



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΑΤΡΩΝ
UNIVERSITY OF PATRAS

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Βιοτεχνολογία (ENE_610)

Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος

Υπεύθυνη διδάσκουσα:

Δρ Παναγιώτα Σταθοπούλου, Βιολόγος

Επίκουρη Καθηγήτρια

panstath@upatras.gr, panayotastathopoulou@gmail.com

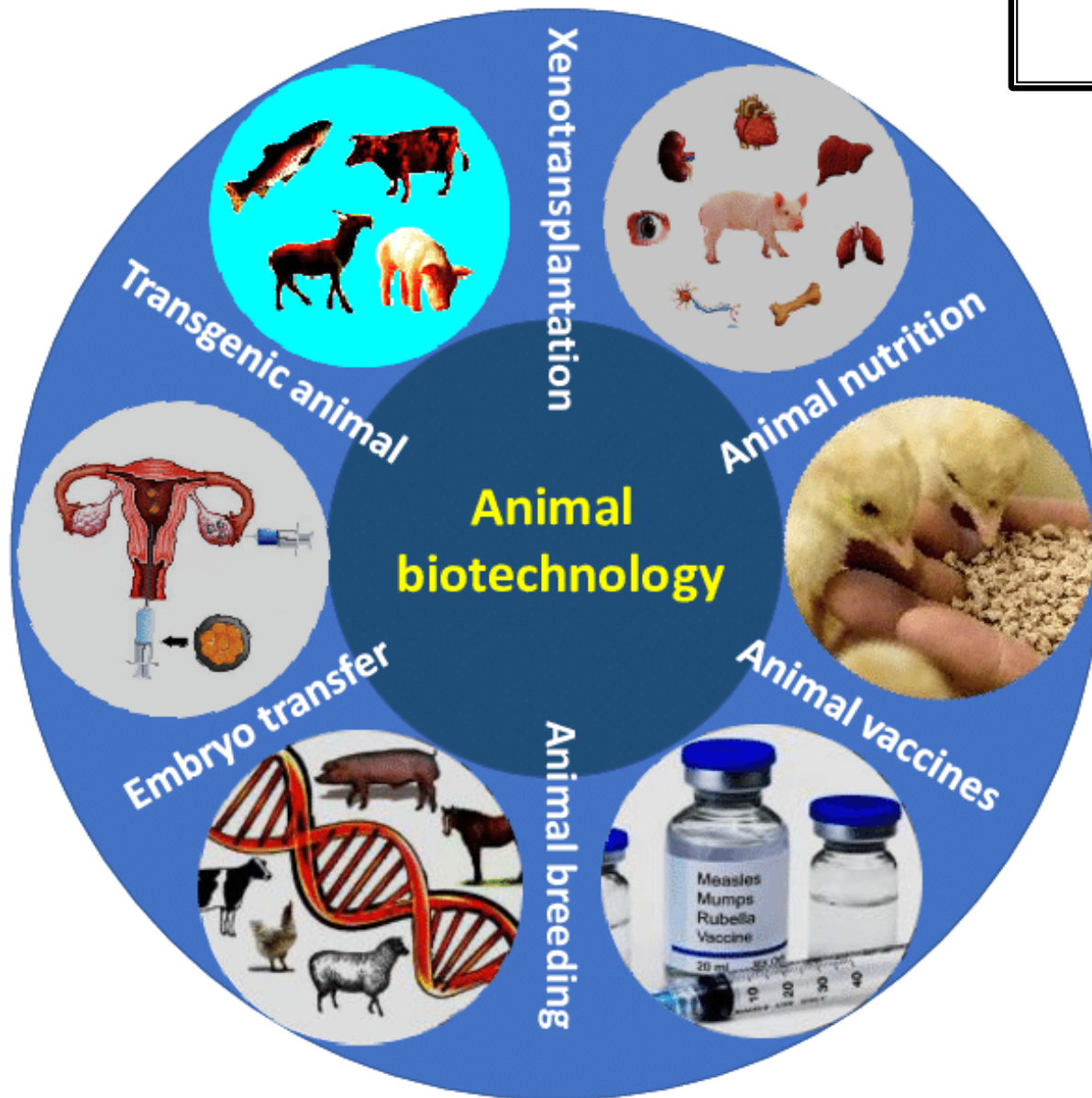
Τηλ: 2641074152



Βιοτεχνολογία Ζώων



Βιοτεχνολογία Ζώων



Η **ζωική βιοτεχνολογία** είναι ένας κλάδος της βιοτεχνολογίας στον οποίο χρησιμοποιούνται τεχνικές μοριακής βιολογίας για τη **γενετική μηχανική (δηλαδή τροποποίηση του γονιδιώματος) των ζώων** προκειμένου να βελτιωθεί η καταλληλότητά τους στην κτηνοτροφία, ιατρική, φαρμακοβιομηχανία και στην έρευνα.

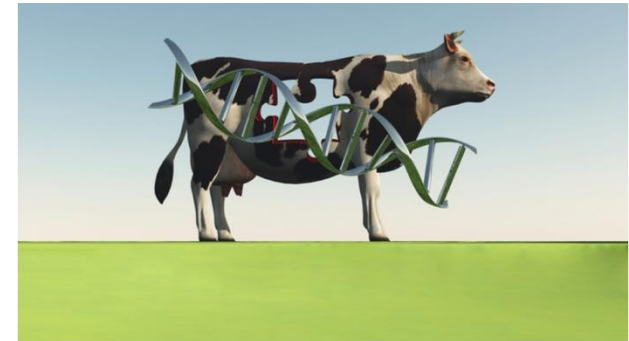
Βιοτεχνολογία Ζώων

Διαγονιδιακά ζώα

Οργανισμός που το γονιδίωμα του:

- έχει τροποποιηθεί με την εισαγωγή «ξένου DNA» (διαγονίδιο)
- Το ξένο γενετικό υλικό μεταβιβάζεται στη συνέχεια στους απογόνους

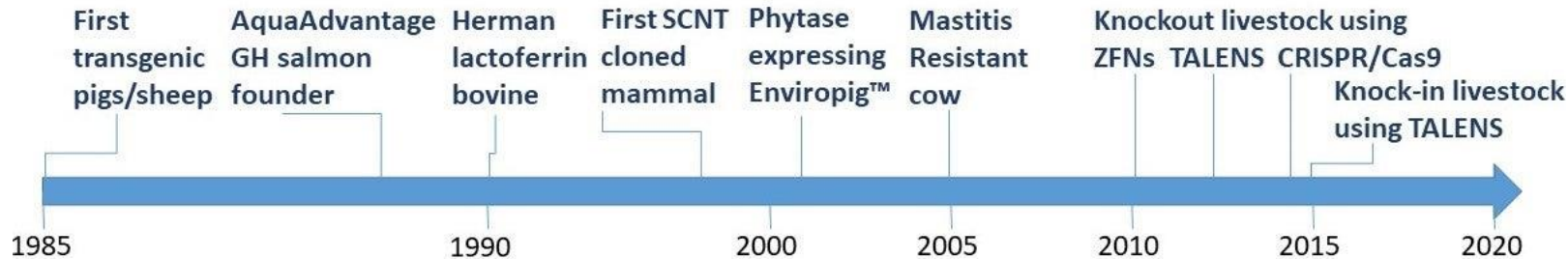
- Έκφραση ενός εξωγενούς γονιδίου
- Υπερέκφραση ενός ενδογενούς γονιδίου



Για την μεγαλύτερη παραγωγή διαγονιδιακών ζώων, εναλλακτικός τρόπος είναι η κλωνοποίηση των ζώων.

Βιοτεχνολογία Ζώων

Διαγονιδιακά ζώα – ιστορική αναδρομή



Microinjection of DNA into early stage zygotes



Precomplexing DNA with sperm (SMGT)



Retroviral delivery into zygotes



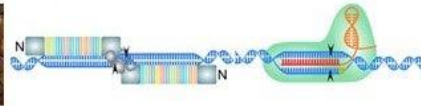
SCNT of genetically engineered cells



Transposon-mediated integration



Genome editing-based genomic alterations (ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9)



History of transgenic animal production

- 1970's, first transgenic mice via viral infection, but not germline transmission
- 1980's, first transgenic mice via microinjection, the most popular technique
- 1985, first transgenic rabbits, sheep, pigs and cattle
- 80-90, commercial transgenic services, via transgenic facility
- 1990's, transgenic farm animal companies as bioreactors and organ donors

Βιοτεχνολογία Ζώων

Σύγκριση μεθόδου ελεγχόμενης διασταύρωσης και δημιουργίας διαγονιδιακών οργανισμών
Κοινός στόχος: η αύξηση και βελτίωση της φυτικής και ζωϊκής παραγωγής.

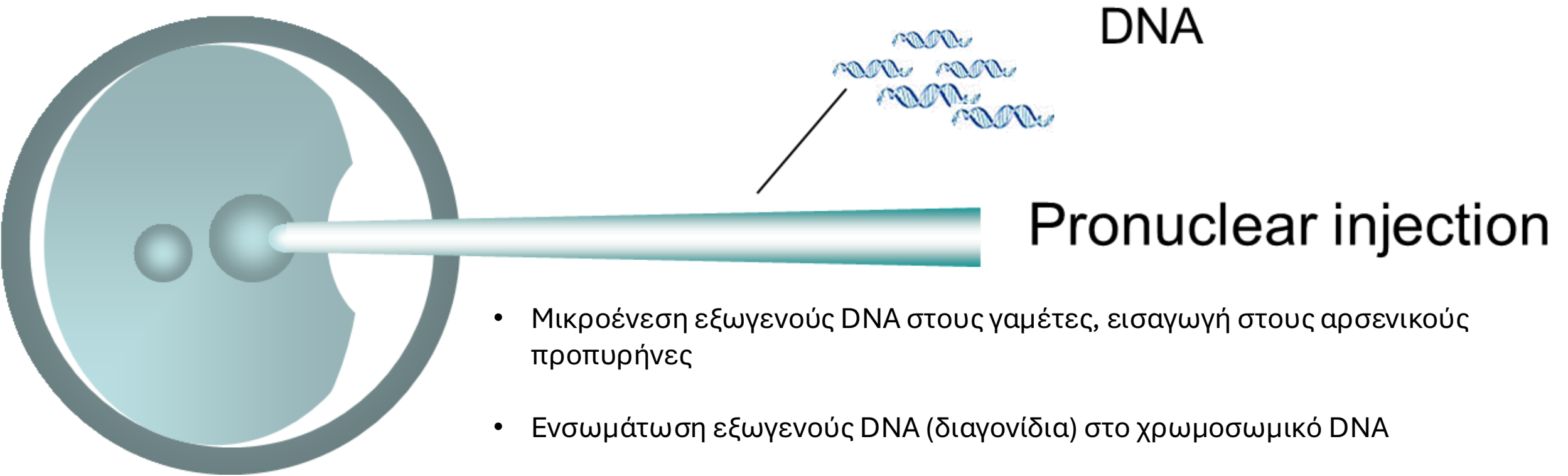
Μέθοδος ελεγχόμενης διασταύρωσης	Δημιουργία διαγονιδιακών οργανισμών
Χρονοβόρα και επίπονη μέθοδος διότι απαιτούνται συνεχείς διασταυρώσεις.	Ταχύτατη μέθοδος.
Δεν γίνεται προσθήκη νέων γονιδίων. Απλώς διατηρούνται ήδη υπάρχοντα και μεταφέρονται από γενιά σε γενιά.	Προσθήκη νέων γονιδίων απευθείας στον οργανισμό (γενετική τροποποίηση).
Οι νέοι οργανισμοί μπορούν να φέρουν και μη επιθυμητά χαρακτηριστικά.	Επιλογή και προσθήκη μόνο των επιθυμητών χαρακτηριστικών στους νέους οργανισμούς.
Δεν δημιουργούνται ηθικά διλήμματα από την εφαρμογή της.	Δημιουργούνται ηθικά διλήμματα από την εφαρμογή της που αφορούν στις επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου καθώς και στο περιβάλλον.

Βιοτεχνολογία Ζώων

Διαγονιδιακά ζώα – τρόποι παραγωγής

- Προπυρηνικός εμβολιασμός (pro-nuclear injection)
- Εμβρυικά βλαστοκύτταρα (embryonic stem cells)
- Μεταφορά του κυτταρικού πυρήνα (nuclear transfer)
{πιο συχνή, γνωστή και ως κλωνοποίηση}
- Φορείς ρετροϊών (retrovirus vector)

- Προπυρηνικός εμβολιασμός (pro-nuclear injection)



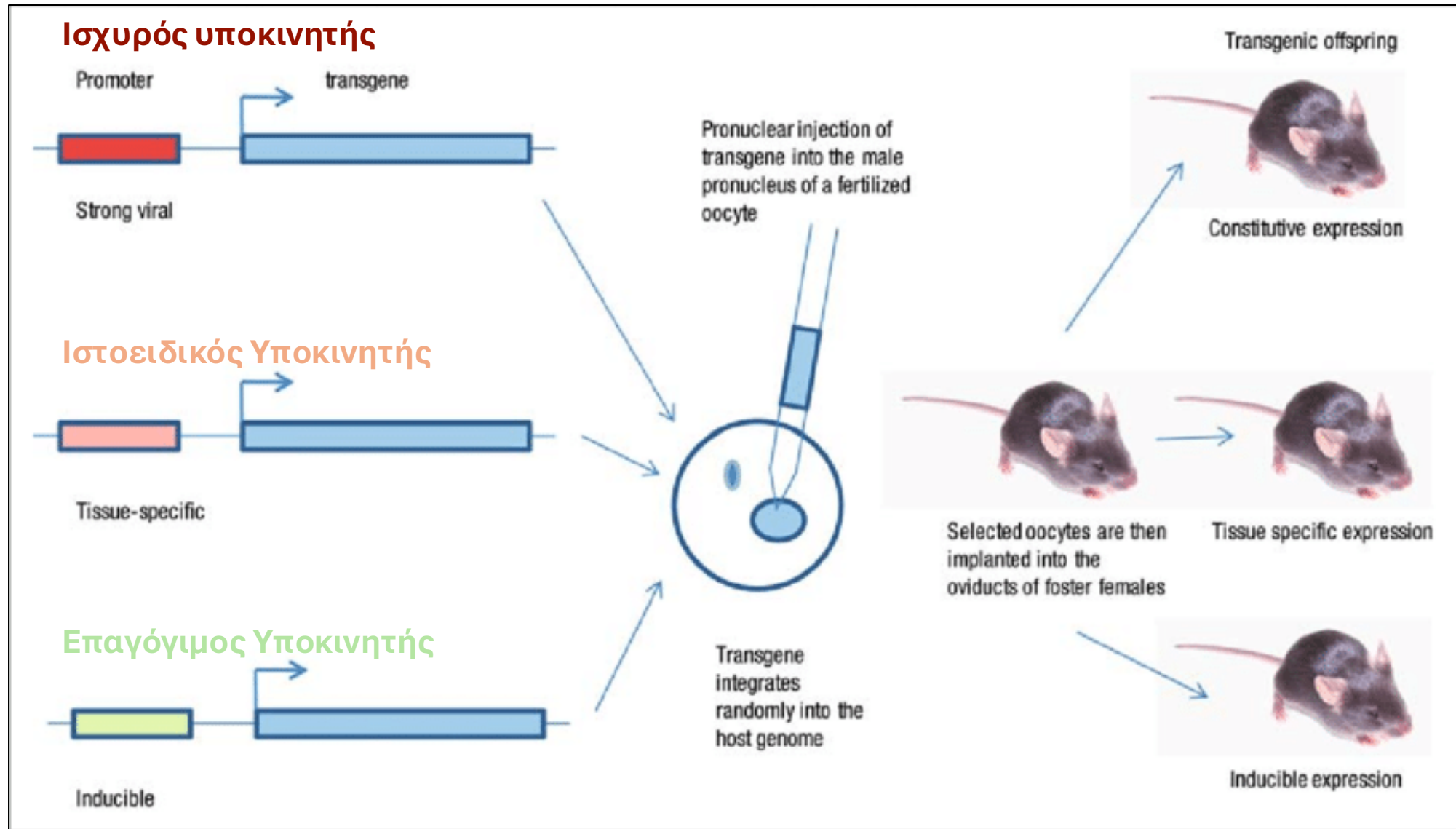
- Μικροένεση εξωγενούς DNA στους γαμέτες, εισαγωγή στους αρσενικούς προπυρήνες
- Ενσωμάτωση εξωγενούς DNA (διαγονίδια) στο χρωμοσωμικό DNA
- Εμφύτευση στις ωοθήκες ενός ψευδοεγκυμονόντος θηλυκού ζώου
- Έλεγχος με PCR για την παρουσία του διαγονιδίου

- **Προπυρηνικός εμβολιασμός (pro-nuclear injection)**

Πολλές προσδοκίες αλλά....

- Δυσκολία στον χειρισμό και στην τροποποίηση πολύπλοκων γενετικών χαρακτηρισμών τα οποία ρυθμίζονται από πολλά γονίδια
- Δυσκολία στην εισαγωγή νέων γενετικών τόπων σε μεγάλους πληθυσμούς γονιδίων όπως είναι το γονιδίωμα ενός θηλαστικού
- Επιτρέπει μόνο την τυχαία ενσωμάτωση γονιδίων στη γενετική σειρά των κυττάρων
- Υψηλό ποσοστό των διαγονιδιακών σειρών δεν εκφράζουν αποτελεσματικά τα διαγονίδια εξαιτίας της «αποσιώπησης»

- Προπυρηνικός εμβολιασμός (pro-nuclear injection)



Συνεχής
έκφραση

Ιστοειδική
Έκφραση

Επαγόγιμη
Έκφραση

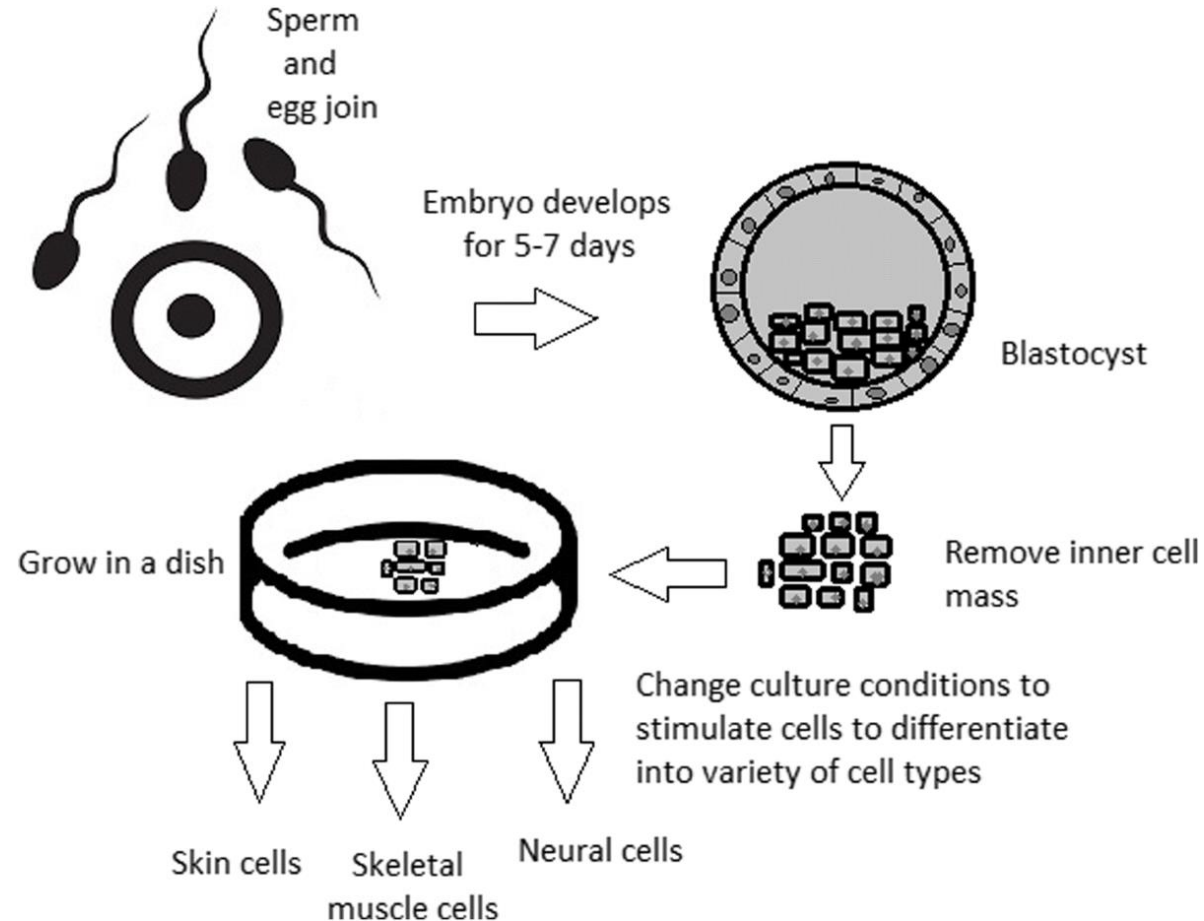
Βιοτεχνολογία Ζώων

Διαγονιδιακά ζώα – μειονεκτήματα

Μειονεκτήματα των μεθόδων είναι:

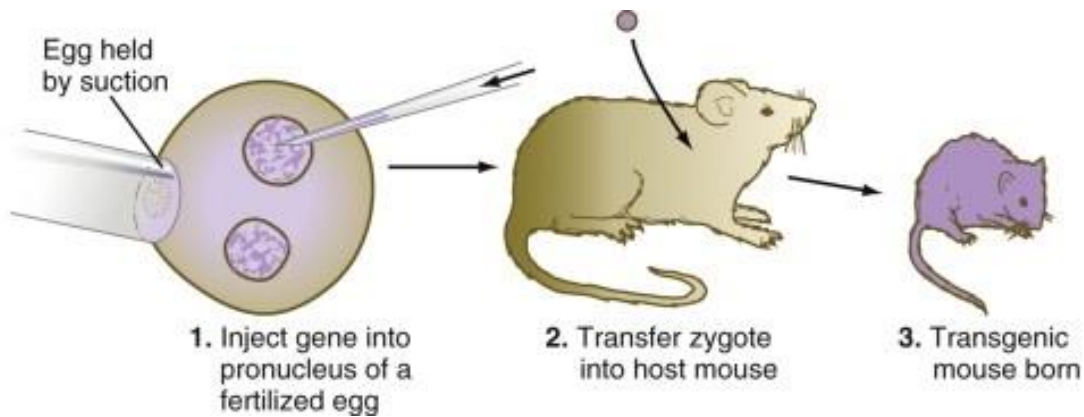
- Το εισαγόμενο DNA ενσωματώνεται τυχαία στο γονιδίωμα
- Τα ωάρια πρέπει να συλλεχτούν και να γονιμοποιηθούν in vitro
- Περισσότερα από ένα αντίγραφα μπορεί να ενσωματωθούν στο γονιδίωμα

- **Εμβρυικά βλαστοκύτταρα (embryonic stem cells)**

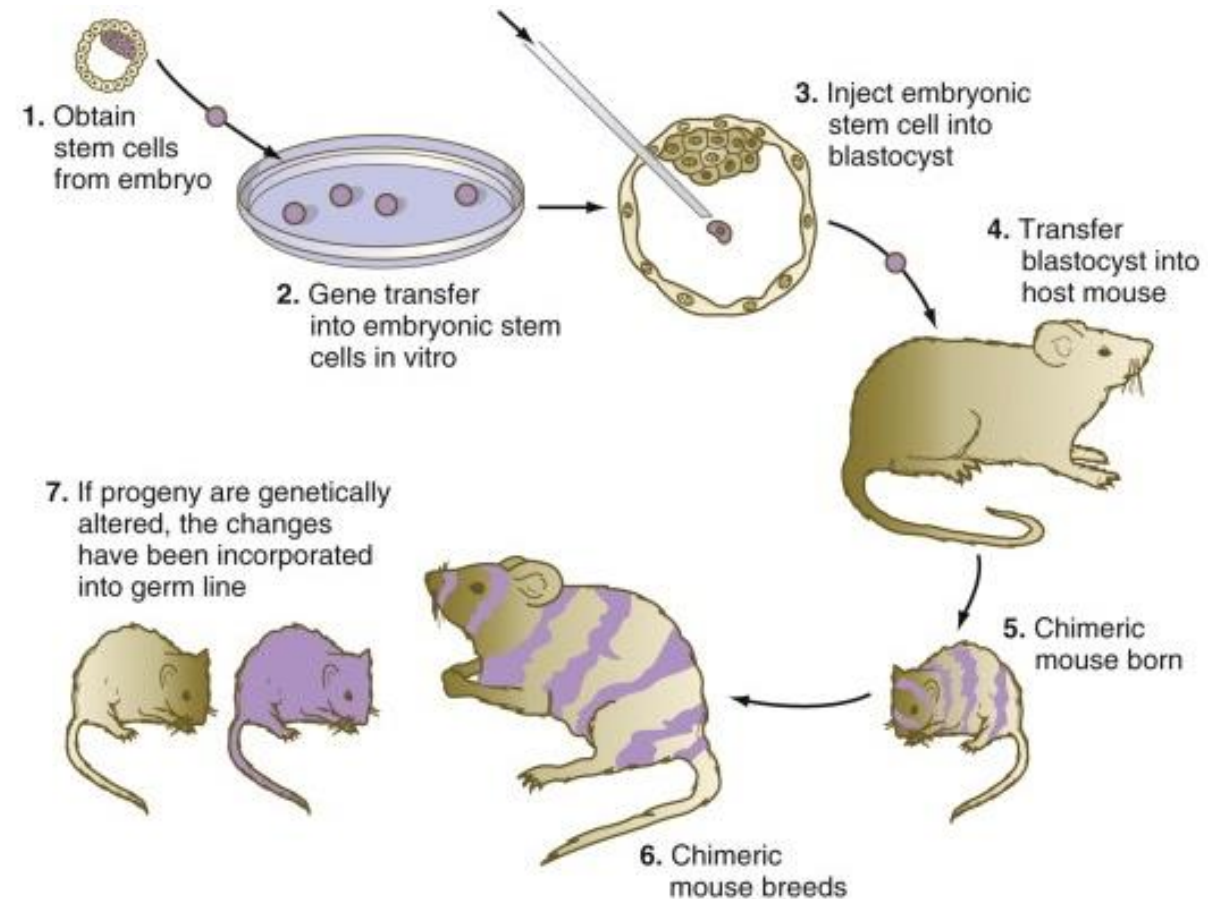


- Τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα λαμβάνονται από την εσωτερική μάζα των κυττάρων της βλαστοκύστης και τοποθετούνται σε καλλιέργεια
- In vitro πολλαπλασιασμός
- Εμβολιασμός σε εμβρυικές βλαστοκύστες – χίμαιρες
- Ζώα με γενετική τροποποίηση στα σωματικά κύτταρα ή στους γαμέτες

- Προπυρηνικός εμβολιασμός (pro-nuclear injection)



- Εμβρυικά βλαστοκύτταρα (embryonic stem cells)



Βιοτεχνολογία Ζώων

Διαγονιδιακά ζώα – κτηνοτροφία

(α) Γενετική βελτίωση. Με τη βοήθεια των διαγονιδιακών ζώων δημιουργούνται φυλές παραγωγικών ζώων με επιθυμητά χαρακτηριστικά (υψηλή γαλακτοπαραγωγή, υψηλός ρυθμός ανάπτυξης κλπ), σε συντομότερο χρόνο και με μεγαλύτερη ακρίβεια συγκριτικά με τις κλασσικές μεθόδους γενετικής βελτίωσης.

(β) Αύξηση παραγωγικότητας. Δημιουργούνται διαγονιδιακές αγελάδες που παράγουν περισσότερο γάλα ή γάλα με λιγότερη λακτόζη ή χοληστερόλη, διαγονιδιακοί χοίροι και βοοειδή με μεγαλύτερη αναλογία μυϊκής μάζας και πρόβατα που παράγουν περισσότερο μαλλί.

(γ) Ανθεκτικότητα στις ασθένειες. Γίνεται προσπάθεια να δημιουργηθούν ζώα ανθεκτικά σε ασθένειες

Βιοτεχνολογία Ζώων

Διαγονιδιακά ζώα – **ιατρική**

α) Μοντέλα μελέτης ανθρώπινων παθήσεων. Γενετικώς τροποποιημένα ζώα χρησιμοποιούνται ως μοντέλα για τη μελέτη ασθενειών όπως η νόσος Creutzfeldt-Jakob (νόσος των τρελών αγελάδων), το AIDS, ο καρκίνος κλπ

Nude mouse: Πρόκειται για φυλή μυών με συγγενή αλωπεκίαση στην οποία υπάρχει μικρός ή μηδενικός αριθμός συγκεκριμένου τύπου ανοσοκυττάρων έτσι ώστε να ευνοείται η ανάπτυξη όγκων.

Knockout mice: Διαγονιδιακές φυλές μυών στις οποίες έχει απενεργοποιηθεί ένα συγκεκριμένο γονίδιο.

Pigmentary mutants: Μελαγχρωστικά μεταλλαγμένα ποντίκια τα οποία έχουν ποικίλα χρώματα δέρματος.

(β) Δημιουργία ξενομοσχευμάτων. Διαγονιδιακοί χοίροι θα μπορούν να παράγουν ιστούς ή ακόμη και όργανα ως ξενομοσχεύματα για μεταμοσχεύσεις στον άνθρωπο.

(γ) Παραγωγή διατροφικών συμπληρωμάτων και φαρμακευτικών ουσιών. Βιολογικές ουσίες όπως η ινσουλίνη, η αυξητική ορμόνη, αντιπηκτικοί παράγοντες του αίματος θα μπορούν σύντομα να παράγονται ή παράγονται ήδη από το γάλα διαγονιδιακών αγελάδων, προβάτων ή αιγών.

(δ) Γονιδιακή θεραπεία. Η γονιδιακή θεραπεία βασίζεται στην προσθήκη ενός φυσιολογικού αντιγράφου ενός ανασυνδυσασμένου γονιδίου στο γονιδίωμα ενός ατόμου που φέρει ελαττωματικά αντίγραφα του γονιδίου. Τα διαγονιδιακά ζώα μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της επιστήμης στον τομέα αυτό.

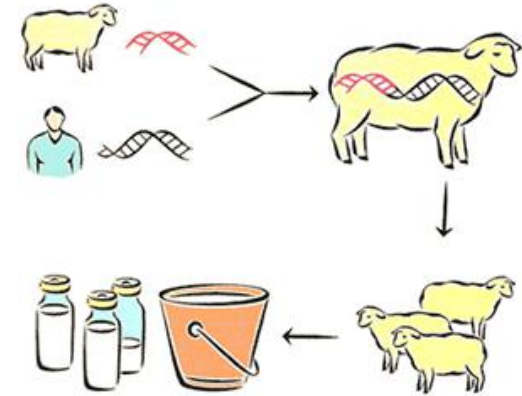
(ε) Τοξικολογικές δοκιμασίες. Έχουν δημιουργηθεί ευαίσθητα σε τοξικές ουσίες διαγονιδιακά ζώα, τα οποία χρησιμοποιούνται σε τοξικολογικές δοκιμασίες.

Βιοτεχνολογία Ζώων

Διαγονιδιακά ζώα – *gene pharming*

Παραγωγή φαρμακευτικών πρωτεϊνών (gene pharming).

Η μέθοδος στηρίζεται στην παραγωγή πρωτεϊνών από κύτταρα των μαστικών αδένων των ζώων, όπως προβάτων και αγελάδων, ώστε να είναι δυνατή η συλλογή της πρωτεΐνης από το γάλα των ζώων.



Βήματα:

- Απομόνωση του ανθρώπινου γονιδίου που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της φαρμακευτικής πρωτεΐνης της οποίας η παρασκευή μας ενδιαφέρει.
- Εισαγωγή του γονιδίου με μικροέγχυση στον πυρήνα γονιμοποιημένου ωαρίου (ζυγωτό).
- Τοποθέτηση του ζυγωτού στη μήτρα ενός ενήλικου ζώου (θετή μητέρα) για κυοφορία.
- Γέννηση διαγονιδιακού ζώου. **ΖΩΙΚΟΙ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ**
- Εκτροφή και επιλεκτικές διασταυρώσεις με σκοπό να περάσει η τροποποιημένη γενετική πληροφορία στους απογόνους.
- Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός της φαρμακευτικής πρωτεΐνης.

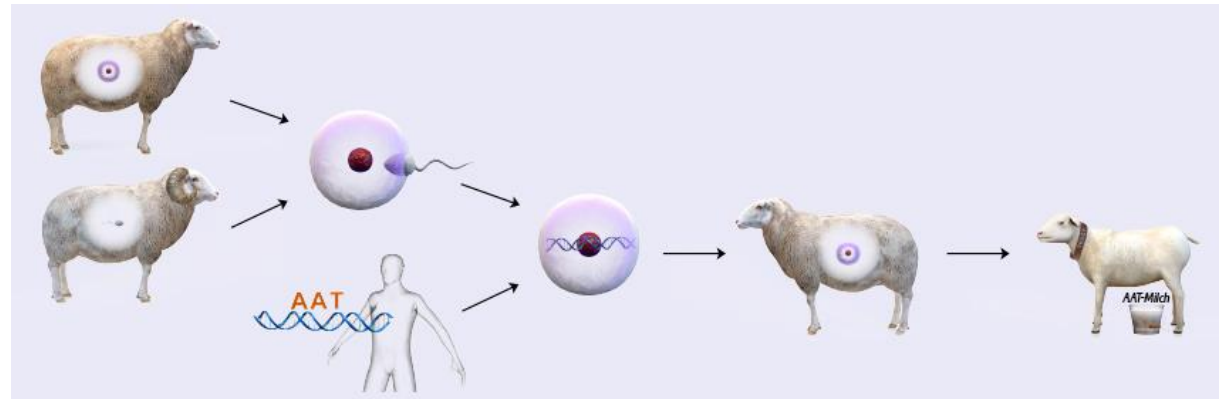
Βιοτεχνολογία Ζώων

Διαγονιδιακά ζώα – *gene pharming*

Το 1997 το πρόβατο Tracy ήταν το πρώτο διαγονιδιακό ζώο που παρήγαγε ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη στο γάλα του

Την **alpha-1-antitrypsin (AAT)** που χρησιμοποιήθηκε στη θεραπεία του εμφυσήματος και της κυστικής ίνωσης

Δημιουργήθηκε από την PPL Therapeutics & The Roslin Institute



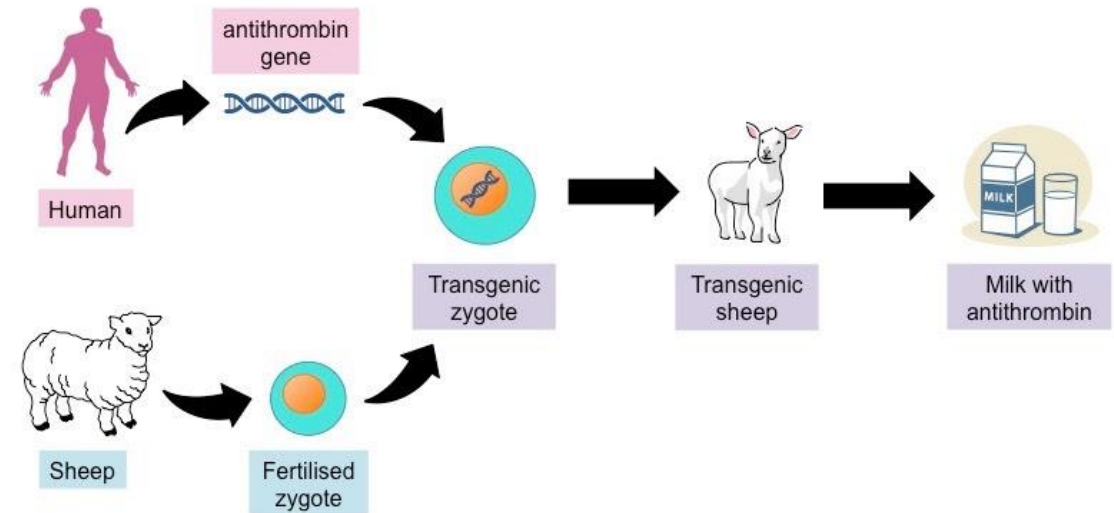
Βιοτεχνολογία Ζώων

Διαγονιδιακά ζώα – *gene pharming*

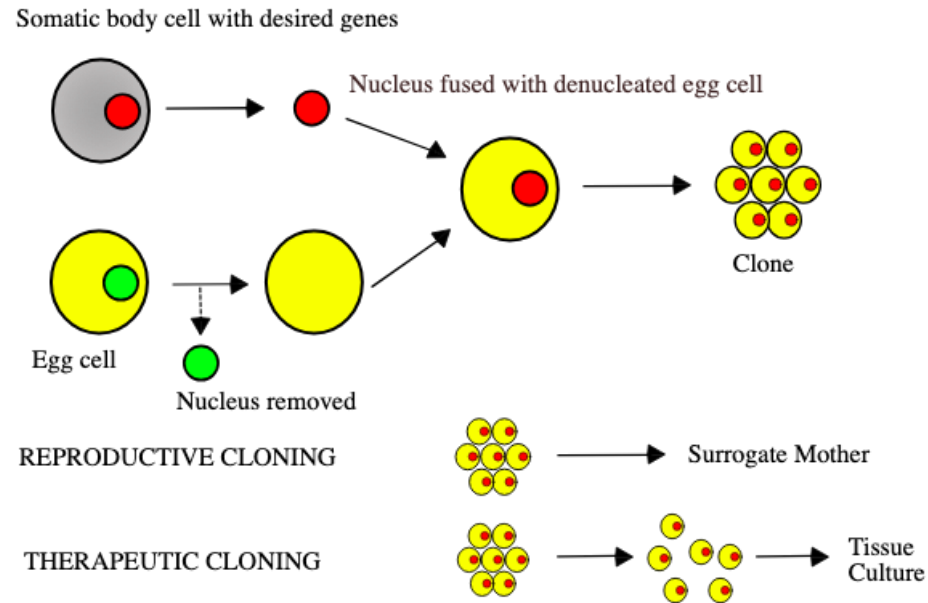
Η **αντιθρομβίνη** είναι μια πρωτεΐνη του αίματος που απενεργοποιεί ορισμένα ένζυμα στο σύστημα πήξης για να αποτρέψει την υπερβολική πήξη. Τα άτομα με γενετική ή επίκτητη ανεπάρκεια αντιθρομβίνης διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν επιβλαβείς θρόμβους αίματος.

Η γενετικά τροποποιημένη αντιθρομβίνη έχει βιοφαρμακοποιηθεί από διαγονιδιακές κασίκες για την παραγωγή αποθεμάτων για εμπορική χρήση. {GTC Biotherapeutics}

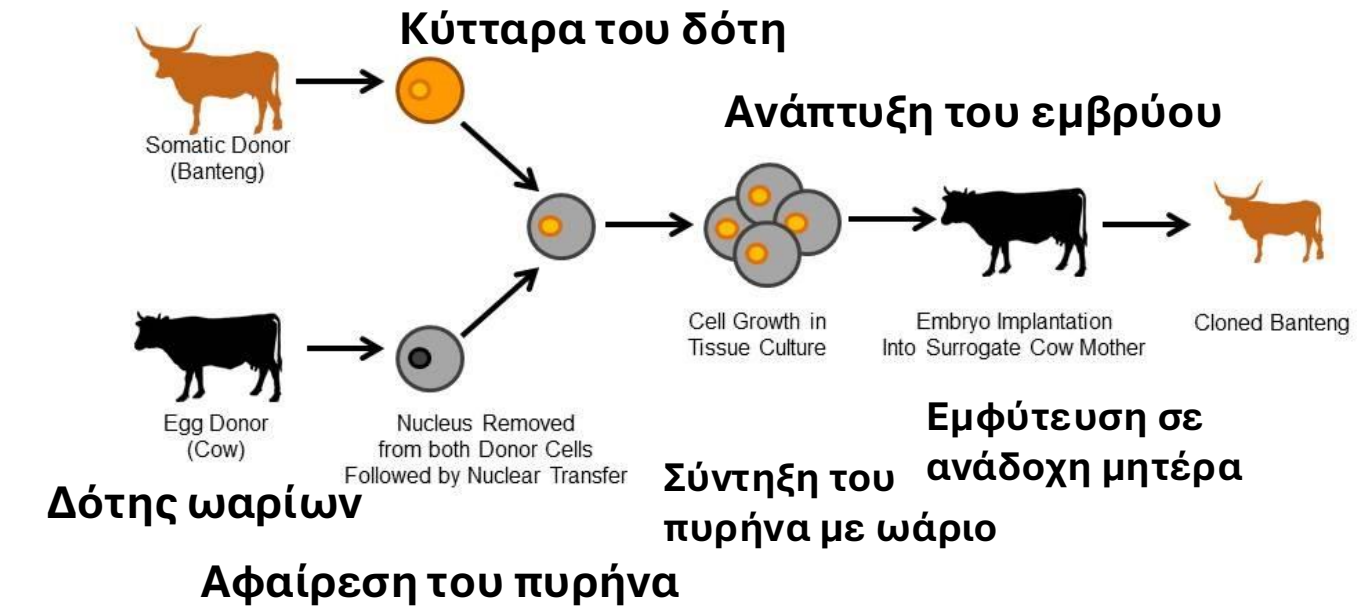
- Ένα ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί την αντιθρομβίνη εισάγεται στο γονιμοποιημένο ωάριο μιας κασίκας
- Τα τροποποιημένα ωάρια εμφυτεύονται στη μήτρα παρένθετων, τα οποία γεννούν διαγονιδιακούς απογόνους
- Ο διαγονιδιακός απόγονος θα παράγει ανθρώπινη αντιθρομβίνη στο γάλα του, η οποία στη συνέχεια μπορεί να εξαχθεί και να καθαριστεί
- Κάθε χρόνο, η διαγονιδιακή κασίκα μπορεί να παράγει μια ποσότητα αντιθρομβίνης που ισοδυναμεί με 90.000 αιμοδοσίες ανθρώπου



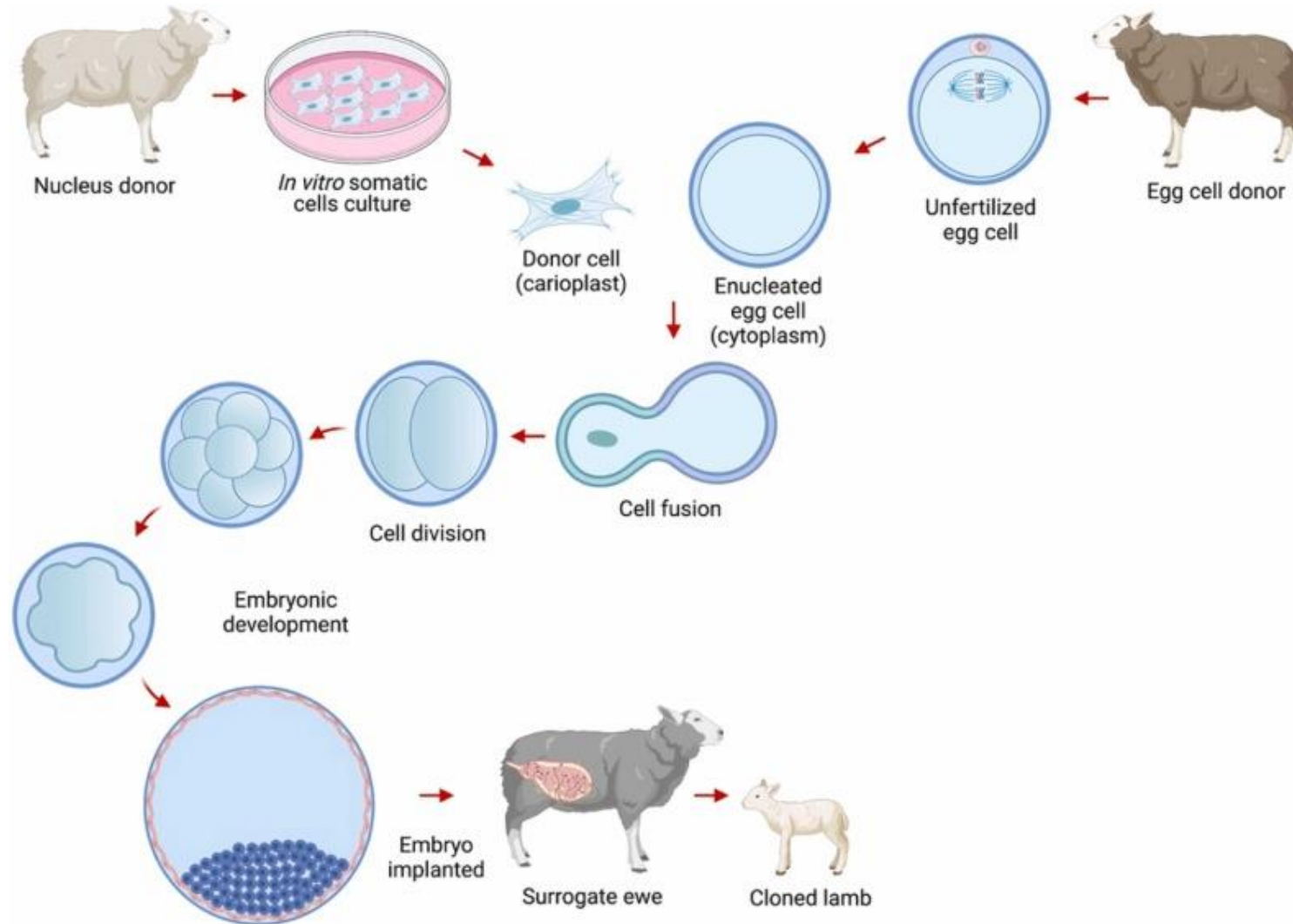
- **Μεταφορά του κυτταρικού πυρήνα (nuclear transfer)**



Δότης σωματικών κυττάρων



- **Μεταφορά του κυτταρικού πυρήνα (nuclear transfer)**



- **Μεταφορά του κυτταρικού πυρήνα (nuclear transfer)**

Λόγοι κλωνοποίησης ζώων

- ✓ Βελτίωση ζωικού κεφαλαίου
- ✓ Παραγωγή φαρμάκων
- ✓ Απάντηση βασικών ερωτημάτων βιολογίας
- ✓ Διατήρηση βιοποικιλότητας
- ✓ Ικανοποίηση επιθυμιών (;)



Το 2002 επιστήμονες από το Texas A&M University ανακοίνωσαν την κλωνοποίηση γάτας.

Η CC είναι δίδυμη με τη γενετική «μητέρα» της, ωστόσο διέφεραν στο χρώμα της γούνας, λόγω περιβαλλοντικών παραγόντων

Ο πρώτος κλώνος αλόγου παρουσιάζεται στην Ιταλία

Το πρώτο στον κόσμο κλωνοποιημένο άλογο είναι ένα υγιέστατο θηλυκό πουλάρι με το όνομα Προμηθέα, γενετικά πανομοιότυπο με τη φέρουσα μητέρα που το κυοφόρησε. Η επιτυχία των Ιταλών ερευνητών ίσως οδηγήσει στην εφαρμογή της τεχνολογίας σε άλογα αγώνων.



Οι Ιταλοί ερευνητές εισήγαγαν τον πυρήνα από κύτταρα δέρματος ενήλικων αλόγων σε ωάρια από τα οποία είχε αφαιρεθεί το γενετικό υλικό. Από τα συνολικά 841 έμβρυα που προέκυψαν, μόνο τα 22 δεν σταμάτησαν να αναπτύσσονται στο εργαστήριο.

Μόνο 17 έμβρυα εμφυτεύθηκαν στη μήτρα εννέα φοράδων, από τις οποίες έμειναν έγκυες οι τέσσερις. Όμως μόνο ο Προμηθέας αναπτύχθηκε τελικά σε πλήρες έμβρυο.

Χρήση Γενετικά Τροποποιημένων Ζώων σε Μεταμοσχεύσεις

Η ζήτηση για μεταμόσχευση οργάνων ξεπερνά δραστικά την προσφορά τόσο στην ΕΕ όσο και παγκοσμίως, με αποτέλεσμα να αυξάνεται συνεχώς ο αριθμός των ασθενών στις λίστες αναμονής.

Οι ανάγκες των ασθενών υπερβαίνουν τη διαθέσιμη προσφορά όλων των τύπων οργάνων.

- Μελετάται η δημιουργία ΓΤΟ που θα χρησιμοποιηθούν ως δότες οργάνων για μεταμοσχεύσεις
 - **Η έρευνα έχει εστιάσει σε χοίρους**
- Αλλά....οι ιστοί των χοίρων είναι ανοσολογικά ασύμβατοι με τον άνθρωπο και προκαλούν ταχεία αντίδραση υπεροξείας απόρριψη του μοσχεύματος



Χρήση Γενετικά Τροποποιημένων Ζώων σε Μεταμοσχεύσεις

Κλώνοι από χοίρους δημιουργήθηκαν από την PPL Therapeutics το 2000

Οι χοίροι είχαν έλλειψη της α 1,3 γαλακτοσυλ τρανσεράσης, ή GT, ένα ένζυμο που εμπλέκεται στην απόρριψη οργάνων

Τα ζώα που δεν εκφράζουν το γονίδιο δεν θα συνθέτουν τον επίτοπο και θα παρουσιάζουν μειωμένη αντίδραση.

Ωστόσο...

Υπάρχουν επιφυλάξεις σχετικά με την ασφάλεια των ζωικών διαγονιδιακών μοσχευμάτων

Δεν υπάρχει σαφές νομικό πλαίσιο

Η έρευνα πλέον έχει στραφεί στην χρήση ανθρώπινων βλαστοκυττάρων για την in vitro παραγωγή ανθρώπινων ιστών και οργάνων



Κλωνοποίηση απειλούμενων ειδών

Απειλούμενο είδος ονομάζεται κάθε είδος ζωντανού οργανισμού το οποίο απειλείται με εξαφάνιση στο άμεσο μέλλον.

Γιατί διαρκώς αυξάνει η λίστα;

- αλλαγή ενδιαιτημάτων
- ρύπανση και μόλυνση περιβάλλοντος
- φαινόμενο θερμοκηπίου
- επέκταση των ανθρώπινων κοινωνιών

Που οδηγούμαστε;

- απώλεια βιοποικιλότητας
- μείωση σταθερότητας οικοσυστημάτων

6η μαζική εξαφάνιση;

Κατάσταση διατήρησης



βάσει κινδύνου εξαφάνισης

Εξαφανισθέν

Εξαφανισμένο

Εξαφανισμένο στη φύση

Υπό απειλή

Σε κρίσιμο κίνδυνο

Σε κίνδυνο

Ευάλωτα

Χαμηλότερου κινδύνου

Εξαρτώμενο από προστασία

Σχεδόν Απειλούμενο

Ελάχιστης Ανησυχίας

Άλλες κατηγορίες

Ανεπαρκώς γνωστά είδη

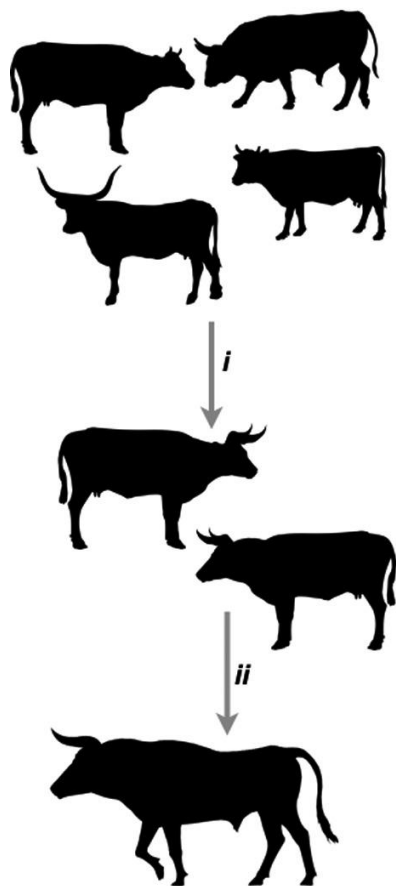
Μη αξιολογημένα είδη

Κόκκινος κατάλογος της IUCN
Διεθνής Ένωση Προστασίας της Φύσης

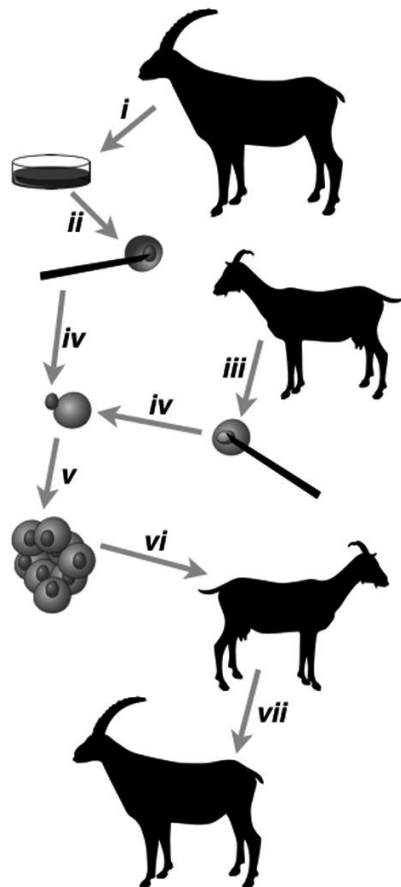


Κλωνοποίηση απειλούμενων ειδών

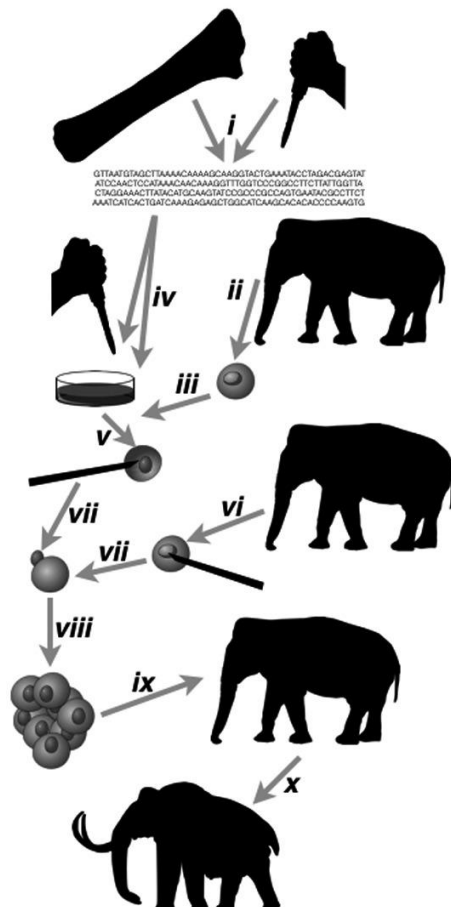
(a) Back-breeding



(b) Cloning



(c) Genome editing



Βιοποικιλότητα στην Ευρώπη

Ποια είναι τα είδη που αντιμετωπίζουν το μεγαλύτερο κίνδυνο εξαφάνισης στην Ευρώπη;
(% σε κίνδυνο)



Μαλάκια γλυκού νερού
(μύδια και σαλιγκάρια)



Ενδημικά δέντρα της Ευρώπης



Ψάρι γλυκού νερού



Αμφίβια



Χερσαία μαλάκια (σαλιγκάρια)



Ερπετά



Θηλαστικά



Λιβελλούλες



Καλλιέργειες άγριων ειδών



Σαπροξυλικά σκαθάρια



Πουλιά



Πεταλούδες



Μέλισσες



Υδρόβια φυτά



Θαλάσσια φυτά



Φαρμακευτικά φυτά

*στοιχεία του 2019

Πηγή: Ευρωπαϊκός Κόκκινος Κατάλογος IUCN (2015 και 2019)



europa.eu

Κλωνοποίηση απειλούμενων ειδών

Η ιδέα της βιβλιοθήκης DNA



- Το μόνο εργαλείο που διαθέτουμε
- Η κλωνοποίηση επιτρέπει να επιλέξουμε τους καλύτερους και τους υγιέστερους δότες



- Χρειάζεται προσαρμογή σε συνήθειες συμπεριφοράς ή φυσιολογίας (εξημέρωση)
- Ίσως εμποδίσει τις προσπάθειες να διατηρηθεί η ποικιλία των ενδιαιτημάτων και δίνει λάθος εντυπώσεις
- Άγνωστες οι επιπτώσεις σε άλλα ζώα
- Οι εξαλείψεις συνεχίζονται
- Πολλές αποβολές εμβρύων



What is next??????



Πρώτο διαγονιδιακό ζώο τρόφιμο - Σολωμός

Η FDA δήλωσε ότι, μετά από ενδελεχή μελέτη του θέματος και αξιολόγηση των διαθέσιμων στοιχείων, κατέληξε ότι ο σολομός με την εμπορική ονομασία **"AquAdvantage Salmon"** πληρεί τις απαιτήσεις ασφάλειας και μπορεί να καταναλωθεί χωρίς φόβο.

Εισαγωγή ενός γονιδίου αυξητικής ορμόνης.

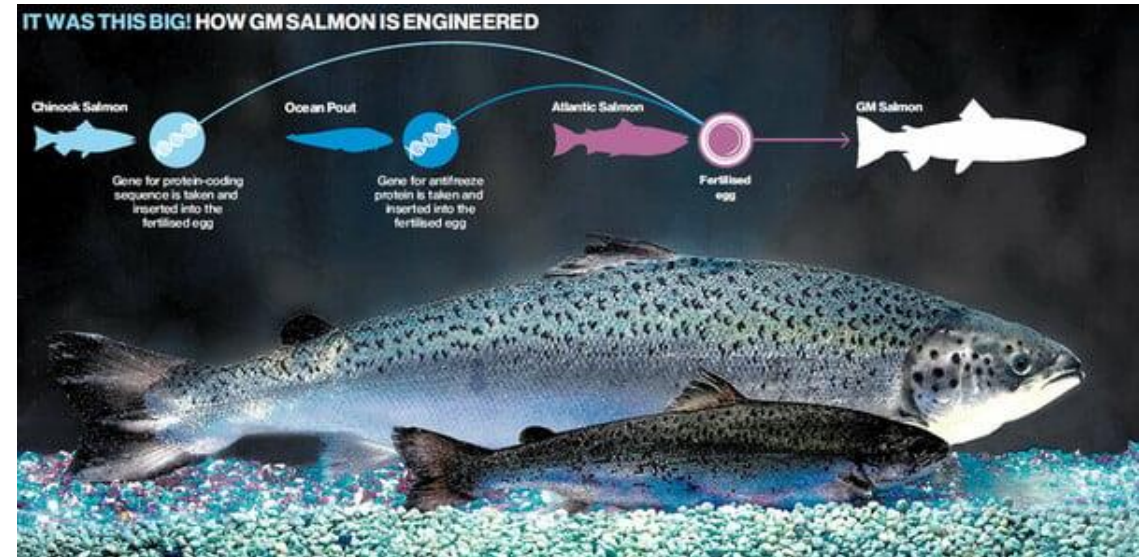
Οφέλη

- Παραγωγή σε μισό χρονικό διάστημα από τα συμβατικά ψάρια
 - Μικρότερο κόστος εκτροφής

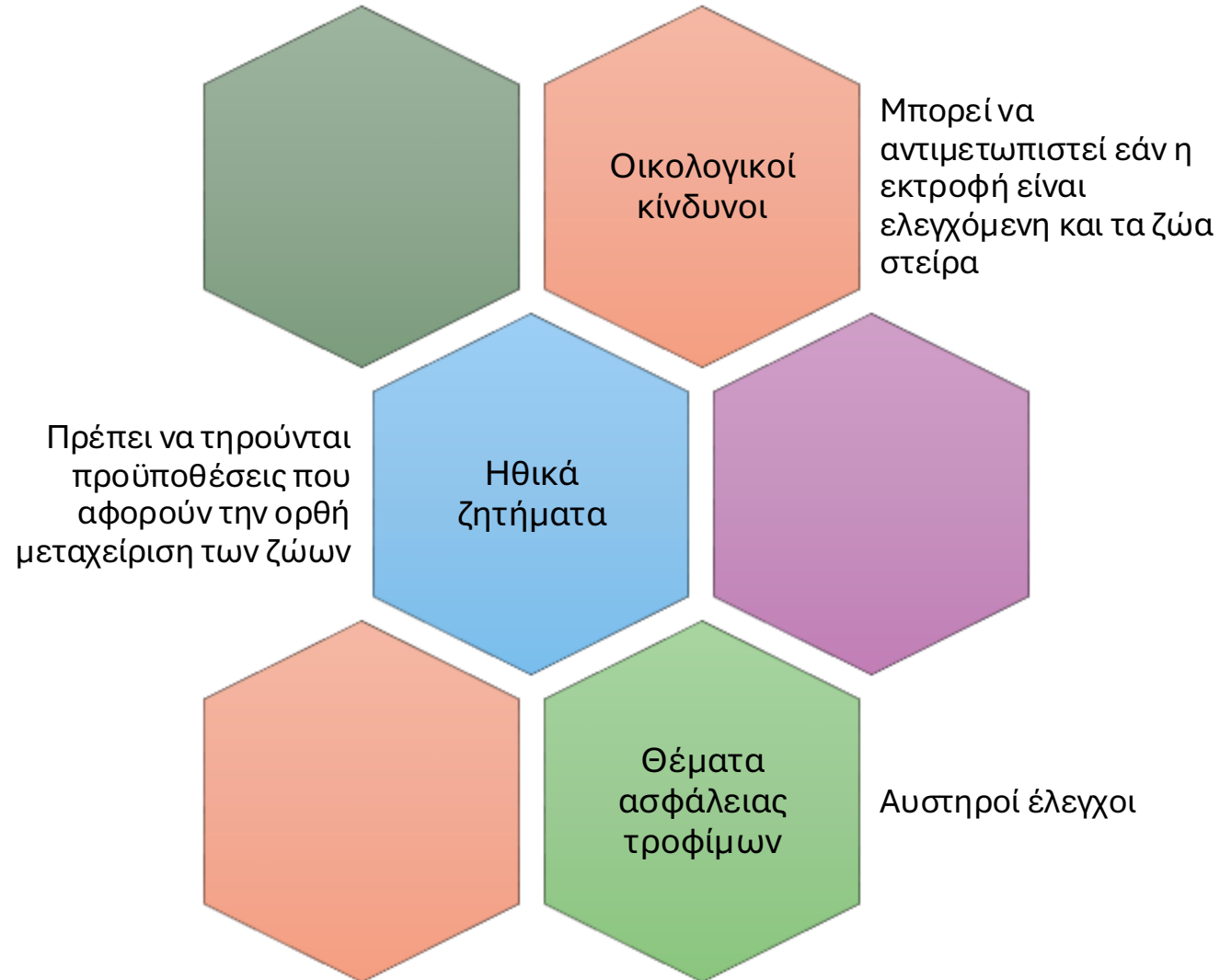
Αλλά....

Η Αρχή όρισε ότι η εκτροφή του μεταλλαγμένου σολομού θα γίνεται σε δεξαμενές στην ξηρά και όχι σε θαλάσσιες ιχθυοκαλλιέργειες και μάλιστα όχι στις ΗΠΑ, αλλά σε μόνο δύο εγκαταστάσεις σε γειτονικές χώρες, στον Καναδά και στον Παναμά.

Ως πρόσθετο μέτρο ασφαλείας, η FDA επέβαλε ο διαγονιδιακός σολομός, που θα είναι μόνο θηλυκός, να είναι στείρος, ώστε να μην μπορεί να ζευγαρώσει με άλλα ψάρια «στην απίθανη περίπτωση που ξεφύγει».



Ανησυχίες από την χρήση διαγονιδιακών ζώων



Αποδοχή καταναλωτών

Όλες οι δημοσκοπήσεις που αφορούν στη γνώμη των καταναλωτών για τους ΓΤΟ παρουσιάζουν μια συνεχή και επίμονη άρνηση των ευρωπαίων να τα καταναλώνουν ως τρόφιμα.

Στην Ελλάδα, το 93,3 % των πολιτών δε θέλει να καταναλώνει ΓΤΟ ενώ το 85% δηλώνει ότι δεν θα αγόραζε αυγά από κόττες που έχουν τραφεί με ΓΤΟ.

