

A 21. SZÁZAD TIPIKUS TUDÓSHŐSE: FENG ZHANG

Venetianer Pál

az MTA rendes tagja
venetpal@brc.hu

Az USA tudományos köreiben régóta terjed a következő vicc: „Kérdés: *mi jellemzi országunk elitegyetemeit?* Válasz: *hogyan ott amerikai pénzből orosz tanárok oktatnak kínai diákokat.*” Nehéz volna megmondani, hogy e vélekedésnek mennyi a valós ténybeli alapja, de az a külföldi érdeklődő számára is nyilvánvaló, hogy az élenjáró tudományos műhelyekből származó legkiválóbb közlemények szerzői között szinte mindig van – a neve alapján – kínainak tekinthető személy. Ezek egyikéről szól ez a cikk. Ahhoz azonban, hogy választott hőszünk, Feng Zhang teljesítményét méltassuk, kell egy kis kerülőt tennünk.

Minden év októberének közeledtével (ekkor hozzák nyilvánosságra a Nobel-díjasok személyét), de többnyire már korábban is, megtelnek a tudományos és tudománypopularizáló magazinok, sőt a tömegkommunikáció médiumai is a találgatásokkal, jóslásokkal arról, ki lesz majd a legjelentősebb tudományos díj nyertese. Ezek az augurok már két éve egyre gyakrabban emlegetnek az orvosi-biológiai (vagy esetleg a kémiai) díj esélyesei között két egymástól független, de szinte egyformán alapvetően fontos, már eddig is sikeresnek bizonyult és még több új lehetőséget megnyitó felfedezést. E sorok írójának is az a véleménye, hogy előbb-utóbb szinte biztosan mindkettő meg fogja kapni

ezt a legmagasabb elismerést. E két felfedezés rövid neve: optogenetika, illetve CRISPR-cas9 genommodosítás.

Noha e két új eredmény jelentősége vitathatatlan, az nyilván még nagy fejtörést fog okozni a Nobel-díj bizottság számára, hogy – figyelembe véve a szigorú szabályt, miszerint egy tudományterületen háromnál több személy között nem osztható meg a díj – ki legyen a (legfeljebb) három kiválasztott nyertes. Tekintettel arra, hogy még a legújszerűbb felfedezéseknek is vannak fontos történeti előzményei, hogy olykor nagy létszámú csapatok közös érdeme az eredmény, továbbá hogy a felfedezés sokszor teljesen párhuzamosan születik meg két vagy több műhelyben, ez a kiválasztás szinte mindig problematikus, és gyakran vezet későbbi vitákhoz, konfliktusokhoz. Ennek egyik következménye esetleg az lehet, hogy ha mindkét említett felfedezés meg is kapja a díjat, a díjazottak között nem lesz ott az az egyetlen személy, akinek mindkét eredmény megszületésében alapvetően fontos része volt: Feng Zhang.

Zhang Kínában született 1982-ben, és tizenegy éves volt, amikor édesanyjával az USA-ba emigráltak. Az iowai Des Moinesben járt középiskolába, ahol korán kitűnt tehetségével. Már tizenhét évesen, érettségi előtt elkezdte a tudományos kutatást a Massa-

chusettsi Műegyetemen (MIT) és a következő évben az INTEL által kiírt tudományos tehetségkutató versenyen harmadik díjat nyert. BSc. diplomáját kémia–fizika szakon a Harvardon kapta meg 2004-ben, majd a Stanfordon doktorált 2009-ben kémia–biomérnökség szakon. Itt szakmai vezetője az a Karl Deisseroth volt, akivel közösen jegyezték az optogenetika minden bizonnyal legfontosabb cikkét (Boyden et al., 2005). Ennek köszönhető a 2012-es Perl-UNC Neuroscience Prize, amelyet mesterével, Deisseroth-tal és szintén ifjú kollégájával, Edward Boydennel együtt nyert el. Elsősorban ennek az eredménynek tudható be, hogy 2014-ben megkapta a fiatal kutatók (35 év alatt) számára elérhető legmagasabb amerikai tudományos elismerést, a Nemzeti Tudományos Alap (NSF) díját is. Zhang 2011-ben önálló kutatócsoportot alapított az MIT-hoz tartozó Broad Institute-ban, és itt fordult érdeklődése a genomszerkesztésre alkalmas új módszer, a CRISPR-cas9 felé. Az ő laboratóriuma publikálta 2013-ban azt az alapvetően fontos közleményt, amelyben beszámolnak a módszer emlőssejtekben (azaz elvileg emberben is) való alkalmazhatóságáról (Cong et al., 2013). Erre a cikkre a következő három évben több mint huszonegyszer hivatkoztak. Minthogy az ebben a munkában alkalmazott technológia alapjait Jennifer Doudna és Emmanuelle Charpentier 2012 nyarán megjelent közleménye fektette le (Jinek et al., 2012), ennek alapján kapták ők hárman együttesen (azaz Zhang, Doudna és Charpentier) 2014-ben a Jacob Heskel Gabbay-díjat. Az együttes elismerés azonban nem jelenti azt, hogy a három kitüntetett puszipajtássá vált. Közben ugyanis szabadalmi háború bontakozott ki a szerzők intézményei között, sokak szerint minden idők egyik legértékesebb találmánya körül (a kommentárok olykor

milliárd dolláros nagyságrendű térről írnak). Zhang ugyanis (egyedül), illetve az őt foglalkoztató Broad Institute 2013-ban szabadalmi bejelentést tett a technológiára, jegyzőkönyvei bemutatásával igazolva, hogy az ő ötlete már 2011-ben megszületett. Ezt az igényt támadta meg a Doudnát foglalkoztató Kaliforniai Egyetem és a hozzá csatlakozó (akkor Charpentiert foglalkoztató) Bécsi Egyetem azzal, hogy az elsőbbség vitathatatlanul Doudnát és Charpentiert illeti meg, hiszen ők Zhangnál korábban, már 2012-ben publikálták a módszert. Ez a jogvita nyilván sokáig fog tartani és igen sok pénzébe fog kerülni a harcoló intézményeknek, sőt az is lehetséges, hogy befolyásolja majd a Nobel-díj bizottság esetleges döntését. Az azonban ettől független tény, hogy Zhang tovább dolgozott a módszeren, és 2015-ben publikált új eredményei úgy tűnik, kiküszöbölhetik a technológia legnagyobb hiányosságát, és ezzel megnyithatják az utat a majdani humán alkalmazás előtt (Zetsche et al., 2015).

Ezután a bevezetés után az olvasó feltehetően szeretné megismerni a két felfedezés lényegét és jelentőségét is. Lássuk tehát először az optogenetikát, amit 2010-ben a *Nature* az „Év módszerének”, a *Science* „Az évtized áttörésének” nevezett. Azt az agykutatói díjat (*Brain Prize*), amelyet első ízben 2011-ben magyar tudósok (Buzsáki György, Somogyi Péter és Freund Tamás) nyertek el, 2013-ban az optogenetika felfedezéséért ítéltek oda hat kutatónak (Ernst Bamberg, Peter Hegemann, Gero Miesenböck, Georg Nagel, Edward Boyden és Karl Deisseroth). Deisseroth fiatal munkatársa, Zhang ebből a díjból kimaradt, valószínűleg igazságtalanul, feltehetően azért, mert már a hat díjazottat is sokallották, és Zhang csak doktoranduszként vett részt a munkában).

Az optogenetika történetét talán a legidősebb díjazottnál, Ernst Bamberg frankfurti biofizikus professzornál kell kezdeni. Ő ismer-te fel, hogy egy algából izolált fehérje (csatornarodopszin2) két érdekes tulajdonsággal rendelkezik, fényérzékeny és emellett ioncsatorna, azaz fény hatására megváltozik az a képessége, hogy biológiai membránba építve elősegíti kationok átjutását a membránon (Nagel et al., 2003). Ebből a felismerésből kiindulva, korábbi munkatársa, Georg Nagel és mások beépítették a csatornarodopszin kódoló gént a *Caenorhabditis elegans* nevű kis féregbe, és így a féreg viselkedésében fény hatására jellegzetes változást tudtak előidézni (Nagel et al., 2005). Ezekkel az eredményekkel többé-kevésbé párhuzamosan Gero Miesenböck osztrák kutató New Yorkban (jelenleg Oxfordban dolgozik) muslica (*Drosophila*) rodopszin génjét vitte be emlős szövetkultúra sejtekbe, és ott hasonló jelenségeket tudott előidézni (Zemelman et al., 2003). A nagy áttörést azonban Deisseroth, Boyden és Zhang 2005-ben megjelent közleménye jelentette (Boyden et al., 2005), amelyben arról számoltak be, hogy a csatornarodopszin génjét egér idegsejtekbe vitték be. Ezzel olyan kísérleti rendszert hoztak létre, amelyben egy magasabbrendű (emlős) állatban specifikus idegpályák működését, és ezáltal az állat viselkedését lehetett irányítottan befolyásolni minden invazív beavatkozás nélkül, pusztán fénysugárral. Azóta az optogenetika a neurobiológiai kutatás egyik legfontosabb eszkö-zévé vált, hazánkban például Acsády László ért el vele izgalmas alapkutatási eredményeket. Az is valószínűsíthető, hogy ez a technológia közelebb fog vinni a Parkinson-kór, az autizmus, a skizofrénia, a depresszió vagy a szorongás mechanizmusainak megismeréséhez, és ezáltal jövőbeni gyógyítási lehetőségéhez is.

A CRISPR-cas9 módszer története még régebbre vezethető vissza. 1987-ben közzéttek japán kutatók, hogy a molekuláris biológusok kedvenc baktériuma, az *Escherichia coli* DNS-ében van egy ismétlődő, sajátos szekvenciaelem, amelynek ismeretlen a szerepe (Ishino et al., 1987). Ez a cikk gyakorlatilag visszhang-talanul sülyedt el a jelentéktelen tudományos közlemények tengerében. Annak sem lett sokkal nagyobb hatása, amikor egy obskurus egyetem (a spanyolországi Alicantében) fiatal doktorandusza, Francisco Mojica egy obskurus baktériumban (*Haloferox mediterranei*) leírt egy ehhez hasonló szekvenciát, sőt meg is sejtette annak lehetséges funkcióját, és ő nevezte el CRISPR-nek (a betűszó a *clustered regularly interspersed palindromic repeats*, azaz halmozottan előforduló, szabályos közzökkel elválasztott palindromikus ismétlődések rövidítése) (Mojica et al., 1995). Az ezután következő két fontos fejlemény alkalmazott kutatóhelyekhez fűződik. Gilles Vergnaud francia genetikus a hadügyminisztériumtól kapott megbízást patogén mikroorganizmusok kutatására azért, hogy a Szaddam Huszein feltételezett biológiai fegyverei elleni védekezést segítse. E munka során, elsősorban a pestist okozó *Yersinia pestis* különböző törzseinek vizsgálata során megtalálták ugyan-ezeket az elemeket, és megerősítve Mojica sejtését leírták, hogy „...a CRISPR-elemek korábbi genetikai agressziók emléknymoi lehetnek” (Pourcel et al., 2005). A sejtés bizonyítása a DuPont cég egyik dániai élelmi-szerbiológiai laboratóriumában (Danisco) történt meg, ahol azt vizsgálták, hogy hogyan lehet megvédeni a joghurt- és sajt készítéshez használt tejsavbaktériumot (*Streptococcus thermophilus*) a gyakori fágfertőzéssel szemben. Ez a csoport (amelynek vezetője egy feltehetően magyar származású francia mikrobiológus,

Philippe Horvath volt) kimutatta, hogy ha egy fág-DNS-ből származó szekvenciaelem mesterségesen beépítenek a baktérium CRISPR-elemébe, az ismétlődő szekvenciák közé, az védelmet nyújt a fág további támadása ellen (Barrangou et al., 2007). Ezzel megerősítették a korábbi feltételezést, amely szerint a természetes védelem úgy jött létre, hogy a fágfertőzőskor a fág-DNS bizonyos töredéke beépült a CRISPR-régióba, és jelenléte biztosította az újabb fertőzéssel szembeni védelmet. Azaz a rendszer többé-kevésbé úgy működik, mint a magasabbrendű élőlények immunrendszere. Azt is megállapították, hogy ehhez az „immunválaszhoz” szükség van a baktérium egy cas9-nek elnevezett fehérjéjére. A rendszer biológiai funkciója tehát immár ismert volt, de működési mechanizmusa még nem. Ekkor azonban már az ügy az érdeklődés középpontjába került, és egymás után születtek meg (olykor párhuzamosan) a jelentős új eredmények. A legfontosabb talán annak a felismerése volt (ez elsősorban Emmanuelle Charpentier érdeme), hogy a baktériumsejtekben jelentős mennyiségben képződik egy RNS-molekula, amelyet a CRISPR-régió melletti genomszakasz kódol, és amelynek egy huszonöt nukleotid hosszúságú szakasza komplementer szerkezetű a CRISPR-régió ismétlődő szekvenciájával (Deltcheva et al., 2011). A másik fontos felismerés az volt, hogy a cas9 fehérje egy DNS-bontó enzim (endonukleáz). A sajátos baktériális immunrendszer működését tehát úgy kell elképzelnünk, hogy fágfertőzőskor a fág-DNS egy kis szakasza beépül a baktérium DNS CRISPR régiójának ismétlődő elemei közé. A CRISPR-régió melletti DNS-szakas-ról kiindulva készül egy olyan RNS-másolat, amely tartalmazza a beépült fág-DNS-ről készült másolatot is. Ez az RNS több általa-

kulási 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. Ennek a működésmódnak a megismerése megnyitotta az utat a rendszer komponenseinek egy *in vitro* kísérleti rendszerben történő összehozásához és ezzel elvben más sejtekben történő működtetéséhez. Erről szólt Doudna és Charpentier *Science*-ben 2012 nyarán megjelent cikke, amelyben a szerzők leírják, hogy „...a rendszer tulajdonságai kihasználhatók lehetnek RNS által programozott genom-szerkesztésre.” (Jinek et al., 2012). Ezért Doudna és Charpentier elnyerték a 2015-ös Breakthrough Prize-t és a l’Oreal-UNESCO 2016-os Nők a Tudományban díját.

Ha ugyanis olyan – mesterségesen szintetizált – RNS-molekulát használnak, amely képes a cas9 enzimmel komplexet képezni, és egyben tartalmaz egy olyan szekvenciát, amely a genom tetszőlegesen kiválasztott szakaszával komplementer (ennek neve *guide*, azaz vezető RNS), akkor a cas9 ezen a ponton el fogja vágni a sejt DNS-ét. Az már korábban ismert volt, hogy ilyen DNS-hasítást a sejt javító mechanizmusai képesek összefoltozni, és ennek manipulálásával mutációk hozhatók létre. Itt érdemes megjegyezni, hogy hasonló eredményt ért el Virginijus Siksnys litván kutató is, de az ő cikkét a *Cell* (lektorálás nélkül) elutasította, és az csak ősszel jelent meg a *PNAS*-ben, az Amerikai Nemzeti Tudományos Akadémia folyóiratában. A programozott genom-szerkesztő rendszer működését emlőssejtekben Zhangék demonstrálták

2013-ban (Cong et al. 2013). Azóta a módszer – tekintettel arra, hogy viszonylag olcsó és egyszerű – futótűzként terjedt el a világon, felhasználták már számos növény- és állatfaj célzott genetikai módosítására, és 2015-ben kínai kutatók emberi embriókon is kipróbálták (Liang et al., 2015). Jelenleg kereskedelmi forgalomban 65 dollárért vásárolhatók rendelkezésre készült vezető-RNS-ek, amelyek elvben az emberi genom bármely pontjának módosítására alkalmasak. A humán alkalmazás legfőbb korlátja az, hogy a nukleáz nem teljesen specifikus, azaz a genom megcélzott egyetlen pontja mellett, jóval kisebb gyakorisággal, máshol is előidézi mutációkat. Ez növényi vagy állati alkalmazásnál nem jelent különösebb gondot, de embernél megengedhetetlen. E problémára kínál megoldást Zhangék legfrissebb eredménye, egy új, cpfl nevéű, a cas9-nél precízebben, specifikusabban működő endonukleáz felfedezése (Zetsche et al., 2015).

Ezt a cikket elsősorban Zhang érdemei méltatásának szenteltem, mert a tudománytörténetben példátlan eseménynek tartom, hogy egy fiatal (jelenleg 34 éves) experimentális kutatónak két teljesen különböző, de egyaránt világraszóló elméleti és gyakorlati jelentőségű felfedezés létrejöttében is döntő szerepe legyen. Befejezésül azonban érdemes kitérni arra is, hogy a CRISPR-cas9-sztoriról nemrégén Eric Lander közzétett egy hosszabb tanulmányt a *Cell* című folyóirat *Perspektívák* rovatában, amelynek végén néhány általános tanulságot

foglalt össze, ezeket talán érdemes a magyar olvasóval is megismertetni (Lander, 2016).

Az első egy közhely, amelyet minden alapkutatással foglalkozó kutató tud és vall (csak a tudományfinanszírozásért felelős politikusok nem). Ez úgy szól, hogy a legnagyobb gyakorlati jelentőségű felfedezések szinte soha nem úgy születnek, hogy a megvalósítandó célt keresik tudatosan a kutatók, többnyire egész más irányú, olykor gyakorlatilag teljesen érdektelen megfigyelésekből, eredményekből, csak az ismeretszerzésre irányuló kutatásokból indul el a fontos, gyakorlatban is hasznosítható felfedezéshez vezető út. A második tanulság a magyar kutatók számára egyáltalán nem evidens, de ha igaz, akkor jó hír. Ez pedig: a fontos felfedezéshez vezető úton nemcsak a leggazdagabb országok világhírű műhelyei, hanem kis országok és kis kutatóhelyek kutatói is tehetnek, és tettek is fontos, olykor döntő lépéseket (például az alicantei Mojica, az oszakai Ishino, Philippe Horvath a Danisconál, vagy a vilniusi Siksnys).

Végül a harmadik – igen szomorú – tanulság, hogy milyen sok fontos kéziratot utasítottak el a legnagyobb presztízsű folyóiratok (*Nature*, *Science*, *Cell*) – többnyire azonnal, bírálónak ki sem küldve azokat –, ezzel súlyosan torzítva a szabadalmi és karrierszempontból döntő jelentőségű prioritási viszonyokat.

Kulcsszavak: *optogenetika*, *CRISPR-cas9*, *Nobel-díj*, *csatornarodopszin*, *guide-RNS*, *genomszerkesztés*, *endonukleáz*

IRODALOM

Barrangou, Rodolphe et al. (2007): CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*. 315, 1709–1712. DOI: 10.1126/science.1138140 • http://isites.harvard.edu/fs/docs/icb.topic802911.files/Oct%208%20-%20Kelli/Barrangou_07_CRISPR.pdf

Boyden, Edward S. et al. (2005): Millisecond-timescale Genetically Targeted Optical Control of Neural Activity. *Nature Neuroscience*. 8, 1263–1268. DOI: 10.1038/nn1525

Cong, Le et al. (2013): Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*. 339, 819–823.

DOI: 10.1126/science.1231143 • http://zlab.mit.edu/assets/reprints/Cong_L_Science_2013.pdf

Deltcheva, Elitza et al. (2011): CRISPR RNA Maturation by *Trans*-encoded Small RNA and Host Factor RNase III. *Nature*. 471, 602–607. DOI: 10.1038/nature09886

Ishino, Yoshizumi et al. (1987): Nucleotide Sequence of the *lap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product. *Journal of Bacteriology*. 169, 5429–5433. • <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC213968/pdf/jbacter00202-0107.pdf>

Jinek, Martin et al. (2012): A Programmable Dual-RNA-guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 337, 816–821. DOI: 10.1126/science.1225829 • <http://genetics.wustl.edu/bio5491/files/2013/03/Jinek-et.-al.-2012.pdf>

Lander, Eric S. (2016): The Heroes of CRISPR. *Cell*. 164, 18–28. DOI: 10.1016/j.cell.2015.12.041 • [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(15\)01705-5.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(15)01705-5.pdf)

Liang, Puping et al. (2015): CRISPR/Cas9-mediated Gene Editing in Human Triploid Zygotes. *Protein & Cell*. 6, 363–372. DOI: 10.1007/s13238-015-0153-5 • <http://link.springer.com/article/10.1007%2F13238-015-0153-5>

Mojica, F. J. M. et al. (1995): Long Stretches of Short Tandem Repeats Are Present in the Largest Replicons of the *Archaea Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and Could Be Involved in Replicon Partitioning. *Molecular Microbiology*. 36, 244–248. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.mm117010085.x • <http://www.academia.edu/17194571/>

Long_stretches_of_short_tandem_repeats_are_present_in_the_largest_replicons_of_the_Archaea_Haloferax_mediterranei_and_Haloferax_volcanii_and_could_be_involved_in_replicon_partitioning

Nagel, Georg et al. (2003): Channelrhodopsin-2, a Directly Light-gated Cation-selective Membrane Channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 100, 13940–13945. DOI: 10.1073/pnas.1936192100 • <http://www.pnas.org/content/100/24/13940.full.pdf>

Nagel, Georg et al. (2005): Light Activation of Channelrhodopsin-2 in Excitable Cells of *Caenorhabditis elegans* Triggers Rapid Behavioral Responses. *Current Biology*. 15, 2279–2284.

Pourcel, Christine – Savignol, G. – Vergnaud, G. (2005): CRISPR Elements in *Yersinia pestis* Acquire New Repeats by Preferential Uptake of Bacteriophage DNA, and Provide Additional Tools for Evolutionary Studies. *Microbiology*. 151, 658–663. DOI: 10.1099/mic.0.27437-0 • <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/151/3/653.pdf?expires=1459508825&cid=id&accname=guest&checksum=D4EF246EB2DB3A68143970CAF9381434>

Zemelman, Boris V. et al. (2003): Photochemical Gating of Heterologous Ion Channels: Remote Control over Genetically Designated Populations of Neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 100, 1352–1357. DOI: 10.1073/pnas.242738899 • <http://www.pnas.org/content/100/3/1352.long>

Zetsche, Bernd et al. (2015): Cpf1 is a Single RNA-guided Endonuclease of a Class2 CRISPR-Cas System. *Cell*. 163, 759–771. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038 • [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(15\)01200-3.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(15)01200-3.pdf)

