

STRESZCZENIE

Opracowanie technik inżynierii genetycznej wywołało obawy iż będą one wykorzystane do konstruowania organizmów zagrażających człowiekowi i środowisku. W roku 1975, na konferencji w Asilomar w Kalifornii, genetycy z wielu krajów uznali, że ze stosowaniem inżynierii genetycznej wiąże się więcej potencjalnych korzyści niż zagrożeń. W ostatnich latach pojawiła się nowa technika CRISPR-Cas, pozwalająca na dokonywanie precyzyjnych zmian w genomach organizmów, np. dezaktywowanie określonych genów lub wstawianie prawidłowych. Dezaktywując u myszy odpowiedniki genów, których mutacje powodują choroby genetyczne człowieka otrzymujemy modele pozwalające na poznanie etiologii danej choroby i opracowanie metod jej leczenia. Technikę tę możemy też wykorzystać do naprawy zmutowanych genów, odpowiedzialnych za choroby metaboliczne i nowotworowe człowieka. Pojawiły się obawy, że może być ona wykorzystana do „udoskonalania” człowieka, co rodziłoby szereg problemów etycznych i społecznych. Genetycy, etycy i prawnicy zebrani na konferencji w Waszyngtonie w 2015 roku przedyskutowali te problemy i zaproponowali zasady stosowania techniki CRISPR-Cas.

W 1975 roku, a więc ponad 40 lat temu, odbyła się w Asilomar w Kalifornii konferencja poświęcona ewentualnym zagrożeniom jakie niesie nowopowstała dziedzina genetyki, inżynieria genetyczna. Bezpośrednim powodem zwołania konferencji był niepokój spowodowany doświadczeniami Paula Berga, polegającymi na wprowadzaniu DNA wirusa SV40 do genomu *Escherichia coli*. Wirus ten powoduje nowotwory u małp, potrafi się też namnażać w hodowanych *in vitro* komórkach ludzkich. Pojawiły się głosy, że wynikiem doświadczeń może być uzyskanie bakterii, która spowoduje, że rak stanie się chorobą zakaźną. W konferencji, którą prowadził laureat nagrody Nobla David Baltimore, uczestniczyło około 150 genetyków z wielu krajów. Polskę reprezentowali Prof. Waław Gajewski i niżej podpisany. Przez kilka dni przedstawiano najrozmaitsze scenariusze potencjalnie niebezpiecznych doświadczeń, by w końcu dojść do konkluzji, że nie wolno zaprzepaścić szansy jakie daje inżynieria genetyczna na otrzymywanie nowych, wartościowych odmian roślin oraz leków, i że należy doświadczenia kontynuować, zachowując w laboratoriach odpowiednie środki bezpieczeństwa. Przy ustalaniu tych środków powinien być brany najbardziej niebezpieczny element doświadczenia. Dla przykładu, prace nad uzyskaniem bakterii *E. coli* zawierającej ludzki gen kodujący insulinę mogą być prowadzone w zwykłym laboratorium, gdyż ani ta bakteria ani gen insuliny, nie wiążą się z jakimikolwiek zagrożeniami. Natomiast rekombinowanie genów wirusów onkogennych powinno być prowadzone jedynie w laboratoriach dostosowanych do prac z niebezpiecznymi mikroorganizmami. W Asilomar duże wrażenie wywołało wystąpienie Jamesa Watsona, który był w owym czasie doradcą rządu USA. Oświadczył, że „gdyby wolno mi było opowiedzieć co zawierają magazyny broni bakteriologicznej USA, a jest w nich tyle świństw że można każdego mieszkańca Ziemi zabić na osiem różnych sposobów, to byście się śmieli z zagrożeń związanych z inżynierią genetyczną”. W ciągu ostatnich kilku dziesięcioleci doniesiono o czterech przypadkach niepokojących wyników doświadczeń nad genetycznie modyfikowanymi organizmami (GMO), które po sprawdzeniu okazały się celowymi fałszerstwami.

Pierwsze doświadczenia z zakresu inżynierii genetycznej były wykonywane na bakteriach i drożdżach. Poczynając od lat 80-tych XX wieku, zaczęły się ukazywać prace poświęcone otrzymywaniu transgenicznych roślin. Fraley i inni [1] zastosowali plazmid Ti z *Agrobacterium tumefaciens*, i poprzez transformację *in vitro* komórek tytoniu i petunii otrzymali rośliny odporne na antybiotyki aminoglikozydowe. Z kolei Vaec i inni [2], poprzez wprowadzenie genu bt2 z *Bacillus thuringiensis* do tytoniu, otrzymali rośliny tytoniu chro-

Piotr Węgleński✉

Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa

✉Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego, ul. S. Banacha 2c, 02-097 Warszawa; tel.: 604 530 527; (22) 5543746, e-mail: wegle@adm.uw.edu.pl

Artykuł otrzymano 22 stycznia 2018 r.
Artykuł zaakceptowano 15 lutego 2018 r.

Słowa kluczowe: edytowanie genów, genetycznie modyfikowane organizmy, konferencja w Asilomar, konferencja Waszyngtońska, CRISPR-Cas

Wykaz skrótów: GMO – genetycznie modyfikowane organizmy; CRISPR-Cas – ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

nione przed atakiem larw owadów. Od tego czasu otrzymano ogromną liczbę genetycznie zmodyfikowanych roślin najrozmaitszych gatunków. Powszechnie znanymi są uzyskane przez koncern Monsanto kukurydza 810 posiadająca gen bt2 oraz ziemniak Amflora, wytwarzający zmodyfikowaną skrobię lepiej nadającą się do produkcji np. papieru i klejów. Obie odmiany były dopuszczone do upraw i obrotu handlowego w Unii Europejskiej, jednak zgodnie z prawem unijnym rządy poszczególnych państw mogą wprowadzać zakazy na swoim terytorium. Senat RP zaproponował poprawkę do ustawy o nasiennictwie wprowadzając zakaz obrotu GMO „kierując się ich nieprzydatnością do uprawy w warunkach klimatyczno-glebowych Rzeczypospolitej Polskiej lub koniecznością uniknięcia zagrożeń zdrowia ludzi, zwierząt, roślin oraz dla środowiska”. Sejm poparł tę poprawkę a prezydent Andrzej Duda ustawę podpisał.

Niechęć do spożywania produktów GMO jest w Polsce bardzo wyraźna i w ostatnich dwóch latach wzrosła, podsycana przez propagandę rządową i opinie mediów. Business Insider z 1 maja 2017 roku donosi, że w Sejmie trwają prace nad rządowym projektem nowelizacji ustawy o mikroorganizmach i organizmach genetycznie zmodyfikowanych. W myśl proponowanych przepisów terytorium RP będzie strefą wolną od upraw GMO. Projekt przewiduje jednak możliwość prowadzenia takich upraw w specjalnych strefach, na których utworzenie zgodę musiałby wydać minister środowiska, pod bardzo rygorystycznymi warunkami. Wiceminister środowiska i Główny Konserwator Przyrody Andrzej Szweda-Lewandowski stwierdził, że „rząd i Ministerstwo Środowiska są przeciwnikami prowadzenia upraw genetycznie modyfikowanych w naszym kraju. Ramowe stanowisko rządu ws. GMO wskazuje, że Polska będzie dążyć do bycia krajem wolnym od GMO - czy to chodzi o uprawy, pasze czy żywność”. W projekcie nowelizacji znajduje się też przepis, który stanowi, iż rolnik, chcąc uprawiać rośliny GMO, będzie musiał uzyskać na to zgodę od właścicieli nieruchomości położonych w promieniu trzech kilometrów od pola. Problemem może być to, że Polska importuje obecnie ok. 2 mln ton genetycznie modyfikowanej śrutu sojowej rocznie, niemodyfikowanej praktycznie nikt już na świecie nie uprawia. Hodowcy drobiu twierdzą, że zastąpienie jej inną wysokobiałkową paszą spowodowałoby wzrost cen drobiu o ok. 30%.

Minister środowiska Jan Szyszko podczas XX Forum Polonijnego w Wyższej Szkole Kultury Społecznej i Medialnej w Toruniu mówił: „Na ten nasz obecny model rolnictwa jest ogromne zapotrzebowanie, a nie na genetycznie modyfikowaną żywność. Jest zapotrzebowanie na zdrową, polską żywność”. W internecie większość wpisów dotyczących GMO jest wobec nich bardzo krytyczna. Na przykład, na stronie spółki Farmio S.A. znajduje się komunikat: „Geny pochodzące z GMO pozostają w organizmie”. Nie sposób zrozumieć, dlaczego autorzy sądzą, że geny z roślin i zwierząt niemodyfikowanych genetycznie są odrzucane lub niszczone. Polska wydaje się być szczególnie niechętna GMO, bardziej niż inne kraje Europy nie mówiąc już o USA. Wśród naukowców amerykańskich panuje przekonanie, że żywność produ-

kowana z wykorzystaniem GMO nie jest szkodliwa dla zdrowia. Już 20 lat temu federalna Agencja Kontroli Żywności i Leków (FDA) orzekła, że nie ma powodu wierzyć, by żywność zmodyfikowana genetycznie różniła się od innych jej rodzajów „w jakikolwiek znaczący sposób”. Na oświadczenie to powołują się odtąd wszyscy amerykańscy producenci GMO.

Przeciwnicy inżynierii genetycznej mają teraz jeszcze twardszy orzech do zgryzienia niż GMO. Pojawiła się bowiem nowa technologia CRISPR-Cas (ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), opracowana w 2012 roku przez Jennifer Doudna i Emanuelle Charpentier [3]. Technologia ta umożliwia precyzyjne wstawianie i usuwanie fragmentów DNA z genomów dowolnych organizmów. Sekwencje CRISPR występują u bardzo wielu gatunków bakterii i archaea [4]. Stanowią one element systemu immunologicznego, chroniącego komórki przed wnikaniem do nich obcego DNA [5]. Składają się z kilku powtórzeń identycznych sekwencji rozdzielonych przez rozmaite sekwencje rozdzielające oraz z genów kodujących endonukleazy Cas, z których najistotniejszą rolę odgrywa Cas9. Sekwencje CRISPR są rozpoznawane przez małą komplementarną cząsteczkę RNA (tzw. sgRNA), która współdziała w przecinaniu obu nici DNA przez endonukleazę Cas9. Technologia CRISPR-Cas pozwala na wstawienie dowolnej sekwencji DNA w dowolne miejsce genu. Można ją wykorzystać do zmutowania określonego genu u np. myszy, po to by uzyskać informację o roli danego genu w metabolizmie lub rozwoju osobnika i otrzymać zwierzęta modelowe do badania określonych chorób genetycznych człowieka. Można też „naprawić” gen zmutowany poprzez wprowadzenie odpowiedniej sekwencji DNA. Manipulacji tych można dokonywać zarówno w komórkach somatycznych jak i płciowych, co wzbudziło obawy, że będą podejmowane próby zastosowania ich do otrzymania nie tylko zwierząt hodowlanych o korzystnych właściwościach, ale też do udoskonalonego człowieka. Obawy te spowodowały, że grupa 12 uczonych zwołała w Waszyngtonie konferencję na wzór tej w Asilomar z roku 1975, aby rozważyć wszelkie konsekwencje nowych technik inżynierii genetycznej. W konferencji tej uczestniczyli między innymi Dawid Baltimore jako przewodniczący, Paul Berg a także Jennifer Doudna, wynalazczyni technologii CRISPR-Cas. Tym razem, wśród uczestników konferencji znajdowali się nie tylko genetycy, ale również lekarze, etycy i prawnicy. Konferencja zakończyła się wydaniem oświadczenia „On Human Gene Editing: International Summit Statement”. W oświadczeniu tym czytamy, że w ostatnich 50 latach nastąpił ogromny postęp biologii molekularnej i jej zastosowań w medycynie i że niektóre z nich, jak stosowanie technik rekombinowania DNA i wykorzystywanie embrionalnych komórek macierzystych, wymaga rozważenia ewentualnych zagrożeń z nich wynikających. Jak piszą autorzy, „...the prospect of human genome editing raises many important scientific, ethical, and societal questions.” Potrzeba uregulowania prac, w których stosowane są nowe techniki inżynierii genetycznej, wynika też z faktu powstania dziesiątków firm, takich jak Thermo Fisher Scientific, PolyGene, Perkin Elmer, GenScript i innych, oferu-

jących swoje usługi przy wytwarzaniu nowych odmian roślin i zwierząt a także z tego, że w Chinach podjęto prace (na razie na niezdolnych do życia triploidalnych embrionach ludzkich), w celu wymiany zmutowanego genu, odpowiedzialnego za dystrofię mięśniową Duchenne'a. Również w Chinach trwają prace nad wykorzystaniem techniki CRISPR-Cas do usunięcia z komórek człowieka wirusa papilloma (HPV) a także do dysrupcji genu PD-1, odpowiedzialnego za białko stymulujące namnażanie się komórek raka płuc [6]. W listopadzie 2017 roku dziennik Guardian doniósł, że w laboratorium Sangamo Therapeutics w Kalifornii, wykonano u 44-letniego mężczyzny zabieg wprowadzenia prawidłowego genu w miejsce zmutowanego genu odpowiedzialnego za nieuleczalną chorobę metaboliczną (syndrom Huntera). Jest jednak za wcześnie by ocenić rezultaty tego zabiegu.

Po trzech dniach dyskusji, członkowie konferencji waszyngtońskiej doszli do następujących wniosków:

I. Badania podstawowe i przedkliniczne powinny być prowadzone i ukierunkowane na opracowywanie technik edytowania genów w komórkach ludzkich, rozpoznanie potencjalnych korzyści i zagrożeń wynikających z ich stosowania oraz poznania biologii ludzkich komórek macierzystych i embrionów. Jeżeli w trakcie prowadzenia badań uzyska się genetycznie zmodyfikowane komórki lub embriony, nie powinny one być użyte do zapoczątkowania ciąży.

II. Edytowanie w celach klinicznych genów komórek somatycznych. Wśród potencjalnych zastosowań tych technik jest edytowanie genów odpowiedzialnych za anemię sierpowatą lub genów kodujących białka układu immunologicznego w celu zwiększenia zdolności rozpoznawania przez nie komórek nowotworowych.

III. Edytowanie w celach klinicznych genów komórek rozrodczych. Edytowanie genów w komórkach rozrodczych i embrionach jest technicznie możliwe i w teorii mogłoby być wykorzystane w celu eliminowania chorób dziedzicznych a nawet w celu „ulepszenia” człowieka. Członkowie konferencji waszyngtońskiej uznali jednak, że przy obecnym stanie wiedzy byłoby to nieodpowiedzialne ze względu na szereg potencjalnych zagrożeń. Należą do nich: (1) ryzyko wywołania mutacji w innych niż docelowym genie; (2) nie wyedytowanie wszystkich genów docelowych, co prowadziłoby do mozaikowości embrionu; (3) trudności w ocenieniu niekorzystnych skutków edytowania genu, jakie mogą pojawić się w związku ze zmieniającymi się warunkami środowiska w jakim dany osobnik przebywa; (4) wprowadzonych zmian nie można będzie usunąć a będą one rozprzestrzeniać się w całej ludzkiej populacji; (5) edytowanie genów, od których zależą zdolności człowieka, mogłoby doprowadzić do wytworzenia klasy „nadludzi”, co miałyby poważne implikacje etyczne i społeczne.

IV. Potrzeba międzynarodowego forum, którego zadaniem byłoby opracowanie zasad prowadzenia prac nad edytowaniem komórek rozrodczych.

Sądzę, że opinia członków konferencji spotka się z pełnym zrozumieniem i akceptacją środowiska naukowego. Oczywiście nie można wykluczyć, że jakiś dyktator, a tych ciągle jeszcze mamy kilku na świecie, nie zechce wyprodukować dla siebie gwardii pałacowej złożonej ze ślepo posłusznych, silnych i sprawnych osobników. Jednakże przykłady z nie tak odległej historii świadczą o tym, że taką gwardię można łatwo stworzyć nie uciekając się do stosowania technik inżynierii genetycznej. Wydaje się, że potencjalne korzyści płynące z zastosowań techniki CRISPR-Cas, znacząco przewyższają potencjalne zagrożenia. Korzyści te rysują się wyraźnie w przypadku pozyskiwania nowych odmian roślin uprawnych a także zwierząt hodowlanych. Udało się już otrzymać super umięśnione świnię [7] oraz owce i krowy [8,9]. We wszystkich tych przypadkach manipulacja genetyczna polegała na dysrupcji jednego genu, kodującego miostatynę. Wykorzystując technikę CRISPR-Cas i pluripotentne komórki macierzyste, podjęto też próby otrzymania świń, których organy lepiej nadawałyby się do ksenotransplantacji świnia – człowiek [10]. Modyfikacje polegały na edytowaniu genów kodujących białka regulacyjne działających w komórkach naczyń krwionośnych i limfatycznych. Cytowana praca wywołała dyskusję na tematy etyczne, pojawiły się opinie, że nie jest właściwym wytwarzanie ludzko-zwierzęcych chimer.

Można przypuszczać, że gdy techniki edytowania genów w całym organizmach zostaną udoskonalone na tyle, że nie będą wiązały się z zagrożeniami, które wymienia Komisja Waszyngtońska, zarówno środowisko naukowe jak i szeroka publiczność zaakceptują bez zastrzeżeń stosowanie tych technik w celu ratowania życia ludzkiego, tak jak obecnie akceptowana jest metoda zapłodnienia *in vitro*, pomimo sprzeciwu nielicznych, na szczęście, fundamentalistów.

PIŚMIENNICTWO

1. Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL, Woo SC (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. Proc Natl Acad Sci USA 80: 4803-4807
2. Vaecck M, Reynaerts A, Hofte H, Jansens S, De Beuckeleer M, Dean C, Zabeau M, Van Montagu M, Leemans J (1987) Transgenic plants protected from insect attack. Nature 328: 33-37
3. Doudna JA, Charpentier E (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science 346: 1258096-1258099
4. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G (2000) Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. Mol Microbiol 36: 244-246
5. Wiedenheft M, Sternberg SH, Doudna JA (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. Nature 482: 331-338
6. Le Page M (2017) Boom in human gene editing as 20 CRISPR trials gear up. New Scientist, News Technology
7. Lillico SG, Proudfoot Ch, Carlson DF, Stverakova D, Neil C, Blain C, King TJ, Ritchie WA, Tan W, Mileham AJ, David G, McLaren DG, Fahrenkrug SC, Whitelaw BA (2013) Live pigs produced from genome edited zygotes. Sci Rep 3: 2847-2852
8. Proudfoot Ch, Carlson DF, Huddart R, Long ChR, Pryor JH, Tim J, King TJ, Lillico SG, Mileham AJ, McLaren D. G, C. Whitelaw BA, Fahrenkrug SC, (2015) Genome edited sheep and cattle. Transgenic Res 24: 147-153

9. Xin Zhao X, Wei Ni, Sai W, Qiao J, Sheng J, H, Guozhong Li G, Wang D, Hu S (2015) Targeted Editing of Myostatin Gene in Sheep by Transcription Activator-like Effector Nucleases. *Asian-Australas J Anim Sci* 29: 413 -418
10. Feng W, Dai Y, Mou L, Cooper DKC, Shi D, Cai Z (2015) The Potential of the Combination of CRISPR/Cas9 and Pluripotent Stem Cells to Provide Human Organs from Chimaeric Pigs. *J Mol Sci* 16: 6545-6556

Gene editing

Piotr Węgleński✉

Centre of New Technologies, University of Warsaw; 2c S. Banacha St., 02-097 Warszawa, Poland

✉ e-mail: wegle@adm.uw.edu.pl

Key words: gene editing, genetically modified organisms, Asilomar conference, Washington conference, CRISPR-Cas

ABSTRACT

Development of the gene engineering techniques has raised worries that they will be used for construction of organism endangering humans and environment. In 1975 at the Asilomar conference, geneticists from many countries decided that genetic engineering brings more benefits than threats. In last years a new CRISPR-Cas technique emerged. It allows to make the precise changes in genomes, e.g. to inactivate particular genes or to replace mutated genes by their wild-type alleles. Inactivation in mice of genes corresponding to those whose mutations cause the genetic diseases in man allows to get model organisms for studying the etiology of given disease and for working out the methods of its curing. This technique can be applied for repairing genes whose mutations result in metabolic diseases and cancer. Some voices were raised that the technique can be potentially used for the "improvement" of man, what would create many ethical and social problems. Geneticists, ethicists and lawyers gathered in 2015 at the Washington conference, discussed these problems and proposed rules for their solving.