
Vladimir
DELIĆ

ŠTO JE GENSKA
TEHNOLOGIJA
I ČEMU SLUŽI?

Biologija kao znanost o živim bićima obuhvaća proučavanja svih živih bića, a to su mikroorganizmi, životinje, biljke i čovjek. U ranim stadijima biologija je po svojem metodološkom pristupu bila deskriptivna, no zbog interesa čovjeka da prođe u bit života, ona se sve više orijentira na otkrivanje biti koja je svojstvena svim živim bićima – a to je kako su regulirani i kontrolirani životni procesi te zašto su potomci slični roditeljima. Tim područjima bavi se posebna grana biologije, genetika, kao središnje područje zanimanja proučavanja u svih živih bića.

Veoma rano, u fazama stjecanja spoznaja o nasljeđivanju, čovjek je temeljem empirije te ne znajući bit i strukture odgovorne za nasljeđivanje počeo koristiti metode genetike kao sredstvo za dobivanje tzv. oplemenjenih sorata biljaka i životinja. Time je hotimice i svijesno narušavao i usmjeravao prirodnu učestalost tzv. rekombinacije nasljednih osnova kao sredstva da se dobiju nove kombinacije gena, a time i nova svojstva.

Novo razdoblje genetike

Od klasične biologije, pa tako i od genetike, rezultat koje su spoznaje o zakonitostima nasljeđivanja ranih 40-ih godina ovog stoljeća, te u želji da se riješi bit “logike živog” (da parafraziram Nobelovca F. Jacoba) pojavila se nova grana biologije, molekularna biologija, termin koji prvi put upotrebljava W. Weaver u izvještaju o istraživačkim aktivnostima Rockefellerovoj fundaciji 1939. godine. Weaver kaže: (1)

I postupno nastaje nova grana znanosti – molekularna biologija – koja počinje razotkrivati mnoge tajne koje se odnose na najmanje jedinice (dijelove) žive stanice... Među studijama kojima Fundacija daje potporu jest i serija u razmjerno novom području koje se može nazvati molekularna biologija, a u tim su se studijama koristile fine moderne tehnike da se istraže najsitniji detalji određenih životnih procesa.

Dakle, bit molekularne biologije jest da rješava i objašnjava život i njegove procese na razini molekula. Budući da je središnje pitanje koje je zaokupljalo pozornost znanstvenika bilo nasljeđivanje i način funkcioniranja živih bića, nije nelogično da su se istraživanja usmjerila na one dijelove stanica koji određuju svojstva živih organizama. Da bi se moglo proučavati fenomene nasljeđivanja i omogućiti rad s molekulama odgovornim za nasljeđivanje, bile su potrebne određene spoznaje i dostignuća molekularne biologije koja, na razini molekula, proučava nasljeđivanje i funkcioniranje živih bića, dakle proučava molekularnu genetiku. Samo neka bitna otkrića i znanja potrebna za razumijevanje ovog teksta dana su u Tablici 1.

Osnovna spoznaja bila je da sva živa biće (osim nekih virusa) imaju deoksiribonukleinsku kiselinu (DNA), strukturu u kojoj su zapisana sva nasljedna svojstva i način funkcioniranja živih bića.

Sama DNA sastoji se, osim od šećera riboze i fosfata, također od baza adenina i gvanina te timina i citozina. Struktura dvostruke zavojnice DNA i njezino značenje pokazao je (2,3) da okosnicu molekule DNA čine riboza i fosfat, a baze se spajaju tako da se adenin spoji s timinom, a citozin s gvaninom. Pri tome je pokazano da tri određene baze u nizu kodiraju jednu aminokiselinu, pa je jasno da redosljed tih baza u DNA su osnova raznolikosti svega živoga svijeta na zemlji (vidjeti: Ž. Kučan, ovo izdanje).

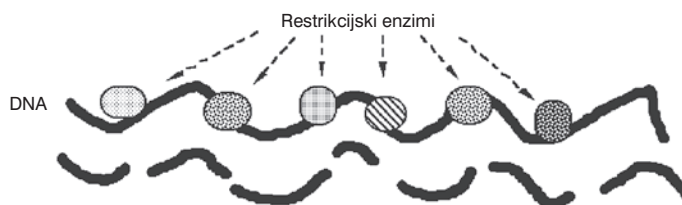
Tablica 1.
 Neke spoznaje molekularne biologije koje su omogućile genetičko inženjerstvo*

Godina	Autori	Spoznaja
1944.	AVERY, MACLEOD, McCARTY	transformirajuće načelo je DNA
1950.	CHARGAFF	4 baze u DNA, stalan odnos pojedinih purinskih i pirimidinskih baza
1951.	SANGER	sekvencioniranje peptida, inzulin
1952.	HERSHEY i CHASE	DNA odgovorna za nasljeđivanje
1953.	WATSON i CRICK	DNA je dvostruka zavojnica
1958.	CRICK	adaptor molekule, (tRNA)
1961.	JACOB i MONOD BRENNER	regulacijska jedinica, operon mRNA
	CRICK i sur.	tri baze su jedan kod
	NIRENBERG i MATTHEI	poliU kodira polifenilalanin
1964.	YANOFSKY i sur.	kolinearnost genetičkoga koda
1965.	BRENNER i sur.	besmisleni kodoni, "stop"

1970.	MANDEL i HIGA	kompetencija, transformacija stanica
	ARBER, SMITH, NATHANS	restriksijski enzimi
1972.	BERG i sur.	ugradnja "strane" DNA, spajanje fragmenata
	MERTZ i DAVIS	T4 DNA-ligaza
1973.	COHEN i sur.	konstrukcija funkcionalnog plazmida
1976.	MANIATIS i sur.	kloniranje eukariotskih gena
	Prvi pravilnik o radu s rekombinantnom DNA	
1977.	SANGER i sur.	sekvencioniranje DNA
	MAXAM i GILBERT	sekvencioniranje DNA
1978.	CHANG i sur.	ekspresija eukariotskoga gena u bakteriji
	CREA, HIROSE, ITAKURA	sinteza oligonukleotida
1980.	COHEN i BOYER	patent za kloniranje gena
	(Process for producing biologically functional molecular chimeras, US Pat. 4237224)	
1983.	van MONTAGU i sur.	Ti-plazmid za transformaciju biljnih stanica

* Navedena su samo neka dostignuća te postoji niz drugih dostignuća bitnih za genetičko inženjerstvo.

Jedno od ključnih otkrića i spoznaja bitno za genetičko inženjerstvo bilo je da se molekula DNA može cijepati na manje dijelove, fragmente, pomoću restriksijskih enzima koji dijele DNA na točno određenom mjestu, (4,5,6) prepoznavajući određen redoslijed purinskih i pirimidinskih baza u molekuli DNA (Slika 1).



Slika 1.

Različiti restriksijski enzimi cijepaju molekulu DNA na određenim mjestima (palindromskim redoslijedima nukleotida) dajući manje fragmente.

To je omogućilo da se tako nastali fragmenti DNA različite dužine mogu izolirati prema veličini i po želji povezati *in vitro* s drugim molekulama DNA iz potpuno drugih izvora ili živih bića, te tako konstruiraju hibridne molekule DNA kakve u prirodi ne postoje.

Prvo takvo povezivanje molekula DNA u epruveti, dakle *in vitro*, od različitih organizama uspjelo je P. Bergu

Tablica 1.
(nastavak)

(7) početkom 70-ih godina. On je kovalentno spojio fragmente DNA od dva različita organizma te tako izvan prirode napravio ono što se naziva rekombinacija gena (Slika 2). Spajajući DNA-virus SV40 zelenog afričkog majmuna i dio gena odgovornog za razgradnju šećera galaktoze iz bakterije *Escherichia coli* dobio je jedinstvenu kružnu molekulu DNA od dva veoma različita i filogenetski udaljena živa bića.

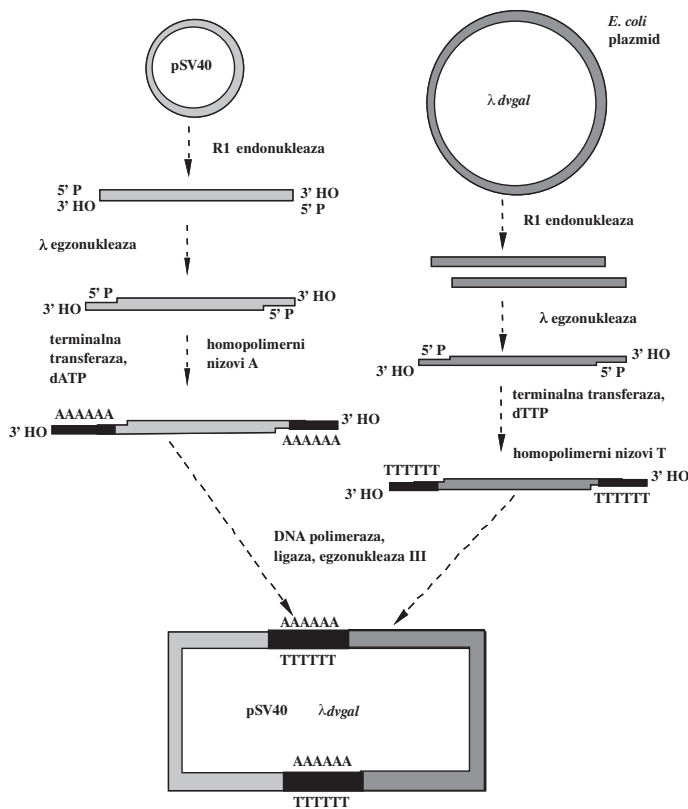
Zbog tog prvog rezultata spajanja molekula DNA *in vitro*, nobelovca P. Berga nazivamo ocem genetičkog inženjerstva.

Genetičko inženjerstvo

Prije nego se navedu neke tehnike genetičkog inženjerstva potrebno je razjasniti definicije i pojmove koji se koriste u literaturi i javnosti (genetičko inženjerstvo, transgeneza, kloniranje), a budući da se radi o različitim pojmovima, oni u nestručnjaka mogu izazvati nedoumice i zabunu. Genetičko inženjerstvo definirano je kao *oblikovanje novih kombinacija nasljednog materijala ugradbom molekula nukleinskih kiselina dobivenih izvan stanice u virus, plazmid ili bilo koji drugi oblik prenositelja, tako da se omogući njegova ugradba u organizam domaćina u kojem one prirodno ne postoje, ali u kojem su sposobne za umnožavanje.*

Termini koji se često upotrebljavaju, osim genetičkog inženjerstva, jesu: tehnologija rekombinantne DNA, kloniranje gena i sl., a kako se najčešće radi o unosu jedne rekombinantne molekule DNA u jedinku domaćina u kojoj se ona umnožava, onda se tome terminu dodaje naziv kloniranje (vidjeti poslije u tekstu). U ovom tekstu pojam genetičko inženjerstvo koristi se kao sinonim za rekombinantnu tehnologiju DNA, koja je određena navedenom definicijom.

Odmah nakon tog prvog pokusa postavilo se pitanje da li je moguće tako kreirane molekule unijeti u živi organizam i da u njemu budu funkcionalne, tj. da izraze svoja svojstva. Taj su problem ubrzo riješili S. Cohen i suradnici (8) unošenjem, u epruveti konstruiranih gena za rezistenciju prema antibioticima iz dva različita mikroorganizma, u jednog domaćina. Taj domaćin (bakterija) bio je rezistentan na oba antibiotika čiji su geni spojeni u jednu molekulu i uneseni u tog domaćina. Primjedba na taj pokus bila je da se normalno u prirodi događa prijenos gena za rezistenciju, čak i između različitih rodova bakterija. Stoga su Morrow i suradnici (9) primjenjujući Bergovu tehnologiju, spojili *in vitro* bakterijski gen koji određuje rezistencija na antibiotik s fragmentom DNA iz žabe, dakle iz eukariot-



Slika 2.

Konstrukcija *in vitro* prve hibridne molekule DNA koja se sastoji od DNA-virusa pSV40 iz zelenog afričkog majmuna i dijela gena virusa lambda s genom za metabolizam šećera galaktoze gal iz bakterije *Escherichia coli*.

skog organizma, i takvu hibridnu molekulu unijeli u bakteriju *E. coli*. Tako konstruirana DNA normalno se replicirala (umnožava) i ekspimirala svoje svojstvo u bakteriji kao domaćinu.

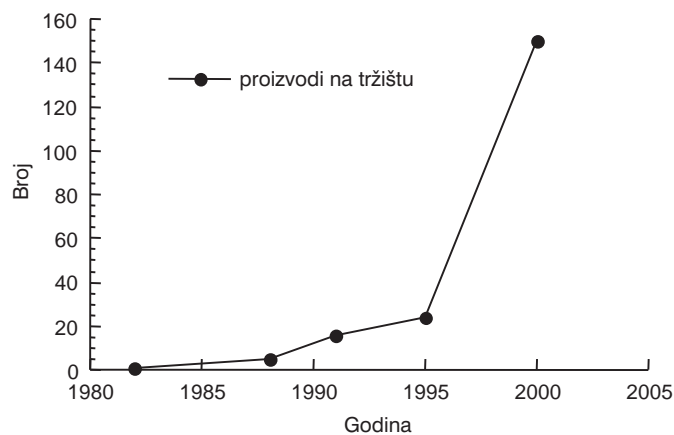
Nakon tih prvih rezultata na razini DNA, genetika kao znanost o nasljeđivanju više nikada neće biti ono što je do tada bila. Ti pokusi i njihovi rezultati omogućili su rekombinaciju DNA različitih organizama, pa je mnogo ispravnije te tehnike nazvati rekombinantna DNA-tehnologija umjesto genetičko inženjerstvo.

Rekombinantna DNA-tehnologija otvorila je nove puteve i vidike te je omogućila da se *in vitro* konstruiraju molekule DNA po želji, da se prenose iz jednog organizma u drugi te da se geni proučavaju na jednostavniji način. Te tehnike poslužile su da se: a) jednostavnije proučavaju strukture i funkcije gena te njihova uloga u živih bića jer se mnogo lakše i jednostavnije mogu proučavati manji fragmenti DNA; b) tehnologije rekombinantne DNA primijene u praktične svrhe kako bi se dobile korisne tvari za čovjeka.

Fundamentalna otkrića genetičkog inženjerstva svakodnevna su i nisu predmet ovog teksta, iako izazivaju i zaslužuju veliku pozornost (npr. funkcioniranje gena u razvoju, projekt o humanom genomu, spoznaje o nastanku raka i dr.).

No brojni primjeri koji pokazuju kakvu je praktičnu korist dobilo čovječanstvo genetičkim inženjerstvom neosporno opravdavaju upotrebu tih tehnologija. Od prvog proizvoda dobivenog rekombinantnom DNA-tehnologijom, inzulina koji se pojavio na tržištu 1982. godine, do danas svakodnevno raste broj proizvoda dobivenih genetičkim inženjerstvom (Slika 3) pa se može očekivati da će do kraja stoljeća na tržištu biti oko 200 različitih proizvoda dobivenih pomoću genetičkog inženjerstva.

Slika 3.
Porast broja proizvoda koji se dobivaju genetičkim inženjerstvom

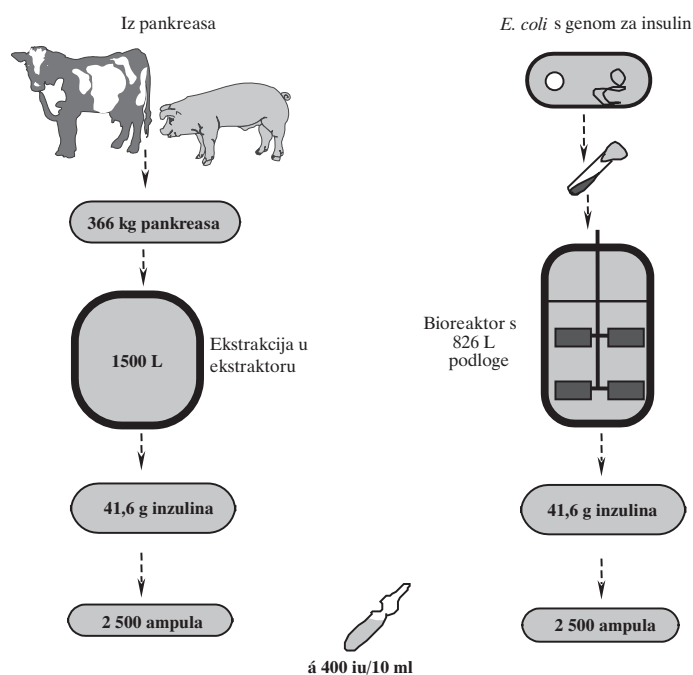


To su, osim već spomenutog inzulina (liječenje dijabetesa), interferoni (protiv različitih virusnih bolesti), eritropoetin (anemije), faktori VII i IX (hemofilija), interleukini (karcinomi), cijepliva protiv hepatitisa, somatostatin (rast djece), različita dijagnostička sredstva, monoklonska protutijela, tkivni aktivator plazminogena te brojni terapijski proteini čije se izlaženje na tržište očekuje oko 2000 godine. Sve te supstancije prijeko su potrebne ljudskom zdravlju a količine primjerene za uspješno liječenje bile su nedostatne ili zbog načina dobivanja, veoma skupe. Stoga je njihovo dobivanje genetičkim inženjerstvom prijeko potrebno i jedini način da se dobiju u dovoljnim količinama biotehnološkim načinom pomoću organizama koji su konstruirani genetičkim inženjerstvom, a koji su prilagođeni i promijenjeni tako da sintetiziraju te proizvode.

Na primjeru jednog od prvih proizvoda nastalih genetičkim inženjerstvom uočljive su sve prednosti korištenja npr. bakterije *Escherichia coli* s ugrađenim genom za huma-

ni inzulin u odnosu na klasičan način dobivanja inzulina iz govedeg ili svinjskog pankreasa (Slika 4). Jedna jedina bakterija s genom za humani inzulin uzgoji se u bioreaktoru od 1000 L i tijekom 72 sata uzgoja sintetizira oko 41.6 g inzulina.

Vladimir Delić
Što je genska tehnologija i čemu služi?



Slika 4.

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

Istodobno za istu količinu govedeg inzulina (41,6 g) potrebno je žrtvovati više od 3000 goveda (ili više od 6000 svinja) da se dobije ista količina govedeg inzulina. (10) Razmatrajući način dobivanja kao i na temelju odgovarajućeg tehnološkog procesa, jasno se uočavaju prednosti dobivanja inzulina genetičkim inženjerstvom. One se mogu sažeti u sljedećem:

- Mikroorganizam s ugrađenim genom za inzulin beskrajan je izvor za biosintezu inzulina.
- Biotehnološki postupak čini nas neovisnim o osnovnoj sirovini (goveda, svinje).
- Biotehnološki proces dobivanja inzulina jednostavniji je nego proces u odnosu na klasične tehnologije.
- Biotehnološki proces ekološki je čišći od ekstrakcijskog procesa iz pankreasa.
- Klonirani mikroorganizam sintetizira humani inzulin te nisu potrebni dodatni postupci kao iz govedeg ili svinjskog.

Brojni drugi slični primjeri, za proizvode koji su navedeni u ovom tekstu, upućuju na korist i prednosti koje nam omogućuje genetičko inženjerstvo. Konstruirani željeni geni, osim u stanice mikroorganizma mogu se djelotvorno unijeti i u stanice različitih tkiva uzgojene u kulturi te se onda u njima sintetiziraju različite korisne tvari (virusna cjepiva, protutijela i dr.). Već danas nam brojni primjeri potvrđuju da znanja i spoznaje iz genetičkog inženjerstva pomažu rješavati dosad teško rješive probleme. To se očituje u svim područjima ljudske djelatnosti – primjerice u medicini (ljudsko zdravlje, lijekovi, dijagnostička sredstva i dr.), u prehrani (nove sorte biljaka s određenim svojstvima) i sl.

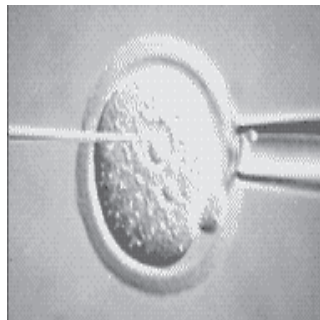
Opasnosti i etička pitanja vezana za genetičko inženjerstvo

Odmah nakon prvih rezultata dobivenih u pokusima genetičkog inženjerstva početkom 70-ih godina sami su znanstvenici predložili i uveli kratki moratorij na tu vrstu istraživanja tražeći da se razmotre i ocijene moguće opasnosti koje bi te tehnike i njezini rezultati mogli imati. (11,12) Ubrzo nakon što su razmotrene sve moguće opasnosti (biološko oružje, širenje neželjenih gena i sl.) doneseni su napatci i regulativa kako se može i treba raditi tehnikama rekombinantne DNA. Zabrinutost koja se u početku činila razložnom danas se uglavnom može zanemariti i praktički u cijelom svijetu nema istraživačkog laboratorija na području molekularne biologije, genetike i drugih prirodnih znanstvenih disciplina u kojem se ne koriste tehnike genetičkog inženjerstva. Primjeri o koristi ili fundamentalnih otkrića ili praktične primjene potvrđuju dobrobit i napredak u spoznajama koje je donijelo genetičko inženjerstvo u proteklih 25 godina. Predviđa se i očekuje da će primjena genetičkog inženjerstva u 21. stoljeću nedvosmisleno produbiti i proširiti znanja za dobrobit čovječanstva.

Transgeneza

Tehnike rekombinantne DNA omogućile su, kako je već rečeno, da se u epruveti konstruiraju geni koji određuju željena svojstva i da se unesu u stanice u kojima normalno ne postoje. Takvi se konstrukti, osim u stanice mikroorganizama, mogu unijeti također u stanice biljaka ili životinja u čije se nasljedne osnove (genom) uneseni gen ugradi, pa cijeli proces nazivamo transgeneza. Stoga je *transgena biljka ili životinja organizam koji u svojem genomu ima ugrađenu rekombinantnu molekulu DNA, koja se nasljeđuje prema Mendelovim zakonitostima kao dominantna.*

Transgeneza, bilo da se provodi na biljkama ili životinjama, osim genetičkog inženjerstva s konstrukcijama na razini DNA kojima se priprema genetički materijal za unošenje u odgovarajućeg domaćina, uključuje i druge tehnike. Na biljkama se primjenjuju tehnike kulture biljnih tkiva i regeneracija tkiva u cjelovitu jedinku, a kod životinja to su spoznaje iz oogeneze i embriogeneze, koje zajedno s tehnologijom rekombinantne DNA i tehnikom mikroinjektiranja (Slika 5) omogućavaju dobivanje transgenih jedinki.



Slika 5.
 Mikroinjektiranje konstruirane DNA u mušku proezgru jajne stanice

Brojni su primjeri dobivanja transgenih organizama u biljaka ili životinja, a namjera je dobiti određena željena svojstva u takvih organizama. Budući da će o transgenim biljkama biti više riječi u drugim dijelovima ove knjige, ovdje navodimo samo primjer u životinju.

Kao i genetičko inženjerstvo tako je i transgeneza imala za cilj dva pravca. Jedan je bio da se jednostavnije i lakše proučavaju funkcije gena u visoko razvijenih organizama kakvi su biljke i životinje, a drugi je da se npr. iz životinja dobiju produkti koji se teško mogu dobiti iz drugih izvora. Neki primjeri transgenih životinja i proizvoda koji se iz njih dobivaju prikazani su u Tablici 2.

Životinja domaćin	Konstrukt DNA ugrađen u životinju	Produkt i količina u 1 litri mlijeka
Miš	mišji promotor-hTPA	hTPA 0.03 g
	goveđi promotor-h1AT	h1AT 7 g
Kunić	goveđi promotor-hIL	hIL
Ovca	ovčji promotor-h1AT	h1AT 35 g
Koza	kozji promotor-hTPA	hTPA 3 g
Govedo	goveđi promotor-hEP	hEP
	goveđi promotor-hLF	hLF

Tablica 2.
 Primjeri transgenih životinja i proizvoda

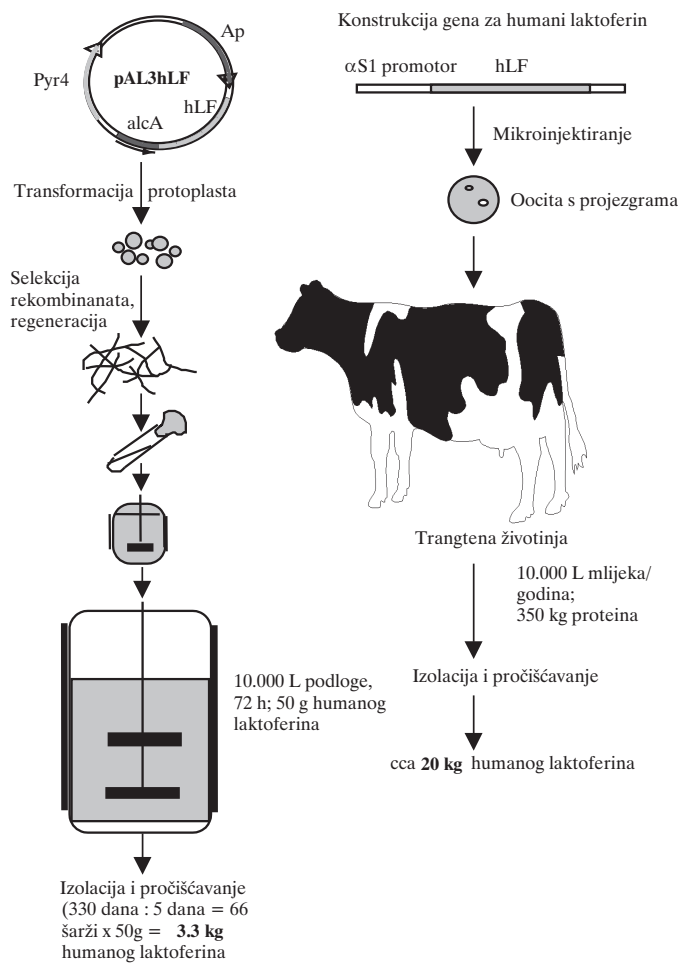
hTPA = humani tkivni aktivator plazminogena
 h1AT = humani α -1-antitripsin
 hIL = humani interleukin
 hEP = humani eritropoetin
 hLF = humani laktoferin

Transgene životinje koriste se uglavnom kao biološki proizvođači terapijskih proteina, uglavnom putem mlijeka. (13) Na primjeru humanog laktoferina, glikoproteina u majčinu mlijeku prijeko potrebnog dojenčadi jer štiti od infekcija, potiče rast te olakšava absorpciju željeza u ranim fazama rasta djece, bit će opisano dobivanje tog proteina transgenom životinjom. S obzirom na današnji način života, majke nemaju dovoljnu količinu mlijeka, a time ni humanog laktoferina, potrebnu za sve nabrojane funkcije rane dojenačke dobi. Stoga je ideja bila da se gen za humani laktoferin ugradi u govedo te da se u mlijeku dobije humani laktoferin.

Gen za humani laktoferin izoliran je iz mliječenih žlijezda žene pomoću reverzne transkripcije iz mRNA. Biblioteka gena pripremljena od takve cDNA pretražena je sondom i pronađen je klon koji je sadržavao gen za humani laktoferin. Taj gen spojen je i stavljen pod kontrolu regulacijske regije za S1 kazein goveda čijeg sadržaja u mlijeku ima više od 10 % od oko 35g/L ukupnih proteina mlijeka. Takav konstrukt mikroinjektiran je u oocitu goveda (Slika 5) te je nakon implantacije oocite i embriogeneze u uterusu krave dobiveno muško transgeno tele. (14) Transgeni bik poslužio je kao izvorište sjemena za umjetno osjemenjivanje i nakon prve oplodnje njegovim sjemenom dobiveno je 16 teladi, od kojih je 8 imalo gen za laktoferin, a 8 nije. Od 8 transgenih telića bilo je 5 muških i 3 ženska teleta. Ti su rezultati pokazali da se nasljeđivanje transgena dogodilo prema Mendelovim zakonima o nasljeđivanju i da se ništa bitno nije dogodilo s obzirom na prirodne zakone o nasljeđivanju. Ovisno o načinu prikazane su dvije mogućnosti dobivanja laktoferina (Slika 6): pomoću mikroorganizma s konstruiranim genom za humani laktoferin i pomoću mlijeka transgene životinje.

Mikroorganizam s genom za humani laktoferin potrebno je uzgajati u hranidbenim podlogama u bioreaktoru od 10 m³, i to 66 šarži tijekom godine da bi se nakon pročišćavanja iz podloge u kojoj je uzgajan mikroorganizam dobilo oko 3.3 kg laktoferina. Alternativa koju omogućava transgeneza jest da jedno visoko mliječno, za laktoferin transgeno govedo, a koje daje oko 10.000 l mlijeka na godinu može dati oko 20 kg humanog laktoferina u mlijeku.

Ovaj primjer nedvosmisleno govori u prilog korištenja domaćih transgenih životinja za dobivanje korisnih proteina potrebnih ljudskom zdravlju. Iz Tablice 2 jasno je vidljivo koji se već proizvodi dobivaju iz transgenih životinja, a da se i ne govori o drugim mogućnostima kao što su dobivanje dijelova organa ili tkiva. Rezultati mnogo-



Vladimir Delić
Što je genska tehnologija i čemu služi?

Slika 6. Usporedba dobivanja humanog laktoferina (hLF) biotehnoškim načinom iz mikroorganizma s ugrađenim genom za laktoferin i transgenom životinjom

brojnih nedavnih istraživanja pokazuju da se može postići, osim već spomenutih primjera dobivanja proteina, i stimulacija razvoja mišićne mase, sinteza određenih bakterijskih enzima, sinteza esencijalnih aminokiselina, specifičnih imunoglobulina i sl. (15)

Dobrobit od transgenih životinja je neprocjenjiva jer se dobivaju oni rijetki proizvodi koji se veoma teško mogu dobiti na klasičan, konvencionalan način kao što su α -1-antitripsin, tkivni aktivator plazminogen, hormon rasta, interleukin, faktor F-IX, eritropoetin i dr. Stoga nije neočekivano da će se transgeneza u životinja, pa i biljaka, i dalje razvijati kako bi se proizvele korisne tvari ili sorte biljaka i životinja potrebne čovječanstvu.

Opasnosti i etička pitanja vezana za transgenezu

Kao i u ranim fazama genetičkog inženjerstva tako je i pojava prve transgene životinje (miša s ugrađenim genom za hormon rasta koji je rastao brže i bio veći od kontrolnih životinja te navedenog bika nazvanog Herman) izazvala dileme i određenu zabrinutost. Javnost se pitala hoće li se transgenezom moći kreirati bića koja u svijetu ne postoje, a za koja mi nismo pripravnici. Zbog takvih i sličnih dilema, bilo je potrebno i više od godine dana da se dopusti osjemenjivanje sjemenom transgenog bika. Naime, javnost u Nizozemskoj, gdje je dobivena transgena životinja, bila je protiv njegove upotrebe. Tek kad je objašnjena dobrobit koju pruža postupak dobivanja transgene životinje, bilo je moguće dobiti potomstvo od transgene životinje. Danas se uvelike koriste transgene životinje i biljke (vidjeti S. Jelska, ova knjiga) za dobrobit čovjeka, iako još postoje dvojbe, uglavnom zbog nepoznavanja bitne problematike o kojoj se raspravlja i zbog nerazumijevanja jasne dobrobiti koju nam pruža i koju će u budućnosti pružati takve biljke i životinje.

Kloniranje

Posljednji primjer dostignuća u biologiji bilo je kloniranje u sisavaca. Iako je kloniranje kao metodologija veoma stara jer se određene biljke razmnožavaju kloniranjem (jagode npr.), te tehnike u viših organizama nije bilo moguće primijeniti. Naime bila su manjkava znanja i metode pomoću kojih bi bilo moguće provesti kloniranje u viših organizama. Budući da se pojam kloniranja često poistovjećuje s genetičkim inženjerstvom, potrebno je podsjetiti na definiciju klona i kloniranja. *Klon (grčki klon, grana, ograna, cijepika, kalem, podmladak) označava skupinu jedinki ili pojedinih organizama, nastalih aseksualnim razmnožavanjem, iz jedne seksualnim načinom dobivene jedinke. Stoga je kloniranje postupak dobivanja populacije klonskih jedinki.*

Preme tome, kloniranje sisavaca treći je tip tehnika rada s nasljednim materijalom, ali se u ovom slučaju ne radi o rekombinantnoj DNA-tehnologiji, nego o prijenosu cijele genetičke strukture (jezgre s kromosomima) u jajnu stanicu drugog domaćina iz koje je mikromanipulacijom izvađena jezgra. Kloniranje ovaca pokazalo je da je jezgru iz diferenciranih tkiva, u kojima su neki geni u stanju "mirovanja", moguće, nakon unošenja u drugu stanicu (jajnu), reprogramirati tako da se genetički materijal potakne na embriogenezu (16) i dobije potomstvo osobina koje su određene genima unesene jezgre.

Što znači ova nova tehnologija koja se u svijetu sve više primjenjuje te danas već imamo brojne klonirane životinje (ovce, goveda, majmune i dr.)?

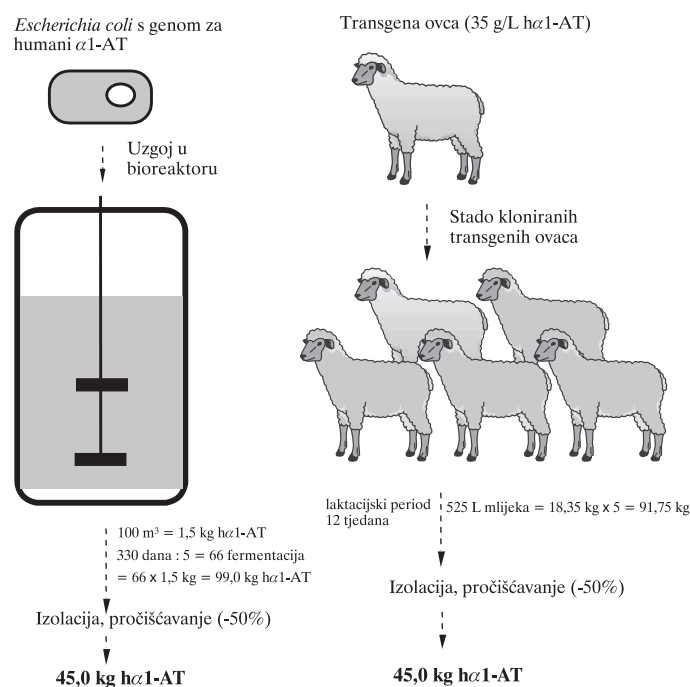
Ona pokazuje napredak nastao kao skup spoznaja iz područja oogeneze i embiogeneze sisavaca bez čijeg poznavanja ne bi bilo moguće prenošenje mikromanipulacijom jezgre iz jednog tipa stanica u drugi (jajnu) i zatim je ne bi bilo moguće unijeti u domaćina u kojem će se nastaviti embriogeneza i razvoj ploda.

Osim fundamentalnih otkrića koja su postignuta kloniranjem sisavaca, postavilo se pitanje kakva bi bila korist u praktičnoj primjeni. Brojni primjeri pokazuju što se sve može postići kloniranjem, npr. u stočarstvu dobivanje stada istovjetnih jedinki željenih svojstava, umnožavanje vrsta koje su pred izumiranjem i sl.

Na primjeru iz prethodnog poglavlja o transgenezi, gdje je dobivena transgena ovca (vidjeti Tablicu 2) koja je u mlijeku imala humani α -1-antitripsin, moguće je predvidjeti prednosti kloniranja i kloniranih životinja (Slika 7). Potomstvo takve ovce dobiveno kloniranjem imalo bi istovjetna svojstva osnovne transgene jedinke, a to je da u mlijeku ima humani α -1-antitripsin u količinama koje su jednake onima iz ishodišne transgene jedinke.

Nedvosmislena je prednost u dobivanju takvog stada od jedne dobivene transgene jedinke za dobivanje željenog

Vladimir Delić
Što je genska tehnologija i čemu služi?



Slika 7. Usporedba dobivanja humanog α -1-antitripsina (h α 1-AT) pomoću mikroorganizma u bioreaktoru i kloniranjem za h α 1-AT transgene ovce

proteina. Na primjeru humanog α -1-antitripsin, inhibitora elastaza čiji nedostatak uzrokuje enfizem pluća, oštećenja jetre i krvarenja (terapija je 200 g/pacijentu na godinu), nedvosmisleno proizlazi zašto je potrebno raditi na kloniranju i kakva je korist od toga. Samo pet kloniranih ovaca čija je prosječna mliječnost tijekom laktacijskog razdoblja oko 525 l mlijeka dala bi nakon izolacije i pročišćavanja oko 45 kg humanog laktoferina.

Opasnosti i etička pitanja vezana za kloniranje

Kontroverze koje je izazvao pokus i dobivanje prve klonirane ovce, nazvane Dolly, bile su brojne i burne, a ponovno su, kao i u prva dva slučaja, uzburkale javnost. (17) Etički problemi više nego ikada na području bioloških istraživanja došli su u prvi plan i logična je bila reakcija javnosti na to znanstveno dostignuće. Najviše primjedaba odnosilo se na mogućnosti kloniranja ljudi (zbog etičkih i vjerskih pitanja) pa su i ta i neetička pitanja, npr. da li bi netko želio za sebe klonirati Dolly Parton (po kojoj je klonirana ovca dobila ime) ili određenu osobu iz sasvim egoističkih razloga, osobe tipa novih diktatora ili znanstvenika i sl. Takva razmišljanja, stajališta i ideje potpuno su neumjesna i neetična i stoga taj oblik (kloniranje) rada s nasljednim osnovama treba u takvom svjetlu razmatrati.

Osim fundamentalnih spoznaja koje su postignute kloniranjem, kao postupkom dobivanja istovjetnih jediniki, potrebno je razmotriti i sve navedene dobrobiti navedenih primjera, koje nam kloniranje pruža i pružit će u budućnosti.

Zaključak

Ulaskom u 21. stoljeće, koje će biti stoljeće biotehnologije u najširem smislu riječi, nije moguće spriječiti znanost i ljudsku težnju za otkrivanjem novih spoznaja i stjecanja znanja. Stoga će sve spoznaje i dostignuća koja su rezultat genetičkog inženjerstva, transgeneze i kloniranja i dalje davati rezultate kao i do sada, a moje je duboko uvjerenje na dobrobit čovjeka i cijelog živog svijeta na zemlji. Neetička razmišljanja, primjenu i zlouporabu treba kontrolirati društvo čija razina svijesti i znanja moraju biti takvi da se može odvagnuti i procijeniti moguća opasnost i sva dobrobit takvih dostignuća. Nepoznavanje i neznanje na području tih dostignuća u molekularnoj biologiji vode prema zaostajanju i zaustavljanju normalanog razvoja i napredaka onih društava koja ne prate i ne prihvaćaju te spoznaje.

1. Weaver, W. (1938), *Report of the Rockefeller Foundation*, pp. 203–204.
2. Watson, J. D., Crick, F. H. C. (1953), Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid, *Nature*, 171: 737–738.
3. Watson, J. D., Crick, F. H. C. (1953), Genetic Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid, *Nature*, 171:964–967.
4. Arber, W., Linn, S. (1969), DNA modification and restriction, *Ann. Rev. Biochem.*, 38:467–500.
5. Kelly, T. J., Smith, H. O. (1970), Restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*. II Base sequence of the recognition site, *J. Mol. Biol.*, 51:393–409.
6. Smith, H. O., Nathans, D. (1973), Suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes, *J. Mol. Biol.*, 81:419–423.
7. Jackson, D. A., Symons, R. H., Berg, P. (1972), Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:2904–2909.
8. Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., Helling, R. B. (1973), Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70:3240–3244.
9. Morrow, J. F., Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., Goodman, H. M., Helling, R. B. (1974), Replication and Transcription of Eukaryotic DNA in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 1743–1747.
10. Delić, V. (1993), Some applications of recombinant DNA technology in pharmaceutical industry, *Medicus*, 2:85–101.
11. Berg, P., Baltimore, D., Boyer, H. W., Cohen, S. N., Davis, R. W., Hogness, D. S., Nathans, D., Roblin, R., Warson, J. D., Weissman, S., Zinder, N. D. (1974), Potential Biohazard of Recombinant DNA Molecule, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:2593–2594.
12. Delić, V. (1994), Berg Paul: Dileme genetičkog inženjeringa u: *Velikani naše epohe - Ličnosti i djela druge polovice XX. stoljeća*. Vince, R. (ur.), str. 53–58. Hrvatski radio, Zagreb.
13. Janne, J., Hyttinen, J.-M., Peura, T., Tolvanen, M., Alhonen, L., Halmekyto, M. (1992), Transgenic Animals as Bioproducers of Therapeutic Proteins, *Annals of Medicine*, 24:273–280.
14. Krimpenfort, P., Rademakers, A., Eyestone, W., van der Schans, A., van den Broek, S., Kooiman, P., Kootwijk, E., Platenburg, G., Pieper, F., Strijker, R., de Boer, H. (1991), Generation of transgenic dairy cattle using *in vitro* embryo production, *Biotechnology*, 9:844–847.
15. Pursel, V. G., Rexroad, C. E. (1993), Status of Research with Transgenic farm Animals, *J. Anim. Sci.*, 71:10–19.
16. Wilmut, I., Schieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., Campbell, K. H. S. (1997), Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature*, 385:810–813.
17. Delić, V. (1997), Vrijeme kloniranja, *Priroda*, 87(838):12–16.