

IV. RNA

1. Svět RNA

Co bylo první?

Buňky jsou tvořeny tisíci různých molekul uspořádaných do obrovského počtu kombinací, které reprezentují aktuální stavy organismů. Připomeňme si základní prvky, jež musí být v živém systému obsaženy: aparát reprodukce spojený s kopírováním dědičné informace, výkonné katalyzátory reakcí a funkční ohraničení. Bez žádné ze tří uvedených složek by živé organismy nemohly existovat. Je přesto možné, že se některá z funkcí vyvinula jako první, bez ohledu na přítomnost ostatních? A pokud ano, tak která? Zodpovědět položené otázky je obtížné zejména proto, že buňka vyžaduje jednoznačnou spolupráci mezi všemi dílčími podsystemy. V předchozím textu jsme se věnovali aminokyselinám a proteinům, jejichž význam, zejména v katalýze, je nesporný. I když se objevily úvahy o jejich prvenství na časové škále evoluce života, jako žhavější kandidát se z mnoha důvodů jeví jiný typ biopolymeru, a to ribonukleová kyselina – RNA. RNA je totiž schopná nést genetickou informaci, zatímco proteiny nikoliv.

Problematická je nutnost vytváření kopií, potřeba replikace, bez níž by se systémy molekul nemohly množit a šířit. Obecně platí, že proteiny prostě nejsou schopné kopírovat vlastní strukturu přímou výstavbou z drobných prekurzorů typu aminokyselin.

Lze si představit systém, ve kterém vznikají z jednotlivých aminokyselin peptidy vhodných katalytických vlastností, které budou stejnou jednoduchou strukturu vytvářet stále znovu. Ale toto není kopírování tak, jak probíhá u RNA či DNA, kde je podle vzoru vyráběna kopie více či méně přesná. Uvidíme, že RNA jsou čtené a přepisované, ale peptidy svou strukturu číst nedokážou. Rozdíl v obou soustavách lépe pochopíme, když si uvědomíme, že osamocená molekula RNA nedokáže vyrábět vlastní kopii, pokud nemůže číst posloupnost stavebních prvků na partnerské molekule RNA. Ale katalyticky aktivní peptid může vyrábět identické peptidy, i když je v systému ojedinelý – pouze propojuje přítomné stavební prvky stále dle stejného reakčního schématu a žádoucí matici, již by četl, nepotřebuje. Právě absence kopírovatelného vzoru je výrazným nedostatkem proteinů v soutěži o prvenství v raných sebereplikujících se soustavách.

Ač se to nezdá, rozdíl je dramatický. Pokud nějaký peptid nebo bílkovina dokáže katalyzovat reakce, při kterých se spojují aminokyseliny v peptid identický s mateřským enzymem, může se nám zdát takový systém jako pro evoluci dostačující. Ale není – nejedná se totiž o obecnou schopnost proteinů jako

takových, ale o náhodné a nepravděpodobné uspořádání jediné soustavy, která z podstaty nemůže mít většího evolučního významu. Kdyby peptid, či dokonce bílkovina něco takového dokázaly, představovaly by naprostou výjimku, jež by odrážela jedinečnost a neopakovatelnost jejich struktury a funkce. Takový materiál přirozený výběr nemůže využít šířeji, neboť to prostě nelze – proteiny samy sebe zkrátka nekopírují. Pouze hovoříme-li o dipeptidech (tvořených dvěma aminokyselinami) či velice krátkých formách, jistou evoluci lze pozorovat i v laboratorních podmínkách. Možná by mohl vzniknout autokatalytický cyklus založený na několika peptidech, ale byl by naprosto omezený, jelikož by nikdy nedosáhl kapacity nesené nukleovými kyselinami, především RNA.

V původních chemických systémech mohlo být přítomno jen asi deset z biogenních aminokyselin, které vznikají i abioticky, nezávisle na enzymové katalýze. Výroba ostatních aminokyselin je obtížnější a patrně vyžaduje činnost již makromolekulárních katalyzátorů typu enzymů. Ukazuje se, že mezi prvními aminokyselinami není žádná z pozitivně nabitých a vyvstává otázka, zda bez těchto významných zástupců (lysin a arginin) vůbec mohly peptidy vytvářet vzhledem ke schopnostem katalýzy smysluplné prostorové uspořádání.

Svět jílu

Molekula RNA se jeví jako nejžhavější kandidát zejména pro schopnost kopírování vzoru při reprodukci, prokázané katalytické vlastnosti a možný vznik v abiotických podmínkách. Není ovšem kandidátem jediným. Vedle světa RNA je paralelním světem, kde lze hypoteticky předpokládat vznik replikujících se molekul, svět jílu. Na molekulární úrovni jsou částičky jílu katalyticky aktivní a umožňují vytváření částíček nových. Je nanejvýš zajímavé, že ve světě jílu můžeme pozorovat základní ze znaků charakterizující živé soustavy. Vrstvy jílu se na sebe skládají, přičemž patra následná kopírují strukturu původních. Vidíme tak jasně reprodukci, dědičnost, proměnlivost (systém není bezchybný), a dokonce konkurenci o zdroje – stavební látky, místo, katalyzátory. Zdá se, že nic nebrání nastartování biologické evoluce a vzniku pravých živých systémů. Tento koncept již v roce 1985 představil a přiblížil britský biolog Alexander Graham Cairns-Smith. Vzhledem k tomu, že život založený na jílu nikde doopravdy nepozorujeme, je otázkou, zda se nejedná pouze o úvahy teoretické. Nicméně sám autor předkládá další nikoliv nepodstatnou myšlenku, která jeho hypotézu o původu života posouvá mezi potenciálně věrohodné.

Jíly totiž katalyzují nejen výrobu a úpravy vlastních částic, ale dokážou také urychlovat reakce světa organického. To neznamená nic jiného, než že na platformě jílu je budován svět organických molekul. Jíly tak podobně jako sloučeniny kovů (jejichž prvky jsou ostatně do molekul jílu začleněny také) vytvářejí důležitý přechod od světa anorganického k organickému. Spolupráce

s organickými molekulami zpětně ovlivňuje i uspořádání, kopírování a šíření jílových útvarů. Celý cyklus kopírování, množení a rozšiřování jílu úzce souvisí s cykly zaplavování a vysychání prostředí. Ve fázi sucha se vrstvy jílu odlupují a vítr je roznáší do okolí, při zatopení dochází k chemickým reakcím, vodní proud přináší stavební materiál a nové typy látek. Vysychání mění reakční podmínky, vrstvy se ukládají na sebe a celý proces vykazuje značnou dynamiku.

Jelikož syntéza organických molekul je obecně méně závislá na omezujícím prostředí jílu, mohlo být jen otázkou času, kdy se organické molekuly od spolupráce s jíly zcela odpoutaly a rozšířily se samy do okolního světa, aby daly vzniknout opravdovému životu. Je tedy možné, že jíly vytvářely prvotní inkubátor, ze kterého se vylíhly formy molekulárních systémů schopné života, ale na jíly si v sobě vzpomínku nezachovaly.

Nukleové báze

Základem představ předbuněčného světa jsou tedy organické molekuly, kde ústřední roli hraje RNA nebo něco velice podobného. Dokáže se kopírovat a má schopnosti katalyzátoru, který nakonec vytváří nejen své kopie, ale zvyšuje zastoupení i dalších biomolekul v soustavě – včetně těch, jež obohacují metabolismus a tvoří ohraničení.

Podobně jako jsou proteiny sestaveny z aminokyselin a polysacharidy z monosacharidů, nukleové kyseliny včetně RNA se skládají z nukleotidů (obr. 2.6). Nukleotid je složen z cukru, fosfátu a nukleové (dusíkaté) báze. Nukleové báze jsou heterocyklické molekuly – cyklické uhlovodíky, ve kterých jsou atomy uhlíku uspořádány do kruhů obsahujících také atomy dusíku. Rozlišujeme nukleové báze purinové – adenin (A) a guanin (G) a pyrimidinové – thymin (T), cytosin (C) a uracil (U). Cukr je představován buď ribózou (v RNA), nebo deoxyribózou (v DNA – deoxyribóza se od ribózy liší jen minimálně, chybí jí jeden atom kyslíku, ale jak uvidíme dále, tento rozdíl je z mnoha důvodů velice podstatný). Nukleová báze s cukrem formuje nukleosid, navázáním zbytku kyseliny fosforečné (fosfátu) vzniká nukleotid. Řetězec nukleotidů tvoří polynukleotid čili příslušnou kyselinu deoxyribonukleovou nebo ribonukleovou (podle typu cukru). Jelikož v každé RNA jsou cukerná složka a fosfát vždy stejné, základním prvkem nesoucím informační hodnotu je nukleová báze. Je tedy jedno, zda hovoříme o posloupnosti nukleotidů, nukleosidů či bází.

Z obou typů nukleových bází zastoupených v nukleových kyselinách je jednodušším představitelem pyrimidin (obr. 2.5). Pyrimidiny jsou šestičlenné aromatické heterocykly obsahující dusík. Úpravami (další aminoskupinou, methylem či kyslíky) vznikají cytosin, thymin a uracil (obr. 2.6 na s. 89). O něco složitější jsou molekuly purinových bází, jelikož purin je molekula složená ze dvou těsně přimknutých kruhů (sdílejí společnou vazbu mezi dvěma uhlíky).

Jeden kruh je šestičlenný (pyrimidinový) a druhý pětičlenný (imidazolový). Přítomností postranní aminoskupiny na pyrimidinové části purinu vzniká adenin, pokud se váže ještě karbonylový kyslík (=O), jedná se o guanin. A tím máme všech pět základních nukleových bází, které formují DNA i RNA.

Nukleové báze se uplatňují i v různých enzymech, kde jsou nezastupitelnými složkami významných kofaktorů. Klíčová je role adenosintrifosfátu (ATP), který je základním přenašečem energie v buňce, stejně jako zdrojem fosfátu pro fosforylační reakce.

Svět RNA

Zásadní funkcí, kterou model světa RNA nabízí, je replikace. Molekula RNA představuje vzor ke kopírování (matrici, templát), současně produkt kopírování, a navíc vlastní aparát, který replikaci provádí. Nejsou tudíž hned od okamžiku zrodu života vyžadovány bílkoviny – enzymy, jež by vykonávaly nutnou katalýzu, a tedy ani genetický kód.

Pokud katalýzu zvládá samotná RNA, je pravděpodobnost vzniku samoudržující se a rozmnožující se entity mnohonásobně vyšší. Zejména z tohoto důvodu zaujímá představa světa RNA významné místo v objasňování vzniku života. Umění RNA katalyzovat replikaci RNA bylo experimentálně mnohokrát prokázáno. Molekuly RNA mají současně genotyp (tedy zapsanou informaci) a současně fenotyp (nějaký projev navenek).

Následný přechod k proteinům coby katalyzátorům lze vysvětlit výrazně lepšími schopnostmi bílkovin katalyzovat široké spektrum nejrůznějších reakcí, ale také jejich vyšší stabilitou a odolností v cytoplazmě buňky. Ne všude ovšem k nahrazení RNA bílkovinami došlo – ribonukleová kyselina se dodnes účastní několika dějů spojených s tvorbou proteinů.

Odkazem na původnost RNA v procesu katalýzy je požadavek celé řady enzymů proteinové povahy na přítomnost neproteinového kofaktoru. Jsou to právě tyto kofaktory, které jsou klíčové pro katalytické funkce daných bílkovin, a právě tyto kofaktory mají často povahu ribonukleotidu, tedy stavební jednotky RNA. Jedná se o molekulární fosilie z dávných dob, kdy metabolismus byl dosud založen na RNA? Nutno říct, že nukleotidové kofaktory se vyskytují právě u proteinů, které považujeme za původní a velice starobylé, často související s těmi nezákladnějšími metabolickými a energetickými procesy.

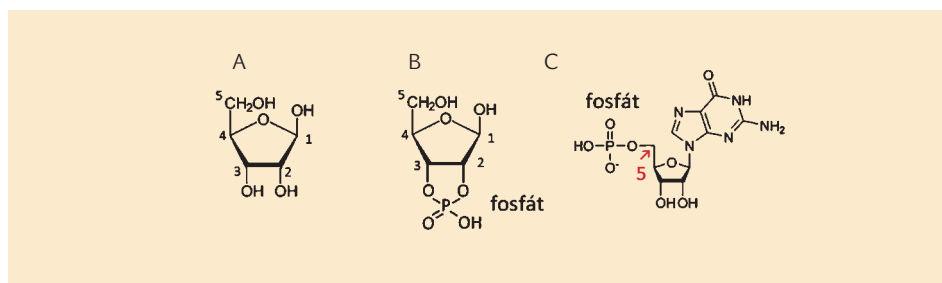
Je pravděpodobné, že aminokyseliny, a přinejmenším i krátké peptidy, byly ve světě RNA přítomné také. Nebyly ale vytvářeny na základě genetického kódu a jejich syntézu obstarávala RNA, byť napomáhat mohly i atomy kovů či jiné molekuly včetně samotných aminokyselin a peptidů. Taková spolupráce mezi různými typy molekul nejen v aktivních místech enzymů je běžná dodnes.

Nukleosidfosfáty

Na cestě ke vzniku RNA je významným krokem aktivace stavebních jednotek skrze vazbu fosfátů – molekula po přijetí zbytku kyseliny fosforečné nese dost energie na to, aby mohla za vhodné katalýzy vstupovat do syntetických, polymeračních reakcí. Vazba fosfátů na organické molekuly může mít podobný aktivační efekt, jaký jsme pozorovali při vazbě koenzymu A, byť mechanismus působení se poněkud liší. Určujícím je opět energetický obsah příslušných vazeb. Navázáním několika fosfátů vedle sebe (obvykle tří) se v daném místě hromadí záporný náboj (každý fosfát nese jeden) a elektrostatické odpuzování celý komplex destabilizuje. Molekula se ocitá v energeticky ne příliš výhodném uspořádání a katalyzovanou reakcí se snadno mění v nový produkt, přičemž se navázané fosfáty opět uvolní. Molekula přechází do stavu energeticky výhodnějšího.

Samovolné odpoutání navázaných fosfátů ovšem probíhá jen pomalu a nukleosidfosfáty, stavební kameny RNA a DNA, jsou obvykle poměrně stabilní i ve vodném prostředí. Nutná je katalýza defosforylace (odštěpení fosfátu), teprve tak se uvolní energie a molekula může podstoupit další fázi reakčního sledu. V biochemickém světě je aktivace molekul pomocí vazby fosfátů velice běžná a týká se nejen nukleových kyselin, ale i sacharidů či lipidů.

Jak je vidět na obrázku 4.1, jsou na molekule ribózy přítomny celkem tři skupiny –OH, na které se mohou vázat fosfáty. U molekuly RNA je vazba fosfátu na druhý či třetí uhlík ribózy problematická v tom, že zachycený fosfát se současně váže na oba sousední hydroxyly, druhý i třetí ribózového kruhu. Tím dojde k uzavření původních hydroxylů s fosfátem do jednoho kruhu (obr. 4.1B). Taková molekula ovšem nevstupuje ochotně do dalších polymeračních reakcí, které jsou nutností při vzniku polynukleotidů s replikační a katalytickou aktivitou. Pouze forma, která nese fosfát na pátém uhlíku, je vhodným prekurzorem



Obrázek 4.1 Ribóza a fosfát

A) Ribóza – očíslovány jsou atomy uhlíku, které tvoří kostru sacharidu. B) Ribóza, u které došlo k fosforylaci na druhém a třetím atomu uhlíku. Výsledkem je vznik uzavřené struktury, která není vhodná pro fungování v biopolymeru. C) Nukleosid-5-monofosfát. Červeně je zvýrazněný pátý atom uhlíku ribózy, jehož fosforylace je pro vznik funkčních RNA nezbytná.

pro vznik biologicky smysluplné makromolekuly schopné polymerace a replikace. Tím se nukleosid-5-trifosfáty (NTP) staly základními stavebními prvky RNA a DNA.

Polymerace

Pro polymerační reakce jsou tedy potřeba molekuly nukleosidtrifosfátů (NTP), nukleotidů se třemi fosfáty. Vazba jednoho nebo dvou fosfátů pro plnou aktivaci prekurzoru nestačí. Stabilita molekuly NTP ve vodném prostředí je vyhovující – molekula drží pohromadě, dokud není rozštěpena enzymem. Ovšem ve světě, kde enzymy dosud chybějí, pracuje stabilita substrátů proti možnému vzniku produktů, protože odolné molekuly se nerady mění. Nukleosidtrifosfáty setrvávají volné a samostatné, aniž by se propojovaly v makromolekuly. Fosfáty se neoddělují.

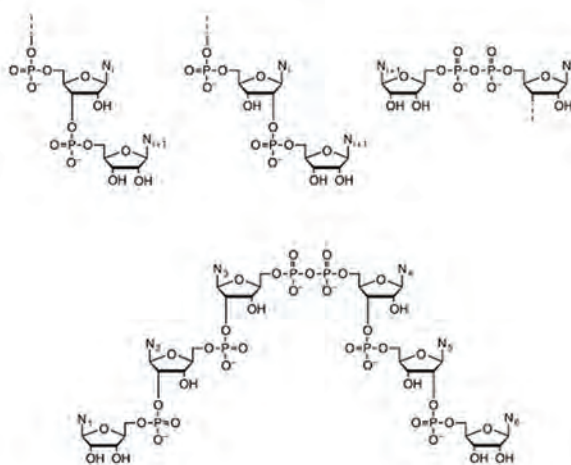
Jenže živé systémy fungují jako soustavy polymerních makromolekul. Zdá se tedy, že v evoluci bude podchycen jakýkoliv přijatelný způsob, který posílí reakce polymerační a zpomalí opačné, depolymerační. Oboje se děje vhodnou organizací v prostoru, která posouvá hladiny reaktantů i produktů, účastí katalyzátorů nejprve zcela anorganické, později i organické povahy, stabilizací vybraných stavů pomocí dalších molekul atd.

Ribonukleotidy, tedy nukleotidy obsahující ribózu, mají celkem tři reaktivní skupiny. Těmi jsou vázaný fosfát a hydroxyly na druhé a třetí pozici ribózové struktury. Jelikož jednotlivé nukleosidfosfáty mohou reagovat mezi sebou různými způsoby, je i soubor produktů různorodý, jak zachycuje obr. 4.2. Pravděpodobnost získání delšího smysluplného řetězce s pravidelným řazením podjednotek je tak poměrně nízká. Klíčová je vazba mezi hydroxylem na třetím uhlíku jednoho nukleotidu a hydroxylem na pátém uhlíku jiného nukleotidu zprostředkovaná molekulou fosfátu (na obr. 4.2 vlevo nahoře). Ke správnému uspořádání lze dospět zapojením vhodného katalyzátoru. Prostorovou orientací reagujících molekul na povrchu katalyzátoru je dán i charakter vznikajícího produktu.

Kopírování

Zdvojení RNA neprobíhá jednoduchým vytvořením zcela totožné molekuly v jednom kroku. Principem je tvorba komplementárního (doplňkového) řetězce, kdy se vyrobí nejprve jakýsi otisk a z něj se v druhém kroku replikační události vytvoří kopie původního řetězce. K přiblížení nám může posloužit tvorba odlitku stopy zvířete, chrupu či zkameněliny. Nejprve je vyroben doplňkový útvar, jenž následně slouží k formování věrných kopií originálu.

Syntéza kopie RNA probíhá podle pevných pravidel. Komplementární řetězec vzniká jen podle následujícího schématu: adenin se přepíše do uracilu

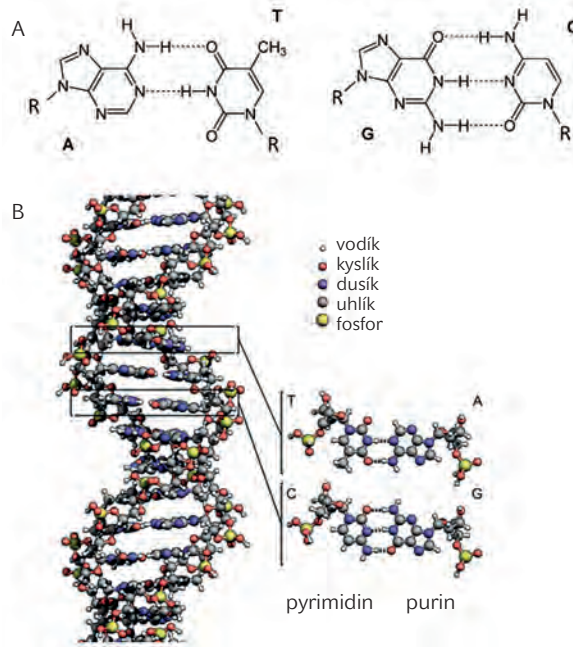


Obrázek 4.2 Vazby mezi nukleotidy

Molekuly nukleosidfosfátů se mezi sebou mohou propojovat různými způsoby, pouze některé vedou ke vzniku stabilní makromolekuly schopné nést informaci. V živém světě se uplatnilo propojení fosfátem mezi třetím a pátým hydroxylem dvou po sobě následujících nukleotidů (vlevo nahoře). Převzato z Robertson, M. P. et Joyce, G. F. (2012): The Origins of the RNA World. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4(5). pii: a003608.

a uracil do adeninu, zatímco guanin do cytosinu a cytosin do guaninu (hovoříme pouze o bázích, ve skutečnosti se jedná o reakce mezi nukleotidy z příslušných bází odvozených, obr. 4.3). Posloupnost AGGCUAAU se přepisuje (transkribuje) do UCCGAUUA, a teprve při druhém kroku dochází k opětovnému vybudování kopie původního řetězce AGGCUAAU dle nové matrice (vzoru) UCCGAUUA. Může se tento dvoustupňový proces vynořit v abiotickém světě bez enzymové katalýzy?

Pokud uvažujeme reakční soustavu zahrnující pouze templát (vzor, původní molekulu RNA) a směs stavebních jednotek (aktivovaných nukleotidů – nukleosidfosfátů), je rychlost a specifita kopírování vzoru nedostatečná. Proces je pomalý a nepřesný. Avšak není tomu tak vždy, kupříkladu posloupnost tvořená pouze guaninovými nukleotidy je do řetězce doplňkových bází cytosinů kopírována vcelku přesně, totéž pak platí, pokud jsou cytosiny a guaniny v jednom řetězci kombinovány. Problémem však je, že nově vzniklé řetězce spárovaných cytosinů a guaninů jsou silně náchylné k tvorbě stabilních a do sebe uzavřených struktur, které další kola replikací nedovolují. Nová vlákna jsou do sebe zaklesnuta natolik pevně, že se jen neochotně rozcházejí. Takto by se evoluce



Obrázek 4.3 Párování bází

A) Mezi jednotlivými nukleovými bázemi vznikají nekovalentní interakce. K rozpoznání slouží vodíkové můstky, které umožňují vytvoření vazby pouze mezi vybranými bázemi: adeninem (A) a thyminem (T) či uracilem (U), nebo cytosinem (C) a guaninem (G). Ke stabilizaci struktury nukleových kyselin významně napomáhají interakce mezi elektrony heterocyklických částí, jež se přikládají nad sebe (tzv. patrová interakce). R – zbytek nukleotidu (cukr deoxyribóza nebo ribóza a fosfát). B) V důsledku párování bází vzniká nadmolekulární útvar typu dvoušroubovice. Jedná se o typické uspořádání molekul deoxyribonukleové kyseliny, DNA. Převzato z Wikimedia Commons, autor Zephyris.

celé struktury zastavila. Příměs ostatních, volněji provázaných nukleotidů zablokování reakčního sledu efektivně brání.

Nelze vyloučit ani mechanismus spojování krátkých řetězců oligonukleotidů, které účinnost replikačních procesů navyšují. Podle některých studií je dokonce možné, že spíše než tvorba nového doplňkového vlákna z izolovaných monomerů je spojování již předpřipravených kratších řetězců právě tou cestou, která vede ke zvýšení množství delších vláknitých produktů v populaci RNA. Kratší řetězce mohou vznikat za katalýzy kovovými minerály, jílů či RNA.