

Jak se přepisuje genetická informace v buňkách

Kornbergovi
mají druhou Nobelovu cenu

VLADIMÍR
VONDREJS

Doc. RNDr. Vladimír Vondrejs (*1937) vystudoval fyzikální chemii na Přírodovědecké fakultě UK v Praze. Na katedře genetiky a mikrobiologie této fakulty se zabývá především genovými manipulacemi kvasinek.

ROGER DAVID KORNBERG /*24. 4. 1947 v St. Louis, Missouri/ Narodil se Sylvě a Arthuru Kornbergovým jako první ze tří dětí. Roku 1967 ukončil studium na Harvardově univerzitě v Bostonu, doktorandské studium absolvoval r. 1972 na Stanfordově univerzitě a jako postdoktorand působil v Ústavu molekulární biologie Lékařské výzkumné rady Británie v Cambridži. Poté pracoval na Lékařské fakultě Harvardovy univerzity a od r. 1978 je na Stanfordově univerzitě. Externě přednáší na Hebrejské univerzitě v Jeruzalémě. Je členem americké federální Akademie věd a také americké Akademie věd a umění.

Rodinné klany se ve vrcholné vědě a umění objevují dosti často. Příkladem u nás jsou Purkyňovi a Wichterlovi v obou odvětvích tvůrčí činnosti, Mánesovi speciálně v malířství, Heyrovští v přírodních vědách. Pravděpodobnost, že otec i syn dostanou Nobelovu cenu, není nijak velká. Např. Braggovi (otec a syn) se roku 1915 podělili o cenu za výzkum krystalů pomocí X-paprsků a r. 2006 přidal Kornberg syn Nobelovu cenu za chemii k otcově ceně za fyziologii nebo medicínu z r. 1959. V celé historii Nobelových cen je to šestý případ, kdy toto prestižní ocenění dostali otec a syn. Ani v tomto případě nepadlo jablko daleko od stromu. Arthur Kornberg (otec) se podílel na ceně za objevení mechanismu biologické syntézy RNA a DNA (spoluoceněný Severo Ochoa se zasloužil o syntézu ribonukleové kyseliny). Kornbergův syn navázal cenou za poznání molekulárních základů transkripce u eukaryotických organismů. Roger D. Kornberg, profesor strukturální biologie na Stanfordově univerzitě, proslavil univerzitu, na níž „profesoroval“ už jeho otec. Rok 2006 byl vůbec dobrý jak pro Stanford, tak pro RNA. Vždyť jeden ze dvou pionýrů interference RNA Andrew Fire, který spolu s Creigem Melloem získal Nobelovu cenu za fyziologii nebo medicínu (2006), pracuje na téže univerzitě.

Stojí jistě za zmínku, že Kornberg přispěl zásadním způsobem také k pochopení struktury komplexu zvaného chromatin, uvnitř něž se DNA snoubí s proteiny. „V souvislosti s touto etapou práce mohl Kornberg sdílet i Nobelovu cenu za výstavbu a dynamiku chromatinu,“ řekl Andrew Travers z Ústavu molekulární biologie Lékařské výzkumné rady Británie v Cambridži, kde Roger Kornberg pracoval v letech 1972–1975.

Vzpomínám, jako by to bylo dnes, jak jsme byli u vytržení, když se vedoucí naší katedry doc. L. Stárka vrátil z Pasteurova ústavu v Paříži, kde se setkal s objeviteli mechanismu regulujícího transkripci F. Jacobem a J. L. Monodem. Přednesl tehdy nezapomenutelnou nadšenou přednášku, kterou začal přibližně těmito slovy: „Právě se podařilo pochopit, podle jakých pravidel se řídí regulace transkripce u *Escherichia coli*. A co platí pro bakterii, platí na molekulární úrovni pravděpodobně i pro slona.“ Jak horlivě jsme tehdy přitakávali. Profesor Kornberg a další nás však poučili, že naše nadšení bylo předčasné. Eukaryotické buňky se svými mnohem většími promotory, na kterých se vytvářejí složi-

té komplexy různých transkripčních faktorů s RNA-polymerázou a dále úseky DNA, takzvané zesilovače a zeslabovače transkripce, na nichž se shlukují další regulační proteiny – to vše jsou součástky složité mašinerie rozhodující o tom, jak se jednotlivé geny v průběhu diferenciaci buněk a pod různými vnějšími vlivy projeví. Zatímco bakterie mají jedinou transkriptázu, eukaryota jsou vybavena skupinou tří enzymů s touto aktivitou. A to nemluvíme o komplexnosti celého aparátu, který podléhá velmi složité regulaci v závislosti na buněčném cyklu, ontogenetickém vývoji, příslušnosti buňky k orgánu, respektive tkáni, a také na vnějších vlivech. Prostě rozdíl mezi prokaryotickými a eukaryotickými organizmy jsou dramatické.

Kornberg vzbudil obrovský obdiv, když r. 2001 publikoval momentku, na níž byla transkripce zachycena v úžasném molekulárním detailu – v okamžiku, kdy RNA-polymeráza ve spojení s DNA připojila nukleotid k narůstajícímu řetězci právě syntetizované RNA a zastavila se jakoby v údivu: „Kde se zastavil přísun dalších stavebních kamenů?“ Přesně to Kornberg zamýšlel, když vynechal jeden stavební blok a zastavil proces syntézy RNA. Překvapené molekulární komplexy pak nechal krystalizovat a strukturu transkripční „strojovny“ v akci analyzoval pomocí paprsků X na úrovni rozlišení 0,33 nm. Tuto slavnou momentku ukázal 7. prosince 2001 v Karolinském institutu ve Stockholmu publiku nobelovského sympozia při své přednášce „Transkripce eukaryotických genů na úrovni atomového rozlišení“ a vysloužil si potlesk. Jde jistě o efektní výsledek, který prý sám autor považuje za významný, ale popravdě řečeno ostatní jeho výsledky, které osvětlují, co se děje na DNA, než se transkripce zahájí, a co se odehrává, když pokračuje, přinášejí informace neméně důležité.

Podobně jako slavní housloví virtuozové nezapomněl ani Kornberg při tiskové konferenci v Clarkově auditoriu (v Lékařském centru Stanfordovy univerzity) 4. 10. 2006, kde se dověděl o svém úspěchu, polaskat slovy uznání svůj nástroj, obří synchrotron (v uni-

1) V nich kultivovali své mutanty poškozené v jednotlivých krocích regulačního procesu a díky geniálnímu interpretacím rozdílů v jejich chování byli schopni pospat základní zákonitosti tohoto nesporně superzávažného procesu.

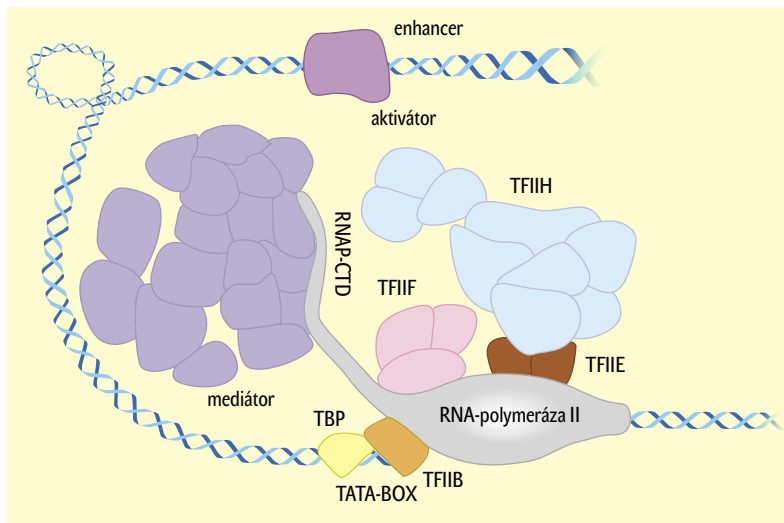
2) Čtenáře, kteří chtějí své poznatky o výsledcích dosažených Kornbergovou skupinou prohloubit, odkazují na čtení článků FEBS Lett. 579, 899–903, 2005, Trends Biochem. Sci. 30, 235–239, 2005, Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry 2006 a také na výukový film včetně trojrozměrné animace o transkripci <http://www.dnalc.org/home.html>.

verzitním Centru lineárního urychlovače). Díky tomuto zařízení mohl se svými spolupracovníky pomocí paprsků X zmapovat nadmolekulární komplexy a detailní strukturu molekuly samotné RNA-polymerázy, která je vystavena přibližně z 30 000 atomů. Další uznání patřilo vysokorychlostním počítačům, bez nichž by vyhodnocení experimentálních dat nebylo možné.

Tyto informace mi připomněly několikaleté období mého života, které jsem věnoval závažnému fyzikálnímu biologii na Matematicko-fyzikálních fakultách v Praze a v Košicích. Při setkání s fyzikou jsem měl největší práci s tím, abych studentům vysvětlil, že biologie je sice mnohem méně exaktní než fyzika, ale přesto dnes přináší ty nejzávažnější objevy, které na rozdíl od fyziky nevyžadují čím dál komplikovanější a nákladnější přístroje. Uváděl jsem jako příklad objevy nobelistů F. Jacoba, J. Monoda a A. M. Lwoffa, kteří vnikli do tajů mechanismů, jež regulují transkripci u bakterií, za pomoci jednoduchých termostatů.¹ Zdá se, že doba, kdy biologové byli schopni objevů za pomoci jednoduchých a nepřilíš nákladných prostředků, pozvolna končí a budoucnost začíná patřit velkým, špičkově vybaveným týmům. Individuální výzkumné dobrodružství v malých laboratořích se prosazuje vzácněji a vzácněji.

Které hlavní kroky vedly Kornberga k úspěchu: Na začátku bylo nutné překonat závažný problém. Na rozdíl od mnoha jiných enzymů včetně bakteriální RNA-polymerázy se nedařilo purifikované eukaryotické enzymy přinutit, aby pracovaly mimo buňku, ve zkuševce. Když se Kornberg vrátil z Cambridge na Stanfordskou univerzitu, vybral si jako model pekařskou kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*, u níž se mu podařilo vytvořit systém obsahující kromě purifikované RNA-polymerázy obecné transkripční faktory (TFIIB, E, F, H) a protein TBP (sekvenci TATA vázající protein-TATA-binding). Všechny tyto složky dohromady byly schopny bez aktivátorů zajistit bazální hladinu transkripce na DNA *in vitro*. Na počátku devadesátých let se Kornbergovu týmu podařilo ukázat, že kromě obecných faktorů se na syntéze podílí proteinový komplex, který se označuje jako „Mediátor“ (obr. 1). Úkolem tohoto komplexu je přenášet signály z pozitivně i negativně působících genově specifických transkripčních faktorů na komplex RNA-polymerázy II s obecnými faktory. Zatímco krystalografické studie struktury dílčích komplexů byly poměrně snadné, popis celé mašinérie byl vzhledem k její rozsáhlosti a nestabilitě tvrdým oříškem, který si prý vyžádal zhruba 20 let práce na proteinové expresi a purifikaci složek a na vývoji speciálních technik pro přípravu proteinových krystalů na lipidových površích. Zlomem v této oblasti byly práce publikované v roce 2001, které jsou reprezentovány schématem funkčního komplexu (obr. 2).

V řadě návazných publikací byly popsány struktury dalších funkčních komplexů v různých stádiích činnosti RNA-polymerázy, které umožnily popsat dynamiku práce tohoto enzymu v rámci nadmolekulárního komple-



xu. Tím způsobem se podařilo do značných podrobností popsat, jak se tvoří iniciační komplex včetně abortivní iniciace, jak je rozeznáván promotor, jak je promotor opuštěn, jaká je dynamika translokace včetně oddělování řetězců DNA, jak narůstá řetězec RNA a zařazuje se správný nukleotid a jak se opět spojují řetězce DNA po dokončení transkripce daného úseku. Protože RNA-polymerázy a řada členů transkripčního aparátu kvasinek jsou vysoce homologní s odpovídajícími členy aparátu savců, lze předpokládat velkou podobnost mezi mechanismy transkripce na úrovni jemných pohybů částí molekul aparátu ve všech eukaryotických buňkách včetně lidských. Navrhovatelé se shodli na tom, že detailní poznání transkripčního procesu je důležité nejen z hlediska základního výzkumu, ale také například pro aplikace založené na kmenových buňkách, pro boj s rakovinou a s řadou dalších chorob, které nás postihují.²

Na závěr se obrátím aspoň stručně k svým milovaným kvasinkám (viz Vesmír 84, 198, 2005/4): Vám nikdo nepoděkoval! My si však uvědomujeme, že bez vás by to pan profesor Kornberg nedokázal.

1. Iniciační komplex pro eukaryotickou transkripci: RNA-polymeráza II, obecné iniciační faktory, mediátor, specifický faktor na enhanceru a dvojšroubovice DNA.

2. Struktura transkripčního komplexu: RNA-polymeráza II (bílá se zeleným přemostěním), DNA (modrá), atom kovu v aktivním centru enzymu (červená kulička), syntetizovaná RNA (oranžová).

