

„Směrovací číslo“ v bílkovině

Strukturní signální informace
v sekvenci aminokyselin

IVAN RAŠKA

NOBELOVA CENA ZA CHEMIÍ

V úterý 12. října ráno na mne v počítači čekal e-mail: „Asi už to víte. Ale přesto, šéf dostane Nobelovu cenu! Fantastické!“ Günter Blobel patří mezi špičkové vědce v molekulární buněčné biologii, navíc se v posledních letech věnuje problematice buněčného jádra. Patří k průkopníkům, kteří přeměnili buněčnou biologii v molekulární buněčnou biologii. Nobelova cena mu byla udělena za předpovězení a důkaz toho, že bílkoviny v sobě nesou strukturní signální informaci, která je obsažena v sekvenci několika aminokyselin a předurčuje, že bílkovina je buď dopravena na správné místo uvnitř buňky, nebo je sekretována. V analogii se mluví o signálu v podobě poštovního směrovacího čísla, který zaručí, že „zásilka“ (bílkovina) je doručena do Rybitví a ne do Dějvic.

Vznik Rockefellerovy univerzity v New Yorku, kde G. Blobel působí, se datuje 1901. Tehdy byl založen „Rockefellerův ústav lékařských studií“, první americké výzkumné biomedicínské centrum. S univerzitou je spjatý již 20 nobelistů, z nichž 5 zde nyní pracuje. Uprostřed velkoměsta je tato univerzita oázou klidu pro soustředěnou vědeckou práci. Vše je uděláno pro to, aby vědečtí pracovníci nebyli zatěžováni administrativním ani jiným balastem. Každý měsíc zde proběhne více kvalitních biomedicínských seminářů než u nás za celý rok.

G. Blobel přišel do Paladeovy laboratoře Rockefellerovy univerzity ještě před sklonkem zlatého věku elektronové mikroskopie, kdy se tímto způsobem podařilo stanovit funkci buněčných organel. Mimochoodem, ribozomy se původně nazývaly Paladeho granula. Palade (zavedl vhodné fixace pro buňky a tkáně) spolu s Porterem (jehož ultramikrotomy umožnily nakrájet dostatečně tenké řezy pro elektronovou mikroskopii) mohli konstatovat velmi důležitý fakt. Buněčná architektura byla všude stejná, ať již v hepatocytu nebo v neuronu, nicméně elektronmikroskopický popis byl značně statický. Pro dynamický popis se právě na Rockefellerově univerzitě začaly používat biochemické přístupy. Z té doby pocházejí důležité práce o sekreci proteinů, které v sobě již obsahují dynamické prvky. Tyto objevné práce popsaly principy transportu nově syntetizovaných proteinů od endoplazmatického retikula až po extrabuněčný prostor.

Do tohoto stimulačního prostředí Rockefellerovy univerzity přišel G. Blobel se zásadními a zcela originálními myšlenkami o důležitosti membrán. Dnes je sice každý z nás generálem, ale jak a proč vznikly membrány před miliardami let? Buňka obsahuje „od-

dělení“ ohraničená membránou (kompartmenty) či organely, jako je jádro, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát apod. Každý takový kompartment plní specifické úkoly. Buněčné jádro je rezervoárem genetické informace uložené v molekule DNA, určité segmenty DNA, geny, jsou přepisovány do mRNA, jež je transportována do cytoplazmy a na cytoplazmatických ribozomech (tj. továrnách na bílkoviny) je genetická informace uložená v mRNA v podobě sekvence nukleotidů přeložena do bílkoviny s odpovídající sekvencí aminokyselin. Mitochondrie jsou buněčné elektrárny, které buňku zásobují energeticky bohatými metabolity. Specifické úkoly jsou v buňce zprostředkovány specifickými bílkoviny. Některé bílkoviny (strukturní) jsou stavebními kameny buňky, jiné provádějí specifické enzymatické reakce. Různých bílkovin jsou však v buňce desetitisíce. Jsou ale také mechanismy, které umožní, že se enzymy produkující energeticky bohaté metabolity nacházejí v mitochondriích a enzymy provádějící přepis DNA do mRNA jsou v jádře?

Blobelova geniální myšlenka spočívala v tom, že nahlížel na směrovací signál proteinů jako geneticky zakódovaný. Navázal na práce laboratoře o sekreci proteinů. Na rozdíl od bílkovin potřebných pro buňku samotnou, které jsou zpravidla syntetizovány na volných ribozomech v cytozolu, jsou proteiny určené k sekreci syntetizovány na ribozomech vázaných na endoplazmatické retikulum, přičemž syntetizovaný polypeptid je translokován skrze membránu retikula do jeho lumen. V r. 1971 Blobel spolu se Sabatinim vyslovil předpoklad, že pro přemístování úseku musí proteiny obsahovat strukturní informaci v NH₂-terminální sekvenci polypeptidu (tj. části proteinu, která je syntetizována jako první), viz obr. na s. 2 dole.

Blobel vyvinul přístup *in vitro*, používající izolovanou mikrozomální membránovou frakci, v němž mohl standardně provádět translokaci a detailní biochemickou analýzu. Jeho přístupy se staly standardem i pro jiné vědecké týmy. Na podobných principech se mohly později studovat translokace proteinů u mitochondrií, chloroplastů či peroxizomů, ale také bakterií. Spolu s dr. Dobbersteinem r. 1975 původní hypotézu rozšířil – částečně stanovil pořadí aminokyselin v signální sekvenci u několika nezralých (prekurzorických) proteinů určených pro sekreci. Tato signální hypotéza počítala s existencí kanálu v endoplazmatickém retikulu, skrze který je syntetizující se polypeptid translokován. Během následujících 20 let Blobel se svými spolupracovníky plně potvrdili signální hypotézu a v molekulárních termínech charakterizovali jednotlivé kroky příslušných procesů. Hypotéza se ukázala být univerzální, neboť zúčastněné mechanismy byly stejné v buňkách kvasinek, rostlin i živočichů.

V r. 1977 G. Blobel prokázal, že stromální protein chloroplastu, jehož kódující gen je umístěn v jádře, je syntetizován jako prekurzorický polypeptid obsahující dočasně signální směrovací sekvenci pro chloroplast. O rok později poprvé prokázal, že integrální protein membrány obsahuje v NH₂-konci polypeptidického řetězce sekvenci, která je strukturním i funkčním ekvivalentem signální sekvence u proteinů určených pro sekreci. Rovněž *in vitro* vyvinul translokační systém u bakterií. Prokázal v něm, že membránový protein je součástí membrány a identifikoval bakteriální pepti-

Prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc., (*1945) vystudoval Přírodovědeckou fakultu Univerzity v Ženevě. V Ústavu experimentální medicíny AV ČR a Laboratoři genové exprese 3. LF UK v Praze se zabývá buněčnou biologii, zejména integrací procesů replikace DNA a syntézy a vyzrání RNA do jaderné architektury.

dázu štěpící signální sekvenci. Na sklonku 70. let prokázal, že mRNA kódované jadernými geny pro proteiny mitochondriální matrix jsou v cytozolu přeloženy do prekurzorických proteinů a vyvinul první systém *in vitro* pro sledování importu proteinů do mitochondrií. V tomto systému zdokumentoval syntézu prekurzorického lyzozomálního proteinu a jeho translokaci do mikrozomálních měchýřků. Určil celou primární strukturu signální sekvence stromálního proteinu chloroplastů.

V r. 1980 formuloval obecnou hypotézu vnitrobuněčného pohybu proteinů a biogeneze membrán a navrhl koncepci topogenických signálů (obr. 2). Izoloval a charakterizoval protein rozpoznávající signální sekvenci v proteinech translokovaných přes endoplazmatické retikulum, který nazval *signal recognition protein* (SRP) a postuloval existenci receptoru pro tento protein v membráně. Určil primární strukturu signální sekvence u lyzozomálního proteinu.

V r. 1982 prokázal, že SRP je součástí komplexu skládajícího se ze 7S RNA a šesti různých proteinů. SRP je od té doby zkratkou pro *signal recognition particle*. Identifikoval receptor pro SRP z mikrozomálních membrán. Určil primární strukturu signální sekvence pro proteiny importované do mitochondrií pomocí cDNA klonování. V r. 1983 prokázal, že funkce SRP receptoru spočívá v uvolnění signální sekvence od SRP a uvolnění SRP z ribozomu.

V druhé polovině 80. let izoloval proteinový komplex navázaný na membránu endoplazmatického retikula a skládající se ze šesti polypeptidů, který vykazoval peptidázovou aktivitu vůči signální sekvenci. Identifikoval receptor pro signální sekvenci proteinů importovaných do chloroplastů a izoloval bakteriální protein vyvazující signální sekvenci u presekretorických proteinů v bakteriích.

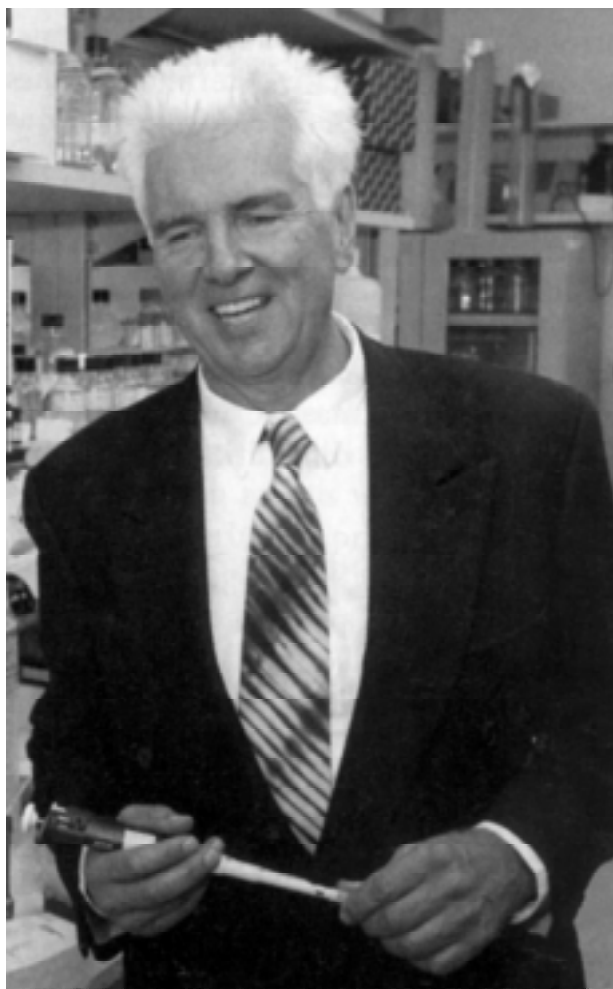
V 90. letech vytvořil z membrán zbavených ribozomů měchýřky, které se ukázaly jako ideální pro *in vitro* identifikaci bílkovin účastnících se translokace, včetně receptoru SRP a proteinů vytvářejících translokační kanál. Identifikoval mitochondriální receptor pro signální sekvenci, klonoval a sekvencoval cDNA receptoru pro import bílkovin do chloroplastů a charakterizoval mechanismus vedoucí k translokaci proteinů do chloroplastů. Elektrofyzilogickými pokusy prokázal existenci proteinových kanálů v endoplazmatickém retikulu a poskytl důkaz, že signální sekvence dostačuje k otevření těchto kanálů. Pomocí nativní elektronové mikroskopie (kryoelektro-nové) tyto kanály zviditelněl.

Hlavní zájem Blobelovy laboratoře byl v 90. letech zaměřen především na buněčné jádro, na mechanismy související jak s importem, tak s exportem makromolekul. Zde je nutné uvést průkaz důležitosti RAN-proteinů v jaderném transportu, určení způsobu importu ribozomálních bílkovin do jádra a určení krystalické struktury jaderných transportních faktorů.

Velký význam má Blobelovo dílo pro medicínu. Např. funkce celého imunitního systému spočívá na topogenických signálech. Několik dědičných nemocí – cystická fibróza, familiární hypercholesterolemie či primární hyperkalciurie – spočívá ve změnách nasměrování proteinů v buňce.

Desítky Blobelových spolupracovníků dnes pracují jako vedoucí laboratoří po celém světě. Atmosféra jeho laboratoře je nadmíru tvůrčí. I když je na jedné stra-

Pozn.: Cystická fibróza je narušená sekrece chloridových iontů mající za následek vysokou vazkost sekretů exokrinních žláz (např. v plicích či slinivce); familiární hypercholesterolemie je zvýšená koncentrace cholesterolu v krvi; primární hyperkalciurie je zvýšené vylučování vápníku v moči.



GÜNTER BLOBEL /* 21. 5. 1936 ve slezském Waltersdorfu, dnešní Walimí. Po válce ještě „budoval socializmus“, avšak brzy přesídlil do Německé spolkové republiky. R. 1960 absolvoval Lékařskou fakultu v Tübingenu, a poté působil na několika klinikách. V r. 1963 se stal postgraduálním studentem R. van Pottera v McArdleově laboratoři pro výzkum nádorů ve wisconsinském Madisonu. Po obhájení doktorátu v r. 1967 přešel na Rockefellerovu univerzitu do New Yorku jako postdok George Paladeho, nositele Nobelovy ceny za r. 1974 (spolu s G. Porterem a Ch. R. de Duvem, rovněž z Rockefellerovy univerzity). Na této univerzitě pracuje dosud. V r. 1986 se stal v rámci univerzity vedoucím Laboratoře Howarda Haghese, což je v Americe nejprestižnější biomedicínská vědecká nadační instituce. V r. 1992 získal profesuru „Johna D. Rockefellera mladšího“. Obdržel řadu amerických i mezinárodních ocenění, např. medaili Americké společnosti pro buněčnou biologii (1986), vědeckou cenu Maxe Plancka (1992), Laskerovu cenu (1993). Byl zvolen členem mnoha vědeckých organizací a akademií. Je členem Americké akademie věd a (přidruženým) členem Evropské molekularněbiologické organizace. V r. 1980 byl prezidentem Americké společnosti buněčné biologie.

ně nesmlouvavý, nechává svým spolupracovníkům volnost a prostor a je vždy ochoten přijmout opačný názor, podpořený solidními výsledky.

Blobelova manželka Laura Maioglio je italského původu a vlastní v New Yorku restauraci Barbetta. A ještě osobní novinka vzhledem k laboratoři. V letošním roce doprovázejí Güntera do laboratoře ne dva, ale už tři angličtí setři.

Günter Blobel má obrovský cit pro „evropanství“. Je prezidentem správní rady nadace „Přátelé Drážďan“. Většinu finančních prostředků z Nobelovy ceny věnuje na rekonstrukci „Frauenkirche“ v Drážďanech.

V osobním styku působí Blobel velice příjemně, v podstatě máte dojem, že Nobelovu cenu jste dostali vy a ne on. A bez okolků přizná, že kdyby zůstal v NDR, asi by nebyl tam, kde je.

Congratulations, Günter!

□

Chemie v reálném čase

„Fotografování“ neuvěřitelně rychlých chemických reakcí

PAVEL JUNGWIRTH

NOBELOVA CENA ZA CHEMI

Z vlastní zkušenosti mnohonásobného otce dobře vím, jak je těžké vyfotografovat právě narozené dítě. Vše se semele hrozně rychle, člověku se navíc třesou ruce a výsledkem jsou pak trochu rozmazané momentky potomků stáří několika desítek sekund. Letošní Nobelova cena za chemii byla udělena profesoru Kalifornské techniky Ahmedu Zewailovi za to, že se mu podařilo vyfotografovat zrození molekuly. K tomu je třeba mít nejen pevnou ruku, ale i „fotoaparát“ se závěrkou řádově 100 femtosekund (tj. 0,000 000 000 000 1 sekundy). Ano, čtete dobře a máte samozřejmě pravdu, že takový fotografický aparát neexistuje.

Zato existuje femtosekundový laser, což je přístroj, který dokáže generovat ultrakrátké světelné pulzy. Takové zařízení koncem 80. let postavili na Kalifornské technice právě pod vedením A. Zewaila a použili ho k pozorování chemických reakcí v reálném čase. Elementární procesy při chemických reakcích, jako je vznik a zánik chemických vazeb, probíhají neuvěřitelně rychle,

Ahmed Zewail se narodil 26. 2. 1946 v Alexandrii (v Egyptě). Studoval na Alexandrijské univerzitě a doktorandské studium absolvoval na Pennsylvánské univerzitě v USA. Nějaký čas působil na Kalifornské univerzitě a od r. 1976 na Kalifornské technice. Získal spoustu ocenění, například Cenu Benjamina Franklina, Röntgenovu cenu, Cenu Karla Zeisse, ocenění různých vědeckých společností a akademií. Roku 1995 obdržel vyznamenání od prezidenta Mubaraka a roku 1999 byla dokonce v Turecku vydána poštovní známka se Zewailovým portrétem. Má čtyři děti a se svou rodinou žije v kalifornském San Marinu. Vychoval již okolo 150 postdoků Kalifornské techniky.



typicky na časové škále pikosekund (1 ps = 0,000 000 000 001 s). Tradiční experiment je příliš pomalý a může tyto jevy studovat pouze nepřímo. Je to, jako kdybyste přišli na stadion před hokejovým utkáním, a potom až po něm, a snažili byste se uhodnout skóre a průběh zápasu z tváří odcházejících fanoušků. Ahmed Zewail se svou skupinou byl první, kdo dokázal přímo sledovat celé „utkání“ (chemickou reakci) a zaznamenat každou „branku“ (vznik nebo zánik chemické vazby). Dal tak vzniknout novému oboru – femtochemii.

Ukazuje se, že při focení molekul je důležitá synchronizace, podobně jako když fotíte s bleskem. Synchronizace se dosáhne tak, že se ultrakrátký (kolem 100 fs) laserový pulz rozdělí na dva, přičemž jeden se vůči druhému definovaně zpozdí o stovky femtosekund až několik pikosekund. Zpoždění se dosáhne tak, že druhý paprsek necháme projít trochu delší dráhu (pro představu světlo za 100 fs urazí pouze 0,03 mm). První paprsek je absorbován molekulou, čímž spustí chemickou reakci. Druhý, zpožděný paprsek pak zkoumá, co se mezi dvěma záblesky stihlo udát. Uděláme-li sadu měření, kde budeme postupně měnit zpoždění mezi budicím a detegujícím zábleskem, dostaneme detailní obraz v reálném čase o průběhu zkoumaného chemického procesu.

Jaké chemické reakce se ve skupině profesora Zewaila studovaly a studují? Na Kalifornské technice zřejmě znají Komenského, neboť začali od těch nejjednodušších a skončili u velmi složitých. Koncem 80. let „nafotili“ roztržení jednoduché chemické vazby v malých molekulách (například jodidu sodného). Jako další studovali reakci atomu vodíku s oxidem uhličitým, která je důležitá při spalování. V následujících letech se zabývali složitějšími reakcemi, jako je kupříkladu abstrakce jodu z tetrafluordijodethanu anebo přeměna cyklobutanu na dvě molekuly etylenu. V poslední době se intenzivně zabývali cis-trans izomerizací stilbenu, což je model pro tak důležité procesy, jako je vidění nebo fotosyntéza.

Nejkratší laserový pulz, který jsme dnes schopni generovat, má délku asi 6 femtosekund. Má cenu se snažit dál pulzy zkracovat a dostat se tak do oblasti attosekund (1000 as = 1 fs)? Pokud studujeme chemické reakce, odpověď zní ne. Každá chemická reakce trvá alespoň několik desítek femtosekund a v tomto smyslu je femtochemie konečným nástrojem k jejich studiu. To ale neznamená, že v přírodě neprobíhají i rychlejší procesy. Skupiny, které se dnes zabývají vývojem attosekundových laserů, si brousí zuby na přímé pozorování například pohybu elektronů v molekulách, který je ještě o několik řádů rychlejší než atomární pohyby.

Signály, jež experimentátoři při femtochemickém měření zaznamenají, samozřejmě nejsou „normální“ fotky molekul, kde by kyslík byl třeba červená a vodík bílá kulička. Jde o křivku zachycující časovou závislost záření vznikající (nebo zanikající) molekuly, k jejíž správné interpretaci je toho třeba o studovaném chemickém systému poměrně mnoho vědět. Zde se uplatní teoretici a počítačové chemici tím, že počítají interakce mezi atomy v molekule, jakož i dynamiku atomárních pohybů. Loňská Nobelova cena udělená kvantovému chemikovi J. Popleovi (viz Vesmír 78, 73, 1999/2) spolu s tou letošní možná náhodou, ale přesněto pěkně symbolizují spojení výpočtů a experimentu.

Dr. Pavel Jungwirth (*1966) vystudoval Matematicko-fyzikální fakultu UK v Praze. V Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR se zabývá modelováním ultrarychlých kvantových procesů v polyatomických chemických systémech. (e-mail: jungwirth@jh-inst.cas.cz)



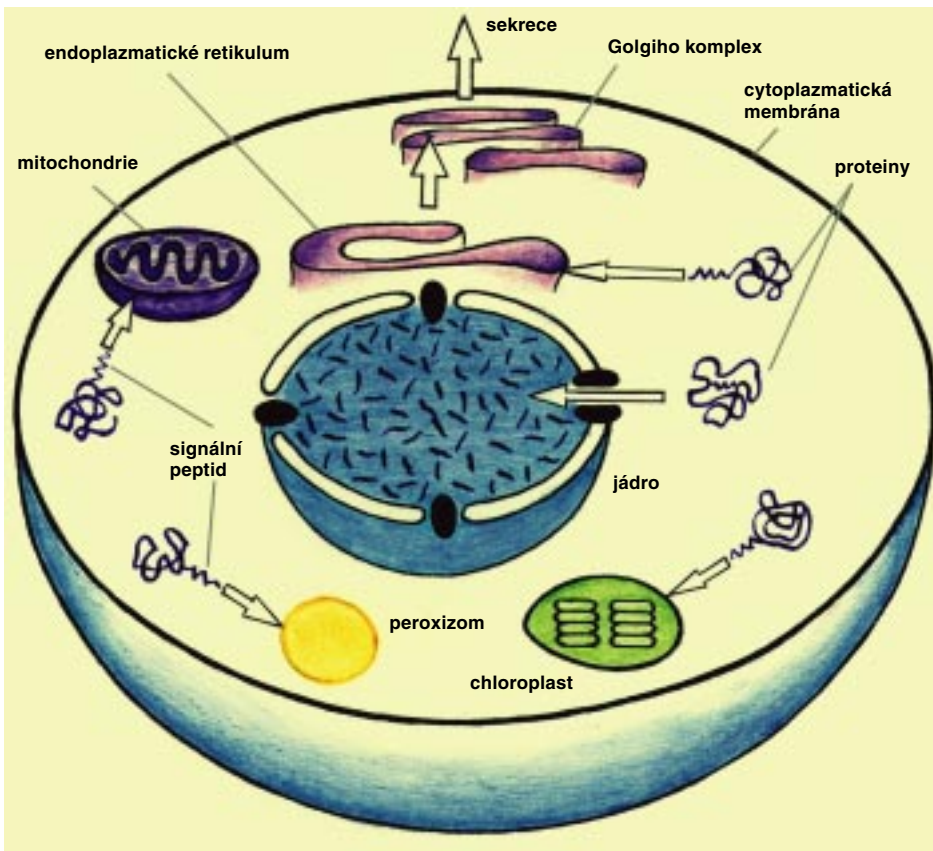
KRÁSA KAPAJÍCÍHO KOHOUTKU

Pokud vám doma začne kapat kohoutek, nebudete příliš spokojeni a půjdete vyměnit těsnění nebo zavoláte instalátora. Ne tak skupina fyziků z Ústavu Jamese Francka na Chicagské univerzitě. Ti si tento jev vybrali jako předmět seriózního vědeckého výzkumu (I. Cohen ad., *Physical Review Letters* 83, č. 6. 1147–1150, 9. 8. 1999).

Experiment spočíval v sledování časových změn tvaru povrchu kapky glycerinu při jejím formování a odtržení ve viskózním prostředí (v polydimethylsiloxanu). Děj byl zaznamenán vysokorychlostní kamerou s kadencí deset tisíc snímků za sekundu! I. Cohen z chicagského týmu řekl novinářům, že ho ohromila krása zpomalených záběrů odtržení kapky a že tato krása pro něj byla jednou z motivací k práci (*Physical Review Focus*, Vol. 4, story 9: <http://focus.aps.org/v4/st9.html>). Že na tom něco bude, lze usoudit z krásné fotografie.

Matematický popis jevů je obtížný, protože v blízkosti bodu odtržení vzniká *singularita* – nekonečně velké zakřivení povrchu kapaliny. Autoři ukázali, že pokud se vhodně změní („přeškáluje“) měřítko, mají všechny křivky v okolí odtržení (snímané v různých časech během 50 milisekund před odtržením) stejný tvar – jsou si *samopodobné* (self-similarity). Tato vlastnost umožňuje zjednodušit popis jevu a výpočty. Autoři poznamenávají, že jejich teorie je obecně použitelná na všechny problémy související se vznikem singularity v systému s lokální nestabilitou (např. sféricky symetrický gravitační kolaps). V článku je také odvozena teorie popisující závislost frekvence odkapávání na viskozitách obou kapalin, což může velmi zajímat techniky řešící problém míšení různých kapalin nebo navrhující inkoustové tiskárny. Tak vida, jaké vznešené souvislosti může mít náš banální špatně těsnící vodovodní kohoutek.

Jan Valenta



Zatím poslední Nobelovu cenu za chemii získal za strukturní signální informace v sekenci aminokyselin Günter Blobel. Na obrázcích jsou příklady směrovaného transportu bílkovin zprostředkovaného topogenickými signály.

Ve schematickém obrázku buňky jsou zobrazeny některé základní kompartmenty, přičemž chloroplast je organela přítomná v rostlinných buňkách, ale ne v buňkách živočišných. Organely mají specifické funkce a jsou ohraničeny membránou. Nově syntetizované proteiny obsahují strukturně zakódovanou informaci o adresátu (tj. signální sekvenci či topogenický signál), která nasměruje proteiny na správné místo v buňce a umožní jim prostoupit membránou organel. Vlastní signál se skládá z řetězce několika aminokyselin, který je integrální součástí nově syntetizovaného proteinu a který se často nachází na konci polypeptidického řetězce proteinu. V současné době je v centru zájmu buněčné biologie jaderný import a export a strukturně funkční charakterizace jaderného póru, který představuje – pomíneme-li chromozomy – největší buněčnou strukturu. Jaderný pór má hmotnost asi jako 30 ribozomů.

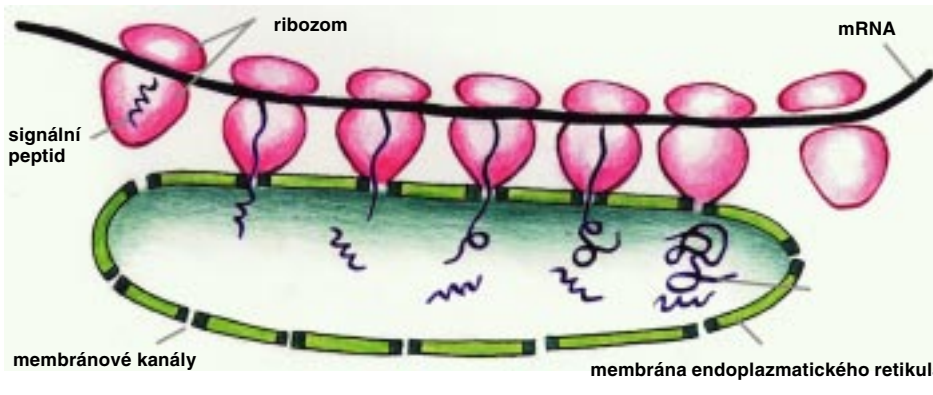


Schéma signální hypotézy. Proteiny, které jsou určeny k sekreci, jsou syntetizovány ribozomy na endoplazmatickém retikulu. Genetická informace z jaderné DNA je prostřednictvím informační RNA (mRNA) dopravena do cytoplazmy. Tato informace určuje, jaké a v jakém pořadí jsou aminokyseliny zabudovány do polypeptidického řetězce proteinu. Nejdříve je syntetizována signální sekvence (signální peptid). Pomocí navázaných proteinových komponent nasměruje signální peptid ribozom ke kanálu v endoplazmatickém retikulu. Prodlužující se polypeptidický řetězec aminokyselin proniká do kanálu, signální peptid je specifickými peptidázami odstraněn a zralý polypeptidický řetězec je uvolněn do lumen endoplazmatického retikula. Posléze je protein skrze Golgiho aparát transportován vně buňky.

Kresby © Robert Čermák k článku J. Rašky „Směrovací číslo“ v bílkovině na s. 25

Na obálce: Ledňáčka říčního (*Alcedo atthis*) vyhláší Česká společnost ornitologická ptákem roku 2000. Více na s. 42 a 43. Snímek © Jan Halady