

Od stavebních bloků k polymerům života ...

... aneb prebiotická evoluce

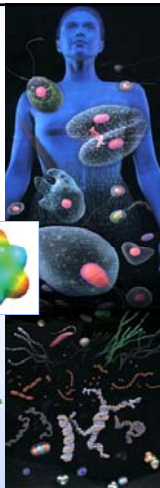
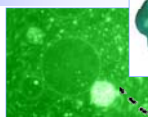
Vladimír Kopecký Jr.

Fyzikální ústav Univerzity Karlovy v Praze

Oddělení fyziky biomolekul

<http://biomolecules.mff.cuni.cz>

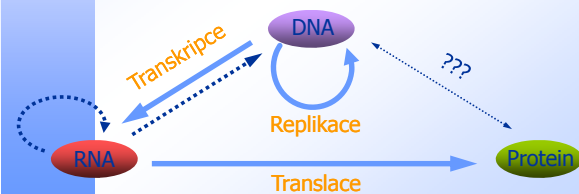
kopeccky@karlov.mff.cuni.cz



Evoluce jak ji známe

Centrální dogma molekulární biologie

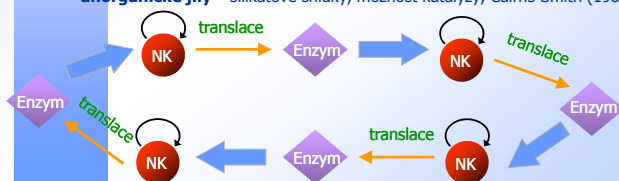
- 1865 – **Gregor Mendel** postuluje **zákony genetiky**
- 1940 – „**jeden gen – jeden enzym**“ (George Beadle & Edward Tatum)
- 1958 – Francis Crick formuluje **ústřední dogma molekulární biologie**
- 1961 – **aminokyseliny specifikovány třípísmennými kodony** (Sidney Brenner & Francis Crick & George Gamow)
- 1961 – rozluštění prvního kódu UUU (M. Nirenberg & H. Matthaei)
- 1966 – finální rozluštění genetického kódu



Počátky života

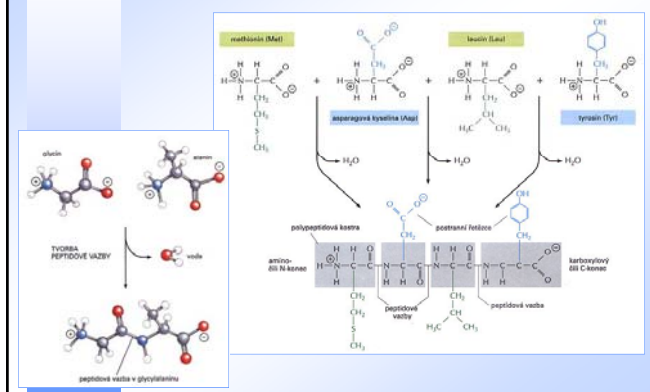
Scénáře vzniku života

- **Proteiny, nikoli nukleové kyseliny**
 - **koacerváty** – semipermeabilní membrány, Oparin (1924)
 - **mikrosféry** – protenoidy (shluky aminokyselin), Fox
- **Nukleové kyseliny, nikoli proteiny**
 - **genová hypotéza** – ribozymy, koenzymy, možná afinita k protenoidům (1986)
- **Koexistence proteinů a nukleových kyselin**
 - **hypercykly** – teoretický model autoreplikujících se systémů, Eigen (1960)
- **Úplně jiný základ**
 - **anorganické jílly** – silikátové shluky, možnost katalýzy, Cairns-Smith (1980)



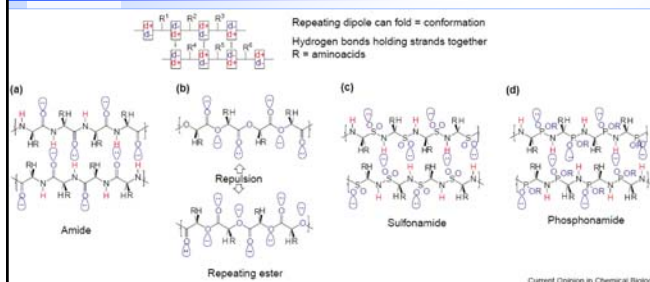
Proteiny při vzniku života

Vznik proteinů v živých organismech



Proteiny při vzniku života

Existuje jiná volba u proteinů?



Možné formy skládání v H_2O . A) opakující se dipól u polyamidu (v proteinech) je ideální, B) polyester se naopak nikdy nesbalí, C) polysulfonamid a D) fosfonamid jsou však možnou volbou.

■ S. A. Benner et al., Current Opinion in Chemical Biology 8 (2004) 672–689.

Proteiny při vzniku života

Vznik peptidů

- Aminosyseliny mohou začít vytvářet peptidy za aktivity CO v podmínkách horkých vodných roztoků za přítomnosti koloidního (Fe,Ni)S
- (Fe,Ni)S hydrolyza močoviny může být evolučním předchůdcem enzymu Ni-ureázy
- Podporuje chemoautotrofii vznik života s primitivním (Fe,Ni)S metabolismem

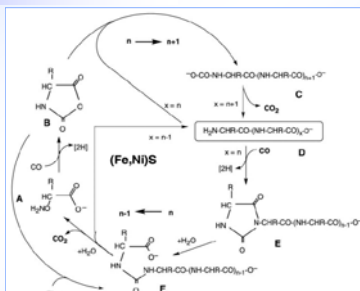


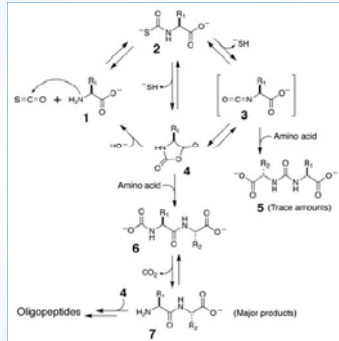
Schéma CO-řízeného peptidového cyklu. A) aminosyselina, B) anhydrid N-carboxy aminosyseliny, C) série N-carboxamyl peptidů, D) série aminoselin, tj. peptid, E) racemické deriváty hydantoinu, F) deriváty močoviny

■ C. Huber et al., Science 301 (2003) 938–940.

Proteiny při vzniku života

Vznik peptidů

- **Karbonyl sulfid (COS)**, jednoduchý sopečný plyn, katalyzuje reakce vedoucí ke vzniku polypeptidů ve vodných roztocích
- **Reakce probíhá za pokojové teploty s výtěžností 80 % v řádu minut až hodin**
- Přítomnost kovových iontů (ve formě metosulfidů), oxidačních (O_2) a alkylačních ($K_3Fe(CN)_6$) činidel dramaticky urychluje reakci a zvyšuje její účinnost

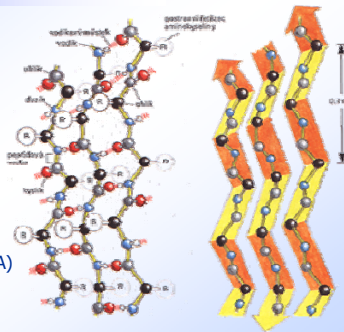


■ L. Leman et al., Science 306 (2004) 283–286.

Proteiny při vzniku života

První proteinové struktury

- **β -skládaný list** se spontánně tvoří v polypeptidech s alternujícími hydrofobními a hydrofilními AA
- Jsou **10× rezistentnější proti hydrolytickému štěpení** než α -helix nebo klubko
- β -list (8–10 AA) z poly-Arg nebo poly-Lys účinně (150×) hydrolytický štěpí polynukleotidy (fragменты RNA)
- β -list pravděpodobně katalyzoval formování RNA
- Větší stabilita β -listů je činí favority při vzniku života...

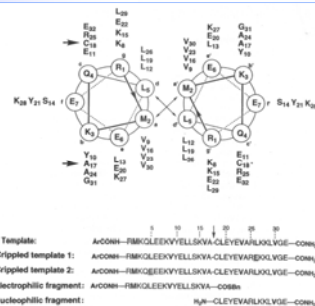
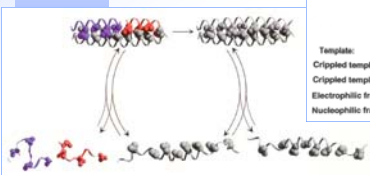


■ A. Brack & L. Orgel, Nature 256 (1975) 383–387. A. Brack, Pure & Appl. Chem. 65 (1993) 1143–1151.

Proteiny při vzniku života

Samosereplikující peptid

- **32-mer α -helix (coiled-coil) podobný leucinovému zipu** autokatalyzuje ve vodném prostředí vznik svého obrazu složením 15- (**nukleofilní fragment**) a 17-meru (**elektrofilní fragment**)



■ D. H. Lee et al., Nature 382 (1996) 525–528.

Proteiny při vzniku života

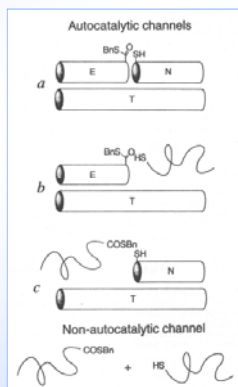
Samosereplikující peptid

■ Elektrofilní fragment atakuje prostřednictvím thiobenzyl esteru – COSBn terminální SH-amino skupinu nukleofilního fragmentu

■ Vznikne cystein thioester intermediát, který se přemění na termodynamicky favorizovanou peptidovou vazbu a spojí oba fragmenty

■ Katalytická cesta může probíhat:

- A) prostřednictvím ternárního komplexu
- B), C) za vzniku binárních komplexů (nízká výtěžnost, problémy s agregací)
- D) přímou interakcí obou fragmentů, což je v porovnání s autokatalýzou proces s malou výtěžností



■ D. H. Lee et al., Nature 382 (1996) 525–528.

Proteiny při vzniku života

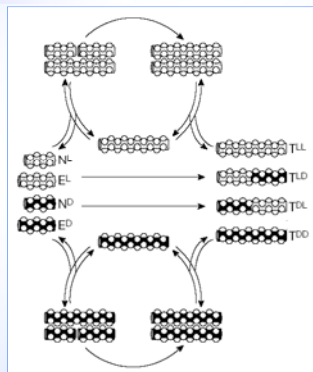
Chirální selektivita

■ Schématické znázornění chiroselektivních replikačních cyklů

■ Homochirální peptidy T^{DD} a T^{LL} jsou produkovány autokatalýzou

■ Heterochirální (T^{DL} a T^{LD}) peptidy vznikají nekatalyzovanou kondenzací nukleofilního (N) a elektrofilního (E) peptidu

■ Teplátem řízená ligace homochirálních fragmentů vede k amplifikaci homochirální produktů obecně



■ A. Sagatelian et al., Nature 409 (2001) 797–801.

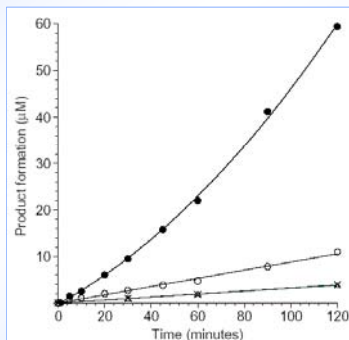
Proteiny při vzniku života

Chirální selektivita

■ Stupeň formování produktu v závislosti na čase

■ Produkce homochirálních produktů (T^{LL} a T^{DD}) – ●, a heterochirálních produktů (T^{LD} a T^{DL}) – ○, je ukázána jako funkce času pro roztok obsahující 100 μ M koncentraci N^L , N^D , E^D a E^L

■ Spodní křivka (Δ , $\times$, resp.) je kontrola v přítomnosti 3M GndHCl

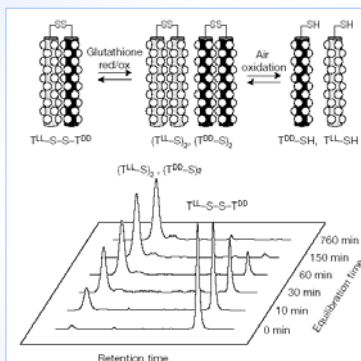


■ A. Sagatelian et al., Nature 409 (2001) 797–801.

Proteiny při vzniku života

Chirální selektivita

- Formování coiled-coil struktury a odpovídající HPLC retenční časy
- Příkrá disproporce ukazuje, že vznik coiled-coil helikální struktury je přísně chiroselektivní
- Stejně mechanismy vedly ke vzniku homochirálního života na Zemi

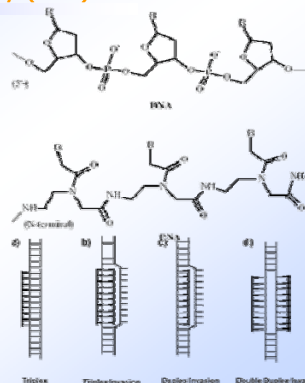


■ A. Sagatelian et al., Nature 409 (2001) 797–801.

Proteiny při vzniku života

Peptidové nukleové kyseliny (PNA)

- Kostra PNA je tvořena polymerem N-(2-aminoethyl)glycinem (AEG)
- AEG může snadno nahradit nestabilní cukry
- PNA se váží na DNA formující dvoj- či trojřoubovici příbuzné Watson-Crickové helixu
- PNA mohou být prekurzorem světa RNA
- PNA mají terapeutické využití v antisense strategii a genetické diagnostice

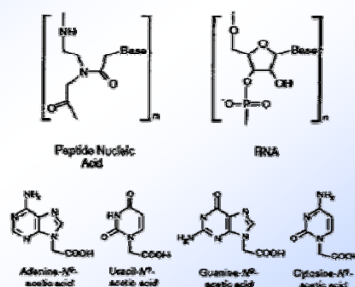


■ K. N. Ganesh and P. E. Nielsen, Current Org. Chem. 4 (2000) 931–943.

Proteiny při vzniku života

Peptidové nukleové kyseliny (PNA)

- V PNA je oproti RNA nahrazena kostra z ribózy a fosfátu N-(2-aminoethyl) glycinem (AEG)
- Báze nukleových kyselin jsou připojeny k AEG pomocí karboxylové skupiny
- Syntéza PNA musí probíhat odlišně od proteinů a nukleových kyselin (ale s podobnými stupni reakcí)



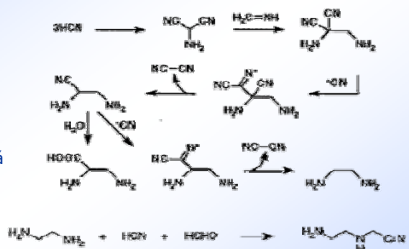
■ K. E. Nelson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 3868–3871.

Proteiny při vzniku života

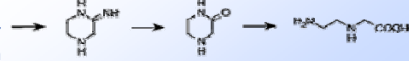
Peptidové nukleové kyseliny (PNA)

- Reakce vedoucí ke vzniku kostry PNA, tj. k AEG

- V prvním kroku vzniká z HCN a NH_4CN kyselina 2,3-diaminopropionová a ethylendiamin (probíhá za teplot 80–100 °C, v řádech desítek hod.). Jako boční produkt vzniká kyanogen.



- Ethylenediamin může dále reagovat standardní Steckerovou reakcí za vzniku AEG

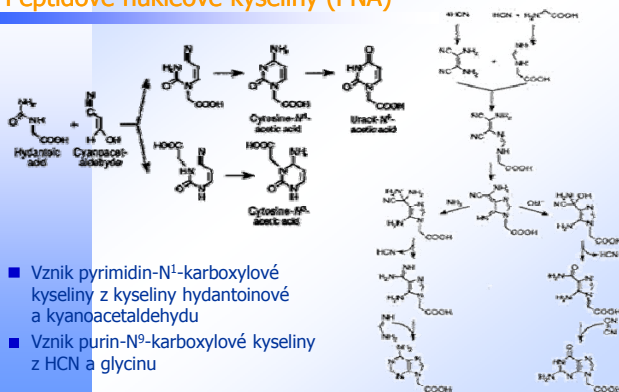


K. E. Nelson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 3868–3871.

Proteiny při vzniku života

Peptidové nukleové kyseliny (PNA)

- Vznik pyrimidin-N¹-karboxylové kyseliny z kyseliny hydantoinové a kyanogacetaldehydu
- Vznik purin-N⁹-karboxylové kyseliny z HCN a glycinu

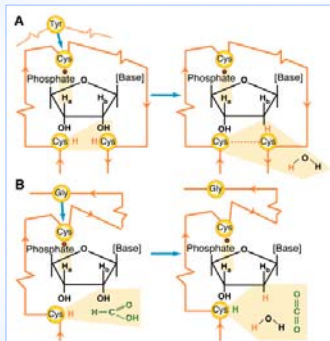


K. E. Nelson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 3868–3871.

Proteiny při vzniku života

Předcházely proteiny vznik DNA?

- RNA obsahuje ribonukleotidy, DNA deoxyribonukleotidy → potřeba tvorby deoxyribonukleotidů
- Tvorby se neúčastní RNA, ale pouze **enzym ribonukleotid reduktáza (RNR)**
- Ukazuje se, že RNR je ve všech organizmech vysoce konzervována (podařilo se prokázat pro vzdálené třídy A) RNR I a B) RNR III)
- Proteiny musely být minimálně součástí světa RNA a předcházet vzniku DNA**

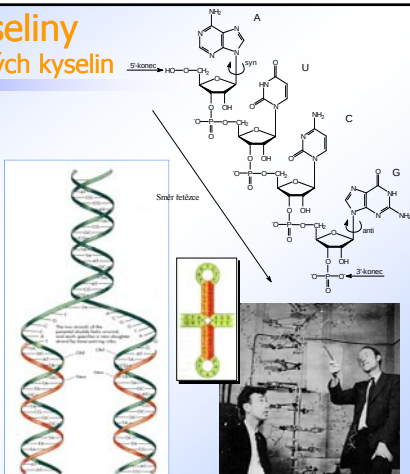


S. J. Freeland et al., Science 286 (1999) 690–692.

Nukleové kyseliny

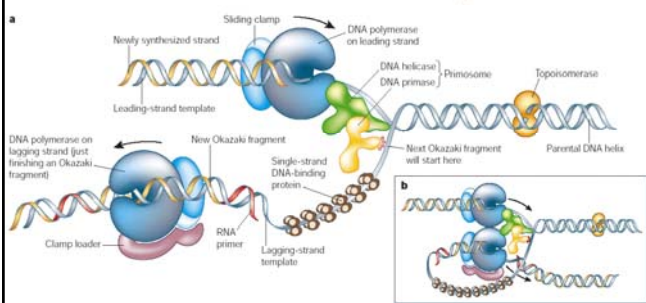
Struktura nukleových kyselin

- 1953 – objev struktury DNA (J. Watson, F. Crick – Nobelova cena spolu s M. Wilkinsnem 1962, podíl patří i R. Franklinové)
- 1958 – semikonzervativní replikace DNA (Messelson, Stahl)
- DNA a RNA jsou polymorfni molekuly
 - Pravotočivá A, B
 - Levotočivá Z
 - Vlášenková
 - Triplex
 - G-kyvadrupelex



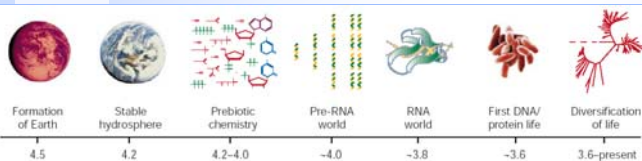
Nukleové kyseliny

Replikace DNA



Svět RNA

Biochemické epochy světa



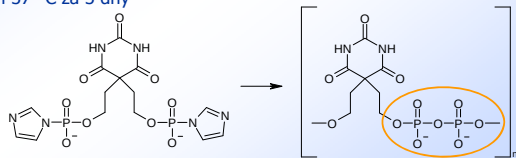
Časová škála událostí na ranné Zemi. Udáno v Gy před současností. Vyznačení událostí je přibližné a RNA svět je třeba posunout hlouběji do minulosti.

■ G. F. Joyce Nature 418 (2002) 214–221.

Svět RNA

Pra-RNA svět

- RNA je příliš složitá aby byla počáteční molekulou
- Monomery by měly být **spojeny pyrofosfátovou vazbou**, vznikající snadno za prebiotických podmínek
- Favoritem je **analog obsahující kyselinu barbiturovou**, která je achirální, tj. nepodléhá enantiomerní inhibici
- V přítomnosti Mn^{2+} reakce monomerů vyústí v 15-mery při 0 °C za 14 týdnů, při 37 °C za 3 dny

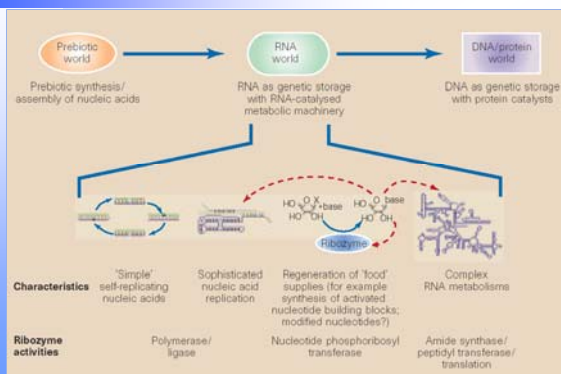


Konverze navrženého pre-RNA monomeru do polymeru jehož monomery jsou spojeny pyrofosfátovými skupinami

■ M. J. Van Vleet et al., J. Mol. Evol. 41 (1995) 257–261.

Svět RNA

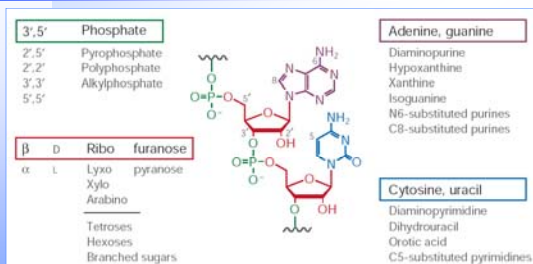
Biochemické epochy RNA světa



■ M. P. Robertson and A. D. Ellington, Nature 395 (1998) 223–225.

Svět RNA

Alternativní systémy k RNA

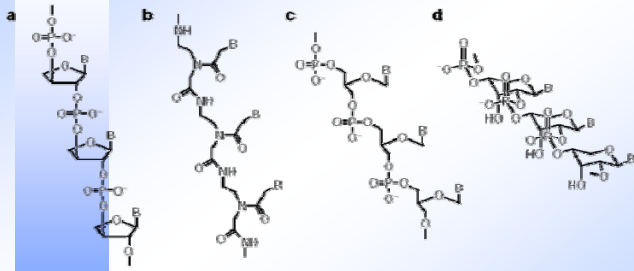


Změť molekul jež byly k dispozici pro tvorbu RNA světa. Rozdílné barvy udávají čtyři základní komponenty potřebné pro tvorbu RNA. Seznam možných analogů je udán pod základní složkou. Analogy lze prakticky libovolně kombinovat do funkčních celků, sic!

■ G. F. Joyce Nature 418 (2002) 214–221.

Svět RNA

Alternativní systémy k RNA



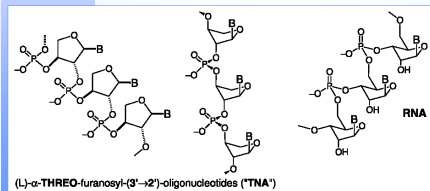
Možní kandidáti na předchůdce RNA v ranné historii Země. a) threosová nukleová kyselina, b) peptidová nukleová kyselina, c) analog nukleové kyseliny odvozený od glycerolu, d) pyranosyl RNA. B – značí nukleotidovou bázi.

■ G. F. Joyce, Nature 418 (2002) 214–221.

Svět RNA

Alternativní systémy k RNA

- Vzhledem k nestabilitě ribosy je **vhodné nahradit cukr za jiný**, např. pyranosu (6) či furanosu (5)
- TNA a jiné cukerné modifikace **vykazují podobné hybridizační vlastnosti** jako RNA či DNA a vytváří s nimi i heteroduplexy (viz. teploty tání udané v tabulce), většinou mají **větší strukturní flexibilitu**



	TNA	RNA	DNA	
TNA	42 58 53 31	28 57 57 39	32 47 49 25	A B C D
RNA	76 58 50 41	62 59 57 52	59 44 40 36	A B C D
DNA	68 41 36 28	47 43 41 35	55 46 43 36	A B C D

DUPLEX

A 3'-A₁₂-2'
2'-T₁₂-3'

B 3'-A₂T₂ATAT₂AT₂A-2'
2'-T₄A₂TATAT₂T₂T-3'

C 3'-AT₂AT₂ATAT₂A₂-2'
2'-TAT₂AT₂ATAT₂T₂-3'

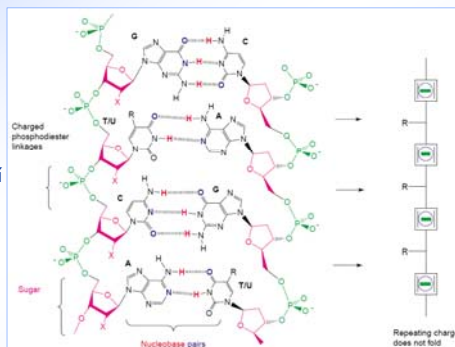
D 3'-ATTCAGCG-2'
2'-TATGATCG-3'

■ K.-U. Schöning et al., Science 290 (2000) 1347–1351.

Svět RNA

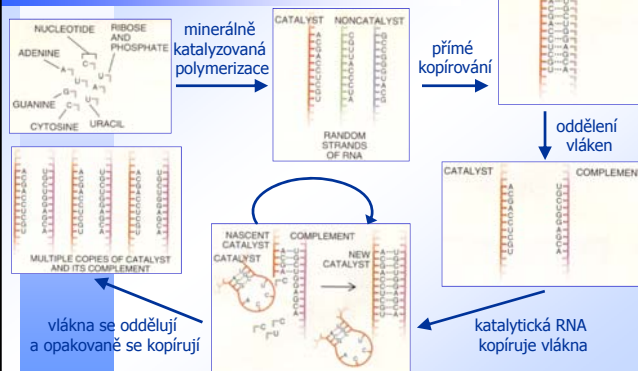
Alternativní systémy k RNA – neschůdnost

- Opakující se **náboje na kostře posilují interakce na vnitřní straně vláken** mimo kostru
- Důsledkem je **vznik párování bází**
- Bez poly-anionické vnější kostry může docházet ke kontaktům libovolně bez uspořádání



■ S. A. Benner et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 8 (2004) 672–689.

První kroky k replikaci

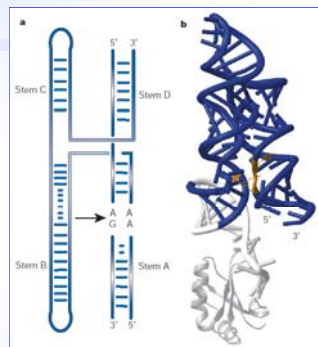


- L. E. Orgel, *Sci. Am.*, No. 10 (1994) 53–61.

Svět RNA

Kdo je ribozym?

- RNA molekula má **klíčové postavení** v centrálním dogmatu molekulární biologie
- **RNA s katalytickou funkcí se nazývá ribozym**
- **Ribozymy vytvářely primitivní svět života**
- Existovaly RNA organismy, ale evoluční stopy byly již zahazeny – vzpomínka na RNA svět ale zůstala...



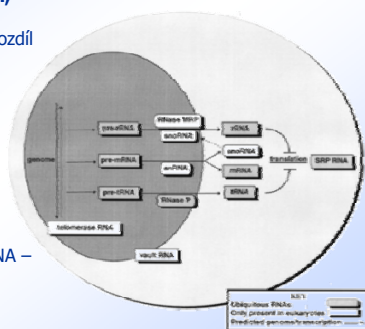
Struktura vlásenkového ribozymu. Důležité nukleotidy účastníci se sestřihu jsou zvýrazněny. (Protein je kokrystalizován.)

■ J. A. Doudna & T. R. Czech, *Nature* 418 (2002) 222–228.

Svět RNA

Co všechno umí RNA?

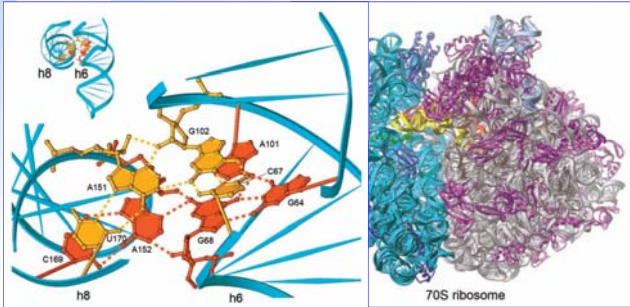
- **RNA má stále informační, autokatalytickou a katalytickou funkci** (na rozdíl od DNA)
- **Syntézy telomer** – telomerová RNA
- **Syntézy genetické informace** – mRNA
- **Přenosu aminokyselin** – tRNA
- **Syntézy bílkovin** – rRNA
- **Hydrolyzy prekurzorů** RNA – RNase P
- **Samoseřihu intronů**



- J. A. Doudna & T. R. Czech, *Nature* 418 (2002) 222–228.

Svět RNA

Jak vlastně RNA vypadá?

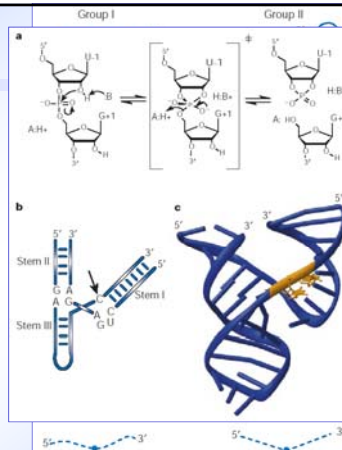


■ H. F. Noller Science 309 (2005) 1508–1514.

Svět RNA

Viděl někdo ribozym?

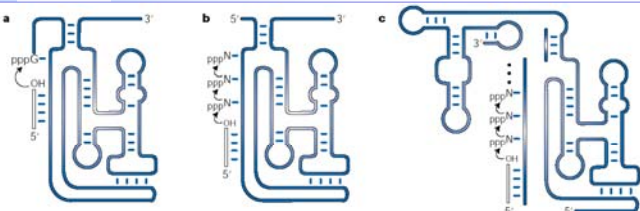
- Thomas Cech (Nobelova cena 1989) objevil samosestrážnost intronů u prvoka *Tetrahymena thermophila* v roce 1982
- U skupiny I je sestřih katalyzován GTP
- U skupiny II je sestřih veden přes A 2'-hydroxylovou skupinu
- RNA katalyzovaný samosestrih skupiny II provádí např. tzv. hammerhead ribozym ☺



■ J. A. Doudna & T. R. Cech, Nature 418 (2002) 222–228.

Svět RNA

Evolve ribozymů – polymeráz



In vitro evoluce ribozymu RNA polymerázy. a) ribozym katalyzuje templátem řízené připojení 3'-konce RNA primeru k 5'-konci ribozymu, b) katalyzuje připojení pppN na 3'-konec RNA primeru (urychlení $\sim 10^9\times$), c) katalyzuje připojení 14 NTP k externímu RNA templátu.

■ G. F. Joyce Nature 418 (2002) 214–221.

Svět RNA

Evoluce ribozymů – polymeráz

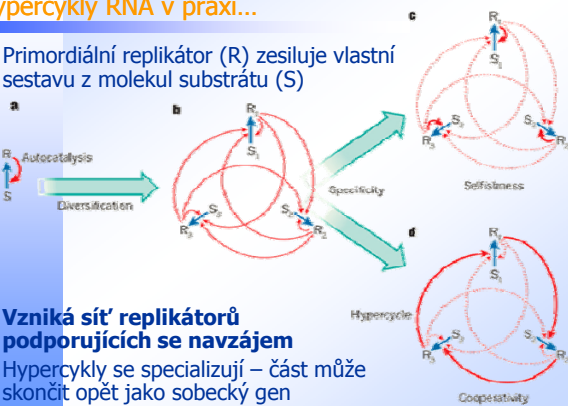
- **Ribozymy lze vyvíjet uměle in vitro**
- Předchozí fáze jsou známy pro ribozym ligázu třídy I
 - Fáze a) je ~120-mer, pracující rychlostí 100 reakcí/min
 - Fáze c) je ~200-mer, který připojí 14 nukleotidů za 24 hod., s přesností 97 %
- **Přesnost kopírování musí být lepší než 1/délka sekvence**, tj. pro 100-mer 99%, pro 40-mer 97,5% - takové ribozymy nejsou dosud známy...
- **Pouze malá část variant RNA má katalytickou funkci!**
 - Pro RNA o délce 100 nukleotidů vychází 4^{100} možných sekvencí – seskupení všech takových RNA má hmotnost ca. $10^{13} \times$ větší než Země...
 - Pro RNA o délce 40 nukleotidů vychází hmotnost ca. 40 kg

■ G. F. Joyce, Nature 418 (2002) 214–221.

Svět RNA

Hypercykly RNA v praxi...

- Primordiální replikátor (R) zesiluje vlastní sestavu z molekul substrátu (S)



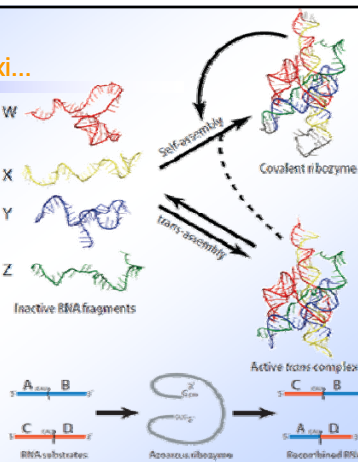
- **Vzniká síť replikátorů podporujících se navzájem**
- Hypercykly se specializují – část může skončit opět jako sobecký gen

■ J. Attwater, P. Holliger, Nature 491 (2012) 48–249.

Svět RNA

Hypercykly RNA v praxi...

- ~200 nukleotidový Azoarcus ribozym ze skupiny intronů I
- **Katalyzuje rekombinantní sebezposkládání ze 2 až 4 fragmentů**
- Fragmenty se váží skrze párování a terciární strukturu
- Nekovalentní komplexy ribozymů katalyzují sérii rekombinantních reakcí na dalších fragmentech, včetně formování kovalentních ribozymů



■ N. Vaidya et al., Nature 491 (2012) 72–77.

Svět RNA

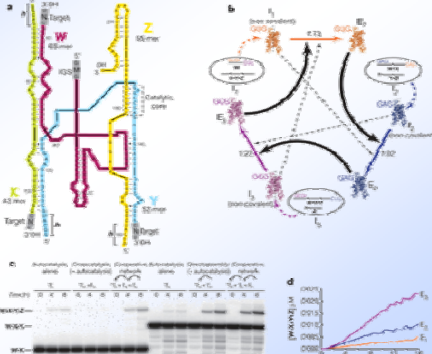
Hypercykly RNA v praxi

- A) Azoarcus ribozym lze rozštěpit na 4 fragmenty s cílovou rozpoznávací sekvencí na 3'-konci

- B) Kooperativní systém zahrnuje 3 subsystémy vytvořené dělením rybozymu do dvou částí na různých spojkách

- C) elektroforetické výtěžky skládání

- D) výtěžky v čase



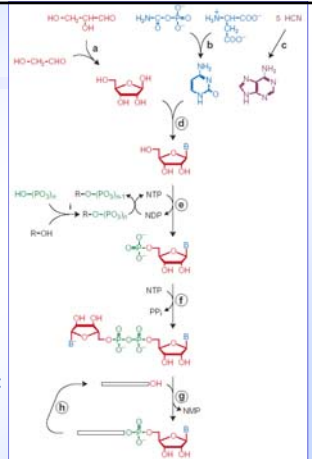
■ N. Vaidya et al., Nature 491 (2012) 72–77.

Svět RNA

Metabolické funkce

- Hypotetická cesta RNA-katalyzované syntézy RNA

- a) aldolová kondenzace glycerinaldehydu a glykolaldehydu vedoucí k ríose
- b) přenos karbamoylu z karbamoyl fosfátu na aspartát a cyklizace formující pyrimidin
- c) pentamerizace HCN za vzniku purinu
- d) vytvoření nukleosidu
- e) fosforylace (minerální zdroj) nukleosidu na nukleotid
- f) aktivace nukleotidu NTP
- g) připojení nukleotidu na 3'-konec RNA primeru
- h) prodlužování RNA (NDP je recyklováno v kroku e)



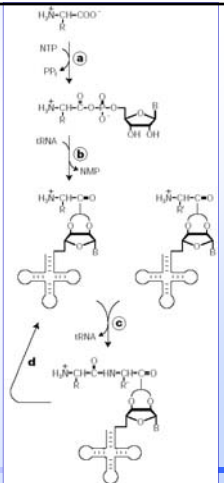
■ G. F. Joyce, Nature 418 (2002) 214–221.

Svět RNA

Metabolické funkce

- Hypotetická cesta RNA-katalyzované syntézy proteinů

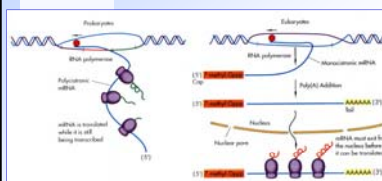
- a) aktivace aminokyseliny formování aminoacyl-nukleotid anhydridu
- b) přenos aktivované aminokyseliny na 2' (3')-konec tRNA (aminokyselina může snadno migrovat mezi oběma pozicemi)
- c) přenospeptidu vedoucí k formování dipeptidu. Dvě aminoacyl-tRNA jsou blízko u sebe vázány na komplementárním tmplátu
- d) postupné opakování cyklu vede k formování polypeptidu



■ G. F. Joyce, Nature 418 (2002) 214–221.

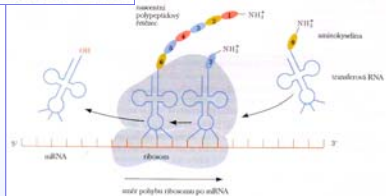
Genetický kód je když...

Jak se staví protein



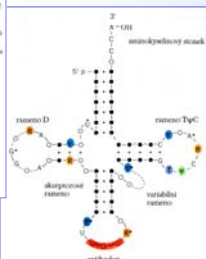
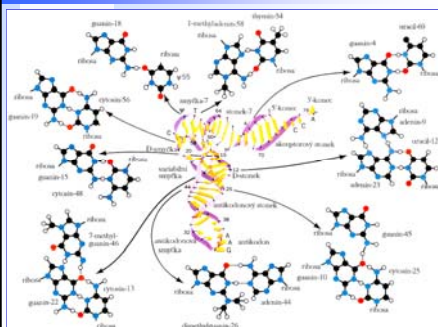
Protein o velikosti 40 kDa je syntetizován za ca. 10 sekund...

Pravděpodobnost inkorporace chybné aminokyseliny je 10^{-4} na kodon...



Genetický kód je když...

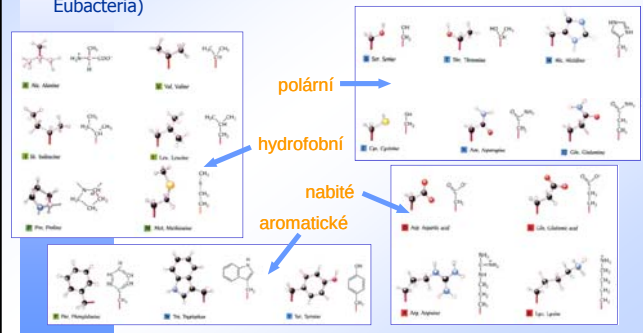
K čemu je dobrá tRNA



Genetický kód je když...

Standardní sada 20 aminokyselin?

- 21 aminokyselinou je **selenocystein** (přítomná od Archae po savce)
- 22 aminokyselinou je **pyrrolysine** (z r. 2002 výskyt v Archae a Eubacteria)



Genetický kód je když...

Kódovací tabulka

První pozice	Druhá pozice				Třetí pozice
	U	C	A	G	
	Fenylalanin	Serin	Tyrosin	Cystein	
	Leucin	Prolin	STOP	Tryptofan	
C	Izoleucin	Treonin	Histidin	Arginin	U
	Metionin		Glutamin		
A	Valin	Alanin	Asparagin	Serin	C
			Lysin	Arginin	
G			Kys. asparag.		A
			Kys. glutam.	Glycin	

Genetický kód je když...

Je genetický kód univerzální?

- **Standardní kód je velmi rozšířený, ale ne zcela univerzální!**
- Genetický kód mitochondrií a některých nálevníků se liší (objev na základě sekvenačních studií DNA v roce 1981)
- V nálevnicích specifikují kodony **UAA** a **UAG** kyselinu glutamovou a nikoliv **Stop**

Mitochondrie	UGA	AUA	CUN	AGA	CGG
Standardní kód	Stop	Ile	Leu	Arg	Arg
Savčí	Trp	Met		Stop	
Pekařské kvasinky	Trp	Met	Thr		?
Neurospora crassa	Trp				?
Drosophila	Trp	Met		Ser	
Prvoci	Trp				
Rostliny	Trp				

Genetický kód je když...

Vznik a vývoj genetického kódu

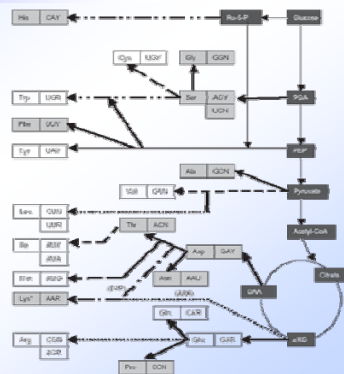
- **Znázornění biochemických drah syntéz aminokyselin**

- Aminoacyl-tRNA synthetasy (aaRSs) se podílí na připojení aminokyselin na tRNA (dělí se na I – bílé a II třídu - šedě)

- **Vývoj kódu je závislý na**

- Biosyntetické dráze aminokyselin
- Relativním obsahu GC v kodonu
- Příslušnosti k třídě aaRSs

- První kód obsahoval Ala, Gly, Ser, Asp, Glu, (Val) důležité při tvorbě β -sheetu



■ L. Kilipcan and M. Safo, J. Theor. Biol. 228 (2004) 389–396.

Genetický kód je když... Vznik a vývoj genetického kódu

Aminokys.	Třída	G,C kodon	G,C,A kodon	G,C,A,U kodon	No. reakcí
Gly	II	GGC, GGG			1
Ala	II	GCC, GCG			1 Prům. 3,2
Pro	II	CCC, CCG			3
Arg	I	CGC, CGG			8
Asp	II		GAC		1
Asn	II		AAC		1
Thr	II		ACC, ACR		5
Ser	II		AGC		3 Prům. 3,8
His	II		CAC		10
Lys	II+I		AAR		9
Glu	I		GAR		1
Gln	I		CAR		2
Phe	II			UUY	10
Tyr	I			UAY	10
Trp	I			UGG	13
Ile	I			AUA, AUU	5 Prům. 7,3
Leu	I			UUR, CUN	8
Val	I			GUN	4
Met	I			AUG	7
Cys	I			UGY	2

■ L. Kilpican and M. Safo, J. Theor. Biol. 228 (2004) 389–396.

Genetický kód je když... Vývoj genetického kódu

- Prvotní kód obsahoval pouze **NAN** sekvenci a aminokyseliny důležité při fixaci amoniaku
- Šípky označují biosyntetické dráhy
- ΔF_T značí průměrnou přenosovou energii, tj. **míru hydrofobicity**

5' ↓	A	C	G	U	3' ↓
G	Asp ²				Y
	Glu ²				R
A	Asn ²				N
	Gln ²				N
C					N
U	Ter				N
ΔF_T	6.6				

■ B. K. Davis, Prog. Biophys. Mol. Biol. 72 (1999) 157–243.

Genetický kód je když... Vývoj genetického kódu

STAGE 4						STAGE 5					
5' ↓	A	C	G	U	3' ↓	5' ↓	A	C	G	U	3' ↓
G	Asp ²	Ala ⁴		Val ⁴	Y	G	Asp ²	Ala ⁴	Gly ⁵	Val ⁴	Y
	Glu ²				R		Glu ²				R
A	Asn ²		Ser ⁴		N	A	Asn ²		Ser ⁴		N
	Gln ²	Pro ⁴			N		Gln ²	Pro ⁴			N
C					N	C					N
U	Ter	Ser ⁴			N	U	Ter	Ser ⁴	Cys ⁵		N
ΔF_T	6.6	-0.7	-0.6	-2.6		ΔF_T	6.6	-0.7	-1.7	-2.6	

■ B. K. Davis, Prog. Biophys. Mol. Biol. 72 (1999) 157–243.

Genetický kód je když...

Vývoj genetického kódu

STAGE 6					
5' ↓	A	C	G	U	3' ↓
G	Asp ³ Glu ²	Ala ⁴	Gly ⁵	Val ⁴	Y R
A	Asn ²	Thr ⁶	Ser ⁴		N
C	Gln ²	Pro ⁴			N
U	Ter	Ser ⁴	Cys ⁵		N
ΔF _T	0.6	-0.8	-1.7	-2.6	

STAGE 7					
5' ↓	A	C	G	U	3' ↓
G	Asp ³ Glu ²	Ala ⁴	Gly ⁵	Val ⁴	Y R
A	Asn ²	Thr ⁶	Ser ⁴	Ile ⁷ Met ²	Y R
C	Gln ²	Pro ⁴	Trp	Leu ⁷	N
U	Ter	Ser ⁴	Cys ⁵	Leu ⁷	N
ΔF _T	0.6	-0.8	-1.7	-3	

■ B. K. Davis, Prog. Biophys. Mol. Biol. 72 (1999) 157-243.

Genetický kód je když...

Vývoj genetického kódu

- Prvotní kód byl postupně doplňován v závislosti na složitosti syntézy a potřebných vlastnostech
- Přibýly **basické aminokyseliny**
- Jako poslední byly doplněny **aminokyseliny s aromatickým postranním řetězcem**
- Šipky označují **biosyntetické dráhy**
- ΔF_T značí průměrnou přenosovou energii, tj. **míru hydrofobicity**

STAGES 9 - 14					
5' ↓	A	C	G	U	3' ↓
G	Asp ³ Glu ²	Ala ⁴	Gly ⁵	Val ⁴	Y R
A	Asn ²	Thr ⁶	Ser ⁴	Ile ⁷ Met ²	Y R
C	Lys ¹⁰ His ¹³ Gln ²	Pro ⁴	Arg ⁹	Leu ⁷	Y R
U	Tyr ¹¹ Ter	Ser ⁴	Cys ⁵ Trp ¹⁴	Phe ¹¹ Leu ⁷	Y R
ΔF _T	5.5	-1.2	3.2	-3.1	

■ B. K. Davis, Prog. Biophys. Mol. Biol. 72 (1999) 157-243.

Genetický kód je když...

Vývoj genetického kódu

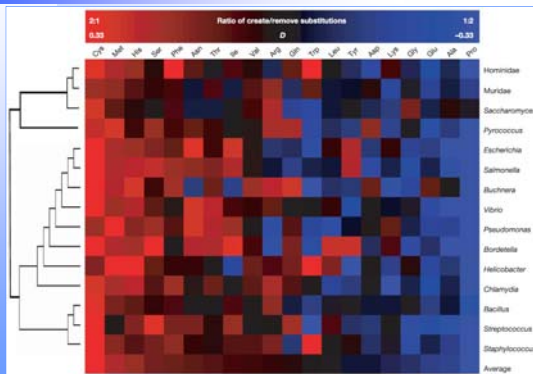
STANDARD CODE					
5' ↓	A	C	G	U	3' ↓
G	Asp ³ Glu ²	Ala ⁴	Gly ⁵	Val ⁴	Y R
A	Asn ² Lys ¹⁰	Thr ⁶	Ser ⁴	Ile ⁷ Met ²	Y A _G
C	His ¹³ Gln ²	Pro ⁴	Arg ⁹	Leu ⁷	Y R
U	Tyr ¹¹ Ter	Ser ⁴	Cys ⁵ Trp ¹⁴	Phe ¹¹ Leu ⁷	Y A _G

Met(t): Archaea, Eukarya
t-Met(f): Bacteria

■ B. K. Davis, Prog. Biophys. Mol. Biol. 72 (1999) 157-243.

Genetický kód je když...

Vývoj genetického kódu není zdaleka ukončen!

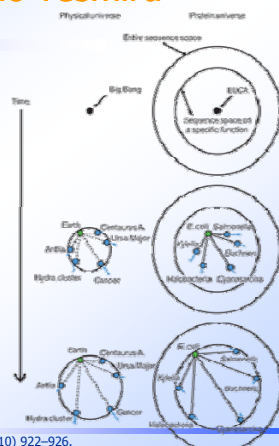


I. K. Jordan et al., Nature 433 (2005) 633–638.

Expanse proteinového vesmíru

Míří do nekonečna?

- Existují jistá omezení mutací daná funkcí proteinů – jsou ale globální?
- Pradávné sekvence proteinů od sebe neustále divergují**
- Za $3,5 \times 10^9$ let nebylo dosaženo divergenčního limitu proteinů!

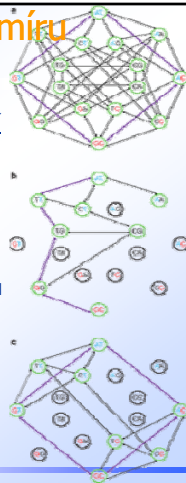


I. S. Povolotskaya & F. A. Kondrashov, Nature 465 (2010) 922–926.

Expanse proteinového vesmíru

Míří do nekonečna?

- Nízká rychlost divergence je dána řidkostí funkčních proteinových sekvencí a nerovnoměrností zdatností hyperplochy
 - Sekvenční prostor dvou nukleotidů zahrnuje nejkratší mutační kroky (šipky) s vysokou a nízkou zdatností od AT ke GC
- ~98 % míst neumožňuje libovolnou AA substituci**
- Umožní ale evoluci pokud se uskuteční kompenzační záměny!**
- LUCA obsahovala mnohem více proteinů než je zřejmé z běžné analýzy homologních proteinů



I. S. Povolotskaya & F. A. Kondrashov, Nature 465 (2010) 922–926.

DNA jak ji neznáme

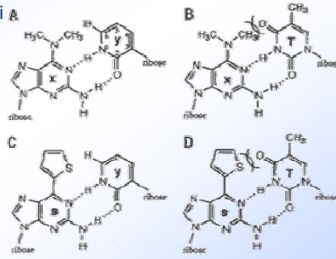
Modifikace genetického kódu a aminokyselin

■ Expandovaný genetický kód

- tRNA kódující jistou sekvenci A je **přirazena nová aminokyselina**
- Inkorporují se modifikace pro biotechnologie v bakteriích i eukaryotech (např. o-methyl-Tyr, p-benzoyl-Phe, p-iodo-Tyr)

■ Modifikovaný genetický kód

- Ke kódu jsou **přirazeny nové vzájemně komplementární báze**
- Počet písmen se tak rozšíří a dále je možno pokračovat via expandovaný genetický kód

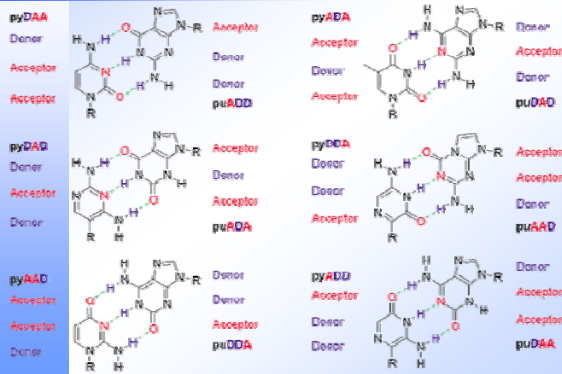


Nepřirozené párování x-y a x-s, a v důsledku sterického bránění nerozpoznávána spojení x-T a s-T.

■ I. Hirao et al. Nature Biotech. 20 (2002) 177–182. J. W. Chin et al. Science 301 (2003) 964–967.

DNA jak ji neznáme

Modifikace genetického kódu a aminokyselin

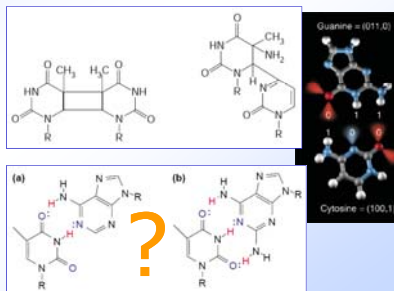
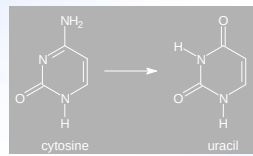


■ S. A. Benner et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 8 (2004) 672–689.

DNA jak ji známe

Jsou báze zvoleny optimálně?

- Na základě teorie informace (donor = 1, akceptor = 0, purin = 0, pyrimidin = 1) lze ukázat, že volba **A–T a G–C je optimální s ohledem na informační šum**
- Náhrada U za T je v DNA nezbytná**
 - C přechází v U deaminací, tato změna je nerozlišitelná
 - Tedy RNA musela předcházet DNA

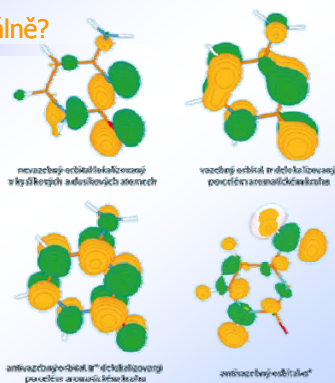


■ D. Bradley, Science 297 (2002) 1789–1791.

DNA jak ji známe

Jsou báze zvoleny optimálně?

- V excitovaném stavu mohou proběhnout **fotchemické reakce poškozující DNA**
- Báze se **musí během pikosekund navrátit do základních stavů**
- Báze DNA to opravdu dělají...
- Adenin (6-aminopurin) za 10^{-12} s vs. 2-aminopurin za 10^{-8} s



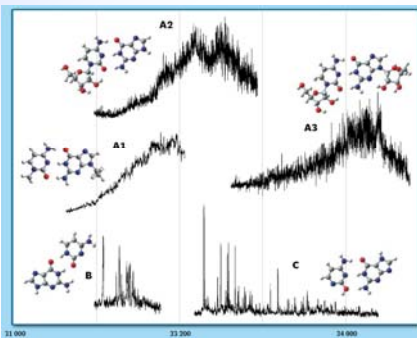
3. Vlastnosti molekulárně-efektivně odstraňují z DNA škodlivé a nebezpečné oxidativní produkty, které vznikají v důsledku působení UV záření a dalších faktorů.

■ A. Abo-Ruiz et al., PNAS 102 (2005) 20–23. D. Nachtigallová a P. Hobza. Vesmír 86 (2007) 502–505.

DNA jak ji známe

Je párování zvoleno optimálně?

- Počítáno 27 uspořádání G–C párů
- **Watson-Crickovské párování** – široké pásy, krátká doba života excit. stavu (10 až 100× kratší než...)
- **Non Watson-Crickovské párování** – čárové spektrum, dlouhé doby života excitovaného stavu
- Další pojistka proti poškození UV-zářením...

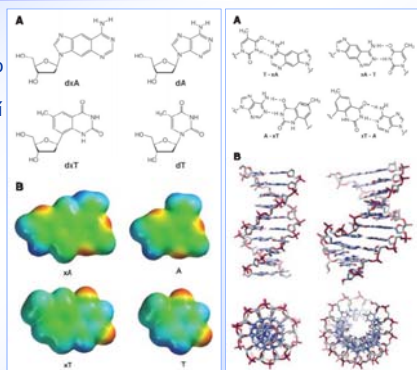


■ A. Abo-Ruiz et al., PNAS 102 (2005) 20–23. D. Nachtigallová a P. Hobza. Vesmír 86 (2007) 502–505.

DNA jak ji neznáme

Expandovaná DNA

- Modifikované báze vznikají přidáním jednoho aromatického kruhu navíc
- **Báze si zachovávají své vlastnosti**
- Expandovaná DNA je **mnohem stabilnější** než DNA „klasická“
- Hybrid i čistá forma **expandované DNA je plně funkční**
- **Neexistuje žádné známé omezení na užití expandované DNA**



■ H. Liu et al. Science 302 (2003) 868–871.

DNA jak ji neznáme

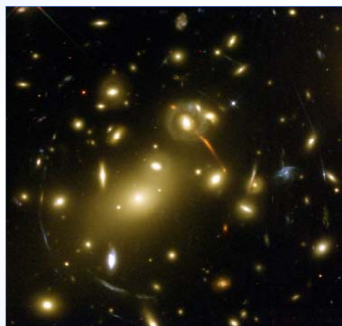
Jak skladovat DNA?



Život jak ho neznáme

Je život opravdu tak jednoduchý fenomén?

- „Průměrný protein“ má 200 aminokyselin
- Počet všech kombinací aminokyselin je 20^{200} , tj. zhruba 10^{260}
- Vesmír má 10^{80} částic
- Rychlá chemická reakce trvá 1 femtosekundu (10^{-15} s)
- Počet všech myslitelných párových srážek od velkého třesku je $10^{80} \times 10^{80} \times 10^{33} = 10^{193}$
- Vesmír by potřeboval 10^{67} životů aby stvořil všechny kombinace tohoto proteinu
- **Vesmír se neopakuje – je nergodický...**



Doporučená literatura

- D. Deamer, J. W. Szostak (eds.): **The origins of life**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2010. {Nejlepší současný soubor vědeckých prací na téma vzniku života}
- M. Gargaud, B. Barbier, H. Martin, J. Reisse (eds.): **Lectures in astrobiology** (Vol 1: From prebiotic chemistry to the origin of life on Earth). Springer, Berlin – Heidelberg 2002. {Učebnice astrobiologie vyžadující hlubší znalosti}
- J. I. Lunine: **Astrobiology** (A multidisciplinary approach). Pearson Education & Addison Wesley, New York 2005. {První a skutečně základní učebnice astrobiologie}
- J. W. Schopf (ed.): **Life's origin (The beginnings of biological evolution)**. University of California Press, Berkeley – Los Angeles – London 2002. {Skvělá kniha shrnující veškeré poznatky z prebiotické evoluce}
- G. Zubay: **Origins of life on earth and in the cosmos**. Wm. C. Brown Publishers, Boston, 1996. {Velmi hezká učebnice o vzniku života}
