

GENETYKA

Edycja genomu człowieka

Minęło pięć lat od pierwszego eksperymentu dotyczącego modyfikacji genomu ludzkich zarodków metodą CRISPR/Cas. W którym miejscu teraz jesteśmy?

TEKST **ANDRZEJ KOCHAŃSKI**, KONSULTANT KRAJOWY W DZIEDZINIE GENETYKI KLINICZNEJ

FAKT

Na naszych oczach odbywa się rewolucja technologiczna w zakresie genetyki człowieka.



W pierwszych dniach października dowiedzieliśmy się o przyznaniu tegorocznej nagrody Nobla w dziedzinie chemii dla Emmanuelle Charpentier i Jennifer A. Doudna za „rozwój metody edytowania genomu”. Minęło zaledwie osiem lat od publikacji pierwszego artykułu dotyczącego modyfikacji genomu technologią CRISPR/Cas na łamach czasopisma „Science”. Metoda ta jest fantastycznym narzędziem

naukowym, ale o nie do końca poznanym jeszcze zastosowaniu klinicznym.

W niniejszym artykule chciałbym ukazać technologię CRISPR/Cas w aspekcie modyfikacji genetycznej ludzkich komórek germinalnych. W 2015 r. świat obiegła wiadomość o pierwszej próbie modyfikacji genomu ludzkich zarodków tą metodą. Środowisko naukowe odniosło

się wówczas z rezerwą do takiego działania. Zaledwie trzy lata później chiński biofizyk dr He Jiankui ogłosił narodziny pierwszych dwóch dzieci ze zmodyfikowanym genomem. Tym razem dokonania chińskiego naukowca spotkały się z ostrą reakcją środowiska naukowego Chin i całego świata. Dyskusja na temat modyfikacji genomu ludzkich zarodków rozgorzała na nowo. Po jednej „stronie barykady” stanęli zdecydowani

przeciwnicy ingerencji w zmiany dziedziczne w ludzkim genomie. Po drugiej stronie sporu słyszalne były głosy zwolenników wolności badań naukowych. W piśmiennictwie pojawiają się zatem pytania o kontrolę nad zastosowaniem technologii CRISPR/Cas w odniesieniu do komórek germinalnych.

HIATUS TERAPEUTYCZNO-DIAGNOSTYCZNY

Lata 90. XX w. przyniosły rewolucję technologiczną w zakresie genetyki człowieka pod postacią łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, polymerase chain reaction). Ta rewolucja nabrała tempa w drugiej dekadzie XXI w., kiedy to pojawiły się możliwości jednoczesnej analizy tysięcy genów człowieka (NGS, next generation sequencing). Wprowadzenie NGS do diagnostyki chorób genetycznie uwarunkowanych całkowicie zmieniło obraz współczesnej medycyny.

W latach 2012-2015 dokonał się kolejny przełom w genetyce człowieka, tym razem budzący nadzieję na leczenie chorób genetycznie uwarunkowanych. Technologia CRISPR/Cas pozwala na wprowadzenie trwałej modyfikacji genomu człowieka. Podobnie jak w przypadku wspomnianie już reakcji PCR, naśladującej naturalny proces replikacji DNA, odkryto system CRISPR/Cas (który przez setki milionów lat był używany przez bakterie do niszczenia materiału genetycznego bakteriofagów), umożliwiając „wymianę” uszkodzonych genów w genomie człowieka.

CO STOI NA PRZESZKODZIE?

Myli się ten, kto myśli, że spór w piśmiennictwie fachowym o zastosowanie technologii CRISPR/Cas ma charakter światopoglądowy. W tym miejscu należy dla porządku dodać, że pierwsze obiecujące próby zastosowania tej technologii w terapii somatycznej chorób (nowotwory, hemoglobinopatie, dystrofia mięśniowa) nie są przedmiotem sporu. Debata w środowisku akademickim dotyczy głównie terapii komórek germinalnych z zastosowaniem



Myli się ten, kto myśli, że spór w piśmiennictwie fachowym o zastosowanie technologii CRISPR/Cas ma charakter światopoglądowy.

metody CRISPR/Cas. Czytelników zainteresowanych szczegółami odsyłam do literatury specjalistycznej. Problemy z zastosowaniem technologii CRISPR/Cas w odniesieniu do komórek germinalnych można podzielić zasadniczo na dwie duże grupy zagadnień. Pierwsza dotyczy kwestii technicznych. Druga grupa problemów odnosi się do struktury ludzkiego genomu, która została rozpracowana zaledwie w części. Sekwencja ludzkiego genomu została wprawdzie poznana, jednakże znajomość aż 98 proc. tejże sekwencji jest ograniczona. Dawniej przyjmowano, że te 98 proc. DNA to tzw. śmieciowe DNA. W rzeczywistości bardzo niewiele wiadomo o części regulacyjnej genomu, która odpowiada za ekspresję poszczególnych genów.

W przypadku CRISPR/Cas oprócz genu, który ma zostać zmodyfikowany, dochodzi do przypadkowych, niepożądanych i trwałych modyfikacji genomu. Jeśli taka przypadkowa i nieprzewidywalna modyfikacja nastąpi w intronie lub innych miejscach niekodujących genu, skutki kliniczne będą znikome. Jeśli jednak nieplanowana modyfikacja genu pojawi się w obrębie innego genu, skutki tego zjawiska mogą być groźne (indukcja nowej dodatkowej choroby genetycznie uwarunkowanej z utrwaleniem mutacji w kolejnych pokoleniach).

Warto jeszcze dodać, że określenie rzeczywistej i pełnej listy mutacji „off-target” nie jest w pełni możliwe. Dokładność technologii CRISPR/Cas zależy od kontekstu genetycznego (sekwencje SNP, single nucleotide polymorphisms), który w przypadku każdego człowieka jest inny. Kolejnym problemem jest zjawisko mozaikowości. Jak dotąd nie udało się

uzyskać pełnej modyfikacji wszystkich komórek poddanych procedurze CRISPR/Cas.

Wreszcie, należy zatrzymać się przy problemie mutacji „on-target”. Początkowo był on niezauważany, gdyż koncentrowano się na mutacjach nieplanowanych, występujących poza genami „docelowymi”. W ostatnich latach zauważono, że technologia CRISPR/Cas może, oprócz delekcji genu docelowego, wywołać delekcje obejmujące geny sąsiadujące z genem modyfikowanym. W przypadku minimalnej zmiany polegającej na zamianie pojedynczych nukleotydów (mutacje typu missense) technologia CRISPR może „nie odróżnić” allelu typu dzikiego od allelu nieprawidłowego. Nawet jeśli założymy, że zostały pokonane wszystkie problemy natury technicznej, technologia CRISPR/Cas „zderzy” się z kompleksową budową genomu człowieka.

Genomu człowieka nie można postrzegać jako mechanizmu, w którym poszczególne geny można przyrównać do trybików, a wymiana uszkodzonego genu na nowy, prawidłowy, przywraca właściwe działanie mechanizmu. Geny oddziałują pomiędzy sobą w bardzo złożony sposób i zwykle nie można przypisać im jednej funkcji. Zasób wiadomości o regulacji działania genomu człowieka jest znikomy, jeśli próbować go porównywać z wiedzą dotyczącą struktury regionów kodujących.

CO SIĘ WYDARZYŁO W ROKU 2018?

W 2015 r. chińscy naukowcy opublikowali wyniki badań nad edycją genomu ludzkich zarodków niezdolnych do dalszego rozwoju, które pochodziły z procedury in vitro. Eksperyment spotkał się z krytyką.



Zdaniem amerykańskiego bioetyka S. Krimskiego eksperyment Jiankui był aktem szaleństwa, podczas którego chiński naukowiec aż 10-krotnie złamał zasady etyki.

W magazynie „Science” opublikowano tekst moratorium na edycję genomów ludzkich zarodków.

W 2018 r. dr He Jiankui ogłosił światu (referat) narodziny pary bliźniąt – dziewczynek o imionach Lulu i Nana ze zmodyfikowanym meto-
dą CRISPR/Cas genomem. Zdaniem amerykańskiego bioetyka S. Krimskiego eksperyment Jiankui był aktem szaleństwa, podczas którego chiński naukowiec aż 10-krotnie złamał zasady etyki. W eksperymencie nie odniósł się do konfliktu interesów ani nie uzyskał właściwych zgód ze strony lokalnych i centralnych komisji bioetycznych. Badacz nie oszacował ryzyka eksperymentu, ponadto nie poddał jego wyników ocenie recenzentów ani ich nie opublikował. O ile w 2015 r. dokonano modyfikacji genomu ludzkich zarodków, to w 2018 r. uzupełniono eksperyment o implantację zarodków do macicy i narodziny dzieci ze zmodyfikowanym genomem. Od strony naukowej eksperyment dr He Jiankui nie powiódł się. Nie miał na celu leczenia choroby genetycznej uwarunkowanej, tylko był próbą

wzmocnienia genetycznego (genetic enhancement).

KONTROLA BADAŃ

Czy i w jaki sposób należy kontrolować badania nad technologią CRISPR/Cas w zakresie edycji genomów ludzkich komórek germinalnych? W środowisku naukowym coraz częściej słyszy się głosy nawołujące do ustanowienia regulacji prawnych na poziomie globalnym dotyczących stosowania tej metody. Już w 2015 r., po publikacji wyników edycji genomu ludzkich zarodków, wydano pierwsze moratorium w tej sprawie. Jego autorzy postulowali: ograniczenie prób modyfikacji genomu ludzkich komórek germinalnych (w szczególności dotyczy to krajów ze „słabym” ustawodawstwem w tym zakresie); stworzenie międzynarodowego forum umożliwiającego dyskusję; zapewnienie transparentności badań naukowych oraz ustanowienie międzynarodowego gremium ekspertów, które wydawałoby odpowiednie rekomendacje.

W 2017 r. Amerykańskie Towarzystwo Genetyki Człowieka (ASHG) na łamach czasopisma „American Journal of Human Genetics” zamieściło oficjalne stanowisko kilku międzynarodowych i amerykańskich organizacji zajmujących się genetyką człowieka. W zasadzie wszystkie organizacje były zgodne co do zasady, że zastosowanie kliniczne technologii edycji genomów zarodków ludzkich na obecnym etapie rozwoju technologii nie powinno mieć miejsca. Takiej jednomyślności nie znajdziemy już jednak w kwestii badań podstawowych

z zastosowaniem edycji genomów ludzkich zarodków. W tym przypadku większość organizacji międzynarodowych opowiedziała się za kontynuacją badań.

Po czterech latach od publikacji pierwszego moratorium dotyczącego zastosowania CRISPR/Cas do edycji genomów zarodków ludzkich, ukazał się kolejny tekst nawołujący do co najmniej pięcioletniego moratorium. Eksperti w zakresie technologii CRISPR/Cas przestrzegają przed niewystarczającym poziomem technicznym tej metody, który zapewniłby bezpieczną edycję genomów ludzkich zarodków. Autorzy moratorium z 2019 r. zwracają szczególną uwagę na możliwość utrwalenia niepożądanych modyfikacji genetycznych, powstałych na skutek zastosowania tej technologii w kolejnych pokoleniach. Sygnatariusze wspomnianego moratorium apelują do rządów poszczególnych państw o publiczne deklaracje uniemożliwiające jakiegokolwiek zastosowanie kliniczne edycji genomów komórek germinalnych w okresie co najmniej pięciu lat. Zdaniem autorów moratorium koordynacją edycji ludzkich komórek germinalnych na poziomie globalnym powinna zająć się Światowa Organizacja Zdrowia bądź inne organizacje międzynarodowe. Na koniec twórcy moratorium przestrzegają przed konsekwencjami zdrowotnymi edycji genomu dla pacjentów, jak i nadwyżeraniem zaufania społecznego.

W literaturze fachowej pojawiają się opracowania, które krytycznie odnoszą się do prób ograniczania zastosowania technologii CRISPR/Cas. Zdaniem prof. Kerry Lynn Macintosh z Wydziału Prawa Santa Clara University, światowe moratorium na modyfikację genomów komórek germinalnych może zachęcić rządy państw do wstrzymania badań, opóźnić badania podstawowe w tym zakresie, a nawet doprowadzić do stygmatyzacji dzieci, które urodziły się ze zmodyfikowanym genomem.

Dziękuję moim Nauczycielom i Wszystkim, którzy nadęstali uwagi i komentarze w trakcie pisania manuskryptu. ■

DYLEMAT

Czy i w jaki sposób należy kontrolować badania nad technologią CRISPR/Cas w zakresie edycji genomów ludzkich komórek germinalnych?

Metoda CRISPR/Cas (ang. *Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats*, pol. zgrupowane, regularnie rozproszone, krótkie, powtarzające się sekwencje palindromiczne) – metoda inżynierii genetycznej, pozwalająca na manipulację genomem danego organizmu. CRISPR/CAS stanowi modyfikację mechanizmu immunologicznego obrony bakterii przed wirusami. Jako technika edycji (modyfikacji genomu) wymaga zastosowania RNA, który „naprowadza” enzym Cas na ściśle określoną sekwencję docelową. Następnie nukleaza Cas „nacina” specyficznie tę sekwencję. W miejscu dwuniciowego pęknięcia DNA komórka „zabudowuje” brakującą sekwencję poprzez dwa konkurencyjne mechanizmy naprawcze DNA (rekombinacja homologiczna i rekombinacja niehomologiczna).