

THE HISTORY OF BIOCHEMISTRY

УДК 577.214

doi: <https://doi.org/10.15407/ubj94.04.093>

ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ ОСНОВ ТРАНСКРИПЦІЇ В ЕВКАРІОТІВ. НОБЕЛІВСЬКА ПРЕМІЯ З ХІМІЇ РОДЖЕРА КОРНБЕРГА, 2006 р.

О. П. МАТИШЕВСЬКА[✉], В.М. ДАНИЛОВА, С. В. КОМІСАРЕНКО

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;

[✉]e-mail: matysh@yahoo.com

Отримано: 18 жовтня 2022; Виправлено: 25 жовтня 2022; Затверджено: 04 листопада 2022

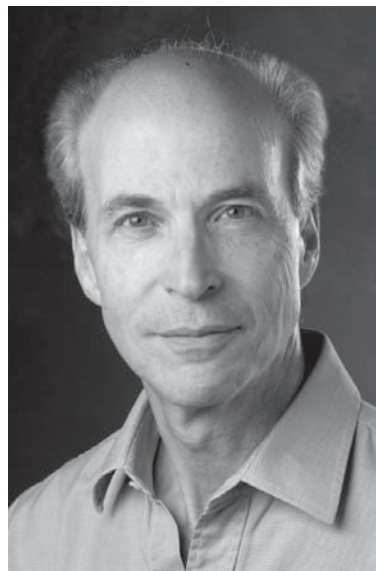
*«Сказано: якщо хочеш зрозуміти функцію, вивчай структуру»
З Нобелівської лекції Р. Корнберга [1]*

У 2006 р. Нобелівської премії в галузі хімії за фундаментальні дослідження механізмів копіювання клітинами генетичної інформації в еукаріот був удостоєний американський біохімік, професор структурної біології Стенфордського університету Роджер Корнберг. Що це за молекулярні механізми? Як формується транскрипційний комплекс і яка його структура? Пошуку відповідей на ці питання Р. Корнберг присвятив свою роботу, яка тривала без упину 20 років. В статті йдеться про ці пошуки зокрема, а також життєвий і творчий шлях Роджера Корнберга в цілому.

Ключові слова: Роджер Корнберг, транскрипція, РНК-полімераза II, транскрипційний комплекс, протейнові кристали, ДНК, РНК.

Роджер Корнберг (англ. *Roger David Kornberg*), американський біохімік, народився 24 квітня 1947 р. у місті Сент-Луїс, штат Міссурі, США, у родині біохіміків Артура Корнберга та Сільвії Рут Леві. Старший із трьох синів, він народився саме у той час, коли його батько, майбутній лауреат Нобелівської премії з фізіології та медицини 1959 року [3] за відкриття механізму біологічного синтезу РНК та ДНК, навчався в аспірантурі Вашингтонського університету. У 12-річному віці Роджеру вдалося побувати у Стокгольмі на церемонії вручення батькові цієї вищої наукової нагороди. То ж не дивно, що Роджер змалечку цікавився науковими дослідженнями. Його батько згадував: «Коли Роджер був ще зовсім маленьким, я брав його іноді у вихідні з собою у лабораторію. Коли ми запитали, що він хотів би отримати у подарунок на Різдво, то він, не замислюючись, відповів: «Провести у лабораторії цілий тиждень!»»

Як зазначав сам Роджер, старший Корнберг ділився з ентузіазмом результатами своїх



Роджер Корнберг (1947) [2]

досліджень з усіма, хто хотів його слухати. «Бесіди про науку у нашій родині велись увесь день, тривали за обідом і навіть упродовж уїк-

ендів. Обидва мої батьки мали гострий науковий розум і своїм прикладом вчили, як логічно й неупереджено розв'язувати питання і проблеми. Наукове мислення стало моєю другою натурою» [4]. Проте юнак зацікавився хімією не завдяки домашньому оточенню, а під час навчання у середній школі. Для вивчення хімії і біохімії Роджер вступив до Гарвардського університету і закінчив його 1967-го року зі ступенем бакалавра.

Після навчання в аспірантурі Стенфордського університету* він у 1972 р. отримав ступінь доктора філософії з фізичної хімії. Саме тут і розпочалася доросла наукова кар'єра Роджера. (*До речі, після переїзду у 1959 році сім'ї Корнбергів до Пало-Альто, штат Каліфорнія, професор Корнберг-старший очолив кафедру біохімії Стенфордського університету).

У своїй науковій роботі з фізичної хімії з використанням методу ядерного магнітного резонансу Роджер Корнберг дослідив переміщення молекул фосфоліпідів у мембранах клітин за механізмами повільного фліп-флоп переходу та швидкої латеральної дифузії [5, 6].

Досвід цієї роботи став у пригоді, коли через декілька років Корнберг розпочав дослідження структури РНК-полімерази II і використав механізм латеральної дифузії ліпідів для отримання цього ензиму в кристалічній формі, про що йтиметься нижче. У 1972 році Корнберг отримав ступінь доктора філософії з хімії Стенфордського університету.

Щоб досконало оволодіти ще одним методом фізико-хімічного аналізу макромолекул, зокрема рентгенівською дифракцією, Р. Корнберг на кілька років відбув до Великобританії для стажування у лабораторії молекулярної біології у Кембриджі, де вчені інтенсивно застосовували метод кристалографії протеїнів. Тут він зацікавився нещодавно опублікованою Френсісом Кріком статтею під назвою «Загальна модель хромосом вищих організмів», на рисунку до якої було зображено петлю ДНК, перетнуту пунктирною лінією, що позначала місцезорозташування гістонів [7].

На той час методами екстрагування хроматину, седиментаційного аналізу, електронної мікроскопії, ендогенного розщеплення ДНК, електрофорезу було отримано низку даних, які свідчили про існування хроматинової структури, що нагадувала намистини на нитці, де

комплекси гістонів упорядковано розподілені вздовж нитки ДНК, у проміжках чутливою до дії нуклеаз, а утворювані фрагменти за розміром були кратними 200 парам основ і розміщувались за електрофорезу на зразок драбини (ladder pattern). Так формувались уявлення про нуклеосому як структурну одиницю пакування ДНК у хроматині, проте деталі її молекулярної організації залишались невідомими. З'ясування ролі гістонів видавалось вартою уваги для розуміння генетичної хімії, проте на перешкоді були складнощі з дослідження цих протеїнів.

П'ять типів гістонів, позначених H1, H2A, H2B, H3 і H4, були, з одного боку, наочуд простими, а з іншого – надто складними. Окремі гістони після виділення ставали липкими й інтенсивно зв'язувалися з ДНК та один з одним в усіх можливих комбінаціях. Біохімічна поведінка гістонів ніяк не пояснювала унікального повторюваного порядку на рентгенівській дифрактограмі хроматину. Екстрагування хроматину за жорстких умов давало змогу з'ясувати молекулярний склад гістонів, проте водночас призводило до їх денатурації та ускладнювало розуміння структури.

У Кембриджі (Великобританія) Р. Корнберг звернув увагу на статтю van der Westhuyzen and von Holt [8], в якій повідомлялось про результати екстрагування хроматину більш м'якими методами. Оскільки за таких умов повного розділення гістонів не відбувалося, статтю було проігноровано. Але Корнберг зацікавився тим, що в разі м'якого екстрагування хроматину спостерігалось чітке розділення гістонів на дві групи: H2A/H2B та H3/H4, що суперечило постульованим раніше безладним взаємодіям гістонів. Роджер Корнберг розпочав виділяти окремі гістони, змішувати їх у різних комбінаціях з ДНК та аналізувати картини рентгенівської дифракції. Вчений показав, що структуру «намистини на нитці» можна отримати, проінкубувавши ДНК із очищеними препаратами димерів гістонів H2A-H2B і H3-H4. Щоб визначити, скільки саме таких димерів входить до складу однієї нуклеосоми, він виміряв молекулярну масу очищеного препарату H3/H4 за допомогою рівноважного ультрацентрифугування і виявив існування подвійного димеру, тобто тетрамеру (H3)₂(H4)₂. Окрім того, Корнеберг разом зі своїм колегою Джином Томасом обробили хроматин так, щоб між усіма розташованими

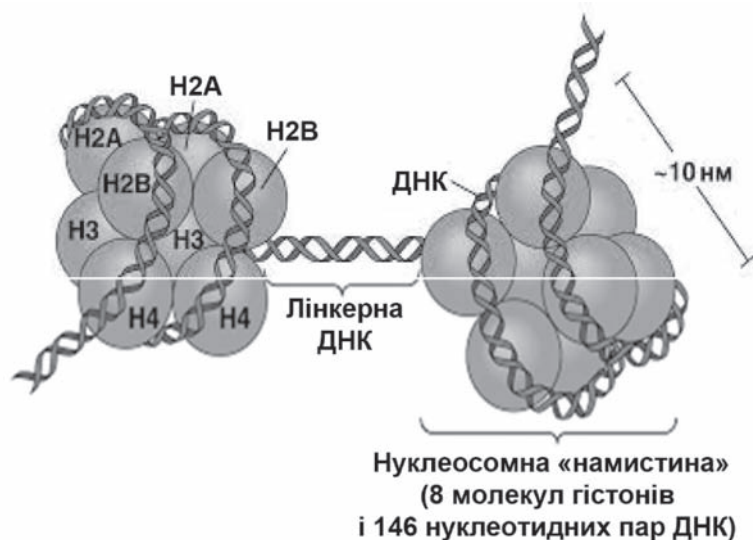


Рис. 1. Схема структурної організації нуклеосоми як основного елемента хромосоми еукаріотів [9]

поруч гістоновими молекулами утворювались поперечні зшивки; зшиті комплекси виділили і визначили молекулярну масу за допомогою гелелектрофорезу. Виявилось, що розміри отриманих комплексів відповідали вісьмом гістоновим протеїнам. Таким чином було встановлено, що нуклеосома складається із двох димерів H2A-H2B та двох димерів H3-H4, тобто є октамером (рис. 1).

Було зроблено ще один важливий висновок, який дав змогу сформулювати повне уявлення про молекулярну організацію нуклеосом. Оскільки тетрамер $(H3)_2(H4)_2$ виявився структурно подібним до $\alpha_2\beta_2$ тетрамеру гемоглобіну, а доступні на той час рентгенівські знімки гемоглобіну, як й інших олігомерних протеїнів, свідчили про компактну структуру без отворів, через які могла б пройти молекула розміром із ДНК, це означало, що ДНК має обвивати зовнішню поверхню гістонового октамеру в складі нуклеосоми.

Розкриття структури нуклеосоми суттєво позначилось на уявленні про функціонування всього апарату реалізації та передання спадкової інформації. Той факт, що ДНК виявилась намотаною зовні на гістоновий кор, вказувало на її відкритість до взаємодії з різноманітними регуляторними факторами.

Після повернення у 1976 р. до США Роджер Корнберг працював у військово-медичній школі при Гарвардському університеті як доцент з

біохімії, а згодом викладав, проводив наукові дослідження хроматину та отримав посаду професора на медичному факультеті Гарвардського університету. У 1978 р. він повернувся до рідного Стенфордського університету як професор кафедри структурної біології і проводив далі наукову роботу, керуючи групою дослідників, до якої входили вчені не лише зі США, але й з інших країн. Корнберг завжди брав до уваги зусилля своїх колег, залучених до спільних досліджень. Тут, у Стенфорді, й було виконано ту значущу наукову роботу, результати якої удостоєно Нобелівської премії.

Р. Корнберг вирішив зосередитись не стільки на структурі нуклеосом, скільки на їхній функції та молекулярних основах транскрипції.



Р. Корнберг у лабораторії [10]

На той час переважала думка, що гістони пригнічують транскрипцію і є універсальними репресорами генів. До досліджень Корнберга доєдналась ізраїльська дослідниця Яхлі Лорх (Yahli Lorch), яка працювала у Стенфордському університеті та спеціалізувалась на молекулярних механізмах експресії генів. Яхлі Лорх стала не лише пожиттєвим науковим партнером Корнберга з дослідження хроматину, але й найближчою людиною, дружиною і, за його словами, постійним джерелом натхнення в роботі. Хоча на той час першочерговим завданням Яхлі було виховання їхніх дітей (Гайі, Майї та Гіла), їй вдалося у співпраці з Корнбергом показати, що під час накручування промоторної ділянки ДНК на гістоновий кор РНК-полімераза II (Pol II) втрачає здатність ініціювати транскрипцію, однак у разі зміщення нуклеосоми, коли промоторна ділянка стає доступною для цього ензиму, подовження ланцюга РНК відновлюється [11].

Ці дані свідчили, що нуклеосома дійсно слугує загальним репресором в еукаріотичних клітинах, блокуючи активність багатьох тисяч генів, за винятком, однак, тих, транскрипція яких активується специфічними позитивними регуляторними механізмами.

Що це за механізми регулювання? І, головне, як формується транскрипційний комплекс та яка його структура? Пошуку відповідей на ці питання Р. Корнберг присвятив свою подальшу роботу, яка беззупинно тривала 20 років.

Для дослідження регуляції транскрипції потрібно було ідентифікувати транскрипційний апарат. Той факт, що під час транскрипції нуклеосоми видаляються з промоторної ДНК давав можливість фракціонувати окремим компонентам транскрипційного апарату. Це було складним завданням, оскільки, як показали дослідження на клітинах ссавців, на кожній промоторній ділянці ДНК до початку транскрипції збирається гігантський комплекс із майже 60 протеїнами загальною масою понад три мільйони дальтонів.

Плануючи дослідження, Корнберг на-самперед поставив два основних завдання. По-перше, скористатися дріжджовою системою транскрипції, оскільки дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* були визнаним переважним об'єктом для генетичного аналізу еукаріотів. Проте на початку були сумніви щодо такого вибору, адже попередні спроби розробити біохімічні

дріжджові системи транскрипції зазнали невдачі, що призвело до поширеної думки, що дріжджі не придатні для біохімічних досліджень. Дійсно, як з'ясувалося, початковий сигнал транскрипції був у тисячу разів меншим, ніж у системах ссавців, проте група Корнберга досягла прориву, розробивши успішну процедуру фракціонування, за якої вдалося зберегти основні компоненти транскрипційного апарату, уникнути накопичення інгібіторів та отримати протеїни, залучені до транскрипції. По-друге, слід було передусім зосередитись на з'ясуванні структурної організації РНК полімерази II (Pol II), яка становить центральну (корову) частину транскрипційного комплексу.

Подальші дослідження повністю підтвердили правильність обох обраних Корнбергом рішень. Відмінності у структурі промотору дріжджів і ссавців виявились незначними, а результати фракціонування транскрипційних протеїнів обох систем були однакові. Обидві системи містили шість протеїнів: Pol II та п'ять загальних факторів транскрипції TFIIB, -D, -E, -F і -H. І хоча розпочати з дослідження менших за розмірами факторів транскрипції було простіше, з'ясувалося, що деякі з факторів набувають повністю згорненої структури лише за взаємодії з Pol II, і саме цей ензим є платформою, на якій збираються всі транскрипційні фактори. Отже, з'ясування структури Pol II було ключовим для розуміння регуляції транскрипції генів еукаріотів [12].

Після напрацювання з використанням розробленої *in vitro* дріжджової системи транскрипції великої кількості активної Pol II слід було зробити найскладніше – виростити протеїнові кристали, а потім отримати електронні та рентгенівські дифракційні зображення кристалічних структур. Проблема була в тому, що Pol II – це комплекс із 12 субодиниць, розмір якого у декілька разів перевищував розмір будь-якої асиметричної структури, охарактеризованої методом рентгенівської дифракції на початку 1980-х років, коли Корнберг розпочав дослідження.

Для кристалізації полімерази II Корнберг розробив унікальний метод, скориставшись досвідом, здобутим під час виконання дипломної роботи з фізичної хімії. Ідея полягала в тому, щоб закріпити протеїн у ліпідному шарі через взаємодію з полярними групами фосфоліпідів.

Це обмежувало рух зв'язаного протеїну у двовимірному просторі, проте не перешкоджало його вільній дифузії у площині та кристалізації. Зрештою, через п'ять років, попри неодноразові невдачі, цю ідею вдалося реалізувати завдяки використанню моноклональних антитіл проти ліпідного гаптена [13].

Отримані спочатку кристали Pol II були дрібними та погано впорядкованими. Невдовзі з'ясувалося, що це спричинено гетерогенністю препарату через наявність двох малих субодиниць полімерази у варіабельних кількостях. Тоді дослідники використали дилеційний мутант дріжджів, без обох малих субодиниць, і отримали однорідний препарат Pol II та його великі, дуже добре впорядковані 2-D кристали [14].

Одержана методом електронної мікроскопії карта електронної щільності двовимірних кристалів уможливила оцінювання структури Pol II з роздільною здатністю 16 Å. Утворені кристали були здатні до епітаксійного росту і їх успішно використали як затравку для вирощування тривимірних кристалів, необхідних для рентгенівського аналізу. «Ми були схвилювані, коли отримали перші 3-D кристали. Я також пригадую холодок тривоги. Адже найбільша рентгенівська структура асиметричної частинки на той час була в п'яту частину розміру Pol II, а інтенсивність рентгенівських променів, детектори та обчислювальні можливості були обмежені», – пригадував Р. Корнберг [1].

Та це ще були не всі труднощі. Для побудови точної молекулярної карти протеїну на основі рентгенівської дифракційної картини потрібно було враховувати не лише інтенсивність дифрагованих рентгенівських променів, але й їхню фазу, тобто місцезнаходження у структурі піків і западин рентгенівської хвилі. Традиційний спосіб вирішення цієї проблеми полягав у тому, щоб увести до складу кристалу важкий атом, який дифрагує рентгенівське випромінювання у певний спосіб із відомою фазою, а потім порівняти дифракційні картини кристалів з інкорпорованим важким атомом та без нього. Саме таку техніку ізоморфної заміни використали Макс Перутц та Джон Кендрю, прагнучи з'ясувати структуру гемоглобіну та міоглобіну, за що вони отримали Нобелівську премію з хімії 1962 року [15].

Однак на фоні розсіювання рентгенівських променів від такого великого за розміром

протеїну, як Pol II, виявити дифракцію від окремого важкого атома було неможливо, а всі сполуки важких атомів, які зазвичай використовували для отримання похідних кристалів, або не давали потрібних похідних, або навіть руйнували дифракційну картину. Ці складнощі було подолано завдяки використанню нестандартних сполук важких атомів. Як зазначав Р. Корнберг, придатні для розуміння структури РНК-полімерази кластери важких атомів, йому порадила Ада Йонат, лауреатка Нобелівської премії з хімії 2009 р. за дослідження структури і функцій рибосом [16].

У такий спосіб групі Р. Корнберга вдалося отримати похідні кристалів Pol II з надійними фазами 5 Å, що дало змогу методом рентгенівської кристалографії знайти місцезнаходження окремих легких атомів і визначити структуру РНК-полімерази з роздільною здатністю майже до атомної. На рис. 2 наведено отриману з роздільною здатністю 2.8 Å структуру РНК-полімерази II, що містить 12 субодиниць, близько 3500 амінокислотних залишків та 28 000 неводневих атомів. Менші субодиниці РНК-полімерази розташовані зовні структури, а дві найбільші – у центрі по обидва боки від щілини, де зв'язується нуклеїнова кислота і міститься сайт активного центру.

Успіх Корнберга у створенні новаторських зображень РНК-полімерази підтвердив ефективність застосування у молекулярно-біологічних дослідженнях кристалографії – тієї самої техніки, яку Френсіс Крік і Джеймс Вотсон використали для відкриття подвійної спіралі ДНК [17, 18].

Але для Корнберга розв'язання структури Pol II стало не лише кульмінацією досліджень, але й початком їх продовження. Тепер постало нове питання – як саме ДНК і РНК зв'язуються з Pol II? Щоб відповісти на нього, Корнберг поставив за мету ініціювати процес транскрипції вирощеним кристалічним транскрибувальним комплексом.

Для цього із середовища інкубації спочатку видаляли один із чотирьох нуклеозидтрифосфатів, зупиняючи транскрипційну активність, а потім просочували ним кристали, завдяки чому транскрипція відновлювалася без втрати кристалічної морфології. Аналіз дифракційної картини показав, що ДНК надходить до транскрипційного

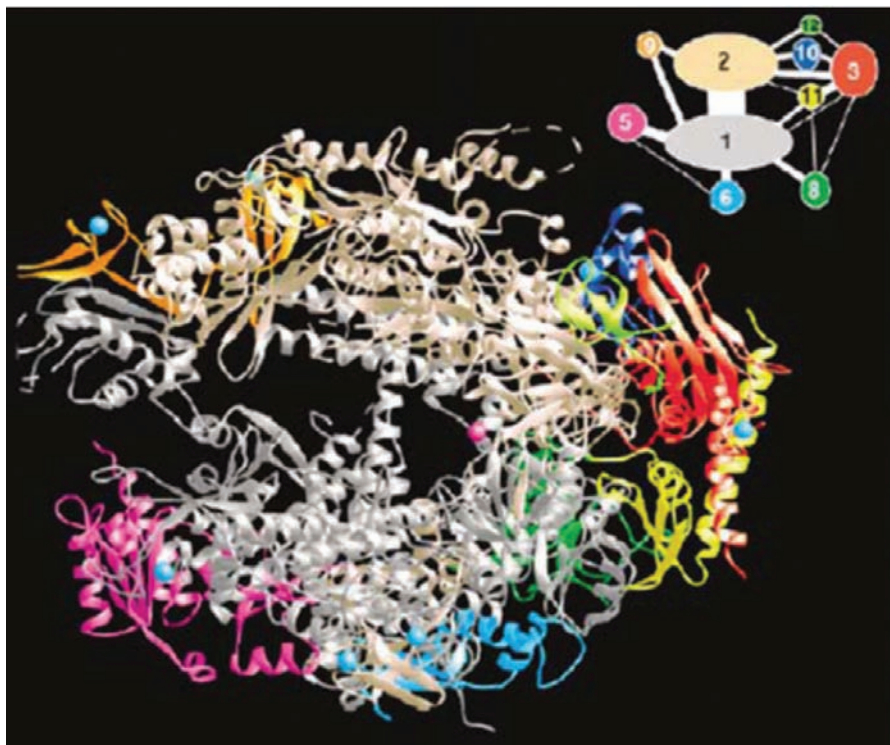


Рис. 2. Структура РНК-полімерази II з роздільною здатністю 2,8 Å, представлена як стрічкова діаграма з кольоровим кодом для різних субодиниць та схемою їх взаємодії у верхньому правому куті. Іон Mg в активному центрі зображено у вигляді рожевої сфери [1]

комплексу як дуплекс, а перед активним центром розкручується на три основи. Після цього матричний ланцюг робить різкий вигин, наступна основа перевертається, спрямовується до активного центру і приєднується до основи рибонуклеотиду у складі ланцюга РНК, що синтезується (рис. 3).

Аби повністю відпрацювати техніку експерименту, Корнбергу знадобилося понад 10 років. Протягом усього цього часу наполегливої роботи він не мав навіть проміжних результатів, які можна було б опублікувати. Прорив стався 2001 року, коли у журналі Science було наведено повну просторову структуру РНК-полімерази з дріжджів, а також структуру її комплексу з ДНК і продуктом реакції – інформаційною РНК [19, 20].

Розкриття електронної кристалічної структури комплексу полімераза-ДНК-РНК у ході транскрипції дало змогу віднайти відповіді на принципові питання – як саме Pol II відбирає правильний нуклеотид для приєднання до ланцюга РНК (адже саме точному зчитуванню генетичного коду й полягає сутність транскрипції),

як забезпечується переміщенням матричного ланцюга ДНК та, зрештою, як регулюється складний процес транскрипції?

Визначна заслуга Корнберга полягає в тому, що він зумів здійснити буквально «покадрове знімання» цього процесу, але не у формі фотознімків, а у вигляді розшифрованих результатів рентгеноструктурного аналізу, доповненого електронною мікроскопією та комп'ютерним моделюванням. У результаті цілісну динамічну картину копіювання генетичної інформації вдалося зробити видимою.

У початковій структурі транскрибувального комплексу нуклеотид, щойно доданий до РНК, і далі перебував в активному центрі. Дослідники змогли зафіксувати структуру комплексу після транслокації ДНК і РНК поверхнею ензиму та ідентифікували доступний для зв'язування наступного нуклеотиду порожній сайт входу до активного центру. Намочування кристалів цього «посттранслокаційного» комплексу з нуклеотидом призводило до появи додаткової електронної густини на двох сайтах. Усі чотири нуклеозид-

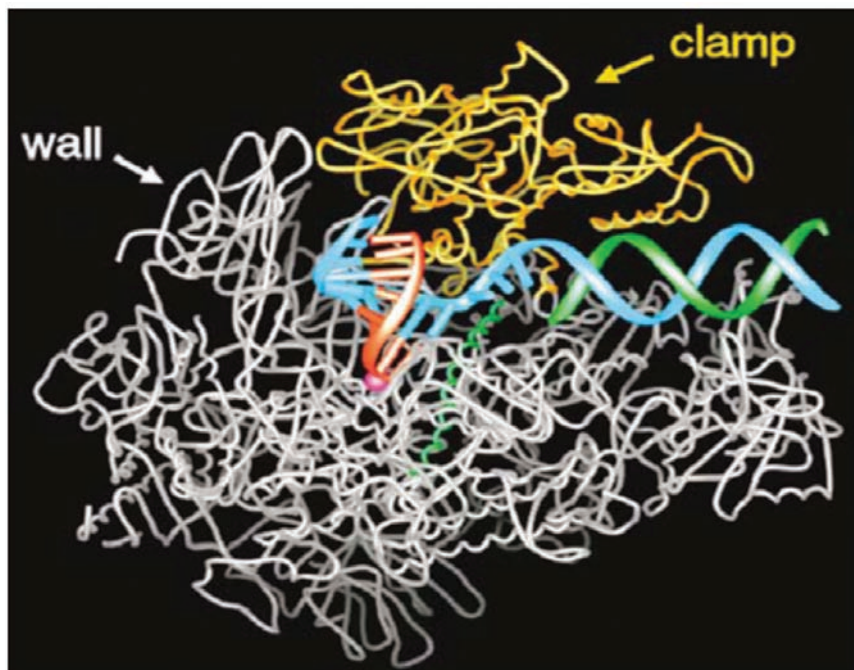


Рис. 3. Структура РНК-полімерази II в процесі генної транскрипції. Поліпептидний ланцюг ензиму позначено білим, рухомий “затискач” – оранжевим, місточкова спіраль, що з’єднує дві найбільші субодиниці – зеленим. Макетні моделі нуклеїнових кислот виділено синім (матричний ланцюг ДНК), зеленим (ланцюг ДНК, що відстає) та червоним (РНК) [1]

трифосфати (NTP) зв’язувались із сайтом входу, тоді як у сайті активного центру безпосередньо зв’язувався лише NTP, правильно підібраний для спарювання з кодувальною основою ДНК. Детальний аналіз результатів уможливив ідентифікування важливих для транскрипції мобільних структур елементів РНК-полімерази, названих, зокрема, тригерною петлею (trigger loop), місточковою спіраллю (bridge helix), затискачем (clamp).

Розміщена під сайтом активного центру тригерна петля контактує з усіма частинами нуклеозидтрифосфату – основою, фосфатними та цукровими залишками і, на думку дослідників, розгойдується на зразок навісної панелі задля відбору правильного NTP. Тригерна петля не лише поєднує розпізнавання NTP з утворенням фосфодієфірного зв’язку, але й формує мережу контактів (trigger loop network) з іншими структурними елементами [21].

Місточкова спіраль (bridge helix) завдовжки у 35 амінокислотних залишків перетинає щілину між двома великими субодиницями ензиму, контактує з кодувальною основою у складі матричного ланцюга ДНК та здатна шарнірно

змінювати свою α -спіральну конформацію з випрямленої на вигнуту. Було зроблено висновок, що саме такі періодичні зміни конформації місточкової спіралі під час кожного додавання рибонуклеотиду є механічною основою для його транслокації через активний центр, і що місточкова спіраль виконує роль наноконмутатора, забезпечуючи переривчастий поступальний рух лише в одному напрямку. Ще один структурний модуль, затискач, утворює одну зі стінок щілини і, як показали подальші дослідження, залучений до контролю не лише плавлення промотору, але й закриття щілини для конформаційної зміни ензиму під час транслокації та вивільнення РНК.

Pol II здатна розмотувати ДНК та синтезувати РНК, проте не спроможна розпізнавати промотор та ініціювати транскрипцію. Для виконання цих функцій необхідна участь загальних факторів транскрипції та інших регуляторних протеїнів.

З 2001 року лабораторія Корнберга досліджує кристалічні структури РНК-полімерази у різних функціональних комплексах. З використанням рентгенівської та

електронної кристалографії Р. Корнбергу вдалося не лише з'ясувати структуру п'яти основних транскрипційних факторів – ТВР і ТFIIB, TFIIE, TFIIIF і TFIIH – але й встановити їх місцезнаходження у структурі комплексу ДНК-РНК-Pol II.

Раніше вважали, що система з РНК-полімерази та п'яти факторів транскрипції може не лише ініціювати, але й регулювати транскрипцію через прямий зв'язок із промоторною ділянкою. Однак досліджуваний Корнбергом транскрибувальний комплекс із шести протеїнів не реагував на додавання регуляторів експресії генів. Виявилось, що системі бракує ще одного додаткового важливого елемента – комплексу з 25 субодиниць, успішно виділеного та охарактеризованого у лабораторії Корнберга і названого медіатором (Mediator) [22, 23].

За розміром дріжджовий медіаторний комплекс цілком зіставний з малою субодиницею еукаріотичної рибосоми, він має форму півмісяця, значною мірою охоплює Pol II та має багато точок контакту як із самим ензимом, так і з загальними факторами транскрипції на промоторі, протеїнами-активаторами на енхансері, а також протеїнами – репресорами, через які передаються регуляторні сигнали. «Ми були вражені складністю комплексу, елегантністю архітектури та тим, як така надзвичайна машина еволюціонувала для досягнення таких важливих цілей», – так говорив Корнберг про зображення, створені ним та його колегами. «РНК-полімераза озвучує генетичну інформацію, яка сама по собі є мовчазною» [1].

У 2006 році Роджера Корнберга було удостоєно Нобелівської премії з хімії за «фундаментальні дослідження молекулярних основ транскрипції в еукаріотів» [1].

Багато вчених бралися за цю тему, але налаштувати необхідну техніку та отримати якісні зображення РНК-полімерази, що працює, змогла лише команда терплячого Корнберга. «Це була технічна демонстрація результатів, на отримання яких пішло близько 20 років роботи. Як й інші великі вчені, Роджер не здається. Він упертий. Багато хто з учених відступився б через п'ять років», – відзначив професор Джозеф Паглісі, завідувач кафедри структурної біології Стенфордської школи медицини [24]. А Сет А. Дарст, структурний біолог Рокфелерівського університету, США, зазначав: «Роботі Родже-

ра Корнберга властиві водночас як широкість, так і глибина, адже вона розпочалася з дослідження структури хроматину та його впливу на регуляцію транскрипції, а завершилася з'ясуванням не лише складного механізму активації транскрипції в еукаріотичних клітинах, а ще й детальної хімії та структурної біології самого транскрипційного ензиму» [14].

Одним із перших Роджера Корнберга привітав із нагородою інший Нобелівський лауреат – його батько Артур Корнберг. Присудження Нобелівської премії його синові стало примітним ще з декількох причин. Це був вже восьмий випадок в історії Нобелівської премії, коли звання лауреата переходить “у спадок” від батьків до дітей. Серед таких кланів можна назвати, зокрема, лауреатів премії з фізики Нільса Бора та його сина Оге Нільса, подружжя П'єра і Марії Кюрі та їхню доньку Ірен Жоліо-Кюрі, яка розділила премію з хімії зі своїм чоловіком Фредеріком Жоліо, шведських фізиків Карла Манне Сігбана та його сина Кая. У 2006 році таких сімей стало на одну більше.

Окрім того, вперше у 20 сторіччі премію в галузі природничих наук отримала одна людина. Батько і син Корнберги досліджували одну й ту саму проблему – механізми синтезу нуклеїнових кислот як носіїв генетичної інформації, проте Артур Корнберг розділив Нобелівську премію із Северо Очоа [3], тоді як Роджер, озброєний набагато досконалішим інструментарієм, уперше спромігся зробити процес синтезу інформаційної РНК видимим, не мав у цій царині конкурентів і одержав Нобелівську премію одноосібно.

Зацікавленість генетичними дослідженнями у великій та дружній родині Корнбергів, схоже, закладено в генах: середній син Артура Корнберга – Томас також зробив низку відкриттів у цій галузі, зокрема довів існування різних форм ДНК-полімераз у *Escherichia coli*, і сьогодні є професором генетики Каліфорнійського університету в Сан-Франциско. Молодший із трьох братів, Кеннет, хоч і став архітектором, але спеціалізується в галузі дизайну.

Роджер Корнберг до сьогодні працює професором на кафедрі структурної біології Стенфордського університету. Поряд із роботою у Стенфорді професор Корнберг щороку проводить 4 місяці в Ізраїлі, читаючи там лекції та керуючи науковими дослідженнями в Єврейському університеті в Єрусалимі.

Результати наукового відкриття Р. Корнберга важко переоцінити, адже з'ясування структури РНК полімерази II та каталітичного механізму функціонування цього ензиму є ключовим елементом для розуміння всього процесу транскрипції і водночас знаковою подією великого значення для сучасної біології. Оскільки РНК-полімерази II дріжджів і людини на 53% ідентичні за амінокислотною послідовністю, стає можливою побудова адекватної моделі функціонування цього ензиму в організмі людини. Окрім того, ця робота продемонструвала вирішальне значення великих протейнових комплексів для регуляції транскрипції генів і тому є стандартом для майбутніх досліджень регуляторних протейнових комплексів.

На сьогодні накопичено достатню кількість біохімічних та генетичних даних, що повністю підтверджують ідеї та гіпотези Р. Корнберга щодо молекулярних механізмів роботи РНК-полімерази II. Дослідження процесу транскрипції залишаються актуальними дотепер і тривають на атомарному рівні із застосуванням нових сучасних підходів, зокрема таких, як криогенна мікроскопія, моделювання, симуляція методом молекулярної динаміки [24-29].

STUDIES OF THE MOLECULAR BASIS OF EUKARYOTIC TRANSCRIPTION. ROGER KORNBERG THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2006

O. P. Matyshevska[✉], V. M. Danylova,
S. V. Komisarenko

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
[✉]e-mail: matysh@yahoo.com

The Nobel Prize in Chemistry 2006 was awarded to an American biochemist and professor of structural biology at Stanford University Roger Kornberg for his fundamental research on the molecular mechanisms of copying genetic information in eukaryotic cells. What are these molecular mechanisms? How is transcription complex formed and what is its structure? R. Kornberg devoted tirelessly 20 years of his work to answer these questions. The article is focused on his research and also describes Roger Kornberg's life and scientific career.

Key words: Roger Kornberg, transcription, RNA polymerase II, transcription complex, protein crystals, DNA, RNA.

References

1. Kornberg R. D. The molecular basis of eukaryotic transcription. Nobel Lecture. 2006. Stanford University, School of Medicine, Stanford, USA.
2. Roger D. Kornberg – Facts. Regime of access : <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2006/kornberg/facts/>
3. Matyshevska OP, Danilova VM, Komisarenko SV. The discovery of the mechanisms of biological synthesis of nucleic acids: 1959 Nobel laureates S. Ochoa and A. Kornberg. *Ukr Biochem J.* 2021; 93(1): 129-138.
4. Roger D. Kornberg – Interview. Regime of access : <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2006/kornberg/interview/>
5. Kornberg RD, McConnell HM. Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. *Biochemistry.* 1971; 10(7): 1111-1120.
6. Kornberg RD, McConnell HM. Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971; 68(10): 2564-2568.
7. Crick F. General model for the chromosomes of higher organisms. *Nature.* 1971; 234(5323): 25-27.
8. Van der Westhuyzen DR, von Holt C. A new procedure for the isolation and fractionation of histones. *FEBS Lett.* 1971; 14(5): 333-337.
9. Kornberg RD, Thomas JO. Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science.* 1974; 184(4139): 865-868.
10. At the intersection of chemistry, genetics and biology. Regime of access: <https://www.peoples.ru/science>.
11. Lorch Y, LaPointe JW, Kornberg RD. Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell.* 1987; 49(2): 203-210.
12. Conaway RC, Conaway JW. General transcription factors for RNA polymerase II. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1997; 56: 327-346.
13. Uzgiris EE, Kornberg RD. Two-dimensional crystallization technique for imaging macromolecules, with application to antigen-antibody-complement complexes. *Nature.* 1983; 301(5896): 125-129.

14. Darst SA, Kubalek EW, Edwards AM, Kornberg RD. Two-dimensional and epitaxial crystallization of a mutant form of yeast RNA polymerase II. *J Mol Biol.* 1991; 221(1): 347-357.
15. Danilova VM, Vynogradova RP, Komisarenko SV. The contribution of Nobel prize laureates to research of the protein structure: J. Sumner, J. Northrop, W. Stanley, L. Pauling, F. Sanger, M. Perutz, J. Kendrew. *Ukr Biochem J.* 2020; 92(4): 127-153.
16. Komisarenko S. The ways how the genetic information is realized. *Visnyk NAS Ukraine.* 2009; (12): 40-45.
17. Matyshevska OP, Danilova VM, Komisarenko SV. The discovery of the DNA double helix, or the revolution that ushered in the era of molecular biology (Nobel Prize 1962). *Ukr Biochem J.* 2020; 92(6): 183-198.
18. Danylova TV, Komisarenko SV. Double Nobel Prize Winner: Frederick Sanger – The Father of Genomics. *Ukr Biochem J.* 2021; 93(2): 116-122.
19. Cramer P, Bushnell DA, Kornberg RD. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science.* 2001; 292(5523): 1863-1876.
20. Gnatt AL, Cramer P, Fu J, Bushnell DA, Kornberg RD. Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science.* 2001; 292(5523): 1876-1882.
21. Wang D, Bushnell DA, Westover KD, Kaplan CD, Kornberg RD. Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell.* 2006; 127(5): 941-954.
22. Kelleher RJ 3rd, Flanagan PM, Kornberg RD. A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell.* 1990; 61(7): 1209-1215.
23. Kornberg RD. Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem Sci.* 2005; 30(5): 235-239.
24. Roger Kornberg wins the 2006 nobel prize in chemistry. Stanford report, October 4, 2006. <https://news.stanford.edu/news/>
25. Duchi D, Mazumder A, Malinen AM, Ebright RH, Kapanidis AN. The RNA polymerase clamp interconverts dynamically among three states and is stabilized in a partly closed state by ppGpp. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(14): 7284-7295.
26. Nedialkov YA, Opron K, Caudill HL, Assaf F, Anderson AJ, Cukier RI, Wei G, Burton ZF. Hinge action versus grip in translocation by RNA polymerase. *Transcription.* 2018; 9(1): 1-16.
27. Schier AC, Taatjes DJ. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Genes Dev.* 2020; 34(7-8): 465-488.
28. Mazumder A, Lin M, Kapanidis AN, Ebright RH. Closing and opening of the RNA polymerase trigger loop. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020; 117(27): 15642-15649.
29. Richter WF, Nayak S, Iwasa J, Taatjes DJ. The Mediator complex as a master regulator of transcription by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022; 23(11): 732-749.