



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)

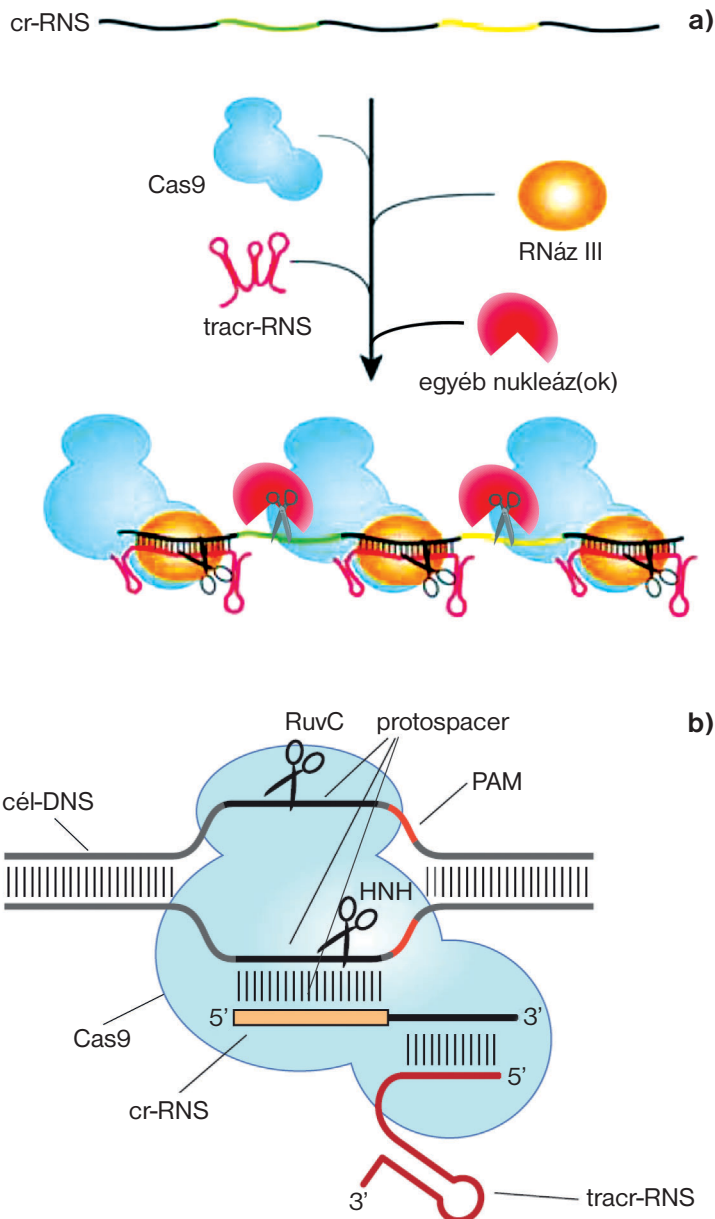
Érdekes bővebben kifejteni a Nobel-díj indoklását, hiszen a genomszerkesztést programozható mesterséges nukleázok segítségével már előbb megvalósították, és ezeket az enzimeket ma is tanulmányozzák/fejlesztik. Ezek a nukleázok olyan kimer fehérjék, melyeket egy DNS-felismerő domén (cinkujj- vagy transzkripció aktivátor típusú TALE fehérje) és egy nukleáz domén (a FokI restrikciós 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 régi-

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 egyszerű formává alakulva önhibridizáció révén hurkokat képesek kialakítani csakúgy, mint a róluk esetlegesen átiródó 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 terjedelemben 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 biogenezeise (2.a ábra) és iii) a behatoló nukleinsavak semlegesítése. A kirakó darabjai egyre sza-



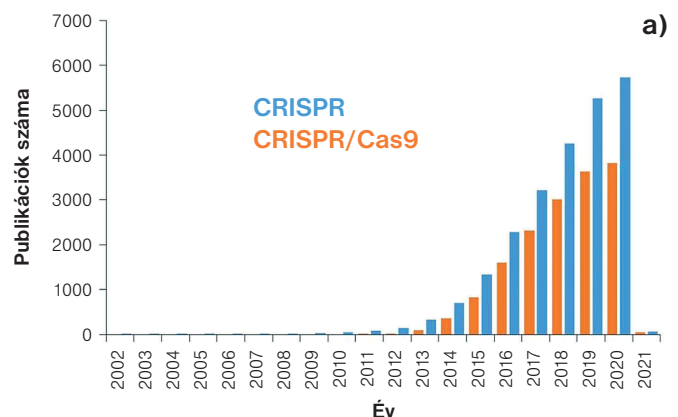
2. ábra.a) A crRNS érési folyamatában részt vevő komponensek.
b) A II-es típusú CRISPR/Cas rendszer aktív komplexe: a Cas9 endonukleáz két RNS-molekula (crRNS és tracrRNS) segítségével ismeri fel a cél-DNS-ben elhasítani kívánt szekvenciát ([10] alapján)

porodtak, és a különböző csoportok különböző módon próbálták ezeket összeilleszteni. 2011-re a verseny annyira kiéleződött, hogy bármelyik pillanatban többen is publikálhatták a rendszer pontos leírását. Virginijus Siksnys, a litván Vilniusi Egyetem vegyész-profesorának 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-

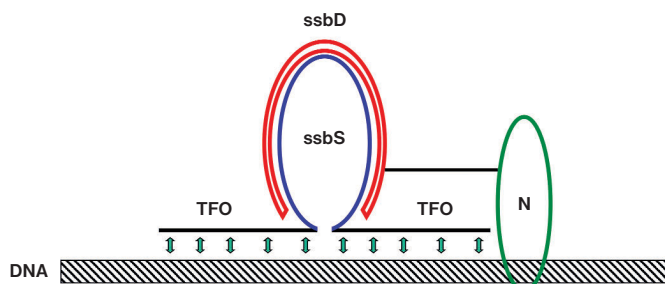
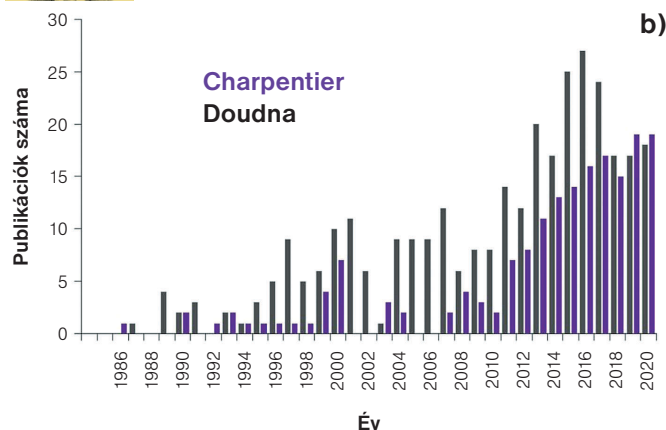
ták meg egymás között addigi eredményeiket. További közösen végzett részletes kísérleteik alapján jutottak arra a következtetésre, hogy a védekező rendszer alapja egy duális RNS-által vezérelt programozható endonukleáz. Sikertült kimutatniuk, hogy a DNS-hasításhoz *in vitro* körülmények között a crRNS és a Cas9 fehérje mellett szükséges még az addig hiányzó láncszem, az ún. tranz-aktiváló 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 hasítást 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-szálat 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 megcélózható 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



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



4. ábra. A szerző által 2009-ben javasolt mesterséges nukleáz. DNA – cél-DNS-szekvencia, TFO – triplexképző oligonukleotidok a cél-DNS-szekvencia specifikus felismerésére, ssbS – a hurok-képző részlegesen palindrom egyszálú DNS, ssbD – az ssbS-t felismerő és megkötő fehérje (NFI), N – a DNS hasítását végző nukleáz domén

3. ábra. b) A két Nobel-díjas kutatónő publikációs tevékenysége.

A közölt publikációk száma alapján nem tartoznak a világ leg-többet publikáló kutatói közé [12], azonban a minőség különleges érték közlési szokásaikban: a *Science* és a *Nature* folyóiratokban közölt tudományos cikkek aránya a teljes cikkszámhoz viszonyítva: 17/157 (E.Ch.), illetve 94/294 (J.A.D.)

génterápia gyakorlati megvalósítása felé. Ugyanakkor különösen értékelendő az a tény, hogy 2013 után a gyakorlati alkalmazás mellett (Charpentier a CRISPR Therapeutics és az ERS Genomics, Doudna pedig a Mammouth Biosciences és a Scribe Therapeutics cégek társalapítói) a rendszer további fejlesztése, a finomhangolás lehetőségeinek jobb megértésére, az alapvető kutatási feladatokra fókuszáltak, és számos magas színvonalú közleményt (többet közülük a *Nature* és *Science* folyóiratokban) jelentettek meg az elmúlt időszakban (3.b ábra).

Meg kell említeni, hogy Siksnys az említett Charpentier és Doudna-féle *Science* publikációnál [10] előbb, még 2012 áprilisában benyújtotta kéziratát a *Cell* folyóiratba, ahonnan bírálattal utasították vissza, majd májusban a *PNAS* folyóiratba, ahol végül csak szeptemberben jelent meg [14]. Emiatt felmerült a kérdés, hogy Siksnys miért maradt ki a díjazottak sorából. Ezt persze mások esetében is megkérdőjelezhetnénk, hiszen sok-sok kutató kemény munkája vezetett el végül a rendszer teljes leírásához. Ugyanakkor a működőképes rendszer jellemzését elsőként Charpentier és Doudna publikálta. Siksnys modelljében [14] nem szerepelt például a tracrRNA a nukleázkomplex részeként, holott nélkül nem történik meg a DNS hasítása. Érdekességgé jegyzem meg, hogy a mesterséges nukleázokkal kapcsolatos szegedi kutatásokról, illetve ezen enzimek alkalmazásának lehetőségeiről a genom szerkesztésében már a Magyar Kémikusok Lapja egy 2009-es számában is beszámoltunk [15]. E cikk szerzője abban az évben egy párizsi kutatási ösztöndíjat pályázott meg, melynek kutatási tervében a 4. ábrán bemutatott mesterséges nukleáz előállítását javasolta. Az ötlet három terület eredményeit ötvözte: i) a Kyosuke Nagata, japán együttműködő partner, által felfedezett Nukleáris Faktor I (NFI) specifikus DNS-kötő fehérje valószínűleg egy hurokot alkotó részben palindrom szekvenciájú egyszálú DNS-hez kötődik [16]; ii) Carine Giovannangeli, potenciális párizsi fogadó kutató triplexképző oligonukleotidok segítségével állított elő DNS-t specifikusan hasító mesterséges nukleázokat [17]; iii) a szegedi kutatások alapján a HNH motívum alkalmas lehet egy fúziós mesterséges nukleáz kialakítására [15]. Ekkor még nem volt ismert az RNS által vezérelt nukleázrendszer. A pályázat nem nyert.

A Nobel-díj elnyeréséhez azonban nem elég egy ötlet, sőt annak részleges megvalósítása sem. Érdemes tanulmányozni Char-

pentier és Doudna életrajzát. Ebből mindenki számára nyilvánvalóvá válik, hogy a sikerhez szükséges a tehetség, elhivatottság, céltudatosság, a széles tudományos látókör kialakítása (nemzetközi) tanulmányutak során, az eredmények bemutatása, valamint a diszkuessziók sora a tudományos konferenciákon, minőségi publikálás a legmagasabb színvonalú tudományos folyóiratokban, a (nemzetközi) együttműködések és tudományos kutatóműhelyek kialakítása, az intézményi és pályázati háttértámogatás és nem utolsósorban egy kis szerencse is. Charpentier és Doudna eredményei nagyban hozzájárultak a mesterséges nukleázok működési mechanizmusának molekuláris szintű megértéséhez. Ezen eredmények további olyan kutatásokat is jelentősen előmozdítottak, melyek révén a DNS meghibásodásához köthető betegségek gyógyítása válik majd lehetségessé. Mindezek alapján vitathatatlan, hogy a 2020-as kémiai Nobel-díj a lehető legjobb kezekbe került. Gratulálunk!

IRODALOM

- [1] Y. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, A. Nakata, *J. Bacteriol.* (1987) 169, 5429–5433.
- [2] R. Jansen, J. D. A. van Embden, W. Gaastra, L. M. Schouls, *Mol. Microbiol.* (2002) 43, 1565–1575.
- [3] F. J. M. Mojica, C. Díez-Villaseñor, J. García-Martínez, *J. Mol. Evol.* (2005) 60, 174–182.
- [4] C. Pourcel, G. Salvignol, G. Vergnaud, *Microbiology (Reading)* (2005) 151, 653–663.
- [5] A. Bolotin, B. Quinquis, A. Sorokin, S. D. Ehrlich, *Microbiology (Reading)* (2005) 151, 2551–2561.
- [6] K. S. Makarova, N. V. Grishin, S. A. Shabalina, Y. I. Wolf, E. V. Koonin, *Biol. Direct* (2006) 1, 7.
- [7] R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D.A. Romero, P. Horvath, *Science* (2007) 315, 1709–1712.
- [8] R. Sapranaukas, G. Gasiunas, C. Fremaux, R. Barrangou, P. Horvath, V. Siksnys, *Nucleic Acids Res.* (2011) 39, 9275–9282.
- [9] E. Deltcheva, K. Chylinski, C.M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z.A. Pirzada, M.R. Eckert, J. Vogel, E. Charpentier *Nature* (2011) 471, 602–607.
- [10] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna, E. Charpentier, *Science* (2012) 337, 816–821.
- [11] P. Liang, Y. Xu, X. Zhang, C. Ding, R. Huang, Z. Zhang, J. Lv, X. Xie, Y. Chen, Y. Li, Y. Sun, Y. Bai, Z. Songyang, W. Ma, C. Zhou, J. Huang, *Protein Cell* (2015) 6, 363–372.
- [12] J. P. A. Ioannidis, R. Klavans, K.W. Boyack, *Nature* (2018) 561, 167–169.
- [13] E. S. Lander, F. Baylis, F. Zhang, E. Charpentier, P. Berg, C. Bourgain, B. Friedrich, J. K. Joung, J. Li, D. Liu, L. Naldini, J.-B. Nie, R. Qiu, B. Schoene-Seifert, F. Shao, S. Terry, W. Wei, E.-L. Winnacker, *Nature* (2019) 567, 165–168.
- [14] G. Gasiunas, R. Barrangou, P. Horvath, V. Siksnys, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2012) 109, E2579–E2586.
- [15] Gyurcsik B., *MKL* (2009) 64, 304–305.
- [16] R.A. Guggenheimer, B.W. Stillman, K. Nagata, F. Tamanoi, J. Hurwitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984) 81, 3069–3073.
- [17] E. Brunet, M. Corgnani, F. Cannata, L. Perrouault, C. Giovannangeli, *Nucl. Acids Res.* (2006) 34, 4546–4553.