



Kiricsi Mónika

SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék | kiricsim@bio.u-szeged.hu

Evolúció a kémcsőben

A 2018. évi kémiai Nobel-díjat felerészben Frances H. Arnold kapta, a másik felén, egyenlő arányban, George P. Smith és Sir Gregory P. Winter osztozott. Az idei kémiai Nobel-díjak az evolúció erejének kémiai hasznosítását ismerték el. A három díjazott kutató munkája alapot teremtett az evolúciós folyamatok mechanizmusainak kiaknázásához és az emberiség szolgálatába állításához. Az irányított evolúció és a fágbemutatás olyan technikai lehetőségeket jelentenek, melyek révén enzimfehérjéket és antitesteket lehet egyrészt ipari célú alkalmazások, másrészt számos autoimmun- és egyes áttétes tumoros betegségek elleni küzdelem számára előállítani és optimalizálni.



Sir Gregory P. Winter, Frances H. Arnold, George P. Smith

Az élet csíráinak megjelenése óta milliónyi kémiai probléma ütötte fel fejét, mellyel az élő szervezeteknek meg kellett birkóznuk. Számos esetben az életet felépítő és működtető molekulák módosítására, optimalizálására volt szükség az életfolyamatok fenntartásának érdekében. A természetes evolúció révén gének mutálódtak, így a keletkező fehérjék is átfurmálódtak, hogy javítsák az élő szervezet alkalmazkodóképességét a változó környezeti körülményekhez.

Az irányított evolúció viszont ember alkotta folyamat, melyet a természetes evolúció mechanizmusairól szerzett ismeretek ihlettek. A természetes folyamatokat lemásolva laboratóriumi körülmények között, praktikusán kémcsövekben valósíthatók meg a kívánt változtatások az életet felépítő legjelentősebb makromolekulákban. Jól megtervezett mértékű, random változások alakíthatók ki a fehérjék szerkezetében, melyeket szelekciós események követnek. Ennek során kiválasztható a keletkezett molekulák közül a legoptimálisabb tulajdonságokkal rendelkező. Mivel az irányított evolúció iteratív módszer, azaz részfolyamatai ciklikusan ismétlődnek, újabb random szerkezeti változtatások és szelekciós lépések következnek, melyek eredményeképpen az előállított molekulák tulajdonságai ciklusról ciklusra egyre jobban közelítik az ideálisan várt termék tulajdonságait.

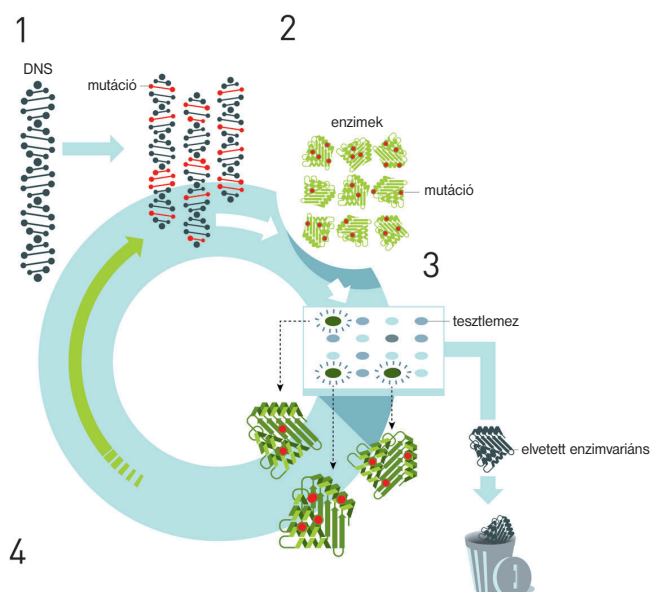
Az alaputatásban, de az ipari, elsősorban gyógyszeripari és biotechnológiai enzimfejlesztések során is gyakran alkalmazott megközelítés az irányított evolúció. Az így előállított enzimek képesek aktivitásukat megváltozott körülmények között is kifejteni, akár új szubsztrátokat felismerni, esetenként új kémiai reakciókat katalizálni. Ez a megoldás növelheti a katalízis hatékonyságát vagy környezetkímélő alternatívát jelenthet a hagyományosan fémeket vagy szerves katalizátorokat alkalmazó kémiai és biotechnológiai ipari folyamatok számára. Az irányított evolú-

ció azonban másra is jó: például adott molekulákat specifikusan megkötni képes kötőfehérjék esetében olyan variánsok létrehozását és azonosítását teszi lehetővé, melyek a kiindulási fehérjénél jelentősen nagyobb affinitással és szelektivitással képesek a célmolekulák megkötésére. A módszer segítségével azokat a fehérje szekvenciájában rejlő kritériumokat is azonosíthatjuk, melyek az optimalizált tulajdonságokért felelősek. Hasonló megközelítéssel valósítható meg terápiás célokra tervezett antitestek előállítása és karakterizálása is.

Frances H. Arnold vezetésével 1993-ban végezték az első, enzimek optimalizálásának céljából bevetett, irányított evolúciós eljárást. Az akkor még úttörőnek számító módszert azóta finomította, fejlesztette, és manapság már rutinszerűen használják új, környezetbarát katalizátorok, bioüzemanyagok, gyógyszerkészítmények létrehozására.

Manfred Eigen már 1984-ben felvázolta egy olyan munkafolyamat lehetőségét, ahol enzimek tökéletesített variánsai nem óriási molekulakönyvtárak előállításával és szűrésével, hanem több generációban képzett, kisebb könyvtárak segítségével optimalizálhatók egy tervezett, és irányított evolúciós „gépezet” révén. Egy évtizeddel később Frances H. Arnold sikeresen alkalmazta már a gyakorlatban is az Eigen által vázolt munkatervet, kontrollálta és felgyorsította az evolúciós folyamatokat. A szubtilizin E enzimet termelő baktériumokban irányított mutációk létrehozása révén olyan enzimvariánsot állított elő, mely rendkívül extrém, denaturáló körülmények között is aktív maradt. Négy szekvenciálisan alkalmazott, mutagenézisből és a kapott variánsok szűréséből álló ciklus után rendelkezésre állt a vad típusú fehérjénél 256-szor nagyobb aktivitást mutató enzimvariáns. Arnold részletesen bemutatta a módszer sikeréhez szükséges feltételeket. A leglényegesebb elemek közé sorolta a kiindulási en-

1. ábra. Az enzimek irányított evolúciójának lépései (www.nobelprize.org)





zimmolekula helyes megválasztását, a megfelelően tervezett DNS-szekvencia-könyvtár létrehozását, a legalkalmasabb szelekciós kritériumok kitűzését az optimális variánsok szűrésére. Felvetette azt is, hogy nem érdemes egy adott enzimet minden aminosav-pozícióban mutáltatni, hanem elsősorban az aktív centrum környékén, vagy pedig az attól távol eső, az enzimfehérje felszínén található aminosavak megváltoztatása vezet legnagyobb valószínűséggel az enzimaktivitás jelentős növekedéséhez. Arnold és munkatársai ezért arra is rávilágítottak, hogy a kialakítandó molekulakönyvtárat molekuláris és szerkezeti ismeretek birtokában kell megtervezni. Először tehát random mutációkat kell létrehozni az optimalizálni kívánt enzimet kódoló génben (1. ábra, 1). A mutációt hordozó géneket baktériumokba kell bejuttatni, melyek így random mutációkat hordozó enzimfehérjéket állítanak elő (1. ábra, 2). A keletkező enzimek tesztelése, szűrése következik, hogy kiválasszuk a leghatékonyabb variánst (1. ábra, 3). A többi, kevésbé hatékony, vagy nem a kívánt reakciót katalizáló variánssal nem dolgozunk tovább. Az első szelekció során kiválasztott variánsokat kódoló géneket újabb mutagenézisnek vetjük alá (1. ábra, 4), így megint új DNS-könyvtárat hozunk létre. Majd ismételt szűrés következik, melynek során az előző ciklusnál alkalmazottakhoz képest szigorúbb szelekciós kritériumok beállítása szükséges. Így ciklusról ciklusra a tervezett módon javul és tökéletesedik az enzimfehérje szerkezete és katalitikus működése. Ennek megfelelően Arnold az irányított evolúció gyakorlati megvalósításának vizsgálatára a szubtilizin enzimet választotta. Polimeráz-lánreakciót alkalmazott a random mutagenézis és a DNS-szekvencia-könyvtárak létrehozására. Az így generált variánsok közül a legoptimálisabbat az alapján választotta ki, hogy melyik volt képes a legnagyobb mértékben a kazein tejfehérjét hidrolizálni dimetil-formamid oldószer jelenlétében. A legaktívabb enzimvariánsokat termelő klónok DNS-ét izolálta, majd ismételt mutagenézisnek vetette alá azokat. A szubtilizin aktivitásának irányított evolúcióval történő optimalizálása kulcsfontosságú lépésnek bizonyult, és megnyitotta az utat más enzimek evolúciója előtt. A továbbiakban Arnold és munkatársai a *Bacillus subtilis* p-nitrobenzil-észteráz enzim olyan variánsait állították elő, melyeknek katalitikus aktivitása azonos, de hőstabilitásuk jóval nagyobb volt, mint a kiindulási variánsnak. De fejlesztettek olyan enzimeket is, amelyek az eredeti aktivitástól eltérő reakciókat katalizáltak, mint ahogy azt a *Pyrococcus furiosus* triptofán-szintetáz katalitikus doménjének irányított evolúciója is bizonyította, melynek eredményeképpen új triptofán-analógok előállítására válhatott lehetővé.

George Smith 1985-ben dolgozott ki egy bakteriofágokon, a baktériumokat fertőző vírusok alapuló, innovatív módszert fehérjék irányított evolúciójának megvalósítására.

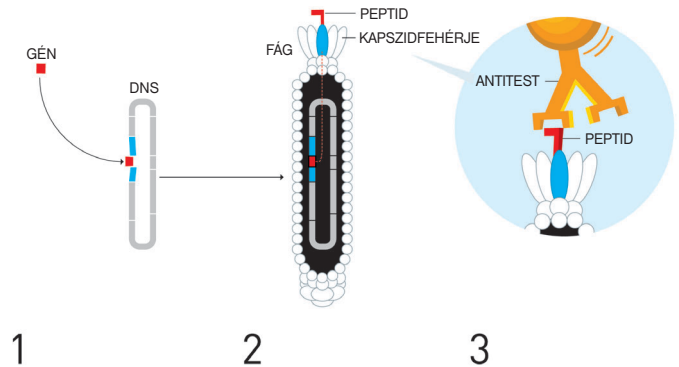
Sir Gregory Winter a fágbemutatást fejlesztette tovább, elsősorban gyógyszeripari alkalmazás céljából. Olyan antitesteket hozott létre, melyeket sikerrel alkalmaznak reumatoid arthritisz, pszoriázis és gyulladásos bélbetegségek kezelésére, toxinok hatásának semlegesítésére vagy áttétes rákos megbetegedések terápiaja során.

A két utóbbi díjazott kutató technológiai innovációja a fágbemutatás módszerét használja antitestek és bizonyos molekulákat specifikusan megkötni képes fehérjék irányított evolúciójára. Az 1980-as években, amikor George Smith bakteriofágokkal kezdett dolgozni, a DNS-technológiák még gyerekcipőben jártak, és a humán genomról meglehetősen kevés tudás állt rendelkezésre. Az már ismert volt, hogy a genom géneket tartalmaz, melyek a test fehérjéinek előállításához szükséges információt rejtik, ám akko-

riban egy adott fehérjét kódoló gén azonosítása rendkívül nehéz feladatnak bizonyult. George Smith ötlete az volt, hogy a gének azonosításához bakteriofágokat alkalmazzanak.

A fágok felépítése rendkívül egyszerű. Örökítőanyagukat, mely lehet RNS vagy DNS, fehérjékből álló kapszid borítja. A fág szaporodása során behatol a gazdasejtbe, virális genomja integrálódik a gazdasejt genomjába, annak segítségével sokszorozódik. A gazdaszervezetben felborul a nukleinsav-, és a fehérjeszintézis: a baktérium a virális fehérjék, többek között a kapszidot alkotó proteinek termelésére kényszerül.

Smith ötlete az volt, hogy a fágok működését ki lehetne használni ismert fehérjét kódoló ismeretlen gén azonosítására. Ekkor már óriási méretű molekulakönyvtárak álltak rendelkezésre, tele ismeretlen gének milliányi fragmentjével. Smith szerint ezeket a



2. ábra. A fágbemutatás lépései (www.nobelprize.org)

fragmenteket bele kell építeni a fág genomjába (2. ábra, 1), mégpedig a kapszidot alkotó egyik fehérje génjébe. Így ha a fágok szaporodnak, az ismeretlen gén fehérje- vagy peptidterméke a fág felszínén, a kapszid részeként kifejeződik (2. ábra, 2). Ez olyan fágkeveréket hoz majd létre, melynek mindegyik eleme különböző fehérjéket hordoz a felszínén. Ebből a keverékből specifikus antitestek segítségével kihorgászhatók az ismert fehérjéket hordozó egyedek (2. ábra, 3). A kihálászott fággal viszont hozzájuthatunk és azonosíthatjuk a fehérjét kódoló, eddig ismeretlen gént is. 1985-ben Smith egy restriktív endonukleáz enzim 57 aminosavból álló peptidrészt fág felszínén fejeztette ki, majd a fágkeverékből a peptidet hordozó fágot endonukleáz-specifikus antitest segítségével, affinitás-kromatográfiával kihálászta.

1988-ban vetette fel, hogy ha a fágok felszínén nagyszámú, random szekvenciával rendelkező peptidet fejeztetünk ki, akkor azonosíthatjuk az antitestek által felismert epitópokat. Hiszen a legtöbb antitest csak egy rövid, 5-6 aminosavból álló szegmenst ismer fel az antigén szekvenciájából.

Gregory Winter érdeklődését éppen ez keltette fel. Olyan új antitesteket szeretett volna előállítani, melyeket az immunrendszer tolerál, és rendkívüli szelektivitásuknak köszönhetően képesek bizonyos kóros állapotok előrehaladását megállítani. Smith munkája alapján feltételezte, hogy a fágbemutatás alkalmas módszer lehet a kérdés megoldására. Az antitestek epitóp-felismeréséért felelős szegmensét kódoló génfragmentet építette be a fág egyik kapszidfehérjéjének génjébe, így a fág felszínén kifejeződött az antitestnek ez a fehérjereszlete. Majd az antigént csaliként alkalmazva kihorgászta a keresett fágot 4 millió másik közül. Ezt követően Winter a fágbemutatás technológiáját alkalmazta az antitestek direkt evolúciójára, optimalizálására. Ehhez olyan fágkönyvtárat hozott létre, melyben a fágok az antitest fehérjeszegmensek milliárdnyi variációját hordozták, majd kihorgászta azo-



kat, amelyek a célfehérjéhez kötődtek. Ezután ezeket az első generációs antitesteket random módon tovább változtatta, és újabb fágkönyvtárat létesített. Ebben már olyan antitestek voltak, melyek még nagyobb affinitással kötődtek a célfehérjéjé.

Winter nevéhez fűződik például az adalimumab, a tumornekrozis faktor-alfa-elleni humán antitest kifejlesztése, mely első-

sorban autoimmun betegségek kezelésére alkalmas. De hasonló innovatív folyamatok eredményeképpen előállítottak már antitesteket, melyek metasztatikus daganatos betegségek egyes típusainak, a lupus, a reumathoid arthritisz, a gyulladásoos bélbetegségek vagy az Alzheimer-kór kezelésére nyújtanak terápiás megoldást.

Ormos Pál – Börzsönyi Ádám

■ MTA SZBK | pal.ormos@rbc.mta.hu

■ ELI-HU | Adam.Borzsonyi@eli-alps.hu

Nobel-díj a lézerfizikának

A 2018. évi fizikai Nobel-díjat Arthur Ashkin az optikai csipesz megalkotásáért és az eszköz biológiai rendszerekben való alkalmazásáért, Gérard Mourou és Donna Strickland a nagy intenzitású, ultrarövid lézerimpulzusok létrehozásának kidolgozásáért kapta.

Az indoklás szerint az idei kitüntetettek forradalmasították a lézerfizikát. Rendkívül kis, precíz eszközök megalkotásával új kutatási területek nyíltak meg nemcsak az orvostudományban, hanem az iparban is.

Az **Arthur Ashkin** által feltalált optikai csipeszek részecskéket, atomokat, vírusokat és más élő sejteket képesek megragadni lézernyaláb-„ujjaikkal”. Az alkalmazás a fény mechanikai hatásán alapul. Már 1619-ben észrevette Kepler, hogy az üstökösök csóvjája a nappal ellentétes irányba mutat, és úgy vélte, ez a fény nyomása miatt van így. Az elektromágnesség Maxwell-féle elmélete azután megmagyarázta, hogy az elektromágneses sugárzás nyomást fejt ki, és a nagyságát is pontosan megadta 1873-ban. Ekkor az is látszott, hogy a hatás makroszkopikus testek esetén, termikus fényforrásokból származó fényvel nagyon kicsiny, gyakorlati jelentősége igazából nincsen. Csak 1900-ban sikerült Pjotr Lebegyev orosz fizikusnak kísérletben kimutatni a jelenséget. A lézerek megjelenése nagy változást hozott. A lézerek tökéletesen fókuszálható fénysugarat produkálnak, és e „tankönyvi” nyalábok mikroszkopikus, a fény hullámhosszával összemérhető méretű testekre olyan erővel hatnak, amelyek mechanikai manipulációra: mozgatásra, csapdázásra alkalmasak. A jelenséget tehát a Nobel-díjas Ashkin, a Bell Laboratórium kutatója mutatta ki. A nevéhez fűződik az optikai manipuláció szinte minden fontos ágának leírása, bevezetése.

Az első lépés a dielektromos részecskék fókuszált fény általi mozgatása volt vízben és levegőben – erre 1970-ben került sor. A részecskék alapvetően a fény terjedésének irányában mozognak. Ashkin azt is kimutatta, hogy a terjedési irányba mutató ún. szórási erőn kívül fellép egy, a fényintenzitás gradiensének irányába mutató, ezért gradiensereőnek nevezett erő, amely a nyalábban tartja a környezeténél nagyobb törésmutatójú részecskéket. Ebben az 1970-es, forradalmi közleményben azt is megmutatta, hogy egymással szemben haladó fókuszált nyalábokkal a részecskék háromdimenziós csapdázása is megvalósítható. A csapdázás technikájában fontos mérföldkő a gyűjtőlencsés megoldás: elegendően nagy numerikus apertúrájú mikroszkóp-objektívekkel lehet olyan fókuszot létrehozni, amelyben a gradiensereő meghaladja a szórási erő nagyságát, vagyis csapdázás érhető el. Ezt 1986-ban közölték le. Jelenleg ez a kivétel a legszélesebb körben

használt elrendezés – bár más elrendezéseknek is van létjogosultsága.

Fizikusként először fizikai alkalmazások felé fordult a tudós érdeklődése. Igen hamar felvetette két rendkívül fontos fizikai alkalmazás lehetőségét: 1978-ban arról írt, hogy a lézer fénynyomása alkalmas atomok csapdázására. 1979-ben pedig azt vetette papírra, hogy a csapdázó fényvel lehetséges a csapdázott atomok megfelelő lassítása is, vagyis a direkt hűtés. Ez utóbbi hatás azon a szellemes ötleten alapul, hogy a csapdázó fény és a csapdázott atom rezonáns kölcsönhatását a részecske hőmozgása modulálja a Doppler-effektus révén, így több irányú csapdák frekvenciájának (hullámhosszáinak) megfelelő hangolásával elérhető, hogy a különböző irányból jövő fénynyalábok mind lassítsák a csapdázott atomot, vagyis hőmérsékletének a csökkenését eredményezték. E korai, atom- és molekulafizikára vonatkozó alkalmazások furcsa módon nem szerepeltek a Nobel-díj indoklásában. Valószínűleg ennek az az oka, hogy a két említett alkalmazásnak (a lézeres hűtésnek, ill. atomcsapdázásnak) két korábbi fizikai Nobel-díjban már kulcsszerepe volt. Az 1997-es fizikai Nobel-díjat S. Chu, C. Cohen-Tannoudji és W. D. Phillips kapták a lézeres atomcsapdázás és hűtés megvalósításáért. A lézeres hűtéssel sikerült egy mikrokkelvin foknál alacsonyabb hőmérsékletet elérni. Steven Chu korábban Arthur Ashkin munkatársa volt a Bell Laboratóriumban, nála ismerkedett meg az optikai csapdázással. Nem sokkal később, 2001-ben szintén rokon munkát jutalmaztak Nobel-díjjal: E. A. Cornell, W. Ketterle és C. E. Wieman érdemelték ki döntően a Bose–Einstein-kondenzátum létrehozásáért – e kísérletekben is kulcsszerepe van a lézeres csapdázásnak és hűtésnek. Még az 1920-as években posztulálta Bose és Einstein, hogy ha egy bozongáz atomjai nagyon lehűlnek, hullámfüggvényeik átfedésével újfajta anyagot képeznek, ez a Bose–Einstein-kondenzátum, és ezt sikerült létrehozniuk a kitüntetett tudósoknak. Tekintve, hogy e két említett korábbi Nobel-díj Arthur Ashkin „találalmán” alapult, a szakterület általános véleménye szerint neki is a kitüntetettek között kellett volna szerepelnie akár mind a két esetben.

Azt mondhatjuk, hogy a jelenlegi díj mintegy a korábbi mellőzések kárpótlása is – mindenesetre az idej Nobel-díj rá vonatkozó részében az indoklás a biológiai alkalmazásokat hangsúlyozza. Szerencsére az optikai csapdázás olyan nagy horderejű felfedezés, olyan széles körben alkalmazható különleges hatékonysággal, hogy a jelek szerint egy harmadik fizikai Nobel-díjat is generált. Ezek alapján a biológiai alkalmazás is Arthur Ashkin nevéhez köthető: ő ismerte fel először, hogy biológiai mikrorészecskék is