



Gyurcsik Béla

■ Szegedi Tudományegyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

# Kémiai Nobel-díjat ért a mesterséges nukleázok kutatása 2020-ban

**A** genomszerkesztés egy módszerének kifejlesztéséért adományozta a Svéd Királyi Tudományos Akadémia két női kutatónak a kémiai Nobel-díjat 2020-ban (**1. ábra**). *Emmanuelle Charpentier*, mikrobiológus, genetikus és biokémikus, 1968. december 11-én született (Juvisy-sur-Orge, Franciaország). Egyetemi diplomát a párizsi Pierre és Marie Curie Egyetemen (1986–1992), PhD-fokozatot pedig a párizsi Pasteur Intézetben (1992–1995) kapott. Ezután számos külföldi egyetem és kutatóintézet laboratóriumában dolgozott (USA, Ausztria, Svédország). Jelenlegi munkahelye az általa alapított és vezetett Patogének Tudományának Max Planck Egysége (Berlin, Németország). *Jennifer Anne Doudna*, vegyész, biokémikus, biofizikus és szerkezeti biológus, 1964. február 19-én született (Washington, DC, USA). A Pomona Egyetemen kapott diplomát 1985-ben, PhD-fokozatát a Harvard Medical School adományozta 1989-ben. Több amerikai egyetem után jelenlegi munkahelye a Kaliforniai Egyetem, Kémiai Kar (Berkeley, CA, USA).



1. ábra. A díjazottak: Emmanuelle Charpentier (balra) és Jennifer Anne Doudna (jobbra)

Érdeemes bővebben kifejteni a Nobel-díj indoklását, hiszen a genomszerkesztést programozható mesterséges nukleázok segítségével már előbb megvalósították, és ezeket az enzimeket ma is tanulmányozzák/fejlesztik. Ezek a nukleázok olyan kimer fehérjék, melyeket egy DNS-felismerő domén (cinkujj- vagy transzkripció aktivátor típusú TALE fehérje) és egy nukleáz domén (a FokI restriktív endonukleáz katalitikus doménje) alkot. A CRISPR/Cas9 rendszer felfedezése azonban forradalmasította ezt a tudományterületet. Vizsgáljuk meg, mi is a CRISPR/Cas9 rendszer. Elsőként a japán Oszakai Egyetem kutatói tették közzé véletlen megfigyelésüket egy szokatlan ismétlődő DNS-szekvenciáról az *Escherichia coli* baktérium genomjának nem kódoló régió-

ójában 1987-ben [1]. Öt, egyenként 61 bázispárból álló egymás utáni DNS-szakaszt azonosítottak, melyek mindegyike tartalmazott egy szigorúan megőrzött 29 bázispárból álló, részlegesen palindrom szekvenciát. A palindrom kifejezés a DNS-terminológiában azt jelenti, hogy a szekvencia a DNS két szálán az 5'→3' irányban olvasva ugyanaz. Bár ezen szekvenciák jelentőségét akkor nem ismerték fel, az ilyen DNS-szakaszok egyszálú formává alakulva önhibridizáció révén hurkokat képesek kialakítani csakúgy, mint a róluk esetlegesen átíródó RNS-molekulák. A következő 15 év kutatásai során számos más baktérium DNS-ében is megfigyeltek hasonló titokzatos ismétlődő szekvenciákat. 2002-ben kapták ezek a szakaszok a Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats azaz CRISPR (csoportosan előforduló, szabályos közökkel elválasztott rövid palindromikus ismétlődések) nevet [2]. 2005-ben több kutatócsoport is kimutatta, hogy az ismétlődő szakaszok nem megőrzött (nem palindrom) szekvenciái (protospacer) valójában a baktériumsejtekbe behatoló, de végül legyőzött fágokból vagy plazmidokból származhatnak [3–5]. A protospacer szekvenciákkal azonos nukleinsav-szekvenciákat tartalmazó behatolókkal szemben ugyanis a baktériumsejtek rezisztenciát mutattak. Azt is sikerült kimutatni, hogy egy túlélő fertőzés után új ismétlődő szakasz jelenik meg a CRISPR régióban, mintegy megőrizve a támadó ágens emlékét, hogy amint az a következő alkalommal megjelenik, azonnal azonosítható és semlegesíthető legyen. 2006-ban Koonin és munkatársai felvetették [6], hogy a CRISPR-régióhoz társítható gének (Cas = CRISPR associated) olyan fehérjéket kódolnak, melyek a CRISPR régióval együtt a bakteriális immunitás egyik mechanizmusát alkotják, mely analóg az eukarióta RNS- interferenciarendszerrel. 2007-ben ezt a hipotézist Barrangou és munkatársainak kísérleti úton is sikerült igazolniuk [7]. Ennek a felfedezésnek a gyakorlati jelentőségét akkor az adta, hogy olyan baktériumtörzseket tudtak kifejleszteni, melyek számos vírussal szemben ellenállóvá váltak; például a sajt- és a joghurtgyártásban ezt azóta is alkalmazzák.

A továbbiakban számos kutatócsoport kapcsolódott be a CRISPR és az asszociált fehérjék szisztematikus vizsgálataiba. E kísérleteket itt terjedelem hiányában nem tudjuk részletesen bemutatni. Sikerült számos Cas-fehérjét azonosítani, és szerepüket a CRISPR/Cas rendszerben megfejteni. Kimutatták, hogy a mechanizmus a fertőző ágens DNS-ének a protospacer-szekvencia által történő felismerésével és ezt követő szekvenciaspecifikus hasításával kapcsolatos. Arra is fény derült, hogy a protospacer-szekvencia melletti rövid motívum (PAM = protospacer adjacent motif) jelenléte elengedhetetlen a DNS-hasításhoz. A baktérium DNS-ébe újonnan beépülő CRISPR-egységek kiválasztása a fertőző ágensek DNS-éből egy ott megtalálható PAM-szekvencia alapján történik. Azonban a PAM-szekvencia nem kerül át a bakteriális genomba, így a bakteriális CRISPR-szekvencia nem ha-

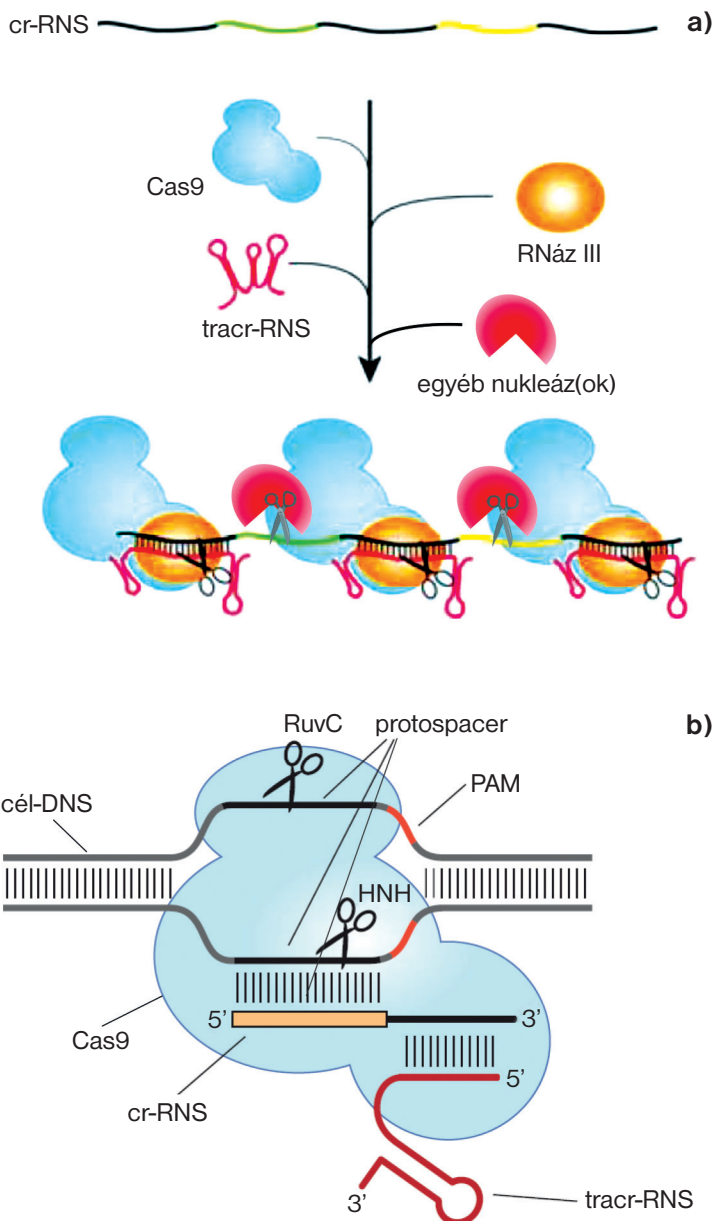


sítható a CRISPR/Cas rendszerrel. Világossá vált, hogy a Cas fehérjék három szinten szerepelnek a mechanizmusban: i) az új protospacer-szekvenciák beépítése a bakteriális genomba, ii) a CRISPR RNS- (crRNS) molekulák biogeneze (2.a ábra) és iii) a behatoló nukleinsavak semlegesítése. A kirakó darabjai egyre sza-

ták meg egymás között addigi eredményeiket. További közösen végzett részletes kísérleteik alapján jutottak arra a következtetésre, hogy a védekező rendszer alapja egy duális RNS-által vezérelt programozható endonukleáz. Sikertült kimutatniuk, hogy a DNS-hasításhoz *in vitro* körülmények között a crRNS és a Cas9 fehérje mellett szükséges még az addig hiányzó láncszem, az ún. tranz-aktíváló RNS (tracrRNS) is, melyet Charpentier a crRNS érési folyamatának tanulmányozása során mutatott ki először [9]. Ezt az áttörő felfedezést tartalmazó, Nobel-díjat érő kéziratot nyújtották be és publikálták is 2012 júniusában a *Science* folyóiratban [10]. A DNS hasítását a 2.b ábra szemlélteti.

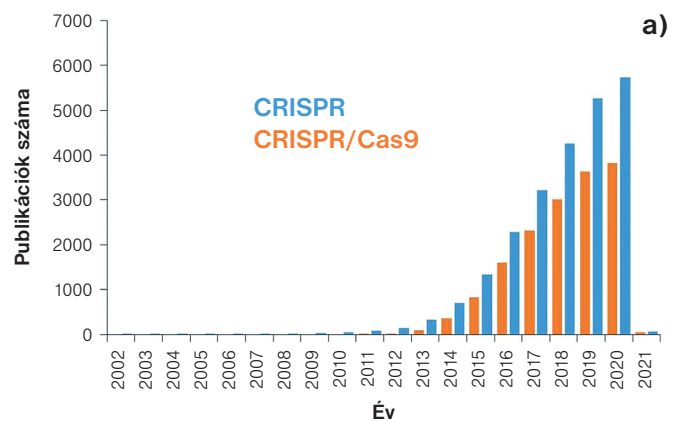
A tracrRNS a crRNS konzervált szekvenciájához hibridizálódva található meg a Cas9 fehérjével képzett komplexében. A crRNS protospacer-szekvenciája a cél-DNS komplementer szekvenciájához hibridizálódva határozza meg a DNS-hasítás specifikusságát. A Cas9 nukleáz HNH doménje a cél-DNS komplementer szálát, míg az RuvC doménje a protospacer-szekvenciával megegyező szekvenciájú cél-DNS-szálát hidrolizálja, kétszálú hasítást eredményezve. Kimutatták azt is, hogy a tracrRNS és a crRNS egyesíthető egy kimer RNS-sé a rendszer hatékonyságának csökkenése nélkül. Charpentier és Doudna felismerték a CRISPR/Cas9 rendszerben rejlő lehetőséget, miszerint azzal tetszőlegesen kiválasztott DNS-szekvencia egyszerűen megcélozható akár a humán genomban is, a crRNS protospacer- szekvenciájának megfelelő kialakításával. Ez pedig óriási előny az eddig alkalmazott cinkujj-nukleázokkal szemben, melyekben a célszekvencia megváltoztatásához a fehérje áttervezésére volt szükség. Így a CRISPR/Cas9 mesterséges nukleázrendszer alkalmas lehet génmódosítási feladatok tanulmányozására, illetve végrehajtására. Emiatt szinte pillanatok alatt kutatócsoportok százai figyelmének középpontjába került, és a CRISPR/Cas9 rendszerrel, főként annak alkalmazási lehetőségeivel kapcsolatos publikációk száma exponenciális növekedésnek indult. Jól látszik a 3.a ábrán, hogy ez a növekedési folyamat 2012-től kezdődött el. Már 2013-tól számos közlemény jelent meg eukarióta sejtek módosításáról, 2015-ben pedig életképtelen humán embrionális sejteket is módosítottak kínai kutatók [11]. Ez a publikáció meglehetősen élénk vitát váltott ki a tudományos közvéleményben, és azóta nemzetközi szakértők moratóriumot fogadtak el a humán genomban öröklődő változtatások kialakítása kapcsán [13].

Így végül Charpentier és Doudna felfedezései forradalmasították a génszerkesztés tudományterületét, és utat nyitottak a



2. ábra. a) A crRNS érési folyamatában részt vevő komponensek. b) A II-es típusú CRISPR/Cas rendszer aktív komplexe: a Cas9 endonukleáz két RNS-molekula (crRNS és tracrRNS) segítségével ismeri fel a cél-DNS-ben elhasítani kívánt szekvenciát ([10] alapján)

porodtak, és a különböző csoportok különböző módon próbálták ezeket összeilleszteni. 2011-re a verseny annyira kieleződött, hogy bármelyik pillanatban többen is publikálhatták a rendszer pontos leírását. Virginijus Siksnys, a litván Vilniusi Egyetem vegyész-profeszorának kutatócsoportja ekkor közölte, hogy a DNS-hasítást a Cas9 fehérje végzi a HNH és az RuvC nukleáz doménjei segítségével [8]. Charpentier és Doudna, akiket szintén foglalkoztatott a CRISPR/Cas rendszer, ebben az évben találkoztak az Amerikai Mikrobiológiai Társaság konferenciáján, és itt osztot-



3. ábra. a) A CRISPR, illetve a CRISPR/Cas9 rendszer jellemzésének leírása által inspirált publikációk száma napjainkig. A CRISPR-publikációk száma magában foglalja a CRISPR/Cas9 rendszerrel kapcsolatos publikációk számát is.

