

Ks. HENRYK NOWIK

## ANTROPOCENTRYCZNE ZAŁOŻENIA INŻYNIERII GENETYCZNEJ

### WSTĘP

W połowie lat siedemdziesiątych naszego stulecia teoria sterowania podłożem dziedzicznym zrobiła zawrotną karierę. W prasie codziennej i w licznych doniesieniach naukowych na całym świecie pisano o wyprowadzeniu genu z organizmu. Zachwycano się nad wielką perspektywą usuwania genów niepożądanych dla życia i rozwoju człowieka. Snuto obiecujące perspektywy nad wprowadzaniem nowych genów do organizmów roślinnych i zwierzęcych dla dobra populacji ludzkiej i całej bioplanety.

Inżynieria genetyczna, zwana również chirurgią genową, polega na genialnym naśladownictwie mechanizmów biosystemów oraz na stosowaniu narzędzi wymyślonych przez ewolucję układów ożywionych. Dzięki metodom biotechnicznym człowiek zdobył możliwość ingerencji w najskrytsze tajniki życia biosfery.

Wspaniałość tych osiągnięć nakłada na człowieka dużą odpowiedzialność za życie całej rodziny ludzkiej i za przyszły kształt ewolucji świata roślin i zwierząt. Poczucie odpowiedzialności jest zawarte w antropocentrycznych założeniach inżynierii genetycznej. Próba wykrycia i sformułowania tych milczących założeń jest celem niniejszych rozważań. Przyjętą drogą analitycznego postępowania jest szlak najnowszych osiągnięć w dziedzinie biochemicznych mechanizmów dziedziczenia i biomolekularnej teorii genu w aspekcie praktycznych problemów inżynierii genetycznej czyli w aspekcie sztucznej rekombinacji DNA (kwas dezo-ksyrybonukleinowy).

Rekombinacja DNA in vitro nie jest nową dyscypliną naukową. Jest to tylko dziedzina metod inżynieryjnych zastosowanych w procesie badania struktury, funkcji i rozwoju mechanizmów dziedziczenia na poziomie biomolekularnym.

## I. INŻYNIERIA W BIOLOGII MOLEKULARNEJ GENU

Techniki inżynierii genetycznej opierają się przede wszystkim na eksperymencie manipulacyjnym. Eksperyment jest to ingerencja badacza w układ materialny względnie odizolowany od całości przyrody w celu przeprowadzenia obserwacji, podyktowanej przez zadania poznawcze nauk empiriologicznych. Ingerencja ta ma charakter manipulacyjny i składa się z różnych kroków postępowania; takich jak: a) jeśli urzeczywistnisz zjawisko X, może zaobserwujesz zjawisko Y; b) jeśli przeszkodzisz urzeczywistnieniu się zjawiska X, może nie dopuścisz do pojawienia się zjawiska Y; c) jeśli zmodyfikujesz zjawisko X, może zauważysz zmianę w natężeniu zjawiska Y. Kroki postępowania eksperymentalnego niejednokrotnie uzupełniają się wzajemnie ze względu na bardzo złożoną i wielopłaszczyznową dziedzinę badań, jaką jest biologia molekularna genu.

### 1. BIOCHEMICZNE PODSTAWY DZIEDZICZENIA

W latach dwudziestych naszego stulecia wykryto zjawisko transformacji. Odkrycia tego dokonał F. J. Griffith<sup>1</sup>. Zajmował się on jednym z gatunków pneumokoków (*Diplococcus pneumoniae*), wywołującym u ssaków zapalenie płuc. Doświadczenie Griffitha polegało na tym, że zakażał on jedną grupę myszy bakteriami szorstkimi (zjadliwe) zabitymi podwyższoną temperaturą, drugą grupę bakteriami gładkimi (niezjadliwymi), trzecią natomiast — zabitymi bakteriami szorstkimi i żywymi bakteriami gładkimi. Okazało się, że tylko myszy trzeciej grupy wygięły. Griffith wyciągnął wniosek, że bakterie szorstkie, które zostały zabite, przekazały cechę zjadliwości bakteriom gładkim (żywym w tym doświadczeniu). Zjawisko to nazwał transformacją.

W latach czterdziestych O. T. Avery, C. M. MacLeod i M. McCarty<sup>2</sup> wykazali, że transformacja występuje jedynie przy użyciu elementów komórki bakteryjnej zawierającej kwas dezoksyrybonukleinowy. Wynik doświadczenia był jednoznaczny, a mianowicie, że materiałem dziedzicznym u bakterii jest DNA. Powstał zatem nowy problem, a mianowicie; jaka jest struktura DNA? Rozwiązanie tego zagadnienia przypadło w udziale J. D. Watsonowi i F. H. C. Crickowi<sup>3</sup>. Autorzy ci w 1953 r. przedstawili model DNA i jego replikację. Model swój oparli przede wszyst-

<sup>1</sup> Zob. D. M. Goldfarb, *Wstęp do genetyki bakterii*, tłum. A. Piekarowicz, Warszawa 1971, s. 80—113.

<sup>2</sup> Zob. J. D. Watson, *Biologia molekularna genu*, tłum. J. Z. B. i in., Warszawa 1975, s. 192—198.

<sup>3</sup> A structure for deoxyribose nucleic acid. *Natura*, Lond. (1953), s. 171, 737.

kim na wynikach rentgenograficznych M. Wilkinsa i współpracowników<sup>4</sup>. Według tego modelu DNA składa się z trzech elementów; a) zasady azotowej, b) cukru dezoksyrybozy i c) reszty kwasu fosforowego. Nukleotydy (jednostki DNA) różnią się między sobą zasadami azotowymi. Jest ich cztery: adenina, tymina, guanina i cytozyna. Dwa łańcuchy nukleotydowe są okręcone wokół siebie na wzór drabiny skręconej, tworząc podwójną spiralę — ściśle podwójną helisę<sup>5</sup>. Nukleotydowe łańcuchy utrzymywane są razem dzięki wiązaniom wodorowym pomiędzy zasadami, leżącymi na przeciwko siebie na wzór szczebli drabiny. Regułą budowy cząsteczki DNA jest pewna prawidłowość, a mianowicie, że guanina jednego łańcucha może łączyć się w parę z cytozyną drugiego łańcucha, natomiast adenina może łączyć się z tyminą. Cząsteczka DNA ma zdolność samoodtworzenia się, czyli replikacji. Zjawisko replikacji przebiega w ten sposób, że nukleotydowe łańcuchy cząsteczki DNA rozkręcają się, a następnie każdy z nich dobudowuje sobie łańcuch komplementarny. Dzięki replikacji substancja dziedziczna ma zapewnioną zdolność do samopowielania się.

Materiał genetyczny nie tylko winien mieć zdolność samoodtworzenia się, ale powinien również kierować procesami fizjologicznymi organizmu i determinować jego cechy strukturalne. Otóż DNA pełni taką rolę dzięki procesowi produkcji różnego rodzaju białek, które budują organizm. Proces biosyntezy białka został już dokładnie poznany. Przebiega on w dwóch zasadniczych fazach. Pierwsza faza nazywa się transkrypcją druga zaś translacją. Transkrypcja polega na tym, że podwójna helisa DNA na pewnym odcinku rozkręca się i wzdłuż jednego łańcucha dołączają się nukleotydy przy udziale enzymu (polimeraza RNA), tworząc tym samym łańcuch mRNA (informacyjny RNA). Proces dołączania przebiega w myśl reguł łączenia się zasad azotowych w pary, tzn. w punkcie, w którym DNA posiada np. guaninę a RNA zawiera cytozynę. Adenina w DNA odpowiada uracylowi w RNA. Jest tak dlatego, że zasada ta występuje w RNA zamiast tyminy. Molekuła mRNA wędruje do cytoplazmy jako wzorzec do syntezy molekuly białka. Fazę tę nazywamy translacją. W tej fazie zaangażowane są jeszcze inne rodzaje RNA takie jak: przenośnikowy i rybosomowy oraz szereg enzymów. U organizmów prokariotycznych (bez wyodrębnionego jądra komórkowego) procesy transkrypcji i translacji zachodzą prawie równocześnie.

---

<sup>4</sup> Zob. J. N. Davidson, *Biochemia kwasów nukleinowych*, tłum. Z. Walczak, Warszawa 1963, s. 74, 77.

<sup>5</sup> W piśmiennictwie polskim przyjęto początkowo tłumaczenie angielskiego słowa „helix” jako „spiralą”. Nie jest to termin ścisły, a to dlatego, że spiralą jest krzywą o coraz mniejszym promieniu wodzącym. Natomiast strukturę geometryczną DNA winno się opisywać za pomocą krzywej biegnącej wokół walca o jednakowym promieniu. Taką strukturę winno się nazywać helisą.

Proces transkrypcji rządzi się regułami kodu genetycznego<sup>6</sup>. Prawa kodu odnoszą się do struktur molekularnych, ułożonych w łańcuchy o charakterze sekwencyjnym. Przestrzenne następstwo struktur łańcuchów DNA tworzą nukleotydy. Natomiast przestrzenne następstwo struktur łańcuchów białkowych tworzą aminokwasy. Tłumaczenie zasad na sekwencję aminokwasów odbywa się w ten sposób, że jeden aminokwas przyporządkowuje się trzem zasadom. Trójkowy charakter kodu wykazano na drodze działania akredynami na DNA. Jest to mutageniczna grupa związków chemicznych, których wpływ na DNA polega na usuwaniu lub wstawianiu pojedynczych nukleotydów. Doświadczenia wykazały, że usunięcie lub wstawienie jednego z nukleotydów sprawiło pod kontrolą DNA całkowitą zmianę w strukturze białka. Podobny skutek następował przy wypadnięciu lub wstawieniu dwóch nukleotydów. Natomiast przy ubytku lub wstawieniu trzech nukleotydów nie zaobserwowano tak drastycznych zmian. Co więcej, jeśli po usunięciu jednego nukleotydu to miejsce wypełnił sąsiedni, białko przyjmowało strukturę normalną. Dane te przemawiają za trójkowym i kierunkowym zapisem informacji. Zapis ten jest również bezprzecinkowy, tzn. trójki nukleotydów odpowiedzialne za ułożenie poszczególnych aminokwasów danego białka nie są odgródzone od siebie żadnymi przecinkami w postaci np. pojedynczych nukleotydów.

Białka można syntetyzować *in vitro*, o ile użyje się wszystkich składników systemu syntetyzującego, takich jak: rybosomy, RNA przenośnikowy, ATP i odpowiednie enzymy, wzorzec w postaci informacyjnego RNA, który może być pochodzenia sztucznego. W pierwszych doświadczeniach Nirenberg<sup>7</sup> użył w charakterze wzorca RNA, zbudowanego wyłącznie z nukleotydów zawierających zasadę uracylu. Otrzymane białko składało się z aminokwasów jednego rodzaju, a mianowicie fenyloalaniny. Stało się jasne, że tryplet UUU tworzy zapis dla fenyloalaniny. W następnych doświadczeniach prowadzonych przez Nirenberga i szereg innych badaczy, w których używano różnych nukleotydów pochodzenia sztucznego o znanym składzie zasad, ustalono sens wszystkich trypletów zwanych kodonami.

W pewnych odstępach w łańcuchu nukleotydowym pojawiają się trójki, nieoznaczające żadnego aminokwasu, są to tryplety nonsensowne, które w genetycznym kodzie pełnią rolę znaków przystankowych, informując o zakończeniu zapisu jednego białka i o rozpoczęciu zapisu drugiego. Sposób zapisu ma charakter powszechny, ponadtaksonomiczny, tzn., że od wirusów począwszy a na człowieku skończywszy, te same tryplety kodują te same aminokwasy.

<sup>6</sup> Zob. J. D. Watson, *dz. cyt.*, s. 337 n.

<sup>7</sup> *Tamże*, 342 nn.

## 2. BIOMOLEKULARNA ANALIZA GENU

Mendłowska analiza<sup>8</sup>, oparta na wynikach krzyżowania organizmów, doprowadziła do sformułowania teorii genów przypominającej teorię atomistyczną. Według tej analizy gen był jednostką: dziedziczności, rekombinacji, mutacji i funkcji. W świetle badań na poziomie molekularnym gen jest odcinkiem DNA, w którym zakodowana jest informacja o określonym białku. Przeciętnej wielkości molekula białka składa się z kilkaset jednostek, zwanych aminokwasami. Przyjmując, że jeden aminokwas jest determinowany przez jeden tryplet, należy uznać, że odcinek DNA jako jeden gen jest łańcuchem zbudowanym z kilkuset do kilku tysięcy nukleotydów. W łańcuchu tym mogą zachodzić mutacje<sup>9</sup> i rekombinacje<sup>10</sup>.

Metodą indukcyjną, polegającą na wywoływaniu dziedzicznych zmian w sposób sztuczny, można otrzymać wiele różnych mutantów danego szczepu, które posiadają zmutowany ten sam gen. Świadczą o tym badania J. Pritharda<sup>11</sup> nad mutantami grzyba *Aspergillus nidulans*, które wymagają do wzrostu adeniny. Po skrzyżowaniu ze sobą dwóch mutantów tego gatunku w potomstwie pojawiły się organizmy typu dzikiego, które nie wymagają adeniny do swego wzrostu. Można było założyć, że pojawiła się mutacja genu (ad) w kierunku genu typu dzikiego (mutacja powrotna) oznaczona symbolem (+ad). Obserwacje, za pomocą technik pomiarowych, wykazały, że dla obu krzyżowanych mutantów częstość występowania mutacji powrotnych była jednak niższa niż częstość pojawiania się organizmów typu dzikiego w krzyżówce. Ten fakt nasunął przypuszczenie, że wewnątrz genu zachodzi rekombinacja. Wkrótce okazało się, że rekombinacja wewnątrzgenowa jest regułą i zaczęto sporządzać mapy genetyczne dla wielu genów różnych osobników. Przykładem tego rodzaju badań są molekularne analizy struktury genu S. Benzera<sup>12</sup> nad fagiem T4, namnażającym się w bakterii *Escherichia coli* (w skrócie *E. coli*). Namnażanie tego wirusa w tej bakterii powoduje jej lizę czyli zniszczenie; potomstwo T4 wydostaje się na zewnątrz i atakuje sąsiednie osobniki *E. coli*. Jeżeli *E. coli* wysiewa się gęsto, to powstaje na powierzchni pożywki zwarty kożuch, a obecność T4 rozpoznaje się na podstawie pojawienia się tzw. łysinek, czyli miejsc wolnych od *E. coli*. Bakteriofagi typu dzikiego tworzą łysinki małe i koliste. Natomiast mu-

<sup>8</sup> J. G. Mendel, *Versuche über Pflanzenhybriden*, Brünn 1865.

<sup>9</sup> Termin „mutacja” pochodzi od H. de Vriesa (*Die Mutationstheorie*, Bd. I. Leipzig 1901) i oznacza dziedziczną zmianę materiału genetycznego, która nie jest następstwem segregacji ani rekombinacji genetycznej.

<sup>10</sup> Rekombinacja genetyczna jest to proces, który prowadzi do pojawienia się potomstwa o odmiennym zestawie jednostek genetycznych w stosunku do rodziców.

<sup>11</sup> Zob. J. D. Watson, *dz. cyt.*, s. 201 nn.

<sup>12</sup> The fine structure of the gene. *Sci. Am.*, January 1962, s. 70—84.

tanty tworzą łyśinki duże i rozlane, charakteryzując się ponadto tym, że wykazują zdolność do namnażania się w *E. coli* szczepu B, bez właściwości namnażania się w *E. coli* szczepu K. Tego typu mutanty noszą znak (rII). Fagi typu dzikiego rozwijają się równie dobrze na obu szczepach *E. coli*.

Metodą krzyżowania różnych mutantów rII Benzer ulokował na mapie genowej ponad 2000 punktów mutujących. Doświadczenia Benzera wykazują jasno, że gen nie jest ani jednostką mutacji, ani jednostką rekombinacji. Mutacja może zachodzić w wielu różnych miejscach genu, które z kolei mogą ulegać zjawisku crossing-over.

Ch. Yanofsky<sup>13</sup> opracował mapę genu odpowiedzialnego za syntezę tryptofanową tj. za powstanie enzymatycznego białka *E. coli*, potwierdzając tym samym zasadę kolinearności genu i białka. Ustalił ponadto sekwencję aminokwasów w tym białku tak w szczepie dzikim, jak i zmutowanym. Białko osobników zmutowanych różniło się od białka szczepu dzikiego zamianą jednego z aminokwasów. Zmiana taka wystarcza, by dane białko zmieniło lub utraciło swą aktywność biologiczną. Wiele przykładów mutacji pochodzących z zamiany tylko jednego aminokwasu w białku dostarczyły badania nad hemoglobinami człowieka, w których to skład wchodzi cztery łańcuchy białkowe (dwa łańcuchy alfa i dwa beta), kontrolowanych przez dwa geny. Łańcuch alfa liczy 141, a łańcuch beta 146 aminokwasów. Są ludzie, którzy mają hemoglobinę nienormalną, przybierającą kształt sierpu. Doświadczenia wykazały, że hemoglobina ludzi chorych różni się od normalnej jedynie zmianą jednego aminokwasu w łańcuchu alfa. W hemoglobinie normalnej na siódmej pozycji znajduje się kwas glutaminowy, a w hemoglobinie nienormalnej to miejsce zajmuje walina.

Kwas glutaminowy kodują trójki DNA: „cytozyna-tymina-tymina” oraz „cytozyna-tymina-cytozyna”, natomiast walinę koduje „cytozyna-adenina-adenina”, „cytozyna-adenina-guanina”, „cytozyna-adenina-tymina” oraz „cytozyna-adenina-guanina”. Przyjmuje się, że mutacja prowadząca do powstania hemoglobiny sierpowatej polega na tym, że druga zasada w trójce, tj. adenina, zostaje zamieniona przez tyminę.

Najmniejsze takie odcinki<sup>14</sup> sekwencji DNA są bardzo specyficzne w kontrolowaniu syntezy białka. Nic też dziwnego, że z punktu widzenia biologii molekularnej zmienił się ostatnio obraz genu. Obecnie nazwę „gen” przypisuje się pescyficznej liniowej sekwencji nukleotydów w DNA.

<sup>13</sup> Gene structure and protein structure. In: R. H. Haynes, P. C. Hanawalt, (ed): *The Molecular Basis of Life*, San Francisco 1968, s. 224—229.

<sup>14</sup> F. H. C. Crick zaproponował hipotezę kodonu, według której aminokwas otrzymuje swoje miejsce w łańcuchu polipeptydowym ze względu na trzy sąsiadujące nukleotydy łańcucha DNA. (*The recent excitement in the coding problem*, Progr. Nucleic Acid Res. 1963, 1, 163).

Gen działa jako funkcjonalna jednostka, determinująca kolejność aminokwasów w określonym polipeptydzie oraz pełniąc rolę sygnałów regulujących i przystankowych.

Odcinki liniowej sekwencji nukleotydów w DNA mogą w komórce ulegać procesowi rekombinacji. W przypadku rekombinacji u wirusów mechanizm wymiany odcinków polega na działaniu specyficznych nukleaz. Oprócz rekombinacji znane są naturalne procesy włączania się do chromosomu obcego DNA. Większość jednak obcego DNA po wtargnięciu do komórki gospodarza jest od razu niszczona. W przypadku organizmów bakteryjnych rolę niszczyielską względem obcego DNA pełnią nukleazy restrykcyjne. Jest to poważny problem dla chirurgii genowej, nazywanej też sztuczną rekombinacją lub manipulacją materiałem genetycznym.

### 3. PRAKTYCZNE PROBLEMY INŻYNIERII GENETYCZNEJ

Najogólniej rzecz biorąc inżynieria genetyczna polega na łączeniu *in vitro* fragmentów DNA (etap rekombinowania) a następnie na wprowadzaniu ich do komórki gospodarza, w której nowo powstała kombinacja DNA może ulec namnażaniu (etap klonowania) i determinować syntezę odpowiednich białek. W sztucznej rekombinacji mogą brać udział fragmenty DNA dowolnych organizmów, uzyskując zupełnie nowe kombinacje genowe począwszy od bakterii a skończywszy na człowieku. Przenoszenie genów z wyższych organizmów do bakterii jest dość skomplikowane. W preparatach chemicznych izoluje się DNA wyższego organizmu a następnie poddaje się go fragmentowaniu na małe odcinki. Zabieg fragmentowania dokonuje się mechanicznie i biochemicznie za pomocą enzymu restrykcyjnego. Enzymy restrykcyjne należą do grupy endonukleaz i są otrzymywane z bakterii i sinic. Selektywnie podchodzą do kilku nukleotydowych sekwencji w DNA na wzór rozpoznawczych mechanizmów i przecinają molekułę DNA w obrębie rozpoznawanych sekwencji. Miejsca przecięcia dwóch łańcuchów w obrębie rozpoznanej sekwencji nie leżą dokładnie na przeciw siebie, dzieli ich bowiem różnica odległości o kilka nukleotydów.

Na skutek trawienia DNA enzymem restrykcyjnym EcoRI (otrzymywany z bakterii *E. coli*) uzyskuje się fragmenty dwułańcuchowych cząsteczek. Otrzymane fragmenty DNA można łatwo łączyć ze sobą, gdyż posiadają one takie same jednołańcuchowe zakończenia. Zakończenia te nazywają się lepкими końcami i posują do siebie w wyniku komplementarnych procesów powstawania łańcuchów nukleotydowych. Wystąpienie wodorowych wiązań pomiędzy zasadami w obszarze lepких końców nie można oczywiście utożsamiać z powstawaniem kowalencyjnych wiązań pomiędzy sąsiadującymi nukleotydami w jednym łańcuchu. Do wytwo-

rzenia tych wiązań stosuje się enzym zwany ligazą DNA. Ligaza katalizuje wiązania fosfodwuestrowe.

Proces laboratoryjnego fragmentowania DNA za pomocą restrykcyjnych enzymów oraz różnego rodzaju próby łączenia tych fragmenów przez zadziałanie ligazą dają w wyniku molekuly mieszańcowe DNA, w których sąsiadują ze sobą odcinki DNA, zawierające geny lub zespoły genów z różnych organizmów. Aby zapewnić zdolność samopowielania się, nie tworzy się kombinacji pomiędzy dowolnymi fragmentami substancji dziedzicznej, lecz łączy się fragmenty DNA z cząsteczkami DNA, które spełniają rolę przenośników, czyli wektorów. Nazwę „wektor” odnosimy do krótkiego łańcucha DNA, mającego zdolność samodzielnej replikacji. W eksperymentalnym zabiegu wprowadzania obcych genów do komórki bakterii rolę wektorów<sup>15</sup> mogą spełniać wirusy bakteryjne lub plazmidy. Dobrym wektorem wirusowym jest fag gama. Wektor o charakterze plazmidu jest małą kolistą cząsteczką DNA, która występuje w kilku kopiach w organizmie bakterii. Grupa naukowców ze Stanfordu<sup>18</sup> znalazła dobry plazmid pSC 101, w którym znajduje się cecha oporności na tetracyklinę. Plazmid ten wyizolowano z dużego plazmidu *E. coli*. Wyizolowany plazmid z łatwością wprowadza się do *E. coli* po uprzednim rozluźnieniu błony bakteryjnej przez zadziałanie roztworem chlorku wapnia. Obecność genu kodującego oporność na tetracyklinę w plazmidzie pozwala na identyfikację jego obecności u *E. coli*, pochodzących ze szczepu pozbawionego oporności przeciwko temu antybiotykwowi.

Pierwsze doświadczenia<sup>17</sup> z zakresu chirurgii genetycznej odbywały się na szczepach bakterii *E. coli*. Dawcą nowego genu był plazmid, pochodzący z *E. coli*, przenoszący cechę oporności na antybiotyk kanamycynę, ale pozbawiony zdolności do samoreplikacji w organizmie bakterii. Połączone ze sobą cząsteczki plazmidu pSC 101 z plazmidem przenoszącym oporność na kanamycynę poddane zostały działaniu restryktazy *EcoRI*, a następnie ligazy DNA. Otrzymaną cząsteczkę DNA wprowadzono do komórek *E. coli* przynależnych do szczepu nie wykazującego oporności ani na tetracyklinę, ani na kanamycynę. Wśród bakterii potomnych znaleziono jednak i takie organizmy, które były odporne na obydwa antybiotyki.

Następne doświadczenia<sup>18</sup> dotyczyły wprowadzenia genu ze *Staphylococcus aureus* do *E. coli*. Mieszanina plazmidu pSC 101 z *E. coli* i plazmidu pI258 z *S. aureus*, poddana kolejno enzymatycznemu działaniu

<sup>15</sup> Magdalena Fikus, *Rekombinacja DNA in vitro*, w: „Biologia molekularna, Warszawa 1980, s. 438 n.

<sup>16</sup> *Tamże*, s. 440.

<sup>17</sup> Magdalena Fikus, *Inżynierowie żywych komórek*, Warszawa 1982, s. 77 nn.

<sup>18</sup> *Tamże*, s. 93 nn.

restryktazy Eco RI i ligazy DNA a następnie wprowadzana do bakterii *E. coli* wrażliwych na penicylinę i tetracyklinę, wydawała bakterie namnażające się swobodnie w obecności obydwu antybiotyków. Metody sztucznej rekombinacji przełamały bariery międzygatunkowe. Geny obcego gatunku realizują się i replikują w komórce gospodarza tak, jak jego rodzime geny. Nowsze doświadczenia są jeszcze bardziej obiecujące, a to dlatego, że wprowadza się na szeroką skalę geny zwierzęcego pochodzenia do *E. coli*. Otóż do organizmu *E. coli* wprowadzono za pomocą wektora pSC 101 wyizolowany z żaby *Xenopus laevis* gen determinujący rybosomalny RNA. Żabi DNA podłączony do plazmidu replikował się w organizmie bakteryjnym i wraz z nim przechodził do organizmów potomnych. Co więcej, w obrębie materiałów genetycznych mieszańcowych organizmów *E. coli* zauważono rybosomalny RNA syntetyzowany przez żabę *Xenopus laevis*.

Ewolucyjna odległość między dawcą genu a jego biorcą nie jest przeszkodą w rekombinacji *in vitro*<sup>19</sup>. Każdy dowolny gen może być doprowadzony do materiału genetycznego bakterii ze skutkiem pomyślnym pod warunkiem, że jego obecność nie zakłóci przemiany materii gospodarza. Poszczególne etapy manipulacji genami zachodzą z małą wydajnością. W mieszaninie plazmidu pSC 101 i obcego DNA, poddanej wpływom restryktazy i ligazy, trzy czwarte czynnych biologicznie cząsteczek to zrekonstruowany plazmid, nie połączony z DNA. Na milion bakterii *E. coli* tylko jedna przyjmuje cząsteczkę zmodyfikowanego plazmidu. Fakt ten utrudnia proces wykrywania zmodyfikowanych bakterii. Wektorowy plazmid winien mieć cechę łatwo wykrywalną. Taką własnością jest oporność na antybiotyk. Pozwala on w bardzo prosty sposób usunąć bakterie, do których wnętrza nie dotarła cząsteczka DNA pochodzenia plazmidowego. W przypadku mniej uchwytnych cech, niesionych przez DNA, stosuje się bardziej zawile metody. Do tych metod należy: elektroforetyczna analiza DNA, analiza DNA przez wirowanie w gradiencie gęstości soli cesowych oraz analiza DNA metodą hybrydyzacji. Rozwój metod wykrywania zmodyfikowanych cząsteczek (chimer) przyczyni się waleń do rozwoju genetyki inżynierskiej, która niesie ze sobą nowe perspektywy teoretyczne i praktyczne dla rozwoju kultury i cywilizacji. Chirurgia genowa niesie ze sobą również i pewne konsekwencje, których nie można pominąć w refleksji nad postępem badań w zakresie technik manipulacyjnych w genetyce molekularnej.

<sup>19</sup> Tamże, s. 147 nn.

## II. PERSPEKTYWY I KONSEKWENCJE REKOMBINACJI DNA

### *in vitro*

Rekombinacja DNA *in vitro* przełamała naturalne bariery pomiędzy eksperymentatorem a badanym fragmentem przyrody ożywionej. W dziejach poznania biologicznego uczeni badali swój przedmiot na różnych poziomach biosfery, ale nigdy nie konstruowali przedmiotów swego poznania. W ostatnich bowiem czasach rekonstruuje się nowe własności dziedziczne i to o charakterze międzygatunkowym. Chirurgiczna manipulacja genami daje szanse na wprowadzenie do wnętrza genomu żywego organizmu dowolnie wybranego fragmentu DNA w taki sposób, że gospodarz uznaje ten odcinek molekularnej substancji dziedzicznej za własną strukturę. Fakt ten fascynuje uczonych całego świata ze względu na wielkie perspektywy jakie rysują się na horyzoncie rozwoju naszej cywilizacji.

### 1. PERSPEKTYWY INŻYNIERII GENETYCZNEJ

Problem manipulacji podłożem dziedzicznym *in vitro* wyrósł na bazie informacji, dostarczonej z badań nad strukturą i funkcją materiału genetycznego pochodzenia wirusowego i bakteryjnego.

Komórka bakteryjna jest bardzo szczęśliwym przypadkiem dla badań biologicznych ze względu na prostą budowę aparatu genetycznego i łatwą obserwację w procesie ustalania zmian mutacyjnych. Ustalona zależność pomiędzy zmianami w strukturze DNA a zmianami w metabolizmie komórki bakteryjnej jest najbardziej efektywną podstawą dla metod genetyki molekularnej. Podstawa ta mniejszą rolę odgrywa w metodach badawczych nad eukariontami, a to dlatego, że organizmy jądrowe posiadają bardzo skomplikowany genom i w związku z tym utrudnione są techniki izolowania i badania mutantów. Natomiast rewelacyjne efekty w tej dziedzinie niesie manipulacyjna technika klonowania DNA w plazmidach bakteryjnych lub bakteriofagach. Wybrane, w sposób zupełnie dowolny, odcinki jądrowego DNA można wprowadzać za pomocą przenośnikowych plazmidów lub fagów do różnych mutantów bakteryjnych i obserwować efekty tego zabiegu. Jeżeli ów fragment zniesie efekt mutacji, to znaczy, że wniósł on taką informację, którą utraciła komórka gospodarza. Jest to najprostsza metoda posługiwania się mutantami prokariotycznymi do badania substancji dziedzicznej eukariontów.

Kolejna wartość tej dziedziny badań to eksperymentalne obserwacje wyizolowanych fragmentów jądrowych DNA, które determinują bardzo złożone struktury i funkcje w procesie różnicowania się i integracji organizmów wyższych.

Nowe metody, nazwane inżynierią genetyczną, doprowadziły do odkrycia bardzo ciekawych zjawisk z zakresu struktury genu. Tytułem przykładu wypada wspomnieć o tzw. zjawisku genów podzielonych. Okazało się bowiem, że gen nie jest ciągłą nicią DNA, która koduje ciągłą nić białka, ale wiele genów zwierzęcych jest podzielonych na odcinki kodujące (egzony) i nie kodujące (introny). Przykładem genów złożonych z egzonów i intronów są geny globin osocza krwi ssaków, które wraz z hemem tworzą hemoglobinę, składnik erytrocytów konieczny w zjawisku utleniania krwi. Przyczyny występowania podzielonych genów oraz rola intronów są przedmiotem licznych kontrowersji i hipotez. Genetyka rozporządza danymi, które świadczą, że introny mogą wpływać na ekspresję tego genu, w którym się znajdują. Mogą również zmieniać ekspresję innych genów. Nie jest również wykluczona myśl, że introny są szczątkowym odpadem ewolucyjnych przemian.

Istnieją odcinki łańcuchów genomowych, które nie ulegają transkrypcji ani translacji. Odcinkom tym przypisuje się rolę regulatywną i noszą nazwę „operonów”. Po licznych badaniach operonu laktozy ustalono sekwencję nukleotydów operatora. Okazało się, że odcinek operatora do oddziaływań z represorem składa się z 21 nukleotydów, podczas gdy cały operon jest zbudowany z kilku tysięcy nukleotydów.

Z czysto praktycznych względów nie sposób pominąć sprawę badań nad produkcją insuliny. Dokonano syntezy genu insuliny ludzkiej. Są to geny, które kodują niezależne dwa polipeptydy: łańcuch A (21 aminokwasów) i łańcuch B (30 aminokwasów). Geny połączono osobno z wektorem plazmidowym i transformowano bakterie, z których jeden był identyczny z łańcuchem A insuliny ludzkiej, a drugi z łańcuchem B. Połączenie łańcucha A i B umożliwia utrwalenie się struktury przestrzennej insuliny, jako warunku aktywności biologicznej tego związku.

Metody inżynieryjne w genetyce doprowadziły również do wykrycia enzymu reduktazy dihydrofolianowej myszy, który jest szczególnie konieczny do szybkiego podziału komórek nowotworowych. Enzym ten specyficznie hamuje działanie hormonu zwanego ametoptyryną. Zwiększona dawka hormonu warunkuje wzrost enzymu reduktazy. Podjęto syntezę genu przez użycie reduktazy odwrotną transkryptazą. Używając tego genu zauważono, że w chromosomie komórek opornych na ametoptyrynę gen reduktazy uległ zwielokrotnieniu rzędu kilkuset kopii.

Opisano również klonowanie DNA wirusa żółtaczkowego w bakteriach. Uważa się, że białka tego rodzaju mogą być użyte do produkcji profilaktycznej szczepionki.

W ramach badań manipulacyjnych zauważono, że nie spotyka się przypadków jednoczesnego pojawienia się dwu chorób wirusowych u jednego pacjenta. Dzieje się tak dlatego, że zakażający wirus warunkuje

wydzielanie się białka, zwanego interferonem, który uodparnia organizm przeciw innym wirusom. W procesie klonowania genu interferonu stosuje się metody odwrotnej transkrypcji, tzn. rozpoczyna się pracę od mRNA interferonu, a nie od wydzielania odcinka DNA z genem interferonu. Geny te zostaną wykorzystane do produkcji poszczególnych preparatów interferonu. Przypuszcza się, że niektóre z nich okażą się szczególnie skuteczne w walce w wirusami lub nowotworami<sup>20</sup>.

Perspektywy te odnoszą się również do rozwoju rolnictwa i przemysłu. W tej bowiem dziedzinie można odnotować możliwość rozbudowy teorii zmiany genotypu roślin uprawnych na użytek przemysłu spożywczego. Rysuje się możliwość przeniesienia genu z roślin motylkowych do zbóż, który umożliwi przyswajanie azotu z powietrza bakteriom korzeniowym na zasadzie wiązania z tkanką roślinną. Fakt ten pociągnie za sobą likwidację kosztownych zakładów przemysłu azotowego. Przemysł spożywczy i farmaceutyczny może zwielokrotnić swą produkcję. Jest to tylko sprawa doboru odpowiednich genów ze względu na odpowiednie zapotrzebowanie określonych gałęzi przemysłu. Zrekonstruowanie odpowiednich genomów określonych bakterii ze względu na oczyszczanie ścieków kanalizacyjnych dałoby wielkie usługi w zakresie ochrony środowiska naturalnego człowieka.

Szeroko zakrojona perspektywa rozwoju technik manipulacyjnych, z racji dotychczasowych wielkich osiągnięć, kryje jednak w sobie szereg problemów w pełni nie rozwiązanych. Do nich należy między innymi sprawa klonowania obcego DNA w genomie eukariontów. Jedną z pierwszych możliwości, jaką się bierze pod uwagę podczas rozwiązywania tego zagadnienia, to stosowanie wektora wirusowego. Musi być jednak przy tym spełniony warunek, a mianowicie, że po dołączeniu do niego genu obcego DNA zachowa on zdolność do infekcji. Jest to sprawa dość niebezpieczna.

Inną ewentualność to wykorzystanie pozajądrowego DNA eukariontów, który występuje w mitochondriach i chloroplastach. Problem polega jednak na tym, że dobrze nie wiadomo jak wprowadzić DNA pozajądrowe do komórki eukariotycznej, nie mającej bakteryjnej właściwości do transformacji.

## 2. WIELOASPEKTOWE KONSEKWENCJE MANIPULACJI GENAMI

Biofizyczne i biomolekularne techniki manipulacji genami budzą wielki niepokój w społeczności uczonych<sup>21</sup> od momentu zastosowania ich do badań teoretycznych i praktycznych w obrębie poznania przyrody oży-

<sup>20</sup> Tamże, s. 180 nn.

<sup>21</sup> F. Fikus, *dz. cyt.*, s. 198.

wionej. Niektórzy uczeni uważają, że rozprzestrzenianie się laboratoriów inżynierii genetycznej na naszej planecie jest równie niebezpieczne, a nawet bardziej groźne niż rozbudowa doświadczeń broni atomowej. Inni natomiast zdradzają skłonność do minimalizowania tego niebezpieczeństwa. Warto zatem rozważyć argumenty jednych i drugich, by tym samym stworzyć podstawę do analizy etycznej eksperymentu manipulacyjnego w relacji do zasady antropocentrycznej. Zasada ta głosi, że cała przyroda ożywiona i nieożywiona winna służyć człowiekowi ze względu na jego rozwój materialny i duchowy. Człowiek zaś winien pozostać w stosunku do przyrody w roli króla stworzenia a nie w roli tyra, który egocentryzm przekształca w egoizm i tym samym zmierza ku samozagładzie. Zobaczmy zatem jak ten wielki problem przedstawia się w przypadku rekombinacji DNA *in vitro*.

Istotne niebezpieczeństwo eksperymentów manipulacyjnych w genetyce polega na tym, że nie potrafimy w tej chwili uświadomić sobie skutków ingerencji człowieka w obręb genomu. Manipulacyjne techniki nie są skomplikowane, ale struktury molekularne oraz relacje dynamiczne, wiążące ilość zasad azotowych oraz ich sekwencje w DNA ze względu na określoną postać fenotypową danego organizmu, są bardzo złożone i wielopoziomowe. Organizmy pod tym względem, są jeszcze bardzo mało poznane. Sztuczny proces rekombinacji opiera się na eksperymentach, w których przypadkowo wybiera się odcinki łańcucha DNA z komórki dawcy. Rozpoznawanie ich przez restryktazy nie jest na tyle specyficzne, by można było tym procesem kierować w sposób jednoznaczny. Podobnie specyficzność transkrypcji jest wielce problematyczna. Okazuje się bowiem, że przeszczepiany odcinek DNA traci subtelne mechanizmy regulacyjne.

Sztuczna rekombinacja przełamuje naturalne bariery genetyczne między gatunkami, które rodziły się w ciągu milionów i setek milionów lat w procesie specjacji. Należy się mocno zastanowić nad różnymi następstwami, jakie mogą pojawić się w związku z eksperymentami manipulacyjnymi na poziomie struktur genetycznych. Cała bowiem biosfera jest systemem zorganizowanym na zasadzie hierarchicznych poziomów, które z kolei zbudowane są z poszczególnych układów ożywionych w aspekcie struktury, funkcji i rozwoju. W biologicznej literaturze rozpowszechniony jest pogląd, że układem najniższego rzędu jest komórka a najwyższego — biosfera jako całość<sup>22</sup>. Bioplaneta jako całość jest zdeterminowana przez podłoże genetyczne na poziomie komórki, natomiast poziom komórkowy jest modyfikowany przez całokształt relacji interakcyjnych poziomów różnych rzędów, składających się na całość biosfery. Manipu-

<sup>22</sup> T. Ścibor-Rylska, *Porządek i organizacja w przyrodzie*, Warszawa 1974, ss. 84—94.

lacja podłożem genetycznym na poziomie komórkowym nie pozostaje bez wpływu na różne biopoziomy naszej planety. Ten fakt nie może ująć uwadze uczonych we wszystkich refleksjach nad wartością badań opartych na eksperymentach w myśl zasady „na chybił trafił”.

Przestrzenno-czasowy rozwój rodziny ludzkiej jest wpleciony w biosferę jako całość poprzez misterną sieć złożonych relacji i różnorodnych więzi adaptacyjnych, uwarunkowanych długotrwałym procesem ewolucji życia na ziemi. Dominująca pozycja człowieka na ziemi opiera się właśnie na jego adaptacji do istniejących na ziemi warunków fizycznych i biotycznych. Naturalnymi wrogami ludzkiej populacji są mikroorganizmy ze świata bakterii i wirusów. Żadnemu z nich jednak, jak dotychczas, nie udało się wygubić populacji ludzkiej. Obecny organizm człowieka, efekt trwającego miliony lat procesu adaptacji do środowiska fizyko-chemicznego oraz przystosowywania się międzygatunkowego, rozporządza skutecznymi mechanizmami obronnymi przed różnego rodzaju mikroorganizmami różnych gatunków. Tam, gdzie nie mogą poradzić naturalne mechanizmy obronne, przychodzi z pomocą medycyna, której działalność sprowadza się do przywracania równowagi fizjologicznej organizmu. Równowaga fizjologiczna organizmu leży na linii działania mechanizmów obronnych, uwarunkowanych genetycznie. Układ dziedziczenia kontroluje również równowagę ekologiczną pomiędzy różnymi gatunkami w określonych populacjach danej biocenozy. Różne jednostki taksonomiczne wirusów i bakterii oraz eukariontów, do których należy człowiek, rozwijają się i żyją od wiele milionów lat wspólnie. Ekologicznie znają się wzajemnie, kształtowały je bowiem te same mechanizmy ewolucji.

Sztuczna rekombinacja DNA na „chybił trafił” może łatwo doprowadzić do przypadkowego ukształtowania się genomu o zupełnie nowych możliwościach, które dotychczas nie zostały jeszcze wypróbowane przez mechanizmy ewolucji. Rzecznicy nurtu „ograniczeń” eksperymentów manipulacyjnych w dziedzinie rekombinacji DNA *in vitro* bardzo często odwołują się do wyobraźni na temat takiej bakterii, która na skutek przeszczepów uzyskuje cechy zjadliwości dotychczas niespotykanej i cechy oporności na wszystkie znane antybiotyki oraz takie właściwości budowy zewnętrznej, która uniemożliwia zwalczanie jej przez ludzkie przeciwciała. Załóżmy hipotetycznie, że tą bakterią będzie *E. coli* przysłowiowy królik doświadczalny w badaniach mikrobiologicznych. Bakteria ta od niepamiętnych czasów zadomowiła się na stałe w jelicie ludzkim. Nietrudno sobie wyobrazić wszelkiego rodzaju skutki eksperymentów manipulacyjnych.

Stan badań nad mechanizmami powstawania i rozwoju nowotworów jest jeszcze niewystarczający do tego, by można było pokusić się na jakieś uogólnienia przydatne do terapii, ale przynajmniej w niektórych

przypadkach już ustalono, że transformacja przeciętnej komórki w komórkę nowotworową zachodzi na skutek włączenia DNA wirusowego do jej genomu. Takim wirusem onkogennym jest np. SV 40. Dotychczas nie rozwiązano zagadnienia; czy do transformacji nowotworowej wystarczy samo włączenie wirusowego DNA w specyficznym punkcie chromosomu i spowodowanie tym samym określonej zmiany geometrii DNA, czy też wymagana jest synteza pewnych białek wirusowych. Tym niemniej stosunkowo łatwo jest wyobrazić sobie fakt, że manipulując fragmentami DNA pochodzenia wirusowego można wyprodukować pewną ilość fragmentów zdolnych do przeprowadzenia nowotworowych transformacji, a jednocześnie o cechach infekcyjnych trudnych do zwalczania.

Obiegowa wiedza biomolekularna jest wystarczająca do tego by wydłużyć listę zagrożeń. Wystarczy choćby jeszcze wymieniść i ten fakt, że niebezpieczne eksperymenty fizyków w każdej chwili można wstrzymać; natomiast zrekonstruowana bakteria *E. coli* o właściwościach superzjadliwych będzie się namnażała sama przez czas nieograniczony niezależnie od podjętych decyzji na temat dalszych badań nad rekonstrukcją nowych genomów.

Są jednak autorzy, którzy uważają, że niebezpieczeństwo nie jest aż tak wielkie, by można było prowadzić dyskusję, kończącą się ciągle na „nie”. Szereg autorów<sup>23</sup> sądzi, że nie wolno zaprzepaścić cennego nurtu badań ze względu na widmo ciągłych zagrożeń, które wydają się być wielce problematyczne. Wyprodukowanie bowiem superzjadliwego szczepu mikroorganizmalnego jest sprawą bardzo dyskusyjną, a to dlatego, że cecha superzjadliwości jest następstwem kompleksu nieprzypadkowych rekombinacji genetycznych, powstających w stosunkowo długim czasie i to w obrębie całych populacji. Pojawienie się bowiem osobnika o nowym zestawie cech w danej populacji jest mało prawdopodobne. Ponadto proces transformacji i transdukcji zachodzi w sposób naturalny u prokariotów. Być może, że tego rodzaju wymiana genetyczna występuje między organizmami odległych gatunków, tylko ze względu na minimalny efekt, nie została jeszcze ujawniona.

### 3. ANTROPOCENTRYCZNE DYREKTYWY INŻYNIERII GENETYCZNEJ

Przy obecnym stanie wiedzy nie można z całą pewnością stwierdzić; czy rację mają zwolennicy czy przeciwnicy badań nad sztuczną rekombinacją z użyciem inżynierskich technik manipulacji genami. Stopień ryzyka jest jednak tak znaczny, że każdy badacz bierze na siebie etyczną odpowiedzialność za ludzi pracujących w laboratorium i za całą zbioro-

<sup>23</sup> Science, 185 (1974 ss. 41—48).

wość ludzką. To poczucie odpowiedzialności wystąpiło z całą wyrazistością u międzynarodowej społeczności uczonych. Dano temu wyraz w czerwcu 1973 r. w New Hampton (USA) na konferencji Gordonowskiej, poświęconej kwasom nukleinowym. W rok później dziesięciu amerykańskich specjalistów w dziedzinie genetyki biomolekularnej wystosowało apel do wszystkich laboratoriów na świecie o czasowe wstrzymanie najbardziej ryzykownych eksperymentów manipulacyjnych. Apel ten warto przytoczyć w obszerniejszym cytacie ze względu na wielki odzew, jaki wzbudził wśród naukowców świata i w szerokich kręgach rzesz licznych społeczeństw:

„Niżej podpisani, działając w imieniu i przy poparciu Zgromadzenia Nauk Przyrodniczych Narodowej Rady Naukowej Akademii Nauk, proponują następujące zalecenia:

Po pierwsze — i uważamy to za najważniejsze — zanim nie będziemy zdolni do dokładniejszej oceny potencjalnego zagrożenia i zanim nie opracuje się odpowiednich metod zabezpieczających przed niekontrolowanym rozprzestrzenianiem się komórek ze zrekombinowanym DNA, wzywamy naukowców na całym świecie, aby powstrzymali się dobrowolnie od następujących doświadczeń.

Typ 1: Konstrukcje nowych, niezależnych od chromosomu plazmidów bakteryjnych, w których wprowadzono by odporność na antybiotyki lub zdolność do syntezy bakteryjnych jądów do bakterii, które dotychczas takich cech nie miały. Również nie należałoby konstruować takich szczepów bakteryjnych, do których wprowadzono by oporność na klinicznie stosowane antybiotyki, chyba że plazmidy z tym zestawem oporności istnieją i są znane w przyrodzie.

Typ 2: Łączenie fragmentów lub całych cząsteczek DNA wirusów onkogennych lub innych wirusów zwierzęcych z autonomicznymi replikonami, takimi jak plazmidy bakteryjne lub inne wirusowe DNA. Takie zrekombinowane cząsteczki DNA mogłyby łatwiej rozprzestrzeniać się w bakteriach współżyjących z człowiekiem i innymi gatunkami i w ten sposób np. zwiększać częstotliwość zachorowań na raka i inne choroby. Po drugie — plany łączenia fragmentów zwierzęcych DNA z bakteryjnymi plazmidami lub fagami powinny być oceniane ostrożnie, w świetle faktu, że wiele zwierzęcych DNA zawiera sekwencje wspólne z sekwencjami wirusów onkogennych typu RNA. Ponieważ połączenie jakiegokolwiek obcego DNA z replikonem stwarza nowe zrekombinowane cząsteczki DNA, których właściwości biologiczne trudno jest przewidzieć z całą pewnością, doświadczenia takie nie powinny być podejmowane bez gruntownego ich przemyślenia (...)”<sup>24</sup>.

Następstwem apelu były międzynarodowe sympozja w Asilomar i La Jolla, na których wspólnie opracowano wytyczne odnośnie sprawy bezpieczeństwa granic manipulacyjnych eksperymentów. Dyrektywy z sympozjów, po wprowadzeniu pewnych poprawek, zostały opublikowane w czerwcu 1976 r. przez NIH (Narodowy Instytut Zdrowia) jako wytyczne regulujące tryb badań inżynierijsko-genetycznych. U podstaw przepisów NIH legło przekonanie, że należy kontynuować badania nad rekombinacją DNA in vitro. Badania te powinny jednak spełniać optymalny stopień bezpieczeństwa osób, w pracowniach laboratoryjnych i w środowis-

kach ludzkiej egzystencji bez naruszania równowagi biosfery, ze szczególnym uwzględnieniem prawa nietykalności tych gatunków, które są najbliższymi krewniakami gatunku ludzkiego.

W przypisach NIH zaproponowano cztery stopnie zabezpieczeń technicznych wraz z charakterystyką wyposażenia pracowni:

**P1** Znakiem tym oznaczono pracownię mikrobiologiczną o standardowym stopniu wyposażenia zabezpieczającego.

**P2** Znak ten symbolizuje pracownię standardową, ale ze zwiększonymi wymaganiami co do kwalifikacji pracowników i sposobu bezpieczeństwa pracy (dokładna sterylizacja używanych naczyń szklanych, aparatury i powierzchni roboczej oraz wzmożona ostrożność osobista).

**P3** Jest to znak, który przysługuje pracowni o wydzielonym pomieszczeniu w danym laboratorium z nakładem wysokich kosztów inwestycyjnych w zakresie technicznym i budowlanym. Personel zaś takiej pracowni winien wykazywać wysokie kwalifikacje techniczno-badawcze.

**P4** Znak ten oznacza taką pracownię, która spełnia wymogi wymienionych pracowni w najwyższym stopniu. Z pracowni tego typu nie może „uciec” żaden żywy organizm laboratoryjny przez drzwi, okna, przewodami wentylacyjnymi lub kanalizacyjnymi. Praca zaś prowadzona jest w szczelnych komorach wyposażonych w „sztuczne ręce”. Ciśnienie powietrza w pracowniach i komorach jest niższe niż na zewnątrz pracowni. Cała masa powietrza wychodząca z pracowni przechodzi przez specjalne filtry oczyszczające. Jedyną pracownią na świecie typu P4 do roku 1979 była pracownia w Fort Detrick (USA) przekazana przez armię amerykańską w roku 1971 na rzecz badań naukowo-społecznych.

Drugim rodzajem zestawu zaleceń NIH są mikrobiotyczne stopnie bezpieczeństwa. Zestaw ten dotyczy przede wszystkim wyselekcjonowanych typów *E. coli* (EK). I tak:

**EK1** oznacza standardowy szczep *E. coli* o znaku E12, który jest pozbawiony zdolności do przebywania w ludzkim jelicie.

**EK2** symbolizuje *E. coli* lub bakteriofagów, które są pozbawione zdolności do przeżycia poza laboratorium.

**EK3** jest znakiem *E. coli*, której przeżywalność dodatkowo sprawdza się w organizmach zwierzęcych i roślinnych.

Zestaw różnego rodzaju EK i P daje obraz dążeń uczonych do minimalizacji zagrożeń od strony manipulacyjnych eksperymentów w molekularnej genetyce. Ten stan rzeczy ilustruje tablica 1.

Przypisy te obowiązują administracyjnie tylko tych badaczy, których badania finansowane są przez NIH. Nie obejmują np. pracowni przemysłowych. Oceniono, że do roku 1979 firmy przemysłowe zainwestowały 150 milionów dolarów w badania nad sztuczną rekombinacją DNA. Prze-

Źródło DNA	Wymagane zabezpieczenie
<p>A. Doświadczenia z przypadkowymi fragmentami DNA. Gospodarz: <i>E. coli</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>— Nieembrionalne tkanki naczelných</li> <li>— Embrionalne tkanki naczelných</li> <li>— Inne ssaki</li> <li>— Ptaki</li> <li>— Niższe eukarionty</li> <li>— Rośliny</li> <li>— Prokarioty, które nie wymieniają genów z <i>E. coli</i> w sposób naturalny               <ul style="list-style-type: none"> <li>a) niepatogenne</li> <li>b) umiarkowanie patogenne</li> <li>c) wysoce patogenne</li> </ul> </li> </ul>	<p>P3+EK3 lub P4+EK2            P3+EK2            P3+EK2            P3+EK2            P2+EK1            P2+EK1              P1+EK1            P2+EK2            doświadczenia zabronione</p>
<p>B. Plazmidy, bakteriofagi i inne wirusy. Gospodarz: <i>E. coli</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>— Wirusy zwierzęce</li> <li>— Wirusy roślinne</li> </ul>	<p>P4+EK2 lub P3+EK3            P3+EK1 lub P2+EK2</p>
<p>C. Różne. Gospodarz. wirusy onkogenne np. SV40</p>	<p>od P3 do P4</p>
<p>D. Różne, wszczepiany za pomocą wirusów roślinnych. Gospodarz: rośliny</p>	<p>od P2 do P3</p>

Zabezpieczenie wymagane w inżynierii genetycznej przy pracach z różnym materiałem.

pisy NIH są postulatami wewnątrz amerykańskimi i tym samym nie odnoszą się do personelu laboratoriów zagranicznych. Ważniejsze od przepisów jest jednak poczucie osobistej odpowiedzialności w procesie planowania i prowadzenia eksperymentów. Ta odpowiedzialność staje się tym większa im bardziej uświadamiamy sobie stopień zagrożenia człowieka bądź to bezpośrednio, bądź to pośrednio przez biologiczną interwencję w otaczającą nas biosferę. Nic też dziwnego, że to właśnie człowiek jest centralnym punktem odniesienia przy redakcji przepisów NIH. Przepisy bezpieczeństwa NIH mają zatem charakter antropocentryczny. Jest to szczególnie widoczne w przypadku ustalenia stopni bezpieczeństwa w dziedzinie doboru pracowni i *E. coli*, jak to ilustruje tabela 1. Analiza tej tabeli oraz treści apelu P. Berga, jak również refleksja nad strukturą eksperymentu manipulacyjnego, w obrębie genetyki molekularnej, pro-

wadzi do szeregu twierdzeń dyrektywalnych o charakterze antropocentrycznym. Wydaje się, że można je sformułować w sposób następujący:

1. Pracownie laboratoryjne, w zakresie badań nad rekombinacją DNA *in vitro*, winny spełniać możliwie wszystkie warunki największego bezpieczeństwa w ramach dostępnych najbardziej nowoczesnych technik budownictwa i aparatury badawczej ze względu na najwyższe bezpieczeństwo personelu naukowego, pomocniczego, administracyjnego i fizycznego oraz całego środowiska społecznego.

2. Laboratoria inżynierii genetycznej winny być odizolowane od otaczających środowisk biotycznych, w oparciu o najbardziej nowoczesne techniki selektywne w dziedzinie filtrów powietrznych, kanalizacji odpływowych i chemicznej sterylizacji ścieków laboratoryjnych, ze względu na zachowanie równowagi biocenotycznej, która jest koniecznym warunkiem prawidłowego życia i rozwoju człowieka.

3. Program inżynierii genetycznej nie może zawierać żadnych badań nad rekonstrukcją szczepów bakteryjnych o objawach superzjadliwych dla celów wojennych.

4. Należy bezwzględnie kierować się zasadą wzrastającej ostrożności, w sięganiu po materiał biotyczny do eksperymentów manipulacyjnych, w miarę wzrostu pokrewieństwa gatunków w odniesieniu do człowieka, rozumianego jako gatunek *H. sapiens*.

5. Należy kierować się zasadą szczególnego bezpieczeństwa, na odcinku wyboru rodzaju pracowni i doboru całej aparatury badawczej, w przypadku manipulacyjnych badań nad DNA wirusów i bakterii patogennych bezpośrednio groźnych dla człowieka oraz jego środowiska biotycznego, składającego się z populacji zwierzęcych i zbiorowisk roślinnych; w szczególności dotyczy to DNA wirusów onkogennych.

6. Laboratoria inżynierii genetycznej winny być poddane międzynarodowej kontroli ONZ w dziedzinie programu badań oraz w zakresie używanych pracowni wraz z ich wyposażeniem, jak również w ramach stosowania materiału biotycznego do eksperymentów manipulacyjnych ze względu na bezpieczeństwo ludzkości i całej biosfery.

#### ZAKOŃCZENIE

Opublikowanie przepisów bezpieczeństwa, jak również podejmowanie prób formułowania dyrektyw, regulujących rozwój badań nad rekombinacją DNA *in vitro*, nie pociąga jeszcze za sobą faktu skrupulatnego stosowania się do nich. Ważniejszą sprawą od przepisów i egzekwowanych dyrektyw jest sfera osobistej postawy w poczuciu odpowiedzialności za planowanie i wybór programu badań i sposób ich wykonania.

Dzisiaj nie można przewidzieć, czy wyniki eksperymentu manipulacyjnego w chirurgii genowej spełnią pokładane w nich nadzieje, czy też przyniosą o wiele większe niebezpieczeństwo dla całej ludzkości niż sądzi się w szerokich kręgach społecznych. Pewne jest, że prowadzone prace nad sztuczną rekombinacją DNA na ewolucyjnie zróżnicowanym materiale biotycznym są jedną z centralnych i najbardziej fascynujących dziedzin biologii molekularnej na dziś i na jutro.