

**INŻYNIERIA GENETYCZNA (rekombinacja DNA in vitro)** – zespół technik pozwalających na zamierzone, kontrolowane, przewidziane przez eksperymentatora modyfikacje genetyczne genomów, a także na analizę genów i genomów. W wyniku takich działań powstają m.in. trwałe zmiany właściwości dziedzicznych biorcy.

**METODY INŻYNIERII GENETYCZNEJ.** Rekombinację DNA in vitro umożliwiło odkrycie enzymów restrykcyjnych – DNA-endonukleaz. Z kilku znanych klas enzymów restrykcyjnych największe znaczenie praktyczne mają enzymy typu II, które rozpoznają i przecinają dwuniciowy DNA w obrębie określonych sekwencji nukleotydów. Enzymy restrykcyjne znaleziono jedynie w komórkach bakterii i sinic, prawdopodobnie stanowią ich system obronny przed infekcją wirusów bakteryjnych, bakteriofagów, a dokładnie – przed inwazją obcego DNA. W laboratoriach enzymy restrykcyjne stosowane są do powtarzalnego uzyskiwania zdefiniowanych fragmentów długich cząsteczek DNA. Długość takich fragmentów z poddanej trawieniu cząsteczce DNA zależy od odległości między sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym. Obraz cząsteczki DNA, z zaznaczonymi miejscami rozpoznawanymi przez różne enzymy restrykcyjne, to mapa restrykcyjna. Wybrany fragment restrykcyjny można namnożyć w żywej komórce (klonowanie DNA). Klonowanie może posłużyć do uzyskania dużej ilości badanego DNA lub dużych ilości kodowanego przez ten DNA białka.

Najwcześniej opracowano metody klonowania DNA w bakteriach *Escherichia coli*. Badane fragmenty DNA dołącza się do kolistych cząsteczek DNA zw. plazmidami i razem wprowadza (transformuje) do bakterii. Plazmid, wektor klonowanego DNA, replikowany jest niezależnie od genomowego DNA bakterii, a jeżeli klonowany DNA jest genem, to może w bakterii ulegać ekspresji. Stosowane w i. g. plazmidy, powstałe przez liczne modyfikacje plazmidów naturalnych, sprzedawane są jako odczynniki biochemiczne w biotechnologicznych firmach wytwarzających “narzędzia” i. g. Wektorami mogą być także odpowiednio modyfikowane bakteriofagi.

Sklonowany DNA może zostać użyty jako sonda molekularna do identyfikacji w materiale biologicznym podobnych fragmentów DNA. Uzyskanie w komórce gospodarza ekspresji zrekombinowanego DNA kodującego białko wymaga spełnienia kilku dodatkowych warunków, m.in.

odpowiedniego umiejscowienia obcego genu w otoczeniu właściwych dla gospodarza sekwencji nukleotydów regulujących ekspresję, dopasowania do preferencji kodonowych komórki gospodarza i in. W razie uzyskania wydajnej ekspresji, komórki niosące zrekombinowany DNA mogą wytworzyć dużą ilość dowolnego białka, np. leku, szczepionki, enzymu przemysłowego.

Istotnym celem osiąganym przez klonowanie DNA może być także ustalanie sekwencji nukleotydów w DNA, sekwencjonowanie genomów i ich dużych fragmentów. Zazwyczaj poprzedza się je ustaleniem mapy restrykcyjnej fragmentu. Znajomość sekwencji genomu pozwala na rozpoznanie rejonów cząsteczki DNA o znanych funkcjach: kodujących białka, rybosomalne i transportujące RNA, sekwencji regulujących aktywność genów (promotory, operatory, wzmacniacze, wyciszacze i in.), sekwencji powtarzających się (rodziny Alu, telomery i in). Techniki sekwencjonowania DNA opracowane w drugiej poł. lat 70. XX w. są obecnie zautomatyzowane, a wyniki przechowuje się m.in. w międzynarodowych bazach danych, dostępnych bez opłat przez internet. Liczba sekwencjonowanych genomów szybko rośnie. Za największe osiągnięcia uznać należy poznanie sekwencji genomu człowieka (2001), myszy (2002) i ryżu (2002).

Do badań szczegółowych można uzyskiwać DNA metodami: syntezy chemicznej, odwrotnej transkrypcji i PCR (Polymerase Chain Reaction). W odpowiednich, automatycznie działających przyrządach syntetyzuje się chemicznie fragmenty 50–100 nukleotydów, które następnie łączy się w miarę potrzeby w dłuższe, stosując enzymy: polimerazy DNA i ligazy polinukleotydowe. W ten sposób uzyskano np. niewielkie geny, sondy molekularne, startery dla polimeraz DNA.

W reakcji odwrotnej transkrypcji używa się jako matrycy RNA, a jako enzymu – polimerazy DNA zależnej od RNA, zw. odwrotną transkryptazą, poznaną jako enzym ptasiego retrowirusa AMV. Kopiując mRNA uzyskuje się kilkusetnukleotydowe fragmenty DNA, komplementarne do jednej nici DNA, z którego dany mRNA był transkrybowany. Fragmenty te, zw. EST (Expression Sequence Tags), mogą posłużyć np. do identyfikacji całych genów, być markerami ich położenia w chromosomach.

W reakcji PCR dokonuje się z kolejnych cykli termicznej denaturacji dwuniciowego DNA i dobudowywania do każdej nici, przez polimerazę DNA,

nici komplementarnej. Pełny cykl trwa kilka minut, a ponieważ w kolejnych cyklach liczba cząsteczek narasta wykładniczo, to po 30–40 cyklach ilość fragmentu DNA wzrasta kilka milionów razy. Metoda PCR umożliwia namnażanie i analizę pojedynczych genów z dużych zróżnicowanych genomów, szybką diagnozę medyczną, identyfikację DNA z mumii egip., kopalnych szczątków roślin i zwierząt, znalezisk archeologicznych, a także śladów krwi lub włosów znalezionych na miejscu przestępstw.

Manipulacje genetyczne dokonywane na organizmach wyższych są technicznie bardziej skomplikowane, wiążą się z koniecznością wprowadzania genu (genów) do tkanek lub całych organizmów. Trudności sprawia sterowanie pozycją wprowadzanego DNA w genomie gospodarza i regulacja jego aktywności. Modyfikacje genetyczne wyższych organizmów są zatem uznawane za mniej bezpieczne technicznie i bardziej kontrowersyjne etycznie.

GENOM CZŁOWIEKA I GENOMY ORGANIZMÓW MODELOWYCH. Genom to suma wszystkich kodujących i niekodujących sekwencji DNA zawartych w haploidalnej komórce organizmu. W czerwcu 2000 z dwu konkurujących instytucji – prywatnej firmy Celera Genomics i finansowanego ze źródeł publicznych projektu poznania genomu ludzkiego, HGP (Human Genome Project), wyszły jednocześnie deklaracje, a w lutym 2001 publikacje o oznaczeniu pełnych sekwencji ludzkiego genomu. Genom ten składa się z dwudziestu trzech chromosomów, których DNA mierzy prawie 1m, licząc 3 miliardy par nukleotydów. Jest to ok. 1.000 razy więcej niż wynosi długość przeciętnego genomu bakterii, choć genów mamy zapewne tylko 10–15 razy więcej.

Geny ludzkie, w części kodującej, nie są od bakteryjnych znacząco dłuższe, co oznacza, że znaczna część ludzkiego genomu nie zawiera genów kodujących białka. W badaniach obu grup oceniono, że 1,5% ludzkiego DNA stanowią eksony, 25,5% introny, 73% to DNA niekodujący.

W końcu XX w. poznano pełne sekwencje setek plazmidów, bakteriofagów, wirusów oraz kilkudziesięciu genomów bakteryjnych. W kolejności publikowania danych poznano również genomy eukariotyczne: drożdży, *Saccharomyces cerevisiae*, nicienia, *Caenorabditis elegans*, muchy *Drosophila melanogaster*, rzodkiewnika (roślina) *Arabidopsis thaliana*, ryżu *Oryza sativa* i myszy (*Mus musculus*). Porównawcza analiza tych genomów,

genomika, wskazująca na podobieństwa i różnice między genomami, wspomaga tworzenie hipotez ewolucyjnych uzupełniających i korygujących badania paleontologiczne, w szczególności wnosi istotne informacje o ewolucji i historii gatunku ludzkiego. Od badań genomicznych rozpoczyna się także rozwój kolejnej molekularnej nauki – proteomiki, czyli wiedzy o zespołach białek wytwarzanych przez komórki, tkanki i narządy organizmów w różnych (czasowo i fizjologicznie) momentach ich życia. Ewolucja wykształciła w organizmach wyższych mechanizmy syntezy większej liczby białek niż jest genów w ich genomach.

Dalszy postęp w poznawaniu genów, ich transkryptów i białek, choć w znacznym stopniu zależny od rozwoju aparatury i technik badawczych, całkowicie uzależniony jest od bezpośredniego rozwoju bioinformatyki, zarówno w zakresie instrumentów, programów, jak i sposobów przechowywania informacji.

**PRAKTYCZNE ZASTOSOWANIA INŻYNIERII GENETYCZNEJ.** Genetyczne modyfikacje mikroorganizmów. Wprowadzanie nowych genów do bakterii i grzybów pozwala na korzystne modyfikacje organizmów produkujących różnorodne substancje w procesach fermentacji: podwyższenie wydajności, zmianę optymalnych parametrów procesu, powstanie nowych mikroorganizmów – producentów, mikroorganizmów oczyszczających środowisko, wytwarzających białka obce gatunkowo, a użyteczne dla ludzi z punktu widzenia wielu gałęzi ich działalności i przemysłu: medycyny, farmacji, produkcji chemicznej, metalurgii i in. Bakterie i drożdże stosowane są w produkcji licznych leków (insulina, interferon, czynniki wzrostu, szczepionki), które wchodzi do stosowania po kilkunastu latach testów *in vitro* i prób klinicznych.

**Organizmy transgeniczne.** Organizm transgeniczny powstaje po wprowadzeniu na trwałe do genomu obcego genu (transgenu), dziedziczonego w kolejnych pokoleniach. Zwyczajowo ten termin zarezerwowany jest dla organizmów wyższych (rośliny i zwierzęta). Istnieją wspólne dla obu królestw tzw. bezwektorowe techniki wprowadzania obcego genu (elektroporacja, lipofekcja, transfekcja w obecności związków chemicznych destabilizujących strukturę błony komórkowej, armatka genowa). Różne dla roślin i zwierząt są wektory: w roślinach stosuje się niektóre

modyfikowane wirusy roślinne i agroinfekcję za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens*, natomiast modyfikowane wirusy zwierzęce (retrowirusy, adenowirusy, AAV i in.) do zwierząt i ludzi.

Transgenizację roślin rozpoczęto od wprowadzania jednego lub dwu obcych genów, nadających takie cechy, jak podwyższona tolerancja na herbicydy, częściowa odporność na choroby wywoływane przez wirusy, bakterie, grzyby oraz szkodliwe owady w formie larwalnej. Do obrotu towarowego wprowadzono w niektórych krajach (USA, Kanada, Argentyna, Chiny) m.in. transgeniczny rzepak, kukurydzę, ziemniaki, pomidory i soję. W stadium badawczym w końcu XX w. znalazły się rośliny transgeniczne należące do blisko stu różnych gatunków. Rośliny transgeniczne są również konstruowane z zamiarem: podwyższenia ilości produktu, bez zmiany jego cech; zmiany cech produktów spożywczych (oleje roślinne) i produktów o innych niż spożywcze zastosowaniach (bawełna); uzyskania z wybranych części rośliny produktu jej obcego (leków pochodzenia zwierzęcego, szczepionek).

Transgeniczne zwierzęta można otrzymać przez: 1) (najczęściej stosowane) nastrzyknięcie *in vitro* DNA (genu) do jednego z przedjądrzy zapłodnionej *in vivo* komórki jajowej; 2) infekcję wczesnego zarodka zrekombinowanym wektorem pochodzenia wirusowego; 3) modyfikację genetyczną pierwotnych komórek zarodkowych i wprowadzenie ich do zarodka w stadium blastocysty. Jako pierwsze poddano modyfikacji dodatkowymi kopiami genu hormonu wzrostu bydło, króliki, owce, świnie i ryby. Żadna modyfikacja nie przyniosła oczekiwanej perspektywy zastosowań praktycznych. Prawdopodobnie do takich należą konstrukcje dużych zwierząt gospodarczych (kozy i owce), z mlekiem których wydzielane jest białko kodowane przez transgen, o znaczeniu terapeutycznym (np. tkankowy aktywator plazminogenu, laktoferyna, czynnik IX krzepliwości krwi, alfa-antytrypsyna). Być może odpowiednio "humanizowane" zwierzęta (transgeniczne świnie) staną się w przyszłości dawcami narządów do przeszczepiania ludziom. Skonstruowanie transgenicznego zwierzęcia, ze względu na jeszcze zawodne techniki i niską wydajność, to zabieg bardzo kosztowny, dlatego dalsze powielanie udanego, z punktu widzenia ludzi, egzemplarza powinno być prowadzone na drodze klonowania. Transgeniczne myszy służą do rozwijania

badan podstawowych z zakresu medycyny i genetyki zwierząt i człowieka.

Terapia genowa. Techniki i. g. wykorzystywane są w diagnostyce tych wszystkich schorzeń, których przyczyną pierwotną jest uszkodzenie genu lub obecność organizmu patogennego (wirus, bakteria, grzyb) o znanym genomie (genach). Naprawa genu, zastąpienie go lub dodanie prawidłowej kopii, a także ingerencja w genom organizmu patogennego leżą u podstaw myślenia i działań terapii genowej. Diagnostyka wyprzedza znacznie możliwości terapii.

Terapia komórek rozrodczych lub zarodka w stadium jednej lub kilku komórek zmieniałaby genom człowieka dziedzicznie i nie jest obecnie w medycynie dopuszczana. Terapia komórek ciała (somatyczna) wprowadzana jest ostrożnie w wybranych klinikach, jako metoda doświadczalna, a nie rutynowa terapia, od 1990 (w USA próba leczenia dziedzicznego złożonego niedoboru odporności – SCID). Próby somatycznej terapii genowej dopuszcza się gdy: choroba nie jest uleczalna dotychczas stosowanymi metodami, choroba dotyczy głównie jednej tkanki lub narządu i uszkodzenia jednego genu (jednogenowa), poziom ekspresji genu nie jest kluczowym parametrem decydującym o kondycji pacjenta. Wg danych z końca 2001 terapii somatycznej poddano na całym świecie 3.464 osoby, z tego 63% pacjentów z Ameryki Płn., 26% z Europy. Najpowszechniej stosowanym wektorem były pochodne retrowirusów (51% pacjentów) oraz adenowirusów (19%). Podejmowano próby leczenia chorób nowotworowych (69% pacjentów), chorób zakaźnych, w tym głównie AIDS (11%), i jednogenowych (8,5%). Do końca 2001 nikogo z żadnej choroby o tle genetycznym nie wyleczono.

INGERENCJE O CHARAKTERZE EUGENICZNYM. Teoretycznie możliwe są również propozycje ingerencji genetycznych o charakterze eugenicznym. Mogłoby to być najpierw tzw. wzmocnienie genetyczne – w zakresie pożądanых cech, które dotyczyłyby zarówno psychiki, jak i stanu fizycznego człowieka. Eugeniczny wymiar mają również projekty genetycznego “projektowania człowieka”. Propozycje takie znajdują dzisiaj swój wyraz raczej w pozycjach o charakterze science fiction niż w praktyce i nie są poważnie rozważane w kręgach naukowych. Szczególnym sposobem “projektowania człowieka” byłoby klonowanie organizmu ludzkiego. Nie mamy tu do czynienia z wprowadzeniem zmian w genomie człowieka, lecz z “powieleniem”

organizmu.

Osobnym problemem jest eksperymentowanie na ludzkich zarodkach, np. tzw. klonowanie terapeutyczne. Eksperymenty takie zostały już w niektórych krajach zalegalizowane (Wielka Brytania, USA); uznanie ich za dopuszczalne zależy zasadniczo od przyjętej odpowiedzi na pytanie: kiedy zaczyna się osoba ludzka?

OCENA ETYCZNA. Ocena etyczna zastosowań i. g. zależy najpierw od przedmiotu ingerencji, a następnie od ich rodzaju. Genetyczna modyfikacja mikroorganizmów, roślin i zwierząt winna być oceniana w perspektywie wartości, jaką przedstawia naturalne środowisko człowieka. Świat roślin i zwierząt stanowi wartość nie jedynie ze względu na to, że jest on wykorzystywany przez człowieka, ale przez sam fakt jego istnienia. Winien być zatem traktowany przez człowieka proporcjonalnie do wartości, jaką stanowi, a to wyklucza takie modyfikacje, które łączą się np. z zadawaniem bólu zwierzętom. Stojąc na stanowisku, że człowiek ma prawo wykorzystywać środowisko naturalne dla własnych celów (pożywienia, ubrania i schronienia), należałoby ograniczyć ingerencje genetyczne w środowisko naturalne do tych, które rzeczywiście przynoszą wymierne korzyści dla człowieka i oceniać je w perspektywie powodowanych przez nie konsekwencji. Wykluczone zatem winny być tego rodzaju modyfikacje, które mogą zagrażać środowisku bądź samemu człowiekowi. To z kolei obliguje genetyków i biotechnologów do szczególnej ostrożności i odpowiedzialności w prowadzonych badaniach i eksperymentach.

Szczególnie wnikliwej ocenie etycznej poddawane są ingerencje genetyczne w naturę ludzką, mamy bowiem świadomość, że dotyczą one nie tylko biologicznej natury jako takiej, ale osoby ludzkiej posiadającej biologiczno-duchową naturę gatunku *Homo sapiens*. Z byciem osobą łączymy natomiast implikacje natury moralnej. Ocena praktycznych zastosowań i. g. uzależniona jest zasadniczo od przyjmowanej przez oceniającego koncepcji osoby, w szczególności od odpowiedzi na następujące pytania: czy każdy człowiek jest osobą? od kiedy człowiek jest osobą? czy i jak dalece wolno ingerować w ludzką naturę? Chociaż koncepcji osoby proponowanych w dyskusji wokół etycznych aspektów zastosowań inżynierii genetycznej jest stosunkowo dużo, to ostatecznie możemy mówić o dwóch zasadniczych

stanowiskach i wynikających z nich implikacjach moralnych.

Wg pierwszego, każdy człowiek jest osobą od momentu poczęcia do naturalnej śmierci i z tego tytułu jego życie winno podlegać bezwzględnej ochronie, a wszelkie ingerencje w biologiczną naturę człowieka winny brać pod uwagę, że ingerowanie w nią oddziałuje nie tylko na organiczną strukturę człowieka, ale może również wpłynąć na sposób jego osobowej (rozumnej i wolnej) aktualizacji. Ingerencje genetyczne mogą być (nie muszą) formą biologicznej predeterminacji człowieka, a jako takie są moralnie niedopuszczalne, ponieważ naruszają jego autonomię. Naruszanie autonomii człowieka wiąże się z traktowaniem go w sposób przedmiotowy (jako przedmiotu eksperymentów). O ile terapeutyczne ingerencje genetyczne nie mają na celu zmiany genetycznie uzależnionych cech, lecz przywrócenie właściwej im funkcji, to ingerencje eugeniczne dążą do tego rodzaju zmian. Z tego powodu możliwym już dzisiaj (i planowanym w przyszłości) ingerencjom w genom człowieka wyznacza się granice dopuszczalności, przebiegające najogólniej zgodnie z podziałem: terapia – eugenika.

Drugie z istniejących stanowisk przypisuje człowiekowi status osoby dopiero na podstawie stwierdzenia określonych cech, najczęściej świadomości. Konsekwentnie względem przyjętych założeń, życie człowieka podlega ochronie tylko w granicach jego osobowego, czyli świadomego istnienia, uwarunkowanego ekspresją określonych aktów działania. Ponieważ za konstytutywną cechę osoby przyjmuje się tu świadomość, dopuszczalne ingerencje w genetyczną strukturę człowieka mogą mieć również charakter eugeniczny. Granicą ich dopuszczalności będzie wolna decyzja i korzyść, jaką zainteresowani mogą odnieść z ich przeprowadzenia (korzyść mierzona jakością psychofizycznej kondycji człowieka).

Uznane za dopuszczalne przez przedstawicieli obu wymienionych wyżej stanowisk są ingerencje o charakterze terapeutycznym (somatyczna terapia genowa). Jeśli budzą one dzisiaj zastrzeżenia natury moralnej, to nie z uwagi na charakter samej interwencji, ale wciąż jeszcze niedoskonałe techniki, które powodują, że terapie te stanowią poważne ryzyko dla życia pacjenta. Problemem zasadniczo nie jest też naruszenie genetycznej konstytucji ludzkiego organizmu, ponieważ przez somatyczną terapię genową dokonuje się niewielkiego naruszenia genetycznej struktury organizmu, jest to zmiana



polegająca na korekcie, czyli przywróceniu właściwej funkcji uzależnionych genetycznie cech, a nie na ich zmianie. Nie naruszamy zatem osobowej integralności człowieka rozumianej jako całość jego psychofizycznych cech. Naruszenie owej integralności – moralnie niedopuszczalne w opinii pierwszego z wymienionych stanowisk – miałyby natomiast miejsce w przypadku ingerencji o charakterze eugenicznym, stąd eugeniczna i. g. oceniana jest jako moralnie naganna. Trudne do jednoznacznej kwalifikacji moralnej są natomiast ingerencje o charakterze meliorystycznym. Jeśli miałyby one charakter prewencyjny i dotyczyły komórek somatycznych, wówczas nie stanowiłyby przedmiotu specjalnych kontrowersji moralnych, jeśli jednak “wzmacniałyby” ludzki organizm w stopniu wykraczającym poza naturalne możliwości gatunku, wówczas należałoby je odrzucić z podobnych powodów, co ingerencje eugeniczne. Za dopuszczeniem ingerencji natury eugenicznej kryje się wspomniana wyżej wizja osoby ludzkiej, zgodnie z którą “genetyczna jakość” wyznacza wartość życia. Twierdząc tak, promowalibyśmy nowy rodzaj naturalizmu (tym razem genetycznego), zakładając w sposób niczym nie usprawiedliwiony, że wartość ludzkiego życia zależy od genetycznej konstytucji organizmu. Zwolennicy biologicznej predeterminacji człowieka zdają się czasem nie uwzględniać faktu, że osoba ma prawo wykorzystywać w sposób wolny swoje genetycznie uzależnione zdolności, te natomiast mają charakter ambiwalentny. Nawet dokładne zaplanowanie zapisu genetycznego przyszłego człowieka nie stanowi gwarancji, że będzie on podejmował wybory zgodne z planowanymi przez nas oczekiwaniami.

K. Kloskowski, *Bioetyczne aspekty i. g.*, Wwa 1995; L. Walters, J. G. Palmer, *The Ethics of Human Gene Therapy*, NY 1997; T. A. Brown, *Genomes*, Ox 1999, 2002<sup>2</sup> (*Genomy*, Wwa 2001); *Klonowanie człowieka. Fantazje – zagrożenia – nadzieje*, Lb 1999; B. Chyrowicz, *Bioetyka i ryzyko. Argument “równi pochyłej” w dyskusji wokół osiągnięć współczesnej genetyki*, Lb 2000; *Granice ingerencji w naturę*, Lb 2001.

*Magdalena Fikus, Barbara Chyrowicz*