

GENOM CZŁOWIEKA I SPOSOBY JEGO REDAGOWANIA

WŁODZIMIERZ KRZYŻOSIAK

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Zakład Biomedycyny Molekularnej

WPROWADZENIE

Przystępując do rozważań na temat korzyści i zagrożeń związanych z inżynierią genetyczną człowieka, dobrze jest spojrzeć na ten temat w kontekście innych problemów oraz wyzwań współczesnej biologii i medycyny. Społeczeństwo niemal codziennie informowane jest o nowych odkryciach w biologii i kolejnych sukcesach medycyny. Jednak sami naukowcy wiedzą dobrze, że są to najczęściej małe kroki na drodze do poznania molekularnych podstaw funkcjonowania różnych organizmów i wykorzystania tej wiedzy w praktyce medycznej. Bardziej znaczące odkrycia i przełomowe technologie pojawiają się rzadziej, raz na kilka lat lub dekad, i jeśli dotyczą bezpośrednio człowieka, budzą wiele emocji i niekiedy obaw. W przypadku edycji ludzkiego genomu obawy są wyrażane z podobną mocą jak entuzjazm, ponieważ nowa technologia może być w łatwy sposób wykorzystana do wprowadzania zmian w genomie komórek rozrodczych, co może mieć poważne konsekwencje dla przyszłych pokoleń, dla dalszego rozwoju całego gatunku.

Esej ten składa się z dwóch części. Pierwsza przedstawia w ujęciu historycznym stan naszej wiedzy o ludzkim genomie, czyli obiekcie, na którym rozważane jest dokonywanie modyfikacji genetycznych. W tej części opisane są pokrótce związki między mutacjami w genach i chorobami, realizowany w ostatniej dekadzie minionego wieku Projekt Poznania Genomu Człowieka, kolejne wielkie projekty genomiki, a także wiedza o wpływie genów na takie cechy, jak kolor oczu, kształt twarzy, wzrost czy długość życia człowieka. Pojawia się też pytanie, czy informacja zawarta w DNA pozwoli nam odtworzyć dokładny wizerunek naszych odległych przodków? Druga część dotyczy już samych metod edycji genomu, ich aktualnego stanu oraz kierunków zastosowań w biologii i medycynie. Na koniec przedstawione zostały opinie przedstawicieli świata nauki na temat możliwości podejmowania już w niedalekiej przyszłości badań nad redagowaniem genomu ludzkich komórek rozrodczych oraz etycznych aspektów tego zagadnienia.

CHOROBY GENETYCZNE U LUDZI - PRZYKŁAD CHOROBY HUNTINGTONA

W komórkach człowieka, podobnie jak u innych organizmów, DNA ulega ciągłym mutacjom, co w ewolucyjnej skali czasu jest korzystne, stwarzając genetyczne zróżnicowanie populacji. Jednak mutacje w komórkach rozrodczych, dziedziczone po rodzicach, jeśli dotyczą genów kluczowych dla rozwoju i funkcjonowania organizmu, mogą prowadzić do wielu chorób genetycznych. Mutacje w komórkach somatycznych, nabywane w czasie trwania życia człowieka, pojawiają się podczas podziału komórek i duplikacji materiału genetycznego lub wywoływane są czynnikami środowiskowymi, takimi jak promieniowanie UV, infekcje wirusowe lub czynniki chemiczne. Gdy nie zostają skorygowane przez komórkowe systemy naprawy, mogą prowadzić do powszechnych chorób

cywilizacyjnych, takich jak nowotwory wywoływane zwykle kumulacją mutacji w kilku kluczowych genach. Drastycznymi przykładami chorób i wad genetycznych są nerwiakowłókniakowatość typu 1, dawniej zwana chorobą *von Recklinghausena*, cechująca się obecnością licznych podskórnych guzków pochodzenia nerwowego, hipertrichoza, zwana niekiedy potocznie zespołem wilkołaka, cechująca się nadmiernym zarostem na całym ciele, progeria, czyli przyspieszone starzenie się, znane jako zespół *Huthinsona-Gilforda* ze średnim czasem przeżycia 13 lat, i polidaktylia wyrażająca się nadmierną liczbą palców u kończyn górnych lub dolnych.

Choroba Huntingtona, którą badamy w Zakładzie Biomedycyny Molekularnej IChB PAN w aspekcie mechanizmów patogenety i podejść terapeutycznych, wywołwana jest dziedziczną mutacją w jednym tylko genie. Historia badań nad tą chorobą jest dobrym przykładem, aby uzmysłowić sobie, jak wiele czasu wymagała w latach 80. i 90. minionego wieku identyfikacja genu, którego mutacja powoduje chorobę kończącą się nieuniknioną śmiercią pacjenta po 15–20 latach od wystąpienia pierwszych objawów klinicznych. Ta choroba zwana była dawniej płasawicą od greckiego słowa *chorea* określającego rodzaj tańca. Nazywano ją też tańcem Świętego Wita, patrona tancerzy. Chorobę tę w 1872 r. opisał w literaturze medycznej młody lekarz amerykański George Huntington jako progresywną degenerację mózgu. Po ponad stu latach, chcąc znaleźć wadliwy gen, badano wiele dotkniętych nią rodzin pod kątem współwystępowania choroby z markerami genetycznymi, rozlokowanymi w różnych regionach chromosomów. Stwierdzono, że choroba dziedziczona jest wraz z markerem występującym w krótkim ramieniu chromosomu 4. We wskazanym obszarze chromosomu 4 występuje jednak wiele genów i znalezienie tego jednego sprawczego, w którym zaszła mutacja, zajęło badaczom aż 10 lat.

PROJEKT POZNANIA GENOMU CZŁOWIEKA

Aby przyspieszyć proces znajdowania genów związanych z chorobami, na przełomie lat 80. i 90. XX w. Kongres USA podjął decyzję o sfinansowaniu Projektu Poznania Genomu Człowieka. Twórcy projektu postanowili jednym ogromnym, skoordynowanym wysiłkiem poznać wszystkie geny człowieka, określić ich funkcje oraz sposoby regulacji. Uznali, że poznanie całego genomu powinno umożliwić stworzenie wielu testów genetycznych ujawniających skłonności ludzi do różnych chorób oraz dać podstawy do bardziej skutecznego niż dotąd zwalczania chorób.

Terminu *genom* używamy do określenia materiału genetycznego zawartego w podstawowym zestawie chromosomów danego organizmu. Genom człowieka stanowią 3 mld par zasad DNA, podzielone na 23 chromosomy, zlokalizowane w jądrze komórek haploidalnych. Jeszcze przed podjęciem realizacji Projektu Poznania Genomu Człowieka uważano, że ludzki genom zawiera ok. 100 tys. genów. Prace rozpoczęte w 1990 r. miały trwać 15 lat i pociągnąć za sobą koszty wysokości 3 mld dolarów. W projekcie uczestniczyły setki naukowców z najlepszych ośrodków badawczych krajów wysoko rozwiniętych. Pierwszym szefem projektu został współodkrywca struktury DNA James Watson. Na półmetku badań liczbę przewidywanych genów zrewidowano do 80 tys. Prace nad projektem zakończyły się kilka lat wcześniej, niż przewidywano, ponieważ pojawił się silny konkurent dla rządowego konsorcjum w postaci prywatnej firmy Celera (nazwa pochodzi od słowa *celerity* – szybkość). W połowie lutego 2001 r. ukazały się równocześnie publikacje w najbardziej prestiżowych czasopismach *Nature* i *Science*, przedstawiające na otwarcie trzeciego milenium sekwencję ludzkiego genomu [1,2]. W *Nature* swoje wyniki przedstawiło międzynarodowe konsorcjum, którego pracami po rezygnacji Watsona zarządzał Francis Collins, a w *Science* swoją sekwencję przedstawiła Celera, której działaniami kierował jej założyciel Creig Venter. Podejście konsorcjum Collinsa można określić w uproszczeniu stopniowym, systema-

tycznym, a podejście Ventera drogą na skróty. Wyniki uzyskane przez obie grupy były jednak podobne. Okazało się, że w ludzkim genomie jest tylko ok. 30-40 tys. genów kodujących białka, czyli zaledwie połowa wcześniej szacowanej liczby. Kiedy niemal 20 lat temu PWN wydało naszą książkę pt. *Genom człowieka – największe wyzwanie współczesnej biologii i medycyny* [3], był to jeszcze etap szacowanych 80 tys. genów w genomie.

GENOM I TRANSKRYPTOM CZŁOWIEKA W LICZBACH

W 2003 r. prace nad Projektem Poznania Genomu Człowieka uznano oficjalnie za zakończone. Jednak sekwencja ludzkiego genomu jest ciągle analizowana i poprawiana przez bioinformatyków oraz aktualizowana pod względem liczby genów i różnego typu transkryptów. Liczba genów kodujących białka w wyniku kolejnych weryfikacji spadła do poniżej 20 tys. i wynosi obecnie 19 815 (baza GENCODE v24, sierpień 2015). Liczba pseudogenów, czyli sekwencji, które były kiedyś genami kodującymi białka, lecz później w ewolucyjnej skali czasu tę zdolność straciły, wynosi 14 505. Natomiast liczba genów kodujących regulatorowe RNA systematycznie rośnie. Dwie przełomowe prace podające pierwsze sekwencje ludzkiego genomu w lutym 2001 r. nie informowały jeszcze ani słowem o prawie 10 tys. genów kodujących małe regulatorowe RNA (głównie mikroRNA). O wielkiej skali transkrypcji genomu, o tym, że niemal cały genom ulega transkrypcji (biorąc pod uwagę różne typy komórek i etapy rozwoju organizmu), wiadomo jest od niedawna. Liczba znanych obecnie długich niekodujących RNA wynosi 15 941, a liczba krótkich RNA sięga 14 000. Liczba wszystkich znanych obecnie transkryptów wynosi 199 169 i przewyższa ponadtrzykrotnie liczbę 60 554 wszystkich znanych ludzkich genów. Jedną z atrakcyjnych hipotez zakłada, że różne transkrypty, kodujące i niekodujące białek, komunikują się ze sobą w komórkach poprzez wiązanie i uwalnianie cząsteczek mikroRNA, regulując w ten sposób poziomy białek w komórkach [4].

ERA MEGAPROJEKTÓW SEKWENCJONOWANIA GENOMÓW

Przez pierwsze pięć lat minionej dekady poznano kolejne genomy, między innymi myszy [5] i szympansa [6]. Stwierdzono, że zgodność sekwencji ludzkiego genomu z sekwencją genomu szympansa wynosi 96%, a z sekwencją genomu myszy 82%. Nastąpił też przełom w zakresie metod sekwencjonowania DNA, który doprowadził do znacznego obniżenia jego kosztów do 1000 dol. za genom. Można było podjąć wielkie projekty, takie jak 1000 Genomes Project [7], mający na celu poznanie zróżnicowania sekwencji genomów w różnych światowych populacjach ludzkich, czy The Cancer Genome Atlas [8], którego zadaniem było znalezienie mutacji genowych w 30 głównych typach nowotworów. Stwierdzono, że populacje światowe różnią się 88 mln wariantów w genomie, z czego 85 mln to zamiany typu SNP pojedynczych liter sekwencji DNA. Znalezione też ponad 10 mln mutacji w genach odpowiedzialnych za procesy nowotworowe.

Ogłoszone już projekty, a także te przewidziane do realizacji w najbliższych latach, są bardzo ambitne – dotyczą 100 tys., miliona, a nawet wielu milionów genomów. Prezydent USA Barack Obama ogłosił inicjatywę medycyny precyzyjnej (The Precision Medicine Initiative), której ważnym elementem ma być poznanie genomów miliona Amerykanów. Pracami tego projektu kieruje Francis Collins. Na poziomie miliona genomów zanoszą się znowu na naukową potyczkę z Craigiem Venterem, którego nowa firma Human Longevity Inc postawiła sobie nie mniej ambitny cel zmierzający do poprawy zdrowia i jakości życia społeczeństwa. W Korei Południowej planuje się poznanie zapisu DNA wszystkich jej mieszkańców, a szef tego projektu mówił nawet o sekwencjonowaniu miliarda genomów. George Church, inicjator projektu personalnych genomów Personal Genome Project, uważa, że genomy wszystkich ludzi żyjących na Ziemi powinny być zsekwencjonowane. Inne projekty dotyczą poznania genomów wielu przedstawicieli innych gatunków. Przykładowo, wszystkich

organizmów żyjących na malowniczej wyspie Mo'orea na Pacyfiku, należącej do Francuskiej Polinezji. Pojawiło się też pojęcie genomu planetarnego, czyli genomów wszystkich gatunków żyjących na naszej planecie. Nowe wyzwanie technologiczne to genom za 100 dol. Osiągnięcie tego celu może spowodować zalew baz danych miliardami sekwencji genomów w następnej dekadzie.

JUN WANG - BIOINFORMATYK I WIZJONER

Zmieniła się też mapa największych ośrodków badań genomowych w świecie. Chiński Beijing Genomics Institute (BGI), zlokalizowany w Schinzan w pobliżu Hongkongu, ma, jak się szacuje, 30–50% udział w ogólnoswiatowej rocznej produkcji sekwencji genomowych. Pracują w nim prawie 3 tys. badaczy, którzy mają do dyspozycji ponad 200 nowoczesnych sekwenatorów DNA. Instytut zasłynął wcześniej z określenia sekwencji DNA pierwszego Azjaty, pandy, ryżu i genomów wielu gatunków ptaków. Poznano w nim również sekwencje genomów ponad 100 tys. ludzi. Celem, jaki postawił przed sobą współtwórca i dyrektor BGI, bioinformatyk i wizjoner Jun Wang, jest stworzenie dla potrzeb ochrony zdrowia i medycyny klinicznej nowego, cyfrowego systemu monitorowania zdrowia [9]. Będzie to ogromna baza danych, w której obok sekwencji milionów genomów, transkryptomów, proteomów, metabolomów i lipidomów zawarte będą informacje o stylu życia każdej z osób objętych badaniem i wpływie środowiska (1 terabajt na osobę). W ramach tego systemu udzielane będą uczestnikom porady dotyczące sposobu odżywiania i ćwiczeń fizycznych, aby mogli żyć dłużej w dobrym zdrowiu. Uczestnicy będą też informowani o potencjalnych i zbliżających się zagrożeniach dla zdrowia, aby mogli im w porę zapobiegać. Częścią systemu będą też lekarze, naukowcy oraz firmy farmaceutyczne. Jun Wang traktuje to przedsięwzięcie jako projekt swojego życia i daje sobie 20 lat na jego realizację. Jest przekonany, że zmierza we właściwym kierunku, a ryzyka nie boi się podejmować.

MOZAIKOWATOŚĆ GENOMU

Organizm człowieka zbudowany jest z ok. 30 trylionów komórek, które nie posiadają identycznych genomów. Rozwój organizmu z pojedynczej zapłodnionej komórki wymaga wielu podziałów komórkowych, podczas których materiał genetyczny jest wielokrotnie replikowany. Różne populacje komórek ulegają mutacjom w różnych stadiach rozwoju organizmu. Dotyczy to zarówno komórek macierzystych, jak i komórek zróżnicowanych. Niektóre mutacje prowadzą do eliminacji takich komórek, czyli do ich negatywnej selekcji. Inne komórki z mutacjami nie są eliminowane i mają swój udział w tworzeniu mozaikowości genetycznej organizmu [10]. Różne tkanki i organy mogą wykazywać mozaikowość genomu w różnym stopniu, nie wspominając już o znacznie zmienionym genomie tkanki nowotworowej. Z tych powodów nie dziwi fakt, iż mówi się o rynku sekwencjonowania ludzkich genomów wielkości kilku dziesiątek miliardów genomów, podczas gdy liczba ludzi zamieszkujących naszą planetę nie osiągnęła jeszcze 10 mld.

ODDZIAŁYWANIE GENOMU Z MIKROBIOMEM

Liczba mikroorganizmów zasiedlających organizm człowieka jest kilkukrotnie większa od liczby komórek, które tworzą ludzki organizm. Oznacza to, że niecałe 20 tys. genów człowieka ma bliskie sąsiedztwo w postaci skumulowanej liczby kilku milionów różnych genów pochodzących od mikroorganizmów. Ta symbioza mikrobów ze zwierzętami doprowadziła w ewolucyjnej skali czasu do wielu przypadków integracji DNA mikrobów również z ludzkim genomem. Zatem nie wszystkie geny człowieka pochodzą od naszych naczelných przodków, a pewna ich część wniknęła do naszego genomu na drodze tzw. horyzontalnego transferu, który jest znanym mechanizmem wymiany genów u bakterii i prostych organizmów eukariotycznych. Dobrze poznany jest przykład przenoszenia bakteryjnych genów przez insekty, co pomaga im trawić

niektóre typy pożywienia. Badacze z Uniwersytetu w Cambridge analizowali niedawno sekwencje genomów 40 różnych organizmów zwierzęcych, m.in. niciania, muszki owocowej oraz naczelnych, włączając człowieka. Porównywali ich sekwencje DNA z sekwencjami genomów drobnoustrojów. W genomie człowieka znaleźli 145 fragmentów DNA wskazujących na ich pochodzenie od bakterii, innych jednokomórkowych organizmów i wirusów [11]. Geny te pełnią obecnie funkcje w metabolizmie ludzkiej komórki, odpowiedzi immunologicznej i podstawowych procesach biochemicznych. Należy do nich m.in. gen *ABO*, określający grupę krwi. Autorzy tej pracy nie wyjaśniają jednak, jak i dokładnie kiedy do tej integracji materiału genetycznego doszło. U człowieka i innych naczelnych do takiego transferu dochodziło prawdopodobnie dość dawno u ich ostatnich wspólnych przodków, natomiast u niciania i muszki owocowej wydarzenia te następowały także znacznie później. Transfer genów z prostego organizmu do złożonego wymaga pokonania wielu barier. Na pytanie, jak bakterie wprowadziły swój DNA do komórek jajowych, plemników czy wczesnych zarodków człowieka, aby na dobre zadomowić się w ludzkim genomie, nie ma jeszcze konkretnych odpowiedzi.

GENY OKREŚLAJĄCE CECHY MORFOLOGICZNE CZŁOWIEKA

Przez kilka tysięcy pokoleń istnienia gatunku *Homo sapiens* nastąpiło wiele zmian w genomie wpływających na znaczne zróżnicowanie ludzkich fenotypów. W okresie ostatnich dziesiątek tysięcy lat doszły ponadto zmiany adaptacyjne związane z zasiedlaniem przez nasz gatunek różnych stref klimatycznych na kuli ziemskiej, a w ostatnich tysiącach lat kolejne adaptacje spowodowane zmianą trybu życia z łowiecko-zbierackiego na osiadły, związany z rozwojem rolnictwa i urbanizacją. Sekwencjonowanie setek tysięcy i milionów ludzkich genomów przyspieszy nie tylko rozwiązywanie problemów dotyczących poprawy zdrowia i dłu-

gości życia. Pozwoli także na lepsze poznanie związku pomiędzy sekwencją genomu i naszą aparycją, jeżeli sekwencja DNA będzie zestawiona z takimi cechami morfologicznymi, jak kolor oczu, włosów czy skóry, wokalizacja, a także kształt twarzy czy wzrost. Idea rekonstrukcji kształtu twarzy człowieka na podstawie jego DNA jest bardzo chwytliwa. Można sobie na przykład wyobrazić sytuację, że zamaskowany przestępca pozostawił na miejscu przestępstwa ślady swojego DNA. Czy można będzie na tej podstawie zrekonstruować jego posturę i wygląd twarzy z fotograficzną niemal precyzją? Czy można będzie także zrekonstruować wygląd odległego przodka na podstawie DNA izolowanego z zębów lub kości? Czy można będzie na podstawie DNA izolowanego z płynu owodniowego kobiety przewidzieć dokładny wygląd nienarodzonego jeszcze dziecka, gdy będzie miało 20 lat? Przy przewidywaniu cech na podstawie DNA ważne są dwa czynniki: jaki jest udział genów w determinowaniu danej cechy i jak duża liczba genów tę cechę określa. Jak dotąd badania zmierzające w tym kierunku prowadzone są na stosunkowo niewielką skalę. Grupy badane obejmują kilkaset do kilku tysięcy osób. Takie badania odnoszą sukces wtedy, gdy za cechę odpowiada niewielka liczba polimorficznych różnic w kilku lub najwyżej kilkudziesięciu genach. Gdy genów związanych z cechą jest kilkaset lub kilka tysięcy i każdy z nich wnosi niewielki wkład w jej tworzenie, grupa badana musi być znacznie większa.

KOLOR OCZU I WŁOSÓW

Określanie koloru oczu, włosów i skóry oraz etnicznego pochodzenia na podstawie DNA należy do mniej skomplikowanych problemów, z którymi genetyka już sobie w dużej mierze poradziła [12]. Analiza jedynie sześciu wariantów polimorficznych w sześciu genach pozwala na określenie niebieskiego lub brązowego koloru oczu, z ponad 90-procentową precyzją. Podobnie jest z kolorem włosów, do którego określenia analizuje się 24 warianty polimor-

ficzne 12 genów i poprawność przypisania wynosi od 80 do nawet 90% w przypadku rudych włosów. Podobnie jest z określaniem koloru skóry. Jednak kolory oczu inne niż niebieski lub brązowy są trudniejsze do przewidzenia, podobnie jak kolor włosów dorosłych blondynów i brunetów, którzy byli w dzieciństwie blondynami.

Niedawno odnaleziono pod parkingiem miejskim w Leicester miejsce pochówku Ryszarda III króla Anglii, który poległ na polu bitwy pod Bosworth w 1485 r. i którego śmierć zakończyła w Anglii rządy dynastii Plantagenetów, a rozpoczęła panowanie Tudorów. Króla pochowano na terenie klasztoru Franciszkanów, zburzonego kilkadziesiąt lat później, gdzie spoczywał przez 527 lat. Badania DNA potwierdziły jednoznacznie, że są to szczątki króla Ryszarda III, a uszkodzenia czaszki wskazały, iż zmarł on od rany głowy zadanej najprawdopodobniej halabardą. Badania DNA pozwoliły ponadto stwierdzić, że był on niebieskookim blondynem, a jego wygląd dobrze oddawał tylko jeden z kilku zachowanych portretów z epoki [13]. William Shakespeare w tragedii Król Ryszard III mylnie opisywał króla jako dotkniętego garbem, podczas gdy jego szkielet ukazał jednoznacznie boczną skoliozę, czyli kręgosłup zgięty w kształcie dobrze wyprofilowanego znaku zapytania. Sięgając jeszcze dalej w przeszłość, badania DNA dowiodły, że odnaleziony na terenie dzisiejszej Hiszpanii, datowany na 7 tys. lat, szkielet należał do niebieskookiego mezolitycznego Europejczyka o ciemnobrązowych włosach, jednak o ciemnej jeszcze karnacji skóry [14], na którą wskazują „stare” warianty genów *MC1R*, *TYR*, *KITLG* oraz genów *TYRP1*, *ASIP* i *IRF4*.

GENY ODPOWIEDZIALNE ZA KSZTAŁT TWARZY

Jeżeli chodzi o kształt twarzy, to bliźnięta jednojajowe są bardziej podobne do siebie od dwujajowych, a rodzeństwo bardziej od osób niespokrewnionych, wskazując na silny genetyczny komponent w determinacji morfologii twarzy. W opublikowanych w 2012 r. wynikach badań porównywano odpowiednio sparametryzowany

kształt twarzy (48 cech jej budowy) niemal 10 tys. osób, uzyskany za pomocą obrazowania metodą trójwymiarowego magnetycznego rezonansu i fotografii portretowych z wynikami asocjacji poszczególnych parametrów budowy twarzy z dużą liczbą ponad 2,5 mln wariantów sekwencji genomu [15]. Szukano niewielkich różnic polimorficznych w sekwencjach DNA, które występują częściej u ludzi z określoną cechą. Zidentyfikowano warianty polimorficzne pięciu genów: *PRDM16*, *PAX3*, *TP63*, *C5orf50* i *COL17A1*, jako związane ze zróżnicowaniem kształtu twarzy. Trzy pierwsze geny już wcześniej były wiązane z zaburzeniami rozwoju twarzoczaszki. Zidentyfikowane warianty stanowią jednak tylko wierzchołek góry lodowej, ponieważ liczbę takich miejsc w genomie określających kształt twarzy szacuje się na kilkaset lub nawet kilka tysięcy. Ich identyfikacja wydaje się być tylko kwestią czasu w dobie milionów poznawanych genomów. Tematyką tą zafascynował się również Creig Venter, który za cel postawił sobie nie tylko rekonstrukcję ludzkiej twarzy na podstawie znajomości genomu, lecz także określanie tembru ludzkiego głosu. Nawet to wydaje się być celem osiągalnym wobec znacznego postępu wiedzy o genach związanych z wokalizacją w świecie zwierząt. Ta sama grupa ok. 80 genów ulega bowiem aktywacji w odpowiadających sobie regionach mózgu ludzi i ptaków śpiewających [16]. Badania dotyczące związku genów z morfologią twarzy, prowadzone na mysich embrionach z wykorzystaniem obrazowania twarzoczaszki metodą tomografii komputerowej i analiz genetycznych, doprowadziły do identyfikacji w genomie ponad 4 tys. fragmentów sekwencji, które nie kodują białek, a pełnią funkcję wzmacniaczy *enhancerów* genów aktywnych w okresie embrionalnego rozwoju mysiej twarzoczaszki [17]. Natomiast badania kierowane przez Polkę Joannę Wysocką na Uniwersytecie Stanforda, porównujące na modelach komórkowych aktywność genów związanych z budową twarzoczaszki człowieka i szympansa, pozwoliły na identyfikację ponad tysiąca takich regulatorów genów różniących się aktywnością u obu gatunków [18]. Genetyka potrafi też wytłumaczyć różnice w budowie twarzoczaszki człowieka współczesnego i Neandertalczyka [19].

GENY ODPOWIEDZIALNE ZA WZROST CZŁOWIEKA

Wzrost człowieka jest cechą bardzo zróżnicowaną zarówno w obrębie, jak i pomiędzy populacjami. Udział czynników genetycznych w dziedziczeniu tej cechy określa się na ok. 80%. Za mieszczący się w normie uważa się, przykładowo, wzrost 150 cm do 200 cm u mężczyzn. Zróżnicowanie wzrostu w jego normalnym zakresie jest także cechą wielogenową, określaną przez niewielkie udziały każdego z wielu zaangażowanych genów. Niepełne jeszcze wyniki badań 250 tys. genomów wskazują, że ze wzrostem człowieka związanych jest ok. 700 wariantów genów w 400 regionach genomu [20]. Są to największe opisanie badania asocjacji jakiejś cechy fenotypowej z genami, łączące ze sobą i sumujące wyniki prawie osiemdziesięciu wcześniejszych badań tego typu. Te 700 wariantów tłumaczy jednak zaledwie 16% całkowitego zróżnicowania wzrostu. Wariant wywierający największy efekt wpływa na zaledwie kilkumilimetrową różnicę we wzroście. Poprzednia największa analiza doprowadziła do znalezienia 180 wariantów genów mających udział w określaniu wzrostu u ludzi. Liczba badanych osób, czyli wielkość próby badanej metodą całogenomowej analizy asocjacji wariantów genetycznych z określoną cechą (metoda znana jako GWAS) ma krytyczne znaczenie, ponieważ im jest ona większa, tym większa jest moc statystyczna przypisywania wpływu wariantu na daną cechę, w tym przypadku na wzrost. Zaburzenia w pojedynczych genach odpowiadają natomiast za skrajne zróżnicowanie wzrostu, gigantyzm i karłowatość, które są traktowane inaczej, jako przypadki medyczne. Najwyższy człowiek w zapisanej historii miał 272 cm, a najniższy 55 cm. Giganci zwykle żyją krócej i umierają z powodu niewydolności krążeniowych. Natomiast ludzie bardzo niskiej postury cechują się często długowiecznością. Przykładem może być znany w osiemnastowiecznej Europie liczący niespełna 80 cm wzrostu polski karzeł, wyróżniający się wszechstronnym wykształceniem oraz intelektem Józef Borusławski, znany szerzej jako hrabia Joseph Boruwlaski, który przeżył w dobrym zdrowiu 98 lat.

GENY DŁUGOWIECZNOŚCI

Wiek, jakiego człowiek dożywa, ma również swoje uwarunkowania genetyczne, są one jednak znacznie mniejsze niż w przypadku omawianych wyżej cech morfologicznych. Nasz prehistoryczny przodek żył, jak się sądzi, dwukrotnie krócej niż człowiek współczesny. Wpływ genów na proces normalnego starzenia się sięga 25%, lecz zwiększa się znacznie w przypadku stulatków i superstulatków, czyli osób żyjących dłużej niż 110 lat. Takie właśnie grupy osób najdłużej żyjących (stulatek pojawiał się raz na sześć tysięcy osób w badanej populacji amerykańskiej) poddawano analizie typu GWAS, aby stwierdzić, jakie warianty jakich genów pojawiają się u nich częściej niż w całej populacji. W badaniach 300 tys. wariantów genowych u prawie tysiąca stulatków z Nowej Anglii zidentyfikowano 33 geny związane ze skrajną długowiecznością [21]. Badani stulatkowie mieli natomiast taką samą częstość wariantów predysponujących do chorób wieku starczego jak populacja kontrolna. Wyciągnięto na tej podstawie wniosek, że aby dożyć stu lat, nie trzeba być wolnym od wariantów genów grożących pojawieniem się takich chorób, a wystarczy mieć inne warianty, które sprzyjają długiemu życiu. Część badaczy kwestionuje jednak znaczenie tych wyników ze względu na zbyt małą grupę badanych osób. W innej pracy [22] opisano badania przeprowadzone z użyciem zmodyfikowanej metody GWAS, w której zidentyfikowano z dużą pewnością warianty czterech genów związane z długowiecznością: *APOE/TOMM40* zasocjowany również z chorobą Alzheimera, *CDKN2B/ANRIL* związany z regulacją cyklu komórkowego, *ABO* określający grupę krwi i *SH2B3/ATXN2* związany z rzadką chorobą neurodegeneracyjną ataksją rdzeniowo-mózdkową typu 2.

PODSUMOWANIE STANU WIEDZY O GENOMIE

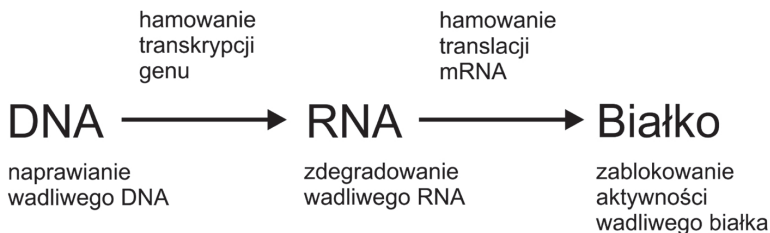
Przedstawione powyżej w dużym skrócie informacje o stanie badań nad ludzkim genomem pokazują, że wiemy o nim coraz więcej. Z drugiej jednak strony odsłaniają znacznie większe obszary naszej niewiedzy, szczególnie dotyczącej sposobu wykorzystywania przez komórkę informacji zawartej w genomie. Zbyt mało wiemy o tym, jakie są funkcje wielu genów, jak ich aktywność jest regulowana i jakie cząsteczki w tej regulacji uczestniczą. Podobna liczba genów kodujących białka u człowieka i prostszych organizmów, a znacznie większa liczba regulatorowych cząsteczek RNA świadczy o tym, że za stopień złożoności organizmu odpowiadają przede wszystkim jego mniej lub bardziej rozbudowane systemy regulujące ekspresję genomu. Żeby lepiej poznać i zrozumieć wszystkie procesy zachodzące na poziomie komórek, tkanek i całych organizmów, nie wystarcza wiedza o ich genomie. Potrzebna jest wiedza o wszystkich składnikach komórki uzyskiwana na poziomie pojedynczych komórek oraz wiedza o interakcjach pomiędzy tymi składnikami. Do zgromadzenia tej wiedzy potrzeba jeszcze wiele czasu. Zatem na pytanie, czy wiemy już wystarczająco dużo o funkcjonowaniu komórki według instrukcji zapisanej w jej genomie, aby w sposób w pełni bezpieczny w genom ingerować, odpowiedź narzuca się sama i brzmi nie.

STRATEGIE TERAPEUTYCZNE

Pełne poznanie przyczyn chorób i ich mechanizmów nie jest jednak warunkiem koniecznym dla podejmowania prób leczenia. Jest natomiast sprawą oczywistą, że im szersza jest wiedza o podłożu choroby, tym większa jest szansa na skuteczne leczenie chorego.

Kierunek przekazywania informacji genetycznej z DNA, poprzez RNA, do białka znany jest od kilkudziesięciu już lat. Dotyczy on również, w pewnym uproszczeniu, sposobu przekazywania informacji wadliwej przez zmutowane geny, z których powstają cząsteczki RNA zawierające mutację, a z nich zmutowane białka

niezdolne do pełnienia normalnych funkcji w komórce. Efekt działania zmutowanego genu można jednak próbować powstrzymać na różnych etapach przekazywania tej informacji.



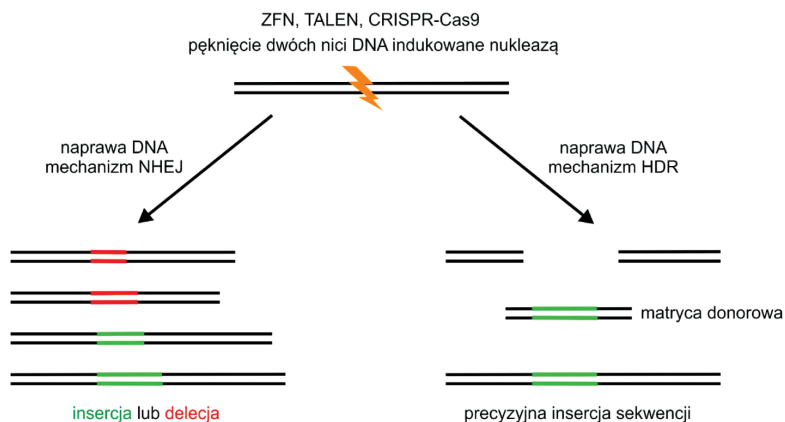
Ryc. 1. Strategie terapeutyczne wykorzystywane do hamowania ekspresji zmutowanego genu u pacjentów z chorobami genetycznymi. Efekt działania zmutowanego genu może być zatrzymywany na poziomie DNA, RNA lub białka

Można blokować toksyczne działanie końcowego produktu genu, czyli zmutowanego białka. Można obniżyć produkcję zmutowanego białka w komórce, indukując degradację RNA lub blokując jego translację. Taką strategię stosujemy w Zakładzie Biomedycyny Molekularnej w eksperymentalnej terapii dla choroby Huntingtona [23]. Można też działać bezpośrednio na wadliwy DNA, nie dopuszczając do tworzenia się zmutowanego transkryptu lub wymieniając zmutowany gen na prawidłowy. Rozwoju i zastosowań tej właśnie strategii dotyczyć będzie dalsza część tego artykułu.

MECHANIZMY NAPRAWY PĘKNIĘĆ DNA

Jak już wcześniej wspomniano, w komórkach człowieka, w wyniku zachodzących procesów metabolicznych i działania czynników zewnętrznych, dochodzi często do mutacji w DNA. Jednym z efektów mutacji są pęknięcia DNA, które w komórkach naprawiane są przez różne systemy. Najważniejsze z nich to łączenie niehomologicznych końców DNA (NHEJ) i naprawa kierowana homologią sekwencji (HDR), które funkcjonują u wszystkich

organizmów. NHEJ, który dominuje nad HDR w większości typów komórek i organizmów, używa wielu enzymów, aby bezpośrednio związać końce DNA w miejscu pęknięcia, jednak popełnia przy tym błędy. Jego zadziałanie może być wykorzystane przez badacza zajmującego się edycją genomu jako sposób na wprowadzenie do DNA mutacji, w tym niewielkich insercji lub delecji.



Ryc. 2. Mechanizmy naprawy pęknięć DNA wykorzystywane do edycji genomu wykorzystujące ścieżki łączenia niehomologicznych końców DNA (*NHEJ*) i naprawy kierowanej homologią sekwencji (*HDR*)

W HDR naturalna naprawa DNA następuje na drodze wymiany jego fragmentu zawierającego uszkodzenie na prawidłową sekwencję z chromatydy siostrzanej. Ten system naprawy działa jednak tylko w późnej fazie S i G2 cyklu komórkowego, kiedy siostrzana chromatyda jest dostępna. Badacz może użyć tzw. matrycy donorowej jako zamiennika dla siostrzanej chromatydy, a taką matrycą może być prawidłowy gen lub nawet całkiem inny gen, pod warunkiem że otoczony jest sekwencjami homologicznymi do miejsca wstawiania. Pożądany udział HDR w naprawie DNA zwiększono kilkukrotnie poprzez hamowanie aktywności NHEJ za pomocą wyciszania jego kluczowych elementów, m.in. ligazy IV DNA, lub poprzez synchronizację cyklu komórkowego.

NUKLEAZY ZF I TALE

W starszych technologiach redagowania genomów miejsca wprowadzania nienaturalnych mutacji lub wymiany fragmentów DNA indukowane były przez specjalnie przygotowywane w tym celu enzymy wywołujące pęknięcia DNA w ściśle zaplanowanych miejscach genomu. Pierwszą generację takich enzymów stanowiły meganukleazy rozpoznające długie, składające się kilkunastu par zasad sekwencje DNA, ale nie odniosły one sukcesu. Postęp nastąpił w połowie lat 90., kiedy stworzono sztuczne nukleazy wykorzystujące do rozpoznawania specyficznej sekwencji DNA motywy palców cynkowych tzw. *Zinc Finger Nucleases* (ZFN) [24]. Nukleaza ZFN ma budowę hybrydową. Obok części rozpoznającej określoną sekwencję DNA, wykorzystującej w tym celu palce cynkowe (różne sekwencje aminokwasów w takich palcach rozpoznają różne kombinacje trzech nukleotydów), posiada ona domenę FokI, czyli część niespecyficznie przecinającą DNA. Części te zespolone są peptydowym łącznikiem. Pracochłonność i bardzo wysokie koszty konstruowania ZFN oraz nie w pełni zadowalająca selektywność spowodowały, że dalej poszukiwano prostszych i tańszych systemów. Stworzono nukleazy TALE, zwane też TALENAMI [25]. Motywy peptydowe TALE, występujące u roślinnego patogena *Xanthomonas*, rozpoznają nie trójki zasad jak palce cynkowe, a pojedyncze zasady. Domena rozpoznająca zadaną sekwencję DNA zbudowana z połączonych tandemowo motywów TALE zespolona jest z domeną tnącą DNA, którą jest FokI, podobnie jak w ZFN. Sekwencje DNA kodujące nukleazy TALE i ZFN dostarczane są do komórek w odpowiednich wektorach. Edycja genomu z użyciem TALEN została uznana przez czasopismo *Nature Methods* Metodą Roku 2011, jednak nie zdążyła szerzej pokazać swoich zalet, bo na horyzoncie pojawiła się już kolejna uznana za tak rewolucyjną, jaką 30 lat temu była PCR, służąca do enzymatycznego powielania fragmentów DNA.

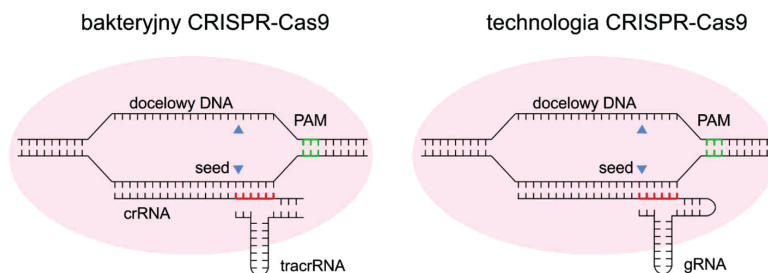
METODA EDYCJI GENOMU CRISPR-CAS9

Tę nową metodę nazwano CRISPR-Cas9 od nazwy układu nabytej oporności na obcy, wirusowy lub plazmidowy DNA występującego u niemal połowy bakterii i większości archeonów [26]. Akronim CRISPR oznacza *Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats*, co w polskim tłumaczeniu znaczy Zgrupowane, Regularnie Przerwane Krótkie Powtórzenia Palindromowe. System ten uważany jest za odległy bakteryjny analog dobrze poznanego zjawiska interferencji RNA występującego u Eukariota. Niektórzy badacze próbowali tę strukturalną nazwę zmienić na prostszą i bardziej funkcjonalną, RGN (*RNA-Guided Nucleases*), czyli nukleazy naprowadzane przez RNA – jednak bez większego powodzenia.

Sekwencje CRISPR odkryli u bakterii *E. coli* badacze japońscy w 1987 r., a w kolejnych latach wykryto je u wielu innych bakterii i archeonów. Jednak dopiero w 2007 r. dowiedziono ich roli w układzie opornościowym bakterii, pełnionej wspólnie z białkami rodziny Cas (ta nazwa pochodzi od CRISPR-associated) [26]. Jaki to był dowód? Stwierdzono, że bakterie *Streptococcus thermophilus* nabierają oporności na wirusy bakteryjne (bakteriofagi) po wbudowaniu krótkich fragmentów ich sekwencji DNA do *locus* CRISPR, pomiędzy znajdujące się tam sekwencje tandemowo powtórzone. Fragment DNA „intruza” tzw. Protospacer z sekwencją rozpoznawaną PAM – *Protospacer Adjacent Motif* zostaje wycięty przez białka Cas1 i Cas2 i wprowadzony do sekwencji liderowej CRISPR przed pierwszą sekwencją powtórzoną. W ten sposób informacja o intruzie zostaje zapisana w DNA zaatakowanej bakterii. W wyniku transkrypcji DNA CRISPR powstaje pre-crRNA, mający zapisanych w swojej sekwencji („pamięci”) wszystkich wcześniejszych intruzów. Dalej następuje dojrzewanie tego pierwotnego transkryptu (z udziałem Cas9 i RNazy III), czyli takie jego docinanie, aby każda z sekwencji „pamiętających” wcześniejszego najeźdźcę wraz z innym fragmentem częściowo do niej komplementarnym, zwanym tracrRNA, znalazła się w obrębie kompleksu z białkiem Cas9. Kompleks ten jest w stanie zniszczyć takiego intruza, jeśli zaatakuje bakterię ponownie.

ADAPTACJA SYSTEMU CRISPR-CAS9 DO EDYCJI GENOMÓW

Aby kompleksu RNA-białko rodem z bakterii (organizmów bez jądra komórkowego) użyć do edycji genomów eukariotycznych, należało go odpowiednio zaadaptować, wprowadzić do białka Cas9 sygnał lokalizacji jądrowej i zoptymalizować użycie kodonów do jego translacji w ludzkich komórkach. Połączono też dwie cząsteczki RNA w jedną i powstałą hybrydę tracrRNA i crRNA nazwano gRNA (guide RNA).



Ryc. 3. System redagowania genomu wykorzystujący białko *Cas9*. Z lewej strony przedstawione jest działanie naturalnego systemu bakteryjnego, na którego podstawie stworzona została technologia CRISPR-Cas9 przedstawiona z prawej strony. W technologii tej dwie cząsteczki crRNA oraz tracrRNA połączone zostały w jedną gRNA.

Zakodowano te zmiany w sekwencji DNA, którą umieszczono w odpowiednich wektorach, aby cały system *gRNA-Cas9* uległ ekspresji w komórkach. Dokonano tego we współpracujących ze sobą laboratoriach Emmanuelle Charpentier, pracującej wtedy na Uniwersytecie w Wiedniu oraz Umea w Szwecji, i Jennifer Doudny na Uniwersytecie w Berkeley w Kalifornii. Wśród współtwórców systemu CRISPR-Cas9 jest Polak dr Krzysztof Chyliński, ówczesny doktorant E. Charpentier. Otwierająca listę jego publikacji praca z 2011 r., opublikowana w *Nature* [27], opisuje odkrycie tracrRNA, a kolejna praca, opublikowana rok później w *Science*, opisuje uniwersalną metodę edycji genomów [28].

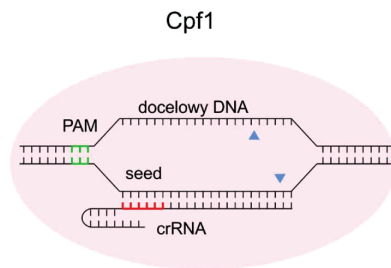
Jak taki system redagowania genomu działa? Białko Cas9 rozplata dwuniciowy DNA, a gRNA swoją sekwencją naprowadzającą poszukuje w nim sekwencji komplementarnej. Po jej odnalezieniu i rozpoznaniu sekwencji PAM (NGG) przez Cas9 białko to wiąże się do DNA i dwie domeny DNazowe Cas9 (RuvC i HNH) go przecinają. Wkraczają następnie do akcji systemu naprawy DNA NHEJ lub HDR wraz z matrycą donorową, dokonując edycji DNA. Po trzech latach od stworzenia systemu CRISPR-Cas9 pokazano na licznych przykładach, że ten bakteryjny układ funkcjonuje bardzo dobrze u wszystkich badanych organizmów.

AMERYKAŃSKA KONKURENCJA

Mający obecnie 34 lata Feng Zhang, który jako pierwszy opisał zastosowanie CRISPR-Cas9 do edycji DNA w komórkach ludzkich, usilnie dąży do wykazania swojego prymatu w tej dziedzinie. Od kilku już lat prowadzi swoje laboratorium w Broad Institute w Cambridge, Massachusetts, powiązany z dwoma najlepszymi uniwersytetami amerykańskimi – Harvardem i MIT. Badacze, którzy go dobrze znają, mówią o nim *The Midas of Methods*, bo mityczny Król Midas znany jest potocznie z tego, że czego się dotknął, zamieniało się w złoto. W październiku 2015 r. Feng Zhang opublikował pracę, w której opisał inny system redagowania genomu, wykorzystujący zamiast białka Cas9 inne białko Cpf1 z bakterii *Francisella* i *Privotella* [29]. Cpf1 jest mniejsze od Cas9, zatem jego gen można łatwiej dostarczyć do komórek lub tkanek. Tworzy ono kompleks z jednym tylko RNA i tnie DNA, zostawiając lekkie końce bardziej oddalone od miejsca rozpoznawania PAM niż w przypadku Cas9.

Ponieważ kompleks RNA z białkiem Cpf1 wymaga sekwencji PAM innej niż Cas9, pozwala to znajdować inne sekwencje docelowe, rozszerzając możliwości zastosowań tego typu metod edytowania DNA. A możliwości te są szerokie, szczególnie w powiązaniu z technologią indukowanych pluripotencjalnych

komórek macierzystych (iPSC). Komórki somatyczne izolowane od pacjenta mogą być odróżniane do komórek iPS, te poddane redagowaniu i następnie różnicowaniu. Zredagowane i zróżnicowane komórki mogą być wykorzystane jako komórkowe modele chorób do testowania potencjalnych leków i do tzw. terapii komórkowej w medycynie regeneracyjnej. W ostatnich latach opisano już liczne przykłady takich zastosowań.



Ryc. 4. System redagowania genomu wykorzystujący białko *Cpf1*

PODAWANIE, EFEKTYWNOŚĆ I SPECYFICZNOŚĆ

Chociaż uznana za przełomową, metoda CRISPR-Cas9 nie jest wolna od problemów, jakich doświadczyły wcześniej inne metody terapii celowane w DNA i RNA, czyli od trudności związanych z efektywnym dostarczaniem czynników terapeutycznych do komórek i tkanek oraz niezadowolającą selektywnością ich działania.

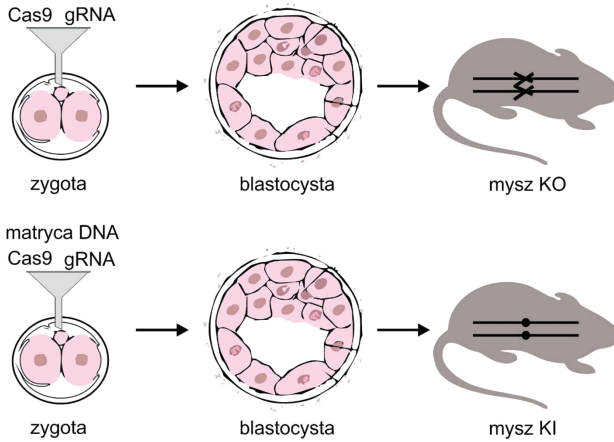
Specyficzność edycji genomu zależy w dużym stopniu od postaci, w jakiej molekularne „nożyce” są dostarczane do komórek, ponieważ postać ta określa czas ekspozycji genomu na aktywny reagent. Im ten czas jest dłuższy, tym specyficzność redagowania genomu jest niższa, ponieważ obok wybranej sekwencji celowanej również inne, nieco mniej preferowane, ulegają edycji. Z tego punktu widzenia najmniej korzystne jest dostarczanie reagentów

CRISPR-Cas9 w postaci plazmidów, gdyż wymagają one zarówno transkrypcji, jak i translacji w komórkach, na co potrzeba dłuższego czasu i procesy te nie są łatwe do kontrolowania. Podawanie do komórek mRNA jest lepszym rozwiązaniem, bo wymaga tylko zajścia jego translacji. Obecnie sądzi się, że najlepiej jest podawać komórkom na specjalnym nośniku oczyszczone kompleksy RNA i białka, które rozpoczynają działanie natychmiast po dostarczeniu i szybko ulegają degradacji, nie wywołując znacznych efektów ubocznych. Efekty takie znane jako *off-target* udało się niedawno zredukować do niewykrywalnego niemal poziomu. Dokonał tego znowu Feng Zhang ze swoją grupą [30], korzystając z rozwiązanej wcześniej struktury krystalograficznej białka Cas9. Efekt ten został osiągnięty przez zmianę zaledwie trzech kluczowych aminokwasów w domenie DNazowej białka Cas9, którego sekwencja liczy niemal 1400 aminokwasów. Autorzy tego usprawnienia uważają, że podobny efekt poprawy specyficzności można będzie uzyskać dla enzymów Cpf1, C2C1 i C2C. Obok transfekcji komórek z użyciem dedykowanych nośników, do dostarczania DNA, RNA i białka do komórek szeroko stosowana jest także nukleofekcja. W jakikolwiek jednak sposób reagenty do edycji DNA podawane są komórkom, zawsze należy precyzyjnie ocenić skutki ich działania na genom. W tym celu stosowane jest sekwencjonowanie nowej generacji lub metoda Droplet Digital PCR (ddPCR), która umożliwia wykrywanie bardzo rzadkich zmian w DNA lub RNA z wielką precyzją. Zatem zarówno w zakresie skutecznego podawania reagentów edycji DNA do komórek, efektywności ich działania na wybrane miejsce w genomie (*on-target*), jak i redukcji efektów *off-target* uzyskano znaczny postęp. Jest to jednak nadal etap badań pionierskich i jeszcze nie wiadomo, które z proponowanych rozwiązań metodycznych okaże się najskuteczniejsze, najbezpieczniejsze i utoruje drogę do kliniki.

TESTOWANIE CRISPR-CAS9 W KOMÓRKACH SOMATYCZNYCH

Metoda CRISPR-Cas9 i jej warianty funkcjonujące na podobnej zasadzie mogą być użyte do edycji genomu komórek i tkanek dotkniętych różnymi chorobami, zarówno jednogenowymi, jak i wielogenowymi, a także infekcjami wirusowymi. Metoda ta stwarza możliwość inaktywacji wadliwego genu, jego korekty lub wprowadzania nowych mutacji o właściwościach ochronnych. Chorób jednogenowych o znanym podłożu genetycznym są ponad trzy tysiące i do tej grupy należy wcześniej przedstawiona choroba Huntingtona. Dla niektórych z tych chorób podjęto już testowanie podejść terapeutycznych z wykorzystaniem mysich modeli ludzkich chorób [31]. Naprawiane były defekty w genach warunkujące przykładowo mukowiscydozę, dystrofię mięśniową Duchena i anemię sierpowatą. Potencjalne zastosowania terapeutyczne CRISPR-Cas9 dotyczą również chorób nowotworowych, chorób serca i układu krążenia oraz powszechnych chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera. Ponadto technologia CRISPR-Cas9 została już użyta do inaktywacji wirusów HIV, HPV, HSV, HBV, HCV oraz czynników, które promują ich replikację [32]. W prowadzeniu takich badań bardzo pomocne są zwierzęta transgeniczne. Z ich użyciem badana jest funkcja genów, procesy rozwoju organizmu i modelowane są choroby człowieka. Przed pojawieniem się technologii CRISPR-Cas9 tworzenie takich organizmów było zadaniem bardzo pracochłonnym.

Obecnie iniekcja mRNA Cas9 i gRNA do zygoty lub zarodka myszy, lub małpy, w jego wczesnym stadium rozwoju pozwala na stworzenie zmutowanych organizmów w jednym prostym kroku.



Ryc. 5. Schemat przedstawia tworzenie modeli zwierzęcych o zmienionym genomie z wykorzystaniem technologii CRISPR-Cas9. U góry pokazane jest tworzenie myszy typu knock-out (KO), pozbawionej obu kopii wybranego genu. U dołu pokazane jest tworzenie myszy typu knock-in (KI), do której genomu wprowadzone zostały dwie kopie obcego genu.

EDYCJA LUDZKICH EMBRYONÓW DLA CELÓW MEDYCZNYCH

Zasadność prowadzenia badań nad edycją genomu komórek somatycznych u pacjentów dotkniętych chorobami nie budzi większych kontrowersji, kiedy sama technologia jest bezpieczna, bo konsekwencje jej stosowania dotyczą tylko danego pacjenta. Zupełnie inaczej przedstawia się sprawa edycji DNA linii zarodkowych i wczesnych embrionów, ponieważ prowadzi to do trwałych zmian genetycznych w przyszłych pokoleniach. Sprawa stała się na tyle poważna, że nawet naukowcy, którzy stworzyli metodę CRISPR-Cas9, zaapelowali o wstrzymanie się z jej stosowaniem na ludzkich embrionach, a agencje rządowe USA finansujące badania naukowe postanowiły takich badań nie wspierać do czasu pełniejszego przedyskutowania ich implikacji zarówno biomedycznych, jak i etycznych z ekspertami i społeczeństwem. W kwietniu 2015 r.

ukazała się jednak publikacja badaczy chińskich [33], która opisywała edycję embrionów, co prawda wadliwych i niezdolnych do przeżycia, jednak sprawa niezastosowania się do zaleceń wywołała duże poruszenie. W związku z tym zwołano kilka międzynarodowych konferencji, podczas których eksperci w zakresie tej technologii, etycy, prawnicy i zainteresowani przedstawiciele społeczeństwa przedstawiali swoje różne stanowiska w sprawie regulacji badań nad edycją ludzkich embrionów. Przykładowo, Eric Lander, dyrektor Broad Institute w Cambridge USA, który odegrał kluczową rolę w poznawaniu sekwencji ludzkiego genomu, wyraził opinię, że edycja genomu nie musi stanowić pierwszej opcji na drodze do eliminacji choroby genetycznej z populacji, ponieważ istnieją alternatywne, prostsze sposoby. Jego zdaniem lepszym, mniej inwazyjnym rozwiązaniem jest stosowana już dość szeroko diagnostyka preimplantacyjna i selekcja komórek niezawierających wady genetycznej do zapłodnienia *in vitro*. George Church z Harvardu wskazał jednak na sytuacje, w których takie podejście nie da efektu i pozostanie opcją edycji genomu zarodka. Jest tak w przypadku osób posiadających dwie kopie wadliwego genu z mutacją dominującą, a także w przypadku potencjalnych rodziców, kiedy oboje są nosicielami dwóch kopii genu z mutacją recesywną. Takie sytuacje nie są odosobnione, a stanowią poważny problem dla znacznej części światowej populacji (Indie, Pakistan), w której małżeństwa między bliskimi krewnymi są głęboko zakorzenione w tradycji. George Church uważa ponadto, że wprowadzanie zakazu edycji genomu zarodka dla celów medycznych nie ma większego sensu, ponieważ już obecnie obowiązujące zasady dobrej praktyki medycznej nie zezwalają na stosowanie u pacjentów technologii medycznych, które nie zostały wcześniej uznane za bezpieczne w wyniku badań na zwierzętach. Jennifer Doudna uważa, że wprowadzenie obecnie całkowitego zakazu eksperymentów z edycją ludzkich embrionów mogłoby znacznie spowolnić rozwój przyszłych terapii, co wydaje się też niepraktyczne ze względu na powszechny dostęp do technologii i łatwość

jej stosowania. W wydanych po konferencji rekomendacjach przyjęto dość elastyczne, kompromisowe stanowisko. Dopuszczono prowadzenie badań naukowych nad edycją DNA w embrionach, nie zezwalając jednak na używanie zredagowanych embrionów do inicjowania ciąży.

GENETYCZNIE MODYFIKOWANI LUDZIE

Przed nauką widnieje zatem w najbliższych latach perspektywa prowadzenia bardzo ostrożnego i niezwykle odpowiedzialnego rozpoznania korzyści i zagrożeń wynikających z pojawienia się nowej technologii genetycznej. Czy jednak w przypadku powodzenia takich badań i zapalenia się zielonego światła dla uwalniania przyszłych pokoleń od ryzyka chorób genetycznych, np. choroby Huntingtona, nie przyjdzie komuś do głowy pomysł, aby przy tej okazji zapewnić potomkowi niebieski kolor oczu, włosy koloru blond czy słuszny wzrost, skoro będzie to technicznie możliwe i bezpieczne? Aktualny rekord, jeżeli chodzi o liczbę różnych zmian wprowadzanych jednocześnie do genomu z użyciem systemu CRISPR-Cas9, wynosi 62, bo tyle różnych gRNA użyto z powodzeniem po to, aby pochodzący od zwierzęcia organ nie został odrzucony przez organizm człowieka, co dobrze rokuje transplantologii [34]. Jednak takie cechy człowieka, jak inteligencja, kształt twarzy czy wzrost są cechami wielogenowymi, dla których „wzmocnienia” nawet aktualny rekord multipleksowego działania systemu CRISPR-Cas9 nie byłby wystarczający. Na takie genetyczne wzmocnianie ludzi nie ma jednak przyzwolenia, także ze strony świata nauki, chociaż sprawa przestaje już być domeną jedynie literatury *science fiction*.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Lander E.S. i inni (2001). *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 409, 860–921.
- [2] Venter J.C. i inni (2001). *The sequence of the human genome*. Science, 291, 1304–51.
- [3] Czarny J., Jasińska A., Kozłowski P., Napierała M., Sobczak K., Woźniak M. (1997). Krzyżosiak W. (red.), *Genom Człowieka – największe wyzwanie współczesnej genetyki i medycyny molekularnej*, PWN, Warszawa.
- [4] Salmena L., Poliseno L., Tay Y., Kats L., Pandolfi P.P. (2001). *A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?* Cell, 146, 353–8.
- [5] Waterston R.H. i inni (2002). *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome*. Nature, 420, 520–62.
- [6] Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium. (2005). *Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome*. Nature, 437, 69–87.
- [7] 1000 Genomes Project Consortium, Auton A., Brooks D., Durbin R.M., Garrison E.P., Kang H.M., Korbel J.O., Marchini J.L., McCarthy S., McVean G.A., Abecasis G.R. (2015). *A global reference for human genetic variation*. Nature, 526, 68–74.
- [8] Lawrence M.S., Stojanov P., Mermel H., Robinson J.T., Garraway L.A., Golub T.R., Meyerson M., Gabriel B., Lander E.S., Getz G. (2014). *Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types*. Nature, 505, 495–501.
- [9] Cyranoski D. (2015). *Exclusive: Genomics pioneer Jun Wang on his new AI venture*. Nature News doi: 10.1038/nature.2015.18091.
- [10] Lupski J.R. (2013). *Genetics. Genome mosaicism-one human, multiple genomes*. Science, 341, 358–9.
- [11] Crisp A., Boschetti C., Perry M., Tunnacliffe A., Micklem G. (2015). *Expression of multiple horizontally acquired genes is a hallmark of both vertebrate and invertebrate genomes*. Genome Biol., 16, 50.
- [12] Walsh S. i inni (2014). *Developmental validation of the HIRISplex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage*. Forensic Sci Int Genet., 9, 150–61.
- [13] King T.E. i inni (2014). *Identification of the remains of King Richard III*. Nat Commun., 5, 5631.
- [14] Olalde i inni (2014). *Derived immune and ancestral pigmentation alleles in a 7,000-year-old Mesolithic European*. Nature, 507, 225–8.
- [15] Liu F. i inni (2012). *A genome-wide association study identifies five loci influencing facial morphology in Europeans*. PLoS Genet., 8, e1002932.

- [16] Pfenning A.R. i inni (2014). *Convergent transcriptional specializations in the brains of humans and song-learning birds*. *Science*, 346, 256846.
- [17] Attanasio C. i inni (2013). *Fine tuning of craniofacial morphology by distant-acting enhancers*. *Science*; 342, 1241006.
- [18] Prescott S.L., Srinivasan R., Marchetto M.C., Grishina I., Narvaiza I., Selleri L., Gage F.H., Swigut T., Wysocka J. (2015). *Enhancer divergence and cis-regulatory evolution in the human and chimp neural crest*. *Cell*, 163, 68–83.
- [19] Lacruz R.S., Bromage T.G., O’Higgins P., Arsuaga J.L., Stringer C., Godinho R.M., Warshaw J., Martínez I., Gracia-Tellez A., de Castro J.M., Carbonell E. (2015). *Nat Commun*. 2015, 6, 8996.
- [20] Wood A.R. i inni (2014). *Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height*. *Nat Genet.*, 46, 1173–86.
- [21] Sebastiani P. i inni (2013). *Meta-analysis of genetic variants associated with human exceptional longevity*. *Aging (Albany NY)*, 5, 653–61.
- [22] Fortney K., Dobriban E., Garagnani P., Pirazzini C., Monti D., Mari D., Atzmon G., Barzilai N., Franceschi C., Owen A.B., Kim S.K. (2015). *Genome-Wide Scan Informed by Age-Related Disease Identifies Loci for Exceptional Human Longevity*. *PLoS Genet.*, 11, e1005728.
- [23] Fiszer A., Krzyzosiak W.J. (2014). *Oligonucleotide-based strategies to combat polyglutamine diseases*. *Nucleic Acids Res.*, 42, 6787–810.
- [24] Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. (1996). *Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 1156–60.
- [25] Cermak T., Starker C.G., Voytas D.F. (2015). *Efficient design and assembly of custom TALENs using the Golden Gate platform*. *Methods Mol Biol.*, 1239, 133–59.
- [26] Lander E.S. (2016). *The Heroes of CRISPR*. *Cell.*, 164, 18–28.
- [27] Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E. (2011). *CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III*. *Nature*, 471, 602–7.
- [28] Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012). *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. *Science*, 337, 816–21.
- [29] Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. (2015). *Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system*. *Cell*, 163, 759–71.
- [30] Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. (2016). *Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity*. *Science*, 351, 84–8.
- [31] Cox D.B., Platt R.J., Zhang F. (2015). *Therapeutic genome editing: prospects and challenges*. *Nat Med.*, 21, 121–31.

- [32] Kennedy E.M., Cullen B.R. (2015). *Bacterial CRISPR/Cas DNA endonucleases: A revolutionary technology that could dramatically impact viral research and treatment*. *Virology*, 479–480, 213–20.
- [33] Liang P. i inni (2015). *CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triplo-nuclear zygotes*, *Protein Cell*, 6, 363–72.
- [34] Yang L. i inni (2015). *Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs)*. *Science*, 350, 1101–4.