

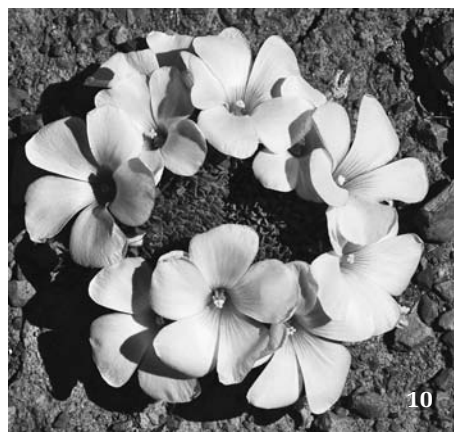
možnost s Honzou opravdu rozloučit. Domů jsem se vrátil s řadou nově nabytých zkušeností, za což budu Honzu vyzdvihovat jako jednoho ze svých největších vědeckých vzorů.

João Loureiro

Z redakce: Vzpomínky studentů na Jana Sudu jsou ponechány bez větších redakčních úprav.

10 Štavel (*Oxalis densa*). Kapsko.

Foto Radka a Jan Sudovi



11 Účastníci exkurze katedry botaniky PřF UK Na Podkarpatskou Rus (1997). Kromě studenta Honzy Sudy (sedící zcela vpravo) jmenujme alespoň některé jeho spolužáky působící dodnes v oboru (s omluvou ostatním). Zleva: sedící Petr Dostál (Botanický ústav AV ČR), stojící Jiří Brabec (Muzeum Cheb), sedící Daniel Abazid (Blatské muzeum v Soběslavi), stojící Tomáš Fér a Jaroslav Vojta (4. a 7., katedra botaniky PřF UK), Renata Pohlová (8., Národní památkový ústav), u ní sedící Tomáš Tichý (CHKO Český kras),

Martina Réblová a Petr Petřík (9. a 10., BÚ AV ČR), Aleš Hoffman a Pavel Špryňar (11. a 13., Agentura ochrany přírody a krajiny ČR), mezi nimi sedící Petr Kulíšek (NAD ORLÍCÍ, o. p. s.), vpravo od něj Zuzana Münzbergová (katedra botaniky PřF UK), stojící zcela vpravo Vladimír Melichar (ochrana přírody, Karlovarský kraj), vlevo od něj Ota Šída (Národní muzeum). Exkurzi vedli Pavel Kovář a Zdeněk Soldán (2. a 3. stojící zleva), Karel Prášil a Jiří Liška (3. a 5. zprava vzadu). Foto z archivu P. Kováře



Jan Svoboda

Sága reverzní transkripce

Reverzní transkripce kyseliny ribonukleové na deoxyribonukleovou je dnes běžnou součástí geneticko-inženýrských postupů, diagnostiky řady infekčních onemocnění, patodiagnostiky, čítaje v to mnohá nádorová onemocnění, a samozřejmě nových a ještě se rodících laboratorních technik a postupů. Reverzní transkripce totiž umožňuje převést genové RNA přepisy zpětně na DNA, a tím získávat sondy pro určení struktury genů. Tyto sondy navíc dovolují stanovit stupeň transkripční aktivity genů, tedy stupeň jejich vyjádření (exprese). To je zvláště důležité v dnešní době, kdy sice máme k dispozici neuvěřitelné množství informací o genových sekvencích, ale daleko méně víme o jejich funkcích.

Z pohledu obecné genetiky se reverzní transkripce (RT) stává klíčem k poznání modifikací našeho genomu. Jak se v současnosti odhaduje, asi polovina genomových struktur vyšších organismů (včetně člověka) vznikla působením RT. Zdrojem této aktivity jsou retroviry a zvláště některé retrotransponibilní elementy, jež nejen působily, ale i dnes působí změny v genomu tím, že umožňují reverzní transkripci.

Co vedlo k objevu RT? Byla za tím nějaká motivace? Na tuto otázku odpovídá Howard M. Temin ve své nobelovské přednášce nazvané DNA provirová hypotéza (Science 1976, 192: 1075–1080). Jak vyplývá z jejího názvu, byly to nálezy ukazující, že se genom retroviru stává součástí

genetické informace buňky – integruje (vkládá) se do ní jako provirus. Jak uvádí Temin, přinesla naše skupina nezávisle reprezentován DNA, může vzniknout z retrovirového, tedy RNA genomu. Temin po řadě většinou neúspěšných pokusů navrhl existenci retrovirového enzymu reverzní transkriptázy, jehož přítomnost v retrovirových částicích dokázal stejně, jako to učinil David Baltimore. Tyto analýzy se zcela vymykaly našim možnostem, neboť vyžado-

Zůstávala však nezodpovězená otázka, jak takový provirus, který by měl být reprezentován DNA, může vzniknout z retrovirového, tedy RNA genomu. Temin po řadě většinou neúspěšných pokusů navrhl existenci retrovirového enzymu reverzní transkriptázy, jehož přítomnost v retrovirových částicích dokázal stejně, jako to učinil David Baltimore. Tyto analýzy se zcela vymykaly našim možnostem, neboť vyžado-

valy u nás (pozn. red.: v tehdejší Československu) zcela nedostupné radioaktivně značené nukleotidtrifosfáty, které jsou substrátem pro RT.

Kroky reverzní transkripce

K detailnímu popisu jednotlivých stupňů reverzní transkripce mě vedly výroky našich postmodernistů o čarodějných magických hrách, které vedou vědci, ale široká veřejnost jim nerozumí. Chci ukázat, že tomu tak není a že s trochou trpělivosti lze porozumět zajímavým způsobům, jak příroda pracuje. Samozřejmě koho zařazené schéma (obr. 1) unavuje, nechť ho přeskočí.

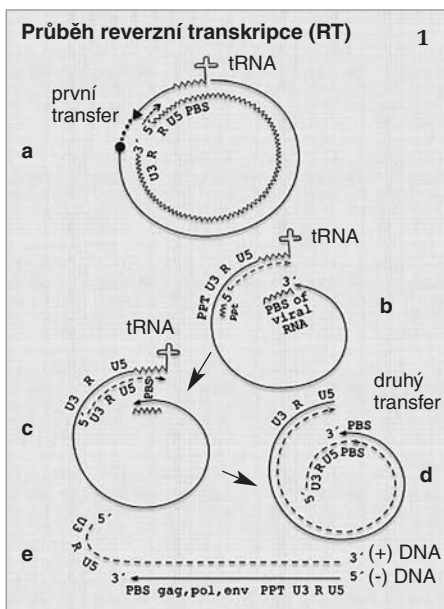
Poznání kroků vedoucích k tvorbě DNA na základě reverzního přepisu (RT) z předlohy RNA zachovává základní poznatky z molekulární biologie známé z replikace nukleových kyselin. Proto dříve, než se vrátíme k RT, zopakujeme některé základní skutečnosti rozhodující o replikaci DNA i RNA. Jak je známo, DNA představuje dvouvláknovou molekulu. Replikace DNA je semikonzervativní – každé z obou vláken, která jsou vzájemně komplementární, se může replikovat. Komplementarita je přitom faktor významný pro živou i neživou přírodu. Nejjednodušší komplementaritu ukazuje třeba elektrický náboj, kdy kladný pól reaguje na záporný tím, že ho přitahuje. Přítomnost zvláště slabých nábojů umožňuje vznik makromolekul. Komplementaritu mezi dvěma vlákny DNA, která zajišťuje jejich spojení, zprostředkovává nekovalentní, tedy slabá vazba mezi nukleotidy (adenin se váže s thyminem, guanin s cytozinem). Při replikaci vláken nukleových kyselin nutno dodržet zásadu, že nově vznikající vlákno sleduje templát čili matici, z které vzniká, v jednom určitém směru – a to ve směru 5' konce templátu.

Tento 5' konec je reprezentován fosfátem svázaným s deoxyribózou na její uhlík v pozici 5. Naproti tomu 3' konec má nukleotid, jehož deoxyribóza nese hydroxyl v pozici 3. Důvody pro toto uspořádání vyplývají z postupu zřetězení nukleosid-trifosfátů při sestavování molekuly nukleových kyselin, což představuje jinou kapitolu. Je třeba zdůraznit, že směr syntézy nového vlákna při RT sleduje stejné pravidlo, tj. jeho syntéza probíhá ve směru k 5' konci templátu.

Další poznámka se týká začátku syntézy prvního nového vlákna DNA označovaného minus (-). Ta vyžaduje primer neboli očko, které je v případě začátku RT představováno transferovou RNA (tRNA) přenášející aminokyselinu vkládanou do proteinového řetězce během proteosyntézy. Takových tRNA je mnoho a jednotlivé druhy retrovirů využívají vždy jen určitou specifickou tRNA. Pro vznik druhého, plus (+) virového DNA vlákna slouží jako primer zbytek virové RNA bohaté na purinové nukleotidy (polypurinový tract, ppt), který odolá štěpení ribonukleázou H. Tento enzym je kódován jednou z oblastí genu pro RT a účinně štěpí RNA, jež představovala templát pro vznik prvního vlákna DNA a zůstává s ním svázaná, neboť obě molekuly jsou komplementární. Odstranění RNA umožní první přeskok RT i vznik druhého vlákna DNA.

Během reverzní transkripce dochází k dvěma přeskokům (transferům). Jaká konfigurace virových nebo buněčných proteinů umožní sestavení různých molekul tak, aby se přeskoky uskutečnily, není dosud zcela jasné. Na tomto procesu se podílejí některé proteiny vykazující chaperonové vlastnosti, tj. schopné měnit konformaci jiných proteinů nebo orientovat složky proteinových komplexů do správné vzájemné polohy.

Průběh reverzní transkripce popisujeme podle toho, jak ji známe z retrovirů. Dlužno ale podotknout, že v případě retrovirů tento proces dosáhl vysokého stupně uspořádanosti a efektivity. U předchůdců retrovirů, tedy u retroelementů, jsou průběh a funkce RT jednodušší, ale tím i méně přesné. Současná srovnávací studia by měla říci více o kořenech a vzniku RT. Proces reverzní transkripce je z několika důvodů příčinou velké genetické variability retro-



1 Průběh reverzní transkripce.

Blíže v textu. Z archivu J. Svobody

2 Stará láska nerezaví. Jan Svoboda si užíval práci s buněčnými kulturami až do posledních dní. Tento snímek byl však pořízen již v r. 2014, kdy mu bylo 80 let. Foto V. Stepanets

virů, což znamená velkou překážku pro zásahy proti těmto virům.

Věřím, že po výše zmíněných vysvětleních se čtenáři bez obtíží seznámí se zvláštnostmi RT. Uvádím jednotlivé stupně detailně, abychom se vyhnuli zplošťování a přílišnému zjednodušování, které i mne odrazuje od čtení některých popularizujících statí.

Průběh reverzní transkripce

Genom retroviru se skládá ze dvou molekul RNA. Obě jsou v plus (+) orientaci, a mohou tedy přímo fungovat jako poslíčkové RNA (messenger, mRNA) určující průběh tvorby bílkovin. Proces RT začíná tím, že buněčná tRNA nasedne na oblast virové RNA (vRNA), která je k ní komplementární, a proto s ní hybridizuje. Tuto oblast vRNA nazýváme PBS (z anglického Primer Binding Site – oblast vázící primer). Očko je potřebné pro započítí syntézy (-) vlákna

DNA (na obr. 1a vlákno RNA znázorněno vlnovkou, vlákno (-) DNA rovnou linkou), jež pak pokračuje směrem k 5' konci templátu (raznice), kterou představuje vRNA. Zde se zastaví a nastupuje druhá aktivita RT – ribonukleáza H štěpí RNA v hybridní molekule sestávající z (-) DNA a vRNA, podle níž (-) DNA vznikla. Uvolní se (-) DNA úsek označený jako r, který je shodný (redundantní) jak v oblasti 5' vRNA, tak v její 3' oblasti. To umožní první přeskok RT (na obr. 1a vyznačen silnými tečkami), při němž se uvolněná redundantní 5' (-) DNA přichytí na komplementární 3' vRNA. Umožní tak další zpětný přepis vRNA na (-) DNA až do té doby, kdy přepisování narazí na dvouvláknovou RNA tvořenou tRNA a PBS. V druhém stupni (obr. 1b) RNáza H odštěpí virovou RNA až na malý úsek označený ppt, sestávající hlavně z purinových nukleotidů. Tento úsek funguje jako primer pro syntézu komplementárního (+) vlákna DNA (v obr. 1 označeném čárkovaně). Plus vlákno kopíruje (-) vlákno, až narazí na oblast tRNA x PBS, kterou rozvolní a kopíruje PBS vRNA. Také (-) vlákno již může tuto oblast kopírovat, poněvadž hybrid tRNA x PBS je uvolněn (obr. 1c). Tím je připraven druhý přeskok RT (viz obr. 1d), protože (+) vlákno DNA se v oblasti PBS uchytlí na komplementárním úseku (-) DNA a zkopíruje ji až po dlouhé opakované sekce (Long Terminal Repeats, LTR) označené jako U3 R U5. Jak vyplývá z obr. 1d, (+) vlákno má na rozdíl od (-) vlákna na obou koncích LTR (U3 R U5). Chybějící druhý LTR (-) vlákna je doplněn syntézou podle templátu (+) vlákna (obr. 1e).

Je toto vše koncem ságy reverzní transkripce?

Vůbec ne. Spíše začátkem. V prvním sledu nových studií stojí otázka – lze z DNA polymerázy odvodit reverzní transkriptázu? Nové údaje ukazují, že z jednoduché DNA polymerázy je možné selektovat molekulu reverzní transkriptázy tak, že se dodávají očka RNA a vytřídí se molekuly schopné syntetizovat nejdelší úseky RNA. Překvapivý je nálezy, že uměle získaná reverzní transkriptáza se liší od původní DNA polymerázy jen v 37 mutacích. Naskytá se další otázka, proč tedy u dnešních organismů nemáme běžně dostupnou reverzní transkriptázu. Odpověď asi zní, že by nám nadělala neúnosné množství genetických změn.

Další pozoruhodný krok vpřed znamenalo zjištění, že antivirový systém zvaný CRISPR-Cas9, který se stává hlavním nástrojem genetického inženýrství dneška, může být vybaven reverzní transkriptázou. Funkce CRISPR (anglicky Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) spočívá ve schopnosti do sebe integrovat kritické součásti DNA virů a další změny vedou k tomu, že CRISPR ničí novou virovou infekci způsobenou DNA virem (viz Živa 2017, 2: XLVII–XLIX). Ale jak je známo, většina nebezpečných virů se skládá z RNA. A tady jsme u kořene problému, neboť CRISPR vybavený reverzní transkriptázou přepíše virovou RNA na DNA, díky čemuž může kontrolovat i infekci RNA virem. Tak tedy širší a hlubší poznání reverzní transkripce významně rozšiřuje, a doufejme i překoná, současné nedokonalé možnosti boje proti virovým nákazám.

