

## **R. Komel: Ponovitev nekaterih osnov genskih tehnologij**

Živimo v času velikega znanstvenega, tehnološkega in duhovnega napredka, ki naj bi človeštvu prinesel vsesplošno blaginjo in odprl nove razsežnosti v razumevanju našega obstajanja in prihodnosti. Februarja 2003 je preteklo natanko petdeset let, odkar sta James Watson in Francis Crick v znanstveni reviji *Nature* objavila razkritje dvojnoverižne vijačne strukture DNA, osnovne sestavine genomov vseh organizmov na Zemlji, in njene vloge kot informacijske molekule življenja. Malo pred tem, tri leta prej, sta mednarodni konzorcij *PROJEKT ČLOVEŠKI GENOM* in zasebna družba *CELERA GENOMICS* v revijah *Nature* in *Science* ločeno, vendar istočasno objavila osnutka nukleotidnega zaporedja 3 milijarde nukleotidnih parov velikega človeškega genoma in napovedala začetek obdobja *funkcijske genomike*, ko bomo raziskali vlogo in delovanje vseh 35.000–40.000 človeških genov in tako morda razumeli kako deluje celica, kako se je razvilo življenje in po katerih poteh bo evolucija potekala naprej. Že pred tridesetimi leti so znanstveniki odkrili način rezanja molekul DNA na manjše delce in njihovega združevanja v poljubna nova zaporedja. Delce DNA je mogoče tudi vnašati v različne organizme, kjer se v primeru, ko gre za gene, ti lahko izrazijo v obliki svojih proteinskih produktov. Z genskim inženirstvom, ki je nepogrešljivi del sodobne biotehnologije, smo do danes pridobili že vrsto rekombinantnih beljakovin, ki jih medicina uporablja za zdravljenje številnih bolezni, pa tudi industrijskih encimov, ki jih uporabljamo v kemični, predelovalni in živilski industriji. Z vnosom novih genov nam je uspelo ustvariti gensko spremenjene rastline in živali. V medicini je prišlo do prave revolucije v diagnostiki bolezni in pri napovedovanju nagnjenj k nekaterim boleznim, veliki pa so tudi obeti na področju tako imenovanega “genskega zdravljenja”. Seveda se ob vseh teh uspehih pojavljajo tudi dvomi o možnih zlorabah znanstvenih dognanj, ki jih spremljajo številna etična vprašanja. Rojstvo ovčke Dolly in zdajšnje polemike o možnostih kloniranja človeka ter o raziskavah matičnih celic za tako imenovano “terapevtsko kloniranje”, ki naj bi s hitro razvijajočo se “medicinsko” oz. “celično biotehnologijo” medicini prineslo zmagoslavje nad nekaterimi, danes še neozdravljivimi boleznimi, so dogodki, ki nas močno zanimajo, saj v njih iščemo odgovore na vprašanja od kod izviramo in kam gremo.

## DNA – nosilka informacije

### Nukleotidi so gradniki DNA

Nosilke današnjih oblik življenja so **molekule deoksiribonukleinske kisline (DNA)**, saj vsebujejo gene – osnovne informacijske enote za zgradbo in delovanje vsakega organizma. Pri višjih organizmih (rastline in živali) so shranjene v celičnem jedru. Molekula DNA je sestavljena iz dveh polimernih verig, ki sta prepleteni v *dvojno vijačnico*. Enojni verigi sta sestavljeni iz **nukleotidov**, ki so med seboj povezani. Posamezen nukleotid sestavljajo dušikova **baza**, sladkor **deoksiriboza** in **fosfatna skupina**.

**Molekule DNA so velevzrite v kromosome.**

**Življenje celice = celični cikel in delitev.**

**Celice si podvojijo kromosome in se nato delijo.**

**Nastanek spolnih celic je osnova spolnega razmnoževanja organizmov.**

**Spolno razmnoževanje** je način razmnoževanja evkariontskih organizmov, pri katerem se genetski informaciji dveh organizmov združita v novo kombinacijo: dve haploidni spolni celici se združita v diploidno zigoto. Iz zigote se nato razvije nov večcelični osebek, in sicer z mitotično delitvijo celice.

**Gen je osnovna fizična in funkcijska enota dednosti, ki omogoča prenos svoje informacije iz ene celične generacije v drugo.**

**Gen** je odsek v molekuli DNA, ki nosi informacijo za sintezo nekega “genskega produkta”. Ko se *izraža* (**izražanje, ekspresija genov**), se njegovo nukleotidno zaporedje (genetsko sporočilo, informacija) v procesu *prepisovanja* (**prepisovanje genov, transkripcija**) prepíše v nukleotidno zaporedje ustrezne molekule RNA. Razlikujemo tri glavne vrste RNA: (a) transportne RNA (tRNA), ki nase vežejo aminokislino in jih kot gradnike proteinov prenašajo na kraj sinteze proteinov; (b) ribosomske RNA (rRNA), ki skupaj z ribosomskimi proteini sestavljajo ribosome, celične “tovarne” za sintezo proteinov; (c) sporočilne RNA (angl. messenger RNA, mRNA), katerih nukleotidna zaporedja kot prepisi ustreznih genov so matrice za sintezo ustreznih proteinov. Vidimo, da sta v primeru tRNA in rRNA ti dve vrsti RNA že končna genska produkta svojih genov, v primeru mRNA pa se informacija posreduje še naprej – do zaporedja aminokislin v proteinu, ki je tako končni produkt izražanja nekega gena. Zaporedje aminokislin v

njem je določeno z zaporedjem nukleotidov v mRNA oziroma (v osnovi!) z zaporedjem nukleotidov v DNA “njegovega” gena.

Diploidni evkarionti imamo v vseh telesnih celicah po dve kopiji vsakega gena. Kopiji posameznega gena sta v obeh homolognih kromosomih na enakem mestu (*lokusu*). Lahko sta popolnoma enaki, lahko pa se tudi dovolj razlikujeta, da v medsebojnem odnosu povzročita opazno razliko v lastnosti, za katero je “odgovoren” omenjeni gen.

S prepisovanjem (transkripcijo) se začne gen “izražati”. “**Izražanje gena**” pomeni nastajanje njegovega produkta (RNA, pri večini genov nato še proteina), ki je funkcionalen, kar pomeni, da v celici ali izven nje opravlja svojo biološko vlogo. Sprožilni dejavniki za izražanje nekega gena so molekule (večinoma specifični proteini), ki se s svojo obliko prilegajo k značilni obliki regulacijskega zaporedja gena, se tja vežejo in izpostavijo začetek gena, da se nanj veže encim **polimeraza RNA**. Dvoverižna DNA gena se razkrene in encim na sproščene nukleotidne baze ene (nekdirajoče) od obeh verig DNA začne v smeri 5'→3' polagati komplementarne ribonukleotide in jih povezovati med seboj v zaporedje RNA, ki bo prepis druge (kdirajoče) DNA-verige gena. Med tem opravilom se giblje vzdolž gena, dvoverižna DNA se pred njim razklenjuje, za njim pa se enojni verigi DNA znova združujeta. Ko pride do konca gena, naleti na zaključno zaporedje, ki ga prepíše v konček RNA, ki se zaradi množice komplementarnih baz spari v nekakšno zanko. Ta sporoči encimu, da je konec opravila – sinteze RNA.

**Prevajanje genske informacije, zaporedja nukleotidov mRNA v zaporedje aminokislin proteina (translacija) poteka na ribosomih.**

## **Genom in njegovo izražanje**

**Genom je celotna celična genetska informacija.**

Organizmi se razlikujejo po vrsti in številu kromosomov. Kadar ima organizem več kromosomov, se ti med seboj razlikujejo po velikosti (različno število nukleotidov v njihovih molekulah DNA) in tudi po sestavi (različna zaporedja nukleotidov). Opis števila, velikosti in oblike vseh kromosomov neke celice oz. organizma imenujemo **kariotip**. Isti izraz uporabljamo tudi za mikroskopsko

sliko s posebnim barvilom obarvanih metafaznih kromosomov, ki jih razporedimo (v primeru diploidnih organizmov po parih) od največjega do najmanjšega: človeški kariotip tako vsebuje 46 kromosomov – 22 parov nespolnih kromosomov in oba spolna kromosoma, X in Y.

Eni garnituri kromosomov celice rečemo celični **genom**. Ker imajo vse telesne celice organizma enako število istih kromosomov, je celični genom tudi genom nekega organizma. Človeške celice so diploidne, saj imajo 2 garnituri (2 niza) kromosomov; vsebujejo torej dve kopiji človeškega genoma. V celicah so tudi mitohondriji, organeli, ki so pomembni v celičnem dihanju; teh je v vsaki celici lahko tudi do nekaj sto ali nekaj tisoč (odvisno od vrste celic) in vsak ima lahko 5–15 kopij majhnega krožnega mitohondrijskega kromosoma. Ker so vse kopije mitohondrijskega kromosoma enake, ga pri opisu sestave celičnega genoma upoštevamo le enkrat, torej le 1 molekulo. Ta predstavlja samo en odstotek genoma. Natančen opis človeškega genoma, ki je velik približno tri milijarde nukleotidnih parov, bi tako bil: 22 različnih nespolnih kromosomov + spolni kromosom X + spolni kromosom Y + mali mitohondrijski kromosom. Genom neke bakterije, velik “samo” 5 milijonov nukleotidnih parov, pa vsebuje le 1 kromosom.

## **Genško inženirstvo in biotehnologija**

### **Kaj je kloniranje?**

Beseda *klon* je grškega izvora in je povezana z razmnoževanjem - klon je popolnoma enaka kopija ali skupina kopij nekega izvornika.

*Celični klon* je kolonija celic, ki so vse potomke ene celice in imajo zato popolnoma enako dedno zasnovo. Krožec gnilobe, ki zraste na hruški ali jabolku, je klon, kolonija genetsko enakih celic, ki so se razvile iz ene same bakterijske celice.

Ko damo neko celico (bakterijsko, kvasno, rastlinsko, človeško ...) v tekoče gojišče, v katerem so primerna hraniva in molekule, ki spodbujajo rast, se ta deli in deli in sčasoma dobimo tako imenovano “celično kulturo”, v kateri so vse celice genetsko enake, saj izhajajo iz ene same celice. Opravili smo *celično kloniranje*.

*Klon* je lahko tudi višji organizem, ki ima popolnoma enako genetsko zasnovo kot njegov dvojnik. Ko je nekoč

kmet zaradi prihranka razrezal gomolj krompirja na štiri dele in jih posadil, je iz vsakega zrastle krompirjeva rastlina in vse štiri so si bile druga drugi klon. Tudi gozdna jagoda med vegetativnim razmnoževanjem z viticami v svoji okolici razvija nove jagodne rastlinice, ki so prav tako kloni.

Ovca Dolly je bila klon ovce, iz katere so vzeli telesno celico in iz nje razvili Dolly, saj ni nastala z mešanjem dednega materiala očetove in matrine spolne celice, kar bi sicer dalo neko novo, kombinirano dednino. Tudi enojajčna dvojčka sta si klona, čeprav sta nastala z oploditvijo jajčeca s semenčico; oplojeno jajčece, zigota, je sicer imelo novo, kombinirano dednino, vendar je že po prvih delitvah prišlo do razcepa zarodka na dva popolnoma enaka.

Postopek, s katerim pomnožujemo molekule DNA oziroma dele teh molekul, pa imenujemo *molekulska kloniranje* ali *kloniranje DNA*. Iz kromosoma nekega organizma odvezamemo manjši segment DNA, npr. gen, in tega vcepimo v prenašalno molekulo, npr. virus, bakterijski plazmid ...). S prenašalno molekulo nato tak košček DNA vnesemo v gostiteljsko celico, npr. bakterijo, v kateri se bo prenašalec (in skupaj z njim tudi vanj vnešeni košček DNA) namnožil v veliko število kopij. Ker se bakterijska celica medtem v tekočem gojišču tudi deli, je *molekulska kloniranje* združeno s *celičnim kloniranjem*. Na koncu dobimo na tisoče ali celo milijone kopij molekule DNA (gena), ki smo jo klonirali. Molekulska in celična kloniranja sta nepogrešljiva dela *genskega inženirstva*, pri katerem molekule DNA spreminjamo in pomnožujemo po svojih željah.

### **Kako režemo in prerazporejamo DNA?**

Bakterije se borijo proti invaziji tuje DNA, ki v obliki različnih virusov prihaja vanje in moti njihov življenjski cikel. V evoluciji so razvile encime, ki tujo DNA prepoznajo in jo razrežejo na manjše, neškodljive koščke. Ti encimi, ki jih imenujemo "razrezovalni" ali "restriksijski" encimi, v tuji DNA prepoznavajo posebna zaporedja, ki so "palindromna", berejo se enako v obe smeri: perica-reže-raci-rep. Ker je za vsak posamezen encim v neki molekuli DNA število razpoznavnih mest veliko in so ta mesta med seboj na različnih razdaljah, bo bakterija z encimom DNA razrezala na veliko število koščkov, ki so različno dolgi. Zakaj pa bakterija ne razreže tudi svoje DNA, saj so verjetno tudi v njej

razpoznavna mesta za omenjeni encim? Ne more, ker so v njej zaščitena z metilnimi skupinami, tuja DNA pa ne.

Vidimo, da so nastali koščki DNA s štrlečimi konci, ki se med seboj prilegajo. Če bi jih znova združili, bi prišlo do komplementarnega parjenja baz in izhodiščna DNA bi bila spet sestavljena. Če pa jih pomešamo, bi lahko sestavili popolnoma novo DNA, z zaporedji, ki so povsem različna od izhodiščne; sestavili bi “prerazporejeno” oz. “rekombinirano” DNA:

Do zdaj je bilo pri bakterijah odkritih že nekaj tisoč različnih restrikcijskih encimov in več kot sto posebnih zaporedij, ki jih ti prepoznavajo in režejo v DNA. Vsak restrikcijski encim seveda prepozna samo eno vrsto omenjenih zaporedij, ki so navadno dolga 4–6 nukleotidnih parov.

### **Kaj je gensko inženirstvo?**

Postopku prerazporejanja dobljenih fragmentov DNA pravimo *tehnologija rekombinantne DNA* ali, kadar je to natančno načrtovano, kar *gensko inženirstvo* oziroma *genska tehnologija*. Če z encimom (restrikcijski encim) razrežemo neko kromosomsko DNA in z enakim encimom tudi odpremo molekulo prenašalne DNA (npr. bakterijski virus ali plazmid), potem lahko izbrani fragment kromosomske DNA vložimo v prenašalno molekulo in nastalo “rekombinirano” DNA zapremo, zacelimo s posebnim encimom, *ligazo DNA*. Rekombinirani prenašalec nato vnesemo v bakterijsko celico, ki jo zlahka in hitro razmnožimo v tekočem gojišču ter (tako, kot je prikazano na eni od prejšnjih slik) z molekulskim in celičnim kloniranjem pridobimo veliko število kopij omenjenega fragmenta DNA. Kadar je ta fragment gen, ki nosi zapis za farmacevtsko zanimiv protein, ga v bakterijskih celicah tudi izrazimo – sprožimo njegovo prepisovanje v mRNA in njeno prevajanje v protein. Na ta način lahko pridobimo zelo velike količine nekega proteina, ki bi ga iz izvornega evkariontskega organizma pridobili veliko manj, ker ga je v njegovih celicah zelo malo ali pa je slabo dostopen.

Gen lahko tudi malce spremenimo, mu zamenjamo del zaporedja, in tako ustvarimo nekoliko drugačen protein z novimi, izboljšanimi lastnostmi; tej izvedenki genskega inženirstva pravimo “proteinsko inženirstvo”. Še bolj zapletena pa je izvedenka genskega inženirstva, imenovana “metabolno inženirstvo”, pri kateri v

gostiteljsko celico vnesemo več različnih genov, najraje tako, da jih predhodno v prenašalni molekuli razvrstimo v neko zaporedje; to predstavlja zaporedje sporočil za biosintezo encimov, ki so potrebni za večstopenjsko pretvorbo neke organske molekule v končno učinkovino, npr. zapleten, sestavljen antibiotik. Sodobna biotehnološka proizvodnja temelji na genski tehnologiji, s katero uvajamo gene za uporabne proteine v gostiteljske celice, kjer se ti na preprost način razmnožijo in izrazijo v obliki svojih proteinskih produktov.

### **PCR – verižna reakcija s polimerazo**

DNA-polimeraza je encim, ki pred delitvijo celice, pri podvojevanju DNA, potem ko se vijačna dvoverižna DNA razpre, na vsaki od obeh verig sintetizira novo, komplementarno verigo DNA. To omogoči, da iz ene dvoverižne DNA nastaneta dve “hčerinski” dvoverižni DNA, ki sta si enaki in sta enaki tudi “starševski” molekuli (glej poglavje Podvajanje DNA – replikacija!). Z omenjenim encimom je podvojitev neke DNA načelno mogoče opraviti tudi v laboratoriju: dvoverižno molekulo DNA bi razprli s segrevanjem (toplotna energija poruši vodikove vezi med dušikovimi bazami, ki sicer komplementarno združujejo dve verigi, A=T in G=C); v epruveto bi potem, ko bi raztopino ohladili, dali encim DNA-polimeraza in velik prebitek gradbenih “zidakov”, vseh štirih deoksinukleotidov (A, T, G, C); DNA-polimeraza bi na vsaki od obeh enoverižnih matric z dodajanjem komplementarnih nukleotidov sintetizirala drugo, komplementarno verigo; nastali bi dve enaki molekuli dvoverižne DNA. In nič več! Če bi želeli postopek ponoviti in pridobiti štiri enake molekule DNA, bi namreč morali obe pridobljeni molekuli DNA znova toplotno razpreti, pri tem pa bi občutljiv encim razpadel – zato bi vsakič morali dodajati nov encim, kar bi bilo zelo zamudno in potratno.

Raziskovalec Karry Mulis pa je ugotovil, da za neomejeno pomnoževanje molekul DNA lahko uporabi toplotno stabilen encim, DNA-polimerazo, ki so jo pridobili iz bakterij, ki živijo v vročih gejzirih na Islandiji in v ZDA. Stabilen encim iz bakterije *Thermophilus aquaticus* so poimenovali “polimeraza Taq”. S polimerazo Taq lahko molekule DNA neomejeno pomnožujemo v epruveti. Po vsaki podvojitvi DNA novi molekuli sicer toplotno razpremo, vendar to ne vpliva na encim, ki lahko na ta način v nekaj urah iz ene molekule sintetizira zelo veliko število enakih kopij; to je nekakšna

verižna reakcija, verižna reakcija s toplotno stabilno DNA-polimerazo, znana pod imenom "PCR". PCR je kratica treh angleških besed, **P**olymerase **C**hain **R**eaction, ki v slovenskem prevodu pomeni "verižna reakcija s polimerazo".

*V vročih vrelicah na Islandiji živijo bakterije, ki prenašajo temperaturo tudi do 100 °C, kar pomeni, da za nemoten potek njihovega metabolizma skrbijo encimi, ki so toplotno obstojni. To sicer ni značilnost večine drugih organizmov na Zemlji, saj njihovi proteini niso obstojni izven območja njihove telesne toplote. Pri višjih temperaturah šibke vezi med aminokislinami, ki neki protein zvijajo v biološko aktivno prostorsko strukturo, razpadejo in pride do novih povezav, med drugimi aminokislinami. Posledica je, da protein zavzame drugačno prostorsko obliko, ki ni več biološko aktivna; pravimo, da je denaturiral. DNA-polimeraza Taq je toplotno stabilen encim; njegova povezanost aminokislin mu omogoča prostorsko strukturo, ki ohranja stalno obliko in biološko aktivnost pri visokih temperaturah.*

*Verižna reakcija s polimerazo, PCR. Molekulo DNA damo v epruveto, dodamo encim – termostabilno DNA-polimerazo Taq (veliko količino molekul tega encima), veliko količino deoksinukleotidov A, T, C in G ter veliko količino molekul obeh PCR začetnikov. PCR začetnika sta kratki verigi DNA (16–24 med seboj povezanih deoksinukleotidov), ki sta komplementarni enemu oziroma drugemu koncu predela molekule DNA, ki ga želimo pomnožiti. Molekulo DNA razpremo ("denaturiramo") s segrevanjem na 94 °C (**A**). Hitro ohladimo na 50–65 °C in PCR začetnika bosta poiskala vsak svoj komplementarni konec ene oziroma druge verige razklenjene DNA ter se nanj vezala (**B**). Nato temperaturo dvignemo na 72 °C, ki je optimalna za delovanje encima Taq-polimeraza. Dve molekuli encima bosta iz obeh izhodišč, PCR začetnikov, v obeh primerih v smeri 5'→3', začeli dodajati matrični verigi komplementarne nukleotide in obe enojni verigi bosta zelo hitro podvojeni (**C**). Novo nastali dvoverižni DNA nato znova*



*razklenemo s hitrim dvigom temperature na 94 °C (denaturacija DNA), toplotno stabilen encim to preživi, in postopek ohlajevanja na 50–65 °C (prileganje PCR začetnikov) ter ponovnega dviga temperature na 72 °C (sinteza DNA) lahko ponovimo – s tem smo pridobili že štiri enake kopije DNA. Koraki “denaturacija DNA” (94 °C; 30–60 sekund), “pripenjanje PCR začetnika” (50–65 °C; 30–60 sekund) in “sinteza DNA” (72 °C; 30–60 sekund ali več) sestavljajo en cikel, ki navadno traja 2–3 minute. Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je sestavljena iz 20–30 ciklov, kar pomeni, da navadno traja 1–4 ure. V tem času tako lahko iz neke molekule DNA pridobimo 2<sup>n</sup> enakih kopij (n = število ciklov), s posebno napravo, v katero vstavimo epruveto z reakcijsko raztopino, in ki omogoča računalniško programirano segrevanje in ohlajanje oz. menjavo ciklov. V 10 ciklih pridobimo 1.026 kopij neke molekule DNA, v 20 ciklih že 1.048.576 kopij itn.*

S PCR si lahko iz poljubne molekule DNA namnožimo odsek, ki ga omejimo z dvema PCR začetnikoma. Na ta način lahko brez molekulskega kloniranja v bakterijah pridobimo veliko količino fragmenta DNA (npr. nekega gena), ki nas zanima. V nasprotju s tem smo pri rezanju DNA z restrikcijskimi encimi pridobili velike količine zelo različnih fragmentov, ki smo jih nato namnožili s kloniranjem in potem z zamudnimi in dragimi postopki šele iskali fragment (klon), ki nas je zanimal. S PCR pa pridobimo želeni fragment v nekaj urah in ga nato lahko vnesemo v bakterijo, kjer se bo še dodatno namnožil in nato izrazil v obliki proteinskega produkta (kloniranje PCR produkta). Kary Mullis je za iznajdbo PCR leta 1993 prejel Nobelovo nagrado. Seveda pa moramo fragmente DNA še vedno pridobivati z restrikcijskimi encimi v vseh primerih, ko ne poznamo nukleotidnega zaporedja DNA, ki jo želimo pomnožiti.

### **Kaj prinaša nova biotehnologija? Kakšne so njene posledice?**

V šestdesetih letih prejšnjega stoletja je bilo veliko pomislekov. Bali so se, da bi gensko spremenjeni mikroorganizmi (tisti, v katere vnesemo tuj gen) “ušli” iz laboratorijev in povzročili nepopravljive posledice v naravi. Če bi zaradi raziskovalne radovednosti

v njih klonirali virusni gen, ki povzroča hudo bolezen, ali bi take bakterije lahko ušle iz laboratorija in povzročile epidemijo bolezni svetovne razsežnosti? Desetletja raziskovanja so prinesla spoznanje, da to ni možno! Pri molekularnem kloniranju namreč uporabljamo mikroorganizme, ki razmer izven poskusnih ali proizvodnih laboratorijev ne preživijo. Poleg tega se na novo vnešen gen sčasoma izgubi, saj se pri delitvi celic ne prenaša enakomerno na vse celice potomke. Biotehnologija prodobivanja koristnih učinkovin je v zadnjih desetletjih z uporabo genske tehnologije prišla do odličnih dosežkov in javno mnenje ji je zato naklonjeno. Oglejmo si primer ravnega hormona, proteina, ki ga medicina uporablja za celjenje ran, zdravljenje opeklin in kostnih prelomov, zdravljenje otrok, ki zaostajajo v rasti, ipd. Pred uveljavitvijo genske tehnologije je bilo za potrebe držav, kot je Slovenija, potrebno uporabiti vsaj 2.000 žlez hipofiz umrlih ljudi, da bi iz njih izločili dovolj hormona za potrebe njenega zdravstva. Na ta način pridobljeni hormon je lahko vseboval tudi primesi, viruse, ki so bili škodljivi za človekovo zdravje. Z vnosom človeškega gena v bakterijo pa je na biotehnološki način v nekaj dneh, z bakterijsko kulturo 100 litrov, mogoče pridobiti dovolj omenjene učinkovine, da z njo zadostimo vsem potrebam naše države, obenem pa ta tudi ne vsebuje zdravju nevarnih primesi. Spomnimo se tragedije, ko so pred leti v Franciji hemofiliki, ki so jim dajali pripravek tako imenovanega "faktorja VIII", proteina, ki je pri poškodbah potreben za nemoteno strjevanje krvi, zbolevali za AIDS-om. Protein je bil namreč izločen iz krvi velikega števila krvodajalcev in kljub vsem varnostnim ukrepom se je v njem znašel tudi virus HIV. Danes hemofiliki prejemajo rekombinantni faktor VIII, ki je proizvod tehnologije rekombinantne DNA in je popolnoma varen, saj ne vsebuje virusnih primesi. Ali pa primer sladkorne bolezni! Bolniki so do nedavnega prejemali insulin govejega ali prašičjega izvora. Številni so ga dobro prenašali, pri marsikom pa je zaradi (sicer majhnih) razlik v primerjavi s človeškim insulinom izzval imunski odgovor – proti njemu je organizem začel proizvajati protitelesa, ki so ga onesposobila in bolnikom se zato stanje ni izboljšalo. Danes sladkorni bolniki prejemajo rekombinanten človeški insulin, proizveden na biotehnološki način iz človeškega gena, ki so ga vnesli v bakterijske ali kvasne celice.

Biotehnologija je veda, ki združuje spoznanja biokemije, genetike, (mikro)biologije in tehnološkega inženirstva, da bi s pomočjo

organizmov (npr. mikroorganizmov, celičnih kultur, rastlin ...) oziroma njihovih delov (npr. encimov) na industrijski način proizvajala različne učinkovine. Gensko inženirstvo je nepogrešljivi del "nove biotehnologije", saj z vnosom ali spreminjanjem genov izdeluje (mikro)organizme z novimi lastnostmi – za proizvodnjo večjih količin industrijsko ali farmacevtsko pomembnih spojin oziroma izboljšanih učinkovin.

### **Transgenski organizmi**

Če tuj gen vnesemo v neki organizem tako, da se bo vgradil v genom vseh celic, pridobimo *gensko spremenjeni* oziroma *transgenski organizem*. Pri enoceličnih organizmih, kot so bakterije, je to preprosto. Pri večceličnih pa moramo genski poseg, vnos tujega gena, izvesti v spolni celici ali v zigoti ali pa v vseh celicah zgodnjega zarodka, da bo vnešeni gen prisoten v vseh celicah odraslega organizma. Bitje, ki ga s prenosom gena/genov pridobimo, je gensko spremenjena, "transgenska rastlina" oziroma "transgenska žival". Če se vnešeni gen v njej tudi izrazi, smo ji vnesli novo lastnost; če izraženi protein vpliva na druge lastnosti (proteine), smo ji spremenili lastnosti. Zamisli za uporabo transgenskih rastlin in živali ni nikoli zmanjkalo! Lahko bi npr. v govedo vnesli gen za človeški rastni hormon, ki bi se izražal v mlečni žlezi; iz kravjega mleka bi "posneli" rastni hormon, preostalo mleko pa uporabili kot po navadi – za prehrano in mlečne izdelke. Pri prašičih, ki imajo po obliki in velikosti človeku podobne notranje organe, bi lahko njihove gene, ki nosijo zapis za površinske značilnosti celic teh organov, nadomestili s človeškimi geni in tako pridobili organe, ki bi bili primerni za nadomeščanje človeških organov (presaditve organov), saj jih zaradi spremenjenih površinskih značilnosti naš organizem ne bi več zavračal. Večjo uporabo pa so do zdaj doživeli genski posegi za izboljšanje lastnosti kmetijskih rastlin, kot so hitrejša rast, odpornost proti škodljivcem, odpornost proti suši ipd.

### **Argumenti "za" in "proti" transgenskim organizmom**

Zagovorniki uporabe genske tehnologije za spreminjanje lastnosti kmetijskih rastlin in živali menijo, da gre pri novi tehnologiji samo za bolj načrtovane in hitrejše

spremembe, kot jih je sicer človek dolga stoletja in tisočletja izvajal s križanjem in selekcijo. Pri tem je prihajalo, sicer zelo počasi in postopoma, do sprememb celih nizov genov in posledica je bila zelo spremenjena lastnost neke rastline ali živali. Številne pasme psov, kot jih poznamo danes, so zelo drugačne od volka, domače govedo ni zelo podobno turu, koza se razlikuje od kozoroga in ovca od muflona ... Solata, korenje in druga zelenjava, ki jo danes kupujemo na trgu, ne raste v gozdu in tudi sadje, ki ga lahko uživamo vsak dan, je daleč od divje rastočih sorodnikov. Pri genski tehnologiji zaenkrat ne spreminjamo celega niza lastnosti, saj v organizme navadno vnašamo samo posamezen gen, ki nosi zapis za eno samo beljakovino; ta je sicer v transgenskem organizmu nova, tuja, vendar gre za naravno beljakovino (sicer nekega drugega organizma), ki se v transgenskem organizmu znajde v množici nekaj sto tisoč vrst njemu lastnih beljakovin. V primeru, da bi bila nova beljakovina za transgenski organizem škodljiva, nadaljevanje poskusa ne bi bilo več smiselno in bi ga prekinili. Postopek vnosa gena je po mnenju zagovornikov tudi veliko bolj načrtovan in natančen kot so sicer dolgotrajni postopki križanja in naključnega mešanja celih nizov genov oziroma lastnosti. Ker so učinki hitri, jih je mogoče opazovati in pravočasno preprečiti neželene posledice.

Nasprotniki po drugi strani trdijo, da z vnosom tujih genov lahko vplivamo na sosednje, organizmu lastne gene, ki bi zato lahko spremenili način svojega izražanja. Posledice ne bi bile vidne takoj, temveč bi se zaradi spremenjenega razmerja nekaterih proteinov lahko pokazale (v obliki bolezni) šele veliko pozneje, nekatere morda tudi v naslednjih generacijah. Bojijo se tudi škodljivega vpliva na okolje; transgenske, proti škodljivcem zaščitene rastline bi lahko zaradi svoje velike prednosti začele izpodrivati divje rastoče sorodnike, širile bi se s pelodom in bi sčasoma prerasle v neobvladljiv plevel. Kličejo k previdnosti, saj menijo, da z gensko tehnologijo prehitevamo evolucijo, ki sicer izvaja selekcijo vrst počasi in postopoma, vendar "preverjeno", saj temelji na soočenju z drugimi življenjskimi vrstami oziroma okoljem.

Na kako zelo nasprotnih bregovih so včasih zagovorniki in nasprotniki pridobivanja in uporabe gensko spremenjenih organizmov, lahko vidimo iz naslednjega primera. S transgenezo so razvili sojo, odporno proti herbicidu glifozatu, ki je aktivni sestavni del pripravka, znanega pod imenom RoundUp. Nasprotniki so takoj protestirali, češ da gre za prizadevanja velike

multinacionalke, ki bi rada povečala prodajo omenjenega pripravka za zatiranje širokolistnih plevelov. Poudarjali so, da bo povečana prodaja herbicida močno povečala onesnaževanje okolja in s tem ogrozila zdravje ljudi in živali. Herbicidi so namreč strupeni pripravki, ki sicer izkoreninijo plevel, vendar po navadi onesnažijo tla in se še leto po uporabi spirajo v podtalnico. Zagovorniki pa so pojasnili, da je RoundUp pripravek, ki se v okolju razgradi v 48 urah in zato sploh ne vpliva na naravo; že 48 ur po njegovi uporabi je na polje mogoče saditi tudi rastline, ki so sicer nanj občutljive. Zato je dovolj, da se polje, na katerem raste gensko spremenjena soja, odporna proti omenjenemu herbicidu, obdela s tem pripravkom enkrat v sezoni in sicer poleti, ko raste plevel, brez bojzani pred škodljivimi vplivi na okolje.

Kje je resnica? Dejstvo je, da bo uporaba gensko spremenjenih rastlin, odpornih proti bakterijam in plesnim, ki povzročajo bolezni, ali rastlin, odpornih proti ličinkam žuželk, močno zmanjšala uporabo kemičnih pripravkov (fungicidov, insekticidov), ki sicer zelo onesnažujejo okolje in katerih ostanki v hrani lahko tudi škodljivo vplivajo na naše zdravje. Za kmetijstvo bo blagodejna uporaba gensko spremenjenih sort, ki bodo odporne proti zmrzali, suši ali povečani slanosti v prsti. Če želimo povečati pridelek, da bi zadostili potrebam hitro rastočega prebivalstva našega planeta, ne da bi pri tem nadaljevali z brezumnim krčenjem še preostalih gozdov in pretirano uporabljali kemične pripravke, se bomo verjetno morali sprijazniti s povečano uporabo transgenskih rastlin in živali. Boljša prehranjenost svetovnega prebivalstva bi pomenila tudi dvig splošnega blagostanja, kar bi zagotovo prispevalo k boljšemu nadzoru oziroma zmanjšanju neverjetne rasti prebivalstva "tretjega sveta". Zato napredne države sprejemajo gensko tehnologijo, vendar skupaj z zakonodajo, ki prepoveduje njeno nepremišljeno uporabo. Dovoljuje izključno uporabo preverjenih in varnih postopkov prenosa genov. Zahteva dolgoletna preverjanja učinkov gensko spremenjenih organizmov na okolje ter na zdravje ljudi in živali; ta preverjanja morajo potekati v zaprtih sistemih, na koncu v pol-odprtih sistemih in šele nato, če škodljivih učinkov ni, se dovoli uporaba določenega transgenskega organizma. Zakonodaja v razvitih državah tudi zahteva, da se pri razvijanju transgenskih živali za kmetijstvo upoštevajo etična merila, kar pomeni, da se je potrebno izogibati posegom, ki bi živalim povzročali trpljenje. Evropska unija je v nasprotju z ZDA ter velikimi latinskoameriški in azijskimi državami za veliko let zamrznila razvijanje in uporabo transgenskih kmetijskih

rastlin in živali. Ker se predvidevanja o škodljivih učinkih niso uresničila in so neodvisne znanstvene ustanove potrdile varno uporabo genske tehnologije, tudi Evropa postopoma opušča prepovedi. Gensko spremenjene poljščine so danes tudi že evropska stvarnost in Slovenija pri tem ne bo mogla ostati “izoliran otok”, seveda pa je naša dolžnost, da neprestano izvajamo učinkovit nadzor in pri tem sodelujemo z drugimi evropskimi državami.

Posebno poglavje so transgenske poskusne živali, ker so model za preučevanje bioloških zakonitosti in bolezni. Miška, v katero vnesejo mutiran gen, ki pri človeku povzroča neko bolezen, je transgenska miš, ki omogoča preučevanje nastanka, poteka in možnih postopkov zdravljenja te bolezni. Enako pomembne so tudi poskusne živali, ki jim izničijo oziroma inaktivirajo kakšen gen, zato, da bi spoznali njegovo vlogo. Znane so pod imenom “knock out”. Čeprav je številne poskuse že mogoče izvajati tudi s celičnimi kulturami, transgenske poskusne živali še naprej ostajajo nepogrešljive za preučevanja bolezni in njihovega zdravljenja.

### **Kaj je “gensko spremenjena hrana”?**

Živila, ki jih pridobimo iz gensko spremenjenih rastlin in živali (npr. paradižnikova mezga iz gensko spremenjenega paradižnika), živila, ki so gensko spremenjene rastline ali njihovi deli (npr. gensko spremenjeni paradižnik), in živila, ki vsebujejo gensko spremenjene organizme (npr. jogurt, izdelan z gensko spremenjenimi mlečnimi bakterijami), pogosto imenujemo “gensko spremenjena hrana”. V zadnjih letih so v številnih državah nekatere nevladne organizacije dosegle prepoved ali zamrznitev njene uporabe, največkrat z zelo populističnimi in demagoškimi prijemi. V Veliki Britaniji se je celo uveljavil vzdevek “frankensteinska hrana”. Trdili so, da so gensko spremenjena živila škodljiva za zdravje ljudi in da so posledice njihovega uživanja lahko dolgoročne, da se bodo škodljivi učinki pokazali šele po nekaj letih ali celo v naslednjih generacijah. Čeprav stvarnih dokazov za njihove trditve ni bilo in jih ni, so s strašenjem ljudi preglasili pojasnila strokovnjakov. Zadeva pa je veliko bolj preprosta, kot se zdi na prvi pogled! Vzemimo primer gensko spremenjenega paradižnika, v katerega so vnesli gen, ki nosi zapis za protein, ki preprečuje gnitje. Tak paradižnik lahko oberemo, ko dozori, in nobene potrebe ni več, da bi ravnali tako, kot je sicer v navadi: obiranje nezrelh plodov, nato prevoz do porabnikov in pred prodajo umetno zorenje v hladilnicah. V paradižniku je

zdaj nov, njemu tuj protein, ki se je znašel v množici nekaj sto tisoč paradižniku lastnih vrst proteinov. Ko ga použijemo, encimi v naših prebavilih razgradijo omenjeni protein, tako kot tudi vse druge, paradižniku sicer lastne proteine. Enako velja za tuji gen, ki smo ga vnesli v paradižnikov genom, med več deset tisoč paradižnikovih genov. Proteini se v naših prebavilih razgradijo do naravnih aminokislin in tudi "tuji" protein je bil sestavljen iz naravnih aminokislin. Gensko spremenjeni paradižnik je zato podvržen enakim merilom kot veljajo za vse vrste živil: ali je (ne)užitno, (ne)okusno, (ne)strupeno in (ne)vsebuje snovi, ki škodijo zdravju? Če se izkaže, da zadosti vsem zahtevam, ki opredeljujejo neko živilo, je enakovreden živilski proizvod. Lahko pa se zgodi, da bi bil za nekatere ljudi novi protein, ki ni prisoten v navadnem paradižniku, alergen: povzročil bi alergijski odziv organizma. Ti ljudje gensko spremenjenega paradižnika zato ne bodo uživali, podobno kot ljudje, ki so alergični na vrtno jagode, teh pač ne uživajo! Zato zakonodaja zapoveduje, da so gensko spremenjena živila primerno označena in se tako potrošnik zlahka odloči ali jih bo kupoval ali ne. Pri tem je zakonodaja celo strožja kot za druga živila, saj pri slednjih namreč sploh ne zahteva, da bi npr. jasno označevali na sadju in zelenjavi, s kakšnimi kemičnimi pripravki so bili obdelani med rastjo in pred prodajo! Pa čeprav so kemični pripravki, tudi v sledovih, dokazano škodljivi za zdravje, gensko spremenjena hrana pa ne! Tudi govorjenje o nekakšnih "dolgoročnih učinkih" gensko spremenjenih živil je nesmiselno! Zakaj? Nikoli se o "dolgoročnih učinkih" ne sprašujemo, ko prvič v življenju použijemo npr. banano ali kivi, pa čeprav pri tem v svoj organizem oziroma prebavni sistem vnesemo na tisoče novih proteinov, ki jih naše telo do tega trenutka ni poznalo. V primeru gensko spremenjenega živila pa med tisočeri že poznanimi proteini vnesemo samo enega novega! Uporaba gensko spremenjene hrane je tako stvar osebne presoje in zaupanja v strokovne službe, ki v skladu s predpisi skrbijo za neoporečnost živil.

### **Ali lahko z gensko spremenjenimi organizmi vplivamo na biološko pestrost?**

V načelu s pridobitvijo vsakega novega gensko spremenjenega organizma povečamo biološko pestrost. Seveda pa bi v primeru, ko bi novi organizem zaradi svoje premoči v okolju izrinil kakšnega sorodnika ali celo drugo vrsto (v borbi za prostor, hrano itn.), to negativno vplivalo na biološko pestrost. Zato so, kot že rečeno, pred izpustom katerega koli gensko spremenjenega organizma

v okolje potrebna dolgoletna preverjanja njegovih vplivov na okolje in zdravje. Ta preverjanja potekajo v popolnoma zaprtih laboratorijskih sistemih in šele na koncu v polodprtih ter nazadnje v strogo nadzorovanih odprtih sistemih. Do izrinjanja avtohtonih vrst je v preteklosti že prihajalo tudi brez vnosa gensko spremenjenih organizmov. Primer je nezakonit vnos rib rdečeperk v Cerkniško jezero; prav te ribe so pred tremi desetletji drastično zmanjšale populacijo ščuk. Rdečeperke so ščukam sicer dober plen, vendar tudi jedo njihove ikre. V Cerkniškem jezeru so našle izjemno dobre pogoje in so se namnožile prek vseh razumnih meja. Tisočletno ravnotežje med avtohtonimi kleni (ki so sicer tudi plen ščuk) in ščukami je bilo porušeno na škodo ščuk in klenov. Še usodnejši je bil primer vnosa potočne postrvi v porečje reke Soče, kar se je zgodilo pred dobrimi 100 leti. Potočna postrv je bila glede izbire hrane prilagodljivejša od avtohtone soške in se je zato hitreje razmnoževala. Usodno je bilo to, da se je tudi križala s soško postrvjo in križanci so iz generacije v generacijo pridobivali več lastnosti potočne postrvi, tako da je avtohtona vrsta iz porečja Soče skoraj izginila. Na srečo so pred nekaj leti v osamljenih pritokih Soče našli še nekaj populacij genetsko čiste soške postrvi, ki jo je sedaj mogoče vzgajati in razmnoževati v ribogojnici in z mladnicami ponovno naseljevati Sočo in njene pritoke. Nasprotniki genske tehnologije izpostavljajo, da bi z vnosom in izključno uporabo donosnejših gensko spremenjenih kmetijskih rastlin začeli zanemarjati tradicionalne vrste, ki jih je človek sicer pridobil v tisočletjih in stoletjih s križanji in selekcijo. Vseeno pa pri tem ne smemo pozabiti, da je na ta način počasi sam sicer povečeval biološko pestrost, vendar lahko tudi na račun divje rastočih vrst in ni vedno jasno, ali je bila vsota pozitivna. Vnos nove, gensko spremenjene sorte, ki bi bil pod nadzorom, načeloma ne bi bil drugačen od vnosa nove sorte, pridobljene na tradicionalen način.

## **Genska tehnologija in medicina**

### **Genetske bolezni in genske okvare**

Spremembe v nukleotidnem zaporedju genov lahko povzročijo spremembe v zaporedju aminokislin, ki sestavljajo proteine. Če okvare proteinov prizadenejo dovolj veliko število celic, se odražajo kot okvare metabolizma in okvare tkiv oziroma organov. Kadar se genske okvare zgodijo v zarodnih oziroma spolnih celicah



ali kadar prizadenejo vse celice zgodnjega zarodka, bo okvara prisotna v vseh celicah odraslega organizma in se bo tudi prenašala na naslednje generacije. Govorimo o trajnih genskih spremembah oziroma mutacijah, katerih posledica so *genetske bolezni*.

Če je okvarjen en sam gen in se okvara odraža v obliki bolezni, govorimo o *enogenskih (monogenskih) boleznih*. Primer je anemija srpastih celic. Kadar bolezen povzročajo okvare večjega števila genov, so to *večgenske (poligenske) bolezni*. Lahko pa na obliko neke bolezni (fenotip bolezni) poleg okvar genov vplivajo tudi drugi dejavniki, npr. dejavniki okolja; takrat govorimo o *večfaktorskih boleznih*. Nekdo ima npr. lahko poškodovan gen, katerega proteinski produkt zagotavlja nemoteno delovanje površinskih celic v pljučnih mešičkih; “manj škodljiva sprememba” se morda niti ne bo opazila, če oseba živi na Havajih, zelo pa bi bil bolnik lahko prizadet, če bi živel v kakšnem industrijskem mestu na severu Evrope – to je primer “večfaktorske” bolezni. Večgenske in večfaktorske bolezni so navadno zelo zapletene, saj so pri njih prisotne mutacije večjega števila genov, ki se jim v življenju lahko pridružijo še nove okvare v drugih genih.

*Primer enogenske bolezni je anemija srpastih celic. Normalna rdeča krvnička (eritrocit) je napolnjena s proteinom hemoglobinom. Ta je sestavljen iz štirih proteinskih podenot: dveh  $\alpha$  in dveh  $\beta$  podenot. Hemoglobin  $\alpha_2\beta_2$  veže štiri molekule kisika in ker je v eritrocitu veliko število njegovih molekul, je ta celica zelo dober oskrbnik telesnih tkiv s kisikom. V normalnem stanju ima lepo obliko nekoliko vgreznjene ploščice, diska (A). Mutacija v genu za  $\beta$  podenoti spremeni kodon 6. aminokislino, tako da ta ne kodira več polarne aminokislino (Glu), temveč nepolarni, hidrofobni valin (Val). Posledica te spremembe je, da pomembno območje v obeh  $\beta$  podenotah hemoglobina postane hidrofobno, “beži stran od vode” in se zato celotna struktura hemoglobina nekako skrči sama vase in skrčeni hemoglobini se med seboj sprimejo v skupke. Ker se to zgodi vsem hemoglobinom eritrocita, ta pridobi spremenjeno, srpasto obliko (B), ki se pri potovanju po kapilarah zatika, eritrociti se na ožinah med seboj*

*zlepijo, mašijo kapilare, to pa zaradi zmanjšane oskrbe s kisikom povzroča hude poškodbe tkiv. Zakaj se je bolezen kljub resnim posledicam prenašala iz roda v rod in se tako ohranila? Ker je naš genom sestavljen iz dveh nizov homolognih kromosomov imamo med vsemi ostalimi genkimi aleli tudi dve različici gena za  $\beta$  podenoto hemoglobina. Pri ljudeh, ki so imeli mutiran samo enega od obeh alelov, ni prihajalo do tako hudih težav in so preživali, saj so njihovi eritrociti poleg spremenjenih imeli tudi veliko število normalnih molekul hemoglobina in so zato bili (eritrociti) manj spremenjeni. Z navzočnostjo mutiranih hemoglobinov v svojih eritrocitih pa so pridobili še neko veliko prednost! V pokrajinah, kjer je navzoča malarija, jih povzročitelj te bolezni, krvni parazit plazmodij, ni mogel prizadeti, ker je zanj kri z eritrociti, v katerih je navzoč mutiran hemoglobin, neprimerno in neprijetno okolje. Tako so ti ljudje preživali in so mutacijo prenašali na svoje potomstvo.*

Številne večgenske bolezni so kombinacija podedovanih genskih mutacij in med življenjem pridobljenih genskih okvar: tak je na primer rak, kjer lahko podedujemo spremembe v nekaterih genih in te so zato navzoče v vseh telesnih celicah, vendar do bolezni pride le v primeru, ko neka telesna celica med življenjem po naključju doživi spremembe še v nekaterih drugih genih, kar ji skupaj podeli izjemne rastne prednosti pred ostalimi celicami prizadetega tkiva in organa. Celica se bo divje, nekontrolirano delila in sčasoma bodo njeni potomci (tumor) prerastli ostale celice organa. V tem primeru smo podedovali samo *nagnjenost k bolezni*, ne pa tudi bolezen samo!

Včasih je za nastop bolezni dovolj, če je poškodovan en sam genski alel: en sam alel celici ne zagotavlja dovolj potrebnega proteina; spremenjen protein je lahko za celico škodljiv, kljub prisotnosti normalnega iz drugega genskega alela; poškodovan je genski alel, ki se sicer v celici izraža dominantno. V teh primerih govorimo o *dominantni* genetski bolezni. Veliko pa je tudi tako imenovanih *recesivnih* genetskih bolezni, pri katerih morata biti okvarjena oba genska alela; kadar je okvarjen en sam alel, je oseba zdrava, saj nepoškodovani alel celicam zagotavlja dovolj potrebnega proteina. Taka oseba je samo prenašalec bolezni, saj je pri paru, kjer sta

oba partnerja prenašalca poškodbe v enem od obeh alelov nekega gena, verjetnost, da bo njun otrok bolnik (homozigot z mutacijo v obeh alelih), 25-odstotna; tudi verjetnost, da bo otrok zdrav (homozigot z obema nepoškodovanima aleloma), je 25-odstotna, medtem ko je verjetnost, da bo otrok sicer zdrav, vendar prenašalec bolezni (heterozigot z enim poškodovanim in enim normalnim alelom), 50-odstotna.

Danes poznamo blizu 6.000 bolezni, za katere menimo, da imajo genetsko osnovo. Če tem pridružimo še genske okvare večjega števila celic, ki se v življenju zgodijo zaradi izpostavljenosti mutagenim dejavnikom, je to število še večje. In če upoštevamo, da so tudi infekcijske bolezni "genske", saj mikroorganizmi napadejo naše celice in poškodujejo njihovo zgradbo, s tem pa lahko poškodujejo tudi njihov genetski material (virusi to počnejo neposredno!), potem lahko za veliko večino bolezni rečemo, da so posredno ali neposredno "genske". "Prave" genetske bolezni bremenijo najmanj 15–20 odstotkov otroških oddelkov bolnišnic po svetu. Ko se jim pridružijo še večgenske bolezni starejših ljudi, kot so sladkorna bolezen, rak, degenerativne bolezni živčevja ter bolezni srca in ožilja, vidimo, da je sodobna medicina z njimi zelo obremenjena. Bolnikom povzročajo neprijetnosti in trpljenje, hudo obremenjujejo svojce in so tudi veliko breme za družbo in njeno zdravstveno varstvo. Zato ni nič nenavadnega, da želimo imeti natančno in zgodnjo diagnostiko, učinkovito preprečevanje in v bližnji prihodnosti tudi čim več primerov uspešnega zdravljenja ljudi, ki trpijo za temi boleznimi.

### **Genska diagnostika temelji na fragmentiranju DNA in preiskavi dobljenih fragmentov**

Genska diagnostika temelji na dveh alternativnih postopkih genske analize: **hibridizaciji nukleinskih kislin** in verižni reakciji s polimerazo (**PCR**). Z obema v množici različnih DNA prepoznamo tisto, ki nas zanima – del molekule DNA (košček, fragment), ki nosi mutacijo.

Kaj je *hibridizacija nukleinskih kislin*? Pri obravnavanju strukture dvoverižne vijačnice DNA smo spoznali, da se vedno med seboj povežeta komplementarni verigi DNA. Zamislimo si, da verigi razklenemo (npr. s toploto ali z alkalijami), ju ločimo in v epruveti ohranimo samo eno od obeh verig. Če nato izdelamo umeten **košček** druge verige DNA, dolg npr. samo 50 nukleotidov, in ga damo v omenjeno epruveto, se bo na mestu, kjer si zaporedji odgovarjata, zaradi komplementarnega parjenja dušikovih

baz sprijel s prvo verigo – pravimo, da se je prilegel oz. *hibridiziral* s prvo verigo. Če ta košček DNA primerno označimo (npr. nanj pritrdimo fluorescirajoče barvilo ali neko molekulo z radioaktivnim izotopom), imamo možnost, da v neki raztopini v množici različnih **enojnih verig DNA** prepoznamo tisto, ki je v delu svojega nukleotidnega zaporedja komplementarna z omenjenim označenim koščkom DNA. V tem primeru “iskalnemu koščku DNA” pravimo “**DNA-lovka**”, “DNA-sonda” ali “DNA-proba”. Če DNA-sondo izdelamo tako, da je komplementarna tistemu delu molekule DNA, ki nosi neko **mutacijo** (povzročiteljico bolezni, ki jo preučujemo), bomo z njo “ulovili” omenjeni odsek DNA in ga nato lahko preiskali.

Alternativa temu postopku je **PCR**: v množici različnih molekul DNA bomo lahko našli tisto (ali del tiste), ki nas zanima, ko bomo v verižni reakciji uporabili oligonukleotidna začetnika, ki omejujeta samo iskano zaporedje DNA, ne pa tudi vseh drugih prisotnih – iskano DNA bomo s PCR pomnožili na izstopajoče veliko število enakih fragmentov, ki jih bomo zlahka razbrali med drugimi, nepomnoženimi DNA, jih od njih ločili in preiskali.

Temeljna metoda genske diagnostike je **elektroforeza**, saj omogoča ločevanje različno velikih molekul DNA. Če raztopino molekul DNA naneseemo na trden nosilec (gel iz polisaharida agaroze ali gel iz polimeriziranega akrilamida) in nosilec nato postavimo v električno polje, bodo molekule DNA, ki imajo zaradi fosfatov v hrbtenici strukture DNA negativen naboj, potovale proti pozitivnemu polu. Manjše molekule oziroma delci (fragmenti) DNA potujejo hitreje od večjih, in ko po določenem času elektroforezo ustavimo, bodo ti ločeni po velikosti.

Kako torej postopamo pri genski diagnostiki? Pripravimo si fragmente DNA, ki jo izoliramo iz celic bolnikovega tkiva, npr. iz levkocitov v njegovi krvi. Fragmente lahko pridobimo z restrikcijskim encimom, ki DNA razgradi na 500.000 – 1.000.000 različno dolgih fragmentov. Z elektroforezo jih ločimo po velikosti in z alkalijami pretvorimo v enoverižne. Iz gela jih nato odtisnemo na najlonsko folijo in to okopamo v raztopini, v kateri imamo označeno (npr. s fluorescentnim barvilom) sondo; izbrali smo tako, da se bo specifično prilegala fragmentu (hibridizacija!), ki nosi mutacijo, odgovorno za obravnavano bolezen. Recimo, da gre za delecijo nekaj

nukleotidov. V tem primeru bomo v bolnikovem vzorcu opazili krajši fragment od pričakovanega.

Pri postopku s PCR v raztopino, ki vsebuje vso celično DNA (vse kromosome), damo oligonukleotidna začetnika, ki omejujeta samo iskani odsek na eni od molekul DNA (kromosomov). Izvedemo verižno pomnoževanje s polimerazo in po reakciji molekule DNA ločimo z elektroforezo. Ko elektroforezni gel obarvamo z ustreznim barvilom, bomo na njem opazili samo liso, ki ustreza velikemu številu molekul pomnoženega fragmenta; nepomnožene velike molekule DNA bodo ostale v bližni začetnega položaja elektroforeze. Če obravnavamo enak primer kot zgoraj, torej delecijo, bomo tudi v tem primeru opazili krajši fragment od fragmenta, ki bi ga sicer pomnožili pri zdravi osebi.

### **Genska diagnostika je hitra in natančna.**

Načeloma danes raje uporabljamo diagnostični postopek s PCR, ki zahteva bistveno manj izhodiščnega materiala od pridobivanja fragmentov DNA z restrikcijskimi encimi. Teoretično bi za izvedbo PCR zadostovalo že nekaj celic, iz katerih bi pridobili DNA, vendar v praksi izhajamo iz malo večjih vzorcev, da si zagotovimo dovolj materiala za brežhibno izvedbo postopka. Ker imajo vse celice organizma enak genom, kar pomeni, da je mutacija, ki povzroča bolezen, prisotna v vseh celicah, DNA izoliramo iz najbolj dostopnega tkiva – nekaj mililitrov krvi oziroma levkocitov v njej. Dobro je, da primerjamo vzorec bolnika z vzorcem zdrave osebe oziroma z vzorci drugih družinskih članov – na ta način dobimo tudi informacijo o prisotnosti/odsotnosti mutacije v vsej družini. V primeru genske okvare, do katere je prišlo pri odrasli osebi in je omejena na določeno tkivo oziroma del organa, pa primerjamo vzorec obolelega tkiva z vzorcem zdravega tkiva iste osebe. Z natančno gensko diagnostiko lahko potrdimo bolezen, ki jo je včasih zaradi nejasnih kliničnih znakov težko opredeliti; govorimo o “klinični genski diagnostiki”.

Danes lahko kirurg na varen način z iglo odvzame tkivo, ki v maternici obdaja zarodek. Iz majhne količine tega tkiva lahko izoliramo DNA in opravimo gensko preiskavo. Govorimo o “predrojstveni diagnostiki”, katere odlika je v tem, da jo je mogoče opraviti v zgodnji nosečnosti in da je bistveno bolj natančna in zanesljiva od klasičnih encimskih preiskav. To vrsto diagnostike izvajamo pri družinah s tveganjem, kar pomeni, da je bolezen v družini prisotna. V primeru slabe napovedi

lahko zdravnik predlaga prekinitev nosečnosti. Seveda je zdravnik samo “genetski svetovalec”, katerega dolžnost je prizadeti družini razložiti pomen rezultatov genske preiskave, nikakor pa ne sme vplivati na njihovo odločitev, ki je od družine do družine lahko zelo različna – odvisna od družbenega ozadja, socialnega položaja, verskega prepričanja, tradicije ipd.

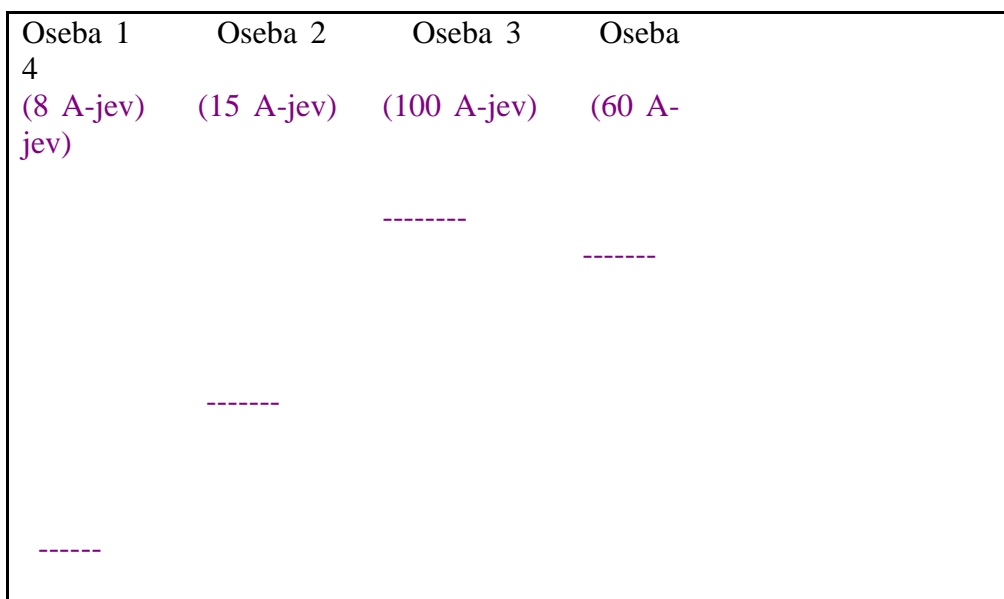
**Genske preiskave za potrebe sodne medicine in kriminalistike imajo v molekularni genetiki posebno mesto.**

Naš genom je velik približno 3 milijarde nukleotidnih parov. Imamo 30.000–35.000 različnih genov, ki zasedajo približno 1% njegovega “prostora”, in po lastnostih smo si zelo podobni, ne pa tudi enaki. Kriva je variabilnost človeškega genoma, kar pomeni, da se posamezniki med seboj bolj ali manj razlikujemo na vsakem 150.–300. nukleotidu. Večinoma gre za razlike v enem samem nukleotidu, ki so posledica sprememb v evoluciji. Za strukturo, splošne lastnosti in delovanje genoma nimajo nobenih posledic. Vsako zelo variabilno mesto (lokus) v genomu je uporabno za razlikovanje med posamezniki; tak lokus imenujemo *genetski označevalec* (genetski marker). Ljudje se zelo razlikujemo po celičnih površinskih molekulah, po katerih imunski sistem vsakega človeka takoj prepozna, ali je neko tkivo njegovo lastno ali pa tuje. Znan je problem presajanja organov, kjer morajo zdravniki najti darovalca, ki je glede celičnih površinskih (antigenskih) lastnosti čim bolj podoben prejemniku organa, da ne bi po presaditvi prišlo do njegove zavrnitve. Geni, ki kodirajo omenjene površinske proteine, so torej zelo variabilni in zato so jih dolga leta uporabljali kot označevalce razlik med ljudmi.

Spoznanja iz raziskave človeškega genoma so razkrila nove vrste genetskih označevalcev, po katerih se posamezniki še bolj razlikujemo. V današnjem času uporabljamo predvsem tako imenovane “mikrosatelite”, ki so zaporedja, v katerih se ponavlja en do nekaj nukleotidov: npr. –AAAAAAAAA- ali –ATATATAT- ali –CTACTACTACTA-, pri čemer je število omenjenih ponovitev zelo različno. Vzemimo za primer “mikrosatelit” –AAAAAAAAA-: vidimo, da gre za ponovitev osmih A-jev, vendar je to značilnost ene osebe; pri drugem bo ponovljenih A-jev morda 15, pri tretjem 100, pri četrtem 60 itn. Če bi omenjeno mikrosatelitsko zaporedje A-jev pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo in pomnoženi fragment od vsega drugega ločili z elektroforezo, bi dobili naslednjo sliko:

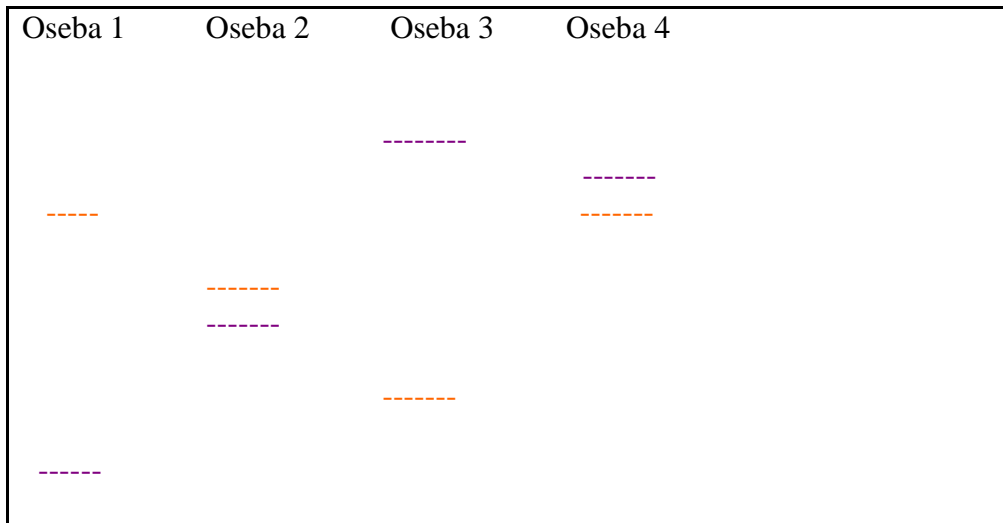
Zaradi poenostavitve smo predstavili primer, kot da bi bili vsi preiskovanci homozigotni za omenjeni mikrosatelit. V resnici je to skoraj nemogoče pri tako velikem številu alelov. Zato bi pravilna slika za vsako osebo prikazovala dva različno dolga alela; seveda pa bi se tudi v dvoalelni predstavitvi preiskovanci med seboj (še bolj) razlikovali.

Podobno poenostavitev smo naredili tudi pri naslednji sliki.



Vidimo, da smo z opisanim lokusom mikrosatelita A lahko razlikovali štiri osebe, vendar bi slej kot prej našli nekoga, ki bi imel omenjeni lokus enak npr. osebi 2; to pomeni, da osebe x ne bi mogli razlikovati od osebe 2. Zato bomo poleg omenjenega lokusa A uporabili še drug lokus oziroma drug mikrosatelit. Po verižni reakciji s polimerazo in elektroforezi bi verjetno ugotovili, da se tudi v tem primeru osebe med seboj razlikujejo (glej rdeče črtice, ki prikazujejo morebitne različne alele drugega mikrosatelitskega lokusa!). Če bi sliko drugega

elektroforeznega gela združili z zgornjo, bi dobili naslednji prikaz:



Z uporabo dveh različnih mikrosatelitskih lokusov oziroma označevalcev bi bila verjetnost, da bi našli dve osebi, ki bi se ujemali v obeh, bistveno manjša. Pri sodobnih sodnomoedicinskih preiskavah zato uporabljamo večje število različnih mikrosatelitskih označevalcev (ne samo različnih lokusov ene vrste mikrosatelita, temveč tudi različne vrste mikrosatelitov); z 9–12 različnimi mikrosateliti je verjetnost, da bi se dve osebi ujemali prav v vseh, manjša od 1 : 9 milijard. Ker nas je na svetu trenutno 6 milijard, je zelo malo verjetno, da bi se z genetsko preiskavo razlik med posamezniki zmotili.

Danes imamo na razpolago zelo občutljivo reakcijo PCR, s katero lahko pomnožimo dovolj nekega fragmenta DNA teoretično že iz ene same molekule DNA. Zato lahko izhajamo iz zelo majhnih količin bioloških vzorcev, iz katerih izoliramo DNA: kapljica krvi, krvni madež, las s koreninskim mešičkom, sled slin na cigaretnem ogorku ipd. Pri kriminoloških preiskavah primerjamo vzorec DNA žrtve, DNA iz biološke sledi na kraju zločina in DNA osumljenca. Pri testiranju očetovstva primerjamo vzorce DNA matere, otroka in očeta; otrok mora imeti “elektroforezne črtice” matere in očeta, v nasprotnem primeru možkega izključimo kot “biološkega očeta”. Podobno je pri preiskavah sorodstvene povezanosti, kjer morajo posamezniki imeti večje ali manjše število enakih “elektroforeznih črtic”. Genetske preiskave razlik med posamezniki naša sodna medicina in kriminalistika uporabljata že od leta 1995 naprej in sodišča jih priznavajo kot pomembno dokazno gradivo.



## Gensko zdravljenje

Gensko zdravljenje oziroma "genska terapija" pomeni, da iz genoma celice odstranimo okvarjeni gen in ga nadomestimo z nepoškodovanim, normalnim genom. Tega imenujemo *terapevtski gen*. Terapevtski gen pa lahko vnesemo v celični genom tudi na neko drugo mesto, ne da bi obenem odstranili okvarjeni gen. V prvem primeru govorimo o genskem zdravljenju z zamenjavo (substitucijska genska terapija), v drugem primeru pa o genskem zdravljenju z dodajanjem (aditivna genska terapija). Slednjega lahko izvajamo tudi z dodajanjem večjega števila kopij terapevtskega gena – v tem primeru govorimo o "povečanju genske doze". V vsakem primeru moramo za vnos terapevtskega gena uporabiti prenašalec (vektor). To so lahko spremenjeni (torej ne več patogeni) virusi, plazmidi ali lipidne kapljice (liposomi). Virusi in plazmidi lahko neposredno vstopijo v celico oziroma njen genom, liposomi pa se zlijejo s celično membrano in v notranjost celice sprostijo terapevtski gen. Pomembno je, da vektorji vstopijo v čim več celic obolelega organa. V primeru genskega zdravljenja odrasle osebe govorimo o *somatskem genskem zdravljenju*, kar pomeni gensko zdravljenje telesnih celic. Za razliko od tega je *gensko zdravljenje zarodnih celic* tisto, pri katerem terapevtski gen vnesemo v oplojeno jajčece oziroma v vse še nediferencirane celice zgodnjega zarodka. Zaradi njihovega majhnega števila uspešnost postopka zlahka preverimo.

Trenutno po vsem svetu poteka na stotine poskusov genskega zdravljenja genskih bolezni in okvar, vendar so pri kliničnih poskusih zdravniki previdni, saj je obvladovanje vgraditve terapevtskih genov v genom s homologno rekombinacijo še zelo pomanjkljivo. Zakonitosti človeškega genoma sicer spoznavamo vedno bolj, iz dneva v dan, a jih še vedno ne poznamo dovolj, da bi docela razumeli celični metabolizem, kako geni oziroma njihovi proteinski produkti vplivajo drug na drugega in kako bi se izognili vsem nevarnostim poseganja v genom ali celično strukturo. Z optimizmom lahko pričakujemo, da bo v naslednjem desetletju gensko zdravljenje začelo vstopati v klinično prakso kot ena od učinkovitejših metod zdravljenja genetskih bolezni in bolezni zaradi hudih genskih okvar, kot so rak, bolezni ožilja in srca, sladkorna bolezen in bolezni osrednjega živčevja.

V nasprotju s poskusi somatskega genskega zdravljenja pa so poskusi genskega zdravljenja zarodnih celic ljudi

prepovedani. Ne samo zaradi slabega obvladovanja same tehnike postopka in iz tega izhajajoče nevarnosti tudi za naslednje rodove, temveč tudi zaradi zadržkov, ki so izključno etični. Genski poseg v zarodne celice vnese spremembe v vse celice bodoče osebe in metode genskega zdravljenja omogočajo tudi "lepotne posege", ki niso namenjeni zdravljenju: npr. vplivanje na splošne telesne lastnosti kot so višina in oblika telesa, barva oči in las, inteligenca posameznika ... Splošno sprejetje genskih posegov v genom, na katere še nerojena oseba tudi nima nikakršnega vpliva, bi kmalu lahko privedlo do želja po izboljšanju privilegiranih skupin ljudi, kar je v nasprotju z našim razumevanjem enakosti med ljudmi in humane družbe. Seveda pa poskusi zarodnega genskega zdravljenja potekajo na številnih živalskih modelih, saj take raziskave pomenijo zelo učinkovito pot do bodočega zdravljenja genskih bolezni: uspešnost in varnost posega bo zaradi majhnega izhodiščnega števila celic mogoče preveriti in tako zagotoviti, da bo napaka v vseh celicah bodoče osebe odpravljena. Zelo verjetno je, da bo v prihodnosti, ko bomo postopke že zelo dobro obvladovali, za natančno določene primere dovoljeno tudi zarodno gensko zdravljenje.

### **Kloniranje sesalcev je novo področje znanosti, biotehnologije in veterinarske medicine**

Pred nekaj leti nas je osupnila vest o kloniranju prvega višjega organizma iz jedra telesne celice, ovčke Dolly. Do tedaj je veljalo prepričanje, da celic, ko so enkrat že diferencirane, ni več mogoče vrniti nazaj in iz njih znova ustvariti živ organizem. Ko se združita moška in ženska spolna celica (semenčica in jajčece), nastane iz dveh haploidnih genomov diploidni genom zigote, ki se med potovanjem po jajcevodu deli. V začetku je število celic majhno, vendar hitro narašča in po nekaj dneh, pred vgnezditvijo v steno maternice, jih je lahko že sto ali več. Še vedno so vse enake, nediferencirane in skupaj sestavljajo tako imenovano "blastocisto". Ko njihovo število naraste, se začnejo raporejati v več slojev; tiste na površini sprejemajo signalne molekule iz materinega krvožilja. Te sporočajo, kateri geni naj se izražajo. V naslednjem sloju sprejemajo celice že nekoliko "prefiltrirane" signale, poleg njih pa tudi signale, ki jih izločajo celice površinskega sloja. Ker se celice v različnih slojih tako znajdejo v različnih molekulskih okoljih, začnejo izražati različne gene in zato se spreminjajo po obliki in aktivnosti – diferencirajo se v različne celične tipe, tkiva in organe. V njih so aktivni

promotorji nekaterih genov, promotorji nekaterih drugih pa ne, ker ni več ustreznih molekulskih sporočil (rastnih dejavnikov, hormonov, aktivatorjev izražanja genov ...) ali pa so med razvojem zarodka doživeli kemijske spremembe (npr. metilacija nukleotidov). Pravimo, da so "zgodnji geni" opravili svojo vlogo in so pri odraslem organizmu "blokirani" oziroma "so zaspali"; do nedavnega je veljalo, da ne more več priti do njihovega vnovičnega delovanja. Nediferencirane celice zgodnjega zarodka oziroma blastociste so "vsezmogljive" (*omnipotentne* oziroma *totipotentne*), kar pomeni, da se iz vsake od njih lahko razvije poljubni celični tip, seveda ob primerni, specifični molekulski spodbudi. V nasprotju z njimi so nekatere telesne celice odraslega organizma lahko "mnogozmogljive" (*pluripotentne*), npr. celice kostnega mozga, iz katerih se lahko razvijejo različne vrste krvnih celic, ali "enozmogljive" (*unipotentne*) – take so matične celice tkiv, ki so potrebne za regeneracijo pri poškodbah, saj med delitvijo proizvedejo po eno matično celico in eno celico regenerirajočega se tkiva. Večinoma pa so "ničelno zmogljive" – gre za popolnoma diferencirane celice tkiv in organov. Totipotentne celice blastociste imenujemo tudi *zarodkove* (embrionalne) *matične celice* oziroma *izvirne celice*, medtem ko so pluripotentne in unipotentne telesne celice *odrasle matične celice*.

Škotski znanstveniki so dokazali, da je mogoče dednino poljubne odrasle telesne celice s primernim postopkom in v pravem okolju pripraviti do tega, da znova ustvari *omnipotentno* celico, iz katere lahko z vnovično diferenciacijo zraste popoln osebek, precej zvesta kopija darovalca izvirne celice. Kako je potekal postopek? Iz nekega organa (v opisanem primeru mlečne žleze) odrasle ovce A so odvzeli popolnoma diferencirano telesno celico, iz nje izločili jedro (vse kromosome celičnega genoma) in ga za kratek čas izpostavili kemikalijam in električnem polju, kar je povzročilo, da so se odstranile vse molekule, ki so blokirale izražanje zgodnjih genov – genom so "reprogramirali", ga vrnilo na izhodiščno točko, kakršen je bil v blastocisti ovce A pred njenim razvojem v odraslo žival. Nato so to jedro pod mikroskopom vnesli v izpraznjeno jajčece ovce B – iz njega so predhodno odstranili jedro, torej vso dedno zasnovo ovce B. Jajčece oziroma njegovo citoplazmo so namreč potrebovali kot "posodo" oziroma okolje z vsemi potrebnimi proteini in sporočilnimi molekulami, ki so potrebni za izražanje zgodnjih genov, delitev celice in nastanek blastociste. Blastocisto so nato vnesli v maternico tretje ovce, ovce C, v kateri se je ta razvila v ovčko Dolly. Dolly je bila klon

ovce A, saj je imela enako dednino kot njena telesna celica, katere jedro so uporabili.

Do današnjega dne so klonirali že nekaj vrst živali, vendar je uspešnost postopka še vedno zelo majhna. Zavedati se moramo, da je sama izvedba reprogramiranja jedra telesne celice zelo groba, čeprav ga zdaj izvajajo kar v sami odvzeti celici, ne da bi iz nje izločili jedro. V nekaj minutah ali urah nasilno reprogramiramo genom, ki se je počasi spreminjal vrsto let, vse življenje. Poleg tega imamo pred seboj genom odraslega organizma, "star genom", ki je v življenju doživel tudi številne mutacije, katerih postopno kopičenje povzroča bolezni, ki se pojavljajo v poznejšem obdobju življenja. Tudi samo izpraznjenje jajčeca in vnos reprogramiranega jedra je postopek, ki lahko nevidno poškoduje notranje celične strukture, kar se lahko pokaže pozneje kot slabše delovanje celic, tkiv in organov. Zato se veliko kloniranih živali rodi s telesnimi napakami, pri številnih pa pozneje v življenju odpovedo posamezni organi. Vseeno pa so znani tudi uspešni primeri kloniranja živali in rejci upajo, da bo že v bližnji prihodnosti to morda eden od načinov biotehnoške reprodukcije izjemnih živali.

Na telesne lastnosti pa ne vplivajo samo geni, temveč tudi okolje. Okolje je že notranje okolje (maternica) živali, v kateri se razvije klonirani osebek – je namreč drugačno od notranjega okolja, v katerem se je razvijala žival, darovalka telesne celice oziroma genoma: vsaj nekoliko drugačne, tako po količini kot po vrsti, so lahko spodbujevalne molekule, ki vplivajo na izražanje genov. Drugačno je seveda tudi življenjsko okolje, ki osebek spremlja vse življenje. Ko so klonirali domačo mačko, so pričakovali, da bodo vse klonirane muce imele enak vzorec kožuščka kot darovalka genoma, izkazalo pa se je, da so bili vzorci različni. Ta poskus je dokazal, da ni mogoče dobiti klonov, ki bi bili popolne kopije nekega osebk.

## **Uporaba genska tehnologije v medicini odpira etična vprašanja**

**Zanimiva je zgodba afriškega zdravnika Felixa Konotey-Ahulu, ki je povedal: »Rodil sem se v plemenu Krobo. Na vsaki roki sem imel po en prst več, kar je genetska nepravilnost, ki je v Gani prisotna enkrat na sto rojstev. Če bi se rodil nekaj kilometrov bolj v smeri jugovzhoda, na drugem bregu reke Volte, bi bila to velika sreča, saj bi plemenske starešine to**

**imeli za znak usode, ki mi namenja veliko bogastvo. Če pa bi me mati rodila nekaj kilometrov bolj v smeri severozahoda, za griči, vam tega danes ne bi mogel pripovedovati, saj bi me tamkajšnje pleme takoj po rojstvu utopilo. No, na srečo so bili moji Krobanci nevtralni kar se tiče dodatnih prstov, čeprav so si do vladine prepovedi tudi pri nas nekateri plemenski poglavarji jemali pravico odločati, kateri geni imajo pravico do življenja in kateri ne ...«.**

### **Ali je genska diagnostika etična?**

Vprašamo se lahko ali je genska diagnostika, posebno predrojstvena, tudi etična. Veliko zdravnikov meni, da ni etično napovedovati nastop bolezni, ki jih še ne znamo zdraviti. Mnogi iz verskega prepričanja nasprotujejo kakršnemu koli posegu "v življenje", čeprav lahko genska preiskava pove, ali bo prizadeti otrok sploh rojen živ. Drugi se spet bojijo, da bi genske preiskave, ki lahko poleg bolnikov ugotovijo tudi prenašalce genskih mutacij, pripeljale do razlikovanja ljudi na "bolj ali manj normalne".

Pa vendar! Zelo veliko je bolezni, ki jih povzroča večje število različnih mutacij v istem genu. Če lahko napovemo, da bo mutacija A povzročila blago obliko bolezni, mutacija B pa zelo hudo, je to vsekakor dragocen podatek, ki bo zdravniku svetovalcu omogočil, da bo prizadeti družini na primeren način pojasnil možnosti preživetja še nerojenega otroka. V primeru napovedi blage oblike bolezni se bodo najverjetneje odločili za rojstvo otroka, ki mu bodo s primerno oskrbo lahko zagotovili razmeroma kakovostno in tudi dovolj dolgo življenje, da bo morda celo dočakal uvedbo uspešnega genskega zdravljenja svoje bolezni. Prav tako ni nujno, da bi z obsežnimi preiskavami celih populacij, katerih namen bi bil identificirati prenašalce za neko pogostejšo in hudo genetsko bolezen, razdelili ljudi na dobre in slabe. Ob morebitnih porokah bi bili prenašalci vnaprej seznanjeni s tveganjem za njihovo potomstvo in številni bi tvorno sodelovali z zdravniki pri omejevanju bolezni, ki je pogosta in za družbo pogubna. Z genskimi preiskavami, katerih rezultate vzporejamo z obliko bolezni, se veliko naučimo tudi o samem molekularnem ozadju bolezni in oboroženi z novimi spoznanji bomo lahko uspešnejši pri iskanju boljših načinov zdravljenja.

### **Ali smemo preiskovati nagnjenosti do bolezni?**

Res je, z gensko preiskavo nekaterih recesivnih genov lahko pri posamezniku ugotovimo podedovano okvaro enega od obeh genskih alelov, medtem ko je drugi še vedno normalen. Oseba bo zbolela le v primeru, če v njenem življenju pride do mutacije še v drugem alelu istega gena. To samo po sebi ne bi bilo hudo, saj se lahko zgodi le naključno in v redkih celicah v množici vseh drugih. Problem nastopi takrat, ko inaktivacija obeh alelov povzroči rastno prednost prizadete celice nad drugimi. Ta celica se bo delila veliko hitreje in pogosteje, in končno bo število na novo nastalih celic dovolj veliko, da se bo odražalo kot funkcijska okvara prizadetega organa. Opisani pojav je pogost pri razvoju raka, boleznih srca, sladkorni boleznih itn.

Ali smo upravičeni, da z gensko napovedjo nagnjenosti k neki bolezni, za katero ni zagotovila, da bo do nje sploh prišlo, po nepotrebnem "strašimo" ljudi? Tudi tukaj imamo lahko dva nasprotujoča si odgovora! Za nekoga bi bilo spoznanje, da je nagnjen k hudi bolezni, lahko zelo stresno ter bi povzročilo potrnost in morda celo nerazsodne odločitve. Za nekoga drugega pa bi bilo to opozorilo, naj se v življenju izogiblje dejavnikom tveganja, spremeni način življenja in se pogosteje posvetuje z zdravnikom, ki bo že ob morebitnih prvih znakih bolezni vedel, za kaj gre, in znal tudi ustrezno ukrepati. Za večino bolezni, ki jih še ne znamo zdraviti, velja, da jih v začetku, če so odkrite dovolj zgodaj, vsaj zelo ublažimo in upočasnimo njihov potek.

Kaj pa delodajalci in zavarovalnice? Ali imajo pravico izvedeti za rezultate genske preiskave posameznika? Ali smemo na odvzetih tkivih opraviti vrsto genetskih preiskav brez vednosti dajalca tkiva? Načeloma ne, saj zakonodaja naprednih držav zapoveduje, da se vzorci tkiva nekoga lahko uporabijo izključno le za izvedbo preiskave, za katere namen so bili odvzeti. Z rezultati preiskave sme biti seznanjena samo oseba, ki je dala vzorec, in ona je tudi njihov izključni "lastnik". V večini primerov velja prepričanje, da delodajalci in zavarovalnice ne smejo naročati genskih testov, ker bi delodajalci lahko zavračali prosilce za zaposlitev, ki jim zaradi možnega nastanka bolezni ne bi ustrezali, zavarovalnice pa ne bi sklepale življenjskih zavarovanj za ljudi "s tveganjem". Pa vendar so tudi tukaj izjeme in tudi v tem primeru potekajo živahna soočanja nasprotujočih si stališč. Ali sme letalska družba, ki zaposluje pilota, vedeti ali je kandidat nagnjen k bolezni, ki lahko povzroči nenadno odpoved srca? Ali sme zavarovalnica za nekoga, ki se je nenadoma za zelo veliko vsoto življenjsko

zavaroval v korist svoji družini, preveriti, ali morda človek ne goljufa, saj ve, da bo skoraj gotovo čez nekaj let neozdravljivo zbolel? Prihodnost bo verjetno prinesla kompromisne rešitve; vsesplošna genetska testiranja (še) dolgo ne bodo mogoča. Verjetno pa bodo tudi izjeme, ki se bodo obravnavale od primera do primera, kot pri zgoraj omenjenem pilotu ali sumljivem zavarovancu – izjeme, za katere bo družba presodila, da so pomembne za njeno varnost. Gre za dileme sodobne družbe, pomembno pa je, da se o njih pogovarja čim več ljudi različnih poklicev, od znanstvenikov, zdravnikov, pravnikov, politikov, filozofov, družboslovcev, zgodovinarjev in duhovnikov do vseh, ki se jih omenjena vprašanja dotikajo. Samo na tak način je mogoče priti do soglasja, ki ga bo sprejela večina ljudi. In ob vsem tem se moramo zavedati, da “poseg v našo intimo” pomeni tudi vsaka preiskava naše krvi in drugih telesnih tekočin ali tkiv, pa tudi preiskava vida ali sluha, ki so že dolgo del našega vsakdanjika!

### **Kaj pa kloniranje človeka?**

Leta 2002 je italijanski porodničar Antonirakis napovedal kloniranje človeka, kar je po svetu takoj izzvalo vsesplošno nasprotovanje. Ne samo, da smo obsojali poskuse s človeškim življenjem v trenutku, ko metoda še zdaleč ni dognana in varna, obsodbe je bila deležna že sama misel na tako imenovano *reprodukcijsko kloniranje*. Je namreč v popolnem nasprotju s tem, kar pojmuje kot “človečnost”, ki jo zaznamuje nepredvidljivost, različnost in spoštovanje razlik. Ker smo različni, se zanimamo drug za drugega, želimo si ugajati, kar spodbuja našo radovednost in kreativnost. Kloniranje bi zadušilo omenjeni element našega obstoja. Pri naravni reprodukciji se tudi združita moška in ženska spolna celica, v katerih je že med njunim nastajanjem prišlo do prekrižanja kromosomov in izmenjavi dednega materiala ter s tem do popraviljanja obsežnejših napak (pravimo, da se genomi tako “pomlajujejo”). Po združitvi pride do kombinacij lastnosti zaradi različnega izražanja homolognih genov. Kloniranje bi take “osvežitve” genomov seveda odpravilo, zaradi česar bi se začele kopičiti okvare in mutacije in s tem tudi genetske nepravilnosti in bolezni. Iz omenjenih razlogov strokovna in splošna javnost odklanjata reprodukcijsko kloniranje človeka, ki je nesmiselno tudi zaradi prenaseljenosti planeta. Da bi poskusili vzgojiti čete poslušnih vojakov ali neukih delavcev je prav tako brez osnove, saj smo že dokazali, da popolnoma enakih klonov ni mogoče ustvariti; če bi nekdo želel narediti 100 klonov Hitlerja bi najprej potreboval 100 telesnih celic “izvirnega Hitlerja”,

ki bi že same bile nekoliko različne (možnost različnih sprememb v celičnem genomu), nato 100 mater, v katerih bi se razvijali klonirani zarodki (to pomeni 100 različnih notranjih okolij), nazadnje pa bi vseh 100 kloniranih otrok morali vzgajati 50 let in vsako sekundo življenja v popolnoma enakem okolju. Ker to ni mogoče, bi se na koncu lahko zgodilo, da bi imeli 95 mirovnikov in samo 5 diktatorjev, ki pa bi morda bili manj "uspešni" od izvirnika in bi vojno izgubili že po enem letu. Kloniranje bi se za pobudnika izkazalo kot zelo neuspešen in izjemno drag "podvig"! Kljub temu nekateri zdravniki razmišljajo, da bo nekoč v prihodnosti družba morda le dovolila izjeme, kot sta kloniranje otrok parom, ki jih po naravni poti ne morejo dobiti, ali pa "nadomestitev" edinega otroka, ki je v nesreči izgubil življenje. Kljub temu je ob vseh zgoraj navedenih pomislekih prihodnost reprodukcijskega kloniranja človeka močno vprašljiva!

Mnenja pa so si zelo nasprotujoča in različna glede tako imenovanega *terapevtskega kloniranja*, ki je v začetku, do stopnje blastociste, enako reprodukcijskemu, nato pa, namesto da bi zarodek razvijali naprej, iz blastociste odvzamemo nediferencirane onipotentne matične celice in njihov nadaljnji razvoj s primernimi spodbujevalnimi snovmi "v epruveti" usmerimo v načrtovani celični tip, npr. v jetrne celice. Na ta način bi lahko ustvarili jetrno tkivo, ki bi bilo primerno za presaditve. Seveda pa je še daleč do razvoja celovitega organa, ki je sistem različnih tkiv: samega jetrnega tkiva, ožilja, živčevja ... Nekoč v prihodnosti bi bolniku, ki bi npr. zbolel za neozdravljivo boleznijo jeter, oboleli organ odstranili in ga nadomestili z jetri, ki bi jih pridobili iz ene same njegove telesne celice (katere genom bi pred tem z genskim posegom lahko tudi "popravili"). Bolnik "svojega" organa seveda ne bi zavrnil, saj bi njegov imunski sistem ne imel opravlja s tujim organom.

Seveda se pri tem takoj zastavljajo etična vprašanja glede pridobivanja zarodkov s kloniranjem, njihove uporabe in predvsem, na kateri stopnji zarodka gre lahko še za "dovoljen poseg". In, ali je pridobivanje jajčec za potrebe kloniranja etično? Večje ali manjše odklanjanje kloniranja za terapevtske namene je odvisno tudi od tradicionalnega, družbenosocialnega, kulturnega in verskega ozadja družbe in posameznika. Katoliška cerkev se zavzema za popolno prepoved kakršnega koli poseganja v zarodek in kot "začetek življenja" obravnava že samo dejanje spolne združitve. Nekatera druga verstva so glede tega manj stroga, številni znanstveniki pa menijo, da o človeškem bitju lahko govorimo šele v trenutku, ko se začnejo



oblikovati osrednji živčni sistem in telesni organi. Ob vsem tem pa ne bi smeli pozabiti nauka, ki ga je dala ovčka Dolly – da je življenje večno, če ga le fizično ne prekinemo: vsaka naša telesna celica namreč nosi sposobnost, da se iz nje lahko razvije klonirani “zarodek”. Zato v biološkem pomenu besede pri kloniranju ne moremo govoriti o “začetku in koncu življenja”, govorili bi lahko le o začetku in koncu posameznega človeškega bitja, če bi “poskus” nadaljevali v ta namen.

Ker večina zakonodaj prepoveduje umetno ustvarjanje “zarodkov” s kloniranjem, v nekaterih državah znanstveniki vidijo začasno rešitev v raziskavah matičnih celic, ki jih lahko pridobijo iz normalnih zarodkov, ki ostajajo “neizkoriščeni” pri poskusih oploditve z biomedicinsko pomočjo (“otroci iz epruvete”). Seveda pa se pri tem ne bi mogli izogniti problemu zavračanja, s katerim bi se soočili pri presajanju na ta način pridobljenih tkiv in organov. V številnih državah pa na sploh odklanjajo kakršno koli uporabo zarodkov, tudi “neizkoriščenih” naravnih. Zato iščejo rešitve v odraslih (telesnih) matičnih celicah, ki bi jih vzgajali in iz njih morda uspeli razvijati različna tkiva.

Znanstveniki opozarjajo, da je ob sedanjem znanju uporaba zarodkov oziroma “zarodkov” za poskuse pridobivanja nadomestnih tkiv nujna, saj odraslih matičnih celic še ne znamo iz *uni-* ali *pluripotentnosti* preusmeriti v *omnipotentnost*, poleg tega pa jih veliko težje vzgajamo v laboratorijskih razmerah. Vsekakor pa se strinjajo, da bi bila uporaba “zarodkov” samo začasna rešitev, ki naj bi jo za namene terapijskega kloniranja čimprej nadomestila neposredna uporaba odraslih telesnih celic, pri kateri bi znali “blastocisto” ustvariti kar v epruveti, brez potrebe po jajčni celici. Seveda je tako kot pri uporabi genske tehnologije tudi tukaj potrebna široka in vsestranska javna razprava. Samo s pametnim dialogom med poučenimi ljudmi bomo namreč lahko prišli do najboljših sporazumnih rešitev vprašanj, za katere menimo, da so sporna. Čeprav je taka razprava za nekatere preuranjena, saj bo do razumevanja biologije matičnih celic potrebna še vrsta let raziskovanja na poskusnih živalih, je vseeno bolje, da se dileme razrešijo zgodaj in pravočasno. Medicina si namreč z razvojem omenjenih raziskav obeta velik korak naprej k uspešnemu zdravljenju telesnih poškodb in hudih bolezni sodobne civilizacije.

## Literatura

Chiras D.D.: Human Biology – Health, Homeostasis and the Environment, 3<sup>rd</sup> ed. Jones and Barlett Publishers, Boston, 1999.

Grant Cooper N. (ed.): The Human Genome Project – Deciphering the Blueprint of Heredity. University Science Books, Mill Valley, CA, 1994.

Mueller R.F., Young I.D.: Emery's Elements of Medical Genetics, 11<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2001.

Nelson D.L., Cox M.M.: Lehninger Principles of Biochemistry, 4<sup>th</sup> ed., W.H. Freeman and Company, New York, 2005.

Russel P.J.: Genetics, 3<sup>rd</sup> ed. Harper Collins Publishers, New York, 1992.

Strachan T., Read A.P.: Human Molecular Genetics, 2<sup>nd</sup> ed. BIOS Scientific Publishers Ltd., New York, 1999.