

# 2. Biotechnologia w ogólnym zarysie i jej historia

## 1. Co to jest biotechnologia?

Biotechnologia to świadczenie dóbr i usług z zastosowaniem metod biologicznych. Biotechnologia integruje nauki przyrodnicze i inżynieryjne w celu osiągnięcia zastosowań organizmów, komórek lub ich części oraz molekularnych analogów do pozyskania produktów i usług (definicja według Europejskiej Federacji Biotechnologii). U jej podstaw leży wiele dziedzin nauki i techniki, jednak szczególne miejsce zajmuje biologia i genetyka molekularna.

Człowiek od zarania dziejów starał się dostosowywać uprawy roślin i hodowlę zwierząt do swoich potrzeb, świadczą o tym liczne wykopaliska i dzieła sztuki. Potwierdzają to również stare zapisy, na przykład hieroglify odnalezione w piramidach faraonów czy też Biblia. Już w starożytności wykorzystywano procesy fermentacji do produkcji wina i piwa oraz pokarmu, między innymi chleba, jogurtu, octu oraz sosu sojowego. Piwo warzono przed 8000 laty w Egipcie, a 4000 lat temu w Sumerze znano co najmniej 19 gatunków piwa. Prace z zakresu modyfikacji roślin i zwierząt trwają do dziś dnia, a ich gwałtowny rozwój nastąpił w połowie XX wieku, po wykryciu struktury DNA, przyczyniając się do rozwoju biotechnologii i powstawania nowych wyzwań dla biogospodarki, do których należy zrównoważone zarządzanie zasobami naturalnymi, zrównoważona produkcja roślinna i zwierzęca, poprawa zdrowia publicznego, łagodzenie niekorzystnych skutków zmian klimatycznych oraz wykorzystanie nowych osiągnięć naukowych.

## 2. Co to jest inżynieria genetyczna?

Inżynieria genetyczna jest zestawem technik biologii molekularnej stosowanych w celu modyfikacji genomu. Za pomocą technik inżynierii genetycznej możemy dowiedzieć się, jakie substancje chemiczne powinien wytworzyć organizm, by móc funkcjonować, rosnąć i rozmnażać

się. Inżynieria genetyczna najczęściej polega na przenoszeniu genów z jednego organizmu do drugiego w celu jego ulepszenia (np. uzyskanie oporności roślin na szkodniki) za pomocą technik laboratoryjnych. Działalność taka jest określana również mianem nowoczesnej biotechnologii.

Poprzez zmiany DNA organizmu, dzięki technikom rekombinacji DNA, można spowodować wytwarzanie większej ilości podstawowego białka lub produkowania jego zmodyfikowanej formy. Znaczące jest to, że naukowcy mogą przenieść mały fragment DNA z jednego organizmu do genomu innego, łamiąc w ten sposób naturalne granice pomiędzy gatunkami. Analogicznie mogą być wprowadzone geny człowieka do bakterii lub drożdży, umożliwiając wytwarzanie ludzkich białek dla celów medycznych w kontrolowanych kulturach. Podobne techniki inżynierii genetycznej stosowane są zarówno przy rozmnażaniu zwierząt i roślin, jak i w większości dziedzin tradycyjnej biotechnologii.

### 3. Co rozumiemy pod pojęciem organizmów z celową zmianą genomowego DNA?

Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) wprowadziła pojęcie organizmów z celowo zmienionym genomowym DNA czy też z celowymi zmianami genomu (ang. *intentional genomic alterations*, IGA). Pojęcie to obejmuje organizmy, głównie zwierząt uzyskanych z zastosowaniem technologii edycji genomu i inżynierii genetycznej.

### 4. Co to jest edycja genomu?

Edycja genomu dotyczy nowych technologii, które umożliwiają precyzyjne zmiany w DNA roślin, zwierząt lub innych żywych organizmów. Technologie edycji genomu można wykorzystać do wprowadzenia, usunięcia lub zastąpienia jednego lub większej liczby określonych nukleotydów (liter w kodzie DNA) w określonym miejscu w genie organizmu. Edycję genomu można przeprowadzić przy użyciu na przykład technologii CRISPR/Cas9 (zgrupowane, regularnie rozproszone, krótkie, powtarzające się sekwencje palindromowe, ang. *Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats*), nukleaz palca cynkowego (ZFN), nukleaz efektorowych typu aktywatora transkrypcji (TALEN) i mutagenazy kierowanej oligonukleotydami (ODM).

## 5. Jaka jest różnica między edycją genomu a inżynierią genetyczną?

Edycja genomu jest znacznie bardziej precyzyjną metodą wprowadzania zmian w genomie rośliny, zwierzęcia lub innego żywego organizmu niż metody stosowane wcześniej do dokonywania takich zmian. Pozwala również na celowe dodanie, podstawienie lub usunięcie określonych nukleotydów (liter w kodzie DNA) w genomie organizmu. Inżynieria genetyczna pozwala na wprowadzenie nowego DNA (określanego jako rekombinowana konstrukcja DNA lub rDNA) do organizmu w celu zmiany genomu tego organizmu, ale z reguły bez kontroli miejsca w genomie, w którym nastąpiłoby wstawienie konstrukcji rDNA. Dzięki edycji genomu badacze i twórcy produktów mogą kierować zmiany, które chcą wprowadzić, do określonych lokalizacji.

## 6. Co to jest biotechnologia tradycyjna?

Mianem tym określa się wszystkie metody technicznego stosowania biologii z wyjątkiem najnowszych, które pojawiały się poczynając od połowy lat siedemdziesiątych XX wieku dzięki rozwojowi inżynierii genetycznej, biologii molekularnej, embriologii i hodowli tkankowych (Reiss i Straughan, 1997). Tradycyjna biotechnologia sięga zamierzonych czasów. Na przykład około 8000 lat temu w Egipcie rozpoczęto warzenie piwa, a 4000 lat później Sumerowie wytwarzali już co najmniej 19 gatunków piwa.

## 7. Jaka jest różnica pomiędzy tradycyjną a nowoczesną biotechnologią?

W „nowoczesnej” biotechnologii utożsamianej i zawężanej do inżynierii genetycznej, stosowane procedury polegają przede wszystkim na przenoszeniu lub modyfikacji (w sposób aseksualny) określonych, zdefiniowanych genów pomiędzy różnymi osobnikami, najczęściej pomiędzy różnymi gatunkami, za pomocą technik laboratoryjnych.

W „klasycznej” hodowli również ma miejsce przenoszenie genów, na przykład podczas dokonywanych krzyżówek; jednak nie wiadomo, jakie geny czy zespoły genowe zostały przeniesione. Ta „nowoczesna” biotechnologia ściśle wiąże się z „klasyczną”, a zatem taki podział jest sztuczny, wręcz niewłaściwy. Można natomiast wyróżnić inżynierię ge-

netyczną, czyli zespół metod stosowanych dla modyfikacji genomu, a zatem w celu zmian właściwości organizmu.

Coraz większa możliwość kontrolowania podstawowych procesów biologicznych przez badaczy wywołała bardzo duże zainteresowanie w ciągu ostatnich dwudziestu lat. W tradycyjnych procesach biotechnologicznych, takich jak warzelnictwo, silosowanie, produkcja nabiałów i inne, człowiek zawsze wykorzystywał i przystosowywał żywe organizmy. Rośliny uprawne i zwierzęta domowe były wybierane przez farmerów ze względu na ich podstawowe cechy – na przykład wydajność plonów, wytrzymałość, oporność na choroby. Obecny poziom zrozumienia podstaw molekularnych biologii umożliwia naukowcom znacznie precyzyjniejsze wprowadzanie nowych (lepszyc) cech do organizmów.

## 8. Co to jest mikroorganizm?

W dużym uproszczeniu to bardzo mały organizm. Do mikroorganizmów zalicza się bakterie, wirusy, drożdże, jednokomórkowe glony i pierwotniaki, na przykład amebę. Są niewidoczne gołym okiem. Opis ten nie jest w pełni zgodny z definicją biologiczną, ale odpowiada praktyce biotechnologicznej.

## 9. Czym różnią się nowoczesne biotechnologie mikroorganizmów od klasycznych biotechnologii?

Technologie opracowane w latach czterdziestych XX wieku, czyli „klasyczne biotechnologie”, były wynikiem wydzielenia ze środowiska naturalnego wcześniej nieznanymi mikroorganizmów i zastosowania w produkcji przemysłowej (na dużą skalę) nowych szczepów mikroorganizmów. Ten etap rozwoju biotechnologii, związany ze stosowaniem naturalnych mikroorganizmów, rozwinął się w logiczny sposób do etapu modyfikacji dostępnego materiału biologicznego technikami rekombinowanego DNA (rDNA). Technologia rDNA prowadzi do zmiany podstawowej informacji genetycznej żywego organizmu poprzez wprowadzenie, modyfikację lub usunięcie fragmentu(-ów) DNA, stanowiącego instrukcję genetyczną organizmu. Pierwsze zastosowania tej techniki sięgają 1973 r. Intensywny rozwój technologii dotyczył przede wszystkim mikroorganizmów w związku z relatywną prostotą ich struktury biologicznej. Obecnie w wielu procesach przemysłowych

stosuje się zmodyfikowane mikroorganizmy do otrzymywania ważnych i cennych preparatów hormonalnych i enzymatycznych (np. insulina, hormon wzrostu, amylazy, lipazy).

## 10. Jak przedstawia się historia rozwoju nowoczesnej biotechnologii?

Początek rozwoju nowoczesnej biotechnologii sięga połowy XIX wieku, niekiedy natomiast wskazuje się początek nowoczesnej biotechnologii dopiero na rok 1945. Rozwój ten trwa, a dzięki tendencjom rozwojowym poznajemy bardziej samego człowieka oraz znajdujemy sposoby na leczenie tzw. nieuleczalnych chorób. W tabeli zostały przedstawione wybrane przykłady osiągnięć biotechnologii.

Data	Odkrywca lub realizator	Opis
1	2	3
1854-1864	Ludwik Pasteur	Udowodnienie, że proces fermentacji powodują mikroorganizmy
1865	Gregor Mendel	Opublikowanie wyników doświadczeń wykazujących zasady dziedziczenia
1869	Friedrich Mischer	W spermie łososi wykryto substancję, którą nazwano kwasem nukleinowym, substancja ta została wykryta w jądrze (łac. <i>nucleus</i> )
1928	Alexander Fleming	Odkrycie pierwszego antybiotyku – penicyliny
1944	Erwin Schrödinger	Opublikowanie książki <i>Czym jest życie</i> – naukowe podważenie teorii witalizmu i próba tłumaczenia istoty życia poprzez mechanikę kwantową
1953	James Dewey Watson Francis Harry Compton Crick	Opracowanie modelu struktury DNA ( <i>helisa</i> ) i zaproponowanie mechanizmu powielania informacji genetycznej (na podstawie badań krystalograficznych wykonanych przez Rosalind Franklin i Maurice'a Wilkinsa)

1	2	3
1957	Arthur Kornberg	Odkrycie polimerazy DNA
1956	Trofim Denisowicz Łysenko	Zaniechanie w byłym ZSRR administracyjnego przyjmowania teorii autorstwa Łysenki „stadialnego rozwoju roślin”, która negowała molekularny mechanizm dziedziczenia
1957	Mahlon Bush Hoagland Paul Charles Zamecnik Mary L. Stephenson	Wydzielenie cząsteczki transferowego (t)RNA
1958	Francis Harry Compton Crick	Prezentacja podstawowego dogmatu biologii molekularnej: „DNA syntetyzuje RNA, a RNA syntetyzuje białka”
1961-1965	Marshall Warren Nirenberg Har Gobind Khorana Severo Ochoa de Albornoz	Rozszyfrowanie kodu genetycznego: trzy nukleotydy DNA tworzą kodon, który odpowiada jednemu aminokwasowi
1970	Har Gobind Khorana	Pierwsza chemiczna synteza genu
1972	Paul Berg	Połączenie DNA wirusa i DNA bakterii
1973	Stanley Norman Cohen Herbert Wayne “Herb” Boyer	Transfer genu z ropuchy do bakterii
1975	Asilomar, USA	Konferencja najwybitniejszych naukowców w celu opracowania norm regulujących prace w zakresie inżynierii genetycznej
1979	David Lane Arnold J. Levine	Odkrycie genu <i>p53</i> odgrywającego zasadniczą rolę w procesach kancerogenezy
1982	Wiele firm i autorów, w tym Adam Kraszewski	Komercjalizacja insuliny człowieka produkowanej w bakteriach ( <i>humulina</i> , <i>gensulina</i> )
1982	Firma E. Lilly oraz Genentech	Opracowanie rDNA insuliny człowieka.

1	2	3
1982	Los Alamos, USA	Założenie GenBank w Los Alamos (USA). Bank ten zbiera w formie elektronicznej wszystkie poznane sekwencje kwasów nukleinowych
1984	Alec John Jeffreys	Opracowanie technologii „DNA fingerprinting”, czyli odcisku genetycznego
1985	Boehringer Ingelheim	Opracowanie DNA interferonu alfa
1986	Plant Genetic System, Belgia	Otrzymanie transgenicznych pomidorów i tytoniu zawierających gen <i>Bt</i> odpowiedzialny za syntezę białka <i>Bt</i> odstraszającego owady
1986	USA	Opracowanie roślin (soja, kukurydza, bawełna, rzepak) transgenicznych, opornych na szkodliwe owady i na pewne herbicydy
1987	Calgene, USA	Opracowanie pomidora <i>Flavr.Savr</i> ®, który dzięki zastosowanej technologii antysensowej zachowuje dłużej jędrną skórkę (nie mięknie)
1988	Harvard University, USA	Opatentowanie, po raz pierwszy w historii ssaka, myszy z wszczepionym genem powodującym nowotwór ( <i>oncomouse</i> )
1990	USA	Rozpoczęcie projektu poznania genomu człowieka, którego celem było poznanie pełnej sekwencji nukleotydowej genomu człowieka (HGP)
1990	Wspólnota Europejska	Uchwalenie Dyrektyw Rady 90/219/EWG i 90/220/EWG z 23 kwietnia 1990 r. regulujących zasady zamkniętego użycia i wprowadzania GMO do środowiska

1	2	3
1990	Genetech, Calgene, USA	Próby polowe z transgenicznymi pomidorami <i>FlavrSavr</i> <sup>®</sup> o przedłużonym okresie składowania
1990	Wspólnota Europejska	Pierwsze europejskie patenty na rośliny transgeniczne (ziemniak i tytoń odporne na herbicydy)
1991	UNEP (Program Środowiskowy Organizacji Narodów Zjednoczonych)	Uchwalenie <i>Konwencji o różnorodności biologicznej</i> w Rio de Janeiro w ramach tzw. „Szczytu Ziemi”
1994	Genetech, Calgene, USA	Pierwsza na świecie komercjalizacja roślin transgenicznych pomidorów <i>FlavrSavr</i> <sup>®</sup>
1995	William French Anderson	Pierwsza skuteczna terapia genowa (w tym samym roku National Institutes of Health opublikowały raport podważający efektywność i celowość terapii genowej)
1997	Ian Wilmut	W szkockim Roslin Institute dokonano klonowania owcy (owieczka Dolly) z komórki somatycznej
1998	Uniwersytet na Hawajach, USA	Klonowanie transgenicznych myszy
1999		Łączny areal uprawny na świecie roślin transgenicznych wynosi blisko 40 mln ha
1999	Program HGP ( <i>Human Genome Project</i> ), USA	Poznanie pełnej sekwencji chromosomu nr 22; jest to najmniejszy chromosom człowieka, ale zawiera 33 miliony nukleotydów (z 3 miliardów genomu człowieka)
1999	Harry F. Noller i inni	Ustalenie struktury bakteryjnego rybosomu za pomocą technik krystalograficznych



1	2	3
24.05.2000	UNEP (Program Środowiskowy Organizacji Narodów Zjednoczonych)	Podpisanie w Montrealu „Protokołu biobezpieczeństwa” ( <i>Biosafety Protocol</i> ), czyli pierwszego międzynarodowego, o globalnym znaczeniu, traktatu dotyczącego inżynierii genetycznej („Protokół biobezpieczeństwa” jest aktem wykonawczym konwencji z Rio de Janeiro, 1991)
2000		Odczytanie genomu <i>Arabidopsis</i> (rzodkiewnik)
15.02.2001	Celera i HGP	Prezentacja pełnej sekwencji genomu człowieka
12.03.2001	Unia Europejska	Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2001/18/WE z 12 marca 2001 r. zastępująca dyrektywę nr 90/220/EWG z 1990 r. w sprawie uwolnienia do środowiska genetycznie zmodyfikowanych organizmów
10.07.2001	Polska	Podpisanie przez prezydenta Ustawy z dnia 22 czerwca 2001 r. o organizmach genetycznie zmodyfikowanych
2001	Unia Europejska i Ameryka Północna	Liczne kontrowersje w zakresie możliwości i ewentualnej realizacji klonowania człowieka oraz komórek macierzystych w celu produkcji cennych leków do zwalczania takich chorób jak Alzheimera i Parkinsona
2001	Agencja ds. Żywności i Leków, FDA, USA	Zatwierdzenie pierwszego leku dla pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową Gleevec® (imatinib)
2002	Advanced Cell Technology	Sklonowanie pierwszego bantenga, gatunku zagrożonego wyginięciem
2003	Shenzhen SiBiono GenTech, Chiny	Zatwierdzenie pierwszego produktu do terapii genowej Gendicine, który dostarcza gen <i>p53</i> do terapii raka płaskonabłonkowego głowy i szyi

1	2	3
2003	Tajwan	Komercjalizacja pierwszych genetycznie modyfikowanych zwierząt domowych TK-1 (GloFish)
2004	Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa	Wskazanie, że uprawy biotechnologiczne uzupełniają tradycyjne metody rolnictwa, pomagając ubogim rolnikom i konsumentom w krajach rozwijających się
2006	European Medicines Agency	Zatwierdzenie pierwszego leku ATryn uzyskanego w mleku transgenicznych kóz. W USA lek zatwierdzono dopiero w 2009 r.
2007	University of Wisconsin, Madison, USA	Reprogramowanie/przekształcenie komórek skóry człowieka w zarodkowe komórki macierzyste
2008	Japonia	Pierwsza cząsteczka DNA uzyskana prawie w całości ze sztucznych fragmentów
2008		Sekwencjonowanie indywidualnego genomu człowieka
2009		Łączny areał uprawny na świecie roślin transgenicznych wynosi blisko 134 mln ha
2010	Craig Venter	Uzyskanie syntetycznego genomu
2010	Michael Riehle, University of Arizona, USA	Naukowcy stworzyli odporne na malarię komary
2010	Konferencja Stron Konwencji o różnorodności biologicznej (CBD COP10)	Przyjęcie Protokołu z Nagoi do Konwencji o różnorodności biologicznej dotyczącej dostępu do zasobów genetycznych oraz uczciwego i sprawiedliwego podziału korzyści wynikających z ich wykorzystania
2011		Drukowanie przestrzenne – druk 3D tkanki

1	2	3
2012	Vitor Pinheiro Philipp Holliger	Utworzenie polimeru XNA jako alternatywy do kwasów nukleinowych (DNA i RNA)
2012	University of Washington, USA	Sekwencjonowanie DNA płodu z wolnych krążących komórek we krwi matki
2013	Emmanuelle Charpentier Jennifer Doudna Feng Zhang	Nowa, szybka i precyzyjna metoda edycji fragmentów kodu genetycznego – system CRISPR wykorzystujący strategię obronną bakterii
2013	The Foundation for AIDS Research	Wyleczenie pierwszego dziecka urodzonego z HIV
2014	Cleveland Clinic, USA	Narodziny pierwszego dziecka po przeszczepieniu macicy
2014	Jef Boeke	Zrekonstruowanie przez międzynarodowy zespół naukowców syntetycznego i w pełni funkcjonalnego chromosomu drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2014		Wskazanie, że epidemia Ebola była związana z pojedynczym kontaktem zwierzęcia z człowiekiem
2015		Odkrycie nowego antybiotyku tejsobaktyny
2015	US National Institutes of Health	Mapa epigenomu człowieka
2015		Odtworzenie strun głosowych człowieka z komórek
2016	Chiny	Zastosowanie technologii CRISPR do leczenia ludzi
2017		Zmodyfikowane genetycznie limfocyty T (CAR-T cells), z chimerowym receptorem antygenowym, rozpoznające i niszczące komórki nowotworowe

1	2	3
2017	Duke University, USA	Uzyskanie komórek mięśni z pluripotentnych komórek macierzystych
2017	Rice University, USA	Wykorzystanie wirusów związanych z adenowirusami do dostarczania leków nanopeptydowych do komórki
2018	Trybunał Sprawiedliwości Unii Europejskiej (TSUE)	Rośliny uzyskane za pomocą precyzyjnych technik hodowlanych, takich jak CRISPR, są organizmami zmodyfikowanymi genetycznie (GMO)
2019	Tel Aviv University, Izrael	Wydrukowanie bijącego serca z zastosowaniem komórek w technologii 3D
2019	Eric Lander Françoise Baylis Feng Zhang Emmanuelle Charpentier Paul Berg i inni	Wezwanie do wprowadzenia przepisów kontrolujących edycję genomu w odniesieniu do linii zarodkowych człowieka

## 11. Czy biotechnologia jest skomercjalizowana?

Tak. Biotechnologia znajduje dziś zastosowanie na skalę przemysłową w takich dziedzinach jak: rolnictwo, medycyna, przemysł chemiczny, produkcja żywności, przemysł farmaceutyczny, ochrona środowiska. W niektórych krajach Ameryki Północnej i Południowej produkuje się rośliny genetycznie zmodyfikowane na skalę przemysłową. Dominują Stany Zjednoczone, Brazylia, Argentyna, Kanada i Indie, które obejmują razem 91% upraw. Również w Europie Środkowej i Wschodniej w 1999 r. po raz pierwszy skomercjalizowano uprawy biotechnologicznie ulepszonych ziemniaków, soi i kukurydzy. W medycynie zdobyte biotechnologii wykorzystuje się do opracowywania diagnostyki chorób genetycznie uwarunkowanych, do leczenia nowotworów, produkcji leków i do poprawy jakości życia za pomocą terapii komórkowych.

Platforma Grand View Research, Inc.<sup>1</sup> wskazała w 2020 r. kilka istotnych kierunków rozwoju komercyjnego zastosowań biotechnolo-

<sup>1</sup> <https://www.grandviewresearch.com/>

gicznych. Raporty mówią o rozwoju rynku specjalistycznych enzymów w służbie zdrowia (węglowodany, proteazy), w odniesieniu do chorób metabolicznych. Wzrosło zainteresowanie wykorzystaniem hydrożeli i rusztowań opartych na nanowłóknach na potrzebach medycyny regeneracyjnej i transplantacyjnej. Rozwija się sekwencjonowanie DNA w onkologii, typowaniu HLA czy w badaniach klinicznych, w tym również sekwencjonowanie nowej generacji. Wzrasta zapotrzebowanie na enzymy, odczynniki i zestawy biologii molekularnej, w tym także na potrzeby oceny mechanizmów programowanej śmierci komórek do diagnostyki chorób przewlekłych. Następuje silny rozwój technologii rekombinacji i proteomiki z wykorzystaniem elektroporacji i wektorów adenowirusowych. Zwraca się uwagę na wzrost liczby zawieranych kontraktów biologicznych, szczególnie w onkologii i zaburzeniach immunologicznych. Nie należy zapominać o rynku usług w zakresie badań bioanalitycznych dużych cząsteczek dla potrzeb badań przedklinicznych i klinicznych.

W związku z wykorzystaniem organoidów i sferoidów jako modeli wnikania wirusa SARS-CoV-2 do komórek, wyceniono wzrost tej części rynku nawet o 22,5% rocznie w latach 2020-2027, przy wycenie 405,3 mln USD w 2019 r. Z biotechnologią wiąże się globalny rynek chromatografii preparatywnej i procesowej; przewiduje się wzrost sektora obejmującego testy i badania przesiewowe w hemoglobinopatiach.

Mówiąc o nowych technikach, nie można zapominać o rynku opartym na technologii CRISPR/Cas9. W badaniach *in vitro* i badaniach klinicznych będzie wzrastał udział badań z wykorzystaniem genów reporterowych (lucyferaza, beta-galaktozydaza) na potrzeby wysokoprępowych badań przesiewowych. Rozwija się również rynek oferujący narzędzia dla szeroko pojętych nauk przyrodniczych, w tym biologii komórkowej, genomiki, cytometrii przepływowej, technologii separacji. Nie można zapomnieć również o obrazowaniu danych biologicznych przez sekwencjonowanie, MRI, mikroskopię, analizę biomarkerów, wolnych krążących komórek nowotworowych, terapię genową, analizy stabilności białka i pojedynczych komórek oraz terapię komórkową. Wskazane jest także znaczenie personalizowanego odżywiania, wykorzystanie wektorów wirusowych i produkcji plazmidowego DNA, a także wielkość rynku komórek macierzystych. Coraz silniej rozwija się usługa badań toksykologicznych *in vitro* oraz izolacji i oczyszczania kwasu nukleinowego czy wielkość rynku kultury komórkowej 3D. Część białkowa obejmuje oczyszczanie i izolację białek, rynek przeciwciał monoklonalnych i poliklonalnych.

Przewidywany jest również wzrost biotechnologii rolniczej opartej na wykorzystaniu szczepionek, hodowli kwiatów, biopaliw czy uzyskiwaniu genetycznie modyfikowanych roślin, zwierząt i drobnoustrojów. Narzędzi biotechnologicznych używa się w hodowlach tkankowych i mikrorozmnażaniu, selekcji wspomaganej markerami lub hodowlą molekularną, uprawach zmodyfikowanych genetycznie i inżynierii genetycznej, technologiach diagnostyki molekularnej i konwencjonalnej hodowli roślin. Przyjmuje się, że rozwój szczepionek będzie najbardziej perspektywnym sektorem biotechnologii rolniczej.

Polski rynek biotechnologiczny dopiero zaczyna się rozwijać. Konieczne jest inne spojrzenie na biotechnologię z punktu widzenia biznesu, a nie nauki. Przez pandemię sektor zdrowia stał się dla inwestorów na całym świecie znacznie ważniejszy, przy czym przyjmuje się, że polskie firmy mają realną szansę na współpracę z dużymi firmami farmaceutycznymi ze względu na swój olbrzymi potencjał i innowacyjne rozwiązania prowadzące często do produktów przewyższających produkty światowych gigantów (Andrzejewska-Górecka i in., 2020).

## 12. Czy można zarobić na biotechnologii?

Tak. Wśród najprężniej rozwijających się firm biotechnologicznych, głównie w Stanach Zjednoczonych, wyróżnić należy firmę Merck, która rozwinęła szczepionkę przeciw wirusowi Ebola. Firma Sage Therapeutics opracowała metodę leczenia depresji poporodowej. Lek Trikafta firmy Vertex Pharmaceuticals poprawia oddychanie pacjentów z mukowiscydozą, a przenośne elektroniczne urządzenie stymulujące firmy Theranica Bioelectronics Nerivio leczy ból migrenowy. Firma Gelesis opracowała hydrożelową kapsułkę, która stymuluje uczucie sytości do kontrolowania utraty wagi, firma Avita Medical – spray na komórki skóry zmniejszający zapotrzebowanie na przeszczepy przez ofiary oparzeń o 35%. Firma Syqe Inhaler zaprojektowała pierwsze programowalne urządzenie do inhalacji umożliwiające kontrolowane dostarczanie leków, na przykład z konopi. Firma Intermountain Healthcare zainicjowała największe badania genomiki pojedynczej populacji. Firma Pivot Bio wprowadziła na rynek pierwszy produkt mikrobiologiczny wytwarzający azot do odżywiania kukurydzy. Firma AbCellera skupia się na odkrywaniu przeciwciał terapeutycznych, wykorzystując naturalny układ odpornościowy organizmu do potencjalnej walki z rakiem, zapaleniem

stawów, bólem i innymi chorobami; podejmuje także działania zapobiegające epidemii koronawirusa.

Wśród 20 najlepiej rozwijających się firm biotechnologicznych w Europie wymienić należy firmę AC Immune z Lozanny (Szwajcaria), która opracowuje metody leczenia chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimerera. Londyńska firma Adaptate Biotherapeutics zajmuje się rozwijaniem terapii przeciwciałami, opartymi na kontroli aktywności cytotoksycznych limfocytów T gamma delta. Firma Adaptimmune z Abingdon (Wielka Brytania) zajmuje się opracowywaniem terapii limfocytami T w leczeniu raka. Firma Avantium z Amsterdamu (Holandia, spółka wydzielona z Shell) opracowuje odnawialne biotworzywa pochodzenia roślinnego, które stanowią alternatywę dla źródeł petrochemicznych. Firma BioNTech z Moguncji (Niemcy) zajmuje się terapiami immunoonkologicznymi z wykorzystaniem różnych technologii. Firma Carbios z St-Beauzire (Francja) opracowuje technologię enzymatyczną, która umożliwi pełną degradację i recykling tworzyw sztucznych. Firma Celyad z Mont-Saint-Guibert (Belgia) zajmuje się opracowaniem nowej generacji terapii komórkami CAR-T, którą można uzyskać od dawców, a nie wytwarzać indywidualnie dla każdego pacjenta. Firma CRISPR Therapeutics z Zug (Szwajcaria) opracowuje metody leczenia opartego na edycji genów CRISPR/Cas9. Firma F2G z Manchesteru (Wielka Brytania) przygotowuje leki przeciwgrzybicze nowej generacji. Firma Follicum z Lund (Szwecja) opracowuje leki peptydowe do leczenia wypadania włosów i cukrzycy. Firma Genfit z Loos (Francja) opracowuje metody leczenia chorób metabolicznych i chorób wątroby. Firma GenSight Biologics z Paryża (Francja) zajmuje się terapiami genowymi do leczenia genetycznych form ślepoty. Firma Hookipa Biotech z Wiednia (Austria) opracowuje immunoterapie chorób zakaźnych i raka. Kolejna firma – MaaT Pharma z Lyonu (Francja) opracowuje terapie z żywych bakterii, które mają na celu poprawę wyników leczenia raka poprzez zapobieganie niszczeniu mikrobiomu jelitowego. Firma Meatable z Delft (Holandia) zajmuje się zwiększaniem skali produkcji mięsa hodowanego w laboratorium. Firma Orphazyme z Kopenhagi (Dania) opracowuje terapie chorób rzadkich, które upośledzają prawidłowe składanie białek. Firma Oryzon Genomics z Barcelony (Hiszpania) przygotowuje leki epigenetyczne do leczenia raka i chorób neurodegeneracyjnych. Firma Promethera z Mont-Saint-Guibert (Belgia) zajmuje się terapiami komórkowymi opartymi na komórkach wątroby człowie-

ka. Firma Targedys z Paryża (Francja) przygotowuje terapie modulujące apetyt przez oddziaływanie na mikrobiom jelitowy. Z kolei firma Ynsect, również z Paryża, zajmuje się opracowaniem produkcji żywności i paszy z owadów.

W Polsce można wyróżnić z kolei 10 firm biotechnologicznych, głównie farmaceutycznych, cieszących się uznaniem międzynarodowym. Firma Selvita z Krakowa zajmuje się odkrywaniem leków, głównie przeciwnowotworowych, opracowuje terapię w ostrej białaczce szpikowej. Firma Mabion z Konstantynowa Łódzkiego opracowuje leki na bazie przeciwciał, między innymi lek biopodobny do rytuksymabu firmy Roche, przeciwciała stosowanego w leczeniu raka krwi i zapalenia stawów. Zarówno Selvita, jak i Mabion zaangażowały się w produkcję szczepionki przeciwko SARS-CoV-2. Firma Pure Biologics z Wrocławia opracowuje leki na bazie przeciwciał, a także aptamery DNA – cząsteczki DNA, które podobnie jak przeciwciała wiążą się z określonym celem. Najbardziej zaawansowanym programem firmy jest opracowanie aptameru przeznaczonego do leczenia choroby Devica, choroby autoimmunologicznej powodującej epizody utraty wzroku i paraliżu. Firma OncoArendi Therapeutics z Warszawy opracowuje leki drobnocząsteczkowe oparte na inhibitorach chitynaz i arginaz przeznaczone do leczenia astmy, innych chorób płuc czy nowotworów. Firma Proteon Pharmaceuticals z Łodzi produkuje dodatki paszowe oparte na bakteriofagach, które mogą zapobiegać i eliminować infekcje bakteryjne u zwierząt gospodarskich. Firma Captor Therapeutics z Wrocławia opracowuje leki, które prowadzą do rozpadu białek wywołujących choroby, koncentrując się na nowotworach i chorobach autoimmunologicznych. Firma Celon Pharma z Kielcina koło Łomianek rozwija leki biologiczne, w szczególności leki biopodobne. Firma Bowil Biotech z Władysławowa wykorzystuje fermentację bakteryjną do produkcji na skalę przemysłową biocelulozy służącej do przygotowywania opatrunków na rany i masek na twarz. Firma Bioavlee z Wrocławia wprowadza metodę szybkiej identyfikacji mikroorganizmów bez konieczności sekwencjonowania ich DNA, a firma NanoVelos z Warszawy opracowuje nanocząsteczki do dostarczania leków przeciwnowotworowych.



### 13. Czym jest odporność, a czym oporność?

Terminy odporność i oporność są bardzo często używane w biotechnologii i bardzo często mylone. Już przed wojną szkoła lwowskich biochemików sugerowała, że odporność to zestaw wszystkich mechanizmów biorących udział w wytworzeniu odpowiedzi odpornościowej. W znaczeniu bardziej ogólnym oznacza to zdolność do czynnej i biernej ochrony organizmu przed patogenami. Badaniem odporności zajmuje się immunologia. Wytwarzanie i wzmacnianie odporności uzyskuje się sztucznie, stosując szczepienia profilaktyczne lub surowice odpornościowe. By organizm mógł zachowywać odporność, należy co pewien czas powtórzyć wymienione zabiegi medyczne.

Oporność to niepoddawanie się działaniu czynników zewnętrznych. Oporność wykazują na przykład szczepy bakterii na antybiotyki. Jest to niebezpieczne, gdyż to właśnie antybiotyki powinny zwalczać bakterie. Jednak bakterie są w stanie wytworzyć takie mechanizmy obronne, które sprawiają, że antybiotyki przestają być skuteczne. Można tutaj mówić o oporności pierwotnej i nabytej. Oporność pierwotna na antybiotyki jest cechą naturalną bakterii, niektóre z nich są po prostu odporne na niektóre antybiotyki. Natomiast oporność nabyta pojawia się w chwili, kiedy bakteria w wyniku spontanicznej mutacji lub kontaktu z innymi bakteriami wytwarza oporność na antybiotyk, który jeszcze do niedawna był skuteczny w walce z nią.

Oporność mikrobiologiczna polega na tym, że niektóre szczepy bakterii mogą przeżyć większe stężenie antybiotyku niż takie same lub pokrewne mikroorganizmy.

Oporność farmakologiczna charakteryzuje się tym, że szczepy bakterii mogą przeżyć większe dawki antybiotyku niż standardowo stosowane w procesie leczenia.

Oporność kliniczna to oporność na antybiotyk przy jednoczesnym braku występowania innych rodzajów oporności. Może zależeć od osobniczej wrażliwości na lekarstwo lub być powiązana z innymi zażywanyymi lekami.

### 14. Czy nowoczesna biotechnologia jest bezpieczna dla zdrowia ludzi?

Biotechnologia jest w tym samym stopniu zarówno bezpieczna, jak i niebezpieczna, co każda technologia. O „współczynniku bezpieczeń-

stwa” nie decydują stosowane technologie, lecz cel, w którym są użytkowane. Dlatego tak sformułowane pytanie jest błędne.

## 15. Jaki wpływ ma nowoczesna biotechnologia na ochronę środowiska?

Dzięki zastosowaniu metod biologicznych następuje oczyszczanie środowiska, czyli tzw. bioremediacja. Mikroorganizmy są wykorzystywane w oczyszczalniach ścieków, gdzie usuwają najczęściej występujące zanieczyszczenia przed odprowadzeniem ścieków komunalnych i przemysłowych do rzek i jezior. Dzięki mikroorganizmom zostały ulepszone biofiltry służące do oczyszczania powietrza, wody i gazu. Do oczyszczania gleby stosuje się metody wykorzystujące zmodyfikowane bakterie zdolne do rozkładu wielu zanieczyszczeń, na przykład ropy naftowej, detergentów, herbicydów itp. Ponadto biotechnologia ma duży wpływ na tworzenie nowoczesnych technologii w przemyśle, na przykład skórzanym, chemicznym przez stosowanie metod enzymatycznych zamiast chemicznych.

## 16. Jakie są kierunki prac biotechnologicznych?

Wyróżniamy następujące, podstawowe kierunki prac biotechnologicznych w zakresie:

- zdrowia – terapie lecznicze w chorobach genetycznych lub neurodegeneracyjnych, terapie związane ze starzeniem społeczeństwa, terapie regeneracyjne, wytwarzanie produktów i usług opartych na zaawansowanych technikach analizy danych na potrzeby ochrony zdrowia (sztuczna inteligencja *Artificial Intelligence*, AI i uczenie maszynowe *Machine Learning*, ML)
- żywienia – wykorzystanie biotechnologii rolniczej w produkcji żywności i innych procesach rolniczych
- przemysłu – wytwarzanie produktów użytecznych takich jak surowce, materiały i chemikalia
- ochrony środowiska – wykorzystanie enzymów, mikroorganizmów i hodowli komórkowych do przetwarzania odpadów, biomasy; wykorzystanie i doskonalenie technik biotechnologii stosowanych do oczyszczania ścieków, gazów, unieszkodliwiania odpadów, uzdatniania wody, remediacji gruntów z zanieczyszczeń

- energetyki – wytwarzanie produktów użytecznych, na przykład energii społecznych aspektów biotechnologii – kapitał ludzki, miejsca pracy, rozwój biotechnologii.

Współczesna nauka, a konkretnie określone dziedziny biotechnologii stwarzają szansę zasadniczej poprawy zdrowotnego i ekonomicznego bytu dla wielu milionów ludzi. Postęp badań naukowych, a przede wszystkim realizacja prac wdrożeniowych wymagają akceptacji społeczeństwa. Ponieważ wiele kwestii praktycznych zastosowań inżynierii genetycznej dotyczy naszego codziennego życia, konieczne jest, aby społeczeństwo rozumiało stosowane technologie, dlatego też niezbędną jest ciągła edukacja (Andrzejewska-Górecka i in., 2020).

### **17. W jakim stopniu Komisja Europejska uczestniczy w pracach w zakresie biotechnologii?**

Biotechnologia i nauki przyrodnicze przyczyniają się do modernizacji przemysłu europejskiego. Znajdują zastosowanie w różnych sektorach przemysłu, takich jak: opieka zdrowotna i farmacja, zdrowie zwierząt, tekstylia, chemikalia, tworzywa sztuczne, papier, paliwa, żywność i przetwórstwo pasz. Wykorzystanie biotechnologii pomaga w rozwoju gospodarki UE i zapewnia nowe miejsca pracy, wspierając jednocześnie zrównoważony rozwój, zdrowie publiczne i ochronę środowiska. W zastosowaniach medycznych i farmaceutycznych biotechnologia doprowadziła do odkrycia i rozwoju zaawansowanych leków, terapii, diagnostyki i szczepionek. Na przykład dzięki przełomom biotechnologicznym powstały nowe leki dla pacjentów cierpiących na zaburzenia wzrostu, choroby metaboliczne, stwardnienie rozsiane (SM), reumatoidalne zapalenie stawów, raka i chorobę Alzheimera.

W rolnictwie, hodowli zwierząt, produktach weterynaryjnych i akwakulturze biotechnologia ulepszyła paszę dla zwierząt, przyczyniła się do wyprodukowania szczepionki dla zwierząt gospodarskich i poprawiła diagnostykę wykrywania chorób takich jak gąbczasta encefalopatia bydła (BSE), pryszczycza i salmonelloza. Umożliwiła również zastosowanie enzymów do wydajniejszego przetwarzania żywności i usprawniła hodowlę roślin w celu uzyskania pożądanych cech.

W procesach przemysłowych i produkcji biotechnologia doprowadziła do wykorzystania enzymów w produkcji detergentów, masy celulo-

zowej i papieru, tekstyliów i biomasy. Dzięki zastosowaniu fermentacji i biokatalizy enzymatycznej zamiast tradycyjnej syntezy chemicznej można uzyskać wyższą wydajność procesu przy mniejszym zużyciu energii i wody. Prowadzi to do zmniejszenia ilości toksycznych odpadów.

Komisja Europejska wdrożyła strategię i plan działania na rzecz rozwoju nauk o życiu i produktów opartych na biotechnologii w latach 2002–2010. Zostały ustalone priorytety w zakresie lepszego dostępu do finansowania i transferu technologii w dziedzinie biotechnologii w latach 2007–2010. Nauki o życiu i biotechnologia stały się częścią strategii „Europa 2020” i programu „Unia innowacji”. Obecnie bardzo duże fundusze przeznaczone są na finansowanie projektów w ramach Programu ramowego UE w zakresie badań naukowych i innowacji „Horizont 2020”, a budżet przeznaczony do potrzeb przeciwdziałania epidemii COVID-19 jest zwiększany.

## **18. Czy Polska posiada potencjał rozwoju biotechnologii na poziomie światowym?**

Według ostatniego opracowania Polskiego Instytutu Ekonomicznego *Biotechnologiczny skok w przyszłość czy dryf? Polska potrzebuje strategii rozwoju biotechnologii* (Andrzejewska-Górecka i in., 2020) biotechnologia jest bardzo silnie rozwijającym się sektorem gospodarki na potrzeby rozwoju w medycynie, przemyśle i rolnictwie, oferując skuteczniejsze produkty lecznicze lub leki i terapie, bardziej zrównoważoną gospodarkę zasobami, przeciwdziałanie zmianom klimatycznym i konsekwencjom klęsk naturalnych. Niestety, nakłady na badania i rozwój w biotechnologii, prywatne i państwowe, są istotnie niższe niż w innych państwach OECD. Polska nie opracowała również własnej strategii rozwoju biotechnologii. Autorzy publikacji sugerują projektowanie nowatorskich produktów i usług uzupełniających dostępny asortyment na rynkach medycznym, przemysłowym i rolniczym lub stworzenie zupełnie nowego obszaru. Na uwagę zasługuje możliwość wykorzystania dostępnego kapitału ludzkiego w rozwoju nowych produktów i usług w zakresie bioinformatyki i biostatystyki.

## **19. Jakie osiągnięcia mają polscy biotechnolodzy?**

Biotechnologia uważana jest za jeden z najbardziej innowacyjnych sektorów gospodarki na świecie, który osiągnie wartość 727,1 mld dolarów

do 2025 r., według raportu Grand View Research. Również w Polsce obserwuje się dość intensywny wzrost liczby przedsiębiorstw prowadzących działalność w dziedzinie biotechnologii. W 2011 r. było 91 firm, a w 2016 r. ich liczba wzrosła dwukrotnie i wyniosła 184. Nakłady wewnętrzne poniesione w 2016 r. przez przedsiębiorstwa na działalność biotechnologiczną osiągnęły 761,1 mln zł. Najwięcej firm biotechnologicznych było zlokalizowanych w województwie mazowieckim (ok. 21,1%), następnie w dolnośląskim (ok. 13,6%) oraz w wielkopolskim (ok. 13%), po jednej firmie w województwie podlaskim i zachodniopomorskim, natomiast w województwie świętokrzyskim nie działała żadna firma biotechnologiczna. Ten stan rzeczy ściśle wiąże się z liczbą jednostek naukowych, a także szkół wyższych zlokalizowanych w każdym województwie. Zdaniem badaczy głównym kierunkiem rozwoju biotechnologii jest obecnie opracowanie nowych metod terapeutycznych lub diagnostycznych w chorobach związanych z układem nerwowym, chorobach nowotworowych, a także chorobach cywilizacyjnych. Najistotniejszym utrudnieniem dla rozwoju branży jest ograniczony dostęp do środków finansowych. Warunki do prowadzenia działalności gospodarczej ocenia się jako umiarkowane i dobre z możliwością poprawy w kolejnych latach.

## **20. Jakie mamy osiągnięcia w zakresie biotechnologii mikroorganizmów i biotechnologii przemysłowej?**

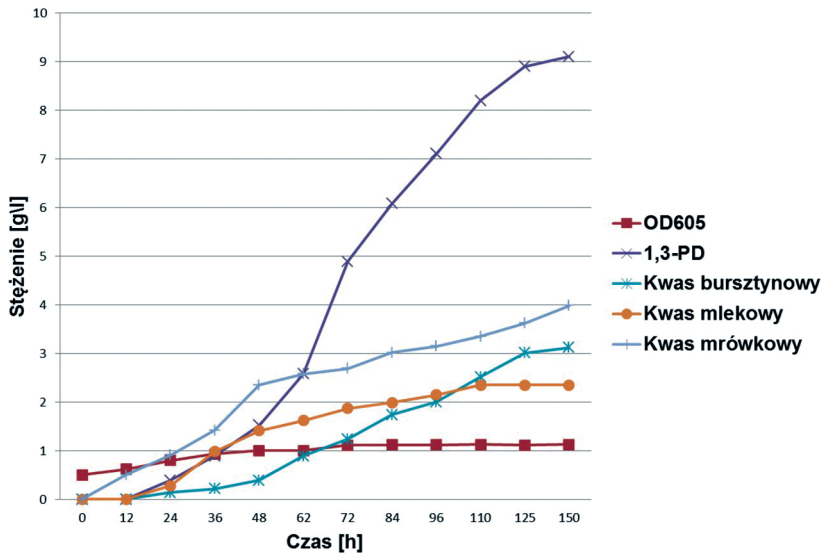
Produkcję insuliny przez bakterie prowadzi firma Bioton w Macierzyszu pod Warszawą – jeden z najnowocześniejszych zakładów biotechnologicznych na świecie. To w niej powstaje insulina – zarówno substancja czynna, jak i gotowe formy leku. Bioton produkuje insulinę wysokiej jakości na skalę komercyjną, zapewniając pacjentom bezpieczne i skuteczne leczenie cukrzycy. Posiada dwa zakłady produkcyjne: Zakład Produkcyjny zajmujący się produkcją form gotowych oraz Zakład Biotechnologii – wytwarzający substancję aktywną.

Możliwości produkcyjne to 1500 kg substancji aktywnej, 95 mln wkładów, 10 mln fiolek. Podstawowym celem strategicznym i priorytetem jest bezpieczeństwo pacjentów zapewnione dzięki wytwarzaniu substancji czynnej (rekombinowanej insuliny ludzkiej) o wysokiej jakości oraz skutecznych, bezpiecznych i trwałych produktów leczniczych. Wszystkie produkty powstaną zgodnie z przepisami prawa oraz wymaganiami Dobrej Praktyki Wytwarzania (GMP). Spełnienie tych

wymagań jest potwierdzane stale utrzymywanymi certyfikatami GMP wydanymi przez Głównego Inspektora Farmaceutycznego, a także agencje z innych krajów. Certyfikacją objęte są wszystkie linie produkcyjne, kontrola jakości i magazyny. Produkty są wytwarzane i kontrolowane zgodnie ze specyfikacjami i dokumentacją będącą podstawą wydania pozwoleń na dopuszczenie do obrotu produktów leczniczych. Wysoką jakość produktów gwarantuje wdrożony i stale doskonalony system zapewnienia jakości.

Przykładem przedsięwzięcia z zakresu przemysłu jest projekt POIG 01.01.02-00-074/09, akronim: Zielona Chemia „Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksylowych”, realizowany w latach 2010-2014 przez Konsorcjum obejmujące Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu – Katedrę Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności (lider projektu UPP, prof. Włodzimierz Grajek, kierownik projektu), Katedrę Biochemii i Biotechnologii, Katedrę Chemii; Politechnikę Poznańską, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie. Celem projektu było opracowanie technologii mikrobiologicznej konwersji odpadowego glicerolu powstającego przy produkcji estrów metylowych (tzw. biodiesla), do 1,3-propanodiolu, erytrytolu oraz kwasu bursztynowego i fumarowego. Wymienione związki chemiczne zostały wyizolowane z podłoża hodowlanego i oczyszczone. W kolejnym etapie badań opracowano technologię wykorzystania 1,3-propanodiolu do syntezy poliuretanów i nienasyconych poliestrów. Użycie glicerolu do produkcji polioli pozwala na rezygnację ze stosowania w tej dziedzinie surowców ropopochodnych. Innym atrakcyjnym produktem przerobu odpadowego glicerolu jest erytrytol. Polioli ten z uwagi na słodki smak i niską kaloryczność może być stosowany przez przemysł spożywczy jako substancja słodząca w miejsce sacharozy. Kolejnymi produktami oferowanymi w projekcie są kwas bursztynowy i kwas fumarowy. Kwas fumarowy w przemyśle chemicznym służy do produkcji żywic alkilowych, farb i lakierów oraz jako kopolimer. Substancję wykorzystuje się także w przemyśle spożywczym jako naturalny środek zakwaszający i konserwujący. Kwas bursztynowy jest stosowany jako surowiec do produkcji sztucznych tworzyw oraz w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym.

### *E.coli* BL21 (konstrukcje z *Citrobacter freundii*) Kolonia nr 1527



**Ryc. 1.** Wytwarzanie 1,3-propanodiolu z odpadowego glicerolu przez bakterię *E.coli* BL21 z przeniesionym szlakiem metabolicznym z patogennych bakterii *Citrobacter freundii*. Z pracy doktorskiej Hanny Przysiałowskiej. Projekt PO IG 01.01.02-00-074/09 pt. „Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksyłowych” o akronimie „ZIELONA CHEMIA” realizowany był w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, 2007 – 2013, Oś Priorytetowa 1: Badania i rozwój nowoczesnych technologii. Działania: 1.1. Wsparcie badań naukowych dla budowy gospodarki opartej na wiedzy. Poddziałania 1.1.2. Strategiczne programy badań naukowych i prac rozwojowych, w zakresie „nowe materiały i technologie”, „biotechnologia i bioinżynieria”, a także „rolnictwo i środowisko”

Projekt otworzył drogę do rozwoju w Polsce innowacyjnej „zielonej chemii” opartej na surowcach odnawialnych i jest powiązany z produkcją biopaliw silnikowych. Zadania realizowane w projekcie miały przyczynić się do: wprowadzenia do praktyki gospodarczej technologii o wysokim ładunku innowacyjności polegającej na wykorzystaniu surowców odpadowych pochodzenia roślinnego w miejsce surowców kopalnianych, głównie ropopochodnych, i tym samym przyczyniających się do zmniejszenia emisji gazów cieplarnianych, racjonalnego zagospodarowania odpadów z produkcji biopaliw i rozwoju nowoczesnej, proekologicznej

produkcji chemicznej, opracowania nowych technologii produkcji ważnych surowców chemicznych, wzrostu poziomu wiedzy i umiejętności i ich praktycznego wykorzystania w priorytetowej dziedzinie konwersji odnawialnych źródeł surowcowych do ważnych gospodarczo produktów przemysłowych, wzrostu roli nauki w rozwoju gospodarczym naszego kraju. Dużym osiągnięciem było przygotowanie zmodyfikowanych bakterii *E.coli* wytwarzających z glicerolu 1,3-propanodiol, który może być wykorzystany w przemyśle włókienniczym (ryc. 1).

Oferowane technologie dotyczą: wytwarzania kwasu bursztynowego metodą mikrobiologiczną z glicerolu w warunkach semi-aerobowych, wytwarzania kwasu bursztynowego metodą mikrobiologiczną z substratów mieszanych i jego oczyszczanie, produkcji syropu erytrylowego z glicerolu dla celów spożywczych, otrzymywania mikrokapsulek do immobilizacji mikroorganizmów stosowanych w procesach biotechnologicznych, technologii mikrobiologicznej syntezy 1,3-propanodiolu z glicerolu, technologii wydzielania i oczyszczania 1,3-propanodiolu z cieczy pofermentacyjnych.

## 21. Jakie są krajowe osiągnięcia w biotechnologii środowiskowej?

Biotechnologia środowiskowa jest prężnie rozwijającym się kierunkiem, którego technologie są wykorzystywane w wielu dziedzinach, między innymi w ochronie środowiska. Warto wspomnieć, że procesy biotechnologiczne zachodzą naturalnie w świecie, jednak zadanie biotechnologii polega na ich przyspieszeniu, zwiększeniu wydajności i prowadzeniu na szeroką skalę. Ciekawą i bardzo ważną metodą jest bioremediacja.

Przyczyną skażeń gruntów, często przekraczających dopuszczalne normy, jest wnikanie do nich toksycznych substancji z odpadów, ale i ze źródeł pierwotnych. Powoduje to destabilizację parametrów gleby, skażenie wód oraz wymieranie flory i fauny. Szczególnie często widać to w okolicach stacji benzynowych, lotnisk, rafinerii, miejsc eksploatacji cystern i stacji obsługi maszyn.

W ostatnich latach w Polsce rozwinął się i w dalszym ciągu trwa proceder sprowadzania śmieci. Pomimo wielu pożarów i afer związanych z nielegalnym importem śmieci oszuści dalej próbują wprowadzać do kraju nielegalne odpady. W kontenerach, które przyplłynęły do Polski, odnaleziono ponad milion kilogramów nielegalnych odpadów komunalnych pochodzących z Europy Zachodniej. Uruchomiono procedurę zwrotu odpadów. Nadawcom grożą bardzo surowe kary finansowe,



a nawet kara więzienia. Trujące resztki spalonych śmieci miesiącami zalegają na pogorzeliiskach. Za ich uprzątnięcie ostatecznie i tak zapłacą samorządy lub państwo. W sumie mogą to być dziesiątki milionów złotych! Czyli po prostu – zapłacimy za to my! My wszyscy!

Bioremediacja jest procesem naprawczym, w którym wykorzystuje się bakterie, drożdże czy grzyby strzępkowe. Mikroorganizmy te mają za zadanie obniżenie stężenia zanieczyszczeń do bezpiecznego poziomu, przekształcenie węglowodorów naftowych do związków nietoksycznych lub przeprowadzenie mineralizacji do dwutlenku węgla i wody. Najczęściej stosuje się bakterie, ponieważ charakteryzują się dużą liczebnością populacji, szybkim wzrostem, a co więcej – produkty ich metabolizmu rozkładają zanieczyszczenia. W bioremediacji możliwe jest wykorzystanie drobnoustrojów, dla których substancje ropopochodne stanowią jedyne źródło węgla i energii. Wszystkie organizmy używane do usuwania zanieczyszczeń izolowane są spośród mikroflory naturalnej występującej na danym terenie lub otrzymywane są w wyniku inżynierii genetycznej. Ponieważ poszczególne gatunki nie mogą przyswajać wszystkich węglowodorów, a jedynie konkretne związki o określonej strukturze chemicznej, w praktyce często stosuje się specjalne zestawy, czyli konsorcja mikroorganizmów degradujące grupę węglowodorów. Aby wspomóc biodegradację zanieczyszczeń, oprócz żywych, aktywnych mikroorganizmów można wprowadzić do gleby także sorbent. Stanowi on barierę przed toksycznymi związkami, a także zatrzymuje w sobie substancje odżywcze takie jak sole biogenne i witaminy.

Bioremediacja może być prowadzona na dwa sposoby – *ex situ* i *in situ*. Ten pierwszy polega na zastosowaniu specjalnych urządzeń – bioreaktorów lub filtrów zraszanych do usuwania zanieczyszczeń ciekłych, a do odpadów stałych zaleca kompostowanie. Drugi sposób (*in situ*) pozwala na oczyszczanie w miejscu skażenia, bez konieczności przenoszenia gruntu i dzieli się na trzy istotne procesy, a mianowicie: bioremediację podstawową, obejmującą monitoring naturalnego procesu biodegradacji; biostymulację – modyfikację środowiska polegającą na wprowadzaniu dodatkowych substancji odżywczych, tj. pożywek dla mikroorganizmów oraz dodatkowe napowietrzanie terenu poddawanego procesowi bioremediacji; bioaugmentację, tzw. szczepienie gleby, czyli sztuczne wprowadzanie szczepów do środowiska glebowego w celu zainicjowania procesów rozkładu.

Jednak każde z rozwiązań, jakie oferuje biotechnologia, ma również swoje wady i przeszkody, które należy ominąć. Na przebieg bioreme-

diacji wpływają: ilość dostępnego tlenu, wody, pH, obecność pożywek i temperatura. Nie bez znaczenia jest także rodzaj gruntu, na którym prowadzi się proces, i rodzaj substancji ropopochodnych. Tak więc ograniczać ją będą skrajnie wysokie stężenie zanieczyszczeń, niekorzystne pH, niedobór substancji odżywczych dla mikroorganizmów albo zbyt niska wilgotność. Biotechnolodzy jednak potrafią sobie z tym poradzić, prowadząc natlenianie i dodawanie pożywek. Pamiętać należy także, że proces bioremediacji wymaga ciągłego monitoringu stanu środowiska, w którym prowadzony jest proces.

Przykładem polskiej firmy zajmującej się bioremediacją, intensyfikującą i stymulującą procesy zachodzące naturalnie, jest JARS S.A., która od powstania w 2002 roku świadczy w szerokim zakresie wyspecjalizowane usługi. Zajmuje wiodącą pozycję i dysponuje unikatowym na rynku *know-how* w zakresie badań laboratoryjnych, posiada sieć 7 nowoczesnych laboratoriów. Obsługuje największe firmy z Polski oraz rynków Unii Europejskiej. Doradza w obszarach bezpieczeństwa żywności, kosmetyków i ochrony środowiska. Bada produkty największych firm z całej Europy; każdego dnia bada ponad 1500 próbek.

## 22. Jakie są polskie osiągnięcia w biotechnologii medycznej?

Firmy biotechnologiczne coraz częściej inwestują w opracowywanie nowych leków biologicznych – to trend obecny w ostatnich latach na całym świecie. We współczesnym rozumieniu leki biologiczne definiowane są jako substancje pozyskiwane od żywych organizmów (ludzi, zwierząt, roślin, mikroorganizmów), które można stosować w leczeniu chorób u ludzi. Leki biologiczne wytwarza się w hodowlach komórek zwierzęcych, roślinnych, z wykorzystaniem bakterii, wirusów czy drożdży. Są one zdolne do naśladowania funkcji prawidłowych białek człowieka, mogą także wpływać na interakcje między różnymi biologicznie czynnymi cząsteczkami. Do głównych grup leków biologicznych zalicza się rekombinowane białka ludzkie, białka fuzyjne, a także przeciwciała monoklonalne.

Leki biologiczne dosyć znacznie różnią się od konwencjonalnych chemicznych farmaceutyków – inny jest sposób ich wytwarzania, budowa, farmakokinetyka. Leki biologiczne podlegają o wiele bardziej zastrzeżonej kontroli na etapie produkcji, gdyż są produkowane przez żywe komórki. Ze względu na większą skuteczność terapii w różnych chorobach, szybsze działanie czy też wygodę stosowania terapie biologicz-

ne są uznawane przez niektórych ekspertów za rewolucję w leczeniu licznych przypadków ciężkich chorób – reumatycznych, onkologicznych bądź innych.

Dostępność terapii biologicznych jest w Polsce ograniczona – według danych z 2015 roku wśród wszystkich osób cierpiących na choroby reumatyczne, zaledwie około 1% pacjentów miało dostęp do leczenia z zastosowaniem leków biologicznych. Biorąc pod uwagę odsetek pacjentów kwalifikujących się do tego rodzaju terapii, Polska jest zdecydowanie w tyle za takimi krajami jak Czechy, Hiszpania, Szwecja, Anglia czy Niemcy.

Oprócz oryginalnych leków biologicznych rozwija się również branża leków biopodobnych (ang. *biosimilars*) – produktów, które budową i działaniem naśladują leki oryginalne, natomiast do ich wytworzenia stosuje się nowe procesy technologiczne i inne linie komórkowe. Wprowadzenie takich leków na rynek możliwe jest po wygaśnięciu ochrony patentowej dla oryginalnych cząstek biologicznych.

Jednym z najważniejszych graczy na rynku jest gdańska firma farmaceutyczna Polpharma, która sukces odniosła dzięki opracowaniu, produkcji i sprzedaży leków generycznych. W 2011 r. Polpharma otworzyła nowy dział zajmujący się głównie opracowaniem leków biopodobnych – Polpharma Biologics. Leki biopodobne powstają w jednym z najnowocześniejszych ośrodków biotechnologicznych w Europie. Całkowita inwestycja firmy w działalność biotechnologiczną ma do 2023 roku przekroczyć 2 mld zł, a pierwszy produkt komercyjny ma się pojawić na rynku amerykańskim w roku 2020.

Bardzo duży wkład w rozwój polskiego rynku leków biopodobnych wniósł Mabion – utworzona w 2007 r., obecna na giełdzie spółka biotechnologiczna. Mabion rozwija preparat pod nazwą MabionCD20 – lek biopodobny do Mabthera (rituximab), przeciwciało monoklonalne, które ma znaleźć zastosowanie w leczeniu chłoniaka, przewlekłej białaczki limfocytowej czy też reumatoidalnego zapalenia stawów. MabionCD20 był już podawany pacjentom w ramach trzeciej fazy badań klinicznych. W 2018 roku Mabion złożył wniosek rejestracyjny dla tej cząsteczki w Europejskiej Agencji Leków (EMA); spółka zainicjowała również proces jej rejestracji w Brazylii. Poza MabionCD20 firma w ramach swojego portfolio rozwija aż 5 różnych związków biopodobnych. Oprócz Mabionu i Polpharmy prace nad lekami biologicznymi i biopodobnymi prowadzą również Celon Pharma (akcjonariusz Mabionu), Selvita czy też OncoArendi Therapeutics.

Dużym osiągnięciem biotechnologicznym są prowadzone od 1992 r. prace prof. Andrzeja Mackiewicza nad szczepionką terapeutyczną na czerniaka. Od tamtego czasu opracowano już kilka generacji szczepionek. Cały proces jest bardzo skomplikowany, gdyż obecnie w Polsce obowiązują przepisy Unii Europejskiej, a wymagania stawiane ośrodkom akademickim i szpitalnym są identyczne z tymi, które obowiązują wielkie koncerny farmaceutyczne. Szczepionka lub lek musi być wytwarzany zgodnie z zasadami tzw. Dobrej Praktyki Wytwarzania (*Good Manufacturing Practice, GMP*) i mieć zezwolenie Głównego Inspektora Farmaceutycznego na jej wytwarzanie. Udało się stworzyć linię produkcyjną szczepionki, która została zlokalizowana w Pilotowej Stacji Biotechnologii na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu. Przez wszystkie lata łącznie do badań klinicznych, które obejmowały fazę I i II, zakwalifikowano około 450 chorych z zaawansowanym czerniakiem. Mediana przeżycia chorych z tak zaawansowaną chorobą wynosi około 7 miesięcy. W badaniach ponad 130 chorych nadal żyje i jest leczonych, a okres ich przeżycia wynosi od 5 do 13 lat. Badania są nadal kontynuowane, gdyż szczepionka musi być podawana bez przerwy do końca życia.

### 23. Jakie są krajowe osiągnięcia w biotechnologii roślin?

Minęło ponad 20 lat od komercjalizacji transgenicznych roślin określanych w literaturze przedmiotu jako uprawy biotechnologiczne (ang. *biotech crop*) lub genetycznie modyfikowane GM lub GMO. W tym okresie stało się jasne, że mimo wielu kontrowersji w różnych krajach areał upraw tych roślin wzrasta z roku na rok, sprawiając, że rozwój GMO znalazł się na pierwszym miejscu wśród głównych innowacji rolniczych. Na rycinie 2 przedstawiono areał światowych upraw roślin GMO, przy czym warto wskazać, że główne uprawy dotyczą zaledwie czterech gatunków – soi, kukurydzy, bawełny i rzepaku, wśród których zdecydowanie przeważa transgeniczna soja (95,9 mln ha, 78% wszystkich upraw), kukurydza (58,9 mln ha, 30% wszystkich upraw), bawełna (24,9 mln ha, 76% wszystkich upraw), rzepak (10,1 mln ha, 29% wszystkich upraw). To co dawniej wydawało się mało realne – rośliny odporne na herbicydy i szkodniki są już uprawiane zarówno w krajach rozwiniętych, jak i rozwijających się. W 2018 roku areał upraw roślin transgenicznych osiągnął rekordową powierzchnię – 191,7 mln hektarów w 26 krajach. Szacuje się, że uprawa roślin GMO przyniosła dochód przewyższający 133 mld dolarów (ISAAA 2018).



**Ryc. 2.** W 2018 r. uprawy biotechnologiczne prowadzono w 26 krajach, w tym w 21 krajach rozwijających się i 5 krajach uprzemysłowionych. Obsiano 191,7 mln hektarów upraw. Łącznie w 70 krajach uprawiano/importowano rośliny transgeniczne według Global Status of Commercialized Biotech / GM Crops opublikowanym przez ISAAA<sup>2</sup>. Ciągłe prowadzenie upraw biotechnologicznych przez rolników na całym świecie wskazuje, że uprawy biotechnologiczne nadal pomagają sprostać globalnemu wyzwaniu obejmującemu głód, niedożywienie i zmiany klimatu

Omówienie osiągnięć z zakresu biotechnologii roślin w naszym kraju jest stosunkowo trudne, ponieważ Polska opowiedziała się jako kraj wolny od GMO i właściwie uprawy roślin transgenicznych nie są w Polsce prowadzone. Stąd obraz biotechnologii roślin w Polsce w dużej mierze nie dotyczy biotechnologii i wiele opracowań obejmuje raczej biologię komórki, biochemię czy też fizjologię. Przykładami osiągnięć mogą być jednak prace z zakresu mikropropagacji roślin i utrzymywania bioróżnorodności.

Najsłynniejsze dęby w Polsce – Lech, Czech i Rus – rosną w parku otaczającym pałac w Rogalinie. Najlepiej zachowanym drzewem jest Rus, który ma ponad 9 metrów w obwodzie. I właśnie ten dąb naukowcom z Instytutu Dendrologii Polskiej Akademii Nauk w Kórniku udało się sklonować! To pierwszy taki odmłodzony dąb metodą *in vitro*. Było

<sup>2</sup> ISAAA Brief 54, <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/54/default.asp>

to możliwie dzięki prowadzonym w latach 2013-2017 badaniom nad mikrorozmnażaniem w sterylnych kulturach *in vitro* wiekowych, historycznych dębów pomnikowych rosnących w Polsce, liczących od 500 do 800 lat. Badania finansowane były przez Generalną Dyрекcję Lasów Państwowych.

W 2014 r. w połowie kwietnia zostały ścięte i zabrane do laboratorium specjalnie wybrane gałęzie najstarszych dębów w Polsce. Dęby szypułkowe należą do najokazalszych drzew występujących naturalnie na terenie Polski. Są w stanie osiągać obwód pnia (mierzony na wysokości 120 cm) nawet do 10 metrów. Są to często pomniki przyrody, o walorach nie tylko przyrodniczych, lecz także historycznych i kulturowych.

Z pobranych próbek dębów Bartek, Lech, Dziaduś, Chrobry oraz kilku innych dębów pomnikowych rosnących na terenie Polski tylko Rus dał się ukorzenić. Sklonowany dąb Rus został posadzony w parku przy dawnej rezydencji Pałacu Raczyńskich w Rogalinie.

Innym przykładem jest projekt PBS1/A8/9/2012, akronim SORMISOL „Opracowanie innowacyjnej technologii produkcji bioetanolu II generacji z biomasy sorgo (*Sorghum* sp.) i miskanta (*Miscanthus* sp.)”, realizowany w latach 2012-2016 przez konsorcjum obejmujące Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu – Katedrę Biochemii i Biotechnologii (KBiB UP, lider projektu) oraz Katedrę Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności (KBiMŻ UP), Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich (IWNiRZ), Instytut Genetyki Roślin PAN (IGR PAN) oraz Instytut Chemii Bioorganicznej PAN (IChB PAN). Celem projektu było opracowanie technologii produkcji bioetanolu drugiej generacji z biomasy sorgo i miskanta. W ramach projektu ustalono parametry technologiczne oraz przeprowadzono selekcję gatunków i uzyskano nowe szczepy drobnoustrojów do fermentacji alkoholowej z wykorzystaniem biomasy roślinnej sorgo i miskanta. Zwiększono potencjał plonotwórczy i określono parametry biochemiczne miskanta jako surowca do produkcji bioetanolu. Przeprowadzono modyfikację roślin sorgo dla zwiększenia wydajności produkcji bioetanolu, a także opracowano i scharakteryzowano konstrukcje genowe dla podwyższenia zawartości sacharozy i modyfikacji składu ściany komórkowej sorgo i miskanta.

Biotechnolodzy z Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. Jana Szopy-Skórkowskiego już kilka lat temu stworzyli len modyfikowany genetycznie, z którego powstały opatrunki na trudno gojące się rany. Len jest rośliną, w której obecność najważniejszych szlaków me-

tabolizmu stwarza rzadko spotykaną możliwość przystosowania surowców z niego pochodzących do wielu produktów, takich jak tekstylia o konkurencyjnej jakości, materiały opatrunkowe, włókna kompozytowe i kompozyty włókien z polimerową matrycą. Według badaczy len to „inteligentna roślina” o szerokim zastosowaniu, jednak podatna na choroby. Żeby zwiększyć oporność tej rośliny, wykorzystano metody inżynierii genetycznej i utworzono rośliny transgeniczne, odporne na infekcje oraz o zwiększonej zawartości związków o właściwościach antyoksydacyjnych. Dzięki tym modyfikacjom otrzymano len, którego parametry pozwoliły na stworzenie opatrunków leczących owrzodzenia, zespół stopy cukrzycowej, ropne zgorzelinowe zapalenia skóry i odleżyny.

Wkrótce okazało się, że restrykcyjne przepisy i rozporządzenia Unii Europejskiej uniemożliwiły wykorzystanie surowców lnianych pozyskanych z roślin modyfikowanych genetycznie w przemyśle. Obecnie jest możliwość tworzenia organizmów modyfikowanych i ich badania, jednak wyłącznie po to, by poznać strukturę i funkcje danego białka, ale nie można takich organizmów wykorzystać jako źródła surowcowe. Boimy się roślin GMO?

## 24. Jakie osiągnięcia ma polska biotechnologia zwierząt?

Biotechnologia rozwija się niezwykle dynamicznie, a praktyczne możliwości związane z biotechnologią zwierząt wykraczają daleko poza hodowlę i produkcję zwierzęcą. Obejmują obszary biomedycyny i farmacji, dostarczają narzędzi do zachowania bioróżnorodności oraz ratowania ginących gatunków. Jako przykład osiągnięcia z zakresu biotechnologii zwierząt można wskazać klonowanie i transgenezę zwierząt dla potrzeb biomedycznych. Jednym z ostatnich projektów zrealizowanych z powodzeniem jest uzyskanie transgenicznych świń i wykorzystanie ich skóry, zastawek serca i naczyń w medycynie. Marszałek Województwa Wielkopolskiego przyznał nagrodę Innowacyjna Wielkopolska badaczom z Katedry Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. W realizacji badań brały udział zespoły badawcze z Katedry Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu pod kierunkiem prof. Ryszarda Słomskiego, Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego pod kierunkiem prof. Zdzisława Smorąga, a odbiorcami wyników były Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich w osobach dr. Kazimierza Cieślaka i dr. Agnieszki Klamy-Baryły oraz

Fundacja Rozwoju Kardiologii im. prof. Zbigniewa Religi w Zabrzu pod kierunkiem dr. Piotra Wilczka.

Transplantacja stała się obecnie rutynowym zabiegiem chirurgicznym i w wielu wypadkach najlepszą lub jedyną metodą umożliwiającą ratowanie życia ludziom cierpiącym z powodu schyłkowej niewydolności narządów. Utrzymujący się od lat krytyczny niedobór potencjalnych organów i tkanek do przeszczepów spowodował duże zainteresowanie badaniami ukierunkowanymi na poszukiwanie alternatywnych źródeł organów. Wykorzystanie do przeszczepów u ludzi organów pochodzących od innych ssaków (ksenotransplantacja) stało się oczywistą strategią rozwiązania problemu i szansą na ratowanie życia tysiącom ludzi. Wcześniejsze próby skazane były na niepowodzenie, dopiero współczesna biotechnologia pozwoliła na wprowadzanie modyfikacji genetycznych do zwierząt przewidzianych jako dawcy narządów w taki sposób, by ich organy nie były rozpoznawane przez układ odpornościowy biorcy, a procesy prowadzące do odrzucenia ksenoprzeszczepu ulegały zahamowaniu.

Głównym osiągnięciem było uzyskanie drogą inżynierii genetycznej modyfikowanych świń, których tkanki i narządy mogłyby być wykorzystane do przeszczepów u ludzi. Zaprojektowano modyfikacje świń i uzyskano pięć linii transgenicznych świń, scharakteryzowano je na poziomie molekularnym i funkcjonalnym i przekazano do eksperymentalnego leczenia. Uzyskanie transgenicznych oraz podwójnie transgenicznych świń na podstawie zasobów poznańskiego i współpracujących ośrodków jest osiągnięciem liczącym się w skali światowej. Już obecnie skórę zwierząt wykorzystuje się do leczenia ciężkich oparzeń, zastosowano ją w czterech bardzo ciężkich przypadkach, zakończonych uratowaniem życia, w dwóch przypadkach powierzchnia oparzeń wynosiła 80-90% całkowitej powierzchni ciała. Również zastawki serca są intensywnie badane pod kątem ich wykorzystania do przeszczepów u ludzi.

Kolejny projekt INNOMED/I/17/NCBR/2014, akronim: MEDPIG „Opracowanie innowacyjnej technologii wykorzystania tkanek transgenicznych świń dla celów biomedycznych”, realizowany w latach 2014-2017, stanowił kontynuację tematyki ksenotransplantacji. Konsorcjum obejmowało Instytut Zootechniki – PIB (IZ-PIB); Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu – Katedrę Biochemii i Biotechnologii (lider projektu, KBiB UP); Instytut Genetyki Człowieka PAN (IGC PAN); Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (UMP); Fundację Rozwoju Kardiologii im. Zbigniewa Religi w Za-



brzu (FRK); Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich (CLO) i Laboratorium Genetyki Molekularnej (LGM). Celem projektu było opracowanie technologii wykorzystania tkanek transgenicznych świń dla potrzeb biomedycznych. Projekt stanowił alternatywę w stosunku do badań z zastosowaniem komórek macierzystych i prac ukierunkowanych na uzyskanie sztucznych narządów. Mimo upływu czasu i zaangażowania znaczących środków nie obserwuje się przełomu technologicznego w pracach na komórkach macierzystych i prototypach sztucznych narządów, natomiast konsorcjanci przekazali już do banku tkanek preparaty skóry świń, które wielokrotnie zastosowano do leczenia oparzeń. Dla realizacji projektu zaplanowano siedem głównych zadań: 1 – opracowanie systemu hodowli oraz pozyskiwanie skóry, zastawek i naczyń krwionośnych od transgenicznych świń do wykorzystania w biomedycynie; 2 – zwiększenie potencjału uzyskiwania świń politransgenicznych metodami biotechnologii rozrodu; 3 – opracowanie i charakterystyka konstrukcji genowych zapobiegających odrzuceniu ksenoprzeszczepu; 4 – wieloparametryczną charakterystykę transgenicznych zwierząt z uwzględnieniem genomiki, cytogenetyki, proteomiki i testów funkcjonalnych; 5 – opracowanie możliwości leczenia chorób naczyń człowieka oparte na naczyniach transgenicznych świń; 6 – opracowanie technologii wytwarzania innowacyjnych bioprotez zastawek serca z wykorzystaniem technik inżynierii tkankowej i metod biologii molekularnej; 7 – przygotowanie dwóch wariantów opatrunku biologicznego ze skóry transgenicznych świń przeznaczonych do wykorzystania klinicznego u chorych z ranami oparzeniowymi i przewlekłymi, z zastosowaniem technik inżynierii tkankowej i komórkowej; 8 – kontrolę spójności jakościowej realizowanych zadań i stabilności transgenezy. Tkanki transgenicznych zwierząt – skóra, zastawki, naczynia – mogą być stosowane do leczenia pacjentów onkologicznych. Niedobór organów i tkanek od zmarłych dawców, niezbędnych dla celów transplantacyjnych, jest współcześnie znaczącym problemem. Wydłużająca się średnia długość życia ludzi doprowadziła do wzrostu liczby pacjentów cierpiących na choroby przewlekłe oraz schyłkową niewydolność narządów. Zapotrzebowanie na organy, tkanki i komórki do transplantacji (np. serce, nerki, komórki Langerhansa) znacznie przewyższa liczbę dostępnych dawców. Rozziew pomiędzy liczbą dostępnych organów a liczbą oczekujących na przeszczep rośnie z roku na rok. Mimo postępu w biologii komórek macierzystych i inżynierii tkankowej kliniczne zastosowanie technik z zakresu powyższych dzie-

dzin to daleka przyszłość. Łatwo dostępne źródło narządów, tkanek i komórek pochodzenia zwierzęcego (transplantacja między gatunkami, ksenotransplantacja) rozwiązałoby istniejący problem. Najodpowiedniejszym dawcą organów w dziedzinie ksenotransplantacji wydaje się być genetycznie modyfikowana świnia domowa, która ze względu na fizjologiczne podobieństwo jest najodpowiedniejszym donorem organów.

## 25. Jakich korzyści dostarcza nowoczesna biotechnologia?

Biotechnologia należy do trzech – obok informatyki i telekomunikacji – najbardziej perspektywicznych dziedzin przemysłu w XXI wieku. Przyjmuje się, że biotechnologia jest szeroką dyscypliną, w której procesy biologiczne, organizmy, komórki lub składniki komórkowe są wykorzystywane do opracowywania nowych technologii. Nowe narzędzia i produkty opracowane przez biotechnologów są wykorzystywane w badaniach naukowych, rolnictwie, przemyśle i klinikach.

Biotechnologia to wykorzystanie systemów biologicznych i organizmów żywych do wytwarzania lub modyfikowania produktów bądź procesów do określonych celów. Rolnictwo, produkcja żywności i medycyna stanowią najpowszechniejsze obszary zastosowania biotechnologii, obok innych dziedzin interdyscyplinarnych takich jak genomika, immunologia stosowana oraz rozwój terapii farmaceutycznych i testów diagnostycznych. Według danych przedstawionych przez Conora Stewarta na platformie Statista w raporcie *Biotechnology in Europe – Statistics & Facts* z 28 lutego 2020 r.<sup>3</sup> sektor ten jest uważany za strategiczny dla gospodarki europejskiej, przynosi około 25 mld dolarów przychodów i zatrudnia 72 tysiące pracowników. W ciągu ostatnich kilku lat sektor biotechnologiczny stał się jedną z najbardziej innowacyjnych gałęzi przemysłu w Unii Europejskiej, z prawie 80 tysiącami zgłoszeń patentowych zarejestrowanych w 2014 roku. Niezwykle wysokie koszty badań i rozwoju wymuszają współpracę europejskich firm biotechnologicznych z większymi firmami, aby zakończyć rozwój swoich produktów i patentów.

Wykorzystanie biotechnologii w rolnictwie, produkcji żywności i medycynie jest również szeroko dyskutowanym tematem ze względu na wpływ na środowisko i zdrowie ludzi. Niektóre z najbardziej palących problemów etycznych w tej branży to na przykład wykorzystanie ludzi w badaniach klinicznych, uprawy genetycznie modyfikowanych roślin,

<sup>3</sup> <https://www.statista.com/topics/3399/biotechnology-in-europe/>

inżynieria genetyczna, testy na zwierzętach, bioterroryzm i badaniach nad komórkami macierzystymi.

Jako przykłady zastosowań biotechnologii w życiu codziennym wymienić należy między innymi: 1 – pozyskiwanie dodatków i czynników wspomagających produkcję żywności (zamiast czynników chemicznych) determinujących parametry technologiczne produktów spożywczych; 2 – obniżanie kosztów przetwórstwa; 3 – podwyższanie jakości produktów; 4 – dostarczanie szybkich i tanich metod analitycznych zarówno w medycynie, jak i w procesach przemysłowych czy w ochronie środowiska; 5 – przedłużanie trwałości produktów; 6 – obniżanie kosztów obróbki odpadów, na przykład przez stosowanie biodegradowalnych materiałów do pakowania produktów; jak również 7 – otrzymywanie cennych terapeutyków, na przykład hormonów.

## 26. Do czego służą nowe techniki hodowli (NBT)?

Nazwa NBT (ang. *new breeding techniques*) odnosi się do nadanego przez Unię Europejską Wspólnotowemu Centrum Badawczemu (ang. *Joint Research Centre, JCR*) obowiązku zajęcia się technikami NBT i utworzenia Grupy Roboczej ds. Nowych Techniki (ang. *New Techniques Working Group*). Do technik NBT zaliczana jest: mutageneza ukierunkowana nukleazami (ang. *site-directed nuclease technology, SDN*); mutageneza ukierunkowana oligonukleotydami (ang. *oligonucleotide directed mutagenesis, ODM*); cisgeneza i intrageneza (ang. *cisgenesis and intragenesis*); metylacja DNA zależna od RNA (ang. *RNA-dependent DNA methylation, RdDM*); szczepienia na transgenicznej podkładce (ang. *grafting on GM rootstock*); odwrócona hodowla (ang. *reverse breeding*); agroinfiltracja (ang. *agro-infiltration, agro-inoculation, floral dip*); syntetyczna genomika (ang. *synthetic genomics*), technologia CRISPR/Cas (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*).

Technologie NBT można uznać za napędzające działanie małych i średnich przedsiębiorstw unijnych, gdyż są stosunkowo proste i w przyspieszony sposób mogą dostarczać nowych odmian roślin, w tym również owocowych i warzywnych. Zwolennicy tej technologii uważają, że kraje unijne powinny uwzględnić je jako nie prowadzące do powstawania GMO, co wpłynie na rozwój firm hodowlanych, ożywienie całego sektora i wzrost ekonomiczny. Może też prowadzić do poprawy konkurencyjności.

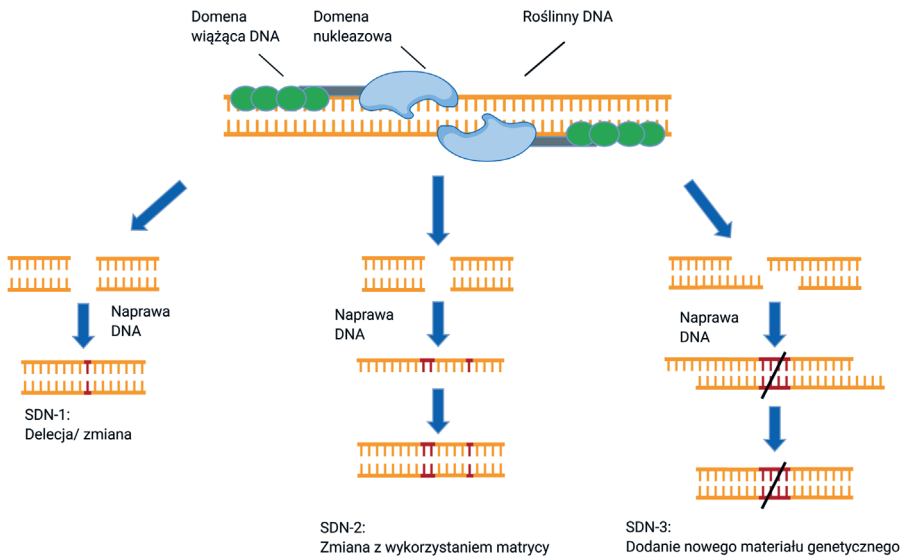
Niektórzy badacze uważają, że do tych technik należy również transgeneza, dzięki której uzyskano szereg odmian roślin opornych na herbi-

cydy i pestycydy. Ich areal upraw ciągle wzrasta i dzieli świat na kraje zezwalające na uprawy transgeniczne i takie, które upraw transgeniczy-nych nie akceptują.

## 27. Jak można wykorzystać ukierunkowane nukleazy (ang. *site-directed nuclease technology*, SDN) w technologii NBT?

W grupie ukierunkowanych nukleaz (ang. *site-directed nuclease technology*, SDN) można wyróżnić trzy główne technologie określane jako SDN-1, SDN-2 i SDN-3. Terminy alternatywne to: meganukleazy, nukleazy palca cynkowego (ang. *zinc finger nuclease*, *ZFN technology*, ZFN-1, ZFN-2, ZFN-3) i nukleazy efektorowe podobne do aktywatora transkrypcji (ang. *transcription activator like effector nucleases*, TALENs). Technologie oparte są na obserwacji, że cząsteczki biologiczne zawierające domeny rozpoznające specyficzne regiony DNA i jednocześnie wykazujące aktywność nukleolityczną, po dodaniu do komórek roślinnych i wnikięciu do ich wnętrza przecinają DNA (hydroliza DNA). Głównym celem tej technologii jest wykorzystanie mechanizmów naprawczych komórki, podczas których może dojść do wprowadzenia zmian w DNA w miejscu przerwania nici. Mogą być to zmiany o charakterze małych delecji (ubytku informacji genetycznej), substytucji (zamianie informacji genetycznej) lub addycji (dodaniu informacji genetycznej). W ten sposób można uzyskać rośliny o nowej charakterystyce, w tym o zmianach korzystnych dla hodowców.

Technologia SDN-1 powoduje powstanie dwuniciowych przerw w genomowym DNA rośliny, przy czym do komórek nie jest dodawany obcy DNA (ryc. 3). Podczas naprawy uszkodzeń DNA może dojść do zamiany nukleotydu lub jego delecji powodujących wyciszenie bądź wyłączenie (ang. *knock-out*) genu w komórce. Technologia SDN-2 różni się od SDN-1 tym, że w procesie naprawczym można dodać niewielki komplementarny odcinek DNA, który służąc jako matryca w naprawie genomowego DNA, wprowadzi w nim zmianę. Zmiany mogą mieć trwa-ły charakter, tzn. zmiany są przekazywane do potomstwa. Technologia SDN-3 jest zbliżona do SDN-2, przy czym podczas naprawy genomowego DNA wprowadzić można całe geny.

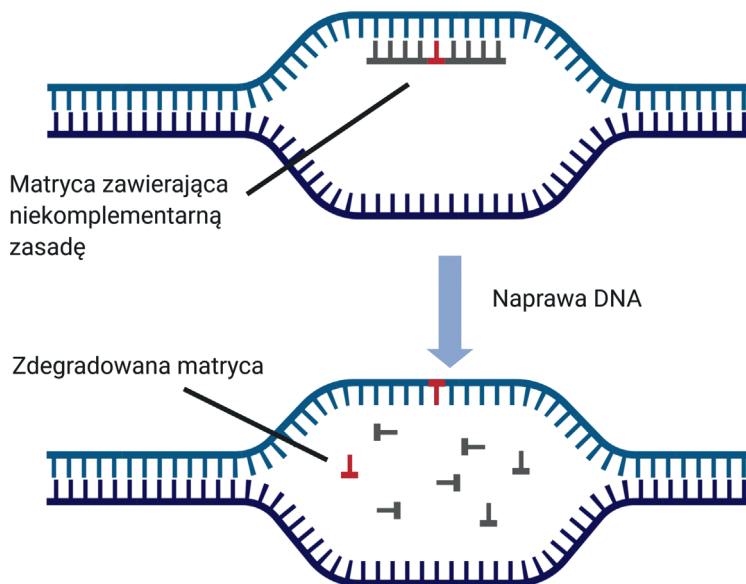


**Ryc. 3.** Technologia ukierunkowanych nukleaz. Nukleazy rozpoznają swoje miejsca, a następnie hydrolizują (przecinają) DNA. W procesie naprawy można wyróżnić trzy możliwości: SDN-1, delecja lub zmiana zasady w DNA; SDN-2, zmiana z wykorzystaniem matrycy; SDN-3, włączenie nowego materiału genetycznego

Ośrodki stosujące technologię SDN-1 i SDN-2 uważają, że nie wprowadzają rekombinowanego DNA i stąd ich badania nie prowadzą do otrzymania nowych odmian, które można by uznać za GMO. Z kolei technologia SDN-3 wprowadzając dodatkowe fragmenty DNA, podlega pod definicję GMO. Jednakże ośrodki stosujące tę technologię uważają, że do GMO powinno się zaliczać wprowadzanie odcinków powyżej 20 par zasad (pz). Okazało się bowiem, że długość oligonukleotydu składającego się z 9 nukleotydów położonych wokół centralnego nukleotydu niosącego mutację jest optymalna dla niepełnej hybrydyzacji z homologicznym odcinkiem DNA. Pełna długość tak przygotowanego oligonukleotydu będzie wynosiła 19 par zasad. Określenie długości wprowadzanego do komórek odcinka DNA na powyżej 20 par zasad umożliwi badaczom szerokie stosowanie technologii, głównie SDN. Technologia SDN może prowadzić do uzyskania nowych odmian o ulepszonych cechach, przypomina jednak tradycyjne metody mutagenyzy chemicznej lub radiacyjnej, które prowadziły do uzyskania roślin o cechach korzystnych lub niekorzystnych.

## 28. Jak można wykorzystać technikę mutagenезы ukierunkowanej z zastosowaniem oligonukleotydów (ang. *oligonucleotide directed mutagenesis*, ODM)?

Technika mutagenезы ukierunkowanej z zastosowaniem oligonukleotydów (ang. *oligonucleotide directed mutagenesis*, ODM) umożliwia wprowadzanie do organizmów mutacji punktowych. Stosuje się w niej oligonukleotydy (krótkie jednoniciowe odcinki DNA), które po wprowadzeniu do komórki łączą się z homologicznym odcinkiem DNA. Syntetyczne oligonukleotydy mogą zawierać pojedynczą zmianę w sekwencji DNA i po połączeniu z DNA gospodarza, w procesie naprawy, zmiana która była zawarta w oligonukleotydzie, może być wprowadzona na stałe do DNA gospodarza. Oligonukleotyd nie zostaje włączony do DNA komórki roślinnej i podlega degradacji, natomiast wprowadzona zmiana jest przekazywana do potomstwa (ryc. 4).



**Ryc. 4.** Technika mutagenезы ukierunkowanej z zastosowaniem oligonukleotydów. Podczas naprawy DNA może dojść do wbudowania niekomplementarnej zasady opartej na oligonukleotydzie zawierającym celowo wprowadzoną zmianę

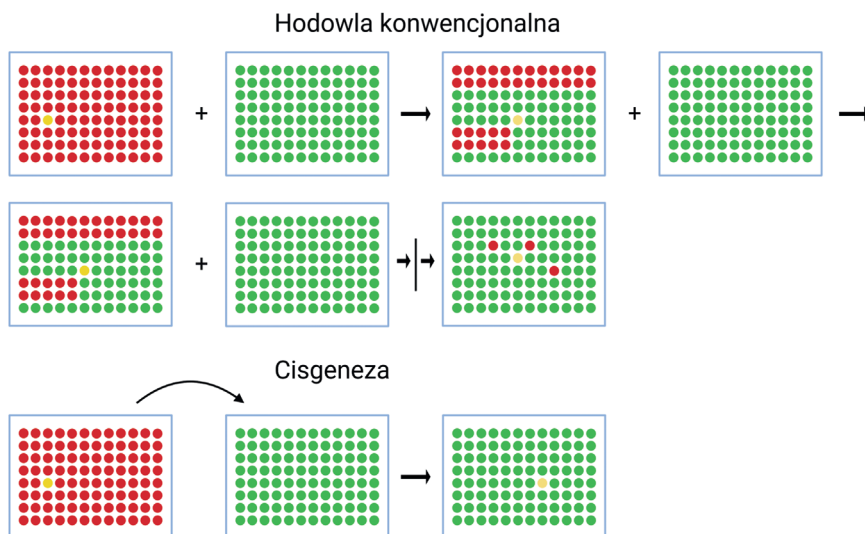
Szeroko dyskutowana jest kwestia, czy w wyniku stosowania technologii ODM powstają organizmy GMO czy też nie. Biorąc pod uwagę obowiązujące definicje, jest to technologia inżynierii genetycznej, którą można uznać za prowadzącą do powstania GMO. Niewątpliwą zaletą tej technologii jest przyspieszenie procesu uzyskiwania nowych odmian, jest ona stosunkowo prosta, polega na inkubacji komórek roślinnych z oligonukleotydem zawierającym zmianę, następnie prowadzona jest standardowa regeneracja roślin. Stosowanie metody ODM dotyczyć ma bardzo ważnych cech oporności na choroby, tolerancji na warunki stresowe, na przykład susze, i poprawę wartości odżywczych. Metoda ODM choć zbliżona do metod konwencjonalnych, jest jednak czterokrotnie szybsza.

## 29. Jakie jest znaczenie cisgenezy i intragenezy w NBT?

Technologia cisgenezy jest bardzo podobna do konwencjonalnych technik hodowlanych, jednak umożliwia bardziej specyficzny transfer genów między blisko spokrewnionymi gatunkami roślin. W tej technologii można przenieść określoną cechę, na przykład oporności, na patogen z tego samego lub blisko spokrewnionego gatunku, pod warunkiem możliwości wykonania krzyżowań, jedynie nieznacznie zmieniając genom. Cisgeneza umożliwia uzyskanie nowych odmian w czasie czterokrotnie szybszym niż metodami tradycyjnymi, przy czym określona cecha jest wprowadzana w sposób kontrolowany, bez konieczności usuwania cech niepożądanych (ryc. 5). Roślina donorowa danej cechy, jak już zaznaczono, musi krzyżować się z rośliną biorcą. Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. *European Food Safety Authority*, EFSA) uważa, że cisgeneza nie odbiega w sensie bezpieczeństwa od metod tradycyjnych. Przyjmuje się, że cisgeneza może być zastosowana do uzyskiwania oporności na patogeny u warzyw i owoców, głównie ziemniaków, jabłek i bananów, co spowoduje spadek użycia pestycydów i będzie miało korzystny wpływ zarówno na środowisko, jak i konsumentów. Cisgeneza wymieniana jest również jako bardzo ważna dla upraw winorośli i przemysłu winiarskiego.

Intragneza (ang. *intra-genesis*) z kolei różni się od cisgenezy wykorzystaniem nowych kombinacji genów utworzonych przez rearanżację funkcjonalnych fragmentów DNA. Dotyczy również wykorzystania materiału genetycznego pochodzącego z tego samego gatunku lub gatunku blisko spokrewnionego, zdolnego do krzyżowania. Rośliny uzyskane

przez cisgenezę lub intragenezę, w przeciwieństwie do roślin transgenicznych, nie zawierają obcych genów takich jak geny selekcyjne czy elementy wektora. Obecnie rośliny powstałe z zastosowaniem technologii cisgenezy, podobnie jak transgenyzy, podlegają tym samym przepisom, a więc uznawane są za GMO. W szeregu krajów toczy się dyskusja, aby rośliny uzyskane przez cisgenezę ze względu na wykorzystanie takiej samej puli genowej jak w przypadku roślin konwencjonalnych były wyłączone spod przepisów dotyczących GMO (Holme i in., 2013).



**Ryc. 5.** Technika cisgenezy. Porównanie konwencjonalnej metody hodowli i cisgenezy do przeniesienia określonej cechy (zaznaczonej żółtym kolorem) między roślinami blisko spokrewnionymi. Cisgeneza umożliwia przeniesienie w jednym etapie nowej cechy do rośliny biorcy bez utraty jej właściwości. Według definicji GMO jest to technika, w której powstają organizmy genetycznie modyfikowane, chociaż wprowadzone zmiany jedynie nieznacznie modyfikują genom

Zwolennicy tej technologii uważają, że będzie ona stanowiła wartość dodaną do gospodarki Unii Europejskiej. Unijna Komisja Ekspertów (ang. *EU Expert Working Group on New Breeding Techniques*) powołana do zbadania nowych technologii hodowli roślin wskazuje, że cisgeneza prowadzi do powstania podobnych odmian jak odmiany uzyskane konwencjonalnymi metodami hodowlanymi lub przez standardowe meto-



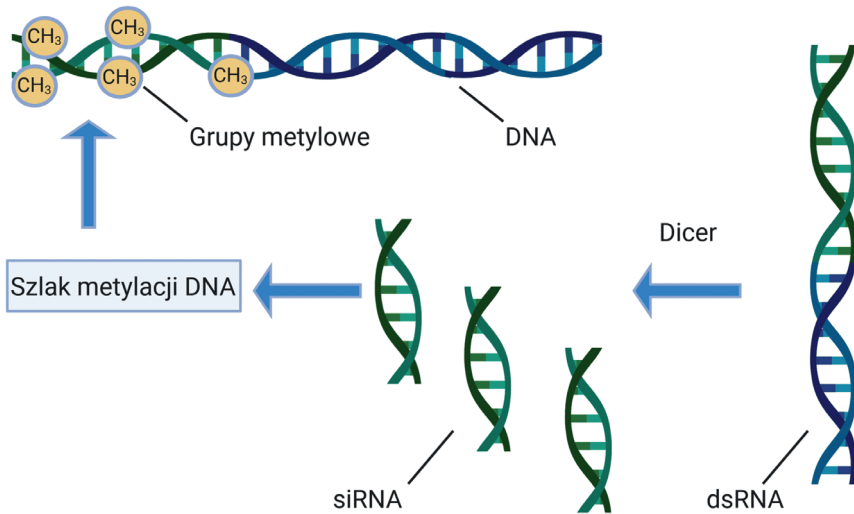
dy reprodukcji. Usankcjonowanie tego statusu przez Unię Europejską umożliwi rozwój firm związanych z uzyskiwaniem i wykorzystywaniem nowych odmian roślin i zwiększy konkurencyjność rynku europejskiego.

### 30. Dlaczego metylacja DNA zależna od RNA należy do grupy technik NBT?

W technice metylacji DNA zależnej od RNA (ang. *RNA-dependent DNA methylation*, RdDM) do komórki roślinnej wprowadza się krótkie dwuniciowe cząsteczki RNA (dsRNA), które są rozpoznawane przez mechanizmy obronne rośliny z udziałem enzymu DICER. Enzym ten przecina dsRNA do mniejszych cząsteczek określanych jako drobne interferujące RNA (siRNA), które mogą oddziaływać na roślinny mechanizm obronny i w rezultacie prowadzić do metylacji DNA powodującej wyciszenie genu (ryc. 6). Nie zachodzi więc zmiana sekwencji nukleotydów w DNA, lecz ich metylacja, co określa się jako zmianę epigenetyczną. Prawdopodobnie za wyciszenie genu odpowiadają bardziej kompleksowe zmiany w strukturze chromatyny. Zmiany epigenetyczne mogą być przekazywane do potomstwa. Po wyciszeniu genu poziom jego metylacji nie zmienia się w następnych pokoleniach, jednak cząsteczki RNA są gubione w trakcie podziałów komórek. Powstawanie drobnych dwuniciowych cząsteczek RNA działających w technice RdDM można uzyskać również innymi sposobami, na przykład przez infekcje wirusowe (ang. *Virus Induced Gene Silencing*, VIGS) lub wprowadzanie do komórek transgeny. W przypadku infekcji wirusowych typu VIGS dochodzi do utraty cząstki dsRNA podczas mitozy, a w przypadku transgeny konieczne jest wykonanie krzyżowania z rośliną nietransgeniczną.

Zakłada się, że technologią RdDM można ulepszyć wiele cech u różnych gatunków roślin na zasadzie obniżenia ekspresji (ang. *down-regulation*) endogennych genów bez zmiany w materiale genetycznym. Wymieniane są tutaj tolerancja na suszę lub ciepło, oporność na choroby i owady, dłuższa przydatność do spożycia, poprawa wartości odżywczych i smakowych, jak również zmiana koloru. Technologia może być stosowana w różnych dziedzinach, na przykład w ogrodnictwie, produkcji roślin ozdobnych i leśnictwie.

Zwolennicy RdDM uważają, że uzyskana za jej pomocą nowa odmiana rośliny nie jest rośliną genetycznie modyfikowaną, ponieważ nie wprowadzono do niej materiału genetycznego i nie ma zmian sekwencji DNA w stosunku do wyjściowej rośliny. Jedyną zmianą, która występuje



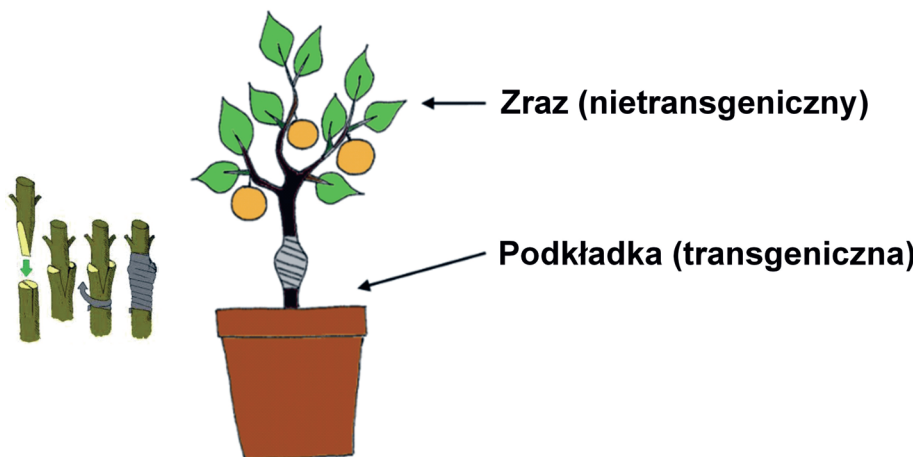
**Ryc. 6.** Technika metylacji DNA zależnej od RNA. Dwuniciowa cząsteczka RNA (dsRNA) jest rozpoznawana przez układ obronny roślin i rozcinana przez enzym DICER na drobne interferujące RNA (siRNA). siRNA mogą oddziaływać na roślinny mechanizm obronny i w rezultacie prowadzić do metylacji DNA, która powoduje wyciszenie genu

je, jest wprowadzenie metylacji DNA prowadzącej do wyciszenia genu. Dlatego też zwolennicy tej technologii uważają, że należy ją wyłączyć z Dyrektywy 2001/18/WE.

### 31. Dlaczego szczepienie rośliny na transgeniczej podkładce (ang. *grafting on GM rootstock*) budzi kontrowersje?

Potomstwo uprawnych odmian drzew i krzewów owocowych rozmnażanych z nasion charakteryzuje się zróżnicowaniem właściwości i zaledwie w niewielkim stopniu dziedziczy cenne cechy rośliny macierzystej. W praktyce sadowniczej stosuje się rozmnażanie wegetatywne, które w krótkim czasie umożliwia otrzymanie dużej liczby osobników identycznych z rośliną mateczną. W ten sposób otrzymuje się potomstwo jednolite pod względem genetycznym, które określa się mianem klonu. Szczepienie lub okulizacja są najtańszą i najszybszą ze wszystkich znanych metod produkcji drzewek i stanowią podstawowy sposób rozmnażania drzew owocowych odmian uprawnych (Hryniewicz-Sudnik i in., 2001; Czynczyk, 2012).

Znanych jest kilkadziesiąt sposobów szczepienia. W wyniku tego procesu otrzymuje się organizm zbudowany z dwóch komponentów genetycznie różnych: zraza (odmiany uprawnej), z którego rozwija się część nadziemna drzewa i podkładki, z której rozwija się system korzeniowy (ryc. 7). Warunkiem dobrego zrastania się zraza i podkładki jest ściśle połączenie ich tkanki twórczej, połączenie wiązek sitowo-naczyniowych, co umożliwi przepływ składników mineralnych z korzeni do korony i produktów fotosyntezy w kierunku odwrotnym.



**Ryc. 7.** Rozmnażanie wegetatywne drzew i krzewów stanowi podstawowy sposób rozmnażania drzew owocowych odmian uprawnych. W wyniku tego procesu otrzymuje się organizm zbudowany z dwóch komponentów genetycznie różnych: zraza (odmiany uprawnej), z którego rozwija się część nadziemna drzewa i podkładki, z której rozwija się system korzeniowy. Między obydwoma częściami rośliny dochodzi do wymiany substancji czynnych, lecz nie dochodzi do wymiany materiału genetycznego. Proponowany rodzaj szczepienia nie prowadzi zatem do tworzenia GMO. Może przyczynić się do poprawy oporności na choroby i poprawy jakości owoców. Rozważa się również aspekty ekonomiczne oczyszczania gleby przed założeniem uprawy (dezynfekcja lub parowanie gleby)

Generalnie, dobrze zrastają się rośliny blisko ze sobą spokrewnione, trudniej różne gatunki należące do tego samego rodzaju, a raczej źle z rodzajów oddalonych pod względem systematycznym. Znane są jednak wyjątki: niektóre odmiany gruszy dobrze zrastają się z pigwą, a renkloda Ulena źle zrasta się z podkładką Marianna, która stosowana jest

dla śliw. Zraz i podkładka organizmu powstałego w wyniku szczepienia wzajemnie na siebie oddziałują, a stopień zrośnięcia ma duży wpływ na procesy fizjologiczne, aktywność enzymatyczną i skład chemiczny związków organicznych. Zasadnicze znaczenie dla najważniejszych dla praktyki sadowniczej właściwości drzewa ma metoda otrzymania podkładki. Podkładki generatywne są niejednolite pod względem genetycznym i w różnym stopniu wpływają na siłę wzrostu, wczesność owocowania, plenność, wytrzymałość na mróz oraz oporność na choroby i szkodniki nowego organizmu. Stąd nie można przewidzieć, jak rozwiną się te cechy szczepionych drzew. Podkładki otrzymane w wyniku rozmnażania wegetatywnego rośliny matecznej są jednolite genetycznie i dają po zaszczepieniu materiał wyrównany pod względem siły wzrostu, okresu kwitnienia, plenności i wytrzymałości na mróz. W wyniku szczepienia rzadko może dojść do połączenia się różnicujących komórek zraza i podkładki, z których rozwijają się pędy. Organizmy roślinne rozwijające się z pędów wytworzonych przez genotypowo niejednorodne wierzchołki noszą miano chimer roślinnych. W zależności od wzajemnego ułożenia komponentów genotypowych rozwijają się chimery roślinne peryklinalne, sektorialne lub meryklinalne. Komponenty chimer roślinnych mogą się różnić gatunkowo lub nawet rodzajowo, na przykład: +*Laburnocytisus adamii*, +*Crataegomespilus*. Potomne rośliny o cechach chimer można otrzymać w wyniku rozmnażania wegetatywnego. W wyniku rozmnażania generatywnego powstają rośliny charakteryzujące się cechami tylko jednego z gatunków wyjściowych.

### **32. Czy odwrócona hodowla (ang. *reverse breeding*) prowadzi do uzyskania GMO?**

Nowy kierunek w hodowli roślin stanowi odwrócona hodowla (ang. *reverse breeding*), która pozwala na produkcję nowych odmian hybrydowych roślin w dużo krótszym okresie i z wykorzystaniem mniejszej liczby krzyżowań w porównaniu do konwencjonalnych technik hodowli roślin. W odwróconej hodowli wybiera się pojedynczą roślinę charakteryzującą się unikatową cechą. Przez zablokowanie prawidłowego procesu rekombinacji genetycznej z rośliny uzyskuje się homozygotyczne linie rodzicielskie. Krzyżowanie tych linii doprowadza do odtworzenia oryginalnego układu genetycznego rośliny, z której linie zostały uzyskane. Podczas odwróconej hodowli stosuje się genetyczną modyfikację w celu zablokowania genetycznej rekombinacji, a uzyskane w ten

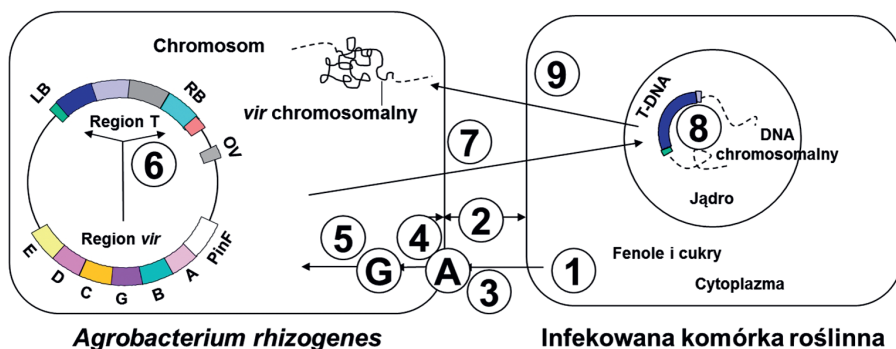
sposób rośliny podlegają przepisom o organizmach GMO (Dyrektywa Europejska 2001/18/WE). Jednak linie rodzicielskie oraz uzyskane ostateczne odmiany nie zawierają modyfikacji genetycznych i nie podlegają ograniczeniom prawnym dotyczącym GMO.

W praktyce odwrócona hodowla może znaleźć zastosowanie do uzyskiwania heterozygotycznych hybrydowych odmian roślin charakteryzujących się pełnym wigorem hybrydy, co przy użyciu klasycznych metod hodowlanych byłoby trudne i wymagało dużych nakładów czasowych. Klasycznie uzyskiwane heterozygotyczne hybrydy nie mogą być stabilnie utrzymywane przez hodowców z powodu zjawiska rekombinacji genetycznej chromosomów. Do tej pory hodowcy odtwarzali wciąż na nowo hybrydy o wyjątkowo korzystnych parametrach przez krzyżowanie homozygotycznych linii rodzicielskich (tzw. hodowla „do przodu”). Odwrócona hodowla umożliwia przygotowanie homozygotycznych linii rodzicielskich, które następnie przez wzajemnie krzyżowane odtwarzają dokładnie wybrany heterozygotyczny hybryd. Te homozygotyczne linie rodzicielskie mogą być w nieograniczony sposób rozmnażane przez hodowców. Ponieważ proces odwróconej hodowli nie stosuje rekombinowanego DNA, homozygotyczne linie rodzicielskie oraz ich potomstwo nie są transgeniczne. Odmiany uzyskiwane tą metodą są podobne do tych, które mogą być tworzone przez konwencjonalne techniki hodowlane.

### 33. Czy agroinfiltracja (ang. *agro-infiltration*, *agro-inoculation*, *floral dip*) prowadzi do powstania GMO?

Agroinfiltracja to metoda stosowana w biotechnologii roślin w celu wywołania przejściowej lub stałej ekspresji genów w roślinie lub jej częściach w warunkach laboratoryjnych lub polowych. Badania mogą być prowadzone zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* w celu wytworzenia określonego białka. W metodzie konieczne jest zastosowanie wektora, którym może być bakteria *Agrobacterium tumefaciens*. Metody wektorowe definiuje się jako transformację roślin przy użyciu gram ujemnych bakterii glebowych z rodzaju *Agrobacterium*. Podstawą w tym sposobie transformacji jest wykorzystanie bakterii będących bezpośrednią przyczyną guzowatości szyjki korzeniowej (*A. tumefaciens*, *A. vitus*), guzowatości trzciny (*A. rubi*) lub tworzenia korzeni włóśnikowatych (*A. rhizogenes*). Bakterie z tego rodzaju potrafią przenosić do komórek roślinnych tzw. transferowy DNA (T-DNA), a zlokalizowane w nim geny mogą ule-

gać ekspresji, prowadząc do transformacji rośliny. Warunkiem powodzenia transformacji genetycznej jest zaistnienie szeregu czynników w komórce roślinnej, a także opóźnienie bądź zahamowanie reakcji obronnych (ryc. 8). *Agrobacterium* to jedyny znany przykład takiego rodzaju transferu kwasu nukleinowego między przedstawicielami dwóch królestw. Ponadto zasięg infekcji rekombinowanymi szczepami tych bakterii pozwala na genetyczne modyfikacje szerokiego spektrum organizmów i nie ogranicza się tylko do królestwa roślin. Wykazano, że *Agrobacterium* zdolne są do transformacji drożdży, grzybów, zarodków jeźowców, a nawet komórek człowieka. Użycie wektorowych metod transformacji stało się cennym narzędziem do najczęściej przejściowej czy konstytutywnej (stałej) transgenezy roślin i stanowi kluczową rolę zarówno w badaniach podstawowych (genomika funkcjonalna), jak i aplikacyjnych (agrobiotechnologia, *biopharming*).



**Ryc. 8.** Schemat transformacji komórki roślinnej przez *A.rhizogenes*. Badacze odwzorowali infekcję bakteryjną zachodzącą w sposób naturalny, głównie u roślin dwuliściennych. Bakteria może przekazać do komórki roślinnej swój T-DNA (transferowy DNA), który może być zmodyfikowany przez dołączenie DNA kodującego określoną cechę. DNA może w sposób trwały integrować z genomowym DNA rośliny i dochodzić do przejściowej lub stałej ekspresji określonej cechy: 1 – związki chemotaktyczne, 2 – ściany komórkowe, 3 – A, receptory błonowe *Agrobacterium* kodowane przez gen A, 4 – G, białka aktywujące region vir, 5 – białko wiążące DNA, 6 – region T plazmidu, 7 – sekwencje graniczne T-DNA, 8 – nić T zintegrowana z genomem komórki roślinnej, 9 – produkty genów opinowych

Zawiesinę *Agrobacterium* wprowadza się do liści roślin przez biolistykę lub infiltrację próżniową, lub wprowadzane są do unieruchomionych na podłożu komórek roślinnych, przy czym bakterie przenoszą określony gen do komórki roślinnej poprzez T-DNA. Główną zaletą agroinfiltracji w porównaniu do bardziej tradycyjnych transformacji roślin jest szybkość i wygoda, chociaż wydajność otrzymywania rekombinowanego białka jest na ogół wyższa i bardziej stabilna.

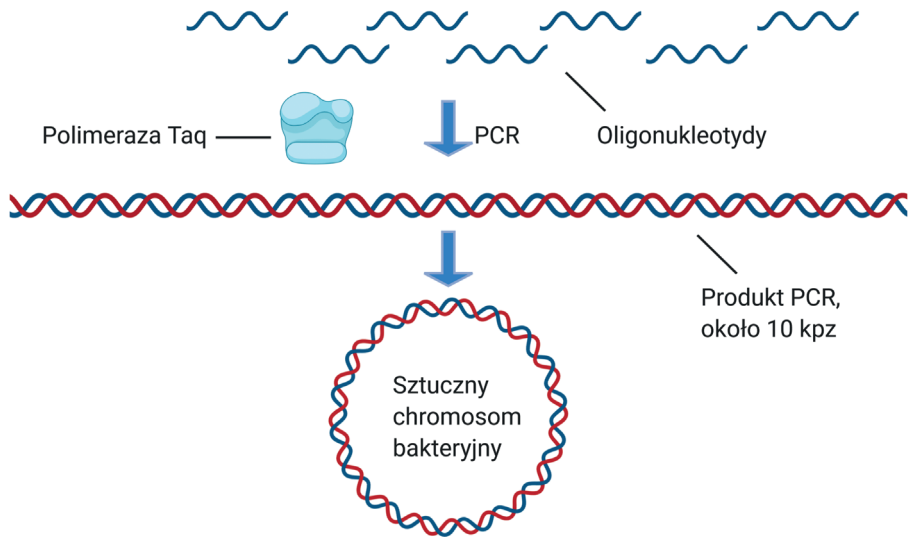
Zwolennicy agroinfiltracji uważają, że transformowane są jedynie części roślin, a materiał genetyczny nie jest włączany do genomu komórek rozrodczych i nie jest przenoszony do komórek potomstwa, a więc nie można uważać transformowanych roślin jako roślin GMO. Zwolennicy uważają, że za pomocą tej techniki można będzie szybciej uzyskać oporność na zakażenia wirusowe.

### 34. Jakie znaczenie ma syntetyczna genomika (ang. *synthetic genomics*) i dlaczego zaliczana jest do NBT?

Syntetyczna genomika to interdyscyplinarna część biologii i inżynierii, która łączy obszary biotechnologii, biologii ewolucyjnej, biologii molekularnej, biologii systemów, biofizyki, inżynierii komputerowej i inżynierii genetycznej. Syntetyczna genomika używa technik inżynierii oprogramowania, bioprzetwarzania, bioinformatyki, chemii analitycznej, fermentacji, optymalizacji komórek i syntezy DNA, aby projektować i budować systemy biologiczne (ryc. 9). Obejmuje zagadnienia dotyczące zrównoważonych biopaliw, upraw opornych na owady, narządów do przeszczepów, specjalistycznych leków, narzędzi syntezy DNA, a także szeregu odczynników biologicznych.

W odróżnieniu od klasycznej inżynierii genetycznej genomika syntetyczna kładzie duży nacisk na racjonalne projektowanie nowych systemów oraz intensywne wykorzystanie technik modelowania matematycznego w celu przewidzenia zachowania się układu oraz optymalizacji jego działania.

Przykładem osiągnięć genomiki syntetycznej jest uzyskanie sztucznej bakterii *Mycoplasma laboratorium* (381 genów), która została zaprojektowana z genomu *Mycoplasma genitalium*. W tym osiągnięciu uczestniczył zespół 20 naukowców pod przewodnictwem laureata Nagrody Nobla, Hamiltona Smitha w Instytucie Craiga Ventera. *Mycoplasma genitalium* była uważana za gatunek o najmniejszej liczbie genów umożliwiających samodzielne funkcjonowanie (482 geny). Innym przykładem



**Ryc. 9.** Technologia syntetycznej genomiki na podstawie opracowanej informatycznie sekwencji pozwala uzyskać z 4 nukleotydów pełną sekwencję tworzącą sztuczny, ale zdolny do samodzielnego funkcjonowania organizm czy strukturę

jest zsyntetyzowanie genomu bakterii *Mycoplasma mycoides* na podstawie komputerowej bazy danych. Syntetyczny genom przeszczepiono do komórki bakterii *Mycoplasma capricolum*, z której usunięto jej DNA. Nowa bakteria okazała się w pełni funkcjonalna i zachowała proces replikacji, czyli namnażania miliardy razy. Niektórzy badacze kwestionują osiągnięcie jako nie w pełni syntetyczne, ponieważ do tworzenia nowej bakterii wykorzystali żywą komórkę. W rozumieniu Ustawy genomikę syntetyczną należy zaliczyć do technik generujących GMO, dlatego że do komórek wprowadzany jest obcy DNA.

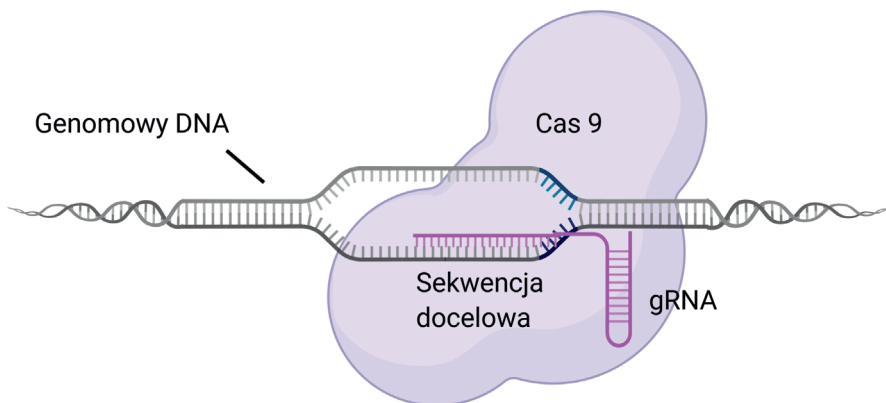
**35.** Czy technologia zgrupowanych regularnie rozproszonych krótkich powtarzających się sekwencji palindromowych CRISPR/Cas9 (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) dokonała rewolucji we wprowadzaniu zmian w genomach?

Technologię CRISPR/Cas9 (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) opracowano na podstawie systemu obronnego organizmów prokariotycznych, w którym sekwencja CRISPR obejmująca sekwencję



kierującą gRNA (ang. *guide RNA*) umożliwia komplementarne wiązanie się z obcym dla komórki genomem wirusowym. Jednocześnie dochodzi do uaktywnienia enzymu Cas9 zasocjowanego z CRISPR (ang. CRISPR-*associated enzymes*, Cas), który wykazując aktywność nukleazy, przecina DNA wirusa, chroniąc bakterie przed infekcją. Sekwencja rozpoznająca DNA wirusa może zostać zastąpiona przez inną, określoną sekwencję. W 2012 roku dwie grupy badawcze opublikowały wyniki wskazujące, że oczyszczone białko Cas9, pochodzące ze *Streptococcus thermophilus* lub *Streptococcus pyogenes*, może być kierowane przez RNA CRISPR (crRNAs), przecinając docelowy DNA w warunkach *in vitro* (Gasiunas i in., 2012; Jinek i in., 2012). Ponadto składniki RNA systemu CRISPR/Cas9 mogą być użyte oddzielnie jako zawierające crRNA (celowana sekwencja sterująca) i stałe (niezmienne) cząsteczki tracrRNA lub jako pojedyncza sterująca chimera RNA (sgRNA) składająca się z crRNA i tracrRNA, ułatwiająca szybkie włączenie systemu CRISPR/Cas9 do genomu. Rozpoznanie sekwencji docelowej w DNA przez Cas9 wymaga zarówno określonej sekwencji w docelowym DNA, jak i zachowania komplementarności zasad pomiędzy 20 nukleotydową sekwencją sterującą RNA a komplementarną sekwencją docelową DNA. Wygenerowane przez system Cas9 specyficzne, dwuniciowe miejsca złamań DNA (ang. *double strand breaks*, DSB) indukują endogenne procesy naprawcze DNA, które mogą być wykorzystane do inżynierii genomu. DSB są na ogół naprawiane przez jeden ze szlaków – homologicznie kierowaną naprawę (ang. *homology-directed repair*, HDR), jeśli dostępna jest homologiczna matryca, lub w przeciwnym przypadku przez niehomologiczne łączenie końców (ang. *non-homologous ends joining*, NHEJ). NHEJ jest procesem podatnym na błędy, który może szybko łączyć (ligować) złamane końce, ale często prowadzi do powstania małych insercji i delecji (ang. *indels*) w docelowych miejscach, których efektem często jest zakłócenie lub zniesienie funkcji docelowego genu. Alternatywnie DSB mogą być również naprawiane przez HDR, która ma zdolność rekombinacji egzogenego DNA i może być stosowana do wprowadzania transgenów lub do precyzyjnej edycji genomu (ryc. 10).

Wcześniejsze technologie do wprowadzania pęknięć dwuniciowych w DNA, takie jak nukleazy palca cynkowego (ZFN) oraz nukleazy TALEN, polegały na fuzji produktu niespecyficznego cięcia DNA nukleazą restrykcyjną *FokI* z domeną wiążącą DNA o specyficznych sekwencjach pochodzącą z białek ZF i TALEN. Technologie ZFN i TALEN wymagają zaprojektowania białek dla każdego nowego miejsca docelowego, co jest czasochłonne i bardzo drogie. Dla kontrastu w technologii



**Ryc. 10.** Edycja genomu za pomocą technologii CRISPR/Cas9. Kierująca RNA (ang. *guide RNA*, gRNA) posiada fragment komplementarny do sekwencji docelowej oraz gen lub jego fragment, który ma być włączony w genom. Przez wnikięcie do komórki nukleazy Cas9 i gRNA dochodzi do rozcięcia nici DNA w ściśle określonym regionie, dzięki czemu może dojść do usunięcia genu występującego w komórce lub dodania nowego genu

CRISPR-Cas9 celowanie w nowe miejsce wymaga jedynie zaprojektowania odpowiedniego sgRNA (ang. *single guide RNA*), ponieważ białko Cas9 pozostaje niezmiennie we wszystkich przypadkach. Ponadto ekspresja Cas9 i wielokrotne sterujące RNA mogą być użyte w jednoczesnej edycji kilku miejsc docelowych w genomie (Cong i in., 2013). Technologia CRISPR/Cas9 jest łatwa do zaprojektowania i przeprowadzenia, wysokowydajna i niskonakładowa. Przykładowe protokoły do przygotowania odczynników CRISPR/Cas do stworzenia genetycznie modyfikowanych myszy zostały opisane przez Harmsa i in. (2014).

### 36. Czy technologia CRISPR/Cas jest bezpieczna?

W 2015 r. technologia CRISPR/Cas jako *Adaptive Bacterial Immune System on its Way to Become a Game Changer in Genetic Engineering*<sup>4</sup> stanowiła

<sup>4</sup> Invernizzi C. CRISPR/Cas. An Adaptive Bacterial Immune System on Its Way to Become a Game Changer in Genetic Engineering. BWC Meeting of Experts Standing Agenda Item: Science & Technology Wednesday, 12 August 2015 Palais des Nations, UN Geneva. [http://www.unog.ch/80256EDD006B8954/\(httpAssets\)/A60F7B2106175E24C1257E9F0065DDEF/\\$file/Swiss\\_presentation\\_BWC\\_MX\\_2015\\_S&T-CRISPR\\_INC.pdf](http://www.unog.ch/80256EDD006B8954/(httpAssets)/A60F7B2106175E24C1257E9F0065DDEF/$file/Swiss_presentation_BWC_MX_2015_S&T-CRISPR_INC.pdf)

jeden z tematów Konwencji o Zakazie Stosowania Broni Biologicznej – konferencji ekspertów ONZ w Genewie (ang. *Biological Weapons Convention, BWC. Meeting of Experts of United Nations Geneva*). Przyczyną było pojawienie się raportów o możliwościach podwójnego (ang. *dual use*) wykorzystania tej technologii. Prezentacje dotyczące technologii CRISPR/Cas9 spotkały się z wielkim zainteresowaniem wśród delegacji poszczególnych krajów, ale wzbudziły też zaniepokojenie. Niepokój był spotęgowany przez artykuły wskazujące na możliwość wykorzystania tej technologii do wywołania nowotworu u myszy w celu stworzenia modelu dla raka płuc człowieka (Maddalo i in., 2014). Dostarczenie myszom składników CRISPR/Cas przez inhalację przy zastosowaniu adenowirusów spowodowało w łatwy sposób powstanie nowotworów płuc u tych zwierząt już po kilku tygodniach. Większym niepokojem napawa fakt, jak łatwo i szybko można indukować nowotwory w różnych tkankach i organizmach stosując tę technologię i jakiego rodzaju konsekwencje będą związane z niewłaściwym zaprojektowaniem lub wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9.

Na początku 2016 roku naukowcy pracujący nad technologią CRISPR/Cas na konferencji w miejscowości Napa w Kalifornii wystosowali apel, który zamieściło pismo „Science”, aby rozważyć i szczegółowo przedyskutować tę technologię, zanim zostanie szerzej zastosowana u ludzi, szczególnie do wprowadzenia zmian w komórkach rozrodczych. Podkreślono, że konsekwencje takich działań są trudne do przewidzenia i oceny, ponieważ dotyczyłyby całych pokoleń, a więc znacząco długich okresów. W roku 2015 takich apeli było znacznie więcej. Podobny apel w 1974 r. dotyczył rekombinowanych (sztucznie połączonych) fragmentów DNA, gdy Paul Berg i inni badacze wystosowali apel nawołujący „naukowców na całym świecie” do zawieszenia niektórych typów badań do chwili, gdy zostanie oszacowane związane z nimi ryzyko (Berg i in., 1974). Jednakże mimo wielu obaw nie udało się zatrzymać badań, które wkrótce doprowadziły do nowych, wielkich odkryć i osiągnięć w dziedzinie biologii, rolnictwa i medycyny. Co ciekawe, Paul Berg podpisał obydwie apele, z 1974 i 2015 r. (Baltimore i in., 2015).

Technologia CRISPR/Cas9 jest wydajnym, tanim oraz łatwym do stosowania narzędziem edycji genomu, które zaczyna być szybko wykorzystywane w wielu dziedzinach, włączając tworzenie modeli zwierzęcych, funkcjonalne przesiewanie genomowe oraz naprawę zaburzeń genetycznych. Jednak technologia ta musi być wykorzystywana ostrożnie. Należy wziąć pod uwagę planowanie doświadczeń CRISPR/Cas,

precyzyjne zaprojektowanie gRNA (kierujący/sterujący RNA), wybranie najlepszego wariantu nukleazy Cas oraz poszukiwanie w obszarze genu potencjalnych miejsc modyfikacji. Naukowcy powinni być bardzo ostrożni w planach stosowania tej potężnej technologii. Tylko wtedy będzie można bezpiecznie stosować system CRISPR/Cas9.

### 37. Czym jest broń biotechnologiczna i jak się ją kontroluje?

Terminy takie jak broń chemiczna czy też broń bakteriologiczna istnieją od dawna. Katastrofalne przykłady zastosowań takiej broni znane są chociażby z bieżącej prasy, na przykład użycie toksycznego gazu w metrze tokijskim w 1995 roku. Powszechne są także obawy przed ewentualnym zastosowaniem broni bakteriologicznej. Obawy te są bardzo aktualne w związku z zamachami terrorystycznymi, jakie miały miejsce 11 września 2001 r. w Stanach Zjednoczonych.

Nową groźbą jest możliwość zastosowania technik inżynierii genetycznej w celu wyprodukowania transgenicznych organizmów (np. bakterii albo roślin). Należy przede wszystkim zauważyć, że obecnie znacznie tańsza i mniej skomplikowana technologicznie jest produkcja broni chemicznej, a toksyn możliwych do syntezy jest niestłuchanie wiele. Nie można jednak wykluczyć zainteresowania jakiejś grupy terrorystycznej wyrafinowaną bronią otrzymywaną z wykorzystaniem nowoczesnych technik inżynierii genetycznej. Obawy takie są uzasadnione zarówno w odniesieniu do jednostek patologicznych opętanych jakąś manią, jak i – niestety – do rządów niektórych państw, które deklarują zainteresowanie „cudowną tajemniczą bronią, która rzuci ich wrogów na kolana”.

Społeczność międzynarodowa stara się zapobiec takim groźbom przez odpowiednie porozumienia, które stanowią podstawę do kontroli importu/eksportu zarówno substratów, półpreparatów, jak i znajomości technologii (*know-how*). Polska uczestniczy w procesach integracji europejskiej i jest członkiem NATO. Jednym z warunków przynależności do tych organizacji międzynarodowych jest kontrola towarów i technologii uznanych przez komisje ekspertów za dobra „podwójnego zastosowania” (ang. *dual use*), czyli takie, które mogą zostać wykorzystane do produkcji lub przenoszenia broni masowego rażenia. Polska jest jednocześnie stroną szeregu traktatów i porozumień międzynarodowych, z których wynikają zobowiązania naszego kraju w zakresie kontroli, na przykład transportu międzynarodowego pewnych towarów, technologii i usług.

W roku 1949 powstał Komitet Koordynacyjny Wielostronnej Kontroli Eksportu (COCOM), który koordynował działania 17 przemysłowych państw zachodnich w celu ograniczenia dostępu innych, w tym Polski, do nowoczesnych technologii. W konsekwencji przemian społeczno-politycznych w 1989 r. nastąpiło zasadnicze złagodzenie ograniczeń w odniesieniu do Polski (oraz Węgier i byłej Czechosłowacji). W 1994 r. COCOM został rozwiązany. W wyniku dobrowolnego porozumienia państw już w 1985 r. utworzona została „Grupa Australijska” (*Australia Group, AG*) – dobrowolne stowarzyszenie blisko 30 państw pracujących na zasadzie konsensusu opinii w zakresie ograniczeń importowo/eksportowych potencjalnie niebezpiecznych towarów i technologii. Polska została przyjęta do „Grupy Australijskiej” w listopadzie 1994 r. Członkami Grupy są: Argentyna, Australia, Austria, Belgia, Bułgaria, Kanada, Chorwacja, Cypr, Czechy, Dania, Estonia, Komisja Europejska, Finlandia, Francja, Niemcy, Grecja, Węgry, Islandia, Irlandia, Włochy, Japonia, Korea Południowa, Łotwa, Litwa, Luksemburg, Malta, Holandia, Nowa Zelandia, Norwegia, Polska, Portugalia, Rumunia, Słowacja, Słowenia, Hiszpania, Szwecja, Szwajcaria, Turcja, Ukraina, Wielka Brytania i Stany Zjednoczone. Skutkiem przynależności Polski do „Grupy Australijskiej” jest ustanowienie dodatkowych wymogów w zakresie kontroli obrotu z zagranicą towarami i technologiami. Ponadto została opracowana i opublikowana lista towarów i usług objętych stosowną kontrolą, która obejmuje związki chemiczne (tzw. prekursorzy do syntez chemicznych), toksyny, bakterie, wirusy i inne formy patogenne, w tym na przykład plazmidy, a także urządzenia i technologie, które mogą mieć zastosowanie do prac badawczych i wdrożeniowych oraz do produkcji broni chemicznej i bakteriologicznej, włącznie z nowoczesnymi technikami inżynierii genetycznej.

Zagadnienia związane z wykorzystaniem osiągnięć nauki jako broni biologicznej poruszane są również na spotkaniach Konwencji o Broni Biologicznej (ang. *Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on their Destruction, Biological Weapons Convention, BWC*). Traktat zakazujący sygnatariuszom opracowywania, produkcji i magazynowania broni biologicznej i toksycznej został podpisany 10 kwietnia 1972 r. w Londynie, Moskwie i Waszyngtonie i zaczął obowiązywać od 26 marca 1975 r. po ratyfikacji przez 22 państwa, w tym także Polskę. Obecnie, w październiku 2020 r. liczba państw, które ratyfikowały Konwencję, wynosi 183, jednak brak jest formalnego systemu weryfikacji monitorowania zgodności z założeniami Konwencji, co ogranicza jej skuteczność.

### 38. Czy osiągnięcia nauki można wykorzystać przeciw człowiekowi?

Przyjmuje się, że każde odkrycie czy osiągnięcie naukowe wykazuje potencjał do zastosowania jako broń biologiczna/biotechnologiczna. Do takiej sytuacji może dojść w związku z pojawieniem się w sposób naturalny epidemii, na przykład w przypadku ptasiej grypy, wirusa Ebola czy obecnie wirusa SARS-CoV-2. Badania mogą wywołać niezamierzone konsekwencje – czynniki niebezpieczne mogłyby zostać uwolnione przypadkowo z laboratorium przez zainfekowany personel. Zakłada się też możliwość zaniedbań ze strony człowieka. Kolejny poziom związany jest z wandalizmem i świadomym sabotażem oraz zamierzonym, przemyślanym zastosowaniem broni biologicznej. Powszechna dostępność wiedzy może pomóc w tworzeniu „nowych” patogenów o unikalnych właściwościach lub w tworzeniu zupełnie nowych klas czynników zagrożeń, a niebezpieczne czynniki można ukraść lub zastosować w celach innych niż pokojowe. Już w 2009 r. w „Biological Weapons Reader” przewidywano, że w XXI wieku nastąpi epoka biologiczna, która będzie rywalizowała z rewolucjami w technologii informacyjnej, chemii przemysłowej i procesach produkcyjnych. Takie osiągnięcia, zapowiadane jako przynoszące niezrównane korzyści dla ludzkości, ostatecznie zostały wykorzystane do wrogich celów. Wiemy, że niektóre organizacje już używały biologii przeciwko ludziom czy środowisku. Musimy usilnie pracować, by „stulecie biologii” nie doprowadziło do nowego biologicznego wyścigu zbrojeń. Spośród bakterii mających potencjał do wykorzystania jako broń biologiczna należą: bakterie węglik *Bacillus anthracis*, bakterie wywołujące brucellozę *Brucella* spp., nosaciznę *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, ornitozę *Chlamydophila psittaci*, gorączkę Q *Coxiella burnetii*, sepsę *Francisella tularensis*, tyfus *Rickettsia prowazekii*, czerwonek *Shigella* spp., cholere *Vibrio cholerae*, dżumę *Yersinia pestis*. Wśród wirusów, które można zastosować jako broń, wymienia się: wirusa gorączki doliny Rift (*Bunyviridae*), wirusa Ebola, wirusa japońskiego zapalenia mózgu (*Flaviviridae*), wirusa Machupo, Marburg, a także wirusa żółtej febry oraz wirusa ospy (wirus Variola). Spośród toksyn wymieniane są rycyna, enterotoksyna B gronkowcowa, toksyna botulinowa, saksytoksyna i wiele mykotoksyn.

### 39. Jak spotkania ekspertów ONZ w ramach konwencji o zakazie stosowania broni biologicznej chronią przed rozpowszechnieniem broni biologicznej?

Program „Sprzymierzone owady” (*Insect Allies*) ogłoszony przez Amerykańską Agencję Zaawansowanych Projektów Badawczych (*U.S. Defense Advanced Research Projects Agency*, DARPA) w listopadzie 2016 r., uzyskał dotację w wysokości 27 mln dolarów na kontrakty badawcze. W lipcu 2017 r. pierwsze z trzech konsorcjów ogłosiło, że otrzymało od DARPA zamówienie na opracowanie systemów rozprzestrzeniania genetycznie zmodyfikowanych wirusów przez owady. Są to kontrakty na ukończenie czteroletniego programu, którego efektem będzie wykazanie na dużą skalę, w warunkach szklarniowych, działania poziomych czynników zmiany genetycznej w środowisku, HEGAA (ang. *horizontal environmental genetic alteration agents*). W prowadzonych badaniach wykorzystuje się rośliny kukurydzy i pomidora, a owadami rozprzestrzeniającymi są skoczki liściowe, mączliki i mszyce.

Ostatnie spotkania ekspertów konwencji o zakazie stosowania broni biologicznej (ang. *Biological Weapon Convention*, BWC) odbyły się w Pałacu Narodów w Genewie od 29 lipca do 8 sierpnia 2019 r. Towarzystwo Maxa Plancka przygotowało nowe informacje pt. „Wirusy. Celowe uwalnianie wirusów GM do środowiska”, wsparte animacjami i dyskusją panelową pod przewodnictwem Filipy Lentzos (King’s College London). Guy Reeves, współautor i biolog z Instytutu Biologii Ewolucyjnej Maxa Plancka w Niemczech, uważa, że nowa technologia jest bardziej realna jako broń – do niszczenia roślin – niż jako narzędzie rolnicze. W rezultacie DARPA (*U.S. Defense Advanced Research Projects Agency*) może wysłać alarmującą wiadomość niezależnie od swoich zamiarów.

Program *Insect Allies* jest pierwszym, w którym zaproponowano i sfinansowano uzyskanie wirusów z zastosowaniem poziomych czynników zmiany genetycznej w środowisku (HEGAA), które zostały genetycznie zmodyfikowane w celu uzyskania zdolności do edycji chromosomów gatunku docelowego (np. rośliny lub zwierzęcia) po celowym uwolnieniu do środowiska. Słowo „poziome” pochodzi od zdolności wirusów do przenoszenia się w środowisku przez infekcję, a słowo „środowiskowy” dotyczy zamiaru rozprzestrzeniania się tych genetycznie zmodyfikowanych wirusów w środowisku. Określenie „czynniki zmiany genetycznej” odnosi się do zdolności do zmiany w chromosomach gatunku docelowego. Może to być spowodowane przypadkową mutacją lub wprowadze-

niem nowej sekwencji DNA. Specyficzność HEGAA zależy od dwóch czynników: występowania gatunków, które mogą zakażać genetycznie zmodyfikowanym wirusem, oraz obecności odpowiednich sekwencji DNA w chromosomach zakażonych komórkach roślinnych.

Niedawne postępy w edycji genów, w tym stosunkowo tani i prosty system CRISPR (dla zgrupowanych, regularnie rozproszonych, krótkich, powtarzających się sekwencji palindromowych), mogą potencjalnie pozwolić badaczom na dostosowanie wirusów do konkretnego celu w zakażonej roślinie. Skonstruowany wirus może włączać lub wyłączać określone geny, które na przykład regulują tempo wzrostu rośliny, co staje się przydatne podczas nieoczekiwanej ciężkiej suszy. Projekt *Insect Allies* budzi obawy związane z możliwością wykorzystania bioterrorystycznego. Naukowcy i prawnicy kwestionują uzasadnienie wykorzystania owadów do rozprzestrzeniania zakaźnych wirusów genetycznie zmodyfikowanych w celu edycji chromosomów w roślinach, ostrzegając, że technologię można bardzo łatwo wykorzystać jako broń biologiczną.

Dlaczego twierdzimy, że prawie zawsze łatwiej jest opracować system broni biologicznej HEGAA niż system rolniczy? Aby wyobrazić sobie rutynowe zastosowanie HEGAA w rolnictwie, konieczne będzie zbudowanie wielu mechanizmów kontrolujących przestrzenne i taksonomiczne rozprzestrzenianie się wirusów, co będzie skomplikowane. Natomiast opracowując broń biologiczną, można pominąć większość „zabezpieczeń” lub „niezależnych wyłączników awaryjnych”, jeśli nie wszystkie. Przydatne ukierunkowanie edycji genów na uprawy wrogów zapewnia specyficzność sekwencji DNA przewodniczących RNA (*guide RNA*) używanych przez CRISPR. Chociaż zniszczenie lub sterylizację rośliny można prawdopodobnie osiągnąć, wyłączając pojedynczy gen, to bardziej złożone cechy będą prawdopodobnie wymagały wstawienia nowych genów do chromosomów roślin (przykłady wielokrotnie prezentowane obejmują oporność na suszę, mróz, powódź, zasolenie, herbicydy i choroby roślin). W większości przypadków niszczenie genów jest ponad 1000 razy bardziej skuteczne niż insercje genów.

Dlaczego zastosowania wirusów wymagają funkcjonalnej kontroli ponadnarodowej? Jeśli weźmiemy przykład uwolnienia wirusów w celu kontrolowania populacji królików (nie były to wirusy modyfikowane genetycznie), wówczas liczba zatwierdzonych uwolnień wirusów jest ograniczona przez inne rodzaje przemieszczeń międzynarodowych (z których niektóre są międzykontynentalne). Jeśli wirus zakaźny postrzega się jako skuteczny i użyteczny, w wielu okolicznościach rozsądne jest



założenie, że zostanie on przeniesiony bez zgody (Angulo i Cooke, 2002).

Użycie horyzontalnych czynników środowiskowych zmiany genetycznej (HEGAA) prawdopodobnie nie będzie ostatecznie ograniczone do rolnictwa, dlatego tak ważna jest otwarta dyskusja na temat technologii, jej potencjalnych zastosowań, nadużyć i konsekwencji – w tym niezamierzonych. W 2018 r. w trzech publikacjach naukowych omówiono rozwój „samoprenoszących się szczepionek”, tj. szczepionek, które byłyby przenoszone między ludźmi i dlatego nie wymagałyby już szczepień indywidualnych. Takie produkty eliminowałyby również możliwość świadomej zgody, co stwarza naprawdę ogromny dylemat etyczny. W ostatnim dziesięcioleciu co najmniej siedem prac naukowych dotyczyło szczepionek zakaźnych.

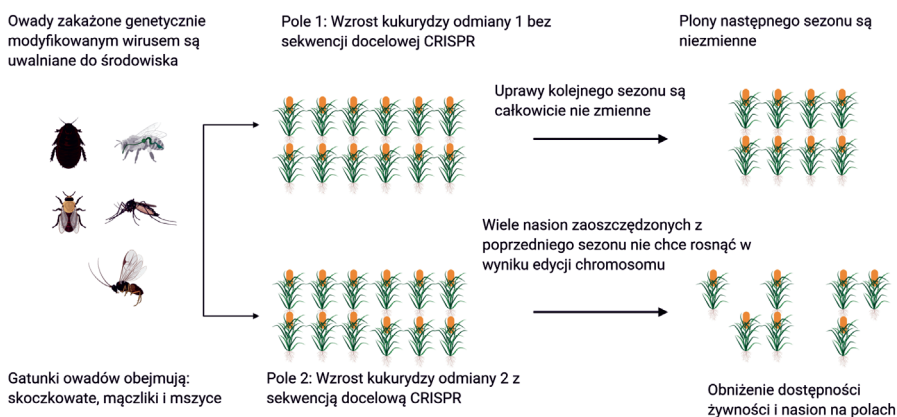
Badacze zwracają również uwagę na oczywistą kwestię, że owady nie będą w stanie odróżnić upraw tradycyjnych od upraw ekologicznych z certyfikatem, które nie pozwalają na stosowanie inżynierii genetycznej. Tylko w jaki sposób rolnicy ekologiczni mają powstrzymać te owady (wektory) przed modyfikowaniem ich upraw? Nie mogą, a to może skutecznie zniszczyć przemysł organiczny, jaki znamy. Inżynieria genetyczna umożliwia teraz projektowanie żywych szczepionek wirusowych, które są potencjalnie przenoszone. Niektóre projekty modyfikują tylko pojedynczy genom wirusa, aby ulepszyć odwieczną metodę atenuacji, podczas gdy inne projekty tworzą chimery genomów wirusa. Przeniesienie ma tę zaletę, że zwiększa odporność ponad tę, którą uzyskuje się przez bezpośrednie szczepienie, ale także zwiększa możliwość ewolucji szczepionki, co zwykle osłabia jej użyteczność. Podejścia które integrują inżynierię szczepionek ze zrozumieniem ewolucji i epidemiologii, przyniosą największe korzyści z przenoszenia szczepionek.

Inżynieria genomu wirusów otworzyła nowe możliwości dla żywych szczepionek – przenoszenia między żywicielami. Szczepionka może być przeznaczona dla ludzi lub dzikich zwierząt, a przeniesienie może być celowe lub przypadkowe. Oprócz obiekcji społecznych co do przenoszenia szczepionek u ludzi, istnieje kilka problemów biologicznych, które mogą prowadzić do niezamierzonych konsekwencji lub nieskuteczności szczepionki. Wykorzystanie możliwych korzyści szczepionek przenoszonych będzie wymagało współpracy między epidemiologami, biologami ewolucyjnymi i inżynierami genomu.

HEGAA może uwzględniać zastosowanie edycji genów somatycznych. Genomy roślin uprawnych podatne na infekcje mogą być mo-

dyfikowane, gdy obecny jest określony cel w chromosomie. Nawet uwzględniając przyszły rozwój technologiczny w edycji genów, jest mało prawdopodobne, aby wszystkie rośliny na polu otrzymały taką samą modyfikację w zamierzonym miejscu docelowym chromosomów. Różni się to od specyficznych modyfikacji genetycznych generowanych w laboratorium i związanych z nimi opisów ich właściwości.

HEGAA z możliwością edycji genów linii germinalnej polega na wprowadzeniu zmian w plazmie zarodkowej upraw i może znacznie skomplikować wysiłki na rzecz ochrony globalnie krytycznego zasobu, który od czasów starożytnych odgrywał fundamentalną rolę w zabezpieczeniu na przyszłość. Nie zawsze będzie można z całą pewnością stwierdzić, które rośliny lub pola zostały zainfekowane genetycznie zmodyfikowanym wirusem (z powodu nieuniknionej niepewności co do przemieszczania się owadów i podatności upraw na infekcję wirusową). Byłby to szczególnie krytyczny problem na obszarach, na których produkuje się nasiona do ponownego siewu (ryc. 11).



**Ryc. 11.** Relatywnie łagodny hipotetyczny scenariusz ukierunkowanej broni polegający na dostarczaniu HEGAA przez owady. Wirusowa HEGAA atakuje geny chromosomalne istotne dla płodności nasion w określonej odmianie roślin uprawnych, przy czym gatunki upraw są ogólnie podatne na zakażenie genetycznie zmodyfikowanym wirusem. Zakłada się, że genetycznie zmodyfikowany wirus może infekować nasiona lub merystemy. W tym przykładzie wypuszczone owady zakażone wirusem mogą przeżyć dłużej niż ustalone przez DARPA 2 tygodnie lub ponownie nabyć infekcję wirusową z roślin

Niedawne postępy technologii CRISPR umożliwiają naukowcom wprowadzanie zmian w genomach różnych organizmów. Na przykład doświadczenia w Chinach doprowadziły do powstania hipermięśnionych psów dzięki zastosowaniu inżynierii genetycznej CRISPR. W Chinach rozpoczęły się już próby na ludziach z zastosowaniem technologii CRISPR, a firmy w USA również starają się rozpocząć próby na ludziach. Co więcej, wraz z pojawieniem się ruchu *biohacking*, ludzie posiadający podstawową wiedzę i dostęp do technologii CRISPR będą mogli pozornie edytować swoje własne genomy. W miarę usprawniania technologii i procedur możemy spodziewać się wzrostu liczby tego rodzaju eksperymentów. W przypadku terapii CRISPR, których celem są komórki odpornościowe w celu zwalczania raka, można sobie wyobrazić, że będzie można uzyskać komórki odpornościowe z zamiarem wywołania białaczek, autoimmunizacji lub osłabienia funkcji odpornościowej osoby docelowej w połączeniu z zakaźnym patogenem.

#### 40. Jak działa napęd genowy (ang. *gene drive*)?

Zasadnicza koncepcja oparta jest na teorii George'a C. Williamsa sformułowanej w pochodzącej z 1966 r. książce *Adaptation and natural selection*. Z kolei Richard Dawkins w wydanej 10 lat później publikacji *The selfish gene* stworzył określenie „samolubny gen” dla wyrażenia hipotezy przyjmującej jednostkę doboru naturalnego jako gen, w przeciwieństwie do osobnika, gatunku czy populacji. Według tej koncepcji jest to właściwy sposób analizowania ewolucji, jako że proces doboru naturalnego obserwowany na poziomie organizmów lub populacji nigdy nie wykracza poza dobór na poziomie genów. Tendencja do maksymalizacji zdolności przetrwania i reprodukcji, co zapewnia większą liczbę istniejących kopii genów, prowadzi do stabilnej strategii ewolucyjnej. W przełomowej książce Richarda Dawkinsa selekcję naturalną można postrzegać jako działanie na poziomie genu, a nie na poziomie organizmu czy populacji. Zgodnie z tym allele organizmów rozmnażających się płciowo „konkurują”, aby przejść do następnego pokolenia. W tradycyjnym darwinowskim sensie konkurencja jest uczciwa – każdy allele ma 50% szans na przekazanie potomstwu (dziedziczenie mendlowskie).

Allele, które przynoszą pożytek ich gospodarzom, stopniowo rozmnażają się w populacji, podczas gdy te, które nie przynoszą pożytku, są ostatecznie eliminowane. Niektóre geny nie działają zgodnie z zasadami. Sekwencje DNA, zwane napędami genowymi, zapewniają ich

przetrwanie, promując ich własną transmisję do potomstwa organizmu. Napęd genowy jest mechanizmem samoregenerującym się, dzięki któremu pożądaný wariant genetyczny może rozprzestrzeniać się w populacji szybciej niż tradycyjne dziedziczenie mendelowskie. Ta strategia może być na tyle skuteczna, że allele mogą się rozprzestrzeniać, nawet jeśli nadają organizmowi niekorzystną cechę, taką jak na przykład bezpłodność lub nawet prowadzą do śmierci. Napędy genowe stanowią potencjalne nowe rozwiązania dla problemów, przed którymi stoi globalna populacja, w tym eliminacji lub zmiany wektorów chorobowych (takich jak komary), kontrolowania inwazyjnych gatunków roślin, owadów lub ssaków oraz zwalczania oporności na pestycydy.

Dzięki najnowszym osiągnięciom i udoskonaleniom technologii CRISPR potencjał napędów genów został znacznie zwiększony. Koncepcja wykorzystania napędów genowych do genetycznej kontroli rozprzestrzeniania się szkodników została pierwotnie opracowana już w latach sześćdziesiątych. Wczesne pomysły oparte były na naturalnych napędach genowych (zwanym także samolubnymi elementami genetycznymi), przekazywanych częściej do potomstwa. Ostatnie postępy w metodach biotechnologii i biologii molekularnej sprawiły, że pomysł ten znalazł się na czele badań w dziedzinie ekologii, a obecnie zmienia się z potencjalnej idei w aktywną strategię.

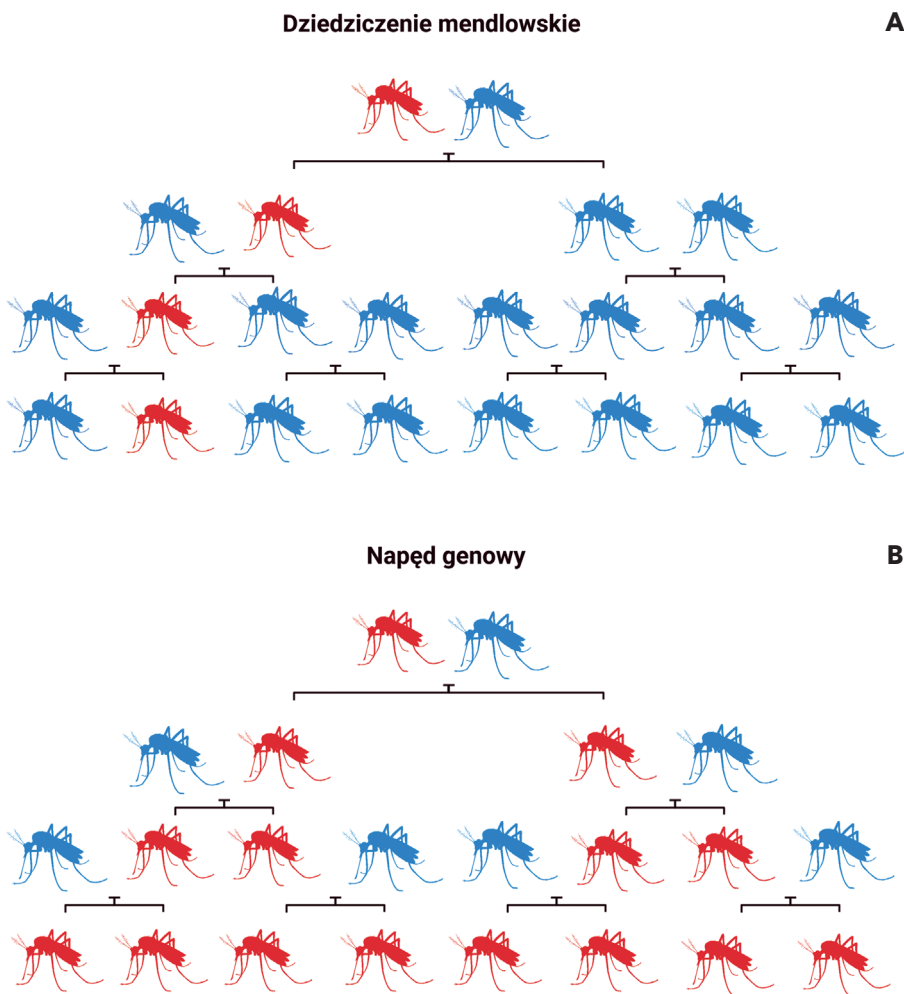
Naturalne napędy genowe występują w różnych organizmach. Na przykład transpozony to ruchome fragmenty DNA, które „włączają się” w różne części genomu, potencjalnie inaktywując elementy genetyczne w miejscach ich wstawienia. W rzeczywistości wiele fragmentów tzw. „śmieciowego DNA” (ang. *junk DNA*) w genomach eukariotycznych pochodzi z tego rodzaju samolubnego DNA. Tak zwane „bazujące” geny endonukleaz (ang. *homing endonuclease genes*, HEG) są innym rodzajem naturalnego napędu genowego występującego w niektórych rodzajach roślin, grzybów i bakterii. Rozprzestrzeniają się, odcinając homologiczny fragment chromosomu typu dzikiego i kopiując się w miejscu cięcia przez ukierunkowaną naprawę homologiczną w procesie zwanym „bazowaniem” (ang. *homing*). Dzięki temu procesowi osobnicy heterozygotyczni pod względem allelu napędowego stają się homozygotami. Allel napędowy ma prawdopodobieństwo odziedziczenia, które jest większe niż 50% i szybko rozprzestrzenia się w populacji.

Chociaż naukowcy od dawna dostrzegali potencjał wykorzystania napędów genowych do zmian populacji, wcześniej byli ograniczeni brakiem możliwości kontroli lokalizacji genomowych, w które napędy ge-

nowe celowały i kopiowały się. Kiedy jednak w latach dziewięćdziesiątych dokonano postępu w inżynierii genetycznej, stworzenie napędów genowych opartych na endonukleazach, które mogłyby być ukierunkowane na określone lokalizacje, stało się realne. Wczesne próby inżynierii syntetycznych napędów genowych opartych na endonukleazach wykorzystywały nukleazy palca cynkowego (ZFN) i nukleazy efektorowe podobne do aktywatora transkrypcji (TALENs). Korzystając z tych narzędzi, naukowcy mogą celować w określone miejsca genomowe, które należy zmienić. Chociaż metody te umożliwiają specyficzne dla miejsca wstawienie napędów genowych, to nadal napotykać na znaczące ograniczenia, ponieważ sekwencje tych nukleaz mają powtarzalne elementy i szybko mutują. Mutacje często inaktywują napęd genowy, zanim zdąży się on rozprzestrzenić w całej populacji.

W 2012 r. opracowano nowe narzędzie do edycji o nazwie CRISPR (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Wykorzystuje się w nim programowalny kierujący RNA (ang. *guide RNA*), by doprowadzić endonukleazę (często Cas9) do określonego celu genomowego z niespotykaną łatwością i precyzją. Endonukleaza rozcina DNA w docelowym miejscu, pobudzając komórkę do naprawy dwuniciowego pęknięcia. Proces naprawy można wykorzystać do wprowadzenia zmian genomowych w miejscu docelowym.

Technologia CRISPR otworzyła nowe możliwości opracowywania napędów genowych opartych na endonukleazach. Składniki CRISPR można włączyć do „allelu napędowego”, który przecina określone miejsce na homologicznym chromosomie typu dzikiego. W tych typach napędów genowych allel napędowy składa się zarówno z pożądanego wariantu do propagacji, jak i z RNA prowadzącego CRISPR i Cas9. Aby naprawić przerwę w DNA, komórka używa chromosomu zawierającego wariant jako matrycy w procesie zwanym naprawą ukierunkowaną na homologię (HDR). Po naprawie allel napędowy jest z powodzeniem kopiowany do chromosomu typu dzikiego, całkowicie zastępując sekwencję DNA typu dzikiego w tej pozycji genomu. Gen oparty na technologii CRISPR napędza wybiórczość dziedziczenia określonych alleli. W przypadku wprowadzenia zmienionego allelu w linii zarodkowej organizmu, przy standardowym dziedziczeniu mendlowskim, zmieniony gen ma 50% szans na przekazanie danemu potomstwu. Po odziedziczeniu w ten sposób allel może nie rozprzestrzeniać się na wielu osobników w populacji (część A ryciny 12).



**Ryc. 12.** Schemat przedstawiający dziedziczenie cechy w sposób naturalny, zgodnie z prawami Mendla (A) oraz przy wykorzystaniu napędu genowego, w którym dzięki technologii CRISPR-Cas9 zmieniona cecha wprowadzana jest do każdego organizmu potomnego (B). Na czerwono zaznaczono owada ze zmienioną cechą, na niebiesko osobniki w formie „dzikiej”, niezmienionej

Jeśli zmieniony allel jest połączony z napędem genowym (razem zwanym „allelem napędowym”), zostanie skopiowany do homologicznego chromosomu typu dzikiego w komórce. CRISPR gRNA najpierw prowadzi Cas9 do miejsca docelowego na chromosomie typu dzikiego

i przerywa dwuniciowy DNA. Komórka następnie naprawia przerwę przez naprawę homologiczną (HDR), wykorzystując chromosom zawierający napęd jako matrycę. W wyniku tego gRNA i Cas9 kierują allelem, a zmieniony gen jest kopiowany do homologicznego chromosomu. Gdy komórki linii zarodkowej przechodzą mejozę, allele napędowe są przekazywane do wszystkich gamet. Tak więc praktycznie całe potomstwo dziedziczy allel napędowy, który rozprzestrzenia się w populacji (część B ryciny 12).

W celu przygotowania systemu napędu genowego do uwolnienia do dzikiej populacji, przygotowuje się w laboratorium jeden lub więcej transgenicznym organizmów. Sekwencję DNA typu dzikiego na jednym chromosomie zastępuje allel napędowy, zawierający składniki CRISPR (geny kierujące RNA i Cas9) i zmieniony allel. Organizm transgeniczny jest następnie uwalniany do środowiska, aby mógł rozmnażać się z osobnikami typu dzikiego. Można zaprojektować dwa typy napędów: napęd modyfikujący (ang. *modification drive*) lub napęd hamujący (ang. *suppressive drive*). W napędzie modyfikującym zmieniony allel rozprzestrzenia się przez przypadkowe włączenie się w chromosomy typu dzikiego na zasadzie „autostopu” (ang. *hitchhiking*). Kopiowanie allelu napędowego może wystąpić u potomstwa na wczesnym etapie zygoty. Jeśli tak się stanie, wszystkie komórki potomstwa będą homozygotyczne pod względem zmienionego genu. Alternatywnie, napęd może być aktywny tylko w linii zarodkowej potomstwa. W tym przypadku wszystkie gamety będą zawierały allel napędowy, ale komórki tworzące inne tkanki pozostaną heterozygotyczne. W napędach hamujących rozprzestrzenia się genetyczna zmiana, która powoduje zmniejszenie liczebności populacji. Aby to osiągnąć, rozprzestrzenia się zmieniony allel, który jest szkodliwy dla organizmu (np. powoduje śmierć lub bezpłodność), gdy obecne są dwie kopie (układ homozygotyczny recesywny).

Dzięki kopiowaniu napędu w linii zarodkowej całe potomstwo jest heterozygotyczne, a zatem modyfikacja genetyczna ma na nie minimalny wpływ. Dzięki temu zmiany genetyczne mogą szybko rozprzestrzeniać się w populacji. Jednak gdy zmiana stanie się bardziej powszechna, powstanie homozygotyczne potomstwo i populacja ulegnie zaburzeniu. Zmieniony allel prowadzi do wyniku pożądanego przez naukowców, którzy zaprojektowali napęd, ale niekoniecznie jest korzystny dla organizmu.

Najczęściej napędy genowe stosuje się do eliminacji chorób przenoszonych przez wektory (choroby zakaźne rozprzestrzeniane przez owa-

dy lub inne stawonogi). Istnieje duże zainteresowanie opracowaniem napędu, który mógłby wyeliminować malarię, chorobę wywołaną przez pasożyta *Plasmodium* i przenoszoną przez komary *Anopheles*. Opracowano i przetestowano kilka napędów genowych opartych na technologii CRISPR w zamkniętych populacjach komarów. Grupa naukowców opracowała gen modyfikujący, który rozprzestrzenia gen oporności na malarię. Inna grupa opracowała gen supresyjny, który powoduje bezpłodność u samic homozygotycznych recesywnych w przypadku zmian genetycznych. Bill Gates dodał swój głos, by poprzeć wykorzystanie genów w walce z malarią w ostatnim przemówieniu na konferencji „Malaria Summit London” w 2018 r.: „Jestem bardzo podekscytowany potencjałem napędów genowych, metodą samopodtrzymującej się zmiany genetycznej, która może uczynić komary nieplodnymi lub uniemożliwić im przenoszenie pasożyta malarii”.

Podobnie jak w celu wyeliminowania niepożądanych chorób, CRISPR może być wykorzystany do uzyskania napędu genów w celu kontroli lub pozbycia się gatunków inwazyjnych. Gatunki wprowadzane na obszary, na których nie występują naturalnie, mogą wyrządzić znaczne szkody ekologiczne i ekonomiczne. Mogą konkurować z rodzimymi gatunkami lub niszczyć je, czasami doprowadzając do ich wyginięcia. Geny supresyjne lub modyfikujące można wykorzystać do wyeliminowania gatunków na obszarach, na których nie są one rodzime.

W jednym z badań zastosowano modele komputerowe do oceny napędów genowych opartych na CRISPR, które potencjalnie mogłyby wyeliminować inwazyjne kręgowce (myszy, szczury i króliki) z wysp, powodując śmierć lub bezpłodność u homozygotycznych samic, lub zmieniając samice w sterylne samce. Napędy genowe można również wykorzystać do zmniejszenia liczebności populacji szkodników rolnych. Obecnie gospodarstwa często używają pestycydów, aby powstrzymać szkodniki niszczące rośliny. Jednak populacje szkodników często ewoluują z czasem i oporność na pestycydy się zmniejsza. Napęd oparty na CRISPR może być wykorzystany do rozprzestrzeniania zmian genetycznych, które ponownie uczulają szkodniki na toksyny lub sprawiają, że są wrażliwe na inne nieszkodliwe dla człowieka związki.

Chociaż napędy genowe są najczęściej używane do kontrolowania lub zmniejszania populacji organizmów docelowych, mogą być również wykorzystywane do ratowania gatunków zagrożonych wyginięciem. Przez modyfikację napędu genów gen ochronny może się rozprzestrzeniać. Na przykład populacja żab i innych płazów dramatycznie spada na ca-



łym świecie w dużej mierze z powodu grzybów *Chytrium* powodujących często śmiertelną chorobę skóry – chytridiomikozę. Gen zapobiegający zakażeniom grzybiczym może potencjalnie uratować wiele gatunków żab i innych gatunków płazów przed wyginięciem.

Znanych jest kilka czynników, które mogą wpływać na skuteczność napędów genowych opartych na technologii CRISPR. Allele napędowe, które są stabilne w czasie, rozprzestrzenia się na większą liczbę osobników, a te, które akumulują mutacje, mogą stać się odporne na mechanizm napędowy. Koszt sprawności allelu napędowego może również wpływać na jego rozprzestrzenianie się. Na przykład allel, który znacznie obniża sprawność u osobników heterozygotycznych, nie rozprzestrzeni się tak skutecznie jak allele, które mają jedynie minimalny koszt sprawności.

Kopiowanie allelu napędowego do chromosomów typu dzikiego nastąpi tylko wtedy, gdy komórka zastosuje ukierunkowaną naprawę homologiczną (HDR), aby naprawić pęknięcie dwuniciowe. Komórka może zamiast tego naprawić przerwę przez niehomologiczne łączenie końców (NHEJ). Ten szlak wkleja razem końce bez użycia szablonu naprawy, a zatem nie kopiuje genu napędu do chromosomu typu dzikiego. Częstotliwość homologicznej naprawy genów HDR w stosunku do NHEJ wpłynie na wydajność napędu genowego.

Kilka cech organizmu docelowego może również wpływać na napędy genowe, w tym na czas potrzebny do wytworzenia nowej generacji i częstotliwości kojarzenia. Ponadto napędy genowe są skuteczne tylko w populacjach organizmów rozmnażających się płciowo i organizmy rozmnażające się bezpłciowo, na przykład bakterie i wirusy, nie mogą być skutecznie atakowane.

W ostatnich latach nastąpił znaczny postęp w opracowywaniu napędów genowych opartych na CRISPR. Kilka projektów koncentrowało się na rozwijaniu napędów genowych u komarów i innych wektorów owadów w celu zwalczania chorób. Latem 2018 r. zespół naukowców pod kierunkiem Kim Cooper z University of California w San Diego po raz pierwszy z powodzeniem przetestował napęd genowy u ssaków. Naukowcy opracowali napęd genowy, który zaburzył gen koloru sierści w grupie myszy laboratoryjnych. Ich zdaniem odkrycia mogą pewnego dnia przyczynić się do napędu genów zaprojektowanego w celu wyeliminowania inwazyjnych myszy i potencjalnie mogą być również wykorzystane do produkcji złożonych fenotypów ssaków w laboratorium.

Napędy genowe wywierają pozytywny wpływ, jeśli są stosowane w sposób odpowiedzialny. Chociaż napędy genowe oparte na CRISPR

mogą potencjalnie rozwiązać wiele problemów, to wśród znaczącej liczby badaczy budzą również zaniepokojenie ich wykorzystaniem. Uwalnianie dowolnego organizmu genetycznie zmodyfikowanego do środowiska musi odbywać się w sposób odpowiedzialny i ostrożny, z uwzględnieniem potencjalnego wpływu na środowisko. Na przykład napęd genowy, który wyeliminowałby całą populację komarów na danym obszarze, może zakłócić ekosystem w nieprzewidywany sposób. Niektórzy mają również obawy etyczne dotyczące tego, czy ludzie powinni w ogóle zmieniać naturalne ekosystemy. Biorąc pod uwagę potencjalne ryzyko związane z napędami genowymi, prowadzone są liczne badania w celu opracowania zabezpieczeń, które ograniczyłyby czas trwania napędu genowego lub całkowicie je odwróciły. Na przykład napędy genowe „łańcuchowe” zaprojektowano tak, aby z czasem zniknęły, aby nie kierowały allelem w nieskończoność.

Podczas korzystania z napędów genowych do zmiany środowiska ważną kwestią jest to, kto bierze udział w podejmowaniu decyzji. Kevin Esvelt z MIT przyjął innowacyjne podejście do swoich badań nad wykorzystaniem edycji genów do zmiany populacji. W projekcie zatytułowanym „Myszy przeciw kleszczom” Esvelt i jego zespół współpracują ze społecznościami Martha’s Vineyard i Nantucket, aby wykorzystać CRISPR do wyeliminowania boreliozy (choroby kleszczowej). Projekt „Myszy przeciw kleszczom” nie obejmuje napędu genowego, lecz naturalną propagację edytowanych alleli przez populację. Naukowcy zaproponowali użycie CRISPR do wprowadzenia allelu niektórym myszom, które uodpornią je na tę chorobę. Następnie zmodyfikowane genetycznie myszy zostaną uwolnione, aby mogły krzyżować się z dzikimi myszami. W ten sposób allel może naturalnie rozmnażać się przez populacje dzikich myszy na wyspach. Potencjalne uwolnienie zmodyfikowanych genetycznie myszy musi zostać zatwierdzone przez stanowe i federalne organy regulacyjne, komitet sterujący kierowany przez każdą wyspę, niezależną grupę naukowców i ostatecznie przy urnie wyborczej.

W przyszłości ważne będzie, aby wszyscy badacze korzystali z napędów genowych z podobnym poczuciem świadomości i ostrożności. Napędy genowe mogą stać się jednym z najbardziej wpływowych osiągnięć w historii ludzkości, ale tylko pod warunkiem starannego i odpowiedzialnego wykorzystania.

#### 41. Czy zastosowanie broni biologicznej/biotechnologicznej to wynalazek ostatnich lat?

Nie. Najwcześniejsze udokumentowane incydenty znaleziono w tekstach hetyckich z lat 1500-1200 p.n.e., kiedy ofiary zarazy wprowadzano na ziemi wrogów. Epickie wiersze Homera o wojnie trojańskiej informują o zatrutych włóczniach i strzałach. W IV wieku p.n.e. scytyjscy łucznicy pokrywali groty strzał jadem węża, ludzką krwią i zwierzęcymi odchodami. W starożytnej Grecji i czasach rzymskich zatrutowano zbiorniki wody, rzucano we wrogów dzbanami wypełnionymi jadowitymi węzami czy skorpionami. W bliższych nam czasach podczas I wojny światowej niemieccy agenci próbowali zarazić zwierzęta węglikiem i uważano, że są odpowiedzialni za wybuchy nosacizny u koni i mułów. W czasie wojny wietnamskiej niszczone uprawy lub prowadzono defoliację roślin. Chociaż herbicydy są substancjami chemicznymi, często zalicza się je do broni biologicznej jako bioregulatory w podobny sposób jak biotoksyny (wojna w Wietnamie, czynnik pomarańczowy i Wojna Węgorza na Sri Lance). Czynnik pomarańczowy (ang. *agent orange*) był zanieczyszczony dioksyną (2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxyna, TCDD) prowadzącą do niekorzystnych zmian u dzieci. Również w latach osiemdziesiątych XX wieku Ministerstwo Rolnictwa Związku Radzieckiego opracowało warianty pryszczycy i księgosuszu przeciwko krowom, afrykański pomór świń i ornitozę atakującą kurczaki.

#### 42. Czy epidemia COVID-19 zmieniła podejście do konwencji o zakazie stosowania broni biologicznej?

Tak. W dniach od 6 października do 4 listopada 2020 r. odbyło się posiedzenie Pierwszego Komitetu ds. Rozbrojenia i Bezpieczeństwa Międzynarodowego Zgromadzenia Ogólnego ONZ (*United Nations General Assembly First Committee on Disarmament and International Security*). Posiedzenie naznaczone było przez międzynarodową pandemię zdrowia, ale także pandemię prawa międzynarodowego, polegającą na celowym usuwaniu przepisów i norm dotyczących broni i przemocy; oraz pandemii militarizmu, polegającej na masowych inwestycjach w bomby i kule. Wiele państw wskazywało, że nasze zbiorowe bezpieczeństwo nie zależy od tego, ile państw posiada broń lub ile ma broni jądrowej, ale raczej od tego, jak przygotowały społeczność na przewyżczenie zagrożenia takie jak COVID-19 i przyszłe wirusy. Podkreślono, że jeśli

pandemia czegoś nas nauczyła, to tego, że rozwój, a nie uzbrojenie może zapewnić pokój i bezpieczeństwo na świecie. Pandemia wysunęła na pierwszy plan błędną logikę ogromnych wydatków na cele wojskowe ograniczających nasze zasoby (zmniejszone przez COVID-19), które muszą zostać wydane na globalne zdrowie publiczne i łagodzenie zmian klimatycznych. Jednocześnie wskazano, że globalna pandemia ujawniła, jak współzależne są państwa. Uznano również za bezcelowe kierowanie zasobów na wyścigi zbrojeń, które nie zwiększają bezpieczeństwa żadnego narodu, ale ogólnie podważają bezpieczeństwo międzynarodowe.

W związku z wirusem SARS-CoV-2 podczas posiedzenia w siedzibie Organizacji Narodów Zjednoczonych pięć grup państw i 55 państw indywidualnie podkreślało znaczenie Konwencji o zakazie broni biologicznej i toksycznej (BWC) i wyraziło poparcie dla Traktatu. Powszechnie podkreślano potrzebę uniwersalizacji i skutecznego wdrażania BWC. Niszczycielskie skutki COVID-19 zostały wymienione przez kilka państw jako wyraźny przykład potencjalnych konsekwencji i zakłóceń, jakie moglibyśmy zobaczyć, gdyby kiedykolwiek została użyta broń biologiczna. Między innymi Australia, Kanada, Grecja, Finlandia, Francja, Indie, Irlandia, Nepal, Holandia i Stowarzyszenie Narodów Azji Południowo-Wschodniej (*Association of Southeast Asian Nations, ASEAN*) uznało, że pandemia podkreśliła potrzebę wzmocnienia BWC. Zdaniem Chin: „COVID-19 ogłosił alarm dotyczący bezpieczeństwa biologicznego i podkreślił znaczenie i pilność wzmocnienia globalnego zarządzania bezpieczeństwem biologicznym”.

W szczególności dla Federacji Rosyjskiej i Ruchu Państw Niezaangażowanych (*Non-Aligned Movement, NAM*), lecz także dla innych krajów, takich jak Brazylia, Chiny, Hiszpania i Holandia wzmocnienie BWC oznacza negocjowanie prawnie wiążącego mechanizmu weryfikacji. Wiele państw sygnalizowało, że jest to dla nich główny priorytet na zbliżającej się konferencji przeglądowej w 2021 r. Dla innych państw wzmocnienie BWC oznacza kolejne problemy. Działania wyrażone w oświadczeniach z debaty ogólnej obejmowały: większą współpracę międzynarodową, pomoc i gotowość; właściwe i trwałe wsparcie finansowe traktatu; większy potencjał instytucjonalny i wspieranie synergii między odpowiednimi organizacjami międzynarodowymi; powołanie naukowego organu doradczego; usprawnienie wdrażania środków budowy zaufania zawartych w traktacie i przyjęcie dodatkowych środków przejrzystości, takich jak wzajemna weryfikacja; traktowanie mobilnych jednostek biomedycznych w celu pomocy w reagowaniu na celowe dzia-

łania oraz opracowanie dobrowolnego kodeksu postępowania dla przyrodników.

Kazachstan powtórzył swoją propozycję powołania specjalnego wielostronnego organu – Międzynarodowej Agencji Bezpieczeństwa Biologicznego (International Agency for Biological Safety) w celu wzmocnienia BWC, którą po raz pierwszy przedstawił prezydent Kazachstanu podczas 75 Generalnej Debaty Zgromadzenia Ogólnego. Na posiedzeniu podkreślano konieczność utrzymania Protokołu genewskiego z 1925 roku o zakazie używania na wojnie gazów bojowych, trujących lub podobnych oraz wszelkich cieczy, materiałów lub analogicznych środków, a także środków bakteriologicznych.

#### **43. Jakie dotychczasowe osiągnięcia biotechnologii uzasadniają pozytywną opinię o tej dziedzinie?**

Z pewnością największą uwagę zwraca produkcja wielu leków, zwłaszcza hormonów, na przykład insuliny, hormonu wzrostu, leków przeciwnowotworowych czy szczepionek oraz nowoczesne metody diagnostyczne, których nie można by uzyskać bez stosowania inżynierii genetycznej. Należy wymienić tu leki uzyskiwane w zwierzętach transgenicznych. Biotechnologia i jej osiągnięcia są szeroko stosowane w przemyśle, w przetwórstwie żywności, hodowli zwierząt czy uprawie roślin. Wprawdzie w Polsce i licznych krajach europejskich nie można uprawiać roślin transgenicznych, to jednak wiele roślin i produktów z nich uzyskiwanych jest dopuszczonych do obrotu i stosowania jako żywność i pasze. Należy zwrócić również uwagę na szeroko pojętą ochronę środowiska. Dzięki stosowaniu mniejszej ilości odczynników chemicznych mamy czystsze środowisko, tańsze i zdrowsze produkty oraz obniżone koszty ponoszone przez rolnika. Oczyszczanie środowiska (bioremediacja) i odzyskiwanie metali z zastosowaniem modyfikowanych bakterii – to są fakty i dokonania już dające realne korzyści, bez zagrożeń dla ludzi i środowiska. Coraz częściej wskazuje się również na metody związane z medycyną regeneracyjną opartą na technikach biotechnologicznych czy stosowaniu terapii genowej w sposób coraz bardziej świadomy.

#### **44. Czy dzięki nowoczesnej biotechnologii poprawiamy przyrodę?**

Pytanie to zadaje sobie większość z nas. Człowiek w całej swojej działalności stara się poprawić przyrodę, aby uzyskać lepsze efekty, aniżeli

oferuje natura. Nie zawsze się to udaje, do rozwiązania są zarówno poważne, jak i mniej poważne problemy, ale gdybyśmy z tego zrezygnowali, to nadal byłibyśmy na niższym poziomie rozwoju (*Australopithecinae*). Szczególne możliwości stwarza nam inżynieria genetyczna, jednak błędem będzie stwierdzenie, że ludzie, a szczególnie uczeni, próbują poprawiać dzieła Pana Boga i „stwarzają” coś nowego.

Inżynierowie genetyczni, czy mówiąc poprawnie: mikrobiolodzy, genetycy i biologowie molekularni robią dokładnie to samo co hodowcy roślin i zwierząt od wielu pokoleń. Mianowicie starają się pozyskać pożądane przez człowieka cechy roślin i zwierząt czy też mikroorganizmów jak najszybciej. Różnica leży jednak w stosowanych „narzędziach”. Dawniej hodowca na podstawie swej wiedzy i wieloletniej praktyki krzyżował zwierzęta lub rośliny o wybranych cechach, aby otrzymać pokolenie potomne, które te wybrane właściwości miało mocniej zaznaczone i było zdolne do ich przekazania następnym pokoleniom. W kolejnych uzyskiwano dalsze wzmocnienie i stabilizację tych wybranych właściwości. Proces trwał zawsze wiele generacji. Od tysiącleci wykonywano wiele krzyżówek, z których ogromna większość kończyła się ... niepowodzeniem. W ten właśnie sposób otrzymano szlachetne odmiany drzew owocowych, miniaturowe sznauclery, jak również dokonano krzyżówek międzygatunkowych: wyhodowano muły, osłomuły, żubronie, pszenżyto. Wszyscy znamy te „produkty modyfikacji genetycznych”, korzystamy z nich i ... nikt nie zgłasza protestów. Wspólną cechą tych wszystkich procesów i produktów była stosowana metoda – hodowcy wykorzystywali „techniki mendlowskie”. Cechą charakterystyczną jest ich niepowtarzalność. Hodowca zasadniczo nie jest naukowcem – rzemieślnikiem; jest raczej artystą, który kieruje się w równym stopniu swą wiedzą co i intuicją, wycuciem właściwości i cech charakterystycznych, które będą przekazane na następne pokolenia.

Współcześnie dostępne stały się dla nas „metody niemendlowskie”, czyli techniki oparte na znajomości biologii molekularnej, a w szczególności struktury genu. Polegają one na tym, że właściwości i cechy organizmów są identyfikowane nie na poziomie cech morfologicznych, lecz molekularnym. Oznacza to, że współcześni hodowcy potrafią połączyć takie cechy jak na przykład szybkość wzrostu czy też oporność na insekty z konkretnym genem, białkiem, hormonem i innymi cząsteczkami chemicznymi. Białko czy też hormon są „produktami” genu, który stanowi fragment genomu, czyli kompleksowej informacji genetycznej charakteryzującej na poziomie molekularnym każdy żywy orga-

nizm. Określony gen odpowiedzialny za zdefiniowaną funkcję (bądź też uczestniczący w złożonym procesie multienzymatycznym), na przykład syntezę określonego enzymu, może być nie tylko zidentyfikowany, lecz także wydzielony, a następnie przeniesiony do innego układu, czyli innej rośliny lub zwierzęcia, w którym będzie pełnił tę samą funkcję. Możliwe jest zatem kontrolowanie hodowli na poziomie molekularnym, a nie wyłącznie przez cechy morfologiczne, jak było to realizowane w minionych tysiącleciach. Oczywiście, także w tym przypadku ma miejsce wiele ograniczeń i uwarunkowań. Postęp wiedzy i techniki w tej dziedzinie stwarza wspaniałe możliwości i dosłownie otwiera nowe horyzonty przed hodowlą. W produkcji rolniczej ma to szczególne znaczenie. Przecież końcowym celem wszelkiej hodowli jest pozyskanie żywności. Procedury, które trwały wiele generacji, mogą być obecnie realizowane w ciągu kilku lat. Krzyżowanie odległych gatunków, będące marzeniem i celem prac hodowców, stało się realne nie tylko w wybranych i szczęśliwych przypadkach (pszenżyto, żubroń, muł), ale może być realizowane w sposób celowy i planowy.

Należy również zwrócić uwagę na silny rozwój technik edycji genomów, które umożliwiają wprowadzanie zmian w sposób ściśle kontrolowany, w których kierunku zwraca się coraz więcej prac. Powstają pierwsze komercyjnie dostępne rośliny uzyskane tymi metodami, mówi się wręcz o roślinach drugiej generacji. Nowe technologie wykorzystuje się też do szybkiego przygotowywania leków i szczepionek przy użyciu modyfikowanych zwierząt. Już w 2016 r. na zjeździe „International Society for Transgenic Technologies”<sup>5</sup> w Pradze ponad 95% doniesień dotyczących transgenicznych myszy ograniczało się do zastosowania technologii CRISPR/Cas9 i jej modyfikacji. Tego typu metody mają przysłużyć się do uzyskiwania i analizy transgenicznych modeli zwierzęcych do badań biomedycznych i zastosowań biotechnologicznych. Nie należy zapominać o wkroczeniu edycji genomu do leczenia człowieka i przyspieszaniu prac związanych z terapiami genowymi.

---

<sup>5</sup> International Society for Transgenic Technologies (ISTT, Inc.) <https://www.transtechsociety.org/index.php>