CRISPR-Cas9 w praktyce: jak naprawde dziala edycja genow

Mechanizm molekularny, zastosowania kliniczne i przemilczane ryzyko off-target effects

Piotr Nowak · 16.10.2026

W 2023 roku brytyjska agencja MHRA zatwierdzila Casgevy - pierwsza terapie oparta na CRISPR-Cas9 dopuszczona do uzytku klinicznego. Lek kosztuje w USA okolo 2,2 miliona dolarow za leczenie jednego pacjenta. Naglowki krzyczaly o przelomie, o wyleczeniu sierpowatosci i beta-talasemii. Malo kto jednak pisal o tym, ze w tej samej terapii obserwowano edycje w miejscach genomu, ktore nie byly celem. Albo o tym, ze mechanizm, ktory sprawia, ze CRISPR w ogole dziala, pochodzi z ukladu immunologicznego bakterii.

Pracuje z mikroorganizmami od ponad dekady i musze przyznac, ze kiedy po raz pierwszy przeczytalem oryginalna prace Doudny i Charpentier z 2012 roku w Science, bylem pod wrazeniem nie tyle samej technologii, co jej elegancji. To nie byl wynalazek z prozni - to bylo odkrycie czegos, co bakterie robily od milionow lat.

Skad sie wzial CRISPR - historia bakteryjnej odpornosci

Zanim przejde do mechanizmu, chce cofnac sie do poczatku. Skrot CRISPR oznacza Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - krotkie powtarzajace sie sekwencje palindromiczne rozmieszczone regularnie w genomie bakterii. Odkryto je po raz pierwszy w 1987 roku w genomie Escherichia coli, ale przez kolejne dwie dekady nikt nie wiedzial, do czego sluza.

Odpowiedz przyszla w 2007 roku, gdy Rodolphe Barrangou i wspolpracownicy wykazali, ze sekwencje CRISPR stanowia czesc bakteryjnego ukladu odpornosciowego. Bakteria, ktora przezyje atak wirusa, moze wbudowac fragment wirusowego DNA pomiedzy swoje sekwencje CRISPR. Przy kolejnym zakazeniu tym samym wirusem bakteria rozpoznaje najezdzce i niszczy jego material genetyczny. To cos w rodzaju immunologicznej pamieci - tyle ze zakodowanej bezposrednio w genomie.

System CRISPR-Cas9, ktory dzis stosujemy w laboratoriach i klinikach, pochodzi glownie od bakterii Streptococcus pyogenes - tego samego drobnoustroju, ktory odpowiada za angine paciorkowcowa. Bialko Cas9 z tej bakterii stalo sie molekularnym skalpelem, ktory zmienil biologie.

Od bakteryjnej tarczy do narzedzia inzynierii genetycznej

Przelom nastapil w 2012 roku, gdy Jennifer Doudna i Emmanuelle Charpentier opublikowaly prace pokazujaca, ze system CRISPR-Cas9 mozna przeprogramowac - zamiast rozpoznawac sekwencje wirusowe, moze ciac dowolny odcinek DNA, ktory tylko wskazemy. W 2020 roku obie badaczki otrzymaly za to Nagrode Nobla w dziedzinie chemii. To bylo uznanie nie tylko odkrycia, ale calkowicie nowego paradygmatu w biologii molekularnej.

Jak dziala nukleaza Cas9 - molekularne szczegoly

Zeby zrozumiec, dlaczego CRISPR-Cas9 jest tak precyzyjny - i dlaczego bywa nieprecyzyjny - trzeba wejsc na poziom atomow i wiazan.

Bialko Cas9 z S. pyogenes (SpCas9) ma mase czasteczkowa okolo 160 kDa. To stosunkowo duze bialko, ktore sklada sie z dwoch glownych platow: plata rozpoznajacego (REC) i plata nukleazowego (NUC). Miedzy nimi znajduje sie kanal, przez ktory przechodzi dwuniciowy DNA podczas skanowania genomu.

Samo bialko Cas9 jest jednak niefunkcjonalne bez RNA. W oryginalnym systemie bakteryjnym uczestnicza dwa rodzaje RNA: crRNA (CRISPR RNA) i tracrRNA (trans-activating crRNA). W praktyce laboratoryjnej laczy sie je w jeden czasteczka - sgRNA (single guide RNA), co znacznie upraszcza stosowanie technologii.

Rola RNA prowadzacego - sgRNA

Czasteczka sgRNA ma dwa funkcjonalne regiony. Pierwszy - scaffold - jest staly i wiaze sie z bialkiem Cas9. Drugi - spacer - to sekwencja 20 nukleotydow komplementarna do miejsca docelowego w genomie. To wlasnie te sekwencje mozemy zaprojektowac dowolnie, wskazujac Cas9, gdzie ma ciac.

Gdy kompleks Cas9-sgRNA wnika do jadra komorkowego, zaczyna skanowac DNA. Nie robi tego sekwencja po sekwencji w sposob liniowy - bialko Cas9 wiaze sie z DNA w miejscach zawierajacych sekwencje PAM (Protospacer Adjacent Motif). Dla SpCas9 to sekwencja NGG (gdzie N to dowolny nukleotyd). Gdy Cas9 znajdzie PAM, rozplata podwojna helise i sprawdza, czy sasiednia sekwencja 20 nukleotydow jest komplementarna do spacera w sgRNA.

Jesli komplementarnosc jest wystarczajaca, dochodzi do aktywacji domeny nukleazowej. Cas9 posiada dwie domeny katalityczne: RuvC i HNH. Kazda z nich przecina jedna nic DNA. Efektem jest dwuniciowe pekniecie DNA (double-strand break, DSB) - trzy do czterech nukleotydow od sekwencji PAM.

Co dzieje sie po cieciu - naprawa DNA

Pekniecie dwuniciowe to powazne uszkodzenie genomu. Komorka musi je naprawic i robi to na dwa glowne sposoby:

- NHEJ (Non-Homologous End Joining) - szybka, ale niedokladna naprawa. Dwie wolne koncowki DNA sa laczone bez matrycy, co czesto prowadzi do insercji lub delecji (indels) kilku nukleotydow. To niszczy funkcje genu - przydatne, gdy chcemy gen wylaczyc (knockout).
- HDR (Homology-Directed Repair) - wolniejsza, ale precyzyjna naprawa oparta na matrycy. Jesli dostarczymy komorce odpowiednia sekwencje DNA jako matryce, komorka moze wbudowac ja dokladnie w miejsce pekniecia. To umozliwia naprawe mutacji lub wprowadzenie nowej sekwencji.

Problem polega na tym, ze HDR zachodzi glownie w komorkach dzielacych sie, podczas fazy S i G2 cyklu komorkowego. W komorkach postmitotycznych - jak neurony czy kardiomiocyty - dominuje NHEJ. To powazne ograniczenie dla terapii chorob neurodegeneracyjnych.

Zastosowania kliniczne - od teorii do sali operacyjnej

Minelo zaledwie 11 lat od publikacji Doudny i Charpentier do pierwszego zatwierdzonego leku opartego na CRISPR. To tempo jest niezwykle jak na standardy medycyny.

Casgevy (exa-cel, exagamglogene autotemcel) celuje w choroby hemoglobinopatie - sierpowatosc krwi i beta-talasemie. Mechanizm jest elegancki: zamiast naprawiac zmutowany gen hemoglobiny doroslej, terapia reaktywuje gen hemoglobiny plodowej (HbF), ktory normalnie wycisza sie po urodzeniu. Edycja w genie BCL11A usuwa element wzmacniajacy, ktory tlumi produkcje HbF. Efekt? U pacjentow leczonych Casgevy poziom hemoglobiny plodowej wzrasta do wartosci, ktore praktycznie eliminuja kryzysy sierpowate.

W badaniach klinicznych fazy III, ktorych wyniki opublikowano w New England Journal of Medicine w 2023 roku, 93,5% pacjentow z sierpowatoscia nie doswiadczylo ani jednego kryzysu przez co najmniej 12 miesiecy po leczeniu. To liczba, ktora robi wrazenie.

Inne kierunki terapeutyczne

Hemoglobinopatie to dopiero poczatek. W 2026 roku w roznych fazach badan klinicznych znajduja sie terapie oparte na CRISPR-Cas9 lub pokrewnych systemach, skierowane przeciwko:

To imponujaca lista. Ale kazda z tych terapii niesie ze soba pytania, ktore rzadko trafiaja na pierwsze strony gazet.

Off-target effects - przemilczany problem

Tu dochodzimy do sedna. Off-target effects to edycje genomu, ktore zachodza w miejscach innych niz zamierzone. To nie jest rzadkosc - to nieodlaczna cecha systemu CRISPR-Cas9 w jego podstawowej formie.

Skad sie biora? Kompleks Cas9-sgRNA nie wymaga idealnej komplementarnosci, zeby dokonac ciecia. Badania pokazuja, ze SpCas9 moze tolerowac do 5 niedopasowan w sekwencji spacera, szczegolnie jesli sa one ulokowane dalej od sekwencji PAM. W genomie czlowieka, ktory liczy okolo 3,2 miliarda par zasad, sekwencji podobnych do naszego celu moze byc kilka, kilkadziesiat, a czasem kilkaset.

"Wyobraz sobie, ze wysylasz wyszukiwarke po slowo 'kot' w bibliotece zawierajacej 3,2 miliarda liter. Znajdzie 'kot', ale tez 'kota', 'kotlet' i 'Skot' - zalezy od tego, jak czula jest wyszukiwarka.