
Mira
GRDIŠA

GENETIČKO
INŽENJERSTVO U
SLUŽBI ČOVJEKA

Genetičko inženjerstvo zauzima važno mjesto u životu čovjeka. Nakon Mendelove genetike bilja i otkrića antibiotika, ono predstavlja najznačajniji razvojni napredak. Pojam pokriva širok raspon promjena genetičkog materijala (manipuliranje genima na molekularnoj razini) kod živih organizama, primjenom modernih metoda molekularne biologije. Te su metode revolucionarno uzdignule davno znane procese biotehnologije koja uključuje opremanje bioloških procesa mikroba te biljnih i životinjskih stanica. Biotehnologija je od davnina u službi čovjeka (čovjek peče kruh, proizvodi pivo, sir itd.). Metode moderne molekularne biologije, naročito genetičko inženjerstvo, otvorile su nove mogućnosti u mnogim industrijama. Primjena genetičkog inženjerstva vrlo je raznolika i u današnje vrijeme nezamjenjiva.

1. U medicini se koristi u liječenju raznih bolesti ljudi i životinja:

- proizvodnja cjepiva protiv raznih bolesti
- proizvodnja čistih humanih produkata u komercijalnim količinama (inzulin, eritropoetin, hormoni rasta i dr.)
- proizvodnja postojećih antibiotika pomoću ekonomičnijih metoda
- proizvodnja novih antibiotika, koji nisu dostupni drugim putem
- razvoj dijagnostičkih kitova
- popravak "greške" u genu - genska terapija.

2. U poljoprivredi i stočarstvu genetičko se inženjerstvo koristi za proizvodnju jeftinije, kvalitetnije i zdravije hrane:

- uzgoj biljaka i životinja poboljšane hranjive vrijednosti za povećanje životnog standarda
- pojačati osobinu prirodnu za određeni organizam (povećati brzinu rasta)
- proizvesti sjeme biljaka otporno na razne bolesti i kukce, što će smanjiti korištenje štetnih herbicida i pesticida.

3. Pročišćavanje industrijskih otpada.
4. Dobivanje goriva iz otpada.
5. Dekontaminacija tla.

U ovom članku bit će opisani neki proteini – humani produkti, koji se proizvode metodama genetičkog inženjerstva, a primjenjuju se u kliničke svrhe. Da bi se neki protein mogao proizvesti genetičkim inženjerstvom, potrebno je poznavati njegovu primarnu strukturu ili moramo znati gen koji kodira taj protein.

Tehnologija genetičkog inženjerstva

Hoće li živa stanica obaviti specifičan i upotrebljiv zadatak na predviđen i kontroliran način, određuju njezini genetički parametri, odnosno upute sadržane u skupini kemijskih poruka nazvane gen. Gen sadrži sve informacije u dugom lancu kemijske molekule, koja određuje prirodu organizma (da li je on ameba, drvo, životinja ili čovjek), čije karakteristike su individualne. Detaljne genetičke informacije jedinstvene su za individuu, isključujući identične blizance. Geni se nasljeđuju s generacije na generaciju tako da kopija nasljeđuje razne osobine od svojih roditelja. Te kemijske instrukcije određuje kodirajući sustav, koji se nalazi u supstanciji nazvanoj deoksiribonukleinska kiselina (DNA). Gen je zapravo segment DNA s porukom kodiranom u njegovoj kemijskoj strukturi. Pojedini geni, kao dijelovi lanca DNA, smješteni su uzduž lanca te određuju karakteristike i funkcije pojedinog organizma. Poremećaji (nedostaci) pojedinih gena mogu uzrokovati poremećaje u organizmu i one su korijen raznih genetičkih bolesti.

Razvoj genetičkog inženjerstva omogućilo je manipuliranje specifičnim genima na molekularnoj razini tako da se koriste laboratorijske procedure na materijalu uzetom iz živih organizama. Taj materijal može biti zamijenjen u istom organizmu ili može biti stavljen u neki drugi organizam.

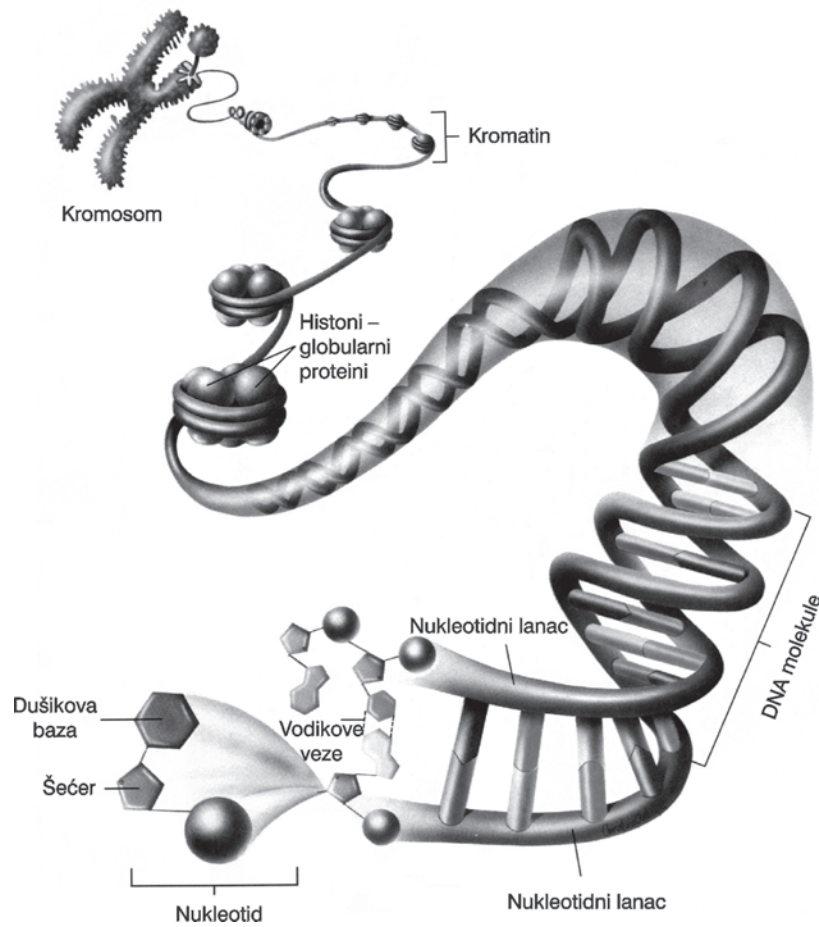
Metodama genetičkog inženjerstva moguće je uzeti gene iz biljnih i životinjskih stanica i prenijeti ih u mikroorganizme (bakterije ili kvasce), koje je lagano uzgojiti u velikim količinama. Produkti koji su bili dostupni u malim količinama iz biljaka i životinja sada su dostupni u velikim količinama iz brzorastućih mikroorganizama. Te metode također omogućuju da se održe određene karakteristike biljnih i životinjskih vrsta. Dakle, željeni gen jedne biljke, životinje ili mikroorganizma može biti ugrađen u neku drugu, nesrodnu vrstu. Metode genetičkog inženjerstva omogućuju razvoj različitih karakteristika znatno brže i uspješnije nego što je to moguće postići konvencionalnim metodama.

Genetički kod

Da bi se poduzela takva genetička manipulacija, potrebno je poznavati genetički kod zapisan u molekuli DNA, koja je dvolančana molekula, umotana u spiralu, nazvana *uzvojnica* (helix) (Slika 1). Formirana je od dva lanca nukleotida, koji su međusobno povezani vodikovim vezama između baza suprotnih lanaca. Nukleotidi su građeni od dušikovih baza (purinske: adenin (A) i gvanin (G); pirimidske: timin (T) i citozin (C)), šećerne komponente (deoksiriboza u DNA i riboza u RNA) i fosfata. Vodikove veze stvaraju se između komplementarnih baza: A-T i G-C. Svaki gen je segment DNA-lanca koji kodira za određeni protein. Da bi se mogao kontrolirati proces proizvodnje proteina, potrebno je razumjeti pojedinosti kodirajućeg sustava DNA. Takve DNA-molekule sadrže informacije za sve proteine sintetizirane u stanici.

Slika 1.

Struktura DNA: Nukleotidi se vežu i formiraju lanac. Nukleotidi jednog lanca vežu se s nukleotidima drugog lanca i formiraju molekulu DNA. Molekule DNA povezane su s histonima – globularnim proteinima. Molekula DNA obično je istegnuta, nalik na konopac sa zrnima, nazvana kromatin. Tijekom dijeljenja stanica kromatin se kondenzira tvoreći tjelešca nazvana kromosomi.

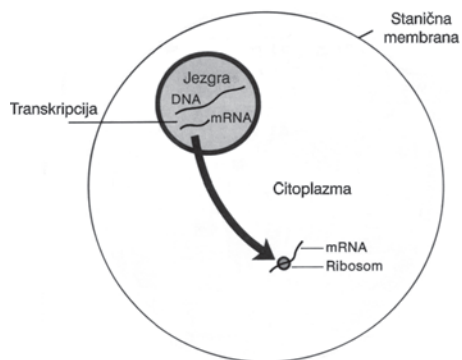


Prepisivanje koda

Da bi došlo do sinteze proteina, informacija sadržana u molekuli DNA (genetički kod) prepisuje se u aminokiseline u proteinima, posredstvom ribonukleinske kiseline – mRNA (Slika 2A). Molekula DNA prvo se odmotava, zatim se lanci odvoje i stanica stvara kopiju odgovarajućega dijela DNA u obliku jednolančane molekule nazvane mRNA. Tako sintetizirana mRNA putuje do staničnih organela, tzv. *ribosoma*, gdje služi kao kalup za sintezu proteina (Slika 2B). Genetički kod za sintezu proteina čita se iz baza u sekvenci mRNA. Svaka sekvenca od 3 baze u lancu DNA jest kemijski kod za jednu aminokiselinu. Za taj kod veže se transportna RNA (tRNA), za koju je vezana određena aminokiselina i pomoću nje se aminokiseline, jedna po jedna, dodaju u protein (Slika 2C). Kodirajući sustav je univerzalan i bazično je isti u svim sisavcima, biljkama i mikroorganizmima.

Proteini, slično kao i DNA, dugačke su molekule nalik na lanac. Sastavljeni su od 20 različitih aminokiselina. Proteini su molekule građene od nekoliko desetina do više stotina aminokiselina, ali s izrazito mnogo različitih funkcija. Proteini se presavijaju i umotavaju u nebrojene varijacije trodimenzionalnih oblika (Slika 3). Tijelo čovjeka posjeduje oko 30.000 različitih proteina, koji imaju razne funkcije u životu čovjeka. Njihova funkcija može biti strukturalna ili fiziološka. Tako hemoglobin ima fiziološku ulogu prijenosa kisika u organizmu. Aktin i miozin međusobno djeluju i omogućuju pokretanje mišića. Inzulin kontrolira uzimanje šećera iz krvi. Kolagen je strukturalni protein, nađen na mnogim mjestima, uključujući nokte i zglobove.

Danas su poznate aminosekvence mnogih proteina. Ako je poznat protein, može se odrediti gen koji ga kodira. Poznavanje strukture proteina ili gena koji ga kodira prijeko je potrebno za njegovu proizvodnju genetičkim inženjerstvom.

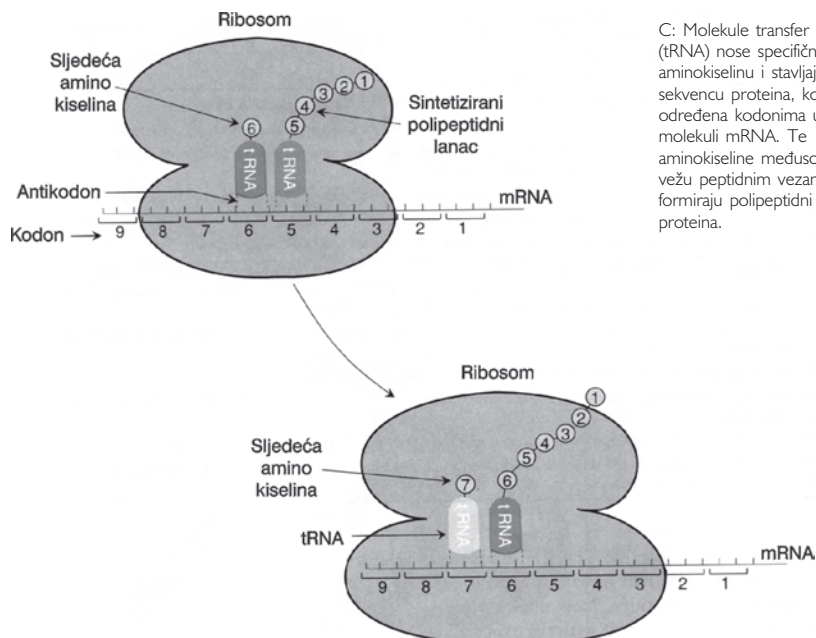
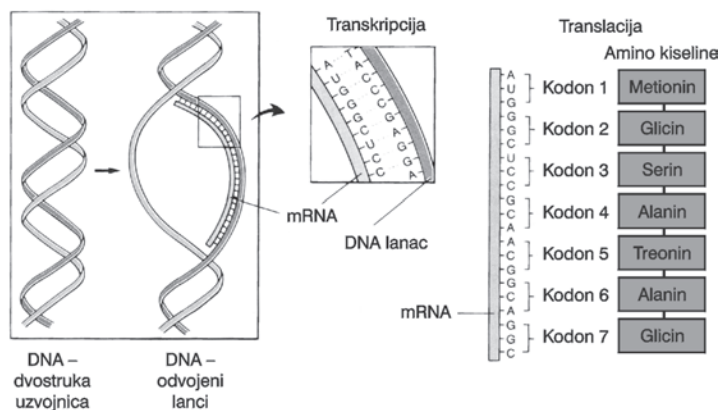


Slika 2.

Transkripcija – translacija – sinteza proteina

A: Nakon transkripcije DNA u mRNA, molekula mRNA izlazi iz jezgre i ulazi u citoplazmu stanice, gdje se veže na ribosome.

B: Transkripcija je proces kojim se informacija DNA kopira u strukturu mRNA. Translacija je proces kojim se poruka u mRNA koristi za sintezu proteina.



C: Molekule transfer RNA (tRNA) nose specifičnu aminokiselinu i stavljaju je u sekvencu proteina, koja je određena kodonima u molekuli mRNA. Te aminokiseline međusobno se vežu peptidnim vezama i formiraju polipeptidni lanac proteina.

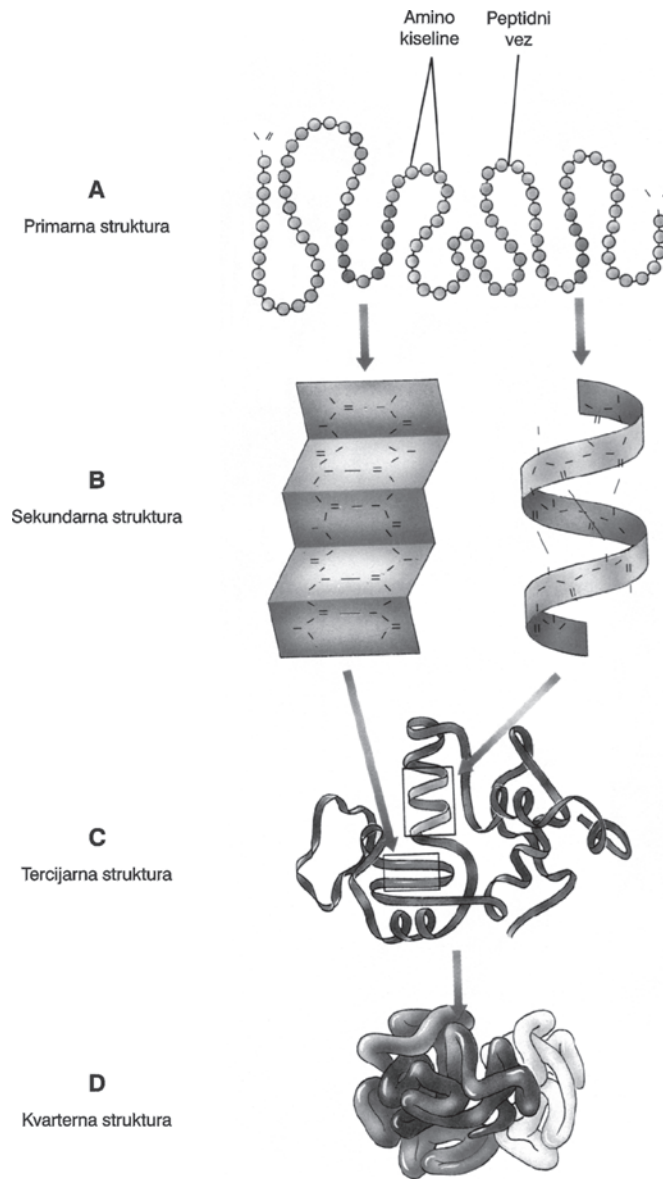
Slika 3.
Struktura proteina:

A: Primarna struktura – slijed aminokiselina.

B: Sekundarna struktura – presavijanje proteina kao posljedica stvaranja vodikovih veza.

C: Tercijarna struktura – nastaje kao posljedica interakcije polipeptida i njegove neposredne okoline.

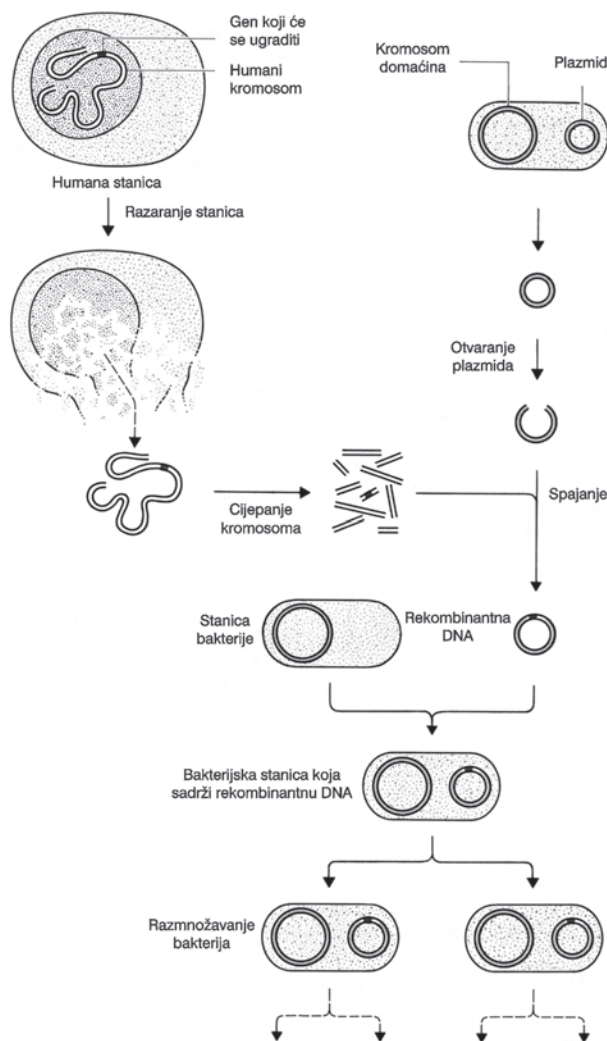
D: Kvarterna struktura – predstavlja protein sastavljen od podjedinica.



Rekombinantna DNA-tehnologija

Znanost se nije zaustavila samo na poznavanju gena. Pokazalo se da je potrebno kopirati taj gen i ubacivati ga u druge stanice, koje se mogu jednostavno uzgojiti pomoću postojećih mikrobioloških tehnika, ili u stanice drugih biljaka ili životinja, gdje je dotični protein potreban. Da bi se to postiglo, korištene su nove biokemijske tehnike, pa i specijalni enzimi za cijepanje DNA u odabranim točkama,

ubacivanje novog segmenta i njegovo spajanje u lanac DNA domaćina (Slika 4). Rezultat takve manipulacije jest tzv. rekombinantna DNA (ima ugrađeni segment koji prije nije imala). Segment gena jednostavnije se ubacuje pomoću bakterijskih plazmida – malih cirkularnih DNA, koje su znatno manje od bakterijskog kromosoma. Neki od tih plazmida mogu jednostavno prijeći od jedne stanice do druge, čak i ako su stanice daleko na evolucijskoj skali. Koristeći “specijalni rez i ubacivanje” pomoću enzima, moguće je ubaciti gene iz jednog organizma u bakterijski plazmid, zatim se rekombinantni plazmid ubacuje u mikroorganizam, gdje će se izravno sintetizirati željeni protein.



Slika 4.

Rekombinantna DNA. Segment molekule DNA (gen čiji je produkt neki određeni protein) ugradi se u plazmidni vektor (bakterije ili kvasca). Tako dobivena rekombinantna DNA unese se u stanice mikroorganizama, gdje će izravno sintetizirati željeni protein (humani inzulin i drugi proteini dobivaju se na taj način).

Geni iz raznih eukariotskih stanica su izrezani i zatim klonirani (ubačeni) u bakterije pomoću tehnika restrikcijskih endonukleaza i reverzne transkripcije. Bakterija koja sadrži rekombinantnu DNA sposobna je proizvoditi eukariotski protein. Prvi eukariotski protein dobiven u bakterijama jest proinzulin, iz kojeg se dobio inzulin. **Inzulin** je protein građen od dva polipeptidna lanca (α i β), međusobno povezana vodikovim vezama. Izlučuje ga gušterača, a on stimulira uzimanje glukoze iz krvi putem glukoneogeneze (sinteza glukoze u jetri), sintezu proteina i lipogeneze. Povećano uzimanje glukoze iz krvi u stanice mišića i adipocita (masne stanice) posljedica je povećanja broja transportera za glukozu. Inzulin također povećava aktivnost enzima u jetri koji potiču sintezu glikogena i triglicerida. Potiče rast mnogih stanica, odnosno djeluje kao čimbenik rasta (IGF). Poremećaji u fiziološkoj funkciji inzulina izazivaju šećernu bolest ili dijabetes. Za tu je bolest karakteristična abnormalna funkcija ili regulacija inzulinskog receptora, posljedica toga jest nedovoljna aktivnost inzulina i produžena povišena razina glukoze u krvi. Većina pacijenata s ranim dijabetesom ima poremećaj u sintezi inzulina, a stanje se poboljša davanjem injekcija inzulina. Koristi se humani inzulin, proizveden genetičkim inženjerstvom.

Interferon je glikoprotein koji izlučuju razne stanice (limfociti, fibroblasti) nakon infekcije virusom. Otkriven je na temelju zapažanja da su virusom zaraženi pojedinci rezistentni na infekcije drugim virusima. Interferon oslobođen iz stanice reagira s receptorom na plazma-membrani druge stanice i blokira njezinu infekciju virusom (mehanizam se ne zna). Budući da se sintetizira i izlučuje u malim količinama, njegovo dobivanje genetičkim inženjerstvom od općeg je značenja. Potiskuje umnožavanje velikog broja RNA-virusa i DNA-virusa. Također se pokazalo da potiskuje rast nekih tumorskih stanica. Opisane su tri vrste interferona:

- alfa-interferon (leukociti)
- beta-interferon (fibroblasti)
- gama-interferon (limfociti)

Klinički se koristi protiv viralnih infekcija i određenih tumora. Interferon sprečava proliferaciju virusa uglavnom inhibicijom sinteze proteina u inficiranim stanicama. Limfocitni interferon također modulira imuni odgovor.

Eritropoetin je polipeptid čija je fiziološka uloga regulacija razvoja crvenih krvnih stanica. Sintetizira se i otpušta iz bubrega i jetre animalnih i humanih stanica kao odgovor na manjak kisika. Prekursorske eritroidne stanice odgovaraju na stimulaciju hormona kroz površinski recep-

tor tako da sazrijevaju u zrele eritrocite. Povećan broj eritrocita povećava sposobnost dovođenja kisika u tkiva, pa se smanjuje i otpušta eritropoetin. To je jedan od načina kontrole eritropoeze. Poremećaji u sintezi toga hormona reguliraju se davanjem humanog eritropoetina, proizvedenoga genetičkim inženjerstvom.

Somatotropin je hormon rasta, a izlučuje ga adenohipofiza. Stimulira rast i sintezu somatomedina, koji se pak izlučuje u jetri a potiče rast hrskavice (ima aktivnost sličnu inzulinu).

Fuzijski proteini (CD4-immunoadhezin, kimerični proteini) za liječenje leukemija

Cjepiva (za tumore, hepatitis B, malarija, DNK-cjepiva, konjugirana cjepiva)

Antigeni (HIV2-env antigen, strogo specifičan za aminokiseline 309-702 HIV2)

Humani faktori rasta (IGF-1) koriste se za liječenje Turnerovog sindroma, Downova sindroma, tumora mozga, leukemija, daje se osobama niskog rasta te odraslim osobama s manjkom faktora rasta

Faktori VIII, IX i drugi rekombinantni produkti krvi koriste se u liječenju hemofilije

U Tablici 1 navedeni su komercijalni nazivi proizvoda dobivenih genetičkim inženjerstvom u eukariotskim staničnim kulturama, a koriste se u kliničke svrhe. Tablica 2 prikazuje rekombinantne proteine, koji su još u kliničkim istraživanjima.

Zbog snažnih potencijala genetičkog inženjerstva postoji bojazan za pravilnu kontrolu i regulaciju procesa i njihovih produkata. Naime, upotreba biljaka i životinja s promijenjenim genetičkim karakteristikama mogla bi ugroziti okolinu narušavajući postojeću ravnotežu između organizama. Ta je ravnoteža dinamična. Budući da su mutacija gena i promjena položaja unutar kromosoma normalni događaji u živim organizmima, stalno se pojavljuju organizmi s novim svojstvima (biljke i životinje). Proširenje djelokruga tih zbivanja omogućilo je genetičko inženjerstvo primjenom transgeničnih tehnologija. Stoga je prijeko potrebno ispitati sva svojstva transgeničnog organizma, prije no što on napusti laboratorij ili staklenik.

Nameću se i sljedeća pitanja:

- Je li genetičko inženjerstvo etično?
- Je li etično promijeniti genetički materijal bilo kojeg živog organizma?
- Je li etično promijeniti genetički materijal selektivnim uzgojem?
- Je li dobit genetičkog inženjerstva veća od rizika?

- Je li pravilno da se genetički modificirani organizmi patentiraju? Je li taj tip patenta različit od drugih?
- Da li bi održavanje genetičkog inženjerstva trebalo biti strogo regulirano zakonom ili treba postojati neki drugi način?

I tehnologija i etička strana trebaju se razvijati istodobno. Treba imati na umu i potrebe i želje za dostignućem. Bilo bi pogrešno ne prihvatiti mogućnost proizvodnje vitalnih humanih proteina (inzulin, eritropoetin, cjepiva, čimbenici rasta, faktor zgrušavanja krvi iz mlijeka ovce) potrebnih u liječenju, ako to možemo, kao i dobivanje genetički modificiranih organa životinja za transplantaciju kod ljudi (srce svinje). Stoga genetičko inženjerstvo nedvojbeno zauzima nezamjenjivo mjesto u životu današnjeg čovjeka.

Tablica 1.
Proizvodii dobiveni genetičkim inženjerstvom koji se koriste u kliničke svrhe

Produkt (originalno ime)	Protein	Liječenje
<i>Aktivase/Actilyse</i>	plazminogen aktivator (tPA)	tromboliza u infarktu miokarda i plućnoj emboliji
<i>Epogen/Procrit/Eprex</i>	eritropoetin (Epo)	stimulacija eritropoeze (AIDS, anemija, kronične bubrežne bolesti)
<i>Epogin/Recormon</i>	eritropoetin (Epo)	
<i>Saizen</i>	čimbenik rasta (hGH)	nedostatak čimbenika rasta
<i>GenHevac B Pasteur</i>	cjepivo za hepatitis B (HbsAg)	prevencija infekcije hepatitisom B
<i>HB Gamma</i>	cjepivo za hepatitis B (HbsAg)	
<i>Granocyte</i>	čimbenik za stimulaciju rasta kolonija granulocita (G-CSF)	neutropenije (manjak neutrofila) povezane npr. s transplantacijom koštane srži, odnosno s intenzivnom kemoterapijom citotoksičnim lijekovima
<i>Recombinate</i>	faktor VIII (80 + 90 kDa)	krvarenja kod hemofilije A
<i>Kogenate</i>	faktor VIII (80 + 90 kDa)	
<i>Pulmozyme</i>	DNase I	smanjenje gustoće bronhalnog sekreta u oboljelih od cistične fibroze

Protein	Klinička primjena
sCD4	AIDS
sCD4-IgG	AIDS
gB, gD (HSV)	cjepivo za herpes virus
gp120, gp160 (HIV)	cjepivo za HIV
tPA muteins	tromboliza
monoklonska protutijela: her2, CD52	zloćudni tumor
CD4	autoimunost, transplantacija
TNF α	sepsa
CD20	limfomi B-stanica
TAC	transplantacija
CD18	hemoragični šok
leukotrien	multipla skleroza
CF54, CD7	reumatoidni artritis
interferon beta (IFN β)	multipla skleroza
hormon stimulacije štitnjače (TSH)	rak štitnjače
topljiv komplement receptor-1 (sCR-1)	akutni respiratorni distres sindrom (ARDS)
transformirajući čimbenik rasta beta (TGF- β)	mehaničke ozljede mekog tkiva
glukocerebrozidaza	Gaucherova bolest (tip I)
čimbenik za stimulaciju rasta kolonija makrofaga (M-CSF)	tumor, hiperkolesterolemija
koštani morfogenetski protein 2 (BMP-2)	cijeljenje prijeloma kostiju
hormon stimulacije folikula (FSH)	bolesti policističnih jajnika
interleukin 6 (IL-6)	trombocitopenija (manjak trombocita)

Tablica 2.

Rekombinantni proteini iz stanica eukariota u kliničkim istraživanjima

- Hole, V. J. Jr. (1993), *Human Anatomy & Physiology*, Wheatley, C. H. (ed.), Wm. C. Brown, Dubuque, I. A.
- Goeddel, D. V. (ed.) (1990), Vol. 185 Gene expression technology (articles 21, 24, 34), *Methods in Enzymology*, Academic Press. Inc.
- Stryer, L. (1988), *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York.
- Seeley, R. R., Stephens, T. D., Tate, P. (1995), *Anatomy & Physiology*, Callanan, R. J. (ed.), Mosby-Year Book Inc., St. Louis, MO.
- Stateva, L. *Recombinant proteins*, <http://www.bi.umist.ac.uk>
- Gianguarde, P. L. F. *Recombinant blood products for the treatment of patients with haemophilia*, <http://www.medicine.ox.ac.uk>
- Lubinecki, A. S., Lupker, J. H. (1994), Purified protein products of rDNA technology expressed in animal cell culture.
- Kisner, D. L., Synth, J. F. (eds.) (1985), *Interferon alpha-2: pre-clinical and clinical evaluation*, Martinus Nijhoff Publishers, Boston, Dordrecht, Lancaster.

LITERATURA