

MUDr. Emil Pavlík, CSc.

Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN v Praze, Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva FBMI ČVUT, Kladno

Polymerázová řetězová reakce

v průběhu třiceti let od první publikace

Každý, kdo okusil vědeckou práci v přírodovědných disciplínách, ví, že současná vědecká práce je prací týmovou. Základem každého vědeckého objevu je nápad. Avšak tento nápad musí být rozvinut, ověřen, dopracován, což je ještě dlouhá cesta k publikovatelnému výsledku.

Letos v lednu uplynulo přesně 30 let od chvíle, kdy časopis *Methods of Enzymology* ve svém 155. svazku na stránkách 335 až 350 zveřejnil stať autorů Kary B. Mullise a Freda A. Faloony, nazvanou *Specific Synthesis of DNA in vitro via a Polymerase-catalysed Chain Reaction*. Byl to již třetí pokus o publikaci kompletních výsledků výzkumu technologie, jež se v následujících dvou desetiletích stala mezníkem ve vývoji řady biologických

oborů. V předchozích dvou letech tento příspěvek odmítly redakční rady prestižních časopisů *Science* a *Nature*, takže vůbec první literární zmínku o nové metodě PCR nalezneme v článku *Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia*, od kolektivu autorů R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. Mullis, G. Horn, H. E. Ehrlich a N. Arnheim zveřejněném v roce 1985

ve 230. svazku časopisu *Science* na stránkách 1 350 až 1 354, který dokládá ukončení vývoje metody na přelomu let 1983 a 1984. Bezprostředním předchůdcem publikované stati byl článek ve sborníku *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology* 51: 263–273 z listopadu 1986, nazvaný *Specific Enzymatic Amplification in Vitro: Polymerase Chain Reaction*, jehož autory byli Kary B. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn,





H. Ehrlich. Dovolte mi prosím při této příležitosti malé zamyšlení, jak to tenkrát bylo.

Start-up programy na kalifornských univerzitách

Od poloviny sedmdesátých let se v americké Kalifornii rozvíjelo unikátní prostředí, které následně umožnilo řadu významných objevů v mnoha oborech lidské činnosti. Základní výzkum v biologických vědách na pěti významných kalifornských univerzitách v čele se Stanford University a University of California v Berkeley přitáhl řadu perspektivních odborníků z celých Spojených států, kteří navíc představovali významnou vzdělávací kapacitu pro mladé adepty vědy. Působení na univerzitách má však na celém světě jednu nevýhodu: je vázáno rozpočtem pro daný projekt na určité období, a tak kontinuita projektů a tím i pravidelný přísun financí

nemusí být zaručeny. Navíc platové ohodnocení v akademické sféře zpravidla nedosahuje závratné výše, takže si mladí akademici rádi přivydělají. A tak zde vznikla šance pro řadu malých firem se start-upovými projekty, využívajících finanční zdroje společností ochotných investovat do aplikovaného výzkumu v perspektivních oblastech, které se propojily s univerzitami zpočátku v personální, později i ve výzkumné oblasti. Mnohé z těchto firem měly poměrně široký a velmi diverzifikovaný program. Je třeba zmínit, že ne všechny byly úspěšné, což do značné míry záviselo na kvalitě managementu, lépe řečeno na jeho schopnosti ve správném okamžiku firemního růstu zajistit potřebný kapitál.

Začátky společnosti Cetus Corporation v projektu rekombinace DNA

Cetus Corporation, založená v roce 1971 pro start-up projekt rekombinace DNA, takové štěstí měla. Po neúspěšném shánění investora se její prezident Peter Farley rozhoduje vydat v roce 1981 emisi 5 milionů veřejně obchodovatelných akcií po 23 USD, která je velmi úspěšná. Farley však, bohužel, nemá ujasněnu strategii budoucího rozvoje společnosti. Cetus v té době disponuje velmi diverzifikovaným programem zahrnujícím kvasnou chemii, farmacii a řadu dalších projektů, včetně již zmíněného původního start-upu rozšířeného o sekvenování DNA. Farley vidí šanci ve farmacii, jedná mimo jiné s japonskými partnery. Zároveň nabírá 160 zaměstnanců na celkových 350, což následně vede, po neúspěšném jednání s Japonci, k úpadku pracovní morálky. Po řadě jednání o budoucím výrobním programu společnost v roce 1982 angažuje do funkce prezidenta Roberta Fildese s mandátem zredukovat množství řešených projektů a z Cetusu udělat obchodně úspěšnou společnost.

Pro budoucí zaměření firmy na biotechnologie měla význam další událost z roku 1981, kdy byl vedoucím programu rekombinace a sekvenování DNA jmenován Tom White. Jeho vize „How do we improve quickly enough to become a credible force in biotechnology and a proven threat to our competitors“ hrála podstatnou roli v transformaci Cetus Corporation na biotechnologickou společnost zaměřenou

na diagnostiku. A právě toto zaměření umožnilo dosáhnout výsledků převratné úrovně, potvrzené celkem 17 udělenými patenty.

Kdo a kdy tedy vlastně objevil PCR?

Každý, kdo okusil vědeckou práci v přírodovědných disciplínách, ví, že současná vědecká práce je prací týmovou. Základem každého vědeckého objevu je nápad. Avšak tento nápad musí být rozvinut, ověřen, dopracován, což je ještě dlouhá cesta k publikovatelnému výsledku. Nejinak tomu bylo v Cetus Corporation v případě PCR. Autorství koncepce PCR – tedy onoho nápadu – je přiznáno Kary B. Mullisovi. Dnes využívaná technologie by však nevznikla bez Henryho Ehrlicha, Freda Faloony, Randalla Saikkioho, Normana Arnheima, Glenna Horna, Coreye Levensona, Stevena Scharfa, již zmíněného vedoucího programu Toma Whitea a řady laborantů, kteří ji propracovali, experimentálně ověřovali, upravovali instrumentarium potřebné k provádění techniky a přivedli technologii k výsledkům odpovídajícím vědeckým standardům, takže na přelomu let 1987/88 byla připravena k rutinnímu využití. Zájem, který PCR vyvolala u odborné veřejnosti, vedl k tomu, že Americká společnost pro rozvoj vědy (AAAS), vydavatel časopisu Science, přiznala v prosinci 1989 nově udělované prestižní ocenění Molecule of the Year právě PCR.

Na propracování technologie PCR pracovaly v letech 1984 a 1985 v Cetus Corporation dva týmy. První z nich tvořili Kary B. Mullis a Fred Faloona, druhý ostatní výše jmenovaní vedoucí vědeckí pracovníci a špičkoví laboranti v jejich laboratořích. Přesto trvalo půl roku, než bylo dosaženo prvních vědecky spolehlivých a publikovatelných výsledků experimentů a téměř celé dva roky, než byly optimalizovány reagentie a technické postupy, jimiž je možno dosahovat výsledků s dostatečnou senzitivitou a specificitou tak, aby mohly být demonstrovány síla a flexibilita, jaké slibovala Mullisova koncepce.

Tvrdý boj o platnost patentů

Zájem veřejnosti však vždy signalizuje možnost dobrého uplatnění na trhu, a te-

dy obchodní potenciál. Zde nastupuje tvrdý business se svými známými bezskrupulózními metodami (co na tom, že je to „svinstvo“, hlavně, že vynáší). Zde již končí prostor pro vědce, teď nastupují právníci. A to ne ledací, přímo nejzkušenější ze zkušených, nejbezohlednější z bezohledných, všemi mastmi mazaní – a samozřejmě velmi dobře placení. Kam se hrabe odměna pro Kary B. Mullise, byť byla nejvyšší v historii firmy Cetus.

Firma DuPont Corporation poté, co zjistila, že prakticky celý postup technologie má Cetus patentován, zadala svým právníkům úkol zpochybnit platnost těchto patentů. Hlavním argumentem bylo, že PCR není nová metoda, neboť téměř všechna fakta o součástech, z nichž je sestavena, jsou známa již od konce šedesátých let, kdy byla objevena v laboratoři nositele Nobelovy ceny Hara Gobinda Khorany. Argumentem obhajoby bylo, že jednotlivé procesy mohly být známy, přínosem PCR je však koncepce, díky níž se právě nabízí široké praktické využití. Proč, když byly součásti známé, za téměř 15 let nikdo tuto koncepci nevytvořil? Proč tyto technologie nikdo nepatentoval? Obžaloba napadala Cetus v 50 bodech. Porota

nakonec, po několik let trvajícím procesu, ve všech 50 bodech rozhodla ve prospěch patentů Cetus z roku 1987.

Nezávisle na verdiktu soudu zbývá otázka, proč vědec formátu Hara Gobinda Khorany neobjevil PCR koncem 60. let? Podle Henriho Ehrlicha odpověď spočívá zřejmě v rozdílném zadání: Har Gobind Khorana si kladl otázku, jak namnožit gen in vitro. Odpověď na ni přinesla technika klonování, která na počátku sedmdesátých let znamenala možnost získat dostatečný počet kopií in vivo. Druhou příčinou byla skutečnost, že Khoranův tým byl svázán faktem, že v té době při manipulaci s DNA dominovaly koncepce a systémy striktně biochemické a molekulárně biologické. Kary B. Mullis měl odlišný úkol: syntetizovat oligonukleotidy, tedy konkrétně jeden oligonukleotid o 158 bázích, takže si kladl otázku, jak in vitro namnožit stopadesátiosmimer? Mullisova koncepce vkládala biologický proces do stroje, což byl oproti Khoranovým snahám opačný přístup.

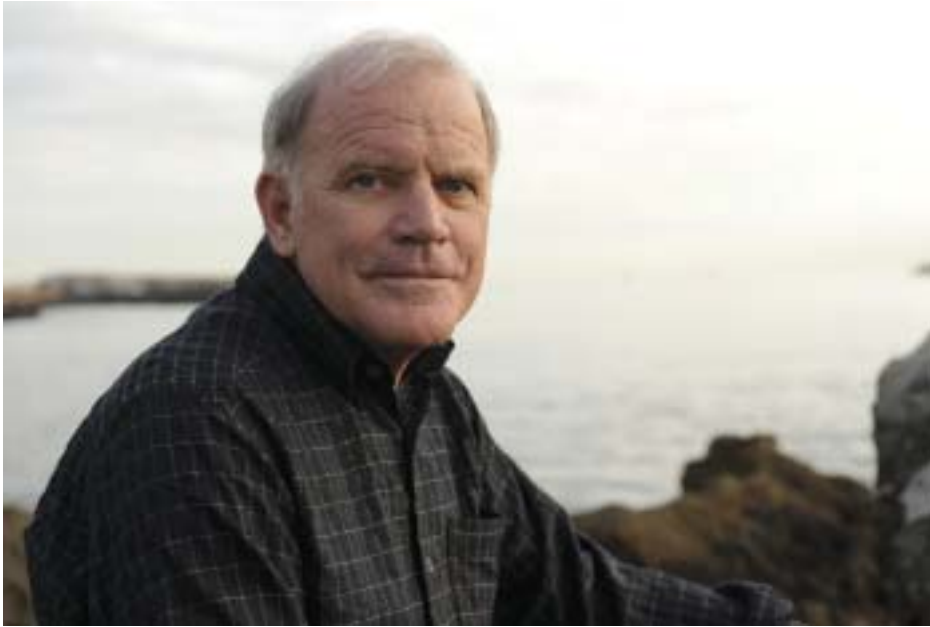
Dalším faktorem, který výrazně ovlivnil úspěch Cetus Corporation, byla v oblasti výzkumu biotechnologií v 70. letech minulého století nově vzniklá a uplatňovaná

strategie Work-Patent-Publish. U jejího zrodu stála určitá soutěživost s konkurenčními firmami (v případě Cetusu zejména Genentech), ale i určitá řevnivost s akademickými výzkumníky. Tato vědecká elita měla vůči odpadlíkům, kteří se vzepřeli zavedenému pořádku, přezíravý postoj. Navíc při prezentacích výsledků na vědeckých konferencích čelili výzkumníci z praxe aroganci akademických autorit. Takže registrace patentu na originální díle řešení před jeho publikací znamenala nejen definitivní zisk prvenství před konkurencí, nýbrž i jistou formu uznání odborné veřejnosti.

Objevitel – vynálezce – člověk Kary Banks Mullis

Oficiální životopis nositele Nobelovy ceny za biochemii z roku 1993 lze nalézt na webu Nobel Prize Committee. Je zpracován podle osnovy z dodaných podkladů a odpovídá požadavkům autorů encyklopedií. Tuto verzi bych, s vaším svolením, ponechal příštím generacím a pokusím se předložit verzi z faktů získaných Paulem Rabinowem, profesorem antropologie na University of California v Berkeley, z roz-





Kary B. Mullis, foto: Kent Clemenco

hovorů s pracovníky Cetus Corporation při přípravě knihy *Making PCR* (The University of Chicago Press 1996).

KARY BANKS MULLIS se narodil 28. 12. 1944 v Lenoir v Severní Karolině v rodině obchodníka s nábytkem. Povinnou školní docházku absolvoval v hlavním městě Jižní Karolíny Columbiu. Velký vliv na něho měl jeden z jeho učitelů, který jej přivedl k samostudiu z literárních pramenů („Chceš-li něco studovat, nečekej, začni tady a hned! Táhle je knihovna.“). V roce 1962 zahájil studium chemického inženýrství na Georgia Technical Institute. Když mu kamarád popsal studium na univerzitě v Berkeley, rozhodl se podat si tam přihlášku ke studiu. Ke svému překvapení byl přijat, aniž měl jakékoli kone-
xe. V roce 1966 zahajuje studium doktorského programu v biochemii. Atmosféra tvůrčí svobody na University of California v Berkeley mu učarovala. Jeho původní školitel Allan Wilson mu povolil široký výběr kurzů, takže se Mullis dostává do laboratoře známého protiválečného aktivisty J. P. Neilandse. Jeho názory přijímá v morální, nikoli politické rovině. V květnu 1968 učiní Mullis pro postgraduálního studenta bezprecedentní krok a posílá svůj článek *The Cosmological Significance of Time Reversal* do prestižního časopisu *Nature* a daří se mu jej protlačit k publikaci. Situaci komentoval slovy: „Netušil jsem, že je to bezprecedentní. Myslel jsem, že když máš nápad, pošleš jej do *Nature*.“ Na následující doktorandské zkoušky sice nebyl dobře připraven,

ale lze vyhodit někoho, kdo publikuje v *Nature*? V roce 1972 obhajuje práci *Structure and Organic Synthesis of Microbial Iron Transport Agents* a získává titul Ph.D. v biochemii. Práce byla napsána v „lehce dráždivě humorném tónu“, což část komise těžce trávila. Mullise tentokrát zachránila silná Neilandsova podpora. Mezitím se Kary Mullis stihl oženit a rozvést. Krátce nato se opět žení a odchází do Kansasu, kde jeho druhá žena začíná studium medicíny a on zamýšlí psát román. Místo toho nastupuje do laboratoře dětské kardiologie, což je pro Ph.D. z Berkeley „kariérní sešup“, což on tak nebere. Spíš v tom spatřuje možnost rozšířit své vědecké a technické schopnosti, tentokrát v oblasti fyziologie a medicíny. Práce spočívající v pokusech na zvířatech, končící denně pytlek krysích hlav, jej však brzy frustruje, a tak začíná psát science-fiction. Po rozvodu v roce 1975 se vrací z Kansasu do Berkeley se svou budoucí třetí ženou, studentkou ošetrovatelství. Nikoli však na univerzitu. Téměř celé 2 roky pracuje jako manažer místní restaurace a kavárny *The Buttercup Bakery*, patříci Mullisově první ženě. Zde jej v roce 1977 objeví Thomas White a upozorní ho na volné místo v laboratoři Wolfganga Sadeeho na University of California v San Franciscu. Šlo o pozici chemika izolujícího endorfíny. Mullis ji přijal s nadšením, že se bude moci vrátit do vědy, a navíc získá zkušenosti v neurovědách. Jeho nadšení brzy končí u pytle s mrtvými krysami. Když jej Tom White v roce 1979 informuje

o volné pozici v Cetus Corporation, neváhá ani minutu a podává přihlášku. Nastupuje do Laboratoře syntézy DNA vedené dr. Bahlem. Jeho úkolem je syntéza oligonukleotidů. Je nadšen. Konečně pochopil DNA jako chemickou strukturu, již lze syntetizovat. Pracuje velmi tvrdě na zrychlení a zefektivnění této syntézy. Jeho akce mnohdy vedou ke konfliktům s Bahlem. Po nástupu do funkce vedoucího programu rekombinace a sekvenování DNA v roce 1981 Tom White odvolává Bahla a do funkce vedoucího laboratoře ustanoví Mullise. Živelnost, s jakou se Mullis pustil do plnění zadaných úkolů při určitém deficitu znalostí z molekulární biologie, měla za následek úpadek kvality produkovaných oligonukleotidů a vlnu kritiky a konfliktů ze strany ostatních vědců, pro něž je připravoval. Za této situace White nařizuje Mullisovi provádět pouze standardizované pokusy. Téměř okamžitě se kvalita produkce zlepšila. White byl přesvědčen, že má v týmu vědce s inovativním myšlením, jehož stojí za to podporovat, byť je třeba jej částečně krotit. Konflikty se spolupracovníky byly na denním pořádku i v jeho vlastní laboratoři. Pokud přesáhly rámeček, řešil je White nařízením zpravidla týdenní dovolené. Kary usilovně pracoval na zpřesnění syntézy oligonukleotidů a její automatizaci. K tomu potřeboval nové, kvalitnější přístrojové vybavení. Ke zděšení svých laborantů začal s komputizací celé laboratoře, což mu umožnilo sledovat celý její provoz z domácího terminálu. Zkoušel nové softwarové programy, testoval přístroje vyrobené jinými výrobci. Dnes to možná zní jako samozřejmost, ale je třeba si uvědomit, že v té době měl doma k dispozici 32kB Amigu a v práci tehdy vysoce výkonný VAX, z dnešního pohledu s téměř směšnými parametry.

Výsledky Mullisových experimentů

Prvním výsledkem Mullisových experimentů byl poznatek, že oligonukleotidy hybridizují velmi rychle, takže čas pro hybridizaci lze podstatně zkrátit. Ve spolupráci s firmou *Biosearch* testuje prototyp DNA syntetizéru a navrhuje jeho úpravy. Výsledkem je, že jím vedená laboratoř je průkopníkem automatizace syntézy DNA a výroba oligonukleotidů se zkracuje

z měsíců na dny. Tato zvýšená efektivita umožňuje Mullisovi věnovat se softwaru a dostává se k exponenciální amplifikaci, jež je jednou z klíčových charakteristik konceptu PCR. Kdy přesně vznikla koncepce PCR? Na to byl Kary B. Mullis tázán, když vypovídal pod přísahou ve výše zmíněném soudním procesu *DuPont vs. Cetus* v zimě 1990. Odpověď zněla: „Jedné páteční noci na jaře 1983 během několikahodinové jízdy autem po státní dálnici a klikatých okresních silnicích z Cetus Corporation do mého bungalovu v Mendocinu.“ Podle toho, že Mullis udává, že právě kvetl *Aesculus californica*, lze osudovou noc upřesnit na duben až květen. Oné noci, za volantem vozu, při úvahách, jak zvýšit citlivost hybridizační detekce betaglobinového genu, došlo k osudovému myšlenkovému propojení tepelné denaturace DNA, hybridizace, oligonukleotidů jako primerů a sond, enzymů a dalších složek. Krok směřující k PCR byl učiněn. Celý týden domácího pobytu Kary Mullis věnoval novému nápadu: načrtával různé varianty, skládal možnosti využití dostupných procesů a poznatky ze svých dosavadních pokusů, až nabyl přesvědčení, že technologie replikace DNA *in vitro* je reálná. Po návratu do Cetus Corporation pak studoval dostupnou literaturu a dotazoval se kolegů z firmy i univerzit, zda o takové technologii nevědí. Nevěděl nikdo. A tak se v Cetusu spustil proces mravenčí práce na ověřování koncepce a vývoji nové technologie. Trvalo více než rok, než bylo dosaženo prvních publikovatelných výsledků. V této době se značně vyostřily již nijak valné vztahy mezi Mullisem a jeho kolegy ve firmě. K vyvrcholení konfliktu došlo v červnu 1984 na firemním sympoziu v Monterrey. Mullis zde měl poster s výsledky týkajícími se amplifikace betaglobinového genu, který jeho kolegové prakticky ignorovali. Na následné party došlo k obviňování z nekompetentnosti a k fyzickému násilí mezi Mullisem a Mikem McGroganem, které ukončil až mohutnou

postavou vybavený John Sninsky. Přesto však toto sympozium a poster sehrály důležitou roli v již zmínovaném procesu *DuPont vs. Cetus*, a to svědectvím Joshua Lederberga, kterého právě Mullisův poster jako jediného zaujal.

Po Monterreyském incidentu zesílil tlak na Toma Whitea, podpořený řadou dalších argumentů, aby Mullise propustil. Kdyby byl Mullis propuštěn, nikdo by se nemohl divit. Top manažeři White, Price a Fildes se rozhodli dát mu šanci: Mullis byl odvolán z funkce vedoucího laboratoře syntézy DNA a přeřazen do oddělení lidské genetiky vedeného Normanem Arnhemem, kde dostal čas 1 rok, aby předložil validní výsledky potvrzující jeho koncepci, s podmínkou vypracování zprávy pro vedení po půl roce.

White věřil ve správnost Mullisovy koncepce, postupně však ztrácel víru, že ji Mullis uvede v život. Proto iniciuje vznik PCR-skupiny složené z Arnheima, Ehrlicha a jejich spolupracovníků. Skupina se schází každý pátek a prezentuje dosažené výsledky. Mullis a Faloona, tvořící druhou skupinu, jsou na tyto schůze zváni a minimálně jeden z nich je na každé přítomen. Konstruktivnost jednání opět obnovuje kolegiální vztahy. Výsledky jsou slibné. Nyní přichází čas pro špičkové laboranty – Freda Faloona doplňují Randall Saikki a Stephen Scharf. 15. listopadu 1984 přináší Scharf na poradu výsledky, které jasně dokumentují, že PCR funguje. V jeho deníku je záznam IT WORKS! Skupina však cítí, že byť jsou nyní dosahované výsledky jednoznačné, projekt není ještě dotažený. Proto je Randall Saikki uvolněn pro práci na PCR na celý úvazek. Úspěch se dostává záhy: 28. 3. 1985 je vyplněna první patentová přihláška. White s Arnhemem, který právě přijal místo vedoucího katedry biologie na University of South California (USC) a v srpnu 1985 odchází zpět do akademické sféry, rozhodují, že je čas publikovat. Mullis je zásadně proti. Po řadě konfliktních jednání je rozhodnuto, že Mullis připraví článek o meto-

dě a Saikki o praktickém využití při amplifikaci betaglobinového genu. Mullis se definitivně podvolí teprve v okamžiku, kdy se ukáže, že dopodrobna popsal novou metodu jednomu ze svých přátel mimo Cetus a že hrozí ztráta prvenství, pokud by se PCR ujal Genentech nebo Chiron. Saikkiho článek vychází v *Science* 20. 12. 1985. Mullis posílá svůj článek do *Nature*, bohužel bez průvodního dopisu, jenž by popisoval, v čem se liší od Saikkiho článku pro *Science*. Výsledkem je, že článek je odmítnut jako neoriginální. Následně článek odmítá i *Science* s tím, že je příliš metodický. Zuřící Mullis je opět v konfliktu se svými kolegy, hovoří o krádeži objevu. Vedoucí pracovníci se snaží umístit Mullisův článek co nejdříve do vhodného časopisu. Shing Chang navrhuje *Methods in Enzymology*; šéfredaktor Ray Wu slibuje rychlé zveřejnění. Shodou nešťastných okolností se však vydání čísla s Mullisovým a Faloonovým článkem zpozdlilo a vyšlo až v lednu 1987. Mezitím byl už Kary B. Mullis známý a slavný muž. Frank McCormick z vedení Cetus Corporation kontaktoval Jamese Watsona z Cold Spring Harbor a prosadil u něj zařazení Mullisovy přednášky na nadcházejícím sympoziu CSH The Molecular Biology of Homo Sapiens, konaném v květnu 1986. Pro Mullise to byla první „invited lecture“ v životě, navíc na velmi prestižním vědeckém fóru. Bohužel Cold Spring Harbor Proceedings, obsahující přednášky ze sympozií, nemají takový dosah na odbornou veřejnost ve srovnání s jinými periodiky, takže jen málokdo zná publikaci K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saikki, G. Horn and H. Ehrlich: *Specific Enzymatic Amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction*.

Volně zpracováno na podkladě faktů publikovaných Paulem Rabinowem v knize Making PCR, A Story of Biotechnology, The University of Chicago Press 1997, ISBN 0-226-70147-6.

Zveřejněnou fotografii Karyho B. Mullise jsme získali díky laskavosti jeho ženy Nancy. Paní Mullisová nám zároveň poslala upozornění, jehož doslovný překlad uvádíme v rámci objektivitu:

*„Kary nikdy neautorizoval Rabinowovu knihu, protože je v ní příliš mnoho nepřesností. Kary nebyl požádán o rozhovor ani o konzultaci. Ti, kteří rozhovory a konzultace poskytli, měli snahu ukázat svůj větší podíl na vývoji PCR, než jim ve skutečnosti náleží. Navíc všichni se, včetně Karyho šéfa v Cetus Corporation Toma Whitea, rozhodli ignorovat Karyho nápad, který jim objasnil bezprostředně po objevu. Trvalo jim značnou dobu, než se přesvědčili o správnosti koncepce, o to víc se pak snažili přisvojit si část zásluh. Až teprve v soudním procesu *Du Pont vs. Cetus*, když vypovídali pod přísahou, byli nuceni vypovědět, že Kary vymyslel PCR sám. Proto se s nimi nemusel dělit o Nobelovu cenu.“*