

1. BIOTEHNOLOGIJA U XXI VIJEKU

*Sergej Đuranović**

Sažetak: Budućnost nauke je nepredvidljiva i svaki pokušaj predviđanja razvoja iste uglavnom se završava greškama i ozbiljnim propustima. Glavni razlog tome je da je jako teško odrediti granice ljudske inventivnosti u pokušajima ovladavanja prirodom i prirodnim procesima, kao i u stvaranju alternativnih hipoteza kroz kritičko i kreativno razmišljanje. Ogroman i brz napredak u prirodnim naukama u posljednjih 40 godina kao i kratak uvid u potencijalne aplikacije istih u razvoju biotehnologije kao jedne od primijenjenih nauka podstiču objektivnog posmatrača na zaključak da će biotehnologija biti nauka XXI vijeka.

Ključne riječi: *biotehnologija, funkcionalna i strukturna genomika, sintetička ćelija*

Abstract: The future of the science is unpredictable and every attempt to predict its development usually ends with errors and serious omissions. The main reason for this is that it is very difficult to determine the limits of human invention in attempts to master nature and natural processes as well as the creation of alternative hypotheses through critical and creative thinking. The enormous and rapid progress in natural sciences in the last 40 years as well as a brief insight into the potential application of the same in the development of biotechnology as one of the applied sciences encourages an objective observer to the conclusion that biotechnology will be the science of the 21 st century.

Key words: *biotechnology, functional and structural genomics, synthetic cell*

1. 1. UVOD

Po nekoj nepisanoj definiciji – biotehnologija je nauka koja povezuje prirodne, medicinske i inženjerske nauke da bi se postigla primjena organizama, ćelija, njihovih djelova i molekularnih analoga u dobijanju proizvoda za dobrobit čovječanstva. Moglo bi se slobodno reći da istorija biotehnologije počinje još u doba neolita i opštepoznate neolitske revolucije. Tadašnji preci današnjeg modernog čovjeka su uvidjeli načine po kojima je bilo moguće selektirati i unaprijediti određene biljke kako

* Dr Sergej Đuranović, Howard Hughes Medical Institute and Department of Molecular Biology and Genetics, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

bi dobili više proizvoda potrebnih za prehranu. Iako je proces fermentacije bio znan u starim civilizacijama poput Mesopotamije, Egipta i Indije, tek Pasterovo objašnjenje ovog procesa predstavlja prvi primjer kontrolisane i razumne primjene biotehnologije za konvertovanje jednog oblika hrane u drugi. Razvojem nauke a ponajviše mikrobiologije, početkom 20. vijeka, dolazi do prave eksplozije u razvoju tradicionalne biotehnologije i njene primjene u industriji. Spektar proizvoda dobijenih izolovanjem prirodnih produkata od odabranih i prirodnom selekcijom unaprijeđenih organizama raste svakog dana.

Otkriće restrikcioni endonukleaza, 1970. godine [1], kao enzima za specifično i kontrolisano siječenje DNK molekula [2], kao i docniji razvoj metoda za izolovanje i amplifikaciju gena ili segmenata DNK-a i tehnika za ubacivanje istih u druge ćelije stvorilo je mogućnost stvaranja genetički modificovanih organizama, kao i proizvodnju rekombinantnih proteina. Korišćenjem ovih saznanja patentiran je 1980. godine prvi genetičko-modificovani organizam (izveden iz roda *Pseudomonas*) koji je bio u stanju da razloži sirovu naftu [3, 4, 5]. Nedugo zatim, 1982. godine, odobreno je u SAD i nekim zemljama Zapadne Evrope, korišćenje biosintetičke verzije humanog insulina proizvedenog rekombinantnom DNK tehnologijom iliti genetičkim inženjeringom u bakteriji *E. Coli* [6]. Ova dva događaja su označena u istoriji biotehnologije kao početak onoga što danas nazivamo moderna biotehnologija.

Vrlo je nezahvalno dati prognozu razvoja bilo koje nauke, ali ako je biotehnologija jasno napredovala krajem 20. vijeka, sada nakon završetka sekvenciranja ljudskog genoma [7, 8] i razvoja bioinformatike može se slobodno reći da će ova naučna grana imati još vidljiviju i značajniju ulogu u 21. vijeku. Nedavno objavljeni rezultati o stvaranju takozvane „sintetičke ćelije” predstavljaju novi pravac u razvoju moderne biotehnologije ovog vijeka [9]. Ne treba takođe zaboraviti da još uvijek neotkrivena flora i fauna nekih djelova naše planete, kao i raznolikost mikroorganizama nastanjenih u najekstremnijim uslovima životne sredine predstavljaju i dalje nepresušan izvor za razvoj i tradicionalne biotehnologije.

1. 2. NASTAVAK RAZVOJA ZAPOČETOG KRAJEM XX VIJEKA

Razvoj kao i otkrivanje novih tehnika, kao i najnovija saznanja iz oblasti prirodnih nauka, medicine, tehnologije i inženjerstva predstavljaju i dalje glavnu pokretačku snagu za razvoj biotehnologije. Nakon uspješne primjene biosintetičkog humanog insulina sve je više novih lijekova zasnovanih na proteinima dobijenim rekombinantnom DNK tehnologijom. Možda najbolji primjeri su današnja primjena u medicini rekombinantnog ljudskog hormona rasta (rhGH, Humatrope), eritropoetina (EPO, Epogen) ili interferona (Avonex, Rebif ili Betaseron). Kombinaciona hemija kao i automatizacija metoda za skeniranje fiziološke aktivnosti velikog broja supstanci dodatno su poboljšali mogućnosti za pronalazak novih lijekova.

Sekvenciranje humanog, kao i genoma ostalih organizama, i sve veća upotreba bioinformatike, prouzrokovalo je stvaranje novih interesantnih sfera u biološkim naukama. Inteligentno korišćenje podataka dobijenih sekvenciranjem genoma, pravilna anotacija sekvenci, kao i određivanje njihove primarne funkcije kroz reduk-

cionistički eksperimentalni pristup su osnovni zadatak funkcionalne genomike. Sa druge strane, razvoj metoda za predikciju strukture proteina (zasnovanih na homologiji proteinskih sekvenci), kao i napredak u metodama za određivanje strukture proteina doveo je do razvoja takozvane strukturne genomike – čiji je cilj određivanje strukture svakog proteina iz genoma. Krajem prošlog vijeka stvoren je takođe i proteomiks ili sveobuhvatna studija proteina u živim ćelijama [10]. S obzirom na limite genomike – proteomiks ima za cilj istraživanje proteina u „originalnim” živim ćelijama, određivanje funkcionalnih modifikacije na proteinima kao i ispitivanje njihovih interakcija u kompleksima s drugim proteinima ili nukleinskim kiselinama. Ove tri grane biologije predstavljaju osnov razvoja i primjene moderne biotehnologije u farmaceutskoj industriji danas.

Glavni fokus biotehnologije u farmaciji naredne dvije decenije vjerovatno će biti na proizvodnji „individualnih” lijekova. Normalne genetske varijacije u genima odgovornim za metabolizam lijekova ili receptorima za određene ligande su vrlo značajne kod primjene lijekova uopšte. Određivanjem posebnih „individualnih” varijacija za svakog pojedinca može se racionalisati izbor lijeka, kao i nivo doziranja istog. Korišćenjem farmakogenomike moguće je razviti lijekove na bazi specifičnih proteina, enzima ili RNK-a molekula, koji bi za cilj imali samo „bolesne” gene ili ćelije kod određenih bolesti. Ovakav pristup ima za svrhu da minimizira štetan uticaj određenih lijekova na susjedne inače potpuno zdrave ćelije. Kombinacijom strukturne genomike i bioinformatike vrlo brzo će biti moguć racionalni dizajn specifičnih lijekova koji će biti napravljeni prema određenoj strukturi proteina. Na taj način će se smanjiti ogromni troškovi „de novo” razvoja i testiranja ogromnog broja potencijalno aktivnih supstanci, a takođe će biti moguće izbjeći neželjene interakcije lijeka sa sličnim ciljnim proteinima ili makromolekulima.

Paralelno sa razvojem lijekova nove generacije biće potreban razvoj i metoda kojima će se omogućiti lakši skrining potencijalno oboljelih pojedinaca. Uz već korišćene metode za prenatalni kao i skrining novorođenčadi, biće potrebne još bolje metode za presimptomatsko testiranje pojedinaca za procjenu rizika od pojave raka kao i predviđanje mogućih oboljenja u kasnijim stadijumima života (Hantingtonova, Alchajmerova ili Parkinsonova bolest). Svakako, glavni fokus razvoja u tom smjeru obuhvataju proteinski-bazirani „biočipovi” koji mogu zamijeniti silicijumske čipove. Vjeruje se da će „biočipovi” biti brži i energetski efikasniji. Bioelektrični integrisani krug implantata u tijelu može da isporuči precizne količine lijekova i da utiče na rad srca, lučenje hormona ili da kontroliše vještačke udove. Biosenzori koji za monitoring koriste enzime, ili monoklonska antitjela, ili neke druge proteine mogu biti korišćeni za testiranje kvaliteta vazduha i vode, za otkrivanje opasnih materija, kao i za praćenje komponenti krvi in vivo.

Izolovanje humane embrionalne matične ćelije u laboratoriji je bio ogroman napredak za biomedicinska istraživanja u posljednjih 10 godina [11]. Matične ćelije ili ti „majke svih ćelija” se tokom razvoja embriona na kraju diferenciraju u 200 ili više tkiva koji čine ljudsko tijelo. Iako je do danas izolovan relativno mali broj matičnih ćelija, sasvim je sigurno da će većina matičnih ćelija koje čine osnov za sva tkiva u ljudskom tijelu biti otkrivena u narednim godinama. Već je stvoren izraz „tkiv-

ni inženjering” za granu biotehnologije koja ima za cilj da u *in vitro* uslovima produkuje jednostavna ljudska tkiva. Primjena ovako stvorene kože ili srčanih zalistaka iz matičnih ćelija oboljelog pojedinca višestruko smanjuje rizik od odbacivanja ovakvih tkiva u operacijama transplantacije. Jedan od prioriteta u ovom polju su eksperimenti na matičnim ćelijama izolovanim iz mozga. Trebalo bi biti moguće ubrizgati matične ćelije mozga direktno u mozak i kičmene moždine i omogućiti nove načine liječenja Alchajmerove ili Parkinsonove bolesti, kao i povreda kičmene moždine. Realno je da u narednim godinama treba očekivati i pokušaje *in vitro* produkcije manje kompleksnih organa, sastavljenih iz manjeg broja tkiva, koji barem u bliskoj budućnosti mogu biti korišćeni za izolovane medicinske studije.

Tradicionalna biotehnologija je kroz istoriju selekcijom, kao i razumnim ukrštanjem različitih vrsta biljaka ili životinja uspjela da stvori najpoželjnije, industrijski i ekonomski najisplativije poljoprivredne kulture biljaka ili životinja. Međutim, s ogromnim rastom ljudske populacije u posljednjem vijeku, kao i sve većim globalnim ekološkim problemima potrebno je naći način da prinos i kvalitet hrane ostane isti ako ne i viši iz godine u godinu. S obzirom na ograničenu raznovrsnost kao i nemogućnost prirodnog ukrštanja pojedinih poljoprivrednih vrsta, postalo je jasno da je neophodna primjena genetičkog inženjeringa u današnjoj poljoprivredi. Sekvenciranjem genoma za poljoprivredu važnijih biljnih i životinjskih vrsta omogućava se brži razvitak i primjena moderne biotehnologije u ovoj industrijskoj grani. Posebna pažnja se obraća ne genetički modifikovane biljne vrste gdje je ubacivanjem ili uklanjanjem jednog ili više gena moguće povećati prinos plodova ili ubrzati i omogućiti rast u nepovoljnim životnim sredinama. Razvojem genetički modifikovanih biljaka sa većom „samozaštitom” od virusa, mikroorganizama, insekata ili drugih štetočina, smanjuje se i upotreba ogromnih količina pesticida, koji pored toga što hemijski zagađuju okolinu, predstavljaju i opasnost za zdravlje ljudi. Uzgajanje biljaka ili životinja sa poboljšanim nutricionističkim vrijednostima je postala realnost prvih godina 21. vijeka. „Zlatni pirinač” koji proizvodi vitamin A pokazao se kao jako koristan za smanjenje sljepila uzrokovano nedostatkom ovog vitamina u ljudskoj populaciji čija je ishrana pretežno bazirana na pirinču [12]. Slični pristup se može iskoristiti i za proizvodnju biljaka koje bi u plodovima sadržali materijal za vakcinu protiv različitih bolesti. Ako se ovaj pristup u budućim kliničkim ispitivanjima pokaže uspješnim, prednosti jestivih vakcina će biti ogromne, posebno za zemlje u razvoju. Poseban aspekt danas, a i u narednim godinama će se davati modifikacijama biljaka koje će smanjiti štetan uticaj pretjerane iskorišćenosti životne sredine i poremećene ekološke ravnoteže industrijskom proizvodnjom. Na taj način se želi zaustaviti negativan trend uništavanja prirodnih bogatstava na uštrb industrijske dobiti naročito prisutnog u industrijski i biotehnoški nerazvijenim zemljama.

1. 3. GENOMSKI INŽENJERING KAO OSNOV ZA DALJI RAZVOJ

Za potrebe proizvodnje složenijih molekula u industriji primjena moderne biotehnologije se često povezuje sa upotrebom genetički izmijenjenih mikroorganizama, najčešće bakterija ili kvasaca. Tokom posljednjih godina sve veća je takođe i

upotreba animalnih ili biljnih ćelija za dobijanje određenih tarapeutskih agenasa. Ovi procesi su zasnovani na metodama genetičkog inženjeringa kojima se rekombinantna DNK ubacuje pomoću određenih DNK vektora (plazmidi, virusi, kozmidi, vještački hromozomi, i sl.) u ćelije određenog organizma u cilju dobijanje rekombinantnih proteina. Međutim, ciljana biosinteza složenih bioorganskih jedinjenja u određenim ćelijama nije moguća bez ubacivanja više gena kao i kontrole nad povezanom mrežom metaboličkih procesa u ćeliji. Za biosintetičku i biotehnološki isplativu proizvodnju artemisinina – lijeka protiv malarije koji se u malim količinama dobija iz biljke *A. Annua*, bilo je potrebno izmijeniti mrežu od 12 metabolički povezanih gena u ćelijskoj kulturi kvasca i praktično promijeniti metabolički put korišćenja ugljenika u kvascima [13]. Četiri naknadno ubačena rekombinantna gena iz *A. Annua*, koja nose informaciju za sintezu proteina uključenih u proizvodnju artemisinina, takođe su morala biti redizajnirana da bi bila pod kontrolom metaboličkih puteva u ćelijama kvasca. Ovaj poduhvat vjerovatno predstavlja i limit genetičkog inženjeringa i sintetičke biologije u pokušaju da se na tradicionalan način izmijeni genom nekog mikroorganizma u svrhu primjene u biotehnologiji.

Novootkrivena tehnika za uspješno sintetisanje „vještačkog” genoma kao i njegovo ubacivanja u živu bakterijsku ćeliju bi mogla predstavljati revolucionarni pomak u takozvanom genomskom inženjeringu i sintetičkoj biologiji. Ova metoda je u osnovi zasnovana na korišćenju rekombinantne DNK metodologije pri čemu krajnji produkt ne predstavlja genetički modifikovani mikroorganizam koji je od svog pretka različit u jednom ili više vektorima ubačenih gena, već posjeduje sasvim nov i kompletan genom. Na taj način kroz nekoliko generacija mijenja se i kompletan proteinski sastav tog već sada kompletno novog mikroorganizma. Naravno, tokom same sinteze novog genoma moguće je u potpunosti reprogramirati ne samo jedan već sve metaboličke puteve i probiti limite s kojima se suočila sintetička biologija na početku ovog vijeka. Značaj ove tehnike za biotehnologiju se ogleda u tome što će u bliskoj budućnosti, koristeći saznanja dobijena funkcionalnom i strukturnom genomikom, biti moguće stvarati kompletno nove bakterijske vrste čiji će osnovni zadatak biti proizvodnja biogoriva, vakcina, određenih lijekova ili sirovina za farmaceutsku industriju. S obzirom na relativno malu razliku u veličini genoma između laboratorijski redizajnirane bakterijske ćelije i ćelija kvasca, realno je očekivati da se genomskim inženjeringom u bliskoj budućnosti može reprogramirati i genom kvasca. Sljedeća stepenica nakon toga će naravno biti kompletan redizajn genoma biljnih ili životinjskih ćelija u kulturi.

1. 4. ZAKLJUČAK

Biotehnologija u XXI vijeku raste kao nuklearna industrija u XX vijeku. Svima je jasno da zloupotreba biotehnologije može imati veće posljedice nego i zloupotreba nuklearnog naoružanja. Međutim, jedna od glavnih razlika od nuklearnog doba je da se biotehnologija razvija pod punom pažnjom medija i uz strog nadzor kritičara. U tom smislu, krajnju sudbinu razvoja i primjene biotehnologije u ovom, a i u budućim vjekovima, utvrdiće demokratska rasprava. Što više ljudi upoznati sa moćima,

granicama i obećanjima tehnologije, to će naučnici moći više da se bave zrelim i plodonosnim radom na novim horizontima biotehnoških istraživanja.

LITERATURA

- [1] Smith, H. O. & Wilcox, K. W.: *A restriction enzyme from Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* 51, 379–391, 1970.
- [2] Danna, K. & Nathans, D.: *Specific Cleavage of Simian Virus 40 DNA by Restriction Endonuclease of Hemophilus Influenzae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 2913–2917, 1971.
- [3] Rheinwald, J., G., Chakrabarty, A. M. Gunsalus, I. C.: „A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida*”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70 (3): 885–9, 1973.
- [4] Shaham, M., Chakrabarty, A. M., Gunsalus, I. C.: „Camphor plasmid-mediated chromosomal transfer in *Pseudomonas putida*”. *Journal of bacteriology* 116 (2): 944–9, 1973.
- [5] Chakrabarty, A. M.: „Transcriptional control of the expression of a degradative plasmid in *Pseudomonas*”. *Basic life sciences* 3: 157–65, 1974.
- [6] Villa-Komaroff, L., Efstratiadis, A., Broome, S., Lomedico, P., Tizard, R., Naber, S. P., Chick, W. L., Gilbert, W.: *A bacterial clone synthesizing proinsulin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (8): 3727–31, 1978.
- [7] Venter, J. C., et al.: *The sequence of the human genome*. *Science* 291(5507): 1304–51, 2001.
- [8] Levy, S., et al.: *The diploid genome sequence of an individual human*. *PLoS Biol.* 5 (10): e 254, 2007.
- [9] Gibson, D. G., et al.: *Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome*. *Science*. May 20. 2010 [Epub ahead of print].
- [10] Wilkins, M. R., et al.: *From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis*. *Nature Biotechnology* 14 (1): 61–5, 1996.
- [11] Thomson, J. A., et al.: *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. *Science* 282(5391): 1145–7, 1998.
- [12] Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., Potrykus, I.: *Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm*. *Science* 287 (5451): 303–5, 2000.
- [13] Ro, D. K., et al.: *Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast*. *Nature* 440 (7086): 940–3, 2006.