

VENETIANER PÁL

# A génebeszét új technikái

Immár negyvenéves az a biokémiai-genetikai technika, amely a magyar nyelvben a „génebeszét” (angolul: genetic engineering, azaz génmérnökség) nevet kapta és forradalmasította a biológiai tudományok valamennyi ágát, valamint azok gyakorlati alkalmazásait, a biotechnológiát. Ezzel kapcsolatban talán érdemes felidézni – hiszen tudománytörténeti szempontból nagyon érdekes –, hogy mi vezetett a génebeszeti technika felfedezéséhez. E technológia kulcsa a génebeszét „műtési eszköze”, az a „restriktív endonukleáz” nevű enzimtípus, amely képes a DNS bizonyos szekvenciaelemeit nagy pontossággal felismerni, és azoknál elvágni a DNS-láncot. Ha a DNS nukleotidsorrendjét szövegnek tekintjük, akkor azt mondhatjuk, hogy ezek az enzimek a szöveg bizonyos szavait ismerik fel és ott vágják el a szövegfolymot. A restriktív endonukleázok kizárólag baktériumokban fordulnak elő, és biológiai szerepük az idegen DNS behatolása, azaz a bakteriofágok (a baktériumokat megtámadó vírusok) fertőzése elleni védekezés. Azt, hogy ilyen védekezés létezik, a molekuláris biológia egyik alapító atyja, *Salvador Luria* fedezte fel 1952-ben. Luria figyelte meg és írta le, hogy bizonyos esetekben, bizonyos baktériumokon a fágfertőzés hatékonysága korlátozódik, visszaszorul (ezt nevezte el „restriktív”-nak), bár magyarázatot a jelenségre nem tudott adni. Ezt a magyarázatot egy évtizeddel később *Werner Arber* szolgáltatotta, aki elméletében feltételezte a DNS-t specifikusan hasító „restriktív enzimek” létét, majd *Hamilton Smith* izolálta és jellemezte az első ilyen enzimet. Arber és Smith ezért (a restriktív enzimek első hasznos gyakorlati alkalmazását felfedező *Dan Nathans*-al együtt) 1978-ban Nobel-díjat kapott. Egy ilyen restriktív enzim felhasználásával vált lehetővé különböző eredetű DNS-szakaszok kémcsőben történő vágása-ragasztása, összemontírozása, ami a génebeszeti technika lényege.

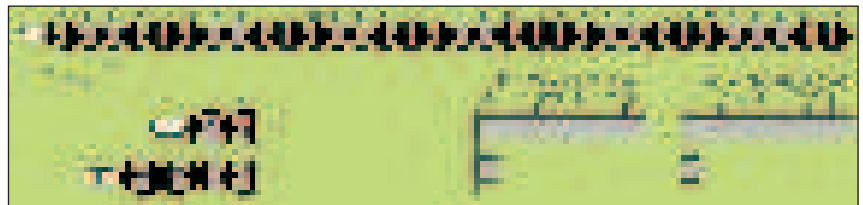
A tudománytörténetnek ezt az epizódját azért volt érdemes felidézni, mert az utóbbi években a baktériumok fágfertőzés elleni védekezésének egy teljesen új módját találták meg, és ez ismét egy új – rendkívül hasznos és sokoldalú – műtési eszközt szolgáltatott a génebeszék számára. Az új védekezési me-

chanizmus felfedezése – ez elég kivételes jelenség a modern kísérleti biológia történetében – nem alaputatási műhelyben, hanem ipari kutatóhelyen történt.

A tejiparban, a sajt- és a joghurtkészítésben kulcsszerepe van a *Streptococcus thermophilus* baktériumnak. E baktériumok tenyészteti elég gyakran esnek áldozatul bakteriofág-támadásnak, ami súlyosan veszélyezteti a termelési folyamat eredményességét és minőségét. A DuPont konzern egyik dániai élelmiszeripari laboratóriumában az ezzel a problémával küzdő kutatók 2007-ben megfigyeltek egy furcsa, a magasabb rendű élőlények immunválaszához hasonló jelenséget. Ha fágfertőzésnek tették ki a baktériumkultúrát, ezzel mintegy vakcinálták azt, vagyis a megmaradt baktériumok ellenállóká váltak a következő hasonló fertőzéssel szem-

ben. CRISPR elemekről 2005-ben kimutatták, hogy az ismétlődő palindromok közötti DNS-szekvenciák előfordulnak fágokban is, és ezért feltételezték, hogy azok korábbi fágfertőzések eredményeként kerültek be a baktériumok öröklési anyagába. E feltételezés helyességét bizonyították be, és használták ki a DuPont cég kutatói, amikor a veszélyes bakteriofágból származó DNS egy szakaszának a CRISPR elembe való mesterséges bevitelével immunissá tették a baktériumot az adott fág fertőzésével szemben. Vajon hogyan, milyen mechanizmussal immunizál a CRISPR-elemben lévő fág eredetű DNS-darab?

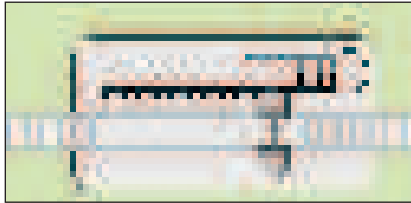
Erre a kérdésre egy évtizeddel korábban minden bizonnyal lehetetlen lett volna válaszolni. Ebben az évtizedben azonban a biológusok valósággal új világot fedeztek fel: a különböző kisméretű – korábban is-



1. ábra. A CRISPR-elem működése. A felső sor a baktérium-DNS CRISPR régiójának sematikus ábrája. Feketének az ismétlődő palindrómok, szürkék a közbeiktatott szekvenciák. A második sor külön mutatja a régió elejét és a baktériumtörzs érzékenységét két fággal szemben. A harmadik sorban látható, hogy ha ebbe a szakaszba beültetnek két új szakaszt a két bakteriofágból (S13, S14), a fágérzékenység nagyságrendekkel csökken

ben. A jelenség okát kutatva rájöttek, hogy a védekezésért a bakteriális DNS-nek egy speciális szakasza a felelős. Ezt a DNS-elemet már húsz évvel korábban leírták japán kutatók, de funkciójáról sejtelmük sem volt, és akkoriban a közleményük nem keltett semmilyen feltűnést. A következő években a megismert DNS-szekvenciájú baktériumfajok 40%-ában és az Archebaktériumok 90%-ában megtaláltak ezt a furcsa szerkezetet és CRISPR-nek nevezték el. A betűszó jelentése: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (azaz: együttesen előforduló, szabályos közökkel elválasztott rövid palindromikus ismétlődések, ahol a palindromikus azt jelenti, hogy a szekvencia előlről és hátulról olvasva ugyanaz, mint például a „kerek” szóban). A

meretlen – RNS-eknek a szabályozásban és a védekezésben játszott, hallatlanul fontos, egészen újszerű szerepét. (Ézért kapott Nobel-díjat 2006-ban *Fire* és *Mello*, l. a szerzőtől: A mikro-RNS. Új főszereplő a biológia színpadán. *Természet Világa*, 139, 2008, 120–122.) Kiderült tehát, hogy a baktérium-DNS CRISPR eleméről készül egy RNS-másolat, amely több átalakulási lépés után kapcsolódik egy Cas9 elnevezésű DNS-bontó enzimhez. Ez az enzim viszont csak akkor működik, ha a hozzá kapcsolódott RNS odavezette és kötötte egy kiegészítő (komplementer) szekvenciájú DNS-hez, ekkor azt képes elvágni. Minthogy a CRISPR-elemben ott volt a veszélyes fág-DNS egy szakasza, így az újra támadó fág DNS-ét lebontja a Cas9 enzim. Ezzel megoldódott egy fontos gya-



**2. ábra. A vezető (CRISPR-eredetű) RNS és a Cas9 nukleáz asszociációja. A nyílak mutatják a DNS-hasítás helyét. A vezető RNS DNS-el komplementer része sötétebb, a közös jellegzetes szerkezeti elem világosabb színű**

korlati probléma, de az eredmény ennél sokkal nagyobb jelentőségű.

Tavaly két kutatócsoport is kimutatta, hogy megfelelő szerkezetre alakított tetszés szerinti szekvenciájú „vezető” RNS-molekulákat kémcsőben összehozva a Cas9 enzimmel, bármilyen, a vezető-RNS-el komplementer szerkezetű DNS-t el lehet vágni. Ezzel valószínűsítő lavina indult el. *George Church* laboratóriumában mesterséges vezető RNS-molekulák tízezreit készítették el, amelyek képesek lehetnek az emberi gének 90%-ának specifikus elvágását irányítani – egyelőre csak kémcsőben. Rászállt a technikára a kiszolgáló biotechnológiai ipar is, egy cég mindössze 65 dollárért kínál rendelésre készült CRISPR-elemeket.

Mielőtt azonban az új technológia alkalmazásának legújabb területeit és perspektíváit ismertetném, érdemes visszatekinteni néhány előzményre. A DNS élő sejtben történő (*in vivo*) manipulálásának a CRISPR-technika felfedezése előtt is volt néhány – annál jóval korlátozottabb hatáskörű – lehetősége.

Ilyen a ZFN- (Zinc Finger Nuclease, azaz cink-ujj nukleáz) módszer. A cink-ujj sok természetes fehérjében előforduló szerkezeti elem, amely lehetővé teszi a szóban forgó fehérje specifikus kötődését bizonyos DNS-szekvenciákhoz. Számos génműködést szabályozó természetes fehérje ilyen cink-ujj segítségével kötődik a DNS meghatározott szakaszához, és ott egy adott gén működésének gátlását vagy fokozódását idézi elő. Ha egy ilyen cink-ujjat mesterségesen egy DNS-t hasító enzimhez kötnék, akkor a bontó enzim csak a megfelelő, a cink-ujj által meghatározott DNS-szakaszhoz kötődve, közvetlenül a kötőhely mellett hasítja a DNS-t. Ezt a hasítást a sejt természetes DNS-javító rendszerei igyekeznek befoltozni és ez a javítás manipulálható, azaz kisebb DNS-szakaszok, vagy egyes nukleotidok beépíthetők a hasítóhelyre. Ez lényegében annyit jelent, hogy megvalósítható irányított mutációk létrehozása.

A ZFN-technikánál modernebb, mindössze kétéves, és annál hatékonyabb az úgynevezett TALEN-ek (Transcription Activator-Like Effector Nucleases, vagyis a génátírást

aktiváló fehérjékhez hasonló nukleázok) felhasználása. A TALEN egy DNS-hasító enzimet kapcsol egy olyan 12–26 DNS-kötő modul tartalmazó fehérjéhez, amelynek minden modulja egy bizonyos nukleotidot képes felismerni. E modulok megfelelő megválasztásával elvileg tetszés szerinti 24 bázispáros vagy még hosszabb felismerő szekvenciájú fehérjék tervezhetők és hozhatók létre, amelyek a szóban forgó szekvencia mellett hasítják a DNS-t. Ezeket a TALEN-eket eddig elsősorban növényi gének manipulálására használták.

Kérdés, ha eddig is voltak módszereink a DNS élő sejtben belüli irányított módosítására, akkor miért keltett szenzációt az új CRISPR-módszer? Nos, a válasz igen egyszerű. Fehérjék mesterséges módosítása és fuzionálása, amely a ZFN- és TALEN-technológia lényege, meglehetősen költséges, fáradságos és olykor nehezen megjósolható eredményű eljárás. Ezzel szemben adott nukleotidsorrendű rövid RNS-molekulák szintézise, amely a CRISPR-módszerhez szükséges, rendkívül olcsón, egyszerűen, rutinszerűen megvalósítható, mint ezt a fentebb idézett példák is bizonyítják.



**3. ábra. Az optogenetikus génszabályozás. A CRY2 fotoreceptort hozzákapcsolják a DNS-felismerő TALE fehérjéhez, majd két közvetítő fehérjén (CIB1, VP64) keresztül a génátíró apparátushoz. Fény hatására az adott génen az átírási intenzitása megváltozik**

A CRISPR-módszer felfedezése valószínűsítő lavinát indított el, egyes kommentátorok szerint minden idők leggyorsabban fejlődő tudományterülete e technológia alkalmazása. Kínai kutatók rizsben és búzában valószínűsítottak meg génmódosítást ily módon, az amerikaiak zebrahal-embrióknál, fonalféregben alkalmazták először, de vannak már eredmények emlősben (egér, patkány) is. A legfontosabb terület, az emberi génterápiás alkalmazás előtt még tisztázandó, hogy mennyire specifikus a módszer, azaz biztosítható-e, hogy a vezető RNS kizárólag a tervezett egyetlen helyre vezesse a DNS-t bontó enzimet.

Az előbbieken bemutatott új génszerkezeti módszerek egyik legérdekesebb alkalmazása egyesíti ezt a technikát korunk egy másik korszakalkotó felfedezésével, az optogenetikával (véleményem szerint a következő orvosi Nobel-díj egyik legnagyobb esélyesei az optogenetika módszerének kidolgozói *Deisseroth*, *Zhang* és *Boyden*!). Az optogenetika technikáját eddig elsősorban a neurobiológia alkal-

mazta, lényege, hogy egy fényérzékeny fehérjét, többnyire egy növényi eredetű fotoreceptort fuzionálnak egy jelátvitelben vagy génszabályozásban résztvevő fehérjével úgy, hogy a fotoreceptor fény hatására történő alakváltozása a másik fehérjére és ezáltal a jelátvitelre, vagy az általa szabályozott gén működésére is hasonlít. Azaz: fény sugaral, a sejtbe való behatolás nélkül lehet előidézni azonnali, pontosan kontrollált működés-változást. A módszer azt is lehetővé teszi, hogy különböző fotoreceptorok alkalmazásával különböző színű (hullámhosszú) fény sugaral, különböző megváltozásokat idézzenek elő ugyanabban a sejtben, vagy élőlényben. Nos, a *Nature* augusztus 22-i számában *Konermann* és munkatársai beszámolnak arról, hogy a TALEN-technológia és az optogenetika kombinációjával élő, ébren lévő egerek agyában két gén aktivitását percek alatt 10–20-szorosra tudták fokozni kék fény sugaral. A CRISPR-technológiával még könnyebben és sokoldalúbban lehet ugyanezt az elvet alkalmazni. A perspektívák beláthatatlanok.

## Irodalom

- Barrangou R. et al.: *CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes*. Science, 315 (2007) 1709-1712.
- Ishino I. et al.: *Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product*. J. Bacteriol., 169 (1987) 5429-5433.
- Jinek M. et al.: *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science, 337 (2012) 816-821.
- Konermann S. et al.: *Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states*. Nature, 500 (2013) 472-475.
- Mali P. et al.: *RNA-guided human genome engineering via Cas9*. Science, 339 (2013) 823-826.
- Perez-Pinera P. et al.: *RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors*. Nature Methods (2013) doi:10.1038/nmeth.2600