

Biotehnologije

aplikacije rekombinantne DNA

Področja uporabe biotehnologij

- Odkrivanje
 - Določanje genetskih profilov
- Farmacevtika
 - Genska terapija
- Kmetijska biotehnologija
 - Transgene živali
 - Transgene rastline
- Okolje
 - Bioremediacija
 - Biogoriva

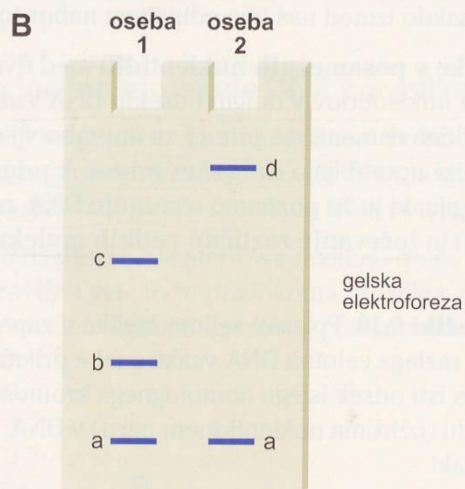
Določanje genetskega profila osebe

- Včasih rečemo, da se ljudje razlikujejo po ***DNA prstnih odtisih*** (***fingerprinting***), saj je **zaporedje DNA** vsake osebe **edinstveno**, **kot** njeni **prstni odtisi**.
- Strokovno pa rečemo, da se osebe razlikujejo po **genetskih profilih**.
- **Določanje genetskih profilov** uporabljajo:
 - v **forenzični** (sodni) **medicini** za določanje **identitete storilcev** kaznivih dejanj in identitete **posmrtnih ostankov**;
 - za **ugotavljanje očetovstva** in drugih **sorodstvenih odnosov** med osebami;
 - za ugotavljanje **izvora hrane** (npr. če ikre v kaviarju pripadajo vrsti ribe, ki je označena na nalepki);
 - za ugotavljanje prisotnosti **tkiv ogrožene živalske vrste** v nekem izdelku (npr. maščoba kita v lepotni kremi,...).

Ugotavljanje razlike DNA med dvema osebama

- Za to nalogo nam **ni treba določiti** natančnega **zaporedja** nukleotidov (analiza je možna, a predraga in dolgotrajna).
- Dovolj je da **DNA razrežemo** znotraj specifičnih zaporedij z **restriktivskimi encimi** in **ločimo** različno velike **fragmente** z gelsko elektroforezo.

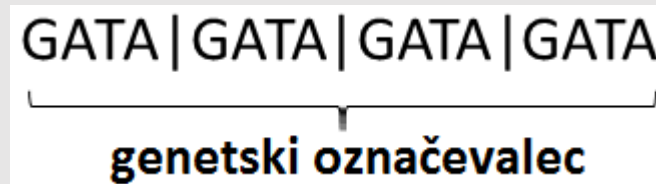
Ugotavljanje razlike DNA med dvema osebama



- DNA oseb 1 in 2 se na prikazanem odseku kromosoma **razlikuje le po enem nukleotidu**, ki je prikazan **rdeče**.
- DNA obeh **razrežemo** z restrikcijskim encimom **BsuFI**, ki prepozna specifično zaporedje nukleotidov v molekuli DNA.
- Pri **osebi 1** sta **zaporedji za** encim **BsuFI** **dve**, pri **osebi 2** pa le **eno**.
- Pri **osebi 1** razreže encim DNA na **tri** fragmente.
- Pri **osebi 2** razreže encim DNA na **dva** fragmenta.
- Fragmente obeh oseb nanesimo na gel in izvedemo **gelsko elektroforezo**.
- Dve **osebi se razlikujeta po vzorcu lis** na gelu.

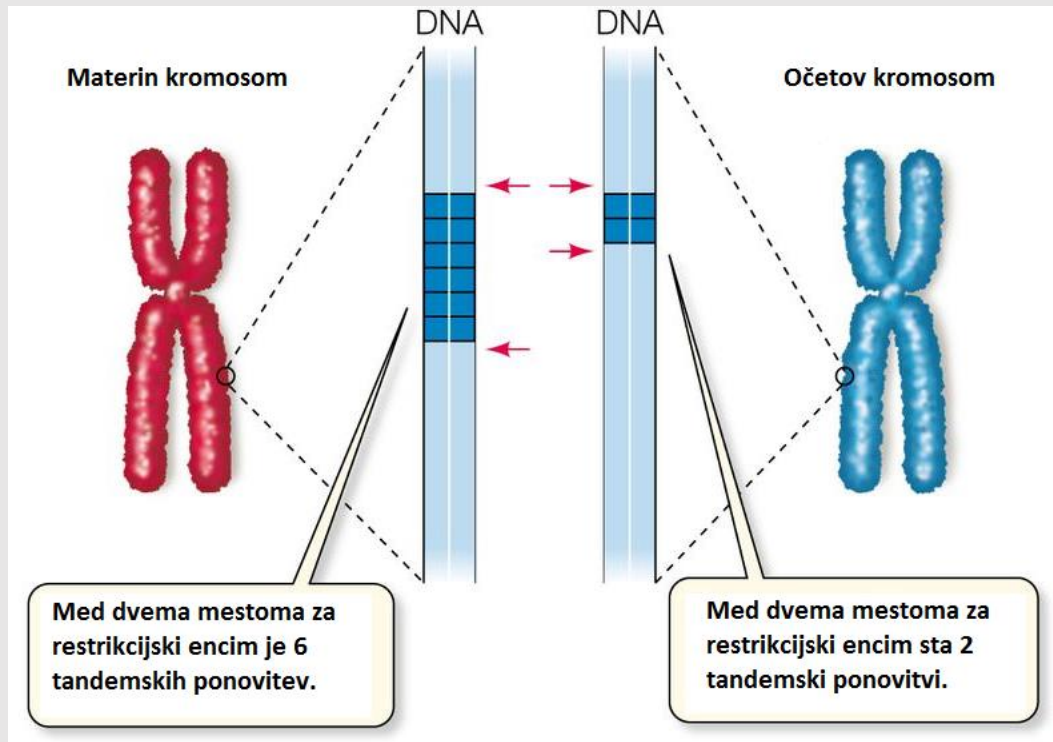
Ugotavljanje razlike DNA med dvema osebama (novejša metoda: **razlika v tandemskih ponovitvah**)

- Novejša metoda za razlikovanje oseb na podlagi njihovih genetskih profilov temelji na dejstvu, da se ljudje razlikujejo po dolžini določenih odsekov DNA, ki jih imenujemo **kratke tandemske ponovitve** (*STR – short tandem repeats*) ali mikrosateliti (npr.: GATA | GATA | GATA | GATA, ali ACAT | ACAT | ACAT | ACAT | ACAT).
- Tandemske ponovitve so **2 – 5 bp** dolga **zaporedja** v DNA, ki so na določenih mestih v genomu **nanizana drugo za drugim v različnem številu ponovitev**.
- **Mesta v genomu**, ki vsebujejo tandemske ponovitve, imenujemo **genetski označevalci**.



- **Ljudje se razlikujejo po številu kratkih tandemskih ponovitev** znotraj genetskih označevalcev.
- **Genetski označevalci** imajo torej izrazit **polimorfizem po dolžini** (=v različnih osebah so posamezni označevalci različno dolgi, ker vsebujejo različno število tandemskih ponovitev), **zato jih lahko uporabimo za razlikovanje genetskega profila** dveh oseb.

Ugotavljanje razlike DNA med dvema osebama (novejša metoda: **razlika v tandemskih ponovitvah**)



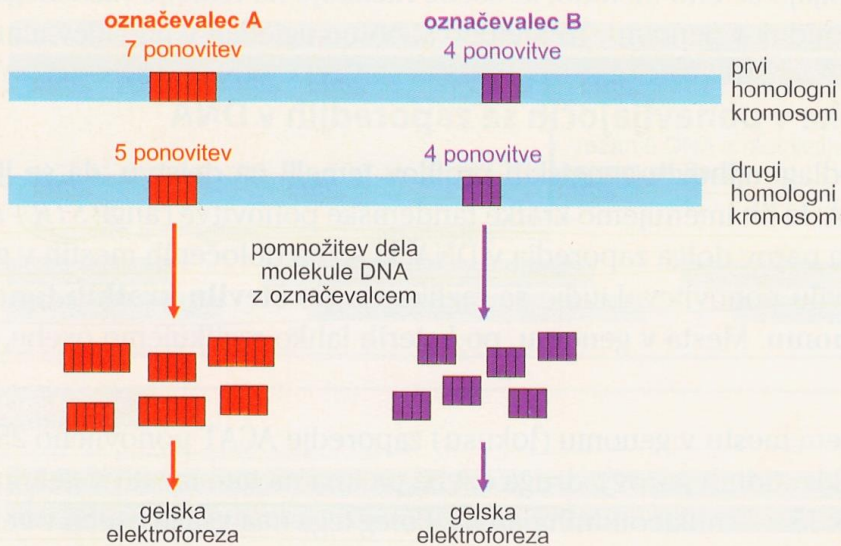
- **Neka oseba** ima lahko npr. na enem locusu določenega kromosoma **zaporedje GATA** ponovljeno **6-krat**, na istem locusu **homolognega kromosoma** pa **2-krat**.
- **Druga oseba** ima pa npr. na istem locusu zaporedje GATA ponovljeno **3-krat**, na homolognem kromosomu pa **5-krat**.

Primer uporabe genskih označevalcev v forenziki

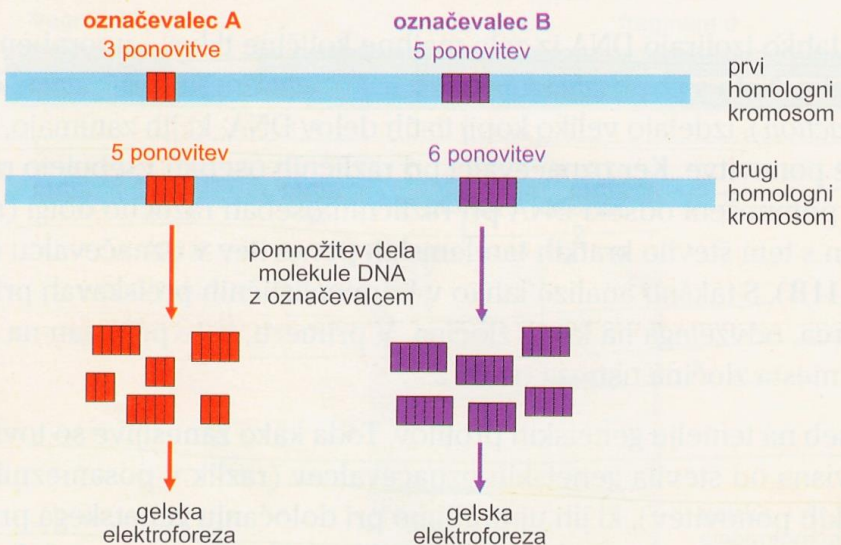
- Iz celičnega vzorca **dokaznega materiala** in iz celičnih vzorcev **osumljencev izoliramo DNA**.
- **Vsak vzorec damo v eno epruveto**.
- Z **restrikcijskimi encimi izrežemo** 16 različnih označevalcev v celotnem genomu.
- Vsaka oseba ima po dva označevalca iste vrste na homolognih kromosomih.
- Z verižno reakcijo s polimerazo (**PCR**) **pomnožimo** dobljene **označevalce**.
- Za določitev **dolžine vsakega označevalca** uporabljamo **gelsko elektroforezo**.
- **Dolžine označevalcev** vsake osebe **primerjamo** z dolžino označevalcev dokaznega materiala.

Primer uporabe genskih označevalcev v forenziki

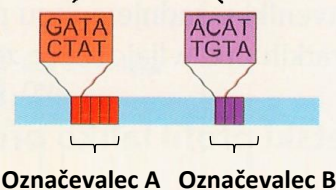
Oseba 1



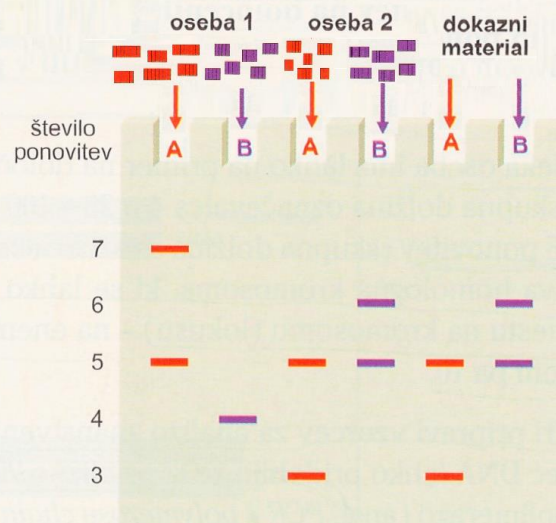
Oseba 2



Kratki tandemski ponovitvi (STR)



Gelska elektroforeza



Oseba 2 ima za oba označevalca enako število ponovitev kot dokazni material. Iz tega sledi, da izvira dokazni material iz njenih celic.

Oseba 1 je homozigot za označevalca B, zato se pojavi ena sama lisa.

Primer obravnava dva označevalca, A in B, ki ležita na istem kromosomu.

Zanesljivost identifikacije

- Zanesljivost identifikacije je **odvisna** od **števila genetskih označevalcev**, ki jih uporabljamo.
- Če uporabljamo npr. **13 označevalcev**, je **verjetnost**, da bi imeli **dve osebi enak genetski profil** med **1 proti 10 milijard** in **1 proti več 1.000 milijard**.

DNA fingerprinting (=genetski profil) 16 oseb

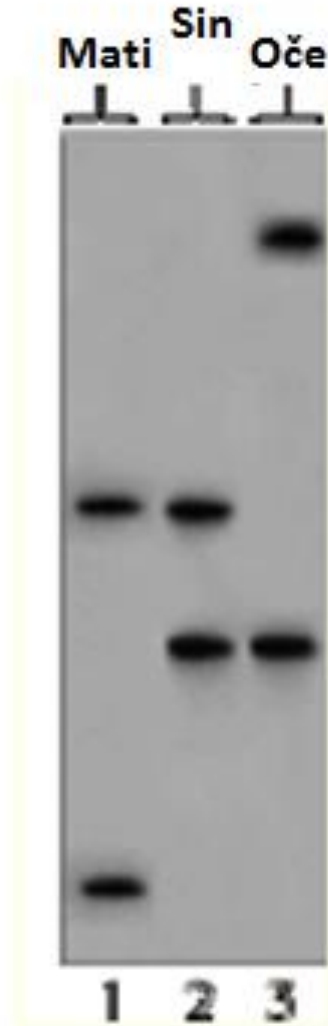


- Fingerprinting 16 oseb, ki niso v sorodu in se razlikujejo po številu tandemskih ponovitev STR izbranega označevalca.
- Gelska elektroforeza evidentira 19 različic STR od najkrajše (1) do najdaljše (19).
- V vzorcu niti dve osebi nimata enakega števila tandemskih ponovitev.

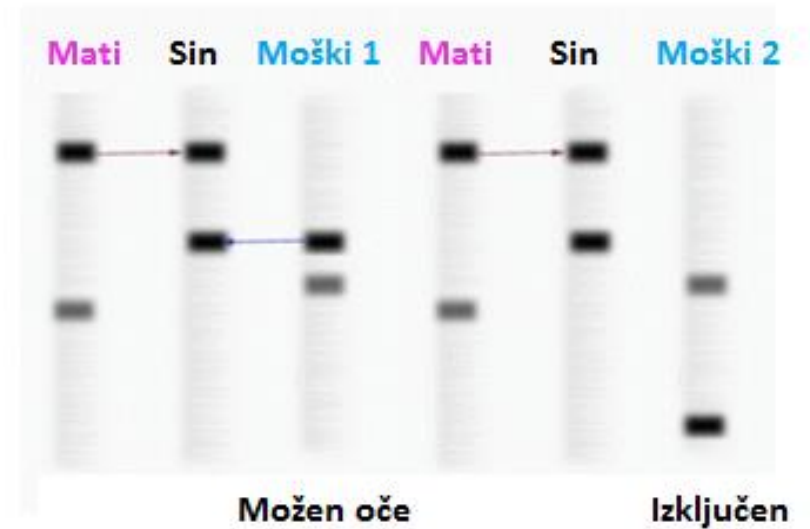
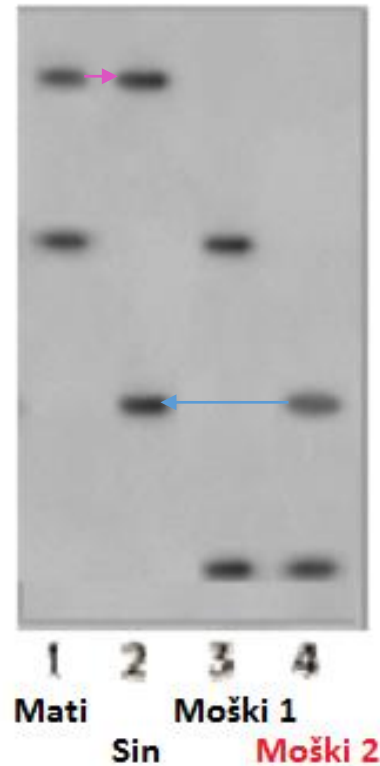
Primerjava genetskih profilov za dokazovanje očetovstva

- Genetski profili omogočajo tudi zelo zanesljivo dokazovanje očetovstva.
- Včasih so očetovstvo ugotavljali na temelju primerjave krvnih skupin, vendar so bile tovrstne metode dokaj nezanesljive.
- Pri primerjavi genetskih profilov upoštevamo, da otrok polovico kromosomov prejme od matere, polovico pa od očeta.
- Zato ima polovico genetskih označevalcev enakih kot mati, polovico pa kot oče.
- S primerjavo vzorcev DNA otroka, matere in domnevnega očeta lahko zelo zanesljivo potrdimo ali ovržemo očetovstvo.

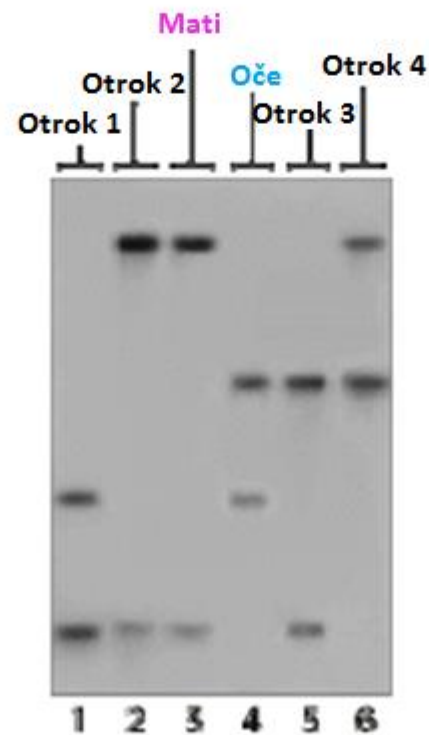
DOKAZOVANJE OČETOVSTVA



KATERI IZMED DVEH MOŠKIH JE MOŽEN BIOLOŠKI OČE?



GENETSKI PROFIL DRUŽINE S 4 OTROKI. KATERI OTROK JE POSVOJEN?



Odgovor:
Otroka 2 je oče posvojil

Projekt Človeški genom

- **Projekt Človeški genom** je bil uradno ustanovljen oktobra 1990 v ZDA.
- Gre za mednarodni javno financiran projekt, namen katerega je bil **določiti celotno zaporedje baznih parov človeškega genoma**.
- Projekt se je zaključil leta 2003, ko so razbrali celotno zaporedje haploidnega človeškega genoma (nad **3 milijarde baz**) ter določili okoli **1500 genov**, odgovornih za **različne bolezni**.
- Glavna **težava** pri odkrivanju povezave med geni in boleznimi je ta, da **običajno vpliva na eno bolezen več genov**.
- Za projekt se je doslej porabilo približno **10 milijonov ameriških dolarjev**.

Človeška genska terapija ponuja nove perspektive v zdravljenju genetskih bolezni

- Genska terapija je ena izmed novih metod zdravljenja, ki jih znanstveniki šele razvijajo.
- Genska terapija je zdravljenje prirojenih in pridobljenih gensko pogojenih bolezni z:
 - nadomestilom okvarjenega gena z zdravim
 - popravilom gena
 - inaktivacijo gena (vključitev onkosupresorjev v rakaste celice, ki bi povzročili apoptozo)

Izvajanje genske terapije

- Do sedaj se genska terapija izvaja samo na somatskih celicah v fazi delitve ali v fazi mirovanja.
 - Če hočemo, da bodo učinki genske terapije trajni, moramo vnesti normalni alel v tiste celice, ki se delijo vse življenje.
- Zaradi **možnosti zlorabe**, predvsem pa zaradi **nedostopnosti celic** se genska terapija **ne izvaja na zarodnih celicah**.

Genska terapija somatskih celic

- Genska terapija somatskih celic je lahko dveh vrst:
 - *ex vivo*
 - Celice odvzamemo iz telesa, jih spremenimo s pomočjo virusnega ali nevirusnega vektorja, jih gojimo v kulturi in reimplantiramo v telo.
 - *in vivo*
 - Celice ne odvzamemo iz telesa, pač pa jih spremenimo v telesu s pomočjo virusnega ali nevirusnega vektorja.

Genska terapija *ex vivo*

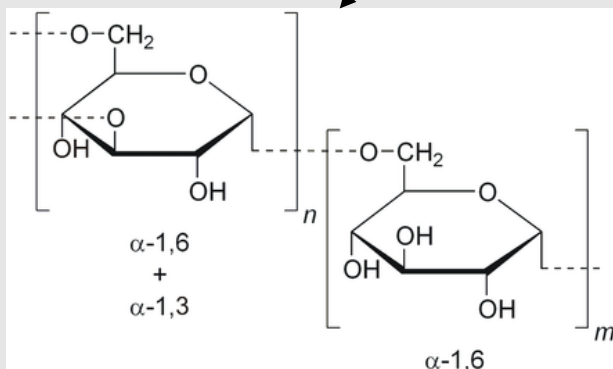
- Izvaja se v vseh primerih, kjer celice lahko vzamemo iz telesa, jih gojimo in jih reimplantiramo v telo (npr. celice kostnega mozga, krvne celice).
- Gen vključimo v celično kulturo
 - z metodo **transfekcije**
 - s pomočjo **virusa** ali drugega **nanodelca**.

Vključitev gena s transfekcijo

- **Transfekcija** je metoda direktne vključitve DNA v celično kulturo. Izvaja se na različne načine:

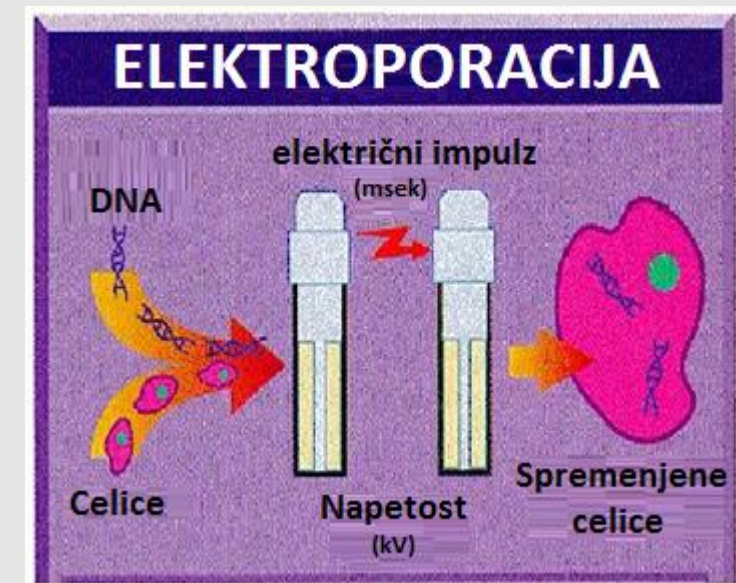
1. DNA najprej pomešamo s $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ in DEAE dekstranom, nato vse skupaj dodamo celični kulturi.

- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ fluidificira celično membrano in tako omogoči endocitozo
- DEAE dekstran nevtralizira negativni naboj membranskih beljakovin.
- *Ex vivo* je sistem učinkovit, *in vivo* pa ne.



Vključitev gena s transfekcijo

2. DNA vbrizgamo v celico z **mikroinjekcijo** (nekateri celice so za to opravilo premajhne).
3. S pomočjo **električnega toka** povzročimo v celičnih membranah nastanek **hidrofilnih por**, skozi katere bo DNA vstopila (**elektroporacija**).
 - Nekateri raziskovalci trdijo, da lahko **elektroporacija celico trajno poškoduje** in tako povzroči **težko predvidljive kolateralne učinke**.



Genska terapija *in vivo*

- Izvaja se v vseh primerih, kjer celice ne moremo odvzeti iz telesa, jih gojiti in jih reimplantirati v telo (npr. **možganske celice**, **srčne celice**, **celice večine notranjih organov**).
- Metoda je ekonomsko dostopna, a je njeno izvajanje težavno.
- Gen vključimo v **viruse** ali druge **nanodelce** (liposome, polikatione).
- **Viruse ali nanodelce injiciramo v organizem.**



Liposom z vključenim genetskim materialom

Vrste vektorjev in njih uporaba

- **Vektor** je **najpomembnejši člen** v genski terapiji in doslej še vedno **predstavlja največji problem**.
- Najbolj uporabni so **virusni vektorji**, ki jim pred vgradnjo terapevtske DNA iz genoma odstranimo gene, ki jih virus potrebuje za svojo replikacijo.
- Uporabljamo torej **nepopolne viruse**.
- Virus pa mora **ohraniti sposobnost infekcije celice in izražanja heterolognega gena**, kar pomeni, da virusni genom pride v jedro tarčne celice, da se prepiše in prevede.

Značilnosti dobrega vektorja

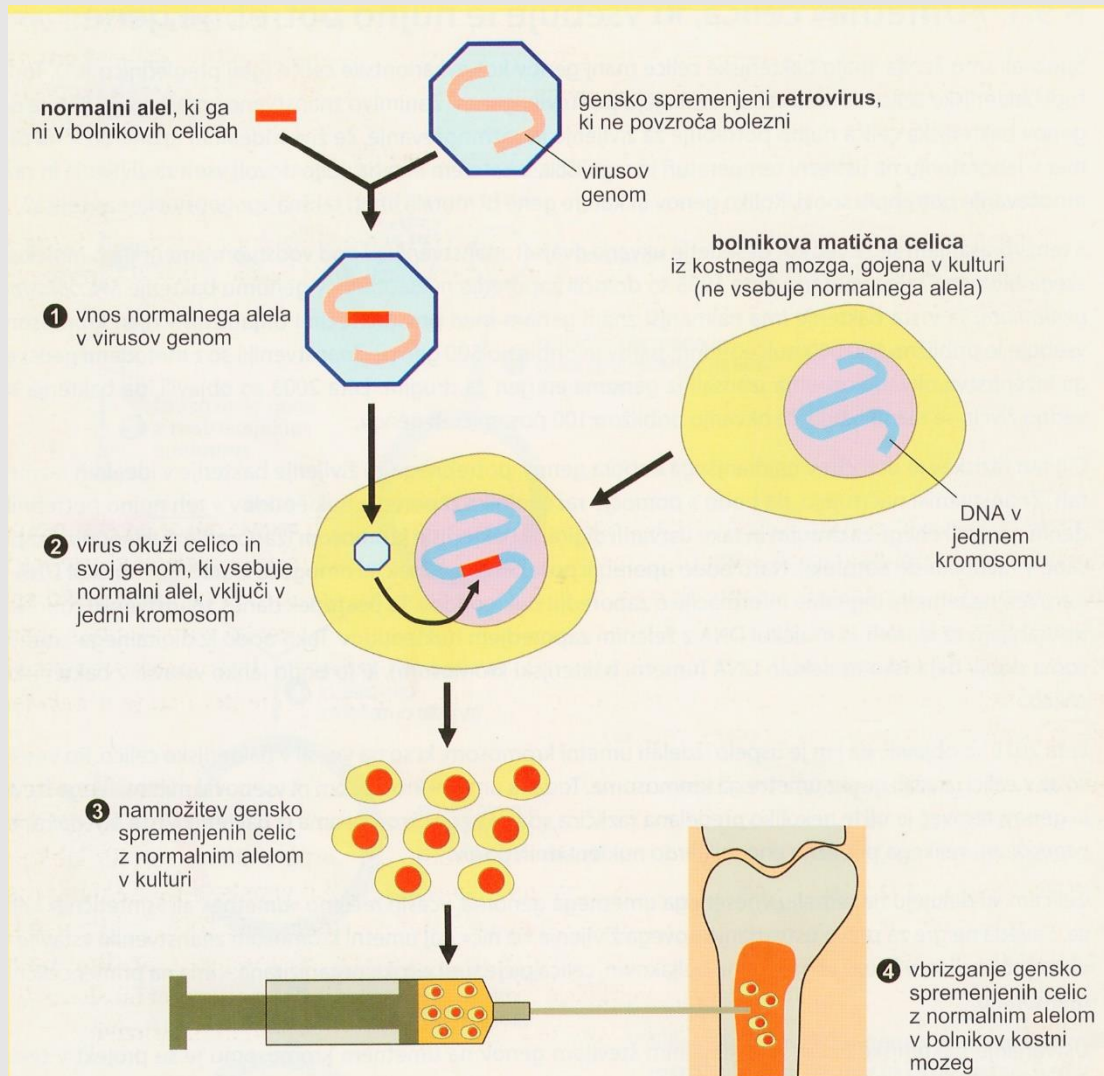
1. **Stabilnost**: možnost vgraditve terapevtskega gena v vektor.
2. **Tropizem**: sposobnost vezave na tarčno celico.
3. **Selektivnost**: visoko specifičnost izbiranja tarčnih celic.
4. **Neimunogenost**: ne sme sprožiti imunskega ali vnetnega odgovora.
5. **Velikost**: mora biti sposoben vezati zadostno količino terapevtskega dednega materiala.
6. **Neekspresivnost**: ne sme replicirati svojega lastnega genoma.
7. **Lahek dostop**: vektor mora imeti lahko dostopna mesta vstopa v organizem.

Primer genske terapije *ex vivo*:

Zdravljenje Deficita adenozin deaminaze (deficit ADA)

- **Deficit ADA** je huda otroška bolezen, ki ima za posledico popolno pomanjkanje imunitarne odpornosti.
- Gre za **recesivno avtosomno bolezen**, za katero je značilno **pomanjkanje gena ADA**, ki je odgovoren za proizvodnjo **encima ADA** v **limfocitih T**.
- Otrok lahko preživi samo v popolnoma sterilnem okolju.
- **ADA** je **edina bolezen**, ki so jo doslej **uspešno zdravili z gensko terapijo**.
- Možna postopka sta dva:
 - **Odvzem kostnega mozga, vnos normalnega gena** v matične celice, **reimplantacija** matičnih celic z normalnim genom.
 - **Odvzem krvi, vnos normalnega gena** v limfocite T, **reimplantacija** limfocitov T z normalnim genom.

Primer genske terapije *ex vivo*: Zdravljenje Deficita ADA



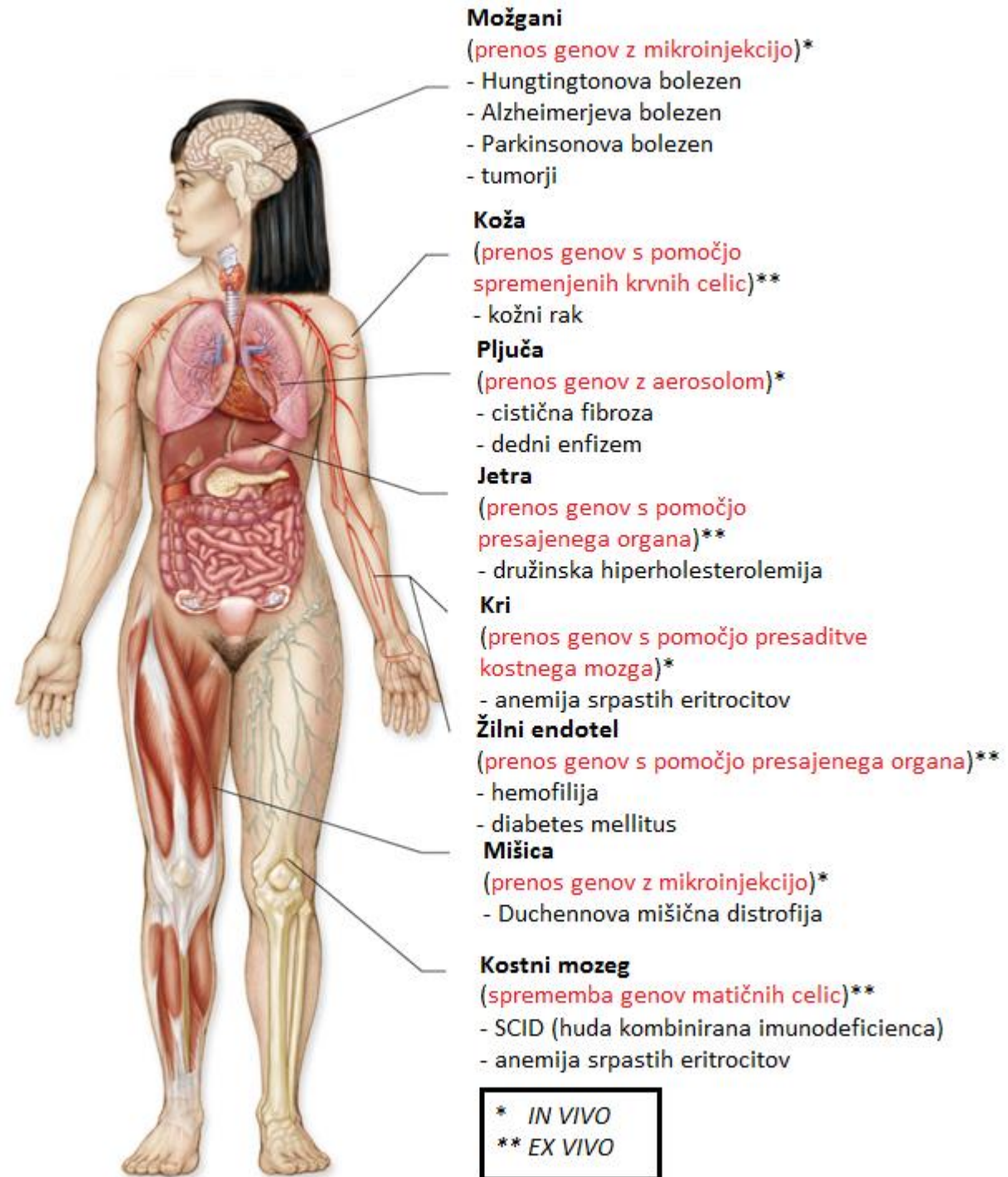
- **Postopek:**

- Vključitev normalnega alela v genom retrovirusa.
- Odvzem celic iz kostnega mozga.
- Okuženje celic z retrovirusom → rekombinacija → zamenjava nenormalnega alela z normalnim.
- Vbrizganje gensko spremenjenih celic v bolnikov kostni mozeg.

Pogoji za uspešnost genske terapije

- Genska terapija je **uspešnejša pri monogenških boleznih**, se pravi pri tistih boleznih na katere vpliva en sam gen in je **vpliv okolja minimalen**.
- Pri bolj kompleksnih **poligenških boleznih** in pri katerih je **vpliv okolja znaten** pa genska terapija zaenkrat **nima veliko uspeha**.
- Za uspešno gensko zdravljenje so potrebni naslednji pogoji:
 - terapevtski **gen** mora biti **kloniran**
 - **poznati** moramo njegovo **nukleotidno zaporedje**
 - **razumeti** moramo **način** njegovega **izražanja**
 - imeti moramo **primeren vektor**
 - **celice**, ki jih zdravimo morajo biti **dostopne**
 - **spremenjene celice** morajo imeti selektivno prednost pred nespremenjenimi: **večjo stabilnost** in **daljšo življenjsko dobo**

Potencialne možnosti zdravljenja z gensko terapijo v prihodnosti



Gensko spremenjene živali

- Znanstveniki razvijajo postopke, kako bi lahko razvili npr.
 - črede goveda, ki bi v mleko izločale zdravilne učinkovine
 - ovce, ki bi v mleko izločale faktorje za strjevanje krvi.
- Postopkom izdelovanja zdravil v živalskih farmah pravimo **pharming**.

Metode ustvarjanja gensko spremenjenih živali

- Za ustvarjanje gensko spremenjenih živali je potrebna **vključitev** ustreznega **gena v zarodek** .
- Postopek izvajajo na dva načina:
 - z **mikroinjiciranjem gena v zigoto**
 - z **implantacijo** spremenjenih **zarodnih matičnih celic (ZMC)** v blastocisto.

1. Mikroinjiciranje gena v zigoto

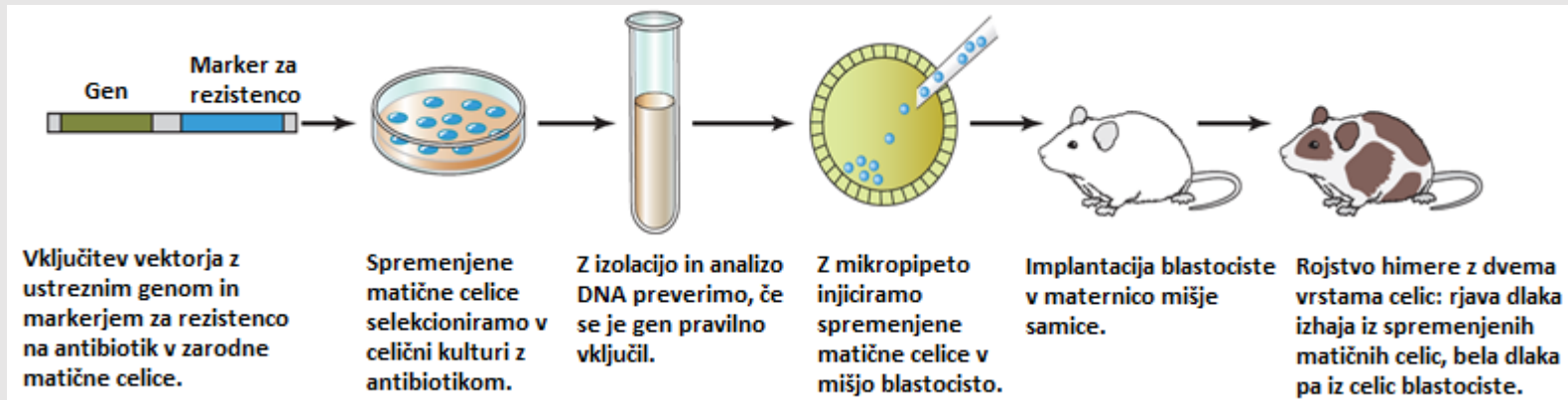
- **Z mikropipeto** vključimo vektor z ustreznim genom v jedro zigote.
- Gen se integrira v DNA zigote in bo prisoten **v vseh celicah organizma**.



- Iz zigote se razvije zarodek, ki ga implantiramo v maternico miške samice, ki bo mladiča skotila.

2. Implantacija spremenjenih zarodnih matičnih celic (ZMC) v blastocisto

- Vektor z ustreznim genom in markerjem za rezistenco na antibiotik vključimo v zarodne matične celice.
- Spremenjene matične celice selekcijiramo v celični kulturi z antibiotikom.
- Potem ko smo izolirali in analizirali njihov DNA, injiciramo spremenjene matične celice v blastocisto, ki jo potem implantiramo v maternico miške samice.

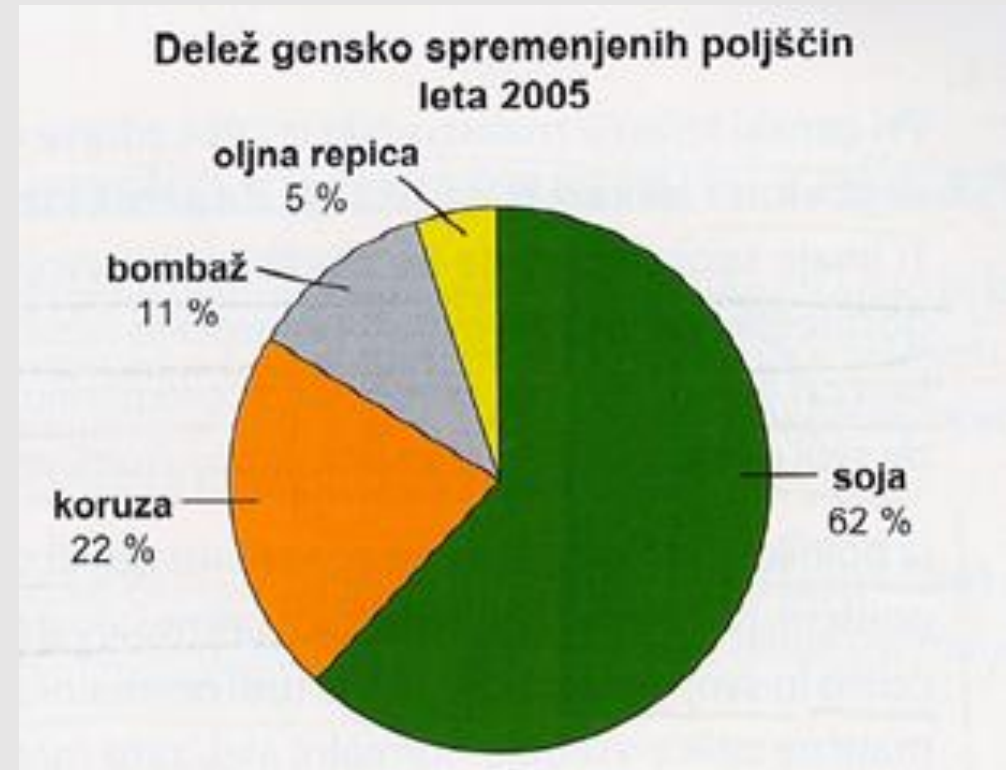


Transgene živali v raziskovalne namene

- Poskusnim živalim znanstveniki **deaktivirajo** kakšen **gen** zato, da bi spoznali njegovo vlogo. Te živali so znane pod imenom "**knock out**".
- Živalim z **dodanim genom** pa pravimo "**knock in**".
- Miške **knock out** in **knock in** omogočajo proučevanje **efekta genov na mnoge bolezni**, od genetskih bolezni do rakastih obolenj.
- Z vidika **ljubiteljev živali** je seveda **izkoriščanje živali v raziskovalne namene etično nedopustna**.

Gensko spremenjene rastline (GSO)

- Začetek razvoja GSO sega v 80. leta 20. stoletja.
- Prva komercialno gojena GS rastlina je bil **paradižnik Flavr Savr**, ki je prišel **na tržišče v ZDA** leta **1994**, čigar **plodovi se mehčajo počasneje** kot plodovi navadnega paradižnika (odstranitev gena za encim, ki razkraja celične stene).
- V naslednjih letih so začeli gojiti še **sojo**, **koruzo**, **bombaž**, **oljno repico**, **riž**, **pšenico**, **krompir**, **sončnico** in **peso**.



Pozitivne lastnosti GSO

- Izboljšanje **zoritvenih procesov** (npr. paradižnik Flavr Savr);
- odpornost na **herbicide**;
- odpornost na **stresne situacije** (mraz, slanost, suša);
- odpornost na **patogene** organizme (viruse, bakterije, glive);
- izboljšanje **hranilne vrednosti** (zlati riž z β -karotenom, GSO krompir vsebuje manj asparagina, aminokisline, iz katere se pri cvrtju tvori rakotvorni akrilamid);
- produkcija **rikombinantnih proteinov** (encimi, protitelesa, antigeni za cepiva).

Zlati riž

- V revnejših državah, v katerih je riž glavna hrana velikih skupin prebivalstva, je **pomanjkanje vitamina A** **resen zdravstveni problem**, ki **vsako leto** povzroča **oslepitev 500.000 otrok**.
- Riževa zrna namreč ne vsebujejo β -karotena, iz katerega človeško telo izdelava vitamin A.
- Znanstveniki so z vnosom tujih genov vzgojili **zlati riž**, ki vsebuje **velike količine β -karotena**.



Kljub temu, da so nekatere lastnosti GS rastlin potencialno boljše, so dvomi o njihovi neoporečnosti na človeka in na okolje še zelo aktualni.

Zakaj je veliko ljudi proti uporabi GSO v kmetijstvu in prehrani?

- Ker jih skrbijo **nepredvidljivi stranski učinki uživanja** GS poljščin (predvsem **možnost alergijskih reakcij** zaradi sinteze novih beljakovin, ki jih telo ne prepozna).
- Ker **lahko GS rastline oplojujejo** tudi **običajne rastline**, s tem pa je **ogroženo semenarstvo in ekološko kmetovanje**.
- Ker so ti procesi neobvladljivi, saj **veter raznaša cvetni prah** in **semena** kilometre daleč.
- Ker njihovo razširjanje **omejuje biotsko pestrost** na Zemlji.
- Ker **škodljivi učinki GSO na človeka niso dolgoročno raziskani**.
- Ker **imajo od GSO koristi samo** in izključno **proizvajalci** GSO, kmetje in potrošniki nimamo nikakršnih koristi.

Zakaj je veliko ljudi, proti uporabi GSO v kmetijstvu in prehrani?

- Ker se je razvil **monopol velikih proizvajalcev GS semen**.
- Ker **ni mogoče predvidevati posledic**, ki jih lahko GSO povzročijo **okolju** (**toksin Bt**, ki nastaja v listih in omogoča **zastropitev metuljevih gosenic**, **se sprošča tudi v zemljo**, česar znanstveniki niso predvideli in lahko negativno vpliva na talne nevretenčarje).

Izjava dr. Marka Debeljaka,
predavatelja ekologije na Univerzi v Novi Gorici, sicer
zaposlenega na Institutu Jožef Stefan

»Ljudi je strah stvari, ki jih ne poznajo, posebno, če čutijo, da jim te ogrožajo zdravje in okolje, v katerem živijo. Zato je pri odnosu splošne javnosti do gojenja gensko spremenjenih organizmov in do njihove uporabe v prehrani živali in ljudi povsem normalno, da pride do pojava splošnega dvoma in negotovosti ter do bolj ali manj prikritega strahu. To na žalost lahko pomeni dvoje: da znanost ni uporabila pravega pristopa pri obveščanju javnosti o GSO ali da ne razpolaga z dovolj trdnimi dokazi o zdravju in okolju neškodljivih vplivih GSO.«

Kaj je res o GSO – Kaj ni res o GSO

Vir: knjižica Boruta Bohanca in Miša Alkalaja, ki jo je nedavno izdala Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

GSO vsebujejo gene za odpornost proti antibiotikom

- Ti geni bi lahko iz rastlin preskočili v bakterije ter tako izničili uporabnost antibiotikov za zdravljenje vrste bolezni. Ta trditev vsebuje kanec resnice: nekatere gensko spremenjene rastline prve generacije dejansko vsebujejo (poleg funkcionalno vgrajenih genov) še gen za odpornost proti antibiotiku kanamicin. Vendar, pri novejših tehnologijah za gensko manipulacijo vključevanje teh tako imenovanih selekcijskih genov ni neizogibno oziroma so na voljo številni nesporni selekcijski geni, tako da se lahko vsaj v Evropi ugovor nanaša le na že starejše GSO. Posebna znanstvena skupina Evropskega urada za varnost hrane (EFSA) je že leta 2004 uradno analizirala posledice pridelovanja tovrstnih GSO in v svojem poročilu ugotovila, da imajo te gensko spremenjene rastline »13-letno zgodovino varne uporabe za prehrano«. Ampak, v istem dokumentu (pa tudi drugje) najdemo podatek, ki tezo o nevarnosti možnega prenosa gena za odpornost proti antibiotikom postavi v povsem drugačno luč: »odpornost proti tem vrstam antibiotikov je splošno razširjena pri vrsti naravno prisotnih mikrobov, pri ljudeh in v okolju nasploh«. Selekcijski geni, ki so jih uporabljali v genski tehnologiji, niso umetno ustvarjene tvorbe, kakršne se v naravi ne bi pojavljale – taki geni so v povsem naravnih organizmih prisotni že milijone let! Dejansko je verjetnost prenosa takega gena med vrstami zelo majhna – ampak, tudi če se lahko zgodi, se lahko pojavlja povsem naravno in se je pojavljala že davno pred človeško uporabo genskih tehnologij, zato uporaba GSO tveganja nič ne poveča.

Kaj je res o GSO – Kaj ni res o GSO

Vir: knjižica Boruta Bohanca in Miša Alkalaja, ki jo je nedavno izdala Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

GSO so povezani s celiakijo

- Kot mnoge podobne tudi ta trditev ne temelji na nikakršni znanstveni raziskavi, ki bi bila objavljena v recenzirani reviji. Vir je samo članek na spletnih straneh ameriške nevladne organizacije IRT (Institute for Responsible Technology), ki zagovarja popolno prepoved GSO. Sklep članka temelji na zelo čudni logiki: v zadnjih dveh desetletjih se je povečalo število alergij (kar je res), in prav tako se je povečala količina hrane, ki jo zaužijemo iz GŠ virov (kar je tudi res); tej sočasnosti pripisovati vzročno povezavo pa je logično neutemeljeno – v zadnjih letih se je povečalo tudi število osebnih računalnikov, pa najbrž nihče ne bo trdil, da to povzroča celiakijo. Trditev je še toliko bolj absurda, saj nikjer na svetu ni odobrena nobena GŠ sorta pšenice, ki je sicer poglavitni vzrok z glutenom povezanih težav. »Študijo« IRT je zavrnila celo ameriška Fundacija za celiakijo (Celiac Disease Foundation).

Kaj je res o GSO – Kaj ni res o GSO

Vir: knjižica Boruta Bohanca in Miša Alkalaja, ki jo je nedavno izdala Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

Toksini iz GSO so bili odkriti v krvi nosečnic in fetusov

- Najprej je treba pripomniti, da množina (»toksini«) v tej trditvi ni povsem upravičena. Medijski članki, ki izrazito poudarjajo to domnevno škodljivo lastnost GSO, se namreč sklicujejo na eno samo raziskavo »Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in Eastern Townships of Quebec, Canada« Aziza Arisa in Samuela Leblanca (Reproductive Toxicology, 2011). Dejansko sta avtorja opisala detekcijo samo ene (za žuželke) toksične beljakovine Cry1Ab ter njen izvor pripisala GSO, ki vsebujejo gen iz *Bacillus thuringiensis* (npr. korusa MON810). Članek je doživel vrsto ugovorov, najpomembnejši je, da sta avtorja za merjenje koncentracije toksina v ljudeh uporabila metodo ELISA, ki za ta namen ni bila primerna. Avtorja tudi ne navajata podatkov o prehrani preiskovanih subjektov, zato je neupravičena trditev, da v študiji zaznani Cry1Ab izhaja prav iz GSO – povsem naravno ga namreč vsebuje v zemlji zelo pogosta bakterija *Bacillus thuringiensis*; živi sevi te bakterije so tudi dovoljeno sredstvo za zatiranje škodljivih žuželk v ekološki pridelavi zelenjave! A celo če bi bil članek znanstveno povsem korekten – kar ni – ostaja dejstvo, da so bile detektirane koncentracije Cry1Ab prenizke (povprečje 0,19 ng/ml) celo za to, da bi škodile žuželkam – človeški organizem pa sploh nima receptorjev za to beljakovino. Različne snovi pač različno delujejo na organizme: npr. češnje so strupene za pse, mačke in konje, ne pa za ljudi.

Kaj je res o GSO – Kaj ni res o GSO

Vir: knjižica Boruta Bohanca in Miša Alkalaja, ki jo je nedavno izdala
Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

DNK iz GSO se lahko prenesejo na ljudi, ki jedo tako hrano

- Študija, ki jo nasprotniki GSO citirajo, ne trdi, da se to lahko zgodi samo z geni GSO, ampak da je mogoče gene iz vsake zaužite hrane najti tudi v človeškem organizmu. Vendar se ti geni ne vgradijo v človeške genetske strukture, ampak jih je mogoče najti v krvi. Študija, ki je to ugotovila, si je zaslužila mnogo pripomb, saj je sicer potrjeno, da so strukture DNK kemično precej nestabilne in hitro razpadejo že v blago kislem okolju (npr. v človeškem želodcu), hkrati pa jih razgradi tudi pepsin. Ampak vseeno sprejmemo, da je tako. Kar preprosteje povedano pomeni, da lahko v človeški krvi najdemo gene iz Bt koruze ali iz govejega mesa, če jih jemo. Vendar še nikomur, ki je pojedel goveji zrezek, niso zato zrasli rogovi. Možnost, da bi na tak način v človeka vgradili kakšno gensko strukturo iz GSO, je enako neverjetna. Horizontalni prenosi genov – torej med povsem različnimi vrstami – se v naravi dogajajo, a so zelo redki. Lahko, da je bil pri katerem mehanizmu tudi prenos skozi hrano, a kot kaže vrsta raziskav, vsebujejo genomi (tudi naš) obsežno zaščito proti prevzemu tujega gena. In sploh, kot kaže zgodovina evolucije, tak horizontalni prenos ni omejen na gene iz GSO.

Kaj je res o GSO – Kaj ni res o GSO

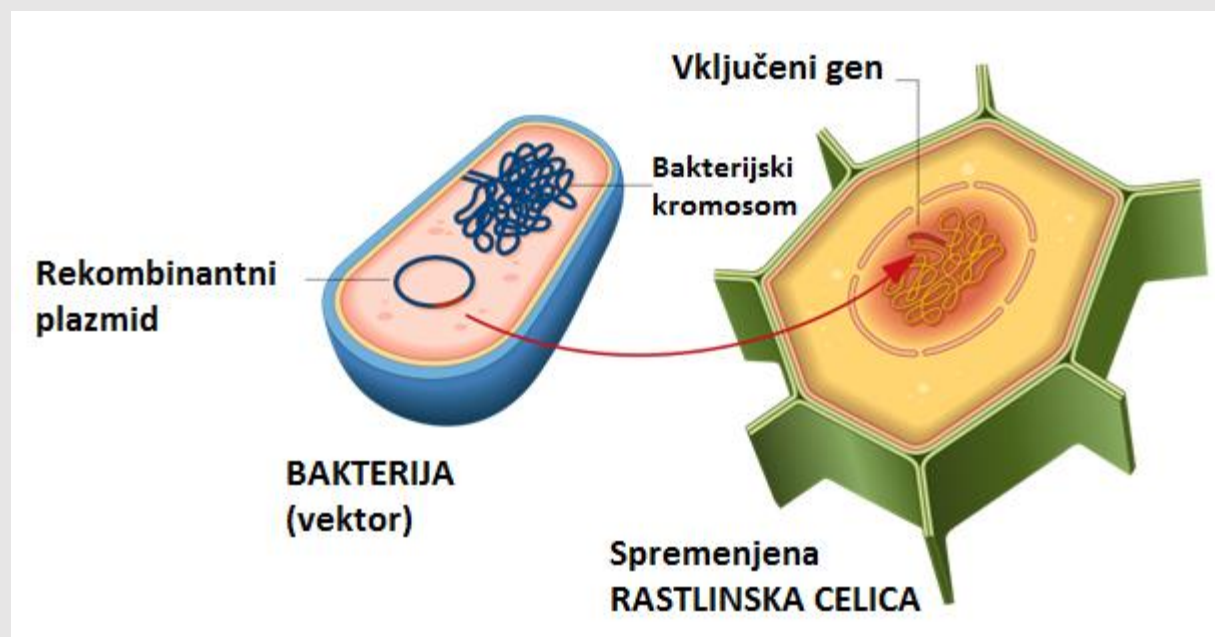
Vir: knjižica Boruta Bohanca in Miša Alkalaja, ki jo je nedavno izdala Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

Plodovi GSO povzročajo alergije

- Take trditve se pojavljajo vedno znova in nemogoče je na vse odgovoriti. Zato si oglejmo le dva znana primera. Koruza starlink evropskega podjetja Aventis povzroča alergijo pri ljudeh. Sploh ne. Koruza starlink je bila prvotno razvita in odobrena samo za prehrano živali. Vendar so okoljevarstvene organizacije »na osnovi lastnih raziskav« ugotovile, da se je GS koruza znašla tudi v človeški hrani, predvsem v (v ZDA) priljubljenem koruznem čipsu, in da povzroča alergije. Zaradi intenzivne medijske kampanje poklicnih okoljevarstvenikov je več deset ljudi dejansko prijavilo alergične reakcije, domnevno povzročene s koruznim čipsom – vendar so klinične študije to domnevo, kot tudi tezo o alergenosti koruze starlink, ovrgle. Kot drugi si oglejmo primer brazilskih oreškov in soje. Domnevni »dokaz«, ki ga nasprotniki GSO citirajo, je samo poročilo o raziskavah na GS soji podjetja Pioneer, ki so ji zato, da bi imela bolj ugodno beljakovinsko sestavo, dodali gen iz brazilskega oreška. Kljub temu, da so GS sojo razvijali samo za prehrano piščancev, so nadaljnji razvoj ukinili, ko so ugotovili, da bi dodani gen lahko povzročal alergično reakcijo pri ljudeh – »sporna« soja torej nikoli ni bila pridelovana niti kot hrana za živali. Primer lepo ilustrira izjemno visoko stopnjo previdnosti, ki je prisotna prav pri testiranju GSO. Če bi takšna sorta soje vendarle prišla v pridelavo, bi torej lahko povzročila alergijsko reakcijo le pri ljudeh, ki so sicer alergični na brazilske oreške, kajti alergena snov bi bila povsem enaka. Omenimo še, da brazilski oreški, ki preučevano alergeno snov vsebujejo povsem naravno, niso nikjer prepovedani.

Proizvajanje GSO

- Nekatere bakterije lahko prenašajo plazmide tudi v evkariontske celice.
- Takemu prenosu pravimo **transfekcija**.



Transfekcijo so odkrili s študijem naravnega primera genskega inženiringa



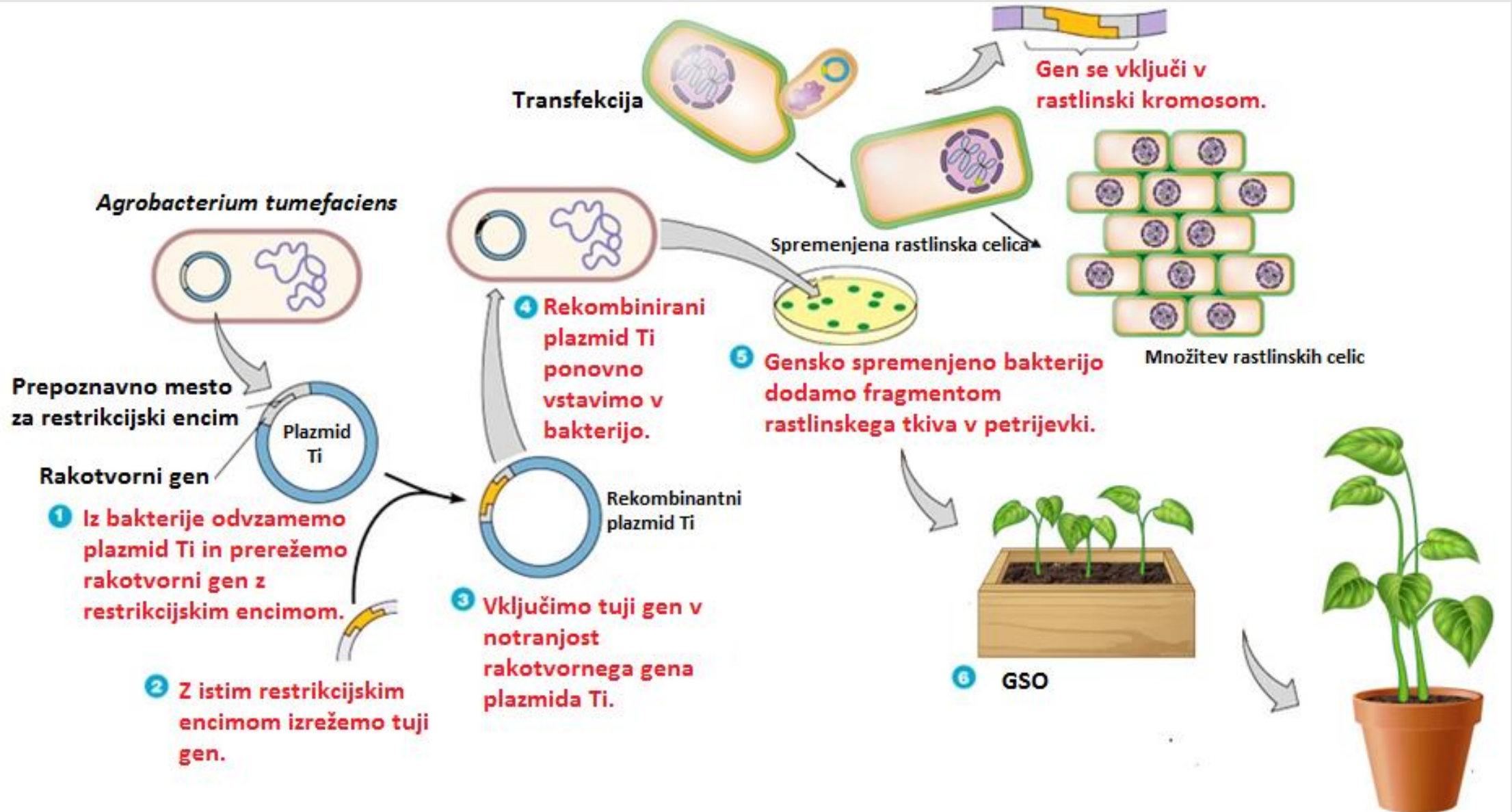
Bakterija *Agrobacterium tumefaciens* povzroča nastanek rakastih izrastkov na številnih rastlinah.

Bakterija prenese v rastlino del svoje DNA in tako omogoči nastanek gensko spremenjene rastline.

Proizvajanje GSO

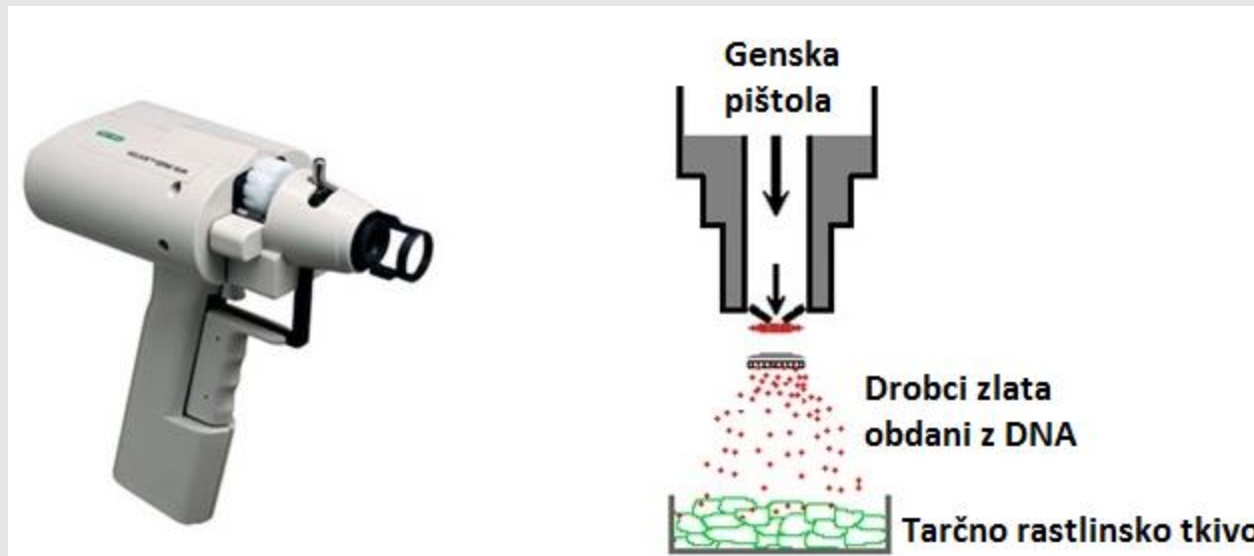
- S pomočjo bakterije *Agrobacterium tumefaciens* lahko vključimo katerikoli gen v celice dvokaličnic.
- Iz bakterije odvzamemo plazmid T_i , ki vsebuje rakotvorni gen.
- V notranjost rakotvornega gena vključimo želeni gen.
- V bakterijo ponovno vstavimo spremenjeni plazmid T_i .
- Rastlino okužimo z bakterijo.
- Gen se vključi v rastlinsko DNA.

Proizvajanje GSO



Proizvajanje GSO

- Za proizvodnjo GS **enokaličnic** uporabljajo **biobalistično metodo**:
- Rastlinske celice bombardirajo z **mikronaboji** iz **zlata** ali **tungstena**, ki so **obdani z molekulami DNA**, ki jih hočejo vključiti.

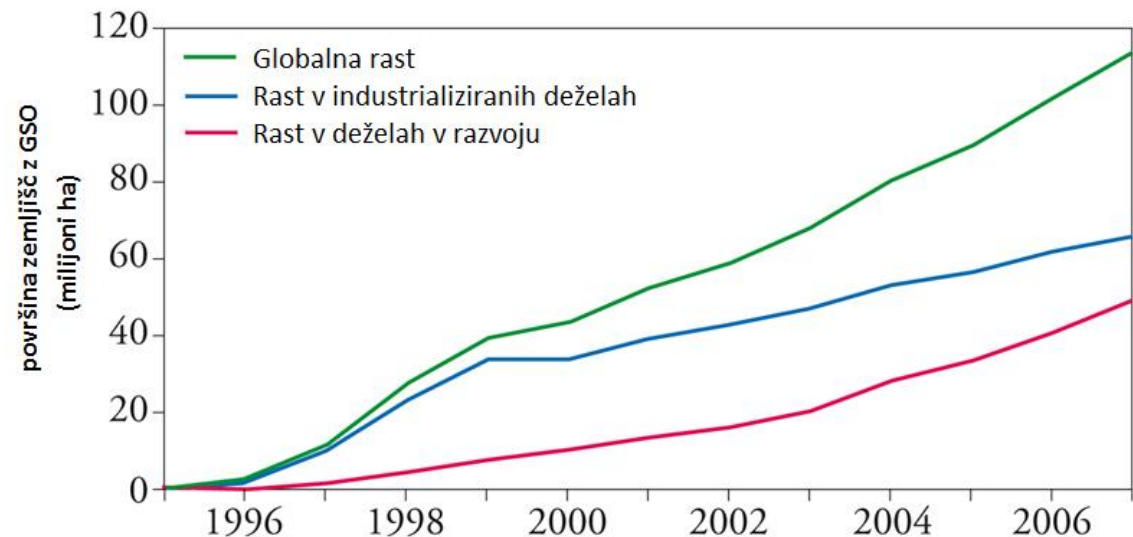
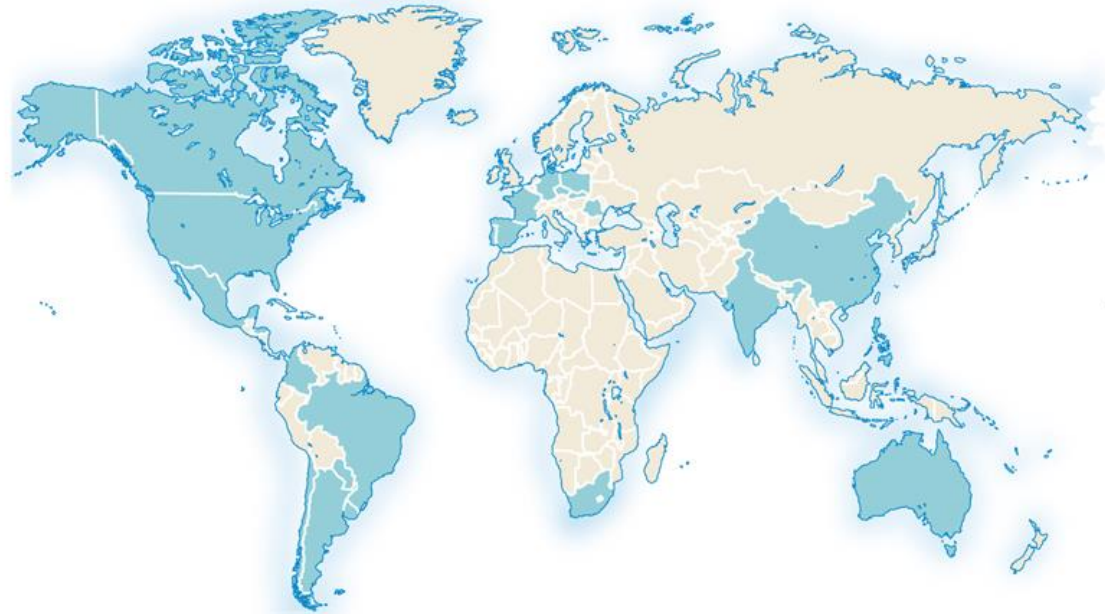


Zakonodaja, ki ureja uporabo GSO

- **Zakonodaja, ki ureja gojenje GSO** je od države do države različna.
- V **Evropi** je bolj **restriktivna** kot v ZDA.
- V **Italiji** in **Sloveniji** je **gojenje GSO dovoljeno samo v znanstvene namene**, na pa za pridelovanje poljščin.
- **Dovoljeno** pa je **uvažanje GSO pridelkov**.

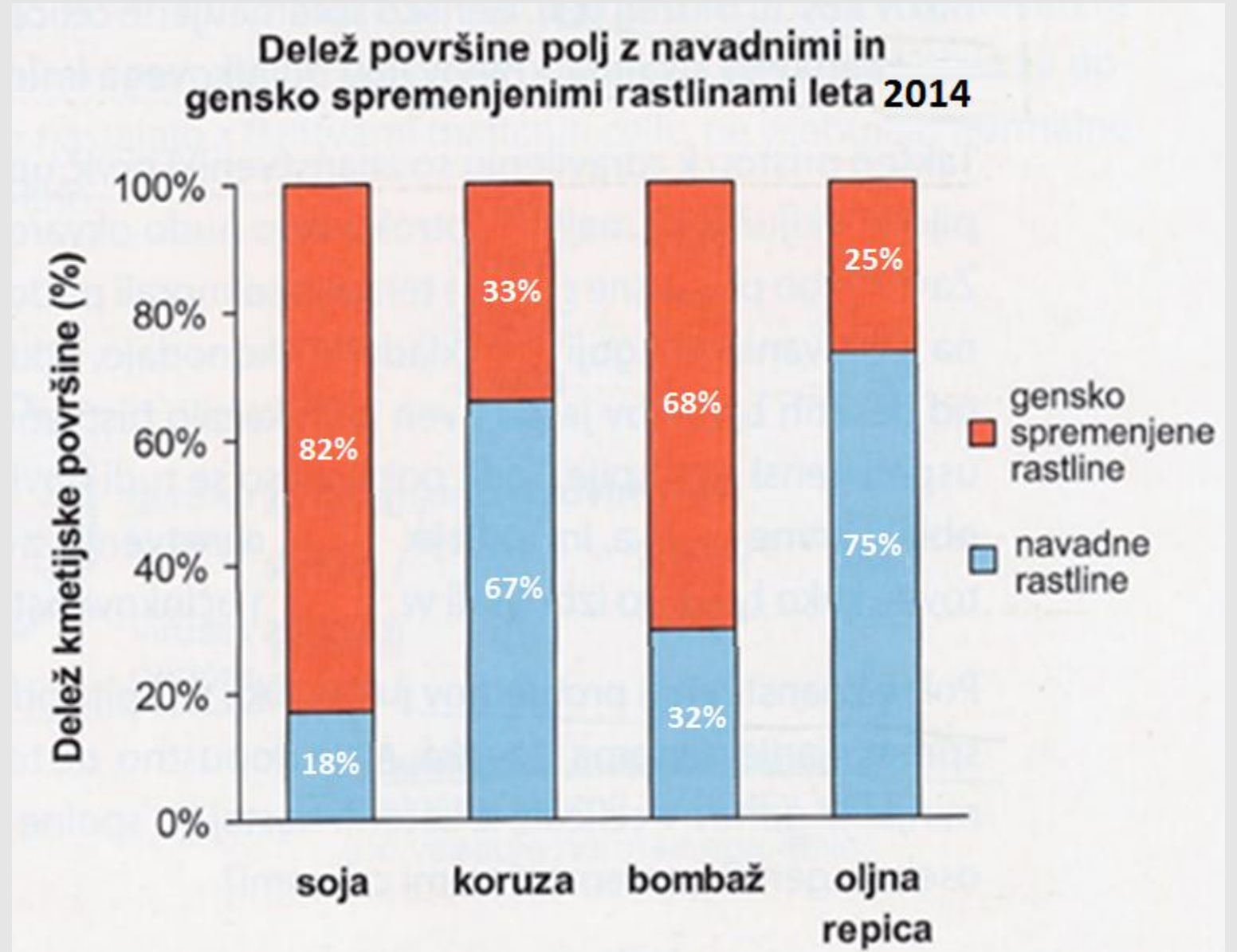
Naraščanje površine zemljišč, na katerih gojijo GSO

- Od leta 1996 (1,7 milijonov ha) do leta 2014 (181 milijonov ha) se je površina zemljišč, na katerih gojijo GSO več kot 100-krat povečala.
- Vsekakor se naraščanje nanaša samo na 28 držav na skupnih 198.
- Zabeležiti gre tudi, da se v skoraj vseh 28 državah čedalje bolj širijo protesti zoper gojenje GSO.

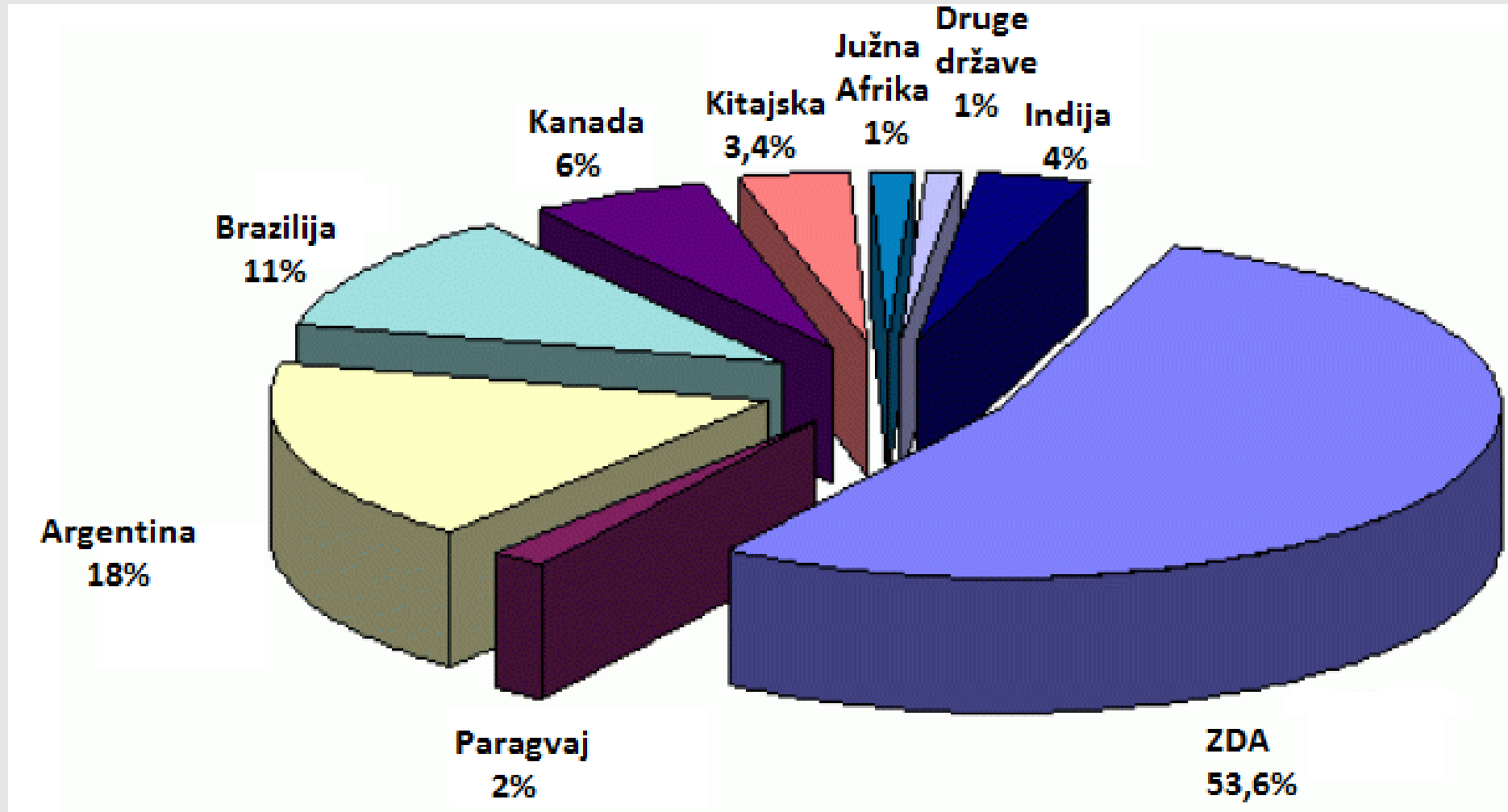


V svetovnem merilu je bilo leta 2014 gensko spremenjenih

- 33% koruze,
- 25% oljne repice,
- 68 % bombaža
- in kar 82 % soje.



Svetovna razporeditev pridelovanja GSO



GSO v Evropi

- V Evropi je GSO precej manj, saj jih trenutno (le koruzo MON810) pridelujejo le **v petih državah**:
 - Španiji (največ),
 - Portugalski,
 - Romuniji,
 - Češki
 - Slovaški.

Okoljska biotehnologija

Biotehnološke metode lahko uporabljamo tudi za:

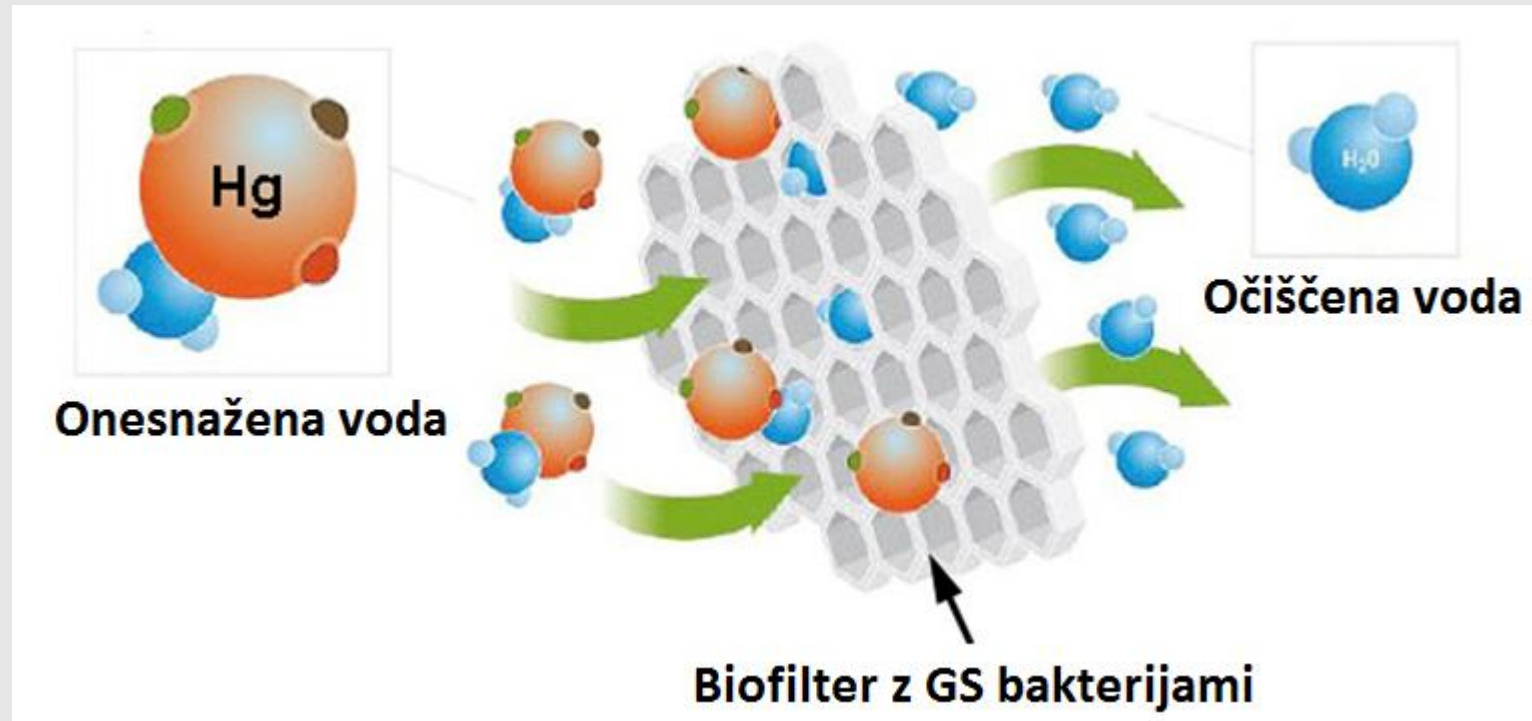
- **bioremediacija** (biotehnološke procese za čiščenje vode in tal)
- **proizvajanje biogoriv**.

Bioremediacija

- Bioremediacija je postopek, pri katerem **gensko spremenjeni mikroorganizmi** razgradijo **onesnaževalce okolja** v **neškodljive** ali **biološko razgradljive** končne **produkte**.
- Bioremediacija temelji na naravnih procesih **osidacije** in **redukcije**.
- Bioremediacija je za svojo **nizko ceno** izredno učinkovita metoda odstranjevanja nečistoč, v nekaterih primerih pa je to **edina praktična rešitev za čiščenje**.
- **Primeri bioremediacije:**
 - **Absorbcija težkih kovin** (Hg, Cr, Pb, As)
 - **Razgradnja ogljikovodikov** (nafte) in **industrijskih organskih odpadkov**
 - **Sprememba plastike** v **biološko razgradljivo snov**.

Absorpcija težkih kovin

Z gensko spremenjeno bakterijo *E. coli* lahko proizvajamo **biofiltre** za **odtegovanje Hg iz onesnažene vode**.



Biogoriva

- Svet je preplavila ideja o nadomestitvi bencina z biogorivom (etanol, biodizel).
- Etanol pridobivajo s fermentcijo rastlin, ki so bogate na ogljikovih hidratih (koruza, sladkorni trs, pšenica, ječmen).



- **Energija** fosilnega goriva, porabljena za izdelavo koruznega etanola v primerjavi z energijo, ki jo da koruzni etanol, je 1:1,3. Koruzni etanol izpušča v zrak 22 % manj toplogrednih plinov kot bencin.
- **Energija** fosilnega goriva, porabljena za izdelavo etanola iz sladkornega trsa v primerjavi z energijo, ki jo da etanol, je 1:8. Etanol sladkornega trsa izpušča v zrak 56 % manj toplogrednih plinov kot bencin.



Biogoriva

- **Biodizel** pridobivajo iz **oljnatih rastlin** (soja, palma, oljna repica).
 - **Energija** fosilnega goriva, **porabljena za izdelavo** biodizla v primerjavi z **energijo**, ki jo da **biodizel** je **1:2,5**.
 - Biodizel izpušča v zrak **91 % manj toplogrednih plinov** kot bencin.
 - **Največja pomanjkljivost** biodizla so **visoki stroški pridelave**.



Polje z oljno ogrščico

www.vdcey.si



Biodizel iz sončnic

<http://o2z2.com>

Zagovorniki biogoriv

- **Zagovorniki** pravijo, da bi biogoriva lahko **rešila umirajoče podeželsko gospodarstvo**, omogočila **neodvisnost od Srednjega vzhoda** in, kar je najpomembneje, zmanjšala vsebnost toplogrednih plinov v ozračju.
 - Z razliko od starega ogljika, ki ga v zrak spuščamo z izgorevanjem fosilnih goriv, **izhaja ogljik v biogorivih iz ozračja**, saj ga **rastline** skladiščijo s fotosintezo v času rastne sezone (**črpajo iz ozračja CO₂**).
 - Z biogorivi bi prišlo do **nevtraliziranja bilance CO₂**: črpanje bi se izenačilo z izločanjem.
- V nasprotju s premogom in nafto so biogoriva **obnovljiva** in v celoti **biorazgradljiva**.

Nasprotniki biogoriv

- **Okoljevarstveniki** se bojijo, da bodo naraščajoče cene koruze in soje vodile kmete v **obdelavo obrobne kmetijske zemlje**, ki so sedaj namenjene ohranjanju prsti in divjih živali in bi se potencialno tudi **na območju neobdelanih zemljišč** spuščalo v zrak CO₂.
- **Neprijetna resnica** je tudi ta, da bi bilo v trenutnem stanju razvoja mogoče **pridelati zadostne količine surovin**, ki bi bile z ekonomskega stališča zanimive za proizvodnjo biogoriv, **samo z intenzivnim kmetijstvom** (ki vključuje porabo velike količine **umetnih škropiv, gnojil in vode**).

Nasprotniki biogoriv

- Biogoriva **porabljajo pridelke**, ki bi lahko **služili prehrani**.
- Nedavno **poročilo Združenih narodov** zaključuje, da kljub temu, da so potencialne koristi velike, bi **širjenje proizvodnje** lahko **zmanjšalo prehransko varnost** in **povečalo cene hrane** na območjih, kjer vsak dan zaradi lakote umre 25.000 ljudi.
- **Potreba po** obeh, **gorivu in hrani**, **naj bi se do sredine stoletja podvojila**; mnogo znanstvenikov se pa boji, da bodo **podnebne spremembe** v naslednjih desetletjih **spodkopale kmetijsko proizvodnjo**.
- **Čarobnega pridelka**, ki bi rešil naše energetske težave, **ne da bi škodoval okolju, ni**.

Druge vrste biogoriv

- V skupino **lesne biomase**, ki jo je smotrno uporabljati v energetske namene, uvrščamo:
 - manj kvaliteten les iz gozdov,
 - les iz površin v zaraščanju,
 - les iz kmetijskih in urbanih površin,
 - lesne ostanke predelave lesa,
 - odslužen (neonesnažen) les.
- Lesna biomasa se kot vir energije uporablja v obliki polen, lesnih sekancev in lesnih pelet.



Druge vrste biogoriv

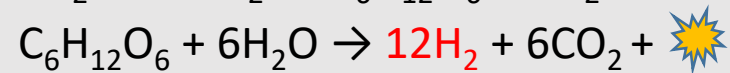
- **Bioplin (CH_4)** pridobivajo v **anaerobnih razmerah** iz **organske biomase** (koruza, trava, detelja, krmna pesa, listi sladkorne pese, sončnice, ogrščica), iz **hlevskega gnoja** in **gnojevke** ter iz **komunalnih odpadkov**.
- Bioplin lahko uporabimo za **proizvodnjo toplote** in **električne energije** ter kot **pogonsko gorivo** za **kmetijsko mehanizacijo**, za **čistilne naprave** in za **industrijo**.
- Bioplin prispeva k **zmanjševanju onesnaževanja vode** in **degradacije tal**.
- V **Sloveniji** uporaba bioplina **še ni razširjena**.
 - Bioplin pridelujejo npr. na prašičji farmi Ihan in v čistilnih napravah (Škofja Loka, Domžale, Kranj, Jesenice).
 - Država spodbuja energetska izrabo bioplina z zagotovljenim odkupom in ugodno odkupno ceno električne energije.



Druge vrste biogoriv

- **Biovodik** je privlačna alternativa tudi kot pogonsko avtomobilsko gorivo, ki se lahko uporablja v motorjih z notranjim izgorevanjem.
- Obstajajo trije tipi mikroorganizmov, ki so sposobni proizvodnje vodika:

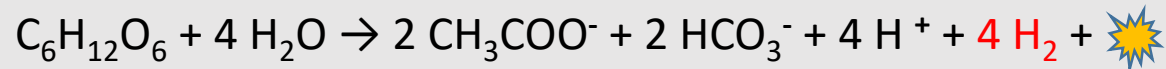
- **Cianobakterije:**



- **Fotoheterotrofne bakterije** (halofilne arhibakterije ter škrlatne in zelene nežveplove bakterije) ki pretvarjajo organske substrate, npr. organske kisline v vodik in druge snovi s pomočjo svetlobne energije.



- **Kemoheterotrofne bakterije**, ki v temi pretvarjajo organske odpadke v vodik in druge snovi s pomočjo kemijske energije v organskih snoveh. Postopku, ki poteka v striktno anaerobnih pogojih in v prisotnosti zadostne količine vode, pravimo temna fermentacija.



Varnostne prednosti in slabosti biovodika

- Ob razlitju se bo **vodik**, ker je **lažji**, hitreje razširil kot metan in se bo **hitro razpršil po prostoru**.
- To je na prostem verjetno vodikova **največja varnostna prednost**.
- **Visoka vnetljivost** vodika in njegovih mešanic z zrakom predstavlja **slabost** v primerjavi z ostalimi gorivi.

Mnenje večine znanstvenikov o načinu produkcije biogoriv

- Večina znanstvenikov meni, da naj bi bile **najboljša možnost alge**, enocelični vodni organizmi, saj **rastejo v odpadni vodi, tudi morski**, in za uspevanje **zahtevajo le svetlobo in CO₂**.
- Medtem ko koruzo in sojo žanjejo enkrat letno, lahko **alge uporabljamo vsak dan**.

GSO za proizvodnjo biogoriv

- Znanstveniki zagovarjajo tudi uporabo gensko spremenjenih organizmov (**GSO**) za **proizvodnjo biogoriv**.
- V ta namen načrtujejo produkcijo **GS poljščin**:
 - s povečanim **deležem ogljikovih hidratov in olj**
 - s povečano **odpornostjo**
 - s povečano **fotosintetsko sposobnostjo**
 - s povečano **sposobnostjo pobabe atmosferskega dušika**
- Načrtujejo tudi produkcijo **GS bakterij**, ki bi bile sposobne:
 - proizvajati **biodizel**
 - **izboljšati** že **poznane procese pridobivanja biovodika**.