


P3. Koevoluce proteosyntézy a genetického kódu; cesta k prvním buňkám

Otázku, zda molekuly typu RNA předcházely bílkovinám či naopak, jsme rozhodli ve prospěch RNA - molekul schopných zastat funkci genotypu i fenotypu. Na konci kapitoly o vzniku života jsme navíc předložili možnost primární existence protometabolismu, tj. látkových přeměn v rámci neinstruovaných autokatalytických cyklů (cyklů s proteinovými katalyzátory, syntetizovanými v nepřítomnosti genetické instrukce); protometabolismus by řešil problém vzniku prekursorů RNA (aktivovaných ribonukleotidů), původně asi ve funkci nosičů chemické energie. Tyto cykly mohly být i zdrojem prvních replikativních molekul RNA - staly by se základem světa RNA a zdrojem hypercyklů, schopných darwinovské evoluce.

Další etapou by bylo převzetí („take-over“) protometabolismu hypercykly. Tato etapa by zahrnovala koevoluci systému, umožňujícího primitivní proteosyntézu. Selekcí hypercyklů se schopností využít produkty protometabolismu by mohlo docházet ke vzniku kongruentního (navazujícího, souvztažného) instruovaného metabolismu (deDuve 1991; de Duve 2002).

 *Kritickou etapou byl přechod ze světa RNA do světa genetických systémů s instruovanou proteosyntézou. Tento přechod předpokládá evoluci translačního aparátu a genetického kódu.*

Dnešní syntéza proteinů umožňuje přechod od lineárního uspořádání bazí v genech (čtyřpísmenového jazyka) k lineárnímu uspořádání aminokyselin svázaných peptidovou vazbou (dvacetipísmenovému jazyku); uskutečňuje se prostřednictvím RNA templátu, souboru molekul tRNA, a předpisů pro přiřazení jednotlivých aminokyselin trojicím bazí (kodonům).

Jednou z prvních hypotéz o vzniku tohoto přiřazení je Crickova hypotéza fixované náhody („frozen accident hypothesis“; Crick 1968). Nevysvětluje však základní vlastnost genetického kódu - jeho vnitřní konsistenci, projevující se odolností proti mutačním změnám.

Pozorováním vztahů mezi kodony a jim přiřazenými aminokyselinami k následujícím závěrům:

-matici přiřazení kodonů aminokyselinám lze vertikálně rozdělit na dvě poloviny, z nichž levá (kodony s U, a C, na druhém místě) obsahuje hydrofobní aminokyseliny (hydrofobicita vzrůstá ve směru C \rightleftharpoons U), a pravá (s kodony A, G, na druhém místě) obsahuje aminokyseliny převážně hydrofilní (hydrofilnost vzrůstá ve směru G \rightleftharpoons A); aminokyseliny jejichž kodony mají společný dublet jeví velmi podobné polární

vlastnosti; aminokyseliny jejichž kodony jsou vzájemně komplementární, jeví opačnou polaritu.

-všechny aminokyseliny (s výjimkou Met a Trp) jsou kodovány více než jedním kodonem,

-vícenásobné kodony pro tutéž aminokyselinu tvoří bloky synonymních kodonů: v blocích se dvěma synonymními kodony se kodony liší tranzicí na 3. místě; v blocích se 3 nebo 4 kodony jsou rozdíly opět pouze na 3. místě; šestikodonový blok (Leu) se rozpadá na dva souvislé bloky, jeden se dvěma a druhý se čtyřmi kodony,

Podrobnějším studiem přiřazení 64 kodonů 20 aminokyselinám lze odhalit ještě další, jemnější, souvislosti (Knight, Freeland et al. 1999).

Vzhledem vysoce optimalizované struktuře kódu považujeme dnes Crickův "frozen accident" za mrtvou hypotézu. V rozporu s ní jsou i nálezy odchylek od universálního, kanonického kódu, které byly nalezeny v genomech eukaryot, mikroorganismů i mitochondrií a které lze vysvětlit jen dodatečnými změnami již ustálených pravidel kódování a re-adaptací příslušných organismů či organel na tyto změny. Příklady těchto odchylek a jejich vysvětlení ve prospěch evolvability a adaptability kódu uvádějí R.D. Knight a spol. (Knight, Freeland et al. 1999)

Z velmi rozsáhlé a nesnadno přehledné literatury, zaměřené na řešení záhady vzniku genetického kódu a souvislosti proteosyntézy, můžeme vyčlenit čtyři základní přístupy


a. „spekulativní“: i) zmíněnou již Crickovu hypotézu („frozen accident hypothesis“); ii) spekulace založené na předpokladech o složení prebiotického prostředí (A. Jiménez-Sánchez 1995);

b. „experimentální“: Woese (1966), Yarus a spol. (1998; 2002), Knight a spol. (1999; 2000), cestou *in vitro* selekce aptamerů pro vazbu aminokyselin; vychází se z hypotézy o přímých interakcích aminokyselin s oligonukleotidy v prebiotických podmínkách a přímé selekci kodonů/antikodonů ve vazebných místech pro aminokyseliny (experimenty byly zatím plně přesvědčující jen pro velmi omezený repertoár aminokyselin);

c. „molekulárně paleontologický“: i) Meizels & Weiner (1994); Schimmel & Ribas de Pouplana (1995), starší polovina tRNA, akceptorová mikrosmyčka s operačním kódem, evolučně předcházela antikodonové části; antikodonová část vznikla nezávisle a připojila se k operačnímu kódu později;

d. „hypotézu o koevoluci operačního a tripletového kódu“: Rodin & Rodin, Ohno (1996; 1997) zjistili, že mezi dnešními složkami proteosyntézy, především molekulami tRNA, lze najít konsensuální prvky a zákonitosti pro dedukci hypotézy o vzniku kódu – starší operační kód a novější tripletový kód vznikly ve vzájemné koevoluční souvislosti, tripletový kód je odvozen z operačního. Tento přístup je prozatím jediným, kdy se podařilo najít konsistentní vztahy mezi operačním kódem, tripletovým kódem, evolucí molekul tRNA, aaRs (aminoacyl tRNA syntáz), a provázat tyto základní složky proteosyntézy v jediném koevolučním schématu.


O této hypotéze bude podrobněji pojednáno dále.

 Použijeme dále evoluční, historický přístup a vysvětlení, že vznik proteosyntézy a vznik tripletového genetického kódu jsou výsledkem posloupnosti vzájemně závislých evolučních kroků. Z Darwinovy

teorie plyne, že evoluce budoucnost neplánuje; žádná předem naprojektovaná trajektorie, vedoucí k proteosyntéze, neexistuje. Evoluce tápavě postupuje od jedné etapy ke druhé, usměřována jen lokálními podmínkami adaptace. My proto nezaváháme hledat počátky kódované proteosyntézy na odlehlém poli, v počátcích replikace RNA a hledání předchůdců dnešních tRNA.

Molekuly typu tRNA (tj. molekuly obsahující části s vásenkovou konformací) jsou považovány za první replikátory i nejstarší molekuly světa RNA (Eigen and Schuster 1979). Počítačová analýza sekvencí tRNA ukazuje, že tyto molekuly mohly evolovovat amplifikací a diversifikací palindromatických modulů (sekvencí obsahující motivy s protisměrným uspořádáním komplementárních bází, např. sekvence A C C A C G A U G C A U C G U G G U).

V kapitole o vzniku života jsme uvedli, že *in vitro* byly vyselektovány ribozymy, katalyzující ligaci krátkých nukleotidových řetízků i prodlužování konců vlákna RNA. Nepřetržitá replikace delší molekuly RNA je však náročnějším procesem. Prvotní templáty RNA pravděpodobně umožňovaly zahájení replikace v libovolném místě a proto převážně produkovaly jen neúplné kopie. Selekční výhodou musel být vznik strukturální značky pro zahájení replikace na 3'-konci templátu, jediném vazebném místě pro RNA polymerasu, tj. vznik replikačního počátku ještě v lůně RNA hypercyklů.

 Replikace dnešních RNA genomů ukazuje možnou souvislost mezi původními RNA replikátory a vznikem dnešní tRNA (Weiner and Maizels 1987; Maizels and Weiner 1994).

Stopy této pradávnejší evoluční etapy můžeme najít v genomech RNA virů a v příbuzných strukturách RNA (Giegé, Frugier et al. 1998).

Dobře prostudovaným virem je bakteriofág Q β . Strukturálním signálem pro vazbu RNA polymerázy je krátká smyčka zakončená tripletem CCA na 3'-konci jednovláknového genomu Q β . Motiv -CCA najdeme i v akceptorové části všech dnešních tRNA jako sekvenci určenou pro vazbu aminokyselin (připojení aminokyseliny na 2'- nebo 3'-hydroxyl ribosy v terminálním adenosinu).

Replikační počátek Q β RNA může být *in vitro* aminoacylován, byť se *in vivo* translace neúčastní; vazba aminokyselin na replikační počátky RNA však mohla mít původně svůj specifický význam - mohla se podílet na stabilizaci replikačního komplexu a usnadňovat vyhledávání 3'- konce templátu (Orgel 1989; deDuve 1991). Možná sloužila i jako spojka pro zakotvení replikačního komplexu na membránu a usnadňovala tak separaci vláken RNA.

☞ Pro naši diskusi je podstatné, že *triplet -CCA, jednou vyselektovaný jako universální akceptorová sekvence, zůstal již během další historie pro tento účel zachován* (Weiner and Maizels 1987).

Vrátíme-li se zpět k hypercyklům, postreplikační úpravy RNA, například odštěpení zmíněných replikačních počátků z části populace replik, mohly vytvořit podmínky pro další diferenciaci a evoluci systému. Hypercykly pak mohly obsahovat:

- informační složky s funkcí genomů,
- výkonné složky, kopie RNA s ribozymovými aktivitami,
- pomocné složky s konformacemi způsobilými k interakcím s aminokyselinami nebo jinými substráty (C.R. Woese a spol. 1966): adaptory nebo aptamery (*aptus* - přesně padnoucí, hodící se).

☞ *Struktury, moduly a funkce, využití v dřívějších evolučních etapách, později modifikované a zakomponované do jiných kontextů* (Ganforina and Sánchez 1999), *mohou tímto „flikováním“* (Jacob 1977) *přispět ke vzniku přelomových evolučních inovací.*

Podle toho přisoudíme vlásenkovým konformacím RNA, odštěpených z replikačních počátků RNA replikátorů novou úlohu adaptorů usnadňujících nekatalyzovanou kondenzaci aminokyselin.

Spontánní kondenzace aminokyselin vyžaduje relativně tvrdé chemické podmínky. *Adaptorová syntéza peptidů* by do systému vnesla nové možnosti. Díky aktivaci karboxylové skupiny aminokyselin vazbou na hydroxyl adenosinu skupiny -CCA v adaptorové vlásence by vznik peptidové vazby mohl probíhat v měkkých podmínkách.

Vlásenkové konformace oligoribonukleotidů mají schopnost vytvářet agregáty přeskupením *intra*-molekulárních vodíkových vazeb v *iter*-molekulární. Takže i aminoacylované adaptory mohly ve vhodných podmínkách vytvářet agregáty. Agregace by pak usnadňovala spontánní kondenzační reakci při vzniku peptidů. Tento mechanismus by ovšem vedl k peptidům s převážně náhodným uspořádáním aminokyselin. Přesto by mohla i tato *neinstruovaná peptidosyntéza* přinášet riboorganismům určité selekční výhody, například stabilizaci celého systému a přispět k diferenciaci funkcí lipidových membrán.

☞ *Další cesta k proteosyntéze nepochybně vedla přes vznik operačního („druhého“) kódu* (DeDuve 1988; DeDuve 1991; Schimmel and Henderson 1994), *který můžeme považovat za nejstarší způsob kodování, předcházející tripletovému genetickému kódu.*

Operačním kódem v podmínkách dnešní translace rozumíme soubor strukturálních signálů pro specifické přiřazení aminokyseliny odpovídajícím tRNA příslušnou aminoacyl tRNA syntázou (aaRs).

Translace ve své současné podobě zahrnuje dvě časově i prostorově odlišené etapy. V první etapě se uskutečňuje dvoustupňová aktivace aminokyselin s jejich specifickou vazbou na akceptorovou část tRNA, druhá etapa zahrnuje interpretaci informace, uložené tripletovým genetickým kódem v mRNA. Všimněme si strukturálního a funkčního *propojení dvou rozpoznávacích mechanismů*:

i) rozpoznávání na úrovni komplexu [aaRs-aktivovaná aminokyselina-akceptorová část tRNA],

Rozpoznávání komplexu aminokyselina-aaRs příslušnou tRNA primárně souvisí s nukleotidovým složením krátké dvouvláknové struktury v akceptorové části tRNA (mikrohelixu), ale často je důsledkem interakcí enzymového komplexu i s jinými částmi molekuly tRNA. Velmi záleží na prostorové konformaci celého systému.

ii) rozpoznávání na úrovni párování tripletů antikodonové části tRNA s kodony v mRNA.

Rozpoznávání aminokyselin na úrovni akceptorové části tRNA musí být v souladu s rozpoznáváním na úrovni párování tripletů kodon mRNA/antikodon tRNA, přestože akceptorová sekvence -CCA a antikodonový triplet jsou od sebe prostorově vzdáleny 7-8 nM. A navíc, z degenerativity (redundance) genetického kódu plyne, že jedna a tatáž aminokyselina může být kódována více než jedním kodonem a může být vázána na více než jeden typ tRNA.

O výběru párů [aminokyselina-tRNA] rozhodují jednotlivé typy aminoacyl-tRNA syntetas, které jsou schopny přiřadit jedinou z 20 aminokyselin té podmnožině (isoakceptorových) molekul tRNA, která odpovídá skupině společných (synonymních) kodonů.

Aminoacylace tRNA, se účastní:

- soubor 30-50 druhů tRNA (v buňce *E. coli* je to cca $1,6 \times 10^5$ molekul). Rozdíl mezi skutečným a očekávaným počtem typů tRNA (v souladu s počtem antikodonů 61 typů různých tRNA) vysvětluje mechanismus „wobblingu“ (F. Crick), tj. odchylky od kanonického párování první (5'-) baze antikodonu s třetí (3'-) bází kodonu; v důsledku wobblingu může být počet typů isoakceptorových tRNA menší než počet odpovídajících synonymních kodonů;

- soubor 20 aminoacyl-tRNA syntetas;

- soubor 20 aminokyselin; mezi aminokyselinami a aaRs je jednoznačné přiřazení;

- ATP jako zdroj chemické energie.

Vznikem a evolucí operačního kódu byla umožněna vyšší účinnost *neinstruované* (nekódované) syntézy peptidů působením koevolvujících katalyzátorů: ribozymové peptidyltransferasy a ribozymů s vlastnostmi dnešních aaRs. Stopy po původních peptidyltransferasách se zachovaly v ribosomech (23S rRNA v 50S subjednotce ribosomů *E. coli* má peptidyltransferázovou aktivitu; (Noller, Hoffarth et al. 1992; Pace 1992).

V laboratorních podmínkách, *in vitro* selekcí, se podařilo připravit ribozym s peptidyltransferázovou aktivitou (Lohse and Szostak 1996; Zhang and Cech 1997) a modifikovat intronový ribozym (*Tetrahymena pyriformis*) tak, že výsledný ribozymový komplex získal schopnost:

-vázat koncový fragment *N*-formyl-L-methionyl-tRNA^{fMet}
-štěpit esterickou vazbu mezi formylmethioninem a hydroxylem adenosinu v akceptorové sekvenci -CCA (Picirilli, McCornell et al. 1992).

Takto byl podán důkaz, že ribozymy mohou reagovat s esterickými vazbami obsahujícími karboxyl (vazbami typu -C(O)O-R). Obrácením této reakce by vznikla aminoacylační aktivita *aaRs*. Po ribozymech s funkcí *aaRs* se však nezachovala žádná památka - jejich roli nakonec ve úspěšně převzaly proteinové katalyzátory.

Dříve zmíněné aptamery, které lze selektovat *in vitro* metodou SELEX (systematic evolution of ligands by exponential amplification; (Wilson and Szostak 1999), umožňují studovat nekovalentní interakce rozličných molekul s RNA v závislosti na její prostorové konformaci. Tyto studie ukazují, že právě tento druh interakcí mohl iniciovat vznik operačního kódu.

Byly připraveny aptamery s vazebnou specifikou pro adenosintrifosfát (ATP), aminokyseliny (L-arginin, L-tyrosin, L-valin a L-soleucin) a pro řadu dalších malých molekul (Famulok 1999).

Je zajímavé, že ve vazebných místech aptamerů pro aminokyseliny L-arginin, L-tyrosin, L-soleucin (nikoli pro L-valin) byla zjištěna opakování odpovídajících kodonových tripletů (Illangasekare and Yarus 2002). Je však nepravděpodobné, že by byly takto definovány a fixovány kodony pro každou z aminokyselin zvlášť

Metodou SELEX byly též připraveny ribozymy katalyzující tvorbu aminoacyladenylátů (Kumar and Yarus 2001) a další ribozymy pro přenos aktivované aminokyseliny z aminoacyladenylátu na akceptorovou sekvenci tRNA (Illangasekare and Yarus 1999).

Mohou tedy existovat ribozymy schopné katalyzovat tytéž reakce, které katalyzují dnešní proteinové *aaRs*; laboratorní experimenty ukazují *možnost koevoluce aaRs a operačního kódu rozšířením funkcí aptamerů*:

- o schopnost vázat aminokyseliny (nekovalentní interakce),
- o schopnost vázat ATP (nekovalentní interakce),
- o schopnost aktivovat aminokyseliny (tvorbou kovalentních vazeb typu NH₂(R)COO-AMP),
- o schopnost nekovalentní vazby k adaptorovým smyčkám,
- o aktivitu pro aminoacylaci adaptorů (tvorba kovalentních vazeb typu NH₂(R)CO-O-adaptor)

☞ *Na základě operačního kódu, bez doplňujícího předpisu pro jednoznačné lineární řazení aminokyselin, mohly vznikat jen peptidy s náhodným uspořádáním aminokyselin.*

Molekulární evoluce metodou zkoušek a omylů dále směřovala k zajištění jednoznačnosti. Jednoznačnost v uspořádání aminokyselin v peptidech a bílkovinách měla zásadní význam pro rozvoj katalytických funkcí a evoluci komplexních fenotypů.

☝ *Stojíme před klíčovou otázkou, jak došlo k rozšíření operačního kódu o další úroveň kódování, odpovídající dnešnímu tripletovému genetickému kódu.*

Zmínili jsme již hypotézu F. Cricka, že tato událost byla náhodná a první funkční varianta pravidel pro přiřazování aminokyselin sekvencím bází zůstala evolučně fixována ve struktuře tRNA (jako „frozen accident“).

Jiní (Woese, Dugre et al. 1966; Yarus 1998) soudí, že od počátku musel existovat nějaký strukturní (konformační) vztah mezi jednotlivými aminokyselinami a nukleotidovými sekvencemi, které se následně staly kodony. Tato idea je v souladu se spontánním vznikem antikodon/kodonových vazebných center pro některé aminokyseliny v syntetických aptamerech, vychází však z velmi omezeného počtu úspěšných experimentů (viz výše).

☝ *Žádná z uvedených hypotéz není přesvědčující, především proto, že nevysvětluje vznik souvislosti mezi operačním kódem, tripletovým (genetickým) kódem a vazebnou specífitou aaRs.*

Proti laboratorním přístupům S. Ohno (Beckman Res. Institute, California, USA) a jeho ruští kolegové S. Rodin a A. Rodin (Ruská Akad.Věd, Novosibirsk) uplatnili analýzu databázových údajů o tRNA. Jako první využili zákonitosti ve struktuře složek kódujícího systému ke konstrukci velmi uspokojivého modelu, který, podložen fakty, zatím jediný nabízí komplexní pohled na společnou evoluci obou základních složek proteosyntézy: tRNA a aaRs.

☝ *Podle hypotézy Rodin-Ohno nebyly antikodony připojeny k operačnímu kódu dodatečně, ale jsou přímo od něj odvozeny.*

Takto by byla vyřešena „záhada“ funkčního propojení operačního kódu s antikodony, vzdálenými v molekulách tRNA 7-8 nM.

Pro ověření této hypotézy podrobili zkoumání *konsensuální sekvence tRNA* odpovídající každé ze 20 aminokyselin, zkonstruované na základě 1268 databázových údajů. Tyto konsensuální sekvence bylo možno uspořádat do 32 párů podle vzájemné komplementarity

antikodonů, což bylo známkou toho, že *tRNA nevznikaly individuálně ale v párech*.

☞ Pokud platí hypotéza Rodin-Ohno, že jsou antikodony odvozeny z operačního kódu, tj. ze sekvencí akceptorového mikrohelixu, lze očekávat, že *tRNA s komplementárními antikodony budou současně jevit určitou komplementaritu akceptorových mikrohelixů*. U 29 párů skutečně byla zjištěna komplementarita i mezi bázemi na 2. místě akceptorového mikrohelixu.

V případě šestinásobně degenerativních leucinových kodonů, 5'-CUN (N je jakákoli báze), antikodony rozpoznávající tyto tripletety jsou sekvence 5'-N'AG (N' je báze komplementární s N podle pravidel wobblingu).

Jeden leucinový antikodon, AAG, je komplementární s lysinovým antikodonem CUU. Druhá báze tRNA^{Leu} je G, zatímco v párové tRNA^{Lys} je druhou bází C:

(Leu) 5'- GG2 AAG
UUC C2G -5' (Lys)

Podobně isoakceptorová tRNA^{Leu} má antikodon UAG komplementární k antikodonu CUA, tRNA^{Gln}; tRNA^{Leu} má na druhém místě C, a tRNA^{Gln} má na druhém místě G:

(Leu) 5'- GC2 UAG
AUC G2G - 5' (Gln)

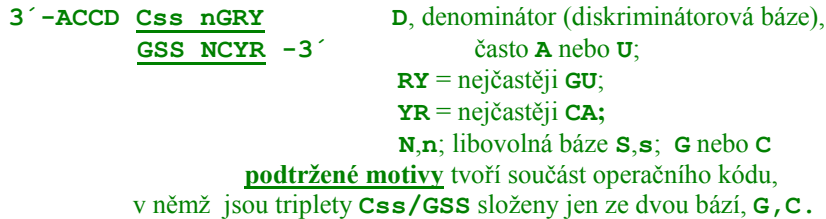
Připomeňme si, že číslování nukleotidů začíná na 5'-konci vlákna tRNA; sekvence prvních spárovaných bází v molekule tRNA tvoří *mikrohelix*.

První bázi ve všech konsenzuálních sekvencích je G, spárované s C72. Jestliže 2. bázi může být C nebo G, v množině 29 párových tRNA existují dva základní typy molekul: tRNA(C2:G71), a tRNA(G2:C71).

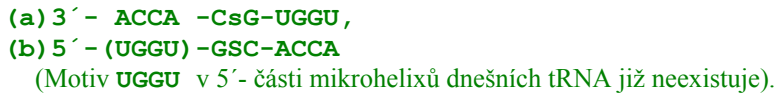
Analogické zrcadlově symetrické relace najdeme i v ostatních 28 párech konsenzuálních sekvencích tRNA. Pravděpodobnost náhodného vzniku takové *duální symetrie* ve 29 párech tRNA je menší, než 10^{-6} .

Na základě těchto pozorování byl navržen modelový mechanismus koevoluce obou typů kódů a evoluce molekul tRNA:

Konsenzuální struktura akceptorového mikrohelixu odvozená z databázových údajů o tRNA je

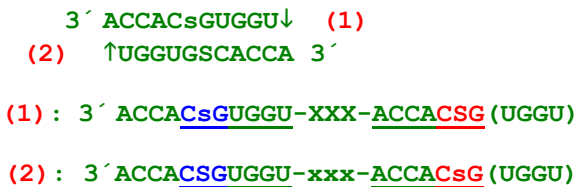


Tato konsenzuální sekvence mohla například vzniknout ze dvou komplementárních palindromů:



Palindrom (a) je produktem autoreplikací motivu ACCA: ACCA/UGGU a následné ligace centrálním tripletem CsG.
 (b) je replikou (a).

(a), (b), lze ligovat dvojím způsobem:
 spojkami **xxx** podle (1),
xxx podle (2):



-svinutím palindromů (1), a (2), vzniknou dvě genericky závislé, zrcadlově symetrické smyčky, s možnou funkcí adaptorů pro aminoacylaci;

-sekvence ACC- se zachovala jako *universální akceptorová sekvence*;

-intramolekulárně spárované sekvence (součást dnešního akceptorového mikrohelixu) jsou *zdrojem operačního kódu*;

- zrcadlově symetrické **5'-triplety GSC, GsC**, mohly původně sloužit jako *pra-antikodony*; součást archetypálního GC kódu.

- další evoluce molekul tRNA vedla k postupné *translokaci pra-antikodonů z mikrohelixu do vzdálenějších částí molekuly, nakonec až do dnešní jednovláknové antikodonové smyčky* - právě toto je příčinou duální symetrie párových molekul;

-mutační diferenciaci pra-antikodonů v jednovláknové části smyčky postupně vedla k využití všech 4 bází a k expanzi kódu k 4³ kodonům;

☞ Model názorně ilustruje postup evoluce: neplánované směřování od jedné struktur a funkcí k novým, využitelným v jiné evoluční etapě.

System vycházející z GC pra-kódu již splňoval podmínky pro syntézu jednoduchých peptidů z několika základních aminokyselin: Ala s antikodonem **GGC**, Gly s antikodonem **GCC**. Jednou transicí dospějeme k antikodonům **GAC** (Val), **GUC** (Asp). Další záměny poskytly **CCG**, **GCG** (Arg), **CGG**, **GGG** (Pro), **CCC** (Gly). Aminokyseliny Gly, Val, Asp, mohly být přítomny v prebiotických podmínkách, vznikají z jednoduchých sloučenin nekatalyzovanou syntézou. Není také bez zajímavosti, že v dnešních bílkovinách patří k nejčastějším.

Zdánlivý rozpor mezi ne-degenerativitou operačního kódu a mutační expansí tripletového (genetického) kódu lze vysvětlit odlišnými lokálními podmínkami v molekule: operační kód je svázán pravidly komplementarity v dvouvláknovém úseku akceptorové části adaptoru a vztahem ke 20 aaRs, tím je do značné míry konservován; antikodon se ocitl v jednovláknové smyčce, málo chráněné proti mutačním změnám. Mohl koevolvovat s mRNA v rámci evoluce transkripce. Rozšiřování antikodonových motivů k dnešnímu degenerativnímu (redundantnímu) kódu však již zůstalo trvale spojeno se zdrojovým operačním kódem (na rozdíl od představ předložených jinými autory, viz např. Schimmel a Ribas de Pouplana, 1995).

☞ Rodinové a Ohno poukázali i na zrcadlovou symetrii vztahů mezi dvěma základními typy tRNA, *tRNA(C2: G71)*, *tRNA(G2:C71)* a dnešními aaRs_I, aaRs_{II}, a poskytují konsistentní řešení vztahů mezi dvěma strukturálními mody mikrohelixů a dvěma mody rozpoznávání operačního kódu molekulami aaRs.

Většina dnešních aaRs patří do jedné ze dvou tříd: aaRs_I, nebo aaRs_{II}, podle toho, zda při aminoacylaci rozlišují hydrofobní nebo hydrofilní aminokyseliny a rozpoznávají 2'- a 3'- hydroxyl ribosy adenosinu v akceptorové sekvenci -CCA. Dnešní aaRs opačných tříd (s komplementárními reakčními centry) přistupují k akceptorovým koncům tRNA z opačných stran: aaRs_I ze strany malého žlábků atakují 2'-OH adenosinu, aaRs_{II} zrcadlově symetricky ze strany velkého žlábků atakují v adenosinu akceptorového tripletu -CCA hydroxyl 3'-OH.

Podle představ Rodin-Ohno si párové tRNA na počátku navzájem poskytovaly (dnes již ztracenou) aktivitu jako ribozymové aaRs a tedy *pra*-aaRs vznikaly koordinovaně, jako komplementární dvojice.

Pokusme se nyní provést syntézu poznatků:

- jednovláknové molekuly RNA s vnitřně komplementárními úseky (vlásečkové konformace), pravzory dnešních tRNA, byly původně součástí replikačního mechanismu a sloužily jako strukturní signál pro zahájení replikace,

- došlo k diferenciaci komplementárních vláken RNA na „genotyp“ a „fenotyp“; některé kopie RNA se mohly uvolnit pro nové úkoly, v důsledku přímých interakcí mezi aminokyselinami a různými konformacemi RNA mohlo docházet k selekci sekvencí vhodných pro vazbu aminokyselin (ne nutně ve vztahu k dnešním antikodonům), ATP a jiných molekul. Vznikly *adaportory* specializované jen na vazbu aminokyselin a *ribozomy-aptamery*; některé aptamery vážící aminokyseliny získaly schopnosti současně vázat ATP, aktivovat aminokyseliny a interagovat s adaportory - staly se aminoacylačními ribozomy. To mohl být základ dnešního mechanismu aktivace aminokyselin a aminoacylace RNA,

- prvotní aptamerové aaRs i adaptorové smyčky koevolvovaly a jejich vzájemné interakce vytvořily most mezi dvěma odlišnými světy, světem RNA a světem proteinů (řešila by se tak i otázka co bylo dříve, zda proteiny či geny),

- adaptorové smyčky, které vznikly jako komplementární páry, by si mohly poskytovat aminoacylační aktivitu navzájem; z nich později odvozené proteinové moduly by posléze mohly převzít funkci základních modulů obou tříd proteinových aaRs (Rodin and Ohno 1997); výsledkem této koevoluce by bylo dnes existující propojení čtyř způsobů rozpoznávání: operačního kódu, genetického kódu a informace v rozpoznávacích částech dvou tříd aaRS,

- spárovaná část adaptoru (akceptorový mikrohelix), předala dnešním tRNA svůj operační kód, kopie 5'- tripletů prvních spárovaných sekvencí mikrohelixů, postupně přemísťované a modifikované, našly uplatnění jako součást dnešní antikodonové smyčky.

-další osudy operačního a tripletového kódu byly různé: akceptorové části tRNA pomalu koevolvovaly s rozšiřujícím se repertoárem aaRs, jednovláknové antikodonové smyčky, genericky i fyzicky svázané se svými akceptorovými mikrohelixy, podléhaly mutačním změnám a postupně rozšířily repertoár kódujících bází: (G,C) ⇌ (G,C,A,U).

-transpeptidázový ribozym umožnil efektivní polymeraci aminokyselin a evoluci ribosomů.

Pro úplnost: existuje námitka (Jiménez-Sánchez), že předpoklad dostupnosti C,G (tak jak předpokládá výše uvedený model s GC kódem), není samozřejmý pro nestabilitu cytosinu a jeho snadnou konverzi v U. Proto byl navržen model založený na předpokladu, že první molekuly RNA převážně A,U, a tudíž i antikodony s A,U (A. Jiménez-Sánchez 1995).

Tento model však neposkytuje komplexní řešení problému tak jako model Rodin-Ohno.

☝ Mějme stále paměti, že žádný ze současných poznatků a modelů zatím nedovoluje jednoznačně, definitivně rozhodnout, jakými cestami se ubírala evoluce kódu a proteosyntézy. Tento problém zůstává výzvou pro evoluční molekulární biology. Byla to od počátku selekce jediné optimalizující se cesty? Nebo při vzniku živých systémů probíhaly vzájemně kompatibilní evoluční experimenty a dnešní kódovaná proteosyntéza je výsledkem jejich průniku?

Literatura

Crick, F. H. C. (1968). "The origin of the genetic code." J. Mol. Biol. **38**(367-379).

de Duve, C. (2002). Life Evolving. Oxford, Oxford University Press.

deDuve, C. (1988). "The second genetic code." Nature **333**: 117-118.

deDuve, C. (1991). Blueprint for a Cell: The Nature and Origin of Life. Burlington, N.C., USA, Neil Patterson.

Eigen, M. and P. Schuster (1979). The Hypercycle. A Principle of Natural Self-Organization. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.

Famulok, M. (1999). "Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules." Curr. Opinion in Struct. Biol. **9**: 324-329.

Ganforina, M. D. and D. Sánchez (1999). "Generation of evolutionary novelty by functional shift." BioEssays **21**: 432-439.

Giegé, R., M. Frugier, et al. (1998). "tRNA mimics." Curr. Opinion in Struct. Biol. **8**: 286-293.

Illangasekare, M. and M. Yarus (1999). "Specific, rapid synthesis of Phe-RNA by RNA." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 5470-5475.

Illangasekare, M. and M. Yarus (2002). "Phenylalanine-binding RNAs and genetic code evolution." J. Mol. Evol. **54**: 298-311.

Jacob, F. (1977). "Evolution and tinkering." Science **196**(4295): 1161-1166.

- Knight, R. D., S. J. Freeland, et al. (1999). "Selection, history and chemistry, the three faces of the genetic code." TIBS **24**(241-247).
- Kumar, R. K. and M. Yarus (2001). "RNA-catalyzed amino acid activation." Biochemistry **40**: 6998-7004.
- Lohse, P. A. and J. W. Szostak (1996). "Ribozyme-catalyzed amino-acid transfer reactions." Nature **381**: 442-444.
- Maizels, N. and A. M. Weiner (1994). "Phylogeny from function: Evidence from the molecular fossil record that tRNA originated in replication, not translation." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 6729-6734.
- Noller, H. F., V. Hoffarth, et al. (1992). "Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures." Science **256**: 1416-1419.
- Orgel, L. E. (1989). "The origin of polynucleotide-directed protein synthesis." J.Mol.Evol. **29**: 465-474.
- Pace, N. R. (1992). "New horizons for RNA catalysis." Science **256**: 1402-1403.
- Picirilli, J. A., T. S. McCormell, et al. (1992). "Aminoacyl esterase activity of the *Tetrahymena* ribozyme." Science **256**: 1420-1423.
- Rodin, S., A. Rodin, et al. (1996). "The presence of codon-anticodon pairs in the acceptor stem of tRNAs." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 4537-4542.
- Rodin, S. N. and S. Ohno (1997). "Four primordial modes of tRNA-synthetase recognition, determined by the (G,C) operational code." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 5183-5188.
- Schimmel, P. and B. Henderson (1994). "Possible role of aminoacyl-RNA complexes in noncoded peptide synthesis and origin of coded synthesis." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 11283-11286.
- Schimmel, P. and L. Ribas de Pouplana (1995). "Transfer RNA: From minihelix to genetic code." Cell **81**: 983-986.
- Weiner, A. M. and N. Maizels (1987). "tRNA-like structures tag the 3' ends of genomic RNA molecules for replication: Implications for the origin of protein synthesis." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 7383-7387.
- Wilson, D. S. and J. W. Szostak (1999). "In vitro selection of functional nucleic acids." Annu. Rev. Biochem **68**: 611-647.
- Woese, C. R., D. H. Dugre, et al. (1966). "On the fundamental nature and evolution of the genetic code." Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **31**(723-736).
- Yarus, M. (1998). "Amino acids as RNA ligands: A direct-RNA-template theory for the code's origin." J. Mol. Evol. **47**: 109-117.
- Zhang, B. and T. R. Cech (1997). "Peptide bond formation by *in vitro* selected ribozymes." Nature **390**: 96-100.