

CRISPR/Cas9 – od bakterijske imunosti do preurejanja genoma

Nobelova nagrada za kemijo za leto 2020

Radovan Komel

Emmanuelle Charpentier in Jennifer Doudna sta prejeli Nobelovo nagrado za kemijo za leto 2020 za odkritje enega od najnatančnejših orodij genske tehnologije: genske škarje CRISPR/Cas9. Raziskovalci jih lahko uporabljajo za spreminjanje DNA živali, rastlin in mikroorganizmov z izjemno visoko natančnostjo. Nova tehnologija prinaša revolucionarne spremembe molekularne znanosti o življenju, nove možnosti za vzrejo rastlin in živali, prispeva k ino-

vativnim pristopom pri zdravljenju raka in morda bo tudi uresničila sanje o ozdravitvi dednih bolezni. Emmanuelle Charpentier bo tudi vabljen plenarna predavateljica na 45. kongresu evropske biokemije (FEBS 2021), ki bo julija v organizaciji *Slovenskega biokemijskega društva* potekal v Ljubljani.

Ko so raziskovalci primerjali genski material zelo različnih bakterij in arhej (vrste mikroorganizma), so našli ponavljajoča se



Emmanuelle Charpentier

Rodila se je leta 1968 v Juvisy-sur-Orgeu v Franciji. Doktorirala je leta 1995 na Inštitutu Louisa Pasteurja v Parizu v Franciji. Sedaj je direktorica enote Inštituta Maxa Plancka za znanstvene raziskave patogenih organizmov v Berlinu v Nemčiji.



Jennifer A. Doudna

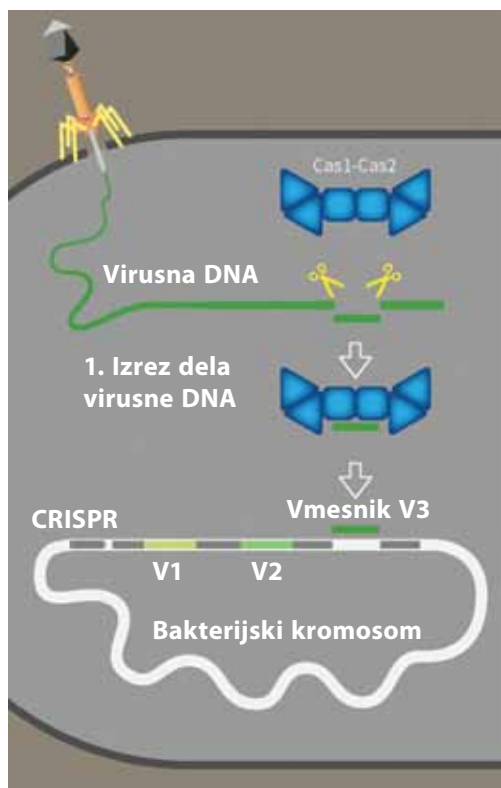
Rodila se je leta 1964 v Washingtonu v ZDA. Doktorirala je leta 1989 na Harvardski medicinski šoli v Bostonu v ZDA. Sedaj je profesorica na Kalifornijski univerzi v Berkeleyju v ZDA in raziskovalka na Medicinskem inštitutu Howarda Hughesa v ZDA.

zaporedja DNA, ki so med vrstami bakterij presenetljivo dobro ohranjena. Isti genetski zapis (zaporedje nukleotidov) se vedno znova pojavlja, med ponovitvami pa so prisotna edinstvena zaporedja, ki se med seboj razlikujejo. Kot da bi se ena in ista beseda ponavljala med posameznimi (različnimi) stavki v knjigi. Ponavljajoča se zaporedja DNA so poimenovali CRISPR, kar je kratica za angleško besedno zvezo *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (grozd enakomerno ločenih ponovitev kratkih palindromskih zaporedij nukleotidov). Posebnost teh zaporedij je, da so »palindromska«, kar pomeni, da se berejo enako, ne glede s katerega konca začnemo brati (perica-reže-raci-rep'), in to, da, kot rečeno, razdvajajo neka posebna, drugačna in edinstvena zaporedja nukleotidov. Ugotovili so, da so ta različna zaporedja nekakšen spomin na predhodno okužbo bakterije z virusom,

bakterije, ki je to okužbo preživela. Virus je namreč ob okužbi svojo škodljivo DNA vbrizgal v bakterijo, ta pa si je del virusne DNA vcepila v svoj odsek CRISPR, nekam med dve palindromski ponovitvi, kot spomin na okužbo, ki bo sedaj njo in njene potomke varoval pred novim napadom iste vrste virusa.

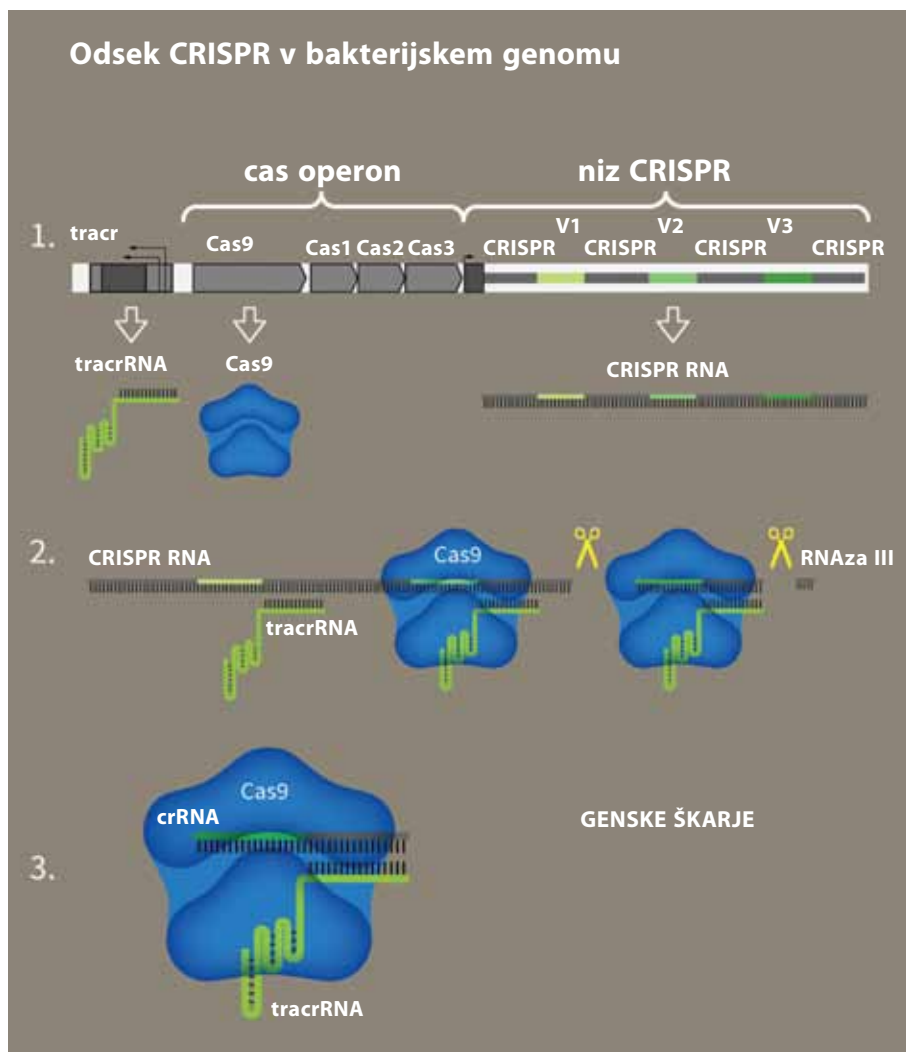
Bakterije, ki preživijo virusno okužbo, si ustvarijo orodje obrambe pred novim napadom

Bakterijin genomski odsek CRISPR je torej sestavljen iz samega niza CRISPR, v katerem so »spominski« delci (poimenovani »vmesniki«) virusov iz predhodnih okužb, poleg tega pa pred tem vsebuje še zapis (cas operon) za proteine Cas, v katerem je tudi zapis za poseben protein Cas9 kot tudi gen, ki je zapis za tako imenovano »transaktivacijsko crisper RNA« - tracrRNA.



Ob virusni okužbi in pribodu njegove DNA v bakterijsko celico tujek zaznajo bakterijski proteini razreda Cas in ga razrežejo na manjše delce. Če bakterija okužbo preživi, proteini Cas vgradijo kakšnega od teh delcev v genom bakterije, med dva palindromska segmenta CRISPR. Zato tak delec virusne DNA sedaj imenujemo »vmesnik«. Na sliki so označeni vmesniki V1, V2 in V3, ki so lahko delci istega virusa, lahko (vmesnika V1 in V2) pa izvirajo tudi iz predhodnih okužb z drugimi vrstami virusov.

Prirjeno (R.K.) po: <https://en.wikipedia.org/wiki/CRISPR>.

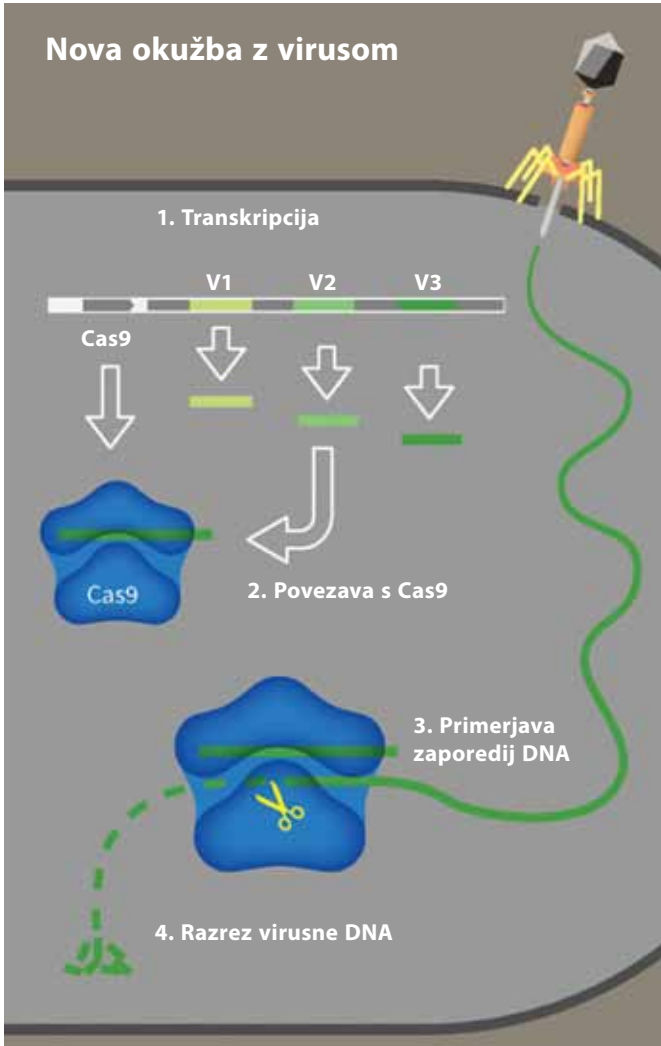


(1) Iz genomskega odseka CRISPR se v procesu transkripcije prepíšejo *tracrRNA*, *Cas9 RNA* in *CRISPR RNA*. Del *tracrRNA* predstavlja zaporedje nukleotidov za prepoznavo palindromskega zaporedja v *CRISPR RNA*, *Cas9 RNA* pa se nadalje prevede v protein *Cas9*.

(2) Sledi preureditev v nadzorni kompleks, tako imenovane genske škarje. V tem procesu se *tracrRNA* pari s ponavljajočim palindromskim zaporedjem *CRISPR RNA*, kar prepozna protein *Cas9*, da tvori trajni kompleks s *tracrRNA* in delom *CRISPR RNA*, ki obsega palindromsko ponovitev (*CRISPR*) in virusno zaporedje (vmesnik, *V*) tik ob njej. Nato se posamezni kompleksi sprostijo s cepitvijo z encimom *RNAza III*.

(3) Posamezen kompleks za nadzor nove virusne okužbe (genske škarje) je tako sestavljen iz proteina *Cas9* in dupleksa, ki ga sestavljata *tracrRNA* in virusni del (*V*) *CRISPR RNA*, sedaj poimenovan *crRNA*. *crRNA* predstavlja spominsko virusno zaporedje za primerjavo z novodošlo virusno DNA ob ponovni okužbi, z drugim delom pa, kot rečeno, tvori dupleks s *tracrRNA*.

Prirjeno (R.K.) po: <https://en.wikipedia.org/wiki/CRISPR>.



Na okužbo z virusom bakterijska celica odgovori tako, da spodbudi izražanje genov, ki so del njenega obrambnega sistema. Slika zaradi preglednosti poenostavlja dogajanje, saj na njej ni prikazana tracrRNA (glej predhodno sliko!), ki je sicer nujno potrebna za izgradnjo genskih škarij, ima pa tudi vlogo zaščite pred razgradnjo bakterijske lastne DNA.

V primeru, da enim od genskih škarij odgovarja zaporedje virusne DNA, se ta na to DNA vežejo in jo razrežejo ter predajo nadaljnji razgradnji.

Priručje (R.K.) po:

<https://en.wikipedia.org/wiki/CRISPR>.

Zgodba o odkritju sistema CRISPR/ Cas9 kot dejavnika imunosti in obrambe bakterij pred virusi

Emmanuelle Charpentier, mlada raziskovalka francoskega porekla in nemirnega duha, je bila že od samega začetka svojega raziskovalnega življenja navdušena nad patogenimi bakterijami. Zakaj so tako agresivne? Kako razvijejo odpornost proti antibiotikom? Ali je mogoče najti nove načine zdravljenja, ki bi zaustavili njihov pohod? Vključno z doktorskim študijem na Inštitutu Louisa Pasteurja v Parizu je živela v petih različnih

državah, sedmih različnih mestih in delala v desetih različnih ustanovah. Leta 2002, ko je ustanovila svojo raziskovalno skupino na dunajski univerzi, se je osredotočila na eno od bakterij, ki človeštvu povzročajo največ škode: *Streptococcus pyogenes*. Vsako leto okuži milijone ljudi, ki sicer pogosto zbolijo za lahko ozdravljivimi boleznimi, kot sta angina (tonzilitis) in kožna krastavost (impetigo), lahko pa se okužba konča tudi z življenjsko nevarnim telesnim vnetnim odzivom (sepsa) in razgradnjo mehkih tkiv. Da bi bolje razumela življenjski krog bakte-

rije, se je posvetila temeljitemu preučevanju uravnavanja delovanja njenih genov.

Medtem na drugem koncu sveta, na Kalifornijski univerzi v Berkeleyju, biokemičarka Jennifer Doudna raziskuje majhne različice molekul RNA, ki igrajo pomembno vlogo pri uravnavanju aktivnosti genov v celicah. Njeno pozornost vzbudi odkritje kolegov, da med različnimi vrstami bakterij obstajajo zelo podobna ponavljajoča se zaporedja nukleotidov, poimenovana CRISPR, ki jih prekinjajo različna kratka zaporedja, ki se ujemajo z genetsko kodo različnih virusov. Je to posledica tega, da je bakterija, če je uspela preživeti virusno okužbo, dodala v svoj genom del genetskega zapisa virusa kot spomin na okužbo? In če se edinstvena neponavljajoča se zaporedja v genetskem grozdu CRISPR ujemajo z nukleotidnim zaporedjem različnih virusov, ali to pomeni, da je to del starodavnega imunskega sistema, ki varuje bakterije in arheje pred virusi? Jennifer Doudna je takrat ravno preučevala biološki proces, v katerem vrsta majhnih molekul RNA z ustvarjanjem dvoverižnih parov z molekulami RNA, ki prenašajo genetsko informacijo za sestavo celičnih proteinov, sodeluje pri utišanju izražanja genov (interferenca RNA). Ali bakterije uporabljajo podoben mehanizem za nevtralizacijo virusov? Dodatno spodbudo za iskanje odgovora na to vprašanje je dalo tudi odkritje genov *cas* tesno ob grozdu CRISPR, ki so zelo podobni genom že poznanih proteinov, katerih vloga je odvijanje in razrez molekul DNA. Pomeni bližina grozda CRISPR s spominom na preteklo okužbo in genov *cas* prisotnost zapletene obrambe bakterij pred okužbami z virusi?

Emmanuelle Charpentier, ki je v tem času svoje raziskave uravnavanja delovanja bakterijskih genov z dunajske univerze prenesla na Univerzo Umeå na severu Švedske, je prav tako pri svojem delu naletela na molekule majhnih RNA kot dejavnikov izražanja genov. Med iskanjem genov, ki so v bakteriji *S. pyogenes* zapis za omenjene male molekule

RNA, je opazila vrsto enih, katerih nukleotidni zapis se zelo prilega nukleotidnemu zaporedju CRISPR, ki je del genoma te iste bakterije. Podrobna preiskava je razkrila, da se del te majhne molekule RNA popolnoma prilega delom grozda CRISPR, ki so enovite tandemske ponovitve zaporedja nukleotidov. Takrat je sicer že bilo poznano, da je bakterijski sistem CRISPR s sodelovanjem proteina Cas9 udeležen pri razgradnji virusnih DNA, vendar je Emmanuelle Charpentier razkrila, da pri tem odločilno vlogo igra omenjena mala RNA, ki so jo poimenovali »transaktivirajoča crisper RNA« – tracrRNA. Predpostavi, da je tracrRNA potrebna, da se dolgi prepis genomskega nukleotidnega zaporedja CRISPR pretvori v nekaj, kar delu tega zaporedju podeli aktivno vlogo v življenju bakterijske celice.

Objava tega odkritja je prinesla povabilo na mednarodno konferenco biokemikov v Portoriku in v kongresni kavarni je drugi dan konference prišlo do naključnega srečanja med Emmanuelle Charpentier in Jennifer Doudna. Takoj sta se ujeli in naslednji dan med sprehodom po starem delu mesta sklenili tesno osebno in raziskovalno prijateljstvo. Vzpostavita sodelovanje med laboratorijema, med katerim preko digitalnih srečanj poteka intenzivna izmenjava podatkov in mnenj. Sodelavci Jennifer Doudne sumijo, da je CRISPR RNA potrebna za identifikacijo DNA virusov in da so protein Cas9 škarje, ki razrežejo molekulo virusne DNA. Vendar se, ko v laboratorijskih poskusih virusni DNA dodajo CRISPR RNA in protein Cas9, ne zgodi nič, DNA ostane nerazrezana. Na drugi strani v laboratoriju Emmanuelle Charpentier za prepoznavanje novodošlih virusov izpostavijo ključno vlogo molekule tracrRNA, ki se poveže s prepisom virusne DNA, to je s CRISPR RNA, ta pa se nato razcepi na manjše delce s pomembno vlogo pri še neraziskani razgradnji virusnih DNA. Ko pa spoznanja obeh laboratorijev združijo in v poskusu k virusni DNA poleg CRISPR RNA in proteina Cas9 dodajo še

tracrRNA, poskus uspe, molekula DNA se razcepi na dva dela. Emmanuelle Charpentier in Jennifer Doudna sta odkrili mehanizem zaščite streptokokov pred virusi: vlogo spominske imunosti, shranjene v genetskem grozdu CRISPR, pomembne za prepoznavo nove virusne okužbe, to je molekule RNA (CRISPR RNA), ki je »odtis« preteklega virusne DNA, ob sočasnem delovanju ostalih delov sistema CRISPR (tracrRNA in Cas9), potrebnih za onemogočanje novodošlega virusa - z razgradnjo njegove DNA.

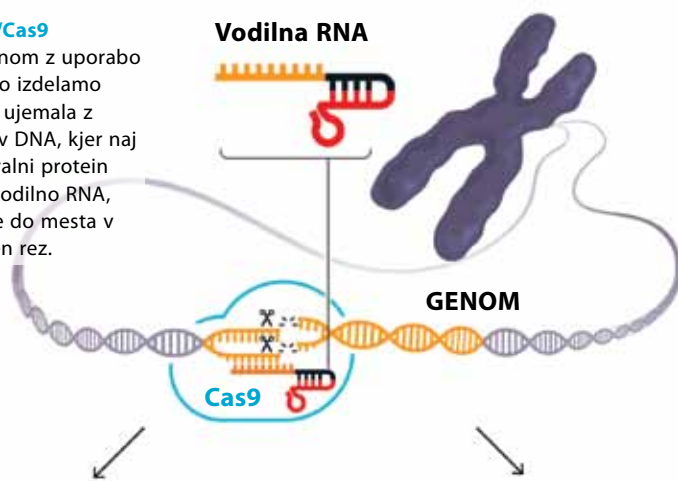
Raziskovalci se odločijo, da bodo poskušali poenostaviti genske škarje

Z novim znanjem o vlogi molekul tracrRNA in CRISPR RNA so obe umetno

združili v eno molekulo, ki so jo poimenovali »vodilna RNA«. S to poenostavljeno različico *genskih škarij* so nato izvedli epohalni eksperiment: novo gensko orodje so uporabili tako, da so razrezali poljubno DNA na mestu, ki so ga pred tem sami določili. V laboratoriju Jennifer Doudna so v poskusu uporabili enega od genov s poznano vlogo v organizmu in v njem izbrali pet različnih mest, kjer naj bi gen razcepili. Nato so spremenili del genskih škarij CRISPR, tako da so se njihova nukleotidna zaporedja ujemala z zaporedji na tarčni DNA, tam, kjer naj bi razrezi bili opravljeni. Rezultat poskusa je bil presenetljivo natančen: molekula DNA je bila razcepljena na točno določenih mestih.

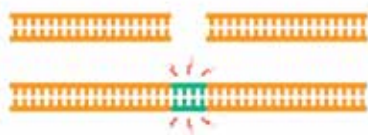
Genske škarje CRISPR/Cas9

Ko želimo preurejati genom z uporabo genskih škarij, si umetno izdelamo »vodilno RNA«, ki se bo ujemala z zaporedjem nukleotidov DNA, kjer naj bi naredili rez. Razrezovalni protein Cas9 tvori kompleks z vodilno RNA, ki genske škarje odpelje do mesta v genomu, kjer bo izveden rez.



A

Celici lahko dopustimo, da sama popravi rez v DNA. V večini primerov to povzroči izklop funkcije gena.

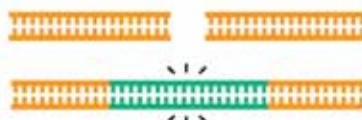


ODPRAVA GENSKE OKVARE

B

Če želimo vstaviti, popraviti ali preurediti gen, lahko za ta namen posebej oblikujemo majhno predložko DNA. Celica jo bo uporabila, ko bo popravila zarezo v genomu, posledično se bo na tem mestu nukleotidni zapis v genomu spremenil.

DNA PREDLOŽKA ZA POPRAVEK



VSTAVLJENA DNA

Prirjejeno (R.K.) po:

<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/popular-information>.

Kmalu po objavi *genskih škarij*, leta 2012, je več raziskovalnih skupin dokazalo, da je to orodje mogoče uporabiti za spreminjanje genoma tudi v celicah miši in ljudi. Pred tem je bilo spreminjanje genov višjih organizmov dolgotrajno in včasih tudi nemogoče dejanje. Z uporabo genskih škarij z umetno izdelano vodilno RNA, ki se ujema s kodo DNA, kjer naj bo rez narejen, lahko raziskovalci načeloma režejo kateri koli genom, ki ga želijo. Celici lahko dovolijo, da sama popravi zarez v DNA, kar večinoma povzroči izklop funkcije gena. V primeru, da želimo vstaviti, popraviti ali preurediti gen, pa lahko za to posebej oblikujemo majhno matrično DNA, ki jo bo celica uporabila pri popravku reza v genomu in na tem mestu vstavila željeno zaporedje nukleotidov.

Ker je to gensko orodje tako enostavno za uporabo, je zdaj razširjeno v temeljnih raziskavah. Uporabljajo ga za spreminjanje DNA celic in laboratorijskih živali, da bi razumeli, kako različni geni delujejo in se med seboj sporazumevajo, na primer med boleznijo. Genetske škarje so postale tudi standardno orodje v vzreji rastlin. Med drugim so preuredili gene, zaradi katerih običajni riž sicer absorbira težke kovine iz tal, kar je pripeljalo do izboljšanih sort riža z nižjo vsebnostjo kadmija in arzena. Razvili so tudi pridelke, ki bolje prenašajo sušo v toplejšem podnebnju in se upirajo žuželkam in škodljivcem, s katerimi bi se sicer morali spoprijeti s pesticidi.

Metodologija CRISPR/Cas9 prinaša novo upanje na ozdravitev genetskih bolezni

Genetske motnje so zdravstvene težave, ki jo povzroča ena ali več nepravilnosti v genomu. Lahko jih povzroči mutacija enega samega gena (monogenske bolezni) ali več genov (večgenske bolezni), lahko pa so tudi posledica nepravilnosti v širšem območju kromosoma. Mutacija, ki je vzrok monogenske bolezni, se lahko pojavi spontano pred embrionalnim razvojem (mutacija *de novo*) ali pa se kot dedna bolezen podeduje

od staršev, ki sta nosilca okvarjenega gena (avtosomno recesivno dedovanje), oziroma od enega od staršev z motnjo (avtosomno dominantno dedovanje). Znanih je več kot šest tisoč različnih genetskih motenj in za večino velja, da so z ustaljenimi medicinskimi postopki neozdravljive. Od dednih bolezni, ki jim lahko rečemo tudi prirojene bolezni, saj so prisotne že ob rojstvu, pa se razlikujejo tako imenovane pridobljene bolezni, ki se začnejo kasneje v nekem obdobju življenja. Večina rakov, čeprav gre za genske mutacije majhnega deleža celic v telesu, je pridobljenih bolezni.

Genske škarje so novo upanje za zdravljenje dednih in prirojenih genetskih bolezni. Raziskovalci že izvajajo klinične raziskave, da bi ugotovili, ali bi metodo CRISPR/Cas9 lahko uporabili za zdravljenje bolezni krvi, kot sta srpastocelična anemija in beta talasemija, pa tudi za zdravljenje dednih očesnih bolezni. V razvoju so metode za popravilo genov v velikih organih, kot so možgani in mišice. Poskusi na živalih so pokazali, da lahko s posebno zasnovanimi virusi genske škarje ciljano dostavimo do zelenih celic. Na ta način bi lahko zdravili uničujoče dedne bolezni, kot so mišična distrofija, mišična atrofija hrbtenice in Huntingtonova bolezen. Prav tako so v razvoju tudi novi pristopi v imunoterapiji raka. Vseeno pa je potrebno, v izogib možnim stranskim učinkom (naključni razrez DNA na nepravem mestu), natančnost tehnologije še izboljšati, preden jo bo mogoče preizkusiti in na široko uporabiti pri ljudeh.

Izredna moč genskih škarij zahteva tudi ustrezno pravno ureditev. Možne bi namreč bile zlorabe tehnologije za ustvarjanje gensko spremenjenih zarodkov, čeprav že vrsto let obstajajo zakoni in predpisi, ki nadzorujejo uporabo genskega inženirstva in ki vključujejo prepovedi spreminjanja človeškega genoma na način, ki omogoča prenos uvedenih sprememb na potomce. Za poskuse, ki vključujejo ljudi in živali, morajo etični odbori pred njihovo izvedbo vedno

dati ustrezno soglasje. Vseeno pa zaradi natančnosti in razmeroma enostavne uporabe nova tehnologija preurejanja genoma prinaša tudi tveganja nepooblašcene in zlonamerne uporabe.

Gotovo pa je eno: te genetske škarje vplivajo na vse nas. Soočili se bomo z novimi etičnimi vprašanji, vendar bo novo orodje vsekakor lahko prispevalo k reševanju številnih izzivov, s katerimi se sooča človeštvo. Emmanuelle Charpentier in Jennifer Doudna sta s svojimi odkritji razvili orodje, ki je znanosti o življenju popeljalo v novo obdobje.

Viri:

Ann Ferholm, The Royal Swedish Academy of Sciences:

*The Nobel Prize in Chemistry 2020 – Popular Science Background; <https://www.nobelprize.org/uploads/2020/10/popular-chemistryprize2020.pdf>.
Claes Gustafsson, The Royal Swedish Academy of Sciences: *Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry – A Tool for Genome Editing; <https://www.nobelprize.org/uploads/2020/10/advanced-chemistryprize2020.pdf>.**

CRISPR (Wikipedia): <https://en.wikipedia.org/wiki/CRISPR>.

Genetic Disorder (Wikipedia): https://en.wikipedia.org/wiki/Genetic_disorder.

Scopolijev vrt v Idriji • Botanični vrtovi

Scopolijev vrt v Idriji

Tinka Gantar, Ivica Kavčič, Anka Rudolf, Nada Praprotnik, Igor Dakskobler



Scopolijev vrt v zgodnji pomladi: kronica ali pomladanski veliki zvonček (Leucojum vernum), navadni mali zvonček (Galanthus nivalis) in pomladanski žafran (Crocus vernus subsp. vernus). Foto Tinka Gantar.