

WACŁAW SZYBALSKI

Department of Oncology

University of Wisconsin Medical School

1400 University Ave., Madison, WI 53706-1599, USA

e-mail: szybalski@oncology.wisc.edu

REWOLUCJA GENETYCZNA NA PRZEŁOMIE XX I XXI WIEKU

Rewolucja genetyczna? Czy to naprawdę rewolucja czy tylko lepsze zrozumienie naturalnych przemian w naturze oraz wykorzystanie tego dla dobra ludzkości? No i kiedy się to



Wacław Szybalski urodzony 9 września 1921 r. we Lwowie, w Polsce. Profesor Onkologii, studia chemi-

wszystko rozpoczęło i jak to się wiąże z naszą cywilizacją i obecnym dobrobytem?

Rozpoczęło się to ponad 10 000 lat temu, kiedy niektórym naszym pra-pra przodkom znudziło się zbieranie jagód i grzybów oraz polowanie, a zatem jakieś przedsiębiorcze jednostki zdecydowały, aby zacząć uprawiać użyteczne rośliny i udomowić zwierzęta. W ten sposób powstało rolnictwo z hodowlą zwierząt, co pozwoliło człowiekowi na polepszenie bytu i osiadły tryb życia. Ta wczesna rewolucja rolnicza przyniosła zwiększony przyrost naturalny oraz przeprowadzkę z jaskiń do nowego rodzaju domów, a potem stworzenie gospodarstw, wsi, miast i państw. Geny wynalazców rolnictwa i ich pobratymców zdominowały nasz świat.

Mimo, że praczłowiek i jego następne pokolenia potrafiły uszlachetnić dzikie trawy w po-

czne na Politechnice Lwowskiej i Gliwickiej, doktorat na Politechnice Gdańskiej (1949). Od 1950 r w USA: Cold Spring Harbor Laboratory (1951–1955); Institute of Microbiology, Rutgers University (1955–1960); McArdle Laboratory of Cancer Research, University of Wisconsin (1960–). Istotne osiągnięcia badawcze m. in. w zakresie: genetyki oporności na antybiotyki i genetyki *Streptomyces*, relacji między mutagenezą i karcinogenezą, transformacji komórek ludzkich (początki terapii genowej), biologii molekularnej bakteriofaga lambda oraz elementów transpozycyjnych IS, terminacji i antyterminacji transkrypcji oraz (ostatnio) sekwencjonowania dużych genomów. W tomie GENE poświęconym Autorowi z okazji 75 rocznicy urodzin omówiony jest jego dorobek naukowy [223, 395–409, 1998]. Założył i redagował międzynarodowe czasopismo GENE (1976–1996, obecnie honorowy redaktor). Otrzymał wiele wyróżnień i odznaczeń, m. in.: czł. zagr. PAN, dr. hc. UMCS i UG, nagr. Fundacji A. Jurzykowskiego, Hil-dale Award (Univ. Wisconsin), Złoty Medal Grzegorza J. Mendla (Czeska Akademia Nauk).

żywno i zdrowe zboża, a dzikie bestie w bardziej przydatne zwierzęta hodowlane, nie rozumieli oni naukowych podstaw dziedziczenia. Nawet w czasie rozkwitu kultury greckiej, Hippocrates, Arystoteles i inni filozofowie mogli tylko spekulować na temat podstaw dziedzictwa, ale nikomu nie przyszło na myśl, aby zrobić proste doświadczenia, choćby takie jakie wykonał Grzegorz Mendel dwa millenia później.

Dopiero w połowie XIX w., w ciągu tylko jednego dziesięciolecia, przełomowe odkrycia „posypały się jak z rękawa”. W 1855 r. R. Virchow wykazał, że nowe komórki powstają tylko poprzez podział już istniejącej komórki. W 1856 r. Grzegorz Mendel zaczął doświadczenia z groszkiem ogrodowym, a w 1859 r. Karol Darwin opublikował swoje dzieło „O Pochodzeniu Gatunków” („On Origin of Species”), w którym wprowadził pojęcie ewolucji. Na dodatek, Ludwik Pasteur udowodnił w 1861 r., że nie istnieje samoródtwo (ang. spontaneous generation), a w roku 1866 F. Miescher wyizolował kwasy nukleinowe (DNA). Podwaliny genetyki stworzył, głównie w okresie dziesięciolecia 1856–1866, opat GRZEGORZ MENDEL (1866), który żył i pracował w Brnie na Morawach. Do swoich doświadczeń użył on samozapładniający się groszek ogrodowy, studiując jego różne dziedziczne cechy. Zauważył, że w krzyżówce między roślinami z białymi i czerwonymi kwiatami, cechy koloru nie mieszają się tworząc, w tym pokoleniu tylko kwiaty o pośrednim kolorze, ale w następnym pokoleniu pojawia się przewidziany procent (25%) roślin z czysto białymi kwiatami. To znaczy, że kolory muszą być zdeterminowane przez jakieś specjalne fizyczne lub chemiczne cząsteczki, a więc istnieją niezależne geny „czerwone i białe”.

Prawdę mówiąc, Mendel obserwował głównie cechy nasion groszku a nie kwiatów, ale łatwiej jest opisywać kolory kwiatów, których dużo teraz rośnie w dawnym ogrodzie Mendla w Mendelianum. Jak mi opowiedział dyrektor, kurator Muzeum Mendelianum w Brnie, do fizycznego zrozumienia dziedziczności i odkrycia matematycznych praw Mendla przyczynił się polski uczonej Aleksander Zawadzki, polityczny uciekinier ze Lwowa, który jako fizyk rozumiał korpuskularną budowę materii i dlatego mógł pomóc Mendlowi (który też studiował fizykę we Wiedniu) w zrozumieniu wyników doświadczeń z groszkiem, stosując podejście fizyczne i matematyczne. Aleksander Zawadzki był bardzo wybitnym uczonym, znanym i poważanym we Lwowie i w Brnie (OREL 1972, ILTIS 1924). Urodzony na Śląsku w 1798 r. został mianowany w 1840 r. profesorem fizyki na Uniwersytecie im. Jana Kazimierza we Lwowie, a następnie dzie-

kanem Wydziału Nauk Filozoficznych. Niestety w 1853 r. został wygnany ze Lwowa za jego działalność przeciwko Austrijskiej okupacji polskiego Lwowa w czasie Wiosny Ludów w 1848 r. Przeniósł się do Brna, gdzie w 1854 r. został profesorem fizyki, zoologii i botaniki w realnym gimnazjum (Brno nie miało wtedy uniwersytetu). W ten sposób został zwierzchnikiem i przyjacielem Mendla, który był 24 lata młodszy od niego i właśnie został nauczycielem w tej samej szkole. OREL (1972) opisuje ogromny entuzjazm i wpływ naukowy Zawadzkiego, który na pewno omawiał z Mendlem jego doświadczenia nad dziedzicznością u groszku. Zawadzki, jako sekretarz Towarzystwa Nauk Przyrodniczych, wprowadził młodego Mendla do tegoż Towarzystwa i bardzo go popierał. Gdy Zawadzki zmarł w 1868 r. Towarzystwo Nauk Przyrodniczych ufundowało mu pomnik, na którym jest wyryte: Aleksander Zawadzki, urodzony 6 maja 1798 r. zmarł 6 maja 1868 r. od Towarzystwa Nauk Przyrodniczych, jego Przyjaciół i Wielbicieli („Der Naturforschende Verein, eine Freunde und Verehrer”).

Prawie jednocześnie z Mendlem, Fryderyk Miescher odkrył w komórkach śluzowatą substancję chemiczną, DNA, nie mając pojęcia, że może to mieć jakiś związek z odkryciami Mendla, o których na pewno nawet nie słyszał. Na tym się chyba kończą „prace genetyczne” dziewiętnastego wieku, ale 80 lat później okazało się, że cząsteczki dziedziczne Mendla odpowiadają odcinkom polimeru, DNA, odkrytego przez Mieschera. Obecnie Mendel ma swoje muzeum w Brnie i wiele pomników, a nazwisko Mieschera otrzymał instytut naukowy w Bazylei (Friedrich Miescher Institute).

Prawa Mendla nie były znane aż do przełomu stulecia, kiedy to w 1900 r. trzy laboratoria niezależnie odkryły je ponownie, co spowodowało wybuchowy rozwój genetyki. Mendlowskie jednostki dziedziczności zostały nazwane genami; mieszczą się one na chromosomach będących skondensowanymi nićmi DNA. Tak więc, każdy gen jest specyficznym odcinkiem nici DNA i jego sekwencje umiemy teraz „czytać i pisać”, to znaczy sekwenjonować i syntetyzować w laboratorium. I to jest właśnie rewolucja genetyczna XX w., której zastosowania w biotechnologii i medycynie tworzą całą nową gałąź nauki i nowe dziedziny przemysłu; możliwości w tej dziedzinie są prawie nieograniczone już teraz, a co dopiero będzie w przyszłości! Zatem na początku XXI w., będziemy zbierać bogate plony zasiane w czasie ponad dziesięciu tysiącleci.

O tym co się stało w już mijającym, eksplozywnym dwudziestym stuleciu, czego byłem

często naocznym świadkiem, spróbuje opowiedzieć. Pierwsze lata były ogromnie ważne dla genetyki, ale dla mnie jest to już „prehistoria”. Zapoczątkowało je ponowne odkrycie praw Mendla przez H. de Vriesa, C. Corrensa i E. Tschermacka. W latach 1901–1902 powstaje koncepcja mutacji i hipoteza jednostek dziedziczności, które obecnie nazywamy genami. Znajdują się one na chromosomach, które się powielają i rozdzielają pomiędzy dzielącymi się komórkami. Pierwsze, ważne zastosowanie tej nowej genetyki w rolnictwie, to hybrydy kukurydzy stworzone przez G. H. Schulla w 1909 r. Poznałem dwóch braci Schullów w Cold Spring Harbor w 1952 r. i z ciekawością słuchałem opowiadań o, wtedy już prawie półwiecznych, doświadczeniach.

W latach 1909–1920 zaczął się ogromny rozwój formalnej genetyki muszki, *Drosophila*, i innych organizmów, łącznie z kukurydzą. Ogromna część tej pracy, która doprowadziła do dokładnego opisu mechanizmów genetycznych i nakreślenia map genetycznych, jest zasługą szkoły T. H. Morgana w Nowym Jorku (MORGAN i współaut. 1915). Do dziś pamiętam może najdokładniejszą mapę części genomu *Drosophila*, która wisiała w gabinecie M. Demereca, dyrektora laboratoriów w Cold Spring Harbor i mojego szefa w latach 1951–1954. Tam pracowała również moja starsza koleżanka, Noblistka Barbara McClintock, która ostatecznie w 1931 r. wykazała powiązanie map genetycznych i chromosomowych u kukurydzy. Były to prace głównie opisowo-ilościowe aż do lat 1927–1928, kiedy Noblista H. G. Mueller, a następnie L. J. Stadler wprowadzili sztuczne mutacje w genach *Drosophila* i kukurydzy, używając promieni Roentgena. To był pierwszy krok, aby sztucznie zmieniać geny! (MULLER 1927).

Podobna mutageneza przy pomocy światła ultrafioletowego i chemicznych mutagenów pozwoliła usprawnić hodowlę roślin, a począwszy od lat 40. przyczyniła się bardzo do udoskonalenia produkcji antybiotyków. I tak na przykład, w latach 1948–1951 podwyższono jakość penicyliny i wydajność jej produkcji ponad tysiąc-krotnie. Antybiotyki były wielkim triumfem mutagenezy i genetyki mikroorganizmów i zapoczątkowały ogromny dział przemysłu farmaceutycznego oparty na fermentacji.

Po raz pierwszy spotkałem się z koncepcją przemysłu fermentacyjnego jeszcze jako student, w czasie (1942/43) wykładów Prof. Adolfa Joszta, kierownika Zakładu Technologii Fermentacyjnej (Biotechnologii) na Wydziale Chemii Politechniki Lwowskiej. Przed drugą wojną światową, Zakład Joszta we Lwowie znajdował się w czołówce światowej nauki o zastosowa-

niach fermentacji. W swoim wykładzie o fermentacji drożdżowej Prof. Joszt silnie podkreślał kluczowe znaczenie opracowania genetyki drożdży przez Prof. Winge w Kopenhadze, w latach 1935–1940, i przepowiedział ogromny rozwój technologii opartej na genetyce, dzięki której ważne cechy fermentacyjne będzie można łatwo wprowadzać do drożdży lub innych organizmów stosowanych w przemyśle. Ten wykład Prof. Joszta zrobił na mnie tak ogromne wrażenie, że w tym samym dniu zdecydowałem, że połączenie genetyki i biotechnologii będzie celem mego życia naukowego. Dlatego, gdy ta straszna i nieludzka druga wojna światowa i obie okupacje, sowiecka i niemiecka, się skończyły, i kiedy w latach 1946/1947 sowiecka policyjna kontrola chwilowo osłabła, udało mi się wyjechać do Kopenhagi. Tam, między innymi zajęciami, studiowałem genetykę drożdży u Prof. Wingego w Carlsberg Laboratory (na terenie browaru Carlsberga), tak jak to sobie obiecałem po wykładzie Joszta we Lwowie. Wiadomości z kraju o zaciśnięciu pasa komunistycznego i o wzmożeniu terroru stalinowskiego, łącznie z wymordowaniem lub wysiedleniem prawie wszystkich 350 000 Polaków (ang. ethnic cleansing) z mego ojczystego, polskiego Lwowa, przyczyniły się do mojej decyzji, aby wyemigrować do USA. W 1950 r. zostałem kierownikiem doświadczalnej produkcji antybiotyków w firmie Wyeth w West Chester w Pensylwanii. W następnym roku zdecydowałem się na przeniesienie się do laboratorium w Cold Spring Harbor w USA (mimo że to obniżyło moje pobory do około połowy), ponieważ był to wówczas najważniejszy ośrodek naukowy na świecie, w którym z czasem stworzona została przez nas nowoczesna genetyka molekularna. Dlatego rewolucję genetyczną w drugiej połowie XX w. przeżyłem jako naoczny jej świadek i uczestnik. Jej dzieje postaram się tu nakreślić trochę z polskiego punktu widzenia, bo to chyba bardziej zainteresuje czytelnika KOSMOSU. Najważniejsze elementy tej rewolucji były następujące.

W latach 40. rozwinęła się bardzo genetyka drobnoustrojów. Z punktu widzenia biochemii, powstała hipoteza „jeden gen, jeden enzym” propagowana przez Noblistów GEORGE BEADLE’a i EDWARDA L. TATUMA (1941). Równolegle, w 1946 r., O.T. AVERY ze współpracownikami (1944) w Instytucie Rockefellera w Nowym Jorku wykazali, że DNA jest materiałem, z którego zbudowane są geny. Opierając się na wcześniejszych doświadczeniach F. GRIFFITHA (1928) w Anglii, który odkrył czynnik transformujący, wyizolowali oni ten czynnik z komórek bakterii i udowodnili, że jest nim DNA. Wprowadzenie tego DNA do innych komórek zmieniało odpo-

wiednio ich cechy dziedziczne. Przeczytałem o tym w roku 1947 czy 1948, kiedy jeszcze kierowałem Zakładem Fermentacji i Przemysłu Spożywczego na Politechnice Gdańskiej; dostaliśmy wtedy amerykańskie czasopisma (łącznie z *Journal of Experimental Medicine* z 1944 r.) jako dar od UNRRA. Zrobiło to na mnie, jako na chemiku, ogromne wrażenie, bo wyizolowane DNA, czyli geny, były substancją chemiczną!

Genetyczna rola DNA, tym razem u bakteriofaga, została potwierdzona w latach 1951/52 przez ALA D. Hersheya (HERSHEY i CHASE 1952), mego starszego kolegę z Cold Spring Harbor Laboratory. Historycznie rzecz biorąc, szczęście mi znowu sprzyjało, bo byłem obecny kiedy po raz pierwszy Hershey opisał nam swoje proste doświadczenia, które ustaliły, że fag wstrzykuje swoje DNA (oznaczone radioaktywnym izotopem ^{32}P) do bakteryjnej komórki gospodarza, podczas gdy fagowe białko (oznaczone ^{35}S) nie wchodzi do komórki. Na wstępie Al podkreślił, że będąc immunologiem mocno wierzył tylko we „wszechmocne” białka i dlatego chciał pokazać, że to białka są podstawą dziedziczności. Al też przyznał się nam, że było to dla niego duże rozczarowanie, gdy doświadczenia wykazały, że to DNA, a nie białko, jest nośnikiem dziedziczności. W dyskusji zapytałem go dlaczego tak myślał, bo ja przecież, będąc jeszcze w Polsce, czytałem i nawet wykladałem, że grupa Averyego już 7 lat temu wykazała, że to DNA jest nośnikiem genów. Al chwilę pomyślał nim mi odpowiedział: „może w Polsce tak się myślało, ale w USA nikt nie wierzył w wyniki Averyego, ponieważ profesor Alfred Mirsky (też z Nowego Jorku) głosił (teraz wiemy, że fałszywie), że Avery nie umiał odróżnić czystego DNA od jego kompleksów z białkiem, które nawet w małej ilości może być genetycznie bardzo ważne” (SZYBAŁSKI 2000).

W ten sposób, w latach 1951–1953, DNA zostało ostatecznie uznane za istotę genów. Prace nad strukturą chemiczną DNA, polimeru złożonego z tylko czterech zasad, A, C, G i T, zostały ukoronowane zaproponowaniem modelu podwójnej helisy, opublikowanym w 1953 r. przez moich kolegów i przyjaciół, JIMA D. WATSONA i F. H. C. CRICKA (1953). W tym modelu jedna nić DNA jest komplementarna do drugiej, co od razu tłumaczyło samo-replikację DNA. Pamiętam jak Max Delbrueck, „wielki kapłan” naszej grupy fagowej, tak wyraził swój ogromny entuzjazm dla tej idei, gdy pierwszy raz o niej usłyszał: „Gentlemen hats off; it is for the first time that I understand the essence of DNA auto-replication: it is not: like begets like but like begets complementary” [Panowie, uchylmy kapelusze! Nareszcie pierwszy raz zrozumiałem

istotę auto-replikacji; to nie jest tak, że to samo rodzi to samo, ale to samo rodzi swój komplement (komplementarną nić DNA)].

Po zrozumieniu struktury DNA, dalsze odkrycia popłynęły wartkim strumieniem.

Replikacja DNA została zrozumiana i odtworzona enzymatycznie w laboratorium przez Arthura Kornberga i jego szkołę, a potem przez Johna Cairnsa (DE LUCIA i CAIRNS 1969), który odkrył właściwą DNA polimerazę III w *E. coli*. Natomiast pierwsza, czysto enzymatyczna synteza biologicznie czynnego (żywego) transformującego DNA była wynikiem doświadczeń RÓŻY LITMAN (która zginęła tragicznie w wypadku samochodowym) i W. SZYBAŁSKIEGO (1963).

Równolegle, Har Gobind Khorana opracował metodę chemicznej syntezy DNA i stworzył chemicznie pierwsze syntetyczne geny. Obecnie jest to już rutyna, a specjalne „gen-maszyny” syntetyzują dowolną sekwencję DNA. Następne zagadnienie, które zostało zrozumiane w latach 60., to ekspresja DNA, najpierw zachodząca przez transkrypcję z DNA na RNA, a potem przez translację z RNA na białka.

Teraz zostały już napisane tomy o mechanizmie transkrypcji i jej regulacji, kiedy to samo DNA może kierować syntezą różnych transkryptów, i w różnych ilościach zależnie od obecności poszczególnych czynników i sygnałów. Na dodatek sekwencje RNA mogą ulegać dalszym przemianom. To, co mi się wydawało w latach 60. być jasne i proste w wypadku bakterii i fagów, okazało się teraz znacznie bardziej skomplikowane, zwłaszcza u roślin i u zwierząt.

Translacja RNA w białka była *a priori* znacznie trudniejszym zadaniem, bo nie jest to proste powielanie; każda trójka zasad (A, C, G oraz U; ta ostatnia w RNA odpowiada T w DNA) jest „przetłumaczana” na dany aminokwas, zaś 64 ($4 \times 4 \times 4$) kombinacje trypletów zasad, odpowiadają dwudziestu istniejącym aminokwasom. To ogromne odkrycie stworzyło nowy model kodu genetycznego. Sławny fizyk, G. Gamow, w swym pierwszym wykładzie na temat kodowania w Nowojorskiej Akademii Medycyny (na którym miałem szczęście być obecny; było to dla mnie rodzajem „objawienia”) wytłumaczył nam, że „stosunek 1:1 lub 2:1 (zasada:aminokwas) jest niewystarczający, bo wtedy cztery zasady mogłyby zakodować tylko 4 lub 16 (4×4) aminokwasów, i chociaż stosunek 3:1 daje aż 64 ($4 \times 4 \times 4$), lepiej jest za dużo (bo jest tylko 20 aminokwasów) niż za mało”. Genetycy pierwsi nakreślili (CRICK i współaut. 1961), a biochemicy (M. Nirenberg, S. Ochoa, H. G. Khorana i inni) systematycznie oznaczyli, które kombinacje trypletów zasad odpowiadają poszczególnym aminokwasom. Było to genialne rozwią-

zanie kodu genetycznego, który okazał się uniwersalnym dla prawie całego żyjącego świata, co świadczy niezbicie, że wszystkie stworzenia powstały przez ewolucję ze wspólnego „pnia” !!!

Następnie nadszedł czas na pełne zrozumienie map całych genomów. Pierwsze mapy były genetyczne, a następnie pokazały się pierwsze, dokładne, heterodupleksowe mapy fizyczne, wypracowane przez BARBARĘ WESTMORELAND, HANSA RISA i W. SZYBAŁSKIEGO (1969). Przez hybrydyzację rozdzielonych nici DNA można było dokładnie oznaczyć pozycje wydeletowanych genów i porównać je z ich położeniem na mapach genetycznych. Metoda ta pozwoliła też dokładnie określić nowe elementy genetyczne, tak zwane skaczące geny (ang. jumping genes), które są bardzo ważne w usprawnieniu naturalnej ewolucji (FIANDT i współaut. 1972).

Ale jak zwykle w nauce, ta „najnowocześniejsza” metoda heterodupleksów straciła swoje znaczenie, gdy zostały wypracowane nowe metody sekwencjonowania DNA. Obecnie tylko jedna z nich, wynaleziona przez dwukrotnego Noblistę F. Sangera (SANGER i współaut. 1977) jest powszechnie używana i dziesiątki dużych genomów zostało już całkowicie zsekwencjonowanych, począwszy od wirusów i bakterii do małych eukaryontów. Wielkie zasługi na tym polu mają moi przyjaciele, Noblista Jim Watson, który zapoczątkował cały projekt genomowy (ang. Human Genome Project), Noblista Ham Smith i świetny organizator sekwencjonowania genomowego Craig Venter, który zaproponował i zrealizował wiele nowych pomysłów. Ukoronowaniem tych działań będzie cała sekwencja genomu ludzkiego, który liczy 3,2 miliardy zasad, to znaczy 3,2 miliardy liter A, C, G i T (mówiąc obrazowo, jeśli by sekwencje ludzkiego genomu zapisać w postaci książki, to miałyby ona około tysiąca tomów, każdy o tysiącu stron). Obecnie, w połowie roku 2000, około 90% genomu ludzkiego już jest zsekwencjonowane w postaci długich fragmentów — odcinków (ang. contigs) otoczonych małymi (być może też dużymi) przerwami (ang. gaps). Bardzo niedawno obecne stadium sekwencjonowania zopstało uhonorowane przez prasę oraz mowę prezydenta USA Billa Clintona i premiera Anglii Toniego Blaira, łącznie z przedstawicielami trzech sektorów: rządowego pod kierownictwem Francisa Collinsa, społecznego (Sanger Center) oraz prywatnego (Celera, Craig Venter) (GOLDEN i LEMONICK 2000, LEMONICK 2000). Ale jeszcze daleko do ostatecznej koronacji ! (PENISI 2000).

Innym, współczesnym, rewolucyjnym odkryciem było izolowanie poszczególnych genów lub zestawów genów przez klonowanie molekularne. Teraz można nie tylko „rozparcelować”

cały genom na odcinki, ale każdy gen lub jego odcinek można starać się „wetknać” do innego gospodarza. Ma to ogromne znaczenie dla naukowego badania genów i stanowi też podstawę całej nowej dziedziny, biotechnologii, która pozwala produkować na dowolną skalę różne ważne białka i inne produkty. Produkty te można wytwarzać przez fermentacje używając odpowiednio skonstruowanych mikroorganizmów przemysłowych. Ale można też taką produkcję zastosować w normalnej gospodarce wiejskiej, bo użyteczne geny wprowadzone do roślin lub zwierząt mogą wytworzyć ulepszone produkty rolnicze; na przykład mleko krowie stanie się zdrowsze, bardziej pożywne albo nawet stanie się lekarstwem. Oczywiście, produkty te można z roślin lub z mleka ekstrahować.

Wszystko to (i dużo jeszcze więcej) były osiągnięcia XX stulecia. Ale czego możemy się spodziewać w XXI w. i w trzecim milenium? Nie jest to takie proste — „zgaduj-zgadula”; na pewno znacznie więcej się stanie niż potrafię przewidzieć. Trudno mi też zdecydować od czego zacząć swoje prorocтва, bo nowoczesna genetyka pozwala na bardzo wiele nowych pomysłów oraz ulepszeń. Ale chyba spróbuje zacząć od medycyny molekularnej.

Zanim się pomyśli o leczeniu, pierwszym zadaniem jest diagnoza danego schorzenia. Jeśli bylibyśmy maszyną, to najpierw trzeba mieć jej „blueprint”. Anatomia i patologia posługują się już od kilku stuleci atlasami i modelami (naszym obowiązkiem jest pamiętać o tym, że studiowanie anatomii było kiedyś karane paleniem uczonego na stosie !!!). Na poziomie genetyki odpowiada to całkowitej mapie i sekwencji genomu. Wydawałoby się, że jesteśmy na dosyć dobrej drodze do otrzymania pełnej sekwencji genomu ludzkiego, gdyby nie obecny, szalony „wyścig i konkurencja” pomiędzy rządowymi i fundacyjnymi projektami genomowi (głównie USA i UK) z jednej strony, a prywatnymi firmami (głównie Celera), z drugiej strony. Dlatego zamiast wypróbowywania całkiem nowych metod i ciągłego ich ulepszania, mamy do czynienia z ogromnym i rozrzutnym wysiłkiem, aby wygrać te zawody przy użyciu metod już sprawdzonych, bo ogromne zyski są głównym celem prywatnych firm, a celem niektórych badaczy szybkie zaspokojenie własnych ambicji. Jest to przedmiotem obszernej dyskusji w prasie (zobacz np. Science 287, 2000, str. 1723). Na przykład, w naszym laboratorium mamy bardzo stabilne wektory pBAC/oriV, które są znacznie lepsze i wydajniejsze od obecnie stosowanych wektorów pBAC, ponieważ po indukcji mogą wytworzyć 50–100-krotnie więcej DNA (HRADECNA i współaut. 1998, SZYBAŁSKI, 1999), a to

ogromnie ułatwia i przyspiesza sekwencjonowanie. Ale w obecnej atmosferze niedorzecznego pośpiechu, decydujący o Projekcie rządowym nie chcą podjąć ryzyka przedstawienia się na nasze, lepsze wektory, chociaż ostatnio i Celera i projekty rządowe przygotowują się do zastosowania naszych opatentowanych wektorów. Tak czy owak, będziemy niebawem znali więcej niż obecne 90% sekwencji genomu człowieka, ponadto wiedza o nich będzie pełniejsza i dokładniejsza. Ale pamiętajmy, że ostatecznym celem jest, aby każde nowonarodzone dziecko miało pełny wydruk sekwencji swego genomu. Sekwencja ta będzie przeanalizowana przez komputer, co pozwoli ustalić, z czasem coraz lepiej, czy noworodek (lub embrion) jest „udany”, a jeśli nie, czy będzie wymagał napraw w czasie swego życia, a jeżeli tak to jakich, oraz jak i kiedy mogą one być zrobione?

Oprócz pełnego sekwencjonowania, będziemy mieli więcej i więcej, prostych i tanich testów genetycznych. Można będzie łatwo diagnozować uszkodzone geny i różne stadia chorób genetycznie uwarunkowanych, spowodowanych powtórkami trójnukleotydów, delecjami, wstawkami transpozonów lub wirusów i innymi wrodzonymi lub nabytymi błędami w zapisie informacji w DNA. Oporność genetyczną na leki przeciwnowotworowe, wrodzoną lub nabytą w czasie leczenia, też będzie można wykryć, co pomoże ustalić metody leczenia.

Specjalne, standartowe testy PCR są obecnie podstawą nowoczesnej analizy DNA na użytek sądownictwa. Takie testy łatwo stwierdzają pokrewieństwo lub ojcostwo i pozwalają ustalić prawdę historyczną nawet po wielu wiekach. Dzięki temu unieważniono wiele fałszywych wyroków, a także udowodniono wiele przestępstw. Każdy człowiek może być teraz łatwo zidentyfikowany, pewniej i łatwiej niż przy pomocy analizy odcisków palców.

Jak będziemy leczyć zdiagnozowane choroby genetyczne? Wydaje się, że najlepiej byłoby użyć części zamiennych. Wymiana serca lub nerki jest już rutyną, ale wymiana genów ludzkich jeszcze nie jest wystarczająco opracowana (mimo, że minęło już 40 lat od czasu kiedy po raz pierwszy w moim laboratorium wymieniliśmy uszkodzony ludzki gen HPRT na nowy gen w hodowli ludzkich komórek (SZYBAŁSKA i SZYBAŁSKI 1962). Ale terapia genowa na pewno stanie się rutyną kiedyś w XXI w.

A może zamiast wymieniać geny, będziemy wymieniali całe komórki używając do tego celu różne rodzaje komórek macierzystych (ang. stem cells). Ta dziedzina jest teraz bardzo modna i obiecująca (HINES i współaut. 2000). Być może będziemy tworzyć całe nowe organy i po-

łączenia nerwowe u człowieka używając takich właśnie komórek.

Człowiek posiada cały system genowy służący naprawie błędów w DNA, które mogą prowadzić do transformacji nowotworowej, a potem rozwoju raka. Na dodatek inny system genów przyhamowuje komórki w różnych fazach rozwoju, aby umożliwić naprawę zanim będzie za późno. Rak często jest wynikiem uszkodzenia genów kierujących naprawą DNA. Dodatkowe systemy genowe służą niszczeniu komórek (apoptoza), w których zaszły nienaprawialne zmiany rakotwórcze. Na pewno XXI w. przyniesie duży postęp „w naprawianiu lub ulepszeniu systemów napraw”.

Zapewne dokona się także duży postęp w kierunku eliminowania genów odpowiedzialnych za przedwczesne starzenie. Wiemy, że tracimy odcinki telomerów w naszych chromosomach, jeśli enzym telomeraza nie działa wydajnie. Ale to nie wszystko. Wierzę, że w XXI w. powstanie dużo nowych sposobów, aby znacznie przedłużyć nasze aktywne życie. W ten sposób przejdziemy do następnego etapu ewolucji, w którym stare powiedzenie, „że starość się Panu Bogu nie udała” stanie się znacznie mniej aktualne.

Kilka lat temu wielkim triumfem było sklonowanie owcy Dolly. Powstaje więc pytanie, czy będzie można sklonować ukochanego psa czy kota. Nie będzie w tym chyba nic złego, bo klon będzie bardzo przypominał nasze utracone zwierzę. Ale może ważniejszym jest, że klonowanie zwierząt laboratoryjnych, na przykład myszy, będzie bardzo przydatne dla nauki, a klonowanie zwierząt hodowlanych, takich jak krowy, obecnie stosowane w laboratoriach, z czasem stanie się powszechne w hodowli. Klonowanie pomoże też uratować zagrożone zagładą dzikie zwierzęta, jak na przykład panda.

A jak będzie z klonowaniem człowieka? Na pewno się to kiedyś uda, ale jaki będzie tego cel? Na pewno rozszerzy to repertuar metod utrzymania gatunku, a z czasem może komuś pomoże w otrzymaniu potomka z już „wypróbowanego modelu”, który będzie „przesuniętym w czasie identycznym bliźniakiem” w stosunku do dawcy jądra komórkowego. Wiemy obecnie bardzo dużo o cechach identycznych bliźniąt, będziemy więc mogli przewidzieć wiele cech przyszłej osobowości klonu. Ponieważ społeczeństwo coraz częściej się domaga, aby osiągać wszystko bez żadnego ryzyka (z czym ja się nie zgadzam, bo bez ryzyka Kolumb nie odkryłby Ameryki) nie zdziwię się, jeśli w przyszłości większość rodziców będzie chciała mieć tylko „bezpieczne i wypróbowane” potomstwo; może wtedy rodzice, którzy zadecydują się na natu-

ralny sposób spłodzenia dziecka, będą określani jako ryzykanci lub awanturnicy.

Mało jeszcze wiemy o podstawowych mechanizmach działania mózgu i systemu nerwowego. Nawet nie wiemy w jakich molekułach i jak odkłada się nasza pamięć. Czy podobnie jak w komputerze czy na jakiejś innej zasadzie? Obecnie komputery używają tylko znaków „0” i „1”. Natomiast nasze „mózgowe komputery” prawdopodobnie stosują modulację między tymi znakami, co daje szansę używania wartości pośrednich. Wyjaśnienie tej zagadki to jedna z najbardziej obiecujących dziedzin nowych odkryć w trzecim tysiącleciu. Ostatnio ukazało się kilka publikacji dotyczących budowy komputerów opartych na DNA. Może to też stworzy nowe perspektywy badań w XXI w.?

Podobna do liczby zasad w naszym diploidalnym DNA (ok. 6,4 miliardów) jest liczba ludzi na świecie. Jest to niewątpliwie za dużo dla naszej planety i jeśli nic się nie zmieni, to dalszy przyrost ludności, połączony ze wzrostem jej stopy życiowej, będzie katastrofalny i dla społeczeństwa i dla całego środowiska. Nauki genetyczne i biotechnologia będą chyba w przyszłości najlepszą przed tym obroną, zamiast wprowadzania drakońskiego ustawodawstwa.

Aby wyżywić wzrastającą szybko populację ludzką, trzeba ciągle usprawniać rolnictwo, powiększać jego wydajność i czynić jego produkty coraz bardziej pożywnymi i zdrowymi. Będzie to nigdy nie kończące się zadanie rolniczej biotechnologii. Zwiększenie powierzchni kuli ziemskiej oraz ilości docierającej do nas energii słonecznej jest pewnie niemożliwe, ale wydajność wykorzystania tej energii będziemy napewno mogli usprawnić.

Na przykład ryż, który jest podstawą wyżywienia na wielkich połaciach świata, będzie można genetycznie wzbogacić w potrzebne witaminy oraz nadać mu odporność na szkodniki i różne choroby. Podobnie będzie się udoskonalało inne zboża i rośliny uprawne. Z drugiej strony, można będzie wprowadzić na rynek odmiany ryżu lub innych produktów żywnościowych, których spożycie obniży płodność w łatwy do przyjęcia i zupełnie odwracalny sposób. Na dłuższą metę będzie to idealnym rozwiązaniem, aby ograniczyć nieplanowane potomstwo. Jestem przekonany, że zamiast stosowania negatywnych metod zapobiegania lub przerywania ciąży, wszyscy powinni stać się odwracalnie niepłodni, bo wtedy trzeba będzie używać tylko pozytywne środki, które pozwolą na zapłodnienie i ciążę. W ten sposób nie tylko bogaci ludzie i dostatnie kraje będą mogły łatwo i tanio kon-

trolować własną reprodukcję. Uważam, że tak byłoby znacznie bardziej „po ludzku”.

Bardzo ważną w przyszłości dziedziną będzie zastosowanie kombinatoryki (informatyki) do produkowania nowych białek i odpowiednich genów. Podejście to, w połączeniu z dobrze sterowanymi, wybiórczymi metodami klonowania (np. opartymi na użyciu tak zwanych „display vectors”, stwarza prawie nieograniczone możliwości syntezy nowych leków i innych pożytecznych produktów. To bardzo nowoczesne i inteligentne podejście, rozwijające się „jak grzyby po deszczu”, doprowadzi do otrzymywania środków, które będą się łączyły z naszymi „chorzymi” białkami albo z innymi szkodliwymi dla organizmu substancjami. Nowe metody i pomysły pojawiają się prawie codziennie w tej dziedzinie. Sam uczestniczę obecnie w półrocznym kursie, który w całości jest poświęcony tej tematyce.

Jesteśmy produktem naturalnej ewolucji i wszystko co wytwarzamy, fizycznie czy intelektualnie, też można uznać za część naturalnej ewolucji. W przyszłości należy się spodziewać ciągłego rozwoju zapoczątkowanych przez Darwina badań nad ewolucją, aby zrozumieć jak powstał świat biologiczny, przewidzieć w jakim kierunku pójdzie jego dalsza ewolucja i wykorzystać ją w laboratorium do stworzenia lepszych i pożyteczniejszych odmian mikroorganizmów, roślin i zwierząt.

Niestety, wynikiem naturalnej ewolucji są czasem też różne choroby; współczesnym tego przykładem jest AIDS (SCHWARTLÄNDER i współaut. 2000). Genetyka i wirusologia XX w. pozwoliły szybko zrozumieć istotę tej choroby i przynajmniej częściowo ją opanować; ponieważ niszczy ona naszą normalną odporność, jest znacznie trudniejsza do leczenia niż gruźlica, polio, tyfus, ospa i inne choroby zakaźne, które tak wspaniale udało się opanować w XX w. dzięki antybiotykom i szczepionkom. Wielkim polskim przyczynkiem była szczepionka na tyfus plamisty, która została opracowana w naszym polskim Lwowie, w latach 1919–1944, przez Rudolfa Weigla, profesora Uniwersytetu Jana Kazimierza. Szczepionka ta uratowała życie milionom ludzi (SZYBAŁSKI 1999b).

Innym niekorzystnym wynikiem naturalnej ewolucji jest odporność mikrobów na antybiotyki i inne środki lecznicze. W tej dziedzinie znajomość podstaw genetyki bardzo nam pomoże. Przykładem tego może być stosowanie terapii wielolekowej, którą zaproponowałem (w oparciu o swoje praktyczne i teoretyczne badania nad częstotliwością oporności w stosunku

do jednego wobec kilku antybiotyków) jeszcze w latach 50. mijającego wieku (SZYBAŁSKI 1956), kiedy lekarze bali się używać więcej niż jednego chemoterapeutyka. Obecnie stosuje się naraz nawet pięć takich środków, aby opóźnić rozwój oporności i wyleczyć pacjenta. Rozwój nauk genetycznych pozwoli nam częściej odnosić zwycięstwa w stałym wyścigu pomiędzy ewolucją mikroorganizmów chorobotwórczych w kierunku oporności i wirulencji a naszymi wysiłkami w poszukiwaniu metod ich zwalczania. Są to zawody, które zawsze będą się odbywały i dlatego nigdy nie spoczniemy na laurach. Niestety, w ostatnich dziesięcioleciach zbyt łatwo uznaliśmy, że można już „spocząć”, czego rezultatem jest bardzo niepokojący wzrost oporności na leki.

Również nowotwory są produktem ewolucji. Znamy już wiele onkogenów, które często kodują różne czynniki wzrostowe. Kaskada zmian mutacyjnych w onkogenach oraz w innych genach kontroli prowadzi do coraz bardziej złośliwych form nowotworów. Zrozumienie tych procesów pozwoli nam w przyszłości dopasować leczenie nowotworów do ich genetycznych i biochemicznych własności i opanować ten rodzaj schorzeń. Ale i tu także będzie to stały wyścig między ciągle nowymi lekami a ewolucją nowotworów.

Studia nad ewolucją oraz nad procesami rozwoju, od zapłodnionego jaja do dorosłego organizmu, będą się ogromnie rozwijały, ponieważ łącznie z sekwencjami DNA dostarczają nam one dowodów na silne powiązanie pomiędzy wszystkimi żyjącymi organizmami, zaczynając od najprymitywniejszych Archae, poprzez bakterie, rośliny i zwierzęta, do człowieka. Sekwencje białek i DNA mają tyle podobieństw w swoich odpowiednich domenach, że ich porównawcza analiza pozwala na śledzenie przebiegu ewolucji całego życia na Ziemi. Darwin wprowadził nas na dobrą drogę a teraz mamy coraz więcej dowodów, że miał rację!

W XXI w. genomika, czyli studiowanie całych genomów, będzie prawdopodobnie królową nauk biologicznych. Jesteśmy obecnie świadkami rewolucji genomicznej! A genomika należy do informatyki, łącząc w ten sposób nauki biologiczne z matematyką i naukami komputerowymi. Dlatego wiele doświadczeń w XXI w. będzie wykonywanych nie tylko *in vivo* lub *in vitro*, ale też *in silico*, to znaczy komputerowo. Jak daleko zajdziemy, przyszłość pokaże, ale osobiście sądzę, że genomika przyniesie same, i to ogromne, korzyści.

Już teraz, a także w bliskiej i dalszej przyszłości, podstawy genetyki i biotechnologii będą ogromnie użyteczne dla celów ochrony środowi-

ska. Mikroorganizmy, które służą do oczyszczania ścieków będą usprawniane genetycznie, aby przetwarzały zanieczyszczenia w pożyteczne produkty i jednocześnie podwyższały społeczną wartość środowiska. Świat stanie się czystszy, zdrowszy i na dodatek piękniejszy! Na przykład, podwyższenie wydajności rolnictwa, łącznie z łatwymi do akceptacji metodami zmniejszania naturalnego przyrostu, pozwoli na to, aby ogromne połacie eksploatowanych obecnie rolniczo terenów zostały przywrócone naturze.

Należałoby na tym zakończyć. Chcę jednak jeszcze ostrzec polskie społeczeństwo przed różnego rodzaju demagogami i ich szkodliwą propagandą przeciwko korzyściom płynącym z genetyki. Zastosowanie genetyki w medycynie i biotechnologii, to ogromnie pożyteczny przyczynek dla rozwoju ludzkiej kultury i podnoszenia dobrobytu. Dlatego społeczeństwo powinno ignorować lub zwalczać wszelkiego rodzaju demagogów, którzy, określając się mianem obrońców środowiska, fałszywie straszą społeczeństwo, że w zastosowaniach genetyki dla dobra ludzkości tkwią jakieś „niby-niebezpieczeństwa”. Uważam, że tacy fałszywi prorocy są społecznymi szkodnikami, ogromnie szkodzą szlachetnym celom obrony naturalnego środowiska, bo genetyka i biotechnologia prowadzą do jego uszlachetnienia. Zapobieganie chorobom, ich leczenie, usprawnianie produktów spożywczych, oczyszczanie środowiska są to ogromnie pożyteczne i szlachetne cele. Jakakolwiek ustawa, która utrudniałaby ich osiąganie powinna być energicznie odrzucona przez społeczeństwo. Nie powinniśmy nawet projektować nowych ustaw, dopóki nie spełniają one systematycznie i odpowiedzialnie następujących warunków.

Wstępnym krokiem powinno być przeanalizowanie rzekomego „niebezpieczeństwa”, bo nie wystarcza, że Pan czy Pani Iks, czy też jakaś organizacja polityczna, mają „poczucie niebezpieczeństwa”. Najpierw musimy wykazać, że powstały jakieś prawdziwe, znaczące i udowodnione szkody (a nie jakieś „wyssane z palca” niebezpieczeństwo) związane z wprowadzeniem nowej metody lub działalności genetycznej czy biotechnologicznej. Następnie musimy udowodnić, że szkody te są znacznie większe niż korzyści płynące z tej nowej metody lub działalności. Dopiero wtedy, kiedy mamy jednoznaczny dowód, że szkody są znacznie większe niż suma korzyści, można zacząć myśleć o projektowaniu nowej ustawy, która mogłaby zabezpieczyć społeczeństwo przed szkodliwymi skutkami jakiegokolwiek biotechnologii. Ostatecznie, taka ustawa powinna być zatwierdzona tylko na jeden rok (nazywa się to w jęz. ang. „sunset

clause” czyli automatycznie zanikająca ustawa „zachodzącego słońca”). Tylko w oparciu o doświadczenie zgromadzone w tym czasie, po dokonaniu odpowiednich poprawek i po poddaniu ustawy przedstawionej procedurze weryfikacyjnej, będzie ona mogła być przedłużona na następny, raczej krótki okres, bo postęp w biotechnologii jest ogromnie szybki, podczas gdy przestarzałe ustawy są zwykle bardzo kosztowne i szkodliwe.

Mam nadzieję, że mądrość polskiego społeczeństwa nie pozwoli na pochopne, nieprzemyślane, szkodliwe ustawodawstwo dotyczące wyimaginowanych „niebezpieczeństw” i nieudowodnionych „szkód”, co niestety miało miejsce w innych krajach.

I jeszcze ostatnia uwaga. Kim jesteśmy? Czy tylko skomplikowaną maszyną powstałą w wyniku ewolucji, której celem jest odgrywanie kasety zawierającej informację w postaci sekwencji DNA? Tą kasetę otrzymaliśmy od rodziców w postaci kombinacji ich kaset. Ale ta kaseta określa też nasz mózg, nasze zdolności, możliwości i wady. Prymitywne stworzenia mają bardzo ograniczone możliwości wyboru swego postępowania, ale my i niektóre wyższe zwierzęta, możemy w dużej części swobodnie o tym decydować, niezależnie od kodu w DNA. Dlatego mamy możliwości i szansę, aby intelektualnie lub fizycznie wzbogacić (a czasem też niestety zubożyć) nasze własne życie, a także życie naszych najbliższych i całego społeczeństwa.

LITERATURA

- AVERY, O. T., MACLEOD, C. M., MACCARTHY, M., 1944, *Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III*. J. Exp. Med. 79, 137–158.
 BEADLE, G. W., TATUM, E. L., 1941, *Genetic control of biochemical reactions in Neurospora*. Proc Natl. Acad. Sci. USA 27, 499–506.
 CRICK F. H. C., BARNETT, L., BRENNER, S., WATTS-TOBIN R. J., 1961. *The general nature of the genetic code for proteins*. Nature 192, 1227 – 1232.
 DE LUCIA P., CAIRNS J., 1969. *Isolation of an E. coli strain with mutation affecting DNA polymerase*. Nature 224, 1164–1166.
 FIANDT, M., SZYBALSKI W., MALAMY M. H., 1972. *Polar mutations in lac, gal, and phage lambda consist of a few IS-DNA sequences inserted with either orientation*. Mol. Gen. Genetics 119, 223–231.
 GOLDEN F., LEMONICK M.D., 2000. *The race is over*. Time 156, 19–23.
 GRIFFITH F., 1928. *The significance of pneumococcal types*. J. Hyg. 27, 113–159.
 HERSHEY A. D., CHASE M., 1952. *Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage*. J. Gen. Physiol. 36, 39–56.
 HINES P. J. i 15 autorów, 2000. *Stem cells research and ethics*. Science, 1417–1446.
 HRADECNÁ, Z., WILD J., SZYBALSKI W., 1998. *Conditionally amplifiable inserts in pBAC vectors*. Microbial & Comp. Genomics 3, 58.
 ILLIS H., 1924. *Gregor Johann Mendel. Leben, Werk und Wirkung*. Springer Verlag, Berlin.
 LEMONICK M. D., 2000. *The genome is mapped. Now what*. Time 156, 24–29.
 LITMAN R. M., SZYBALSKI W., 1963. *Enzymatic synthesis of transforming DNA*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 10, 473–481.
 MENDEL J. G., 1866. *Versuche über Pflanzenhybriden. Verhandlungen Naturforsch. Verein, Brünn (Brno) 4*, 3–47.
 MORGAN T. H., STURTEVANT A. H., MULLER H. J., BRIDGES C. B., 1915. *The Mechanism of Mendelian heredity*. Henry Holt, New York.
 MULLER H. J., 1927. *Artificial transmutation of the gene*. Science, 46, 84–87.
 OREL V., 1972. *Professor Aleksander Zawadzki (1798–1868) — Mendel's superior at the Technical Modern School in Brno*. Folia Mendeliana Musei Moraviae, Brno 7, 13–20.
 PENISI E., 2000. *Finally book of life and instructions for navigating it*. Science 288, 2404–2307.
 SANGER F., NICKLEN S., COULSON A. R., 1977. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463–5467.
 SCHWARTLÄNDER B., GARNETT G., WALKER N., ANDERSON R., 2000. *AIDS in a new Millennium*. Science 289, 64–67.
 SZYBALSKA E. H., SZYBALSKI W., 1962. *Genetics of human cell lines. IV. DNA mediated heritable transformation of a biochemical trait*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48, 2026–2034.
 SZYBALSKI W., 1956. *Theoretical basis of multiple chemotherapy*. Tuberculosis 15, 82–85.
 SZYBALSKI W., 1999a. *Conditionally amplifiable BAC vector*. US Patent No. 5, 874, 259.
 SZYBALSKI W., 1999b. *Maintenance of human-fed live lice in the laboratory and production of Weigl's exanthematic typhus vaccine*. [W:] *Maintenance of Human, Animal, and Plant Pathogen Vectors*. MARAMOROSCH K., MAHMOOD F. (red.). Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA str. 161–180.
 SZYBALSKI W., 2000. *In memoriam: Alfred D. Hershey (1908 – 1997)*. [W:] *We Can Sleep Later*. STAHL F. W. (red.) A. D. Hershey and the Origins of Molecular Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, str. 19 – 22.
 WATSON J. D., CRICK F. C. H., 1953. *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature 171, 737–738.
 WESTMORELAND B. C., SZYBALSKI W., RIS H., 1969. *Mapping of deletions and substitutions in heteroduplex DNA molecules of bacteriophage lambda by electron microscopy*. Science 163, 1343–1348.