

HOGYAN KÉSZÍTSÜNK ÉLŐ SEJTET?

Pósfai György

A biológiai tudomány kandidátusa, tudományos főmunkatárs,
MTA SZBK Biokémiai Intézet, Szeged – posfaigy@nucleus.szbk.u-szeged.hu

Ötven éve, hogy James Watson és Francis Crick révén kiderült, milyen a DNS molekula szerkezete. Ma ott tartunk, hogy a tartalmát is ki tudjuk olvasni, ezt a tartalmat érteni véljük, sőt, akár újra is írhatjuk. A DNS molekula hordozza a szervezet felépítéséhez és működéséhez szükséges információt. Ha értő módon módosítjuk ezt az információt, terveinknek megfelelően módosul a szervezet is. Kisebbségi módosításokat, apró „belepiskálásokat” harminc éve végeznek a biológusok. Ma azonban lehetőség van arra is, hogy akár teljes egészében meghatározzuk, mit kódoljon a DNS molekula, hogyan működjön a sejt, azaz mesterséges, élő sejtet hozunk létre. Vagy legalábbis megpróbálkozunk vele.

A hír

2002. november végén bejárta a világsajtót a hír: Craig Venter és a Nobel-díjas Hamilton O. Smith mesterséges, „minimális” génekkel ellátott sejtet kíván létrehozni. A sajtótájékoztatón bejelentett projektet 3 millió (állami) dollárral, huszonöt fős munkacsoporttal kívánják megvalósítani. Venter ma a molekuláris biológia talán legismertebb alakja. Csak nagy horderejű témákkal foglalkozik, mérés és erősen kétséges kimenetelű munkákba fog – és sikerrel jár. Ő térképezte fel elsőként egy sejt, a *Haemophilus* baktérium teljes DNS-ét (szakszóval: genomját), és ő irányította azt a privát céget, mely az állami laboratóriumokkal párhuzamosan, azokat versenyfutásra kényszerítve feltérképezte (megszekvenálta) az emberi DNS-t. Nem

csoda, hogy a sajtó is felkapta a hírt, számos kommentár, esélylatolgatás jelent meg. Ráadásul a téma izgalmas etikai kérdéseket is felvet (a biológusok „megint Istent akarnak játszani”, vagy más megfogalmazásban, „beszólnak a természet rendjébe”), a bioterrorizmus és a véletlenül veszélyesre sikeredett sejt-kreatúra rémképe is riogat. Ezekre a kérdésekre még visszatérünk.

Mire jó?

Felmerül a kérdés: miért van szükségünk mesterséges sejtre, hol a haszon? Az ilyen kérdésre a kutató kényszeredetten válaszol, hiszen a kutatás igazi terepe a bizonytalan, jósolhatatlan, „csupán” érdekes probléma. Bizonytalanság, érdekesség bőven akad itt, de azért néhány várható alkalmazást fel lehet sorolni. Manipulált sejteket ma is sokféle célra használ a biotechnológia. Gyógyszerek, táplálékkiegészítők termeltetése, környezeti ártalmak monitorozása, vakcinák előállítás – csak néhány az alkalmazások közül. A sejt olcsó, környezetbarát, önjáró, miniatűr biogép. A probléma ott van, hogy még a legegyszerűbb sejt is túlságosan bonyolult. Sok benne az ismeretlen komponens, a kiszámíthatatlan reakció, a sejt sokszor nem „akarja” azt csinálni, amire készíteni szeretnénk. Egy minden alkotórészében, minden működési folyamatában ismert mesterséges sejt viselkedését pontosan tervezhetnénk, programozhatnánk. Variánsaival hatékonyan lehetne gyógyszereket, műanyagokat készíteni, környezetszennyezéseket felszámolni, energiahordozókat termeltetni. Sőt, a mes-

terséges sejtet számítógépen modellezve virtuális sejt építhető, amely aztán – a drága és lassú valódi kísérlet helyett – egy gyógyszer virtuális tesztelésére is bevethető. A kutató számára azonban a legizgalmasabb kérdés: mi szükséges ahhoz, hogy egy sejt működjön, szaporodjon, azaz mi kell az élethez?

A feladat nagysága

Mérjük fel, mire vállalkozunk, ha egy sejtet akarunk készíteni! A néhány köbmikronos sejt a legösszetettebb rendszer, amit csak ismerünk ebben a mérettartományban. Speciális makromolekulák (DNS, RNS, fehérje), kisebb építőköcska-molekulák (aminosavak, nukleotidok, zsírsavak), egyszerű ionok és víz a főbb alkotórészek. Ha egy viszonylag egyszerű sejtet – például egy *Escherichia coli* nevű baktériumot – veszünk szemügyre (Goodsell, 1991), csak fehérjéből több ezer különféle molekulát találunk, ezek némelyike akár tízezres példányszámot is elérhet. Ehhez jön a több ezer különféle RNS molekula (összességében szintén százezres-millió példányszámban), a mintegy 20 millió kisebb szerves molekula és 30 millió ion. Már akár egyetlen nagyobb fehérje szintézise megelédhatatlan feladatot jelentene! De tegyük fel, hogy minden alkotórészt sikerül a megfelelő mennyiségben előállítani, és egy „membrán-zacskóba” beletölteni. Amit kapnánk, az még nem egy élő sejt. Ott az alkotórészek pontosan a megfelelő időben képződnek, a sejten belül a megfelelő helyre jutnak, a partnerek pontosan illeszkednek. A baktériumsejt egyes részei igen összetett, rendezett struktúrákat mutatnak, jól látható ez például a sejtfallal bonyolult szerkezetén, vagy a DNS molekula precízen összecsavart-hajtogatott csomókba rendeződésén (ha kiteker-nénk, ezerszer hosszabb lenne, mint maga a sejt). Vegyük még hozzá, hogy az alkotórészek úgy illeszkednek partnereikhez, úgy biztosítják a sejt olajozott működését, hogy

közben egy rendkívül sűrű közeggel kell megküzdeniük, szomszédokkal erőteljes „molekuláris tuszkolódásban” vannak (egy fehérje mozgása például ezerszer lassabb, mint amilyen híg, vizes közegben lenne). A sejtépítés feladata tehát reménytelenül bonyolultnak tűnik.

A biológus szerencséje

Mi ad mégis alapot ahhoz, hogy mesterséges sejtről beszélhessünk? Az, hogy a sejt önszervező rendszer. Minden sejten ott van a DNS molekula, amely a felépítéshez és működéshez szükséges információt hordozza. Ha ez az információ teljes, akkor az egyes komponensek a megfelelő időben képződnek, a megfelelő helyre jutnak, a megfelelő feladatot végzik el – a sejt megszervezi magát. A feladatot tehát redukálhatjuk: elegendő a megfelelő DNS molekulát elkészíteni, a szükséges információt beléje kódolni. Az *E. coli* baktériumban egyetlen, gyűrűvé zárodott DNS molekula van, kerekítve 5 millió építőelemből (nukleotidból) áll, ezek pedig mintegy 4-5 ezer gént (azaz értelmes egységet, RNS-t és fehérjét kódoló szakaszt) képeznek. Vannak az *E. coli*-nál jóval egyszerűbb baktériumok is, ezeket alapozva kijelenthetjük, hogy százas-ekzes nagyságrendben kellene géneket egyetlen DNS molekulává összeállítani. Persze a DNS molekula önmagában még nem él, valami trükkre még szükség van, hogy „beindítsuk”, a rendszert „meglökjük”, hogy aztán a kódolt információ megnyilvánuljon, a sejt felépüljön, működni kezdjen.

Definiáljuk a célt!

Milyen kritériumoknak feleljen meg az élő sejt? Hírhedten nehéz pontosan definiálni, mit tekintünk élőnek. Itt elégedjünk meg annyival, hogy olyan sejtet akarunk készíteni, amely a számára biztosított tápanyagokból saját magához hasonlókat képes létrehozni. Kézenfekvő ugyanakkor, hogy

olyan egyszerű legyen a sejt, amilyen csak lehet. Kevesebb komponenst, gént könnyebb összeállítani, a működés könnyebben követhető. Létezik-e valamiféle abszolút minimuma a géneknek, valami alap-génkészlet, ami elegendő az élethez? A válasz: részben igen. A mai élővilág, hihetetlen változatossága dacára, nagyon is egységes képet mutat a sejt alapfolyamataiban. A DNS másolása és javítása, az átírás RNS-re, a fehérjeszintézis olyan folyamatok, amelyek minden sejtben – az emberi sejtől a baktériumig – hasonlóak, és közös eredetre mutatnak. Meg lehet kísérlni ezt a közös génkészletet rekonstruálni, de ez még nem elég. A géncsomag másik része biztosítja, hogy a rendelkezésre álló alapanyagokból, energiaforrásból ezek a folyamatok végbemehessenek. Márpedig a külső körülmények rendkívül sokfélék, és rajtunk is múlik, mit tekintünk kiindulásnak, milyen környezeti feltételeket, tápanyagokat biztosítunk a sejt számára. Legyen elegendő pusztán víz, néhány szervetlen só és glükóz ahhoz, hogy a sejt mindent elkészítsen? Vagy biztosítsuk a húszféle aminosavat és a nukleotidokat is? Szobahőmérsékleten vagy 37 °C-on szaporodjon a sejt? Használjon oxigént a sejt, vagy ne legyen szüksége rá? Látható, hogy abszolút „minimális” génkészletű sejt nincs, a szükséges génkészlet a konkrét körülményektől is függ, ráadásul egyfajta célra alternatív megoldások is létezhetnek.

Készítsünk vázlatot!

Már egy negyedszázaddal ezelőtt írt biokémia tankönyvből is meglehetősen jó fogalmat alkothattunk arról, milyen anyagcsereutakat tervezzünk egy sejt számára (Watson, 1980). Alapul vehetünk egy viszonylag egyszerű baktériumsejtet: glükolízis, citrátkör, légzési lánc, aminosavak és nukleotidok szintézise, lipidek előállítása, stb. – felrajzolhatjuk a főbb útvonalakat. Ma mindezekhez a lépésekhez géneket is tudunk rendelni. Száz-

nál több baktérium teljes genomját (génkészletét) ismerjük jelenleg, s egy olyan jól ismert élőlény, mint az *E. coli* baktérium esetében a gének 80 %-áról több-kevesebb pontossággal tudjuk is, mire szolgál. A vázlatot, a génlistát tehát összeállíthatjuk, ebben benne lesz minden, amiről tudjuk, hogy szükséges. A baj az, hogy ott van a géneknek egy jelentős hányada (az *E. coli*-nál ez 20 %), amelyről egyáltalán nem tudjuk, mire szolgál. Ezek között vannak olyanok is, amelyek valami eddig fel nem ismert, de nélkülözhetetlen funkciót látnak el. Szükség van tehát a génkészlet szisztematikus analizésére.

Azonosítsuk a létfontosságú géneket!

A nélkülözhetetlen gének listájának összeállítását kezdhethetjük a számítógépnél is. Ha összehasonlítjuk két *E. coli* törzs – mondjuk a laboratóriumi, ártalmatlan K-12 (Blattner et al., 1997) és a betegséget okozó O157:H7 „hamburger” coli (Perna et al., 2001) – génkészletét, a gének mintegy 80 %-át megtaláljuk mindkét törzsben. A maradék 20-25 % (attól függ, melyik törzset nézzük) azonban csak az egyik, vagy csak a másik törzsben van meg. Honnan erednek ezek a nem közös gének? A két törzs evolúciója kb. 5 millió évvel ezelőtt vált szét. Azóta a nélkülözhető gének egy része elveszhetett egyik vagy másik törzsből, illetve a törzsek a szétválás után „begyűjtettek” más sejtekből – ún. horizontális transzferrel – plusz géneket. Joggal tételezhetjük fel, hogy azok a gének, amelyek nem tartoznak a közös halmazba, nem részei az *E. coli* alap-génkészletének, nem létfontosságúak. Ha az összehasonlításba egy harmadik *E. coli* törzs, az uropatogén CFT073 (Welch et al., 2002) génjeit is belevesszük, a közös halmaz tovább zsugorodik, már csak a gének 60 %-a közös. További genomokat, távolabbi rokonokat (például a rovarparazita *Buchnerá*-t) belevonva az analízisbe akár 10 %-ra is redukálhatjuk a génlistát. Ez azonban már jelzi is a problémát:

minél több genomot hasonlítunk össze, annál kevesebb közös gén marad, a végén elfogy a DNS. Távoli rokonok esetén ugyanis a mutációk miatt már annyira különbözhet két gén, hogy nem ismerjük fel a közös eredetet, de hamis redukciót eredményezhet a paral-
lel és alternatív génfunkciók sokasága is. Bizonyos bioinformatikai trükkökkel (például COG analízissel, ahol kevésbé hasonló génekben is felismerhetjük a közös eredetet) mintegy nyolcvan génről, géncsoportról tudjuk kideríteni, hogy valamiféle közös ősből származnak (Harris et al., 2003), ennyi gén azonban biztosan nem elég a sejtműködéshez. A génkészletek összehasonlítása tehát segít a létfontosságú gének azonosításában, a kör szűkítésében, de a bizonyossághoz más módon nyert információra is szükség van.

Az esszenciális génhalmazt kísérletekkel is behatárolhatjuk. Bizonyos „ugráló” gének (transzpozonok) képesek arra, hogy a DNS egyik helyéről egy másik, véletlenszerűen kiválasztott pozícióba helyezték át magukat. Amelyik génbe beugranak, annak működését – molekuláris sorompóként – megakadályozzák. Egy ilyen ugráló gént „szabadjára engedve” a sejtben, utólag molekuláris térképezéssel megállapítható, melyik génbe érke-
lődött be, azaz melyik gén rontható el anélkül, hogy a sejt elpusztulna. Kellő számú sejtet megvizsgálva az összes elrontható, nélkülözhető gént – bennük a transzpozonnal – feltérképezhetjük. Az esszenciális géneket negatív módon azonosíthatjuk: ezekben nem találunk transzpozont, hiszen egy ilyen beékelődés a sejt pusztulását vonja maga után. Vannak azonban a kísérletes megközelítésnek is buktatói. Lehet két gén külön-külön nélkülözhető, együtt mégsem ejthetők ki, mert egymást kiváltó, alternatív útvonalakhoz szükségesek. A fordított esetre is találunk példát: például a toxin-antitoxin párt termelő gének közül az antitoxin génjét esszenciálisnak találjuk, hiszen ha elrontjuk, akkor nincs, ami közömbösítse a toxint, és a

sejt elpusztul. Ha azonban először a toxin génjét távolítjuk el, semmi szükség nincs a továbbiakban az antitoxin génjére.

Látható tehát, hogy egyedüli üdvözítő megoldás nincs, de a bioinformatikai módszerek a kísérletes megközelítéssel kombinálva – s kiegészítve más forrásból származó információval, például génexpressziós adatokkal – jó közelítéssel megrajzolják a nélkülözhetetlen gének körét.

A sejt-készítés kétféle útja

Jelenleg kétféle megközelítés kínálkozik a mesterséges, minden komponensében ismert sejt létrehozására. Az egyik út az lehet, hogy „alulról fölfelé”, egyszerű alkatrészekből rakjuk össze a sejtet. A másik megoldás az lehet, hogy „fölről lefelé” haladunk, egy már létező sejtől indulunk ki, és abból próbáljuk eltávolítani a „fölsleges” géneket. Külön-külön szemrevételezve a két megközelítést, vegyük számba a buktatókat és esélyeket!

RAKJUK ÖSSZE A SEJTET!

A modell. A lehető legegyszerűbb sejt modellje lehet a *Mycoplasma genitalium* baktérium. Ez az egyik ismert legkisebb génkészletű baktérium: alig ötszáz génje van. Természetes körülmények között parazitaként, emberi sejtekkel alkotott szoros kapcsolatra utalva él, de megfelelő tápanyagokkal ellátva önálló életre is képes a kémcsőben. Venterék minimális sejtjük építéséhez ezt a baktériumot veszik alapul. A fent említett transzpozonos mutagenézissel megállapították, hogy az ötszáz génből 250-300 olyan van, amely nem rontható el, azaz esszenciális (Hutchison et al., 1999). Nem feledve az esszenciális gének azonosításának fent említett bizonytalanságait, egy ilyen génszámú kromoszóma szintézisével már meg lehet próbálkozni.

A DNS szintézise. A DNS jól kezelhető, stabil molekula. A kívánt nukleotid sorrendű DNS-t akár kémiai, akár enzimatiszintézissel elő tudjuk állítani, itt a nehézséget a

DNS hosszúsága okozza: mintegy 300 ezer nukleotid füzéréből álló kromoszómára van szükségünk (átlagosan kb. ezer nukleotid alkot egy gént). A kémiai szintézis hatékonyan kb. száz nukleotidnyi, tehát viszonylag rövid darabok készítésére képes, ezeket a darabokat viszont bizonyos trükkökkel (például ún. ragadós végek hibridizálásával, ligálásával) génméretű darabokká lehet összekapcsolni. Enzimátikus (másolós) szintézissel akár nagyobb darabok is készíthetők, ehhez viszont szükség van egy lemásolandó mintára, melyet a modellsejt kiválasztott DNS-szakasza szolgáltathat. Akármelyik módszerrel készíjtjük a DNS-darabokat, ezeket össze kell fűzni egyetlen óriásmolekulává. Ennek is megvan a technikája, a szükséges molekuláris klónozási lépéseket – ha kisebb léptékben is – rutinszerűen alkalmazzák a laboratóriumokban. A lépésenként összetoldott, nagyméretű DNS-konstrukció bizonyos speciális részek beépítésével ún. mesterséges bakteriális kromoszómaként alkalmas gazdasejtben (például az *E. coli*/baktériumban) fenntartható, sokszorozható, onnan tiszta formában kinyerhető.

A DNS „beindítása”. Az elkészített mesterséges kromoszóma, a tiszta DNS még csak holt információ. A kiolvasáshoz, működtetéshez szükség van enzimekre, a sejtben meglévő speciális miliőre. Venterék nem árulják el, hogyan kívánják ezt biztosítani, de néhány ötletről lehet spekulálni. A mesterséges kromoszómát elektroporálással (a sejtfalet átmenetileg átjárhatóvá tevő, milliszekundumos áramütéssel) be lehet juttatni a baktériumsejtbe. Itt már rendelkezésre állnak a DNS működtetéséhez szükséges enzimek, anyagok. Ha úgy tervezzük meg a mesterséges kromoszómát, hogy kódoljon egy „gyilkos” fehérjét (restrikciós enzimet) is, amely egy meghatározott nukleotidsorrendet felismerve elvágja a DNS-t, akkor ez a fehérje termelődése után eldarabolja, eliminálja a sejt eredeti kromoszómáját. A mesterséges kromoszóma vi-

szont intakt maradhat, ha úgy tervezzük, hogy a „gyilkos” fehérje által felismert nukleotid-sorrend ne forduljon elő rajta. Így a sejtbe juttatott mesterséges kromoszóma rövid úton átveheti az uralmat, és ettől kezdve már irányítja a sejt működését. Más megoldás is kínálkozik. Ismertek olyan mutáns baktériumok, amelyek abnormálisan osztódnak. Míg normális osztódáskor a DNS megkettőződik, és a kétfelé váló sejt mindkét utódjába jut belőle egy-egy kópia, addig a mutáns sejt osztódásakor nagy számban fűződnek le hibás, DNS nélküli „minisejtek”. Ezekbe a „minisejtekbe” aztán elektroporálással beletölthető a mesterséges kromoszóma. Szépséghiba, hogy az *E. coli*/baktérium minisejt mutánsa áll rendelkezésre, ennek enzimejei pedig nem kompatibilisek a *Mycoplasma* genom mintájára készült mesterséges kromoszómával. Elképzelhető viszont, hogy hasonló, minisejtet képező mutációt lehet az eredeti *Mycoplasma*-ban is készíteni.

Milyen eredmény várható? A DNS szintézis – mind a kémiai, mind az enzimátikus – a mai technikák mellett tökéletlen folyamat, a nukleotidsorrendbe hibák csúszhatnak (akár 1:1000 arányban). Elég akár egyetlen ilyen hiba, és a kódolt fehérje képtelen lesz megfelelően működni – a projekt megbukott. Van azonban megoldás: a minőségkontroll. Minden egyes DNS-darabot, mind az összeszerelt részeket, mind a végleges kromoszómát ellenőrizni kell, és a csak a hibátlan konstrukciót meghagyni. Ez az ellenőrzés (szekvenálás) ma olcsó, gyors és hatékony. Adódnak azonban további problémák is, ezek közül a legtöbb bizonytalanságot talán az rejti, hogy keveset tudunk a gének szabályozásáról. A gének ugyanis nemcsak önmagukban, külön egységekként működnek, hanem egy jól összehangolt hálózat részeként is. Nem mindegy, a kromoszómán hol, milyen orientációban, milyen szomszédok között foglalnak helyet, milyen DNS-be kódolt, szabályozó áttételek segítségével kap-

csolnak ki-be. Az ilyen problémák egy részét azzal lehetne elkerülni, hogy a tervezésnél a lehető legjobban utánozzuk az eredeti modellsejt struktúráját (például megtartjuk a gének sorrendjét, közvetlen környezetét, irányultságát). Látható, hogy sok akadállyal kell megküzdeni. Ami mégis esélyt ad, az a rendkívül hatékony szelekció. A hibás, selejt sejt ugyanis nem él. Sokféle génkombinációval, technikai megoldással lehet próbálkozni, a sikeres konstrukció „kiugrik”, megmutatja magát, ugyanis szaporodik, él.

A projekt legfőbb kritikája azonban nem technikai jellegű. Ha sikerül is egy *Mycoplasma* alapú, egyszerű mesterséges sejtet készíteni, mire lesz képes ez a sejt? Maga a modellsejt is egy lassan szaporodó, specializált parazita. A még egyszerűbb mesterséges sejt teljeskörű tápanyagellátásra szorulna, várhatóan rendkívül lassan szaporodna, semmi hasznosat nem „tudna”, épp csak élne. Tudományos érdekességnek talán ez nem is kevés.

EGYSZERŰSÍTÜNK!

A modell. Vizsgáljuk meg a mesterséges sejt készítésének másik lehetőségét, a genom redukálását, egyszerűsítését! E munkák fókuszában az *E. coli* baktérium áll. Nem véletlenül, hiszen már több mint fél évszázada kutatják – minden molekuláris biológiai laboratórium nélkülözhetetlen eszköze, a molekuláris szinten legjobban ismert élőlény. Sokoldalú, változatos környezetben életképes, gyorsan szaporodó baktérium. Biotechnológiai célokra is alkalmazzák: hormonok, gyógyszerek, enzimek készülnek közreműködésével. Lényeges szempont, hogy jól kezelhető, alakításához bőséges genetikai eszköztár áll rendelkezésre.

Az alap E. coli sejt meghatározása. Páratlan lehetőséget jelent, hogy jelenleg már nyolc *E. coli* törzs genomját ismerjük teljes egészében. A génkészletek összehasonlításából sajátos genomstruktúra képe rajzolódik

ki. A minden törzsben közös gének alkotta kromoszómagerincet több száz kisebb-nagyobb „DNS-sziget” (egyes gének, géncsoportok) szakítja meg. Ezek összetétele, lokalizációja törzsenként változik. Ezek a szigetek a korábban említett evolúciós módokon, génvesztéssel illetve génnyeréssel (horizontális transzferrel) keletkezettek, és valószínűleg nem-esszenciális funkciókat kódolnak, nem tartoznak az alap *E. coli* génkészletbe. Mire jók akkor? Részben „önző”, önmagukat fenntartó gének, géncsoportok (fágok, inszerciós szekvenciák, transzpozonok), részben pedig valódi előnyt biztosító gének – az illető törzs speciális életterében (például az ember vékonybele, az urogenitális vezetékek vagy éppen a szarvasmarha béltraktusa). Mindenesetre okunk van feltételezni, hogy az általunk definiált környezetben (kémcsőben, 37 °C-on, ún. glükóz minimál táptalajon) nincsen szüksége a baktériumnak ezekre a szigetekre.

Nagy erővel folyik a létfontosságú gének azonosítása a kísérletes fronton is. Számos nagy laboratórium, nemzeti és nemzetközi konzorcium (angol, japán, kanadai, USA-beli) tűzte ki célul az összes *E. coli* gén funkciójának felderítését (Smalley et al., 2003). Transzpozonos (véletlenszerű) mutagenézis, gének egyesével, irányítottan történő elrontása, DNS-chippel végzett génkifejeződésmérés – csak néhány az alkalmazott technikákból. Az eredményeket a fent említett szekvencia-analízissel kombinálva már nekifoghatunk az *E. coli* genom racionális tervezésen alapuló, drasztikus átalakításába. Ilyen munkát jelenleg két helyen végeznek: a mi szegedi laboratóriumunkban (együttműködve egy amerikai csoporttal) (Kolisnychenko et al., 2002) és egy koreai intézetben (Yu et al., 2002).

Az E. coli genom redukciója. Stratégiánk szerint elsősorban a törzs-specifikus DNS-szigeteket kell kiejteni, eliminálni a kromoszómából, hogy a közös, alap-génkészletű

E. coli sejtet létrehozunk. Az egyes szigetek közvetlen környezetét is megvizsgáljuk: kiterjeszhető-e a kiejteni kívánt szakasz a szomszédos génekre, géncsoportokra? A laboratóriumi alaptörzsnek számító K-12-ből indulunk ki, ennek 4300 génjéből kellene kiejteni mintegy 1300 gént, hogy az alapgénkészletű *E. coli* sejtet létrehozunk. Ha ide eljutunk, a még ismeretlen funkciójú gének többségétől megszabadulunk, és a távlati cél, a minden komponensében ismert mesterséges sejt elérhető közelségbe kerül. Hol tartunk most? A DNS-szakaszok kivágásához (deléciójához) kidolgoztunk egy gyors és hatékony, a sejt saját DNS-javító mechanizmusait alkalmazó módszert. Segítségével az élő sejten belül nukleotidnyi precizitással tudunk tetszőlegesen kiválasztott DNS-szakaszokat kivágni a kromoszómából. A kijelölt szakaszok egymás utáni kivágásával eddig 15 %-kal csökkentettük az *E. coli* kromoszóma méretét. Ez mintegy 700 gén delécióját jelentette.

Mi várható? A genomredukciós munkánk – szemben az „alulról építkezős” technológiával – nagy előnye, hogy az egymást követő lépések ellenőrizhetők: az újabb gének kiejtése milyen hatással van a sejtre? Életben marad? Csökken az életképessége, lassabban szaporodik? Újabb tápanyagokat igényel? Ha nem kívánt változás következik be, egy lépést visszamehetünk, és más irányba fordulhatunk. A kiindulási baktérium, az *E. coli*, hasznos, sokoldalú sejt. Megtisztítása az ismeretlen faktoroktól, főleges génektől valószínűleg egy még jobban kezelhető, ellenőrizhető sejtet eredményez. Míg a genomredukcióval csökkentjük az ismeretlen gének számát, a sejtmodellezéssel foglalkozó szakemberek egyre teljesebb (jelenleg néhány száz génből álló) *E. coli* génhálózatokat építenek és tesztelnek a számítógépen (Covert, 2002). A két út az alapgénkészletű sejtnél találkozhat. Ez a programozható, prediktálható viselkedésű sejt kiin-

dulási pont lehet speciális feladatokra tervezett, extra géncsomagokkal felvértezett sejtek, hasznos biogépek készítéséhez.

Már genomredukciós munkánk közbülső fázisaiban is új lehetőségeket teremt az egyszerűsített sejt. Rendelkezünk már olyan törzssel, amelyből az összes mobilis DNS-elemet (8 db fágot, 44 db inszerciós szekvenenciát) eltávolítottuk. Ezek a mobilis elemek adják a DNS mutációinak jelentős részét. Egy ilyen mobilis elem áthelyeződése elronthat egy ipari termelő törzset, eredményezhet hatástalan vakcinát, átrendezhet egy DNS-klónt. A mobilis elemektől mentes törzs várokozásaink szerint stabilabb, az „ugráló” gének nem okozhatnak problémát. Az ilyen törzs alkalmas eszköz az olyan, nagyon is aktuális jelentőséggel bíró, mobilis DNS közvetítette folyamatok tanulmányozásához, mint az antibiotikum-rezisztencia terjedése vagy az új kórokozók megjelenése.

Veszélyek?

Jelent-e valamiféle veszélyt a mesterséges sejt előállítás? Maga Venter jelentette be, hogy nem fognak minden részletet közölni, nehogy bioterroristák ötleteket kapjanak. Valós-e ez a veszély? A közelmúlt terrorista akciói és az antrax-ijedelem után jelentős figyelmet kap minden, ami a terrorizmussal összefüggésbe hozható. A fokozott figyelem pedig több pénzt és nagyobb publicitást is jelent. Reálisan szemlélve teljességgel valószínűtlen, hogy terroristák speciális, ártalmas sejteket próbáljanak készíteni. Jól felszerelt laboratóriumok, hosszú munkával megszerzett szakértelem kell az ilyen feladatokhoz, az eredmény pedig teljesen bizonytalan. Sokkal egyszerűbben lehet már meglévő kórokozókat tenyésztetni, esetleg még veszélyesebbé tenni, de még ennél is egyszerűbb, olcsóbb és „hatékonyabb” hagyományos fegyvereket gyártani. Ha a terrorizmus veszélyével nem is kell számolnunk, vajon féljünk-e véletlen balesettől, a mesterséges

sejt elszabadulásától, ámokfutásától? Kikerülhet-e a laboratóriumból egy rosszindulatú mutáns? Egy betegséget okozó, patogén baktérium általában extra génekkel rendelkezik ártalmatlan változatához képest. Külön génekre, fegyverekre van szüksége például ahhoz, hogy a tápcsatornába jutva túlélje a gyomor savas közegét, a bélben speciális nyúlványokkal megkapaszkodjon, elkerülje az immunrendszer támadását, toxinokat válasszon ki, stb. Ez a génkészlet nyilvánvalóan hiányozni fog a mesterséges baktériumból, nincs is esélye rá, hogy ezeket a fegyvereket véletlenül megszerezze. Azzal, hogy a mobilis DNS-elemeket is kivettük belőle, még a változékonyság képességét is jórészt elvesztettél! Minél jobban egyszerűsítjük, a sejt annál inkább a kémcső rabja lesz; csak az általunk megtervezett feltételek között, meghatározott közegben, alkalmazkodásra képtelenül létezhet. A mesterséges sejtet tehát kihúzhatjuk félelmeink listájáról.

Teremtés?

Térjünk vissza a kérdéshez: Isten (természeti rend/teremtő evolúció/stb.) helyébe akar-e

lépni a biológus? Tisztázzuk: a mesterséges sejt létrehozására irányuló kísérletekkel nem valami kezdeti, az élet hajnalán lezajlott lépéseket kívánunk lejátszani, valami alternatív teremtést véghezvinni, a tervezett sejt nem valamiféle primitív kreatúra. Mintáink mind modern, közel 4 milliárd éves evolúció eredményeként kialakult, finomodott, rendkívül hatékony, de különböző életstratégiájú sejtek. Arra törekszünk, hogy valamiféle közös nevezőt találjunk, számunkra előnyös módon újra-keverjük a kártyákat. Új szabályok, törvények, alapelvek kitalálásáról nincsen szó. Aki tehát azt kérdezi, Istent (természeti rendet/teremtő evolúciót) akar-e játszani a kutató, annak nincs nagy véleménye Istenről, hiszen a laboratóriumban pipettázó, kész sablonokat, építő-kockákat használó biológus szintjére degradálja. Legfeljebb annyit állíthatunk, hogy az ellesett trükkökkel „vegkyonyhánkban” megpróbáljuk az Istent utánozni, példáját követni. És tehetünk ennél jobbat?

Kulcsszavak: *mesterséges sejt, minimális genom, Escherichia coli, Mycoplasma genitalium*

IRODALOM

- Blattner, Frederick R. – Plunkett, G. III. – Bloch, C. A. – Perna, N. T. – Burland, V. – et al. (1997): The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 5 September, 1453-1474.
- Covert, Markus W. – Palsson, Bernhard Ø. (2002): Transcriptional Regulation in Constraints-based Metabolic Models of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2 Aug., **277**, **31**, 28058-28064.
- Goodsell, David S. (1991): Inside a Living Cell. *Trends in Biochemical Sciences*. **16**, 203-206.
- Harris, J. Kirk – Kelley, S. T. – Spiegelman, G. B. – Pace N. R. (2003): The Genetic Core of the Universal Ancestor. *Genome Research*. **13**, **3**, 407-412.
- Hutchison, Clyde A. – Peterson, S. N. – Gill, S. R. – Cline, R. T. – White, O. – Fraser, C. M. – Smith, H. O. – Venter, J. C. (1999): Global Transposon Mutagenesis and a Minimal *Mycoplasma* Genome. *Science*. **286**, 10 Dec., 2165-2169.
- Kolisnychenko, Vitaliy – Fehér T. – Herring, C. D. – Plunkett, G. III. – Pósfai J. – Blattner, F. R. – Pósfai G. (2002): Engineering a Reduced *E. coli* Genome. *Genome Research*. **12**, **4**, 640-647.
- Perna, Nicole T. – Plunkett, G. – Burland, V. – Mau, B. – et al. (2001): Genome Sequence of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*. **409**, 25 Jan., 529-533.
- Smalley, D. J. – Whiteley, M. – Conway, T. (2003): In Search of the Minimal *Escherichia coli* Genome. *Trends Microbiol* **11**, 6-8.
- Welch, R. A. – Burland, V. – Plunkett, G. III. – et al. (2002): Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 17020-17024.
- Yu, B. J. – Sung, B. H. – Koob, M. D. – Lee, C. H. – Lee, J. H. – Lee, W. S. – Kim, M. S. – Kim, S. C. (2002): Minimization of the *Escherichia coli* genome using a Tn5-targeted Cre/loxP excision system. *Nat Biotechnol* **20**, 1018-1023.
- Watson, James D. (1980): *A gén molekuláris biológiája*. Medicina, Budapest