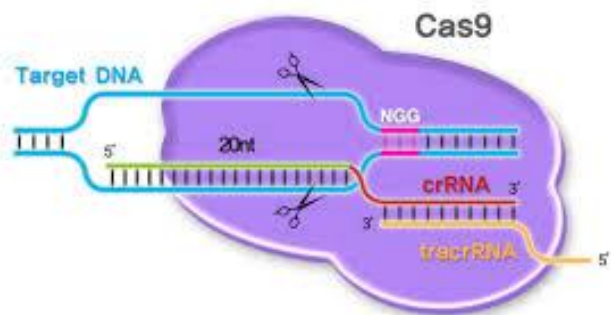


ΕΚΘΕΣΗ

Γενετική επεξεργασία του γονιδιώματος

Εισηγητές: Βασιλική Μολλάκη, Τάκης Βιδάλης



ΕΘΝΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΒΙΟΗΘΙΚΗΣ

Νεοφύτου Βάμβα 6, Τ.Κ. 10674, Αθήνα, τηλ. 210- 88.47.700, φαξ 210- 88.47.701

E-mail: secretariat@bioethics.gr, url: www.bioethics.gr



Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	4
2. Τα δεδομένα.....	4
2.1. Νουκλεάσες, οι νέες τεχνολογίες επεξεργασίας του γονιδιώματος.....	4
2.1.1 Οι νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου (ZFNs)	5
2.1.2 Οι νουκλεάσες τύπου TALEN (TALENs)	5
2.1.3 Οι νουκλεάσες του συστήματος CRISPR/Cas9	5
2.2. Τα μειονεκτήματα των νέων τεχνολογιών επεξεργασίας του γονιδιώματος	8
2.3. Εφαρμογές στον άνθρωπο.....	8
2.3.1 Θεραπευτικές εφαρμογές στον άνθρωπο	9
2.3.2 Κλινικές εφαρμογές.....	10
2.3.4 Προεμφυτευτική διάγνωση.....	10
2.3.3 Βελτίωση ανθρώπινων χαρακτηριστικών	11
2.4. Εφαρμογές στα ζώα	11
2.5. Εφαρμογές στα φυτά	11
2.6. Εφαρμογές στα βακτήρια	12
3. Τα ηθικά ζητήματα.....	12
3.1. Έρευνα στο έμβρυο.....	13
3.2 Ευγονική	15
3.3 Επιδράσεις στην εξέλιξη των ειδών και το περιβάλλον	15
3.4 Διπλώματα ευρεσιτεχνίας.....	16
3.5 Χρηματοδότηση της σχετικής έρευνας.....	16
3.6 Δημοσίευση των αποτελεσμάτων της σχετικής έρευνας.....	17
4. Η σχετική νομοθεσία.....	17
5. Προτάσεις.....	19
5.1 Εφαρμογή της αρχής της προφύλαξης	19
5.2 Δημοσιεύσεις	20
5.3 Νέα νομοθεσία.....	20
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	21

1. Εισαγωγή

Κατά την τελευταία δεκαετία, ανακαλύφθηκαν και αναπτύχθηκαν νέοι μηχανισμοί επεξεργασίας του γονιδιώματος, οι οποίοι είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν τόσο στο ανθρώπινο γονιδίωμα, με σκοπό την αποφυγή ή θεραπεία γενετικών ασθενειών, όσο και σε γονιδιώματα άλλων ειδών, με σκοπό τη δημιουργία οργανισμών με συγκεκριμένες ιδιότητες. Η σχετική ευκολία με την οποία μπορούν να εφαρμοστούν οι νέες μέθοδοι τροποποίησης του γονιδιώματος στο εργαστήριο και η εξειδίκευσή τους, σε συνδυασμό με το σχετικά χαμηλό κόστος, τις καθιστά σημαντικά εργαλεία για τη Γενετική Μηχανική, εγείροντας ταυτόχρονα έντονο προβληματισμό για την ορθή και υπεύθυνη χρήση τους.

Η παρούσα Έκθεση παρουσιάζει τα επιστημονικά δεδομένα για τις νέες μεθόδους επεξεργασίας του γονιδιώματος και τις εφαρμογές τους, τα ζητήματα βιοηθικής που προκύπτουν από τη χρήση τους καθώς και το υπάρχον νομοθετικό πλαίσιο για τη χρήση τους, καταλήγοντας σε προτάσεις για την ηθική και ασφαλή εφαρμογή τους.

2. Τα δεδομένα

2.1. Νουκλεάσες, οι νέες τεχνολογίες επεξεργασίας του γονιδιώματος

Οι νέες μέθοδοι επεξεργασίας του γονιδιώματος βασίζονται στη χρήση ειδικών ενζύμων, που ονομάζονται νουκλεάσες.^{1,2,3} Οι νουκλεάσες αυτές κόβουν τους δύο κλώνους του DNA σε συγκεκριμένες και στοχευμένες θέσεις στο γονιδίωμα. Στο κύτταρο, τα ρήγματα στο DNA επιδιορθώνονται με τη βοήθεια δύο μηχανισμών, του ομόλογου ανασυνδυασμού (HR, Homologous Recombination) και της σύνδεσης μη-ομόλογων άκρων (NHEJ, Non-Homologous End-Joining),⁴ έχοντας ως αποτέλεσμα την προσθήκη, αφαίρεση ή αντικατάσταση συγκεκριμένων αλληλουχιών του DNA. Έτσι, η δυνατότητα να δημιουργούνται στοχευμένα ρήγματα στο γονιδίωμα οργανισμών σε συνδυασμό με τη δυνατότητα επιδιόρθωσής τους,

έφεραν επανάσταση στην επεξεργασία/επιδιόρθωση του γονιδιώματος. Οι νουκλεάσες, οι οποίες παρέχουν τη δυνατότητα αυτή, είναι:

- Οι νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου (ZFNs, Zinc Finger Nucleases).
- Οι νουκλεάσες τύπου TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases).
- Οι νουκλεάσες του συστήματος CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/associated protein-9 nuclease).

2.1.1 Οι νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου (ZFNs)

Οι νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου⁵ χρησιμοποιούνται ήδη εδώ και μία δεκαετία στην έρευνα, και η τεχνολογία αυτή έχει ήδη εφαρμοστεί για την επεξεργασία του γονιδιώματος πολλών οργανισμών (Πίν. 1).

2.1.2 Οι νουκλεάσες τύπου TALEN (TALENs)

Οι νουκλεάσες τύπου TALEN⁶ παρουσιάζουν ακόμη μεγαλύτερη ειδικότητα ως προς την αλληλουχία του DNA, σε σχέση με τις νουκλεάσες ψευδαργύρου. Όπως και οι νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου, έτσι και η τεχνολογία TALEN έχει ήδη εφαρμοστεί σε διάφορους οργανισμούς (Πίν. 1).

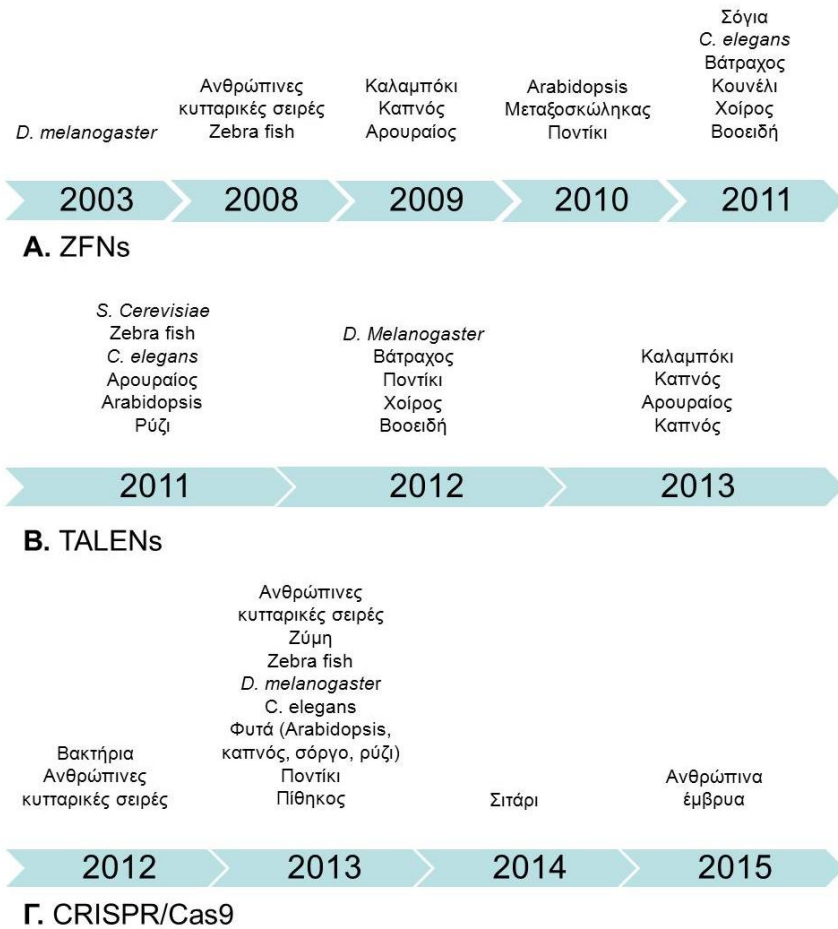
2.1.3 Οι νουκλεάσες του συστήματος CRISPR/Cas9

Το σύστημα CRISPR/Cas9⁷ οδηγείται προς το DNA-στόχο με μόρια RNA που είναι συμπληρωματικά προς την αλληλουχία-στόχο, ενώ οι νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου και τύπου TALEN διαθέτουν ειδική δομή για να συνδεθούν στο DNA. Αν και ανακαλύφθηκε πιο πρόσφατα, χάρη στην απλότητα, την αποτελεσματικότητα και την ευελιξία του συστήματος, η τεχνολογία CRISPR/Cas9 αποτελεί το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο στην τροποποίηση του γονιδιώματος (Πίν. 1). Το σύστημα CRISPR/Cas9 ανακαλύφθηκε το 2007 αρχικά στα βακτήρια κι έπειτα στα αρχαιοβακτήρια, ως αμυντικός μηχανισμός κατά των ιών.

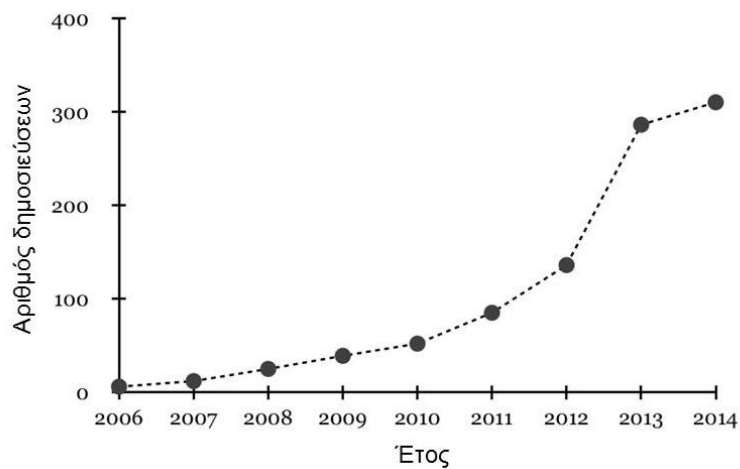
Έκτοτε, το ενδιαφέρον των ερευνητών στράφηκε περισσότερο προς την τεχνολογία CRISPR/Cas9 (Εικ. 1) και είναι αυξανόμενο, όπως φαίνεται από τον αριθμό των επιστημονικών δημοσιεύσεων σε ετήσια βάση (Εικ. 2).

Πίνακας 1. Επεξεργασία γονιδιώματος σε διάφορα είδη οργανισμών με τη χρήση νουκλεασών.

Τύπος νουκλεασών	Οργανισμός	Βιβλιογραφία	
Νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου (ZFNs)	Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές	8	
	Arabidopsis	9,10	
	Καπνός	11,12	
	Σόγια	13	
	Καλαμπόκι	14	
	<i>D. melanogaster</i>	15	
	<i>C. elegans</i>	16	
	Μεταξοσκώληκας	17	
	Zebra fish	18	
	Βάτραχος	19	
	Ποντίκι	20	
	Αρουραίος	21	
	Κουνέλι	22	
	Χοίρος	23	
	Βοοειδή	24	
	<i>S. cerevisiae</i>	25	
Νουκλεάσες τύπου TALEN (TALENs)	<i>D. melanogaster</i>	26	
	Zebra fish	27,28	
	<i>C. elegans</i>	29	
	Βάτραχος	30,31	
	Ποντίκι	32,33	
	Αρουραίος	34	
	Χοίρος & Βοοειδή	35	
	Φυτά (Arabidopsis, ρύζι, καπνός)	36-39	
	Νουκλεάσες συστήματος του CRISPR/Cas9	Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές	40-43
		<i>S. Cerevisiae</i>	44
Zebra fish		45	
<i>D. melanogaster</i>		46	
<i>C. elegans</i>		47	
Φυτά (Arabidopsis, καπνός, σόργο, ρύζι)		48	
Ποντίκι		49	
Πίθηκος		50	
Ανθρώπινα έμβρυα		51	
Σιτάρι		52	



Εικόνα 1. Χρονοδιάγραμμα των εφαρμογών των νουκλεασών δακτύλων ψευδαργύρου (ZFNs) (Α), των νουκλεασών τύπου TALEN (TALENs) (Β), και του συστήματος CRISPR/Cas9 (Γ), σε διάφορα είδη οργανισμών.



Εικόνα 2. Αύξηση των επιστημονικών δημοσιεύσεων για την τεχνολογία CRISPR/Cas9 τα τελευταία έτη (Πηγή: Web of Science).

2.2. Τα μειονεκτήματα των νέων τεχνολογιών επεξεργασίας του γονιδιώματος

Εξαιτίας του τρόπου λειτουργίας των παραπάνω νουκλεασών, οι οποίες αναγνωρίζουν συμπληρωτικές αλληλουχίες, οι νέες μέθοδοι επεξεργασίας του γονιδιώματος, και ιδιαίτερα το σύστημα CRISPR/Cas9, παρουσιάζουν ένα βασικό μειονέκτημα: είναι δυνατόν να δημιουργούν δίκλινα ρήγματα στο γονιδίωμα σε έκτοπες θέσεις, π.χ. ρήγματα στο επιθυμητό γονίδιο-στόχο αλλά ταυτόχρονα και σε άλλα γονίδια, τα οποία παρουσιάζουν ομόλογες (παρόμοιες) αλληλουχίες (off target effects).⁵³⁻⁵⁶

Εκτός και αν ξεπεραστεί, το πρόβλημα των έκτοπων ρηγμάτων θα αποτελέσει τον βασικότερο ανασταλτικό παράγοντα για τη χρήση των τεχνολογιών αυτών για θεραπευτικούς σκοπούς στον άνθρωπο. Η δημιουργία έκτοπων ρηγμάτων αποτέλεσε ένα από τα βασικότερα ευρήματα της μελέτης, η οποία εφάρμοσε την τεχνολογία CRISPR/Cas9 σε ανθρώπινα έμβρυα.⁵¹

Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει ότι τα πιθανά σημεία έκτοπων ρηγμάτων στο γονιδίωμα μπορούν να προβλεφθούν και να ανιχνευτούν.⁵⁷ Οποσδήποτε, η δημιουργία ρηγμάτων σε έκτοπες θέσεις στο γονιδίωμα με την χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας, με σκοπό τη βελτίωση των πρωτοκόλλων και την ελαχιστοποίηση των επιπτώσεων εκτός στόχου.

2.3. Εφαρμογές στον άνθρωπο

Οι δυνατότητες των νέων τεχνολογιών επεξεργασίας του γονιδιώματος, και κυρίως του συστήματος CRISPR/Cas9, ανοίγουν νέους δρόμους για θεραπευτικές καινοτομίες.

2.3.1 Θεραπευτικές εφαρμογές στον άνθρωπο

Πρώτα από όλα, οι τεχνολογίες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιδιόρθωση γονιδιακών μεταλλάξεων, οι οποίες οδηγούν σε ασθένειες. Η τεχνολογία CRISPR/Cas9 έχει ήδη εφαρμοστεί:

- Σε βλαστοκύτταρα εντέρου από ασθενείς με κυστική ίνωση, για την επιδιόρθωση μετάλλαξης στο γονίδιο *CFTR* που προκαλεί κυστική ίνωση.⁵⁸
- Σε ποντίκια, για την επιδιόρθωση μετάλλαξης στο γονίδιο *Crygc* που προκαλεί καταρράκτη.⁵⁹
- Σε ποντίκια, για την επιδιόρθωση μετάλλαξης στο γονίδιο *mdx*, που προκαλεί Μυϊκή Δυστροφία Duchenne.⁶⁰
- Σε ποντίκια, για τη διόρθωση μετάλλαξης στο γονίδιο *F9*, που προκαλεί αιμορροφιλία.⁶¹
- Σε ανθρώπινα έμβρυα, για την επιδιόρθωση μετάλλαξης στο γονίδιο της β-σφαιρίνης, που προκαλεί β-θαλασσαιμία.⁵¹

Η επιδιόρθωση γονιδιακών μεταλλάξεων είναι δυνατόν να εφαρμοστεί σε σωματικά κύτταρα, σε κύτταρα της βλαστικής σειράς (γαμέτες), σε βλαστοκύτταρα και σε ανθρώπινα έμβρυα. Η ταυτόχρονη επεξεργασία διαφορετικών γονιδιακών στόχων καθιστά, θεωρητικά, εφικτή ακόμη και την επιδιόρθωση πολυπαραγοντικών ασθενειών.

Η τεχνολογία CRISPR/Cas9 είναι επίσης δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία και επιδιόρθωση των χρωμοσωμάτων. Ήδη, η μέθοδος έχει εφαρμοστεί σε ποντίκια για τη διόρθωση γονιδιακών αναδιατάξεων σε καρκινικά κύτταρα.⁶²

Η τεχνολογία CRISPR/Cas9 είναι πολλά υποσχόμενη και στη θεραπεία κατά λοιμώξεων, καθώς έχει εφαρμοστεί:

- Κατά του ιού της Ηπατίτιδας Β (HBV), διευκολύνοντας την κάθαρση του ιού.⁶³
- Κατά του ιού ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας- 1 (HIV-1), απενεργοποιώντας την έκφραση και την αντιγραφή γονιδίων του ιού.⁶⁴

Οι νέες τεχνολογίες επεξεργασίας του γονιδιώματος παρέχουν δυνατότητες και κατά του καρκίνου, όπως π.χ. η τεχνολογία CRISPR/Cas9, η οποία έχει ήδη δοκιμασθεί για την παραγωγή συγκεκριμένων υποδοχέων σε T λεμφοκύτταρα ασθενών, ως μια μορφή ανοσοθεραπείας.⁶⁵

2.3.2 Κλινικές εφαρμογές

Έως τώρα, μία κλινική μελέτη Φάσης I εξέτασε τη χρήση των νουκλεασών δακτύλων ψευδαργύρου σε ασθενείς που έχουν μολυνθεί με τον ιό ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV). Ορισμένα άτομα που δεν έχουν την πρωτεΐνη CCR5 στα T-λεμφοκύτταρά τους, παραμένουν υγιή και παρουσιάζουν αντίσταση στον ιό HIV, ενώ τα άτομα που εκφράζουν λιγότερο την πρωτεΐνη CCR5, παρουσιάζουν πιο ήπια λοίμωξη και επιβραδύνεται η εμφάνιση του Συνδρόμου της Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (AIDS). Η μελέτη αυτή εξέτασε εάν επεξεργασμένα T-λεμφοκύτταρά, των οποίων η CCR5 έχει διαγραφεί με τη βοήθεια νουκλεασών δακτύλων ψευδαργύρου, είναι ασφαλή και μπορούν να βοηθήσουν κατά του ιού HIV.^{66,67} Η Φάση I της μελέτης αυτής ολοκληρώθηκε και αναμένονται τα αποτελέσματα, οπότε δεν υπάρχουν σαφείς πληροφορίες ακόμα για την ασφάλεια της μεθόδου στον άνθρωπο. Ωστόσο, η μεγαλύτερη πρόκληση που θα πρέπει να αντιμετωπιστεί και σε αυτή την κλινική μελέτη, είναι η δημιουργία έκτοπων ρηγμάτων στο DNA εκτός του στόχου (βλ. σημείο 2.2).

2.3.4 Προεμφυτευτική διάγνωση

Μόλις τον Μάρτιο του 2015, δημοσιεύθηκε έρευνα επιστημόνων από την Κίνα, οι οποίοι χρησιμοποίησαν την τεχνολογία CRISPR/Cas9 σε ανθρώπινα έμβρυα, με απώτερο σκοπό να μελετήσουν εάν η τεχνολογία αυτή είναι ασφαλής για χρήση σε ανθρώπινα έμβρυα κατά την προεμφυτευτική διάγνωση.⁵¹ Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν περισσευούμενα, μη-βιώσιμα έμβρυα (κάθε ωάριο είχε γονιμοποιηθεί με δύο σπερματοζώαρια), τα οποία έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο της β-σφαιρίνης, που προκαλεί β-θαλασσαιμία, και επεξεργάστηκαν το γονιδίωμα

των εμβρύων με την τεχνολογία CRISPR/Cas9 για να διορθώσουν τη μετάλλαξη αυτή. Ωστόσο, ο μηχανισμός επιδιόρθωσης δεν ήταν πλήρως αποτελεσματικός: η μετάλλαξη δεν διορθώθηκε πλήρως σε όλα τα κύτταρα, με αποτέλεσμα τα έμβρυα να παρουσιάσουν μωσαϊκισμό. Επίσης παρουσιάστηκαν έκτοπα ρήγματα εκτός του στόχου, δηλαδή εκτός του γονιδίου της β-σφαιρίνης.

2.3.3 Βελτίωση ανθρώπινων χαρακτηριστικών

Οι τεχνολογίες επεξεργασίας του γονιδιώματος είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ώστε να επιδιορθώσουν μια βλάβη στο γονιδίωμα και να προσφέρουν θεραπεία αλλά επίσης, είναι δυνατόν να επεξεργαστούν το γονιδίωμα με σκοπό την ενίσχυση υπαρχόντων χαρακτηριστικών. Πράγματι, η «βελτίωση» ή «ενίσχυση» των φυσικών και πνευματικών χαρακτηριστικών του ανθρώπου (human enhancement), η οποία έχει αναπτυχθεί εκτενώς σε προηγούμενες Εκθέσεις για την Εθνική Επιτροπή Βιοηθικής,^{68,69} είναι εφικτή και πολύ περισσότερο προσιτή μέσω της σχετικά απλής τεχνολογίας του συστήματος CRISPR/Cas9.

2.4. Εφαρμογές στα ζώα

Όπως παρουσιάστηκε στον Πίνακα 1, οι τεχνολογίες επεξεργασίας του γονιδιώματος έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί στα ζώα. Οι νουκλεάσες επεξεργασίας του γονιδιώματος παρέχουν τεράστιες δυνατότητες για τη δημιουργία ζωικών μοντέλων εργαστηρίου για τη μελέτη ασθενειών του ανθρώπου^{32-34,49,59-61} αλλά και για τη δημιουργία ζώων με επιθυμητά χαρακτηριστικά για εμπορικούς λόγους,^{23,24,35} όπως η μεγαλύτερη και καλύτερη παραγωγή γάλακτος και κρέατος.

2.5. Εφαρμογές στα φυτά

Αντίστοιχα, η αρχή των νουκλεασών έχει ήδη αποδειχθεί ότι λειτουργεί σε διάφορα είδη φυτών (Πίνακας 1), με σκοπό τη δημιουργία επιθυμητών χαρακτηριστικών, όπως η ευκολότερη και μαζικότερη καλλιέργεια και η αντοχή σε

παράσιτα.^{12-14,37,38} Η χρήση των νουκλεασών για την επεξεργασία του γονιδιώματος των φυτών παρουσιάζει πολλές ομοιότητες, και σε ορισμένες περιπτώσεις ίσως ταυτίζεται, με τη γενετική τροποποίηση των φυτών που προορίζονται για καλλιέργεια ή κατανάλωση από τα ζώα (ζωοτροφές) ή τον άνθρωπο. Ωστόσο, το πλεονέκτημα των νέων τεχνολογιών επεξεργασίας γονιδιώματος είναι ότι μπορεί κανείς να επεξεργαστεί πολλαπλά χαρακτηριστικά των φυτών, ταυτόχρονα. Για παράδειγμα, η ομάδα του Wang *et al.*, χρησιμοποίησε τις τεχνολογίες TALEN και CRISPR/Cas9 για να εξαλείψει ταυτόχρονα τρία γονίδια (knockout) στο σιτάρι προκειμένου να αποκτήσει αντοχή σε μία ασθένεια.⁵² Τέλος, η επεξεργασία του γονιδιώματος των φυτών μπορεί να εφαρμοστεί επίσης για την παραγωγή βιοκαυσίμων.

2.6. Εφαρμογές στα βακτήρια

Το σύστημα CRISPR/Cas9 έχει τη δυνατότητα να ρυθμίσει την έκφραση των γονιδίων, εμποδίζοντας την έκφραση ή ελέγχοντας τα επίπεδα έκφρασης.^{70,71} Εκτός από τη χρήση αυτή για θεραπευτικούς σκοπούς στον άνθρωπο, ο έλεγχος της έκφρασης γονιδίων έχει εφαρμογές στη βιοτεχνολογία για βιομηχανικούς σκοπούς, για την παραγωγή βιοκαυσίμων⁷²⁻⁷⁴ αλλά και στη συνθετική βιολογία.

3. Τα ηθικά ζητήματα

Η ανακάλυψη και βελτιστοποίηση των νέων τεχνολογιών ZFNs, TALEN και CRISPR/Cas9 καθιστούν την επεξεργασία του ανθρώπινου γονιδιώματος πιο εύκολη και πιο πιθανή, τόσο σε σωματικά κύτταρα όσο και σε κύτταρα της βλαστικής σειράς. Απόδειξη αποτελεί η πρόσφατη γενετική επεξεργασία του γονιδιώματος ανθρώπινων εμβρύων από επιστήμονες στην Κίνα,⁵¹ που πραγματοποιήθηκε λίγα μόλις χρόνια μετά την ανακάλυψη του συστήματος CRISPR/Cas9 στα βακτήρια. Κρίσιμο σημείο αποτελεί το γεγονός ότι οι αλλαγές στο γονιδίωμα που επιφέρει η τεχνολογία CRISPR/Cas9 σε αυτήν την περίπτωση, μπορούν να μεταφερθούν στις επόμενες γενιές. Η εν λόγω μελέτη προκάλεσε έντονη συζήτηση στην επιστημονική

κοινότητα αλλά και προβληματισμό για τα όρια και την ηθική χρήση των τεχνολογιών επεξεργασίας του γονιδιώματος.

Αν και οι τεχνολογίες επεξεργασίας του γονιδιώματος δεν είναι πλήρως επιτυχημένες τεχνικά (π.χ. οι νουκλεάσες προκαλούν έκτοπα ρήγματα εκτός του στόχου), οι δυσκολίες αυτές αναμένεται να ξεπεραστούν με περαιτέρω έρευνες και τη βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων. Το γεγονός αυτό καθιστά εξαιρετικά σημαντική τη συζήτηση γύρω από ηθικά θέματα που εγείρει η εφαρμογή των νέων τεχνολογιών τόσο στον άνθρωπο όσο και σε άλλους οργανισμούς.

Είναι χρήσιμο, εδώ, να αναρωτηθεί κανείς:

α. Αν προβλήματα, όπως η ελλιπής επιδιόρθωση μεταλλάξεων ή τα έκτοπα ρήγματα στο γονιδίωμα, θέτουν ζήτημα ως προς την εφαρμογή της «αρχής της προφύλαξης» σε σχέση με την πρόοδο της νέας τεχνολογίας. Σύμφωνα με την αρχή αυτή, εφόσον τα προβλήματα αυτά σημαίνουν αβεβαιότητα κινδύνου, οι εφαρμογές της τεχνολογίας πρέπει να ανασταλούν, έως ότου υπάρξουν σαφείς σχετικές απαντήσεις στην εργαστηριακή έρευνα.

β. Αν η νέα τεχνολογία παρουσιάζει κάποιες ηθικά σημαντικές διαφοροποιήσεις, σε σχέση με τις γνωστές έως σήμερα μεθόδους γενετικής μηχανικής (γονιδιακής θεραπείας, στην περίπτωση του ανθρώπου), θέτοντας νέα ερωτήματα, ιδίως όσον αφορά την ενδεχόμενη τροποποίηση του γονιδιώματος των απογόνων, που σήμερα θεωρείται ηθικά μη αποδεκτή.

3.1. Έρευνα στο έμβρυο

Η τροποποίηση του γονιδιώματος των εμβρύων, η οποία είναι περισσότερο εφικτή από ποτέ με τις δυνατότητες που προσφέρουν οι νουκλεάσες ZFNs, TALEN και CRISPR/Cas9, φέρνουν στο προσκήνιο τον προβληματισμό για το εάν είναι επιτρεπτή η έρευνα στο έμβρυο.

Αφενός η έρευνα είναι απολύτως απαραίτητη προϋπόθεση πριν τη χρήση των μεθόδων αυτών για θεραπευτικούς σκοπούς και σε κλινικό επίπεδο, αφετέρου δε η αξία του εμβρύου και η προστασία της ανθρώπινης ζωής δεν επιτρέπει τους

πειραματικούς χειρισμούς στο έμβρυο. Όπως είναι γνωστό, σύμφωνα με ορισμένες αντιλήψεις, το έμβρυο αποτελεί πλήρη άνθρωπο «εξ άκρας συλλήψεως», κάτι που αποκλείει την έρευνα σε γονιμοποιημένα ωάρια, ενώ σύμφωνα με άλλες αντιλήψεις, η έρευνα σε ανθρώπινα έμβρυα επιτρέπεται υπό προϋποθέσεις, π.χ. εάν πρόκειται για περισσευούμενα έμβρυα από ιατρικώς υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του εμβρύου ή χωρίς περιορισμούς. Ασφαλώς, εδώ υπάρχει ο κίνδυνος εργαλειοποίησης του ανθρώπινου εμβρύου, ο οποίος θα πρέπει να σταθμιστεί με το πιθανό όφελος που θα επιφέρουν οι τεχνολογίες αυτές στην εξάλειψη ασθενειών του ανθρώπου.

Συγκρίνοντας την επεξεργασία γονιδιώματος με τη χρήση νουκλεασών με τις έως τώρα μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, υπάρχει μια σημαντική διαφοροποίηση: Κατά την προεμφυτευτική διάγνωση, εξετάζονται και επιλέγονται τα υγιή έμβρυα, τα οποία τελικά εμφυτεύονται στη μήτρα της μητέρας. Αντιθέτως, με τις νέες τεχνολογίες νουκλεασών πραγματοποιείται επεξεργασία του γονιδιώματος των εμβρύων προκειμένου να διορθωθούν γενετικές ανωμαλίες. Τούτο μπορεί να επιφέρει άγνωστες συνέπειες για την υγεία και ανάπτυξη του εμβρύου, εφ' όσον εμφυτευθεί στη μήτρα, πιθανόν όμως και στην υγεία της ίδιας της μητέρας.

Υπάρχει επομένως ένα νέο ερώτημα, ως προς το αν είναι επιτρεπτή η γονιδιακή θεραπεία σε έμβρυο. Εκείνο που μπορεί τουλάχιστον να υποστηριχθεί είναι ότι, προκειμένου να γίνει αποδεκτή η εφαρμογή της μεθόδου, θα πρέπει να έχει επιτευχθεί ένα υψηλό επίπεδο ασφάλειας ως προς την αποτελεσματικότητα και τις παρενέργειες, συγκρίσιμο με την ασφάλεια των σημερινών επεμβάσεων κατά την εγκυμοσύνη.

Η εκ των προτέρων συναίνεση της μητέρας, χωρίς αυτό το δεδομένο, δεν θα πρέπει να θεωρηθεί ισχυρή, παρά μόνον αν τηρούνται οι προδιαγραφές δεοντολογίας που σήμερα ισχύουν για τις παρεμβατικές κλινικές μελέτες (υπό τον όρο μάλιστα ότι η μέθοδος θα ενταχθεί ρητά στις προβλέψεις της σχετικής νομοθεσίας).

3.2 Ευγονική

Η βασικότερη διαφωνία που προβάλλεται συχνά για τις τεχνολογίες επεξεργασίας του γονιδιώματος πηγάζουν από το γεγονός ότι είναι δυνατόν να εφαρμοστούν σε γαμετικά κύτταρα ή σε γονιμοποιημένα ωάρια, μία διαδικασία γνωστή ως επεξεργασία ή τροποποίηση κυττάρων της βλαστικής σειράς.

Από τη μια πλευρά, κάποιιο υποστηρίζουν ότι η εφαρμογή των τεχνολογιών σε έμβρυα θα μπορούσε τελικά να εξαλείψει σοβαρές και θανατηφόρες ασθένειες του ανθρώπου. Από την άλλη πλευρά, άλλοι θεωρούν ότι, το γεγονός ότι οι επόμενες γενεές κληρονομούν τις αλλαγές στο γονιδίωμα, δεν είναι επιτρεπτό και ξεπερνά τα όρια ηθικής. Σύμφωνα με αυτή την άποψη, εάν επιτραπεί η επεξεργασία του γονιδιώματος εμβρύων τότε είναι ορατός ο κίνδυνος ευγονικής και η δημιουργία σχεδιασμένων απογόνων (“designer babies”). Οι ανησυχίες αυτές διαίρεσαν την επιστημονική κοινότητα, με ορισμένους επιστήμονες να καλούν σε παύση της επεξεργασίας του γονιδιώματος εμβρύων ακόμη και σε ερευνητικό επίπεδο.⁷⁵

3.3 Επιδράσεις στην εξέλιξη των ειδών και το περιβάλλον

Η επεξεργασία του ανθρώπινου γονιδιώματος, ναι μεν αποσκοπεί στην εξάλειψη χαρακτηριστικών που επιφέρουν ασθένειες, ωστόσο θα οδηγήσει στην επιλογή συγκεκριμένων γενετικών χαρακτηριστικών αλλάζοντας τη συχνότητα των γονιδίων. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται γενετική καθοδήγηση (genetic drift), και επιδρά στην εξέλιξη των ειδών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου είδους, με συνέπειες που δεν είναι εύκολο να προβλεφθούν.

Η επεξεργασία του γονιδιώματος και σε άλλα είδη οργανισμών, αναμφισβήτητα θα οδηγήσει σε γενετική καθοδήγηση και, συνεπώς, σε διατάραξη της βιοποικιλότητας στη φύση, θέτοντας σε κίνδυνο πληθυσμούς ειδών και την ισορροπία των οικοσυστημάτων. Η αξία της βιοποικιλότητας αλλά και τα «δικαιώματα των μελλοντικών γενεών», αποτελούν ηθική υποχρέωση, η οποία δεν εξασφαλίζεται με την επεξεργασία γονιδιωμάτων φυτών και ζώων, προκαλώντας μάλιστα αλλαγές που κληρονομούνται στις επόμενες γενεές και μεταβάλλουν τη γονιδιακή δεξαμενή (gene pool) των ειδών.

3.4 Διπλώματα ευρεσιτεχνίας

Οι ραγδαίες εξελίξεις στην επεξεργασία και επιδιόρθωση του γονιδιώματος πολλών διαφορετικών οργανισμών, συνδέεται άμεσα με την επένδυση οικονομικών πόρων στην έρευνα και στην παραγωγή καινοτόμων μεθόδων με εμπορικές εφαρμογές στη βιοϊατρική, τη βιοτεχνολογία, τη βιομηχανία, τη γεωργία και την κτηνοτροφία. Συνεπώς, η έρευνα των τεχνολογιών ZFNs, TALEN και CRISPR/Cas9 συνυπάρχει με ένα παράλληλο αγώνα για την πνευματική ιδιοκτησία και κατοχύρωση των μεθόδων αυτών (και των διαφόρων παραλλαγών τους), καθώς και των προϊόντων που προκύπτουν.⁷⁶

Αναμφίβολα, οι τεχνολογίες αυτές έχουν τροποποιηθεί κατά πολύ σε σχέση με την αρχική, φυσική τους μορφή στα βακτήρια όπου ανακαλύφθηκαν. Ωστόσο, ακόμη και σε αυτήν την περίπτωση τίθεται το ερώτημα εάν επιτρέπεται η κατοχύρωση με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας στοιχείων της φύσης. Ιδιαίτερα με την πιθανή εφαρμογή των τεχνολογιών αυτών για θεραπευτικούς σκοπούς, η αποκλειστική εκμετάλλευσή τους θα οδηγήσει σε αυξημένο κόστος των πιθανών θεραπειών και θα εμποδίσει την ίση πρόσβαση στις εν λόγω θεραπείες.

3.5 Χρηματοδότηση της σχετικής έρευνας

Μετά την επεξεργασία γονιδιώματος ανθρώπινων εμβρύων από επιστήμονες [51], το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (NIH) των Η.Π.Α. εξέδωσε αυστηρή ανακοίνωση, σύμφωνα με την οποία αρνείται κατηγορηματικά να χρηματοδοτήσει οποιαδήποτε έρευνα περιλαμβάνει τεχνολογίες, οι οποίες επιτρέπουν τη γονιδιακή επεξεργασία ανθρώπινων εμβρύων.⁷⁷ Το γεγονός αυτό, έθεσε ξεκάθαρα το πρόβλημα της χρηματοδότησης των ερευνών επεξεργασίας γονιδιώματος σε ανθρώπινα έμβρυα από εθνικούς ή ιδιωτικούς πόρους, ανάλογα φυσικά και με το νομικό πλαίσιο κάθε χώρας για την έρευνα στο έμβρυο.

3.6 Δημοσίευση των αποτελεσμάτων της σχετικής έρευνας

Η πρόσφατη εργασία των Κινέζων επιστημόνων, οι οποίοι επεξεργάστηκαν ανθρώπινα έμβρυα με την τεχνολογία CRISPR/Cas9 δημοσιεύτηκε στο επιστημονικό περιοδικό Protein & Cell,⁵¹ αφού πρώτα απορρίφθηκε από τα περιοδικά Nature και Science για λόγους βιοηθικής. Οι συντάκτες του Protein & Cell υποστήριξαν ότι σκοπός τους ήταν να «σημάνουν συναγερμό» για τέτοιου είδους εργασίες και να «πυροδοτήσουν τη συζήτηση» για τη χρήση των τεχνολογιών αυτών στον άνθρωπο. Το γεγονός αυτό κατέδειξε το πρόβλημα της δημοσίευσης των μελετών με τις τεχνολογίες επεξεργασίας του γονιδιώματος: είναι προτιμότερο να απορρίπτεται η δημοσίευση μελετών σε ανθρώπινα έμβρυα προκειμένου να μην ενθαρρύνεται αυτού του είδους η έρευνα ή να υπάρχει πλήρης διαφάνεια σε όποια μελέτη πραγματοποιείται;

4. Η σχετική νομοθεσία

Το νομοθετικό πλαίσιο για την αντιμετώπιση των ζητημάτων που θέτει η νέα τεχνολογία, παραμένει γενικό. Αξίζει, εδώ, να επισημάνει κανείς:

α) Για την γενετική τροποποίηση μικροοργανισμών, ισχύουν οι προβλέψεις του Πρωτοκόλλου της Καρθαγένης για τη Βιοασφάλεια, καθώς και της Οδηγίας 2009/41 της ΕΕ.

β) Για τους οργανισμούς (φυτά και ζώα), εφαρμόζεται το ίδιο Πρωτόκολλο και η Οδηγία 2001/18 της ΕΕ.

Στα παραπάνω νομοθετήματα, η αρχή της προφύλαξης αποτελεί κομβική έννοια. Ισχύουν, σχετικά, εγγυήσεις τήρησής της, με αναλυτικές εξουσιοδοτήσεις ελέγχων προς εθνικά όργανα της Διοίκησης, οι οποίες βρίσκουν εφαρμογή και εν προκειμένω, χωρίς να προκύπτει ανάγκη νέων ρυθμίσεων.

γ) Για την περίπτωση του εμβρύου, η ελληνική νομοθεσία επιτρέπει την έρευνα σε υπεράριθμα έμβρυα που προορίζονταν αρχικά για αναπαραγωγή, υπό τον όρο της «επαρκούς προστασίας» τους. Απαγορεύει όμως τη δημιουργία εμβρύων για ερευνητικούς σκοπούς (έστω και μη βιώσιμων), σύμφωνα και με τη

Σύμβαση του Οβιέδο (άρθ. 18). Η ίδια Σύμβαση αποκλείει επεμβάσεις στο γονιδίωμα, αν «αποσκοπούν» σε τροποποίηση του γονιδιώματος τυχόν απογόνων (άρθ. 13).

Από τις προβλέψεις αυτές, συνάγεται ότι:

- Επεμβάσεις σε εμβρυικό ιστό είναι επιτρεπτές, όπως και επεμβάσεις σε γαμέτες.
- Επεμβάσεις σε υπεράριθμα έμβρυα είναι επίσης επιτρεπτές, προκειμένου αυτά να μελετηθούν *in vitro*, εφ' όσον αυτά έχουν «επαρκή προστασία» (παραμένουν δηλαδή διαθέσιμα για αναπαραγωγικούς σκοπούς).
- Η τροποποίηση στο «γονιδίωμα απογόνων» δεν αφορά τη γονιδιακή θεραπεία σε σωματικά κύτταρα των ίδιων εμβρύων (επιδιόρθωση μεταλλάξεων) -καθώς αυτή είναι ρητά επιτρεπτή από το άρθ. 13 της Σύμβασης-, αλλά μόνον των δικών τους αναπαραγωγικών κυττάρων. Στο πρώιμο στάδιο των μη διαφοροποιημένων βλαστοκυττάρων, δεν μπορεί εύλογα να υποστηριχθεί ότι η θεραπεία «αποσκοπεί» σε τροποποίηση των (διαφοροποιημένων σε μεταγενέστερο στάδιο ανάπτυξης, άρα «μελλοντικών») αναπαραγωγικών κυττάρων του εμβρύου.

δ) Για την εφαρμογή της μεθόδου σε ανθρώπους μετά τη γέννηση, ισχύουν οι παραπάνω προβλέψεις της Σύμβασης, όσον αφορά τις επιτρεπτές επεμβάσεις στο γονιδίωμα.

Τονίζεται και εδώ, ότι η απαγόρευση της επέμβασης ως προς τις συνέπειες στους απογόνους ισχύει μόνον αν αυτή «αποσκοπεί» στην τροποποίηση του γονιδιώματός τους. Η διόρθωση μεταλλάξεων στο γονιδίωμα σωματικών κυττάρων, έστω και αν συνεπάγεται τυχαία επίπτωση στα αναπαραγωγικά κύτταρα του προσώπου, δεν μπορεί να θεωρηθεί, επομένως, αντίθετη με την εν λόγω πρόβλεψη.

Είναι προφανές, τέλος, ότι η πειραματική εφαρμογή της μεθόδου εντάσσεται στις ισχύουσες προβλέψεις της νομοθεσίας των κλινικών δοκιμών φαρμάκων. Σήμερα, η νομοθεσία αυτή δεν καλύπτει την περίπτωση της μεταφοράς στη μήτρα εμβρύου που έχει υποστεί πειραματική γονιδιακή θεραπεία, ώστε να

εξασφαλίζεται η προστασία της μητέρας. Για την περίπτωση αυτή χρειάζεται ειδική ρύθμιση.

5. Προτάσεις

Οι ραγδαίες εξελίξεις στις νέες τεχνολογίες επεξεργασίας του γονιδιώματος είχαν ως αποτέλεσμα πολλοί επιστήμονες να ζητήσουν εθελοντική, προσωρινή παύση (moratorium) της έρευνας και της κλινικής εφαρμογής στον άνθρωπο,^{78,79} προκειμένου να συζητηθούν οι βιοηθικοί προβληματισμοί και να δοθεί χώρος και χρόνος προκειμένου να επιτευχθεί διεθνής συναίνεση. Αντίθετα, άλλοι επιστήμονες υποστήριξαν ότι το moratorium θα πρέπει να εφαρμοστεί στην κλινική εφαρμογή των μεθόδων μόνο, ενώ η έρευνα *in vitro* σε κύτταρα της βλαστικής σειράς θα πρέπει να συνεχιστεί.^{80,81} Ακολούθως, το National Academy of Sciences και το Institute of Medicine οργάνωσαν διεθνή σύνοδο το Φθινόπωρο του 2015, με στόχο τη χάραξη ηθικών κατευθυντήριων γραμμών ως προς τη χρήση τεχνικών επεξεργασίας ανθρώπινου γονιδιώματος.⁸²

5.1 Εφαρμογή της αρχής της προφύλαξης

Η ασφάλεια των μεθόδων τροποποίησης του γονιδιώματος δεν έχει αποδειχθεί ακόμα, όπως φαίνεται από τα έκτοπα ρήγματα (off target effects) που προκαλούν οι νουκλεάσες. Θα πρέπει να υπάρξουν εκτεταμένες έρευνες, με δεδομένα που θα μπορούν να αντιπραχθούν και να τεκμηριωθούν σε πολλαπλές γενιές ώστε να είμαστε βέβαιοι για την ασφάλεια των μεθόδων.

Οι έρευνες αυτές είναι αναγκαίες και πρέπει να υποστηριχθούν, εν όψει των θετικών προοπτικών που μπορεί να έχουν μελλοντικές εφαρμογές της νέας τεχνολογίας. Έως τον εντοπισμό των κινδύνων, πάντως, και τον προσδιορισμό των μέσων πρόληψής τους, καμία εφαρμογή είτε στο περιβάλλον είτε στον άνθρωπο δεν μπορεί να δικαιολογηθεί.

5.2 Δημοσιεύσεις

Παράνομη ή αθέμιτη εργαστηριακή έρευνα, με ανθρώπινο αναπαραγωγικό υλικό, δεν μπορεί να «νομιμοποιείται» (και να καταλήγει σε δημοσιεύσεις αποτελεσμάτων), με το πρόσχημα την «ενθάρρυνσης του προβληματισμού». Στην περίπτωση αυτή, πρέπει να καταστεί σαφές ότι η ίδια η διαδικασία πάσχει και όχι μόνο το αποτέλεσμά της. Αν δεχόμασταν το αντίθετο, η δέσμευση από τις αξίες της ηθικής και του νόμου θα παρέμενε χωρίς νόημα.

5.3 Νέα νομοθεσία

Υπό την προϋπόθεση ότι θα καλυφθούν στο μέλλον οι επιφυλάξεις που εγείρει η αρχή της προφύλαξης, η ισχύουσα νομοθεσία φαίνεται επαρκής για την υποδοχή εφαρμογών της νέας τεχνολογίας.

Πρόβλημα εξακολουθεί να υπάρχει με τον όρο «επαρκής προστασία» των εμβρύων που υπόκεινται σε επιτρεπτή έρευνα, ιδίως αν ληφθεί υπ' όψη ότι το εν λόγω βιολογικό υλικό διατίθεται στην έρευνα επειδή δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για αναπαραγωγικούς σκοπούς. Με το δεδομένο αυτό, θα ήταν ορθό να επανεξετασθεί η σχετική διάταξη του άρθρου 18 της Σύμβασης του Οβιέδο.

Τέλος, είναι αναγκαίο να προβλεφθεί νομοθετική προστασία των γυναικών που θα δεχθούν να συλλάβουν με γενετικά τροποποιημένους γαμέτες ή να κυοφορήσουν έμβρυα στα οποία έχει εφαρμοσθεί πειραματικά επεξεργασία του γονιδιώματος -με βάση αυτή την τεχνολογία ή άλλες μεθόδους- ώστε να υπαχθούν σε καθεστώς ανάλογο με αυτό που ισχύει σήμερα για τις κλινικές δοκιμές φαρμάκων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013 Jul;31(7):397-405.
2. Ul Ain Q, Chung JY, Kim YH. Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN. *J Control Release.* 2015 May 10;205:120-7.
3. Riordan SM, Heruth DP, Zhang LQ, Ye SQ. Application of CRISPR/Cas9 for biomedical discoveries. *Cell Biosci.* 2015 Jun 21;5:33.
4. Wyman C, Kanaar R. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu. Rev. Genet.* 2006;40:363-383.
5. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:1156-60.
6. Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics.* 2010 Oct;186(2):757-61.
7. Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, Anders C, Hauer M, Zhou K, Lin S, Kaplan M, Iavarone AT, Charpentier E, Nogales E, Doudna JA. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science.* 2014 Mar 14;343(6176):1247997.
8. Carroll D. Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene Ther.* 2008 Nov;15(22):1463-8.
9. Zhang F, Maeder ML, Unger-Wallace E, Hoshaw JP, Reyon D, Christian M, Li X, Pierick CJ, Dobbs D, Peterson T, Joung JK, Voytas DF. High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jun 29;107(26):12028-33.
10. Osakabe K, Osakabe Y, Toki S. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis* using custom-designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jun 29;107(26):12034-9.
11. Cai CQ, Doyon Y, Ainley WM, Miller JC, Dekelver RC, Moehle EA, Rock JM, Lee YL, Garrison R, Schulenberg L, Blue R, Worden A, Baker L, Faraji F, Zhang L, Holmes MC, Rebar EJ, Collingwood TN, Rubin-Wilson B, Gregory PD, Urnov FD, Petolino JF. Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. *Plant Mol Biol.* 2009 Apr;69(6):699-709.
12. Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, Fu F, Maeder ML, Joung JK, Voytas DF. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature.* 2009 May 21;459(7245):442-5.
13. Curtin SJ, Zhang F, Sander JD, Haun WJ, Starker C, Baltes NJ, Reyon D, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Coffman AP, Dobbs D, Joung JK, Voytas DF, Stupar RM. Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. *Plant Physiol.* 2011 Jun;156(2):466-73.
14. Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Worden SE, Mitchell JC, Arnold NL, Gopalan S, Meng X, Choi VM, Rock JM, Wu YY,

- Katibah GE, Zhifang G, McCaskill D, Simpson MA, Blakeslee B, Greenwalt SA, Butler HJ, Hinkley SJ, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*. 2009 May 21;459(7245):437-41.
15. Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*. 2003 May 2;300(5620):764.
 16. Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, Pickle CS, Ralston EJ, Lee AH, Amora R, Miller JC, Leung E, Meng X, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Meyer BJ. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science*. 2011 Jul 15;333(6040):307.
 17. Takasu Y, Kobayashi I, Beumer K, Uchino K, Sezutsu H, Sajwan S, Carroll D, Tamura T, Zurovec M. Targeted mutagenesis in the silkworm *Bombyx mori* using zinc finger nuclease mRNA injection. *Insect Biochem Mol Biol*. 2010 Oct;40(10):759-65.
 18. Ekker SC. Zinc finger-based knockout punches for zebrafish genes. *Zebrafish*. 2008 Summer;5(2):121-3.
 19. Young JJ; Cherone JM, Doyon Y, Ankoudinova I, Faraji FM, Lee AH, Ngo C, Guschin DY, Paschon DE, Miller JC, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Harland RM, Zeitler B. (2011). "Efficient targeted gene disruption in the soma and germ line of the frog *Xenopus tropicalis* using engineered zinc-finger nucleases". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (17): 7052–7057.
 20. Goldberg AD, Banaszynski LA, Noh KM, Lewis PW, Elsaesser SJ, Stadler S, Dewell S, Law M, Guo X, Li X, Wen D, Chapgier A, DeKolver RC, Miller JC, Lee YL, Boydston EA, Holmes MC, Gregory PD, Grealley JM, Rafii S, Yang C, Scambler PJ, Garrick D, Gibbons RJ, Higgs DR, Cristea IM, Urnov FD, Zheng D, Allis CD. Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell*. 2010 Mar 5;140(5):678-91.
 21. Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, Jenkins SS, Wood A, Cui X, Meng X, Vincent A, Lam S, Michalkiewicz M, Schilling R, Foeckler J, Kalloway S, Weiler H, Ménoret S, Anegon I, Davis GD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jacob HJ, Buelow R. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*. 2009 Jul 24;325(5939):433.
 22. Flisikowska T, Thorey IS, Offner S, Ros F, Lifke V, Zeitler B, Rottmann O, Vincent A, Zhang L, Jenkins S, Niersbach H, Kind AJ, Gregory PD, Schnieke AE, Platzer J. Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases. *PLoS One*. 2011;6(6):e21045.
 23. Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, Zhang L, Meng X, Gregory PD, Schwinzer R, Cost GJ, Niemann H. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 19;108(29):12013-7.
 24. Yu S, Luo J, Song Z, Ding F, Dai Y, Li N. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res*. 2011 Nov;21(11):1638-40.

25. Li T, Huang S, Jiang WZ, Wright D, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jan;39(1):359-72.
26. Liu J. Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy talen strategy. *J Genet Genomics* 2012;39(5):209-15.
27. Huang P, Xiao A, Zhou M, Zhu Z, Lin S, Zhang B. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol.* 2011 Aug 5;29(8):699-700.
28. Cade L, Reyon D, Hwang WY, Tsai SQ, Patel S, Khayter C, Joung JK, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR. Highly efficient generation of heritable zebrafish gene mutations using homo- and heterodimeric TALENs. *Nucleic Acids Res.* 2012 Sep;40(16):8001-10.
29. Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, Pickle CS, Ralston EJ, Lee AH, Amora R, Miller JC, Leung E, Meng X, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Meyer BJ. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science.* 2011 Jul 15;333(6040):307.
30. Ishibashi S, Cliffe R, Amaya E. Highly efficient bi-allelic mutation rates using TALENs in *Xenopus tropicalis*. *Biol Open.* 2012 Dec 15;1(12):1273-6.
31. Lei Y, Guo X, Liu Y, Cao Y, Deng Y, Chen X, Cheng CH, Dawid IB, Chen Y, Zhao H. Efficient targeted gene disruption in *Xenopus* embryos using engineered transcription activator-like effector nucleases (TALENs). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Oct 23;109(43):17484-9.
32. Sung YH, Baek IJ, Kim DH, Jeon J, Lee J, Lee K, Jeong D, Kim JS, Lee HW. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol.* 2013 Jan;31(1):23-4.
33. Wefers B, Meyer M, Ortiz O, Hrabé de Angelis M, Hansen J, Wurst W, Kühn R. Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Mar 5;110(10):3782-7.
34. Tesson L, Usal C, Ménoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, Santiago Y, Vincent AI, Meng X, Zhang L, Gregory PD, Anegón I, Cost GJ. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol.* 2011 Aug 5;29(8):695-6.
35. Carlson DF, Tan W, Lillico SG, Stverakova D, Proudfoot C, Christian M, Voytas DF, Long CR, Whitelaw CB, Fahrenkrug SC. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Oct 23;109(43):17382-7.
36. Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ, Voytas DF. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jul;39(12):e82.
37. Christian M, Qi Y, Zhang Y, Voytas DF. Targeted mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* using engineered TAL effector nucleases. *G3 (Bethesda).* 2013 Oct 3;3(10):1697-705.

38. Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol.* 2012 May 7;30(5):390-2.
39. Zhang Y, Zhang F, Li X, Baller JA, Qi Y, Starker CG, Bogdanove AJ, Voytas DF. Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant Physiol.* 2013 Jan;161(1):20-7.
40. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013 Feb 15;339(6121):819-23.
41. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013 Feb 15;339(6121):823-6.
42. Hou Z, Zhang Y, Propson NE, Howden SE, Chu LF, Sontheimer EJ, Thomson JA. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Sep 24;110(39):15644-9.
43. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012 Aug 17;337(6096):816-21.
44. DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.* 2013 Apr;41(7):4336-43.
45. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol.* 2013 Mar;31(3):227-9.
46. Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, Hamm DC, Donohue LK, Harrison MM, Wildonger J, O'Connor-Giles KM. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics.* 2013 Aug;194(4):1029-35.
47. Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, Colaiácovo MP, Church GM, Calarco JA. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods.* 2013 Aug;10(8):741-3.
48. Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res.* 2013 Nov;41(20):e188.
49. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell.* 2013 May 9;153(4):910-8.
50. Guo X, Li XJ. Targeted genome editing in primate embryos. *Cell Res.* 2015 Jul;25(7):767-8.
51. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, Lv J, Xie X, Chen Y, Li Y, Sun Y, Bai Y, Songyang Z, Ma W, Zhou C, Huang J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell.* 2015 May;6(5):363-72.

52. Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu JL. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol.* 2014 Sep;32(9):947-51.
53. Hendel A, Fine EJ, Bao G, Porteus MH. Quantifying on- and off-target genome editing. *Trends Biotechnol.* 2015 Feb;33(2):132-40.
54. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2013 Sep;31(9):822-6.
55. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 2013 Sep;31(9):827-32.
56. Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol.* 2013 Sep;31(9):839-43.
57. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 2013 Sep;31(9):827-32.
58. Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, Sasaki N, Boymans S, Cuppen E, van der Ent CK, Nieuwenhuis EE, Beekman JM, Clevers H. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell.* 2013 Dec 5;13(6):653-8.
59. Wu Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S, Yan Z, Li D, Li J. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell.* 2013 Dec 5;13(6):659-62.
60. Long C, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science.* 2014 Sep 5;345(6201):1184-8.
61. Li H, Haurigot V, Doyon Y, Li T, Wong SY, Bhagwat AS, Malani N, Anguela XM, Sharma R, Ivanciu L, Murphy SL, Finn JD, Khazi FR, Zhou S, Paschon DE, Rebar EJ, Bushman FD, Gregory PD, Holmes MC, High KA. In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature.* 2011 Jun 26;475(7355):217-21.
62. Maddalo D, Machado E, Concepcion CP, Bonetti C, Vidigal JA, Han YC, Ogrodowski P, Crippa A, Rekhtman N, de Stanchina E, Lowe SW, Ventura A. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature.* 2014 Dec 18;516(7531):423-7.
63. Lin SR, Yang HC, Kuo YT, Liu CJ, Yang TY, Sung KC, Lin YY, Wang HY, Wang CC, Shen YC, Wu FY, Kao JH, Chen DS, Chen PJ. The CRISPR/Cas9 System Facilitates Clearance of the Intrahepatic HBV Templates In Vivo. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2014 Aug 19;3:e186.
64. Hu W, Kaminski R, Yang F, Zhang Y, Cosentino L, Li F, Luo B, Alvarez-Carbonell D, Garcia-Mesa Y, Karn J, Mo X, Khalili K. RNA-directed gene

editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Aug 5;111(31):11461-6.

65. National Cancer Institute. CAR T-Cell Therapy: Engineering Patients' Immune Cells to Treat Their Cancers. <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells>.
66. Phase 1 Dose Escalation Study of Autologous T-cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases in HIV-Infected Patients. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01044654?term=hiv+and+sangamo&rank=1>.
67. Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, Spratt SK, Surosky RT, Giedlin MA, Nichol G, Holmes MC, Gregory PD, Ando DG, Kalos M, Collman RG, Binder-Scholl G, Plesa G, Hwang WT, Levine BL, June CH. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*. 2014 Mar 6;370(10):901-10.
68. Τ. Βιδάλης, Β. Μολλάκη. Βελτίωση χαρακτηριστικών του άνθρωπου επίδραση στην πνευματική και ψυχική κατάσταση. 2012. Έκθεση για την Εθνική Επιτροπή Βιοηθικής.
69. Β. Μολλάκη, Τ. Βιδάλης. Βελτίωση χαρακτηριστικών του άνθρωπου - Φυσικά χαρακτηριστικά. 2013. Έκθεση για την Εθνική Επιτροπή Βιοηθικής.
70. Bikard D, Jiang W, Samai P, Hochschild A, Zhang F, Marraffini LA. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res*. 2013 Aug;41(15):7429-37.
71. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. 2013 Feb 28;152(5):1173-83.
72. Ryan OW, Cate JH. Multiplex engineering of industrial yeast genomes using CRISPRm. *Methods Enzymol*. 2014;546:473-89.
73. Currie DH, Raman B, Gowen CM, Tschaplinski TJ, Land ML, Brown SD, Covalla SF, Klingeman DM, Yang ZK, Engle NL, Johnson CM, Rodriguez M, Shaw AJ, Kenealy WR, Lynd LR, Fong SS, Mielenz JR, Davison BH, Hogsett DA, Herring CD. Genome-scale resources for *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *BMC Syst Biol*. 2015 Jun 26;9(1):30.
74. Brown SD, Nagaraju S, Utturkar S, De Tissera S, Segovia S, Mitchell W, Land ML, Dassanayake A, Köpke M. Comparison of single-molecule sequencing and hybrid approaches for finishing the genome of *Clostridium autoethanogenum* and analysis of CRISPR systems in industrial relevant *Clostridia*. *Biotechnol Biofuels*. 2014 Mar 21;7:40.
75. Kaiser J, Normile D. Bioethics. Embryo engineering study splits scientific community. *Science*. 2015 May 1;348(6234):486-7.
76. Who Owns CRISPR? April 3, 2015. *The Scientist*. <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/42595/title/Who-Owns-CRISPR-/>.
77. Statement on NIH funding of research using gene-editing technologies in human embryos. April 29, 2015.

http://www.nih.gov/about/director/04292015_statement_gene_editing_technologies.htm.

78. Scientists Seek Ban on Method of Editing the Human Genome. New York Times. March 19, 2015. http://www.nytimes.com/2015/03/20/science/biologists-call-for-halt-to-gene-editing-technique-in-humans.html?smid=li-share&_r=1.
79. Lanphier E, Urnov F, Haecker SE, Werner M, Smolenski J. Don't edit the human germ line. Nature. 2015 Mar 26;519(7544):410-1.
80. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, Corn JE, Daley GQ, Doudna JA, Fenner M, Greely HT, Jinek M, Martin GS, Penhoet E, Puck J, Sternberg SH, Weissman JS, Yamamoto KR. Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. Science. 2015 Apr 3;348(6230):36-8.
81. The ISSCR Statement on Human Germline Genome Modification. 19 March, 2015 <http://www.isscr.org/home/about-us/news-press-releases/2015/2015/03/19/statement-on-human-germline-genome-modification>.
82. US science academies take on human-genome editing. 18 May 2015. Nature. <http://www.nature.com/news/us-science-academies-take-on-human-genome-editing-1.17581>.