



A GENETIKUSOK ÚJ ESZKÖZE

A CRISPR/cas9

A bakteriális genetika megalapozója, Joshua Lederberg 1959-ben a Nobel-díj átvételekor tartott előadásában mondta a következő szavakat: „A genetikusok csalóka lidércfénye mindig is az volt, hogy találjanak egy specifikus mutagént, egy olyan reagenst, amely eljut egy adott génhez, felismeri azt, és meghatározott módon módosítja.” Ez a lidércfény mára valósággá vált.

Az elmúlt évtized során számos új módszert dolgoztak ki, amelyek képessé tették a kutatókat arra, hogy tervezetten és pontosan irányítottan vigyenek be kívánt mutációkat bármely génbe. E technikák közül a legsokoldalúbban, legegyszerűbben és legolcsóbban alkalmazható a CRISPR/cas9, amely „futótűzként” terjedt el a világon, és feltalálóié, *Emmanuelle Charpentiernek, Jennifer Doudnának* és *Feng Zhangnak* több mint két tucat tudományos díjat hozott az elmúlt három év során.

A módszer lényege, hogy az átalakítandó (mutagenizálendő) sejtbe egy fehérje- és egy RNS-molekulát (pontosabban: többnyire az e két molekulát kódoló DNS-t) kell bejuttatni. A cas9 fehérje egy baktériumokból előállítható DNS-bontó enzim, amely csak akkor bántja a DNS-t, ha a vezető-RNS-nek nevezett (többnyire mesterségesen szintetizált) kb. 100 nukleotid hosszúságú RNS-molekula odavezeti hozzá. Ezt a vezető-RNS-t úgy tervezik meg, hogy legyen benne egy kb. 20 nukleotid hosszúságú szakasz, amely pontosan megfelel a DNS

módosítandó részének, és ekkor ezen a szakaszon a cas9 enzim elvágja a DNS-t. Ez a vágás voltaképpen megölné a sejtet, ha nem lépnének be ilyenkor az önvédelmi, javító mechanizmusok. A korrekciónak két lehetséges útja van: az egyik az, hogy a törés egyszerűen befoltozódik, azaz helyreáll a vágás előtti folyamatos lánc, ez azonban többnyire hibával jár, azaz egy-két nukleotid kiesik a láncból vagy betoldódik. Ennek a következménye — ha a vágás egy működő génben történt — a gén megbénítása, „kiütése”. Olykor ez is lehet a beavatkozás célja, de ennél fontosabb a másik lehetőség. Ehhez szükséges az előbbieken említett kettő mellett egy harmadik molekula bejuttatása is a célsejtbe: egy olyan rövid DNS-darabé, amely majdnem teljesen megegyezik a vezető-RNS által determinált kb. 20 nukleotid hosszúságú módosítandó DNS-szakasszal, de egy ponton eltér attól, amennyiben tartalmazza a kívánt mutációt. Ekkor a sejt saját DNS-e és a bevitt DNS között létrejön egy kicserélődés (szakszóval: homológ rekombináció történik), és ezáltal a kívánt mutáció bekerül a sejt DNS-ébe.

Az elmúlt három évben számos kutatócsoport dolgozott azon, hogy tökéletesítsék a technológiát, javítsák pontosságát és hatékonyságát. E fejlesztések közül talán a legérdekesebb az a módszer, amelyben a módosított cas9 enzim nem vágja el a célpont DNS-t, csak odavisz hozzá egy másik enzimet, amely a DNS guanin-citozin (GC) bázispárját adenin-timinné (AT) alakítja, és ezáltal közvetlenül idézi elő a kívánt pontmutációt [1]. (Magyar vonatkozás: e munka első szerzője az amerikai *Alexis Komor*, a szecesszió nagy magyar építészének, Komor Marcellnek a dédunokája.

A CRISPR/cas9 technológiával már számos kívánt mutációval rendelkező (azaz potenciálisan hasznos) növényt, állatot, gombát, mikroorganizmust állítottak elő. Írásomban azonban kizárólag a humán alkalmazás lehetőségeiről, illetve kezdeti eredményeiről lesz szó. Ezen a téren a leküzdendő technikai nehézségek, elkerülendő és végzetes hibák mellett egy alapvető etikai problémával is szembe kell nézni. Azaz, hogy amikor – több mint négy évtizede – a génszerkezeti technika felfedezésével először tűnt reális lehetőségnek a humán génterápia, vagyis az örökletes, betegségek okozó mutációk kijavítása, világosan meg kellett különböztetni az úgynevezett „szomatikus” génterápiát a „csíravonali” génterápiától. Az előbbi azt jelenti, hogy a beteg ember betegség által érintett szerveiben, szöveteiben kísérlik meg a mutáció kiküszöbölését, és ezáltal a betegség részleges vagy teljes gyógyítását. Ez a hatás természetesen nem öröklődik. A „csíravonali” terápia az ivarsejtekben vagy a korai embrióban előidézett és így örökletes megváltoztatást jelent. Az akkori – és azóta is általánosan érvényesnek tekintett – etikai álláspont szerint ez a beavatkozás nem megengedhető, mivel



A CRISPR/cas9 hősei: Emanuelle Charpentier és Jennifer Doudna

nemcsak az érintett egyénre, hanem a következő, még meg nem született generációkra is kihat. Nos, a CRISPR/cas9 technológia megjelenése ezt a szigorúan elutasító álláspontot kissé fellazította. Az USA Tudományos Akadémiája és Orvosi Akadémiája tavaly nyáron áttekintette a CRISPR/cas9 forradalom lehetséges humán alkalmazásait, és nem zárkózott el attól, hogy a technológia fejlődésével és jelenleg még meglévő hibáinak kiküszöbölésével a jövőben lehetőségessé válhat a „csíravonali” génterápia. Természetesen hangsúlyozták, hogy csak terápiáról, az életet veszélyeztető mutációk kiküszöböléséről lehet szó, nem pedig „designer” bábik előállításáról [2].

Az elmúlt két év során a tudományos irodalomban nyolc olyan közlemény jelent meg, amely az új technológia lehetőségeit és buktatóit próbálta feltárni a „csíravonali” humán génterápia irányában. Az első cikk egy kínai kutatócsoporttól származott [3], ami első lévén, elég nagy vihart kavart. Sokan vitatták, hogy szabad-e emberi embriókon ilyen kísérletet végezni, noha a kínai kutatók eleve megsemmisítésre ítélt embriókkal dolgoztak, és természetesen nem engedték azokat kifejlődni, továbbá az illetékes hatóságoktól megkaptak minden engedélyt. A kísérletben egy súlyos örökletes hematológiai betegséget, a béta-talasszémiát okozó mutációt próbáltak meg kijavítani. Az eredmény: 54 embrióból mindössze négyben találták meg a kívánt mutációt, és azok is valamennyien mozaikok voltak, vagyis nem minden sejtjükben történt meg a változás. Továbbá a kívánt mutáción kívül minden megvizsgált embrióban találtak „céltevesztést” is. Ez azt jelenti, hogy bár a CRISPR/cas9 rendszer meglehetősen pontosan vágja el a kívánt helyen a DNS-t, ez a pontosság azért nem 100%-os. Azaz, jóval kisebb valószínűséggel ugyan, de a célszekvenciához többé-kevésbé hasonló más helyeken is

A CRISPR/cas9 hőse: Feng Zhang



történhet hasítás, és ezáltal új mutáció keletkezése más génekben. A sokat vitatott kísérlet tehát annyiban fontosnak és negatív értelemben eredményesnek bizonyult, hogy rávilágított a módszer tökéletlenségére.

Ugyanettől a csoporttól származik a legfrissebb cikk [4] is, amelyben radikálisan javított módszerekkel értek el sokkal jobb eredményt a béta-talasszémiát okozó mutáció kijavításában. A munka különleges érdekessége, hogy úgy került meg az embriókon végzett kísérletek etikai problémáját, hogy a beteg bőrszövetéből vett sejtet klónozták, és a klónozott embriókon végezték el az irányított mutagenézist az előbbieken ismertetett, Komorék által kidolgozott, guanin adeninre módosító módszerrel. Az eredmény: 20 kezelt klónozott embrió közül nyolcat sikerült „meggyógyítani”. Ez az eredmény természetesen még igen messze van attól, hogy a valóságos orvosi alkalmazást megengedhetővé tegye, de a jövő szempontjából biztatónak tekinthető. Óvatosságra int az is, hogy a kezelt embriók többsége ezúttal is „mozaik”, vagyis nem minden sejtjükben történt meg a mutáció korrekciója. Az viszont pozitívum, hogy ezúttal nem számoltak be „céltevesztés”-ről, bár nem is zárták azt ki teljesen.

Egy másik – amerikai-koreai – kísérletben egy örökletes szívbetegséget (hipertrofiás kardiomiopátia) okozó mutációt próbáltak kijavítani [5]. A betegséget okozó mutáció a MYBPC3 nevű génben van és domináns, azaz akkor is szívelégtelenséget okoz, ha csak az egyik kromoszómában fordul elő (azaz heterozigóta állapotban). A kutatók egy ilyen heterozigóta betegőtől kapott férfi és egészséges homozigóta női ivarsejtekkel mesterséges megtermékenyítést végeztek, és az így nyert embriókon végezték el a CRISPR/cas9 beavatkozást. Elméletileg (beavatkozás nélkül) egy ilyen keresztezés fele-fele arányban vezetne egészséges, illetve beteg utódhoz. A beavatkozás eredményeként azonban 58 embrióból 42 (72,4%) lett egészséges a homológ rekombináció következtében. A többi 16 embrióban is volt a megfelelő helyen DNS-hasítás, de ott a helyreállítás másik lehetősége következett be, azaz nem a megfelelő mutáció. Ez az eredmény (72,4% az 50% helyett) biztató ugyan, de természetesen még nem kielégítő. Talán ennél fontosabb, hogy a kutatók nem találtak „céltevesztést”, azaz a célszekvencián kívüli hasítást és mutagenézist.

Az eddigiekben olyan, a „csírvonalai” génterápiára irányuló kísérletekről volt szó, amelyek célja a technológia hatásosságának, illetve veszélyeinek felderítése volt, és esetleges alkalmazásuk nyilvánvalóan csak sok év múlva válhat lehetségessé. A „szomatikus” génterápiás alkalmazás azonban sokkal előbb megvalósulhat.

Az ilyen irányú – nem laboratóriumi, hanem klinikai, betegeken végzett – kísérleteket természetesen csak igen szigorú etikai és szakmai előzetes vizsgálatok után lehet elvégezni. Jelenleg világszerte 10 ilyen kísérletről tudunk, amelyek megkapták a szükséges engedélyeket és el is kezdődtek. Eredmények természetesen még nincsenek. Érdekes tény, hogy a tíz tervezett program közül kilenc Kínában folyik és csak egy a világ vezető tudományos hatalmában, az USA-ban. A tervezett eljárások többsége a rák gyógyítására irányul. Ezek szakmai alapja az a nem túl régen felfedezett tény, hogy az emberben van egy olyan gén, ami a PD-1 (Programmed Death = programozott



A cas9 működése. Az ábrán kék a cas9 enzim, fekete a DNS, sárga a vezető-RNS és az olló mutatja a hasítás helyét

sejthalál-1) nevű fehérjét kódolja. Ez a fehérje arra szolgál, hogy fékezze, korlátozza az immunrendszert, megakadályozza annak túlreagálását. A rákos folyamatban a ráksejtek – saját életük védelmében – megnövelik az immunitásért felelős T-sejtekben a PD-1 fehérje termelését, hogy ezzel csökkentsék a szervezet immunválaszát a rákra. Nos, a tervezett klinikai kísérletekben a betegektől (egyes esetekben idegen donoroktól) az immunreakcióért felelős T-sejteket nyernek, majd szövettenyésztésben a CRISPR/cas9 technológiával „kiütik” a PD-1 fehérjét kódoló gént, és a „kiütött” T-sejteket elszaporítva visszajuttatják a beteg vérebe. Különböző variációkkal ez az amerikai és hét kínai program lényege. Egy további kínai program a méhnyakrákért felelős papillomavírust veszi célba, egy pedig az AIDS-et okozó HIV vírust.

A CRISPR/cas9 technológia lehetséges humán (gyógyító célú) felhasználásával foglalkozó cikkben nem hagyhatjuk említés nélkül azokat az állatkísérleteket sem, amelyek célja egyértelműen a majdani emberi alkalmazás. Számos fontos emberi genetikai betegségnek van olyan állati modellje, amelyen ezek az eljárások

kipróbálhatók. Az elmúlt két év során megjelentek kísérleti eredmények a Huntington chorea (vitustánc), a korábban említett béta-talasszémia, vagy egy örökletes izomsorvadás (Duchenne-disztrófia) egérmódelleinél a CRISPR/cas9 többé-kevésbé sikeres terápiás alkalmazásáról. A „többé-kevésbé” azt jelenti, hogy a kísérleti egerekben némi állapotjavulást lehetett kimutatni, de nem teljes gyógyulást. Módszertani szempontból ezen kísérletek közül a legérdekesebb (és a legfrissebb) az izomsorvadásos egerek esete [6]. Itt ugyanis az eljáráshoz szükséges molekulák bevitelét úgy oldották meg, hogy azokat arany nanorészecskék felszínére adszorbeálták, majd ezeket a részecskéket injektálták a beteg egerek izmaiba. Az aranyrészecskéket még beburkolták egy olyan mesterséges polimermolekulával is, amely a sejtekben endocitózist indukál, azaz lehetővé teszi, hogy a sejtek felvegyék a részecskéket és ott kiszabaduljanak a sikeres mutagenézishez szükséges molekulák. Az eredmény: egyetlen ilyen aranyinjekció hatására két hét múlva megjelent az ép disztrofin-molekula (ennek hiánya okozza a betegséget) az izomsejtek 5,4%-ában, és az egerek mozgékonyasága, izmainak teljesítőképessége jelentősen javult.

Körülbelül itt tartunk most a technológia humán alkalmazása területén. Ismét hangsúlyozni kell azonban a bevezetésben említetteket, vagyis azt, hogy állatokban, növényekben, gombákban és mikroorganizmusokban már igen sok, gyakorlatilag is hasznos és fontos tervezett módosítás történt, ezek közül több hamarosan megjelenik majd a mezőgazdaságban, az iparban, sőt a szupermarketek polcain is. Az alap kutatásban pedig már szinte forradalmi jelentőségű eredményeket köszönhetünk a módszernek.

VENETIANER PÁL

IRODALOM

- [1] Komor A. C. et al. (2016): Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533, 420-424.
- [2] National Academy of Sciences and National Academy of Medicine: Human Genome Editing: Science, Ethics and Governance. (Washington D.C. 2017)
- [3] Liang P. et al. (2015): CRISPR/cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein & Cell* 6, 363-372.
- [4] Liang P. et al. (2017): Correction of β -thalassaemia mutant by base editor in human embryos. *Protein & Cell*, doi 10.1007/s13238-017-0475-6
- [5] Ma, H. et al. (2017): Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 548, 413-419.
- [6] Lee K. et al. (2017) Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair. *Nature Biomedical Engineering*, doi:10.1038/s41551-017-0137-2

TENZIÓS FEJFÁJÓS CSOPORT TOBORZÓJA FELHÍVÁS AGYKUTATÁSRA!

**Gyakran van nyomó/feszítő jellegű fejfájása?
Akkor a kutatásunknak**

PONT ÖNRE VAN SZÜKSÉGE!

Esetleg nem fejfájós, de érdeklődik a kutatás iránt? Akkor is jelentkezhet, kutatásunkhoz ilyen résztvevőket is keresünk!

Olyan jobb kezes, 20-50 év közötti hölgyeket és urakat keresünk, akiknek rendszeres fejfájásai vannak vagy nem fejfájósok, de érdekli őket az agykutatás és szívesen részt vennének benne. Arra vagyunk kíváncsiak, hogyan működik az agy nyugalomban és különböző feladatok végzése közben, melyet agyi Mágneses Rezonancia vizsgálattal (közismertebb nevén koponya MR-rel) fogunk vizsgálni.

Aki szívesen részt venne, kérjük, írjon az agykutatás.sote@gmail.com e-mail címre, ahol további tájékoztatást kaphat a vizsgálatról.

Az üzenet tárgyának kérjük, adja meg a „Gyakori fejfájós/ önkéntes” vagy „Egészséges/önkéntes” jeligét!

Ismétlődő stresszt átélő kontrollcsoport toborzója FELHÍVÁS AGYKUTATÁSRA!

**Az elmúlt 1 évben több, stresszt okozó,
negatív életesemény történt Önnel?**

Akkor a kutatásunknak pont Önre van szüksége!

Olyan egészséges, jobb kezes, 20-50 év közötti hölgyeket és urakat keresünk, akik az elmúlt időszakban több, jelentős negatív eseményt éltek át, például a munkahelyükön vagy a családi életükben vagy pénzügyi szempontból.

Arra vagyunk kíváncsiak, hogyan működik az agy nyugalomban és különböző feladatok végzése közben, melyet agyi Mágneses Rezonancia vizsgálattal (közismertebb nevén koponya MR-rel) fogunk vizsgálni.

Aki szívesen részt venne, kérjük, írjon az agykutatás.sote@gmail.com e-mail címre, ahol további tájékoztatást kaphat a vizsgálatról.

Az üzenet tárgyának kérjük, adja meg a „Jelentős stressz/önkéntes” jeligét!

(x)