



MOLEKULARNA BIOTEHNOLOGIJA ETIČKI IZAZOV 21. VEKA

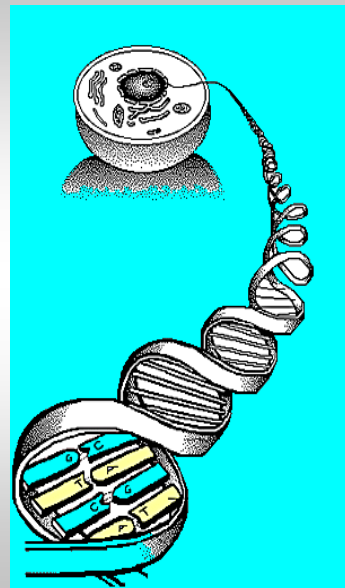
Prof. dr Ljubiša TOPISIROVIĆ

Inovacioni centar, Tehnološko-metalurški fakultet,
Univerzitet u Beogradu



NAUČNI REZULTATI - OSNOVA GENETIČKOG INŽENJERSTVA I MOLEKULARNE BIOTEHNOLOGIJE

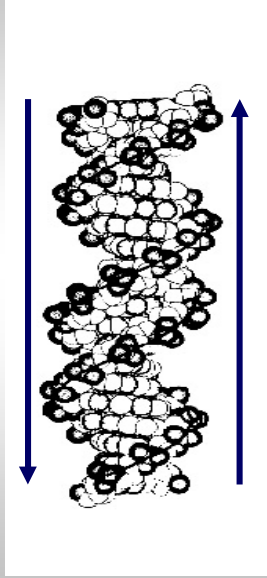
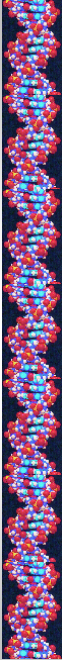
1952. **Hershey i Chase** dokazuju
u eksperimentu sa fazima
da je DNK nosilac
genetičke informacije



**NAUČNI REZULTATI - OSNOVA GENETIČKOG
INŽENJERSTVA I MOLEKULARNE BIOTEHNOLOGIJE**

1953. **Watson i Crick** definišu strukturu dvostrukog heliksa molekula DNK

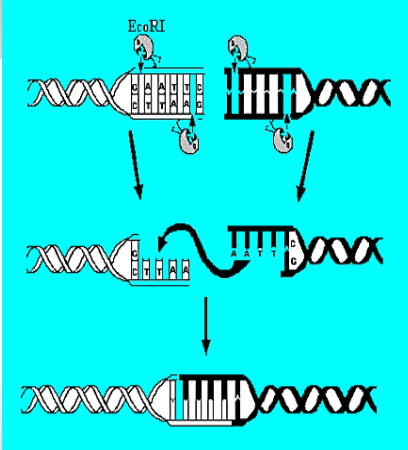
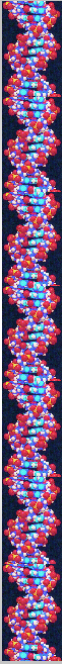
1966. **Nirenberg, Ochoa i Khorana** su definisali genetički kod

**NAUČNI REZULTATI - OSNOVA GENETIČKOG
INŽENJERSTVA I MOLEKULARNE BIOTEHNOLOGIJE**

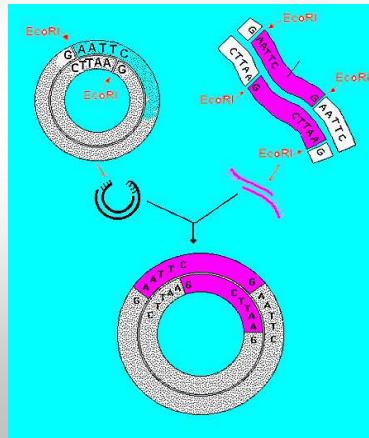
1962. **Arber** prikazuje prve dokaze o postojanju DNK restrikcionih enzima (“molekulske makaze”) koji veoma precizno seku molekul DNK bez obzira na njegovo poreklo

1967. **Gellert** otkriva DNK ligazu, enzim koji katalizuje povezivanje bilo kojih fragmenata DNK

NAUČNI REZULTATI - OSNOVA GENETIČKOG
INŽENJERSTVA I MOLEKULARNE BIOTEHNOLOGIJE

1972-1973. U laboratoriji **Boyer, Cohen i Berg-a** konstruisan prvi rekombinantni plazmid i kloniran prvi gen



NAUČNI REZULTATI - OSNOVA GENETIČKOG
INŽENJERSTVA I MOLEKULARNE BIOTEHNOLOGIJE

1978. Kompanija “GENENTECH” - konstruisana bakterija *Escherichia coli* koja proizvodi humani insulin

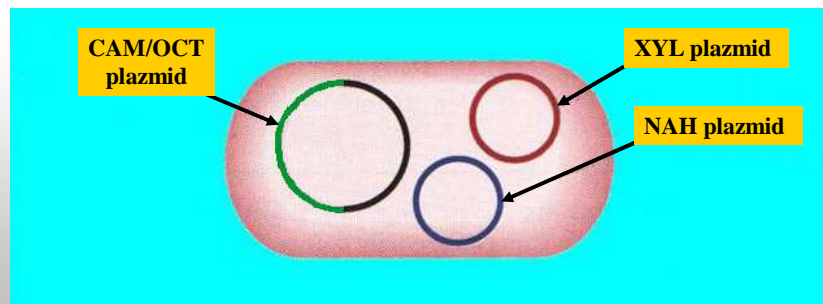


Kap humanog insulina
koji je proizvela bakterija
Escherichia coli
konstruisana genetičkim
inženjersvom

HUMULIN

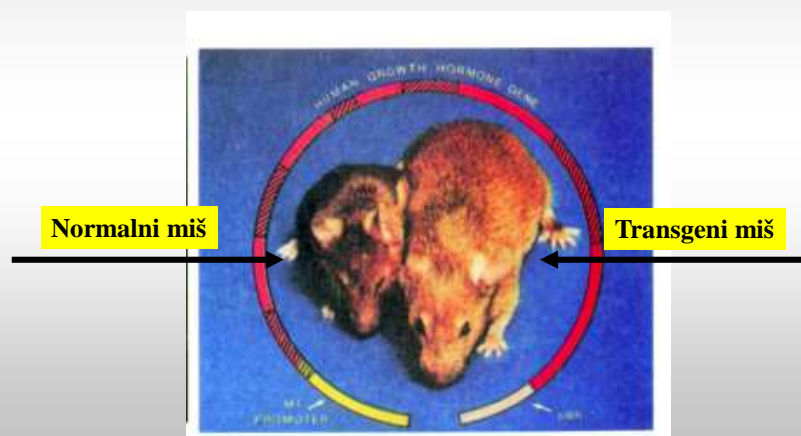
NAUČNI REZULTATI - OSNOVA GENETIČKOG
INŽENJERSTVA I MOLEKULARNE BIOTEHNOLOGIJE

1980. Vrhovni sud SAD u slučaju kompanija
“DIAMOND” protiv Chakrabarty-a presudio
da se **genetički konstruisana bakterija** može
patentirati



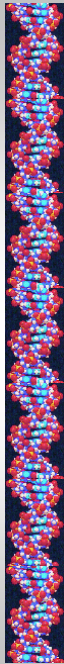
NAUČNI REZULTATI - OSNOVA GENETIČKOG
INŽENJERSTVA I MOLEKULARNE BIOTEHNOLOGIJE

1981-1982. Konstruisana prva transgena životinja - **miš**



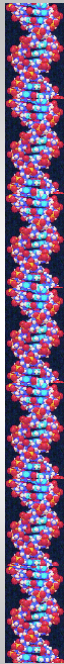
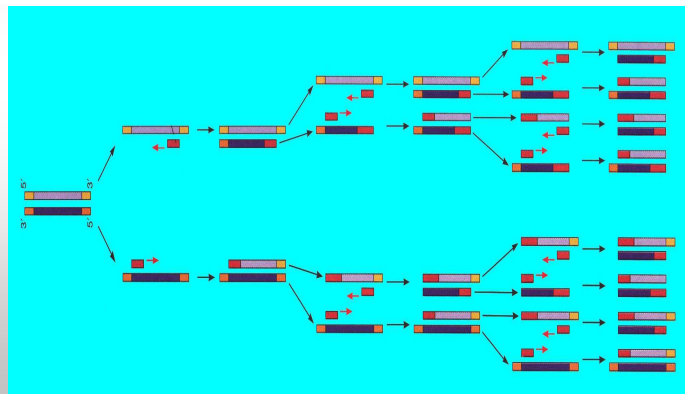
NAUČNI REZULTATI - OSNOVA GENETIČKOG
INŽENJERSTVA I MOLEKULARNE BIOTEHNOLOGIJE

1983. Rekombinantni Ti plazmid prvi put iskorišćen za transformaciju biljaka



NAUČNI REZULTATI - OSNOVA GENETIČKOG
INŽENJERSTVA I MOLEKULARNE BIOTEHNOLOGIJE

1985. Mullis i saradnici su konstruisali sistem lančane reakcije polimeraze (**PCR**) koristeći DNK polimerazu izolovanu iz *Thermus aquaticus*



IZAZOVI BUDUĆNOSTI SAVREMENE CIVILIZACIJE

1. Dobijanje sirovina za hemijsku i ostale industrije iz drugih, obnovljivih izvora (npr. biomasa), a ne iz fosilnih goriva.
2. **1**
3. **1**
4. Unapređenje poljoprivredne proizvodnje (dobijanje đubriva organskog porekla, stočne hrane, aktivnih i manje opasnih pesticida).
5. Zdravstvena zaštita (proizvodnja novih antibiotika, **novih vakcina, novih lekova i novih dijagnostičkih sredstava**).
6. Zaštita životne sredine (**prečišćavanje otpadnih voda, razgradnja polutanata, itd.**)

MOLEKULARNA BIOTEHNOLOGIJA

IZAZOV 21. VEKA

MOLEKULARNA BIOTEHNOLOGIJA

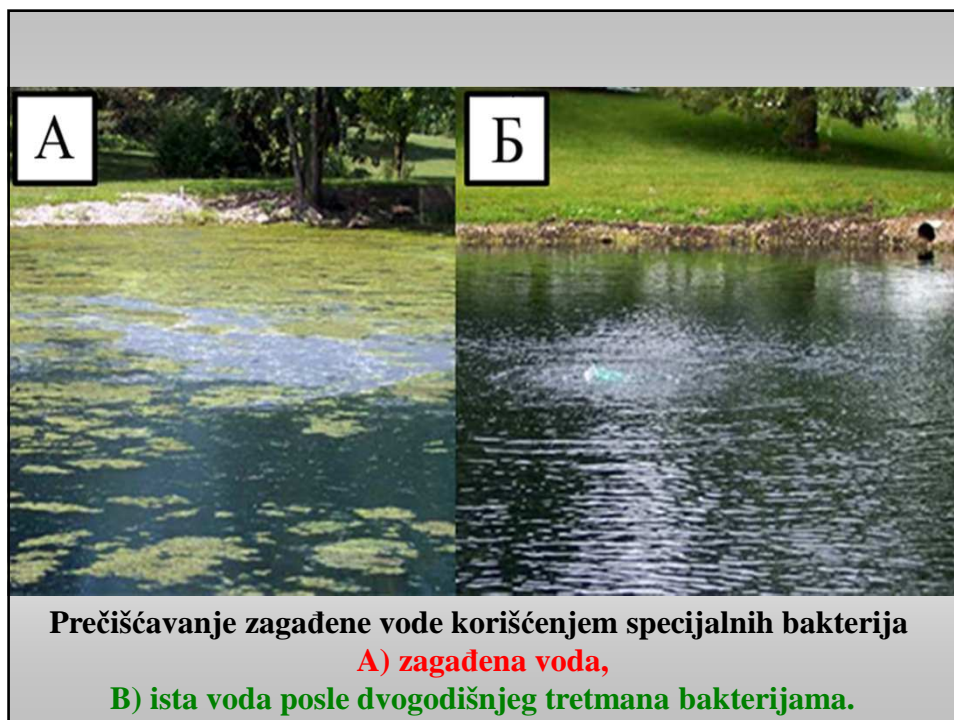
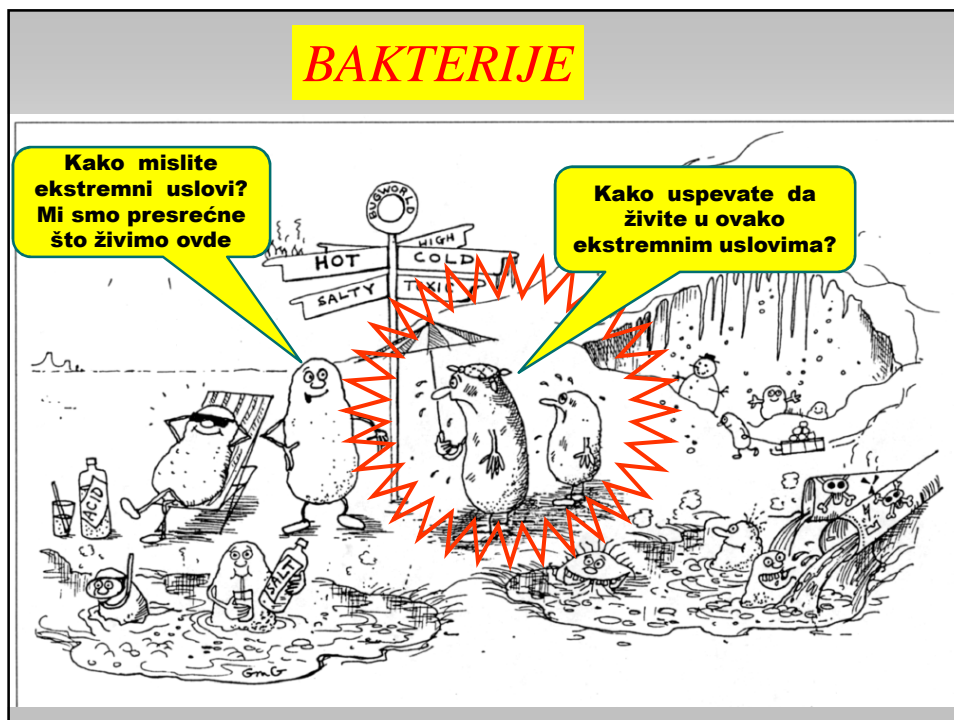
Molekularna biotehnologija je nova naučna disciplina koja je bazirana na korišćenju **GENETIČKOG INŽENJERSTVA**

GMO

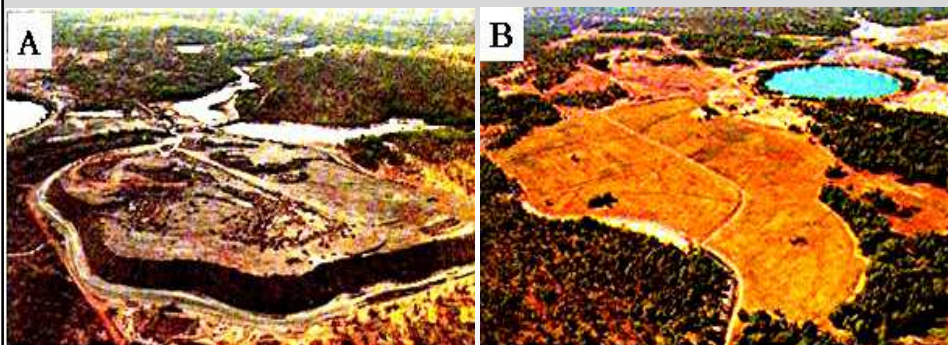
Šta su genetički modifikovani organizmi (GMO)?

- Organizmi u koje je **unešen gen drugog organizma**, čak iz nesrodnog, korišćenjem genetičkog inženjerstva

→ - Organizmi u kojima je **sopstvena DNK** modifikovana da bi se dobio željeni karakter (svojstvo), korišćenjem genetičkog inženjerstva

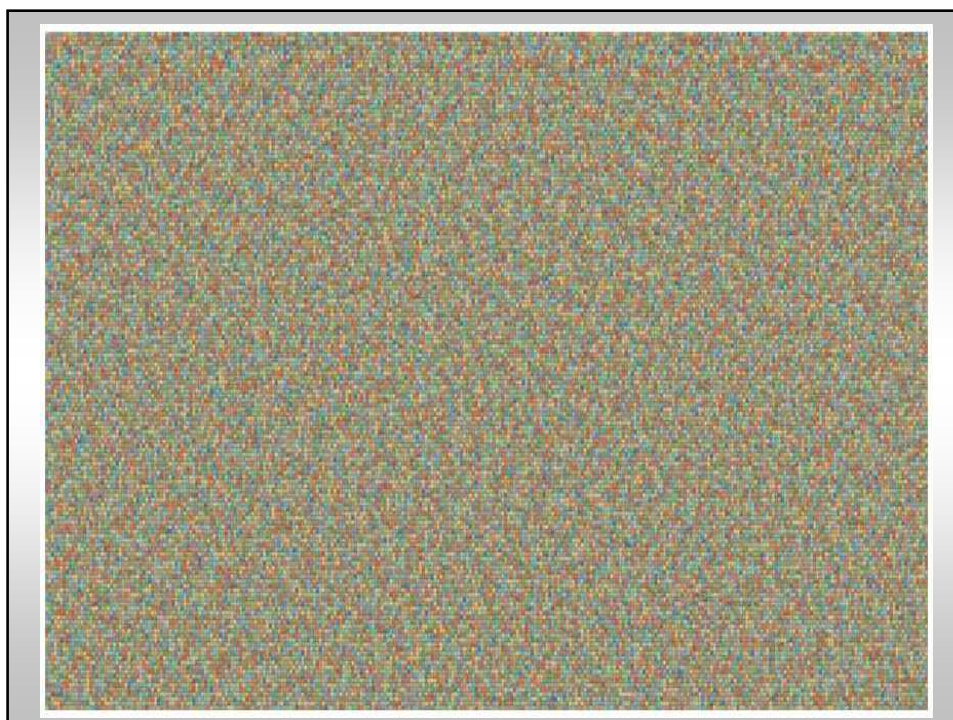


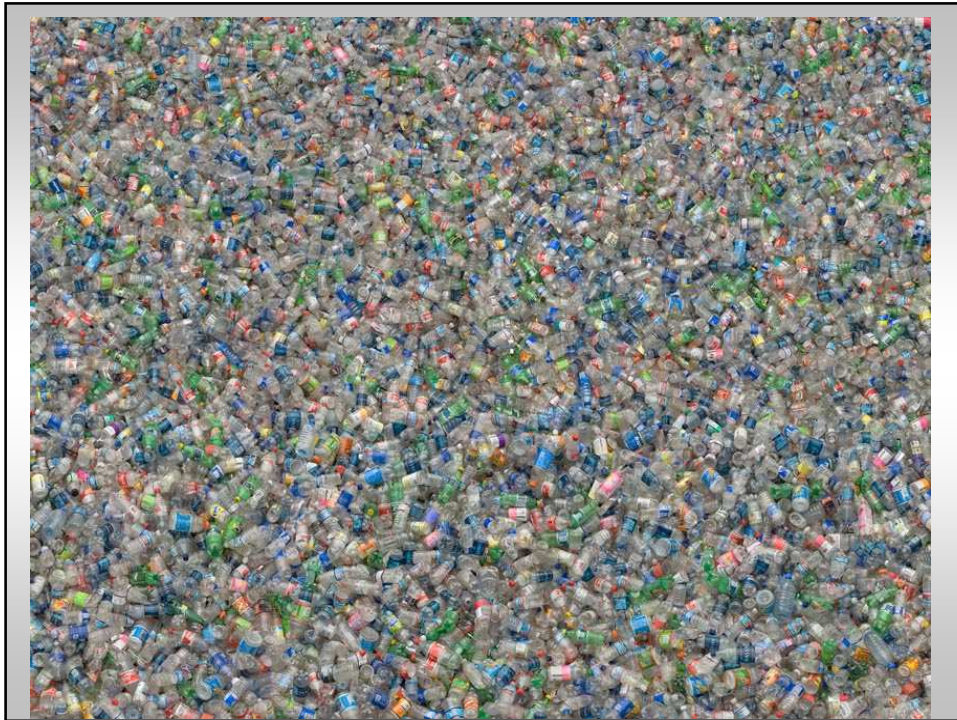
Tehnološki postupak dobijanja (izdvajanja) metala iz jalovine pomoću specijalnih bakterija.



A) Jalovište pored rudnika, 1983. godina

B) Isti prostor posle tretmana izluživanja bakra pomoću bakterija, 1986. godina





Plastične boce, 2007. godina

2.000.000 plastičnih boca od napitaka se baca u SAD-u
svakih 5 minuta





Plastične kese, 2007. godina

60.000 plastičnih kesa se koristi u SAD-u
svakih 5 sekundi

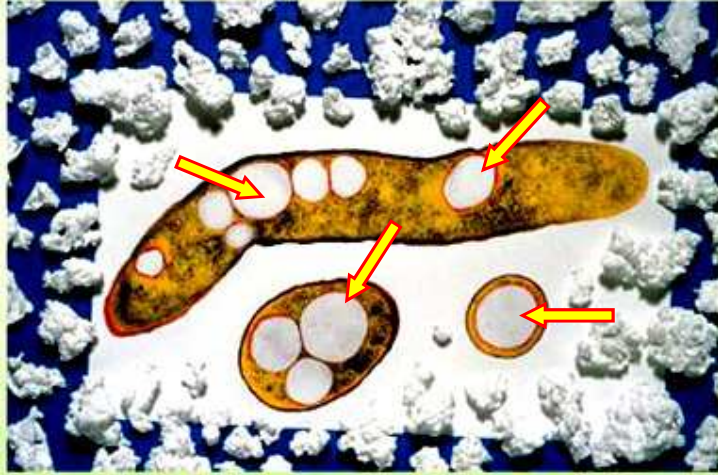
Plastične boce, 2007. godina

2.000.000 plastičnih boca od napitaka se baca u SAD-u
svakih 5 minuta

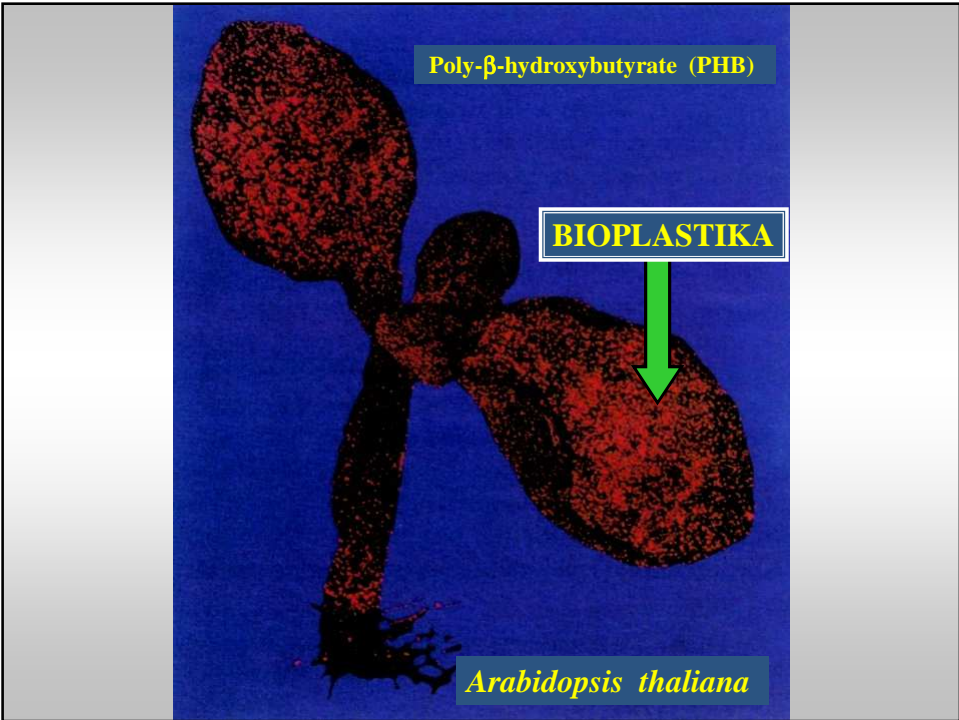


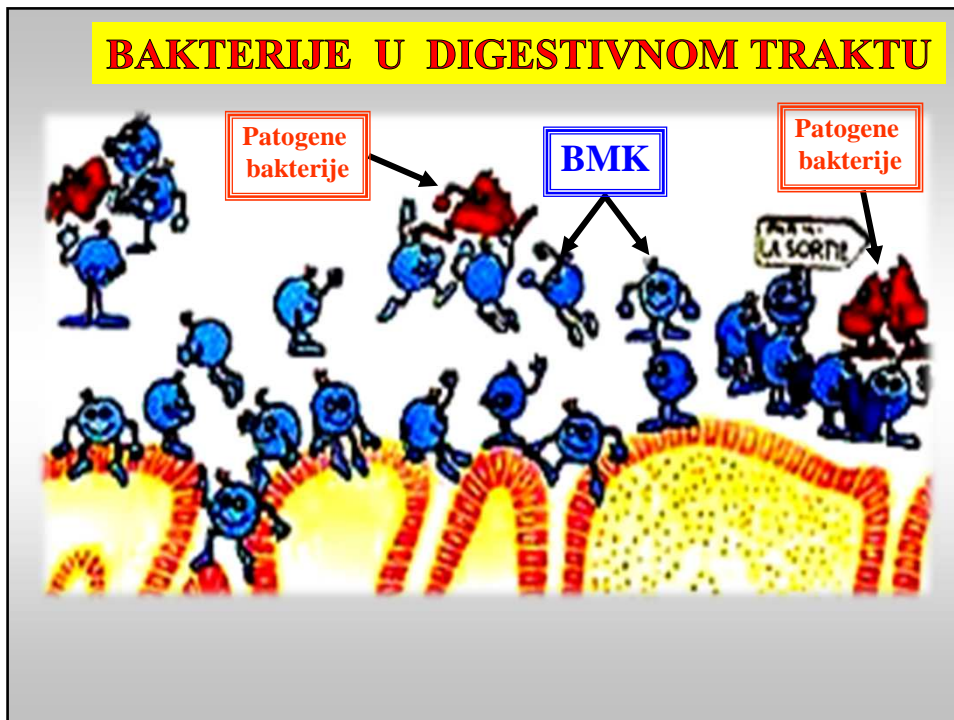
Bioplastika

“BAKTERIJSKI POLIESTER” (poly-3-hydroxybutirat - PHB)




Bacillus megaterium



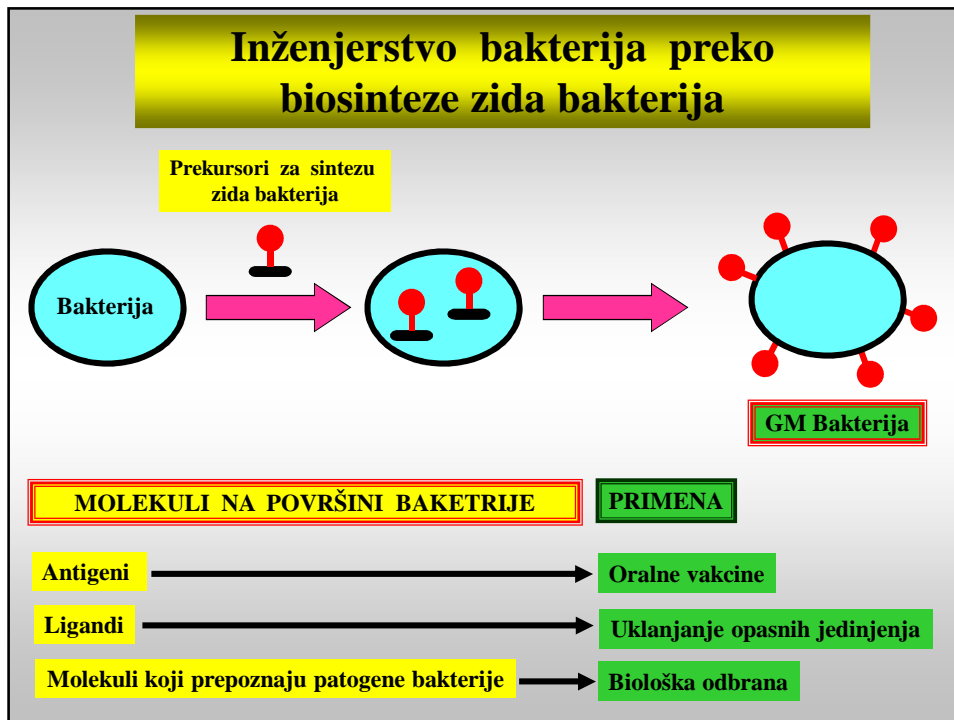


PROBIOTICI



Kulture živih bakterija koje ispoljavaju pozitivan efekte na zdravlje domaćina

- Redukcija krvnog pritiska
- Redukcija koncentracije serumskog holesterola
- Redukcija alergijskih oboljenja
- Modulacija ekspresije citokina
- Efekat adjuvansa
- Regresija tumora



Joshua Lederberg (1925 - 2008)
Američki molekularni biolog

MIKROBIOM podrazumeva ukupan broj mikroorganizama, njihove genetičke elemente (genome) i njihove interakcije sa sredinom u kojoj se nalaze.

The *Human Microbiome Project* (HMP)

Identifikacija i molekularna karakterizacija mikroorganizama u **zdravim** i **bolesnim** osobama

National Institutes of Health 115 mil \$

ZAŠTO ???

CILJ PROJEKTA

Testiranje da li su i kako su promene u humanom mikrobiomu vezane za normalno zdravstveno stanje ljudi ili nastajanje i razvoj bolesti

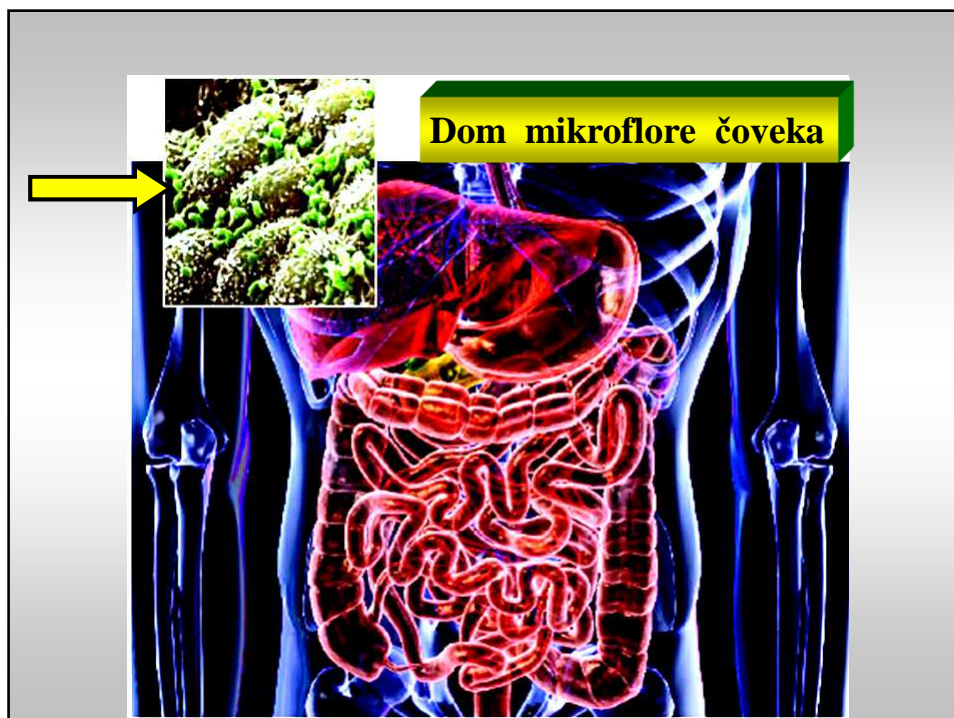
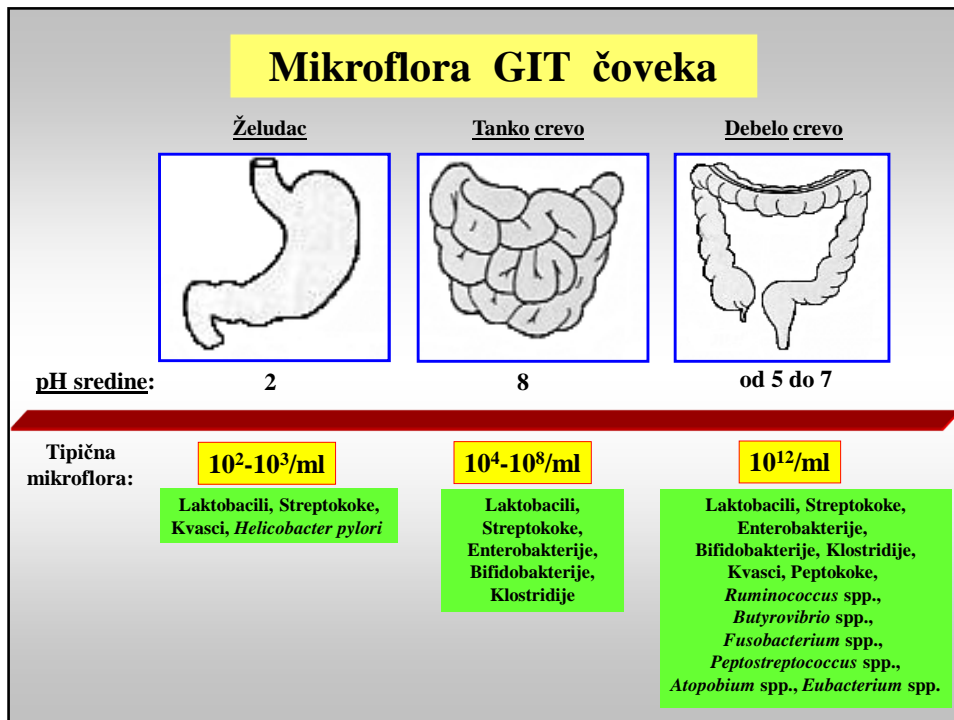
ODGOVOR:

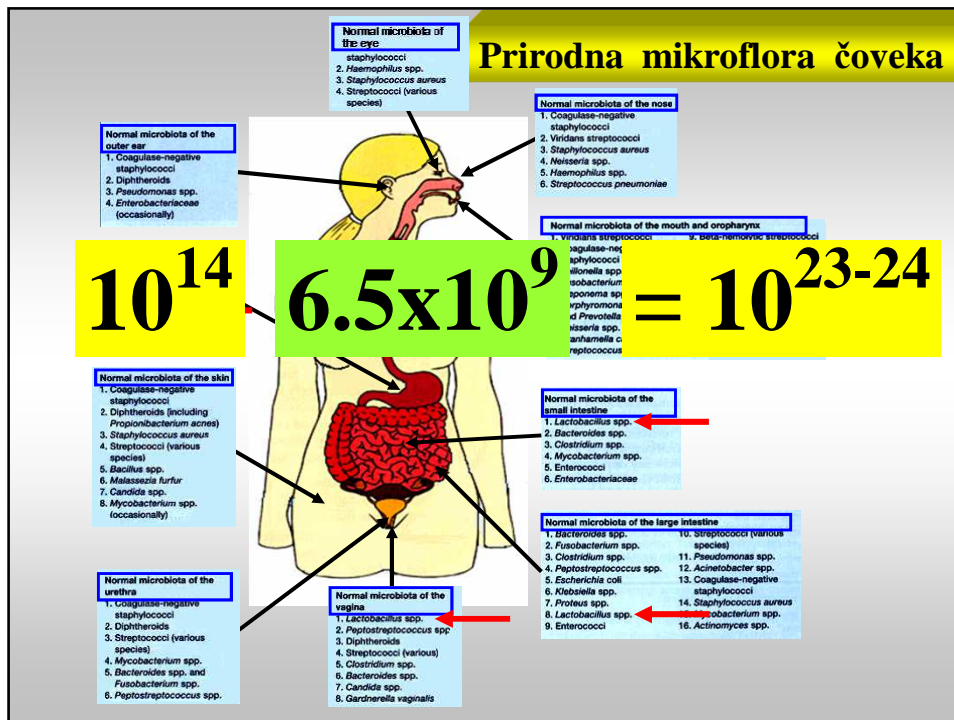
1 Broj mikroorganizama u čoveku je veći od broja ćelija od kojih je izgradjen

2 Ukupni broj gena humanog mikrobioma je 100 x veći od broja gena čoveka

3 Kompleksnost humanog mikrobioma : Eubakterije i bakteriofazi
bakterije domena Archea
kvasci
virusi

4 Mnogi mikroorganizmi humanog mikrobioma su neokarakterisani





Poljoprivreda

BILJKE

✳ Na našoj planeti, **18% zemljišta se koristi za poljoprivrednu proizvodnju**. Ovaj procenat se ne može značajno uvećati.

✳ Apsolutno je potrebno da se **prinos po hektaru poveća iznad današnjeg nivoa**, s obzirom da humana polupulacija raste i da se očekuje da će 2050. godine brojati **9 milijardi**.

✳ Svake godine se gubi **70,000 km²** poljoprivrednog zemljišta zbog rasta gradova i korišćenja zemljišta u druge svrhe.

✳ Značajno se menja tip ishrane u **zemljama u razvoju** u kojima se prelazi sa proteinske ishrane **biljnog porekla** na proteinsku ishranu **životinjskog porekla**. To zahteva povećanje proizvodnje stočne hrane biljnog porekla.

GM BILJKE

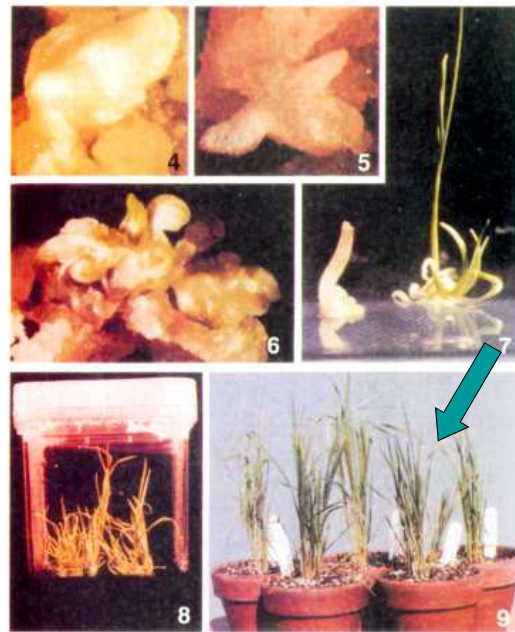
Prednosti:

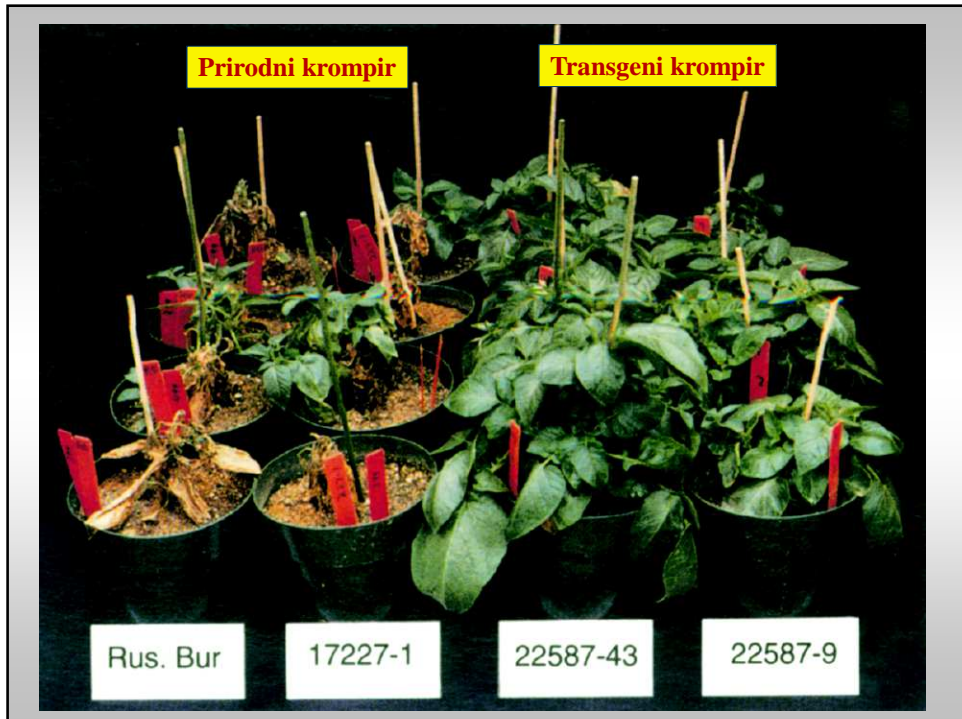
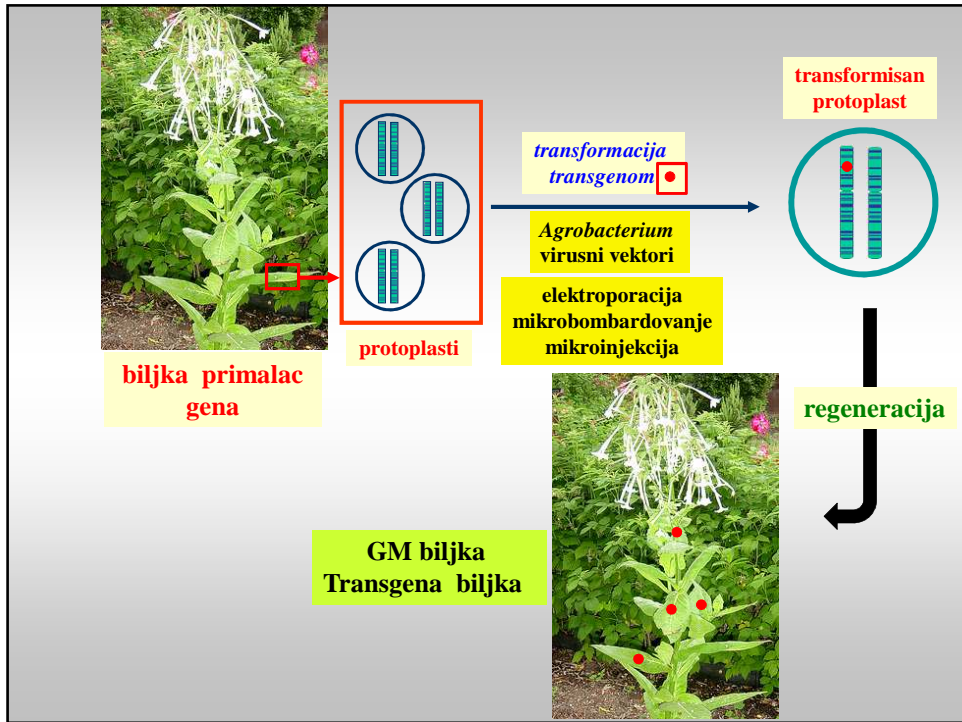
1. Rezistentnost na štetočine (insekte)
2. Tolerancija na herbicide (herbicide deluje na korov, ali ne na gajene GM biljke)
3. Rezistentnost na bolesti (viruse, gljive, bakterije)
4. Tolerancija na hladnoću, mraz
5. Tolerancija na sušu
6. Povećanje nutritivne vrednosti hrane
7. Proizvodnja farmaceutskih sredstava (biljka kao bioreaktor)
8. GM biljke za bioremedijaciju
9. GM biljke za proizvodnju bioplastike

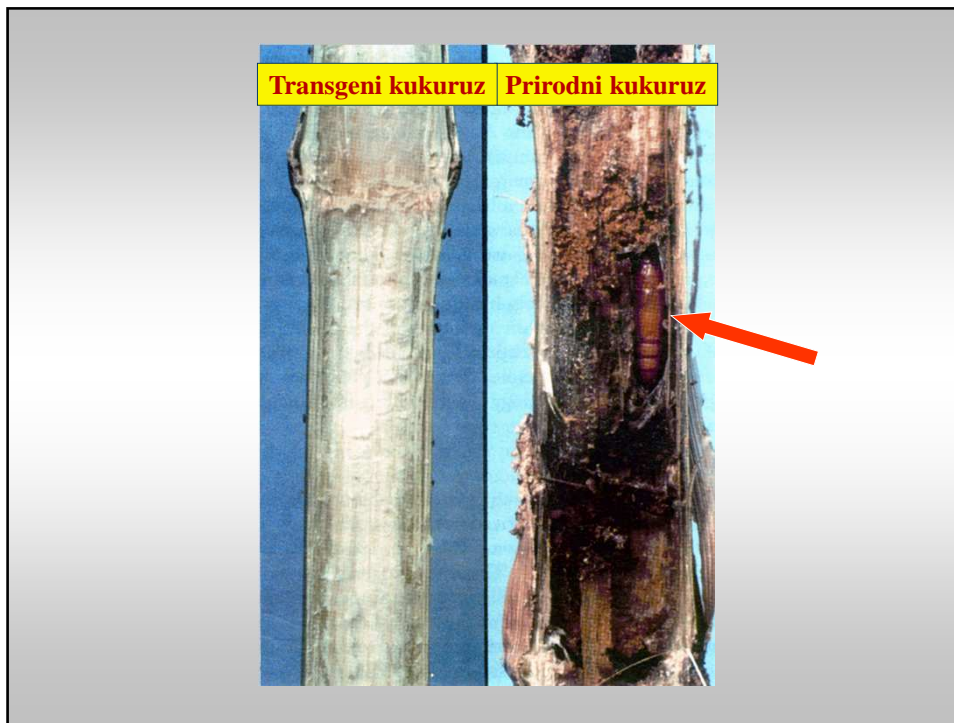


1. Sveže izolovani protoplasti pšenice.
- 2-3. Prva i druga deoba protoplasta po regenerisanju ćelijskog zida.

- 4-5. Dobro organizovan zreli somatski zametak iz protoplasta, i njegovo klijanje.
- 6-8. Izdanci i biljčice.
9. Izrasle regenerisane biljke pšenice.

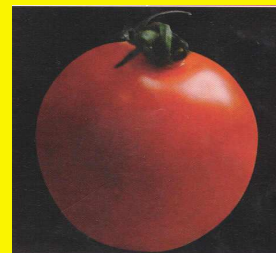






POBOLJŠANJE KVALITETA

- ★ **povećan sadržaj flavonoida**
(antikancerogeni efekat)
- ★ **Odloženo truljenje/sazrevanje**
(inhibicija enzima
koji razgrađuje pektin/inhibicija
sinteze etilena)



GM BILJKE

1 Posledice po zdravlje čoveka, zdravlje životinja i efekat na životnu sredinu

1. Alergenost hrane proizvedene od GM sirovina (GM hrana)
2. Eventualni neželjeni i nepredvidjeni efekti GM hrane
3. Nenamerna šteta po druge organizme (Bt toksin na druge insekte)
4. Smanjena efikasnost pesticida (rezistencija insekata na pesticide)
5. Prenos transgena na druge srodne vrste (ugrožavanje biodiverziteta)

2 Socijalne i ekonomske posledice

BILJKE KAO BIOREAKTORI

VAKCINE

- epitop specifične
- "jestive" vaccine

Klinički testirane:

hepatitis B
dijareja uzrokovana
enterotoksinom iz
E.coli i virusom Norwalk

šap i slinavka goveda
gastroenteritis svinja



ANTITELA - "PLANTIBODIES"

- dijagnostika
- terapija zaraznih bolesti i kancera

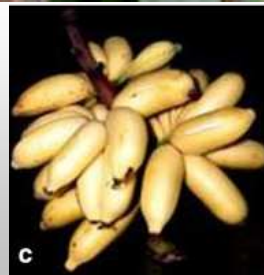
Klinički testirano:

IgA antitela protiv *Streptococcus mutans* izazivača karijesa (duvan)

Antitela za imunodijagnostiku kancera

Grašak
Pirinač
Pšenica

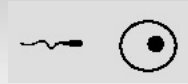
GM banana - "jestiva vakcina" protiv hepatitis B virusa



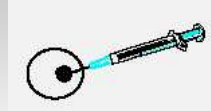
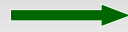
Хепатитис Б је једна од најраширенијих болести света у развоју. Процењује се да око има око 350 милиона хроничних носилаца хепатитис Б вируса и да се тај број увећава за 20 милиона годишње. Профилакса у облику вакцине може спречити ширење болести. Рекомбинантна вакцина добијена из ГМ квасца је скупа, те ограничава масовно коришћење у вакцинацији становништва у земљама у развоју. Стога је производња вакцина у јестивим плодовима економска алтернатива. Показано је да у конструисаном ГМ дувану долази до синтезе површинског антигена хепатитис Б вируса (**HBsAg**). Касније је показано да је могуће добити ГМ салату и шаргарепу у којима се синтетише овај антиген, који има исте карактеристике као и онај изолован из плазме или рекомбинантног квасца.

Банана је идеална биљка за производњу „јестивих вакцина“ с обзиром на предности које има. Банану могу јести људи различитог узраста укључујући и децу, доступна је целе године, расте у тропским и суптропским условима у којима живи велика популација која пати од хепатитис Б. С друге стране, банана која се користи за ГМ нема семе и размножава се вегетативно, тако да не постоји опасност по животну средину у смислу расејања трансгена. ГМ банана је добијена коришћењем стандардне трансформације помоћу бактерије *Agrobacterium*. Поред тога, усмерена су и истраживања на могућности производње епитопа у биљкама који би били цитотоксични за хелије тумора.

PRINCIP DOBIJANJA TRANSGENIH ŽIVOTINJA



Embrion dobijen
in vitro fertilizacijom



Ubacivanje željenog gena sa signalom
za ekspresiju u mlečnoj žlezdi u oplodjenu
jajnu ćeliju



Transgeno potomstvo daje
željeni produkt u mleku




Implantacija embriona u surogat majke

- ☀ Mastitis - bolest vimena krave izazvana bakterijom *Staphylococcus aureus*
- ☀ Mastitis - nanosi štetu u SAD od \$ 1.7 milijardu godišnje
- ☀ Konstruisana **transgena krava** sa genom za lizostafin poreklom iz nepatogenog soja *Staphyococcus*




ANNIE

- ☀ **Annie** je transgena krava (rodjena 2000. godine) sintetiše **LIZOSTAFIN** u mlečnoj žlezdi - ne oboljeva od mastitisa



ROSIE

1997. godine

 Rosie je **transgena krava** u čijem mleku se nalazi humani α -laktalbumin

NOVA STRATEGIJA

-  Kompanija **AgResearch, Novi Zeland** planira konstrukciju transgene krave sa ljudskim genom **za mijelinski bazični protein (MBP)**
-  Izbor domaćina - krava frizijske rase



-  **Rezultat** - velika količina MBP proteina iz mleka transgene krave **za tretman multipne skleroze (MS)**

TRANSGENE KOZE

Nedostatak antitrombina je nasledna bolest (jedna u 2 000 до 5 000 osoba pati од te bolesti).

Kompanija GTC Biotherapeutics u SAD proizvodi rekombinantni terapijski protein antitrombin (**rhAT**) izolacijom iz mleka koze (preko 99% čistoće).

Za tretman **hemofilije**, **diseminovane intravaskularne koagulacije (DIC)** i **trombozu u dubokim venama (DVT)**. Koristi se i pre hiruških intervencija.

GTC tvrdi da **jedna GM koza** može da proizvede istu količinu antitrombina u jednoj godini koliko se može sakupiti iz **krvi 90.000 donatora**.



Антитромбин је протеин у крви који контролише згрушавање крви. Недостатак Антитромбина је наследна болест и једна у 2 000 до 5 000 особа пати од те болести. Рекombinantни антитромбин је изолован из млека ГМ козе и пречишћен више него 99%. Специфична активност овог антитромбина је била идентична као антитромбина изолованог из плазме човека . У циљу комерцијалног добијања рекombinantног антитромбина, компанија GTC Biotherapeutics у САД је почела производњу **ATryn** (комерцијално име за рекombinantни антитромбин човека). Он се изолује из млека ГМ козе и био је први лек који је изолован из трансгене животиње. GTC тврди да једна ГМ коза може произвести исту количину антитромбина у једној години, као из крви 90 000 донатора крви.

Deep vein thrombosis (DVT) occurs when a blood clot (thrombus) forms in one or more of the deep veins in your body, usually in your legs.

Disseminated intravascular coagulation (DIC) is a serious disorder in which the proteins that control blood clotting become over active.






Ekspresija rekombinantnih humanih proteina u mleku transgenih koza			
Gen	Promotor	Nivo ekspresije (mg/mL)	Referenca
Monoklonska antitela	koziji β -kazein	14	Pollock et al., 1999
Antitrombin	koziji β -kazein	0,09 – 12,5	Zhou et al., 2005
Butirilholinesteraza	koziji β -kazein	0,1 – 5,0	Huang et al., 2007
α -fetoprotein	koziji β -kazein	0,6 – 1,1	Parker et al., 2004
Laktoferin	koziji β -kazein	0,77	Zhang et al., 2008
Lizozim	kravlji α_1 -kazein	0,27	Maga et al.,
G-CSF ^a	kravlji i koziji β -kazein	0,07	Freitas et al., 2010
GH ^b	koziji β -kazein	0,07	Lee et al., 2006
G-CSF ^a	koziji β -kazein	0,05	Ko et al., 2000
Faktor IX	kravlji β -kazein	$9,5 \times 10^{-5}$	Huang et al., 1998

^aGranulocyte Colony-Stimulating Factor; ^bGrowth Hormone

SVILENA VLAKNA PAUKA





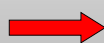
SVILENA VLAKNA PAUKA

- 
 Svileni vlakna pauka su najbogatiji protein - β -KERATIN
- 
 Svileni vlakna pauka su najjača i najtvrdija vlakna poznata u prirodi.
Izdržavaju 200.000 kg po kvadratnom inču bez pucanja!!!!
- 
 Svileni vlakna pauka su 25% lakša od plastičnih vlakana iste debljine
dobijenih petrohemijski
- 
 Svileni vlakna pauka imaju veliku elastičnost i mogu se rastezati
do 30% svoje originalne dužine bez pucanja
- 
 Svileni vlakna pauka su kompatibilna s kožnim tkivom životinja

TRANSGENE KOZE









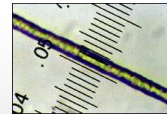
- 
 Paukov gen je jedan od 70,000 gena koze i ne utiče na njen izgled
- 
 U adultnoj kozi, gen pauka se aktivira za vreme laktacije i prestaje biti aktivan sa prestankom laktacije




Jedna transgena koza može sintetisati
7 gr svilenih vlakana pauka dnevno

Biočelik


-  Biočelik je rekombinantni protein svilenog vlakna **pauka**
-  Svilena vlakna pauka su čist protein - **β -KERATIN**
-  Izlučuje se putem mleka (nazvano "svileno mleko")
-  Proteini se izoluju iz mleka i upredu u vlakno
-  Vlakna biočelika su u prečniku tanja od 1 mm
-  Vlakna biočelika će biti korišćena u medicini za dobijanje:
 - jakih i čvrstih tetiva
 - jakih i čvrstih ligamenata
 - jakih i čvrstih kukova



DOBROBIT ZA ^OVE^ANSTVO

 Napredak medicine i razvoj novih terapijskih pristupa koji je omogućiti le~enja, do sada, neizle~ivih bolesti i spa{avanje `ivota mnogih bolesnika

MOLEKULARNA MEDICINA

 Nova saznanja vezana za procese ranog razvi}a sisara uklju~uju}i i ~oveka

Primena projekta sekvenciranja humanog genoma

FARMAKOGENOMIKA

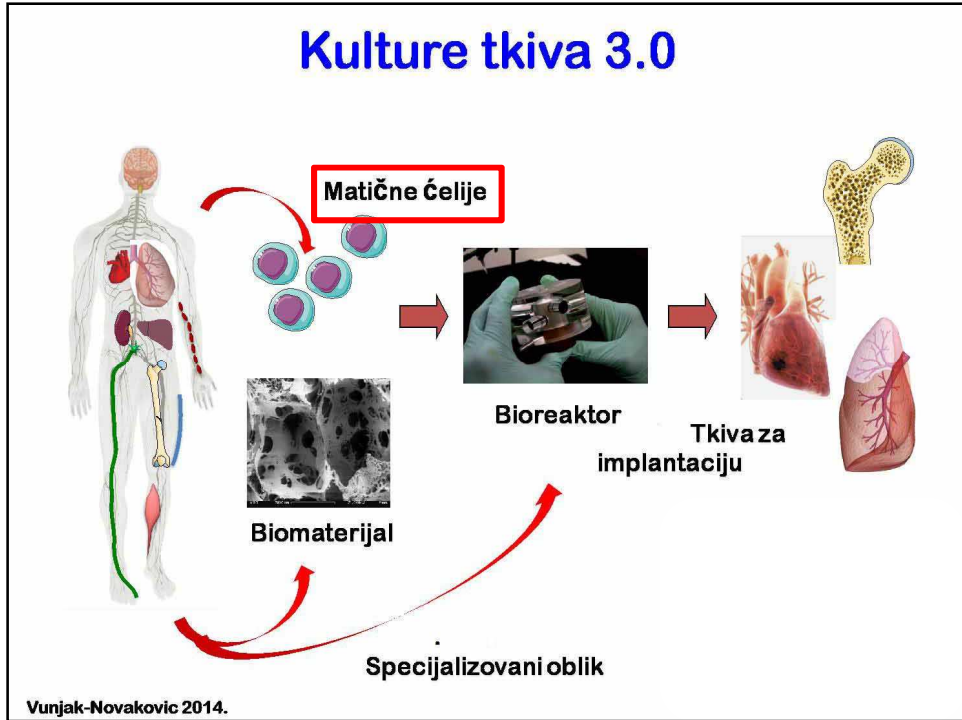
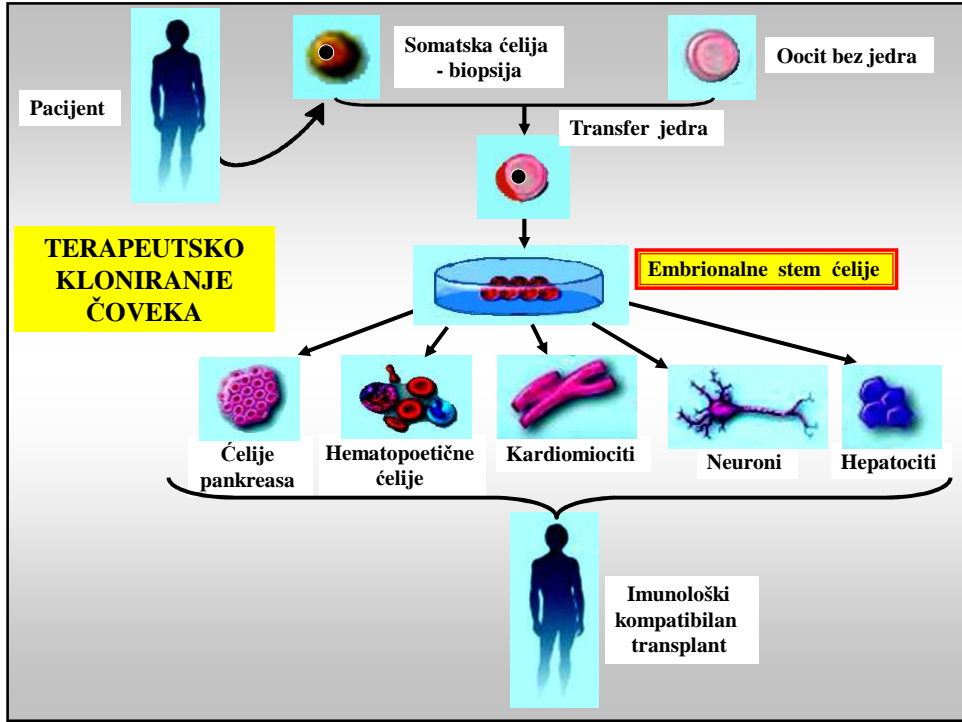
pharmaco - lek

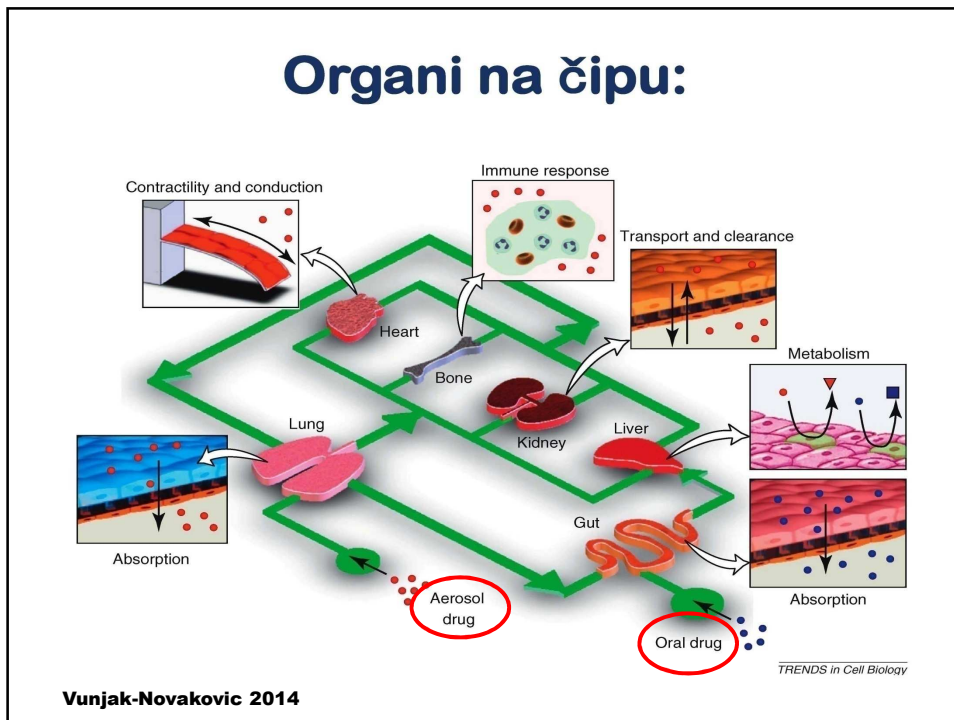
genome - ukupna genetička informacija jedne ćelije ili organizma

- Studije farmakogenomike ne predstavljaju lov na gene odgovorne za bolest **već traženje genetičkih markera** koji mogu biti bitni **za izbor pravilne terapije**.
- Odgovor pacijenta na bilo koji lek ne zavisi od produkta samo jednog gena.

TERAPEUTSKO KLONIRANJE

- ★ Proizvodnja ranih embriona čoveka do stupnja blastocita čime bi se dobio bezgranični izvor imunokompatibilnih ćelija za zamenu obolelih ćelija i transplantacionu medicinu
- ★ Otvara mogućnost lečenja različitih oboljenja kao što su dijabetes, infarkt, multipla skleroza, neurodegenerativne bolesti (**Parkinson, Alchajmer**) kao i razne povrede

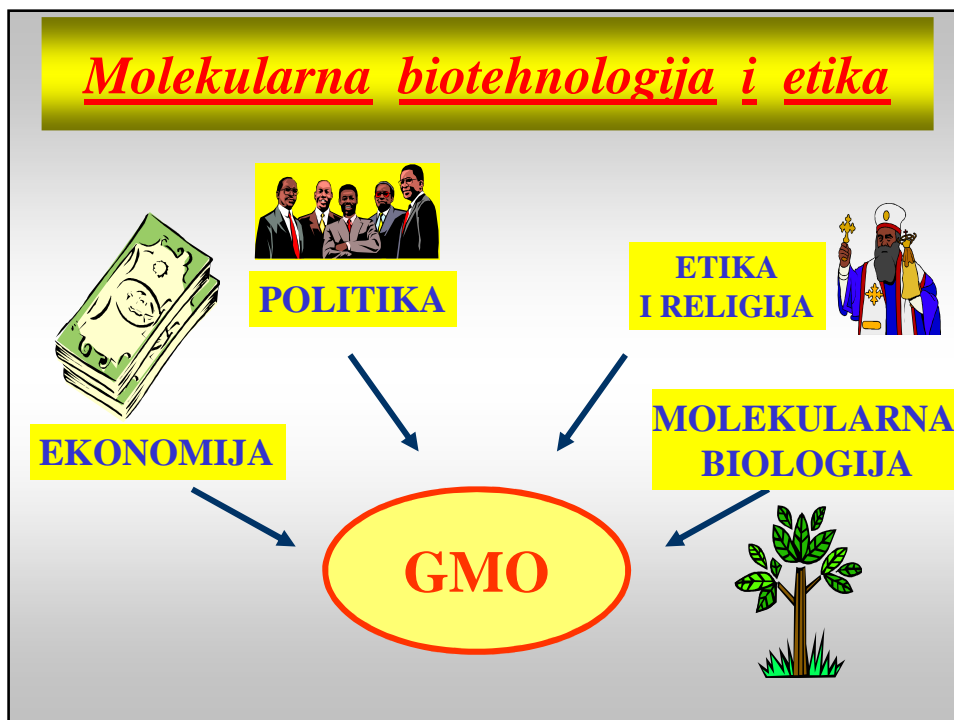


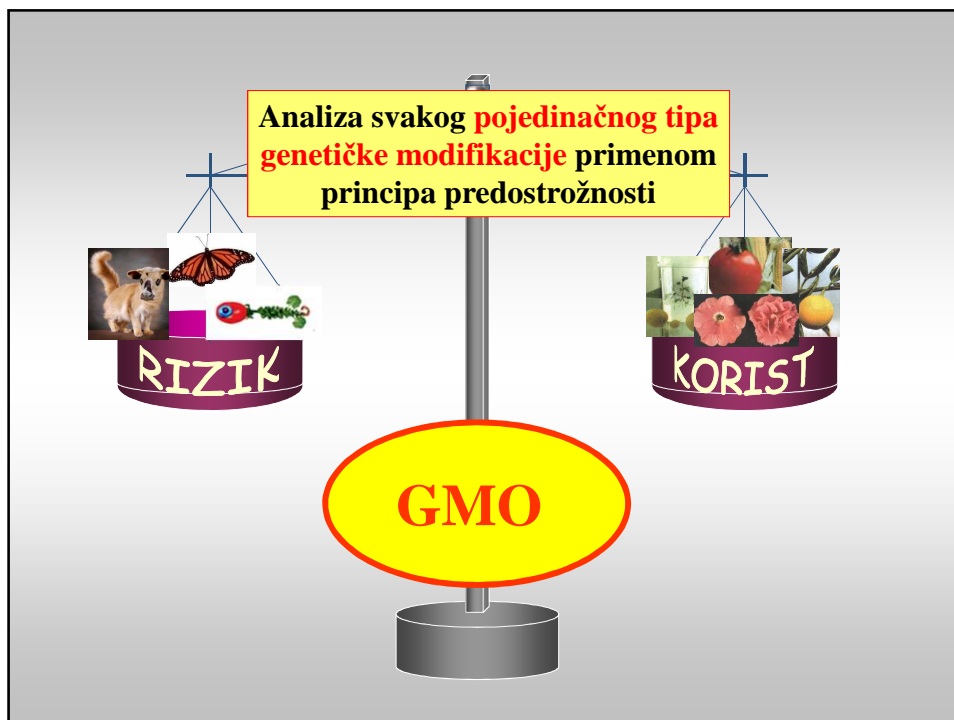


IZAZOVI BUDUĆNOSTI SAVREMENE CIVILIZACIJE

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

Molekularna biotehnologija i etika





TEHNOLOŠKI RAZVOJ

GDE NAS VODE NOVE TEHNOLOGIJE I ŠTA MI MOŽMO UČINITI POVODOM TOGA ???

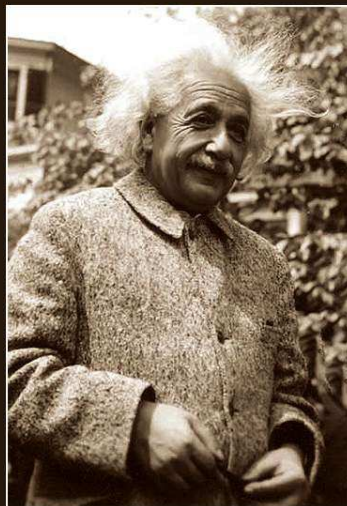
MI MORAMO RAZUMETI TEHNOLOGIJU I KOOPERATIVNO SARADJIVATI I TO SAMO NA GLOBALNOJ SKALI ILI ĆEMO NESTATI !!!

John McHale
u knizi "Future of the future", 1969

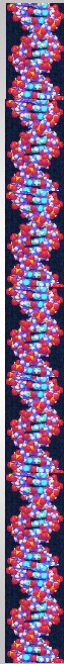
**"Modern man does not experience himself as part of nature,
but as an outside force destined to dominate and conquer it.**

**He even talks of a battle with nature - forgetting that,
if he won the battle, he would find himself on **the losing side.**"**

Ekonomista **Fritz Schumacher (1911-1977)
u knjizi: "Small is Beautiful"**



**Nažalost, naučna otkrića
su često kao sekira u
rukama patološkog
kriminalca**



HVALA VAM NA PAŽNJI !!!