

Predavanje za nastavnike u sklopu Nacionalnog odbora za koordinaciju projekta

**"Razvitak okvira nacionalne biološke sigurnosti u Republici Hrvatskoj"
9. siječnja 2004.**

Znanstvene osnove genetičkog inženjerstva

Prof. dr. sc. Vladimir Delić

Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Biološki odsjek, Zavod za molekularnu biologiju, Rooseveltov trg 6, Zagreb

S a ž e t a k

Razvojem spoznaja i dostignuća iz molekularne biologije i naročito molekularne genetike početkom 70-tih godina prošlog stoljeća omogućeno je rekombiniranje molekula DNA *in vitro*. Neke biokemijske metode pružile su mogućnost odjeljivanje molekula DNA i njihovo proučavanje. Fenomen restrikcije i modifikacije omogućio je dobivanje manjih fragmenata DNA, a njihovo spajanje *in vitro* uz određene enzime nastanak novih kombinacija nasljednih osnova koji u prirodi ne postoje. Takve rekombinantne molekule DNA moguće je unijeti u žive stanice određenog domaćina (mikrobnu, biljnu, životinjsku) u kojima te rekombinantne molekule DNA izražavaju svoja svojstva. Da bi to bilo moguće bilo je potrebno konstruirati nosioce (vektore) koji se u unesenom domaćinu stabilno održavaju i naslijeđuju. Te tehnike nazvane tehnologijom rekombinantne DNA ili popularnije genetičkim inženjerstvom značajno su unaprijedile i ubrzale neka temeljna istraživanja na području prirodnih znanosti te veoma brzo pronašli put u praktičnoj primjeni.

U v o d

Tehnike rekombinantne DNA ili popularnijeg naziva genetičko inženjerstvo su jedno od najrevolucionarnije dostignuće u području prirodnih znanosti postignuto u u zadnjih 30-tak godina. Taj skup različitih tehnika uzrokovao je i izazvao pravu revoluciju u biologiji i to naročito u onom dijelu koji se odnosi na proučavanje nasljednih osnova (gena) i funkcioniranja živih bića. Zbog mogućnosti široke primjene u gotovo svim područjima prirodnih znanosti kao što su biologija, medicina, agronomija, biotehnologija i druge, te tehnologije postale su naša svakodnevnica. Samo jedan manji broj primjera rezultata genetičkog inženjerstva bit će prikazan u ovom broju izlaganju, a brojni drugi primjeri mogu se pronaći u opsežnoj znanstvenoj i stručnoj literaturi.

Rad u časopisu PRIRODA (Delić, V.: Trideset godina genetičkog inženjerstva: kako je došlo do otkriće mogućnosti rekombiniranja DNA molekula *in vitro*. PRIRODA, **94**, br. 918 (1), 2004) detaljno opisuje znanstvene osnove koje su omogućile tehnologiju rekombinantne DNA (tehnologija rDNA) ili kolokvijalnog naziva genetičko inženjerstvo.

Međutim, potrebno je navesti još podataka zbog brzog razvoja te grane molekularne genetike kao i nekih naročito u javnosti negativnih napisa o dostignućima te grane biologije. Ti podaci pokazat će i objasniti što je to genetičko inženjerstvo, kako je nastalo i kako je došlo do mogućnosti da se *in vitro* može spajati DNA od različitih organizama te općenito raditi s molekulama DNA odnosno njezinim manjim fragmentima. Naročito se za to ukazuje potreba u današnje vrijeme, kada je putem javnih glasila stvorena uglavnom negativna slika o dostignućima u području prirodnih znanosti dobivenih putem tehnologije rDNA odnosno genetičkog inženjerstva. S druge pak strane, razvijeni svijet koristeći spoznaje dobivene tehnologijom rDNA kroči krupnim koracima naprijed zahvaljujući upravo zasadama temeljenim na tim tehnologijama.

Definicije i pojmovi

Budući je znanje javnosti o genetičkom inženjerstvu najčešće nejasno i nedefinirana potrebno je prije nego se uopće počinje govoriti i pisati o toj problematici razjasniti neke temeljne pojmove i definirati ih kako ne bi u tekstovima i kod čitatelja izazvali nedoumice i zabune. To tim više, jer se često u javnosti različiti pojmovi kao što su: genetičko inženjerstvo, manipuliranje genima, kloniranje, genetički modificirani organizmi (GMO), genetički modificirana hrana i sl. koriste krivo. Budući da se u svakodnevnom komuniciranju često puta koriste različiti termini za iste ili različite pojmove u ovom će tekstu najčešći pojmovi iz genetičkog inženjerstva biti točno definirani. Za druge termine i pojmove, a koji se odnose na ovu temu, čitatelji se upućuju na časopis PRIRODA, 1998, 88.

Genetičko inženjerstvo (ili **tehnologija rekombinantna DNA**) je dobivanje novih hibridnih nasljednih materijala izvan stanice i njihovo spajanje s prenositeljem (virusom, plazmidom ili drugim), čime se omogućava njegovo unašanje u organizam domaćina u kojem one prirodno ne postoje, ali u kojem se mogu umnožavati.

Ovdje valja napomenuti da se prenositelje često naziva i **vector**(i), a umnožavanje kombinirane (hibridne) molekule DNA unesene u domaćina često se naziva i **kloniranje**. Kako se ovim tehnikama dobiva rekombinirana (rekombinantna) molekula DNA kao i u klasičnim rekombinacijama DNA, tehnologija se naziva i tehnologija rekombinantne DNA ili skraćeno tehnologija rDNA.

Transgena biljka ili **životinja** je organizam koji u svom genomu ima ugrađenu rekombinantnu molekulu DNA, a koja se nasljeđuje u tom organizmu prema Mendelovim zakonitostima kao dominantna. Transgeneza je metoda i postupak kojim se postiže transgena jedinka. Organizam s ugrađenim stranim genom u svom genomu naziva se **genetski modificirani organizam** (GMO), termin koji se često pogrešno pripisuje hrani koja se dobiva iz genetski modificiranih biljaka ili životinja.

Klon (grčki klon, grana, ogranak, cijepika, kalem, podmladak) označava skupinu jedinki ili pojedinih organizama, nastalih aseksualnim razmnožavanjem, iz jedne seksualnim načinom dobivene jedinke. **Kloniranje** je postupak dobivanja populacije klonskih jedinki. Ovaj način umnožavanja molekula ili jedinki ne znači nužno i rekombinantnu DNA, posebno kada se razmatra kloniranje u sisavaca (vidi: PRIRODA, 1997, 838). Budući se i hibridna molekula najčešće unošenjem u domaćina umnoži aseksualnim načinom taj dio

se također ponekad naziva kloniranjem (**molekulsko kloniranje**). Kloniranje je kao postupak dobro poznat način dobivanja populacije jedinki naročito u biljnih organizama kao npr. razmnožavanje jagoda i sl.

Molekularne osnove genetičkog inženjerstva

Brojna znanstvena otkrića i spoznaje na području molekularne biologije, koja se odnose na nasljeđivanje u živih bića, a bila su poznata do 1970. godine, omogućila su da se počne razmišljati o mogućnosti spajanja *in vitro* dviju molekula DNA dobivenih iz različitih organizama, odnosno spojiti ih u epruveti te unijeti u određeni organizam domaćin gdje bi ta hibridna molekula DNA izrazila svoje svojstvo. Jedno od temeljnih spoznaja bilo je razjašnjenje strukture DNA i njezine uloge u nasljeđivanju, što zahvaljujemo J.Watson-u i F.Crick-u (Slika 1.), koji su zajedno s M.Wilkins-om dobitnici Nobelove nagrade 1962. god. Oni su pokazali da se

Slika 1. James Watson i Francis Crick, regulacijska i strukturna regija u molekuli DNA

molekula DNA koja se sastoji od šećera deoksiriboze povezanih fosfodieterskim vezom u okosnicu. Takve dvije polimerne molekule spojene su preko šećera parovima baza i to: adeninom iz jednog lanca i timinom iz drugog, te gvaninom iz jednog lanca sa citozinom iz drugog, tvoreći na taj način dvostruku zavojnicu DNA povezanu vodikovim vezama preko tih parova purinskih i pirimidinskih baza. Daljnja istraživanja pokazala su da po tri baze iz jednog lanca DNA kodiraju jednu aminokiselinu, prema tome niz nukleotida ili odsječak lanca DNA može kodirati određenu polipeptidnu molekulu.

Slika 2. Prepisivanje i prevoženje genetičke informacije

U regulacijskoj regiji jednog operona nalaze se promotorska i operatorska regija od nekoliko desetaka do stotinjak baza koje služe kao mjesto za početak (ili prestanak) prepisivanja i prevođenja genetičke informacije iz DNA u bjelančevinu. Naravno da postoje razlike u građi i funkciji regulacijskih i kodirajućih dijelova operona između nižih i viših organizama, ali princip građe i funkcioniranja DNA kao nasljednih osnova koje reguliraju svojstva svih živih bića je u suštini isti (izuzetak čine neki virusi u kojima je RNA odrednica nasljednih svojstava).

Proučavanje uloge molekule DNA u nasljeđivanju metodama klasične genetike nije uvijek bilo jednostavno i lako. Osnovni problem bio je u veličini molekula DNA kao sastavnog dijela kromosoma, pa ju je teško proučavati na molekularnoj razini. Stoga se postavilo pitanje kako i na koji način dobiti manje dijelove ili fragmente DNA koji bi poslužili za proučavanje, a da se pri tome ne izgubi njezina funkcija.

Taj problem je riješen biološkim fenomenom nazvanim restriksijsko-modifikacijski sustav koji je pronađen u bakteriji *E. coli* i njezinom fagu lambda, a kasnije otkriven i u brojnim drugim mikroorganizmima. Proučavanje tog sustava dovelo je do otkrića posebnih enzima nazvanih **restriksijskim endonukleazama**, a koji su imali ključnu ulogu u tehnologiji rDNA.

Slika 3. Način djelovanja restrikcijskih enzima

Pojavu restrikcije i modifikacije otkrio je Werner Arber, švicarski znanstvenik, koji je za to otkriće podijelio Nobelovu nagradu za medicinu i fiziologiju 1978. god. i podijelio ju s Amerikancima D. Nathans-om i H. Smith-om. Samo objašnjenje Nobelova komiteta koje u obrazloženju za dodjelu nagrade kaže " ...za cijepanje genetičkog materijala...." dovoljno jasno pokazuje da je metodom moguće cijepati molekulu DNA. No, kako to zapravo rade restrikcijske endonukleaze? Proučavanje svojstava i načina djelovanja restrikcijskih endonukleaza, koje su pronađene i karakterizirane kod brojnih mikroorganizama, pokazalo je da ti enzimi prepoznaju određeni redosljed baza u lancima DNA. To su tzv. **palindromski** rasporedi nukleotida u lancima molekule DNA, koji su istog redosljeda nukleotida čitani u jednom i drugom lancu, ali obrnutim smjerom (strelice) kao npr. na slici 4

Slika 4. Neki restrikcijski enzimi i mjesta djelovanja

Općenito, restrikcijski enzimi cijepaju dvolančanu molekulu ili u osi simetrije palindroma ili lijevo ili desno od osi simetrije. Cijepanje oba lanca u osi simetrije daje molekulu koja ima obzirom na nastale krajeve tzv. tupe krajeve. Ako restrikcijski enzim cijepa palindrom izvan osi simetrije onda najčešće ostaju u jednom ili drugom lancu palindroma jednostruki tzv. izduženi krajevi nazvani i ljepljivi krajevi, jer se lako spajaju s isto takvim izduženim krajevima, ako im je redosljed baza komplementaran (Slika 4.). Kako je redosljed purinskih i pirimidinskih baza u DNA stalan (određen) (ovdje valja zanemariti različite mutacije koje mogu promijeniti taj redosljed), tako će i jedan restrikcijski enzim uvijek naći svoj palindrom i na tom mjestu pocijepati dvolančanu molekulu DNA što će davati fragmente DNA uvijek iste veličine. Do danas je nađeno i proučeno preko 500 različitih restrikcijskih enzima, koji cijepaju DNA na različite načine, obzirom na palindromski raspored nukleotida u molekuli DNA. Izolirani su uglavnom iz različitih mikroorganizama po kojima su dobili imena kao npr. *EcoRI* (iz *Escherichia coli* soj RI), *BamHI* (iz *Bacillus amyloliquefaciens* HI), *Sau3A* (iz *Streptomyces albus* G) itd. Prirodna uloga restrikcijskih enzima u samim stanicama je da ju štiti od unošenja strane DNA cijepajući tu DNA na male fragmente. Pri tome posebni modifikacijski enzimi u stanicama promijene vlastitu DNA tako da ju restrikcijski enzimi ne mogu cijepati. Otkriće restrikcijskih enzima značajno je unaprijedilo istraživanja na području molekularne genetike, jer je bilo moguće proučavati strukturu i funkcije malih fragmenata (odsječaka) DNA mnogo jednostavnije nego metodama klasične genetike. Fragmenti DNA dobiveni nakon cijepanja restrikcijskim enzimima veoma se lako mogu odvojiti na gelu agaroze jer je pokretljivost molekula DNA ovisna o veličini (manji fragmenti pokreću se brže od većih) i pomiču se od negativnog prema pozitivnom polu slabe struje (Slika 5.).

Slika 5. Elektroforeza DNA nakon cijepanja restrikcijskim enzimom

Slijedeći važan događaj za genetičko inženjerstvo bilo je otkriće enzima (u 1967. god.), koji mogu spajati usjeke nastale u jednom lancu molekule DNA i to između susjednih

nukleotida u dvolančanoj molekuli DNA. Ti enzimi, nazvani ligaze dobiveni su ili iz bakterije *E. coli* ili od bakterijskog faga T4, povezuju usjeke koji su preostali u jednom i drugom lancu nakon što su se spojili komplementarni jednolančani ljepljivi krajevi. Ti enzimi mogu spojiti i tupe krajeve dva fragmenata DNA različitih

Slika 6. Spajanje fragmenata molekula DNA od dva različita izvora

Dvije molekule dobivene od različitih organizama nakon što se spoje potrebno je uz pomoć prenositelje (vektora) unjeti u željenog domaćina. Kao vektori služe najčešće plazmidi koji su ekstrakromosomske molekule DNA, a koje imaju sposobnost samostalne replikacije kada se unesu u domaćina. Plazmidi kao ekstrakromosomski elementi široko su rasprostranjeni u brojnim prokariotima, moraju imati određena svojstva da bi mogli poslužiti kao vektori, a neka njihova svojstva prikazana su na slici 7. Prvo je bila sposobnost samostalne replikacije u određenom domaćinu, što znači da se mogu umnažati neovisno od kromosoma svog domaćina. Osim toga, neka od svojstava plazmida kodirana njihovom DNA, kao što je otpornost prema antibioticima ili teškim metalima, mogu uspješno poslužiti za probiranje jedinke domaćina u koju je rekombinantna molekula DNA unesena. Ta svojstva (samostalna replikacija, rezistencija na antibiotike, restriksijska mjesta) bila su bitna svojstva plazmida kao vektora. Pokazalo se da i plazmidi u svojoj DNA imaju palindromske raspodjele baza pa se mogu otvoriti odnosno linearizirati i spojiti s drugim fragmentom DNA.

Slika 7. Vektori i svojstva plazmida kao vektora.

Takve hibridne molekule, kako se pokazalo, veoma su pogodne za istraživanja aktivnosti pojedinih gena kao i njihove strukture bilo da se sastoje od prokariotskih ili eukariotskih fragmenata DNA. Međutim, osnovno je pitanje bilo mogu li se takve molekule unijeti u aktivne stanice i tamo iskazati svoja svojstva.

Budući većina mikroorganizama, koji bi mogli poslužiti kao domaćini, ne dozvoljava unošenje strane hibridne molekule DNA u svoju citoplazmu to je predstavljalo ozbiljnu poteškoću. Taj problem riješili su 1970. god. M. Mandel i A. Higa s Univerziteta na Hawaima, SAD, koji su pokazali da stanice bakterije *E. coli* koje su obrađene otopinom kalcijeva klorida mnogo djelotvornije primaju DNA faga lambda. Odmah nakon tog otkrića Stanley Cohen i Annie Chang s Univerziteta u Stanfordu, SAD, pronašli 1973. god. da se i molekule plazmida mogu mnogo djelotvornije unijeti u stanicu bakterije *E. coli* i time je transformirati, ako se prethodno obrade kalcijevim kloridom. Oni su zajedno s H. Boyer-om i R. Helling-om s Univerziteta u San Francisku odmah i konstruirali *in vitro* hibridnu molekulu DNA, koja se sastojala od fragmenata DNA plazmida iz *E. coli* i plazmida iz *Staphylococcus aureus*. Hibridni plazmid unesen je u *E. coli*, gdje je pokazivao biološko svojstvo iz *S. aureus* sadržano u hibridnom plazmidu. Ono što je bilo još važnije bio je podatak da kada se takvom hibridnom molekulom transformirana stanica jednom razmnoži u njezinoj se citoplazmi dobiju točne kopije molekula kojim je stanica transformirana. **To je bilo prvi puta da je genetičkim inženjerstvom dobivena *in vitro* hibridna molekula DNA od dva različita organizma**

unesena u domaćina u kojem je ta molekula eksprimirala (izrazila) svojstvo iz drugog organizma.

Naravno da se ubrzo postavilo pitanje može li se konstruirati hibridni plazmid koji bi sadržavao gene od bakterija i od viših organizama i da li se takav gen može izraziti (eksprimirati) u novom domaćinu. Stoga su konstruirane hibridne plazmidne molekule DNA koje su se sastojale od dijelova bakterijskog plazmida i fragmenta DNA iz žabe *Xenopus laevis*. Takvim molekulama, provedeni su uspješno transformacije bakterijskih stanica u kojima se uneseno svojstvo eksprimiralo i trajno održavalo. Time se dokazalo da metodologija koju je otkrio P. Berg može poslužiti za konstrukciju hibridnih molekula DNA, koje kada se unesu u različite domaćine tim domaćinima donošaju nova svojstva.

Z a k l j u č a k

Navedenim eksperimentalnim rezultatima i spoznajama započela je era novih otkrića i primjene dostignuća tehnologije rekombinantne DNA ili popularnijeg naziva genetičkog inženjerstva. Danas praktički nema područja prirodnih znanosti u najširem smislu riječi u kojem tehnologija rDNA nema svog udjela. Tako se koristi za rješavanje temeljnih pitanja iz domene molekularne biologije ili daje praktična rješenja u biologiji, medicini, agronomiji, veterini, kriminalistici i drugdje.

Obzirom na klasično križanje genetičkog materijala u cilju oplemenjivanja mikroorganizama, biljaka i životinja sa ciljem odabira jednog željenog svojstva (pri čemu su isključena ostala svojstva iz reprodukcije) tehnologija rDNA omogućuje da se selekcionira vrijedno genetičko svojstvo iz različitih organizama na molekularnoj razini uz upotrebu mnogo preciznije tehnike genetičkog inženjerstva. U osnovi obje tehnike su slična jedna drugoj jer rekombiniraju genetički materijal ali uz bitne razlike. Tehnika rDNA nam omogućuje korištenje i prenošenje jednog gena čija je funkcija dobro poznata iz jednog u drugi organizam. U selekcijskom oplemenjivanju velika garnitura gena nepoznatih funkcija prenosi se između srodnih organizama. Genetičko inženjerstvo omogućuje zbog veće točnosti manipulacije da se izbjegne rizik dobivanja organizma s neočekivanim svojstvima te da se izbjegne dugotrajno testiranje, pokušaja-i-pogreške selekcijskim oplemenjivanjem.

Stoga se predviđanja, da će ovo stoljeće biti bitno stoljeće nove biotehnologije u kojoj rDNA ima središnju ulogu, ostvaruju brže nego što su predviđali i najveći optimisti.

L i t e r a t u r a

Cohen, S. N.: The Manipulation of Genes.
Scientific American, 233; 25-33, 1975.

Delić, V.: Trideset godina genetičkog inženjerstva: kako je došlo do otkriće mogućnosti rekombiniranja DNA molekula *in vitro*. PRIRODA, 94, br. 918 (1), 2004)

Neki primjeri praktične primjene tehnologije rekombinantne DNA

Prof. dr. sc. Vladimir Delić

Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Biološki odsjek, Zavod za molekularnu biologiju, Rooseveltov trg 6, Zagreb

S a ž e t a k

Kao rijetko koje otkriće u području prirodnih znanosti, tehnologija rDNA imala je i ima značajnu primjenu u novim fundamentalnim otkrićima kao i u praktičnoj primjeni. Praktična primjena ogleda se u mogućnosti dobivanja novim biotehničkim postupcima određenih proizvoda naročito u području biomedicine, ekologije, poljoprivrede i drugih prirodnih znanosti. Brojni primjeri na području medicine i dobivanja spojeva potrebnih ljudskom zdravlju pokazuju dostignuće i nemjerljivu korist tehnologije rDNA. Uz upotrebu različitih domaćina za unos konstrukata DNA na tržištu se nalazi preko 150 proizvoda a mnogi su u fazi istraživanja. Na par primjera (insulina, α -antitripsina i vakcina) bit će prikazane prednosti dobivanja proizvoda tehnologijom rDNA.

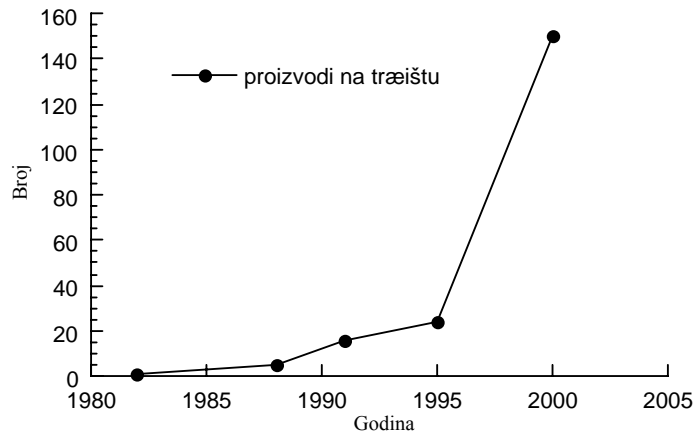
U v o d

Osim u otkrivanju novih fundamentalnih spoznaja u kojima danas ima nezamjenjivu ulogu tehnike rDNA se koriste za proizvodnju novih medikamenata (lijekova, dijagnostičkih sredstava) i sigurnih vakcina, kontrolu virusima uzrokovanih oboljenja, liječenju nekih genetskih oboljenja i sl. U poljoprivredi se genetičko inženjerstvo koristi za povećanje uroda i smanjenja troškova proizvodnje, smanjena količine alergena u nekim namirnicama, povećanju hranidbene vrijednosti nekih živežnih namirnica i dr. U ekologiji se koristi za razvoj biorazgradivih materijala, za smanjenje zagađenja zraka i vode, proizvodnju proteina za opću upotrebu (enzimi, protutijela, stanični receptori i sl.), biosenzora i drugih. Na nekoliko primjera prikazat će se prednosti dobivanja proizvoda tehnologijom rekombinantne DNA. Budući je moguće unijeti konstruirane (rekombinantne) molekule DNA u gotovo sva živa bića od mikroorganizama, biljaka do kralješnjaka (Slika 1.), postoje bezbrojni primjeri koji ukazuju na svrhovitost primjene tehnologije rDNA sa željom postizanja željenog cilja i svrhe.

Slika 1. Unošenje rekombinantne molekule u mikrobnu, biljnu i životinjsku stanicu.

Od prvog proizvoda dobivenog tehnologijom rekombinantne DNA insulina, koji se pojavio na tržištu 1982. godine, do danas svakodnevno raste broj proizvoda dobivenih genetičkim inženjerstvom (Slika 2.) pa je za očekivati da će do kraja 2004. god. na tržištu biti više od 200 različitih proizvoda dobivenih pomoću genetičkog inženjerstva.

To su, osim već spomenutog insulina (liječenje dijabetesa), interferoni (lijekovi protiv različitih virusnih oboljenja), eritropoetin (anemije), faktori VII i IX (hemofilija), interleukini (karcinomi), cjepiva protiv hepatitisa, somatostatin (rast djece), različita dijagnostička sredstva, monoklonska protutijela, tkivni aktivator plazminogena, te brojni terapijski proteini čije se izlaženje na tržište očekuje oko 2004. godine.



Slika 2. Porast broja proizvoda koji se dobivaju genetičkim inženjerstvom

Sve ove supstancije neophodne ljudskom zdravlju i količine potrebne za uspješnu terapiju bile su nedostatne ili zbog načina dobivanja veoma skupe. Stoga je njihovo dobivanje genetičkim inženjerstvom neophodno potrebno i jedini način da se dobiju u dovoljnim količinama je biotehnoški način pomoću organizama koji su konstruirani genetičkim inženjerstvom, a koji su prilagođeni i promijenjeni tako da sintetiziraju te proizvode.

Primjer dobivanja humanog insulina

Na primjeru jednog od prvih proizvoda, koji su dobiveni genetičkim inženjerstvom, uočljive su sve prednosti korištenja npr. bakterije *Escherichia coli* s ugrađenim genom za humani inzulin u odnosu na klasičan način dobivanja insulina iz goveđeg ili svinjskog pankreasa. Na temelju poznavanja redoslijeda aminokiselina humanog insulina u lancu A i lancu B molekule (Slika 3.) bilo je moguće kemijskom sintezom dobiti slijed

Slika 3. Slijed aminokiselina insulina i tripleta baza koji ih kodiraju te plazmidni vektor koji je unesen u bakterije. Streljice označavaju nakupini insulina u citoplazmi.

nukleotida koji kodiraju te aminokiseline. Takav niz nukleotida je tada ugrađen u plazmid i takvim konstruiranim plazmidom provedena je transformacija bakterije *Escherichia coli*. Nakon što je plazmid unesen u stanicu bakterije, u citoplazmi te bakterije sintetizirala su se molekule insulina prema genetskim uputama unesene DNA molekule plazmida. Takva bakterija može se jednostavno razmnožiti i uzgajati pod

kontroliranim uvjetima da se dobije velika količina bakterijske biomase iz koje se inzulin izolira, pročisti i kristalizira.

Radi usporedbe na Slici 4. prikazan je postupak industrijskog dobivanja goveđeg (ili svinjskog) inzulina u usporedbi s onim za dobivanje humanog dobivenim iz bakterije.

Slika 4. Usporedba dobivanja inzulina klasičnim načinom iz goveđeg (ili svinjskog) pankreasa i bakterije *Escherichia coli* s ugrađenim genom za humani inzulin.

U prvim fazama tehnološkog procesa kod žrtvovanja životinja u klaonicama i skupljanja pankreasa uočljiva je prednost dobivanja pomoću bakterije.

Jedna jedina bakterija s genom za humani inzulin (ne goveđi ili svinjski) uzgoji se u bioreaktoru u kojem se nalazi jednostavna hranidbena podloga za uzgoj bakterija. Nakon uzgoja i odvajanja biomase koja se razbije daljnji postupak je više-manje sličan u oba tehnološka postupka dobivanja.

Da bi se još bolje prikazala prednost dobivanja humanog inzulina u odnosu na goveđi inzulin na slici 5. prikazane su potrebne količine izvora iz kojih se dobiva ista količina inzulina.

Slika 5. Usporedba dobivanja iste količine inzulina klasičnim načinom i pomoći bakterije promjenjene genetičkim inženjerstvom-.

Da bi se dobilo oko 42 gr. goveđeg inzulina potrebno je žrtvovati preko 3000 goveda (ili više od 6000 svinja) da se tehnološkim postupkom ekstrakcijom iz njihova pankreasa dobije 41,6 gr. inzulina.

Istovremeno potrebna je jedna jedina bakterija s genom za humani inzulin koja se preduzgojem razmnoži i nacijepi u tekuću hranidbenu podlogu (oko 826 L) koja je u bioreaktoru zapremnine cca 1000 L u kojoj se pod sterilnim uvjetima uzgoji bakterija. Nakon 72 sata uzgoja iz bakterije se izolira 41,6 gr. humanog inzulina.

Iz razmatranja načina dobivanja kao i odgovarajućeg tehnološkog procesa, jasne su prednosti dobivanja inzulina genetičkim inženjerstvom.

One se mogu sažeti u slijedećem:

- mikroorganizam s ugrađenim genom za inzulin predstavlja beskrajn izvor za biosintezu inzulina;
- biotehnološki postupak čini nas neovisnim o osnovnoj sirovini (goveda, svinje);
- biotehnološki proces dobivanja inzulina je jednostavniji u odnosu na klasičnu tehnologiju;
- biotehnološki proces je ekološki čišći u odnosu na ekstrakcijski iz pankreasa;
- klonirani mikroorganizam sintetizira humani inzulin te nisu potrebni dodatni postupci kao iz goveđeg ili svinjskog.

Brojni drugi slični primjeri, za proizvode koji su navedeni u ovom tekstu, ukazuju na korist i prednosti koje nam omogućuje genetičko inženjerstvo. Konstruirani željeni geni, osim u stanice mikroorganizama mogu se djelotvorno unijeti i u stanice različitih tkiva

uzgojene u kulturi te se onda u njima sintetiziraju brojne korisne tvari (virusne vakcine, protutijela i dr.). Danas su već brojni primjeri gdje nam znanja i spoznaje iz genetičkog inženjerstva pomažu i rješavaju do danas teško riješive probleme. To se očituje u svim područjima ljudske djelatnosti od medicine (ljudskog zdravlja, lijekovi, dijagnostička sredstva i dr.), prehrane (nove sorte biljaka s određenim svojstvima) i sl.

Dobivanje proteina iz transgenih životinja

Humani α -antitripsin je važan inhibitor elastaze čiji nedostatak uzrokuje enfizem pluća, oštećenja jetre i krvarenja pa ga bolesnici trebaju uzimati u količinama od 200 gr. na godinu. Kako ga je nemoguće dobiti izolacijom (ekstrakcijom) iz humanih ili životinjskih organa, gen koji kodira taj protein izoliran je iz ljudskih stanica i ugrađuje u plazmidni vektor te njime transformirana *E.coli* koja je proizvodila taj protein i omogućilo njegovo dobivanje biotehnološkim načinom. Međutim taj protein iako je pokazivao aktivnost nije bio glikoziliran. Stoga je konstrukt tog gen (odgovarajući promotor, gen s intronima za antitripsin) metodom mikroinjektiranja unesen u oplodenu jajnu stanicu ovce i takvo jajašce uneseno u uterus ovce. Uneseni gen se u jajašcu ugradio u genom ovce i daljnim diobama prenosio u embrijo. Ovca je ojanjila transgeno janje koje je kad je odraslo u 1 L mlijeka imala 35 gr. α -antitripsina. Da bi se dobila dovoljna količina tog proteina kao i iz jednog bioreaktora pomoću *E.coli*, potrebno je dobit svega pet ovac koje bi davale istu količinu α -antitripsina. (Slika 6.). Klasično križanje da se dobije dovoljno veliko stado iziskivalo bi dulje vremene (Mendelovi zakoni) stoga se od ove jedne ovce može dobiti kloniranjem dovoljan broj jedinki koje bi lakše i brže mogle dati potrebne količine ovog proizvoda.

Slika 6. Mogućnost dobivanja humanog α -antitripsina biotehnološkim načinom ili transgenim stadom kloniranih ovaca.

Takve transgene životinje dobivene su već u velikom broju životinjskih vrsta (miševi, štakori, kunići, ovce, koze, svinje, goveda, ribe, ptice) s ciljem da se proučavaju njihove temeljne biogije ili da se dobiju željeni proizvodi ili nova svojstva. Posebno mjesto imaju laboratorijske transgene životinje koje služe za razjašnjenje nekih bolesti i otkrivanje mogućih lijekova za danas teško izlječivih bolesti ljudi.

Druge primjene genetičkog inženjerstva

Nebrojeni su primjeri primjene tehnologije rDNA bilo u fundamentalnim otkrićima bilo u praktičnoj primjeni u cilj dobivanja određenog proizvoda ili svojstva. Naročito su često korišteni mikroorganizmi čija je molekularna biologija dobro proučena.

Jedan od mogućih veoma interesantnih primjera primjen tehnologije rDNA je u ekologiji. Poznato je da brojne bakterije imaju sposobnost razgradnje toksičnih tvari koje čovjek ispušta u okoliš i time zagađuje i uništava ekosustave smanjuje uvjete za obitavanje živog svijeta na zemlji.

Tako bakterije iz roda *Pseudomonas* imaju sposobnost razgradnje toksičnih cikličkih armatskih spojeva (Slika 7.) do prirodnih metabolita živih bića. Upoznavanjem s

Slika 7. Razgradnja cikličkih spojeva bakterijskim enzimima do ciklusa trikarbonskih kiselina. Sličnost eksploziva TNT-a s toluenom i ksilenom.

molekularnim svojstvima genetičke kontrole tog procesa omogućilo je da se izdvoje regulacijske regije koje prepoznaju cikličke spojeve ali i da se na njih spoje geni čija je funkcija da proizvode vidljivi učinak. Jedan od poznatih vidljivih bioloških fenomena je i bioluminiscencija kod npr. meduza. Gen odgovoran za tu zelenu svjetlost izoliran je iz stanica meduze i povezan s regulacijskom regijom koja prepoznaje cikličke spojeve. Ta regija nakon kontakta s molekulama cikličkog aromatskog spoja (pa i TNT-a) pokreće prepisivanje i prevođenje gena za zeleni fluorescentni protein. Nakon unošenja plazmida koji ima takvu strukturu u bakteriju *Pseudomonas putida* moguće je transformiranu bakteriju uzgojiti u većoj količini i primjeniti na mjestima gdje se nalazi eksplozivna sredstva koja sadrže TNT. Kako iz takvih sredstava izlaze pare TNT-a bakterije koje su raspršene preko takvog područja na mjestu gdje se nalazi taj spoj (TNT) počet će intenzivno fluorescirati i na taj način indirektno otkriti moguće mjesto eksplozivnog sredstva.

Slika 8. Bakterije *P. putida* s plazmidom za zeleni fluorescentni protein i indukcija fluorescencije TNT-om

Ovaj način korištenja spoznaja i primjene genetičkog inženjerstva ukazuje na široke mogućnosti u kombiniranju nasljednih osnova (genetskog materijala) u rješavanju ekoloških problema. Brojni su primjeri koji ukazuju na mogućnosti korištenje genetičkog inženjerstva u konstrukciji organizama za razgradnji zagađivača prirode kao što su insekticidi, herbicidi, naftni derivati i drugi.

Z a k l j u č a k

Kao rijetko koje temeljno otkriće iz područja prirodnih znanosti, tehnologija rDNA našla je veoma brzo praktičnu primjenu nakon što je prvi puta objavljena mogućnost spajanja DNA molekula *in vitro*. Prva je bila biomedicina koja je uočila korisnost spoznaja i primjenila je sa ciljem dobivanja korisnih supstanci za zdravlje ljudi. Jednako tako sve više se primjenjuje u poljoprivredi, stočarstvu, zaštiti okoliša i drugim područjima prirodnih znanosti sa željom da se riješe brojni vitalni problemi. Može se predvidjeti da će se praktična primjena genetičkog inženjerstva širiti na sve veći broj područja od koji su neka već sada nezamisliva bez upotrebe tehnologija rDNA.

L i t e r a t u r a

Delić, V.: Što je genska tehnologija i čemu služi ? U: Društveni značaj genske tehnologije, D. Polšek i K. Pavelić (Ured.), st. 23-39. Institut društvenih znanosti Ivo Pilar, Zagreb, 1999.

Delić, V.: Some application of recombinant DNA technology in pharmaceutical industry. *Medicus*, 2,(1), 85-101. 1993.

Delić, V.: Dobivanje inzulina rekombinantnom DNK iz bakterija. Medicinska enciklopedija, drugi dopunski svezak, str. 273-276, Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb, 1986.

Vučemilović, A. i Delić, V.: Mogućnost otkrivanja mina i neeksplozivnih sredstava genetički izmjenjenim bakterijama. Hrvatski vojnik, XI, br. 75, st. r28-31. 2001.