

Komentar Dr. sc. Branko Brdar

Poštovani,

Želio bi se uključiti u raspravu koja se odnosi na uspješan e-znanstveni sastanak pod naslovom: Primijenjena genomika u COVID-19. Osvrnut ću se na sintetsku biologiju koja uz genetsko inženjerstvo igra sve važniju ulogu u razvoju antivirusnih spojeva i cjepiva protiv multivarijantnih virusa. Ne mogu se oteti dojmu da je nekoliko laboratorija u Hrvatskoj, koji koriste ili bi mogli koristiti upravo spomenute tehnike (i ne samo ove), mogli iskoristiti stoljetnu šansu i krenuti u izradbu antikoronavirusnog cjepiva. Mislim da još nije prekasno.

Izvan je stanice virus (npr. poliovirus, koronavirus) inertna kemikalija koja je pročišćena do homogenosti i kristalizirana (poliovirus), čija su fizikalna i kemijska svojstva ustanovljena, a trodimenzionalna struktura riješena. Štoviše, poznavajući kemijski sastav (genomsku sekvenciju) i fizikalna svojstva (kristalnu strukturu) poliovirusa bilo je moguće kemijski izraziti virus sljedećom empirijskom formulom: C332.652 H492.388 N98.245 O131.196 P7.501S2.340 (Molla A, Paul AV, Wimmer E. Cell-free de novo synthesis of poliovirus. Science 1991;254:1647-51). Premda postoji mala praktična korist u opisivanju poliovirusa empirijskom formulom, ona uvjerljivo označava (oslikava) virus kao kemikaliju. Pravilnim poredanjem atoma nastaje virusna čestica visoke simetrije sa svim svojstvima potrebnim za njegovu proliferaciju i preživljenje u prirodi. Ta su svojstva kodirana u virusnom genomu, (+)jednolančanoj molekuli RNA poliovirusa od oko 7500 nukleotida, te koronaviруса od oko 30000 nukleotida.

Budući da je tehnički nemoguće kemijski sintetizirati RNA takvih veličina (dužina), ona je sintetizirana iz dvolančane DNA (informacija iz interneta), koristeći komercijalno sintetizirane komplementarne deoksioligonukleotide koji se mogu međusobno povezati na linearan način. Nakon mnogo koraka elongiranja lanca DNA dodavanjem novih deoksioligonukleotida, sintetizirana je genomski dvolančana komplementarna DNA (cDNA) od oko 7.500 (poliovirus)(Wimmer et al.) odnosno 30000 (koronavirus)(Becker et al. Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice PNAS 2008;105:19944-49) baznih parova, koja sadrži sve genetske informacije virusnog genoma RNA. Ta je cDNA prepisana u virusnu RNA pomoću polimeraze RNA faga T7, tvoreći infektivnu virusnu RNA. Sintetske se virusne RNA nasade (inokuliraju) u bez-stanični ekstrakt neinficiranih stanica-domaćina lišenih jezgara, mitohondrija i drugih staničnih organela osim ribosoma, gdje se prevode i repliciraju kao i u intaktnim stanicama, tvoreći virusne proteine i nove genome sve dok se ne postigne kritična masa virusnih proteina, kada se virusne čestice spontano samosastavljaju.

Novosintetizirani virusi, poput divljih tipova virusa, infektivni su i stvaraju čistine (plakove) na jednoslojnim stanicama-domaćinima u kulturi. Prema tome, kada jednom virus, kemikalija, uđe u živu stanicu posjeduje u nukleinskoj kiselini zapisan plan za preživljenje. Njegovo je umnažanje tada podložno evolucijskim zakonima: nasljeđivanju, genetskoj varijaciji (promjeni), evoluciji u različite podvrste (tipove).

Virus se dakle pokorava istim pravilima koja vrijede za živa bića. Podložan je seksualnoj reprodukciji, budući da se spremno rekombinira s virusnim potomstvom ili s drugim srodnim virusima, razmjenjujući genetsku informaciju (Wimmer 1993). S druge strane, virusi su isključeni iz klasifikacije kao živi entiteti, jer ne konzumiraju hranu i ne proizvode „otpad“ zbog manjka metabolizma te, kao unutarstanični paraziti, ovise o opskrbi energijom. Takve rasprave o „živom“ i „neživom“ postaju, međutim, bezvrijedne (jalove) uzimajući u obzir „vjerojatni slijed događaja (koraka) u povećanju kompleksnosti koji su morali karakterizirati tranziciju iz geokemijskog u biokemijski svijet“ (Hazen RM. Genesis. The scientific quest of life's origin. Washington DC. USA: Joseph Henry).

Postavlja se pitanje zašto se trudi kemijski sintetizirati cDNA kada se to može učiniti brže i jeftinije pomoću enzima (reverznom transkriptazom)?. Poruka je višeslojna: (i) virusi se mogu smatrati kemikalijama i kao takvi mogu se sintetizirati iz pristupačne informacije s lako dostupnim kemikalijama, a čitav proces rekreiranja virusa se može dogoditi izvan žive stanice; (ii) u usporedbi sa sekvencijom divljeg tipa genoma, sintetska poliovirusna cDNA sadržavala je 27 promijenjenih baza koje su namjerno uvedene u nukleotidni lanac kao genetski biljezi. Ta promjena baza nije utjecala na replikaciju virusa u stanicama HeLa. Jedna od mutacija, međutim, atenuirala je neurovirulenciju sintetskog virusa 10.000 puta u transgeničnim miševima podložnim (primljivim) na poliovirusnu infekciju (de Jesus et al. 2005). Dakle, poliovirusna sinteza pružila je vrijedne znanstvene podatke o genetici virusne patogeneze, omogućujući istraživanje novih strategija u razvoju vakcina (Mueller S, Papamichail D, Coleman JR Skiena S, Wimmer E. J Virol 2006;80:9687); (Becker et al. Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice PNAS 2008;105:19944-49).

Premda su točne sekvencije mnogih virusa RNA poznate, postoje slučajevi u kojima bi sinteza DNA mogla biti jedini način da se ustanovi točnost genomske sekvencije, kao što je to primjerice slučaj kod obnavljanja (resurekcije) arheoloških uzoraka virusa španjolske gripe iz 1918. (Tumpey TM et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza. Science 2005;310:77-80). Taj je virus s genetskim potpisom H1N1 uzrokovao u pandemiji gripe 1918. višemilionski pomor ljudi. Uzimajući u obzir stalnu opasnost od novih pandemija gripe, bilo je bitno da se obnovi španjolski virus gripe te da se ustanove molekularni mehanizmi kojima je ispoljavao smrtonosne učinke.

Zaključak: Biološkom sintezom koronavirusa mogu se po želji uvesti promijenjene baze u nukleotidni lanac, pružajući vrijedne znanstvene podatke o genetici virusne patogeneze i omogućujući istraživanje novih strategija u razvoju cjepiva.