

Biohakiranje u genetičkom inženjerstvu: mogućnosti i rizici

Katavić, Mario

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:985752>

Rights / Prava: [Attribution-ShareAlike 4.0 International/Imenovanje-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju

Mario Katavić

**Biohakiranje u genetičkom inženjerstvu :
mogućnosti i rizici**

Završni rad

Split, rujan 2020.

Ovaj rad, izrađen u Splitu, pod vodstvom doc.dr.sc. Ivice Šamanića, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnika biologije i kemije

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za Biologiju
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Završni rad

Biohakiranje u genetičkom inženjerstvu: mogućnosti i rizici

Mario Katavić

SAŽETAK

Biohakiranje je novi i široki pojam koji obuhvaća raznolike aktivnosti eksperimentiranja na živim bićima. Biohakiranjem u genetičkom inženjerstvu možemo smatrati različite eksperimente s genetičkim materijalom, koje najčešće izvode školovani stručnjaci i znanstvenici koji su napustili formalne znanstvene zajednice, ili to mogu biti i ljudi koji nisu educirani stručnjaci ili znanstvenici i koji se biohakiranjem bave iz hobija ili kako bi ostvarili svoje vlastite ideje u području biologije. Oni se često okupljaju u biohakerskim zajednicama, čiji cilj je smanjivanje razlika između znanstvenog svijeta i samog društva. Laboratoriji tih zajednica su mjesta gdje se zainteresirane osobe mogu upoznati s tehnikama i materijalima koji se mogu koristiti u istraživanju. Zainteresirani pojedinci putem interneta mogu naručiti sve potrebno kako bi mogli samostalno kod kuće izvoditi istraživanja. Brojni studenti se tijekom studiranja uključuju u istraživanja i projekte te čak natječu kroz natjecanje IGEM (engl. *International Genetically Engineered Machines*). Veliki broj ljudi može sudjelovati u različitim biohakerskim aktivnostima te time doprinijeti znanosti. Iako vođeno dobrom idejom, međutim, biohakiranje je povezano s nizom problema, otvara brojna pitanja i nekad se nalazi na granici ilegalnog djelovanja. Budući aktivnosti biohakera nisu obuhvaćene unutar formalnih znanstvenih okvira, te su bez nadzora i samim tim nesigurne zbog mogućih povezanih rizika i opasnosti, biohakiranje bi moglo doći u konflikt sa brojnim sigurnosnim zakonodavnim odredbama, te će zasigurno biti neophodno zakonski regulirati te aktivnosti, što su neke zemlje već i napravile.

Ključne riječi: Biohakiranje, Laboratoriji zajednice, otvorena znanost, sintetski Gene drive sustavi, sekvence DNA BioBricks, Metoda CRISPR/Cas9, "uradi sam" biologija, rizici i etička pitanja u biohakiranju

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad sadrži: 31 stranicu, 1 tablicu i 34 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: **Dr. sc. Ivica Šamanić**, *docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivica Šamanić**, *docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Dr. sc. Jasna Puizina, *redoviti profesor u trajnom zvanju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Splitu*

Dr. sc. Željana Fredotović, *docentica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Rad prihvaćen: rujan, 2020.

Basic documentation card

University of Split
Faculty of Science
Department of Biology
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

Thesis

Biohacking in genetic engineering: possibility and risks

Mario Katavić

ABSTRACT

Biohacking is a new and broad term that includes a large array of different experiments on living organisms. By biohacking in genetic engineering, we consider various experiments with genetic material, most commonly performed by educated professionals and scientists who have left formal scientific communities, or that they may be people who are not educated experts or scientists and who practice biohacking as a hobby or to pursue their ideas in the field of biology. They often gather in biohacker communities, whose goal is to reduce the gap between the scientific world and the society itself. Community labs (biohacker spaces) are places where interested persons are being acquainted with the techniques and materials that can be used in research. Interested individuals can order required materials online to be able to conduct research independently at home. Numerous students take part in research and projects during their studies and even compete through the IGEM (International Genetically Engineered Machines) competition. A great number of people can participate in various biohacker activities and thus contribute to science. Although driven by a good idea, biohacking is associated with several problems which raises a variety of questions and is sometimes on the verge of illegal activity. Biohacker activities are unsupervised and not covered by formal scientific frameworks which results in them being associated with risks and dangers. Moreover, biohacking could conflict with several security legislation. In the future it will certainly be necessary to legally regulate these activities and some countries have already done so.

Key words: Biohacking, Community laboratories, Open Science, Synthetic gene drive systems, BioBricks DNA sequences, CRISPR/Cas9 Method, do-it-yourself biology, risks and ethical concerns and biohacking

Thesis deposited in library of Faculty of science, University of Split

Thesis consists of 31 pages, 1 table and 34 references Original language: Croatian

Mentor: **Ivica Šamanić, Ph.D.** *Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split*

Reviewers: **Ivica Šamanić, Ph.D.** *Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split*

Jasna Puzina, Ph.D. *Full Professor of Faculty of Science, University of Split*

Željana Fredotović, Ph.D. *Assistant Professor of Faculty of Science,
University of Split*

Thesis accepted: September 2020.

IZJAVA

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom

Biohakiranje u genetičkom inženjerstvu: mogućnosti i rizici

izradio samostalno pod voditeljstvom doc. dr. sc. Ivice Šamanića. U radu sam primijenio metodologiju znanstvenoistraživačkog rada i koristio literaturu koja je navedena na kraju diplomskog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući naveo u diplomskom radu na uobičajen, standardan način citirao sam i povezao s fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Student

Mario Katavić

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. RAZRADA TEME	2
2.1. DIYbio – biohakerska zajednica	2
2.2. Laboratoriji zajednice (engl. <i>Community laboratories</i>)	3
2.2.1. Biohakerska istraživačka oprema	3
2.2.2. Primjeri biohakerskih laboratorija	5
2.2.2.1. Laboratorij Biocurious	5
2.2.2.2. Laboratorij Genspace	6
2.2.2.3. Laboratorij BioTehna	6
2.2.2.4. Hrvatski UR Institut	7
2.3. Projekt <i>Odin</i>	8
2.4. Organizacija IGEM	10
2.5. Sekvence DNA BioBricks	15
2.7. Metoda CRISPR/Cas	16
2.7.1. Primjeri primjene tehnike CRISPR/Cas9	19
2.7.2. Metoda CRISPR-Cas9 u svrhu biohakiranja	19
2.8. Sintetski <i>Gene drive</i> sustavi	20
2.9. Zakoni vezani za biohakiranje	22
2.10. Prihvaćenost biohakiranja u modernom društvu	23
2.11. Budućnost znanosti i biohakiranja	24
3. ZAKLJUČAK	27
4. LITERATURA:	28

1. UVOD

Biohakiranje, je relativno novija pojava koja se javlja u razdoblju između 2000. - 2008. godine, kao reakcija ili odgovor na veliku količinu znanstvenih informacija i materijala, prije svega biomedicinskih i biotehničkih, javno dostupnih putem interneta. Isto tako, biohakiranje se može sagledati dijelom i kao reakcija na smjer u kojem je moderna biologija krenula u nekim dijelovima svijeta. Profit i privatizacija znanosti, nemogućnost liječenja modernim pametnim lijekovima, pogotovo u SAD, dovele su do pojave jedne vrste bunta u društvu i željom za „Otvorenom znanosti“ dostupnom svima. Taj „pokret“, o kojem ću pisati, nastoji omogućiti biohakerima alate da riješe probleme s kojima se susreću, u smislu povećane privatizacije genetičkog istraživanja radi patenata i drugih oblika restrikcije pristupa podacima. Iako vođeno dobrom idejom, međutim, biohakiranje je povezano s nizom problema, otvara brojna pitanja i nekad se nalazi na granici ilegalnog djelovanja te je generalno gledajući „siva zona“.

Biologija se zbog takve promjene u društvu počinje sve više odvijati u prostoru veće dostupnosti podacima i alatima, strožim politikama i intelektualnim pravima. Nastoji se više otvoriti prema novim sudionicima kao što su „građanski“ znanstvenici, razvojni (start-up) projekti i (internetske) online platforme za razmjenu znanja. Takvi oblici istraživanja igraju ključnu ulogu u biohakiranju.

Biohakeri se nastoje boriti protiv velikih troškova i raznih restrikcija koje onemogućavaju pokretanje istraživanja, poput astronomske cijene postavljanja biomedicinskog laboratorija, povećane složenosti samog istraživanja, obaveznog obrazovanja za sam rad na fakultetima ili u laboratorijima ili legalne i tehničke prepreke za pristup biomedicinskim podacima. Zbog toga, sve veći broj ljudi želi znanost (samim tim i biologija) vratiti svojim korijenima kad je bila etički vođena i njezini rezultati su bili dijeljeni u ime jednakosti i općeg dobra.

Biohakeri svakodnevno smišljaju nove načine (trikovima, engl. *"hackovima"*) smanjivanja razlike između velikih bio-tvrtki i običnog čovjeka, od stvaranja jeftinih alternativa skupim aparatima do organiziranja radionica u koje se mogu priključiti svi, bez obzira na stupanj obrazovanja kako bi biologija bila dostupna svima.

Postoji nekoliko načina na koje se ljudi odlučuju uključiti u biohakiranje:

- "Uradi-sam" biologija (engl. *Do-It-Yourself Biology*) uključuje ljude koji proučavaju biologiju pojedinačno ili u manjim skupinama koristeći iste istraživačke tehnike kao i tradicionalni laboratoriji.
- "Grinder Biohacking" gdje ljudi mijenjaju svoja tijela kibernetским implantatima.
- "Uradi sam" genska terapija (engl. *Do-It-Yourself Gene Therapy*) privlači pojedince spremne da utječu na svoju nasljednu genetičku informaciju.
- Nutrigenomika prati promjene genske ekspresije potaknute određenim prehrambenim navikama.

2. RAZRADA TEME

2.1. DIYbio – biohakerska zajednica

Počeci biohakiranja se mogu povezati s aktivnošću skupine *Critical Art Ensemble* ranih 2000-ih. U svom performansu „*Free range grain*“ (u slobodnom prijevodu „žitarice slobodnog uzgoja“) dopustili su publici da testira hranu koristeći osnovne tehnike molekularne biologije, u smislu otkrivanja da li je hrana kontaminirana GM usjevima i time protestirali protiv tadašnjih zakona o hrani.

Rob Carson, fizičar koji radi na području genetike napisao u članku u časopisu *Wired* (američki mjesečnik i najutjecajnija tiskovina iz područja razvojnih tehnologija, informatičke tehnologije, i cyber kulture) kako predstoji doba bioloških istraživanja u garaži (engl. „*the era of garage biology is upon us*“) (Carlson, 2005). On je radio u laboratoriju na Kalifornijskom sveučilištu Berkley-u i bio je jako inspiriran kompjuterskom revolucijom koja se dogodila u garažama, poput priče o Steve Jobs-u. Smatrao je da je sličnost između informatike tada i biologije danas neupitna. Tri godine kasnije nastao je DIYbio.

DIYbio (engl. *Do-it-Yourself Biology*) je mreža amatera biologa koja je nastala u Bostonu 2008. godine i danas je sastavljena od velikog broja zajednica po cijelom svijetu. Njihov glavni cilj je omogućiti svakoj zainteresiranoj osobi prostor, opremu i drugo sve potrebo za istraživanje na području biologije u opuštenoj atmosferi. Takozvana „Građanska biologija“ (engl. *Citizen Biology*) se provodi na raznim razinama složenosti, od srednjoškolskog znanja te jednostavnih eksperimenata do pravih projekata iz područja biologije, koje se odvijaju izvan fakulteta i službenih laboratorija. Glavni cilj tog pristupa je prikazati biologiju kao nešto čime se svaka osoba može baviti te da ona zapravo nije toliko složena koliko se čini. Prema tome, sve se može vrlo lako pojednostaviti i osoba se isto tako može brzo uključiti u projekte te imati osjećaj da doprinosi znanosti. Prostori kojim se oni koriste nazivaju se „Laboratoriji zajednice“ (engl. „*community laboratories*“).

2.2. Laboratoriji zajednice (engl. *Community laboratories*)

2.2.1. Biohakerska istraživačka oprema

„Laboratoriji zajednice“ ili „prostori za biohakiranje“, usporedno s laboratorijima kakve imamo na fakultetu ili u većim biološkim tvrtkama, slabije su opremljeni. Razlog tomu je manjak sredstava i potrebne dozvole za kupnju instrumenata i kemikalija. Usprkos tome, zadnjih par godina „Laboratoriji zajednice“ uznapredovali su zbog veće dostupnosti računalne strojne opreme za biološka istraživanja iz otvorenih izvora (engl. *open source hardware*) te povećanja dostupnosti informacija unutar same biološke zajednice. Kako bi osigurali sigurnost svojih istraživanja, Laboratoriji zajednice moraju minimalno zadovoljiti uvjete za ograničenu upotrebu GMO u zatvorenim sustavima (razina biološke sigurnosti 1, engl. *Biosafety level 1*, BSL-1). Pri tome usko surađuju s vlastima da bi primjenili sve sigurnosne i zdravstvene propise.

Biohakerska zajednica DIYbio u svojim laboratorijima često radi jednostavnije metode, poput izolacije DNA ili uzgoja bakterija s kemikalijama i alatima iz svakodnevne upotrebe kao što su detergentski ili centrifuge kućne izrade (Slika 1). Takvi eksperimenti, iako veoma jednostavni, dobar su uvod u svijet biohakiranja za početnike te stvaraju određenu dozu zainteresiranosti pojedinca za eksperimentiranjem. Neki od naprednijih projekata uključuju DNA kloniranje s PCR tehnologijom, gel elektroforezu ili proizvodnju genetski modificiranih bakterija kroz rekombinantnu tehnologiju DNA. Zbog smanjenja troškova samih projekata biohakeri su razvili par instrumenata koji su slobodno dostupni (engl. *open source*).

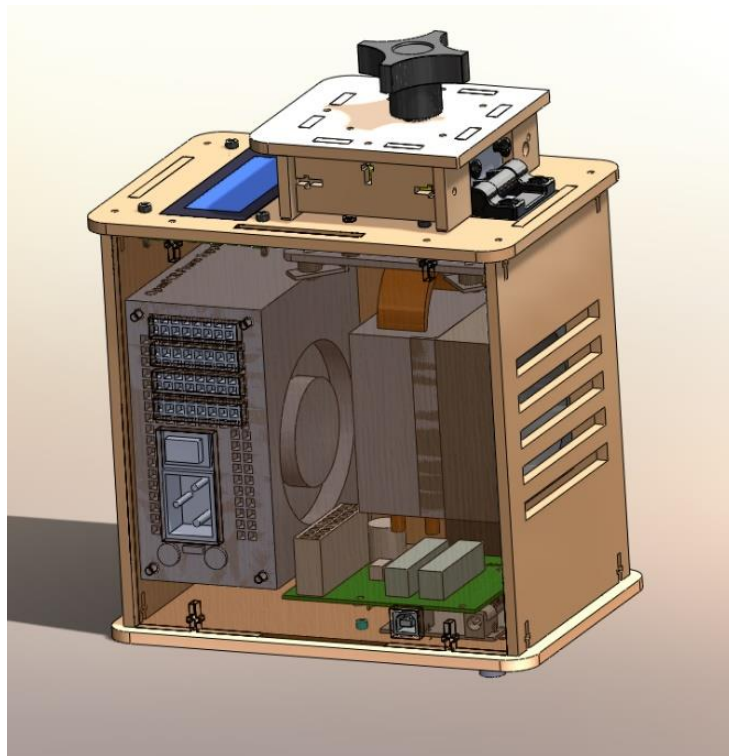


Slika 1. Centrifuga Dremelfuge (preuzeto sa:

<https://cdn.hackaday.io/images/7833321520876538964.png>).

Centrifuga Dremelfuge (Slika 1) može se koristiti s običnom bušilicom a sam dizajn se može preuzeti s interneta i proizvesti uz pomoć 3D printera.

OpenPCR (Slika 2) je uređaj za umnožavanje sljedova DNA lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR) koji se može naručiti za znatno manju cijenu u odnosu na komercijalni PCR termocikler . Samo sastavljanje uređaja se obavlja samostalno te se upute dobiju uz njega. Međutim, uređaj OpenPCR, za razliku od komercijalnih pruža samo 16 mjesta za uzorke u grijaćoj ploči u odnosu na 96 mjesta kod komercijalno dostupnih termociklera..



Slika 2. Uređaj OpenPCR za umnažanje uzoraka DNA lančanom reakcijom polimerazom (preuzeto s <https://s3-us-west-2.amazonaws.com/oww-files-public/8/8c/OpenPCR.jpg>).

MinION je mali prijenosni DNA sekvenator (Slika 3) koji se može priključiti na laptop. Relativno je jeftin te uz pomoć softvera MinKNOW podatci se mogu analizirati tijekom samog sekvenciranja.



Slika 3. Prijenosni sekvenator MinION (preuzeto sa <https://scx1.bcdn.net/csz/news/800/2015/minidnaseque.jpg>)

2.2.2. Primjeri biohakerskih laboratorija

Navedene inovacije omogućile su otvaranje sve više laboratorija takve vrste u svijetu, primjerice *Sprout*, *GenSpace*, *Biocurious* u SAD-u, *La paillase* u Francuskoj, *BioTehna* u Sloveniji.

2.2.2.1. Laboratorij Biocurious

Laboratorij *Biocurious* smješten je u Silikonskoj dolini. Omogućava učlanjivanje koje uključuje i osobni prostor u laboratoriju za vlastite pokuse. Imaju par vlastitih projekata kao što je veganski sir, u kojem se kvasac genetički modificirao tako da stvara mliječne proteine. Zatim, dodaju vodu i ulje čime proizvode mlijeko iz kojeg proizlazi sir.

Također imaju projekt nazvan „Inzulin svima dostupan“ (engl. *Open Insulin Projekt*) u kojem nastoje optimizirati protokol za ekspresiju inzulina u genetički promijenjenom kvascu. Namjera je da bilo tko s malo novca može napraviti vlastiti laboratorij kod kuće, te po njihovim uputama proizvoditi inzulin. Takav projekt je potreban jer cijena inzulina raste sve više.

Sličnim projektima može se bilo tko priključiti bez obzira na dob i znanje.

2.2.2.2. Laboratorij Genspace

Laboratorij *Genspace* smješten je u New York-u, pruža priliku svakoj osobi koja ima želju za znanstvenim istraživanjem da stekne osnovne vještine i znanja za rad u laboratoriju. Također, daje mogućnost učlanjenja u sam laboratorij kojim se dobivaju različite pogodnosti kao što su osobni prostor, mogućnost naručivanja kemikalija i korištenje opreme. Laboratorij uz to ima razne edukativne radionice u kojem se polaznici upoznavaju s osnovama rada u laboratoriju, kako modificirati gene metodom CRISPR-CAS9 ili kako napraviti vlastiti inkubator. Uz edukacijske radionice, laboratorij također ima i neke vlastite projekte kao što je optogenetika, genetički alat kojim stanice postaju osjetljive na svjetlo. Cilj je napraviti optogenetički sustav te zatim s njim kontrolirati gensku ekspresiju. Postoji projekt iz područja sintetičke biologije u kojem nastoje proizvesti kompleksne proteine (engl. *OpenPlant collaboration*) u jetrenki *Marchantia polymorpha*, koja je idealan organizam za takve pokuse zbog svoje kozmopolitske rasprostranjenosti i brzog životnog ciklusa.

2.2.2.3. Laboratorij BioTehna

Laboratorij Biotehna pruža edukativne, znanstvene i umjetničke projekte. Projekti u laboratoriju su usko povezani s ekshibicijskim programom u galeriji Kapelica. Laboratorij je opremljen kao znanstveni laboratorij, njegova primarna svrha je povezati znanstvenike, umjetnike i druge zainteresirane članove. Cilj je umjetničko istraživanje živih organizama, u kojem umjetnici uz pomoć znanstvenika razvijaju projekte koji žele istraživati korelaciju prirode i tehnologije. Jednom tjedno BioTehna organizira otvorena vrata tijekom kojih bilo tko zainteresiran ih može posjetiti i uvidjeti kako biotehnologija utječe na svakodnevni život. Tijekom otvorenih vrata na raspolaganju su znanstvenici i umjetnici koji upoznaju zainteresirane za tehnike, projekte i rado odgovaraju na bilo kakva pitanja kako bi ljudima pomogli u ostvarivanju njihovih osobnih ideja. Također BioTehna organizira radionice i otvorena vrata za djecu i mlade koji žele znati nešto više osim onog što im škola pruža. U okružju koje potiče raznolikost, kreativnost i inovaciju mladi mogu eksperimentirati i sami dolaziti do vlastitih saznanja i spoznaja. Primjer jednog od njihovih projekata je "Vivarium". Projekt je posvećen istraživanju različitih oblika simbioza između životinja, biljaka i tehnologije. Nastoje napraviti hidroponsku farmu, gdje biljke uz pomoć senzora pozicioniranih u akvariju s ribama dobivaju nutrijente koje im dodaje robot pauk.

Laboratoriji takve vrste odlična su startna točka za ljude koje zanima biohakiranje. Tu se mogu u sigurnom okruženju upoznati s raznim tehnikama, s korištenjem opreme u laboratoriju, odnosno, naučiti od osoba s iskustvom kako pravilno izvoditi pokuse te ih dokumentirati. Ovakvi prostori su namijenjeni da bi se povećalo zanimanje ljudi za znanost te pokazalo ljudima kako postoji „biologija za svakoga“, koja za istraživanja i projekte ne zahtjeva akademsko zvanje te skupu opremu. Osoba nakon upoznavanja sa tehnikama rada i stečenim znanjem može s interneta naručiti osnovni pribor te sama započeti vlastite projekte u okruženju svojega doma. Uz samo educiranje zainteresiranih budućih biohakera, laboratoriji kroz radionice ili dane otvorenih vrata upoznavaju širu javnost s novim inovacijama u području biologije kao i mogućom širom biotehnološkom primjenom u budućnost. Što se javnost bolje upozna s biotehnologijom to će ju u budućnosti bolje i prihvatiti.

2.2.2.4. Hrvatski UR Institut

Hrvatski Univerzalni Istraživački Institut za primijenjena znanstvena istraživanja, razvoj društveno korisnih inovacija i vezanu edukaciju je neprofitna organizacija koja se financira većinom iz donacija istraživača i članarina. Također imaju i javne izvore financiranja, prijavljuju se na razne javne natječaje, projektne natječaje i natječaje europskih fondova. Njihov glavni cilj je putem razvoja istraživanja, inovacija i edukacije doprinijeti razvoju suvremenog održivog društva. UR Institut zapravo je mjesto gdje zainteresirani mladi ljudi provode eksperimente pod stručnim vodstvom, gdje se potiču da razvijaju svoju znanstvenu kreativnost. Osim same edukacije Institut radi na više projekata. Imaju tri projekta bazirana na mikrobnjoj celulozi. To je nano materijal koji proizvode bakterije, nanometarski tanka vlakna čiste celuloze. Upotreba tog materijala u bioelektronici i biomedicini je potpuna inovacija na globalnoj razini (<http://old.dubrovniknet.hr/novost.php?id=52948#.X2CHEmgzaUk>).

Ta tri projekta su :

a) **Projekt proizvodnje zvučnika i mikrofona**

Ovakav tip zvučnika ima prednost radi lakše i potpuno čiste proizvodnje, bolje kvalitete u odnosu na tradicionalne proizvode, a cijeli proces proizvodnje i zbrinjavanja otpada nakon proizvodnje je potpuno čist te bez nusproizvoda koji bi zagadili prirodu.

b) **Projekt sintetske kože za robote**

Sintetska koža koja imitira ljudsku kožu, štiti robota od oštećenja, a ima i sposobnost regeneracije.

c) **3D podloga od nanometarskih tankih vlakna i metoda uzgoja zamjenskih ljudskih organa.**

Dugoročni projekt koji zahtjeva velika financijska sredstava te materijal.

2.3. Projekt *Odin*

Mnogi biohakeri koji nemaju lokalne laboratorije traže internetske (online) izvore znanja i materijale za eksperimentiranje. Stoga na internetu često dođu u kontakt s firmom *Odin*, koju je osnovao Josiah Zaynor, inače doktor biofizike, koji je napustio posao u NASI i pokrenuo vlastitu tvrtku *the Odin* (<https://www.vox.com/future-perfect/2019/5/19/18629771/biohacking-josiah-zayner-genetic-engineering-crispr>). Firma omogućava nabavu materijala za eksperimentiranje, s posebnim naglaskom na komplete za ciljanu gensku korekciju metodom CRISPRCas9 te također putem interneta nudi predavanja povezana s biohakiranjem. Težina predavanja varira od početničkih do zahtjevnijih. Preko stranice je moguće naručiti sve što je potrebno da bi se napravio mali laboratorij kod kuće.

Njihov komplet opreme za genetsko modificiranje uključuje (Slika 4):

- PCR uređaj
- mikrocentrifuga s 10 000 okretaja u minuti
- PCR tubice
- 3 pipete laboratorijske kvalitete
- plastični nastavci za sve 3 pipete
- kutija za elektroforezu s češljem
- izvor napona struje

- stalak za epruvete
- 10g agaroze
- 50g TAE Buffer mix (27g Tris Baze/23g tris acetat/ 0,5g EDTA)
- 5g Kanamycin sulfat
- 5g Ampilicin sodium
- 40g LB agar
- 20g LB medija
- 28 petrijevih zdjelica
- vaga
- transiluminator s izvorom plavog svjetla
- 5 x 15ml tubice
- 5 x 50ml tubice
- svjetlosno aktivirane bakterije pDusk, pDawn
- genetski modificirane bioluminiscentne bakterije pJE202
- 100uL boje GelGreen (10,000 x)
- 1000uL 2x Taq Master mix
- 200uL boje za nanošenje uzoraka na gel (engl. *Gel loading dye*)
- 100uL standarda za određivanje veličine uzorka, 100bp (engl. *DNA Ladder*)
- set za genotipiziranje
- sva potrebna dodatna oprema, kemikalije i biomaterijal za pokuse korištenjem CRISPR/CAS9 tehnologije
- Stručna predavanja iz biohakiranja

Narudžbom ovakvog kompleta moguće je samostalno započeti vlastite projekte te nadopunjavati potrošni materijal putem internetske stranice. Također, postoji i manji kompleti kojima je cijena znatno manja, ali i s njima je moguće provoditi projekte koji uključuju genetsko modificiranje. Namjera je omogućiti ljudima da samostalno obavljaju pokuse i projekte te time doprinose znanstvenom svijetu.



Slika 4. Komplet opreme za biohakiranje (preuzeto sa https://cdn10.bigcommerce.com/s-89v4ku3/products/170/images/511/MolecularBioKit2__43940.1485299000.1280.1280.jpg?c=2).

2.4. Organizacija IGEM

IGEM (engl. *International Genetically Engineered Machines*) je organizacija u sklopu koje se studentski timovi iz cijelog svijeta natječu u izradi „bioloških strojeva“. Ti „strojevi“ su zapravo mikroorganizmi koji su toliko promijenjeni genima drugih organizama da se mogu nazvati novim i originalnim mikroorganizmima, koji obavljaju određene i predvidljive zadatke koje inače taj organizam ne obavlja.

Neki od projekata koji su predstavljeni na natjecanju su: bakterije koje detektiraju razinu arsena u pitkoj vodi, bakterije koje su formirale tanak biofilm na kojem su vizualni uzorci i slike nanijete kao na fotografskom filmu, mikroorganizmi koji proizvode hemoglobin koji može zamijeniti crvene krvne stanice u hitnim transfuzijama ili bakterija *E. coli* koja izlučuje peptid koji potiskuje apetit. Svi ti novi mikroorganizmi su izgrađeni iz standardiziranih genetičko-molekularnih dijelova, već postojećih genetičkih blokova (engl. *BioBricks*), koji se mogu presložiti u skoro bilo koju kombinaciju. Uz to svi ti dijelovi su spojeni po već standardnom

protokolu. Želja organizatora je da u genetskom istraživanju dođe do jedne vrste standardizacije genetičkih dijelova i protokola izrade samih organizama.

Znanstvenici su u prošlosti koristili organizme onakve kakvi su nastali tijekom svog evolucijskog razvoja. U današnje vrijeme moguće je isplanirati model organizma, dizajnirati ga, stvoriti ga po svojim idejama i očekivati da radi po genetičko-molekularnim uputstvima. U nekom smislu riječi bili bi to biološki strojevi. IGEM je ideja koju je razvilo privatno istraživačko sveučilište MIT (engl. *Massachusetts Institute of Technology*) u američkom gradu Cambridge, s ciljem da se što veći broj fakulteta, u nekom obliku natjecanja, uključi u izradu genetskih dijelova i kreiranja samih organizama. Natjecanje su modelirali po uzoru na studentska natjecanja iz robotike, koja su bila jako uspješna u privlačenju studenata.

Prvo natjecanje ove vrste je održano 2004. godine te je uključivao 5 timova. Timovi su započeli svoje projekte u ljeto 2004. godine te se sastali u mjesecu studenom da bi podijelili svoje rezultate.

Tim Sveučilišta Princeton osmislio je sustav sastavljen od triju stanica koji bi nakon detekcije određenog slijeda uputa reagirao opuštajući određenu molekulu, u ovom slučaju žuti fluorescentni protein (engl. *Yellow fluorescent protein*, YFP).

Tim s kalifornijskog Caltech-a (engl. *California Institute of Technology*) htio je dizajnirati vrstu kvašćevih gljivica koja može otkriti različitu koncentraciju kofeina u kavi.

Tim Sveučilišta u Bostonu udružio se s Harvardom s namjerom produkcije stanica koje bi se mogle prebrojati.

Tim Sveučilišta Texas u Austin-u odlučio je napraviti *E. coli* biofilm koji bi snimio nešto što bi se moglo nazvati biološka fotografija.

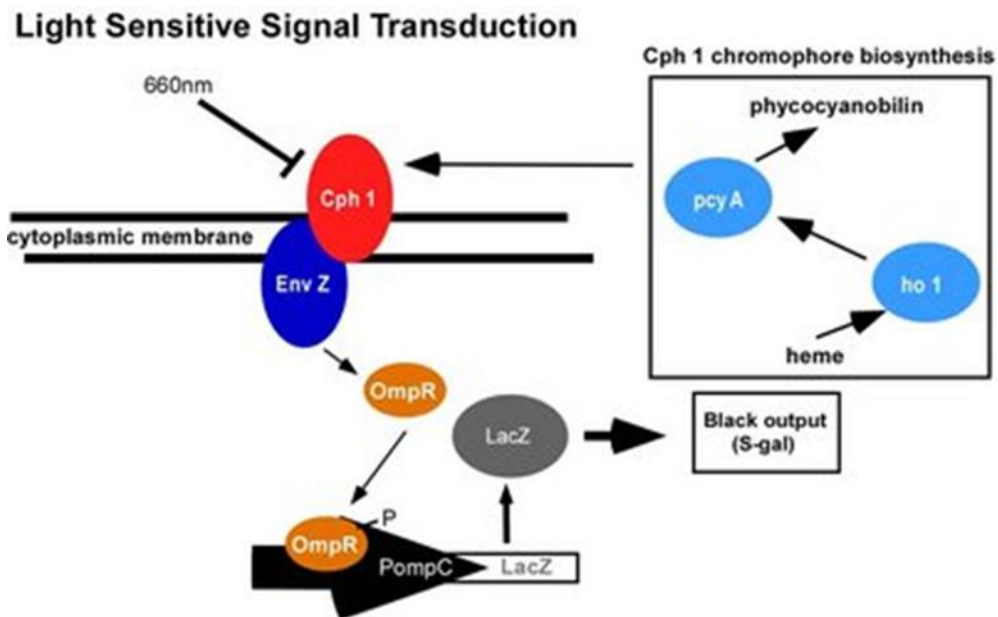
Naravno neki su imali poteškoća u svojim projektima. Tim s Princeton-a ipak nije uspio svoj mehanizam napraviti funkcionalnim, dok su studenti s Caltech-a bez problema ostvarili svoj projekt. Njihove kvašćeve gljivice su svijetlile zeleno u prisutnosti male količine kofeina, žuto-zeleno u srednjoj količini kofeina i žuto u velikoj količini kofeina (Campbell, 2005).

Studenti sa Sveučilišta Texas u Austinu ugradili su u bakteriju *E. coli* fotoreceptorske gene te stvorili tanki biofilm svjetlosno osjetljivih bakterija (tzv. Bakterijska fotografija), koji je prikazivao frazu „*Hello World*“ u obliku nataloženih pigmenata (Slika 5).



Slika 5. Slika koja nastaje izlaganjem Petrijeve zdjelice s fotoosjetljivom genetički promijenjenom *E. coli* crvenom svjetlu u tami (preuzeto sa <https://2004.igem.org/austin.cgi>).

U teoriji, svaka stanica na bakterijskoj livadi mijenja svoje stanje kao odgovor na ulaznu svjetlost te ovisno o stanju susjednih stanica, određuje da li će promijeniti boju ili ne. Prema tome, u tom sustavu, zajednica genetički modificiranih bakterija *E. coli* funkcioniše poput računala koje može procesirati granice svjetla i tame na umjetnoj dvodimenzionalnoj slici. Glavna prepreka bila je genetičko programiranje detekcije svjetlosti u organizmu poput *E. coli*, koji je prirodno slijep. Kako bi to postigli koriste su biosintetički dio Cph8 (BBa_I15010, http://parts.igem.org/Part:BBa_I15010), nastao fuzijom između svjetlosno osjetljivog fitokroma cianobakterija (Cph1) i transmembranske histidin kinaze (EnvZ) *E. coli*. Svjetlo valne duljine 660 nm uzrokuje izomeraciju u Cph1 domeni biosintetičke kimere što inaktivira aktivnost histidin kinaze EnvZ (Slika 6). Inhibicija kinaze EnvZ potiskuje transkripciju promotora OmpR (BBa_R0082, u prirodi je to promotor koji se nalazi uzvodno od gena OmpR za porin, protein iz skupine transmembranskih proteina, http://parts.igem.org/Part:BBa_R0082), dok istovremeno potiče transkripciju promotora OmpF (BBa_R0084, http://parts.igem.org/Part:BBa_R0084). Kinaza EnvZ fosforilira OmpR u fosforilirani oblik OmpR-P. Nadalje, poznato je kako kromofor različito reagira na pobudnu svjetlost valne duljine 735 nm u odnosu na 660 nm. Dok svjetlost valne duljine 660 nm inhibira transdukciju signala, svjetlost valne duljine 735nm potiče prijenos svjetlosnih signala. Istovremenim obasjavanjem pobudnim svjetlom od 735 nm i 660 nm, postiže se kontrast svjetla i tame na bakterijskim livadama. Ekspresijom ovakvog biosintetičkog sustava u bakteriji *E. coli* omogućena je transformacija svake bakterijske stanice na hranjivoj



Slika 6. Prijenos svjetlosnog signala. U mraku, OmpR je fosforiliran, LacZ je eksprimiran dok se šećer (S-gal) u podlozi razgrađuje stvarajući crni talog. U prisutnosti crvenog svjetla, takva kaskada prijenosa signala je potisnuta (slika preuzeta s https://2006.igem.org/wiki/index.php?title=University_of_Texas_2006&oldid=21293).

podlozi u jedinicu koja ima mogućnost razlikovanja svjetla od tame. Takvom genetičkom modifikacijom zajednica bakterijskih stanica dobila je mogućnost reproduciranja svjetlosne slike. U ovom projektu koristili su 5 genetičkih sklopova DNA (engl. *BioBrick*). Biosintetički kimerni dio za detekciju svjetlosti sastavljen je od dvaju biosintetičkih gena, BBa_I15010 (http://parts.igem.org/Part:BBa_I15010) i BBa_R0082 (http://parts.igem.org/Part:BBa_R0082). Isto tako, biosintetički kimerni dio za ekspresiju svjetlosti čine 3 biosintetička gena naziva BBa_B0034 (http://parts.igem.org/Part:BBa_B0034), BBa_E0033 (http://parts.igem.org/Part:BBa_E0033) i BBa_B0015 (http://parts.igem.org/Part:BBa_B0015).

Zanimljivo je kako su studenti počeli raditi stvari, uglavnom iz zabave, koje su molekularni biolozi 10 godina ranije mogli napraviti uz teške napore. Neki od projekata koji su bili dizajnirani u svrhu natjecanja bili su toliko dobri da su imali i ekonomske koristi.

Studenti Sveučilišta Edinburgh dizajnirali su bakterijski senzor arsena u pitkoj vodi (Aleksic i sur. 2007). Komercijalni načini testiranja vode imaju osjetljivost od 50 ppb (engl. *parts per billion*), sintetička *E. coli* imala je osjetljivost detekcije od 5 ppb.

Tim Sveučilišta Kalifornije, Berkley 2007. godine kreirao je genetičkom modifikacijom bakteriju *E. coli* koja proizvodi zamjensku krv. Takva krv može se zamrznuti te odleđiti i koristiti po potrebi.

Tim iz Slovenije 2008. godine je pobijedio s projektom kojim su stvorili sintetičko cjepivo za patogen *Helicobacter pylori*, uzročnika želučane ulkusne bolesti. Bitno je napomenuti kako je slovenski tim također osvojio IGEM 2006. i 2010. godine. Slovenski pobjednički projekt 2010. godine revolucionaran je jer su željeli postići da rad s molekulom DNA nalikuje na pokretnu traku. Tim je napravio sintetsku DNA sekvencirajući određene blokove sekvenci u predodređenom slijedu. Zatim, poboljšali su grupu enzima proteinima koji omogućavaju enzimima povećanu brzinu i efikasnost ekspresije DNA. Mijenjajući redoslijed blokova sekvenci DNA tim je mogao mijenjati produkte ekspresije. Rezultat su prikazali kao „DNA vođena pokretna traka“. Slovenski tim je podnio 151 novi blok sekvenci (engl. *BioBricks*) u registar.

Svake godine samo natjecanje privlači sve više sudionika (Tablica 1), 2004. godine je uključivalo 5 timova dok je 2017. u natjecanju sudjelovalo 310 timova. Rast natjecanja pokazuje da najkreativniji i najznačajniji projekti ne dolaze iz velikih farmaceutskih ili bioloških tvrtki. Dolaze s fakulteta, sveučilišta ili čak iz srednjih škola koji su uglavnom to radili iz rekreacije i zabave.

Natjecanje IGEM pokazuje kako nije potrebno toliko opsežno znanje ni godine iskustva da bi se stvorilo nešto korisno. Uspoređujući s postupcima biohakera vidimo da biologija može biti jednostavna i pristupačna za istraživanje svim uzrastima, bez obzira na razinu akademskog obrazovanja.

Tablica 1. Pregled rasta broja sudionika i timova u natjecanju IGEN te broj dijelova sekvenci DNA dodanih u registar (podatci preuzeti sa https://igem.org/Previous_Competitions)

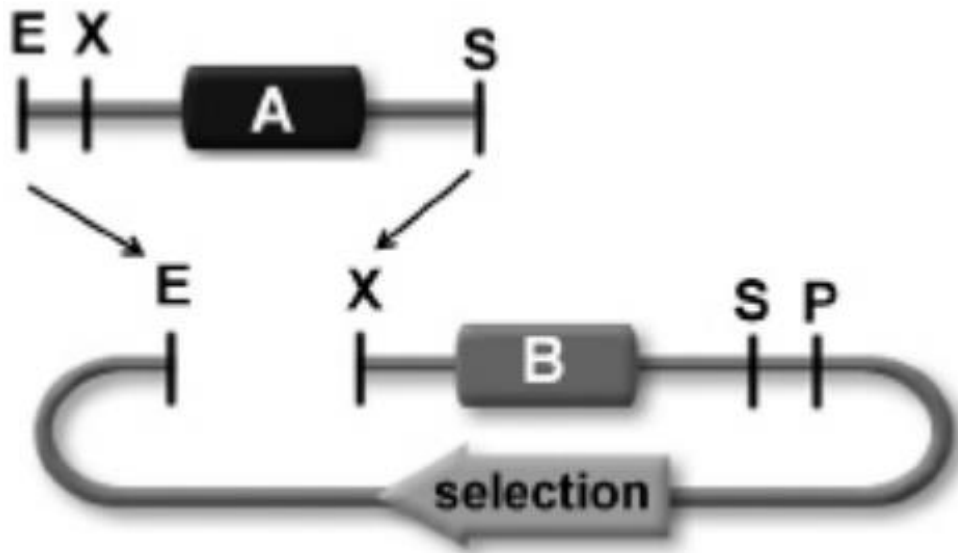
Godina	Broj sudionika	Broj timova	Broj dijelova dodanih u registar standardnih bioloških dijelova
2004	31	5	≈50
2005	125	13	≈125
2006	723	32	≈724
2007	777	54	≈800
2008	1248	88	1387
2009	1840	113	1348
2010	2327	128	1863
2011	2586	165	1355
2012	3696	190	1708
2013	407	215	/
2014	4515	245	/
2015	5018	280	/
2016	4432	300	/
2017	5386	310	/
2018	5790	340	/
2019	353	6375	/

(Od 2013. godine ne prikazuje se ukupan broj dijelova dodanih u registar)

2.5. Sekvence DNA BioBricks

Sekvence DNA BioBricks su izmjenjivi, standardizirani biološki dijelovi molekule DNA, koji se povezuju po standardnim protokolima u cilju stvaranja bioloških sustava u živim stanicama. Molekularno-genetičkim rječnikom BioBricks su sekvence DNA koje kodiraju točno određenu biološku funkciju i mogu se lako sastaviti s bilo kojim dijelom drugog BioBrick-a. Zapravo, svaki blok sekvenci DNA BioBricks je plazmid koji sadrži malu sekvencu DNA poznate strukture i funkcije. Ta sekvenca DNA je promjenjivi dio dok je ostatak plazmida okosnica. Krajevi sekvence se sastoje od specifične molekularne strukture koja ih čini lako povezujućim za druge blokove sekvenci DNA. Standardna procedura za sastavljanje 2 biološka dijela je zamišljena jednostavno. Koristeći restriktivne enzime, režući i spajajući fragmente DNA standardnim tehnikama genetičkog inženjerstva, izrezao bi se biološki dio A iz odgovarajućeg plazmida donora i pocijepao plazmid koji sadržava fragment B. Zatim se pomiješa fragment A s lineariziranim plazmidom koji sadrži dio B čime se ljepljivi krajevi fragmenata A i B spoje (Slika 7). Ovim nastaje veći plazmid sadržavajući u svojoj strukturi novi biološki dio AB. Taj

plazmid bi se zatim klonirao u bakteriju *E. coli* koja će eksprimirati svojstva kodirana tim plazmidom.



Slika 7. Struktura sekvence DNA BioBricks (slika preuzeta iz knjige *Regenesis: How synthetic BIology will reinvent Nature and Ourselves*, stranica 183).

Svi biološki dijelovi spremaju se u Registar standardnih bioloških dijelova (<https://igem.org/Registry>). Sam registar raste svake godine uz pomoć timova IGEM te je dostupan kao otvoreni izvor svim natjecateljima te akademskim istraživačkim laboratorijima. Registar sadrži preko 20 000 dijelova.

2.7. Metoda CRISPR/Cas

CRISPR/Cas (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) mehanizmi stečeni su imunološki sustavi pronađeni u oko 50% bakterija i 90% arheobakterija (Makarova et al., 2015). To su dijelovi obrnuto ponavljajućih sekvenci DNA (palindromske sekvence) genoma bakterijskih virusa koji služe kao zapisi o prethodnim infekcijama.

Sustav CRISPR aktivira se ulaskom virusa u bakterijsku stanicu. Ukratko, bakterija koristi nukleaze vođene molekulama RNA (engl. *guided RNA*, gRNA) s ciljem cijepanja stranih genetskih elemenata (Ran et al., 2013). Znanstvenici su otkrili kako se tijekom evolucije sustav CRISPR ugradio u sve razine organizama te da je to alat pomoću kojeg je moguće manipulirati genima od interesa, što će izazvati velike promjene u svijetu genetičkog inženjerstva i uređivanja genoma (Jamie Metzl, 2019a).

Godine 2010. Sylvain Moineau i njegove kolege pokazali su kako sustav CRISPR-Cas9 reže dvolančanu molekulu DNA na preciznim i predvidljivim mjestima (Garneau i sur., 2010).

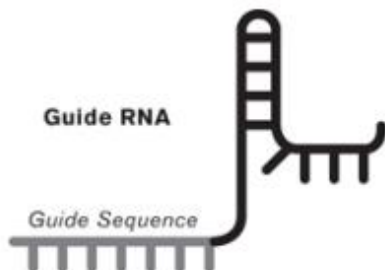
Emmanuelle Charpentier (2011) otkrio je kako dvije vrste molekula RNA usmjeravaju Cas9 enzim do svoje mete (Deltcheva i sur., 2011).

Godine 2012. Emmanuelle Charpentier, Jennifer Doudna i Martin Jinek ukomponirali su sustav CRISPR-Cas9 u precizni alat koji se može prilagoditi tako da cijepa DNA neovisno o njenom podrijetlu (Jinek i sur., 2012). Također, otkrili su kako se sustav CRISPR-Cas9 može koristiti i za ciljanu ugradnju željene molekule DNA (Slika 8). Kaspaza (Cas), zapravo je enzim nukleaza kojeg je moguće jednostavno programirati tako da, kad se unese u stanicu ili organizam, vrši cijepanje molekule DNA na specifičnom ciljnom mjestu putem komplementarnog sparivanja baza između vodeće gRNA i njene ciljne nukleotidne sekvence. Navođenje nukleaza na ciljnu DNA daje mogućnost uvođenja nasumičnih insercija i/ili delecija (indela) na mjestu cijepanja, primjerice za integriranje ciljnih promjena u genomskoj sekvenci blizu mjesta loma (Slika 8). Taj proces omogućio je preciznije genetsko modificiranje.

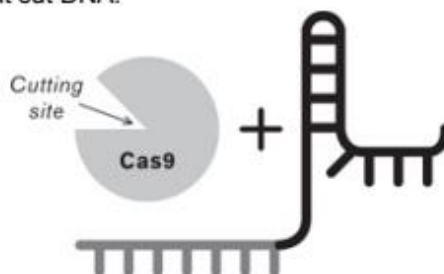
Jennifer Doudna, Emmanuelle Charpentier i Feng Zhang (2013) objavili su kako se CRISPR-Cas9 može koristiti ciljano na više lokacija u ljudskom genomu odjednom (Pennisi, 2013).

EDITING A GENE USING THE CRISPR/CAS9 TECHNIQUE

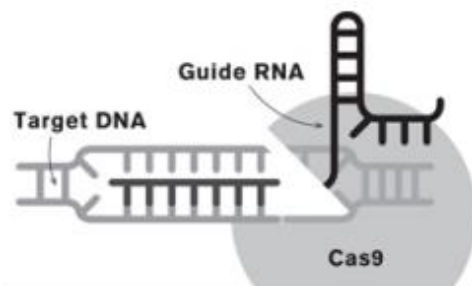
- 1 Scientists create a genetic sequence, called a "guide RNA," that matches the piece of DNA **they want to modify**.



- 2 This sequence is added to a cell along with a protein called Cas9, which **acts like a pair of scissors** that cut DNA.



- 3 The guide RNA homes in on the target DNA sequence, and Cas9 **cuts it out**. Once their job is complete, the guide RNA and Cas9 leave the scene.



- 4 Now, another piece of DNA is swapped into the place of the old DNA, and **enzymes repair the cuts**. Voilà, you've edited the DNA.



Slika 8. Prikaz mehanizma rada tehnike CRISPR-Cas9 (Slika preuzeta iz knjige Hacking Darwin: genetic engineering and the Future of Humanity, stranica 124-125).

2.7.1. Primjeri primjene tehnike CRISPR/Cas9

Biljni patolog na sveučilištu Pennsylvania State koristio je metodu CRISPR /Cas9 za prekrajanje gena koji kodiraju polifenol oksidazu, enzima odgovornog za oksidaciju (Amy Maxmen, 2017). Genetski modificirana „Arktička jabuka“ može se izrezati i ostaviti na otvorenom bez da potamni, zbog toga što joj je utišan gen odgovoran za proizvodnju enzima polifenol oksidaze.

Papaja *Rainbow* je genetski modificirana papaja koja je otporna na virus prstenaste pjegavosti papaje te je već dostupna u dućanima (Jamie Metzl, 2019b).

Tvrtka *Del Monte* pokušava proizvesti genetski modificirani ružičasti ananas koji sadrži povećanu koncentraciju antioksidansa likopena (Jamie Metzl, 2019b).

Ovakvi primjeri znanstvenih eksperimenata prikazuju sve mogućnosti CRISPR/Cas9 tehnike te daju naznaku kakve eksperimente su i sami biohakeri u mogućnosti provesti izvan formalnih znanstvenih okvira.

2.7.2. Metoda CRISPR-Cas9 u svrhu biohakiranja

Ova tehnika omogućila je smanjenje troškova i kompleksnosti genetskog modificiranja. Sve potrebne kemikalije i biomaterijali mogu se kupiti putem interneta te postoje internetska predavanja o uređivanju gena metodom CRISPR/Cas9. To je najveća prekretnica u biohakerskom svijetu. Tehnika je u osnovi veoma jednostavna te se lako primjenjuje. Tom tehnikom neki biohakeri vrše pokuse na vlastitim tijelima s ciljem kako bi današnjem društvu pridonijeli lijek za bolest od koje i oni sami boluju (Jessica Lussenhop, 2017). Jedan od najpoznatijih eksperimenata primjene metode CRISPR-Cas9 u svrhu mijenjanja vlastitog tijela napravio je Josiah Zayner, kad je na vlastitom tijelu testirao aplicirao izmijenjenu verziju gena za miostatin (protein mišića) kojeg je prethodno u kućnom laboratoriju izmijenio tehnikom CRISPR/Cas9 (<https://www.vox.com/future-perfect/2019/5/19/18629771/biohacking-josiah-zayner-genetic-engineering-crispr>). Taj eksperiment vrlo je teško etički opravdati jer se ne radi o liječenju bolesti, već o želji za većim i ljepšim mišićima.

Upoznavanjem javnosti s tom tehnikom i mogućnostima njene primjene je ključno kako bi opća populacija gledala pozitivnije na moguće genetsko modificiranje ljudskih stanica. Genskom terapijom, korištenjem sustava CRISPR/Cas9 kao i drugih alata za uređivanje genoma, mogle bi se izliječiti razne bolesti, ali isključivo ako se to radi precizno i sigurno. Rastom te razine sigurnosti javnost će se početi pitati, može li se tim alatima spriječiti sama bolest u startu.

2.8. Sintetski *Gene drive* sustavi

Genetički elementi *Gene drive* zaobilaze Mendelova pravila nasljeđivanja. Shodno tome, razvijena je molekularna tehnika kojom se gen ugrađuje u organizam na način da će potomak uvijek naslijediti određeni alel, koji će se prenositi s generacije na generaciju i ako sveukupno nema pozitivnih efekata za domaćina. Tehnologija koristi sustav CRISPR/Cas9 kako bi se izrezao alel divljeg tipa jednog roditelja, a ugrađuje se kopija alela nekog promijenjenog gena. Kad se taj organizam križa s organizmom koji nosi divlju verziju gena dolazi do usmjerenog nasljeđivanja, svi njihovi potomci će imati promijenjeni alel i izražavat će tu osobinu. Time se promijenjeni alel može jako brzo proširiti kroz populaciju, pogotovo u slučaju kad ta vrsta ima veliku brzinu razmnožavanja. Ta tehnika može se koristiti kako bi se određena vrsta uklonila s nekog područja, primjerice kad ta vrsta prenosi određenu bolest. To je moguće uvođenjem gena koji će negativno utjecati na sposobnost preživljavanja neke invazivne vrste u staništu ili se može uvesti gen koji uzrokuje sterilnost u svakom ženskom potomku. Znanstvenici su uspješno napravili genetski modificirane organizme koji uz pomoć sustava *gene drive* prenose gene kroz transgeničnu laboratorijsku populaciju komaraca i vinskih mušica (Megan Scudellari, 2019).

Neke od limitacija sustava *gene drive* su:

- Potreban je velik broj generacija kako bi se svojstvo raširilo kroz populaciju. Vrijeme ovisi o reprodukcijском ciklusu organizma, broju genetski modificiranih organizama uvedenih u populaciju, itd.
- Sustavom *gene drive* može se samo uređivati gene i sekvence koji su od velike važnosti za preživljavanje organizma i održavanje reprodukcije.
- Ne može se koristiti kod populacija koje se razmnožavaju nespolno.

- Neke vrste mutacija morale bi se konstantno uvoditi u populaciju, jer ako to svojstvo negativno utječe na organizam s vremenom će se eliminirati. Primjerice, svojstvo koje korov čini podložnim herbicidima podliježe utjecaju prirodne selekcije u cilju stvaranja otpornosti na taj herbicid. U takvim slučajevima, potrebno je neprestano uvoditi nove kopije svojstva u ciljani genom.

Zbog toga što ova tehnika utječe na ekosustav koji svi dijelimo, znanstvenici žele prvo upoznati javnost s sustavom *gene drive* prije nego što ga započnu primjenjivati u prirodi. Moguće je da organizam modificiran korištenjem sustava *gene drive* u prirodi negativno utječe na druge organizme. Zato, svako korištenje sustava *gene drive* u prirodi mora se proučiti zasebno. Ova tehnika predstavlja sigurnosni rizik te se može zlouporabiti i koristiti kao oblik bio-terorizma. Sustav *gene drive* je po mnogima kontroverzna tehnika te postoji određeni broj ljudi koji traže moratorij na korištenje. Ujedinjeni narodi zasad su odlučili limitirati korištenje gene sustava *gene drive* ali su odbacili moratorij.

Znanstvenici navode brojne sigurnosne mjere koje se mogu uspostaviti:

- Sustav *gene drive* može se optimizirati za pojedine vrste bez rizika otpuštanja u prirodu, primjerice odvajanjem određenih genetičkih dijelova kako se ne bi mogao cijeli umnožiti ili kreirati ga kako bi porezao sekvence DNA koji ne pripadaju divljoj populaciji.
- Aleli *gene drive* koji se mogu teoretski raširiti na divljim populacijama mogli bi se razvijati i testirati u laboratorijima koji se nalaze u područjima u kojem ta vrsta ne može preživjeti ili naći jedinku iste vrste za razmnožavanje.
- Može se testirati kako modificirane laboratorijske jedinke utječu na ekosustav puštajući u prirodu organizme s promjenom ali bez *gene drive* alela .
- Promjene nastale sustavom *gene drive* mogu se poništiti drugim kontrolnim sustavom. Uz razvoj svakog novog sustava *gene drive* kreirao bi se i suprotni *gene drive*.
- Populacije se može imunizirati protiv određenog alela *gene drive*.
- Moguće je mijenjati točno određenu vrstu ili podpopulaciju ali ne i druge divlje populacije.

2.9. Zakoni vezani za biohakiranje

U Hrvatskoj i većini zemalja svijeta postoje zakoni koji reguliraju rad s genetski modificiranim organizmima (https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_06_70_1372.html). Tim zakonom i podzakonskim aktima, propisana su pravila rada, tehnički uvjeti rada u laboratorijima, zbrinjavanje otpada, kao i obvezu registracije i dobivanja posebne dozvole za rad takvih laboratorija. Laboratoriji su razvrstani u četiri kategorije s obzirom na stupanj opasnosti rada s mikroorganizmima, pri čemu prva kategorija označava najmanji, a četvrta kategorija najveći rizik. Tako je Laboratorij za genetiku i molekularnu biologiju pri Prirodoslovno-matematičkom fakultetu ovlašten za rad s GMO na razini prve kategorije, a primjerice sličan Laboratorij na Medicinskom fakultetu u Splitu, ima dozvolu za rad mikroorganizmima na razini druge kategorije. Prilikom dobivanja dozvola za rad često se trebaju ispuniti brojni zahtjevni tehnički uvjeti rada, primjerice pod otporan na požar, tuševi za dekontaminaciju, specijalna ventilacije zraka koja ne dopušta nekontrolirano otpuštanje GMO-a u okoliš, specijalno čuvanje zapaljivih kemikalija, evidencije GMO-a, zbrinjavanje biootpada i brojne druge zahtjeve.

Na organizme modificirane tehnikom CRISPR/Cas9 se od 2018. godine u Europskoj uniji primjenjuju svi vrlo strogi propisi kao i na konvencionalne genetski modificirane organizme. Mnogi su ostali razočarani takvom odlukom i drže da bi to moglo dovesti do manjka financiranja projekata koji koriste metodu CRISPR/Cas9, budući proizvodi dobiveni tom tehnikom moraju zadovoljiti vrlo rigorozne kontrole kao klasični GMO- i prije stavljanja na tržište, što poskupljuje procedure i proizvode.

Kompleti DIYbio za izvođenje tehnike CRISPR/Cas9 koji su dostupni na internetskim stanicama poput firme *Odin* tema su brojnih rasprava zbog moguće zloupotrebe. Njemačka je 2017. godine zabranila prodaju takvih kompleta na svom teritoriju. Također je zabranila korištenje tih kompleta u školi. Njemačka također ima zakon koji zabranjuje pokuse koji uključuju genetsko modificiranje izvan licenciranih laboratorija, tako da biohakeri u slučaju zloupotrebe mogu dobiti i do 3 godine zatvora. Za očekivati je da će i druge zemlje uskoro dobiti slične zakone, čime će biohakerima biti zabranjene nekontrolirane genetske modifikacije. Poseban problem je i rad s pokusnim životinjama koji je također strogo reguliran zakonom u našoj zemlji i svijetu (https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2017_10_102_2342.html), te je upitno drže li se biohakeri koji izvode eksperimente na životinjama tih propisa. Konačno, tu je i Zakon o zaštiti prirode, (<https://www.zakon.hr/z/403/Zakon-o-za%C5%A1titi-prirode>), koji nalaže sprječavanje štetnih zahvata i poremećaja u prirodi kao posljedicu tehnološkog

razvoja i obavljanja djelatnosti. Iz gore navedenoga vidljivo je da bi nekontrolirane i nedopuštene genetske modifikacije koje bi biohakeri izvodili na vlastitu ruku, bez nadzora i posebnih odobrenja, bile zapravo ilegalne i nezakonite aktivnosti u Republici Hrvatskoj te kao takve podložne zakonskim sankcijama.

Slično je i u svijetu, primjerice nedavno je jedan od pionira biohakerstva, osnivač firme Odin, Josiah Zayner stavljen pod istragu zbog neovlaštenog obavljanja medicinskih zahvata bez dozvole nakon što je na vlastitom tijelu testirao aplicirao izmijenjenu verziju gena za miostatin (protein mišića) kojeg je prethodno u kućnom laboratoriju izmijenio tehnikom CRISPR/Cas9 (<https://www.vox.com/future-perfect/2019/5/19/18629771/biohacking-josiah-zayner-genetic-engineering-crispr>).

Važno je nadodati kako je biohakerska zajednica upoznata s problemima koje ona sama u današnjem Svijetu predstavlja. Zbog toga je 2011. godine DIYbio – biohakerska zajednica organizirala kongres na kojem su brojne zainteresirane osobe i predstavnici regionalnih grupa iz Sjeverne Amerike i Europe donijele kodeks koji služi kao temelj za postići produktivnu i sigurnu globalnu zajednicu DIYbio praktičara, regionalnih grupa i Laboratorija zajednice (<https://diybio.org/codes/>).

2.10. Prihvaćenost biohakiranja u modernom društvu

Biohakiranje je relativno nova pojava, te ona nema samo cilj manipuliranja s DNA. Biohakeri kao svoj glavni cilj smatraju promijeniti tehno-znanstvenu kulturu i znanstvene institucije. Biohakerska kultura izražava borbu između otvorenosti i zatvorenosti znanosti. Biohakeri su puno složeniji izraz promjene normi koje reguliraju današnju proizvodnju znanstvenih spoznaja, promjena koja utječe na odnos između bioznanosti, društva, medija i tržišta. Oni također utjelovljuju promjenu u medijskom okruženju. Mediji imaju ključnu ulogu u tome da neke znanstvenike učine "vidljivima" i daju im važan javni prostor. Naime, uspon novih medija također predstavlja tehnološke temelje u načinu na koji se znanje proizvodi, dijeli, raspravlja i legitimira. Rezultat tog procesa je nova otvorena znanstvena kultura povezana s promjenama u načinu na koji se biomedicinska istraživanja provode, dijele i prisvajaju. Biohakeri su u modernom društvu povezani s novom vrstom interakcije između znanstvenih praksi i biološke društvene komunikacije koja je u funkciji na korporativnoj i društvenoj razini. Oni grade most između običnog čovjeka te samog biološkog istraživanja. Modeli otvorene znanosti i otvorenog

koda dobivaju javnu vrijednost jer su važan dio prilagodbe odnosa između istraživanja, društva i tržišta. Zbog toga su biohakeri u širem smislu vezani uz hakiranje koje je u našem društvu poprimilo veći značaj.

Naravno ne gledaju svi jednako na pojavu biohakiranja. Mnogi smatraju da takva vrsta otvorenosti, kakvu oni zastupaju, može izazvati negativne posljedice ako se zloupotrijebi.

Biohakiranje kao pojam postepeno mijenja društvo. Ljudi se upoznavaju s novim konceptom znanosti te samim tim mijenja se njihov stav prema biologiji te prema biomedicinskom istraživanju. Tema je aktualna i s vremenom će igrati sve veću ulogu u našim životima kao nezaobilazan dio svakodnevnice.

2.11. Budućnost znanosti i biohakiranja

Mnogi podcjenjuju moć genetičke revolucije. Teško je procijeniti što će nam budućnost donijeti no za nju se moramo pripremiti. Era genetskog modificiranja ljudi započela je u molekularno-genetičkim laboratorijima s ciljem pronalaženja lijekova za razne bolesti ili kako bi se pomoglo mnogim neplodnim parovima diljem svijeta da postanu roditelji. Osim mnogih koristi postoje, međutim, i brojne opasnosti genetskog modificiranja ljudi koje ne možemo ignorirati. S vremenom, te opasnosti će vjerojatno rasti kako raste i pristup revolucionarnim genetskim alatima.

Uskoro će pristup jeftinijim i sve moćnijim alatima biti realnost. Time rastu šanse za velikim inovacijama, ali i rizik zloupotrebe. Što više ljudi koristi sve moćniju tehnologiju kako bi se rješavalo zdravstvene ili ekološke probleme sadašnjice, povećati će se i kapacitet samog genetskog inženjerstva da nam poboljša život brže nego što itko može zamisliti. No istodobno, širenje znanja i sposobnosti manipuliranja genima u „garaži“ može donijeti stvarne prijetnje. Grupa znanstvenika na kanadskom sveučilištu, za 100 000\$ uspješno je sintetizirala izumrli virus konjskih boginja *horsepox* iz više fragmenata DNA naručenih od odgovarajućih tvrtki (Noyce i sur., 2018). Takvo što prije samo desetak godina bilo je nezamisljivo i iznimno skupo, ali s današnjom tehnologijom to nije problem te cijena za takvo što pada iz godine u godinu. Tu se postavlja pitanje da li će u budućnosti i druge osobe s zlim namjerama biti u mogućnosti napraviti isto te dovesti čovječanstvo u opasnost od nove pandemije. Pandemija virusa Covid-19 nam je pokazala koliko smo ranjivi takvom nečemu.

Promjene koje se događaju u biohakerskom svijetu privlače različite ljude s potpuno drugačijim ciljevima. S njima dolaze nove prilike i opasnosti na koje moramo biti spremni te biti odgovorni za sve što nas čeka.

Kako bi se uspostavilo kontroliranje genetske tehnologije, svaka država bi trebala napraviti vlastiti program edukacije vlastitih građana, formirati bioetičke komisije i regulirati korištenje tehnologije na temelju vlastite tradicije, vrijednosti i interesa. Također, trebala bi se uspostaviti nezavisna internacionalna komisija koja bi postavila smjernice potencijalnih budućih genetskih modificiranja na nama samima. Neka od bitnih pitanja koja trebaju biti odgovorena u tim smjernicama su:

- Što se može učiniti kako bi se osigurala najšira dostupnost genetskih tehnologija koje će doprinosti zdravlju cjelokupne svjetske populacije?
- Da li i na koji način treba postaviti limit za primjenu genetskih tehnologija za tretiranje ili eliminiranje bolesti?
- Da li ljudi trebaju imati puni pristup informacijama o sastavu njihovog genoma te kako će izgledati genom njihovih potomaka?
- Da li bi roditelji trebali imati slobodu birati između svojih embrija kako bi si izabrali „idealno dijete“ u *in vitro* oplodnji?
- Da li je sigurno koristiti genetsko modificiranje kako bi se uklonile genetske bolesti u spolnim stanicama ili embrijima na način da se promjene prenose na buduće generacije?
- Da li nam je potreban globalni okvir kako bi se spriječilo korištenje genetske tehnologije s zlim namjerama te kakve standarde bi trebalo održavati?
- Što se može napraviti kako bi se osiguralo da „genetska revolucija“ pomogne svima nama te kako se svatko od nas može bolje uključiti u sam proces?

S toliko puno regulativa koje već postoje te mnogim drugim koje će se donijeti, postavlja se pitanje da li će biohakiranje kao pokret nestati. Mnogi smatraju kako je preopasno igrati se s takvim moćnim genetskim alatima na tako neprofesionalan način. Gledajući koliko još uvijek malo razumijemo našu i fiziologiju drugih vrsta, neki znanstvenici smatraju kako namjera genetskog manipuliranja i eksperimentiranja na ljudima nije toliko dobra ideja, pogotovo izvan akademskih okvira. Moramo biti oprezni kako koristimo alate koji su nam dostupni jer će to odlučivati o budućnosti naše vrste. Također, teško je poznavati motive svake osobe koja prakticira takve prakse. Definitivno treba uzeti određene aspekte biohakiranja s dozom opreza. Regulacija je nužno potrebna kako bi se sve odvijalo u sigurnom ozračju s dobronamjernim

željama. Razumljivo je da nisu svi toliko otvoreni prema biohakiranju i smatraju ga kao mogući novi način bioterorizma, gdje „zli“ znanstvenici manipuliraju opasnim genima da bi stvorili primjerice patogene mikrobe ili doveli do drugih neželjenih posljedica. FBI je pokazao veliki interes za biohakiranje te ga vidi kao potencijalno oružje jednako opasno kao i nuklearnu energiju. FBI pomno promatra kako se pokret razvija te što proizlazi iz njega. Cilj im je naučiti o biohakiranju te razaznati između ljudi s dobrim i lošim namjerama. S obzirom na dostupnost svih potrebnih alata te materijala lako je vidljivo zašto postoji takva zabrinutost. Zato oni predlažu da biohakeri sami postanu prva linija obrane protiv zloupotrebe te da prijavljuju sumnjive projekte. Biohakerska zajednica je zasad uvelike pozitivno prihvatila takav pristup. Laboratoriji kao *Genspace* surađuje s FBI-om od samog početka te im je agencija čak pomogla s lokalnim zdravstvenim i sigurnosnim protokolima.

Biohakiranje neće potpuno nestati, da li će ono promjeniti znanost ili znanost njega, ostaje otvoreno pitanje. Imati laboratorij za sebe u vlastitoj garaži nije dovoljno sigurno da bi se to moglo dopustiti bez rigorozne regulacije te možda čak potpune zabrane. Takvi laboratoriji nisu sigurni od opasnosti i nesreća koje mogu osloboditi neki nepoznati, potencijalno patogeni soj bakterija koji bi štetno djelovao na širu populaciju u okolici. Za razliku od takve vrste provedbe biohakiranja Laboratoriji zajednice kao mjesto za provođenje biohakiranja će sigurno ostati jer podliježu svim sigurnosnim zahtjevima. Laboratoriji kao *Genspace* te *Biocurious* djeluju kao zatvoreni sustavi prve razine sigurnosti (engl. *Biosafety Level 1 laboratories*). Važno je napomenuti da velika većina biohakera radi unutar Laboratorija zajednice, čak njih 92% (<https://www.wilsoncenter.org/publication/seven-myths-and-realities-about-do-it-yourself-biology-0>). Takvi laboratoriji su mjesto, gdje se uz nadzor, znanost može odvijati izvan formalnih okvira

3. ZAKLJUČAK

Biohakiranje je doprinijelo promjeni slike biologije kao znanstvene discipline te donosi neke nove kvalitete ali rizike i opasnosti. Jedna od glavnih prednosti biohakiranja je demokratizacija znanosti, zahtjev da znanost bude za svakoga i svjedočenje kako nije potrebno veliko ulaganje niti znanje da bi se stvorilo nešto što je na dobrobit svih nas. Dijeljenjem tehnologije i samih podataka ubrzava se napredak znanosti te omogućuje svakome da prisustvuje u događajima koji su bitni za svih nas. Brojni su takvi primjeri. Organizacija IGEM omogućava bolju primjenu znanja studentima kroz kreativne projekte i tako pruža mogućnost da sami kreiraju modificirane organizme koji će imati komercijalnu upotrebu. Laboratoriji zajednice omogućuju biologima amaterima da razvijaju svoje ideje bez obzira na razinu vlastitog obrazovanja a ujedno su mjesto educiranja opće populacije u smjeru korištenja modernom tehnologijom genetskog modificiranja. Zahvaljujući međusobnom dijeljenju znanja i alata, ono što je prije bilo moguće samo uz velika financijska sredstva i dugotrajan trud, sada je moguće napraviti za puno manja sredstva uz osnovno poznavanje tehnika.

Međutim, biohakiranje nije bezopasno, uz njega se povezuje čitav niz rizika i mogućih negativnih posljedica:

- Nedovoljno upoznavanje zainteresiranih s mogućim rizicima upotrebe ovakvih tehnika na sebi samima.
- Većina internetskih stranica koja promovira takve sadržaje ne upućuje korisnike na zakone te regulative koje moguće krše primjenom tehnika.
- Često ne govore o efikasnosti materijala koji promoviraju.

Sve te posljedice mogu dovesti da ljudi još manje vjeruju znanosti nego što vjeruju sada. U zadnje vrijeme vidimo sve veći manjak povjerenja te samo jedan krivi korak može uništiti i ovo malo povjerenja koje društvo ima u znanost kao disciplinu, koja je tu da poboljša kvalitetu ljudskog života. Prakticiranje same znanosti izvan formalnih znanstvenih okvira može imati velike posljedice na znanost. Mediji su najmoćnije oružje, ovisno kako oni prikažu znanost te njezino prakticiranje, to bi moglo imati najveći utjecaj na to koliko se samoj znanosti vjeruje. Zbog toga, pitanja koja iz proizlaze iz biohakerskog pokreta moraju biti odgovorena te se ova tema ne smije ignorirati te olako odbaciti.

4. LITERATURA:

1. Aleksic J, Bizzari F, Cai YZ, Davidson B, de Mora K, Ivakhno S, Seshasayee SL, Nicholson J, Wilson J, Elfick A, French CE, Kozma-Bognar L, Ma HW, M. A. (2007). Development of a novel biosensor for detection of arsenic in drinking water. *IET Synthetic Biology*. *IET Synthetic Biology*, 87–90.
2. Amy Maxmen. (2017). Genetically modified apple reaches US stores, but will consumers bite? *Nature*, 551, 149–150.
3. Campbell, A. M. (2005). Meeting report: synthetic biology Jamboree for undergraduates. *Cell Biology Education*, 4(1), 19–23. <https://doi.org/10.1187/cbe.04-11-0047>
4. Carlson, R. (2005). *Splice It Yourself*. Wired.
5. Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602–607. <https://doi.org/10.1038/nature09886>
6. Garneau, J. E., Dupuis, M.-È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A. H., & Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67–71. <https://doi.org/10.1038/nature09523>
7. Jamie Metzl. (2019). *Hacking Darwin: Genetic Engineering and the Future of Humanity*. Sourcebooks, Inc.
8. George M. Church. (2012). *Regenesis: How Synthetic Biology will reinvent Nature and Ourselves*. Basic Books
9. Jessica Lussenhop. (2017). *Why I injected myself with an untested gene therapy*. BBC

News. <https://www.bbc.com/news/world-us-canada-41990981>

10. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
11. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Terns, R. M., Terns, M. P., White, M. F., Yakunin, A. F., Garrett, R. A., van der Oost, J., ... Koonin, E. V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. In *Nature reviews. Microbiology* (Vol. 13, Issue 11, pp. 722–736). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>
12. Megan Scudellari. (2019). Self-destructing mosquitoes and sterilized rodents: the promise of gene drives. *Nature*, 571, 160–162.
13. Noyce, R. S., Lederman, S., & Evans, D. H. (2018). Construction of an infectious horsepox virus vaccine from chemically synthesized DNA fragments. *PLOS ONE*, 13(1), e0188453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188453>
14. Pennisi, E. (2013). The CRISPR Craze. *Science*, 341(6148), 833 LP – 836. <https://doi.org/10.1126/science.341.6148.833>
15. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>

LITERATURA S INTERNETA:

1. http://parts.igem.org/Part:BBa_I15010
2. http://parts.igem.org/Part:BBa_R0082
3. http://parts.igem.org/Part:BBa_R0084
4. http://parts.igem.org/Part:BBa_B0034
5. http://parts.igem.org/Part:BBa_B0015
6. <https://cdn.hackaday.io/images/7833321520876538964.png>
7. <https://s3-us-west-2.amazonaws.com/oww-files-public/8/8c/OpenPCR.jpg>
8. <https://scx1.b.cdn.net/csz/news/800/2015/minidnaseque.jpg>
9. https://cdn10.bigcommerce.com/s-89v4ku3/products/170/images/511/MolecularBioKit2__43940.1485299000.1280.1280.jpg?c=2
10. <https://2004.igem.org/austin.cgi>
11. https://2006.igem.org/wiki/index.php?title=University_of_Texas_2006&oldid=21293
12. <https://igem.org/Registry>
13. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_06_70_1372.html
14. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2017_10_102_2342.html

15. <https://www.vox.com/future-perfect/2019/5/19/18629771/biohacking-josiah-zayner-genetic-engineering-crispr>
16. <http://old.dubrovniknet.hr/novost.php?id=52948#.X2CHEmgzaUk>
17. <https://diybio.org/codes/>
18. <https://www.zakon.hr/z/403/Zakon-o-za%C5%A1titi-prirode>
19. <https://www.wilsoncenter.org/publication/seven-myths-and-realities-about-do-it-yourself-biology-0>