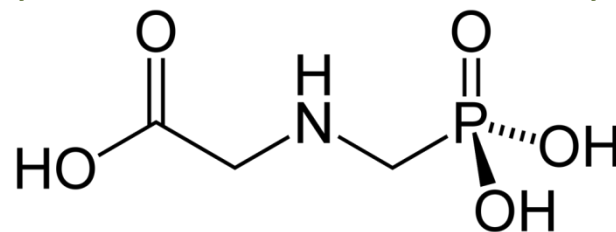
Herbicīdu tolerance – glifosāts

- Glifosāts (*Roundup* aktīvais komponents) ir sistēmisks herbicīds
- Darbības mehānisms saistīts ar enzīma 5-enolpiruvilšikimāta-3-fosfāta sintāzes (EPSPS) inhibīciju un attiecīgi aromātisko aminoskābju fenilalanīna, tirozīna un triptofāna biosintēzes kavēšanu
- Glifosāta tolerantie ĢM augi satur baktēriju gēnu vai arī modificētu augu *EPSPS* gēnu, kuri veido enzīmu, kuru glifosāts nespēj inhibēt

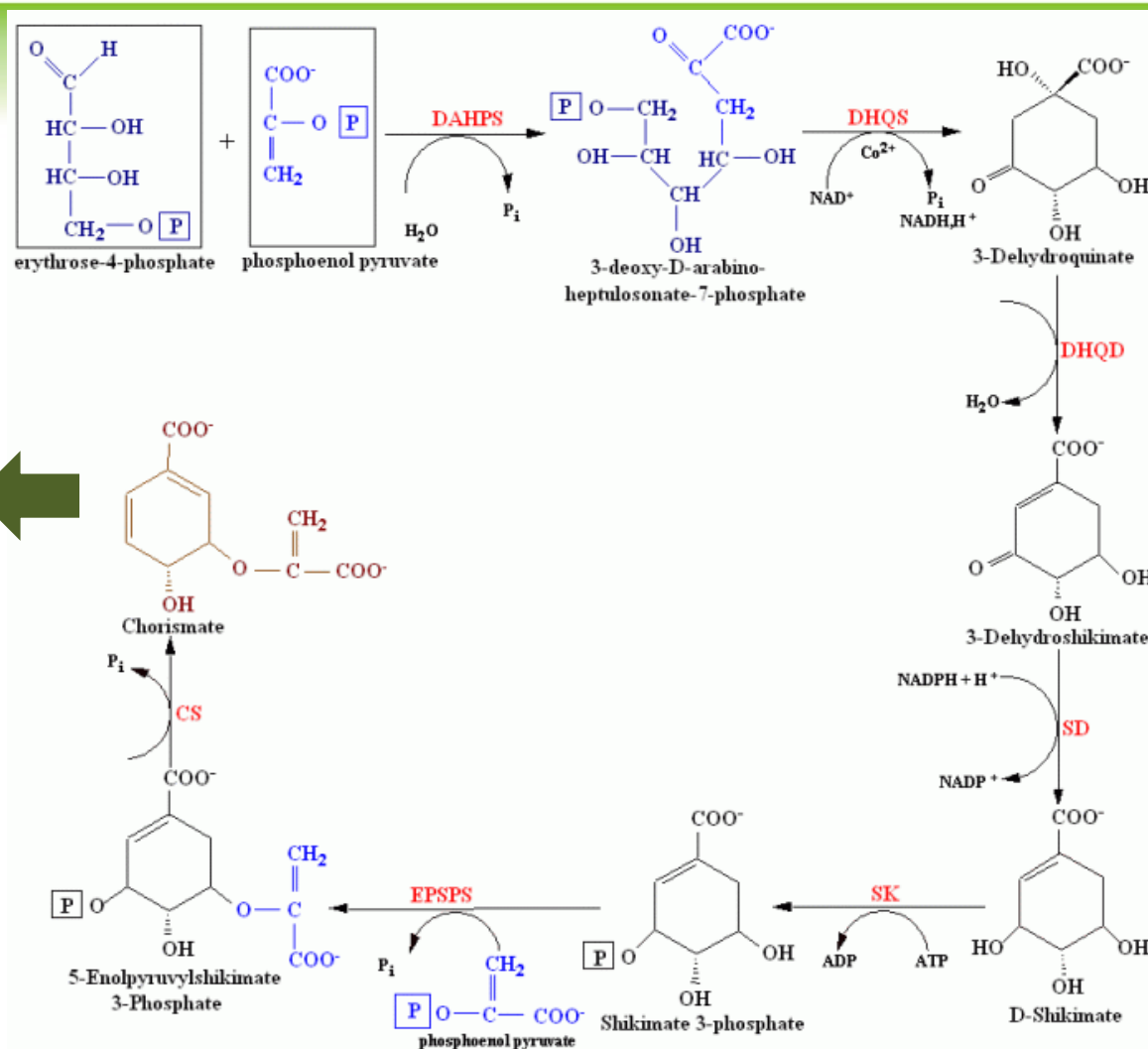


2019.07.23.

ALFA



Aromātisko aminoskābju biosintēze



Fenilalanīns
Tirozīns
Triptofāns
u.c.

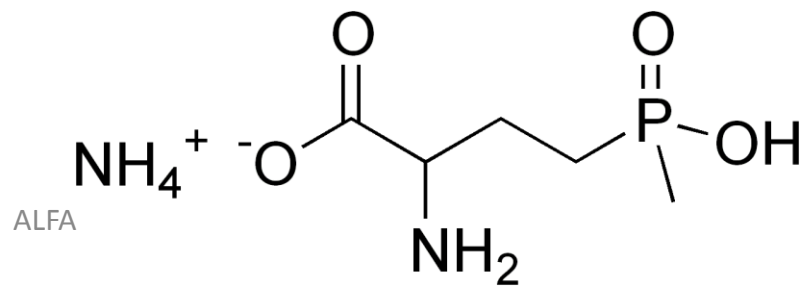


Herbicīdu tolerance – amonija glufosināts

- Fosfinotricīns (amonija glufosināts, Basta, Bialophos vai Liberty aktīvais komponents) ir sistēmisks herbicīds
- Darbības mehānisms saistīts ar glutamīna sintēzes inhibīciju un attiecīgi glutamīna sintēzes kavēšanu, kas noved pie samazināta glutamīna un paaugstināta amonija daudzuma augu audos un fotosintēzes inhibīcijas
- Pret fosfinotricīnu tolerantie ĢM augi satur no baktērijām *Streptomyces hygrosopicus* vai *S. viridochromogenes* iegūtu *bar* gēnu, kas kodē enzīmu fosfinotricīna acetiltransferāzi (PAT)



2019.07.23.



Kukaiņu rezistence

- Augsnes baktērija *Bacillus thuringiensis* veido daudzus dažādus proteīnu dabas toksīnus, kas specifiski iedarbojas uz noteiktām kukaiņu grupām
- Dabiskie Bt toksīni nonāk kāpuru zarnu traktā, kur sārmainā vidē proteāžu klātbūtnē tiek aktivēti, saistās ar noteiktiem kāpuru zarnu šūnu receptoriem, un veido poras zarnu sienīnās novedot pie kāpuru bojāejas
- Bt toksīnu specifiskums attiecībā uz noteiktu kukaiņu grupu ir saistīts ar kukaiņu receptoriem, kas saista tikai noteiktus aktivētu Bt toksīnu veidus



Kukaiņu rezistence

- Zināmie Bt toksīni Cry un Cyt iedalās 32 grupās
- Bt toksīnu gēni ir modificēti, lai optimizētu to ekspresiju augu genomā, kurā tie tiek ievietoti
- Bt toksīni specifiski pret tauriņiem (*Lepidoptera*), mušām (*Diptera*), vabolēm (*Coleoptera*) un nematodēm
- ĢM augi var saturēt vairākus Bt toksīnu gēnus



Kombinēta herbicīdu tolerance un kukaiņu rezistence

- *Stacked events , stacks*
- Iegūst tradicionālā ceļā krustojot divas augu šķirnes, no kurām viena ir herbicīdu toleranta un otra izturīga pret kukaiņiem
- Hibrīdās sēklas ar *stacked events* ražos sēklas, kurās dažādas modifikācijas skaldīsies



GI perspektīvas Latvijā

- Fundamentālā zinātne – gēnu funkciju pētījumi, cilvēku, dzīvnieku un augu slimību molekulārie mehānismi
- Pielietojumi biomedicīnā, biotehnoloģijā un augu un dzīvnieku selekcijā – jaunu rekombinanto vakcīnu izstrāde, mikroorganismu metabolisma inženierija, jaunu molekulāro marķieru izstrāde augu un dzīvnieku selekcijai (bet ne ģenētiski modificēti kultūraugi vai dzīvnieki)



GI perspektīvas Latvijā

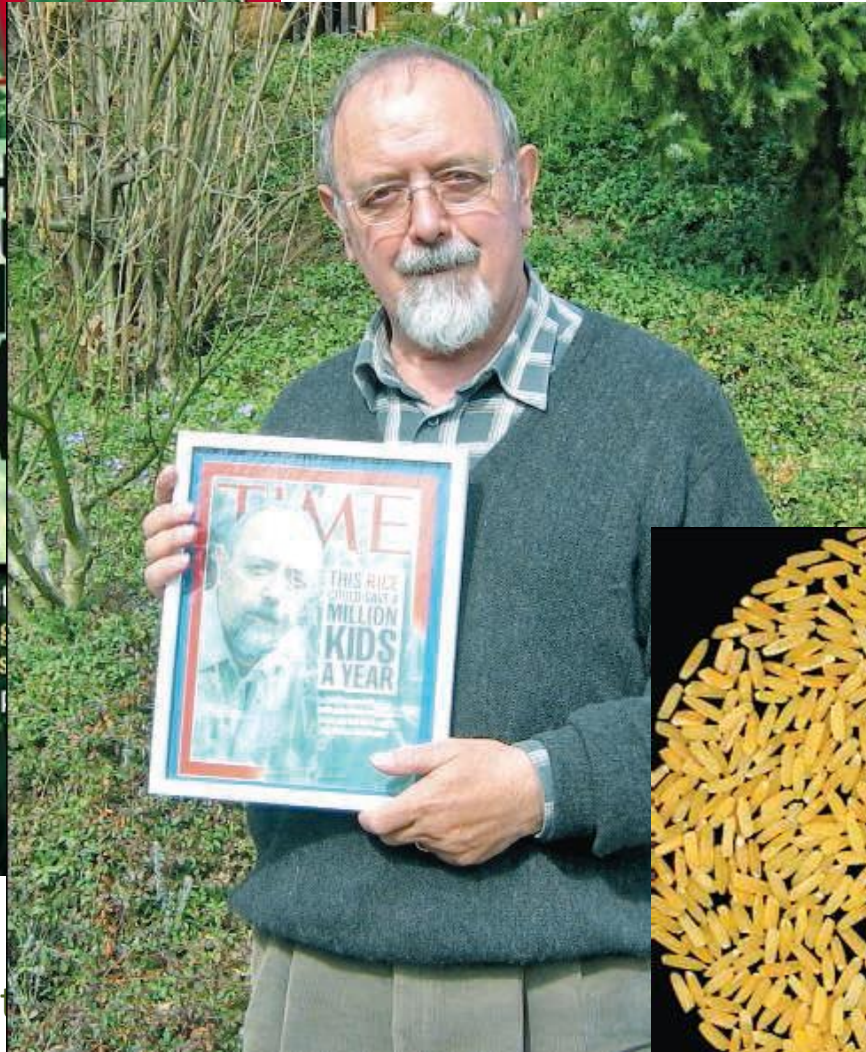
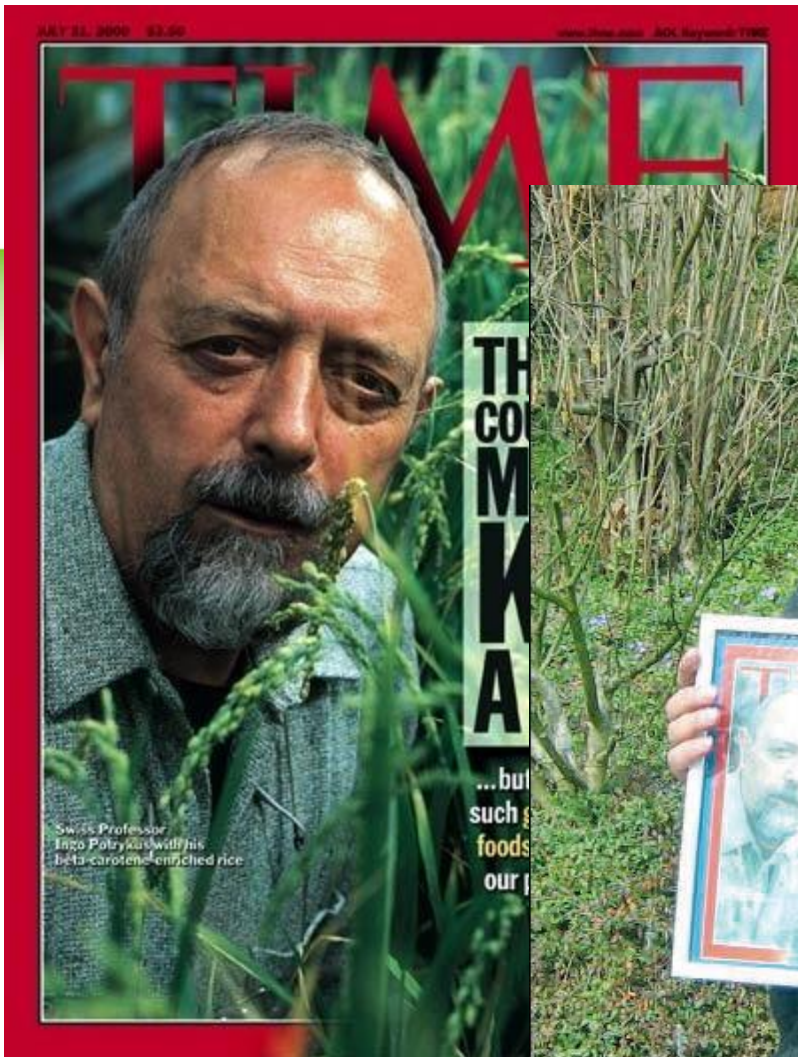
- Pētniecības iestādes, kurās izmanto GI metodes:
 - LU Bioloģijas fakultāte, LU BF Bioanalītisko metožu laboratorija
Mikroorganismu un augu gēnu inženierija
 - Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs
Rekombinanto vakcīnu izstrāde
 - LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūts
Mikroorganismu producentu inženierija



Nākamās paaudzes ĢMO

- Veselu metabolisma ceļu inženierija – Golden Rice I un Golden Rice II
- Slimību izturības pārnese no vienas šķirnes (sugas) citā
- Abiotiskā stresa tolerance
- Ievadīti nevis gēni, bet mikro RNS vai antisense RNS, kas regulē genomā esošos gēnus – soja ar augstāku oleīnskābes saturu (FDA autorizēta 11.06.2010)
- Precīzāka (laikā un telpā) transgēnu regulācija





<http://www.time.com/>

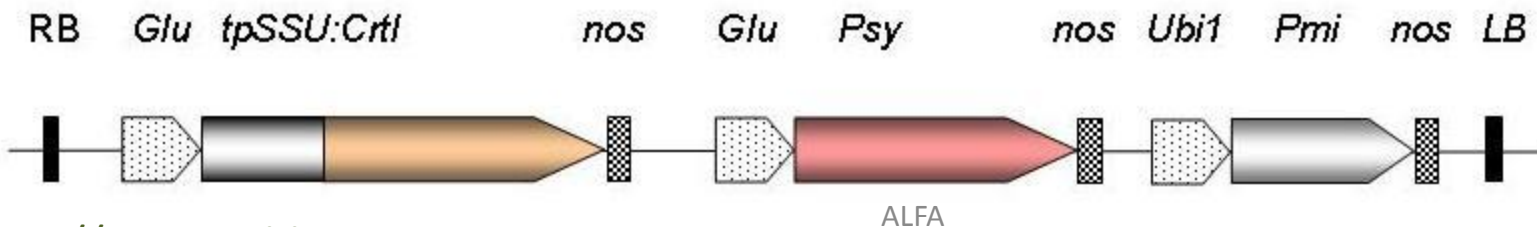
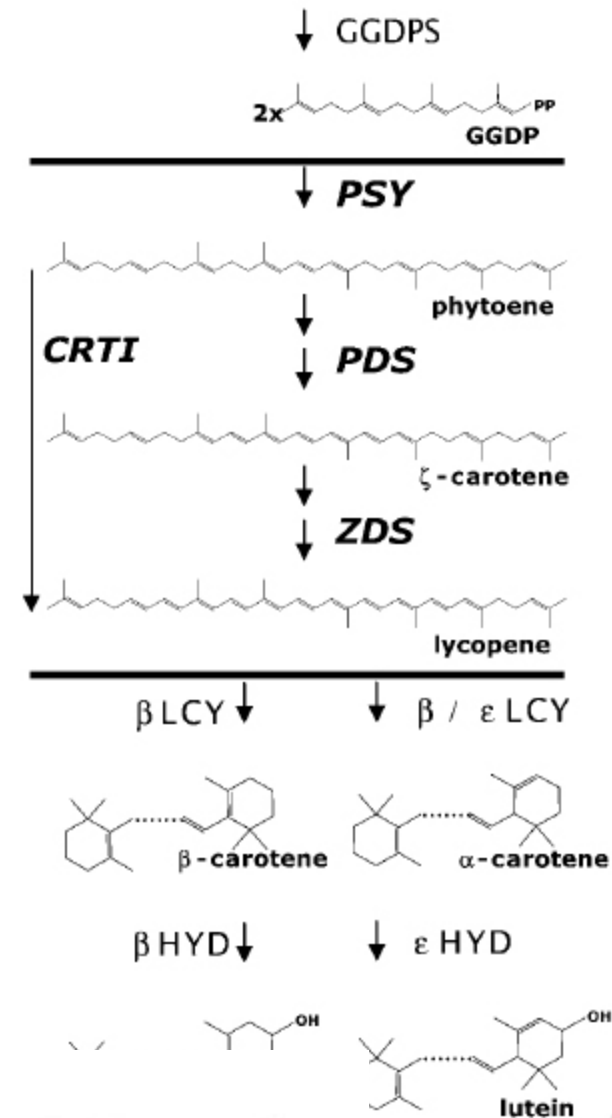
<http://www.sciencemag.org/cgi/content/summary/320/5875/468>

2016-07-23.

ALFA

Golden Rice zinātne

- Rīsi nesintezē β -karotīnu graudos
- Graudos trūkst divi β -karotīna biosintēzes enzīmi - fitoēnu sintāze (*psy*) and fitoēnu desaturāze (*crt I*)





NEWS VIDEO PEOPLE VOICES SPORT TECH LIFE PROPERTY ARTS + ENTS TRAVEL MOI

UK v / World v / Business v / People / [Science](#) / Environment v / Media v / Technology / Education v / Images / Obit

News > Science

Scientists behind 'golden rice' GM crop to receive humanitarian award from the White House



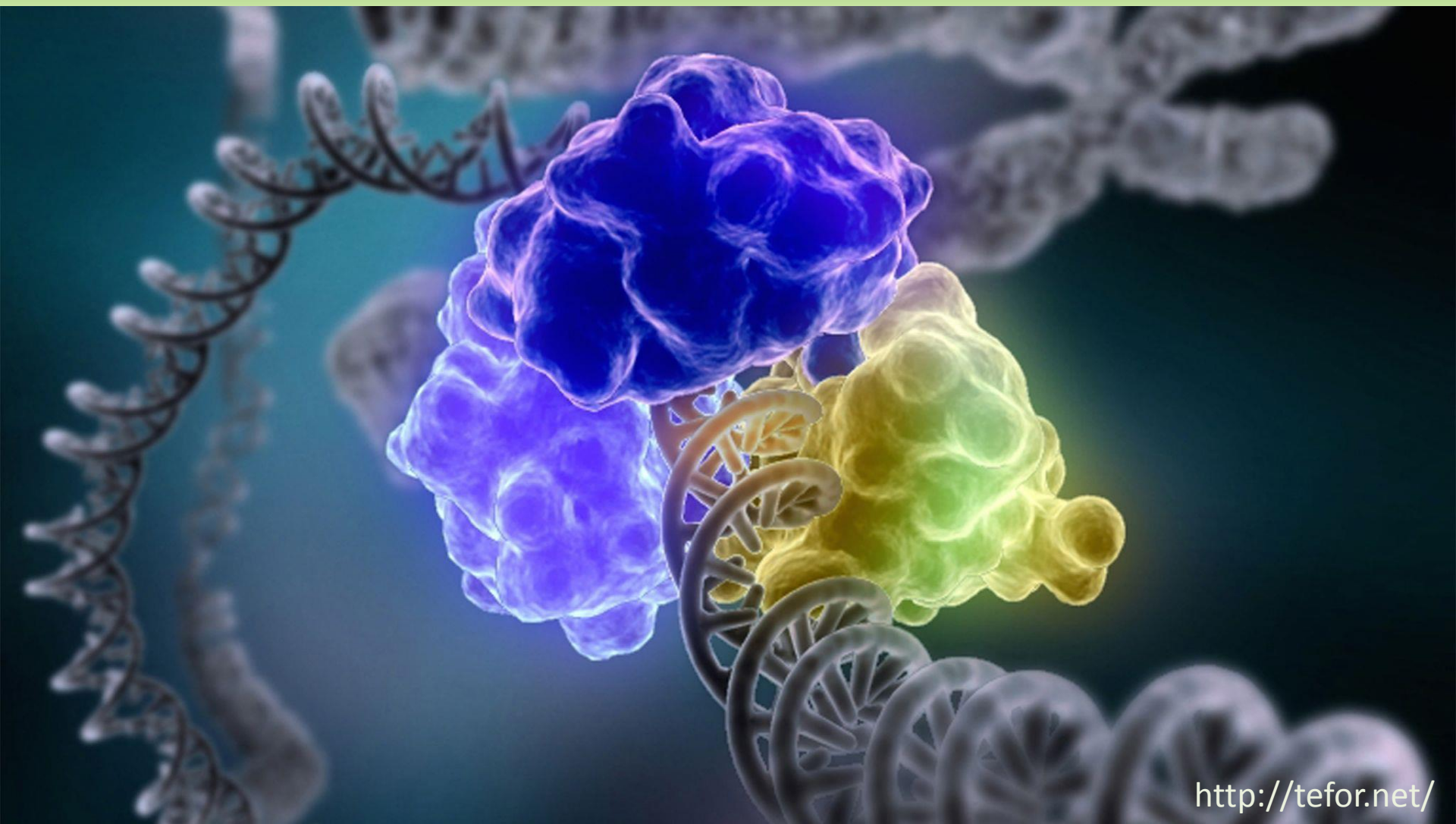
ALFA

The rice could become a staple food that saves millions of lives



2015-07-23.

Jaunas tehnoloģijas genomu modifikācijai



Gēnu inženiera sapnis

- Transgēna insercija precīzi definētā un raksturotā vietā
- Pēc vajadzības precīza dažu nukleotīdu insercija, delēcija vai aizvietošana, vai arī veselu gēnu ievietošana
- Stabila un garantēta transgēna ekspresija



Jaunas tehnoloģijas genoma modifikācijai

Eiropas Komisijas jauno tehnoloģiju darba grupa:

- Oligonukleotīdu virzītā mutāģenēze
- ZFN tehnoloģijas
- Cisģenēze un intraģenēze
- RNS atkarīgā DNS metilācija
- Sintētiskā genomika

http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/index_en.htm



Saitspecifiskās nukleāzes

Pēc iegūšanas veida:

- ZFN (*Zinc finger nucleases*)
- TALEN (*transcription activator-like (TAL) effector nuclease*)
- MN (*meganuclease*)
- CRISPR/Cas sistēma



ZFN un TALEN

- Ar gēnu inženierijas metodēm konstruēti enzīmi
- Sastāv no divām daļām:
 - DNS saistīšanas domēns
 - DNS šķelšanas domēns
- DNS saistīšanai tiek izmantots vai nu eikariotu cinka pirkstu transkripcijas faktoru vai baktēriju transkripcijas aktivatoriem līdzīgie proteīnu DNS saistīšanas domēns
- Zn pirkstu transkripcijas faktori visos eikariotos
- TALEN no baktēriju šūnām nonāk auga šūnās un regulē gēnu ekspresiju inficētajā augā



ZFN un TALEN DNS saistīšana

- Dabiskie Zn pirkstu transkripcijas faktori parasti satur 3 Zn pirkstus, no kuriem katrs atpazīst 3 n
- Modificētie Zn pirkstu transkripcijas faktori var saturēt 3 – 6 pirkstus (kopā atpazīst 9 – 18 n DNS)
- TALEN satur 33 – 35 aa atkārtojumus, kuros variablas parasti ir 2 aa, kuras atpazīst 1 bp. 2 aa sekvenci sauc par *repeat-variable di-residue* (RVD)
- Tipisks TALEN satur 12 – 30 atkārtojumus ar tādu pat skaitu RVD (kopā atpazīst 12 – 30 n)



ZFN un TALEN DNS saistīšana

- Gan Zn pirkstiem, gan RVD piemīt spēja atpazīt noteiktus nukleotīdus (kods), taču tā nav perfekta
- Dažos gadījumos noteiktas Zn pirkstu vai RVD kombinācijas nav iespējamās proteīnu struktūras problēmu dēļ
- Pastāv vairākas metodes, kā veidot jaunus ZFN un TALEN DNS saistīšanās domēnus, piemēram, SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), arī *in vitro* selekcija vai evolūcija

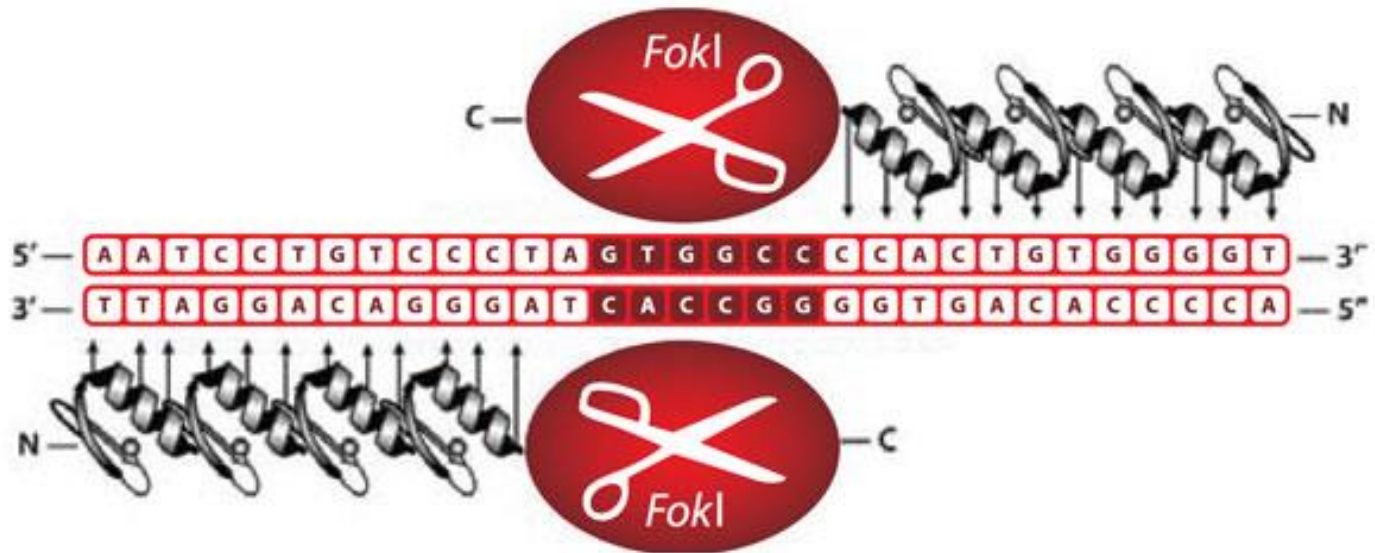


DNS šķelšanas domēns

- Parasti tiek izmantots DNS šķelšanas domēns no restrikcijas endonukleāzes *FokI* (*Flavobacterium okeanokoites*)
- IIS tipa restriktāze, kas šķeļ 9/13 n no atpazīšanas sekvences
- *FokI* darbojas kā dimērs un visefektīvāk darbojas, kad abi DNS saistīšanās rajoni ir atdalīti ar speiseri
- ZFN un TALEN arī tiek veidoti kā dimēri



ZFN



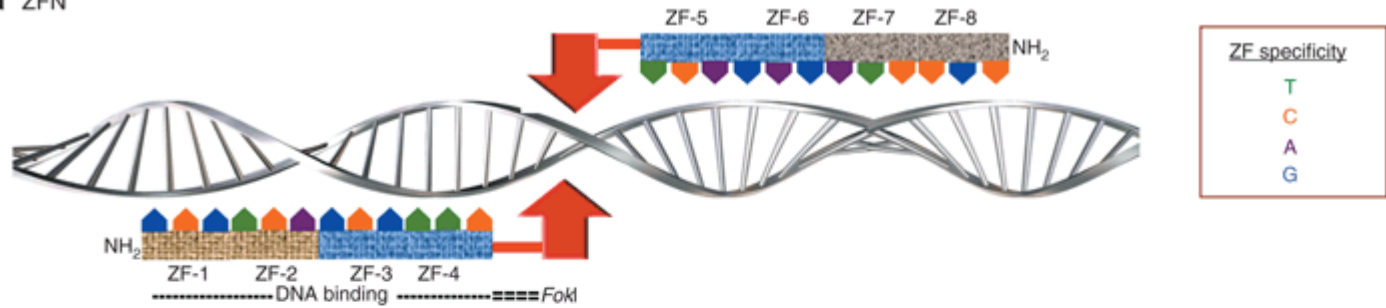
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/learning-center/biowire/biowire-fall-2010/zfn-technology.html>

2016-07-23.

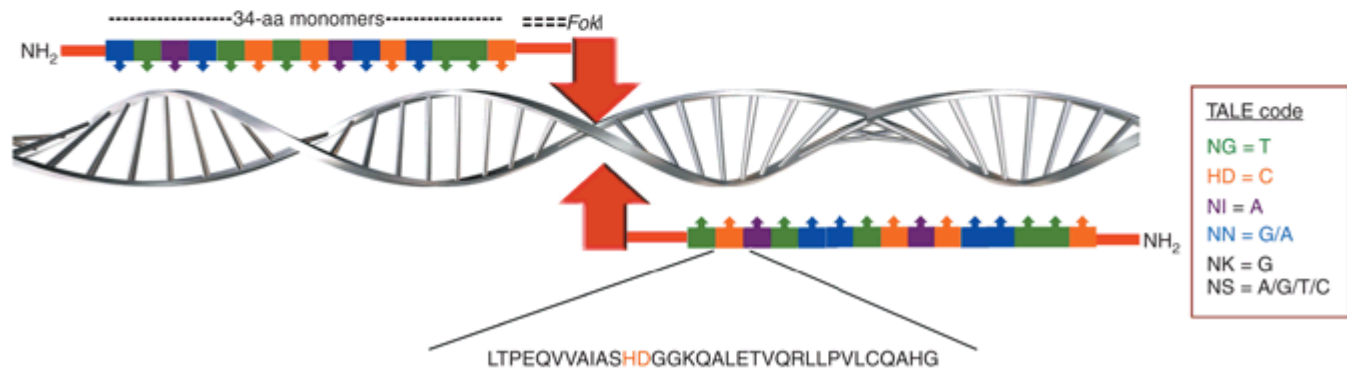
ALFA

ZF vs. TALEN

a ZFN



b TALEN



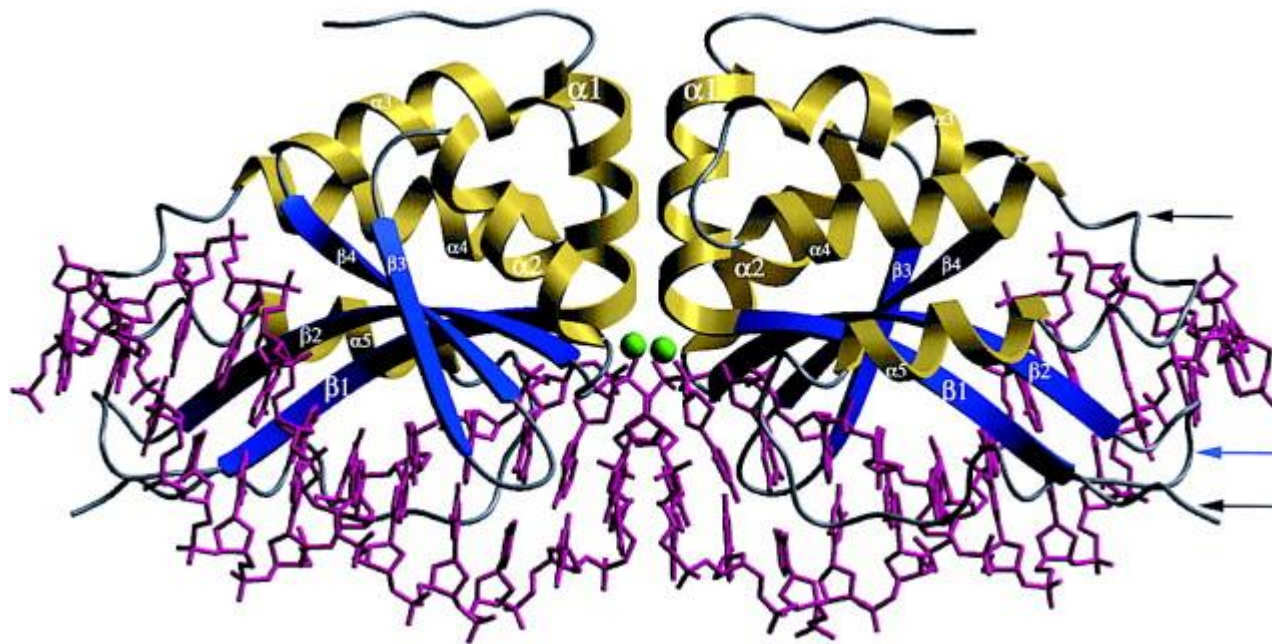
Carlson et al. (2012) Mol Therapy – Nucleic Acids, 1: e3

MN (LAGLIDADG nukleāze)

- Meganukleāzes vai *homing* nukleāzes
- Dabiski DNS restrikcijas enzīmi, kuri ir sastopami arheobaktērijās, baktērijās, sēnēs, aļģēs un atsevišķās augu grupās, kuri ir iekodēti intronos vai inteīnos
- Funkcionē kā homodimēri vai iekšēji simetriski monomēri
- Pazīst 14 – 40 bp garas DNS secības, taču DNS saistības un šķelšanas domēni nav skaidri nodalīti
- Dabiskais atpazīto DNS sekvenču spektrs ir neliels, bet to var palielināt



MN



Jurica et al. (1998) Mol Cell, 2:469

α -CrI-endonukleāzes komplekss ar 24 bp DNS fragmentu

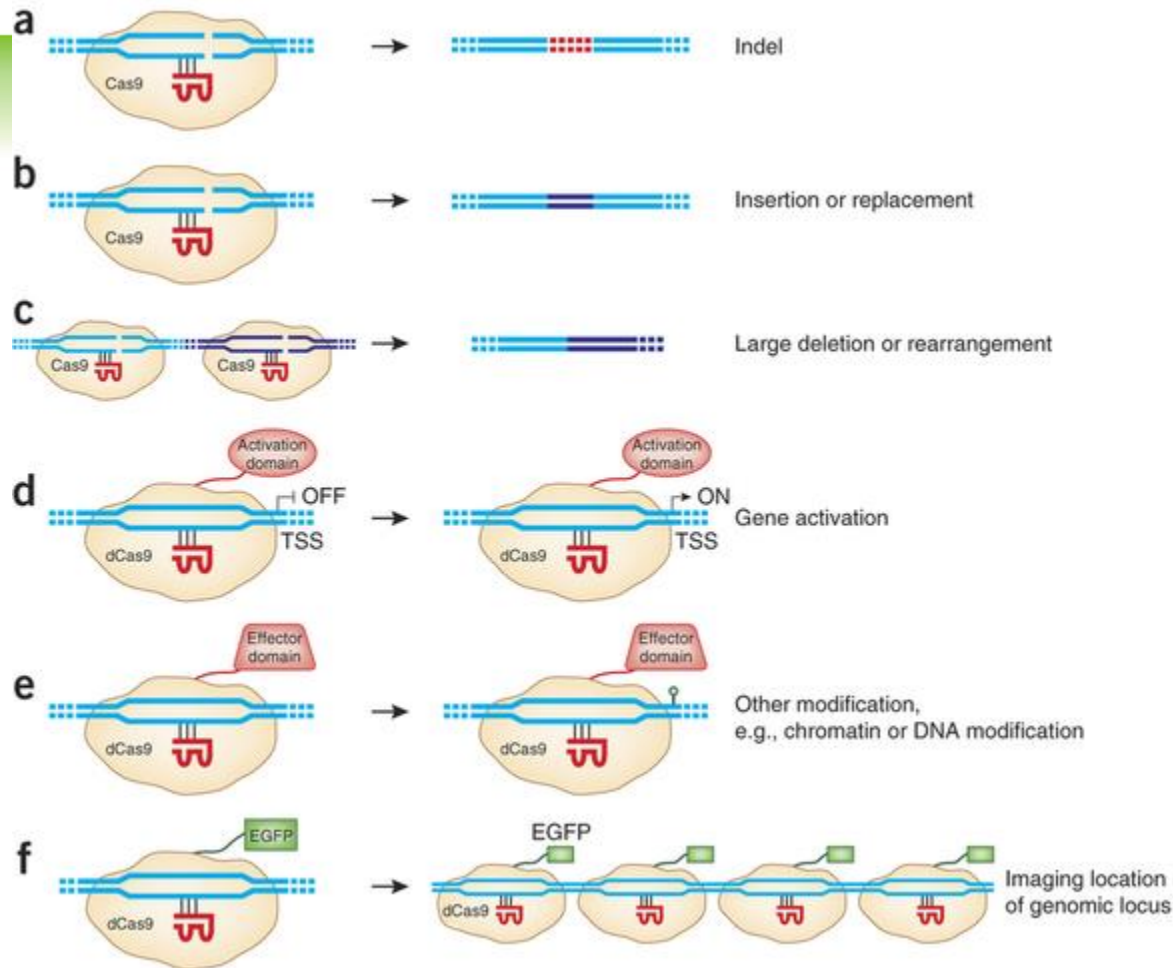
CRISPR/Cas sistēma

- CRISPR - *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*
- Baktēriju imūnā sistēma, kas nodrošina rezistenci pret svešiem DNS elementiem, piemēram, vīrusiem vai plazmīdām
- Pamatā ir Cas9 nukleāze, kura kompleksā ar nelielu RNS molekulu atpazīst un šķeļ noteiktas DNS sekvences
- Baktēriju Cas9 nukleāzi un nekodējošo RNS molekulu iespējams pārnest arī eikariotu genomos, kur atkarībā no RNS molekulas sekvences tiks atpazītas noteiktas kodola genoma sekvences

Cong et al. (2013) Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339: 819



CRISPR/Cas sistēmas pielietojumi



Katie Vicari

Saenger, J.D., and Joung, J.K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotech* 32, 347-355.

2019-07-23.

ALFA

Genoma modifikācijas scenāriji ar SDN

Pēc donora DNS klātbūtnes:

- Jā / nē

Pēc rekombinācijas veida:

- HR (*homologous recombination*)
- NHEJ (*non-homologous end joining*)

SDN scenāriji:

- SDN-1
- SDN-2
- SDN-3

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2943.htm>

SDN darbība

SDN komplekss piesaistīts
pie DNS mērķa sekvenču



nē

jā

jā

+ donora DNS

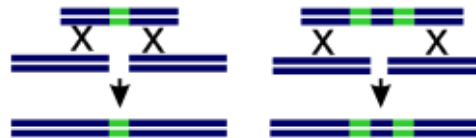
NHEJ



Nejauša DSB reparācija
Punktveida mutācijas,
dažāda izmēra delēcijas

SDN-1

HR



Gēna modifikācija
vienā vai vairākās
pozīcijās

SDN-2

HR

vai

NHEJ



DNS fragmenta insercija
homologās rekombinācijas (HR)
vai nehomologās DNS galu
savienošanas rezultātā (NHEJ)

SDN-3

Genoma modifikācija ar SDN

- SDN ievadišana šūnā (stabila vai transienta SDN kodējoša gēna ekspresija)
- SDN saistīšanās pie DNS specifiskā vietā
- DNS šķelšana (SDN nukleāzes aktivitāte)
- DNS reparācija izmantojot vai nu NHEJ, vai HR
- Modificēto genomu saturošo šūnu atlase un organisma reģenerācija



SDN darbības rezultāts

- SDN-1 un SDN-2 gadījumā genoma modifikācijas ir ļoti nelielas – noteiktās vietās dažu nukleotīdu insercija, delēcija vai nomainīšana
- SDN-3 gadījumā genomā tiek ienests papildus ģenētiskais materiāls (simti – vairāki tūkstoši bāzu pāru DNS) precīzi definētā vietā



Potenciālā ietekme

- SDN-1 un SDN-2 gadījumā genoma modifikācijas ir tehniski neatšķiramas no dabiskās ģenētiskās daudzveidības (ģenētiskās modifikācijas noteikšana ir apgrūtināta)
- SDN-3 gadījumā genomā tiek ienests papildus ģenētiskais materiāls precīzi definētā vietā, kas atvieglo ģenētiskās modifikācijas noteikšanu un tās ietekmes raksturojumu



GMO regulācija ES

- Katrs GMO ir individuāls gadījums, katram GMO savs risku novērtējums
- Riska novērtējumā ietilpst molekulārais raksturojums, tai skaitā
 - insertētās DNS raksturojums;
 - insercijas vietas raksturojums;
 - nejaušu ORF veidošanās insercijas vietās;
 - saimniekorganisma gēnu inaktivēšana



SDN ietekme uz ĢMO regulāciju ES

- EFSA turpinās izmantot esošās vadlīnijas, lai regulētu SDN-3 gadījumus, taču *«on a case-by-case basis lesser amounts of event-specific data may be needed for the risk assessment of plants developed using SDN-3 technique»*
- Pagaidām nav skaidra nostāja SDN-1 un SDN-2 gadījumos



SDN pielietojums

- ZFN pielietojums, lai kukurūzai piešķirtu herbicīdu toleranci un samazinātu fitātu biosintēzi

Shukla et al. (2009) Nature, 459: 437



SDN pielietojums

- TALEN pielietojums, lai inaktivētu sivēnu LDL receptora gēnu izveidojot dzīvnieku hiperholesterolemijas modeli

Carlson et al. (2012) PNAS, doi: 10.1073/pnas.1211446109



Photo Courtesy of
the American Livestock Breeds Conservancy



ALFA

<http://priede.bf.lu.lv/grozs/Mikrobiologijas/Nils/Files/ALFA2015/>



2019.07.23.

ALFA