

O predpovediach vedeckých objavov¹

Lubomír Tomáška

"It's difficult to make predictions, especially about the future"
Niels Bohr (?)²

Na úvod krátky príbeh.³ Začína sa v roku 1993 v stredomorskom prístave Santa Pola na španielskej Costa Blanca. Francisco Mojica, vtedy doktorand na Univerzite v Alicante, dostal ako dizertačný projekt štúdium halofilného archeónu *Haloferax mediterranei*,⁴ u ktorého spolu so svojim školiteľom a ďalšími dvomi kolegami zistili, že vysoká koncentrácia soli v kultivačnom médiu vedie k zmene profilu reštrikčných fragmentov DNA tohto mikroorganizmu.⁵ Mojica sa podujal charakterizovať ich sekvencie. V prvom DNA fragmente, ktorý sekvenoval, objavil kuriozitu: niekoľko tandemových kópií palindromických sekvencií dlhých 30 párov báz, ktoré boli oddelené sekvenciami (*spacermi*) dlhými približne 35 párov báz. V tom čase tento typ repetícií nepripomínal nič, čo bolo známe v literatúre. Mojica výsledky spísal do publikácie, ktorú uverejnil časopis *Molecular Microbiology*.⁶

Vtedy 28-ročný Mojica sa rozhodol tieto záhadné repetície študovať detailnejšie. Zistil, že sa vyskytujú nielen u *Haloferax mediterranei*, ale aj u blízko príbuznej *Haloferax volcanii* aj u ďalších halofilných archeónov. Všimol si tiež, že v druhej polovici 80. rokov 20. storočia japonská skupina publikovala prácu, v ktorej bol zmieneny výskyt repetitívnych sekvencií u *Escherichia coli*, ktoré síce s tými u *H. mediterranei* a *H. volcanii* nevykazovali sekvenčnú podobnosť, ale v genóme boli organizované podobne ako u Mojicom študovaných halofilov.⁷ Na základe týchto výsledkov Mojica spísal publikáciu, v ktorej hypotetizoval, že tento typ repetícií u prokaryotov má zrejme nejaký funkčný význam.⁸ Po krátkom postdoktorálnom pobyte na University of Oxford, kde sa venoval inej problematike,⁹ sa Mojica vrátil do Alicante a aj k téme mysteriózneho typu tandemových repetícií u prokaryotov. V roku 2000 ich identifikoval u 20 rôznych mikroorganizmov včítane

¹ Úvodná prednáška na podujatí *V čom bude rok 2019 prelomový vo vede?*, 26. marec 2019, Vedecký park Univerzity Komenského v Bratislave. Akcia bola organizovaná skupinou študentov pod vedením Simony Veselej z Katedry genetiky Prírodovedeckej fakulty UK.

² Nie je jasné, kto je autorom výroku, podľa všetkého to bol Dán, možno pôvodne niekto v dánskom parlamente. Najčastejšie sa však pripisuje dánskemu fyzikovi Nielsovi Bohrovi (1885–1962); preto "?".

³ Prevzaté z Lander, E. (2016). The heroes of CRISPR. *Cell* **164**: 18–28.

⁴ V solárnom solivare v Santa Pola, južne od Alicante, bolo nájdených niekoľko druhov halofilných archeónov, napr. *Haloferax mediterranei*, *H. gibonsii*, *H. lucentense*, *Haloarcula hispanica*. Táto oblasť, v ktorej sa nachádza aj národný park Salinas de Santa Pola, je preto ideálna pre ich štúdium.

⁵ Juez, G., Rodríguez-Valera, F., Herrero, N., Mojica, F.J. (1990). Evidence for salt-associated restriction pattern modifications in the archaeobacterium *Haloferax mediterranei*. *J. Bacteriol.* **172**: 7278–7281.

⁶ Mojica, F.J., Juez, G., Rodríguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified *Pst*I sites. *Mol. Microbiol.* **9**: 613–621.

⁷ Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Nakata, A. (1987). 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.

⁸ Mojica, F.J.M., Ferrer, C., Juez, G., Rodríguez-Valera, F. (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. *Mol. Microbiol.* **17**: 85–93.

⁹ Superšpiralizácii prokaryotickej DNA *in vivo*.

Mycobacterium tuberculosis, *Clostridium difficile* a *Yersinia pestis*.¹⁰ Mojicove práce ukázali, že tieto repetície, pôvodne označené ako krátke pravidelne oddelené opakovania, resp. *short regularly spaced repeats* (SRSRs) [neskôr premenované na *clustered regularly interspaced palindromic repeats* (CRISPRs)] sú takmer univerzálne prítomné u prokaryotov. Aká je však ich funkcia? Pôvodne sa špekulovalo o ich úlohe v regulácii expresie génov, segregácii chromozómov, či oprave poškodení DNA, ani jedna z týchto hypotéz sa však nepotvrdila.¹¹

Mojica pokračoval v analýze CRISPR využívajúc relatívne primitívnu formu vyhľadávania ich podobností so sekvenciami, ktoré pridávali do databáz a všimol si pozoruhodnú vec. V CRISPR lokuse, ktorý našiel v niekoľkých kmeňoch *Escherichia coli*, identifikoval sekvenciu *spacera*, ktorý zodpovedal časti sekvencie fága P1. Podstatnou doplnkovou informáciou bolo, že všetky tieto kmene *E. coli* boli zároveň rezistentné k infekcii fágom P1. Za týždeň zanalyzoval sekvencie ďalších takmer 5000 *spacerov* a zistil, že 88 z nich je identických so sekvenciami časti genómov bakteriofágov, resp. plazmidov. To ho navedlo na myšlienku, že CRISPR predstavujú úložisko pamäťových (sekvenčných) stôp po infekciách fágmi, resp. transformácii plazmidmi a umožňujú prokaryotom realizovať adaptívnu imunitnú ochranu pred opätovnými infekciami a transformáciami. Na jeseň v roku 2003 napísal článok a poslal ho na posúdenie do časopisu *Nature*. V novembri dostal správu o jeho odmietnutí bez toho, aby editor poslal článok na review so zdôvodnením, že tento fenomén je už známy (sic!). V januári 2004 editor v *Proceedings of National Academy of Sciences USA* urobil to isté so slovami, že článok nie je originálny a dôležitý. Nasledovalo odmietnutie v ďalších "vysoko-impaktových" časopisoch. V roku 2005, rok a pol po napísaní prvej verzie, sa článok objavil v *Journal of Molecular Evolution* (IF₂₀₁₇=1,957).¹²

Dnes je Mojicov článok z 1. februára 2005 považovaný za jednu z najdôležitejších vedeckých publikácií prvej dekády 21. storočia. Stál pri zrode ikonickej CRISPR-Cas technológie, pomocou ktorej dnes vieme s jednonukleotidovou presnosťou modifikovať aj tak zložité genómy, ako je ten ľudský.¹³ Uvedomovala si túto dôležitosť vtedajšia vedecká komunita? Bolo evidentné, že ide o prelomový objav? A, nadväzujúc na ústrednú otázku v názve podujatia, bol tento objav očakávaný?

Musíme pokorne priznať, že nielenže nikto začiatkom roku 2005 nepredpokladal, že Mojica a jeho spolupracovníci objavia úlohu CRISPR v imunite prokaryotov a už vôbec nie, že bude mať take ďalekosiahle využitie v biomedicíne a biotechnológiách. V *Science* zo 17. decembra 2004 sú ako oblasti, ktoré treba sledovať v roku 2005 uvedené nové spôsoby farmakologickej intervencie s obezitou, project *HapMap* zameraný na

¹⁰ Mojica, F.J.M., Díez-Villasenor, C., Soria, E., Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.* **36**: 244–246.

¹¹ Pre historický prehľad pozri Mojica, F.J.M., Garrett, R.A. (2012). Discovery and seminal developments in the CRISPR field. In: CRISPR-Cas Systems, R. Barrangou and J. van der Oost, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–31.

¹² Mojica, F.J.M., Díez-Villasenor, C., Garcia-Martínez, J., Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* **60**: 174–182.

¹³ Lander, E. (2016). The heroes of CRISPR. *Cell* **164**: 18–28.

mapovanie haplotypov vo vybraných ľudských populáciách a autofágia.¹⁴ [pritom, podčiarkujúc hlavný odkaz textu, zásadné práce Yoshinuri Ohsumiho o autofágii, za ktoré získal Nobelovu cenu v roku 2016, boli publikované už začiatkom 90. rokov 20. storočia]¹⁵. Dokonca, ani pri spätnom hodnotení roku 2005 sa Mojicova práca neobjavila vo výberoch toho najdôležitejšieho, čo sa vo vede v tomto roku odohralo. V *Science* z 23. decembra 2005 bola v každoročnej ankete *Breakthrough of the Year* za víťaza vyhlásená skupina prác, ktoré využili vtedajšie genomické nástroje na štúdium evolúcie.¹⁶ V ďalšom poradí (v biológii) boli vyzdvihnuté práce popisujúce molekulárne mechanizmy kvitnutia u rastlín, genetickej podstaty niektorých ochorení mozgu, či štruktúry proteínového kanála pre draslík.¹⁷ Ani s citačným ohlasom na prácu Mojica a kol. (2005) to nevyzeralo oslnivo. V roku 2005 získala 3 citácie, v roku 2006, 10, v roku 2007 12, v 2008 18, v 2009 19. Nič nenasvedčovalo tomu, že sa z nej stane jedna z najcitovanejších prác v mikrobiológii¹⁸...ale až s odstupom niekoľkých rokov. A áno, CRISPR-Cas sa stala *Breakthrough of the Year*, ale až v roku 2015, teda 10 rokov po Mojicovom objave.¹⁹

Tento príbeh je typický pre prelomové objavy. Dôkaz, že DNA nesie gény, priniesla publikácia v roku 1944,²⁰ ešte koncom 50. rokov 20. storočia však neexistovala zhoda, že to je skutočne univerzálny fenomén. Watson s Crickom síce publikovali svoj model dvojzávitnicovej štruktúry DNA na prvý pokus v *Nature* v roku 1953,²¹ veľký ohlas však táto práca bezprostredne po jej vydaní nezískala.²² Barbara McClintock popísala mobilné genetické elementy (dnes známe ako transpozóny) v roku 1950,²³ niekoľko dekád bola jej publikácia viac-menej ignorovaná. Napriek tomu, že v týchto i mnohých ďalších prípadoch si práce mohli prečítať tí najkompetentnejší ľudia, neodhalili hneď ich dôležitosť. Ak nie sme schopní okamžite odhaliť význam už publikovaných výsledkov, ktoré sa s odstupom času ukážu byť prelomovými, dokážeme ich predikovať *a priori*? Alebo inak, je v tomto kontexte opodstatnené zamýšľať sa nad otázkami typu, aké objavy môžeme očakávať v najbližšom období?

A predsa, zvlášť na akademickej pôde majú diskusie o tom, čo dôležité nás čaká v nasledujúcich mesiacoch, či rokoch, veľký význam. Ako inak by bolo možné naplánovať si vedecký projekt, ktorý má potenciál priniesť dôležité výsledky? Autor/ka takého projektu musí vedieť, aké dôležité otázky v oblasti,

¹⁴ <http://science.sciencemag.org/content/306/5704/2014.full>

¹⁵ Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* **119**: 301–311; Tsukada, M. Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **333**: 169–174.

¹⁶ <http://science.sciencemag.org/content/310/5756/1878.full>

¹⁷ <http://science.sciencemag.org/content/310/5756/1880.1.full>

¹⁸ podľa *Web of Science* mala práca k 18. marcu 2019 663 citácií; <http://apps.webofknowledge.com>

¹⁹ <https://www.sciencemag.org/news/2015/12/and-science-s-2015-breakthrough-year>

²⁰ Avery, O.T., MacLeod, C.M., McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III". *J. Exp. Med.* **79**: 137–158.

²¹ Watson, J.D., Crick, F.H.C. (1953). Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**: 737–738.

²² Judson, H.F. (1996). *The Eighth Day of Creation. Makers of the Revolution in Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

²³ McClintock, B. (1950), The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **36**: 344–355.

ktorej sa venuje, nie sú zodpovedané, ktoré sú hlavné výzvy, aké medzery pre adekvátne porozumenie nejakého fenoménu je potrebné zaplniť. Každý vedec musí vedieť, čo o fenoméne, ktorý študuje, vieme a čo sa dozvedieť potrebujeme. Na základe týchto indícií je možné s istou dávkou odvahy predpovedať, ktoré medzery v poznaní budú doplnené a v akom časovom horizonte.

Na univerzitnej pôde má kladenie si takýchto otázok ešte ďalší rozmer. Slovami Mikuláša Koperníka: "Vedieť, čo vieme, že vieme a vedieť, čo vieme, že nevieme, to je pravá podstata vzdelania." Je na škodu veci, že tento pohľad na vzdelávanie viac nerezonuje v didaktike prírodných i spoločenských vied. Tá sa na všetkých stupňoch škôl takmer výlučne sústreďuje na prezentáciu známych faktov. Zmyslom vedy pritom nie je katalogizovanie existujúcich poznatkov, ale hľadanie aktuálne neznámych odpovedí na otázky týkajúce sa fungovania sveta.

Tento aspekt vedy je vo vzdelávaní chronicky zanedbávaný. Pritom môže byť dôležitým motivačným nástrojom ku kreatívnemu mysleniu. S týmto argumentom neurobiológ Stuart Firestein vedie na Kolumbijskej univerzite v New Yorku kurz s názvom *Ignorancia*.²⁴ Na prednášky pozýva prominentných vedcov, aby študentom povedali nie to, čo vedia, že vedia, ale to, čo vedia, že nevedia. Študentom tak poskytujú možnosť nahliadnuť do neznámych zákutí a pripraviť ich na úlohu budúcich výskumníkov.

Otázka, ktorá zastrešuje dnešné podujatie je tak dôležitá pre každého, kto chce zvýšiť šancu na to, že jeho/jej výskum bude skôr, alebo neskôr vedeckou komunitou vyhodnotený ako dôležitý. Odpovede na ňu sú do veľkej miery individuálne a závisia od osobných preferencií, záujmov, zamerania, špecializácie. Napriek obsahovej heterogenite by však mali mať jednu spoločnú vlastnosť: "Kto chce dospieť k dôležitým výsledkom, musí sa venovať štúdiu dôležitých problémov", píše nositeľ Nobelovej ceny Peter Medawar vo svojej knižke *Advice to a Young Scientist*, a pokračuje: "Nudné alebo zbytočné problémy vedú k nudným alebo zbytočným odpovediam. Nestačí, ak je problém 'zaujímavý' – takmer každý problém môže byť zaujímavý, ak je študovaný do patričnej hĺbky, neznamená to však zároveň, že je dôležitý".²⁵ Medawar uvádza príklad tohto typu výskumu, ktorý sa neoplatí robiť. Predstavte si doktoranda na zoológii, ktorý chce zistiť dôvod, prečo 36 percent morských ježoviek má na dorzálnej časti čiernu škvrnu. Toto nie je dôležitá otázka, hoci je zaujímavá. Zaujímavá je však iba pre dvoch ľudí, pre samotného študenta a pre jeho kolegu z vedľajšieho laboratória, ktorý chce zistiť, prečo 64 percent morských ježoviek nemá na dorzálnej časti čiernu škvrnu. Ide o imaginárny príklad, pretože morské ježovky nemajú na tele žiadnu škvrnu. Ilustruje však hlavnú Medawarovu pointu: *problém je dôležitý, ak na odpovedi skutočne záleží*.²⁶

²⁴ O svojom koncepte napísal aj knihu: Firestein, S. (2012). *Ignorance: How It Drives Science*. Oxford University Press.

²⁵ "It can be said with complete confidence that any scientist of any age who **wants to make important discoveries must study important problems**"; Medawar, P.B. (1979). *Advice to a Young Scientist*. Basic Books, str. 13.

²⁶ "...such that it matters what the answer is" *ibid*.

Vedieť čo vieme (t.j. poznať *známe známe*) a vedieť, čo nevieme (t.j. poznať *známe neznáme*) je základom pre to, aby sme vedeli odhadnúť, čo je dôležité v Medawarovom ponímaní. Zároveň je však základným predpokladom pre tie najdôležitejšie objavy, pre ktoré platí, že nevieme čo nevieme (t.j. *neznáme neznáme*).²⁷ Pokrok v našom poznaní nie je výsledkom premysleného procesu, pri ktorom spejeme k vopred stanoveným cieľom. Veda napreduje nepredikovateľným smerom a tie najzaujímavejšie objavy sú výsledkom nečakaných šťastných náhod. Je to, parafrázujúc známy citát, ako hľadanie čiernej mačky v tmavej miestnosti, pričom v miestnosti mačka vôbec nemusí byť.²⁸

Pravdaže, vzdelanie má v prvom pláne za cieľ poskytnúť študentom obraz o našej aktuálnej predstave o fungovaní sveta. Jeho pointou by však malo byť dávať im aj kľúče od tmavých izieb našej ignorancie, a tak ich pripraviť na vzrušujúcu, nevyspytateľnú cestu k redukcii našej nevedomosti, k schopnosti rozpoznať dôležitosť zistenia, ktoré môže byť v prvom pláne bezvýznamné; tak ako sa zdalo editorom pri posudzovaní Mojicovej práce z roku 2005.

Úspech vedca spočíva v schopnosti rozpoznať dôležitosť informácie, ktorú pri tomto pátraní, často náhodne, získa. Mojica nemohol tušiť, že pri prehľadávaní sekvencií CRISPR lokusov u kmeňov *E. coli* narazí na podobnosť s genómom fága P1. Adaptívna imunitná odpoveď prokaryotov prostredníctvom CRISPR-Cas bola ešte v roku 2003 *neznámou neznámou*. Význam jej odhalenia, aj vďaka neočakávateľnosti tohto objavu, bol rozpoznaný až s relatívne dlhým časovým odstupom. Ak by však Mojica nehľadal odpoveď na dôležitú otázku, *čo vieme, že nevieme* o funkcii CRISPR u mikroorganizmov, nikdy by nedospel k objavu, ktorý bol principiálne nepredikovateľný.

Úvodný Mojicov príbeh ilustruje, že často o dôležitosti objavu nevieme ani keď ho máme priamo pred očami. “*Research is to see what everybody has seen and think what nobody has thought*”,²⁹ povedal pred rokmi Albert Szent-Györgyi. Je úlohou vzdelávacích inštitúcií mladých ľudí stimulovať v nekonformnom uvažovaní a interpretácii dostupných faktov. Je úlohou učiteľov takýmto spôsobom zvýšiť šance, že ich študenti budú výraznou mierou participovať na objavoch, ktoré sú dnes ešte *neznámymi neznámymi*. Každý jeden prípad, keď sa tak stane v roku 2019, zvlášť na Univerzite Komenského, oslavujúcej 100. výročie založenia, bude možné považovať za prelomový.

²⁷ Táto slovná hračka je známa už dlho; v roku 2002 ju preslávil predovšetkým vtedajší minister obrany Donald H. Rumsfeld, keď na brífingu odpovedal na otázky ohľadom dôkazov o tom, že Irak vlastní zbrane hromadného ničenia; <http://archive.defense.gov/Transcripts/Transcript.aspx?TranscriptID=2636>

²⁸ Citát býva pripisovaný rôznym ľuďom, napr. Charlesovi Darwinovi.

²⁹ Opäť nie je jasné, kto je pôvodným autorom tohto výroku. Často sa pripisuje maďarskému biochemikovi Albertovi Szent-Györgyimu (1893–1986), pôvodne (aj keď v mierne odlišnej forme) ho však mal napísať nemecký filozof Arthur Schopenhauer (1788–1860).