

A CRISPR-Cas9 rendszerrel végzett genomszerkesztés módszere és onkológiai alkalmazásai

HUDACSEK VIKTÓRIA¹, GYÖRFFY BALÁZS^{1,2}

¹Semmelweis Egyetem, II. Sz. Gyermekklinika, ²MTA TTK Lendület Onkológiai Biomarker Kutatócsoport, Budapest

Pályázati támogatás: A Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal NVKP_16-1-2016-0037-es pályázata.

Levelezési cím:

Dr. Györfy Balázs MD, PhD, MTA TTK Lendület Onkológiai Biomarker Kutatócsoport, Enzimológiai Intézet, 1117 Budapest, Magyar Tudósok körútja 2., e-mail: gyorffy.balazs@ttk.mta.hu, tel.: +3630-514-2822

Közlésre érkezett:

2017. november 15.

Elfogadva:

2018. január 6.

Ma már szükséges, hogy egyes géneket célzottan meg tudjunk változtatni – ebben segítenek a genomszerkesztési technikák. Ezekben vagy egy génszakaszt mozgatunk vagy távolítunk el, vagy pedig célzott mutációt viszünk be a sejtbe. Írásunkban a CRISPR-Cas9 genomszerkesztő rendszert részletesen is bemutatjuk. A módszer alapja egy olyan mechanizmus, amelyet baktériumok használnak visszatérő vírusfertőzések kivédésére. Megfelelő módosításoknak hála, ma eukarióta sejtekben célzottan is tudjuk alkalmazni. A módszer három fő lépésből áll: az első a rendszer tervezése és felépítése, a második a transzfekció, vagyis a létrehozott konstrukció bejuttatása a célsejtekbe, és végül az elért hatást funkcionális tesztekkel kell igazolni. A módszer megbízhatósága lehetővé teszi, hogy onkológiai kutatásokban onkogéneket, tumorsuppresszor géneket, transzlokációkat, valamint további molekuláris eltéréseket részletesen is megvizsgáljunk. A jelenleg elérhető CRISPR-Cas9 protokollok *in vitro* és *in vivo* alkalmazást is lehetővé tesznek. Mindezek alapján a CRISPR-Cas9 a jövő onkológiai kutatásainak egyik alpmódszere lehet. *Magy Onkol* 62:119–127, 2018

Kulcsszavak: mutáció, génbevitel, génvesztés, genomszerkesztés, transzfekció, *in vitro* modellek

Today, we have to investigate the effects of selected mutations and molecular alterations – this is made possible by the new genome editing technologies. In these, either a section of the DNA is deleted or moved, or a targeted mutation is introduced into the cell. Here, we describe in detail the CRISPR-Cas9 genome editing method. The technology is based on a feature used by bacteria to combat recurrent viral infections. At present, commencing a set of modifications, the method is functional and can be applied in eukaryotic cells as well. The method has three major steps: first, the system has to be carefully designed and constructed, then the construct has to be introduced into the target cells by transfection, and finally, the achieved effect has to be functionally validated. The reliability of the method enables multiple applications in oncology, including the detailed and efficient investigation of oncogenes, tumor suppressor genes, chromosomal translocations and other molecular changes. At the moment, available CRISPR-Cas9 protocols enable both in vitro and in vivo application. All these already made CRISPR-Cas9 one of the basic methods required for future-proof oncology research.

Hudacsek V, Györfy B. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system and applications in cancer research. Magy Onkol 62:119–127, 2018

Keywords: mutations, gene knock-in, gene knock-out, genome editing, transfection, in vitro models

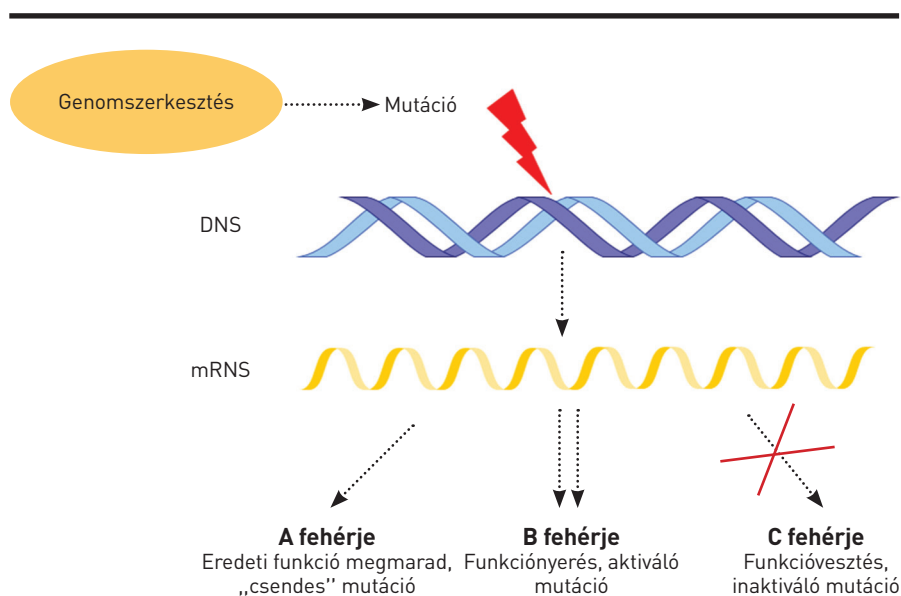
BEVEZETÉS

A humán genom közel 25 000 gént tartalmaz, melyekben már több mint 3700 megváltozott fenotípust eredményező mutációt azonosítottak¹. A humán genom projektnek és a szekvenálási technikák fejlődésének köszönhetően folyamatosan növekszik azoknak a száma, akiknél a teljes genomot meghatároztuk. Ezáltal egyre pontosabban felderíthetővé válik a genetika szerepe az emberi egészségben. A meglévő DNS-szekvenciákat összehasonlítva felderíthetők az egy nukleotidra vonatkozó eltérések, a törlődések (deléciók), beszűródött szakaszok (inszerciók), és kromoszómaváltozatok. A mutációk azonosításával és elemzésével be tudjuk azonosítani a tumoros folyamatok kialakulásáért felelős mutációkat, melyek célzott terápiák célpontjaivá válhatnak [1]. A mutáció lehet csendes, amely nem okozza a gén funkciójának megváltozását; lehet

modellek létrehozását is, amelyek alkalmasak a ráktípusok és azok mutációinak tanulmányozására. A technológia a programozható nukleázokon alapul, ilyen a cink-ujj nukleázokkal, a TALEN nukleázokkal, valamint a CRISPR-Cas9 rendszerrel végrehajtott szerkesztés [2. ábra]. A nukleázok olyan enzimek, amelyek képesek hasítani a DNS-t. Az alábbiakban az elérhető genomszerkesztési technikák rövid ismertetése után a CRISPR-Cas9 rendszert részletesen is bemutatjuk, majd kitérünk a módszer onkológiai alkalmazásaira is.

ISMERT GENOMSZERKESZTÉSI TECHNIKÁK

A genomszerkesztés megvalósítására vonatkozó első próbálkozásokban rövid oligonukleotidokkal és keresztkötő ágensekkel (bleomicin, pszoralen) próbáltak létrehozni adott genomi helyre specifikus kromoszómamódosításokat



1. ÁBRA. A DNS-ben létrejövő mutáció hatása a képződő fehérjére. A DNS-ben különböző mutációk alakulhatnak ki – szakaszok eshetnek ki, beékelődések keletkezhetnek, nukleotidok változhatnak meg –, amelyeket a képződő fehérjékben történő változás alapján csoportosíthatunk. Ha a fehérje funkciójában nem szenved károsodást, akkor egy csendes mutáció történt, pl. módosult egy nukleotid, de az aminosav nem változott. Aktiváló mutáció hatására a fehérje működése fokozódik, melynek oka lehet egy promóter régióban történő mutáció is. A fehérje elvesztheti funkcióját, ha a kódoló régiójából szakaszok esnek ki, vagy nukleotidcsere következtében STOP kodon jelenik meg

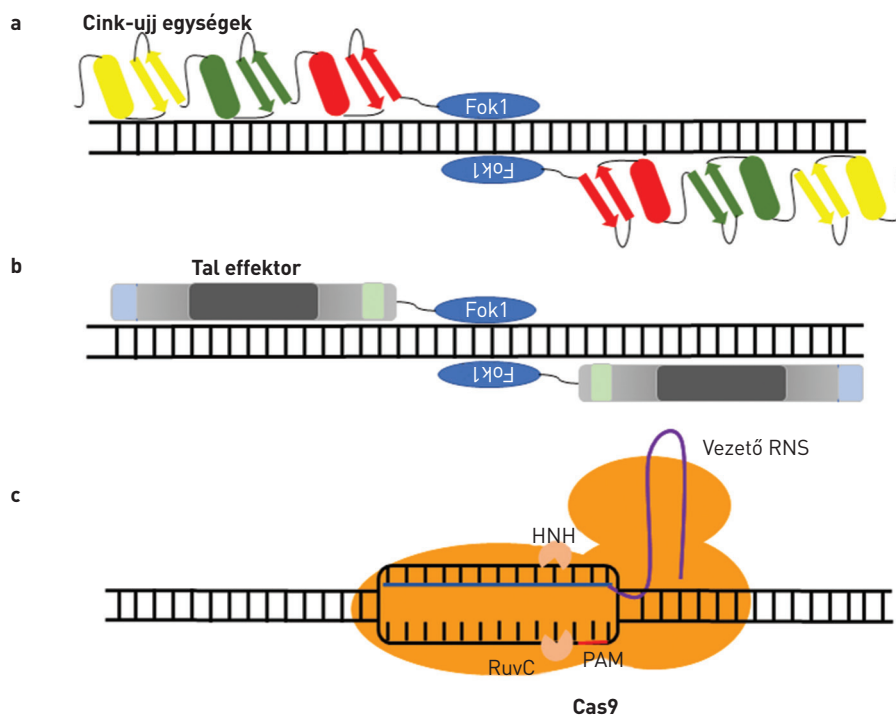
funkcióvesztéssel járó mutáció, amely kikapcsolja a gént; és lehet funkciónyeréses mutáció, amikor a gén aktiválódik vagy az expressziója növekszik [1. ábra]. Áttételesen, ezek eredményeképpen az azonos jelátviteli útvonalban szerepet játszó gének expressziója is megváltozhat.

A genomszerkesztési technikák lehetővé teszik a mutációk típusának beazonosítását, de olyan *in vitro* és *in vivo*

emlőssejtekben [2]. Az RNS-ben szekvenciai módosításra önmagukat hasító oligonukleotidokkal próbálkoztak [3]. Azonban ezek a technikák nem voltak megbízhatóak és könnyen ismételhetők, ezért mára teljesen eltűntek.

A korai próbálkozásokhoz viszonyítva már egy specifikusabb DNS-módosítást tudtak létrehozni a mesterségesen összeállított, cink-ujj nukleázokkal megvalósított genomszerkesztéssel. A DNS-kötő cink-ujj doméneket (funkcionálisan aktív egységeket) kötötték össze a FokI endonukleázzal – az endonukleázok olyan nukleázok, amelyek a DNS-szál közepén

¹<https://www.omim.org/statistics/geneMap>



2. ÁBRA. Genomszerkesztési módszerek. a) Cink-ujj nukleázok összekapcsolása a Fok1 enzimmel; b) Tal nukleotidfelismerő effektorok Fok1 enzimmel fuzionáltatva; c) Cas9 fehérje és a vezető RNS-szál

tudnak hasítani. A cink-ujjak három nukleotidot ismernek fel, amely után a FokI elhasítja a DNS-t. A technika hátrányai közé tartozik, hogy az egyedi szubsztitúciós nukleotidok miatt nagy valószínűséggel rossz helyen vágja a DNS-t, a fehérjekonstrukció drága és költséges, kevés a felismerési szekvencia, és sokszor az aktív egységek között nem alakul ki megfelelő kölcsönhatás [4] – ezért tovább folytatódott a keresés új módszerek után.

A TALEN genomszerkesztő rendszerben a *Xanthomonas* baktérium által termelt TAL DNS-kötő fehérjedoménokat kapcsolták össze a FokI endonukleázzal, amely már hosszabb felismerési szekvenciát tartalmazott, így pontosabb és olcsóbb volt, mint a cink-ujj nukleázokkal működő rendszer. Eközben azonban a fehérjetervezés nehézségei megmaradtak a szintézisben [5].

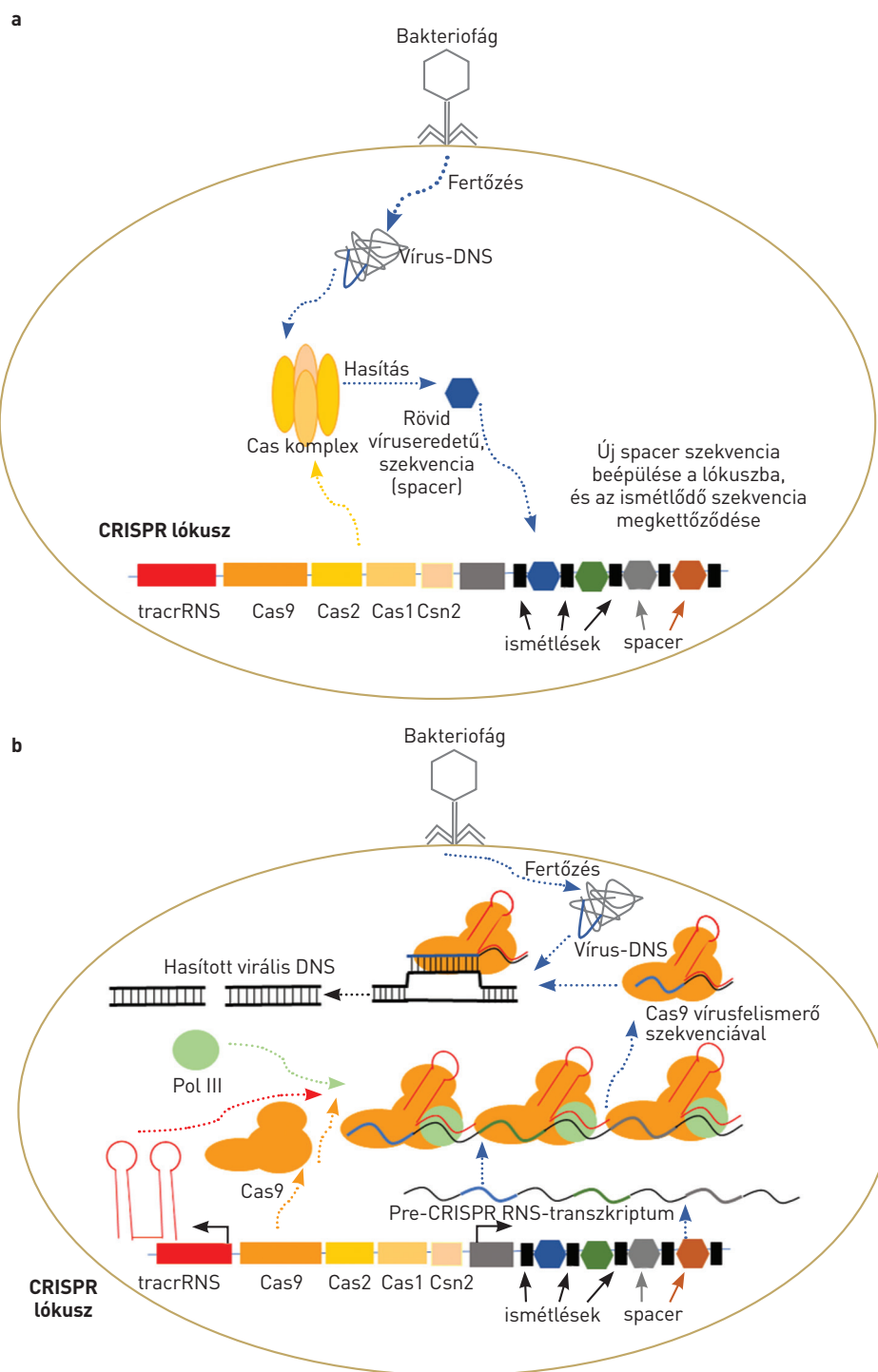
Ezt a hátrányt képes kiküszöbölni a CRISPR-Cas9 rendszer, amely egy RNS-szál által programozott genomszerkesztési technika, amely már nem igényel proteintervezési feladatokat, illetve nagyon specifikussá tehető. A Cas9 egy endonukleáz, amely egy „vezető” gRNS-szekvenciával a komplementer (nem kódoló, a kódoló szál tükröképe) DNS-szálhoz képes kötődni, azzal bázispárosodni, majd kettős szálú DNS-törést tud létrehozni a cél-DNS-en. A vezető gRNS-szekvencia 5' vége képes 20 bázis hosszú szakaszon bázispárosodni a célszekvenciával, a 3' vége pedig a Cas9 fehérjéhez tud kötődni.

A hasítás az úgynevezett PAM (protospacer adjacent motif, protospacer melletti motívum) szekvencia után történik. A keletkezett kettős szálú DNS-törés javítása kétféle módon történhet: egyrészt a NHEJ (nem homológ végkapcsoló) mechanizmussal, másrészt a homológ rekombináció (HR) által. Abban az esetben, ha a NHEJ mechanizmus javítja ki a hibát, a génekben törlődések keletkeznek, melynek következtében a gén elveszítheti funkcióját. Ha pedig a homológ rekombinációval történik a javítás, akkor génszakaszokat cserélhetünk ki, így be tudunk vinni specifikus mutációkat is egy adott genomszakaszra [6].

A CRISPR-CAS9 RENDSZER

Prokarióták védekező mechanizmusa

1987-ben rövid ismétlődő szekvenciákat fedeztek fel *E. coli*-törzsek örökítőanyagában, amelyeknek a funkcióját még nem ismerték [7]. Az elkövetkező évtizedben számos más baktérium és ősbaktérium (archaea) törzs genomjában találtak ilyen rövid, ismétlődő, egymást követő szekvenciákat [8]. Ezeket a szekvenciákat később „halmozottan előforduló, szabályos kö-zökkel elválasztott palindromikus ismétlődéseknek” [CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats] nevezték el [9]. Azóta kiderült, hogy ezek a rövid, változékony, 20–50 bázispárnyi beékelődött (spacer) szekvenciák virális eredetűek. Ez a felfedezés vezetett ahhoz a hipotézishez, hogy



3. ÁBRA. Baktériumok vírusok elleni védekező mechanizmusa. a) Immunizálás fázisa: a víruseredetű DNS bekerül a baktériumsejtbe, a Cas komplex a PAM szekvenciánál elhasítja a virális DNS-t, a keletkező spacer szekvencia beépül a baktérium CRISPR lókuszába az ismétlődő szakaszok közé. b) Immunitás, idegen DNS lebontása: A CRISPR lókuszból egy pre-transzkriptum keletkezik, amelyhez a tracrRNA-ék és a Cas9 fehérjék hozzákapszolódnak, majd a Polimeráz III különálló RNS-fehérje komplexekre hasítja, amelyek képesek felismerni a bekerülő virális eredetű DNS-t. A felismerés során a spacer szekvencia bázispárosodik a virális eredetű DNS-sel, amit a Cas9 elhasít, így inaktíválva az idegen DNS-t

a beékelődött szekvenciák genetikai memóriaelemek lehetnek a baktériumok immunitásában [10]. A CRISPR szekvenciák mellett Cas (CRISPR-asszociált) géneket találtak, melyek ki tudják tekerni a DNS-t és el tudják hasítani [11].

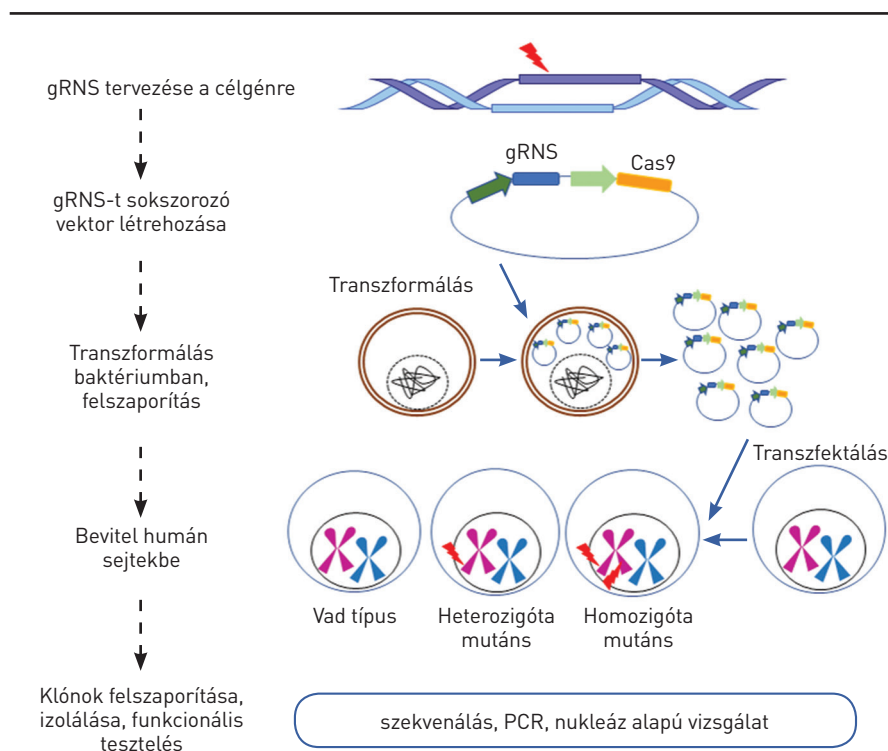
A baktériumokban három különböző mechanizmusú CRISPR-Cas rendszer fejlődött ki, amelyek közül a II. típus használható eukarióta genomszerkesztésre, ezért ezt a mechanizmust részletezzük a továbbiakban. Az első, immunizációs fázisban a baktérium először találkozik az adott bakteriofág DNS-ével, ilyenkor a baktériumgenomba kódolt Cas2 és Cas1 fehérje elvágja a virális DNS-t a PAM szekvencia előtt és után. A keletkező darab beépül a baktérium CRISPR lókuszába (amely régióban a virális eredetű beékelődött szekvenciák tömörülnek) egy 'ismétlődő szekvencia – beékelődött virális szekvencia – ismétlődő szekvencia' (crRNS) struktúrát létrehozva [3.a ábra] [12]. Az ismétlődő szekvencia egy CRISPR lókuszból konzervált, de több CRISPR lókuszt összehasonlítva az ismétlődés eltérést mutat a szekvencia nukleotid-összetételében és hosszában. Az 'ismétlődés – beékelődött szakaszok' száma organizmusfüggő [13].

Ha a baktérium másodszor is találkozik ugyanazzal a vírussal, akkor a CRISPR lókusztól megtörténik az átírás, és

egy pre-crRNS transzkriptum keletkezik. Az ismétlődő szakaszokhoz hibridizálnak a transzaktivátor RNS-ek (tracrRNS). A Cas9 fehérje a transzaktivátor RNS-struktúráját ismeri fel, majd az RNáz III (RNS-polimeráz III) különálló fehérje-RNS komplexszé vágja a keletkezett Cas9 és vezető RNS szekvenciákat. A vezető RNS Watson-Crick-bázispárosodik a virális DNS-sel és a Cas9 fehérje RuvC és HNH egysége elvágja a célszekvenciát a PAM szekvencia után [3.b ábra]. Ezáltal a baktérium képes arra, hogy a vírust hatástalanítsa [14].

GENOMSZERKESZTÉS EUKARIÓTÁKBAN

Felismerték, hogy a 20 nukleotidos felismerő szekvencia kicserélhető, így alkalmas lehet eukarióta DNS-szekvencia felismerésére is. Mivel a rendszer prokarióta eredetű volt, számos módosítást kellett végezni rajta, hogy eukariótákban is használni lehessen. Bizonyították, hogy a rendszer működésére a Cas fehérjék közül csak a Cas9-re van szükségük. A fehérje kodonfelhasználását az eukariótákra jellemző kodonokra módosították. A tracrRNS-t és crRNS-t összekapcsolták egy loop motívumon keresztül, így a rendszer irányítható egy RNS-molekulával, amely az adott célszekvenciára tervezhető. A teljes rendszert még ellátták egy nukleáris lokalizációs szignállal,



4. ÁBRA. Génkiütés létrehozása emberi sejtvonalban. A módszer első lépéseként megtervezük a vezető RNS-t (gRNS), amely a célgénre fogja felismerni és kiütni, majd a tervezett gRNS-ből egy vektorkonstrukciót hozunk létre, amelyben a Cas9 és egy szelekciót biztosító marker is kifejeződik – lehetnek külön vektorokban is. A vektort baktériumokba transzformáljuk és felszaporítjuk, majd a konstrukciót humán sejtekbe transzfektáljuk. Felszaporítjuk a klónokat és szekvenálással, PCR-rel vagy nukleáz alapú módszerekkel teszteljük az adott gén mutációját

1. TÁBLÁZAT. A CRISPR-Cas9 klinikai vizsgálatokban

Betegség	Alkalmazott kezelés	Fázis	Típus
Metasztatikus nem kisesejtű tüdőrák	Biológiai: CRISPR-Cas9-cel PD-1-kiütött autológ T-sejtek Gyógyszer: ciklofoszfamid, interleukin-2	I	<i>ex vivo</i>
Izominvazív húgyhólyagrák 4-es stádium	Biológiai: CRISPR-Cas9-cel PD-1-kiütött autológ T-sejtek Gyógyszer: ciklofoszfamid, interleukin-2	I	<i>ex vivo</i>
Hormonrezisztens prosztatarák	Biológiai: CRISPR-Cas9-cel PD-1-kiütött autológ T-sejtek Gyógyszer: ciklofoszfamid, interleukin-2	I	<i>ex vivo</i>
Metasztatikus vesekarcinóma	Biológiai: CRISPR-Cas9-cel PD-1-kiütött autológ T-sejtek Gyógyszer: ciklofoszfamid, interleukin-2	I	<i>ex vivo</i>
Előrehaladott nyelőcsőrák	Biológiai: CRISPR-Cas9-cel PD-1-kiütött autológ T-sejtek Gyógyszer: ciklofoszfamid, interleukin-2	I/II	<i>ex vivo</i>
Gyomor-, orrgerati tumorok 4-es stádiumban, T-sejtes limfóma, felnőttkori Hodgkin-limfóma és diffúz nagy B-sejtes limfóma 4-es stádiumban	Biológiai: CRISPR-Cas9-cel PD-1-kiütött autológ T-sejtek Gyógyszer: fludarabin, ciklofoszfamid, interleukin-2	I/II	<i>ex vivo</i>
HIV-fertőzés	Biológiai: CRISPR-Cas9-cel módosított CCR5 gént tartalmazó CD34+ autológ hemopoetikus őssejtek/progenitorsejtek Gyógyszer: anti-retrovírus terápia	I	<i>ex vivo</i>
B-sejtes leukémia, B-sejtes limfóma	Biológiai: CRISPR-Cas9-cel módosított TCR és B2M gént tartalmazó, CD19, CD20, CD22 antigént felismerő univerzális CAR-T-sejtek	I/II	<i>ex vivo</i>
B-sejtes leukémia, B-sejtes limfóma	Biológiai: CRISPR-Cas9-cel módosított TCR és B2M gént tartalmazó, CD19 antigént felismerő univerzális CAR-T-sejtek	I/II	<i>ex vivo</i>
*Mielóma multiplex, melanóma, szinoviális szarkóma, mioxoid/kerekesejtű liposzarkóma	Biológiai: NY-ESO-1-specifikus autológ T-sejtek CRISPR-Cas9-cel módosított TCR és PD-1 génekkel	I	<i>ex vivo</i>
Humán papillómavírus-asszociált malignus elváltozások	Biológiai: CRISPR-Cas9 és TALEN módszerek HPV E6/E7 célzására	I	<i>in vivo</i>

A Clinicaltrials.gov oldalon szereplő klinikai vizsgálatok listája, melyekben a CRISPR-Cas9 genomszerkesztő módszert felhasználják. A *-gal jelölt vizsgálatot Amerikában a Pennsylvániai Egyetemen végzik, de a többi klinikai vizsgálat mind Kínában zajlik. A kezelések során főleg CRISPR-Cas9 módszerrel módosított T-sejteket hoznak létre *ex vivo*, melyeket visszajuttatnak a betegekbe. 2018 januárjától pedig elindult egy *in vivo* kísérlet is a HPV-asszociált tumorok esetében

ami által az be tud jutni az eukarióták sejtmagjába, és ezáltal lehetővé válik a DNS módosítása [15].

Ha egy emberi sejtvonalon szeretnénk létrehozni génkiütést, akkor a tervezési fázissal indul a folyamat, majd létrehozunk a konstrukciót, amelyet bejuttatunk a kiválasztott sejtkultúrába. A transzfektált sejteket analizáljuk és megvizsgáljuk, hogy tartalmazzák-e az általunk létrehozott mutációt, majd a megfelelő sejteket felszaporítjuk [4. ábra]. A következőkben e fázisokat ismertetjük részletesen.

Első fázis: tervezés

A CRISPR-es génkiütésnek többféle lehetséges módja érhető el. Megtervezhetjük saját magunk azokat az oligókat, amelyek a kiütni kívánt szakaszt ismerik fel, és elkészíthetjük a számunkra megfelelő vektorkonstrukciót. Napjainkban már létezik olyan nonprofit vektoradatbázis (<https://www.addgene.org>), ahonnan meg is rendelhetjük a kiválasztott génre tervezett gRNS-t. A saját konstrukció létrehozásánál fontos, hogy a kiválasztott 20 nukleotid és a hozzá tartozó PAM szekvencia exonban legyen, és az utóbbi szekvenciáját felismerje az általunk használt Cas9, illetve a pontos

illeszkedés miatt SNP (egy nukleotidnyi eltérés) ne legyen a célzott szakaszon, valamint a más génekre gyakorolt hatása is minimális legyen. A célszekvencia megtalálásában nyújtanak segítséget az online CRISPR tervezőszoftverek (<http://crispr.mit.edu/>).

A tervezett oligókat tartalmazó vektor elkészítése több módon is lehetséges. Az egyszerű oligókból kettős szálú DNS-t hozunk létre, majd összekapcsoljuk egy kiegyenesített plazmiddal (pl. egy Gibson összeszerelési kittel – ebben az esetben a módszer korlátja, hogy a célszekvenciának G nukleotiddal kell kezdődnie). A vektort kompetens baktériumba transzformálva (kémiai transzformálás, elektroporáció) felszaporítható a konstrukció [16]. Az elkészült vektorkonstrukcióhoz hozzáadjuk a Cas9-et és a szelekciót biztosító markert, amely lehet fluoreszcens fehérjét (GFP) vagy antibiotikum- (pl. puromicin, higromicin, geneticin) rezisztenciagént kifejező plazmid, és az elkészült eleggyel transzfektáljuk a humán sejteket. Létrehozható olyan vektorkonstrukció is, amely egy plazmidot tartalmaz, és erről fejeződik ki a célszekvencia, a Cas9 és a szelekciót biztosító gén is. Ebben az esetben a tervezett szekvencia elé egy restriktációs enzim hasító helyét tesszük, ugyanezzel az

ClinicalTrials.gov azonosító	Kezdés dátuma	Várható befejezés
NCT02793856	2016. augusztus	2018. április
NCT02863913	2016. szeptember	2019. szeptember
NCT02867345	2016. november	2020. december
NCT02867332	2016. november	2020. november
NCT03081715	2017. március	2018. december
NCT03044743	2017. április	2022. március
NCT03164135	2017. május	2021. május
NCT03166878	2017. június	2022. május
NCT03398967	2018. január	2022. május
NCT03399448	2018. január	2033. január
NCT03057912	2018. január	2019. január

enzimmel a beillesztendő darabot és a plazmidot is elhasítjuk, majd összekapcsoljuk. A konstrukciót baktériumban felszaporítjuk, és transzfektáljuk emberi sejtekbe [17].

Második fázis: transzfekció

A konstrukció transzfektálása történhet kationos liposzómakészítmény felhasználásával (pl. lipofektamin, oligofektamin, FuGene), ezek hátránya, hogy jelentős toxikus hatásuk lehet. Egyes gyártók nem toxikus sejtfehérjét és kis mennyiségű poliamint tartalmazó reagenseket kínálnak transzfekcióhoz (pl. GeneJuice), amelyek toxikus hatása jóval kisebb, azonban a hatékonyság csak bizonyos sejtvonalakra korlátozódik. Az emberi sejteken elektromos hullámok hatására pórusok nyílnak, amelyen keresztül bejuttatható idegen DNS, ezen a módszeren alapul a sejtek elektroporációja. Ha a plazmid GFP-t expressezál, akkor e tulajdonság alapján fluoreszcens mikroszkóppal megkülönböztethetők a pozitív és negatív klónok [17].

Harmadik fázis: funkcionális igazolás

A teszteléshez egy sejtől indulunk ki, amelyet először felszaporítunk. A hosszabb DNS-szakaszok kiütése már PCR

segítségével is kimutatható. Ha rövidebb módosítást végzünk, vagy egy nukleotidot változtattunk meg a genomban, akkor szekvenálással meghatározható a mutáns gén szekvenciája, és összevethető a vad típussal. Egy nukleotidnyi eltérés Surveyor-teszttel is kimutatható. Ebben a mutáns DNS-t hibridizálják a vad típussal, és ha nem megfelelő bázisok állnak egymással szemben, akkor a Cell enzim hasítja a szálakat, így gélképen futtatva megállapítható, hogy van-e eltérés a két DNS-szakasz között [18].

A CRISPR ONKOLÓGIAI ALKALMAZÁSAI

In vitro alkalmazás

A tumorsejtek genetikai állományát megvizsgálva számos génmutációt és epigenetikai változást találtak, amelyek hozzájárulnak a tumorok kialakulásához és továbbfejlődéséhez. A mutációk hatására onkogének bekapcsolódhatnak, tumorsuppresszor gének kieshetnek, jelátviteli útvonalak aktiválódhatnak – ezek által a sejtek osztódása gyorsul, rezisztenssé válhatnak a programozott sejthalálra, és kontrollálatlanul osztódó, halhatatlan sejtekké alakulhatnak, továbbá indukálhatják az érképződést és az áttétképzést.

A CRISPR-Cas9 technikával azonosíthatók a rosszindulatú daganatok kialakulásáért felelős gének, valamint azon véletlenszerűen megváltozott gének, amelyek mutációja nem vesz részt a tumor kialakulásában [19]. A technikával tanulmányozhatók a mutáció hatása következtében inaktivált tumorsuppresszorok. E gének közé tartozik a TP53, amely a humán tumorokat tekintve az esetek több mint 50%-ában szenved mutációt. A PTEN tumorsuppresszor inaktiválása a glioblasztómában, prosztata tumorban és az endometriális karcinómákban jelentős. A BRCA-1 és BRCA-2 gének funkcióvesztése a mell-, illetve a petefészekrákban számottevő. A CRISPR-Cas9 módszerrel létre tudjuk hozni e tumorsuppresszorok specifikus inaktivációját emberi sejtvonalakban [20]. Az onkogénekben történő, funkcionyeréssel járó mutációk hatására e gének aktiválódnak, és fokozottan kifejeződnek egyes tumortípusokban. Ebbe a csoportba tartozik az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR), az ösztrogénreceptor (ER), a G-proteinek családjába tartozó RAS fehérjék és az intracelluláris RAF kináz stb. A CRISPR-Cas9 technikával bevezethető azon pontmutációk, melyek az onkogének aktivációjáért felelősek [21]. A gének expresszióját poszttranszkripcionálisan és poszttranszlációsan a mikroRNS-ek (miRNS-ek) is befolyásolják, amelyek a gének 3' végéhez hibridizálnak, és aktivációs vagy gátló hatásuk van a célgénen. A CRISPR módszerrel ezek a miRNS-hatások is vizsgálhatók, kiüthetők [22].

A neoplázia megjelenéséért felelősek lehetnek kromoszómatranszlokációk is, amikor egy kromoszómáról leszádott szakaszok egy másik kromoszómára helyeződnek át. A transzlokáció következtében fúziós fehérjék alakulnak ki, amelyek elindíthatják a neopláziát [23]. Torres és kutatócsoportja CRISPR-Cas technikával *in vitro* létrehozták az akut mieloid leukémia és a Ewing-szarkóma kialakulásáért felelős transzlokációkat [24].

A tumorok kialakulásának és progressziójának modellezése mellett azonosíthatóvá válnak a gyógyszer-rezisztenciában szerepet játszó gének mutációi is. Joung és munkatársai a CRISPR-Cas9 technikával melanóma-sejtvonalban olyan gének aktivációját és funkcióvesztését fedezték fel, amelyek felelősek a vemurafenib- (BRAF-inhibitor) rezisztenciáért [25].

In vivo alkalmazás

Lehetőség nyílt új egérmodellek létrehozására, mert a technológia alkalmas felnőtt egyedekben szomatikus sejtek genommodosítására. Tyler Jack laboratóriumában vad típusú egerek májában PTEN és TP53 tumorszuppresszor gének mutációját hozták létre, illetve specifikus pontmutációt vittek be a β -katenin génbe, elsőként demonstrálva az új technológia alkalmazhatóságát májrákmodellek létrehozásában [26]. A genomszerkesztési módszert felhasználva egerekbe olyan vektorkonstrukciót injektáltak, amelyben a tüdőrák 3 leggyakoribb mutációt szenvedő módosított génjeit (TP53, LKB1, KRAS) helyezték, melynek következtében tumorok jelentek meg az egerek tüdőszövetében [27].

A CRISPR-Cas9 módszer genetikai térképezésre is használható, hiszen *in vivo* azonosíthatóvá válnak azon gének és mutációik, amelyek a tumor növekedésében és/vagy áttétképzésében játszanak szerepet [28].

Kromoszómaátrendeződések is kiválthatók a CRISPR módszerrel *in vivo*. A nem kissejtes tüdőrák kialakulását előidéző fúziós fehérjét sikeresen létrehozták egérmodellben. A megalkotott preklinikai tumormodell alkalmas a gyógyszer-rezisztencia mechanizmusának tanulmányozására és új terápiák tesztelésére is [29].

TERÁPIÁS FELHASZNÁLÁS

A CRISPR genomszerkesztő módszer felhasználható a tumorok immunterápiájában. Az első klinikai kísérlet 2016 augusztusában indult, amelyben metasztatikus nem kissejtes tüdőrákban használtak CRISPR módszeren alapuló eljárást. A ClinicalTrials.gov oldalon 12 olyan klinikai kísérlet (2018. 02. 05-ig) szerepel, amelyben a CRISPR-Cas9 genomszerkesztő módszer szerepet játszik [1. táblázat]. A kísérletek döntő többségében CRISPR módszerrel módosított T-sejteket adnak tüdő-, húgyhólyag-, prosztata-, vese-, gyomor-, nyelőcsőtumoros betegeknek. A betegek véréből T-sejteket izolálnak, majd *ex vivo* kiütik a programozott sejthalált okozó fehérjét (PD-1-et), így fokozva a T-sejtek aktivitását. A módosított T-sejteket beadják a betegeknek, hogy felszámolják a ráksejteket. Vannak olyan antitestek (nivolumab, pembrolizumab), amelyek neutralizálják a PD-1-et, és sikeresen alkalmazták a tumorok immunterápiájában [30], de a génszerkesztéssel kiűtött PD-1 várhatóan nagyobb biztonsággal akadályozza meg a PD-1 működését, így nagyobb T-sejt-aktiváció érhető el a módszerrel.

A következő generációs kiméra antigénreceptort (CAR) kifejező T-sejtek létrehozásában is nagy szerepe lehet a CRISPR módszernek [NCT03166878]. A receptorok egy extracelluláris, egyszálú, antigénspecifikus variábilis fragmentummal kapcsolódnak a rosszindulatú B-sejtes tumorok felszínén kifejeződő CD19 antigénhez. A kapcsolódás hatására az intracelluláris, kimérikus, szignalizációs egység aktiválja a T-sejt toxikus hatását, így elpusztítja a tumorsejteket [31]. A kiméra antigénreceptorokat tartalmazó T-sejtekkel kiemelkedő eredményeket értek el az akut limfoid leukémia kezelésében [32]. 2017-ben az FDA két CAR-T-sejt terápiát engedélyezett, a Novartis által létrehozott Kymriah-t és a Gilead Yescarta nevű terápiáját. A kezelés viszont nagyon drága, mert egyedi CAR-T-sejtek létrehozását igényli, így kerülhető el a graft versus host jelenség. A megoldást a CRISPR-Cas9 módszerrel módosított univerzális CAR-T-sejtek jelentenék, melyekben az endogén T-sejt-receptort (TCR) és a béta-2 mikroglobulin (B2M) géneket módosítják, hogy minimálisra csökkentsék az allotranszplantációval kapcsolatos immunogenitást. A terápiák másik hátránya, hogy rezisztencia alakulhat ki ellenük. A tumorsejtek egyik védekező mechanizmusa, hogy a sejtfelszínükön PD-L1 ligandumok találhatók, melyek a T-sejtek felszíni PD-1 receptorához kötődve megszüntetik a T-sejtek toxicitását, így rezisztenssé válnak a kezelésre [33]. A T-sejtek aktivitása is megszűnhet a CTLA-4 receptorok sejtfelszínre kerülésével [34]. A CRISPR módszer használatával az említett PD-1 és CTLA-4 gének kiűthetők, így fokozva a CAR-T-sejtek hatékonyságát. Szolid tumorok esetében a meglévő tumor-mikrokörnyezet és a bonyolult gátló útvonalak miatt nehezebb a CAR-T-sejtek fejlesztése, de már számos szolid tumorban előforduló célgénre történik receptorfejlesztés [35].

A CCR5 gén kiűtése a T-sejteken megakadályozza, hogy a sejt megfertőződjön a HIV-vírussal, így nem fog elpusztulni, hanem továbbra is ellátja szerepét. A CRISPR módszerrel létrehozhatók olyan T-sejtek, amelyek nem tartalmaznak CCR5 receptort [NCT03164135].

A módszert 2018 januárjától [NCT03057912] *in vivo* is alkalmazni fogják Kínában a humán papillómavírus által okozott tumoros elváltozásokban, ahol az E6 és E7 onkoproteineket célozzák genomszerkesztő módszerekkel, bár a módszer még nem elég specifikus, ezért további kutatást és fejlesztést igényel. A következőkben pár specificitást javító módszert ismertetünk.

A MÓDSZER LIMITÁCIÓJA

A módszer alkalmazását lassítja, hogy viszonylag nagy az off-target hatása (nem a célgénen történő hasítás, 6 darab pozícióban történő eltérés esetén is képes a bázispárosodással), bár már számos biztató megoldás létezik a problémára. Az egyik lehetőség a vezető RNS tervezésében és a jól megválasztott célpont megtalálásában rejlik, melyre már kifejlesztettek olyan prediktív algoritmusokat, amelyek képesek

olyan szekvenciákat találni, amelyek kevésbé egyeznek a többi szekvenciával, így csökkentve az off-target hatást [36]. A vezető RNS-ek lehetnek csönkolt RNS-ek, 20 bázispár helyett 17 bázis hosszúak, amelyek érzékenyebbek a mismatchekre (egy nukleotid eltérésekre), így növelhető a szelektivitás [37]. Néhány tanulmány bemutatja, hogy a CRISPR reagensek csökkentésével is redukálható az off-target hatás, bár így az on-target hatásban is csökkenés tapasztalható [38]. Egy másik megközelítésben a *Streptococcus pyogenes* Cas9 fehérjében végeztek aminosav-módosításokat, melynek következtében a fehérje nagyobb hatékonysággal kötődött a célszekvenciához, míg ismert off-target helyekhez való kötődése jelentős mértékben csökkent [39]. Feltehetőleg az ilyen nagy hatékonyságú és szelektivitású Cas9 fehérjék létrehozása jelentheti a kulcsot a jövőbeli klinikai alkalmazásokban.

IRODALOM

- Lander ES. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature* 470:187–197, 2011
- Wang G, Levy DD, Seidman MM, et al. Targeted mutagenesis in mammalian cells mediated by intracellular triple helix formation. *Mol Cell Biol* 15:1759–1768, 1995
- Cech TR. RNA editing: world's smallest introns? *Cell* 64:667–669, 1991
- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* 11:636–646, 2010
- Nemudryi AA, Valetdinova KR, Medvedev SP, et al. TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems: tools of discovery. *Acta Naturae* 6:19–40, 2014
- Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346:1258096, 2014
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, 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* 169:5429–5433, 1987
- Mojica FJ, Díez-Villasenor C, Soria E, et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 36:244–246, 2000
- Jansen R, Embden JD, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 43:1565–1575, 2002
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151:2551–2561, 2005
- Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol* 1:e60, 2005
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315:1709–1712, 2007
- Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol* 8:R61, 2007
- Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods* 10:957–963, 2013
- Jinek M, East A, Cheng A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2:e00471, 2013
- Wang JW, Wang A, Li K, et al. CRISPR/Cas9 nuclease cleavage combined with Gibson assembly for seamless cloning. *Biotechniques* 58:161–170, 2015
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8:2281–2308, 2013
- Qiu P, Shandilya H, D'Alessio JM, et al. Mutation detection using Surveyor nuclease. *Biotechniques* 36:702–707, 2004
- Sanchez-Rivera FJ, Jacks T. Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. *Nat Rev Cancer* 15:387–395, 2015
- Albers J, Danzer C, Rechsteiner M, et al. A versatile modular vector system for rapid combinatorial mammalian genetics. *J Clin Invest* 125:1603–1619, 2015

KITEKINTÉS

A CRISPR-Cas9 technikának számos alkalmazási lehetősége van a különböző tudományterületeken, többek között a rákterápiában is. Összehasonlítva a korábban ismert genomszerkesztési technikákkal, jóval egyszerűbb tervezést igényel, és a genomszerkesztés is sokkal specifikusabban valósítható meg. Létrehozhatók emberi sejtvonalakban vagy egy komplex organizmusban konkrétan azok a mutációk vagy mutációkombinációk is, amelyek egy adott beteg esetében előfordulnak. Tanulmányozható a kromoszómaátrendeződések indukálta tumorképződési folyamat és a gyógyszer-rezisztencia kialakulási mechanizmusa. Mindezek alapján a jövőben az új rákellenes terápiák kidolgozása során várhatóan fontos szerepe lehet a CRISPR-Cas9 módszernek, többek között az immunterápiák kidolgozásában is.

- Harrod A, Fulton J, Nguyen VTM, et al. Genomic modelling of the ESR1 Y537S mutation for evaluating function and new therapeutic approaches for metastatic breast cancer. *Oncogene* 36:2286–2296, 2017
- Chang H, Yi B, Ma R, et al. CRISPR/cas9, a novel genomic tool to knock down microRNA in vitro and in vivo. *Sci Rep* 6:22312, 2016
- Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 7:233–245, 2007
- Torres R, Martin MC, Garcia A, et al. Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun* 5:3964, 2014
- Joung J, Konermann S, Gootenberg JS, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. *Nat Protoc* 12:828–863, 2017
- Xue W, Chen S, Yin H, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature* 514:380–384, 2014
- Platt RJ, Chen S, Zhou Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell* 159:440–455, 2014
- Chen S, Sanjana NE, Zheng K, et al. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell* 160:1246–1260, 2015
- Maddalo D, Manchado E, Concepcion CP, et al. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature* 516:423–427, 2014
- Zhang T, Xie J, Arai S, et al. The efficacy and safety of anti-PD-1/PD-L1 antibodies for treatment of advanced or refractory cancers: a meta-analysis. *Oncotarget* 7:73068–73079, 2016
- Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, et al. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta/CD28 receptor. *Nat Biotechnol* 20:70–75, 2002
- Maus MV, Grupp SA, Porter DL, et al. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood* 123:2625–2635, 2014
- Ishizaki Y, Yukaya N, Kusuhara K, et al. PD1 as a common candidate susceptibility gene of subacute sclerosing panencephalitis. *Hum Genet* 127:411–419, 2010
- Ewing MM, Karper JC, Abdul S, et al. T-cell co-stimulation by CD28-CD80/86 and its negative regulator CTLA-4 strongly influence accelerated atherosclerosis development. *Int J Cardiol* 168:1965–1974, 2013
- Abken H. Adoptive therapy with CAR redirected T cells: the challenges in targeting solid tumors. *Immunotherapy* 7:535–544, 2015
- Zhou H, Zhou M, Li D, et al. Whole genome analysis of CRISPR Cas9 sgRNA off-target homologies via an efficient computational algorithm. *BMC Genomics* 18(Suppl 9):826, 2017
- Fu Y, Sander JD, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol* 32:279–284, 2014
- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 31:827–832, 2013
- Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* 351:84–88, 2016