

MOLEKULARNA BIOTEHNOLOGIJA – ETIČKI IZAZOV 21. VEKA

Ljubiša Topisirović

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd

Sve svetske prognoze oko osnova tehnologije 21. veka se slažu u tome da će upravo molekularna biotehnologija biti pokretačka snaga razvoja savremene civilizacije. Razlog za ovakve prognoze leži u problemima sa kojima se već uveliko susreće današnja civilizacija. Ti glavni problemi se mogu relativno lako sumirati u sledećim izazovima:

1. Dobijanje sirovina za hemijsku i ostale industrije iz drugih, obnovljivih izvora (npr. biomasa), a ne iz fosilnih goriva čije su količine ograničene.
2. Dobijanje novih biodegradabilnih materijala.
3. Dobijanje alternativnih formi energije (korišćenje sekundarne biomase i ostalih otpadaka raznog porekla za proizvodnju gasa, alkohola i vodonika).
4. Unapređenje poljoprivredne proizvodnje (dobijanje đubriva organskog porekla, stočne hrane, aktivnih i manje opasnih pesticida).
5. Zdravstvena zaštita (proizvodnja novih antibiotika, novih vakcina, novih lekova i novih dijagnostičkih sredstava).
6. Zaštita životne sredine (prečišćavanje otpadnih voda, razgradnje polutanata, revitalizacija zagađenog zemljišta, itd.).

U najgrubljim crtama, biotehnologija se definiše kao proces koji koristi žive organizme ili njihove delove za dobijanje ili modifikaciju određenih proizvoda, kao i za različite vidove usluga (na primer, korišćenje mikroorganizama za prečišćavanje otpadnih voda ili za razgradnju gradskog đubriva). Uvođenjem najnovijih znanja iz oblasti molekularne biologije u obliku genetičkog inženjerstva u cilju unapređivanja biotehnoških procesa, dobio se jedan sasvim novi kvalitet, odnosno počela je da se razvija molekularna biotehnologija. Umesto da se samo izoluju određeni proizvodi koje neki organizam već sintetiše, sada je moguće od mikroorganizama, biljnih ili životinjskih ćelija napraviti "biološke fabrike" koje će proizvoditi veliku količinu ekonomski vrednih jedinjenja kao što su, na primer, proteini, vitamini, aminokiseline, antibiotici, itd. S druge strane, genetičkim inženjerstvom je

moguće povećati proizvodnju ili u samom tom organizmu ili je moguće klonirati gene za biosintezu tog produkta i prebaciti ih u neki drugi organizam, odnosno konstruisati transgene organizme.

Značaj molekularne biotehnologije za opštu proizvodnju hrane, dobijanja energije i sirovina za različite vidove industrije, uvećava se usled mogućnosti da se njenom primenom kao izvor polaznog sirovinskog materijala koriste obnovljivi resursi, kao što su biomasa, otpaci iz industrije, stočarstva ili gradskih sredina. Zapravo, sve se više radi na unapređenju iskorišćavanja sekundarnih sirovina, koje često stvaraju ekološke probleme. Na ovaj način se postiže dvostruka dobit: rešavanje ekoloških problema i dobijanje korisnih proizvoda iz takvih sirovina.

Doprinos genetičkog inženjerstva razvoju molekularne biotehnologije se ogleda u tome što omogućava:

1. izučavanje strukture i funkcije gena svih živih sistema koji su interesantni za manipulaciju, jer determinišu proizvodnju neke supstance od komercijalnog značaja,

2. izazivanje mutacija na specifičnom mestu u genu (dirigovana mutageza) koja za posledicu može imati povećanje sinteze produkta za koga taj gen nosi informaciju,

3. prevazilaženje uskih grla u biosintetski različitim metabolita od koristi, povećanjem broja gena koji je odgovoran za sintezu kritičnog enzima u biosintetskom putu. Povećanje broja gena u ćeliji omogućava sintezu tog enzima u većoj količini i na taj način povećanu sintezu krajnjeg produkta tog biosintetskog puta,

4. dobijanje proizvoda koje je na drugi način teško, skupo ili nemoguće dobiti. Svakako da je najveći doprinos genetičkog inženjerstva molekularnoj biotehnologiji upravo u ovom domenu. Naime, genetičko inženjerstvo omogućava manipulaciju genima ili bakterijama gena i prebacivanjem tih gena iz jedne biološke vrste u drugu, što se u prirodi ne može spontano dešavati. S druge strane, moguće je konstruisati himerne gene (na primer, jedan deo gena koji kodira proteinazu je poreklom iz jedne, a drugi deo gena koji kodira isti enzim iz druge vrste) i tako konstruisane gene ubaciti u živi organizam. Uopšte uzev, organizmi čiji je genetički materijal promenjen na način koji se ne dešava u prirodi, odnosno kod kojih je izmena u genetičkom materijalu ostvarena korišćenjem genetičkog inženjerstva, nazivaju se opštim imenom genetički modifikovani organizmi (GMO). Na taj način se mogu dobiti novi biološki sistemi koji se mogu koristiti u biotehnološkim procesima (1).

Odluka o primeni molekularne biotehnologije za poboljšanje postojeće biotehnološke proizvodnje ili za razvoj novog biotehnološkog postupka, mora zavisiti od tehno-ekonomske analize celokupnog procesa, koji se želi unaprediti. Ta analiza treba najmanje da sadrži informacije (a) o raspoloživom tržištu za biotehnološki proizvod (potreba za specifičnim proizvodom, u kojoj količini i kojoj godišnjoj dinamici), (b) o dostupnosti i ceni sirovinskog materijala za

biotehnoške procese, (c) o razlozima neefikasnosti biotehnoškog postupka koji je već u upotrebi i (d) o postojanju uslova za uspešnu primenu genetičkog inženjerstva gde se ustanovi da ova primena može dovesti do povećanja ekonomičnosti biotehnoškog procesa.

S obzirom na svoje mogućnosti, molekularna biotehnologija daje osnovu da se u postojećim procesima ostvari značajno veća proizvodnja. Pored toga pruža mogućnosti otvaranja nove industrijske ere u smislu konstrukcije procesa koji će omogućiti dobijanje proizvoda koji se na drugi način nisu mogli dobijati u zadovoljavajućoj količini ili koji su dobijani na veoma skupe načine. Nisu nerealna očekivanja da će se primenom molekularne biotehnologije današnje biotehnologije učiniti efikasnijim i ekonomičnijim. Stoga se, danas u svetu, pod molekularnom biotehnologijom upravo podrazumevaju tehnološki procesi zasnovani na GMO, te se u svetu, ne bez osnove, očekuje da molekularna biotehnologija postane osnova za razvoj tehnologija 21. veka. Stoga nije čudno što je izuzetno veliki broj kompanija orijentisao svoja istraživanja i razvoj u oblasti molekularne biotehnologije imajući upravo u vidu potencijale ove tehnologije i sagledavanje razmera razvoja novih proizvoda i usluga, samim tim i profita (Tabela 1).

Tabela 1. Najuspešnije biotehnoške kompanije - prihod i investicije u 2002. godini.

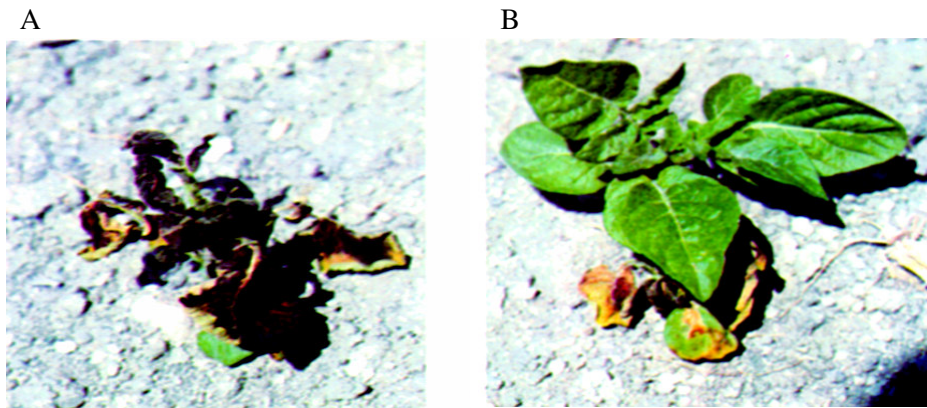
| Kompanija | Prihod (\$M) | Investicije u istraživanja i razvoj (\$M) | Odnos |
|------------------|---------------------|--|--------------|
| AMGEN | 5.523 | 1.117 | 4,94 |
| GENENTECH | 2.719 | 623 | 4,36 |
| SERONO | 1.547 | 358 | 4,32 |
| CHIRON | 1.276 | 326 | 3,91 |
| BIOGEN | 1.148 | 368 | 3,11 |
| QIAGEN | 299 | 28 | 10,67 |
| AFFIMETRIX | 290 | 70 | 4,14 |

Molekularna biotehnologija mikroorganizama

Mikroorganizmi se veoma dugo koriste u različitim proizvodnim procesima i manipulacija s njima je relativno dobro poznata. Stoga nije ni čudno što su zapravo mikroorganizmi bili prvi organizmi koji su korišćeni za genetičke manipulacije. S druge strane, mikroorganizmi su najbrojniji živi sistemi na planeti Zemlji sa još uvek nesagledivim potencijalima. Neki od mikroorganizama su već iskorišćeni za konstrukciju genetički modifikovanih mikroorganizama (GMM), koji imaju praktičnu primenu. Bakterije su važna komponenta mikroflore lista biljaka i značajno utiču na stanje biljaka, jer od

sastava ekosistema lista zavisi i kvalitet biljaka. Među ovim bakterijama najviše je rađeno na *Pseudomonas syringae* koji je definisan kao biljni patogen i uzrok zamrzavanja biljaka, pošto poseduje svojstvo da se odbrani od zamrzavanja formirajući nukleus kristalizacije leda na biljci. Stoga je konstruisan genetički modifikovan *P. syringae* koji je izgubio sposobnost formiranja kristala leda na biljci pri niskim temperaturama. To je bio prvi rekombinantni organizam (Ice *P. syringae*) koji je svesno pušten u prirodnu sredinu (2). Biljke koje na svojim listovima imaju genetički modifikovan Ice *P. syringae* podnose niže temperature, odnosno smrzavaju se na nižim temperaturama nego iste biljke sa *P. syringae* divljeg tipa (Slika 1). Mikroorganizmi se već duže vreme koriste za ekstrakciju različitih metala (bakar, zlato, uran) iz jalovina rudnika, što čini proces eksploatacije rudnih bogatstava (Slika 2) mnogo efikasnijim, s jedne, a ujedno revitalizaciju zemljišta s druge strane (3, 4, 5).

Nije, takođe, čudno što su zapravo mikroorganizmi bili iskorišćeni kao domaćini prvog izbora za dobijanje, npr. humanih proteina. Pre uvođenja genetičkog inženjerstva, najveći problem je bio doći do dovoljnih količina humanih proteina koji se koriste u terapijske svrhe. Ovaj problem je bilo moguće prevazići kloniranjem odgovarajućih gena u mikroorganizme, koji onda mogu da se gaje u relativno jednostavnim medijumima i iz kojih je moguće izolovati dati proizvod u velikim količinama i na mnogo lakši način. Neki od humanih proteina, koji su dobijeni u procesima molekularne biotehnologije baziranim na transgenim mikroorganizmima su insulin, hormon rasta, interferoni, interleukini, antitripsin, faktor nekroze tumora, urokinaza, serum albumin, itd.



Slika 1. A) Krompir oštećen mrazom; B) Krompir sa koga su eliminisane bakterije odgovorne za formiranje kristala leda.

Efekat jednak ovome može se postići ako se biljka popraska bakterijama Ice *P. syringae* kojima je sposobnost formiranja kristala leda uklonjena genetičkim inženjerstvom.

A



B



Slika 2. Tehnološki postupak dobijanja (izdvajanja) bakra iz jalovine pomoću specijalnih bakterija. A) Jalovište pored rudnika, 1983. godina. B) Isti prostor posle tretmana izluživanja bakra pomoću bakterija, 1986. godina.

Molekularna biotehnologija biljaka

Primena genetičkog inženjerstva u manipulaciji biljkama otvorilo je nesagledive perspektive korišćenja biljaka u budućnosti. Glavni cilj molekularne biotehnologije biljaka je konstrukcija novih varijeteta kultivisanih biljaka (transgenih biljaka), odnosno poljoprivrednih kultura. Izučavanja su usmerena na razvoj varijeteta koji će dati veći prinos sa istim ili povećanim hranljivim kvalitetom biljke. Stoga su već konstruisane genetički modifikovane biljke koje poseduju rezistenciju na insekte, patogene (u prvom redu na viruse), herbicide, određene stresne uslove sredine, biljke čiji plodovi sporije trule ili biljke sa izmenjenim kvalitetom ulja ili proteina. Već u 2000-oj godini, ukupna površina zemljišta zasejanog transgenim biljkama je bila 44,2 miliona hektara, a porast u odnosu na 1999. godinu je iznosio 11%. Te godine transgene biljke su se gajile u 13 zemalja sveta i to u SAD (30,3 miliona ha), Argentina (10 miliona ha), Kanada (3 miliona ha) i Kina (0,5 miliona ha). Transgene biljke se gaje i u Južnoj Africi, Australiji, Bugarskoj, Francuskoj, Nemačkoj, Meksiku, Rumuniji, Španiji i Urugvaju. U 2000-toj godini je najviše bilo zasejano transgene soje (25,8 miliona ha), a kukuruza (10,3 miliona ha) i pamuka (5,3 miliona ha). Transgene biljke tolerantne na herbicide su bile zastupljene sa 74%. Transgene biljke otporne na insekte su konstruisane ubacivanjem Bt gena odgovornog za sintezu toksičnog proteina za insekte (Bt toksin = Cry1Ab toksin), a koji je poreklom iz bakterije *Bacillus thuringiensis*. Ove biljke su bile zastupljene sa 19% zasejanog zemljišta (6). Podaci iz 2004. godine govore da se transgene biljke gaje u 16 zemalja širom sveta na površini od preko 200 miliona hektara i da su najbrojnije transgene biljke rezistentne na herbicide, a da prednjači soja.

S obzirom da su transgene biljke proizvod ljudske aktivnosti i da se takve ne nalaze spontano u prirodi, organizuju se istraživanja vezana za praćenje eventualnog efekta korišćenja transgenih biljaka na okolinu u kojoj se gaje. Šta

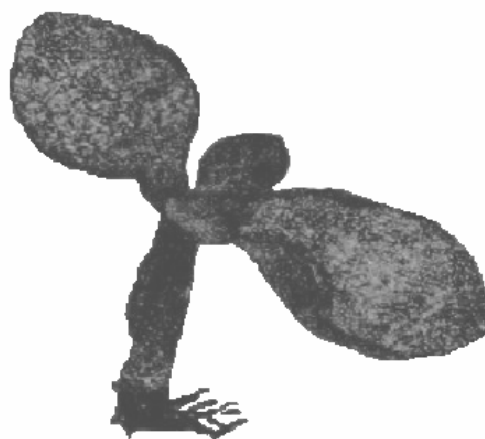
više u mnogim zemljama gajenje transgenih biljaka je regulisano pravilima definisanim u zakonima/direktivama. Tako je detektovano da se insekticidni Bt toksin ekskretira iz korena transgenog kukuruza nakon 40 dana gajenja u laboratorijskim uslovima, ali i u okolini korena zrelog kukuruza u polju, dok Bt toksin nije nađen u zemljištu na kome nisu rasle transgene biljke kukuruza. Prisustvo Bt toksina u zemljištu može biti uzrok razvoja štetnih insekata koji su otporni na Bt toksin (7). Upravo ovakvi nalazi su inicirali razvoj sistema za kvantitativnu detekciju genetičkih modifikacija kod kukuruza (8). Međutim, rezultati istraživanja koja su pratila razgradnju Bt toksina u različitim godišnjim dobima i trajala ukupno 200 dana su pokazali da se Bt toksin ne razlaže kompletno u zemljištu (9). Mnogo obimnije četvorogodišnje studije praćenja razgradnje Bt toksina u ostacima kukuruza u polju su pokazale da je Bt toksin u tim ostacima izuzetno nestabilan i da se brzo raspada u zemljištu, a da mali procenat može zaostati u čvrstim delovima biljke (10). Postoje rezultati da kada se primenjuje na poljima preparat Bt toksina u vidu spreja, ovaj toksin može da egzistira i bude aktivan u zemljištu 28 meseci (11).

Agrobacterium tumefaciens je zemljišna bakterija, koja izaziva nastanak tumora u inficiranoj biljci i to prebacivanjem gena lociranih na plazmidu (geni virulencije) u genom biljke, korišćenjem informacije smeštene u delu plazmida označenom kao T-DNK. Prebačena DNK se ugrađuje na bilo koje mesto u hromozomu biljke. Ovo svojstvo *A. tumefaciens* je iskorišćeno za konstrukciju vektora za transformaciju biljaka tako što su geni za virulenciju zamenjeni genima koji determinišu rezistenciju na antibiotike (radi selekcije transformanta) i sa genom koji nosi korisno svojstvo (npr. tolerancija na herbicide). Za ekspresiju gena najčešće se koristi promotor virusa mozaika karfiola (CaMV 35S). Međutim, *A. tumefaciens* može doći u organizam insekata ili životinja, koje se hrane inficiranim biljkama. Zato se postavilo pitanje da li T-DNK bakterije *Agrobacterium* može da inficira animalne ćelije? Eksperimenti u laboratorijskim uslovima su pokazali da se ova bakterija veže za i da može stabilno da transformiše HeLa, neuronske ćelije i ćelije bubrega u kulturi. Šta više, utvrđeno je da se ugradnja T-DNK u hromozom humanih ćelija vrši mehanizmom sličnim kako se to dešava u biljnim ćelijama. Integrisana T-DNK može imati efekat mutagena kada se ugradi u hromozom. Utvrđeno je, takođe, da je viralni CaMV 35S promotor aktivan u humanim HeLa ćelijama (12). Stoga se, danas, sve češće postavlja pitanje sigurnosti korišćenja transgenih biljaka za pripremu hrane za ljude i stoku.

Najinteresantniji aspekt uključivanja genetički modifikovanih biljaka u proizvodnju je njihovo korišćenje u obliku bioreaktora. Biljke relativno brzo rastu, i lako ih je održavati, pri čemu proizvode ogromnu biomasu. Stoga bi biljke mogle biti bioreaktori za proizvodnju komercijalnih proteina, bioplastike ili specifičnih hemikalija. Najnovija istraživanja govore da će biti moguće koristiti transgene biljke i viruse biljaka za proizvodnju vakcina protiv bolesti ljudi, u rasponu od zaštite kvarenja zuba do vakcina protiv kolere, dijareje i SIDE. Transgene biljke bi direktno sintetisale antitela protiv specifičnih

patogena, odnosno predstavljale bi fabrike antitela. Vakcine proizvedene u biljkama su mnogo jeftinije, jer je daleko lakše gajiti velike količine biljnog materijala nego animalne ćelije ili kvasce, koji su, danas, glavni izvori za pravljenje vakcina. S druge strane, ovakva jeftina produkcija će omogućiti da se i u nerazvijenim zemljama proizvode vakcine, koje su sada u većini slučajeva nedostupne tim zemljama zbog visoke cene. Najatraktivnija naučno zasnovana ideja je da se neke vakcine ugrade u biljke koje se normalno koriste kao hrana, i da se tako dođe do konstrukcije "jestivih vakcina". Naime, ovako konstruisane transgene biljke imale bi u sebi antigene koji mogu pobuđivati imuni odgovor čoveka ili životinje koji jedu takve biljke (13, 14, 15, 16, 17). Korišćenje transgenih biljaka za dobijanje farmaceutskih proizvoda je izuzetno veliki biznis tako da, na primer, u SAD-u potražnja za ovim proizvodima raste stopom od 13% godišnje, a 2004. godine je njihovo tržište dostiglo vrednost od 28 milijardi dolara.

Dobijanje biodegradabilne plastike je veliki izazov savremene civilizacije. Tokom poslednje decenije je mnogo pažnje posvećeno razvitku nove biodegradabilne plastike, odnosno plastike koja se može u prirodnim uslovima razgraditi do sastavnih delova, koji ne opterećuju, zagađuju životnu sredinu. Ovo interesovanje je u najvećoj meri upravo pokrenuto zbog ekološki štetnog dejstva postojećih sintetičkih plastičnih masa petrohemijskog porekla, koje su nerazgradljive prirodnim putem, kao i problema njihovog odlaganja. Među mnogim razgradljivim plastikama koje su poznate, najviše pažnje je počelo da se pridaje grupi polyhydroxyalkanoata (PHA) t.j. poliesterima za koje se od ranije zna da ih sintetišu neke bakterije. Ovi polimeri predstavljaju vredan izvor biološki razgradljivim biomaterijama neškodljivih po okolinu. Mogu se koristiti za širok spektar proizvoda, kao na primer: sudova u prehrambenoj industriji, folija za pakovanje, higijenskih proizvoda, u medicinskoj industriji za proizvodnju implantata ili za proizvodnju gaza, plastičnih folija za staklenike itd. Većina biodegradabilnih plastika se mogu samo delimično razgraditi i to do produkata, konstituenata, koji se dalje ne mogu razgrađivati i to bilo fotohemijski, bilo pomoću neenzimske hidrolize. Za razliku od ovih plastika, PHA se mogu potpuno razložiti do ugljen dioksida i vode delovanjem određenih mikroorganizama. Prema tome, proizvodi za široku potrošnju napravljeni od PHA, mogu se potpuno razložiti pod dejstvom tih bakterija, u prirodnim uslovima komposta, odnosno zemljišta. Sinteza PHA u biljkama je prvo proučavana ekspresijom gena za sintezu polihidroksibutirata (PHB), kao forme PHA, bakterije *Ralstonia eutropha* u biljci *Arabidopsis thaliana*. Pokazalo se da su tako dobijene transgenske biljke sintetišu PHB (Slika 3), koju akumuliraju isključivo u plastidima. Maksimalna količina bioplastike detektovane u listovima transgene *A. thaliana* je bila 10-14% suve materije (18, 19). Sinteza PHB je ostvarena i korišćenjem transgene deteline alfalfa (*Medicago sativa* L.). Transgena detelina je konstruisana prebacivanjem tri gena za sintezu PHB iz iste bakterije, a transgene biljke su sintetisale bioplastiku u količini od 40% suve mase (20). Bioplastika je sintetisana i u transgenom pamuku (21).



Slika 3. Proizvodnja bioplastike u *Arabidopsis italiana*.

Pored plastike, konstruisane su transgene biljke koje proizvode specifične hemikalije, tako da se potreba za naftom kao sirovinom u ovom domenu proizvodnje smanjuje. Međutim, još uvek je rentabilnost proizvodnje petrohemijski veća nego korišćenjem transgenih biljaka (Tabela 2).

Tabela 2. Uporedni pregled vrednosti proizvoda (\$/kg)

| Proizvod | Petrohemijski proces | Transgena biljka |
|-------------------|----------------------|------------------|
| Adhezivi | 3,30 | 2,80 |
| Sirćetna kiselina | 0,66 | 0,75 |
| Pigmenti | 4,00 | 11,60 |
| Plastika | 1,00 | 4,00 |

Molekularna biotehnologija životinja

Razvitak istraživanja u molekularnoj biologiji je omogućio inženjersanje transgenih životinja, tj., životinja koje nose gene poreklom iz drugih vrsta. Prva transgena životinja je bio miš (22). Ubrzo iza toga, molekularna biotehnologija je omogućila konstrukciju transgenih zečeva, svinja, ovca i krava (23, 24, 25, 26). Postojala su tri osnovna razloga za konstrukciju transgenih životinja. Prvo, da se konstruišu životinjski model sistemi za izučavanje molekularnih osnova bolesti (27). Veliki prodor u ovom segmentu je bio realizacija patenta od strane naučnika sa Harvard univerziteta, SAD, koji su konstruisali miša, nazvanog

OnkoMiš (OncoMouse), koji je imao gene koji promovišu razvoj različitih vrsta kancera čoveka (28).

Do uvođenja molekularne biotehnologije u stočarstvo, nove životinjske rase su dobijane mukotrpnim ukrštanjem i selekcijom, pri čemu su se za, dalju oplodnju, birale one jedinke koje su imale bolje karakteristike (davale više mleka, imale bolji kvalitet vune, imale veću telesnu masu, ili davale više jaja). Taj proces je bio vremenski jako dug i u velikom broju slučajeva neprecizan. Stoga je drugi interes bio da se molekularna biotehnologija iskoristi za konstrukciju transgenih životinja koje će imati poboljšane ili razvijene nove ekonomski značajne osobine na efikasniji način. Na primer, za povećanje mase životinja radi dobijanja veće količine mesa korišćeni su hormoni, ali se ispostavilo da se ostaci hormoni nalaze u finalnim mesnim proizvodima i da imaju štetno dejstvo na ljudski organizam.

Tradicionalni selekcioneri i molekularni biotehnolozi bi voleli da se ostvari prognoza da će buduće domaće životinje mnogo efikasnije iskorišćavati unetu hranu, da će imati meso boljeg kvaliteta (manje masnoće ili holesterola, na primer) (29, 30), da će dorastati veličinu prihvatljivu za tržište brže i da će biti otporne na današnje bolesti koje desetkuju populacije i ostvareni profit. Jedan od ciljeva primene molekularne biotehnologije je, na primer, dobijanje krava koje bi proizvodile mleko drugačijeg kvaliteta. Glavni proteini mleka su α , β i κ -kazeini. Međutim, količina sira proizvedena od mleka najviše zavisi od sadržaja κ -kazeina, i zbog toga je cilj da se poveća eksprimiranje transgena za κ -kazein. Druga osobina mleka na koju se može uticati ovom metodom je sadržaj laktoze. Pojedine osobe ne mogu da tolerišu prisustvo laktoze u mleku ili u mlečnim proizvodima. Ukoliko bi se dobile transgene krave koje bi imale gen za razgradnju laktoze, moglo bi se dobiti i mleko bez ovog šećera. Rad na proizvodnji transgenih pilića se usmerava na to da je efikasniji prirast mišića pileta, da se poveća produkcija jaja i da pilići budu otporniji na bolesti, ali da se za ostvarenje ovih ciljeva ne koriste hemikalije.

Treći interes je prilaz konstrukciji transgenih životinja koje bi bile bioreaktori za dobijanje važnih proteina od medicinske važnosti (biofarmaceutici) (Tabela 3) ili izvori ksenotransplantata. Sa uspehom su dobijene transgene ovce i koze koje sekretuju humane proteine u svom mleku. Geni za humane proteine se ekspimiraju u mlečnim žlezdama a prisustvo datog proteina u mleku nema nepovoljno dejstvo ni na samu životinju ni na njeno potomstvo koje se tim mlekom hrani. Ispitivanja su pokazala da ovako dobijeni biološki aktivni proteini (na primer, tkivni aktivator plasminogena, urokinaza, α_1 -antitripsin, faktor koagulacije IX, laktoferin) imaju aktivnost sličnu onima dobijenim iz ljudskih tkiva (31, 32, 33).

Tabela 3. Dobijanje proteina od medicinske važnosti (biofarmaceutika) izolacijom iz mleka transgenih životinja.

| Domaćin/Sintetisani protein | Poreklo transgena | Promotor | Nivo ekspresije gena (mg/ml) |
|---|-------------------|-------------------------------|------------------------------|
| KRAVA | | | |
| Laktoferin | cDNK | Govedi α_{s1} -kazein | ND |
| Humani α -laktalbumin | NA | NA | 2,4 |
| KOZA | | | |
| Anti-trombin-III | NA | Koziji β -kazein | 14 |
| α -Antitripsin (α -inhibitor proteinaze) | NA | Koziji β -kazein | 20 |
| Hormon rasta | NA | Retrovirus | $1,2 \times 10^{-4}$ |
| Monoklonska antitela (za kancer kolona) | Genomski | Koziji β -kazein | 10 |
| Tkivni plazminogen aktivator | cDNK | Koziji β -kazein | 6 |
| SVINJA | | | |
| Faktor VIII | cDNK | Viralni | 3 |
| Protein C | cDNK | Viralni | 1 |
| OVCA | | | |
| α -Antitripsin (α -inhibitor proteinaze) | Minigen | Ovčiji β -laktoglobulin | 35 |
| Faktor VIII | cDNK | Ovčiji β -laktoglobulin | ND |
| Faktor IX | cDNK | Ovčiji β -laktoglobulin | 0,005 |
| Fibrinogen | Genomski | Ovčiji β -laktoglobulin | 5 |
| ZEC | | | |
| Kalcitonin | Fuzioni protein | Ovčiji β -laktoglobulin | 2,1 |
| Insulinu-sličan faktor rasta 1 | cDNA | Govedi α_{s1} -kazein | 1 |
| Interleukin-2 | Genomski | Zečiji β -kazein | 0,0005 |
| Eritropoetin | cDNA | Govedi β -laktoglobulin | 0,05 |

NA = nije poznato; ND = nije određeno

Godine 1997. dobijena prva transgena krava, nazvana "Rozi", čije je mleko sadržavalo 2,4 gr/L humanog proteina α -laktalbumina. Ovo mleko je mnogo bolje za upotrebu u nutritivnom smislu nego mleko goveda pogotovu za bebe ili osobe sa specijalnim nutritivnim ili digestivnim zahtevima.

Veliki broj pacijenata umire godišnje usled nedostatka srca, jetre ili bubrega za transplantaciju. Stoga je pitanje dobijanja ksenotransplantata izuzetno značajno (34). Na primer, samo je u Velikoj Britaniji potrebno oko 5000 organa za transplantaciju. Eksperimenti su pokazali da transgeni prasići mogu biti odgovarajući izvor organa za transplantaciju koji se neće odbacivati od strane čoveka kao primaoca organa (35, 36, 37). Interesantan je i pristup korišćenja transgenih životinja za dobijanje novih materijala. Tako su 2001. godine u kompaniji Nexia Biotechnologies u Kanadi, naučnici konstruisali kozu, koja ima gen za sintezu svilenog vlakna ("web" protein) pauka. Taj protein se izlučivao u mleku transgenih koza. Sakupljanjem svilenih vlakana i njihovim upređanjem dobio se novi materijal nazvan "biočelik". Biočelik je izuzetno lak, čvrst i rastegljiv materijal koji je lakši od čelika ili plastičnih materijala, a mnogo otporniji na naprezanje. Stoga se planira korišćenje ovog biomaterijala u vojnoj industriji, astronautici i izradi medicinskih pomagala za čoveka (npr. veštačke tetive, kukovi).

Molekularna biotehnologija i savremena medicina

Postoji preko 1000 različitih bolesti za koje se zna da su nasledne. Neke se javljaju sa malom učestalošću u populaciji, a samo pojedine - sa relativno velikom učestalošću (1 na 10000 novorođenih). Primarni zadatak istraživanja u humanoj molekularnoj genetici je da se utvrdi kakvih oštećenja ima na nivou gena, i kako ta oštećenja utiču na simptome određenog genetičkog oboljenja.

Jedan od pristupa izučavanju naslednih bolesti je da se izoluju defektni i normalni gen, što omogućava njihovu komparativnu analizu. U slučaju kada se odredi izmenjeni gen koji uzrokuje bolest, moguće je razviti dijagnostičke testove za njegovu preciznu detekciju korišćenjem molekularne biotehnologije. Pomoću ovih testova, moguće je sa velikom pouzdanošću utvrditi, na primer, na samom početku trudnoće da li će se roditi dete sa "zdravim" ili "bolesnim" genom. Pored dijagnostike, poznavanje promena na nivou DNK može da dovede do boljeg razumevanja molekularne osnove određene bolesti, a samim tim i do iznalaženja najboljeg rešenja za njenu terapiju.

Kloniranje normalnog gena, što omogućava molekularna biotehnologija, koji je u izmenjenoj formi odgovoran za neku bolest može da se iskoristi za lečenje bolesti, i to na genetičkom nivou. Zbog toga su ove procedure dobile naziv genska terapija. Genska terapija može da se vrši na ćelijama u kulturi koje se zatim vraćaju u oboleli organizam (genska terapija *ex vivo*) (38) ili se, pak, normalni gen direktno ubacuje u odgovarajuće tkivo pacijenta (genska terapija *in vivo*) (39).

U genskoj terapiji *ex vivo*, koriste se ćelije dobijene od samog pacijenta, i njihov genetički defekt se ispravlja ubacivanjem normalnog gena. Sledeći korak je selekcija ćelija sa željenim karakteristikama, i takve ćelije se gaje u kulturi da bi se zatim vratile u pacijenta. Prednost ovakvog načina genske terapije je u tome što se radi o autolognim ćelijama koje imuni sistem pacijenta ne odbacuje. Međutim, to ovu metodu čini izuzetno skupom i dugotrajnom pošto

ceo put mora da se pređe za svakog pacijenta ponaosob. Zbog toga se radi na izolovanju ćelija koje bi bile univerzalni donori, odnosno ćelija koje bi mogao prihvatiti imuni sistem bilo kog pacijenta. Jedna od testiranih strategija genske terapije *ex vivo* zasniva se i na korišćenju glatkih mišićnih ćelija koje se nalaze u krvnim sudovima. Ove ćelije je moguće vratiti u organizam nakon toga što se hirurškim putem izazove mala ozleda na krvnim sudovima. U toku zarašćivanja ovakve rane, strane ćelije, odnosno genetički izmenjene ćelije postaju deo tkiva. Prednost ove metode je što se genetički inženjerisane ćelije nalaze u kontaktu sa cirkulatornim sistemom, i što mogu da izlučuju željeni protein direktno u krvotok. Pored genetički determinisanih bolesti, postoji mogućnost da se genska terapija koristi i u lečenju pojedinih tipova malignih oboljenja.

Za gensku terapiju *in vivo* razvijaju se mogućnosti unošenja zdravog gena direktno u određeno tkivo pacijenta pomoću čiste plazmidne DNK ili pomoću pojedinih virusa kao što su genetički inženjerisani adenovirus ili herpes simpleks virus (40). Bez obzira na to kakav vektor se koristi u genskoj terapiji *in vivo*, neophodno je da se vodi računa o tome da ti vektori, odnosno geni koje oni nose, budu tkivno specifični. To je moguće postići tako što bi se koristili virusi koji specifično napadaju samo određena tkiva, ili bi pak gen koji se unosi bio pod kontrolom signalâ za ekspresiju koji mogu da budu prepoznati samo u ciljnim tkivima. Takvu mogućnost pruža herpes simpleks virus, koji inficira samo nervne ćelije, i koji bi u skorijoj budućnosti mogao da se koristi za lečenje pacijenata sa neurološkim poremećajima.

Koristeći animalne sisteme, naučnici su pokazali da je ovakav vid terapije izvodljiv. Nizom eksperimenata je pokazano da je moguće ubaciti plazmid sa kloniranim genom za protein distrofin u mišićne ćelije laboratorijskih životinja gde se ovaj gen uspešno eksprimira. Na taj način je možda otvorena mogućnost za lečenje Dišenove (Duchenne) mišićne distrofije. Ipak je možda najveći napredak napravljen u pokušajima terapije malignih tumora mozga pomoću retrovirusnog vektorskog sistema. U testovima sa eksperimentalnim životinjama je pokazano da se ovakav vektor ubacuje samo u maligne ćelije mozga koje zatim bivaju uništene, dok ceo tretman nema nikakvog efekta na zdrave ćelije mozga. Zbog izuzetnog uspeha ove metode, već su dobijene dozvole za kliničko testiranje na pacijentima, dobrovoljcima, sa malignim tumorima mozga koje nije moguće operisati.

Imajući u vidu značaj doprinosa molekularne biotehnologije u medicini Dr Francis Collins, direktor Američkog nacionalnog instituta za izučavanje genoma čoveka (U.S. National Institute of Human Genome Research) dao je predviđanje postgenomskih inovacija u narednih 40 godina. On je podelio postgenomsku eru u četiri faze.

Faza I (5 godina) – (a) naglo ubrzanje razvoja molekularnih dijagnostičkih testova; (b) identifikacija molekularnih podtipova glavnih oboljenja čoveka.

Faza II (10 godina) – (a) rastući broj terapija baziranih na ciljano delovanje na određene molekule u organizmu; (b) definisanje

farmakogenomskih markera za praćenje odgovora pacijenta na lekove; (c) razvoj novih proba za vizualizaciju praćenja funkcija organizma; (d) razvoj testova za predviđanje više od 20 izmenjenih genetičkih stanja koje vode oboljenju.

Faza III (15 do 20 godina) – (a) testiranje različitih populacija za formiranje baze podataka o genotipovima; (b) konstrukcija lekova za dijabetes, protiv visokog krvnog pritiska, različitih vrsta kancera i drugih bolesti; (c) podela terapije opšteg tipa na podtipove, a prema različitosti u genotipovima; (d) potpuna primena regenerativne medicine (dobijanje sopstvenih tkiva za presađivanje od somatskih ćelija); (e) genska terapija (zamena gena) *in utero* i u odraslih ljudi.

Faza IV (30 godina) – (a) geni odgovorni za starenje će biti determinisani i biti korišćeni na klinikama za produžavanje ljudskog života; (b) sveobuhvatna zdravstvena zaštita bazirana na genomici.

Molekularna biotehnologija i etika

U ovom pregledu su iznete samo neke mogućnosti molekularne biotehnologije koje su već uveliko zaživele u praksi. Zato postoji opravdano mišljenje da će akumulacijom znanja ti potencijali biti još više korišćeni. Razvijanje potencijala genetičkog inženjerstva svakako se ne završava dosad postignutim rezultatima. Naprotiv, mnogi problemi savremene civilizacije će se verovatno, u godinama koje nailaze, najuspešnije rešavati potencijalima molekularne biotehnologije. Međutim, tu se otvara ozbiljno pitanje etičkog razmatranja na koji način i u kojoj meri će se primenjivati molekularna biotehnologija. Imajući u vidu aktivnost čoveka, na primer, u dobu nuklearne energije i mogućnosti zloupotrebe naučnih saznanja, savremena civilizacija se nalazi pred ozbiljnim iskušenjima. Neosporno je da molekularna biotehnologija nudi fantastične mogućnosti, ali i u pozitivnom i negativnom smislu po čoveka. Koja orijentacija će preovladati i kako uspostaviti regulativu koju će svi koji su uključeni u rad u molekularnoj biotehnologiji su ključna pitanja? Drugo, imajući u vidu koristi koje se mogu dobiti korišćenjem molekularne biotehnologije postavlja se pitanje određivanja balansa između korisnog i štetnog.

Osnovna etička pitanja na koja se već traži odgovor se mogu formulisati na tri opšta nivoa.

1. Posledica po zdravlje čoveka, životinja i životnu sredinu.
2. Socijalne i ekonomske posledice.
3. Obim odgovornosti naučnika, koji se bave tom oblašću.

S obzirom da je molekularna biotehnologija relativno nova nauka normalno je da ne postoji još uvek dovoljno naučnih podataka o bezbednosti korišćenja njenih rezultata u praksi. Stoga se pitanje korišćenja GMO može posmatrati na tri nivoa;

(a) da li ima dovoljno informacija o potencijalnom negativnom efektu na biodiverzitet i ekološke procese u celini? Ili, da li ima efekta na zdravlje ljudi i životinja?

(b) kompleksnost ekosistema i multicelularnih organizama čini veoma teškim da se uradi predviđanje potencijalnog negativnog efekta na njih sa dovoljnom pouzdanošću.

(c) još uvek nije razvijen potpuno pouzdan sistem praćenja prisustva GMO u životnoj sredini, kao i metode za praćenje efekta na ljudsko zdravlje.

Imajući sve ovo u vidu, potrebno je precizno definisati sve mere preventive i procena rizika korišćenja GMO u bilo kom obliku. U pripremi i primeni preventivnih mera i regulative u oblasti korišćenja GMO, kao i u realizaciji eksperimentalnih testova o eventualnom ugrožavanju životne sredine i ljudskog zdravlja moraju biti uključeni naučni radnici iz različitih disciplina. S druge strane, izuzetno je značajno uključiti i druge sektore društva, a ne samo naučnike, u donošenje odluka o korišćenju GMO, radi informiranosti najšire populacije stanovništva.

Reference

- (1) Glick BR, Pasternak JJ. *Molecular Biotechnology; Principles and applications of recombinant DNA (Third Edition)*, ASM Press, Washington, DC, 2003.
- (2) Hiranol, SS, Upper CD. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringaea* pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol Molec Biol Rev* 2000; 64:624-653.
- (3) Edwards KJ, Hu B, Hamers RJ, Banfield JF. A new look at microbial leaching patterns on sulfide minerals. *FEMS Microbiol Ecol* 2001; 34: 197-206.
- (4) Kalinowski BE, Oskarsson A, Albinsson Y, Arlinger J, Ödegaard-Jensen A, Pedersen T. Microbial leaching of uranium and other trace elements from shale mine tailings at Ranstad. *Geoderma* 2004; 122: 177-194.
- (5) Gadd GM. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr Opinion Biotechnol* 2000; 11: 271-279.
- (6) ISAAA, December 2000, www.isaaa.org
- (7) Saxena D, Stotzky G. Fate and effects of the insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* 2001; *FEMS Microbiol Eco* 33: 35-39.
- (8) Degrieck I, de Andrada Sylva S, Van Bockstaele E, De Loose M. Quantitative GMO detection in maize (*Zea mays* L.) seed lots by means of a three-dimensional PCR based screening strategy. *Seed Sci & Technol* 2005; 33: 31-43.
- (9) Zwalen C, Hilbeck A, Gugerli P, Nentwig W. Degradation of the Cry1Ab protein within *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Molec Ecol* 2003; 12: 765 – 755.
- (10) Hopkins DW, Gregorich EG. Detection and decay of the Bt endotoxin in soil from a field trial with genetically modified maize. *European J Soil Sci* 2003; 54: 793 – 800..

- (11) Vetori C. Paffetti D. Saxena D. Stotzky G. Giannini R. Persistence of toxins and cells of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* introduced in sprays to Sardinia soil. *Soil Biol Biochem* 2993; 35: 1635 – 1642.
- (12) Kunik T, Tzfira T, Kapulnik Y, Gafni Y, Dingwall C, Citovsky V. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 10: 1073-1078.
- (13) Cockburn A. Commercial plant breeding: what is in the biotech pipeline? *J Commercial Biotechnol* 2004; 10: 209-223.
- (14) Chevassus-au-Louis N. Molecular farming; a future on hold. *Biofutur* 2001. 217: 75-77.
- (15) Fischer R, Stoger E. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion In Plant Biology* 2004; 7: 152-158.
- (16) Streatfield SJ, Howard JA. Plant-based vaccines. *Int J Parasitol* 2003; 33: 479-493.
- (17) Ma KC. Genes, greens and vaccines. *Nature Biotechnol*, 2000; 18: 1141-1142
- (18) Nawrath C. Poirier Y. Sommerville C. Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 12760-12764.
- (19) Bohmert K. Balbo I. Kopka J. Mittendorf V. Nawrath C. Poirier Y. Tischendorf G. Trethewey R.N. Willmitzer L. Transgenic *Arabidopsis* plants can accumulate polyhydroxybutyrate to up 4% of their fresh weight. *Planta* 2000; 211: 841-845.
- (20) Purev S. Friedrich S. Somers DA. Samac DA. Production of a biodegradable plastic polymer, poly- β -Hydroxybutyrate, in transgenic alfalfa. *Crop Science* 2002; 42: 919-927.
- (21) John ME, Keller G. Metabolic pathway engineering in cotton: Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 12768-12773.
- (22) Gordon JW. Scangos GA. Plotkin D. Barbosa A. Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection. *Proc National Acad Sci USA* 1980; 77: 7380-7384
- (23) Hammer RE. Pursel VG. Rexroad CE. Wall RJ. Bolt D. Ebert KM. Palmiter RD. Brinster RL. Production of transgenic rabbits, sheep, and pigs by microinjection. *Nature* 1985; 315: 680-683.
- (24) Pursel V.G. Rexroad Jr. CE. Bolt D. Miller KF. Wall J. Hammer RE. Pinkert CA. . Palmiter D. Brinster L. Progress on gene transfer in farm animals. *Vet Immunol Immunopathol* 1987; 17: 303-312.
- (25) Roschlau K. Rommel P. Andreewa L. Zackel M. Roschlau D. Zackel B. Schwerin M. Huhn M Gazarjan KG. Gene transfer experiments in cattle. *J Reproduction Fertility (Suppl.)* 1989; 38: 153-160
- (26) Campbell KHS. McWhir J. Ritchie, WA. Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996;380: 64 – 66.

- (27) Petters RM. Sommer JR. Transgenic animals as models for human disease. *Transgenic Research*, 2000; 9: 347 – 351.
- (28) <http://www.laskerfoundation.org/awards/kwood/leder/vignettes.shtml> ("Philip Leder: Vignettes," Lasker Foundation's bio about Leder, lead scientist for OncoMouse®, accessed Jan. 2003).
- (29) Gibson JP. The potential for genetic change in milk fat composition. *J Dairy Sci* 1991; 74: 3258 – 3266.
- (30) Bobe G. Hammond EG. Freeman AE. Lindberg GL. Beitz DC. Texture of butter from cows with different milk fatty acid composition. *J Dairy Sci* 2003; 86: 3122 - 3127.
- (31) Rudolph NS. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *TIBTECH* 1999; 17: 367 – 374.
- (32) Wall RJ. Hawk HW. Nel V. Making transgenic livestock: genetic engineering on a large scale. *J Cellular Biochem* 1992; 49: 113-120.
- (33) Zinovieva N. Lassnig C. Schams D. Besenfelder U. Wolf E. Müller S. Frenyo L. Seregi J. Müller M. Brem G. Stable Production of Human Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) in the Milk of Hemi- and Homozygous Transgenic Rabbits Over Several Generations. *Transgenic Res* 1998; 7: 437 – 447.
- (34) Auchincloss H. Jr. Sachs D.H. Xenogenic transplantation. *Annu.Rev.Immunol.* 1998; 16: 433-70.
- (35) Cozzi E. White DG. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans, *Nature Medicine* 1995; 1: 964 – 966.
- (36) Fodor WL. Williams BL. Matis LA. Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogenic hyperacute organ rejection *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 11153 – 11157.
- (37) Diamond LE. Quinn CM. Martin MJ. A human CD46 transgenic pig model system for the study of discordant xenotransplantation. *Transplantation* 2001; 7:132 -136.
- (38) Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 2002;346: 1185 - 1193.
- (39) Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* 2000; 24: 257 - 261.
- (40) Qing K. Li W. Zhong L. Tan M. Hansen J. Weigel-Kelley KA. Chen L. Yoder MC. Srivastava A. Adeno-Associated Virus Type 2-Mediated Gene Transfer: Role of Cellular T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase in Transgene Expression in Established Cell Lines In Vitro and Transgenic Mice In Vivo. *J Virol* 2003; 77: 2741 - 2746